



## РЕСТРИКЦІЙНИЙ АНАЛІЗ

Рестрикційний аналіз – встановлення місць розщеплення ДНК рестрикційними ендонуклеазами. Рестрикційний аналіз широко використовується у молекулярно-біологічних дослідженнях та прикладних роботах і є одним з найважливіших інструментів дослідження нуклеїнових кислот. Як правило, продукти розщеплення ДНК рестриктазами аналізуються за допомогою гель-електрофорезу в агарозному чи акриламідному гелі. За результатами рестрикційного аналізу будується рестрикційна карта – схема молекули ДНК, на якій вказано сайти розрізання її різними рестрикційними ендонуклеазами.

*Мета роботи:* за результатами рестрикційного аналізу побудувати рестрикційну карту лінійного фрагмента ДНК.

Лінійний фрагмент ДНК довжиною 1500 пар нуклеотидів ампліфікували, після чого одну частину обробили рестриктазою I, другу – рестриктазою II, третю – обома рестриктазами разом. Продукти розщеплення розділили гель-електрофорезом у агарозному гелі (див. рис.1).	Рестриктаза I	Рестриктаза II	Рестриктази I+II
	700	550	450
	600	500	400
		450	300
			200
			150

Рис.1. Результати розділення рестрикційних фрагментів

*Хід роботи:*

Уважно розгляньте результати розділення рестрикційних фрагментів, наведені на рис.1. Цифрами вказано довжину відповідного фрагмента у парах нуклеотидів (п.н.).

- Користуючись прикладом, наведеним у бланку для відповіді, побудуйте рестрикційну карту даного фрагмента ДНК.
- Дайте відповідь на запитання.
  - Скільки рестрикційних фрагментів утвориться при розщепленні лінійної молекули ДНК, на якій міститься 4 сайти рестрикції?
  - Скільки рестрикційних фрагментів утвориться при розщепленні кільцевої молекули ДНК, на якій міститься 4 сайти рестрикції?

БАЖАЄМО УСПІХУ!



## РЕСТРИКЦІЙНИЙ АНАЛІЗ

Рестрикційний аналіз – встановлення місць розщеплення ДНК рестрикційними ендонуклеазами. Рестрикційний аналіз широко використовується у молекулярно-біологічних дослідженнях та прикладних роботах і є одним з найважливіших інструментів дослідження нуклеїнових кислот. Як правило, продукти розщеплення ДНК рестриктазами аналізуються за допомогою гель-електрофорезу в агарозному чи акриламідному гелі. За результатами рестрикційного аналізу будується рестрикційна карта – схема молекули ДНК, на якій вказано сайти розрізання її різними рестрикційними ендонуклеазами.

*Мета роботи:* за результатами рестрикційного аналізу побудувати рестрикційну карту лінійного фрагмента ДНК.

Лінійний фрагмент ДНК довжиною 1500 пар нуклеотидів ампліфікували, після чого одну частину обробили рестриктазою I, другу – рестриктазою II, третю – обома рестриктазами разом. Продукти розщеплення розділили гель-електрофорезом у агарозному гелі (див. рис.1).	Рестриктаза I	Рестриктаза II	Рестриктази I+II
	700	550	450
	600	500	400
		450	300
			200
			150

Рис.1. Результати розділення рестрикційних фрагментів

*Хід роботи:*

Уважно розгляньте результати розділення рестрикційних фрагментів, наведені на рис.1. Цифрами вказано довжину відповідного фрагмента у парах нуклеотидів (п.н.).

- Користуючись прикладом, наведеним у бланку для відповіді, побудуйте рестрикційну карту даного фрагмента ДНК.
- Дайте відповідь на запитання.
  - Скільки рестрикційних фрагментів утвориться при розщепленні лінійної молекули ДНК, на якій міститься 4 сайти для даної рестриктази?
  - Скільки рестрикційних фрагментів утвориться при розщепленні кільцевої молекули ДНК, на якій міститься 4 сайти для даної рестриктази?

БАЖАЄМО УСПІХУ!



**ТОНКОШАРОВА ХРОМАТОГРАФІЯ**

Тонкошарова хроматографія — метод розділення і аналізу сумішей речовин, що базується на їхньому різному поглинанні тонким шаром сорбенту (*нерухомою фазою*) при рухові по ньому розчинника (*рухомої фази*).

**Мета роботи:** проаналізувати результат розділення ліпідів методом тонкошарової хроматографії.

**Хід роботи:**

На **рисунку 1** зображений результат розділення ліпідів, зібраних з поверхні шкіри здорової людини та деяких приматів, методом тонкошарової хроматографії на силікагелі. Для ідентифікації окремих фракцій використовується фактор утримання  $R_f$  (див. **таблицю 1**), який розраховується як відношення відстані, пройденої фракцією, до загальної відстані, пройденою системою розчинників ( $R_f = a/b$ ). На **рисунку 2** позначено ці відстані літерами **a** і **b** відповідно.

**Таблиця 1**  
Значення фактору утримання для різних ліпідних фракцій

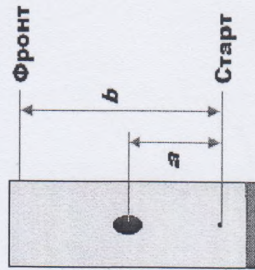
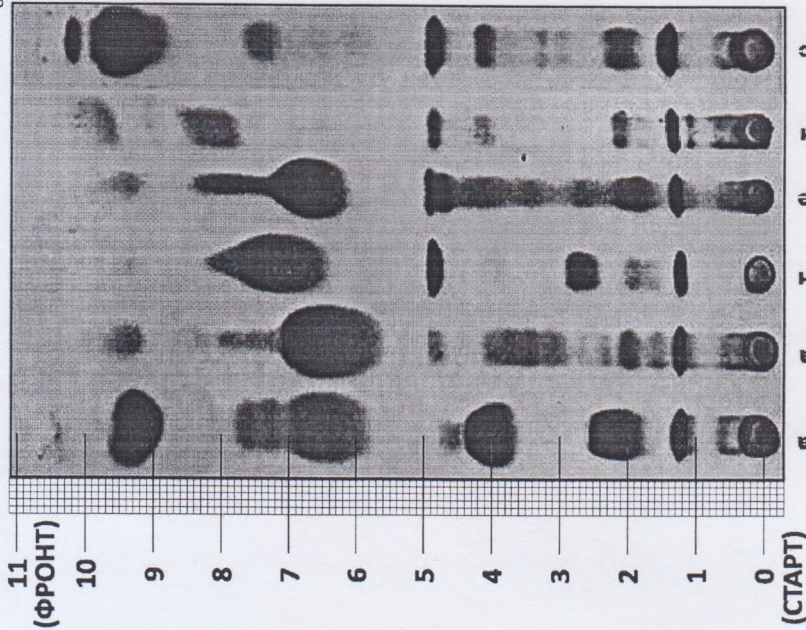
Фракція ліпідів	$R_f$
Фосфоліпіди	Старт
Моноацилгліцероли	0,05
Диацилгліцероли	0,11
Триацилгліцероли	0,36
Вільні жирні кислоти	0,21
Воски	0,59
Естери холестеролу	0,68
Продукти окиснення ліпідів	0,44
Сквален	0,85
Вільний холестерол	0,25

1. Визначте на хроматограмі усі можливі фракції ліпідів.
2. Установіть правильність тверджень, наведених у **таблиці 1** бланку для відповіді.
3. Резидентна мікрофлора поверхні шкіри має потужну ліполітичну активність, перетворюючи триацилгліцероли на продукти повного і часткового гідролізу. Встановіть за даними хроматограми, нейтральні жири якого організму виявилися найбільше гідролізованими. Результат занотуйте до **таблиці 2** бланку для відповіді.

4. За спекотної погоди (вище +30 °C) вони відіграють роль поверхнево-активних речовин, запобігаючи утворенню крапель поту. За холодної погоди ці ліпіди створюють водовідштовхувальний шар. Оцініть правильність тверджень, наведених у **таблиці 3** бланку для відповіді.
5. У **таблиці 4** бланку для відповіді зазначте про що може свідчити різниця вмісту сквалену у різних зразках, зібраних з поверхні шкіри здорової людини та деяких приматів?
6. Фосфоліпіди — основа всіх мембран клітин. У деяких піддослідних методом хроматографічного розділення виявлено різницю у складі фосфоліпідів. В **таблиці 5** бланку для відповіді зазначте чим це може бути обумовлено.

7. У людини триацилгліцероли утворюються за умов, споживання понад необхідне білків, жирів та вуглеводів. Проаналізувавши фроматограму, у **таблиці 6** бланку для відповіді зазначте хто з піддослідних вживав білки, жири та вуглеводи більше, ніж необхідно.

8. Враховуючи, що примати є нашими еволюційно найближчими родичами, які висновки (з наведених у **таблиці 7** бланку для відповіді) можна зробити на основі аналізу, наведеної хроматограми?



**Рисунок 2.** Параметри, що визначають положення зони фракції

**Фосфоліпіди**

**Рисунок 1** Хроматограма фракцій ліпідів зі шкіри людини й деяких приматів (цифри ліворуч позначають відстань у см, яку пройшли фракції)