

I Разделение и очистка биомолекул

Хроматография

Электрофорез

Ультрацентрифугирование

II Детекция и идентификация биомолекул

Гибридизация нуклеиновых кислот

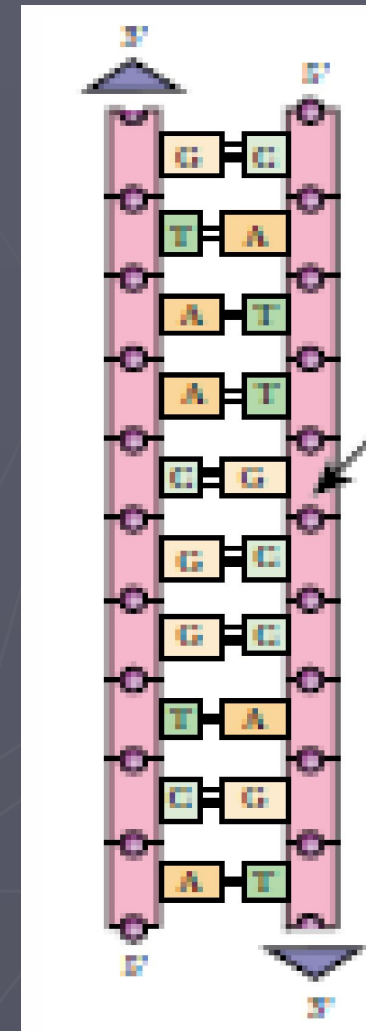
Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Масс-спектрометрия

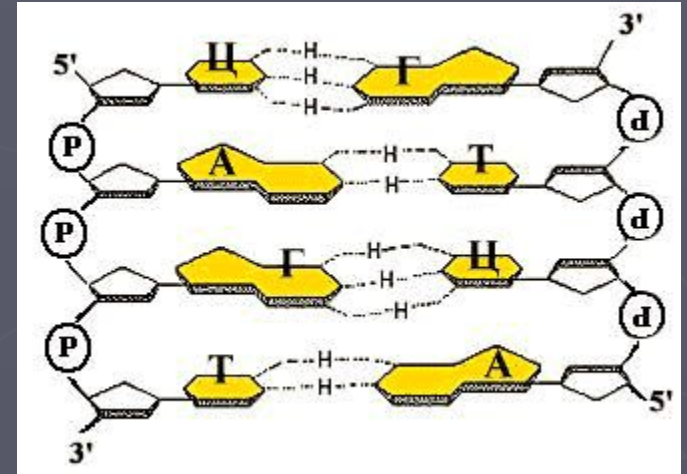
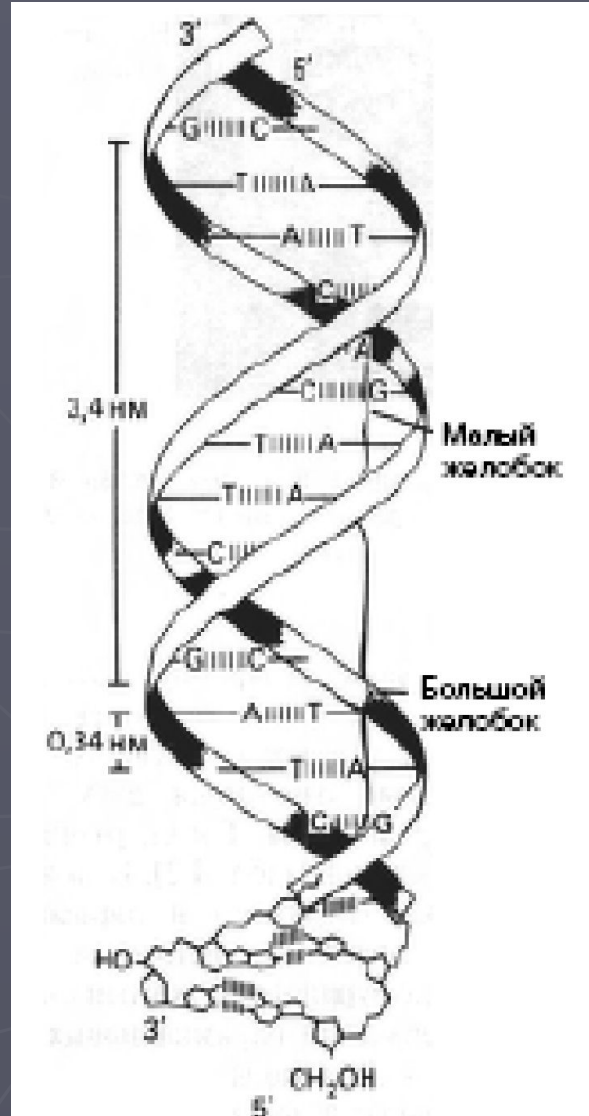
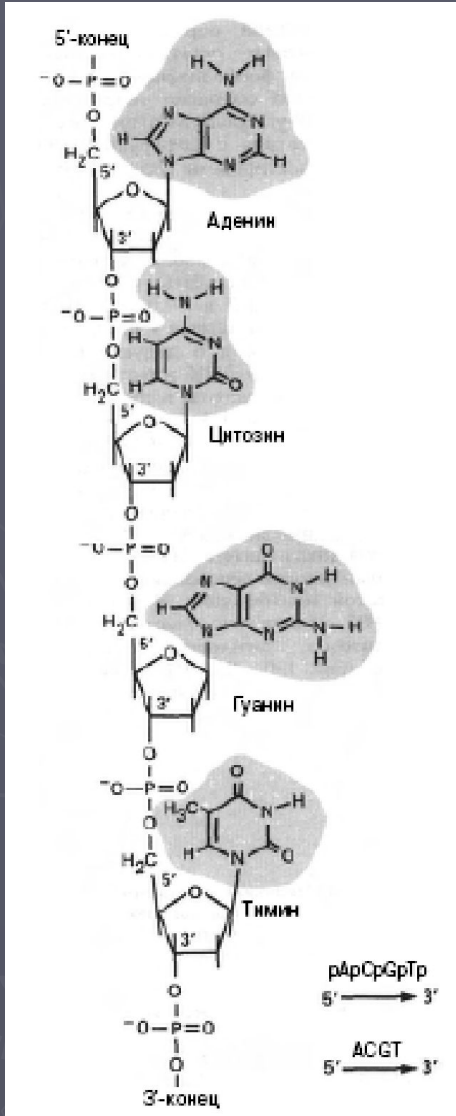
Иммунохимические методы анализа

Гибридизация нуклеиновых кислот

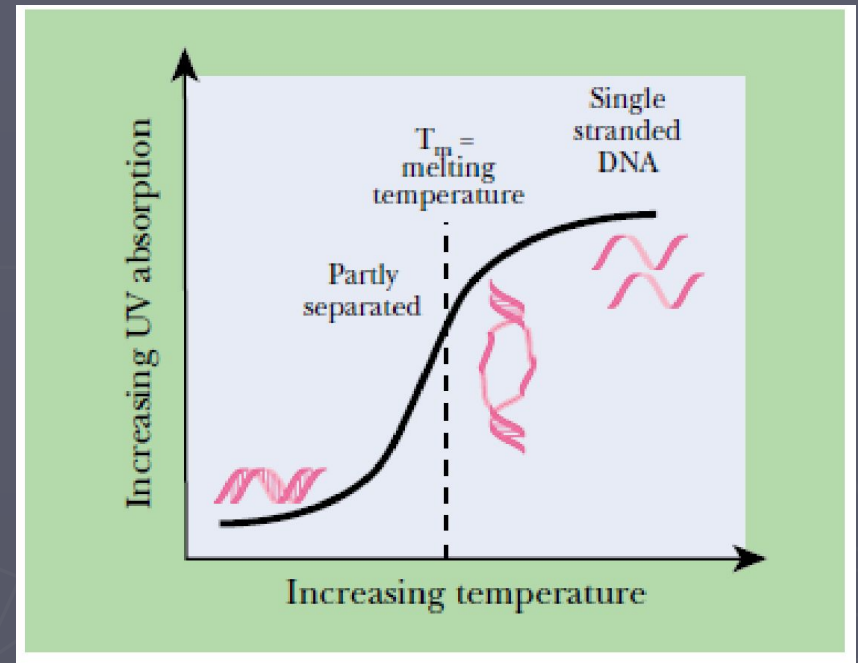
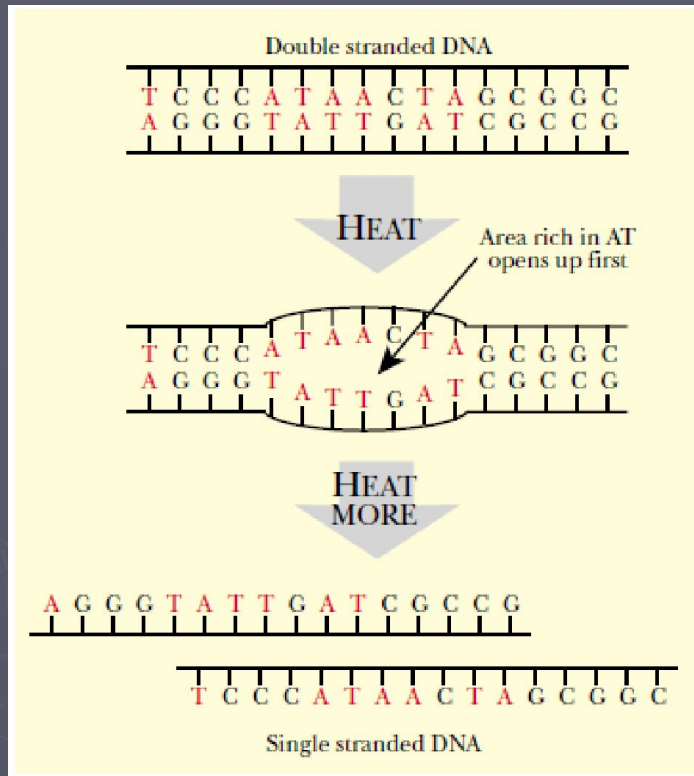
Экспериментальные методы детекции и идентификации нуклеиновых кислот основаны на явлении их гибридизации, которое заключается в способности одноцепочечных молекул нуклеиновых кислот связываться с комплементарными по составу нуклеотидов одноцепочечными молекулами, образуя дуплексы (двухцепочечные молекулы нуклеиновых кислот).



Структура нуклеиновых кислот



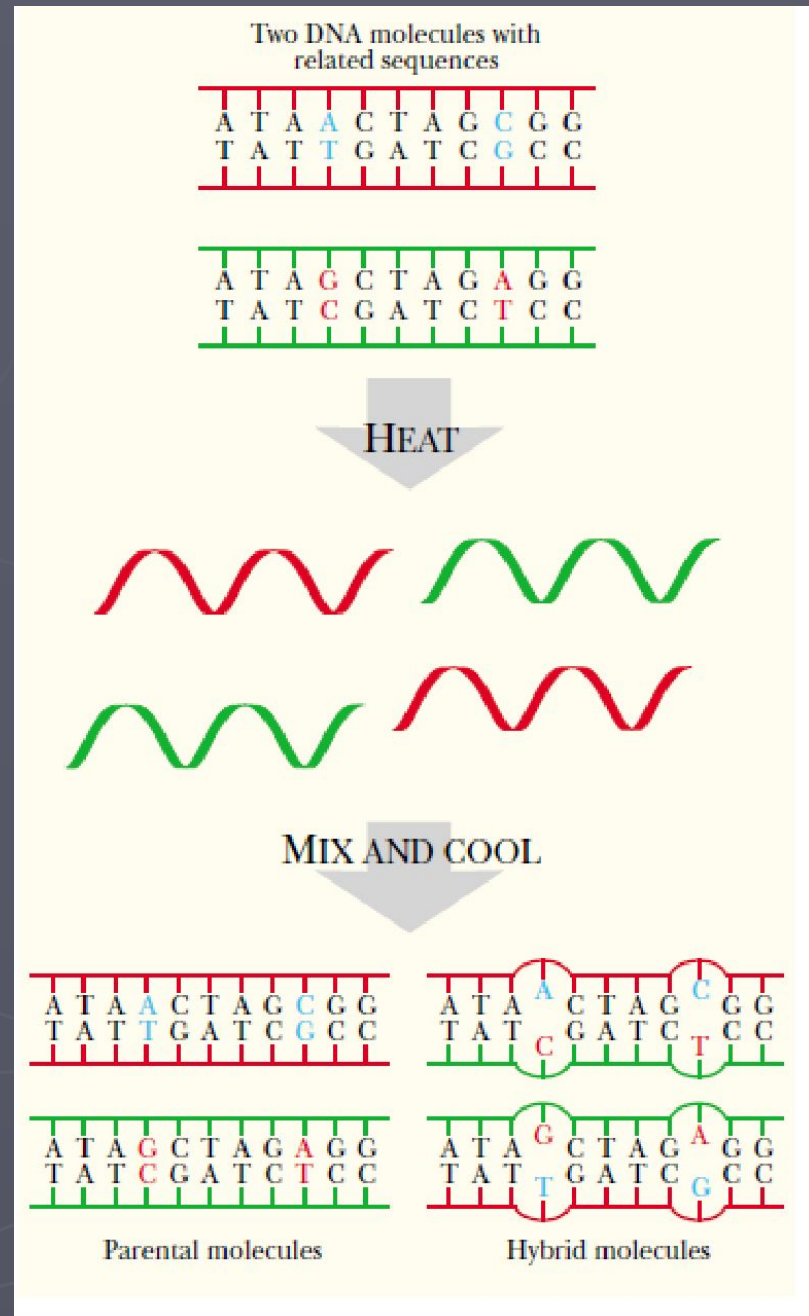
Денатурация (плавление) ДНК



Денатурация ДНК обратима. Процесс восстановления структуры дуплекса ДНК называется ренатурацией или отжигом

Гибридизация НК

Дуплексы могут образовываться между одноцепочечными комплементарными по составу молекулами ДНК, РНК, олигонуклеотидами



Стабильность дуплексов нуклеиновых кислот

Стабильность дуплексов нуклеиновых кислот определяется следующими факторами:

- длина цепей – длинные дуплексы удерживаются большим числом водородных связей и требуют больше энергии для их разрушения;
- состав нуклеотидов – так как GC-пары образуют три водородные связи, а AT-пары – две, чем выше процентное содержание GC-нуклеотидов в составе цепей дуплекса, тем выше температура или pH среды, при которых происходит денатурация дуплекса;
- состав среды – моновалентные катионы (например, ионы Na^+) стабилизируют структуру дуплекса; а вещества, разрушающие водородные связи, такие как мочевины и формамид, облегчают денатурацию

Стабильность дуплексов нуклеиновых кислот

Мерой стабильности дуплекса нуклеиновых кислот является температура плавления (T_m). Это температура, соответствующая средней точке перехода между исходным (двухцепочечным) и денатурированным (одноцепочечным) состоянием молекул нуклеиновых кислот.

Температуру плавления (T_m) дуплексов нуклеиновых кислот, в составе которых две цепи полностью комплементарны друг другу по составу нуклеотидов, можно рассчитать с помощью формул. Наличие некомплементарных оснований в цепях гетеродуплекса снижает его стабильность.

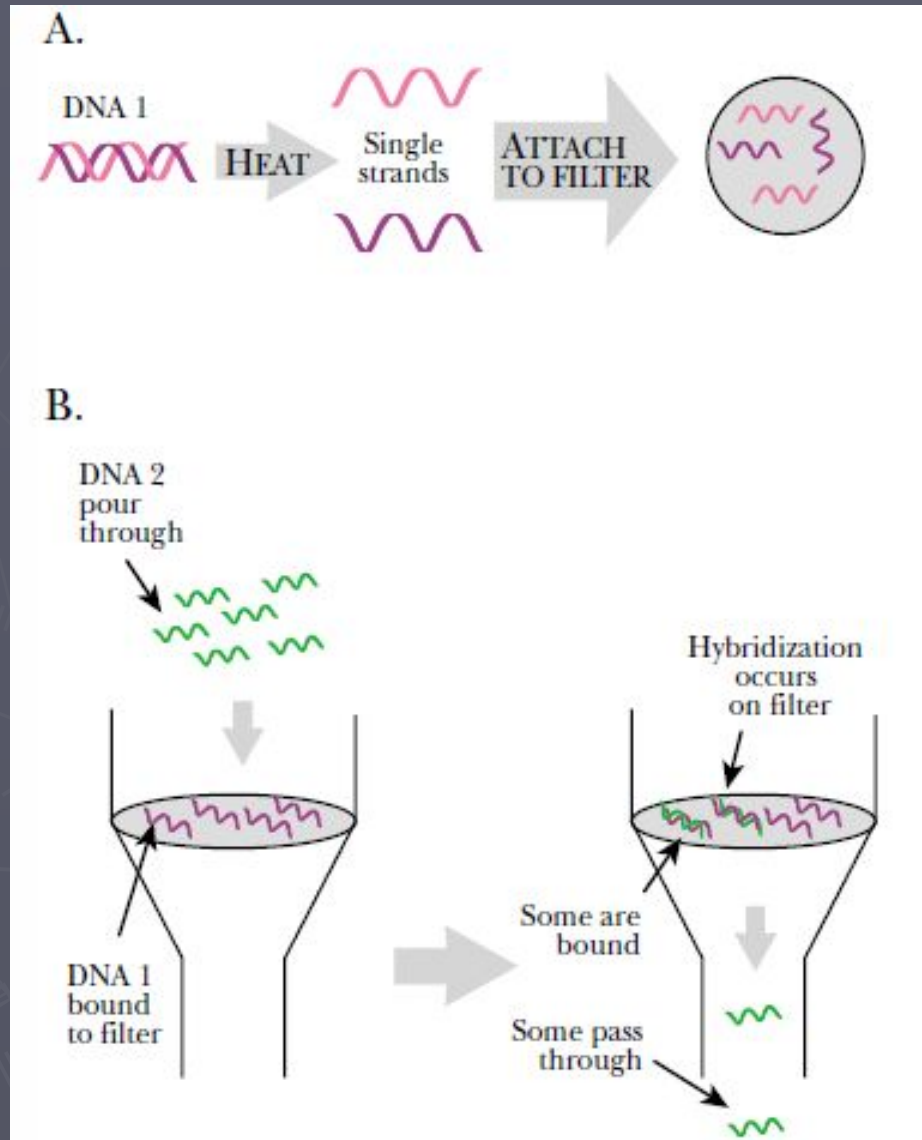
Гетеродуплекс	T_m (°C)
ДНК–ДНК	$81,5+16,6(\lg[\text{Na}^+]^a)+0,41(\%GC^b)-500/N^b$
ДНК–РНК или РНК–РНК	$79,8+18,5(\lg[\text{Na}^+]^a)+0,58(\%GC^b)+11,8(\%GC^b)^2-820/N^b$
олиго-ДНК или олиго-РНК	менее 20 нуклеотидов: $4(G + C) + 2(A + T)$ 20-35 нуклеотидов: $22 + 2,92(G + C) + 1,46(A + T)$

Примечания: ^a или для других моновалентных катионов, выполняется в диапазоне концентраций ионов 0,01- 0,4 М;

^b справедливо при содержании GC пар от 30% до 70%;

^b N – длина гетеродуплекса в п.н.

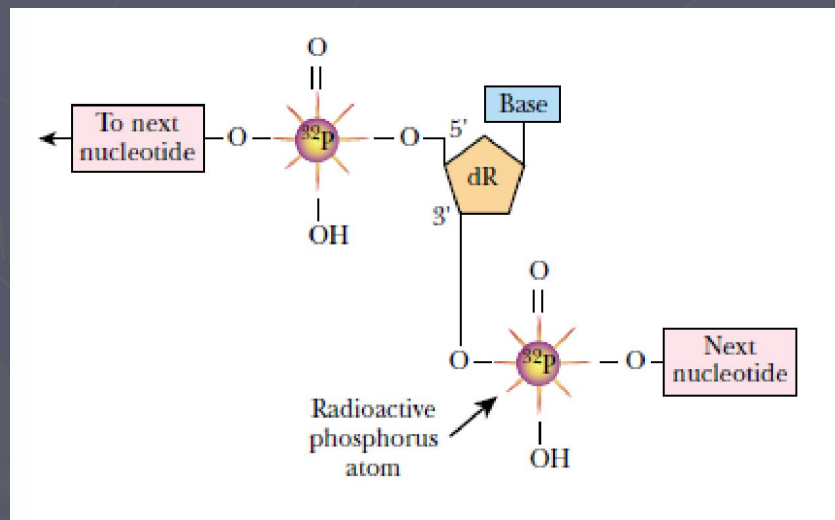
Метод гибридизации нуклеиновых кислот



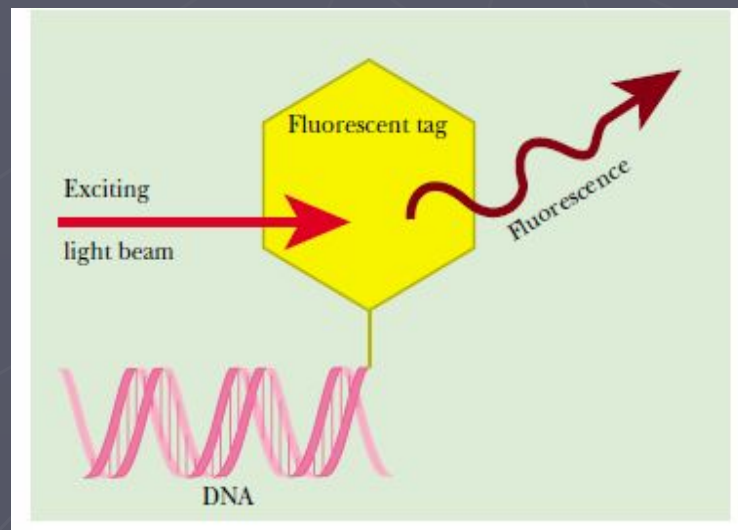
Детекция формирования гибридных дуплексов НК

Прямые методы детекции

Радиоактивные метки



Флуоресцентные метки



Флуорофоры, используемые для мечения нуклеиновых кислот

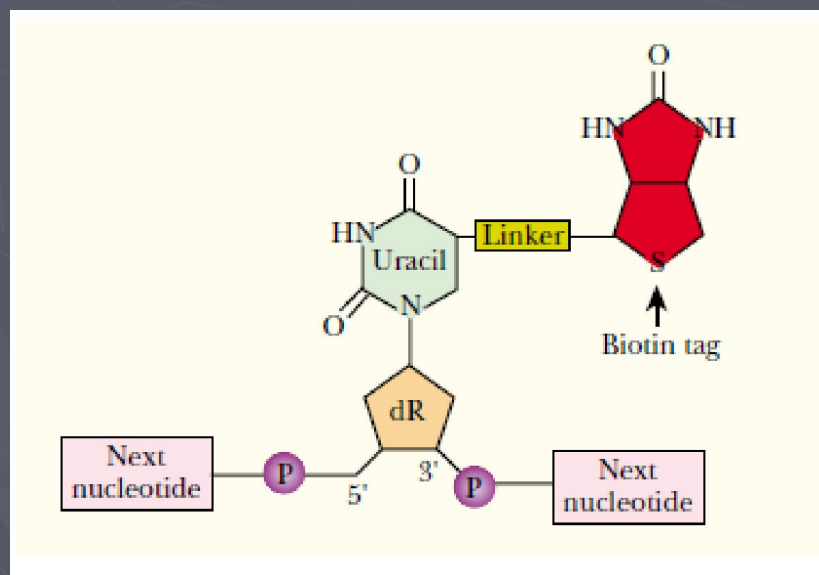
Флуорофор	Поглощение (нм)	Излучение (нм)
AMCA	350	450
FITC	494	518
Fluor X	494	520
AlexaFluor 488	495	519
Oregon Green 486	496	524
6-JOE UV	520	548
AlexaFluor 532	531	554
Cy3	550	570
AlexaFluor 546	556	573
TMR	555	580
AlexaFluor 568	578	603
X-rhodamine	580	605
AlexaFluor 594	590	617
Texas Red	595	615
Bodipy 630/650	625	640
Cy5	649	670

Детекция формирования гибридных дуплексов НК

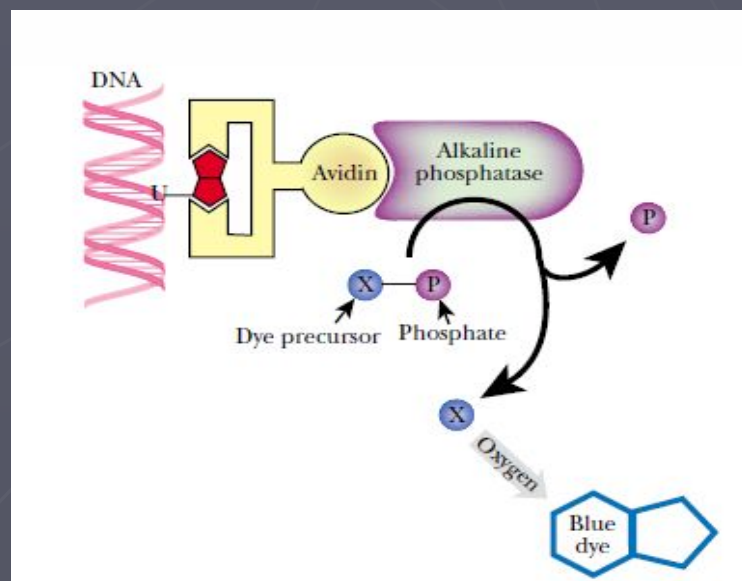
Непрямые методы детекции

Репортерные молекулы

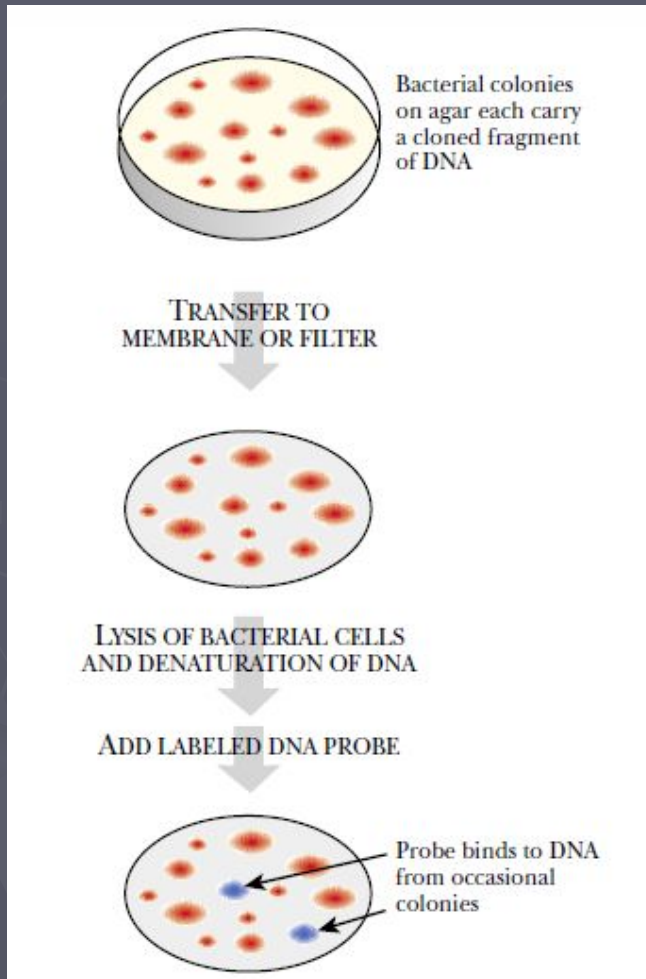
биотин



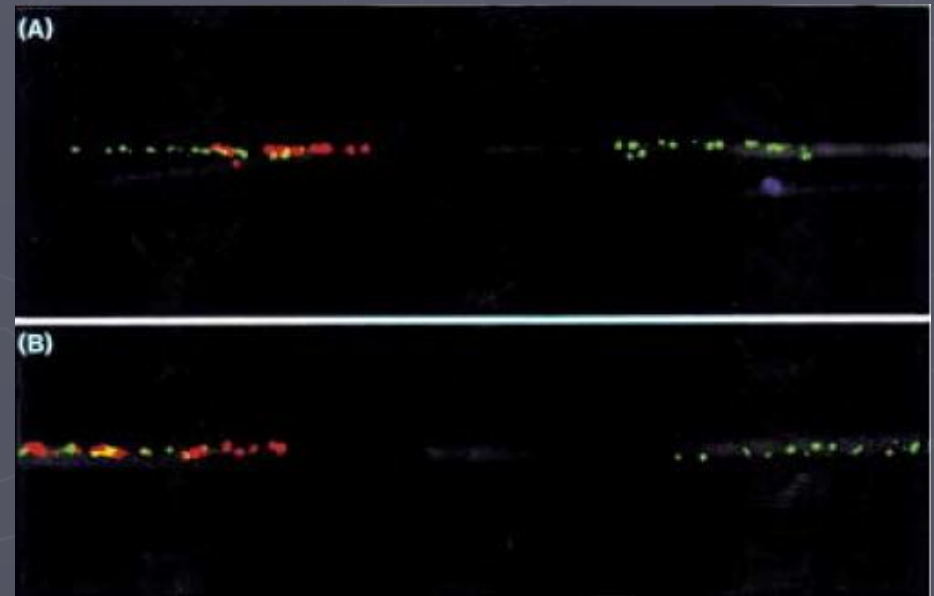
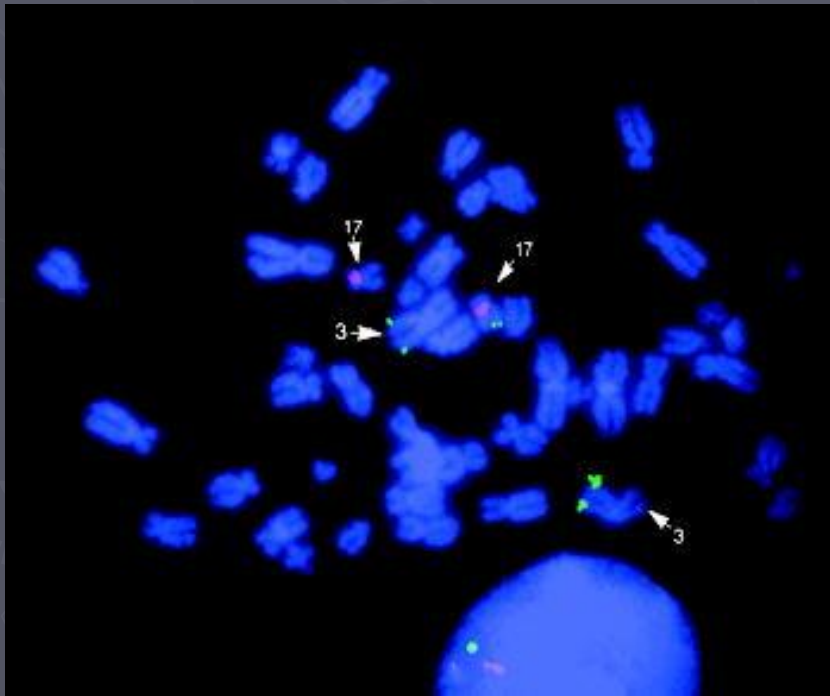
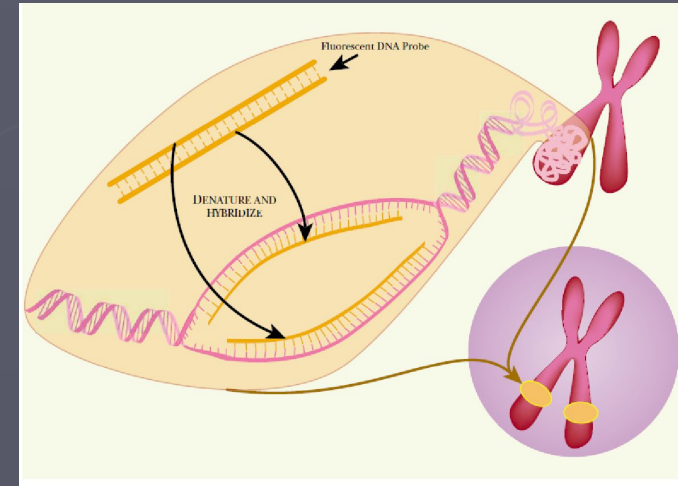
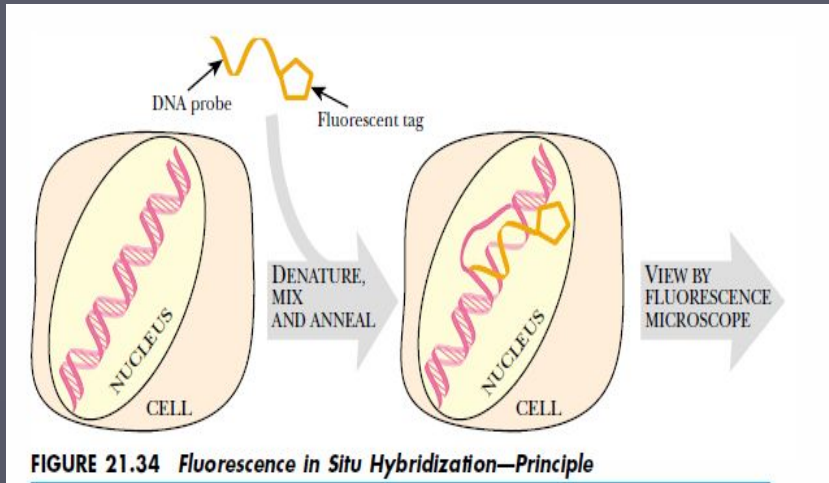
биотин – авидин - фермент



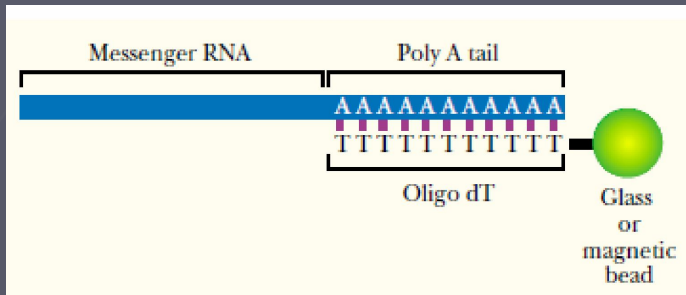
Метод гибридизации нуклеиновых кислот



Метод гибридизации *in situ* с применением флуоресцентных ДНК-зондов (fluorescence *in situ* hybridization, FISH)



Исследование активности генов

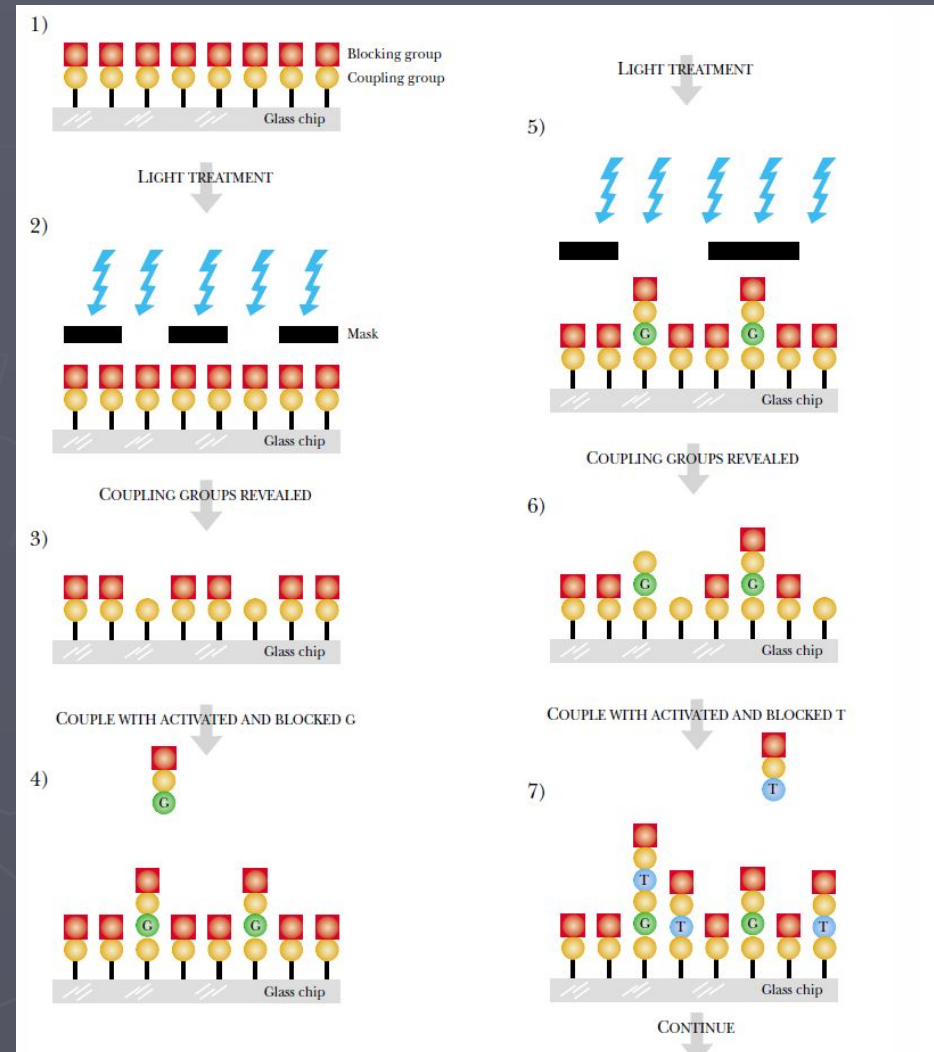
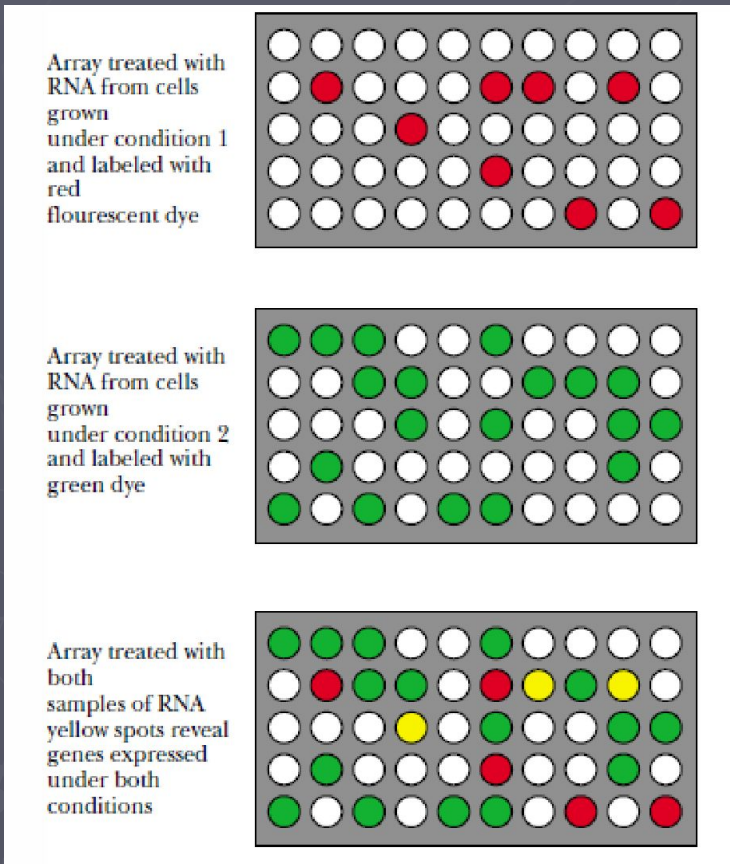


мРНК эукариот содержит на 3'-конце поли-А хвост.

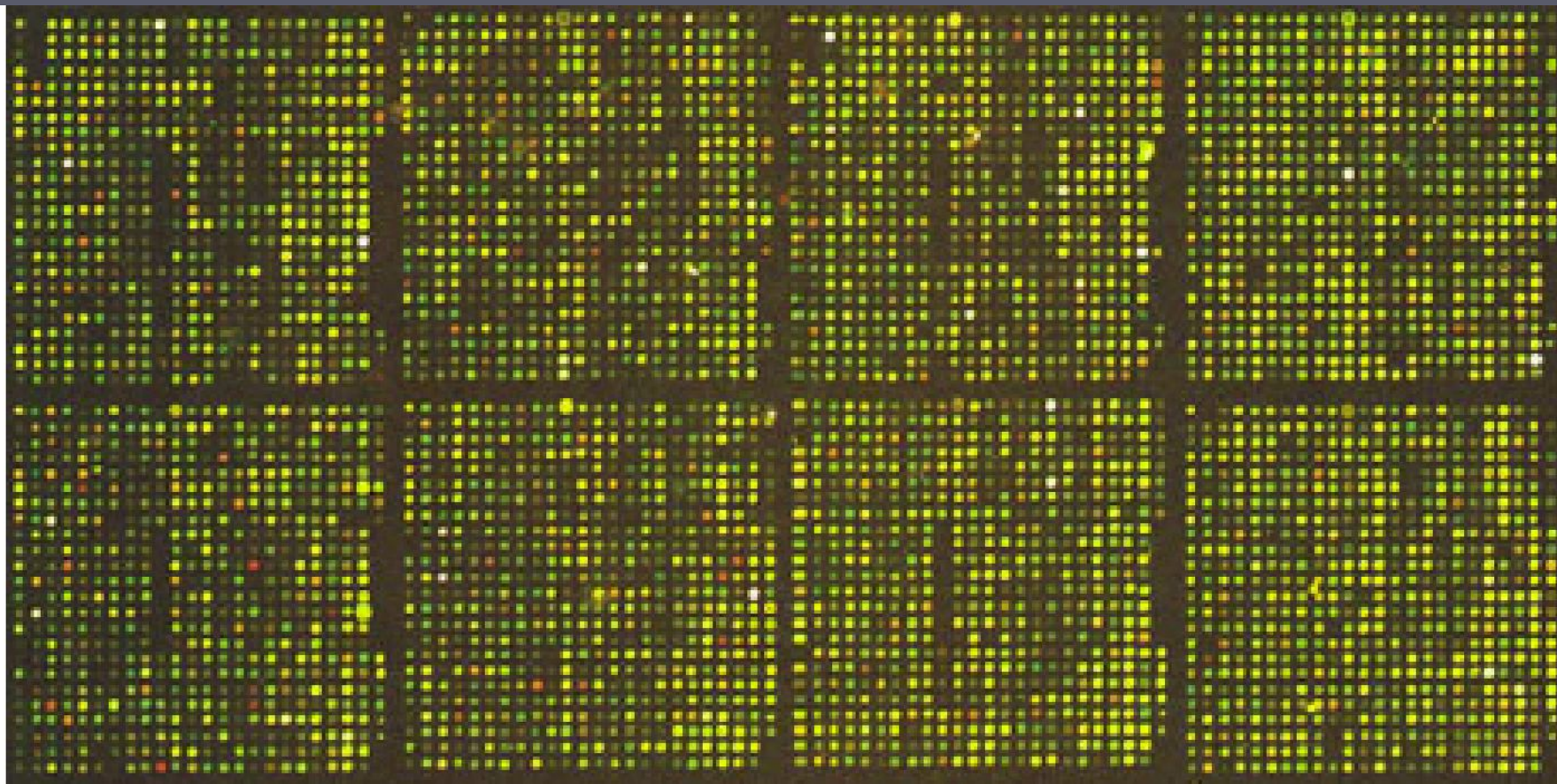
Суммарную мРНК клетки можно выделить методом аффинной хроматографии, используя носитель с последовательностью поли-Т

Исследование активности генов

ДНК-микроматрицы и ДНК-биочипы



Исследование активности генов

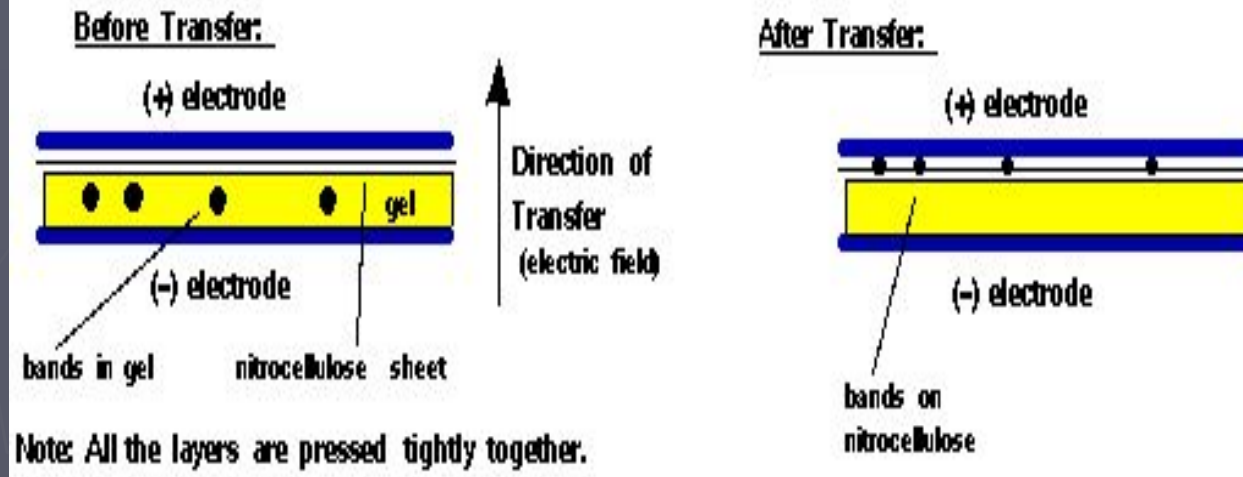


Саузерн-блоттинг

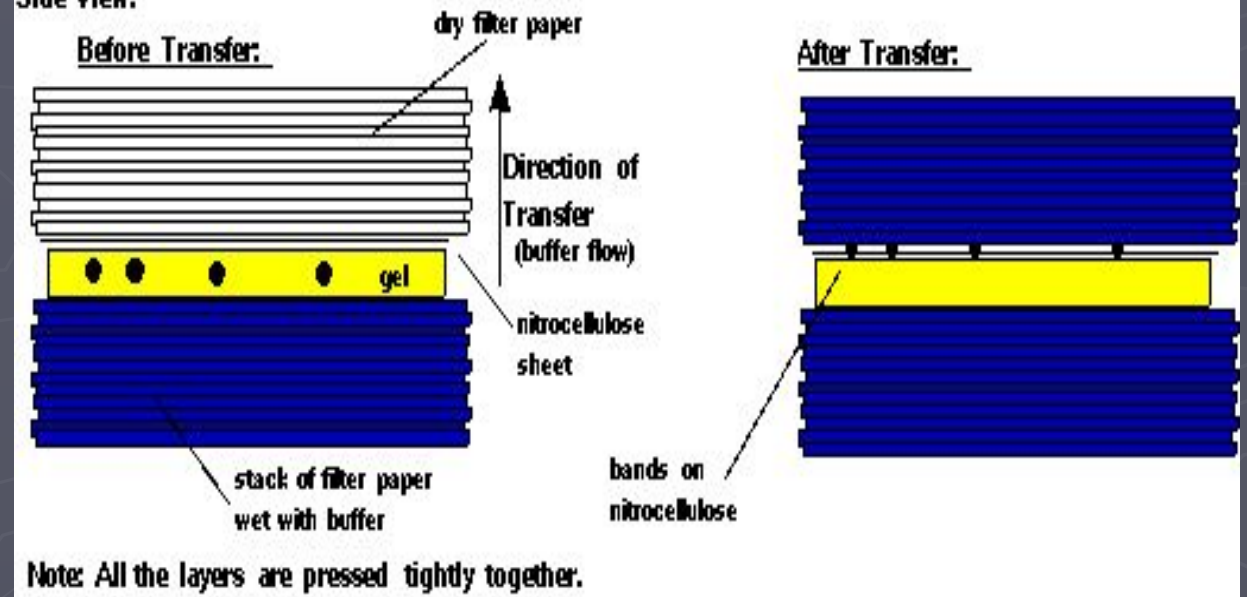


Саузерн-блотТИНГ

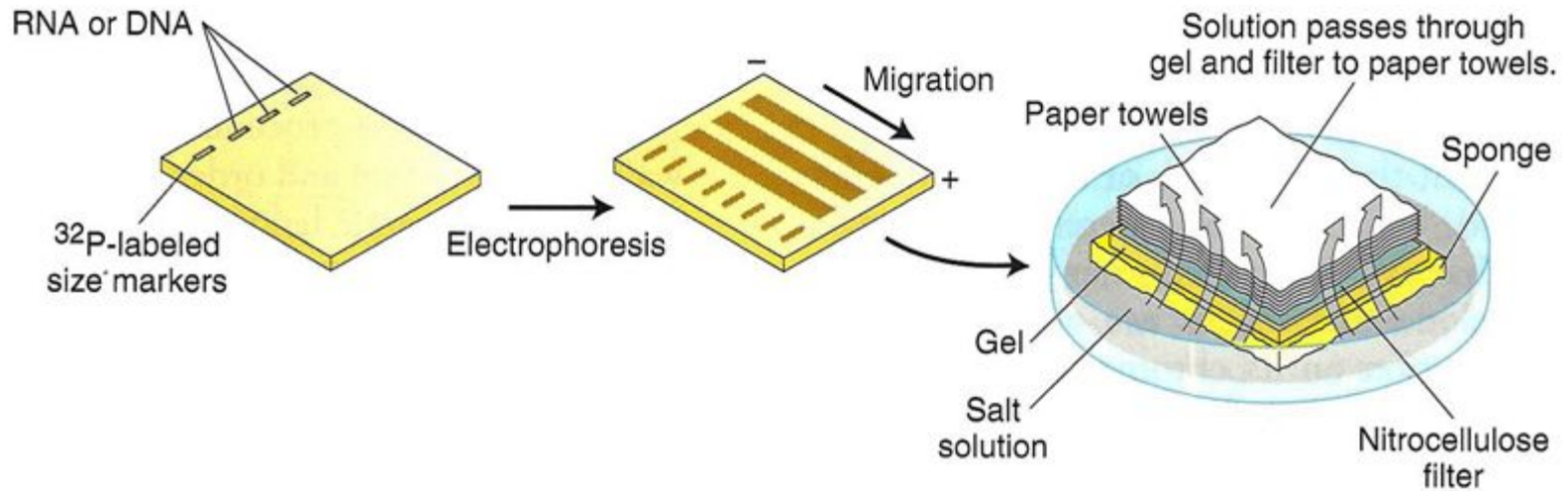
Side View:



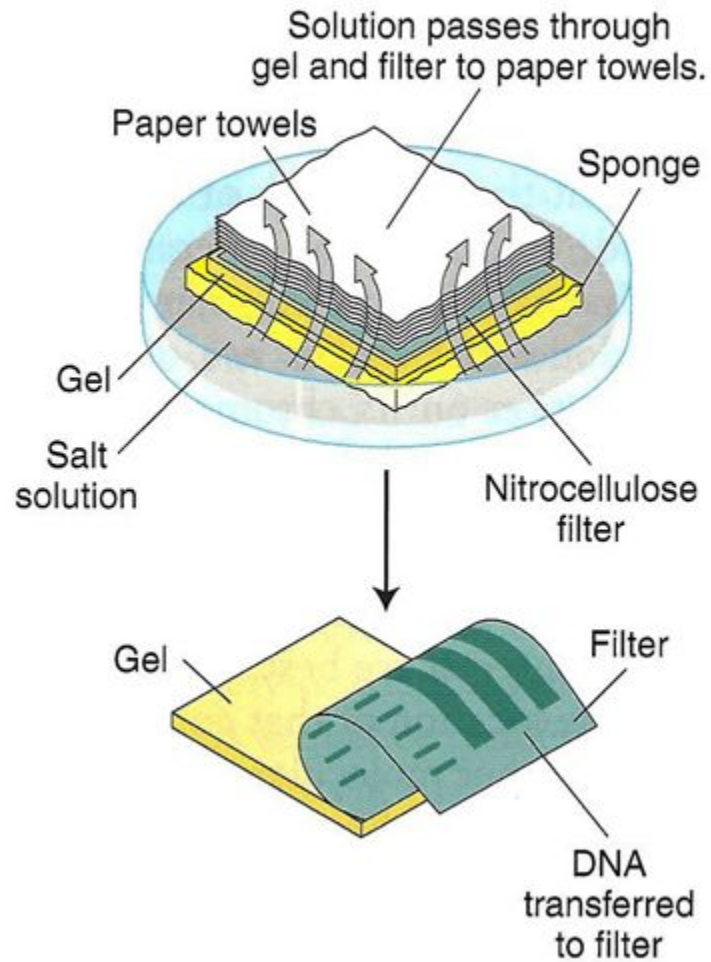
Side View:



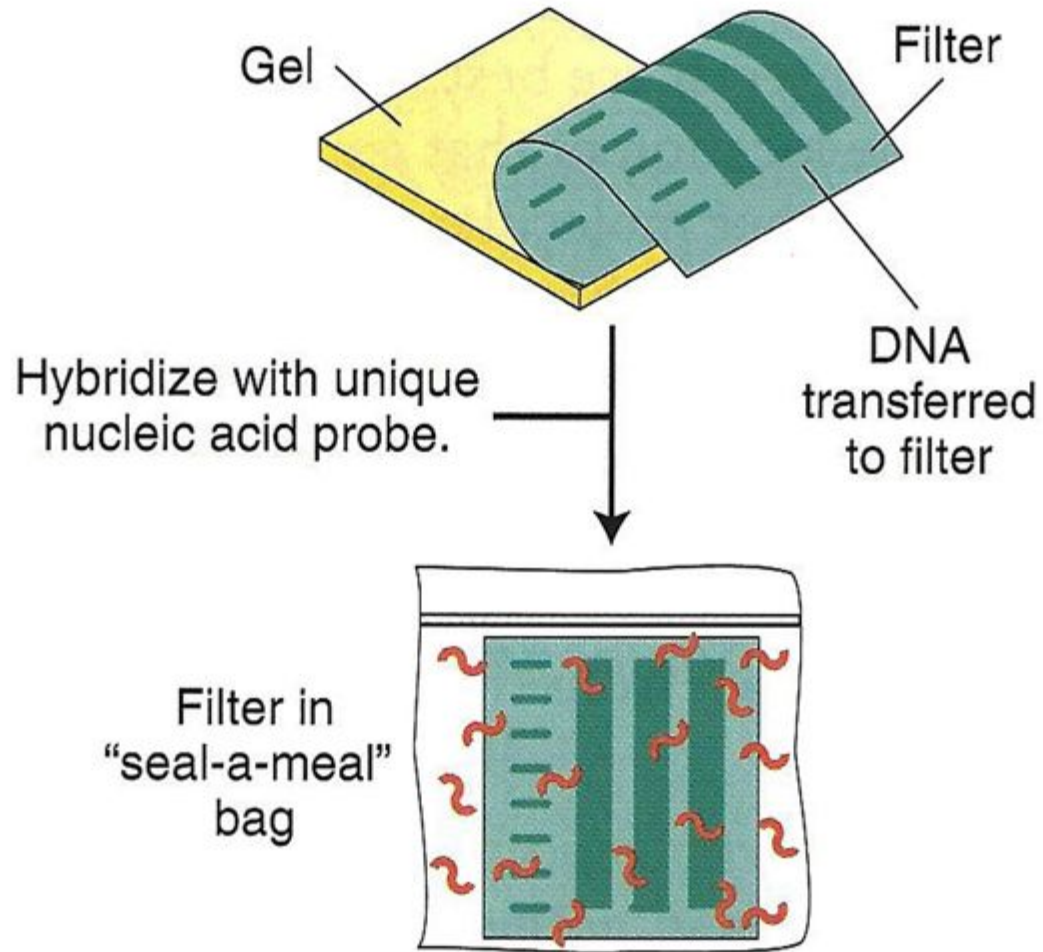
Southern blot



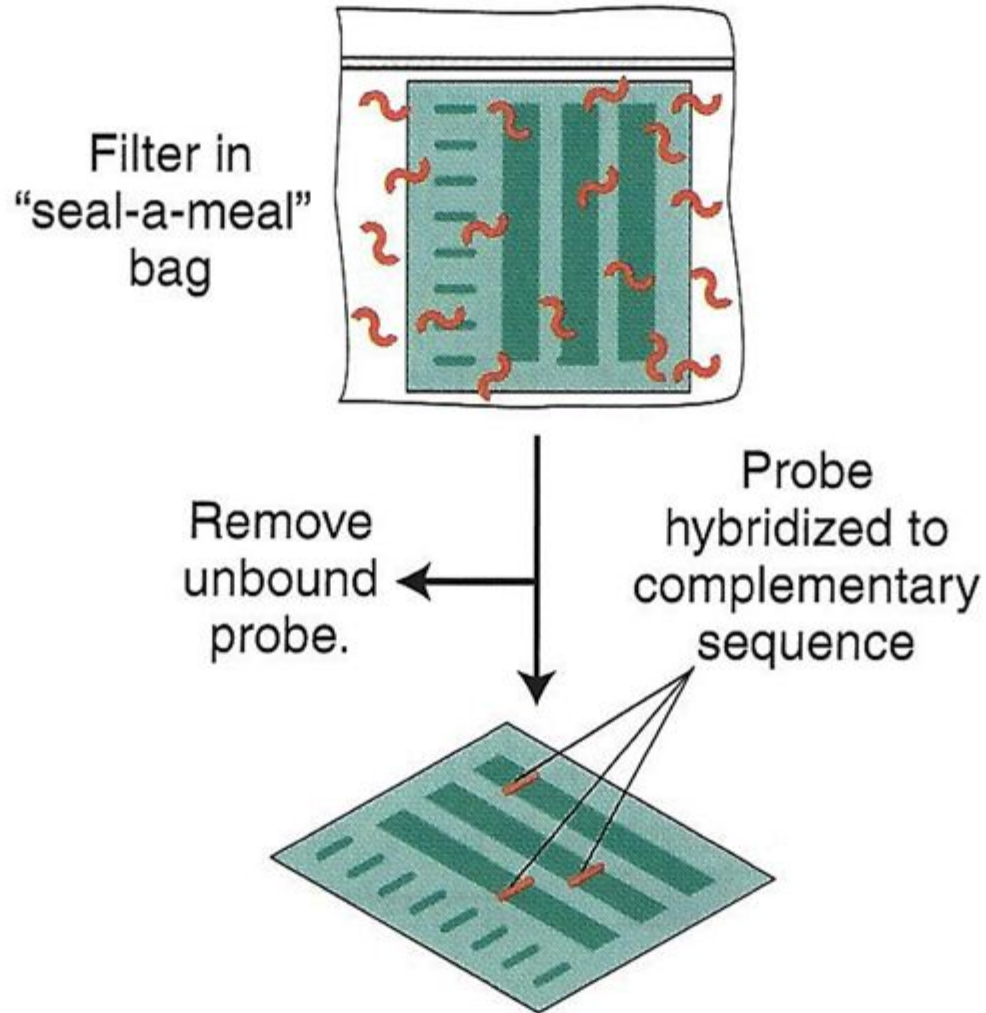
Southern blot



Southern blot

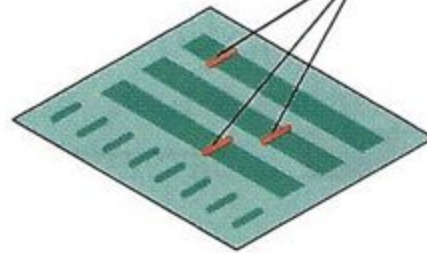


Southern blot



Southern blot

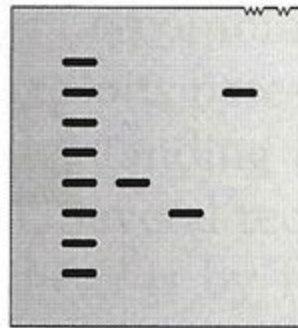
Probe
hybridized to
complementary
sequence



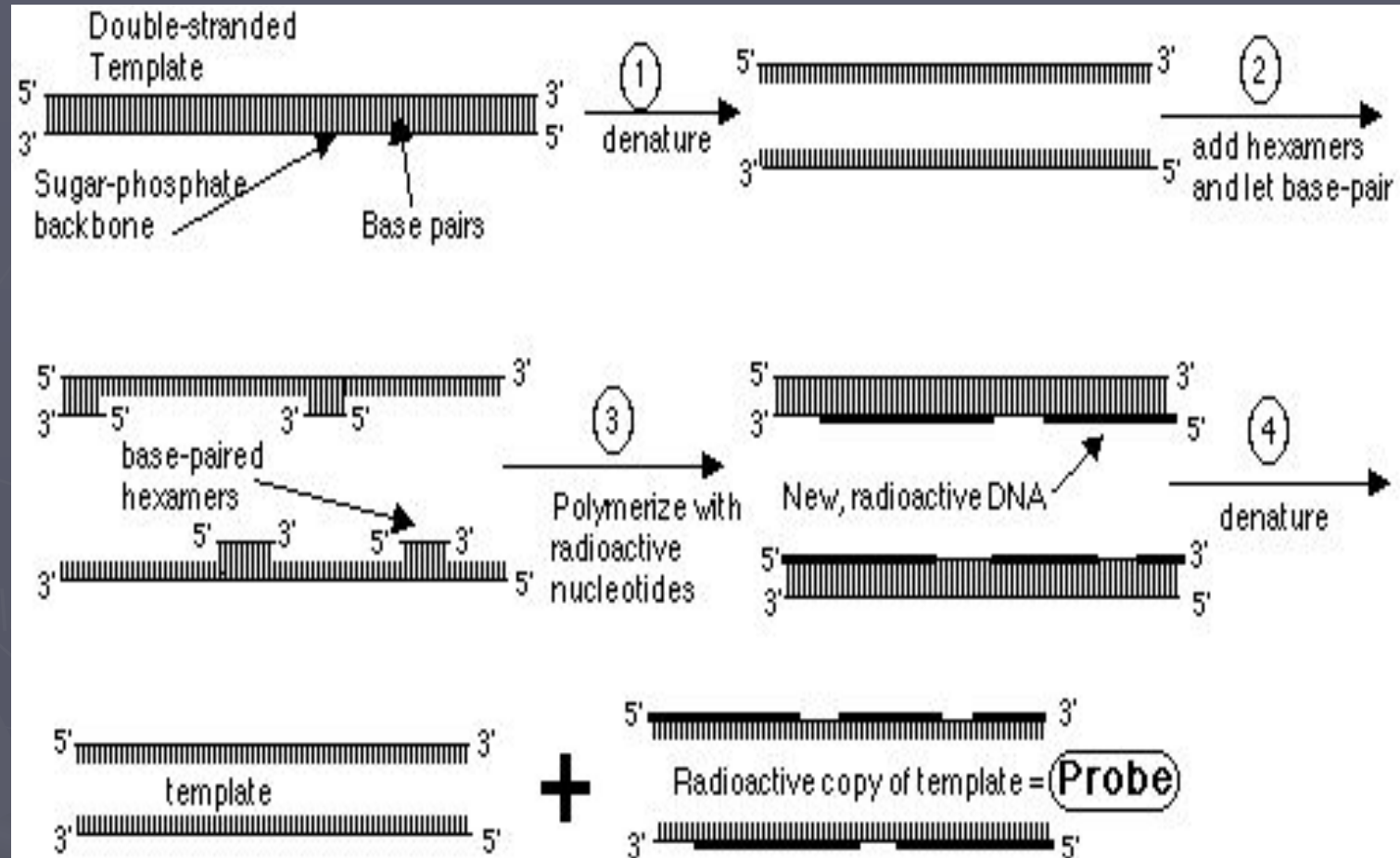
Expose
X-ray film
to filter.

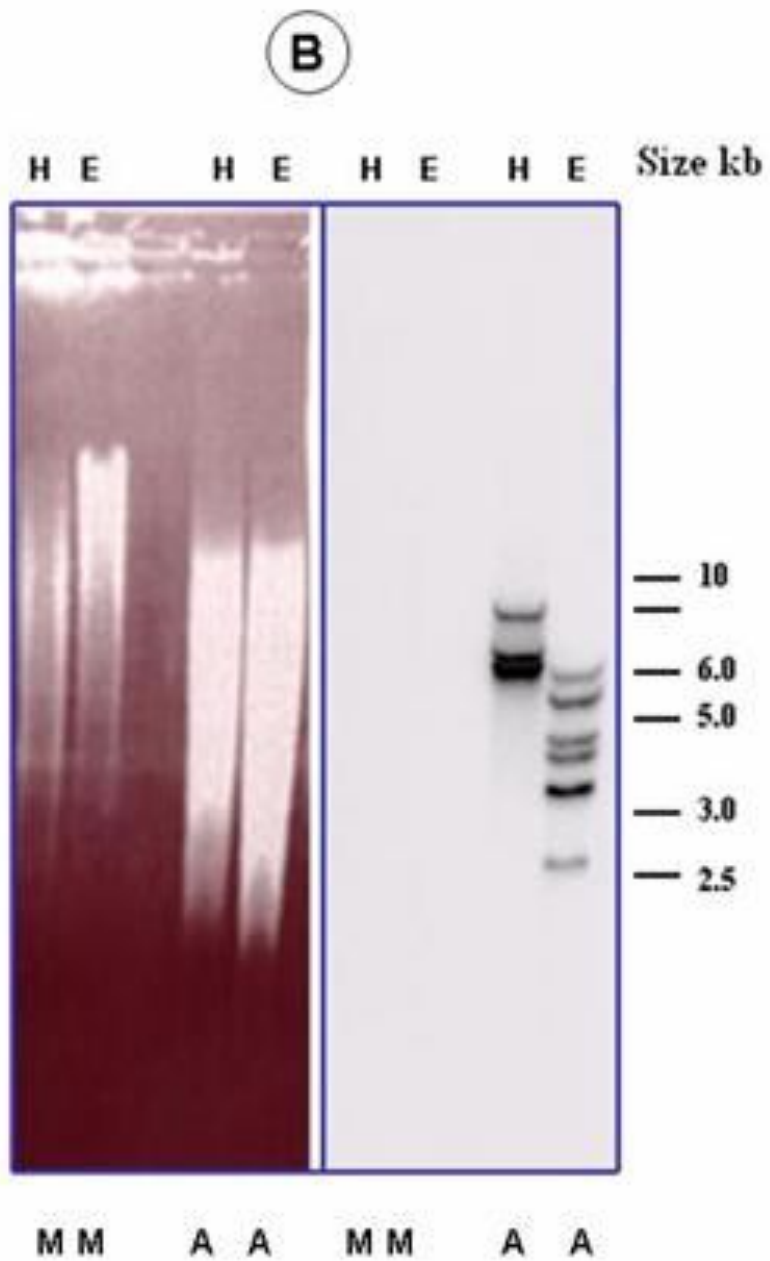
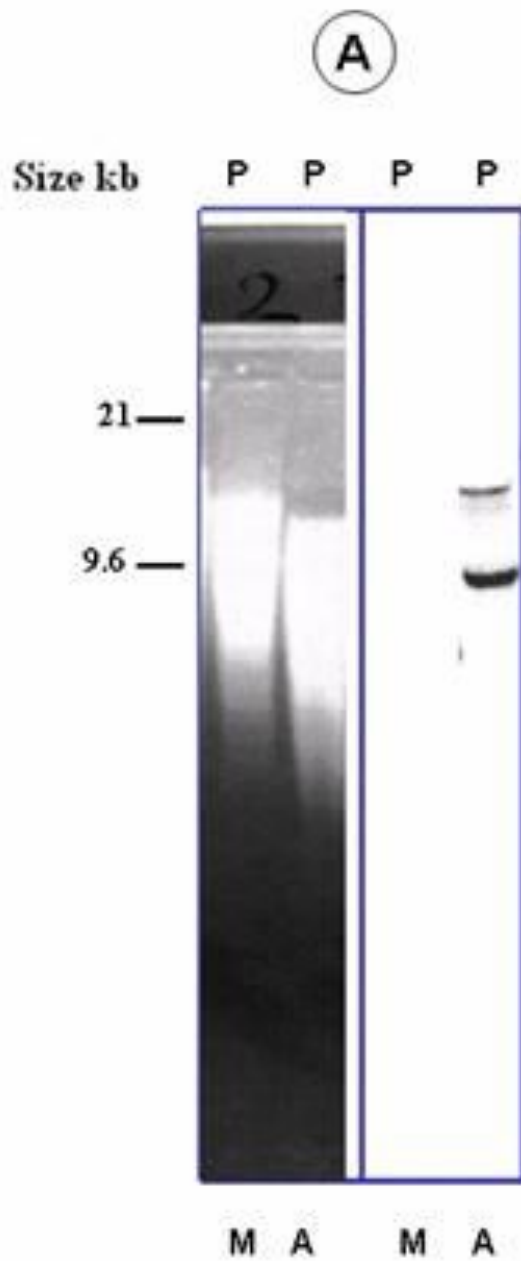


Autoradiogram



Саузерн-блоттинг





Саузерн-блоттинг

	Southern	Northern	Western
What is separated by molecular weight? (target)	DNA cut with restriction enzymes	RNA denatured with formaldehyde	Protein denatured with SDS
Probe	radioactive gene X DNA	radioactive gene X DNA	Antibody against protein X, labeled with radioactivity or enzyme
What do you learn from it?	Restriction map of gene X in chromosome	-how much gene X mRNA is present? -how long is gene X mRNA?	-how much protein X is present? -how big is protein X?

Саузерн-блоттинг

Southern Blot	Northern Blot	Western Blot
1) Extract DNA from cells	1) Extract RNA from cells	1) Extract protein from cells
2) Cut with restriction enzyme		
	2) Denature with formaldehyde	2) Denature with SDS
3) Run on gel (usually agarose)	3) Run on gel (usually agarose)	3) Run on gel (usually polyacrylamide — called "SDSPAGE")
3.5) Denature DNA with alkali		
4) Transfer to nitrocellulose (usually by capillary action)	4) Transfer to nitrocellulose (usually by capillary action)	4) Transfer to nitrocellulose (usually by electrophoresis)
5) Block with excess DNA	5) Block with excess RNA	5) Block with excess protein
6) Hybridize with labeled DNA probe	6) Hybridize with labeled DNA probe	6) Hybridize with labeled antibody probe
7) Wash off unbound probe (use controlled stringency)	7) Wash off unbound probe (use controlled stringency)	7) Wash off unbound probe
8) Autoradiograph	8) Autoradiograph	8) Autoradiograph or develop with chromogenic substrate