Кода необходимо детектировать НК?

- Для решения различных фундаментальных задач молекулярной биологии, биоорганической химии и биохимии
- Для диагностики заболеваний
- Для экспертиз

В разных объектах:

- ***В растворах***
- ***В гелях***
- ***На мембранах***
- ***В клетках***
- ***В биологическом материале (в крови, тканях органов, волосах, листьях, культуре клеток и т.п.)***

Что определять:

- ***Суммарное количество НК***
- ***ДНК и РНК отдельно***
- ***Несколько молекул ДНК***
- ***Отдельные участки в ДНК***

In vitro

Количественное определение НК в растворе:

- Точное измерение выходов кДНК перед клонированием
- Оценка количества НК в различных препаратах
- Определение выхода плазмид
- Определение количества ДНК-матриц перед торможением в геле, опытами по футпринтингу ДНК
- Определение количества продуктов ПЦР (полимеразной цепной реакции)

In vivo

Функционирование ДНК и РНК в клетке

ДНК-диагностика:

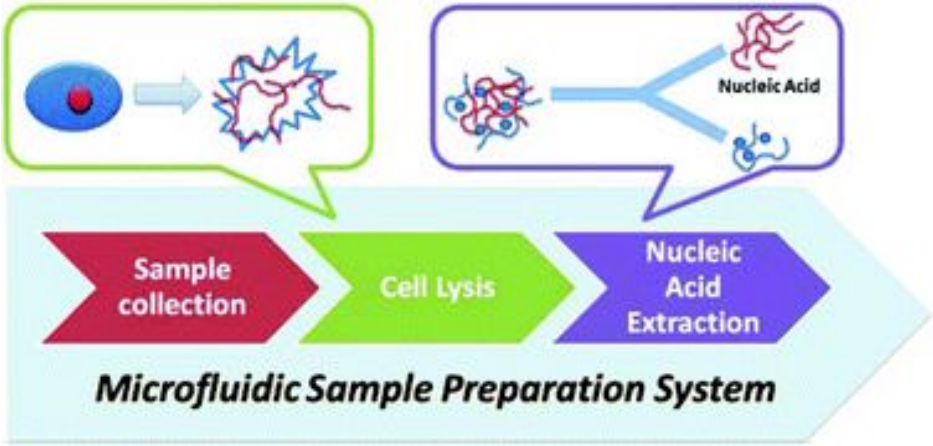
- ***наследственные заболевания;***
- ***генетическая предрасположенность;***
- ***бесплодие и вынашивание беременности;***
- ***онкологические заболевания;***
- ***определение совместимости донора и реципиента.***

Экспертизы:

- ***установление биологического родства, генетическая экспертиза отцовства;***
- ***ПЦР-диагностика инфекционных заболеваний***

Выделение и очистка НК

Этапы выделения геномной ДНК:



-Приготовление образца

разное для разных тканей, для культуры клеток млекопитающих и для бактериальных клеток

-Лизис клеток

(необходимо избегать фрагментации длинных молекул ДНК за счет механической деструкции или действия эндогенных нуклеаз)

Механическое разрушение
Химическая обработка (например, лизис с помощью детергентов или хаотропных агентов)
Ферментативное расщепление белков (например, с помощью протеиназы К)

-Фенольная или фенольно- хлороформная экстракция

-Отделение от белков и др.молекул
Центрифугирование, осаждение этанолом

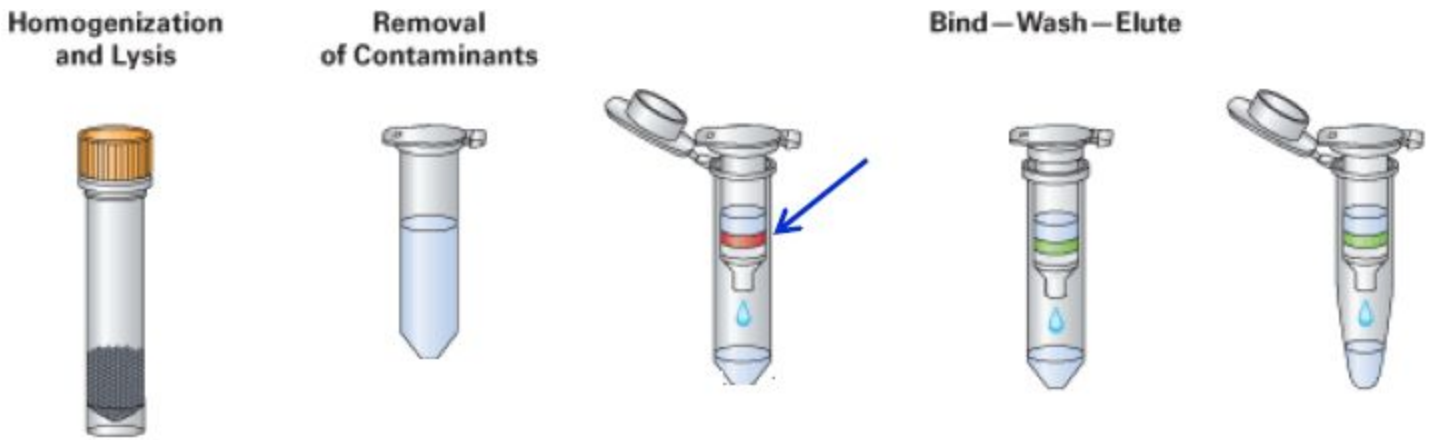
Выделение и очистка ДНК

Silica

- DNA binds selectively to silica in the presence of high concentrations of chaotropic salts (e.g., guanidinium HCl).
- Protein does not bind under these conditions.
- Silica membranes or columns are washed with an alcohol-based solution to remove the salts.
- DNA is eluted from the membrane with a low-ionic-strength solution, such as a low-salt buffer or water.

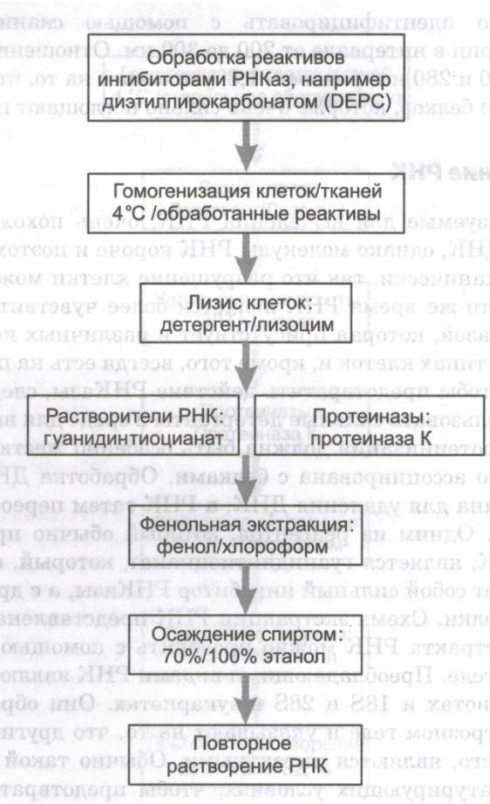
Advantages

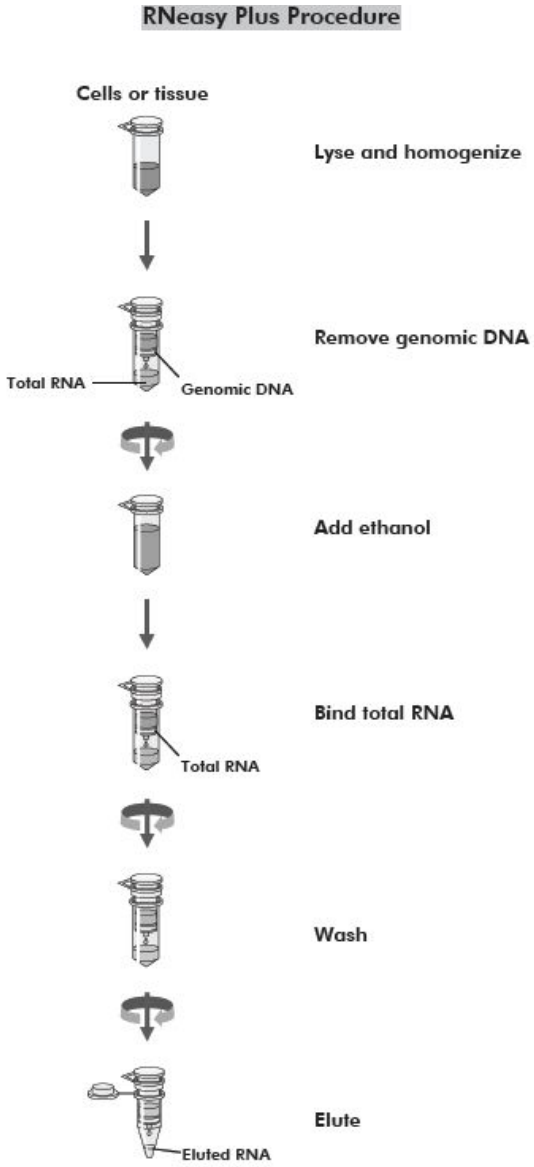
- Fast purification
- Amenable to automation
- No centrifugation required (can use vacuum)
- No organic solvents or precipitation steps



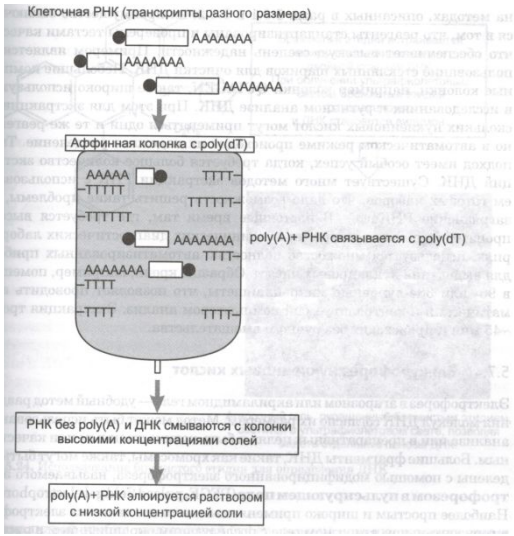
Выделение и очистка РНК

Этапы выделения РНК





Выделение мРНК



Количественное определение НК

Для решения разных задач методы определения НК варьируют от определения общего содержания НК до определения одной молекулы или даже одного гена.

Стандартные методы определения общего содержания НК:

1) **Принципы спектрофотометрического определения НК**

2) **Определение с помощью флуоресцирующих красителей**

Закон Бера

(соотношение между количеством поглощающего вещества и величиной поглощения)

$$I = I_0 \cdot e^{-klc}$$

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon lc}$$

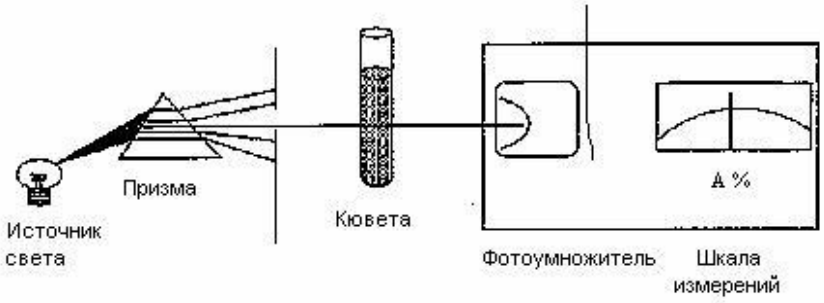
$$A = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

I – интенсивность прошедшего света,
I_0 – интенсивность падающего света
c – концентрация, моль/л
l – длина оптического пути, см

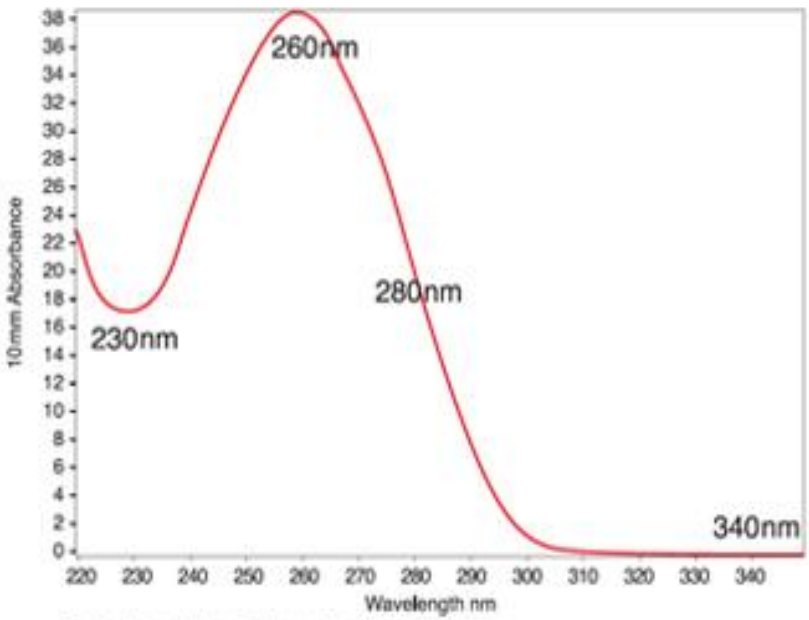
ε – молярный коэффициент экстинкции, $М^{-1}см^{-1}$

A - поглощение

Однолучевой спектрофотометр:



Определение по поглощению при 260 нм



Typical nucleic acid spectrum

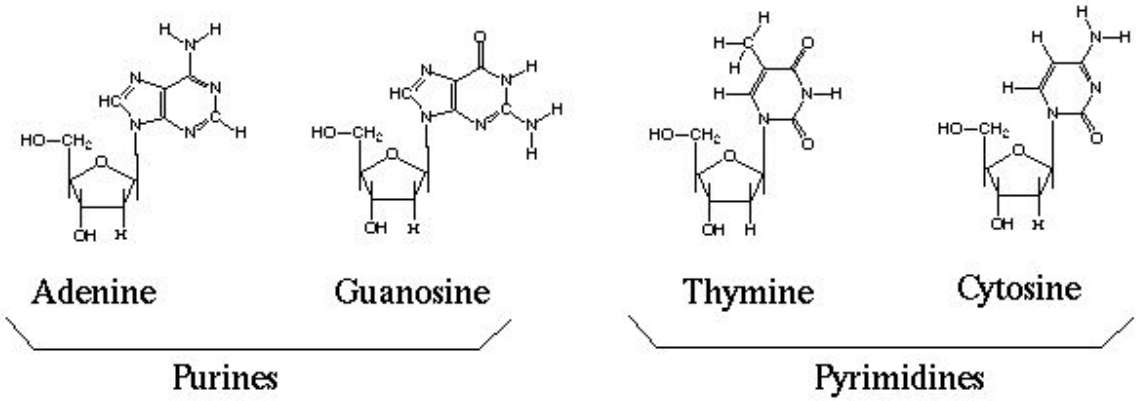
λ макс НК = 260 нм

- **Чистые препараты ДНК характеризуются величинами отношения A_{260}/A_{280} 1.8, а A_{260}/A_{280} для чистой РНК = 2.0**
- **A_{260} = 1, кювета 1см**
  50 мкг/мл, двухцепочечной ДНК
  40 мкг/мл одноцепочечной ДНК и РНК
- **Синтетические олигонуклеотиды:**

$$A = \lg\frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

$$\varepsilon_{pdA}^{260} = 15400,\ \varepsilon_{pdC}^{260} = 7400,\ \varepsilon_{pdG}^{260} = 11500,\ \varepsilon_{pdT}^{260} = 8700$$

The Nucleotides of DNA



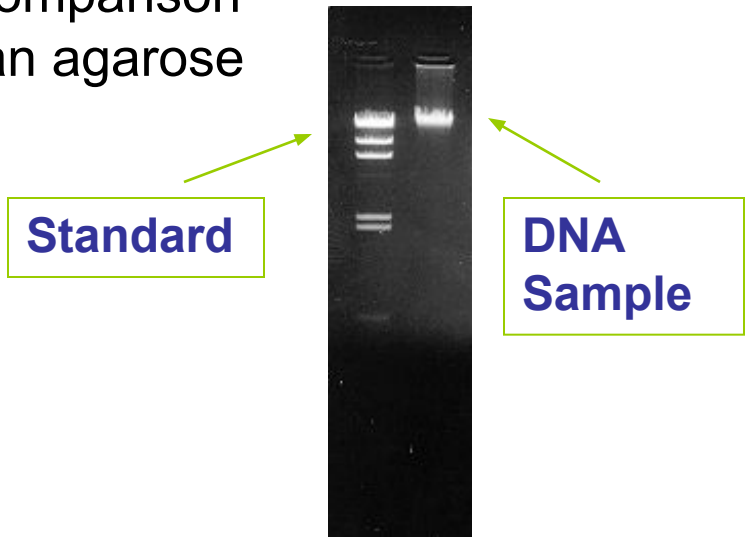
Определение по флуоресценции

High-sensitivity fluorescence methods are also available (определяется 25 pg/ml)

- PicoGreen® method. Mix sample with reagent, wait 5 minutes and read with a fluorimeter.

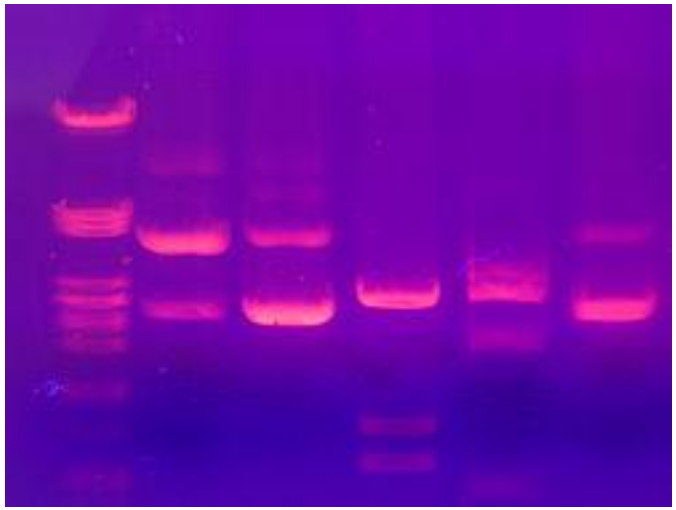
Lower sensitivity methods

- Estimation of concentration based on comparison to a known concentration standard on an agarose gel.



Определение по флуоресценции этидий бромида

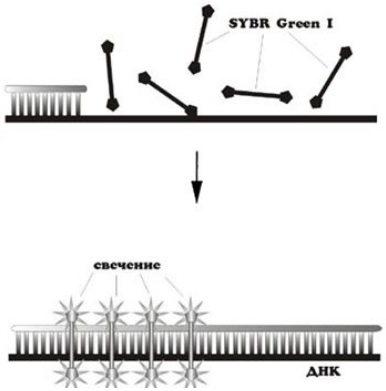
- Определение 10-50 нг ДНК и РНК в геле
- Определение размера ДНК
- Оценка концентрации путем сравнения со стандартом

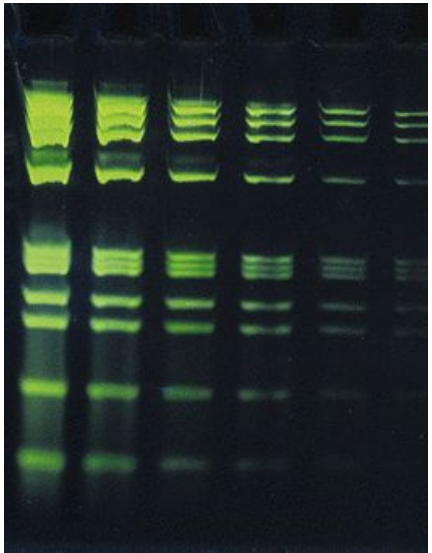


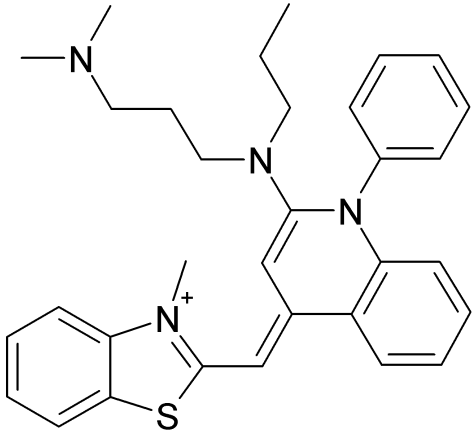
$\lambda_{фл}$ 590

EthdBr 1мкг/мл

Механизм:
разгорание флуоресценции при интеркалировании красителя в двойную спираль





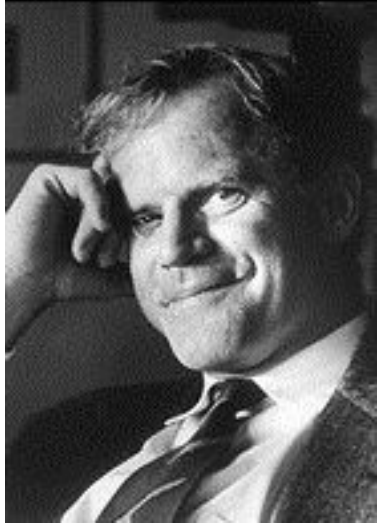


$\lambda_{фл}$ 520 nm

Новый краситель - **SYBR Green:**

Полимеразная цепная реакция

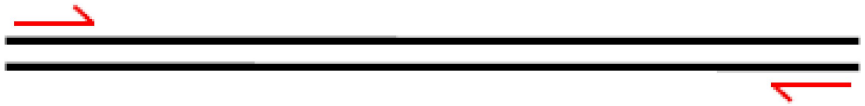
Mullis and Faloona, 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.
Nobel Prize 1993



Kary Mullis

ПЦР - многократное избирательное копирование определённого участка ДНК (в том числе и из смеси ДНК) при помощи ДНК-полимеразы и двух олигонуклеотидных затравок.

Затравки (праймеры) комплементарны определенному участку в разных цепях ДНК



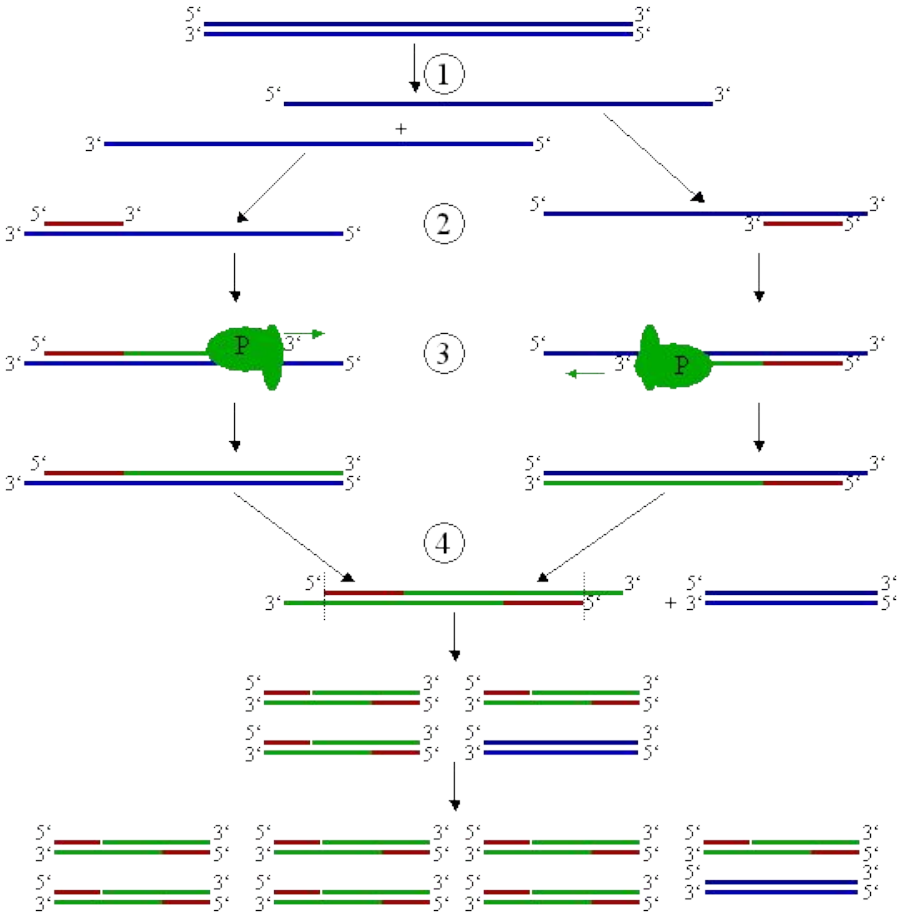
Мишени для ПЦР:

Следы крови
Один волос
Соскоб из-под ногтей
Насекомые в янтаре
Египетские мумии
Зубная щетка
Зуб неандертальского ребенка

Используется для

- амплификации определенного участка ДНК
- введения мутаций в ДНК
- диагностики заболеваний (наследственных, инфекционных)
- установления отцовства
- клонирования генов, выделения новых генов.

Полимеразная цепная реакция



Схематическое изображение амплификации ДНК:

*1 – **денатурация** при 96 °С;*
*2 – **отжиг** при 68 °С;*
*3 – **удлинение** при 72 °С;*
*4 – **окончание первого цикла**.*
*(Р – **Taq-ДНК-полимераза**). Две образующихся цепи ДНК являются шаблоном для следующего цикла. Таким образом, происходит удваивание количества ДНК в каждом новом цикле.*

Taq-ДНК-полимераза – полимераза из термофильных бактерий

Templates for PCR

- Small amount of template
- In theory a single molecule
- Do not need to isolate sequence of interest
- DNA template need not be highly purified
- DNA is stable in absence of nucleases

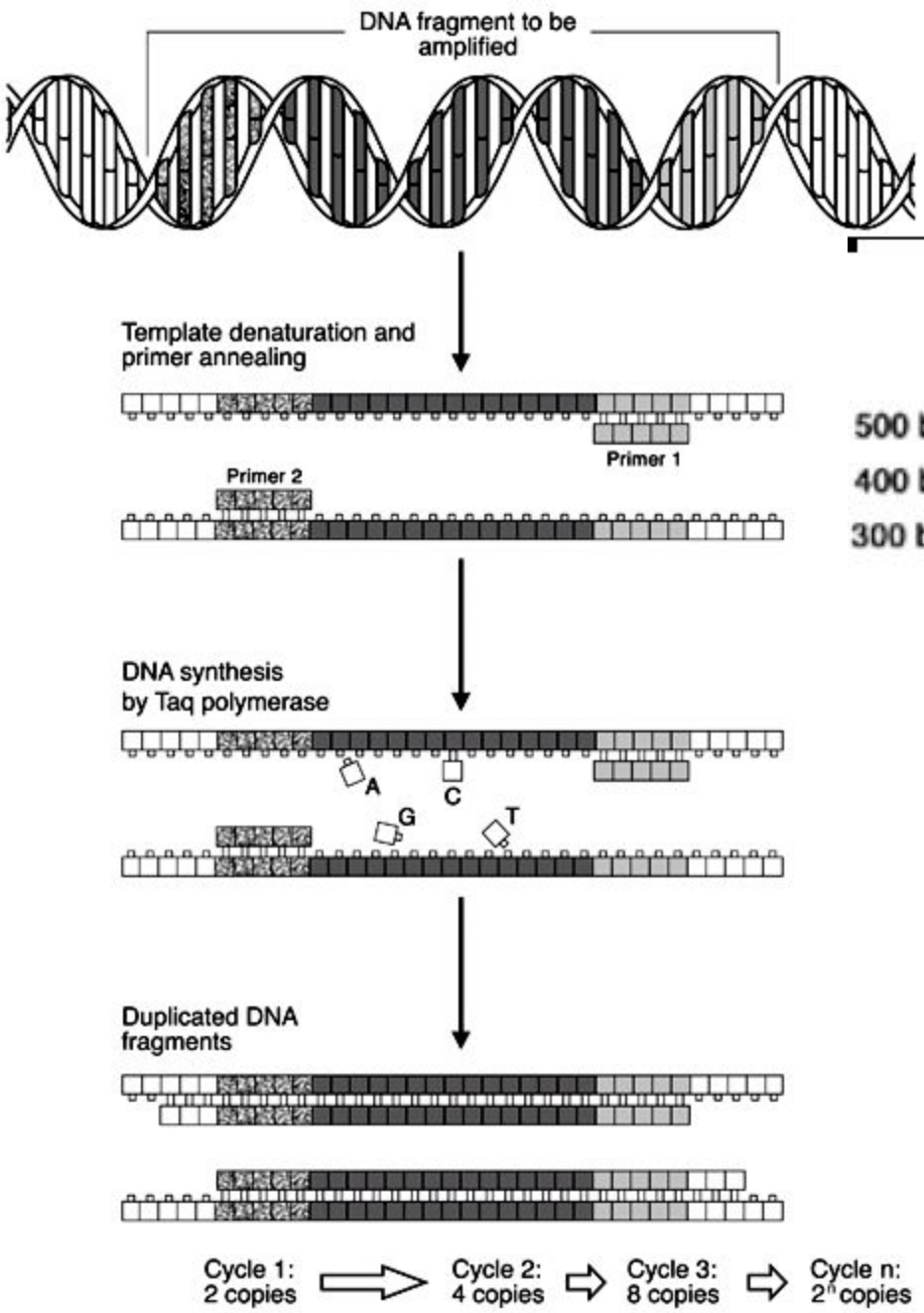
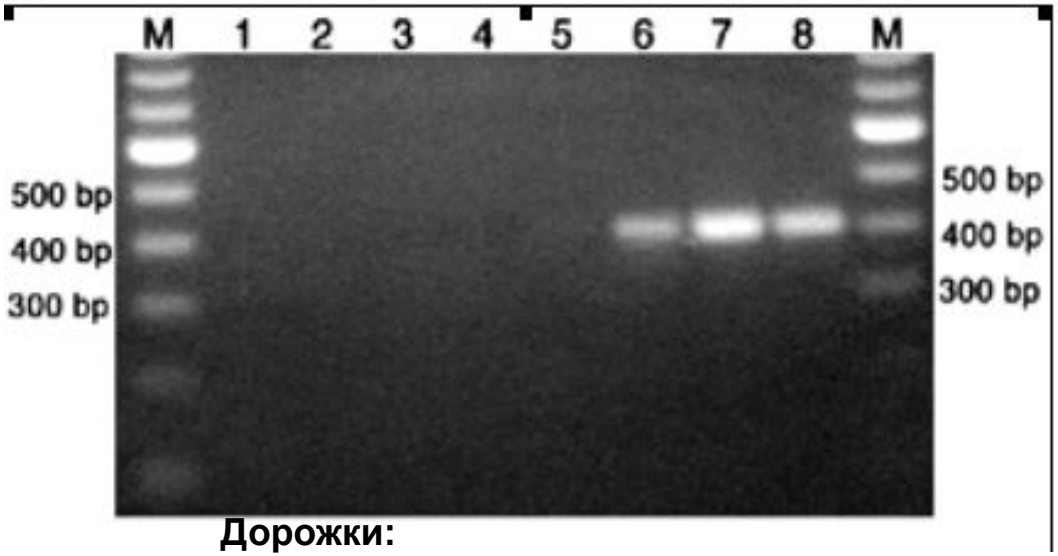


FIGURE 1 - Schematic diagram of PCR showing that each cycle contains three steps (annealing of primers to the DNA template, extension of the DNA and DNA denaturation), and illustrating the exponential nature of the reaction (Modified from

Агарозный гель продуктов ПЦР (прокрашен этидий бромидом)



Дорожки:

М-маркеры
1-отрицательный контроль
2-5- пробы, в которых нет амплификации ДНК-мишени
6-7- пробы, в которых есть амплификация ДНК-мишени
8- положительный контроль

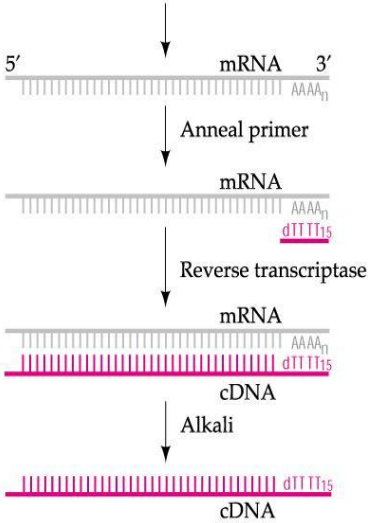
Обычно 20—35 циклов .

Теоретически количество продукта = 2^n , где n – количество циклов

Определение РНК

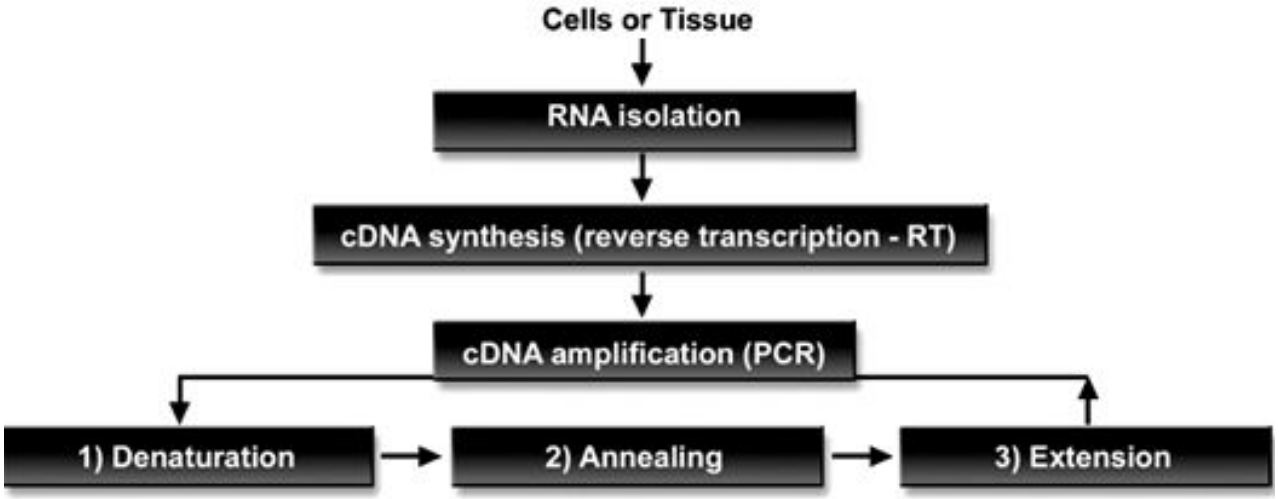
RT-PCR – ПЦР с обратной транскрипцией

Обратная транскрипция:
получение ДНК, комплементарной вирусной РНК-матрице, для чего используют специфические праймеры к РНК и фермент – РНК-зависимую ДНК-полимеразу (обратную транскриптазу).



Обратная транскрипция

1-ый этап – получение ДНК-копии путем обратной транскрипции
2-ой этап - ПЦР **кДНК**

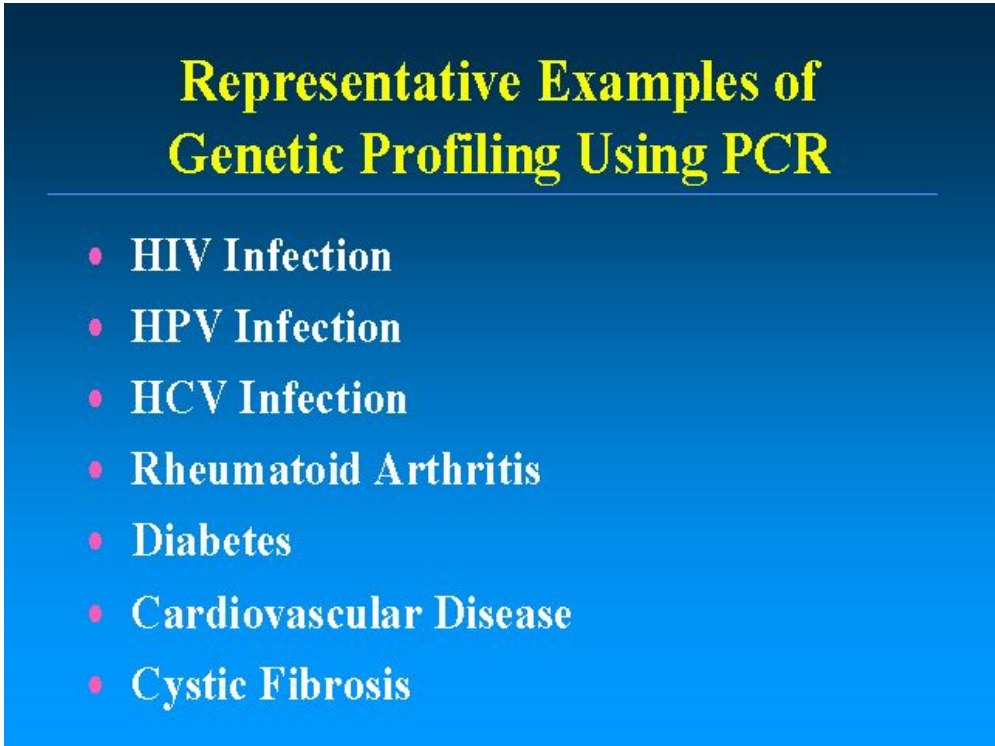


ПЦР в медицинской диагностике

ДНК

- определение в образце всего нескольких молекул ДНК, например, ДНК - возбудителя какого-либо заболевания (бактериальные, грибковые, вирусные инфекции)
- ДНК-диагностика различных заболеваний (пренатальная диагностика и др.)

РНК ПЦР-анализ РНК-содержащих вирусов



Определение количества НК с помощью ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ,Q-PCR)

ПЦР-РВ (количественная ПЦР в реальном времени) – методика, базирующаяся на ПЦР. Особенности и отличия от ПЦР:

- наряду с амплификацией ДНК определяется ее количество. Определяется абсолютное или относительное (когда нормализуют к количеству ДНК на входе) количество копий.
- амплифицированная ДНК определяется по мере прохождения реакции в реальном времени после каждого цикла амплификации. При ПЦР – в конце реакции.
- не требуется проведения электрофореза
- автоматическая регистрация и интерпретация полученных результатов

В ПЦР-РВ НК используют два основных подхода , включающие:

— **неспецифические флуоресцентные красители**, интеркалирующие в любое место в двуцепочечных молекулах ДНК

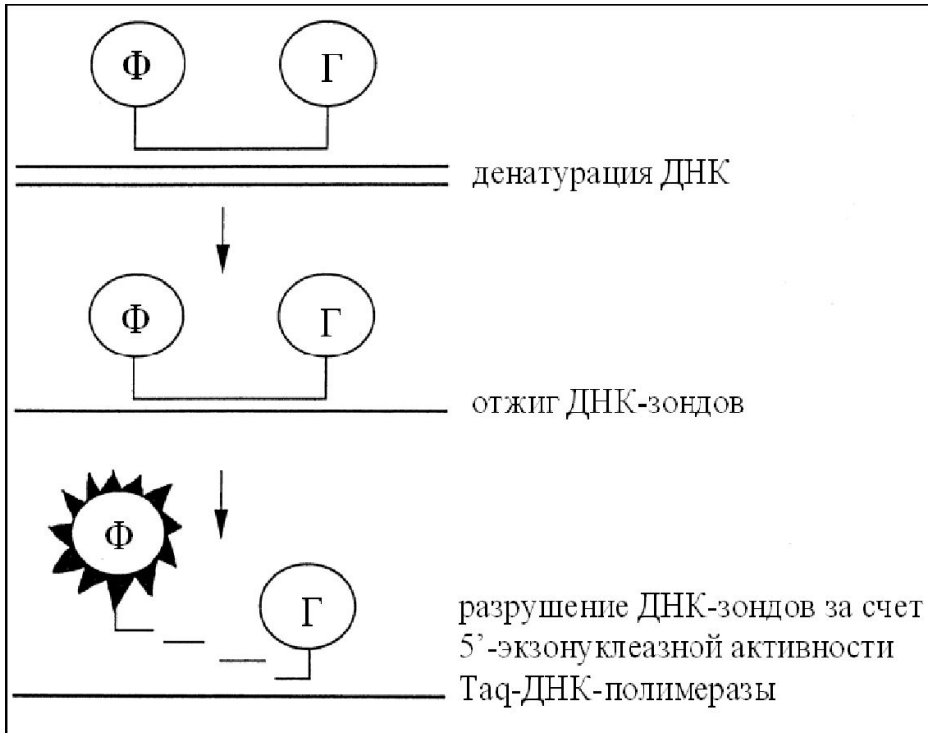
- **SybrGreen, EthdBr**

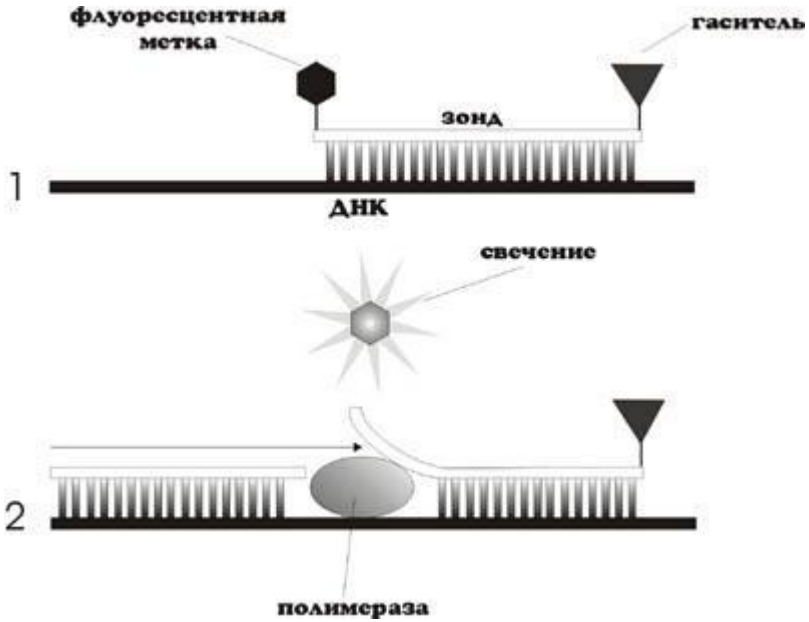
— **специфические модифицированные олигодезоксинуклеотиды (ДНК-зонды)**, которые флуоресцируют после гибридизации с комплементарными участками ДНК.

- **TaqMan Assay**
- **Molecular beacons**

Метод гидролизуемых зондов или Taqman

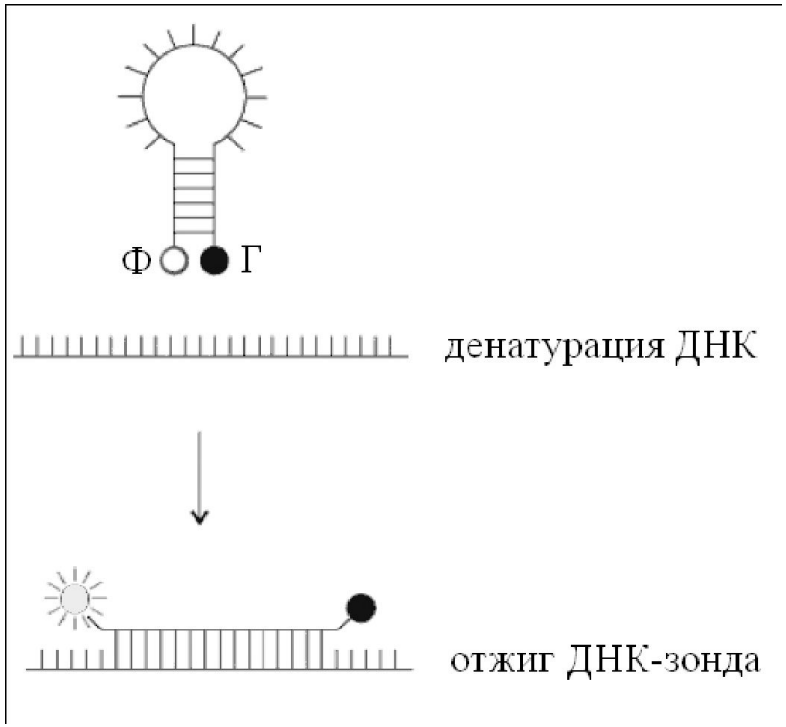
Принцип детекции ПЦР-продуктов с использованием зондовTaqman. Ф – флуорофор. Г – гаситель

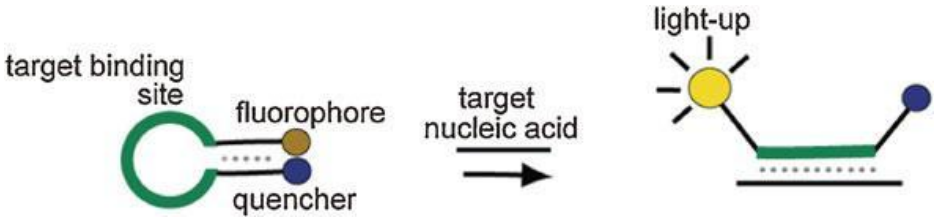




Использование зондов с комплементарными концевыми последовательностями (molecular beacons)

Принцип детекции ПЦР-продуктов с использованием зондов Molecular Beacons. Ф – флуорофор. Г – гаситель

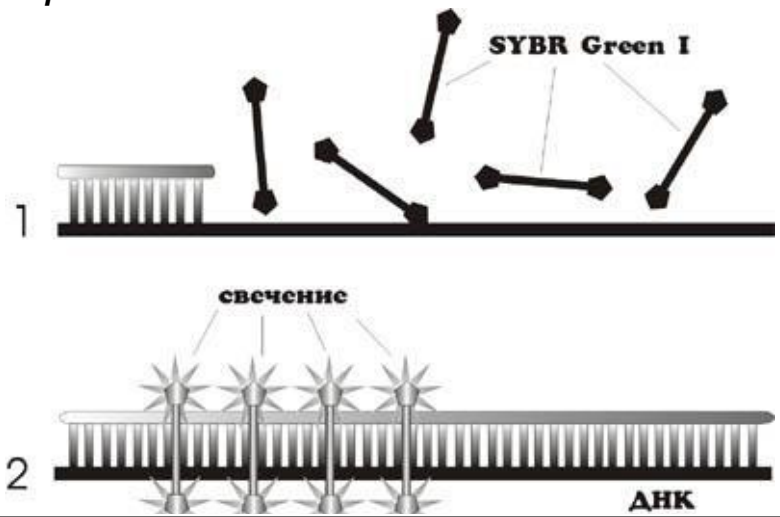




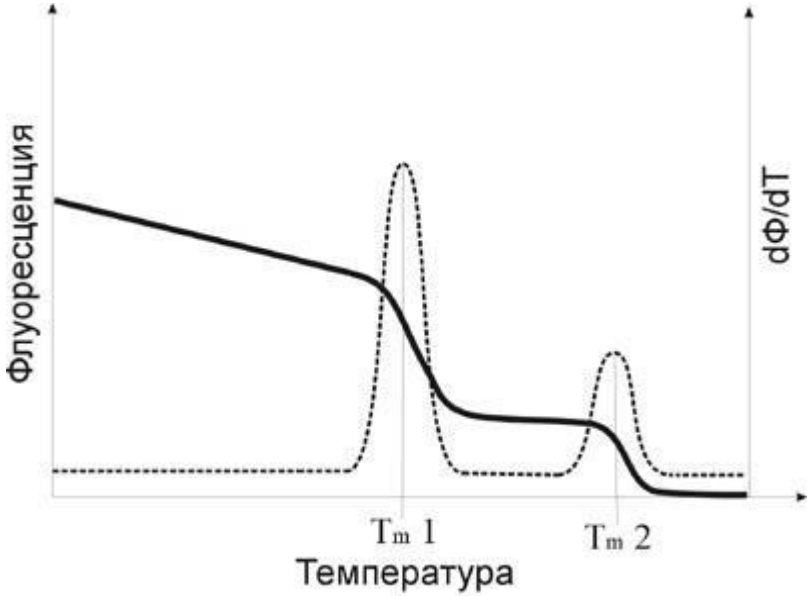
Внутренняя область зондов содержит нуклеотидную последовательность, комплементарную амплифицируемой области.

Использование интеркалирующих агентов

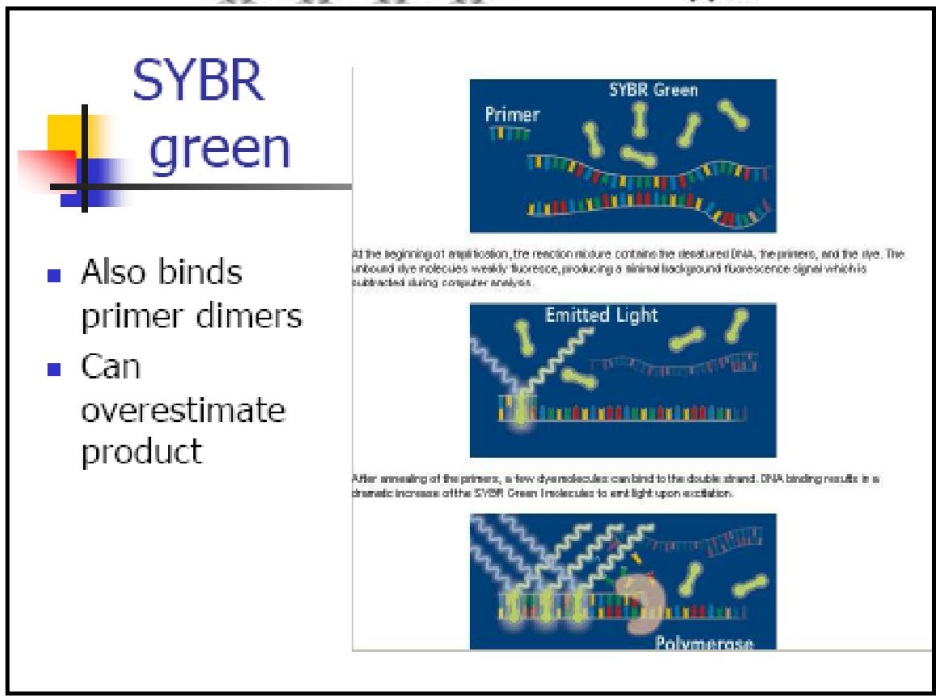
Принцип детекции ПЦР-продуктов с использованием интеркалирующих красителей



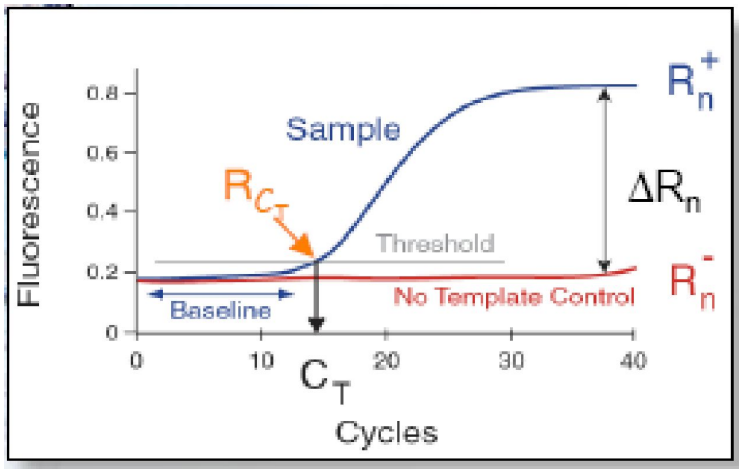
Плавление продуктов амплификации



Кривые плавления



Обработка данных (в случае интеркалирующих красителей)



- Возрастание флуоресценции пропорционально количеству ДНК-мишени.
- C_T (пороговый цикл) – пересечение кривой амплификации и пороговой линии (количество циклов, необходимых для достижения порога). Он является относительной мерой концентрации ДНК-мишени в реакции ПЦР.
- C_T обратно пропорционально логарифму первоначального количества ДНК-мишени.

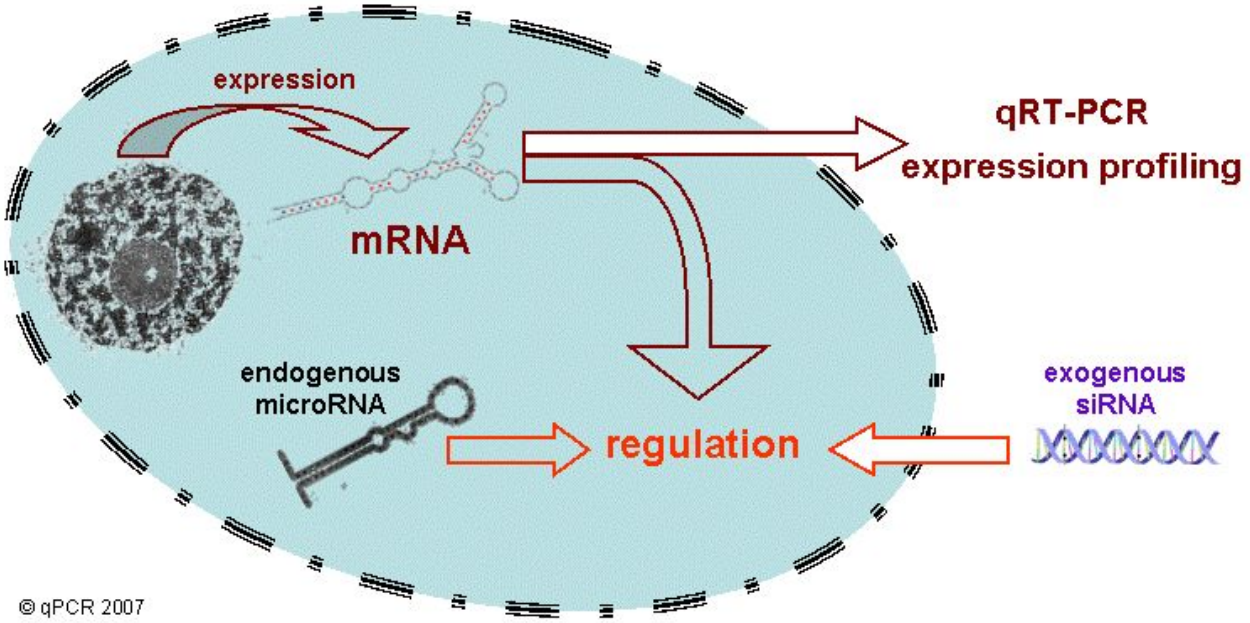
Определение концентрации ДНК/РНК с использованием ПЦР-РВ

- Определение «порогового» цикла для исследуемых проб.
- Использование стандартных растворов ДНК для построения калибровочной кривой.
- Расчет исходной концентрации НК.

ПЦР-РВ может быть использован для количественного определения НК **двумя путями:** относительное или абсолютное количество.
Относительное количество базируется на нормализации экспрессии изучаемых генов к экспрессии внутренних стандартных генов. В качестве стандартов выбраны гены, экспрессия которых не меняется в разных условиях и образцах (напр., ген актина).
Абсолютное количество дает точное число молекул ДНК-мишени путем сравнения со стандартной ДНК (известной концентрации).

Применение ПЦР-РВ в фундаментальных исследованиях

- Изучение экспрессии генов. Определение количества мРНК.
- Определение количества некодирующих РНК



Применение ПЦР-РВ в медицине

- количественные измерения ДНК и РНК инфекционных агентов
- мониторинг эффективности проводимой терапии, оценка клинического прогноза

Гибридизация НК

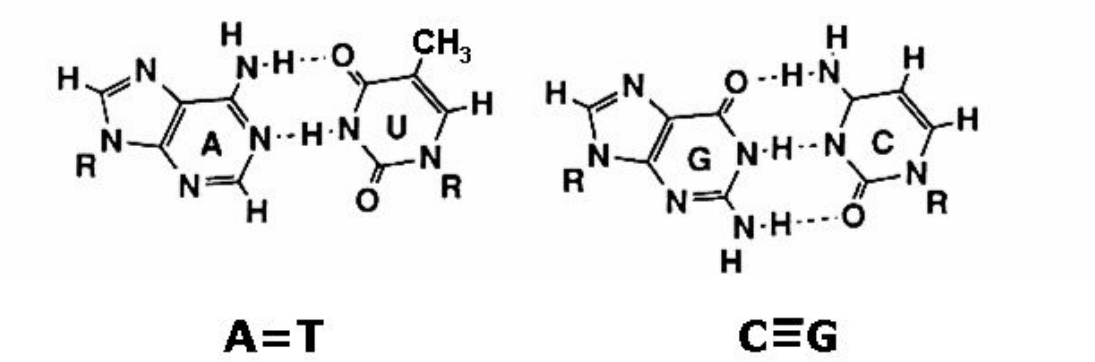


Схема образования водородных связей в уотсон-криковских парах оснований

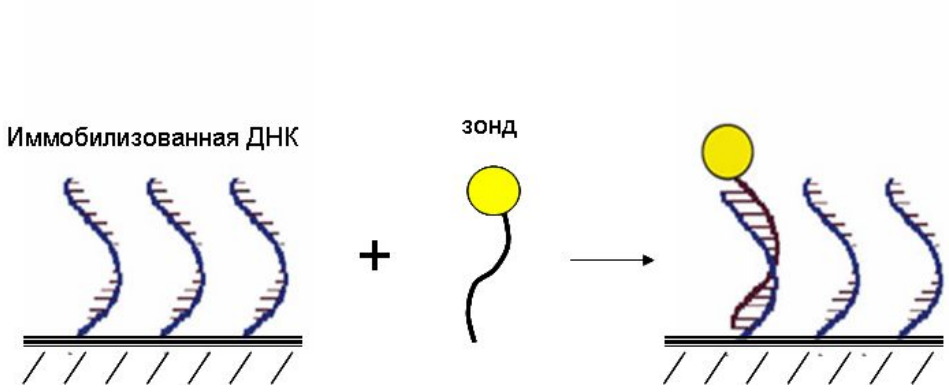
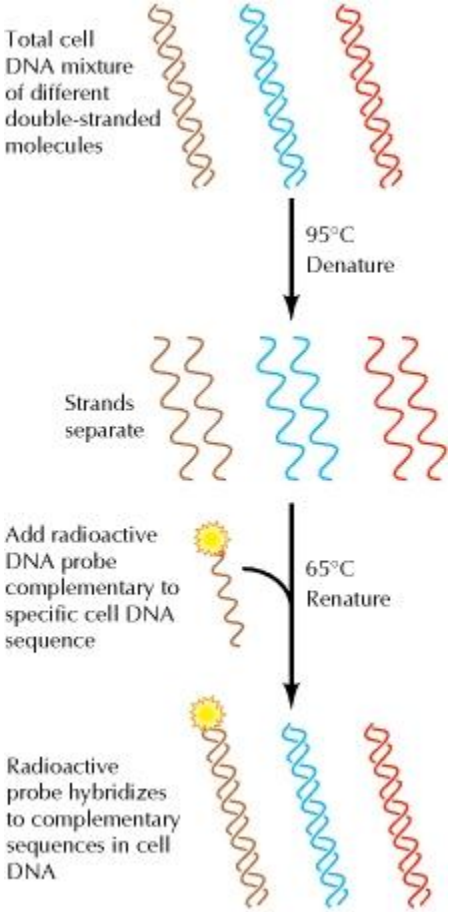


Схема гибридизации иммобилизованной ДНК с олигонуклеотидным зондом

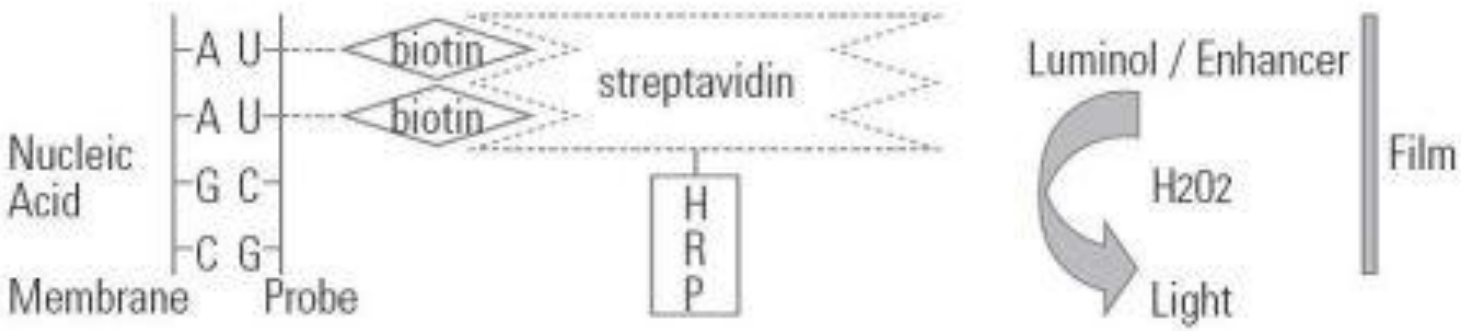


Обнаружение НК гибридизацией

Зонд метится какой-либо репортерной группой:

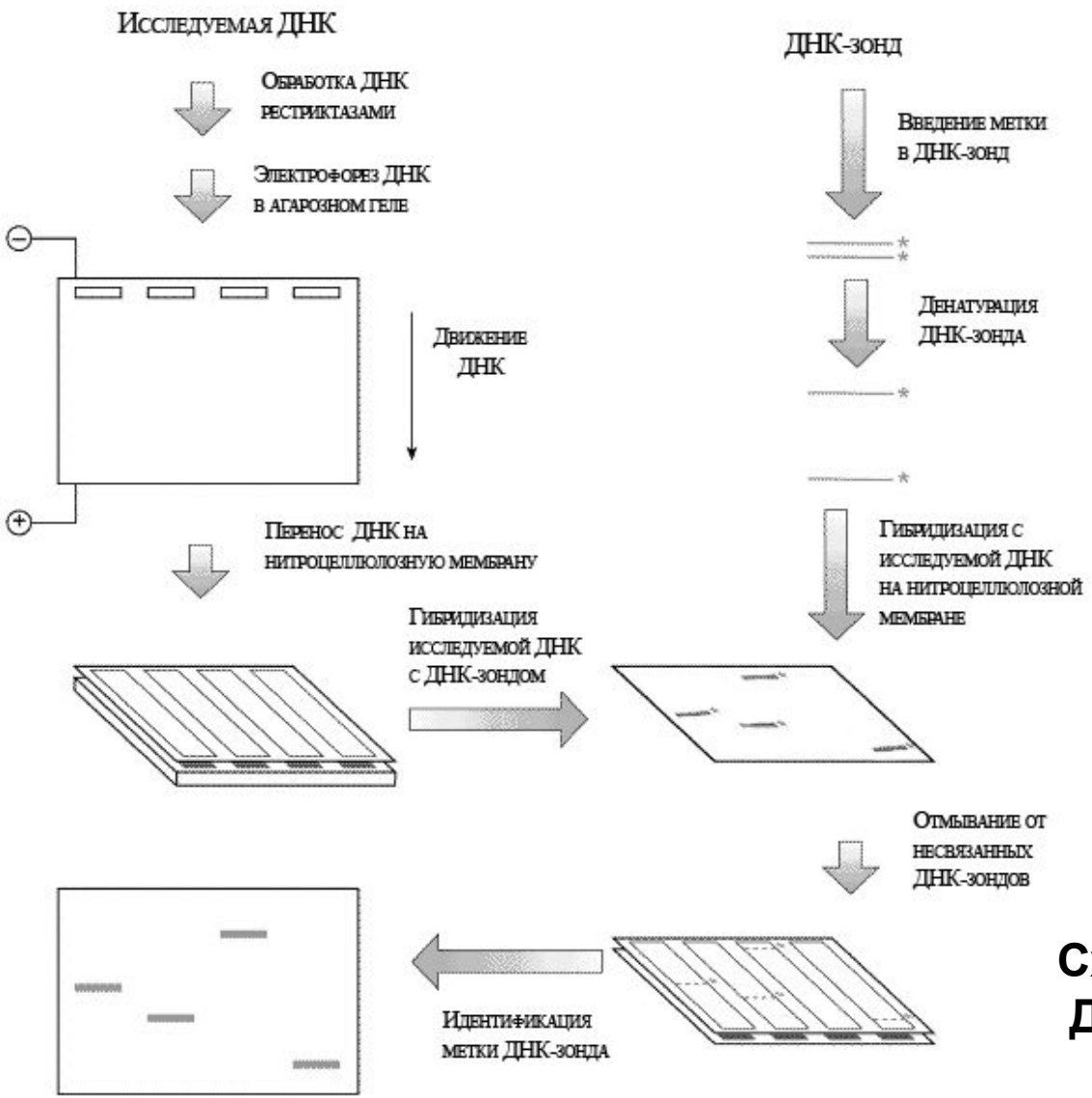
- радиоактивным изотопом,
- флуорофором,
- ферментом, дающим окрашенный или люминесцирующий продукт

Примеры детекции НК через гибридизацию



- НК на мембране
- гибридизация с зондом, несущим биотин
- образование прочного комплекса биотин-стрептавидин (стрептавидин «пришит» к ферменту HRP - пероксидазе хрена)
- хемолюминесценция (катализатор - пероксидаза хрена)

Блоттинг От англ. blotting - промокашка



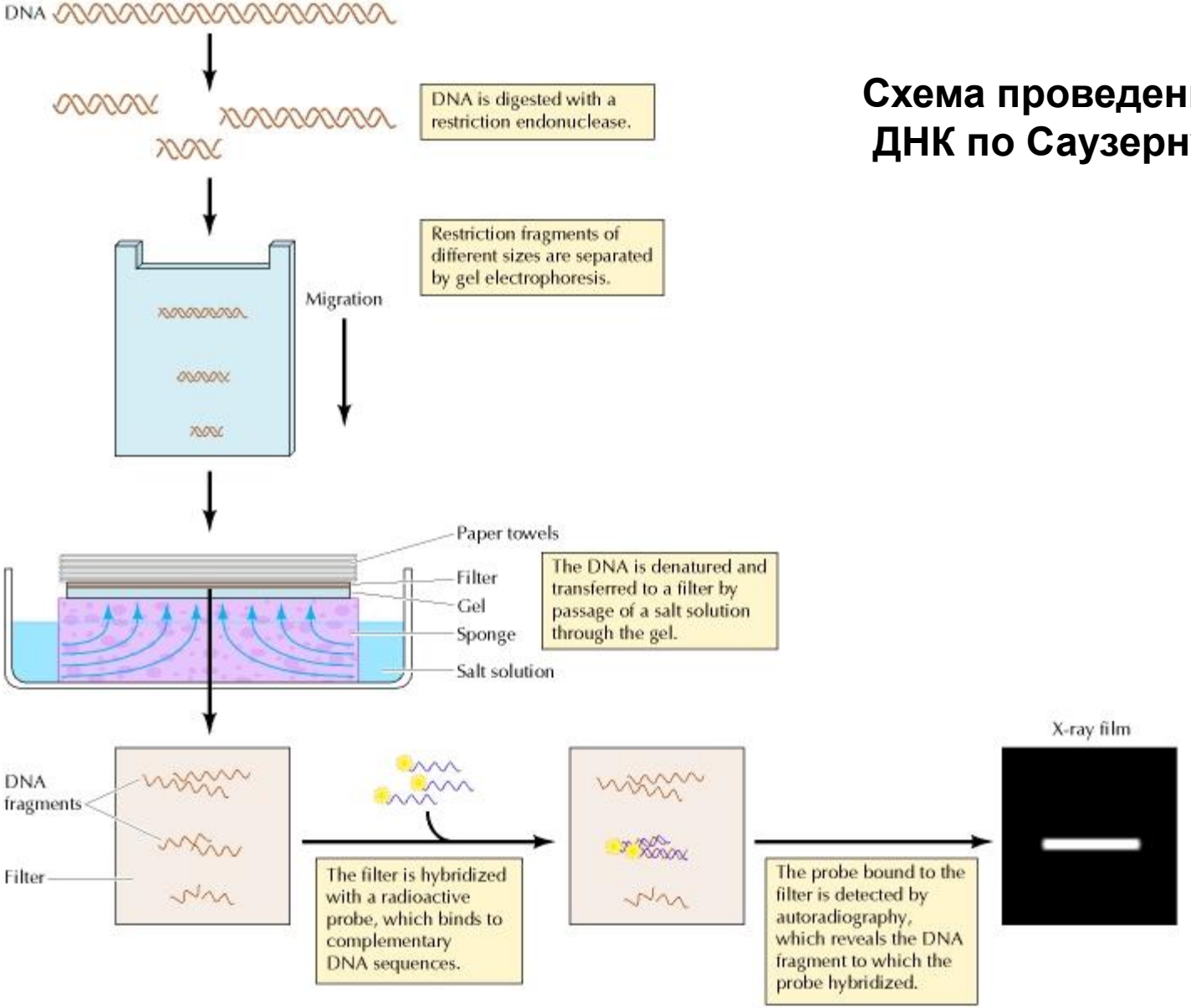
Саузерн-блоттинг **(Southern,1975) – перенос ДНК на носитель (нитроцеллюлозный фильтр);**

Нозерн (Nothern)-блоттинг **– перенос РНК;**

Вестерн (Western) -блоттинг – перенос белка

Схема проведения гибридизации ДНК по Саузерну

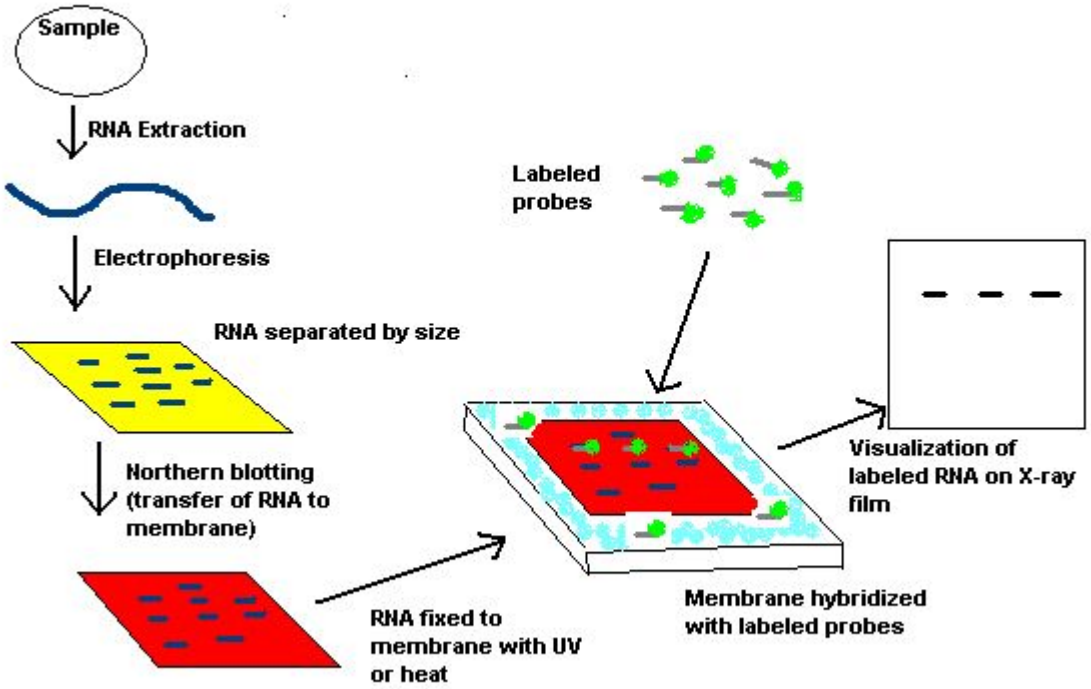
Схема проведения гибридизации ДНК по Саузерну



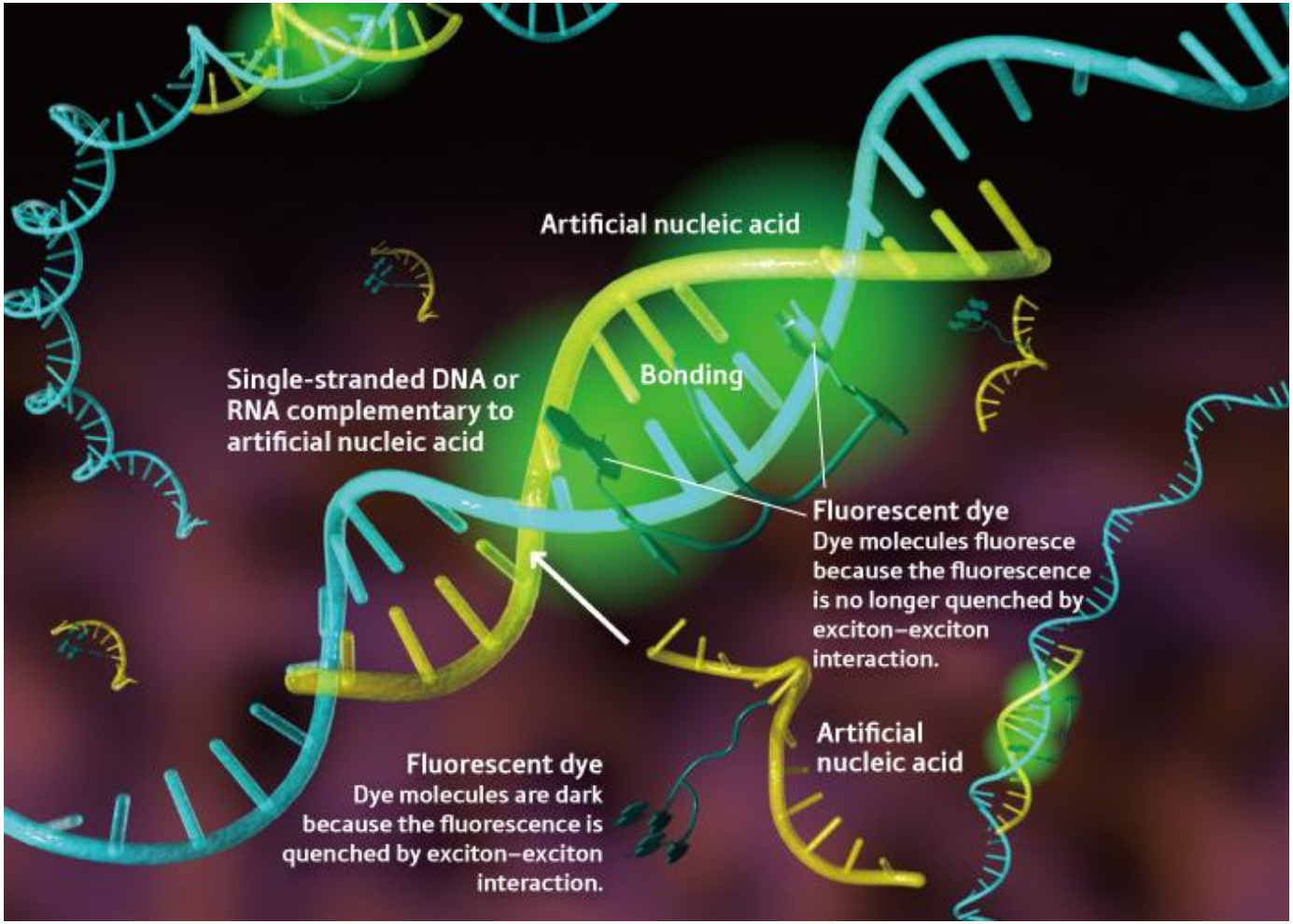
SOUTHERN BLOTTING

Restriction endonuclease fragments of DNA are separated by gel electrophoresis. Specific DNA fragments are then identified by hybridization with an appropriate probe.

Обнаружение РНК с помощью Нозерн-блоттинга

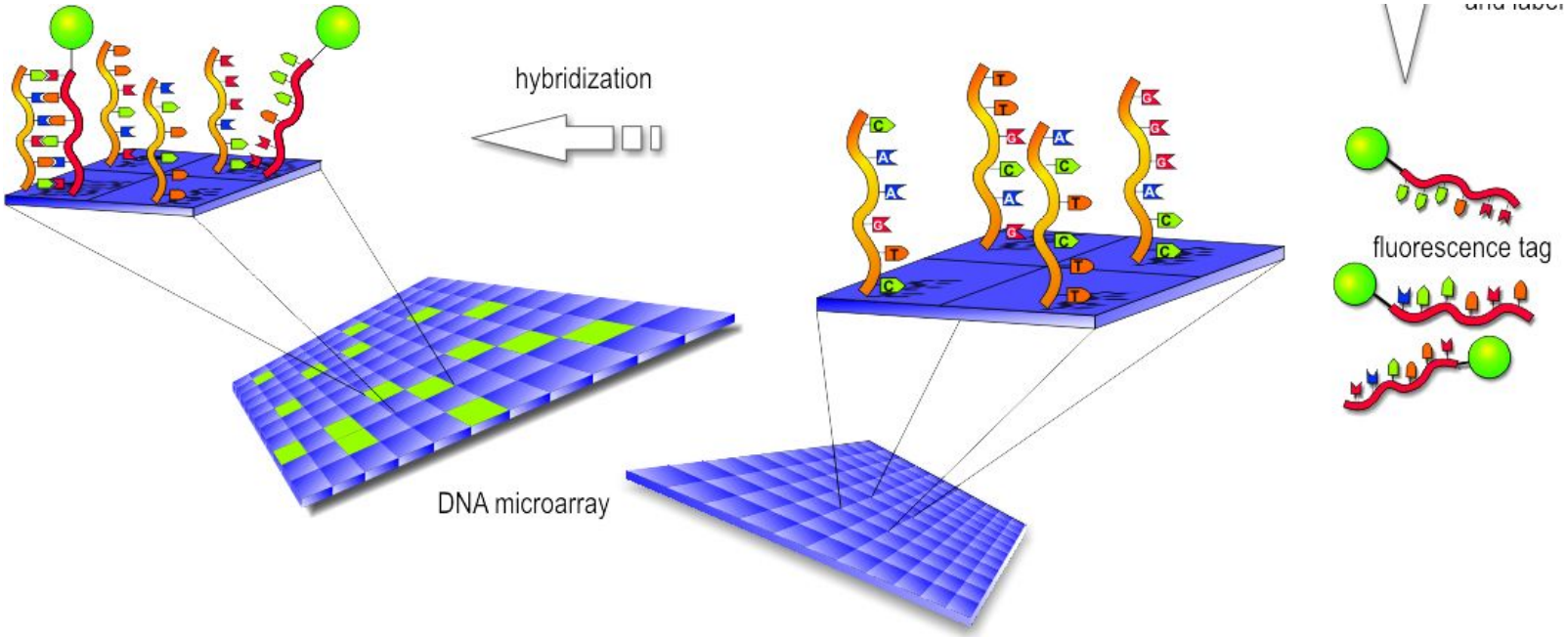


Примеры детекции НК через гибридизацию. Изучение динамики поведения ДНК и РНК.



Синтетические ДНК-зонды, которые флуоресцируют при связывании с одноцепочечной ДНК-мишенью.

Детекция ДНК с помощью ДНК-микрочипов



Олигонуклеотидные зонды

ДНК-мишени