## РНК-интерференция Выделение и очистка нуклеиновых

**КИСЛОТ** 



## Некодирующие РНК:

#### Типы некодирующих ДНК:

- 1.Некодирующая функциональная РНК (рибосомальная РНК, транспортная РНК, Piwi-PHK 26-31, microRNA 21-24).
- 2. Цис- и транс-регуляторные элементы
- 3.Интроны
- 4.Псевдогены
- 5. Повторые последовательности, транспозоны и вирусные элементы
- 6.Теломеры

#### Функции:

- Регуляция экспрессии генов, Защита генома, генетические переключатели, факторы транскрипции, операторы, энхансеры, инсуляторы

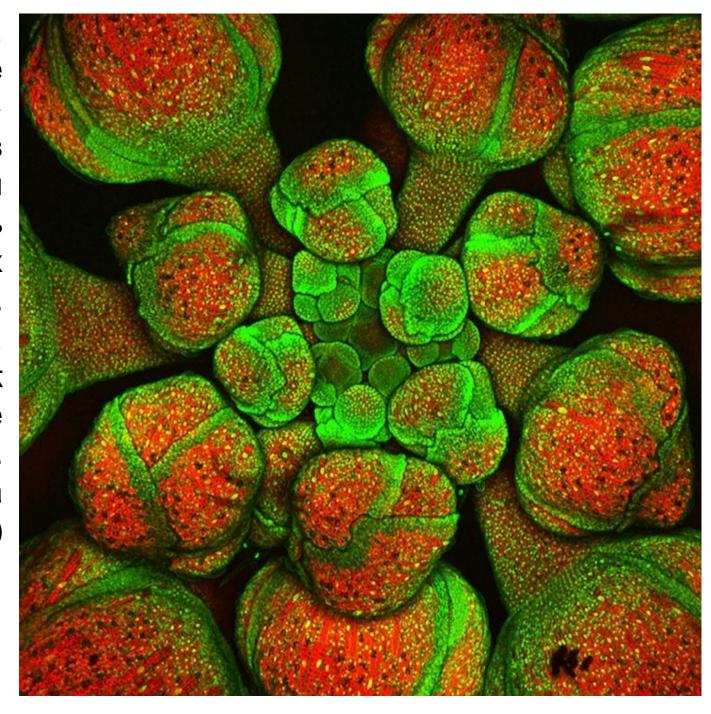
## МикроРНК

- МикроРНК MicroRNAs (miRNAs) –
   21-24 нуклеотидов
- Они вызывают деградацию РНК или блокируют ее трансляцию

- Феномен ингибирования экспрессии генов молекулами РНК называется РНК-интерференцией (RNAi technology)
- РНК-интерференция вызывается «small interfering RNAs (siRNAs)» малыми интерферирующими РНК (иРНК или миРНК) они же еще одно название микроРНК, это историческое название. Обычно в среднем 21-22 нуклеотида.
- У животных часто прикрепляется в начале мРНК, одна микроРНК для нескольких десятков генов. У растений в большинстве случаев требуется точнейшее «попадание» если отличие в один или несколько нуклеотидов, то будет отсутствовать трансляция.
- Фермент, распознающий и «уничтожающий» бессмысленную конструкцию дайсер.

МикроРНК, препятсвующие синтезу белка «А» можно вводить в плазмиду, которая может содержаеть ген, кодирующих 3ФБ.

Тогда становится, видно, где белок «А» точно не образуется. (зеленый цвет на фотографии)



#### Gene silencing mechanisms:

http://www.youtube.com/watch?v=D-77BvIOLd0

# Изоляция и визуализация нуклеиновых кислот (НК)

Зачем изолировать нуклеиновые кислоты? **⊓Источники НК** □Технические аспекты и ограничения при изоляции и очистке НК □ Ключевые стадии изоляции и очистки НК Визуализация НК (гель-электрофорез в агарозе, полиакриламидные гели: PAGE)

# Нуклеиновые кислоты: сырой материал для генных технологий

```
□ ДНК:
  хромосомная ДНК
  плазмидная ДНК
  вирусная ДНК
(двух- и одноцепочная ДНК)
□ РНК – основные классы:
    рибосомальная РНК (рРНК)
    матричная РНК (мРНК)
    транспортная РНК (тРНК)
```

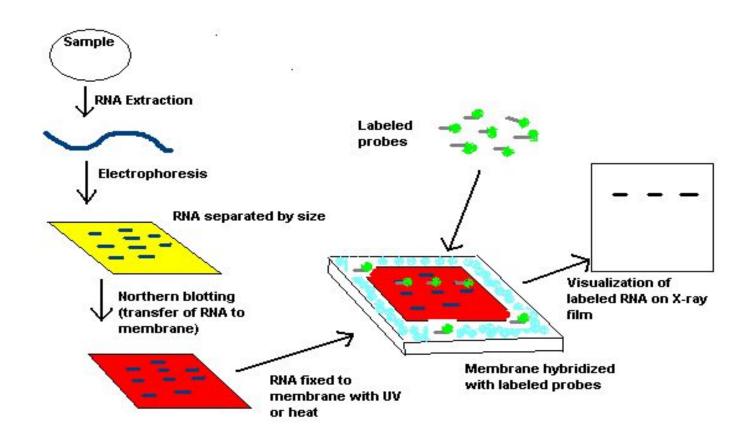
## Для чего нужна изоляция НК?

Клонирование ДНК
ПЦР и изучение уровня экспрессии специфических генов Секвенирование ДНК
ДНК-фингерпринтинг и картирование
ДНК-гибридизация
ДНК-мутагенез

Клонирование экспрессируемых генов - cloning of expressed genes - cDNA cloning. Комплиментарной ДНК - это ДНК, синтезированная из зрелой мРНК в реакции, катализируемой обратной транскриптазой. В ней, как правило, удалены интроны.

Анализ экспрессии РНК (Northerns) – Нозерн-блоттинг

мРНК амплификация – для синтеза белков *in vitro* (первый шаг при биохимическом изучении белка *in vitro*)



Нозерн-блот - метод исследования экспрессии генов путём тестирования молекул РНК (мРНК) и их фрагментов в образцах.

Гибридизация с *ДНК-зондом* указывает на экспрессию определенного гена.

**ДНК/РНК -30НД** (англ. DNA/RNA probe или hybridisation probe) - фрагмент ДНК или РНК, меченный флуоресцентным, радиокативным или каким-то другим маркером и использующийся для гибридизации со специфическим участком молекулы ДНК/РНК.

Позволяет идентифицировать комплементарные ему нуклеотидные последовательности.

Процессы гибридизации происходят между любыми одинарными цепями, если они комплементарны: ДНК–ДНК, РНК–РНК, ДНК–РНК.

ДНК при температуре 94—100°С диссоциирует на 2 цепи, так как водородные связи между основаниями разрушаются. Этот процесс обратим: при температуре 65-70°С происходит восстановление структуры двойной спирали. Зонд добавляется при повышенной температуре и просоединяется с одноцепочной ДНК.

На основе гибридизации осуществляют анализ с помощью ДНК-чипов: аналитические (детектирующие) ДНК-зонды гибридизуются со специфическими последовательностями нуклеиновых кислот и, таким образом, выявляют их в исследуемых образцах.

Флуоресцентно-меченые зонды используются для проведения ПЦР в реальном времени, позволяющей детектировать количество ДНК в исследуемом образце.

Также флуоресцентные зонды используются при проведении флуоресцентной гибридизации in situ (FISH — Fluorescence in situ hybridization) — цитогенетического метода, который применяют для детекции и определения положения специфической последовательности ДНК на интактных («жизнеспособных») хромосомах.

В нанотехнологии ДНК-зонды используются при создании детектирующих систем нового поколения (ДНК-наночипы).

#### Ключевые требования к изоляции НК:

```
□ Количество:
    достаточное количество для ваших целей:
  ПЦР – малое количество (нг)
  Клонирование – среднее количество (µг)
  Генная терапия – гигантские количества (мг)
Качество:
  отсутствие склеивания (ширинга) и разрывов
  отсутствие суперспирализации плазмидной ДНК
□ Чистота:
  свободно от загрязнителей:
     нуклеаз (ДНКаз, РНКаз)
     белков
     ингибиторов (гуминовая кислота и др.)
     фенольных соединений (схожие спектр. сво-ва)
```

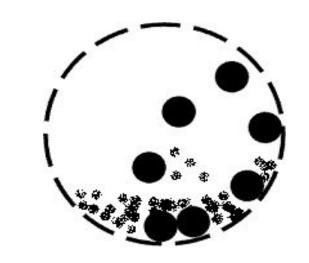
### Ключевые стадии изоляции НК:

- □ Лизирование (разрушение) клеток
- □ Депротеинизация (устранение белков)
- □ Очистка
- □ Концентрирование (осаждение)

#### Лизирование клеток:

#### Механическое/звуковое:

встряхивание со стеклянными шариками, французский пресс (через сито) замораживание/оттивание перетирание (например, в пудру в жидком азоте) озвучивание (баззер – ультразвуковой дезинтегратор)



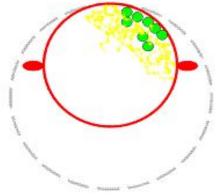
Ферментативное: лизоцим, целлюлазы и т.д.

Xимическое: SDS (sodium dodecyl sulfate)/NaOH

**CTAB** 

*Киты:* уанидиум изотиоцианат

Далее центрифугирование (удаление осадка – дебриса):





### Изоляция плазмидной ДНК

#### Щелочной лизис:

□При высоком рН ДНК денатурирует

Нейтрализация при высоком содержании солей

(в присутствие SDS)

хромосомальная ДНК ДНК с открытой цепью Клеточная РНК

белок

Остается денатурированной

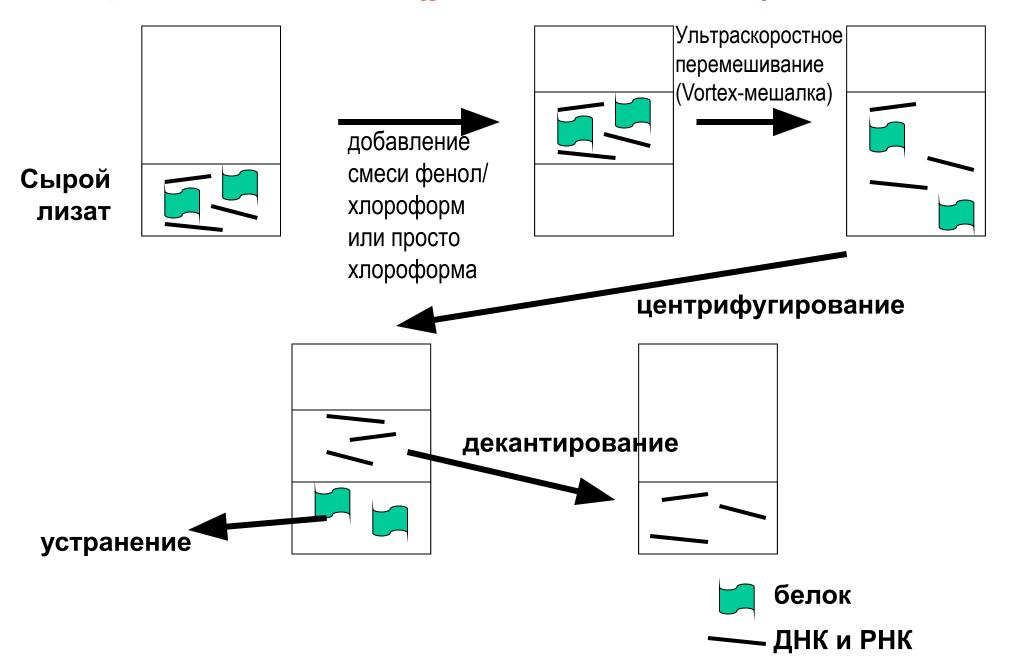
Оседает

Двухцепочная ковалетно-замкнутая кольцевая ДНК – т.е. плазмидная ДНК

Способна к ренатурации

Остается в растворе

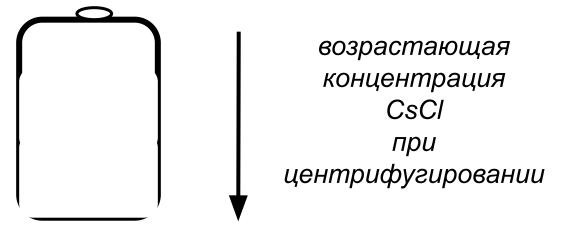
#### Депротеинизация (удаление белка)



### Очистка нуклеиновых кислот

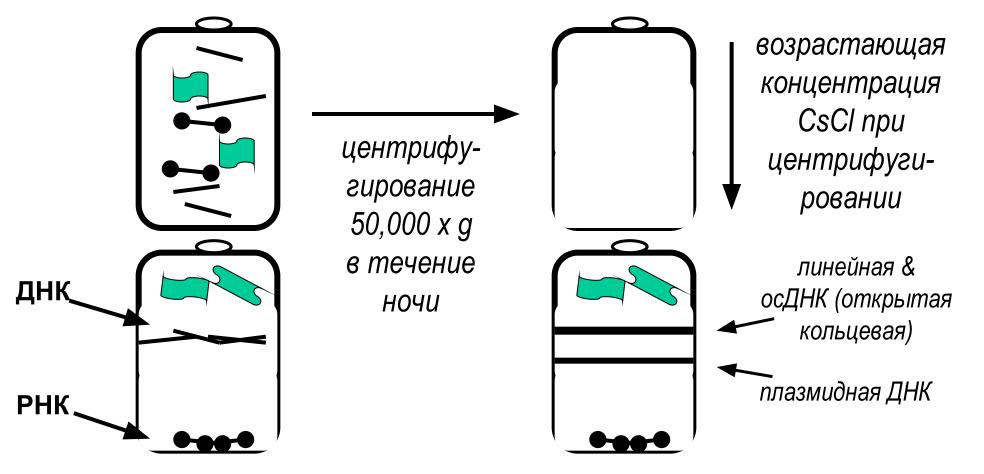
Центрифугирование в градиенте плотности EtBr/CsCl

Разделение ДНК на основе ее конформации



□ Макромолекулы в CsCl-градиенте формируют полосы в определенных зонах градиента в зависимости от их плотности («плавучей» плотности - buoyant density)

ДНК ~ 1.7 г/см<sup>3</sup> Белки имеют более низкую плотность РНК имеет более высокую плотность



□ Добавление этидиум-бромида (EtBr) используется для того, чтобы отобрать вирусную сссДНК (covalently closed circular DNA) и ос/линйеную ДНК 4EtBr встраивается между соседними парами оснований □ вызывает частино расплетание спирали □ это снижает плотность ДНК□сссДНК имеет очень ограниченные возможности к расплетанию □ соответственно, в присутствии EtBr ее плотность снижается меньше, чем у других форм ДНК и РНК

#### Очистка с использованием колонок

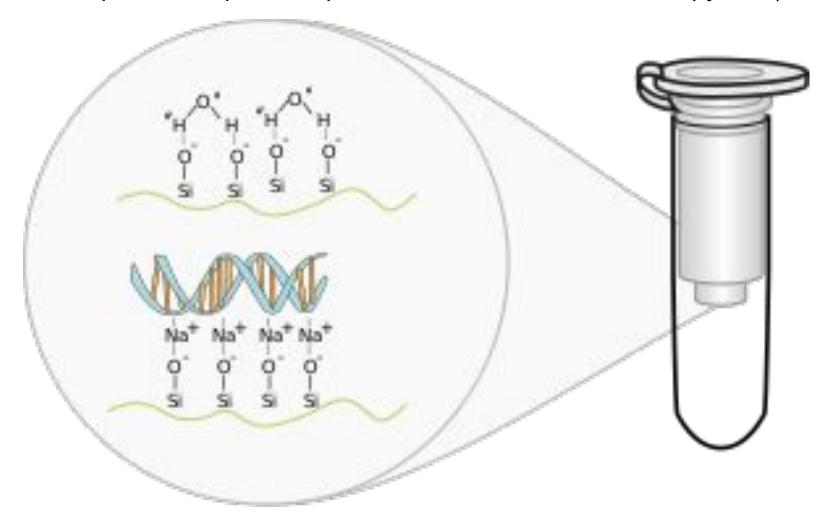
| □ Очистка на основе EtBr/CsCl является медленной и дорогой |
|--|
| □В последнее время развились системы колоночной очистки.   |
| Они основаны на силиконовом/силикагелевом (кремниевом)     |
| наполнителе.   |

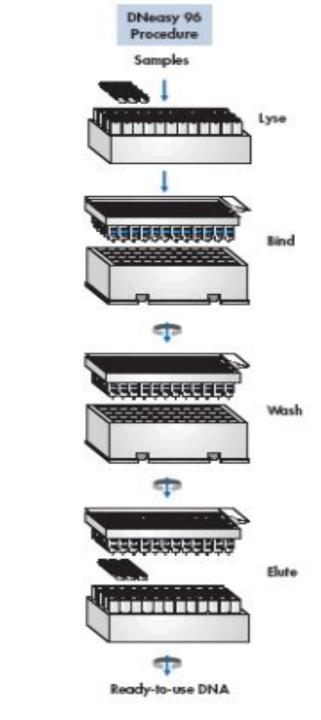
- В колонку вносят сырой экстракт ДНК, полученный при высокой концентрации солей. Он закрепляяется в колонке, которыую промывают устраняя белки и другую органику. Затем промывают раствором, открепляющим НК от оксида кремния.

## □ Это наиболее часто используемый метод в молекулярной биологии и биотехнологии:

- быстрый и дает высокое качество ДНК
- надежный, простой и быстрый
- процедуры могут быть роботизированы
- □ компании-производители колонок: Qiagen and Promega

НК связываются с твердой фазой (оксид кремния или другой наполнительсорбент) по-разному в зависимости от рН и содержания солей в буффере, которым может быть Трис-ЭДТА или фосфатный буффер (чаще используется при подготовки для ДНК-микроэррэй - DNA microarray, в связи с тем, что в Трисе содержатс\я реакционно-активные аминогруммы)





DNeasy Mini

Procedure

Sample

#### Типичные стадии протокола:

Образец помещается в колонку вместе со «связывающим раствором», который способствует тому, что НК связываются к сорбенту (кремнию) – в этом растворе низкое рН (при низком рН силаноловые группы кремния активны), добавлены ионы натрия и часто белок-денатурирующий агент – часто это гуанидин гидрохлорид (GdmCI), сильнейший детергент Triton X-100, изопропанол и рН-индикатор.

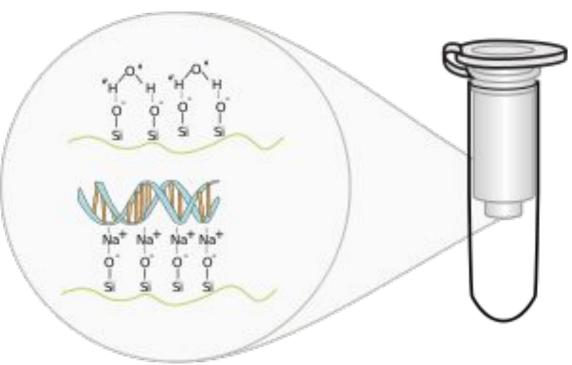
Колонка промывается раствором с высоким рН и низким содержанием соли (5 мМ КРО<sub>4</sub>, рН 8.0 или выше). НК отделяются от стенок и собираются в пробирку.

<u>Промывается 80-процентным спиртом для</u> очистки. Может быть использована несколько раз.



## Простой, быстрой и при этом недорогой протокол на основе колонок Qiagen







## Концентрирование НК

4Требуется для формирования больших количеств ДНК или РНК (µг):

□ Обычно достигается осаждением порций НК при помощи:

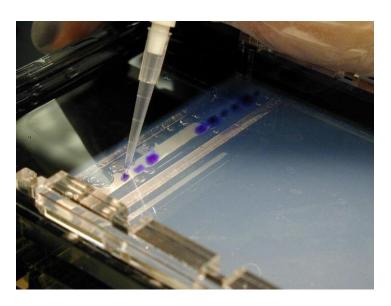
смеси изопропанола (+/-) с ацетатом аммония или

этанол /ацетат натрия (рН 4.8/5.2)

□затем вымывание 70% EtOH (этанолом)

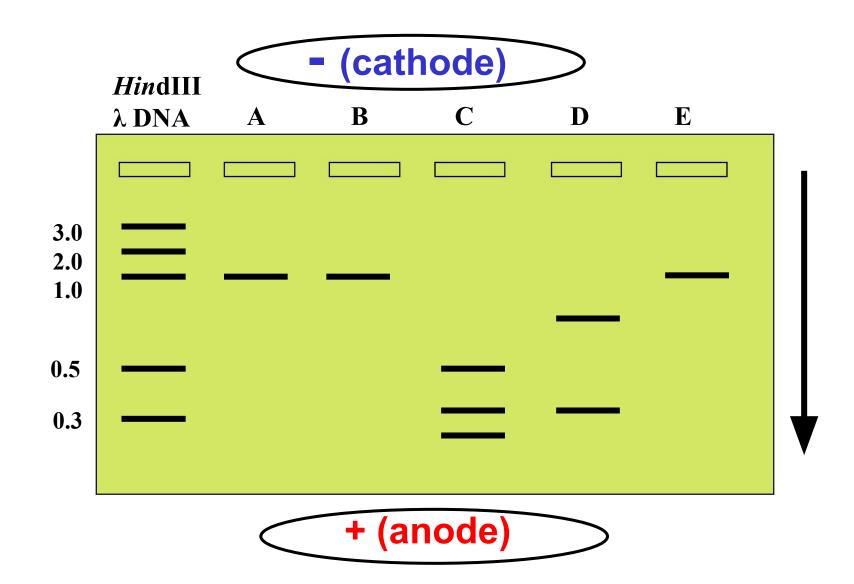
## Гельэлектрофорез





- □ Это разделение молекул на основе относительной миграции через гель в электрическом поле:
- □ ДНК заряжена отрицательно и мигрирует от катода к аноду через гелевый матрикс.
- □Два основных типа гель-электрофореза:
  - 1. Гель-электрофорез в агарозе
- обычно используется при разделении молекул НК размером от 100 kб to 100 бп
  - два варианта:
- \* пульс-гель электрофорез (PFGE) &
- \*\* гель электрофорез в инвертированном поле (FIGE) используется при разделении больших молекул (50-1000 kб)
- 2. Полиакриламидный гельэлектрофорез (PAGE)
- разрешение одиночных пар нуклеотидов

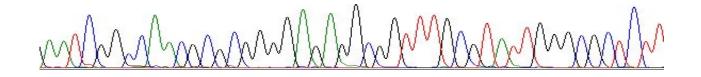
### Гель-электрофорез в агарозе

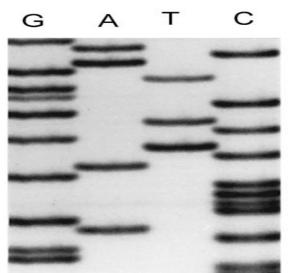


# Гель-электрофорез в полиакриламидном геле

Разрешение до отдельных пар нуклеотидов необходимо для секвенирования ДНК







Или для ДНК-фингерпринта, футпринта и т.д.

