

РНК-интерференция

Выделение и очистка нуклеиновых кислот



Некодирующие РНК:

Типы некодирующих ДНК:

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

Функции:

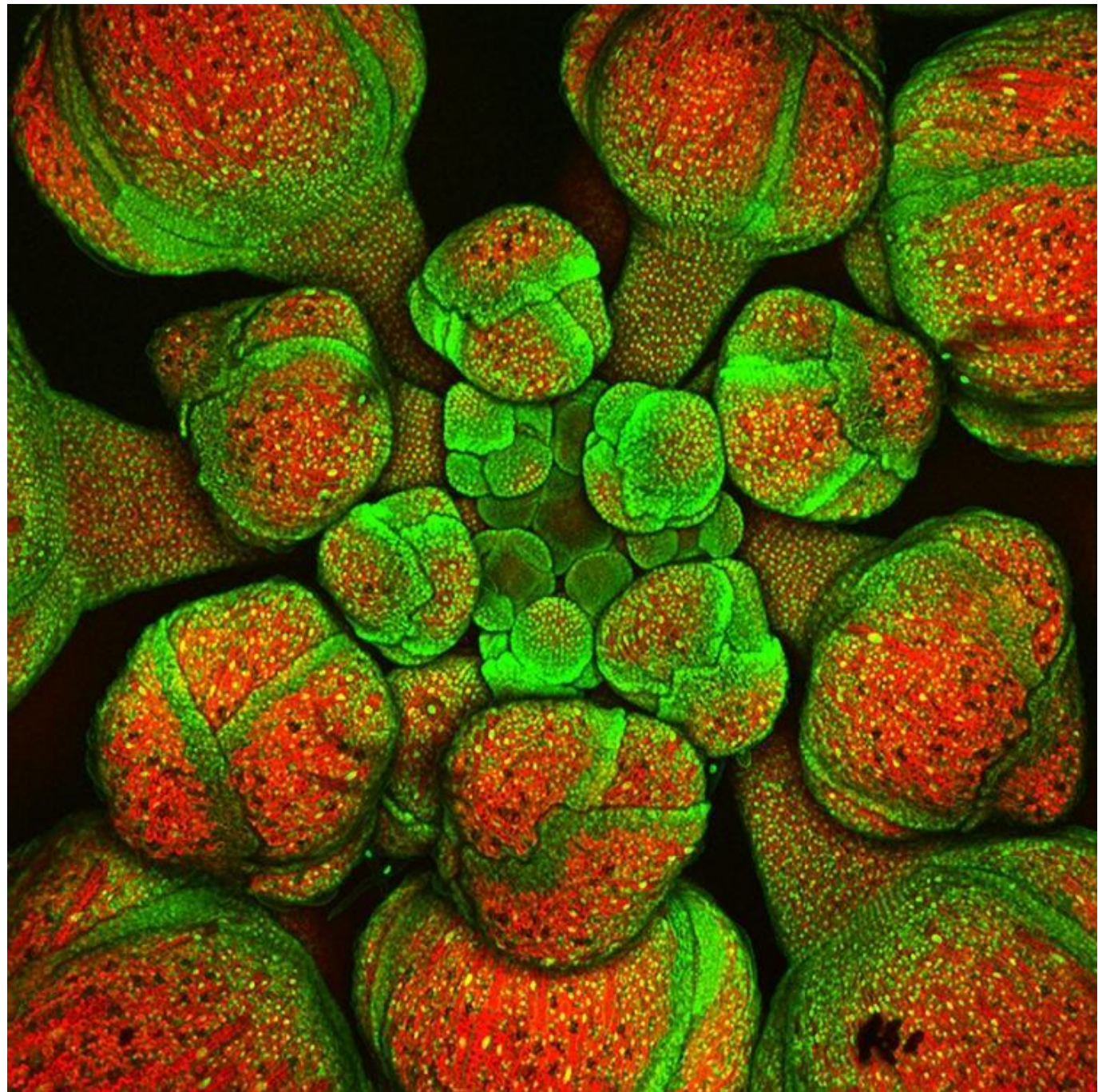
- Регуляция экспрессии генов, Защита генома, генетические переключатели, факторы транскрипции, операторы, энхансеры, инсуляторы

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 микроРНК) – 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,
препятствующие
синтезу белка «А»
можно вводить в
плазмиду, которая
может содержать
ген, кодирующий
ЗФБ.
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

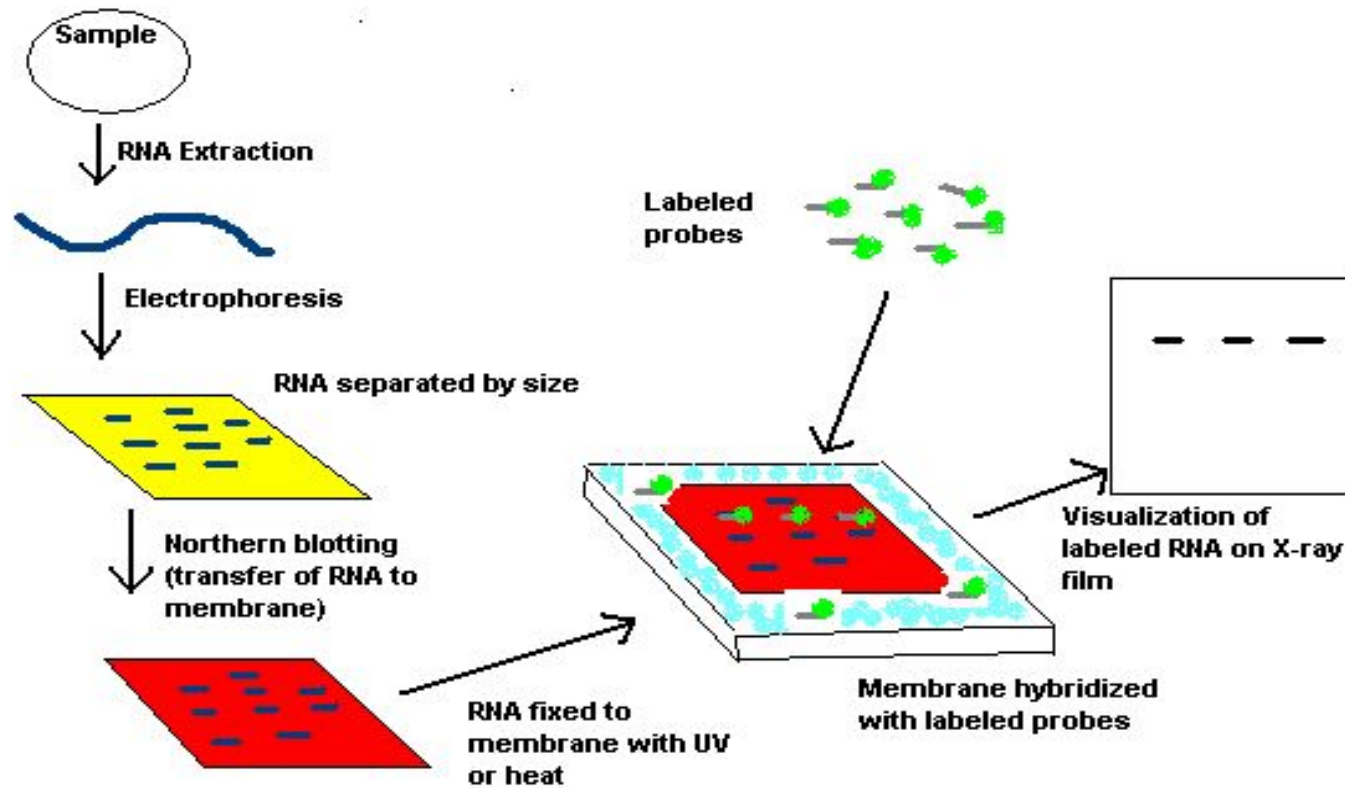
ДНК-гибридизация

ДНК-мутагенез

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

Анализ экспрессии РНК (Northern) – 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 -зонд (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°C диссоциирует на 2 цепи, так как водородные связи между основаниями разрушаются. Этот процесс обратим: при температуре 65-70°C 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 (шпринга) 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
- Депротейнизация (устранение белков)
- Очистка
- Концентрирование (осаждение)

Лизирование клеток:

Механическое/звуковое:

встряхивание со стеклянными шариками,

французский пресс (через сито)

замораживание/оттаивание

перетирание (например, в пудру в жидком азоте)

озвучивание (баззер – ультразвуковой дезинтегратор)

Ферментативное: лизоцим, целлюлазы и т.д.

Химическое: SDS (*sodium dodecyl sulfate*)/NaOH

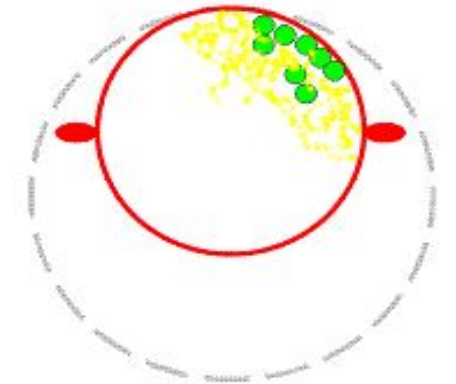
СТАВ

Киты:

www.promega.com

Гуанидиум изотиоцианат

Далее центрифугирование
(удаление осадка – дебриса):



Изоляция плазмидной ДНК

Щелочной лизис:

□ При высоком pH ДНК денатурирует

□ Нейтрализация при высоком содержании солей
(в присутствии SDS)

хромосомальная ДНК
ДНК с открытой цепью
Клеточная РНК
белок



Остается денатурированной



Оседают

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

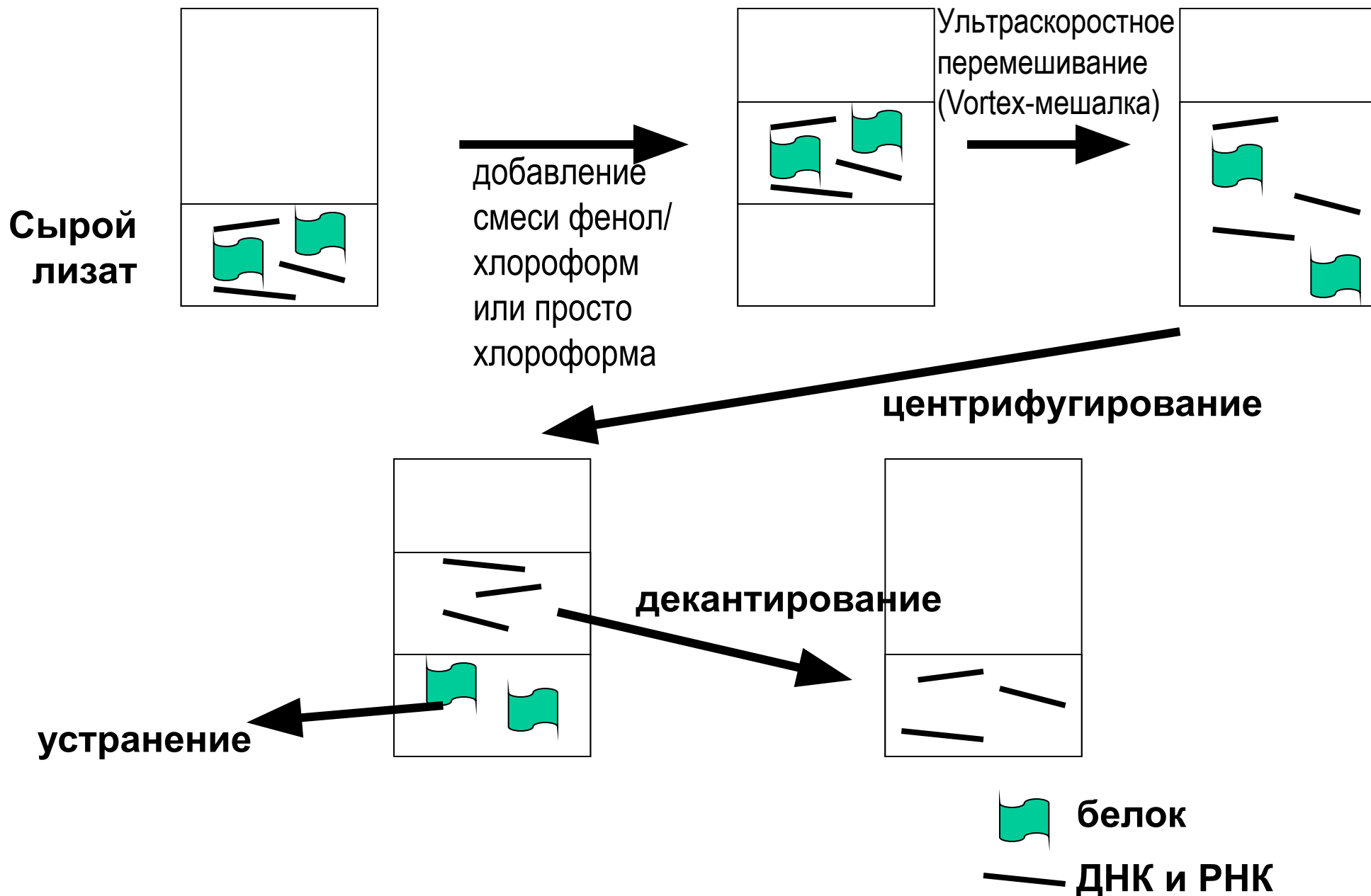


Способна к ренатурации



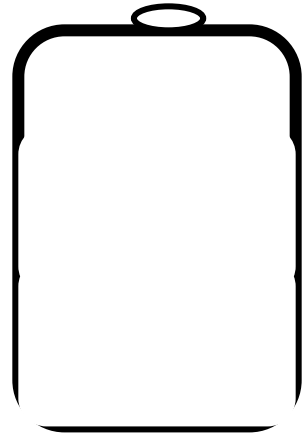
Остается в растворе

Депротейнизация (удаление белка)



Очистка нуклеиновых кислот

Центрифугирование в градиенте плотности EtBr/CsCl
Разделение ДНК на основе ее конформации



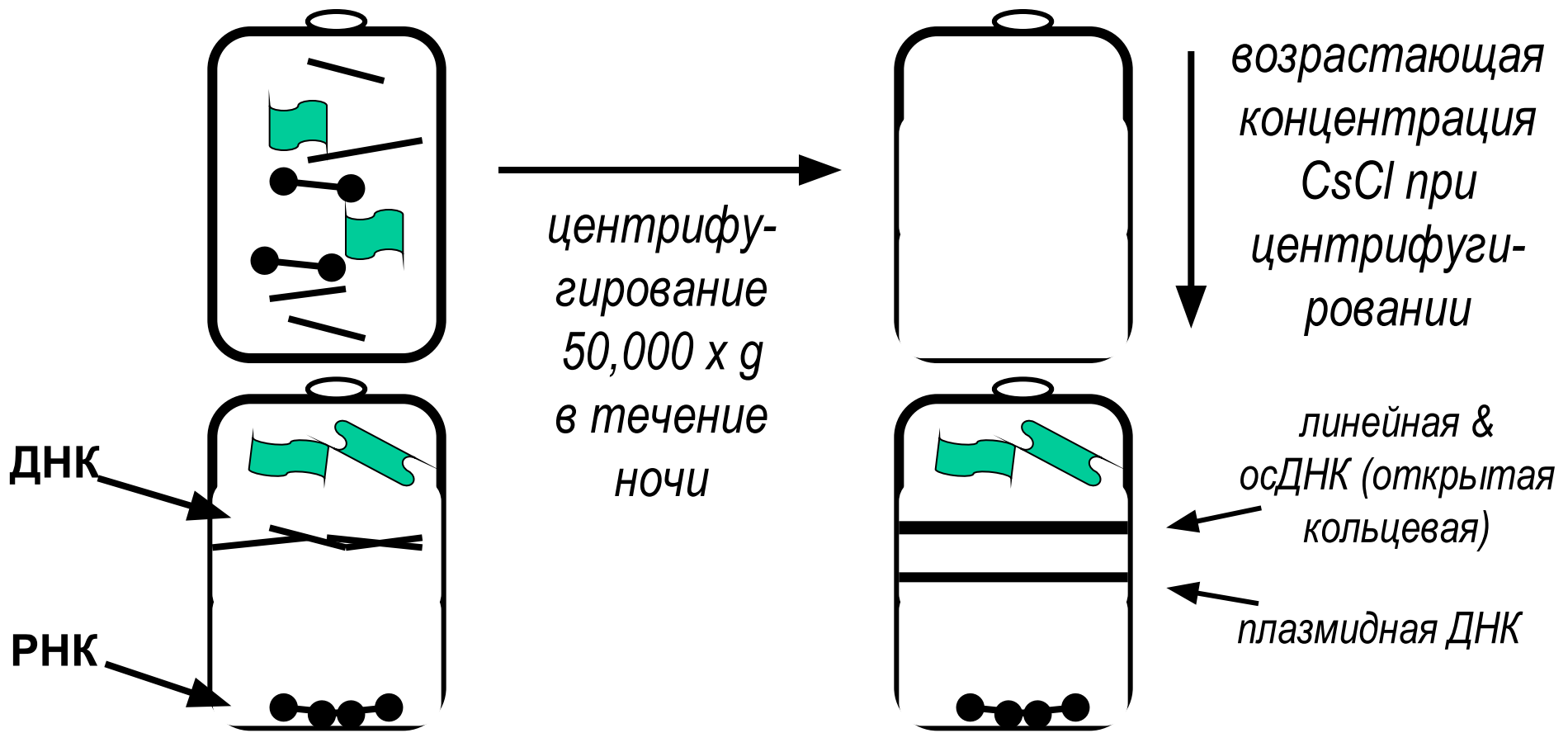
*возрастающая
концентрация
CsCl
при
центрифугировании*

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

ДНК ~ 1.7 г/см³

Белки имеют более низкую плотность

РНК имеет более высокую плотность



□ Добавление этидиум-бромиды (EtBr) используется для того, чтобы отобрать вирусную сссДНК (covalently closed circular DNA) и ос/линейную ДНК

4EtBr встраивается между соседними парами оснований □ вызывает частично 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.

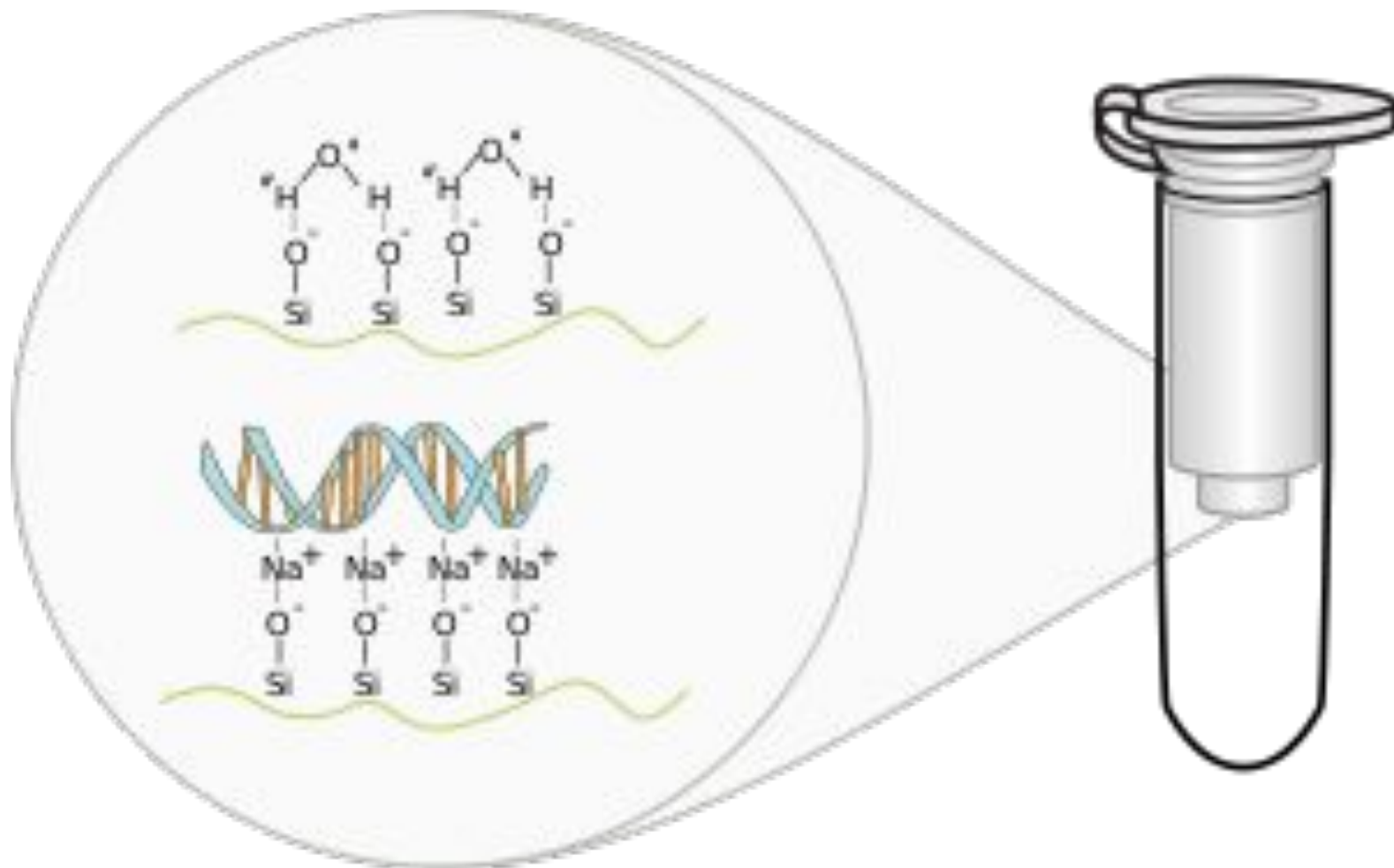
- В колонку вносят сырой экстракт ДНК, полученный при высокой концентрации солей. Он закрепляется в колонке, которую промывают устраняя белки и другую органику. Затем промывают раствором, открепляющим НК от оксида кремния.

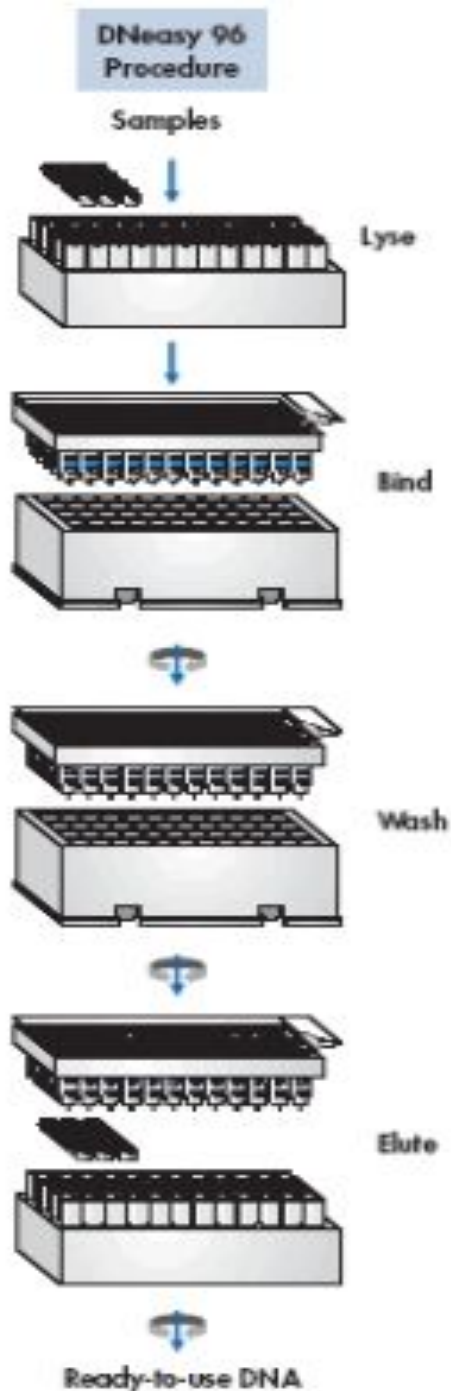
Это наиболее часто используемый метод в молекулярной биологии и биотехнологии:

- 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 наполнитель-сорбент) по-разному в зависимости от pH и содержания солей в буфере, которым может быть Трис-ЭДТА или фосфатный буфер (чаще используется при подготовки для ДНК-микрочипа - DNA microarray, в связи с тем, что в Трисе содержатся реакционно-активные аминокислоты)





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 (GdmCl), сильнейший детергент Triton X-100, изопропанол и рН-индикатор.

Колонка промывается раствором с высоким рН и низким содержанием соли (5 мМ KPO_4 , рН 8.0 или выше). НК отделяются от стенок и собираются в пробирку.

Промывается 80-процентным спиртом для очистки. Может быть использована несколько раз.

Роботизация процесса выделения НК

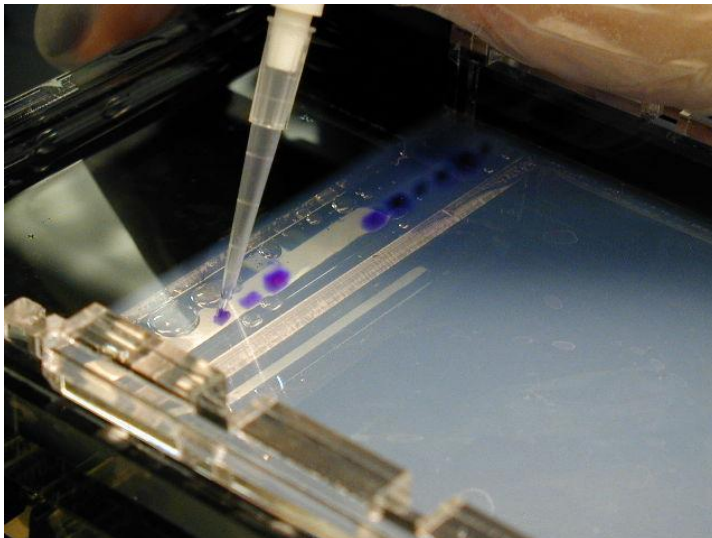


Концентрирование НК

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

- Обычно достигается осаждением порций НК при помощи:
 - смеси изопропанола (+/-) с ацетатом аммония
 - или
 - этанол /ацетат натрия (pH 4.8/5.2)
- затем вымывание 70% EtOH (этанолом)

Гель-электрофорез



□ 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 кб to 100 бп

- два варианта:

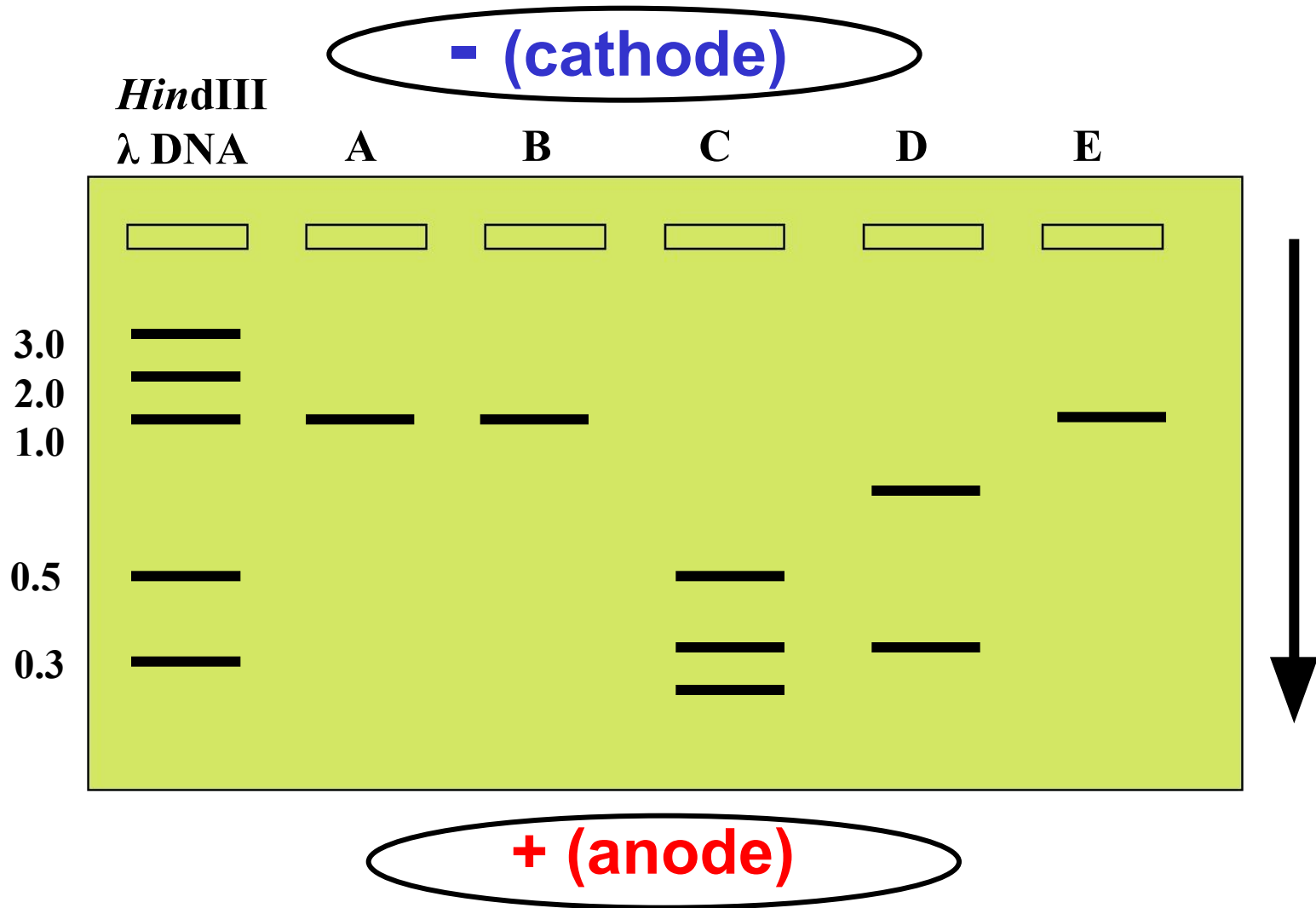
* пульс-гель электрофорез (PFGE) &

** гель электрофорез в инвертированном поле (FIGE) - используется при разделении больших молекул (50-1000 кб)

2. Полиакриламидный гель-электрофорез (PAGE)

- разрешение одиночных пар нуклеотидов

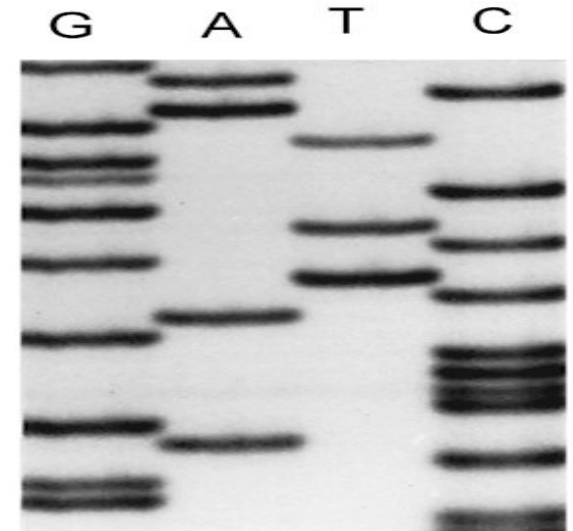
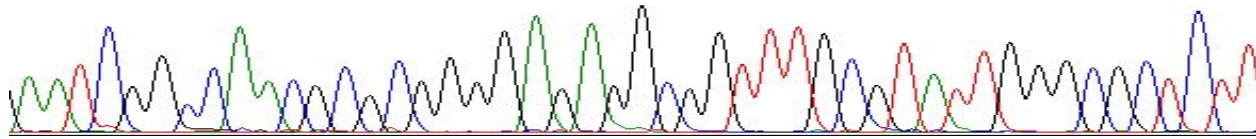
Гель-электрофорез в агарозе



Гель-электрофорез в полиакриламидном геле

Разрешение до отдельных пар нуклеотидов необходимо для секвенирования ДНК

A A T C G G C C A A C G C G C G G G G A G A G G C G G T T T G C G T A T T G G G C G C T C T T
300 310 320 330 340



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

