РНК-интерференция
Выделение и очистка нуклеиновых кислот

Некодирующие РНК:

Типы некодирующих ДНК:

1. Некодирующая функциональная РНК (рибосомальная РНК, транспортная РНК, Piwi-РНК – 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

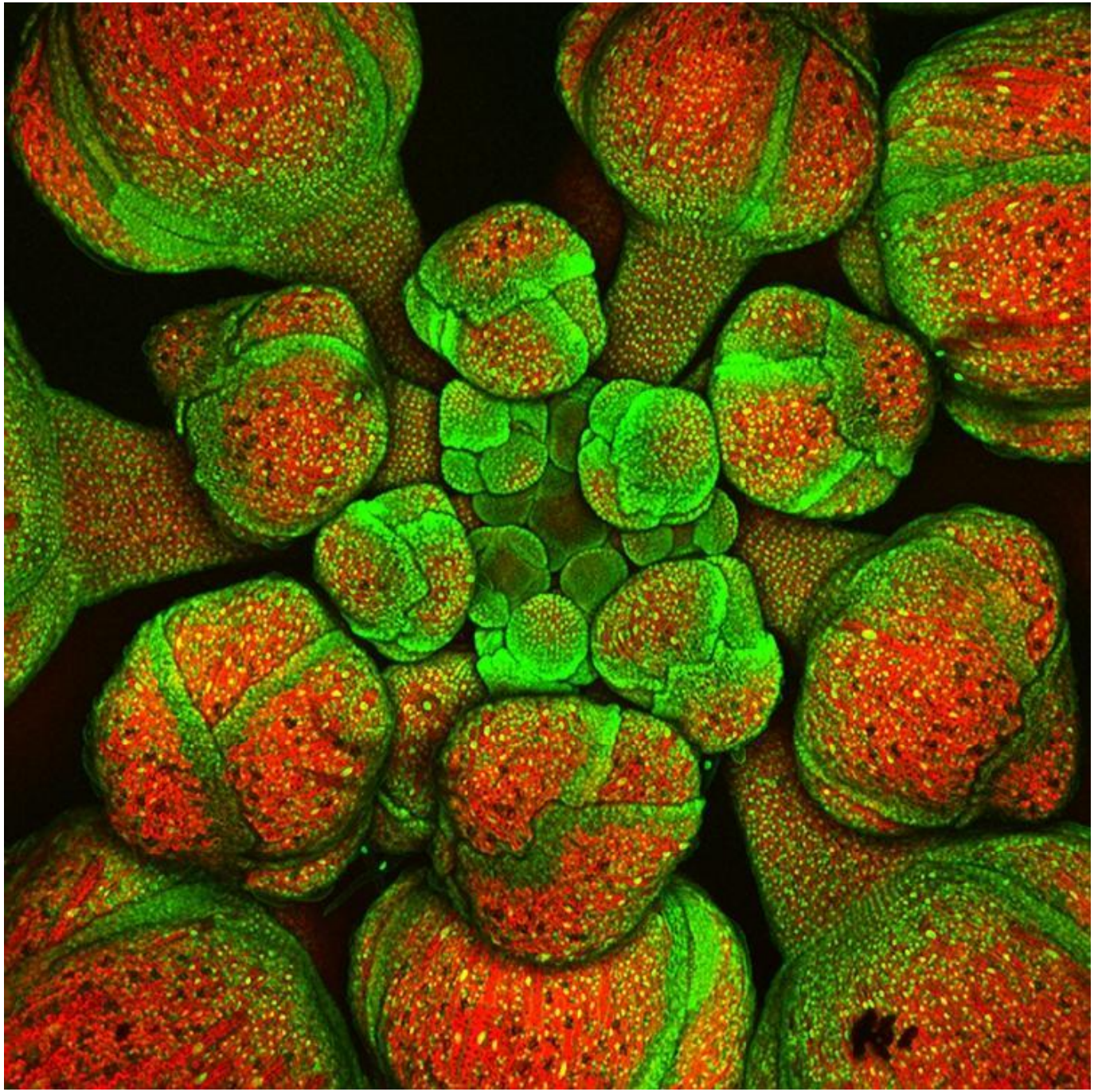
МикроРНК

- 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 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)

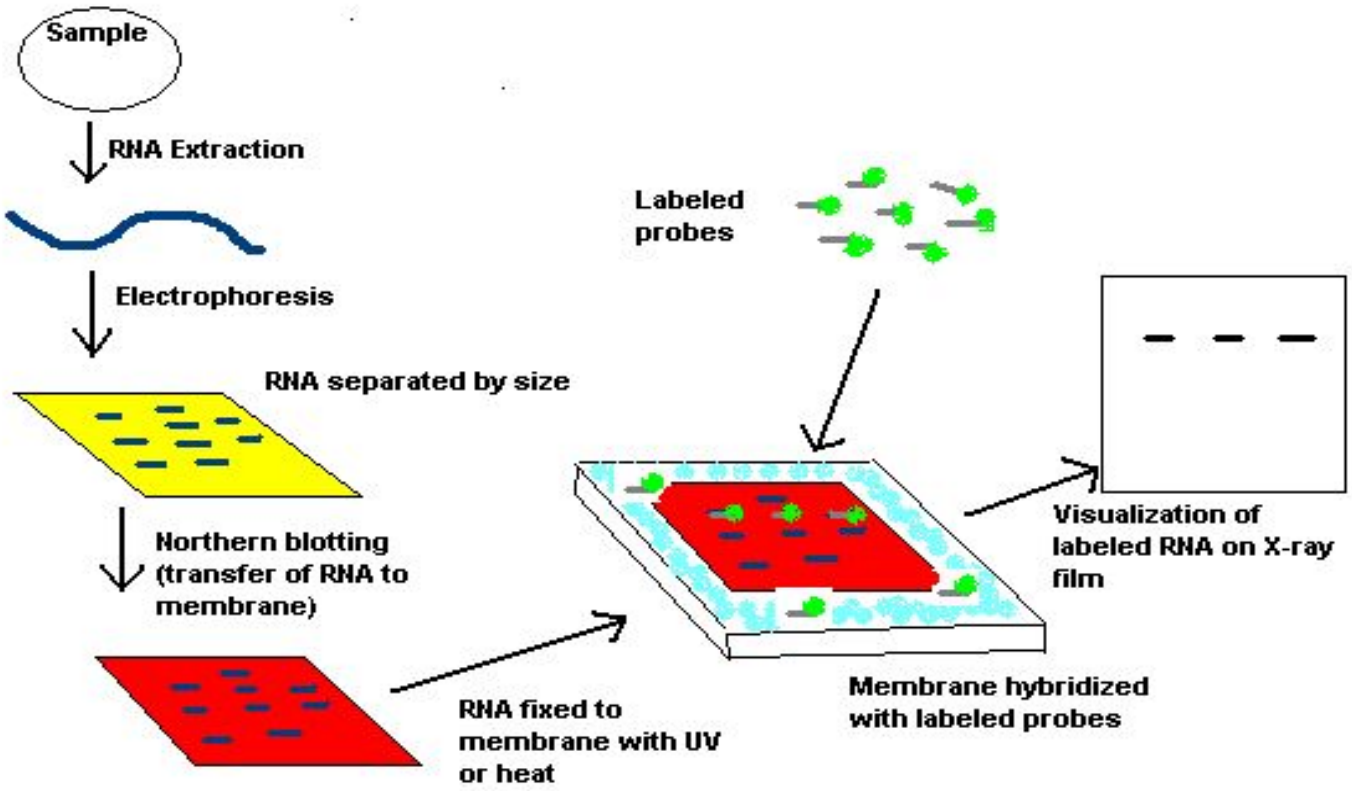
Для чего нужна изоляция НК?

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. 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 -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 (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)

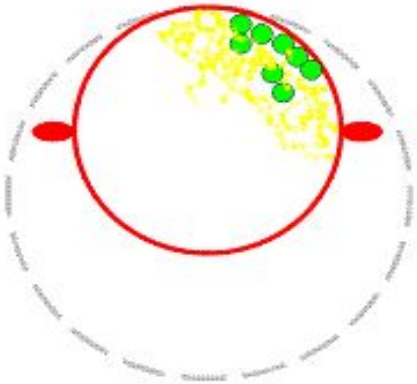
Ферментативное: лизоцим, целлюлазы и т.д.

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

CTAB

Гуанидиум изотиоцианат

Киты:
www.promega.com



Далее центрифугирование
(удаление осадка – дебриса):

Изоляция плазмидной ДНК

Щелочной лизис:

- **При высоком pH 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

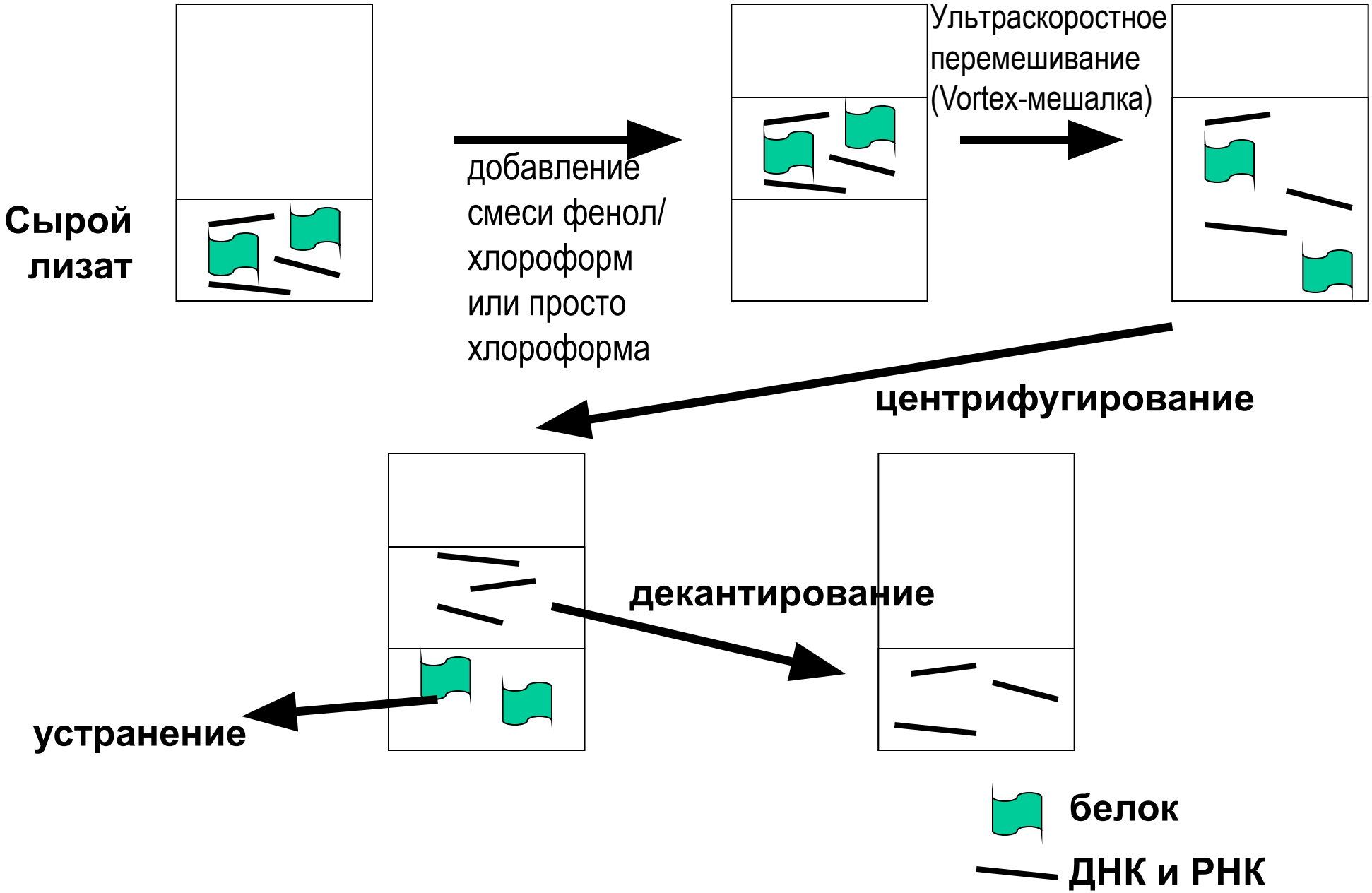
↓

Способна к ренатурации

↓

Остается в растворе

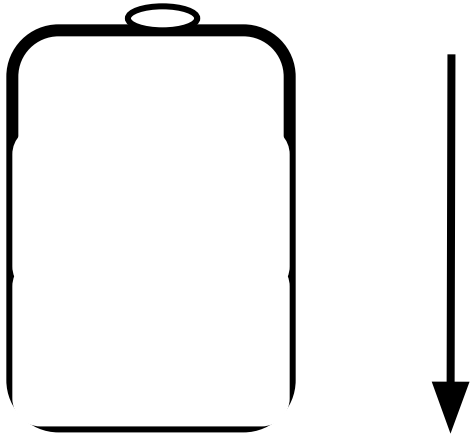
Депротеинизация (удаление белка)



Очистка нуклеиновых кислот

Центрифугирование в градиенте плотности EtBr/CsCl

Разделение ДНК на основе ее конформации



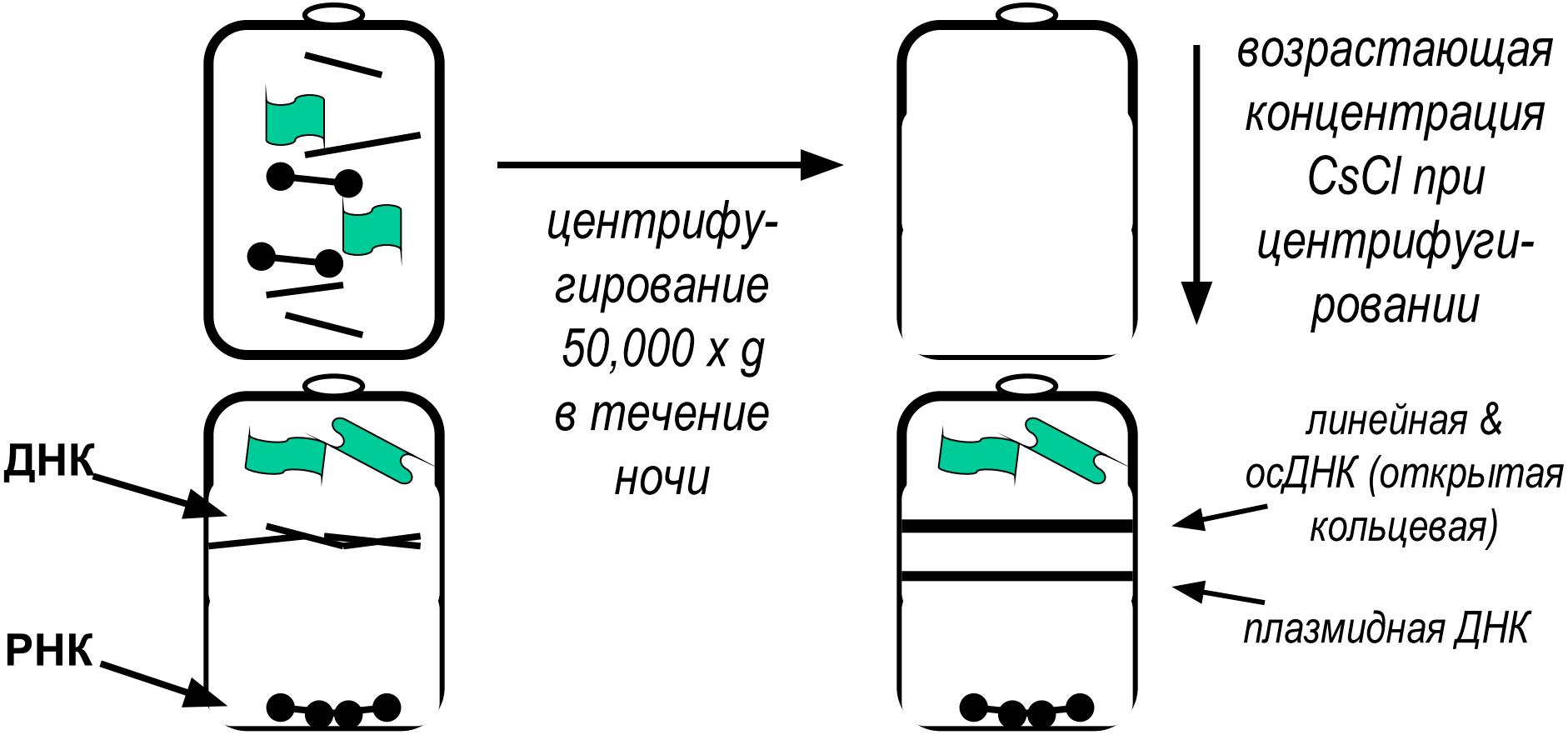
возрастающая концентрация CsCl при центрифугировании

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

ДНК ~ 1.7 г/см^3

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

4 EtBr встраивается между соседними парами оснований вызывает частино расплетание спирали это снижает плотность ДНКсссДНК 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

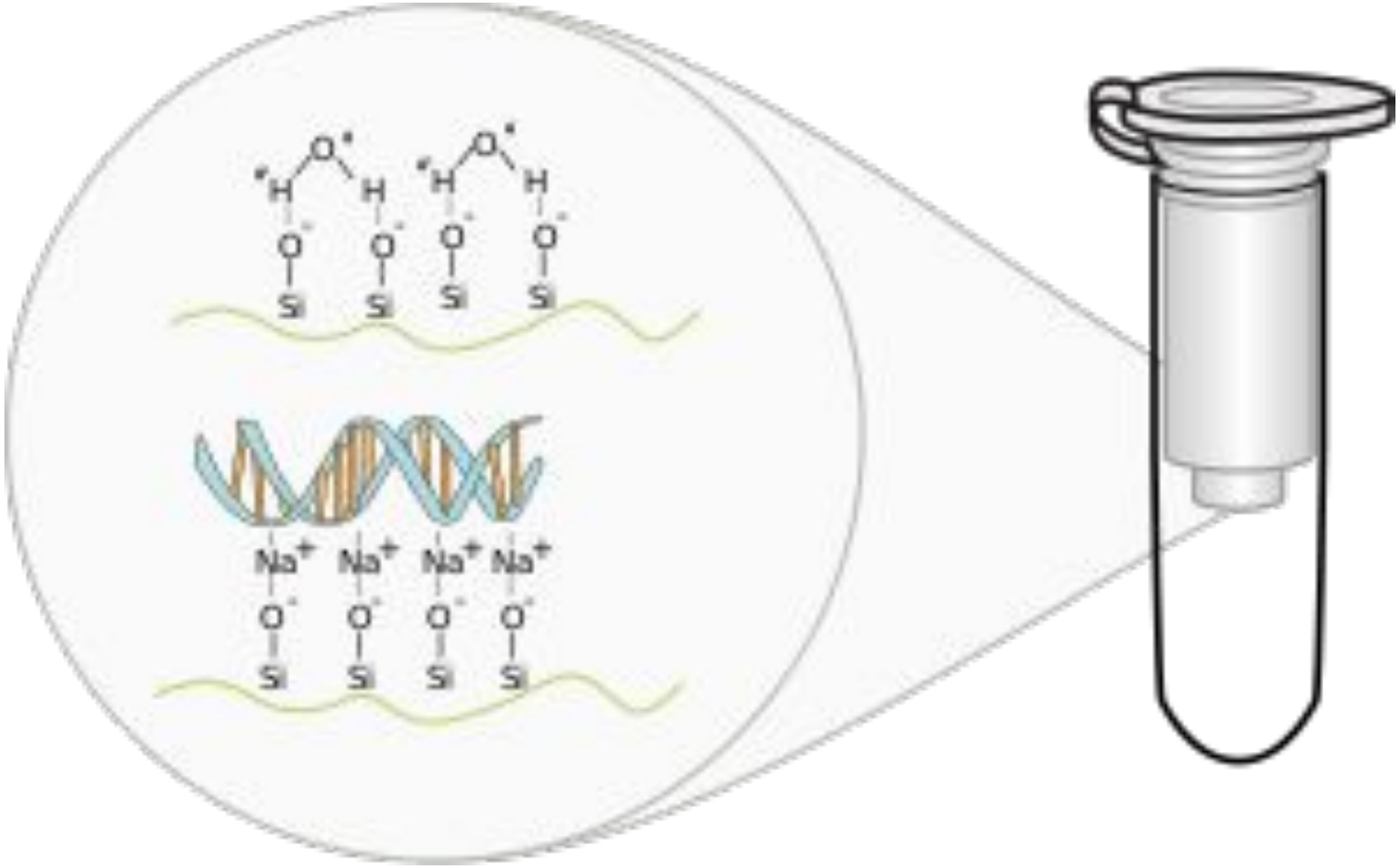
- Очистка на основе EtBr/CsCl является медленной и дорогой
- В последнее время развились **системы колоночной очистки**. Они основаны на силиконовом/силикагелевом (кремниевом) наполнителе.

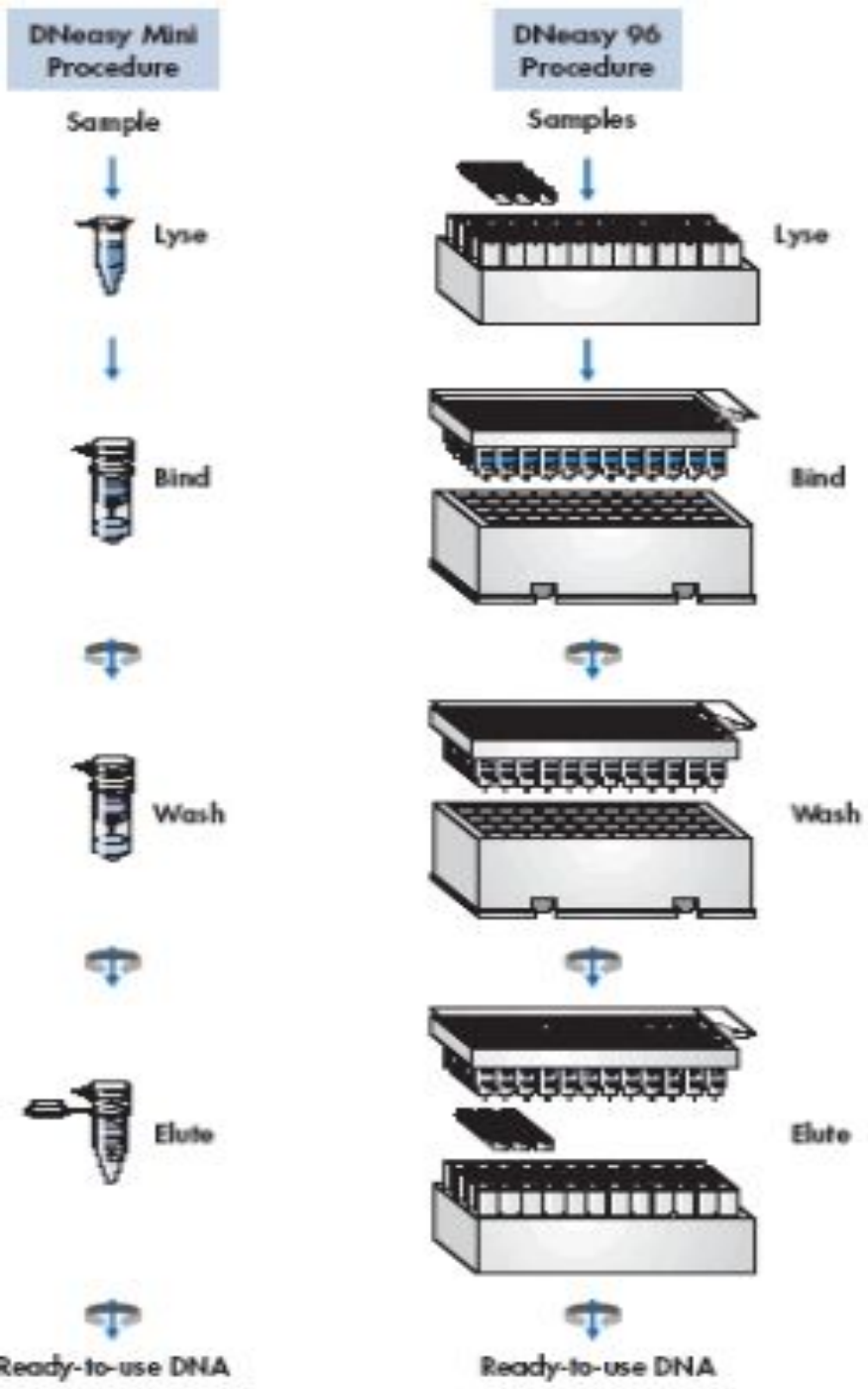
  - *В колонку вносят сырой экстракт ДНК, полученный при высокой концентрации солей. Он закрепляется в колонке, которыую промывают устраняя белки и другую органику. Затем промывают раствором, открепляющим НК от оксида кремния.*

- **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 наполнитель-сорбент) по-разному в зависимости от pH 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)





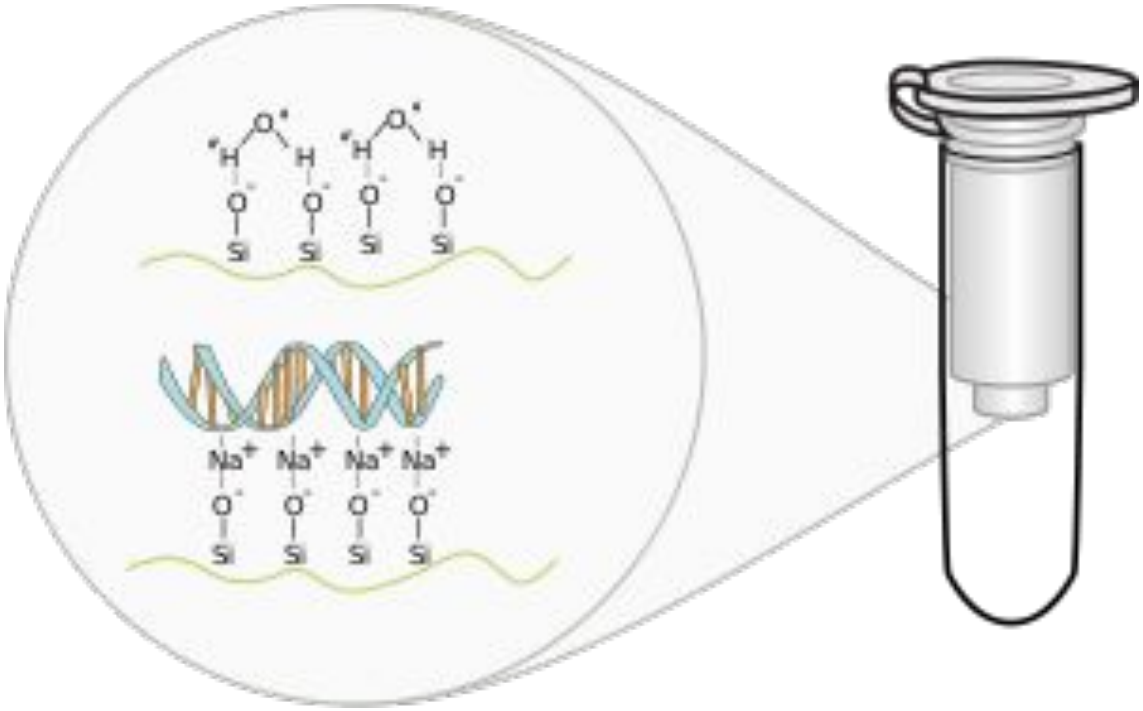
Типичные стадии протокола:

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

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

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

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



Роботизация процесса выделения НК

Концентрирование НК

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

- Обычно достигается осаждением порций НК при помощи:

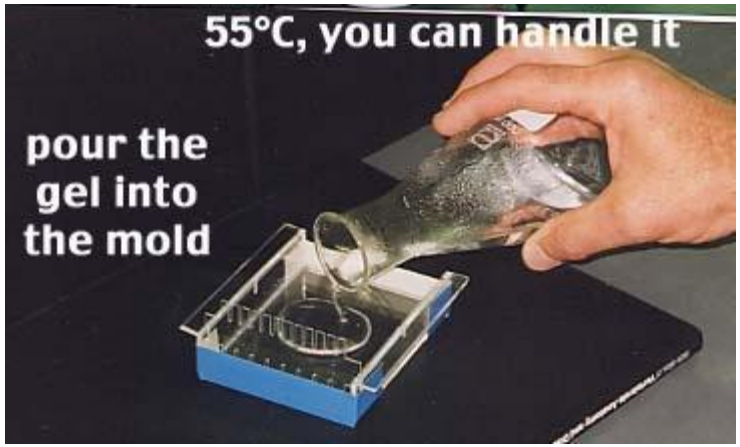
  смеси изопропанола (+/-) с ацетатом аммония

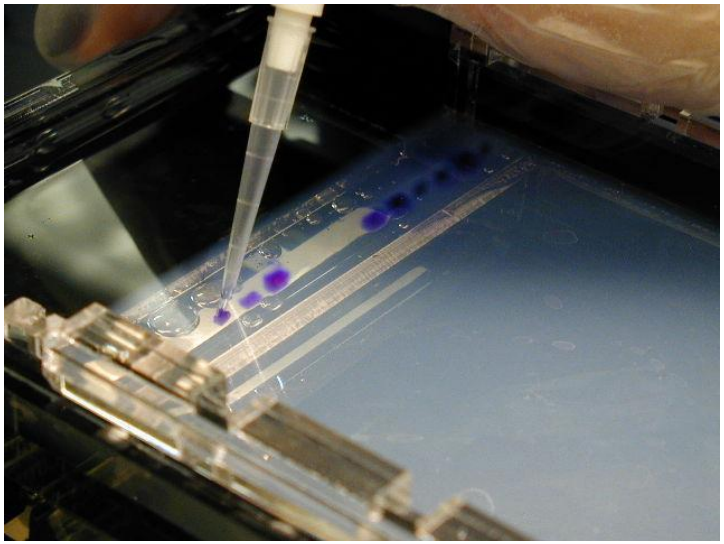
  или

  этанол /ацетат натрия (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 kб to 100 бп

- два варианта:

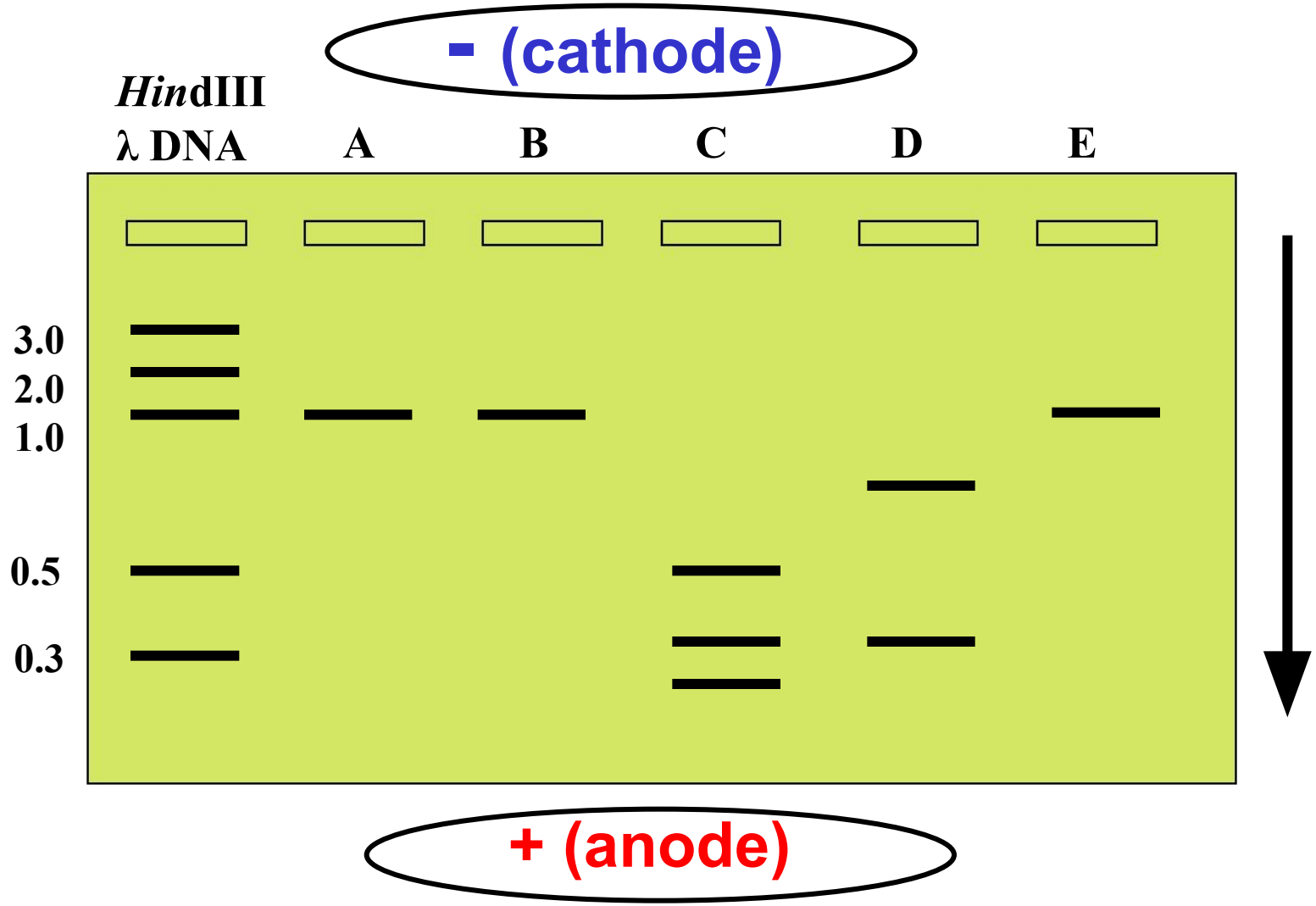
*** пульс-гель электрофорез (PFGE) &**

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

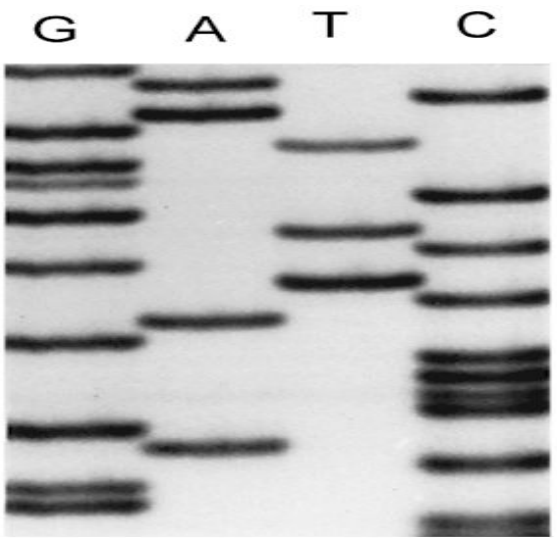
2. Полиакриламидный гель-электрофорез (PAGE)

- разрешение одиночных пар нуклеотидов

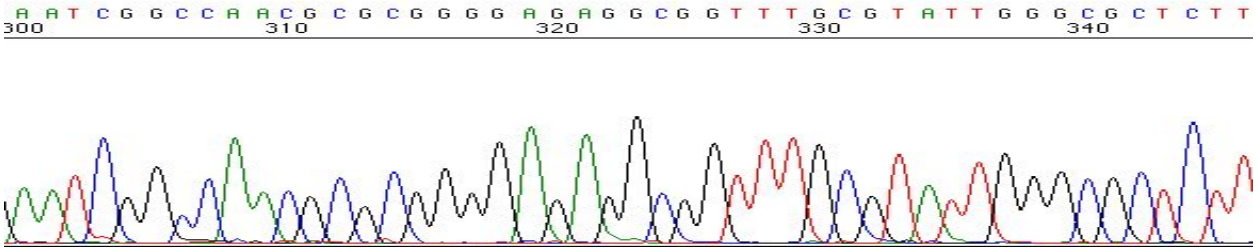
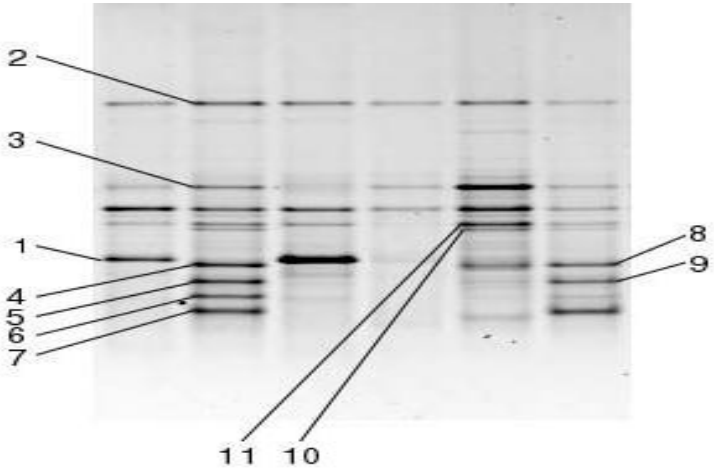
Гель-электрофорез в агарозе



Гель-электрофорез в полиакриламидном геле



Разрешение до отдельных пар нуклеотидов необходимо для секвенирования ДНК



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