

Вспомогательные методы технологии рекомбинантной ДНК

- 1. Секвенирование ДНК**
- 2. Денатурация и ренатурация ДНК**
- 3. Гибридизация нуклеиновых кислот в растворе.**
- 4. Блотинг – иммобилизация нуклеиновых кислот или белков на твердой подложке**
- 5. Гибридизация нуклеиновых кислот на чипах**

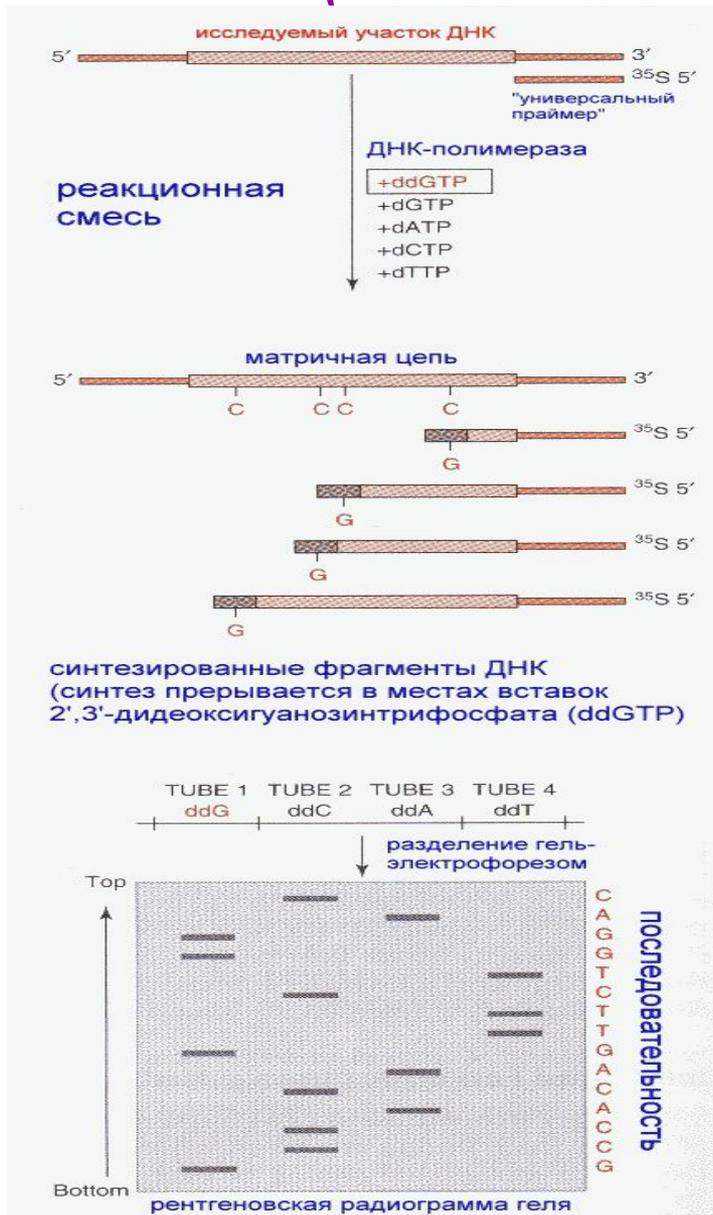
Секвенирование ДНК: методы определения последовательности фрагментов нуклеиновых кислот

Общий принцип:

проводят
сравнение длин всех возможных концевых продуктов,
полученных из исходного фрагмента таким образом, что
все они имеют на одном конце одну и ту же
последовательность, а на другом – один и тот же
нуклеотид.

Современным методом определения нуклеотидной
последовательности ДНК является
метод обрыва цепи (англ. *chain termination method*)
(метод Ф. Сэнгера [F. Sanger])

Секвенирование ДНК по Сэнгеру (метод полимеразного копирования)

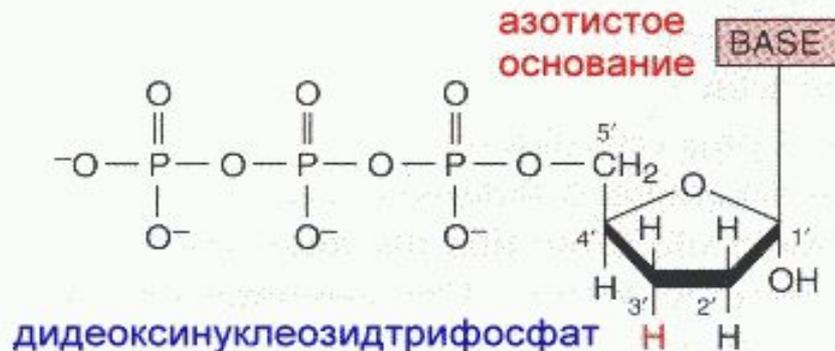
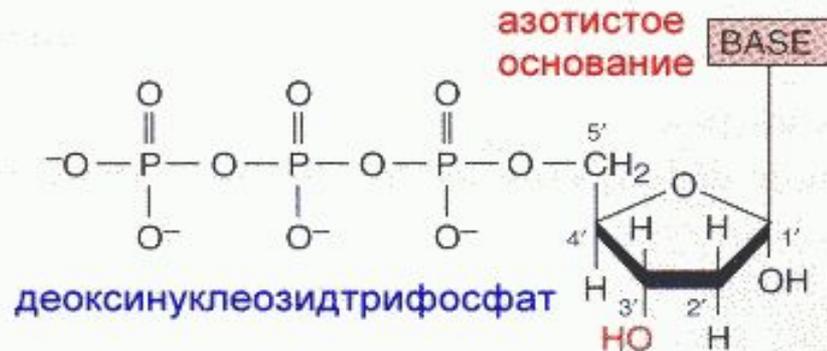


- I. Прежде всего фрагмент ДНК клонируют в *фаге M13*, из которого легко выделяют *однонитевую ДНК*.
- II. Ее гибридизуют с короткой ДНК, называемой *праймером*, которая связывается с 3'-концом однонитевой ДНК.
- III. Затем к полученной матрице добавляют *четыре дезоксирибонуклеозидтрифосфата дНТФ (dNTP)*:
 - δATP (dATP),
 - δGTP (dGTP),
 - δTTP (dTTP),
 - δCTP (dCTP).

Секвенирование ДНК по Сэнгеру (продолжение)

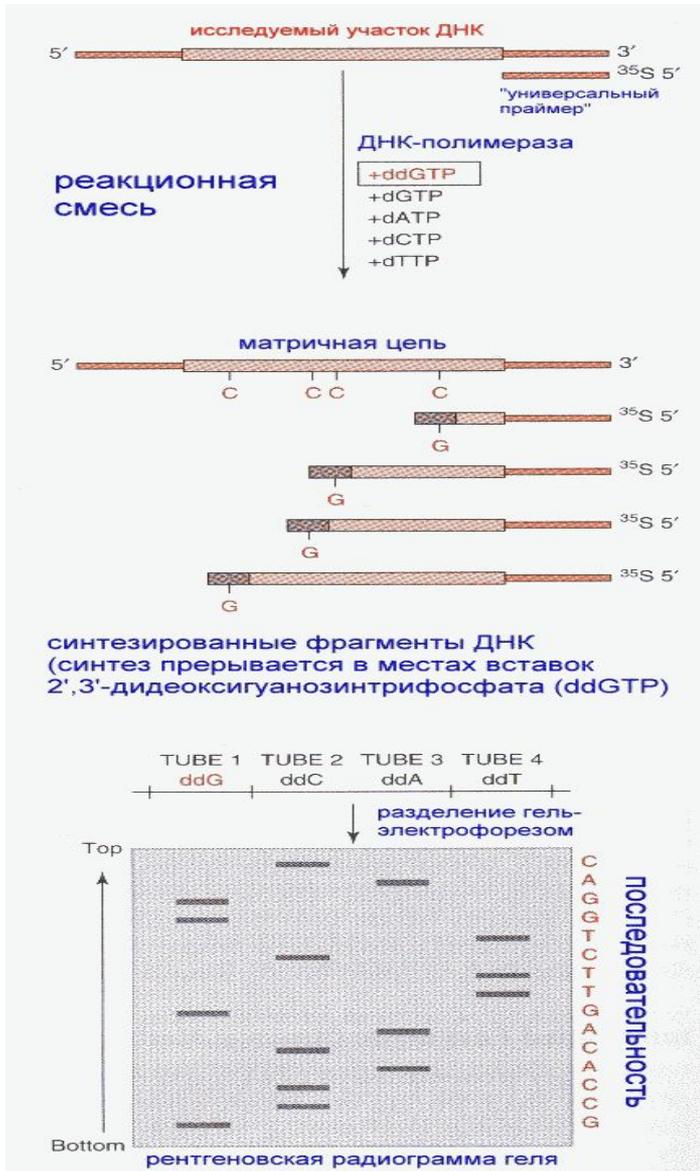
IV. Кроме $dNTP$ в реакционную смесь добавляют один из четырех

дидезоксирибонуклеозидтрифосфатов [$ddNTP$ ($ddNTP$)].



$ddNTP$ ($ddNTP$) – это полученный искусственным путем нуклеотид, лишенный 2'- и 3'-гидроксильных групп при углеродных атомах рибозы

Секвенирование ДНК по Сэнгеру (продолжение)



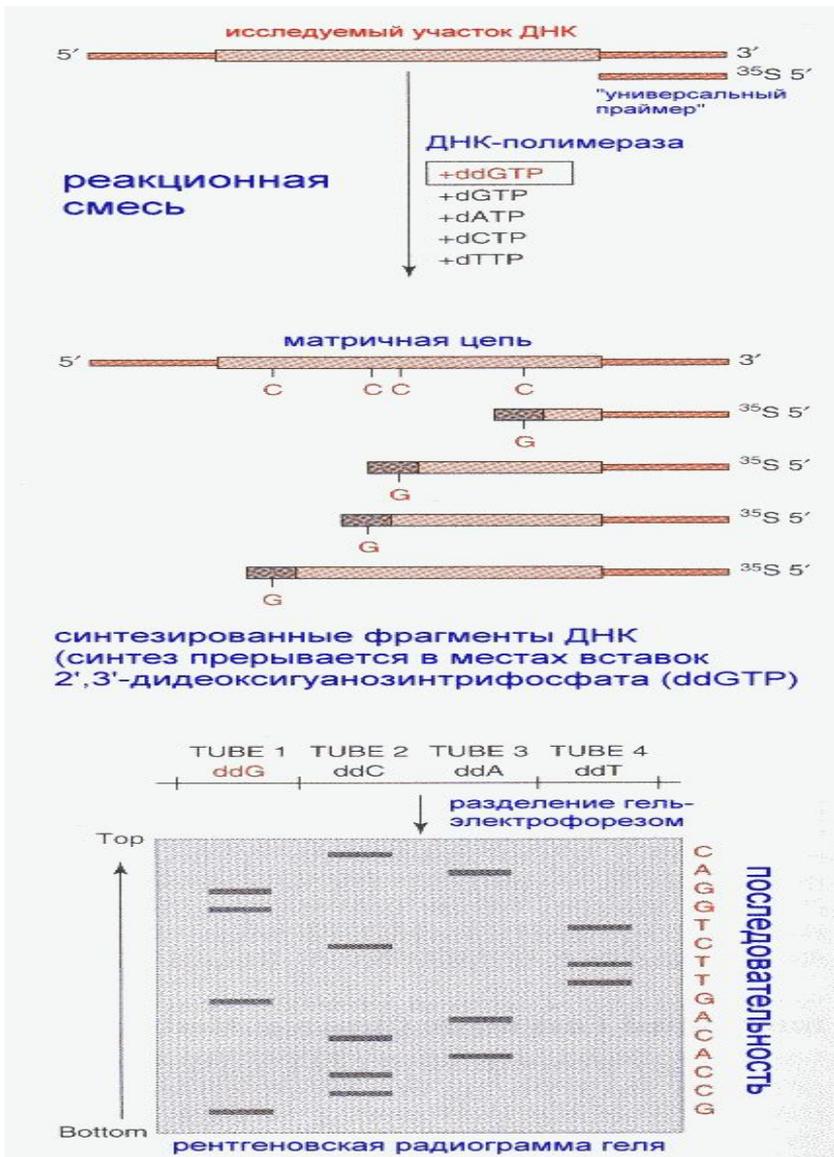
V. Затем с помощью **ДНК-полимеразы** ведут синтез **второй (комплементарной) цепи ДНК**.

Остановка синтеза (обрыв цепи) будет происходить всякий раз, когда вместо **dNTP** в растущую цепь ДНК будет встраиваться соответствующий ему **ddNTP**.

VI. Для определения последовательности нуклеотидов необходимо поставить **4 отдельные реакции** в присутствии **каждого из четырех ddNTP**.

Соотношение концентраций **dNTP** и **ddNTP** подбирают с таким расчетом, чтобы **ddNTP** оказался включенным по всем позициям в смеси растущих цепей. В результате, если в пробирке содержится **ddGTP**, то к концу реакции в ней оказывается набор всех возможных полинуклеотидов, начинающихся с 5'-концевого нуклеотида-праймера и заканчивающихся **дидезоксигуанозином (ddGTP)**.

Секвенирование ДНК по Сэнгеру (продолжение)

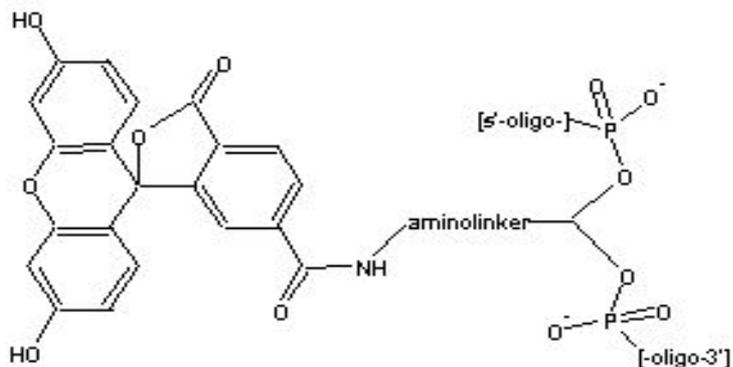


VII. Затем **четыре пробы** вносят в соседние лунки пластины геля и проводят **гель-электрофорез**.

Длина пробега каждого компонента **обратно пропорциональна** длине цепи ДНК.

VIII. Как только фрагменты ДНК визуализированы, **нуклеотидную последовательность** можно прочесть прямо в геле снизу по направлению к старту в соответствии с очередностью, в которой фрагменты располагаются на отдельных «дорожках».

Автоматическое секвенирование

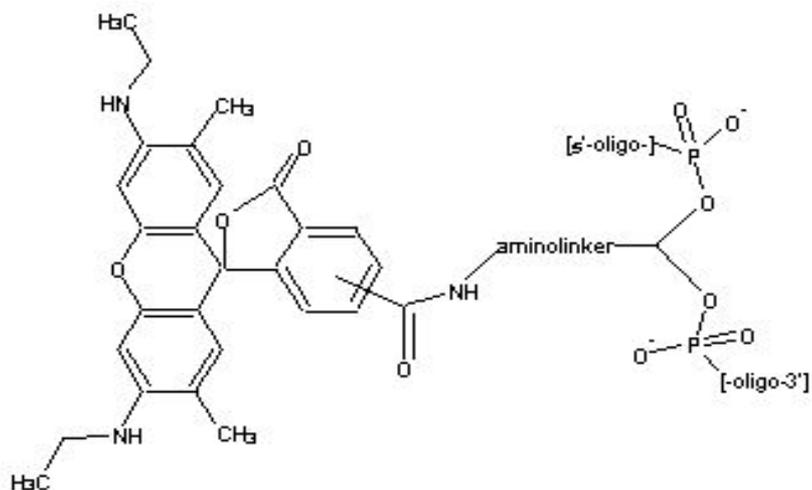


- С введением в практику **флуоресцентных меток** достигнут серьезный прогресс в автоматизации процесса секвенирования.

ФЛУОРЕСКАМИН

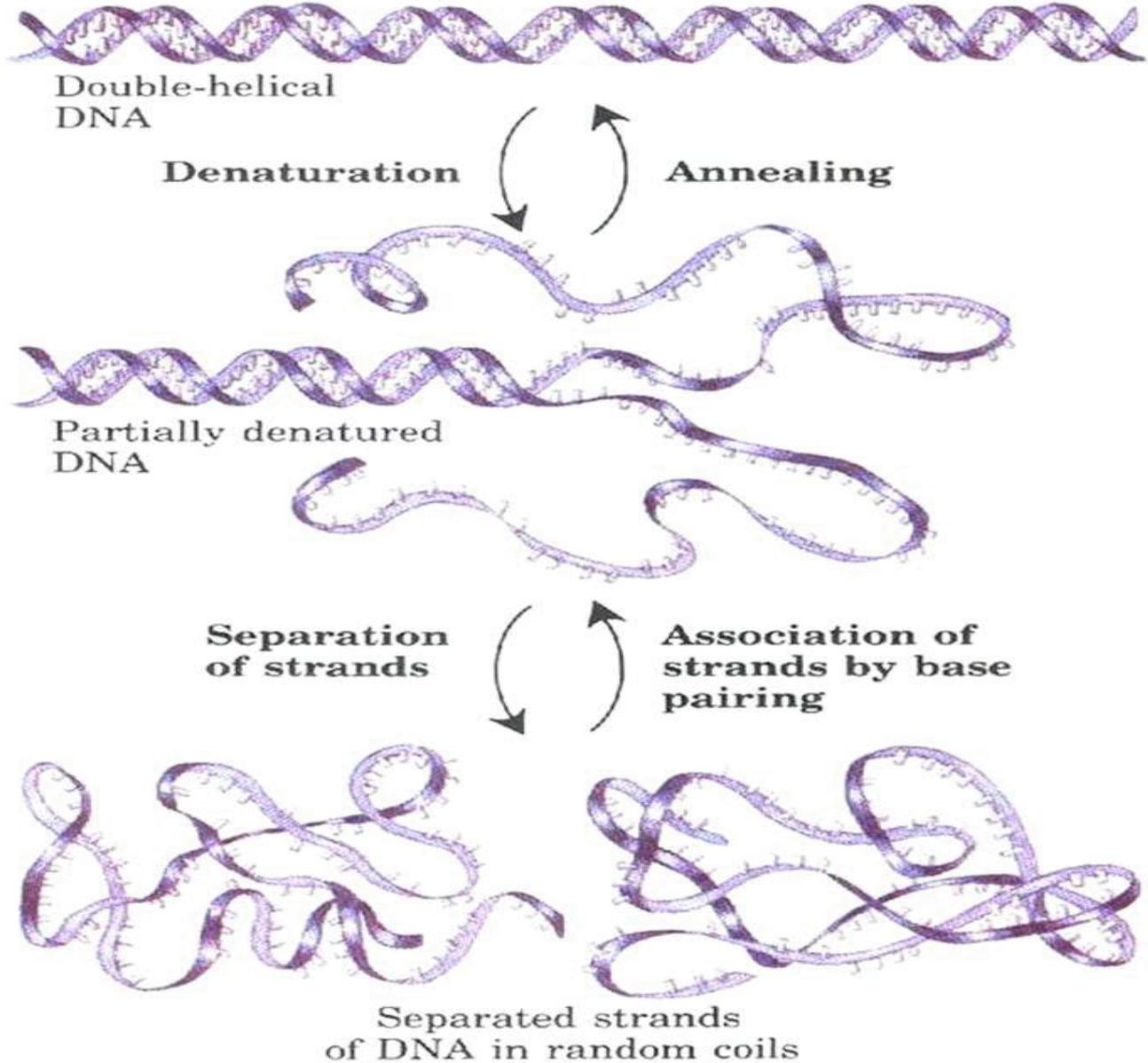
- Наиболее эффективный способ их использования - **присоединение к каждому из четырех терминирующих аналогов специфической метки**, отличающейся от других спектром флуоресценции.

- Такие **модифицированные нуклеозидмонофосфаты** включаются в цепь ДНК-полимеразой и выполняют сразу две функции - **терминируют синтез ДНК и вводят метку в ее 3'-конец**.



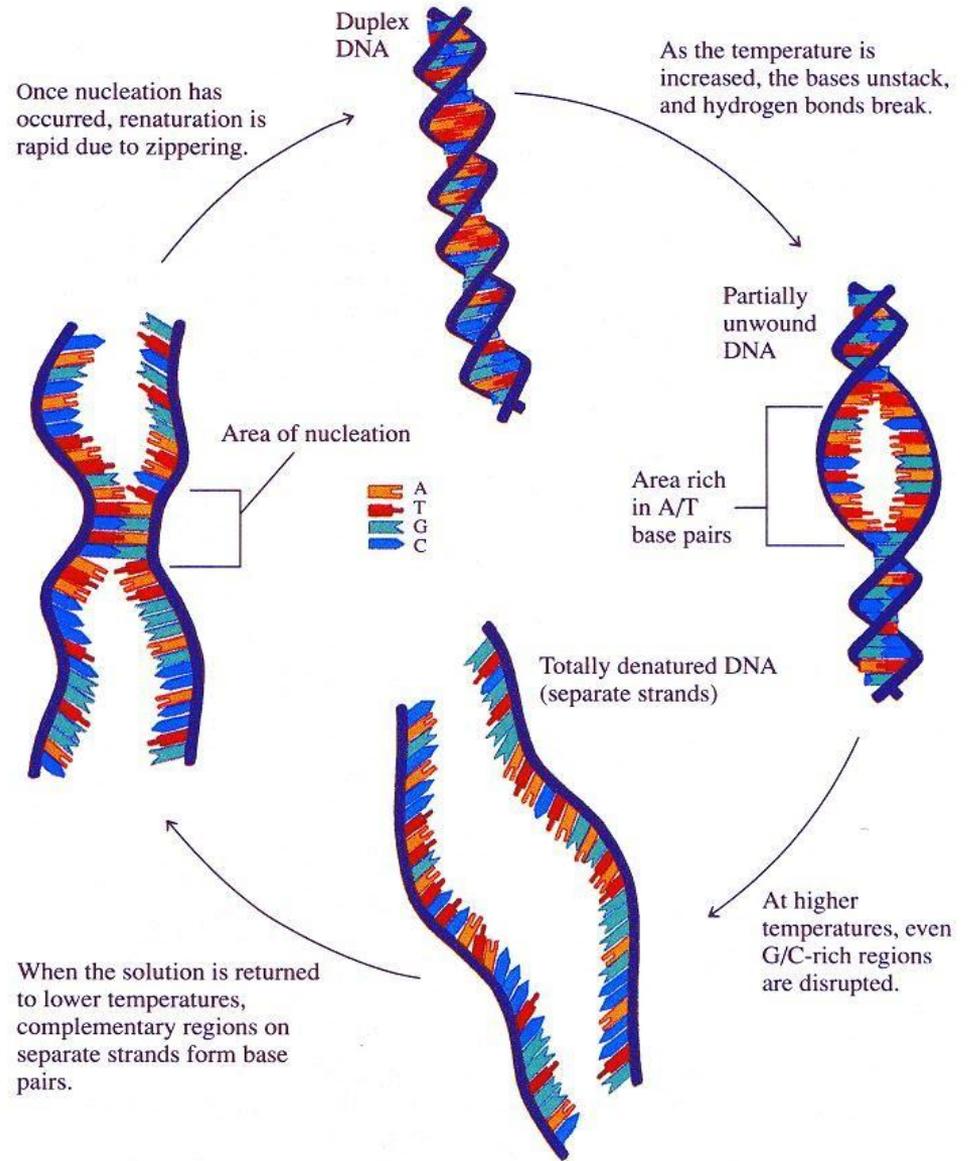
РОДАМИН

2. Денатурация и ренатурация ДНК

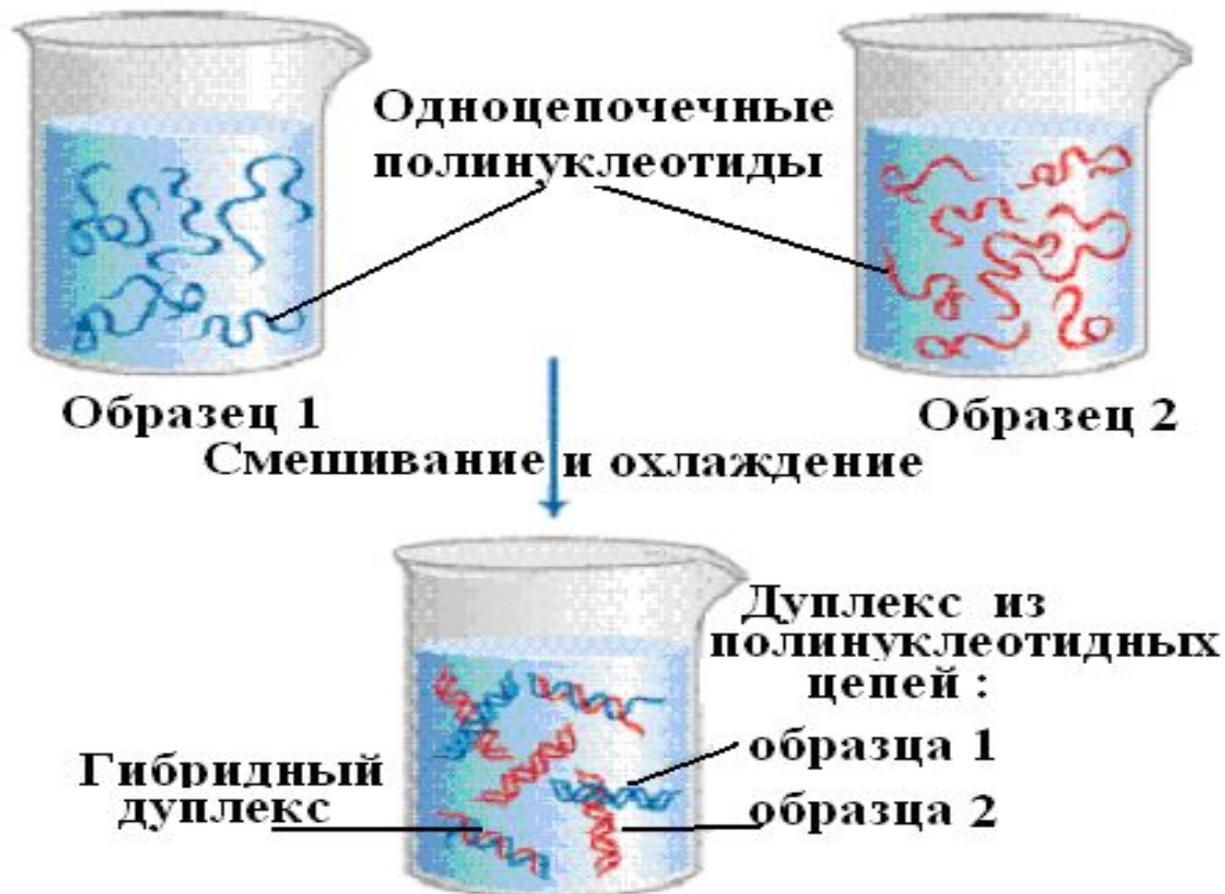


Плавление ДНК

температура 94-100°C



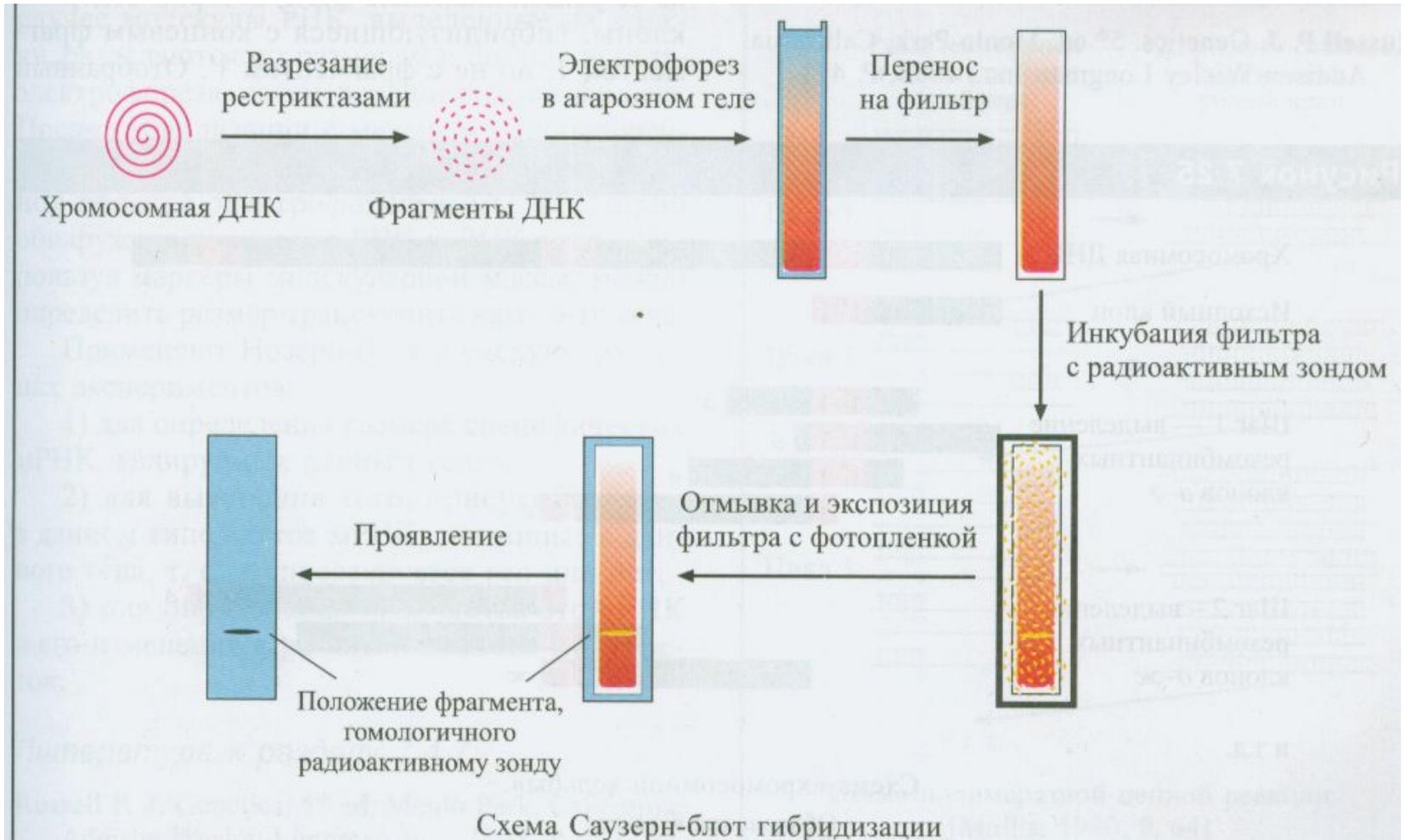
3. Гибридизация нуклеиновых кислот в растворе (плавление и отжиг)



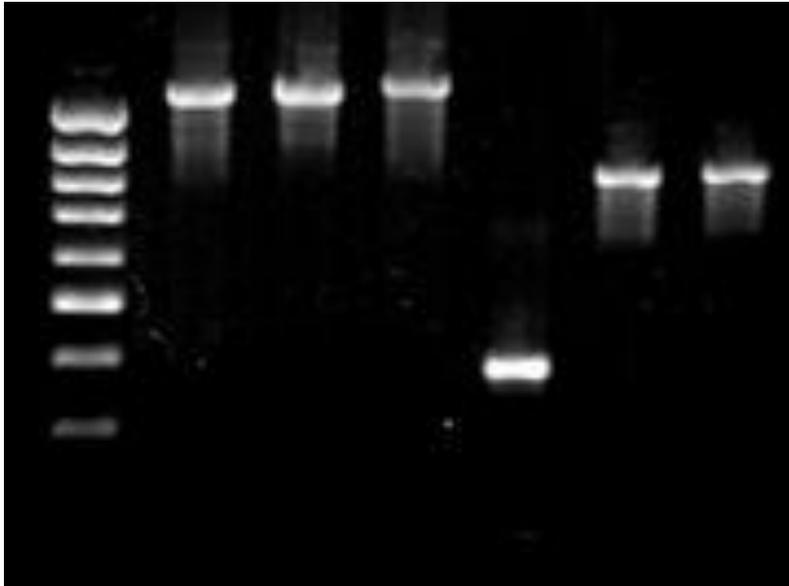
4. Гибридизация нуклеиновых кислот на твердых подложках (блот-анализ)

- Термин **блот-анализ (блотинг)** применяют к процедуре **иммобилизации нуклеиновых кислот или белков на твердой подложке, обычно на нейлоновых или нитроцеллюлозных мембранах.**
- Иммуобилизованные ДНК и РНК используют в последующих **гибридизационных экспериментах** с целью детекции специфических последовательностей.
- **Саузерн (Southern, 1975)** предложил оригинальную идею по переносу фрагментов ДНК из агарозного геля на гибридную мембрану

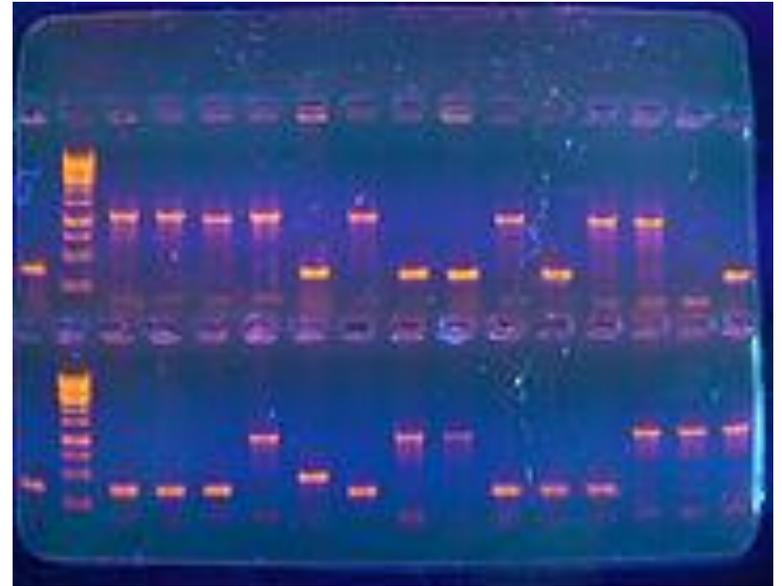
Схема Саузерн-блот гибридизации (И.Ф. Жимулев, с.165)



Результат электрофоретического разделения фрагментов ДНК

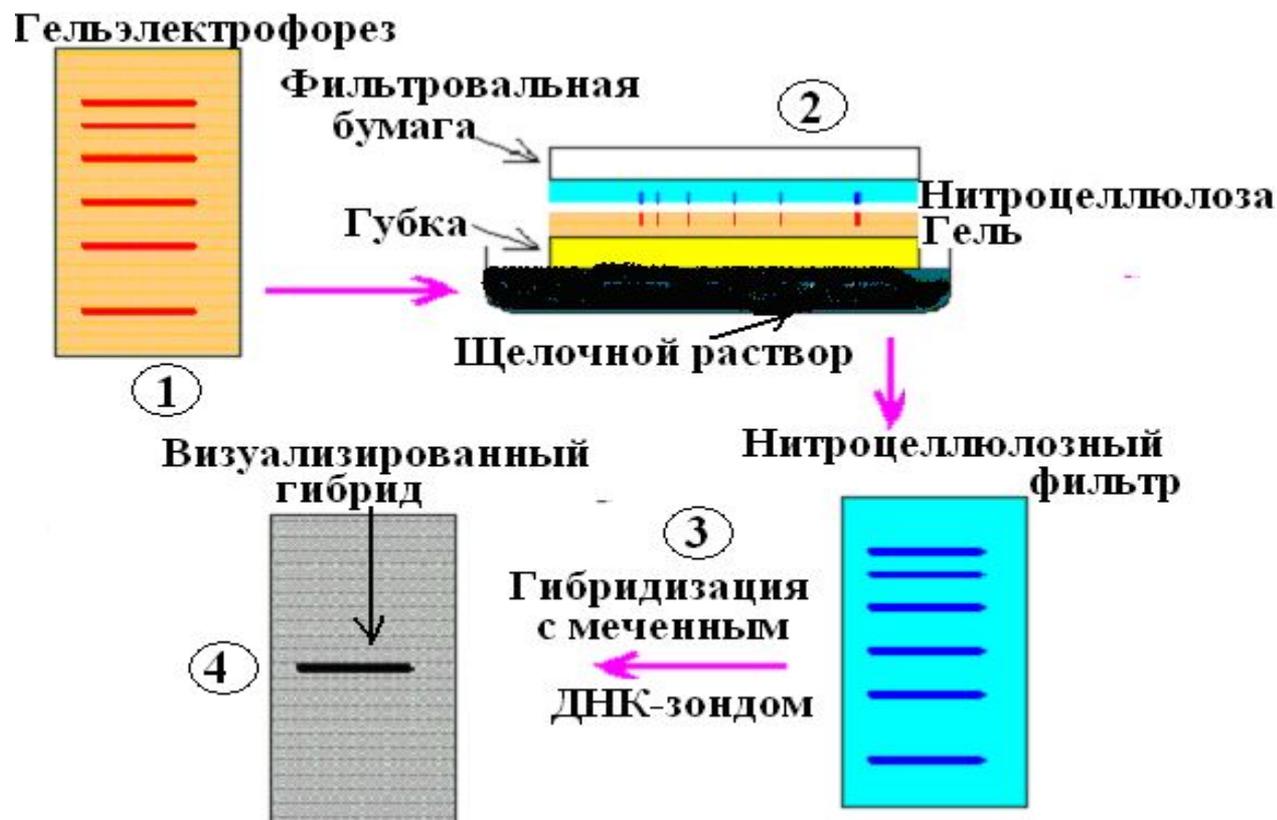


Агарозный гель окрашен
бромистым этидием



Облучение
ультрафиолетом с λ 312нм.

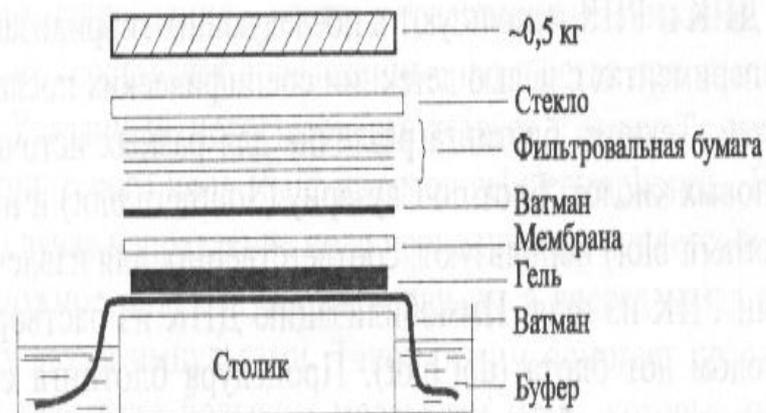
Блотинг по Саузерну (1975)

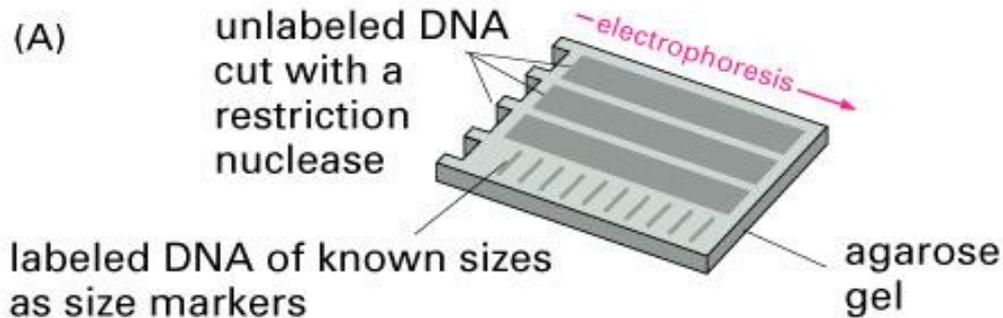


Блотинг по Саузерну (1975)

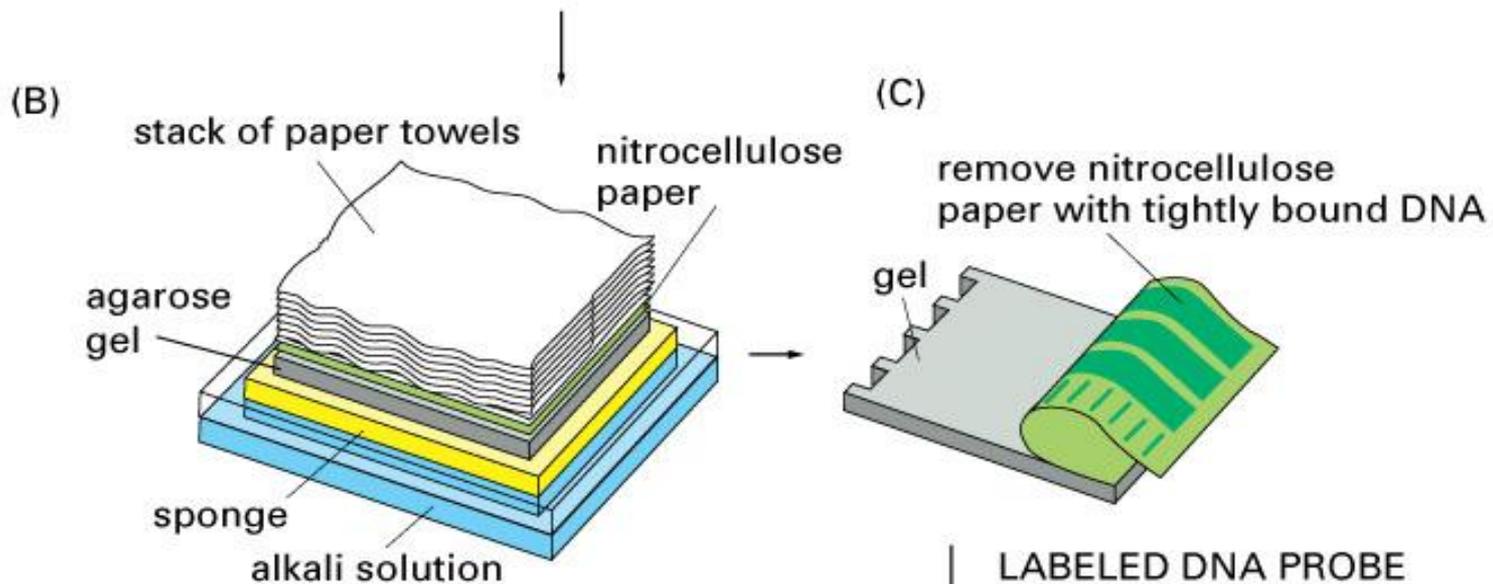
- Гель помещают на фильтровальную бумагу, находящуюся в контакте с буфером.
- Мембрану накладывают на гель, а сверху укладывают несколько слоев фильтровальной бумаги, легко абсорбирующей влагу. Бумага служит своеобразным капиллярным насосом, способствуя вымыванию фрагментов ДНК током буфера из геля и переносу их на мембрану.
- Фиксируют ДНК на мембране (мембрану выдерживают при 80°C или облучают УФ-светом)
- Затем мембрану помещают в раствор с меченым зондом, в котором и происходит гибридизация.
- После отмытки несвязавшейся радиоактивности результат выявляют с помощью радиоавтографии.

Перенос фрагментов ДНК из агарозного геля на гибридизационную мембрану





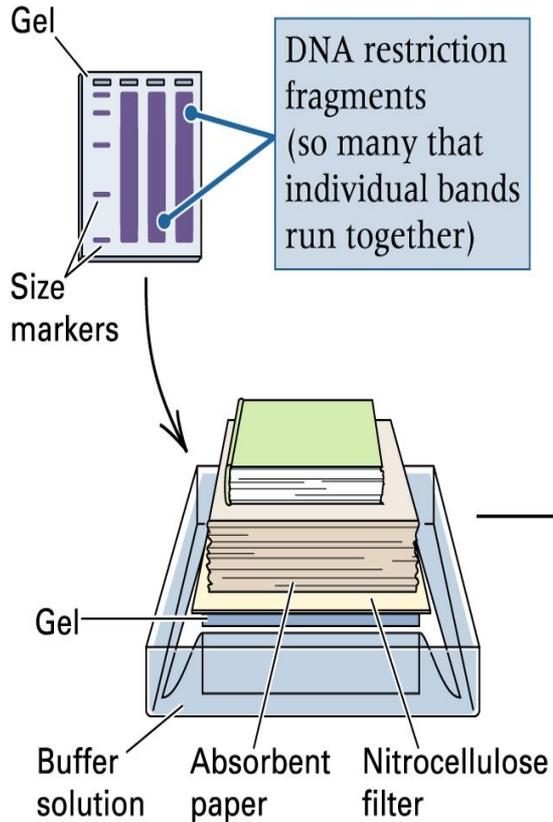
DNA FRAGMENTS SEPARATED BY AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS



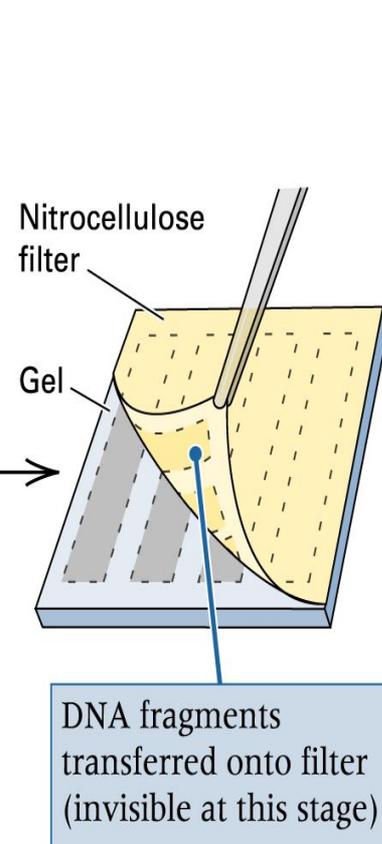
SEPARATED DNA FRAGMENTS
BLOTTED ONTO NITROCELLULOSE PAPER

LABELED DNA PROBE
HYBRIDIZED TO
SEPARATED DNA

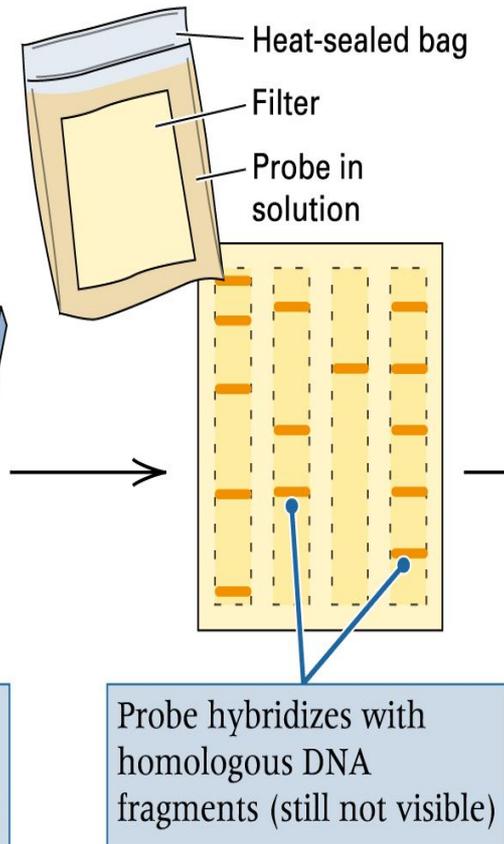
(A) DNA is cleaved; electrophoresis is used to separate DNA.



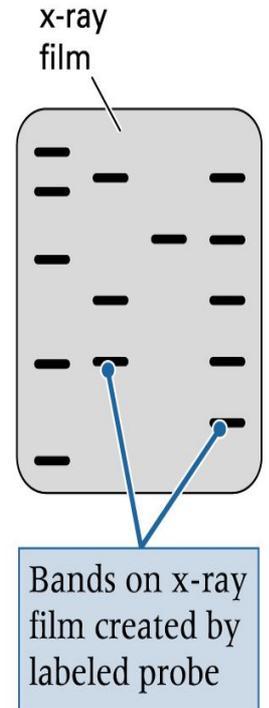
(B) DNA fragments are blotted onto nitrocellulose filter.



(C) Filter is exposed to radioactive probe.



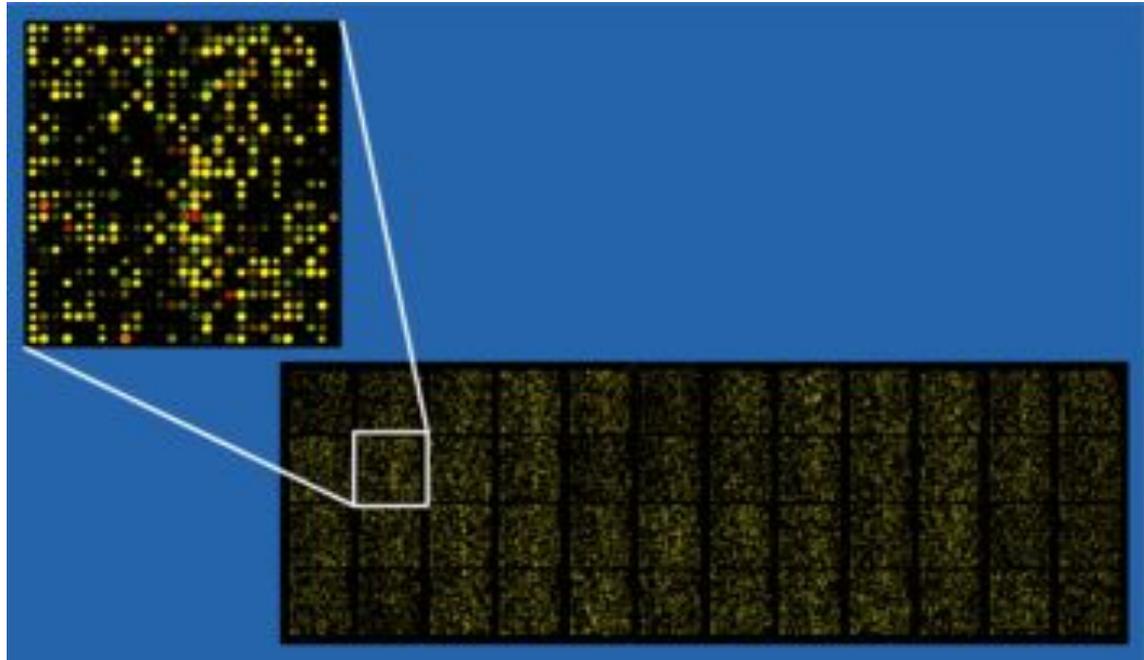
(D) Filter is exposed to photographic film; film is developed.



Виды блотинга

- Метод переноса **ДНК** из агарозного геля на нитроцеллюлозные или нейлоновые мембраны был назван **по Саузерну саузерн-блотинг** (southern — южный)).
- Метод переноса **РНК** из агарозного геля на нитроцеллюлозные или нейлоновые мембраны был назван **нозерн-блотинг** (nothern — северный).
- Метод переноса **белков** из полиакриламидного геля на нитроцеллюлозные или нейлоновые мембраны (Burnette, 1981) был назван **вестерн-блотинг** (western — восточный).
- В описанных видах блотинга для организации потока ДНК, РНК и белков через гель к мембране вместо капиллярных сил используют также электрофорез и вакуум.

5. Гибридизация нуклеиновых кислот на чипах

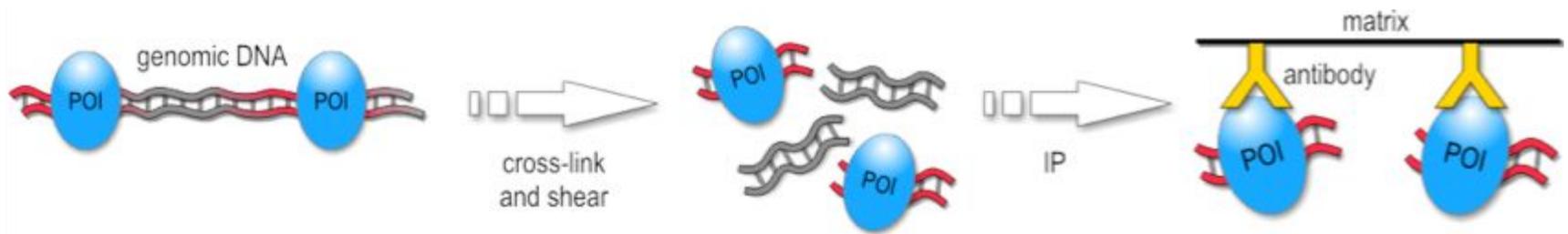


ЧИПЫ — пластинки с иммобилизованными мечеными ДНК-зондами.

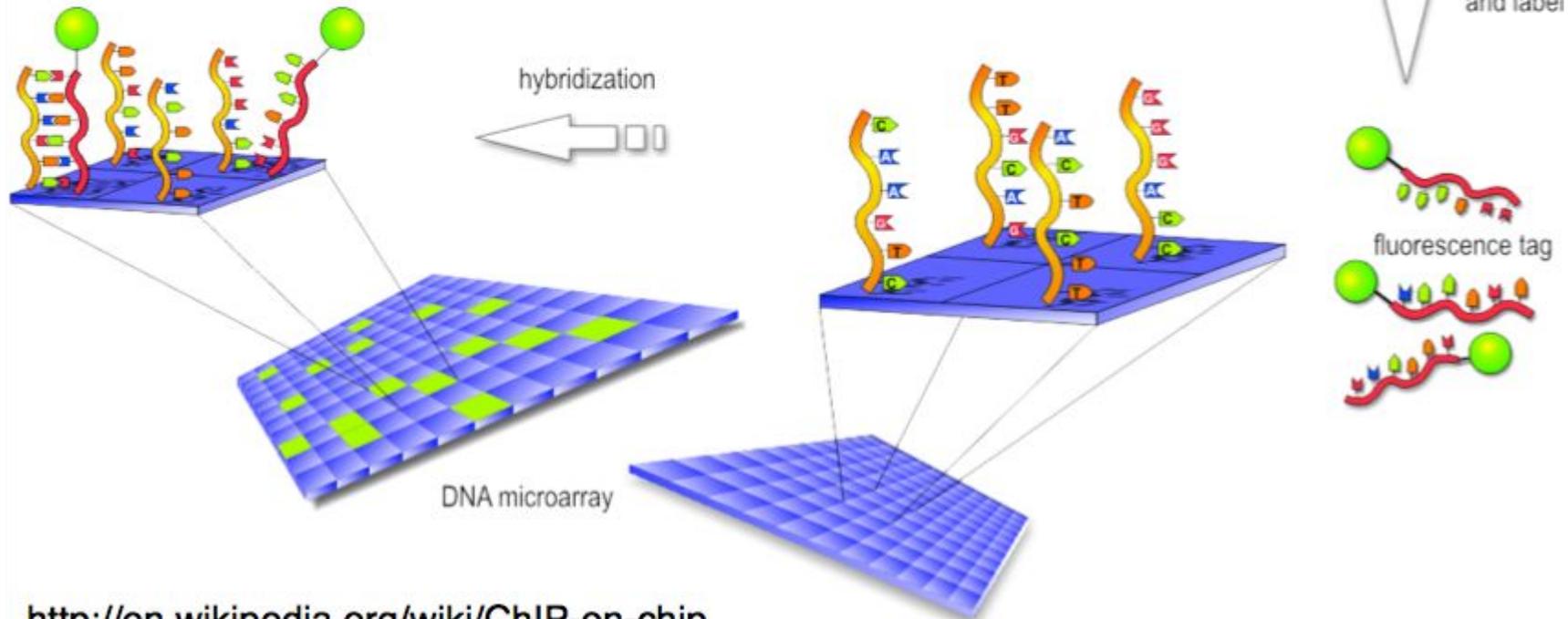
ДНК-зонд — фрагмент ДНК, меченный тем или иным образом и использующийся для гибридизации со специфическим участком молекулы ДНК. Позволяет идентифицировать комплементарные ему последовательности.

Каждая пластинка может содержать несколько десятков тысяч зондов, расположенных в определенной последовательности.

Метка проявляется только в спаренных двухцепочечных фрагментах.



ChIP-on-chip wet-lab portion of the workflow



<http://en.wikipedia.org/wiki/ChIP-on-chip>

Схема анализа последовательностей нуклеотидов с помощью ДНК-чипов

