



ДНК - сенсоры

Студент гр. 120551ЦКБА
Хрячков М.В.

Биологическая роль ДНК – хранение наследственной информации и ее передача в ряду клеточных поколений (**репликация**), обеспечение синтеза белка.

В ДНК с помощью генетического кода зашифрована информация об аминокислотном составе белков.

Свойства генетического кода

Триплетность – одну аминокислоту кодируют три нуклеотида (триплет, кодон).

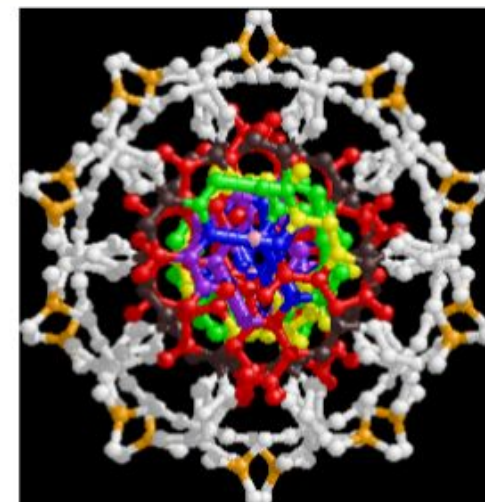
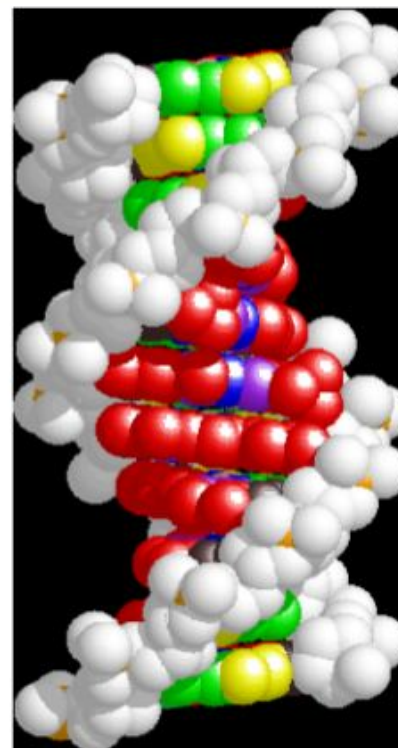
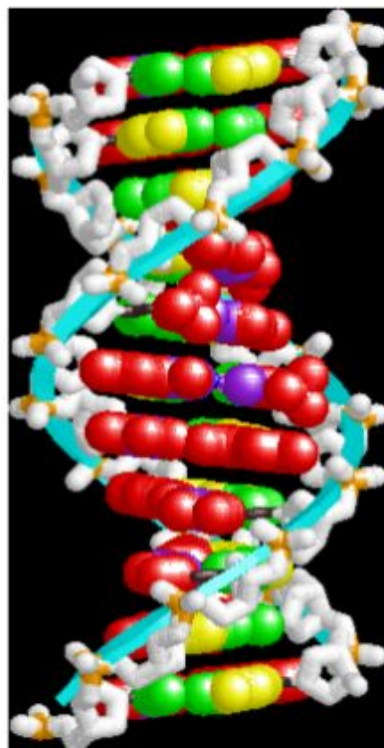
Специфичность – триплет кодирует только одну аминокислоту.

Вырожденность – одну и ту же аминокислоту могут кодировать несколько триплетов.

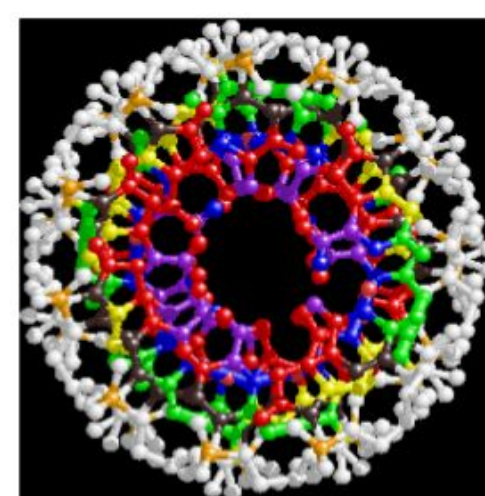
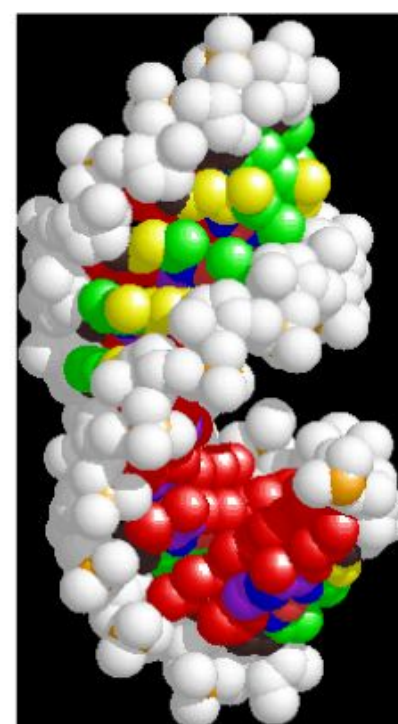
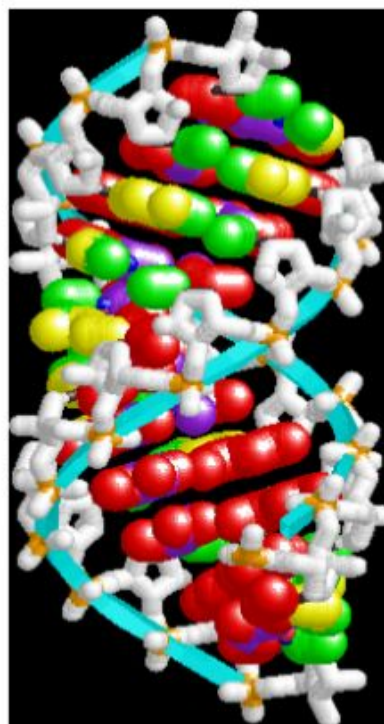
Универсальность – у всех живых организмов генетический код одинаков.

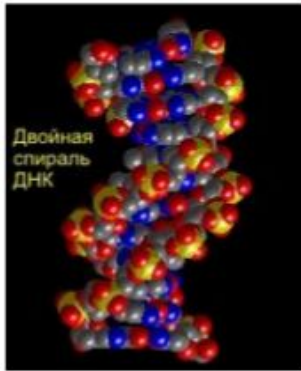
ДНК

- В-Форма ДНК



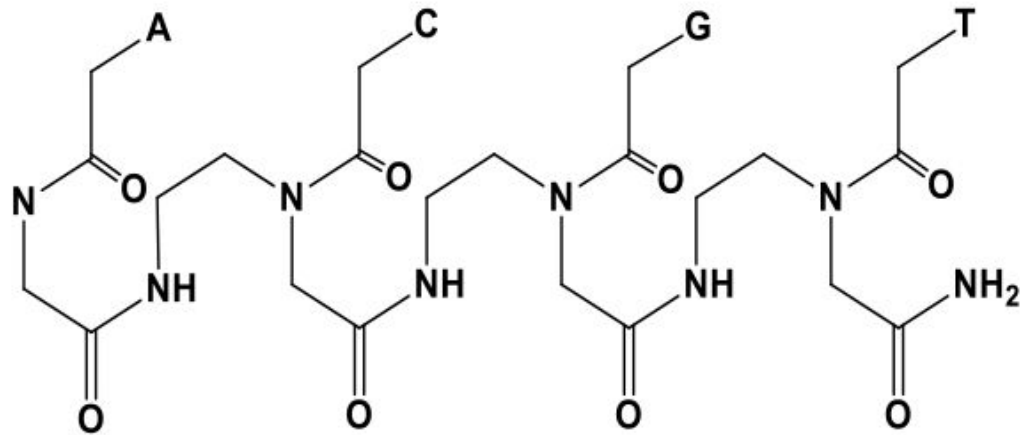
- А-Форма РНК



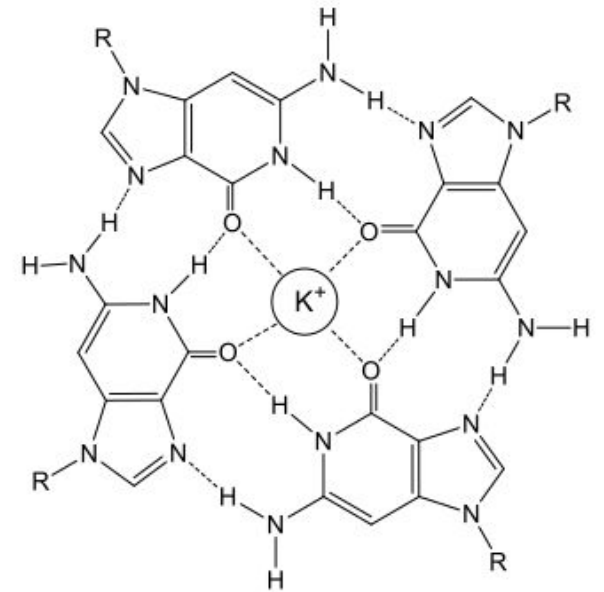
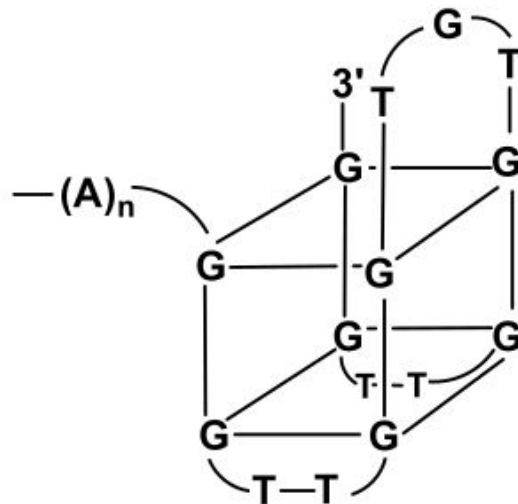


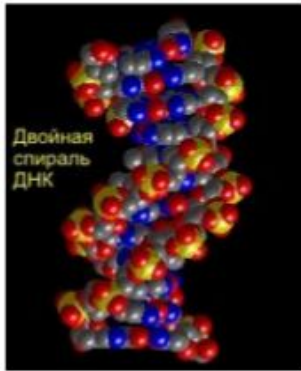
Аналоги ДНК

**Пептидные
нуклеиновые
кислоты**



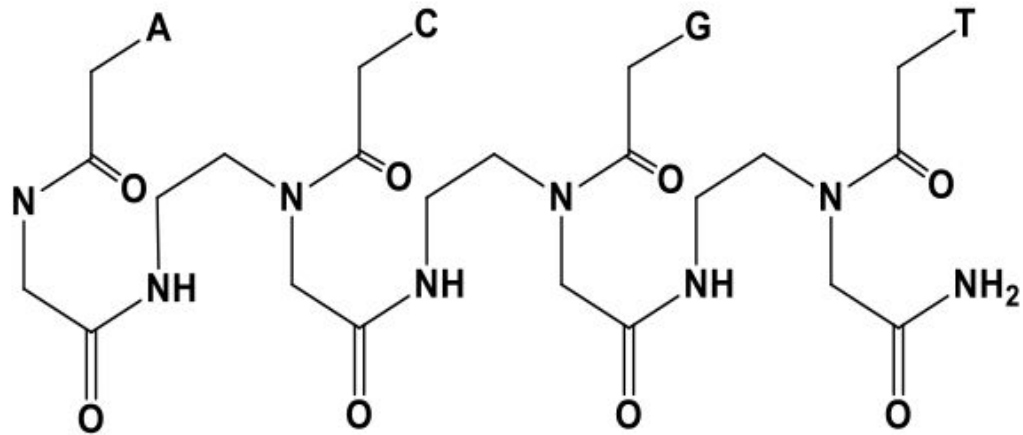
Аптамеры



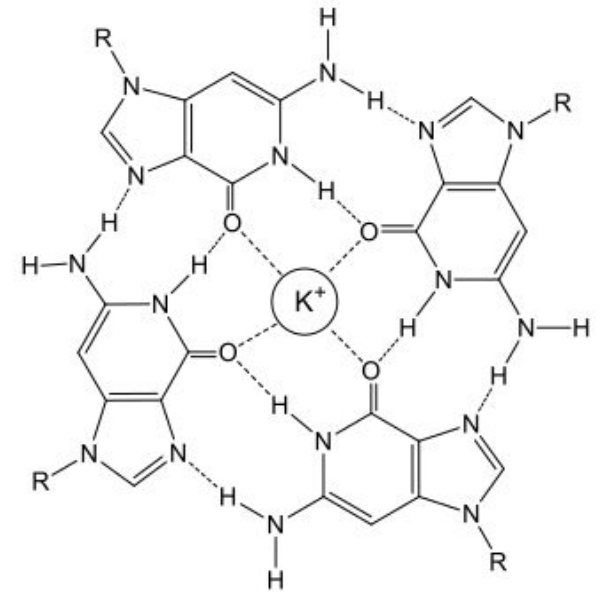
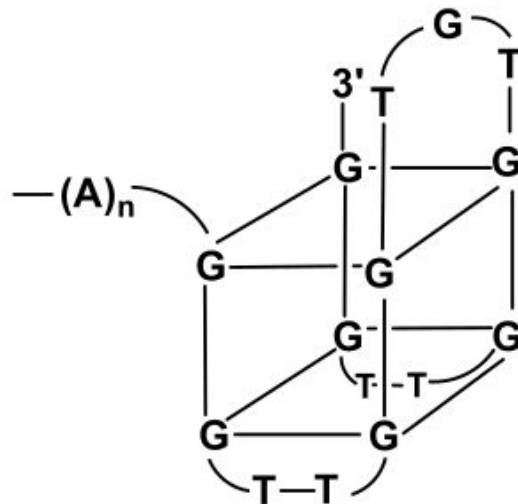


Аналоги ДНК

**Пептидные
нуклеиновые
кислоты**



Аптамеры

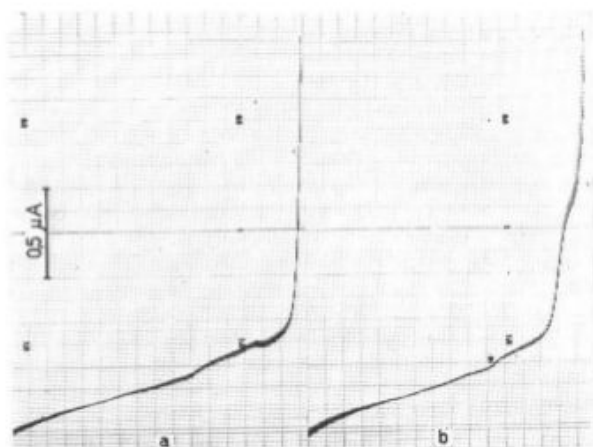


Применение ДНК-сенсоров

- **Изучение строения ДНК;**
- **Определение комплементарных последовательностей олигонуклеотидов;**
- **Изучение взаимодействия ДНК-белок;**
- **Определение низкомолекулярных соединений, реагирующих с ДНК;**
- **Оценка ДНК-повреждающих факторов.**

Из истории ДНК-сенсоров

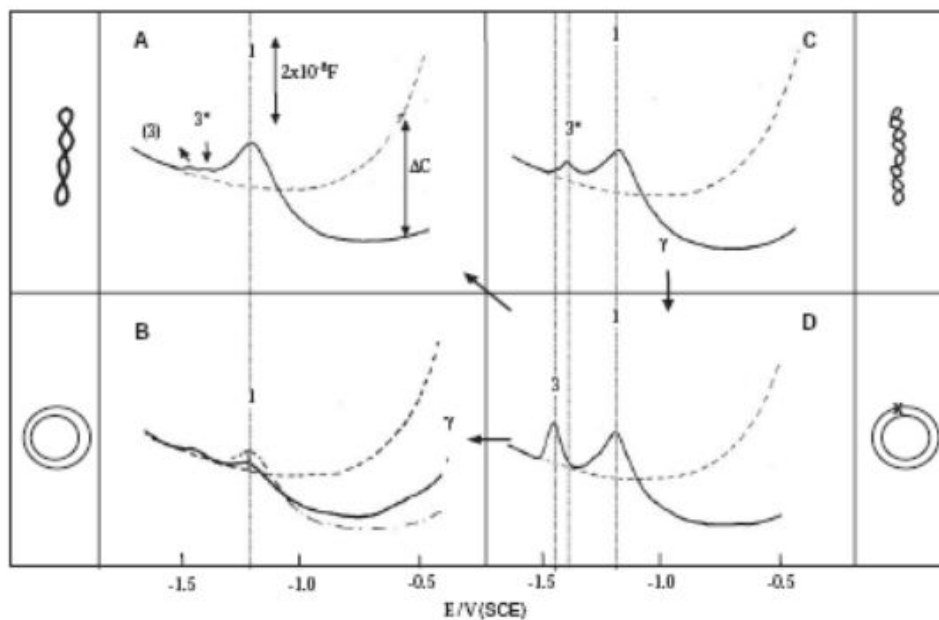
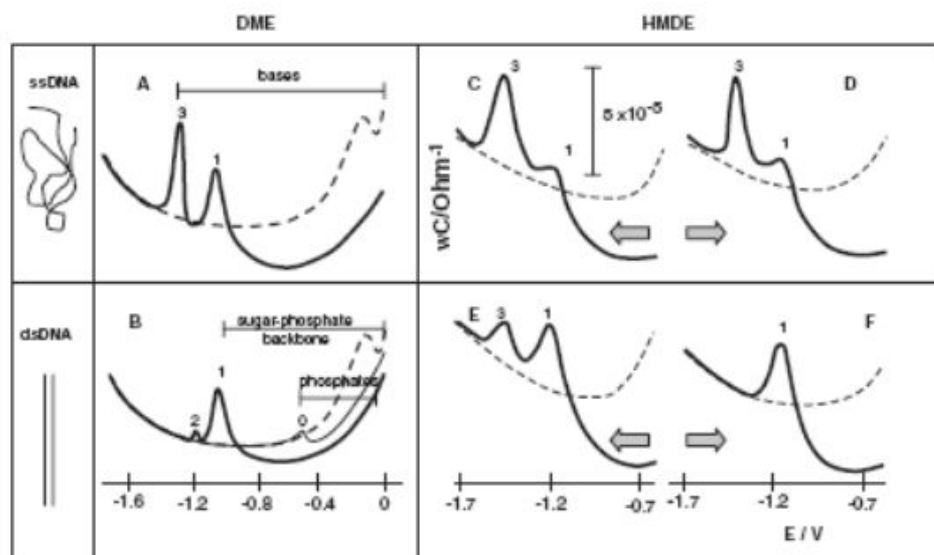
● Институт биохимии Чешской академии наук, проф. Э.Палечек.

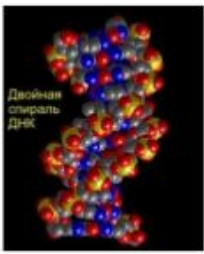


Полярография нативной или термически денатурированной ДНК на ртутном электроде

- Найдены токи восстановления на ртутных электродах с адсорбированной ДНК – 1957 -1961 гг.
- Разделение сигналов нативной и денатурированной ДНК, разделение процессов ренатурации и денатурации – 1964-1966
- Дифференциально импульсная полярография в определении повреждения ДНК
- Понятие редокс-маркера (1970-1976, группа Берга)
- Начало использования углеродных электродов (1978)
- Использование ковалентно связанных маркеров (1981)
- Концепция ДНК-анализа на модифицированных ДНК электродах (1981)

Распознавание одно- и двухцепочечной ДНК





ДНК-Чипы

- **Не являются аналитическими устройствами**
- **Биохимические компоненты**
 - Олигонуклеотиды, ассоциированные с генами мишеней
 - Плазмидные ДНК
 - БАК клоны клеток
- **Иммобилизация компонентов ДНК-сенсоров**
 - Нанесение в каплях
 - Синтез де ново
 - Самосборка
- **Применение**
 - Сравнение двух проб
 - Полиморфизм генов
 - Экспрессия генов

Современные виды ДНК-ЧИПОВ

Микромассивы ДНК (3D-Gene®)

Массив олигонуклеотидов, химически синтезированных де ново длиной 20-100 нуклеотидов, специфичных к определенным генам. Благодаря небольшой длине отсутствует кросс-гибридизация и специфичность высока.

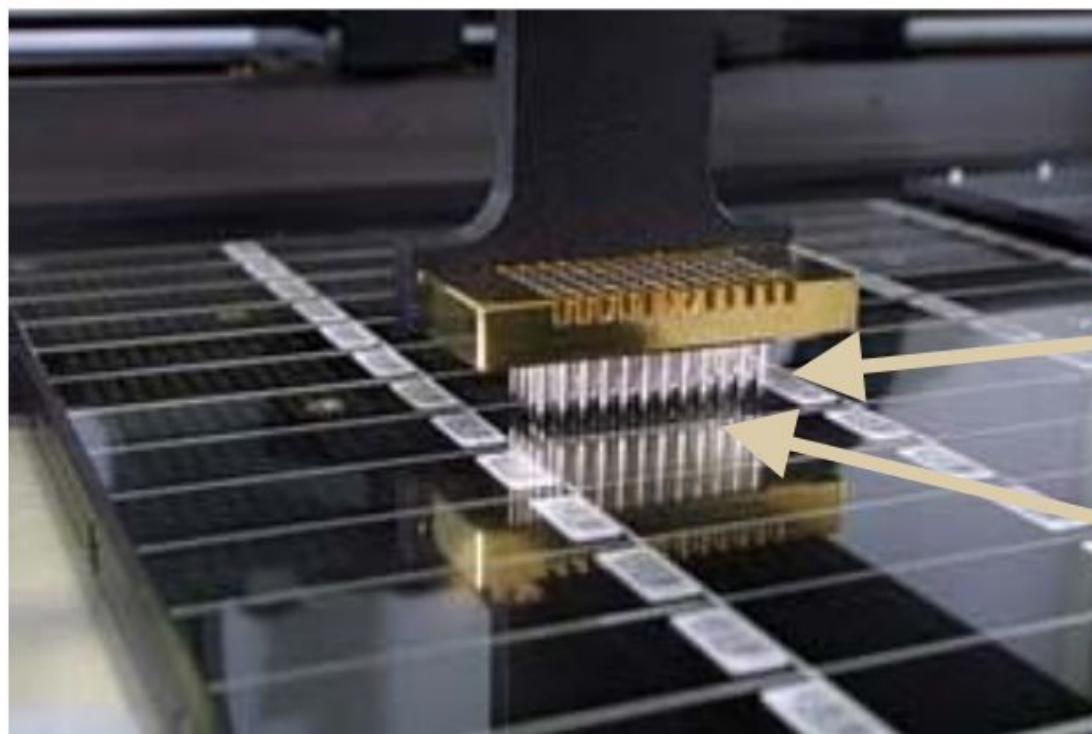
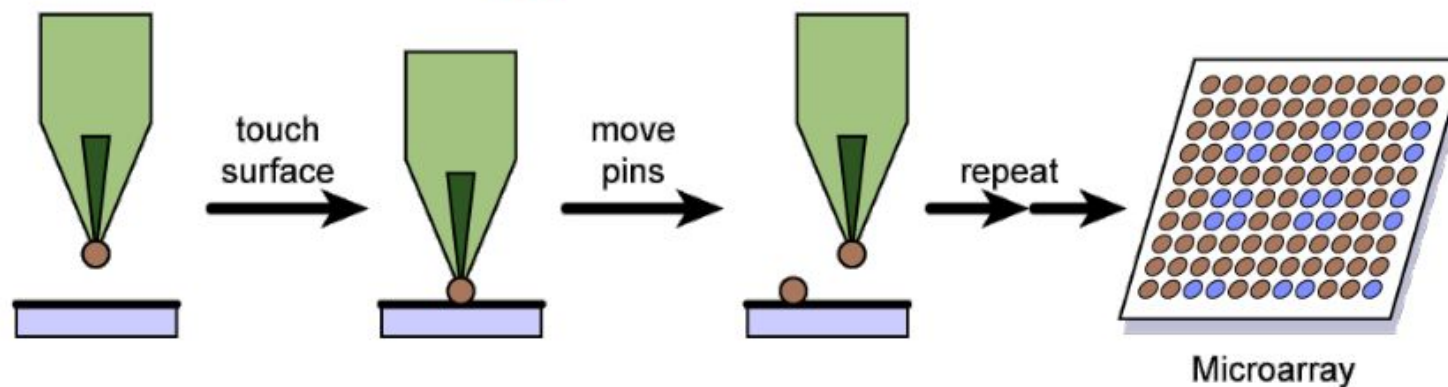
Массивы плазмидных ДНК

Включают фрагменты плазмидных ДНК, полученных обратной транскрипцией продуктов транскрибирования генов (мРНК) – иммобилизованы на субстрате. Объекты анализа – продукты ПЦР длиной от несколько сот до несколько тысяч нуклеиновых оснований.

Чипы на основе клонов ВАС

ВАС (bacterial artificial chromosome) – искусственные бактериальные хромосомы – используются как шаблоны для ПЦР. Длина 100-3000 тыс. нуклеиновых оснований, позволяют регистрировать присутствие геномных копий ДНК.

ДНК-чипы



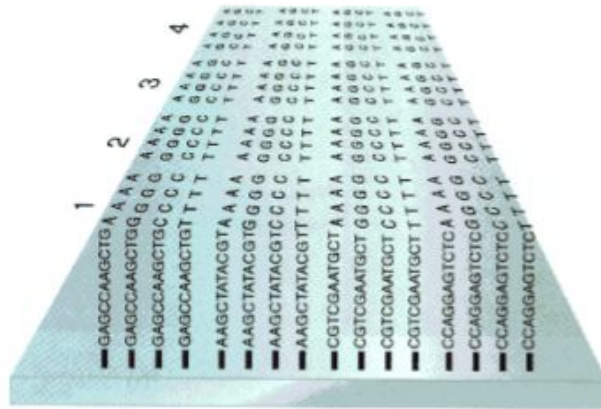
Координация
ДНК-зондов

Подложка для
иммобилизации

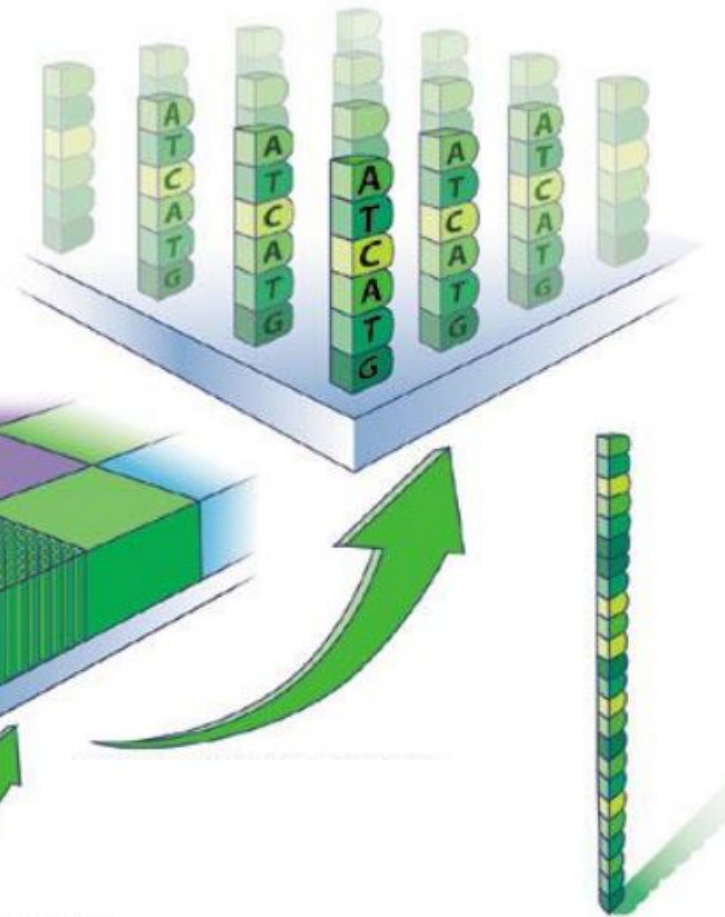
Технология капельного нанесения (пятен)

ДНК-чипы

- Комбинаторный подход: синтез de novo (Affimetrix)



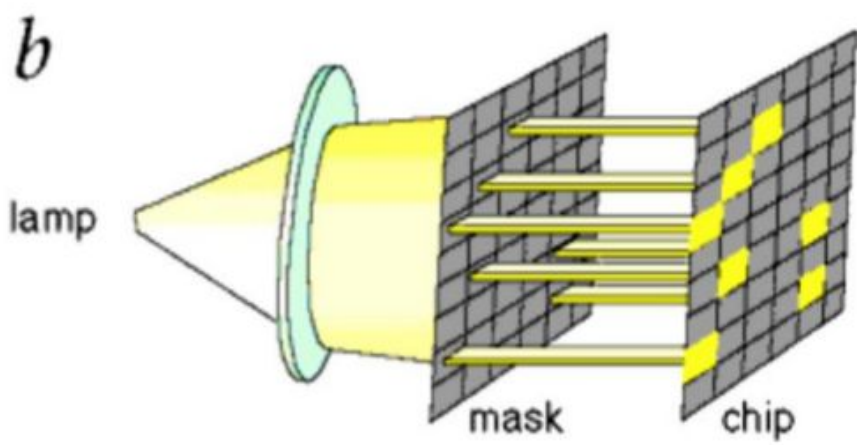
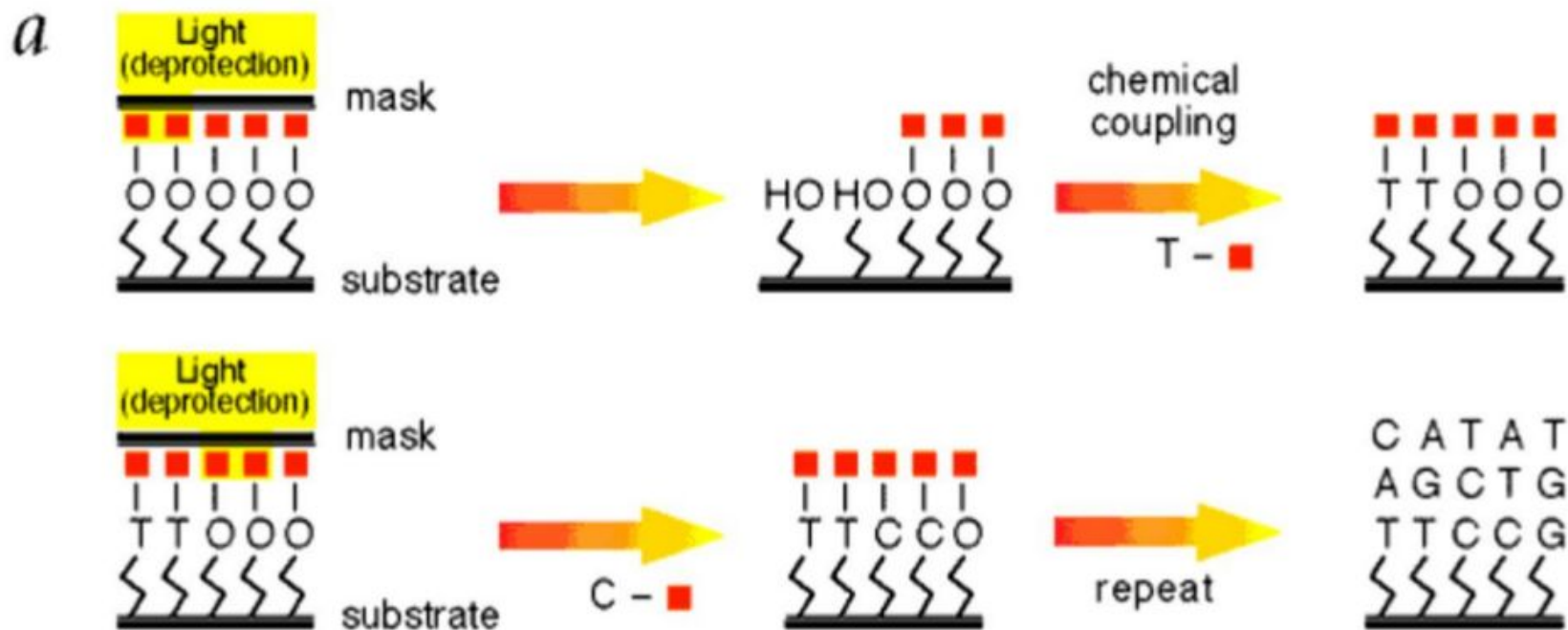
GeneChip –
реальный
размер
1.28x1.28 см



GeneChip – 500 000 ячеек

ДНК-зонд 25 нуклеотидов

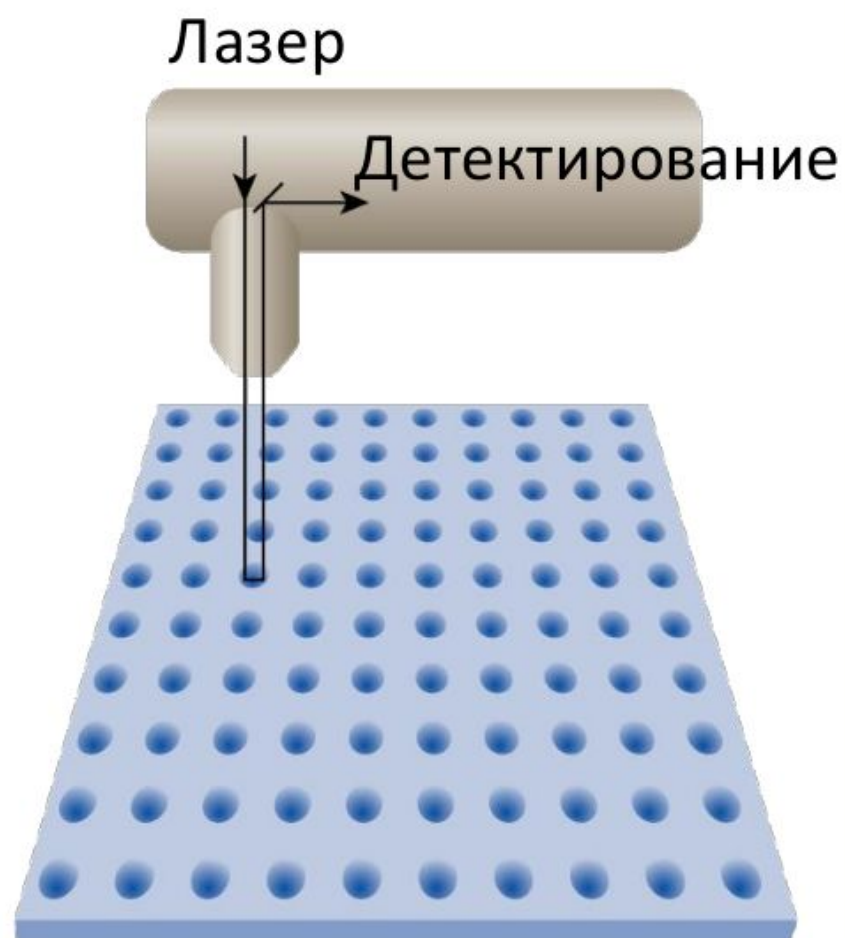
Фотолитографическое получение массивов ДНК ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ



High density synthetic oligonucleotide arrays
Robert J. Lipshutz *et al.*
Nature Genetics 21, 20 - 24 (1999)

Сканирование массивов ДНК

- Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия
- Лазерный луч возбуждает каждый спот ДНК
- Детектируется уровень флуоресценции
- Разные лазеры для разных длин волн Cu3 и Cu5



Применение ДНК-чипов



Roche Diagnostics использует ДНК-чип для подбора лекарств, влияющих на экспрессию генов, отвечающих за метаболизм ксенобиотиков

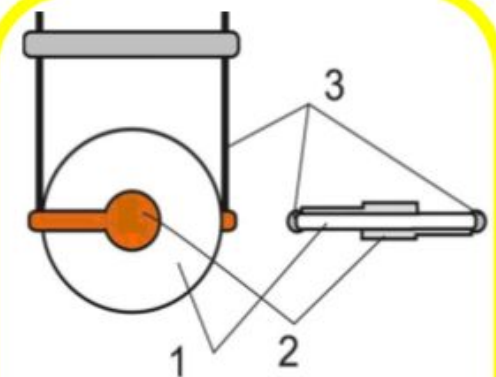
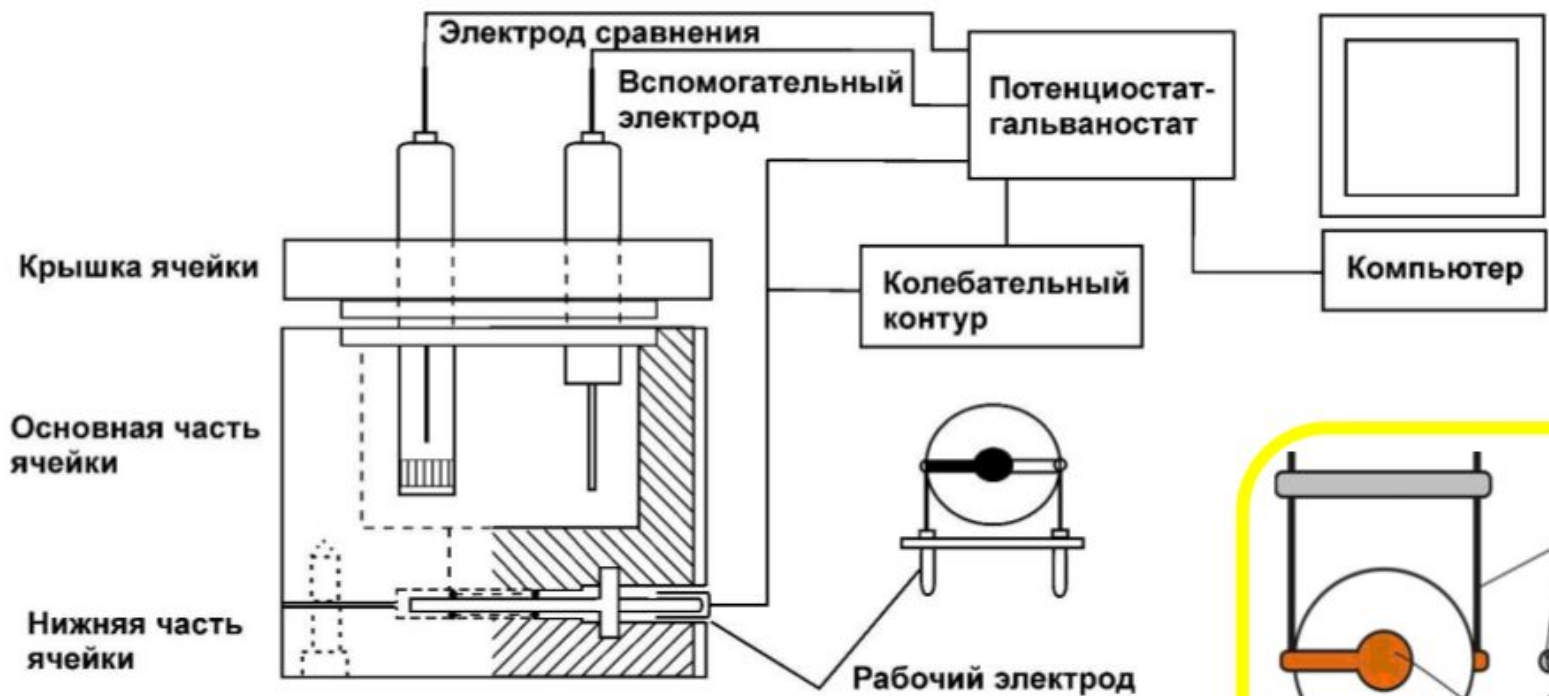


Технология GeneChip используется для идентификации продуктов питания (мясо свинины, птицы, геномодифицированная продукция, религиозные ограничения и пр.)



Nanogen (США) – экспресс-диагностика генетического материала для идентификации преступников и жертв

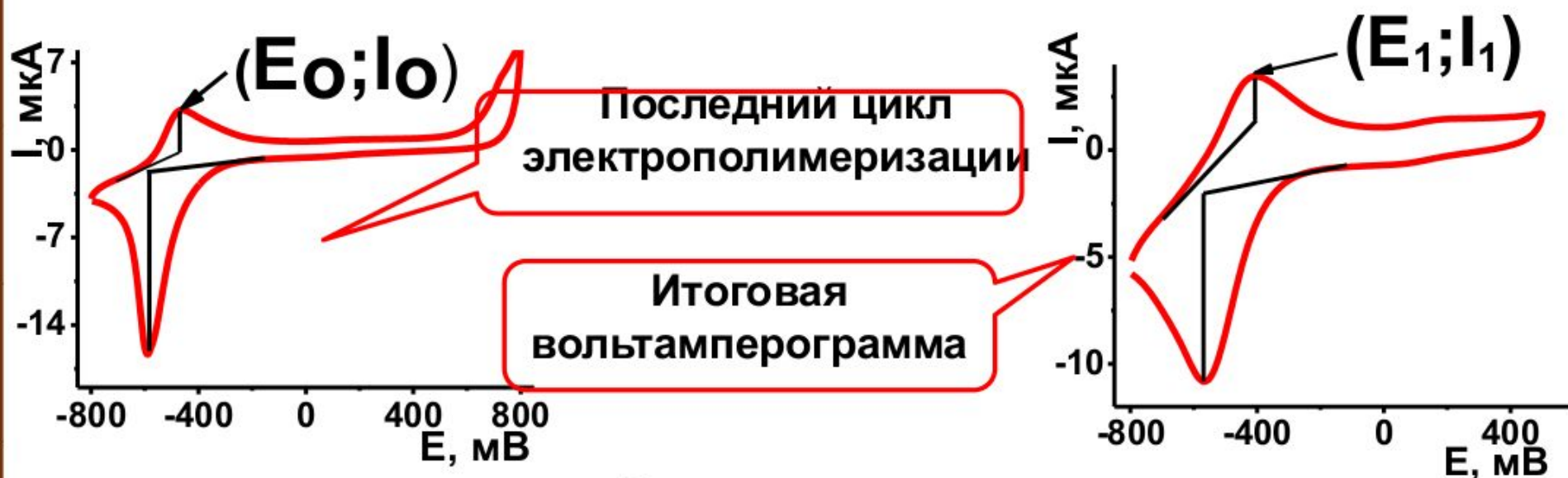
Пьезометрический ДНК-сенсор



Рабочий электрод: 1 – кварцевая пластина, 2 – золотые электроды, 3 – проволочные держатели.

Вольтамперометрический ДНК-сенсор. Методика эксперимента

- Механическая (с помощью оксида алюминия) и электрохимическая (в серной кислоте) очистки СУЭ;
- Электрополимеризация в растворе мономера;
- Капельное нанесение раствора ДНК (2мкл) и высушивание в печи (50°C);
- Запись итоговой вольтамперограммы.



$$\left. \begin{array}{l} E_1 - E_0 = \Delta E \\ I_1 - I_0 = \Delta I \end{array} \right\} \text{Подсчет результатов}$$

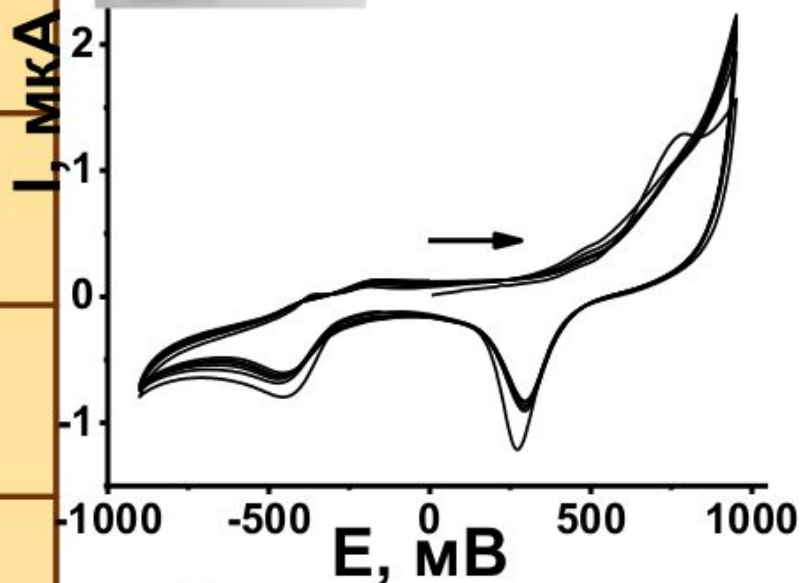
Измерение поверхностного плазмонного резонанса (ППР)



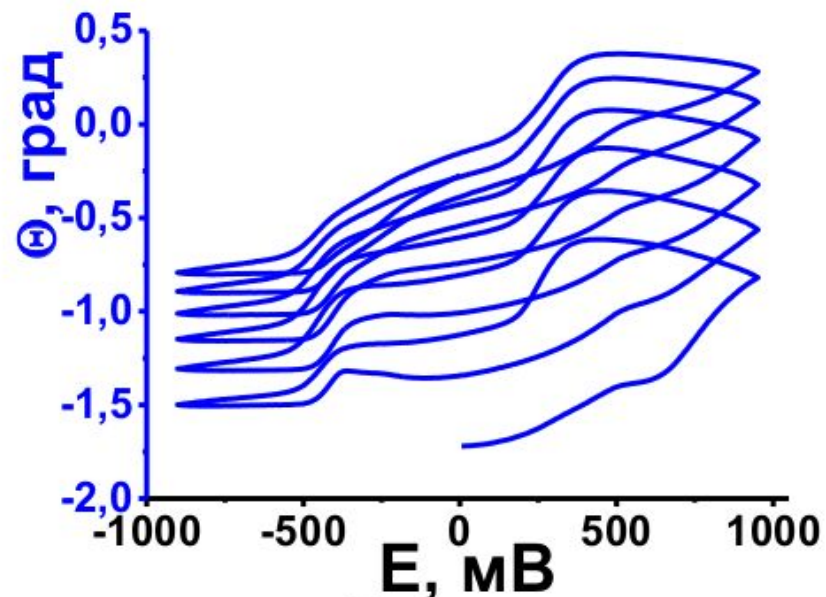
Стекланный диск с золотым покрытием, закрепленный в слайдере



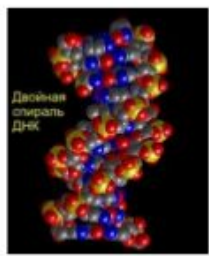
Рабочая ячейка для проведения электрохимических исследований совместно с анализом ППР



Вольтамперограмма электрополимеризации MS



Сенсограмма электрополимеризации MS



ДНК-сенсоры для регистрации гибридизации

- Определение изменения сигнала, связанного с электрохимически активными метками, включенными в состав ДНК-зонда, или редокс-индикаторов, интеркалирующих в продукт гибридизации;
- Контроль изменений в электрохимических характеристиках полимерного носителя в результате взаимодействий ДНК-зонда с целевой последовательностью нуклеотидов;
- Характеристика изменений параметров электрода, обусловленных различной проницаемостью зонда и продукта гибридизации для низкомолекулярных ионов.