

Семинар 1

Медицинская биотехнология 6 курс

Отделения биохимии и биофизики

**Выделение нуклеиновых кислот из
различного клинического материала.
ПЦР и электрофорез в медицинской
генетике.**

Из какого материала приходится выделять ДНК и РНК при проведении биомедицинских исследований?

Клеточные «суспензии»

Ликвор, плазма крови, смывы с бронхов и т.п. – наиболее удобный материал с точки зрения сложности этапов выделения, включающих лизис клеток, очистку от белков и клеточных фрагментов, отмывку от низкомолекулярных примесей спиртовыми растворами и концентрирование.

Цельная кровь – все те же этапы, но сначала необходимо провести гемолиз и избавиться от высвободившегося содержимого эритроцитов.

Соскоб буккального эпителия, соскобы из уретры – при выделении НК зачастую приходится сначала лизировать образец специальными муколитиками или удлинять первый этап лизиса с детергентами.

Осадки мочи – могут быть, фактически, суспензиями клеток, а могут содержать значительное количество слизи и/или пигментов, солей; необходимо индивидуально оценивать целесообразность того или иного метода выделения.

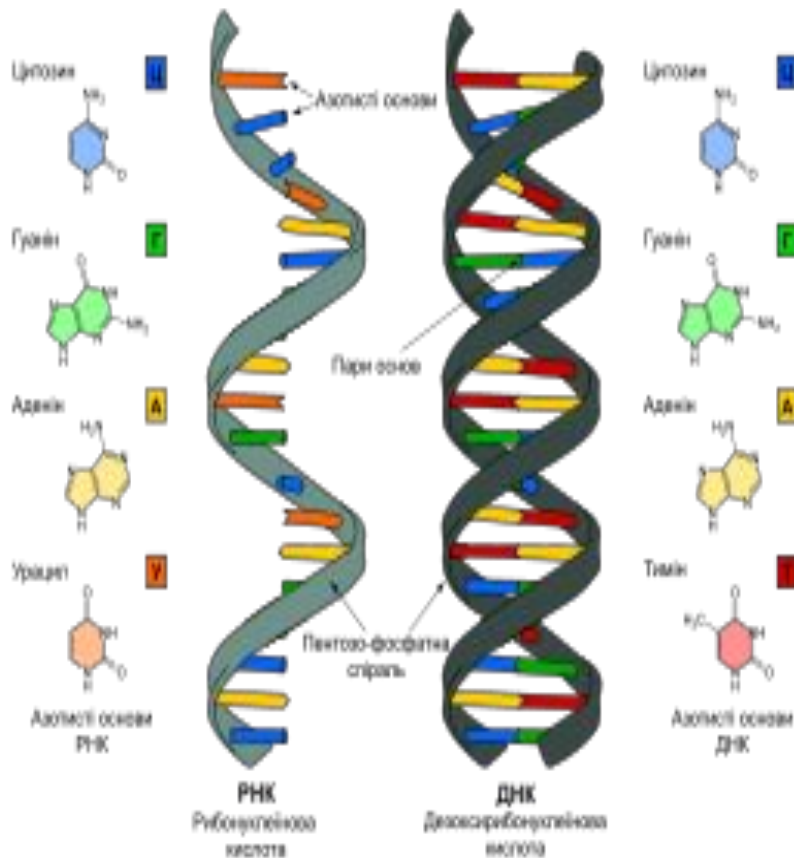
Структурированная ткань

Замороженные образцы от макропрепарата – операционного материала. Наиболее удобный материал для выделения больших количеств ДНК и РНК высокого качества, но предварительно требует гомогенизации и, желательно, лизиса с протеиназой К.

Биоптаты – без гомогенизации, только с протеиназой К, но гораздо меньший выход НК по сравнению с операционным материалом.

Архивные образцы в парафиновых блоках – необходима депарафинизация (желателен этап с восстановлением химических связей, нарушенных формальдегидом при фиксации ткани), подсушка, затем лизис с протеиназой. Как правило, хорошо отобранный и аннотированный материал, но может быть со значительной фрагментацией и деградацией НК (особенно РНК).

Стабильность нуклеиновых кислот при выделении из клеток



В целом, РНК менее стабильная молекула, чем ДНК. Наличие дополнительной ОН-группы в рибозе и меньшее по сравнению с ДНК содержание стабилизированных спиральных участков делает молекулы РНК более химически реакционноспособными. При действии кислот и, особенно, щелочей рибозный каркас РНК легче гидролизуются, и азотистые основания отщепляются легче. В связи с этим при работе с РНК рекомендуют соблюдать правила, защищающие ее от грубых внешних воздействий и попадания нуклеаз:

- использование перчаток, наконечников с фильтрами, RNase-free пластика
- ограничить количество замораживаний-оттаиваний, время пребывания раствора РНК на столе в тепле и на солнечном свете
- добавлять в буферы или соответствующие реакционные смеси ингибиторы РНКаз

Экспресс-методы выделения нуклеиновых кислот

Образец биоматериала инкубируется с лизирующим буфером при высокой температуре (порядка 90-95°C), в процессе чего происходит деструкция клеточных мембран, вирусных оболочек и других биополимерных комплексов и высвобождение нуклеиновой кислоты. При последующем центрифугировании нерастворимые компоненты осаждаются на дне пробирки, а супернатант (надосадочная жидкость) содержит НК. Может быть добавлен сорбент для связывания клеточных фрагментов с белковых комплексов, который после центрифугирования увлекает с собой посторонние примеси в осадок.

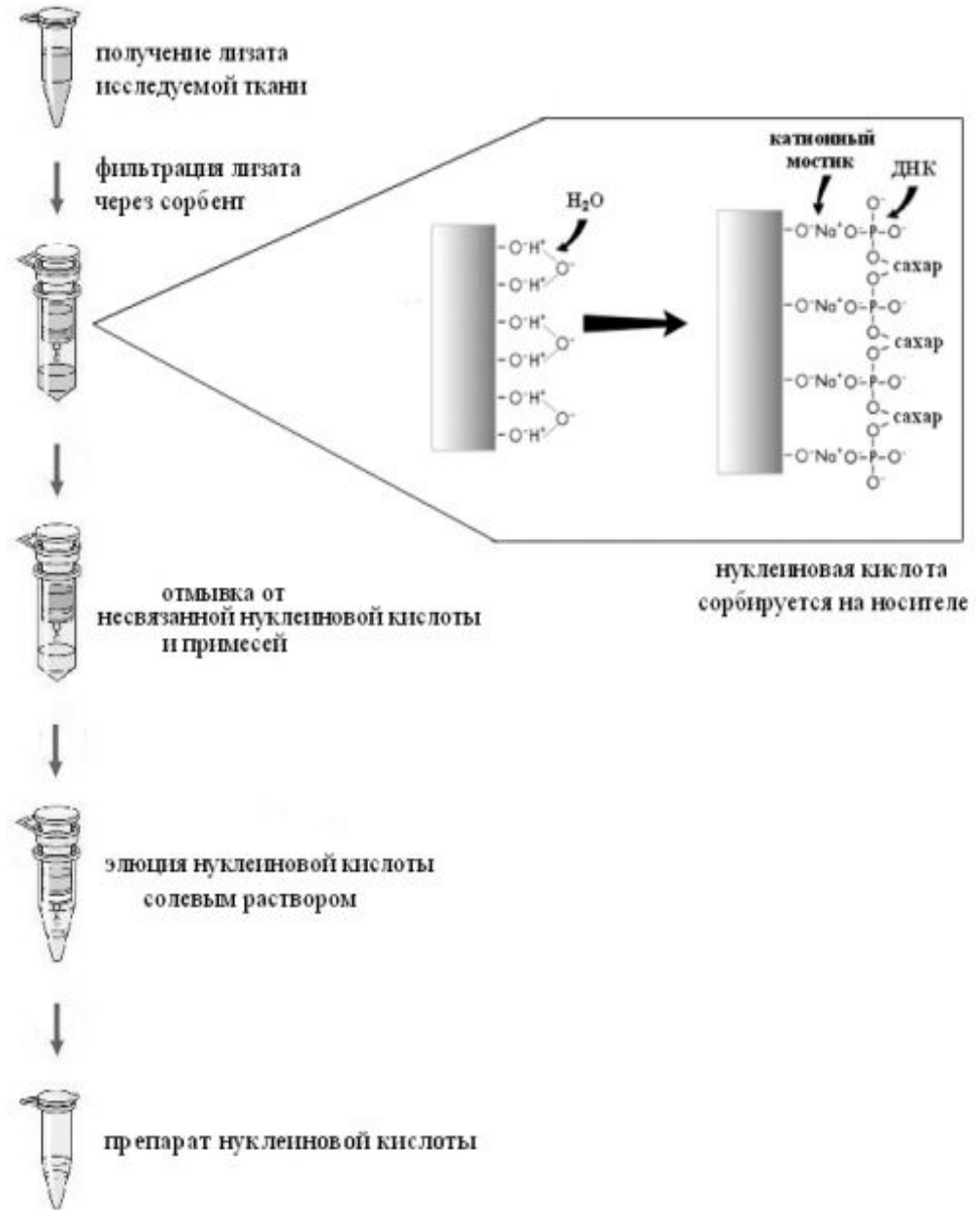
Преимущество – быстрота метода (час).

Недостаток – низкое качество выделенного препарата НК – загрязнение продуктами лизиса клеток (белками и липидами) – можно поставить ПЦР несколько раз, затем под действием высвободившихся нуклеаз ДНК и РНК будут деградированы. Кроме того, многие примеси являются ингибиторами полимераз, поэтому такие образцы могут быть не пригодны для анализа с уже отработанными на чистых препаратах условиями ПЦР, ОТ, или требовать применения специальных дорогостоящих смесей полимераз.

Метод сорбции нуклеиновых кислот на силиконовом носителе

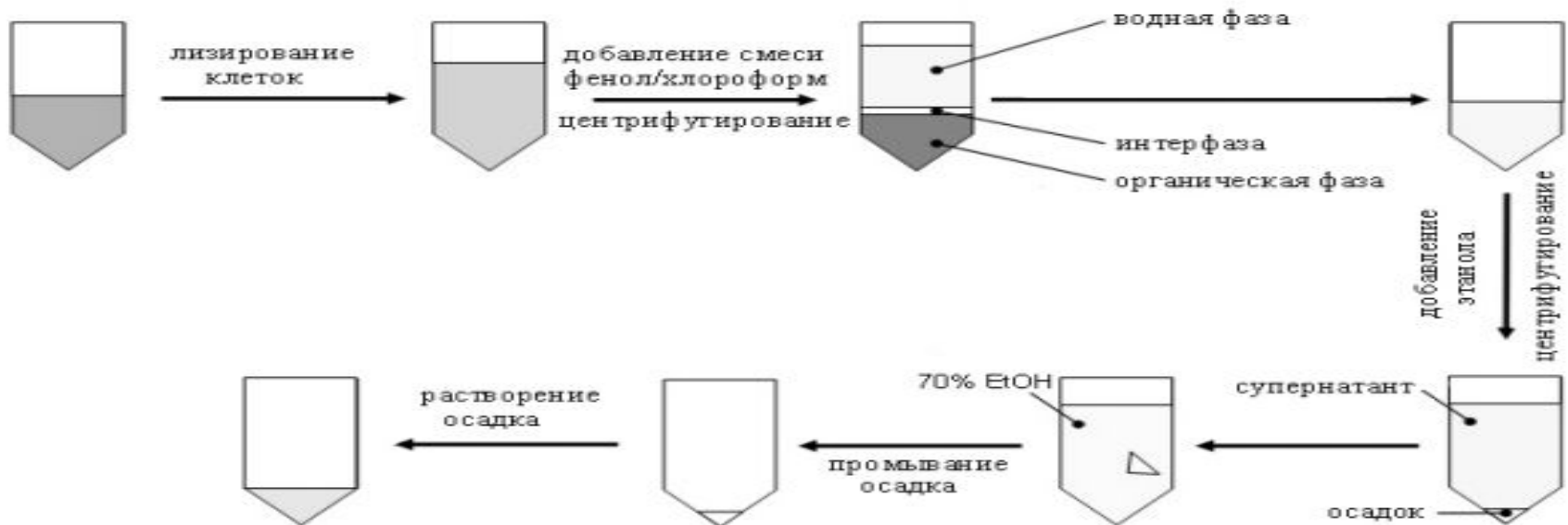
В основе лежит избирательная сорбция НК в присутствии хаотропной соли на носитель, содержащий кремний (сuspензии стеклянных порошков, диатомовые земли, диоксид кремния, стеклянные волокна). В качестве хаотропной соли используют перхлорат натрия, гуанидин тиоционат и др. Следует отметить, что многие из используемых хаотропных солей так же осуществляют лизис клеточных компонентов. После аффинной сорбции НК на поверхности носителя ингибиторы ферментативных реакций, другие примеси и компоненты биологического материала остаются в растворе. Носитель, связавший НК, осаждается с помощью центрифугирования, а надосадочная жидкость удаляется. Серия последующих отмывок обеспечивает получение

НОСИТЕЛЕ



Метод фенол-хлороформной экстракции

Принцип метода основан на том, что НК является полярной молекулой и не растворяется в органических растворителях. Смесь фенола с хлороформом не смешивается с водой. При добавлении к лизату смеси фенола с хлороформом и интенсивном перемешивании, присутствующие в растворе белки денатурируют, а гидрофобные примеси (липиды, жиры и др.) растворяются хлороформом. Последующее центрифугирование приводит к разделению на водную (верхнюю) и органическую (нижнюю) фазы. НК находится в водной фазе, а денатурированные белки формируют кольцо на границе раздела фаз или растворяются в нижней фазе.

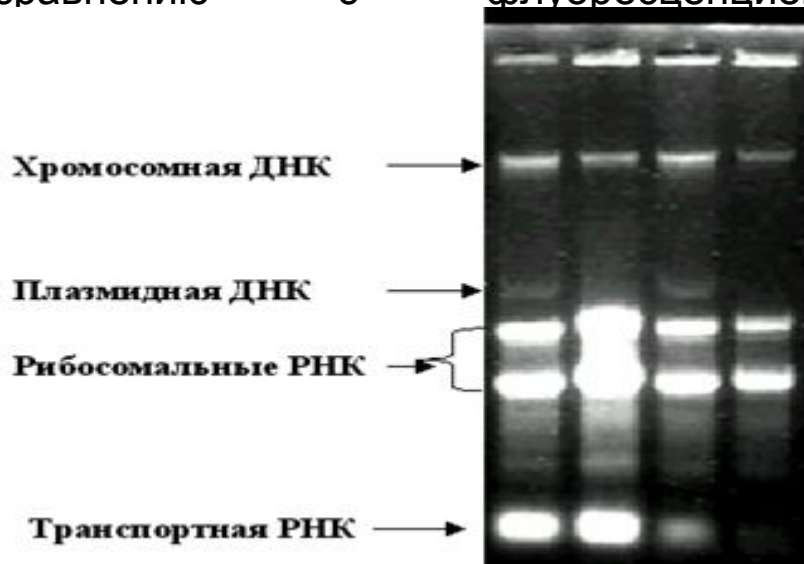


Выделение ДНК и РНК из парафиновых блоков

1. Получение срезов. После того, как морфолог отберет нужный блок, с него делают 3-5 срезов по 10 мкм каждый в 1,5 мл пробирку.
2. Депарафинизация. Добавляют 1 мл ксилола, перемешивают, инкубируют 5-15 мин при 50°C. Осаждают фрагменты ткани центрифугированием, отбирают ксилол, добавляют 1 мл 96% этанола, перемешивают на вортексе. Затем центрифугируют 1-2 мин при максимальных оборотах, отбирают спирт, высушивают осадок.
3. Лизис. Добавляют протеиназу К и лизирующий буфер, инкубируют при 56°C (в зависимости от объема ткани – от часа до следующего дня). Далее выделение с помощью сорбции на колонке.

Определение количества и качества нуклеиновых кислот

Качественный метод – электрофорез в агарозном геле нуклеиновой кислоты и контрольного образца с известной концентрацией (например, коммерческий маркер размерности ДНК). При этом для более точного определения количества нуклеиновой кислоты используют стандартное разведение контрольного образца. После проведения электрофореза концентрацию препарата нуклеиновой кислоты оценивают по яркости свечения полосы в ультрафиолетовом свете по сравнению с флуоресценцией



Количественный метод – измерение концентрации с помощью спектрофотометра или флуориметра. Белки и нуклеиновые кислоты УФ между 210 и 300 нм. Максимум поглощения растворов ДНК и РНК при 260 нм, а для белков – 280 нм. Для оценки содержания примесей препарата НК используют отношение A_{260}/A_{280} , которое для чистого препарата ДНК приблизительно равно 1,8, а для РНК – 2,0. При использовании флуориметра Qubit измеряется свечение от разных флуорофоров, каждый из которых специфично связывается с ДНК, РНК или белками, т.е. это более точное измерение, чем на спектрофотометре (но более дорогостоящее – необходимо пе ра



Дополнительная обработка образцов нуклеиновых кислот ферментами нуклеинового обмена

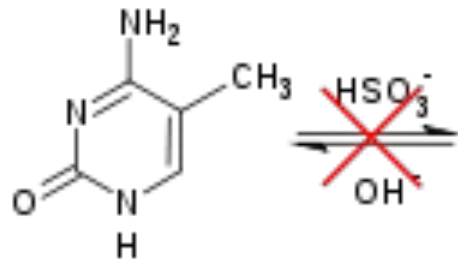
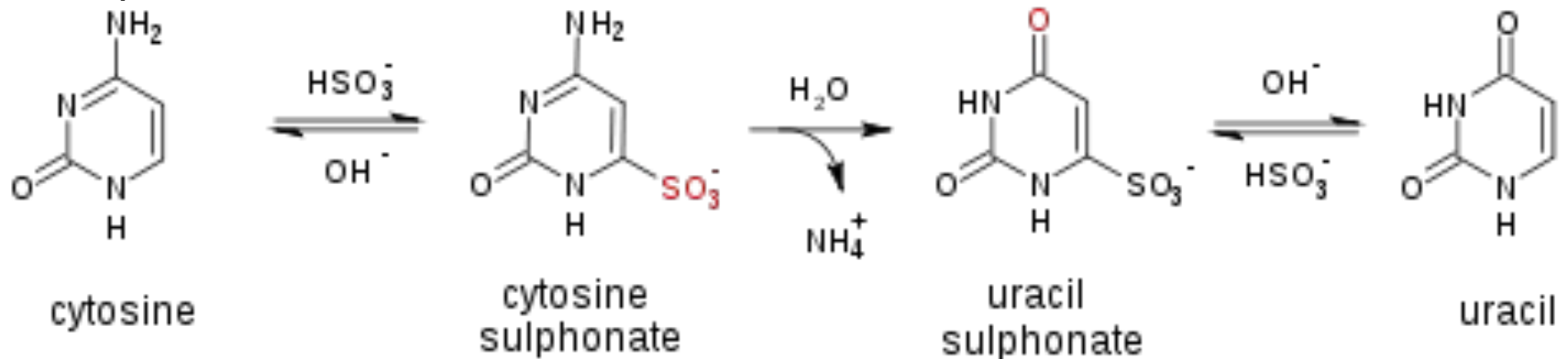
Если нужно получить ДНК без примеси РНК, то обрабатывают образец РНКазой H.

Если нужно получить РНК без примеси ДНК (что бывает гораздо чаще, например, при исследовании экспрессии генов), то обрабатывают образец ДНКазой I.

В некоторых экспериментах нужно обработать геномную ДНК рестриктазами (например, частощепящими рестриктазами для гибридизации по Саузерну, но это уже история). В частности, метилчувствительными рестриктазами HhaI или HpaII перед постановкой метилчувствительной ПЦР.

Дополнительная пробоподготовка: бисульфитная конверсия

Перед проведением метилспецифичной ПЦР или бисульфитного секвенирования необходимо провести обработку ДНК бисульфитом натрия и щелочью, чтобы неметилированные цитозины перевести в урацил (метилированные цитозины останутся интактными). Это позволит потом дискриминировать метилированные и неметилированные аллели с помощью праймеров.

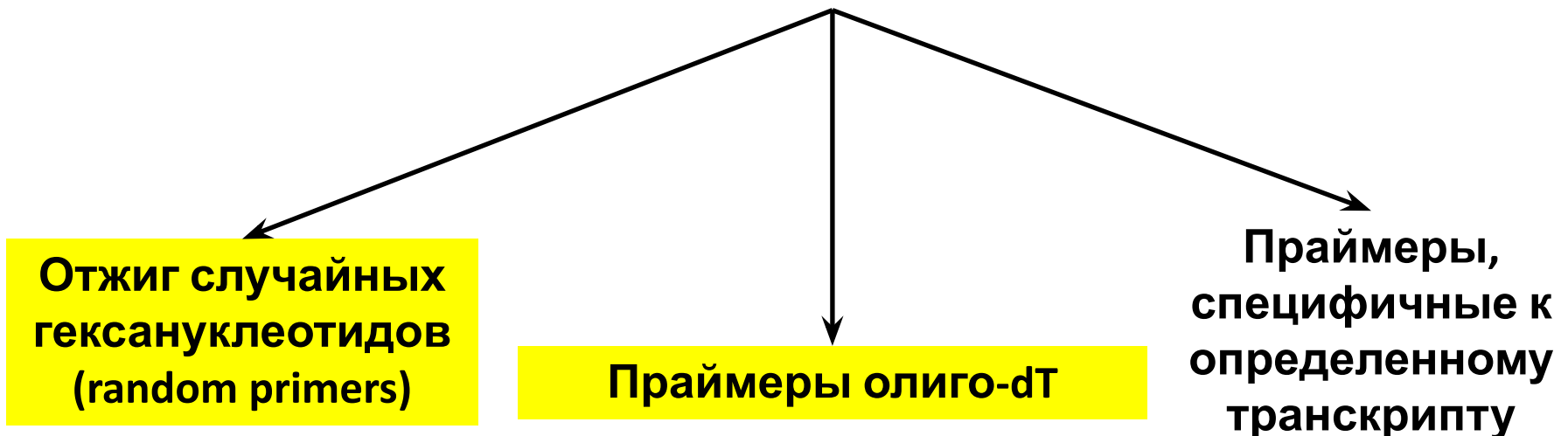


5-methylcytosine

Дополнительная пробоподготовка: обратная транскрипция

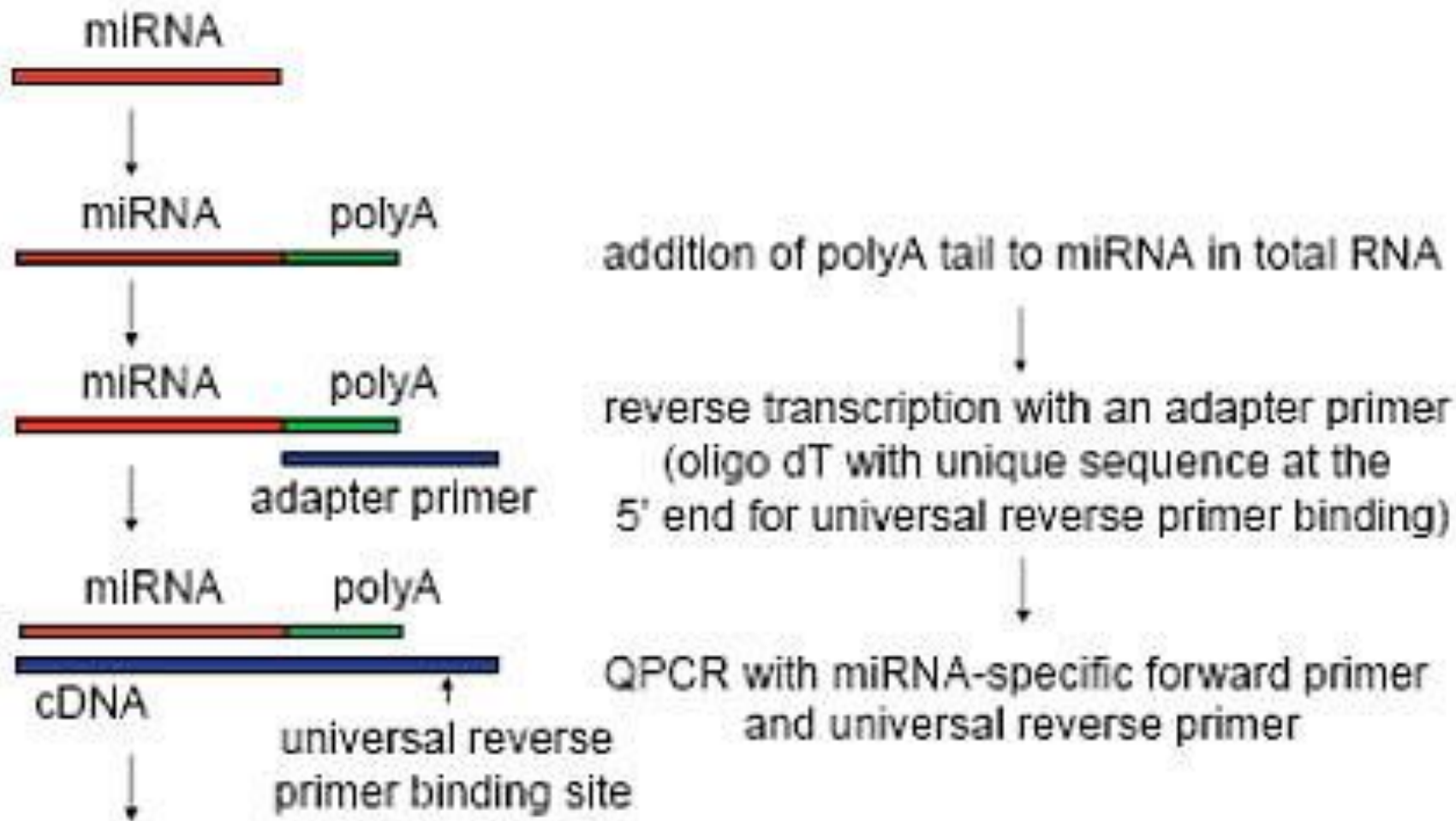
Как правило, полимеразы, используемые в ПЦР, нуждаются в матрице ДНК. Поэтому для анализа, например, экспрессии генов необходимо синтезировать кДНК на имеющейся в образце РНК. Эта реакция называется обратной транскрипцией (ОТ) и осуществляется РНК-зависимыми ДНК-полимеразами. Для них тоже необходимы праймеры, в зависимости от схемы эксперимента для ОТ используют разные типы олигонуклеотидов:

Обратная транскрипция



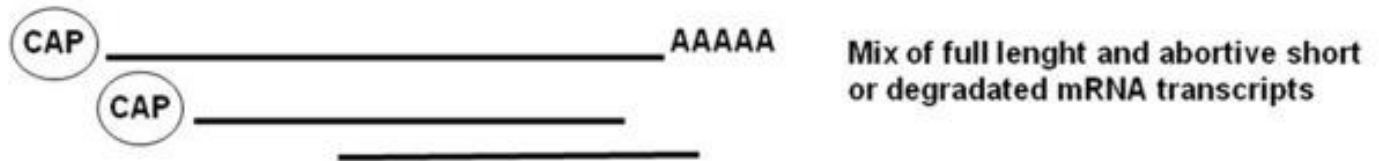
*основные варианты ОТ выделены желтым

Обратная транскрипция с олиго-dT-праймерами

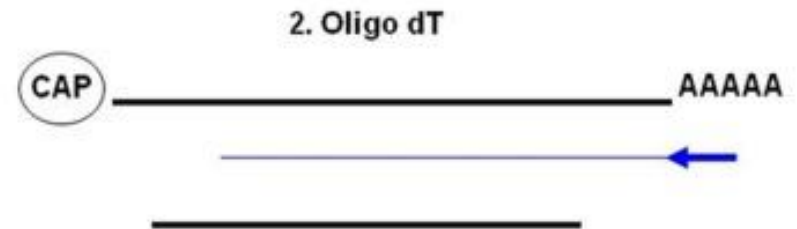
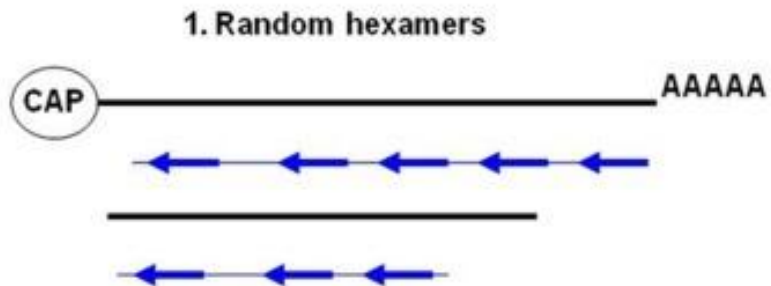


Обратная транскрипция со случайными гексамерами

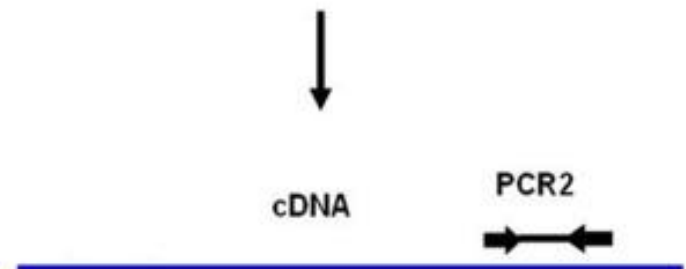
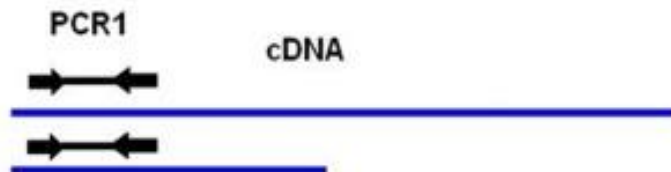
1. mRNA isolation



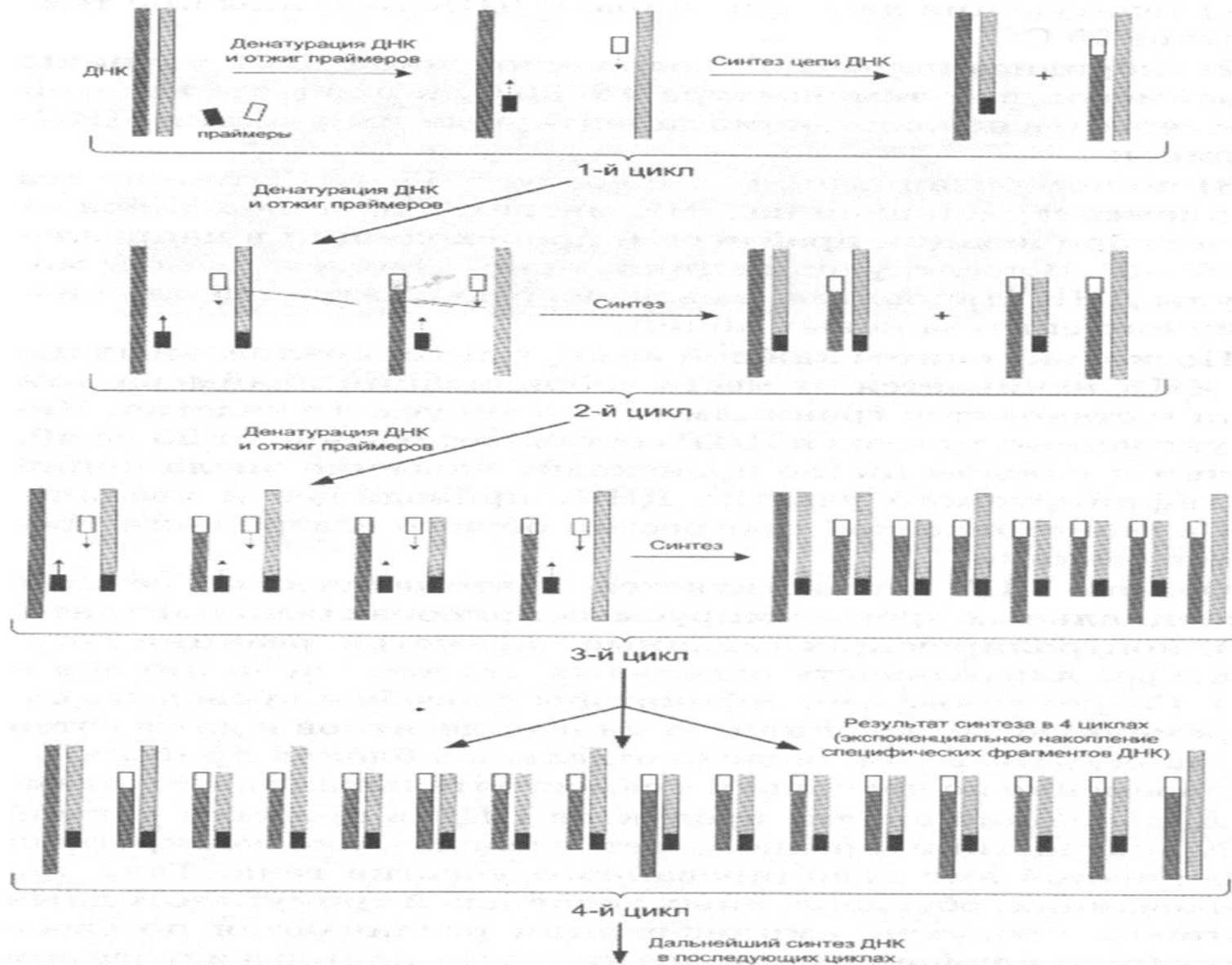
2. Reverse transcription



3. qRT-PCR



Метод ПЦР – краткое напоминание



ПЦР – это качественный или количественный анализ?

Если оценивать по конечной точке - качественный

$N_n = N_0 2^n$, где:

n – номер цикла реакции, N_0 – количество целевых молекул в начале реакции, N_n – количество продуктов реакции на цикле n и 2 – эффективность ПЦР.

Эффективность ПЦР, как правило, не бывает строго равна 2 и меняется на протяжении ПЦР, особенно в конце реакции, когда возникает конкуренция между процессами отжига праймеров и реассоциации ампликонов, или заканчивается один из компонентов ПЦР. С учетом эффективности как переменной величины, количество нарабатываемой ДНК будет равно:

$N_n = N_0 E^n$, где E – эффективность ПЦР.

E – это число, показывающее, во сколько раз за один цикл реакции изменится количество фрагментов ДНК. Даже небольшие изменения E ведут к существенным различиям в получаемых в ходе эксперимента результатах ПЦР. Так, отличие E на 0.15 к 30 -му циклу



ПЦР – это качественный или количественный анализ?

Если измерять концентрации продуктов в log-фазе - количественный

$N_n = N_0 E^n$, тогда:

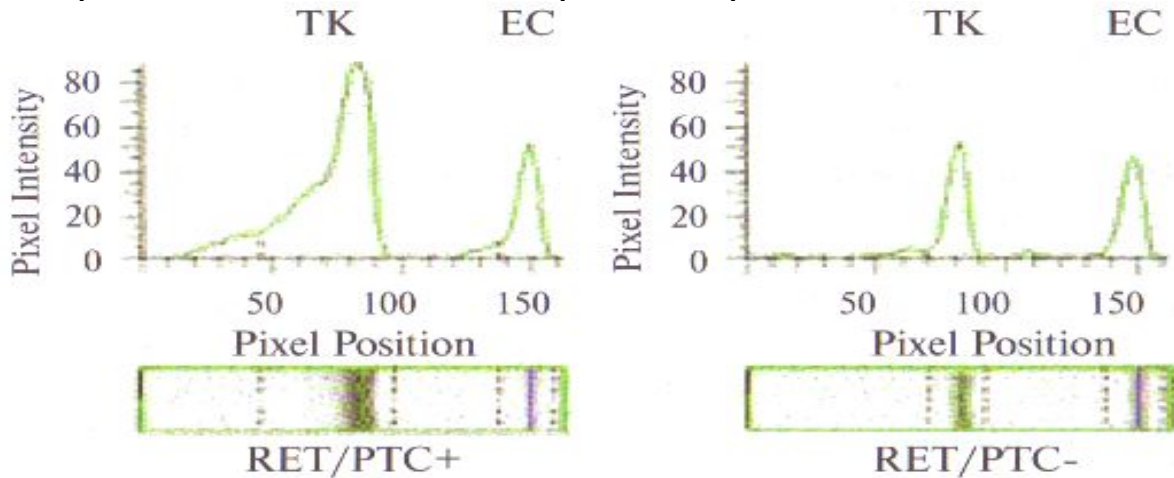
$N1_n/N2_n = (N1_0/N2_0)(E1/E2)$ - отношение количества ПЦР-продуктов при одновременной амплификации 2 локусов. Если n относится к экспоненциальной фазе, то: $E1 = E2 \approx 2$, следовательно:

$$N1_n/N2_n = N1_0/N2_0$$

При денситометрии в геле $N1 = a1S1$, $N2 = a2S2$, где $a1$ и $a2$ – коэффициенты пропорциональности. Если a одинаковы по анализируемой площади геля и для всех нанесенных образцов, то: $N1_n/N2_n = S1/S2 = N1_0/N2_0$

Трудности:

- надо точно знать, на каком цикле остановить реакцию (ПЦР-продукта уже достаточно для определения в геле, но еще идет экспоненциальная фаза)
- в лунки геля должно быть нанесено оптимальное количество ПЦР-продукта
- окраска геля должна быть равномерной по всей площади измерения



Сравнительный анализ экспрессии EC- и ТК-доменов, кодируемых геном *RET*, с помощью мультиплексной ПЦР при папиллярной карциноме щитовидной железы. Программа TotalLab v.1.10.

Программируемые термоциклеры

Что важно учитывать при выборе:

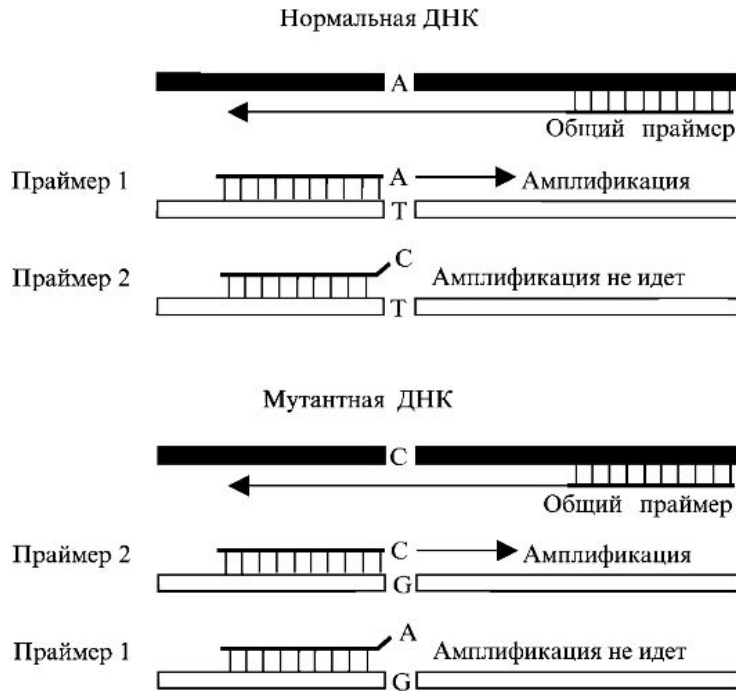
1. Формат (стандартные 0,2 мл, или 0,1 мл, или 0,5 мл в Терцике)
2. Возможность работы с индивидуальными пробирками, стрипами, плашками.
3. Наличие нескольких независимых программируемых модулей, что особенно востребовано в научных лабораториях.



Мультиплексная ПЦР

1. При увеличении количества локусов в мультиплексной ПЦР, практически, экспоненциально растут затраты времени на отработку условий.
2. Необходимо подбирать праймеры с, примерно, одинаковой температурой отжига. Желательно также проверять праймеры на образование дуплексов между разными парами.
3. При электрофоретической детекции обеспечить разницу между соседними по длине ПЦР-продуктами, хотя бы в несколько десятков п.н. Если используют меченые праймеры с разными флуорофорами и затем продукты мультиплексной ПЦР детектируют на секвенаторе в режиме фрагментного анализа, то можно располагать их ближе по длине, они даже могут перекрываться, но в этом случае возникают ограничения по сбалансированности высоты пиков и др.

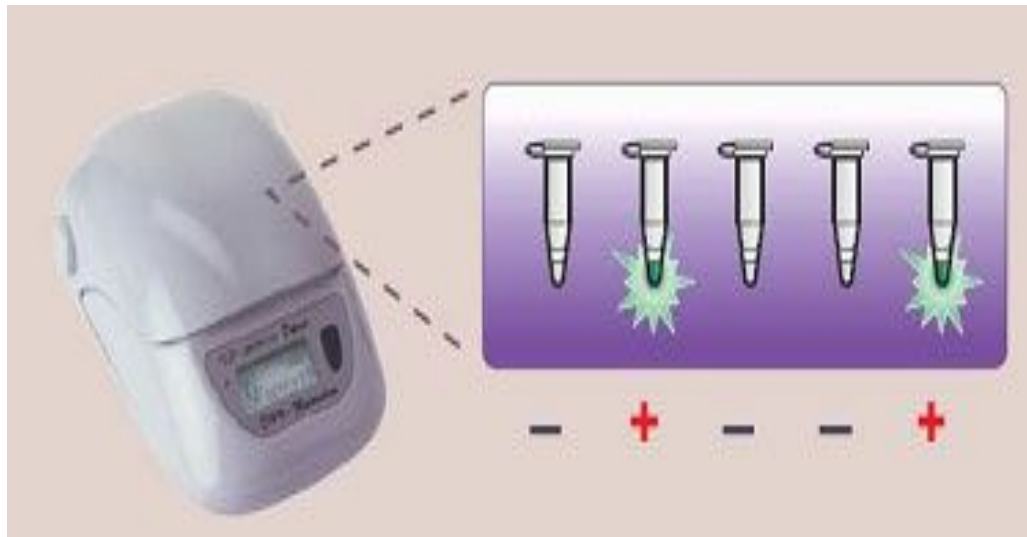
Аллель-специфичная ПЦР



Основная проблема АС-ПЦР – это неспецифический синтез с частично комплементарного праймера. Решения: вводить неспаренные основания недалеко от 3'-конца праймера, использовать LNA, блокирующие олиги на другой аллель, долго отрабатывать условия.



Способы визуализации ПЦР «по конечной точке»

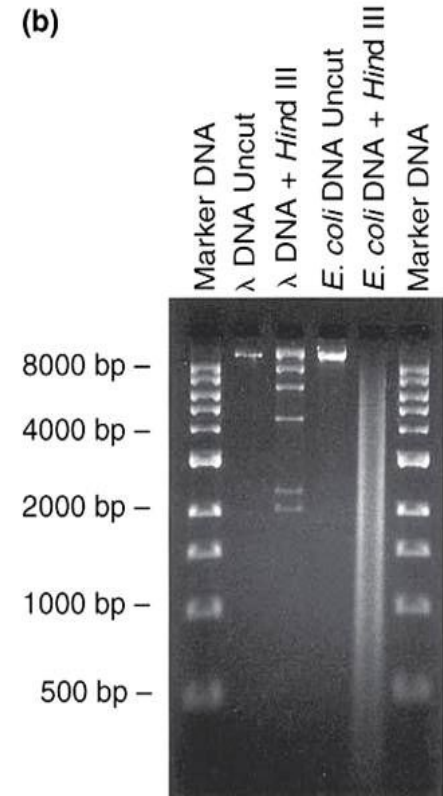
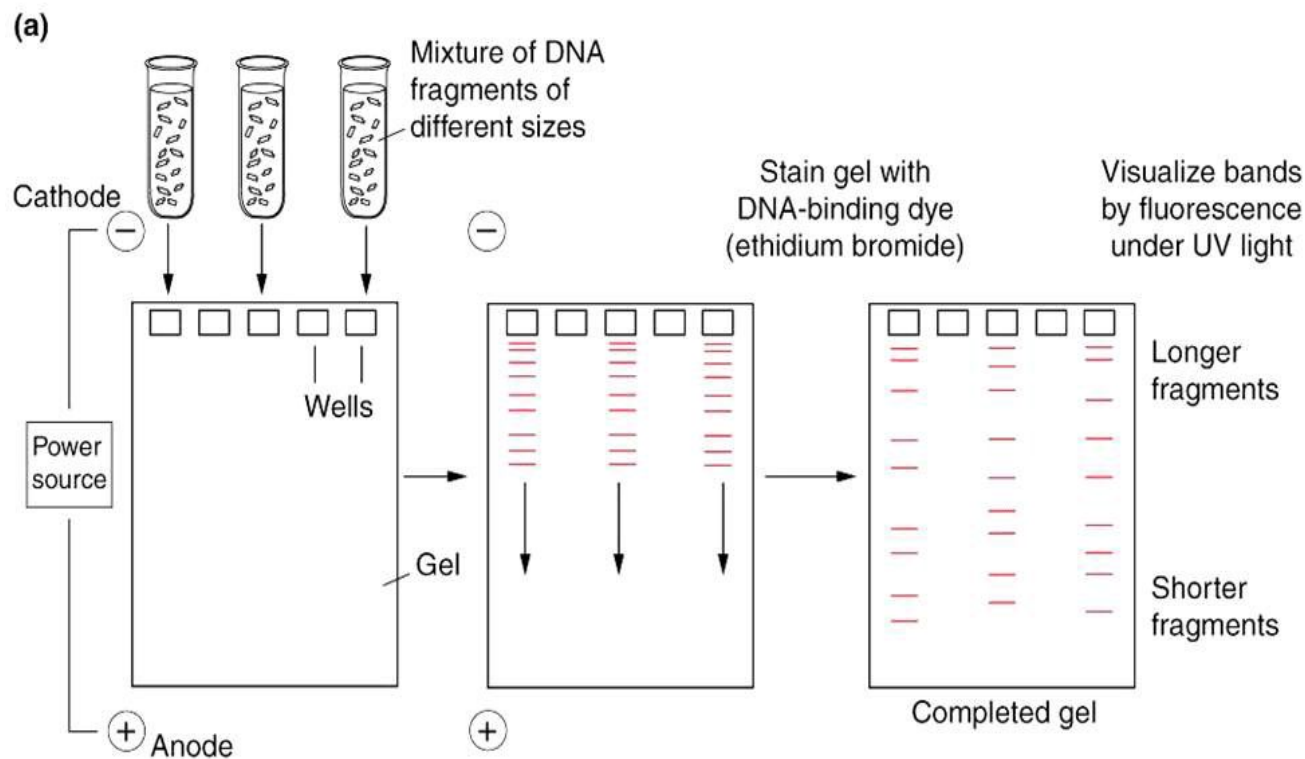


Детекция по конечной
точке:

1. FLASH
2. Электрофорез в геле

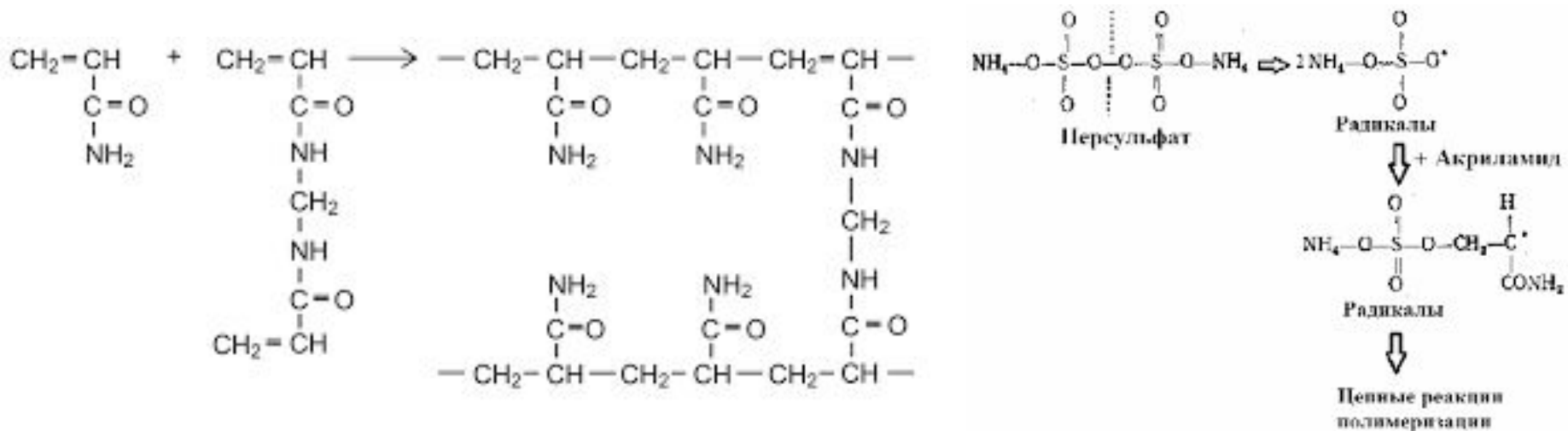
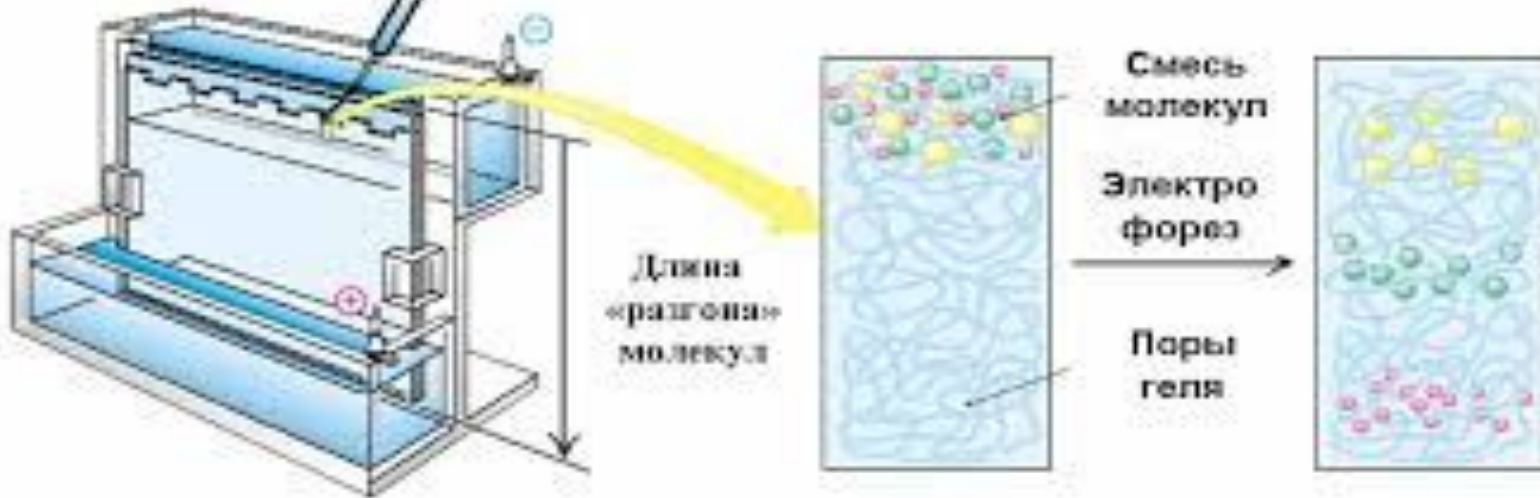
Электрофорез в агарозном геле

Гель формируется за счет нековалентных связей. Имеет относительно низкую разрешающую способность. Раньше широко использовался в диагностических лабораториях. Сейчас, в основном, его используют для препаративного электрофореза.



Электрофорез в полиакриламидном геле

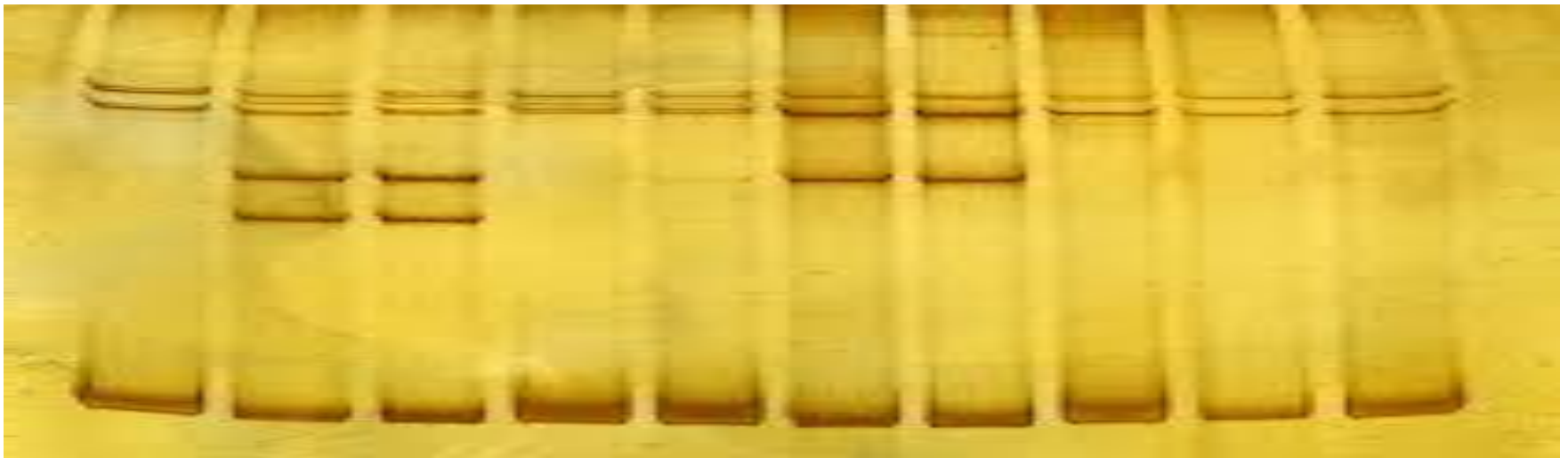
Большая разрешающая способность. Часто используют в молекулярно-генетической диагностике. Красить лучше нитратом серебра (наиболее чувствительная окраска).



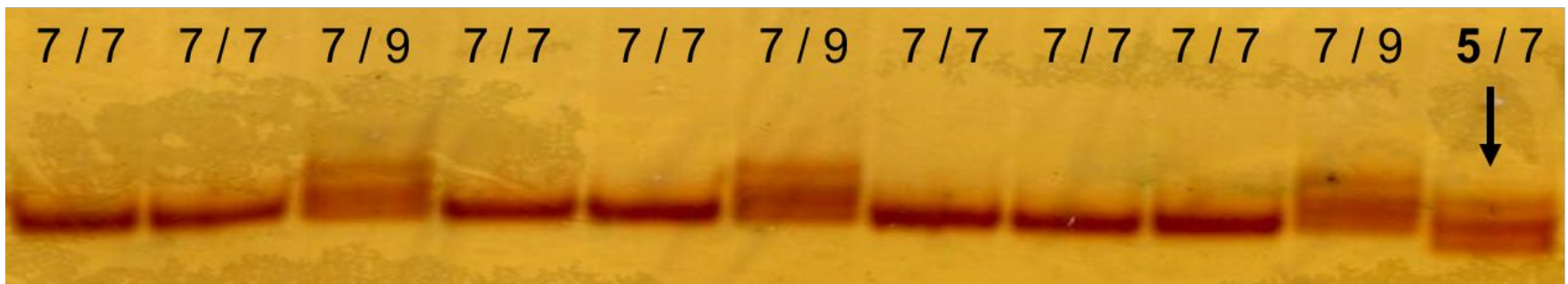
Гетеродуплексный анализ

Метод основан на том, что при ренатурации смеси нормальных и мутантных аллелей наряду с нормальным и мутантным гомодуплексами образуются гетеродуплексы между нормальной и мутантной цепочками ДНК с выпетливаниями между ними. Они отличаются по подвижности при электрофорезе от гомодуплексов. Применяются для:

1. Скрининга образцов на наличие делеций/инсерций

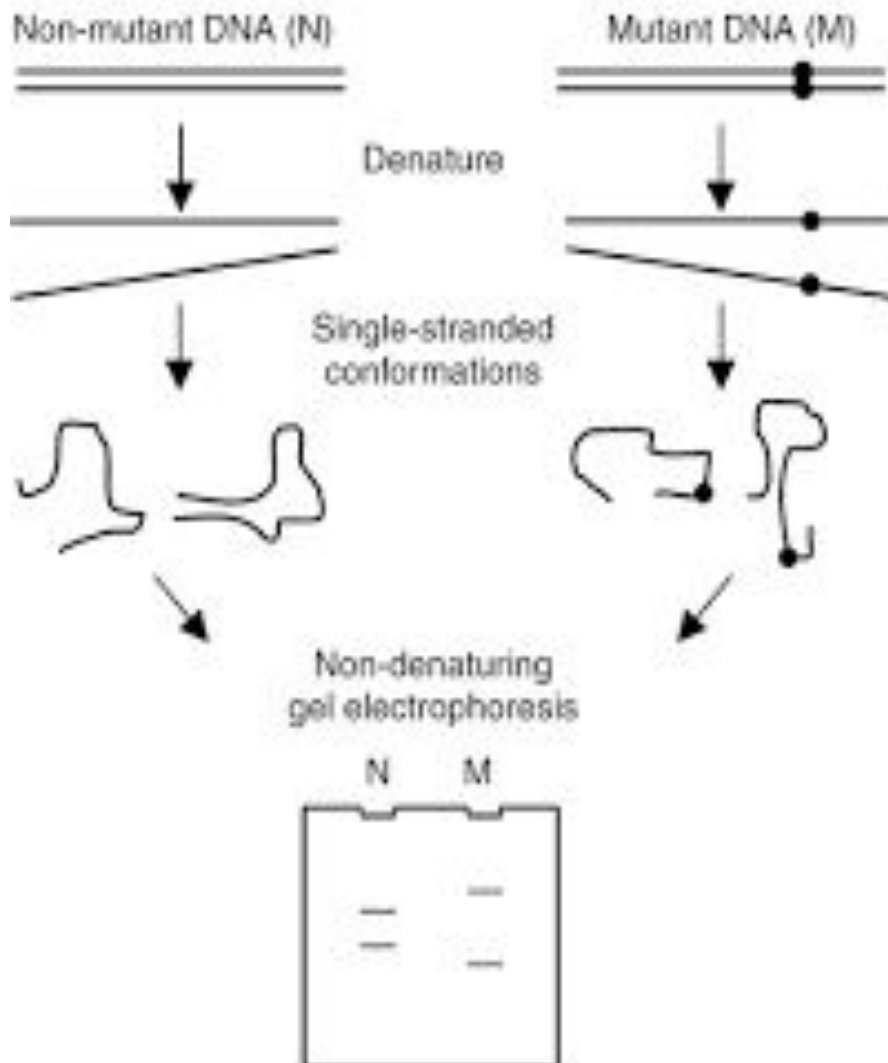


2. Генотипирования по известным аллелям



SSCP-анализ

SSCP



SSCP – Single Strand Conformation Polymorphism. Метод основан на разной подвижности при электрофорезе в ПААГ быстро ренатурированной одноцепочной ДНК референсного и мутантного аллелей. Применяется для скрининга наличия мутаций (полиморфизмов). Недостаток – нельзя определить новую мутацию без последующего секвенирования.

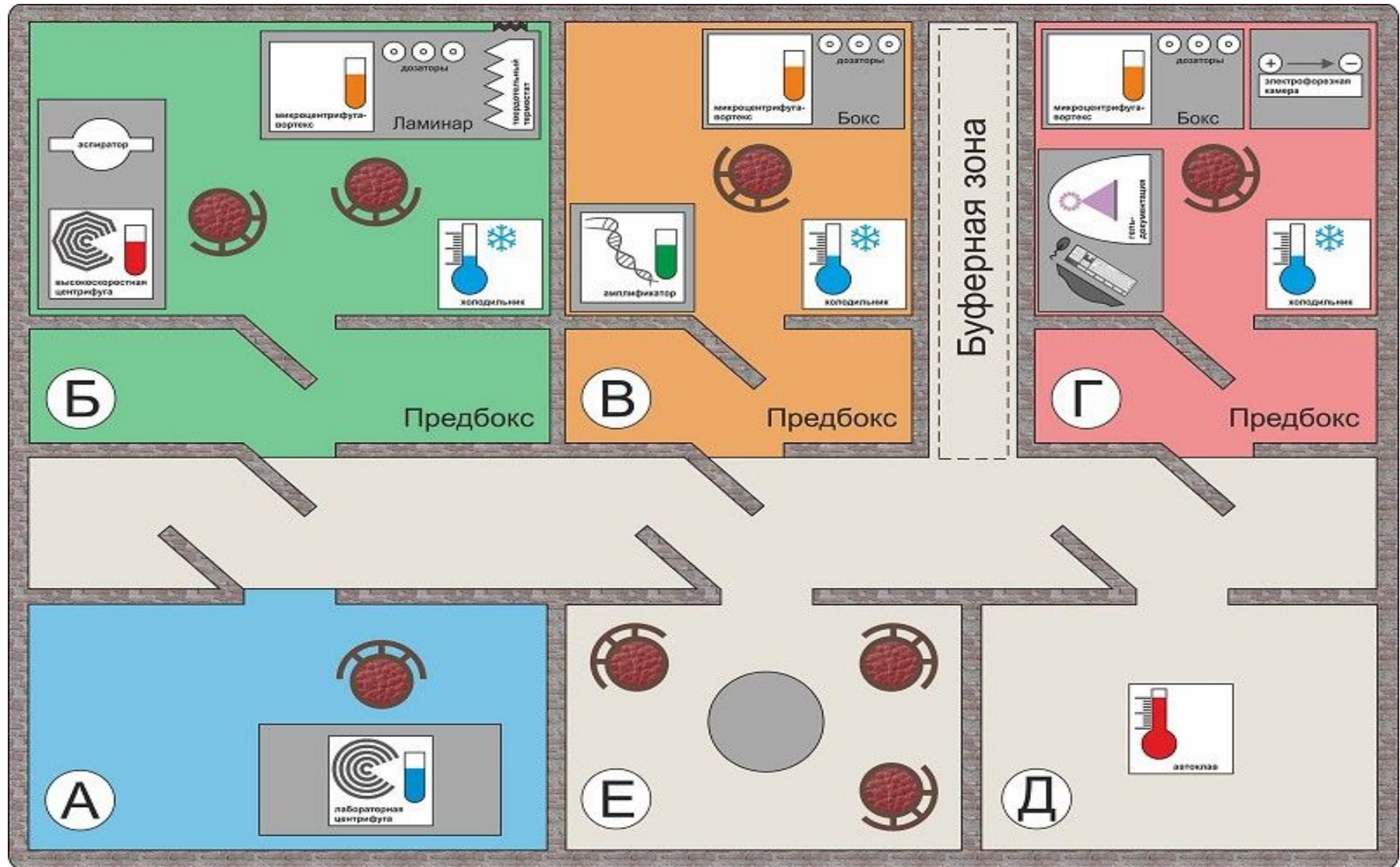


Figure 2 PCR-SSCP analysis of the CYP2D6*10.

Notes: The two, three, and four bands in each lane represent the homozygous wild-type (C/C), homozygous (T/T), and heterozygous (C/T) alleles of the CYP2D6*10, respectively; Lanes 1 and 2 represent the heterozygous C/T genotype (four fragments), lane 3 represents the homozygous T/T genotype (three fragments), while lane 4 represents the wild-type C/C genotype (two fragments).

Abbreviation: PCR-SSCP, polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism.

Требования к организации работы ПЦР-лабораторий



Если есть реал-тайм ПЦР, то зона Г не нужна. Д – можно рассматривать как склад.

Вопросы к тесту

1. Для выделения ДНК из каких образцов необходим этап механической гомогенизации:

- кровь
- срезы с парафиновых блоков
- замороженные кусочки ткани
- соскоб из уретры

2. К основным этапам фенол-хлороформной экстракции ДНК (РНК) относятся:

- лизис клеток
- экстракция смесью фенол-хлороформ
- сорбция на стеклянных шариках
- осаждение ДНК (РНК) спиртом

3. Какими методами можно оценить качество полученного препарата нуклеиновых кислот:

- электрофорезом в 1% агарозном геле с окраской бромистым этидием
- на спектрофотометре по отношению A_{260} / A_{280}
- на флуориметре типа Qubit со специфичными флуорофорами

4. Какая модификация электрофореза в ПААГ может выявить различия в подвижности однонитевых молекул ДНК (ПЦР-продуктов) референсного и мутантного аллелей, возникающих вследствие их разной конформации при ренатурации:

- гетеродуплексный анализ
- SSCP-анализ
- ПЦР-ПДРФ
- ни одна из перечисленных выше