

Тело человека весом 70 кг , включает 42 кг воды + 28 кг органического вещества и только около **1,3 кг (??)** нуклеиновых кислот.



Объект	Размер гаплоидного генома в п.н.
Вирусы	$3 \cdot 10^4 - 2 \cdot 10^5$
Бактерии	$10^5 - 10^7$
Грибы	$2 \cdot 10^7 - 1,8 \cdot 10^8$
Водоросли	$5 \cdot 10^7 - 7 \cdot 10^7$
Черви	$\sim 10^8$
Моллюски	$5 \cdot 10^8 - 5 \cdot 10^9$
Насекомые	$10^8 - 5 \cdot 10^9$
Ракообразные	$\sim 10^9$
Иглокожие	$2 \cdot 10^8 - 2 \cdot 10^9$
Рыбы	$3 \cdot 10^8 - 10^{10}$
Амфибии	$7 \cdot 10^8 - 7 \cdot 10^{10}$
Рептилии	$2 \cdot 10^9 - 3 \cdot 10^9$
Птицы	$\sim 10^9$
Млекопитающие	$\sim 3 \cdot 10^9$
Цветковые растения	$2 \cdot 10^8 - 10^{11}$

Методы исследования первичной и вторичной структуры нуклеиновых кислот

- 1. Выделение ДНК и РНК**
- 2. Физико-химические свойства ДНК**
- 3. Методы анализа первичной структуры ДНК**
- 4. Методы анализа вторичной структуры ДНК**
- 5. Методы гибридизации ДНК**

1.Этапы выделения ДНК и РНК

- 1. Разрушение клеток.**
- 2. Отделение нуклеиновых кислот от белков, полисахаридов и др. соединений.**
- 3. Осаждение нуклеиновых кислот.**
- 4. Анализ чистоты препарата.**

В зависимости от того, из какого организма выделяют ДНК используют различные методы разрушения клеток:

1. Для разрушения клеток бактерий используют химические вещества, разрушающие клеточную стенку бактерий – ЭДТА, лизоцим, ультразвук, гомогенизация и др. Для лизиса клеток и денатурации белков часто используется детергент додецилсульфат натрия или гуанидинизотиоцианат.
2. Разрушение клеток животных и человека не вызывает сложностей: используют гомогенизацию, обработку SDS, либо клетки обрабатывают протеиназами.
3. Для разрушения клеточных стенок растений – ферменты, разрушающие целлюлозу, замораживание в жидком азоте и последующее механическое разрушение клеток и др. Часто используют обработку детергентами, растворяющих мембраны клеток, и хелатирующими агентами, подавляющих действие клеточных нуклеаз за счёт связывания двухвалентных катионов.

2. Отделение нуклеиновых кислот от белков осуществляют :

- депротеинизацию клеточного лизата чаще всего осуществляют с помощью фенола и хлороформа (белки переходят в фазу растворителя).

Молекулярщики часто подразумевают смесь водонасыщенного фенола с хлороформом 1:1, а не кристаллическое вещество. В смеси с хлороформом фенол работает эффективнее, а изоамиловый спирт гасит пенообразование.

-

Часто белки разрушают протеиназами, например, протеиназой К; центрифугированием для удаления денатурированных белков и фрагментов клеточных органелл.

Ряд современных методов предусматривает осаждение ДНК на гранулах силикагеля, центрифугирование и последующую элюцию ДНК с гранул в раствор.

Некоторые коммерческие наборы предусматривают сорбцию ДНК на мембранах или ионообменных сорбентах.

Нуклеиновые кислоты остаются в водном растворе.

ДНК осаждают из раствора этанолом и после центрифугирования растворяют осадок в буферном растворе.

Вместе с ДНК частично выделяется и РНК, от которой избавляются с помощью фермента РНКазы.

Концентрацию полученной нуклеиновой кислоты, а также наличие примесей (белки) обычно определяют спектрофотометрически по поглощению на A_{260} нм.

Максимум поглощения белка приходится на 280 нм. Одна (каждая) оптическая единица соответствует концентрации ДНК в 50 мкг/мл. Для расчёта можно воспользоваться калькулятором на интернет-ресурсе MOLBIOL.RU (<http://www.molbiol.ru>) или других подобных порталах.

Для оценки чистоты препарата ДНК, свободного от РНК, проводят измерения оптической плотности раствора при длинах волн 260, 280 и 235 нм, т.е. на максимумах поглощения растворов ДНК, белков и полисахаридов, соответственно.

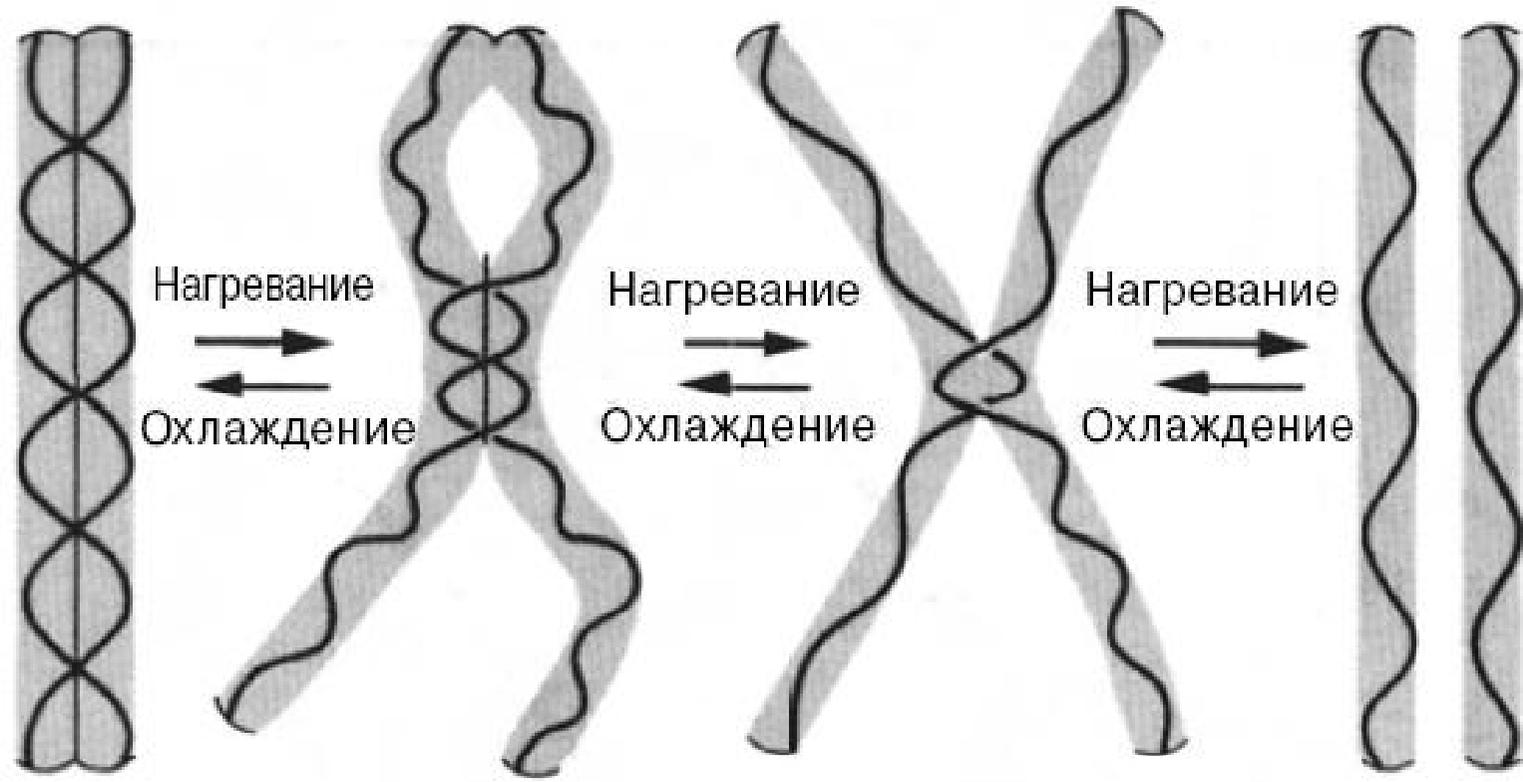
Значение соотношения $A_{260/280}$ для чистой ДНК должно быть больше 1,8.
Значение $A_{260/235}$ должно быть больше, чем 2,2.

2. Физико-химические свойства ДНК и РНК

Физические свойства молекулы ДНК. При повышении температуры или добавлении щелочей происходит разрыв водородных связей между комплементарными основаниями. При этом происходит денатурация (плавление) и нативная двухцепочечная ДНК переходит в одноцепочечную форму. При охлаждении или понижении pH среды происходит ренатурация (отжиг), т.е. восстановление двойной спирали ДНК.

Температура плавления (T_m) – это температура, при которой денатурируется 50% всей ДНК. T_m зависит от содержания Г=Ц пар в молекуле ДНК. У млекопитающих, в том числе и у человека, T_m ДНК составляет 87°C .

Способность ДНК денатурировать и восстанавливать двойную структуру используют для гибридизации при образовании дуплексов ДНК-РНК или ДНК-ДНК.



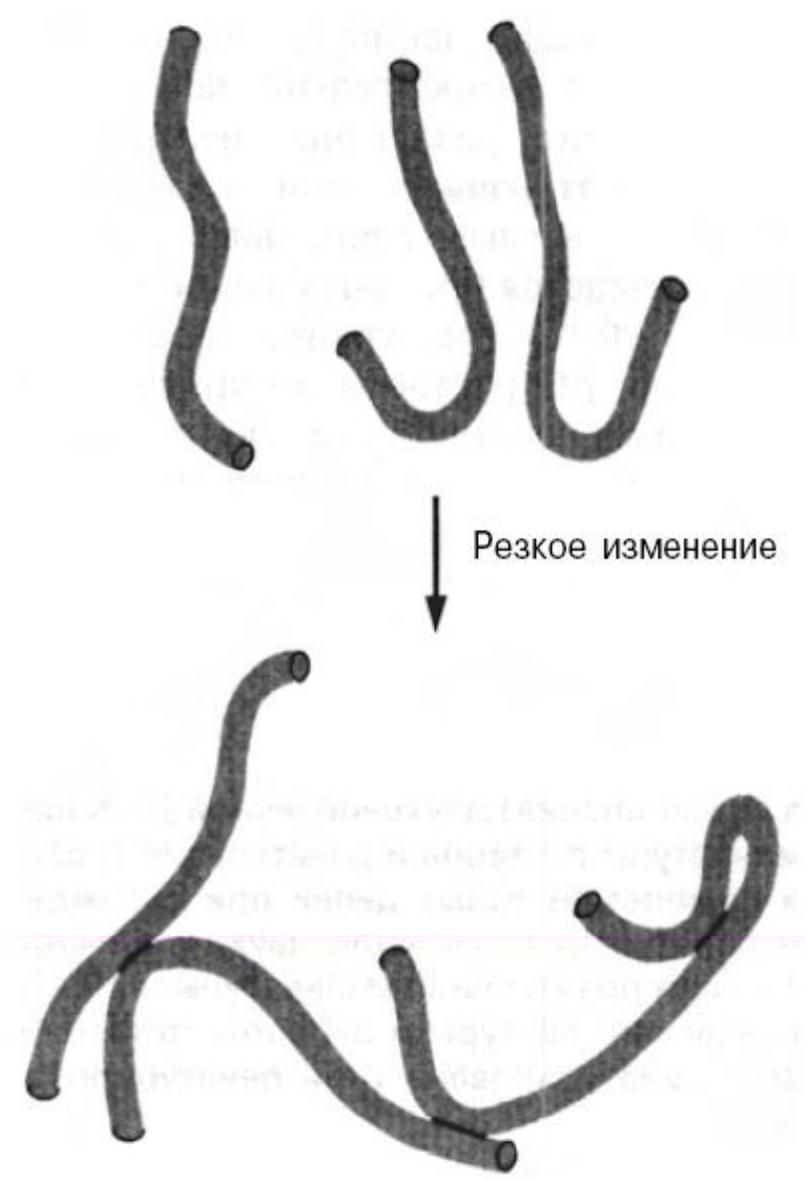
Нативная ДНК

Частично денатурированная ДНК

Почти полностью денатурирования ДНК

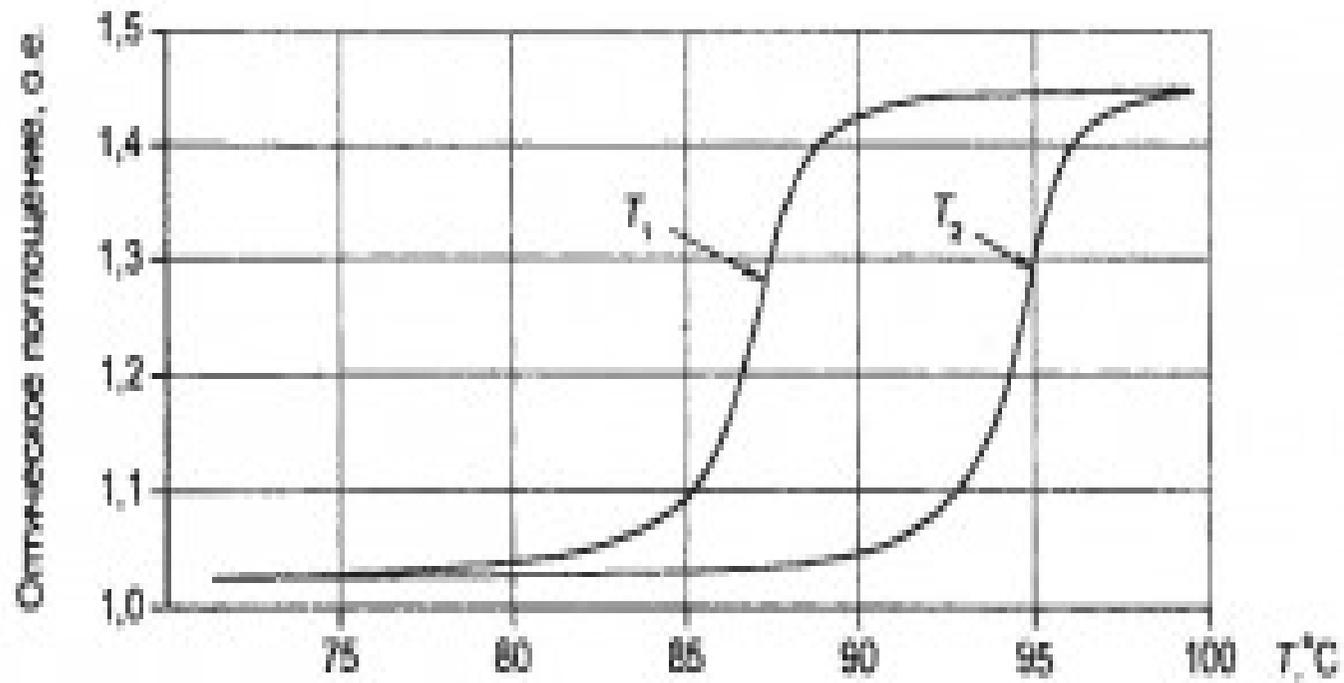
Денатурация происходит также при увеличении рН раствора до уровня, при котором разрушаются водородные связи между основаниями.

Денатурация - процесс обратимый, последующее восстановление двухцепочечной структуры ДНК может происходить даже при полном расхождении цепей. **Процесс воссоединения, называемый ренатурацией, реассоциацией или отжигом, происходит при понижении температуры или рН.** Если температура или рН понижаются постепенно, то цепи соединяются правильно, с восстановлением всех исходных пар оснований. При резком понижении температуры или рН правильное воссоединение комплементарных цепей затрудняется и они остаются в несвязанном состоянии. Этот процесс называется **«quenching»** из-за спаривания оснований локально комплементарных участков в пределах одной или разных цепей.

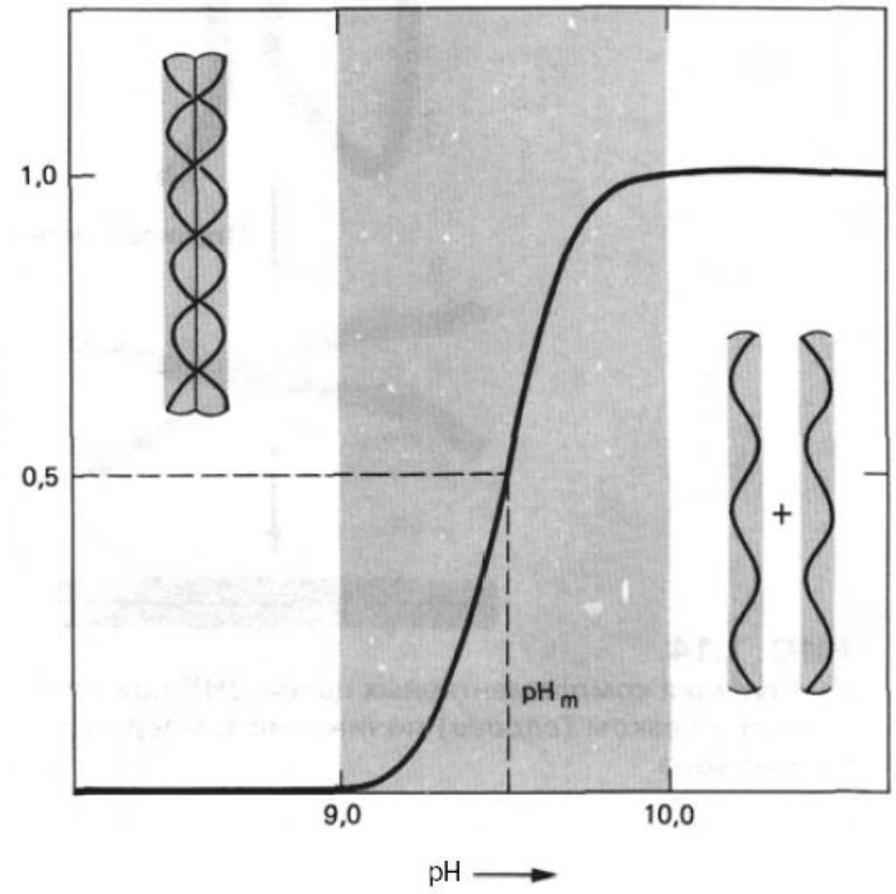
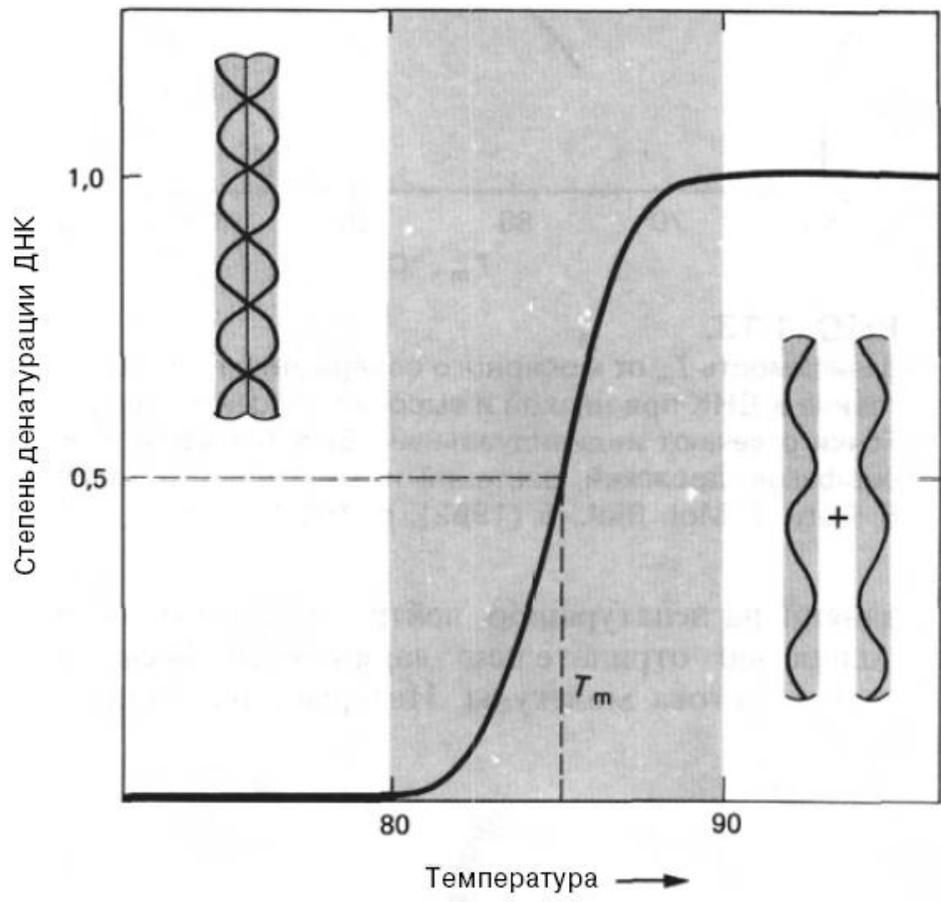


«quenching»

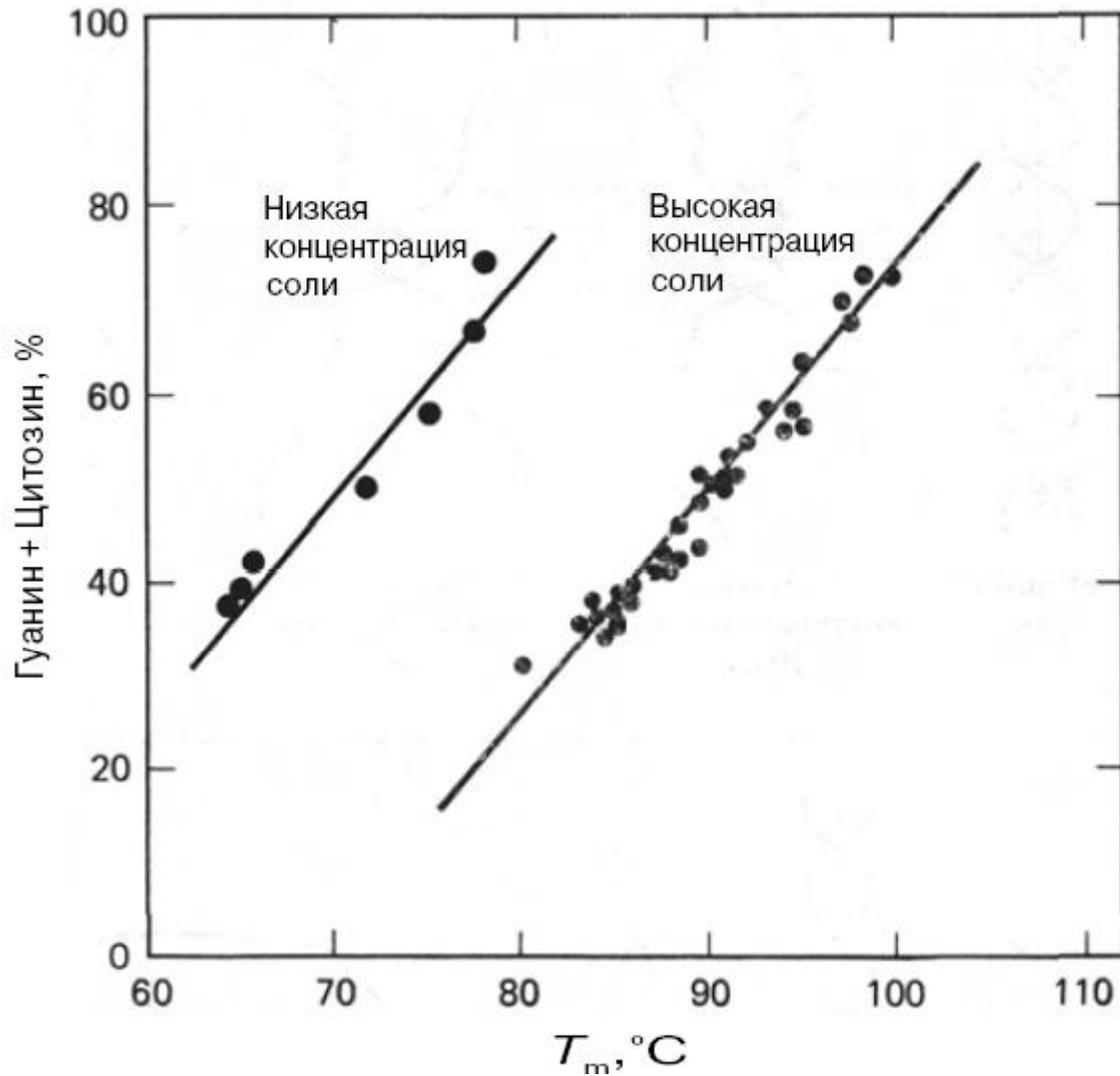
При денатурации изменяются некоторые физические свойства ДНК, например ее оптическая плотность. Азотистые основания поглощают свет в ультрафиолетовой области (с максимумом, близким к 260 нм). ДНК поглощает свет почти на 40 % меньше, чем смесь свободных нуклеотидов того же состава. Это явление называют гипохромным эффектом, а обусловлено оно взаимодействием оснований при их расположении в двойной спирали.



Денатурация ДНК при нагревании, наблюдаемая по изменению ее оптической плотности. Показаны кривые денатурации ДНК, содержащей в своей последовательности 40 % (T₁) и 60 % (T₂) пар G-C



Поскольку для разрушения двух водородных связей АТ-пар требуется меньше энергии, чем для разрыва трех водородных связей GC-пар, значения температуры и рН, при которых происходит денатурация, зависят от нуклеотидного состава ДНК. Чем выше содержание GC-пар, тем выше T_T или pH_m .



Зависимость T_m от молярного содержания гуанина и цитозина в ДНК при низкой и высокой концентрации соли.

Точки отвечают индивидуальным ДНК бактерий, бактериофагов, дрожжей, растений и животных

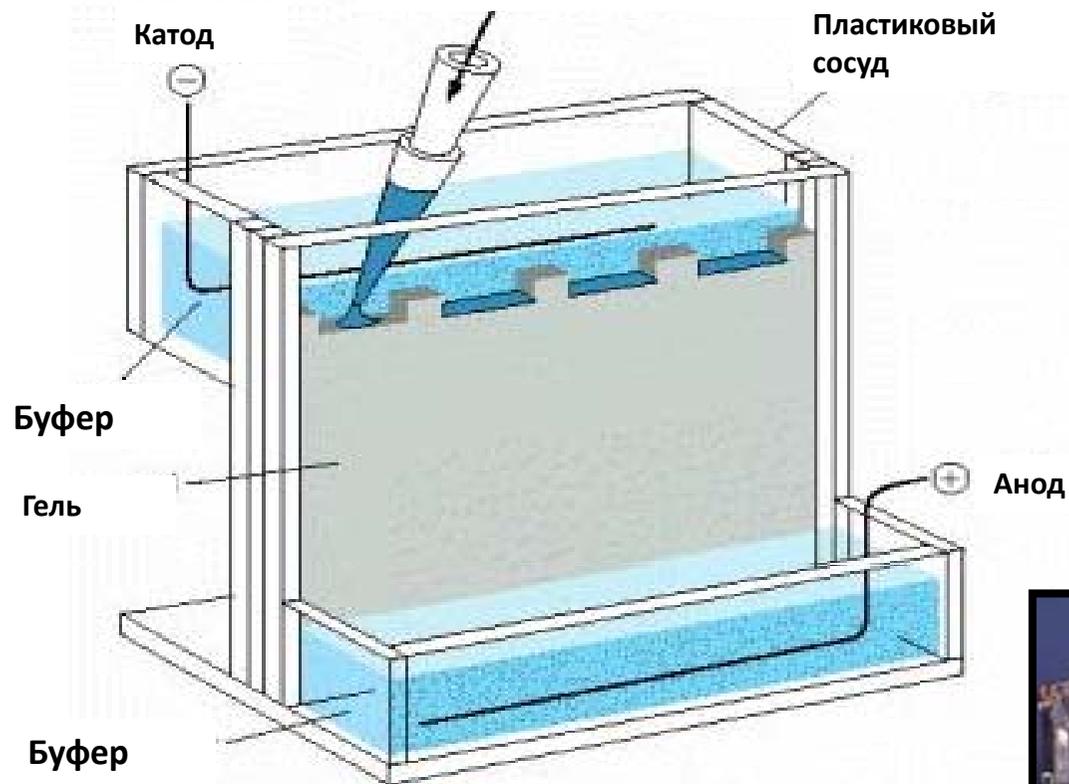
Методы изучения ДНК и РНК

Электрофорез в агарозном геле является стандартным методом для разделения, идентификации и очистки интактных молекул ДНК и их фрагментов (высокомолекулярная хромосомная ДНК всегда фрагментируется при изоляции из клетки). Агароза – фракция природного полисахарида агар-агара.

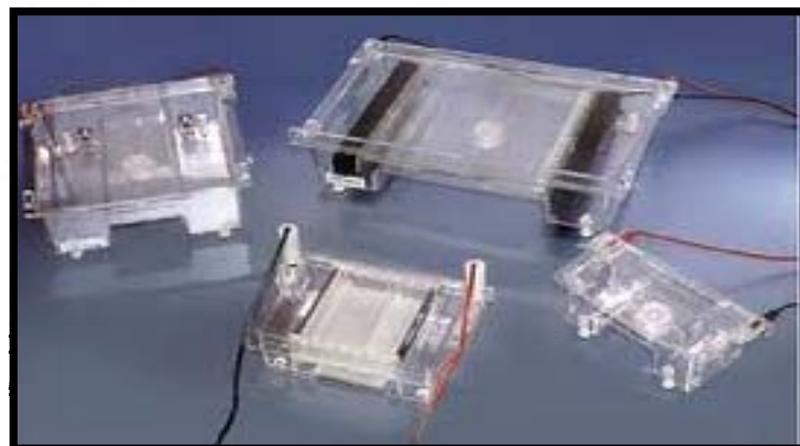
- Гель предотвращает свободную диффузию образца (в воде то же самое не получится);**
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота, значит, в растворе она диссоциирует на отрицательно заряженные ионы кислоты и H^+ (протоны). Если у вас есть смесь фрагментов ДНК длин 10 и 20, то соответствующие анионы кислоты будут иметь заряд, пропорциональный длине фрагмента (и, соответственно, пропорциональный массе).**

Гель-электрофорез

В каждую лунку агарозного геля микропипеткой добавляется проба ДНК



Аппарат для электрофореза



Гель-электрофорез

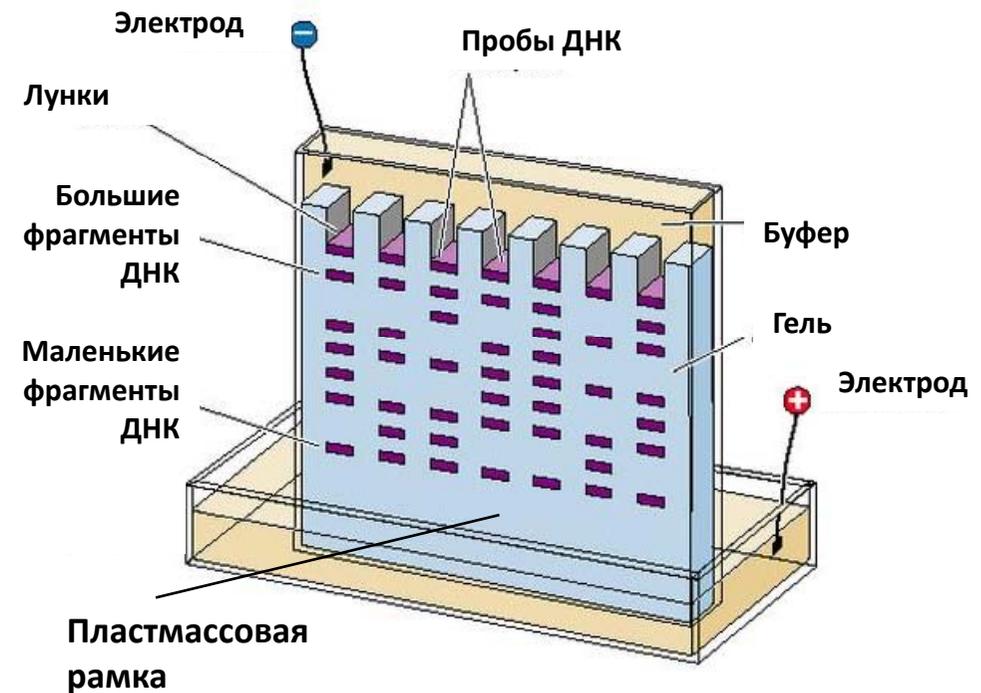
Пусть у вас есть смесь фрагментов ДНК разной длины и массы. Как разделить эту смесь и выделить индивидуальные компоненты?

ДНК – это слабая кислота, поэтому она движется к аноду («+») за счёт отрицательно заряженных фосфатных групп.

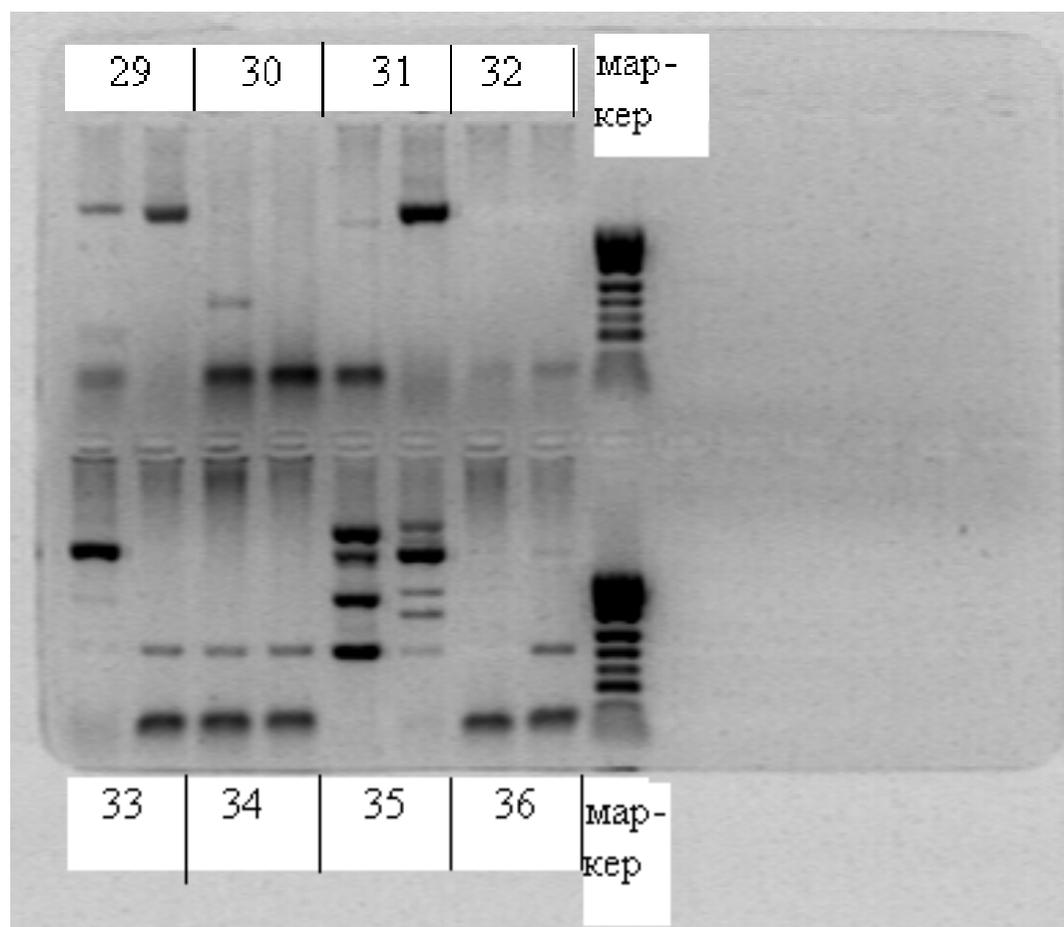
За движением ДНК (РНК) в пластине геля можно следить, так как полосы окрашенной флуоресцентными красителями ДНК, формируемые молекулами одного размера при продвижении через поры геля, видны в УФ свете.

Для окрашивания ДНК применяют краситель этидий бромид ($\lambda_{max} = 590 \text{ нм}$). Молекулы этидий бромида интеркалируют в молекулы ДНК, т.е. встраиваются между соседними парами нуклеотидов.

Интенсивность флуоресценции связанного этидиум бромида в 20 раз выше, чем свободного.

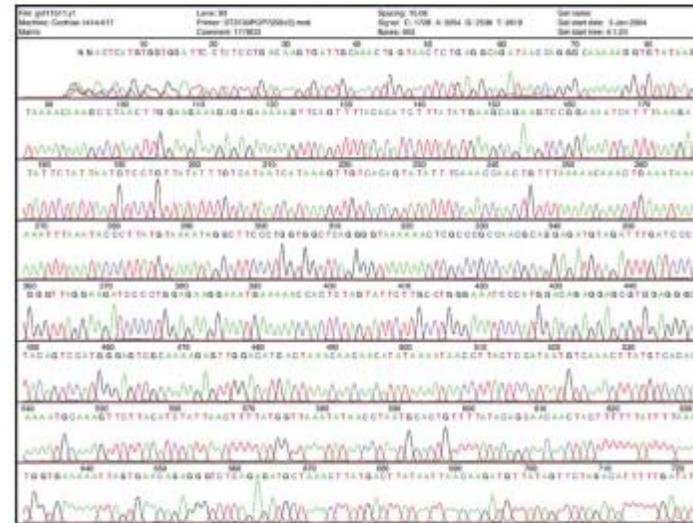


Такая окраска ДНК обеспечивает высокую чувствительность: от 10 нг ДНК можно увидеть в виде полосы оранжевого цвета.

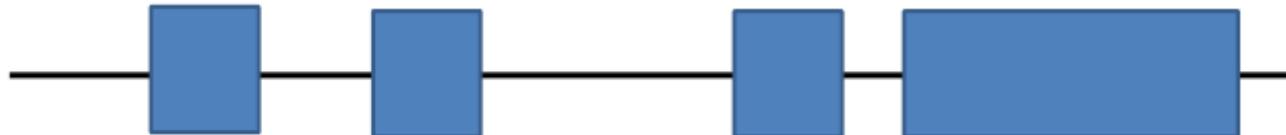


Секвенирование

Анализ первичной структуры ДНК и её функции



Что? Где? Когда?



В 1977 г. Максамом и Гилбертом был предложен метод секвенирования, основанный на **селективной химической модификации** различных типов оснований в составе ДНК с последующим расщеплением межнуклеотидных связей в модифицированных звеньях.

Реакции селективной модификации по каждому типу гетероциклических оснований проводятся таким образом, чтобы в каждой молекуле ДНК в среднем модифицировалось только одно звено данного типа.

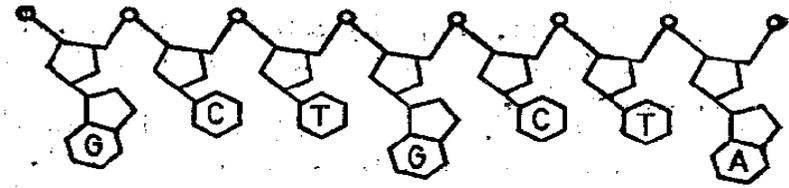
Поскольку все звенья данного типа в составе молекулы эквивалентны и реагируют с модифицирующим агентом с одинаковыми скоростями, то в сумме каждое звено этого типа окажется частично модифицированным.

Дальнейшая обработка ДНК вторичным амином или щелочью приводит к отщеплению модифицированных гетероциклических оснований от цепи ДНК и разрыву полинуклеотидной цепи в местах отщепления гетероциклов.

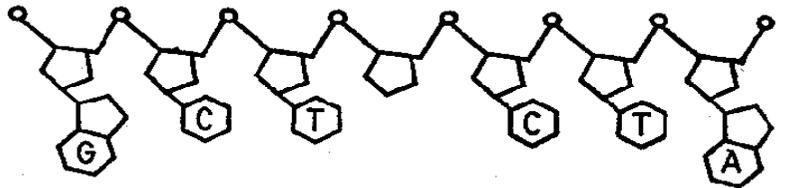
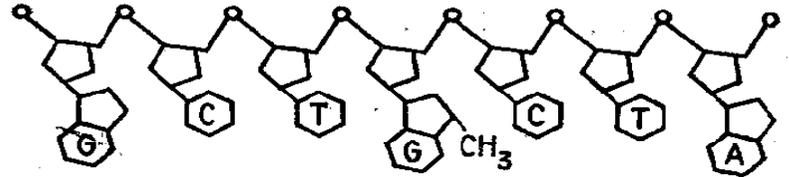
Модификации подвергают ДНК, ^{32}P -меченные по 5'-концевому нуклеотидному звену. Радиоактивная метка вводится фосфорилированием с помощью ^{32}P -АТФ и Т4-полинуклеотидкиназы.

Основные принципы секвенирования по Максаму и Гилберту

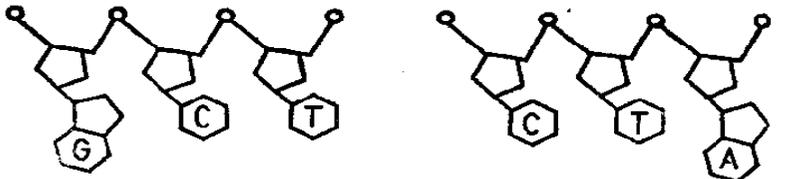
Фрагмент ДНК



Модификация азотистого основания

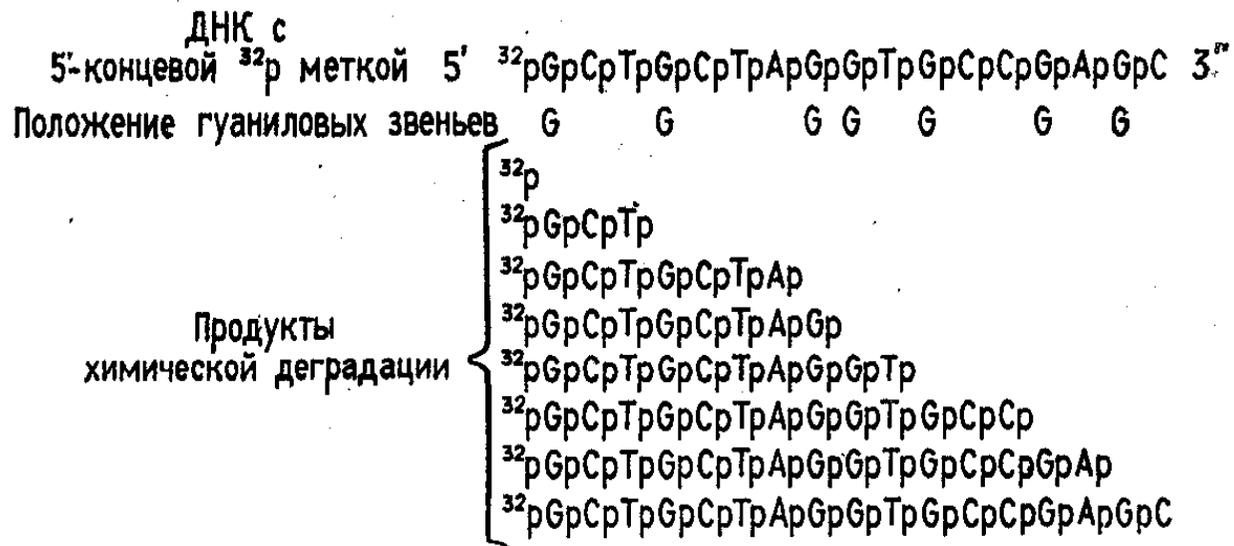


Разрыв сахаро-фосфатной цепи ДНК



Отщепление модифицированных звеньев от цепи ДНК после обработки вторичным амином или щелочью.

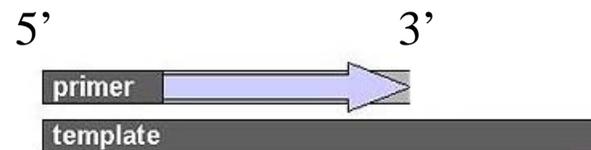
Таким образом, в результате химической деградации получается набор фрагментов ДНК различной длины. Длины этих фрагментов соответствуют положению мономерных звеньев того типа, который подвергся модификации. Концевая радиоактивная метка служит точкой отсчета при определении длины продуктов химической деградации ДНК.



Метод Максама и Гилберта, разработанный для анализа первичной структуры достаточно длинных ДНК, применим и для коротких (8 – 16 звенных) олигодезоксирибонуклеотидов.

Пусть есть образец ДНК, надо узнать его последовательность.

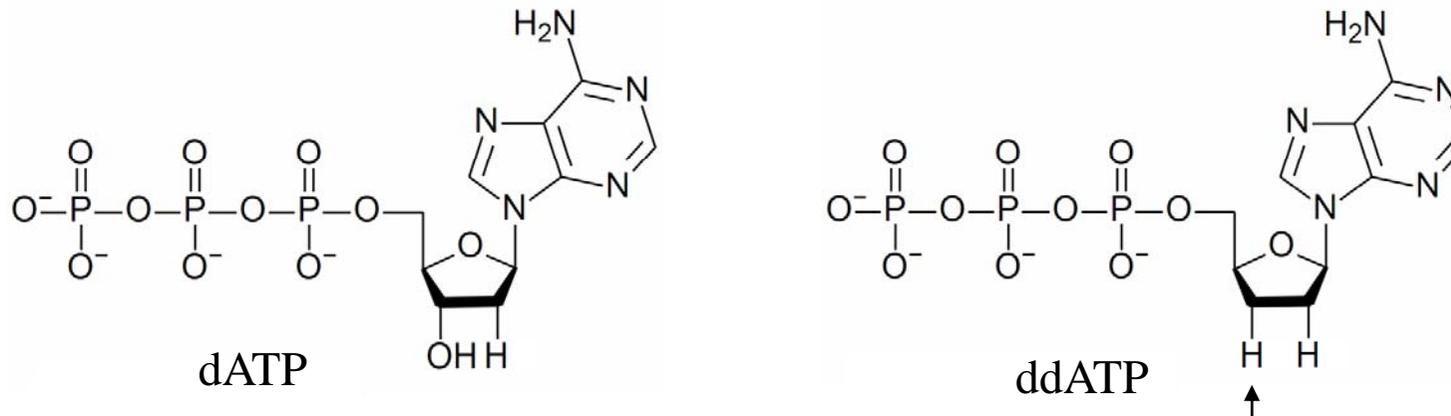
- Возьмем раствор, содержащий наш образец (одноцепочечную ДНК в достаточном количестве), дезоксинуклеотиды дНТФ (кирпичи, из которых строится ДНК), ДНК-полимеразу (белок-строитель), и праймер к образцу (праймер – это комплементарная «затравка» - кусочек ДНК, комплементарный началу нашего фрагмента, достаточной длины, чтобы с него начался синтез комплементарной цепи):



- Если позволить полимеразе работать (то есть, держать температуру, в которой ей удобно вести синтез), то в результате мы получим полностью достроенные комплементарные цепи.

Секвенирование ДНК по Сэнгеру

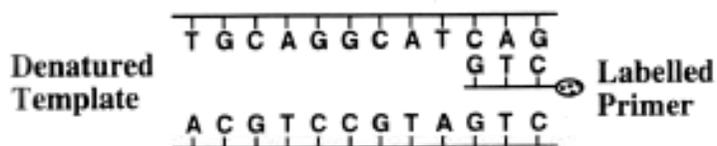
- А теперь разобьем всю смесь на 4 пробирки, в которых содержатся в небольшом количестве радиоактивно меченные ddATP, ddGTP, ddCTP или ddTTP (в каждой пробирке – что-то одно).



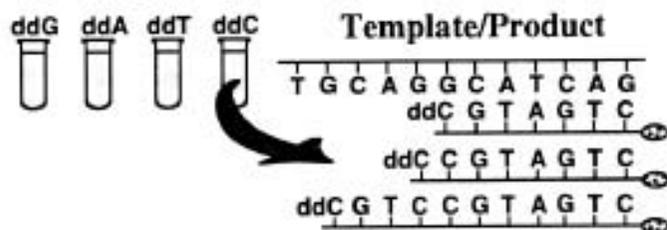
- У ди-дезоксидНТФ нет кислорода на 3'-конце, поэтому, если его встроили в молекулу ДНК, такая молекула удлиниться не будет, поскольку к ди-дезоксидНТФ ничего присоединиться уже не может – на 3' кислорода нет.

Секвенирование ДНК по Сенгеру

a.

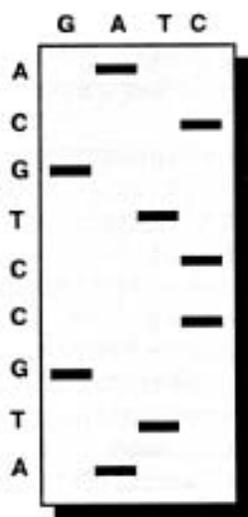


Add dNTPs and Polymerase

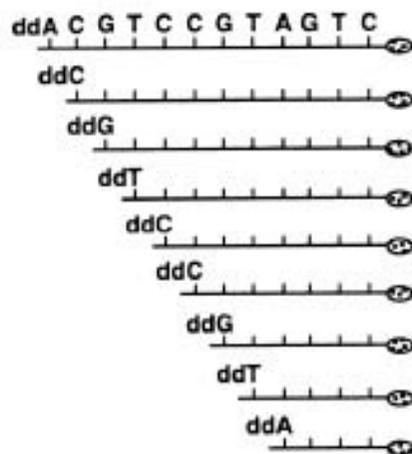


b.

Denaturing Gel



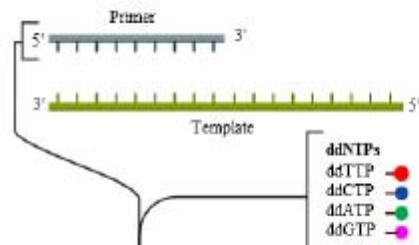
Labeled Strands



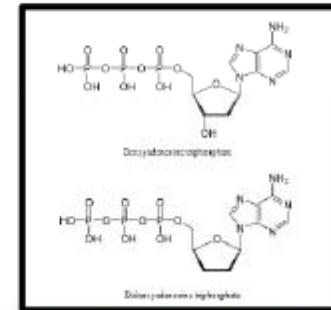
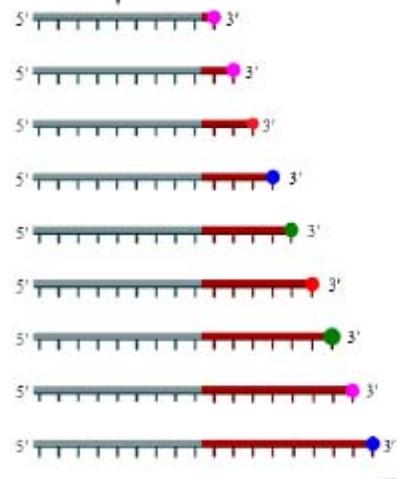
Капиллярное секвенирование с флуоресцентными терминаторами

① Reaction mixture

- Primer and DNA template
- DNA polymerase
- ddNTPs with flouochromes
- dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP)



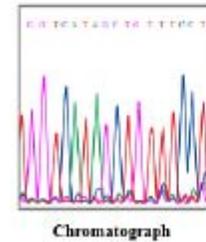
② Primer elongation and chain termination



③ Capillary gel electrophoresis separation of DNA fragments



④ Laser detection of flouochromes and computational sequence analysis



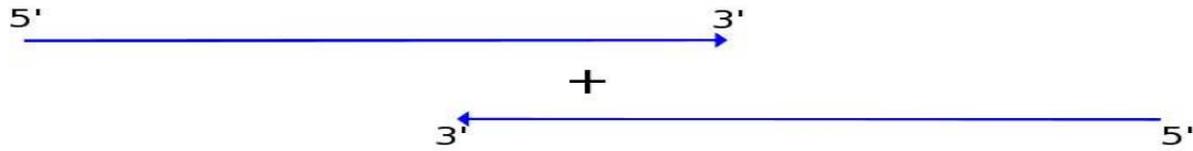
Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Полимеразная цепная реакция (ПЦР, PCR, Kary Mullis, 1983)

- Пусть у вас есть следовые количества ДНК в косточке неандертальца, а вам нужно получить ее в высокой концентрации, чтобы секвенировать.
- Действующие лица: ваша двуцепочечная ДНК (образец), праймеры (короткие кусочки по ~ 20 нуклеотидов, комплементарные к 2 участкам вокруг той области, которую вы хотите «поднять»), дезоксиНТФ (кирпичи для постройки ДНК), термоциклер, термоустойчивая полимераза (Taq).



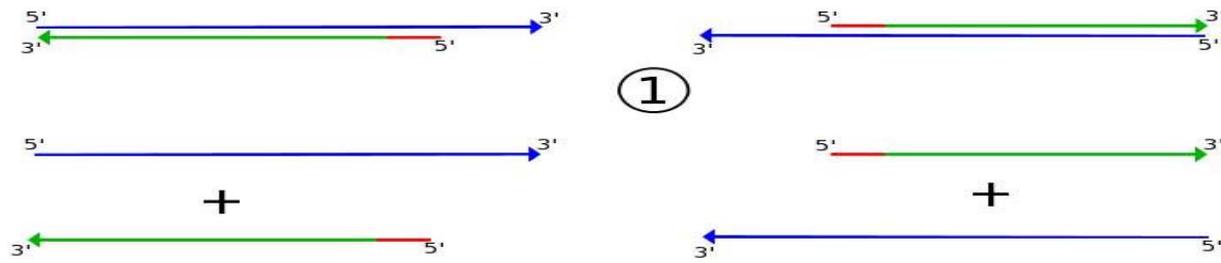
① Denaturation



② Annealing

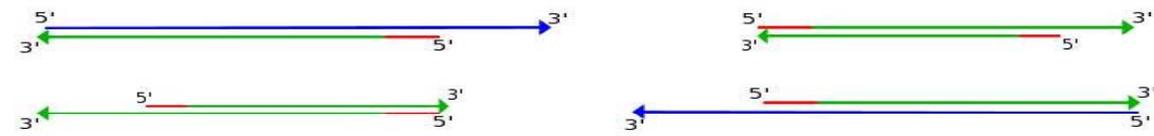


③ Elongation

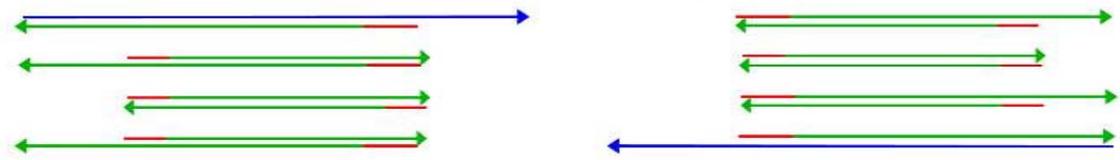


①

② & ③



①, ② & ③



①, ② & ③

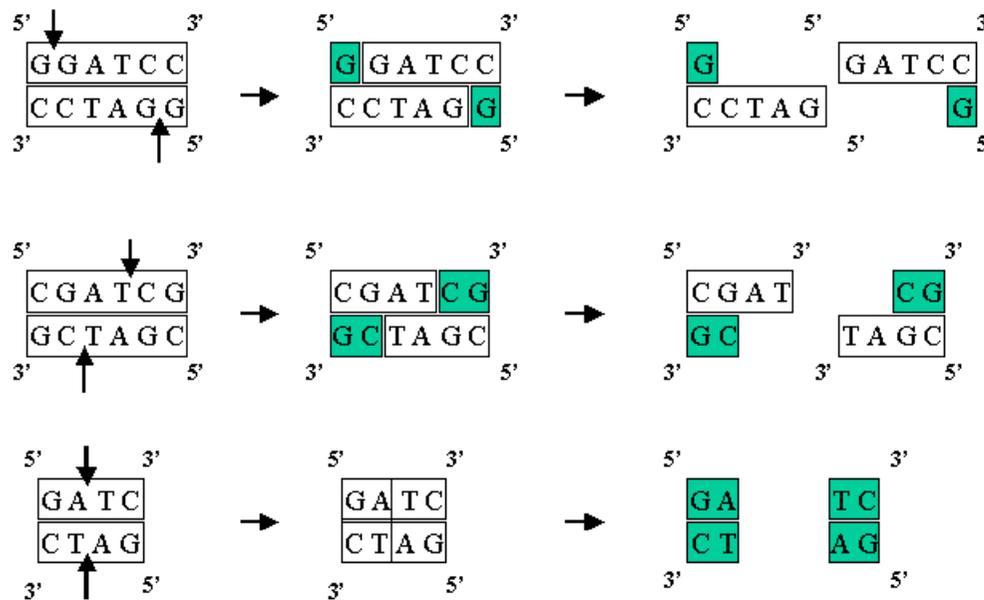


ПЦР

- Когда вы поднимаете температуру, то цепи ДНК друг от друга отлипают, когда опускаете – происходит отжиг (то есть слипаются обратно). При отжиге чаще слипаются не полные цепи, а праймеры с цепями (просто потому, что праймеров в растворе много, а цепей – мало). Полимераза начинает удлинять праймеры и так во всем объеме => удвоение концентрации цепей ДНК на каждом шаге.
- Дальше с этой ДНК можно делать все, что угодно, например, секвенировать.

Сайты рестрикции

- Когда делаете ПЦР своего гена, подбираете праймеры к концам вашего фрагмента так, чтобы на них были сайты узнавания рестриктазы (см. следующие слайды).



рестриктазы
и реакции,
которые они
катализируют

BamHI

PvuII

DpnI

- Рестриктазы часто разрезают ДНК, образуя липкие концы, которые позволяют склеивать между собой несколько участков ДНК. Если разрезать сайты на концах праймеров вокруг вашего гена, а также в ДНК плазмиды одной и той же рестриктазой, то можно будет вставить ваш ген в плазмиду – на плазмиде и вокруг гена образуются одинаковые липкие концы, которые имеют шанс слипнуться друг с другом. Разрывы после этого надо «зашить» белком – лигазой.



Праймеры с сайтами рестрикции

- Нарабатываете ПЦРом любое необходимое количество вашего гена с праймерами, на концах которых есть сайты рестрикции.

