**Тема: Анализ электрофоретических паттернов.**

**Основные вопросы, выносимые на обсуждение семинара.**

1. Эмуляция гель-электрофореза с использованием компьютерных программ. 2. Определение размеров фрагментов ДНК на электрофореграммах.

3. Сравнительный анализ электрофоретических паттернов.

**Краткое содержание темы.**

Gel Display Window – это достаточно мощный инструмент для симуляции и анализа гель-электрофореза. Vector NTI позволяет предсказать результаты реального эксперимента и отобразить их в текстовой и графической форме.

Схема работы с Gel Display Window достаточно проста и включает следующие этапы:

Открыть Gel Display Window;

Выполнить необходимые настройки;

"Добавить" в окно ислледуемый образец и гель-маркеры;

Запустить симуляцию;

Использовать графические возможности Vector NTI для анализа и манипуляций с гелем.

Итак, запускаем программу Vector NTI. После загрузки необходимо создть новый гель и открыть Gel Display Window. Это можно сделать из соответствующего меню Gel или нажав клавишу New Gel.

После этого появится диалоговое окно, позволяющее задать параметры эксперимента – тип геля (агароза, полиакриламид, импульсный), концентрацию, напряженность электрического поля, размеры геля, буфер, параметры симуляции. Можно выбрать настройки по умолчанию или ввести свои, сохранить из в виде профиля электрофореза, а затем использовать в других экспериментах.

Создадим исследуемый образец и "добавим" его на гель. Выберем из базы данных последовательность для молекулы ДНК вируса SV40 и "порежем" ее эндонуклеазами Hae III и Hind III. Для это необходимо нажать на пикторграмму Create Sample.

В появившемся окне необходимо выбрать соответствующую молекулу и эндонуклеазы. Затем поименовать образец, введя название в соответствующее поле и ввести краткое описание (хотя это и необязательно). Нажать клавишу Add to Gel и закрыть окно. Программа “порежет” молекулу эндонуклеазами и добавит результат на Gel Display Window.

Для того чтобы на гель добавить маркер необходимо всего лишь нажать пиктограмму Load Gel Marker.

И в появившемся окне выбрать маркер PBR322-HAEIII. Для того, чтобы эксперимент выглядел более эффектно, снова нажмем на пиктограмму Load Gel Marker и выберем SPP1-ECORI.

В результате получим графическое изображение трех дорожек геля и текстовое описание параметров эксперимента.

Если дважды кликнуть на папке с названием Sample, можно посмотреть описание, которое мы ввели, когда создавали образец, и увидеть результаты рестрикции. Фрагменты рестрикции отсортированы в порядке убывания длин фрагментов. Двойной клик на любой папке фрагмента, например, на папке 540, открывает информацию о том, как получен данный фрагмент. Так, фрагмент 540 образовался между двумя сайтами рестрикции HaeIII с позициями 2261 и 2801 соответственно. Эта информация оформлена в виде гиперссылки, перейдя на которую можно посмотреть на саму молекулу и увидеть последовательность нуклеотидов между этими сайтами.

Цвет черных квадратов, помечающих фрагменты можно поменять, вызвав меню по правой клавише мыши на квадрате. Соответственно изменится и отображение этих фрагментов на дорожке геля.

Для того, чтобы включить симуляцию гель-электрофореза в нашем эксперименте, необходимо выполнить следующее:

Сделать активной графическую панель, кликнув мышкой в любом ее месте или нажав соответствующую пиктограмму на панели инструментов;

Растянуть графику по высоте экрана нажав пиктограмму Fit To Window;

Нажать пиктограмму Step Forward.

После этого в процессе эксперимента (по нашим настройкам) пройдет ровно 15 минут. Сделав еще несколько кликов мы увидим, как развивается процесс. Определенное время можно ввести и в ручную, в окне счетчика.

Можно также анимировать процесс, нажав пиктограмму Animate на панели инструментов.

Для того, чтобы детально рассмотреть результаты эксперимента, воспользуемся пиктограммой Zoom in. Уменьшить изображение можно, нажав на пиктограмму Zoom out, а реальные размеры изображение примет после нажатия на True Scale View.

Если несколько раз нажать на Zoom in, тонкие линии на изображении превратятся в нечеткие серые полосы. Эти полосы показывают минимальную дистанцию между фрагментами при которой они будут различимы в геле. Между некоторыми полосами не будет четкой границы, это означает что соответствующие фрагменты не будут различимы и в геле.

Для того, чтобы все таки разделить фрагменты в реальных условиях, необходимо использовать гель с большим разрешением. А в эксперименте с Gel Display Window изменить параметр Separation Distance в окне Gel Setup, которое вызывается при нажатии на пиктограмму Gel and Display Setup.