

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОМЕДИЦИНА

Часть 2

Учебное пособие для вузов

Воронеж
Издательский дом ВГУ
2014

СОДЕРЖАНИЕ

Генетическая диагностика.....	4
Введение.....	4
Выделение и анализ нуклеиновых кислот.....	5
Качественный анализ нуклеиновых кислот	5
Количественный анализ нуклеиновых кислот.....	5
Некоторые ферменты, применяемые в молекулярной диагностике.....	6
Нуклеазы и их применение	6
Ингибиторы РНКаз и их практическое применение	7
Рестриктазы	7
Гибридизационные методы.....	8
Метод гибридизации в растворе.....	11
Метод гибридизации на твердом носителе	11
Гибридизация in situ	11
Блот-гибридизация.....	13
Блот-гибридизация по Саузерну	14
Метод сэндвич-гибридизации	15
Метод разветвленной ДНК	16
Методы амплификации нуклеиновых кислот	16
Полимеразная цепная реакция.....	17
Лигазная цепная реакция	32
Молекулярная диагностика генных болезней	33
Методы первичной идентификации мутаций	33
Молекулярное сканирование известных мутаций.....	38
Метод ПЦР/ЛОЗ.....	40
Использование ДНК-биочипов.....	42
Биоинформатика.....	44
Цели и задачи биоинформатики	45
Прикладная область биоинформатики.....	47
Анализ гомологичности последовательностей.....	47
Разработка лекарственных препаратов.....	47
Прогнозирующие функции	48
Примечания в медицине.....	48
Биоинформатика последовательностей	49
Структурная биоинформатика.....	51
Компьютерная геномика	53
Применение некоторых методов анализа для получения новых биологических знаний	55
Разработка новых методов анализа биологических данных	59
Разработка новых баз данных	61
Открытие лекарственных препаратов и фармакоинформатика	64
Открытие лекарственных препаратов.....	64
Определение опытного соединения	66
Программы поиска	69

Количественный анализ нуклеиновых кислот

Для определения концентрации ДНК и РНК в растворе наиболее широко используется 2 метода. Более простым и точным является спектрофотометрический метод, однако он обладает сравнительно малой чувствительностью. Если общее содержание нуклеиновых кислот невелико, то концентрацию ДНК и РНК можно определить по интенсивности их флуоресценции в УФ-свете после окрашивания бромистым этидием.

1. Спектрофотометрический метод

Концентрацию нуклеиновых кислот в растворе можно рассчитать, измерив его оптическую плотность (D) при 260 нм. Одна единица D примерно соответствует концентрации двухцепочечной ДНК 50 мкг/мл и концентрации одноцепочечной ДНК и РНК 40 мкг/мл. Для оценки чистоты образцов можно использовать отношение между D при 260 и 280 нм. Для чистых препаратов ДНК и РНК оно должно быть равно соответственно 1,8 и 2. Если это соотношение меньше, значит, препараты загрязнены белками или фенолом, и оценка концентрации будет неверна.

2. Окрашивание бромистым этидием

А) Электрофоретический метод

Для примерной оценки концентрации препаратов ДНК или РНК на гель наносят разные количества маркерных нуклеиновых кислот. Концентрацию исследуемых ДНК или РНК в образце оценивают, сравнивая интенсивность флуоресценции образца и стандартных маркеров с известной концентрацией. При этом важно, чтобы образцы ДНК и РНК сравнивались с соответствующими маркерами, поскольку при одинаковом количестве ДНК и РНК интенсивность их флуоресценции в УФ-свете различается.

Б) Метод пятен

Концентрацию нуклеиновых кислот в растворе можно определить, окрасив раствор бромистым этидием, измерив интенсивность флуоресценции в УФ-свете и сравнив ее с флуоресценцией маркеров известной концентрации. Как и при электрофоретическом методе, маркеры должны представлять собой нуклеиновые кислоты соответствующего типа (т.е. ДНК или РНК).

Для количественного определения РНК можно использовать также орциновый метод, ДНК – дифениламинный.

Некоторые ферменты, применяемые в молекулярной диагностике

Нуклеазы и их применение

Нуклеазы – ферменты, расщепляющие нуклеиновые кислоты до моно- и олигонуклеотидов, по характеру своего действия относятся к фосфодиэстеразам. Концевые мононуклеотиды отщепляются экзонуклеазами; расщепление внутри полинуклеотидной цепи осуществляют эндонуклеазы. Нуклеазы могут расщеплять РНК или ДНК (в соответствии с чем разделяют РНКазы и ДНКазы), а также и те, и другие (неспецифические нуклеазы).

В лабораториях нуклеазы применяют для очистки препаратов от нуклеиновых кислот определенного вида, для установления структуры исследуемых нуклеиновых кислот, изучения механизма их распада и синтеза.

Нуклеазы в молекулярной клинической диагностике применяют:

- 1) для обеспечения отрицательного контроля в результате удаления нуклеиновой кислоты-мишени;
- 2) при обработке РНКазой повышается специфичность гибридизации ДНК-ДНК, а при обработке ДНКазой – специфичность анализа РНК;
- 3) для проверки специфичности зонда – обработка перед гибридизацией РНКазой должна приводить к исчезновению сигнала, возникающего при связывании РНК с зондом, а ДНКазой – не должна влиять на РНК-специфичный сигнал.

Ингибиторы РНКаз и их практическое применение

РНК по сравнению с ДНК гораздо более лабильна и чувствительна к действию нуклеаз. Кроме того, РНКазы менее чувствительны к действию денатурирующих белки веществ, чем ДНКазы. Все это затрудняет получение полноразмерной РНК и заставляет проводить инактивацию РНКаз одновременно с лизисом клеток. Вся используемая вода должна быть обработана 0,1%-м диэтилпиروкарбонатом (ДЭПК). Ингибиторы РНКаз должны использоваться везде, где это возможно: в буферах для выделения РНК, при последующих экспериментах, при хранении РНК в водных растворах. Можно выделить белковые и небелковые ингибиторы РНКаз. Белковые ингибиторы РНКаз производятся несколькими фирмами (например, Sigma), однако они могут денатурировать под действием определенных агентов или деградировать под действием протеаз. Некоторые фирмы (например, Sigma) производят ванадил-рибонуклеозидные комплексы. Это комплексы, образованные ионом оксованадия и любым из четырех рибонуклеозидов, которые связываются со многими РНКазами и практически полностью их ингибируют. Однако они ингибируют трансляцию РНК в бесклеточной системе синтеза белка.

Рестриктазы

Рестриktionная эндонуклеаза (рестриктаза) – это фермент бактериального происхождения, распознающий специфическую нуклеотидную последовательность длиной от 4 до 10 н.п. и разрезающий двунитевую молекулу ДНК в этом месте (сайте рестрикции).

В зависимости от частоты встречаемости сайтов рестрикции в молекуле ДНК различают 3 класса рестриктаз: часто-, средне- и редкощепящие. Сайты рестрикции могут быть использованы в качестве генетических маркеров ДНК. Образующиеся в результате рестрикции фрагменты ДНК могут быть упорядочены по длине путем электрофореза в агарозном или полиак-

риламидном геле, и тем самым может быть определена их молекулярная масса, а, значит, и физическое расстояние между сайтами.

Рестриктазы широко используются при определении первичной структуры ДНК, для картирования генов и в генетической инженерии для создания и клонирования гибридных молекул ДНК.

Гибридизационные методы

Гибридизационный анализ, или генное зондирование, – это направление по определению специфических нуклеотидных последовательностей ДНК и РНК.

В основе гибридизационных методов лежит способность нуклеиновых кислот к гибридизации – образованию двухцепочечных структур за счет взаимодействия комплементарных нуклеотидов.

Зонд – меченая молекула ДНК (РНК), гибридизующаяся с изучаемым комплементарным участком геномной ДНК или РНК.

Выделяют 3 основных типа зондов:

а) фрагменты комплементарной ДНК (кДНК), входящие в состав плазмидного вектора или изолированные;

б) комплементарная РНК (кРНК), встроенная в плазмидный вектор, который содержит сайт инициации транскрипции, распознаваемый бактериальной РНК-полимеразой (обычно SP6);

в) синтетические некодирующие олигонуклеотиды, полученные с помощью автоматического ДНК-синтезатора.

Также в зависимости от используемой метки выделяют:

1) радиоизотопно меченые зонды.

Традиционно для получения РНК– или ДНК-зондов используют радиоактивно меченые с помощью ^{32}P , ^{35}S , ^{125}I , ^3H нуклеотиды, которые после гибридизации зонда с нуклеиновой кислотой-мишенью выявляют методом автордиографии. Преимущества: обеспечивают высокую чувствительность, специфичность и воспроизводимость результатов. Недостатки: имеют малый период полураспада, требуют соблюдения строгих мер безопасности;

2) нерадиоактивно меченые зонды.

В основе большинства методов нерадиоактивного мечения лежат ферментативные реакции с участием нуклеозид-трифосфатов, ковалентно связанных с молекулой-свидетелем, обычно *биотином* – витамином Н – или *дигоксигенином*. Использование в качестве метки дигоксигенина обеспечивает большую специфичность, т.к. биотин присутствует в большинстве тканей. Для их детекции используют гистохимические методы.

После гибридизации такие нерадиоактивно меченые зонды можно выявить: во-первых, с помощью неиммунологической системы детекции на основе авидина и стрептавидина (белков, имеющих высокое сродство к биотину) – аффинный метод – или, во-вторых, с помощью конъюгирован-