

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ
МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ**

Воронежский государственный университет

**МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ И
ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Учебно-методическое пособие

по специальности 020201(011600) – Биология

Воронеж 2005

ГЛАВА I.

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Теоретические основы методов

Чтобы проводить молекулярный анализ нуклеиновых кислот, нужно прежде всего получить их в чистом виде. Типичная клетка человека в норме содержит примерно 7 пг геномной ДНК и около 15 пг РНК. Из них 80-85% приходится на долю рибосомной (28S, 18S и 5S) РНК, а остальная часть представлена в основном низкомолекулярными РНК. Лишь 1-5% суммарной РНК составляет матричная РНК (мРНК). мРНК эукариот имеет на 3'-конце poly(A)-«хвост». Благодаря этому возможно очистить мРНК с помощью аффинной хроматографии на олиго-(dT)-целлюлозе, а также получить копию мРНК (копийную ДНК, или кДНК), используя олиго-(dT) праймер.

Для выделения геномной ДНК разрушают плазматическую и ядерную мембраны (а также клеточную стенку растений и грибов) и освобождаются от клеточных белков. Из водных растворов геномную ДНК можно осадить добавлением этанола или изопропанола. Обычно получают фрагменты ДНК размером 100-200 тысяч пар нуклеотидов (п.н.), пригодные для большинства последующих анализов. Одной из причин фрагментации геномной ДНК является механическое воздействие в процессе выделения. Поэтому образцы следует перемешивать очень осторожно.

Методы выделения суммарной РНК из тканей аналогичны экстракции ДНК. Существуют лишь некоторые методологические различия. Для выделения РНК проводят лизис клеток, депротеинизацию клеточного лизата и отделение РНК от ДНК. Однако РНК по сравнению с ДНК гораздо более лабильна и устойчива к действию нуклеаз. Поэтому все работы с РНК следует проводить в одноразовых резиновых перчатках.

Общие принципы методов экстракции РНК

Препарат РНК может быть получен как из свежей, так и замороженной в жидком азоте или на -70°C ткани. Большинство методов экстракции нуклеиновых кислот, которые мы будем использовать в данном цикле работ, основаны на обработке гомогенатов тканей *смесью фенола с хлороформом*.

Принципиальную схему методов фенол-хлороформной экстракции нуклеиновых кислот можно представить следующим образом. Ткань, из которой выделяют ДНК или РНК, гомогенизируют в присутствии веществ,

0,5 мл раствора дифениламина и ставят пробирку на кипящую водяную баню на 15 мин. Развивается зелёная окраска жидкости вследствие взаимодействия рибозы с дифениламином.

- 3) *Серебряная проба на пуриновые основания.* К 1 мл гидролизата дрожжей приливают 2 капли концентрированного раствора аммиака и 5 капель 1% раствора нитрата аммония. Через 3-5 мин выпадает бурый осадок серебряных соединений пуриновых оснований.
- 4) *Молибденовая проба на фосфорную кислоту.* К 1 мл гидролизата дрожжей прибавить 5 капель молибденового реактива и осторожно кипятить несколько минут. Развивается лимонно-жёлтая окраска жидкости вследствие образования фосфорномолибденового аммония по реакции



РАБОТА № 2 КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Для определения концентрации ДНК и РНК в растворе широко используются два метода. Наиболее 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 флюоресценции в УФ-свете после **окрашивания бромистым этидием**.

Спектрофотометрический метод

Концентрацию нуклеиновых кислот в растворе можно рассчитать, измерив его оптическую плотность (А) при 260 нм (A_{260}). Данная длина волны является максимумом поглощения аденина. Одна единица A_{260} примерно соответствует концентрации двухцепочечной ДНК 50 мкг/мл, одноцепочечной ДНК 33 мкг/мл, одноцепочечной РНК 40 мкг/мл.

Спектрофотометрический метод также позволяет оценить чистоту образцов. Критерием чистоты препаратов ДНК и РНК является отношение A_{260}/A_{280} 1,8 и 2, соответственно (A_{280} — максимум поглощения ароматических аминокислот). Если это отношение меньше, препараты загрязнены белками или фенолом, и оценка концентрации будет неверна.

Окрашивание бромистым этидием

Электрофоретический метод

Для примерной оценки концентрации препаратов ДНК или РНК на гель наносят разные количества маркерных нуклеиновых кислот (с известной

концентрацией). Концентрацию исследуемых препаратов нуклеиновых кислот оценивают, сравнивая интенсивность флюоресценции образца и стандартных маркеров. Важно, чтобы образцы ДНК и РНК сравнивались с соответствующими маркерами, поскольку при одинаковом количестве ДНК и РНК интенсивность их флюоресценции в УФ-свете различается.

Метод пятен

Концентрацию нуклеиновых кислот можно определить, окрасив раствор бромистым этидием, измерив интенсивность флюоресценции в УФ-свете и сравнив её с флюоресценцией маркеров известной концентрации.

Цель работы: определить концентрацию и чистоту препаратов геномной ДНК и суммарной РНК.

Материалы

• Буфер Трис-НСl

• Раствор бромистого этидия: 1 мкг/мл в воде

Оборудование. Спектрофотометр, УФ-трансиллюминатор, микропипетки.

Ход работы

Спектрофотометрический метод

1. Растворить несколько мкл препарата нуклеиновой кислоты в минимальном объёме Трис-НСl буфера, достаточном для спектрофотометрирования. Вычислить коэффициент разбавления ($K_p = V_{\text{общий}} / V_{\text{препарата}}$).
2. Измерить A_{260} разбавленного раствора нуклеиновой кислоты.
3. Вычислить концентрацию образцов ДНК и РНК по формулам

$$\text{Концентрация диДНК} = \frac{A_{260} \times 50 \times K_p}{1000} \text{ (мкг/мкл)}$$

$$\text{Концентрация суммарной РНК} = \frac{A_{260} \times 40 \times K_p}{1000} \text{ (мкг/мкл)}$$

4. Измерить A_{280} и вычислить отношение A_{260}/A_{280} . Сделать вывод о чистоте препаратов.

Электрофоретический метод

1. Готовят серию разведений образца ДНК или РНК и соответствующих стандартных растворов в буфере Трис-НСl и добавляют ко всем разведениям равный объём бромистого этидия.

2. На трансиллюминатор кладут кусочек пластиковой плёнки (типа SaranWrap).
3. На плёнку наносят по 5 мкл каждого разведения и стандартного раствора.
4. Определяют концентрацию образца, сравнивая интенсивности флюоресценции стандартного раствора и разведений. Для облегчения оценки можно сфотографировать плёнку.

Альтернативным подходом является электрофорез разведений ДНК или РНК в агарозном геле с последующей оценкой интенсивности свечения полос нуклеиновых кислот в УФ-свете.

РАБОТА № 3 ВЫДЕЛЕНИЕ ГЕНОМНОЙ ДНК ИЗ ТКАНЕЙ И КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Цель работы: подготовить препарат геномной ДНК из тканей и культуры клеток млекопитающих

Материалы

- Жидкий азот
- Расщепляющий буфер
- Буфер PBS, охлаждённый на льду
- Смесь фенол/хлороформ/изоамиловый спирт (25:24:1)
- 7,5 М раствор ацетата аммония
- 96-100% этанол
- 70% этанол
- Буфер TE, pH 8,0

Оборудование. Ступка и пестик, центрифуга, настольная микроцентрифуга, микропробирки, центрифужные пробирки на 50 мл, ледяная баня.

Ход работы

Выделение ДНК из ткани

1. Орган (или его часть), из которого выделяют ДНК, измельчить и быстро заморозить в жидком азоте. Растереть замороженную ткань в охлаждённой ступке до состояния порошка. Суспендировать в лизирующем буфере из расчёта 1,2 мл на 100 мг ткани.

Выделение ДНК из культуры клеток

1. а) Центрифугировать культуру клеток при 500 g и удалить супернатант.
б) Ресуспендировать клетки в 1-10 мл охлаждённого на льду буфера PBS. Центрифугировать 5 мин при 500 g, удалить супернатант и повторить. Ресуспендировать клетки в 1 мл лизирующего буфера. *Если количество*