

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

А.Т. Епринцев,  
Д.Н. Федорин,  
О.С. Федорина

## **МЕТОДЫ ГИБРИДИЗАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И БЕЛКОВ**

Учебно-методическое пособие для вузов

Воронеж  
Издательский дом ВГУ  
2014

## Содержание

Введение.....	4
<b>Раздел 1. Гибридизация дезоксирибонуклеиновой кислоты .....</b>	<b>5</b>
Работа 1. Использование биотин-11-dUTP для нерадиоактивного мечения ДНК методом ПЦР .....	11
Работа 2. Использование биотин-11-dUTP для нерадиоактивного мечения ДНК методом удлинения затравки .....	12
Работа 3. Проведение гибридизации ДНГ по Саузерну .....	13
Работа 4. Выявление меченых ДНК с образованием нерастворимого окрашенного продукта .....	15
Работа 5. Дот-блот-гибридизация ПЦР-амплифицированной ДНК.....	15
<b>Раздел 2. Гибридизация рибонуклеиновой кислоты .....</b>	<b>17</b>
Работа 6. Анализ содержания РНК методом Нозерн-гибридизации .....	17
Работа 7. Выявление зондов с помощью радиоавтографии. Выявление гибридизовавшихся зондов.....	18
Работа 8. Выявление неизотопно меченных зондов. Выявление биотинилированных зондов.....	20
<b>Раздел 3. Флуоресцентная гибиридизация .....</b>	<b>22</b>
<b>Раздел 4. Гибридизация белков.....</b>	<b>25</b>
Работа 9. Анализ содержания белков с помощью метода Вестерн-блотинга .....	29
Список литературы .....	32

сле переноса одноцепочечные нити фиксируют на фильтре, а щелочь нейтрализуют, и пластину геля накрывают нитроцеллюлозой. После прогревания фильтра при 80 °С в вакууме или обработки УФ-светом ДНК необратимо связывается с нитроцеллюлозой. Затем мембрану помещают в раствор с меченым зондом, в котором и происходит гибридизация.

В ходе гибридизации происходит образование устойчивого комплекса между исследуемой ДНК, иммобилизованной на носителе, и внесенной меченой пробой. Для предотвращения неспецифического связывания меченой пробы с мембраной в случае блот-гибридизации, перед ее внесением проводят процедуру прегибридизации. Она заключается в следующем: мембрану, содержащую образцы ДНК, некоторое время инкубируют в растворе, который содержит блокирующий реагент. Обычно в качестве блокирующего реагента выступают различные препараты денатурированной ДНК: из спермы лосося, тимуса телят, цыпленка (в солевых буферах часто используют молоко). В результате достигается полная адгезия неспецифических мелких фрагментов ДНК (блокирующий реагент) участками фильтра, не связанными с образцами ДНК.

После отмывки несвязавшейся радиоактивности результат выявляют с помощью радиоавтографии или иных способов в случае использования нерadioактивных меток. Расположение полос иммобилизованной ДНК точно соответствует их расположению в геле.

Для того, чтобы визуально выявить нужные фрагменты (фиксированная на фильтре ДНК не видна), проводят гибридизацию со специфическим по нуклеотидной последовательности меченым радионуклидом или флюоресцентной меткой олигонуклеотидным синтетическим зондом (такой зонд состоит из 16–30 пар оснований), или клонированным фрагментом ДНК. Нуклеотидная последовательность зонда должна быть полностью или частично комплементарна изучаемому участку геномной ДНК.

При инкубации фильтра с раствором, содержащим меченый зонд, происходит гибридизация комплементарных цепей ДНК зонда и фрагмента на фильтре. Неспецифические связанные молекулы зонда отмываются с помощью специальной процедуры.

Радиоактивно меченые участки выявляют путем экспонирования фильтра с рентгеновской пленкой (ауторадиография). После проявления на пленке видны полосы меченой зондом ДНК (рис. 2).

Нерadioактивные метки визуализируют с помощью флюоресценции или опосредованно с помощью антител.

ДНК, связанную с нитроцеллюлозным фильтром, можно гибридизовать с радиоактивно меченым ДНК-зондом. Блоттинг по Саузерну является исключительно полезным также и для локализации изучаемых генов в определенных фрагментах, полученных в результате гидролиза различными рестриктазами гибридных молекул ДНК, хромосомной ДНК и т. д.

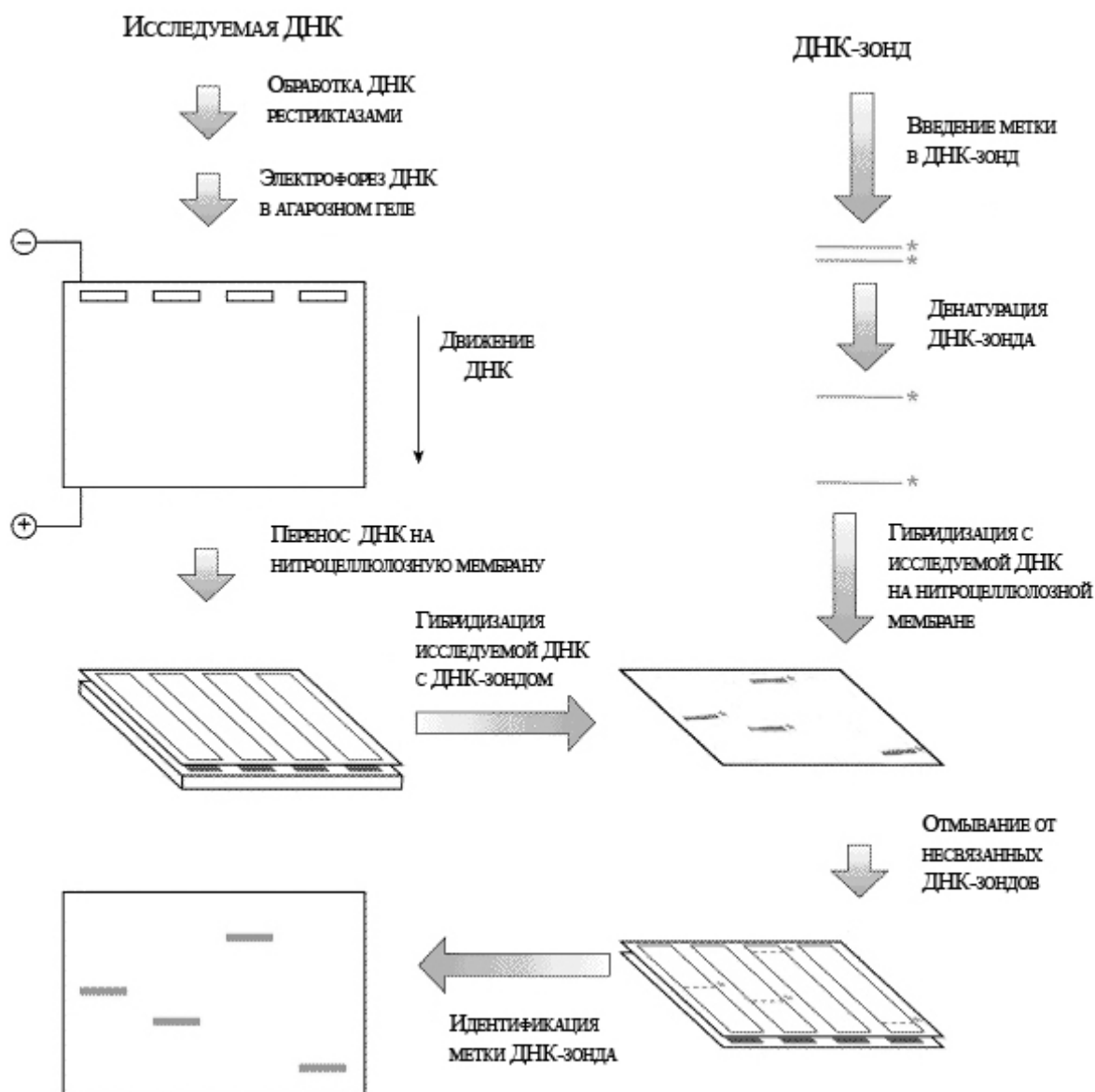


Рис. 2. Схема проведения гибридизации ДНК по Саузерну

Одним из наиболее точных и современных методов анализа является использование чипов. Они представляют собой пластинки с иммобилизованными мечеными ДНК-зондами. Каждая такая пластинка может содержать несколько десятков тысяч зондов, расположенных в определенной последовательности. Метка проявляется только в спаренных двухцепочечных фрагментах. Если в исследуемом образце есть последовательности, комплементарные последовательностям зонда, то гибридизацию можно определить визуально или с помощью специальных приборов. Как правило, детекторы соединены с компьютером, то есть процедура считывания и обработки информации автоматизирована.

При подготовке ДНК-зондов включение метки в ДНК возможно тремя основными способами:

1) **Удлинение затравки.** Данный способ получения ДНК-зондов подразумевает использование олигонуклеотида (менее 20 звеньев), комплементарного какому-либо известному участку анализируемой ДНК. В процессе его гибридизации с денатурированной ДНК в реакционную смесь добавляют ДНК-полимеразу и набор всех четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (дНТФ), один из которых несет метку. Используя олигонуклеотид в качестве затравки, полимеразы удлиняет растущую цепь, встраивая в нее меченый нуклеотид. В результате образуется полинуклеотидный меченый зонд.

2) **Полимеразная цепная реакция.** ПЦР предусматривает наличие двух олигонуклеотидных затравок, комплементарных участкам, фланкирующим выбранный район ДНК. При проведении ПЦР в присутствии нуклеотида, несущего метку, происходит синтез ПЦР продуктов, несущих в своем составе меченые нуклеотиды. При повторении процедуры денатурации, гибридизации и полимеризации около 30 циклов можно получить несколько миллионов меченых полинуклеотидов, используемых в качестве ДНК-зондов. Флуорофор, находящийся в составе ДНК-зонда, начинает светиться, что позволяет идентифицировать его при проведении гибридизации (Б) (рис. 3).

А)

