

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

**ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ ПЦР
В ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ**

Учебно-методическое пособие

Воронеж
Издательский дом ВГУ
2019

СОДЕРЖАНИЕ

Список использованных сокращений.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ЗАНЯТИЕ 1. Выделение геномной ДНК из клеток и тканей различных организмов.....	6
ЗАНЯТИЕ 2. Основы полимеразной цепной реакции (ПЦР).....	9
ЗАНЯТИЕ 3. Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле.....	18
ЗАНЯТИЕ 4. ПЦР в реальном времени (<u>Real-time</u> PCR).....	28
ЗАНЯТИЕ 5. Оптимизация условий ПЦР.....	33
ЗАНЯТИЕ 6. Генотипирование методом аллель-специфичной ПЦР....	42
ЗАНЯТИЕ 7. Подбор праймеров для аллель-специфичной ПЦР.....	50
ЗАНЯТИЕ 8. Подбор праймеров для определения экспрессии генов ...	61
ЗАНЯТИЕ 9. Подбор вырожденных праймеров.....	65
РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА.....	78

ЗАНЯТИЕ 1. Выделение геномной ДНК из клеток и тканей различных организмов

Цель занятия: изучить методики выделения геномной ДНК из клеток и тканей различных организмов, а также освоить методику выделения ДНК с помощью ЦТАБ – буфера из биоматериала.

Основные теоретические положения.

Подготовка пробы биологического материала.

Процедура выделения ДНК из клеток и тканей часто является исходным (основным) этапом в исследовании живого организма на молекулярном уровне. От ДНК напрямую или через белки-ферменты зависят все биосинтезы и катаболизм клетки. Клетку необходимо разрушить тем или иным способом, а хромосомную ДНК очистить от других клеточных компонентов. Прежде всего, нужно отделить ДНК от белков, входящих в состав нуклеопротеидных комплексов хроматина. При этом важно защитить ДНК от действия нуклеаз и максимально сохранить её целостность, поскольку длинные линейные молекулы ДНК при их изоляции из клетки неизбежно фрагментируются.

Методы выделения ДНК обычно включают следующие этапы (рис.1): 1) лизис клеток (или разрушение физическим, механическим способом); 2) ферментативное разрушение белков протеиназами и/или депротеинизацию клеточного лизата с помощью фенола и хлороформа; 3) центрифугирование для удаления денатурированных белков и фрагментов клеточных органелл. Затем 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.



Рис.1. Основные этапы выделения ДНК

Для лизиса клеток и денатурации белков часто используется детергент додецилсульфат натрия и хаотропный агент гуанидинизотиоцианат. Ряд современных методов предусматривает сорбцию ДНК на гранулах силикагеля в присутствии хаотропных веществ, центрифугирование и последующую элюцию ДНК с гранул в раствор. Некоторые фирмы продают наборы реактивов для выделения ДНК с использованием магнитных частиц, покрытых силикой SiO_2 . Некоторые коммерческие наборы предусматривают сорбцию ДНК на мембранах или ионообменных сорбентах. Фенолхлороформный метод экстракции ДНК считается стандартным.

Таким образом, к выбору метода пробоподготовки следует относиться с пониманием целей проведения предполагаемых анализов.

Материалы и оборудование.

Микроцентрифуга, центрифуга для больших объемов, вортекс, термостат твердотельный для микропробирок, микропипетки-дозаторы с одноразовыми наконечниками, ламинарный бокс, вытяжной шкаф, весы, лабораторный пластик и посуда, ЦТАБ - буфер (состоящий из 100 мМ Tris, 1,4 мМ NaCl, 20 мМ ЭДТА, 3% ЦТАБ), хлороформ, изоамиловый спирт, этиловый спирт, дистиллированная вода, mQ H_2O .

Ход работы.

Выделение ДНК ЦТАБ - методом из биологического материала.

В основе метода лежит лизис клеток буфером на основе ЦТАБ (ЦТАБ – цетилтриметиламмонийбромид, входит в состав многих бытовых моющих средств), депротеинизация хлороформом и осаждение ДНК изопропанолом.

Внимание! Хлороформ – сильный канцероген, может вызывать нарушения работы центральной нервной системы. Работать необходимо в хорошо проветриваемом помещении под вытяжкой.

1. Биоматериал поместить в фарфоровую ступку.
2. Добавить 1 мл 3% ЦТАБ - буфера, подогретого до 65°C, измельчить материал с помощью пестика.
3. Полученный гомогенат перелить в пробирку типа Eppendorf на 2 мл и инкубировать в термостате 2-3 минуты при температуре 65°C. Периодически аккуратно встряхивать пробирку.

4. Остудив до комнатной температуры, в пробирку добавить равный объем хлороформ-изоамилового спирта (24:1). Тщательно перемешать содержимое пробирки на вортексе в течение 2-3 минут.
5. Центрифугировать 5 мин при максимальной скорости 13 000 g.
6. Осторожно пипеткой отобрать верхнюю фазу (постараться не захватить промежуточную фазу) и перенести в новую пробирку типа Eppendorf на 1,5 мл.
7. Добавить 0,7 объема мл холодного изопропанола и тщательно перемешать растворы, не допуская энергичного встряхивания.
8. Центрифугировать 5 мин при 21 000 g.
9. Изопропанол аккуратно слить и осажденную ДНК дважды промыть 70% этанолом.
10. Спирт удалить и ДНК оставить в открытой пробирке до полного высыхания осадка.
11. Высохшую ДНК растворить в mQ H₂O.

Количественная и качественная оценка образца полученной ДНК осуществляется при последующей стандартной процедуре электрофореза ДНК в агарозном геле путём визуального сравнения с образцами известной концентрации. Спектрофотометрическое определение даёт более точную характеристику препарату ДНК.

Вопросы для самопроверки

1. Какие методы выделения нуклеиновых кислот Вы знаете?
2. Перечислите основные этапы процедуры выделения ДНК из клеток и тканей.
3. На чем основан принцип действия ЦТАБ – буфера при выделении ДНК?

ЗАНЯТИЕ 2. Основы полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Цель занятия: изучить теоретические основы полимеразной цепной реакции, а также овладеть навыками постановки качественной ПЦР.

Основные теоретические положения.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК/РНК) в биологическом материале (пробе).

Открытию полимеразной цепной реакции предшествовало развитие молекулярно-биологических технологий. В 1869 г. И. Мишером была открыта ДНК. Биологическая функция нового вещества была не ясна. В 1944 г. ученые О. Эвери, К. Мак-Леода и М. Мак-Карти провели ряд экспериментов по трансформации бактерий, доказавших, что за трансформацию (приобретение болезнетворных свойств безвредной культурой в результате добавления в неё мёртвых болезнетворных бактерий) отвечают выделенные из пневмококков ДНК.

Вплоть до 50-х годов XX века точное строение ДНК и способ передачи наследственной информации оставались неизвестными, хотя и было доказано, что ДНК содержит несколько цепочек, состоящих из нуклеотидов. Количественные соотношения между различными типами азотистых оснований в составе нуклеотидов ДНК были сформулированы в 1949–1951 гг. группой биохимика Э. Чаргаффа и получили название «правила Чаргаффа». Суть этих правил заключалась в следующем:

1. Количество аденина (А) равно количеству тимина (Т), а гуанина (Г) – цитозину (Ц): $A=T$, $G=C$.
2. Количество пуринов равно количеству пиримидинов: $A+G=T+C$.

Правила Чаргаффа, наряду с данными рентгеноструктурного анализа, сыграли решающую роль в расшифровке структуры ДНК и определении принципа комплементарности Дж. Уотсоном и Ф. Криком в 1953 году. Ученые пришли к выводу, что ДНК состоит из двух полимерных цепей, удерживаемых водородными связями между азотистыми основаниями и образующих двойную спираль.

При этом азотистые основания формируют парные (комплементарные) комплексы аденин – тимин и гуанин – цитозин при взаимодействии цепей нуклеиновых кислот (рис.2).

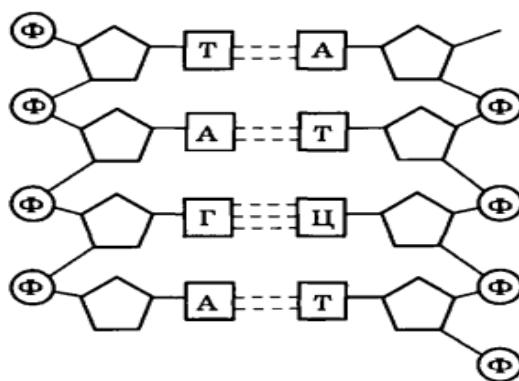


Рис. 2. Принцип комплементарности нуклеотидов ДНК

Каждая цепь служит матрицей при синтезе новой цепи, а последовательность в синтезируемой цепи задается последовательностью комплементарных оснований цепи – матрицы.

В 1955 г. А. Корнберг открыл фермент, который назвал ДНК-полимеразой. Этот фермент способен удлинять короткие олигонуклеотидные затравки (праймеры), присоединяя к 3'-концу цепи ДНК дополнительный нуклеотид, но для этого необходимо, чтобы праймер был связан с комплементарной цепью ДНК (матрицей). Раствор, в котором происходит эта реакция, должен содержать нуклеозидтрифосфаты (дНТФ), которые используются в качестве строительных блоков.

В 1971 г. Клеппе и соавт. представили данные, касающиеся состава ингредиентов реакционной смеси, и принципы использования коротких искусственно синтезированных молекул ДНК-праймеров для получения новых копий ДНК.

Однако возможность использования ПЦР в плане наработки большого количества копий нуклеиновых кислот еще не рассматривалась. Это было связано с техническими трудностями, обусловленными необходимостью трудоемкого синтеза праймеров и нестабильностью фермента. В начале использования метода ПЦР после каждого цикла нагревания – охлаждения ДНК-полимеразу приходилось добавлять в реакционную смесь, так как она быстро инактивировалась при высокой температуре, необходимой для разделения цепей спирали ДНК. Процедура была очень неэффективной, требовала много времени и фермента.

В 1975г. Т. Брок и Х. Фриз открыли *Thermus aquaticus* – граммотрицательную палочковидную экстремально-термофильную бактерию, а в 1976 г. из нее была впервые выделена *Taq-полимераза*. Преимуществом данного