ННЦ «ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТА МЕДИЦИНИ»

КАТЕРИНА АФАНАСЬЄВА, МАР'ЯНА ЧОПЕЙ

НАВЧАЛЬНО-МЕТОДИЧНИЙ ПОСІБНИК
«СУЧАСНІ МЕТОДИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ»

КИЇВ - 2024

УДК 577.21/.3(075.8)

ББК 28.04+28.071я73

А94

Рецензенти:

Савчук О.М., д.б.н., професор, завідувач кафедри біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.
Сківка Л.М., д.б.н., професор, завідувач кафедри мікробіології та імунології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.
Філоненко В.В., член-кореспондент НАНУ, професор, завідувач відділом сигнальних систем клітини Інституту молекулярної біологіїта генетики НАНУ.

Рекомендовано до друку вченою радою

Навчально-наукового центру "Інститут біології та медицини"

(протокол №12 від 14 травня 2024 року)

Афанасьєва К.С.,Чопей М.І. Навчально-методичний посібник "Сучасні методи молекулярної біології", Київ, 2024. – 129 с.

Викладено теоретичні відомості про ряд сучасних методів молекулярної біології: методи виділення нуклеїнових кислот, спектрофотометрію та електрофорез, клонування ДНК, блот-гібридизацію, ПЛР, методи аналізу ДНК-білкових взаємодій та фіксації конформації хромосом. Окреслено сфери застосування описаних методів, їх переваги та недоліки. Запропоновано варіанти лабораторних робіт з детальним протоколом проведення експерименту із застосуванням відповідних методів. Для студентів і аспірантів, що вивчають молекулярну біологію та суміжні галузі біологічних наук.

ЗМІСТ

РОЗДІЛ 1. ВИДІЛЕННЯ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ **4**

РОЗДІЛ 2. СПЕКТРОФОТОМЕТРІЯ **17**

РОЗДІЛ 3. ЕЛЕКТРОФОРЕЗ **26**

РОЗДІЛ 4. МЕТОДИ БЛОТ-ГІБРИДИЗАЦІЇ **48**

РОЗДІЛ 5. ПОЛІМЕРАЗНА ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ (ПЛР) **59**

РОЗДІЛ 6. КЛОНУВАННЯ ДНК **78**

РОЗДІЛ 7. МЕТОДИ АНАЛІЗУ ДНК-БІЛКОВИХ ВЗАЄМОДІЙ **90**

РОЗДІЛ 8. МЕТОДИ ФІКСАЦІЇ КОНФОРМАЦІЇ ХРОМОСОМ **108**

ЗАПИТАННЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ **123**

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА **127**

РОЗДІЛ 1. ВИДІЛЕННЯ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ

Виділення того чи іншого типу нуклеїнових кислот найчастіше є одним з найперших етапів різноманітних молекулярно-біологічних досліджень. Власне, виділені зразки надалі можуть використовуватися або для аналізу за допомогою таких підходів як спектрофотометрія, електрофорез, полімеразна ланцюгова реакція, секвенування тощо, або ж для більш складних маніпуляцій з ними, як наприклад, методи клонування ДНК та редагування геномів. Зрозуміло, що від якості виділених препаратів нуклеїнових кислот буде залежати успішність проведення усіх подальших досліджень.

Ключовими етапами при виділенні нуклеїнових кислот є лізис клітин, очищення матеріалу від усіх непотрібних компонентів (залишки цитоплазми та органел, ліпіди, полісахариди і білки) та збір очищеного матеріалу. За потреби за допомогою відповідного типу нуклеаз додатково можна очистити препарати ДНК від домішок РНК або навпаки.

Усі методики виділення нуклеїнових кислот прийнято поділяти на дві групи: рідкофазні (liquid-phased) та твердофазні (solid-phased) підходи.

Рідкофазні методи виділення (їх ще також визначають як класичні методи) полягають у тому, що всі етапи проходять в системі рідин з використанням різноманітних розчинів. До даної групи методів належать, зокрема, методи органічної екстракції (наприклад, метод фенол-хлороформної екстракції) та методи неорганічної екстракції (використання високосольових розчинів або цетилтриметиламоній броміду). На першому етапі (лізис клітин) усі ці методи передбачають подібні процедури з використанням лізуючих буферних розчинів (табл. 1.1).

Склад таких розчинів може відрізнятися для різних підходів, але обов’язково вони включають речовини, які власне забезпечуватимуть руйнування мембран клітини та інших її компонентів: досить часто використовують додецилсульфат натрію (Sodium Dodecyl Sulphate, SDS), нерідко з додаванням ферменту протеїнази К, що розщеплює більшість білків. Також до складу лізуючого буферного розчину повинні входити речовини для підтримання оптимального значення pH (наприклад, Tris-HCl) та іонної сили розчину (солі натрію, калію чи амонію) – створення оптимальних умов для нуклеїнових кислот після вивільнення їх у розчин лізату при руйнуванні клітини. Нарешті, дуже важливими компонентами лізуючого буферу є

інгібітори нуклеаз. Найчастіше використовують натрієву чи калієву сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти (Ethylenediaminetetraaceticacid, EDTA), яка зв'язує двовалентні катіони, в тому числі Mg^{2+}, без яких неможлива робота ДНКаз.

Таблиця 1.1. **Типові компоненти буферного розчину для лізису клітин при виділенні нуклеїнових кислот**

Компонент	***Призначення***
Додецилсульфат натрію чи інші детергенти	Руйнування мембран клітини та інших її компонентів, осадження частини білків
Протеїназа К	Гідроліз білків
Tris-HCl	Підтримання pH
Солі натрію, калію чи амонію	Підтримання йонної сили розчину
Етилендіамінтетраоцтова кислота	Інгібування нуклеаз

Варто зазначити, що у випадку виділення РНК, коли потрібно інгібувати інший тип нуклеаз – РНКази, даний варіант інгібування не працює, адже ці ферменти не потребують для своєї роботи двовалентних катіонів. В цьому випадку до складу лізуючого буферного розчину необхідно додати речовини, які забезпечать дуже швидку та ефективну денатурацію білків клітини, в тому числі і РНКаз (наприклад, гуанідин тіоціанат чи ізотіоціанат).

Отже, на етапі лізису клітин, який є найпершим кроком будь-якого виділення нуклеїнових кислот, потрібно здійснити ефективне руйнування клітин та їх компонентів, а також забезпечити оптимальні умови для молекул, що виділяються (ДНК чи РНК) та уникнути їх деградації (інгібувати відповідні ферменти, які можуть їх розрізати).

Після лізису нуклеїнові кислоти будуть перебувати у розчиненому стані, разом із іншими розчинними сполуками (білки, полісахариди, неорганічні солі). Тому наступний етап будь-якого виділення нуклеїнових кислот буде полягати у очищенні зразків ДНК чи РНК від усіх інших речовин. Власне, в залежності від способу очищення і класифікують різні підходи рідкофазних методів виділення нуклеїнових кислот.

Перший варіант, який варто відмітити, це виділення за допомогою *фенол-хлороформної екстракції*. В цьому випадку до розчину після лізису додається суміш фенол-хлороформу у співвідношенні 1:1. За таких умов відбувається

досить ефективна денатурація білкових молекул (за допомогою фенолу), а також розчинення ліпідів та інших органічних компонентів клітини в даних органічних розчинниках. Після центрифугування такої суміші відбувається її розділення на дві фази: нижню (органічну) та верхню (водну), у якій, власне, і знаходяться на цьому етапі нуклеїнові кислоти (рис. 1.1). Денатуровані білки знаходяться на межі між двома фазами. Хлороформ збільшує густину органічної фази, запобігаючи потраплянню фенолу у водну фазу (густина фенолу (1,07 г/мл) є досить близькою до густини води (1 г/мл)). Таким чином, використання хлороформу забезпечує захист ДНК від пошкодження фенолом. Надалі водну фазу відбирають, змішують із сумішшю хлороформ-ізоаміловий спирт у співвідношенні 24:1 (ізоаміловий спирт запобігає піноутворенню), центрифугують і відбирають верхню водну фазу, повторюючи цю процедуру кілька разів для максимального очищення від фенолу (слідові кількості фенолу при цьому залишаються). Досить часто перший етап з фенолом взагалі пропускають, використовуючи відразу суміш хлоформ-ізоаміловий спирт. Зокрема, такий підхід використовують, коли сліди фенолу є дуже небажаними (наприклад, для подальших спектроскопічних досліджень).

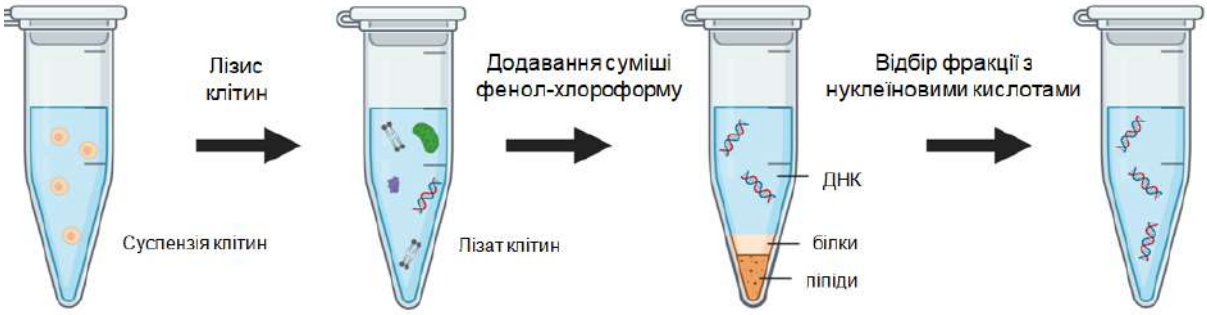

Рис. 1.1. Виділення нуклеїнових кислот методом фенол-хлороформної екстракції.

Однією з модифікацій даного підходу є *екстракція за допомогою суміші гуанідинтіоціанат-фенол-хлороформ.* Додавання солі гуанідинтіоціанату, що є хаотропним агентом, забезпечує ще швидшу і більш ефективну денатурацію білків та подальше очищення від них. Це є надзвичайно важливо, зокрема, при виділенні молекул РНК, які є менш стабільні та швидше деградують, ніж ДНК (також РНКази неможливо інгібувати додаванням EDTA). В цьому випадку суміш гуанідинтіоціанат-фенол додають вже на етапі лізису клітин для пришвидшення денатурації всіх білків, в тому числі РНКаз. Лізис та очищення

тут проводять за більш кислотних значень pH, ніж виділення ДНК (там використовують слаболужні значення). За таких умов РНК буде знаходитися у верхній (водній) фазі, тоді як всі інші молекули будуть в органічній фазі або на межі розділення двох фаз. Фенол-хлороформний метод є «золотим стандартом» для виділення нуклеїнових кислот. Його можна використовувати для виділення ДНК чи РНК із будь-якого типу клітин з достатньо високим виходом і чистотою виділеного матеріалу (найвища чистота серед усіх рідкофазних методів виділення нуклеїнових кислот). Однак, значним недоліком є токсична природа фенолу та хлороформу, що вимагає дуже обережного поводження з даними сполуками та ретельних заходів з дотримання техніки безпеки.

Інший підхід, що використовується при виділенні нуклеїнових кислот, – метод очистки від білків *шляхом висолювання за допомогою високої концентрації солі***.** Для цього після лізису до отриманого лізату додається висококонцентрований розчин солі (наприклад, 2-6 М NaCl). За таких умов більшість білків, що знаходиться у розчині, випадають у осад і ДНК можна очистити надалі шляхом центрифугування. Варто відмітити, що даний метод є більш безпечним порівняно з фенол-хлороформною екстракцією, оскільки не потребує використання високотоксичних речовин, однак є менш ефективним способом очищення зразків нуклеїнових кислот від білків.

Ще один підхід, що використовується при виділенні нуклеїнових кислот, – метод очистки зразків за допомогою *екстракції з використанням цетилтриметиламоній броміду* (Cetyltrimethylammonium Bromide (CTAB)). Зокрема, цей метод є дуже ефективним при виділенні нуклеїнових кислот з тканин та клітин, що містять велику кількість полісахаридів (наприклад, рослинні тканини чи певні грам-негативні бактерії). CTAB – це неіонний детергент, який у розчинах з низькою іонною силою зумовлює преципітацію ДНК та кислих полісахаридів, тоді як інші молекули (білки, нейтральні полісахариди) залишаються розчиненими. При збільшенні іонної сили розчину додавання CTAB, навпаки, зумовлює преципітацію білків, тоді як нуклеїнові кислоти не випадають у осад. Таким чином, на етапі лізису клітин до лізуючого буферного розчину з низькою іонною силою додається цетилтриметиламоній бромід, за рахунок чого забезпечується відділення ДНК (з кислими полісахаридами) від інших компонентів клітини. Після цього використовуються розчини з високою концентрацією солі для очищення ДНК від кислих полісахаридів. Варто відмітити, що для більш ефективного очищення зразків ДНК від будь-яких домішок, доцільно поєднувати даний підхід з подальшою фенол-хлороформною екстракцією.

Ще один варіант рідкофазних методів виділення нуклеїнових кислот – це *метод лужної екстракції* (лужної денатурації або лужного лізису). Найчастіше даний підхід використовується для виділення плазмідної ДНК з бактеріальних клітин. Метод лужної екстракції передбачає проведення лізису клітин в присутності високої концентрації NaOH. За таких умов відбувається руйнування мембран та інших компонентів клітини, досить ефективна денатурація більшості білків (за рахунок присутності SDS та NaOH), а також денатурація молекул ДНК. На наступному етапі проводять нейтралізацію в присутності ацетату натрію чи калію. За таких умов відбувається швидка ренатурація невеликих за розміром циркулярних молекул нуклеїнових кислот (плазмід), тоді як високомолекулярна бактеріальна хромосома залишається денатурованою і може бути осаджена шляхом центрифугування разом з іншими денатурованими компонентами клітини.

Після лізису та очищення зразків нуклеїнових кислот від залишків клітини, білків та інших високомолекулярних сполук одним з перерахованих вище способів, проводиться заключний етап виділення ДНК чи РНК за допомогою рідкофазних методик: збір очищеного матеріалу, що є універсальним для всіх зазначених методів (рис. 1.2).

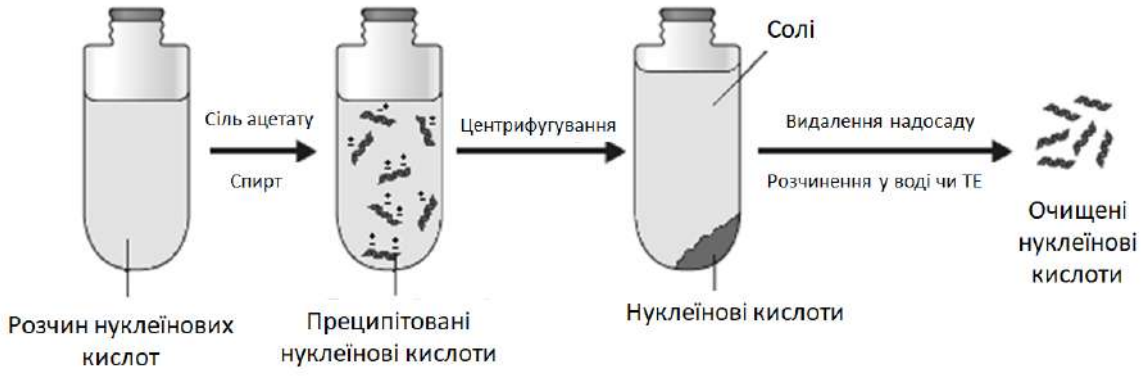

Рис. 1.2. Преципітація нуклеїнових кислот в присутності спирту та солі ацетату.

Для цього проводиться преципітація нуклеїнових кислот в присутності спиртів етанолу або ізопропанолу та високої концентрації солі, найчастіше – ацетату натрію чи калію. Змішування очищеного розчину ДНК чи РНК з даними сполуками зумовлює осадження нуклеїнових кислот з формуванням ниткоподібного преципітату білого кольору (позитивно заряджені іони солі нейтралізують негативний заряд нуклеїнових кислот, а спирт збільшує

гідрофобність таких комплексів у водному розчині). Надалі ДНК чи РНК осаджуються за допомогою центрифугування, осад висушують та розчиняють у відповідному буфері для зберігання (найчастіше використовується буферний розчин ТЕ (див. далі) або дистильована вода без нуклеаз).

Твердофазні методи виділення полягають у використанні певної твердої фази (матриці), з якою селективно зв'язуються нуклеїнові кислоти з розчину, а всі інші компоненти клітини послідовно видаляються за рахунок промивання. Порівняно з рідкофазними методами виділення, твердофазні методики є набагато швидшими у виконанні, менш трудомісткими, не потребують використання токсичних речовин, а також забезпечують вищий вихід (отриману кількість) нуклеїнових кислот та їх чистоту. Як тверду фазу найчастіше використовують матриці на основі сполук кремнію (англ. silica-based), аніонно-обмінні носії, скляні частинки, металовмісні матеріали (наприклад, наночастинки золота) тощо. Селективна взаємодія нуклеїнових кислот з такими матрицями забезпечується за рахунок водневих зв'язків з гідрофільними матрицями за хаотропних умов, а також іонних взаємодій з аніонно-обмінними носіями.

Виділення нуклеїнових кислот за допомогою твердофазних методів включає наступні етапи: лізис клітин, зв'язування нуклеїнових кислот з матрицею твердої фази, промивання від інших компонентів клітини та елюція очищених нуклеїнових кислот (рис. 1.3).

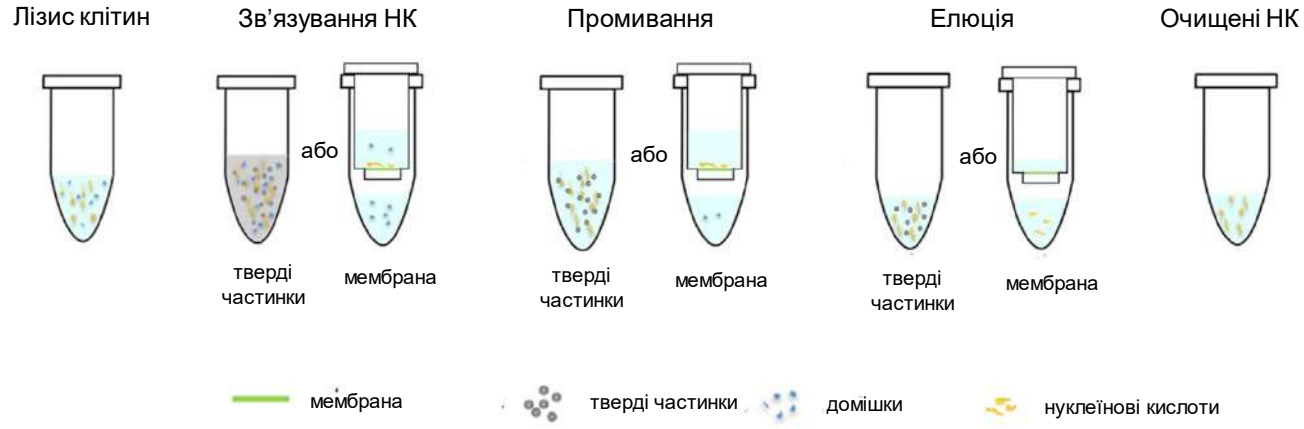

Рис. 1.3. Основні етапи виділення нуклеїнових кислот за допомогою твердофазних методик. НК – нуклеїнові кислоти. Тверді частинки та мембрана – варіанти твердої фази.

Лізис клітин проходить подібно до аналогічного етапу при рідкофазному виділенні нуклеїнових кислот. Зокрема, до складу лізуючих буферних розчинів

також входять SDS та протеїназа К, Tris, EDTA, можуть входити солі гуанідину (найчастіше - при виділенні РНК). Після лізису отриманий лізат наноситься на поверхню твердої фази і за відповідних умов (визначаються типом матриці, а також pH та йонною силою буферного розчину) відбувається адсорбція нуклеїнових кислот на поверхні матриці твердої фази. Надалі проводиться видалення розчину та незв'язаних компонентів і промивання матриці за допомогою декількох (найчастіше 2-3) раундів відмивання. За таких умов нуклеїнові кислоти залишаються міцно зв'язані з твердою фазою, а всі інші молекули, що неспецифічно адсорбувалися на її поверхні легко від'єднуються та вимиваються. Промивання твердої фази від неспецифічно зв'язаних молекул зазвичай здійснюється за допомогою центрифугування, в результаті чого відбувається відділення розчину з незв'язаними компонентами від твердої поверхні. Наприклад, досить часто відповідна тверда фаза включається до мікроцентрифужної колонки: відповідно, при центрифугування рідка фаза (розчин для промивання) проходить крізь матрицю твердої фази, вилучаючи з неї неспецифічні молекули, збирається в окрему пробірку та видаляється. В іншому випадку тверда фаза може бути представлена у вигляді мікро- чи наночастинок, на поверхні яких адсорбуються нуклеїнові кислоти. В цьому випадку при промиванні теж проводиться центрифугування, важчі частинки при цьому осідають на дно пробірки, а розчин для промивання, який формує надосад, відбирається та видаляється.

Ще одним прикладом є використання твердих фаз з магнітними властивостями (магнітні наночастинки або кремнієві кульки з магнітними характеристиками). Для такого підходу взагалі можна уникнути етапів центрифугування, оскільки зібрати такі частинки можна шляхом застосування магнітного поля в нижній частині пробірки за допомогою зовнішнього магніту.

На останньому етапі при твердофазних методах виділення проводиться елюція нуклеїнових кислот з твердої матриці за допомогою дистильованої води або низькосольових буферних розчинів (наприклад, розчину ТЕ). За таких умов нуклеїнові кислоти від'єднуються від матриці і розчин з ними можна відділити від твердої фази та зібрати шляхом центрифугування (або з використанням магнітного поля для матриць з магнітними властивостями).

Лабораторна робота №1

Виділення геномної ДНК за допомогою фенол-хлороформної екстракції

Мета роботи: виділити геномну ДНК із клітин ссавців за допомогою стандартної фенол-хлороформної екстракції (рідкофазний метод виділення).

Хід роботи

1. Приготувати необхідні розчини для виділення ДНК:

- 20 мл лізуючого буферного розчину (склад: 25 мМ EDTA; 10 мМ Tris – HCl, pH 7,6; 100 мМ NaCl);
- 20 мл 10%-го SDS;
- 20 мл 3 М ацетату натрію.
- 500 мл буферного розчину ТЕ (склад: 10 мМ Tris-HCl, 1 мМ EDTA, pH 8,0)

2. Змішати 300-500 мкл суспезії клітин (приблизно 3×10^7 клітин) з рівним об'ємом лізуючого буферного розчину. Додати 10%-ий SDS до кінцевої концентрації 1% та 20 мг/мл протеїназу К до кінцевої концентрації 100 мкг/мл. Ретельно перемішати за допомогою вортексу. Інкубувати 1-2 години при 65ºС.

3. Змішати отриманий лізат з рівним об'ємом суміші фенол-хлороформ у співвідношенні 1:1. Ретельно перемішати за допомогою вортексу.

УВАГА! Техніка безпеки! *Фенол є надзвичайно токсичною та корозійною сполукою, дуже леткий. Хлороформ – летка токсична сполука. Працювати виключно під витяжною шафою та у захисному одязі (лабораторний халат, рукавички, респіраторна маска та захисні окуляри). При потраплянні на шкіру негайно звернутися до викладача.*

4. Центрифугувати 10 хвилин при 10000 об/хв при кімнатній температурі. Після центрифугування повинно спостерігатися розділення фаз: нижня (органічна) та верхня (водна), а на межі розподілу фаз збирається преципітат (осад) білків.

5. Обережно відібрати верхню водну фазу (саме там на даному етапі знаходяться розчинені молекули ДНК) та перенести у чисту пробірку. Додати рівний об'єм хлороформу та ретельно перемішати за допомогою вортексу.

6. Центрифугувати 10 хвилин при 10000 об/хв при кімнатній температурі. Відібрати верхню (водну) фазу у чисту пробірку.

7. Додати 3 М ацетат натрію до кінцевої концентрації 0,15 М та 2,5 об'єми 96%-го етанолу і перемішати. За таких умов ДНК преципітує, утворюючи ниткоподібні структури білого кольору.

8. Осадити преципітовану ДНК за допомогою центрифугування при 10000 об/хв протягом 10 хвилин при кімнатній темепературі.

9. Видалити надосад та промити ДНК 200 мкл 70%-го етанолу для видалення залишків солей та фенолу. Вилити етанол та підсушити осад на повітрі.

10. Розчинити осад в 500 мкл буферного розчину ТЕ.

ПРИМІТКА. Виділені зразки ДНК можна негайно використовувати для досліджень або зберігати при температурі ≤ -20ºС.
За потреби домішки РНК можна видалити шляхом інкубування з ферментом РНКазою, після чого повторити процедуру очищення ДНК.

Лабораторна робота №2

Виділення геномної ДНК за допомогою комерційного набору Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit

Мета роботи: виділити геномну ДНК із клітин людини за допомогою комерційного набору *Quick*-DNA™ Miniprep Plus Kit (твердофазний метод виділення).

Хід роботи

1. Приготувати розчин протеїнази К. Додати 1040 мкл буфера для зберігання протеїнази К у пробірку з ліофілізованою протеїназою К (20 мг) та ретельно перемішати (кінцева концентрація протеїнази К становить ~20 мг/мл). Після змішування зберігати при -20ºС.

ПРИМІТКА. Буфер для зберігання протеїнази К та всі інші буферні розчини, що використовуються в даному протоколі лабораторної роботи, надаються в готовому вигляді у складі комерційного набору для виділення ДНК.

2. Змішати 200 мкл суспензії клітин людини (приблизно 5×10^6 клітин) з 200 мкл буфера для лізису BioFluid & Cell Buffer та 20 мкл 20 мг/мл протеїнази К.

3. Ретельно перемішати або вортексувати протягом 10-15 секунд. Інкубувати пробірку при 55˚С протягом 10 хвилин для проходження лізису клітин.

4. Центрифугувати при 10000 об/хв протягом 1 хвилини при кімнатній температурі для видалення нерозчинних залишків. Перенести водний надосад у чисту мікроцентрифужну пробірку.

5. Додати 1 об'єм Genomic Binding Buffer до лізованого зразка. Ретельно перемішати на вортексі протягом 10-15 секунд.

6. Перенести суміш у колонку Zymo-Spin™ IIC-XLR, вставлену у збірну пробірку, для зв'язування ДНК з твердою матрицею колонки. Центрифугувати при 10000 об/хв протягом 1 хвилини при кімнатній температурі. Вилити рідину із збірної пробірки. Якщо лізат все ще видно на верхній частині матриці колонки, центрифугувати ще 1 хвилину при 10000 об/хв.

7. Додати 400 мкл DNA Pre-Wash Buffer (розчин для промивання 1) у колонку, вставлену у збірну пробірку Центрифугувати при 10000 об/хв протягом 1 хвилини при кімнатній температурі. Вилити рідину із збірної пробірки.

8. Додати 700 мкл g-DNA Wash Buffer (розчин для промивання 2) до колонки. Центрифугувати при 10000 об/хв протягом 1 хвилини при кімнатній температурі. Вилити рідину із збірної пробірки.

9. Додати 200 мкл g-DNA Wash Buffer до колонки. Центрифугувати при 10000 об/хв протягом 1 хвилини при кімнатній температурі. Викинути збірну пробірку з рідиною.

10. Перенести колонку в чисту мікропробірку. Додати ≥ 50 мкл буфера для елюції ДНК (склад: 10 мМ Tris-HCl, pH 8,5; 0,1 мМ EDTA) або дистильованої води (без нуклеаз) безпосередньо на матрицю колонки. Інкубувати протягом 5 хвилин при кімнатній температурі, потім центрифугувати при 10000 об/хв протягом 1 хвилини, щоб елюювати ДНК.

ПРИМІТКА. ДНК після елюції можна негайно використовувати для досліджень або зберігати при температурі ≤ -20ºС для подальшого використання.
Загальний вихід ДНК можна підвищити, провівши елюцію при температурі 60-70ºС.

Лабораторна робота №3

Виділення РНК за допомогою комерційного набору Direct-zol™ RNA Miniprep

Мета роботи: виділити тотальну РНК із клітин людини за допомогою комерційного набору Direct-zol™ RNA Miniprep (твердофазний метод виділення).

Хід роботи

1. Приготувати необхідні буферні розчини:

- додати 10 мл 96%-го етанолу до 40 мл концентрату Direct-zol™ RNA PreWash;
- додати 52 мл 96%-го етанолу до 12 мл концентрату RNA Wash Buffer;
- відновити ліофілізовану ДНКазу I (1500 U*) за допомогою 275 мкл дистильованої води, вільної від ДНКази/РНКази, перемішати шляхом обережного перевертання та розділити на окремі аліквоти. Після відновлення зберігати при -20°C.

ПРИМІТКА. Концентровані розчини Direct-zol™ RNA PreWash і RNA Wash Buffer та всі інші буферні розчини, що використовуються в даному протоколі лабораторної роботи, надаються в готовому вигляді у складі комерційного набору для виділення РНК.
**U - від англ. units – це одиниці активності ферменту. В даному випадку 1 U – це така кількість ДНКази I, яка забезпечує зростання абсорбції розчину високомолекулярної ДНК при 260 нм (див. розділ 2) зі швидкістю 0,001 одиниць/мл реакційної суміші при температурі 25°C.*

2. До 100 мкл суспензії клітин (приблизно 5×10^6 клітин) додати ≥ 300 мкл TRI Reagent® (або аналогічного йому) та ретельно перемішати. Щоб видалити тверді частинки (якщо такі є), відцентрифугувати суміш та перемістити надосад у пробірку, вільну від РНКази.

ПРИМІТКА. Всі кроки виконуються при кімнатній температурі. Для біологічних зразків (цільної крові, плазми, сироватки, лейкоцитів тощо) рекомендовано виконати обробку протеїназою К.

УВАГА! Техніка безпеки! *До складу TRI Reagent® входить фенол, що є надзвичайно токсичною та корозійною сполукою, дуже леткий, а також гуанідин тіоціанат, що може викликати подразення. Працювати виключно під витяжною шафою та у захисному одязі (лабораторний халат, рукавички, респіраторна маска та захисні окуляри). При потраплянні на шкіру негайно звернутися до викладача.*

3. Додати рівний об'єм 96%-го етанолу до зразка, лізованого в TRI Reagent® і ретельно перемішати.

4. Перенести отриману суміш у колонку Zymo-Spin™ IICR2, вставлену у збірну пробірку, для зв'язування РНК з твердою матрицею колонки. Центрифугувати при 10000 об/хв протягом 1 хвилини. Вилити рідину із збірної пробірки. Якщо лізат все ще видно на верхній частині матриці колонки, центрифугувати ще 1 хвилину при 10000 об/хв.

5. Додати 400 мкл RNA Wash Buffer (розчин для промивання) у колонку, вставлену у збірну пробірку. Центрифугувати при 10000 об/хв протягом 1 хвилини. Вилити рідину із збірної пробірки.

6. Обробити зразки ДНКазою I для очищення від молекул ДНК. Для цього розчинити 5 мкл ДНКази I (приготованої у п.1, вихідна концентрація - 6 U/мкл) у 75 мкл DNA Digestion Buffer і перемішати, обережно перевертаючи пробірку. Додати суміш безпосередньо на матрицю колонки. Інкубувати при кімнатній температурі (20-30°C) протягом 15 хвилин.

7. Додати 400 мклDirect-zol™ RNA PreWash (розчин для промивання) у колонку, вставлену у збірну пробірку. Центрифугувати при 10000 об/хв протягом 1 хвилини. Вилити рідину із збірної пробірки та повторити цей крок.

8. Додати 700 мкл RNA Wash Buffer (розчин для промивання) у колонку, вставлену у збірну пробірку. Центрифугувати при 10000 об/хв протягом 1 хвилини. Переконатися, що залишки буфера для промивання повністю видалені з колонки (за необхідності центрифугувати ще раз). Викинути збірну пробірку з рідиною.

9. Обережно перенести колонку у чисту пробірку без РНКази. Додати 50 мкл дистильованої води (без нуклеаз) безпосередньо на матрицю колонки та центрифугувати при 10000 об/хв протягом 1 хвилини, щоб елюювати РНК.

ПРИМІТКА. РНК після елюції можна негайно використовувати для досліджень або зберігати при температурі ≤ -20°C для подальшого використання.

РОЗДІЛ 2. СПЕКТРОФОТОМЕТРІЯ

Спектрофотометрія – один із методів, яким користуються дослідники, що працюють у багатьох різноманітних напрямках біологічної науки. Цей метод, що базується на аналізі спектрів поглинання світла речовинами, має дуже широку сферу застосування: від точного визначення концентрацій речовин до аналізу їх фізико-хімічних властивостей і реєстрації хімічних реакцій. Достатня простота і висока точність методики зробили спектрофотометрію незамінною у молекулярно-біологічних, біохімічних, генетичних та інших дослідженнях.

Як було зазначено, в основі спектрофотометричних методів лежить аналіз спектрів поглинання світла речовинами (наприклад, біополімерами, такими як нуклеїнові кислоти чи білки), тобто аналіз залежності ефективності поглинання від довжини хвилі світла, яке подається на досліджувану речовину. Зазвичай у спектрофотометричних дослідженнях використовують світлові хвилі видимого та ультрафіолетового діапазонів.

При проходженні світла крізь розчин, заповнений речовиною, відбувається часткове поглинання світла (за умови, що досліджувана речовина в принципі здатна до поглинання); частина світла просто проходить крізь розчин, частина завжди розсіюється – відбувається зміна напрямку розповсюдження хвилі. Молекули або їх частини, що здатні до поглинання, називаються *хромофорами*. Ця здатність обумовлена структурою молекули, і хромофорами зазвичай виступають ароматичні або гетероциклічні сполуки із доволі жорсткою просторовою структурою (див. далі).

При поглинанні кванта світла відбувається збудження хромофору – електрон у його складі переходить із найнижчого (основного) енергетичного рівня на більш високий. Такий перехід можливий лише за умови, що різниця енергій між двома рівнями дорівнює енергії кванта світла. Ефективність поглинання світла хромофором залежить, у першу чергу, від довжини хвилі, яка і визначає енергію кванта: для кожної сполуки є свій невеликий діапазон значень довжин хвиль, за якого поглинання є максимальним (значення довжини хвилі, що відповідає максимуму, позначається λ_{max}). Діапазон довжин хвилі, при якому відбувається поглинання, залежить не тільки від структури самого хромофора, а й від середовища, в якому він знаходиться (наприклад, на спектр поглинання ряду речовин впливають полярність розчинника та його pH).

Основний закон, який описує поглинання світла молекулами, – закон Ламберта-Бера – вказує на те, що частка поглинутого світла залежить від концентрації хромофорів та довжини оптичного шляху:

$$\lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon_\lambda Cl \qquad (2.1)$$

де I_0 – інтенсивність світла, яке подається на розчин хромофорів, I – інтенсивність світла, що детектується після проходження крізь розчин, C – концентрація хромофорів, ε_λ – коефіцієнт екстинкції (є пропорційним до імовірності поглинання світла даним хромофором у даному середовищі за довжини хвилі λ, є паспортною характеристикою хромофору), l – товщина шару, крізь який проходить світло (товщина кювети), виражена в сантиметрах. Величину $\lg \frac{I_0}{I}$ називають *оптичною густиною* (позначають літерою A) і вона є мірою ефективності поглинання світла. Як видно із наведеного рівняння, оптична густина – безрозмірна величина. Отже, коефіцієнт екстинкції має розмірність оберненої концентрації, помноженої на обернену довжину. Якщо концентрація вимірюється у молях на літр, то коефіцієнт екстинкції називають молярним коефіцієнтом екстинкції і вимірюють у $М^{-1}см^{-1}$ (л/моль·см). Вимірюючи оптичну густину розчину хромофору та знаючи його коефіцієнт молярної екстинкції, можна із високою точністю визначати концентрацію цієї сполуки.

Іноді замість коефіцієнту екстинкції використовують обернену величину ε^{-1}, що має розмірність концентрації (називаючи, не зовсім коректно, цю величину також коефіцієнтом екстинкції). Зрозуміло, що у такому випадку (якщо довжина оптичного шляху $l = 1$ см) концентрація C може бути розрахована за простою формулою $C = a \cdot A$, де $a = \varepsilon^{-1}$ ("інвертований" коефіцієнт екстинкції), A – оптична густина.

Оптичну густину розчину вимірюють за допомогою спеціального приладу – спектрофотометру. Принцип його роботи полягає у тому, що у загальному промені від джерела світла за допомогою монохроматору виділяється певний дуже вузький діапазон довжин хвиль, який подається на зразок із хромофором, що аналізується. Далі відбувається детекція інтенсивності світла, яке пройшло через розчин із хромофором, і обчислюється логарифм відношення I_0 до I (власне, це значення і відображається на дисплеї приладу). Слід зазначити, що насправді у якості I_0 вимірюється інтенсивність світла, яке пройшло через чистий розчинник без хромофору. На сьогоднішній день існує велика кількість різних марок спектрофотометрів, одними із

надсучасних є прилади серії NanoDrop™ – мікрооб'ємні спектрофотометри, які дозволяють встановлювати концентрації речовин та досліджувати їх спектральні характеристики у зразках об'ємом всього 0,5 мкл, при цьому вимірювання відбувається у краплі нанесеної на прилад рідини без будь-яких ємностей (кювет, пробірок тощо).

Серед біологічних макромолекул, здатних до поглинання, особливої уваги заслуговують біополімери – нуклеїнові кислоти та білки. Хромофорами у складі нуклеїнових кислот є азотисті основи – жорсткі гетероциклічні сполуки характеризуються високою ефективністю поглинання світла. Кожна азотиста основа має свій власний максимум поглинання із усередненим значенням λ_{max} для ДНК та РНК 260 нм (рис. 2.1, табл. 2.1).

За поглинання білків відповідають у першу чергу пептидні групи: хоча ефективність поглинання є порівняно невисокою, велика кількість пептидних груп у складі будь-якого білка визначає їх суттєвий внесок у поглинання. Саме поглинання пептидних груп використовують для оцінки загальної концентрації білків у суміші, особливо це актуально, коли амінокислотна послідовність досліджуваних молекул невідома. Максимум поглинання пептидної групи знаходиться в діапазоні 210 нм, проте, оскільки в цій області ефективно поглинають атмосферні гази, зазвичай оптичну густину білків, за яку відповідають пептидні групи, вимірюють за довжини хвилі 230 нм.

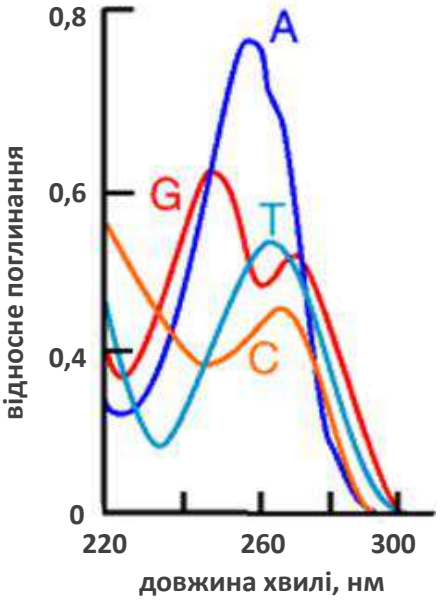

Рис. 2.1. Спектри поглинання азотистих основ.

Іншими хромофорами у складі білків є ароматичні амінокислоти – триптофан, тирозин та фенілаланін (табл. 2.1). Максимум поглинання білкових

молекул завдяки ароматичним залишкам в середньому становить 280 нм і, оскільки фенілаланін характеризується дуже низькою здатністю до поглинання, основний внесок у поглинання світла білками за цієї довжини хвилі роблять залишки триптофану та тирозину.

Таблиця 2.1. **Максимуми поглинання (λ_{max}) та молярні коефіцієнти екстинкції (ε_λ) основних хромофорів білків та нуклеїнових кислот**

Речовина	λ_{max}, нм	ε_λ, $М^{-1}см^{-1}$
Пептидна група	230	923
Фенілаланін Phe	260	200
Тирозин Tyr	275	1400
Триптофан Trp	280	5600
Аденозин A	260	14900
Гуанозин G	253	13600
Цитозин C	267	6100
Тимідин T	267	9700
Уридин U	261	10100
РНК	260	7 400 (на моль нуклеотидів)
ДНК	260	6600 (на моль нуклеотидів)

Коротко розглянувши принципи поглинання світла молекулами та основні хромофори у складі білків та нуклеїнових кислот, зупинимося на огляді основних сфер застосування спектрофотометрії у молекулярно-біологічних дослідженнях.

Визначення концентрації речовин. Закон Ламберта-Бера визначає зв'язок між оптичною густиною розчину із хромофором та концентрацією останнього (див. вище). За умови, якщо коефіцієнт молярної екстинкції досліджуваної речовини відомий, оцінка оптичної густини за допомогою спектрофотометру дає можливість із високою точністю виміряти концентрацію хромофора у зразку у молях на літр. Подібні вимірювання зазвичай проводяться у максимумі поглинання хромофору (наприклад, для ДНК – 260 нм, для білків – 280 нм або 230 нм). Використання спектрофотометрії із метою визначення концентрації речовин чи не найбільш рутинний і широко вживаний напрям застосування цього методу.

Оцінка чистоти нуклеїнових кислот після їх виділення. Необхідність виділення ДНК чи РНК із біологічного матеріалу – рутинна задача, із якою регулярно стикаються і при проведенні наукових досліджень, і в практичних цілях в медичній практиці, криміналістиці тощо. Важливо при цьому оцінити якість виділеного зразку на предмет наявності у ньому домішку білків чи інших сполук (наприклад, речовин-компонентів сумішей для осадження ДНК чи РНК, складових буферів тощо). Для цього дуже часто використовують спектрофотометричний метод: проводять вимірювання оптичної густини досліджуваного зразка при трьох довжинах хвиль 230 нм, 260 нм та 280 нм і визначають співвідношення A_{260}/A_{280} та A_{260}/A_{230}. Перше співвідношення використовують для встановлення наявності білкових молекул у зразках нуклеїнових кислот, адже саме для білків λ_{max}= 280 нм і високе поглинання розчину за даної довжини хвилі буде свідчити про їх присутність. Оптимальним значенням A_{260}/A_{280} є ~1,8 і ~2,0 для ДНК и РНК, відповідно. Оцінка співвідношення A_{260}/A_{230} використовується як для оцінки внеску від домішків білків, так і для встановлення домішку органічних сполук, таких як фенол чи ізотіоціонат гуанідіну, що присутні у сумішах для виділення нуклеїнових кислот.

Реєстрація структурних переходів в макромолекулах. Під впливом певних чинників навколишнього середовища (наприклад, температури) або в результаті взаємодії молекул між собою (наприклад, білків із їх лігандами) макромолекули можуть змінювати свою конформацію. Іноді такі різні структурні форми макромолекул характеризуються різними спектрами поглинання та/або коефіцієнтами молярної екстинкції, що дозволяє із використанням спектрофотометричного підходу реєструвати структурні переходи в цих молекулах.

Одним із хрестоматійних прикладів використання спектрофотометрії в даному напрямку є реєстрація плавлення ДНК – розплітання (денатурації) подвійної спіралі під впливом температури. В основі аналізу лежить явище *гіпохромії нуклеїнових кислот* – зниження коефіцієнта екстинкції (та оптичної густини розчину) для дволанцюгових молекул у порівнянні із одноланцюговими полінуклеотидами і ще сильніше – у порівнянні із вільними нуклеотидами. В результаті реєстрації оптичної густини розчину полінуклеотидів в залежності від температури отримують S-подібну *криву плавлення* (рис. 2.2).

Точка напівпереходу цієї кривої називається *температурою плавлення* (T_m), фактично це температура за якої 50% послідовностей ДНК перебувають у

денатурованому стані. Температура плавлення буде різною для різних послідовностей ДНК, оскільки залежить від співвідношення АТ- та GC-пар у молекулі: вона буде тим вища, чим більший відсоток гуанілових та цитидилових нуклеотидів.

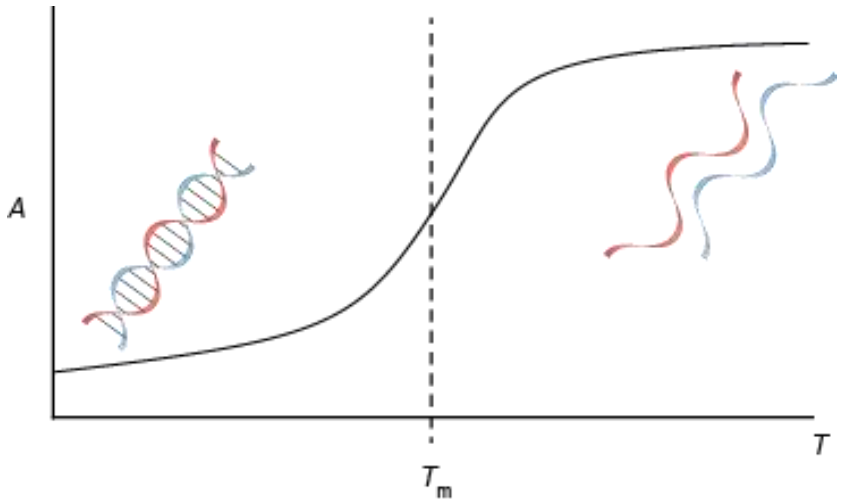

Рис. 2.2. Крива плавлення ДНК.

Ще одним прикладом реєстрації структурних перебудов макромолекул є дослідження зміни спектру поглинання тирозину у складі білків в залежності від pH розчину із використанням методу спектрофотометричного титрування. Річ у тім, що тирозин і його іонізована форма – тирозинат (pK переходу ≈10) – мають різні спектри поглинання із двома характерними максимумами при різних довжинах хвиль (табл. 2.2).

Таблиця 2.2 **Спектральні характеристики тирозину та тирозинату.**

Параметр	Тирозин	Тирозинат
λ_{max1}	222 нм	240 нм
ε_1	8000 $M^{-1}см^{-1}$	11700 $M^{-1}см^{-1}$
λ_{max2}	275 нм	293 нм
ε_2	1400 $M^{-1}см^{-1}$	2300 $M^{-1}см^{-1}$

Очевидно, що перетворення тирозину на тирозинат під дією високих pH можливе лише за умови доступності розчинника до даної амінокислоти, тобто тоді, коли залишки тирозину експоновані на поверхні білкової глобули. За таких умов спектр поглинання білка, який оцінюється по поглинанню тирозину, буде поступово змінюватися в напрямку такого, який характерний для тирозинату. У випадку структурних перебудов білка і занурення тирозинових залишків всередину білкової глобули у неполярне оточення зміна pH не приведе до зміни спектру поглинання досліджуваного білка.

Встановлення констант зв'язування лігандів із біополімерами. Для деяких лігандів спостерігається зміна їх спектральних характеристик при зв'язуванні із своїми макромолекулами-партнерами – саме на цьому факті базується встановлення констант асоціації комплексів ліганд-мішень. Для оцінки константи зв'язування експериментально визначають ізотерму адсорбції – співвідношення між концентрацією незв'язаного ліганда у розчині та кількістю адсорбованого. Ізотерму будують зазвичай у координатах Скетчарда, де по осі ординат відкладене відношення щільності зв'язаного ліганда до його вільної концентрації, а по осі абсцис – щільність зв'язування.

Дослідження перебігу біохімічних реакцій. Деякі субстрати біохімічних реакцій та продукти їх перетворень є хромофорами і мають свої унікальні відмінні один від одного спектри поглинання. Досліджуючи зміну спектральних характеристик розчину, який містить субстрат реакції та відповідний фермент, що забезпечує її протікання, можна спостерігати за накопиченням продукту цієї реакції у дослідній системі. Одним із прикладів такого застосування спектрофотометрії є визначення у розчині відновленого коферменту NADH в реакції перетворення лактату на піруват за допомогою лактатдегідрогенази при гліколізі:

$$\text{Лактат} + NAD^+ \longrightarrow \text{Піруват} + NADH + H^+$$

Спектр поглинання розчину NADH має два максимуми: один знаходиться в ультрафіолетовому діапазоні з $\lambda_{max} \approx 250$ нм, інший – в діапазоні видимого світла з $\lambda_{max} \approx 340$ нм. На відміну від відновленої форми, NAD^+ ефективно поглинає світло лише в ультрафіолетовій області зі схожою до NADH λ_{max}. Аналіз спектру поглинання реакційної суміші дозволяє встановити факт накопичення NADH в результаті перетворення лактату на піруват.

Лабораторна робота №4

Спектрофотометричне визначення концентрації та чистоти виділених зразків нуклеїнових кислот

Мета роботи: оцінити за допомогою методу спектрофотометрії концентрацію виділених зразків ДНК та РНК, а також їх чистоту на предмет забруднення білками та іншими сполуками.

Хід роботи

1. Виділені зразки ДНК та РНК (див. лабораторні роботи №1, №2, №3) розвести в 100 разів за допомогою буферного розчину ТЕ (склад: 10 мМ Tris-HCl, 1 мМ EDTA, pH 8,0) до загального об'єму 3 мл.

2. За допомогою спектрофотометра провести вимірювання оптичної густини (А) розчинів ДНК та РНК при довжинах хвилі 230 нм, 260 нм та 280 нм. В якості референса використовувати буферний розчин ТЕ. Для вимірювання використовувати виключно кварцові кювети.

3. Значення оптичної густини, отримані для кожного зразка при довжині хвилі 260 нм, використати для обрахунку концентрації C зразків в мкг/мкл за наступною формулою:

$$C = A_{260} \times a \times n / 1000,$$

де A_{260} – значення оптичної густини зразка при довжині хвилі 260 нм, a – "інвертований" коефіцієнт екстинції (для дволанцюгової ДНК становить 50 мкг/мл, а для одноланцюгової РНК – 40 мкг/мл); n – ступінь розведення зразка.

4. Для оцінки чистоти зразків на предмет наявності в них домішок білків для кожного зразка розрахувати відношення значення оптичної густини, отриманого при довжині хвилі 260 нм, до значення, отриманого при 280 нм (A_{260}/A_{280}). Для зразків дволанцюгової ДНК оптимальне співвідношення повинно становити 1,6-2,0, а для зразків одноланцюгової РНК – 2,0-2,3. Значення даного співвідношення, що є нижчі від наведених, свідчать про забруднення зразків білками. Для зразків ДНК співвідношення A_{260} до A_{280} вище від оптимального свідчить про можливу наявність молекул РНК.

5. Для оцінки чистоти зразків на предмет наявності в них вуглеводів, (фенолу, ізотіціанатів тощо) розрахувати відношення значення оптичної густини, отриманого при довжині хвилі 260 нм, до значення, отриманого при 230 нм (A_{260}/A_{230}). Для зразків ДНК та РНК оптимальне співвідношення повинно становити приблизно 1,8-2,2. Значення даного співвідношення, що є нижчі від оптимальних, свідчать про забруднення зразків зазначеними сполуками.
6. Зробити висновок щодо якості виділених зразків ДНК та РНК: порівняти кількість та чистоту отриманих препаратів. Вказати, які із зразків можуть бути використані для подальших досліджень.

РОЗДІЛ 3. ЕЛЕКТРОФОРЕЗ

Електрофорез – один із гідродинамічних методів, в основі якого лежить аналіз руху молекул або їх комплексів у рідині під впливом сили електричного поля. Електрофорез в молекулярній біології є чи не найбільш уживаним методом, який в першу чергу використовується для розділення молекул за молекулярною масою. Проте, цим сфери застосування даного методу не обмежуються: його використовують для дослідження білково-нуклеїнових взаємодій, оцінки певних параметрів циркулярних молекул ДНК тощо.

Фізичні принципи електрофорезу. Зрозуміло, що рух молекул в електричному полі буде можливий лише тоді, коли вони будуть мати певний заряд і коли сила електричного поля (F_e) буде достатньою для того, щоб протидіяти дифузії, яка забезпечує рівномірний розподіл молекул у рідині. Сила F_e, яка діє на молекулу, поміщену в електричне поле, буде визначатися зарядом цієї молекули q та силовою характеристикою поля – напруженістю E (величина, що залежить від різниці потенціалів, що прикладаються, та відстані між електродами): $F_e = qE$. При цьому рух молекул буде гальмуватися силою тертя F_f, що діє у протилежному до сили струму напрямку і гальмує рух молекул. В свою чергу, сила тертя визначається добутком коефіцієнту тертя f (величина, що залежить від розміру та форми молекули, а також в'язкості рідини, в якій відбувається рух) та швидкості руху молекул v.

Оскільки, відповідно до законів гідродинаміки, рух молекул у рідині здійснюється із постійною швидкістю, то сила тертя F_f та сила електричного поля F_e будуть рівні за абсолютною величиною. Підставивши значення цих сил, отримаємо рівняння залежності швидкості руху молекул в електричному полі від їх заряду, коефіцієнту тертя та напруженості електричного поля:

$$v = \frac{qE}{f} \qquad (3.1)$$

Отже, швидкість руху буде тим більша, чим більший заряд молекули та вища напруженість електричного поля, і тим менша, чим вище коефіцієнт тертя. Два параметри – заряд і коефіцієнт тертя – є характеристиками молекули, що рухається в певному середовищі, проте напруженість електричного поля є величиною, яка задається умовами експерименту. Для того, щоб визначати

швидкість руху, яка не буде залежати від параметрів поля, використовують такий показник як *електрофоретична рухливість*, нормалізуючи рівняння 3.1 на напруженість електричного поля:

$$u = \frac{v}{E} = \frac{q}{f} \qquad (3.2)$$

В експериментах електрофоретичну рухливість досліджуваної молекули вимірюють як відношення її рухливості до рухливості певної молекули, розміри якої і заряд відомі (так звана молекула-маркер), а саму рухливість для досліджуваної молекули та маркеру визначають як відстань, яку пройшли обидві молекули від старту за час тривалості електрофорезу.

Говорячи про електрофоретичну рухливість молекул слід звернути увагу на один важливий факт. Якщо, наприклад, збільшити довжину молекули ДНК чи РНК на один нуклеотид, це призведе як до збільшення її заряду (один фосфатний залишок у складі нуклеотиду надає молекулі додатковий негативний заряд), так і до збільшення коефіцієнту тертя, який залежить від маси молекули. Аналогічна ситуація буде характерна і для білків за певних умов електрофорезу (див. далі). Отже, відповідно до рівняння 3.2 електрофоретична рухливість теоретично повинна бути однаковою для молекул різного розміру через пропорційну зміну двох величин q та f. Проте на практиці розділення молекул за допомогою електрофорезу відбувається дуже ефективно і така ефективність досягається за рахунок використання гелів, в яких і відбувається рух молекул: лише при взаємодії із елементами гелю, які створюють опір для руху молекул, одні молекули починають рухатися повільніше за інші.

Тут слід зазначити, що на рух молекул в електричному полі, окрім їх заряду, коефіцієнту тертя та особливостей гелів, впливає ще достатньо велика кількість параметрів, які, зазвичай, повинні контролюватися при проведенні експериментів. Наприклад, електрофоретична рухливість буде залежати від концентрації молекул, що рухаються в електричному полі, в'язкості середовища та температури, йонної сили буферу тощо.

Гелі, що використовуються при електрофорезі. Обидва варіанти гелів, які використовують при електрофорезі – поліакриламідний та агарозний – являють собою просторову сітку у порах якої здійснюється рух молекул в залежності від їх розміру: чим більша молекулярна маса молекули, тим менша кількість пор крізь які можлива її міграція. Отже, великі молекули будуть

рухатися повільніше, ніж малі. Якщо при зростанні молекулярної ваги пропорційно зростає заряд (як для нуклеїнових кислот, а також для білків за певних умов електрофорезу), то молекулярна вага буде практично єдиним параметром, що впливає на рухлівість. Тоді електрофоретична рухливість і молекулярна вага пов'язані між собою простим емпіричним рівнянням, що виконується у певному діапазоні значень молекулярної ваги (рис. 3.1):

$$u = b - a \lg M , \qquad (3.3)$$

де M – молекулярна маса полімеру, a і b – константи. Такі залежності будують, вимірюючи відстані у сантиметрах, які пройшли маркерні молекули із відомою молекулярною масою. Використовуючи отримані залежності як калібрувальні, можна із високою точністю визначати молекулярну масу досліджуваного біополімеру за його електрофоретичною рухливістю.

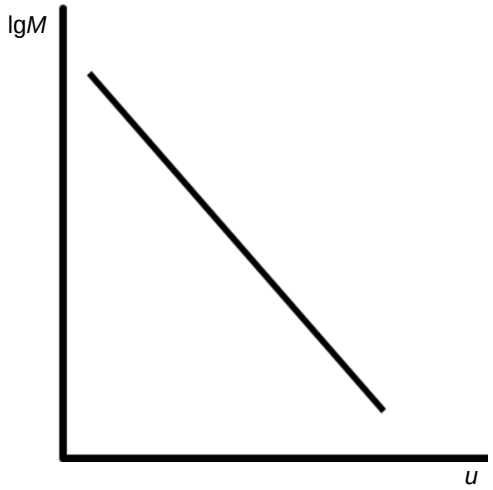

Рис. 3.1. Логарифмічна залежність молекулярної маси полімеру M від його електрофоретичної рухливості u.

Агарозний гель готують із полісахариду агарози, який отримують із агару. Агароза являє собою порошок білого кольору, суспендування якого у дистильованій воді або буфері з нейтральним pH при високих температурах (точка плавлення становить ≈95°C) приводить до утворення прозорого розчину. При застиганні розчину утворюється просторова сітка за рахунок утворення водневих зв’язків між мономерами агарози (точка утворення гелю становить ≈45°C). Розмір пор такої сітки визначається концентрацією агарози: чим вона вища, тим менший розмір пор.

Поліакриламідний гель (ПААГ) готують із використанням двох складових – акриламіду та N,N'-метилен-*біс*-акриламіду. Для запуску реакції

полімеризації додаються її каталізатори – персульфат амонію та ТЕМЕД (N,N,N',N'-тетраетилетилендиамід). При полімеризації акриламіду утворюються довгі полімерні тяжі, що слугують основою для формування гелю, *біс*-акриламід зшиває їх поперечно в результаті чого утворюються пори, крізь які відбувається рух молекул при електрофорезі (рис. 3.2). Діаметр пор поліакриламідного гелю визначається, в першу чергу, концентрацією акриламіду, проте важливе значення у модулюванні структури гелю має співвідношення акриламід / *біс*-акриламід.

Два основні варіанти гелів, що використовуються при електрофорезі, мають різну роздільну здатність. Пори агарозного гелю, навіть за умови високої концентрації агарози, достатньо великі за розміром і для розділення невеликих молекул вони не придатні. Цей гель зазвичай використовують для швидкого електрофорезу нуклеїнових кислот з низькою роздільною здатністю. В поліакриламідному гелі відбувається розділення білкових молекул та, з підвищеною роздільною здатністю, фрагментів нуклеїнових кислот.

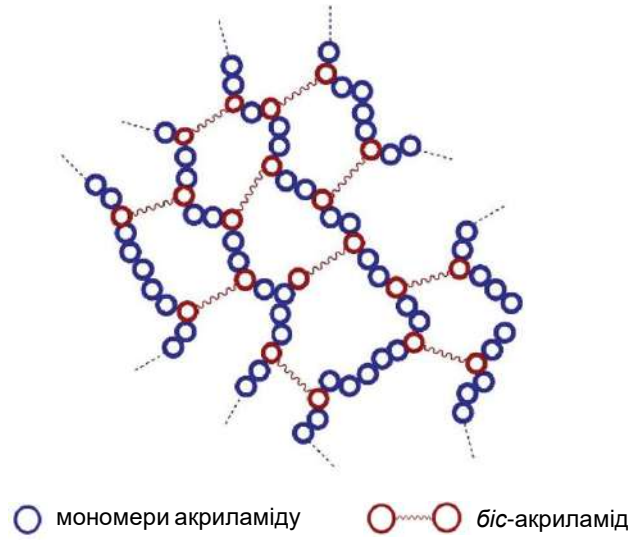

Рис. 3.2. Схематичне зображення поліакриламідного гелю.

Електрофорез нуклеїнових кислот. Основне призначення електрофорезу як методу молекулярної біології – це розділення молекул за їх молекулярною масою. Тому не дивно, що найчастіше в лабораторіях електрофорез нуклеїнових кислот використовується саме з цією метою: наприклад, для визначення розміру цільового фрагмента після полімеразної ланцюгової реакції чи аналізу поліморфізму довжин фрагментів, що утворилися в результаті рестрикції геномної ДНК специфічними нуклеазами. Останній приклад – доволі цікавий метод молекулярної біології, який дозволяє

досліджувати геномну ДНК, спираючися на різницю у послідовностях сайтів рестрикції (наприклад, такі відміни можуть бути спричинені появою точкових мутацій у відповідних сайтах) для групи рестриктаз в геномах різних організмів. Електрофорез як метод розділення нуклеїнових кислот використовується і на останньому етапі секвенування ДНК за Сангером. Особливість цього електрофорезу полягає у тому, що електрофорез проводять в умовах денатурації ДНК (рух в гелі здійснюють одноланцюгові молекули) при високій концентрації сечовини та температурі ~60 °С. Якщо гель достатньо тонкий або електрофорез здійснюється у тонких капілярах, заповнених гелем, це дає змогу розділити фрагменти, що відрізняються за розміром всього на один нуклеотид.

Крім розділення полінуклеотидів за молекулярною масою, електрофорез використовують також і для дослідження ДНК-білкових або РНК-білкових взаємодій. Одним із підходів, що дозволяє виявляти такі взаємодії, є так званий аналіз зсуву електрофоретичної рухливості (gel shift assay, electrophoretic mobility shift assay, EMSA). Суть підходу полягає у тому, що проводиться електрофорез певного фрагменту ДНК чи РНК без додавання білка, а потім – за його присутності в суміші. Оскільки молекулярна маса комплексу більша, ніж «голого» фрагменту, спостерігається зсув (shift) у електрофоретичній рухливості: суттєве зниження руху буде спостерігатися для фрагменту ДНК, якщо він буде утворювати комплекс із білком. Якщо початкові концентрації білка та фрагменту нуклеїнової кислоти, які наносяться на гель, відомі, а також якщо відома стехіометрія утвореного між ними комплексу, можна визначити спорідненість (константу зв’язування) досліджуваного білка до певного фрагменту.

Електрофоретична рухливість молекул нуклеїнових кислот може змінюватися не лише при їх взаємодії з білком, але і в результаті структурних особливостей (конформацій) самих молекул. Так, наприклад, однакові за розміром і послідовністю нуклеотидів кільцеві молекули ДНК, які відрізняються лише за рівнем їх надспіралізації (так звані топоізомери), будуть мати різну електрофоретичну рухливість: унаслідок збільшення компактності при збільшенні рівня надспіралізації рух більш надспіралізованих топоізомерів буде вищий. Отже, за допомогою електрофорезу можна аналізувати топологічний стан циркулярних молекул ДНК, присутніх у зразку. Аналогічно до циркулярних молекул із різним рівнем надспіралізації, рух лінійних та циркулярних молекул ДНК також буде відрізнятися: довгі лінійні молекули

ДНК рухаються в гелі повільніше від їхніх циркулярних ізомерів, а короткі – навпаки, швидше.

Незалежно від мети проведення електрофорезу нуклеїнових кислот отримані гелі візуалізують за допомогою флуоресцентних барвників, найчастіше використовують розчин бромистого етидію (рис. 3.3).

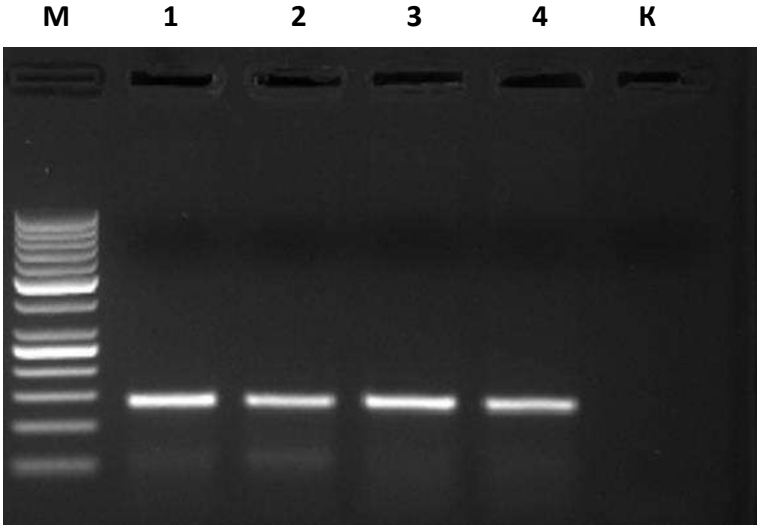

Рис. 3.3. Приклад електрофореграми продуктів полімеразної ланцюгової реакції гена інтерлейкіна 2 людини. М – маркер молекулярної маси, 1-4 продукти полімеразної ланцюгової реакції, К – негативний контроль (дистилят).

Електрофорез білків. На відміну від нуклеїнових кислот, де кожен мономер має негативний заряд, залишки амінокислот у складі білків за фізіологічних значень pH зазвичай не мають заряду. Виключення становлять аспарагінова та глутамінова кислоти, в яких наявність двох -COOH груп надає їм негативного заряду, та лізин і аргінін – позитивно заряджені амінокислоти за рахунок присутності в їх структурі аміно- та гуанідинової груп відповідно. Це наштовхує на думку, що розділення білкових молекул за молекулярною масою за допомогою електрофорезу неможливе, оскільки заряд молекули, а отже і її електрофоретична рухливість, будуть визначатися амінокислотним складом, а не розміром білка. Крім того, різна конформація білків (особливості їх вторинної та третинної структури, наявність субодиничної організації) також будуть впливати на їх рухливість в гелі при дії сили електричного поля.

Для того, щоб забезпечити розділення білків виключно відповідно їх молекулярній масі використовують електрофорез у денатуруючих умовах із використанням детергенту – додецилсульфату натрію (SDS – sodium dodecyl sulfate). SDS має гідрофобний хвіст, що складається із 12-вуглецевого ланцюга, та полярної сульфатної групи (рис. 3.4, а). Гідрофобний хвіст із високою

ефективність взаємодіє із поліпептидними ланцюгами, віддаючи преференцію гідрофобним амінокислотам, а сульфатна група надає розгорнутому ланцюгу негативного заряду – який буде тим більшим, чим вище молекулярна маса ланцюга. Щільність зв'язування SDS оцінюється приблизно як одна молекула на два амінокислотних залишки, фактично білок стає оточеним «шубою» із молекул SDS. В результаті взаємодії з детергентом білки, по-перше, денатурують (повністю або частково) (рис. 3.4, б). По-друге, білкові молекули набувають досить сильного негативного заряду, який нівелює будь-який заряд, що може мати сам білок. Оскільки зв'язування SDS практично не залежить від послідовності амінокислот, то за таких умов електрофорезу розділення білків відбувається саме за їх розміром. Для порушення дуже міцних дисульфідних зв'язків, що утворюються між двома цистеїнами і, відповідно, додаткової денатурації білків, в систему електрофорезу в денатуруючих умовах додають β-меркаптоетанол.

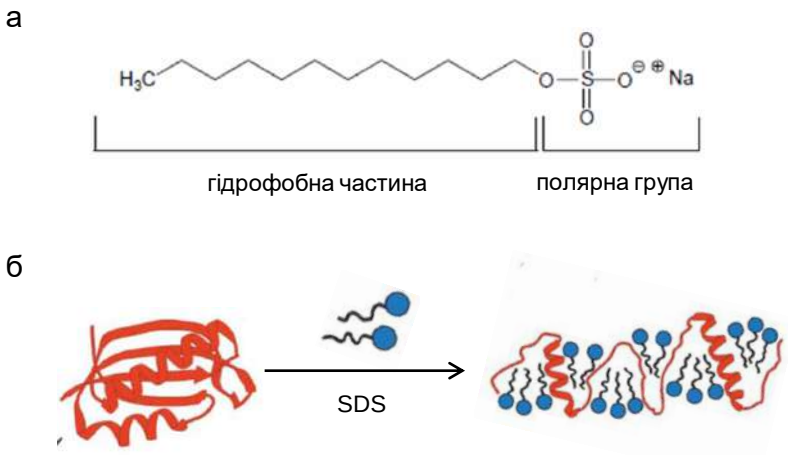

Рис. 3.4. Структура додецилсульфату натрію (SDS, а) та схема його взаємодії із білком (б).

З метою визначення молекулярної маси досліджуваного білка SDS-електрофорез проводять у поліакриламідному гелі у вертикальному електрофоретичному апараті у трис-гліциновому буфері із значенням pH 8,3 (абревіатура цього методу, яку часто можна зустріти не лише в англомовних, але і у вітчизняних виданнях, SDS-PAGE – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis with Sodium Dodecyl Sulfate), одночасно здійснюючи розділення білкових молекул-маркерів із відомою молекулярною масою на окремій доріжці. Оптимальне розділення білків в такому варіанті електрофорезу можливе лише за умови використання гелів із різними властивостями: вони розрізняються як

за концентрацією поліакриламіду, так і за значенням pH. Спочатку в електрофоретичний апарат заливають так званий розділяючий гель (running gel), фактично саме у ньому буде відбуватися розділення білкових молекул за їх молекулярною масою. Цей гель має достатньо високу концентрацію поліакриламіду (від 15% до 18%) і лужне значення pH. Потім поверх нього нашаровують інший гель – концентруючий (stacking gel), вміст поліакриламіду у якому майже в 5 разів менший, ніж у розділяючому гелі, а значення pH знаходиться у кислому діапазоні. Відповідно, нанесені білкові зразки дуже швидко рухаються у верхньому концентруючому гелі, адже розмір пор у ньому великий, і сповільнюють свій рух на межі входу у нижній слабко пористий гель, поступово концентруючись. Додатково концентруванню зразків на межі двох гелів сприяє і різниця pH. Оскільки, як було зазначено, електрофорез проводиться в присутності гліцину, то за кислих значень pH, характерних для концентруючого гелю, він переважно знаходиться у катіонній формі і його рух відбувається повільніше білкових молекул: фактично молекули гліцину створюють зверху певний тиск і сприяють ще кращій концентрації зразків на межі гелів. При вході молекул у нижній гель гліцин набуває негативного заряду (лужне значення pH) і його рух стає, навпаки, швидшим, що не заважає руху та розділенню білкових зразків.

По завершенні електрофорезу гелі фіксують у суміші метанолу (етанолу) та оцтової кислоти для запобігання деградації зразків та дифузії молекул із місця їх локалізації у гелі після припинення електрофорезу, потім (або одночасно з цим) відбувається фарбування. Зазвичай, використовують два основних підходи – забарвлення з використанням барвника Кумасі або розчину срібла. Останній варіант фарбування є більш ніж на порядок чутливішим щодо детекції кількості молекул у зразку і дозволяє виявляти ~2 нг білка. Рідше гелі візуалізують, використовуючи комерційні флуоресцентні барвники, що зв’язуються із білками, проте, незважаючи на більш швидку процедуру фарбування, чутливість щодо виявлення кількості білків у зразку залишається на рівні такої при фарбуванні сріблом. Приклад електрофореграми, отриманої після SDS-електрофорезу гістонових білків, наведено на рис. 3.5.

Метод SDS-PAGE дозволяє розділити певну кількість білкових молекул одночасно, але ця кількість, насправді, достатньо обмежена. У випадку необхідності розділення великої кількості молекул використовують методику, яка являє собою, фактично синтез двох методів – ізоелектричного фокусування та SDS-електрофорезу. Це так званий двомірний (2D) електрофорез.

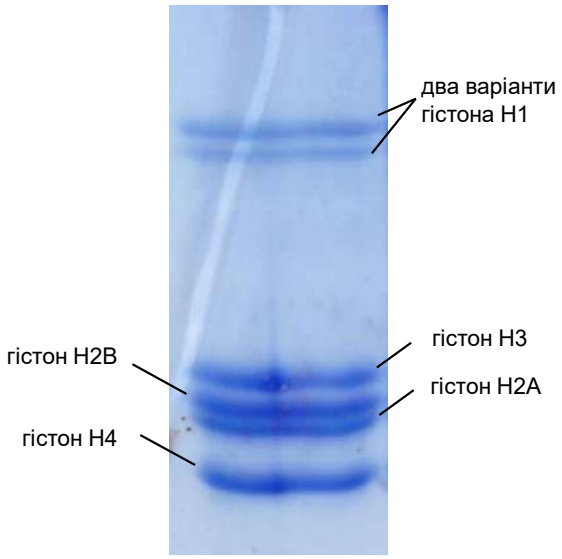

Рис. 3.5. Електрофореграма SDS-електрофорезу гістонових білків.

Суть ізоелектричного фокусування полягає у розділенні білкових молекул відповідно до їх ізоелектричних точок (pI), тобто тому значенню pH середовища, за якого даний білок перестає мати заряд. Для цього проводять електрофорез нативних (неденатурованих) білків у поліакриламідному гелі або у присутності суміші амфотерних електролітів, які в електричному полі створюють градієнт pH, або за наявності слабких кислот та основ, що включаються в певні місця гелю при його приготуванні. Під час електрофорезу спостерігається рух заряджених білків до тих пір, поки вони не дійдуть до тої зони гелю, pH якої дорівнює їх ізоелектричній точці: у цьому місці відбувається зупинка міграції білкової молекули. Після ізоелектричного фокусування при двомірному електрофорезі проводиться звичайний SDS-електрофорез у перпендикулярному до ізоелектрофокусування напрямку. Таким чином в результаті 2D-електрофорезу отримують двоетапне розділення білків за двома параметрами: їх зарядом та молекулярною масою.

Лабораторна робота №5

Електрофоретичне розділення нуклеїнових кислот в агарозному гелі

Мета роботи: оцінити якість виділеної геномної ДНК за допомогою електрофорезу в агарозному гелі.

Хід роботи

1. Приготувати 1 л однократного буферного розчину TBE (від англ. Tris Borate EDTA) для проведення електрофорезу. Однократний буферний розчин TBE – це такий розчин, концентрації компонентів якого є наступними: 0,089 М Tris, 0,089 М борна кислота, 0,002 М EDTA, pH 8,0). Такий розчин прийнято позначати 1×. Також можна використовувати концентровані розчини TBE (наприклад, 5×, 10×, 20× тощо), розвівши їх в потрібну кількість разів дистилятом. Виміряти pH, за необхідності довести його до потрібного значення.

ПРИМІТКА. Однократними вважаються розчини, які будуть безпосередньо використовуватися для виконання відповідних етапів лабораторної роботи. Розчини, які позначаються 2×, 5×, 10× тощо – це розчини, у яких концентрації всіх компонентів збільшені відповідно у 2, 5, 10 разів.

Замість TBE при виконанні лабораторної роботи також можна використовувати буферний розчин TAE (від англ. Tris Acetate EDTA). Концентрації компонентів однократного TAE є наступними: 0,04 М Tris, 0,04 М ацетат натрію, 0,001 М EDTA , pH 8,0.

2. Приготувати 100 мл 1%-го агарозного гелю. Для розчинення агарози використовувати той самий буферний розчин, що і для проведення електрофорезу. Розплавити агарозу шляхом нагрівання у мікрохвильовій печі чи на водяній бані, періодично помішуючи для рівномірного розчинення.

3. Охолодити розплавлену агарозу приблизно до 45-60°C перед заливанням у платформу для гелю (щоб уникнути деформації платформи). Закрити відкриті краї платформи для заливки гелю. Залити розплавлену агарозу у платформу та вставити гребінку для формування лунок. У випадку утворення пухирців повітря в гелі обережно вилучити їх за допомогою наконечника для автоматичної піпетки.

ПРИМІТКА. Об'єм розчину агарози, який готується, визначається розмірами платформи для заливки гелю, так, щоб товщина гелю становила 0,5-1 см. Концентрація агарози підбирається залежно від розмірів молекул, які будуть розділятися при електрофорезі. У таблиці 3.1 наведено найбільш оптимальні концентрації агарозного гелю для розділення фрагментів ДНК різних розмірів.

Для розділення високомолекулярної геномної ДНК найкраще підійдуть концентрації агарозного гелю не вище 1%.

Таблиця 3.1. **Оптимальні концентрації агарози для ефективного розділення фрагментів ДНК різних розмірів.**

Концентрація агарози (%)	Діапазон розмірів лінійних фрагментів ДНК (тисячі пар нуклеотидів)
0,5	1-30
0,7	0,8-12
1,0	0,5-10
1,2	0,4-7
1,5	0,2-3

4. Після полімеризації агарози (20-30 хв при кімнатній температурі) обережно витягнути гребінку, щоб не деформувати лунки, та помістити гель в електрофоретичний апарат. Залити його однократним буферним розчином ТВЕ, так щоб він повністю покривав гель приблизно на 1-2 мм.

ВАЖЛИВО! Гель потрібно розмістити в електрофоретичному апараті так, щоб лунки були орієнтовані зі сторони катода (-), оскільки нуклеїнові кислоти мають негативний заряд та при електрофорезі будуть мігрувати до анода.

5. Приготувати зразки для завантаження у лунки. Для цього змішати зразки ДНК з 6× буферним розчином для завантаження (*англ. – loading buffer*, типовий склад (6×): 0,25% бромфеноловий синій, 0,25% ксилолціанол, 40% сахароза) до кінцевого розведення 1× та ТВЕ (за потреби) до загального об’єму 18 мкл. Сахароза додається до буферного розчину для завантаження з метою збільшення в’язкості суміші, що вноситься у лунки (полегшує їх потрапляння саме в лунку, а не за її межі). Альтернативно, замість сахарози до складу таких розчинів може входити гліцерин або фікол. Бромфеноловий синій та ксилолціанол – це барвники, які дозволяють відслідковувати прогрес електрофорезу (так звані “tracking dyes”).

Окремо приготувати зразки для завантаження відповідного маркера молекулярних мас (в залежності від розмірів молекул ДНК, які розділяються) аналогічного об’єму.

ПРИМІТКА: загальний об’єм зразків для завантаження визначається розміром лунок. Важливо не переповнити (перевантажити) лунки.

6. Приготовані зразки для завантаження внести у лунки гелю за допомогою мікропіпетки. Обов’язково у робочому зошиті записати послідовність внесення зразків у лунки. Уникати потрапляння зразків за межі лунок.

7. Закрити кришку електрофоретичного апарату та під’єднати електроди до джерела живлення. Встановити необхідне значення напруги, в залежності від потрібного значення напруженості електричного поля (для розділення високомолекулярної геномної ДНК рекомендовано 5-7 В/см) та відстані між електродами у відповідному апараті для проведення електрофорезу. Увімкнути електричний струм.

8. Електрофоретичне розділення геномної ДНК проводити протягом 90-120 хвилин. Перебіг проходження електрофорезу можна відслідковувати за допомогою міграції барвника бромфенолового синього, який входить до складу буферного розчину для завантаження. Швидкість міграції даного барвника корелює зі швидкістю руху найменших за розміром молекул ДНК (див. таблицю 3.2).

Після того, коли барвник бромфеноловий синій промігрував на відстань, достатню для розділення фрагментів ДНК, вимкнути струм, від’єднати електроди від джерела струму та перейти до візуалізації результатів електрофоретичного розділення.

Таблиця 3.2. **Розміри фрагментів нуклеїнових кислот з якими рухаються бромфеноловий синій та ксилолціанол при електрофорезі в залежності від концентрації агарози.**

Концентрація агарози (%)	**Розміри фрагментів ДНК (пари нуклеотидів), з якими**	**Розміри фрагментів ДНК (пари нуклеотидів), з якими**

	рухається бромфеноловий синій	**рухається ксилолціанол**
0,5-1,5	300-500	4000-5000
2,0-3,0	80-120	700-800
4,0-5,0	20-30	100-200

9. Приготувати розчин бромистого етидію в дистильованій воді (або у буферному розчині для проведення електрофорезу), концентрацією 10 мкг/мл.

ПРИМІТКА: Розчин зберігати у закритому темному посуді при кімнатній температурі. Можна використовувати декілька разів.

УВАГА! Техніка безпеки! *Бромистий етидій є сильним мутагеном та канцерогеном. Працювати виключно у нітрилових рукавичках (латексні рукавички можуть пропускати молекули бромистого етидію), лабораторних халатах та захисних окулярах. При потраплянні на шкіру – негайно звернутися до викладача та промити великою кількістю води з милом.*

10. Витягнути гель з електрофоретичного апарату та помістити в темний посуд для пофарбування. Залити 10 мкг/мл розчину бромистого етидію. Фарбувати протягом 10-20 хвилин, періодично помішуючи. При необхідності гель можна знебарвити, промиваючи у воді протягом додаткових 30 хв. Це допомагає видалити надлишок бромистого етидію, який викликає фонову флуоресценцію і ускладнює візуалізацію невеликих кількостей ДНК.

ПРИМІТКА: Бромистий етидій також можна додати безпосередньо до гелю під час його приготування (п.п. 2-3) або до буферного розчину для проведення електрофорезу. Ці два варіанти суттєво економлять час проведення експерименту – аналіз результатів можна здійснювати відразу по завершенні електрофорезу, не потрібно додатково витрачати час на пофарбування гелю. Однак, барвник, доданий до гелю, може створювати яскравий флуоресцентний фон, який не дозволяє чітко побачити смуги, що відповідають зразкам, особливо, коли кількість ДНК певних розмірів є не дуже високою. Барвник, доданий безпосередньо до буферного розчину для проведення електрофорезу, забезпечує більш стійке забарвлення, проте, за рахунок цього створюється більша кількість небезпечних відходів. Окрім цього, молекула бромистого етидію має позитивний заряд, що теж може впливати на міграцію негативно

заряджених молекул нуклеїнових кислот (також може впливати на ступінь надспіралізації молекул, що важливо при розділенні кільцевих молекул ДНК).

11. Після пофарбування перенести гель на УФ-трансілюмінатор, закрити захисний пластиковий екран та аналізувати при довжині хвилі 254, 312 або 365 нм.

УВАГА! Техніка безпеки! *Ультрафіолетове випромінювання може уразити слизові оболонки ока. Тому візуалізацію результатів електрофорезу за допомогою УФ-трансілюмінатора потрібно проводити в захисних окулярах або з використанням захисного пластикового екрану.*

12. Зробити висновок про цілісність виділеної геномної ДНК.

Лабораторна робота №6

Визначення розмірів фрагментів ДНК на основі їх електрофоретичної рухливості. Побудова рестрикційної карти фрагмента ДНК та його віртуальна рестрикція.

Мета роботи: встановити за допомогою електрофорезу розміри фрагментів ДНК, отриманих після розрізання молекули ДНК рестриктазами та побудувати рестрикційну карту. Провести віртуальну рестрикцію даної молекули.

Хід роботи

1. Лінійну молекулу ДНК розміром 5655 п.н. було розрізано рестриктазами *Hind*III та *Eco*RI (окремо та їх сумішшю). На основі отриманої електрофореграми (рис. 3.6) встановити, скільки сайтів має кожна рестриктаза в межах даного фрагмента, побудувати рестрикційну карту молекули ДНК та показати на ній відстані в парах нуклеотидів між сайтами розрізання *Hind*III та *Eco*RI.

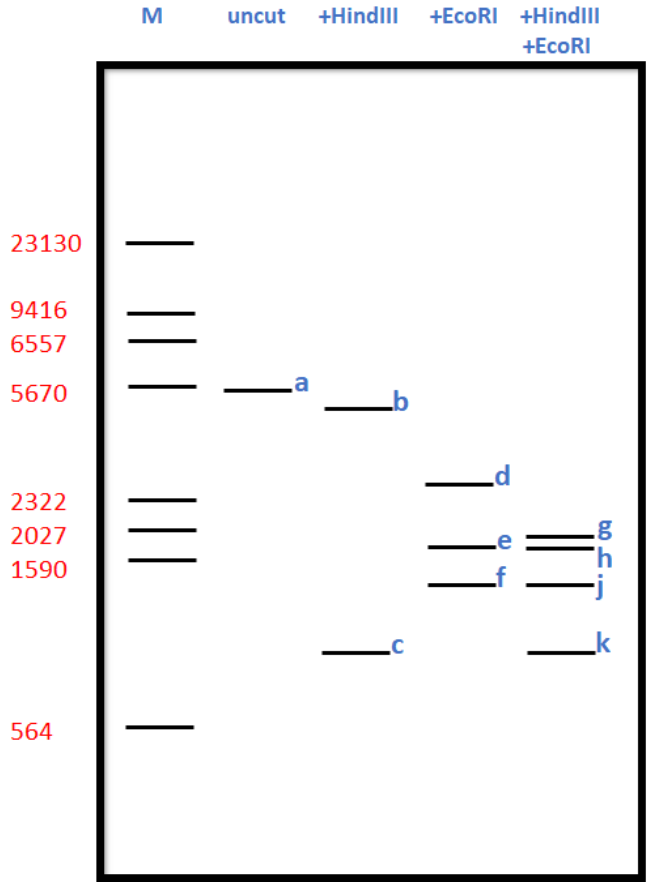

Рис. 3.6. Схема електрофореграми результатів розрізання молекули ДНК рестриктазами *Hind*III (+*Hind*III), *Eco*RI (+*Eco*RI) та їх сумішшю (+*Hind*III +*Eco*RI). М – маркер молекулярних мас (вказано в парах нуклеотидів); uncut – нерозрізана молекула. Буквами ***a-k*** позначені фрагменти, отримані після рестрикції.

2. Побудувати графік залежності логарифму молекулярної маси (lgL) маркерних фрагментів від їх відносної електрофоретичної рухливості (калібрувальна крива), використовуючи дані з таблиці 3.3. Відносна електрофоретична рухливість виражена як відстань, яку промігрував кожен фрагмент маркера молекулярних мас в гелі від старту (в см).

Таблиця 3.3. **Відносне вираження електрофоретичної рухливості фрагментів маркера молекулярних мас при електрофорезі.**

Розмір фрагмента, L, пар нуклеотидів	Відстань від старту до відповідної смуги, см
23130	3,2

9416	4,6
6557	5,2
5670	6,1
2322	8,4
2027	9
1590	9,6
564	13

3. За допомогою калібрувальної кривої, отриманої в п.2, визначити розміри фрагментів ***a-k*** (в парах нуклеотидів), використовуючи значення відносної електрофоретичної рухливості для фрагментів ***a-k***, що наведені у таблиці 3.4.

Таблиця 3.4. **Відносне вираження електрофоретичної рухливості фрагментів *a-k* при електрофорезі.**

Розмір фрагмента, L, пар нуклеотидів	Відстань від старту до відповідної смуги, см
a	6,23
b	6,64
c	11,57
d	8,25
e	9,52
f	10,24
g	9,19
h	9,52
j	10,24
k	11,57

4. Провести віртуальну рестрикцію даного фрагменту з використанням рестриктаз *Hind*III та *Eco*RI (окремо та їх сумішшю) за допомогою інструменту RestrictionMapper (http://www.restrictionmapper.org/). Для цього необхідно скопіювати наведену нижче нуклеотидну послідовність вихідної молекули ДНК у поле «Sequence Info», вибрати необхідну рестриктазу у графі «Select Individual Enzymes» та натиснути «Virtual Digest».

GATCCTCACC TCTTCTATGC CCAAACCTTT AAGAAAATTC TGGGCCAGGC
GCAGCGGCTC ACAGCTGTAA TCCACCACTT TGGGAAGCCG AGGTGGGTCG
ATCACCTAAG GTCGGGAGTT CGAGACCAGC CTGACCAACA TGGAGAAAAC
CCGTCTCTAC TAAAAATACA AAATTAGCTG GGTGTGGTGG CACACACCTG

TAATCCCAGC TACTCGGGAG GCTGAGGCAG GAGAATCGCT TGAACCCAGG
AGGCGGAGGT TGCGGTGAGC CGAGATTGCA CCATTGCACT CCAGCCTGGG
CAACAAGAGC AAAACTCCAT CTCAAAAAAA AAAAAAAAAT TCTGGAAAAG
CTAGGTCAGT GACATGAATA TTGGAATCAG AGTCTAACAA ACTCAATTTC
TTCCTTTCTA AATCCGTGGT ACGGATTCAT GTCTGCAGTA GTTTTTCTGA
GAAAGCAGAA GGGGTAGGTA TTGGCAATCA ACAAGCTGCA GAGTATGCAG
ATTGAGGTCA GTAACTGTAA ATGCCCCATG ACTGTCTGAT CATTTTAATA
CCAAAAGAAA AACTTAAAAT CCCAGTTGCT AAAATCTTTG TCTTAGACAA
CTCTTTGAGC CTCTCCCTAC AAGGCCCAGA AAGGAATGAG ATAGATGTGA
ATGGAATCTG TTTTCCCTTC CCTTGCCACG CTCTGGAGGA GGAGTCTAGG
GCAGTAGCCA AGGCCAGCTG CCAGTCAAGG AAAGGGGAGC GGCCCCGTTG
AATCCACAAA CCACACCATC CTGGCCCATG GGTTATATAC AAACTCCCAC
ATTGGCAACA AACAAAGGGC ATGCACATTC AGGGGATTTT GCTTTCACTG
TGAGTGTTTA TCTTTGAAGG GTGTCACATC AAGATGAATG GGAAGGGTGT
GTTGCAGTTG AGCTGAGGTT TGGTCTTTCT TGGCTTTTTT AGGGACACTT
ACAGGTCCAA ATCTGCTTTC AGCCGGCTGG TGGACATGGT AGGAGACACA
GTAGTCTCAG GACCAGGCCT CCAGGTGGGA GCTGAGATTC TAGAGGGTGG
AAACCACTTG GAGATTGAGT CAAAGCAGAC CTGTCCTCAT TCTGTGCTGG
GCAGGAGCCA GCTCTCCATG TCCCTGCAGC TCCAGCAACA CCTCCGGATC
TTTCAGCTTC CCTGGGACTA AGGACCATGC ACATTATTAA TTCTGATATA
AACAGTCACA CAGGCACATG TCTCAAGATG AGGGTGAGAA GTTGGTTACA
GCAAATGAAG TAATAATGAT CTTTGTGCTT CACAATAGGA ATTCAACCAA
CCTGAGGTTT ATAATTCACT TATTAACACT TTTTATTTTT GTTGAGACGG
AGTGTCCCTC TGTCACTCAC GCTGGAGTGC AATGGTGTCA TCTCGGCTCA
CTGCAACCTC CGCCTCCTGG GCTCAAGTGA GTCTCGTGCC TTGAGTGGCT
GAGACTACAG GCACATGCCA CCATGCCCAA CTAATTTTTT TGTATTTTTA
GTAGAGATGG GGTTTTGCCA TGTTGGCTAG GCTGGTCTCA AACTCCTGGC
TTCAAGTGAT CCGCCTACCT CAATCTCTTC AAGCGCTGGG ATTACAGGGG
TAAGCCACTG TGCCTGGCCA TAATTCATTT ATCAGTCATA TATATATACA
CACACACTGG GAGAATCTAG GGTCAGTGCC TTACAAATGG CACAAGTTGA
AGCCCTGAGA CTCCCACTCC TACCCTGCTC CCCCCATTCT CAGTACTGCT
CCTCAGATGC CTCCAGCAGA TCATCCATTT CTGCTAGGCT GGGCCTGGGT
ACATGCAGGG AGATGTGTAC AGGGGCTAAG AGCAGAAACT TTTGAGTGAG
ACACTCCTGA GTTCATGCAC TGGCCCTGCC ATTTGTCAGC TAATTGATGT
TGCATTTAAT TGCATCATCT GTATGTAAGC CTAATAATTT ATAGCCATCT
TAGAGATGTT GTGAGCTTAA ATAACATAGT AGTGAATATT TATTTATTTG
TTTATTTATT TATTTAGACA GGGCCTCGCT CTGTCACCTA GGCTGGAGTG
CAGTGGTGTG ATCATAGCTC ACTGCAGCCT TGACCTCCCA CACTCCAGTT
ATCCTCTCAC CTCAGCCTCC TGAGTAGCTT GAGACAACAG ATGCATGCCA
CCATAACTGA CTAATTTTTT AAAATTTTCT GCAGAGACAG TGTCTCCCTA
TGTTGCCCAG GCTGGCCTCG ATCTCTTGGG CTCAAGCGAT CATCCTGCCT
TGGTCTTCCA AAGTGCTGGG ATTACTGGTG TGAGCCACTG CACCCACAGC
CTATTTATTG AGAAATGTGG AAGGCCCAGG CACTATTCTA AGTGCTCCAG
CTGTTTTATC TCCCACAGTT TTGCTCAGAT AGGAGTTCCA AAGCTGGAGC
TGGAAGACTC ATATTTTTAG AAATGTTACA GTTAATTCTG AGGTGGGTCA
GATTGAGATT CATGGCTATG CATTAATGTT TAGGTGGTGA CTAACCACTC
AGGGTTTTAG AGACAAACAG ACCTTATTCT GTCACTCACT GACTGAGCGT

GGCCAAGTCT TTCAGCCTCT CTAAGCCTCA GTGTCCTCAT CCATAAAATG
GGACCAATCG TAGCATCCAC TTCTGAGAAC TGTTCAGAAG TGGAAATGAG
CTAGTTTAGG TGGCTGTGTC TGGCATACGC CAATGGTTTG ATAAGTATTA
GCTTGTGCCT TTATTAGGCC AACTCCTTTT TGTTAGGTGA CTGAGAAACC
AAGGACCTTC TGCCCTTTAT GCACCAGTCA CTATTAGTTT AAATTTGTTG
CTCTTCCATC CACATGATTC ATTCCAAATT TGAAGTGTTG GAGAAAGGGA
GTTAGTATGT CATAGAAAAA TCTCTGTTTT TGGCTCAGCA GGACTGAGTT
TGACTCCATG TAACTGTCTG AGTCTTAGTT TCCTCATCCA TAACATGGGA
GAACAATACC CTGAATTAGA GAATTCTGCT GCCAGAATTA GAGATAGTTC
ATGTCAAGGT GCAACATATA GGTAATGTGT TATTGCTGGT GTTCTGGTTA
TAAAATGTAC AAGATGTGAA AGCAAAAGGG CAGAAAACCC TTTTTAAAAA
TTCATGGCTG GGCGCGCTGC CTCATGCCTG TAATCCCAGC ACTCTGCCAG
GCCGAGGCGG GTGGATCACC TGAGGTCGTG AGTTTGAGAC CAGCCTGACC
AACATGGAGA AACCCTGTCT CTACTAAAAA TACAAAATTA GCCGGGCATG
GTGGCGCATG CCTGTAATCC CAGCTACCCA GGAGGCTGAG GCAGGAGAAT
CGCTTGAACC CGGGAGGCGG AGGTTGCTGT GAGCCGAGAT GGCACCATTG
CACTCCAGCC TGGGCAACAA GAGCGAAACT CCGTCCCCCG AACAAAAAAT
TCAAATGGGA AAGAGAGGCA GATGGCAGAG AACAGGGGAG GGGCTGGGCA
CCGTGGCTCA TGCCTGTAAT CCCAGCACTT TGGGAGGCCA AGGCGGGTGG
ATTTCTTGAG GTCAGGAGTT CAAGACCAGT CTGACCAACA TGGTGAATCC
CCATCTCTAT TAAAAATACA AAAATTAGCC GGGGGTGGTG GTGGGTGCCT
GTAGTCCCAG CTACTCGGGA GGCTGAGGCA GGAGAATCAC CTGAACTCAG
GAGGTGGAGG TTGCAGTGAG TCAAGATCGC ACCACTGTAC TGTTGCCTGG
GCAACGCACC GAGACTCCGT CTCAAAAAAA AAAAAAAAAT GAGAGAACAG
GGGAGGGTCT AGGGCTCAGA GCTTTGGAGA ACAGACCTCA GTAGCACCAA
CACTCCAGGA TCAATGCTAC AAAGACACGG GTTACAACTA AACTGGAGAA
CATGGCCAAG GATGGGAACT CAGCCTGAGC AGGGCTGAGC CGAGCAGGGC
TAAGCCAAGT AGGGCTGAGC CAGAACACTT CCTCCTTTTT TCTGAACAAT
CTACCTACAT TTCAGCTACA GGGCTGGCTT TACCCAGTCC GGCGGGAGGG
AGGAGAGGGC TGGTCTGTGA CTTCAGTGCT GAGGTTTGAT CAAGGCAAAG
GGAAACTTCC TATTCCCAGA CCCTTTGCAA GAAAGAATGG CATATTACTT
GCCACCGACA GGGGTTATTA TTACTAAATG GAGTCAGTAT AAATGCTTTC
CAATAAAGCA TGTCCAGCGC TCGGGCTTTA GTTTGCACGT CCATGAATTG
TCTGCCACAT CCCTCTTCTG AATGGTTGGA AATTGGGCAT CTGTTCCTTT
AAACAGGAAA CATTTCTTGT TCGAGTGAGT CATCTCTGTT CTGCTTTAGG
AGTAAAGTTT ACCCTGCAGT TCCTTCTGTG GTGAAGTTTT CTCTTTCTCT
CGGAGACCAG ATTCTGCCTT TCTGCTGGAG GGAAGTGTTT TCACAGGTTC
TCCTCCTTTT ATCTTTTGTG TTTTTTTTCA AGCCCTGCTG AATTTGCTAG
TCAACTCAAC AGGAAGTGAG GCCATGGAGG GAGGCAGAAG AGCCAGGGTG
GTTATTGAAA GTAAAAGAAA CTTCTTCCTG GGAGCCTTTC CCACCCCCTT
CCCTGCTGAG CACGTGGAGT TAGGCAGGTT AGGGGACTCG GAGACTGCGA
TGGTGCCAGG AAAGGGTGGA GCGGGTGAGT GCCTGTTGCC AAGGTGGCCT
CTTCAACAGG AAACCACAAT ATTTTTGTTT CTTGACTTGC TCTAGAAACA
GGGCTGTGGG GGTGGGGAAG CAACTTGGAT CTGCCCTTCT GAGGACACCT
CTGGGTGCTG CCTGGCCCAG GTCTCCTGTG TGGTTTCTCT CTGAGCCGTT
GCCTCTGACT TTGCTACTTT TTCACTCTGA GCAGTCTCCA GTTCCTCTGC
TACCTTTTTG TCCTCCAAGC TTCCCTGCCG CCTCGAATGC AGATACACGG

TCTCCCTCCT GTGGACCCGT TTGGAGAGTC CAGAAGACTT TATCAATCCA
CTTTTTTTTC TTTTTCATTT GGCCCTGGGG CCGACGGTTA AGTACTTTAT
TCTGTCATTC TGTCGAATCA CGATGCCCTG AGGTGCACAG CCCCTTCCCC
CTCTTCCGTG TCTGAAGGGT TTCCTTTTAT CTCTCCACCC CCACCCTTGC
CCTCCTGCCC TCTCTCTTGT TCCCCAAAGA CAGTTCTCTA ATGTTTTGAT
GTGGATTCGT GAATTTATCT GTATCTTTGC AAAATGTATT TTTCTTTTGT
ATGTGTACAC TGTTTTTTAA CTATGCGATC TCAGGCAAGT AATTCCTCTG
TGCCTCTGTT ATCTCATCAT TAAATGATTA ATAATGCCTC CAGAGGTGAC
TGTGAGGCTT GAAGGAGATA ATACGCATAC ATCACTTACT ACACGAGTTA
GCAATTATTA TTGCATATTA ATACTATTGG TATTTTATTT TGCTCATTCT
GTTTCTATTT CTTTTTTATT TATTTATTTT TTGAGACAAA GTCTTGCTCT
GTCACCCAGG CTGCAGTGCA GTGGTGCAAT CACGGCTCAC TGCAGCCTCA
ACATCCTGGG ATCAAGCAAT TTTCCCATCT CAGCCTTCAG ATTAGCTGGG
ACCACAGGCG CGTGCTACCA CACCTGGCTA ATTAAAAAAT TTTTCTTCAT
AGAGATGGTG TCTCATTTTG TTGCCCAGGC TGGTCTCAAA CTCCTATGCT
CAAGG

5. Ознайомитися з отриманими результатами. Порівняти, наскільки розміри фрагментів співпадають з тими, які були обраховані на основі електрофореграми.

6. Зробити загальний звіт по виконаній роботі. До звіту додати побудовану калібрувальну криву та обраховані розміри фрагментів ***a-k,*** рестрикційну карту всього фрагмента ДНК, а також результати його віртуальної рестрикції.

Лабораторна робота №7

Електрофоретичне розділення білків в поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах

Мета роботи: розділити суміш білків плазми крові за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах.

Хід роботи

1. Приготувати необхідні для виконання лабораторної роботи розчини, виміряти їх pH та за необхідності довести його до потрібного значення.:

- 100 мл 30% акриламіду/0,8% бісакриламіду;

- 100 мл 4× буферного розчину Tris-HCl/SDS, pH 6,8 (0,5 M Tris-HCl, 0,4% SDS);
- 500 мл 4× буферного розчину Tris-HCl/SDS, pH 8,8 (1,5 M Tris-HCl, 0.4% SDS);
- 50 мл 10% персульфату амонію;
- 500 мл 5× буферного розчину для електрофорезу (0,25 M Tris, 1,9 M гліцин, 0,5% SDS, pH 8,3);
- 10 мл 2× буферного розчину для приготування зразків (0,125 M Tris, pH 6,8, 4% SDS, 2% гліцерол, 4 мМ β-меркаптоетанол, 0,02% бромфеноловий синій).

УВАГА! Техніка безпеки! *Мономер акриламіду є нейротоксичним. При зважуванні порошку акриламіду обов'язково слід одягати захисну маску та рукавички, працювати в лабораторних халатах та захисних окулярах. При роботі з розчином одягати рукавички та лабораторні халати. При потраплянні на шкіру – негайно звернутися до викладача.*

2. Скласти скляну систему-сендвіч для заливки гелю, використовуючи дві чисті скляні пластини та два спейсери. Зафіксувати систему у відповідну підставку.

3. Приготувати 15 мл 10%-го розділяючого гелю. Для цього потрібно змішати всі необхідні компоненти у відповідних співвідношеннях (див. таблицю 3.5).

4. Відразу після приготування залити розділяючий гель у скляну систему-сендвіч до потрібної мітки (необхідно залишити місце для заливки концентруючого гелю).

5. Покрити поверхню гелю невеликим об'ємом ізобутилового чи ізопропілового спирту (приблизно 1 см завтовшки). За відсутності спирту можна покрити дистильованою водою.

6. Дати гелю заполімеризуватися протягом 30-60 хвилин при кімнатній температурі.

7. Приготувати 5 мл 3,9%-го концентруючого гелю. Для цього потрібно змішати 0,65 мл 30% акриламід/0,8% бісакриламіду, 1,25 мл 4× буферного розчину Tris-HCl/SDS, pH 6,8, 3,05 мл H_2O, 25 мкл 10% персульфату амонію та 5 мкл ТЕМЕД. Концентруючий гель необхідно використовувати відразу після його приготування. Видалити залишки спирту чи дистиляту з поверхні

розділяючого гелю та залити концентруючий гель. Вставити гребінку для формування лунок. Уникати потрапляння пухирців повітря.

Таблиця 3.5. **Об'єми стокових розчинів компонентів, необхідних для приготування розподільчого гелю різних концентрацій.**

Компонент гелю	***Кінцева концентрація акриламіду в розділяючому гелі (%)***									
	5	***6***	***7***	***7,5***	***8***	***9***	***10***	***12***	***13***	***15***
30% акриламід/ 0,8% бісакриламід, мл	2,50	3,00	3,50	3,75	4,00	4,50	5,00	6,00	6,50	7,50
4× буферний розчин Tris-HCl/SDS, pH 8.8, мл	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75
H_2O, мл	8,75	8,25	7,75	7,50	7,25	6,75	6,25	5,25	4,75	3,75
10% персульфат амонію, мл	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
ТЕМЕД, мл	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01

8. Дати гелю заполімеризуватися протягом 30-45 хвилин при кімнатній температурі.

9. Розвести зразки білків для аналізу у співвідношенні 1:1 з 2× буферним розчином для приготування зразків. Нагріти 3-5 хв при 100°С в щільно закритій пробірці.

10. Після полімеризації гелю витягнути гребінку (обережно, щоб не деформувати лунки) та помістити гель в електрофоретичний апарат. Заповнити лунки 1× буферним розчином для електрофорезу.

11. Налити у нижню камеру електрофоретичного апарату необхідний об'єм 1× буферного розчину для електрофорезу. Заповнити частину верхньої камери апарату цим же буфером так, щоб він покривав гель.

12. Внести приготовані зразки білків у лунки гелю за допомогою мікропіпетки. Обов'язково записати послідовність внесення зразків. Уникати потрапляння зразків за межі лунок. В окремі лунки внести відповідний маркер молекулярних мас.

13. Долити необхідну кількість буферу для електрофорезу у верхню камеру електрофоретичного апарату до її заповнення.

14. Закрити кришку електрофоретичного апарату та під’єднати електроди до джерела живлення. Проводити електрофорез при постійній силі струму 10 mA поки бромфеноловий синій не досягне розділяючого гелю. Після цього збільшити силу струму до 15 mA.

15. Після того як бромфеноловий синій домігрує до кінця розділяючого гелю, вимкнути джерело живлення.

16. Приготувати 0,1%-ий розчин кумасі синього у 40%-му етанолі та 10%-ій оцтовій кислоті.

17. Для візуалізації результатів електрофоретичного розділення білків пофарбувати гель 0,1%-м розчином барвника кумасі синього протягом 1-2 годин при кімнатній температурі.

18. Злити барвник та промити гель один раз деіонізованою водою.

19. Приготувати 100 мл розчину для знебарвлення, що містить 10% етанолу та 7,5% оцтової кислоти.

20. Інкубувати гель в розчині для знебарвлення, обережно помішуючи, поки не буде досягнуто бажаної чистоти фону.

21. Проаналізувати результати електрофоретичного розділення білків плазми крові. Зробити висновок про розміри білкових молекул, що наявні у суміші.

РОЗДІЛ 4. МЕТОДИ БЛОТ-ГІБРИДИЗАЦІЇ

Методи блот-гібридизації (від англ. blot – промокати) – це підходи, що досить широко використовуються у різноманітних молекулярно-біологічних дослідженнях для ідентифікації певної специфічної молекули у загальній суміші таких молекул. В залежності від типу молекули, яка ідентифікується, розрізняють три основні варіанти блот-гібридизації: *Саузерн*, *нозерн* та *вестерн блот-гібридизація* (табл. 4.1.).

Таблиця 4.1. **Основні методи блот-гібридизації.**

Метод гібридизації	**Мішень**	**Спосіб детекції**	**Використання**
Саузерн блот-гібридизація	ДНК	Зонди ДНК чи РНК	Детекція послідовностей молекул ДНК, визначення структури гена, його мутантних варіантів
Нозерн блот-гібридизація	РНК	Зонди ДНК чи РНК	Детекція послідовностей молекул РНК, визначення структури РНК, дослідження експресії генів та альтернативного сплайсингу
Вестерн блот-гібридизація	Білок	Антитіла	Виявлення молекул білків, дослідження експресії генів, процесингу білків

Саузерн блот-гібридизація (названо на честь вченого Едвіна Саузерна (Edwin Southern), що вперше розробив цей підхід) використовується для детекції специфічних послідовностей ДНК у суміші (наприклад, окремих генів чи їх варіантів). Нозерн блот-гібридизація – це модифікація Саузерн-блотингу, яка дозволяє ідентифікувати специфічні молекули РНК (назва походить від англ. «northern» - північний через схожість із методикою Саузерн-блотингу, що співзвучно з англ. «southern» - південний). Вестерн блот-гібридизація – це підхід, розроблений для ідентифікації певного білка у суміші білкових молекул (названо по аналогії з нозерн блот-гібридизацією). Виділяють також ще ряд додаткових варіантів блотингу (наприклад, дот/слот-блот-гібридизація,

Саузерн-вестерн та нозерн-вестерн блот-гібридизація тощо), що є модифікаціями трьох основних підходів.

Загальний принцип методів блот-гібридизації полягає у наступному: суміш відповідних молекул розділяють за допомогою гель-електрофорезу, після чого розділені зразки переносять на мембрану (звідси назва блот – промокання), а далі наявність певної молекули детектують за допомогою гібридизації зі специфічним нуклеотидним зондом (для Саузерн та нозерн-блотингу) або взаємодією із специфічним антитілом (для вестерн-блотингу) (рис. 4.1).

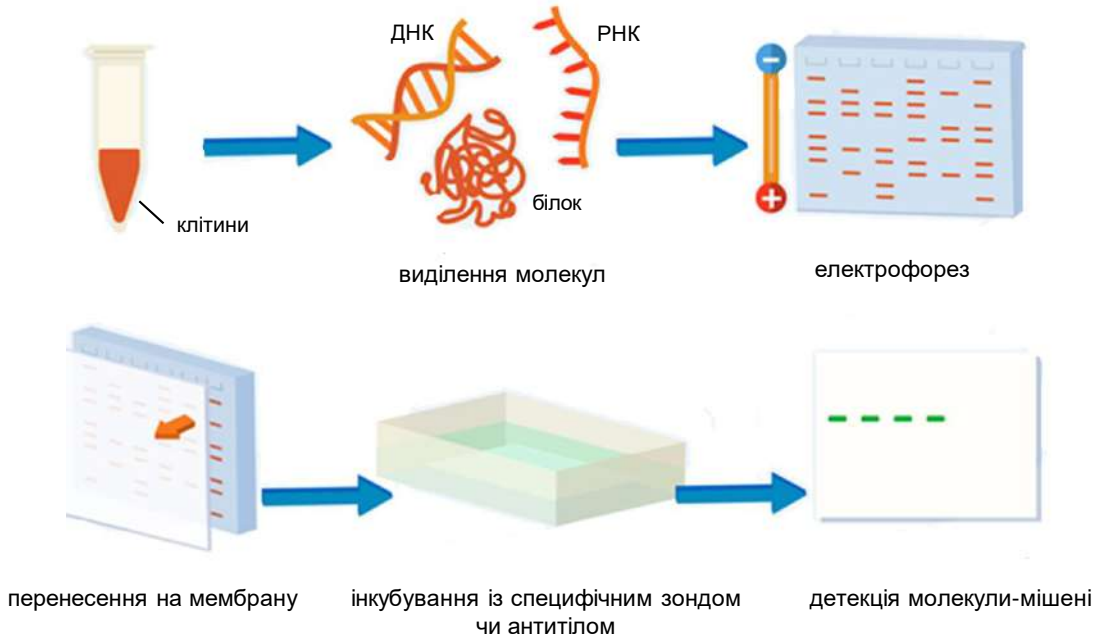

Рис. 4.1. Загальна схема методів блот-гібридизації.

Варіант електрофоретичного розділення обирається відповідно до типу молекул, які аналізують (див. розділ 3). Так, для розділення нуклеїнових кислот (ДНК чи РНК) використовують електрофорез як в агарозному, так і в поліакриламідному гелях, тоді як для розділення білків – лише в поліакриламідному гелі. Також, електрофоретичне розділення РНК та білків переважно проходить у відповідних денатуруючих умовах (див. далі). Після електрофорезу проводиться власне блотинг – перенесення розділеної суміші молекул на певну мембрану (тверду фазу) з метою іммобілізації молекул на ній. Основні типи мембран, що найчастіше використовуються при блот-гібридизації – це нітроцелюлозні, нейлонові та PVDF (від англ. polyvinylidene difluoride) мембрани. Найчастіше при блот-гібридизації як нуклеїнових кислот, так і білків застосовують саме нітроцелюлозні мембрани. Вони мають досить високу

спорідненість до перерахованих типів молекул, що забезпечує надійну іммобілізацію цих молекул на поверхні мембрани. Міцна взаємодія білків чи нуклеїнових кислот забезпечується за рахунок необоротніх нековалентних взаємодій, а саме гідрофобних та електростатичних взаємодій з поверхнею мембрани. Інший тип мембран, що досить широко використовується при проведенні блот-гібридизації – це PVDF-мембрани. Ці мембрани частіше застосовуються саме при вестерн-блотингу, оскільки мають більш високу механічну міцність і більшу здатність зв'язувати білки на противагу нітроцелюлозним мембранам (табл. 4.2). Основний тип взаємодій, за допомогою яких відбувається іммобілізація молекул на PVDF-мембранах - це гідрофобні взаємодії. Ще один тип мембран, які можуть використовуватися при блот-гібридизації - нейлонові (поліамідні) мембрани, які складаються з немодифікованого або позитивно зарядженого нейлону. Зв’язування білків чи нуклеїнових кислот з такими мембранами забезпечується за рахунок електростатичних та гідрофобних взаємодій. Нейлонові мембрани мають досить високу механічну міцність, однак вони рідко використовуються для вестерн-блот гібридизації, оскільки мають підвищену специфічність до адсорбції антитіл.

Таблиця 4.2. **Характеристики різних типів мембран, що використовуються при блот-гібридизації**

	PVDF мембрани	**Нітроцелюлозні мембрани**	**Нейлонові мембрани**
Застосування	Найкраще для високомолекулярних білків	ДНК, РНК, низькомолекулярні білки (< 20 кДа)	Найкраще для нуклеїнових кислот
Зв'язуюча здатність (мкг молекул/см^2)	100-200	80-100	400-500
Фоновий шум	Помірно низький	Дуже низький	Високий
Механічна стійкість	Висока	Крихкі при висиханні	Висока
Розміри пор	0,2 мкм, 0,45 мкм	0,2 мкм, 0,45 мкм	0,45 мкм

Перенесення розділеної суміші молекул з гелю на мембрану можна здійснити декількома способами. В оригінальному протоколі, що був розроблений Саузерном для перенесення ДНК з гелю на мембрану

використовувався *капілярний метод (метод простої дифузії)*. В цьому випадку гель після електрофорезу поміщається на стопку фільтрувального паперу, занурену у лужний буферний розчин для перенесення, за рахунок чого відбувається денатурація молекул. Поверх гелю накладається відповідна мембрана і стопка сухого фільтрувального паперу. Під дією капілярних сил буферний розчин буде рухатися від нижнього стеку фільтрувального паперу до верхнього (сухого), проходячи при цьому через гель в напрямку мембрани, що і забезпечує перенесення молекул ДНК (рис. 4.2). Такий варіант перенесення є простим у виконанні, однак досить довготривалий по часу і має відносно низьку ефективність перенесення.

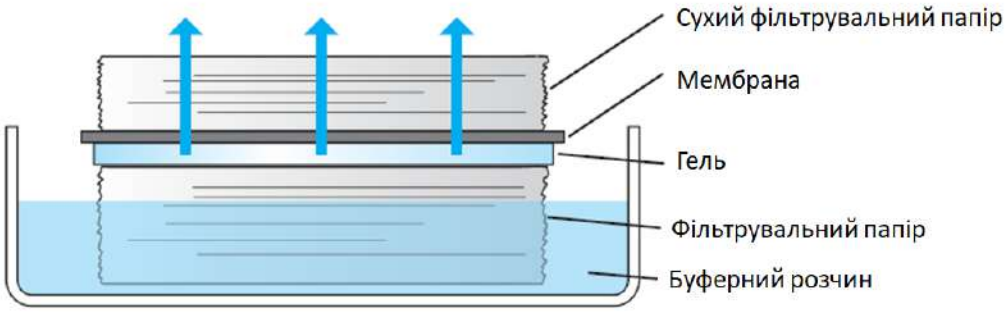

Рис. 4.2. Капілярний метод перенесення молекул з гелю на мембрану при блот-гібридизації. Стрілками вказано напрямок руху молекул при перенесенні.

Інший варіант – *електроперенесення* (електроблотинг) передбачає використання електричного струму для перенесення молекул з гелю на мембрану. У цьому випадку через гель з накладеною на нього мембраною пропускають електричний струм, під дією якого заряджені молекули (нуклеїнові кислоти чи білки) рухаються поперечно в напрямку від гелю до мембрани. Електроперенесення можна здійснювати двома способами: вологе перенесення (або перенесення в резервуарі) та напівсухе перенесення. У першому випадку гель з накладеною мембраною, затиснуті між декількома шарами фільтрувального паперу, поміщають у резервуар, заповнений буферним розчином для перенесення. Відповідно, електричний струм проходить через буферний розчин, забезпечуючи перенесення молекул з гелю на мембрану (рис. 4.3, а). У другому випадку, на гель з мембраною з обох боків накладається декілька шарів фільтрувального паперу, змочених у буферному розчині для перенесення. Пластини електродів прикладаються безпосередньо до цих шарів фільтрувального паперу, що забезпечує проходження електричного струму

через систему гель-мембрана та перенесення молекул на мембрану (рис. 4.3, б). Обидва методи електроперенесення є достатньо ефективними та менш затратними по часу, особливо у порівнянні з капілярним перенесенням. Загалом перенесення у резервуарі рекомендовано при дослідженні великих за розміром молекул, тоді як напівсухе перенесення – при аналізі менших за розміром молекул. На даний час метод електроперенесенння найбільш широко використовується при різних варіантах блот-гібридизації.

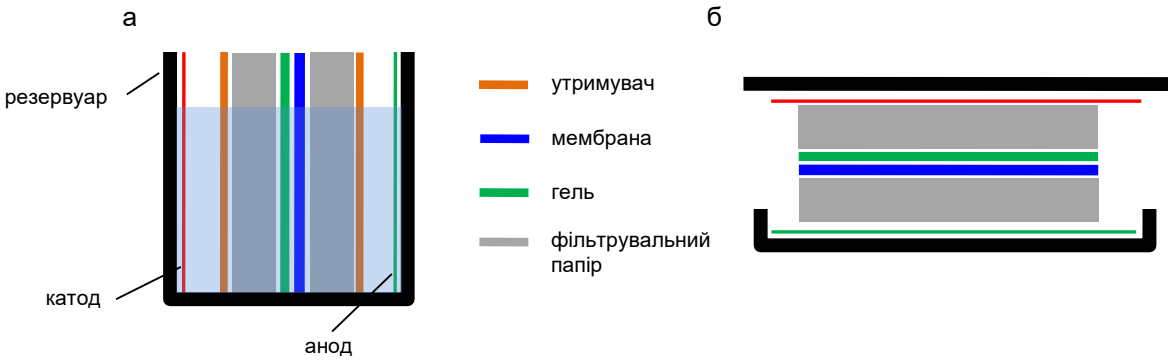

Рис. 4.3. Вологе (а) та напівсухе (б) електроперенесення молекул з гелю на мембрану при блот-гібридизації.

Ще один метод перенесення при блот-гібридизації – *вакуумне перенесення*. У цьому варіанті перенесення молекул з гелю на мембрану здійснюється за рахунок їх витягування під дією сил вакуумного насоса. Даний метод по швидкості та ефективності є співставним з методом електроблотингу.

Після перенесення молекул з гелю на мембрану обов'язковим етапом для кожного варіанту блот-гібридизації є блокування усіх незаповнених ділянок мембрани неспецифічними молекулами (наприклад, розчинами білків альбуміну чи казеїну, детергентів Tween-20 або SDS тощо). Цей крок необхідний для того, щоб уникнути адсорбції молекул зондів чи антитіл на поверхні мембрани, що буде призводити до формування неспецифічного фонового сигналу і спотворення результатів детекції.

На останньому етапі блот-гібридизації здійснюється власне детекція наявності молекули інтересу на мембрані. У випадку Саузерн та нозерн блот-гібридизації для детекції використовуються специфічні зонди – одноланцюгові послідовності нуклеїнових кислот (розміри варіюють від десятків до тисяч пар нуклеотидів), що комплементарні до ділянки ДНК чи РНК, яка аналізується. Зонди можуть бути створені на основі молекул РНК, одноланцюгової ДНК або інших модифікованих нуклеїнових кислот (наприклад, пептид-нуклеїнові

кислоти (ПНК), у яких цукрофосфатний остов нуклеїнових кислот заміщений на пептидний остов). Для проведення детекції до молекули зонда приєднується певна мітка (радіоактивна, флуоресцентна тощо), наявність сигналу від якої і буде свідченням позитивного результату присутності молекули інтересу у суміші, яка аналізується (рис. 4.4).

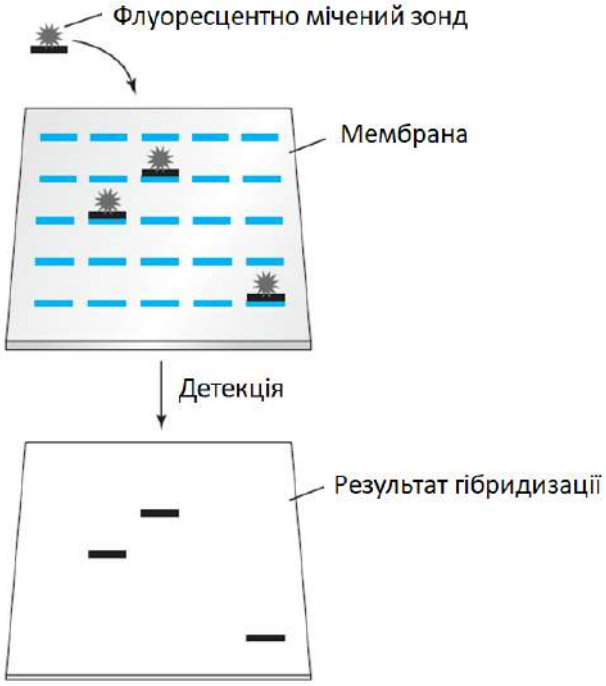

Рис. 4.4. Детекція результатів Саузерн та нозерн блот-гібридизації.

При проведенні вестерн блот-гібридизації для детекції використовуються антитіла – імуноглобулінові білки, які специфічно впізнають та взаємодіють з відповідною білковою молекулою. В якості міток до антитіл найчастіше приєднуються ферментативні мітки (наприклад, фермент пероксидаза хрону чи лужна фосфатаза), які після додавання відповідного субстрату забезпечують його перетворення з утворенням кольорового продукту (хромогенна детекція) або випроміненням квантів світла (хемілюмінесцентна детекція) (рис. 4.5). Часом можуть використовуватися флуоресцентні мітки.

Рис. 4.5. Детекція результатів вестерн блот-гібридизації.

В залежності від типу молекул, що розділяються, кожен метод блот-гібридизації характеризується рядом специфічних особливостей його проведення.

Саузерн блот-гібридизація – метод, що використовується для детекції наявності певної послідовності ДНК у суміші молекул ДНК (наприклад, послідовність гена чи його мутантних варіантів у геномі певного організму; наявність специфічного продукту ампліфікації після проведення полімеразної ланцюгової реакції тощо). Суміш молекул ДНК, що аналізуються, розділяють за допомогою гель-електрофорезу (найчастіше - в агарозному гелі). У випадку, якщо аналіз буде здійснюватися із використанням повногеномної ДНК чи великомолекулярних фрагментів, перед проведенням електрофорезу ці молекули потрібно розрізати на менші за розміром для ефективного їх розділення. Для цього у більшості випадків проводиться оброблення ДНК однією чи декількома рестриктазами. Після електрофорезу здійснюється перенесення розділеної суміші на нітроцелюлозну чи нейлонову мембрану за допомогою капілярного перенесення або електроблотингу. Перенесення здійснюється в денатуруючих умовах, наприклад, із використанням розчинів з високими значеннями pH (сильнолужне середовище). Такі умови необхідні для розділення дволанцюгових молекул ДНК на одноланцюгові фрагменти для подальшої можливої гібридизації із молекулами зондів. На наступному етапі проводиться фіксація молекул на мембрані (за допомогою ультрафіолетового опромінення чи нагрівання за високих температур), блокування мембрани та детекція за допомогою специфічних зондів, комплементарних до шуканої послідовності. У випадку наявності такої послідовності у суміші відбудеться гібридизація зонда з такою послідовністю та отримання відповідного сигналу від мітки, яка приєднана до нього.

Нозерн блот-гібридизація – модифікація, яка використовується для детекції специфічної молекули РНК у суміші відповідних молекул. Цей підхід може використовуватися для аналізу експресії певного гена у клітинах та тканинах чи для дослідження альтернативного сплайсингу молекул мРНК. При проведенні нозерн блот-гібридизації суміш молекул РНК після виділення з клітини розділяють за допомогою електрофорезу в денатуруючих умовах (наприклад, в присутності сечовини чи формальдегіду) для руйнування елементів вторинної структури. Надалі, подібно до Саузерн блотингу здійснюється перенесення на мембрану, фіксація молекул на ній, блокування незаповнених місць на мембрані та детекція за допомогою специфічних зондів.

Вестерн блот-гібридизація – підхід, для виявлення наявності певного білка у суміші (наприклад, при дослідженні протеому певних клітин або тканин). Як і у інших варіантах блот-гібридизації суміш молекул попередньо розділяють за допомогою електрофорезу. Найчастіше використовують електрофорез в поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах (SDS-PAGE, див. розділ 3). Після цього здійснюється перенесення на нітроцелюлозну або PVDF мембрану за допомогою електроблотингу (капілярне перенесення майже не використовується для цього варіанту блот-гібридизації через низьку ефективність; часом може проводитися вакуумне перенесення). Надалі здійснюється блокування мембрани та детекція за допомогою антитіл, які специфічно взаємодіють із білком, що аналізується. Мітка, за допомогою якої буде проводитися детекція, може приєднуватися безпосередньо до антитіла, яке впізнає білок інтересу (таке антитіло називається первинним) або ж приєднуватися до вторинних антитіл, які специфічно розпізнають первинні антитіла.

Для досліджень, у яких не потрібно аналізувати розміри молекул, що детектується, проводять *дот-блот-гібридизацію* (від англ. dot – крапка, цятка) або *слот-блот-гібридизацію* (від англ. slot – щілина, слот). В цьому випадку суміш молекул наносять безпосередньо на мембрану без попереднього електрофоретичного розділення у формі крапки чи видовженої смуги відповідно для дот- та слот-гібридизації (рис. 4.6). Далі проводиться блокування мембрани та детекція відповідним способом в залежності від типу молекул, що аналізується. Такі варіанти блот-гібридизації добре підходять для аналізу не дуже складних сумішей молекул (наприклад, аналіз продуктів полімеразної ланцюгової реакції).

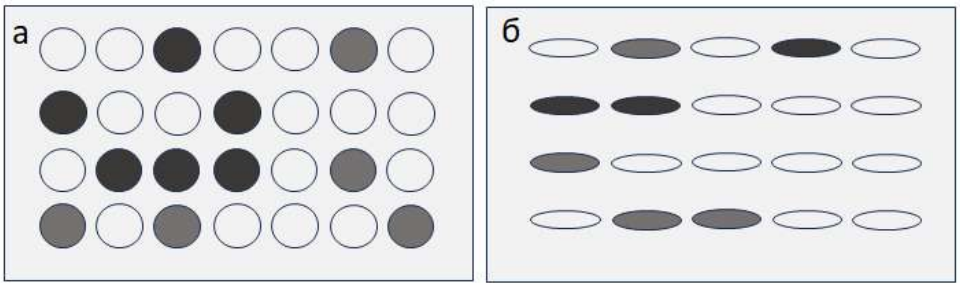

Рис. 4.6. Схематичне зображення результатів дот-блот-гібридизації (а) та слот-блот-гібридизації (б).

Лабораторна робота №8

Детекція наявності певного білка у суміші за допомогою вестерн блот-гібридизації

Мета роботи: проаналізувати суміш білків, виділених з клітин людини, щодо наявності певного білка за допомогою вестерн блот-гібридизації

Хід роботи

1. Розділити суміш білків за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах (див. лабораторну роботу №7).

2. По завершенні електрофорезу помістити гель в 1× буферний розчин для перенесення (склад: 25 мМ Tris; 190 мМ гліцин; 20% метанол) та інкубувати 15 хвилин.

ПРИМІТКА. Для аналізу білків масою більше 80 кД рекомендовано додати до буферного розчину для перенесення SDS до кінцевої концентрації 0,1%.

3. Підготувати PVDF-мембрану: змочити мембрану в метанолі протягом 15 секунд (мембрана повинна рівномірно змінитися з непрозорої на напівпрозору). Перенести мембрану в дистильовану воду на 2 хвилини. Помістити мембрану в 1× буфер для перенесення та інкубувати 5 хвилин.

4. Зібрати пакет «гель-мембрана»: покласти мембрану поверх гелю, уникаючи потрапляння бульбашок повітря між ними. Накрити гель з мембраною з обох боків фільтрувальним папером, змоченим в 1× буфер для перенесення. Накласти на фільтрувальний папір ззовні волокнисті підклади та вкласти цю систему у касетотримач.

5. Помістити касеторимач у резервуар для перенесення. Гель має бути розташований зі сторони катода (-), а мембрана – зі сторони анода (+). Залити достатнім об'ємом 1× буферного розчину для перенесення, щоб повністю покрити касетотримач.

6. Підключити струм та проводити перенесення протягом 2 годин при напруженості від 6 до 8 В/см за температури 4°С.

7. По завершенні перенесення обережно розібрати пакет «гель-мембрана». Промити мембрану дистильованою водою та пофарбувати її барвником Понсо S (Ponceau S) протягом 30 с для перевірки успішності перенесення.

8. Промити мембрану від Ponceau S тричі за допомогою 1× Tris-буферного розчину Tween 20 (Tris-buffered saline with Tween 20 (TBST); склад: 20 мМ Tris, pH 7,5; 150 мМ NaCl; 0,1% Tween 20).

9. Помістити мембрану у 3%-ий розчин БСА в TBST та інкубувати перемішуючи протягом години при кімнатній температурі для блокування мембрани.

10. Перенести мембрану у розчин первинних антитіл, що специфічно впізнають та взаємодіють з білком інтересу. Інкубувати 1 годину при кімнатній температурі, обережно помішуючи.

ПРИМІТКА. Антитіла повинні бути розчинені у розчині для блокування (3%-ий БСА в TBST).

11. Промити мембрану тричі в розчині TBST протягом 10 хвилин.

12. Помістити мембрану у розчин вторинних антитіл (специфічно впізнають первинні антитіла), кон'югованих з ферментом пероксидаза хрону та інкубувати 1 годину при кімнатній температурі, обережно перемішуючи.

13. Промити мембрану тричі в розчині TBST протягом 10 хвилин.

14. Помістити мембрану у розчин з хемілюмінесцентним субстратом та інкубувати протягом 1 хвилини. Злити залишки субстрату.

15. Помістити мембрану на чорний екран та сфотографувати за допомогою камери CCD для виявлення хемілюмінесцентного сигналу.

16. Зробити висновок щодо присутності білка інтересу у суміші білків, яку аналізували.

РОЗДІЛ 5. ПОЛІМЕРАЗНА ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ (ПЛР)

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР, англ. Polymerase Chain Reaction (PCR)) – надзвичайно важливий молекулярно-біологічний метод, що полягає у синтезі *in vitro* великої кількості копій (ампліфікації) певної специфічної послідовності ДНК. Важко уявити зараз будь-яке молекулярно-біологічне дослідження, що передбачає використання нуклеїнових кислот, де хоча б на якомусь із етапів не потрібно було провести ПЛР. Первинно даний підхід було розроблено для синтезу достатньої кількості вихідного матеріалу – окремих ділянок ДНК, наприклад, певного гена, для подальшого їх дослідження чи маніпуляцій з ними. Наступні вдосконалення та модифікації вихідного протоколу значно розширили сфери застосування ПЛР як у наукових дослідженнях, так і з суто прикладними цілями (наприклад, у лабораторній діагностиці різноманітних захворювань, криміналістиці чи у біотехнологічних розробках). Більше того, наразі даний метод є не лише необхідним проміжним етапом при виконанні багатьох інших процедур (наприклад, різноманітні підходи секвенування нуклеїнових кислот, клонування ДНК, методи фіксації конформації хромосом, футпринтинг ДНК тощо), але й дозволяє здійснювати більш складні маніпуляції, як, скажімо, вносити зміни в послідовності нуклеїнових кислот (сайт-спрямований мутагенез).

Принцип методу ПЛР полягає у тому, що за допомогою ферменту ДНК-полімерази здійснюється синтез комплементарних ланцюгів ДНК на матричній молекулі. Процедура синтезу здійснюється циклічно, за рахунок чого, власне, і відбувається ампліфікація послідовності-мішені: в кожному наступному циклі як матриця будуть використовуватися всі молекули, синтезовані у попередніх циклах, тож накопичення продукту буде відбуватися експоненційно (рис. 5.1).

Кожний цикл ПЛР складається з трьох послідовних етапів (рис. 5.2):

- денатурація (розходження) ланцюгів матриці ДНК;
- приєднання (гібридизація, відпал, англ. – annealing) праймерів – коротких одноланцюгових олігонуклеотидів (15-30 нуклеотидів), які комплементарні границям унікальної ділянки послідовності ДНК, що ампліфікується;
- власне синтез комплементарних ланцюгів ДНК за допомогою ферменту (елонгація).

Синтез ДНК за допомогою ПЛР відбувається в умовах *in vitro*, що забезпечує набагато швидше отримання необхідної кількості копій фрагменту ДНК, ніж це відбувається в умовах *in vivo*, як, наприклад, при використанні методу клонування генів (див. розділ 6): при ПЛР достатньо декілька годин на противагу декільком дням чи навіть тижням при клонуванні.

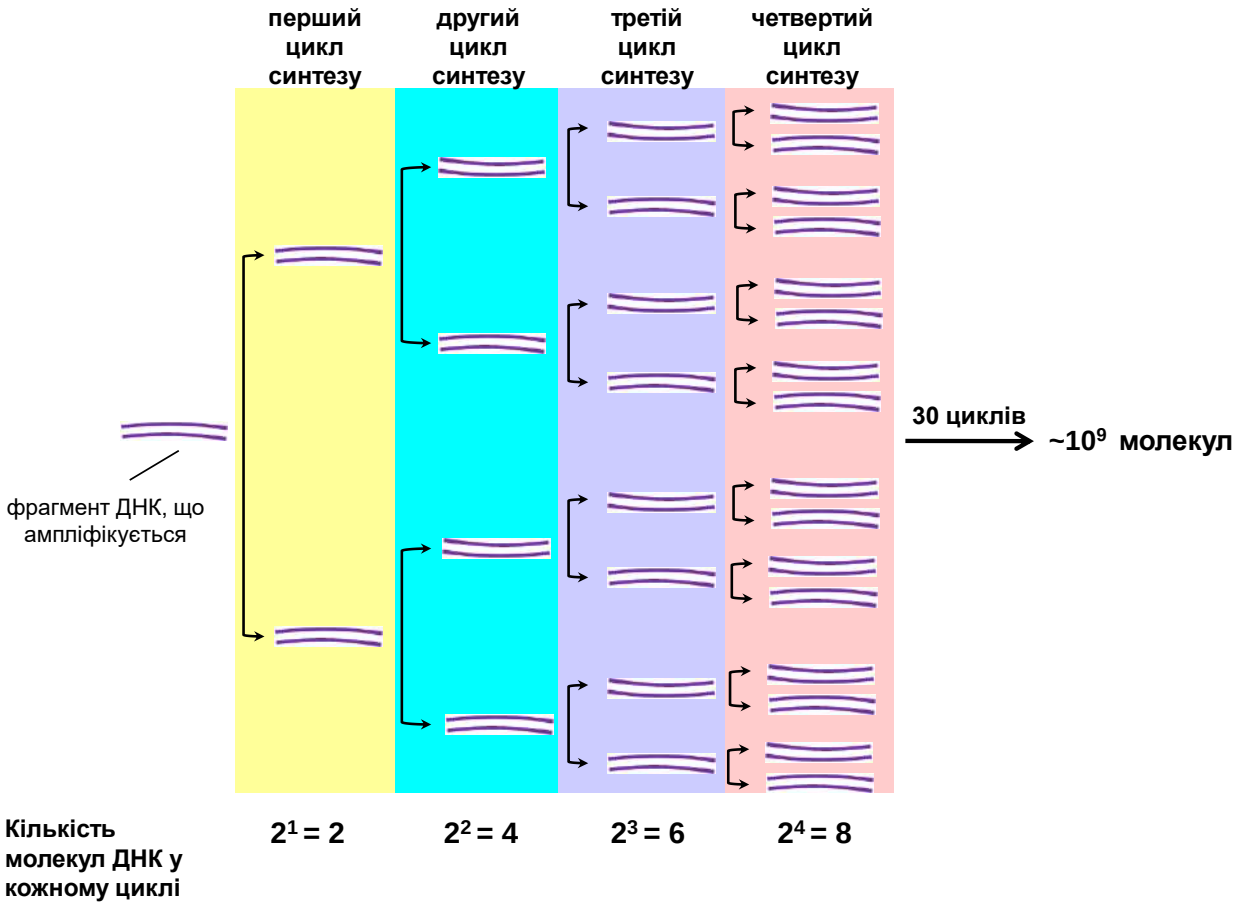

Рис. 5.1. Схема експоненційного збільшення кількості ДНК після кожного циклу ПЛР.

Зрозуміло, що при ПЛР всі необхідні компонети мають бути додані до складу реакційної суміші у відповідних пропорціях. У таблиці 5.1 наведено ключові компоненти, які мають бути додані до реакційної суміші, та їх функцію при проведенні ПЛР.

Перш за все, до реакційної суміші необхідно додати власне матеріал, що містить послідовність-мішень, яка буде ампліфікуватися. Це можуть бути як молекули ДНК, так і РНК, виділені з будь-яких типів клітин (при використанні РНК необхідно додати додатковий етап синтезу кДНК (див. далі). При цьому,

для успішного проведення ПЛР достатньо навіть досить невеликої кількості вихідного матеріалу (50-100 нг).

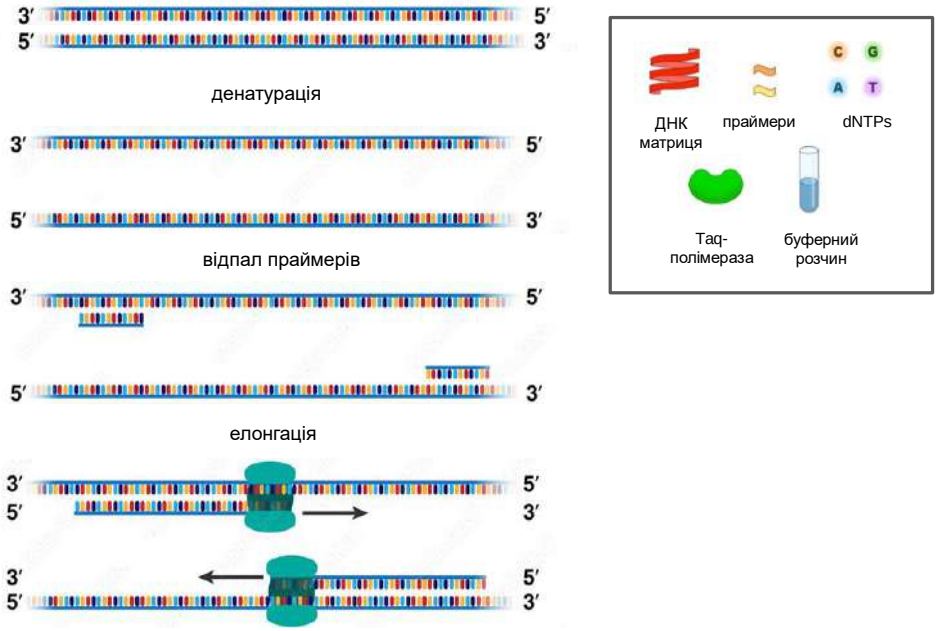

Рис. 5.2. Схема етапів полімеразної ланцюгової реакції в межах одного циклу. На вставці зображено основні компоненти реакційної суміші для ПЛР, dNTPs - нуклеозидтрифосфати

По друге, до складу суміші потрібно додати два *праймери* – прямий та зворотній, кожний з яких комплементарний унікальній послідовності на одному з ланцюгів матричної ДНК з протилежних кінців ділянки, що ампліфікується. Таким чином, приєднання праймерів до специфічних послідовностей в межах матриці ДНК визначає межі ділянки-мішені, які буде ампліфікуватися, адже саме з цих олігонуклеотидів буде розпочинатися синтез комплементарних ланцюгів за допомогою ферменту. Підбір праймерів здійснюється за допомогою спеціалізованого програмного забезпечення або онлайн-інструментів (наприклад, Primer-BLAST від NCBI (National Center for Biotechnology Information, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/), після чого проводиться штучний синтез таких олігонуклеотидів. Важливими характеристиками, на які потрібно звернути увагу при підборі праймерів, є їх розміри (оптимально – 15-30 нуклеотидів), вміст GC-нуклеотидів (30-60%),

відсутність самокомплементарності, особливо на 3’-кінці, а також ділянок, комплементарних іншому праймеру у парі (для уникнення формування елементів вторинної структури чи димерів праймерів). Також варто підбирати праймери з близькими значеннями температури плавлення T_m, оскільки саме цей параметр визначає оптимальну температуру відпалу при проведенні ПЛР. Нарешті, при додаванні праймерів до реакційної суміші надзвичайно важливо додати оптимальну концентрацію кожного з праймерів (0,1-1 мкМ): недостатня кількість праймерів чи нерівномірні їх концентрації можуть зумовити зниження ефективності проходження ПЛР, тоді як їх надлишок може призвести до неспецифічного приєднання та ампліфікації нецільового продукту. Загалом, від правильного підбору праймерів та їх параметрів значною мірою залежить успішність проходження ПЛР – специфічність та ефективність реакції.

Таблиця 5.1. **Компоненти типової ПЛР та їх призначення**

Компонент	**Призначення**
Матриця ДНК	зразок ДНК, що містить специфічну ділянку - мішень для ампліфікації
Прямий та зворотній праймери (англ. – forward and reverse primers)	«направляє» синтез послідовності ДНК до бажаної ділянки, тобто забезпечує специфічність реакції
Термостабільна ДНК-полімераза	фермент, що каталізує реакцію синтезу ланцюгів
4 типи дезоксинуклеозидтрифосфатів (dNTP) – dATP, dGTP, dCTP, dTTP	«будівельні блоки» (мономери) для синтезу комплементарних ланцюгів ДНК
Солі Mg^{2+}	Кофермент ДНК-полімерази
Моновалентні катіони (наприклад K^+)	для оптимізації гібридизації праймерів з матрицею
Tris	підтримання оптимального значення pH для роботи ферменту

Наступний обов’язковий компонент реакційної суміші – фермент, що забезпечує синтез ланцюгів ДНК – ДНК-полімераза. Ключовою характеристикою ДНК-полімерази для ПЛР є те, що фермент має бути термостабільним, тобто, ефективно працювати за підвищених температур ~60–70°C (за яких відбувається синтез) і витримувати температуру до 96°C (не денатурувати за таких умов), адже саме за такої температури відбувається розходження ланцюгів ДНК. Ферменти з такими характеристиками були

виділені з бактерій роду *Thermus,* зокрема з *Thermus aquaticus*– *Taq*-полімераза, (найбільш часто використовується), чи з *Thermus thermophilus* – *Tth*-полімераза, або ж археїв роду *Pyrococcus (Pyrococcus furiosus* - *Pfu*-полімераза, *Pyrococcus woesei*- *Pwo*-полімераза). Загальною характеристикою цих організмів є те, що вони живуть в екстремальних умовах за дії високих температур, тож відповідно всі їх білки, в тому числі ДНК-полімерази, є термостабільними. На сьогодні розроблено велику кількість модифікацій таких ферментів, спрямованих на збільшення їх процесивності (зрозуміло, що ферменти для ПЛР синтезуються сьогодні у бактеріальних клітинах на основі рекомбінантних технологій). Обов'язково до складу суміші для ПЛР необхідно включити йони Mg^{2+} (найчастіше додається сіль $MgCl_2$), адже саме цей двовалентний катіон необхідний для роботи ДНК-полімерази.

Важливим компонентом, необхідним для проходження ПЛР, є дезоксирибонуклеозидтрифосфати (dNTPs) – мономери, що використовуються для синтезу комплементарних ланцюгів ДНК при ПЛР. Тут важливим є додавання рівних кількостей усіх 4 dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), оскільки при порушенні співвідношення той нуклеотид, що буде в надлишку, може помилково вбудовуватися ДНК-полімеразою у неправильному місці в ланцюзі, що синтезується. Для створення необхідного середовища та для роботи ферменту та ефективного відпалу праймерів до складу реакційної суміші також мають входити одновалентні катіони (наприклад, K^+, Na^+ чи NH_4^+) та речовини, що підтримують необхідне значення pH (найчастіше – Tris). Така реакційна суміш є базовою для всіх різновидів ПЛР, однак деякі модифікації передбачають використання ще додаткових компонентів (див. далі).

Для проведення ПЛР використовуються спеціальні прилади – термоциклери (англ. thermocycler, які часто ще називають ампліфікаторами (DNA amplifier)), що дозволяють запрограмувати циклічні зміни температури та час проходження кожного етапу. Як було зазначено раніше, кожний цикл ПЛР включає 3 основні етапи: денатурацію ланцюгів ДНК, відпал праймерів та елонгацію комплементарних ланцюгів за допомогою ДНК-полімерази. Перший етап – денатурація – проходить за температури 94-96°C. За таких умов відбувається розходження комплементарних ланцюгів матриці ДНК, що робить їх доступними для подальшої гібридизації праймерів та елонгації. У живій клітині аналогічний етап здійснюється за допомогою ферментів ДНК-геліказ та потребує енергії АТР. При проведенні ПЛР дана ферментативна реакція замінена на фізичний процес, що значно пришвидшує цю процедуру. Після розходження ланцюгів відбувається відпал праймерів за температури 50-70°C –

ланцюги матриці за таких температур не ренатурують, а праймери гібридизуються з ними, оскільки присутні у суміші у відносно високій концентрації. Температура відпалу визначається температурою плавлення праймерів, що в свою чергу залежить від їх послідовності. Правильний підбір температури відпалу, як і правильний підбір праймерів та їх параметрів має ключове значення для специфічності проходження ПЛР, тобто ампліфікації саме бажаного фрагменту ДНК. Третій етап – елонгація, проходить за температури 68-75°С, що залежить від оптимуму роботи фермента, який використовується. У таблиці 5.2 наведено основні етапи кожного циклу ПЛР та тривалість їх проведення.

Таблиця 5.2. **Етапи циклу ПЛР та умови їх проведення.**

Етап	**Температура, °С**	**Час (с)**
Денатурація	90-96	20-60
Відпал праймерів	50-70	20-90
Елонгація	68-75	10-60

Типово, для успішної ампіфікації необхідно 25-40 циклів, під час яких відбувається експоненційне зростання кількості копій фрагмента мішені (після кожного циклу кількість копій подвоюється). Експоненційна реплікація цільової ДНК зрештою досягає плато приблизно через 30-40 циклів, головним чином через обмежену кількість реагентів. Це плато також може бути наслідком дії інгібіторів активності ферменту ДНК-полімерази, що можуть бути виявлені у реакційній суміші, самовідпалу продукту ампліфікації та накопичення молекул пірофосфату, що виділяються при приєднанні нуклеотидів.

По завершенні ПЛР успішність та специфічність ампліфікації зазвичай перевіряється за допомогою електрофорезу в агарозному гелі – аналізується розмір отриманих продуктів. Додатково можна також перевірити результати за допомогою Саузерн-блот гібридизації або секвенування. У цих варіантах можливо точно підтвердити, що було ампліфіковано саме бажану послідовність ДНК.

Крім описаного вище класичного варіанту ПЛР, на сьогоднішній день розроблено велику кількість різноманітних модифікацій. Багато з них спрямовані на збільшення специфічності полімеразної ланцюгової реакції та уникнення ампліфікації нецільових ділянок ДНК (наприклад, вкладена ПЛР,

ПЛР з гарячим стартом). Деякі модифікації дозволяють ампліфікувати РНК у вигляді її кДНК-копій (ПЛР із зворотною транскрипцією) або здійснити відносну кількісну оцінку ДНК (або РНК) у вихідному матеріалі (ПЛР у реальному часі або кількісна ПЛР). Інші модифікації ПЛР мають більш вузьке призначення і застосування. Наприклад, мультиплексна ПЛР (використання одночасно декількох пар праймерів) застосовується в діагностиці захворювань та криміналістичних дослідженнях; асиметрична ПЛР (використання надлишку одного з праймерів) – при підготовці зразків для секвенування; інвертована ПЛР (циркуляризація певної ділянки ДНК за рахунок лігування) – ампліфікація ділянки ДНК, послідовність якої повністю невідома, тощо.

ПЛР із зворотною транскрипцією (RT-PCR) – дуже важливий варіант ПЛР, оскільки дає можливість використовувати в якості вихідного матеріалу молекули РНК (найчастіше мРНК), а надалі проводити ампліфікацію саме кДНК, а не всього еукаріотичного гена. Суть модифікації полягає у тому, що спочатку проводиться реакція зворотної транскрипції на матрицях за допомогою ферменту зворотної транскриптази (ревертази). Для зворотної транскрипції саме на молекулах мРНК найчастіше використовуються оліго(dT)-праймери, які комплементарно приєднуються до полі(А)-хвостів цих молекул. Після цього проводиться власне ПЛР з використанням специфічних праймерів до кДНК певного гена. Така модифікація дозволяє синтезувати достатню кількість копій саме кДНК відповідного гена для подальших досліджень, а також здійснити відносну кількісну оцінку рівня експресії певного гена у різних тканинах (використовуючи ПЛР у реальному часі, див. нижче). Ця модифікація ПЛР може також використовуватися для діагностики захворювань, що спричинені збудниками, які мають геноми у вигляді РНК.

Вкладена ПЛР (Nested PCR) – модифікація, направлена на збільшення специфічності ампліфікації. Тут передбачається використання двох пар праймерів до цільової послідовності. При цьому друга пара комплементарна послідовностям всередині ділянки, яка визначається першою парою праймерів («вкладена» всередині продукту, що синтезується після гібридизації першої пари). Таким чином, якщо перші праймери помилково гібридизуються з нецільовою послідовністю, продукти, які тут утворяться надалі ампліфікуватися не будуть, оскільки до них не зможе приєднатися друга пара праймерів. Лише у випадку відпалу першої пари на цільовій послідовності та подальшого приєднання другої пари в межах цієї послідовності буде проходити успішна ампліфікація.

ПЛР з гарячим стартом (hot-start PCR) – ще одна модифікація, що забезпечує більшу точність і специфічність ампліфікації. У даному випадку використовується інактивована у той чи інший спосіб ДНК-полімераза (часом використовуються інактивовані dNTPs), що буде активуватися при нагріванні за високих температур (наприклад, при 95°C, тобто на першому етапі денатурації). Це дозволяє уникнути помилкової роботи ДНК-полімерази перед початком програми ампліфікації (за кімнатної температури чи нижчих температур), адже саме тоді можливе проходження неспецифічного синтезу і подальша ампліфікація неспецифічного продукту. Інактивація (з наступною активацією за високої температури) полімерази здійснюється у різні способи, наприклад: приєднання до полімерази антитіл, які дисоціюють за високої температури; додавання до реакційної суміші крапель воску з полімеразою всередині, які плавляться за високої температури; просто додавання полімерази до реакційної суміші в останню чергу – після нагрівання суміші до високої температури у першому циклі.

ПЛР у реальному часі або кількісна ПЛР (іноді позначається як RT-PCR (real time), частіше як qRT-PCR (quantitative) або qPCR) – варіант ПЛР, що передбачає реєстрацію накопичення продукту ампліфікації в режимі реального часу, тобто, безпосередньо під час проходження ПЛР. Така модифікація дозволяє проводити кількісну оцінку ампліфікованого продукту, а отже і оцінювати кількість вихідного матеріалу (матриці для ампліфікації). Реєстрація накопичення продуктів реакції (синтезованих копій певної ділянки ДНК) в реальному часі проводиться за рахунок реєстрації зростання інтенсивності флуоресценції при взаємодії певних флуорофорів із синтезованими молекулами ДНК після кожного циклу ПЛР. Типовий графік залежності інтенсивності флуоресценції від номеру циклу наведено на рис 5.3. На основі такого графіку відбувається визначення порогового циклу (англ. threshold cycle, C_T) – порядкового номеру циклу ПЛР, на якому було досягнуто деякий пороговий рівень флуоресценції у зразку. Пороговий цикл визначається як точка перетину порогової лінії з кривою ампліфікації (рис. 5.3). Порогова лінія проводиться приблизно на рівні середини прямої ділянки кривої ампліфікації у логарифмічному масштабі (пряма ділянка логарифмічної кривої відповідає ділянці експоненційного зростання кількості ДНК у зразку). Оцінка кількості ДНК у вихідному зразку базується на простому міркуванні: чим більше ДНК у вихідному зразку, тим швидше (на циклі з меншим порядковим номером) буде досягнуто порогового рівня флуоресценції (меншим буде значення C_T).

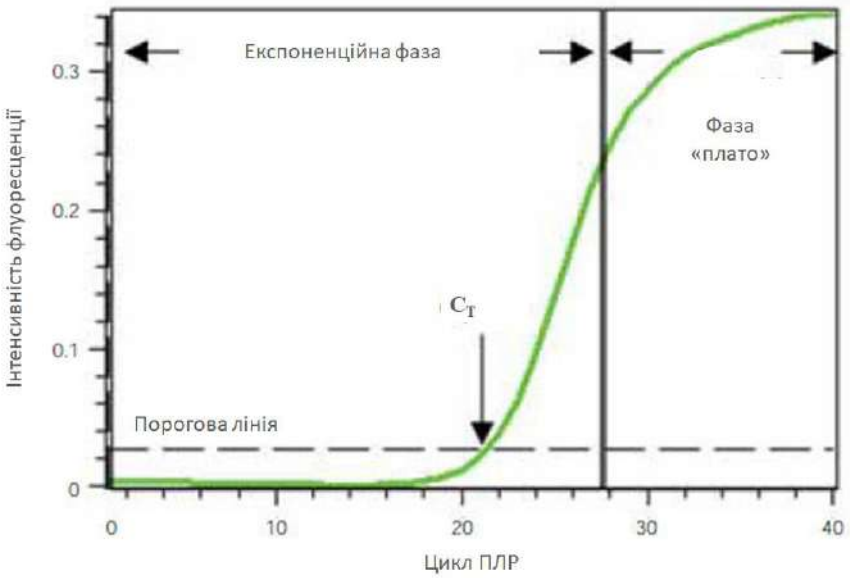

Рис. 5.3. Типовий графік залежності зростання інтенсивності флуоресценції від номеру циклу при проведенні ПЛР в реальному часі. C_T – пороговий цикл при якому розпочинається детекція рівня флуоресценції.

Кількісна оцінка молекули-мішені у зразку, що досліджується, здійснюється шляхом порівняння отриманого значення C_T для цього зразка із значенням C_T для якогось іншого зразка, в якому концентрація ДНК невідома (відносна оцінка) або відома (точна оцінка).

Термоциклери для кількісної ПЛР повинні бути обладнані оптичною системою, що забезпечуватиме реєстрацію випромінення флуорофорів, які повинні бути присутніми у реакційній суміші, при їхній взаємодії з ДНК. У найпростішому випадку в якості флуорофорів для реєстрації накопичення продуктів ПЛР можуть використовуватися флуоресцентні барвники, що взаємодіють з дволанцюговою молекулою ДНК (найчастіше використовується барвник SYBR Green I). Однак, така система реєстрації є неспецифічною, оскільки даний барвник буде взаємодіяти з будь-якими молекулами ДНК, що є у суміші, незалежно від їх послідовності. Тобто, у випадку синтезу якогось неспецифічного продукту теж буде відбуватися зростання флуоресценції.

Для більш точної кількісної оцінки саме цільового продукту реакції було розроблено ряд специфічних систем детекції, що передбачають приєднання флуорофору до молекули зонда – невеликого одноланцюгового олігонуклеотиду, що комплементарний до певної ділянки в межах продукту ампліфікації. Підбір таких специфічних зондів також здійснюється за рахунок спеціалізованого програмного забезпечення, як і у випадку підбору праймерів. Часто це здійснюється за допомогою одних і тих же самих інструментів

(наприклад, за допомогою Primer-BLAST). Кожна з таких специфічних систем детекції передбачає гасіння флуоресценції за відсутності цільової послідовності та випромінювання флуоресценції при зв'язуванні такого зонда з комплементарною йому послідовністю. Наприклад, у системі для специфічної детекції TaqMan до 5'-кінця зонда ковалентно прикріплений флуоресцентний барвник, а до 3'-кінця – молекула-гасник (англ. quencher) флуоресценції. Такі зонди гібридизуються до специфічної дільники на матриці ДНК і за таких умов гасник флуоресценції пригнічує випромінювання флуоресценції флуорофором. Коли проходить синтез на такій матриці ДНК за допомогою *Taq*-полімерази, то за рахунок додаткової 5'-екзонуклеазної активності, якою володіє даний фермент, відбувається «усунення» перешкоди у вигляді гібридизованого зонду: здійснюється його розрізання на окремі нуклеотиди. За рахунок цього флуоресцентний барвник вже не буде знаходитися поблизу молекули-гасника, тож буде реєструватися випромінювання флуоресценції, пропорційне кількості специфічного продукту, що синтезується. Інша система специфічної детекції – «молекулярні маячки» (англ. molecular beacons) передбачає реєстрацію флуоресценції після гібридизації зонда із специфічним продуктом ампліфікації. Такі зонди на обох кінцях фланковані короткими (приблизно 5 пар нуклеотидів) інвертованими повторами, за рахунок чого при відсутності послідовності-мішені формуються елементи вторинної структури «стебло» та «петля». Оскільки до 5'-кінця молекули приєднаний флуорофор, а до 3'-кінця – гасник флуоресценції, то при формування такої вторинної структури зонда (у вигляді «шпильки») ці молекули є просторово наближеними і випромінювання флуоресценції не відбувається. За умови ж наявності послідовності мішені, відбудеться його гібридизація з нею, відповідно вторинна структура зонда буде порушена, а флуорофор опиниться на певній відстані від гасника і відповідно буде відбуватися реєстрація збільшення рівня флуоресценції. Ще один тип специфічної детекції при ПЛР в реальному часі – зонди-«скорпіони» (або праймери типу «скорпіон», англ. Scorpion probes чи Scorpion-type primers) - подібний до попередньої системи («молекулярних маячків»): молекула зонда теж формує вторинну структуру у вигляді «шпильки» за відсутності цільової послідовності, за рахунок чого флуоресцентний барвник просторово наближений з гасником флуоресценції. Принциповою відмінністю є те, що такі зонди ковалентно прикріплені до 5'-кінця праймера. Відповідно, коли праймер гібридизується з матрицею, вторинна структура зонда буде розплітатися і він буде взаємодіяти з комплементарною йому ділянкою в межах мішені, що буде супроводжуватися випроміненням флуоресценції флуорофором.

Сайт-спрямований мутагенез із використанням ПЛР – методика, що передбачає використання полімеразної ланцюгової реакції для внесення змін у нуклеотидну послідовність певної ділянки ДНК (наприклад, гена). Для цього при проведенні ПЛР використовуються праймери, що комплементарні до ділянки, яка цікавить, але містять у своїй послідовності відповідну нуклеотидну заміну. Надалі, після проведення ПЛР з використанням таких праймерів буде отримано ампліфікований фрагмент із зміненою послідовністю, який можна використовувати для подальших досліджень.

Лабораторна робота №9

Ампліфікація певного фрагмента гена людини за допомогою полімеразної ланцюгової реакції

Мета роботи: здійснити підбір праймерів для ампліфікації фрагмента певного гена людини; провести ампліфікацію цього гена за допомогою ПЛР.

Хід роботи

1. Провести підбір праймерів для специфічної ампліфікації фрагмента певного гена людини (наприклад, інтерлейкіну-2), використовуючи онлайн-інструмент Primer-BLAST порталу NCBI. Спочатку знайти у базах даних NCBI нуклеотидну послідовність обраного гена. Для цього на стартовій сторінці NCBI обрати категорію «Gene» та ввести у поле пошуку назву гена або білка та організму англійською мовою. Перейти за отриманим посиланням, що відповідає шуканому гену. В категорії «Genomic regions, transcripts, and products» обрати опцію «FASTA». На сторінці, що відкриється, обрати опцію «Pick primers» для переходу до онлайн-інструменту Primer-BLAST. Задати необхідні параметри для пошуку оптимальних пар праймерів та натиснути кнопку «Get primers». Після завершення пошуку обрати найбільш оптимальну пару праймерів, скопіювати їх послідовність, характеристики та розмір очікуваного продукту ампліфікації.

2. Кожний зразок виділеної геномної ДНК (див. лабораторні роботи №1 та №2) перед проведенням ПЛР змішати з 2,5 об’єму охолодженого 96%-го етанолу та додати ацетат натрію до кінцевої концентрації 0,15 М. Перемішати шляхом перевертання пробірки для преципітації ДНК. Центрифугувати 7 хв при 10000

об/хв за кімнатної температури. Видалити надосад та промити осад 200 мкл 96%-го етанолу, висушити впродовж 15 хв. Розчинити у охолодженій дистильованій H_2O. Визначити концентрацію зразків ДНК за допомогою спектрофотометрії (див. лабораторну роботу №4).

3. Розморозити суміші DreamTaq PCR MasterMix (2×), прямого та зворотного праймерів, обережно провортексувати та помістити на лід.

ПРИМІТКА. Суміш DreamTaq PCR MasterMix (2×) містить у своєму складі всі необхідні компоненти для проведення ПЛР, окрім праймерів та зразка ДНК. До неї входять ДНК-полімераза DreamTaq, 2× буфер DreamTaq, dATP, dCTP, dGTP і dTTP, по 0,4 мМ кожний, і 4 мМ $MgCl_2$. Така попередньо змішана суміш суттєво економить час і знижує можливість контамінації реакційних сумішей. У більш ранніх протоколах ПЛР кожен з перерахованих компонентів додавали окремо.

4. Розрахувати об'єм кожного зразка, який потрібно додати до реакційної суміші ПЛР, щоб кількість матриці ДНК у пробірці становила 0,5-1 мкг (на основі результатів, отриманих у п. 2).

5. Приготувати необхідну кількість тонкостінних мікропробірок для проведення ПЛР та помістити їх на лід. Додати у кожну мікропробірку наступні компоненти:

DreamTaq PCR MasterMix (2×) – 25 мкл;
Прямий праймер – 0,1-1,0 мкМ;
Зворотній праймер – 0,1-1,0 мкМ;
Геномна ДНК – 0,5-1 мкг (див. п. 4);
Вода, вільна від нуклеаз – до загального об'єму суміші 50 мкл.
Окремо приготувати аналогічну суміш для негативного контролю ПЛР (містить всі компоненти, крім ДНК).

6. Обережно перемішати та осадити краплини на дно пробірки.

7. Перенести пробірки у термоциклер та задати необхідний режим ампліфікації:

I етап - Початкова денатурація – 95ºС – 1-3 хв;
II етап (25-40 циклів) –

- Денатурація - 95ºС – 30 с,
- Відпал - 55 ºС – 30 с,
- Елонгація - 72 ºС – 60 с;

III етап – Фінальна елонгація - 72 ºС – 5-15 хв.

ПРИМІТКА. Температура відпалу праймерів визначається як температура їх плавлення (див. розділ 2), від якої віднімається 5ºС. Тому для оптимальної ампліфікації вкрай важливо, щоб Тт прямого та зворотного праймерів відрізнялися не більше, ніж на 2ºС. Елонгація протягом 60 с достатня для ампліфікації ділянки ДНК розміром до 2 тисяч пар нуклеотидів. Для більших за розміром ділянок час елонгації потрібно збільшити на 1 хв для кожної тисячі пар нуклеотидів.

8. По завершенні ПЛР проаналізувати результати за допомогою електрофорезу в 1,5%-му агарозному гелі (див. лабораторну роботу №5).

9. Зробити висновок про успішність і специфічність проведеної ампліфікації.

Лабораторна робота №10

Визначення рівня експресії певного гена людини за допомогою кількісної ПЛР в реальному часі після зворотної транскрипції

Мета роботи: здійснити підбір праймерів для ампліфікації мРНК (кДНК) певного гена людини; визначити рівень експресії цього гена у різних типах клітин людини за допомогою ПЛР в реальному часі.

Хід роботи

1. Провести підбір праймерів до мРНК (кДНК) певного гена людини (наприклад, каспаза 8), використовуючи онлайн-інструмент Primer-BLAST порталу NCBI. Спочатку знайти у базах даних NCBI нуклеотидну послідовність мРНК обраного гена. Для цього на стартовій сторінці NCBI обрати категорію «Gene» та ввести у поле пошуку назву гена або білка та організму англійською мовою. Перейти за отриманим посиланням, що відповідає шуканому гену. В категорії «категорії «mRNA and Protein(s)» обрати посилання, що відповідає мРНК (кДНК) даного гена та перейти за цим посиланням. На сторінці, що відкриється знайти послідовність мРНК (кДНК) у форматі FASTA та обрати опцію «Pick primers» для переходу до онлайн-інструменту Primer-BLAST. Задати необхідні параметри для пошуку оптимальних пар праймерів. Особливо

звернути увагу на опцію «Exon junction span»: тут рекомендовано обрати варіант «Primer must span an exon-exon junction». Це дозволить уникнути відпалу праймерів на послідовності гена, що аналізується, в межах геномної ДНК та подальшої його ампліфікації. Натиснути кнопку «Get primers». Після завершення пошуку обрати найбільш оптимальну пару праймерів, скопіювати їх послідовність, характеристики та розмір очікуваного продукту ампліфікації.

2. Кожний зразок виділеної РНК (див. лабораторну роботу №3) перед проведенням ПЛР змішати з 2,5 об'єму охолодженого 96%-го етанолу та додати ацетат натрію до кінцевої концентрації 0,15 М. Перемішати шляхом перевертання пробірки для преципітації РНК. Центрифугувати 7 хв при 10000 об/хв за кімнатної температури. Видалити надосад та промити осад 200 мкл 96%-го етанолу, висушити впродовж 15 хв. Розчинити у охолодженій дистильованій H_2O. Визначити концентрацію зразків РНК за допомогою спектрофотометрії (див. лабораторну роботу №4).

Варіант а – проведення реакції зворотної транскрипції та ПЛР в реальному часі в один етап (обидві реакції в одній пробірці)

3а. Розморозити суміші Luna Universal One-Step Reaction Mix (2×), Luna WarmStart RT Enzyme Mix (20×), прямого та зворотного праймерів, обережно перемішати та помістити на лід.

ПРИМІТКА. Суміш Luna Universal One-Step Reaction Mix (2×) містить у своєму складі всі необхідні компоненти для проведення ПЛР в реальному часі, окрім праймерів та зразка РНК. До неї входять Taq ДНК-полімераза, 2× буфер для проведення ПЛР, dATP, dCTP, dGTP і dTTP, по 0,4 мМ кожний, 4 мМ $MgCl_2$ та флуоресцентний барвник SYBR Green I для вимірювання ампліфікації ДНК після кожного циклу ПЛР. Суміш Luna WarmStart RT Enzyme Mix (20X) містить у своєму складі фермент зворотну транскриптазу для синтезу кДНК на матриці мРНК, а також інгібітор РНКаз для зниження деградації РНК.

4а. Розрахувати об'єм кожного зразка, який потрібно додати до реакційної суміші ПЛР, щоб кількість матриці РНК у пробірці становила 0,5-1 мкг (на основі результатів, отриманих у п. 2).

5а. Приготувати необхідну кількість тонкостінних мікропробірок для проведення ПЛР з оптично прозорими кришками та помістити їх на лід. Додати у кожну мікропробірку наступні компоненти:

Luna Universal One-Step Reaction Mix (2×) – 10 мкл;
Luna WarmStart RT Enzyme Mix (20×) – 2 мкл;
Прямий праймер – 0,4 мкМ;
Зворотній праймер – 0,4 мкМ;
РНК – 0,5-1 мкг (див. п. 4);
Вода, вільна від нуклеаз – до загального об'єму суміші 20 мкл.
Окремо приготувати аналогічну суміш для негативного контролю ПЛР (містить всі компоненти, крім РНК).

ПРИМІТКА. Для великої кількості зразків можна приготувати майстер-суміш з усіх компонентів, окрім РНК.
Для кожної реакції робити по 3 повтори.

6а. Обережно перемішати та осадити краплини на дно пробірки.

7а. Перенести пробірки у термоциклер та задати необхідний режим ампліфікації:

I етап – Зворотна транскрипція – 55ºС – 10 хв;
II етап – Початкова денатурація - 95ºС – 1 хв;
III етап (40-45 циклів) –

- Денатурація - 95ºС – 10 с,
- Відпал праймерів та елонгація - 60ºС – 60 с;

III етап – Побудова кривої плавлення – 60-95ºС – 5-15 хв.

ПРИМІТКА. При програмуванні режиму ампліфікації також задати систему детекції ампліфікації ДНК в реальному часі (неспецифічна, за допомогою флуоресцентного барвника SYBR Green I), а також метод кількісної оцінки рівня експресії (порівняльний метод).

8а. По завершені ПЛР проаналізувати отримані результати та зробити висновок про рівень експресії гена, який аналізували.

Варіант б – проведення реакції зворотної транскрипції та ПЛР в реальному часі два етапи (в окремих пробірках)

3б. Приготувати суміш для проведення реакції зворотної транскрипції (синтезу кДНК). Змішати (на льоду) наступні компоненти:
LunaScript RT SuperMix (5×) – 4 мкл;
Зразок РНК – 0,5-1 мкг (розрахувати на основі даних, отриманих в п.2);
Вода, вільна від нуклеаз – до загального об'єму суміші 20 мкл.
Обережно перемішати та осадити краплини на дно пробірки.
Окремо приготувати аналогічну суміш для негативного контролю реакції зворотної транскрипції (містить всі компоненти, крім РНК).

ПРИМІТКА. До складу суміші LunaScript RT SuperMix (5×) входять всі необхідні компоненти для проведення реакції зворотної транскрипції, крім РНК (зворотна транскриптаза, буфер для її роботи, dATP, dCTP, dGTP і dTTP, $MgCl_2$, оліго-d(T) праймери). Оліго-d(T) праймери використовуються для проведення зворотної транскрипції тільки на матрицях мРНК за рахунок приєднання до їх poly(A)-хвостів.

4б. Провести реакцію зворотної транскрипції за наступних умов:
I етап – Відпал оліго-d(T) праймерів – 25ºС – 2 хв;
II етап – Синтез кДНК - 55 ºС – 10 хв;
III етап – Інактивація фермента – 95ºС – 1 хв.

5б. Приготувати суміш для проведення ПЛР в реальному часі. Змішати (на льоду) наступні компоненти:
Luna Universal qPCR Master Mix (2×) – 10 мкл;
Прямий праймер – 0,25 мкМ;
Зворотній праймер – 0,25 мкМ;
Синтезована кДНК – 1 мкл;
Вода вільна від нуклеаз - до загального об'єму суміші 20 мкл.
Окремо приготувати аналогічну суміш для негативного контролю ПЛР (містить всі компоненти, крім кДНК).

ПРИМІТКА. Для великої кількості зразків можна приготувати майстер-суміш з усіх компонентів, окрім кДНК.
Для кожної реакції робити по 3 повтори.
Суміш Luna Universal qPCR Master Mix (2×) містить у своєму складі всі необхідні компоненти для проведення ПЛР в реальному часі, окрім праймерів та зразка ДНК. До неї входять Taq ДНК-полімераза, 2× буфер для проведення

ПЛР, dATP, dCTP, dGTP і dTTP, по 0,4 мМ кожний, 4 мМ $MgCl_2$ та флуоресцентний барвник SYBR Green I для вимірювання ампліфікації ДНК після кожного циклу ПЛР.

6б. Обережно перемішати та осадити краплини на дно пробірки.

7б. Перенести пробірки у термоциклер та задати необхідний режим ампліфікації:

I етап – Початкова денатурація - 95 ºС – 1 хв;
II етап (40-45 циклів) –

- Денатурація - 95ºС – 15 с,
- Відпал праймерів та елонгація - 60ºС – 30 с;

III етап – Побудова кривої плавлення – 60-95ºС – 5-15 хв.

ПРИМІТКА. При програмуванні режиму ампліфікації також задати систему детекції ампліфікації ДНК в реальному часі (неспецифічна, за допомогою флуоресцентного барвника SYBR Green I), а також метод кількісної оцінки рівня експресії (порівняльний метод).

8б. По завершені ПЛР проаналізувати отримані результати та зробити висновок про рівень експресії гена, який аналізували.

Лабораторна робота №11

Підбір праймерів для проведення сайт-спрямованого мутагенезу із використанням ПЛР

Мета роботи: проаналізувати можливі зміни у третинній структурі білка при заміні чи вилученні певної амінокислоти та провести підбір праймерів для внесення цих змін у послідовність гена за допомогою сайт-спрямованого мутагенезу із використанням ПЛР.

Хід роботи

1. Знайти у базі даних NCBI нуклеотидну послідовність мРНК (кДНК) певного білка (наприклад, tumor protein p53 людини) у форматі FASTA. Для цього на стартовій сторінці NCBI обрати категорію «Gene» та ввести у поле пошуку

назву гена або білка та організму англійською мовою. Перейти за отриманим посиланням, що відповідає шуканому гену. В категорії «mRNA and Protein(s)» обрати посилання, що відповідає мРНК (кДНК) даного гена та перейти за цим посиланням. На сторінці, що відкриється знайти послідовність мРНК (кДНК) у форматі FASTA та скопіювати її.

2. Провести пошук відкритих рамок зчитування (ORF, від англ. Open Reading Frame) в межах даної послідовності за допомогою онлайн-інструменту ORFfinder бази NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/). У відповідне поле вставити скопійовану нуклеотидну послідовність мРНК (кДНК), обрати мінімальну довжину відкритої рамки зчитування 75 п.н., стандартний генетичний код та стартовий кодон лише ATG. Натиснути кнопку «Submit».

3. Обрати рамку зчитування, що найбільш ймовірно відповідає мРНК (кДНК) білка, який аналізується (зазвичай це найбільша за розміром відкрита рамка зчитування). Скопіювати амінокислотну послідовність білка, що кодується даною рамкою зчитування, у форматі FASTA (наведено в окремому вікні на сторінці результату пошуку відкритих рамок зчитування).

4. Перевірити у базі даних Uniprot (https://www.uniprot.org/), що це дійсно білок, який був обраний для аналізу. Для цього на стартовій сторінці бази Uniprot обрати опцію BLAST, вставити у відповідне поле скопійовану амінокислотну послідовність та натиснути кнопку «Run BLAST». Дочекатися результатів пошуку. За умови, що знайдена амінокислотна послідовність дійсно відповідає обраному білку, результат покаже 100% співпадіння з наявною у базі даних амінокислотною послідовністю цього білка. Якщо такого співпадіння немає, повернутися до п.2 і обрати наступну за розміром відкриту рамку зчитування та виконати з нею п.3 та п.4. Повторювати поки не буде знайдено правильну рамку зчитування.

5. Побудувати модель третинної структури білка на основі знайденої амінокислотної послідовності за допомогою онлайн-інструменту SWISS-MODEL від веб-серверу Expasy (https://swissmodel.expasy.org/interactive). Вставити у відповідне поле скопійовану амінокислотну послідовність та натиснути кнопку «Build Model».

6. У отриманій моделі обрати певний елемент вторинної структури (наприклад β-складка та якусь одну амінокислоту, що задіяна у його формуванні (наприклад, Val216).

7. Проаналізувати за допомогою генетичного коду, на які амінокислоти її було б найлегше замінити (потрібно внести найменшу кількість замін у нуклеотидну послідовність гена, що її кодує). Обрати декілька амінокислот для заміни (наприклад, Leu, Phe, Arg, Asp, Glu).

8. В межах амінокислотної послідовності послідовності, знайденої у п.3, замінити обрану амінокислоту Val216 на інші амінокислоти: Leu, Phe, Arg, Asp, Glu, або взагалі видалити її.

9. Використати отримані модифіковані амінокислотні послідовності для побудови моделей білка, як описано в п.5. Проаналізувати, яка модифікація призвела до найбільш суттєвих змін в обраному елементі вторинної структури.

10. Повернутися до сторінки з результатами, отриманими у пункті 2. Скопіювати нуклеотидну послідовність відкритої рамки зчитування, що кодує обраний білок.

11. Провести підбір праймерів для проведення сайт-спрямованого мутагенезу із використанням ПЛР з метою внесення відповідних мутацій у ген, який кодує обраний білок, що призведуть до заміни амінокислоти на іншу чи видалення її. Для цього скористатися онлайн-інструментом PrimerX від веб-ресурсу Bioinformatics.org (https://www.bioinformatics.org/primerx/index.htm). Обрати опцію «Protein-based primer design». Вставити скопійовану нуклеотидну послідовність (з п.10) у відповідне поле та натиснути кнопку «Translate».

12. У вікні, що відкрилося, ввести у відповідне поле бажану мутацію згідно наведеного там формату запису та натиснути кнопку «Next». У наступному вікні задати оптимальні параметри для праймерів, зокрема мінімальна та максимальна температура плавлення, GC вміст, довжина, розташування сайту мутації в межах праймера тощо. Натиснути кнопку «Generate primers» та ознайомитися з отриманими результатами. Обрати пару праймерів з найбільш оптимальними параметрами для внесення необхідної мутації за допомогою сайт-спрямованого мутагенезу із використанням ПЛР. Послідовно підібрати праймери для всіх амінокислотних замін чи видалення відповідної амінокислоти, зазначених у п.8.

13. Зробити загальний звіт, у якому представити результати, отримані у п. 9 та у п.12.

РОЗДІЛ 6. КЛОНУВАННЯ ДНК

Клонування ДНК – процес ампліфікації деякого фрагменту ДНК у живих клітинах (частіше бактеріальних). До появи ПЛР клонування було єдиним засобом ампліфікації. Але клонування широко застосовується і досі як зручний засіб збереження необхідних ділянок ДНК, як додатковий метод ампліфікації у комбінації з ПЛР, як необхідний етап приготування фрагментів ДНК для генетичної модифікації організмів. Крім того, якщо клонований фрагмент ДНК являє собою деякий ген, то його можна змусити експресуватись у клітинах з метою отримання бажаного білка у великих кількостях. Оскільки фрагмент ДНК, що клонується, може бути змінений у будь-який спосіб (об'єднаний з іншими фрагментами, позбавлений певної ділянки, містити зміни у своїй нуклеотидній послідовності), це дає змогу конструювати білки із новими властивостями – здійснювати білкову інженерію.

Клонування ДНК за допомогою плазмідних векторів. Для того, щоб провести клонування, цільовий фрагмент ДНК (його часто отримують за допомогою ПЛР) вбудовують у *вектор* – достатньо велику молекулу ДНК, яка слугує "носієм" для даної ділянки певної нуклеотидної послідовності. Необхідність використання вектора обумовлена тим, що при звичайному введенні лінійної молекули ДНК у клітини, вона піддається дії нуклеаз, які зумовлюють її деградацію. Для того, щоб захистити введену в клітину ДНК від руйнування вона повинна стати складовою частиною генетичного апарату клітини: або вбудуватися в її геном, або бути здатною до автономної реплікації. У якості вектора для клонування найчастіше використовують бактеріальні плазміди – циркулярні молекули ДНК, що здатні автономно (незалежно від основної геномної ДНК) реплікуватися у бактеріальній клітині. Плазміди, які будуть використовуватися у якості векторів, повинні відповідати наступним основним вимогам: мати у своєму складі ориджин (ділянку старту) реплікації, один сайт, що впізнається певною рестриктазою (а краще – ділянку із певним набором рестриктних сайтів для різних рестриктаз – так званий *полілінкер*), та одного чи кількох селективних маркерних генів, наприклад генів стійкості до певних антибіотиків, за допомогою яких потім буде відбуватися селекція тих бактерій, в яких наявний даний плазмідний вектор.

Перший етап клонування – створення рекомбінантного вектора. Найпростіший варіант створення рекомбінантної молекули включає наступну

послідовність реакцій (рис. 6.1): (1) отримання цільового фрагменту ДНК за допомогою певної рестриктази в результаті чого він має *липкі кінці* – взаємно комплементарні 5'-кінцеві (іноді 3'-кінцеві) одноланцюгові вирости; (2) обробка очищеної плазміди, яка містить єдиний сайт рестрикції цієї ж рестриктази, рестриктазою з метою отримання лінійного вектора з липкими кінцями; (3) об’єднання двох препаратів ДНК, в результаті чого відбувається гібридизація комплементарних липких кінців із їх подальшим зашиванням за допомогою лігази.

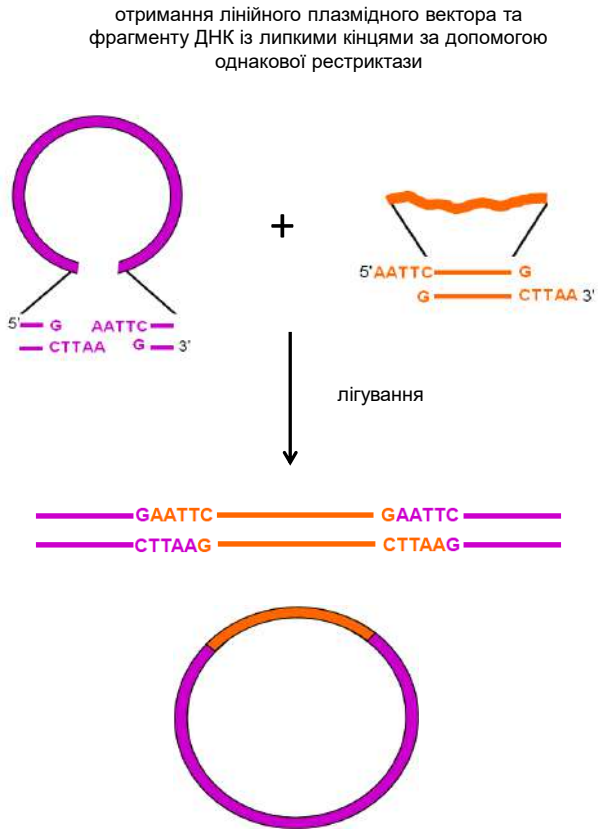

Рис.6.1. Створення рекомбінантноговектора на основі плазміди.

В результаті утворюється рекомбінантна молекула – плазміда із вбудованим у неї цільовим фрагментом. Насправді після обробки лігазою буде утворюватись два типи продуктів: рекомбінантна плазміда і просто вихідна плазміда, зашита лігазою (без вбудованого фрагменту). Щоб виключити другу можливість, розрізану плазміду після рестрикції (перед додаванням фрагменту) іноді обробляють фосфатазою, яка відщеплює 5'-кінцеві фосфатні залишки. Тоді лігаза не буде здатна відновити цілісність плазміди, а тільки створить два фосфодіефірні зв'язки, використавши 5'-кінцеві фосфати фрагменту ДНК і 3'-кінцеві ОН-групи плазмідної ДНК. Два одноланцюгові розрізи на стиках між

фрагментом і плазмідною ДНК залишаться, але вони будуть розташовані у різних ланцюгах і на досить великій відстані один від одного – така конструкція буде достатньо стабільною, а після її введення у клітину одноланцюгові розрізи будуть заліковані внутрішньоклітинними системами репарації ДНК.

У випадку, коли дві молекули ДНК, з яких потрібно створити рекомбінантну молекулу, були отримані за допомогою різних рестриктаз, а отже вони не мають взаємно комплементарних липких кінців, можуть бути застосовані дещо складніші схеми. Однією із них є наступна: фрагмент ДНК та розрізану плазміду з будь-якими одноланцюговими виростами на кінцях перетворюють у молекули із тупими кінцями (без виступів), застосувавши спеціальні ферменти нуклеазу S1, яка видаляє одноланцюгові вирости, або фрагмента Кленова ДНК-полімерази I, який, навпаки, їх добудовує. Зшивання таких фрагментів здійснює лігаза, проте ефективність реакції є дуже низькою. Отже, в такому випадку застосовують нуклеотидилтрансферазу – фермент, який здатний шляхом безматричнго синтезу проводити полімеризацію нуклеотидів: у присутності dATP вона створює одноланцюгові олігоА-вирости на 3'-кінцях фрагменту, а у присутності dTTP – олігоТ-вирости на кінцях лінійної плазміди (рис. 6.2).

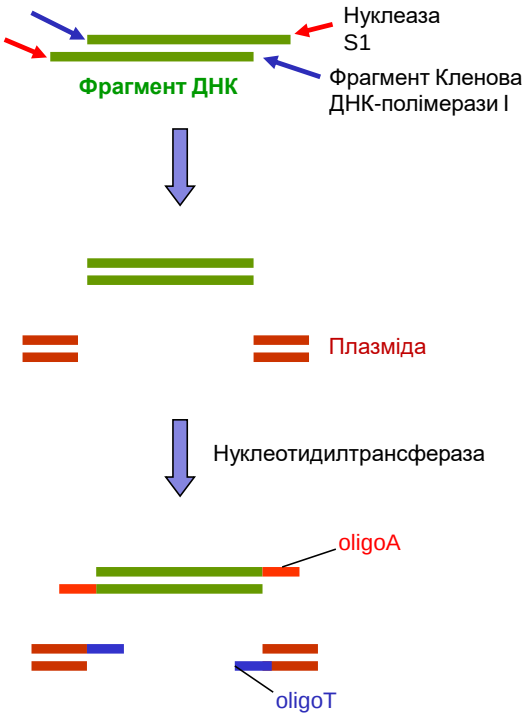

Рис. 6.2. Вбудовування у плазміду фрагмента ДНК із тупими кінцями (пояснення у тексті).

Якщо фрагмент, що буде клонований, отримано шляхом його ампліфікації методом ПЛР, зручним прийомом є використання спеціальних праймерів – таких, що мають на своїх кінцях вирости, які співпадають з деякими рестриктними сайтами (рис. 6.3).

Ще одним дуже зручним сучасним методом створення рекомбінантної плазміди є так зване топо-клонування. Процедура здійснюється за допомогою ДНК-топоізомерази I вірусу вакцинії. Топоізомерази I – ферменти, які роблять тичмасовий одноланцюговий розріз в ДНК, ковалентно пришиваючи кінцевий фосфат до залишку тирозину у своєму активному центрі. Після цього зв'язок з тирозином замінюється на фосфодіефірний зв'язок у складі ДНК – цілісність ланцюга відновлюється. Серед топоізомераз I є ферменти, не специфічні до нуклеотидної послідовності, а є такі, що впізнають лише певні специфічні сайти. Один з ферментів другого типу – топоізомераза I вірусу вакцинії (вставка на рис. 6.4).

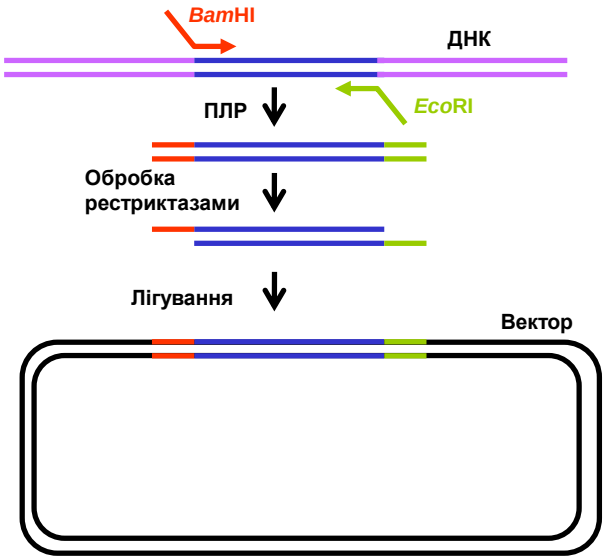

Рис. 6.3. Створення рекомбінантної плазміди з використанням ампліфікованого фрагменту ДНК: праймери містять на кінцях послідовності, що відповідають двом рестриктним сайтам; після ампліфікації і обробки відповідними рестриктазами на кінцях фрагменту утворюються липкі кінці; до фрагменту додається плазміда, з якої тими самими рестриктазами вирізано ділянку; замість неї у плазміду вбудовується лігазою ампліфікований фрагмент.

У якості комерційних продуктів є доступними так звані активовані вектори – лінійні плазміди, кінцеві ділянки яких співпадають із сайтом

топоізомерази I вірусу вакцинії, із приєднаними до кінців двома молекулами топоізомерази I (рис. 6.4, а). Практично, топоізомерази є "заарештованими" на проміжному етапі реакції, яку вони каталізують, – залишки Tyr їхніх активних центрів ковалентно приєднані до фосфатів на кінцях ДНК. До такого вектору додають ампліфікований продукт ДНК – топоізомерази завершують свою роботу, створюючи фосфодіефірні зв'язки між фрагментом та кінцевими фосфатами у складі вектору. З метою підвищення ефективності – полегшення взаємодії між кінцями фрагменту і вектору – використовують активований вектор із однонуклеотидними одноланцюговими Т-виростами, а до 3'-кінців ампліфікованого фрагменту додають аденінові нуклеотиди (використовуючи відповідну активність Taq-полімерази) – така процедура має назву топо(ТА)-клонування (рис. 4, б).

Другий етап клонування – введення в бактеріальні клітини отриманих рекомбінантних плазмід (так звана трансформація бактерій). Для створення умов трансформації необхідно підвищити проникність клітинної стінки бактерій. Зазвичай це здійснюється або завдяки інкубації бактерій у розчині $CaCl_2$, або шляхом електропорації (за допомогою електричного струму). Типова процедура підвищення проникності (створення так званої компетентності бактеріальної культури) за допомогою $CaCl_2$ включає в себе інкубацію бактерій у 0,1 М $CaCl_2$ на крижаній бані, додавання рекомбінантних плазмід, нагрівання до 42°С (тепловий шок сприяє підвищенню проникності), швидке охолодження на льоду. Потім клітини висівають у чашки Петрі із твердим поживним середовищем, що містить антибіотик, ген стійкості до якого мала плазміда. Після певного часу культивування у чашці Петрі з’являються колоній бактерій, кожна з яких походить від однієї клітини – є її клоном.

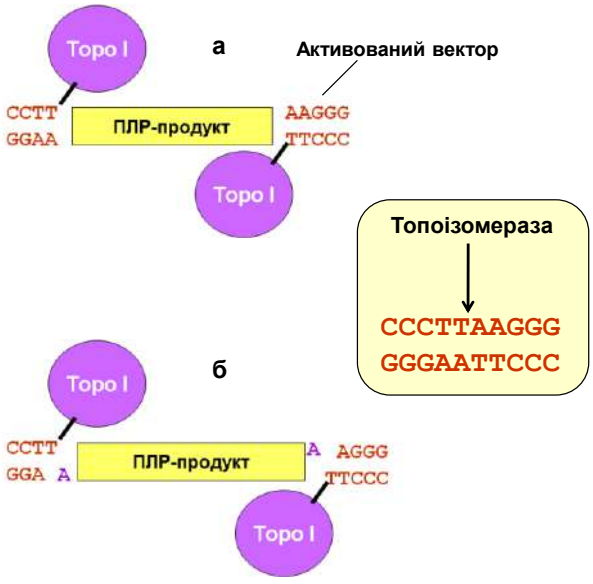

Рис. 6.4. Схема створення рекомбінантної плазміди при клонуванні за допомогою топоізомерази I (Topo I) у двох варіантах: топо-клонування (а) і топо(ТА)-клонування (б). Активований вектор – лінеаризована плазміда із ковалентно приєднаними до її кінців молекулами сайт-специфічної топоізомерази I вірусу вакцинії. На вставці – сайт впізнання для цієї топоізомерази.

Третій етап – відбір клонів. При трансформації не всі бактерії отримують плазміду, насправді ефективність цього процесу не дуже висока: приблизно одна клітина із тисячі буде нести плазміду. Відповідно, треба відібрати тільки трансформовані клітини і при цьому тільки ті, що трансформовані саме рекомбінантною плазмідою. Такий відбір здійснюється за допомогою селективних маркерів.

Прикладом (який демонструє загальний принцип, але має сьогодні скоріше історичне значення) слугує процес клонування за допомогою плазміди pBR322 (рис. 6.5). Плазміда у якості селективних маркерів містить гени стійкості до двох антибіотиків – ампіциліну і тетрацикліну. Коли фрагмент ДНК вбудовується в один з рестриктиних сайтів у межах другого гена, експресія цього гена порушується. Відбір здійснюють у два кроки: на першому відбирають усі трансформовані клони завдяки тому, що на середовищі з ампіциліном нетрансформовані клітини просто не виживають. На другому кроці роблять репліку з першої чашки Петрі і пересівають бактеріальні колонії на середовище з тетрацикліном – виживають тільки клітини, в які потрапила вихідна нерекомбінантна плазміда. У такий спосіб можна легко визначити колонії, трансформовані рекомбінантною плазмідою, на першій чашці і культивувати їх далі.

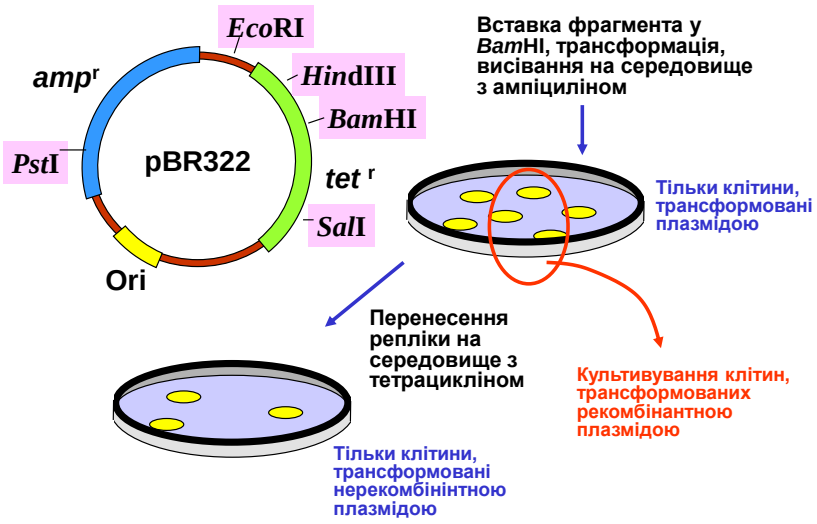

Рис. 6.5. Відбір колоній, трансформованих рекомбінантною плазмідою pBR322. Позначено унікальні рестрикті сайти. amp^r і tet^r – гени стійкості до ампіциліну і тетрацикліну відповідно, Ori – ориджин реплікації.

Найбільш поширеними плазмідними векторами сьогодні є штучні плазміди – похідні від плазміди pUC19 (pBluescript, pGEM). Це невеликі (~2,7 тис. пар основ) мультикопійні плазміди, що містять ген стійкості до антибіотику, ориджин та полілінкер, вбудований у ген *lacZ'* (рис. 6.6). При клонуванні за допомогою таких плазмід відбір клонів здійснюється за один крок. Ген *lacZ'* являє собою фрагмент бактеріального гена β-галактозидази – одного з генів лактозного оперона *E. coli*. Як і цей оперон, *lacZ'* контролюється *lac*-репресором – продуктом гена *lacI*, який також входить до складу плазміди. У присутності синтетичного індуктора IPTG репресор втрачає зв'язок з промотором і транскрипція стає можливою. Для клонування використовують бактеріальний штам, дефектний по фрагменту *lacZ'* – штам продукує неактивну β-галактозидазу. Продукт гена *lacZ'* взаємодіє в клітині з продуктом дефектного бактеріального гена, у результаті чого утворюється активна β-галактозидаза. Полілінкер у складі *lacZ'* сам по собі не впливає на експресію цього гена. Але якщо фрагмент ДНК вбудовується у полілінкер, це порушує експресію гена *lacZ'*: активність β-галактозидази буде спостерігатись у випадку трансформації клітини нерекомбінантною плазмідою, для рекомбінантної така активність буде неможливою. При відборі клонів бактерії висівають після трансформації на середовище з ампіциліном (виживають тільки трансформовані клітини) і синтетичним субстратом β-галактозидази, який під дією цього ферменту перетворюється на сполуку синього кольору. Отже, колонії білого кольору будуть містити рекомбінантну плазміду (рис. 6.6).

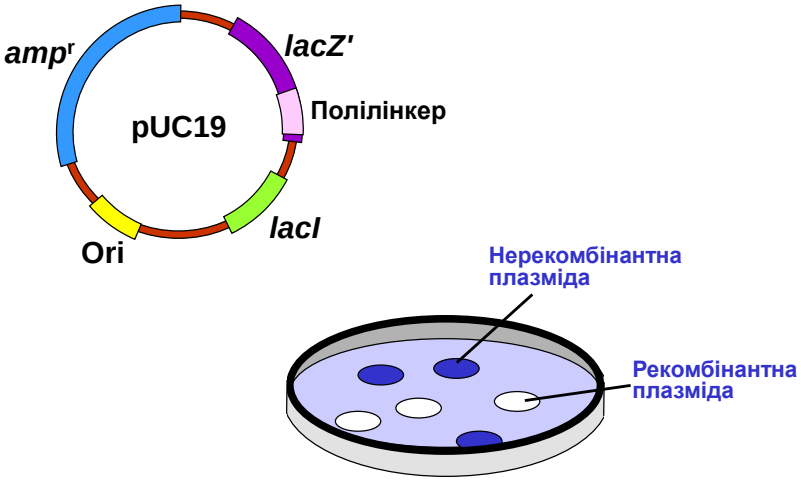

Рис. 6.6. Відбір колоній, трансформованих рекомбінантною плазмідою pUC19. *amp*^{r} – ген стійкості до ампіциліну, Ori – ориджин реплікації, *lacZ*' – фрагмент гена β-галактозидази, *lacI*– ген репресора лактозного оперона, полілінкер містить набір унікальних рестриктних сайтів і сам по собі не заважає експресії повноцінного продукту *lacZ*'. Фрагмент ДНК вбудовують у полілінкер, трансформують бактеріальні клітини і висівають їх на середовище з ампіциліном, IPTG та синтетичним субстратом β-галактозидази.

Колонії, трансформовані плазмідою, можна зберігати і підтримувати у культурі довгий час. За необхідності клоновані плазміди виділяють із бактеріальної культури та за допомогою тієї самої рестриктази (рестриктаз), що була використана (використані) при лінеаризації плазміди перед лігуванням вирізають клонований фрагмент ДНК.

Як зазначалося вище, плазмідні вектори є найбільш часто вживаними для клонування фрагментів ДНК. Проте, їх основне обмеження – максимальний розмір фрагменту, який можна вбудувати у достатньо невелику за розміром плазміду (зазвичай, до 10 тис. пар нуклеотидів). Для роботи із фрагментами ДНК більшого розміру використовують вектори на основі бактеріофага λ, що дозволяє збільшити розмір вставки до ~20 kb. Фагова частинка містить лінійну ДНК розміром біля 50 kb з липкими кінцями – так званими *cos*-сайтами. Після проникнення ДНК у бактеріальну клітину ці сайти використовуються бактеріальною лігазою для циркуляризації ДНК бактеріофага. Всередині фагової ДНК міститься ділянка довжиною ~20 kb (обмежена сайтами рестриктази *Bam*HI), на якій розташовані гени, що від них залежить інтеграція ДНК фага у бактеріальний геном (при здійсненні так званої лізогенії – існуванні інтегрованого фагового геному у стані спокою). На кінцях фагової ДНК розміщені гени, від яких залежить лізис бактеріальної клітини, реплікація фагової ДНК і синтез білків оболонки фагових частинок (рис. 6.7).

На першому етапі процедури клонування виділяють фагову ДНК і її центральну ділянку вирізають рестриктазою *Bam*HI. Додають лігазу і бажаний фрагмент ДНК довжиною ~20 kb – важливо, щоб у результаті було отримано молекулу ДНК довжиною ~50 kb, оскільки тільки такі молекули здатні упакуватись у фагові частинки. Використовуючи ДНК, отриману після лігування, і білки оболонки бактеріофага, здійснюють реконструкцію фагових частинок *in vitro*. Усі продукти лігування, розмір яких не відповідає ~50 kb, не потрапляють всередину частинок: утворюються тільки частинки, що містять вихідну фагову ДНК (яка, звісно, також присутня у продуктах лігування) і

рекомбінантну. Фаговими частинками заражають бактеріальну культуру на поверхні чашки Петрі. Тільки рекомбінантні фаги (ДНК яких не містить генів інтеграції) реалізують шлях лізису – на поверхні культури утворюються бляшки, що містять лізовані бактеріальні клітини і велику кількість рекомбінантних фагових частинок. Далі залишається підтримувати клони, пересіваючи ці бляшки.

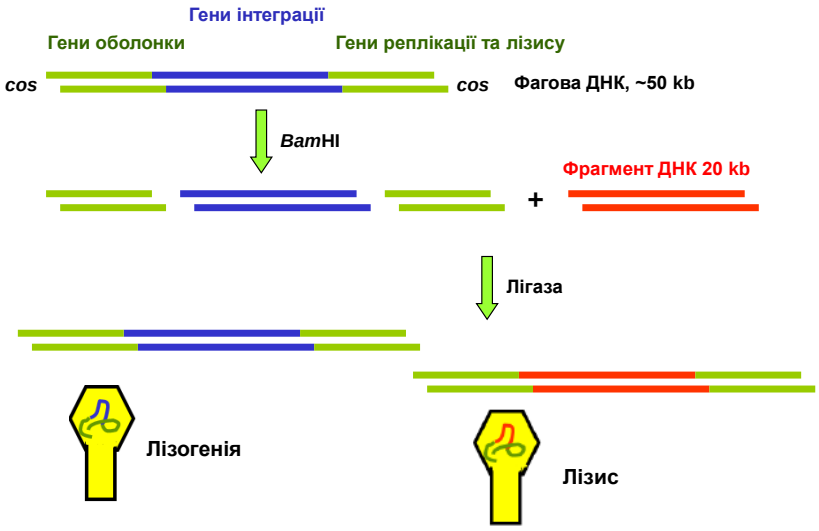

Рис. 6.7. Схема клонування ДНК за допомогою бактеріофага λ.

Крім плазмід та бактеріофага λ основою для створення векторів є так звані *космiди* – плазміди, що містять вставку двох *cos*-сайтів ДНК бактеріофага λ (і це єдиний елемент фагової ДНК у її складі), розділені рестриктним сайтом *Sca*I (рис. 6.8). Лінійна космiда, отримана за допомогою рестриктази *Sca*I, розрізається однією з рестриктаз, наприклад *Bam*HI, і туди вбудовується фрагмент ДНК, який бажано клонувати. Отримана рекомбінантна космiда, розмір якої становить ~50 kb упаковується у фагові частинки, якими заражають бактеріальну культуру. В клітинах бактерій відбувається циклізація лінійної космiди і її розмноження. Основною перевагою космід у порівнянні із попередніми описаними векторами є можливість клонувати фрагменти розміром 40 kb

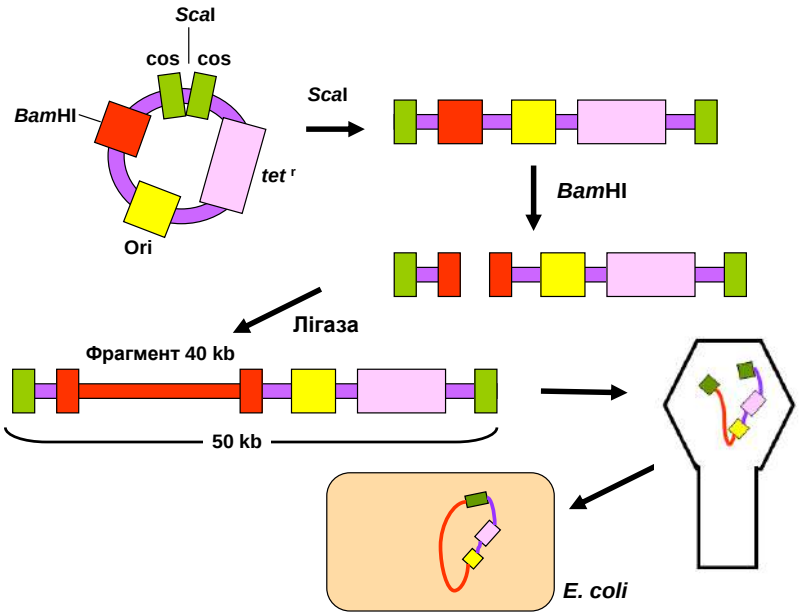

Рис. 6.8. Схема клонування ДНК за допомогою космід. Ori – оріджин реплікації, tet^r– ген стійкості до антибіотику тетрацикліну.

Лабораторна робота №12

Клонування певного еукаріотичного гена із використанням плазмідного вектора

Мета роботи: провести клонування еукаріотичного гена із застосуванням плазмідного вектора.

Хід роботи

1. Ампліфікувати ген інтересу за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (див. лабораторну роботу №9). При дизайні праймерів для ПЛР включити на 5'-кінцях кожного праймера послідовність, що відповідає сайту рестрикції для рестриктази, яка буде використовуватися при клонуванні гена.

2. Відібрати аліквоту 5 мкл суміші після ПЛР та провести електрофорез у 1,5%-му агарозному гелі для перевірки успішності ампліфікації (див. лабораторну роботу №5). За умови успішної ампліфікації на електрофореграмі має бути наявна лише 1 смуга правильного розміру. Оцінити кількість ампліфікованого продукту за допомогою спектрофотометрії (див. лабораторну роботу №4).

3. Провести рестрикцію фрагменту для клонування за допомогою обраного типу рестриктази. Для цього змішати наступні компоненти:

- 1 мкг амліфікованого фрагменту;
- 10 одиниць (U) обраної рестриктази;
- 5 мкл 10× буферного розчину для рестриктази;
- вода, вільна від нуклеаз до загального об'єму 50 мкл.

Інкубувати 1 годину при 37°C.

4. Провести рестрикцію плазмідного вектора для клонування. Для цього змішати наступні компоненти:

- 500 нг плазмідного вектора;
- 10 одиниць (U) обраної рестриктази;
- 5 мкл 10× буферного розчину для рестриктази;
- вода, вільна від нуклеаз до загального об'єму 50 мкл.

Інкубувати 1 годину при 37°C.

5. Провести очищення рестрикційних сумішей за допомогою електрофорезу. Для цього розділити отриману ПЛР-суміш на 1%-му агарозному гелі в TBE буфері. Візуалізувати гель на трансілюмінаторі за довжини хвилі 365 нм для мінімізації пошкодження ДНК короткими хвилями (див. лабораторну роботу №5). Вирізати ділянку гелю, що містить потрібний фрагмент ДНК. Виділити ДНК з агарози за допомогою набору для очистки з гелю. Оцінити кількість ДНК за допомогою спектрофотометрії (див. лабораторну роботу №4).

6. Провести лігування вектора та гена інтересу. Змішати розрізаний вектор з фрагментом для вбудовування у співвідношенні 1:3 (наприклад, змішати 0,02 пмоль вектора та 0,06 пмоль фрагменту для вбудовування). Додати 1 мкл T4 ДНК-лігази, 2 мкл буферного розчину для лігування та води, вільної від нуклеаз, до загального об'єму 20 мкл.

7. Інкубувати 1-2 години при кімнатній температурі або протягом ночі при температурі 16°C.

8. Трансформувати компетентні клітини *E.coli* сумішшю після лігування за допомогою теплового шоку. Змішати 50 мкл компетентних клітин з 5 мкл ДНК після лігування. Інкубувати 30 хвилин на льоду для осідання ДНК на поверхні клітин.

9. Провести тепловий шок клітин при температурі 42°C протягом рівно 30 секунд, після чого помістити пробірку з клітинами на лід та інкубувати протягом 5 хвилин.

10. Змішати суспензію клітин з 950 мкл середовища SOC (від англ. Super Optimal broth with Catabolite repression; склад: 2% триптон; 0,5% дріжджовий екстракт; 10 мМ NaCl; 2,5 мМ KCl; 10 мМ $MgCl_2$; 10 мМ $MgSO_4$; 20 мМ глюкози). Інкубувати 30 хвилин при температурі 37°C, постійно помішуючи.

11. Висіяти 50 мкл суспензії клітин на чашку з агаром, що містить необхідний антибіотик (до якого наявний ген стійкості у плазмідному векторі.

12. Оцінити наступного дня ефективність трансформації: підрахувати кількість колоній, що виросли на середовищі.

РОЗДІЛ 7. МЕТОДИ АНАЛІЗУ ДНК-БІЛКОВИХ ВЗАЄМОДІЙ

ДНК-білкові взаємодії відіграють важливу роль не лише у компактизації та просторовій організації ДНК у ядрах еукаріотичних клітин, але і залучені до здійснення та регуляції основних клітинних процесів: транскрипції, реплікації, репарації та рекомбінації ДНК, контролю та прогресії клітинного циклу тощо. Для дослідження таких взаємодій розроблена велика кількість різноманітних підходів, огляду яких буде присвячений даний розділ.

Серед основних методів аналізу взаємодії білків та ДНК виділяють наступні: аналіз зсуву електрофоретичної рухливості (gel shift assay), який був розглянутий у розділі 3, футпринтинг ДНК (DNA footprinting), імунопреципітація хроматину (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP) та технологія "ідентифікації за допомогою ДНК-аденінметилтрансферази" (DNA adenine methyltransferase identification, DamID). Кожен із цих методів має свої переваги та недоліки, відрізняється чутливістю щодо детекції взаємодій, проте всі вони є широковживаними у сучасних молекулярно-біологічних дослідженнях.

Футпринтинг ДНК – один із найбільш давніх методів дослідження ДНК-білкових взаємодій, розроблений ще у 1978 році, який дозволяє ідентифікувати фрагмент ДНК, що здатний взаємодіяти із досліджуваним білком. Протокол методу включає наступні кроки: (1) отримання мічених цільових фрагментів певних послідовностей ДНК, щодо яких є відомості про взаємодію із досліджуваним білком; (2) додавання до отриманих фрагментів досліджуваного білка (дослідний варіант) за обов'язкової умови наявності контрольного експерименту – фрагментів ДНК без білка; (3) внесення невеликої кількості випадкових одноланцюгових розрізів тим чи іншим агентом; (4) розділення утворених після подрібнення одноланцюгових фрагментів у поліакриламідному гелі; (5) аналіз отриманих результатів. Загалом, суть методу полягає у тому, що ті ділянки ДНК, які утворили комплекс із досліджуваним білком, будуть захищені від дії агентів, що спричинюють розриви ДНК. В такому випадку, у контрольному експерименті на електрофореграмі буде спостерігатися характерна «драбинка», утворена фрагментами різної довжини, у той час як у досліді буде наявний певний проміжок (gap) у тій зоні, де білок взаємодіяв із ДНК – так звана «зона

футпринту» (рис. 7.1) Відстань від міченого кінця до країв цієї зони відображає сайт зв’язування досліджуваного білка.

Розглянемо більш детально кожний із зазначених вище етапів методу футпринтингу ДНК. Для дослідження ДНК-білкових взаємодій у даному методі використовуються достатньо довгі фрагменти ДНК: від 50 до 400 пар нуклеотидів, які ампліфікують за допомогою ПЛР чи клонують у плазмідних векторах. Отримані послідовності специфічно мітять на 5'-кінці одного ланцюга або за рахунок додавання радіоактивно міченого нуклеотиду, до складу якого включений ізотоп фосфору ^{32}P, або, рідше, за рахунок ковалентного приєднання флуоресцентної мітки. Радіоактивне мічення, хоча і є дещо небезпечним для дослідника, має дуже високу чутливість щодо виявлення ДНК у невеликих концентраціях, на відміну від використання флуоресцентноой мітки. Після введення мітки за допомогою різних підходів мічені фрагменти ДНК очищують від немічених і додають до них досліджуваний білок (як було зазначено вище, обов’язково створюють контрольний зразок, в якому відсутній білок, а є лише мічені фрагменти ДНК). Тут слід зазначити, що для методу футпринтингу ДНК необхідно використовувати добре очищений препарат білка і забезпечити оптимальні умови для його зв’язування із своїм сайтом на ДНК.

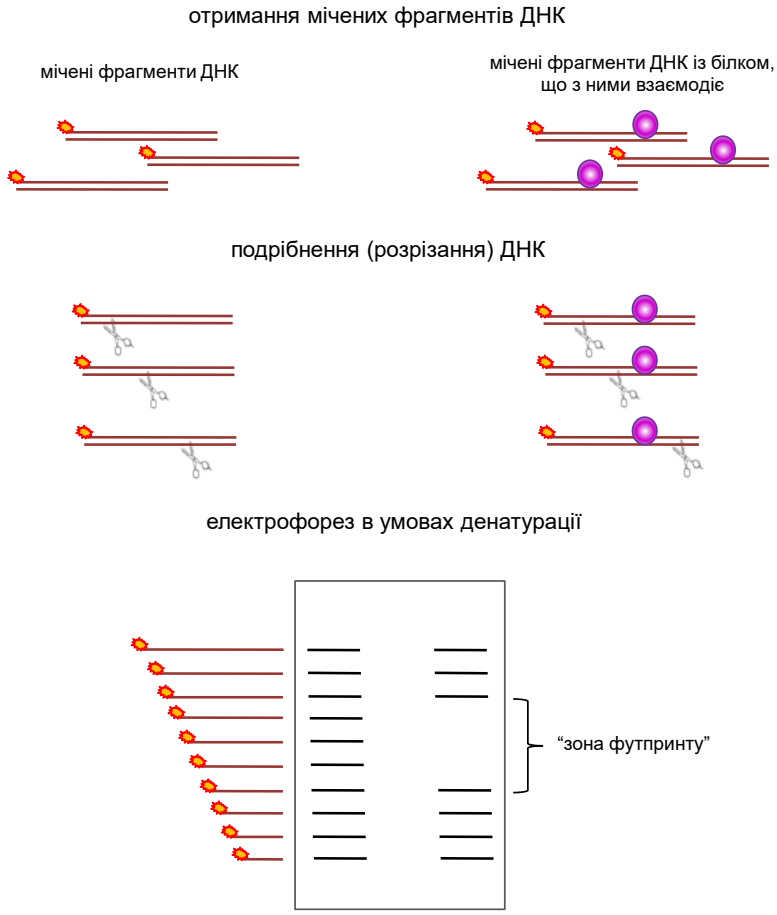

Рис. 7.1. Загальна схема футпринтингу ДНК.

На етапі розрізання молекул ДНК використовують агенти, які здатні незалежно від послідовності вносити одноланцюгові розрізи: це забезпечує розрізання фрагментів на шматки різної довжини за рахунок рівноімовірного упізнання будь-якого нуклеотидного контексту. У методі футпринтингу для фрагментації ДНК можна використовувати ДНКазу I – відносно неспецифічну щодо послідовності ендонуклеазу. Проте, цей фермент має ряд недоліків, які не завжди задовольняють вимогам методу ДНК-футпринтингу: по-перше, достатньо великий розмір ДНКази I не дозволяє їй обирати сайт розрізу ДНК поблизу білка, який зв'язався із даною послідовністю, через стеричні перешкоди, а, по-друге, для неї існують певні часткові преференції у послідовності нуклеотидів для упізнання та розрізання. Тому найбільш вживаним методом фрагментації ДНК є використання гідроксильних радикалів, які генеруються під час реакції Фентона між йонами заліза та перекисом водню.

Заключний етап – електрофорез отриманих після подрібнення ДНК фрагментів, який проводиться у поліакриламідному гелі в умовах денатурації. Візуалізація результатів електрофорезу відбувається або за рахунок радіоавтографії (у випадку, якщо фрагменти ДНК мічені радіоактивним ізотопом фосфору), або за допомогою флуорографії (якщо була внесена флуоресцентна мітка). Отже, на електрофореграмі будуть видимі лише ті фрагменти, на 5'-кінцях яких знаходиться мітка. Аналіз «зони футпринту» - проміжку в електрофореграмі, отриманій при електрофорезі фрагментів, утворених при подрібненні ДНК-білкового комплексу, дозволяє встановити ділянку послідовності, з якою взаємодіяв досліджуваний білок.

Метод імунопреципітації хроматину (Chromatin immunoprecipitation, ChIP) – один із широковживаних методів аналізу ДНК-білкових взаємодій, який, у поєднанні із методами секвенування, дозволяє із високою точністю визначати сайти взаємодії різноманітних білків з ДНК у хроматині живих клітин. У загальних рисах принцип підходу полягає у наступному: у клітинах, отриманих для досліду, індукують ковалентні зшивки між ДНК та білками, які з нею взаємодіють. Після чого відбувається лізис клітин (руйнування мембран) та подрібнення хроматину для отримання невеликих фрагментів. Далі, власне, проводиться імуноперципітація: фрагменти ДНК та зв'язаний із ними досліджуваний білок осаджуються за допомогою специфічних до даного білка антитіл. Після імунопреципітації індуковані ДНК-білкові зшивки руйнуються і очищені фрагменти ДНК використовуються для подальшого аналізу з метою

встановлення послідовності нуклеотидів, що є сайтом взаємодії досліджуваного білка (Рис. 7.2).

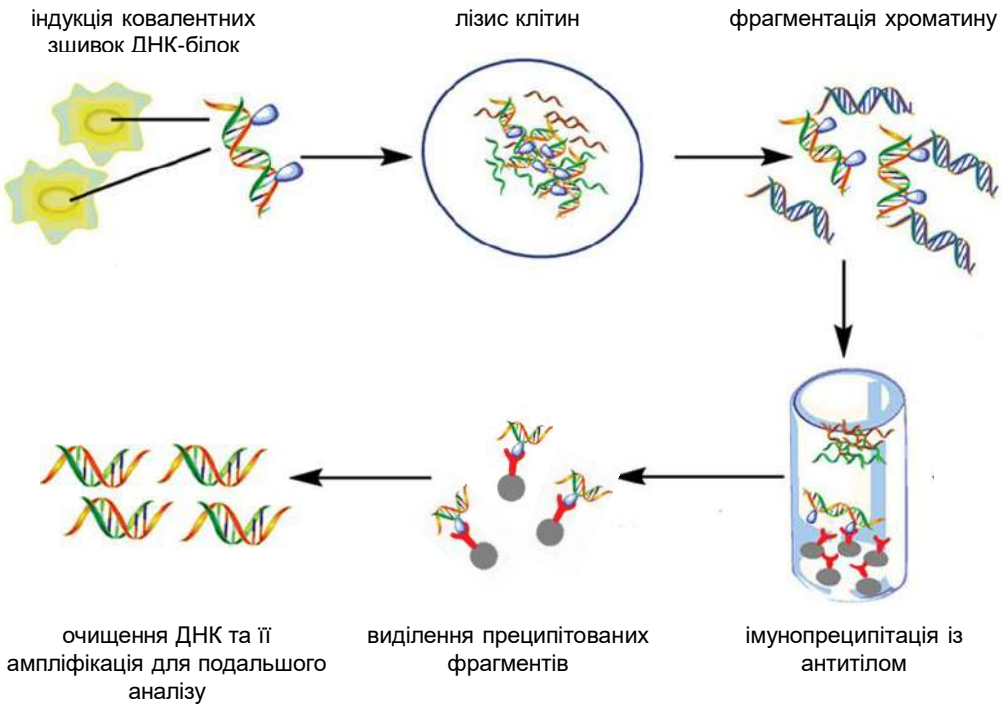

Рис. 7.2. Загальна схема методу імунопреципітації хроматину.

Прийнято виділяти два основних варіанти методу імунопреципітації хроматину – нативний (native, N-ChiP) та імупреципітація на фіксованих зразках (fixed, cross-linked, X-ChIP). Принципова різниця між двома підходами полягає у тому, який матеріал використовується для імунопреципітації. У першому випадку для постановки методу використовують хроматин, отриманий із лізату клітин, в якому попередньо не були індуковані ковалентні зшивки між ДНК та білками; у другому випадку етап індукції зшивок до лізису клітин є необхідною умовою. Незважаючи на те, що більшою популярністю у біологічних дослідженнях користується метод X-ChIP, метод нативної імунопреципітації хроматину теж має свої переваги. Зокрема, ефективність та специфічність взаємодії ДНК-білкового комплексу із відповідним антитілом є вищою у випадку нативної імунопреципітації хроматину, а отже вихід очищених від білка фрагментів ДНК зрештою буде вищий.

Першим етапом методу імунопреципітації хроматину (мова далі буде йти в основному про X-ChIP) є фіксація наявних у клітині ДНК-білкових комплексів за рахунок утворення між ними міцних ковалентних зшивок.

Найчастіше для цього використовують формальдегід, який у серії поступових хімічних реакцій забезпечує приєднання аміногрупи лізину до аміногрупи азотистої основи (рис. 7.3). Цей агент здатний індукувати ковалентні зшивки не лише між білками та нуклеїновими кислотами, але також утворювати білок-білкові зшивки, причому довжина утворених зв'язків коливається в межах 2 ангстрем, а це означає, що індуковані формальдегідом зшивки можуть утворюватися лише між молекулами, що знаходяться в дуже тісному контакті одна з одною. Утворені за допомогою формальдегіду ковалентні зв'язки є оборотними: вони легко руйнуються пролонгованою дією високих температур.

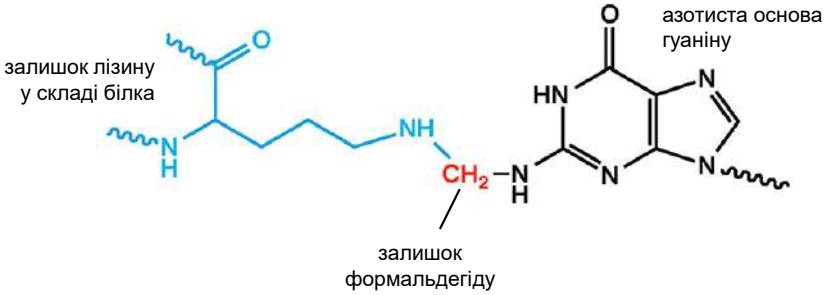

Рис. 7.3. Приклад ковалентного зв'язку між ДНК та білком, індукованого формальдегідом.

Час експонування формальдегідом є вкрай важливим параметром проведення експерименту і зазвичай підбирається емпіричним шляхом. Надмірна витримка клітин у розчині формальдегіду може призвести до часткового руйнування білкової структури та/або до «маскування» лізинових залишків у складі епітопу (антигенна частина молекули) і, як наслідок, до зниження ефективності взаємодії досліджуваного білка із відповідним антитілом у подальшій реакції імунопреципітації. Крім того, існують свідчення того, що «перефіксування» матеріалу у формальдегіді утруднює подальшу фрагментацію хроматину. Крім формальдегіду в деяких експериментах використовуються також інші агенти, здатні до формування ковалентних зшивок: цисплатин, метиленовий синій, ультрафіолет чи лазерне опромінення.

Після індукції зшивок та проведення високосольового лізису клітин проводять фрагментацію хроматину. Для цього використовують два основних підходи. Перший – обробка ультразвуком частотою більше 20 кГц (sonication) – використовується у X-ChIP і в результаті такої обробки отримують фрагменти від 300 до 1000 пар основ. У методі N-ChiP для фрагментації використовують обробку неспецифічними рестриктазами, в основному віддають перевагу

мікрококковій нуклеазі – ферменту, який індукує розриви ДНК на ділянках між нуклеосомами. Отримані фрагменти після обробки такою нуклеазою коливаються від 200 пар основ (1 нуклеосома) до 1000 пар основ (5 нуклеосом). Слід зазначити, що обробка нуклеазами хроматину, в якому були попередньо індуковані зшивки формальдегідом, також застосовується, але іноді може бути малоефективною. Проте, використання для зшивок цисплатину усуває дану проблему.

Етап імунопреципітації – найважливіший у даному методі – проводиться на колонках із використанням антитіл до досліджуваного білка, які зв'язані з певним імуносорбентом (наприклад, A-Sepharose®) або, частіше, спеціальними магнітними кульками. Специфічність та афінність антитіл до конкретного білка попередньо встановлюється експериментально. Більшість робіт вказує на те, що використання поліклональних антитіл, які мають специфічність до різних антигенних частин певного білка, є більш оптимальним, ніж моноклональних: це забезпечує високу імовірність упізнання білкової молекули навіть за умови часткової деструкції частини епітопів при обробці клітин формальдегідом. Слід зазначати, що у методі імунопреципітації хроматину можна підбирати антитіла, специфічні не лише до різних білків хроматину, але і до їх окремих посттрансляційних модифікацій (наприклад, фосфорильованих чи убіквітинованих форм).

Імунопреципітовані фрагменти хроматину піддаються витримці у низькосольовому буфері за високих температур (~65^{0}C) у присутності протеїназ з метою зняття ковалентних зшивок, внесених формальдегідом, та руйнування білків. Очищена від білка ДНК екстрагується у суміші фенол-хлороформ, ампліфікується за допомогою тих чи інших варіантів ПЛР і аналізується. Загалом, аналіз включає в себе встановлення послідовності фрагменту, з яким взаємодіяв досліджуваний білок, та локалізацію цієї послідовності в геномі. Найчастіше ампліфіковані фрагменти аналізують за допомогою методів секвенування нового покоління (метод скорочено називають ChIP-Seq).

Технологія DamID. Даний підхід до аналізу ДНК-білкових взаємодій суттєво відрізняється від описаних вище методів тим, що дозволяє встановлювати такі взаємодії у системі *in vivo* і без попередньої фіксації матеріалу, як це притаманне для методу імунопреципітації хроматину. Для картування у геномах сайтів зв'язування певних білків використовуються як культури клітин, так і окремі тканини чи навіть організми.

Ідея методу, запропонованого у 2000 році Басом ван Стінселом (Bas van Steensel) та Стівеном Хеніковим (Steven Henikoff), базується на тому, що в

геномах еукаріотів, на відміну від прокаріотів, майже повністю відсутнє метилування аденілових залишків: як відомо, метилування у них відбувається по цитозину. Використання специфічної прокаріотичної ДНК-аденін метилтрансферази (Dam), яка приєднана до певного досліджуваного білка хроматину, забезпечить рекрутування цього ферменту до послідовності ДНК, з якою взаємодіє даний білок, і, як наслідок, здійснення метилування аденіну у найближчих сайтах (для Dam – це тетрануклеотид GATC). Обробка отриманої геномної ДНК чутливими до метильованих аденінів рестриктазами із подальшим аналізом отриманих фрагментів дозволить картувати послідовність, з якою взаємодіяв досліджуваний білок в клітині (рис. 7.4). Як і будь-який інший метод, технологія DamID має свої особливості, деталі та «підводні камені», про які зараз і піде мова.

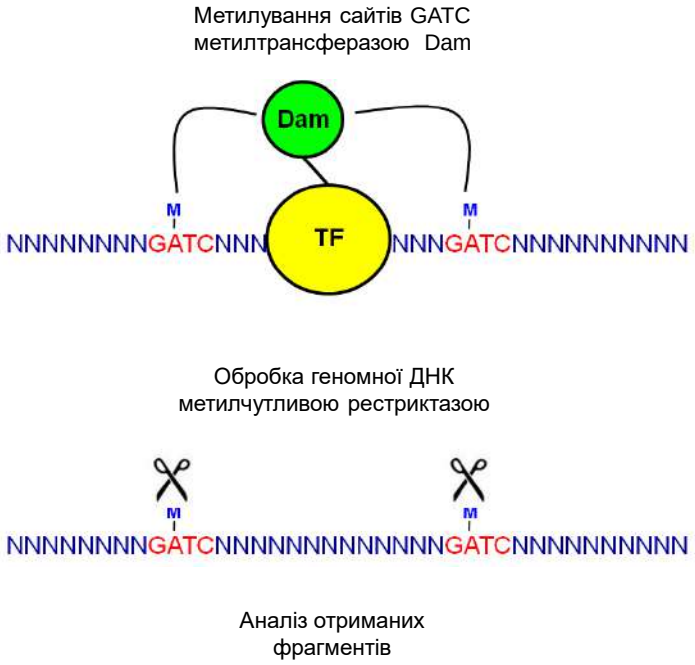

Рис. 7.4. Загальний принцип технології DamID. TF – білок-транскрипційний фактор, що взаємодіє із ДНК; M – метильна група; N - будь-який нуклеотид.

В першу чергу, для реалізації технології DamID необхідно створити химерну генно-інженерну конструкцію, яка містить ген цільового білка та ген метилтрансферази і забезпечити її транзієнтну (тимчасову) експресію в дослідних клітинних лініях. Важливим аспектом при цьому є правильний підбір промотора, під контролем якого буде знаходитися експресія: поява у клітинах високої концентрації комплексу метилтрансферази Dam та цільового білка

приведе до неспецифічного насичення метильними групами послідовностей ДНК, що унеможливить точне визначення сайту взаємодії даного білка в геномі. Тому зазвичай використовують слабкі індуцибельні промотори – транскрипція з таких промоторів відбувається на низькому рівні, а її ініціація вимагає впливу на клітину певного фактора (наприклад, високої температури). Для додаткового підвищення точності визначення сайту взаємодії досліджуваного білка із ДНК та уникнення врахування в експериментах «хибного» метилування аденінів за рахунок випадкової асоціації Dam із хроматином (доведено, що у клітинах існує певна частка синтезованих білкових комплексів метилтрансферази із відповідним білком, які здатні достатньо довгий час вільно дифундувати у ядрі, при цьому здійснюючи метилування), профіль метилування отримують використовуючи відповідні контролі. Такими контролями є лінії клітин, в яких індукується експресія лише гена метилтрансферази, і метилування певного локусу визначається як відношення частоти його метилування при експресії химерної конструкції до метилування за експресії лише Dam.

При створенні вектору, що містить гени *DAM* та досліджуваного білка, важливо переконатись, що утворений після трансляції продукт буде мати можливість взаємодіяти із ДНК із такою ж ефективністю і у такий же спосіб, як це робив даний білок без приєднаної трансферази; з іншого боку – активність самої трансферази також повинна бути збережена на її «нативному» рівні. Численні експерименти вказують на те, що обидві умови успішно виконуються, незалежно від того, до N- чи C-кінця певного білка буде приєднана трансфераза Dam. Більш того, химерний білок здебільшого не має або має дуже низьку токсичність для клітин, що дозволяє проводити його експресію достатньо довгий час.

Після екстракції геномної ДНК її обробляють метил-чутливою рестриктазою *Dpn*I, яка впізнає метильований аденін у послідовності GATC. Далі до кінців отриманих фрагментів приєднуються адаптери – фрагменти ДНК із відомою послідовністю, до яких в подальшому будуть підбиратися специфічні праймери для проведення ампліфікації метильованих фрагментів. Для того, щоб уникнути ампліфікації фрагментів, які містять неметильовані сайти GATC, ДНК додатково обробляють рестриктазою *Dpn*II, яка розпізнає дані тетрануклеотиди без метильних груп (рис. 7.5). Після ампліфікації отримані послідовності аналізують за допомогою секвенування.

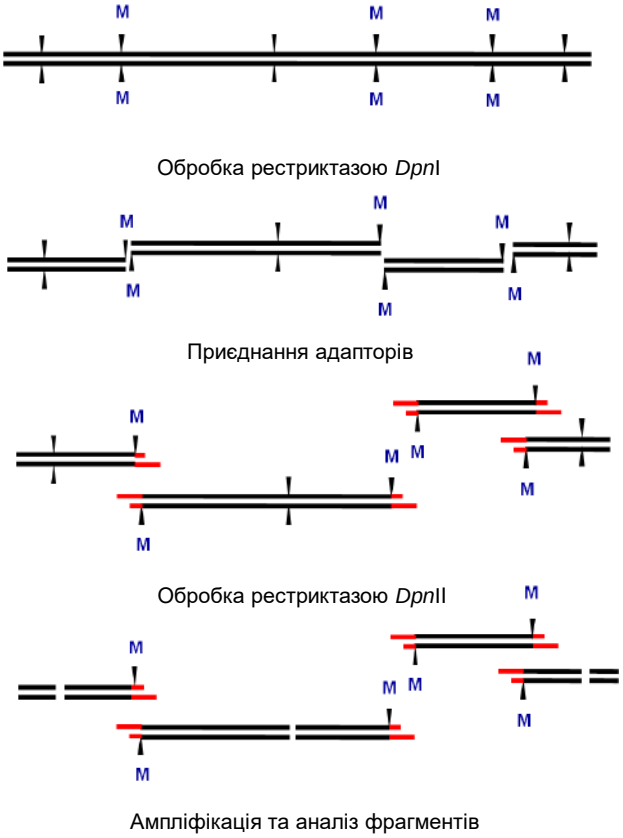

Рис. 7.5. Послідовність отримання цільових фрагментів за допомогою двох рестриктаз у методі DamID.

Технологія DamID та імунопреципітація хроматину є найбільш часто вживаними підходами до аналізу ДНК-білкових взаємодій. Кожен з них має свої недоліки і переваги, які важливо розуміти при виборі методу для конкретного експерименту. Говорячи про обмеження DamID, в першу чергу слід зазначити, що на відміну від імунопреципітації хроматину, використання цього методу не дає можливості встановити посттрансляційні модифікації тих білків, які взаємодіють із ДНК (наприклад, гістонів). По-друге, метод DamID менш ніж імунопреципітація хроматину підходить для аналізу динаміки зв'язування певного білка із ДНК (наприклад, впродовж клітинного циклу). Справа в тому, що культивування клітин із введеною конструкцією здійснюється протягом ~24 годин і більше, а отже патерни метилування, які в результаті отримують, є усередненим значенням метилування сайтів GATC упродовж всієї тривалості експерименту. По-третє, аналіз послідовностей ДНК, що є ділянками взаємодії певного білка, при застосуванні технології DamID лімітований розташуванням у геномах тетрануклеотидів GATC. Проте, ряд досліджень, зокрема на дрозофілі, вказують, що частота їх зустрічальності

становить приблизно 1 на 200-300 пар нуклеотидів, і здатність DamID ідентифікувати послідовності ДНК співставна із такою для методу імунопреципітації хроматину.

Основними перевагами методу DamID є відсутність необхідності використання високоякісних і дорогих антитіл, а також індукції зшивок між ДНК та відповідними білками, які потенційно можуть призводити до отримання хибних результатів. Крім того, кількість біологічного матеріалу, необхідного для постановки методу DamID (~10^6 клітин), на порядок-два менша, ніж для проведення імунопреципітації хроматину.

Лабораторна робота №13

Детекція взаємодії між ДНК та білком за допомогою футпринтингу ДНК

Мета роботи: дослідити послідовність ДНК на предмет можливої взаємодії з певним білком хроматину за допомогою методу футпринтингу ДНК.

Хід роботи

1. Приготувати мічений фрагмент ДНК для аналізу. Для цього ампліфікувати фрагмент ДНК, який цікавить, за допомогою ПЛР. Змішати наступні компоненти:
5 мкл 10× буферного розчину для Taq-полімерази;
5 мкл суміші dNTP, що має у своєму складі по 2,5 мМ dATP, dCTP, dGTP і dTTP (кінцева концентрація – 0,25 мМ кожного dNTP);
1 мкл зразка (наприклад, плазмідна ДНК із цільовою ділянкою ДНК для ампліфікації);
0,5 мкл (2,5 U) *Taq*-полімерази (концентрація - 5 U/мкл);
по 4 мкл прямого та зворотного праймерів (вихідна концентрація - 10 пмоль/мкл), один з яких має флуоресцентну мітку на 5’-кінці для подальшої детекції результатів електрофорезу;
дистильована вода до загального об’єму 50 мкл.

ВАЖЛИВО! Праймери потрібно підбирати таким чином, щоб передбачуваний сайт взаємодії з білком знаходився на невеликій відстані від міченого 5'-кінця праймера.

2. Провести ПЛР, використовуючи наступні параметри:

1 етап:	2 хв 94°С
2 етап:	30 секунд 94°С
(25 циклів)	30 секунд 55°С
	30 секунд 72°С
3 етап:	5 хв 72°С

ПРИМІТКА. Температура відпалу залежить від праймерів, що використовуються (див. розділ 5), а час елонгації ланцюга при 72°С залежить від довжини фрагменту, який ампліфікується. Футпринтинг на фрагментах більших за 500 пар нуклеотидів не рекомендовано, тому 30 секунд елонгації зазвичай достатньо.

3. Перевірити розмір ампліфікованого фрагменту за допомогою електрофорезу в агарозному гелі (використати 1-2 мкл суміші після ампліфікації). Візуалізацію проводити за допомогою пофарбування бромистим етидієм (див. лабораторну роботу №5).

4. Провести очищення ампліфікованого фрагменту за допомогою електрофорезу. Для цього розділити отриману ПЛР-суміш на 1%-му агарозному гелі в ТВЕ буфері. Візуалізувати гель на трансілюмінаторі за довжини хвилі 365 нм для мінімізації пошкодження ДНК короткими хвилями (див. лабораторну роботу №5). Вирізати ділянку гелю, що містить ампліфікований фрагмент. Виділити ДНК з агарози за допомогою набору для очистки з гелю.

ПРИМІТКА. Теоретично для подальших маніпуляцій можна використовувати просто суміш після ПЛР. Однак, будь-які мінорні контамінації фрагментами з меншою довжиною будуть створювати артефакти у футпринті. Тому, зазвичай, проводять очищення міченої ДНК з агарозного гелю.

5. Провести електрофорез очищеної ДНК (1 мкл) на новому агарозному гелі та виміряти її кількість шляхом порівняння з інтенсивністю пофарбування маркера молекулярних мас відомої концентрації.

6. Приготувати необхідний об’єм 1× буферу для зв’язування ДНК з білком (склад: 25 мМ Hepes, pH 8.0; 100 мМ глутамату калію, pH 8,0; 0.5 мг/мл БСА) та зберігати його на льоду.

7. Підготувати потрібний об’єм міченої ДНК. Наприклад, для 12 реакцій підготувати 240 мкл буферу для зв’язування та додати мічений фрагмент ДНК (кінцева концентрація ДНК має бути близько 1 нМ у 40 мкл кожної реакції футпринтингу). Добре перемішати.

8. Розподілити по 20 мкл суміші ДНК у 12 мікропробірок за кімнатної температури.

9. Розвести досліджуваний білок до 1 мкМ у 50 мкл буферу для зв’язування. Додати 20 мкл цього розведення до однієї пробірки ДНК (щоб отримати кінцеву концентрацію білка 500 нМ). Ресуспендувати та залишити за кімнатної температури (суміш 1).

10. Змішати 25 мкл 1 мкМ розчину білка з 25 мкл буферу для зв’язування (концентрація білка – 500 нМ). Додати 20 мкл даного розчину до наступної пробірки з ДНК (кінцева концентрація білка у пробірці - 250 нМ). Ресуспендувати та залишити за кімнатної температури (суміш 2).

11. Змішати 25 мкл 500 нМ розчину білка з 25 мкл буферу для зв’язування (концентрація білка – 250 нМ). Додати 20 мкл даного розведення до наступної пробірки з ДНК (кінцева концентрація білка - 125 нМ). Ресуспендувати та залишити за кімнатної температури (суміш 3).

Продовжити до отримання серії з 10 розведень білка з ДНК (до суміші 10).

ПРИМІТКА. Білкові розведення виконуються при 4°С для мінімізації будь-якої нестабільності білка у розчинах. Реакції зв’язування білка з ДНК можуть бути зроблені за кімнатної температури, при 30°С або 37°С.

12. Додати по 20 мкл буферу для зв’язування до двох зразків ДНК для контрольного експерименту (суміші 11-12).

13. Інкубувати 10 хв при кімнатній температурі (або за визначеною температурою та часом в залежності від білка, що досліджується) для зв’язування білка з ДНК.

14. Підготувати розчин ДНКази I 5 мг/мл у буфері для розведення ДНКази I (склад: 10 мМ Tris, pH 8,0; 10 мМ $MgCl_2$; 10 мМ $CaCl_2$; 125 мМ KCl; 0,1 мМ DTT (dithiothreitol). Розвести концентрований розчин ДНКази I у 10000 разів для отримання кінцевої концентрації 0,5 мкг/мл (зберігати у аліквотах при -20°С).

ПРИМІТКА. Важливо підібрати таку концентрацію ДНКази І, щоб не вся ДНК деградувала (повинно бути не більше ніж 1 розрив/ланцюг).

15. Провести реакції футпринтингу для перших 4 пробірок (Т – час в секундах від початку змішування компонентів у першій пробірці, суміш 1):

Т=0: додати 4 мкл ДНКази І (0,5 мкг/мл) до суміші 1. Перемішати.

Т=15 секунд: додати 4 мкл ДНКази І (0,5 мкг/мл) до суміші 2. Перемішати.

Т=30 секунд: додати 4 мкл ДНКази І (0,5 мкг/мл) до суміші 3. Перемішати.

Т=45 секунд: додати 4 мкл ДНКази І (0,5 мкг/мл) до суміші 4. Перемішати.

Т=60 секунд: додати 100 мкл фенолу, pH 8,0 до суміші 1. Перемішати на вортексі для зупинення реакції.

Т=75 секунд: додати 100 мкл фенолу, pH 8,0 до суміші 2. Перемішати на вортексі для зупинення реакції.

Т=90 секунд: додати 100 мкл фенолу, pH 8,.0 до суміші 3. Перемішати на вортексі для зупинення реакції.

Т=105 секунд: додати 100 мкл фенолу pH 8,0 до суміші 4. Перемішати на вортексі зупинення реакції.

Виконати ці кроки поки не буде оброблено всі 12 сумішей. Проводити за кімнатної температури.

ПРИМІТКА. Важливо дотримуватися вказаних часових рамок для отримання співставних результатів розрізання ДНКазою І у кожній суміші.

УВАГА! Техніка безпеки! *Фенол є надзвичайно токсичною та корозійною сполукою, дуже леткий. Працювати виключно під витяжною шафою та у захисному одязі (лабораторний халат, рукавички, респіраторна маска та захисні окуляри). При потраплянні на шкіру негайно звернутися до викладача.*

16. Додати по 200 мкл розчину для зупинки роботи ДНКази І (склад: 0,5 М ацетат натрію, pH 5,0; 2,5 мМ EDTA) до кожної реакційної суміші. Добре перемішати на вортексі. Центрифугувати 10 хв при 10 000 об/хв за кімнатної температури.

17. Перенести водну (верхню) фазу, що містить ДНК, очищену від білка, у нову мікропробірку. Додати 600 мкл 96%-го етанолу. Перемішати та інкубувати на льоду 1 годину або протягом ночі при -80°С.

18. Центрифугувати 15 хв при 10 000 об/хв за температури 4°С. Обережно видалити надосад. Центрифугувати 5 хв при 10 000 об/хв за температури 4°С. Видалити решту рідини. Висушити на повітрі 5 хвилин.

19. Ресуспендувати осад у 5 мкл води і додати 6 мкл буферного розчину для завантаження, що містить у своєму складі формамід для дентатурації молекул ДНК (склад: 1 мл деіонізованого формаміду; 10 мкл 5%-го ксилолціанолу та бромфенолового синього). Добре перемішати на вортексі та осадити суміш на дно пробірки.

23. Прогріти суміш до 90°С протягом 2 хвилин. Охолодити на льоду і одразу ж завантажити на поліакриламідний гель для секвенування в денатуруючих умовах (з додаванням 7 М сечовини). Концентрація акриламіду залежить від розмірів фрагментів, що розділяються, див. табл. 7.1).

Методика заливки гелю подібна до протоколу лабораторної роботи №7. Рекомендовано використовувати 6%-ий поліакриламідний гель. До його складу входять наступні компоненти:
6% акриламіду (акриламід/біс-акриламід у співвідношенні 19:1);
7 М сечовини;
1× буфера ТВЕ;
0,05% персульфату амонію;
0,05% ТЕМЕД;
дистильована вода.
Для визначення точного місця зв’язування білка важливо використовувати маркер молекулярних мас з відповідною флуоресцентною міткою на 5'-кінці (такою ж, як і у фрагменті ДНК, що досліджується).
24. Проводити електрофорез за напруги 60 В.
25. Після завершення електрофорезу (час припинення відслідковувати за допомогою бромфенолового синього, поки він не домігрує до кінця гелю) вимкнути струм і візуалізувати результати за допомогою обладнання для детекції флуоресцентної мітки, приєднаної до 5'-кінця молекули ДНК, що аналізується.
26. Зробити висновок щодо розташування сайту зв’язування білка в межах послідовності ДНК, яка аналізується.

Таблиця 7.1. **Рекомендовані концентрації акриламіду для оптимального розділення фрагментів ДНК за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі в умовах денатурації.**

Концентрація акриламіду (%)	Розміри фрагментів (нуклеотиди)
30	2-8
20	8-25
10	25-35
8	35-45
6	45-70
5	70-300
4	100-500

Лабораторна робота №14

Детекція взаємодії між ДНК та білком за допомогою методу імунопреципітації хроматину

Мета роботи: дослідити послідовність ДНК на предмет можливої взаємодії з певним білком хроматину за допомогою методу імунопреципітації хроматину.

Хід роботи

1. Виростити 1-5×10^7 клітин у відповідному поживному середовищі (наприклад, середовище RPMI 1640 для лімфоцитів; не повинно містити сироватки або білків з великою молекулярною масою, щоб уникнути будь-яких перешкод від цих білків при формуванні зшивок). Центрифугувати клітини 10 хв при 1500 об/хв за кімнатної температури, відібрати надосад та розчинити осад в свіжому поживному середовищі.

2. Додати 37%-ий формальдегід до кінцевої концентрації 1%. Перемішати шляхом піпетування і інкубувати 10 хвилин при кімнатній температурі, помішуючи, для формування ковалентних зшивок між ДНК та білками у ядрі.

УВАГА! Техніка безпеки! *Формальдегід є сильним мутагеном та канцерогеном, може викликати подразнення шкіри та слизових оболонок. Працювати виключно під витяжною шафою та у захисному одязі (лабораторний халат, рукавички, респіраторна маска та захисні окуляри). При потраплянні на шкіру негайно звернутися до викладача.*

3. Додати 2,5 М гліцину до кінцевої концентрації 125 мМ та інкубувати, помішуючи, протягом 5 хвилин при кімнатній температурі.

4. Двічі промити клітини із 10 мл охолодженого буферного розчину PBS (склад: 137 мМ NaCl; 2,7 мМ KCl; 10 мМ Na_2HPO_4; 1,8 мМ KH_2PO_4), центрифугуючи при 1000 об/хв за температури 4°С.

5. Видалити надосад та ресуспендувати осад в 750 мкл лізуючого буферу ChIP (склад: 50 мМ HEPES-KOH, pH 7,5; 140 мМ NaCl; 1 мМ EDTA; 1% Triton X-100; 0,1% дезоксихолату натрію; 0,1% SDS; 0,1 мл інгібітора протеаз (завжди додавати новий перед використанням). Інкубувати протягом 10 хвилин на льоду.

6. Додати 1 мл буферного розчину для розрізання та мікрококову нуклеазу (micrococcal nuclease) до кожного зразка, щоб фрагментувати ДНК. Змішати, перевернувши пробірку кілька разів, та інкубувати при температурі 37°С протягом 20 хвилин. Перемішувати шляхом інверсії кожні 3-5 хвилин.

ПРИМІТКА. Кількість мікрококової нуклеази та час інкубації, необхідні для розрізання геномної ДНК до оптимальної довжини фрагментів розміром 150-900 пар нуклеотидів, потрібно визначати емпіричним шляхом для окремих типів клітин.

11. Зупинити розрізання ДНК, додавши по 10 мкл 0,5 М EDTA до кожного зразка. Помістити зразки на лід.

12. Центрифугувати 10 хв при 8000 об/хв за температури 4°С. Перенести надосад, що містить зшитий хроматин, у нову пробірку.

13. Відібрати по 50 мкл кожного зразка для визначення концентрації ДНК та розміру фрагментів. Додати по 70 мкл буферу для елюції (склад: 1% SDS; 100 мМ $NaHCO_3$) до 50 мкл хроматину. Додати 4,8 мкл 5 М NaCl та 2 мкл РНКази А (10 мг/мл) та інкубувати на шейкері при 65°С протягом ночі.

14. Додати 2 мкл протеїнази К (20 мг/мл) та інкубувати із помішуванням при 60°С протягом 1 години.

15. Очистити ДНК за допомогою фенол-хлороформної екстракції (див. лабораторну роботу №1).

16. Для визначення концентрації ДНК перенести 5 мкл очищеної ДНК до пробірки, що містить 995 мкл буферу ТЕ, щоб зробити розведення у 200 разів для визначення оптичної густини A_{260}. Розразувати концентрацію ДНК у мкг/мл (див. лабораторну роботу №4).

17. Провести електрофорез очищеної ДНК у 1,5 %-му агарозному гелі із маркером молекулярних мас для визначення розмірів фрагментів (див. лабораторну роботу №5).

18. Провести імунопреципітацію хроматину. Для цього використовувати зшитий хроматин, отриманий в п.12. Рекомендується брати приблизно 25 мкг ДНК для імунопреципітації (згідно концентрації, отриманої в п.16). Розчинити кожен зразок у співвідношенні 1:10 із буфером RIPA (склад: 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0; 150 мМ NaCl; 2 мМ EDTA; 1% NP-40; 0,5% дезоксихолату натрію; 0,1% SDS; інгібітор протеаз (завжди додавати новий перед використанням). Знадобиться по одному зразку для визначення взаємодії із специфічними антитілами і ще по одному зразку – для контролю.

ПРИМІТКА. Відібрати 50 мкл хроматину (він буде слугувати в якості зразка для «завантаження») і зберігати при - 20°С для майбутнього використання.

19. Додати первинні антитіла до всіх зразків, окрім контрольного, та перемішувати на шейкері протягом 1 години при температурі 4°С. Кількість антитіл, що додається, має бути визначена емпірично; зазвичай добре працює 1-10 мкг антитіл на 25 мкг ДНК.

20. Підготувати Protein A/G агарозні кульки (кульки, до яких ковалентно прикріплені бактеріальні білки А та G, які мають високу спорідненість до імуноглобуліну G): якщо використовуються і Protein A, і Protein G кульки, змішати рівні об’єми кульок Protein A та Protein G і промити їх тричі в буфері RIPA. Відібрати буфер аспіратором і додати одноланцюгову ДНК сперми оселедця до кінцевої концентрації 75 нг/мкл кульок і БСА до кінцевої концентрації 0,1 мкг/мкл кульок для їх блокування. Додати буфер RIPA, щоб

подвоїти об’єм кульок, та інкубувати протягом 30 хв із помішуванням при кімнатній температурі.

21. Додати 60 мкл заблокованих білкових A/G-кульок до зразків та імунопреципітувати із помішуванням протягом ночі при 4°C.

22. Центрифугувати імунопреципітовані зразки протягом 1 хв при 2000 об/хв та видалити надосад.

23. Провести відмивання зразків:

один раз буфером для промивання із низькою концентрацією солі (склад: 0,1% SDS; 1% Triton X-100; 2 мМ EDTA; 20 мМ Tris-HCl, pH 8,0; 150 мМ NaCl);
один раз – із високою концентрацією солі (склад: 0,1% SDS; 1% Triton X-100; 2 мМ EDTA; 20 мМ Tris-HCl, pH 8.0; 500 мМ NaCl);
один раз – буфером для промивання з LiCl (склад: 0,25 М LiCl; 1% NP-40;1% дезоксихолату натрію; 1 мМ EDTA; 10 мМ Tris-HCl, pH 8,0).
Після кожного промивання центрифугувати протягом 1 хв при 2000 об/хв та видалити надосад.

24. Провести елюцію ДНК шляхом додавання 120 мкл буферу для елюції до білкових A/G-кульок та повільно помішуючи протягом 15 хв при 30°C.

25. Центрифугувати протягом 1 хв при 2000 об/хв та перенести надосад в нову пробірку.

26. Додати 4,8 мкл 5 М NaCl та 2 мкл РНКази А (10 мг/мл) та інкубувати на шейкері при 65°C протягом ночі.

27. Додати 2 мкл протеїнази К (20 мг/мл) та інкубувати із помішуванням при 60°C протягом 1 години.

28. Очистити ДНК за допомогою фенол-хлороформної екстракції (див. лабораторну роботу №1).

29. Провести кількісну ПЛР в реальному часі (див. лабораторну роботу №10) для ідентифікації послідовності ДНК, з якою взаємодіє білок інтересу. Використовувати праймери (чи декілька пар праймерів) до ділянки, для якої передбачається взаємодія з білком.

30. Зробити висновок щодо наявності сайту зв’язування білка в межах послідовності ДНК, яка аналізується.

РОЗДІЛ 8. МЕТОДИ ФІКСАЦІЇ КОНФОРМАЦІЇ ХРОМОСОМ

Методи фіксації конформації хромосом – це група підходів, які дозволяють аналізувати просторову організацію молекул ДНК у клітинному ядрі на основі визначення частоти контактів між різними геномними локусами. Від англійського – chromosome conformation capture – у літературі ці методи скорочено називають 3C та 3C-подібні методи.

Принцип найпершої, можна сказати базової, методики, на основі якої були розвинуті всі інші варіанти фіксації конформації хромосом, був запропонований у 2002 році: саме її називають 3C. У даному протоколі ізольовані клітинні ядра обробляли формальдегідом для індукції ковалентних зшивок між ДНК та білками, що з нею взаємодіяли (рис. 8.1). Передбачалося, що така фіксація забезпечить утримання поруч двох ділянок однієї або різних молекул ДНК, які у клітинному ядрі були наближені одна до одної. Після обробки формальдегідом ядра лізували, за допомогою детергентів очищали отриману геномну ДНК від залишків білків, що не були до неї ковалентно приєднані, та проводили рестрикцію із використанням рестриктази *EcoR*I (сайт рестрикції – GAATTC) для фрагментації ДНК.

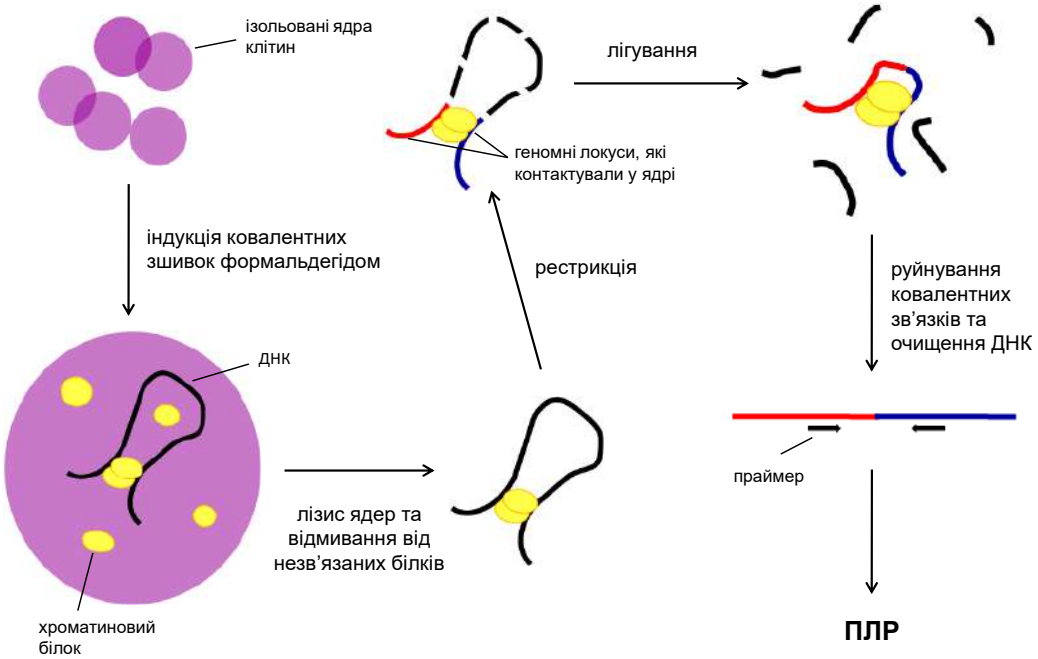

Рис. 8.1. Загальна схема методу 3C.

Фактично перші етапи методу 3С дуже схожі із методом імунопреципітації хроматину (див.розділ 7). Проте, на відміну від ChIP, де після фрагментації ДНК відбувалася імунопреципітація досліджуваного білка і зшитої із ним нуклеотидної послідовності за допомогою відповідного антитіла, у запропонованому підході проводили лігування отриманих фрагментів за дуже низької концентрації ДНК у суміші. Це дозволяє забезпечити суттєво підвищену імовірність лігування тих фрагментів, які були ковалентно зшиті, ніж просто випадкових фрагментів, що утворилися після рестрикції. Після руйнування ковалентних зв'язків і очищення ДНК продукти лігування детектували за допомогою кількісної ПЛР із використанням пари праймерів, специфічних до двох геномних локусів, щодо яких було висунуте припущення про їх контакт у клітинному ядрі *in vivo*. Частота появи зшивок між двома фрагментами ДНК, оцінена за кількістю відповідних продуктів лігування, пропорційна частоті, з якою досліджувані геномні локуси контактують у ядрі (рис. 8.2).

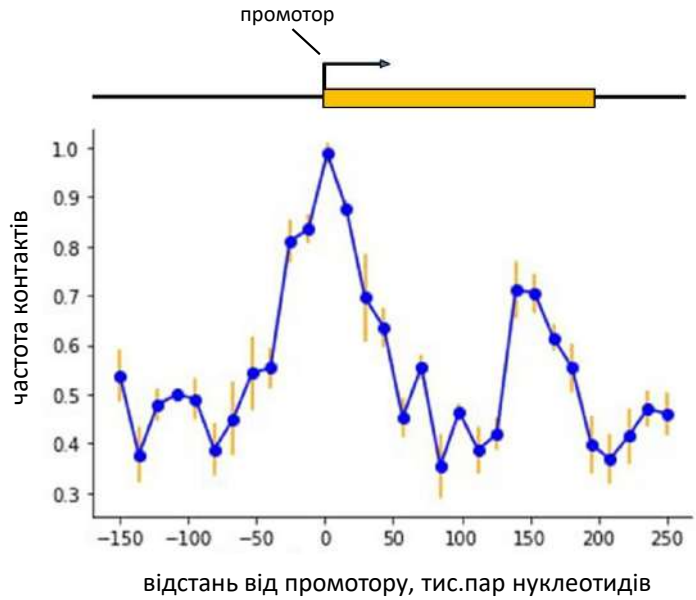

Рис. 8.2. Схема типової візуалізації даних, отриманих за допомогою методу 3С. В даному випадку по осі ординат відкладена частота контактів між промотором гена (точка 0 на осі абсцис) та віддаленими від нього на різну відстань послідовностями ДНК.

Очевидно, що основне суттєве обмеження першого із серії методів фіксації конформації хромосом – 3С – полягає у тому, що частоту контактів можна встановлювати лише між двома відомими локусами. Фактично, питання, яким задається дослідник, використовуючи даний підхід, можна сформулювати

наступним чином: чи наявний у клітинному ядрі контакт послідовності ДНК №1 із послідовністю ДНК №2, і з якою частотою він відбувається. Саме тому в літературі часто можна зустріти таке визначення методу 3С як підхід «один з одним» («one-by-one»).

Базуючись на описаному принципі технології 3С, був розроблений ряд аналогічних методик, спрямованих на подолання згаданого ліміту «один з одним», – таких, які б дозволили одночасний аналіз всіх контактів між будь-якими геномними сайтами. Перша така спроба була реалізована у методі, який отримав назву 4С (абревіатура від circular chromosome conformation capture). Початкові етапи – індукція зшивок, лізис клітин чи ізольованих ядер та рестрикція – були ідентичними до технології 3С, проте процедура лігування відрізнялася тим, що для неї був підібраний такий протокол, щоб в результаті реакції утворювалася кільцева молекула із фрагментів ДНК, які були ковалентно зшиті (рис. 8.3). Утворення кільцевої молекули дало змогу підбирати праймери для подальшої ампліфікації продуктів лігування лише до одного геномного локусу, контакти якого досліджуються. Фактично, при проведенні методу необхідно було знати тільки нуклеотидну послідовність досліджуваної ділянки ДНК і в такий спосіб встановлювати її контакти із будь-якою іншою ділянкою геному. Остаточний аналіз продуктів ампліфікації проводився за допомогою методів секвенування. Отже, використання технології 4С дозволило розширити питання, яке задає дослідник, до наступного: з якими послідовностями ДНК контактує в геномі (і чи контактує взагалі) послідовність ДНК №1 і яка частота цих контактів: принцип 3С «один з одним» («one-by-one») трансформувався у принцип «один з усіма» («one-by-all»).

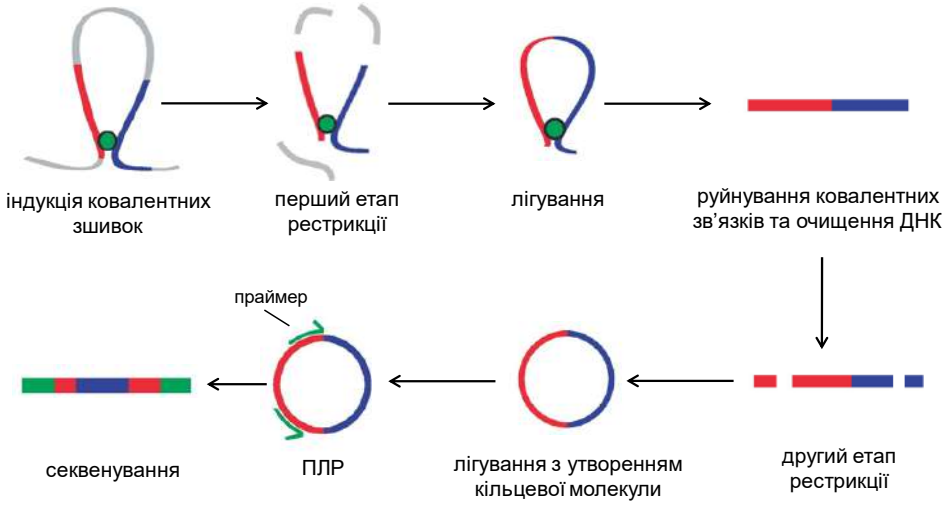

Рис. 8.3. Загальна схема методу 4С.

Метод 4C не став надто широковживаним, оскільки майже одразу йому на зміну був розроблений новий варіант методу фіксації конформації хромосом – 5C (chromosome conformation capture carbon copy). Аналогічно до 4C, початкові етапи методу 5C ідентичні процедурі 3C до моменту аналізу продуктів лігування (рис. 8.4). Якщо у методі 3C для встановлення двох геномних локусів, які контактували між собою у ядрі, обирається пара праймерів, специфічних до їх послідовностей, то у методі 5C використовується велика кількість пар праймерів (їх іноді називають первинними), які відпалюються поблизу точки лігування фрагментів ДНК, що були ковалентно зшиті: один із них комплементарний одному фрагменту, інший – іншому. Кожен з пари праймерів на одному своєму кінці має приєднаний універсальний адаптер, який в подальшому буде використаний для ампліфікації. Після відпалу праймерів відбувається їх лігування (за умови, що вони знаходяться поруч) і утворюється один олігонуклеотид, фланкований двома адаптерами. Власне, цей олігонуклеотид і ампліфікується за рахунок використання вторинних праймерів, які відпалюються на послідовностях двох адаптерів. Отримані ампліфіковані послідовності – бібліотеки 5C – аналізуються за допомогою методів секвенування нового покоління. Використання методу 5C розширило формулу, що використовувалася для методу 3C, від «один з одним» («one-by-one») до «багато із багатьма» («many-by-many») у тому сенсі, що даний підхід дозволяє, використовуючи значний набір праймерів, аналізувати контакти великої кількості різноманітних геномних локусів один із одним.

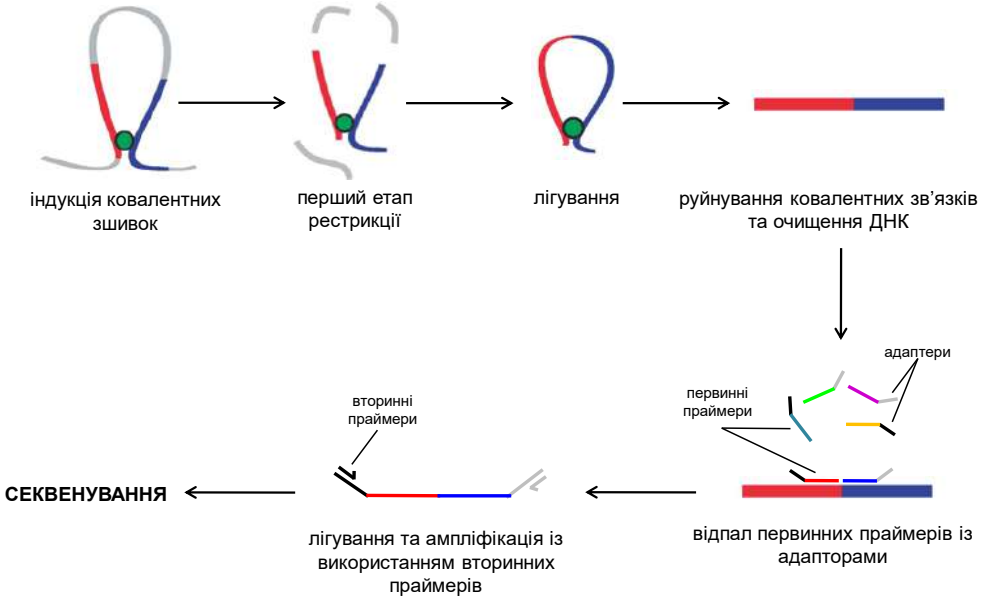

Рис. 8.4. Загальна схема методу 5C.

Хоча метод 5С суттєво розширив можливості детекції контактів між хроматиновими фібрилами у клітинних ядрах, наступна розроблена модифікація методу фіксації конформації хромосом – Hi-C – зняла будь-які ліміти щодо аналізу взаємодій між геномними локусами (рис. 8.5). Як і в протоколах 4С та 5С, перші етапи методу Hi-C повністю повторюють послідовність маніпуляцій, закладену у методі 3С: ковалентне зшивання білків та ДНК, лізис клітин і відмивання від незв'язаних білків, рестрикція за допомогою специфічної рестриктази (найчастіше використовують рестриктазу *Hind*III, яка упізнає сайт AAGCTT). Наступний етап є паспортною характеристикою методу Hi-C: заповнення 5'-виступів, наявних після рестрикції на кінцях фрагментів ДНК, нуклеотидами, до яких приєднаний біотин.

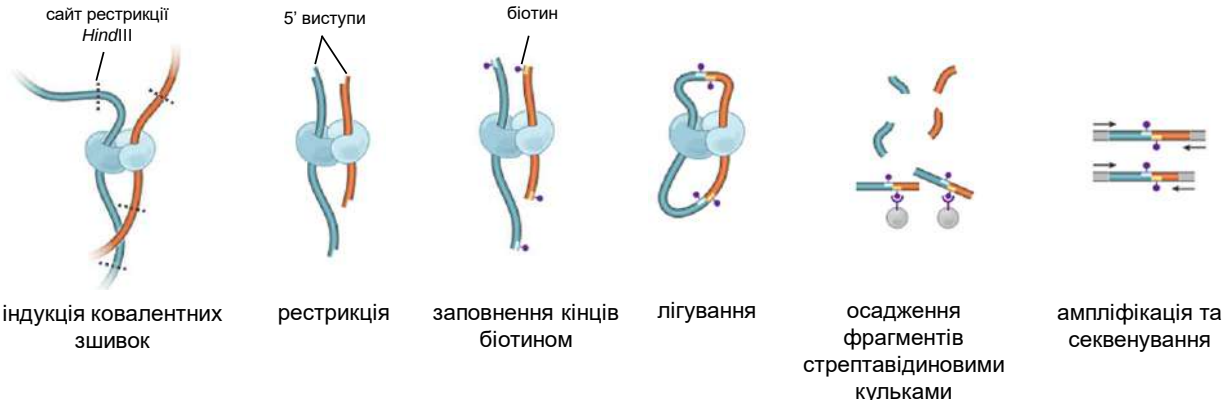

Рис. 8.5. Загальна схема методу Hi-C.

За цим кроком слідує лігування фрагментів при якому, аналогічно класичному протоколу 3С, використовується низька концентрації лігази для забезпечення більш імовірнісного з'єднання тих фрагментів, що зшиті між собою за рахунок білків. В результаті утворюються гібридні кільцеві молекули, місця з'єднання яких біотинільовані. Після руйнування ковалентних зшивок відбувається додаткова фрагментація ДНК (найчастіше використовують ультразвук) з метою отримання невеликих за розміром послідовностей від 300 до 500 нуклеотидів. Біотинільовані фрагменти осаджуються за допомогою магнітних кульок, вкритих високоочищеним білком стрептавідином, який має високу афінність до біотину. До отриманих у такий спосіб фрагментів із двох боків приєднуються стандартні адаптери, після чого відбувається ампліфікація та секвенування. Після аналізу результатів секвенування отримують повногеномні карти (матриці) контактів між різними локусами, на основі яких

роблять висновки щодо просторової організації молекул ДНК в клітинному ядрі (рис. 8.6).

Метод Hi-C, для якого в літературі використовують формулу «всі з усіма» («all-by-all»), дійсно дозволяє аналізувати максимальну кількість контактів між хроматиновими фібрилами, проте матриці контактів, які отримують, мають роздільну здатність від одного мільйона пар основ. Для менших відстаней точність визначення частоти контактів сильно знижується. Розроблений у 2014 році варіант *in situ* Hi-C вирішив цю проблему за рахунок проведення процедур індукції ковалентних зшивок, рестрикції, заповнення 5'-виступів біотином та лігування в інтактних ядрах клітин. Новий протокол не лише підвищив роздільну здатність методу до 1000 пар нуклеотидів, але і збільшив імовірність лігування локусів, що контактували, за рахунок використання рестриктази, яка упізнає сайт рестрикції у 4 пари нуклеотидів, а не у 6, як це було у класичному протоколі методу Hi-C.

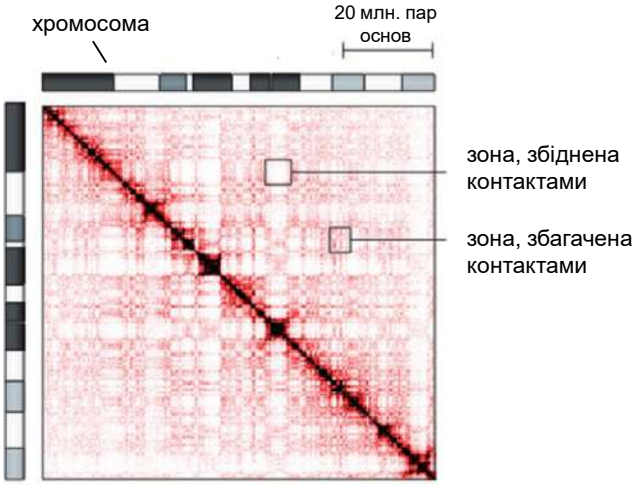

Рис. 8.6. Матриця контактів між локусами однієї хромосоми, що відображає їх частоту, якій пропорційна інтенсивність зафарбування. Найбільш інтенсивно зафарбовані ділянки по діагоналі відображають контакти між наближеними по контуру ділянками.

Ще більшого підвищення роздільної здатності детекції частоти контактів вдалося досягнути у іншій модифікації методу Hi-C – Micro-C. В даному випадку для фрагментації ДНК використовують не рестриктазу, а мікрококову нуклеазу (див. розділ 7), яка дозволяє отримати фрагменти розміром від 200 до декількох тисяч пар нуклеотидів і в такий спосіб аналізувати просторову організацію хромосом, починаючи з мононуклеосомного рівня.

Лабораторна робота №15

Аналіз частоти взаємодій між двома ділянками ДНК в ядрах клітин ссавців за допомогою методу 3C

Мета роботи: провести аналіз частоти контактів між двома ділянками геному людини за допомогою методу фіксації конформації хромосом (3C).

Хід роботи

А. Створення 3C-бібліотеки контактів між ділянками ДНК в ядрах клітин людини.

1. Виростити 1×10^8 клітин у відповідному поживному середовищі (наприклад, середовище RPMI 1640 для лімфоцитів). Центрифугувати клітини 10 хв при 1500 об/хв за кімнатної температури, видалити надосад та розчинити осад в 45 мл свіжого поживного середовища.
2. Додати 1,35 мл 37%-го формальдегіду (кінцева концентрація – 1%), перемішати шляхом піпетування та інкубувати 10 хв при кімнатній температурі для формування ковалентних зшивок між ДНК та білками у ядрі.

УВАГА! Техніка безпеки! *Формальдегід є сильним мутагеном та канцерогеном, може викликати подразнення шкіри та слизових оболонок. Працювати виключно під витяжною шафою та у захисному одязі (лабораторний халат, рукавички, респіраторна маска та захисні окуляри). При потраплянні на шкіру негайно звернутися до викладача.*

3. Додати 2,5 мл 2,5 М гліцину. Перемішати піпетуванням і інкубувати 5 хв при кімнатній температурі.

4. Тримати на льоду щонайменше 15 хвилин.

5. Центрифугувати клітини 10 хв при 2000 об/хв за кімнатної температури, ресуспендувати осад в 1 мл крижаного лізуючого буферу (склад: 10 мМ Tris-HCl, pH 8,0; 10 мМ NaCl; 0,2% Ігепал (NP-40)), додати 0,1 мл коктейлю

інгібіторів протеаз та інкубувати 15 хв на льоду для проходження лізису клітин. Лізуючий буфер має бути свіжоприготовлений в день використання.

6. Гомогенізувати клітини на льоду обережно перемішуючи.

7. Провести рестрикцію, отриманого хроматину зі зшивками. Для цього центрифугувати клітини 5 хв при 5000 об/хв, при кімнатній температурі, та промити 0,5 мл 1× відповідного буферного розчину рестриктази (в залежності від рестриктази, яка буде використовуватися; надається виробником ферменту). Знову центрифугувати 5 хв при 5000 об/хв і ресуспендувати осад в 0,5 мл 1× буферного розчину рестриктази.

8. Розподілити 25 мкл клітин у 20 окремих мікроцентрифужних пробірок (кожна пробірка буде містити приблизно 5×10^6 клітин). Центрифугувати 5 хв при 5000 об/хв при кімнатній температурі та ресуспендувати кожен осад у 362 мкл 1× буферного розчину рестриктази.

9. Додати по 38 мкл 1%-го SDS до кожної пробірки та інкубувати 10 хвилин при 65°C.

10. Додати 44 мкл 10%-го Triton X-100 до кожної пробірки. Перемішати шляхом піпетування.

11. Додати по 400 U рестриктази у кожну пробірку. Добре перемішати і інкубувати протягом ночі за відповідної температури (згідно з інструкціями виробника).

12. Додати 86 мкл 10%-го SDS та інкубувати 30 хвилин при 65°C для зупинки реакції рестрикції.

13. Провести лігування розрізаного хроматину зі зшивками за низьких концентрацій ДНК та ферменту. Для цього перенести кожну реакційну суміш в пробірку на 15 мл. Додати у кожну пробірку наступні компоненти та інкубувати 2 години при 16°C:

745 мкл 10%-го Triton X-100;
745 мкл 10× буфера для лігування (склад: 500 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 100 мМ $MgCl_2$, 100 мМ дитіотреїтолу (DTT); зберігати до 1 року при -80°C);
80 мкл 10 мг/мл БСА (бичачий сироватковий альбумін);
80 мкл 100 мМ ATP;
5960 мкл дистильованої води;
4000 одиниць T4 ДНК-лігази.

ПРИМІТКА. Для великої кількості пробірок, як правило, виготовляється майстер-суміш усіх компонентів.

14. Додати 50 мкл 10 мг/мл протеїнази К, розчиненої у буфері ТЕ (склад: 10 мМ Tris-HCl, 1 мМ EDTA, pH – 8,0), та інкубувати протягом ночі при 65°С для видалення ковалентних зшивок між ДНК та білками і гідролізу білків.

15. Додати ще 50 мкл 10 мг/мл протеїнази К у буфері ТЕ та інкубувати 2 години при 42°С.

16. Перенести розчини в пробірки на 20 мл, додати рівний об'єм фенолу до кожної з пробірок, перемішати на вортексі протягом 30 секунд і центрифугувати 5 хв при 3500 об/хв за кімнатної температури.

УВАГА! Техніка безпеки! *Фенол є надзвичайно токсичною та корозійною сполукою, дуже леткий. Хлороформ – летка токсична сполука. Працювати виключно під витяжною шафою та у захисному одязі (лабораторний халат, рукавички, респіраторна маска та захисні окуляри). При потраплянні на шкіру негайно звернутися до викладача.*

17. Перенести водну (верхню) фазу у чисті пробірки на 20 мл і повторити екстракцію фенолом.

18. Додати рівний об'єм суміші фенол/хлороформ у співвідношенні 1:1, перемішати на вортексі протягом 30 секунд і центрифугувати 5 хв при 3500 об/хв за кімнатної температури.

19. Перенести водну (верхню) фазу у чисті пробірки на 10 мл, додати 1/10 об'єму 3 М ацетату натрію, pH 5,2, швидко перемішати на вортексі та додати 2,5 об'єми крижаного 96%-го етанолу.

20. Інкубувати 30 хв (або протягом ночі) при -80°С та центрифугувати 20 хв при 10 000 об/хв та температурі 4°С.

21. Видалити надосад і ресуспендувати осад в загальному об'ємі 1 мл буферного розчину ТЕ. Виконати екстракцію фенолом (п. 16), а потім дві екстракції фенолом/хлороформом у співвідношенні 1:1 (п. 18) для кожної пробірки.

22. Додати рівний об’єм хлороформу в кожну пробірку, перемішати на вортексі протягом 30 секунд і центрифугувати 5 хв при 3500 об/хв за кімнатної температури.

23. Перенести водну фазу у чисті мікропробірки. Додати 1/10 об’єму 3 М ацетату натрію, pH 5,2, і швидко перемішати на вортексі. Преципітувати ДНК шляхом додавання 2,5 об’ємів крижаного 96%-го етанолу, обережно перемішуючи. Інкубувати 15 хв при −20°C і центрифугувати 20 хвилин при 14000 об/хв та температурі 4°C.

24. Промити осад п'ять разів 70%-м етанолом.

ПРИМІТКА. Ці п’ять кроків відмивання необхідні для видалення зайвої солі.

25. Висушити осад та розчинити у загальному об’ємі 1 мл буферного розчину ТЕ, pH 8,0 (власне це і є 3С-бібліотека контактів, які зафіксовано у ядрах клітин).

26. Додати 1 мкл 10 мг/мл РНКази А без ДНКази та інкубувати 15 хв при 37°C для видалення молекул РНК.

ПРИМІТКА. 3С-бібліотеки контактів можна зберігати до 2 років при -20°C.

Б. Створення контрольної бібліотеки контактів для геному людини.

1. Вибрати один або декілька клонів BAC (від англ. Bacterial Artificial Chromosome), що охоплюють геномну область, яка досліджується. Відібрати по 20 мкг ДНК кожного клону для проведення рестрикції (рекомендована концентрація ДНК BAC повинна бути від 50 до 100 нг/мл)

2. Провести рестрикцію ДНК BAC-клонів (використовувати ту ж саму рестриктазу, що і для рестрикції зшитого хроматину (див. п.7 частини А). Перенести ~20 мкг ДНК BAC у мікроцентрифужну пробірку на 2 мл. Загальний об’єм ДНК повинен становити 10% кінцевого об’єму суміші.

ПРИМІТКА. Зберегти 1 мкл нерозрізаного матеріалу для електрофорезу, разом із розрізаною ДНК BAC і лігованою ДНК BAC (див. далі), як контроль ефективності розрізання.

3. Додати відповідну кількість дистильованої води, 10× буферного розчину рестриктази, 10 мг/мл БСА (якщо рекомендовано виробником) для отримання, після додавання ферменту, розчину, що містить 1× буферний розчин рестриктази та 100 нг/мкл БСА.

4. Додати 40 U/мкл рестриктази. Інкубувати протягом ночі при відповідній температурі (згідно з інструкціями виробника).

5. Очистити розрізану ДНК від компонентів рестрикційної суміші. Для цього додати рівний об'єм суміші фенол/хлороформ у співвідношенні 1:1, перемішати на вортексі протягом 30 секунд і центрифугувати 5 хвилин при 14000 об/хв за кімнатної температури, розподіливши реакційну суміш у декілька пробірок, якщо необхідно.

6. Перенести водну (верхню) фазу в нову мікропробірку на 1,5 мл. Додати 1/10 об'єму 3 М ацетату натрію, pH 5,2, та перемішати на вортексі. Додати 2,5 об'єму крижаного 96%-го етанолу та обережно перемішати. Інкубувати не менше 15 хв при −20°C і центрифугувати 20 хв при 14 000 об/хв за температури 4°C.

7. Видалити надосад і промити осад, ресуспендуючи в 1 мл 70%-го етанолу. Центрифугувати 15 хвилин при 14 000 об/хв та температурі 4°C.

8. Видалити 70%-ий етанол для відмивання і недовго підсушити на повітрі. Не дозволяти ДНК повністю висохнути, оскільки її дуже важко ресуспендувати.

9. Ресуспендувати ДНК в 161 мкл дистиляту. Інкубувати 15 хв при 37°C для розчинення ДНК.

ПРИМІТКА. Зберегти аліквоту (4 мкл) розрізаного матеріалу, щоб проаналізувати за допомогою електрофорезу разом з нерозрізаною ДНК ВАС і лігованою ДНК ВАС як контроль ефективності розрізання.

10. Провести лігування ДНК ВАС. Змішати наступні компоненти та інкубувати протягом ночі при 16°C:
157 мкл розрізаної ДНК ВАС
20 мкл з 10× буферу для лігування
2 мкл 10 мг/мл БСА
2 мкл 100 mM АТР
7600 одиниць Т4 ДНК-лігази.

ПРИМІТКА. Якщо велика кількість зразків, як правило, виготовляється майстер-суміш усіх компонентів.

11. Інкубувати ДНК 15 хв при 65°C для інактивації лігази.

12. Провести очищення контрольної матриці. Додати до суміші після лігування 200 мкл фенолу/хлороформу у співвідношенні 1:1, перемішати на вортексі протягом 30 с і центрифугувати 5 хв при 14 000 об/хв за кімнатної температури.

13. Перенести водну (верхню) фазу в нову 1,5-мл мікроцентрифужну пробірку. Повторити екстракцію фенолом/хлороформом.

14. Перенести водну (верхню) фазу в нову пробірку. Додати 200 мкл хлороформу, перемішати на вортексі протягом 30 секунд і центрифугувати 5 хв при 14 000 об/хв за кімнатної температури.

15. Перенести водну (верхню) фазу в нову 1,5-мл пробірку. Додати 1/10 об'єму 3 М ацетату натрію, pH 5,2, і перемішати на вортексі. Додати 2,5 об'єми крижаного 96% етанолу і обережно перемішати. Інкубувати 15 хв при −20°C і центрифугувати 20 хв при 14 000 об/хв за температури 4°C.

16. Видалити надосад і ресуспендувати осад в 1 мл 70% етанолу. Центрифугувати 15 хвилин при 14 000 об/хв за температури 4°C.

17. Видалити надосад і злегка підсушити на повітрі. Ресуспендувати осад у буфері ТЕ, pH 8,0, щоб отримати кінцеву концентрацію ∼100 нг/мкл.

18. Інкубувати 15 хв при 37°C, щоб повністю розчинити ДНК (це контрольна бібліотека контактів, тобто сукупність усіх можливих продуктів лігування між ділянками геномної ДНК, які присутні в еквімолярних кількостях. Ця контрольна бібліотека використовується разом із 3С-бібліотекою для визначення частоти взаємодії між ділянками ДНК в ядрі).

ПРИМІТКА. Зберегти 1 мкл лігованого матеріалу для електрофорезу.

19. Провести електрофорез з наступними зразками: 1 мкл нерозрізаної ДНК ВАС, 4 мкл розрізаної ДНК ВАС (отримано у п. 9) і 1 мкл лігованої ДНК ВАС (отримано у п. 18) на 0,8% агарозному гелі, приготованого з використанням буферного розчину ТВЕ (див. лабораторну роботу №5).
Після розрізання має бути «шлейф» ДНК, а частина шлейфу зникне після лігування. Приклад показано на рис. 8.7.

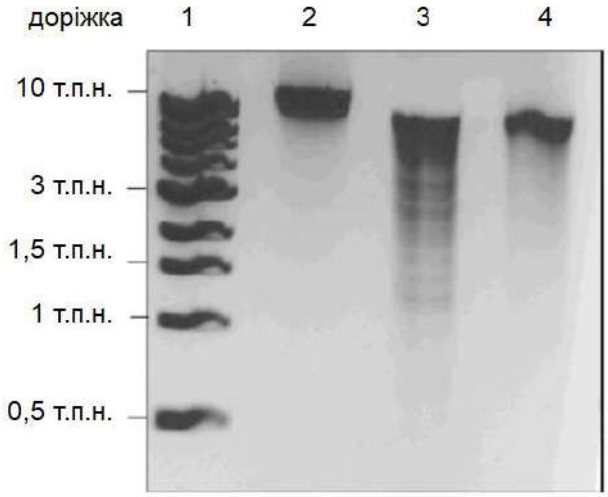

Рис. 8.7. Аналіз ДНК BAC під час створення контрольної бібліотеки. Доріжка 1 – маркер молекулярних мас. Доріжка 2 - нерозрізана ДНК BAC (трохи більше 10 тисяч пар нуклеотидів). Доріжка 3 – розрізана ДНК BAC. Доріжка 4 - лігована BAC ДНК. Т.п.н. – тисяч пар нуклеотидів.

В. Аналіз частоти взаємодій між двома локусами за допомогою ПЛР.

1. Визначити концентрацію ДНК у бібліотеках (контрольній та 3C) за допомогою електрофорезу в агарозному гелі, порівнюючи з маркером молекулярних мас відомої концентрації.

ПРИМІТКА. ДНК бібліотек буде рухатися так, як зразок високомолекулярної ДНК. Зовнішній вигляд може відрізнятися між зразками, а також може містити сліди, подібні до шлейфу (мазків). Як правило, концентрація ДНК становить ~200-250 нг/мкл.
Спектрофотометрія в даному випадку не використовується для вимірювання концентрації ДНК через високу концентрацію солі, що залишилася в матрицях після очищення.

2. Провести ПЛР для визначення частоти взаємодій між ділянками ДНК. Приготувати реакційні суміші ПЛР для контрольної та 3C-бібліотеки (загальний об’єм суміші – 25 мкл), що містять:
2 мкл кожної бібліотеки (контрольної або 3C)
1× буфер для ПЛР
4 мМ $MgSO_4$
0,2 мМdNTP

0.4 мкМ кожного праймера
1 U *Taq*ДНК-полімерази.
Для кожної реакції виконати по 3 повтори. ПЛР для обох бібліотек потрібно виконувати одночасно.

ПРИМІТКА. Прямий та зворотній праймери підбираються до різних ділянок геному (наприклад, двох різних генів), між якими передбачається наявність контактів у ядрі. Таким чином, успішне проходження ПЛР можливе лише тоді, коли фіксується взаємодія між цими двома ділянками у ядрі.

3. Використовувати наступні параметри для проведення ПЛР:
1 етап: 1 хв 95°C

2 етап: 1 хв 95°C
(34 цикли) 45 секунд 65°C
2 хв 72°C

3етап: 1 хв 95°C
(1 цикл) 45 секунд 65°C
8 хв 72°C

4. Проаналізувати продукти ПЛР за допомогою електрофорезу, використовуючи концентрацію агарози – 1,5% (див. лабораторну роботу №5).

ПРИМІТКА. Рекомендується використовувати буферний розчин для завантаження без бромфенолового синього, оскільки цей барвник буде рухатися близько до продуктів ПЛР і заважати кількісній оцінці. Продукти ПЛР, отримані при використанні 3С і контрольної бібліотек, потрібно аналізувати поруч на одному і тому ж гелі, оскільки можливі варіації пофарбування ДНК між різними гелями.

5. Оцінити кількість продуктів ампліфікації для контрольної та 3С-бібліотеки, порівнюючи з маркером молекулярних мас відомої концентрації.

6. Визначити частоту взаємодії між двома ділянками геному, які аналізувалися. Для цього потрібно поділити кількість продукту ПЛР, отриманого з використанням бібліотеки 3С, на кількість продукту ПЛР, отриманого з використанням контрольної бібліотеки. Оскільки для кожної реакції було

виконано по 3 повтори, то для обрахунку частоти взаємодій потрібно розрахувати їх середнє значення (стандартне відхилення не повинно перевищувати 15%). Зробити висновок про частоту контактів між двома ділянками геному у ядрах клітин людини.

ЗАПИТАННЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

РОЗДІЛ 1. ВИДІЛЕННЯ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ

1. Що таке рідкофазні методи виділення нуклеїнових кислот?
2. Який компонент буферного розчину для лізису клітин забезпечує руйнування клітинних мембран?
3. У чому суть методу фенол-хлороформної екстракції нуклеїнових кислот?
4. У чому суть методу високосольової екстракції?
5. Опишіть принцип виділення нуклеїнових кислот за допомогою цетилтриметиламоній броміду.
6. Принцип лужної екстракції нуклеїнових кислот. Коли він найчастіше використовується?
7. В чому полягає принципова різниця між рідкофазними та твердофазними методами виділення нуклеїнових кислот?
8. Перерахуйте етапи виділення нуклеїнових кислот за допомогою твердофазних методів.
9. Які елементи можуть використовуватися у якості матриці при твердофазних методах виділення нуклеїнових кислот?

РОЗДІЛ 2. СПЕКТРОФОТОМЕТРІЯ

1. Що таке хромофор?
2. Що таке оптична густина розчину? В чому вона вимірюється?
3. Опишіть принцип роботи спектрофотометра.
4. Які елементи у складі білків та нуклеїнових кислот є хромофорами?
5. Як за допомогою спектрофотометрії визначати концентрації речовин?
6. Що таке гіпохромія нуклеїнових кислот?
7. Що таке температура плавлення?
8. Наведіть приклади використання спектрофотометрії для дослідження перебігу біохімічних реакцій.

РОЗДІЛ 3. ЕЛЕКТРОФОРЕЗ

1. Які сили діють на молекулу під час електрофорезу?
2. Що таке електрофоретична рухливість молекули та чим вона визначається?

3. Які гелі використовують для проведення електрофорезу? Навіщо їх використовують?
4. Як залежить електрофоретична рухливість молекули від її молекулярної маси?
5. Опишіть принцип методу аналізу поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів.
6. В чому особливість секвенуючого гель-електрофорезу?
7. Для чого використовують метод аналізу зсуву електрофоретичної рухливості?
8. Вкажіть фактори, які впливають на рухливість нуклеїнових кислот при електрофорезі.
9. Опишіть принцип електрофорезу білків в умовах денатурації.
10. Опишіть принцип двомірного електрофорезу. Для чого його використовують?

РОЗДІЛ 4. МЕТОДИ БЛОТ-ГІБРИДИЗАЦІЇ

1. Опишіть загальний принцип методів блот-гібридизації.
2. Опишіть принцип методу Саузерн блот-гібридизації.
3. Для чого використовується метод нозерн блот-гібридизації?
4. Яким чином проводиться виявлення наявності специфічних молекул при вестерн блот-гібридизації?
5. Що таке зонд?
6. Які є способи перенесення молекул з гелю на мембрану при блот-гібридизації?
7. У чому полягає принцип методу електроперенесення при блот-гібридизації?
8. Які типи мембран використовуються для перенесення молекул при блот-гібридизації?
9. У чому полягає суть методів дот-блот-гібридизації та слот-блот-гібридизації? Для чого вони використовуються?

РОЗДІЛ 5. ПОЛІМЕРАЗНА ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ

1. Вкажіть три основні етапи ПЛР.
2. Вкажіть приблизні температурні режими для кожного етапу ПЛР.
3. Перерахуйте обов’язкові компоненти, що необхідні для здійснення ПЛР. Вкажіть їх призначення.
4. Що таке праймер?

5. Які вимоги висуваються до праймерів, що використовуються у ПЛР?
6. Яка особливість ДНК-полімерази, що використовується у ПЛР?
7. Опишіть принцип ПЛР зі зворотною транскрипцією.
8. В якому варіанті ПЛР використовують інактивовану ДНК-полімеразу? Навіщо це робити?
9. Які варіанти ПЛР використовують для визначення концентрації ДНК у зразку? Який принцип такого визначення?
10. Опишіть систему детекції ДНК у зразку за допомогою зонда TaqMan.
11. Принцип визначення кількості ДНК у суміші за допомогою «молекулярних маячків» (molecular beacons).
12. Як використовують ПЛР для сайт-спрямованого мутагенезу?

РОЗДІЛ 6. КЛОНУВАННЯ ДНК

1. Що таке вектор?
2. Що таке полілінкер?
3. Опишіть етапи створення рекомбінантного вектора.
4. Які підходи застосовують для створення рекомбінантного вектора у випадку, коли дві молекули ДНК не мають взаємно комплементарних липких кінців?
5. Опишіть принцип топо-клонування та топо(ТА)-клонування.
6. Що таке трансформація бактерій та як її проводять?
7. Як відбувається селекція трансформованих клітин?
8. Опишіть принцип відбору колоній бактерій, трансформованих рекомбінантною плазмідою pUC19.
9. Опишіть принцип відбору колоній бактерій, трансформованих рекомбінантною плазмідою pBR322.
10. Як здійснюють клонування фрагментів ДНК за дпомогою векторів на основі бактеріофага λ?
11. Що таке космід? В чому їх перевага у порівнянні із векторами на снові плазмід та фагу λ?

РОЗДІЛ 7. МЕТОДИ АНАЛІЗУ ДНК-БІЛКОВИХ ВЗАЄМОДІЙ

1. Для чого застосовують метод футпринтингу ДНК? Вкажіть основні етапи проведення даного методу.
2. Що таке «зона футпринту»? Що вона дозволяє виявити?
3. Які підходи застосовують для отримання фрагментів ДНК у методі футпринтингу?

4. Опишіть принцип методу імунопреципітації хроматину (ChIP). Які сфери його застосування?
5. Яка відміна між методами N-ChiP та X-ChIP? В чому переваги та недоліки кожного із підходів?
6. Які антитіла використовують для осадження фрагментів ДНК, зшитих із білком у методі ChIP? Чому?
7. Яка функція білка Dam?
8. Які особливості проведення експресії генно-інженерної конструкції із трансферазою Dam?
9. Перерахуйте етапи реалізації технології DamID.
10. Порівняйте технології DamID та ChIP.

РОЗДІЛ 8. МЕТОДИ ФІКСАЦІЇ КОНФОРМАЦІЇ ХРОМОСОМ

1. Вкажіть сфери застосування методів фіксації конформації хромосом.
2. Опишіть загальну схему методу 3C.
3. Як у методах фіксації конформації хромосом досягається підвищення імовірності лігування фрагментів, що контактували?
4. Чим принципово відрізняється метод 4C від методу 3C?
5. Чому метод 5C в літературі позначають як «багато із багатьма» («many-by-many»)?
6. У чому перевага методу 5C у порівнянні із 3C та 4C?
7. Розкрийте принцип методу Hi-C. У чому його суттєва відмінність від інших методів фіксації конформації хромосом?
8. Яким чином у різних методах фіксації конформації хромосом встановлюють ділянки ДНК, що контактували у клітинному ядрі?

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

Основна:

1. Афанасьєва, К. (2016) *Фізичні методи в молекулярній генетиці. Практикум: навч. посіб.* Київ: ВПЦ «Київський університет».
2. Сиволоб, А. (2023) *Молекулярна біологія: підручник*. Київ: ВПЦ «Київський університет».
3. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E. et al. (2003) *Current Protocols in Molecular Biology*. Hoboken: John Wiley & Sons.
4. Carson, S., Miller H., Srougi, M. and Witherow, D.S.(2019) *Molecular biology techniques*. 4th ed. Cambridge: Academic Press.
5. Buckingham, L. and Flaws M. (2007) *Molecular diagnostics: fundamentals, methods and clinical applications.* Philadelphia: F.A. Davis Company.

Додаткова:

1. Adams, L.D. and Gallagher, S. (2004) Two-dimensional gel electrophoresis. *Curr. Prot. Mol. Biol*, 67, pp. 10.4.1–10.4.23.
2. Ali, N., Rampazzo, R.C.P., Costa, A.D.T. and Krieger, M.A. (2017) Current nucleic acid extraction methods and their implications to point-of-care diagnostics. *Biomed Res Int*. Available at: doi: 10.1155/2017/9306564. PMID: 28785592; PMCID: PMC5529626.
3. Artika, I.M., Dewi, Y.P., Nainggolan, I.M., Siregar, J.E. and Antonjaya, U. (2022) Real-time polymerase chain reaction: current techniques, applications, and rolein COVID-19 diagnosis. *Genes*, *13*, e2387. Available at: doi: 10.3390/genes13122387. PMID: 36553654; PMCID: PMC9778061.
4. Begum, H., Murugesan, P. and Tangutur, A.D. (2022) Western blotting: a powerful staple in scientific and biomedical research. *Biotechniques*, 73(1), pp.58-69.
5. Dadi, M., and Yasir, M. (2022) *Spectroscopy and spectrophotometry: principles and applications for colorimetric and related other analysis*. Colorimetry. Intech Open. Available at: http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.101106.
6. Das, P.M., Ramachandran, K., van Wert, J. and Singal, R. (2004) Chromatin immunoprecipitation assay. *Biotechniques*, 37, pp.961–969.

7. Dostie, J., Richmond, T.A., Arnaout, R.A., et al. (2006) Chromosome conformation capture carbon copy (5C): a massively parallel solution for mapping interactions between genomic elements. *Genome Res*, 16(10), pp.1299-1309.

8. Ferraz, R.A.C., Lopes, A.L.G., da Silva, J.A.F., et al. (2021) DNA-protein interaction studies: a historical and comparative analysis. *Plant Methods*, 17(1), a82. Available at: doi: 10.1186/s13007-021-00780-z. PMID: 34301293; PMCID: PMC8299673.

9. Ghannam, M.G. and Varacallo, M. (2023) *Biochemistry, polymerase chain reaction*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.

10. Hellman, L. and Fried, M. (2007) Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein–nucleic acid interactions. *Nat Protoc*, 2, pp. 1849–1861.

11. Hilario, E. (2007). Overview of hybridization and detection techniques. In: Hilario, E., Mackay, J. (eds) *Protocols for nucleic acid analysis by nonradioactive probes. Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ: Humana Press.

12. Hsieh, T.S., Fudenberg, G., Goloborodko, A. and Rando, O.J. (2016) Micro-C XL: assaying chromosome conformation from the nucleosome to the entire genome. *Nat. Methods* 13, pp. 1009–1011.

13. Jerkovic, I. and Cavalli, G. (2021) Understanding 3D genome organization by multidisciplinary methods. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 22(8), pp. 511-528.

14. Mahony, S. and Pugh, B.F. (2015) Protein-DNA binding in high-resolution. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 50(4), pp.269-283.

15. Rao, S.S., Huntley, M.H., Durand, N.C., et al. (2014) A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell*, 159, pp. 1665–1680.

16. Sajjadi, S.H, Ahmadzadeh, H. And Goharshadi E.K. (2020) Enhanced electrophoretic separation of proteins by tethered SiO_2 nanoparticles in an SDS-polyacrylamide gel network. *Analyst*, 145(2), pp.415-423.

17. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (2012) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 4th ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

18. Song, C., Zhang, S., Huang, H. (2015) Choosing a suitable method for the identification of replication origins in microbial genomes. *Front Microbiol*, 6,

a1049. Available at: doi: 10.3389/fmicb.2015.01049. PMID: 26483774; PMCID: PMC4588119.

19. Stellwagen, N.C. (2009) Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. *Electrophoresis*. Available at: 10.1002/elps.200900052. PMID: 19517510; PMCID: PMC2757927.
20. Taylor, S.C., Nadeau, K., Abbasi, M., et al. (2019) The ultimate qPCR experiment: producing publication quality, reproducible data the first time. *Trends Biotechnol.* 37, 761–774.
21. Vogel, M., Peric-Hupkes, D. and van Steensel, B. (2007) Detection of *in vivo* protein–DNA interactions using DamID in mammalian cells. *Nat Protoc*, 2, pp. 1467–1478.

Інтернет-ресурси:

1. NCBI databases https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
2. Uniprot https://www.uniprot.org/
3. Expasy: Swiss Bioinformatics Resource Portal: https://www.expasy.org/