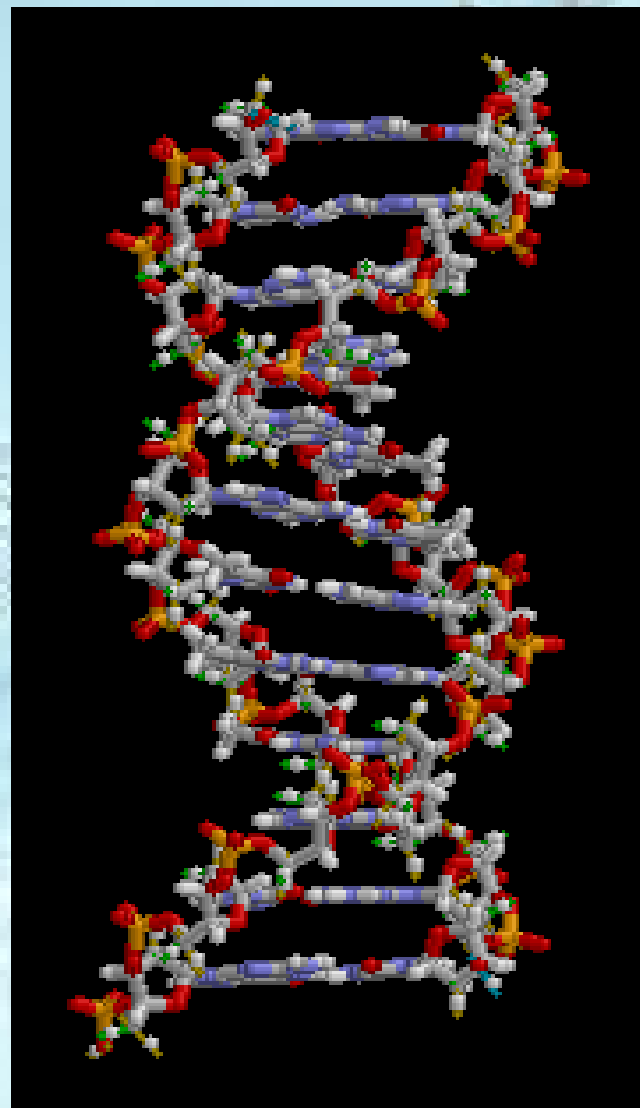





Межфакультетский курс лекций
Химический факультет МГУ
имени М.В. Ломоносова



«Геном человека: страхи и надежды»

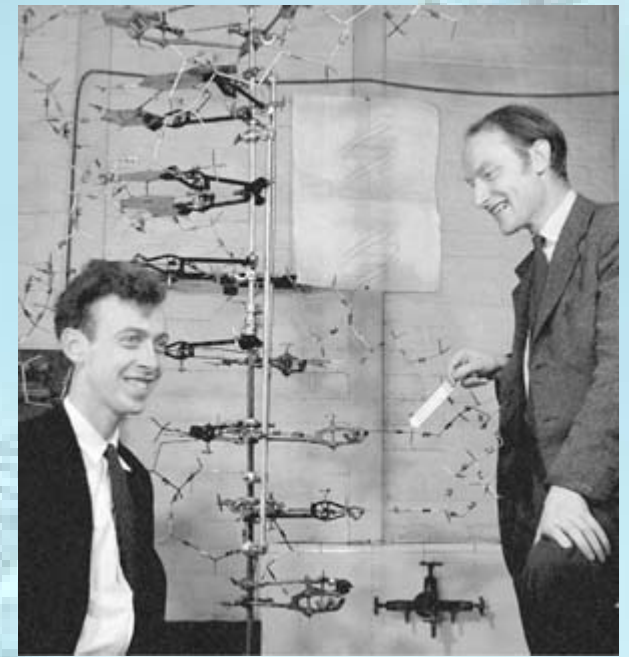


Определение нуклеиновых кислот,
ДНК-зонды и ДНК-чипы.

Выявление наследственных и
инфекционных заболеваний.
Как определяют коронавирус?

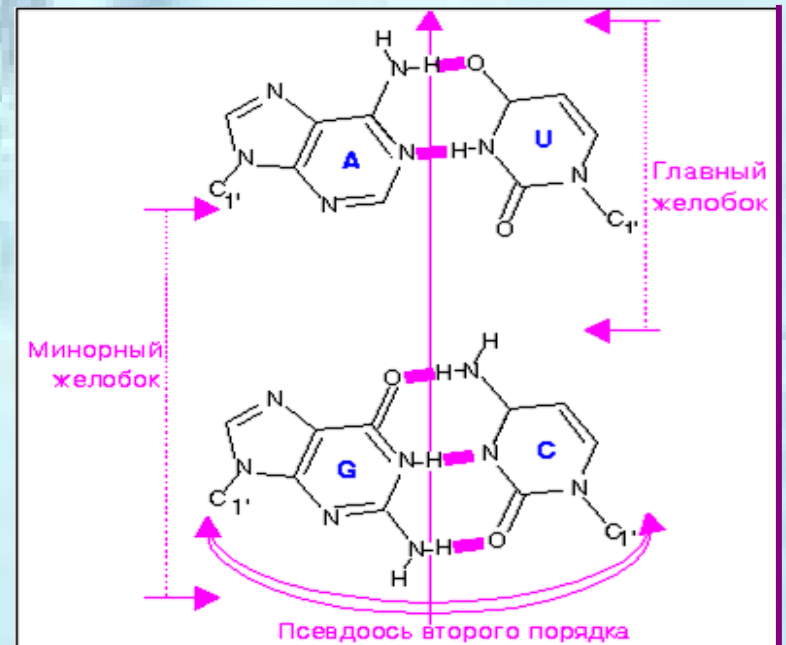
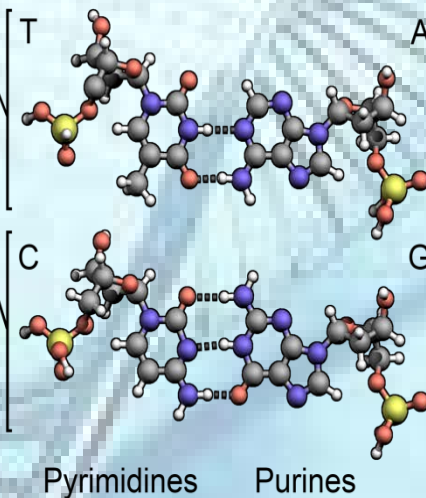
Готтих Марина Борисовна
профессор кафедры химии природных соединений
Химического факультета МГУ

Двойная спираль ДНК формируется за счет образования водородных связей между комплементарными основаниями



T = A

C ≡ G



Образование комплексов комплементарными последовательностями НК

НК-1

–AGTGGTCTGCGTAACCGGTGAGTACACCG–

НК-2

–AGGTATGCGCCAAGGTTTGAGTACACTG–

CGCCTTGGCCACTCA

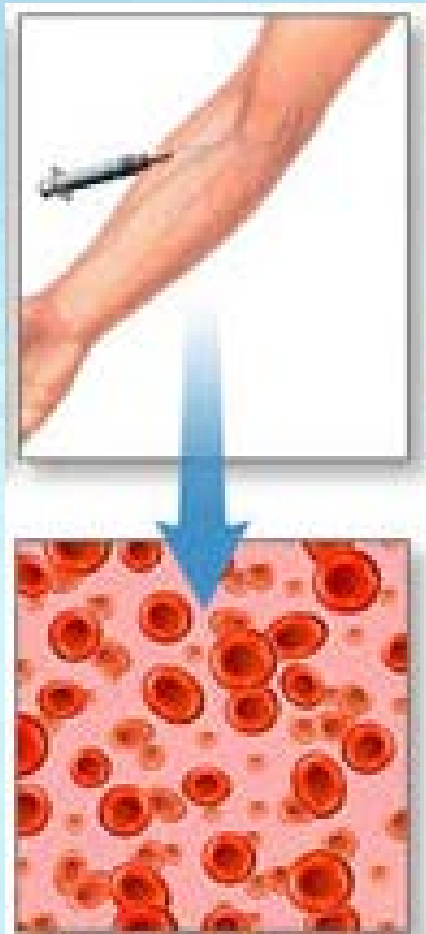
–AGTGGTCT**GCGGAACCGGTGAGT**ACACCG–
 •••••
 CGCCTTGGCCACTCA

Нет комплекса

Образовался комплементарный комплекс

Определение нуклеиновых кислот

основано на способности
олигонуклеотидов образовывать
специфические комплексы
(гибридизоваться) с комплементарными
последовательностями ДНК и РНК



Существует два принципиальных
подхода к определению
нуклеиновых кислот:

1. гибридизационный анализ;
2. ПЦР-диагностика

Гибридизационный анализ нуклеиновых кислот

Задача:

Идентифицировать в смеси определенную ДНК или РНК

Решение:

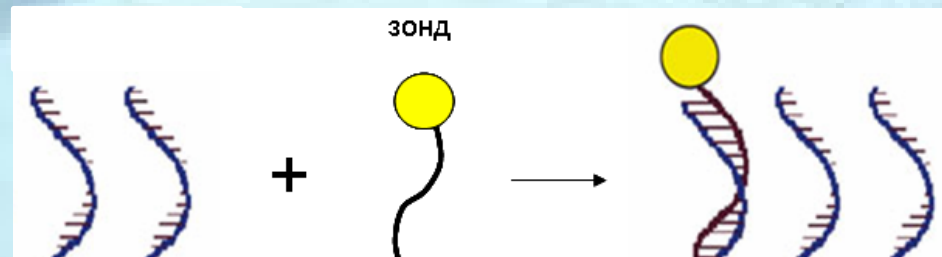
Добавляют в смесь олигонуклеотид-зонд, комплементарный искомой НК и содержащий какую-либо метку, позволяющую его увидеть, и он формирует с анализируемой НК комплекс, который можно детектировать за счет метки зонда

Проблема 1:

ДНК двуцепочечная, РНК обычно имеет очень сложную структуру

Решение:

НК денатурируют и «отжигают» с зондом



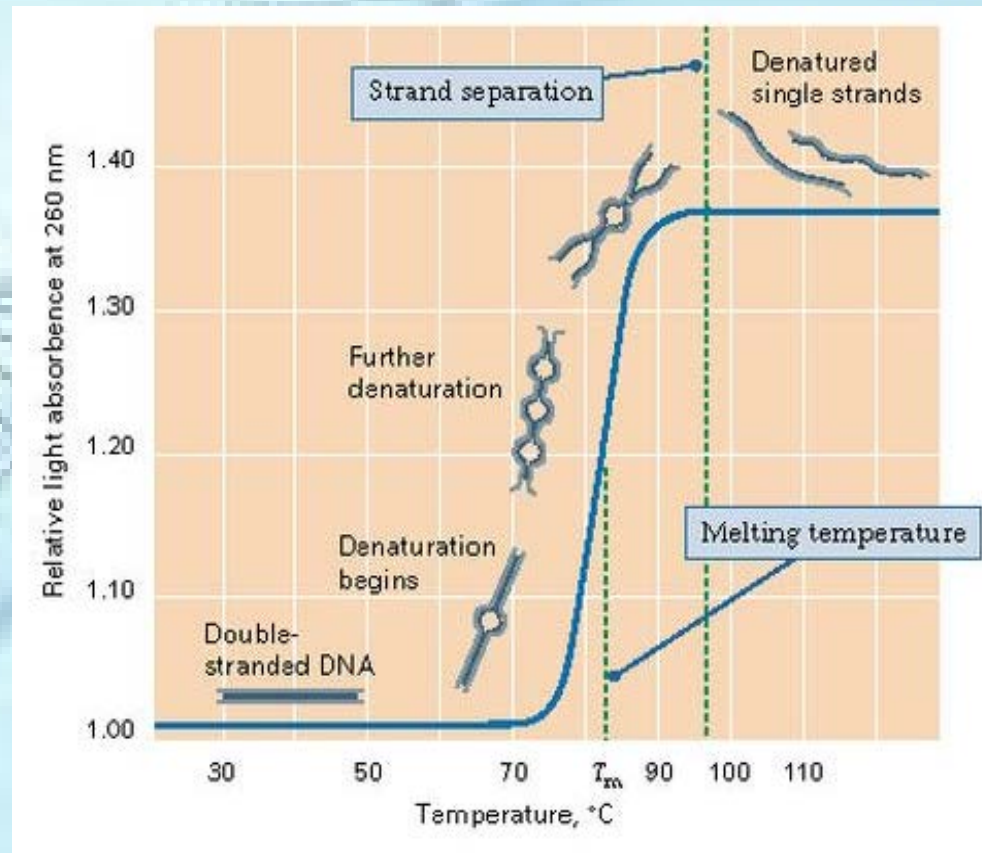
Денатурация двойной спирали НК

➤ Устойчивость двойной спирали характеризуется температурой плавления

Плавление НК - процесс перехода регулярной двойной спирали линейной молекулы НК в неупорядоченное состояние.

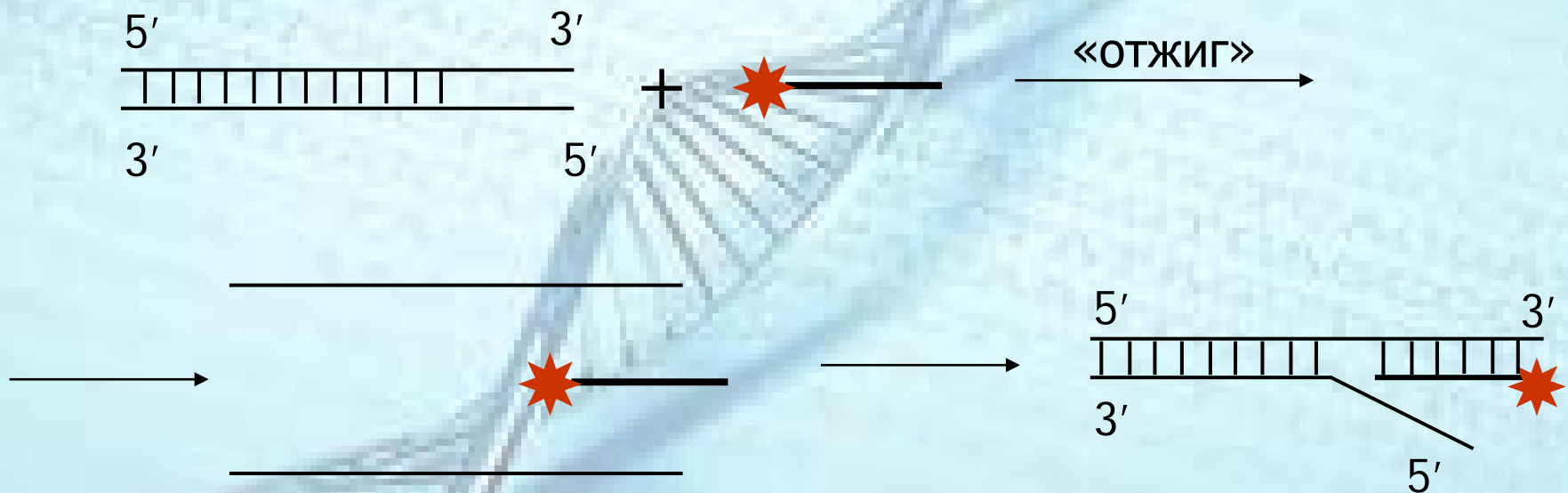
Для количественных измерений степени перехода используется изменение поглощения света раствором НК в области длин волн 250-270 нм. При переходе НК из спирального состояния в клубкообразное поглощение раствора А в этой области длин волн увеличивается.

Плавление является обратимым процессом.



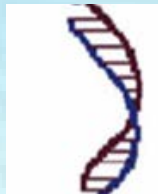
Формирование комплекса ДНК с зондом

«Отжиг» - нагревание смеси ДНК с зондом до 90-95°C и медленное охлаждение для формирования комплементарного комплекса. Смесь содержит избыток олигонуклеотида-зонда и зонд короче ДНК, поэтому дуплекс ДНК-зонд образуется быстрее, чем ДНК-ДНК.

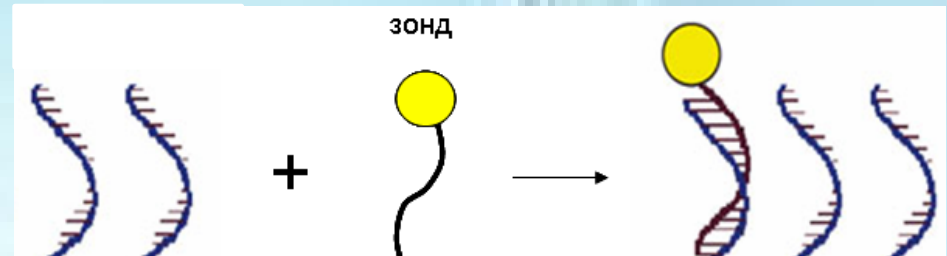


Гибридизационный анализ нуклеиновых кислот

Анализируемая
ДНК



денатурация



Проблема 2:

Чтобы определить искомую НК в смеси других НК, надо знать ее структуру

Решение:

Надо определить структуру искомой ДНК

Как «прочитать» структуру ДНК?

Проблемы:

Две цепи в одной молекуле

Очень длинные молекулы

Определение последовательности (sequence) нуклеотидов в ДНК (секвенирование ДНК)

Стало возможным в середине 80-х годов 20 века
благодаря открытию:

- эндонуклеаз рестрикции
- возможности полимеразной достройки ДНК
- высокоразрешающего ПААГ

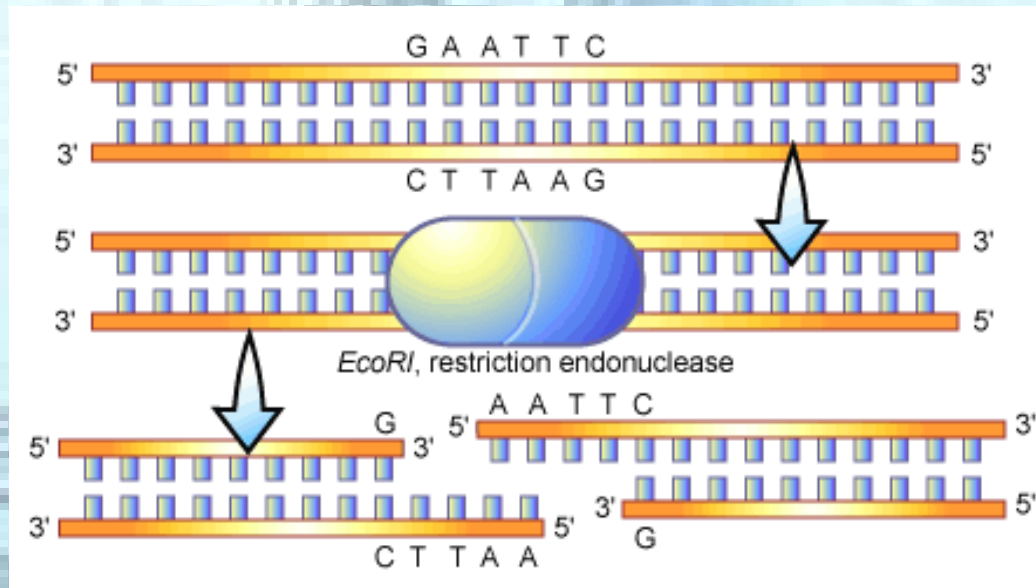


Эндонуклеазы рестрикции

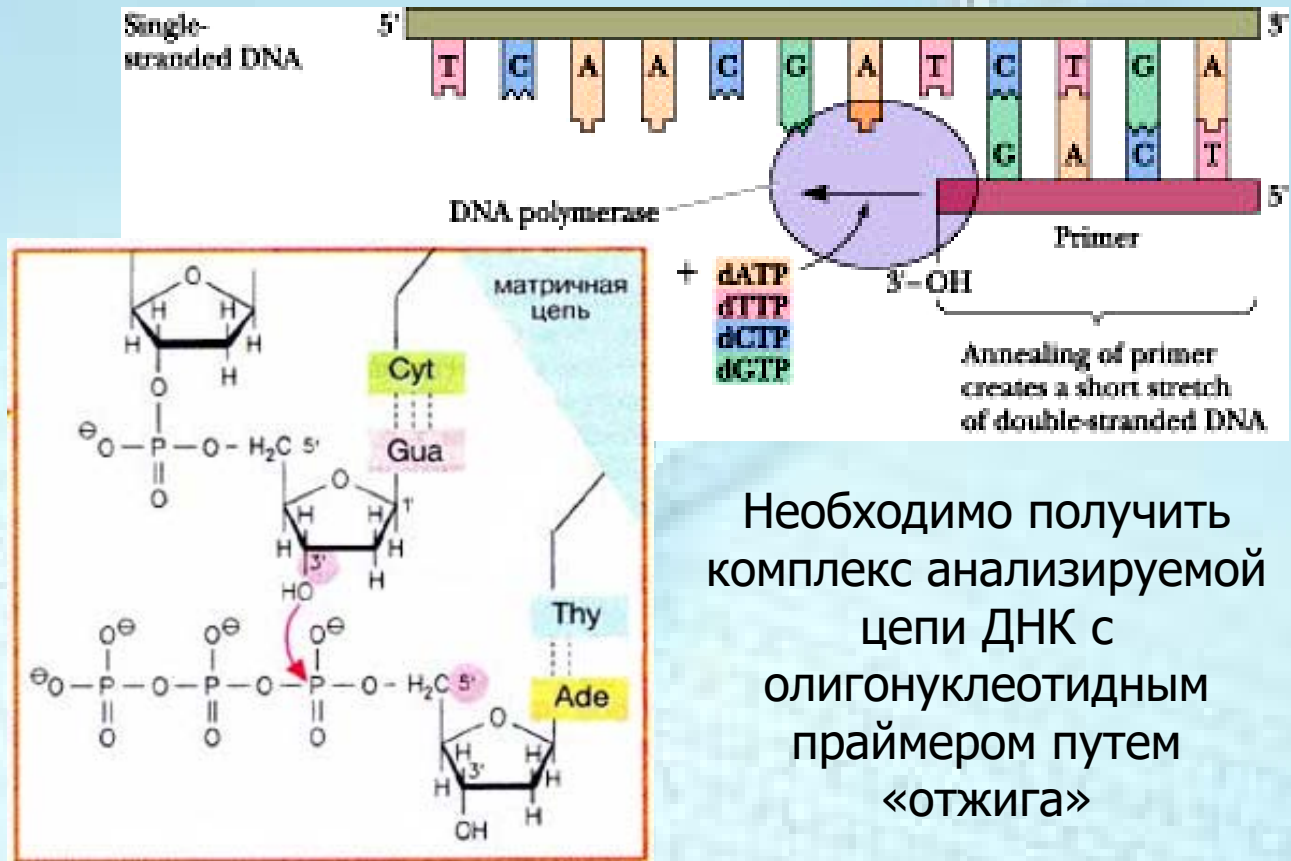
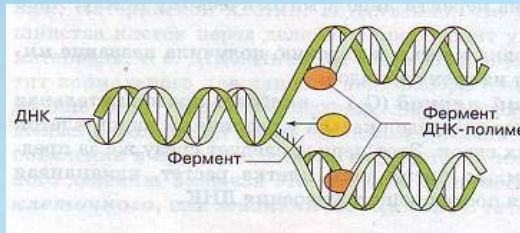
В начале 70-х годов в бактериях обнаружены эндонуклеазы - ферменты, расщепляющие двуцепочечную ДНК по строго определенным последовательностям, эндонуклеазы рестрикции.

Эндонуклеазы рестрикции II типа имеют сайты из 4-8 нуклеотидов. Обычно, но не всегда, сайты симметричны.

Узнаваемые тетрануклеотидные последовательности в среднем встречаются в геноме через $4^4 = 256$ нуклеотидов, гексануклеотидные – $4^6 = 4096$ нуклеотидов



Принцип полимеразной достройки ДНК

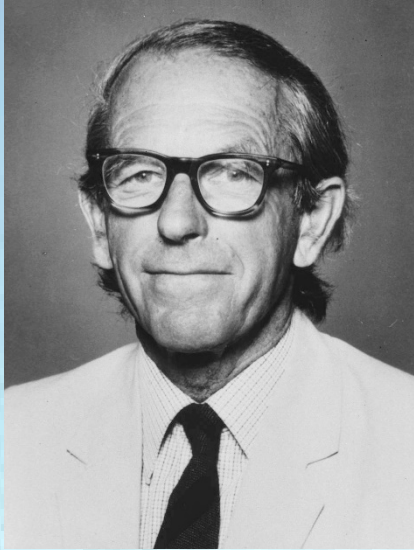


Необходимо получить комплекс анализируемой цепи ДНК с олигонуклеотидным праймером путем «отжига»

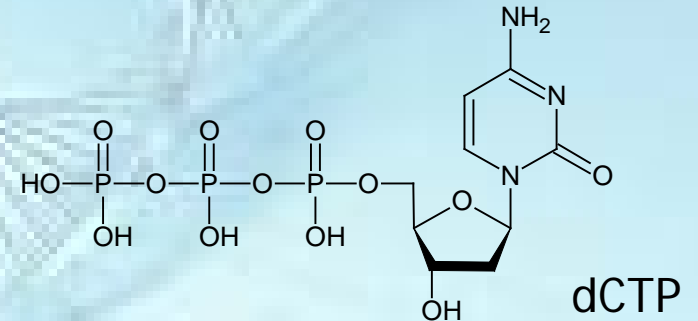
Наращивается цепь, комплементарная анализируемой

Первичную структуру анализируемой цепи можно определить, если научиться останавливать достройку на определенных основаниях

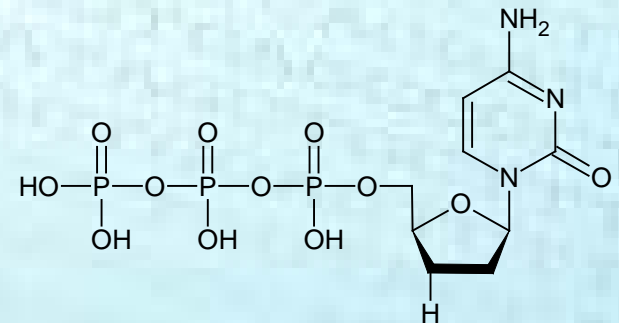
Секвенирование ДНК с обрывом цепи метод "терминаторов" или дидезокси-метод



В 1977 г. **Фредерик Сэнгер** предложил для ферментативного секвенирования ДНК **метод терминирующих аналогов трифосфатов**. Специфическую терминацию (остановку) синтеза – обрыв цепи – обеспечивали добавлением в реакционную смесь помимо четырех типов dNTP еще и одного из 2',3'-дидезоксинуклеозид-трифосфатов (ddATP, ddTTP, ddCTP или ddGTP), который способен включаться в растущую цепь ДНК, но не способен обеспечивать дальнейшее копирование из-за отсутствия 3'-ОН группы.



Трифосфат дезоксицитидина



ddCTP

Трифосфат дидезоксицитидина

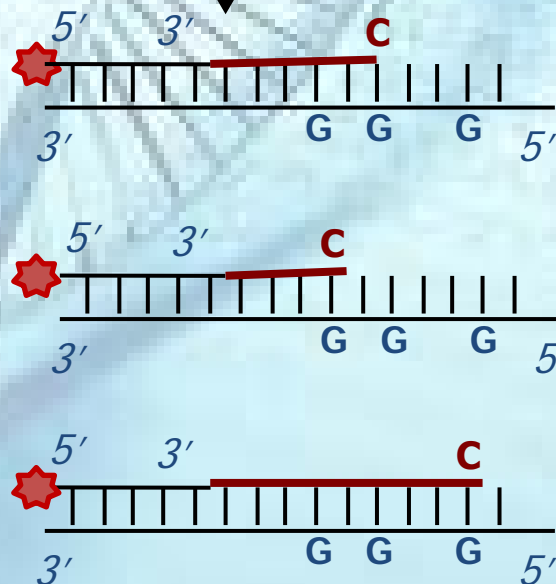
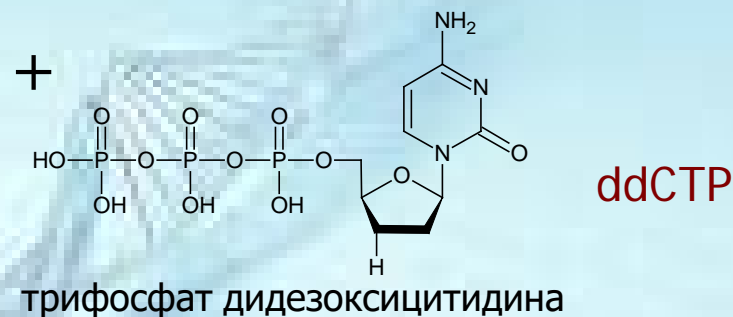
Секвенирование ДНК с обрывом цепи

праймер



Праймер содержит
метку

Добавляют ДНК-полимеразу,
смесь трифосфатов всех
4-х нуклеотидов (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)

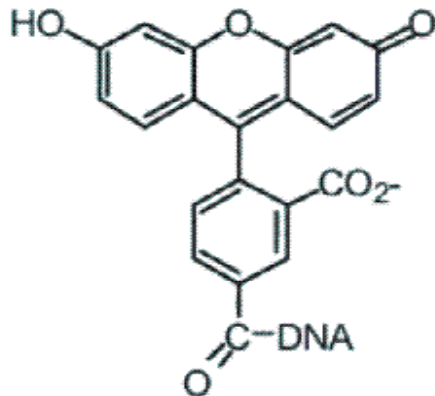
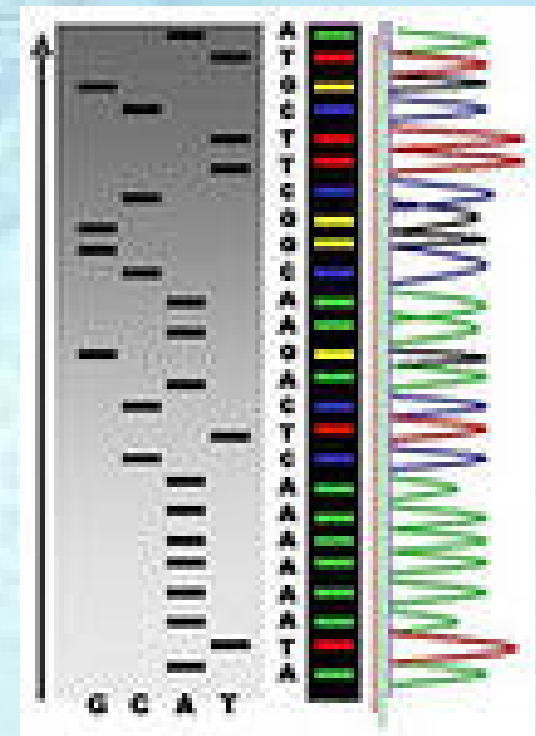


Получают семейство
фрагментов ДНК
разной длины, но все
молекулы имеют на
3'-конце
дидезоксицитидин

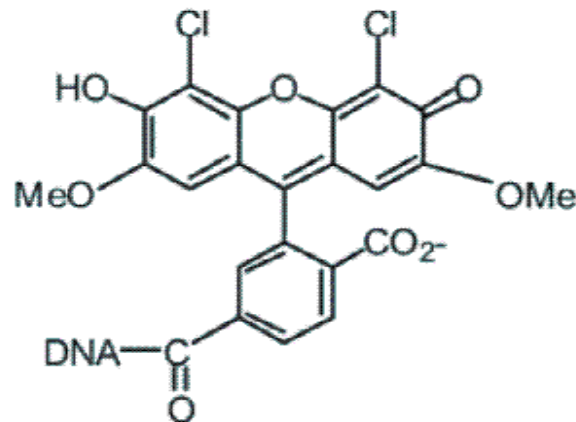
Типы меток для секвенирования ДНК

1. Радиоактивная метка $-^{32}\text{P}$
2. Флуоресцентные метки

Разные метки
для разных букв



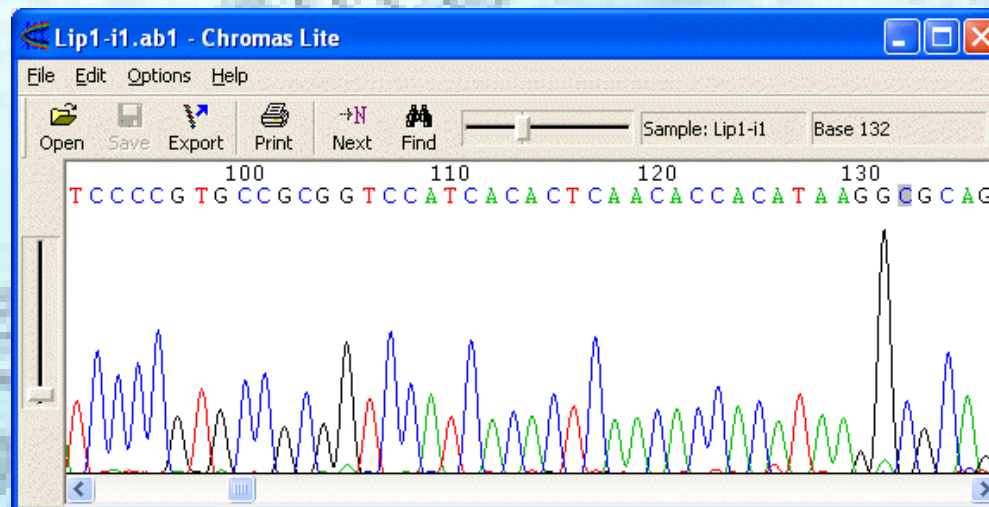
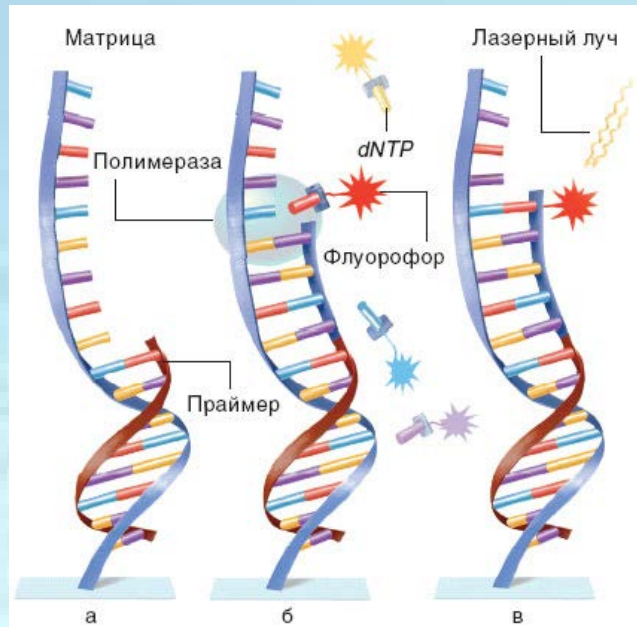
5 FAM



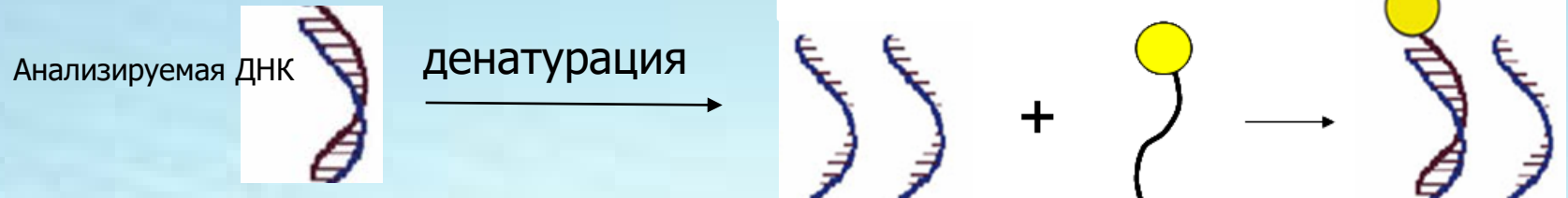
JOE

Структурные формулы флуоресцеиновых красителей

Автоматическое секвенирование ДНК



Гибридизационный анализ нуклеиновых кислот



Проблема 3:

Как детектировать малые количества определяемой НК?

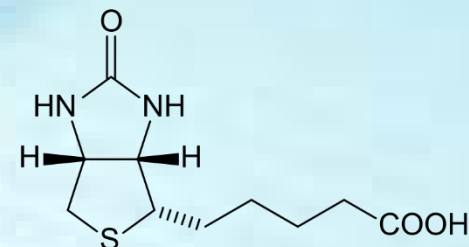
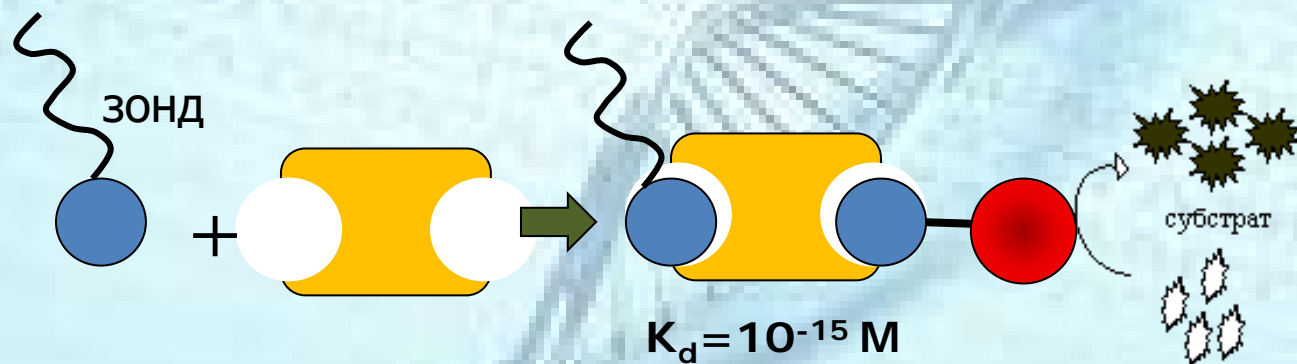
Решение:

Надо повысить чувствительность определения метки и/или увеличить количество определяемой НК

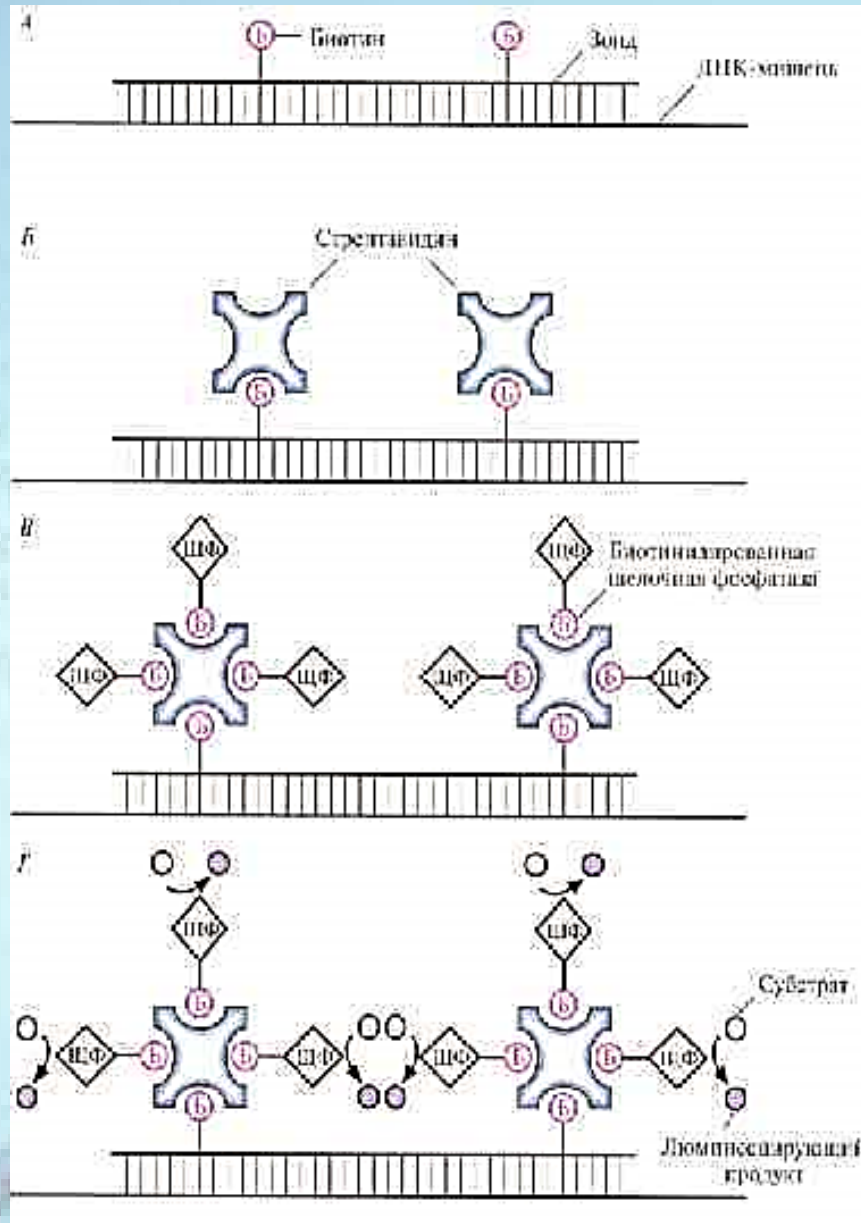
Типы меток для детекции зондов

Флуоресцентные метки

Система биотин-авидин (стрептавидин)



Принцип анализа ДНК с помощью системы биотин-стрептавидин



Зонд связывается с ДНК

Стрептавидин связывается с биотином

Биотинилированная щелочная фосфатаза связывается со стрептавидином

Щелочная фосфатаза катализирует синтез окрашенного продукта

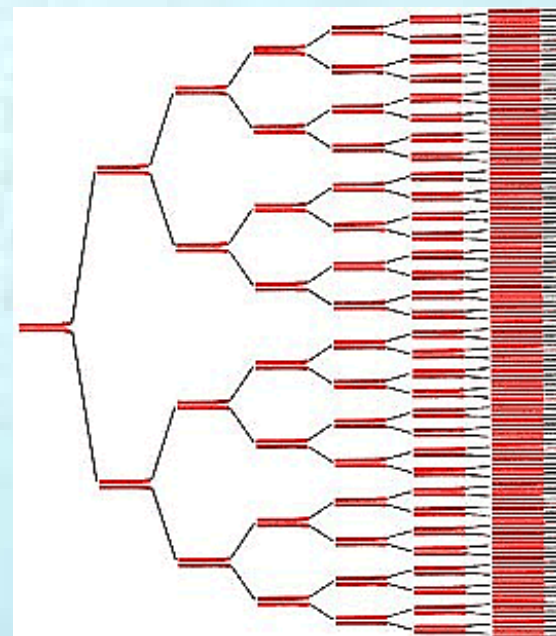
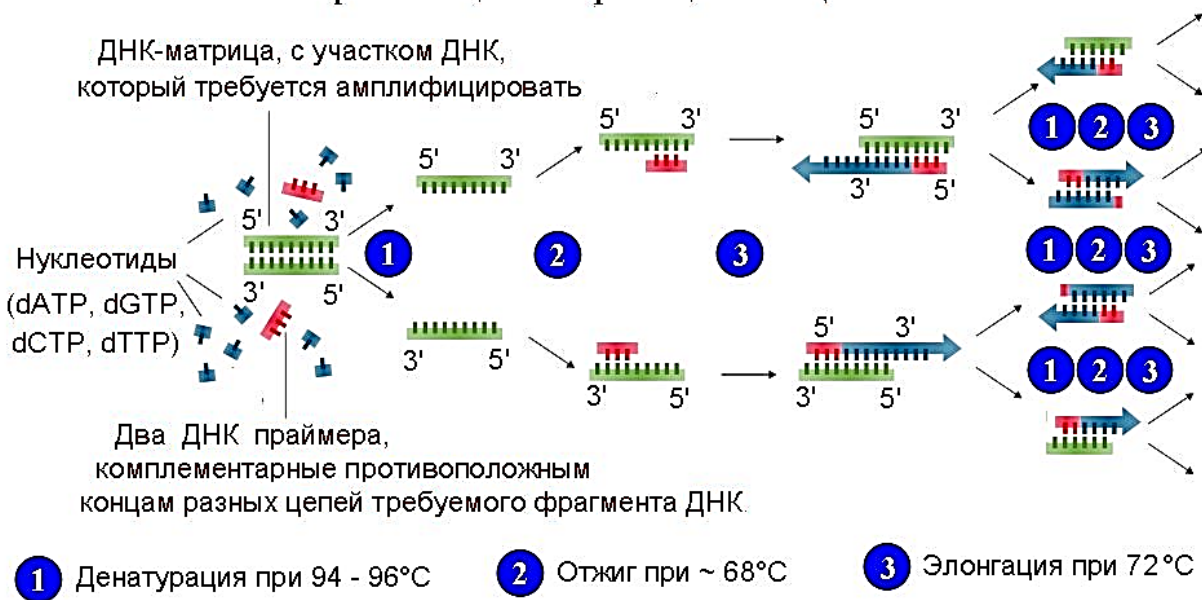
Увеличить количество определяемой ДНК можно с помощью полимеразной цепной реакции - ПЦР

Полимеразная цепная реакция [ПЦР (PCR)] позволяет многократно **воспроизводить (амплифицировать)** выбранный фрагмент ДНК. Специфичность ПЦР основана на образовании комплементарных комплексов между матрицей и праймерами длиной 18—30 оснований. Каждый из праймеров комплементарен одной из цепей двуцепочечной матрицы и ограничивает начало и конец амплифицируемого участка.

Обычно при проведении ПЦР выполняется 20—35 циклов, каждый из которых состоит из трёх стадий

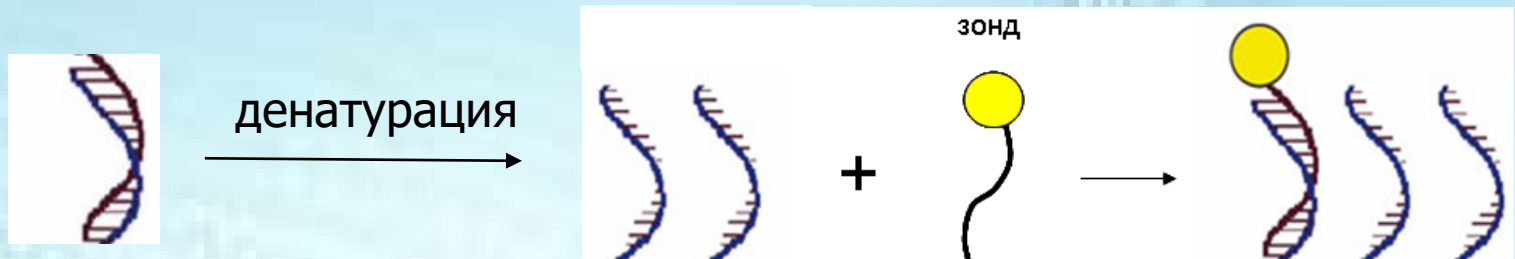
С каждым циклом ПЦР количество целевой ДНК удваивается

Полимеразная цепная реакция - ПЦР



Гибридизационный анализ нуклеиновых кислот

Анализируемая
ДНК



Проблема 4:

Для идентификации комплементарного комплекса НК-зонд надо отделить его от свободного (несвязанного) зонда

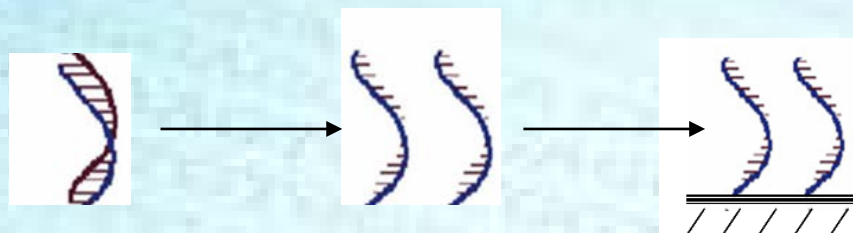
Решение:

Надо иммобилизовать комплекс НК-зонд на твердой фазе и отмыть его от свободного зонда

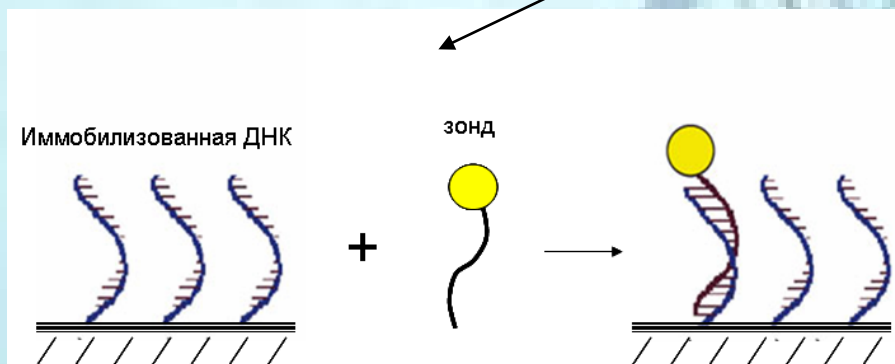
Существует два варианта гибридизационного анализа в зависимости от того, какой компонент фиксирован на носителе:

блот-гибридизация и ДНК-чипы

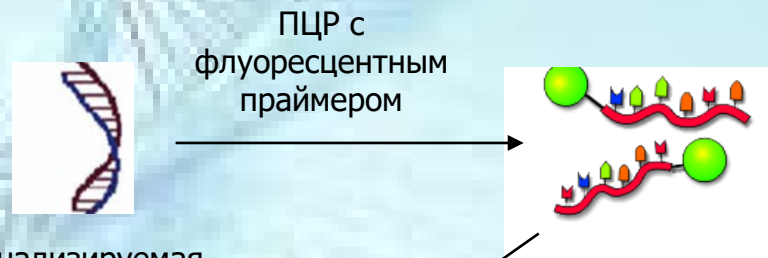
Блот-гибридизация



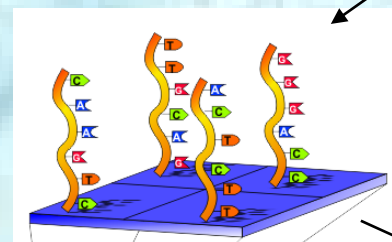
Анализируемая ДНК



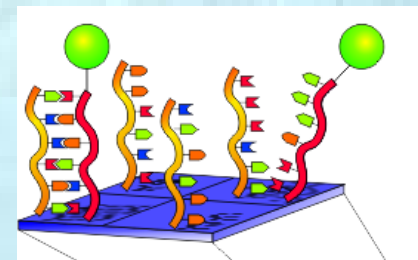
ДНК-чипы



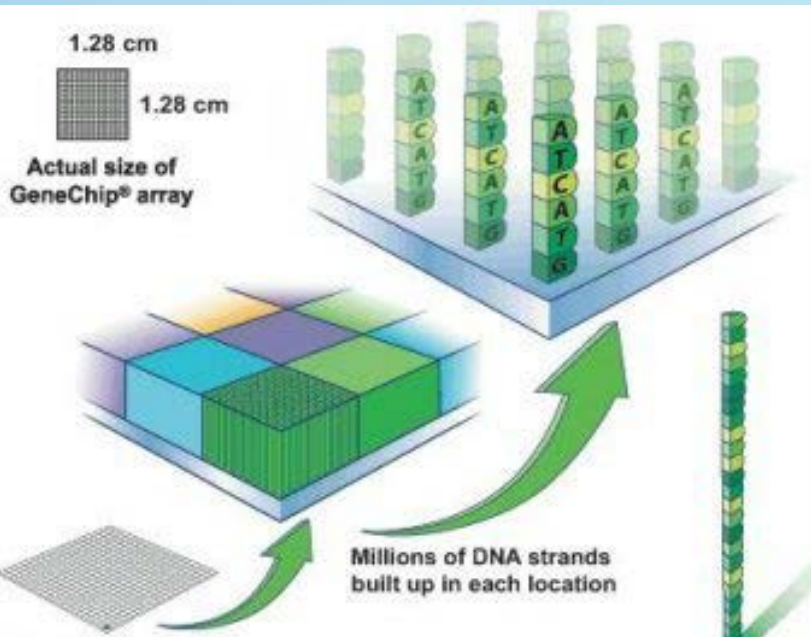
Анализируемая ДНК



Иммобилизованный зонд



ДНК-чипы (*DNA microarray*)



Каждая ячейка размером в 5-10 мкм содержит одноцепочечные олигонуклеотиды одной определенной последовательности, их длина от 9-10 до 1000 нуклеотидов

Southern E.M. DNA chips: Analysing sequence by hybridization to oligonucleotides on a large scale. Trends Genet 12:110, 1996

Два основных способа создания ДНК-чипов:

- Иммобилизация синтезированного олигонуклеотида на поверхности

Количество последовательностей
 $< 100\,000\text{ на }1\text{ см}^2$

- Синтез олигонуклеотидов на поверхности чипа ('on-chip') путем поэтапного добавления нуклеотидов к растущему концу цепи

Количество последовательностей
 $> 1\,000\,000\text{ на }1\text{ см}^2$

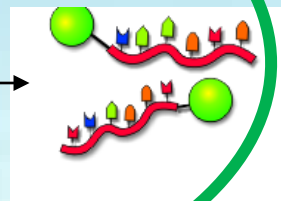
Стандартная длина 20-25 нуклеотидов

Принципиальная схема гибридизации на чипах

ПЦР с использованием
одного
флуоресцентного
праймера



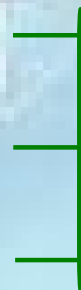
Анализируемая
ДНК



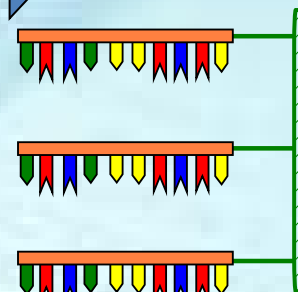
олигонуклеотидный зонд



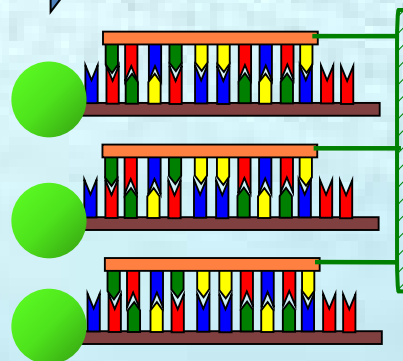
носитель



иммобилизация



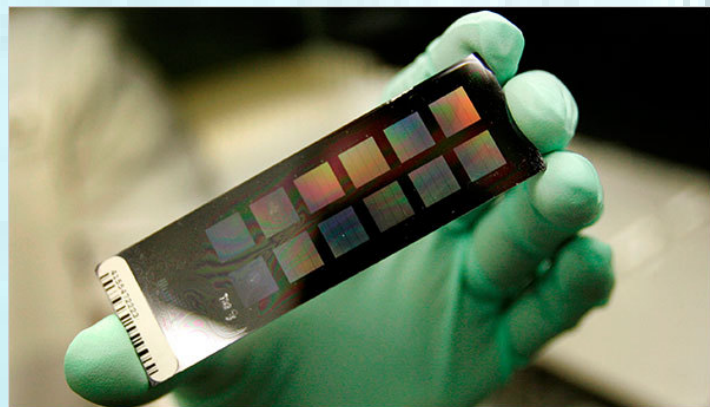
гибридизация



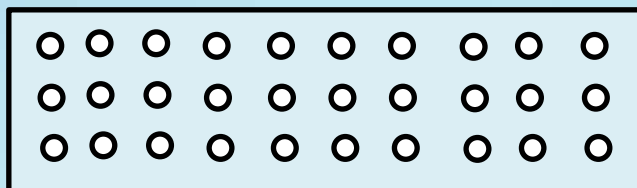
Флуоресцентный
ПЦР-продукт



регистрация
сигнала

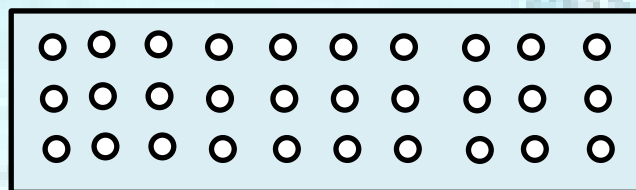


Принципиальная схема блот-гибридизации



+ образец суммарной ДНК

П 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



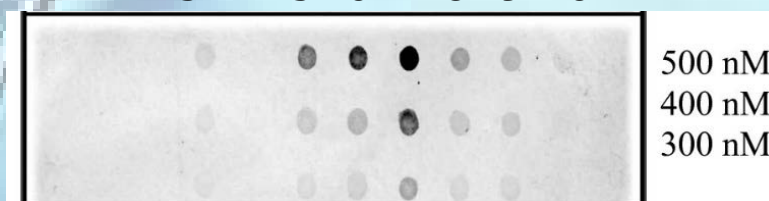
↓ Пробы с разными концентрациями ДНК

↓ ОТМЫВКА

+ ЗОНД

↓ ОТМЫВКА

П 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



500 nM
400 nM
300 nM

Гибридизационный анализ нуклеиновых кислот



Проблема 5:

Зонд может связаться с нецелевой ДНК за счет образования не полностью комплементарного дуплекса

Решение:

1. Надо проводить гибридизацию с отмывками в определенном градиенте температуры

Совершенные и ошибочные комплексы различаются по термической устойчивости, важно правильно выбрать температуру гибридизации.

2. Надо оптимизировать структуру зонда

Например, использовать зонды типа «молекулярных маяков»

Комплексы, получаемые при гибридизации

➤ совершенный комплекс

–AGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCG–
 •••••
 CGCCTTGGCCAТСА

➤ «неправильные» комплексы

–AGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCG– –AGTGGTCTGCGGA– –GGTGAGTACACCG–
 ••••• AAA ••••• •••••
 CGCCTTGG CTCA CGCCT TGG CCAТСА
 CCA

➤ комплекс с одонуклеотидным несоответствием

–AGTGGTCTGCGGAACGGTGAGTACACCG–
 ••••• •••••
 CGCCTTGGCCAТСА

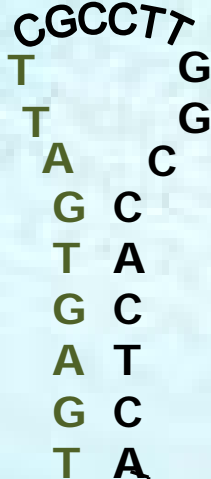
При анализе возможна неспецифическая гибридизация!

Использование зондов типа шпильки («молекулярных маяков» - molecular-beacon) для повышения специфичности гибридизации

совершенный комплекс

-AGTGGTCTGCGTAACCGGTGAGTACACCG-
CGCCTTGGCCACTCA

-AGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCG-



Разгорание
флуоресценции

-AGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCG-

CGCCTTGGCCACTCA



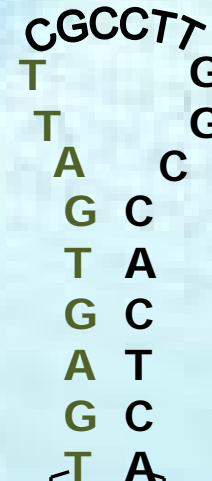
комплекс с

однонуклеотидным

несоответствием

-AGTGGTCTGCGTAACCGGTGAGTACACCG-
CGCCTTGGCCACTCA

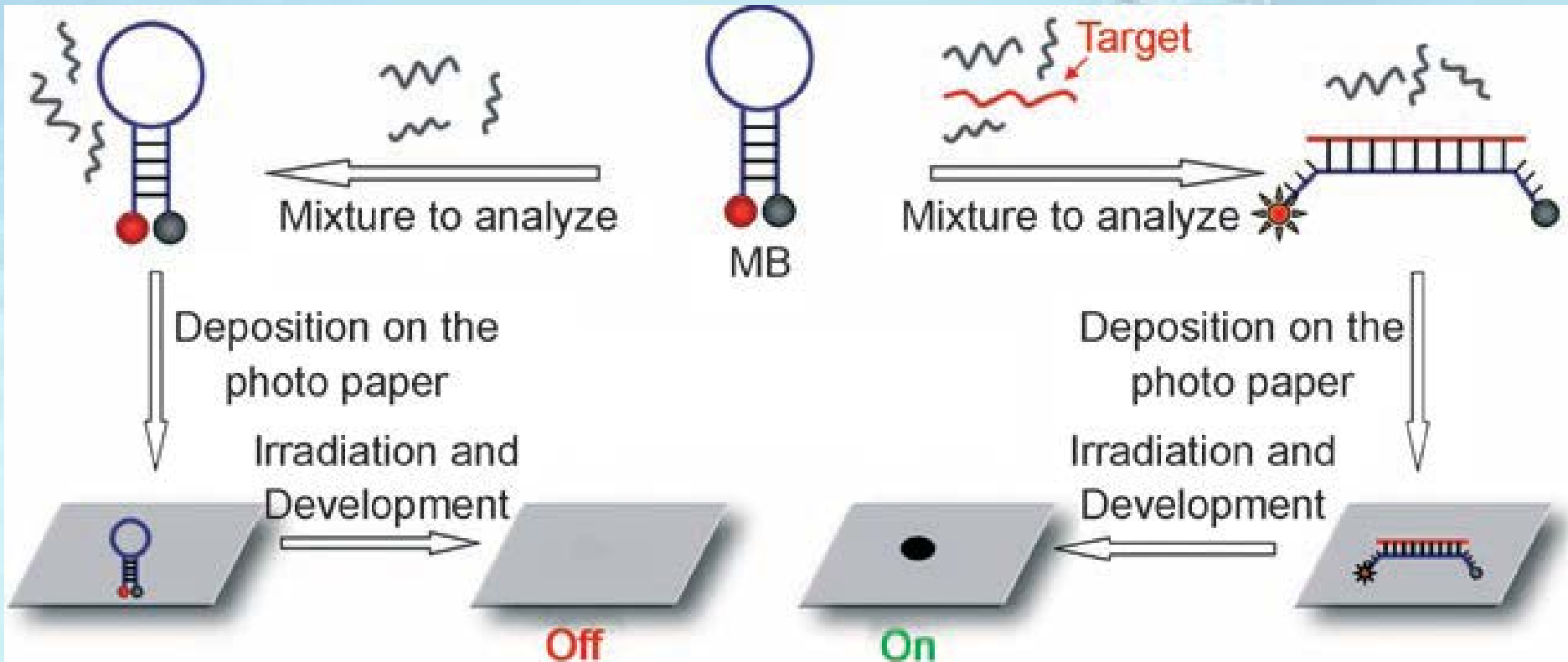
-AGTGGTCTGCGTAACCGGTGAGTACACCG-



Нет разгорания
флуоресценции

Принцип детекции НК с использованием «разгорания» флуоресценции molecular-beacon (MB)

Детектируются только искомые молекулы-мишени

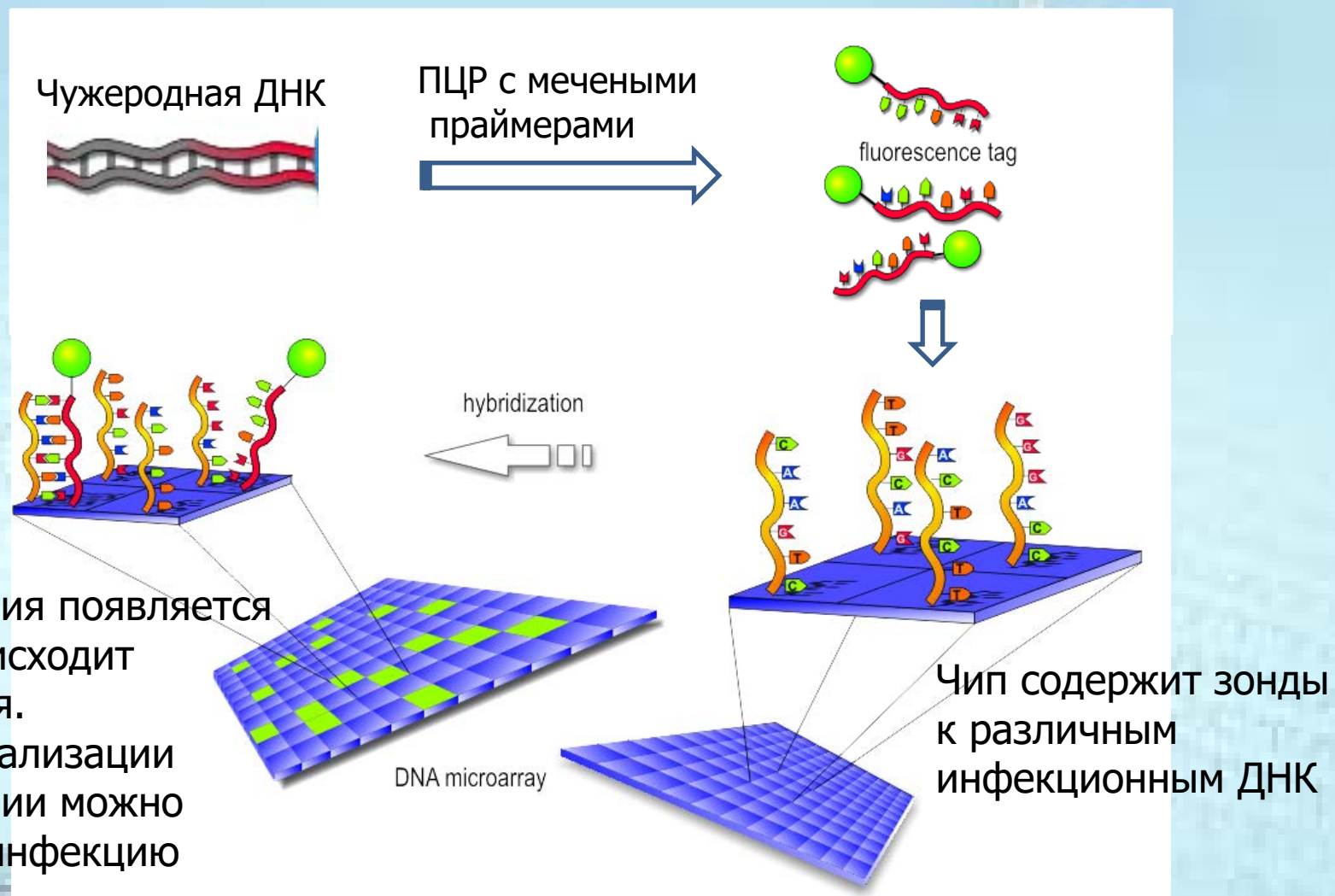


Использование зондов типа MB позволяет существенно повысить специфичность гибридационного анализа. MB позволяют определять даже однонуклеотидные замены в ДНК

Применение методов гибридизационного анализа

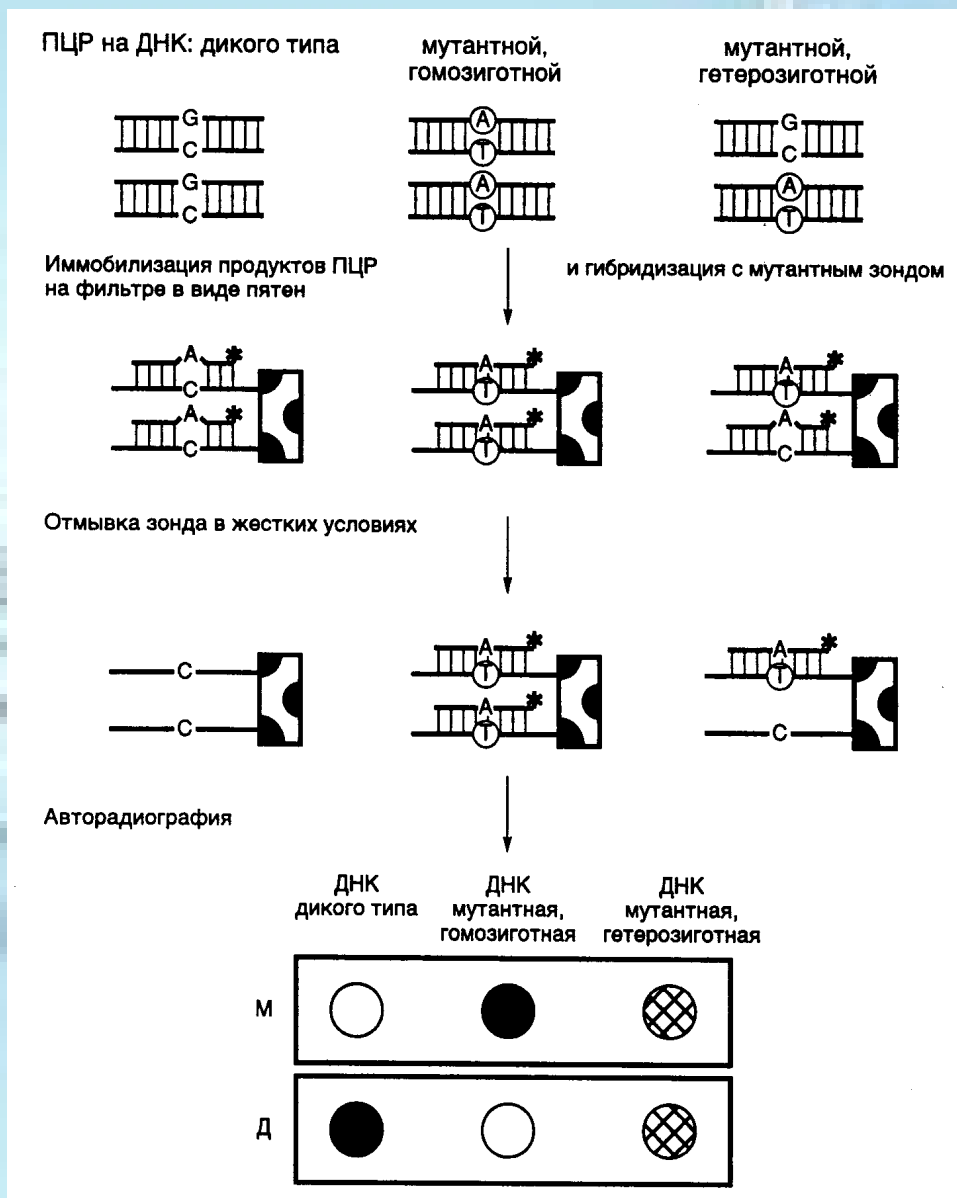
- Диагностика инфекционных заболеваний и определение наиболее эффективного метода антибиотикотерапии
- Идентификация мутаций в генах, связанных с различными заболеваниями
- Наблюдение за активностью генов (анализ экспрессии)
- Идентификация генов, важных для нормального развития различных организмов
- Скрининг микроорганизмов, как патогенных, так и полезных

Диагностика инфекционных заболеваний



Идентификация мутаций в генах, вызывающих наследственные заболевания

Определение
серповидноклеточной анемии
блот-гибридизацией



Определение серповидноклеточной анемии на чипах в системе с двумя зондами

НОРМА

— AGATTCA^GGCATATT —
— TCTAAGT^CCGTATAA —

— AGATTCA^GGCATATT —
— TCTAAGT^CCGTATAA —

НОСИТЕЛЬ

— AGATTCA^GGCATATT —
— TCTAAGT^CCGTATAA —

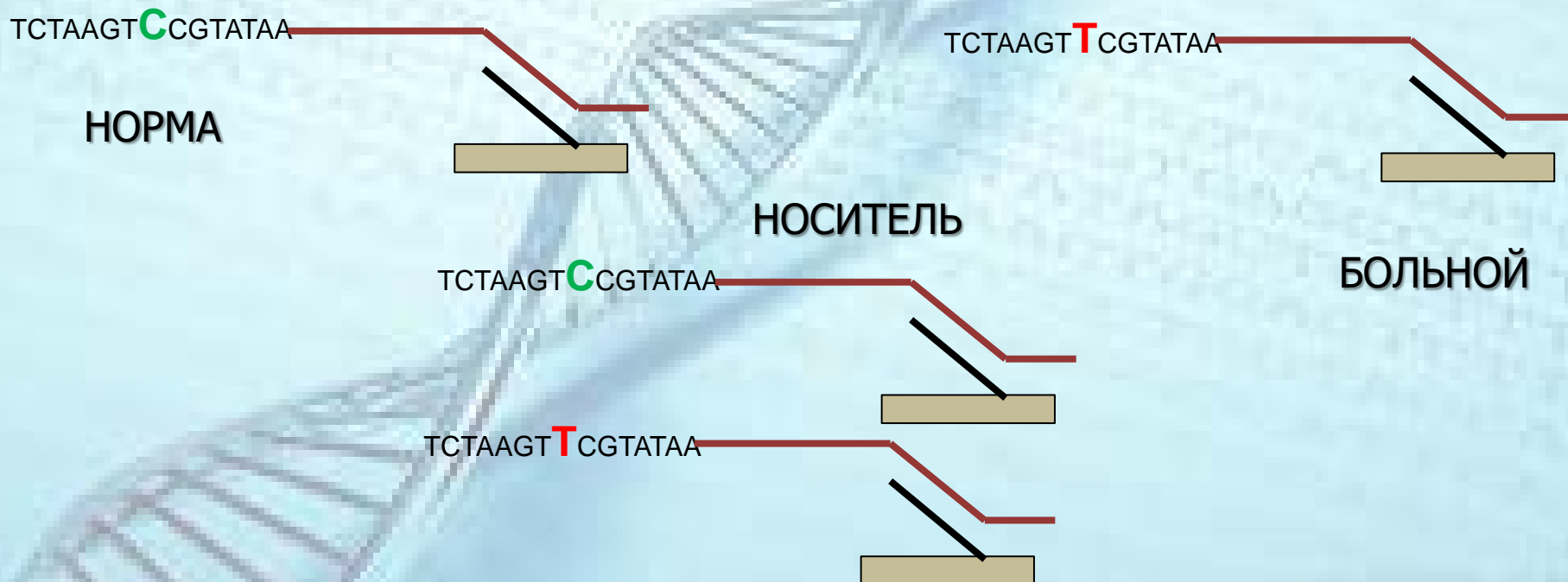
— AGATTCA^AGCATATT —
— TCTAAGT^TCGTATAA —

БОЛЬНОЙ

— AGATTCA^AGCATATT —
— TCTAAGT^TCGTATAA —

— AGATTCA^AGCATATT —
— TCTAAGT^TCGTATAA —

Гибридизация с иммобилизованным на чипе зондом, комплементарным одной из цепей анализируемой ДНК в районе, НЕ содержащем мутации



TCTAAGT **C**CGTATAA

НОРМА

TCTAAGT **T**CGTATAA

БОЛЬНОЙ

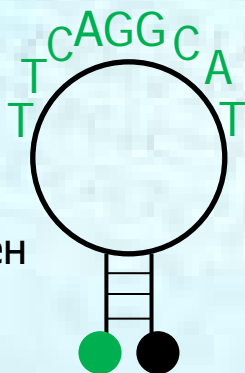
НОСИТЕЛЬ

TCTAAGT **C**CGTATAA

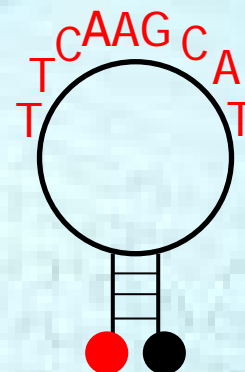
TCTAAGT **T**CGTATAA

К чипу добавляют
одновременно оба зонда,
но каждый из них
связывается только с
полностью
комплементарной ДНК

Зонд на
нормальный ген



Зонд на
мутантный ген



AGATT**C**AGGCATATT
TCTAAGT**C**CGTATAA

AGATT**C**AAGCATATT
TCTAAGT**T**CGTATAA

В результате гибридизации с флуоресцентными зондами происходит «разгорание» зеленой флуоресценции только там, где есть нормальный ген, а красной – там, где есть мутантный ген.

В гетерозиготных образцах, содержащих оба гена, флуоресценция желтая

НОРМА

AGATTCAGGCATATT
TCTAAGTCCGTATAA
TCTAAGTCCGTATAA
AGATTCAGGCATATT

зеленый

НОСИТЕЛЬ

AGATTCAGGCATATT
TCTAAGTCCGTATAA
TCTAAGTTCGTATAA
AGATTCAAGCATATT

желтый

БОЛЬНОЙ

AGATTCAAGCATATT
TCTAAGTTCGTATAA
TCTAAGTTCGTATAA
AGATTCAAGCATATT

красный

Образец пациента



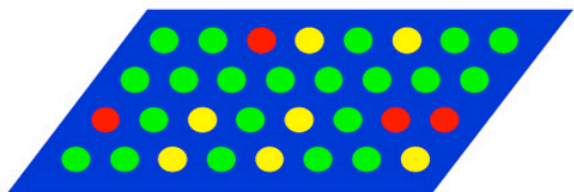
Амплификация



Посадка на 1 зонд



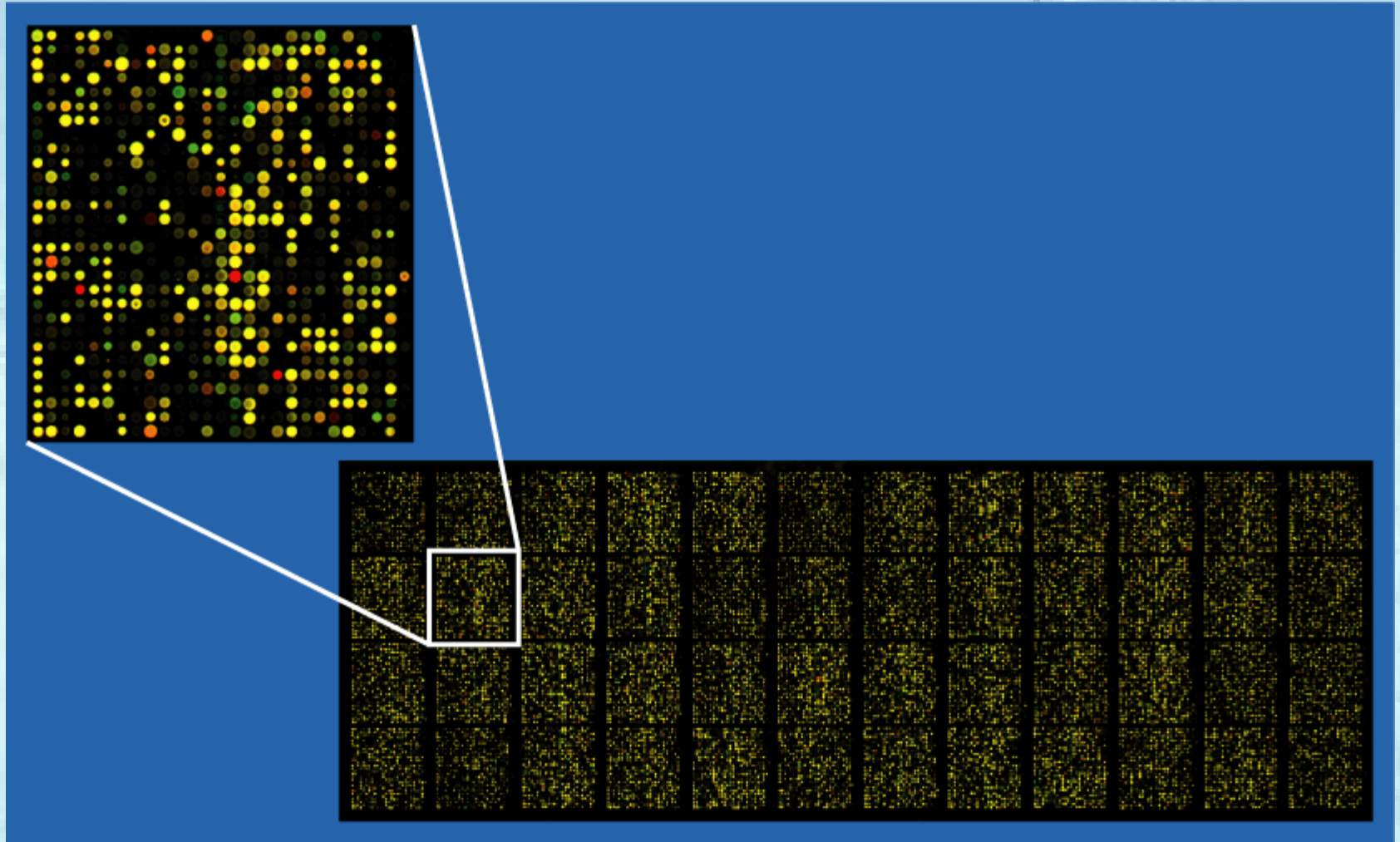
Гибридизация с меченым зондом



ARRAYIT VIP™ ТЕХНОЛОГИЯ

позволяет изготовление чипов содержащих 100000 зондов. В результате можно анализировать образцы 100000 пациентов одновременно

Example of an approximately 40,000 probe spotted oligo microarray with enlarged inset to show detail



ПЦР-диагностика

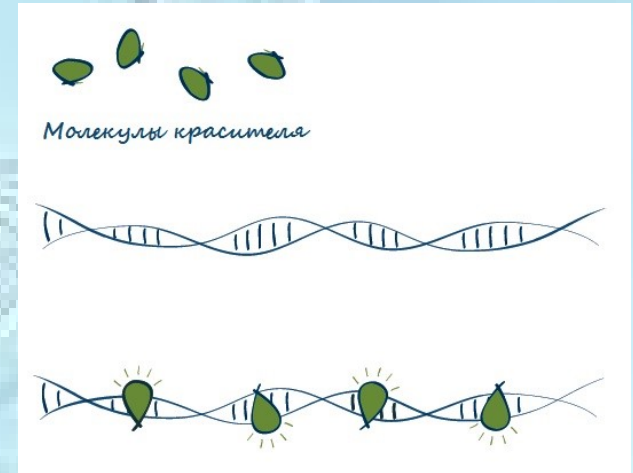
Детекция ДНК с помощью ПЦР в реальном времени (real-time PCR или q-PCR)

ПЦР в реальном времени (или *количественная* ПЦР) — используется для одновременной амплификации и измерения количества данной молекулы ДНК. Включает в себя одновременно детекцию и количественное определение специфической последовательности ДНК в образце. Метод использует общие принципы ПЦР. Основное отличие состоит в том, что измеряется количество амплифицированной ДНК в реальном времени после каждого цикла амплификации. Для количественного определения используют два метода — флуоресцентные красители, интеркалирующие в двуцепочечные молекулы ДНК, и ДНК-зонды, которые флуоресцируют после гибридизации с комплементарными участками ДНК, при этом флуоресценция усиливается с каждым новым циклом. Таким образом, сила сигнала говорит о первоначальном количестве анализируемой молекулы.

Детекция ДНК с помощью ПЦР в реальном времени (real-time PCR или q-PCR)

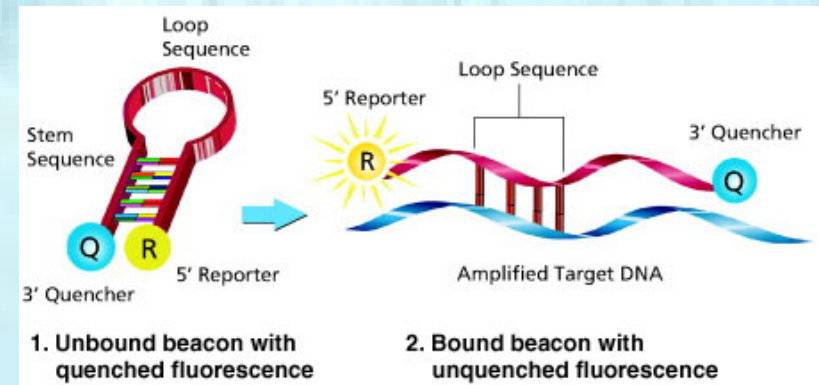
Использование флуоресцентных красителей, интеркалирующих в двуцепочечные молекулы ДНК

Используются соединения, у которых в свободном состоянии флуоресценция очень слабая, но она резко возрастает при их связывании с двуцепочечной ДНК. Чем больше ДНК, тем сильнее разгорается их флуоресценция. Это позволяет по силе сигнала оценить количество ДНК

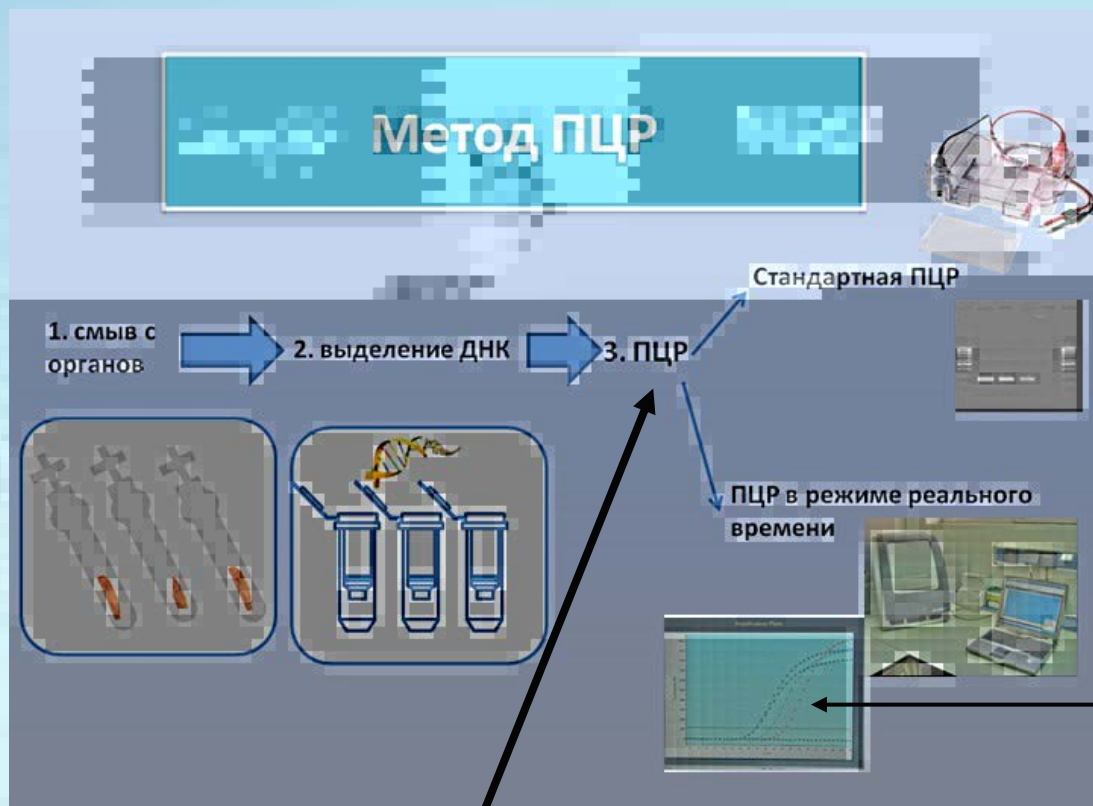


Использование зондов типа «молекулярных маячков» (molecular beacon)

При температуре отжига свободные зонды образуют *шпильки*, при этом флуорофор и тушитель оказываются в непосредственной близости, что приводит к тушению флуоресценции. При синтезе новой цепи ДНК зонды комплементарно присоединяются к амплифицируемому участку ДНК, тушитель оказывается пространственно отделен от флуорофора и наблюдается рост флуоресцентного сигнала.



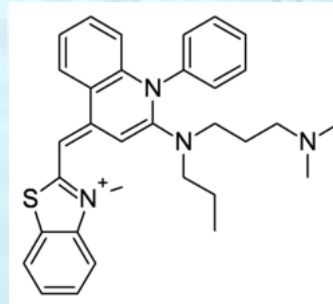
ПЦР-диагностика для выявления чужеродных ДНК



Анализ амплифицированной ДНК в геле. Наличие полосы с нужной подвижностью говорит о наличии анализируемой ДНК в пробе

Анализ интенсивности сигнала флуоресценции. Обычно используются интеркалирующие красители

Используются праймеры к искомой ДНК, поэтому в результате ПЦР происходит амплификация только анализируемой ДНК, независимо от ее содержания в исходной смеси ДНК

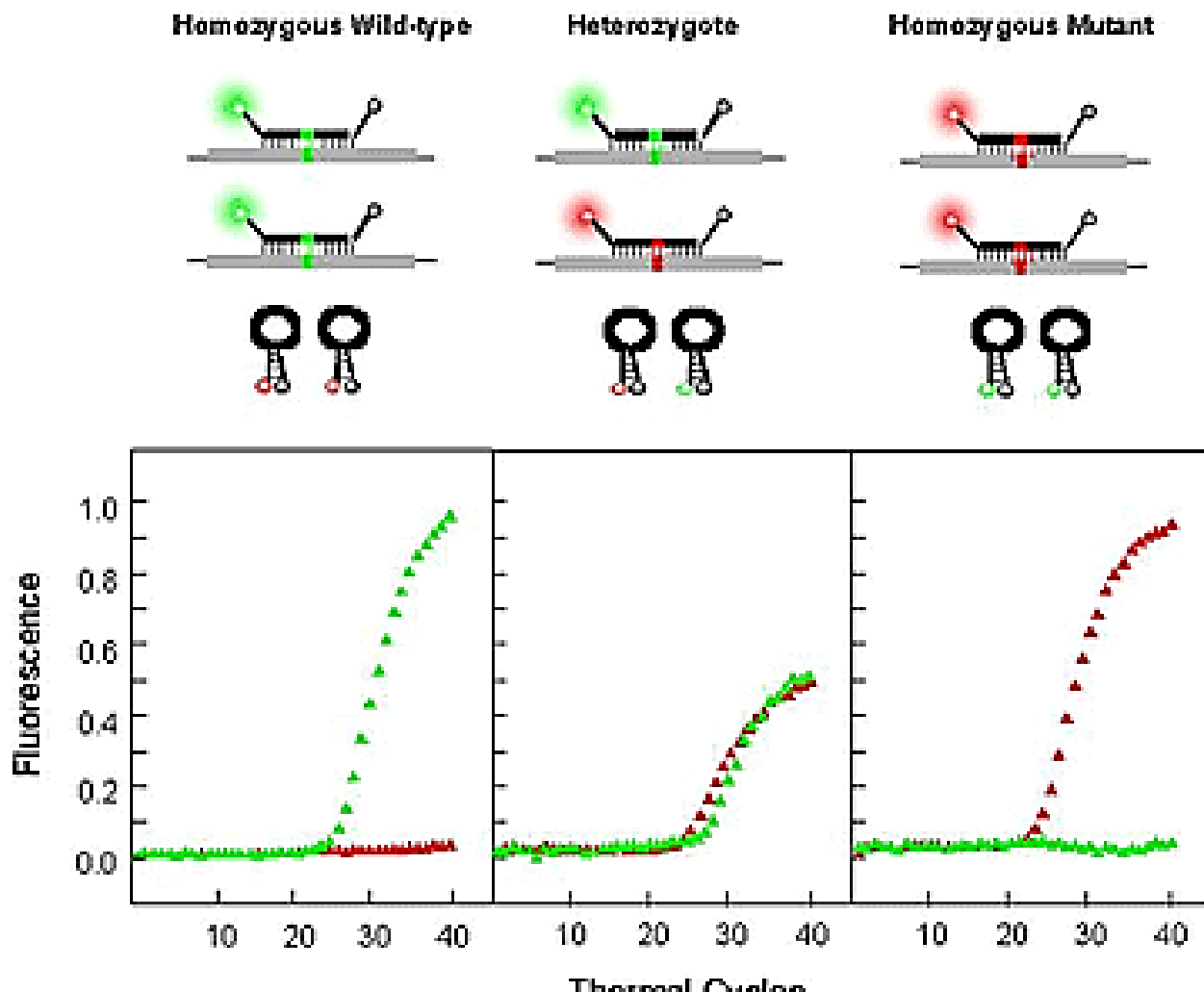


Структурная формула SYBR Green I

Идентификация точечных мутаций в ДНК

Определение серповидноклеточной анемии с использованием Molecular beacon Probe

Используется две пробы (на нормальную и мутантную последовательности) с разными флуорофорами



Анализ искомой РНК в пробе или как выявить коронавирус (ОТ-ПЦР анализ)



Анализируемая РНК в смеси с другими РНК и ДНК

Обратная транскрипция

Используются праймеры к анализируемой РНК, фермент обратную транскриптазу (РНК-зависимая ДНК-полимераза) и смесь dNTP
В результате образуется ДНК-копия искомой РНК, для которой затем делают ПЦР анализ



ПЦР

