



ӘЛ-ФАРАБИ АТЫНДАҒЫ ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ
БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ БИОТЕХНОЛОГИЯ ФАКУЛЬТЕТІ
МОЛЕКУЛАЛЫҚ БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ГЕНЕТИКА
КАФЕДРАСЫ

ДӘРІС 3. ДНҚ ҮЛГІСІН ЗЕРТТЕУГЕ ДАЙЫНДАУ.

Лектор: PhD,
қауымдастырылған
профессор Тайпақова С.М.

Жоспар:

- **Молекулалық диагностика әдістері**
- **Үлгіні зерттеуге дайындау**
- **ДНҚ молекуласын бөліп алу әдістері**
- **ДНҚ молекуласын бөлу кезеңдері**
- **ДНҚ экстракциясының жалпы ережелері**

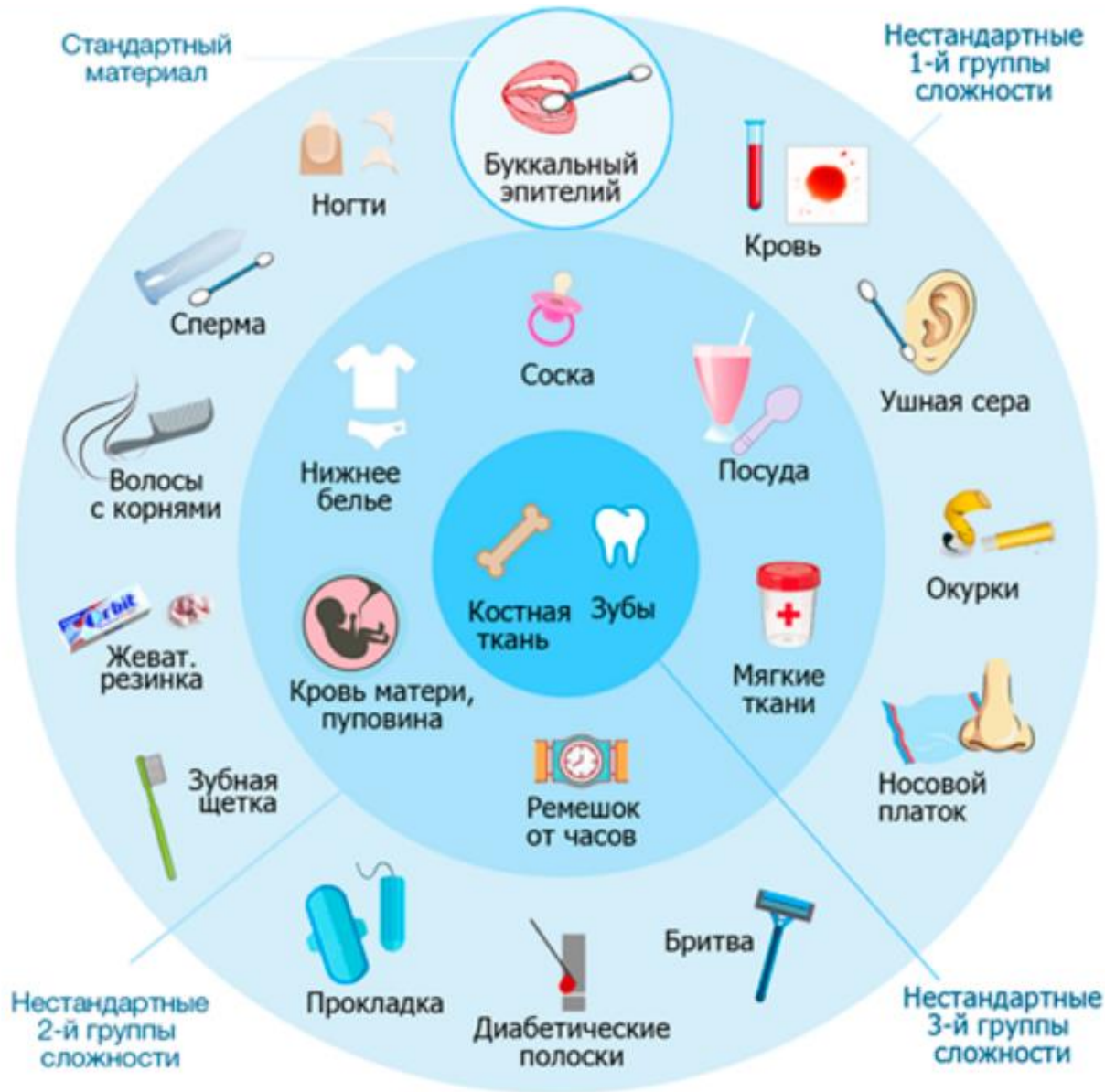
Молекулалық диагностика әдістері патологиялық жағдайдың **себепін анықтау, диагноз қою және емдеудің** тиімділігін бақылау үшін геномдық ДНҚ, РНҚ және белоктар деңгейінде жүргізілетін молекулалық биологиялық және молекулалық генетикалық, биохимиялық және генетикалық әдістер жиынтығы. **Молекулалық диагностика** – геннің деңгейінде жүзеге асырылатын диагностика әдістері.

Молекулалық диагностикада зерттелетін объектілер: ақуыздардар (гемоглобин, альфа 1 антитрипсин т. б.) және нуклеин қышқылдары: РНҚ немесе ДНҚ.

Молекулалық диагностикада қолданылатын негізгі әдістер – НҚ және белоктарды зерттеу әдістері болып табылады

- Рекомбинация әдістерді көмегімен гендерді және ДНҚ фрагменттерін клондау;
- ДНҚ фрагменттердің бірізділігін анықтау;
- Нуклеин қышқылдардың гибридизациясы;
- рестрикциялық сайттардың идентификациясы;
- ПЦР әдісті пайдаланып ДНҚ амплификациясы;
- Ақуыз өнімін *in vitro* талдау

Геномдық ДНҚ молекуласын кез келген клеткадан бөледі



- тырнақ (аяқ, қол),
- сағыз қалдығы,
- құлақтағы сера,
- темекі тұқылы,
- шаш түбімен,
- бет орамал немесе мұрын сүрткен сулық,
- тіс щеткасы,
- тарақ,
- ұстара және т.б.

Геномдық ДНҚ молекуласын кез келген клеткадан бөледі

ДНҚ молекуласын бөлуде кеңінен қолданылатын материалдар:

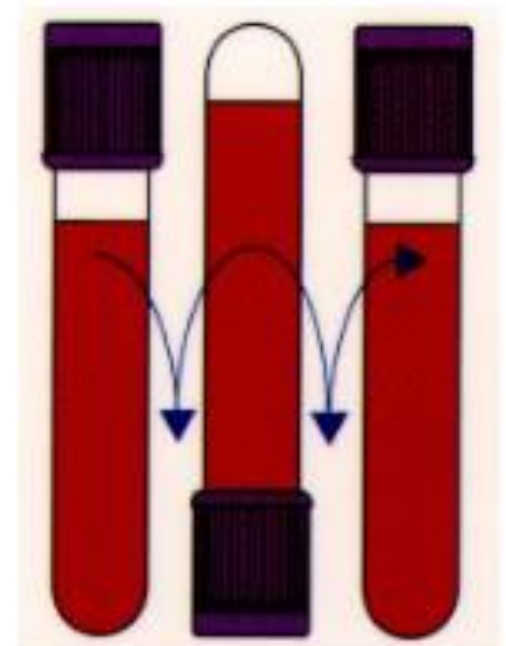
Ғылыми-зерттеу жұмыстарында арнайы антикогулянтты бар пробиркаларға жиналған вена тамырынан алынған қан клеткалары және ауыз ұртынан жиналған клеткаларды қолданады.



Биологиялық материалдарды жинау және оны лабораторияға тасымалдауға қойылатын негізгі талаптар:

Температуралық режим сақталуы керек. Мысалы, қан салқында тасымалдануы керек, алайда ол мұздатылған болмауы керек.

Шамамен 48 сағаттың ішінде биоматериалдан (ұлпа немесе қан) ДНҚ молекуласы бөлінбейтін болса, онда бұл материалдар -20 немесе -80 температурада мұздатқышта сақталуға қойылады.



Қан материалдарын арнайы антикогулянтты бар пробиркаларға жинағанда қан ұйып қалмауы үшін бірнеше мәрте араластыру керек. **Мұнда қатты араластыруға болмайды.**

ДНҚ молекуласын бөліп алу әдістері

ДНҚ молекуласын бөліп алу алға қойылған міндетке, талдау уақытына және ДНҚ-ның тазалық дәрежесіне байланысты.

Органикалық ерітінділер арқылы бөліп алу

Силики (силикагель) арқылы бөліп алу

Гель-филтрация арқылы бөліп алу

Магнитті бөлшектермен байланыстыру арқылы бөліп алу

Микроцентрифугалық колонкаларда бөліп алу

Қағаз фильтрлерден экстракциялау арқылы бөліп алу

ДНҚ молекуласын фенол-хлороформдық әдіспен бөліп алу

ДНҚ молекуласын бөлу кезеңдері

- Клетканы қабығын, клеткалық мембраналарды лизиске ұшырату
- Қосымша қоспалардан, Белоктардан тазарту, немесе депротеиндеу
- ДНҚ молекуласын тунбаға түсіру, тазалау және концентрациялау

Қарапайым лизис:

Механикалық бұзу (арнайы аспаптар арқылы механикалық майдалау, френч преспен өңдеу, ультрадыбыспен өңдеу т.б.)

Химиялық өңдеу (мысалы, детергенттер ДСН, хаотропты агенттер, мысалы гуанидин арқылы өңдеу)

(Хаотропты агент - су молекулалары арасындағы сутегі байланысын бұзуға қабілетті молекула; Мысалы гуанидиний тиоцианаты ретінде белгілі *ДНК, РНҚ және белок молекулаларының үшінші реттік құрылымын бұзатын заттар*

Ферменттердің көмегімен бұзу (мысалы, ЛИЗОЦИМ, ЦЕЛЛЮЛАЗА, ЗИМОЛАЗА т.б.)

Клетканы қабығын, клеткалық мембраналарды лизиске ұшырату

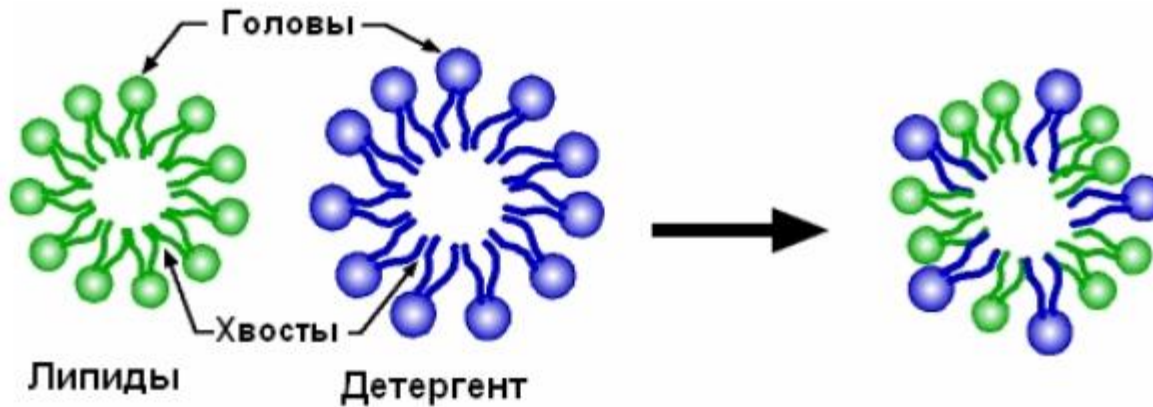
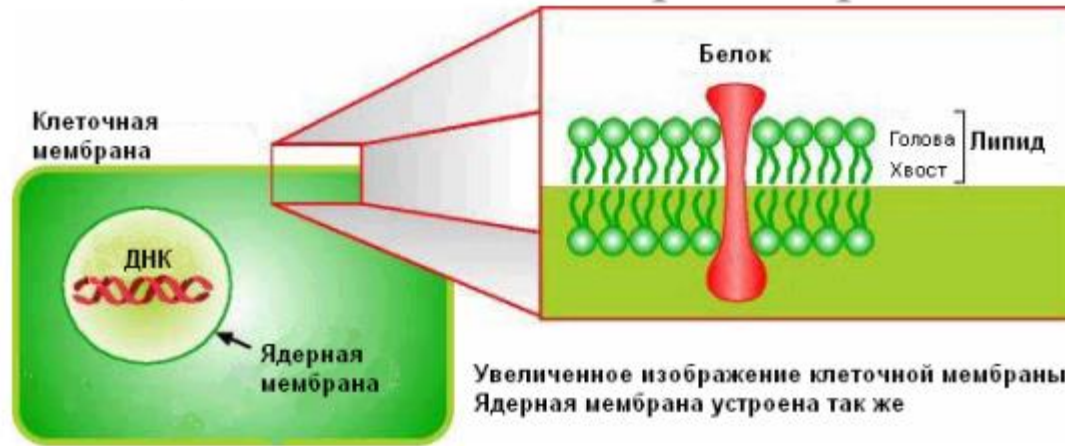


Рисунок 2 Солюбилизация липидов

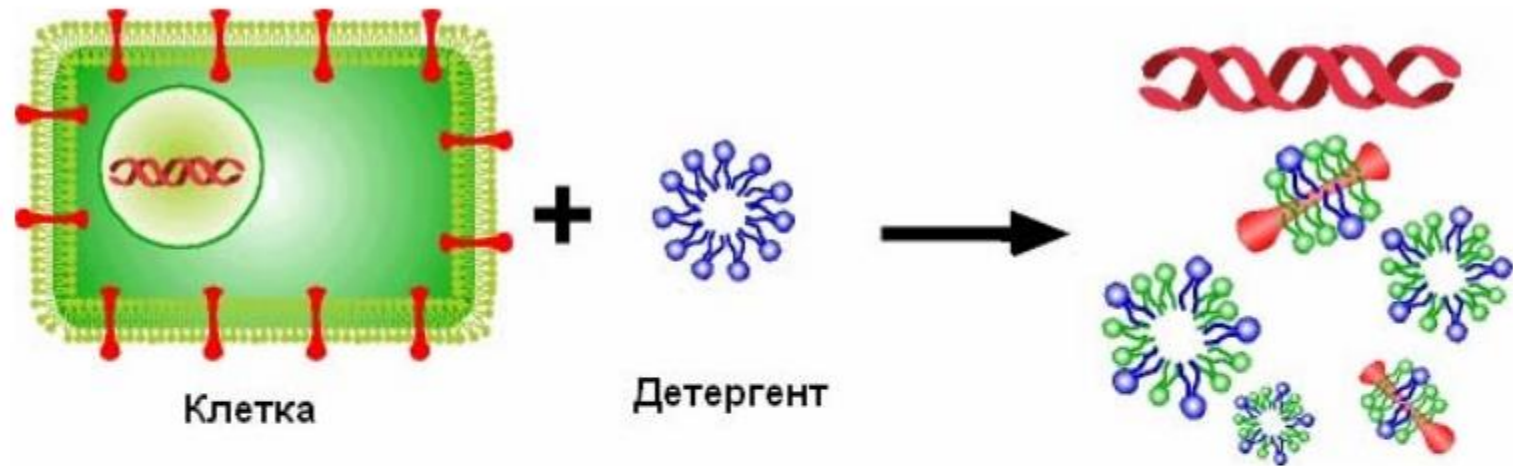


Рисунок 3. Разрушение клеточной мембраны и выделение геномной ДНК

Қосымша қоспалардан, Белоктардан тазарту, немесе депротейндеу

Протеиназа К- ДНҚ молекуласымен байланысқан белоктарды және нуклеаза ферменттерін ыдыратады.

Фенолдар – молекула құрамында көміртек атомымен байланысқан бір немесе бірнеше гидроксил тобы бар хош иісті қосылыстар. Полярлы емес органикалық еріткіш Фенол сынамада кездесетін ақуыздарды ыдыратады және полярлы емес қосындыларды ерітеді.

Water density – 1.00 g/cm³

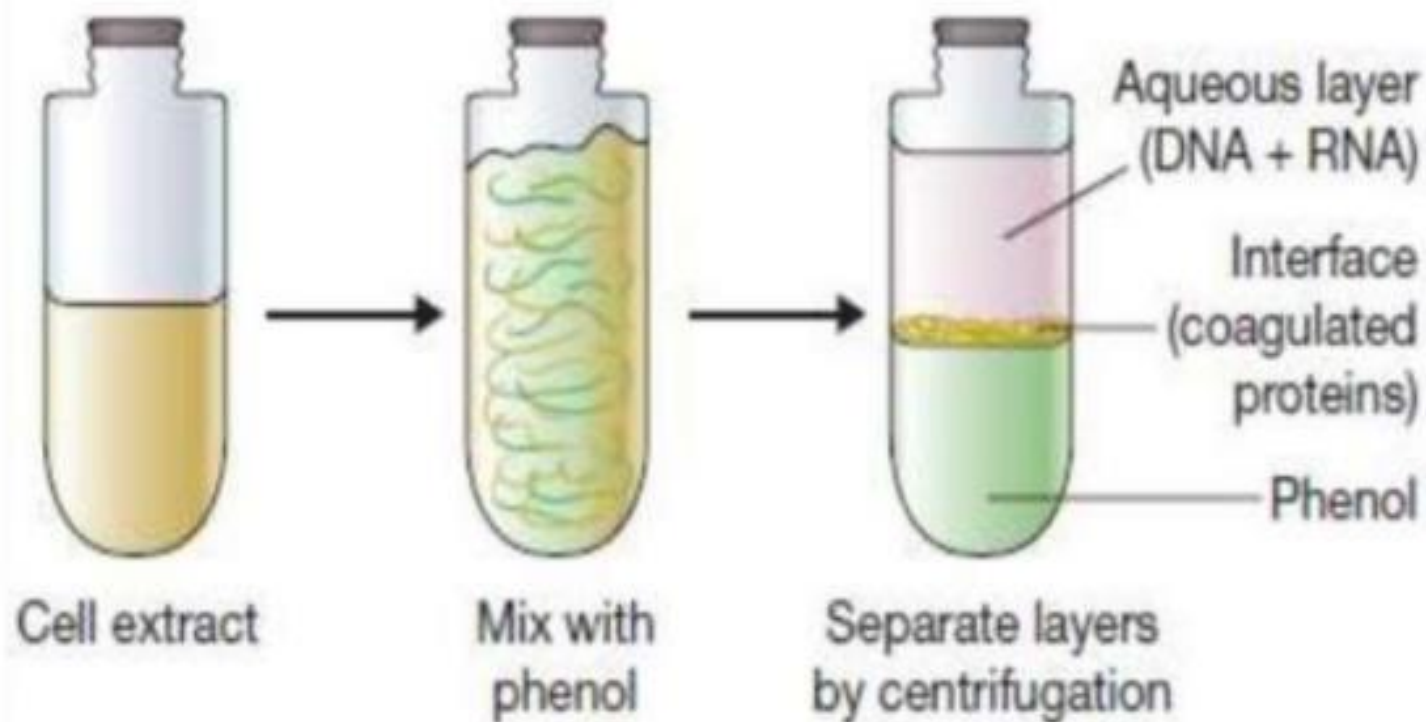
Phenol density – 1.07 g/cm³

Chloroform density – 1.47 g/cm³

Центрифугаланғаннан кейін денатурацияланған белоктар органикалық фазада қалады, ал хлороформмен араласқан ДНҚ молекулалары сулы фазада болады. Хлороформ фенолдың қалдықтарын кетіреді.

Депротенинизация фенолом/хлороформом

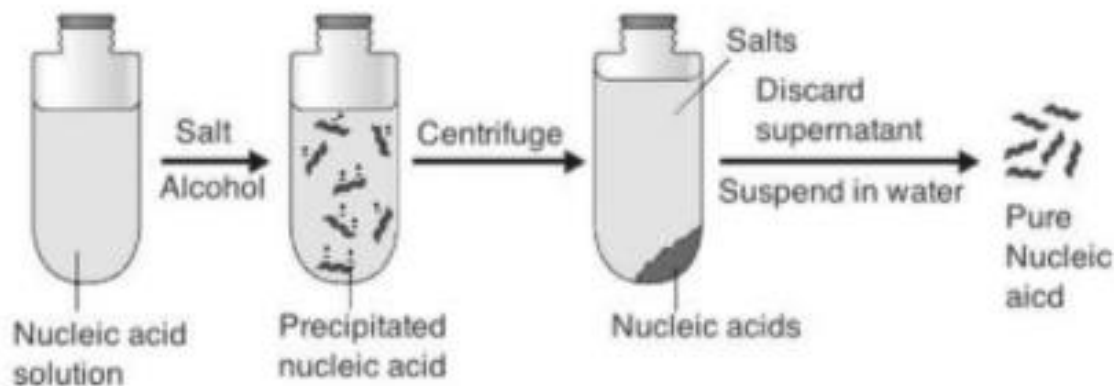
ДНК/РНК гидрофильна*. Фенол гидрофобен. Белки содержат гидрофильные и гидрофобные химические группы.



- ДНҚ молекуласын тұнбаға түсіру, тазалау және концентрациялау

- ДНҚ молекуласын тұнбаға түсіру
- $\text{AcNH}_4 \Rightarrow 2.0\text{M}$
 $\text{LiCl} \Rightarrow 0.8\text{M}$
 $\text{NaCl} \Rightarrow 0.2\text{M}$
 $\text{AcONa} \Rightarrow 0.3\text{M};$
- соосадытитель (линейный РАА, tRNA, гликоген);
- Әдістің мәні: Концентрленген тұздар теріс зарядталған фосфат тобын бейтараптайды. ДНҚ (РНҚ) тұздың қатысуымен 70% EtOH да агрегацияланады (агрегация төменгі температурада жақсы өтеді және оған біраз уақыт кетеді). Содан кейін қалыптасқан агрегаттар центрифугалау арқылы тұндырылады.
- Ерітіндідегі ДНҚ (РНҚ) қышқыл емес, бірақ оның тұзы мен катионы преципитацияға жұмсалатын тұзбен бірдей екенін ескереміз.
- Тексерілмеген ақпарат Температураны төмендетіп, инкубация уақытын $\{0\text{C}, 15 '\}$ - ден (4-тармаққа) дейін арттыру преципитация тиімділігіне айтарлықтай әсер етпейтіні көрсетілген ($> 20\text{нг} / \text{мл}$ үшін). Ең байқалатын әсері - центрифугалау уақытының $\{4\text{C}$ кезінде $\sim 1\text{сағ}$ дейін өсуі).
- MgCl_2 10мМ-ге дейін қосылса, преципитация жақсарды.

Осаждение ДНК/РНК спиртами (этанол, изопропанол)



Соль (ацетат натрия) добавляется для того, чтобы ионы Na^+ нейтрализовали отрицательные заряды фосфатных групп ДНК. Растворимость ДНК снижается. Однако вода обладает высокой диэлектрической константой, что не дает ионам Na^+ как следует сблизиться с ДНК, и та остается растворимой.

Спирт обладает значительно более низкой диэлектрической константой. Добавление достаточного количества спирта (около 70% минимум) приводит к усилению электростатического взаимодействия ионов Na^+ с ДНК, что вызывает критическое снижение растворимости ДНК и ее выпадение в осадок.

Центрифугирование помогает сконцентрировать всю ДНК из образца в небольшом участке пространства.

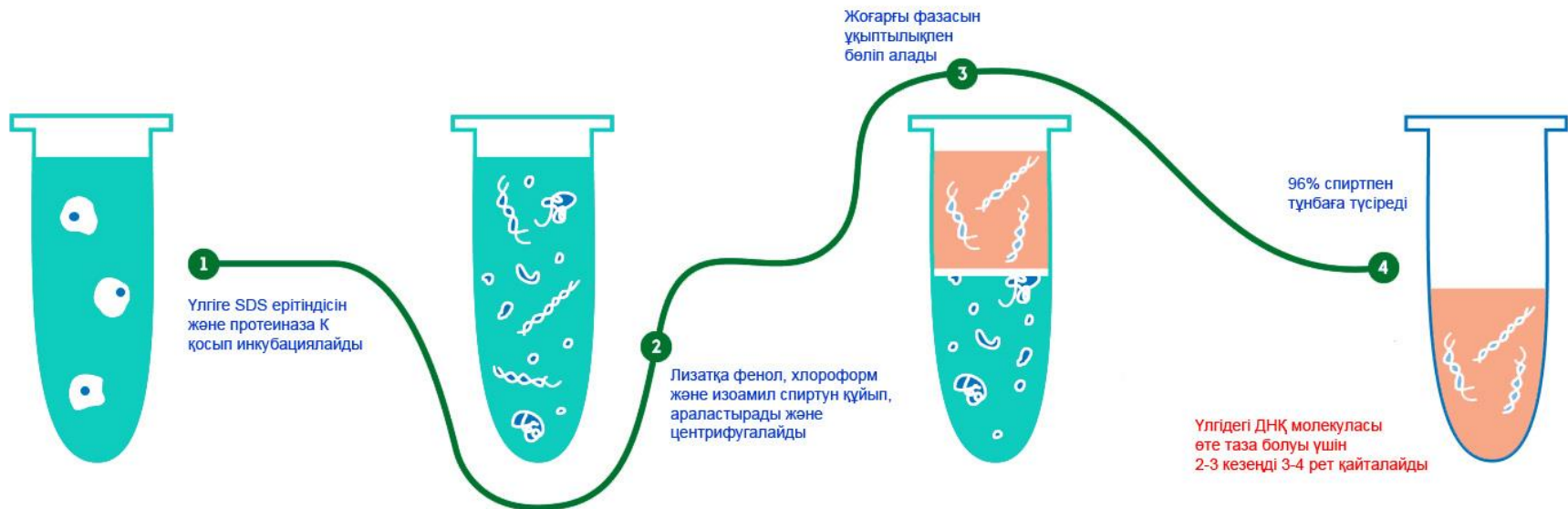
ДНК молекуласын ингибиторлардан тазалау

Ингибитор	Концентрация ингибитора
SDS	> 0.005%
Фенол	> 0.2%
Этанол	> 1%
Изопропанол	> 1%
Ацетат натрия	> 5 mM
Хлористый натрий	> 25 mM
EDTA	> 0.5 mM
Гемоглобин	> 1 мг/мл
Гепарин	> 0.15 i.m/ мл
Мочевина	> 20 mM
Реакционная смесь	> 15%

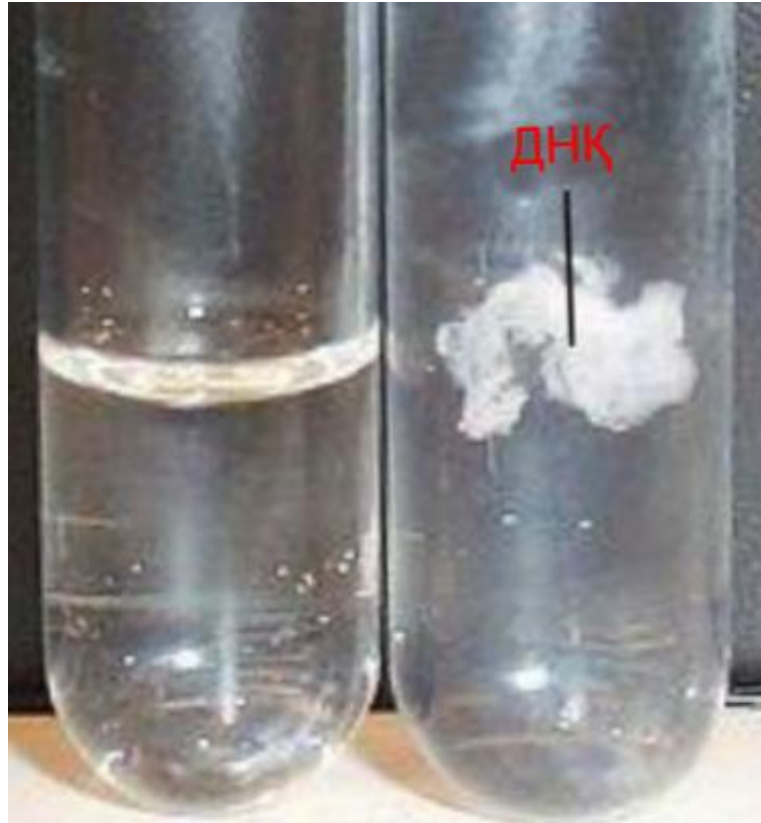
Очистка препарата ДНК Потенциаль

ДНҚ молекуласын фенол-хлороформдық әдіспен бөліп алу

Клеткалардың лизисінен және нуклеазалардың активсізденуінен кейін пайда болатын клеткалық массадан сүзу арқылы немесе центрифугалау арқылы арылуға болады.



ДНК молекуласын 96 % спиртпен тұнбаға түсіру



Спирт алды

**Спирт құйғаннан
кейін**

Әдістің артықшылығы:

- ДНҚ молекуласының сапасы жақсы және жоғары концентрацияда болады.
- Көптеген зерттеулерде қолдануға болады
- Бөлініп алынған ДНҚ молекуласы тұрақты және ұзақ уақытқа сақтауға болады

Әдістің кемшілігі:

- Фенол-хлороформ улы зат болып есептеледі
- Салыстырмалы түрде көп уақытты алады
- Автоматтандыруға болмайды

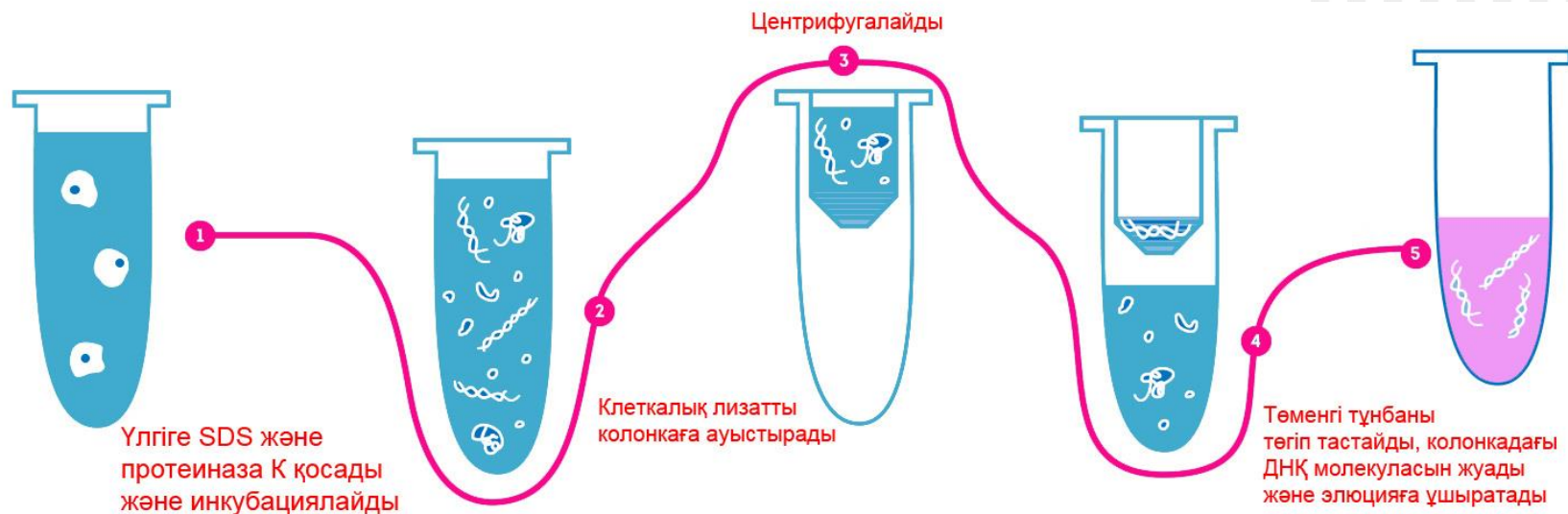
Спин-колонка (силикагель) арқылы бөліп алу

Клеткалық экстрактқа немесе қан клеткаларына гуанидинтиоцианат реагентін қосады.

Мұнда ДНҚ молекуласынан басқа клетка компоненттерінің барлығы денатурацияға ұшырайды.

Ары қарай ДНҚ молекуласы силика бөлшектерімен байланысады. Үлгіні силикасы бар пробирка-колонка арқылы өткізеді. ДНҚ осы колонкада қалады.

Арнайы ерітінді арқылы ДНҚ молекуласын тұнбаға түсіреді (элюция).



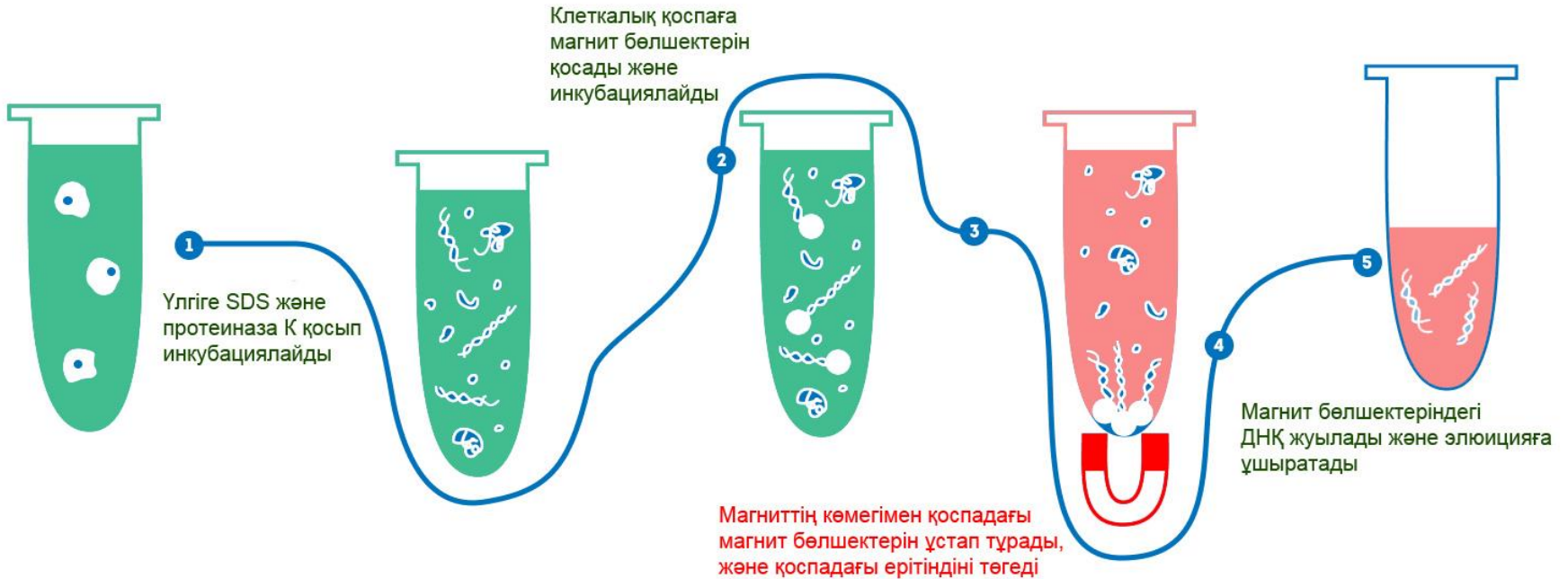
Әдістің артықшылығы:

- Бөлінген ДНҚ молекуласы таза болады
- ДНҚ молекуласының сапасы жоғары болады
- Бөліп алу протоколы қарапайым

Әдістің кемшілігі:

- Саны көп үлгілерден бөліп алу кезінде контаминацияға әкелуі мүмкін
- ДНҚ молекуласының қысқа бөліктері спин-колонкадан бөлінуі қиын
- Бағасының қымбат болуы

Магнитті бөлшектермен байланыстыру арқылы бөліп алу

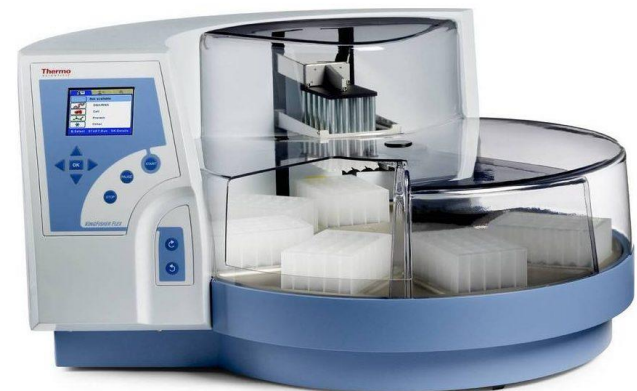


Әдістің артықшылығы:

- Жүзеге асыру уақыты жылдам
 - Орындалуы қарапайым
 - Ингибиторлардың болуын төмендетеді
 - Автоматты жүзеге асыруға болады
 - Қосымша құралдарды қажет етпейді
- Қазіргі кезде көптеген автоматты ДНҚ бөлу жүйелері осы магнитті бөлшектер технологиясына негізделген

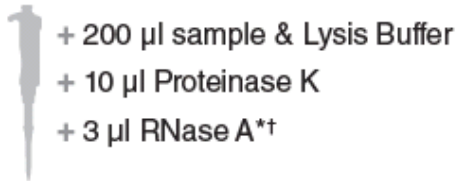
Әдістің кемшілігі:

- Бағасының қымбат болуы



New England Biolabs **КОМПАНИЯСЫНЫҢ** **ГЕНОМДЫҚ ДНҚ МОЛЕКУЛАСЫН БӨЛЕТІН** **ЖАҢА ЖИЫНТЫҒЫ (Monarch)**

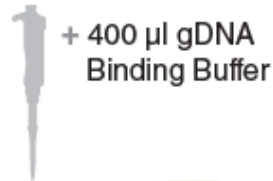
1 Lyse



Blood/cells: 5 min. (56°C)
Tissue: 60 min. (56°C)

* Add separately for tissue samples
† Include debris removal spin for fibrous tissues

2 Bind



3 min. (1,000 xg)
1 min. (max. speed)

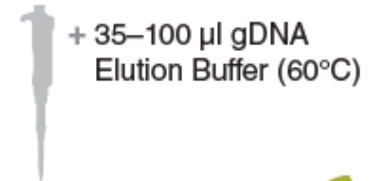
No ethanol required

3 Wash (2X)



1 min. (max. speed)

4 Elute

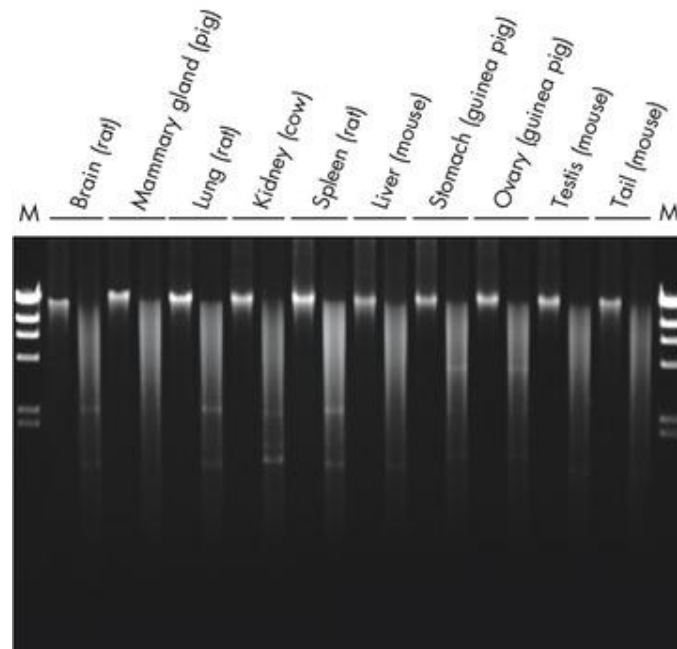
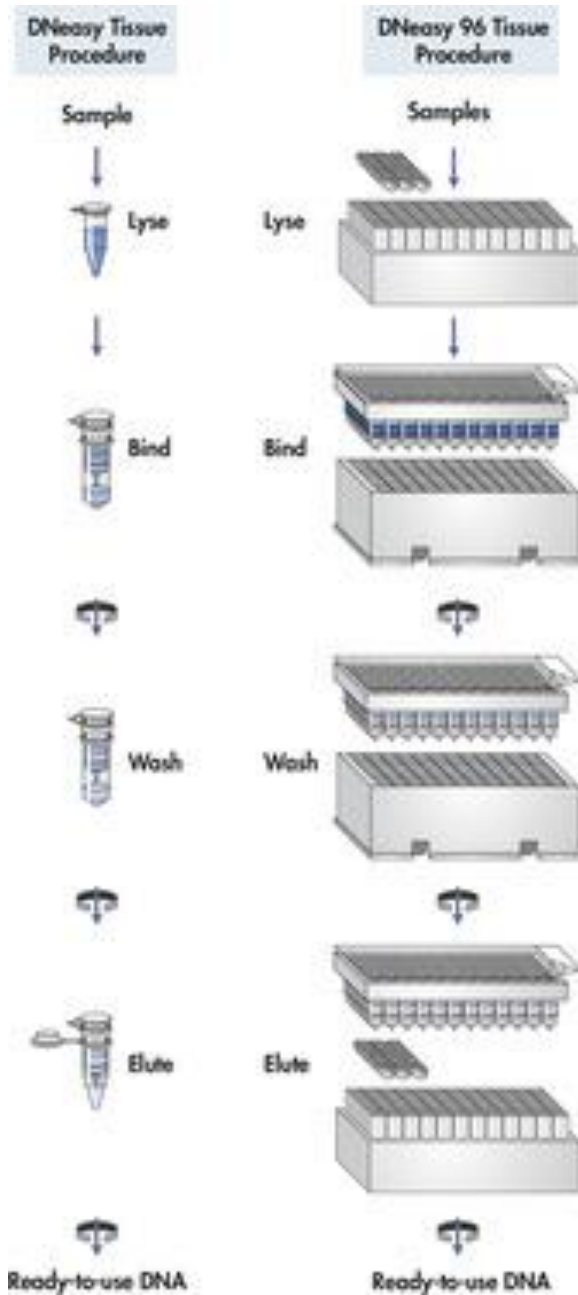


1 min. (max. speed)

Only 1 spin needed



**QIAGEN компаниясының
геномдық ДНҚ молекуласын
бөлетін жаңа жиынтығы
(DNeasy Blood & Tissue Kits)**





SIGMA-ALDRICH

ThermoFisher
SCIENTIFIC



Жалпы ережелер

- Геномдық ДНҚ-ны оқшаулау кезінде ДНҚ тұтастығын сақтау үшін жұмсақ лизис әдістері қолданылады (қыздыру, сілтілі лизис қолданылмайды) (геномдық ДНҚ үлкен, ол температураның, рН, механикалық әсер ету кезінде оңай бұзылады)
- Геномдық ДНҚ оқшаулау кезінде ДНҚ ерітіндісін қарқынды шайқаудан аулақ болыңыз, сонымен қатар пипеткалар үшін тар ұштарды қолданбаңыз
- Жоғары молекулалы ДНҚ препаратын қыздырмай құрғатыңыз
- Мұндай препаратты түтікпен шайқамай мұқият ерітіңіз.

<https://ru.coursera.org/lecture/bioinformatika/znakomstvo-s-mietodami-vydielieniia-ghienomnoi-dnk-genomic-dna-isolation-WChAS>

<file:///C:/Users/Lenovo/Downloads/vydelenie-i-ochistka-nukleinovyh-kislot-sostoyanie-problemy-na-sovremennom-etape.pdf>