



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

ДӘРІС 4. БИОЛОГИЯЛЫҚ МАКРОМОЛЕКУЛАЛАРДЫ ТАЛДАУ ӘДІСТЕРІ

Лектор: PhD,
қауымдастырылған профессор
Тайпақова С.М.

Жоспар:

- **Электрофорез әдісі**
- **НҚ молекулаларының электрофорезі**
- **Белок электрофорез әдістері**
- **Саузерн блот-гибридизация әдісі**
- **Вестерн блот-гибридизация әдісі**

Электрофорез – бұл электр өрісі әсерінен сұйық ортада дисперсті фазалар бөліктерінің жылжуын электрокинетикалық тұрғыдан зерттеу.

Электрофорез әдісі макромолекулаларды олардың көлеміне, электрлік зарядына және басқа да физикалық қасиеттеріне байланысты бөлуге негізделген.

Электрофорез термині зарядталған бөлшектердің электр тогы әсерінен белгілі кеңістікте жылжуы (миграциясы) деген мағынаны береді.

Гель электрофорезі - бұл негізінен нуклеин қышқылдарын, ақуыздарды немесе аминқышқылдарын оның заряды, мөлшері мен формасына қарай бөліп алу үшін қолданылатын әдіс.

Бұл әдісте бөлу ортасы ретінде полимерлі зат болып табылатын физикалық гель қолданылады. Жиі қолданылатын гелдер - агароза (нуклеин қышқылын бөлу үшін) және полиакриламид (нуклеин қышқылын не ақуызды бөлу үшін).

Электрофорез

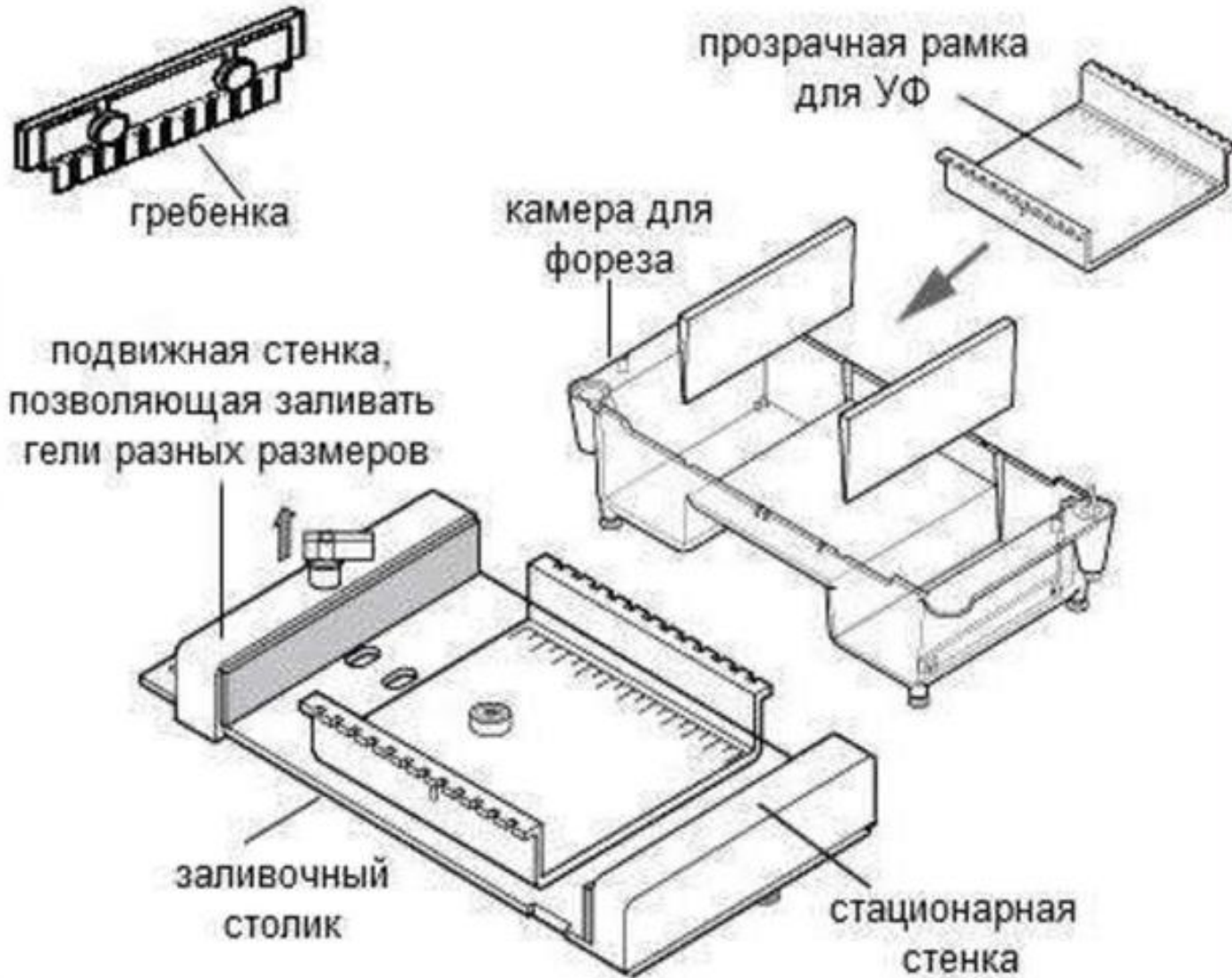
Горизонтальды
электрофорез



Вертикальды
электрофорез



Горизонтальды электрофорез



Гельдік электрофетикалық аппарат құрамына гель дайындауға арналған гель құю науасы, құдықтарды дайындауға арналған құйғыш тарақтар, буферлік резервуар, электродтар - оң (анод) және теріс (катод) және кернеу блогы кіреді.

Құрамындағы фосфат тобының теріс зарядталуына байланысты, ДНҚ молекуласы да теріс зарядталған болады



анод — оң зарядталған электр полюсі

катод — теріс зарядталған электр полюсі

Теріс зарядталған ДНҚ немесе РНҚ тәрізді молекулалар катодтан анодқа, ал оң зарядталған молекулалар керісінше қозғалады.

Гель дайындау талапқа сай жасалады.

Егер жоғары ажыратымдылық немесе молекулалардың бөлінуі қажет болса, кеуек мөлшері азырақ болатын жоғары концентрациялы гельді дайындау керек.

**ДНҚ молекуласын ажыратуда
қолданылатын агарозалық гельдің концентрациясы**

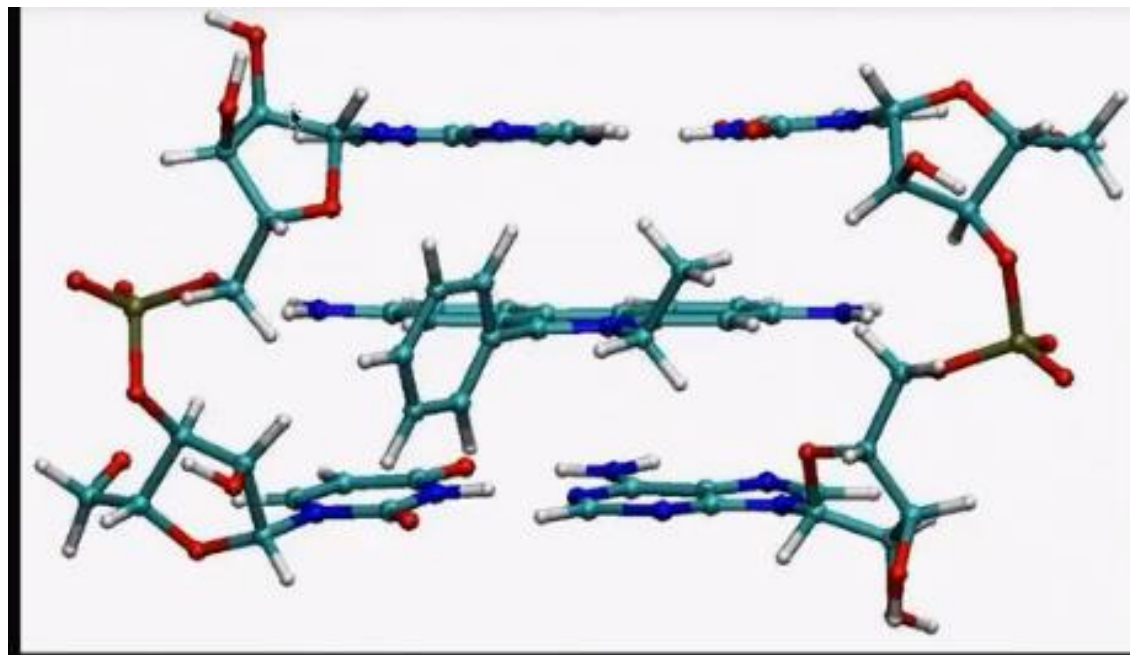
Агарозаның концентрациясы %	ДНҚ молекуласының көлемі (ж.н.)
0.75	10 000 – 15 000
1.00	500 – 10 000
1.25	300 – 5 000
1.50	200 – 4 000
2.00	100 – 2 500
2.50	50 – 1 000

Агарозады гель бромды этидий реагентімен боялады

Оның екі түрлі жолы бар.

1. Агарозды гелді дайындау барысында сол агарозаның ішіне құйып араластырады.
2. Гель-электрофорез жүріп болғаннан кейін арнайы ыдысты бромды этидий реагентінің белгілі концентрациясында боялады.

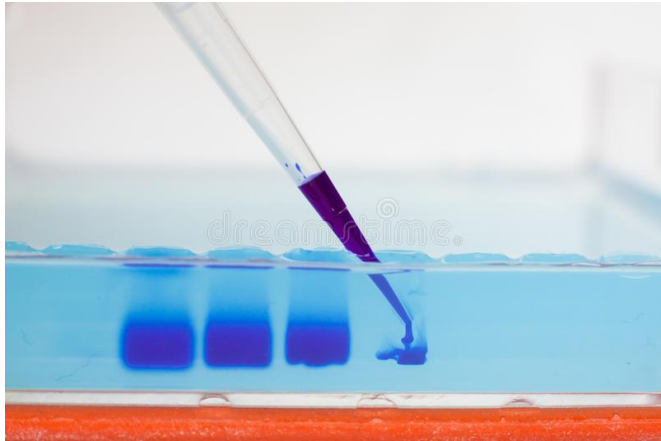
Бромды этидий өте күшті канцероген,
сондықтан онымен жұмыс істегенде өте
ұқыпты болу керек және әруақытта арнайы
медициналық қолғаптармен жұмыс істеген
жөн !



Үлгілерге арналған буферлер

10x есе концентрленген ерітінді

1. 50% глицерин немесе 70% сахароза
2. 0.25% бромфенолды көгілдір немесе 0.25% ксилен цианол ерітінді бояғышы
3. 1x TAE буфер



Электродты буфер

ТАЕ:

1x Трис-ацетат-ЭДТА

40 mM Трис (pH 7,6), 20 mM сірке қышқылы және 1 mM ЭДТА
(Этилендиаминтетра сірке қышқылы)

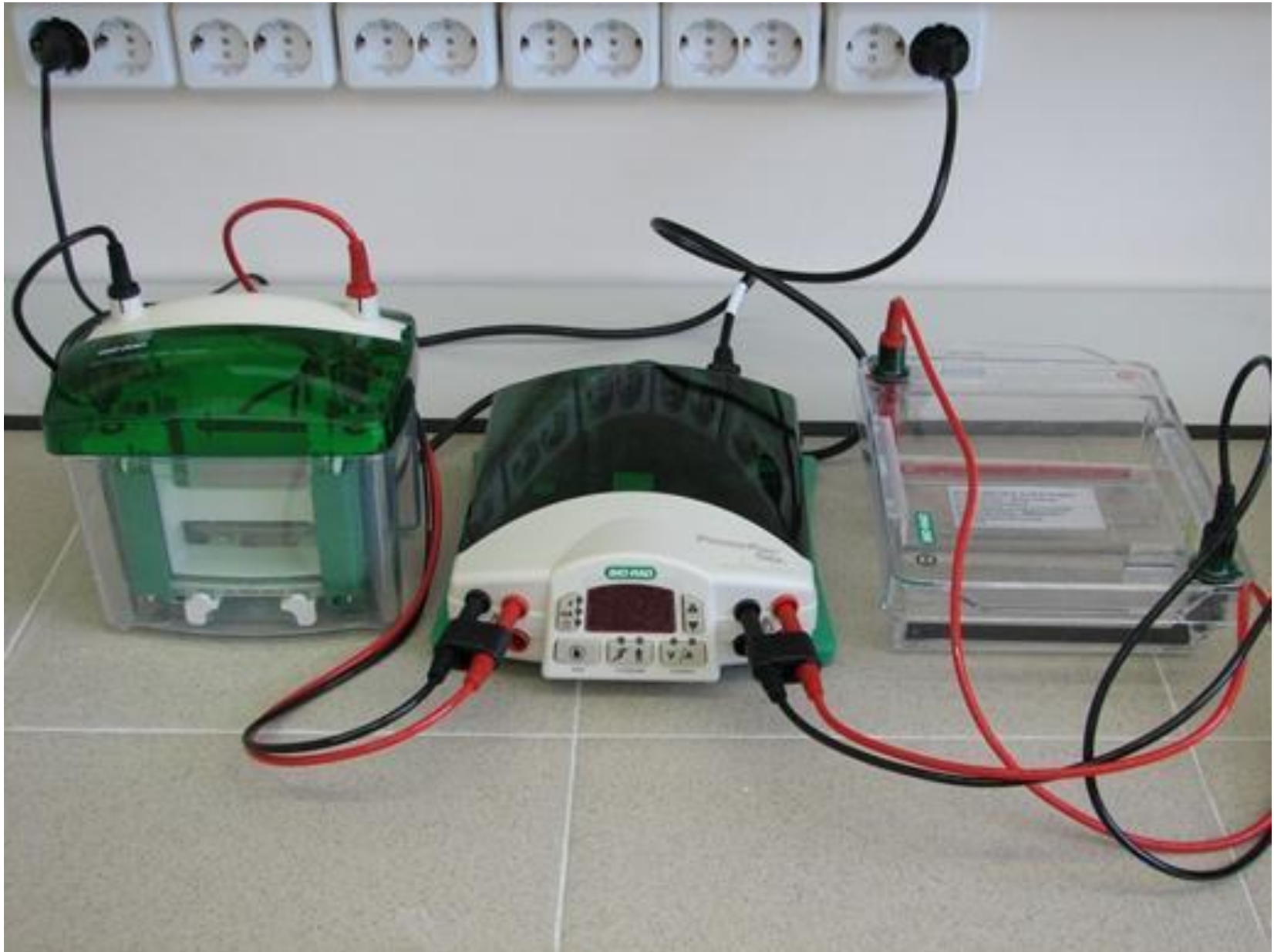
75 г Трис негізгі (FW = 121)

57,1 мл концентралнег сірке қышқылы

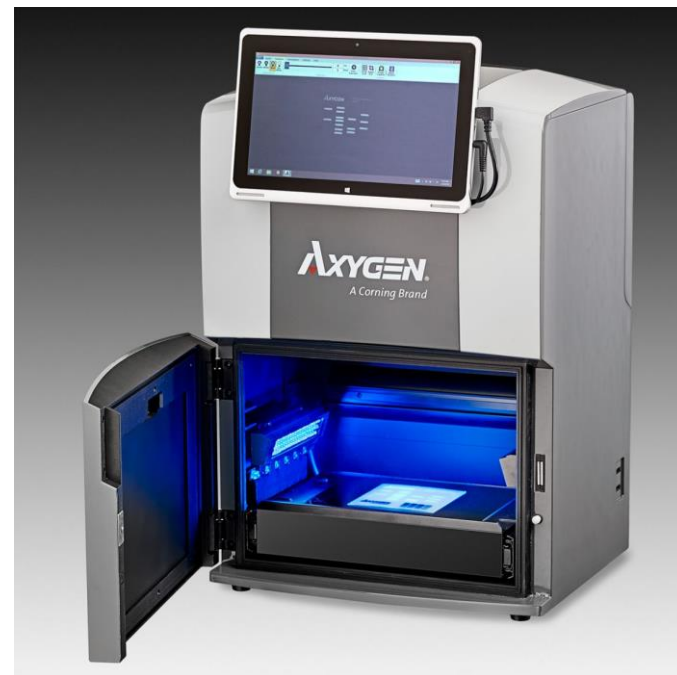
100 мл 0,5 M EDTA (pH 8,0).

Бұл ерінтінді қоспасын 1 литрге дейін жеткізу керек.

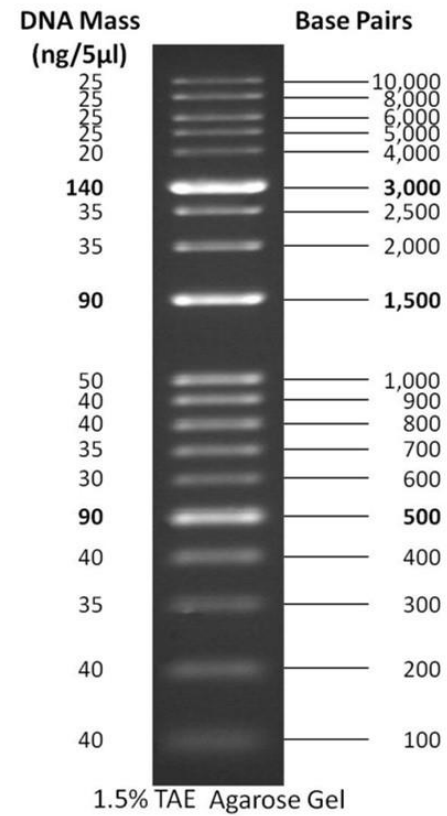
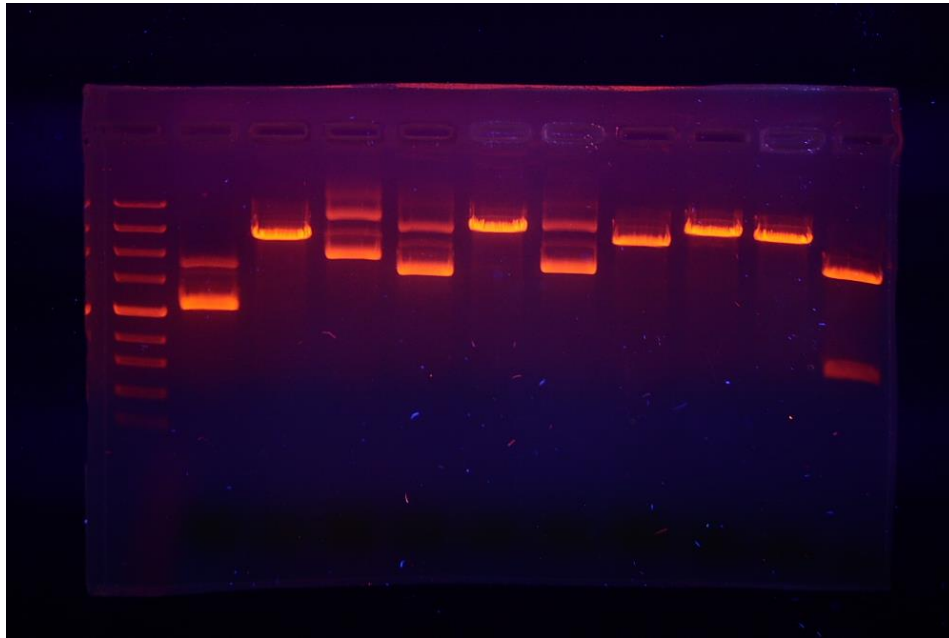




Агарозды гелдегі ДНҚ молекуласын талдайтын трансюллиминатор



Молекулалық массасы белгілі ДНҚ фрагменттерінің қосындысы

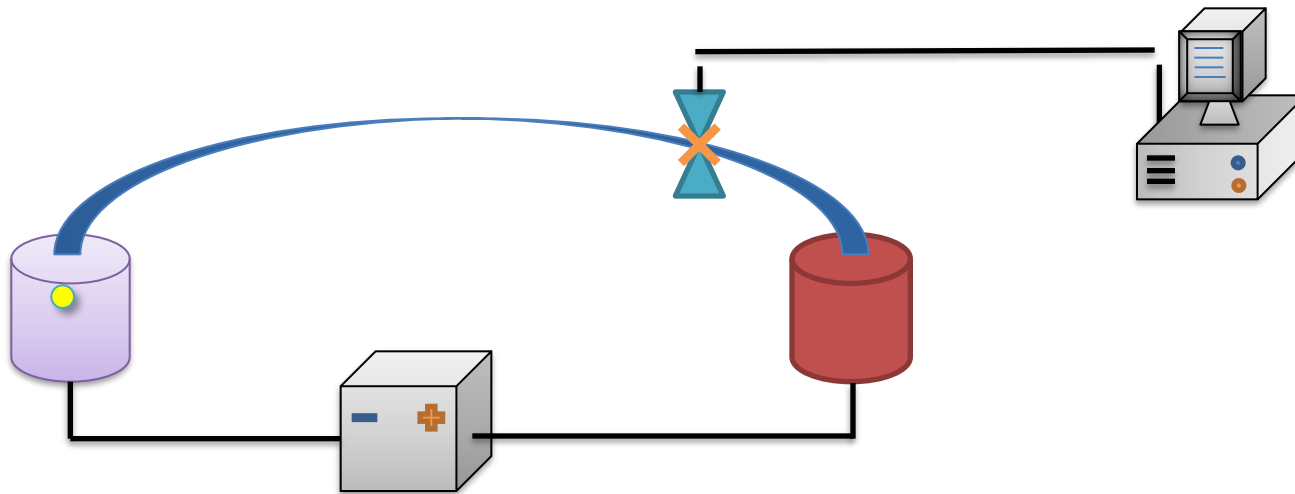


ДНҚ мен РНҚ теріс зарядталған молекулалар. Олар гельдің теріс ұшынан гелге түсіп, электр өрісіне жағылғаннан кейін, олар гельдің кеуектері арқылы гельдің оң зарядталған ұшына қарай жылжиды. Көші-қон жылдамдығы зарядқа және молекуланың мөлшеріне байланысты. Үлкен молекулаларға қарағанда кіші молекулалар гельдің тесіктерімен оңай ауысады. Демек, кіші молекулалар гель арқылы ұзақ қашықтыққа, ал үлкен молекулалар қысқа қашықтыққа өтеді. Гельдегі молекулалардың жүруін бақылау үшін арнайы бояғыш түрлері қолданылады. Электр өрісі белгілі бір уақыт аралығында қолданылады және молекулалардың жоғалуын болдырмау және молекулаларды қозғалатын күйінде ұстау үшін тоқтатылады. Гельде әртүрлі жолақтарды байқауға болады. Бұл жолақтар әртүрлі мөлшердегі молекулаларды білдіреді. Демек, гель электрофорезі молекулаларды мөлшеріне қарай саралау үшін пайдалы.

Капиллярлы электрофорез



1960-шы жылдары капиллярлы электрофорез әдісі ұсынылды
ДНҚ молекуласын секвенирлеуде қолданылды.
Қазіргі кезде Фрагментті талдау әдісінде де кеңінен
қолданылады



Капиллярлық электрофорез - бұл гель электрофорезінің модификациясы, ол зарядқа, молекуланың мөлшеріне негізделген бөлу принципін қолданады, бірақ капиллярлық түтікте гелдік зат немесе сұйық полимер арқылы жүзеге асырылады.

Капиллярлық түтік

Капиллярлар балқытылған кремнийден дайындалған, әр капиллярлық түтіктің ішкі диаметрі 50-100 мкм және ұзындығы 25-100 см құрайды. Үлгілер полимерлі материалдан тұратын капиллярлық түтікке енгізіледі және кәдімгі гель электрофорезіне қарағанда тез бөлінеді. Оқшаулағыш пиджак ішінде капиллярлық жүйе жақсы қорғалған, ол үлгіні кез-келген ластанудан қорғайды.

Капиллярларды гидроксипропил целлюлоза немесе полиакриламид сияқты жоғары ажыратымдылықтағы гелдер сияқты сұйық полимерлермен толтыруға болады. Капиллярлық электрофорез үлкен ажыратымдылықты қамтамасыз етеді; сондықтан бөлу дәлірек болады.

Капиллярлық электрофорез спектрофотометриялық талдау арқылы автоматтандырылған детекторлық жүйені қолданады. Бұл жер бетінің көлемінің көлемге қатынасына байланысты.

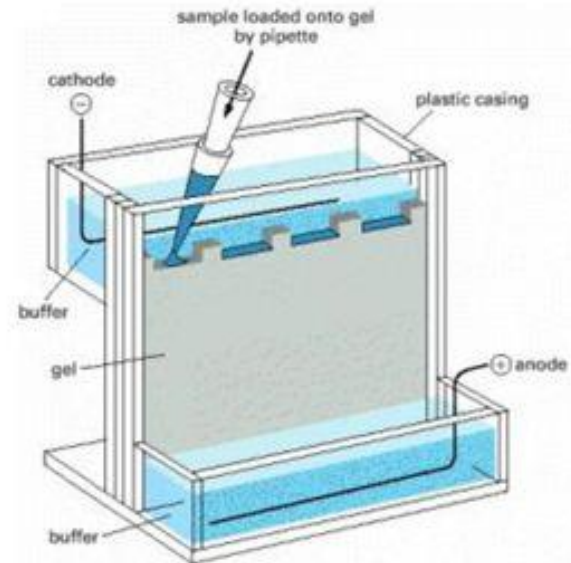
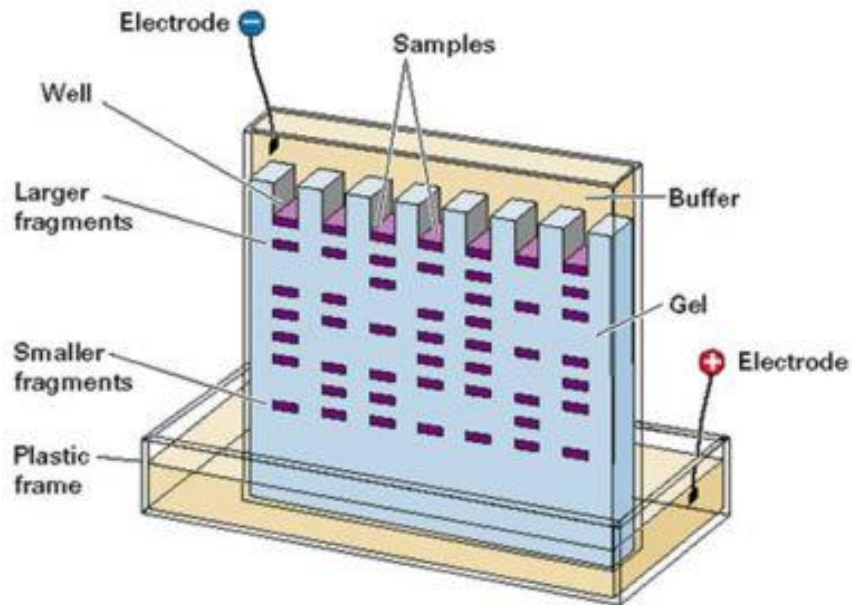
Капиллярлық электрофорез жоғары дәлдікті қажет ететін және криминалистикалық жағдайларда, қымбат техника болғандықтан жиі қолданылмайтын жағдайларда қолданылады.

Капиллярлық электрофорез мен гель электрофорезінің арасындағы басты ұқсастығы

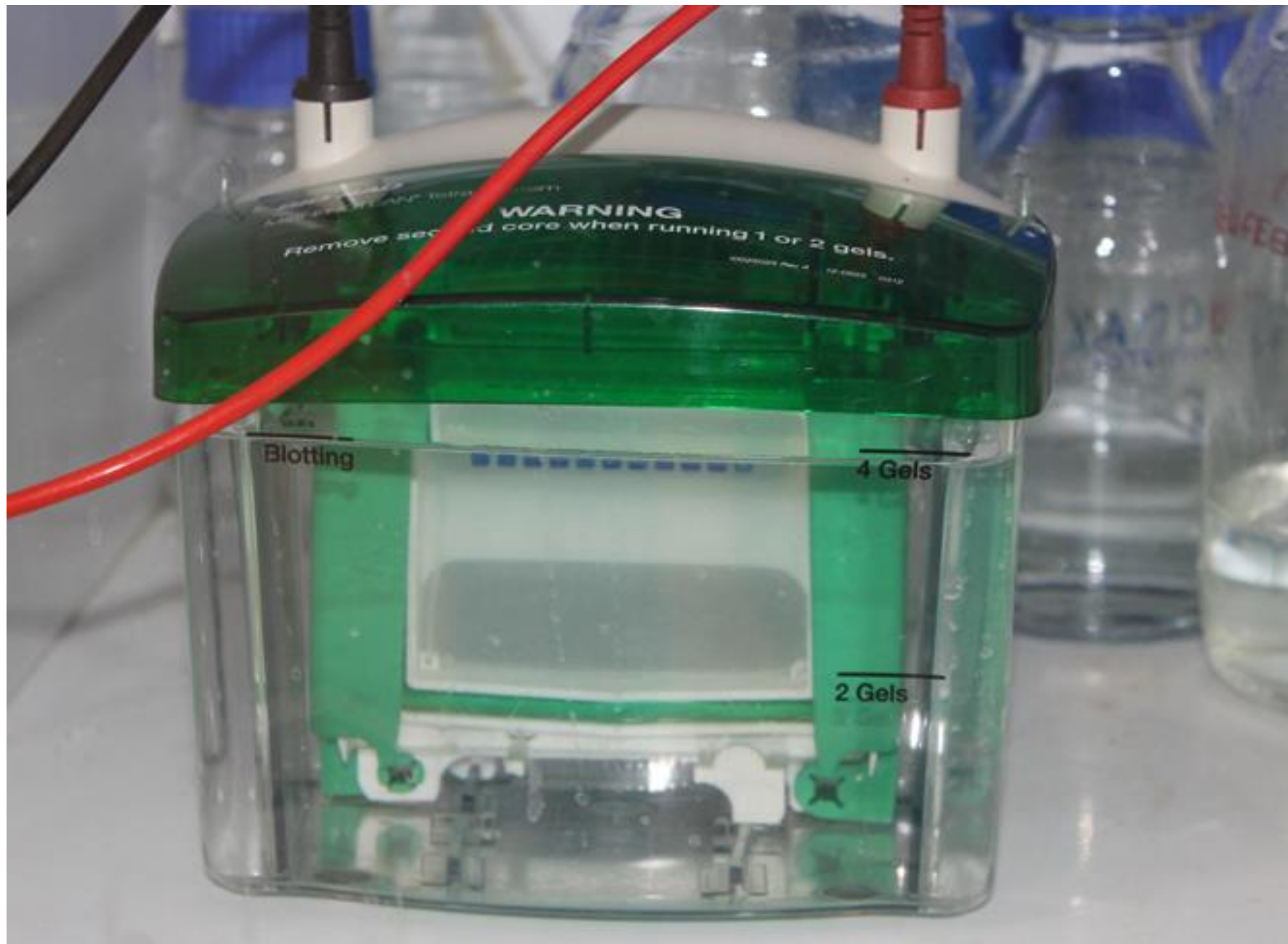
Екі техникада да молекулалардың бөлінуі молекуланың заряды мен мөлшеріне байланысты. Екі әдісті де нуклеин қышқылын және ақуызды бөліп алу үшін қолдануға болады. Екі техниканың да көлемі бірдей. Екі әдіс бөлуді жеңілдету үшін буферді қолданады.

Капиллярлық электрофорез мен гель электрофорезінің арасындағы басты айырмашылық - гель электрофорезі тік немесе көлденең жазықтықта стандартты кеуек өлшеміндегі полимерлі гельді қолдану арқылы жүзеге асырылады, ал капиллярлық электрофорез полимерлі сұйықтықпен немесе гельмен капиллярлық түтікте жасалады.

Вертикальды электрофорез

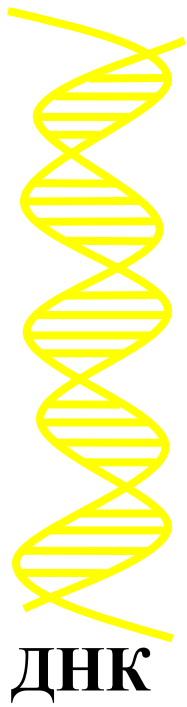


An Electrophoresis Apparatus.
A solution of proteins is applied to indentations made in a thin gel that is held between two clear plates of plastic. An electric current is applied, and over time the proteins separate.

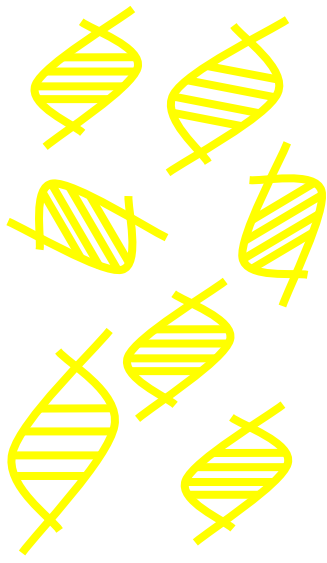
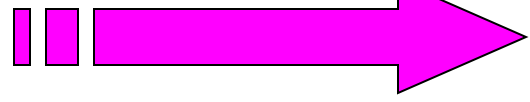


Саузерн блот гибридизация

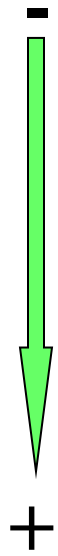
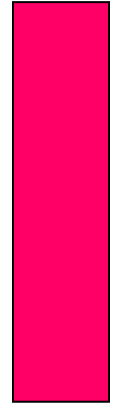
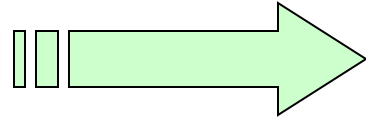
Саузерн-блотинг – талданушы ДНҚ-ны гельден нитроцеллюлозаға немесе нейлонға ауыстыруға негізделген ДНҚ молекуласын талдаудың молекулалық-генетикалық әдісі. Бұл әдісті Саузерн Э. ұсынды, сондықтан ол *Саузерн блотинг* (ағыл. *to blot*— қағазға сорылу) деп аталады. Саузерн бойынша блотинг әдісінің маңызы жалпы геномнан жеке гендерді бөлуде арта түседі. Бұл молекулалық деңгейдегі күрделі жұмыс үлкен мұқияттылықты керек етеді. Мысалы, сүтқоректілер клеткасының геномы 10^9 н.ж. құралған болса, онда ұзындығы тіпті 5000 н. ж. тең жалғыз ген геномның бар болғаны ядролық ДНҚ-ының 0,00005 %-ін ғана құрайды.



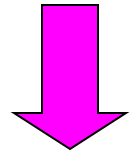
**РЕСТРИКТАЗАЛАРМЕН
КЕСУ**



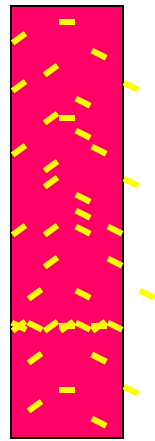
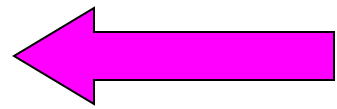
**Агарозды геледегі
электрофорез**



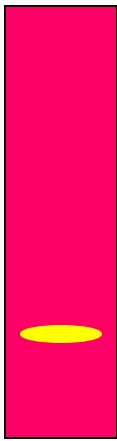
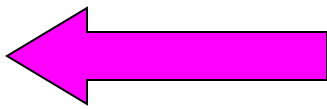
Арнайы фильтрге өткізу



**Радиоактивті зондтармен
өндеу**



Жуу этаптары



Пленкаға шығару

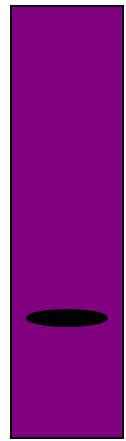
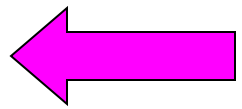
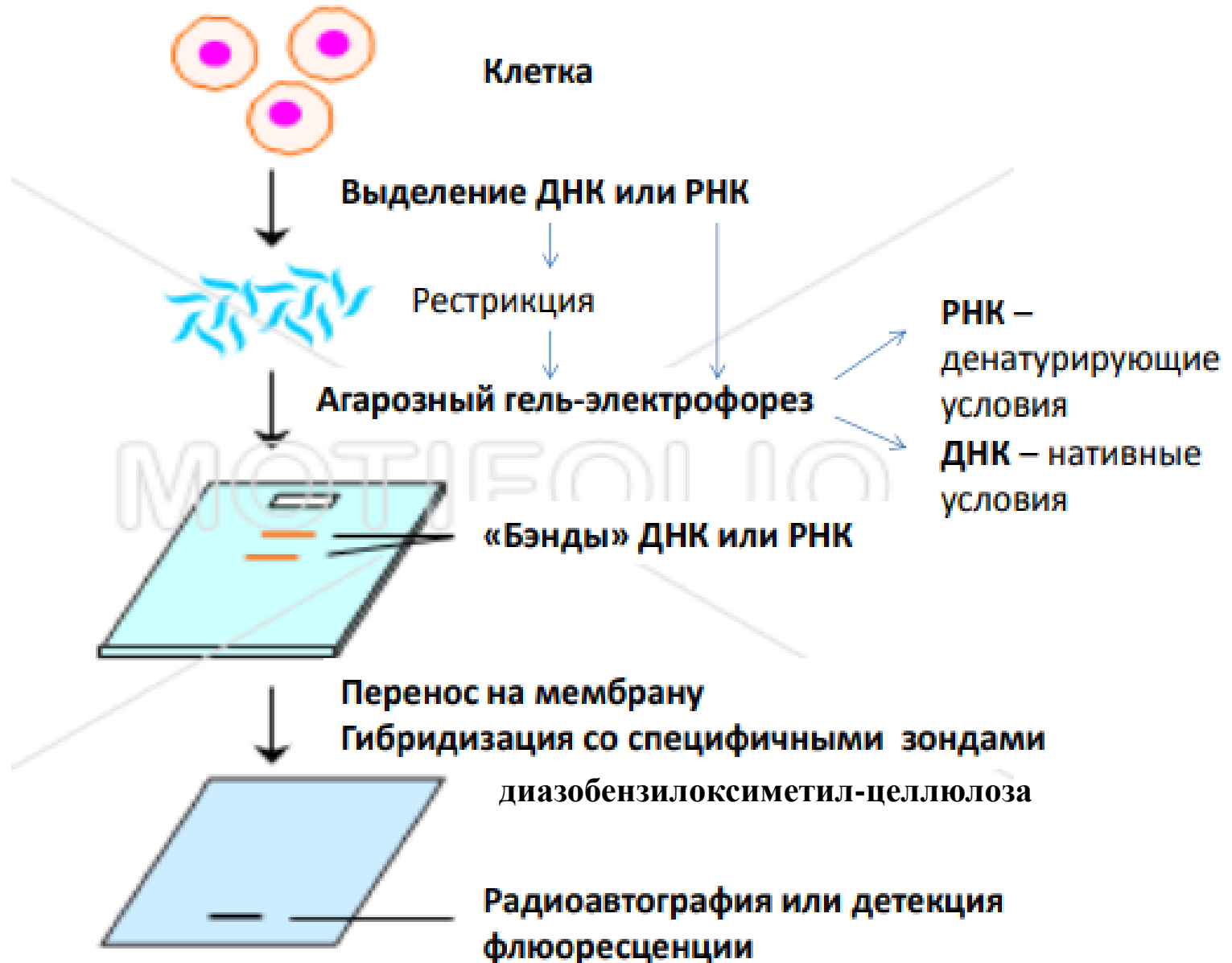


СХЕМА АНАЛИЗА



Вестерн блоттинг

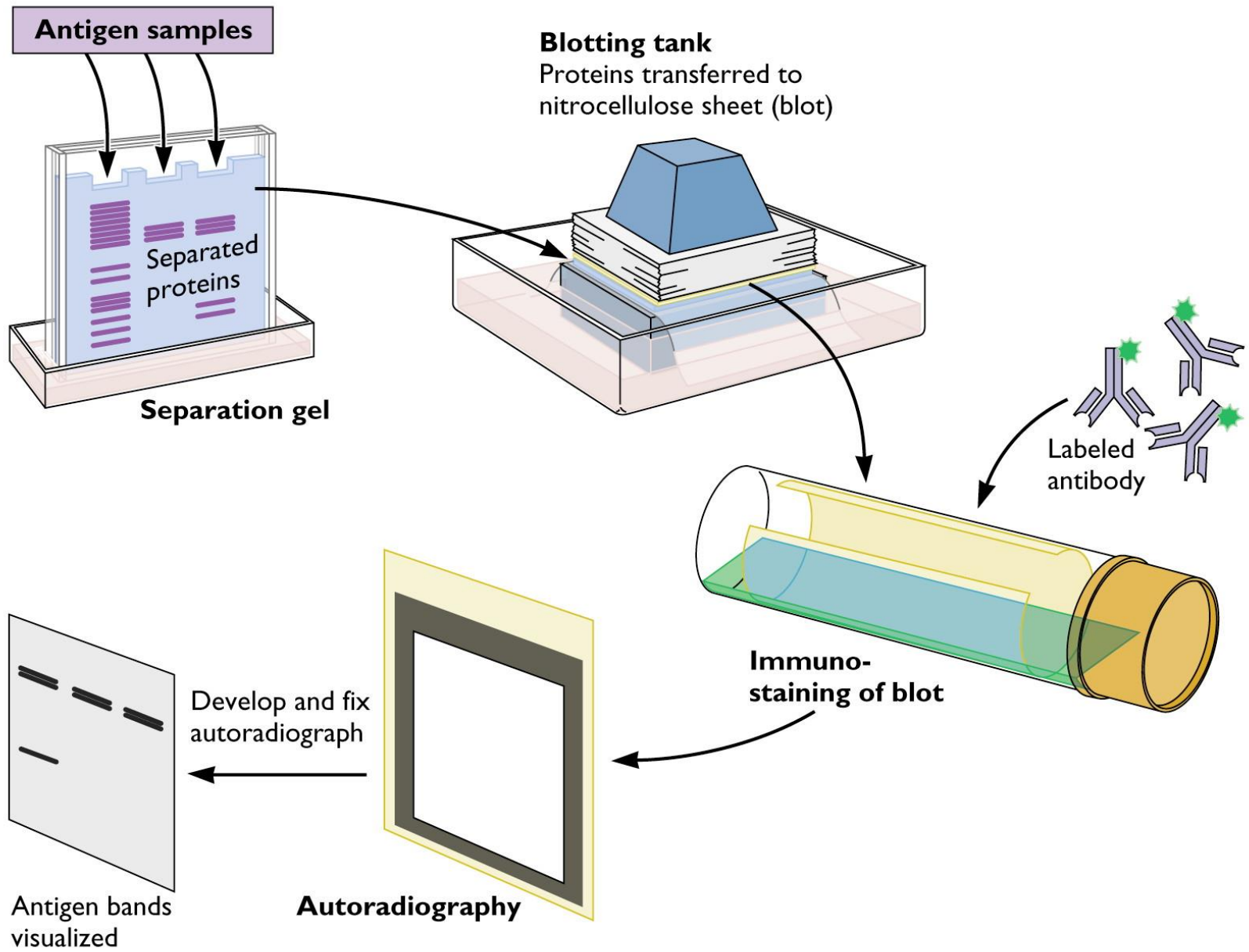
Вестерн блоттинг

(белок иммуноблоттингі деп аталады) - гомогенат үлгісіндегі немесе клетка сығындысындағы арнайы ақуыздарды анықтау үшін молекулалық биология мен иммуногенетикада кеңінен қолданылатын аналитикалық әдіс.

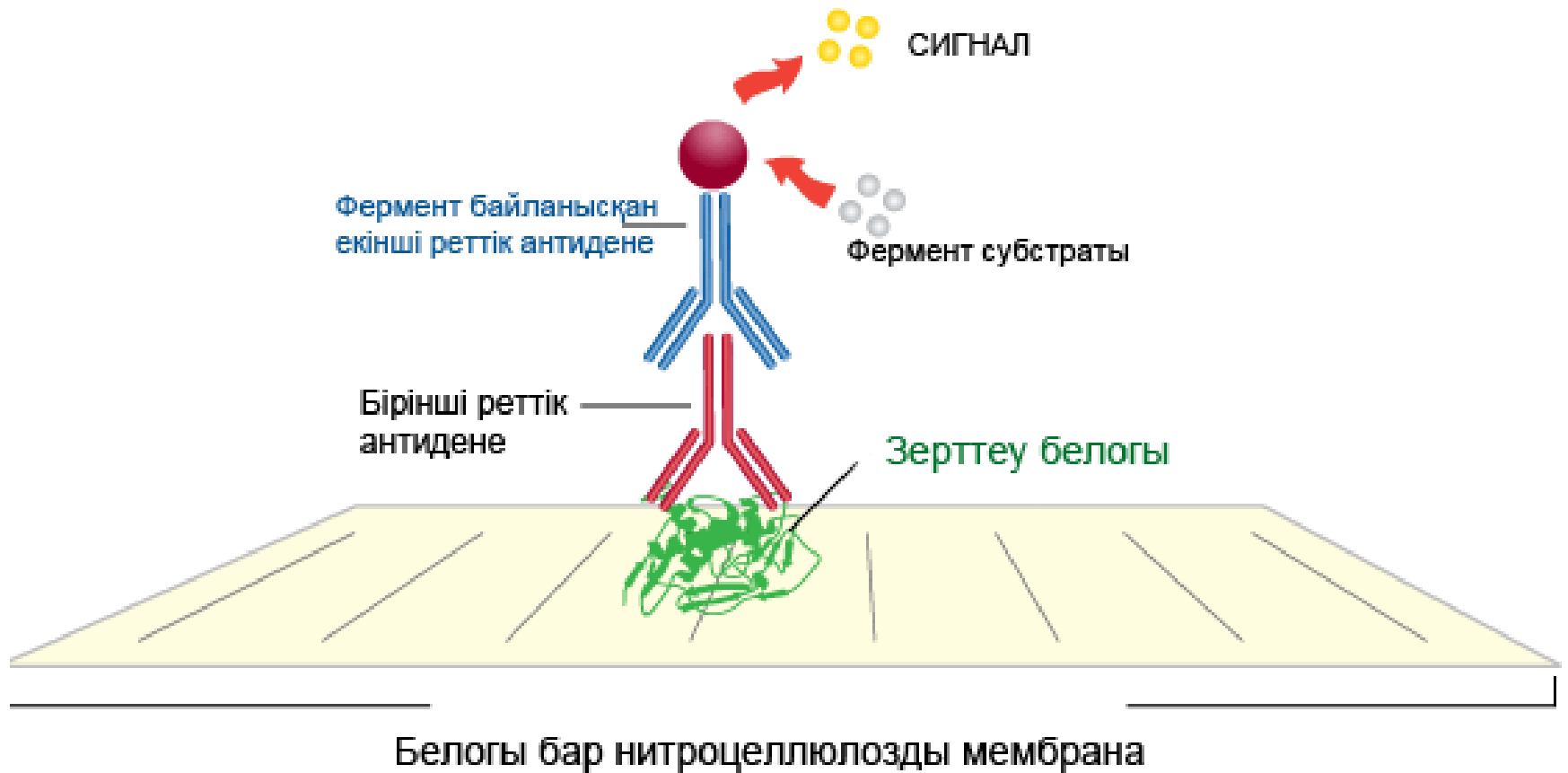
Вестерн-блоттинг әдісі Стэнфорд университетінде, Джордж Старк зертханасында жасалды. Бұл әдіске 1981 жылы «Western blot» атауын берген У. Нейл Бурнет, ағылшын биологы Эдвин Саузерннің атымен аталған ДНҚ анықтау әдісі – «Southern blot»-қа ұқсатып.

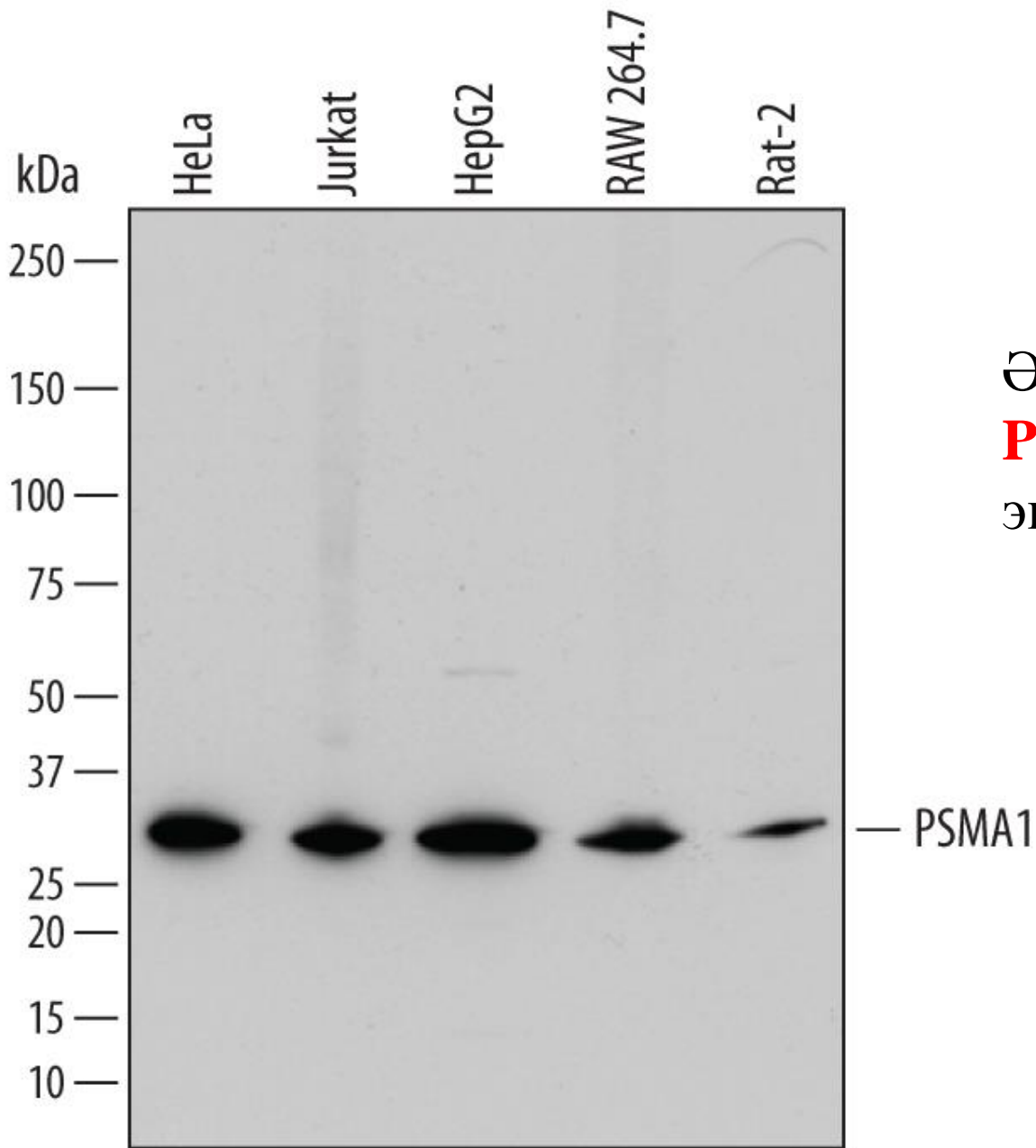
Әдістің принципі

Белоктың SDS -PAGE –де молекулалық салмағы бойынша сұрыпталғаннан кейін гельге мембрана қойылады, оған гелдегі сұрыпталған белок жолақтары капиллярлық түрде тасымалданады. Содан кейін тасымалданатын ақуыздары бар мембрана майсыздандырылған сүтпен спецификалық емес байланыстарды болдырмау үшін блокталып, бірінші реттік антиденемен (мақсатты ақуызға тән антидене) гибридизацияланады, жуылады және желкек пероксидазасы (HRP) сияқты ферментпен конъюгацияланған екінші реттік антиденемен әрекеттеседі. Байланыстырылған ферменттің белсенділігі мақсатты ақуызды анықтау үшін қолданылады және химилюминесцентті немесе хромогендік әдіспен көрінеді .



Вестерн блот кезіндегі антиденелер





Әртүрлі объектілерде
PSMA1 белогының
экспрессиясы

ru.coursera.org/lecture/gmo/2-3-stavim-ghiel-eliektroforiez-v-laboratorii-jbmpJ

<https://www.youtube.com/watch?v=cbkPUTrMP5k>