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

Пән атауы: Молекулалық биология

Дәріс 14

Гендер экспрессиясын анықтау және зерттеу әдістері

Лектор: к.б.н., Алтыбаева Н.А.

Дәрістің мақсаты: Ген экспрессиясын РНҚ және ақуыз деңгейлерінде бағалау принциптерін түсіндіру, сондай-ақ нысаналы ДНҚ тізбегін анықтауға арналған Саузерн әдісін Нозерн және Вестерн әдістерімен салыстыру.

Дәрістің жоспары:

1.Блоттингтің жалпы қағидасы. Молекулаларды электрофорез арқылы бөлу, мембранаға көшіру және сигналды тіркеу.

2.Саузерн блоттингі. Геномдық ДНҚ фрагменттерін бөлу және нысаналы тізбекті комплементарлы зондпен анықтау.

3.Нозерн блоттингі. РНҚ транскриптін анықтау, оның ұзындығы мен салыстырмалы мөлшерін бағалау.

4.Вестерн блоттингі. Нысаналы ақуызды антиденелермен анықтау, оның молекулалық массасы мен салыстырмалы мөлшерін бағалау.

Оқыту нәтижелері

Дәрісті меңгеру нәтижесінде білім алушы:

1.Блоттингтің негізгі кезеңдерін ретімен сипаттайды және электрофорездің, мембранаға көшірудің, нысананы танудың және сигналды тіркеудің мақсатын ажырата алады.

2.Саузерн блоттингінде комплементарлы зонд арқылы геномдық ДНҚ-ның нысаналы фрагментін анықтау қағидасын сипаттай алады.

3.Нозерн блоттингінде жолақтың орналасуына қарай РНҚ транскриптінің ұзындығын бағалайды және қалыптандырылған сигнал қарқындылығы бойынша оның үлгілердегі салыстырмалы мөлшерін салыстыра алады.

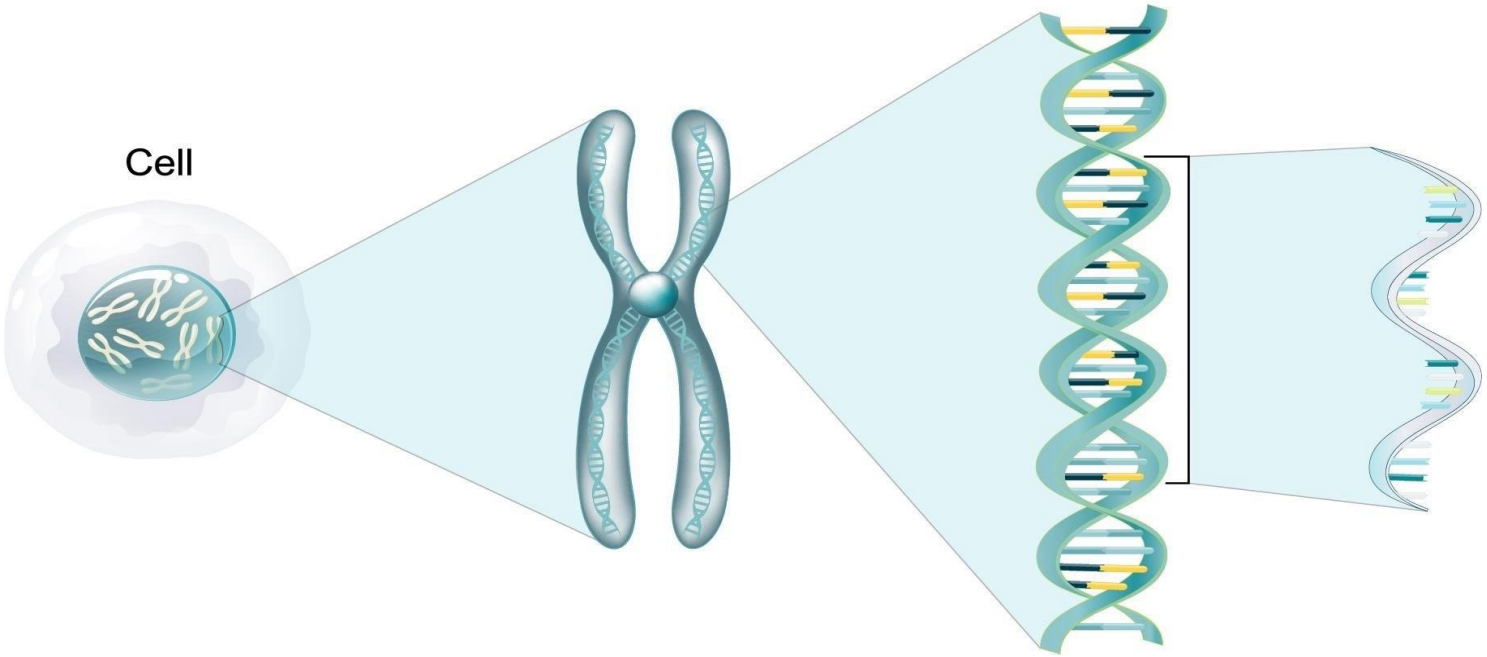
4.Вестерн блоттингінде нысаналы ақуызды анықтауда бастапқы және екінші антиденелердің қызметін ажыратады, жолақ бойынша ақуыздың шамамен молекулалық массасы мен салыстырмалы мөлшерін бағалай алады.

5.Саузерн, Нозерн және Вестерн блоттингін зерттеу нысаны, анықтау қағидасы және алынатын дерек түрі бойынша салыстырады, зерттеу мақсатына сәйкес әдісті таңдай алады.

Кіріспе

Гендік экспрессия- геннің ішіндегі ақпарат функционалды өнімді (РНҚ немесе ақуыз) синтездеу үшін қолданылатын үрдіс.

Гендік экспрессияны зерттеу үшін ДНҚ, РНҚ және ақуыз молекулаларының бар болуын, санын және мөлшерін анықтау әдістері қолданылады.



Ген экспрессиясын зерттеу әдістері

Ген экспрессиясын зерттеу әдістері зерттеу нысанына байланысты үш негізгі топқа бөлінеді:

ДНҚ деңгейіндегі әдістер – гендердің құрылымын және олардың көшірме санын анықтайды (мысалы, Саузерн блоттинг).

РНҚ деңгейіндегі әдістер – транскрипция белсенділігін зерттейді (мысалы, Нозерн блоттинг, RT-PCR).

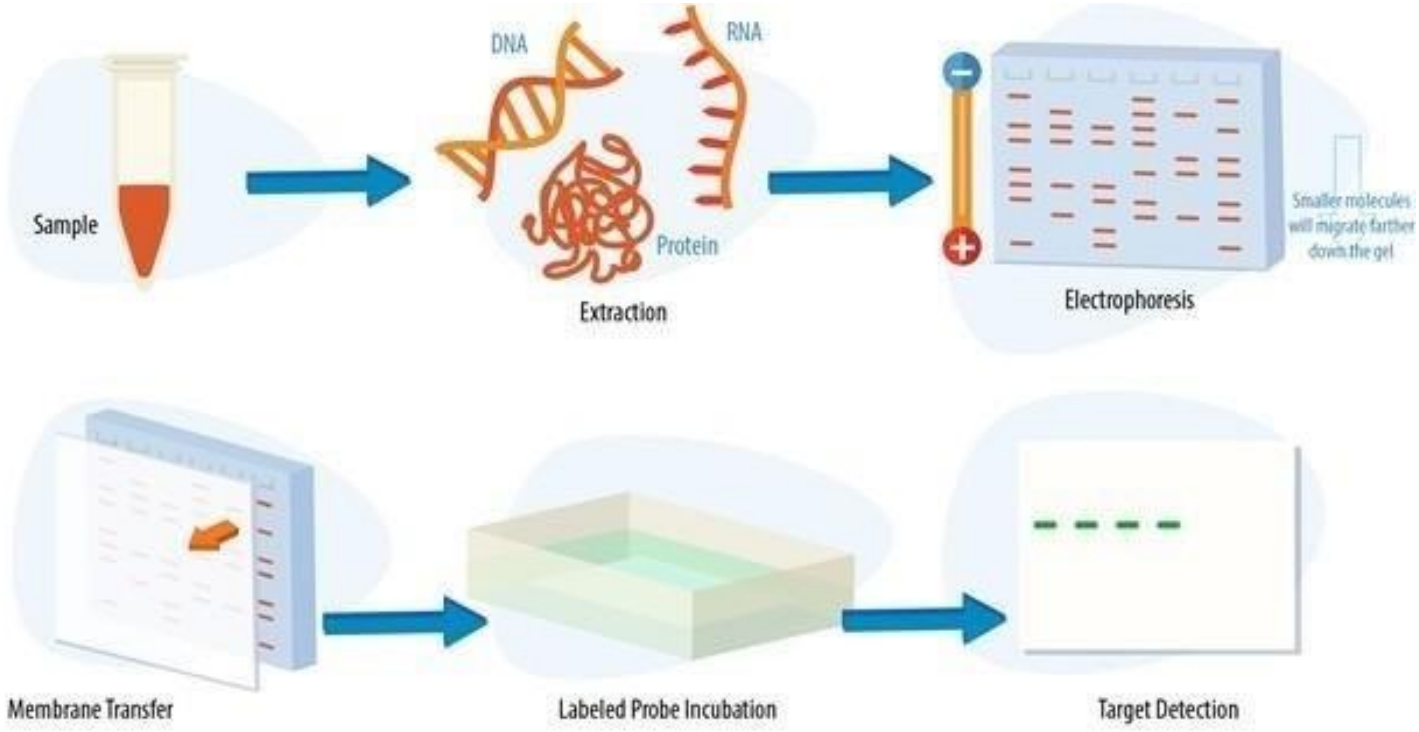
Ақуыз деңгейіндегі әдістер – ген өнімдерінің мөлшері мен қасиеттерін анықтайды (мысалы, Вестерн блоттинг, ELISA).
Бұл әдістер бір-бірін толықтырады және генетикалық ақпараттың барлық деңгейлерінде экспрессияны кешенді түрде бағалауға мүмкіндік береді.

Блоттинг әдістерінің жалпы принципі

Блоттинг (blotting) — нуклеин қышқылдары немесе ақуыздарды арнайы тасымалдаушы бетке көшіру және оларды таңбалы зонд арқылы анықтау әдісі. Бұл тәсілді алғаш рет Эдвин Саузерн (Southern, 1975) ұсынған. Кейін осы принцип негізінде РНҚ мен ақуыздар үшін Нозерн және Вестерн блоттинг әдістері жасалды.

Блоттингтің негізгі кезеңдері:

1. Молекулаларды электрофорез арқылы бөлу,
2. Мембранаға көшіру,
3. Зондпен немесе антиденемен гибридизациялау,
4. Сигналды анықтау.



Гендік экспрессияны анықтау және зерттеу тәсілдері

- Нозерн блоттинг
- Саузерн блоттинг
- Вестерн блоттинг

Басты ерекшеліктері

Әдіс	Нысаны	Мақсаты	Зонд түрі	Негізгі қолданыс
Саузерн блоттинг	ДНҚ	Геннің бар-жоғын анықтау	ДНҚ	Ген құрылымы
Нозерн блоттинг	РНҚ	Ген экспрессиясын өлшеу	ДНҚ/РНҚ	Транскрипция деңгейі
Вестерн блоттинг	Ақуыз	Ген өнімі мен мөлшерін анықтау	Антидене	Трансляция деңгейі

Нозерн блоттинг

РНҚ (әдетте мРНҚ) анықтау үшін қолданылады.

Мақсаты: транскрипттің деңгейі мен өлшемін зерттеп, РНҚ деңгейіндегі ген экспрессиясын анықтау.

Жасушадан РНҚ-ны оқшаулау.

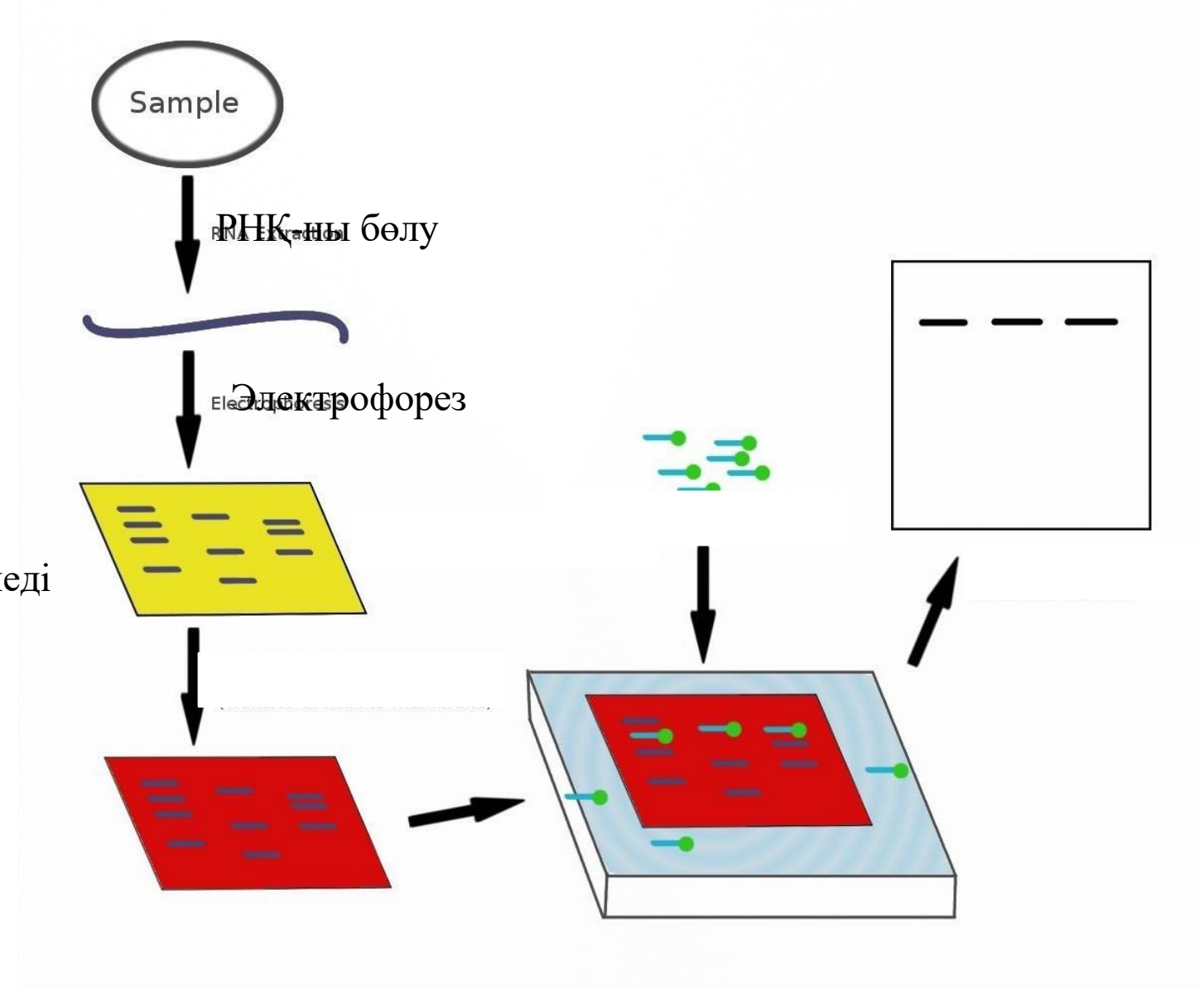
РНҚ бөліктерін мөлшері бойынша денатурациялаға ұшыратын гельдегі электрофорез арқылы бөлу.

РНҚ-ны мембранаға тасымалдау.

Керекті мРНҚ-ға комплементарлы ДНҚ немесе РНҚ зондымен гибридизация.

Сигналдың анықталуы гендік экспрессия деңгейін көрсетеді. Нозерн блоттинг әртүрлі жазушаларда және жағдайларда геннің белсенділігін салыстыруда қолданылады.

Нозерн блоттинг



Бөліктер мөлшерлері бойынша бөлінеді

Нозерн блоттинг әдісінің орындалу кезеңдері

а. РНҚ-ны денатурациялайтын гельде бөлу

РНҚ гель ерітіндісі агароз ерітіндісіне формальдегид қосу арқылы дайындалады.

Гель қалыптастыру құрылғысы (қалып) жиналып, дайындалған денатурациялайтын гель қалыпқа құйылады. Гель қатайып келе жатқан кезде сәйкес өлшемдегі тістер бар тарақ орнатылып, үлгі ұяшықтары түзіледі.

Гель қатайған соң тарақ алынып тасталады және гель электрофорезге арналған жүгіру буферімен 30 минут бойы теңгеріледі.

15 мкг РНҚ үлгісі тең көлемдегі РНҚ жүктеу буферімен араластырылады. Сонымен қатар, 3 мкг РНҚ маркерлері дәл осындай буфер көлемімен дайындалады.

Үлгілер 65°C температурада қыздыру блогында шамамен 12–15 минут инкубацияланады.

Дайындалған үлгілер теңгерілген гельге жүктеледі, ал бірінші қатардағы ұяшықтар РНҚ маркерлерімен толтырылады.

Содан кейін гель 125 В кернеуде шамамен 3 сағат бойы электрофорезге ұшырайды.

b. РНҚ-ны гельден нейлон мембранасына көшіру (Transfer of RNA)

Денатурациялайтын гель өлшемінен сәл үлкен нейлон мембрана кесіледі. Сол өлшемге сәйкес сүзгі қағазы (filter paper) да дайындалады.

Электрофорез аяқталғаннан кейін гель резервуардан алынып, дистилденген сумен шайылады.

Гель өлшемінен сәл үлкен тікбұрышты губка шыны ыдысқа орналастырылады. Ыдысқа SSC буфері құйылып, губканың шамамен жартысы ерітіндіге батып тұратындай деңгейде болады.

Губканың үстіне бірнеше Whatman 3 мм сүзгі қағаздары қойылып, SSC буферімен суландырылады.

Гель осы сүзгі қағаздың үстіне орналастырылады. Әйнек пипетканы айналдыра отырып, гельдің астындағы ауа көпіршіктері шығарылады.

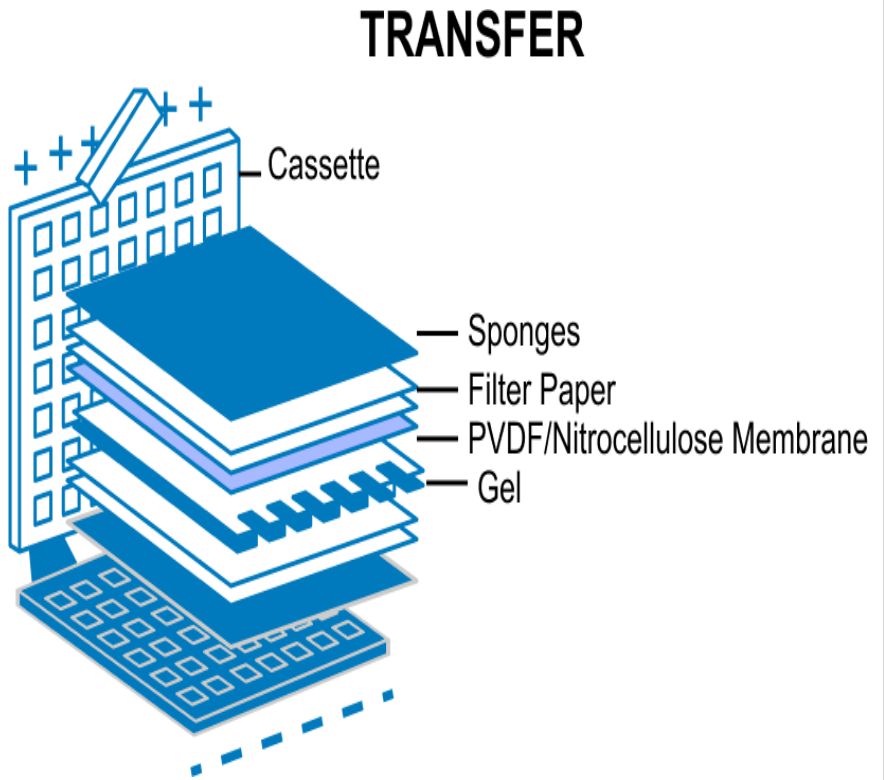
Нейлон мембранасы RNase-тен таза табақшада 5 минут бойы дистилденген сумен суландырылады.

Суланған мембрана гельдің үстіне мұқият орналастырылады, ауа көпіршіктерінің пайда болуына жол берілмейді.

Үстінен SSC буфері құйылады және тағы бірнеше сүзгі қағаз қабаты қойылады.

Барлық құрылымның үстіне әйнек пластина орналастырылады.

Бұл жүйе тиімді көшіру жүруі үшін түн бойы (шамамен 12–16 сағат) қалдырылады.

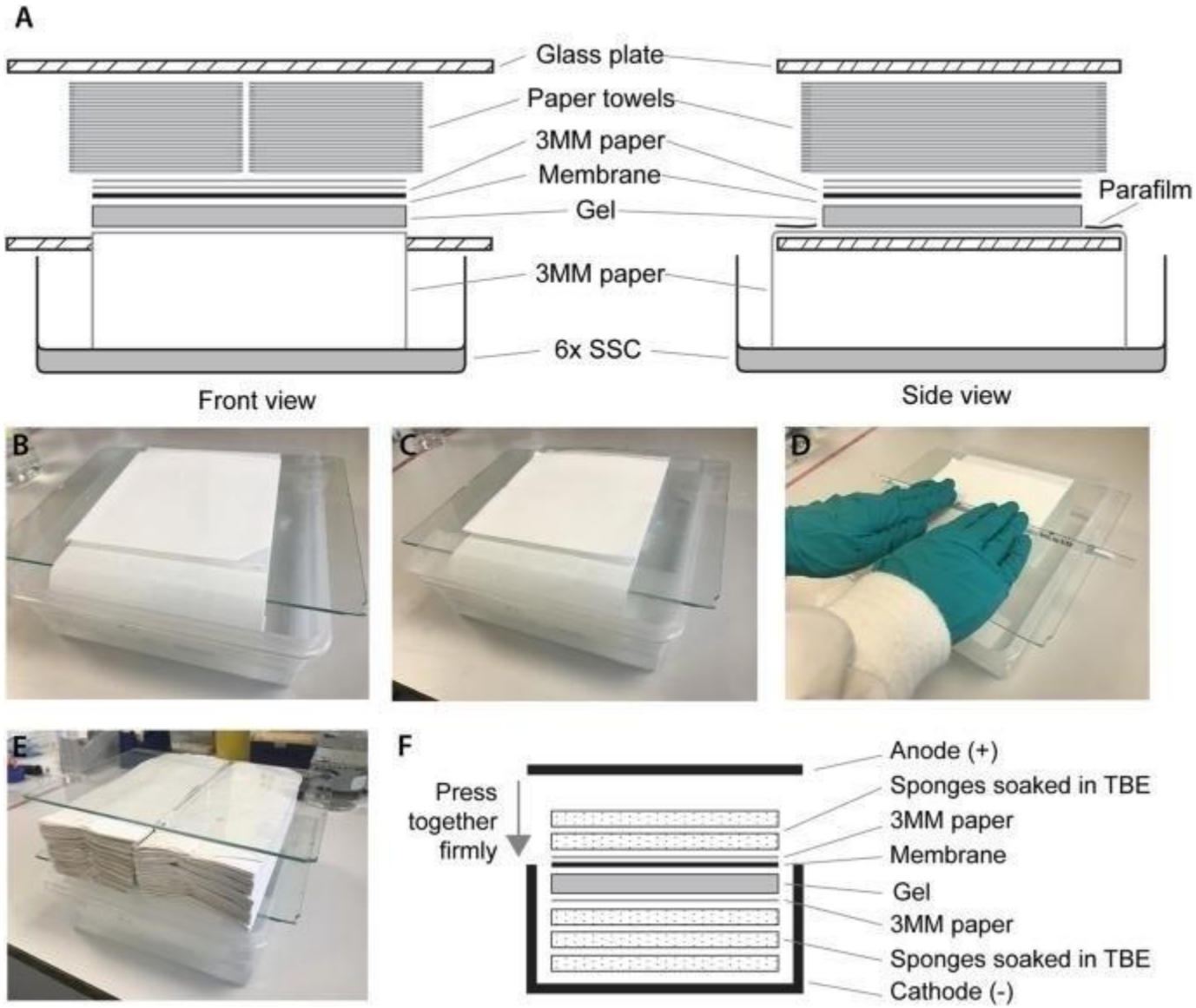


c. Иммобилизация (RNA фиксациясы)

Көшіру аяқталған соң гель алынып, SSC буферімен шайылып, кептіріледі.

Мембрана екі сүзгі қағазының арасына салынып, вакуумдық пеште 80°C температурада 2 сағат бойы кептіріледі.

Кей жағдайларда мембрана ультракүлгін сәулені өткізетін пластик қабықшаға оралып, UV-трансиллюминаторда белгілі уақыт бойы сәулелендіріледі.



d. Гибридизация кезеңі (Hybridization)

Қолданылатын ДНҚ немесе РНҚ зондтары 10^8 dpm/мкг-тен жоғары меншікті белсенділікке дейін таңбаланады және кіріктірілмеген нуклеотидтер алынып тасталады.

Иммобилизацияланған РНҚ бар мембрана SSC буферімен суландырылады.

Мембрана гибридизация түтігіне РНҚ беті жоғары қаратып орналастырылады, оған 1 мл формальдегид ерітіндісі қосылады.

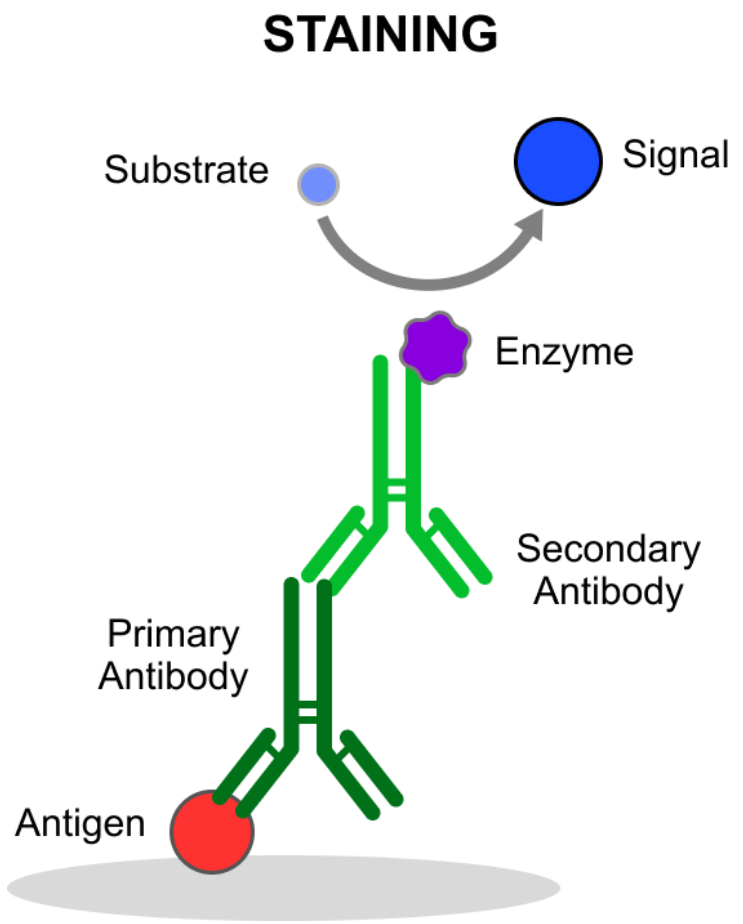
Түтік гибридизация пешіне салынып, 42°C температурада 3 сағат инкубацияланады.

Егер қолданылатын зонд екі тізбекті ДНҚ болса, ол 100°C температурада су моншасында немесе инкубаторда 10 минут бойы қыздыру арқылы денатурацияланады.

Қажетті көлемдегі зонд гибридизация түтігіне енгізіледі және инкубация 42°C температурада жалғасады.

Инкубациядан кейін ерітінді төгіледі, мембрана жуғыш ерітіндімен (washing solution) жуылады.

Соңында мембрана **авторадиография әдісімен** зерттеледі — яғни, зондтардың байланысу нәтижесінде РНҚ нысандары анық көрінеді.



Зертханада жұмыс істеуге қажеттілер

Қажетті реактивтер (Materials / Reagents)

- Агарозды гель (Agarose gel)
- Натрий цитраты (Sodium citrate)
- Этилендиаминтетра сірке қышқылының динатрий тұзы (Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dehydrate)
- Натрий гидроксиді (NaOH)
- Тұз қышқылы (HCl)
- Формальдегид (Formaldehyde)
- Глицерин (Glycerol)
- Этидий бромиді (Ethidium bromide)
- Бромфенол көгі (Bromophenol Blue)
- РНҚ маркері (RNA ladder)
- Магний хлориді ($MgCl_2$)
- Натрий хлориді (NaCl)
- Поливинилпирролидон (Polyvinylpyrrolidone)
- Сиыр сарысу альбумині (Bovine Serum Albumin)
- Натрий додецилсульфаты (SDS)
- Натрий фосфаты (NaH_2PO_4)
- Трис-гидрохлорид буфері (Tris-HCl)
- Тритон X (Triton-X)
- Дитиотреитол (DTT)
- Taq буфері (Taq buffer)
- Taq полимераза (Taq polymerase)

Қажетті жабдықтар (Requirements / Equipment)

- Агарозды гель қалыптастыру құрылғысы
- Электр қоректендіру көзі (Power Supply)
- Микротолқынды пеш (Microwave)
- Центрифуга
- Қыздыру блогы (Heating block)
- Ультракүлгін сәулелі байланыстырғыш құрылғы (UV crosslinker)
- Гибридизация пеші (Hybridization oven)
- Гибридизация ыдыстары (Hybridization vessels)
- Пробиркалар (Vials)
- Пинцет (Forceps)
- Пипеткалар (Pipettes)
- Шыны түтіктер (Glass tubes)

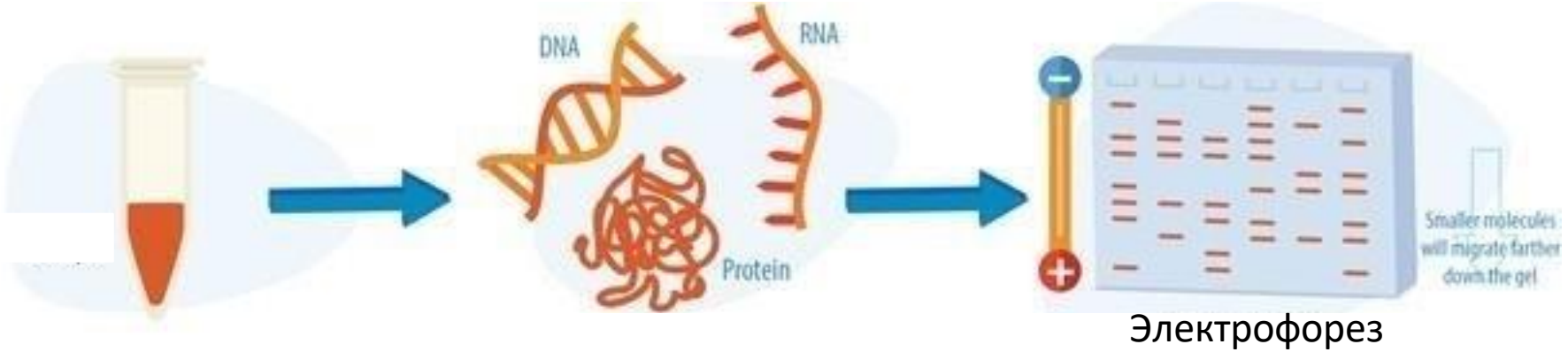
Саузерн блоттинг

- Мақсаты: геномда белгілі бір геннің немесе оның фрагментінің болуын анықтау.

1. ДНҚ рестриктаза ферментімен фрагменттерге бөлінеді.
2. Фрагменттер агарозалық гельде электрофорез арқылы бөлінеді.
3. Фрагменттер мембранаға (нитроцеллюлоза немесе нейлон) тасымалданады ("блоттанады").
4. Мембрана қажетті тізбекке комплементарлы ДНҚ зондымен өңделеді.
5. Гибридизация және сигналдың анықталуы қажетті геннің болуын не болмауын анықтайды.

- Саузерн блоттинг клондау кезінде генді енгізуді тексеруде және мутация мен полиморфизмдерді анықтауда қолданылады.

Саузерн блоттинг



Электрофорез



Мембрана

Инкубация

Қажетті ДНҚны анықтау

Вестерн блоттинг

Ақуыздарды анықтау үшін қолданылады.

Мақсаты: ақуыздың экспрессиясын, массасын, модификацияларын анықтау.

1. Ақуыздар жасушалардан бөлініп, SDS-PAGE (молекулалық салмағы бойынша) арқылы бөлінеді.
2. Мембранаға тасымалдау (PVDF немесе нитроцеллюлоза).
3. Мембрананы керекті ақуызға арнайы антиденемен өңдеу.
4. Фермент белгісі бар антидене сигналдың визуализациясын қамтамасыз етеді (хемилюминесценция, бояу және т.б.).

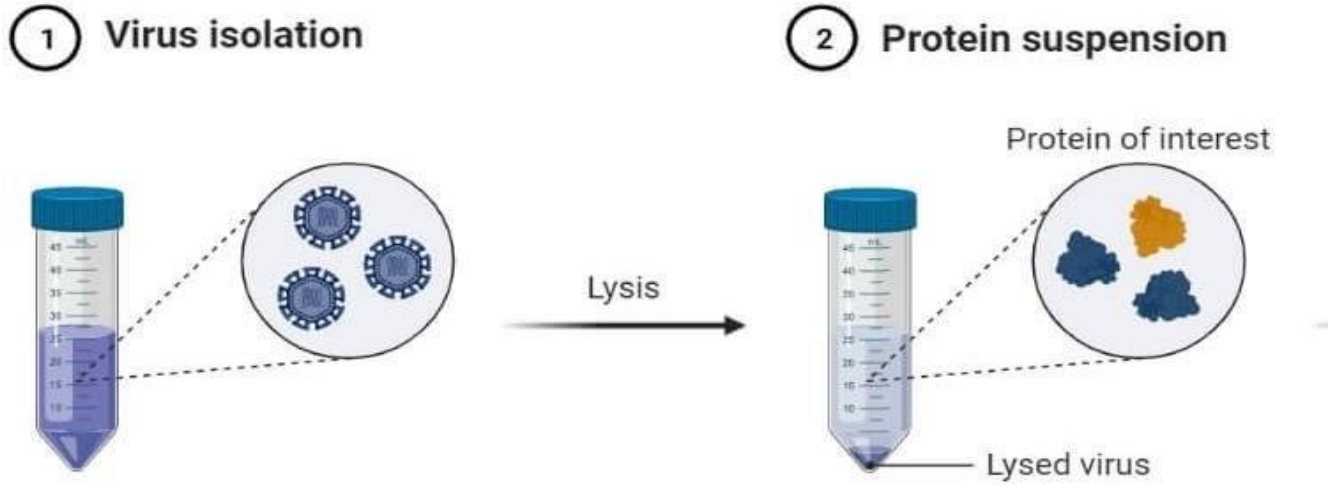
Веатерн блоттинг зерттелетін геномммен кодталған ақуыз синтезін растауда, трансляциядан кейінгі модификацияларды зерттеуде, және кейбір аурулардың (АИВ) диагностикасында қолданылады.

Вестерн блоттинг әдісінің орындалу кезеңдері

1. Үлгіні дайындау (Sample Preparation)

Western blot үшін ең жиі қолданылатын үлгілер — жасуша лизаттары. Олар ақуыздарды шығарып алу (экстракция) процесі арқылы дайындалады.

Экстракция механикалық бұзу, химиялық экстракция немесе ферменттерді пайдалану арқылы жүзеге асырылады. Процесс әдетте **төмен температурада**, **протеазалық ингибиторлардың** қатысуымен жүргізіледі, бұл ақуыздардың денатурациясын болдырмау үшін қажет.



2. Гель электрофорезі (Gel Electrophoresis)

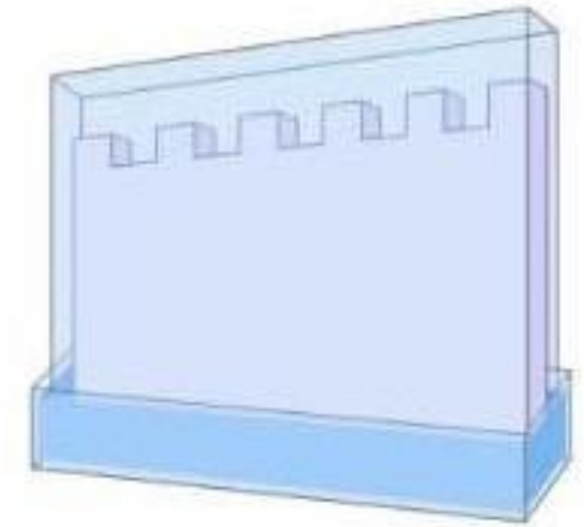
Ақуыз үлгісі үлгі буферімен сұйылтылады, содан кейін **70°C температурада 10 минут бойы қыздырылып, шайқалады**.

Үлгі 5000g-де центрифугаланады.

Гель корпусы ашылып, буфер резервуарына орнатылады, резеңке тығыздағыш арқылы герметикалық бекітіледі.

Жоғарғы резервуарға **жүгіру буфері (running buffer)** құйылады. Әрбір ұяшыққа бірдей көлемдегі денатурацияланған үлгі енгізіледі, ал бір арна **ақуыз маркерлеріне (protein ladder)** бөлінеді.

Қақпақ жабылып, құрылғы **200 В тұрақты кернеуде 50 минут** жұмыс істейді.



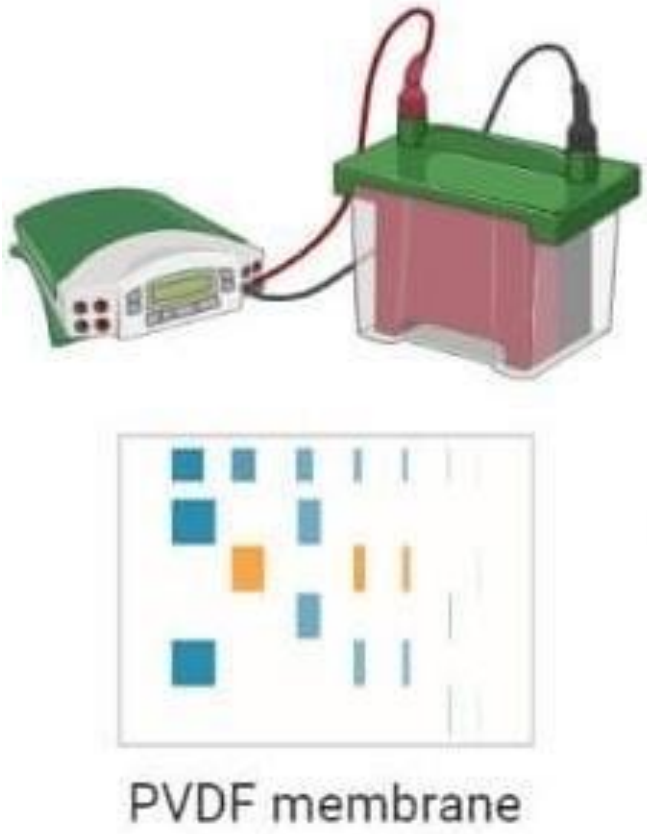
3. Ақуызды көшіру (Protein Transfer)
Көшіру буфері (transfer buffer) 10% метанол қосу арқылы дайындалады.

Көшіру құрылғысы жиналып, буфермен суландырылады.
Төменгі қабатқа губка, оның үстіне сүзгі қағазы қойылады — екеуі де буфермен ылғалданған болуы керек.

Гель резервуардан алынып, суланған сүзгі қағаз үстіне орналастырылады.
Нитроцеллюлоза мембранасы көшіру буферімен суландырылады және гельдің үстіне **ауа көпіршіктерінсіз** қойылады.

Көшіру құрылғысы резервуарға салынып, буфермен толтырылады.
Процесс **100 В кернеуде 1 сағат** бойы жүргізіледі.

Көшіру аяқталған соң, мембрана гельден бөлінеді.

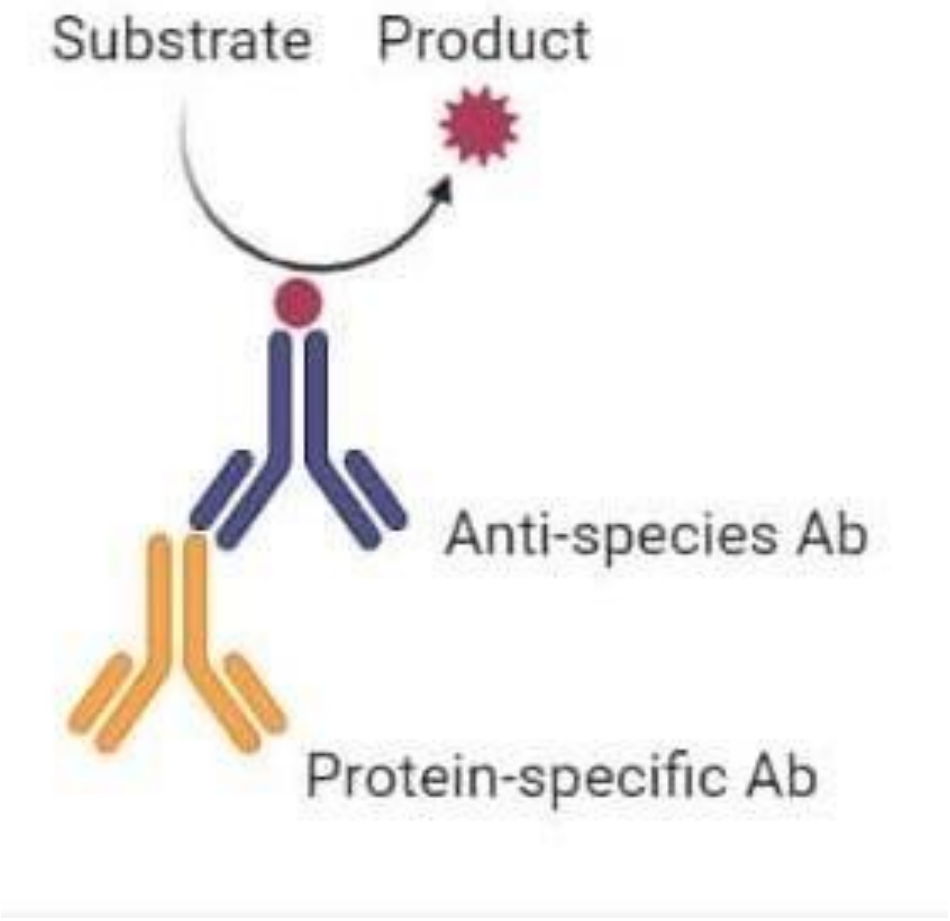


4. Иммунодетекция (Immunodetection)
Мембрана **Tris-буферлі тұз ерітіндісімен (TBS)** 5 минут жуылады. 10% майсыз құрғақ сүт Tris буферімен араластырылып, мембрана осы қоспамен **30 минут бөлме температурасында** инкубацияланады.

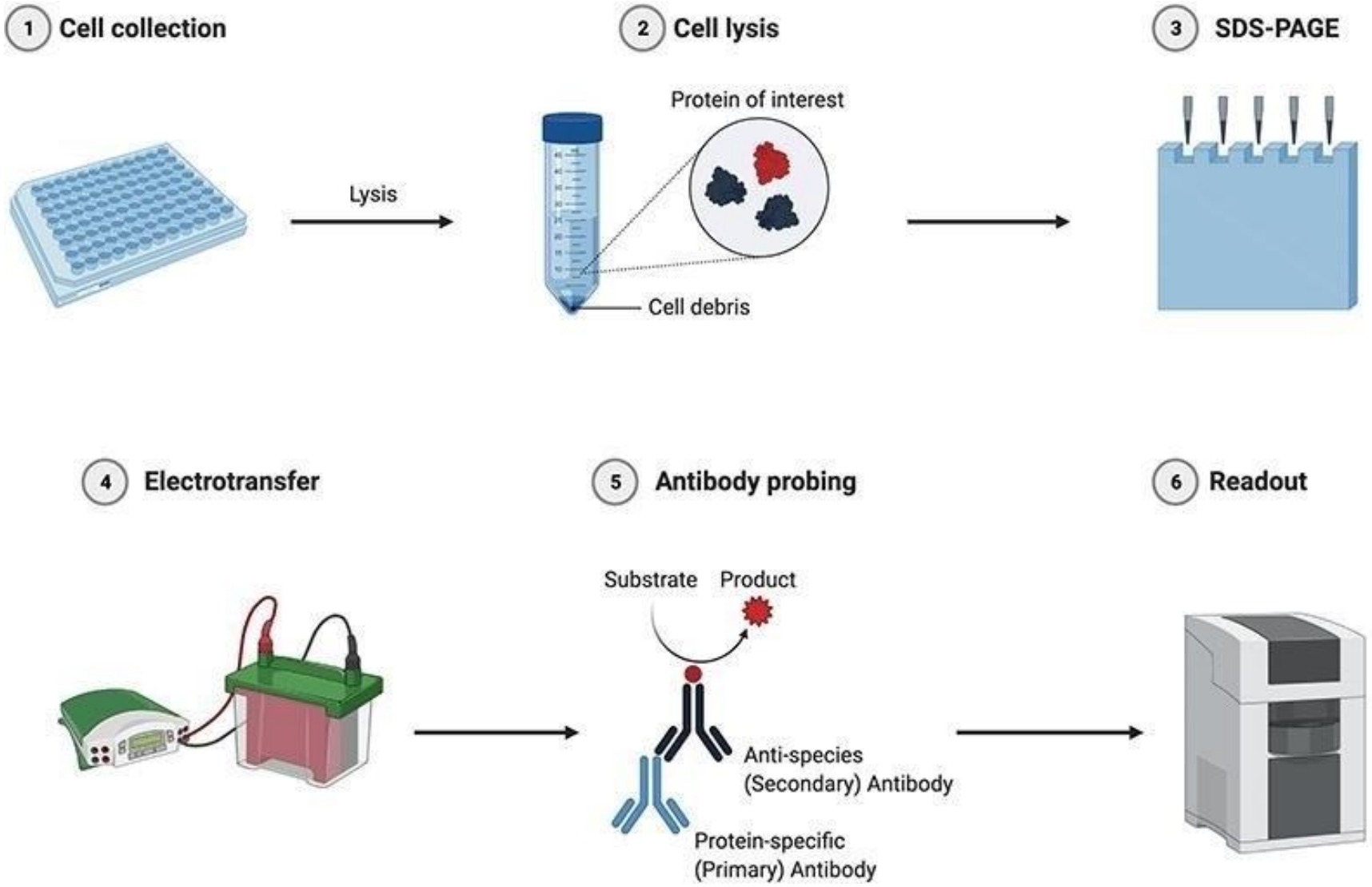
Артық қоспа жуылып тасталады.
Пинцет көмегімен мембрана жаңа Петри табақшаға ауыстырылып, оған **біріншілік антидене (primary antibody)** қосылады.
Мембрана антиденемен **3 сағат бойы** бөлме температурасында инкубацияланады, содан кейін Tris буферімен жуылады.

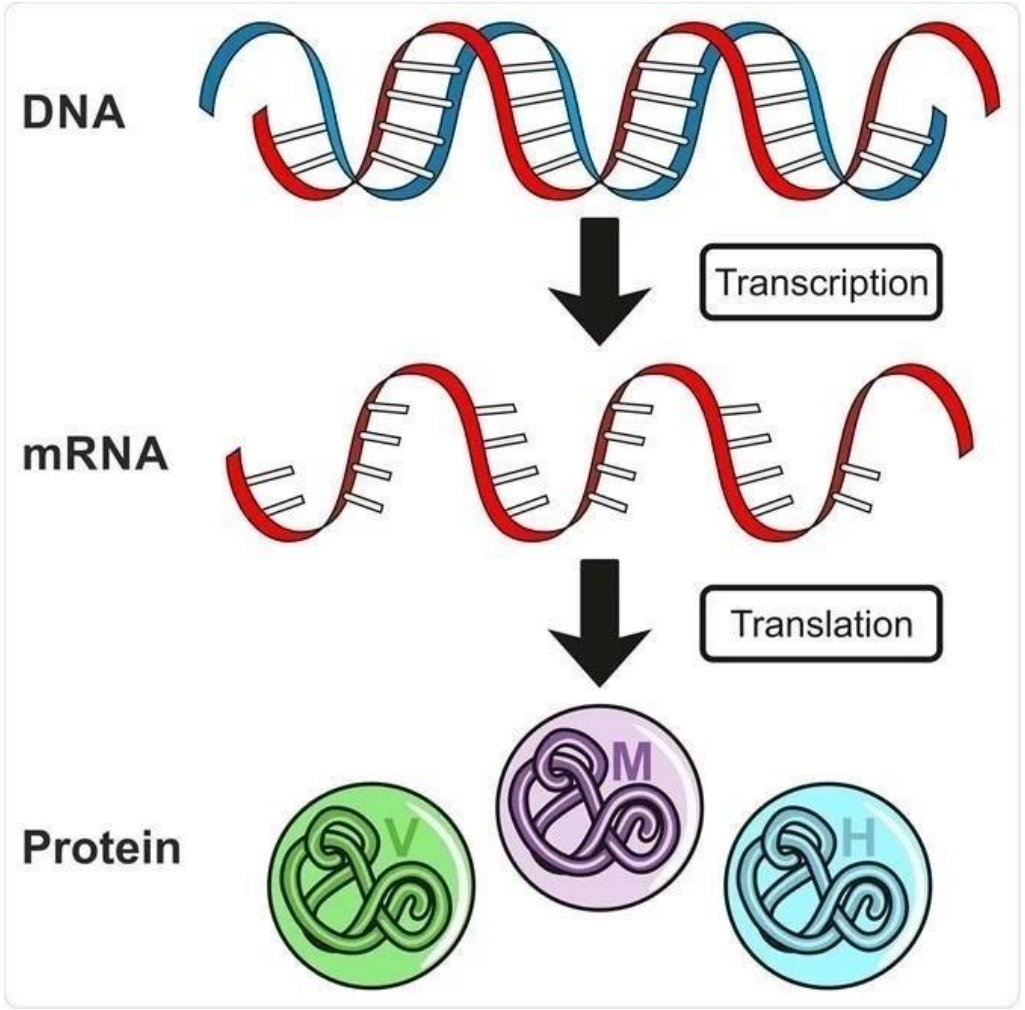
Содан соң мембрана жаңа табақшаға ауыстырылып, оған **екіншілік HRP-конъюгирленген антидене** қосылады (орташа концентрациясы 1 мкг/мл).
Мембрана **1 сағат бойы** инкубацияланады және қайтадан жуылады.

Мембрана **субстратпен 5 минут бойы** инкубацияланады.
Нәтиже — мембранадағы ақуыз жолақтары **иммундыферменттік реакция арқылы** визуализацияланады.



Вестерн блоттинг





Маңыздылығы

- Нозерн блоттинг, саузерн блоттинг, және вестерн блоттинг гендік экспрессияны үш деңгейде зерттеуге мүмкіндік береді:
- ДНҚ (Созерн блоттинг)
- РНҚ (Нозерн блоттинг)
- Ақуыз (Вестерн блоттинг).
- RT-PCR, RNA-seq, ELISA сияқты заманауи әдістерге негіз болады.

Қорытынды

Ген экспрессиясын зерттеу әдістері молекулалық биологияның негізін құрайды. Саузерн, Нозерн және Вестерн блоттинг — генетикалық ақпараттың үш деңгейін: ДНҚ, РНҚ және ақуызды зерттеудің әмбебап тәсілдері. Бұл әдістердің арқасында ғалымдар гендердің белсенділігін, олардың реттелуін және аурулармен байланысын нақты анықтай алады. Блоттинг технологиялары биомедицинада, онкологияда, фармакологияда және гендік инженерияда кеңінен қолданылады. Қазіргі уақытта классикалық блоттинг әдістері сандық ПТР, микрочиптер және протеомдық талдау сияқты жоғары өнімді әдістермен толықтырылғанымен, олар ген экспрессиясын зерттеудің алтын стандарты болып қала береді.

Өзін-өзі тексеруге арналған сұрақтар:

1.Блоттингтің негізгі кезеңдері қандай және электрофорезден кейін молекулалар қандай мақсатпен мембранаға көшіріледі?

2.Саузерн блоттингінде геномдық ДНҚ-ның нысаналы фрагменті қалай анықталады? Комплементарлы зонд қандай қызмет атқарады?

3.Нозерн блоттингінде жолақтың орналасуы мен сигнал қарқындылығы транскрипт туралы қандай ақпарат береді?

4.Вестерн блоттингінде бастапқы және екінші антиденелердің қызметтері қалай ажыратылады? Нысаналы ақуыздың шамамен молекулалық массасы қалай анықталады?

5.РНҚ немесе ақуыз мөлшерін үлгілер арасында салыстырғанда сигнал қарқындылығын неліктен қалыптандыру қажет?

6.Белгілі бір ДНҚ тізбегінің геномда бар-жоғын, оның транскриптінің мөлшерін және тиісті ақуыздың мөлшерін бағалау үшін қандай әдістерді таңдар едіңіз? Таңдауыңызды негіздеңіз.

Пайдаланылған әдебиеттер тізімі:

1. Берсімбаев РІ Молекулалық биология – 2016, Қазақ университеті, Алматы
2. Льюин Б. Гены. – М.: Бином. Лаборатория знаний. 2012. – 896 с.
3. Т. А. Муминов, Е. У. Куандыко. Основы молекулярной биологии: курс лекций // Алматы: ССК, 2017. - 222 с.
4. Огурцов А.Н., Близнюк О.Н., Масалитина Н.Ю. Основы генной инженерии и биоинженерии. Учебное пособие. Часть 1.: Молекулярные основы генных технологий. Харьков: НТУ "ХПИ", 2018. 288 с.
5. Уилсон К., Уолкер Дж.: Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии. Серия: Методы в биологии. Издательство: Лаборатория знаний, 2021 г.

Ғаламтор ресурстары:

1. http://elibrary.kaznu.kz/ru
2. http://molbiol.ru/