

Просто сделай это!

Методы молекулярной биологии

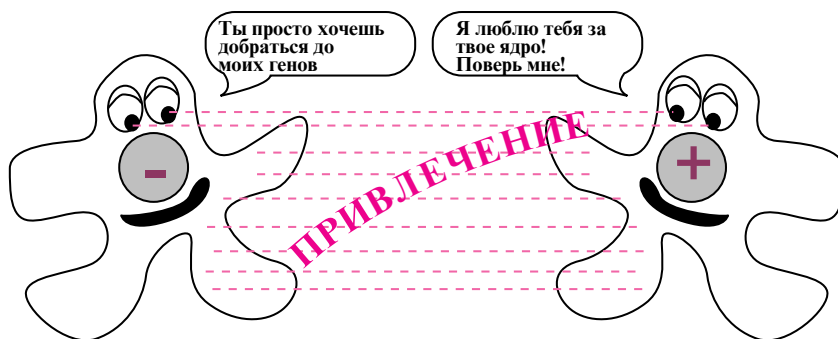
16

В этой главе мы рассмотрим принципы, лежащие в основе некоторых методов, широко применяемых в молекулярной биологии. Более подробные случаи применения этих методов к конкретным ситуациям приводятся в перекрестных ссылках. Методы клонирования, ПЦР и секвенирование ДНК являются громоздкими, поэтому они обсуждаются в отдельных главах.

Гель-электрофорез

Возможно, самым распространенным физическим методом в молекулярной биологии является **гель-электрофорез**. В основе **электрофореза** лежит идея, заключающаяся в том, что положительные заряды притягивают отрицательные и наоборот (Рис. 16.1), а два одинаковых заряда отталкиваются друг от друга.

16.1 ПРОТИВОПОЛОЖНОСТИ ПРИТЯГИВАЮТСЯ



Для осуществления электрофореза мы можем растворить в воде молекулы, несущие электрические заряды, и поместить в этот раствор два электрода, один положительный, а другой отрицательный. Когда мы включим электрический ток, отрицательно заряженные молекулы будут притягиваться положительным электродом и устремятся к нему через раствор. Положительно заряженные молекулы будут двигаться в противоположном направлении (Рис. 16.2). Несущие электрические заряды молекулы называются **ионами**.

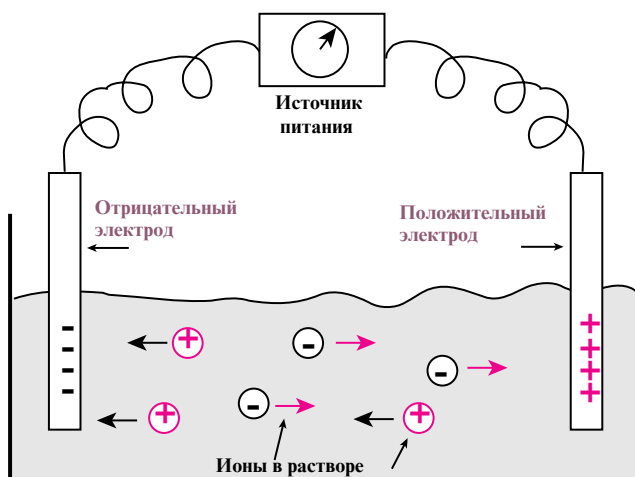
Чем больше заряд, тем быстрее молекула будет двигаться под влиянием силы электрического притяжения. С другой стороны, чем крупнее молекула, тем большая сила требуется, чтобы заставить ее двигаться. Молекулы нуклеиновой кислоты имеют точно по одному электрическому заряду на каждый нуклеотид, поэтому эти два фактора взаимно компенсируются.

электрофорез - движение заряженных молекул в направлении противоположно заряженного электрода. Применяется для разделения нуклеиновых кислот

гель-электрофорез - электрофорез заряженных молекул в гелевой сетке, чтобы рассортировать их по размеру

ион - любая молекула, имеющая электрический заряд

16.2 ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В РАСТВОРЕ



Соответственно, все молекулы ДНК или РНК будут двигаться с одной скоростью в направлении положительного электрода, поскольку они могут свободно перемещаться в растворе.

Если мы хотим разделить наши РНК или ДНК исходя из их размера, мы должны добавить дополнительное препятствие, чтобы замедлить более крупные молекулы -

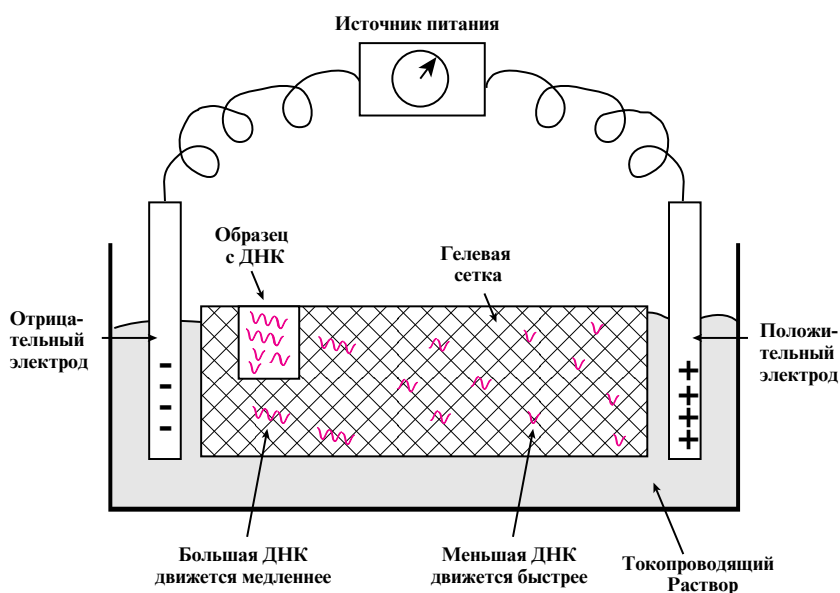
гель - полужидкое вещество, состоящее из полимера, образующего межмолекулярную сетку в воде

агароза - полисахарид из водорослей, который используется для получения гелей

гель. Гель представляет собой сетку из поперечно связанных полимерных цепей, обычно из **агарозы** для нуклеиновых кислот. Молекулы ДНК замедляют движение, когда пытаются прорваться через гелевую сетку (Рис. 16.3). Чем больше их размер, тем труднее им протиснуться через отверстия. В результате этого смесь молекул ДНК сортируется по размеру, поскольку небольшие молекулы движутся по гелю гораздо быстрее, чем более крупные.

После использования геля, мы каким-то образом должны визуализировать наши ДНК. ДНК можно пометить с помощью радиоактивной метки и обнаружить затем методом автордиографии, который описывается на странице 243. Или мы можем окрасить гель с помощью этидиум-бромид, который образует прочные связи с ДНК или РНК. Затем гель необходимо рассмотреть под ультрафиолетовым освещением, под которым этидиум-бромид, связанный с ДНК будет иметь ярко оранжевое свечение. В любом случае мы увидим темное или цветное скопление ДНК, где наши молекулы закончили свой путь.

16.3 ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗ



Все нуклеиновые кислоты изначально имеют отрицательный заряд, однако белки не так удобны. Некоторые аминокислоты, из которых состоят белки, имеют положительный заряд, некоторые заряжены отрицательно, а большинство нейтральны. Поэтому, в зависимости от своего общего аминокислотного состава, белок может быть положительным, отрицательным или нейтральным.

Чтобы избежать этих сложностей, белки кипятятся в растворе детергента под названием **додецил-сульфат натрия (SDS)**. Кипячение разрушает свернутую трехмерную структуру белка, то есть белок **денатурируется**. Молекула SDS имеет **гидрофобный** хвост с отрицательным зарядом. Этот хвост оборачивается вокруг основной цепи белка. Белок разворачивается и покрывается с головы до ног молекулами SDS, которые придают ему общий отрицательный заряд (Рис. 16.4).

Более того, количество отрицательных зарядов, присоединившихся к белку, пропорционально его длине. Поэтому теперь мы можем разделить белки в соответствии с их размерами, пропустив их через гель (Рис. 16.5). Поскольку белки в среднем гораздо меньше ДНК или РНК, обычно мы используем гель, сделанный из искусственного полимера, **полиакриламида**, сетка которого имеет меньшие ячейки, чем агароза.

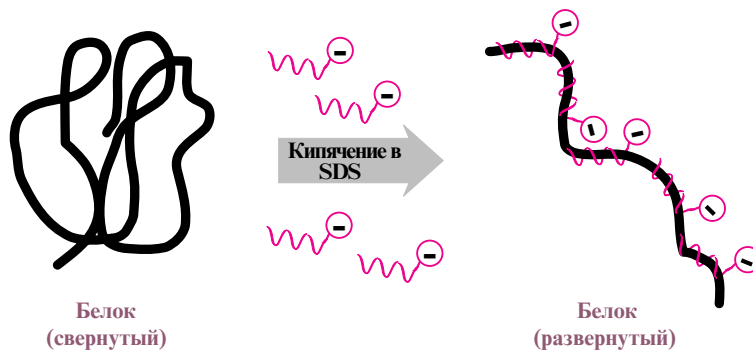
После использования нашего геля мы должны окрасить его, чтобы увидеть полосы белка. Существует два любимых красителя: Coomassie Blue, синий краситель, образующий прочные связи с белками, и серебрясодержащие вещества. Атомы серебра образуют очень прочные связи с белками и дают в результате черные или лиловые комплексы. Серебряный краситель более чувствителен и, конечно, дороже обходится!

додецил-сульфат натрия (SDS) - детергент, используемый для разворачивания белков

денатурировать - разрушать свернутую трехмерную структуру белка или других полимерных молекул

гидрофобный - нелюбящий воду

16.4 SDS ПРИДАЕТ БЕЛКАМ ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ ЗАРЯД



полиакриламид - искусственный полимер, применяемый в приготовлении гелей для разделения белков путем электрофореза

16.5 ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ

