

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения и социального развития России

Кафедра молекулярной биологии и генетики



Отчетная работа

По результатам выполнения индивидуальных заданий профильной учебной
практики:

«Профильная учебная практика по генетике»

на тему:

«Метод гель - электрофореза для визуализации ДНК. Принцип метода и его
разновидности »

Ош...
И
24.07.19.

Выполнили:

студентки III курса 301 группы
медико-биологического факультета

направления подготовки «Биология» (профиль «Генетика»)

Горемыкина Евгения Андреевна

Казьмина Юлия Сергеевна

Проверила:

Доцент кафедры молекулярной биологии и генетики, к.м.н.

Корсакова Ирина Игоревна

Оглавление

Список сокращений.....	3
Введение.....	4
Глава 1. История открытия электрофореза.....	5
Глава 2. Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле.....	6
2.1. Буферы для электрофореза.....	7
2.2. Окраска ДНК в агарозных гелях.....	8
2.3. Фиксирование электрофореграмм.....	8
Глава 3. Электрофорез нуклеиновых кислот в ПААГ геле.....	9
3.1. Полиакриламидные гели.....	9
3.2. Механизм полимеризации.....	10
Глава 4. Капиллярный электрофорез.....	11
Глава 5. Пульс-электрофорез.....	13
Заключение.....	14
Список литературы.....	15

Список сокращений

CCD (ПЗС) – прибор с зарядовой связью

LIF (ЛФД) - лазерный флуориметрический детектор

АА – акриламид

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

МБА – N,N'-метиленбисакриламид

ПААГ – полиакриламидный гель

ПСА – персульфат аммония

РНК – рибонуклеиновая кислота

ТЕМЕД – N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин

УФ – ультрафиолетовое излучение

В – вольт

Мб – мегабайты

млн – миллион

мМ – миллимоль

нг – нанограммы

нл – нанолитр

нм – нанометр

п.н. – пары нуклеотидов

см – сантиметры

Введение

Электрофорез – метод разделения макромолекул, различающихся по таким параметрам, как размеры (или молекулярная масса), пространственная конфигурация, вторичная структура и электрический заряд.

Принцип метода заключается в том, что находящиеся в буферном растворе макромолекулы обладают некоторым суммарным электрическим зарядом, величина и знак которого зависят от природы мономеров и pH среды. Так, все молекулы нуклеиновых кислот несут отрицательный заряд, который возникает в результате диссоциации остатка фосфорной кислоты каждого нуклеотида. Молекулы разных белков в зависимости от суммарного количества положительно и отрицательно заряженных остатков аминокислот могут нести как положительный, так и отрицательный заряд. Если через этот раствор, заключенный в канал из изолирующего материала, например стеклянную трубку, начать пропускать электрический ток, то вдоль канала установится определенный градиент напряжения, т.е. сформируется электрическое поле. Его напряженность измеряется разностью потенциалов по концам рабочего канала, отнесенной к его длине (В/см). Под действием поля макромолекулы в соответствии со своим суммарным зарядом мигрируют в направлении катода или анода, причем их трение об окружающую среду ограничивает скорость миграции. В зависимости от величины электрического заряда и размеров молекулы приобретают разные скорости, и в этом заключается сущность метода электрофореза [1].

Глава 1. История открытия электрофореза

Электрофорез ведет свое начало от исследований профессора Московского университета Федора Федоровича Рейсса. В 1807 году он провел следующий опыт. В кусок влажной глины были помещены два отрезка стеклянной трубки, в которые насыпали хорошо промытый песок и затем налили в них до одинакового уровня воды. После того как в трубках с совершенно прозрачной над песком водой были опущены электроды от вольтова столба (источник электрической энергии, сконструированный Алессандро Вольта) и включен ток, Ф.Ф. Рейсс наблюдал, что в трубке с положительно заряженным электродом вода стала мутнеть, сквозь слой песка начинали проникать частички глины, образуя суспензию в воде. Одновременно уровень в трубке с анодом понижался, а в трубке с катодом повышался. Происходило перемещение воды навстречу частицам глины. Этот опыт показал, что частицы глины в воде несут отрицательный заряд [2].

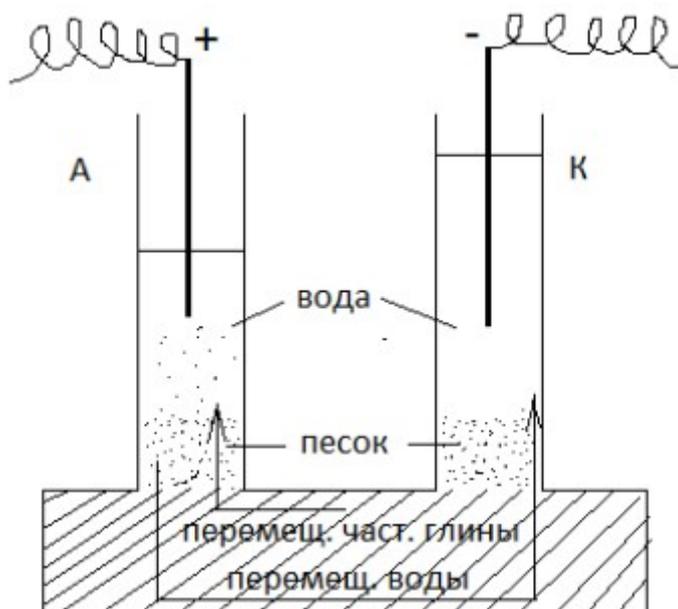


Рис. 1. Схема опыта Рейса.

Движение заряженных дисперсных частиц в дисперсионной среде под действием внешнего электрического поля называется электрофорезом, а движение жидкости через пористое твердое тело – электроосмосом.

Глава 2. Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле

Электрофорез в агарозном геле является стандартным методом, используемым для разделения, идентификации и очистки фрагментов ДНК. С помощью этой простой техники можно быстро разделить такие смеси фрагментов ДНК, которые не могут быть разделены другими способами. Кроме того, при разделении в геле прямо следят за положением ДНК, так как полосы ДНК в геле можно окрашивать флуоресцирующим и интеркалирующим в ДНК красителем – бромистым этидием в низкой концентрации. Просматривая прокрашенный гель в ультрафиолетовом свете, можно заметить даже 1 нг ДНК. Есть пять главных параметров, которые определяют скорость миграции ДНК через агарозный гель при электрофорезе:

1. Размер молекул ДНК. Чем длиннее, тем медленнее двигаются.

2. Концентрация агарозы. Чем больше, тем медленнее двигается ДНК в геле. Таким образом, применяя гели разных концентраций, можно разделить большой набор фрагментов ДНК, различающихся по размеру.

Таблица 1

Количество агарозы в геле, %	Область эффективного разделения линейных молекул ДНК, kb
0,3	60–5
0,6	20–1
0,7	10–0,8
0,9	7–0,5
1,2	6–0,4
1,5	4–0,2
2,0	3–0,1

3. Конформация ДНК. Линейные молекулы ДНК одного размера движутся в геле с одинаковой скоростью. Однако подвижность суперспирализованных и кольцевых молекул ДНК отличается от подвижности линейных молекул того же размера. Разделение трех типов молекул ДНК в одном геле выглядит следующим образом по подвижности от катода к аноду:

(-) катод

кольцевая

линейная

суперспирализованная

(+) анод

4. Напряженность электрического поля (E). Чем больше, тем быстрее двигаются. Максимальное разделение фрагментов происходит при напряженности, не превышающей

5 В/см. закон Ома: $I = U/R$. Следовательно, с увеличением напряженности сила тока возрастает. Сильное повышение выделения теплоты нежелательно, поскольку при этом возрастает диффузия разделяемых макромолекул в геле, что снижает эффективность разделения.

5. Состав оснований и температура. Электрофоретическое поведение ДНК в агарозных гелях слабо зависит от состава оснований ДНК и температуры геля от 4 до 30°C. Обычно электрофорез в агарозных гелях ведут при комнатной температуре. Если электрофорез ведут при очень высоком напряжении, то в таком случае применяется принудительное жидкостное охлаждение [3].

2.1. Буферы для электрофореза

Для электрофореза обычно применяют буферы, содержащие трис-ацетат, трис-борат или трис-фосфат в концентрации 50 мМ и имеющие рН 7,5-8,0. Их готовят в виде концентрированных растворов и хранят при комнатной температуре. Непосредственно перед работой путем разведения готовят рабочий раствор. Чаще всего используется трис-боратный буфер, имеющий достаточно высокую буферную емкость. Тем не менее, при продолжительных электрофорезах он постепенно истощается (анодное пространство становится более щелочным, а катодное – более кислым) в связи с чем камеру заполняют новым буфером [10].

Агароза является компонентом агар-агара, который содержится в красных морских водорослях. Она построена из чередующихся остатков D-галактозы и 3,6 ангидро-L-галактозы, связанных попеременно β 1,4 и α -1,3 гликозидными связями. Гель возникает в результате образования водородных связей между цепями агарозы. Существует много различных марок агарозы. Даже в пределах одной марки агарозы из разных упаковок могут сильно различаться. Наиболее подходящей для общих целей считается агароза типа II. Пластина агарозного геля представляет собой застывшую после расплавления в электрофорезном буфере агарозу в определенной концентрации с добавлением специального красителя ДНК, например бромистого этидия. При заливке расплавленной агарозы с помощью гребенок в геле формируют лунки, в которые после застудневания агарозы вносят раствор ДНК в буфере. В отдельную лунку вносят также маркер молекулярных масс, который представляет собой смесь фрагментов ДНК с известными значениями молекулярных масс и используется для определения размера линейных ДНК [11].

2.2. Окраска ДНК в агарозных гелях

Наиболее удобный метод визуализации ДНК в агарозных гелях – окрашивание ее флуоресцирующим красителем бромистым этидием. Молекула этого вещества содержит плоскую группу, которая интеркалирует между соседними основаниями ДНК. В результате такой интеркаляции в непосредственной близости от оснований краситель связывается с ДНК, что сопровождается увеличением интенсивности флуоресценции. Бромистый этидий является сильным мутагеном. Поэтому все манипуляции с гелями и растворами, содержащими краситель, необходимо проводить в перчатках. Для контроля внесения ДНК в лунки геля, а также скорости движения ДНК и времени окончания процесса электрофореза применяют специальный краситель, например бромфеноловый синий, который перемещается в геле, немного опережая макромолекулы ДНК, движущиеся в процессе электрофореза [4].

2.3. Фиксирование электрофореграмм

После окончания электрофореза гель помещают на фильтр трансиллюминатора, который излучает свет в ультрафиолетовом диапазоне (254 – 310 нм). Энергия ультрафиолета, поглощаемая ДНК в области 260 нм, передается на краситель, заставляя его флуоресцировать в оранжево-красной области видимого спектра (590 нм). При этом для оформления протокола исследования возникает необходимость фиксирования полученной электрофореграммы. С этой целью ранее широко использовались пленочные фотоаппараты. При наличии мощного УФ-излучения трансиллюминатора и хороших линз фотоаппарата получали четкое изображение полос, содержащих, даже незначительные количества ДНК (1 нг). В настоящее время с целью фиксирования электрофореграмм используются системы гель-документирования, созданные на базе CCD камер высокого разрешения и чувствительности, что позволяет получать изображение в цифровом виде и сохранять в памяти компьютера [14].

Глава 3. Электрофорез нуклеиновых кислот в ПААГ геле

В настоящее время электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ, или PAGE от англ. Polyacrylamide Gel Electrophoresis) является наиболее распространенным способом электрофоретического разделения белков и нуклеиновых кислот. Популярность метода, во многом, обусловлена его высокой разрешающей способностью и экспериментальной гибкостью. Он позволяет варьировать в широких пределах пористость геля, добиваясь тем самым оптимальных условий при разделении каждого конкретного образца. Путём изменения состава геля и буферных систем можно осуществлять разделение макромолекул по массе, по заряду или по соотношению между их массой и зарядом [5].

3.1. Полиакриламидные гели

Полиакриламид — общее название группы полимеров и сополимеров на основе акриламида и его производных. Гель полиакриламида имеет ряд преимуществ, определяющих его широкое использование. Он прозрачен, химически стабилен, инертен, устойчив к изменениям pH и температуры, нерастворим в большинстве растворителей, и, наконец, в нем практически отсутствуют адсорбция и электроосмос.

Разделяющие свойства полиакриламидных гелей (ПААГ) определяются трехмерной сетью волокон и пор, которая сформирована за счет бифункциональных бисакриламидных связей между смежными полиакриламидными цепями. Полимеризация катализируется системой, производящей свободные радикалы, составленной из аммония персульфата и тетраметилэтилендиамина [15].

С увеличением концентрации акриламида в геле эффективный размер пор уменьшается. Эффективный размер пор геля определяет его разделяющие свойства, то есть сопротивление геля к перемещению макромолекул. Существуют пределы концентраций акриламида, которые могут использоваться. При высоких концентрациях акриламида гели становятся более ломкими и трудны в обращении. С уменьшением размера пор геля уменьшается скорость перемещения белка через гель. Регулируя размер пор геля путем изменения концентрации акриламида, можно оптимизировать разрешающую способность метода для конкретного анализируемого образца. Таким образом, физическое состояние ПААГ характеризуется по составу акриламида и бисакриламида. Обычно используются гели, в которых общая концентрация мономера и сшивающего агента находится в диапазоне от 3 до 30%, а количество сшивающего агента обычно составляет от одной десятой до одной двадцатой от количества мономера. При этом содержание сшивающего агента тем меньше, чем выше общая концентрация геля.

3.2. Механизм полимеризации

Полиакриламидные гели образуются при сополимеризации акриламида (АА) и бис-акриламида (N,N'-метиленабисакриламид, МБА, или просто "бис"). Реакция полимеризации проходит по свободно радикальному механизму за счёт объединения винильных групп и носит цепной характер. Полимеризация инициируется персульфатом аммония (ПСА): $\text{NH}_4\text{--SO}_4\text{--SO}_4\text{--NH}_4$, который при растворении в воде подвергается гомолитическому расщеплению по связи между атомами кислорода. В результате образуются два достаточно долго живущих радикала с одним неспаренным электроном у атома кислорода $\text{NH}_4\text{--SO}_4^\cdot$. Скорость образования свободных радикалов из ПСА можно увеличить путём добавления в раствор ТЕМЕД тетраметилэтилендиамин, $(\text{CH}_3)_2\text{N--CH}_2\text{--CH}_2\text{--N}(\text{CH}_3)_2$, который, таким образом, служит катализатором реакции полимеризации. Свободные радикалы ПСА взаимодействуют с мономерами акриламида, приводя к разрыву двойной связи и превращая их в свободные радикалы. Последние, в свою очередь взаимодействуют с неактивированными мономерами с образованием нового радикала, давая, таким образом, начало цепной реакции полимеризации. Цепная реакция идёт до тех пор, пока не встретятся два радикала, которые после взаимодействия образуют обычную ковалентную связь [6].

Глава 4. Капиллярный электрофорез

Капиллярный электрофорез представляет собой физический метод анализа, основанный на миграции внутри капилляра заряженных частиц определяемых веществ,

растворенных в растворе электролита, под влиянием постоянного электрического поля. В условиях нормального капиллярного электрофореза анионы перемещаются в направлении, противоположном направлению электроосмотического потока, а их скорости меньше электроосмотической скорости. Катионы мигрируют в направлении, совпадающем с направлением электроосмотического потока, а их скорости превышают электроосмотическую скорость [14]. В условиях, когда электроосмотическая скорость превышает электрофоретическую, катионы и анионы могут быть разделены в течение одного анализа.

Прибор для капиллярного электрофореза состоит из:

- регулируемого высоковольтного источника постоянного тока;
- двух резервуаров с буферными растворами, расположенных на одном и том же уровне и содержащих указанные анодный и катодный растворы;
- двух электродов (катода и анода), погруженных в резервуары с буферными растворами и соединенных с источником питания;
- капилляра, в котором проводится разделение (обычно изготовленного из плавленого кварца); при использовании некоторых типов детекторов капилляр имеет оптическое окошко, расположенное на уровне детектора; концы капилляра помещены в резервуары с буферными растворами; капилляр заполняют раствором;
- подходящей системы ввода пробы;
- термостата, способного поддерживать постоянную температуру внутри капилляра для получения воспроизводимых результатов разделения;
- регистрирующего устройства и подходящего интегратора или компьютера.
- детектора, способного контролировать количество определяемых веществ, проходящих через разделяющий сегмент капилляра в течение определенного времени. Детектирование обычно основано на абсорбционной спектрофотометрии (в ультрафиолетовой и видимой областях) или флуориметрии. В ряде случаев может быть использовано также кондуктометрическое, амперометрическое или масс-спектрометрическое детектирование; альтернативным способом детектирования веществ, которые не поглощают УФ-излучение и не флуоресцируют, является не прямое детектирование.

Для точного количественного анализа критическими факторами являются определение процесса ввода пробы и его автоматизация. Ввод пробы может быть основан на использовании силы тяжести, давления, вакуума и электрокинетических сил. Количество каждого компонента образца, введенного электрокинетическим способом,

зависит от его электрофоретической подвижности, что приводит к возможным неравным условиям для разных веществ при использовании данного режима ввода пробы. Используют капилляр, буферные растворы, предварительную подготовку, раствор пробы и условия миграции, указанные в частной фармакопейной статье для испытуемого образца. Применяемый раствор электролита фильтруют для удаления твердых частиц и дегазируют для предотвращения образования пузырьков, мешающих работе детектора и созданию электрического контакта в капилляре вовремя процесса разделения. Для обеспечения воспроизводимых значений времени миграции веществ для каждой аналитической методики должна быть разработана методика тщательной промывки системы [7].

В **капиллярном гель-электрофорезе** разделение происходит внутри капилляра, заполненного гелем, действующим как молекулярное сито. Поскольку молекулы меньшего размера легче проникают в структуру геля и мигрируют быстрее, чем большие, разделение молекул с близкими величинами отношения заряда к массе происходит в соответствии с их размерами. Таким образом, методом капиллярного гель-электрофореза по величинам молекулярных масс могут быть разделены различные биологические макромолекулы (например, белки и фрагменты ДНК), часто имеющие близкие величины отношения заряда к массе [8].

Капиллярный электрофорез имеет целый ряд достоинств:

- Высокая разрешающая способность.
- Высокая скорость анализа до 15 мин.
- Возможность анализа любых веществ, вне зависимости от молекулярной массы, гидрофобности и заряда.
- Минимальный объем анализируемого образца (ввод пробы 10 – 100 нл).
- Низкий расход реагентов.
- Многоразовые регенерируемые капилляры.
- Минимальная пробоподготовка.
- Высокая чувствительность при использовании LIF детектора (до 10-11 М).
- Возможность полной автоматизации исследований.

Глава 5. Пульс-электрофорез

Суть метода пульс-электрофореза заключается в продвижении больших фрагментов ДНК в геле при пульсирующем изменении направления электрического поля. В момент переключения направления поля происходят конформационные изменения

молекул ДНК, обусловленные их скручиванием и раскручиванием. При этом более короткие молекулы легче адаптируются к изменению условий и потому движутся в геле быстрее. При использовании пульс-электрофореза могут быть разделены молекулы ДНК размером от 50 тысяч п.н. до более чем 9 млн. п.н. Следовательно, пульс-электрофорез позволяет манипулировать ДНК целых хромосом или их протяженных участков. Пульс-электрофорез хромосомной ДНК считается «золотым стандартом» типирования многих видов патогенных микроорганизмов [12]. Результаты исследований показали высокую разрешающую силу пульс-электрофореза, а в ряде случаев – его преимущество в сравнении с большинством фено- и генотипических методов. С помощью цифровой системы сканирования гелей и разработки специальных компьютерных программ стало возможным создание банка данных профилей пульс-электрофореза для всех микроорганизмов [9]. Использование пульс-электрофореза в сочетании с применением редкощепящих рестриктаз позволило в 1987 г. получить первую карту генома штамма *K12 E. coli*, а в 1989 г. первую полную рестрикционную карту генома эукариотического организма (дрожжей *Saccharomyces pombe*, размер генома 15 Мб).

Заключение

Электрофорез — один из важнейших методов в молекулярной биологии, применяемый для аналитического и препаративного разделения фрагментов ДНК или РНК в зависимости от их длины, и занимает сейчас центральное место среди методов исследования белков и нуклеиновых кислот. В настоящее время предлагается широкий выбор агароз для различных экспериментальных задач, а также маркеры длин ДНК,

буферные растворы и другие реагенты для электрофореза, красители для визуализации нуклеиновых кислот в геле и оборудование для горизонтального, препаративного и импульсного электрофореза. Данный метод позволяет разделять макромолекулы, различающиеся по таким важнейшим параметрам, как размеры (или молекулярная масса), пространственная конфигурация, вторичная структура и электрический заряд, причем эти параметры могут выступать как порознь, так и в совокупности.

Список литературы:

1. Фердинанд Фридрих фон Рейсс - История развития коллоидной химии [Electronic resource]. URL: <https://www.sites.google.com/site/kolloidnaahimia/elektrokineticskie-svojstva-dispersnyh-sistem-i-vse-taki-ona-dvizetsa/ferdinand-fridrih-fon-rejss> (accessed: 23.06.2019).
2. Электрофорез в агарозном геле [Electronic resource] . URL: http://www.ibmc.msk.ru/content/Education/w-o_pass/ММoB/18c.pdf(accessed: 23.06.2019).
3. Проект_ОФС_Электрофорез_ДНК_в_агарозном_геле.docx [Electronic resource].
4. М.Сомма, М. Кверчи. Анализ образцов пищевых продуктов на присутствие генетически модифицированных организмов [Electronic resource]. URL:<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/manual%20RUS/UM%20Rus-S5.pdf> (accessed: 23.06.2019).
5. Теоретические и практические основы проведения электрофореза белков в полиакриламидном геле [Текст]: Электронное учебно-методическое пособие . / под ред. И.В. Стручковой, Е.А. Кальясовой. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2012. – 60 с. [Electronic resource]. URL: www.unn.ru (accessed: 23.06.2019).
6. Электрофорез в ПААГ (текст).pdf [Electronic resource]. URL: molbioph.niif.spbu.ru (accessed: 23.06.2019).
7. Капиллярный электрофорез [Electronic resource]. URL: www.chem.msu.su (accessed: 23.06.2019).
8. Капиллярный электрофорез. pdf [Electronic resource]. URL: www.eurasiancommission.org (accessed: 23.06.2019).
9. Е.С. Насонова . Пульс-электрофорез: теория метода, инструментальный арсенал и области применения // Цитология. 2008. Санкт-Петербург , № 11(50) [Electronic resource]. URL: tsitologiya.cytspb.rssi.ru (accessed: 23.06.2019).
10. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. - PubMed - NCBI [Electronic resource]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22546956> (accessed: 02.07.2019).
11. Agarose gel electrophoresis. - PubMed - NCBI [Electronic resource]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18432695> (accessed: 02.07.2019).
12. Bio-nano interactions detected by nanochannel electrophoresis. - PubMed - NCBI [Electronic resource]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27334561> (accessed: 02.07.2019).
13. [Establishment and differential protein identification of two-dimensional gel electrophoresis for proteomics in the spinal cord of morphine-toleran... - PubMed - NCBI

[Electronic resource]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31113914> (accessed: 02.07.2019).

14. Instrumentation for capillary electrophoresis and microchip electrophoresis. - PubMed - NCBI [Electronic resource]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25113403> (accessed: 02.07.2019).

15. One-step casting of Laemmli discontinued sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis gel. - PubMed - NCBI [Electronic resource]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22037291> (accessed: 02.07.2019).