

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования
«Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
Кафедра молекулярной биологии и генетики

Отчетная работа
по результатам выполнения индивидуальных заданий
профильной учебной практики
«Профильная учебная практика по генетике»
на тему:

**«Условия хранения и техники манипуляции с
препаратами ДНК и ферментов»**

*Отлично
МЕ
24.07.19г.*

Выполнили:
студенты Медико-биологического факультета
по направлению «Биология (профиль Генетика)»
3 курса 301 группы
Панова Анастасия Сергеевна
Волонтырь Алина Владимировна
Поляков Никита Константинович
Проверил:
Доцент кафедры молекулярной биологии и генетики
К.м.н. Корсакова Ирина Игоревна

Волгоград
2019

Содержание

Введение.....	3
1. Хранение ферментов.....	4
2. Хранение ДНК.....	5
3. Манипуляции с нуклеиновыми кислотами.....	6
3.1 ПЦР.....	7
3.2 Рестрикция.....	9
3.3 Лигирование.....	10
4. Манипуляции с ферментами.....	10
4.1 Регуляция активности путём изменения количества фермента.....	11
4.2 Аллостерическая регуляция.....	11
4.3 Регуляция активности с помощью гормонов.....	12
4.4 Регуляция активности путём химической модификации.....	12
Заключение.....	13
Список литературы.....	14

Введение

Значительные достижения последних лет в области молекулярной биологии и генной инженерии во многом связаны с успешным использованием ферментов и нуклеиновых кислот. Они играют немаловажную роль и в проведении многих технологических процессов.

Следует отметить, что изучение ДНК невозможно без использования и изучения ферментов. Так, из большого арсенала методов анализа ДНК полимеразная цепная реакция (ПЦР), основанная на циклической репликации матрицы (реакцию проводят, циклически поднимая и понижая температуру, обычно в пределах от 40–55 до 95°C), наиболее широко применяется в генно-инженерной практике и клинической диагностике. В основе современной методологии ПЦР лежит использование термостабильной ДНК-полимеразы из термофильной бактерии *Thermus aquaticus* (Taq-ДНК-полимеразы). Однако с точки зрения современных требований, предъявляемых к полимеразам, Taq-ДНК-полимераза обладает рядом недостатков. Таким образом, фермент со свойствами, оптимальными для ПЦР, в природе пока не обнаружен. Создание эффективной ДНК/РНК полимеразы – актуальная задача сегодняшнего дня.

Образцы высокого качества позволяют улучшить технологию, сократить затраты и даже получить новые продукты. Поэтому вопрос о правильном хранении и обращении с этими препаратами является актуальным для проведения исследовательской работы профильной учебной практики.

1. Хранение ферментов

Термолабильные биохимические препараты требуют особенно тщательного обращения и специальных условий хранения. Ферменты и коферменты, нуклеозиды и нуклеотиды и многие другие представители этого класса соединений быстро портятся при хранении в комнатных условиях. Для сохранения их свойств и активности большинство биохимических препаратов хранят в холодильниках при температуре от $-1-4$ до -20 °С. Однако даже при соблюдении всех условий хранения наблюдается постепенное снижение активности препаратов. На сегодняшний день известно множество различных способов хранения ферментов:

- **Лиофилизация**

Высушивание ферментов при низких температурах (лиофилизация) в присутствии стабилизирующих добавок является одним из наиболее распространенных способов их хранения. Нужно, однако, отметить, что лиофилизация - это достаточно трудоемкий и энергоемкий процесс, требующий специального дорогостоящего оборудования. При лиофилизации, кроме того, часто происходит значительная потеря ферментативной активности. Перед использованием лиофилизированные препараты необходимо растворить. Срок хранения лиофилизированных ферментов зависит от природы самого фермента, температуры, влажности и других условий хранения и колеблется от нескольких месяцев до нескольких лет. Хранят лиофилизированные препараты, как правило, при низких температурах.

- **Высушивание на распылительных сушках.**

Ферменты, производимые в промышленных масштабах (например, протеиназы, амилазы и др.), отличающиеся достаточно высокой стабильностью, высушивают на специальных распылительных сушках при температуре $+70-+100$ °С. При распылительной сушке также происходит потеря ферментативной активности. Кроме того, при таком способе высушивания ферментов часто происходят выбросы сухого ферментативного препарата в атмосферу, что приводит к загрязнению окружающей среды. Нужно также отметить, что распылительные сушки - весьма энергоемкие и малопродуктивные установки.

- **Замораживание.**

Наибольшие проблемы возникают, однако, при хранении водных растворов ферментов. Достаточно эффективным и широко распространенным является хранение водных растворов ферментов и других белков в замороженном состоянии при -70 °С.

Хранение ферментов в условиях глубокой заморозки является однако дорогостоящим, требует специального холодильного оборудования и поэтому не всегда доступно.

- **Хранение ферментов в присутствии криопротекторов**

Многие ферменты, используемые в научных исследованиях, хранят в виде водных растворов при температуре -10 , -20°C в незамороженном состоянии в присутствии криопротекторов. В качестве криопротекторов наиболее часто используют глицерин, метанол, диметилсульфоксид (ДМСО). Концентрация ДМСО в водных растворах ферментов, подлежащих хранению при -10 , -20°C , составляет 10-20% .

2. Хранение ДНК

Способ хранения ДНК относится к области молекулярно-генетических исследований и предназначен для консервации выделенных и очищенных препаратов нуклеиновых кислот, например, при создании генетических коллекций наследственного материала различного происхождения.

В зависимости от состояния, типа исходной ткани и применяемых методов хранения ДНК может сохраняться некоторое время без существенной деградации даже при комнатной температуре. Степень сохранности ДНК при разных способах хранения очень сильно варьирует. Методами хранения ДНК являются:

- **Криоконсервация**

Охлаждение проб, содержащих нуклеиновые кислоты, до $+4^{\circ}\text{C}$ может лишь приостановить процессы биodeградации. Для более длительного хранения используют низкие температуры - образец ткани может быть заморожен от -20°C до $-195,8^{\circ}\text{C}$ (например, в условиях промышленных холодильных установок или в жидком азоте) (1).

К недостаткам метода криоконсервации относятся следующие: потенциальная возможность сохранения патогенных возбудителей вместе с образцом, необходимость постоянного поддержания бесперебойной работы холодильного оборудования и обязательной организации фиксации терморежимов хранения и бесперебойного энергоснабжения (если речь идет о холодильных установках). Кроме того, по мнению ряда исследователей, в замороженном состоянии повреждающее действие свободных радикалов может быть более глубоким.

- **Метод FTA Gene Guard**

Метод FTA Gene Guard предназначен для хранения с одновременным извлечением ДНК. Этот метод предполагает нанесение биологических жидкостей на фильтровальную бумагу, обработанную буфером, содержащим мощные денатурирующие вещества,

которые также предотвращают рост бактерий и др. микроорганизмов. Клеточные элементы на FTA-бумаге подвергаются лизису. ДНК высвобождается из ядер лейкоцитов и иммобилизуется на матриксе бумаги. Связанная таким образом ДНК может быть освобождена от гема или др. ингибиторов ПЦР отмыванием, после чего FTA-бумага с иммобилизованной на ней ДНК может вводиться непосредственно в соответствующую амплификационную смесь.

Указанный способ имеет ряд ограничений.

1. Способ предназначен для работы с узким перечнем тканей (кровь и биологические жидкости).
2. Количество иммобилизуемой ткани (10 мкл крови человека) невелико.
3. Сохраняются не чистые препараты ДНК, а ее конгломерат с остатками фиксируемых тканей и реагентов.
4. Качество получаемых препаратов ДНК ограничивает их применение в исследованиях молекулярно-генетическими методами, предъявляющими жесткие требования к чистоте матрицы (RAPD, AFLP).

- **Хранение ДНК на твердой матрице**

Способ хранения ДНК на твердой матрице (например, на фильтровальной бумаге) заключается в том, что состав или компонент матрицы противостоит разложению ДНК, которую данная матрица инкорпорирует или абсорбирует с возможностью восстановления ДНК или использования ДНК *in situ* (например, амплификация последовательности ДНК с помощью ПЦР). Для защиты ДНК от свободно-радикальных повреждений используется урат (NH_2CONH_2), причем, мочева кислота или ее соль должны действовать как «свободно-радикальная» ловушка.

3. Манипуляции с нуклеиновыми кислотами

К методам манипуляций с нуклеиновыми кислотами (например, ДНК или РНК) можно отнести такие процессы как полимеразная цепная реакция, лигирование, рестрикция и т.д. Для их проведения необходимы определённые условия хранения исследуемых образцов, благодаря которым риск их порчи путём кантаминации или денатурации сводится к минимуму.

Как известно, ПЦР, лигирование и рестрикция лежат в основе большинства исследований нуклеиновых кислот и белков, поэтому грамотное обращение с образцами во время проведения этих манипуляций является залогом получения качественного продукта и достоверной информации.

3.1. ПЦР

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – это осуществляемая *in vitro* специфическая амплификация (умножение) фрагментов нуклеиновых кислот, инициируемая синтетическими олигонуклеотидными праймерами. Основные принципы ПЦР были описаны норвежским ученым Хьеллем Клеппе в 1971 году. Но практически данная реакция впервые была осуществлена в 1985 году Кэри Муллисом – сотрудником американской фирмы «Cetus». В дальнейшем ПЦР нашла широкое применение, как в генетической инженерии, так и в молекулярной диагностике. В научноисследовательских лабораториях ПЦР используют для изучения нуклеиновых кислот и проведения манипуляций с ними. Например, благодаря ПЦР стало возможным быстрое получение исследуемых участков ДНК в чистом виде и в достаточном количестве. В медицине ПЦР применяют при диагностике инфекционных заболеваний (туберкулез, инфекции передающиеся половым путем, гепатит В, гепатит С, ВИЧ, особоопасные инфекции и т.д.), наследственных заболеваний, при диагностике рака и иммунных патологий. В судебной медицине ПЦР используют для идентификации личности и определении биологического родства индивидов.

Метод ПЦР позволяет амплифицировать относительно небольшие участки ДНК, длиной от нескольких десятков до нескольких сотен пар нуклеотидов. Необходимым условием для проведения ПЦР является знание нуклеотидной последовательности амплифицируемой области ДНК, т.к. специфический выбор этого участка осуществляют путем гибридизации матричной ДНК с двумя искусственно синтезированными праймерами. Праймеры представляют собой олигонуклеотидные последовательности ДНК длиной от 15 до 30 нуклеотидов, комплементарные 3'-концам амплифицируемого участка на смысловой и антисмысловой нитях ДНК. Таким образом, расстояние между праймерами определяет длину синтезируемых молекул – ампликонов. В качестве матрицы для синтеза может быть использован любой тип ДНК: геномная ДНК различных видов про- и эукариот; ДНК, выделенная из культур клеток, бактериальных клонов, библиотек генов или из других источников. Для проведения специфической амплификации не требуется больших количеств матричной ДНК и теоретически достаточно даже одной молекулы.

Успех в разработке метода ПЦР связан с использованием в качестве фермента термостабильной ДНК-полимеразы, обеспечивающей синтез ДНК. Данный фермент был выделен из бактерий *Thermus aquaticus*, живущих в горячих источниках, и потому устойчивый к действию высоких температур. Поэтому фермент не денатурирует при 90 и

более градусах, но, в то же время, при работе с Taq-полимеразой с целью избежания её разрушения, после использования её сразу помещают в морозильную камеру.

Результат ПЦР можно квалифицировать как положительный или отрицательный в зависимости от того, обнаружена в образце интересующая нас последовательность-мишень или нет. Однако нарушение нормального хода амплификации, недостаточная чувствительность праймеров и непредвиденный полиморфизм последовательности-мишени в области связывания праймеров может дать ложноотрицательный результат. В случае загрязнения отрицательных образцов последовательностями-мишенями и случайной гомологии между праймерами и последовательностью, сходной с мишенью, получаются ложноположительные результаты.

Очень важным для правильной интерпретации результатов является выбор контролей. В процессе проведения ПЦР нужны как минимум три контроля: положительный, отрицательный и внутренний.

Положительный контроль позволяет удостовериться, что все компоненты, входящие в состав реакционной смеси, обеспечивают нормальное прохождение реакции. Для этого используют препарат ДНК, содержащий сайты для отжига праймеров. Этот препарат вносится в отдельную пробирку с реакционной смесью вместо выделенного образца ДНК.

Отрицательный контроль также ставится в отдельной пробирке и включает в себя все компоненты реакции, но вместо образца выделенной ДНК вносится соответствующее количество деионизованной воды или ПЦРбуфера. Отрицательный контроль необходим для проверки загрязнения компонентов реакции ДНК-мишенями и исключения учета ложноположительных результатов.

Препарат ДНК, выделенный из биологического материала, может содержать примеси ингибиторов, заметно снижающих эффективность реакции, а в некоторых случаях и приводящих к отсутствию специфических ампликонов даже при наличии искомой ДНК-мишени. Поэтому становится необходимым контролировать ход амплификации в каждой пробирке с реакционной смесью. Для этой цели в каждую пробирку добавляют дополнительный, так называемый, внутренний контрольный образец (ВКО). Он представляет собой любой препарат ДНК, несхожий с ДНК-мишенью. Для этой цели иногда используют β -глобиновый ген, к концам которого с помощью генно-инженерных манипуляций «пришивают» участки ДНК, гомологичные праймерам.

При отсутствии регистрации внутреннего контроля и выявлении специфической ДНК результат следует считать недостоверным. В этом случае для данного исследуемого образца рекомендуется перевыделить ДНК.

Если внутренний контроль внести в реакционную смесь, то он станет такой же мишенью для отжига праймеров, как и ДНК-мишень. Размер продукта амплификации внутреннего контроля подбирают таким образом, чтобы он отличался от специфических ампликонов в 2 и более раз.

3.2. Рестрикция.

Рестрикция - это специфическое расщепление ДНК эндонуклеазами, что необходимо для выделения генов и манипуляций с ними

Рестриктазы – это ферменты, обладающие эндонуклеазной активностью, которые специфически гидролизуют молекулы двухцепочечных ДНК при наличии в них определенных последовательностей нуклеотидов – сайтов рестрикции. Название этих ферментов происходит от английского restriction (ограничения); они были выявлены у определенных штаммом бактерий. В настоящее время общепринято считать синонимами термины «рестриктаза», «эндонуклеаза рестрикции» и «сайт специфическая эндодезоксирибонуклеаза». Крайне редко помимо эндонуклеазной активности рестриктаза обладает еще и метилазной (Eco571), производя модификацию (метилирование) определенных нуклеотидов в последовательности, узнаваемой рестриктазой; такие модифицированные последовательности не подвержены ферментативной рестрикции. Но обычно эти ферменты структурно независимы и работают в комплексе, образуя так называемую RM-систему (систему рестрикции-модификации). Одновременное наличие в клетке обеих ферментативных активностей защищает от интеграции в геном чужеродной ДНК (например, вирусов или плазмид) и предотвращает разрушение собственной ДНК.

В качестве мишеней (мест узнавания) для рестриктаз часто выступают палиндромы из 4-6 пар оснований – сайты рестрикции. Точки узнавания рестриктазами симметричны относительно поворота на 180 °С, то есть последовательность нуклеотидов слева направо в одной нити такая же, как справа налево в другой. Симметрия подразумевает, что метилированные сайты встречаются на обеих цепях ДНК. Сайт-мишень может быть полностью метилирован (обе цепи модифицированы), полуметилирован (только одна цепь метилирована) или не метилирован.

Полностью метилированный сайт не подвержен ни рестрикции, ни модификации. Полуметилированный сайт не узнается ферментом рестрикции, но может быть превращен с помощью метилазы в полностью метилированный. Репликация полностью метилированной ДНК ведет к образованию полуметилированной ДНК. Вероятно, узнавание полуметилированных сайтов представляет собой обычный этап функционирования метилазы *in vivo*.

Неметилированный сайт-мишень представляет собой субстрат либо для рестрикции, либо для модификации *in vitro*. В клетке немодифицированная ДНК с большей вероятностью рестрицируется. Реакция разрезания осуществляется в две ступени. Сначала разрезается одна цепь ДНК, а затем рядом разрезается другая. В областях, прилегающих с каждой стороны к сайту разрезания, может иметь место экзонуклеотическая деградация. Протекает эффективный гидролиз АТФ, роль которого еще не выяснена.

Так, фаг, плохо размножается в клетках кишечной палочки штамма K12. Это ограничение развития бактериофага связано с эндонуклеазной деградацией его ДНК. Сама клеточная ДНК защищается от рестриктаз метилированием части нуклеотидов с помощью метилазы.

Существуют две альтернативные модели, объясняющие взаимосвязь между сайтами узнавания и разрезания: в соответствии с одной из них движется фермент, согласно другой модели, перемещается ДНК. Если движется фермент, то его перемещение вдоль ДНК будет продолжаться до тех пор, пока он не сделает выбор сайта разрезания. Если же движется ДНК, то фермент остается прикрепленным в сайте узнавания, а ДНК протаскивается через второй сайт связывания на ферменте, и это продолжается до тех пор, пока фермент не достигает области разрезания. Получены электронно-микроскопические данные, свидетельствующие, что фермент вызывает образование петли в ДНК и остается, по-видимому, связанным с сайтом узнавания после разрезания; эти данные подтверждают вторую модель.

3.3. Лигирование

Лигирование молекул ДНК- это процесс, заключающийся в сшивании двух молекул ДНК, получающихся после рестрикции.

ДНК-лигаза представляет собой фермент, способный катализировать синтез фосфодиэфирной связи между 5'-фосфатным и 3'-гидроксильным концами цепей ДНК. Образование одной фосфодиэфирной связи сопровождается выделением одной молекулы воды. Наиболее часто в генетической инженерии используется ДНК-лигаза фага T4, способная в присутствии АТФ сшивать двухцепочечные фрагменты ДНК как с липкими, так и с тупыми концами. Данный фермент состоит из одной полипептидной цепи.

4. Манипуляции с ферментами

В то же время, ферменты также подвергаются манипуляциям, с помощью которых использование этих белков в лабораторных исследованиях становится более удобным и выгодным.

В частности основные манипуляции с нуклеиновыми кислотами осуществляются за счёт работы модифицированных ферментов. К ним можно отнести термостабильный фермент Таq-полимеразу, инактивированную присоединением антител или имитирующими антитела молекулами, или лишённый домена, обладающего 5'- и 3'-экзонуклеазную активность, фрагмент Кленова, используемый в секвенировании нуклеиновых кислот по Сенгеру и другие.

Все манипуляции с ферментами направлены на регуляцию их активности, обусловленную изменением структурного строения путём добавления функциональных групп или изъятия доменов, отвечающих за ту или иную активность.

Регуляция активности ферментов бывает пассивная (с помощью изменения условий среды), то есть существуют постоянные ферменты и непостоянные, которые появляются под действием каких-либо факторов среды под действием температуры) или с помощью ионной силы и pH, {S} и {E}.

Активная регуляция классифицируется:

- 1) изостерическая (регуляция с помощью субстрата и продукта)
- 2) аллостерическая (регуляция активности фермента с помощью веществ, отличных от субстрата и продукта).

4.1. Регуляция активности путём изменения количества фермента.

У бактерий хорошо изучен феномен индуцированного синтеза ферментов при выращивании на средах с одним углеводом, например, глюкозой. Замена глюкозы на лактозу приводит к индуцированному синтезу фермента галактозидазы, расщепляющей лактозу на глюкозу и галактозу.

В животных тканях подобный быстрый синтез ферментов наблюдается реже, однако при поступлении в организм некоторых ядов, канцерогенных веществ наблюдается резкое увеличение количества (а значит и активности) гидроксилаз, окисляющих чужеродные вещества в не токсические продукты. С другой стороны, иногда под действием этих гидроксилаз чужеродные вещества превращаются в более токсичные продукты (летальный синтез).

4.2. Аллостерическая регуляция.

Аллостерические ферменты – это ферменты, располагающиеся в начале метаболического потока или на его узловых этапах и управляют этим метаболическим потоком.

Свойства аллостерических ферментов:

- 1) Являются олигомерами, состоящими из протомеров;
- 2) Имеют 2 центра: активный центр и центр аллостерической регуляции;
- 3) Имеют ось симметрии;
- 4) Протомеры изменяют свою структуру в пределах олигомеров;
- 5) Изменение конформации олигомеров ограничено локализациями отдельных протомеров.

Существует 2 вида веществ (эфффекторы, которые оказывают на фермент двойное действие:

1. активаторы
2. ингибиторы

Аллостерический фермент имеет 2 центра аллостерической регуляции:

1. центр аллостерической активации
2. центр аллостерического ингибирования

При взаимодействии аллостерического фермента с аллостерическим активатором резко возрастает степень сродства активного центра к субстрату. При взаимодействии аллостерического ингибитора с аллостерическим ферментом резко снижается степень сродства фермента к субстрату. Наличие двух центров в аллостерических ферментах доказывается путём технической денатурации в мягких условиях (под действием мочевины), следовательно, при этом аллостерический фермент теряет регуляторные свойства (они связаны с центрами аллостерической регуляции), но сохраняют каталитические свойства, связанные с активными центрами.

4.3. Регуляция активности с помощью гормонов.

Гормональная регуляция осуществляется на генетическом уровне путём обратимого фосфорилирования. Например, под действием адреналина происходит активация процесса распада гликогена. В ходе этого процесса образуется небелковое соединения – γ -АМФ. γ -АМФ – внутриклеточный гормон (вторичный посредник) является аллостерическим регулятором большого числа протеинлипаз. γ -АМФ образуется из АТФ под действием аденилатциклаз.

4.4. Регуляция активности путём химической модификации.

Химическая модификация- присоединение каких-либо функциональных групп к ферменту, с последующим изменением его активности. Химическая модификация обратима. Так например, ключевые ферменты энергетического обмена - фосфоорилаза, гликогенсинтаза контролируются путём фосфорилирования и дефосфорилирования, осуществляемого специфическими ферментами - протеинилазой и фосфотазой. И уровень активности ключевых ферментов будет определяться соотношением фосфорилированных и дефосфорилированных форм этих ферментов.

Заключение

Таким образом, можно прийти к выводу, что на данный момент существует множество способов хранения ДНК и ферментов, которые эффективно используются в разного рода лабораториях и помогают предотвращать загрязнения препаратов, их порчу путём изменения молекулярного строения или утери той или иной активности, что делает эти образцы непригодными для проведения исследований на базе лаборатории.

Также следует отметить большое количество способов манипуляций над этими образцами, направленных на облегчение изучения макромалекул в генно-инженерных исследованиях.

Однако, стоит обратить внимание на то, что не все методы достаточны результативны и некоторые нуждаются в доработке или более не являются актуальными. Поэтому изучение данного вопроса не теряет своей актуальности и остаётся привлекательной темой для исследования по сей день.

Список литературы

1. Гены по Льюису [Электронный ресурс] / Дж. Кребс, Э. Голдштейн, С. Килпатрик - М. : Лаборатория знаний, 2017.
2. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. — М.: Мир, 2002. — 589 с.
3. Жимулев И.Ф., Общая и молекулярная генетика Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2007.
4. Молекулярная биология. Структура и биосинтез нуклеиновых кислот. Под редакцией Спирина А.С.М.: Высшая школа, 1990.
5. Мупкамбаров Н.Н., Кузнецов С.Л. Молекулярная биология; Медицинское информационное агентство - Москва, 2007. - 536 с.
6. Патрушев Л. И. Искусственные генетические системы. — М.: Наука, 2005.
7. Пименов А.В., Пименова И.Н., Биология для поступающих в вузы. 2007.
8. Степанов В.М., Молекулярная биология. Структура и функции белков [Электронный ресурс]: учебник / Степанов В.М. - 3-е изд. - М. : Издательство Московского государственного университета, 2005. – 336 с.
9. Степт Г., Кэлиндар Р., Молекулярная генетика, пер. с англ. 1981.
10. Херрингтон С., Макгли Дж. Молекулярная клиническая диагностика. Методы. М.: Мед. книга, 1999. 433 с.
11. Щелкунов С. Н. Генетическая инженерия. — Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2004. — 496 с.
12. Корниенко И.В. Подготовка биологического материала для молекулярно-генетических исследований при массовом поступлении неопознанных тел. Ростов-на-Дону, 2001.