**Методы выделения нуклеиновых кислот из биологического материала**

Содержание

ВВЕДЕНИЕ 4

1 Нуклеиновые кислоты 5

1.1 Типы и распространение нуклеиновых кислот. 6

1.2 Общие свойства нуклеиновых кислот 7

1.2.1 Химическая структура. 7

1.2.2 Трехмерная структура. 7

1.2.3 Правило комплементарности 8

1.2.4 Правила Чаргаффа 8

1.3 Функция нуклеиновых кислот 10

1.3.1 Репликация и транскрипция. 10

1.3.2 Трансляция 11

1.3.3 Транспортные РНК и супрессия 13

1.4 Значение нуклеиновых кислот 14

2 Макромолекулярная структура ДНК 15

2.1 Выделение дезоксирибонуклеиновых кислот 17

2.1.1 Фракционирование ДНК 17

3 Макромолекулярная структура РНК 18

3.1 Выделение рибонуклеиновых кислот 19

3.1.1 Фракционирование РНК 19

4 Жидкофазные методы выделения нуклеиновых кислот 22

4.1 Классические методы выделения нуклеиновых кислот 22

4.2 Методы, позволяющие выделить ДНК и РНК одновременно 22

5 Твердофазные методы выделения нуклеиновых кислот 24

5.1 Основные принципы твердофазных методов 24

5.1.1 Метод выделения нуклеиновых кислот на стекле 24

5.1.2 Метод на основе магнитной сепарации 25

6 Другие методы выделения нуклеиновых кислот 28

6.1 Определение первичной структуры (секвенирование) нуклеиновых кислот. 28

6.3 Спектрофотометрический анализ 30

6.3 Амплификация нуклеиновых кислот 33

6.3.1 Методы амплификации нуклеиновых кислот 33

6.3.2 Форматы амплификации нуклеиновых кислот в режиме "реального времени": 33

6.3.3 Методы амплификации нуклеиновых кислот микроорганизмов I - IV групп 34

6.4 Метод количественного анализа нуклеиновых кислот 35

6.5 Сканирующая зондовая микроскопия нуклеиновых кислот 36

6.5.1 Основные методики препарирования образцов для зондовой микроскопии нуклеиновых кислот 36

6.5.2 Применение зондовой микроскопии для исследования структуры и свойств молекул нуклеиновых кислот и их комплексов 40

7 Заключение 41

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 42

ВВЕДЕНИЕ

Выделение ДНК и РНК — важный шаг подготовки проб перед биохимическими и диагностическими процессами. Многие приложения, такие как амплификация, проведение обратной транскрипции, детектирование накопления продуктов амплификации методом ПЦР в реальном времени, клонирование, секвенс, гибридизация, синтез ДНК и т. д., не могут быть выполнены непосредственно на биологических образцах без предварительной очистки нуклеиновых кислот.

При выборе метода выделения необходимо учитывать приоритет предъявляемых к нему требований, таких как высокий выход нужной нуклеиновой кислоты, быстрота метода, большая пропускная способность или высокое качество продукта. Существуют различные методы, позволяющие выделять нуклеиновые кислоты из широкого спектра образцов, но лишь малое их число пригодно для автоматизации. Присутствие загрязняющих веществ, например белков или карбогидратов, в таких комплексных смесях часто мешает реализовать необходимые реакции и методики.

Методы выделения нуклеиновых кислот можно разделить по основным физическим и биохимическим признакам на следующие классы:

жидкофазные методы;

твердофазные методы;

фракционирование ДНК и РНК

Для начала рассмотрим, что же представляют из себя нуклеиновые кислоты и по какому принципу из них строятся молекулы ДНК и РНК.

1 Нуклеиновые кислоты

Нуклеиновые кислоты, биополимеры, состоящие из остатков фосфорной кислоты, сахаров и азотистых оснований (пуринов и пиримидинов). Имеют фундаментальное биологическое значение, поскольку содержат в закодированном виде всю генетическую информацию любого живого организма, от человека до бактерий и вирусов, передаваемую от одного поколения другому.

Нуклеиновые кислоты были впервые выделены из клеток гноя человека и спермы лосося швейцарским врачом и биохимиком Ф.Мишером между 1869 и 1871. Впоследствии было установлено, что существует два типа нуклеиновых кислот: рибонуклеиновая (РНК) и дезоксирибонуклеиновая (ДНК), однако их функции долго оставались неизвестными.

В 1928 английский бактериолог Ф.Гриффит обнаружил, что убитые патогенные пневмококки могут изменять генетические свойства живых непатогенных пневмококков, превращая последние в патогенные. В 1945 микробиолог О.Эвери из Рокфеллеровского института в Нью-Йорке сделал важное открытие: он показал, что способность к генетической трансформации обусловлена переносом ДНК из одной клетки в другую, а следовательно, генетический материал представляет собой ДНК. В 1940–1950 Дж.Бидл и Э.Тейтум из Станфордского университета (шт. Калифорния) обнаружили, что синтез белков, в частности ферментов, контролируется специфическими генами. В 1942 Т.Касперсон в Швеции и Ж.Браше в Бельгии открыли, что нуклеиновых кислот особенно много в клетках, активно синтезирующих белки. Все эти данные наводили на мысль, что генетический материал – это нуклеиновая кислота и что она как-то участвует в синтезе белков. Однако в то время многие полагали, что молекулы нуклеиновых кислот, несмотря на их большую длину, имеют слишком простую периодически повторяющуюся структуру, чтобы нести достаточно информации и служить генетическим материалом. Но в конце 1940-х годов Э.Чаргафф в США и Дж.Уайатт в Канаде, используя метод распределительной хроматографии на бумаге, показали, что структура ДНК не столь проста и эта молекула может служить носителем генетической информации.

Структура ДНК была установлена в 1953 М.Уилкинсом, Дж.Уотсоном и Ф.Криком в Англии. Это фундаментальное открытие позволило понять, как происходит удвоение (репликация) нуклеиновых кислот. Вскоре после этого американские исследователи А.Даунс и Дж.Гамов предположили, что структура белков каким-то образом закодирована в нуклеиновых кислотах, а к 1965 эта гипотеза была подтверждена многими исследователями: Ф.Криком в Англии, М.Ниренбергом и С.Очоа в США, Х.Кораной в Индии. Все эти открытия, результат столетнего изучения нуклеиновых кислот, произвели подлинную революцию в биологии. Они позволили объяснить феномен жизни в рамках взаимодействия между атомами и молекулами.

1.1 Типы и распространение нуклеиновых кислот.

Как мы уже говорили, есть два типа нуклеиновых кислот: ДНК и РНК. ДНК присутствует в ядрах всех растительных и животных клеток, где она находится в комплексе с белками и является составной частью хромосом. У особей каждого конкретного вида содержание ядерной ДНК обычно одинаково во всех клетках, кроме гамет (яйцеклеток и сперматозоидов), где ДНК вдвое меньше. Таким образом, количество клеточной ДНК видоспецифично. ДНК найдена и вне ядра: в митохондриях («энергетических станциях» клеток) и в хлоропластах (частицах, где в растительных клетках идет фотосинтез). Эти субклеточные частицы обладают некоторой генетической автономией.

Бактерии и цианобактерии (сине-зеленые водоросли) содержат вместо хромосом одну или две крупные молекулы ДНК, связанные с небольшим количеством белка, и часто – молекулы ДНК меньшего размера, называемые плазмидами. Плазмиды несут полезную генетическую информацию, например содержат гены устойчивости к антибиотикам, но для жизни самой клетки они несущественны.

Некоторое количество РНК присутствует в клеточном ядре, основная же ее масса находится в цитоплазме – жидком содержимом клетки. Б льшую ее часть составляет рибосомная РНК (рРНК). Рибосомы – это мельчайшие тельца, на которых идет синтез белка. Небольшое количество РНК представлено транспортной РНК (тРНК), которая также участвует в белковом синтезе. Однако оба этих класса РНК не несут информации о структуре белков – такая информация заключена в матричной, или информационной, РНК (мРНК), на долю которой приходится лишь небольшая часть суммарной клеточной РНК.

Генетический материал вирусов представлен либо ДНК, либо РНК, но никогда обеими одновременно.

1.2 Общие свойства нуклеиновых кислот

Молекулы нуклеиновых кислот содержат множество отрицательно заряженных фосфатных групп и образуют комплексы с ионами металлов; их калиевая и натриевая соли хорошо растворимы в воде. Концентрированные растворы нуклеиновых кислот очень вязкие и слегка опалесцируют, а в твердом виде эти вещества белые. Нуклеиновые кислоты сильно поглощают ультрафиолетовый свет, и это свойство лежит в основе определения их концентрации. С этим же свойством связан и мутагенный эффект ультрафиолетового света.

Длинные молекулы ДНК хрупки и легко ломаются, например при продавливании раствора через шприц. Поэтому работа с высокомолекулярными ДНК требует особой осторожности.

1.2.1 Химическая структура.

Нуклеиновые кислоты – это длинные цепочки, состоящие из четырех многократно повторяющихся единиц (нуклеотидов). Их структуру можно представить следующим образом:

Символ Ф обозначает фосфатную группу. Чередующиеся остатки сахара и фосфорной кислоты образуют сахарофосфатный остов молекулы, одинаковый у всех ДНК, а огромное их разнообразие обусловливается тем, что четыре азотистых основания могут располагаться вдоль цепи в самой разной последовательности.

Сахаром в нуклеиновых кислотах является пентоза; четыре из пяти ее углеродных атомов вместе с одним атомом кислорода образуют кольцо. Атомы углерода пентозы обозначают номерами от 1 до 5. В РНК сахар представлен рибозой, а в ДНК – дезоксирибозой, содержащей на один атом кислорода меньше. Фрагменты полинуклеотидных цепей ДНК и РНК показаны на рисунке.

Поскольку фосфатные группы присоединены к сахару асимметрично, в положениях 3 и 5, молекула нуклеиновой кислоты имеет определенное направление. Сложноэфирные связи между мономерными единицами нуклеиновых кислот чувствительны к гидролитическому расщеплению (ферментативному или химическому), которое приводит к высвобождению отдельных компонентов в виде небольших молекул.

Азотистые основания – это плоские гетероциклические соединения. Они присоединены к пентозному кольцу по положению 1. Более крупные основания имеют два кольца и называются пуринами: это аденин (А) и гуанин (Г). Основания, меньшие по размерам, имеют одно кольцо и называются пиримидинами: это цитозин (Ц), тимин (Т) и урацил (У). В ДНК входят основания А, Г, Т и Ц, в РНК вместо Т присутствует У. Последний отличается от тимина тем, что у него отсутствует метильная группа (CH3). Урацил встречается в ДНК некоторых вирусов, где он выполняет ту же функцию, что и тимин.

1.2.2 Трехмерная структура.

Важной особенностью нуклеиновых кислот является регулярность пространственного расположения составляющих их атомов, установленная рентгеноструктурным методом. Молекула ДНК состоит из двух противоположно направленных цепей (иногда содержащих миллионы нуклеотидов), удерживаемых вместе водородными связями между основаниями.

Водородные связи, соединяющие азотистые основания противоположных цепей, относятся к категории слабых, но благодаря своей многочисленности в молекуле ДНК они прочно стабилизируют ее структуру. Однако если раствор ДНК нагреть примерно до 60°С, эти связи рвутся и цепи расходятся – происходит денатурация ДНК (плавление).

Обе цепи ДНК закручены по спирали относительно воображаемой оси, как будто они навиты на цилиндр. Эта структура называется двойной спиралью. На каждый виток спирали приходится десять пар оснований.

1.2.3 Правило комплементарности

Уотсон и Крик показали, что образование водородных связей и регулярной двойной спирали возможно только тогда, когда более крупное пуриновое основание аденин (А) в одной цепи имеет своим партнером в другой цепи меньшее по размерам пиримидиновое основание тимин (Т), а гуанин (Г) связан с цитозином (Ц). Эту закономерность можно представить следующим образом:

Соответствие А-Т и Г-Ц называют правилом комплементарности, а сами цепи – комплементарными. Согласно этому правилу, содержание аденина в ДНК всегда равно содержанию тимина, а количество гуанина – количеству цитозина. Следует отметить, что две цепи ДНК, различаясь химически, несут одинаковую информацию, поскольку вследствие комплементарности одна цепь однозначно задает другую.

Структура РНК менее упорядочена. Обычно это одноцепочечная молекула, хотя РНК некоторых вирусов состоит из двух цепей. Но даже такая РНК более гибка, чем ДНК. Некоторые участки в молекуле РНК взаимно комплементарны и при изгибании цепи спариваются, образуя двухцепочечные структуры (шпильки). В первую очередь это относится к транспортным РНК (тРНК). Некоторые основания в тРНК подвергаются модификации уже после синтеза молекулы. Например, иногда происходит присоединение к ним метильных групп.

1.2.4 Правила Чаргаффа

Правила Чаргаффа — система эмпирически выявленных правил, описывающих количественные соотношения между различными типами азотистых оснований в ДНК. Были сформулированы в результате работы группы биохимика Эрвина Чаргаффа в 1949—1951 гг.

До работ группы Чаргаффа господствовала так называемая «тетрануклеотидная» теория, согласно которой ДНК состоит из повторяющихся блоков по четыре разных азотистых основания (аденин, тимин, гуанин и цитозин). Чаргаффу и сотрудникам удалось разделить нуклеотиды ДНК при помощи бумажной хроматографии и определить точные количественные соотношения нуклеотидов разных типов. Они значительно отличались от эквимолярных, которых можно было бы ожидать, если бы все четыре основания были представлены в равных пропорциях. Соотношения, выявленные Чаргаффом для аденина (А), тимина (Т), гуанина (Г) и цитозина (Ц), оказались следующими:

Количество аденина равно количеству тимина, а гуанина — цитозину: А=Т, Г=Ц.

Количество пуринов равно количеству пиримидинов: А+Г=Т+Ц.

Количество оснований с аминогруппами в положении 6 равно количеству оснований с кетогруппами в положении 6: А+Ц=Г+Т.

Вместе с тем, соотношение (A+Т):(Г+Ц) может быть различным у ДНК разных видов. У одних преобладают пары АТ, в других — ГЦ.

Правила Чаргаффа, наряду с данными рентгеноструктурного анализа, сыграли решающую роль в расшифровке структуры ДНК Дж. Уотсоном и Фрэнсисом Криком.

1.3 Функция нуклеиновых кислот

Одна из основных функций нуклеиновых кислот состоит в детерминации синтеза белков. Информация о структуре белков, закодированная в нуклеотидной последовательности ДНК, должна передаваться от одного поколения к другому, и поэтому необходимо ее безошибочное копирование, т.е. синтез точно такой же молекулы ДНК (репликация).

1.3.1 Репликация и транскрипция.

С химической точки зрения синтез нуклеиновой кислоты – это полимеризация, т.е. последовательное присоединение строительных блоков. Такими блоками служат нуклеозидтрифосфаты.

Энергия, необходимая для синтеза, высвобождается при отщеплении пирофосфата, а катализируют реакцию особые ферменты – ДНК-полимеразы.

В результате такого синтетического процесса мы получили бы полимер со случайной последовательностью оснований. Однако большинство полимераз работает только в присутствии уже существующей нуклеиновой кислоты –матрицы, диктующей, какой именно нуклеотид присоединится к концу цепи. Этот нуклеотид должен быть комплементарен соответствующему нуклеотиду матрицы, так что новая цепь оказывается комплементарной исходной. Используя затем комплементарную цепь в качестве матрицы, мы получим точную копию оригинала.

ДНК состоит из двух взаимно комплементарных цепей. В ходе репликации они расходятся, и каждая из них служит матрицей для синтеза новой цепи:

Так образуются две новые двойные спирали с той же последовательностью оснований, что и у исходной ДНК. Иногда в процессе репликации происходит «сбой», и возникают мутации .

В результате транскрипции ДНК образуются клеточные РНК (мРНК, рРНК и тРНК):

Они комплементарны одной из цепей ДНК и являются копией другой цепи, за исключением того, что место тимина у них занимает урацил. Таким способом можно получить множество РНК-копий одной из цепей ДНК.

В нормальной клетке передача информации осуществляется только в направлении ДНК → ДНК и ДНК → РНК. Однако в клетках, инфицированных вирусом, возможны и другие процессы: РНК → РНК и РНК → ДНК. Генетический материал многих вирусов представлен молекулой РНК, обычно одноцепочечной. Проникнув в клетку-хозяина, эта РНК реплицируется с образованием комплементарной молекулы, на которой, в свою очередь, синтезируется множество копий исходной вирусной РНК:

Вирусная РНК может транскрибироваться ферментом (обратной транскриптазой) в ДНК, которая иногда включается в хромосомную ДНК клетки-хозяина. Теперь эта ДНК несет вирусные гены, и после транскрипции в клетке может появиться вирусная РНК. Таким образом, спустя длительное время, в течение которого никакого вируса в клетке не обнаруживается, он снова в ней появится без повторного заражения. Вирусы, генетический материал которых включается в хромосому клетки-хозяина, часто являются причиной рака.

1.3.2 Трансляция

Генетическая информация, закодированная в нуклеотидной последовательности ДНК, переводится не только на язык нуклеотидной последовательности РНК, но и на язык аминокислот – мономерных единиц белков.

Белковая молекула – это цепочка из аминокислот. Каждая аминокислота содержит кислую карбоксильную группу –COOH и осн вную аминогруппу

–NH2. Карбоксильная группа одной аминокислоты связывается с аминогруппой другой, образуя амидную связь, и этот процесс продолжается, пока не образуется цепь, содержащая до 1000 аминокислот .

В белках присутствует 20 разных аминокислот, от последовательности которых зависят их природа и функции. Эта последовательность определяется нуклеотидной последовательностью соответствующего гена – участка ДНК, кодирующего данный белок. Однако сама ДНК не является матрицей при синтезе белка. Сначала она транскрибируется в ядре с образованием матричной РНК (мРНК), которая диффундирует в цитоплазму, и на ней как на матрице синтезируется белок. Процесс ускоряется благодаря тому, что на каждой молекуле мРНК может одновременно синтезироваться множество белковых молекул.

Репликация нуклеиновых кислот осуществляется благодаря образованию водородных связей между комплементарными основаниями исходной и дочерней цепей. Аминокислоты не образуют водородных связей с основаниями, так что прямое копирование матрицы невозможно. Они взаимодействуют с матрицей опосредованно, через «адапторные» нуклеиновые кислоты – небольшие молекулы транспортных РНК (тРНК), состоящие примерно из 80 оснований и способные связываться с мРНК.

Каждая тРНК содержит специфическую последовательность из трех оснований, антикодон, который комплементарен группе из трех оснований, кодону, в мРНК. Антикодоны взаимодействуют с кодонами по правилу комплементарности, примерно так же, как взаимодействуют две цепи ДНК. Таким образом, последовательность оснований в мРНК определяет порядок присоединения тРНК, несущих аминокислоты. Схематически перенос информации от ДНК к белку можно представить следующим образом:

Последовательность оснований в ДНК задает порядок следования аминокислот в белке, поскольку каждая аминокислота присоединяется специфическим ферментом только к определенным тРНК, а те, в свою очередь, – только к определенным кодонам в мРНК. Комплексы тРНК-аминокислота связываются с матрицей по одному в каждый данный момент времени. Ниже перечислены основные этапы белкового синтеза (см. также рисунок).

1. Ферменты, называемые аминоацил-тРНК-синтетазами, присоединяют аминокислоты к соответствующим тРНК. Таких ферментов 20, по одному для каждой аминокислоты.

2. Молекула мРНК присоединяется своим первым кодоном к небольшой частице, называемой рибосомой. Рибосомы состоят из примерно равных количеств рРНК и белка. Структура и функция рибосом весьма сложны, но главная их задача – облегчение взаимодействия мРНК и тРНК и ускорение полимеризации аминокислот, связанных с разными тРНК.

3. тРНК, нагруженная аминокислотой, связывается с соответствующим кодоном мРНК, которая, в свою очередь, контактирует с рибосомой. Образуется комплекс рибосома-мРНК-тРНК-аминокислота.

4. мРНК, подобно ленте на конвейере, продвигается по рибосоме на один кодон вперед.

5. Следующая тРНК, нагруженная аминокислотой, присоединяется ко второму кодону.

6. Первая и вторая аминокислоты связываются между собой.

7. Первая тРНК отсоединяется от комплекса, и теперь вторая тРНК несет две аминокислоты, связанные между собой.

8. мРНК снова продвигается на один кодон вперед, и все события повторяются, а растущая аминокислотная цепь удлиняется на одну аминокислоту. Процесс продолжается, пока не будет достигнут последний, «стоп»-кодон и последняя тРНК не отделится от готовой белковой цепи. В бактериальных клетках цепь из 100–200 аминокислот собирается за несколько секунд. В животных клетках этот процесс занимает около минуты.

1.3.3 Транспортные РНК и супрессия

Смысл информации, содержащейся в ДНК, если переводить ее на язык аминокислот, определяется как самой ДНК, так и считывающим механизмом, т.е. зависит не только от того, какие кодоны есть в ДНК и в какой последовательности они расположены, но также и от того, какие именно аминокислоты (и к каким тРНК) присоединяют аминоацил-тРНК-синтетазы. Конечно, природа синтетаз и тРНК тоже определяется ДНК, и в этом смысле ДНК является первичным детерминантом белковой последовательности. Тем не менее суммарная детерминация представляет собой функцию всей системы, поскольку результат зависит от исходных компонентов. Если бы соответствие между тРНК и аминокислотами было другим, смысл кодонов тоже изменился бы.

Известно, что мутации в ДНК изменяют считывающий механизм и в результате меняют – пусть и незначительно – смысл кодонов. Так, в бактерии Escherichia coli глициновая тРНК обычно узнает в мРНК кодон ГГА; мутация в ДНК, с которой транскрибируется эта тРНК, изменяет антикодон глициновой тРНК таким образом, что теперь он узнает кодон АГА, соответствующий аргинину, и в белковой молекуле вместо аргинина появляется глицин. Это не обязательно имеет фатальные последствия, поскольку не все аргинины кодируются триплетом АГА и есть аргининовые тРНК, по-прежнему узнающие «свои» АГА. В результате измененными оказываются не все белковые молекулы. Иногда такие мутации, изменяющие антикодон, подавляют (супрессируют) мутации в кодоне. Например, если в результате мутации глициновый кодон ГГА превращается в АГА, он все же может прочитываться как глицин, если антикодон глициновой тРНК, в свою очередь, изменился так, что эта тРНК стала узнавать АГА. В этом случае вторая «ошибка» устраняет первую.

Мутации, приводящие к изменению антикодонов, могут иметь разные последствия, поскольку один и тот же кодон может узнаваться несколькими тРНК. Вообще говоря, узнавание осуществляется благодаря комплементарности оснований кодона и антикодона, однако одно из оснований кодона может модифицироваться таким образом, что антикодон будет узнавать даже не полностью комплементарный кодон. В результате одна и та же тРНК может взаимодействовать с несколькими разными кодонами, кодирующими одну и ту же аминокислоту. Этот феномен неполного соответствия кодона и антикодона был назван Ф.Криком «шатанием».

1.4 Значение нуклеиновых кислот

Значение нуклеиновых кислот очень велико. Особенности их химического строения обеспечивают возможность ранения, переноса в цитоплазму и передачи по наследству дочерним клеткам информации о структуре белковых молекул, которые синтезируются в каждой клетке. Белки обусловливают большинство свойств и признаков клеток. Понятно поэтому, что стабильность структуры нуклеиновых кислот - важнейшее условие нормальной жизнедеятельности клеток и организма в целом. Любые изменения строения нуклеиновых кислот влекут за собой изменения структуры клеток или активности физиологических процессов в них, влияя таким образом на жизнеспособность.

2 Макромолекулярная структура ДНК

В 1953 г. Уотсон и Крик, опираясь на известные данные о конформаци нуклеозидных остатков, о характере межнуклеотидной связи в ДНК и закономерности нуклеотидного состава ДНК (правила Чаргаффа), расшифровали рентгенограммы паракристаллической формы ДНК [так называемой В-формы, образующейся при влажности выше 80% и при высокой концентрации противоионов (Li+) в образце]. Согласно их модели, молекула ДНК представляет собой правильную спираль, образованную двумя полидезоксирибонуклеотидными цепями, закрученными относительно друг друга и вокруг общей оси. Диаметр спирали практически постоянен вдоль всей ее длины и равен 1,8 нм (18 А).

Макромолекулярная структура ДНК.

(а)—Модель Уотсона — Крика;

(6)—параметры спиралей В-, С- и Т-форм ДНК (проекции перпендикулярно оси спирали);

(в)—поперечный разрез спирали ДНК в В-форме (заштрихованные прямоугольники изображают пары оснований);

(г)—параметры спирали ДНК в А-форме;

(д)—поперечный разрез спирали ДНК в А-форме.

Длина витка спирали, который соответствует ее периоду идентичности, составляет 3,37 нм (33,7 А). На один виток спирали приходится 10 остатков оснований в одной цепи. Расстояние между плоскостями оснований равно, таким образом, примерно 0,34 нм (3,4 А). Плоскости остатков оснований перпендикулярны длинной оси спирали. Плоскости углеводных остатков несколько отклоняются от этой оси (первоначально Уотсон и .Крик предположили, что они параллельны ей).

Из рисунка видно, что углеводофосфатный остов молекулы обращен наружу. Спираль закручена таким образом, что на ее поверхности можно выделить две различные по размерам бороздки (их часто называют также желобками) — большую, шириной примерно 2,2 нм (22 А), и малую — шириной около 1,2 нм (12А). Спираль — правовращающая. Полидезоксирибонуклеотидные цепи в ней антипараллельны: это означает, что если мы будем двигаться вдоль длинной оси спирали от одного ее конца к другому, то в одной цепи мы будем проходить фосфодиэфирные связи в направлении 3'à5', а в другой — в направлении 5'à3'. Иными словами, на каждом из концов линейной молекулы ДНК расположены 5'-конец одной и 3'-конец другой цепи.

Регулярность спирали требует, чтобы против остатка пуринового основания в одной цепи находился остаток пиримидинового основания в другой цепи. Как уже подчеркивалось, это требование реализуется в виде принципа образования комплементарных пар оснований, т. е. остаткам аденина и гуанина в одной цепи соответствуют остатки тимина и цитозина в другой цепи (и наоборот).

Таким образом, последовательность нуклеотидов в одной цепи молекулы ДНК предопределяет нуклеотидную последовательность другой цепи.

Этот принцип является главным следствием модели Уотсона и Крика, поскольку он в удивительно простых химических терминах объясняет основное функциональное назначение ДНК — быть хранителем генетической информации.

Заканчивая рассмотрение модели Уотсона и Крика, остается добавить, что соседние пары остатков оснований в ДНК, находящейся в В-форме, повернуты друг относительно друга на 36° (угол между прямыми, соединяющими атомы С1' в соседних комплементарных парах).

2.1 Выделение дезоксирибонуклеиновых кислот

Живые клетки, за исключением сперматозоидов, в норме содержат значительно больше рибонуклеиновой, чем дезоксирибонуклеиновой кислоты. На методы выделения дезоксирибонуклеиновых кислот оказало большое влияние то обстоятельство, что, тогда как рибонуклеопротеиды и рибонуклеиновые кислоты растворимы в разбавленном (0,15 М) растворе хлористого натрия, дезоксирибонуклеопротеидные комплексы фактически в нем нерастворимы. Поэтому гомогенизированный орган или организм тщательно промывают разбавленным солевым раствором, из остатка с помощью крепкого солевого раствора экстрагируют дезоксирибонуклеиновую кислоту, которую осаждают затем добавлением этанола. С другой стороны, элюирование того же остатка водой дает- раствор, из которого при добавлении соли выпадает дезоксирибонуклеопротеид. Расщепление нуклеопротеида, который в основном представляет собой солеподобный комплекс между полиосновными и поликислотными электролитами, легко достигается растворением в крепком солевом растворе или обработкой тиоцианатом калия. Большую часть белка можно удалить либо добавлением этанола, либо эмульгированием с помощью хлороформа и амилового или октилового спирта (белок образует с хлороформом гель). Широко применялась также обработка детергентами. Позднее дезоксирибонуклеиновые кислоты выделяли с помощью экстракции водными n-аминосалицилат — фенольными растворами. При использовании этого метода были получены препараты дезоксирибонуклеиновой кислоты, из которых одни содержали остаточный белок, тогда как другие были фактически свободны от белка, что указывает на то, что характер связи белок — нуклеиновая кислота различен в различных тканях. Удобная модификация состоит в гомогенизировании животной ткани в 0,15 М растворе фенолфталеиндифосфата с последующим добавлением фенола для осаждения ДНК (свободной от РНК) с хорошим выходом.

Дезоксирибонуклеиновые кислоты, каким бы способом они не выделялись, представляют собой смеси полимеров различного молекулярного веса, за исключением образцов, полученных из некоторых видов бактериофагов.

2.1.1 Фракционирование ДНК

Ранний метод разделения заключался в фракционной диссоциации гелей дезоксирибонуклеопротеида (например, нуклеогистона) посредством экстракции водными растворами хлористого натрия увеличивающейся молярности. Таким путем препараты дезоксирибонуклеиновой кислоты были разделены на ряд фракций, характеризующихся различным отношением содержания аденина с тимином к сумме гуанина с цитозином, причем более легко выделялись фракции, обогащенные гуанином и цитозином. Сходные результаты были получены при хроматографическом отделении дезоксирибонуклеиновой кислоты от гистона, адсорбированного на кизельгуре, с применением градиентного элюирования растворами хлористого натрия. В улучшенном варианте этого метода очищенные фракции гистона сочетались с n-аминобензилцеллюлозой с образованием диазомостиков от тирозиновых и гистидиновых групп белка. Описано также фракционирование нуклеиновых кислот на метилированном сывороточном альбумине (с кизельгуром в качестве носителя). Скорость элюирования с колонки солевыми растворами увеличивающейся концентрации зависит от молекулярного веса, состава (нуклеиновые кислоты с высоким содержанием гуанина с цитозином элюируются легче) и вторичной структуры (денатурированная ДНК прочнее удерживается колонкой, чем нативная). Таким способом из ДНК морского краба Cancer borealis выделен природный компонент — полидезоксиадениловая-тимидиловая кислота. Фракционирование дезоксирибонуклеиновых кислот проводилось также посредством градиентного элюирования с колонки, наполненной фосфатом кальция.

3 Макромолекулярная структура РНК

Первые сведения о нуклеотидном составе РНК относились к препаратам, представляющим собой смеси клеточных РНК (рибосомных, информационных и транспортных) и называемым обычно суммарной фракцией РНК. Правила Чаргаффа в этом случае не соблюдаются, хотя определенное соответствие между содержанием гуанина и цитозина, а также аденина и урацила все же имеет, место.

Данные, полученные в последние годы при анализе индивидуальных РНК, показывают, что и на них правила Чаргаффа не распространяются. Однако различия в содержании аденина и урацила, а также гуанина и цитозина для большинства РНК невелики и что, следовательно, тенденция к выполнению указанных правил все же наблюдается. Этот факт объясняется особенностями макроструктуры РНК.

Характерными структурными элементами некоторых РНК являются минорные основания. Соответствующие им нуклеотидные остатки обычно входят в состав транспортных и некоторых других РНК в очень небольших количествах, поэтому определение полного нуклеотидного состава таких РНК представляет собой иногда весьма сложную задачу.

3.1 Выделение рибонуклеиновых кислот

Методы, используемые для экстракции рибонуклеиновых кислот, частично зависят от природы органа или организма. В одном из ранних методов, использованном Левиным, к густому тесту из дрожжей добавляли щелочь, смесь перемешивали с пикриновой кислотой, фильтровали и нуклеиновую кислоту осаждали из фильтрата добавлением соляной кислоты. Такая довольно жесткая обработка приводила к тому, что полученная нуклеиновая кислота значительно отличалась от “нативной” рибонуклеиновой кислоты. Для выделения рибонуклеиновых кислот, приближающихся по структуре к нуклеиновым кислотам живой клетки, необходимо избегать применения жестких условий (рН, температура) в то же время необходимо, насколько возможно, затормозить ферментативный распад. Широко применялась экстракция рибонуклеопротеидов изотоническим раствором хлористого натрия. Белки от нуклеиновых кислот могут быть отщеплены различными методами, такими, как обработка смесями хлороформа с октиловым спиртом, додецилсульфатом натрия, нитратом стронция или спиртом, а также расщепление белковой фракции трипсином. И снова эффективность каждого метода определяется природой рибонуклеопротеида. Для инактивации ферментов в процессе экстракции полезно применение хлоргидрата гуанидина (денатурирующего агента); для выделения рибонуклеиновых кислот и нативных рибонуклеопротеидов из дрожжей был применен метод, использующий адсорбцию рибонуклеаз на бентоните после предварительной обработки ионами цинка.

Особые преимущества имеет выделение рибонуклеиновых кислот из гомогенатов тканей млекопитающих, микроорганизмов и вирусов экстракцией фенолом и водой при комнатной температуре, так как при этом белки и дезоксирибонуклеиновые кислоты выпадают в осадок, активность рибонуклеазы подавляется и высокополимерные продукты могут быть получены с хорошими выходами. Прямая экстракция дрожжей водным раствором фенола была применена для препаративного получения транспортных РНК.

3.1.1 Фракционирование РНК

Помимо ряда вирусных нуклеиновых кислот, большинство выделенных полирибонуклеотидов, бесспорно, представляют собой сложные смеси, содержащие полимеры с различной длиной цепи, нуклеотидной последовательностью и составом оснований (присутствие или отсутствие “минорных” оснований). Существует ряд приемов для частичного фракционирования, однако, пока не разработаны удовлетворительные методы характеристики, трудно определить степень чистоты или гомогенности рибонуклеиновых кислот. В основу оценки чистоты транспортных РНК, этих сравнительно низкомолекулярных полирибонуклеотидов, может быть положена их ферментативная реакция с аминокислотами (через аминоациладенилаты), что, конечно, позволяет оценить и их биохимическую однородность.

Методы фракционирования включают осаждение нейтральными солями, электрофорез, хроматографию на фосфате кальция и осаждение днгидрострептомицином. Недавно для фракционирования рибонуклеиновых кислот была использована фракционная диссоциация комплексов нуклеиновая кислота — гистон, примененная ранее к дезоксинуклеиновым кислотам. Во всех фракциях отношение 6-амино- к 6-кетонуклеозидам было близко к единице. В некоторой степени фракционирование происходит при экстракции фенолом, возможно как результат дифференциального связывания нуклеиновых кислот с белками. Анионообменные целлюлозы, такие как ЭКТЕОЛА и ДЭАЭ, широко применяются в настоящее время для фракционирования не только рибонуклеиновых кислот, включая специфичные для аминокислот транспортные РНК, но и рибонуклеопротеидов и даже вирусных препаратов. Для элюирования обычно используют растворы нейтральных или близких к нейтральным солеи. Поразительной особенностью метода является способность этих ионообменников к разделению очень широкого спектра веществ, начиная от изомеров мононуклеотидов и олигонуклеотидов с различной длиной цепи или различного состава и кончая полинуклеотидами чрезвычайно высокого молекулярного веса. Опубликовано сообщение о разделении на колонках из ДЭАЭ-декстрана РНК, меченной валином, от немеченой акцепторной РНК. Для фракционирования рибонуклеиновых кислот были также применены модифицированные ионообменные целлюлозы, в которых к целлюлозе с помощью эпихлоргидрина присоединены нуклеозиды (вместо триэтаноламина), особенно аденозин и гуанозин [44]. Подобное использование ЭКТЕОЛА-целлюлозы для фракционирования или выделения информационной РНК, связанной в данный момент с ДНК, основано на способности к специфическому образованию водородных связей: ЭКТЕОЛА связывает денатурированную ДНК данного организма (для элюирования ДНК необходим растворитель чрезвычайно высокой ионной силы), а информационная РНК элюируется растворами понижающейся ионной силы. Посредством хроматографии на трет-аминоалкилированном крахмале транспортная рибонуклеиновая кислота была разделена на фракции на основании повышенного сродства к тирозину и лейцину. Хроматография на оксиапатите дает хорошее разделение рибонуклеиновых кислот, специфичных для валина и фенилаланина.

В другом методе, имеющем значительную потенциальную ценность, используется поперечно сшитый полидиазостирол, полученный в результате реакции полиаминостирола с азотистой кислотой; метод основан на наблюдениях, что соединения дназония легко реагируют с некоторыми аминокислотами с образованием ковалентно связанных производных. В пределах рН от 7 до 8,5 быстро реагируют только тирозин и гистидин. Препараты транспортных РНК, полностью этерифицированные аминокислотами, встряхивали с нерастворимым полидиазостиролом, который реагировал только с нуклеиновыми кислотами, меченными тирозином и гистидином.

Дальнейшая очистка достигалась повторной этерификацией тирозином при использовании очищенного тирозин-активнрующего фермента и повторной обработкой полидиазостиролом. С неэтерифицированной специфичной к гистидину рибонуклеиновой кислотой реакции не происходило, и она оставалась в растворе, в то время как специфичная к тирозину нуклеиновая кислота освобождалась, как и прежде, при обработке щелочью в мягких условиях. Обе фракции получены почти чистыми в отношении их аминокислотоакцепторной специфичности. Предварительные наблюдения показали, что специфичная к валину рибонуклеиновая кислота, вполне вероятно, может быть этерифицирована дипептидом тирозилвалином.

4 Жидкофазные методы выделения нуклеиновых кислот

4.1 Классические методы выделения нуклеиновых кислот

Классические методы выделения нуклеиновых кислот из сложных исходных образцов, таких как кровь или ткани, включают в себя лизис биологического материала детергентами или хаотропными агентами иногда в присутствии разрушающих белки ферментов. После этого этапа следуют несколько стадий, в которых используются органические растворители, такие как фенол и/или хлороформ или этанол. Полное отделение белков от нуклеиновых кислот может быть достигнуто добавлением перхлората натрия [4]. Для отделения РНК от ДНК необходимо селективное инкубирование с хлоридом лития или специфичное безнуклеазное изолирование с гуанидин хлоридом или гуанидин тиоцианатом, скомбинированное с фенольной экстракцией или этанольной преципитацией [5]. Такие методы увеличивают вероятность деградации нуклеиновых кислот, потери образца или кросс-контаминации образцов, если несколько проб обрабатываются одновременно. При выделении РНК очень велик риск контаминации со стороны присутствующей в исходном образце ДНК.

Стандартная методика получения чистого препарата основана на том, что ДНК является полярной молекулой и не растворяется в органических растворителях. Традиционно для выделения ДНК используется фенол-хлороформная экстракция. При перемешивании клеточного лизата и фенола формируются две фазы. ДНК находится в верхней (водной) фазе, а денатурированные белки — в нижней (органической) фазе [6]. Однако этот метод ориентирован на работу с такими агрессивными веществами, как фенол и хлороформ, и присутствуют стадии центрифугирования и жидкостной экстракции, которые нельзя автоматизировать.

4.2 Методы, позволяющие выделить ДНК и РНК одновременно

Известны методы, согласно которым можно выделить одновременно и ДНК, и РНК из одного источника (см., например, [11]). Большинство известных методов является модификацией оригинальной процедуры Chirgwin с соавторами [12]. При этом используются сильные хаотропные агенты, такие как гуанидин тиоцианат и цезия три-флуороацетат для одновременного разрушения клеточных мембран и инактивации внутриклеточных рибонуклеаз (РНКаз). Лимитирующими факторами таких методик являются необходимость ультрацентрифугирования и большое время анализа (16–44 ч) [13, 14].

Методы одновременного выделения ДНК и РНК, в которых не присутствует операция центрифугирования, имеют преимущество еще и потому, что фенол действует как эффективный депротеинизирующий агент, разрушающий клетки и денатурирующий белки [6, 15]. Для эффективного отделения высокомолекулярной ДНК от РНК сначала производится фенольная экстракция, а затем две фенол-хлороформные экстракции для одно-временного удаления белков и липидов из раствора, содержащего нуклеиновые кислоты. С целью повышения выхода нуклеиновых кислот оптимизированы компоненты экстрагирующего буфера [16]. Например, определенный рН буфера (pH 7.9) в присутствии детергента (0.2 % додецилсульфат натрия) и относительно низкая концентрация соли (100 мМ LiCl) позволяют эффективно разделять нуклеиновые кислоты в водной фазе и диссоциировать белки. Кроме того, 10 мМ ЭДТА не позволяет образовываться белковым комплексам и об-разует хелатный комплекс с Mg2+, ингибируя, та-ким образом, действие магний-зависимых нуклеаз

[17].

В методе, предложенном Krieg с соавторами [18], для отделения высокомолекулярной ДНК достаточно лизиса и процедуры экстракции с ис-пользованием последующей этанольной преципитации. Время, необходимое для выделения вало-вых клеточных РНК и ДНК, составляет примерно 2 ч.

5 Твердофазные методы выделения нуклеиновых кислот

5.1 Основные принципы твердофазных методов

В твердофазных методах выделения нуклеиновых кислот используются следующие процессы и принципы:

а) водородные связи с немодифицированной гидрофильной матрицей, обычно кварцем, в хаотропных условиях;

б) ионообмен в водном растворе, обычно с использованием анионообменников;

в) аффинность;

г) механизмы исключения по размеру.

Твердофазные системы, адсорбирующие нуклеиновые кислоты, — это частицы на основе кварца [7], стеклянные волокна, анионообменные носители [8], которые используются в хромато-графических сепарационных колонках. Эти носители применяются для выделения или очистки нуклеиновых кислот с высококонцентрированны-ми растворами хаотропных солей (йодид натрия, перхлорат натрия, гуанидин тиоцианата). Описано применение диатомовой земли в качестве сорбента, в этом случае связывание также происходит в присутствии хаотропной соли. Другие методы основаны на совместной детергенции с материала-ми, связывающими нуклеиновые кислоты, или на использовании твердого сорбента со связывающими нуклеиновые кислоты функциональными группами в сочетании с полиэтиленгликанами и солями в высокой концентрации.

Известна группа методов пробоподготовки, основанная на использовании ионообменников типа Chelex, cорбирующих примеси, мешающие ПЦР [10]. Однако эти методы в большинстве случаев не могут удалить все возможные примеси, поэтому их применение довольно ограничено.

5.1.1 Метод выделения нуклеиновых кислот на стекле

Крайне удобным является метод выделения нуклеиновых кислот, предложенный Boom с соавторами [9]. Этот метод включает в себя стадию лизиса клеток сильным хаотропным агентом, который разрушает клеточные мембраны и инактивирует внутриклеточные РНКазы, и последующую сорбцию нуклеиновой кислоты на носителе (стеклянные бусы, диатомовая земля, стеклянное "молоко" и т. д.). Нуклеиновая кислота обратимо связывается со стеклом в присутствии высокой концентрации хаотропных солей (например, гуанидин хлорида, гуанидин тиоцианата). В таких условиях связывания белков с матрицей не происходит. Хаотропные соединения представляют собой вещества, нарушающие упорядоченную структуру воды и тем самым приводящие мембраны в со-стояние хаоса (например, мочевина, йодид натрия). Таким образом, помимо связывания, хаотропные агенты обеспечивают разрушение клеточных мембран и лизис клеток с последующим выходом нуклеиновой кислоты. Примеси отмываются хаотропной солью, а хаотропная соль — 80 % этанолом. Очищенная нуклеиновая кислота снимается со стекла буфером с низкой ионной силой. В настоящее время многие коммерческие фирмы предлагают для выделения нуклеиновых кислот колонки со стеклянной матрицей (например, Zymo Research и Promega). Методы, эксплуатирующие эти колонки, включают стадии центрифугирования или вакуумирования, однако занимают порядка 15 мин.

Использование магнитных твердых носителей в биохимических и молекулярно-биологических процессах имеет много преимуществ по сравнению с немагнитными сепарационными методами. Обычно магнит прикладывается к стенке сосуда, содержащего образец, чтобы частицы агрегировали у стенки сосуда, а остаток образца можно было убрать. Таким способом можно отделять компоненты клеточного лизата, которые ингибируют ДНК-полимеразу и ПЦР-реакцию, например поли-сахариды, фенольные компоненты, гумус [19].

Для процесса выделения используются магнитные носители с иммобилизированными аффинными лигандами или изготовленные из биополимера, увеличивающего аффинность к нужной нуклеиновой кислоте. Магнитные носители имеются в продаже или могут быть изготовлены в лаборатории. Магнитные частицы производятся из различных синтетических полимеров, биополимеров, пористого стекла или на основе неорганических магнитных материалов, таких как оксид железа с модифицированной поверхностью. Особенно подходят для выделения суперпарамагнитные частицы, которые не взаимодействуют друг с другом в отсутствие магнитного поля. Эти частицы приобретают магнитный момент в сильном магнитном поле, но не сохраняют постоянного магнетизма, когда поле убирают. Если устранены магнитная агрегация и слипание частиц, то в течение реакции достигается суспензирование частиц и единообразная экстракция нуклеиновых кислот.

Для автоматического выделения нуклеиновых кислот используются магнитные частицы со стеклянным покрытием [20]. Нуклеиновая кислота связывается со стеклянной поверхностью, затем связанная с частицами она проходит те же стадии экстракционного процесса, что и в методике Boom: после серии отмывок в пробе остается нуклеиновая кислота, сорбированная на носителе, с которого она легко снимается с помощью элюирующего буфера. Метод удобен, технологичен и пригоден для подготовки образца к амплификации, его можно воспроизвести на роботизированных пипеттирующих рабочих станциях. Однако возможны потери продукта вследствие необратимой сорбции на носителе, а также в процессе многочисленных отмывок. Особенно большое значение это имеет при работе с небольшими количествами ДНК в образце [21].

Валовые ДНК и РНК выделяются с помощью одних и тех же магнитных частиц. Чтобы отделить РНК от ДНК, РНК уничтожается до стадии сепарации ДНК. Наилучшим вариантом является добавление РНК-азы или щелочи. Наоборот, РНК может быть выделена при разрушении ДНК дезоксирибонуклеазой (ДНК-азой).

Например, первичный метод очистки плазмиды — отделение плазмидной ДНК (пДНК) от хромосомной ДНК и клеточной РНК бактерии-хозяина. Stadler с соавторами [22] показали, что даже в случае многокопийной плазмиды пДНК составляет не более 3 % клеточного лизата и большинство контаминантов заряжены отрицательно (РНК, комплементарная ДНК (кДНК), эндотоксин), сходны по размеру (кДНК, эндотоксин) и по гидрофобности (эндотоксин). Были разработаны методы для наработки очищенного лизата, но они не способны убрать белки и липиды. Также воз-можен щелочной лизис бактериальных клеток с последующей нейтрализацией [23]. Протоколы очистки лизатов отличаются друг от друга концентрациями солей, объемами, рН, температурой, продолжительностью стадий. Эти методы эксплуатируют разницу в характеристиках ковалентной закрытой кольцевой пДНК и фрагментов хромосомной ДНК при денатурации и ренатурации [24]. Например, суперпарамагнитные частицы, модифицированные мультивалентным катионным полиэтиленимином, используются для выделения пДНК из очищенного бактериального лизата [25].

Доступны различные магнитные частицы с оптимизированными буферами и протоколами для лабораторий и автоматических систем (табл. 1 и 2). Обычно к магнитным носителям прилагаются связывающие растворы, с помощью которых осуществляется селективное связывание нуклеиновых кислот. Например, для связывания вирусных нуклеиновых кислот можно использовать как вирусные белки, так и комплементарные ДНК- или РНК-последовательности [26].

В табл. 2 приведены некоторые магнитные частицы с иммобилизованным на их поверхности олигодеокситимидином для эффективного и быстрого выделения высокоочищенной матричной РНК (мРНК) из культур эукариотических клеток или выделения валовой РНК [28]. Метод выделения основан на гибридизации последовательности олигодеокситимидина стабильным полиаденилированным 3-концом эукариотической мРНК. Длина комплементарной последовательности — 20– 30 олигонуклеотидов. Эта последовательность либо напрямую ковалентно связывается с поверхностью частицы, либо не напрямую, через биотинилированые олигонуклеотиды, и с помощью взаимодействия между покрытыми стрептавидином частицами. Корпорации CPG и Dynal (в настоящее время Invitrogen) производят MPG® и Dynabeads® с иммобилизованными биотинилированными олигонуклеотидами, однако и другие фирмы предлагают модифицированные стрептавидином частицы, которые могут быть использованы для выделения мРНК, как описывается, например, в инструкции к "mRNA isolation kit with MagneSphere®"фирмы Promega.

Почти все магнитные частицы (кроме MagaCell™ oligodT30 и Sera-Mag oligo-(dT)30) продаются вместе с оптимизированными буферными системами и готовыми протоколами. Число производителей магнитных частиц постоянно растет, поэтому для поставленной задачи легко подобрать удобный метод.

6 Другие методы выделения нуклеиновых кислот

6.1 Определение первичной структуры (секвенирование) нуклеиновых кислот.

Секвенирование нуклеиновых кислот позволяет определить в одном эксперименте последовательность нуклеотидов в ДНК или РНК, содержащих несколько сотен мономерных звеньев. Методы основаны на общем принципе - определении с помощью высокоразрешающего электрофореза в полиакриламидном геле с точностью до одного нуклеотида длины всех возможных фрагментов секвенируемого участка нуклеиновой кислоты, содержащих на одном конце одну и ту же последовательность нуклеотидов (гомогенный фрагмент), а на другом - один и тот же нуклеотид. Такие фрагменты получают двумя различными способами. В первом случае (метод Максама-Гилберта) гомогенный фрагмент ДНК или РНК, предварительно меченный радиоактивной меткой по одному из концов, расщепляют хим. агентами, специфичными к одному из четырех нуклеотидных остатков (A, G, С, Т или U); в случае РНК этот процесс осуществляют также специфическими рибонуклеазами. Расщепление ведут в таких ограничивающих условиях, когда в каждой молекуле нуклеиновой кислоты расщепляется только одна меж нуклеотидная связь рядом с нуклеотидом данного типа, независимо от его положения в цепи. Такую операцию проводят для каждого из четырех нуклеотидных остатков и по длинам образующихся радиоактивных фрагментов определяют положение каждого нуклеотида в цепи нуклеиновой кислоты.

В др. случае (метод Сенгера) используют олиго- или полинуклеотидную затравку (праймер) известной длины, комплементарную определенному участку нуклеиновой кислоты. Затравку наращивают с помощью ДНК-полимеразы, останавливая синтез на одном из четырех типов нуклеотидных остатков с равной вероятностью, независимо от его положения в цепи. Для этого к смеси четырех прир. субстратов ДНК-полимеразы добавляют так называемый терминатор (обычно 2', 3'-ди-дезоксинуклеозидтрифосфат) - аналог определяемого нуклеотидного остатка, попадание которого на 3'-конец растущей цепи останавливает синтез. При этом радиоактивная метка вводится либо в затравку, либо в субстрат. Операцию повторяют для каждого из четырех нуклеотидов; длину образующихся радиоактивных фрагментов определяют стандартным способом. Эти методы в настоящее время удалось полностью автоматизировать (заменив в ряде случаев радиоактивную метку на флуоресцентную) и тем самым в тысячи раз повысить скорость секвенирования ДНК.

6.3 Спектрофотометрический анализ

Нуклеиновые кислоты определенным образом поглощают ультрафиолет. В спектрофотометрах образец подвергается действию ультрафиолета с длиной волны 260 нм, а фотодетектор измеряет количество света, прошедшего через образец. Чем больше света поглощено, тем выше концентрация нуклеиновой кислоты в образце.

При помощи закона Бугера — Ламберта — Бера возможно соотнести концентрация молекул, поглощающих излучение с количеством поглощенного света. На длине волны 260 нм средний коэффициент экстинкции для двуцепочечной ДНК составляет 0,020 (мкг/мл)−1 см−1, для одноцепочечной ДНК 0,027 (мкг/мл)−1 cm−1, для одноцепочечной РНК 0,025 (мкг/мл)−1 cm−1 и для коротких одноцепочечных олигонуклеотидов коэффициент экстинкции зависит от длины и соотношения азотистых оснований (около 0,030 (мкг/мл)−1 cm−1). Отсюда, оптическая плотность равная 1 соответствует концентрации двуцепочечной ДНК около 50 мкг/мл. Спектрофотометрический способ определения концентрации нуклеиновых кислот применяет при концентрациях до 2 OD. Более точные коэффициенты экстинкции требуются для определения концентрации олигонуклеотидов, и могут быть предсказаны при помощи модели ближайшего соседства.

Для определения концентрации образца, оптическую плотность, определённую при помощи стандартной кюветы с величиной оптического пути 10 мм, необходимо умножить на соответствующий коэффициент. Например, величина поглощения 0,9 оптических единицы двуцепочечной ДНК соответствует концентрации 45 мкг/мл.

Кюветы малого объема

Для многих биологических исследований требуется (ДНК-микрочип, количественная ПЦР) качественное и количественное определение малых объемов нуклеиновых кислот. Специальные нанофотометры позволяют определять концентрации образцов без помощи кюветы в субмикролитровых объемах, начиная от 0,3 мкл. Так как производятся измерения неразбавленного образца, воспроизводимость результатов очень высокая, а сами образцы могут быть использованы после анализа.

Чистота образца

Часто образцы нуклеиновых кислот содержат примеси белков и других органических веществ. Отношение поглощения на длинах волн 260 и 280 нм (A260/280) часто используют для оценки чистоты препарата. Чистая ДНК имеет соотношение A260/280 порядка 1,8, образец РНК без примесей A260/230 около 2.

Примеси белков и отношение 260:280

Для выявления примесей белков в растворах нуклеиновых кислот, анализируют соотношение поглощения растворов на длинах волн 260 и 280 нм, ароматические аминокислоты в составе белков поглощают на 280 нм. Однако вклад примесей белков в определение концентрации нуклеиновых кислот небольшой — для того, чтобы повлиять на соотношение 260:280 в растворе нуклеиновой кислоты, концентрация белка должна быть значительной.

Такие отличия обусловлены более высоким значением коэффициента молярной экстинкции в случае нуклеиновых кислот на длинах волн 260 и 280 нм, в сравнении с белками. Поэтому даже для раствора белка относительно высокой концентрации вклад в поглощение на длинах волн 260 и 280 нм небольшой. Определение белкового загрязнения в растворе нуклеиновой кислоты не может быть определен по соотношению 260:280, поэтому примеси белков в растворах нуклеиновых кислот вносят незначительную погрешность в определение концентрации ДНК и РНК.

Другие загрязнения:

Загрязнения фенолом, который часто используют при выделении нуклеиновых кислот, может приводить к значительным погрешностям при измерении концентрации нуклеиновых кислот. Фенол имеет максимальное поглощение на длине волны 270 нм и соотношение A260/280 около 1.2. Нуклеиновые кислоты, не содержащие фенол, имеют соотношение A260/280 около 2. Примеси фенола могут значительно завысить концентрацию ДНК.

Поглощение на длине волны 230 нм могут быть вызваны загрязнениями фенолятами, тиоцианатами и другими органическими соединениями. Для чистого образца РНК отношение A260/230 должно быть около 2, для чистого образца ДНК A260/230 около 1,8.

Поглощение на длине волны 330 нм и выше указывает на другие загрязнения раствора. Поглощение на этих длинах волн для чистых препаратов нуклеиновых кислот должно быть равно нулю. Отрицательные значения могут быть вызваны неверным выбором раствора, использованного в качестве пустого (blank). Также отрицательные значения могут быть следствием наличия флюоресцентного красителя в растворе.

Однако позднее были опубликованы данные [3], свидетельствующие о возможности наблюдения сходных ``ДНК-подобных'' структур при исследовании методом СТМ чистой, свежесколотой поверхности пирографита. Возникновение таких структур объясняется чувствительностью СТМ к электронным свойствам поверхности - происходит визуализация доменных стенок пирографита [4]. Эти результаты, а также слабая воспроизводимость и отсутствие безусловно необходимых контрольных экспериментов в первых работах по СТМ-визуализации ДНК вызывали сомнения в применимости методов зондовой микроскопии для исследования макромолекул.

Существенное изменение ситуации произошло в 1992 г., когда были опубликованы первые надежные и воспроизводимые результаты исследования ДНК методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) [5,6]. Таким образом, прошло более пяти лет с момента создания атомно-силового микроскопа (1986 г.) и более десяти лет существования зондовой микроскопии, прежде чем был достигнут определенный успех в применении метода к исследованию биологических объектов. В то же время методы зондовой микроскопии весьма успешно применялись в течение этих десяти лет для исследований структуры поверхности твердых (кристаллических) тел. За эти годы возникло понимание, что потенциал возможностей зондовой микроскопии в исследованиях биологических объектов может быть реализован лишь при решении в каждом конкретном случае основной экспериментальной задачи: определения адекватной методики препарирования образцов.

6.5.1 Основные методики препарирования образцов для зондовой микроскопии нуклеиновых кислот

Универсальной методики приготовления образцов для решения широкого спектра задач зондовой микроскопии пока не существует, поэтому используемые методики определяются спецификой задачи, т.е. являются методиками ``на конкретный случай''. Применительно к исследованиям нуклеиновых кислот во многих случаях бывает важно, чтобы макромолекулы адсорбировались на подложку в расправленном состоянии. Для успешного исследования необходимо также, чтобы исследуемые молекулы достаточно прочно фиксировались на подложке. В противном случае, при исследованиях в жидкой среде, молекулы будут увлекаться зондом в процессе сканирования; при исследовании на воздухе, силы, действующие на молекулу при высыхании капли препарата на подложке, также будут увлекать адсорбируемые структуры, приводя к неоднородному (с образованием агрегатов) поверхностному распределению исследуемых объектов. Ниже рассмотрим основные методики, позволяющие зафиксировать молекулы нуклеиновых кислот на поверхности в расправленном состоянии.

Первые надежные результаты исследования ДНК методом атомно-силовой микроскопии были получены в том случае, когда изучаемые структуры наносили из капли рабочего раствора (раствора буфера, водно-спиртовой среды и т.п.) на поверхность слюды, модифицированной ионами двух- (и более) валентных металлов [5,6]. Эти ионы, по-видимому, служат связующими мостиками между отрицательно заряженной слюдой (в водных растворах) и отрицательно заряженными фосфатными группами молекулы ДНК. Модификация слюды может предшествовать процессу адсорбции макромолекул - в этом случае свежесколотую слюду помещают для предварительной обработки на некоторое время (минуты, часы) в раствор, содержащий катионы металлов, затем промывают (водой, водным раствором этанола и пр.) и высушивают. После этого на модифицированную поверхность наносят рабочий раствор с исследуемыми структурами. Другой подход - добавление солей металлов непосредственно к рабочему раствору - позволяет исключить этап предварительной обработки слюды (препарат наносят непосредственно на поверхность свежего скола). После высыхания капли рабочего раствора образцы, как правило, подвергают дополнительной промывке.

В работе [7] методом АСМ проводили сравнительный анализ процесса адсорбции макромолекул ДНК на слюду из раствора, как с катионами металлов, так и без них. Было показано, что во втором случае адсорбированные молекулы нестабильны в процессе промывки образцов и при сканировании. Кроме того, АСМ-изображения макромолекул характеризуются большим количеством запутанных и перекрученных участков, тогда как при присутствии в растворе катионов металлов и применении предшествующей сканированию процедуры промывки образцов молекулы ДНК фиксируются на поверхности подложки в расправленном состоянии.

Авторы работы [8] исследовали методом АСМ в жидкостной ячейке в реальном масштабе времени обратимое осаждение молекул ДНК на слюду при различных параметрах рабочего раствора. Было показано, что адсорбция объектов на поверхность подложки и величина силы адгезии существенно зависят от концентрации связующих катионов (оптимальное значение около 2 мМ для Zn 2+) и pH среды (оптимальное значение около 7,5).

На сегодняшний день использование катионов металлов для связывания ДНК с подложкой является, пожалуй, наиболее распространенной методикой приготовления образцов при АСМ-исследованиях, что объясняется ее простотой и высокой воспроизводимостью результатов.

Другая широко используемая методика химической модификации подложки для стабилизации молекул нуклеиновых кислот на поверхности - это силанизация слюды [10]. Процесс силанизации существенно не изменяет топографических особенностей поверхности слюды - она остается достаточно гладкой, в то же время улучшается связь макромолекулы с модифицированной подложкой. В работе [11] при проведении АСМ-исследований нуклеиновых кислот (ДНК, двунитевой рибонуклеиновой кислоты (РНК)) в качестве подложки использовали поверхность слюды, химически модифицированную 3-аминопропилтриэтоксисиланом (APTES). Модификация включала ковалентную привязку аминогрупп молекул APTES к слюде, степень модификации контролировали с помощью АСМ, и выбирали таким образом, чтобы шероховатость получаемой поверхности не затрудняла идентификацию исследуемых структур. Это обстоятельство (необходимость контроля степени шероховатости модифицированной подложки) незначительно усложняет методику.

Было показано [12], что этот подход препарирования образцов достаточно эффективен в рутинных исследованиях распределения молекул нуклеиновых кислот по длинам. Представленные авторами результаты совпадали с данными электронной микроскопии (исследовались молекулы двунитевой РНК ретровируса), при этом было отмечено, что при равенстве разрешающих способностей важным преимуществом АСМ является существенно менее сложная методика приготовления образцов.

Была продемонстрирована возможность использования модифицированной APTES слюды при проведении исследований как на воздухе, так и в водной среде - в обоих случаях величина адгезии молекул нуклеиновых кислот к подложке позволяла осуществлять сканирование в контактном режиме. В работе [13] осуществляли сканирование одного и того же участка поверхности с адсорбированными макромолекулами на воздухе и в воде, при этом во втором случае отмечалось увеличение разрешающей способности (примерно в три раза), что может быть связано с исключением негативного влияния капиллярных сил. Капиллярные силы увеличивают силовое воздействие зонда на образец, что вызывает дополнительные деформации макромолекулы, ее разрушение или нестабильность в процессе сканирования, и приводит к уменьшению разрешающей способности.

Другие исследователи также сообщают, что, если АСМ-исследования проводятся либо в сухой газовой атмосфере (иногда для уменьшения относительной влажности температуру рабочей атмосферы повышают до 60-100°С [14]), либо в жидкостной ячейке [15,16], то влияние капиллярных сил уменьшается, что увеличивает достигаемое пространственное разрешение. Применение режима прерывистого контакта [17,18] также позволяет исключить влияние капиллярных сил; микроскопия прерывистого контакта позволяет сегодня достичь разрешения (при проведении исследований в жидких средах), необходимого для визуализации витков двойной спирали ДНК [19].

На пути подбора адекватного подхода к приготовлению образцов может оказаться полезным накопленный за десятилетия исследований багаж методик препарирования образцов электронной микроскопии. В упрощенном варианте многие из этих методик могут применяться и для решения задач зондовой микроскопии. Так, модифицированный метод Кляйншмидта [20,21] (метод белковой пленки) дает хорошие результаты при использовании гидрофобных подложек [22]. Недостатком метода может служить то, что комплексообразование молекул нуклеиновых кислот с белковой пленкой (часто используют пленку цитохромов C) затрудняет исследование взаимодействия этих молекул с другими белками, что ограничивает круг решаемых задач.

Для фиксации развернутых молекул ДНК на поверхности подложки применяют также бензилдиметилалкиламмоний хлорид (BAC) [23,24] - широко используемый в электронной микроскопии реагент, представляющий собой катионное поверхностно-активное вещество (ПАВ). BAC в малых концентрациях (около 5×10-5%) добавляют непосредственно в раствор, содержащий макромолекулы, перед нанесением препарата на поверхность слюды. Вследствие свойств ПАВ, на поверхности капельки, наносимой на подложку, формируется стабильная пленка молекул BAC (со связанными с ней молекулами ДНК), которая распределяется по поверхности слюды и стабилизируется за счет сил электростатического взаимодействия. Использование других ПАВ (в малых концентрациях) также способствует стабилизации молекул нуклеиновых кислот на поверхности слюды. Так, в работе [25] для разворачивания ДНК на поверхности, успешно применили 2,4,6-трис(диметиламинометил)фенол (DMP-30) и хлорид цетилпиридиния (CP), представляющие собой, соответственно, неионное и катионное ПАВ.

К недостаткам метода с применением ПАВ можно отнести некоторую поверхностную неоднородность получаемых образцов, что обусловлено неконтролируемостью процессов формирования пленки и комплексообразования с исследуемыми макромолекулами. Удачным дополнением метода может служить использование методики Ленгмюра-Блоджетт: формирование на границе раздела фаз жидкость/газ пленки амфифильных молекул и последующее контролируемое перенесение ее на поверхность твердой подложки.

В работе [26] для иммобилизации молекул ДНК применили другую методику, сходную с традиционной для электронной микроскопии. Макромолекулы адсорбировали на поверхность слюды, сверху напыляли слой углерода. После этого на углерод приклеивали стальную пластинку, слюду удаляли, и открытой для сканирования оказывалась внутренняя (обращенная прежде к слюде) поверхность углеродной пленки с жестко закрепленными в ней макромолекулами. Шероховатость поверхности углеродной пленки составляла, по оценкам авторов, единицы ангстрем и допускала однозначную идентификацию отдельных молекул ДНК. Авторы работы отмечают высокую стабильность приготовленных образцов - макромолекулы не разрушались при больших силах воздействия зонда, результаты не зависели от среды исследования (эксперименты проводились как на воздухе, так и в жидкости), длительное хранение не влияло на качество образцов. Недостаток этого метода состоит в его относительной экспериментальной трудоемкости.

Успехи применения атомно-силовой микроскопии к исследованию молекул нуклеиновых кислот позволили достичь прогресса и при проведении подобных экспериментов методами сканирующей туннельной микроскопии. Хорошие результаты были получены при СТМ-исследовании молекул ДНК, адсорбированных на химически модифицированных поверхностях металлов [27]. Химическая модификация включала ковалентную связь химически поляризуемых групп тиолов с чистой поверхностью металла. Адсорбция ДНК осуществлялась за счет кулоновского взаимодействия молекулы с плотно упакованной мономолекулярной пленкой тиолов, ориентированной положительными функциональными группами к молекуле ДНК. Характерной особенностью представленных в работе [28] изображений молекул ДНК (приготовленных по описываемой методике) является отрицательный контраст (при движении над молекулой туннельная игла опускается ниже, чем при движении над поверхностью подложки), связанный, по-видимому, со слабой проводимость макромолекулы.

Другой перспективный подход к исследованию макромолекул методами СТМ - применение низкотоковой туннельной микроскопии [29] с рабочим диапазоном туннельного тока менее 1 пА. В этом случае экспериментальные результаты [30] свидетельствуют о возможности визуализации молекул ДНК, адсорбированных на поверхности диэлектрической подложки (слюды). Транспорт заряда в системе зонд-образец-подложка осуществляется за счет проводимости ультратонкой пленки воды, покрывающей поверхности образца и подложки при проведении исследований в условиях контролируемой относительной влажности. Оптимальное значение последней для подобных экспериментов составляет 60- 65%.

Т.о. спектр применяемых методик препарирования образцов нуклеиновых кислот для СЗМ весьма широк. В то же время стоит отметить, что описанные методики разработаны для исследования свободных молекул ДНК, поэтому априори неизвестно адекватны ли они для изучения, например, взаимодействия нуклеиновых кислот с белками или поверхностно-активными веществами. Упомянем также, что в литературе по СЗМ описаны, в основном, лишь исследования двунитевых молекул нуклеиновых кислот: РНК и ДНК, имеющих двойную спираль, и практически отсутствуют данные об исследовании однонитевых молекул (которые сложнее зафиксировать на подложке в расправленном состоянии).

6.5.2 Применение зондовой микроскопии для исследования структуры и свойств молекул нуклеиновых кислот и их комплексов

При подборе адекватной методики приготовления образцов сканирующий зондовый микроскоп представляет собой удобный и надежный прибор для исследования свойств биологических структур на молекулярном уровне. Убедительным доказательством этого утверждения могут служить результаты работ, посвященных исследованию конформационных свойств молекул нуклеиновых кислот и их комплексов с белками, ПАВ и т.п.

Авторы работы [31] исследовали влияние специфических лигандов (дистамицина и микрогонотропена-6b) на конформационные свойства нескольких типов молекул ДНК методом АСМ прерывистого контакта. Результаты исследований не только обеспечили визуальное доказательство влияния данных лигандов на конформацию ДНК, но и позволили сделать определенные количественные оценки, основанные на анализе представленных авторами гистограмм распределения расстояния между концами ДНК.

В работе [32] исследовали специфическое взаимодействие РНК-полимеразы из Escherihia coli с ДНК, содержащей lPL промотор. Образованные комплексы были визуализированы методом АСМ, на полученных изображениях наблюдались молекулы ДНК с РНК-полимеразой, локализованной на расстоянии 4/9 от одного из концов. Проводили анализ структуры комплекса РНК-полимеразы и ДНК как в открытых комплексах, связанных с промотором (OPCs), так и в стабильных элонгационных комплексах (С15) с образованным 15-нуклеотидным транскриптом. Было показано, что в области прикрепления РНК-полимеразы происходит изгиб молекулы ДНК, причем средний угол изгиба для OPCs и С15 составлял 54±31° и 92±37°, соответственно. На основании обнаруженного различия в значениях средних углов изгиба для OPCs и C15 авторы делают вывод, что процесс транскрипции сопровождается изменением структуры комплекса РНК-полимеразы с ДНК, обусловленной конформационными изменениями полимеразы.

Возможность АСМ-визуализации молекулярных процессов продемонстрирована в работе [33] на основе последовательного анализа образования неспецифичных комплексов молекулы ДНК и РНК-полимеразы в реальном масштабе времени. Схема эксперимента включала в себя адсорбцию макромолекул ДНК на слюду из 10 мM HEPES буфера в присутствии ионов магния (1-10 мM MgCl2), затем следовали промывка и высушивание образцов в эксикаторе. После этого образцы помещали в жидкостную ячейку микроскопа, начинали процесс сканирования, а затем в раствор вводили РНК-полимеразу. Было показано, что образование комплексов белок-ДНК наблюдается уже через несколько секунд после добавления полимеразы, что свидетельствует о сохранении нативной конформации РНК-полимеразы и ДНК в процессе приготовления образцов и проведения исследований. Эти результаты демонстрируют возможность использования зондовой микроскопии для исследования процессов, ответственных за распознавание и сборку макромолекулярных комплексов в физиологических условиях. Большое прикладное значение имеет возможность решения методом АСМ задачи физического картирования ДНК: специфические участки макромолекулы помечаются определенными маркерами, анализ местоположения этих маркеров на получаемых АСМ-изображениях позволяет составлять карты относительного расположения специфических последовательностей нуклеотидов. Так, в работе [9] продемонстрирована возможность визуализации местоположения биотина, ковалентно привязанного к первому нуклеотиду праймера. Биотин помечался белковым комплексом стрептавидин-стафиллококковый белок А (стрептавидин имеет высокую способность связывания с биотином, а белок А увеличивает размеры маркера для однозначной его идентификации на АСМ-изображениях).

В работах [34,35] был использован метод картирования клонированных в плазмидный вектор последовательностей LTR (длинные концевые повторы) с помощью специфических маркеров, имеющих характерную форму - R-петель. R-петли формировались последовательностями РНК из 345 и 380 нуклеотидных оснований, комплементарными к U3 и U5 областям LTR человеческого эндогенного ретровируса K-10 (HERV-K10). В процессе образования петли РНК формировала двойную спираль с комплементарным участком ДНК, вытесняя вторую нить ДНК, которая коллапсировала в результате воздействия ионов Mg 2+; характерная форма образованной структуры (петля) позволяла уверенной идентифицировать ее на АСМ-изображениях. Различная длина зондов позволяла уже из одной гистограммы определить как положение, так и ориентацию LTR. Полученные результаты позволяют предположить, что в будущем разрешение приборов СЗМ может быть достаточным для определения последовательности нуклеотидов ДНК.

Уникальную возможность зондового микроскопа как прибора, позволяющего проводить прецизионные исследования локальных свойств поверхности, продемонстрировали авторы работы [36]. Они проводили прямые исследования силового взаимодействия, ответственного за формирование витков молекулы ДНК, по следующей схеме.

На поверхностях подложки и кремниевого микрозонда создавали два типа покрытия, представляющего собой слой ковалентно привязанных за один из концов комплементарных олигомеров - в одном случае (АЦТГ)5, в другом (ЦАГТ)5. В процессе взаимодействия пары данных олигонуклеотидов (длиной в 20 нуклеотидов) возможно образование комплексов с 20, 16, 12, 8 и 4 парами взаимодействующих оснований.

В ходе эксперимента многократно измеряли кривую силового взаимодействия F(z) между зондом и подложкой. На основании этих результатов определяли силу адгезии и строили гистограммы ее распределения. В случае отсутствия специфического взаимодействия между комплементарными участками наблюдалось бы однородное гауссово распределение для силы адгезии. Однако на полученных гистограммах четко прослеживались отдельные пики (1,52±0,19; 1,1±0,13; 0,83±0,11 нН), отображающие, очевидно, специфическое взаимодействие 20, 16 и 12 пар комплементарных оснований (авторы указывают, что комплексы с 8 и 4 взаимодействующими парами оснований термодинамически нестабильны при 27°С - температуре проведения исследований).

Сходную экспериментальную схему - с образованием между взаимодействующими поверхностями ``мостиков'' в виде отдельных нитей ДНК длиной в 160 оснований - использовали для анализа внутримолекулярных упругих свойств. Таким образом, авторам удалось продемонстрировать возможность применения АСМ для прямого количественного анализа межмолекулярного и внутримолекулярного взаимодействия в комплексах биологических и синтетических макромолекул, что открывает новые перспективы для обнаружения и локализации специфических последовательностей нуклеотидов с ангстремным разрешением.

7 Заключение

В результате изучения цитируемых в этом обзоре литературных источников установлены приоритетные требования, которые должны обеспечивать методы выделения ДНК или РНК:

– лизис биологического материала;

– селективную экстракцию (сорбцию);

– концентрирование из больших объемов;

– отделение компонентов, которые ингибируют ПЦР;

– разделение ДНК и РНК; – высокий процент выхода;

– возможность калибровки и положительного контроля;

– отсутствие контаминации; – малые временные затраты;

– возможность автоматизации.

Некоторые автоматизированные приборы с использованием магнитных частиц уже применяются для подготовки образцов в лабораториях. В Институте аналитического приборостроения РАН разработан макет автоматического прибора для выделения ДНК. Метод, положенный в основу данного устройства, получил условное название метода магнитной ротации. Сепарация частиц из раствора осуществляется на намагниченных стержнях, опущенных в раствор. Отделение магнитных частиц с сорбированными на их поверхности нуклеиновыми кислотами происходит после помещения стержней в реакционную смесь и их намагничивания. Перенос магнитных частиц в пробирку со следующим по протоколу реагентом или раствором осуществляется намагниченными стержнями. После помещения стержней в соответствующую жидкость и размагничивания их вращают для равномерного перемешивания суспензии магнитных частиц и прочих компонентов. Подобный принцип построения устройства позволяет достичь высокого качества очистки и не допустить загрязнения предыдущим промывочным раствором следующего раствора. Результаты испытаний макета автоматического прибора для выделения ДНК количественно оценены при помощи известного серийного анализатора нуклеиновых кислот АНК-32 [29].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

G. Travaglini, H. Rohrer, M. Amrein, and H. Gross, Scanning tunneling microscopy on biological matter // Surf. Sci., -1987, - v. 181, - pp. 380-390.

D. D. Dunlap and C. Bustamante, Images of single-stranded nucleic acids by scanning tunneling microscopy // Nature, -1989, - v. 342, - pp. 204-206.

C. R. Clemmer and T. P. Beebe, Graphite: A mimic for DNA and other biomolecules in scanning tunneling microscopes studies // Science, -1991, - v. 251, - pp. 640-642.

W. M. Heckl and G. Binnig, Domain walls on graphite mimic DNA // Ultramicroscopy, -1992, - v. 42-44, - pp. 1073-1078.

C. Bustamante, J. Vesenka, C. L. Tang, W. Rees, M. Guthod, and R. Keller, Circular DNA molecules imaged in air by scanning force microscopy // Biochemistry, -1992, - v. 31, - pp. 22-26.

J. Vesenka, M. Guthod, C. L. Tang, R. Keller, E. Delaine, and C. Bustamante, Substrate preparation for reliable imaging of DNA molecules with the scanning force microscope // Ultramicroscopy, -1992, - v. 42-44, - pp. 1243-1249.

T. Thundat, D. P. Allison, R. J. Warmack, G. M. Brown, K. B. Jacobson, J. J. Schrick, and T. L. Ferrell, Atomic force microscopy of DNA on mica and chemically modified mica // Scanning Microscopy, -1992, - v. 6, - No 4, - pp. 911-918.

N. H. Thomson, S. Kasas, B. Smith, H. G. Hansma, and P. K. Hansma, Reversible binding of DNA to mica for AFM imaging // Langmuir, -1996, - v. 12, - No 24, - pp. 5905-5908.Basic DNA and RNA Protocols, Methods in Molecular Biology. V. 58 / Harwood A.J. (editor). New Jersey: Humana Press, Totowa, 1994. P. 3–7.

M. N. Murray, H. G. Hansma, M. Bezanilla, T. Sano, D. F. Ogletree, W. Kolbe, C. L. Smith, C. R. Cantor, S. Spengler, P. K. Hansma, and M. Salmeron, Atomic force microscopy of biochemically tagged DNA // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, -1993, - v. 90, - pp. 3811-3814.

J. Hu, M. Wang, H.-U. G. Weier, P. Frantz, W. Kolbe, D. F. Ogletree, and M. Salmeron, Imaging of single extended DNA molecules on flat (aminopropyl)triethoxysilane-mica by atomic force microscopy // Langmuir, -1996, - v. 12, - No 7, - pp. 1697-1700.

Y. L. Lyubchenko, A. A. Gall, L. S. Shlyakhtenko, R. E. Harrington, B. L. Jacobs, P. I. Oden, and S. M. Lindsay, Atomic force microscopy imaging of double stranded DNA and RNA // Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, -1992, - v. 10, - No 3, - pp. 589-606.

Y. L. Lyubchenko, B. L. Jacobs, and S. M. Lindsay, Atomic force microscopy of reovirus dsRNA: a routine technique for length measurements // Nucleic Acids Research, -1992, - v. 20, - No 15, - pp. 3983-3986.

Y. Lyubchenko, L. Schlyakhtenko, R. Harrington, and P. Oden, Atomic force microscopy of long DNA: imaging in air and under water // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, -1993, - v. 90, - pp. 2137-2140.

В. В. Прохоров, Д. В. Клинов, Е. В. Юркова, В. В. Демин, Исследование возможностей атомно-силовой микроскопии при картировании ДНК // Материалы 16-ой Российской конференции по электронной микроскопии, -1996, - сс. 227.

H. G. Hansma, J. Vesenka, C. Siegerist, G. Kelderman, H. Morrett, P. L. Sinsheimer, V. Elings, C. Bustamante, and P. K. Hansma, Reproducible imaging and dissection of plasmid DNA under liquid with atomic force microscopy // Science, -1992, - v. 256, - pp. 1180-1184.

J. Yang and Z. Shao, The effect of probe force on the resolution of atomic force microscopy of DNA // Ultramicroscopy, -1993, - v. 50, - pp. 157-170.

Q. Zhong, D. Inniss, K. Kjoller, and V. B. Elings, Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy // Surf. Sci. Lett., -1993, - v. 290, - pp. L688- L692.

P. K. Hansma, J. P. Cleveland, M. Radmacher, D. A. Walters, P. E. Hillner, M. Bezanilla, M. Fritz, D. Vie, H. G. Hansma, C. B. Prater, J. Massie, L. Fukunaga, J. Gurley, and V. Elings, Tapping mode atomic force microscopy in liquids // Apll. Phys. Lett., -1994, - v. 64, - pp. 1738-1740.

H. G. Hansma, D. E. Laney, M. Bezanilla, R. L. Sinsheimer, and P. K. Hansma, Application for atomic force microscope of DNA // Biophisical Journal, -1995, - v. 68, - pp. 1672-1677.

A. K. Kleinschmidt and R. K. Zahn, Uber desoxyribonucleinsaure-molekulen in protein mischfilmen // Zeitschrift fur Naturforschung, -1959, - v. 14b, - pp. 770-779.

A. K. Kleinschmidt, Monolayer techniques in electron microscopy of nucleic acids molecules, - v. XII of Methods in Enzymology. - New York: Academic Press, 1968.

J. Yang, K. Takeyasu, and Z. Shao, Atomic force microscopy of DNA molecules // FEBS Lett., -1992, - v. 301, - pp. 173-176.

A. Schaper, L. I. Pietrasanta, and T. M. Jovin, Scanning force microscopy of circular and linear plasmid DNA spread on mica with a quaternary ammonium salt // Nucleic Acids Res., -1993, - v. 21, - No 25, - pp. 6004-6009.

F. Jelen, V. Vetterl, A. Schaper, T. Jovin, and E. Palacek, Two-dimensional condensation of benzalkonium chloride at the mercury electrode and its relation to DNA imaging using scanning force microscopy // J. Electroanal. Chem., -1994, - v. 377, - pp. 197–203.

A. Schaper, J. P. P. Starink, and T. M. Jovin, The scanning force microscopy of DNA in air and in n- propanol using new spreading agents // FEBS Letters, -1994, - v. 355, - pp. 91-95.

H. Butt, T. Muller, and H. Gross, Immobilized biomolecules for scanning force microscopy by embedding in carbon // Journal of Structural Biology, -1993, - v. 110, - pp. 127-132.

L. A. Bottomley, J. N. Haseltine, D. P. Allison, R. J. Warmack, T. Thundat, R. A. Sachlebe, G. M. Brown, R. P. Woychik, K. B. Jacobson, and T. L. Ferrell, Scanning tunneling microscopy of DNA: The chemical modification of gold surfaces for immobilization of DNA // J. Vac. Sci. Technol. A, -1992, - v. 10, - No 4, - pp. 591-595.

D. P. Allison, T. Thundat, K. B. Jacobson, L. A. Bottomley, and R. J. Warmack, Imaging entire genetically functional DNA molecules with the scanning tunneling microscope // J. Vac. Sci. Technol A, -1993, - v. 11, - No 4, - pp. 816-819.

D. Dunlap, Scanning tunneling microscopy of DNA // IEEE engenering in medecine and biology, -1996, - v. 15, - No 1, - pp. 46-50.

R. Guckenberger, M. Heim, G. Cevc, H. F. Knapp, W. Wiegrabe, and A. Hillebrand, Scanning tunneling microscopy of insulators and biological specimens based on lateral conductivity of ultrathin water films // Science, -1994, - v. 266, - pp. 1538-1540.

H. G. Hansma, K. A. Browne, M. Bezanilla, and T. C. Bruice, Bending and staightening of DNA induced by the same ligand: characterization with the atomic force microscope // Biochemistry, -1994, - v. 33, - pp. 8436-8441.

W. A. Rees, R. W. Keller, J. P. Vesenka, G. Yang, and C. Bustamante, Evidence of DNA bending in transcription complexes imaged by scanning force microscopy // Science, -1993, - v. 260, - pp. 1646-1649.

M. Guthold, M. Bezanilla, D. A. Erie, B. Jenkins, H. G. Hansma, and C. Bustamante, Following the assembly of RNA polymerase-DNA complexes in aqueous solutions with the scanning force microscope // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, -1994, - v. 91, - No 26, - pp. 12927-12931.

Д. В. Клинов, Исследование биополимеров методами сканирующей зондовой микроскопии. Автореф. дис. ... канд. физ.-мат. наук, МФТИ, -М., 1997. -20 с.

D. V. Klinov, I. V. Lagutina, V. V. Prokhorov, T. Neretina, P. P. Khil, Y. B. Lebedev, D. I. Cherny, V. V. Demin, and E. D. Sverdlov, High resolution mapping DNAs by R-loop atomic force microscopy // Nucleic Acids Research, -1998, - v. 26, - No 20, - pp. 4603-4610.

G. U. Lee, L. A. Chrisey, and R. J. Colton, Direct measurements of the forces between complementary strands of DNA // Science, -1994, - v. 266, - pp. 771–773.

Klintschar M., Neuhuber F. Evaluation of an Alkaline Lysis Method for the Extraction of DNA from Whole Blood and Forensic Stains for STR Analysis // Forensic Sci. 2000. V. 45. P. 669–673.

Moss D., Harbison S.A., Saul D.J. An Easily Auto-mated, Closed-Tube Forensic DNA Extraction Pro-cedure Using a Thermostable Proteinase // Int. J. Legal Med. 2003. V. 117. P. 340–349.

Wilcockson J. The Use of Sodium Perchlorate in Deproteinization During the Preparation of Nucleic Acids // Biochem. J. 1973. V. 135. P. 559–561.

Bowtell D.D. Rapid Isolation of Eukaryotic DNA // Anal. Biochem. 1987. V. 162. P. 463–465.

Graham D.E. The Isolation of High Molecular Weight DNA from Whole Organisms or Large Tis-sue Masses // Anal. Biochem. 1978. V. 85, N 2. 609–613.

Breadmore M.C., Wolfe K.A., Arcibal I.G., et al. Microchip-Based Purification of DNA from Biological Samples // Anal. Chem. 2003. V. 75. P. 1880– 1886.

Teeters M.A., Conrardy S.E., Thomas B.L., et al. Adsorptive Membrane Chromatography for Purification of Plasmid DNA // J. Chromatogr. A. 2003. 989. P. 165–173.

Boom R., Sol C.J., Salimans M.M., et al. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids // Clin. Microbiol. 1990. V. 28. P. 495–503.

Walsh P.S., Metzger D.A., Higuchi R. Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic material // Biotechniques. 1991. V. 10, N 4. P. 506–513.

Coombs L.M., Pigott D., Proctor A., et al. Simultaneous Isolation of DNA, RNA and Antigenic Protein Exhibiting Kinase Activity from Small Tumour Samples Using Guanidine Isothiocyanate // Anal. Biochem. 1990. V. 188. P. 338–343.

Chirgwin J.M., Przybyla A.E., MacDonald R.J., Rutter W.J. Isolation of Biologically Active Ribonucleic Acid from Sources Enriched in Ribonuclease // Biochemistry. 1979. V. 18. P. 5294–5299.

Zarlenga D.S., Gamble H.R. Simultaneous Isolatton of Preparative Amounts of RNA and DNA from Tri-chinella Spirahsby Cesium Trifluoroacetate Isopycnic Centrifugation // Anal. Blochem. 1987. V. 162. 569–574.

Meese E., Blin N. Simultaneous Isolation of High Molecular Weight RNA and DNA from Limited Amounts of Tissues and Cells // Gene Anal. Tech. 1987. V. 4. P. 4549.

Raha S., Merante F., Proteau G., Reed J.K. Simultaneous Isolation of Total Cellular RNA and DNA from Tissue Culture Cells Using Phenol and Lithium Chloride // Gene Anal. Tech. 1990. V. 7. P. 173– 177.

Wallace D.M. Large and Small Scale Phenol Extractions // Methods in Enzymology. Guide to Molecular Cloning Techniques. V. 152 / Eds. Berger S.L. and Kimmel A.R. FL, Orlando: Academic, 1987. P. 33– 41.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd ed. NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

Krieg P., Amtmann E., Sauer G. The Simultaneous Extraction of Highmolecular-Weight DNA and of RNA from Sohd Tumours // Anal. Biochem. 1983. 134. P. 288–294.

Demeke T., Adams R.P. The Effects of Plant Polysaccharides and Buffer Additives on PCR // Biotechniques. 1992. V. 12. P. 332–334.

Hoorfar J., Cook N., Malorny B., et al. Making Internal Amplification Control Mandatory for Diagnostic PCR // J. Clin. Microbiol. 2003. V. 41. 5835.

Suffys Ph., Vanderborght P.R., Barros dos Santos P., et al. Inhibition of the Polymerase Chain Reaction by Sputum Samples from Tuberculosis Patients after Processing Using a Silicaguanidinium-thiocyanate DNA Isolation Procedure // Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2001. V. 96, N 8. P. 1137–1139.

Stadler J., Lemmens R., Nyhammar T. Plasmid DNA Purification // J. Gene Med. 2004. V. 6. P. S54–S66.

Birnboim H.C., Doly J.A. Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA // Nucleic Acid. Res. 1979. V. 7. P. 1513– 1523.

Birnboim H.C. A Rapid Alkaline Extraction Method for the Isolation of Plasmid DNA // Methods Enzymol. 1983. V. 100. P. 243–255.

Chiang C.-L., Sung C.-S., Wu T.-F., et al. Applica-tion of Superparamagnetic Nanoparticles in Purification of Plasmid DNA from Bacterial Cells // J. Chromatogr. B. 2005. V. 822. P. 54–60.

Satokari R.M., Kataja K., Soderlund H. Multiplexed Quantification of Bacterial 16S rRNA by Solution Hybridization with Oligonucleotide Probes and Affinity Capture // Microb. Ecol. 2005. V. 50. Р. 120– 127.

Berensmeier S. Magnetic Particles for the Separation and Purification of Nucleic Acids // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. V. 73. P. 495–504.

Jacobsen N., Nielsen P.S., Jeffares D.C., et al. Di-rect Isolation of Poly(A)(+) RNA from 4 M Guanidine Thiocyanate-Lysed Cell Extracts Using Locked Nucleic Acid-Oligo(T) Capture // Nucleic Acids Res. 2004. V. 32. P. e64.

Алексеев Я.И., Белов Ю.В., Варламов Д.А. и др. Приборы для диагностики биологических объектов на основе метода полимеразной цепной ре-акции в реальном времени (ПЦР-РВ) // Научное приборостроение. 2006. Т. 16, № 3. C. 132–136.

Ичас М. Биологический код. М., 1971

Шабарова З.А., Богданов А.А. Химия нуклеиновых кислот и их компонентов, М., 1978

Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. М., 1987

Для подготовки данной работы были использованы материалы с сайта http://bio.freehostia.com

Н. Грин, У. Стаут, Д. Тейлор – Биология.

З.А. Шабарова и А.А. богданов – Химия нуклеиновых кислот и их полимеров.

А.П. Пехов – Биология и общая гинетика.

А. Микельсон – Химия нуклеозидов и нуклеотидов.

Ванюшин Б. Ф. Глава 23. Молекулярная биология // История биологии с начала XX века до наших дней. М.: Наука. 1975. с. 454

Chargaff, E., R. Lipshitz, C. Green and M. E. Hodes The composition of the deoxyribonucleic acid of salmon sperm Journal of Biological Chemistry (1951) Vol. 192. p. 223-230.

6.3 Амплификация нуклеиновых кислот

Процесс амплификации основан на многократном увеличении числа копий фрагмента нуклеиновых кислот (ДНК/(кДНК)/РНК) или усилении сигнала в условиях in vitro, что позволяет обнаружить специфичный участок генома возбудителя с целью его идентификации.

6.3.1 Методы амплификации нуклеиновых кислот

Методы амплификации нуклеиновых кислот: полимеразная цепная реакция (ПЦР), лигазная цепная реакция (ЛЦР), амплификация с удалением (вытеснением) цепи (SDA), транскрипционно-опосредованная амплификация (TMA), реакция амплификации на основе нуклеотидной последовательности нуклеиновых кислот (NASBA), реакция изотермальной транскрипционной амплификации (TAS), самоподдерживающаяся реакция репликации последовательностей (SSSR или 3SR), амплификация с использованием QB-репликазы, амплификации по типу катящегося кольца (RCA) и т.д.

Методы амплификации сигнала: сигнальная амплификация или метод "разветвленной" ДНК (bDNA assay), прямой гибридизационный анализ на основе РНК/ДНК-зондов и т.д.

Разновидности полимеразной цепной реакции: с "горячим" стартом (hot-start PCR), мультиплексная (мультипраймерная), гнездовая ("вложенная", nested PCR), "инвертированная", ассиметричная, метод молекулярных колоний, длинных фрагментов (Long-range PCR), с быстрой амплификацией концов кДНК (RACE-PCR), универсальная (broad-range PCR), с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР, RT-PCR), иммуно-ПЦР (immuno-PCR-IPCR), в режиме "реального времени" (Real-Time PCR), анализ "по конечной точке" (End-point PCR) и т.д.

6.3.2 Форматы амплификации нуклеиновых кислот в режиме "реального времени":

- с применением интеркалирующих флуоресцентных красителей;

- использование меченых флуоресцентными красителями олигонуклеотидных зондов, комплементарных участку ампликона (гибридизационно-флуоресцентная детекция), работающих по принципу: гидролиза зондов (линейно разрушаемые зонды (TaqMan)), зондов с инвертированным концевым повтором (молекулярные "маячки", molecular beacons), праймер-зондов ("скорпионы", Scorpions), гибридизации зондов (с резонансным переносом энергии (FRET-технология)), "амплифлюр" (Amplifluor)-технологии и т.д.

Методы исследования, использующие продукты амплификации нуклеиновых кислот: секвенирование, ДНК-чипы, рестрикционный анализ.

Методы детекции продуктов амплификации нуклеиновых кислот:

- электрофоретический (в агарозном или полиакриламидном геле);

- гибридизационно-ферментный;

- гибридизационно-флуоресцентный (детекция продукта в режиме "реального времени" или регистрация продукта после окончания реакции амплификации ("анализ по конечной точке")).

Форматы исследования: качественный, количественный.

6.3.3 Методы амплификации нуклеиновых кислот микроорганизмов I - IV групп

Методы амплификации нуклеиновых кислот микроорганизмов I - IV групп патогенности используют:

- как метод экспресс-диагностики при исследовании биологического материала, взятого от человека, с целью выявления ДНК (РНК) микроорганизмов I - IV групп патогенности и их количественной оценки;

- как метод специфической индикации патогенных биологических агентов в объектах окружающей среды и пищевых продуктах;

- как ускоренный предварительный тест при выполнении культурального и биологического методов исследования и для идентификации культур;

- для определения эпидемиологической значимости изолятов на основании выявления генетических маркеров вирулентности и патогенности, антибиотикоустойчивости;

- для таксономической характеристики штаммов на основании выявления специфических видовых, родовых и других маркеров;

- для генотипирования штаммов с целью определения их происхождения;

- для прогнозирования течения инфекционного заболевания и оценки эффективности проводимой терапии.

Основные характеристики наборов реагентов, используемых для проведения амплификации нуклеиновых кислот микроорганизмов I - IV групп патогенности: аналитическая чувствительность, аналитическая специфичность, диагностическая чувствительность, диагностическая специфичность, воспроизводимость.

По результатам анализа выдают ответ о наличии (качественный или количественный анализ) в пробе специфических фрагментов ДНК или РНК, имеющих гомологию с определенным участком генома возбудителя инфекционного заболевания, а также о наличии в исследуемом материале генетических маркеров или генетически модифицированных ДНК.

6.4 Метод количественного анализа нуклеиновых кислот

Количественный анализ нуклеиновых кислот — определение концентрации ДНК или РНК в смеси или чистом препарате. Реакции с участием нуклеиновых кислот часто требуют точных сведений о количестве и чистоте препарата. Для определения концентрации нуклеиновой кислоты в растворе используют спектрофотометрический метод и УФ-флюоресценцию, если нуклеиновая кислота содержит краситель.

6.5 Сканирующая зондовая микроскопия нуклеиновых кислот

Среди множества биологических объектов, к исследованию которых применялись методы зондовой микроскопии, первой была молекула дезоксирибонуклеиновой кислоты. Однако на начальном этапе этих исследований отмечались сложности в интерпретации получаемых изображений. Так, авторы работ [1,2] представили данные сканирующей туннельной микроскопии молекул ДНК, адсорбированных на подложку из высокоориентированного пиролитического графита (пирографита). Выбор данного материала в качестве подложки был обусловлен его проводящими свойствами, а также простотой приготовления атомарно гладких участков поверхности значительной площади. На СТМ-изображениях наблюдались протяженные цепочки, обладающие продольной периодичностью (период около 2-3 нм), на основании чего авторы делали вывод о визуализации витков двойной спирали.