

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«НОВОСИБИРСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ».

Физический факультет

Кафедра общей физики

Гладышева Анастасия Андреевна

КУРСОВАЯ РАБОТА

«Изучение различных методов разделения биополимеров в  
электрическом поле»

Электромагнитный практикум, 2 курс, группа №18312

**Научный руководитель:**

к.б.н. Терновой В. А.

Оценка научного руководителя

\_\_\_\_\_

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

**Преподаватель практикума**

к.ф.-м.н. Чуркин Д. С.

Оценка преподавателя практикума

\_\_\_\_\_

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

**Куратор практикума:**

\_\_\_\_\_

Итоговая оценка

к.т.н. Астрелин В.Т.

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

Новосибирск, 2019

## **Аннотация**

Целью работы являлось ознакомление с различными методами проведения электрофореза и идентификация наличия генетического материала вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) в предложенных образцах. Для достижения поставленной цели была произведена наработка биоматериалов с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), проведено разделение биополимеров в электрофорезе, используя агарозный и полиакриламидный гели. Были получены характерные изображения, на основе которых было сделано заключение о наличии или отсутствии (ВКЭ) в предложенных образцах. Также было сделано сравнение методов электрофореза, используемых в данной работе.

Ключевые слова: электрофорез, ПЦР, ВКЭ.

Работа выполнена в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

1. Введение.....	4
2. Теоретическая часть.....	5
2.1 Электрофорез.....	5
2.2 Полимеразная цепная реакция.....	7
3. Экспериментальная часть.....	8
3.1 Описание установки .....	8
4. Материалы и методы исследования .....	9
4.1 Полимеразная цепная реакция.....	9
4.2 Электрофорез.....	10
5. Результаты.....	11
6. Обсуждение результатов .....	12
7. Заключение .....	12
8. Список литературы .....	13

## 1. Введение

В настоящее время электрофорез занимает центральное место среди методов исследования белков и нуклеиновых кислот. С помощью электрофореза возможно проводить разделение макромолекул, различающихся по таким параметрам, как размеры или молекулярная масса, электрический заряд и пространственная конфигурация.

Электрофорез позволяет визуализировать результаты, полученные в ходе работы, что способствует более эффективному и быстрому проведению необходимых исследований.

В данной работе мы провели сравнение различных методов разделения биополимеров в электрическом поле. Выбор метода был основан на точности и разрешении, которые необходимо было получить.

Для анализа был взят генетический материал вируса клещевого энцефалита (ВКЭ). Клещевой энцефалит является одной из самых распространенных и опасных природно-очаговых инфекций лесной и лесостепной зоны. Основными переносчиками ВКЭ являются иксодовые клещи. Укус клеща вызывает заболевание, сопровождающееся лихорадкой и поражением центральной нервной системы. Уровень смертности достигает 9%. Поэтому идентификация и изучение ВКЭ на территории НСО является особо актуальной задачей.

Цель работы: ознакомление с различными методами проведения электрофореза и идентификация наличия генетического материала ВКЭ в предложенных образцах.

### Задачи:

- Нарботать необходимое количество фрагментов комплементарной ДНК (кДНК) ВКЭ методом полимеразной цепной реакции (ПЦР);
- Произвести идентификацию наличия генетического материала ВКЭ, используя различные методы электрофореза;
- Произвести анализ и сравнение полученных результатов

## **2. Теоретическая часть**

### **2.1 Электрофорез**

Электрофорез — это электрокинетическое явление перемещения частиц дисперсной фазы (коллоидных или белковых растворов) в жидкой или газообразной среде под действием внешнего электрического поля. Впервые был предложен профессорами Московского университета П. И. Страховым и Ф. Ф. Рейссом в 1809 году.

Размеры нуклеотидных цепочек могут варьироваться в достаточно широких пределах: от десятков нуклеотидных звеньев до нескольких сотен тысяч. Для разделения ДНК могут использоваться различные гели, например, агарозный или полиакриламидный гель (линейный или не линейный) в зависимости от точности, которую необходимо получить. Агарозный гель — это гель, в основе которого лежит агароза - получаемый из агара линейный полисахарид. Полиакриламидный гель — это гель, образуемый в результате полимеризации мономерных молекул акриламида.

В практике также используются агарозный гель различной концентрации. Выбор концентрации агарозы в геле зависит от того, насколько большие фрагменты будут исследоваться. Чем больше процент геля, тем меньшие фрагменты можно исследовать.

В основе гель-электрофореза лежит простая схема, представленная на рис.1. Отрицательно заряженные частицы двигаются от отрицательно заряженного катода к положительно заряженному аноду под действием силы электрического поля. Гель, в котором двигаются частицы, действует как обыкновенное сито и разделяет частицы по размеру. Скорость перемещения частиц в электрическом поле будет зависеть от силы самого поля, размера и формы исследуемых частиц, а также от температуры буфера, в котором движутся частицы [1].

Время проведения электрофореза определяется для каждого метода отдельно. Для электрофореза в агорозном геле 0.5 ч, для электрофореза в полиакриламидном геле 1 ч.

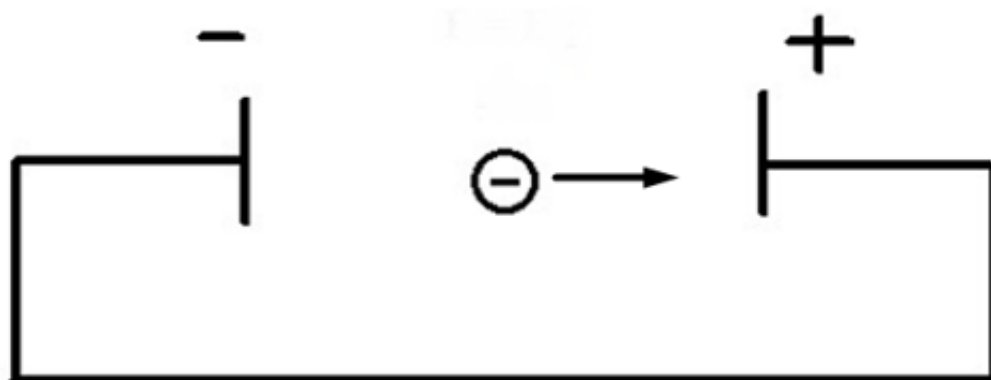


Рис. 1. Схема, лежащая в основе метода гель-электрофореза

Процесс электрофореза можно описать, используя простые рассуждения.

Если приложить к электродам напряжение, то по формуле (1) можно будет определить градиент потенциала  $E$ :

$$E = \frac{U}{d} \quad (1),$$

где  $U$  – прилагаемое напряжение, измеряемое в вольтах;  $d$  – расстояние между электродами в сантиметрах.

Сила, с которой поле действует на частицы, выражается формулой (2):

$$F = Eq \quad (2),$$

где  $q$  - заряд частицы, измеряемый в кулонах. Эта сила и перемещает частицу между электродами, измеряется в ньютонах.

При расчетах также необходимо учесть наличие силы трения, которая препятствует движению частиц. Эта сила будет зависеть от гидродинамического размера частиц, формы, размера пор среды и вязкости буфера, в котором происходит электрофорез.

Скорость  $V$  заряженной молекулы в электрическом поле зависит от градиента потенциала, заряда частицы и силы трения и может быть выражена формулой (3):

$$V = \frac{Eq}{k} \quad (3),$$

где  $k$  – коэффициент трения.

## 2.2 Полимеразная цепная реакция

Для проведения электрофореза необходимо иметь достаточное количество биологического материала. Для этого проводится полимеразная цепная реакция (ПЦР). Сначала проводится денатурация ДНК, т.е. разрушение водородных связей для получения отдельных нитей. Для этого двунитевую ДНК нагревают до  $95^{\circ}\text{C}$ . Когда цепи разошлись, температуру понижают до  $50\text{-}60^{\circ}\text{C}$ , чтобы праймеры могли присоединиться к одноцепочной матрице. Эта стадия называется отжигом.

Праймеры – это олигонуклеотиды, комплементарные необходимому для исследования участку ДНК или РНК. Они служат так называемой затравкой для синтеза ДНК, потому что работа ДНК – полимеразы основана на присоединение к уже имеющемуся 3'-концу (гидроксильной группы) праймера, комплементарного матричной цепи.

Следующая стадия называется элонгацией, во время которой ДНК – полимеразы реплицирует матричную цепь.

Данная реакция проводится с использованием специального прибора, называемого амплификатором. С помощью программного обеспечения задается количество циклов, состоящих из описанных выше стадий, и температурный режим, для получения необходимого количества биоматериалов. На рис.2. приведена наглядная схема ПЦР [2].

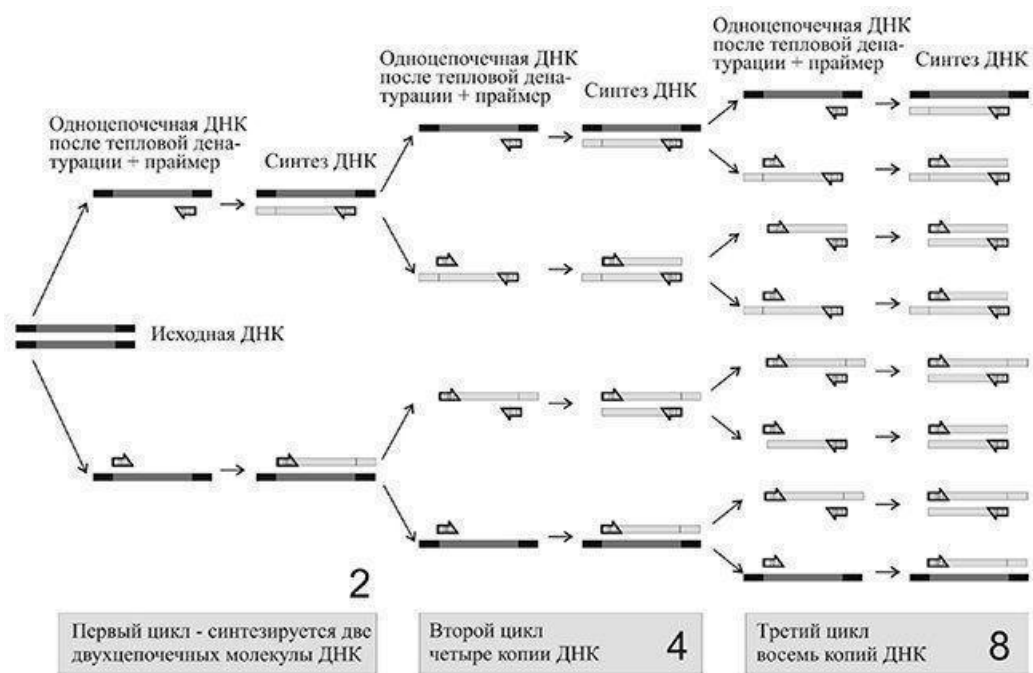


Рис.2. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

### 3. Экспериментальная часть

#### 3.1 Описание установки

Схема для проведения электрофореза представлена на рис.3. Два электрода находятся на противоположных концах резервуара для проведения электрофореза ниже уровня горизонтальной подложки, на которую помещается гель. Гель кладут на подложку лунками кверху, в эти лунки помещаются образцы, смешанные со специальным красителем: бромфеноловым синим, чтобы потом под ультрафиолетовыми лучами можно было увидеть куда сместились фрагменты ДНК.

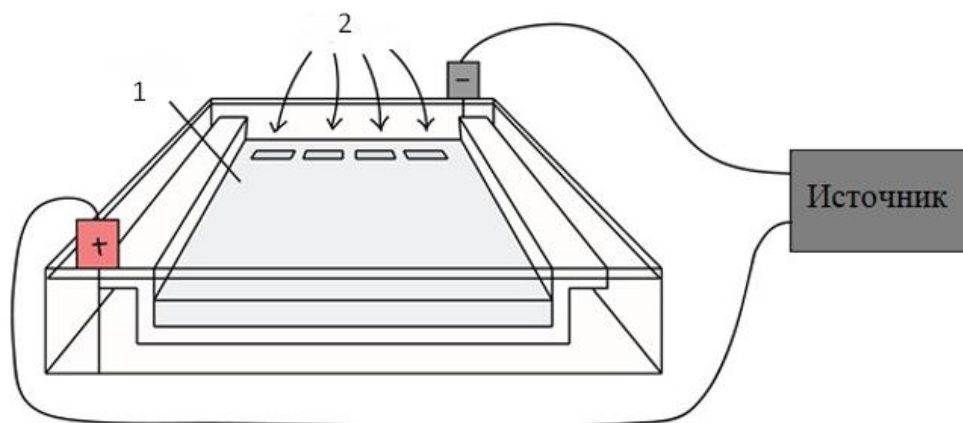


Рис.3. Схема гель-электрофореза. 1-гель; 2-лунки



По мере движения фрагментов ДНК, будет происходить своеобразная фильтрация. Более короткие фрагменты будут проходить через гель быстрее, чем длинные, поэтому если посмотреть на гель, в котором двигались фрагменты, через некоторое время, то можно увидеть их распределение по длине. Короткие сместятся ближе к аноду, а длинные останутся недалеко от лунок, в которые помещали образцы (рис.4.).



Рис.4. Разделение фрагментов по размеру

## 4. Материалы и методы исследования

### 4.1 Полимеразная цепная реакция

Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием авторского набора праймеров. Реакцию проводили в 12,5 мкл; пробирки содержали по 1 мкл материала кДНК ВКЭ, 1 мкл праймеров, 6,5 мкл ПЦР смеси «Био-Мастер LR HS» и 4 мкл деионизованной воды. Образцы помещали в амплификатор согласно программе:

95°C	2 мин	} Количество циклов 40
94°C	10 сек	
55°C	15 сек	
72°C	40 сек	
72°C	7 мин	

## 4.2 Электрофорез

Для дальнейшей идентификации кДНК ВКЭ использовали несколько методов электрофореза. Их особенность заключалась в использовании разных гелей, обеспечивающих электроподвижность фрагментов ДНК. При проведении электрофореза в агарозном и полиакриламидном гелях было установлено оптимальное для методов напряжение равное 100В и 200В соответственно, расстояние между электродами 25 см и 10 см соответственно. Схема подготовки гелей приведена ниже.

Электрофорез в агарозном геле:

2% агарозный гель:

- Вода - 150 мл;
- ТАЕ×50 (Трис-ацетатный буфер пятидесяти кратный) – 30 мл;
- Агароза сухая – 3 г;
- Раствор этидия бромистого (концентрированный) – 10мкл.

Электрофорез в полиакриламидном геле:

Полиакриламидный гель:

- Вода - 50 мл;
- ТАЕ×10 - 5 мл;
- 40% Акриламид - 7,5 мл;
- Персульфат аммония - 50 мг;
- ТЕМЕД (тетраметилэтилендиамин) - 50 мл;

Буфер для проведения электрофореза в расчете на 1 литр воды:

- ТАЕ×50 – 20 мл;
- Раствор этидия бромистого (концентрированный) – 30 мкл.

Для разделения кДНК с использованием гель-электрофореза в лунки добавлялось по 7 мкл кДНК и 3 мкл маркера.

## 5. Результаты

Были получены характерные изображения для электрофореза в агарозном геле (рис.5.) и электрофореза в полиакриламидном геле (рис.6.). Длины фрагментов определялись по маркерам и соответствуют расчетным. Напряжённость электрического поля и сила кулоновского притяжения при проведении электрофорезов были определены по формулам (1) и (2) соответственно и составляли  $4 \frac{\text{В}}{\text{см}}$ ;  $12 \times 10^{-6} \text{Н}$  для электрофореза в агарозном геле,  $20 \frac{\text{В}}{\text{см}}$ ;  $6 \times 10^{-3} \text{Н}$

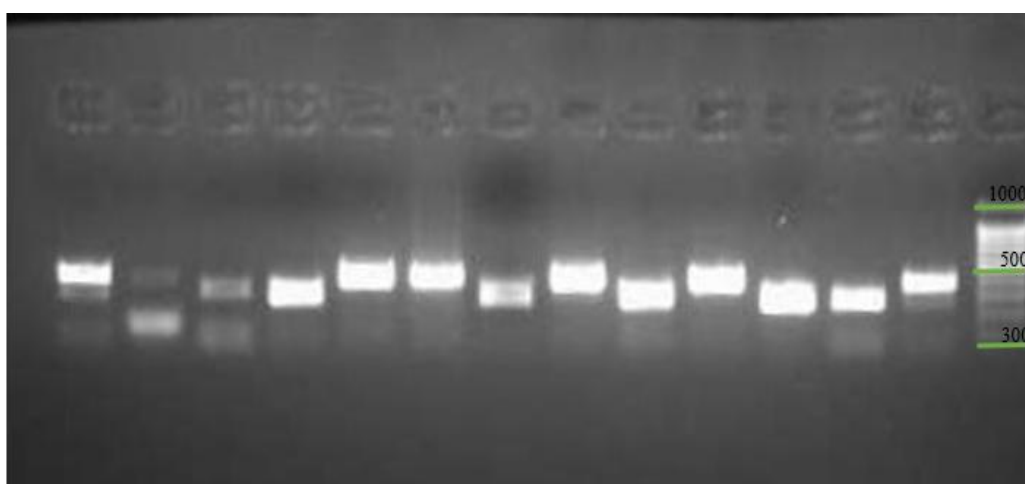


Рис.5. Результаты разделения кДНК ВКЭ методом электрофореза в агарозном геле (2%). Время проведения 0.5 ч

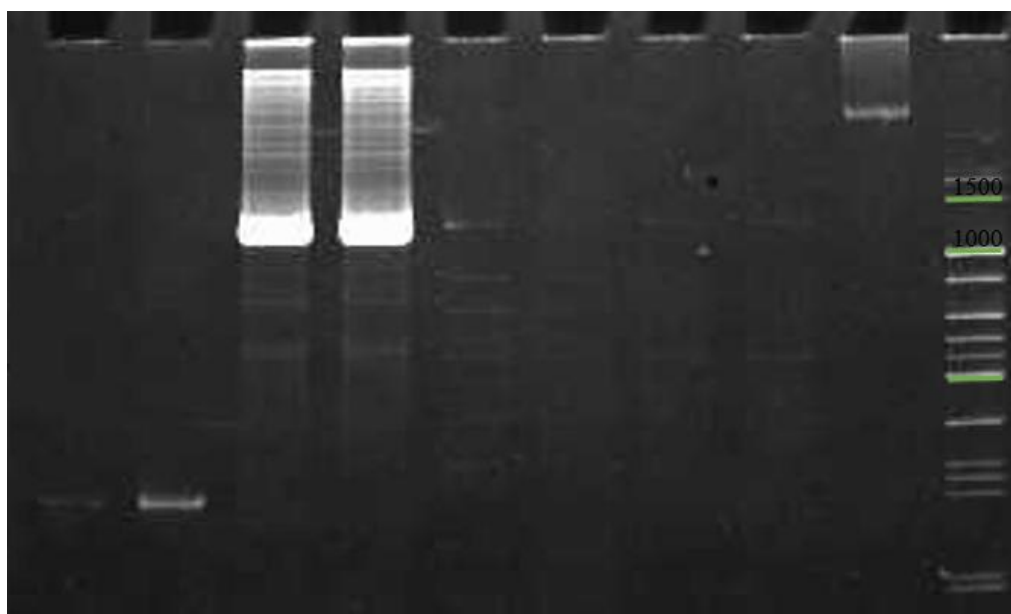


Рис.6. Результаты разделения кДНК ВКЭ методом электрофореза в полиакриламидном геле (6%). Время проведения 1 ч

## **6. Обсуждение результатов**

Справа на изображениях цифрами указана длина кДНК в нуклеотидах. Из литературы известно, что размеры цепочек могут варьироваться в больших пределах. В данной работе ожидаемые размеры для электрофореза в агарозном геле 400-500 нуклеотидов, для электрофореза в полиакриламидном геле 1200. По полученным изображениям видно, что более высокое разрешение дает электрофорез в полиакриламидном геле. Данный метод позволяет работать с более длинными фрагментами поскольку эффективность разделения более высока. Как видно по изображению (рис.6.), в результате работы получилось определить фрагменты ВЭК, длиной 1200 нуклеотидов, что соответствует ожидаемой длине. Если бы мы использовали электрофорез в агарозном геле для данных фрагментов, то столкнулись бы с тем, что наши фрагменты сместились бы от лунок на недостаточное расстояние для получения каких-либо результатов. Это проблема решается уменьшение концентрации агарозного геля (чем меньше концентрация агарозы в геле, тем фрагменты большей длины можно разделить), но при этом появляются сложности с работой с самим гелем. Если же необходимо провести исследование небольших фрагментов и нет необходимости в высоком разрешении, то агарозный гель подходит лучше, так как он проще в приготовление и его можно хранить долгое время после изготовления в отличие от полиакриламидного. Также электрофорез в агарозном геле протекает быстрее, что повышает удобство работы. При проведении электрофореза в агарозном геле (рис.5.) мы получили фрагменты длиной от 400 до 500 нуклеотидов, что также соответствует ожидаемой длине.

## **7. Заключение**

В данной работе было проведено исследование предложенных проб на наличие ВКЭ с помощью различных методов электрофореза. Для этого была произведена наработка необходимого количество биоматериалов, используя метод полимеразной цепной реакции. По изображениям было определено

наличие ВКЭ во всех исследуемых образцах. Также было проведено сравнение методов электрофореза, а именно электрофореза в агарозном геле и электрофореза в полиакриламидном геле, в результате которого были установлены преимущества и недостатки каждого из предложенных методов. Получено хорошее качественное согласование экспериментальных данных с расчетными.

## **8. Список литературы**

1. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). «Наука». Москва, 1981.
2. Ребрикова Д.В. ПЦР в реальном времени. БИНОМ. Лаборатория знаний. Москва, 2009.