

Аннотация

Работа посвящена методу гель – электрофореза, который основан на движении заряженных макромолекул в однородном электрическом поле. При различных нуклеотидных последовательностях коротких фрагментов ДНК в исследуемых образцах меняется способность образцов формировать закрытые самоограниченные комплексы. В результате исследования методом гель - электрофореза, для дорожек с номерами 1, 2 была обнаружена способность формировать длинные цепочки нуклеотидов – конкатамерные комплексы, для образцов в дорожках 3– 17 – закрытые самоограниченные комплексы, в дорожках 18,19 - самоограниченные комплексы с более высокой молекулярностью. Полученные данные необходимы для дальнейшего исследования различных структур нуклеиновых кислот, которое, в свою очередь, может открыть новые перспективы в области создания и применения биологически активных соединений, в том числе биологических агентов на основе нуклеиновых кислот.

Ключевые слова: нуклеиновая кислота, электрофорез, конкатамерный комплекс, электрическое поле.

Оглавление

1. Введение	4
2. Теоретическая часть.....	5
2.1. Электрофорез.....	5
2.2. Типы структур нуклеиновых кислот.....	6
2.3. Закон Бугера – Ламберта – Бера.....	8
3. Экспериментальная часть	8
3.1. Измерение концентрации олигонуклеотидов в растворе.....	8
3.2. Подготовка к электрофорезу.....	9
3.3. Электрофорез.....	11
4. Результаты и обсуждение.....	13

1. Введение

Нуклеиновые кислоты представляют собой высокомолекулярные органические соединения и являются полимерами (длинными макромолекулами, состоящими из мономеров). Они играют огромную роль для живых организмов, по сути являясь «информационными макромолекулами»[1]. Нуклеиновые кислоты участвуют в хранении и реализации генетической информации, а также выполняют регуляторные функции в различных молекулярно – биологических процессах.

Функции нуклеиновых кислот полностью зависят от их молекулярной структуры. Структура нуклеиновых кислот, в свою очередь, бывает первичной, вторичной или третичной (регуляторные функции нуклеиновых кислот определяются вторичной и третичной структурой). Олигонуклеотиды – короткие цепочки нуклеиновых кислот способны формировать различные вторичные и третичные структуры.

Для подробного исследования особенностей и свойств пространственной конфигурации нуклеиновых кислот необходимо сначала качественно изучить распределение молекул по размерам и форме (длине и массе) в исследуемом образце, для чего, среди прочих, используется метод гель – электрофореза. Электрофорез в настоящее время является одним из главных методов исследования белков и нуклеиновых кислот [2]. Он позволяет фракционировать молекулы по физическим параметрам, таким как размер, заряд, структура, пространственная конфигурация.

Целью данной работы является изучение метода гель – электрофореза и качественное исследование распределения молекул в геле.

Исследования структуры данных биополимеров могут открыть новые перспективы в области создания и применения биологически активных соединений, в том числе биологических агентов на основе нуклеиновых кислот.

2. Теоретическая часть

2.1. Электрофорез

Физическая основа электрофореза состоит в следующем. Исследуемые молекулы, находятся в буферном растворе – растворе устойчивым к добавлению небольших количеств сильного основания или сильной кислоты - и обладают некоторым суммарным зарядом, который не зависит от кислотности среды. При пропускании электрического тока через раствор, помещенный в изолирующий материал, в геле возникнет градиент потенциала т. е. формируется электрическое поле. (Напряженность которого измеряется разностью потенциалов на концах материала отнесенного к длине материала В/м). Под воздействием электрического поля молекулы начинают мигрировать в направлении катода или анода (в соответствии со своим суммарным зарядом). В зависимости от величины заряда и размеров, молекулы приобретают различную скорость, которая ограничивается трением молекул об окружающую среду - гель, в который они помещены. Разделяющие свойства полиакриламидных гелей (ПААГ) обусловлены трехмерной сетью волокон и пор, образующихся благодаря бис-акриламидным поперечным связям между соседними полиакриламидными цепями. Процесс полимеризации катализируется системой, генерирующей свободные радикалы, состоящей из аммония персульфата и N,N,N',N'- тетраметилэтилендиамина (ТЕМЭД). Постепенно препарат, состоявший из различных молекул, разделяется на зоны близких по физическим параметрам молекул,двигающихся с одинаковыми скоростями. Для фракционирования молекул по линейным размерам используется гель, с сеткой которого сталкиваются макромолекулы. Варьируя концентрацию геля, можно добиться необходимого распределения молекул в препарате. Молекулы в ходе электрофореза остаются невидимыми, для обнаружения молекул в раствор с образцами добавляют краситель. Молекулам красителя необходимо иметь заряд того же знака, что и исследуемые молекулы.

Краситель должен быть подобран таким образом, чтобы его подвижность была немного больше наиболее подвижных макромолекул. Когда краситель доходит до конца геля, электрофорез заканчивают.

Рассмотрим процесс электрофореза более подробно. На молекулу с суммарным зарядом q , находящуюся в электрическом поле E , действует сила $F = qE$. При воздействии силы молекула будет двигаться с ускорением до тех пор пока не достигнет скорости v , соответствующей стационарному режиму. При этой скорости, действующей на частицу, внешняя сила сравнивается с силой трения: $v = \frac{qE}{f}$ (f – коэффициент трения среды). Для сферической молекулы радиуса a , суммарным зарядом ze : $v = \frac{zeE}{6\pi\eta a}$ (η – вязкость среды). Подвижность (служит важнейшей характеристикой для фракционирования молекул) определяется как скорость отнесенная к единице напряженности: $u = \frac{v}{E}$.

2.2. Типы структур нуклеиновых кислот

Как уже обговаривалось выше, существуют три вида структурной организации нуклеиновых кислот – первичная, вторичная и третичная. Первичная структура представляет собой последовательность нуклеотидов соединенных фосфодиэфирной связью. Фосфодиэфирная связь формируется при взаимодействии гидроксильной группы пентозы одного нуклеотида и фосфатной группы другого нуклеотида. Фосфодиэфирная связь изображена на рис. 1.

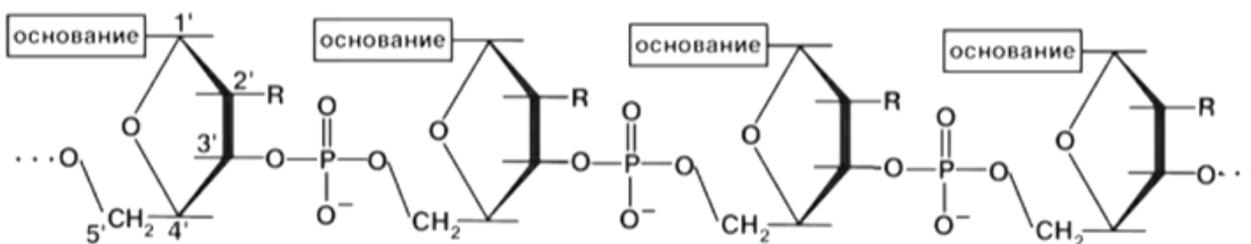


Рис. 1. Механика образования фосфодиэфирной связи: 3' – гидроксильная (-ОН) группа; 5' – фосфатная (-PO₃) группа.

Сам нуклеотид представляет собой три части: пентоза – рибоза для РНК и дезоксирибоза в случае ДНК, остаток фосфорной кислоты и азотистое основание (рис. 2). Выделяют две группы нуклеотидов, определяемых строением азотистого основания – пуриновые: аденин (А), гуанин (G); и пиримидиновые: тимин (Т), цитозин (С), урацил (U).

Вторичная структура формируется за счёт взаимодействий нуклеотидов двух комплементарных цепей ДНК. Третичная структура является пространственно упорядоченной формой полинуклеотидной цепи, часто ассоциированной с белками-гистонами, и иными белками хроматинового комплекса..

Самой распространенной вторичной структурой является двойная спираль ДНК, формирующаяся путем образования водородных связей между азотистыми основаниями двух антипараллельных цепочек нуклеотидов (Уотсон - Криковские пары). Аденин образует пару с тимином, гуанин с цитозином.

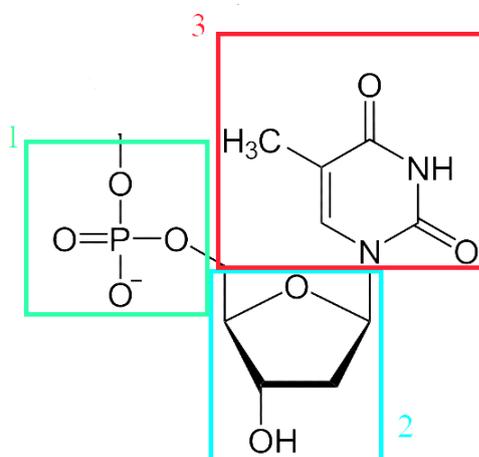


Рис. 2. Фрагмент цепочки ДНК: 1 – остаток фосфорной кислоты; 2 – пентоза; 3 – азотистое основание.

Также, помимо стандартной двойной спирали можно выделить более простые структуры, такие как: петля, выпетливание, шпилька и др. Более сложные структуры можно представить комбинацией данных более простых структур.

Для нуклеиновых кислот существует огромное разнообразие вторичных и третичных структур, различающихся по строению и биологическим функциям.

2.3. Закон Бугера – Ламберта – Бера

Так же, для полной картины проделанной работы необходимо обсудить закон Бугера – Ламберта – Бера, который в данной работе используется для определения концентрации растворов. (Квантово – механические подробности опущены).

При прохождении света через вещество уменьшается его интенсивность (мощность, переносимая волной, в направлении распространения). Уменьшается она за счёт перехода энергии света в другие виды энергии: энергию ионизации молекул, активизации, а так же на энергию теплового движения молекул.

Когда свет проходит через растворы небольшой концентрации ($c < 20\%$), при условии, что растворитель не поглощает данную длину волны, интенсивность света убывает по экспоненциальному закону:

$$I = I_0 e^{-\varepsilon cd} \text{ или же } c = \frac{A}{\varepsilon d} \left(A = \ln\left(\frac{I_0}{I}\right) \right) (1)$$

ε – показатель поглощения для раствора единичной концентрации, зависит от природы вещества и длины падающего света. I_0 и I интенсивность падающего и выходящего света соответственно.

3. Экспериментальная часть

3.1. Измерение концентрации олигонуклеотидов в растворе

Концентрация олигонуклеотидов в растворе была определена спектрофотометрически с помощью спектрофотометра UV – 2100 (Shimadzu). Для измерения был использован коэффициент поглощения на длине волны 260 нм. Исследуемые образцы и их коэффициенты поглощения изображены в таблице 1. Концентрация определялась с помощью закона Бугера – Ламберта – Бера. Для расчёта концентраций используется формула 1.

Таблица 1. Представленные образцы и их коэффициенты поглощения.

Название	Последовательность	Коэффициент χ , м ² /моль
KM20	5'-CTA ACT AAC GCC ATC ATA TG-3'	194.2
KM20-T1	5'-CTA ACT AAC G T CC ATC ATA TG-3'	204.1
KM20-T2	5'-CTA ACT AAC G TT CC ATC ATA TG-3'	212.2
KM20-T3	5'-CTA ACT AAC G TTT CC ATC ATA TG-3'	220.3
KM20-T5	5'-CTA ACT AAC G TTTTT CC ATC ATA TG-3'	236.5
KN20	5'-CGT TAG TTA GCA TAT GAT GG-3'	201
KN20-T1	5'-CGT TAG TTA G T CA TAT GAT GG-3'	210.9
KN-T2	5'-CGT TAG TTA G TT CA TAT GAT GG-3'	219
TW1C	5' - CACTC TGT CACCA GGCTG GAGTG CAG TGGTG - 3'	290.3

3.2. Подготовка к электрофорезу

Для проведения фореа был использован трис - боратный буферный раствор (ТВ), содержащий 0,89 моль/литр триса (трис(гидроксиметил)аминометана (НОСН₂)₃СNH₂), 0,89 моль на литр борной кислоты, а так же 15 ммоль/литр ацетата магния (С₂Н₃О₂)₂. Буферные свойства соответствуют физиологическим значениям рН для большинства организмов. В качестве геля для фореаной

камеры использовался полиакриламидный гель с содержанием АА:ВАА 39:1 15% (АА – акриламид ($\text{CH}_2=\text{CHC}(\text{O})\text{NH}_2$), ВАА – бисакриламид ($\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$)). Были использованы образцы объемом 15 мкл с концентрацией олигонуклеотидов $C_i = 10^{-5}$ моль/литр. Так же был добавлен MgCl_2 в концентрации 15 ммоль/л. Буфером для нанесения служил ТВ без добавления магния, в качестве красителя для нанесения образцов использовался ксиленцианол. Сами образцы, перед проведением эксперимента были помещены в холодильник на 4 часа и наносились в карманы геля изо льда.

Перед проведением электрофореза были подготовлены стёкла для электрофорезной камеры, они были аккуратно вымыты и высушены, во избежание попадания лишних частиц при проведении электрофореза.

Следующий этап подготовки эксперимента - заливка геля, в ходе которой между стёклами помещаются спейсеры, дабы предотвратить растекание геля и попадания пузырьков воздуха.

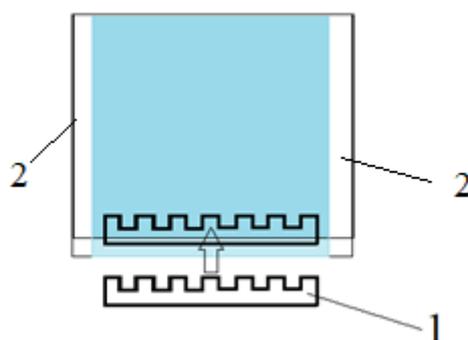


Рис. 3. Конфигурация стёкол при заливке геля: 1 – гребенка; 2 – спейсеры.

После заливки геля между стёклами помещается гребёнка для формирования в нём карманов, куда будут нанесены образцы. После полимеризации геля стёкла помещаются в электрофорезную камеру, далее в кармашки помещаются образцы. Сама электрофорезная камера изображена на рис. 4.

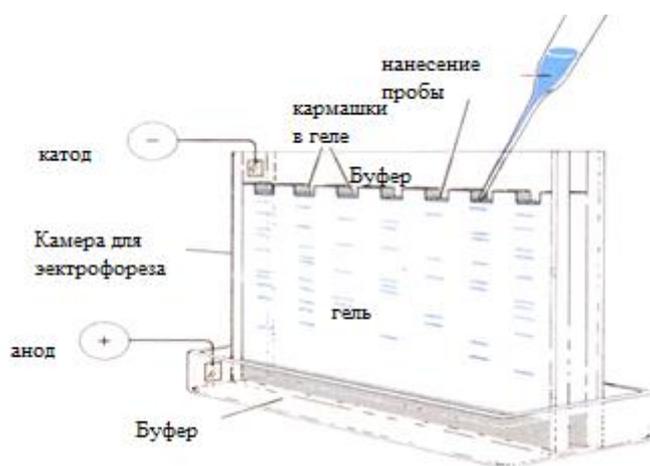


Рис. 4. Электрофорезная камера. Процесс нанесения образцов в кармашки.

3.3. Электрофорез

Схема установки изображена на рис. 5.

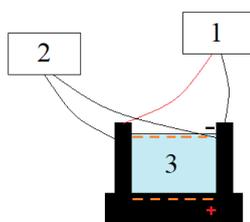


Рис. 5. Схема установки для проведения фореа: 1 – блок управления; 2 – циркуляционный термостат; 3 – электрофорезная камера.

Сам эксперимент проводился при следующих условиях:

С помощью термостата температура 5°C , напряжение на клеммах 300 В, ток 37 мА, мощность 11 Вт. Через три часа напряжение повысили до 400 В, ток 39 мА, мощность 15 Вт. Эксперимент продолжался 5 часов, после того как краска опустилась до конца дорожки эксперимент был прекращен.

Затем было произведено окрашивание геля для визуализации образцов. Полученный результат представлен на рис. 6:

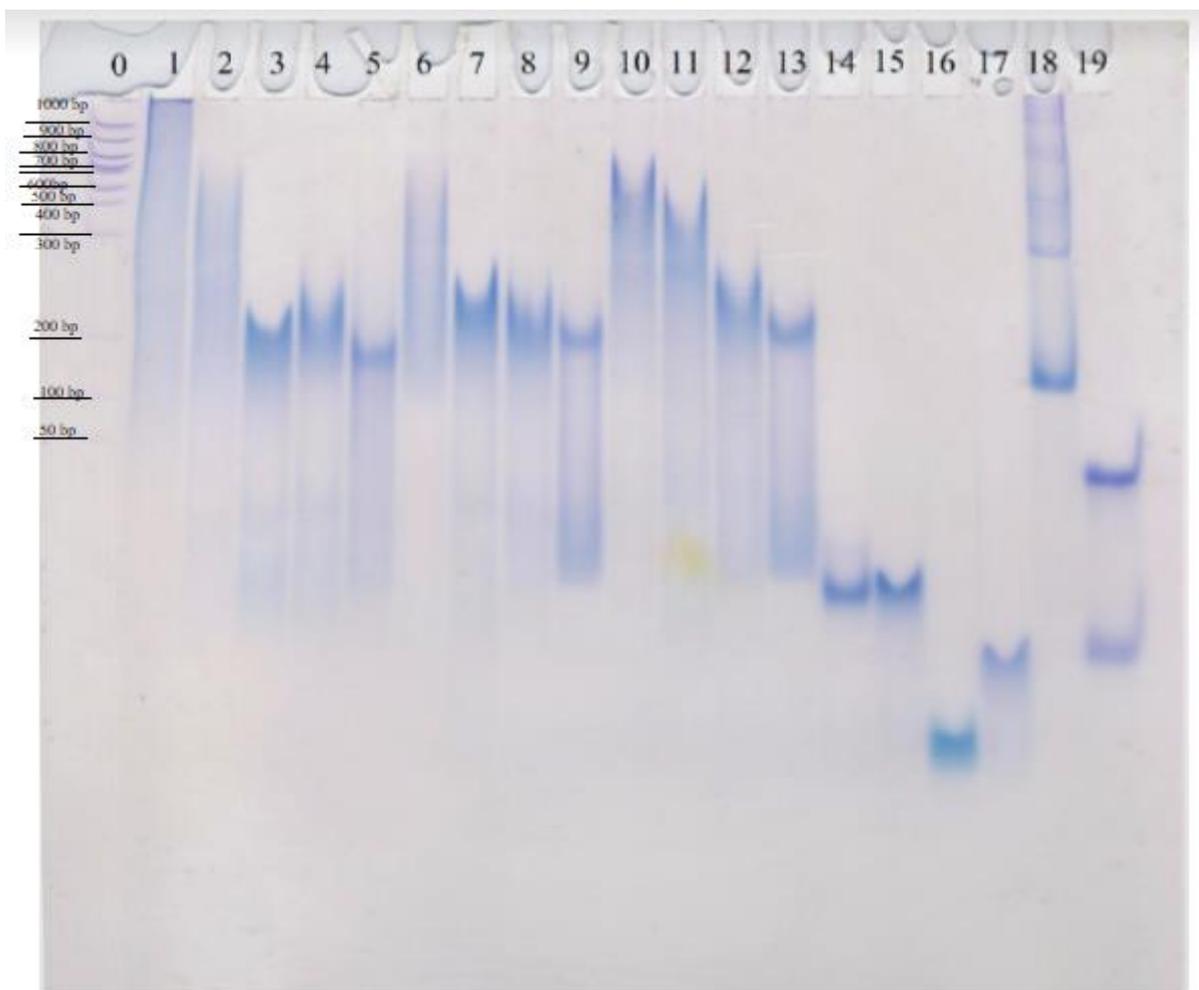


Рис. 6. Результат проведения электрофореза.

Для лучшего описания результата в трек под номером 0 добавлен маркер длины пробега Ladder Sib Enzyme 50 - 1000, 100 bp + 50 bp, M33, 50 мкг, 200 мкг/мл.

Образцы в каждом треке представлены в таблице 2.

Таблица 2. Образцы в каждом треке.

Номер дорожки	Название образца(-ов)
1	KM20/KN20
2	KM20-T1/KN20
3	KM20-T2/KN20
4	KM20-T3/KN20
5	KM20-T5/KN20
6	KM20-T1/KN20-T1
7	KM20-T2/KN20-T1
8	KM20-T3/KN20-T1
9	KM20-T5/KN20-T1
10	KM20-T1/KN20-T2
11	KM20-T2/KN20-T2
12	KM20-T3/KN20-T2
13	KM20-T5/KN20-T2
14	KN20-T1
15	KN20-T2
16	KM20
17	KN20
18	KM20/KN20-T3
19	TW1C

4. Результаты и обсуждение

Если краситель в треке представляет собой размазанную полосу, в дорожке образовался конкатамерный комплекс – длинные полимерные цепочки олигонуклеотидов разных размеров. Такую картину можно наблюдать в

дорожке под номером 1 на рис. 6. В случае номера 2 комплексы всё ещё частично способны образовывать длинные цепочки, но их максимальная длина уже существенно ниже за счёт дополнительной Т вставки. Аналогичный результат наблюдается в 6 дорожке при Т вставке в обеих цепях.

При введении вставки из двух Т (дорожка под номером 3) снижается длина и происходит частичное формирование самоограниченных комплексов, но закрытие комплексов происходит не полностью и присутствует вариативность по размерам. Аналогично происходит в 4 и 5 дорожке, которым соответствует вставки из 3 и 5 Т соответственно. При вставке в обе цепи происходит аналогичный результат, что видно по дорожкам 7 – 13.

Образец в дорожке под номером 14 представляет собой одноцепочечные нуклеотиды. Как видно из опыта, находятся они гораздо ниже (более высокая длина пробега). Аналогично для дорожек 15 – 17.

В дорожке 18 находился уже ранее исследованный образец. Известно, что он формирует самоограниченные комплексы, но видно, что это структуры не только из двух цепочек, но так же более высокой молекулярности (из 4-х, 6-ти, 8-ми, 10-ти олигонуклеотидов). Похожий результат для дорожки 19, с тем отличием, что это самоограниченный комплекс, формируемый одной цепью.

5. Основные результаты и выводы.

В результате эксперимента была получена картина распределения нуклеиновых кислот и способность различных образцов формировать упорядоченные комплексы, так же был изучен один из методов качественного описания строения нуклеиновых кислот – метод гель – электрофореза.

6. Список литературы

1. М. В. Волькштейн Биофизика Учебное руководство, 2-е издание - М.: Наука, 1988 г. - 592 с. 2. Кантор, Шиммел Биофизическая химия том 2 М.: Мир, 1985 - 536 с.

