

БАЛТИЙСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ им. ИММАНУИЛА КАНТА

И. Н. Доминова

ПРАКТИКУМ ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ  
ДЛЯ БИОЛОГОВ И БИОИНЖЕНЕРОВ

Учебно-методическое пособие

Издательство  
Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта  
2023

УДК 577.2.08

ББК 28.070

Д663

*Рецензенты*

*С. В. Тоцаков*, канд. биол. наук, начальник лаборатории  
«Геномная фабрика» «Курчатовского геномного центра»  
НИЦ «Курчатовский институт»;

*В. В. Кадников*, канд. биол. наук, старший научный сотрудник  
Института биоинженерии им. К. Г. Скрябина  
ФИЦ «Биотехнологии РАН»

**Доминова, И. Н.**

Д663 Практикум по молекулярной биологии для биологов и биоинженеров : учебно-методическое пособие / И. Н. Доминова. — Калининград : Издательство БФУ им. И. Канта, 2023. — 131 с. ISBN 978-5-9971-0796-3

Содержит описание основных методик, использующихся для первичного анализа нуклеиновых кислот, в частности выделения нуклеиновых кислот, полимеразной цепной реакции и электрофоретического разведения. Методическое пособие логически разделено на две части: теоретические основы, необходимые для понимания принципов каждого из методов, и практическую часть, включающую протоколы выделения нуклеиновых кислот, проведения полимеразной цепной реакции, электрофоретического разведения и др.

Предназначено для подготовки студентов естественнонаучных специальностей, обучающихся по направлениям «Биология», «Биоинженерия и биоинформатика», «Химия» при освоении дисциплин «Молекулярная биология», «Основы молекулярной биологии», «Введение в молекулярную биологию» и «Методы молекулярно-генетического анализа».

УДК 577.2.08

ББК 28.070

ISBN 978-5-9971-0796-3

© Доминова И. Н., 2023

© БФУ им. И. Канта, 2023

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>Введение</b> .....	4
<b>1. Основное оборудование для проведения молекулярно-генетического анализа</b> .....	6
<b>2. Дозирование жидкостей. Пипетирование</b> .....	18
<b>3. Выделение нуклеиновых кислот</b> .....	27
3.1. Методы выделения нуклеиновых кислот .....	27
3.2. Фенол-хлороформная экстракция .....	32
3.3. Твердофазная экстракция .....	34
3.4. Выделение ДНК из бактерий .....	38
3.5. Выделение ДНК из тканей и клеток растений .....	44
3.6. Выделение ДНК из животных клеток и тканей.....	51
3.7. Выделение РНК.....	51
<b>4. Спектрофотометрический анализ нуклеиновых кислот</b> .....	53
<b>5. Полимеразная цепная реакция</b> .....	58
5.1. Основные компоненты ПЦР-смеси .....	59
5.2. Основные этапы ПЦР .....	66
5.3. Основные виды ПЦР.....	72
<b>6. Гель-электрофорез нуклеиновых кислот</b> .....	90
6.1. Основные принципы гель-электрофореза нуклеиновых кислот.....	91
6.2. Электрофорез в агарозном геле .....	102
6.3. Визуализация образцов в геле .....	102
<b>7. Лабораторные работы</b> .....	104
7.1. Выделение нуклеиновых кислот .....	104
7.2. Определение концентрации нуклеиновых кислот .....	113
7.3. Проведение полимеразной цепной реакции .....	121
7.4. Электрофоретическое разделение продуктов полимеразной цепной реакции в агарозном геле.....	127
<b>Список рекомендуемой литературы</b> .....	129

## ВВЕДЕНИЕ

Практикум по молекулярной биологии для биологов и биоинженеров предназначен для подготовки студентов естественнонаучных специальностей, обучающихся по направлениям «Биология», «Биоинженерия и биоинформатика», «Химия» при освоении дисциплин «Молекулярная биология», «Основы молекулярной биологии», «Введение в молекулярную биологию» и «Методы молекулярно-генетического анализа».

Практикум разделен на две части: теоретические основы и практическую часть. Теоретическая часть содержит главы, посвященные знакомству с основным лабораторным оборудованием, используемым для проведения молекулярно-генетического анализа, правилам пипетирования и работы с автоматическими дозаторами, методам выделения нуклеиновых кислот из различных источников, спектрофотометрическому определению концентрации ДНК и РНК, полимеразной цепной реакции и ее различным видам, принципам электрофоретического разделения нуклеиновых кислот в агарозном и полиакриламидном гелях. Практическая часть содержит экспериментальные протоколы, соответствующие основным разделам теоретической части.

Перед выполнением работ по представленным протоколам сначала необходимо ознакомиться с теоретическими основами того или иного метода, правилами работы с оборудованием и техникой безопасности, предусмотренной в молекулярно-биологических лабораториях. Для успешного выполнения работ студенты должны обладать базовыми экспериментальными навыками, в частности уметь взвешивать на весах, измерять объемы жидкостей, рассчитывать концентрации веществ (в том числе молярные и процентные), проводить математическую обработку результатов и представлять их в графическом виде.

Данный лабораторный практикум поможет студентам закрепить теоретические знания, полученные на лекционных занятиях, а также приобрести практические навыки работы со стандартными протоколами и лабораторным оборудованием для проведения молекулярно-генетического анализа.

## 1. ОСНОВНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Стандартными методами молекулярной биологии являются выделение и количественное определение нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) и/или белков, расщепление нуклеиновых кислот рестриктазами (эндонуклеазами рестрикции, экзонуклеазами), субклонирование, лигирование, полимеразная цепная реакция (ПЦР), синтез кДНК, разделение нуклеиновых кислот и/или белков с помощью гель-электрофореза, различные виды блоттинга (Southern-blot, Western-blot, Northern-blot).

Анализ нуклеиновых кислот целых клеток и отдельных клеточных компонентов предполагает использование специализированного оборудования, методик и протоколов. Стандартное оборудование, используемое в лаборатории молекулярной биологии, включает автоматические дозаторы, центрифуги, вортексы, амплификаторы и другое оборудование, а также лабораторный пластик, необходимый для проведения экспериментальных работ.

**Лабораторный холодильник с совмещенной или отдельной морозильной камерой** (рис. 1.1) используется для хранения исходных растворов, реагентов, наборов и продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Низкотемпературные морозильные камеры ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) используются для хранения таких материалов, как клетки, ткани, ферменты, белки, РНК и т. д. Большинство реагентов для проведения молекулярно-биологических исследований можно хранить при температуре от  $-5$  до  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Магнитная мешалка** (рис. 1.2) — это устройство, обеспечивающее равномерное перемешивание и поддержание определенной температуры химических растворов и смесей в процессе их приготовления.

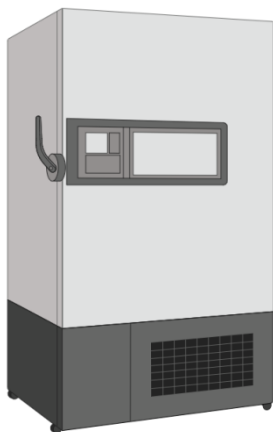


Рис. 1.1. Лабораторный холодильник с морозильной камерой

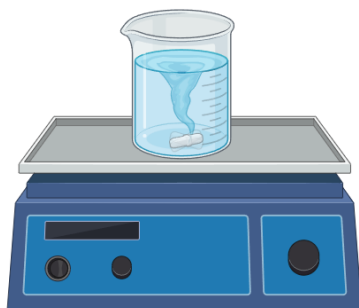


Рис. 1.2. Магнитная мешалка

**Вортекс** (рис. 1.3) используется для быстрого и равномерного смешивания жидкостей, реагентов и образцов с разбавителем в пробирках, а также для ресуспендирования осадка после центрифугирования.



Рис. 1.3. Вортекс

**Автоклав.** Основное назначение автоклава (рис. 1.4) — стерилизация материалов и сред под давлением и паром.

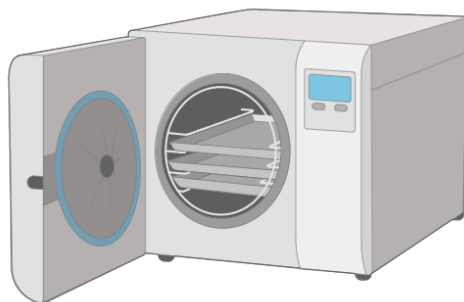


Рис. 1.4. Автоклав

**Центрифуга** (рис. 1.5) в основном используется при приготовлении культур клеток, выделении нуклеиновых кислот и в микробиологии для разделения двух жидкостей в виде эмульсии или взвешенных твердых частиц в жидкости под



действием центробежной силы. Более плотные компоненты смеси мигрируют в сторону от оси центрифуги, а менее плотные — в сторону оси. Молекулярные биологи могут увеличить эффективную гравитационную силу на пробирку, чтобы быстрее и полнее собрать осадок на дне пробирки. Оставшийся раствор правильно называть «супернатом», или «надосадочной жидкостью». Затем надосадочную жидкость либо быстро декантируют из пробирки, не нарушая осадка, либо отбирают пипеткой.



Рис. 1.5. Центрифуга

Скорость центрифугирования определяется ускорением, приложенным к образцу, которое обычно измеряется в оборотах в минуту (RPM) или  $g$ . Скорость осаждения частиц при центрифугировании зависит от их размера и формы, центробежного ускорения, объемной доли твердых частиц, разницы плотности частиц и жидкости, а также вязкости [1].

Основные типы центрифуг по скорости вращения ротора:

— низкоскоростные, в том числе мини-спин центрифуги: скорость чаще всего 3—10 тыс. об/мин, может быть до 25 тыс. об/мин;

— скоростные суперцентрифуги: высокая скорость, до 40 тыс. об/мин;

— высокоскоростные ультрацентрифуги: скорость свыше 40 тыс. об/мин.

Центрифуги могут быть как с охлаждением, так и без него.

**Амплификатор**, или термоциклер (рис. 1.6), является ключевым оборудованием для амплификации определенного участка любого образца ДНК с помощью полимеразной цепной реакции в пробирке.

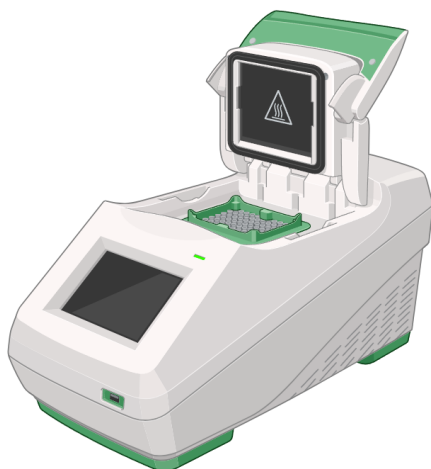


Рис. 1.6. Амплификатор без детекции в режиме реального времени

**Спектрофотометр** (рис. 1.7) — это аналитический прибор, предназначенный для количественного измерения испускания или отражения видимого, ультрафиолетового или инфракрасного света в зависимости от длины волны. Луч света пропускается через образец исследуемого вещества. Различные компоненты образца обладают различными свойствами поглощения света и, следовательно, по-разному отражают или пропускают свет. Спектрофотометры измеряют интенсивность в за-

висимости от длины волны источника света. В лаборатории молекулярной диагностики спектрофотометры используются для количественного определения нуклеиновой кислоты в образце.

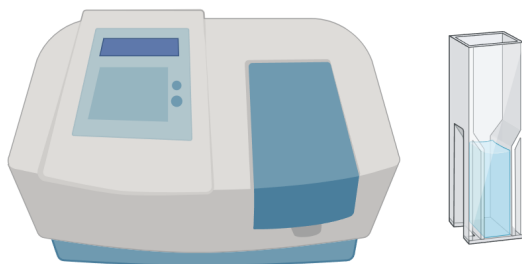


Рис. 1.7. Спектрофотометр с кюветой

**Микроскоп** (рис. 1.8), особенно с камерой, используется для наблюдения, оценки образцов и хранения результатов.

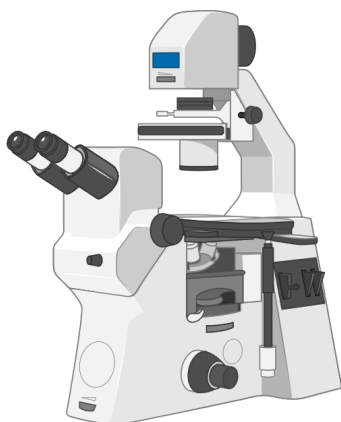


Рис. 1.8. Инвертированный микроскоп

**Оборудование для гель-электрофореза.** Большинство биомолекул существуют в растворе при заданном рН в виде элект-

рически заряженных частиц — положительно или отрицательно заряженных ионов. При пропускании электрического тока через гель или другую матрицу под действием пространственно однородного электрического поля можно наблюдать движение молекул относительно жидкости. Электрофорез используется для разделения молекул ДНК, РНК (нуклеиновых кислот) или белков в зависимости от их размера и электрического заряда, секвенирования ДНК, выявления мутаций и т. д.

В качестве основного оборудования для проведения гель-электрофореза выступают источник постоянного тока, камера для фореза (может быть горизонтальной и вертикальной) (рис. 1.9), система для визуализации (рис. 1.10) и/или трансиллюминатор (рис. 1.11).

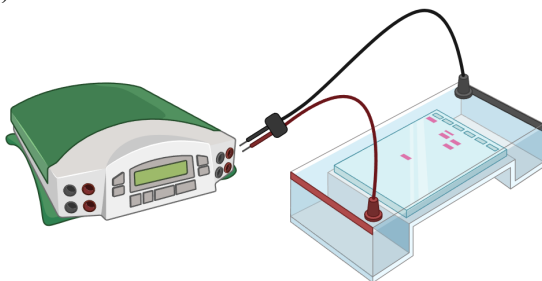


Рис. 1.9. Источник постоянного тока с камерой для горизонтального гель-электрофореза

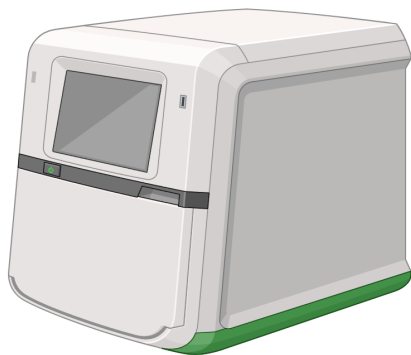


Рис. 1.10. Система для визуализации гелей

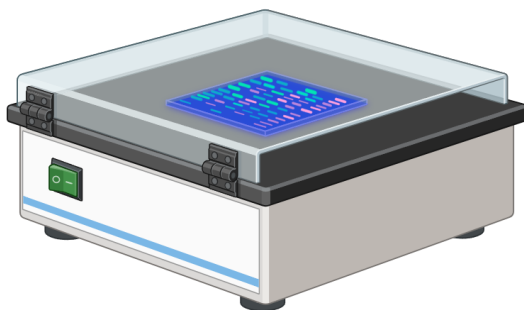


Рис. 1.11. Трансиллюминатор

**ДНК-секвенатор** (рис. 1.12) используется для определения четырехбуквенной последовательности любого гена или участка ДНК, то есть последовательности аденина (А), тимина (Т), цитозина (С) и гуанина (G). Это необходимо для идентификации генетического материала человека, вирусов, микроорганизмов и растений.

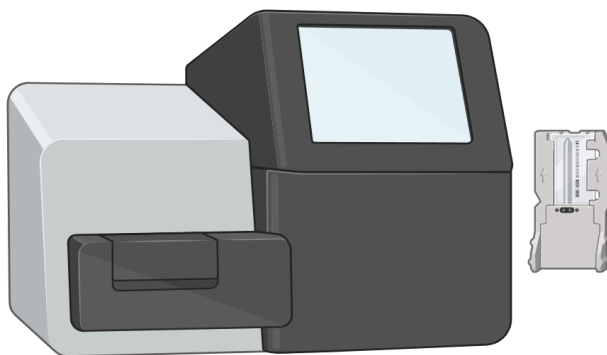


Рис. 1.12. Секвенатор MiSeq (Illumina) с проточной ячейкой

**Инкубатор** (рис. 1.13) используется для поддержания оптимальных условий (температура, влажность) при выращивании и поддержании культур.

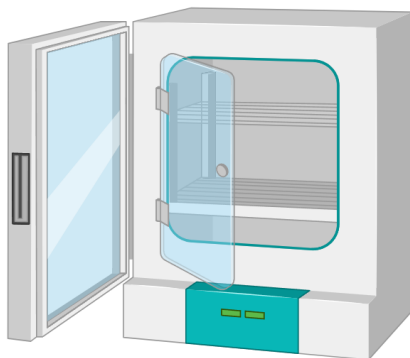


Рис. 1.13. Инкубатор

**pH-метр** (рис. 1.14) используется для измерения кислотности или щелочности водных растворов.

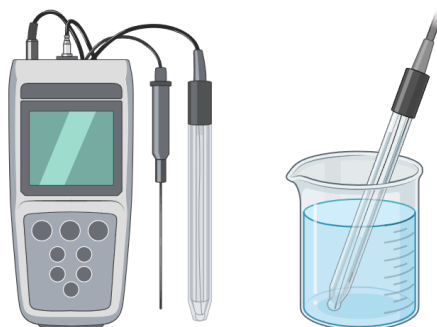


Рис. 1.14. pH-метр

**Микротом** (рис. 1.15) используется для нарезания образцов тканей. Представляет собой режущие инструменты, поз-

воляющие получать тонкие срезы или участки тканей, которые можно наблюдать под микроскопом или другими системами визуализации клеток и анализировать.

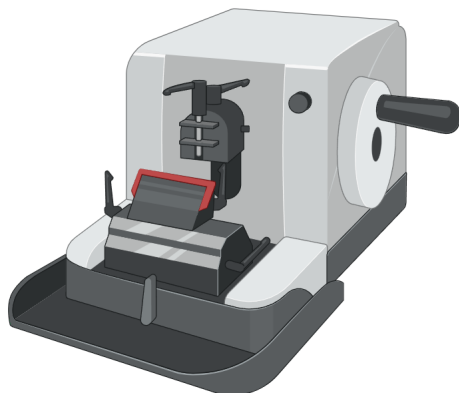


Рис. 1.15. Микротом

**Водяная баня** (рис. 1.16) — это устройство, используемое в лабораториях для инкубации образцов в воде, поддерживаемой при равномерной, контролируемой, постоянной температуре.

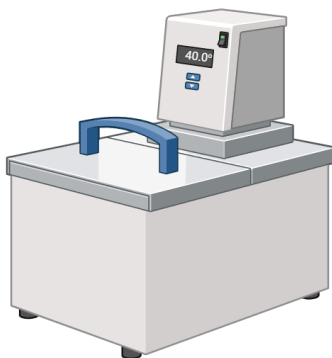


Рис. 1.16. Водяная баня

**Ламинарный бокс** представляет собой шкаф биологической безопасности — по сути, закрытое вентилируемое лабораторное рабочее пространство для безопасной работы с материалами, потенциально зараженными патогенными микроорганизмами. Ламинарные боксы (рис. 1.17) используются для асептического переноса культур, в том числе микроорганизмов, приготовления ПЦР-смесей и т. д.

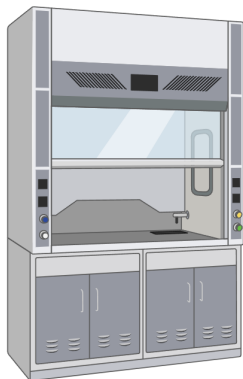


Рис. 1.17. Ламинарный бокс

**Качающиеся платформы и шейкеры** (рис. 1.18) предназначены для постоянного перемешивания содержимого колб и пробирок при проведении длительных реакций, а также для промывания мембран после проведения реакций с фиксированными на ней образцами или окрашивания гелей после проведения гель-электрофореза.

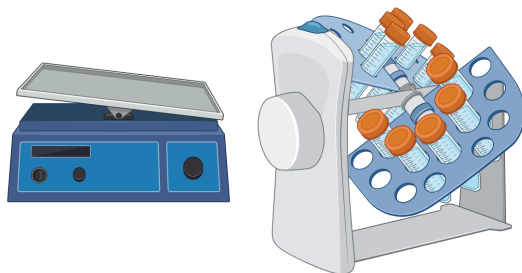


Рис. 1.18. Качающаяся платформа и орбитальный шейкер





## 2. ДОЗИРОВАНИЕ ЖИДКОСТЕЙ. ПИПЕТИРОВАНИЕ

**Пипетирование** — отмеривание и перенос небольших объемов жидкости в диапазоне мкл и мл — является наиболее часто практикуемым видом деятельности в большинстве лабораторий биологических наук. Понимание основ правильной практики пипетирования очень важно для успеха и воспроизводимости любого эксперимента. Каким бы точным ни был дозатор, в конечном итоге точность и надежность результатов определяется умением и знаниями пользователя.

В молекулярно-биологических лабораториях для дозирования жидкостей, то есть пипетирования, преимущественно используются автоматические дозаторы (рис. 2.1) переменного или постоянного объема.



Рис. 2.1. Дозатор переменного объема с наконечником

### Техники дозирования

Для стандартного дозирования используется техника «**прямого дозирования**» (рис. 2.2), которая рекомендуется для водных растворов (буферы, разбавленные кислоты или щелочи) и обычно используется при дозировании и смешивании образца или реагента с другой жидкостью [2].



Рис. 2.2. Схема прямого дозирования жидкостей

Принцип работы при «**прямом дозировании**»:

1. Нажмите кнопку (плунжерный клапан) до первого упора.
2. Опустите наконечник в раствор на глубину 1 см и медленно отпустите кнопку. Извлеките наконечник из жидкости, коснувшись им края резервуара, чтобы удалить излишки жидкости.
3. Дозируйте жидкость из приемной емкости, плавно нажимая на кнопку до второго упора, что приведет к опорожнению наконечника. Извлеките наконечник из емкости, сдвинув его вдоль стенки емкости.
4. Отпустите кнопку для возвращения клапана в начальную позицию [2].

Для растворов с высокой вязкостью или склонностью к вспениванию используется техника «**обратного дозирования**» (рис. 2.3). Эта техника обычно используется в пневматических дозаторах и рекомендуется для точного дозирования небольших объемов. Обратное дозирование позволяет избежать риска разбрызгивания образца, вспенивания или образования пузырьков.

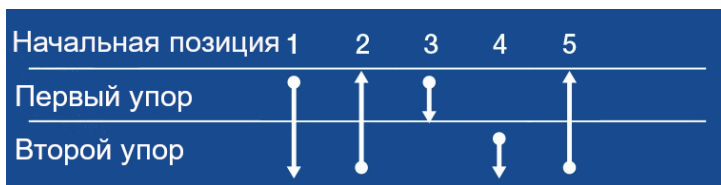


Рис. 2.3. Схема обратного дозирования жидкостей

Принцип работы при «обратном дозировании»:

1. Нажмите кнопку (плунжерный клапан) до второго упора.  
 2. Опустите наконечник на глубину 1 см и медленно отпустите кнопку. В результате этого наконечник заполнится жидкостью. Извлеките наконечник из жидкости и коснитесь им края резервуара, чтобы удалить излишки жидкости.

3. Дозируйте жидкость в приемную емкость, плавно нажимая на кнопку до первого упора. Удерживайте кнопку в этом положении. Часть жидкости останется в наконечнике, ее не следует дозировать. Извлеките наконечник, проведя им по стенке емкости.

4. Оставшуюся в наконечнике жидкость можно пипетировать обратно в исходный раствор или выбросить вместе с наконечником.

5. Отпустите кнопку для возвращения клапана в начальную позицию [2].

Для повторного дозирования одного и того же объема используйте технику «**повторного дозирования**» (рис. 2.4). Эта техника предназначена для повторного дозирования одного и того же объема и идеально подходит для добавления реагентов в пробирки или лунки микропланшетов.

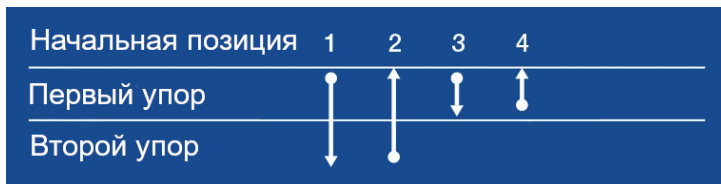


Рис. 2.4. Схема повторного дозирования жидкостей

Принцип работы при «повторном дозировании»:

1. Нажмите кнопку (плунжерный клапан) до второго упора.
2. Опустите наконечник в раствор на глубину 1 см и медленно отпустите кнопку. Извлеките наконечник из жидкости.
3. Дозируйте жидкость в приемную емкость, плавно нажимая на кнопку до первого упора. Удерживайте кнопку в этом положении. Часть жидкости останется в наконечнике, ее не следует дозировать. Извлеките наконечник, проводя им по стенке емкости.
4. Продолжайте дозирование, повторяя шаги 2 и 3 [2].

Для дозирования гетерогенных образцов используется «техника дозирования гетерогенных образцов». Эта техника используется для дозирования неоднородных образцов, таких как кровь или сыворотка. Как правило, предварительная промывка наконечника невозможна и для точного анализа необходимо дозировать весь образец.

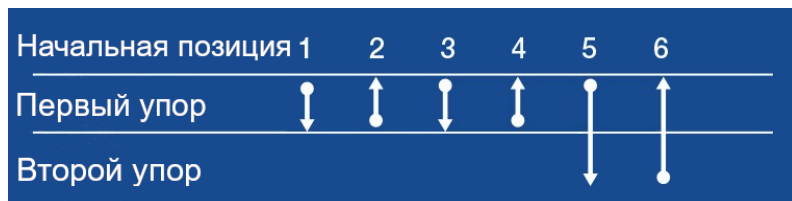


Рис. 2.5. Схема дозирования гетерогенных жидкостей

1. Нажмите кнопку (плунжерный клапан) до первого упора. Опустите наконечник в образец. Убедитесь, что наконечник находится достаточно низко над поверхностью.

2. Кратковременно отпустите кнопку до возвращения в начальную позицию. В результате этого наконечник заполнится образцом. Извлеките наконечник из раствора, проводя им по стенке сосуда.

3. Опустите наконечник в целевой раствор. Убедитесь, что наконечник находится достаточно низко над поверхностью.

4. Нажмите кнопку до первого упора и медленно отпустите ее до возвращения в начальную позицию. Не вынимайте наконечник из раствора. Повторяйте этот процесс до тех пор, пока внутренняя стенка наконечника не станет чистой.

5. Извлеките наконечник из раствора, проведя им по стенке емкости. Нажмите кнопку до второго упора и полностью опорожните наконечник.

6. Отпустите кнопку для возвращения клапана в начальную позицию [2].

**Общие рекомендации по дозированию жидкостей** представлены в таблице 2.1.

Таблица 2.1

### Рекомендации по дозированию жидкостей

Раствор и/или соединение	Примеры	Техника дозирования	Комментарии
Водные растворы	Буферы, разведенные солевые растворы	Прямое	—
Вязкие растворы	Растворы белков и нуклеиновых кислот, глицерин, Tween 20/40/60/80	Обратное	Пипетируйте медленно, чтобы избежать образования пузырьков
Летучие соединения	Метанол, гексан	Обратное	Пипетируйте быстро, чтобы уменьшить эффект испарения. Наконечники с угольным фильтром защищают целостность пипетки, исключая воздействие вредных паров
Биологические жидкости	Цельная кровь, сыворотка	Гетерогенных жидкостей	На внешней поверхности наконечника могут быть остатки жидкости. Перед дозированием протрите наконечник о край емкости, чтобы удалить эту жидкость

## Окончание табл. 2.1

Раствор и/или соединение	Примеры	Техника дозирования	Комментарии
Растворы нуклеотидов	Геномная ДНК, продукты ПЦР	Прямое	Для геномной ДНК можно использовать наконечники с широким отверстием, чтобы исключить механическое повреждение и разрывы
Радиоактивные соединения	$^{14}\text{C}$ Углерод, $^3\text{H}$ -тимидин	Прямое	—
Кислоты/щелочи	$\text{H}_2\text{SO}_4$ , $\text{HCl}$ , $\text{NaOH}$	Прямое	—
Токсичные образцы	—	Прямое или обратное в зависимости от вязкости раствора	—

Перед использованием необходимо проверить дозатор на наличие пыли и грязи на внешней стороне. При необходимости протрите ее 70%-ным этанолом.

Убедитесь, что вы используете наконечники в соответствии со спецификацией производителя.

Для обеспечения точности используйте только высококачественные наконечники, изготовленные из первичного полипропилена, не содержащего загрязнений.

Наконечники предназначены для однократного использования. Их не следует очищать для повторного использования, так как в этом случае их метрологические характеристики станут недостоверными.

Пипетируйте параллельные образцы одинаково, например, в одном и том же положении с наконечником на одной и той же глубине, используя одинаковую скорость движения плунжера.

Не переворачивайте пипетку на бок при наличии жидкости в наконечнике. Жидкость может попасть внутрь дозатора и загрязнить его.

Чтобы избежать загрязнения рук, используйте для удаления наконечника выталкиватель.

Если дозаторы не используются, всегда храните их в вертикальном положении на подставке.




**Правильное дозирование требует как точности, так и достоверности.**

**Точность** — это способность дозатора давать отклик, близкий к истинному или номинальному объему, определяемому настройкой объема.

**Достоверностью** часто называют повторяемость или воспроизводимость дозирования образца, а также стандартное отклонение.

Если дозаторы точны и достоверны, то средний объем является заданным объемом и разброс между разными дозаторами отсутствует.

*Пример:* объем дозатора установлен на 20 мкл.

	<p>Точно, но не достоверно: средний объем является правильным (заданным), но отдельные пипетирования отличаются от заданного объема</p>
	<p>Достоверно, но не точно: разброс между отдельными дозаторами отсутствует, но средний объем отличается от заданного</p>
	<p>Точно и достоверно: средний объем является заданным объемом, и разброс между различными пипетированиями отсутствует</p>



**Факторы, влияющие на точность дозирования [2]:**

➤ *Температура.* Наибольшее влияние оказывает разница температур между дозирующим устройством и жидкостью. Воздушный зазор («мертвый» объем воздуха) между поверхностью жидкости и поршнем подвержен эффекту теплового расширения, характерен только для данного случая. Это приводит либо к уменьшению, либо к увеличению количества жидкости, всасываемой в наконечник, а также к другим эффектам.

➤ *Плотность* (соотношение масса/объем) влияет на объем жидкости, аспирируемой в наконечник. При аспирации жидкости с большей плотностью, чем у воды, в наконечник всасывается меньшая доза по сравнению с аналогичной операцией с водой. При использовании жидкостей с меньшей плотностью эффект обратный. Это обусловлено наличием гибкого мертвого объема воздуха и земным притяжением. Плотность жидкостей также изменяется в зависимости от температуры. Обычно плотность воды составляет  $0,998 \text{ кг/дм}^3$ , этанола —  $0,79 \text{ кг/дм}^3$ , а серной кислоты (95—98 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) —  $1,84 \text{ кг/дм}^3$  (эти значения относятся к температуре  $20^\circ\text{C}$ ).

➤ *Высота над уровнем моря* влияет на точность измерений за счет атмосферного давления. На больших высотах давление воздуха уменьшается, и коэффициент пересчета  $Z$  также уменьшается. Кроме того, для некоторых жидкостей температура кипения снижается достаточно сильно и становится близкой к комнатной температуре, что резко увеличивает потери на испарение.

**Предотвращение перекрестной контаминации:**

➤ *От дозатора к образцу.* Загрязненный дозатор или загрязненные наконечники могут привести к загрязнению проб.

*Профилактика:*

- используйте наконечники с фильтром;
- меняйте наконечник после дозирования каждой пробы;
- регулярно очищайте дозатор.

➤ **От образца к дозатору.** Пробы или аэрозоли из проб могут попасть в конус дозатора.

*Профилактика:*

— при дозировании держите дозатор вертикально, чтобы предотвратить попадание жидкости в корпус дозатора;

— медленно отпускайте кнопку;

— во избежание загрязнения аэрозолями используйте наконечники с фильтром или дозатор и наконечники с принудительным вытеснением.

➤ **От образца к образцу.** Остатки пробы могут смешиваться со следующей пробой внутри наконечника, что может привести к ложному результату теста.

*Профилактика:*

— меняйте наконечник после каждой пробы;

— если вы подозреваете, что ваш дозатор загрязнен, очистите его подходящим способом, а при необходимости проведите автоклавирование.

### 3. ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Экстракция нуклеиновых кислот — распространенная, но крайне важная задача в лаборатории молекулярной биологии, является первым шагом многих генетических и геномных исследований. Подготовка высококачественных образцов повышает вероятность того, что эксперимент пройдет успешно и будут получены необходимые результаты.

#### 3.1. Методы выделения нуклеиновых кислот

Выделение нуклеиновых кислот начинается с разрушения клеточных структур, содержащих генетический материал, — ядер, рибосом, бактерий, вирусов; обычно это достигается добавлением совместимого детергента, механическим разрушением и/или нагреванием.

Далее применяется несколько методов очистки нуклеиновых кислот. В основе каждого метода выделения нуклеиновых кислот лежит свой биохимический принцип. Выбор метода зависит от требуемой производительности, имеющегося в лаборатории оборудования или требуемой степени чистоты.

**Основные этапы** выделения нуклеиновых кислот:

- разрушение клеток;
- отделение нуклеиновых кислот от белков, полисахаридов и других соединений;
- осаждение нуклеиновых кислот;
- анализ чистоты препарата [3].

Критерии выбора определенной методики выделения зависят от того, какая целевая нуклеиновая кислота (ДНК или РНК) необходима, от организма, из которого она выделяется, от первичного материала (свежие растительные или животные ткани или гербарные и архивные образцы, продукты перера-

ботки и т. д.), от ожидаемого результата (выход, то есть масса в нг или мкг, чистота, время, требующееся для очистки, и др.), а также от дальнейшего использования выделенных кислот (ПЦР, клонирование, секвенирование, блоттинг и т. д.).

Независимо от того, какая методика выделения будет выбрана, она должна обеспечивать следующее:

- лизис биологического материала;
- селективную экстракцию (сорбцию);
- концентрирование из больших объемов;
- отделение компонентов, которые ингибируют ПЦР и другие ферментативные реакции;
- разделение ДНК и РНК;
- высокий процент выхода;
- возможность калибровки и положительного контроля;
- отсутствие контаминации;
- малые временные затраты [4].

Все методы выделения нуклеиновых кислот по способу сорбирования можно разделить на твердофазные и жидкофазные.

**Жидкофазные методы** выделения ДНК и РНК являются самыми первыми разработанными методами и считаются классическими. Они основаны на экстракции нуклеиновых кислот органическими растворителями, в качестве которых чаще всего выступают фенол и хлороформ или их производные (например, TRIzol).

**Твердофазные методы** предполагают использование в качестве сорбента нуклеиновых кислот диоксид кремния, которым покрываются магнитные частицы или мембраны колонок для микроцентрифужных пробирок.

Для клеточных мембран могут использоваться следующие **методы лизиса клеток** (рис. 3.1):

- механическое разрушение (например, измельчение, гипотонический лизис);
- химическая обработка (например, лизис с помощью детергентов, хаотропных агентов или тиоловое восстановление);
- ферментативное расщепление белков (например, с помощью протеиназы К) [5].

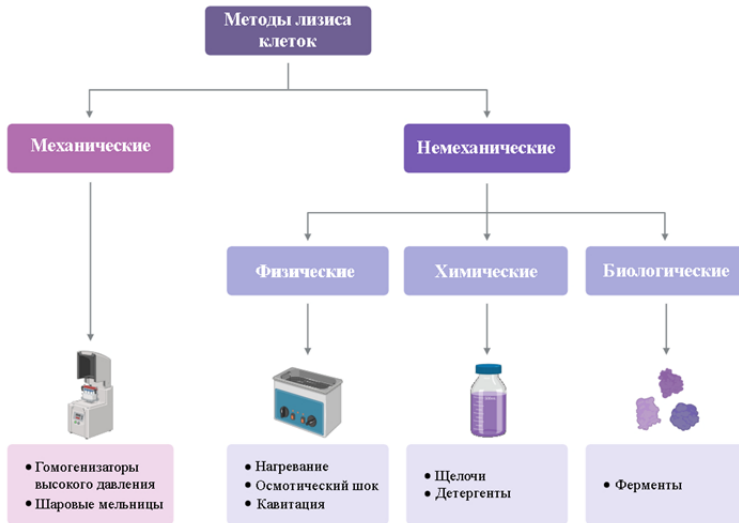


Рис. 3.1. Методы лизиса клеток

Процессы разрушения клеточных мембран и инактивация внутриклеточных нуклеаз могут быть совмещены. Например, один раствор может содержать детергенты для растворения клеточной мембраны и хаотропные соли для инактивации внутриклеточных ферментов.

Для разрушения клеток бактерий используют химические вещества, разрушающие клеточную стенку бактерий, — ЭДТА, лизоцим, ультразвук, гомогенизация и др. Для лизиса клеток и денатурации белков часто используется детергент додецилсульфат натрия (SDS) или гуанидинизотиоцианат.

Разрушение животных клеток не вызывает сложностей: используют гомогенизацию, обработку SDS или гуанидинизотиоцианатом или клетки обрабатывают протеиназами [6].

Для разрушения клеточных стенок растений применяют ферменты, разрушающие целлюлозу, замораживание в жид-

ком азоте и последующее механическое разрушение клеток и др. Часто используют обработку детергентами, растворяющими мембраны клеток, и хелатирующими агентами, подавляющими действие клеточных нуклеаз за счет связывания двухвалентных катионов [7].

В *состав лизирующих буферов*, как правило, входят следующие компоненты:

— *ЭДТА* — разрыхляет клеточную мембрану, ингибирует нуклеазы, связывая ионы магния, требующиеся для работы большинства ДНКаз [8];

— *лизоцим* — разрушает клеточную стенку, применяется при выделении ДНК/РНК из грамотрицательных бактерий;

— *SDS* — анионный детергент, разрушающий цитоплазматическую мембрану, денатурирующий белки. SDS сорбируется на полипептидной цепи, что приводит к денатурации молекулы белка; разрушает ионные ассоциаты и ассоциаты неполярных частиц. Однако затем он должен быть полностью удален из лизата, так как его примесь ингибирует ферментативные реакции;

— *цетилтриметиламмония бромид (CTAB)* — катионный детергент, способствующий отделению полисахаридов и, соответственно, разрушению клеточной стенки растений. Также денатурирует белки и образует с ними положительно заряженные комплексы, образует растворимые соли с ДНК и РНК, что позволяет избирательно осаждать ДНК и РНК из водных растворов при низкой концентрации NaCl;

— *гуанидинизотиоцианат* — хаотропный агент, вызывающий нарушение сети водородных связей между молекулами воды на поверхности мембраны, что обусловлено главным образом ослаблением гидрофобных взаимодействий между компонентами мембраны.

Сводные характеристики и области применения основных способов лизирования клеточных мембран приведены в таблице 3.1.

Таблица 3.1

## Основные методы лизирования клеток

Метод	Технология	Принцип	Способ лизиса	Применение
Химический	Осмотический шок	Осмотический разрыв мембраны	Бережный	Сферопласты и протопласты
	Ферментативное расщепление	Расщепление клеточной стенки	Бережный	Грам +/- бактерии
	Детергенты	Солюбилизация мембран	Бережный	Общее использование
	Щелочной лизис	Солюбилизация мембран	Жесткий	Плазмидная ДНК
Механический	Гомогенизирование (лезвием или псетиком)	Измельчение клеток	Умеренный	Ткани животных
	Ультразвук или кавитация	Разрушение клеток УЗ	Жесткий	Сферопласты, но не первичные клетки
	Давление	Разрушение клеток под давлением	Жесткий	Грам- и некоторые Грам+ бактерии
	Шаровая мельница	Разрушение клеток стеклянными шариками	Жесткий	Бактерии, дрожжи, микроводоросли, одноклеточные

После лизирования клеток проводится очистка целевой нуклеиновой кислоты. Методики очистки нуклеиновых кислот из клеточных экстрактов обычно являются комбинацией двух или более из следующих методов:

- экстракция/осаждение (например, фенол-хлороформная экстракция);
- хроматография;

- центрифугирование;
- аффинное разделение (например, выделение поли(А)РНК с помощью магнитных частиц или колонок, связанных с олиго(dT) [9].

### 3.2. Фенол-хлороформная экстракция

Экстракция фенолом/хлороформом с последующим осаждением этанолом является традиционным методом очистки ДНК, который можно использовать для получения ДНК высокой степени чистоты. Метод предназначен для выделения ДНК из тканей животных и растений, культивируемых клеток млекопитающих, бактерий и дрожжевых клеток. Водный образец нуклеиновой кислоты смешивают с фенолом и хлороформом.

При рН фенола, равным 7—8, происходит растворение ДНК и РНК в водной фазе, белки связанные с ДНК, диссоциируют, затем хлороформ их денатурирует. В итоге образуются три отдельные фазы (рис. 3.2): водная фаза, интерфаза и органическая фаза. Из них водная фаза содержит ДНК, тогда как белки и липиды остаются в двух других фазах [6].

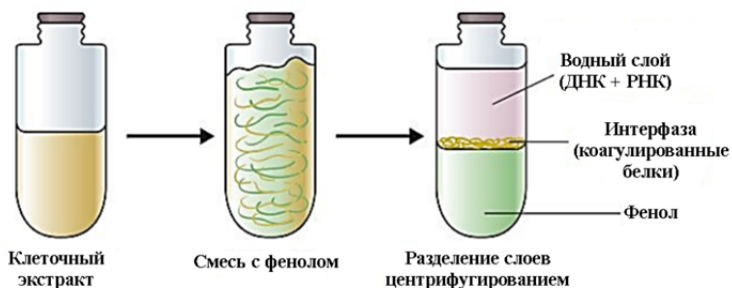


Рис. 3.2. Фенол-хлороформная экстракция

В кислых условиях ( $\text{pH} < 5$ ) суммарная РНК остается в верхней водной фазе (рис. 3.3), в то время как большая часть ДНК и белков остается или в интерфазе, или в органической



фазе. Регулируя содержание фенола и его pH, можно добиться разделения ДНК и РНК между собой, при этом ДНК будет находиться в органической фазе, а РНК — в водной фазе [6].

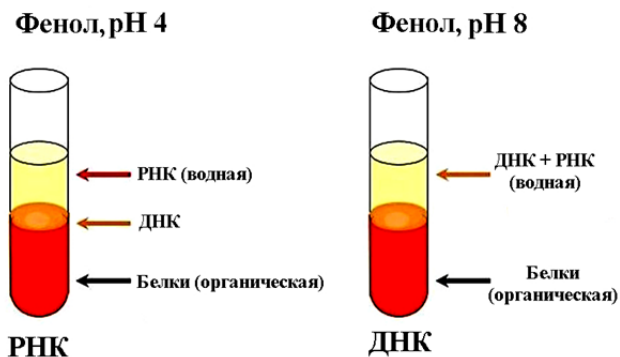


Рис. 3.3. Зависимость разделения РНК и ДНК от значения pH

Затем водную фазу можно обработать этанолом/изопропанолом и отцентрифугировать для осаждения ДНК/РНК (рис. 3.4). Осажденную ДНК/РНК затем растворить в выбранном буфере для использования в последующих реакциях.

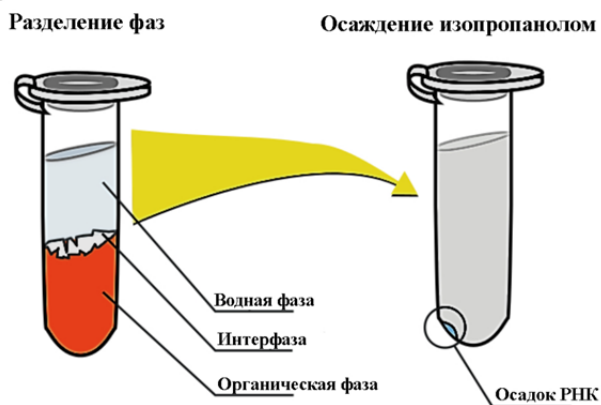


Рис. 3.4. Осаждение нуклеиновых кислот этанолом/изопропанолом

Схематичный процесс выделения нуклеиновых кислот, в частности РНК, методом фенол-хлороформной экстракции представлен на рисунке 3.5.

### Выделение РНК

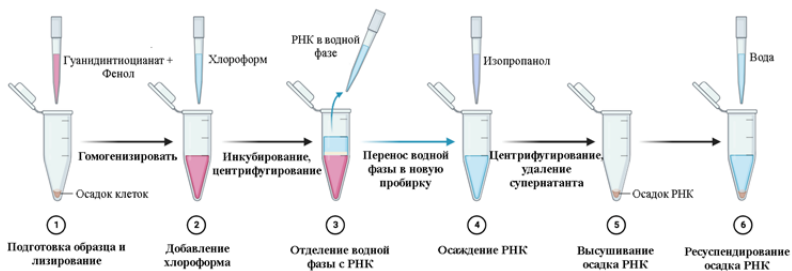


Рис. 3.5. Схема выделения РНК с помощью фенол-хлороформной экстракции

### 3.3. Твердофазная экстракция

Твердофазная экстракция — один из наиболее эффективных методов выделения нуклеиновых кислот, доступных на рынке. Он основан на селективном разделении целевого аналита от раствора на основе специфических гидрофобных, полярных и/или ионных свойств как растворенного вещества, так и сорбента. Взаимодействие между сорбентом и исследуемым веществом является основой этого метода, а «слабые» химические взаимодействия, такие как Ван-дер-Ваальсовы силы (неполярные взаимодействия), диполь-дипольные взаимодействия (полярные взаимодействия) и водородные связи, определяют механизм связывания нуклеиновых кислот с сорбентом.

Принцип данного метода (рис. 3.6) заключается в сорбции нуклеиновых кислот на носителе (оксиде кремния) за счет

слабых связей (водородные связи, электростатические силы, бисульфидные мостики и т. д.) и последующей их элюцией солевыми растворами с высокой ионной силой [10].

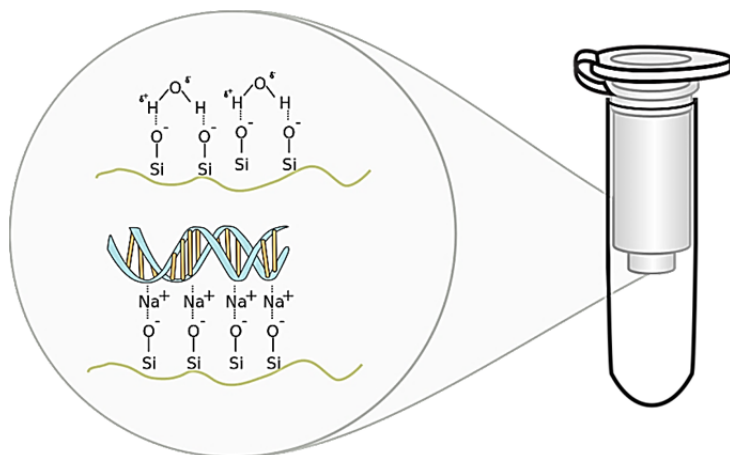


Рис. 3.6. Взаимодействие ДНК и оксида кремния

В двух словах твердофазную экстракцию можно определить следующим образом: нуклеиновые кислоты связываются с твердой поверхностью (кремниевая мембрана или магнитные шарики), нежелательные несвязанные материалы вымываются, а нуклеиновые кислоты позже отделяются от твердой фазы. Двумя наиболее распространенными методами твердофазной экстракции являются экстракция на спин-колонке (микроцентрифужная колонка) и экстракция с помощью магнитных частиц (шариков).

### 3.3.1. Экстракция на спин-колонке

Экстракцию на спин-колонке обычно выполняют с помощью специального набора реактивов, но все они следуют одному и тому же основному принципу (рис. 3.7):

- лизирование образцов в буфере для лизиса (химический лизис часто сочетается с физическими методами лизиса, чтобы разрушить клеточную мембрану);
- перенос образца в спин-колонокки и центрифугирование (нуклеиновые кислоты связываются с мембраной внутри колонки, в то время как другие нежелательные материалы проходят через нее);
- промывание спин-колонокки центрифугированием с промывочным буфером (чтобы смыть все несвязанные компоненты);
- смывание нуклеиновой кислоты с мембраны с помощью элюирующего буфера.

### Выделение ДНК

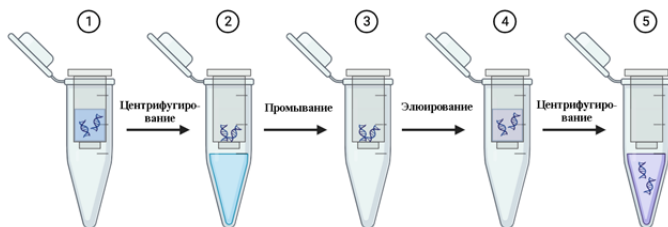


Рис. 3.7. Схема выделения ДНК с использованием спин-колонокки

### 3.3.2. Экстракция на магнитных частицах

Экстракция на магнитных шариках (рис. 3.8) также выполняется с помощью специальных наборов. Как и в случае методов экстракции на спин-колонокке, нужен буфер для лизиса и, в зависимости от образца, метод физического лизиса для разрушения клеток. После лизиса добавляют магнитные шарики, которые связывают нуклеиновые кислоты в образце. Затем пробирки помещают на магнит и отбирают надосадочную жидкость для удаления нежелательного несвязанного материала. Этот шаг повторяют несколько раз, меняя промывочный буфер между ними. На заключительном этапе добавляют элюирующий буфер для отделения нуклеиновых кислот от шариков перед переносом образцов в другую пробирку [11].



Рис. 3.8. Схема выделения ДНК с использованием магнитных частиц

На основе использования магнитных частиц или других сорбентов, на поверхности которых имеются ковалентно связанные oligo d(T) олигонуклеотидные последовательности разной длины, можно выделять чистые препараты мРНК (рис. 3.9) для исследования экспрессии генов в образцах [12].

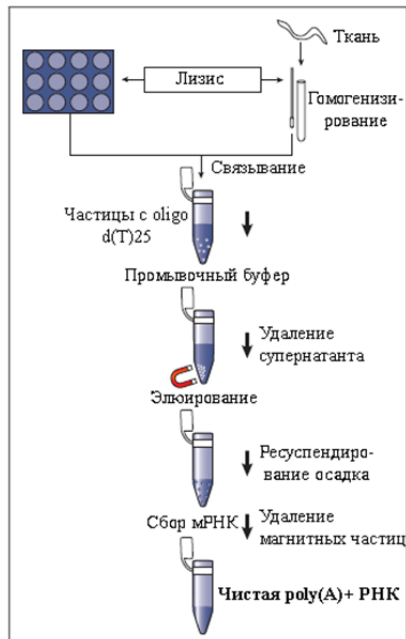


Рис. 3.9. Схема выделения мРНК с использованием магнитных частиц, покрытых oligo d(T)

### 3.4. Выделение ДНК из бактерий

Для выделения ДНК из бактерий здоровым клеткам сначала дают расти в подходящей бульонной среде до тех пор, пока они не достигнут экспоненциальной фазы роста, а затем собирают.

После этого клетки разрушают с помощью химических реагентов (лизоцим, протеиназа К, ЭДТА и другие детергенты). Технологии органической экстракции или технологии на основе диоксида кремния применяются для разделения ДНК и белковых компонентов. Наконец, ДНК осаждается в высокой концентрации [13].

Бактериальные плазмидные ДНК широко используются в качестве векторов для клонирования в исследованиях, включающих методы рекомбинантной ДНК. Плазмиды представляют собой самовоспроизводящиеся кольцевые двухцепочечные внехромосомные молекулы ДНК (рис. 3.10).

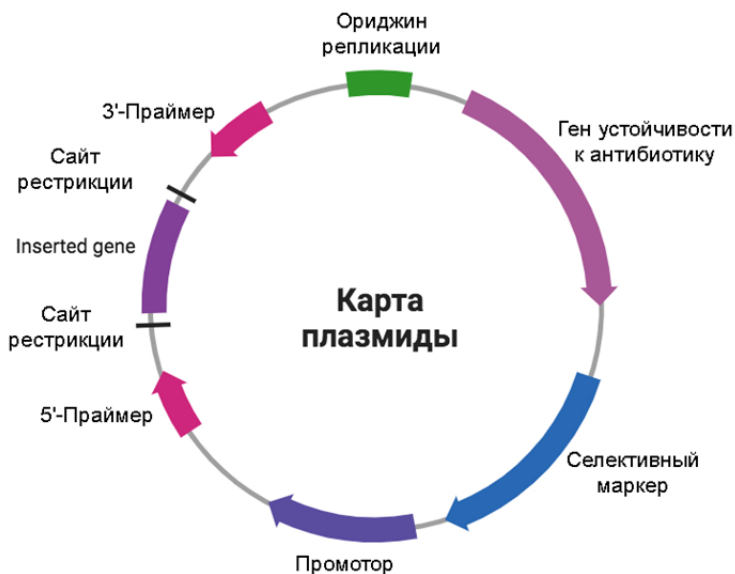


Рис. 3.10. Схематичное представление карты плазмиды

Как только новая плазида сконструирована, ее можно выделить и охарактеризовать по размеру и характеру рестрикционных ферментов с помощью гель-электрофореза. Плазмидную ДНК можно выделить из небольших бактериальных культур обработкой щелочью и SDS. Полученный препарат ДНК можно подвергнуть скринингу с помощью электрофореза или расщепления эндонуклеазами рестрикции. При дальнейшей очистке препараты могут быть использованы в качестве матриц в реакциях секвенирования ДНК.

### 3.4.1. Щелочной лизис

Бирнбоим и Доли впервые в 1979 г. описали метод щелочного лизиса для выделения плазмидной ДНК [14]. С тех пор это наиболее предпочтительный метод выделения плазмидной ДНК с некоторыми модификациями. Конкретные протоколы щелочного лизиса различаются в разных лабораториях, однако все они основаны на одном и том же принципе. На первом этапе выбранные бактериальные колонии выращивают в небольшом объеме среды с лизогенным бульоном (LB), содержащей антибиотик для селекции, а затем обрабатывают их для щелочного лизиса, более известного как метод выделения плазмид методом минипрепа.

С помощью этой процедуры можно получить 2—5 мкг ДНК из 1,5 мл культуры *E. coli*, содержащей плазмиду, полученную из pBR322, а от плазмиды, полученной из pUC, можно ожидать в 3—5 раз больше выделенной ДНК. Успех использования метода щелочного лизиса в основном зависит от используемого штамма *E. coli*. Штаммы с высокой эндонуклеазной активностью (серия HB101 или JM100) дают ДНК, которая часто требует дополнительной очистки с помощью фенол-хлороформной экстракции или дополнительных методов осаждения. Однако процедура щелочного лизиса, по-видимому, является наиболее используемым протоколом очистки плазмид независимо от штамма. Она также лучше подходит для выделения плазмид с высокой молекулярной массой (> 10 т.п.н.) или с низким числом копий, чем метод лизиса с кипячением.

Плазмидная ДНК, выделенная путем щелочного лизиса, пригодна для большинства анализов и процедур клонирования без дополнительной очистки. Выделенная ковалентно-замкнутая кольцевая (covalently closed circular) плазмидная ДНК может быть разделена с помощью электрофореза в агарозном геле либо в интактном виде либо после ее расщепления подходящей эндонуклеазой рестрикции и может быть исследована далее.

Более ранние работы показали, что денатурация линейной ДНК, но не ковалентно-замкнутой кольцевой-ДНК (КЗК-ДНК), происходит в узком диапазоне рН (около 12,0—12,5). Это свойство используется для очистки КЗК-ДНК. Выделение плазмид из хромосомной ДНК бактерий основано на свойстве их дифференциальной денатурации при щелочном лизисе. Во время этой обработки происходит денатурация как хромосомной, так и плазмидной ДНК. Путем тщательного подбора соотношения клеточной суспензии и раствора NaOH достигается щелочное значение рН; дальнейший контроль рН достигается путем включения глюкозы в качестве буфера рН. Этот буфер часто представляет собой трис-буфер с основным рН, помогающим денатурировать ДНК и ЭДТА, которая связывает двухвалентные катионы, дестабилизируя мембрану и ингибируя ДНКазы (ферменты, разрушающие ДНК).

Детергент SDS растворяет фосфолипиды и белки клеточной мембраны, что приводит к лизису клеток и высвобождению клеточных компонентов. Высокая концентрация гидроксида натрия денатурирует геномную и плазмидную ДНК, а также клеточные белки. Клеточная ДНК становится линейной, а нити ДНК разделяются, тогда как плазмидная ДНК имеет кольцевую структуру и остается топологически ограниченной (две нити, хотя и денатурированные, остаются вместе). Последующая нейтрализация ацетатом калия позволяет повторно отжигать только ковалентно замкнутую плазмидную ДНК и оставаться солюбилизированной.

В то же время хромосомная ДНК, еще обладающая очень высокой молекулярной массой, осаждается в виде комплекса,



образованного калием и SDS, который удаляют центрифугированием. Одновременно высокая концентрация ацетата калия вызывает осаждение комплексов белок-SDS и высокомолекулярных РНК. При этом три основные загрязняющие молекулы соосаждаются и могут быть удалены однократным центрифугированием. Плазмидную ДНК выделяют из супернатанта осаждением этанолом.

### 3.4.2. Мини-преп

Разновидностью щелочного лизиса является метод выделения плазмидной ДНК — мини-преп (mini-prep), в котором применяется принцип твердофазной экстракции (рис. 3.11).

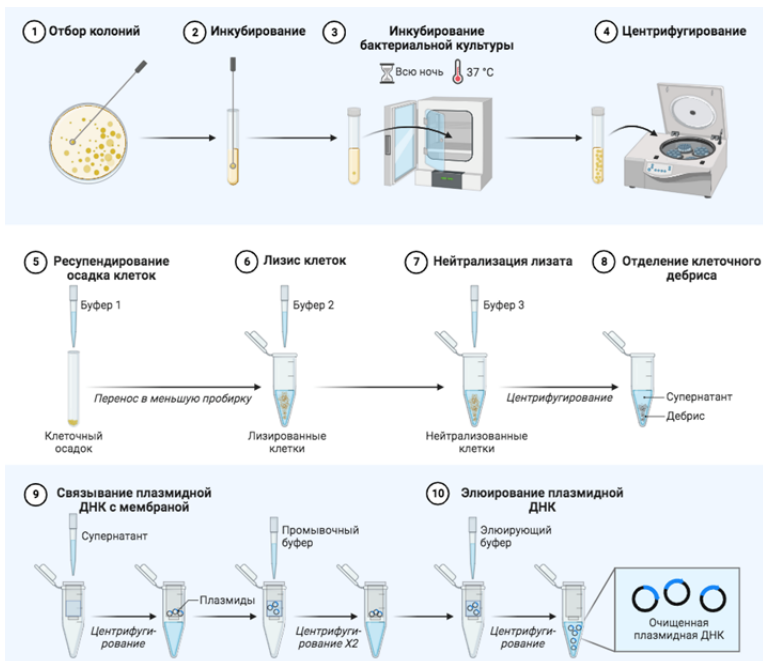


Рис. 3.11. Схема выделения плазмидной ДНК с помощью мини-препа

Первый этап мини-препа включает лизис клеток с помощью щелочного раствора, что способствует высвобождению содержимого в окружающую жидкость. Затем добавляют кислый раствор, который нейтрализует щелочной и денатурирует белки, делая их нерастворимыми. После чего их можно удалить из клеточного лизата центрифугированием.

Второй этап мини-препа включает пропускание клеточного лизата через колонку. Эти колонки связываются с плазмидной ДНК и позволяют проходить хромосомной ДНК и другим клеточным продуктам. Промыв колонку несколько раз, можно смыть плазмидную ДНК, пропустив через элюирующий раствор.

### **3.4.3. Выделение ДНК лизоцимом и протеиназой К**

Жесткие клеточные стенки некоторых микроорганизмов (грамположительные бактерии, дрожжи, споры и т. д.) делают основные методы выделения ДНК сложными и неэффективными. Кроме того, эти обычно используемые процедуры утомительны и непригодны для применения к большим числам выборок. Например, для выделения достаточного количества геномной ДНК для технологии рекомбинации ДНК требуется огромный объем культурных клеток. Эти ограничения можно преодолеть путем предварительной обработки микроорганизмов лизоцимом и протеиназой К для выделения ДНК.

Лизоцим расщепляет компоненты клеточной стенки, тогда как протеиназа К помогает в устранении мешающих белков. Этот метод защищает выделенную ДНК от вероятного повреждения, которое может произойти в длительных протоколах при многократном использовании агрессивных биохимических веществ. Дополнительная очистка выделенной ДНК может быть выполнена в соответствии с определенными требованиями для дальнейших экспериментов / исследований с помощью подходящих методов осаждения, таких как фенол-хлороформ-этанол или протоколы на основе колонок.

Клеточные стенки грамположительных бактерий (рис. 3.12, 3.13) в основном состоят из пептидогликана, который присут-

стует вокруг клеточной мембраны в многослойной форме. Наличие поперечных связей тейхоевой кислоты и N-ацетилглюкозамина в слоях пептидогликана обеспечивает жесткость их клеточных стенок.

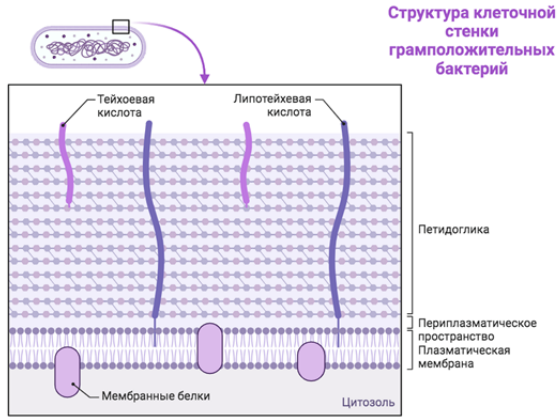


Рис. 3.12. Схематичное представление структуры клеточной стенки грамположительных бактерий

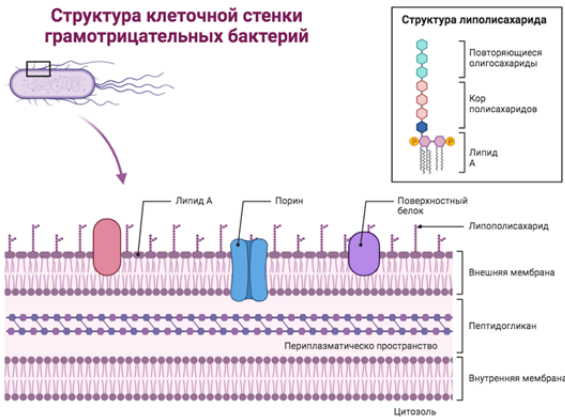


Рис. 3.13. Схематичное представление структуры клеточной стенки грамотрицательных бактерий

С одной стороны, из-за этой жесткости общий метод выделения ДНК или РНК на основе фенола и хлороформа непригоден для грамположительных бактерий и других подобных микробов. С другой — лизоцим представляет собой природный фермент, который убивает бактерии, атакуя и повреждая слой пептидогликана [13].

Протеиназа К представляет собой протеазу широкого спектра действия, способную расщеплять многие поверхностные белки, включая нуклеазы. Добавление разрывов лизоцима открывает клеточную стенку для более легкого удаления нуклеиновых кислот из клетки вместе с подходящим антибиотиком и/или буфером для лизиса клеток. Кроме того, добавление протеиназы К способствует дезактивации РНКаз/ДНКаз и позволяет избежать деградации нуклеиновых кислот в растворе. Кроме того, протеиназа К помогает остановить действие лизоцима в этом протоколе. Наконец, выделенную нуклеиновую кислоту можно очистить либо на подходящей колонке, либо по протоколу фенол-хлороформ-этанольной экстракции.

#### 3.5. Выделение ДНК из тканей и клеток растений

ДНК, генетический материал всех растений, находится внутри ядра, как и любого другого эукариотического организма (рис. 3.14), что делает его экстракцию интересной, поскольку включает окружающую цитоплазматическую среду и жесткую целлюлозную клеточную стенку (рис. 3.15). Биохимическая неоднородность среди видов растений приводит к изменчивости цитоплазматической среды. Например, злаки богаты углеводами, бобовые — белками, семена масличных культур — липидами, а лекарственные растения — полифенолами и вторичными метаболитами; они мешают во время выделения ДНК и должны быть уничтожены. Количество этих загрязняющих веществ в образце зависит от условий окружающей среды, возраста и вида растения, а также используемой его части. ДНК, извлеченная из древесных образцов и образцов гербария, нуждается в некоторых других изменениях в протоколе.

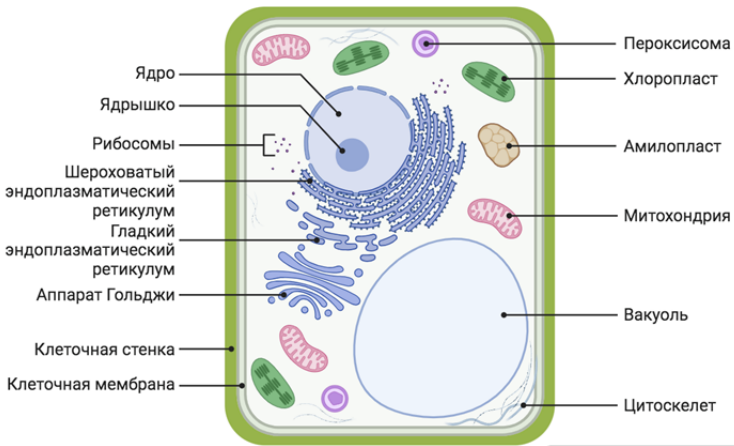


Рис. 3.14. Строение растительной клетки

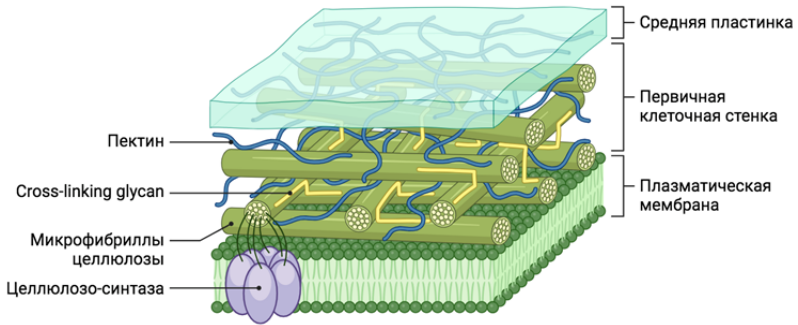


Рис. 3.15. Строение клеточной стенки

Следовательно, протокол выделения ДНК требует незначительных вариаций для получения ДНК в наиболее чистой форме из различных цитоплазматических сред. Более того, варианты протокола определяются целью, для которой извлекается ДНК, то есть клонирование и секвенирование (требует высокой чистоты) или ПЦР (работает достаточно очищенная ДНК).

Из-за наличия клеточных стенок те же химические вещества, например лизоцим, которые используются для выделения бактериальных и животных клеток, не подходят для лизиса растительных клеток. Из-за большого количества полифенолов и полисахаридов в растительных клетках простая экстракция фенолом не может использоваться для выделения ДНК. Поэтому применяется детергент, известный как СТАВ (бромид цетилтриметиламмония), который образует нерастворимый комплекс с нуклеиновой кислотой и избирательно осаждает ДНК, оставляя после себя углеводы, белки и другие загрязняющие компоненты. После этого ДНК-содержащий осадок можно разложить на комплексы, растворив его в NaCl.

Альтернативный метод заключается в использовании гуанидина тиоцианата, который способствует денатурации и растворению белков. Гуанидин тиоцианат также отделяет нуклеопротеины от ДНК и может использоваться для любой ткани. В присутствии гуанидина тиоцианата ДНК также прочно связывается с частицами диоксида кремния. Таким образом, клеточный экстракт или гомогенат ткани, смешанный с гуанидином тиоцианатом, можно наносить на хроматографические колонки, заполненные силикагелем, для выделения ДНК. Затем ДНК избирательно связывается с колонкой и может быть легко элюирована [15].

#### **3.5.1. Выделение ДНК из растений на основе СТАВ**

В 1987 г. Дж. Дж. Дойл и Дж. Л. Дойл впервые внедрили быстрое выделение ДНК из свежих растительных тканей с помощью СТАВ (рис. 3.16). После этого исследователи внесли небольшие модификации, чтобы учесть биохимическую гетерогенность растений. Сообщается, что этот метод работает для различных групп покрытосеменных растений (как однодольных, так и двудольных) и недавно высушенных гербарных образцов [16].

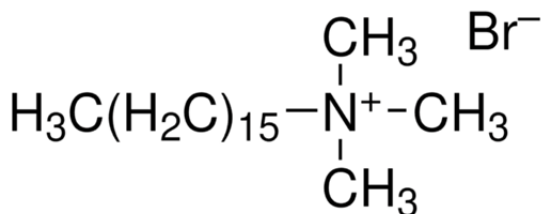


Рис. 3.16. Структурная формула бромид цетилтриметиламмония (СТАВ)

Таким образом, успешная экстракция ДНК из растений должна включать четыре основных этапа:

1) разрушение ткани, клеточной стенки (жидким азотом и СТАВ), клеточной мембраны и ядерной мембраны (сурфактантами);

2) высвобождение интактной ДНК в раствор;

3) осаждение ДНК;

4) очистка от загрязнителей — полисахаридов, белков, липидов, вторичных метаболитов, РНК и солей (используемых во время экстракции).

Трис-НСl, ЕДТА, СТАВ/SDS, PVP-40, ME, NaCl, хлороформ, изоамиловый спирт и этанол — это некоторые из химических веществ, используемых для выделения ДНК из растений.

*СТАВ (бромид цетилтриметиламмония)* представляет собой катионный детергент, растворимый в воде и хорошо растворимый в спирте. Он имеет длинную гидрофобную углеводородную цепь и гидрофильную головку, образующую мицеллы в воде. Во время выделения ДНК он захватывает фосфолипиды (они тоже амфипатические) с биологических мембран, тем самым разрывая их и высвобождая ДНК. Также известно, что ферменты денатурируют, добавляя суммарный положительный заряд, очищая таким образом все ДНКазы и РНКазы, которые могут гидролизовать нуклеиновые кислоты. Во-вторых, растительные клетки содержат большое количество полисахаридов, которые сосаждаются вместе с ДНК в процессе

экстракции, придавая ей вид вязкого клея. При высокой концентрации соли СТАВ связывается с этими полисахаридами и осаждает их, в то время как ДНК остается растворимой. Следовательно, это более предпочтительный детергент при экстракции ДНК растений.

*Трис (гидроксиметиламинометан)* используется для поддержания рН-буфера между 7 и 9. Также он взаимодействует с липополисахаридами в клеточной мембране и способствует ее лизису. Во время измельчения клеточная компартментализация нарушается, и цитоплазматическое содержимое высвобождается, что изменяет рН и может повлиять на стабильность биомолекул (нуклеиновые кислоты). При этом Трис играет важную роль в предотвращении этого.

*ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота)* представляет собой хелатирующий агент, который связывает двухвалентные ионы ( $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$ ).  $Mg^{2+}$ , кофактор фермента ДНКазы, хелатируется в присутствии ЭДТА, делая фермент нефункциональным, тем самым защищая ДНК от деградации. Кроме того, связывание  $Mg^{2+}$  предотвращает ассоциацию белков с ДНК. Точно так же связывание  $Ca^{2+}$  ослабляет клеточную стенку и способствует легкому разрушению ткани.

*SDS (додецилсульфат натрия)* представляет собой анионный детергент, который денатурирует белки в биологических мембранах, что приводит к их разрушению и высвобождению клеточного содержимого. Поскольку SDS линейаризует белки, это также приводит к диссоциации комплексов нуклеиновая кислота — белок.

*МЭ ( $\beta$ -меркаптоэтанол)* является сильным восстанавливающим агентом, поэтому в большинстве случаев его добавляют в экстракционный буфер для удаления дубильных веществ и полифенолов, которые также денатурируют белки, разрывая дисульфидные связи и разрушая их третичную и четвертичную структуру, что снижает их растворимость [3].

*PVP (поливинилпирролидон)* добавляют в экстракционный буфер для удаления фенольных соединений (полифенолов) из клеточных экстрактов. Комплексы PVP с полифенолами удаляются после центрифугирования с хлороформом из интерфазы.



В отсутствие PVP полифенолы необратимо связываются с ДНК и соосаждаются в виде загрязнителей. Во-вторых, полифенолы, которые высвобождаются из вакуолей во время лизиса клеток, окисляются полифенолоксидазой (РРО) (обычно находящейся в пластидах), образуя хинон коричневого цвета. Присутствие PVP также предотвращает обесцвечивание образца.

*NaCl* (хлорид натрия) приводит к удалению белков, связанных с ДНК, и помогает им оставаться растворенными в водном слое. Одновременно  $\text{Na}^+$  нейтрализует ДНК, образуя ионную связь с отрицательно заряженной фосфатной группой, что приводит к сближению нейтральных молекул ДНК (помогает в преципитации), избегая образования комплексов белок — нуклеиновая кислота.

*Фенол*. Нейтральный фенол вместе с хлороформом помогает в удалении белков и полисахаридов из препарата ДНК. В водной среде полярные остатки белка образуют вокруг гидрофобного ядра защитную оболочку (неполярные аминокислотные тяжи). При добавлении фенола к клеточному экстракту и энергичном встряхивании белки денатурируют, обнажая гидрофобное ядро, и осаждаются в интерфазе.

*Хлороформ* ( $\text{CHCl}_3$ ) — неполярный растворитель, растворяет клеточный дебрис, липиды и неполярные белки, оставляя выделенную ДНК в верхней водной фазе.

*Изоамиловый спирт* — при экстрагировании водной фазы, содержащей ДНК, хлороформ контактирует с воздухом, образуя вредный газ под названием фосген ( $\text{COCl}_2$ ), который появляется в виде пены в интерфазе и препятствует правильному извлечению ДНК. Изоамиловый спирт стабилизирует границу раздела между водной и органической (хлороформ) фазами.

*Рибонуклеаза А* — эндонуклеаза, гидролизующая РНК. Во время очистки ДНК этот шаг помогает удалить загрязнения РНК. РНКаза является термостабильным ферментом, поэтому рекомендуется держать ее на кипящей водяной бане в течение 10 мин, поскольку это помогает избавиться от любого загрязнения ДНКазой.

*Изопропанол* и *этанол* удаляют гидратную оболочку вокруг фосфата, что приводит к осаждению нейтрализованной

ДНК (с  $\text{Na}^+$ ) из раствора. Однако они не могут разорвать гидратную оболочку РНК из-за 2'-ОН, прочно связанного с водой. В результате РНК остается растворимой в изопропанол, что позволяет селективно преципитировать ДНК. Изопропанол также растворяет хлороформ, таким образом удаляя примеси предыдущих стадий.

*Ацетаты натрия, аммония или калия.* Поскольку  $\text{Na}^+$  нейтрализуют ДНК и помогают им собраться вместе, в случае если это произойдет в присутствии изопропанола или этанола, будет получено гораздо лучшее осаждение. Так как ацетаты одновалентных катионов более растворимы в изопропанол, их рекомендуется использовать при осаждении.

*70%-ный этанол* используется для удаления лишней соли в осадке ДНК, которая появилась в процессе выделения ДНК.

Общая схема выделения ДНК из растений с использованием СТАВ представлена на рисунке 3.17.

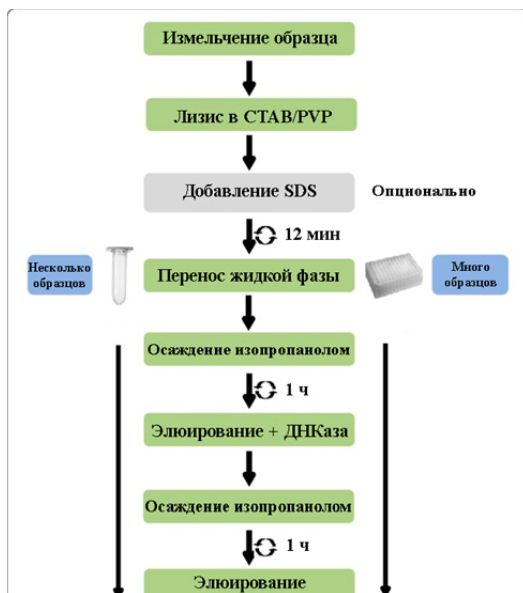


Рис. 3.17. Схема выделения ДНК из растений с использованием СТАВ

### 3.6. Выделение ДНК из животных клеток и тканей

Основные этапы выделения ДНК такие же, как у бактерий (рис. 3.18); однако клеточные культуры и препараты, как правило, более разнообразны для клеток и тканей животных, но при этом их легче лизировать. Обычными лизирующими агентами являются детергенты. На начальном этапе часто требуется механическая гомогенизация, поскольку образцы могут быть неповрежденными целыми тканями или органами. Для выделения ДНК из тканей животных может быть использован метод фенол-хлороформной экстракции и преципитация этанолом.



Рис. 3.18. Общая схема выделения ДНК из животных клеток и тканей

### 3.7. Выделение РНК

По сравнению с выделением ДНК, выделение РНК немного сложнее, потому что экстракция РНК требует среды, свободной от РНКаз, а РНК имеет очень короткий период полураспада после извлечения из тканей. В природе встречаются три типа РНК: рРНК, мРНК и тРНК. Очень важно защитить РНК от деградации; в противном случае транскрипты с очень низким числом копий могут быть потеряны и не будут обнаружены на этапах анализа. Как указывалось ранее, РНК особенно нестабильна из-за повсеместного присутствия РНКаз,

представляющих собой ферменты, содержащиеся в крови, во всех тканях, а также в большинстве бактерий и грибов в окружающей среде. Деградированные молекулы РНК не могут эффективно связываться с комплементарными последовательностями. Поэтому рекомендуется использовать свежие образцы тканей.

Для выделения интактной РНК всегда используют сильные денатуранты, ингибирующие эндогенные РНКазы. Фермент РНКазы термостабилен и восстанавливается после тепловой денатурации. Поскольку РНКазе не требуются кофакторы, их трудно инактивировать. Таким образом, в процедурах выделения РНК необходимо обеспечить свободную от РНКазы фракцию и средство для быстрого охлаждения образца. Для эффективного выделения РНК требуется сильный денатурант белка, так как он разрушает РНКазу. Простой протокол выделения РНК выполняется с использованием гуанидина тиоцианата-фенола-хлороформа. Различные методы, используемые для выделения РНК, могут привести к различным результатам, поэтому для воспроизводимости требуется надежный метод выделения РНК. Исследователям следует оптимизировать эти методы для их конкретного применения и иметь в виду, что методы выделения «тотальной РНК» не позволяют в равной степени выделить все типы РНК.

Основные этапы выделения РНК:

1. Образцы сначала гомогенизируют и лизируют в растворе гуанидина тиоцианата.
2. К этой смеси добавляют фенол, ацетат натрия и хлороформ и выдерживают для центрифугирования.
3. Смесь разделяется на водный слой, интерфазу и органический слой, с РНК в водном слое.
4. Верхний слой экстрагируют, и РНК осаждают раствором изопропанола.

#### 4. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Определение точного количества нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) в образце имеет большое значение в самых разных областях молекулярной биологии. Для того чтобы не тратить образцы впустую в тех случаях, когда имеется лишь их ограниченное количество, что часто бывает, например, в судебно-медицинской практике, необходим надежный метод количественного определения. Сегодня доступно несколько методов, способных работать с образцами с ограниченной массой, каждый из которых имеет свои преимущества и ограничения. Наиболее популярными методиками являются спектрофотометрический и флуориметрический анализы [17].

**Спектрофотометрия** (абсорбционная) — физико-химический метод исследования растворов и твердых веществ, основанный на изучении спектров поглощения в ультрафиолетовой (200—400 нм), видимой (400—760 нм) и инфракрасной (>760 нм) областях спектра. Основная зависимость, изучаемая в спектрофотометрии, — зависимость интенсивности поглощения падающего света от длины волны  $\lambda$  [18]. В соответствии с законом Бугера — Ламберта-Бера оптическая плотность раствора прямо пропорциональна концентрации поглощающего вещества. Нуклеиновые кислоты поглощают УФ-излучение в области 240—290 нм с максимумом при 260 нм. Хромофорами служат азотистые основания в составе нуклеиновых кислот, особенно пиримидиновые. Пиримидины поглощают УФ-свет примерно в 10—20 раз интенсивнее, чем хромофоры белковых молекул — триптофан, тирозин и фенилаланин [17].

В спектрофотометрии применяют монохроматический свет, то есть свет определенной длины волны, который можно выделить из белого света с помощью монохроматора (рис. 4.1).

Монохроматический свет интенсивности  $I_0$  проходит через прямоугольную ячейку из стекла или кварца (кювету), в которой находится раствор поглощающего вещества. Интенсивность  $I$  выходящего света, ослабленного поглощением, измеряется с помощью детектора. **Поглощение света раствором** (обозначается буквой  $d$  или  $E$ ) определяется как **логарифм отношения  $I/I_0$**  [12].

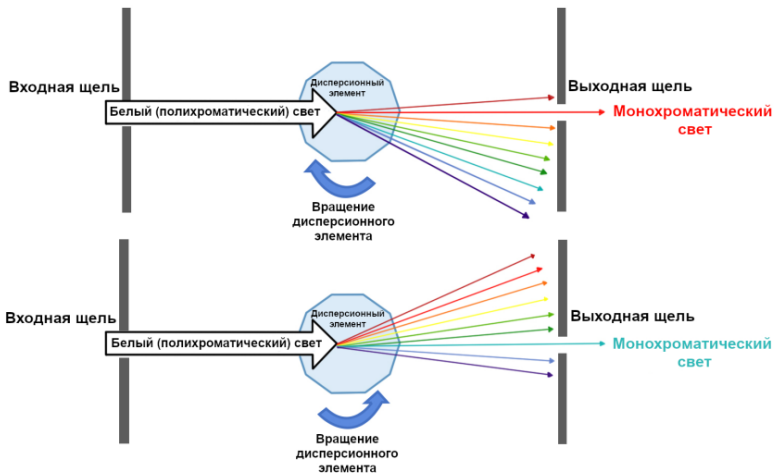


Рис. 4.1. Схема получения монохроматического света

В соответствии с **законом Бугера — Ламберта-Бера** оптическая плотность ( $E$ ) раствора прямо пропорциональна концентрации поглощающего вещества ( $C$ ), длине оптического пути луча в образце ( $d$ ) и молярному коэффициенту экстинкции ( $\epsilon$ -поглощения):

$$\text{Поглощение } E = \log_{10} \frac{I}{I_0} = \epsilon \times c \times d.$$

Закон Бугера — Ламберта-Бера гласит, что  $E$  пропорционально концентрации ( $C$ , моль/л) вещества и толщине ( $d$ , см)

слоя раствора. Раствор с концентрацией 1 моль/л в кювете толщиной 1 см имеет оптическую плотность, равную  $\epsilon$ , то есть  $\epsilon$  численно равен поглощению 1 М раствора при длине пути света 1 см. Молярный коэффициент  $\epsilon$  уже не зависит от условий измерения  $C$ ,  $d$  и характеризует способность молекул данного вещества поглощать свет той или другой длины волны. Размерность его — л/(моль  $\times$  см). Измерив оптическую плотность раствора ( $E$ ) в кювете толщиной 1 см, по значению  $\epsilon$  можно определить концентрацию вещества в растворе:  $C = E/\epsilon$  (моль/л). Если толщина кюветы не равна 1 см, то

$$C\left(\frac{\text{моль}}{\text{л}}\right) = \frac{E}{\epsilon} \times d \text{ [12].}$$

Концентрация нуклеиновых кислот обычно определяется при длине волны 260 нм (рис. 4.2), в сравнении со стандартным раствором. Влияние примесей на результат может быть выявлено по вычислению «отношения». Так как белки поглощают при длине волны 280 нм, то отношение  $A_{260}/A_{280}$  используется для определения чистоты нуклеиновых кислот.

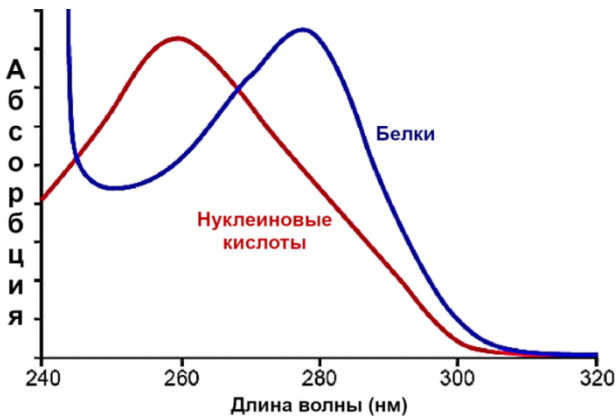


Рис. 4.2. Спектры поглощения нуклеиновых кислот и белков

Чистая ДНК должна иметь величину отношения, равную приблизительно **1,8**, в то время как чистая РНК — величину, равную приблизительно **2,0**. Поглощение при 230 нм отражает загрязнение образца такими веществами, как углеводы, пептиды, ароматические соединения. В случае **чистых образцов** отношение **A260/A230** должно составлять приблизительно **2,2**.

Оптическая плотность раствора нуклеиновых кислот при длине волны 260 нм, равная 1, соответствует 50 мкг/мл для двухцепочечной ДНК, 37 мкг/мл — для одноцепочечной ДНК, 40 мкг/мл — для РНК и 33 мкг/мл — для олигонуклеотидов [12].

### **Приборы и методики анализа нуклеиновых кислот на основе спектрофотометрии**

*NanoDrop* — это спектрофотометрический прибор, измеряющий поглощение света при 260 нм для определения количества нуклеиновых кислот в образце. Одноцепочечная ДНК, двухцепочечная ДНК и РНК поглощают при этой длине волны, поэтому данный метод не позволяет различать эти типы нуклеиновых кислот. Чтобы получить представление о чистоте образца, определяют соотношение 260/280 нм и 260/230 нм. Допустимым является соотношение 1,7—2,0 для 260/280 нм, тогда как более низкое значение может быть вызвано загрязнением белками или фенолом. Если в образце присутствует РНК (или одноцепочечная ДНК), то это приводит к увеличению соотношения. Для соотношения 260/230 нм значение более 1,5 свидетельствует о хорошем качестве образца ДНК. Поскольку NanoDrop определяет поглощенный свет при длине волны 260 нм, он, как правило, дает более высокие значения измеряемой концентрации, чем методы, специфичные для двухцепочечной ДНК (например, Qubit). Ожидаемые точность и воспроизводимость составляют 2% и около 2 нг/мкл для образцов менее 100 нг/мкл соответственно.



Для количественного определения ДНК широко используются **флуориметрические методы**. Эти наборы содержат интеркалирующий краситель, например PicoGreen, который связывается между цепями двухцепочечной ДНК. Измеряемый флуоресцентный сигнал связан с концентрацией ДНК. Флуориметр Qubit в сочетании с набором для количественного определения Qubit High Sensitivity может использоваться для образцов с концентрацией от 10 пг/мкл до 100 нг/мкл. Набор для количественного определения AccuGreen — это недавно разработанный метод количественного определения двухцепочечной ДНК, который может использоваться с флуориметром, например с Qubit, данный набор подходит для образцов в диапазоне 0,1—10 нг/мкл. Эти два набора, основанные на использовании флуоресцентных интеркалирующих красителей, не позволяют судить о чистоте образца. Набор AccuClear Ultra High Sensitivity с семью стандартами содержит зеленый флуоресцентный краситель (468/507 нм), совместимый с флуоресцентными микропланшетными ридерами. Образцы от 0,03 до 250 нг находятся в линейном диапазоне этого набора.

## 5. ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ

**Полимеразная цепная реакция (ПЦР)** — метод амплификации определенных фрагментов нуклеиновых кислот *in vitro*, с помощью которого можно получать миллионы копий целевых фрагментов. Разработан Кэри Мюллисом (1944—2019) в 1983 г. [19].

ПЦР позволяет получать большие количества ДНК, необходимые для различных экспериментов и процедур в молекулярной биологии, судебно-медицинской экспертизе, эволюционной биологии и медицинской диагностике. Таким образом, основной задачей ПЦР, как правило, является получение достаточного количества целевой области ДНК, чтобы ее можно было проанализировать или использовать каким-либо другим способом. Например, ДНК, амплифицированную с помощью ПЦР, можно отправить на секвенирование, визуализировать с помощью гель-электрофореза или клонировать в плазмиду для дальнейших экспериментов.

### **Основные этапы проведения ПЦР-анализа:**

- выделение нуклеиновых кислот;
- собственно ПЦР или амплификация;
- анализ результатов: либо с помощью электрофореза, либо в реальном времени с использованием флуоресцентно-меченых зондов или интеркалирующих красителей.

### **Основные компоненты ПЦР-смеси (рис. 5.1):**

- ДНК-матрица;
- праймеры;
- термостабильная ДНК-полимераза. Используют ферменты, выделенные из экстремофильных организмов, например *Thermus aquaticus* (Тақ-полимераза);
- дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dCTP, dTTP);

- ионы  $Mg^{2+}$ , необходимые в качестве кофакторов для работы полимеразы;
- буферный раствор [20].

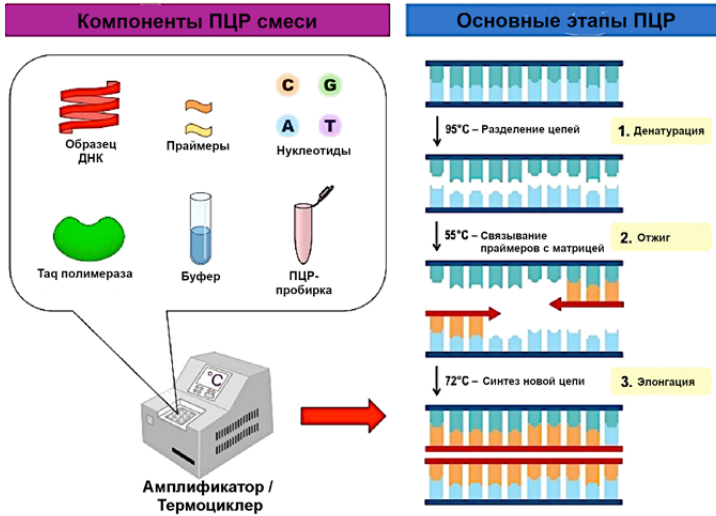


Рис. 5.1. Основные компоненты ПЦР-смеси и этапы ПЦР

## 5.1. Основные компоненты ПЦР-смеси

### 5.1.1. ДНК-матрица

ДНК-матрица для ПЦР может быть из любого источника — геномная ДНК, кДНК и плазмидная ДНК. Состав или сложность ДНК определяют оптимальное количество образца для ПЦР-амплификации. Оптимальные количества матрицы также могут варьироваться в зависимости от типа используемой ДНК-полимеразы, поскольку чем больше сродство фермента к матрице, тем меньше потребуется матрицы на входе в реакцию.

Добавление избыточного количества матрицы увеличивает риск неспецифической амплификации, тогда как более низкие

количества снижают выход реакции (табл. 5.1). Некоторые вещества (ионные детергенты, фенол, этанол и др.), используемые при выделении ДНК, даже в небольших количествах могут ингибировать ПЦР. Целостность ДНК-матрицы важна при амплификации длинных фрагментов [3].

Таблица 5.1

### Оптимальное количество ДНК-матрицы на реакцию [21]

Тип матрицы	Количество на реакцию (25—50 мкл), нг
Плазмидная и фаговая ДНК	0,01—1,0
Геномная ДНК бактерий	0,1—10,0
Геномная ДНК эукариот	10—500
Индивидуальные фрагменты линейной ДНК	0,001—0,1
кДНК	0,001—10

#### 5.1.2. Праймеры

Праймеры для ПЦР (рис. 5.2) представляют собой синтетические ДНК-олигонуклеотиды примерно из 15—30 оснований. Праймеры для ПЦР предназначены для связывания посредством комплементарности с последовательностями, фланкирующими интересующую область в ДНК-матрице. Во время ПЦР ДНК-полимераза удлиняет праймеры с их 3'-концов.

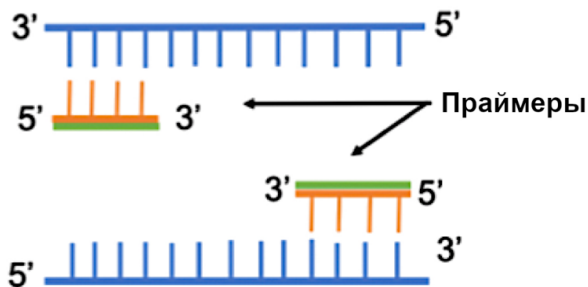


Рис. 5.2. Отжиг праймеров на матрице

Для эффективной ПЦР не требуется полной комплементарности матрице. Допускается присоединение к 5'-концам праймера участков, заключающих сайты рестрикции, кодоны инициации и терминации транскрипции.

Последовательности праймеров должны иметь температуру плавления ( $T_m$ ) в диапазоне 55—70 °С, при этом  $T_m$  двух праймеров должны отличаться друг от друга не более чем на 5 °С. Использование праймеров с низкой температурой отжига может существенно увеличить количество неспецифических продуктов ПЦР [3].

**Температура плавления** — температура, при которой 50% праймеров и его комплементарная последовательность образуют дуплекс.

Приблизительную температуру плавления можно рассчитать по формуле

$$T_m (°C) = 2(A + T) + 4(G + C).$$

Поскольку концентрация  $Na^+$  в реакции влияет на отжиг праймера,  $T_m$  можно рассчитать более точно по формуле

$$T_m (°C) = 81,5 + 16,6(\log_{10}[Na^+]) + 0,41(\%GC) - \\ - 675/\text{длину праймера}.$$

Для пары праймеров, имеющих разную температуру отжига, для постановки ПЦР выбирается наименьшая.

#### *Дизайн праймеров*

При подборе праймеров необходимо учитывать следующие параметры:

➤ содержание GC в праймере в идеале должно составлять 40—60% с равномерным распределением оснований C и G, чтобы избежать ошибочного связывания;

➤ на 3'-концах праймеров должно присутствовать не более трех оснований G или C, чтобы свести к минимуму неспецифическое связывание. С другой стороны, один нуклеотид C или G на 3'-конце праймера может способствовать удлинению продукта;

- следует избегать комплементарности между праймерами, особенно на их 3'-концах, что может приводить к образованию димеров;
- необходимо избегать самокомплементарности, которая может вызвать образование вторичных структур, например шпилек (рис. 5.3);
- ионные условия при проведении ПЦР должны подбираться индивидуально для каждой новой пары праймеров;



Рис. 5.3. Примеры образования шпилек и димеров праймеров

- оптимальные концентрации праймеров подбираются эмпирически. В однократной реакционной смеси концентрация варьируется в пределах 0,2—0,5 мкМ. Более высокие концентрации праймеров часто способствуют неправильному праймированию и неспецифической амплификации. Кроме того, низкие концентрации праймеров могут привести к слабой амплификации желаемой мишени или ее отсутствию [3];
- рекомендуется использовать праймеры с чистотой не менее 95 % [3].

### 5.1.3. ДНК-полимераза

**Термоустойчивая ДНК-полимераза** — термостабильный фермент (рис. 5.4), обеспечивающий достраивание 3'-конца второй цепи ДНК согласно принципу комплементарности [18].

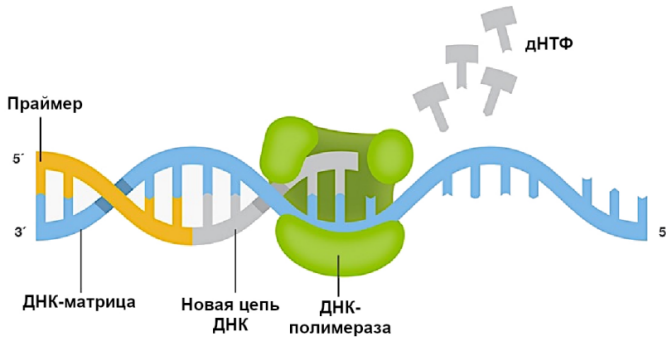


Рис. 5.4. Принцип работы ДНК-полимеразы

Тақ ДНК-полимераза, возможно, является самым известным ферментом, используемым для ПЦР. Тақ ДНК-полимераза обладает относительно высокой термостабильностью с периодом полураспада около 40 мин при 95 °С; включает нуклеотиды со скоростью около 60 нук/с при 70 °С и может амплифицировать длину около 5 т.п.н., поэтому подходит для стандартной ПЦР без особых требований.

В типичной реакции объемом 50 мкл достаточно 1—2 ед. ДНК-полимеразы для амплификации. Однако при использовании сложных матриц может потребоваться корректировка количества фермента. Например, когда в образце ДНК присутствуют ингибиторы, увеличение количества ДНК-полимеразы может улучшить выход, в то же время при более высоких концентрациях фермента могут появляться неспецифические продукты ПЦР.

Для специализированных приложений (ПЦР-клонирование, длинная амплификация и ПЦР с обогащением GC) предпочтительны ДНК-полимеразы с более высокой производительностью. Эти ферменты способны генерировать продукты ПЦР с меньшей ошибкой из длинных матриц за более короткое время с лучшими выходами и более высокой устойчивостью к ингибиторам, архейные Pfu (*Pyrococcus furiosus*), KOD (*Thermococcus sp.*) и GBD (*Pyrococcus sp.*).

### 5.1.4. Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты

Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dNTP) обычно добавляются в реакцию в эквимольных количествах для оптимального включения оснований. Однако в определенных ситуациях, таких как случайный мутагенез с помощью ПЦР, несбалансированные концентрации dNTP преднамеренно добавляются, чтобы способствовать более высокой степени неправильного включения ДНК-полимеразой, не выполняющей коррекцию.

Обычно рекомендуемая конечная концентрация каждого dNTP составляет 0,2 мМ. В некоторых случаях используют более высокие концентрации, особенно при высоком уровне  $Mg^{2+}$ , так как  $Mg^{2+}$  связывается с dNTP и снижает их доступность для включения. Однако слишком высокие концентрации dNTP могут ингибировать ПЦР.

### 5.1.5. Ионы магния

Ионы  $Mg^{2+}$  действуют как кофакторы активности ДНК-полимераз, обеспечивая включение dNTP во время полимеризации. Ионы  $Mg^{2+}$  в активном центре фермента катализируют образование фосфодиэфирной связи между 3'-ОН группой праймера и фосфатной группой dNTP (рис. 5.5).



Рис. 5.5. Принцип взаимодействия ионов магния с ДНК-полимеразой



Кроме того,  $Mg^{2+}$  способствует образованию комплекса между праймерами и матрицами ДНК, стабилизируя отрицательные заряды на их фосфатных остовах (рис. 5.6).

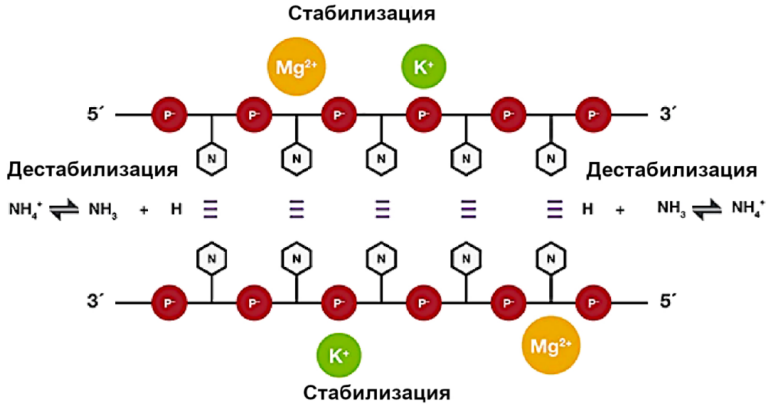


Рис. 5.6. Образование комплекса между ионами магния и матрицей ДНК

Типичная конечная концентрация  $Mg^{2+}$  в ПЦР находится в диапазоне 1—4 мМ, с рекомендуемым шагом титрования 0,5 мМ для оптимизации. Низкие концентрации  $Mg^{2+}$  приводят к небольшому количеству продукта ПЦР или его отсутствию из-за пониженной активности полимеразы. С другой стороны, высокие концентрации  $Mg^{2+}$  часто производят неспецифические продукты ПЦР из-за повышенной стабильности комплексов праймер — матрица, а также увеличения ошибок репликации из-за неправильного включения dNTP.

### 5.1.6. Буфер

ПЦР проводят в буфере, обеспечивающем подходящую химическую среду для активности ДНК-полимеразы. рН буфера обычно составляет от 8,0 до 9,5 и часто стабилизируется

Трис-НСI. Высокое значение рН необходимо потому, что при повышении температуры рН трис-буфера падает и при 72 °С составляет ~7,5.

Для Taq ДНК-полимеразы буфер обычно содержит ионы  $K^+$  из KCl, которые способствуют отжигу праймеров. Иногда сульфат аммония  $(NH_4)_2SO_4$  может заменить KCl в буфере. Ион  $NH_4^+$  оказывает дестабилизирующее действие, особенно на слабые водородные связи между несовпадающими парами оснований праймер — матрица, тем самым повышая специфичность.

В качестве дополнительных компонентов буфера могут использоваться:

➤ **БСА** (обычно в конечной концентрации 0,1—0,8 мкг/мкл) для стабилизации ДНК-полимеразы и связывания ингибиторов ПЦР;

➤ **DMSO** (в концентрации 2—5%, при концентрации  $\geq 10\%$  — ингибитор) для увеличения эффективности реакции и предотвращения образования вторичных структур, особенно для GC-богатых матриц;

➤ **глицерин** (в концентрации 5—10%) для увеличения эффективности реакции при высоких температурах;

➤ **неионные детергенты** — Tween-20, Тритон X, Нонидет Р-40 (в концентрации 0,1—1,0%) — для предотвращения адсорбции молекул ДНК-полимеразы на стенках пробирок. Не используют SDS, так как даже 0,01% SDS снижает активность полимеразы на 10%;

➤ иногда дополнительно используют **ди- и олигосахариды** для стабилизации ДНК-полимеразы, **формамид** для повышения специфичности гибридизации праймеров с ДНК-матрицей [22].

## 5.2. Основные этапы ПЦР

Основные этапы проведения непосредственно ПЦР представлены на рисунке 5.7.

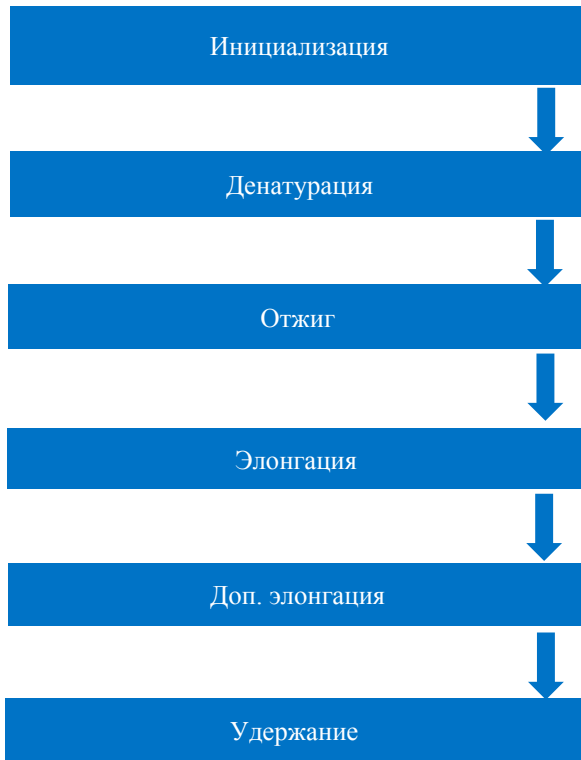


Рис. 5.7. Основные этапы ПЦР

### **5.2.1. Денатурация**

Денатурация проводится для разделения двухцепочечной матричной ДНК на одноцепочечные, чтобы праймеры могли связываться с целевой областью и инициировать удлинение. Полная денатурация вводимой ДНК помогает обеспечить эффективную амплификацию целевой последовательности в течение первого цикла амплификации.

Высокая температура помогает инактивировать термолабильные протеазы или нуклеазы, которые могут присутствовать в образце, с минимальным воздействием на термоста-

бильные ДНК-полимеразы. При использовании ДНК-полимеразы с горячим стартом этот этап также служит для активации фермента.

Начальную стадию денатурации проводят при 94—98 °С в течение 0,5—5 мин. Продолжительность и температура могут варьироваться в зависимости от природы матричной ДНК и концентрации солей в буфере. Например, для геномной ДНК млекопитающих может потребоваться более длительный период инкубации, чем для плазмид и продуктов ПЦР, в зависимости от сложности и размера ДНК. Точно так же ДНК с высоким содержанием GC (например, >65%) часто требует более длительной инкубации или более высокой температуры для денатурации. Буферы с высоким содержанием солей обычно требуют более высоких температур денатурации (например, 98 °С) для разделения двухцепочечной ДНК.

### 5.2.2. Отжиг

На этом этапе температуру реакции снижают, чтобы обеспечить связывание праймеров с ДНК-мишенью (рис. 5.8). Температуру отжига определяют путем расчета температуры плавления ( $T_m$ ) выбранных праймеров. Общее эмпирическое правило заключается в том, чтобы начинать отжиг при температуре на 3—5 °С ниже, чем самая низкая  $T_m$  праймеров. Продолжительность стадии — 0,5—2 мин.

#### Отжиг праймеров

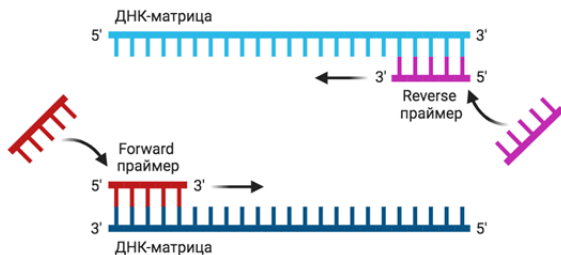


Рис. 5.8. Схема отжига праймеров

### 5.2.3. Элонгация

После отжига праймеров следующим шагом является удлинение 3'-конца праймеров, комплементарных матрице. 5'→3'-полимеразная активность ДНК-полимеразы включает dNTP и синтезирует дочерние цепи (рис. 5.9). Температуру реакции повышают до оптимальной температуры фермента для его максимальной активности, которая обычно составляет 70—75 °С для термостабильных ДНК-полимераз. Если температура отжига праймера находится в пределах 3 °С от температуры удлинения, температуры отжига и удлинения могут быть объединены в одну стадию, называемую двухэтапной ПЦР, вместо обычной трехстадийной ПЦР. Двухэтапная ПЦР сокращает время, необходимое для процесса ПЦР, поскольку нет необходимости переключать и стабилизировать температуры между отжигом и удлинением.

## Элонгация

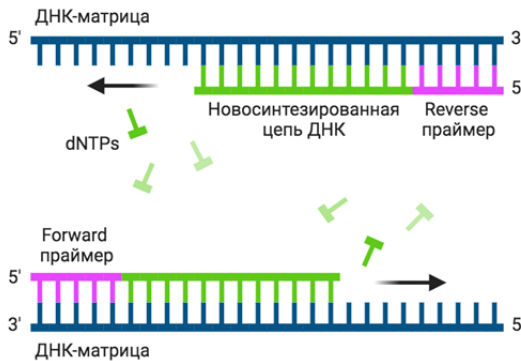


Рис. 5.9. Схема удлинения цепи при ПЦР

Время стадии элонгации зависит от скорости синтеза ДНК-полимеразы и длины ДНК-мишени. Типичное время удлинения для Taq ДНК-полимеразы составляет 1 мин/т.п.н., тогда

как для Pfu ДНК-полимеразы — 2 мин/т. п. н. Следовательно, «медленным» ферментам потребуется больше времени для амплификации, чем их «быстрым» аналогам для сопоставимых выходов. Точно так же длинные ампликоны ДНК требуют более длительного времени удлинения, чем короткие. В дополнение к увеличению времени элонгации при амплификации длинных мишеней (например, > 10 т. п. н.) может потребоваться снижение температуры этапов ПЦР для обеспечения связывания праймеров и устойчивой активности фермента во время длительного циклирования.

#### 5.2.4. Количество циклов ПЦР

Стадии ПЦР-денатурации, отжига и элонгации повторяются (или «заключаются») много раз для амплификации ДНК-мишени (рис. 5.10).

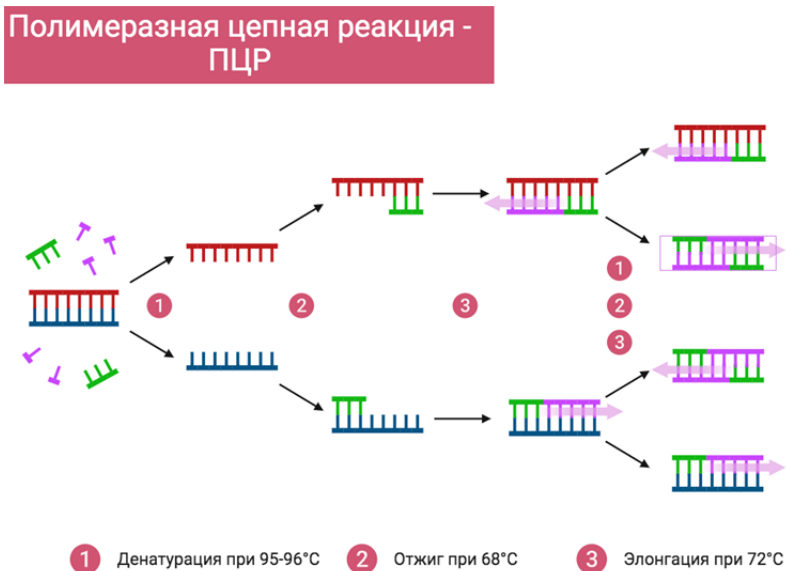


Рис. 5.10. Схема ПЦР

Количество циклов обычно составляет 25—35, но может варьироваться в зависимости от количества вводимой ДНК и желаемого выхода продукта. Если ввод ДНК составляет менее 10 копий, может потребоваться до 40 циклов для получения достаточного выхода. Не рекомендуется проводить более 45 циклов, так как начинают появляться неспецифические полосы. Кроме того, накопление побочных продуктов и истощение компонентов реакции резко снижает эффективность ПЦР, что приводит к характерной фазе плато на кривой амплификации ПЦР (рис. 5.11). И наоборот, низкое число циклов предпочтительнее для амплификации при секвенировании следующего поколения и для точной репликации ДНК-мишени при клонировании.

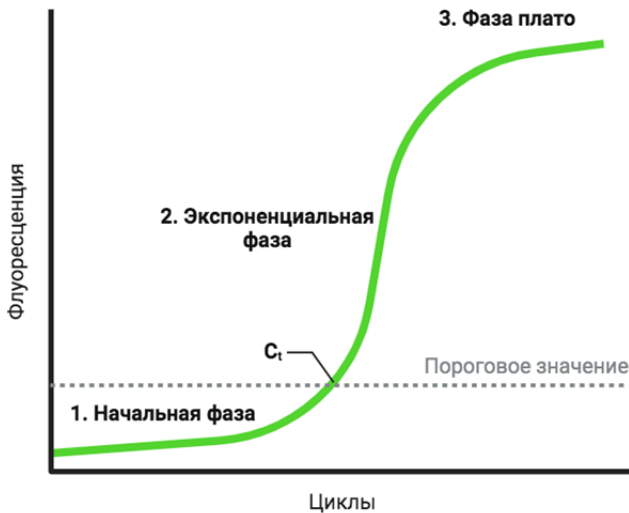


Рис. 5.11. Кривая амплификации

Изменения температуры на разных стадиях ПЦР представлены на рисунке 5.12.

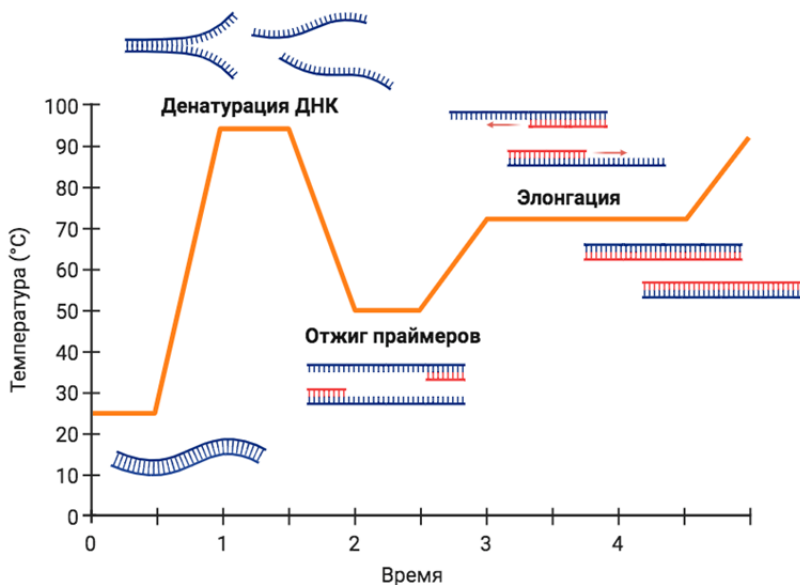


Рис. 5.12. Термограмма одного цикла ПЦР

### 5.3. Основные виды ПЦР

#### 5.3.1. ПЦР с горячим стартом (*Hot-start PCR*)

ПЦР с горячим стартом обычно используется для повышения специфичности амплификации. В ПЦР с горячим стартом используется модификатор фермента, такой как антитело, аптамер или химическая модификация для ингибирования активности ДНК-полимеразы при комнатной температуре. Эта модификация предотвращает неспецифическую амплификацию за счет связывания праймеров с матричными последовательностями с низкой гомологией (ошибочный прайминг) и связывания праймеров друг с другом (праймеры-димеры). Поскольку активность ДНК-полимеразы блокируется при ком-



натной температуре, стратегия горячего старта позволяет проводить несколько реакций при температуре окружающей среды (как в высокопроизводительных экспериментах) без существенного ущерба для специфичности и амплификации.

ДНК-полимераза активируется на этапе начального нагревания или «горячего старта», при котором модификатор фермента высвобождается при высокой температуре (обычно выше 90 °С) (рис. 5.13). Время активации и температура варьируются в зависимости от ДНК-полимеразы и природы модификатора горячего старта. Для некоторых ДНК-полимераз этапы активации и начальной денатурации могут быть объединены в один этап.

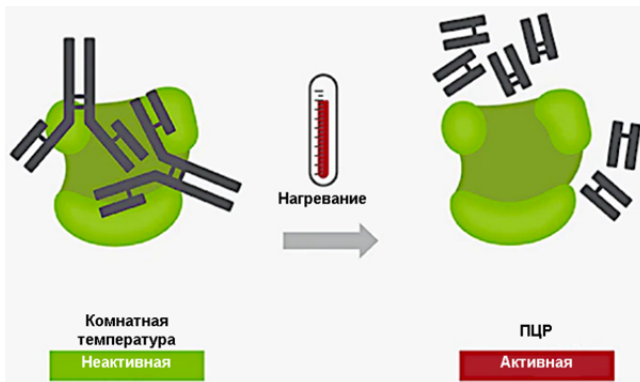


Рис. 5.13. Схема активации полимеразы при «горячем старте»

### 5.3.2. Ступенчатая ПЦР (Touchdown PCR)

Другой подход к повышению специфичности заключается в изменении параметров цикла ПЦР. В ступенчатой ПЦР температура отжига первых нескольких циклов устанавливается на несколько градусов выше, чем самая высокая температура плавления ( $T_m$ ) праймеров. Более высокие температуры помогают дестабилизировать образование димеров праймеров и неспецифических комплексов праймер — матрица, тем самым

сводя к минимуму нежелательную амплификацию. Таким образом, более высокие температуры отжига уменьшают количество неспецифических продуктов и способствуют специфической амплификации в начале ПЦР.

Предотвращая образование димеров праймеров и неспецифическое связывание, более высокие температуры отжига могут привести к снижению выхода ПЦР из-за повышенной диссоциации праймеров от их предполагаемой мишени. Для устранения этой проблемы температуру отжига часто снижают на  $1^{\circ}\text{C}$  в каждом цикле из первых нескольких циклов, чтобы получить достаточный выход желаемого ампликона. Как только температура отжига достигает («touches down») оптимальной температуры (обычно на  $3\text{—}5^{\circ}\text{C}$  ниже самой низкой  $T_m$  праймера), она поддерживается в течение оставшихся циклов отжига праймера (рис. 5.14). Ступенчатая ПЦР повышает специфичность (оранжевая кривая), начиная с температуры отжига выше оптимальной, которую затем постепенно снижают (черная линия) по мере продолжения реакции до тех пор, пока не будет достигнута оптимальная температура отжига. Выход предполагаемого ампликона (зеленая кривая) значительно увеличивается при оптимизированной температуре отжига.

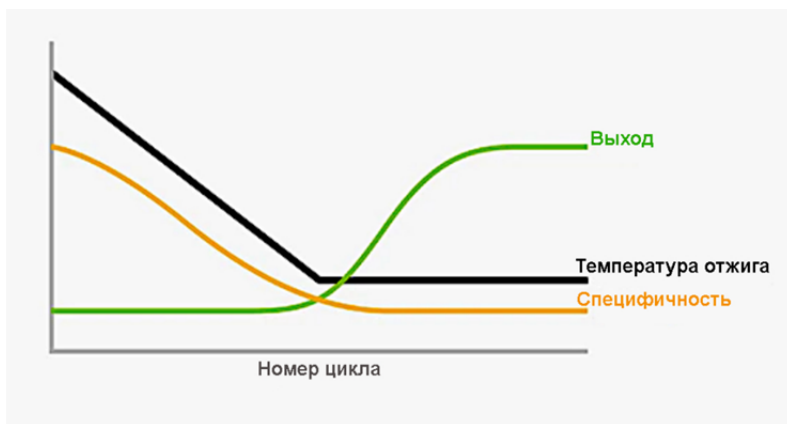


Рис. 5.14. Принцип реализации ступенчатой ПЦР

Таким образом, желаемые продукты ПЦР избирательно увеличиваются с небольшой амплификацией неспецифических мишеней или без нее в ходе ПЦР.

### 5.3.3. Вложенная ПЦР (Nested PCR)

Вложенная ПЦР представляет собой разновидность стандартной ПЦР, повышающую специфичность и выход желаемых ампликонов. В этом методе создаются две пары праймеров для ПЦР: один набор (внешние праймеры) граничит с областью ДНК, содержащей интересующий ампликон, а второй набор (вложенные праймеры) соответствует конкретной области ДНК, подлежащей амплификации. Внешние праймеры используются в первом раунде ПЦР для амплификации мишени с расширенными фланкирующими областями. Продукт этого первого раунда затем служит матрицей во втором раунде ПЦР с вложенными праймерами (рис. 5.15).

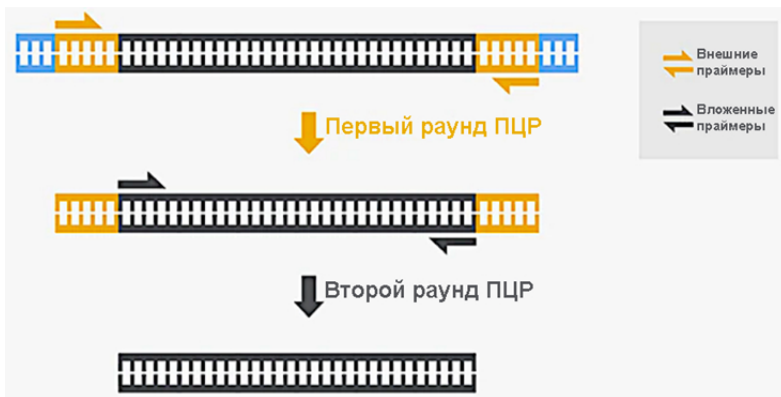


Рис. 5.15. Принцип работы вложенной ПЦР

Еще одно преимущество двух раундов ПЦР заключается в том, что этот подход помогает получить достаточный выход желаемой мишени из ограниченного количества вводимой ДНК.

### 5.3.4. Быстрая ПЦР (Fast PCR)

В быстрой ПЦР продолжительность этапов сокращается для более быстрого завершения амплификации без ущерба для выхода или эффективности. Условия быстрого циклирования особенно подходят для высокопроцессивных ДНК-полимераз, поскольку эти ферменты способны включать большее количество нуклеотидов во время каждого события связывания. Высокопроцессивные ДНК-полимеразы могут поддерживать высокую эффективность амплификации при времени удлинения ПЦР, которое составляет от  $1/2$  до  $1/3$  продолжительности времени удлинения, необходимого для Taq-полимеразы, имеющей низкую процессивность. Продолжительность ПЦР можно дополнительно сократить, объединив отжиг праймеров и удлинение в один этап, если их температуры находятся в пределах нескольких градусов друг от друга. Эта процедура также известна как двухэтапный протокол ПЦР.

При использовании ДНК-полимераз с низкой процессивностью (Taq-полимераза) условия быстрого циклирования можно использовать для коротких мишеней < 500 п. н. Ампликоны такого размера, как правило, не требуют увеличения времени полимеризации, поэтому можно сократить этап элонгации в протоколе (табл. 5.2).

Таблица 5.2

#### Параметры проведения быстрой ПЦР

Параметр	Оптимизация для быстрой ПЦР
Длина ампликона	< 500 п. н.
Продолжительность денатурации	Уменьшение
Температура денатурации	Увеличение
Продолжительность элонгации	Уменьшение

### 5.3.5. Прямая ПЦР (*Direct PCR*)

Прямая ПЦР относится к амплификации ДНК-мишени непосредственно из образцов без выделения нуклеиновой кислоты. В прямой ПЦР образцы (клетки или ткани) лизируются в специально разработанном буфере для высвобождения ДНК во время этапов высокотемпературной денатурации. Таким образом, этот метод упрощает рабочие процессы, экономит время и предотвращает потерю ДНК, вызванную этапами очистки.

Для прямой ПЦР рекомендуется использовать ДНК-полимеразы с высокой процессивностью, так как высвобождающиеся в лизат клеточный дебрис, белки, липиды и полисахариды вместе с ДНК могут ингибировать ПЦР. ДНК-полимеразы с высокой процессивностью толерантны к таким ингибиторам и, кроме того, проявляют более высокую чувствительность, поэтому могут быть использованы для амплификации небольших количеств ДНК из неочищенных образцов.

### 5.3.6. ПЦР для GC-богатых матриц

Матрицы ДНК, имеющие высокое содержание GC (> 65%), могут плохо амплифицироваться из-за более сильных водородных связей между основаниями G и C. GC-богатые последовательности также могут образовывать вторичные структуры. Таким образом, GC-богатые последовательности могут вызывать остановку ДНК-полимераз вдоль матрицы и прерывать синтез ДНК.

Для преодоления сильных GC-взаимодействий используют различные добавки для ПЦР, например DMSO для помощи в денатурации ДНК. Часто эти реагенты снижают  $T_m$  праймера.

Для ПЦР на GC-богатых матрицах необходимо использовать высокопроцессивные ДНК-полимеразы из-за их прочного связывания с матрицами во время удлинения праймера. Гипертермостабильные ДНК-полимеразы также могут быть полезны, поскольку более высокая температура денатурации (например, 98 °C вместо 95 °C) может облегчить расхождение цепей ДНК и амплификацию.

### 5.3.7. ПЦР длинных фрагментов (Long PCR)

ПЦР длинных фрагментов обычно относится к амплификации ДНК-мишеней длиной более 5 т. п. н. ПЦР длинных фрагментов традиционно выполняется со смесью Taq ДНК-полимеразы для быстрой элонгации и высокоточной полимеразы.

Использование высокопроцессивных ДНК-полимераз высокой точности позволяет проводить ПЦР длинных фрагментов за более короткое время. Высокая процессивность достигается за счет создания прочного ДНК-связывающего домена, который позволяет амплифицировать длинные фрагменты (например, >20 т. п. н. из геномной ДНК) за несколько часов. Кроме того, чрезвычайно высокая точность (например, > 100-кратная точность по сравнению с Taq-полимеразой) помогает обеспечить низкую частоту ошибок при репликации длинных фрагментов.

Преимущества высокопроцессивной, сконструированной с высокой точностью ДНК-полимеразы в длительной ПЦР и клонировании представлены в таблице 5.3.

Таблица 5.3

#### Преимущества высокопроцессивной ДНК-полимеразы перед Taq ДНК-полимеразой [23]

Параметр	Смесь Taq и высокоточных ДНК-полимераз	Высокопроцессивная с высокой точностью ДНК-полимераза
Скорость элонгации	60 с/т. п. н.	30 с/т. п. н.
Продолжительность ПЦР (20 т. п. н., 30 циклов)	~ 10,5 ч	~ 5,2 ч
Точность (относительно Taq ДНК-полимеразы)	5х	> 100х
Частота ошибок клонирования (20 т. п. н., 30 циклов ПЦР)	В среднем 2,5 ошибки/клон	0,25 ошибки/клон (то есть только 1 из 4 клонов может содержать ошибку)

Высокая процессивность ДНК-полимеразы значительно сокращает продолжительность ПЦР длинных фрагментов, а высокая точность, например, сокращает усилия, необходимые для скрининга колоний с безошибочными вставками.

### 5.3.8. Асимметричная ПЦР

Используется для получения продуктов амплификации в одноцепочечной форме. Ее суть заключается в том, что один из двух праймеров для ПЦР берется в 100-кратном избытке. На ранних циклах реакции происходит образование двухцепочечной ДНК и экспоненциальный рост ее количества. Как только пул лимитирующего праймера исчерпывается (примерно к 20-му циклу), начинается образование одноцепочечной ДНК (рис. 5.16). Ее накопление носит линейный характер, но этого оказывается достаточно для получения одноцепочечной ДНК в количествах, необходимых для секвенирования или использования в качестве зонда [24].

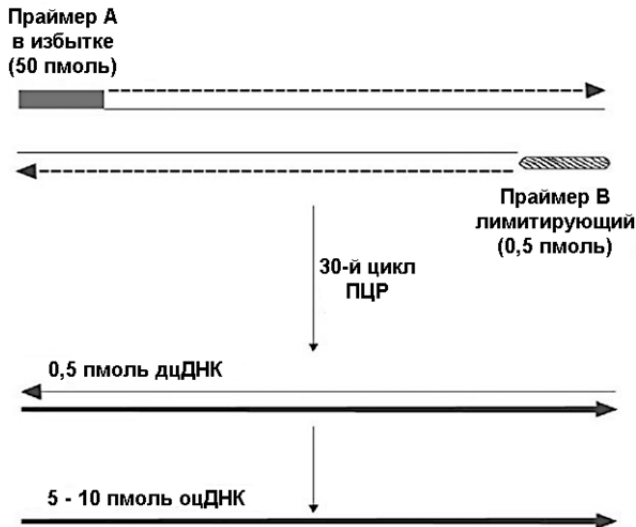


Рис. 5.16. Схематичное изображение асимметричной ПЦР

### **5.3.9. Инвертированная ПЦР (Inverse PCR)**

Инвертированная ПЦР изначально была разработана для определения последовательностей соседних неизвестных областей. Инвертированная ПЦР полезна для исследования промоторных последовательностей генов; онкогенных хромосомных перестроек (слияние генов, транслокация и транспозиция); интеграции вирусных генов. Этот метод известен как инвертированная ПЦР, потому что праймеры разработаны таким образом, чтобы они были направлены друг от друга, а не друг к другу, как в обычной ПЦР. В настоящее время инвертированная ПЦР обычно используется в сайт-направленном мутагенезе для репликации целевой плазмиды при введении желаемых мутаций [23].

В обычном протоколе для изучения неизвестных последовательностей геномной ДНК рестрикционное расщепление и лигирование предшествуют инвертированной ПЦР, за которой затем следует секвенирование ампликона (рис. 5.17). Для расщепления геномной ДНК выбирают рестриктазу для создания фрагментов подходящей длины, которые могут самолигироваться. Кроме того, выбранная рестриктаза не должна расщеплять известную последовательность, поэтому происходит лигирование между фланкирующими неизвестными последовательностями. Лигирование оптимизировано за счет использования низких концентраций расщепленных фрагментов ДНК, способствующих самолигированию. После самолигирования проводят инвертированную ПЦР путем праймирования известного участка ДНК. Полученные ампликоны содержат часть известной последовательности ДНК на каждом конце. Затем эти ампликоны можно секвенировать с концов для изучения областей, прилегающих к ранее известной последовательности [23].



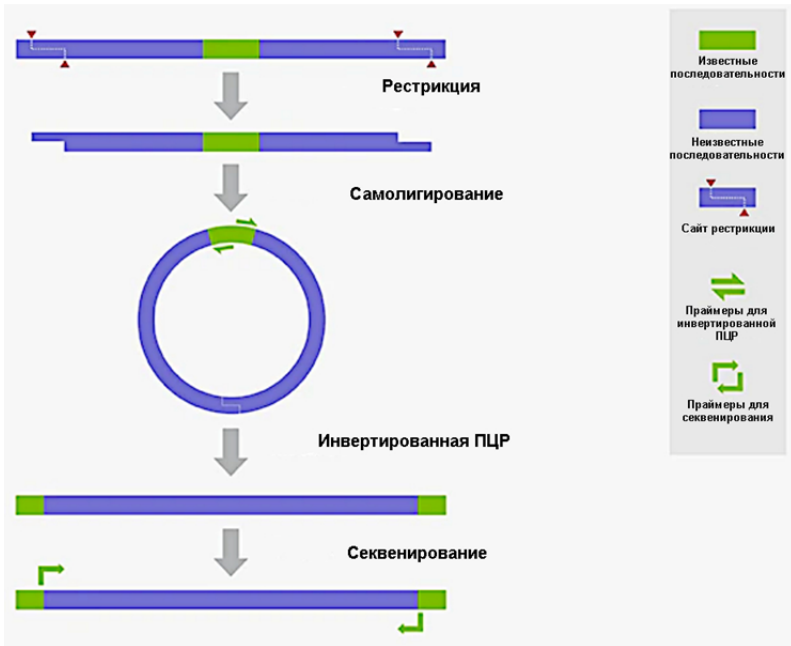


Рис. 5.17. Схема проведения инвертированной ПЦР

### 5.3.10. Количественная ПЦР (*Quantitative PCR*)

Поскольку степень (выход) амплификации последовательности зависит от количества введенной матрицы, ПЦР обычно используется для количественного определения ДНК, присутствующей в образце, наиболее распространенным применением которого является количественный анализ экспрессии / транскрипции генов. ПЦР по конечной точке один из возможных методов, однако он имеет серьезные недостатки, поскольку выход определяется с помощью гель-электрофореза, при котором чувствительность обнаружения ограничена. Что еще более важно, количественный анализ будет проводиться в конце ПЦР, когда амплификация достигнет фазы плато, при этом

интенсивность окрашивания геля ДНК не коррелирует линейно с количеством введенной ДНК. Тем не менее для полуколичественного анализа экспрессии генов с помощью ПЦР по конечной точке до достижения фазы плато в качестве исходных данных можно использовать серийно разведенные образцы ДНК или собирать ампликоны в определенных циклах ПЦР для оценки экспрессируемых генов по интенсивности геля. В конечной точке ПЦР ампликоны обнаруживаются, когда амплификация достигает фазы плато после ПЦР. В ПЦР в реальном времени количественное определение ампликонов происходит во время экспоненциальной фазы (рис. 5.18).

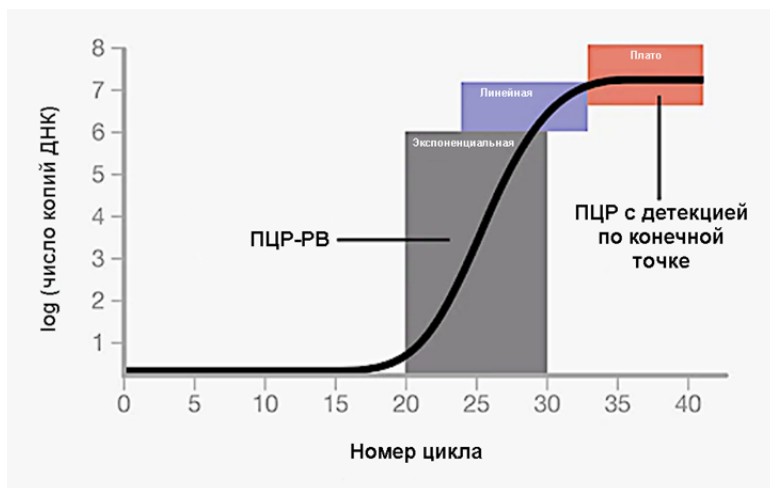


Рис. 5.18. Кривая амплификации, или динамика реакции ПЦР

Ограничения количественного анализа на основе ПЦР по конечной точке были преодолены, когда в 1993 г. Хигучи с соавторами сообщил о мониторинге амплификации ПЦР в реальном времени с использованием флуоресцентных сигналов. Этот метод стал основой количественной ПЦР (qPCR), какой мы ее знаем сегодня. qPCR основывается на мониторинге в реальном времени интенсивности флуоресценции, связанной с амплификацией мишени во время экспоненциальной фазы, что

позволяет избежать проблем количественного определения в ПЦР по конечной точке. qPCR является количественным измерением относительной и абсолютной экспрессии генов, однако ее количественная оценка все еще ограничена возможностями обнаружения [25].

Настоящая абсолютная количественная оценка образцов ДНК стала возможной с помощью цифровой ПЦР (также называемой ПЦР с предельным разведением), метода, разработанного параллельно с ПЦР в реальном времени в 1990-х гг. В цифровой ПЦР сильно разбавленный образец ДНК разделяется на многосекционный чип таким образом, что каждый отсек содержит не более одной копии интересующей мишени (рис. 5.19). Амплификацию в каждом отсеке определяют для получения положительных или отрицательных результатов (от 1 или 0 копий матрицы соответственно, то есть «цифровых» результатов). Количество копий образца определяется по доле отрицательных реакций с использованием статистической модели (распределение Пуассона) без необходимости использования известных образцов (стандартов) для количественного определения. В дополнение к экспрессии генов и определению количества копий цифровая ПЦР подходит для таких приложений, как определение низкочастотных аллелей, вирусное титрование и абсолютное количественное определение библиотек секвенирования нового поколения [26].



Рис. 5.19. Общий рабочий процесс цифровой ПЦР для абсолютного количественного определения

### **5.3.11. ПЦР в реальном времени (*Real Time PCR*) и интерпретация ее результатов**

ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) — это возможность отслеживать ход ПЦР по мере ее возникновения, то есть в режиме реального времени. Таким образом, данные собираются на протяжении всего процесса ПЦР, а не в конце, что полностью меняет подход к количественному анализу ДНК и РНК на основе ПЦР. В ПЦР-РВ реакции характеризуются моментом времени во время цикла, когда впервые обнаруживается амплификация мишени, а не ее количеством, накопленным после фиксированного количества циклов. Чем выше начальное число копий нуклеиновой кислоты-мишени, тем раньше наблюдается значительное увеличение флуоресценции [20].

Обнаружение продуктов ПЦР в режиме реального времени возможно за счет включения флуоресцентной репортерной молекулы в каждую реакцию лунку, что приводит к усилению флуоресценции с увеличением количества продукта. Флуоресцентные химические вещества, используемые для этой цели, включают ДНК-связывающие красители и флуоресцентно меченные специфичные к последовательности праймеры или зонды. Для отслеживания сигнала флуоресценции используются специализированные термоциклеры, оснащенные модулями обнаружения флуоресценции. Измеренная флуоресценция пропорциональна общему количеству ампликона; изменение флуоресценции во времени используется для расчета количества ампликона, продуцируемого в каждом цикле.

Методы ПЦР-РВ можно разделить на две основные группы, различающиеся по способам генерации репортерной флуоресценции:

- 1) применение интеркалирующих флуоресцентных агентов, флуоресценция которых значительно возрастает при связывании с двухцепочечной ДНК (наиболее часто интеркалирующим красителем является SYBR Green) (рис. 5.20);

2) использование меченных флуоресцентными агентами олигонуклеотидных проб, комплементарных участку ПЦР-продукта (протоколы TaqMan, Molecular Beacons и LightCycler) (рис. 5.21) [20].

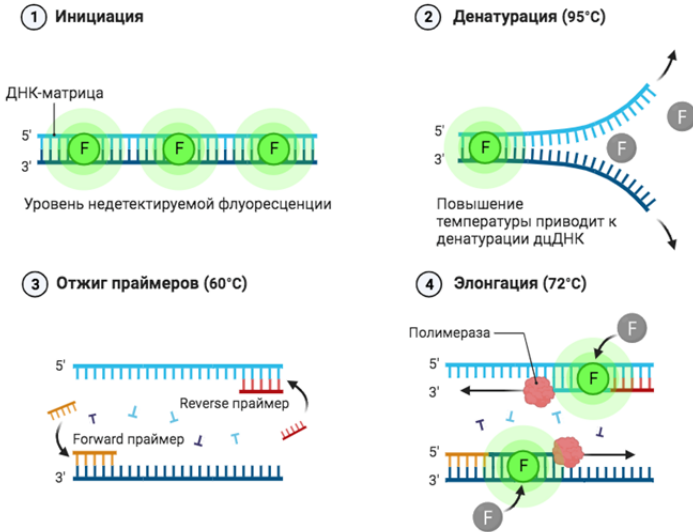


Рис. 5.20. Схема ПЦР-РВ (qPCR) на основе использования флуоресцентного красителя

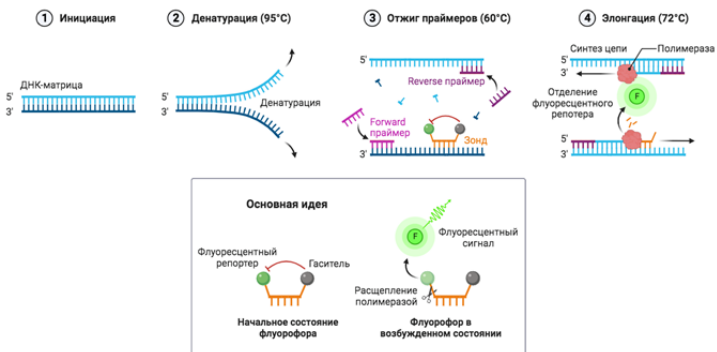


Рис. 5.21. Схема ПЦР-РВ (qPCR) на основе использования флуоресцентно-меченого зонда (протокол TaqMan)

Основное преимущество ПЦР-РВ перед обычной ПЦР заключается в том, что ПЦР-РВ позволяет определять начальное количество копий матричной ДНК (целевой последовательности амплификации) с точностью и высокой чувствительностью в широком динамическом диапазоне. Результаты ПЦР-РВ могут быть качественными (наличие или отсутствие последовательности) или количественными (количество копий). Таким образом, количественная ПЦР-РВ также известна как анализ qPCR. Напротив, обычная ПЦР в лучшем случае является полуколичественным методом. Кроме того, данные qPCR можно оценивать без гель-электрофореза, что сокращает время лабораторного анализа и увеличивает производительность.

График амплификации (рис. 5.11) показывает экспоненциальную фазу, за которой следует неэкспоненциальная фаза — плато. Во время экспоненциальной фазы количество ПЦР-продукта примерно удваивается в каждом цикле. Однако по мере протекания реакции компоненты расходуются, и в конечном итоге один или несколько компонентов становятся лимитирующими. В этот момент реакция замедляется и переходит в фазу плато (рис. 5.11) [27].

Первоначально флуоресценция остается на фоновом уровне, и ее увеличение не обнаруживается (начальная фаза на рис. 5.11), даже несмотря на экспоненциальное накопление продукта. Когда накапливается достаточное количество продукта, прибор детектирует сигнал флуоресценции (Ct). Номер цикла, при котором это происходит, называется циклом количественного определения (Cq) или пороговым циклом (Ct). Поскольку значение Ct измеряется в экспоненциальной фазе, когда реагенты не ограничены, qPCR можно использовать для надежного и точного расчета начального количества матрицы, присутствующей в реакции, на основе известной экспоненциальной функции, описывающей ход реакции [20].

Ct реакции определяется главным образом количеством матрицы, присутствующей в начале реакции амплификации. Если в начале реакции присутствует большое количество шаблона, потребуется относительно небольшое количество циклов

амплификации для накопления достаточного количества продукта, чтобы получить сигнал флуоресценции выше фона. Таким образом, реакция будет иметь низкий или ранний Ct. Напротив, если в начале реакции присутствует небольшое количество шаблона, потребуется больше циклов амплификации, чтобы сигнал флуоресценции поднялся выше фона. Следовательно, реакция будет иметь высокий или поздний Ct. Эта взаимосвязь формирует основу для количественного аспекта qPCR [20].

Для проведения количественного анализа необходим стандарт (произвольный фрагмент ДНК или РНК, ограниченный теми же праймерами, что и в специфической ПЦР-системе). К каждому стандарту конструируется соответствующий зонд. Делают десятикратные разведения стандарта и проводят ПЦР в реальном времени с использованием данных разведений (рис. 5.22). После проведения ПЦР и построения калибровочной зависимости величины Ct от исходного количества копий стандартов ( $\text{Log}N$ ) для каждого из стандартов можно вычислить неизвестное исходное количество копий в анализируемых образцах с помощью интерполяции (рис. 5.23) [20].

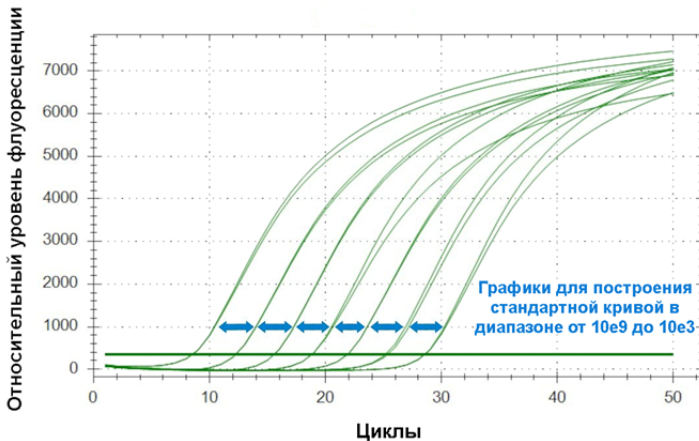


Рис. 5.22. Пример получаемых кривых флуоресценции для десятикратных разведений

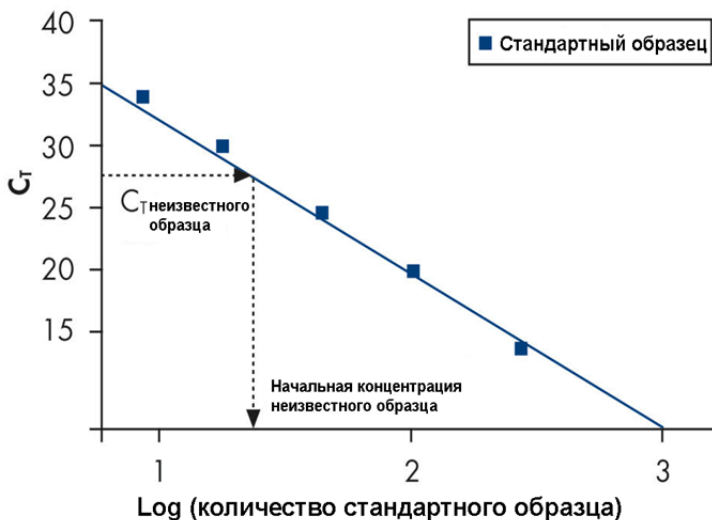


Рис. 5.23. Пример определения концентрации неизвестного образца с помощью стандартной кривой

Для определения динамического диапазона и эффективности ПЦР-РВ используют метод серийного разведения кДНК, полученной из выделенной РНК. Эффективность ПЦР в реальном времени рассчитывают по формуле

$$E = 10^{[-1/\tan \alpha]},$$

где  $E$  — эффективность реакции;  $\tan \alpha$  — тангенс угла наклона линии регрессии, полученной в результате серийных разведений образца кДНК [28].

Относительный уровень экспрессии гена при определенных условиях (например, контроль, эксперимент и т. д.) рассчитывают по формуле

$$\Delta C_t = C_t(\text{gene}) - C_t(\text{reference}),$$

где  $C_t(\text{gene})$ ,  $C_t(\text{reference})$  — уровень экспрессии искомого гена и референсного гена соответственно [29].



Относительные отличия в уровнях экспрессии генов получают при использовании следующей формулы

$$R = E^{(-\Delta\Delta C_t)},$$

где  $R$  — относительная экспрессия генов;  $\Delta\Delta C_t$  — различия в условиях экспрессии между разными группами сравнения (например, контрольной и экспериментальной):

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(1) - \Delta C_t(2) [30].$$

## 6. ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

**Электрофорез** — это движение заряженных частиц в растворе под действием электрического поля [3].

**Электрофоретический метод** в биохимии — это способ пространственного разделения молекул, имеющих разный заряд и размеры, путем помещения их в электрическое поле [3].

Результатом проведения электрофореза является **электрофореграмма** — картина, полученная после разделения сложной смеси с помощью электрофореза и специфического проявления [3].

Изначально электрофорез применялся для разделения аминокислотных последовательностей, однако позже, подтвердив свою эффективность, стал использоваться и для разделения нуклеиновых кислот. При этом разделение нуклеиновых кислот проще осуществить, чем белков, поскольку каждый нуклеотид в молекулах нуклеиновых кислот изначально несет один отрицательный заряд (на фосфатной группе), нет необходимости добавлять отрицательно заряженный детергент SDS, который нужен для того, чтобы молекулы белков двигались в сторону положительного электрода [31].

Существуют два вида электрофореза: горизонтальный и вертикальный.

Для проведения горизонтального электрофореза (рис. 6.1) используют пластину агарозного геля необходимой концентрации с добавлением специального красителя ДНК, например бромида этидия [3].



Рис. 6.1. Горизонтальный гель-электрофорез

## 6.1. Основные принципы гель-электрофореза нуклеиновых кислот

На скорость движения ДНК в геле в процессе электрофореза влияют следующие факторы:

- размер молекул ДНК;
- конформация ДНК;
- заряд молекулы;
- состав оснований и температура;
- концентрация агарозы в геле / ПААГ;
- напряженность электрического поля.

### 6.1.1. Размер молекул

Молекулы линейной двухцепочечной ДНК перемещаются в геле предположительно одним концом вперед со скоростями, обратно пропорциональными десятичному логарифму их молекулярных масс (рис. 6.2) [32].

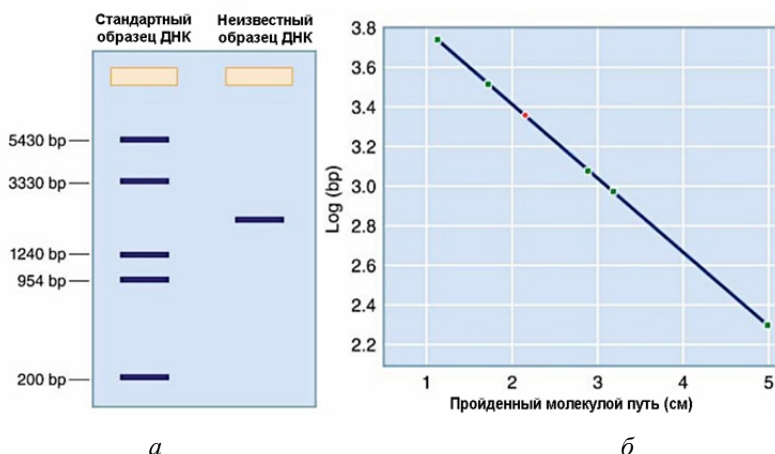


Рис. 6.2. Определение размера молекулы ДНК с помощью гель-электрофореза

ДНК стандартного размера и ДНК неизвестного размера прогоняют по двум дорожкам геля, как показано на рисунке 6.2, *a*. График миграции ДНК известного размера в стандарте представляет собой стандартную кривую (расстояние миграции в см по сравнению с  $\text{Log}(\text{bp})$ ). Точка, показанная красным цветом, предназначена для ДНК неизвестного размера (рис. 6.2, *b*).

При этом молекулы ДНК одного размера движутся в геле с одинаковой скоростью (рис. 6.3).

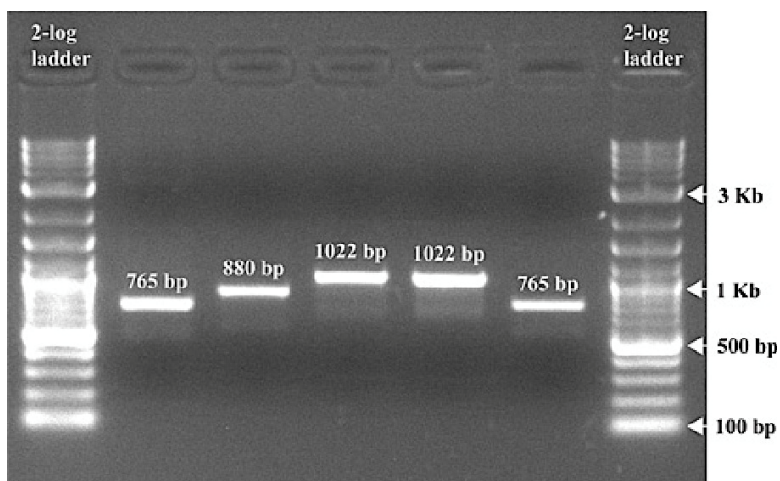


Рис. 6.3. Пример электрофореграммы

Определение размеров производят путем сравнения коммерчески доступных фрагментов ДНК (DNA ladder, маркеры), содержащих линейные фрагменты ДНК известной длины [12].

**Маркеры длин ДНК** — стандарты для определения длины двухцепочечных молекул ДНК при анализе с помощью электрофореза в агарозном геле (рис. 6.4). Маркеры состоят из фрагментов двухцепочечной ДНК строго определенной длины. Все фрагменты имеют «тупые концы» [33].

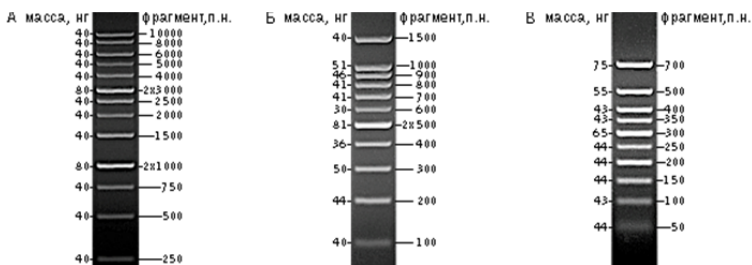


Рис. 6.4. Визуализация маркеров с помощью электрофореза в ТАЕ-агарозе:  
 А — 1 kb DNA Ladder (0,6 мкг на дорожку, 1% агароза);  
 Б — 100 + bp DNA Ladder (0,5 мкг на дорожку, 2% агароза);  
 В — 50 + bp DNA Ladder (0,5 мкг на дорожку, 2% агароза)

### 6.1.2. Конформация ДНК

Подвижность суперспирализованных и кольцевых молекул ДНК отличается от подвижности линейных молекул того же размера. Таким образом, методом электрофореза можно фракционировать три формы молекул ДНК:

- суперспирализованную (нативная молекула);
- кольцевую;
- линейную (например, расщепленная рестриктазой плазмиды).

Двухцепочечная (дц) молекула имеет более жесткую структуру, труднее изгибается, проходя через пространственную сетку геля. Однако для молекул с молекулярной массой больше 3500 кДа ситуация обратная: двухцепочечная молекула обладает достаточной гибкостью, чтобы проходить через сетку геля, в то время как одноцепочечная (оц) молекула той же длины сворачивается в хаотический клубок такого размера, что ее продвижение затрудняется. Вирусные и митохондриальные дцДНК, а также плазмиды могут иметь структуру замкнутого двухцепочечного кольца. Нативное состояние такого кольца — «суперскрученное». Кольцо в целом сворачивается в «жгут»,

что увеличивает его компактность. В случае, когда хотя бы в одной нити кольца имеется единичный разрыв, жгут разворачивается и силами электростатического отталкивания фосфатных групп кольцо расправляется. Компактность молекулы становится меньше, размеры увеличиваются. Суперскрученная ДНК при электрофорезе всегда мигрирует быстрее релаксированной (рис. 6.5) [34].

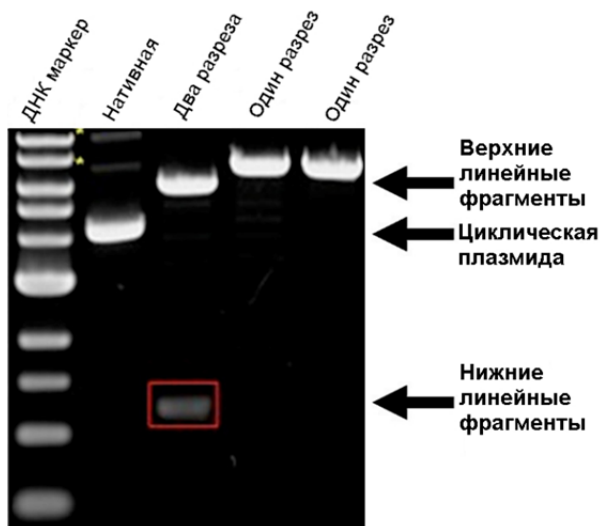


Рис. 6.5. Пример электрофореза нативной (кольцевой/суперспирализованной) и линейной, подвергнутой рестрикции, плазмидной ДНК

Таким образом, с помощью гель-электрофореза можно определить размер (молекулярную массу) только линейной ДНК.

### 6.1.3. Заряд молекулы

Поскольку каждый из нуклеотидов молекулы ДНК несет остаток ортофосфорной кислоты со свободной гидроксильной группой, в нейтральной и особенно в слабощелочной среде

молекула ДНК приобретает отрицательный заряд и способность перемещаться в электрическом поле в направлении от катода (отрицательный электрод) к аноду (положительный электрод). Электрофоретическая подвижность молекулы ДНК существенно снижается с увеличением ее длины [3].

Выбор буфера в данной ситуации не играет существенной роли. Используют 0.089М Трис-боратный, 1X Трис-ацетатный буфер и 0.05М Трис-фосфатный (редко) (табл. 6.1).

Таблица 6.1

**Буферы для проведения гель-электрофореза  
нуклеиновых кислот**

Буфер	Преимущество	Недостатки	Размер нуклеиновых кислот	
			ДНК	РНК
ТАЕ	Разделение крупных фрагментов лучше для коротких запусков	Более склонны к перегреву	> 1,000 п. о.	> 1,500 оснований
	Низкая буферная емкость			
	Подходит для последующего ферментативного анализа			
ТВЕ	Лучше для более коротких фрагментов (линейная двухцепочечная ДНК мигрирует примерно на 10% медленнее в ТВЕ)	Ингибирует ферменты, что делает его непригодным для последующих ферментативных стадий (например, клонирования)	< 5,000 п. о.	< 1,500 оснований
	Высокая ионная сила и буферная способность; хорош для более длинных запусков			
	Менее склонен к перегреву			

### 6.1.4. Состав оснований и температура

Электрофоретическое поведение ДНК в агарозных гелях, в отличие от поведения в полиакриламидных гелях, слабо зависит от состава оснований ДНК или температуры геля. В агарозных гелях в области температур от 4 до 30 °С изменений относительной электрофоретической подвижности фрагментов ДНК разного размера не наблюдается [35].

### 6.1.5. Выбор геля

Агароза и полиакриламид являются двумя наиболее распространенными гелевыми матрицами, используемыми для электрофоретического разделения нуклеиновых кислот. Оба материала образуют трехмерные матрицы с размерами пор, подходящими для разделения нуклеиновых кислот, и не вступают в реакцию с образцами. Размеры пор можно регулировать, варьируя процентное содержание матрицы, чтобы эффективно разделять нуклеиновые кислоты разного размера.

Выбор между агарозой и полиакриламидом (табл. 6.2) зависит в первую очередь от диапазона размеров и желаемого разрешения разделения образцов нуклеиновых кислот.

Таблица 6.2

Различия между агарозным и полиакриламидным гелями

Параметр	Агароза	Полиакриламид
Источник	Полисахаридный полимер из морских водорослей	Полимеризованный акриламид и бис-акриламид
Метод заливки геля	Растопить и дать затвердеть	Инициировать химические реакции
Восстановление нуклеиновой кислоты	Растопить и извлечь	Растворение и диффузия или электроэлюирование
Диапазон разделения ДНК	50—50,000 п. о.	5—3,000 п. о.
Разрешающая способность	5—10 нуклеотидов	Одиночные нуклеотиды



**Агароза** представляет собой очищенную форму агара, углеводного структурного компонента клеточной стенки морских красных водорослей, а также неразветвленный (линейный) полимер с молекулярной массой  $\sim 120\,000$ , состоящий из 800—1000 моносахаридов. Цепочки агарозы состоят из повторяющегося гетеродисахарида, а именно D-галактозы и 3,6-ангидро- $\alpha$ -L-галактозы, связанных  $\beta$ -1,4-гликозидной связью. Дисахаридная единица, также известная как агаробиоза, образует цепь, соединенную  $\alpha$ -1,3-связями (рис. 6.6).

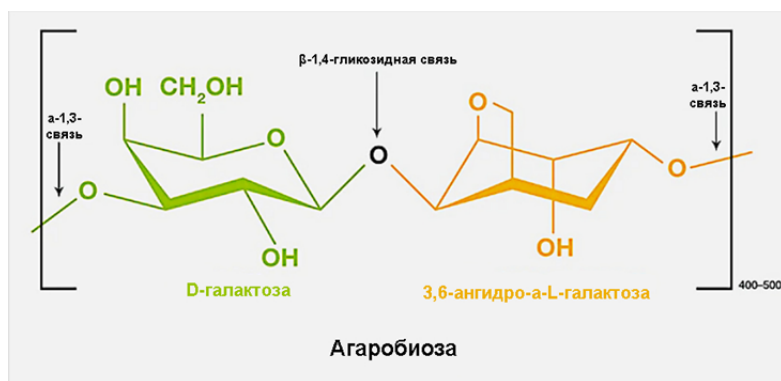


Рис. 6.6. Структурная формула агаробиозы

При нагревании и охлаждении раствора агарозы он образует гелевую матрицу с размерами пор в диапазоне от 50 до 200 нм, в зависимости от концентрации геля. При температуре выше  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  агароза плавится и превращается в случайные клубки. При охлаждении две цепи агарозы образуют спиральные волокна, связанные водородными связями. Дальнейшее охлаждение ниже точки гелеобразования (обычно  $< 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) приводит к образованию сети спиральных пучков, удерживаемых вместе большим количеством водородных связей, образуя гель с трехмерными ячейками (рис. 6.7). Из-за водородных связей гелеобразование агарозы обратимо при нагревании. Следова-

тельно, нуклеиновые кислоты, разделенные электрофорезом, могут быть извлечены путем плавления срезов геля, содержащих интересные фрагменты.

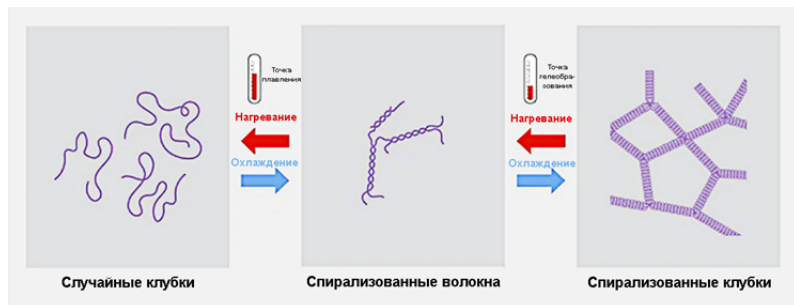


Рис. 6.7. Схема гелеобразования агарозы

Существует зависимость длины разделяемых фрагментов ДНК от концентрации агарозы в геле (табл. 6.3).

Таблица 6.3

**Зависимость длины разделяемых фрагментов ДНК от концентрации агарозы в геле [3]**

Концентрация агарозы, %	0,3	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,2	1,5	2,0
Длина фрагмента ДНК, тыс. п. н.	5—60	1—30	1—20	0,8—12	0,6—10	0,5—8	0,5—7	0,4—6	0,2—3	0,1—2

Таким образом, чем больше агарозы, тем более мелкие фрагменты ДНК можно разделить. Увеличение концентрации агарозы в геле уменьшает скорость миграции ДНК и позволяет разделять малые фрагменты ДНК [12].

Методы вертикального и горизонтального электрофорезов принципиально сходны, однако в последнем случае вместо агарозного геля используют полиакриламидный гель (ПААГ),

и процесс электрофореза проходит вертикально. Электрофорез в ПААГ характеризуется высокой разрешающей способностью (табл. 6.4). Кроме того, акриламид является токсичным веществом. Приготовить ПААГ значительно сложнее, чем агарозный гель. В связи с этим в работе с ДНК преимущественно используют метод горизонтального электрофореза в агарозном геле [3].

Таблица 6.4

**Зависимость длины разделяемых фрагментов ДНК  
от концентрации ПААГ [3]**

Концентрация ПААГ, %	3,5	5	8	12	15	20
Длина фрагментов ДНК, п. н.	1000—2000	80—500	60—400	40—300	25—150	6—100

Таким образом, для фрагментов ДНК длиной менее 500 нуклеотидов используют ПААГ, позволяющие разделять молекулы, которые отличаются по длине всего на один нуклеотид. Однако поры в ПААГ слишком малы для того, чтобы пропускать очень большие молекулы ДНК, поэтому для разделения крупных молекул из разбавленных растворов используют агарозные гели [31].

### **6.1.6. Загрузочный буфер и красители**

Загрузочные буферы (обычно приготовленные в виде маточных растворов 6X или 10X) добавляют к образцам (и стандарту, если это необходимо) при подготовке к гель-электрофорезу. Компоненты загрузочных буферов включают следующее:

- ингредиент плотности (глицерин или сахароза) — увеличивает вязкость образцов, обеспечивая погружение образцов в лунки;

- соли (Tris-HCl) — создают для образцов среду с благоприятной ионной силой и pH. Загрузка буферов с высокой концентрацией солей может привести к более широким или искаженным полосам и мазкам;
- хелаторы металлов (ЭДТА) — предотвращают разрушение нуклеиновых кислот присутствующими в образце нуклеазами;
- красители — обеспечивают цвет для легкого контроля загрузки образца, хода электрофореза и частого изменения pH. Некоторые загрузочные буферы могут содержать более одного красителя, чтобы эффективнее отслеживать миграцию молекул разного размера в образце.

### 6.1.7. Напряженность электрического поля

На скорость движения заряженных молекул ДНК в геле влияет напряженность электрического поля, определяемая напряжением постоянного электрического поля, подаваемого на электроды [3].

В электрофорезе нуклеиновых кислот обычно используется постоянное напряжение, при этом напряжение устанавливается на уровне 5—10 В/см.

Прикладываемое напряжение (В) = расстояние между электродами (см) × рекомендуемое значение В/см.

Напряжение можно регулировать в зависимости от размера фрагментов ДНК, подлежащих разделению, а также от типа используемого рабочего буфера (табл. 6.5).

Таблица 6.5

**Зависимость выбора напряжения и буфера для проведения гель-электрофореза от длины разделяемых фрагментов**

Размер ДНК, кб	Напряжение, В/см	Буфер
< 1	5—10	TBE
1—5	4—10	TAE / TBE
> 5	1—3	TAE
До 10	До 23	TAE

С одной стороны, очень низкое напряжение замедляет миграцию нуклеиновых кислот, что может привести к диффузии малых молекул и низкому разрешению. С другой — при слишком высоком напряжении может произойти плохое разделение и смазывание образцов; в некоторых случаях может наблюдаться перегрев буфера, «полосы улыбки» и даже денатурация образцов (рис. 6.8).

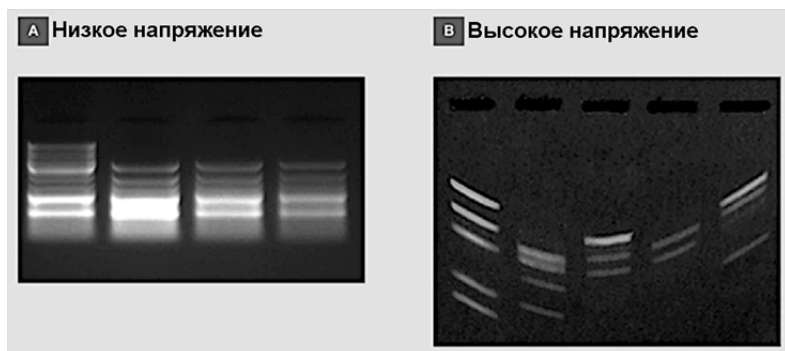


Рис. 6.8. Влияние напряжения на электрофорез ДНК

### 6.1.8. Продолжительность

Продолжительность электрофореза определяют длина геля, используемое напряжение и размеры молекул в образце. Обычно электрофорез проводят до тех пор, пока интересующая полоса не переместится на 40—60% длины геля. Самое главное, следует контролировать время работы, чтобы мельчайшие молекулы в образцах или стандартах не мигрировали за пределы геля. Если времени будет недостаточно, то фрагменты образцов не смогут разделиться. Маркеры длин ДНК, содержащие отслеживающие красители, которые двигаются позади и впереди образцов, помогают отслеживать движения геля, а также гарантируют, что интересующие полосы не маскируются красителями.

## 6.2. Электрофорез в агарозном геле

Электрофоретическое разделение проводят в вертикальных или горизонтальных электрофоретических камерах. Для агарозных гелей чаще применяются горизонтальные камеры (рис. 1.9), а для полиакриламидных гелей — как горизонтальные, так и вертикальные типы камер [3].

## 6.3. Визуализация образцов в геле

После завершения цикла с гелем образцы необходимо визуализировать. Поскольку нуклеиновые кислоты не видны при обычном окружающем освещении, для визуализации требуется метод обнаружения. Как показано в таблице 6.6, доступные методы предлагают различные диапазоны чувствительности и преимущества при обнаружении образцов.

Таблица 6.6

### Выбор красителей для визуализации нуклеиновых кислот при гель-электрофорезе

Краситель	Преимущества	Чувствительность
<i>Колориметрические</i>		
Метиленовый синий; кристаллический фиолетовый	Не требует специального оборудования; требуется шаг очистки; низкая чувствительность	0,5—1 мкг
<i>Флуоресцентные</i>		
Этидиум бромид; SYBR Green I	Требуется возбуждение УФ и/или синим светом; часто мутагенные; может потребоваться специальная утилизация отходов; предлагает менее продолжительные рабочие процессы с высокой чувствительностью; может использоваться для окрашивания образцов во время или после электрофореза	25 пг — 1 нг

Окончание табл. 6.6

Краситель	Преимущества	Чувствительность
<i>Радиоактивные</i>		
$^{32}\text{P}$ $^{33}\text{P}$ $^3\text{H}$	Требуются обучение и меры предосторожности для радиационной безопасности; обнаруживает или маркирует образцы радиоактивными зондами или нуклеотидами; можно использовать для обнаружения олигонуклеотидов; считается самым чувствительным	10 фг — 1 нг

## 7. ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

### 7.1. Выделение нуклеиновых кислот

#### 7.1.1. Выделение ДНК методом фенол-хлороформной экстракции

##### **Необходимые приборы и расходные материалы:**

- центрифуга с ротором для пробирок на 1,5 мл, разгоняющаяся до 15 000 g;
- микроцентрифуга с ротором для пробирок на 1,5 мл;
- твердотельный термостат;
- пробирки типа Эппендорф на 1,5 мл;
- автоматические дозаторы и наконечники: 1000, 200, 10 мкл;
- пинцет;
- штатив.

##### **Реагенты:**

- лизирующий буфер на основе гуанидинизотиоционата (4М гуанидинизотиоционат, 0,025М цитрат натрия, 0,5%-ный лаурилсаркозил натрия);
- 1М Tris-HCl;
- фенол, насыщенный Tris-HCl;
- хлороформ;
- 4М NaCl;
- этанол (96%-, 70%-ный) и / или изопропанол;
- деионизированная вода (H<sub>2</sub>O mQ).

##### **Ход работы**

1. К образцу объемом около 50 мкл добавить девять частей лизирующего буфера.
2. Если образец представляет собой кусочек ткани (не жидкость), то растереть пестиком до гомогенного состояния.



3. Инкубировать смесь в течение 10 мин при 95 °С.
4. Слегка охладить.
5. Добавить  $\frac{1}{10}$  от объема 1М Tris-HCl.
6. Затем добавить равный объем фенола, насыщенного Tris-HCl.
7. Смесь перемешать до образования однородного раствора.
8. К смеси добавить хлороформ в количестве  $\frac{1}{5}$  от объема фенола.
9. Смесь аккуратно перемешать в течение минуты.
10. Инкубировать смесь в течение 20 мин при 4 °С (в холодильнике).
11. Центрифугировать смесь в течение 5 мин при 4000 об/мин при 4 °С для образования раздела фаз.
12. Отобрать водную фазу, перенести в чистую пробирку.
13. Добавить равный объем хлороформа, перемешать.
14. Центрифугировать смесь в течение 5 мин при 4000 об/мин при 4 °С для образования раздела фаз.
15. Отобрать водную фазу, перенести в чистую пробирку.
16. Добавить к отобранной  $\frac{1}{10}$  объема 4М NaCl.
17. Осадить ДНК холодным 96%-ным этанолом или изопропанолом в количестве не меньше двух объемов водной фазы.
18. Инкубировать смесь в течение 10 мин при –20 °С (можно оставить на ночь или несколько дней).
19. Центрифугировать в течение 15 мин при 18 000 об/мин при 4 °С для полного осаждения ДНК.
20. Слить супернатант, не повреждая осадок.
21. Промыть осадок 400 мкл холодного 70%-ного этанола.
22. Отстоять 10 мин.
23. Центрифугировать в течение 5 мин при 18 000 об/мин при 4 °С.
24. Слить супернатант, не повреждая осадок.
25. Промыть осадок 200 мкл холодного 70%-ного этанола.
26. Центрифугировать смесь в течение 5 мин при 18 000 об/мин при 4 °С.

27. Слить супернатант, оставшиеся капли отобрать дозатором.
28. Высушить осадок при комнатной температуре (около 10 мин).
29. Растворить осадок ДНК в 50 мкл  $H_2O$  mQ.

### **7.1.2. Выделение ДНК методом твердофазной экстракции с использованием магнитных частиц**

#### **Необходимые приборы и расходные материалы:**

- центрифуга с ротором для пробирок на 1,5 мл, разгоняющаяся до 15 000 g;
- микроцентрифуга с ротором для пробирок на 1,5 мл;
- твердотельный термостат;
- вортекс;
- пробирки типа Эппендорф на 1,5 мл;
- автоматические дозаторы и наконечники: 1000, 200, 10 мкл;
- пинцет;
- магнитный штатив;
- штатив.

#### **Реагенты:**

- лизирующий буфер на основе гуанидинизотиоционата (4М гуанидинизотиоционат, 0,025М цитрат натрия, 0,5%-ный лаурилсаркозил натрия);
- 1М Tris-HCl;
- 2М NaCl;
- магнитные частицы, покрытые диоксидом кремния;
- промывочный буфер (1мМ Tris-HCl, 1мМ ЭДТА и 0,5М NaCl);
- деионизированная вода ( $H_2O$  mQ).

#### **Ход работы**

1. К образцу объемом около 100 мкл добавить девять частей лизирующего буфера.

2. Если образец представляет собой кусочек ткани (не жидкость), то растереть пестиком до гомогенного состояния.
3. Инкубировать смесь в течение 10 мин при 95 °С.
4. Слегка охладить.
5. Добавить 60,5 мкл 1М Tris-HCl до 0,05М.
6. Добавить 151,6 мкл 2М NaCl до 0,25М.
7. Добавить 15 мкл магнитных частиц.
8. Вortexировать 1 мин.
9. Инкубировать смесь в течение 10 мин при комнатной температуре, периодически взбалтывая, аккуратно переворачивая пробирку.
10. Поставить пробирку на магнитный штатив на 1 мин.
11. Отобрать жидкость пипеткой, не задевая осадок магнитных частиц, и слить в емкость для отходов.
12. Добавить в пробирку 500 мкл холодного промывочного буфера, аккуратно перемешать.
13. Поставить пробирку на магнитный штатив на 1 мин.
14. Отобрать жидкость пипеткой, не задевая осадок магнитных частиц, и слить в емкость для отходов.
15. Повторить пункты 12—14 дважды.
16. Добавить 50 мкл H<sub>2</sub>O mQ в пробирку, провortexировать.
17. Инкубировать смесь в течение 10 мин при 95 °С, периодически vortexируя.
18. Поставить пробирку на магнитный штатив.
19. Отобрать жидкость с выделенной ДНК в чистую пробирку.

### **7.1.3. Выделение ДНК из растений**

#### **Необходимые приборы и расходные материалы:**

- центрифуга с ротором для пробирок на 1,5 мл, разгоняющаяся до 18 000 g;
- микроцентрифуга с ротором для пробирок на 1,5 мл;
- твердотельный термостат;

- пробирки типа Эппендорф на 1,5 мл;
- автоматические дозаторы и наконечники: 1000, 200, 10 мкл;
- пинцет;
- штатив;
- ступка с пестиком.

**Реагенты:**

- 5хСТАВ буфер (5 % СТАВ, 0,35М ЭДТА);
- 2хСТАВ буфер (2 % СТАВ, 1,4М NaCl, 0,1М Tris-HCl (pH 8,0), 20мМ ЭДТА);
- буфер для преципитации (1 % СТАВ, 50мМ Tris-HCl (pH 8,0), 10мМ ЭДТА);
- HS-TE буфер (1М NaCl, 10мМ Tris-HCl (pH 8,0), 1мМ ЭДТА);
- хлороформ;
- этанол (96%-, 70%-ный) и / или изопропанол;
- деионизированная вода (H<sub>2</sub>O mQ).

**Ход работы**

1. Подготовить прогретую до 65 °С пробирку с 2х СТАВ (из расчета 25 мл 2х СТАВ на 2—5 г растительной ткани).
2. Образец растереть в ступке с жидким азотом или 2х СТАВ: 100 мг ткани + 500 мкл 2х СТАВ.
3. Перенести гомогенизированную массу в пробирку, очень хорошо и быстро перемешать.
4. Инкубировать смесь при 65 °С в течение минимум 30 мин (лучше 1 ч, но можно и больше: 2—3 ч).
5. Охладить до комнатной температуры, добавить равный объем хлороформа.
6. Перемешивать в течение 20 мин при комнатной температуре.
7. Центрифугировать смесь в течение 10 мин при 5000 об/мин при комнатной температуре.

8. Перенести водную фазу в чистую пробирку, добавить к ней  $\frac{1}{5}$  от объема 5х СТАВ и перемешать.
9. Инкубировать смесь при 65 °С в течение 10 мин.
10. Добавить равный объем хлороформа.
11. Перемешивать в течение 10 мин при комнатной температуре.
12. Центрифугировать смесь в течение 10 мин при 5000 об/мин при комнатной температуре.
13. Если раствор мутный или большая интерфаза — повторить экстракцию хлороформом (пункты 10—12).
14. Добавить равный объем буфера для преципитации, перемешать и оставить на 1 ч (или на ночь) при комнатной температуре.
15. Центрифугировать смесь в течение 20 мин при 8000 об/мин при комнатной температуре (если ДНК не выпадает в осадок, добавить больше буфера для преципитации, оставить при комнатной температуре на 1 ч, отцентрифугировать).
16. Растворить осадок в 1 мл HS-TE (иногда необходим нагрев до 65 °С).
17. Осадить ДНК холодным 96%-ным этанолом или изопропанолом в количестве не меньше двух объемов водной фазы.
18. Инкубировать смесь в течение 30 мин при –20 °С.
19. Центрифугировать смесь в течение 15 мин при 18 000 об/мин при 4 °С.
20. К осадку добавить 200 мкл H<sub>2</sub>O mQ и 100 мкл 7.5M ацетата аммония.
21. Инкубировать 20 мин на льду (0 °С).
22. Центрифугировать смесь в течение 10 мин при 13 000 об/мин при 4 °С.
23. Добавить к супернатанту 96%-ный этанол или изопропанол в количестве не меньше двух объемов.
24. Инкубировать смесь в течение 20 мин при –70 °С.
25. Центрифугировать смесь в течение 10 мин при 13 000 об/мин при 4 °С.
26. Промыть осадок 200 мкл холодного 80%-ного этанола.

27. Центрифугировать смесь в течение 5 мин при 18000 об/мин при 4 °С.

30. Слить супернатант, оставшиеся капли отобрать дозатором.

31. Высушить при комнатной температуре (около 10 мин).

32. Растворить осадок ДНК в 50 мкл H<sub>2</sub>O mQ.

#### **7.1.4. Выделение РНК методом фенол-хлороформной экстракции**

##### **Необходимые приборы и расходные материалы:**

— центрифуга с ротором для пробирок на 1,5 мл, разгоняющаяся до 15 000 g;

— микроцентрифуга с ротором для пробирок на 1,5 мл;

— пробирки типа Эппендорф на 1,5 мл;

— автоматические дозаторы и наконечники: 1000, 200, 10 мкл;

— пинцет;

— штатив.

##### **Реагенты:**

— лизирующий буфер на основе гуанидинизотиоционата (4М гуанидинизотиоционат, 0,025М цитрат натрия, 0,5%-ный лаурилсаркозил натрия);

— 2М ацетат натрия;

— фенол, насыщенный водой;

— хлороформ;

— 4М NaCl;

— этанол (96%-, 70%-ный) и / или изопропанол;

— деионизированная вода (H<sub>2</sub>O mQ).

#### **Ход работы**

1. К образцу объемом около 50 мкл добавить девять частей лизирующего буфера.

2. Если образец представляет собой кусочек ткани (не жидкость), то растереть пестиком до гомогенного состояния.

3. Добавить к образцу  $\frac{1}{10}$  объема 2М ацетата натрия.
4. Добавить к образцу равный объем фенола, насыщенного водой.
5. К смеси добавить хлороформ в объеме  $\frac{1}{5}$  от объема фенола.
6. Смесь аккуратно перемешать в течение минуты.
7. Инкубировать смесь в течение 20 мин при 4 °С (в холодильнике).
8. Центрифугировать смесь в течение 5 мин при 4000 об/мин при 4 °С для образования раздела фаз.
9. Отобрать водную фазу, перенести в чистую пробирку.
10. Добавить равный объем хлороформа, перемешать.
11. Центрифугировать смесь в течение 5 мин при 4000 об/мин при 4 °С для образования раздела фаз.
12. Отобрать водную фазу, перенести в чистую пробирку.
13. Добавить к отобранной фазе  $\frac{1}{10}$  объема 4М NaCl.
14. Осадить РНК холодным 96%-ным этанолом или изопропанолом в количестве не меньше двух объемов водной фазы.
15. Инкубировать смесь в течение 10 мин при –20 °С (можно оставить на ночь или несколько дней).
16. Центрифугировать в течение 15 мин при 18 000 об/мин при 4 °С для полного осаждения ДНК.
17. Слить супернатант, не повреждая осадок.
18. Промыть осадок 400 мкл холодного 70%-ного этанола.
19. Отстоять 10 мин.
20. Центрифугировать в течение 5 мин при 18 000 об/мин при 4 °С.
21. Слить супернатант, не повреждая осадок.
22. Промыть осадок 200 мкл холодного 70%-ного этанола.
23. Центрифугировать смесь в течение 5 мин при 18 000 об/мин при 4 °С.
24. Слить супернатант, оставшиеся капли отобрать дозатором.
25. Высушить осадок при комнатной температуре (около 10 мин).
26. Растворить осадок РНК в 50 мкл  $H_2O$  mQ.

### **7.1.5. Выделение РНК с помощью реагента ExtractRNA (Евроген)**

#### **Необходимые приборы и расходные материалы:**

- центрифуга с ротором для пробирок на 1,5 мл, разгоняющаяся до 15 000 g;
- микроцентрифуга с ротором для пробирок на 1,5 мл;
- пробирки типа Эппендорф на 1,5 мл;
- автоматические дозаторы и наконечники: 1000, 200, 10 мкл;
- пинцет;
- штатив.

#### **Реагенты:**

- реагент ExtractRNA (Евроген);
- хлороформ;
- изопропанол;
- этанол 80%-ный;
- деионизированная вода (H<sub>2</sub>O mQ).

#### **Ход работы**

1. К образцу объемом около 50 мкл добавить 10 частей реагента ExtractRNA.
2. Если образец представляет собой кусочек ткани (не жидкость), то растереть пестиком до гомогенного состояния.
3. Инкубировать лизат при комнатной температуре в течение 10—15 мин.
4. Центрифугировать лизат при 12 000—15 000 g в течение 10 мин.
5. Отобрать и перенести супернатант в чистую пробирку.
6. Добавить 200 мкл хлороформа на каждый 1 мл реагента ExtractRNA, добавленного на этапе гомогенизации.
7. Смесь аккуратно перемешать в течение 15 с.
8. Центрифугировать смесь при 12 000 g в течение 15 мин при 4 °С.
9. Отобрать водную фазу, перенести в чистую пробирку.
10. Добавить в водную фазу 500 мкл 100%-ного изопропанола на каждый 1 мл реагента ExtractRNA, использованного для гомогенизации.



11. Инкубировать смесь при комнатной температуре в течение 10 мин.
12. Центрифугировать смесь при 12 000 g в течение 15 мин при комнатной температуре.
13. Тщательно отобрать супернатант, оставив осадок РНК на дне пробирки.
14. Аккуратно, по стенке пробирки, добавить 2 мл 75%-ного этанола на каждый 1 мл изопропанола, использованного в пункте 10.
15. Центрифугировать смесь на максимальной скорости в течение 5 мин при комнатной температуре.
16. Слить супернатант, оставшиеся капли отобрать дозатором.
17. Высушить осадок при комнатной температуре (около 5—7 мин).
18. Растворить осадок РНК в необходимом объеме H<sub>2</sub>O mQ.

## **7.2. Определение концентрации нуклеиновых кислот**

### **7.2.1. Определение концентрации нуклеиновых кислот с помощью нанофотометра**

#### **Необходимые приборы и расходные материалы:**

- нанофотометр NanoPhotometer P330 (Implen GmbH);
- микроцентрифуга с ротором для пробирок на 1,5 мл;
- пробирки типа Эппендорф на 1,5 мл;
- автоматический дозатор и наконечники: 10 мкл;
- пинцет;
- штатив;
- фильтровальная бумага.

#### **Реагенты:**

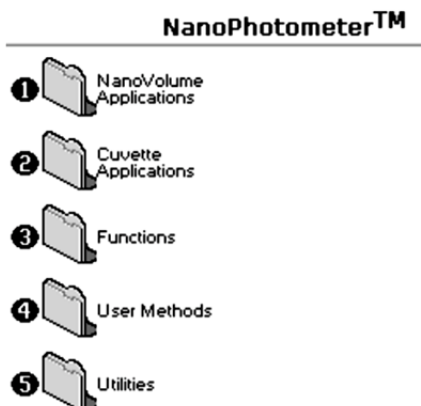
- образцы ДНК и / или РНК;
- деионизированная вода (H<sub>2</sub>O mQ)

## Ход работы

1. Включить нанофотометр NanoPhotometer P330 (Implen GmbH).



2. Нажать «1» для выбора измерений в нанообъемах «NanoVolume Application».



3. Нажать «1», чтобы выбрать папку Nucleic Acids.
4. Нажать «1», чтобы выбрать режим dsDNA ИЛИ «2», чтобы выбрать режим ssDNA ИЛИ «3» для выбора режима RNA.
5. Используя приложения NanoVolume, выбирать значение «Lid Factor».
6. Ввести коэффициент разбавления «Dilution Factor» с помощью цифр клавиатуры. Диапазон от 1,00 до 9,999. Используйте кнопку «С» для возврата к исходному значению и очистки последней введенной цифры ИЛИ нажать кнопку «Menu/Options» для входа в экран коэффициента разбавления. Введите объем образца с помощью цифр клавиатуры. Диапазон от 0,01 до 9999. Введите объем разбавителя с помощью кнопок клавиатуры цифрами. Диапазон от 0,01 до 9999. Нажать «ОК» для расчета коэффициента разбавления и возврата к экрану ИЛИ нажать «Cancel» для отмены выбора и возвращения к экрану «Parameters».
7. Рекомендуется включить «On» коррекцию фона «Background» на длине волны 320 нм.
8. Выбрать единицы «Units» измерения с помощью стрелок влево и вправо. Варианты: мкг/мл, нг/мкл, мкг/мкл.
9. Ввести «Factor» с помощью цифр клавиатуры. По умолчанию значение 50 для dsDNA, 37 для ssDNA и 40 для RNA, диапазон от 0,01 до 9999.

dsDNA - Parameters	
Lid Factor	10
Units	ng/µl
Dilution Factor	1.000
Factor	50.0
Background	On
OK	Cancel

10. Нажать «ОК» для входа в окно Результаты ИЛИ «Cancel» для возврата в папку «Nucleic Acids».

11. Провести установление нулевого порога по контрольному образцу (раствор, в котором были разведены нуклеиновые кислоты). Нанести на стекло каплю контрольного образца (1 мкл), как показано на рисунке ниже.

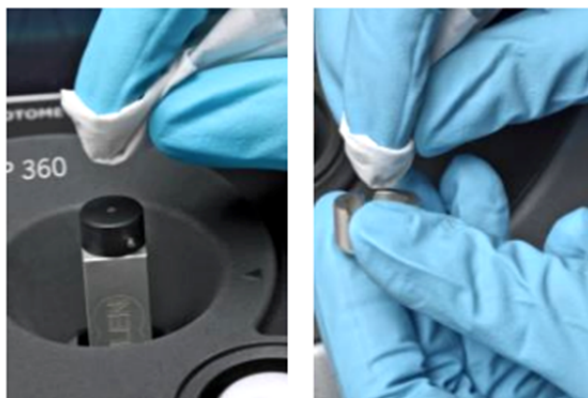


12. Надеть выбранный «Lid Factor», как показано на рисунке ниже.



13. Нажать клавишу «Blank». Выбранный «Lid Factor» будет использоваться для всех последующих образцов, пока не будет изменен.

14. Протереть стекло и «Lid Factor» фильтровальной бумагой.



15. Нанести на стекло каплю образца (1 мкл).

16. Надеть выбранный «Lid Factor».

17. Нажать клавишу «Sample». При этом выполняется измерение на выбранных длинах волн и выводятся результаты. Рассчитывается концентрация образца, соотношение  $A_{260}/A_{280}$  и  $A_{260}/A_{230}$  (с поправкой на значение фоновой длины волны, если она была выбрана).

dsDNA		Sample	
<b>A230</b>	0.053 A	4	
<b>A260</b>	0.174 A	<b>Concentration</b>	
<b>A280</b>	-0.001 A		
<b>A320</b>	-0.001 A	<b>87.5</b>	
<b>A260/A280</b>			
....		<b>Units</b>	
<b>A260/A230</b>			
3.241		µg/ml	

18. Если значение абсорбции образца не находится в линейном диапазоне, то на экране появится «Warning message», а в левом верхнем углу экрана результатов — «Instruction». В этом случае необходимо заменить «Lid Factor» на больший или меньший в зависимости от рекомендаций прибора и провести повторное установление нулевого порога по контрольному образцу с новым «Lid Factor».

19. Повторить пункты 14—17 для всех образцов нуклеиновых кислот.

20. По окончании работы протереть стекло и «Lid Factor» фильтровальной бумагой.

21. Для возврата в папку «Nucleic Acids» нажать «Escape» и подтвердить «Yes».

22. Выключить нанофотометр NanoPhotometer P330 (Implen GmbH).

### ***7.2.2. Определение концентрации нуклеиновых кислот с помощью спектрофотометра***

#### **Необходимые приборы и расходные материалы:**

- спектрофотометр SmartSpec Plus (Bio-Rad);
- микроцентрифуга с ротором для пробирок на 1,5 мл;
- пробирки типа Эппендорф на 1,5 мл;
- автоматические дозаторы и наконечники: 1000, 200, 10 мкл;
- пинцет;
- штатив;
- кюветы.

#### **Реагенты:**

- образцы ДНК и / или РНК;
- деионизированная вода (H<sub>2</sub>O mQ).

#### **Ход работы**

1. Аликвоту нуклеиновой кислоты довести растворителем до 1 мл.

2. Посчитать, во сколько раз разбавили нуклеиновую кислоту в пункте 1. Это будет «Фактор разведения».

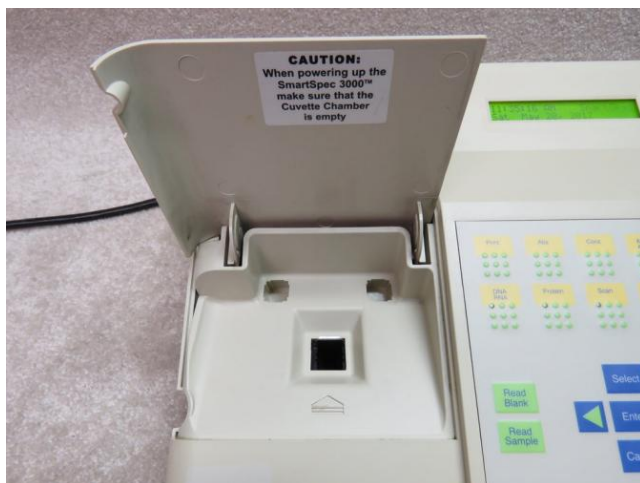
3. Поместить 1 мл раствора нуклеиновой кислоты в чистую кювету.

4. Включить питание спектрофотометра SmartSpec Plus (Bio-Rad). Клавиша «Select» позволяет выбирать из списка вариантов. Клавиша «Enter» подтверждает выбор. Клавиша «Cancel» отменяет все действия. После нажатия клавиши «Cancel» анализ нужно будет начинать сначала. Клавиши со стрелками вправо и влево — функциональные клавиши в появляющемся меню.



5. Поднять крышку оптического модуля.

6. Взять чистую акриловую кювету для растворителя и внести в нее 1 мл растворителя (контрольный образец, например вода).



7. Вставить кювету в оптический приемник и закрыть крышку оптического модуля.

8. Выбрать тип исследования клавишей «DNA/RNA».

9. Выбрать тип исследуемой нуклеиновой кислоты.

10. Ввести «Фактор разведения» (см. п. 2) или отказаться от его введения, если Вас устраивает стандартное значение.

11. Для спектрофотометрирования фона и для очистки памяти спектрофотометра нажать клавишу «Read Blank».

12. Продолжить исследование клавишей ►.

13. Поднять крышку оптического модуля, извлечь кювету с растворителем.

14. Поместить в оптический приемник кювету с исследуемым раствором нуклеиновой кислоты.

15. Для спектрофотометрирования образца нажать клавишу «Read Sample».

16. Повторить пункты 14 и 15 для всех образцов нуклеиновых кислот.

17. Нажать клавишу «Conc» для просмотра данных о концентрации образца.



18. Нажать клавишу «Abs» для просмотра данных об абсорбции образца.

19. Нажать клавишу  $\langle \frac{A_{260}}{A_{280}} \rangle$  для просмотра данных по оценке чистоты исследуемого образца.

20. Нажать клавишу «Dilution factor» для просмотра и изменения значения фактора разведения.

21. По окончании работы помыть кюветы и выключить спектрофотометр SmartSpec Plus (Bio-Rad).

### 7.3. Проведение полимеразной цепной реакции

#### 7.3.1. Синтез первой цепи кДНК (реакция обратной транскрипции)

##### Необходимые приборы и расходные материалы:

- амплификатор C1000 (Bio-Rad);
- центрифуга с ротором для пробирок на 1,5 мл, разгоняющаяся до 15 000 g;
- микроцентрифуга с роторами для пробирок на 1,5 и 0,2 мл;
- пробирки типа Эппендорф на 1,5 мл;
- ПЦР пробирки на 0,2 мл;
- автоматические дозаторы и наконечники: 1000, 200, 10 мкл;
- пинцет;
- штатив-охладитель;
- штатив.

##### Реагенты:

- MMLV-ревертаза (100 ед/мкл);
- праймер Oligo(dT)<sub>15</sub> (20мкМ);
- 5X Буфер для синтеза 1-й цепи кДНК;
- смесь нуклеотидов в эквимольном соотношении (dNTP, 10мМ);
- раствор дитиотреитола (DTT, 20мМ);
- деионизированная стерильная вода (H<sub>2</sub>O mQ).

### Ход работы

1. Приготовить смесь следующих компонентов в стерильной пробирке:

- X мкл — стерильная вода, свободная от РНКаз;
- 1—6 мкл — РНК-матрица (0,5—2 мкг);
- 1—3 мкл — праймер (20 мкМ);
- 9 мкл — суммарный объем первой части реакционной смеси.

2. Аккуратно перемешать смесь пипетированием, сбросить капли со стенок на микроцентрифуге.

3. Включить амплификатор С1000 (Bio-Rad).

4. Установить программу для нагрева: 70 °С в течение 2 мин.

5. Поместить пробирку с реакционной смесью в амплификатор.

6. Запустить программу для прогревания смеси при 70 °С в течение 2 мин для расплавления вторичных структур РНК.

7. После окончания программы немедленно перенести пробирку в лед или в предварительно замороженный штатив-охладитель.

8. Сбросить капли реакционной смеси со стенок пробирки на микроцентрифуге.

9. Добавить к первой смеси 11 мкл предварительно подготовленной смеси следующего состава:

- X мкл — стерильная вода, свободная от РНКаз;
- 4 мкл — 5X Буфер для синтеза первой цепи;
- 2 мкл — смесь dNTP (10 мМ каждого);
- 2 мкл — DTT (20 мМ);
- 1—3 мкл — MMLV-ревертаза (добавить в последнюю очередь!);
- 11 мкл — суммарный объем второй части реакционной смеси.

10. Аккуратно перемешать смесь пипетированием, сбросить капли со стенок на микроцентрифуге.

11. Установить программу для амплификатора: нагрев при 37—42 °С в течение 30—60 мин, затем нагрев при 70 °С в течение 10 мин.

12. Поместить пробирку с реакционной смесью в амплификатор.

13. Запустить программу для прогревания смеси при 37—42 °С в течение 30—60 мин.

14. Для остановки реакции прогреть смесь при 70 °С в течение 10 мин.

15. После окончания синтеза первой цепи кДНК выключить амплификатор С1000 (Bio-Rad).

### ***7.3.2. Амплификация заданного фрагмента гена с помощью полимеразной цепной реакции***

#### **Необходимые приборы и расходные материалы:**

- амплификатор С1000 (Bio-Rad);
- центрифуга с ротором для пробирок на 1,5 мл, разгоняющаяся до 15 000 g;
- микроцентрифуга с роторами для пробирок на 1,5 и 0,2 мл;
- пробирки типа Эппендорф на 1,5 мл;
- ПЦР-пробирки на 0,2 мл;
- автоматические дозаторы и наконечники: 1000, 200, 10 мкл;
- пинцет;
- штатив-охладитель;
- штатив.

#### **Реагенты:**

- Таq ДНК-полимераза (5 ед/мкл);
- 10X Буфер;
- праймер 1 (3 мкМ);
- праймер 2 (3 мкМ);
- смесь нуклеотидов в эквимольном соотношении (dNTP, 10 мМ);
- деионизированная стерильная вода (H<sub>2</sub>O мQ).

### Ход работы

1. Разморозить при комнатной температуре все компоненты для ПЦР, кроме полимеразы.
2. Перемешать их содержимое на вортексе, сбросить капли со стенок на микроцентрифуге.
3. Приготовить реакционную смесь:
  - 2,5 мкл — 10X Буфера;
  - 2,5 мкл — праймер 1 (3 мкМ);
  - 2,5 мкл — праймер 2 (3 мкМ);
  - 0,5 мкл — смесь dNTP (10 мМ каждого);
  - 0,05—0,25 мкл — Taq ДНК-полимераза (в зависимости от концентрации, чистоты ДНК-матрицы и длины ПЦР-продукта);
  - вода деионизированная — до 25 мкл (необходимо учесть объем ДНК-матрицы).
4. Аккуратно перемешать смесь пипетированием, сбросить капли со стенок на микроцентрифуге.
5. Раскапать реакционную смесь в пробирки для ПЦР.
6. Внести необходимое количество ДНК-матрицы в пробирки для ПЦР.
7. Включить амплификатор C1000 (Bio-Rad).
8. Установить программу для нагрева:
  - предварительная денатурация при 95 °С в течение 1—3 мин;
  - циклы ПЦР (40—50 циклов): денатурация при 95 °С в течение 15—20 с, отжиг праймеров при заданной температуре (ориентироваться на используемые праймеры) в течение 15—20 с, элонгация при 72 °С в течение 15 с и более (зависит от длины ПЦР-фрагмента);
  - финальная элонгация при 72 °С в течение 2—10 мин.
9. Поместить пробирки с реакционной смесью в амплификатор.
10. Запустить программу для прогревания смеси.
11. После окончания синтеза первой цепи кДНК выключить амплификатор C1000 (Bio-Rad).

### **7.3.3. Амплификация заданного фрагмента гена или транскрипта с помощью ПЦР в реальном времени**

#### **Необходимые приборы и расходные материалы:**

- амплификатор Real-Time CFX96 (Bio-Rad);
- центрифуга с ротором для пробирок на 1,5 мл, разгоняющаяся до 15 000 g;
- микроцентрифуга с роторами для пробирок на 1,5 и 0,2 мл;
- пробирки типа Эппендорф на 1,5 мл;
- ПЦР-пробирки на 0,2 мл;
- автоматические дозаторы и наконечники: 1000, 200, 10 мкл;
- пинцет;
- штатив-охладитель;
- штатив.

#### **Реагенты:**

- Таq ДНК-полимераза (5 ед./мкл);
- 10X Буфер;
- праймер 1 (3 мкМ);
- праймер 2 (3 мкМ);
- смесь нуклеотидов в эквимольном соотношении (dNTP, 10мМ);
- интеркалирующий краситель 50X SYBR Green I;
- деионизированная стерильная вода (H<sub>2</sub>O mQ).

#### **Ход работы**

1. Разморозить при комнатной температуре все компоненты для ПЦР, кроме полимеразы.
2. Перемешать их содержимое на вортексе, сбросить капли со стенок на микроцентрифуге.
3. Приготовить реакционную смесь:
  - 2,5 мкл — 10X Буфера;

- 2,5 мкл — праймер 1 (3 мкМ);
  - 2,5 мкл — праймер 2 (3 мкМ);
  - 0,5 мкл — смесь dNTP (10 мМ каждого);
  - 0,5 мкл — 50X SYBR Green I;
  - 0,05—0,25 мкл — Taq ДНК-полимераза (в зависимости от концентрации, чистоты ДНК-матрицы и длины ПЦР-продукта);
  - вода деионизированная — до 25 мкл (необходимо учесть объем ДНК-матрицы).
4. Аккуратно перемешать смесь пипетированием, сбросить капли со стенок на микроцентрифуге.
  5. Раскапать реакционную смесь в пробирки для ПЦР.
  6. Внести необходимое количество ДНК-матрицы в пробирки для ПЦР, если анализируется фрагмент транскрипта, то предварительно провести синтез первой цепи кДНК.
  7. Включить амплификатор Real-Time CFX96 (Bio-Rad).
  8. Установить программу для нагрева:
    - предварительная денатурация при 95 °С в течение 1—3 мин;
    - циклы ПЦР (40—50 циклов): денатурация при 95 °С в течение 15—20 с, отжиг праймеров при заданной температуре (ориентироваться на используемые праймеры) в течение 15—20 с, элонгация при 72 °С в течение 15 с и более (зависит от длины ПЦР-фрагмента);
    - финальная элонгация при 72 °С в течение 2—10 мин.
  9. Поместить пробирки с реакционной смесью в амплификатор.
  10. В программе для амплификации указать расположение пробирок в приборе, включить функцию считывания флуоресценции в режиме реального времени, выбрать соответствующий флуоресцентный краситель.
  11. Запустить программу для прогревания смеси.
  12. После окончания синтеза первой цепи кДНК выключить амплификатор Real-Time CFX96 (Bio-Rad).

## 7.4. Электрофоретическое разделение продуктов полимеразной цепной реакции в агарозном геле

### Необходимые приборы и расходные материалы:

- источник питания, 5—250 В, 10—3000 мА, 1—300 Вт, 4 выхода, PowerPac HC (Bio-Rad);
- камера для горизонтального гель-электрофореза;
- заливочный столик и гребенки для приготовления геля;
- микроцентрифуга с роторами для пробирок на 1,5 и 0,2 мл;
- ПЦР-пробирки на 0,2 мл;
- автоматические дозаторы и наконечники: 1000, 200, 10 мкл;
- пинцет;
- штатив.

### Реагенты:

- агароза;
- 50X Буфер TAE (pH 7,6);
- 1X Буфер TAE (pH 7,6);
- 10X Загрузочный буфер (0,1%-ный ксиленцианол, 0,1%-ный бромфеноловый синий, 0,5%-ный SDS, 0,1M ЭДТА рН 8,0), 50%-ный глицерол);
- раствор Этидиум бромида (0,5 мг/мл);
- маркер длин ДНК DNA Ladder 100+ bp (Евроген);
- деионизированная стерильная вода (H<sub>2</sub>O mQ).

### Ход работы

1. Приготовить 2%-ный агарозный гель:
  - в стеклянную емкость на 200 мл внести 4 г агарозы;
  - налить в емкость 8 мл TAE 50x, довести водой до 200 мл.
2. Поставить емкость в микроволновую печь на 4 мин при 800 Вт.
3. Следить за нагревом смеси и периодически помешивать стеклянной палочкой. Будьте осторожны, перегретая смесь при помешивании может сильно вспениться и обжечь!
4. После полного растворения агарозы дать гелю немного остыть, перенести его в вытяжной шкаф и продолжить работы в нем.

5. Добавить в смесь 150 мкл раствора этидиум бромида (0,5 мг/мл). Перемешать.

6. В заливочный столик установить гребенки. Следить, чтобы гребенка была вставлена без перекосов в вертикальной плоскости, иначе кармашки получатся разной глубины (и, соответственно, разного объема). Гребенку необходимо ставить параллельно заслонке, то есть без перекосов в горизонтальной плоскости.

7. Залить гель и оставить застывать для полимеризации (15—20 мин в зависимости от толщины геля и окружающей температуры).

8. Извлечь застывший гель из заливочного столика и поместить в камеру для горизонтального фореза.

9. Залить в камеру 1X Буфер ТАЕ, чтобы он на несколько миллиметров (около 5 мм) покрывал гель.

10. Аккуратно вытащить гребенки.

11. Добавить к каждому анализируемому образцу нуклеиновых кислот около 1 мкл 10X Загрузочного буфера и пропипетировать.

12. Нанести по 10 мкл каждого образца на гель.

13. Нанести на гель 10 мкл Маркер длин ДНК DNA Ladder 100 + bp (Евроген).

14. Закрывать камеру крышкой с электродами.

15. Включить источник питания, задать необходимые условия — напряжение, силу тока или мощность, время. Напряжение рассчитать из расчета 5 В на 1 см расстояния между электродами.

16. По окончании фореза гель осторожно переместить в трансиллюминатор, сделать снимки образцов.

17. Вырезать из геля область, в которой находятся ампликоны. Этот кусок геля выбросить.

18. Остатки геля порезать и поместить назад в стеклянную емкость с агарозой.

19. Буфер слить обратно в емкость, где он находился.

20. Вымыть камеру, заливочный столик, гребенки, трансиллюминатор и т. д.



## СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Патент №2445258 С2 Российская Федерация, МПК С01В 33/037, С30В 29/06. Способ очистки кремния: №2008143439/05 : заявл. 04.04.2007 : опублик. 20.03.2012 / С. Ничол ; заявитель КАЛИСОЛАР КАНАДА ИНК.
2. *Guide T.S.P. Tips for Good Laboratory Pipetting*. 1514170-04 Thermo Fisher Scientific/ТорноваОу. PIPGUIDE-LCP-0407-04. URL: [http://fpb.case.edu/smartcenter/docs/SpitCamp/Pipetting%20Guide\\_Thermo%20Scientific\\_25440.pdf](http://fpb.case.edu/smartcenter/docs/SpitCamp/Pipetting%20Guide_Thermo%20Scientific_25440.pdf) (дата обращения: 01.03.2022).
3. *Кутлунина Н.А., Ермошин А.А.* Молекулярно-генетические методы в исследовании растений : учеб.-метод. пособие. Екатеринбург, 2017.
4. *Нурғалиева М.Т., Исакова Ж.А., Смағулов А.К.* Методы выделения нуклеиновых кислот для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени // Наука и мир. 2017. Т. 1, №4. С. 73—76.
5. *Антонова О.С., Корнева Н.А., Белов Ю.В., Курочкин В.Е.* Эффективные методы выделения нуклеиновых кислот для проведения анализов в молекулярной биологии (обзор) // Научное приборостроение. 2010. Т. 20, №1. С. 3—9.
6. *Лубенникова М.В., Афанасьев В.А., Афанасьев К.А.* Выделение ДНК — важный этап молекулярно-генетического исследования // Электронный научно-методический журнал Омского ГАУ. 2020. №2 (21). С. 4. URL: [e-journal.omgau.ru/index.php/vyp-rus/2020-god/2-21-aprel-iyun-2020-g](http://e-journal.omgau.ru/index.php/vyp-rus/2020-god/2-21-aprel-iyun-2020-g) (дата обращения: 04.03.2022).
7. *Великов В.А.* Молекулярная биология. Практическое руководство. Саратов, 2013.
8. *Свирид А.В., Походня Ю.Г.* Практикум по дисциплине «Химико-аналитические методы в экологии (БСП)» : учеб.-метод. пособие. Минск, 2018.
9. *Ali N. et al.* Current nucleic acid extraction methods and their implications to point-of-care diagnostics // BioMed research international. 2017. Vol. 2017 (12). P. 1—13.
10. *Давыдова О.* Методы генетических исследований микроорганизмов: учеб. пособие. Оренбург, 2013.

11. *Schmitz T. C. et al.* Solid-phase silica-based extraction leads to underestimation of residual DNA in decellularized tissues // *Xenotransplantation*. 2021. Vol. 28, № 1. С. e12643.

12. *Каюмов А. Р., Гимадутдинов О. А.* Практикум по молекулярной генетике : учеб.-метод. пособие. Казань, 2016.

13. *Gautam A.* DNA and RNA Isolation Techniques for Non-experts. Cham, Switzerland, 2022.

14. *Birnboim H. C., Doly J.* A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // *Nucleic acids research*. 1979. Vol. 7, № 6. P. 1513—1523.

15. *Barbier F. F. et al.* A phenol/chloroform-free method to extract nucleic acids from recalcitrant, woody tropical species for gene expression and sequencing // *Plant Methods*. 2019. Vol. 15, № 1. P. 1—13.

16. *Doyle J. J., Doyle J. L.* A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // *Phytochemical bulletin*. 1987.

17. *Аукенов Н. Е., Масабаева М. Р., Хасанова У. У.* Выделение и очистка нуклеиновых кислот. Состояние проблемы на современном этапе // *Наука и здравоохранение*. 2014. № 1. С. 51—53.

18. *Мюллер С.* Нуклеиновые кислоты от А до Я : учеб. пособие. М., 2013.

19. *Arias R.* Nobel prize winning emeryville scientist Kary Mullis passes at 74 // *The E'ville Eye*. 11.08.2019. URL: <https://evilleeye.com/in-the-neighborhood/nobel-prize-winning-emeryville-scientist-kary-mullis-passes-at-74/> (дата обращения: 01.03.2022).

20. *Ребриков Д. В., Савилова А. М., Саматов Г. А.* ПЦР в реальном времени : учеб. пособие. М., 2011.

21. *Рекомендации по постановке ПЦР*. М., 2023. URL: <https://evrogen.ru/> (дата обращения: 28.09.2023).

22. *PCR Basics* : [сайт]. URL: <https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-basics.html> (дата обращения: 01.03.2022).

23. *PCR Methods — Top Ten Strategies* : [сайт]. URL: <https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-methods.html> (дата обращения: 01.03.2022).

24. *Озеровский А. В.* Микрклональное размножение селекционных форм ремонтантной малины с использованием новых регуляторов роста : автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. Брянск, 2007.

25. *Higuchi R. et al.* Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions // *Bio/technology*. 1993. Vol. 11, №9. P. 1026—1030.

26. *Vogelstein B., Kinzler K. W.* Digital pcr // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999. Vol. 96, № 16. P. 9236—9241.

27. *What is Real-Time PCR (qPCR)?* URL: <https://www.bio-rad.com/ru-ru/applications-technologies/what-real-time-pcr-qpcr?ID=LUSO4W8UU> (дата обращения: 04.03.2022).

28. *Determination of PCR Efficiency* : [сайт]. URL: <https://www.gene-quantification.de/efficiency01.html> (дата обращения: 04.03.2022).

29. *Rocha A. J. et al.* Real time PCR: the use of reference genes and essential rules required to obtain normalisation data reliable to quantitative gene expression // *Journal of Molecular Biology Research*. 2015. Vol. 5, № 1. P. 45.

30. *Livak K. J., Schmittgen T. D.* Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2(-\Delta\Delta C(T))$  Method // *Methods*. 2001. Vol. 25, №4. P. 402—408.

31. *Альбертс Б., Брей Д., Хопкин К и др.* Основы молекулярной биологии клетки. М., 2015.

32. *Robert F. W.* *Molecular biology*. N. Y., 2012.

33. *Маркеры* длин ДНК // *Евроген* : [официальный сайт]. URL: <https://evrogen.ru/products/evaluation/ladders> (дата обращения: 28.09.2023).

34. *Five Considerations for the Nucleic Acid Gel Electrophoresis Process*. URL: <https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/na-electrophoresis-education/na-electrophoresis-considerations.html> (дата обращения: 28.09.2023).

35. *Маскаева Т. А., Лабутина М. В., Чегодаева Н. Д.* Молекулярная биология : учеб. пособие. URL: <https://e.lanbook.com/book/75096> (дата обращения: 28.09.2023).

*Учебное издание*

**Доминова** Ирина Николаевна

**ПРАКТИКУМ ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ  
ДЛЯ БИОЛОГОВ И БИОИНЖЕНЕРОВ**

Учебно-методическое пособие

Редактор *В. Е. Москаленко*

Компьютерная верстка *Г. И. Винокуровой*

Подписано в печать 01.12.2023 г.

Дата выхода в свет 15.12.2023 г.

Формат 60×90<sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Усл. печ. л. 8,3

Тираж 300 экз. (1-й завод 30 экз.). Заказ 130

Издательство Балтийского федерального университета им. И. Канта  
236041, г. Калининград, ул. А. Невского, 14