

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ

Государственное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«Оренбургский государственный университет»

Кафедра микробиологии

О.К.ДАВЫДОВА

# ГЕНЕТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ПРАКТИКУМУ

Рекомендовано к изданию Редакционно-издательским советом  
государственного образовательного учреждения  
высшего профессионального образования  
«Оренбургский государственный университет»

Оренбург 2008

УДК 579.25(076.5)  
ББК 28.4 я 73  
Д 13

Рецензент  
кандидат биологических наук Г.П.Алёхина

Д 13                    **Давыдова О.К.**  
                          **Генетика микроорганизмов: методические указания к лабораторному практикуму/О.К. Давыдова – Оренбург. ГОУ ОГУ, 2008. – 35 с.**

Методические указания предназначены для выполнения лабораторных занятий по дисциплине специализации «Генетика микроорганизмов» в 6 семестре по специальности 020209 – Микробиология.

ББК 28.4 я 73

© Давыдова О.К., 2008  
© ГОУ ОГУ, 2008

## Содержание

Введение.....	5
1 Общая характеристика структуры и физико-химических свойств ДНК.....	6
1.1 Строение и количественные характеристики ДНК.....	6
1.2 Основные физико-химические свойства ДНК.....	10
1.3 Денатурация и ренатурация ДНК. Молекулярная гибридизация.....	10
2 Спектры поглощения ДНК.....	13
2.1 Общая теория поглощения света молекулами.....	13
2.2 Параметры, характеризующие поглощение в ультрафиолетовом и видимом свете.....	14
2.3 Информация, содержащаяся в инфракрасных спектрах.....	22
3 Электрофорез ДНК.....	25
3.1 Теория электрофореза.....	25
3.2 Электрофорез ДНК в агарозном геле.....	27
3.3 Разделение ДНК в агарозном геле.....	29
3.4 Окраска ДНК и визуализация результатов электрофореза.....	31
3.5 Анализ результатов электрофореза. Оценка конформации и размеров ДНК...33	
3.6 Использование компьютерной программы ImageJ для обработки результатов гель-электрофореза .....	34
4 Литература, рекомендуемая для изучения дисциплины.....	37

## **Введение**

Дисциплина «Генетика микроорганизмов» изучается студентами специальности 020209 – Микробиология в 6 семестре как дисциплина специализации (Федеральный компонент ДС.Ф.03).

Дисциплина изучается в соответствии с учебным планом специальности 020209 с учетом ГОС ВПО (раздел 4 «Общие требования к обязательному минимуму содержания основной образовательной программы по специальности (ранее 012400) - Микробиология»), введенными в действие с 10.03.2000 г. Министерством образования Российской Федерации.

Основной целью преподавания дисциплины является изучение законов наследственности и изменчивости микроорганизмов; способов передачи генетической информации у микроорганизмов, а также прикладные аспекты: селекционная работа с микроорганизмами, методы генетического конструирования микроорганизмов для использования в качестве промышленных штаммов.

В органической связи с получением фундаментальных знаний по данной дисциплине важной целью ее изучения является формирование практических навыков использования современных методов изучения микроорганизмов и микробиологических процессов генетического анализа и геной инженерии в научных и производственных целях.

# 1 Общая характеристика структуры и физико-химических свойств ДНК

## 1.1 Строение и количественные характеристики ДНК

Главные функции нуклеиновых кислот состоят в хранении и передаче генетической информации. Именно нуклеиновые кислоты были отобраны при эволюции благодаря сочетанию таких возможностей как, во-первых, образование гигантских устойчивых полимеров и, во-вторых, сборка на матрице такого полимера его «негативной копии», которая в свою очередь может служить матрицей для синтеза точной копии исходного.

Изложение будет более компактным, если описывать вначале структуру нуклеиновых кислот, не стремясь обосновывать её физико-химическими данными. Тогда последующее изложение ложится на более стройную основу, хотя несколько нарушается восприятие исторического развития этой области знания.

Диаметр нитей ДНК близок к 20 ангстремам (Å), а длина варьирует в очень широких пределах, например, для бактерий составляет  $0,5-1 \times 10^6$  Å, т.е. 0,05-0,1 мм. Из анализа электронных микрофотографий и других данных можно сделать вывод об относительной негибкости нитей ДНК.

Молекулы нуклеиновых кислот состоят из нуклеотидов, соединённых последовательно ковалентными связями. В свою очередь нуклеотиды состоят из пуринового или пиримидинового основания, рибозы или дезоксирибозы и ортофосфорной кислоты. В состав ДНК входят два пуриновых основания – аденин (А) и гуанин (Г) и два пиримидиновых – цитозин (Ц) и тимин (Т). При приближённых расчётах можно принимать значение молекулярного веса равным 345 для всех нуклеотидов.

Исключительно важное значение имеют закономерности содержания отдельных оснований в ДНК. Эти закономерности были установлены Чаргаффом в 1949 г. и послужили одним из ключей к раскрытию её вторичной структуры. Анализ состава большого числа образцов очищенной ДНК самого различного происхождения показал, что:

1) молярная доля пуринов равна молярной доле пиримидинов:  $(A+G)/(T+C)=1$ ;

2) молярная доля А равна таковой Т, а  $G=C$ .

Соотношение  $(G+C)$  выраженное в молярных процентах или проценты ГЦ-пар называют *коэффициентом специфичности*, отражая тем самым его таксономическое значение.

Линейная последовательность нуклеотидов образует первичную структуру ДНК. Большинство ДНК состоит из двух полинуклеотидных цепей, связанных друг с другом на всём протяжении водородными связями.

В основе взаимодействия цепей лежат особенности расположения функциональных групп пуриновых и пиримидиновых оснований. Одним из партнёров всегда служит пуриновое основание, другим – пиримидиновое. В противном случае условия для спаривания оснований, входящих в состав сдвоенных полинуклеотидных цепочек, были бы неблагоприятными (двум пуриновым

основания было бы слишком «тесно», а два пиримидиновых были бы расположены слишком далеко друг от друга). Пара А-Т стабилизирована двумя водородными связями, а Г-Ц – тремя. Способность к избирательному взаимодействию А с Т и Г с Ц выражают термином *комплементарность*, а соответствующие основания называют *комплементарными*. Цепи, образующие двойную спираль, расположены так, что по оси интервалы между ними неодинаковы – чередуются большие и меньшие промежутки. Это обуславливает возникновение на молекуле ДНК двух неодинаковых борозд – большой и малой.

В стабилизации биспиральных молекул нуклеиновых кислот велика роль и вандерваальсовых связей между основаниями, располагающимися в виде «стопки монет».

Количественные характеристики биспиральной молекулы ДНК таковы: каждый виток спирали содержит 10 нуклеотидов, проекция витка на ось молекулы составляет 34,6 Å, поперечник большой борозды равен примерно 17 Å, а малой – 11 Å. Параметры такой молекулы ДНК соответствуют её конфигурации в препаратах, влажность которых близка к физиологической, – так называемая В-форма ДНК. При частичном обезвоживании препаратов и некоторых функциональных состояниях (образование покоящихся клеток) конфигурация несколько меняется. Образуется А-форма молекул ДНК, характеризующаяся некоторым смещением пар оснований от оси молекулы к периферии. На рисунке 1 сопоставлены конфигурации В- и А-форм. В последней проекция одного витка спирали занимает лишь 28 Å, каждый виток содержит 11 нуклеотидов, а диаметр молекулы меньше на 1 Å, большая и малая борозды приближаются друг к другу по размерам. Всё это свидетельствует об определённой роли в поддержании структуры ДНК молекул воды. Описаны и другие конфигурации ДНК, так под действием солей лития образуется С-форма, в которой на один виток приходится 9 нуклеотидов.

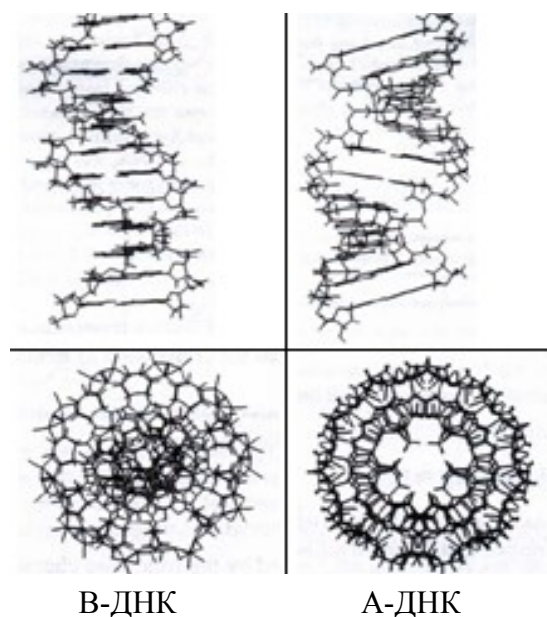


Рисунок 1 – Конфигурации В- и А-форм ДНК

В настоящее время общее описание структуры молекул ДНК нельзя считать исчерпывающим, если доказана биспиральность данной ДНК и установлена длина, нити биспиральной ДНК могут образовывать в пространстве структуры различной степени сложности. Это, например, циклические молекулы ДНК хромосом большинства прокариотов, митохондрий и хлоропластов. Циклические молекулы ДНК могут также быть в перевитом (сверхскрученном) состоянии. Всё большее значение сейчас придаётся связи между последовательностью оснований и особенностями пространственной конфигурации ДНК. Повидимому, те участки ДНК, к которых преобладают АТ-пары (заведомо более лабильные, чем пары ГЦ), являются особенно неустойчивыми и допускают ряд вариаций третичной структуры.

### **Лабораторная работа №1.1. Методы выделения ДНК**

Существует множество методов выделения ДНК, они различаются между собой: 1) чистотой конечного продукта; 2) временем, необходимым для его получения; 3) применимостью для выделения больших (или, напротив, небольших) количеств продукта. Выход ДНК их культур, находящихся в стационарной фазе часто оказывается ниже, чем из культур в логарифмической фазе.

Первый этап при выделении нуклеиновых кислот – это разрушение бактериальных клеток. В зависимости от природы клеточной стенки бактерии могут быть разрушены 1) с помощью одного лишь детергента, 2) с использованием сочетания действия детергентов и гидролитических ферментов или 3) с помощью физических методов, таких как разрушение под действием ультразвука, в результате резкого изменения давления или при встряхивании со стеклянными шариками.

Грамотрицательные бактерии часто лизируются под действием одного лишь детергента, хотя имеется много исключений. А отличие от них почти все грамположительные бактерии приходится сначала обрабатывать лизоцимом (гидролитическим ферментом, действующим на пептидогликан клеточной стенки), а затем уже применять детергент.

*Цель работы* – выделить ДНК из клеток грамотрицательных бактерий по методу Мармура.

#### *Методика выполнения работы*

- 1 Клетки из культуры грамотрицательных бактерий, находящейся в поздней экспоненциальной или ранней стационарной фазе роста, отцентрифугировать при 3000 g в течение 5 минут.
- 2 Русуспендировать в 50-100 мл солевого буфера с ЭДТА (0,15 M NaCl, 0,01 M Na-ЭДТА, pH 8,0).
- 3 Добавить додецилсульфат натрия в виде 20%-го раствора до конечной концентрации 1%.
- 4 Для ускорения лизиса колбу поместить в водяную баню при 50-60 °C и встряхивать. О начале лизиса свидетельствует быстрое увеличение вязкости и появляющаяся опалесценция.

5 Добавить 5 М перхлорат натрия до конечной концентрации 1 М.

6 Добавить 0,5 объёма смеси хлороформ-изопентанол и встряхивать 30 минут на качалке в колбе с притёртой стеклянной пробкой. Скорость встряхивания должна быть достаточной для получения эмульсии, в то время как сильное встряхивание нежелательно.

7 Эмульсию центрифугировать при 13000 g в течение 15 минут в центрифуге с охлаждением при температуре от 0 до 4 °С.

8 Осторожно слить или удалить пипеткой верхний водный слой из каждой пробирки, стараясь не затронуть белый осадок (белок) на границе раздела фаз. Водный слой содержит ДНК и поэтому отличается высокой вязкостью. Рекомендуется, отбирая жидкость, постоянно передвигать пипетку в пробирке из стороны в сторону во избежание захвата белка с поверхности.

9 Повторить операции 6-8.

10 Водную фазу поместить в химический стакан и медленно влить туда холодный 95%-ный этанол (добавляют около двух объёмов водной фазы).

11 Осаждённую ДНК собрать стеклянной палочкой, осторожно размешивая обе фазы круговыми движениями. ДНК прилипает к палочке или наматывается на неё. Избыток этанола удалить, прижимая палочку с ДНК к стенке стакана; затем для удаления остатков этанола палочку на несколько минут установить вертикально, так чтобы конец с ДНК был обращён вверх.

12 Стеклянную палочку с налипшей ДНК поместить в 10-20 л 0,1-кратного буфера SSC (0,15 М NaCl, 0,015 М тринатрийцитрат, pH 7,0) и держать там до размягчения ДНК и удаления её с палочки. После полного растворения ДНК концентрацию буфера SSC довести до 1-кратной, добавляя необходимое количество 20-кратного буфера.

13 К препарату ДНК добавить РНКазу концентрации 50  $\text{v} \cdot \text{v}^{-1}$  в 0,15 М NaCl и инкубировать 30 минут при 37 °С.

14 В раствор ДНК добавить 5-10 мл смеси хлороформ-изопентанол и встряхивать 15 минут на качалке.

15 Повторить операции 7-8. Экстракцию смесью хлороформ-изопентанол повторять до тех пор, пока на поверхности раздела фаз почти не останется белка.

16 ДНК осадить этанолом, наматывая на палочку, и растворяя в буфере 0,1-кратного SSC. Процедуру повторить 2-3 раза для удаления рибонуклеотидов. Каждый раз перед осаждением этанолом концентрацию буфера SSC доводить до 1-кратной.

17 Растворить ДНК в буфере 0,1-кратного SSC и хранить в морозильнике.



## 1.2 Основные физико-химические свойства ДНК

Физико-химические свойства нуклеиновых кислот весьма гармонично увязываются с особенностями их состава и структуры.

Известна высокая **плотность** нуклеиновых кислот близкая к 1,7, являющаяся следствием значительного содержания фосфора. Плотность двуцепочечных ДНК определяется молярной долей Г+Ц, также незначительное влияние на плотность ДНК оказывает её третичная структура.

**Вязкость** растворов нуклеиновых кислот является особенно ценным показателем для характеристики двуцепочечных ДНК. Упругие нитевидные молекулы большой длины определяют очень высокую вязкость и её зависимость от молекулярного веса.

Производя обычные операции с растворами наиболее высокомолекулярных препаратов ДНК, следует учитывать **ломкость её молекул** даже при небольших градиентах скорости среды. Уже при элементарном пипетировании растворов ДНК с молекулярным весом  $100 \times 10^6$  происходят разрывы биспиральных нитей на фрагменты, размер которых близок обычно к половине исходной длины.

Высокая степень упорядоченности структур биспиральных нуклеиновых кислот ярко выявляются при исследовании их **оптических свойств**. Пуриновые и пиримидиновые основания и соответствующие нуклеотиды имеют максимум поглощения света вблизи 260 нм (цитозин – 270 нм). Вхождение нуклеотидов в состав нуклеиновых кислот практически не изменяет положение максимума, но значительно снижает интенсивность поглощения. Оптическая плотность биспиральной ДНК примерно на 40 % меньше соответствующего числа не связанных друг с другом нуклеотидов. Явление это, называемое **гипохромным эффектом**, обусловлено строго упорядоченным, параллельным расположением плоскостей гетероциклических колец оснований в биспиральной ДНК. Простое соединение нуклеотидов в одноцепочечные цепи даёт лишь небольшое снижение оптической плотности при 260 нм. Значения гипохромного эффекта, выраженного в процентах от максимального, очень близки к доле спирализованных участков, поэтому оценка гипохромности широко используется при изучении процессов денатурации-ренатурации нуклеиновых кислот.

## 1.3 Денатурация и ренатурация ДНК. Молекулярная гибридизация

**Денатурация** нуклеиновых кислот – это процесс нарушения водородных и вандерваальсовых связей между отдельными основаниями и полинуклеотидными цепями в целом, однако не сопровождающийся нарушением ковалентных связей в молекуле. Она может быть вызвана целым рядом воздействий: нагреванием, значительными изменениями pH, крайним снижением ионной силы и др. наибольший интерес представляет термическая денатурация. Её значение и высокая степень изученности привели к тому, что нередко вместо наиболее широкого термина «денатурация» пользуются термином «плавление», даже в случа-

ях, когда разъединение цепей вызывается не нагреванием, а другими факторами.

Термическая денатурация нуклеиновых кислот регистрируется с помощью целого ряда показателей, но наиболее показательным и удобным измерением является оптическая плотность при 260 нм. Гипохромизм двуцепочечных нуклеиновых кислот обуславливает при денатурации обратный **гиперхромный эффект**. Удобно оперировать относительными значениями гиперхромного эффекта, принимая за 100 % максимальный прирост оптической плотности, достижимый при нагревании. Величину гиперхромного эффекта оценивают, измерив оптическую плотность при 260 нм для нативной ДНК (или полинуклеотида) –  $D_2$  и денатурированной ДНК (или мононуклеотида) –  $D_1$ , по формуле

$$\Gamma/\Delta(\%) = (D_1 - D_2) / D_1 \times 100.$$

Если бы связи, стабилизирующие биспиральную структуру, были одинаковы на всём протяжении молекулы и если бы препараты ДНК представляли собой смесь абсолютно одинаковых молекул, то кривая зависимости между оптической плотностью и температурой образовала бы очень резкий переход – почти ступеньку – при температуре плавления. В действительности регистрируются довольно отлогие S-образные кривые, почти симметричные в точке перегиба (рисунок 2). Абсцисса точки перегиба, соответствующая половине гиперхромного эффекта, принимается как температура плавления  $T_{пл}$ . Температуры плавления различных препаратов ДНК существенно различаются. Естественно, наиболее тугоплавкими являются ДНК, богатые ГЦ-парами, а легче всего плавятся ДНК АТ-типа. При температуре, которая вызывает почти 100 % гиперхромный эффект, сохраняется существенная доля водородных связей, которые ещё удерживают цепочки друг возле друга, хотя биспиральной структуры уже не существует. Только нагревание до температур, на 5-7 ° превышающих ту, при которой прекратилось повышение оптической плотности, вызывает полное расхождение цепей с образованием клубков, характерных для одноцепочечных ДНК. Наклон кривых плавления ДНК из разных источников, их растянутость вдоль оси абсцисс являются неодинаковыми. Наибольший наклон кривых плавления отмечается для ДНК из клеток высших организмов, меньший – для бактериальной ДНК.

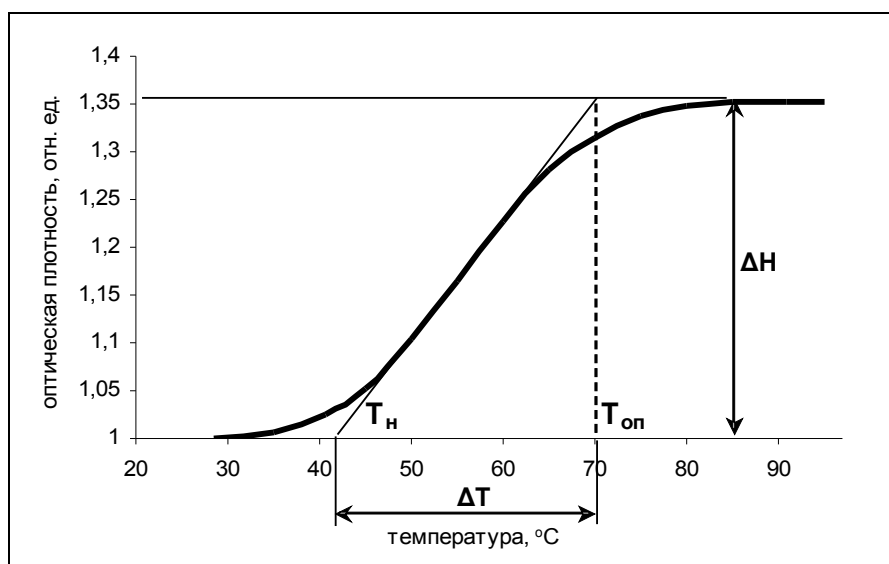


Рисунок 2 – Кривая изменения оптической плотности (260 нм) при увеличении температуры и основные определяемые параметры плавления ДНК

Процесс денатурации нуклеиновых кислот является обратимым. Постепенное охлаждение раствора денатурированной ДНК или выдерживание его при температуре, примерно на 20 ° меньшей температуры плавления, позволяет полностью восстановить нативность молекулы. Напротив, быстрое охлаждение до низких температур (0÷-20 °С и ниже) фиксирует денатурированное состояние на длительное время. Скорость ренатурации тем больше, чем выше концентрация и однородность, гомогенность молекул исходной ДНК по их нуклеотидной последовательности. Последнее послужило основой для разработки метода сравнительной оценки разнообразия нуклеотидных последовательностей в природных ДНК из разных организмов.

Если свести вместе продукты денатурации целых молекул ДНК, лишь частично совпадающих по нуклеотидным последовательностям, то в условиях ренатурации будут возникать двуцепочечные молекулы не только из гомологичных цепей, но и из цепей разных ДНК (рисунок 3). Естественно, в последнем случае биспиральные структуры будут возникать не на всем протяжении молекул. Этот процесс называют **молекулярной гибридизацией**. Чем ближе по первичной структуре сводимые ДНК, тем будет больше протяжённость спирализованных участков в гибридной молекуле. По доле последних можно количественно оценивать сходство нуклеотидных последовательностей ДНК разных организмов и таким образом судить о степени их генетической близости.

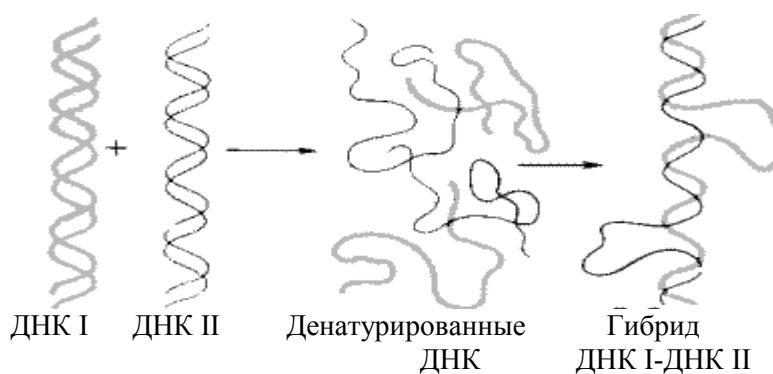


Рисунок 3 – Гибридизация ДНК

Предложен целый ряд методов количественной оценки степени гомологии разных ДНК при молекулярной гибридизации. При этом можно идти либо по пути гибридизации наиболее высокомолекулярных ДНК, измеряя далее долю образовавшихся биспиральных участков, либо предварительно дробить обе или одну из двух сравниваемых ДНК на фрагменты и оценивать какая доля фрагментов может гибридизоваться. В случае без предварительного дробления

одна из ДНК «утяжеляется» введением  $N^{15}$  (через среды выращивания данного организма), затем гибридизуется с «лёгкой» ДНК из второго организма, и смесь разделяется ультрацентрифугированием в градиенте плотности  $CsCl$ . Гибридная ДНК, содержащая лишь одну нить с  $N^{15}$ , занимает промежуточное положение между ДНК I и II, которые также частично ренатурировались. Однако, даже получив выраженный пик гибридной ДНК, ещё нельзя сделать заключение о том, какова в ней доля биспиральных участков и какова количественная степень гомологии. Один из эффективных приёмов, позволяющих решить эту задачу основан на существовании нуклеаз, расщепляющих только одноцепочечные участки.

## 2 Спектры поглощения ДНК

### 2.1 Общая теория поглощения света молекулами

Практически измерение спектров поглощения сводится к оценке доли излучения, поглощённой в объёме определённой толщины для разных длин волн. В качестве примера рассмотрим кювету с раствором какого-либо окрашенного вещества известной концентрации  $C$ . Толщина кюветы  $l$ . Пусть на кювету падает монохроматический световой луч интенсивности  $I_0$ , а интенсивность луча, прошедшего через кювету и измеренного с помощью фотоприёмника, равна  $I$  (рисунок 4).

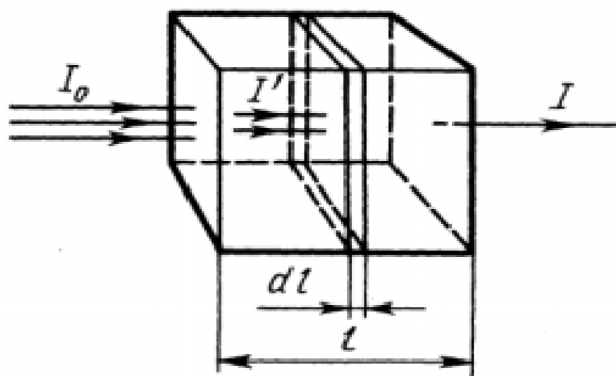


Рисунок 4 – К выводу закона Ламберта-Бера (объяснения в тексте)

Отношение интенсивностей прошедшего и падающего излучений называется пропусканием и обозначается  $T$ .

$$T = I/I_0.$$

Величина  $T$  измеряется в долях единицы или в процентах. Отношение интенсивности света, поглощённого образцом  $(I_0 - I)$ , к интенсивности падающего на кювету  $I_0$  называется поглощением:

$$(I_0 - I)/I_0 = 1 - I/I_0 = 1 - T.$$

Как видно из определения, величины пропускания  $T$  и поглощения  $(1 - T)$  изменяются в пределах от 0 до 1 (от 0 до 100 %).

В общем случае поглощение  $(1 - T)$  не пропорционально концентрации вещества, поэтому для определения концентрации используют другой показатель – оптическую плотность

$$D = \lg(I_0/I).$$

Связь между оптической плотностью и концентрацией вещества описывается законом Ламберта-Бэра:

$$D = \varepsilon Cl,$$

где  $C$  – концентрация вещества, моль/л,

$l$  – толщина кюветы, см,

$\varepsilon$  – молярный коэффициент погашения (коэффициент экстинкции).

Из определения оптической плотности очевидно, что

$$D = \lg(1/T).$$

Из формулы следует, что в то время как значения  $T$  заключены в пределах от 1 до 0, величина  $D$  может изменяться от 0 до 2 (рисунок 5). Так как оптическая плотность – величина безразмерная, то коэффициент молярной экстинкции будет иметь размерность л/(моль·см). Этот коэффициент и определяет поглощающую способность того или иного вида молекул и её зависимость от длины волны света, т.е. спектр поглощения  $\varepsilon = f(\lambda)$ . Спектр поглощения является «паспортом» вещества, благодаря которому возможна идентификация соединений. Наряду со шкалой длин волн в нанометрах ( $1 \text{ нм} = 10^{-8} \text{ м}$ ) используется шкала частот в «волновых числах».  $\bar{\nu} = 1/\lambda \text{ см}^{-1}$ .

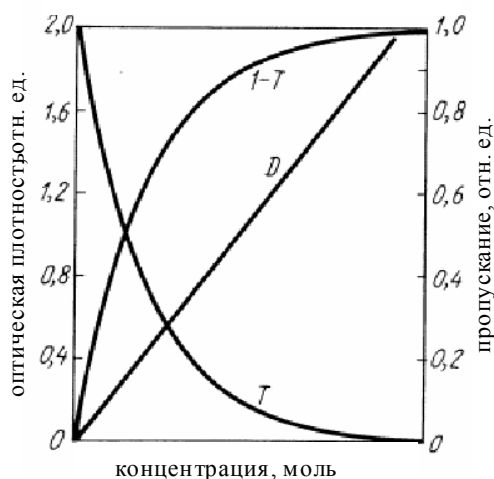


Рисунок 5 – Зависимость пропускания (T), коэффициента поглощения (1-T) и оптической плотности (D) от концентрации хромофора в растворе

## 2.2 Параметры, характеризующие поглощение в ультрафиолетовом и видимом свете

Наиболее важными параметрами спектров поглощения служат: положение максимумов спектра на шкале длин волн ( $\lambda_{\text{макс}}$  нм), полуширины полос поглощения  $\Delta\lambda_{1/2}$  (измеряются на половине высоты максимума), величины максимумов  $D_{\text{макс}}$ , а если их несколько, то и соотношение между ними.

Форма спектра поглощения зависит не только от типа вещества, но и от его состояния, характера молекулярного окружения (например, растворителя). Восстановление, окисление молекул, их агрегация, комплексообразование, водородные связи, изомеризация, изменение полярности (гидрофобности) окру-

жения – все эти факторы существенно сказываются на спектрах поглощения, что позволяет исходя из измерения спектров, делать определённые выводы о характере состояния исследуемых веществ, конформации молекул и т.д.

Как видно из сказанного выше, по измеренной на спектрофотометре оптической плотности  $D = \lg(I/I_0)$  при известных  $\epsilon$  и  $l$  можно определить концентрацию вещества

$$C = D / (\epsilon l).$$

Обычно оптическую плотность измеряют при длине волны, соответствующей максимуму поглощения. Наибольшая точность измерений достигается при оптической плотности 0,43. Точность измерения падает при слишком больших и при слишком маленьких поглощениях (таблица 1).

Таблица 1

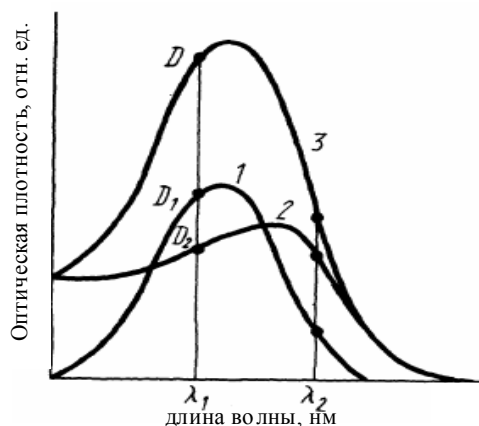
$D_{260}$	Точность, %
$\sim 0,005$	$\sim 18$
$\sim 0,01$	$\sim 9$
0,3-0,7	$\sim 0,3$
0,1-1,0	$\sim 1,0$

Если в исследуемом объёме имеется несколько веществ, поглощающих в одной и той же спектральной области, то для оптической плотности выполняется закон *аддитивности* для каждой длины волны (рисунок 6)

$$D_{AB} = D_A + D_B,$$

для пропускания

$$T_{AB} = T_A T_B.$$



1,2 – спектры компонентов; 3 – спектр смеси.

Рисунок 6 – Количественный спектрофотометрический анализ смеси двух веществ

Спектр ДНК имеет вид, показанный на рисунке 7, максимум поглощения  $\lambda_{\text{макс}}$  приходится на длину волны около 260 нм, а  $\epsilon = 6600$ , однако, индивидуаль-

ные основания имеют  $\lambda_{\text{макс}}$  (в нм): 260,5 для аденина; 264,5 для тимина; 246 для гуанина и 267,0 для цитозина. Величины  $\epsilon$  оснований при  $\lambda_{\text{макс}}$   $13,4 \times 10^3$ ,  $7,9 \times 10^3$ ,  $10,7 \times 10^3$ ,  $6,1 \times 10^3$  соответственно.

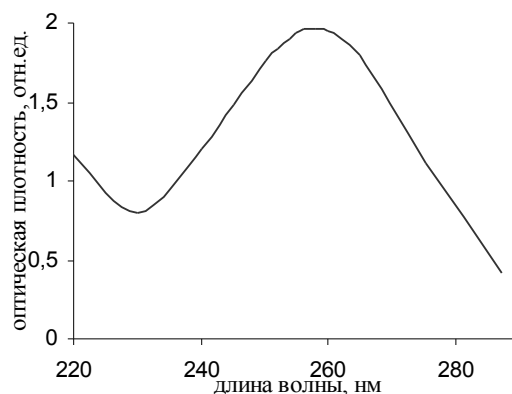


Рисунок 7 – Спектр поглощения ДНК в УФ-диапазоне

Измерение спектров поглощения биологических препаратов существенно отличается от измерения растворов веществ. Неравномерное распределение вещества по объёму (например, весь хлорофилл суспензии находится только в хлоропластах и т.п.) приводит к тому, что часть света проходит мимо частиц не поглощаясь. Такой эффект называемый *эффектом сита*, увеличивает интенсивность прошедшего света  $I$ , а следовательно и светопропускание  $T$  ( $D$  падает).

Вследствие гетерогенности биологических образцов часто появляется сильное светорассеяние. Это часто связано с различными коэффициентами преломления среды и частиц препарата. Рассеянный на границах раздела фаз «среда–частица» свет не попадает на фотоприёмник, вызывая кажущееся падение  $I$  ( $T$  падает, а  $D$  возрастает).

Совместное действие светорассеивания и эффекта сита искажает измеряемый спектр поглощения, сглаживая максимумы и уширяя полосы поглощения. Чтобы избежать этого, необходимо использование более тонких и однородных образцов, а также сред с более близкими к частицам коэффициентами преломления (например, добавление 60 % глицерина к водным суспензиям частиц или клеток).

### **Лабораторная работа №2.1. Изучение принципа и порядок работы на спектрофотометре СФ-46**

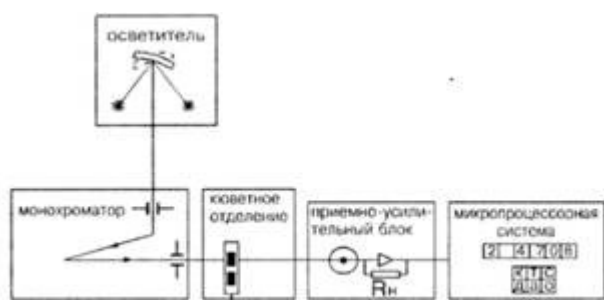
*Цель работы* – изучить принцип и порядок работы на спектрофотометре СФ-46.

В основу работы спектрофотометра СФ-46 (внешний вид показан на рисунке 8а) положен принцип измерения отношения двух световых потоков: потока, прошедшего через исследуемый образец, и потока, падающего на исследуемый образец (или прошедшего через контрольный образец).

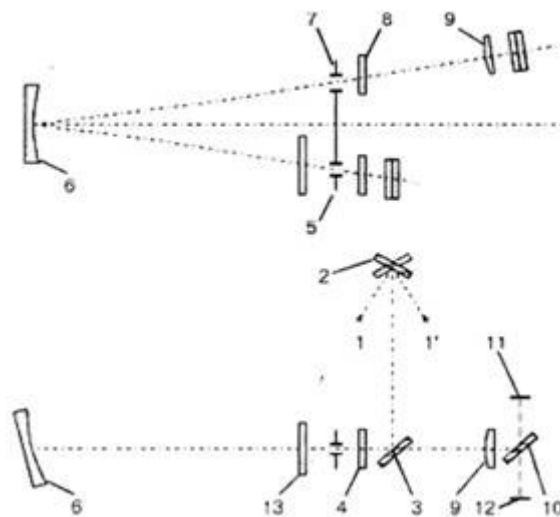
Структурная схема спектрофотометра представлена на рисунке 8б. Световой пучок из осветителя попадает в монохроматор через входную щель и разлагается дифракционной решеткой в спектр. В монохроматический поток излучения, поступающий из выходной щели в кюветное отделение, поочередно вводятся контрольный и исследуемый образцы. Излучение, прошедшее через образец, попадает на катод фотоэлемента в приемно-усилительном блоке. Электрический ток, проходящий через резистор  $R_H$ , который включен в цепь фотоэлемента, создает на резисторе падение напряжения, пропорциональное потоку излучения, падающему на фотокатод. Усилитель постоянного тока с коэффициентом усиления, близким к единице, обеспечивает передачу сигналов на вход микропроцессорной системы (далее - МС). МС по команде оператора поочередно измеряет и запоминает напряжения  $U_T$ ,  $U_0$  и  $U$ , пропорциональные темновому току фотоэлемента, потоку, прошедшему через контрольный образец, и потоку, прошедшему через исследуемый образец соответственно. После измерения МС рассчитывает коэффициент пропускания  $T$  исследуемого образца. Значение измеренной величины высвечивается на цифровом табло.



а)



б)



в)

а) - внешний вид;

б) - структурная схема спектрофотометра;

в) - оптическая схема: 1, 1' - источники света; 2 - зеркальный конденсор; 3 - поворотное зеркало; 4 - линза; 5 - входная щель монохроматора; 6 - дифракционная решетка; 7 - выходная щель монохроматора; 8 и 9 - линзы; 10 - поворотное зеркало; 11 и 12 - фотоэлементы; 13 - светофильтр.



## Рисунок 8 – Спектрофотометр СФ-46

Оптическая схема спектрофотометра СФ-46 показана на рисунке 8в. Излучение от источника 1 или 1' падает на зеркальный конденсор 2, который направляет его на плоское поворотное зеркало 3 и даст изображение источника излучения в плоскости линзы 4, расположенной вблизи входной щели 5 монохроматора. Прошедшее через входную щель излучение падает на вогнутую дифракционную решетку 6. Решетка изготавливается на сферической поверхности, поэтому, помимо диспергирующих свойств, она обладает способностью фокусировать спектр. Диафрагмированный пучок фокусируется в плоскости выходной щели 7 монохроматора, расположенной над входной щелью 5. Сканирование осуществляется поворотом дифракционной решетки, при этом монохроматическое излучение различных длин волн проходит через выходную щель 7, линзу 8, контрольный или измеряемый образец, линзу 9 и с помощью поворотного зеркала 10 попадает на светочувствительный слой фотоэлемента 11 или 12. Для уменьшения рассеянного света и срезания высших порядков дифракции в спектрофотометре используются два светофильтра: для работы в области спектра 230–450 нм и 600–1100 нм. Для обеспечения работы спектрофотометра в широком спектральном диапазоне используются два фотоэлемента и два источника излучения сплошного спектра. Сурьмяно-цезиевый фотоэлемент с окном из кварцевого стекла применяется для измерений в области спектра от 190 до 700 нм, кислородно-цезиевый фотоэлемент - для измерений в области спектра от 600 до 1100 нм. Дейтериевая лампа предназначена для работы в области спектра от 190 до 350 нм, лампа накаливания - для работы в области спектра от 340 до 1100 нм.

### *Методика выполнения работы*

#### 1 Подготовка к измерению

1.1 Включить спектрофотометр кнопкой СЕТЬ, предварительно установив рукоятку переключения шторки в положение ЗАКР и ширину щели на 0,15 нм. Далее нажать клавишу ПУСК на клавиатуре (на табло должна высветиться запятая). В зависимости от области измерений перевести рычаг в положение «Н» для включения лампы накаливания или «Д» для включения дейтериевой лампы, которая загорается только после минутного прогрева. Стабильная работа спектрофотометра и дейтериевой лампы осуществляется через 30 мин после включения.

1.2 Установить в держатель от одного до трёх образцов, а в четвёртую позицию – контрольный образец. При работе с растворами в УФ-диапазоне необходимо использовать кварцевые кюветы. Держатель установить на каретку в кюветном отделении.

1.3 Установить требуемую длину волны и перевести рукоятку выбора фотоэлемента в соответствие с диапазоном измерений.

1.4 Снимать показания следует при плотно закрытой крышке кюветного отделения, открывать крышку во избежание засвечивания фотоэлемента следует только при переключении рукоятки в положение ЗАКР.

#### 2 Измерение коэффициента пропускания

2.1 При нажатии клавиши «Ш(0)» на фотометрическом табло высветится значение сигнала в вольтах, пропорциональное значению темнового тока фотоэлемента.

2.2 Установить рукояткой НУЛЬ на фотометрическом табло числовое значение в диапазоне от 0,05 до 0,1. Показание с табло следует снимать, нажимая клавишу «Ш(0)» до появления показания, равного предыдущему или отличающегося от него не более чем на 0,001. Клавиши нажимать не чаще, чем один раз в 2 с.

2.3 Установить на пути излучения контрольный образец и переместить каретку в соответствующее положение 1, 2, 3 или 4.

2.4 Установить рукоятку переключения шторки в положение ОТКР.

2.5 Нажать клавишу «К(1)». Слева на табло высвечивается индекс «1». Показание должно быть в пределах 0,5-5,0. При показании меньше 0,5 следует увеличить ширину щели. При показаниях больше 5,0 высвечивается индекс « $\square$ ». В этом случае следует уменьшить ширину щели и нажимать клавишу «К(1)» несколько раз до появления показания равного предыдущему или отличающегося от него не более чем на 0,001.

2.6 Нажать клавишу « $\tau(2)$ », при этом на фотометрическом табло должно появиться показание  $100,0 \pm 0,1$ , а слева – индекс «2». Если показание имеет другое значение, необходимо ещё раз ввести значение сигнала сравнения, нажав клавишу «К(1)».

2.7 Нажать клавишу «Ц/Р» для переключения микропроцессорной системы из разового режима в циклический. Нажать клавишу « $\tau(2)$ ». Измерения производятся каждые 5 с автоматически.

2.8 Установить поочерёдно на пути потока излучения измеряемые образцы, перемещая каретку рукояткой в положения 1, 2, 3 или 4. Снять показания, отличающиеся от предыдущего не более чем на 0,1.

3 Определение оптической плотности

3.1 Выполнить операции, указанные в пп. 2.1-2.5.

3.2 Нажать клавишу «D(5)», при этом на фотометрическом табло должно появиться показание  $0,000 \pm 0,001$ , а слева – индекс «5». Если показание имеет другое значение, необходимо ещё раз ввести значение сигнала сравнения, нажав клавишу «К(1)».

3.3 Нажать клавишу «Ц/Р», далее – клавишу «D(5)».

3.4 Установить поочерёдно на пути потока излучения измеряемые образцы, перемещая каретку рукояткой в положения 1, 2, 3 или 4. Снять показания, отличающиеся от предыдущего не более чем на 0,001.

4 Изучите устройство спектрофотометра СФ-46, назначение его основных деталей и узлов. Полученные знания оформите в виде таблицы 2.

Таблица 2

Основные узлы и детали спектрофотометра СФ-46	Оптическая часть	Механическая часть	Электрическая часть
монохроматор			
дифракционная решетка			
фотоэлемент			
микропроцессорная система			
зеркальный конденсор			
кюветное отделение			
рукоятка переключения шторки			
рукоятка каретки			
источник излучения			
фотометрическое табло			

### Лабораторная работа №2.2. Измерение спектров контрольного объекта

*Цель работы* – измерить спектры пропускания и поглощения, определить положение максимумов полимерной плёнки органического красителя или его растворов в различных растворителях (спирт, вода).

*Методика выполнения работы*

- 1 Закрепить в держатель контрольный объект (плёнка или кювета с раствором красителя) в качестве контрольного образца в первом случае использовать неокрашенную полимерную плёнку, во втором случае – кювету с растворителем.
- 2 Измерить оптическую плотность и пропускание объекта с шагом 10 нм по длине волны от 450 до 550. Результаты занести в таблицу 3.

Таблица 3

Образец	Длина волны $\lambda$ , нм	Пропускание T	Оптическая плотность D

- 3 Используя полученные значения построить спектры пропускания и поглощения. Определить положение максимумов.
- 4 Пользуясь справочными данными определить краситель и его концентрацию в объекте. Сделать выводы о влиянии растворителя на спектр вещества.

### Лабораторная работа №2.3. Спектр поглощения ДНК в УФ-диапазоне

*Цель работы* – измерить спектр поглощения ДНК, оценить чистоту препарата и рассчитать концентрацию.

*Методика выполнения работы*

- 1 Приготовить 3 мл раствора ДНК в 0,15 М NaCl (оптическая плотность не должна превышать 0,5 при 260 нм).
- 2 Измерить спектр поглощения ДНК, используя в качестве эталонного раствора 0,15 М NaCl. Измерения провести в диапазоне 230-300 нм с шагом 5 нм, вблизи максимума – 1 нм.
- 3 Построить график зависимости оптической плотности от длины волны.
- 4 Определить соотношения  $D_{260}/D_{230}$ ,  $D_{280}/D_{260}$ , и сравнить их с соответствующими параметрами спектра чистой ДНК (см. рисунке 7).
- 5 Определить концентрацию ДНК, используя значение коэффициента экстинкции  $\varepsilon_{260}=6600$  или соотношение:  $D_{260}=1$  соответствует 0,47 мкг/мл нативной ДНК.

### Лабораторная работа №2.4. Гиперхромный эффект ДНК

*Цель работы* – определение гиперхромного эффекта ДНК при денатурации нагреванием.

*Методика выполнения работы*

- 1 Приготовить 6 мл раствора ДНК концентрации 0,2-0,25 мкг/мл в 0,15 М NaCl (оптическая плотность не должна превышать 0,5 при 260 нм).
- 2 Измерить оптическую плотность нативной ДНК ( $D_2$ ), используя в качестве эталонного раствора 0,15 М NaCl.
- 3 Раствор разделить пополам в две пробирки, закрыть плотно пробками и опустить в горячую водяную баню (~95 °C).
- 4 Выдержав пробирки при такой температуре 10-15 мин, одну из них следует быстро опустить в лёд, а вторую оставить в постепенно остывающей водяной бане. Дать растворам охладиться до комнатной температуры.
- 5 Измерить  $D_{260}$  денатурированной ДНК (быстро охлаждённой –  $D_{1д}$ ) и ренатурированной (медленно остывшей –  $D_{1р}$ ).
- 6 Сравнить измеренные значения оптической плотности ( $D_{1д}$  и  $D_{1р}$ ) между собой и с нативной ДНК.
- 7 Рассчитать величину гиперхромного эффекта. Заполнить таблицу 4.

Таблица 4

Образец	Оптическая плотность $D_{260}$	$\Gamma/\Theta=(D_1- D_2)/ D_1 \times 100$
Нативная ДНК		
Денатурированная ДНК		
Ренатурированная ДНК		

## **Лабораторная работа №2.5. Исследование вторичной структуры ДНК по спектрам поглощения комплекса ДНК-акридиновый оранжевый**

*Цель работы* – проследить спектральные изменения комплекса ДНК-АО при денатурации нагреванием.

Известно, что краситель акридиновый оранжевый (АО) обладает ярко выраженной метахромазией. Это свойство проявляется в том, что при образовании комплекса между высокомолекулярными соединениями и красителем изменяются оптические свойства АО. При низких концентрациях АО (до  $10^{-6}$  М) максимум спектра поглощения красителя находится при 494 нм (мономерный АО). Со спирализованными участками молекул ДНК АО образует комплекс, появление которого сопровождается смещением максимума поглощения мономеров красителя с 494 до 504 нм. На деспирализованных участках молекул ДНК (денатурированная ДНК) краситель всегда образует агрегаты, поглощающие при 474 нм. Таким образом, спектр поглощения комплекса ДНК-АО отражает особенности вторичной структуры молекул ДНК.

### *Методика выполнения работы*

- 1 Приготовить 6 мл раствора ДНК концентрации 0,5 мкг/мл в 0,15 М NaCl.
- 2 Приготовить 3 мл раствора АО концентрации 10 мкг/мл в 0,15 М NaCl.
- 3 К раствору ДНК при постоянном помешивании добавить АО, чтобы его конечная концентрация стала 10 мкг/мл.
- 4 Приготовленный раствор комплекса ДНК-АО разделить на две части, одну из которых поместить в водяную баню с 95 °С на 15 минут с последующим быстрым охлаждением.
- 5 Измерить в 1 см кювете спектры поглощения чистого красителя АО относительно 0,15 М NaCl.
- 6 Измерить спектры поглощения нативного комплекса ДНК-АО и денатурированного нагреванием.
- 7 По характеру спектров сделать вывод о степени поврежденности двуниевой спирали ДНК.

## **2.3 Информация, содержащаяся в инфракрасных спектрах**

Как уже упоминалось ранее, существуют различные конформации молекул ДНК, что определяет биологическую активность данной макромолекулы *in vivo*. В вегетативных клетках ДНК преимущественно находится в В-форме, при превращении же клеток в споры (один из видов покоящегося состояния) она переходит в свою А-конформацию, характеризующуюся повышенной устойчивостью к ряду внешних факторов. Например, в А-состоянии ДНК примерно в 10 раз более устойчива к действию ультрафиолетового излучения, чем та же ДНК в В-форме. Основным фактором, определяющим к какому из семейств должна принадлежать конформация ДНК, считается активность воды. Одним из методов, позволяющим определить в А-или В-форме находится ДНК, является инфракрасная спектроскопия.

ИК-спектры возникают за счёт характеристических движений (растягивания связей, изменения величины углов между связями). Ценность спектрального анализа в ИК-области обусловлена тем, что вид колебаний каждой функциональной группы (метильной, карбонильной, амидной и т.д.) очень чувствителен к изменениям химической структуры и окружения. Инфракрасные спектрофотометры в принципе не отличаются от спектрофотометров, работающих в ультрафиолетовом и видимом свете. Источником излучения является тело, нагреваемое до 1200-1500 °С, для выделения длин волн используется монохроматор, но в качестве детектора применяется термопара.

Главная трудность ИК-спектроскопии состоит в том, что нельзя использовать водные растворы из-за сильного поглощения воды в ИК-области. Это можно частично обойти, используя D<sub>2</sub>O, но наиболее общим приёмом является использование тонких, достаточно сухих плёнок. Плёнки ДНК готовят, например, по следующей методике: первоначально готовятся водные растворы ДНК, затем они наносятся на ZnSe-подложки и осуществляется их ступенчатая дегидратация при контролируемых значениях относительной влажности (о.в.), формируемой над насыщенными растворами солей: KNO<sub>3</sub> (95 % о.в.), KCl (85 % о.в.), NaCl (75% о.в.), NaNO<sub>2</sub> (66 % о.в.) и Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (56 % о.в.). После установления в плёнках определённой о.в., перед проведением ИК-спектроскопии образцы запаиваются в полиэтиленовые пакетики, препятствующие изменению о.в. в процессе измерения. На рисунке 9 приведены спектры поглощения ДНК в ИК-диапазоне при ступенчатом понижении о.в.

Необходимо отметить, что при изображении ИК-спектров традиционно используются волновые числа  $1/\lambda$  или частоты  $\nu$ , а не длины волн. Каждая полоса в ИК-спектре может быть охарактеризована частотой максимума поглощения, шириной полосы на половине высоты, оптической плотностью при частоте максимума поглощения и формой полосы. В случае простых соединений их ИК-спектры состоят из довольно узких линий, однако в случае макромолекул так велико число типов связей и так много различных конформаций, что все полосы перекрываются и вследствие этого в спектре содержится несколько относительно широких полос.

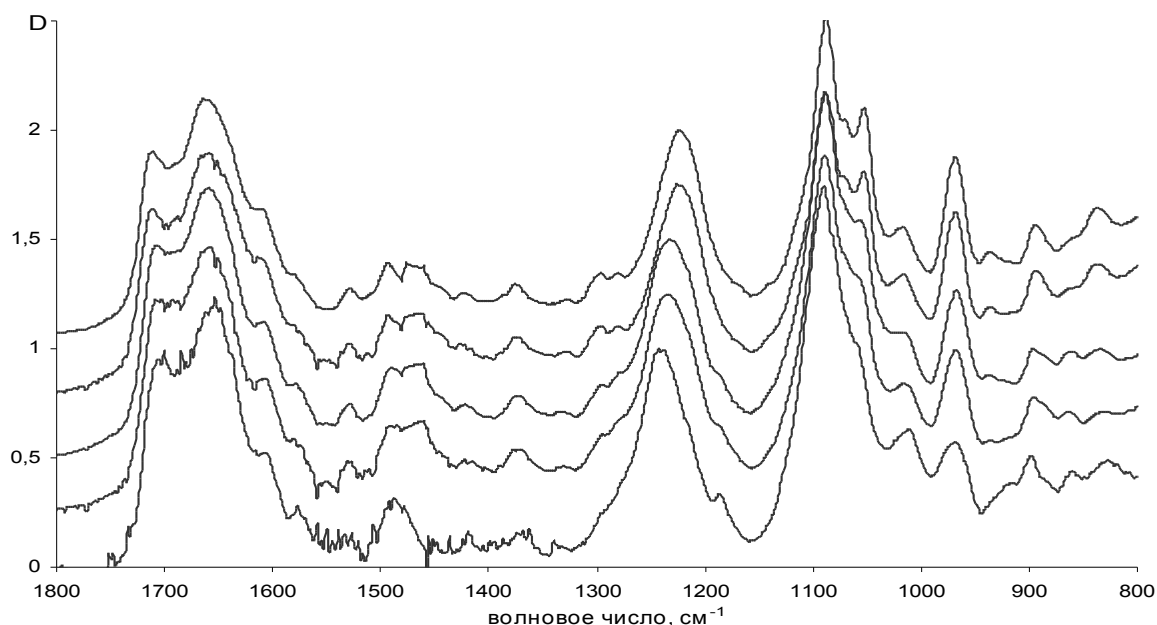


Рисунок 9 – ИК-спектр ДНК в области поглощения сахаро-фосфатного остова при различных значениях о.в.: 1 – 95 %, 2 – 85 %, 3 – 75 %, 4 – 66 % и 5 – 56 %.

Кроме того, в ИК-спектрах пленок ДНК анализируются изменения интенсивности отдельных максимумов, а также их частотные сдвиги, интерпретация которых приведена в таблице 5.

Таблица 5 – Основные полосы в ИК-спектре ДНК (800-1350 см<sup>-1</sup>)

Максимум ИК, см <sup>-1</sup>	Интерпретация
808	Маркер А-формы ДНК
836	Колебания сахарного кольца дезоксирибозы. Маркер В-формы ДНК
865-878-899	Маркер А-формы ДНК
895	Колебания сахарного кольца. Маркер В-формы ДНК
938	Колебания сахарного кольца. Маркер В-формы ДНК
958-970-978	Маркер А-формы ДНК
968	С-С-колебания дезоксирибозы
1021	Колебания кольца дезоксирибозы
1053	Валентные колебания связи С-О дезоксирибозы
1088	Симметричные колебания фосфатной группы
1185	Маркер А-формы ДНК. Колебания дезоксирибозы
1224	Антисимметричные колебания фосфатной группы
1328	Колебания тимина. Маркер В-формы ДНК.

Заключение о соответствии В-конформации молекулы ДНК делается в результате выявления характерных полос 836, 895 и 936 см<sup>-1</sup>, являющихся качественными маркерами В-формы ДНК (таблица 5). При пошаговом снижении относительной влажности с 95 % до 56 % в ИК-спектрах наблюдаются характерные изменения (рисунок 9), заключающиеся в исчезновении описанных выше маркерных полос В-формы с одновременным (начиная с 75 % о.в.) появлением новых полос 864 и 1185 см<sup>-1</sup>, в свою очередь являющихся маркерами А-формы ДНК. Наконец, при существенном снижении о.в. в ИК-спектрах ДНК регистрируется формирование характерной формы триплета 899-878-865 см<sup>-1</sup> и различимой полосы 808 см<sup>-1</sup>, также типичных для А-конформации данного биополимера (таблица 5).

Свидетельством изменения конформации ДНК также является изменение соотношения интенсивностей полос с частотами максимумов 1088 и 1224 см<sup>-1</sup>, обусловленных симметричным и антисимметричным колебаниями заряженной группы PO<sub>2</sub>, позволяющее количественно оценить степень гидратации сахаро-фосфатного остова данного биополимера. Так, например, рост значений соотно-

шения  $D_{1088}/D_{1224}$  до уровня 1,8, при значительном сдвиге частоты с  $1224 \text{ см}^{-1}$  до  $1242 \text{ см}^{-1}$  характеризует появление А-формы ДНК.

Состояние двухспиральности ДНК подтверждается тем, что самая высокочастотная полоса в области кратных связей азотистых оснований  $1712 \text{ см}^{-1}$ , определяемая колебаниями карбонильной группы гуанина и  $\text{C}=\text{O}$ -группы тимина в стекингованных комплементарных парах оснований, сохраняется, в ином случае – регистрируется появление вместо нее полосы  $1692 \text{ см}^{-1}$ , возникающей в результате расплетания ДНК с нарушением стекинга и перехода нуклеиновых оснований в водное окружение.

### **Лабораторная работа №2.6. Спектр поглощения ДНК в ИК-диапазоне**

*Цель работы* – проанализировать ИК-спектр ДНК, определить конформацию макромолекулы.

*Методика выполнения работы*

- 1 На графиках 1, 2 рисунка 10 отметить стрелками наличие и положение А- и В-маркерных полос ДНК.
- 2 Определить соотношения  $D_{1088}/D_{1224}$  для графика 1 и  $D_{1088}/D_{1242}$  для графика 2 на рисунке 10.
- 3 Проанализировать изменения интенсивности отмеченных максимумов, а также их частотные сдвиги. Сделать вывод о конформации ДНК.

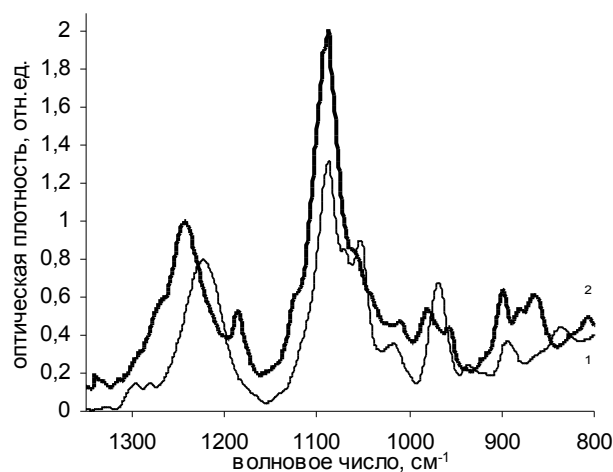


Рисунок 10 – ИК-спектр различных конформаций ДНК

## **3 Электрофорез ДНК**

### **3.1 Теория электрофореза**

Электрофорез занимает сейчас центральное место среди методов исследования нуклеиновых кислот. Метод позволяет разделять макромолекулы, различающиеся по таким важнейшим параметрам, как размеры (или молекулярная масса), пространственная конфигурация, вторичная структура и электрический



заряд, причем эти параметры могут выступать как порознь, так и в совокупности.

Физический принцип метода заключается в следующем. Находящиеся в буферном растворе макромолекулы обладают некоторым суммарным электрическим зарядом, величина и знак которого зависят от рН среды. Если через этот раствор, заключенный в канал из изолирующего материала начать пропускать электрический ток, то вдоль канала установится определенный градиент напряжения, т. е. сформируется электрическое поле. Его напряженность измеряется разностью потенциалов по концам рабочего канала (или его участка), отнесенной к его длине (В/см). Под действием поля макромолекулы в соответствии со своим суммарным зарядом мигрируют в направлении катода или анода, причем их трение об окружающую среду ограничивает скорость миграции. В зависимости от величины заряда и размеров молекулы приобретают разные скорости, и в этом – сущность процесса электрофореза. Постепенно исходный препарат, состоявший из различных молекул, разделяется на зоны одинаковых молекул, мигрирующих с одной и той же скоростью. Со временем эти зоны распределяются по длине канала.

В современных приборах рабочий канал заполняют гелем, что на схеме изображено штриховкой. Достаточно чистая и хорошо смачиваемая (гидрофильная) пространственная сетка геля удерживает жидкость от вытекания и препятствует конвекции. Вместе с тем используемые гели содержат очень много жидкости (80-99,5 %), в которой (т.е. в рабочем буфере) и мигрируют макромолекулы. Наличие сетки геля вносит важную дополнительную деталь в картину электрофоретической миграции. Теперь фракционируемые макромолекулы любых размеров неизбежно сталкиваются с нитями полимера, образующего сетку геля, что увеличивает эффективное трение о среду, а следовательно, снижает скорость движения молекул. Очевидно, что препятствия для миграции становятся особенно серьезными, если средний диаметр пространственных ячеек геля оказывается соизмерим с размерами макромолекул. В этом случае решающее влияние на электрофоретическую подвижность различных макромолекул и степень разделения оказывает соотношение их линейных размеров. Возможна даже такая ситуация, когда особенно крупные молекулы нуклеиновых кислот вообще не смогут «протиснуться» через поры геля и их миграция прекратится.

В настоящее время почти исключительно используются полиакриламидные гели и гели агарозы. Варьируя концентрацию полимера, можно получать гели с очень широким диапазоном размеров пор. Кроме того, можно изменять электрические заряды макромолекул путем вариации рН буфера, а их конфигурацию путем введения в буфер денатурирующих агентов или детергентов. Все это придает методу электрофореза исключительную гибкость. Но есть, разумеется, и свои проблемы. Разделяемые макромолекулы все же находятся в растворе, поэтому возможна их диффузия, приводящая к размыванию зон. Это тем более серьезно, что протекание через жидкость электрического тока неизбежно связано с выделением тепла. К счастью, крупные молекулы нуклеиновых кислот диффундируют не слишком быстро.

Для визуализации результатов электрофореза проводят окрашивание зон путем вымачивания геля в растворе красителя, прочно связывающегося с нуклеиновой кислотой. Излишек красителя удаляют, а гель облучают ультрафиолетом, под действием которого связавшийся с двуниевой ДНК краситель флуоресцирует.

### 3.2 Электрофорез ДНК в агарозном геле

Сочетание прочности и крупнопористости делает гели агарозы незаменимыми при электрофорезе особенно крупных макромолекул, в частности нуклеиновых кислот. Агароза – это особо чистая фракция природного линейного полисахарида агара, который извлекают из некоторых видов морских водорослей. Молекулярная масса ее составляет  $10^4$ – $10^5$ . Гелеобразование идет, как уже указывалось, путем связывания в пространственную сетку пучков нитей за счет водородных связей между ними. Некоторые виды агарозы образуют прочные гели уже при концентрации 0,3 %.

При температурах от 84 до 96 °С (а у специальных типов – уже при 70 °С) раствор агарозы переходит в прозрачную жидкость – «плавится». Растворы агарозы характеризуются ярко выраженным гистерезисом: они затвердевают, образуя гель, при значительно более низких температурах (36-42 °С). У легкоплавких типов агарозы эта температура снижается до 30°. Такая особенность облегчает манипуляции с расплавленной агарозой – можно не опасаться преждевременного ее застывания в гель. Более того, расплавленную на кипящей бане агарозу предварительно охлаждают до 50-55 °С уже при этой температуре дозируют и заливают в формы; это удобно и не связано с возникновением значительных тепловых деформаций.

Гели агарозы не вполне прозрачны, однако это обусловлено не наличием примесей, а своего рода «кристаллизацией» геля и свидетельствует, скорее, о чистоте агарозы. Затвердевший гель представляет собой не вполне равновесную систему: со временем он несколько уплотняется, выдавливая из себя жидкость. Этот процесс идет вначале довольно быстро, а потом – очень медленно. Тем не менее, гели агарозы перед опытом следует выдерживать в течение, по крайней мере, 12 ч (открытые пластины для горизонтального электрофореза выдерживают во влажной камере). Сжатие сильнее выражено у более концентрированных гелей агарозы.

Агароза для электрофореза выпускается обычно в виде лиофилизированного порошка. Для приготовления геля выбранной концентрации навеску порошка растворяют в соответствующем буфере и выдерживают на кипящей водяной бане или в термостате при 90-95 °С около 2 ч для образования истинного раствора полимера. Иногда раствор агарозы просто кипятят с обратным холодильником.

Разнообразные буферы, детергенты и другие добавки смешивают с раствором агарозы в горячем виде (при 50-60 °С). Впрочем, надо иметь в виду,

что высокая концентрация агентов, диссоциирующих водородные связи, несколько затрудняет образование геля.

Плоские гели для горизонтального электрофореза готовят путем заливки дозированного объема расплавленной агарозы на строго горизонтальную пластинку нужного размера.

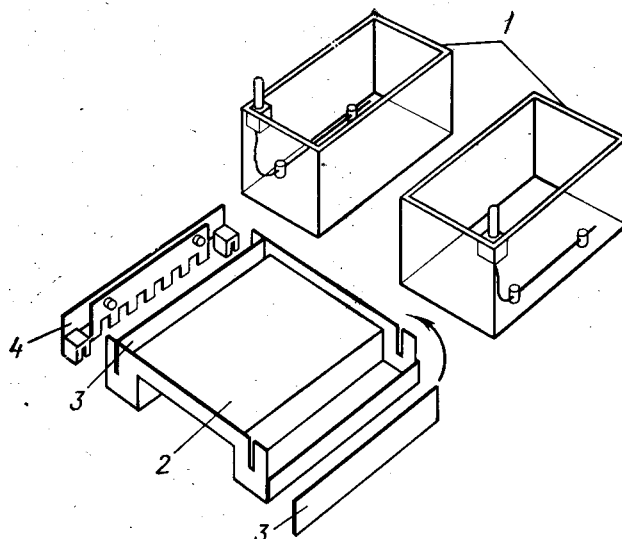
Выбор концентрации агарозы, т.е. пористости ее геля, диктуется размерами фракционируемых макромолекул. Средний размер пор 2%-ного геля агарозы приблизительно соответствует диаметру сферически упакованной молекулы биополимера с массой 50 млн. дальтон. Гели с более высоким содержанием агарозы используют для гель-фильтрации. При электрофорезе поры геля должны быть легко проницаемы для молекул биополимеров, чтобы лишь тормозить их миграцию в электрическом поле за счет трения, поэтому для электрофореза применяют агарозные гели с концентрацией 0,4–2 %. Ниже в таблице 6 для ориентировки представлены примерные концентрации гелей агарозы (в процентах) для некоторых распространенных образцов фракционирования:

Таблица 6

Количество агарозы в геле, %	Объекты
0,4	Высокомолекулярная ДНК вирусов и плазмид
0,7	Рестрикты ДНК (5–20 тыс. н.п)
1,0	мРНК, денатурированная обработкой метилртутью
1,5	Реовирусная двунитевая РНК (500–5000 н.п.)
1,75	Рибосомная РНК
2,0	Нативные мРНК; рестрикты ДНК (100–1000 н.п.)

Перед заливкой в форму или на пластину раствор горячей агарозы охлаждают до 50 °С и выдерживают не менее 1 ч в термостате при данной температуре. Это необходимо для полного выравнивания температуры раствора по всему его объему, чем обеспечивается одновременное застывание всего геля и однородность его структуры.

Гель, полимеризованный на пластинке, помещают на столик открытой поверхностью кверху, поскольку препараты вносят в ряд специальных лунок, образованных опусканием в гель гребёнки и расположенных на некотором расстоянии от его края. Схема прибора для проведения горизонтального электрофореза показана на рисунке 11. Следует быстро вносить препараты в лунки и сразу же начинать электрофорез, так как образцы могут диффундировать в геле.



1 – электродные резервуары; 2 – форма для заливки агарозы; 3 – съемные перегородки; 4 – гребенка.

Рисунок 11 – Прибор для горизонтального электрофореза ДНК в агарозном геле

### 3.3 Разделение ДНК в агарозном геле

Скорость миграции ДНК через агарозный гель при электрофорезе определяются пятью главными параметрами, рассмотренными ниже.

*Размер молекул ДНК.* Молекулы линейной двуцепочечной ДНК перемещаются в геле одним концом вперед со скоростями, обратно пропорциональными десятичному логарифму их молекулярных масс.

*Концентрация агарозы.* Фрагменты ДНК данного размера перемещаются в геле, содержащем разные концентрации агарозы с разными скоростями. применяя гели разных концентраций, можно разделить большой набор фрагментов ДНК, различающихся по размеру (таблица 7).

Таблица 7

Количество агарозы в геле, %	Область эффективного разделения линейных молекул ДНК, тыс. н.п.
0,3	60–5
0,6	20–1
0,7	10–0,8
0,9	7–0,5
1,2	6–0,4
1,5	4–0,2
2,0	3–0,1

*Конформация ДНК.* ДНК, имеющие одинаковую молекулярную массу, но разные конформации, например кольцевая неповреждённая (форма I), кольцевая с одноцепочечным разрывом (форма II) и линейная (форма III), движутся в агарозном геле с разными скоростями (рисунок 12). Относительная подвижность трёх указанных форм зависит главным образом от концентрации агарозы в геле, а также от таких факторов, как сила тока, ионная сила буфера или плотность сверхспиральных витков в форме I.

*Напряжённость электрического поля.* При низких напряжённостях скорость перемещения фрагментов линейной ДНК пропорциональна приложенному напряжению. Однако с увеличением напряжённости электрического поля подвижность фрагментов ДНК с высокой молекулярной массой дифференциально возрастает. Следовательно, с увеличением напряжённости область эффективного разделения ДНК в агарозном геле снижается. Максимальное разделение фрагментов происходит при напряжённости, не превышающей 5 В/см.

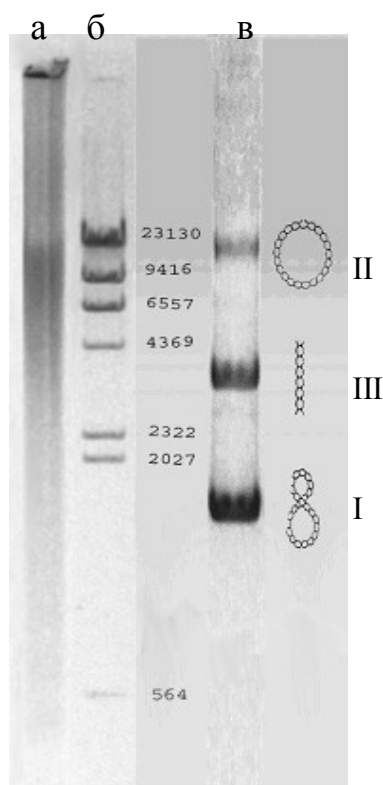


Рисунок 12 – Изображение электрофоретической подвижности препаратов ДНК: а) высокополимерной линейной ДНК, выделенной из молок лосося (ICN); б) ДНК фага  $\lambda$ , расщепленной эндонуклеазой Hind III на линейные фрагменты с фиксированной длиной; в) плазмидной ДНК pUC19

*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. Обычно электрофорез проводят при комнатной температуре, однако следует отметить, что гели, содержащие менее 0,5 % агарозы, очень мягкие, поэтому с ними лучше работать при 4 °С.

### **3.4 Окраска ДНК и визуализация результатов электрофореза**

Наиболее удобный метод визуализации ДНК в агарозных гелях – окрашивание её флуоресцирующим красителем бромистым этидием. Молекула этого вещества содержит плоскую группу, которая интеркалирует между соседними основаниями ДНК. В результате такой интеркаляции в непосредственной близости от оснований краситель связывается с ДНК, что сопровождается увеличением интенсивности флуоресценции. УФ-излучение, поглощаемое ДНК в области 260 нм и передаваемое на краситель (или же излучение, поглощаемое самим красителем при длинах волн 300 и 360 нм), испускается затем в красно-оранжевой области видимого спектра (590 нм).

Бромистый этидий можно использовать для обнаружения как двух-, так и одноцепочечных нуклеиновых кислот (ДНК и РНК). Однако, сродство красителя к одноцепочечной нуклеиновой кислоте гораздо меньше, чем к двухцепочечной; поэтому флуоресценция в первом случае оказывается более слабой.

Обычно бромистый этидий добавляют и в гель, и в электрофорезный буфер. В его присутствии электрофоретическая подвижность ДНК снижается примерно на 15 %, но при этом появляется возможность наблюдать за процессом разделения непосредственно под источником УФ-излучения во время или в конце разделения. Можно также проводить электрофорез в отсутствие бромистого этидия и окрашивать ДНК уже после завершения разделения. В последнем случае гель помещают в электрофорезный буфер или в воду, содержащие бромистый этидий, на 45 минут при комнатной температуре.

Минимальное количество ДНК, которое можно обнаружить при фотографировании геля, окрашенного бромистым этидием, составляет 2 нг при ширине полосы 0,5 см. Если лунка будет переполнена и в полосе будет содержаться более 200 нг ДНК, то полоса окажется расплывчатой и будет иметь шлейф. Этот дефект особенно выражен при разделении крупных фрагментов ДНК. При анализе простого набора молекул ДНК в полсантиметровую лунку вносят 0,2-0,5 мкг ДНК. Если же пробы содержат очень большое число фрагментов ДНК разных размеров, то можно наносить по 5-10 мкг в лунку, не опасаясь существенного снижения разрешающей способности электрофореза.

Фотографии гелей с результатами электрофореза можно делать с помощью специальных устройств, являющихся приставкой к транслюминатору или с помощью обычного цифрового фотоаппарата в режиме макросъёмки с отключенной фотовспышкой. Улучшить качество фотографий помогает использование при съёмке поляризационного УФ-фильтра.

### Лабораторная работа №3.1. Приготовление буферного раствора и агарозного геля для проведения электрофореза

*Цель работы* – научиться готовить буферный раствор и агарозный гель для проведения электрофореза.

Для электрофореза обычно применяют буферы, трис-ацетат, трис-борат или трис-фосфат (таблица 8), чаще всего их готовят в виде концентрированных растворов и хранят при комнатной температуре.

Таблица 8 – Буферы, используемые при электрофорезе

Буфер	Рабочие растворы	Концентрированные растворы (на 1 л)
Трис-ацетат (ТАЕ)	0,04 М трис-ацетат, 0,002 М ЭДТА	(50×): 242 г триса, 57,1 мл ледяной уксусной кислоты, 100 мл 0,5 М ЭДТА, рН 8,0
Трис-фосфат (ТРЕ)	0,08 М трис-фосфат, 0,008 М ЭДТА	(10×): 108 г триса, 15,5 мл 85% фосфорной кислоты (1,679 мкг/мл), 40 мл 0,5 М ЭДТА, рН 8,0
Трис-борат (ТВЕ)	0,089 М трис-борат, 0,089 М борная кислота, 0,002 М ЭДТА	(5×) или (10× на 0,5 л): 54 г триса, 27,5 г борной кислоты, 20 мл 0,5 М ЭДТА (или 2,92 мг), рН 8,0

#### *Методика выполнения работы*

1 Приготовить концентрированный 10-кратный раствор ТВЕ, согласно таблице 8, растворив навески триса, борной кислоты и ЭДТА в 0,5 л дистиллированной воды. Надписать колбу с буфером, указав дату.

2 Приготовить рабочий электрофорезный буфер. В мерный цилиндр влить 80 мл концентрированного ТВЕ, довести дистиллированной водой до 800 мл.

3 Приготовить 0,8 % раствор агарозы. Для этого в мерном стакане к 800 мг порошка агарозы добавить 100 мл рабочего раствора ТВЕ. Агарозу расплавить в микроволновой печи до образования прозрачного раствора, помешивая стеклянной палочкой.

4 Остудить раствор до 50 °С и добавить бромистый этидий (из водного раствора, содержащего 250 мкг/мл) до конечной концентрации 0,5 мкг/мл. Осторожно перемешать стеклянной палочкой, избегая образования пузырьков. **ВНИМАНИЕ!** Бромид этидия – канцерогенное соединение, при работе с ним следует соблюдать правила безопасности: работать только в перчатках, избегать попадания на кожу и слизистые, при попадании на кожу или слизистые промыть соответствующий участок водой.

5 Раствор тёплой агарозы вылить в кювету, равномерно распределяя по поверхности. Кювета должна находиться в строго горизонтальном положении. Немедленно вставить рядом с одним из концов геля гребёнку, от зубцов которой в геле останутся лунки для проб. Необходимо, чтобы между дном лунки и основанием геля был зазор около 1 мм.

6 Оставить агарозу до полного застывания при комнатной температуре на 30-45 минут. Для хранения поместить агарозный гель в кювете в полиэтиленовый пакет и отправить в холодильник.

7 В оставшийся рабочий раствор ТВЕ добавить бромид этидия до концентрации 0,5 мкг/мл.

### **Лабораторная работа №3.2. Электрофорез ДНК в агарозном геле**

*Цель работы* – провести электрофорез ДНК, визуализировать результаты.

*Методика выполнения работы*

1 Достать подложку с застывшим агарозным гелем из кюветы для заливки, осторожно вынуть гребёнку, не повредив лунки.

2 Приготовить образцы для электрофореза и внести в лунки геля по 5 мкл. Записать схему внесения образцов.

3 Поместить подложку с готовым гелем в камеру, лунки должны располагаться ближе к отрицательному электроду.

4 Подготовленный рабочий раствор ТВЕ с бромидом этидия перелить в электрофорезную камеру, буфер должен полностью покрывать гель. Камера должна располагаться на строго горизонтальной поверхности.

5 Подключить камеру к источнику тока, соблюдая полярность (ДНК движется к положительному электроду), и включить источник.

6 Установить режим проведения электрофореза. Оптимальные условия: сила тока 100 мА, напряжённость электрического поля 5 В/см, время разделения 2 часа.

7 По прошествии установленного времени разделения образцов отключить источник тока, снять крышку с электрофорезной камеры, осторожно вынуть подложку с гелем. Ополоснуть гель дистиллированной водой для удаления излишков бромистого этидия.

8 Аккуратно перенести гель из подложки на транслюминатор. После включения транслюминатора использовать защитные УФ-очки.

9 Задokumentировать электрофореграмму цифровым фотоаппаратом.

### **3.5 Анализ результатов электрофореза. Оценка конформации и размеров ДНК**

В качестве стандарта для определения молекулярных масс разделённых образцов ДНК обычно используются ДНК-маркеры. Они представляют собой молекулы ДНК, обработанные рестриктазами и содержащие набор фрагментов фиксированных длин (рисунок 12б). Соотнесение опытного образца с ближайшей дорожкой ДНК-маркера позволяет определить размеры исследуемой ДНК.

Ещё одним способом определения размеров и конформации образца ДНК является сравнение с плазмидной ДНК. Плазмиды имеют одинаковую молекулярную массу, но разные конформации (рисунок 12в), например, кольцевая неповреждённая (форма I), кольцевая с одноцепочечным разрывом (форма II) и



линейная (форма III). В одних условиях форма I перемещается быстрее, а в других – медленнее, чем форма III. Чтобы однозначно определить конформацию ДНК, необходимо провести её электрофорез в присутствии возрастающих концентраций бромистого этидия. С увеличением концентрации красителя число его молекул, связанных с ДНК, растёт. При этом отрицательные сверхспиральные витки в молекулах формы I постепенно исчезают, а скорость движения ДНК в геле постепенно уменьшается. При некоторой критической концентрации свободных молекул красителя, когда в ДНК больше не остаётся сверхспиральных витков, скорость движения формы I достигает минимальной величины. Последующее добавление новых порций бромистого этидия приводит к образованию положительных сверхспиральных витков, в результате чего подвижность формы I начинает быстро возрастать. Подвижность форм II и III в описанных условиях снижаются, хотя и по-разному, вследствие нейтрализации зарядов и увеличения жёсткости молекул ДНК под влиянием бромистого этидия. Для большинства препаратов ДНК, находящейся в форме I, критическая концентрация бромистого этидия находится в области 0,1-0,5 мкг/мл.

Простой метод отделения линейных ДНК от кольцевых с одноцепочечным разрывом заключается в том, что препарат ДНК смешивают с раствором легкоплавкой агарозы. В процессе гелеобразования кольцевые молекулы захватываются гелем, тогда как линейные молекулы остаются свободными и могут быть потом выделены путём электрофореза.

Для графического определения молекулярной массы образца ДНК строят график в координатах расстояния, пройденного от старта (см) и молекулярной массы ДНК-маркеров. В области молекулярных масс до 200 кДа эта зависимость обычно представляет собой прямую.

### **3.6 Использование компьютерной программы ImageJ для обработки результатов гель-электрофореза**

Программа ImageJ представляет собой графический редактор, позволяющий производить анализ изображений. Одним из возможных её применений является обработка результатов гель-электрофореза. Саму программу можно скачать по адресу в Интернете <http://rsb.info.nih.gov/ij/> и установить на своём компьютере. Окно программы ImageJ выглядит как показано на рисунке 13. Для работы с полученной электрофореграммой выберете в меню программы Open→File и откройте нужный файл.

Далее приведено описание панели инструментов и основных операций.

*Инструменты выделения.* Первые четыре кнопки на панели инструментов – инструменты выделения области; они позволяют обводить область на изображении прямоугольной, овальной, многоугольной или свободной формы. После выделения, эти области с помощью соответствующих команд меню могут быть изменены, проанализированы, скопированы. Заметьте, что строка состояния, содержит координаты выделения и размеры в пикселях.

*Инструменты линии.* Следующие три кнопки служат для рисования прямых, ломанных и произвольных линий. Дважды щелкните на кнопке линии для изменения толщины линии.

*Инструмент «перекрестие»* используется для выбора участков на изображении. При этом в информационном окне отображаются координаты пикселей (xxx, ууу) и значение яркости (0-255). Для цветных изображений значения яркости будут приведены в строке состояния отдельно для синего, красного и зеленого каналов.

*Замер и обсчет образцов.* Провести линию между двумя точками с помощью инструмента «линия». В строке состояния высветится угол отклонения от горизонтали и длина линии в пикселях. Для изменения масштаба выполнить следующие действия:

*Установка масштаба.* Проведите линию между двумя точками, расстояние между которыми известно (например, на фотографии линейки). Перейдите в Analyze→Set Scale. В окне Set Scale должна высветиться длина линии в пикселях. Введите известную длину и размерность в соответствующих полях. Теперь все измерения будут отображаться в выбранных единицах. Если зависимость пиксели:длина была известна из предыдущих измерений, можно сразу ввести эту информацию в окно Set Scale. Отметьте 'global' для того, чтобы применить установленный масштаб ко всем открытым окнам.

*Область измерений.* Обведите область по периметру. Это можно сделать с помощью инструмента выделения области («жезл» в случае контрастных изображений или Analyze Particles – анализ частиц). Перейдите в Analyze→Measure; в информационном окне будет показана область и значения яркости пикселей в охваченной области. Для выбора дополнительных параметров (например? длина периметра) используйте Analyze→Set Measurements.

*Подсчет частиц.* Сконвертируйте изображение в серое, затем примените к нему операцию 'threshold' . Перейдите в Analyze→Analyze Particles, задайте верхние и нижние пределы размеров частиц и переключите 'show outlines' (показать контуры). Щелкните 'ОК' и каждая обсчитываемая частица выделится и пронумеруется в новом окне (числа могут быть очень маленькими). Информационное окно будет содержать размеры каждой частицы.

*Сохранение файлов.* Изображения, полученные от цифровых камер, обычно сохраняются как JPEG файлы. JPEG - тип сжатия изображения, которое приводит к потере некоторых данных. Качество изображения в формате JPEG ухудшается при каждом открытии и сохранении файла. Поэтому желательно сохранять изображения в формате TIFF. При нажатии на кнопку 'S', появляется окно «Сохранить как TIFF».

*Печать.* Если Вы сталкиваетесь с проблемами печати, сохраните обработанное изображение и распечатайте из любого редактора фотографий. Сохраненные изображения можно вставить в Word и распечатать.



Рисунок 13 – Окно программы ImageJ.

### Лабораторная работа №3.3. Обработка результатов гель-электрофореза с использованием компьютерной программы ImageJ.

*Цель работы* – освоить работу в программе ImageJ и провести анализ электрофореграммы ДНК.

#### *Методика выполнения работы*

1 Войти в программу ImageJ. Для работы с полученной электрофореграммой (сохранённой в чёрно-белом цвете) выбрать в меню программы Open→File и открыть нужный файл.

2 Определить дорожки на электрофореграмме, которые необходимо проанализировать. На панели инструментов выбрать инструмент выделения прямоугольной области и выделить первую интересующую дорожку на изображении результатов электрофореза. Размеры выделенного прямоугольника при необходимости можно скорректировать.

3 Перейти в Analyze→Plot Profile; в информационном окне будет показан график яркости изображения выделенной области.

4 Нажать Copy и вставить значения точек полученного графика в программу Excel для дальнейшей обработки. В Excel войти в меню Правка→Найти точки и заменить их на запятые для перевода значений из текстового формата в числовой. Через меню Вставка→Диаграмма→Точечная построить график. Для оси ординат задать следующие параметры: обратный порядок значений и пересечение с осью X в максимальном значении.

5 Перетянуть при помощи мышки выделенную прямоугольную область на следующую анализируемую дорожку. Повторить операции 3-4.

6 Полученные профили яркости результатов электрофореза должны иметь вид аналогично, показанным на рисунке 14. Используя сравнение с маркерами молекулярных весов (дорожка 1), определить какую молекулярную массу имеют фрагменты ДНК, преимущественно встречающиеся в препаратах, внесённых в дорожки 2 и 3?

Слева – результаты электрофореза (фото). Справа – профили яркости изображения, отн.ед.: 1 – маркеры молекулярных весов ДНК ( $\lambda$ /Hind III); 2,3 – исследуемые образцы ДНК. Стрелками указано место старта.

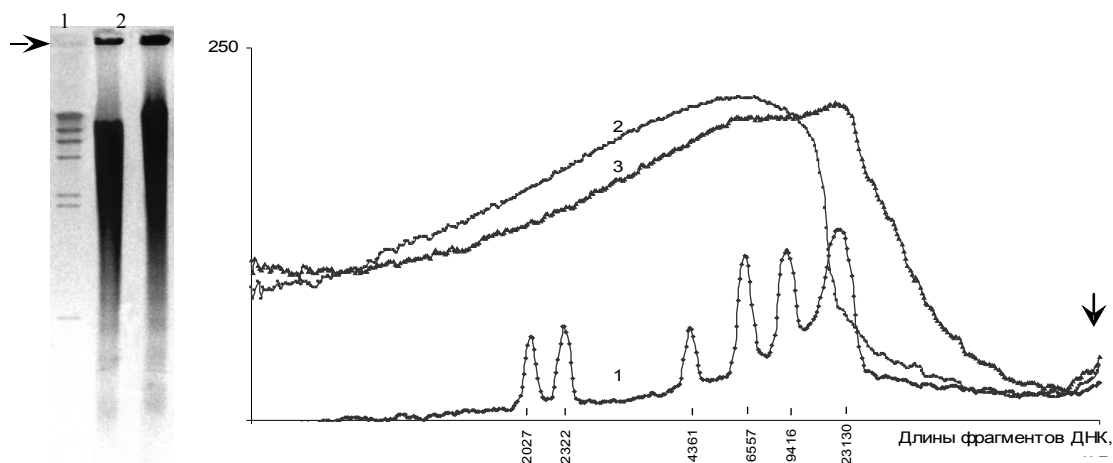


Рисунок 14 – Электрофоретическая подвижность ДНК

#### 4 Литература, рекомендуемая для изучения дисциплины

1. **Ашмарин, И.П.** Молекулярная биология / И.П. Ашмарин. – М.: Медицина, 1974. – 360 с.
2. **Коничев, А.С.** Молекулярная биология / А.С. Коничев, Г.А. Севастьянова. – М.: ИЦ «Академия», 2005. – 400 с.
3. **Современная микробиология. Прокариоты:** в 2-х т. / под ред. Г. Шлегеля, И. Ленгелера, Г. Дрекса. – М.: Мир, 2005. – 493 с.
4. **Жимулев, И.Ф.** Общая и молекулярная генетика / И. Ф. Жимулев. – Новосибирск: Сибирское ун-ое изд-во, 2006. – 479 с.
5. **Иванов, В.И.** Генетика / В.И. Иванов [и др.]. – М.: ИЦ «Академкнига», 2006. – 638 с.
6. **Маниатис, Т.** Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сембрук. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
7. **Гааль Э.** Электрофорез в разделении биологических макромолекул / Э. Гааль, Г. Медьеши, Л. Верецкеи. – М.: Мир, 1982. – 448 с.