

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

Физический факультет

Кафедра общей физики

Канарская Мария Антоновна

КУРСОВАЯ РАБОТА

**Исследование нативных олигонуклеотидов и их комплексов с ФГО
методом гель-электрофореза**

Электромагнитный практикум, 2 курс, группа №18303

Научный руководитель:

В. М. Гольшев

Оценка научного руководителя

«_____» _____ 20__ г.

Преподаватель практикума

к.ф.-м.н. А. А. Симонов

Оценка преподавателя практикума

«_____» _____ 2019 г.

Куратор практикума:

к.т.н. Астрелин В.Т.

Итоговая оценка

«_____» _____ 20__ г.

Новосибирск, 2019

Аннотация

Олигонуклеотиды – короткие синтетические фрагменты нуклеиновых кислот. В лаборатории синтетической биологии ИХБФМ СО РАН были синтезированы нативные олигодезоксирибонуклеотиды и их комплексы с фосфорил-гуанидовыми олигонуклеотидами (ФГО), которые необходимо исследовать. Целью данной работы являлись проверка чистоты образцов и изучение возможности образования комплексов. Исследование проводилось методом гель-электрофореза.

В результате получено, что есть образцы с примесями, но все образцы пригодны для использования. Так же было выяснено, что в условиях эксперимента комплексы с ФГО не образуются, образуются только нативные комплексы.

Оглавление

1. Введение.....	Ошибка! Закладка не определена.4
2. Теоретическая часть.....	5
2.1. ДНК. Олигонуклеотиды.....	5
2.2. Гель-электроорез.....	6
2.3. Определение концентраций	7
3. Экспериментальная часть.....	7
3.1. Образцы.....	7
3.2. Определение концентраций	8
3.3. Нативный гель-электрофорез	8
3.4. Денатурирующий гель-электрофорез	9
3.5. Экспериментальная установка	9
4. Обсуждения и результаты	10
5. Выводы	12
6. Список литературы	13

1. Введение

Олигонуклеотиды - короткие синтетические одноцепочечные фрагменты нуклеиновых кислот. Они получили широкое применение в фундаментальных исследованиях, а также в практических работах. Их используют в качестве зондов в биофизических, биохимических и биомолекулярных исследованиях. Так же они являются частью сенсорных элементов в генодиагностике (ДНК-чипы) [1], а также их используют в терапевтических целях [2]. Такое широкое применение олигонуклеотиды получили благодаря их способности образовывать двухцепочные структуры с комплементарными последовательностями нуклеиновых кислот.

На сегодняшний день актуальной задачей является создание новых производных нуклеиновых кислот, с улучшенными относительно природных НК свойствами. При этом для новых производных НК необходимо тщательное физико-химическое исследование. В институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН были синтезирован новый класс незаряженных производных НК – фосфорил-гуанидиновые олигонуклеотиды (ФГО). На данный момент существует огромное количество производных НК, но физико-химические свойства большинства из них не охарактеризованы в полной мере. Исследование физико-химических свойств ФГО нужны для их успешного дальнейшего применения как в молекулярно-биологических, так и терапевтических целях.

Одним из основным методов исследования нуклеиновых кислот является метод гельэлектрофореза. Метод позволяет разделять макромолекулы по таким важным характеристикам, как размеры, пространственная конфигурация и электрический заряд. В данном исследовании гельэлектрофорез применялся как для доказательства изучения «чистоты» (отсутствия нецелевых последовательностей) олигодезоксирибонуклеотидов, так и исследования возможности образования комплексов ФГО с комплементарными цепями ДНК. По результатам электрофореза можно судить об эффективности образования межмолекулярных комплексов.

Целью данной работы является исследование нативных олигонуклеотидов и их комплексов с ФГО методом гель-электрофореза

2. Теоретическая часть

2.1. ДНК. Олигонуклеотиды

Нуклеиновые кислоты – высокомолекулярные биополимерные органические соединения. Нуклеиновые кислоты дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) и рибонуклеиновая кислота (РНК) присутствуют в клетках всех живых организмов и выполняют функцию хранения, передачи и реализации генетической информации.

Нуклеотиды – мономерные единицы нуклеиновых кислот. Нуклеотиды состоят из 3 структурных элементов: азотистое основание, остаток фосфорной кислоты и сахар (рибозы или дезоксирибозы). Часть нуклеотида без остатка фосфорной кислоты называется нуклеозидом. Их обозначают 2 буквами: маленькая буква



Рис. 1. Структура комплекса ДНК

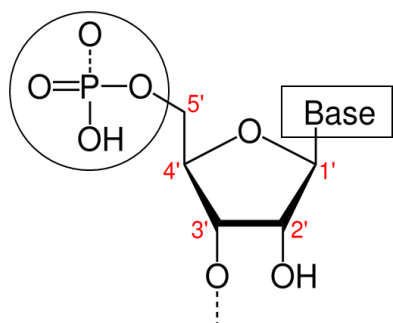


Рис. 2. Структура нуклеотида: фосфатная группа (круг), сахар (пятиугольник) и азотистое основание (Base, прямоугольник)

показывает тип сахара (r – рибоза, d – дезоксирибоза), большая показывает тип азотистого основания (А - аденин, G - гуанин, С - цитозин, Т- тимин, U- урацил). При нейтральных значениях pH нуклеотиды заряжены отрицательно за счет диссоциации одного протона от остатка фосфорной кислоты.

В природе ДНК встречаются в виде упорядоченной двойной спирали, в которой азотистые основания образуют комплементарно-спаренные основания. Комплементарность – взаимное соответствие азотистых оснований для взаимодействия. Пары оснований, находящиеся в противоположных цепях, соединены водородными связями. Аденин с тимином (или уридином в РНК) образуют две водородными связи, гуанин с цитозином – три.

РНК в основном встречаются в одноцепочном состоянии. Для РНК характерны разнообразные структуры, в которых часть нуклеотидов одной цепи спарены между собой.

2.2. Гель-электрофорез

Одним из методов изучения олигонуклеотидов и их комплексов, является методы нативного и денатурирующего гель-электрофореза. По результатам гель-электрофореза можно судить об эффективности образования межмолекулярных комплексов, можно исследовать распределение по размерам комплексов в изучаемом образце.

Электрофоретические методы основаны на разделении ионов при движении их в среде под действие электрического поля. Находящиеся в буферном растворе

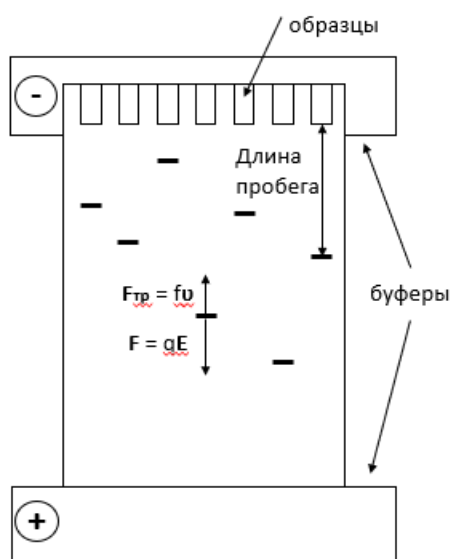


Рис. 3. Схема разделения молекул по скоростям под действием электрического поля

макромолекулы обладают суммарным электрическим зарядом. Если к этой среде подать напряжение, то в среде образуется электрическое поле. Под действием поля макромолекулы в соответствии со своим суммарным зарядом мигрируют в направлении катода или анода, причем их взаимодействие с окружением ограничивает скорость миграции. Скорость молекулы зависит от величины заряда, пространственной конфигурации и размеров молекул, а также от характеристик электрического поля. Постепенно исходный препарат, состоявший из различных молекул,

разделяется на зоны одинаковых молекул, мигрирующих с одной и той же скоростью.

На заряженную частицу в однородном электрическом поле будет действовать сила:

$$\mathbf{F} = q\mathbf{E} \quad (1)$$

где q – суммарный заряд частицы, E – напряженность электрического поля, которую можно найти из соотношения напряжения между электродами U и расстоянию между ними l :

$$E = U / l \quad (2)$$

Эта сила будет ускорять частицу к электроду с противоположным зарядом. Противоположно этой силе будет действовать сила трения, которая прямо пропорциональна скорости v :

$$F_{\text{тр}} = fv \quad (2)$$

где f – коэффициент трения, зависящий от характеристик частицы. По мере движения частицы ее скорость будет увеличиваться, за счет этого увеличивается сила трения. После того, как сила электрического поля и сила трения будут равны, частица будет двигаться с постоянной скоростью.

2.3. Определение концентраций

Для определения концентраций образцов применен закон Бугера-Ламберта-Бера. Он определяет ослабление параллельного пучка света при распространении его в поглощающей среде. Он выражается следующим образом:

$$I = I_0 e^{-x\varepsilon c},$$

где I – интенсивность света, прошедшего слой вещества толщиной x , I_0 – интенсивность света на входе в вещество, ε – коэффициент молярного поглощения (экстинкции), c – концентрация. Показатель поглощения определяется свойствами вещества и зависит преимущественно от длины волны поглощаемого света (спектр поглощения).

3. Экспериментальная часть

3.1. Образцы

В данной работе исследованы 12 звенные олигонуклеотиды. В качестве исследуемых образцов выбраны три олигонуклеотидные последовательности, для которых были синтезированы как сами эти цепи, так и комплементарные им.

Для каждой последовательности было создано два варианта: полностью нативные олигодезоксирибонуклеотидов и ФГО с такой же последовательностью. В дальнейшем эти последовательности будем обозначать Н1, Н2, Н3, Н4, Н5, Н6 и FG1, FG2, FG3, FG4, FG5, FG6 соответственно (под четными номерами цепи, комплементарные к цепям с предыдущим номером).

Таблица 1. Последовательности синтезированных одигонуклеотидов

	Код	Последовательность
1	Н1 / FG1	TAGCTTTGAATC
2	Н2 / FG2	GATTCAAAGCTA
3	Н3 / FG3	GCTTAGTCAAGA
4	Н4 / FG4	TCTTGACTAAGC
5	Н5 / FG5	CGATCCCAGGCT
6	Н6 / FG6	AGCCTGGGATCG

3.2. Определение концентраций

Концентрацию олигонуклеотидов проводили спектрофотометрическим методом на спектрофотометре UV-2100 (Shimadzu, Япония), используя закон Бугера-Ламберта-Бера. Регистрацию оптического поглощения проводили на длинах волн от 200 нм до 300 нм. Величины коэффициентов поглощения на длине волны 260 нм рассчитывали с помощью программы Extinses (Иванов А.В., ИЛФ СО РАН).

3.3. Нативный гель-электрофорез

Электрофоретический анализ в нативных условиях проводили в 19%-ном ПААГ в нативных условиях (акриламид N,N'-метиленабисакриламид (29:1)) в буфере ТВ (89 mM бис-борат, pH 8.3) и 10mM MgAc. Для нанесения образцов олигонуклеотидов использовали буфер (ТВ 0.05 % ксиленцианол FF и 0.05 % бромфеноловый синий). Для окрашивания геля использовался Stains All. Параметры источника питания: напряжение - 400 В, сила тока - 21 мА.

3.4. Денатурирующий гель-электрофорез

Электрофоретический анализ проводили в 15%-ном ПААГ в денатурирующих условиях: (акриламид: N,N'-метиленбисакриламид (30:1), в 8 М мочевины) в буфере TBE (89 mM бис-борат, pH 8.3, 2 mM Na₂EDTA) при мощности 10 Вт. Для нанесения образцов олигонуклеотидов использовали денатурирующий буфер (TBE 8 М мочевины, 0.05 % ксиленцианол FF и 0.05 % бромфеноловый синий). Для окрашивания геля использовался Stains All.

3.5. Экспериментальная установка

В данном исследовании использовался вертикальный гель-электрофорез, так как в нем можно одновременно наблюдать за несколькими образцами одновременно. Были использованы 2 стеклянные пластины (ширина – 16 см, высота – 14 см), 2 спейсера и гребенка одинаковой толщины (задают толщину геля). Все эти элементы были промыты дистиллированной

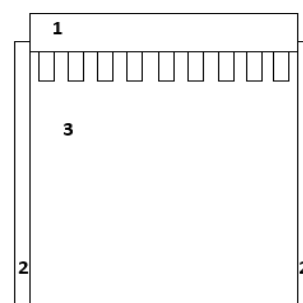


Рис. 4. Сборка установки перед заливанием образцов. 1 – гребенка, 2 – спейсеры, 3 – стекла

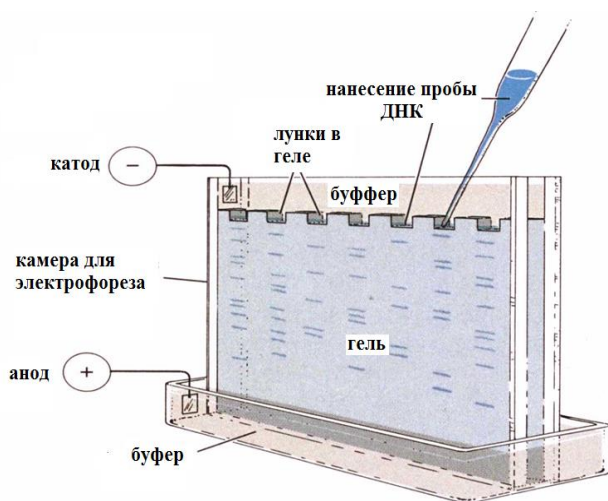


Рис. 5. Установка для вертикального гель-электрофореза

водой, чтобы при проведении эксперимента в гель не попало никаких инородных соединений. Для создания равномерной среды между пластинами заливался полиакриламидный гель. Для создания карманов, в которые заливались образцы, используется гребенка, помещенная в гель до того, как он начал поляризоваться.

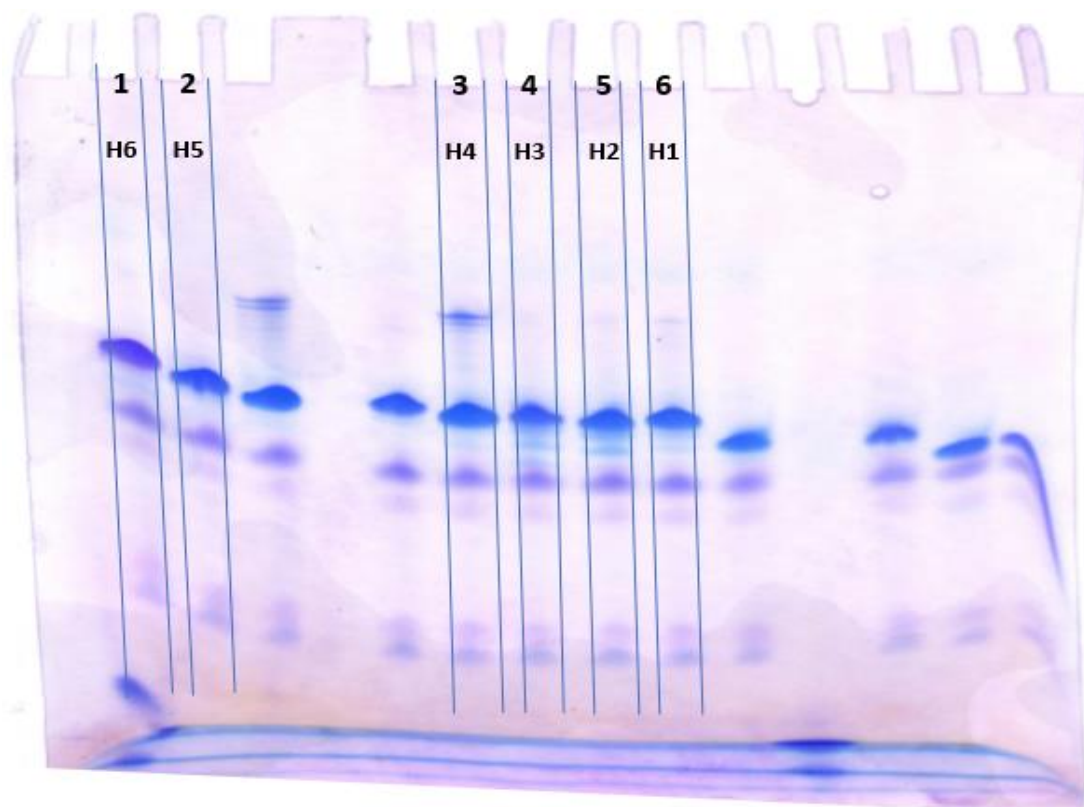
Далее эта конструкция ставится в камеру для гель-электрофореза. Между двумя буферными ванночками. После этого на электроды подается напряжения от источника.

4. Обсуждение и результаты

Таблица 2. Концентрации образцов, определенные по закону Бугера-Ламберта-Бера. A – логарифм отношения интенсивности света на входе в вещество и интенсивности света, прошедшего слой вещества толщиной 1 см; ϵ – коэффициент экстинкции, c – концентрация.

Код образца	A	E	$c \cdot 10^{-4}$, моль/л	Код образца	A	E	$c \cdot 10^{-4}$, моль/л
H1	0,027	114	6,404	FG1	0,117	114	5,132
H2	0,035	124	2,782	FG2	0,059	124	2,379
H3	0,025	122,9	2,278	FG3	0,049	122,9	1,993
H4	0,031	112,1	4,460	FG4	0,061	112,1	2,721
H5	0,024	108,4	3,828	FG5	0,055	108,4	2,537
H6	0,039	115,8	4,102	FG6	0,05	115,8	2,159

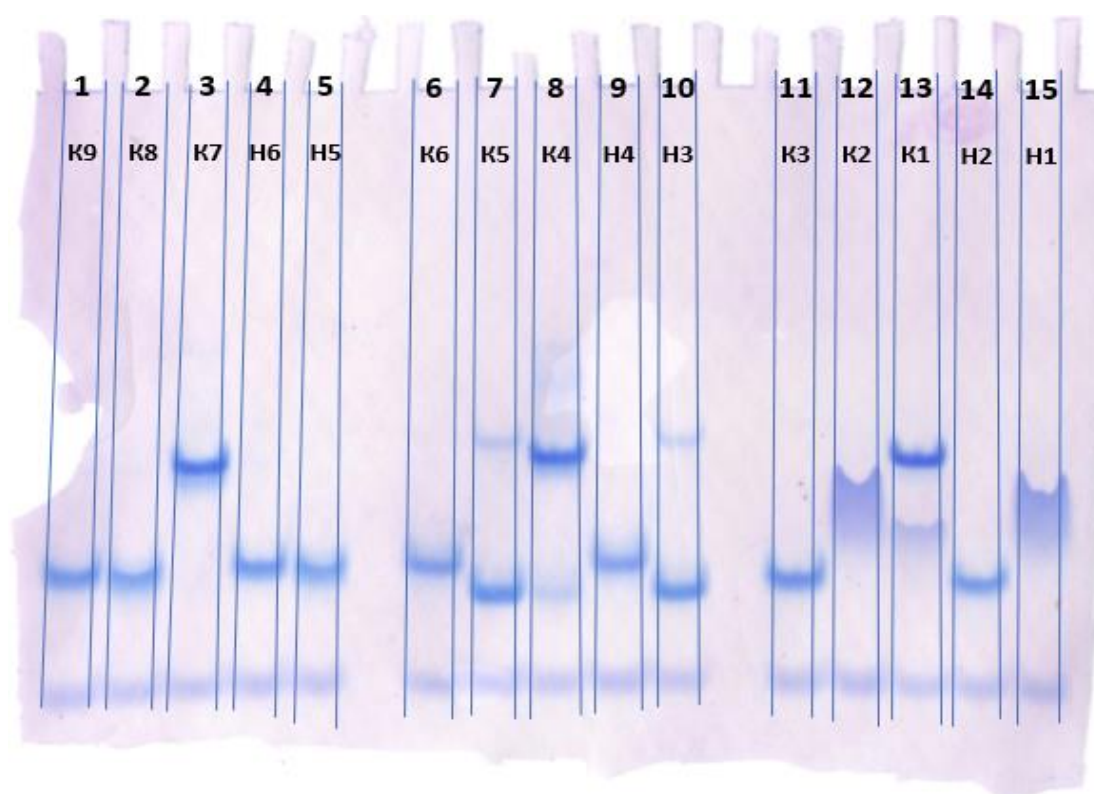
Рис. 6. Результаты денатурирующего гель-электрофореза. На каждой дорожке написан ее номер (верхнее обозначение) и код образца, который по ней мигрировал (нижнее обозначение).



По денатурирующему гель-электрофорезу можно судить о чистоте полученных образцов. Фиолетовые следы – это остатки краски, синие – образцы. Свидетельством чистоты образца является наличие только одной полосы на

дорожке. Присутствие дополнительных полос над образцом свидетельствует о наличии более высокомолекулярных примесей в исследуемой смеси. На рис.3 это образец на дорожке 3. Если под образцом есть дополнительные полосы, то это более низкомолекулярные примеси, то есть при синтезе помимо необходимой последовательности и нуклеотидов образовались другие, более короткие цепи. На рис. 3 это образцы на дорожках 4, 5, 6. Так как интенсивность примесей на картинке сравнимо слабее интенсивности образца, то можно сделать вывод, что образцы пригодны для использования.

Рис. 7. Результаты нативного гель-электрофореза. На каждой дорожке написан ее номер (верхнее обозначение) и код образца или комплекса образцов, который по ней мигрировал (нижнее обозначение). Обозначения Н1, Н2, Н3, Н4, Н5, Н6 – обозначения нативных образцов (были введены выше); К1, К4, К7 – комплексы, образованные двумя нативными цепями (ДНК/ДНК) Н1/Н2, Н3/Н4, Н5/Н6 соответственно; К2, К5, К8 – комплексы, образованные нативной и модифицированной цепями (ДНК/ФГО) Н1/FG2, Н3/FG4, Н5/FG6 соответственно; К3, К6, К9 – комплексы, образованные модифицированной и нативной цепями (ФГО/ДНК) FG1/Н2, FG3/Н4, FG5/Н6 соответственно.



Нативный гель-электрофорез показывает, образуются комплексы или нет. Тускло синие полосы внизу – это остатки краски, ярко синие – образцы и комплексы. По рис. 4 видно, что комплексы с ФГО в данных условиях не образуются, так как уровень следа на дорожке с одноцепочечным образцом и с предполагаемым комплексом этого образца с цепью с ФГО (на примере дорожек

1-5 это дорожки 1, 4 и 2, 5). Образуются только комплексы, где обе цепи нативные (на примере дорожек 1-5 дорожка 3), они выше остальных полос.

5. Выводы

Было проведено исследование нативных олигонуклеотидов и их комплексов с ФГО методом нативного и денатурирующего гель-электрофореза. По результатам денатурирующего гель-электрофореза можно судить, что во всех образцах, за исключением образцов Н5 и Н6, есть примеси. По результатам нативного гель-электрофореза было показано, что в условиях эксперимента не обнаружено образования комплексов олигодезоксирибонуклеотидов с компелментарными ФГО, а образование нативных дуплексов было показано.

Список литературы

1. Smith, CI Edvard, and Rula Zain. "Therapeutic oligonucleotides: state of the art." Annual review of pharmacology and toxicology 59 (2019): 605-630
2. Kupryushkin M. S., Pyshnyi D. V., Stetsenko D. A. Phosphoryl guanidines: a new type of nucleic acid analogues //Acta Naturae (англоязычная версия). – 2014. – Т. 6. – №. 4 (23)
3. <https://elib.gsu.by/bitstream/123456789/6218/6/Лекция%204%20Электрофоретические%20методы.pdf>
4. http://www.ibmc.msk.ru/content/Education/w-o_pass/ММoB/18a.pdf
5. https://ru.wikipedia.org/wiki/Нуклеиновая_кислота
6. <https://lektsii.org/17-27668.html>