

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

Физический факультет

Кафедра общей физики

Кирменкий Алексей Сергеевич

КУРСОВАЯ РАБОТА

**Определение чистоты олигонуклеотидов методом денатурирующего гель-
электрофореза**

Электромагнитный практикум, 2 курс, группа №18303

Научный руководитель:

В. М. Голышев

Оценка научного руководителя

«_____» _____ 20__ г.

Преподаватель практикума

к.ф.-м.н. А. А. Симонов

Оценка преподавателя практикума

«_____» _____ 20__ г.

Куратор практикума:

Итоговая оценка

к.т.н. Астрелин В.Т.

«_____» _____ 20__ г.

Новосибирск, 2019

Аннотация.

Олигонуклеотиды- короткие синтетические фрагменты нуклеиновых кислот, которые широко применяются в молекулярно-биологических исследованиях, в генодиагностике и в терапевтических целях. Для успешного применения нативных олигонуклеотидов требуется проверять «чистоту» полученных олигонуклеотидов, так как в процессе синтеза могут получаться побочные нецелевые олигонуклеотиды. Для проверки чистоты образцов используют метод денатурирующего гель-электрофореза. В данной работе было проведено исследование «чистоты» олигодезоксирибонуклеотидов методом задержки в геле.

Оглавление

Введение	2
Экспериментальная часть.....	6
Результаты.....	8
Вывод.....	10
Список литературы	10

Введение

Олигонуклеотиды – короткие фрагменты ДНК или РНК. В настоящее время олигонуклеотиды широко используются в различных областях науки, таких как медицина и в молекулярно-биологических исследованиях.

Одно из направлений использования олигонуклеотидов является нокдаун гена. Методика, позволяющая снизить экспрессию одного или нескольких генов при помощи изменения соответствующей последовательности нуклеотидов, либо при помощи короткого олигонуклеотида, комплементарного соответствующей молекуле мРНК.

Также олигонуклеотиды используются в генодиагностике - ДНК-чипах. Впервые ДНК-чипы были использованы в исследованиях в конце 80-х годов прошлого века. Они представляют собой твердую подложку, на которую ковалентно пришиты олигонуклеотиды разной длины: короткие – 15-25 нуклеотидов, длинные – 25-60 нуклеотидов и кДНК фрагменты – от 100 до 3000 нуклеотидов. Сигнал о наличии определенной последовательности в смеси, нанесенной на чип, появляется за счет гибридизации, то есть соединения комплементарных одноцепочечных нуклеиновых кислот в одну молекулу.

Для успешного исследования олигонуклеотидов требуется определять их “чистоту”, то есть отсутствие нецелевых фрагментов. Для определения чистоты полученного раствора с олигонуклеотидом можно проводить эксперименты по масс-спектрометрическому анализу, но данный метод является более дорогостоящим и время затратным, по сравнению с методом денатурирующего гель электрофореза

Теоретическая часть:

Нуклеиновые кислоты – высокомолекулярные биоорганические полимерные соединения. Природные нуклеиновые кислоты бывают двух видов – дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК) и рибонуклеиновые кислоты (РНК). Они присутствуют в клетках всех живых организмов и выполняют важнейшие функции хранения, передачи и реализации наследственной информации и др. Имеют отрицательный заряд при физиологических значениях pH.

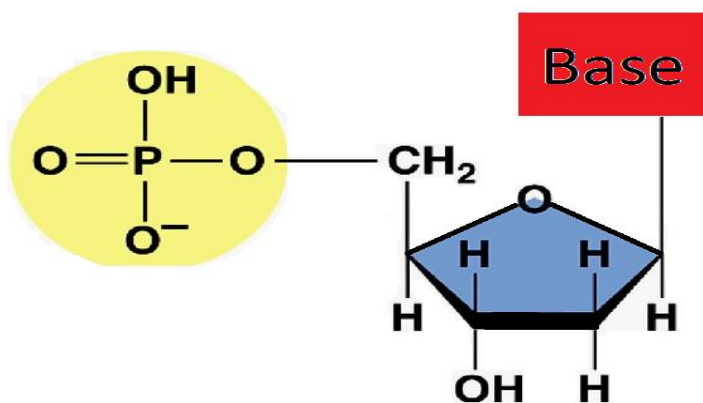


Рисунок 1. Схема нуклеотида. Желтым обозначен фосфатный остаток, синим – сахар, красным – азотистое основание.

Олигонуклеотид — короткий фрагмент ДНК или РНК, получаемый путём химического синтеза. Мономером олигонуклеотидов является нуклеотид, состоящий из азотистого основания, сахара (рибозы или дезоксирибозы) и остатка фосфорной кислоты. Название нуклеотида является производным от названия соответствующего основания. В состав ис-

следуемых образцов входят такие нуклеотиды как: Аденин (А), Тимин (Т), Гуанин (G), Цитозин (С).

В организмах живых существ ДНК встречается в виде двойной спирали, стабилизированной за счет водородных связей, образованными комплементарными цепями и за счет стэкинг взаимодействий внутри цепи. Комплементарные взаимодействия возникают между Аденином и Тимином, Гуанином и Цитозином.

Электрофорез является методом анализа и разделения нуклеиновых кислот под действием электрического поля. При проведении электрофореза в полиакриламидном геле, разделение происходит из-за различий зарядов разделяемых молекул, отличий молекулярных масс, а также от длины молекул. Существует два типа электрофореза-нативный (не денатурирующий) и денатурирующий. Нативный электрофорез позволяет исследовать комплексы олигонуклеотидов, а в процессе денатурирующего исследуются отдельные олигонуклеотиды. При этом образец предварительно денатурируют с помощью хаотропных агентов. Если в образце присутствуют молекулы, у которых разные подвижности, то при проведении гель-электрофореза они разделятся на зоны концентрации этих молекул.

Физический принцип данного метода заключается в следующем. Находящиеся в буферном растворе олигонуклеотиды обладают некоторым средним суммарным зарядом Q , величина которого зависит от буфера. Создание электрического поля, путем разности потенциалов на границах области, приводит в движение олигонуклеотиды, под действие силы

$F = QE$, где Q - суммарный заряд, E - электрическое поле, которое определяется отношением постоянного напряжения между электродами к расстоянию между ними $E = \frac{U}{L}$. Однако скорость миграции ограничивается из-за трения об окружающую среду, которая в свою очередь, при малых скоростях пропорциональна

скорости, тогда $F = -kv$, где V - скорость последовательности, k - коэффициент пропорциональности. В зависимости от заряда и размера, последовательности приобретают разные скорости. Поэтому постепенно происходит разделение на зоны по скоростям. Если изначально олигонуклеотиды были одного заряда, то разделение по зонам обуславливается только разными размерами цепочек. Область между электродами заполняется гелем, через который и “бегут” олигонуклеотиды.

Спектрофотометрия.

Принцип действия спектрофотометра:

Изменение интенсивности света при прохождении через участок среды пропорционально L – его длине и c – концентрации вещества. В формуле ε – коэффициент пропорциональности, называемый коэффициентом экстинкции. Он зависит от природы вещества и длины волны света.

Тогда $\frac{dI}{dl} = -I\varepsilon C$.

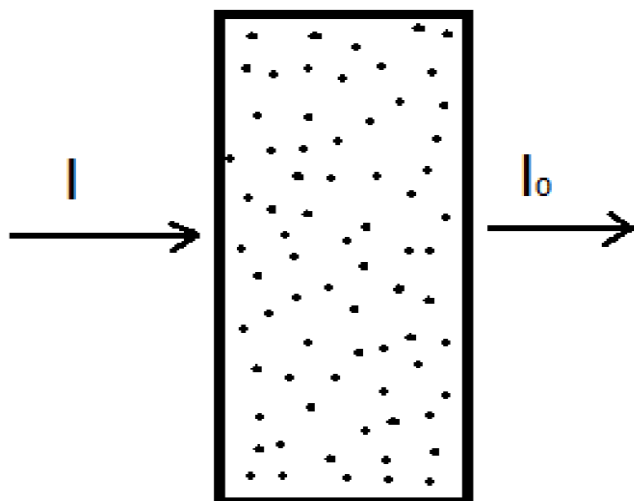


Рисунок 2. Принцип действия спектрофотометра. I_0 – входящая интенсивность, I – результирующая интенсивность.

Проинтегрировав, получаем закон Бугера-Ламберта-Бера в общепринятом виде:

$$I = I_0 e^{-l\varepsilon c} \quad (1)$$

I_0 – входящая интенсивность, I – результирующая интенсивность, c – концентрация раствора, ε – коэффициент экстинкции, l – длина оптического пути.

Экспериментальная часть.

На первом шаге исследований требовалось определить концентрацию исследуемых олигонуклеотидов. Измерения проводили на спектрофотометре Shimadzu. Исследования проводили в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см. Для измерения концентрации олигонуклеотидов мы разбавляли исходный раствор с олигонуклеотидом в 501 раз в деионизованной водой MQ.

Гомогенизировали раствор после добавления олигонуклеотида путем перемешивания. Далее записывали спектр оптической плотности (в диапазоне длин волн от 300 нм до 200 нм), который количественно равен логарифму отношения результирующей и входящей интенсивности светового потока. Для определения концентрации олигонуклеотидов использовали длину волны 260 нм. Данная длина волны была взята, так как на ней находится экстремум поглощения

нуклеиновых кислот. Из уравнения (1) нашел искомую концентрацию. Коэффициенты экстинкции для исследуемых олигонуклеотидов брал в программе Extinctes (Иванов, ИЛФ).

Далее собрал установку для электрофореза, представленную на рис.3.

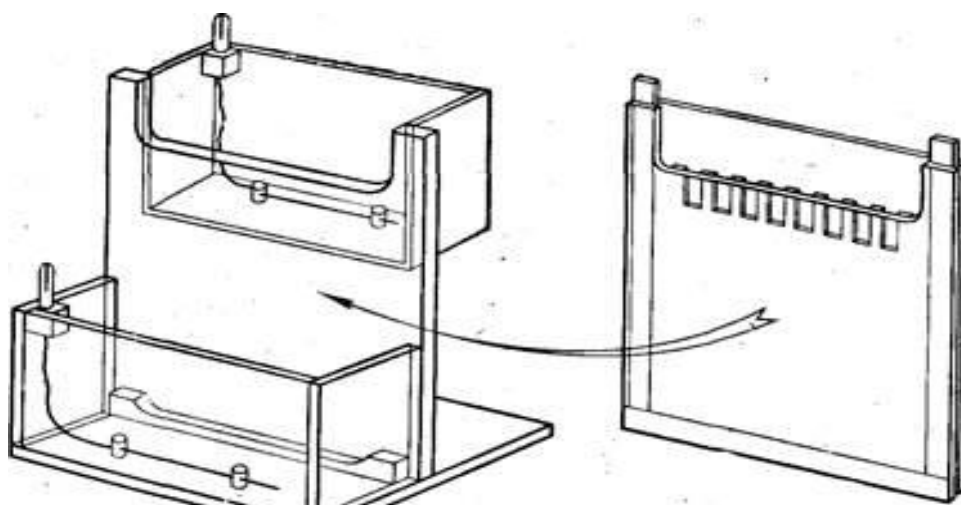


Рисунок 3 Схема электрофореза.

Установка состоит из верхней и нижней ванночек, в ко-

торых находится буферный раствор. В приборе вертикально располагается стекло с проводящей пористой средой – полиакриламидным гелем, на электроды подается напряжение. Для того чтобы сформировать равномерное пространство при создании геля используются спейсеры. Карманы для проб формируют с помощью гребенки, которую извлекают из геля после полимеризации.

Для денатурирующего гель-электрофореза использовали 20% Полиакриламидный гель(N,N'-метиленбисакриламид (29:1)), 8 М мочевины в буфере TBE (89 mM трис, 89mM борная кислота, pH 8.3, 2 mM Na₂ EDTA) Для нанесения образцов олигонуклеотидов использовали денатурирующий буфер (TBE 8 М мочевины, 0.05 % ксиленианол и 0.05 % бромфеноловый синий). Для окрашивания геля использовали реагент StainsAll.

Каждый образец использовали в количестве 0.05 оптических единиц.

Результаты



Рисунок 4. График зависимости оптической плотности от длины волны образца H1-N1.

На первом этапе определили концентрации исследуемых олигонуклеотидов из результатов спектрофотометра и формулы (1).

Таблица 1 . Результирующие концентрации последовательностей.

Последовательность	Номер	Оптическая плотность	Коэффициент экстинкции	Концентрация М/МКл*е-4
TCCAGCTA	H1-N1	0,029	75,4	1,92
TAGCTGGA	H2-N1	0,035	81	2,16
TAACGGAG	H3-M2	0,032	85,2	1,88
CTCCGTTA	H4-N2	0,026	71,8	1,81
TGGCAAGA	H5-M3	0,072	84,3	4,27
TCTTGCCA	H6 -N3	0,022	69,5	1,58
CGAACTTATG	H7 -M4	0,047	97,8	2,40
CATAAGTTTCG	H8 -N4	0,04	99,6	2,01

Из таблицы 1 известны оптическая плотность раствора, в котором концентрация вещества в 501 раз меньше. Для проведения гель электрофореза необходимо взять 0,05 оптических единиц. Требуемое количество вещества нашли из формулы $V = \frac{0,05}{D} \cdot 2$ (мкл), где D – оптические единицы раствора.

Таблица 2. Количество вещества для проведения гель-электрофореза.

Последовательность	Номер	Вещества, мкл	H ₂ O, мкл
TCCAGCTA	H1-N1	3,45	1,55
TAGCTGGA	H2-N1	2,86	2,14
TAACGGAG	H3-M2	3,13	1,88
CTCCGTТА	H4-N2	3,85	1,15
TGGCAAGA	H5-M3	1,39	3,61
TCTTGCCA	H6 -N3	4,55	0,45
CGAACTTATG	H7 -M4	2,13	2,87
CATAAGTTCG	H8 -N4	2,50	2,50

После полимеризации ПААГ, в нижнюю и верхнюю ванночки прибора добавили буфер TBE, контакт геля и буфера осуществляется с помощью специальной пористой фильтровальной бумаги, которая позволяет создать равномерное поле в геле. На катодах создали разность потенциалов. Общее время проведения гель-электрофореза составило 50 минут.

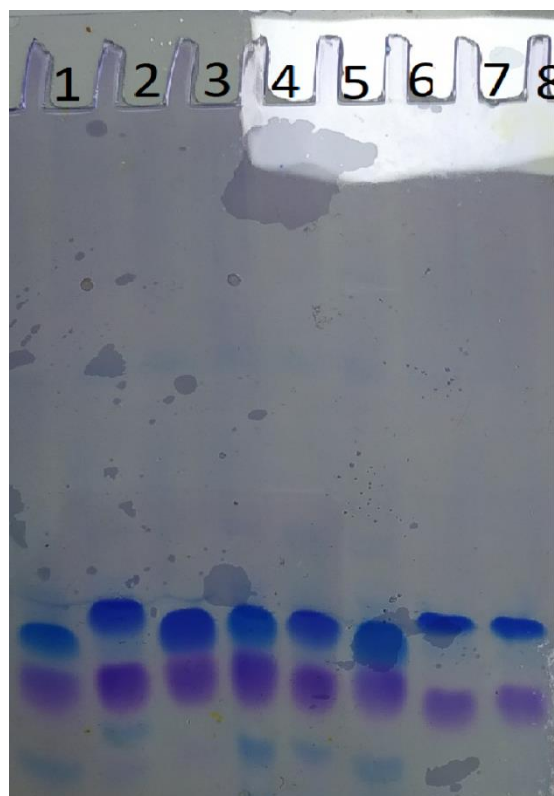


Рисунок 5.

Результаты проведения гель-электрофореза в денатурирующих условиях. Синим цветом выделены исследуемые образцы, фиолетовым краской

Из рис.5 видно, что последовательности на дорожках 3, 7, 8 получились “чистые”, то есть отсутствуют побочные нецелевые фрагменты. Иначе произошло бы разделение на области концентраций молекул разной подвижности и наличие побочных последовательностей характеризовалось бы наличием бондов, находящихся ниже или выше образцов.

Также образцы на дорожках 1-6 имеют большую толщину, по сравнению с образцами, находящихся на дорожках 7-8. Данная разница возникла из-за неточности добавления концентраций. Однако на анализ присутствия нецелевых фрагментов не влияет.

Вывод

В ходе данной работы я освоил метод гель-электрофореза и изучил принцип работы установки электрофореза в вертикальных условиях. Изученные образцы НЗ-М2, Н7 –М4, Н8 –N4 оказались “чистыми”.

В остальных образцах присутствуют побочные нецелевые фрагменты.

Список литературы

1. <https://elib.gsu.by/bitstream/123456789/6218/6/Лекция%204%20Электрофоретические%20методы.pdf>
2. http://www.ibmc.msk.ru/content/Education/w-o_pass/ММoB/18a.pdf
3. https://ru.wikipedia.org/wiki/Нокдаун_гена