

Анализ методов проверки качества экстрагированной ДНК

Брыкова Анастасия Леонидовна

Приамурский государственный университет им. Шолом-Алейхема

студент

Аннотация

Данная статья включает анализ методов проверки чистоты и концентрации ДНК, выделенной из тканей животных. Подробно описано применение геле-электрофореза.

Ключевые слова: ДНК, электрофоретический метод, агарозный гель.

Analysis of methods for testing the quality of extracted DNA

Brykova Anastasia Leonidovna

Sholom-Aleichem Priamursky State University

Student

Abstract

This article includes an analysis of methods for testing the purity and concentration of DNA isolated from animal tissues. Details described the use of gel-electrophoresis.

Keywords: DNA, electrophoretic method, agarose gel.

Введение

Известно, что ДНК можно получить из разных тканей, например, из мышц, эпителия, кости, печени, луковиц волос и др. Однако, для того, чтобы проводить сложные исследования, необходимы нуклеиновые кислоты высокого качества и концентрации. В связи с популярностью исследований ДНК, появляется необходимость не только в оптимизации способов ее получения, но и в подборке оптимального метода проверки качества полученных молекул.

В связи с популярностью исследований генетического материала, возрастает необходимость в подборе методов проверки качества ДНК. В статье С.В. Бекетова и А.П. Легкобит [1] рассматривается вопрос об использовании методов спектрометрии и электрофореза для оценки количественных и качественных показателей нуклеиновых кислот. В своем пособии И.В. Стручкова; Е.А. Кальясова [2] подробно описывают принципы метода электрофореза в геле. В статье Р.А. Козулина, В.М. Золотарева, В.Е. Курочкина [3] приводится метод флуориметрической оценки многокомпонентных жидкостей, к которым относится и раствор ДНК.

Цель исследования: анализ методов проверки ДНК, экстрагированной из тканей животных.

Наиболее распространенными методами оценки выделенной ДНК являются следующие методы:

- 1) спектрофотометрия;
- 2) флуориметрическая оценка;
- 3) гель-электрофорез.

1. Спектрофотометрическая оценка по оптической плотности

Метод спектрофотометрии основан на свойстве молекул ДНК поглощать и отражать волны различной длины. Как и любые методы измерения, метод спектрофотометрической оценки имеет определенные погрешности при использовании для оценки концентрации нуклеиновых кислот. При анализе небольших объемов, на результаты может влиять погрешность пипеток и наличие в пробе. Для оценки чистоты и качества нуклеиновых кислот при спектрофотометрическом измерении, чистоту образца определяют, исходя из соотношения оптических плотностей при длинах волн 230, 260 и 280 нм. Нуклеиновые кислоты имеют максимум поглощения при длине волны 260 нм. Соотношение A_{260}/A_{280} для чистых нуклеиновых кислот должно лежать в пределах 1,8-2,2 и оптимально составляет ~1,8 и ~2,0 для ДНК и РНК, соответственно. Значение менее 1,8 указывает на загрязнение образца полипептидами, более 2 – на деградацию и наличие свободных нуклеотидов.

В настоящее время на рынке представлены спектрофотометры, позволяющие проводить измерение микроколичеств нуклеиновых кислот. Например, спектрофотометр NanoDrop 2000c от Thermo Fisher Scientific Inc. позволяет точное измерение концентраций РНК от 5 нг/мкл и ДНК - от 2 нг/мкл, в объеме от 1 мкл до 2 мкл [1].

Несмотря на недостаточную точность и высокую стоимость оборудования, спектрофотометрический метод применяется очень широко: он быстр, не требует каких-либо реагентов. Основным недостатком метода - невозможность оценить степень деградации нуклеиновых кислот, что очень важно для дальнейших исследований ДНК.

2. Флуориметрическая оценка с использованием флуоресцентных красителей

Для повышения чувствительности измерений используют также флуоресцентные красители. Можно использовать универсальные красители, например, такие как RiboGreen (Life Technologies), также наборы реагентов, для конкретных моделей флуориметров. Помимо высокой чувствительности вторым важным преимуществом флуориметрического определения концентрации молекул является разнообразие предоставленных на рынке красителей и наборов реагентов, позволяющих анализировать концентрацию ДНК в одном и том же образце. Из недостатков стоит отметить проблему транспортировки реагентов, (высокая стоимость отправки заказа и существует риск того, что реактивы разморозятся и испортятся) а также высокую стоимость наборов.

3. Метод гель-электрофореза

Наиболее распространенным способом оценки качества экстрагированных нуклеиновых кислот является электрофорез в агарозном или акриламидном геле. По размещению геля выделяют вертикальный и горизонтальный электрофорез. Для выделения и очистки белков чаще всего используют вертикальную ориентацию геля. Для работы с нуклеиновыми кислотами необходимо горизонтальное расположение геля, что облегчает его заливку и внесение проб ДНК.

Электрофорезом называют движение заряженных частиц в растворе под действием электрического поля. Электрофоретический метод в биохимии – это способ пространственного разделения молекул, имеющих разный заряд и размеры, путем помещения их в электрическое поле.

Результатом проведения разделения молекул является электрофореграмма - картина, полученная после разделения сложной смеси с помощью электрофореза и проявления на специальном аппарате [2].

В работе будет использован безопасный метод приготовления геля из агарозы, так как полиакриламидный гель готовится из токсичного вещества – акриламида. Кроме того, выбранная методика достаточно проста и не требует больших финансовых и временных затрат.

Методика приготовления геля:

1) в термостойкую колбу к 2 г агарозы добавить 2 мл 10xТБЕ буфера;
2) добавить 98 мл дистиллированной воды, встряхнуть колбу и нагревать в СВЧ-печи периодически встряхивая колбу до полного растворения агарозы;

3) после остывания в еще незастивший гель необходимо добавить 2 мкл SYBR Green (флуоресцентный краситель, который специфически связывается с двухцепочечной ДНК) и хорошо размешать содержимое колбы.

Далее гель необходимо залить в формы с заранее размещенными в них гребенками, которые извлекаются после застывания геля, оставляя лунки для внесения образцов (рис. 1).

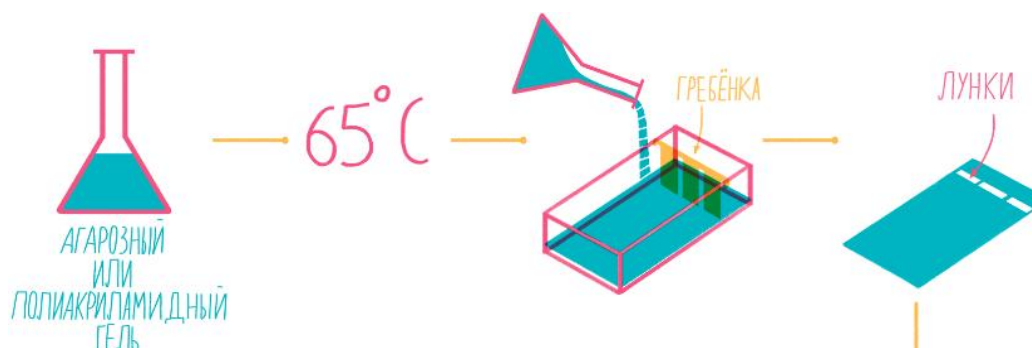


Рисунок 1. Этапы заливки геля

Электрофорез проводится в горизонтальной камере подключенной к источнику питания «Эльф-4» (рис. 2).

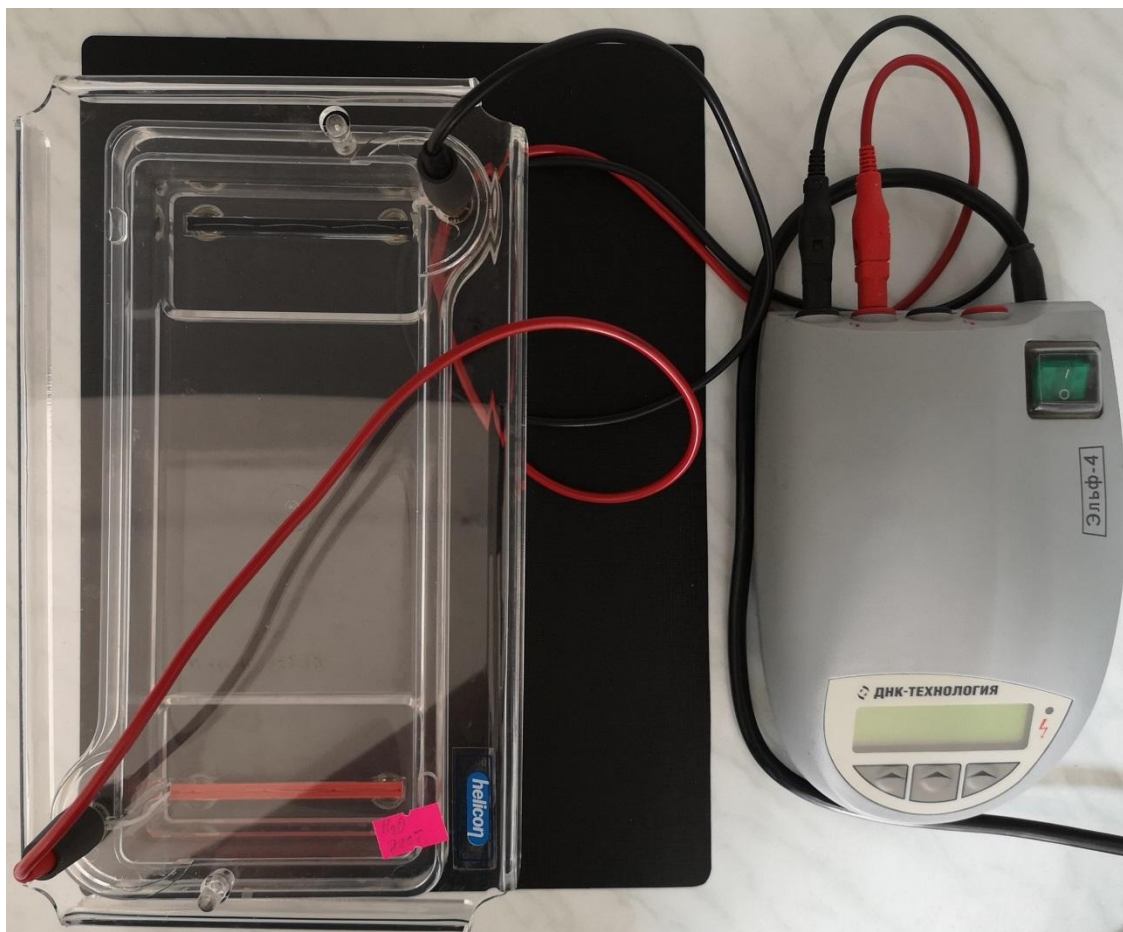


Рисунок 2. Система для гель-электрофореза

Физический принцип метода заключается в том, что внесенная в гель ДНК обладает отрицательным зарядом. Если через буфер и погруженный в него гель начать пропускать электрический ток, то в камере для электрофореза установится определенный градиент напряжения, т.е. сформируется электрическое поле. Под действием поля отрицательно заряженные молекулы ДНК мигрируют в направлении от катода к аноду, при этом сила трения будет ограничивать скорость миграции. В зависимости от величины заряда и размеров молекулы приобретают различные скорости. Постепенно исходный препарат, состоящий из различных молекул, разделяется на зоны одинаковых молекул, мигрирующих с одинаковой скоростью [2].

В камеру для электрофореза помещается приготовленная пластинка геля и заливается специальным буфером, так чтобы гель был полностью погружен в раствор. Далее в лунки геля микропипеткой вносятся образцы ДНК (каждый образец вносится чистым наконечником в отдельную лунку) окрашенные с помощью БФС. БФС (бромфеноловый синий) – натуральный краситель, используемый для визуализации образцов.

После того, как лунки заполнены, необходимо закрыть камеру крышкой и включить прибор выставив запрашиваемые показатели (30 мА; 140 В; 4,5 Вт; 15 мин). Во время работы прибора хорошо заметно как краситель движется

от «-» к «+». Спустя 15 минут, после того краситель пройдет 1,5-2 см от лунок, прибор отключается (рис. 3).

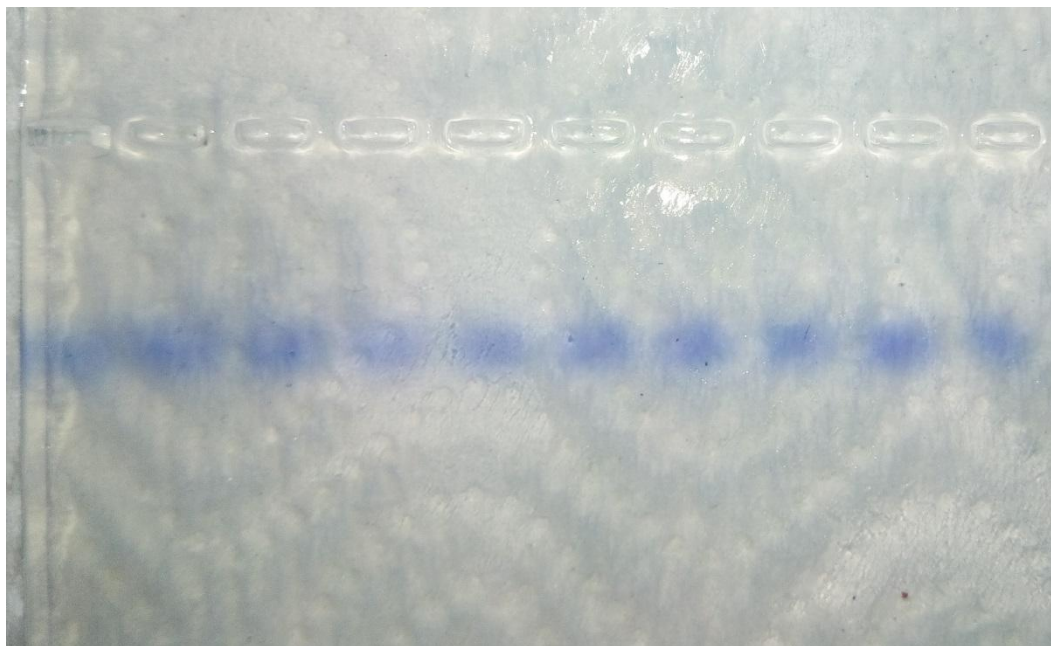


Рисунок 3. Агарозный гель со следами красителя

Далее пластинка помещается в гель-документирующую систему, где в УФ-освещении происходит визуализация и фотографирование результатов (в данном случае использовалась универсальная система гель-документации BioRad ChemiDoc MP). С помощью ПК просматриваются полученные результаты (рис. 4).

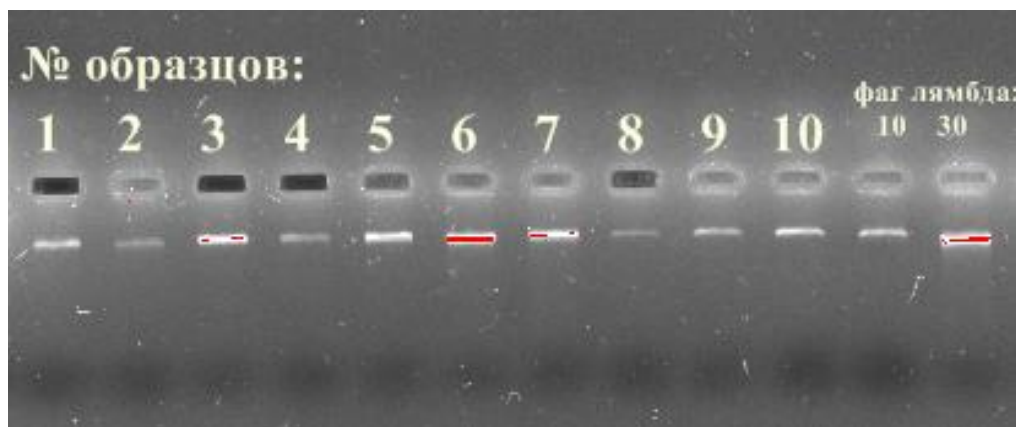


Рисунок 4. Фотография результатов электрофореза в УФ свете

Фрагменты анализируемой ДНК обозначены в виде светлых и красных полос. Для определения концентрации ДНК проводится сравнительный анализ по степени яркости с готовыми коммерческими образцами (в данном случае использовался препарат фага λ (лямбда) - это умеренный бактериальный вирус *E. coli* (кишечной палочки) с двухцепочечной геномной ДНК). Фаг λ взят в концентрации 10 нг/мкл и 30 нг/мкл.

Например, образец №1 примерно соответствует по степени яркости образцу фага λ 10 нг/мкл, а образец №2 менее яркий – около 5 нг/мкл. Образец №6 соответствует образцу фага λ 30 нг/мкл и т.д. Данные заносятся в таблицу (табл.1)

Таблица 1 - Концентрация ДНК разных образцов ткани

№ образца	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Фаг λ	Фаг λ
Примерная конц-ия (нг/мкл)	≈ 10	>10	≈ 30	>10	≈ 20	<30	≈ 30	5	≈ 10	<10	10	30

Результаты электрофореза принимаются во внимание при дальнейших исследованиях ДНК. Концентрация нуклеиновых кислот играет важную роль при проведении ПЦР анализа.

Вывод. У всех рассмотренных методов есть свои преимущества и недостатки. Во внимание были приняты следующие показатели: стоимость оборудования и реактивов, безопасность проведения работы, временные и финансовые затраты. По всем критериям наиболее оптимальным является метод горизонтального электрофореза в агарозном геле. Приготовить агарозный гель гораздо проще, чем полиакриламидный, кроме того достоинством является небольшая продолжительность электрофореза, относительная дешевизна метода и возможность определения степени деградации ДНК.

Библиографический список

1. Бекетов С.В., Легкобит А.П. Оценка показателей ДНК: спектрометрия или электрофорез? // Кролиководство и звероводство. 2014. № 2. С. 20-21.
2. Стручкова И.В.; Кальясова Е.А. Теоретические и практические основы проведения электрофореза белков в полиакриламидном геле. Нижний Новгород: Национальный исследовательский университет, 2012. 60 с.
3. Козулин Р.А., Золотарев В.М., Курочкин В.Е. Аналитические методы контроля многокомпонентных жидкостей // Научное приборостроение. 2003. Т. 13. № 2. С. 3-16.