

ЛЕКЦИЯ 8

Органические вещества клетки.

Нуклеиновые кислоты.

Нуклеиновые кислоты – важнейшие биополимеры, осуществляющие хранение и передачу генетической информации в живой клетке.

ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) — сложное органическое соединение, являющееся материальным носителем наследственной информации. Структура ДНК была смоделирована в 1953 г. в США учеными Д. Уотсоном и Ф. Криком. ДНК представляет собой двойной неразветвленный линейный полимер, закрученный спирально, за исключением одноцепочечной молекулы ДНК вирусов и кольцевой ДНК бактерий, плазмид и митохондрий. Мономерами ДНК являются нуклеотиды. Каждый нуклеотид состоит из азотистого основания, остатка фосфорной кислоты и углевода дезоксирибозы. В одной молекуле ДНК насчитывается 10-25 тыс. нуклеотидов четырех типов, различающихся по азотистому основанию: в адениловый (А) нуклеотид входит аденин, в гуаниловый (Г) — гуанин, в тимидиловый (Т) — тимин, в цитидиловый (Ц) — цитозин. Нуклеотиды двух цепочек ДНК соединены комплементарно (дополняя друг друга) через азотистые основания водородными связями: А = Т, Г = Ц, а внутри одной цепочки — через остатки фосфорной кислоты. ДНК существует в трех формах: ядерная (в хромосомах), митохондриальная и пластидная. Количество ДНК в ядре строго постоянно: например, у человека в соматических клетках $6,6 \cdot 10^{12}$ г, в половых — $3,3 \cdot 10^{12}$ г. Молекулы ДНК во много раз больше макромолекул белка. Длина одной молекулы составляет десятки и сотни микрон; молекулярная масса — десятки и сотни углеродных единиц (например, у ДНК некоторых вирусов — 150 млн у. е.). Уникальное свойство молекулы ДНК — репликация, т. е. способность к самоудвоению. Структура ДНК каждой особи постоянна, стабильна. Изменение молекулы ДНК (генная мутация) приводит к появлению новых признаков и свойств организма, так как вызывает синтез новых белков.

РНК (рибонуклеиновая кислота) — сложное органическое соединение, относящееся к группе нуклеиновых кислот. Известна в четырех формах: информационная (иРНК), рибосомальная (рРНК), транспортная (тРНК) и генетическая (у некоторых вирусов). Количество РНК в клетке непостоянно, так как она синтезируется по мере необходимости на молекуле ДНК. В клетке РНК находится в ядре, цитоплазме, митохондриях и пластидах. Все формы РНК принимают участие в биосинтезе белка, поэтому играют роль посредников между генами (ДНК) и белковыми молекулами, синтезируемыми в соответствии с генетической программой. По строению РНК представляет собой одинарную полинуклеотидную цепочку, которая может образовывать спираль (иРНК) или спаренные спирализованные участки (тРНК). РНК — полимер, мономерами которого являются нуклеотиды. В состав РНК входят нуклеотиды четырех типов, различающиеся по азотистому основанию: аденин входит в состав аденилового нуклеотида (А), гуанин — гуанилового (Г), урацил — уридилового (У), цитозин — цитидилового (Ц). Кроме того, в каждом нуклеотиде имеются углевод рибоза и остаток фосфорной кислоты. Нуклеотиды в цепочке соединены ковалентными связями между рибозой одного нуклеотида и остатком фосфорной кислоты другого. При синтезе РНК на ДНК нуклеотиды присоединяются по принципу комплементарности: гуаниловый к цитидиловому (Г = Ц), уридиловый к адениловому (У = А), т. е. уридиловый нуклеотид

замещает тимидиловый, аналогичный ему по строению и размерам. Каждый вид РНК выполняет свою функцию, поэтому их молекулы различаются по строению, размеру, молекулярной массе. Но в любом случае молекула РНК меньше ДНК. Транспортные РНК (их 20 видов) образуются в ядре на ДНК, затем переходят в цитоплазму. Они имеют самые короткие молекулы из 80-100 нуклеотидов с кодовым триплетом на одном конце (антикодон) и «посадочной площадкой» на другом. Их функция — транспортировка аминокислот к рибосомам, где идет сборка белковой молекулы. Информационная РНК синтезируется также в ядре на молекуле ДНК по принципу комплементарности (транскрипция), после чего она переходит в цитоплазму. Здесь иРНК образует комплекс с рибосомами, и осуществляется сборка молекул белка (трансляция). В период активного синтеза образуется до 1000 молекул иРНК с одного гена. Молекулярная масса иРНК составляет от 100 тыс. до 1 млн углеродных единиц, длина также различна. Рибосомальная РНК оставляет до 80% всей РНК клетки. Она также синтезируется на ДНК (вторичная перетяжка ядрышковой хромосомы) и, войдя в состав субъединиц рибосом, выходит в цитоплазму. Ее молекулы самые крупные и состоят из 3-5 тыс. нуклеотидов. Все виды РНК, за исключением генетической РНК вирусов, неспособны к самоудвоению и самосборке.

Таблица Сравнительная характеристика ДНК и РНК

Признаки	ДНК	РНК
Местонахождение в клетке	Ядро, митохондрии	Ядро, рибосомы, цитоплазма, митохондрии
Местонахождение в ядре	Хромосомы	Ядрышко ядрышковых хромосом
Строение макромолекулы	Двойной неразветвленный линейный полимер, свернутый правозакрученной спиралью, связи - водородные	Одинарная полинуклеотидная цепочка
Мономеры	Дезоксирибонуклеотиды	Рибонуклеотиды
Состав нуклеотида	Азотистое основание (пуриновое – аденин, гуанин; пиримидиновое – тимин, цитозин); дезоксирибоза (углевод); остаток фосфорной кислоты	Азотистое основание (пуриновое – аденин, гуанин; пиримидиновое – урацил, цитозин); рибоза (углевод); остаток фосфорной кислоты
Типы нуклеотидов	Адениловый (А), гуаниловый (Г), тимидиловый (Т), цитидиловый (Ц)	Адениловый (А), гуаниловый (Г), уридиловый (У), цитидиловый (Ц)
Свойства	Способна к самоудвоению по принципу комплементарности (редупликации): А = Т, Т = А, Г ≡ Ц, Ц ≡ Г. Стабильна.	Не способна к самоудвоению. Лабильна. (Генетическая РНК вирусов способна к редупликации)
Функции	Химическая основа хромосомного генетического материала (гена); синтез ДНК; синтез РНК;	Информационная (иРНК) – передает код наследственной информации о первичной

	информация о структуре белков	структуре белковой молекулы; Рибосомальная (рРНК) – входит в состав рибосом; Транспортная (тРНК) – переносит аминокислоты к рибосомам; Митохондриальная и пластидная – входят в состав рибосом этих органелл
--	-------------------------------	---

Таблица . Функции нуклеотидов в клетке

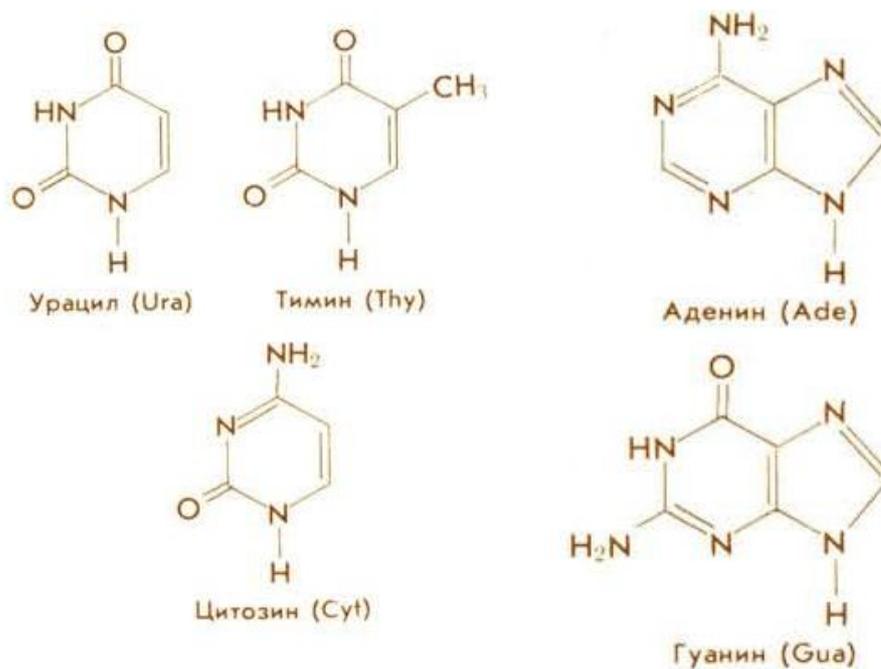
Функция	Примеры
Структурная	Являются мономерами нуклеиновых кислот
Энергетическая	Аденозинтрифосфорная кислота (АТФ) является универсальным переносчиком и хранителем энергии в клетке
Каталитическая	1. Нуклеотиды могут являться предшественниками ряда витаминов (тиамина, рибофлавина, фолиевой кислоты, витамина В12) – коферментов некоторых ферментов. 2. Акцепторы водорода НАД, НАДФ, ФАД, участвующие в окислительно-восстановительных реакциях, являются производными нуклеотидов.
Регуляторная	Производное аденозина – циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) регулирует активность ферментов, являясь посредником между гормонами и ферментами.

Строение нуклеиновых кислот

Нуклеиновые кислоты представляют собой биополимеры, построенные из нуклеотидов, соединенных фосфодиэфирной связью. Каждый нуклеотид, в свою очередь, состоит из остатков гетероциклического основания, углевода и фосфорной кислоты.

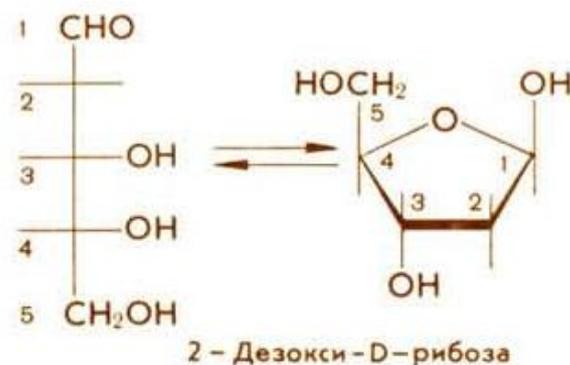
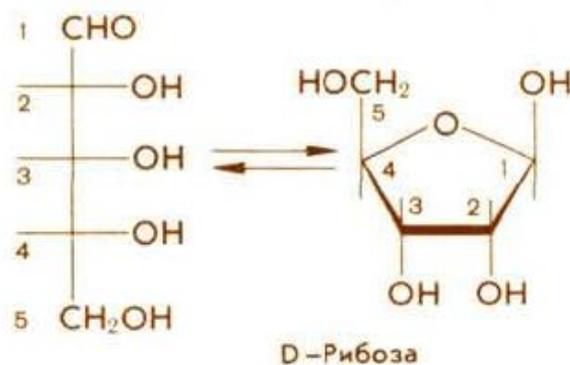
Одним из важнейших компонентов нуклеиновых кислот являются гетероциклические основания. Все они представляют собой производные пурина или пиримидина.





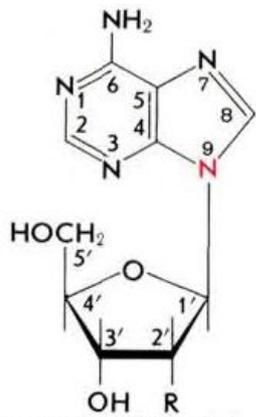
В соответствии с принятой номенклатурой основания могут записываться трехбуквенным кодом, представляющим три первые буквы латинского названия.

Нуклеозиды. В составе нуклеиновых кислот гетероциклические основания связаны с D-рибозой в РНК или с 2-деоксирибозой-D-рибозой в ДНК, образуя соединения, называемые соответственно рибонуклеозидами или дезоксирибонуклеозидами. Нуклеозиды являются β -N-пентафуранозидами гетероциклических оснований.

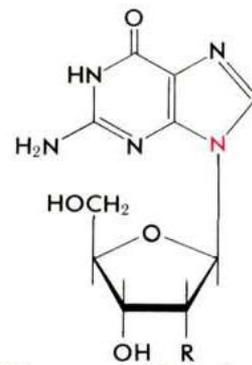


Пиримидиновые основания соединяются с углеводом своими N-1, а пуриновые – N-9 атомами азота. Нуклеозиды, содержащие аденин и гуанин, называются аденозином или дезоксиаденозином и гуанозином или дезоксигуанозином. Нуклеозиды – производные урацила и цитозина называются соответственно уридином или дезоксиуридином и цитозинм или дезоксицитозином. Дезоксирибопроизводное тимина принято называть тимидином, а рибопроизводное – риботимидином.

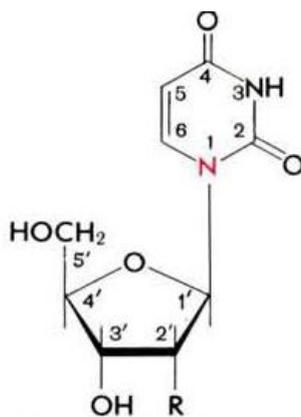
Для сокращения названий нуклеозидов используется трехбуквенное обозначение или однобуквенный код. В первом варианте к двум начальным буквам латинского названия нуклеозида добавляется третья так, чтобы отличить название нуклеозида от названия основания (например, Adenine = Ade, Adenozine = Ado). Во втором варианте используются начальные буквы латинских названий. Дезоксинуклеозиды отличаются от рибонуклеозидов добавлением префикса d; dAdo, dThd или dA, dT и т.д. Для обозначения любого нуклеозида применяется символ N, для пиримидинового нуклеозида символ Y, пуринового – символ R.



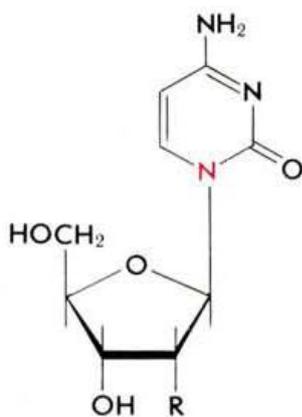
R=OH, аденозин (A, Ado)
R=H, дезоксиаденозин (dA, dAdo)



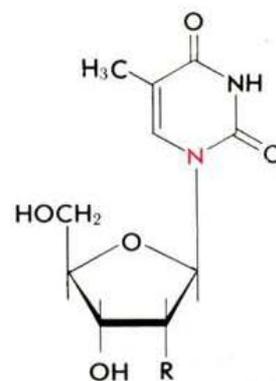
R=OH, гуанозин (G, Guo)
R=H, дезоксигуанозин (dG, dGuo)



R=OH, уридин (U, Urd)
R=H, дезоксиуридин (dU, dUrd)



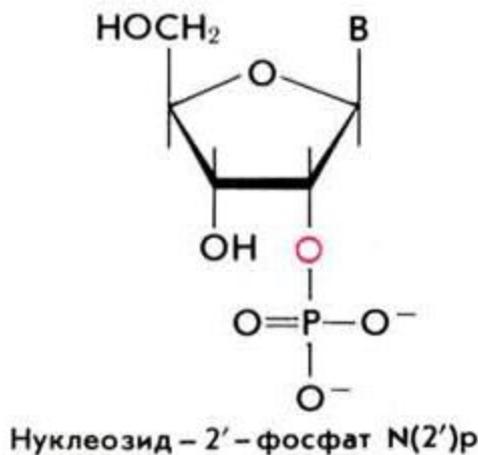
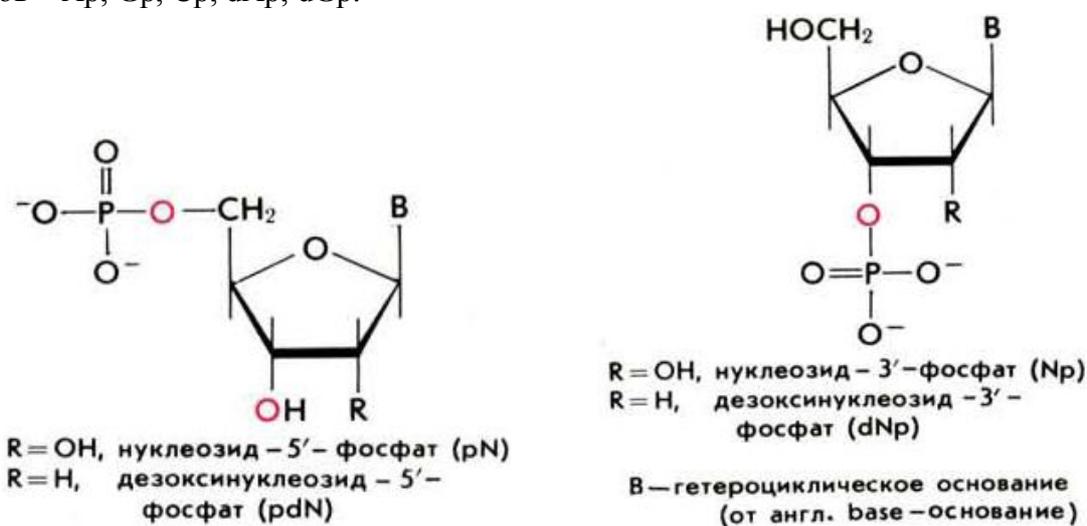
R=OH, цитидин (C, Cyd)
R=H, дезоксцитидин (dC, dCyd)



R=OH, риботимидин (T, Thd)
R=H, тимидин (dT, dThd)

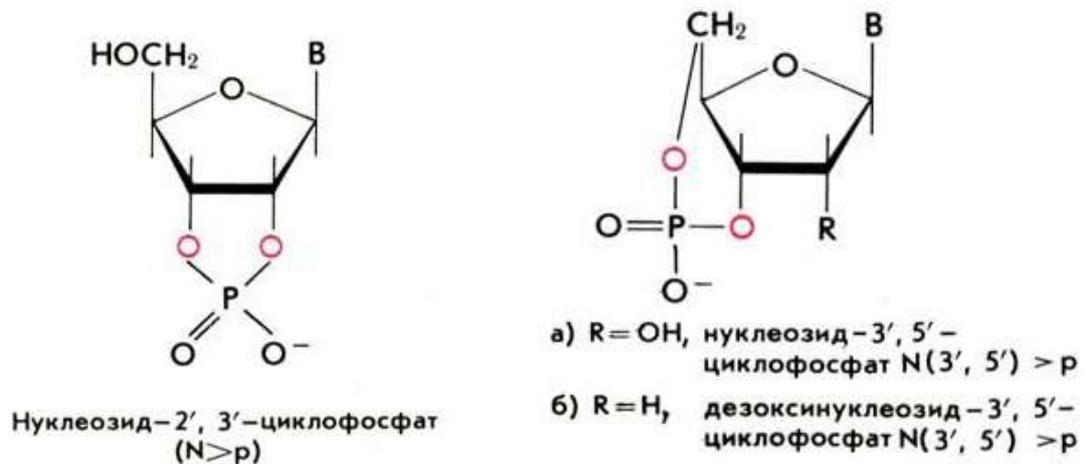
Для того чтобы различать номера атомов оснований и атомов сахара, к последним в нуклеозидах добавляется сверху штрих. Например, С-3 углеродный атом рибозы в нуклеозиде называется С-3' атомом, а связанный с ним гидроксил – 3'-гидроксидом.

Нуклеотиды. Третий компонент нуклеиновых кислот – ортофосфорная кислота – образует сложноэфирные связи со спиртовыми группами рибозы или дезоксирибозы. Путем расщепления нуклеиновых кислот в контролируемых условиях удается выделить сложные эфиры нуклеозидов и фосфорной кислоты – нуклеотиды. Названия нуклеотидов производятся от названия гетероциклического основания, входящего в состав, с добавлением слова «кислота»: цитидиновая кислота, адениловая кислота и т.д. В современной номенклатуре указываются также положения фосфатной группы или групп (аденозин-5'-фосфат, аденозин-3'-фосфат, дезоксиаденозин-5'-фосфат); часто используются буквенные сокращения: для 5'-фосфатов – рА, рG, рC, рN, рdА, рdG, для 3'-фосфатов – Ар, Gр, Ср, dАр, dGр.

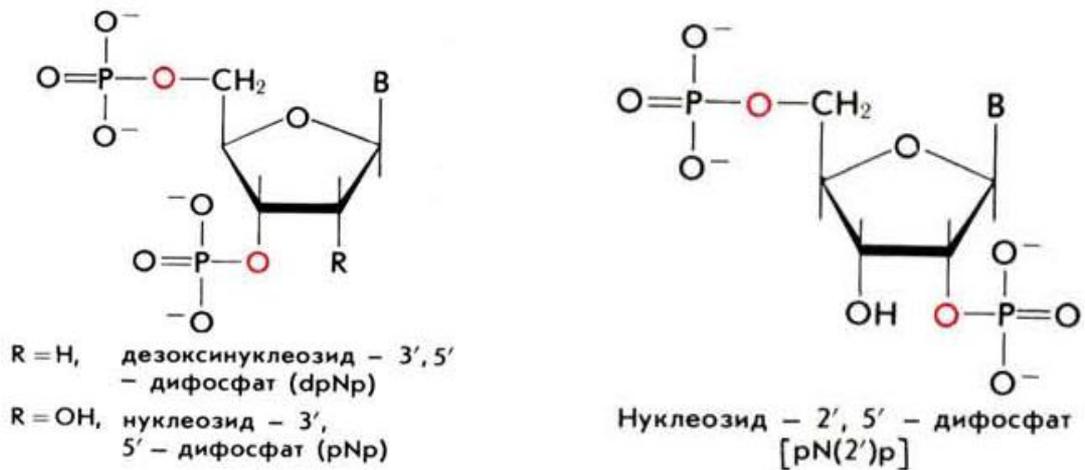


При определенных условиях расщепления рибонуклеиновых кислот образуются циклические фосфаты, представляющие собой диэфиры ортофосфорной кислоты с 2'- и 3'-гидроксильными группами рибозы. Они называются нуклеозид-2', 3'-циклофосфатами и обозначаются N > p (например, аденозин-2', 3'-циклофосфат, или А > p). Циклофосфаты типа (а) N(3', 5') > p не образуются при расщеплении нуклеиновых кислот. Некоторые из

них, например аденозин-3', 5'-циклофосфат, являются продуктами ферментативных реакций, протекающих в клетке, и играют важную биологическую роль.



При гидролизе нуклеиновых кислот могут образовываться нуклеотиды, содержащие два остатка фосфорной кислоты, один из которых связан с 5'-гидроксильной, а другой с 3'- или 2'-гидроксильной группами. Такие производные называют нуклеозид-3', 5'- или нуклеозид-2', 5'- дифосфатами.



Олиго- и полинуклеотиды. Олигонуклеотидами называют полимеры, в которых несколько нуклеозидов (до 20) соединены друг с другом фосфодиэфирными связями; более длинные цепи называют полинуклеотидами.

В обычных нуклеиновых кислотах 5'-гидроксильная группа одного нуклеозида связана с 3'-гидроксильной группой другого посредством остатка фосфорной кислоты, образующей с этими группами сложноэфирные связи. Простейшими олигонуклеотидами являются динуклеозидмонофосфаты [нуклеотидил-(3' → 5') - нуклеозиды]. В молекуле аденилил-(3' → 5')-цитидина два углеводных остатка неодинаковы с химической точки зрения. Тот, который принадлежит аденозину, имеет свободную 5'-гидроксильную группу, тогда как его 3'-гидроксильная группа участвует в образовании фосфодиэфирной связи. Другой, принадлежащий цитидину, напротив, содержит свободную 3'-гидроксильную группу, а его 5'-гидроксильная группа вовлечена в образование фосфодиэфирной связи.

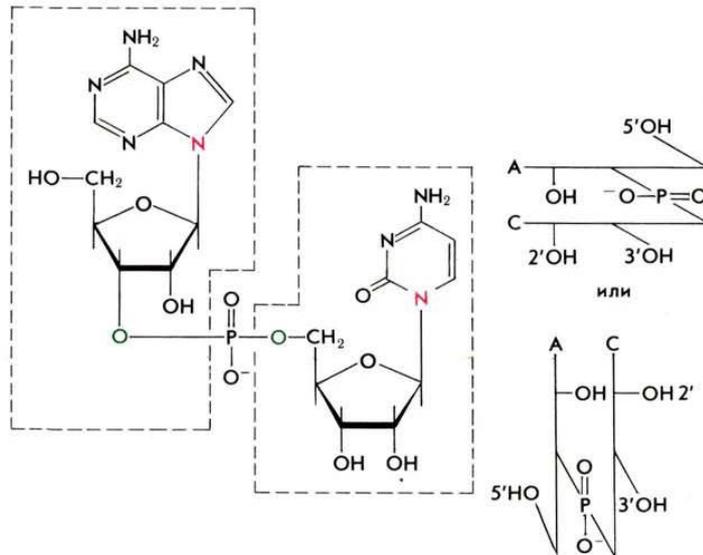


Рисунок 173 – Аденилил-(3' → 5') - цитидин (ApC)

Нуклеозид со свободной 5'-ОН-группой называется 5'-концевым, нуклеозид со свободной 3'-ОН-группой – 3'-концевым. Это определение относится и к более длинным олигонуклеотидам, например тетраонуклеотиду, изображенному на рисунке. Для простоты написания и произношения нуклеозиды обозначаются обнуквенным кодом и нуклеотидные цепи записываются слева направо, начиная с 5'-концевого нуклеозида в порядке следования мономерных звеньев.

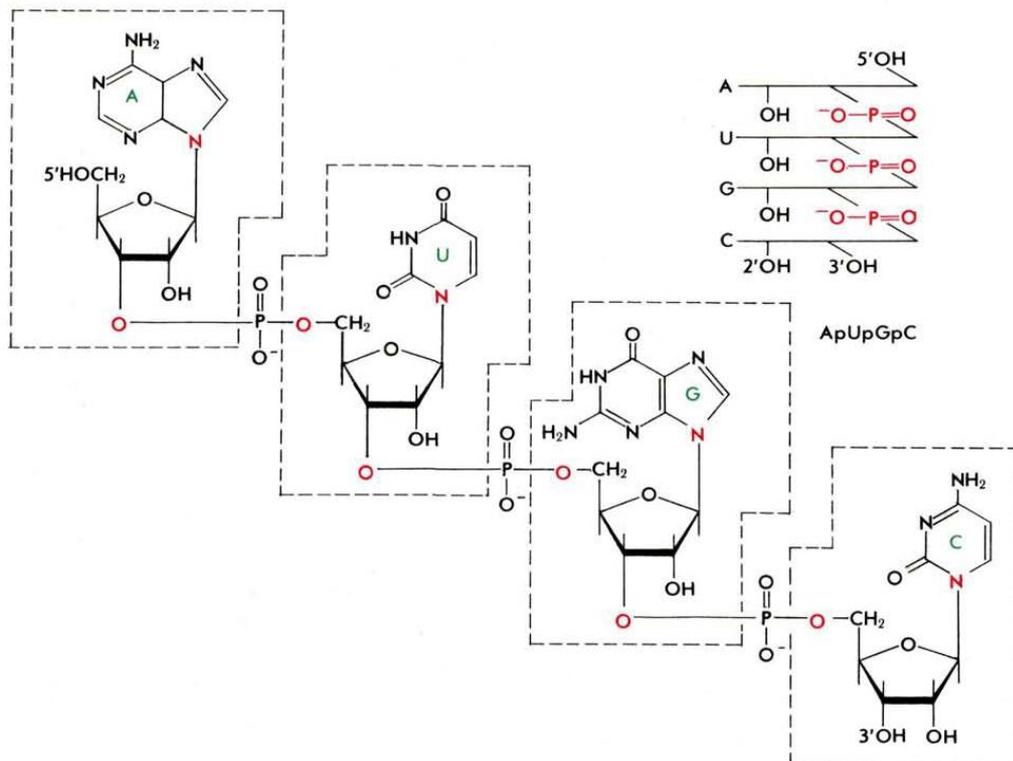


Рисунок – Аденилил-(3' → 5')-уридил-(3' → 5')-гуанилил-(3' → 5')-цитидин (ApUpGpC)

Пространственное строение ДНК и РНК

Двуспиральные полинуклеотиды. В большинстве случаев ДНК существует в виде «двойной спирали» Уотсона – Крика (Рис.191). Ее основные характеристики сводятся к следующему. Две полидезоксирибонуклеотидные цепи соединены друг с другом с помощью водородных связей и образуют правовинтовую спираль вокруг общей оси. Цепи двойной спиралей антипараллельны и комплементарны, т.е. образование водородных связей (поперечных) всегда происходит между основаниями С и G или А и Т.

Гетероциклические основания обращены внутрь двойной спирали, и их плоскости приблизительно перпендикулярны ее оси. Двойная спираль в первом приближении регулярна, т.е. все ее витки имеют практически одинаковые размеры, на каждый виток приходится одинаковое число пар оснований и каждая пара оснований повернута относительно другой на один и тот же угол. С наружной стороны спирали находится гидрофильный углеводно-фосфатный остов.

Комплементарность двух цепей приводит к очень простому принципу удвоения генов, или репликации (рис 193). Для этого достаточно, чтобы цепи ДНК разделились и на каждой из них была синтезирована новая комплементарная цепь. В результате образуются две дочерние молекулы ДНК, идентичные исходной.

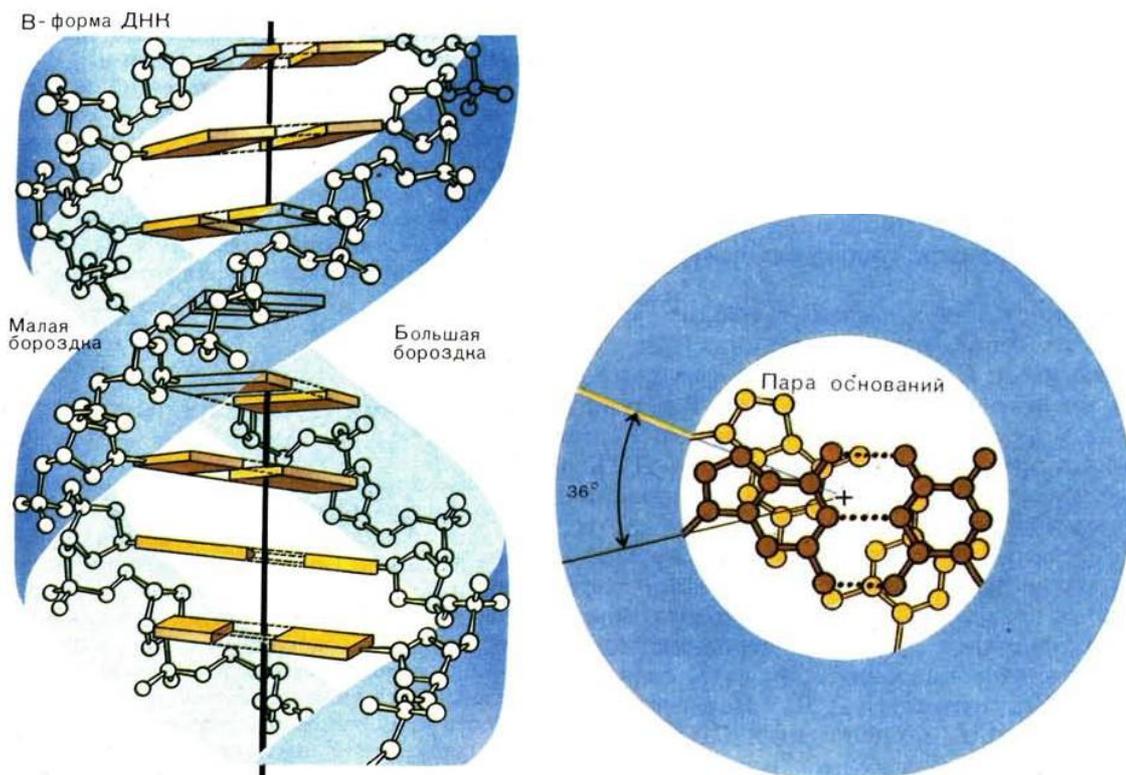


Рисунок 191 – ДНК в В-форме.

Рассмотрим более детально конформационные характеристики двойные спирали ДНК (Рис 192). Шагом спирали (H) называют длину одного витка; расстояние между соседними звеньями обозначается h , а число звеньев на один шаг n . Видно, $h = H/n$. Угол поворота на один остаток $t = h/H \cdot 360$.

Конформации двойной спирали ДНК могут существенно различаться между собой, что прежде всего определяется изменениями торсионных углов. Каждая конформация

ДНК, согласно принятой номенклатуре, может быть описана семибуквенным обозначением торсионных углов α , β , γ , δ , ϵ , ζ и χ в порядке следования связей в нуклеотидной единице. Как видно из рисунков, плоскости пар оснований в В-форме ДНК практически перпендикулярны оси спирали, проходящей через центр каждой пары. Геометрические характеристики В-формы: $h = 0,34$ нм, один виток спирали содержит 10 п.о. и его длина (H) равна 3,4 нм.

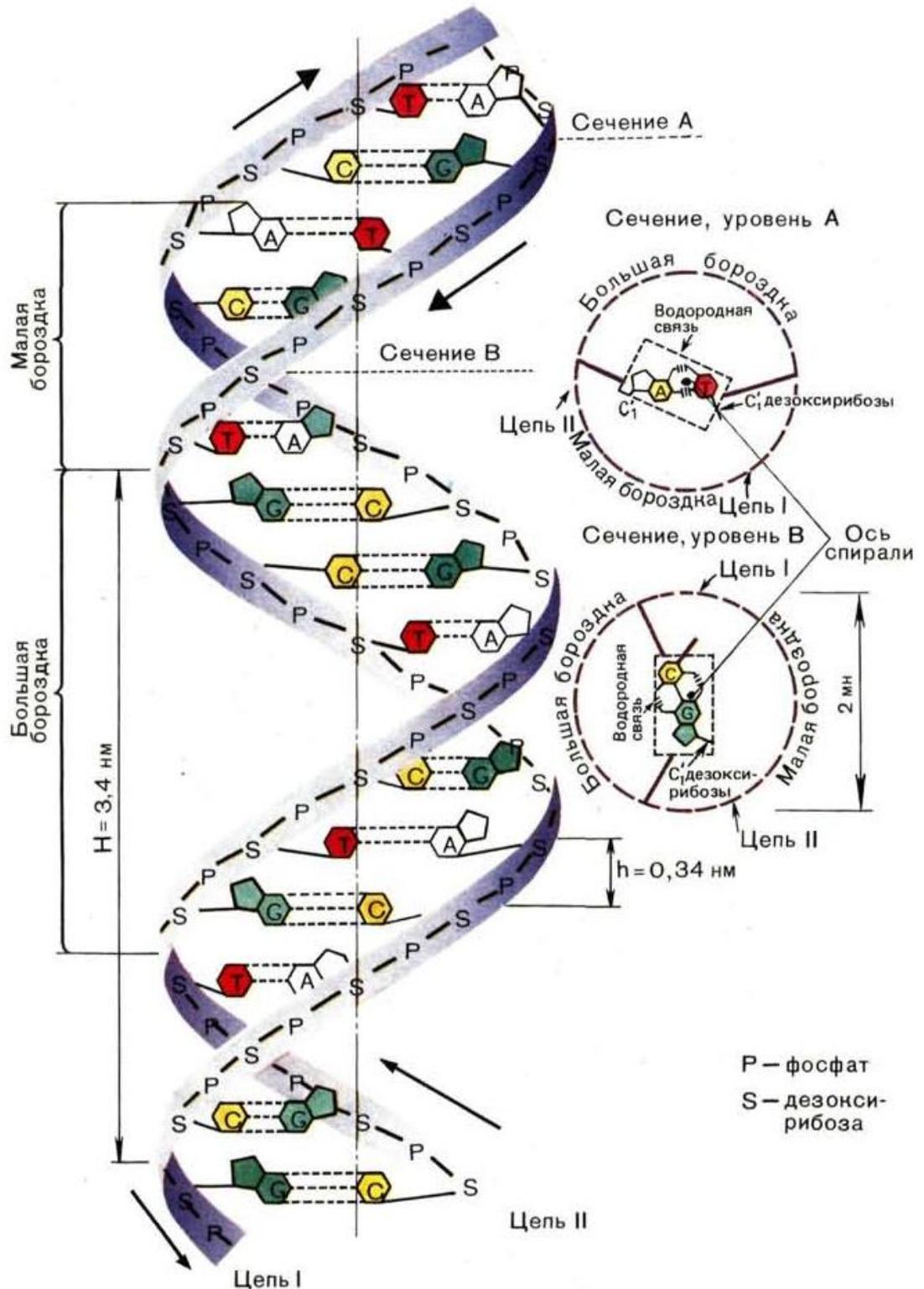


Рисунок 192 – Конформационные характеристики двойной спирали ДНК в В-форме.

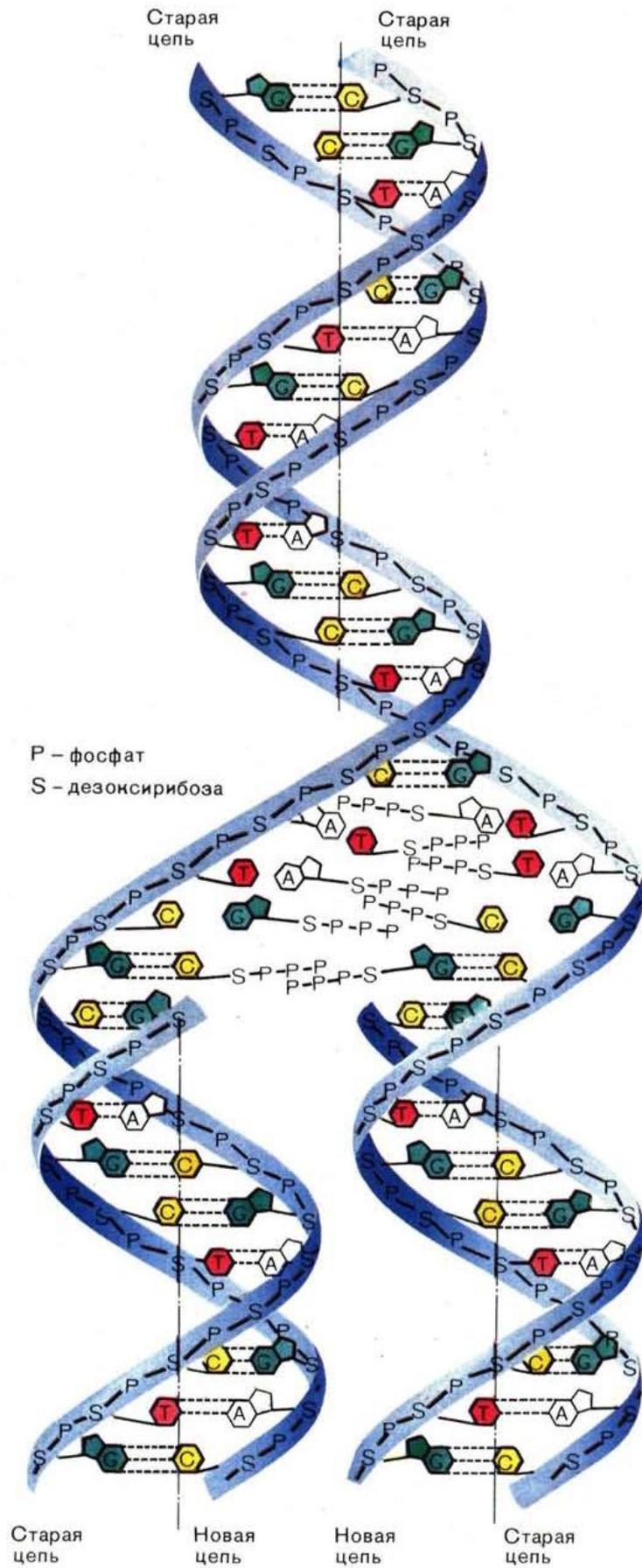


Рисунок 193 – Репликация в ДНК.

Конформация одноцепочечных нуклеиновых кислот.

Конформация тРНК. Транспортные РНК выполняют в клетках разнообразные функции. Однако основная из задач заключается в осуществлении трансляции. В 1965 г. Р.Холли установил первичную структуру тРНК из дрожжей. Тогда же, исходя из представления, что наиболее стабильное состояние тРНК соответствует образованию максимально возможного количества водородно-связанных пар оснований, а также основываясь на экспериментальных данных по неравномерному гидролизу молекулы рибонуклеазами, Р.Холли предложил модель вторичной структуры тРНК необычной формы – с чередующимися одно- и двухцепочечными участками – и назвал эту структуру «клеверным листом» (Рис. 197).

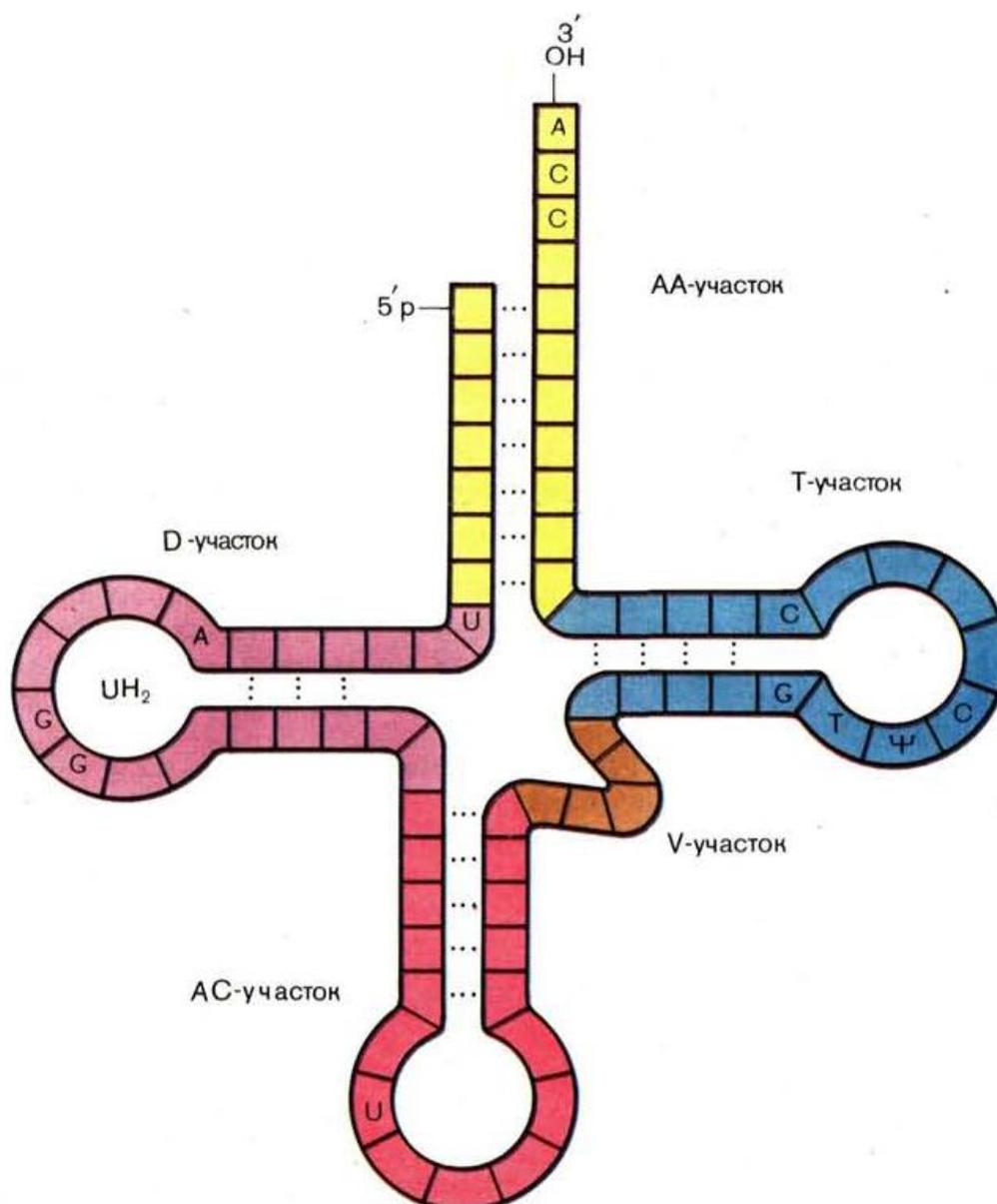


Рисунок 197 – Структура «клеверного листа» тРНК

Структура «клеверный лист» характеризуется пятью ответвлениями («лепестками»), в составе которых имеется одноцепочечный участок и двухцепочечный стебель. Каждому ответвлению присвоено свое название либо по структурному, либо по

функциональному признаку: участок, включающий 3'-концевое звено тРНК, к которому присоединяется аминокислота, получил название аминокислотного (АА); содержащий в петле антикодон – антикодона (АС); участок, в петле которого содержится общая для всех тРНК последовательность ТψС – Т-участка; участок, содержащий дигидроуридины, - D-участка. Наконец, фрагмент структуры, расположенный между Т- и АС-ответвлениями, имеет для всех тРНК различные размеры и называется варибельным V-участком.

Структура типа «клеверный лист» объясняет характерную реакционную способность нуклеотидных звеньев в разных участках тРНК по отношению к химическим агентам и к действию рибонуклеаз. Однако гидродинамические характеристики молекулы свидетельствовали о ее более компактной упаковке, которая могла бы осуществляться за счет третичной структуры. Способ образования третичной структуры стал ясен после рентгеноструктурного анализа первой тРНК, которую удалось получить в кристаллическом состоянии (тРНК из дрожжей). Рентгеноструктурные исследования были выполнены одновременно двумя группами – в лабораториях А. Рича (США) и А. Клуга (Великобритания). Третичная структура молекулы тРНК изображена на рисунке 198, она напоминает латинскую букву L.

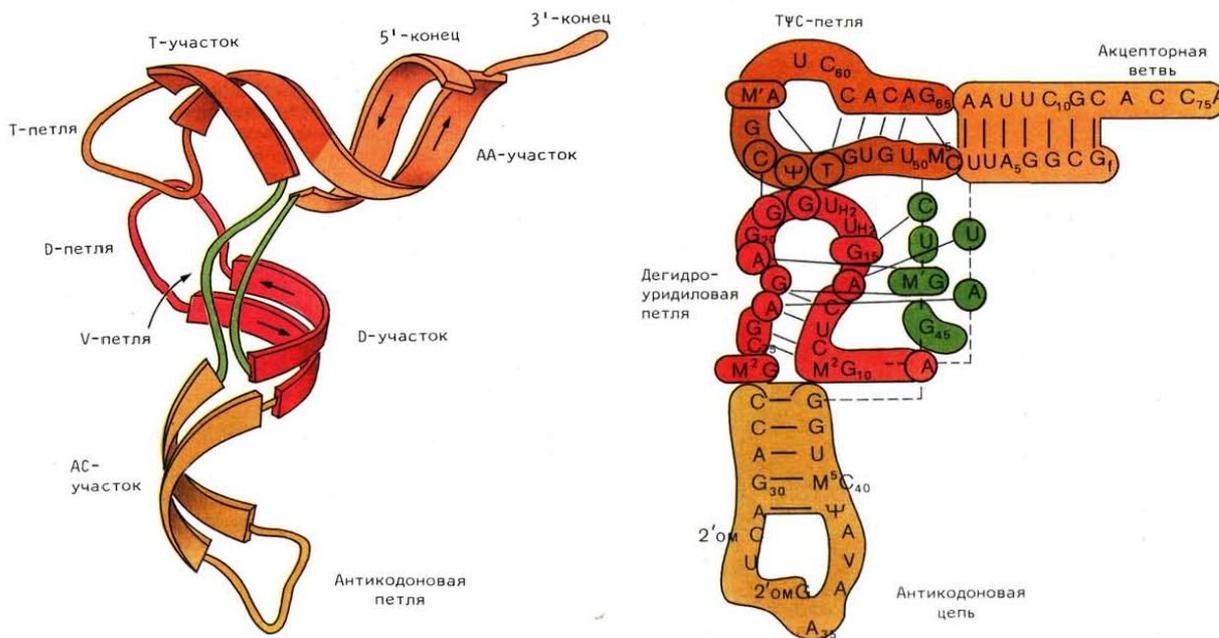


Рисунок 198 – Пространственная структура тРНК из дрожжей

Определение первичной структуры

Общие принципы расшифровки первичной структуры нуклеиновых кислот те же, что и в случае других биополимеров. Полинуклеотидная цепь расщепляется с помощью ферментов и химических агентов, обладающих повышенной избирательностью, на фрагменты, которые дешифруются специфическими методами, и затем реконструируется вся цепь.

Блочный метод

Принцип блочного метода определения последовательности показан на рисунке 175. Олигонуклеотид неизвестной структуры расщепляется двумя способами: X и Y,

использования ДНК-полимеразы из термофильных бактерий. Эти ферменты способны выдерживать множество циклов реакции, что позволяет автоматизировать проведение ПЦР. Одна из наиболее часто использовавшихся термостабильных ДНК-полимераз была выделена из бактерий *Thermus aquaticus* и названа *Taq*-ДНК-полимеразой.

Суть метода. Метод основан на многократном избирательном копировании определенного участка ДНК при помощи фермента *Taq*- ДНК-полимеразы. Полимеразная цепная реакция позволяет получить амплификаты длиной до нескольких тысяч пар нуклеотидов. Для увеличения длины ПЦР-продукта до 20-40 тыс. пар нуклеотидов применяют смесь различных полимераз, но все равно это значительно меньше длины хромосомной ДНК эукариотической клетки.

Реакция проводится в программируемом термостате (амплификаторе) - приборе, который может проводить достаточно быстро охлаждение и нагревание пробирок (обычно с точностью не менее 0,1 °С). Амплификаторы позволяют задавать сложные программы, в том числе с возможностью «горячего старта» и последующего хранения. Для ПЦР в режиме реального времени выпускают приборы, оборудованные флуоресцентным детектором. Существуют также приборы с автоматической крышкой и отделением для микропланшет, что позволяет встраивать их в автоматизированные системы.

Обычно при проведении ПЦР выполняется 20-45 циклов, каждый из которых состоит из трех стадий: денатурации, отжига праймеров, элонгации (рис. 6.1 и 6.2). На рис. 6.1 представлена динамика изменения температуры в пробирке при проведении цикла ПЦР.

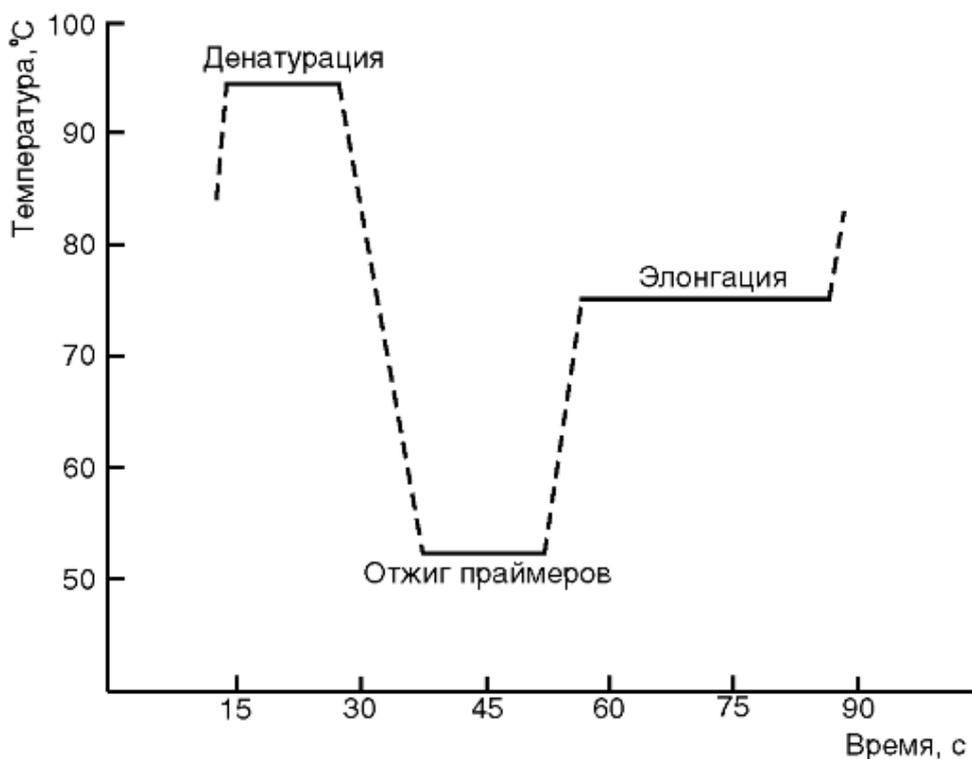


Рисунок 6.1 - График изменения температуры в пробирке в течение одного цикла полимеразной цепной реакции

Денатурация ДНК-матрицы проводится с помощью нагревания реакционной смеси до 94-96 °С на 5 – 90 сек., чтобы цепи ДНК разошлись. Следует отметить, что перед первым циклом осуществляют предварительный прогрев реакционной смеси в течение 2-5 мин для полной денатурации исходной матрицы, что позволяет снизить количество неспецифичных продуктов реакции.

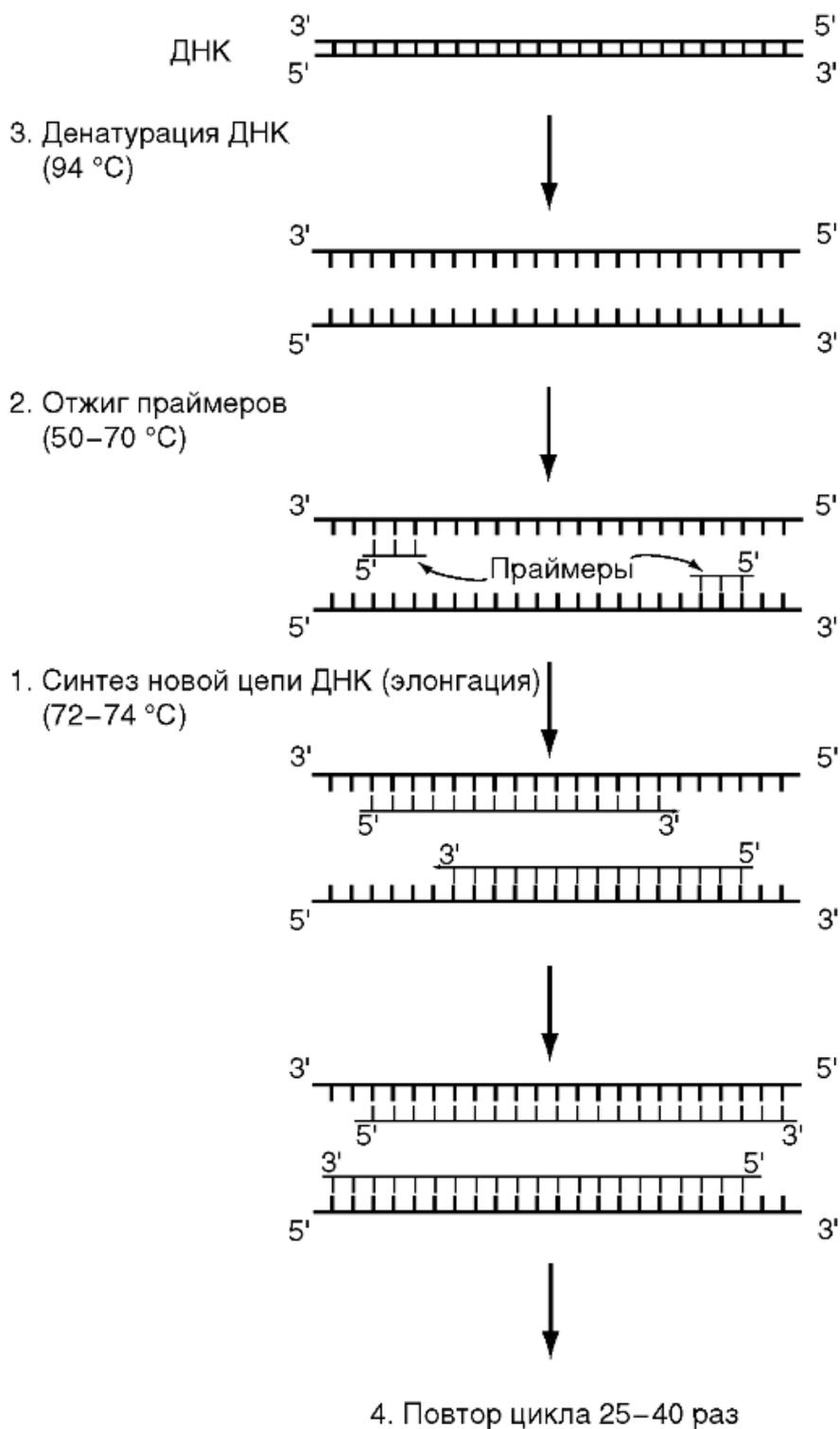


Рисунок 6.2 - Схема первого цикла полимеразной цепной реакции

Стадия отжига праймеров.

При плавном снижении температуры праймеры комплементарно связываются с матрицей. Температура отжига зависит от состава праймеров и обычно она на 4-5° ниже расчетной температуры плавления. Длительность стадии - 5-60 с. Во время следующей стадии - **элонгации**- происходит синтез дочерней цепи ДНК на матрице материнской. Температура элонгации зависит от полимеразы. Часто используемые ДНК-полимеразы Taq и Pfu наиболее активны при 72 °С. Время элонгации, в основном зависящее от длины ПЦР-продукта, обычно составляет 1 мин на каждую тысячу пар оснований. После проведения ПЦР проба инкубируется при температуре 72 °С в течение 10 мин. Количество специфического продукта реакции (ограниченного праймерами) при 100% эффективности теоретически возрастает в геометрической прогрессии по формуле $P = 2^n$, где P - количество специфического продукта, а n - число циклов реакции. Практически эффективность ПЦР меньше 100%, поэтому в действительности

$$P = (1 + E)^n,$$

где P - количество продукта; E - средняя эффективность цикла; а n - число циклов реакции.

При большем, чем указано, количестве циклов реакции происходит накопление неспецифических продуктов последней. Рост требуемого продукта в геометрической прогрессии ограничен числом реагентов, присутствием ингибиторов и побочных продуктов реакции. На последних циклах рост замедляется, это называют «эффектом плато» (рис. 6.3). Кинетика ПЦР имеет экспоненциальный характер только на начальном этапе, после чего начинается выход на плато в силу истощения в реакции компонентов (dNTP, праймеров) и нарастающего температурного повреждения Taq-ДНК-полимеразы, конкуренции за фермент амплификонов.

Компоненты полимеразной цепной реакции.

Компоненты, используемые в ПЦР, следующие: Taq-ДНК-полимераза, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, буферный раствор, «прямой» и «обратный» праймеры, а также ДНК-матрица.

Фермент Taq-ДНК-полимераза. При оптимальных условиях в реакционной смеси ПЦР (50-100 мкл) фермент содержится в количестве 0,5-2 единиц на пробу. Taq-ДНК-полимераза синтезирует цепь ДНК до 1000 пар оснований в минуту. Увеличивая время полимеризации и подбирая новые разновидности ДНК-полимеразы, обладающие и экзонуклеазной (редактирующей) активностью, вырезающей ошибочные (некомплементарные) нуклеотиды, удалось получить очень длинные амплифицированные ДНК - до 42 тыс. пар оснований (Лонг-ПЦР). Избыток Taq-ДНК-полимеразы увеличивает образование неспецифических продуктов ПЦР.

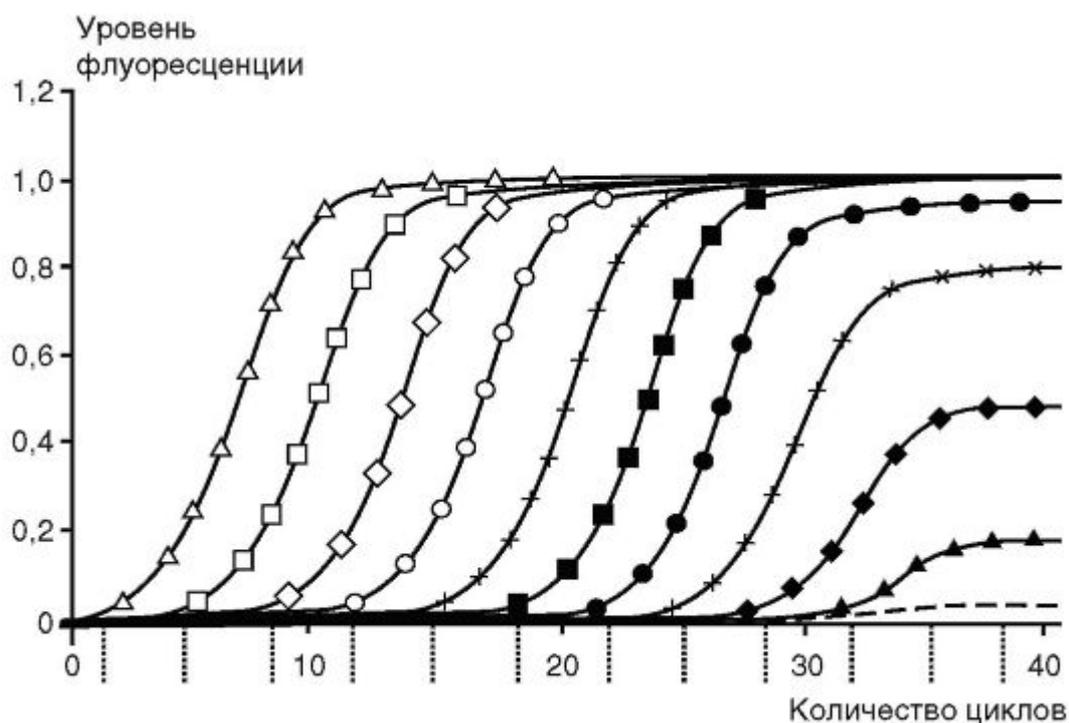


Рисунок 6.3 - Динамика накопления продукта при полимеразной цепной реакции

dNTP. Дезоксирибонуклеотидтрифосфаты (dNTP), используемые в ПЦР, следующие: dATP, dGTP, gTTP, dCTP. dNTP содержатся в реакционной смеси в эквивалентных концентрациях от 200 до 500 мкМ, так как избыток какого-либо из них увеличивает ложное спаривание нуклеотидов в ПЦР.

Праймеры. Специфичность ПЦР основана на образовании комплементарных комплексов между матрицей и праймерами, каждый из последних комплементарен одной из цепей двухцепочечной матрицы, обрамляет начало и конец амплифицируемого участка (рис. 6.4).

Поскольку праймеры каждый раз встраиваются в амплифицируемые фрагменты ДНК-матрицы (амплификоны), то они должны в реакционной смеси ПЦР присутствовать в избытке, и концентрация их составляет 0,5-1 мкМ. Специфичность получаемого продукта

ПЦР в значительной степени определяется так называемой температурой отжига праймеров, при которой они взаимодействуют с комплементарными участками ДНК-матрицы, образуя двухцепочечные структуры.

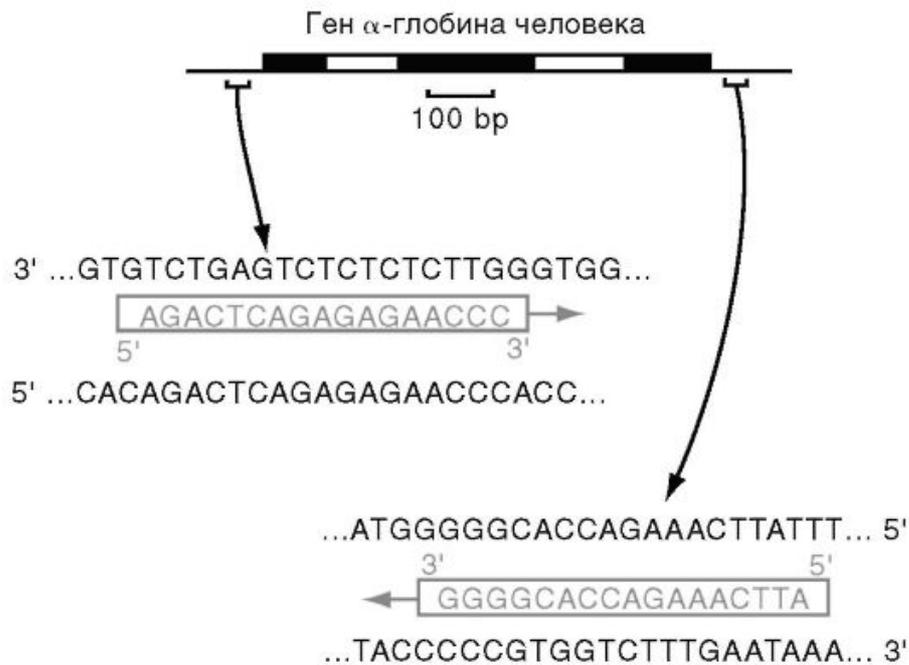


Рисунок 6.4 - Пример «прямого» и «обратного» праймеров

Буферная система. 10-кратный буфер для ПЦР чаще всего имеет состав: 0,5 М KCl; 0,2 М Tris-HCl, pH 8,4; 25 мМ MgCl₂; 1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (БСА) - пример стандартной прописи буферной системы.

Tris Cl. Высокое значение pH нужно из-за того, что при повышении температуры pH Tris-буфера падает и при 72 °C составляет ~7,5.

KCl. Средние концентрации KCl стимулируют на 40-60% активность Taq-ДНК-полимеразы (но 0,2 М полностью ингибирует полимеразную активность).

MgCl₂. Диапазон рабочих концентраций: 0,5-5 мМ. Увеличение концентрации Mg²⁺ оказывает очень резкое влияние на специфичность и эффективность ПЦР: увеличивается выход, но более высокими темпами уменьшается специфичность. Оптимум зависит от последовательностей матрицы и праймеров.

Таким образом, слишком низкая концентрация Mg²⁺ - низкий выход, слишком высокая - неспецифическая амплификация.

На молекулярном уровне: Mg²⁺ образует комплексы с dNTP's. Именно эти комплексы являются субстратом для Taq-ДНК-полимеразы. С Mg²⁺ стехиометрически связываются dNTP's, P_i, EDTA, PO₄. Повышение концентрации Mg²⁺ вызывает повышение температуры плавления ДНК.

В полимеразной цепной реакции используется вода высокой очистки (MQ). В зависимости от конструкции прибора (если «крышка» амплификатора не нагревается) в реакцию бывает необходимым на ПЦР-смесь наслаивать стерильное минеральное масло для предотвращения испарения пробы.

ДНК-матрица. Общее количество ДНК, вносимой в пробирку для ПЦР, не должно превышать 1 мкг, ибо большой избыток неспецифической ДНК снижает специфичность и чувствительность ПЦР амплификации ДНК-матрицы. Подготовка пробы материала (выделение ДНК или РНК) должна проводиться в условиях, исключающих перекрестное загрязнение исследуемых проб выделяемыми нуклеиновыми кислотами.

Чтобы ПЦР прошла успешно, должна произойти гибридизация праймеров с нужной последовательностью-мишенью. Если эта последовательность слегка различается у разных индивидуумов или у микроорганизмов из разных изолятов (т.е. имеет место полиморфизм), может произойти ее неполное спаривание с амплимером и нарушение нормальной амплификации, что приведет к получению ложноотрицательного результата. Следует отметить: у человека большая часть геномных последовательностей консервативна и не различается у разных индивидуумов, а потому обычно в таких случаях для работы подходят одинаковые наборы «консервативных» праймеров.

Контаминация. Для исключения ложноположительного результата необходимо обязательное использование чистых перчаток, одноразовых пробирок и наконечников к автоматическим пипеткам, проведение предварительной ультрафиолетовой обработки помещения и рабочих поверхностей столов и приборов. Подчеркнем: ДНКматрицы генов клеток, вирусов и бактерий пригодны для ПЦР в течение десятков лет даже после замораживания, высушивания, температурной или химической денатурации белков и др.

Чувствительность ПЦР порой достигает математически возможного предела (детекции 1 копии ДНК-матрицы), поэтому существует высокая степень опасности получения ложноположительного результата в силу переноса через предметы и реагенты как самой ДНКматрицы (реже), так и амплификатов (очень часто), получаемых в больших количествах во многих пробирках в течение ежедневной работы.

Причинами ложноположительных результатов являются следующие 3 вида контаминаций.

1. Контаминация от пробы к пробе (в процессе обработки клинических образцов или при раскапывании реакционной смеси), приводящая к появлению спорадических ложноположительных результатов.

2. Контаминация рекомбинантными плазмидами, содержащими клонированные последовательности детектируемого гена.

3. Контаминация продуктами амплификации (амплификатами). Она - наиболее частая причина ложноположительных результатов, поскольку в процессе ПЦР-генодиагностики амплификаты накапливаются в больших количествах и очень легко переносятся с аэрозолями и через приборы. Поэтому детекция продуктов ПЦР должна проводиться в изолированной комнате сотрудником, не производящим обработку клинических образцов и не готовящим реактивы для ПЦР. Приготовление основных растворов также должно производиться в отдельной чистой комнате. Все растворы следует хранить и использовать небольшими порциями.

Необходимо постоянно осуществлять собственные виды лабораторного контроля и периодически применять зашифрованные отрицательные и положительные контрольные образцы для оценки специфичности и чувствительности ПЦР-генодиагностических исследований. Неуклонно выполняя эти требования и выполняя в каждой ПЦР отрицательный контроль разных типов (на процедуру обратной транскрипции, буферный раствор, праймеры), можно практически исключить ложноположительные результаты ПЦР.

Очень важен для правильной интерпретации результатов выбор способов контроля. Положительный и отрицательный контроль должен быть хорошо охарактеризован. Часто используют ДНК из клеточных линий, заведомо содержащих или не содержащих последовательность-мишень. В каждом анализе нужны как минимум три вида контроля:

- 1) положительный контроль (образец заведомо содержит последовательность-мишень);
- 2) отрицательный контроль (образец заведомо не содержит последовательность-мишень);
- 3) бланк-контроль (реакционная смесь, в которой присутствуют все компоненты за исключением ДНК; бланк-контроль является индикатором загрязнений).

Один тип положительного контроля должен содержать максимальное число последовательностей-мишеней, другой - небольшое их число. Это позволяет определить чувствительность и эффективность ПЦР.

Детекция. Для анализа ПЦР-амплифицированной ДНК существуют разные методы: гель-электрофорез, дот-блот-гибридизацию и блот-гибридизацию по Саузерну. С их помощью можно анализировать большинство ПЦР-продуктов, но абсолютно точные результаты получают только при секвенировании. Следует отметить: в дальнейших главах будет описана модификация ПЦР - полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, в которой детекция возрастания количества ПЦР-продуктов осуществляется непосредственно в пробирке при прохождении реакции (см. ниже).

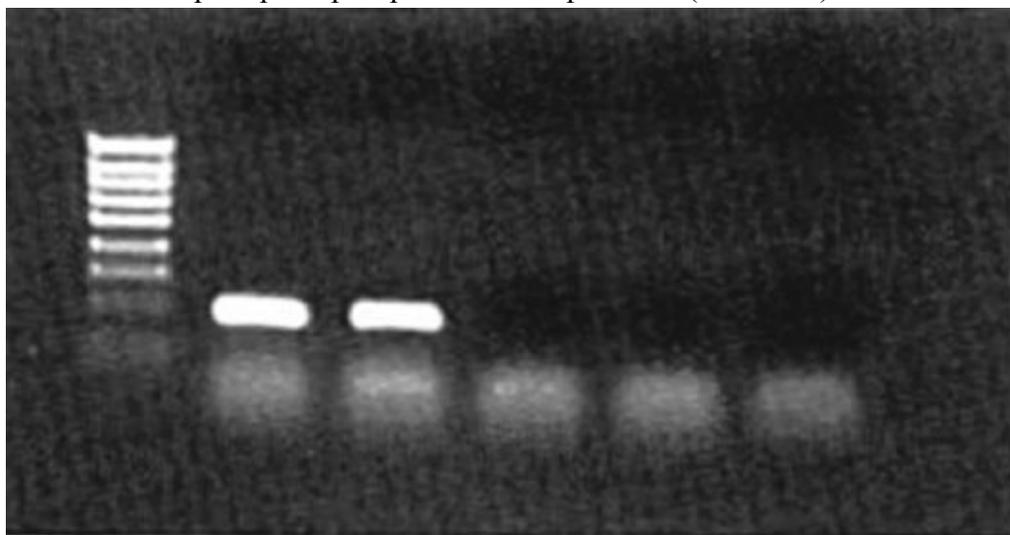


Рисунок 6.5 - Фотография электрофоретического геля с ПЦР-продуктами

Присутствие специфического ПЦР-продукта (амплификона) в подавляющем большинстве случаев детектируют электрофоретическим разделением ПЦР-амплификационной смеси на окрашенных бромистым этидием агарозном или полиакриламидном гелях. Для такого выявления необходимо не менее 20 нг ДНК. Специфичность полосы амплифицированной ДНК подтверждается ее положением (размерами) по отношению к маркерным фрагментам и ДНКстандарту. Дополнительные доказательства специфичности амплификона получают путем расщепления специфическими рестриктазными ферментами или путем гибридизации со специфическим радиоактивным или флуоресцентным олигонуклеотидным зондом.



Рисунок 6.6 - Устройство горизонтальной электрофоретической камеры

Электрофорез в агарозном геле позволяет легко, без применения радиоизотопов, обнаружить амплифицированную ДНК и определить ее размер (рис. 6.5 и 6.6). Остановимся на некоторых ее особенностях применительно к анализу ПЦР-амплифицированной ДНК:

а) 10-20 мкл амплифицированной ДНК разделяют в 2% агарозном геле вместе со стандартными фрагментами размером 50-1000 пар нуклеотидов;

б) электрофорез проводят при высоком напряжении (10-15 В/см), поскольку образующиеся при ПЦР небольшие фрагменты сложно детектировать после электрофореза в течение ночи при небольшом напряжении вследствие их интенсивной диффузии.

Разрешение можно повысить, используя полиакриламидные или агарозные гели с высокой концентрацией агарозы (3-4%). Впрочем, если анализ нужно провести быстро и с небольшими затратами, вполне приемлемы 2% агарозные гели. Обычно при амплификации ДНК, выделенной из фиксированных тканей, выход ПЦР-продуктов ниже, и они менее специфичны, чем в случае амплификации высокоочищенной ДНК.

Метод гибридизации ПЦР-амплифицированной ДНК (по Саузерну) позволяет идентифицировать полосы в геле, наблюдаемые после электрофореза амплифицированной ДНК. Для гибридизации используются как изотопно, так и неизотопно меченые зонды.

Дот-блот-гибридизация дает простой ответ по типу «да-нет» и особенно полезна в тех случаях, когда проводится анализ большого числа образцов.

Прямое секвенирование амплифицированной ДНК - также высоконадежный метод доказательства ее специфичности, но применяется в основном для определения точечных мутаций генов. В последние годы для детекции и одновременно количественной оценки амплифицированной ДНК все больше начинают применять гибридизационно-ферментный метод на микропланшетах. Но существуют и другие варианты: используются олигонуклеотидный зонд, его метят дигоксигенином или флуоресцеином с последующим проявлением моноклональными антителами к дигоксигенину или флуоресцеину; меченные ферментами моноклональные антитела к двухцепочечной ДНК; зонд, меченный рутением (электрохемилюминесцентный метод). Весьма перспективна для количественных детекций амплификатов на гель-электрофореграммах миниатюрная видеокамера, передающая на экран монитора интенсивность флуоресценции полос ДНК-

амплификонов, что позволяет одновременно получить соотношение полос ДНК-стандарта и ДНК-амплификонов исследуемого гена.

Результат ПЦР можно квалифицировать как положительный или отрицательный в зависимости от того, обнаружена в образце интересующая вас последовательность-мишень или нет. Однако нарушение нормального хода амплификации, недостаточная чувствительность метода и непредвиденный полиморфизм последовательности-мишени в области связывания праймеров или гибридизационного зонда порой обуславливают ложноотрицательный результат. При загрязнении образцов и случайной гомологии между зондом, праймерами и последовательностью, сходной с мишенью, получаются ложноположительные результаты.

Модификации. В последние годы широко используется такой простой прием, как «горячий старт ПЦР», который заключается в предварительном прогревании пробирок с ПЦР-амплификационной смесью при температуре 95 °С в течение 3-5 мин. Такой прием предупреждает амплификацию неспецифических ДНК-фрагментов

вследствие низкотемпературного, неспецифического спаривания праймеров.

При использовании РНК в качестве матриц для ПЦР предварительно на этой РНК-матрице посредством фермента РНК-зависимой ДНК-полимеразы (обратная транскриптаза, ревертаза) синтезируют комплементарную ДНК (кДНК), затем использующуюся в качестве матрицы в ПЦР. ПЦР с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР) широко применяется для детекции РНК вирусов, определения экспрессии вирусных, бактериальных и клеточных генов по их РНК.

Существуют различные модификации ПЦР, использующиеся в зависимости от конкретных целей проведения реакции или от характера последующего молекулярного анализа амплификатов. Так, для трудноамплифицируемых участков ДНК (содержащих различные повторяющиеся последовательности или необычные структурные элементы), а также в тех случаях, когда матричная ДНК присутствует в следовых количествах, ПЦР проводят в два этапа, используя в качестве матричной ДНК на втором этапе амплификации продукты ПЦР, синтезированные на первом этапе. Часто в этих случаях для повышения специфичности посадки праймеров применяют систему так называемых вмонтированных праймеров, т. е. при доамплификации в качестве праймеров выбирают последовательности, локализованные внутри амплифицированного на первом этапе участка ДНК.

В ряде случаев удобно проводить мультиплексную ПЦР, т.е. одновременную амплификацию нескольких участков матричной ДНК. Можно получать меченые продукты ПЦР, добавляя в реакционную смесь меченые dNTP. Особого внимания заслуживает возможность проведения ПЦР с молекулами кДНК. На основе этой реакции разработаны методы анализа экспрессии генов и получения больших количеств кДНК. Реакция амплификации осуществима не только в растворах, но и непосредственно на хромосомных препаратах, при этом в случае использования меченых нуклеотидов продукты амплификации гибридизуются и выявляют комплементарные им участки ДНК на хромосомах. До настоящего времени доступными амплификации были участки ДНК, не превышающие по длине 5 тыс. пар оснований. В последнее время благодаря внесению ряда кардинальных усовершенствований (особый подбор праймеров, использование сразу двух различных ДНК-полимераз, специального температурного режима полимеразных циклов) возможно проведение амплификации фрагментов ДНК, достигающих 35 тыс. пар оснований.