

Электрофорез нуклеиновых кислот и анализ продуктов амплификации

Электрофорез нуклеиновых кислот является одним из основных методов молекулярной биологии, используемых для разделения, обнаружения и анализа молекул ДНК и РНК. Метод особенно тесно связан с полимеразной цепной реакцией, поскольку после проведения классической ПЦР исследователю необходимо определить, произошла ли амплификация, соответствует ли полученный продукт ожидаемому размеру и присутствуют ли неспецифические продукты. Поэтому электрофорез можно рассматривать как важный аналитический этап, который позволяет визуально оценить результат многих молекулярно-генетических экспериментов.

Основной принцип электрофореза основан на движении заряженных молекул в электрическом поле. Молекулы ДНК и РНК содержат фосфатные группы, благодаря которым при обычных условиях имеют отрицательный заряд. Поэтому при помещении нуклеиновых кислот в электрическое поле они перемещаются в направлении положительного электрода — анода. Однако движение происходит не в свободном растворе, а через специальную пористую матрицу — гель. Эта матрица выполняет функцию своеобразного молекулярного сита и позволяет разделять фрагменты нуклеиновых кислот преимущественно по их размеру.

Для разделения ДНК наиболее часто используется агарозный гель. Агароза представляет собой полисахарид, способный при соответствующих условиях формировать трехмерную пористую структуру. Размер пор зависит, в частности, от концентрации агарозы. Благодаря наличию пор молекулы ДНК разной длины перемещаются через гель с различной скоростью. Более короткие фрагменты легче проходят через поры и обычно перемещаются быстрее и дальше, тогда как более крупные молекулы испытывают большее сопротивление и мигрируют медленнее.

Таким образом, основной принцип разделения можно сформулировать очень просто: чем меньше фрагмент ДНК, тем быстрее он обычно перемещается через агарозный гель и тем дальше проходит от места нанесения образца.

Размер фрагментов ДНК обычно выражается в парах оснований — base pairs, или bp. Например, PCR-продукт может иметь размер 150 bp, 500 bp, 1000 bp или больше. Для крупных молекул используются также килобазы — kb, причем одна килобаза соответствует приблизительно тысяче пар оснований.

Перед проведением электрофореза готовят гель соответствующей концентрации. Агарозу растворяют в электрофорезном буфере и формируют гель с лунками для внесения образцов. После затвердевания гель помещается в электрофоретическую камеру и покрывается буфером. Электрофорезный буфер необходим для поддержания подходящих химических условий и проведения электрического тока. В молекулярно-биологических лабораториях широко используются буферные системы TAE и TBE.

Исследуемые образцы ДНК смешивают с буфером для нанесения, или loading buffer. Такой буфер обычно содержит компоненты, увеличивающие плотность образца, благодаря чему он опускается в лунку, а также красители, позволяющие визуально контролировать движение фронта во время электрофореза. Необходимо понимать, что цветной tracking dye и сама ДНК — это не одно и то же. Движение красителя используется прежде всего для контроля процесса, тогда как для визуализации нуклеиновых кислот применяются специальные флуоресцентные красители.

После внесения образцов в лунки к электрофоретической камере прикладывается электрическое напряжение. Поскольку ДНК заряжена отрицательно, она начинает перемещаться от отрицательного электрода в сторону положительного. При этом короткие фрагменты движутся быстрее крупных, вследствие чего смесь фрагментов постепенно разделяется на отдельные зоны.

Сам по себе факт миграции ДНК через гель еще не позволяет увидеть ее невооруженным глазом. Для обнаружения нуклеиновых кислот используются специальные красители, которые связываются с ДНК и дают сигнал при соответствующем освещении. Исторически широко использовался бромистый этидий, однако в современных лабораториях применяются и другие флуоресцентные красители. После завершения электрофореза гель помещается в систему визуализации, где полосы ДНК регистрируются при соответствующем возбуждении флуорофора.

В результате исследователь получает изображение геля, на котором отдельные фрагменты ДНК представлены в виде полос, или bands. Каждая отчетливая полоса соответствует совокупности большого числа молекул приблизительно одинаковой длины. Положение полосы в геле дает информацию о размере фрагмента, а интенсивность сигнала может приблизительно отражать его количество, хотя обычный гель-электрофорез не следует рассматривать как высокоточный количественный метод.

Для определения размера неизвестного фрагмента одновременно с исследуемыми образцами используется молекулярный маркер, который называют DNA ladder. Он представляет собой смесь фрагментов ДНК заранее известной длины. Например, маркер может содержать фрагменты 100, 200, 300, 400, 500 bp и так далее. После электрофореза они образуют характерную последовательность полос.

Положение исследуемого PCR-продукта сравнивают с положением полос DNA ladder. Если ожидаемый ампликон имеет длину 500 bp и полоса образца находится приблизительно на уровне 500 bp маркера, это свидетельствует о соответствии наблюдаемого продукта ожидаемому размеру. Однако размер является только одним из критериев идентификации. Два различных фрагмента могут иметь одинаковую или близкую длину. Поэтому при необходимости окончательная идентификация продукта проводится дополнительными методами, например секвенированием.

Рассмотрим типичный результат классической ПЦР. Предположим, что праймеры были разработаны для получения ампликона размером 350 bp. После электрофореза в первой дорожке расположен DNA ladder. Во второй дорожке исследуется первый образец, в третьей — второй образец, а в четвертой находится отрицательный контроль.

Если во втором образце обнаружена одна четкая полоса примерно на уровне 350 bp, такой результат соответствует ожидаемой амплификации. Если в третьей дорожке отсутствует полоса, возможны разные объяснения: целевая последовательность может отсутствовать, количество матрицы может быть недостаточным, в образце могут присутствовать ингибиторы либо реакция могла пройти неэффективно. Поэтому отсутствие полосы нельзя автоматически интерпретировать без учета контролей и экспериментального дизайна.

Если в отрицательном контроле появляется полоса ожидаемого размера, это является серьезным предупреждающим признаком. Отрицательный контроль обычно не должен содержать исследуемую матрицу. Следовательно, появление продукта может указывать на контаминацию реагентов или рабочего пространства либо на другую техническую проблему. В таком случае достоверность результатов экспериментальных образцов должна быть критически оценена.

Если вместо одной полосы исследователь видит несколько полос разного размера, это может указывать на неспецифическую амплификацию. Праймеры могли

связываться не только с целевым участком, но и с другими последовательностями. Причиной могут быть неоптимальные условия реакции, недостаточная специфичность праймеров или другие факторы.

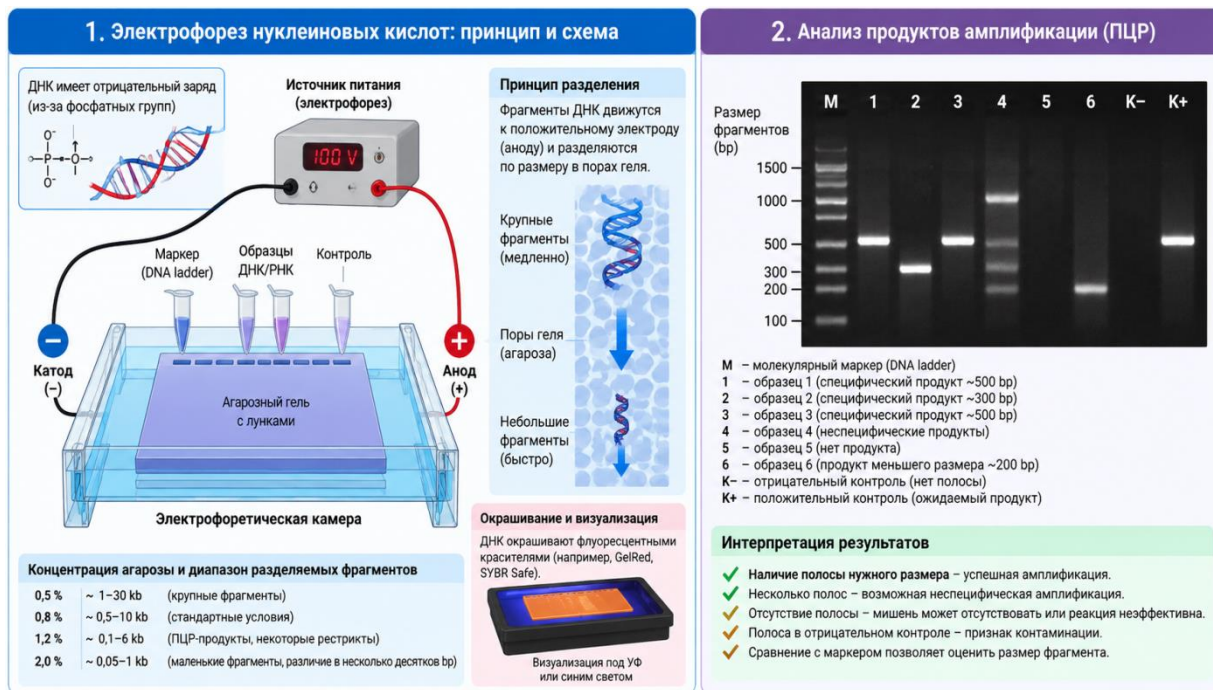
Еще одним возможным результатом является smear — размазанный сигнал по дорожке вместо четкой полосы. Smear может наблюдаться при наличии большого числа фрагментов различного размера, деградации исходной ДНК, неспецифической амплификации или перегрузке дорожки. Поэтому внешний вид геля позволяет получить дополнительную информацию о качестве реакции.

При интерпретации электрофореграммы необходимо обращать внимание не только на наличие полосы, но и на ее положение, количество полос, интенсивность, состояние отрицательного и положительного контролей и общий вид дорожек. Именно совокупность этих признаков позволяет сделать обоснованный вывод.

Важным параметром агарозного электрофореза является концентрация геля. Она определяет размер пор матрицы. При увеличении концентрации агарозы поры становятся меньше, что улучшает разделение сравнительно небольших фрагментов. При меньшей концентрации образуются более крупные поры, которые лучше подходят для разделения относительно больших молекул. Поэтому концентрация геля выбирается с учетом ожидаемого диапазона размеров исследуемых фрагментов.

Кроме агарозного электрофореза существует полиакриламидный гель-электрофорез, или PAGE. Полиакриламидная матрица обладает меньшими порами и может обеспечивать высокое разрешение при разделении относительно небольших фрагментов. Такой подход используется, когда необходимо различать фрагменты, размеры которых отличаются сравнительно незначительно.

Например, если два аллеля отличаются всего на несколько пар оснований, стандартного агарозного геля может быть недостаточно для надежного разделения. В таких случаях полиакриламидный гель способен обеспечить более высокую разрешающую способность.



Электрофорез особенно важен при PCR-RFLP. В этом методе сначала амплифицируется определенный участок ДНК, после чего PCR-продукт обрабатывается рестрикционной эндонуклеазой. Если исследуемый генетический вариант изменяет сайт рестрикции, после ферментативной обработки образуются фрагменты разной длины. Затем они разделяются электрофорезом.

Предположим, исходный PCR-продукт имеет размер 400 bp. Один вариант последовательности не содержит соответствующего сайта рестрикции, поэтому после обработки остается одна полоса 400 bp. Другой вариант содержит сайт и расщепляется на фрагменты 250 и 150 bp. У гетерозиготного образца могут наблюдаться полосы 400, 250 и 150 bp. Таким образом, характер полос позволяет определить генотип.

Аналогичный принцип используется при анализе некоторых вставок и делеций. Если два аллеля отличаются длиной определенного участка, PCR-продукты могут иметь различный размер. После электрофореза образец с одним аллелем дает полосу одного размера, другой аллель — полосу другого размера, а гетерозиготный образец может содержать обе полосы.

Таким образом, электрофорез позволяет анализировать не только факт успешности ПЦР, но и генетические различия, если они приводят к изменению размера ампликона или рестрикционных фрагментов.

Необходимо различать аналитический и препаративный электрофорез. При аналитическом электрофорезе основной целью является получение информации о размере, количестве и качестве фрагментов. При препаративном подходе интересующий фрагмент может быть выделен из геля для дальнейшей работы, например клонирования или других молекулярно-биологических процедур.

В современных лабораториях наряду с классическим гель-электрофорезом используется капиллярный электрофорез. В этом случае разделение происходит внутри тонкого капилляра, а регистрация фрагментов осуществляется автоматически. Капиллярный электрофорез обеспечивает высокую разрешающую способность и удобен для автоматизированного анализа.

Этот принцип используется, например, при анализе STR-маркеров и в некоторых технологиях секвенирования по Сэнгеру. Вместо изображения обычных полос результат может быть представлен в виде электрофореграммы, содержащей пики. Положение пика связано с размером фрагмента, а характеристики сигнала используются для дальнейшей интерпретации.

Особое внимание при проведении электрофореза необходимо уделять контролю качества. Если дорожки искривлены, полосы размыты или образцы мигрируют неравномерно, это может быть связано с качеством геля, состоянием буфера, режимом электрического поля, количеством внесенного материала или другими техническими причинами.

При анализе PCR-продуктов важно избегать перегрузки лунки. Избыточное количество продукта может приводить к очень интенсивным и широким полосам, которые затрудняют точную интерпретацию. Слишком небольшое количество ДНК, напротив, может давать слабый сигнал.

Следует также понимать ограничения гель-электрофореза. Наличие полосы ожидаемого размера не является абсолютным доказательством того, что получен именно необходимый фрагмент. Электрофорез в первую очередь сообщает информацию о размере и приблизительном количестве молекул. Для подтверждения нуклеотидной последовательности используют секвенирование или другие специфические методы.

Интерпретация результата всегда должна начинаться с контролей. Сначала оценивается DNA ladder и проверяется, корректно ли прошло разделение. Затем

рассматривается отрицательный контроль. После этого оценивается положительный контроль, если он предусмотрен экспериментом. Только после подтверждения работоспособности системы следует переходить к анализу исследуемых образцов.

Например, если положительный контроль не содержит ожидаемой полосы, отсутствие полосы в экспериментальном образце нельзя уверенно интерпретировать как отсутствие целевой последовательности. Возможно, сама PCR была неэффективной. Аналогично, если отрицательный контроль дает полосу, результаты других образцов могут быть скомпрометированы контаминацией.

Поэтому логика интерпретации должна быть следующей: сначала оцениваем качество эксперимента и контроля, затем размер продукта и только после этого делаем вывод об исследуемом образце.

Электрофорез применяется не только после ПЦР. Он используется для оценки целостности выделенной геномной ДНК, исследования РНК, анализа продуктов рестрикции, контроля плазмидной ДНК, проверки результатов клонирования и решения других молекулярно-биологических задач.

При работе с РНК необходимо учитывать ее повышенную чувствительность к деградации РНКазами. Для оценки качества РНК применяются соответствующие электрофоретические и инструментальные методы. Состояние РНК особенно важно перед исследованиями экспрессии генов и RNA-seq.

Если объединить весь процесс анализа продуктов амплификации, его можно представить следующим образом:

проведение ПЦР → получение ампликонов → подготовка геля → внесение DNA ladder и образцов → электрофоретическое разделение → визуализация полос → определение приблизительного размера продукта → оценка контролей → сравнение образцов → интерпретация результата → при необходимости подтверждение другим методом.

Следовательно, ПЦР и электрофорез являются взаимосвязанными этапами классического молекулярно-генетического анализа. ПЦР увеличивает количество определенного фрагмента ДНК, а электрофорез позволяет увидеть полученный результат и оценить его размер.

Для будущего специалиста по биотехнологии особенно важно научиться правильно читать гель. Необходимо уметь находить DNA ladder, определять направление миграции ДНК, сравнивать положение полос с маркером, отличать целевой продукт от неспецифических продуктов, распознавать smear и обязательно учитывать результаты положительного и отрицательного контролей.

Например, если ожидается продукт размером 500 bp и исследуемая дорожка содержит одну четкую полосу на соответствующем уровне, а отрицательный контроль остается пустым, результат соответствует успешной специфической амплификации. Если одновременно появляются дополнительные полосы, необходимо рассмотреть возможность неспецифической амплификации. Если ожидаемая полоса отсутствует, но положительный контроль работает, необходимо анализировать особенности конкретного образца. Если же не работает и положительный контроль, проблема, вероятнее всего, относится к самой экспериментальной системе.

Таким образом, электрофорез является не просто способом получения красивого изображения полос ДНК. Это аналитический метод, который дает информацию о размере и распределении фрагментов нуклеиновых кислот и позволяет контролировать качество молекулярно-генетического эксперимента.

Главный принцип метода можно сформулировать следующим образом: отрицательно заряженные молекулы нуклеиновых кислот перемещаются в

электрическом поле через пористую матрицу, причем скорость их миграции зависит от размера и других характеристик молекулы.

Для анализа продуктов классической ПЦР особенно важен следующий принцип: амплификация создает целевой фрагмент, электрофорез разделяет полученные фрагменты, DNA ladder позволяет оценить их размер, а система контролей обеспечивает правильную интерпретацию результата.

Поэтому весь процесс можно запомнить в виде одной логической цепочки:

ПЦР → ампликон → электрофорез → разделение по размеру → визуализация → сравнение с DNA ladder → контроль качества → интерпретация → подтверждение результата при необходимости.

Именно сочетание правильной постановки ПЦР, качественного электрофоретического разделения и грамотной интерпретации полос позволяет получить надежный результат молекулярно-генетического исследования.