

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

ВЛИЯНИЕ КАЧЕСТВА И КОЛИЧЕСТВА ДНК-МАТРИЦЫ
НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы
направления подготовки 06.03.01 - Биология
биологического факультета
Владимировой Анастасии Андреевны

Научный руководитель

к.б.н., доцент _____ А.А. Галицкая

Научный консультант:

канд. биол. наук, ученый
секретарь ИБФРМ РАН _____ Т.Е. Пылаев

Заведующий кафедрой биохимии

и биофизики, д.б.н., профессор _____ С.А. Коннова

Саратов 2016

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) является наиболее распространенной и динамично развивающейся технологией на протяжении более 20 лет. Ежегодно на рынке появляются десятки новых тест-систем для ПЦР-анализа. При проведении ПЦР происходит амплификация фрагмента дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) с последующей его очисткой, секвенированием и накоплением в препаративном количестве, поэтому данный анализ можно считать альтернативным методом молекулярного клонирования. При этом не возникает необходимости в применении сложных методических приемов, которые используют в генной инженерии при обычном клонировании. Разработка метода ПЦР во многом расширила методические возможности молекулярной генетики, и, в частности, генной инженерии, причем настолько, что это кардинально изменило и усилило научный потенциал многих ее направлений.

ПЦР обладает экстремальной чувствительностью, о чем свидетельствует возможность проведения реакции амплификации в присутствии всего нескольких десятков молекул матричной ДНК в анализируемой пробе. Однако, наряду с преимуществом, экстремальная чувствительность является слабым местом при проведении ПЦР-анализа, поскольку, несмотря на методическую простоту, ПЦР является сложной многокомпонентной системой, на результативность которой будет влиять множество факторов. Одним из первых шагов, предшествующих проведению ПЦР-анализа, является выделение и очистка нуклеиновой кислоты (НК) - это первый шаг в большинстве молекулярно-биологических исследований. Поэтому следует учитывать влияние такого фактора, как ДНК-матрица, на процесс амплификации, поскольку ее недостаточное/избыточное количество и несоответствующее качество может привести к снижению эффективности ПЦР и дальнейшим затруднениям в процессе детекции результатов проведения ПЦР-анализа.

Цель работы – выявление степени влияния качества и количества ДНК-матрицы на эффективность проведения ПЦР.

Для реализации цели были поставлены следующие **задачи**:

- 1) Показать влияние исходной концентрации клеток и фазы роста в бактериальной культуре *Azospirillum brasilense* Sp7 на качество получаемых ДНК-матриц.
- 2) Оценить степень влияния качества и количества ДНК-матрицы на эффективность проведения ПЦР на примере выявления маркерного гена азотфиксации *NifD* в бактериальной культуре *A. brasilense* Sp7, находящейся на разных этапах роста.

Материалы и методы исследования: Объектом исследования служила культура бактерий штамма *A. brasilense* Sp7, содержащих в составе своего генома ген *NifD*, который является маркером азотфиксации. В работе использовали бактерии на разных этапах роста: 18-часовую культуру (поздняя логарифмическая фаза), 36-часовую культуру (начальная стационарная фаза) и 48-часовую культуру (поздняя стационарная фаза).

Для достижения поставленной цели и решения задач проводили оценку количества клеток в бактериальной культуре *A. Brasilense* Sp7, выделение ДНК из культуры *A. brasilense* Sp7, контроль качества и количества выделенных препаратов с помощью UV-Vis-спектрофотометрии, проведение горизонтального агарозного гель-электрофореза тотальной ДНК, проведение ПЦР-анализа на наличие маркерного гена азотфиксации *NifD* .

Структура бакалаврской работы: работа состоит из введения, основной части, заключения, выводов и списка использованных источников. Литературный обзор составлен из 67 источников, в нем рассмотрены следующие вопросы: ПЦР: принцип метода; факторы, влияющие на проведение ПЦР; качество и количество ДНК-матрицы, как фактор, влияющий на проведение ПЦР; сравнительная характеристика методов экстракции нуклеиновых кислот.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

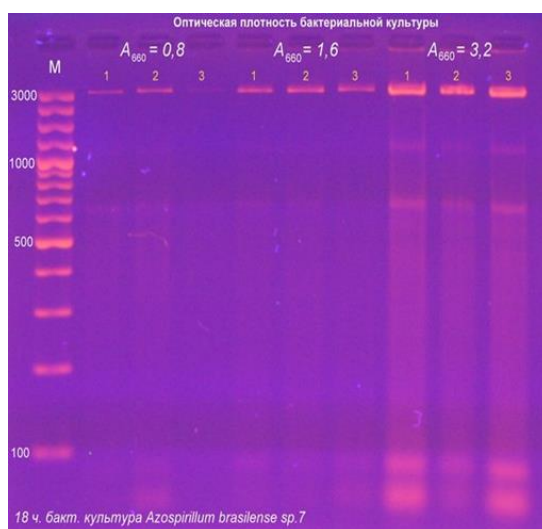
На первом этапе мы исследовали влияние исходной концентрации клеток и фазы роста бактерий *A. brasilense* Sp7 на выход и качество получаемых ДНК-матриц. Для решения данной задачи мы проводили оценку количества клеток в 18, 36, 48-часовой бактериальной культуре; выделяли тотальную ДНК с последующим спектрофотометрическим контролем качества и количества выделенных препаратов; проводили агарозный геле-электрофорез тотальной ДНК. В таблице 1 представлены результаты спектрофотометрического контроля ДНК-матриц, выделенных из 18-часовой культуры, которая находилась в поздней логарифмической фазе роста. Из приведенных ниже данных видно, что увеличение числа исходных клеток ведет к увеличению значений концентраций выделенной ДНК.

Таблица 1 - Результат спектрофотометрического определения количества выделенной ДНК из 18-часовой бактериальной культуры *A. brasilense* Sp7

A ₆₆₀ (оптическая плотность культуры)	UV- Vis-спектрофотометрия образцов				A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	Концентрация ДНК (мкг/мл)
	A ₂₃₀	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₃₀₅			
0,8	- 0,003	0	0,001	-0,001	1,071 ± 0,93	0,399 ± 0,37	27,66 ± 21,93
1,6	0,002	0,008	0,005	0,001	1,9 ± 0,77	1,26 ± 0,95	67,66 ± 46,7
3,2	0,014	0,027	0,017	0,004	1,562 ± 0,08	1,83 ± 0,3	224,66 ± 58,77

Из рисунка 1 видно, что при значении оптической плотности равном 0,8, которое соответствует содержанию $6,4 \times 10^9$ клеток/мл, наблюдается едва заметная полоса на электрофореграмме, что говорит о незначительном количестве ДНК. При увеличении оптической плотности до 1,6, которое соответствует содержанию $12,8 \times 10^9$ клеток/мл, наблюдается более четкая и широкая полоса из-за увеличения количества ДНК. При значении оптической

плотности равном 3,2 которое соответствует содержанию $25,6 \times 10^9$ клеток/мл, наблюдается широкая полоса с фрагментированным шлейфом, что говорит о избытке количества ДНК.



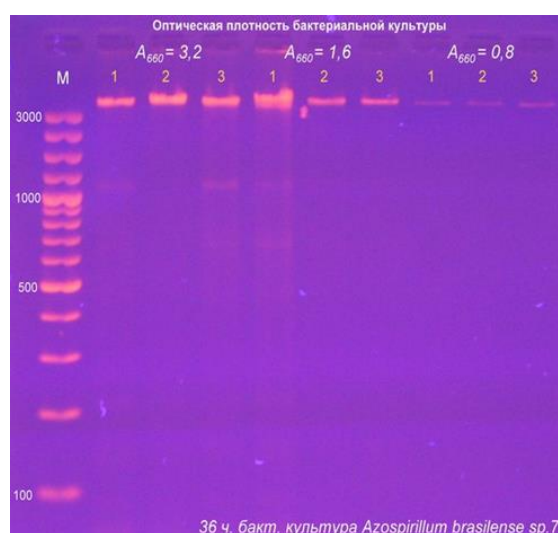
A_{660} - значение оптической плотности при длине волны 660 нм,
М-маркеры молекулярного веса.

Рисунок 1 - Электрофореграмма тотальной ДНК, выделенной из 18-часовой бактериальной культуры *A. brasilense* Sp7.

В таблице 2 представлены результаты спектрофотометрического контроля ДНК-матриц, выделенных из 36-часовой культуры. Из приведенных данных видно, что увеличение числа исходных клеток ведет к увеличению значений концентраций ДНК, однако, отмечается общее снижение количества выделенной ДНК. Из рисунка 2 видно, что при значении оптической плотности равном 0,8 наблюдается менее заметная полоса на электрофореграмме в сравнении с рисунком 1. При значении оптической плотности равном 1,6 наблюдается более четкая и широкая полоса, что подтверждает увеличение количества ДНК в сравнении со значениями при оптической плотности равном 0,8. Из рисунка 2 видно, что при значении оптической плотности равном 0,8 наблюдается менее заметная полоса на электрофореграмме в сравнении с рисунком 1, что говорит о меньшем количестве выделенной ДНК. При значении оптической плотности равном 1,6 наблюдается более четкая и широкая полоса на электрофореграмме.

Таблица 2 - Результат спектрофотометрического определения количества выделенной ДНК из 36-часовой бактериальной культуры *A. brasiliense* Sp7

A_{660} (оптическая плотность культуры)	UV- Vis-спектрофотометрия образцов				A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	Концентрация ДНК (мкг/мл)
	A_{230}	A_{260}	A_{280}	A_{305}			
0,8	-0,004	-0,001	-0,001	-0,001	$1,021 \pm 0,55$	$0,284 \pm 0,07$	$2 \pm 1,73$
1,6	0,001	0,003	0,002	0	$2,216 \pm 2,16$	$0,741 \pm 0,5$	$35,66 \pm 35,09$
3,2	0	0,004	0,002	0	$2,336 \pm 1,2$	$5,81 \pm 5,05$	$38,66 \pm 9,6$



A_{660} - значение оптической плотности при длине волны 660 нм,
 М-маркеры молекулярного веса.

Рисунок 2 - Электрофореграмма тотальной ДНК, выделенной из 36-часовой бактериальной культуры *A. brasiliense* Sp7.

При значении оптической плотности, равном 3,2 наблюдается широкая полоса с фрагментированным шлейфом, менее выраженным, чем на рисунке 1, что доказывает снижение количества выделенной ДНК из 36-часовой культуры в сравнении с 18-часовой.

В таблице 3 представлены результаты спектрофотометрического контроля ДНК-матриц, выделенных из 48-часовой культуры, которая находилась в поздней стационарной фазе. Из приведенных ниже данных наблюдается следовое количество выделенной ДНК, либо полное отсутствие.

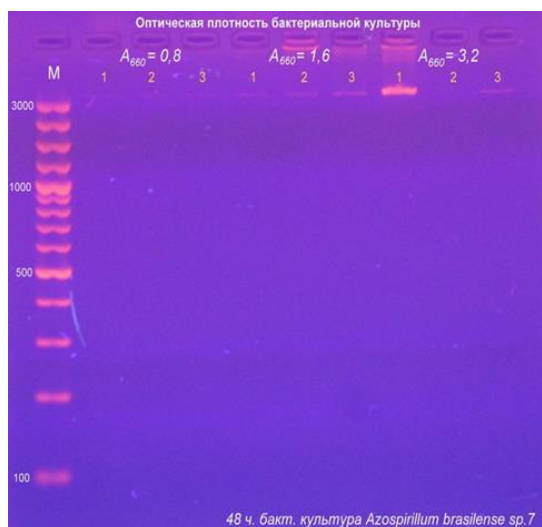
Таблица 3 - Результат спектрофотометрического определения количества выделенной ДНК из 48-часовой бактериальной культуры *A. brasilense* Sp7

A ₆₆₀ (оптическая плотность культуры)	UV-Спектрофотометрия образцов				A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	Концентрация ДНК (мкг/мл)
	A ₂₃₀	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₃₀₅			
0,8	-0,009	-0,012	-0,004	-0,003	0,984 ± 0,01	0,437 ± 0,07	7,33 ± 4,04
1,6	-0,01	-0,004	-0,004	-0,003	0,932 ± 0,04	0,409 ± 0,07	1,66 ± 1,15
3,2	-0,01	-0,003	-0,003	-0,003	0,947 ± 0,12	0,332 ± 0,14	16,667 ± 6,028

Рисунок 3, демонстрирует почти полное отсутствие ДНК, что связано с нахождением 48-часовой бактериальной культуры в фазе отмирания клеток. Поскольку на рисунках 1 и 2 при значениях оптической плотности, равным 3,2 наблюдается наличие широкой полосы с отчетливым шлейфом, мы провели дополнительный гель-электрофорез тотальной ДНК, предварительно разведя данные образцы до концентрации 100 мкг/мл, чтобы убедиться, что подобная картина, наблюдаемая на электрофореграммах, обусловлена избыточным количеством выделенной ДНК, а не свойствами самого образца. На рисунке 4 показано, что образцы, разведенные до оптимальной концентрации, детектируются в виде четко оформленной, не размытой полосы и практически не имеют выраженного шлейфа.

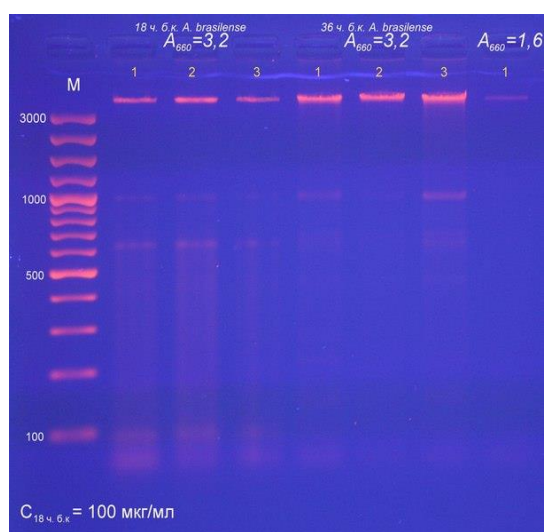
Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что исходная концентрация клеток и фаза роста бактерий главным образом

вливают на выход и качество получаемых ДНК-матриц. Оптимальная концентрация ДНК лежит в пределах 50-100 мкг/мл.



A_{660} - значение оптической плотности при длине волны 660 нм,
M-маркеры молекулярного веса.

Рисунок 3 - Электрофореграмма тотальной ДНК, выделенной из 48-часовой бактериальной культуры *A. brasilense* Sp7.

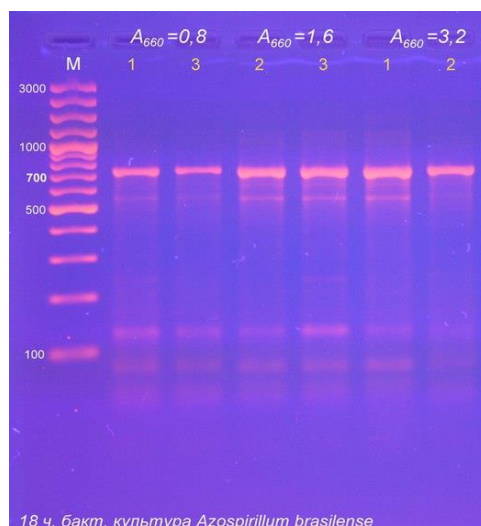


A_{660} - значение оптической плотности при длине волны 660 нм,
M-маркеры молекулярного веса.

Рисунок 4 - Электрофореграмма тотальной ДНК, выделенной из 18,36-часовой бактериальной культуры *A. brasilense* Sp7.

Образцы ДНК, выделенные из 18-часовой бактериальной культуры, находящейся в поздней логарифмической фазе роста, дали наилучшие результаты по количеству и качеству ДНК. Далее мы проводили оценку

степени влияния качества и количества ДНК-матрицы на эффективность проведения ПЦР. Для этого был проведен ПЦР-анализ ДНК на выявление гена нитрогеназной фиксации *NifD* с регистрацией результатов методом агарозного гель-электрофореза. Длина амплифицируемого фрагмента составляла примерно 710 п.н. Как видно из рисунка 5, при значении оптической плотности равном 0,8, наблюдается оформленная полоса целевого продукта с незначительным шлейфом неспецифических продуктов реакции. Напротив, при увеличении значений оптической плотности до 1,6 и 3,2, наблюдается широкая, размытая полоса специфического продукта с длинным шлейфом неспецифических продуктов реакции, что затрудняет детекцию результатов.

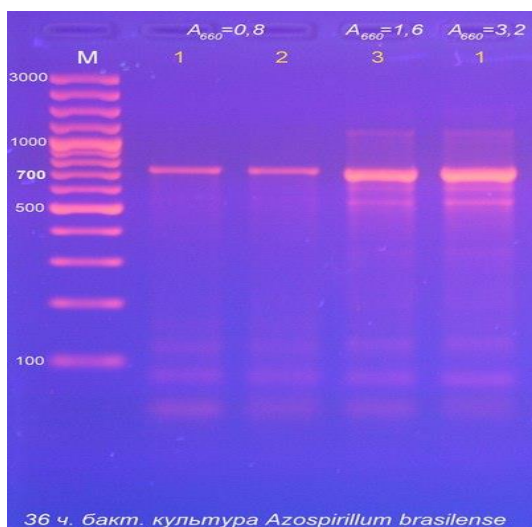


A_{660} - значение оптической плотности при длине волны 660 нм,
 М-маркеры молекулярного веса.

Рисунок 5 - Электрофореграмма ПЦР-продуктов ДНК, выделенной из 18-часовой культуры *A. brasilense* Sp7.

На рисунке 6, при значении оптической плотности равном 0,8, наблюдается четкая, ровная, не яркая полоса специфического продукта и незначительное присутствие неспецифических продуктов реакции в виде шлейфа. В свою очередь, при увеличении значений оптической плотности до 1,6 и 3,2 наблюдается широкая, яркая, размазанная полоса целевого продукта и, соответственно, длинный, фрагментированный шлейф неспецифического продукта. Следует отметить, что образующийся шлейф более выраженный,

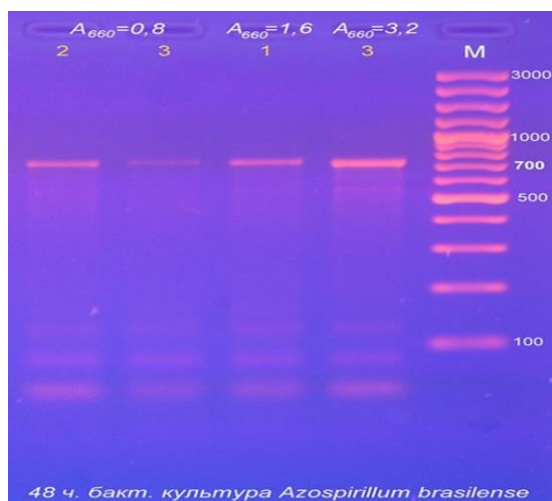
чем на рисунке 5, что обусловлено нахождением исследуемой культуры в стационарной фазе роста.



A_{660} - значение оптической плотности при длине волны 660 нм,
М-маркеры молекулярного веса.

Рисунок 6 - Электрофореграмма ПЦР-продуктов ДНК, выделенной из 36-часовой культуры *A. brasilense* Sp7.

На рисунке 7, при значениях оптических плотностей 0,8, 1,6 и 3,2 наблюдаются слабо окрашенные полосы целевого продукта и незначительное присутствие шлейфа неспецифических продуктов, что обусловлено нахождением исследуемой культуры в фазе отмирания клеток.



A_{660} - значение оптической плотности при длине волны 660 нм,
М-маркеры молекулярного веса.

Рисунок 7 - Электрофореграмма ПЦР-продуктов ДНК, выделенной из 48-часовой культуры *A. brasilense* Sp7.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе, результаты UV-Vis-спектрофотометрии и горизонтального агарозного гель-электрофореза тотальной ДНК свидетельствуют о том, что исходная концентрация клеток и фаза роста бактерий главным образом влияют на выход и качество получаемых ДНК-матриц. Исходя из полученных данных, установлено, что оптимальная концентрация ДНК лежит в пределах 50-100 мкг/мл.

Согласно полученным данным, фаза роста бактерий главным образом влияет на выход и качество ДНК-матриц. Работа с 18-часовой бактериальной культурой *A. brasilense* Sp7, находящейся в поздней логарифмической фазе роста, позволяет получать ДНК нужного качества и количества. В то время как, использование 36-часовой бактериальной культуры, находящейся в начальной стационарной фазе роста, приводит к снижению количества и качества ДНК. При работе с 48-часовой бактериальной культурой, находящейся в поздней стационарной фазе, наблюдается почти полное отсутствие ДНК или следовое количество, что связано с лизисом бактериальных клеток.

В данной работе, результаты ПЦР, проведенной на объекте исследования культуры *A. brasilense* Sp7, свидетельствуют об однозначном влиянии качества и количества ДНК-матрицы на эффективность проведения ПЦР. Было показано, что недостаточное количество ДНК приводит к слабому проявлению целевого продукта. Напротив, избыток количества ДНК, приводит к появлению ярких, широких, размытых полос в геле, сопровождающихся ярко выраженным шлейфом неспецифических продуктов реакции. Выявлено, что фаза роста бактериальной культуры также играет важную роль, поскольку определяет качество ДНК-матрицы. Самые лучшие результаты были получены при работе с бактериальной культурой, находящейся в поздней логарифмической фазе роста. При работе с культурой, находящейся в начальной стационарной фазе роста, наблюдается

общее снижение количества клеток и самого качества ДНК. Бактериальная культура, находящаяся в поздней стационарной фазе, показала следовое количество ДНК сомнительного качества, зачастую недостаточное для проведения ПЦР.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что при работе с культурами бактериальных клеток, на примере *A. brasilense* Sp7, исходная концентрация клеток и фаза роста существенно влияют на качество получаемых ДНК-матриц. Наилучший результат был получен с 18-часовой культурой, имеющей исходную концентрацию $12,8 \times 10^9$ клеток/мл, что соответствует оптической плотности $A_{660} = 1,6$.
2. Показано, что качество и количество ДНК-матрицы непосредственно влияет на эффективность проведения ПЦР. На примере выявления гена нитрогеназной фиксации *NifD* бактерией *A. brasilense* Sp7 обнаружено, что избыток и недостаток ДНК-матрицы приводят к снижению эффективности ПЦР.