**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

**Метод электрофореза ДНК ОФС**

**в агарозном геле Вводится впервые**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод электрофореза ДНК в агарозном геле, предназначенный для определения размеров фрагментов ДНК, а также для их разделения по размеру и форме (в случае, если ДНК образует вторичные структуры, например шпильки).

Метод электрофореза ДНК в агарозном геле представляет собой разновидность зонального электрофореза, описанного в ОФС «Электрофорез».

Сущность метода заключается в том, что молекулы ДНК заряженные отрицательно, под действием силы электрического поля движутся от отрицательного электрода - катода (-) к положительному электроду - аноду (+). Агарозный гель, являясь вязкой средой препятствует продвижению макромолекул - образцов ДНК, в связи с этим, короткие фрагменты ДНК движутся к аноду быстрее, чем длинные. Отношение величины заряда нуклеиновых кислот, мало зависящей от рН окружающей среды, к их массе практически одинаково, поэтому метод электрофореза в агарозном геле позволяет определять только размеры различных фрагментов ДНК.

В зависимости от цели эксперимента после проведения электрофореза в агарозном геле дальнейшее исследование может быть аналитическим и/или препаративным.

При аналитическом исследовании после электрофоретического разделения молекул ДНК, проводится последующая визуализация и анализ полученных результатов.

Препаративное исследование применяют для извлечения из геля разделенных компонентов используя несколько способов: агарозный гель подвергают элюции буферными растворами, центрифугированию, замораживанию и оттаиванию и др.

***Методика электрофореза в агарозном геле***

*Подготовка к проведению анализа*

На ровную поверхность, устанавливают форму для заливки геля. Не касаясь дна формы (1-2 мм) помещают гребенки на расстоянии 5 см друг от друга или как указано в НД.

*Приготовление буферных растворов*

Для приготовления буферных растворов обычно используют готовые составы, входящие в комплекты реагентов для метода электофореза в агарозном геле.

Для приготовления буферных растворов для электрофореза в агарозном геле, как правило, используют трис-боратный - ЭДТА (TBE) или трис-ацетатный буферный раствор (TAE) в объеме, достаточном для заполнения камеры для электрофореза и приготовления геля. Возможно использование других подходящих буферных растворов, указанных в нормативной документации. Буферный раствор для электрофореза можно хранить при температуре (18 – 25) оС в течение 1 недели или при температуре (2 - 8) оС в течение 1 мес.

В буферный раствор для образцов добавляют специально подобранный краситель. Присутствие красителя облегчает внесение образцов в лунки и позволяет в режиме реального времени наблюдать продвижение в геле фрагментов ДНК. Однако, избыточное количество красителя может мешать наблюдению фрагментов при ультрафиолетовом исследовании. В качестве красителей используют: бромфеноловый синий, ксиленцианол, крезоловый красный или OrangeG. Для каждой концентрации агарозного геля подбирается определенный краситель и его концентрация для оптимальных условий проведения электрофореза.

*Приготовление геля*

Для приготовления агарозного геля в СВЧ-печи или на водяной бане расплавляют до прозрачного состояния необходимое количество смеси агарозы, буферного раствора и воды, не допуская закипания геля (в течение 15-20 мин). Расплавленную смесь охлаждают до температуры 50 - 60 оС, далее с помощью автоматического дозатора добавляют бромистый этидий до конечной концентрации 0,5 мкг/мл, тщательно перемешивают и смесь тонким слоем (до 5 мм) заливают на пластинку так, чтобы зубцы гребенок были погружены не менее, чем на 3 мм, не допуская образования пузырьков воздуха. После полного застывания геля в течение 30 – 60 мин при температуре 18 -25 оС осторожно извлекают гребенки плавным движением вверх, избегая повреждения образовавшихся лунок.

*Проведение электрофореза*

Камеру для электрофореза заполняют буфером раствором с бромистым этидием, помещают пластинку с агарозным гелем и осторожно извлекают гребенку плавным движением вверх, избегая повреждения образовавшихся лунок.

Буферный раствор должен полностью покрыть пластинку с гелем слоем приблизительно 3-5 мм. Исследуемые образцы ДНК вносят в лунки агарозного геля под буферный раствор, камеру для электрофореза закрывают, электроды подсоединяют к источнику тока и включают напряжение. Молекулы ДНК одинакового размера (и одинакового заряда) движутся единым фронтом, образуя в геле дискретные невидимые полосы. Чем меньше размер молекул, тем быстрее они движутся от катода (-) к аноду (+).Постепенно исходный образец ДНК, состоящий из разных макромолекул, разделяется на зоны, распределенные по длине пластинки. Процесс электрофореза отслеживают по перемещению в геле красителя - заряженного низкомолекулярного вещества, которое вносят в каждую лунку перед началом электрофореза. Электрофорез останавливают, при приближении красителя к концу пластинки.

***Регистрация результатов***

Результаты электрофореза ДНК в агарозном геле регистрируют в присутствии бромистого этидия, интеркалирующего соединения, образующего с фрагментами ДНК устойчивое соединение, проявляющееся в ультрафиолетовом свете при 290-330 нм в виде светящихся полос при облучении геля с помощью УФ-трансиллюминатора. Фрагменты анализируемой ДНК проявляются в виде светящихся оранжево-красных полос.

Если образец представляет собой дискретный набор макромолекул разного размера, то после проведения электрофореза образуются четкие полосы, расположенные на пластинке одна под другой в соответствии с их размером. Для определения относительной молекулярной массы фрагментов ДНК, одновременно с исследуемым образцом проводят электрофорез маркеров макромолекул ДНК с известными молекулярными массами. Набор маркеров должен охватывать весь диапазон молекулярных масс в данной системе. Образец, содержащий маркеры ДНК, вносят в отдельную лунку. Логарифм относительной молекулярной массы маркера линейно связан с его электрофоретической подвижностью Rf — величиной, равной отношению расстояний, пройденных маркером и красителем (фронтом растворителя). По калибровочному графику зависимости логарифма относительных молекулярных масс маркеров от Rf, находят относительную молекулярную массу каждого компонента образца ДНК. Относительная молекулярная масса двухцепочечных нуклеиновых кислот измеряется в числе пар нуклеотидов, одноцепочечных — в числе нуклеотидов.

***Разделение линейных молекул***

Для разделения линейных двухцепочечных молекул ДНК используют гели с различной концентрацией агарозы от 0,3 % до 2 % соответствующее определенному размеру молекул ДНК (табл.1).

Таблица 1 - Соотношение гелей с различной концентрацией агарозы и размеров, разделяемых ДНК.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | | % агарозы | 0.3 | 0.5 | 0.6 | 0.7 | 0.8 | 0.9 | 1.0 | 1.2 | 1.5 | 2.0 | | Размер ДНК [kbp] | 5-60 | 1-30 | 1-20 | 0.8-12 | 0.6-10 | 0.5-8 | 0.5-7 | 0.4-6 | 0.2-3 | 0.1-2 | |

[kbp] – 1000 пар оснований ДНК

Нижний предел размеров ДНК определяется (в основном) диффузией полосы в геле. В гелях с низкой концентрацией агарозы фрагменты небольших размеров ДНК разделяются, но четкость разделения полос не высокая.

Верхний предел размеров ДНК находится в прямой зависимости от напряженности поля, при которой проводится электрофорез. Чем меньше напряженность поля, тем более эффективно можно разделить длинные молекулы ДНК с большей молекулярной массой.

***Разделение суперскрученных и кольцевых молекул***

Относительная подвижность линейных и кольцевых молекул зависит от условий электрофореза: концентрации агарозного геля в %, скорости электрофореза (например, нельзя пользоваться линейным маркером для оценки размера кольцевых молекул).

Суперскрученные молекулы ДНК имеют меньшую подвижность, поэтому для их разделения используются более высокие значения напряжения и низкое содержание агарозы в геле.

В табл. 2 приведено примерное соотношение подвижностей при умеренной (~6 В/см) скорости электрофореза (в скобках - при более быстром разгоне).

Таблица 2 – Примерное соотношение подвижностей суперскрученных молекул ДНК в зависимости от концентрации агарозы в геле.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Размер суперскрученных. ДНК [kbp] | Размер линейной ДНК [kbp] для различных концентраций, (%) агарозного геля | | | |
| 0.7% | 1% | 1.5% | 2% |
| 2 | 1.2 | 1.3 | 1.3 (1.6) | 1.5 (1.0) |
| 3 | 1.7 | 1.8 | 2 (2.4) | 2.9 (1.8) |
| 4 | 2.2 | 2.3 | 2.7 (3.7) | - |
| 5 | 2.7 | 2.9 | 3.5 (5.5) | - |
| 6 | 3.2 | 3.5 | 5 (8.5) | - |
| 7 | 3.9 | 4.2 | 8.5 (>12) | - |
| 8 | 4.4 | 5.0 | >12 | - |
| 9 | 5.1 | 5.9 | - | - |
| 10 | 5.8 | 6.8 | - | - |
| 12 | 7 | 8.7 | - | - |

[kbp] – 1000 пар оснований

В присутствии 0.5 мкг/мл бромистого этидия разрешение релаксированной и суперскрученной ДНК увеличивается примерно в 20 раз при повышении ионной силы трис-боратного буферного раствора до 4∙ТBЕ. Того же увеличения можно добиться понижая концентрацию бромистого этидия.

Разделение одноцепочечных ДНК

В процессе разделения на 1% агарозном геле одноцепочечная ДНК в электрическом поле движется быстрее (примерно на 10 %), чем двухцепочечная ДНК того же размера. Однако, одноцепочечная ДНК окрашивается бромистым этидием заметно слабее, чем двухцепочечная примерно в 4-5 раз. В связи с этим, для получения одинаковой интенсивности окраски полос, необходимо использовать примерно в 5 раз больше образца одноцепочечной ДНК.

Для разделения цепей ДНК, нужно либо непосредственно перед электрофорезом прогреть испытуемые образцы примерно 1 мин при температуре 100 oC, либо добавить к образцу раствор натрия гидроксида до получения концентрации 0,1 М раствора и выдержать примерно 5-10 мин при комнатной температуре или при температуре 37 oC.

***Напряжённость поля***

При оценке напряженности поля для горизонтального электрофореза принято пренебрегать конкретной геометрией камеры и измерять расстояние непосредственно между электродами.

Оптимальные условия между скоростью и качеством электрофореза для высококачественных или препаративных электрофорезов при напряженности поля около 2 В/см. Для аналитических электрофорезов приемлемое качество сохраняется при напряженности поля до 6 В/см.

ДНК особенно легко теряет бромистый этидий при повышенной температуре. Проведение электрофореза при высоком напряжении может достаточно сильно нагреть гель. Но даже при не высоких значениях напряжения в электрическом поле происходит выделение тепла, поэтому следует обеспечивать теплоотвод и стабильность температурного режима (комнатная температура) с целью исключения изменений вязкости геля, проводимости и скорости потока и, следовательно, искажения зон анализируемых компонентов.

Примечания*.*

Приготовление трис-боратного буферного раствора pH. В мерную колбу вместимостью 1л вносят 10,8 г трис(гидроксиметил)аминометан, 5,5 г борной кислоты, 4 мл 0,05 М раствора ЭДТА pH 8.0 и 700 мл воды очищенной, перемешивают и доводят объем раствора водой очищенной до метки и вновь перемешивают.

Приготовление буферного раствора для внесения. В мерную колбу вместимостью 25 мл вносят 1,25 мл 0,5 % раствора натрия додецилсульфата, 5 мл 0,1 М раствора ЭДТА pH 8.0, 12,5 мл глицерина, 6,25 мл воды очищенной и тщательно перемешивают. Перед использованием отбирают необходимое количество буферного раствора, разводят в 10 раз водой очищенной и добавляют выбранный краситель до необходимой концентрации, указанной в фармакопейной статье или нормативной документации.

Приготовление агарозного геля. Растворяют необходимое количество агарозы в трис-боратном буферном растворе, нагревая в СВЧ-печи или на водяной бане, не доводя до кипения, до полного растворения агарозы. Полученный раствор остужают до температуры 50-60 оС и добавляют водный раствор бромистого этидия до конечной концентрации 0,5 мкг/мл. Раствор заливают в плашку для электрофореза и оставляют на 0,5 – 1 ч до полного застывания геля. Например, для приготовления 1,5 % раствора агарозного геля следует взять 1,5 г агарозы и растворить в 100 мл буферного раствора.