

# Современные проблемы биохимии

---

Методы исследований

# Современные проблемы биохимии

Методы исследований

---

*Допущено  
Министерством образования  
Республики Беларусь  
в качестве учебного пособия  
для магистрантов учреждений  
высшего образования,  
по биологическим  
и медицинским специальностям*

Под редакцией профессора А.А. Чиркина



Минск  
«Вышэйшая школа»  
2013

УДК 577.1(075.8)  
ББК 28.072я73  
С56

Авторы: Е.В. Барковский, С.Б. Бокуть, А.Н. Бородинский, В.У. Буко, О.И. Валентюкевич, А.И. Грицук, Е.О. Данченко, Е.М. Дорошенко, И.К. Дремза, А.С. Дроздов, И.Б. Заводник, Л.Б. Заводник, Д.Я. Задорожный, Л.М. Караедова, В.Н. Кипень, Е.И. Коваленко, Е.А. Лапшина, Т.Л. Лебедь, О.Я. Лукивская, Г.В. Ляхнович, А.Ф. Макарчиков, С.Б. Мельнов, Е.В. Морозова, И.М. Морозова, Л.И. Надольник, Е.Е. Нарута, В.Н. Никандров, Л.Н. Николаевич, Н.В. Пивень, Н.С. Пыжова, В.Ю. Смирнов, Э.П. Титовец, Т.А. Толкачева, В.В. Хрусталеv, В.Т. Чещевик, А.А. Чиркин

Рецензенты: кафедра биохимии биологического факультета Белорусского государственного университета (заведующий кафедрой доцент *И.В. Семак*); заведующий отделом биохимии и биотехнологии растений ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси» доктор биологических наук *В.Н. Решетников*

*Все права на данное издание защищены. Воспроизведение всей книги или любой ее части не может быть осуществлено без разрешения издательства*

**Современные проблемы биохимии. Методы исследований** : учеб. пособие / Е. В. Барковский [и др.] ; под ред. проф. А. А. Чиркина. – Минск : Выш. шк., 2013. – 491 с. : ил.

ISBN 978-985-06-2192-4.

Учебное пособие составлено из трудов специалистов-биохимиков Республики Беларусь.

Изложено 190 методик биохимического исследования различных биологических объектов на различных уровнях их организации.

Для магистрантов учреждений высшего образования по биологическим и медицинским специальностям.

Может быть полезно студентам биологических, медицинских, ветеринарных и фармацевтических специальностей, а также исследователям-биохимикам.

УДК 577.1(075.8)  
ББК 28.072я73

ISBN 978-985-06-2192-4

© Оформление. УП «Издательство  
«Вышэйшая школа»», 2013

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Учебное пособие создано в соответствии с учебным планом и базовой программой подготовки студентов по специальности 1-31 01 01-02 Биология (научно-педагогическая деятельность); специализация 1-31 01 01-02 05 Биохимия. Этот предмет завершает подготовку специалистов в 10-м семестре обучения студентов и предназначен для ознакомления обучающихся с характером биохимических исследований, проводимых в ряде вузов Министерства образования и научно-исследовательских институтах Национальной академии наук Республики Беларусь. Учебное пособие не претендует на исчерпывающую информацию о многогранных биохимических исследованиях белорусских ученых. Данное издание должно продемонстрировать то, что биохимические методы исследования активно внедряются в фундаментальные и прикладные исследования не только в общепризнанных и авторитетных научных и педагогических центрах г. Минска, но и в других городах республики.

Изучение современных проблем биохимии служит для достижения основной цели: подготовить выпускника-биохимика к профессиональной деятельности и сократить время его адаптации к решению научных, производственных и учебных биохимических задач. В соответствии с этим пособие включает материалы по применению биохимических методов *in silico* (компьютерное моделирование), *in vitro* и *in vivo*. В материалах книги содержится более 190 методик биохимического анализа, 50 таблиц, более 90 рисунков, около 200 источников литературы. Потребность в таком издании вызвана тем, что стремительное развитие технологий биохимических исследований сокращает навыки биохимика-исследователя до этапа пробоподготовки, а остальное выполняют приборы.

Наряду с классическими методами выделения и изучения ферментов, оценки обмена белков, углеводов, липидов, нукле-

иновых кислот, состояния энергетического обмена, свободно-радикальных процессов в пособии представлены методы иммунохимического анализа, молекулярно-генетических исследований, анализа данных банков нуклеотидных и аминокислотных последовательностей макромолекул, исследование нанофлюидики. В практическом отношении будут полезными методики изучения фагоцитоза, апоптоза, некроза, биохимических характеристик тканей животного и растительного происхождения.

Глава 1 написана В.В. Хрустальевым, Е.В. Барковским, Д.Я. Задорожным; гл. 2 – А.С. Дроздовым, С.Б. Бокутем; гл. 3 – А.Ф. Макаровичем; гл. 4 – Е.М. Дорошенко, В.Ю. Смирновым; гл. 5 – В.Н. Никандровым, Н.С. Пыжовой; гл. 6 – Л.И. Надольник, О.И. Валентюкевичем; гл. 7 – А.И. Грицуком; гл. 8 – Э.П. Титовцом; гл. 9 – Л.М. Караедовой; гл. 10 – А.Н. Бородинским, И.К. Дремзой; гл. 11 – В.У. Буко, О.Я. Лукивской, Е.Е. Нарутой; гл. 12 – Л.Б. Заводником, Е.А. Лапшиной, В.Т. Чешевицом, И.К. Дремзой, И.Б. Заводником; гл. 13 – Е.И. Коваленко, А.А. Чиркиным; гл. 14 – Е.О. Данченко; гл. 15 – Н.В. Пивень; гл. 16 – С.Б. Мельновым, Т.Л. Лебедь, В.Н. Кипенем; гл. 17 – Т.А. Толкачевой, И.М. Морозовой, Г.В. Ляхновичем; гл. 18 – Е.В. Морозовой, Л.Н. Николаевич, А.А. Чиркиным.

## **ГЛАВА 16. ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА**

*Полимеразная цепная реакция (ПЦР)* — экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий выявить генетический материал и добиться значительного увеличения количества определенных фрагментов нуклеиновой кислоты

(ДНК/РНК) в биологическом материале. Она обладает высокими показателями чувствительности и специфичности среди молекулярно-биологических методов.

Для проведения ПЦР необходимы следующие компоненты [1]:

- ДНК-матрица, выделенная из биологического материала и содержащая участок ДНК, который требуется амплифицировать;
- праймеры (количество пар олигонуклеотидов зависит от вида ПЦР), комплементарно фланкирующие требуемый участок ДНК;
- термостабильная ДНК-полимераза — фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК;
- дезоксинуклеозидтрифосфаты ДНТП (смесь дАТФ, дТТФ, дГТФ, дЦТФ);
- ионы  $Mg^{2+}$ , необходимые для работы полимеразы;
- буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции (рН, ионную силу раствора).

## 16.1. ДНК-матрица

На примере методики выделения ДНК из буккального эпителия рассмотрим выделение и очистку ДНК-матрицы для ПЦР. В основе метода лежат лизис клеток буккального эпителия с помощью додецилсульфата натрия (ДСН) и деградация белков протеиназой К. Клеточный лизат обрабатывают смесью перхлората натрия, хлороформа, изоамилового спирта. Прecipитацию ДНК проводят этанолом, а затем осадок растворяют в буфере для хранения. ДНК, выделенная данным методом, пригодна для длительного хранения и дает возможность использовать образцы, содержащие частично деградированную ДНК.

**Экстракция ДНК из образцов:** 1) срезают дистальный конец ватного тупфера зонда (не касаясь его) в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл и добавляют 200 мкл  $1 \times$  STE буфера; 2) добавляют 75 мкл 10 %-ного раствора ДСН и 12 мкл раствора протеиназы К; 3) вортексируют 10 с; 4) инкубируют 12 ч при температуре 37 °С; 5) добавляют к лизату 8 мкл РНКазы (рибонуклеазы А); 6) инкубируют лизат 1 ч при температуре 37 °С; 7) добавляют 50 мкл 5М раствора перхлората натрия; 8) добавляют 300 мкл смеси хлоро-

форма с изоамиловым спиртом (24:1); 9) вортексируют 50 с; 10) центрифугируют 10 мин при 13 000 об/мин; 11) отбирают супернатант (верхнюю ДНК-содержащую фазу), не затрагивая промежуточного слоя, и переносят в чистую пробирку (1,5 мл); 12) повторяют пункты 8–10 с лизатом образца; 13) добавляют 2,5 объема 96 %-ного этанола в пробирку и центрифугируют 10 мин при 13 000 об/мин; 14) удаляют супернатант, добавляют 150 мкл 70 %-ного этанола; 15) центрифугируют 5 мин при 13 000 об/мин. Удаляют спирт вакуумным аспиратором; 16) высушивают ДНК и растворяют ее в 70 мкл буфера для хранения.

Выделенная ДНК помещается в морозильную камеру для хранения. Следует избегать нескольких циклов замораживания – оттаивания образца, поэтому, если образец планируется исследовать неоднократно, его необходимо разделить на аликвоты в отдельные пробирки.

Оценку качества выделенной ДНК проводят на основании спектрофотометрического измерения оптической плотности раствора ДНК при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения ДНК и белков. В чистых образцах ДНК соотношение  $OD_{260}/OD_{280}$  должно находиться в пределах

$$1,8 < OD_{260} / OD_{280} < 2,$$

где  $OD_{260}$  и  $OD_{280}$  – оптические плотности раствора при длине волны 260 и 280 нм соответственно.

Обычно при постановке ПЦР в пробирку добавляют  $10^2$ – $10^5$  копий матрицы. При уменьшении концентрации матрицы ниже оптимального уровня растет вероятность образования неспецифических продуктов [2]. С другой стороны, уменьшением отношения праймер/матрица можно увеличить специфичность реакции, но с увеличением этого отношения, как правило, растет количество образовавшегося продукта (табл. 16.1).

*Таблица 16.1. Необходимое количество ДНК для проведения ПЦР*

Образец ДНК	Количество образца, объем, масса, шт.	Число копий, шт.
1	2	3
ДНК человека	0,5 мкг	$\approx 1,0 \cdot 10^5$
Кровь человека	1,0 мкл (40 нг)	$\approx 7,5 \cdot 10^4$



1	2	3
Бумажный диск с кровью (кровь цельная либо белая, носитель может быть разный как по текстуре, так и по составу)	2,5 мм диск (диаметр)	$\approx 1,0 \cdot 10^5$
Семенная жидкость	30 мкл (5 мкг)	$\approx 3,0 \cdot 10^5$
Дрожжи	10 нг	$\approx 3,0 \cdot 10^5$
ДНК <i>E.coli</i>	1 нг	$\approx 1,5 \cdot 10^5$
Бактериофаги	1 бляшка	$\approx 1,0 \cdot 10^6$

## 16.2. Праймеры (олигонуклеотиды)

*Химически синтезированные олигонуклеотиды* можно использовать для конструирования целых генов или их фрагментов, амплификации специфических фрагментов ДНК, направленных мутаций изолированных ДНК, а также в качестве зондов при гибридизации и в качестве линкеров, облегчающих клонирование.

Автоматизация синтеза олигонуклеотидов облегчает и ускоряет синтез. Появились приборы – ДНК-синтезаторы, которые выполняют эту работу за несколько часов. Основным компонентом любого ДНК-синтезатора является система клапанов и насосов, с помощью которых в реакционную смесь по строго заданной программе вводятся нуклеотиды и реагенты, обеспечивающие присоединение нужных мономерных единиц к растущей цепи. В отличие от биологического в ходе химического синтеза ДНК каждый новый 3'-нуклеозидфосфат можно присоединять к 5'-гидроксильному концу цепи. Все стадии синтеза осуществляются последовательно в одной реакционной колонке, а продолжительность каждой из них и время отмывания контролируются с помощью персонального компьютера.

В настоящее время наиболее распространенным методом химического синтеза ДНК является *фосфорамидитный*. Исходными строительными блоками в нем являются модифицированные дезоксирибонуклеозиды. Модификация состоит в присоединении к аминогруппам дезоксиаденозина и дезоксицитидина бензоильной группы, а к аминогруппе дезоксигуанозина – изобутирильной. Тимидин, у которого отсутствует

аминогруппа, не модифицируют. Такая модификация необходима для защиты нуклеозидов от нежелательных побочных реакций при росте цепи. Синтез осуществляют в твердой фазе (растущая цепь ДНК фиксируется на твердом носителе), что позволяет проводить все реакции в одной емкости, легко отмывать после каждого этапа ненужные реагенты и добавлять новые в количестве, обеспечивающем возможно полное протекание реакции.

**Этапы многоступенчатого синтеза:**

1. Первый нуклеозид фиксируют на инертном твердом носителе. Обычно это пористые стеклянные шарики с порами одинакового размера; 3'-гидроксильная группа первого нуклеозиды, который будет 3'-концевым нуклеотидом синтезируемой цепи, прикрепляется к молекуле, ковалентно связанной с носителем.

2. Для предотвращения неспецифического взаимодействия 5'-гидроксильной группы первого нуклеотида до добавления в реакционную смесь второго нуклеотида ее защищают с помощью диметокситритильной (ДМТ) группы. Такую группу содержит каждый присоединяемый к растущей цепи нуклеотид, и, кроме того, он несет дизопропиламинную группу, присоединенную к 3'-фосфитной группе, которая в свою очередь защищена О-цианэтильным остатком. Такая молекулярная конфигурация и называется *фосфорамидитом*.

3. Цикл начинается после присоединения первого нуклеозиды к поверхности стеклянного шарика. Далее колонку обильно промывают каким-либо безводным реагентом (например, ацетонитрилом), чтобы удалить воду и другие нуклеофильные вещества, и продувают через нее аргон для вытеснения ацетонитрила.

4. С помощью раствора трифторуксусной кислоты (ТФУ) отщепляют 5'-ДМТ (детритилирование) от присоединенного нуклеотида с тем, чтобы высвободить (экспонировать) реакционноспособную 5'-гидроксильную группу.

5. Колонку вновь промывают ацетонитрилом для удаления ТФУ и продувают через нее аргон для удаления ацетонитрила.

6. Процесс запрограммирован таким образом, чтобы на втором этапе в колонку одновременно вводились следующий фосфорамидит и тетразол (активация и присоединение). Тетразол активирует фосфорамидит, так что 3'-фосфитная группа образует ковалентную связь с 5'-гидроксильной группой первого присоединенного к матрице нуклеозиды. Избыток фосфорамидита и тетразола удаляют продуванием аргона.

7. Поскольку по окончании первого этапа не все фиксированные на носителе нуклеозиды оказываются связанными с фосфорамидитом, необходимо предотвратить их взаимодействие с фосфорамидитом, который будет использован в следующем цикле удлинения цепи. Для этого непрореагировавшую 5'-гидроксильную группу ацетилируют с помощью уксусного ангидрида в присутствии диметиламинопиридина (кэппирование). Если этого не сделать, то уже после нескольких циклов синтезируемые олигонуклеотиды будут различаться как по длине, так и по нуклеотидной последовательности.

8. Фосфиттриэфирная связь, образовавшаяся на втором этапе между нуклеотидами, нестабильна и может разорваться в присутствии кислоты или щелочи. Поэтому фосфиттриэфир окисляют с помощью йода до более стабильного пентавалентного фосфотриэфира.

9. Промывают колонку и повторяют весь цикл (детритилирование, активация и присоединение, кэппирование, окисление).

Описанные выше операции проводят до тех пор, пока к растущей цепи в соответствии с программой не присоединится последний фосфорамидит. Синтезированные олигонуклеотиды связаны со стеклянными шариками; каждый фосфотриэфир несет O-цианэтильную группу; каждый гуанин, цитозин и аденин содержит защищенную аминогруппу, а на 5'-конце последнего нуклеотида находится ДМТ-группа.

10. O-цианэтильные группы удаляют обработкой раствора триэтиламина непосредственно на реакционной колонке. Затем отсоединяют олигонуклеотиды от молекулы вместе с 3'-гидроксильным концом и элюируют их из колонки; далее последовательно удаляют бензоильные, изобутирильные и ДМТ-группы; 5'-конец цепи фосфорилируют ферментативным или химическим методом. Эту реакцию можно проводить и тогда, когда олигонуклеотид еще связан с носителем, но после детритилирования.

Качество синтеза олигонуклеотидов чрезвычайно важно для проведения эффективной и специфичной ПЦР. В идеальном случае используемый в качестве праймера олигонуклеотид должен представлять единственный вариант последовательности фиксированной длины. Чтобы получить олигонуклеотиды заданной длины, первичные продукты большинства химических синтезов необходимо очистить с помощью либо высокоэффективной жидкостной хроматографии, либо электрофореза в полиакриламидном геле.

После того как исследователь определился с локусом в ДНК, который в зависимости от цели исследования необходимо амплифицировать, переходят к разработке дизайна праймеров. В большинстве случаев длина праймеров находится в пределах 18–30 нуклеотидов, однако при проведении направленного мутагенеза могут быть использованы праймеры большей длины [3–5].

При их *конструировании* полезно иметь в виду следующее:

- при выборе мест отжига праймеров на матрице необходимо избегать участков, которые в одноцепочечной форме образуют вторичную структуру, например палиндромных последовательностей;

- по мере необходимости допускается присоединение к 5'-концам праймеров некомplementарных матрице последовательностей, которые могут заключать в себе требуемые сайты рестрикции, промоторные участки, кодоны инициации, термации и трансляции и т.п.;

- для эффективной ПЦР не требуется полной комплементарности праймеров матрице, хотя оно и желательно;

- для исключения отжига праймеров в неспецифических местах анализируемых последовательностей необходимо с помощью компьютерного анализа подтвердить отсутствие в них дополнительных мест «посадки». Это особенно важно при анализе таких больших геномов, как геном человека, животных и растений;

- полезно начинать и заканчивать последовательность праймера с одного-двух пуриновых нуклеотидов, однако следует избегать включения остатков G или C на его 3'-конец, так как это повышает вероятность неспецифического отжига праймеров;

- недопустима самокомплементарность праймеров, особенно в их 3'-концевых областях;

- при амплификации последовательностей в мультигенных семействах, когда не удастся сделать праймеры полностью специфичными для одного локуса, необходимо приложить усилия, чтобы по крайней мере два (чем больше, тем лучше) последних 3'-концевых нуклеотида были полностью специфичны в отношении анализируемого участка ДНК;

- ионные условия при проведении ПЦР и количество циклов должны определяться индивидуально для каждой новой пары праймеров;

- стандартные концентрации праймеров в реакционной смеси составляют 0,1–1,0 мкМ, хотя в большинстве случаев хорошие результаты получаются при их концентрациях 0,2–0,5 мкМ. При этом необходимо иметь в виду, что чем больше концентрация праймеров в реакционной смеси, тем выше вероятность образования неспецифических продуктов ПЦР и тем дороже обходится каждая проба.

Разработка дизайна праймеров в настоящее время облегчается наличием эффективных пакетов программного обеспечения, которые созданы для этой цели. Но ни одна из современных компьютерных программ не освобождает исследователя от необходимости затраты интеллектуальных усилий при попытке решения собственных проблем.

Правильный выбор последовательности олигонуклеотидов, используемых для проведения ПЦР, является, пожалуй, ключевым фактором успеха экспериментатора, применяющего ПЦР в своих исследованиях.

В большинстве экспериментов с использованием олигонуклеотидов ученый старается добиться взаимодействия праймера или пробы лишь с определенным местом изучаемой нуклеиновой кислоты (местом с определенной последовательностью нуклеотидов). Процесс образования связи между синтетическим олигонуклеотидом и исследуемой ДНК называют *отжигом*, а процесс разрыва водородных связей в результате нагревания реакционной смеси – *плавлением*. Следовательно, структура олигонуклеотида должна обеспечивать наилучшую избирательность его отжига [4–5].

Какие факторы влияют на отжиг олигонуклеотида именно в том месте ДНК, где запланировал исследователь? Ключевым параметром олигонуклеотида является его последовательность, определяющая температуру гибридизации при заданных параметрах реакционной смеси. Для рассмотрения процесса гибридизации необходимо вспомнить, что образование двойной спирали из одноцепочечных олигонуклеотидов происходит «кластерно». Принято считать, что единицей взаимодействия двух цепей ДНК при образовании дуплекса является последовательность из 6–8 нуклеотидов. Таким образом, гибридизацию олигонуклеотида именно в этом месте матрицы будут определять наиболее «тугоплавкие» 6–8 нуклеотидов (т.е. участок, состоящий в основном из гуанозина и цитидина).

Под температурой гибридизации или диссоциации («плавления», *melting temperature*,  $T_m$ ) олигонуклеотидов обычно по-

нимают температуру полугибридизации с матрицей, т.е. такое значение температуры, при котором половина мест для посадки праймера уже занята, а половина по-прежнему свободна (рис. 16.1). Температуру гибридизации обычно определяют как точку перегиба на графике гибридизации («плавления»), что соответствует значению максимума первой производной графика. Реже за  $T_m$  принимают температуру, при которой достигнута половина от максимального уровня флуоресцентного сигнала (графики плавления обычно получают через регистрацию флуоресценции смеси, создаваемой включенной в состав праймера флуоресцентной меткой). Поскольку оба эти значения находятся довольно близко друг от друга на оси абсцисс, на практике не столь важно, что именно исследователь принял за  $T_m$ .

Следует различать расчетную и истинную температуры гибридизации олигонуклеотида. *Расчетная температура* получается теоретическим расчетом с использованием некоторой формулы. *Истинное значение* можно получить лишь опытным путем [6–8].

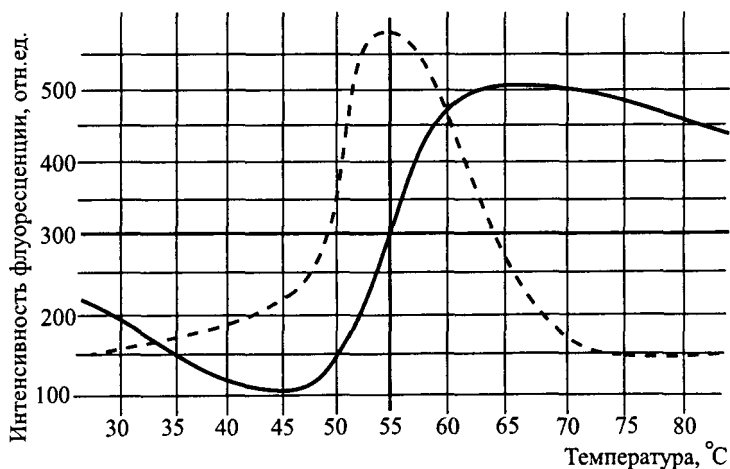


Рис. 16.1. График диссоциации олигонуклеотида от полинуклеотида (сплошная кривая) и график первой производной (пунктирная кривая): график диссоциации получен путем нагревания смеси олигонуклеотида с полинуклеотидом в условиях, когда диссоциация олигонуклеотида ведет к возрастанию уровня флуоресценции (см. пояснения в тексте); горизонтальная прямая линия показывает половину от максимального уровня флуоресценции, вертикальная линия показывает максимум первой производной

Чаще всего на практике для выбора последовательности олигонуклеотида вполне достаточно расчета  $T_m$  по формуле. Даже если расчетная температура существенно отличается от истинной, в большинстве случаев это не так уж важно для хорошей работоспособности системы, поскольку ключевым фактором является не абсолютное значение  $T_m$ , а соотношение  $T_m$  олигонуклеотидов между собой и соответствие этих  $T_m$  используемой программе амплификации. Обычно исследователь просто экспериментально подбирает не  $T_m$  праймера, а температуру соответствующего этапа ПЦР ( $T_a$ ).

Для приблизительного расчета температуры гибридизации олигонуклеотида существует множество алгоритмов, но ни один из них не гарантирует точного определения значения  $T_m$  и не позволяет более или менее стабильно рассчитывать значения для двух олигонуклеотидов [8–12].

Самым простым и самым распространенным подходом к оценке  $T_m$  является так называемый *метод Уоллеса*:

$$T_m = 2(A + T) + 4(G + C) + k,$$

где А, Т, G, С – азотистые основания – соответственно аденин, тимин, гуанин, цитозин;  $k$  – число, обычно находящееся в интервале  $0 < k < 5$ .

Формула позволяет достаточно эффективно рассчитывать относительную температуру гибридизации праймеров, но диапазон длин олигонуклеотидов, для которых можно применить эту формулу, составляет примерно 18–22 нуклеотида.

В программных продуктах разработчики используют более сложные алгоритмы расчета  $T_m$ , учитывающие состав буфера для ПЦР, концентрации ионов, концентрацию самого олигонуклеотида и других реагентов (как основных, так и дополнительных). Так, при расчете  $T_m$  учитываются концентрации праймеров и ионов  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$  (или  $Na^+$ ,  $NH_4^+$  и т.д.).

В настоящее время не существует теоретических алгоритмов, позволяющих точно предсказывать температуру плавления праймеров (не говоря уже об оптимальной температуре отжига). Поэтому для получения наилучших результатов необходимо подбирать температуру отжига праймеров эмпирически (рис. 16.2).

Поскольку образование водородных связей в процессе гибридизации олигонуклеотида происходит не одновременно для всех азотистых оснований, можно говорить о неоднород-

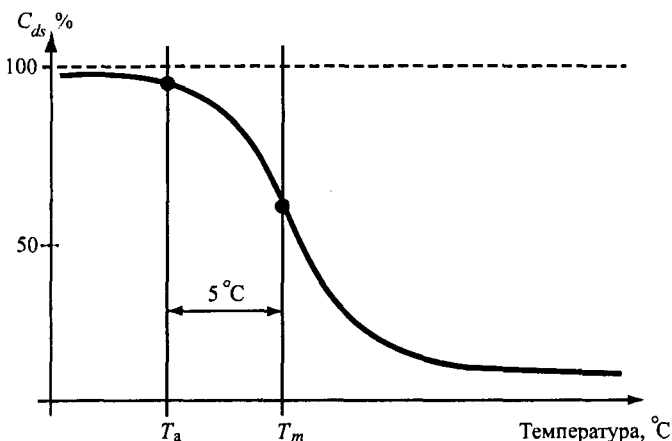


Рис. 16.2. График диссоциации олигонуклеотида, демонстрирующий различие температуры отжига  $T_a$  и температуры плавления  $T_m$ :

$C_{[double\ strand - ds]}$  — концентрация гибризованного праймера в первом приближении (для большинства случаев верным будет соотношение:  $T_a = T_m - 5$ )

ности внутренних регионов праймера или пробы с точки зрения «тугоплавкости». В ряде случаев правильное расположение данных регионов может существенно улучшить качество работы олигонуклеотида. Например, при подборе последовательности праймера для повышения его специфичности желательно сделать 3'-регион менее «тугоплавким». В этом случае праймер будет «срабатывать» только в том месте ДНК, где вся его последовательность полностью комплементарна матрице. Для выбора последовательности олигонуклеотидов можно использовать программы, значительно упрощающие поиск подходящих регионов или даже выбирающие пару праймеров автоматически (такие, как Oligo от Molecular Biology Insights, Inc.; GeneRunner от Hastings Software, Inc.; PrimerSelect из пакета программ для работы с последовательностями ДНК DNASTAR от DNASTAR, Inc., и ряд других). Однако ни один из существующих алгоритмов не обеспечивает полной гарантии хорошей работоспособности праймеров. Компьютерные программы облегчают процесс выбора последовательностей, во-первых, за счет удобного графического отображения свойств ДНК (расположения «тугоплавких» и «легкоплавких» районов, различных сайтов и т.п.), а, во-вторых, они чрезвычайно удобны при одновременном дизайне большого числа праймеров или проб (например, при выполнении масштабных



«сиквенсных» проектов можно автоматически подобрать праймеры с определенными свойствами, расположив их на заданном расстоянии друг от друга) [13].

### 16.3. Термостабильные ДНК-зависимые ДНК-полимеразы

Важным компонентом реакционной смеси для ПЦР является фермент – термостабильная ДНК-полимераза. На данный момент имеется много источников термостабильных ДНК-полимераз. Хорошо развитый рынок компонентов для ПЦР способен предложить большой выбор как отечественной, так и зарубежной продукции, но истинных производителей ферментов намного меньше, чем дилеров. В настоящее время благодаря развитию методов геной инженерии и биоинформатики существует возможность создавать ферменты со свойствами, максимально приближенными к расчетным.

Зачастую фермент полимераза обладает тремя основными свойствами:

- $5' \rightarrow 3'$ -направленность создаваемой цепи (полимеразная активность) (рис. 16.3, а);

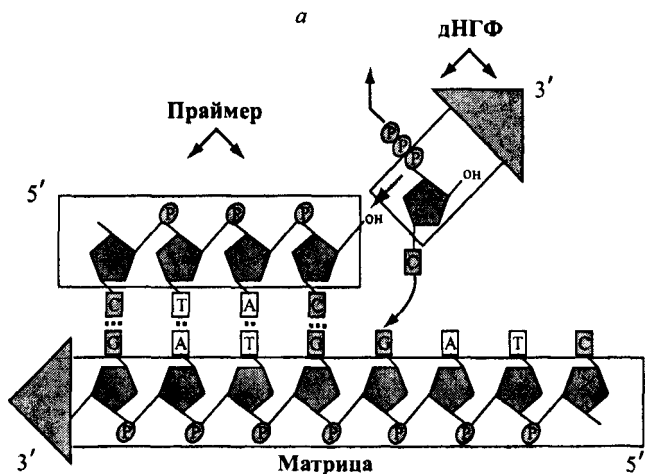


Рис. 16.3. Принципиальные активности, свойственные ДНК-полимеразам:  $5' \rightarrow 3'$ -полимеразная активность (а);  $5' \rightarrow 3'$ -экзонуклеазная активность (б);  $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазная корректирующая активность (в)

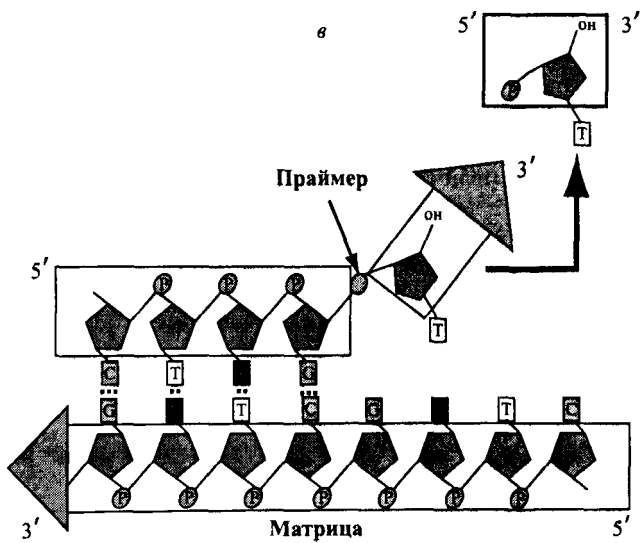
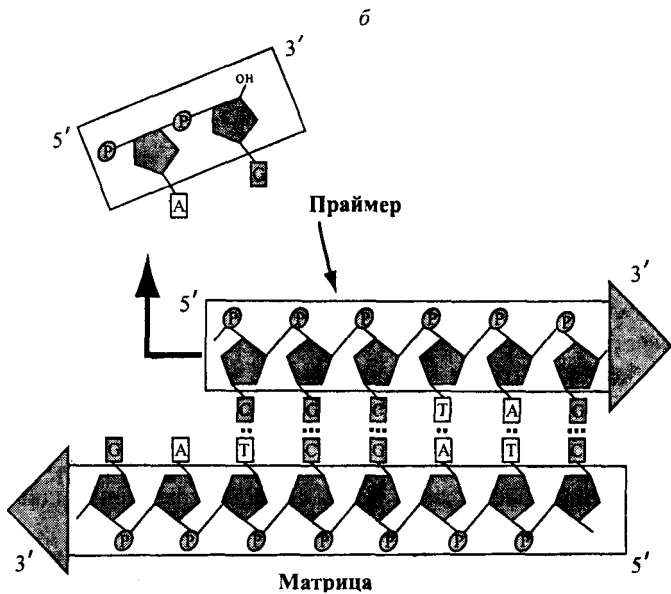


Рис. 16.3. Окончание

- 5'→3'-экзонуклеазная активность (рис. 16.3, б);
- 3'→5'-экзонуклеазная корректирующая активность (рис. 16.3, в);

Ферменты, которые обладают более высокой специфичностью синтеза, обладают 3'→5'-экзонуклеазной корректирующей активностью, т.е. если к 3'-концу синтезирующейся цепи присоединяется некомплементарный исходной матрице нуклеотид, то он удаляется из цепи с участием этой же ДНК-полимеразы. Наиболее распространенная в настоящее время Taq-полимераза такой активностью не обладает. Точность амплификации ДНК данным ферментом невелика в сравнении с ДНК-полимеразами, способными корректировать ошибки репликации, к которым относятся, например, Pfu-, Vent- и Deep Vent ДНК-полимеразы. Но эти ферменты не используют постоянно при постановке ПЦР по причине неспецифического гидролиза праймеров, который происходит под действием корректирующей экзонуклеазы [5,7].

В рутинных экспериментах в пробы объемом 25–100 мкл обычно добавляют 0,25–0,5 ед. фермента. При постановке ПЦР необходимо учитывать, что чем больше в реакционной смеси ДНК-полимеразы (выше активность в конкретно рассмотренной ситуации), тем выше вероятность неспецифического отжига праймеров и, как итог, образование неспецифических продуктов. В то же время необходимо помнить, что амплификация, осуществляемая, в частности, Taq-полимеразой, происходит по дистрибутивному механизму, т.е. в процессе синтеза особенно длинных цепей ДНК молекула фермента, начавшая синтез, редко его заканчивает. Происходит диссоциация комплекса фермент – продукт – матрица, и синтез продолжает уже другая молекула фермента. Исходя из этого, очевидно, что для получения продуктов ПЦР большой длины необходимо повышать концентрацию фермента в пробе вплоть до 10 ед. активности из расчета на 50 мкл реакционной смеси.

## 16.4. Проведение ПЦР

Полимерную цепную реакцию проводят в амплификаторе – приборе, обеспечивающем периодическое охлаждение и нагревание пробирок, обычно с точностью не менее 0,1 °С. Современные амплификаторы позволяют задавать сложные

программы, в том числе с возможностью «горячего старта», touchdown ПЦР, и последующего хранения амплифицированных молекул при температуре 4 °С. Для ПЦР в реальном времени выпускают приборы, оборудованные флуоресцентным детектором. Существуют также приборы с автоматической крышкой и отделением для микропланшетов, что позволяет встраивать их в автоматизированные системы [7,8].

Обычно при проведении ПЦР выполняется 20–35 циклов, каждый из которых состоит из трех стадий (табл. 16.2). Температурно-временной режим изображен на рис. 16.4.

Таблица 16.2. Типичный цикл ПЦР

Денатурация	95 °С, 5–10 мин (при работе с плохоочищенной ДНК время может быть увеличено до 15–20 мин)
Отжиг праймеров	45–65 °С, 20–30 с
Элонгация (удлинение продукта амплификации)	72 °С, 1 мин для удлинения ампликона на 1 тыс. пар оснований (п.о.)
Финальная элонгация	72 °С, до 10 мин (в зависимости от длины конечного продукта время может быть увеличено)

При денатурации двухцепочечную ДНК-матрицу нагревают до температуры 94–96 °С (или до 98 °С, если используется высокотермостабильная полимеразы) на 0,5–2 мин, чтобы цепи ДНК разошлись. Эта стадия называется денатурацией, так как разрушаются водородные связи между двумя цепями ДНК. Иногда перед первым циклом (до добавления полимеразы) проводят предварительный прогрев реакционной смеси в течение 2–5 мин для полной денатурации матрицы и праймеров. Такой прием называется «горячим стартом». Он позволяет снизить количество неспецифических продуктов реакции.

После денатурации ДНК температуру понижают, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей. Данная стадия называется *отжигом*. Температура отжига зависит от состава праймеров и обычно выбирается на 4–5 °С ниже их температуры плавления. Время стадии – 0,5–2 мин. Неправильный выбор температуры отжига приводит либо к плохому связыванию праймеров с матрицей (при завышенной температуре), либо к связыванию в неверном месте и появлению неспецифических продуктов (при заниженной температуре).

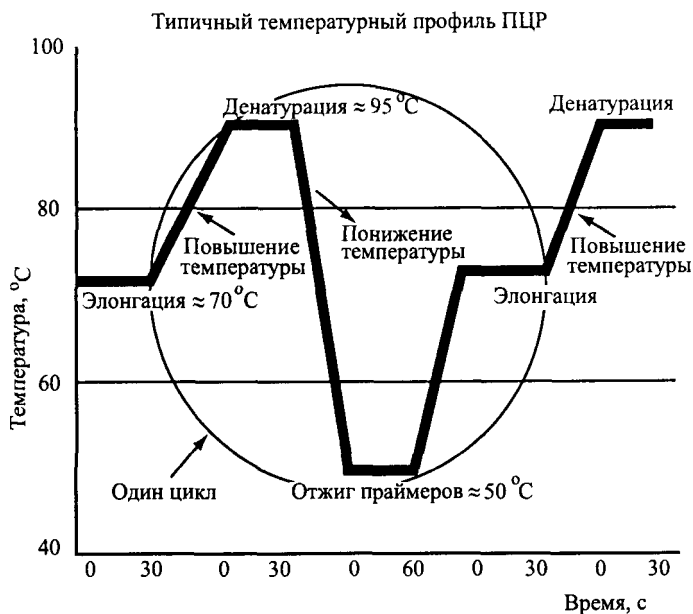


Рис. 16.4. Температурный профиль ПЦР

ДНК-полимераза реплицирует матричную цепь, используя праймер в качестве затравки. Это стадия *элонгации*. Полимераза начинает синтез второй цепи от 3'-конца праймера, который связался с матрицей, и движется вдоль матрицы. Температура элонгации зависит от типа полимеразы. Часто используемые полимеразы Taq и Pfu наиболее активны при температуре  $72^{\circ}\text{C}$ . Время элонгации также зависит как от типа ДНК-полимеразы, так и от длины амплифицируемого фрагмента. Время элонгации в среднем принимают равным 1 мин из учета на каждую тысячу пар оснований. После окончания всех циклов часто проводят дополнительную стадию финальной элонгации, чтобы достроить все одноцепочечные фрагменты. Эта стадия длится 7–10 мин [11–13].

## 16.5. Методы ПЦР

*Стандартная ПЦР*, проводимая по протоколам, разработанным еще К.Б. Мюллисом, применяется в наиболее простых случаях амплификации. Этот вид ПЦР используется

в основном для амплификации последовательностей, длина которых не превышает 3 тыс. п.о. Данный метод может быть рекомендован для амплификации коротких последовательностей, при реамплификации продуктов ПЦР, а также любых последовательностей в составе гомогенных векторных молекул на основе плазмид и хромосом бактериофагов. В этом случае при соблюдении протокола постановки ПЦР можно быть уверенным в получении необходимого ПЦР-продукта.

Если в реакционной смеси находится сразу несколько пар праймеров, специфичных для разных генетических локусов, т.е. имеется возможность проводить несколько ПЦР одновременно в одной пробирке, то говорят о разновидности ПЦР, называемой *множественной ПЦР* (multiplex PCR, mPCR). В наиболее простом случае это возможно, если пары праймеров имеют схожие параметры для своего успешного функционирования (GC-состав, температуры отжига и др.). Имеется возможность проведения множественной ПЦР в формате аллель-специфической ПЦР. Здесь речь идет об одновременной идентификации аллелей одного гена (т.е. амплификации двух генетических локусов – ведь любой ген, например ген человеческого организма в норме, как правило, представлен двумя копиями), которые могут различаться лишь одним нуклеотидом. В таком случае поступают следующим образом: аллель-специфические праймеры делают разной длины, что позволит идентифицировать исследуемые аллели по размеру продуктов ПЦР при проведении электрофореза [7].

*Асимметричная ПЦР* (asymmetrical PCR), или *однонаправленная ПЦР* (single-sided PCR), используется для амплификации одноцепочечных фрагментов ДНК, соответствующих анализируемому участку ДНК. Для этого необходимо, чтобы один из праймеров находился в низкой концентрации. В итоге в процессе ПЦР он будет быстро истощаться. После этого синтез ампликонов будет продолжаться только за счет наличия в реакционной смеси второго праймера, который должен присутствовать в избытке. Когда в пробирке останется один праймер, накопление ПЦР-продукта перестает происходить по экспоненциальному закону – концентрация возрастает линейно. В данном случае продукт ПЦР оказывается представленным в основном одноцепочечными молекулами ДНК. Асимметричную ПЦР также используют для проведения непосредственного секвенирования продукта ПЦР, для наработки одноцепочечных ДНК при создании олигонуклеотидных микро-

чипов и в других случаях, например при исследовании полиморфизма одноцепочечных фрагментов ДНК (single-stranded conformation polymorphism – SSCP) в ДНК-диагностике.

Довольно часто бывает, что в процессе амплификации необходимого фрагмента ДНК не удается избавиться от неспецифических продуктов ПЦР и «шмира» простыми манипуляциями с концентрациями реагентов и рН буфера. В таком случае целесообразно использовать вариант ПЦР, называемый *гнездовым ПЦР* (nested PCR).

Принцип метода гнездовой ПЦР заключается в последовательном применении двух пар праймеров, специфичных в отношении исследуемого локуса. Вначале проводят ПЦР с внешними праймерами, фланкирующими, как правило, довольно протяженный участок ДНК. В результате образуется гетерогенный продукт, в котором нужный фрагмент может визуально не наблюдаться из-за его низкой концентрации. Далее небольшое количество образовавшегося на первом этапе продукта ПЦР без какой-либо очистки используют уже в качестве матрицы во втором этапе ПЦР. Здесь используют новую пару (внутренних) праймеров, комплементарных последовательностям локуса, амплифицированного на первом этапе ПЦР. Поскольку только у специфического продукта ПЦР будут присутствовать места посадки для внутренних праймеров, амплификация всех остальных продуктов ПЦР, представляющих «шмир» и полосы непонятного происхождения, с внутренними праймерами происходить не будет [8,9].

Оптимальной температурой для синтеза ДНК термостабильными ДНК-полимеразами считаются приблизительно 72 °С, но они проявляют активность и при комнатной температуре. Если праймеры в силу своей первичной структуры имеют низкую температуру отжига, то могут возникать условия для неспецифического взаимодействия праймеров и матрицы в случае их неполной комплементарности в соответствующих участках. В такой ситуации 3'-концы праймеров, которые доступны ДНК-полимеразе при комнатной температуре или даже выше, вплоть до температуры денатурации комплексов праймер – матрица, удлиняются. Образующиеся при этом комплементарные матричные участки могут служить эффективными праймерами в следующих циклах ПЦР. В итоге создается последовательность нуклеотидов, очень отдаленно напоминающая ту, которую планировали амплифицировать. Выходом из данной ситуации является создание усло-

вий, при которых удлинение праймеров начиналось бы только после их отжига с соответствующими последовательностями матрицы. Обычно это происходит при понижении температуры после стадии денатурации в первом цикле ПЦР. Другим вариантом является использование ПЦР с «горячим стартом» (рис. 16.5), который позволяет достичь желаемого результата [8,9].

Существует также вариант ПЦР с обратной транскрипцией – ОТ-ПЦР (RT PCR, one tube PCR). Этот метод применяется для обнаружения РНК в биологических образцах. При использовании детекции результатов ПЦР в режиме реального времени есть возможность определять и их начальную концентрацию, что широко используется для оценки дифференциальной экспрессии генов на уровне транскрипции и в ДНК-диагностике возбудителей инфекционных заболеваний (например, вируса гепатита С, ВИЧ). Во время проведения ОТ-ПЦР на РНК (которая используется в качестве матрицы) с помощью обратной транскриптазы синтезируется кДНК, последовательности которой далее, в свою очередь, амплифицируют в обычной ПЦР. В современных вариантах ОТ-ПЦР (обратную транскрипцию и ПЦР) проводят в одной пробирке, что объясняет одно из распространенных названий данного метода – «ПЦР в одной пробирке» – «one tube PCR» [7].

Если необходимо амплифицировать последовательности ДНК или РНК непосредственно на фиксированных препаратах тканей, клеток или хромосом, то используют ПЦР *in situ*. Если с помощью обычной гибридизации *in situ* с использованием меченой ДНК в качестве зонда можно обнаруживать до 10 копий анализируемых последовательностей на клетку, то чувствительность ПЦР *in situ* в 10 раз выше обычной ПЦР. С ее помощью имеется возможность обнаружить даже 1 копию ДНК на фоне 1 мкг неспецифической ДНК, а с помощью ОТ-ПЦР – небольшое количество РНК, образовавшейся в результате транскрипции уникального гена. Данный метод не требует полного лизиса клеток или тканей, что необходимо, например, для проведения гибридизации.

Постановка ПЦР *in situ* включает в себя четыре этапа:

- приготовление и фиксацию препаратов клеток или тканей;
- получение полупроницаемых клеточных мембран;
- амплификацию последовательностей с помощью ПЦР;
- детекцию ПЦР-продукта.



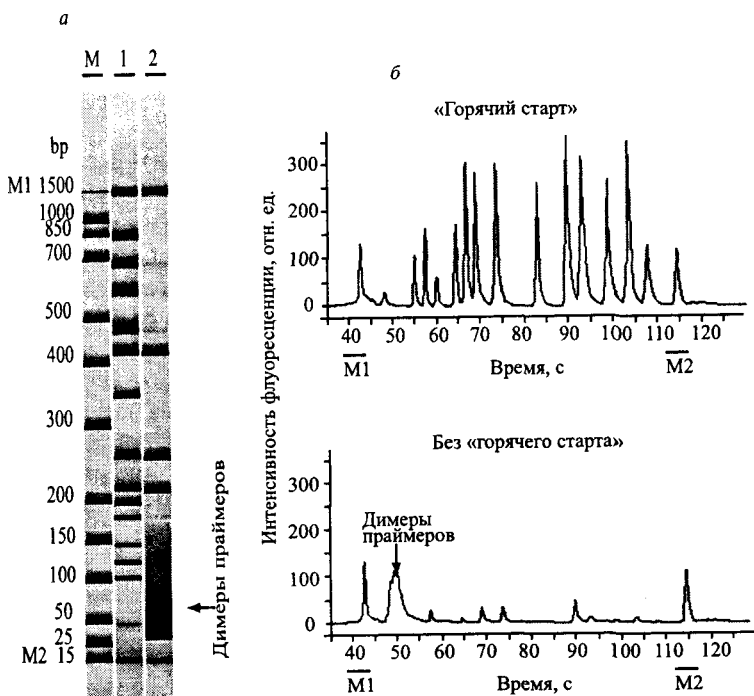


Рис. 16.5. ПЦР с «горячим стартом». Электрофореграмма продуктов ПЦР (а); спектр электрофореграммы (б) (площадь пика характеризует количество продукта):

М – маркер молекулярных масс 15–1500 п.о., M1 – 1500 п.о., M2 – 40–45 п.о.

Для эффективного осуществления ПЦР 3'-концевой нуклеотид праймера должен быть комплементарен соответствующему нуклеотиду матричной ДНК. В противном случае эффективность удлинения праймера во время ПЦР резко снижается и при определенных сочетаниях ошибочно спаренных нуклеотидов даже не происходит (необходимо помнить, что именно 3'-концевая последовательность праймера является ключевой для эффективного проведения ПЦР). Полная комплементарность на данном участке ассоциирует праймер – матрица приводит к амплификации требуемого участка ДНК. Именно эта особенность ПЦР и лежит в основе метода обнаружения мутаций с помощью *аллель-специфической ПЦР*, которая иногда называется *аллель-специфической элонгацией праймера* (allele specific primer extension) [7].

Для выявления гетерозиготного состояния анализируемого гена можно использовать *мутантный* (аллель несет мутации) и *нормальный* (аллель не несет изменений) праймеры разных размеров, которые различаются по длине их 5'-концевых последовательностей. При этом их 5'-концевые последовательности должны быть полностью комплементарны анализируемой ДНК. В данном случае в процессе ПЦР в реакционную смесь можно одновременно добавлять оба аллель-специфических праймера: мутантный и нормальный (праймер на «дикий» тип аллеля) вместе с общим для обоих праймеров – *встречным*. Образовавшиеся продукты реакции, соответствующие мутантному аллелю и аллелю «дикого» типа, далее разделяют с помощью электрофореза (рис. 16.6).

ПЦР с аллель-специфическими праймерами является простым и эффективным методом обнаружения мутаций в геномной ДНК и позволяет находить небольшое количество мутантных ДНК на фоне большого числа молекул ДНК «дикого» типа (в отличие от всех выше рассмотренных видов ПЦР).

Известно по крайней мере семь ковалентных модификаций азотистых оснований геномной ДНК у живых организмов, относящихся к различным таксономическим группам. Одноклеточные эукариоты содержат N<sup>6</sup>-метиладенин (m<sup>6</sup>A) и 5-гидроксиметилурацил (hm<sup>5</sup>U). В клетках человека и насекомых

TP53 R273C

1 - 12wt

3 - 12m

5 - 89wt

7 - 89 m

9 - 78wt

11 - 78m

13 - 50 wt

15 - 50m

date: 07/11/2011

ID: 031.3

wt - wild type

m - mutation

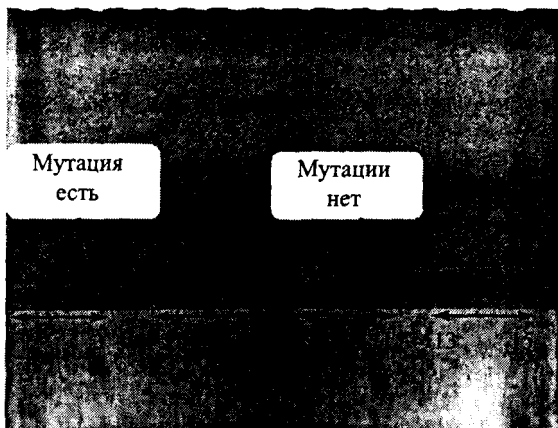


Рис. 16.6. Аллель-специфическая ПЦР. Если мутация имеет место, будет образовываться продукт и с «дикого» (wild type), и с мутантного (mutation) аллеля, если мутации нет – только продукт с «дикого» аллеля (представленного двумя копиями)

были обнаружены  $m^6A$  и  $N^7$ -метилгуанин ( $m^7G$ ). У прокариот наиболее часто встречаются  $m^6A$  и 5-метилцитозин ( $m^5C$ ), а также в меньшей степени  $N^4$ -метилцитозин ( $m^4C$ ). Все модификации связаны с действиями систем рестрикции и модификации ДНК, а  $m^6A$ , кроме того, участвует в контроле репликации и репарации ДНК у этих организмов;  $m^5C$  наиболее часто встречается у эукариот с размером генома больше  $10^8$  п.о. (т.е. у животных и растений), но редко у организмов с меньшим геномом (в том числе дрожжей, двукрылых насекомых и нематод). Хотя в клетках млекопитающих только 3–10 % остатков цитозина метилированы, данная модификация играет большую роль в функционировании их генома. У этих организмов образование  $m^5C$  ассоциировано:

- 1) с регуляцией транскрипции, в том числе с инактивацией X-хромосом;
- 2) импринтингом;
- 3) дифференцировкой клеток;
- 4) различными патологическими процессами, включая канцерогенез.

Одним из простых и эффективных методов обнаружения метилированных остатков С и А в ДНК является *использование эндонуклеаз рестрикции, чувствительных к метилированию* (ЭРЧМ) (рис. 16.7, а, 16.7, б). В этом случае инкубация изучаемой ДНК с ЭРЧМ может приводить или не приводить к разрушению ампликона и подавлению его амплификации в ПЦР. Однако поскольку не всегда в нужных местах генома присутствуют соответствующие сайты рестрикции, применение таких ферментов имеет ограничения [8,9].

Для обнаружения белков и других антигенов используется еще один чувствительный метод *иммуно-ПЦР* (immuno-PCR – IPCR), который был разработан Т. Сано с соавторами в 1992 г. Он обеспечивает приблизительно 1000-кратное увеличение чувствительности по сравнению с обычными иммуноферментными методами анализа. В этой группе методов используют ковалентные конъюгаты фрагментов одноцепочечной или двухцепочечной ДНК с антителами или их генно-инженерными производными в качестве зондов к исследуемым антигенам (рис. 16.8, а). В таком варианте антиген, иммобилизованный на твердом носителе, инкубируют с антителами в виде конъюгатов с маркерным фрагментом ДНК. После отмывания избытка конъюгата оставшийся ампликон обнаруживают с помощью ПЦР. В другом варианте метода (рис. 16.8, б)



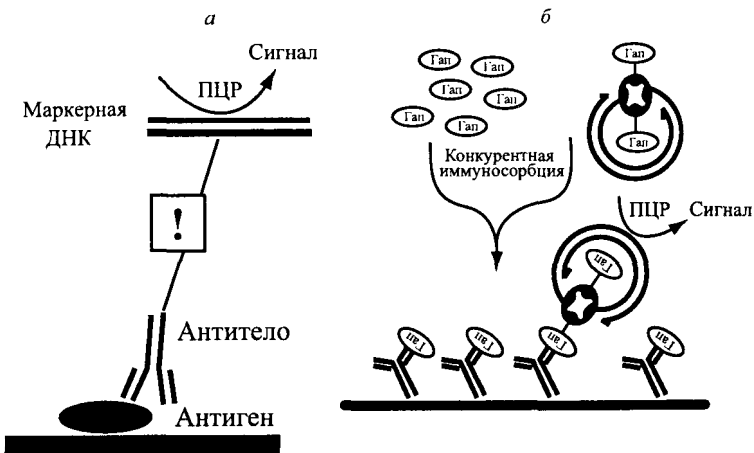


Рис. 16.8. Использование конъюгатов ДНК – белок в иммуно-ПЦР: обнаружение высокомолекулярных антигенов (а); обнаружение низкомолекулярных гаптен (Гап) с помощью конкурентной иммуно-ПЦР (б)

иммуно-ПЦР используют для конкурентного обнаружения низкомолекулярных антигенов. В одном из таких случаев, иллюстрирующем принцип данного метода, свободный анализируемый гаптен конкурирует с конъюгатом гаптен – стрептавидин за сайты связывания в молекулах антител, иммобилизованных на твердой подложке. Конъюгат, оставшийся в связанном состоянии, определяется по присутствию маркерных фрагментов ДНК с помощью ПЦР.

Системы биотин – стрептавидин или биотин – авидин часто используются для формирования различных межмолекулярных комплексов. Использование стрептавидина в различных приложениях с нуклеиновыми кислотами предпочтительнее, чем авидина, поскольку его изоэлектрическая точка  $pI$  лежит вблизи 7,0; следовательно, при физиологических значениях pH неспецифическое взаимодействие этого белка с ДНК менее вероятно. Молекулы биотина могут быть присоединены ковалентными связями к 3'- и 5'-концевым нуклеотидам нуклеиновых кислот, а также включены во внутренние части макромолекул в составе различных конъюгатов с ДНТФ [8].

При исследовании нуклеиновых кислот методом ПЦР часто возникает задача определения числа копий матричной ДНК или РНК в пробе. Эта задача может быть решена путем сравнения интенсивности (метод денситометрии) свечения

продуктов ПЦР, полученных обычными методами и выделенных с помощью электрофореза. Но данный метод оценки не является строго количественным. Из определения понятия ПЦР следует, что количество ПЦР-продукта должно удваиваться с каждым циклом реакции (в теории). В реальных условиях этого не происходит, поскольку ни одна из стадий реакции не протекает со 100 %-ной эффективностью. На эффективность прохождения отдельных циклов могут оказывать влияние различные ингибиторы ПЦР, а последние циклы оказываются наименее эффективными. Поэтому предсказать количество продукта, которое будет образовываться по завершении ПЦР, в каждом конкретном случае не представляется возможным.

Проблему можно решить с помощью методов, называемых *ПЦР в реальном времени* (real-time PCR). В основе таких методов лежит количественное определение содержания продукта ПЦР в реакционной смеси в каждом цикле реакции. Для этой цели разработано несколько подходов, в которых используются флуоресцентно меченные олигонуклеотиды.

**Система TaqMan.** В 1991 г. П. Холланд с соавторами предложили использовать 5'→3'-экзонуклеазную активность Taq-полимеразы для контроля за эффективностью прохождения циклов ПЦР по освобождению в реакционной смеси флуоресцентной метки, ассоциированной с 5'-концевым нуклеотидом зонда. Этот подход лег в основу одного из широко распространенных современных методов количественной ПЦР в реальном времени. В разработке фирм «Perkin-Elmer», «Applied Biosystems» данный метод получил название «*TaqMan*». При реализации такого подхода обычно используют Taq- или Tth-полимеразы, однако, в принципе, те же функции может выполнять любая другая ДНК-полимераза.

При регистрации накопления продуктов на протяжении всего процесса исследователь получает гораздо больше информации об особенностях реакции. Зная кинетику процесса, можно оценивать начальные параметры реакции и сравнивать реакции между собой.

Приведем схему использования метода TaqMan для количественного определения мРНК. Комплементарную ДНК (кДНК), полученную стандартным методом с помощью обратной транскриптазы, используют в качестве матрицы в ПЦР. В реакционную смесь, кроме двух обычных праймеров, добавляют олигонуклеотидный зонд, меченный по 5'-концу

флуорофором, а также содержащий в своей центральной или 3'-концевой части тушитель флуоресценции. Зонд отжигается в каждом цикле ПЦР с центральным участком ампликона между двумя амплифицирующими его праймерами. Для того чтобы сам зонд не использовался в качестве праймера, его 3'-концевую гидроксильную группу фосфорилируют. Элонгацию праймеров проводят при той же температуре, что и температура отжига праймеров и зонда. Во время ПЦР на стадии элонгации праймера Taq-полимераза, достигнув 5'-конца зонда, начинает вытеснять его из дуплекса, а затем отщепляет 5'-концевой нуклеотид зонда, меченный флуорофором, в точке раздвоения цепей ДНК и зонда. Поскольку экзонуклеазная активность Taq-полимеразы специфична в отношении двухцепочечных ДНК, зонд, находящийся в реакционной смеси в свободном состоянии, остается интактным. По мере углубления ПЦР интенсивность флуоресценции реакционной смеси увеличивается, и это возрастание происходит ступенчато по завершению стадии элонгации праймера в каждом цикле ПЦР. Свободный зонд, находясь в растворе в контакте с тушителем флуоресценции, создает небольшой базальный уровень флуоресценции, который преодолевается по мере накопления свободного флуорофора в реакционной смеси. С этого момента, определяемого числом прошедших циклов ПЦР, которое называют *порогом числа циклов* ( $C_t$  – threshold cycle), появляется возможность наблюдать в реальном времени за кинетикой накопления флуорофора в реакционной смеси. Значение  $C_t$  обратно пропорционально количеству амплифицируемой матрицы в пробе [7].

Оптимальная длина ампликона для ПЦР в реальном времени, как правило, меньше 100 п.о. (60–80 п.о.). ПЦР-продукты, полученные с использованием ампликонов такой длины, более эффективно денатурируют, а время фазы элонгации может быть сокращено до 10–15 с, что заметно ускоряет весь процесс амплификации [8–10].

**Система FRET.** Оценку скорости образования продуктов ПЦР в реальном времени осуществляют и с использованием других физических принципов. В частности, функционирование зондов второго типа основано на резонансном переносе энергии флуоресценции (fluorescent resonance energy transfer – FRET). В этом случае два олигонуклеотида, специфичные в отношении продукта ПЦР, тандемно гибридизуют с продуктом в каждой фазе отжига праймеров. Выше расположенный

зонд содержит на своем 3'-конце возбуждающий краситель (в частности, FITC), а следующий за ним олигонуклеотид мечен по 5'-концу красителем-репортером (например, RED 640). Таким образом, в данной системе два вышеупомянутых красителя оказываются пространственно сближенными друг с другом после гибридизации с продуктом ПЦР. После этого возбуждение FITC сопровождается переносом электронов на акцепторную молекулу RED 640, которая испускает кванты света определенной энергии в более длинноволновой части спектра. Интенсивность флуоресценции четко коррелирует с количеством связавшихся зондов и с количеством образовавшегося продукта ПЦР [8,10].

**«Молекулярные маяки».** Третий тип зондов, используемых для обнаружения специфических продуктов ПЦР в реальном времени, получил название «молекулярных маяков» (molecular beacons). Такие олигонуклеотиды обладают тремя характерными чертами:

- к 5'- и 3'-концам «молекулярного маяка» присоединены соответственно тушитель флуоресценции и флуорофор;
- последовательности, примыкающие к данным красителям, самокомплементарны (поэтому в реакционной смеси зонды приобретают структуру типа «стебель – петля», в которой тушитель и флуорофор сближены и флуоресценция флуорофора-репортера подавлена);
- область петли зонда содержит последовательность, комплементарную анализируемому продукту ПЦР.

При температурах более низких, чем температура отжига зонда на продукт ПЦР, структура стебля сохраняется и «молекулярный маяк» находится в выключенном состоянии. После образования гибрида между зондом и продуктом ПЦР или денатурации зонда тушитель и флуорохром пространственно разделяются, флуорохром начинает флуоресцировать. Возбуждение электронов красителей осуществляют аргоновым лазером.

Системы ПЦР в реальном времени, основанные на «молекулярных маяках», обладают гораздо большей специфичностью, чем система TaqMan, и позволяют обнаруживать одиночные замены нуклеотидов в ДНК; они также пригодны для количественной оценки содержания продукта ПЦР по завершении реакции с помощью флуориметра.

К недостаткам этой группы методов следует отнести необходимость очень тщательного дизайна зондов, для каждого из



которых требуется проводить определение индивидуальных профилей плавления.

### **Флуоресцентные красители, связывающиеся с ДНК.**

Четвертый тип систем обнаружения продуктов ПЦР в реальном времени основан на непосредственном взаимодействии флуоресцентных красителей (например, SYBR Green) с двухцепочечной (дцДНК). Краситель, не связавшийся с ДНК, обнаруживает слабую флуоресценцию в растворе. По мере элонгации праймеров в цикле ПЦР флуоресценция возрастает в результате связывания красителя дцДНК. На стадии денатурации интенсивность флуоресценции снова уменьшается. В соответствии с этим интенсивность флуоресценции реакционной смеси измеряют в конце этапа элонгации каждого цикла. Хотя метод исключает необходимость в дополнительных флуоресцентных зондах, его специфичность низка и целиком определяется специфичностью взаимодействия праймеров с ДНК-матрицей. Вторым недостатком данного метода является зависимость интенсивности флуоресценции от размера продукта ПЦР. Чем больше длина синтезированной ДНК, тем большее количество молекул красителя с ней соединяется [7].

**Праймеры типа «Скорпион».** В одной из последних разработок ПЦР в реальном времени используются праймеры, которые сами заключают в своей последовательности флуоресцентно меченые зонды. Такие праймеры выполняют двойную функцию: обычную, обеспечивая синтез цепей ДНК, и функцию зонда, которая реализуется после включения праймера в продукт ПЦР. Принцип действия праймеров «Скорпион» представлен на рис. 16.9. 3'-концевая часть олигонуклеотида «Скорпион» включает в себя последовательность, комплементарную анализируемому участку ДНК и выполняющую непосредственную роль праймера. 5'-концевая часть олигонуклеотида сконструирована таким образом, что образует структуру типа «стебель – петля». За счет этого происходит сближение флуорофора, присоединенного непосредственно к 5'-концу «Скорпиона», с тушителем флуоресценции, расположенным в центральной части олигонуклеотида на границе последовательности праймера. В этом отношении пространственная структура олигонуклеотидов «Скорпион» напоминает таковую для «молекулярных маяков» и выполняет ту же функцию, пока олигонуклеотиды находятся в свободном состоянии. Однако в отличие от «молекулярных маяков» участок ДНК, находящийся в петле «Скорпиона», комплементарна-

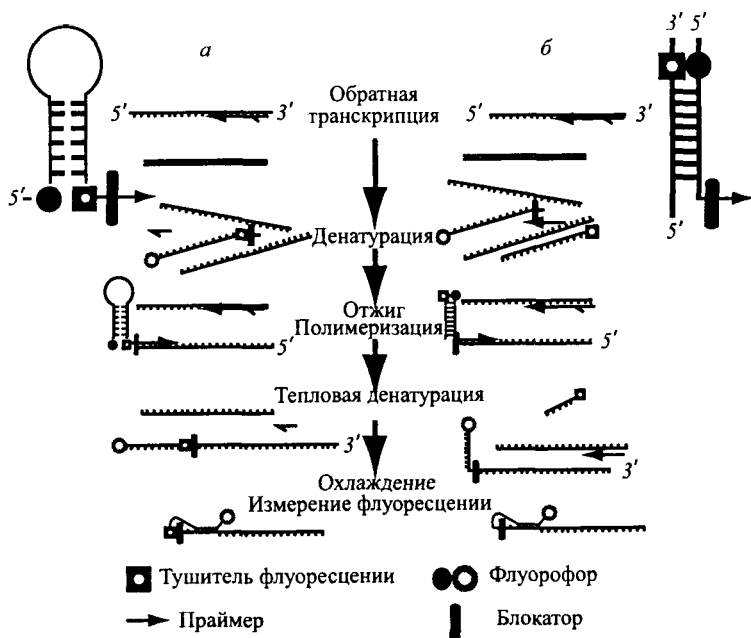


Рис. 16.9. Праймеры типа «Скорпион», используемые для обнаружения продуктов ПЦР в реальном времени. Олигонуклеотиды этого типа объединяют в одной (а) или двух (б) молекулах

рен последовательности нуклеотидов ампликона, что и обеспечивает ему уникальные свойства. Кроме того, за тушителем флуоресценции в цепь ДНК вводится мономер гексэтиленгликоля НЕГ, который блокирует прохождение ДНК-полимеразы вдоль матрицы до 5'-конца, т.е. прекращает амплификацию в этой точке, и последовательность, образующая структуру типа «стебель – петля», остается неамплифицированной [8,10].

## 16.6. Секвенирование ДНК

В настоящее время определение точной нуклеотидной последовательности любого сегмента ДНК умеренной длины – вполне разрешимая задача. Уже определена последовательность нескольких десятков тысяч генов про- и эукариот. Зная последовательность гена и генетический код, легко опреде-

лить аминокислотную последовательность кодируемого им белка. Раньше для определения структуры белка приходилось проводить тщательный и весьма трудоемкий анализ выделенного и очищенного белка. В настоящее время часто бывает проще установить структуру белка путем определения кодирующей его нуклеотидной последовательности ДНК, чем с помощью прямого секвенирования аминокислотной последовательности. Если секвенирование белка занимает месяцы и даже годы, то ДНК удастся секвенировать за несколько недель. Определение последовательности ДНК помогло обнаружить области ДНК, которые не кодируют белки, но принимают участие в регуляции экспрессии генов и репликации ДНК.

**Секвенирование ДНК методом химической дегградации по Максому – Гилберту.** В основе метода секвенирования ДНК путем химической дегградации лежит ограниченное расщепление меченого фрагмента ДНК под действием специфических реагентов. Непременным условием проведения секвенирования этим методом является наличие фрагмента ДНК, меченного радиоактивной меткой только по одному концу. Разделение продуктов дегградации по размеру с помощью высоковольтного электрофореза в полиакриламидном геле высокого разрешения, способного разделять фрагменты ДНК, различающиеся между собой по длине всего на один нуклеотид, и последующая радиоавтография геля позволяют определить нуклеотидную последовательность секвенированного участка ДНК (рис. 16.10).

Последовательность этапов:

- направленная модификация определенных гетерооснований в олигонуклеотиде под действием химических агентов;
- удаление модифицированных гетерооснований, приводящее к появлению в олигонуклеотидной цепи ациклического фрагмента на месте дезоксирибофуранозы. Последующее выщепление этого алифатического фрагмента в результате реакции  $\beta$ -элиминирования сопровождается разрывом олигонуклеотидной цепи и образованием двух 5'-фосфорилированных фрагментов, один из которых имеет радиоактивную метку. В результате четырех (или иногда трех, пяти или даже шести) типов реакций образуется смесь олигонуклеотидных молекул, различающихся по размеру на один нуклеотид и несущих на одном из концов метку;
- разделение продуктов реакции в соседних дорожках секвенирующего денатурирующего полиакриламидного геля;

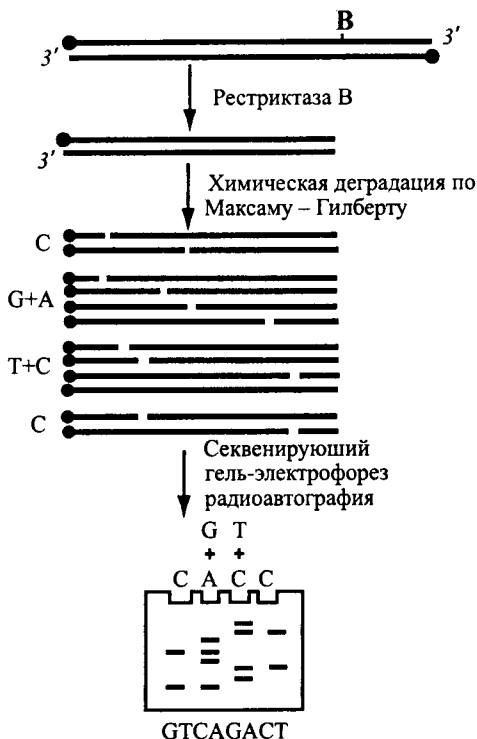


Рис. 16.10. Схема определения нуклеотидной последовательности ДНК методом химической деградации

- радиоавтография на рентгеновской пленке лестницы из полос ДНК на соседних дорожках, а также восстановление последовательности нуклеотидов секвенируемого фрагмента ДНК.

Несмотря на относительно низкую производительность метода секвенирования ДНК путем химической деградации, он в настоящее время все же продолжает использоваться и в отдельных случаях почти незаменим. Так, метод химической деградации применяется для секвенирования синтетических олигонуклеотидов в тех случаях, когда:

- участки ДНК с обильным наличием вторичных структур, приводящих к сверхспирализации цепи, не всегда бывает возможно секвенировать с помощью ферментативного построения новой цепи ДНК;

- с помощью секвенирующего гель-электрофореза необходимо выявить ДНК-белковые взаимодействия после того, как ДНК вместе с белком подверглась химической модификации по Максаму – Гилберту;

К преимуществам данного метода секвенирования можно отнести:

- определение последовательности фрагмента ДНК, или геномного, или клонированного в каком-либо подходящем векторе (т.е. реплицировавшегося *in vivo*), а не новосинтезированная *in vitro* копия, как в ферментативном методе с дидезокситерминаторами;

- осуществление метода возможно практически с любого сайта узнавания любой эндонуклеазы, присутствующего во вставке, и поэтому не требуется предварительной информации об участке нуклеотидной последовательности, окружающей данное место;

- использование метода в качестве стартового при выполнении крупномасштабных проектов по определению нуклеотидных последовательностей протяженных фрагментов ДНК.

В качестве *серьезного недостатка* данного метода необходимо отметить высокую токсичность используемых реагентов, обращение с которыми и их дальнейшая утилизация требуют соблюдения определенных правил.

**Секвенирование ДНК ферментативным методом по Сэнгеру.** В основе ферментативного метода секвенирования ДНК лежит синтез меченой комплементарной цепи ДНК с использованием в качестве матрицы нативной ДНК (рис. 16.11). Для осуществления синтеза необходимы следующие компоненты:

- термостабильная ДНК-полимераза;
- набор четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов;
- одноцепочечная матрица, нуклеотидная последовательность которой должна быть определена;
- праймер, с которого начинается синтез;
- модифицированные дидезоксирибонуклеотиды ddNTP – терминаторы синтеза ДНК, лишённые гидроксильных групп в 2'- и 3'-положениях углеводного кольца, что делает их неспособными встраиваться в растущую олигонуклеотидную цепочку и тем самым прерывать (терминировать) ее удлинение.

В результате элонгация данной цепи терминируется в том месте, где в ДНК включился дидезоксирибонуклеотид ddNTP. Поэтому их называют *терминаторами элонгации*.

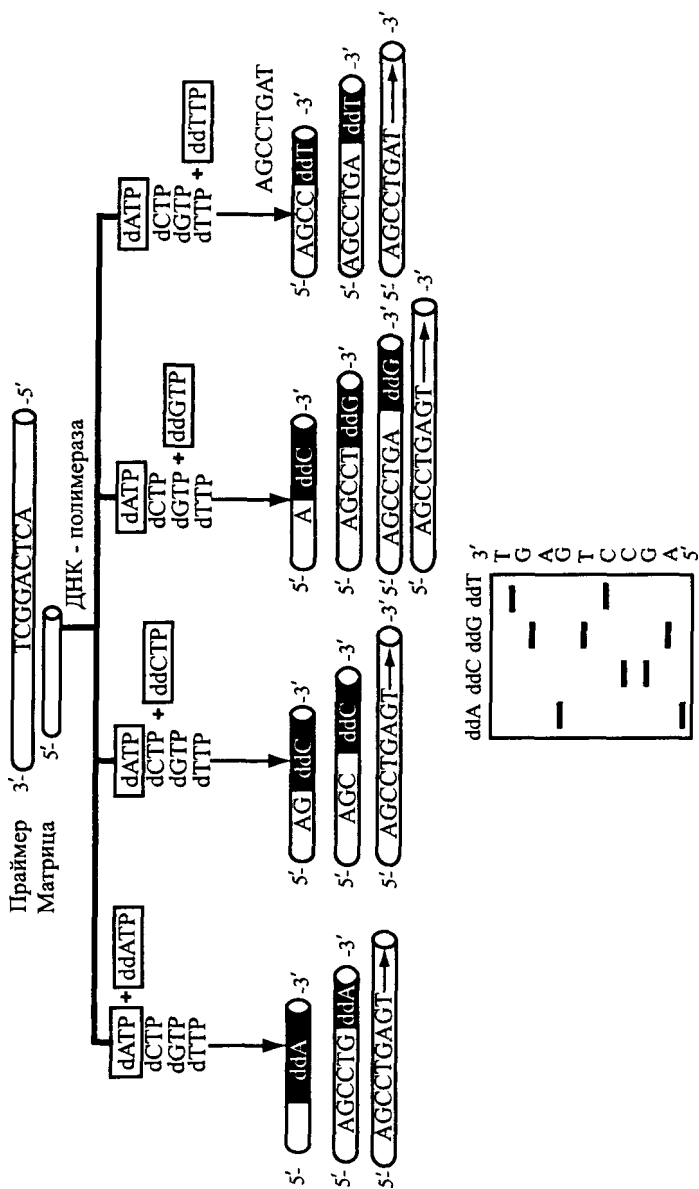


Рис. 16.11. Схема определения нуклеотидной последовательности ДНК ферментативным методом

Обычно готовят четыре смеси, каждая из которых содержит один из четырех ddNTP. В каждой из пробирок образуется набор меченых фрагментов разной длины. Длина их зависит от того, в каком месте в цепь включен дефектный нуклеотид. Полученные меченые фрагменты ДНК разделяют в полиакриламидном геле (с точностью до одного нуклеотида), проводят радиоавтографию и по картине распределения фрагментов в четырех пробах устанавливают нуклеотидную последовательность ДНК.

В настоящее время широкое распространение получила методология автоматического ДНК-секвенирования с использованием генетических анализаторов. Признанным мировым лидером в данной области является компания «Applied Biosystems» (США), приборы которой использовались в ходе реализации программы «Геном человека».

После проведения классической ПЦР-амплификации полиморфизмсодержащего локуса геномной ДНК, очистки продукта амплификации и инактивации дезокситрифосфатов проводится секвенсовая реакция. Вторичная очистка продуктов реакции секвенирования и денатурация предшествуют капиллярному электрофорезу (рис.16.12).

Электрофорез в этом случае проводят в одном капилляре, и на электрофореграмме каждому из четырех нуклеотидов, маркированных различными флуорофорами, соответствует свой цвет полосы, которую сканируют в луче лазера, занося данные в компьютер.



Рис. 16.12. Схема проведения секвенирования на генетическом анализаторе

## Литература

1. *Viljoen, Gerrit J.* Molecular Diagnostic PCR Handbook / Gerrit J. Viljoen [et. al]. Springer, 2005.
2. *McPherson, M.J.* PCR. Second Edition / M.J. McPherson [et. al]. BIOS Scientific Publishers Limited, 2006.
3. *Глик, Б.* Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик [и др.]. М., 2002.
4. *Заякин, О.Б.* Научные и практические аспекты криминалистического ДНК-анализа / О.Б. Заякин [и др.]. М., 2001.
5. *Патрушев, Л.И.* Искусственные генетические системы / Л.И. Патрушев. М., 2004.
6. *Ребриков, Д.В.* ПЦР в «реальном времени» / Д.В. Ребриков. М., 2009.
7. *Щелкунов, С.Н.* Генетическая инженерия / С.Н. Щелкунов. Новосибирск, 2004.
8. *Dieffenbach, Carl W.* PCR primer: a laboratory manual / Carl W. Dieffenbach [et. al]. New York, 2003.
9. *Bartlett, John M.S.* PCR protocols / John M.S. Bartlett [et. al]. New Jersey, 2003.
10. *Logan, Julie M.J.* Real-time PCR: current technology and applications / Julie M.J. Logan [et. al]. UK, 2009.
11. *Van Pelt-Verkuil, E.* Principles and technical aspects of PCR amplification / E. Van Pelt-Verkuil [et. al]. New York, 2007.
12. *Yuryev, A.* PCR primer design / A. Yuryev. New Jersey, 2007.
13. *Innis, Michael A.* PCR applications: protocols for functional genomics / Michael A. Innis [et. al]. USA, 1999.



# ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ПРЕДИЛОВИЕ</b> .....	3
<b>ГЛАВА 1. БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДЛЯ ОТБОРА КОМПОНЕНТОВ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ВАКЦИН</b> .....	5
1.1. Схема отбора компонентов для синтетических вакцин ....	5
1.2. Определение основных направлений мутационного давления в вирусном гене .....	8
1.3. Выделение наиболее иммуногенных областей вирусного белка .....	14
1.4. Предсказание вторичной структуры для выделенных В-клеточных эпитопов .....	21
1.5. Оценка уровней мутабельности В-клеточных эпитопов вирусного белка .....	23
1.6. Оценка консервативности В-клеточных эпитопов вирусного белка .....	29
<i>Литература</i> .....	34
<b>ГЛАВА 2. МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ И ПРИЕМЫ ПОЛУЧЕНИЯ КРИСТАЛЛОВ БЕЛКОВ: КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ МИНОРНОЙ ФОРМЫ ГЕМОГЛОБИНА A<sub>2</sub></b> .....	34
2.1. Обзор методов кристаллизации белковых молекул .....	36
2.2. Стратегии кристаллизации белковых молекул .....	51
2.3. Получение кристаллов гемоглобина A <sub>2</sub> .....	55
<i>Литература</i> .....	64
<b>ГЛАВА 3. ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ФЕРМЕНТОВ</b> .....	65
3.1. Количественное определение белка .....	66
3.2. Общие правила работы с ферментами .....	75
3.3. Определение активности ферментов .....	77
3.4. Выделение и очистка ферментов .....	79
3.5. Частичная очистка растворимой НТФазы из почек быка ...	91
3.6. Исследование свойств ферментов .....	99
<i>Литература</i> .....	104

<b>ГЛАВА 4. АНАЛИЗ АМИНОКИСЛОТ И РОДСТВЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ</b> .....	104
4.1. Аналитические задачи, требующие аминокислотного анализа .....	104
4.2. Определение свободных аминокислот с помощью ионообменной хроматографии .....	107
4.3. Высокоэффективная ионно-обменная хроматография (ВЭЖХ) .....	117
<i>Литература</i> .....	131
<b>ГЛАВА 5. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОТЕОЛИЗА</b> .....	132
5.1. Биологическая роль протеолиза .....	133
5.2. Методы определения активности протеолитических ферментов .....	135
5.3. Препаративные методы при анализе протеолитической активности .....	152
<i>Литература</i> .....	156
<b>ГЛАВА 6. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ И СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В КЛЕТКАХ И ТКАНЯХ</b> .....	158
6.1. Определение показателей, характеризующих активность свободнорадикальных процессов .....	159
6.2. Определение концентрации диеновых конъюгатов в микросомальной фракции печени крыс .....	163
6.3. Определение концентрации вторичных продуктов ПОЛ и скорости процессов перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот с тиобарбитуровой кислотой .....	164
6.4. Определение скорости ПОЛ в микросомальной фракции печени крыс в присутствии прооксидантов .....	167
6.5. Оценка окислительной модификации белков .....	170
6.6. Определение показателей АОС .....	173
6.7. Метод определения антиоксидантной активности смесей веществ или биологических жидкостей с использованием микросомальной фракции печени крыс в качестве модельной системы окисления .....	193
<i>Литература</i> .....	195

<b>ГЛАВА 7. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА И ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ</b> .....	196
7.1. Полярнографический метод .....	197
7.2. Исследование тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования изолированных митохондрий .....	199
7.3. Преимущества изучения митохондриального окисления целой ткани .....	206
<i>Литература</i> .....	212
<b>ГЛАВА 8. БИОХИМИЯ ДЫХАНИЯ И ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА</b> .....	213
8.1. Тканевой цилиндр Крога .....	213
8.2. Концепция конвективного механизма транспорта кислорода .....	217
8.3. Методы исследования осцилляторного массопереноса воды и кислорода .....	223
8.4. Математическое моделирование дыхания и оксигенации	226
8.5. Диффузионный и осцилляторный механизмы оксигенации	228
<i>Литература</i> .....	231
<b>ГЛАВА 9. БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЦИКЛА ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ</b> .....	232
9.1. Роль цикла трикарбонных кислот в обмене веществ .....	232
9.2. Методы определения активности ферментов ЦТК .....	234
9.3. Определение содержания субстратов ЦТК .....	249
<i>Литература</i> .....	254
<b>ГЛАВА 10. БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЛИКОЛИЗА</b> .....	255
10.1. Биологическое значение гликолиза .....	255
10.2. Определение содержания некоторых субстратов гликолитического пути .....	258
10.3. Определение активности важнейших ферментов гликолитического пути .....	266
<i>Литература</i> .....	272

<b>ГЛАВА 11. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ОБМЕНА ЛИПИДОВ</b> .....	273
11.1. Экстракция липидов из крови и тканей .....	273
11.2. Исследование состава липидов методом тонкослойной хроматографии .....	274
11.3. Количественное определение триглицеридов сыворотки крови .....	282
11.4. Качественный и количественный анализ высших жирных кислот методом газожидкостной хроматографии .....	284
<i>Литература</i> .....	292
<b>ГЛАВА 12. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ МИКРОСОМАЛЬНЫХ И МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ МЕМБРАН</b> .....	293
12.1. Микросомальные мембраны и метаболизм ксенобиотиков	293
12.2. Выделение микросом. Количественное определение цитохромов .....	298
12.3. Определение активности некоторых ферментов лекарственного метаболизма .....	299
12.4. Определение активности системы метаболизма ксенобиотиков в целом организме .....	302
12.5. Митохондриальные мембраны. Электрон-транспортная цепь митохондрий .....	305
12.6. Биохимический анализ мембран митохондрий .....	309
<i>Литература</i> .....	317
<b>ГЛАВА 13. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОХИМИИ ФАГОЦИТОЗА</b> .....	318
13.1. Выделение нейтрофилов крови человека .....	320
13.2. Определение жизнеспособности клеток .....	322
13.3. Исследование генерации АФК .....	326
13.4. Изучение процессов активации клеток, связанных с изменением концентрации свободных ионов $\text{Ca}^{2+}$ в цитозоле .....	330
13.5. Методы регистрации внутриклеточной концентрации $\text{Ca}^{2+}$ .....	333
<i>Литература</i> .....	341

<b>ГЛАВА 14. БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ МЕТАБОЛИЗМА В ПЕЧЕНИ</b> .....	341
14.1. Методики воспроизведения повреждения печени .....	342
14.2. Спектрофотометрическое определение суммарного содержания нуклеиновых кислот .....	343
14.3. Определение содержания гликогена в печени по Р. Крисман .....	354
14.4. Определение содержания холестерина в печени .....	356
14.5. Оценка цитотоксичности гепатотропных препаратов <i>in vitro</i> .....	357
14.6. Методы оценки апоптоза гепатоцитов .....	364
14.7. Оценка цитотоксичности с использованием культуры клеток Hep2 (на примере гемолимфы куколок дубового шелкопряда) .....	368
<i>Литература</i> .....	370
<b>ГЛАВА 15. СОВРЕМЕННЫЙ ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ: ПРИНЦИПАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ, РАЗНОВИДНОСТИ И ВОЗМОЖНОСТИ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ</b> .....	371
15.1. Иммунохимический анализ: основные термины и понятия	372
15.2. Радиоиммунологический анализ .....	377
15.3. Иммуноферментный анализ .....	387
15.4. Развитие методов ИХА .....	392
15.5. Методы современного экспрессного иммунохимического анализа .....	394
15.6. Иммунохроматографический анализ .....	398
15.7. Перспективы развития средств иммунохимического анализа .....	401
<i>Литература</i> .....	404
<b>ГЛАВА 16. ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА</b> .....	404
16.1. ДНК-матрица .....	405
16.2. Праймеры (олигонуклеотиды) .....	407
16.3. Термостабильные ДНК-зависимые ДНК-полимеразы ....	415
16.4. Проведение ПЦР .....	417
16.5. Методы ПЦР .....	419

16.6. Секвенирование ДНК .....	432
<i>Литература</i> .....	438

**ГЛАВА 17. ЗАЩИТНЫЕ РЕАКЦИИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ОБЪЕКТОВ ПРИ СТРЕССЕ И МЕТОДЫ ИХ ОЦЕНКИ** 438

17.1. Подготовка материала для исследований .....	439
17.2. Воспроизведение стресса у растений .....	442
17.3. Методы исследования продуктов окислительной деградации макромолекул .....	444
17.4. Методы исследования антиоксидантной системы растительного организма .....	446
17.5. Рутинные биохимические параметры растительных объектов .....	457
17.6. Методы исследования растительных фенолов .....	462
17.7. Молекулярно-генетические исследования растительных объектов .....	466
<i>Литература</i> .....	468

**ГЛАВА 18. ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ PPAR** 469

18.1. Структура и механизмы функционирования .....	470
18.2. Экспрессия генов <i>PPAR</i> в организме .....	472
18.3. Выделение и очистка суммарной РНК из животных тканей .....	474
18.4. Синтез кДНК на РНК-матрице .....	479
18.5. Количественная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени .....	481
<i>Литература</i> .....	485

Учебное издание

**Барковский Евгений Викторович**  
**Бокуть Сергей Борисович**  
**Бородинский Александр Николаевич** и др.

**СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ БИОХИМИИ.**  
**МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Учебное пособие

Редактор *А.В. Новикова*  
Художественный редактор *Т.В. Шабунько*  
Технический редактор *Н.А. Лебедевич*  
Корректоры *Т.К. Хваль, Н.Г. Баранова*  
Компьютерная верстка *А.Н. Бабенковой*

Подписано в печать 11.03.2013. Формат 84×108/32. Бумага офсетная.  
Гарнитура «Times New Roman». Офсетная печать. Усл. печ. л. 26,04.  
Уч.-изд. л. 28,05. Тираж 400 экз. Заказ 541.

Республиканское унитарное предприятие «Издательство “Вышэйшая школа”».  
ЛП № 02330/0494062 от 03.02.2009. Пр. Победителей, 11, 220048, Минск.  
e-mail: market@vshph.com <http://vshph.com>

Филиал № 1 открытого акционерного общества «Красная звезда».  
ЛП № 02330/0494160 от 03.04.2009. Ул. Советская, 80, 225409, Барановичи.