



БИОМИКА / BIOMICS

<http://biomics.ru>



ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ УСУ «КОДИНК» – УНИКАЛЬНОГО СТЕНДА/УСТАНОВКИ «КОМПЛЕКС ОБОРУДОВАНИЯ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ» В ИБГ УНЦ РАН, ЕГО ИСТОРИЧЕСКИЕ ПРЕДПОСЫЛКИ И ДАЛЬНЕЙШЕЕ РАЗВИТИЕ

Гарафутдинов Р.Р., Магданов Э.Г., Бикбулатова С.М., Никоноров Ю.М., Гималов Ф.Р., Чемерис А.В.

Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и генетики
Уфимского научного центра РАН, Уфа, chemeris@anrb.ru

Методы исследования нуклеиновых кислот и приборная база Института - от самодельных разработок до новейших аппаратов

Исторически сложилось так, что нуклеиновые кислоты, причем принадлежащие объектам всех уровней генетической сложности: вирусам, бактериям, грибам, растениям, животным, включая человека, стали практически основным предметом исследований Института биохимии и генетики (до 1999 г. - Отдела биохимии и цитохимии). Отдельным направлением является изучение синтетической модифицированной ДНК. О значимости исследований нуклеиновых кислот вряд ли стоит долго говорить, поскольку хорошо известно, что ДНК и РНК – это молекулы наследственности, и они несут в себе генетическую информацию, знания о которой крайне важны.

Фактически еще до момента образования в 1962 г. нынешнего Учреждения Российской академии наук Института биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, возникшего на базе лаборатории нуклеинового обмена Института биологии Башкирского филиала АН СССР как Отдел биохимии и цитохимии БФ АН СССР, все эти годы с разной интенсивностью шли процессы как укрепления материально-технической базы, направленной на всестороннее исследование нуклеиновых кислот, так и формирования научных школ, ставящих перед собой целью изучение этих важных биополимеров. Причем происходило не только пополнение приборного парка и создание запасов определенных расходных материалов и реактивов, но и издание соответствующих научных публикаций методического плана. Так, книги первого директора-организатора нашего Института В.Г.Конарева «Цитохимия и гистохимия растений», «Методы

исследования нуклеиновых кислот растений» и В.Г.Конарева с С.Л.Тютеревым «Методы биохимии и цитохимии нуклеиновых кислот растений», вышедшие в 1966, 1967 и 1970 гг. в издательствах «Высшая школа» и «Колос», суммировали в себе описание и подробный анализ практически всех применявшихся в те годы методов исследования нуклеиновых кислот и белков растений, благодаря чему они на протяжении многих лет были настольными руководствами нескольких поколений биохимиков растений всего СССР. Объемная монография А.В.Чемериса, Э.Д.Ахунова и В.А.Вахитова «Секвенирование ДНК»¹, выпущенная издательством «Наука» в 1999 году при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и ставшая «бестселлером», продолжила традиции своих предшественниц, явилась и пока остается первой и единственной книгой подобного рода в России. В настоящее время сотрудниками Института биохимии и генетики (А.В.Чемерис и соавт.) завершается подготовка рукописи коллективной монографии с рабочим названием «Циклика нуклеиновых кислот», в которой рассмотрены практически все существующие методы амплификации и высокочувствительной детекции специфичных фрагментов нуклеиновых кислот, как регулируемые сменой температур, так и протекающие в изотермических условиях. Нет сомнения в том, что эта книга будет востребована, поскольку аналогов не имеется не только в отечественной, но и в мировой литературе. Написанию этих трудов, безусловно, способствовало

¹ В виде pdf-файлов эта книга находится в свободном доступе на соответствующей странице <http://ibg.anrb.ru/chemeris.html> web-сайта ИБГ УНЦ РАН.

приборное оснащение Института, в каждый отрезок времени более-менее отвечающее современным тенденциям развития биохимии, цитохимии, молекулярной биологии и других биологических дисциплин. Причем имеющиеся приборы и оборудование позволяли сотрудникам Института не только успешно осваивать известные методы, но и способствовали разработке новых.

Известно, что приборная база и используемые методы неразрывно связаны друг с другом, и именно им принадлежит главенствующая роль в прорывных исследованиях в области физико-химической биологии, да и, наверное, подавляющего большинства других естественных наук. Если попытаться даже очень кратко проанализировать основные методы исследований нуклеиновых кислот и разработанные под них приборы в 60-е, 70-е и последующие годы, то очевиден огромный методический прогресс и постоянно растущее, если так можно выразиться, «биоприборное» разнообразие. Основными методами изучения нуклеиновых кислот в 60-е и в начале 70-х гг. были спектрофотометрия, хроматография, аналитическое и препаративное ультрацентрифугирование и некоторые другие. Активно использовались радиоизотопное мечение нуклеиновых кислот и сопровождающая его радиоавтография. Применялась и электронная микроскопия. Набирало силу электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот, точнее молекул РНК, поскольку фракционирование фрагментов ДНК стало возможным несколько позже, главным образом, после открытия рестрикционных эндонуклеаз. Соответствующими были и приборы того времени. В первую очередь это аналитические и препаративные ультрацентрифуги, лидером по производству которых была и остается несколько изменившая в последние годы свое название американская фирма Beckman-Coulter. О надежности и долговечности их техники говорит, в том числе, и тот факт, что нами совсем недавно была выведена из эксплуатации препаративная ультрацентрифуга модели Spenco L2-65B фирмы Beckman 1971 года выпуска, безотказно служившая без малого 40 лет, у которой лишь однажды во второй половине 80-х гг. была проведена профилактическая замена привода, после того как он полностью «откатал» свой ресурс. Посетившие пару лет назад Институт биохимии и генетики УНЦ РАН представители фирмы Beckman-Coulter в России с большим интересом ее осматривали, фотографировали, поскольку ультрацентрифуга данной модели оставалась в рабочем состоянии возможно единственной в мире, и они такую прежде никогда не видели!

Некоторое время в Институте проработали и ультрацентрифуги VAC-601 и VAC-602 производства

ГДР, запомнившиеся своими не очень удачными непрозрачными пластиковыми пробирками. В 80-х гг. в СССР, используя потенциал оборонной промышленности, имевшей опыт производства центрифуг для обогащения урана, были предприняты попытки выпуска собственных ультрацентрифуг. И две такие ультрацентрифуги модели Ж-62 в нашем Институте эксплуатировались на протяжении полутора десятков лет, причем их уникальной особенностью было то, что ротор во время вращения с помощью магнитной подвески был как бы подвешен в вакууме, что при внезапном внештатном отключении электроэнергии приводило, ввиду отсутствия ощутимого трения, к крайне долгой остановке вращения ротора, длившейся многие часы. По счастью, такое случалось не часто. Имелись в Институте и две аналитические ультрацентрифуги венгерского производства модели MOM 3170, в комплекте которых было и по одному препаративному ротору. На смену всем им была приобретена современная ультрацентрифуга модели Optima L-90K фирмы Beckman-Coulter, которая сейчас одна вполне справляется со стоящими перед сотрудниками Института задачами, поскольку в молекулярно-биологических методах и подходах произошла определенная смена акцентов. При этом в физико-химической биологии до сих пор есть отдельные задачи, которые невозможно выполнить без этапов ультрацентрифугирования, и посему такая техника обязательно должна быть в арсенале исследователей.

Другой дорогостоящей техникой в те годы были автоматические счетчики радиоактивности. В нашем Институте активно использовались весьма удобные в работе системы для жидкостного сцинтилляционного счета с конвейером на 300 образцов модели Isosap 300 фирмы Searle (США), пришедшие на смену устаревшему оборудованию отечественного производства модели УМФ-1500М с торцевым счетчиком МСТ-17 и отдельно стоящим пересчетным прибором Б-2, когда результаты измерения каждого образца надо было записывать вручную. Много позже, уже в новом тысячелетии, нами был приобретен сцинтилляционный счетчик модели Triathler фирмы Hydrex (Финляндия), способный к тому же регистрировать и люминесценцию. И хотя он рассчитан на одновременный анализ всего одного образца, его главными преимуществами перед счетчиками Isosap 300 являются: а) автоматический пересчет регистрируемых импульсов в распады (т.е. вместо $\text{cpm} - \text{counts per minute}$, данный прибор выдает результаты сразу в $\text{dpm} - \text{decays per minute}$), что исключает ошибку из-за возможной неодинаковой эффективности счета у разных образцов; б) высокий предел его чувствительности,

позволяющий регистрировать до миллиарда распадов в минуту вместо миллиона импульсов у наших старых сцинтилляционных счетчиков. При этом следует отметить, что использование в молекулярной биологии радионуклидов для мечения нуклеиновых кислот заметно сократилось в силу различных причин (рассмотрение которых выходит за пределы данного повествования), и теперь таких задач по подсчету сотен меченных радиоизотопами образцов уже не стоит.

Имелось в Институте и такое сложное оборудование, как электронные микроскопы. Надо отметить, что электронная микроскопия в изучении молекул ДНК сыграла в свое время значительную роль, но появление позже множества новых более простых и одновременно более информативных методов исследования нуклеиновых кислот практически полностью вычеркнуло ее из арсенала основных молекулярно-биологических методов, ориентированных на анализ молекул ДНК. Аналогично развивались события и в нашем Институте, и на смену электронным микроскопам модели ЭМВ-100К производства завода электронных микроскопов и электроавтоматики (г. Сумы, УССР) и еще более старой чехословацкой Tesla пришли микроскопы, основанные на иных физических принципах: это сканирующий зондовый микроскоп модели Solver Pro-M фирмы НТ МДТ (Россия, Зеленоград), сканирующий лазерный микроскоп модели LSM5 Exciter, а также флуоресцентный микроскоп модели AxioImager M.1 (оба фирмы Carl Zeiss, Германия) и новый революционного вида и возможностей флуоресцентный микроскоп модели Biozero серии BZ-8100 японской фирмы Keyence. Теперь в дополнении к имеющимся микроскопам решено приобрести еще один прибор модели TransferMap NK2 немецкой фирмы Eppendorf, по сути также являющийся микроскопом, но оснащенный микроманипулятором и микродиссектором, позволяющими, в том числе, оперировать с единичными клетками (их инъецировать, изолировать), что переведет наши исследования на новый уровень.

Из классических методов изучения и фракционирования нуклеиновых кислот всегда важная роль отводилась колоночной, да и другим видам хроматографии, которые широко применялись для фракционирования цельных молекул РНК, фрагментов ДНК, плазмидной ДНК. В нашем Институте ранее очень активно эксплуатировались хроматографические системы низкого давления Uvicord (разных моделей) в комплекте с перистальтическими насосами и коллекторами фракций производства шведской фирмы LKB. В настоящее время в Институте имеется одна ВЭЖХ

(высокоэффективная жидкостная хроматографическая) система высокого давления с коллектором фракций фирмы Bio-Rad Laboratories (США), уже не справляющаяся с требуемыми объемами хроматографирования, поскольку стоящие перед нами задачи в этой области весьма обширны, постоянно растут и уже очень остро стоит необходимость приобретения других современных хроматографов.

Спектрофотометрические измерения в 60-е - 80-е гг. велись с помощью различных моделей отечественных спектрофотометров производства Ленинградского оптико-механического объединения (ЛОМО): СФ-4А, СФ-16, СФ-26, СФ-46, СФ-56. Помимо них имелось несколько спектрофотометров Spekord M40 производства ГДР, к сожалению, часто вышедших из строя, причем у них ломались разные блоки, что иногда давало возможность с помощью собственной ремонтной группы до приезда специалистов из трех временно неработающих создавать хотя бы один годный к работе. Это всё были приборы весьма габаритные. Сейчас имеющиеся в Институте спектрофотометры разных фирм (Bio-Rad Laboratories, Shimadzu) гораздо компактнее, но возможностей у них намного больше. Явная тенденция к миниатюризации реакционных объемов и количеств анализируемых биополимеров в молекулярной биологии коснулась и спектрофотометрии, благодаря чему Институту приобретен уникальный спектрофотометр Nanodrop (Thermo Scientific, США), измеряющий концентрацию нуклеиновых кислот всего в одном микролитре жидкости.

Приборы для секвенирования ДНК – прорывной технологии в исследованиях нуклеиновых кислот

Во второй половине 70-х гг. прошлого столетия в арсенале молекулярных биологов появились два быстрых (по тогдашним меркам) метода определения последовательности нуклеотидов путем химической дегградации по Максаму-Гильберту и ферментативным построением цепи ДНК с дидезокситерминаторами по Сэнгеру, давшие в руки исследователей возможность получения принципиально новых сведений об этой макромолекуле в виде генетических текстов, ранее недоступных, что оказало значительное влияние на дальнейшее развитие не только самой молекулярной биологии, но и общей биологии и других смежных областей знаний. При этом почти целое десятилетие секвенирование велось в ручном режиме в довольно просто устроенных ДНК-секвенаторах, представляющих собой камеры для вертикального электрофореза увеличенного размера (до метра высотой), другими особенностями которых были ультратонкие полиакриламидные гели (от 0,2 до 0,4

мм толщиной) и очень большой градиент напряжения, достигающий 50-60V на см длины геля. В нашем Институте использовалось несколько моделей таких ДНК-секвенаторов производства разных фирм (Bio-Rad Laboratories, LKB, Hoefer). Некоторые из них до сих пор находятся в работе, только используются ввиду низкой производительности не для секвенирования как такового, а при других исследованиях молекул ДНК. После того, как в 1980 г. была опубликована статья с описанием ДНК-секвенатора с термостатируемой пластиной геля для исключения сильно мешающего «чтению» эффекта «улыбки»², нами было принято решение изготовить аналогичный, что и было осуществлено. Этот наш самодельный прибор успел некоторое время успешно эксплуатироваться до того, как тот принцип исключения «улыбки» был реализован в коммерческом секвенаторе модели Mascorphog шведской фирмы LKB, который мы незамедлительно (насколько позволяло тогдашняя схема закупок импортного научного оборудования) приобрели.

С конца 80-х гг. стали появляться первые автоматические ДНК-секвенаторы, резко ускорившие процесс чтения нуклеотидных последовательностей. Но только через десятилетие такие секвенаторы появились и в нашем Институте, что отчасти объясняется трудными годами для российской науки, когда из-за проводимых реформ денег на научные исследования в стране почти не оставалось. Сделать самим автоматический ДНК-секвенатор нам все же было не под силу, ввиду чрезвычайной сложности такой техники, да и по причине отсутствия в стране нужных комплектующих.

По меркам сегодняшнего дня те «быстрые» методы секвенирования ДНК конца 70-х – начала 00-х гг. нового тысячелетия и приборы для них уже не отвечают стоящим перед экспериментаторами задачам, и соответственно требуется разработка принципиально новых методов секвенирования и приборов для них, чему во всем мире (преимущественно в США) уделяется очень серьезное внимание, поскольку появление удобного, дешевого и очень быстрого метода секвенирования ДНК сулит огромные перспективы и принесет разработчикам гигантские прибыли. Появление такого метода секвенирования вкупе с соответствующим оборудованием коренным образом изменит всю биологическую науку, поскольку некоторые направления исследований, в

частности изучение полиморфизма ДНК, станут в их нынешнем виде слишком дорогостоящими и дешевле будет секвенировать весь геном конкретного индивида и уже с помощью биоинформатики выявлять присущий ему полиморфизм. В этой связи имеются все основания считать, что роль биоинформатики в биологии в будущем еще более возрастет. Фактически, в настоящее время в зависимости от применяемого метода, относящегося к новым методам, в англоязычной литературе обозначаемым как «Next Generation Sequencing», стоимость секвенирования одного миллиона нуклеотидов варьирует от 5 до 1000 долларов. При этом стоимость определения последовательности одного миллиона нуклеотидов для способов секвенирования, которые должны позволить «читать» человеческий геном за 1000 долларов, будет составлять всего около 30 центов, тогда как еще не так давно 50 центов стоило секвенирование всего одного нуклеотида методом Сэнгера с дидезокситерминаторами, которое уже не применяется в качестве основного подхода при выполнении проектов по полногеномному секвенированию. Но, как показывают расчеты, эти величины все же далеки от того, чтобы секвенирование привело к персональной медицине, и поэтому сейчас стали говорить о еще более производительных методах секвенирования, называемых как «NNGS» - «Next Next Generation Sequencing».

Весьма перспективно секвенирование ДНК, основанное на детекции образующихся при полимеризации ДНК протонов, разработанное небольшой американской фирмой Ion Torrent, которую в 2010 г. за 725 млн. долларов приобрел гигант Life Technologies, и уже коммерчески реализуется модель PGM sequencer – персональный геномный секвенатор, который пока не в состоянии одномоментно «читать» человеческий геном или равный ему по размеру, но вполне подходит для секвенирования бактериальных геномов, что также весьма востребовано и крайне нас интересует, поскольку у наших коллег из Института биологии УНЦ РАН имеются уникальные штаммы микроорганизмов, принадлежащие роду *Halomonas*, из которого до сих пор не секвенированы полные геномы ни одного представителя.

Несмотря на то, что мы сами разрабатываем новый метод секвенирования ДНК на основе нанотехнологии, относящийся к поколению NNGS или даже к следующему, завершение этой нашей разработки, ввиду весьма скудного финансирования, к сожалению, произойдет не так быстро, а определение последовательностей нуклеотидов некоторых отдельных геномов не хочется

² Эффект «улыбки» электрофоретического рисунка разделяемых фрагментов ДНК возникает за счет неравномерного нагрева геля во время электрофореза, когда посередине ток выше, чем по краям

откладывать. Поэтому у нас есть намерение приобрести именно PGM секвенатор, учитывая не только его относительно невысокую стоимость, но и особенности конструкции, где могут использоваться разные чипы, рассчитанные, в зависимости от стоящих перед экспериментатором задач на секвенирование >10 млн. пар нуклеотидов, >100 млн. и >1 млрд. пар нуклеотидов, что делает данный прибор относительно легкомасштабируемым и фактически универсальным ДНК-секвенатором. К тому же не вызывает сомнений, что фирмой-изготовителем будет продолжено совершенствование чипов для увеличения их производительности.

Химический синтез олигонуклеотидов

Параллельно с разработкой молекулярно-биологических методов и приборов для их осуществления с середины 60-х гг. шло улучшение методов химического синтеза коротких фрагментов нуклеиновых кислот – олигонуклеотидов, завершившееся в начале 80-х революционным переходом к амидофосфитному (фосфорамидитному) методу. Благодаря использованию высокореакционных соединений трехвалентного фосфора, скорость синтеза и его эффективность возросли настолько, что один цикл синтеза, занимавший прежде целый месяц, сократился до нескольких минут на звено, а конечный выход олигонуклеотидов существенно увеличился. Проведение того же секвенирования ДНК и многих других экспериментов в области физико-химической биологии уже просто невозможно без синтетических олигонуклеотидов, в связи с чем они уже давно требуются в огромных количествах и с разными последовательностями. Поэтому на смену ручному синтезу олигонуклеотидов во второй половине 80-х гг. пришел автоматический, где добавление новых порций реагентов и стадии промывки осуществляются по заданной программе в специальном ДНК-синтезаторе. Несмотря на существование заказного синтеза олигонуклеотидов, при разработке, например, новых модификаций олигонуклеотидов, мы посчитали необходимым иметь свое такое оборудование. Так, с самого начала 90-х гг. в Институте имелся ДНК-синтезатор модели «Виктория 6М», выпускавшийся СКТБ Новосибирска, который сыграл определенную роль в становлении в Уфе процесса химического синтеза нуклеиновых кислот. Однако этот прибор скорее морально, чем физически, быстро устарел, и ему на смену были приобретены современные одно-, а затем и восьмиканальный ДНК-синтезаторы производства ООО «Биоссет» (Россия, Новосибирск).

Вспомогательное оборудование для молекулярного клонирования

Появившиеся в середине 70-х гг. методы работы с рекомбинантной ДНК повлекли за собой создание множества разнообразных специализированных приборов, предназначенных для решения конкретных задач, стоящих перед молекулярными биологами на разных стадиях процесса молекулярного клонирования. Немаловажную роль играет и так называемое вспомогательное оборудование, без которого эффективность молекулярного клонирования, под которым понимается целый комплекс методов, будет весьма снижена или оно будет даже невозможно.

В связи с этим нельзя не сказать о таких давних, верных и, как правило, персональных помощниках молекулярных биологов, как наборы автоматических пипеток с регулируемым объемом дозирования жидкости, поскольку без них невозможна практически ни одна подготовительная операция.

Сейчас трудно представить, что когда-то их вообще не было, и для пипетирования жидкостей использовались стеклянные микропипетки на 0,1 и 0,2 мл, точность набора которыми микрообъемов до 20 мкл оставляла желать много лучшего, а именно эти объемы реакционных смесей требовались и были самыми распространенными для экспериментов в тогдашней молекулярной биологии и до сих пор являются наиболее часто употребляемыми. Целый ряд зарубежных фирм выпускали тонюсенькие стеклянные капилляры на разные объемы, которыми можно было уже довольно точно брать и 1 мкл жидкости, но это требовало использования специального микровинта, сильно замедляющего процесс дозирования жидкости. Появление автоматических пипеток французской фирмы Gilson с одноразовыми наконечниками резко ускорило и существенно облегчило подготовку и проведение молекулярно-биологических экспериментов. Учитывая важность такого инструментария для биологической науки, в СССР вскоре был налажен выпуск комплектов автоматических пипеток на 20, 200 и 1000 мкл опытным заводом в Черноголовке, но после передачи их производства в Мукачево качество пипеток, к сожалению, заметно снизилось. В настоящее время автоматические пипетки на большой диапазон дозируемых объемов производятся множеством фирм, для сокращения времени пипетирования их стали делать и многоканальными, и даже электронными. Дальнейшее ускорение составления реакционных смесей произошло благодаря появившимся универсальным роботизированным станциям, которых наш Институт пока не имеет, но намерены

приобрести в текущем году.

Другим часто используемым вспомогательным оборудованием в молекулярной биологии являются микроцентрифуги, рассчитанные обычно на вращение полипропиленовых пробирок объемом 1,5 мл, до сих пор еще называемых «эппендорфами», как бы отдавая дань уважения немецкой фирме Eppendorf GmbH, первой освоившей их выпуск. Поначалу эти пробирки упаковывались по 500 штук в коробки из жесткого цветного картона, поскольку были чуть ли не штучным товаром, и сейчас такая упаковка стоила бы, наверное, дороже самих пробирок. Причем при работе такие пробирки надо было куда-то ставить, и нами была разработана простая и удобная конструкция штативов из оргстекла, относительно долго держащих холод после того, как их доставали из морозильной камеры, что способствовало сохранению активности дорогостоящих молекулярно-биологических ферментов. И только спустя годы аналогичные штативы стали производиться множеством фирм. Когда-то микроцентрифуги, помимо фирмы Eppendorf GmbH, почти никем больше не производились. Но, видимо, в рамках СЭВ³ Польше (тогдашней Польской Народной Республике) было поручено наладить производство ряда наименований вспомогательного оборудования для физико-химической биологии, среди которых оказались и микроцентрифуги, и автоматические пипетки, и шейкеры, и другое мелкое оборудование. Также в нашем Институте имелось несколько польских комплексных биохимических и микробиологических лабораторий, начиненных разным оборудованием. Таким образом, в 70-е и 80-е годы прошлого столетия в нашем Институте было довольно много оборудования и приборов производства стран так называемой народной демократии. Кроме упомянутого польского оборудования, имелось и венгерское, и чехословацкое, а парк крупногабаритных рефрижераторных центрифуг типа К-23, К-24, К-70 и К-80 был представлен преимущественно техникой производства ГДР. Рефрижераторных микроцентрифуг тогда не производилось, и при необходимости центрифугирования образцов на холоду микроцентрифуги помещались нами в специальный охлаждаемый бокс из оргстекла или же просто в холодильник. Сейчас же в нашем Институте имеется несколько микроцентрифуг с охлаждением разных фирм, однако есть намерение приобрести в

³ СЭВ – Совет экономической взаимопомощи для стран социалистического лагеря распределял задания по выпуску разными странами той или иной продукции

ближайшее время, по крайней мере, еще одну.

Приборы для электрофоретического разделения и гибридизации нуклеиновых кислот и сопутствующее оборудование

Работа с рекомбинантной ДНК немаловажна без этапов электрофоретического разделения нуклеиновых кислот. В 60-е и 70-е годы использовались электрофоретические камеры вертикального типа, где разделение проходило в гелях, полимеризуемых в стеклянных трубках или в пластинах. Для электрофореза нуклеиновых кислот по сравнению с трубками более удобными оказались вертикальные пластины геля, хотя у них есть свой недостаток в виде уже упоминавшейся «улыбки». Проведение электрофореза в горизонтальных гелях в камерах с разделенными отсеками для буфера тогда тоже имело свой недостаток. Так, в первоначальных вариантах его проведения уровень буфера в анодном и катодном отсеках не доходил до верхнего среза геля и анализируемые образцы наносились в сухие «колодцы». В результате в процессе электрофореза происходило пересыхание колодцев, что приводило к искажению линий электрического поля и, как следствие - к деформации полос разделяемых фрагментов ДНК и невозможности четкой интерпретации электрофоретической картины. Иногда для предотвращения подсыхания геля мы использовали специальные фитили из хроматографической бумаги, смоченные тем же буфером, накладывая их на край геля с перекрытием колодцев. Применялись и другие способы сохранения буфера в колодцах.

Наверное, это может показаться сейчас смешным, но во всем мире никто долго не отваживался залить в камеру буфера столько, чтобы он покрыл гель полностью, так как считалось, что при этом образуется электрический шунт. А сейчас так называемый «подводный» (который так сейчас уже почти не называют) гель-электрофорез нуклеиновых кислот стал совершенно стандартной процедурой, и все выпускаемые приборы горизонтального типа на него рассчитаны.

Здесь надо сказать, что у нас, помимо купленных приборов для электрофореза и блоков питания к ним, есть немало самодельных камер из оргстекла нескольких типоразмеров, как горизонтальных, так и вертикальных конструкций. Причем имеется и уникальная камера вертикального типа, где передняя стенка «верхней» буферной камеры (она же - задняя стенка геля) изготовлена из обычного (точнее, из очень ровного зеркального) стекла, гораздо лучше перераспределяющего по сравнению с оргстеклом выделяющееся при электрофорезе тепло, исключая, тем самым, эффект «улыбки». Но чтобы соорудить

такую необычную конструкцию талантливому инженеру нашего института Ф.Старухину пришлось тогда провести химическую модификацию склеиваемых поверхностей данного стекла и оргстекла, из которого изготовлены остальные части этого прибора. Конечно, данная конструкция менее удобна в работе на стадии мытья стекла перед заливкой геля, поскольку оно является неразъемной частью прибора, да и на стадии самой заливки геля, однако получаемые результаты перевешивают эти неудобства.

В 80-е годы большое внимание уделялось препаративному гель-электрофорезу и элюции фрагментов ДНК из геля, что составляет довольно серьезную проблему ввиду низкого их выхода. Нами была изготовлена сохранившаяся до сего времени, но уже не используемая весьма сложная камера для кольцевого гель-электрофореза, когда разделение фрагментов ДНК шло от края к центру, где находилась полость, заполненная буфером, периодически откачивающимся перистальтическим насосом с помощью коллектора фракций в разные пробирки, тем самым фактически обеспечивая работу в дальнейшем с уже электроэлюированной ДНК, находящейся в растворе. При этом во время длящегося довольно долго электрофореза необходимо было с помощью другого насоса обеспечивать циркуляцию буфера между анодной и катодной камерами для исключения его истощения и изменения рН среды.

Как известно, для агарозного и полиакриламидного гелей существуют свои ограничения разделения нуклеиновых кислот по размеру, и очень большие молекулы эффективно разделить обычным электрофорезом невозможно, поэтому для этой цели был предложен разнообразный вариант пульсирующего гель-электрофореза. Большинство из них требуют специальных приборов, а есть варианты, рассчитанные на использование обычных электрофоретических камер со специальными контроллерами, обеспечивающими инверсию электрического поля на изменяемые экспериментатором промежутки времени. Нами уже много лет назад приобретен такой инвертор тока модели PPI-200 фирмы MJ Research (США), активно использующийся и поныне. Однако до его приобретения на базе примитивного калькулятора с большим дисплеем нами самими был сконструирован, изготовлен и запрограммирован аналогичный контроллер. Но возникающие задачи требуют разделения фрагментов ДНК более крупного размера, где простой инверсии электрического поля уже недостаточно и необходимы специальные приборы с гексагональным электрическим полем, производимые фирмой Bio-Rad Laboratories, которые мы также

намереемся купить.

Для окрашивания молекул РНК в полиакриламидных гелях ранее часто использовали краситель метиленовый синий. Недостатком метода была необходимость длительных процедур отмычки геля от излишнего красителя. Для ускорения данного процесса разными фирмами предлагались приборы, которые с помощью поперечного низковольтного электрофореза вымывали заряженный краситель, а полосы РНК при этом практически не двигались, тем более в продольном направлении, в котором проводилось их настоящее разделение по размеру и шло сравнение электрофоретических картин. Чтобы также ускорить процесс окрашивания геля после окрашивания РНК, нами из фрагментов алюминиевых сит были изготовлены доказавшие свою пригодность для этой цели плоские электроды, между которыми и помещался прокрашенный метиленовым синим гель. Помимо использования гель-электрофореза в качестве вспомогательного метода разделения и анализа нуклеиновых кислот, он служит и в качестве основного метода получения конечных результатов. В случае весьма популярной во второй половине 70-х и 80-х гг. блот-гибридизации по Саузерну (названной так по имени англичанина Е.М.Southern, предложившего этот метод в 1975 г.) за этапом электрофоретического разделения фрагментов ДНК⁴ следовал этап переноса (блоттинга) уже денатурированной (обычно) ДНК на мембранный (чаще нитроцеллюлозный) фильтр, занимавший немало времени и расходовавший в большом количестве фильтровальную бумагу. Для ускорения данного процесса и ощутимой экономии бумаги, да и специального SSC-раствора высокой кратности (от 6 до 20х) предлагались различные способы переноса нуклеиновых кислот на фильтры. Одним из таких способов было применение вакуума (точнее разрежения воздуха), когда фактически жидкость из геля, содержащая ДНК, просасывалась через нижележащий на пористом полиэтилене мембранный фильтр. Во избежание недопонимания хотим заметить, что пористый полиэтилен представляет собой не тонкую пленку с отверстиями, а довольно толстую пластину из спеченных полиэтиленовых шариков микронного размера в диаметре. Купить тогда в СССР подобный пористый полиэтилен было просто невозможно ввиду отсутствия его производства, а выписать из-за границы практически нереально, однако года два спустя пластину такого пористого полиэтилена мы все же получили, включив ее в спецификацию при покупке прибора, для

⁴ Блот-гибридизация молекул РНК из-за игры слов (southern – южный, northern – северный) получила по аналогии название Нозерн-блот гибридации

которого она была на самом деле и не нужна. Но тогда ждать так долго нам не хотелось, а метод оказался удобным, и мы изготовили пластину из пористого стекла, для чего сначала с помощью шаровой мельницы измельчили пирексное стекло с точно известной температурой плавления, получив большое количество стеклянного порошка, расфракционировали его, и нужную фракцию спекли в муфельной печи при температуре, составляющей 70% от температуры плавления, в специально приготовленной латунной форме. Этот лист пористого стекла был помещен в конструкцию со штуцером для подводки вакуума, изготовленную из толстостенного оргстекла, выдерживающего разрежение, создаваемое водоструйным или слабым масляным насосом. Позже, уже после получения листа пористого полиэтилена, в этом весьма активно используемом нами приборе мы произвели замену стеклянного фильтра на более однородный полиэтиленовый. Другим способом переноса нуклеиновых кислот из гелей на мембранные фильтры был метод электроблоттинга, но здесь мы не стали ничего конструировать, а просто купили подходящую модель фирмы Bio-Rad Laboratories.

В какой-то момент стала активно использоваться так называемая дот-гибридизация, когда анализируемый раствор нуклеиновых кислот в виде 96 точек (8 рядов по 12 колонок) наносился на мембранный фильтр, для чего существовали специальные устройства, например Bio-Dot производства фирмы Bio-Rad Laboratories, которое мы позже купили. Однако, не дожидаясь его приобретения, нами с помощью двух иммунотитраторных планшет с коническими лунками (выпускавшихся ранее полнотельными) были изготовлены собственные устройства путем аккуратного, не допускающего сколов сверления 192 отверстий (по 96 соосно совпадающих отверстий в каждом планшете) для фильтрации и еще по восемь отверстий по периметру для стяжки верхней и нижней продырявленных пластин и плотного прижима фильтра между ними. Конструкция успешно использовалась длительное время как для количественной, так и для качественной дот-гибридизации.

Важным моментом был сам процесс молекулярной гибридации нуклеиновых кислот, фиксированных на мембранных фильтрах с радиоактивно меченными зондами, поскольку во избежание появления фона при радиоавтографии требовалось исключение подсыхания фильтра и эффективный процесс его отмывки от непрореагировавшей пробы. Предлагалось немало способов проведения такой гибридации. Довольно простой и удобный прибор стала выпускать небольшая калифорнийская фирма American Bionetics, Inc. Однако приобрести его

оказалось непросто ввиду небольшой стоимости, что может сейчас показаться странным, но во времена СССР валюта для приобретения импортного оборудования выделялась преимущественно на крупные позиции, что в общем-то было оправданно. И нас даже предупредили, что мы можем потерять деньги и не получить этот прибор, но нам, видимо, повезло, и прибор OmniBlot⁵ был получен и очень активно эксплуатировался на протяжении многих лет, обеспечивая превосходные результаты. Но ничто не вечно, и ему на смену была куплена уже более дорогая установка для молекулярной гибридации нуклеиновых кислот модели OV-1 английской фирмы Hybaid.

Известно, что для наблюдения результатов электрофоретического разделения необходимо освещение геля ультрафиолетовым светом, и при массовом переходе на электрофорез в гелевых пластинах потребовались приборы с нижней подсветкой, получившие название трансиллюминаторов. В связи с увеличением числа лабораторий Института, активно использующих для своих исследований электрофоретические анализы, приобретались все новые трансиллюминаторы разных фирм (UV Products, Inc., LKB, Vilbert-Lourmat и др.). Для документирования с их помощью электрофореграмм требовалось фотографировать обычным фотоаппаратом через оранжевый светофильтр. В настоящее время в дополнение ко всем ныне еще работающим трансиллюминаторам, нами были приобретены специализированные фотодокументационные системы, в том числе оснащенные CCD-камерами с накоплением сигнала, ряда фирм (UVP, Inc., Vilbert-Lourmat, Bio-Rad Laboratories), что заметно повысило чувствительность анализов и сократило время получения готового изображения. При этом старые трансиллюминаторы, включая самый для нас первый модели TM-36 американской фирмы UV Products, после неоднократных замен ламп и сейчас функционируют и служат главным образом для вырезания кусочков гелей, содержащих фрагменты нуклеиновых кислот после препаративного электрофореза для их последующей элюции.

Для некоторых целей, включая долговременное хранение или радиоавтографию, было необходимо высушивание гелей, для чего нами был приобретен подключаемый к источнику вакуума соответствующий сушитель гелей фирмы Bio-Rad Laboratories. Более простое, но при этом и более длительное высушивание гелей велось с помощью

⁵ Некоторое время затем это устройство под своим брендом производила другая более крупная американская фирма Millipore.

листов целлофана, натягиваемых и фиксируемых на специально изготовленной удобной рамке из оргстекла. Альтернативными вариантами высушивания агарозных и полиакриламидных гелей было приклеивание во время полимеризации последних к стеклу или использование хорошей адгезии к специальным поставляемым рядом фирм полимерным пленкам.

При проведении целого ряда экспериментов в молекулярной биологии имеется настоятельная необходимость сконцентрировать растворы нуклеиновых кислот, причем не всегда самый простой способ осаждения их спиртом с последующим растворением в меньшем объеме оказывается пригодным. Для таких случаев много лет назад американская фирма Savant первой стала производить запатентованную ими соответствующую технику, поначалу в виде единственной модели SpeedVac concentrator. Насколько нам известно, мы первыми среди академических институтов АН СССР в начале 80-х гг. приобрели это оборудование в комплекте с их же ловушкой паров воды, охлаждаемой до -60°C . Позже и другими фирмами стало выпускаться подобное оборудование, и сейчас, помимо того старого, но еще вполне работоспособного прибора, у нас имеется уже более совершенная модель фирмы Eppendorf. По существу, данное оборудование представляет собой микроцентрифугу, из роторной камеры которой отсасывается воздух и для ускорения испарения производится ее нагрев. Не дожидаясь приобретения SpeedVac концентратора, мы сконструировали свой такой концентратор, поместив компактную польскую микроцентрифугу модели 320a со снятой крышкой в специально изготовленную герметичную толстостенную камеру из оргстекла, к которой подводили вакуум. Отличием нашего вполне работоспособного устройства было отсутствие нагрева роторной камеры, что, конечно, несколько увеличивало время испарения жидкости, но было некритично.

Приборное оснащение работ с микроорганизмами

Молекулярное клонирование и другие генно-инженерные манипуляции невозможны без использования бактерий, в частности, кишечной палочки *Escherichia coli*. Другими часто трансформируемыми нами бактериями являются представители рода *Agrobacterium*: *A.tumefaciens* и *A.rhizogenes*. Помимо обычной трансформации этих микроорганизмов стандартным кальциевым методом или путем трехродительского скрещивания, другой более эффективный способ трансформации заключается в использовании специальных приборов

– электропораторов. Так, у нас имеются две модели электропораторов фирмы Bio-Rad Laboratories, одна из которых пригодна только для трансформации бактерий, а вторая способна трансформировать еще и животные и растительные клетки. Для трансформации растений (в основном однодольных) нами недавно приобретено другое оборудование фирмы Bio-Rad Laboratories – баллистическая пушка модели Biolistic PDS-1000/He, стреляющая золотыми или вольфрамовыми микрочастицами с нанесенной на них плазмидной ДНК, проникающей внутрь ядра. Когда у нас такого оборудования еще не имелось, но, настоятельная потребность в нем уже была, мы, проанализировав различные журнальные статьи, описывающие устройства для пневматической трансформации растений, посоветовавшись с коллегами из Иркутска из СИФИБР РАН, ранее нас изготовившими собственное «генное ружье», сконструировали свой вариант аналогичного пневматического пистолета, «питающегося» через редуктор баллонным гелием, и стреляющего теми же вольфрамовыми и золотыми микрочастицами.

Проведение работ с рекомбинантной ДНК требует соблюдения стерильных условий при обращении с бактериями. Для этого нами приобретены удобные автоклавы, различные ламинарные боксы, а когда таковых у нас еще не было, с помощью фильтров ЛАИК в специальном боксе создавали поток стерильного воздуха, вполне позволявшего удобно работать с бактериальными культурами без контаминации.

Поиск и анализ рекомбинантных клонов среди массы трансформантов проводился с помощью молекулярной гибридизации бактериальных колоний на нитроцеллюлозных фильтрах с радиоактивно-меченными зондами. Для этого требовалось создание реплик бактериальных колоний. Из коррозионно-стойкого металла было изготовлено устройство (по размеру стандартной чашки Петри), состоящее из нижней пластины, имевшей множество углублений («колодцев») и аналогичной верхней, в которой соосно «колодцам» нижней пластины имелись цилиндрические штырьки. Эти штыри изготавливались отдельно и фиксировались в пластине методом так называемой тугой посадки, достигаемой путем нагрева одной детали (пластины) и охлаждения другой (штырей) и немедленной их сборки. Причем для правильного функционирования устройства требовались ровные срезы штырьков и нахождение их выступающих рабочих концов на одной условной плоскости для исключения повреждения поверхности агара или накладываемого на него нитроцеллюлозного фильтра. Для проведения лизиса бактерий и этапов денатурации и нейтрализации ДНК в репликах бактериальных

колоний было изготовлено также коррозионно-стойкое фактически макрофлюидное устройство из нержавеющей стали, несколько механизировавшее данную работу.

Молекулярно-биологические эксперименты нередко требуют ведения работ, при которых ферменты или иные биопрепараты некоторое время должны находиться на холоду, часто при температуре 0°C, и для этого бывает нужен тающий снег или лед. Несмотря на то, что Уфа расположена в зоне, где снег лежит до 6-7 месяцев в году, и его без особых проблем в это время можно взять на прилегающей территории (до которой еще идти и идти) остаются еще 5-6 бесснежных месяцев, когда в весеннее-летний период о льде для экспериментов надо было заботиться заранее, что мы довольно долгое время делали, используя стандартные ячейки для замораживания воды в холодильнике, однако это было не всегда удобно. Купив генератор чешуйчатого льда итальянской фирмы Scotsmann, мы решили эту проблему, обеспечив себя быстро генерируемым льдом круглогодично.

Для длительного хранения ферментов, штаммов микроорганизмов, образцов нуклеиновых кислот, других биополимеров и некоторых реактивов необходимы холодильники с морозильными камерами, а также специальные морозильники с весьма низкой температурой. В нашем Институте имеется довольно большое число различных chest и upright моделей морозильников преимущественно японской фирмы Sanyo, обеспечивающих длительное хранение биопрепаратов при -85°C. При этом у нас, к сожалению, пока нет ни одного морозильника с ультранизкой температурой хранения на -135°C или -152°C, которые позволили бы неограниченно долго хранить биопрепараты без опасения их порчи, поскольку известно, что аморфный лед при -130°C переходит в кристаллическую форму с пагубными последствиями для своего окружения (имеются ввиду биопрепараты, живые клетки и пр.). Учитывая это обстоятельство, всерьез подумываем о приобретении хотя бы одного такого морозильника на -135°C или -152°C производства той же фирмы Sanyo.

И, наконец, самое главное для молекулярно-биологических экспериментов – это качество воды как универсального растворителя. Из уфимских кранов бежит довольно вкусная благодаря большому количеству растворенных сульфатов и карбонатов вода, но они же и создают проблему при ее очистке. Тем не менее, мы уже на протяжении многих лет с помощью системы очистки воды Milli Q Academic фирмы Millipore (США) очищаем воду до категории 18 МОм, и вполне ею довольны.

Безусловно, для успешного функционирования лабораторий, работающих в области физико-

химической биологии, а теперь и нанобиотехнологии, помимо вышеперечисленных групп приборов и оборудования, требуются и другие. Как то: весы разных классов точности, включая высокоточные, рН-метры, ультразвуковые дезинтеграторы, гомогенизаторы, роторные испарители, различные шейкеры, включая термостатированные, водяные и суховоздушные термостаты, бинокулярные микроскопы и пр. Все это оборудование у нас есть в достаточном количестве.

Приборы для амплификации нуклеиновых кислот. Модификации метода ПЦР

Внимательный читатель, возможно, удивится, что в этот перечень почти обязательного оборудования для исследования нуклеиновых кислот не вошли ДНК-термоциклеры, однако это было сделано нами сознательно, поскольку методы амплификации нуклеиновых кислот, и в частности ПЦР, заслуживают отдельного внимания, которое будет им ниже уделено. Так, во второй половине 80-х годов был разработан метод амплификации специфичных фрагментов нуклеиновых кислот с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием термостабильной ДНК полимеразы, кардинально изменивший всю биологическую науку и уже давно перешедший ее границы. Фактически ПЦР весьма быстро, по крайней мере, по масштабу применения стала методом № 1 в физико-химической биологии, и без него сейчас практически немыслима ни одна крупная работа, где предметом исследования являются нуклеиновые кислоты. То же самое произошло и в медицинской диагностике, где большинство иммуноферментных анализов заменено на ПЦР. Вслед за ПЦР появилось немало и других методов амплификации нуклеиновых кислот, но ни один из них пока не смог составить ему сколько-нибудь серьезной конкуренции. При этом метод ПЦР активно развивается и постоянно совершенствуется. Если на заре появления ПЦР требуемые для этого метода циклические смены температур в реакционной смеси осуществляли путем переноса вручную пробирок из одной водяной бани в другую, то теперь производится большое количество специализированных приборов, так называемых ДНК-термоциклеров. А в начале 90-х годов была разработана модификация ПЦР, протекающая в режиме реального времени, ставшая по существу новым самостоятельным методом, и для ее проведения сейчас выпускается более полусотни моделей ДНК-термоциклеров с оптическим модулем.⁶

⁶ В данном номере журнала имеется статья, специально посвященная приборному оснащению ПЦР в реальном времени.

В настоящее время большинство ДНК-термоциклеров имеют твердотельный алюминиевый или серебряный термоблок, довольно быстрая смена температур в котором происходит с помощью элементов Пельтье. Ряд ДНК-термоциклеров имеют полую воздушную камеру, где еще более быстрая (за счет отсутствия инерции массивного термоблока) смена температур достигается попеременной подачей в нее тем или иным способом горячего и холодного воздуха. Здесь можем заметить, что когда еще не существовало ДНК-термоциклеров, и амплификацию проводили, как упоминалось выше, вручную, перемещая пробирки между банями, то это создавало массу неудобств и заставляло всех искать какие-то альтернативные варианты смены температур. Так, у нас до сих пор сохранился отлитый на одном из заводов Уфы по нашему макету в 1990 г. полый алюминиевый реакционный блок со штуцером на 96 пробирок объемом по 1,5 мл, состоящий из двух половинок, смена температур в котором проводилась путем ручного переключения трехходовым краном потоков воды из ультратермостатов, установленных на соответствующие температуры денатурации, отжига и элонгации, что было уже некоторым прогрессом в этой области. Но до автоматизации процесса дело мы тогда не довели, хотя были намерения устроить переключения потоков воды по задаваемой программе или изготовить дополнительные аналогичные термоблоки, поддерживающие нужную температуру и осуществлять перемещения пробирок уже между ними, что и было реализовано затем помимо нас. Так, американской фирмой Agilent's Stratagene до сих пор производится несколько моделей ДНК-термоциклеров Robocycler, главной особенностью которых является механическое, с помощью манипулятора, перемещение реакционных планшет между четырьмя блоками, постоянно поддерживающими с помощью элементов Пельтье каждый свою температуру (или градиент температур в некоторых моделях). Также роботизированное перемещение специальной трехсекционной алюминиевой корзинки, вмещающей 24 планшета с 96-ю, 384 или с 1536-ю лунками, между тремя встроенными водяными банями, поддерживающими каждая свою температуру, имело место в совсем недавно снятом с производства ДНК-термоциклере гигантского размера - 1720 мм (Ш) x 700 мм (Г) x 1500 мм (В) английской фирмы ABgene модели H₂OVI, весящим целых 700 кг. Другой крайностью по размеру служит опытная модель (не реализуемая коммерчески) карманного ДНК-термоциклера, основанного на эффекте термоконвекции, разработанного сотрудниками Техасского А & М университета. Так, самой крупной деталью всего их

трехблочного устройства является держатель двух батареек типа АА, от которых и питается данный термоциклер. В устройство входят еще небольшой самодельный контроллер температуры и сам алюминиевый термоблок, состоящий из трех секций с общим размером 10x10x50 мм, достаточный для амплификации не более 10 образцов. Такая неточность в нашем описании емкости их реакционного блока происходит от того, что в нем не предусмотрены лунки для размещения пробирок, поскольку амплификация идет в коротких отрезках шланга, замкнутых в кольцо с помощью маленьких отрезков силиконовой или иной подходящей трубки чуть большего диаметра. Таких реакционных сосудов на алюминиевом прямоугольном термоблоке с указанными выше размерами можно разместить довольно ограниченное количество, учитывая еще и то, что часть этих брусков приходится на винты из полимерного материала, служащие для перераспределения тепла между расположенной внизу секции, нагреваемой до температуры денатурации, и по сути запускающей конвекцию жидкости, и другими независимыми термоизолированными частями реакционного блока, поддерживающими температуру отжига и элонгации. При этом достижение нужных температур в них обеспечивается вкручиванием этих самых винтов на разную глубину, от чего и зависит эффективность теплопередачи в каждом конкретном случае. Подобная регулировка температуры, безусловно, усложняет работу с данным конвекционным ДНК-термоциклером. Другим недостатком этой системы является большая длительность процесса амплификации, заключающегося в поочередном и многократном прохождении реакционной смесью соответствующих зон денатурации, отжига и элонгации, требующемся для наработки регистрируемого количества целевого продукта, на что уходит около 50 минут ввиду низкой скорости движения жидкости по шлангу – реакционному сосуду. К слову сказать, помимо данного прибора, создано немало и других ДНК-термоциклеров, использующих конвекцию жидкости, которая возникает или за счет градиента силы поверхностного натяжения, вызванного разницей температур (конвекционная ячейка Марангони), или силы плавучести, являющейся разницей между Архимедовой силой и силой тяжести (конвекционная ячейка Бенара-Рэлея). Однако их общими недостатками являются как большая продолжительность процесса амплификации, так и чрезвычайная сложность конструкции. Нами разработан и запатентован простой прибор для ДНК амплификации, основанный на термоконвекции по типу ячеек Бенара-Рэлея, а вклад конвекции по

типу ячейки Марангони незначителен. Созданный прототип конвекционного ДНК-термоциклера обеспечивает протекание ПЦР за 2-5 минут в стандартных 0,2 мл полипропиленовых пробирках. Новизной данного метода является формирование оптимального тока жидкости и температурного поля (ее градиента) в объеме реакционной смеси. Это достигается за счет размещения зон нагрева и охлаждения у дна и на уровне мениска реакционной смеси соответственно, а также фиксации пробирки в таком положении, чтобы ось пробирки была направлена под некоторым (оптимальным) углом к вектору действия силы тяжести. Экспериментально было установлено, что такое расположение зон нагрева приводит к возникновению ламинарного тока жидкости с эллиптической траекторией. Для анализа характера процесса была построена его математическая модель. Расчеты показали, что при такой ориентации пробирки и диагональном расположении зон нагрева и охлаждения скорость конвекции значительно выше, и жидкость не разбивается на многочисленные ячейки Бенара, как это происходит, например, при вертикальном или горизонтальном направлении вектора градиента температуры. Реакционная смесь из зоны с высокой температурой (зона денатурации ДНК) проходит зону средней температуры (нерабочая зона), попадает в зону более низкой температуры (зона отжига праймеров), вновь попадает в зону средней температуры (зона элонгации праймеров), затем снова в зону высокой температуры и т.д. Таким образом, один условный цикл в такой конвекционной ПЦР с наклонным градиентом температур занимает около 2 - 3 секунд, и за 2-5 минут происходит от 40 до 100 таких циклов. При этом скорость смены температур при проходе жидкости через разные зоны достигает 40 - 50°C/сек против обычных 8-12°C/сек для ДНК-термоциклеров с полой воздушной камерой и всего 2-6°C/сек для приборов с твердотельным реакционным блоком.

В конце 90-х годов появилась цифровая ПЦР (цПЦР), которая долгое время оставалась практически незамеченной и только сейчас по существу переживает свое второе рождение, причиной чему как раз-таки служит создание специализированных приборов для ее проведения⁷. Особенностью нынешней цПЦР является использование микро-/нанофлюидной техники, благодаря которой объемы реакционных смесей измеряются уже несколькими нанолитрами. Так, американская фирма Fluidigm

Corporation выпускает прибор BioMark, в котором в специальных чипах реализована возможность проведения цПЦР для анализа 48 образцов в 770 реакционных камерах по 0,85 нл каждая. Несколько меньшей производительностью характеризуется другой цифровой ДНК-термоциклер модели OpenArray Real-Time PCR Platform, разработанный ранее небольшой американской фирмой Biotrove, Inc., относительно недавно купленной одним из лидеров в ПЦР-технологиях – хорошо известной американской фирмой Applied Biosystems. Отличительной особенностью данного прибора является использование для реакции амплификации специального чипа в виде пластины с 3072 сквозными отверстиями диаметром 300 мкм, вмещающих по 33 нл, удерживающихся там за счет капиллярных сил, чему способствуют местами гидрофильные, местами гидрофобные зоны. Недавно фирмой QuantaLife, Inc. (США) предложена новая технология цифровой ПЦР, названная ими Droplet Digital PCR, в которой с помощью специального модуля генерируется водно-масляная эмульсия из 20 тысяч капелек, служащих независимыми реакционными сосудами объемом 1 нл каждый.

Приборное оснащение для цПЦР пока представлено фактически единичными моделями, но, вне всякого сомнения, подобная техника будет быстро совершенствоваться и становиться все более популярной вплоть до того, что заменит для некоторых приложений нынешнюю ПЦР в реальном времени. Учитывая перспективность цифровой ПЦР, нами создана соответствующая микро- и нанофлюидная техника, за короткое время генерирующая десятки тысяч эмульсионных капелек нанолитровых объемов – независимых реакционных сосудов для проведения ПЦР или иных реакций амплификации нуклеиновых кислот, включая разработанную и патентуемую нами рекуррентную цепную реакцию (РЦР), к которой еще вернемся чуть ниже. Однако главным отличием нашей нанолитровой технологии от уже существующих и коммерчески реализуемых является формирование не стандартной, как обычно, эмульсии «вода-масло», а двойной - «вода-масло-вода» эмульсии, что, на самом деле, не сильно усложняя наши нанофлюидные устройства, дает ощутимые преимущества, причем имеется еще одно важное отличие, о котором по патентным соображениям вынуждены умолчать, поскольку на данную технологию нанофлюидной цифровой ПЦР нами готовится подача заявки на патенты РФ и зарубежных стран. Результаты такой нанофлюидной амплификации нуклеиновых кислот в капельках двойной «вода-масло-вода» эмульсии (цифровой ПЦР или РЦР) могут быть легко и просто визуализованы и зарегистрированы с помощью

⁷ В данном номере журнала в статье, посвященной приборному оснащению ПЦР в реальном времени, приводится информация об оборудовании для цифровой ПЦР.

трансиллюминатора, флуоресцентного микроскопа или фотодокументационной системы.

ПЦР все же недостаточно эффективна, чтобы без проблем детектировать единичные копии нуклеиновых кислот. Разработанная нами новая цепная реакция позволяет делать это уверенно. Несмотря на то, что в ее основе также лежит ПЦР, благодаря весьма существенным отличиям, заключающимся главным образом в характере накопления целевых продуктов, превосходящим по этому показателю ПЦР на несколько порядков, мы решили назвать данную реакцию иначе – Рекуррентная Цепная Реакция, или сокращенно РЦР. Собственно, большинство существующих реакций амплификации нуклеиновых кислот с более чем линейным накоплением целевых продуктов, по сути являются рекуррентными или рекурсивными. Однако помимо существующего математического термина "рекуррентный", основное значение этого слова характеризует происходящие события как "повторяющиеся периодически, от случая к случаю", что в определенной степени соответствует характеру отжига праймеров в РЦР. Таким образом, чтобы исключить длинное название данной реакции типа "ПЦР с увеличивающимся с каждым циклом коэффициентом размножения молекул ДНК (или с увеличивающимся с каждым циклом числом мест для отжига праймеров в составе ампликона)" и отличать эту новую реакцию от обычной ПЦР, нами принято решение о том, чтобы назвать ее стандартно и коротко – РЦР.

Поскольку РЦР характеризуется увеличивающимся с каждым циклом коэффициентом размножения, то благодаря этому заметно быстрее происходит накопление целевых ампликонов, что, с одной стороны, сокращает время реакции, а с другой – увеличивает ее чувствительность, позволяя уверенно детектировать единичные молекулы нуклеиновых кислот всего за 20 - 25 циклов без использования вложенной ПЦР или без второго раунда ПЦР в виде реамплификации с аликвотой из первой реакции с новыми ингредиентами, что в случае эмульсионной ПЦР абсолютно невозможно. Причем РЦР имеет, по крайней мере, два отличающихся варианта, обозначенных нами как РЦР 2/2 и РЦР 2/1, и имеющих разное предназначение. Симметричная РЦР 2/2 – более продуктивная реакция, и в ней гораздо быстрее растет коэффициент размножения, тогда как в ассиметричной РЦР 2/1 происходит преимущественное накопление одной из цепей ДНК, что может быть востребовано в некоторых последующих экспериментах с амплифицированной ДНК.

Если для ПЦР максимальный теоретически возможный коэффициент размножения равен двум

при условии 100%-ной эффективности этой реакции, то в РЦР коэффициент размножения молекул ДНК растет с каждым циклом, и к 20 циклу для РЦР 2/2 он теоретически составит в среднем 4,35 при том, что для ампликонов, появившихся, например, в первых циклах, он будет равен 19. К 20 циклу разница в кратности амплификации между ПЦР и РЦР 2/2 достигнет 5 миллионов раз, а к 30 циклу она превысит 8 порядков. Собственно, такой амплификации достичь и не удастся по причине того, что ДНК в этом случае уже измерялась бы чуть ли не килограммами. Реакция гораздо раньше выходит на плато, заметно сокращая время ее протекания, что также немаловажно. Исходя из таких уникальных возможностей данной реакции амплификации нуклеиновых кислот нами на принцип РЦР поданы заявки на патенты России и зарубежных стран. Патент Российской Федерации уже получен, за рубежом патентование пока продолжается.

Комплектация УСУ «КОДИНК»

Все изложенное выше свидетельствует, что за все время существования самого Института биохимии и генетики УНЦ РАН и предшествующих ему структур шла планомерная работа по формированию материально-технической базы, позволяющей на вполне современном уровне проводить исследования в области физико-химической биологии, а теперь еще и нанобиотехнологии, где главными объектами для нас служили нуклеиновые кислоты, принадлежащие организмам всех уровней генетической сложности, а также синтетические модифицированные олигонуклеотиды. Фактически за эти годы был сформирован цельный комплекс приборов и вспомогательного оборудования для всестороннего исследования нуклеиновых кислот, оформленный позже в УСУ «КОДИНК» - «Комплекс оборудования для исследования нуклеиновых кислот». При этом до приобретения каких-то серийно изготавливаемых приборов в случае крайней необходимости в ИБГ УНЦ РАН конструировались аналоги, успешно эксплуатировавшиеся подчас долгое время. Немалая часть таких устройств изготавливалась в механической мастерской Уфимского научного центра, причем в воплощении наших идей заметная роль принадлежала тогдашнему инженеру Института подполковнику в отставке Ковельзону И.Г., чьи чертежи были безупречны. Другой инженер Института Кантемиров Р.З. многие приборы для нас мастерски изготавливал сам.

Опыт изготовления собственного оборудования сохранился в Институте и по сей день, и в настоящее время наряду с серийно изготовленными приборами в рамках УСУ «КОДИНК» имеются не имеющий аналогов конвекционный ДНК-термоциклер с

наклонным градиентом температур, а также не имеющее аналогов нанофлюидное устройство для проведения цифровой ПЦР.

Таким образом, УСУ «КОДИНК» создан с целью научно-методического и приборного обеспечения научно-исследовательских работ в области молекулярной биологии, молекулярной генетики, биохимии, нанобиотехнологии, биоинженерии, проводимых на современном уровне в рамках приоритетных направлений развития образования, науки, технологий и техники Российской Федерации. Как можно видеть из приведенного ниже далеко неполного перечня оборудования, сгруппированного по решаемым с его помощью задачам, УСУ «Комплекс оборудования для исследования нуклеиновых кислот» состоит из современной техники, позволяющей проводить всесторонний анализ ДНК и РНК, а также манипулировать данными биополимерами. УСУ «КОДИНК» включает в себя различное оборудование общей стоимостью свыше 100 млн.руб. -

- для автоматического секвенирования ДНК: однокапиллярный автоматический секвенатор ДНК ABI PRIZM 310 (Applied Biosystems, США), 8-ми капиллярный автоматический секвенатор ДНК GenomLab фирмы Beckman-Coulter (США), 96-ти капиллярный автоматический секвенатор ДНК MegaBace 1000 (GE Healthcare, США);

- для синтеза олигонуклеотидов: одноканальный синтезатор ASM-102U, восьмиканальный синтезатор ASM-800 (оба - Биоссет, Россия);

- для амплификации нуклеиновых кислот: ДНК-термоциклеры с оптическим модулем для амплификации нуклеиновых кислот в реальном времени - ДНК-термоциклер iCycler iQ, ДНК-термоциклер iQ5, ДНК-термоциклер CFX96 (все - Bio-Rad Laboratories, США), ДНК-термоциклер АНК-32 (Синтол/ИАНП РАН, Россия), ДНК термоциклер роторного типа RotorGene 6000 (Corbett Research, Австралия); ДНК термоциклеры, работающие «по конечной точке» - ДНК термоциклер T1 с модулем Combi и модулем *in situ* (Biometra, Германия), большое количество ДНК-термоциклеров Терцик МС-2 (ДНК-Технология, Россия);

- для микроскопии: сканирующий зондовый микроскоп Solver Pro-M (НТ МДТ, Россия), конфокальный лазерный микроскоп LSM5 Exciter, универсальный флуоресцентный микроскоп Axio Imager.M1 (оба - Carl Zeiss, Германия), универсальный флуоресцентный микроскоп модели Biozero серии BZ-8100 (Keyence, Япония);

- для электрофоретического разделения, регистрации и анализа биополимеров:

разнообразное оборудование (преимущественно фирмы Bio-Rad Laboratories, США), включая различные источники питания, различные камеры для горизонтального и вертикального электрофореза, контроллер модели PPI для пульсирующего гелевого электрофореза FIGE фирмы MJ Research, Inc. (США), система регистрации радиоактивности, флуоресценции и хемиллюминесценции Pharos FX Plus, система регистрации флуоресценции VersaDoc MP5000 с CCD-камерой глубокого охлаждения для накопления слабого сигнала, система геледокументирования GelDoc XR (все - Bio-Rad Laboratories, США), фотодокументационная система Gel Camera system в комплекте с EpiChem1 боксом (UVP Inc., США), гель-документирующая система DocPrint (Vilber Lourmat, Франция), система детекции мутаций DCode (Bio-Rad Laboratories, США);

- для центрифугирования: напольная ультрацентрифуга Optima L-90K (Beckman-Coulter, США), скоростная центрифуга Avanti J-E (Beckman-Coulter, США), многочисленные микроцентрифуги, в том числе рефрижераторные производства разных фирм, разных стран;

- для различных измерений и анализов: проточный цитофлуориметр FC500 (Beckman-Coulter, США), автоматический оптический биосенсор на поверхностных плазмонах модели ProteOn XPR36, спектрофотометр SmartSpec Plus (оба - Bio-Rad Laboratories, США), спектрофотометр NanoDrop 1000 (Thermo, США), спектрофотометр BioSpec UV Mini (Shimadzu, Япония), люминесцентный спектрометр LS-55 в комплекте с многочисленными приставками (Perkin Elmer, США), денситометр Chromoscan 3 (Joyce-Loebl, Англия), иммуноферментный анализатор Benchmark (Bio-Rad Laboratories, США); жидкостный сцинтилляционный счетчик / люминометр Triathler (Hidex, Финляндия);

- вспомогательное оборудование: система очистки воды 18 мОм Milli Q Academic (Millipore, США), низкотемпературные холодильники -85°C различных моделей фирм Sanyo (Япония) и Dairei (Дания), генератор чешуйчатого льда AF80 (Scotsman, Италия), электропораторы MicroPulser и Gene Pulser X-Cell Total System, система пневмотрансформации Biolistic PDS-1000/He (все - Bio-Rad Laboratories, США), различные электронные весы разных фирм, ламинарные шкафы различных типов, ПЦР-боксы, хроматограф высокого давления BioLogic DuoFlow с коллектором фракций модели Bio Frac (Bio-Rad Laboratories, США) и другое лабораторное оборудование.

Нынешняя комплектация приборного парка ИБГ УНЦ РАН и УСУ «КОДИНК» в частности сложилась благодаря многолетнему постоянному слежению за современными тенденциями в науке, за появлением

новых моделей высокоточных приборов и удобного вспомогательного оборудования; благодаря составлению перспективных планов обновления и пополнения парка приборов и оборудования, периодически уточняющейся программы развития УСУ «КОДИНК»; благодаря неустанной работе по привлечению финансовых средств из разных источников и осуществлению самих закупок соответствующего оборудования. Так, в последние годы УСУ «КОДИНК» получил и продолжает получать ощутимую поддержку в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2013 годы» по мероприятию 1.8. «Проведение исследований с использованием уникальных стендов и установок, а также уникальных объектов научной инфраструктуры ...» (ГК №№ 02.518.11.7138 и 16.518.11.7047).

О Федеральном законе № 94

В советские времена практически все крупное оборудование, включая оборудование производства капиталистических стран, закупаемое за валюту, было получено нами по системе заказов через специализированное подразделение Академии наук СССР «Центракадемнаб», снабжавшее институты академии буквально всем и вся. После распада Союза и трудных в финансовом плане (и не только) лет российской науки у самого Института появились альтернативные возможности закупок напрямую у фирм-производителей современного оборудования или у их торговых представителей, чем наш Институт как мог пользовался и продолжает пользоваться. Но после принятия Федерального закона под номером 94, преследовавшего своей первоначальной целью самые благие намерения по устранению коррупции в сфере закупок, ситуация с закупками научного оборудования и расходных материалов заметно усложнилась. Главной причиной является то, что, к глубокому сожалению, 94-ФЗ во многом несовершенен и малопригоден для научной сферы. Но пока действует. Несмотря на то, что в нашем Институте создана соответствующая комиссия, члены которой прошли обучение, в случае закупок дорогостоящих уникальных приборов и оборудования с этой задачей гораздо лучше нас справляется

созданная при РАН специализированная организация – ФГУП "В/О "Академинторг" РАН", сотрудники которой имеют многолетний опыт успешной работы по поставкам в Россию импортного научного оборудования. Причем для нас свидетельством высокопрофессиональной работы специалистов фирмы "Академинторг" служит составленная с их участием оптимальная комплектация поставленных нам в последние годы дорогостоящих приборов и оборудования, заметно усиливших весь приборный парк Института, а одновременно и УСУ «КОДИНК», что дает возможность проводить наши исследования на самом современном мировом уровне.

В последние месяцы появилась было некоторая надежда, что 94-ФЗ будет пересмотрен и изменен, поскольку, касаясь в своем ежегодном Послании Федеральному собранию ситуации с 94-м законом, Президент РФ Д.А.Медведев заметил, что «...его все критикуют, но ситуация действительно уже вышла за грань разумного. <...> Поэтому пора начинать работу над новой редакцией закона о госзакупках – более продуманной и более современной». Однако подготовленный Министерством экономического развития РФ перечень одноименных товаров, вступивший в силу с 1 февраля 2011 г. в виде «Номенклатуры товаров, работ, услуг для нужд заказчиков», ставит перед научными организациями дополнительные ненужные проблемы, на преодоление которых будет тратиться драгоценное время, которое зачастую сильно дороже сэкономленных денег. Уму непостижимо как можно было суметь уложить все многообразие товаров, выпускаемых человечеством в третьем тысячелетии новой эры в 158 групп. Всего! Более того, сейчас фактически создалась абсурдная ситуация, когда для того, чтобы купить прямо непоименованный там товар (например, нанофлуидику) приходится ломать голову – к какой группе данный товар отнести иначе его приобретение будет вне закона. Не должны ученые еще и об этом думать! Принятые Госдумой РФ 11 апреля 2011 г. поправки к данному закону мало что дали и это даже не полумеры. 94-ФЗ надо просто срочно отменять! Не только для науки. И примеры тому в нашей истории уже есть – фактически отменили же несколько лет назад как крайне неудачную монетизацию льгот!

Поступила в редакцию 26 апреля 2011 г.