

ВЛИЯНИЕ ФЕРМЕНТОВ НА ДНК, АДСОРБИРОВАННУЮ НА ТВЕРДУЮ ПОДЛОЖКУ

Д.Ахмерова¹, Н.Янькова¹, А.Сушко², Е.Дубровин^{2,3}, И.Яминский¹⁻³
Yaminsky@nanoscopy.net

Цель работы – изучить влияние ферментов на адсорбированный на твердую подложку биополимер на примере модельной системы, где в качестве биополимера используются различные типы ДНК, а в качестве ферментов – ДНКаза и рестриктаза.

Особенность задачи состоит в том, что молекулы ДНК, прикрепленные к поверхности за счет физической адсорбции, не могут находиться в объеме в свободном состоянии (рис.1).

В исследовании использовались два типа ДНК: коммерческая – pBR322 и лямбда-ДНК компании Fermentas. Их нанесение на слюду производилось стандартным способом из раствора ДНК, содержащего одно- и двухвалентные катионы, после чего образец промывался в течение длительного времени в дистиллированной воде [1].

АСМ-изображение молекул ДНК pBR322 приведено на рис.2а. Средняя длина молекулы по данным АСМ – 1270 нм.

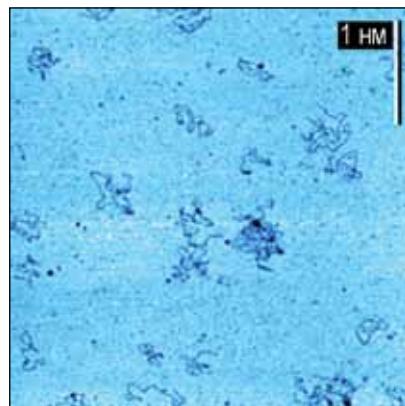


Рис.1. АСМ-изображение ДНК на слюде

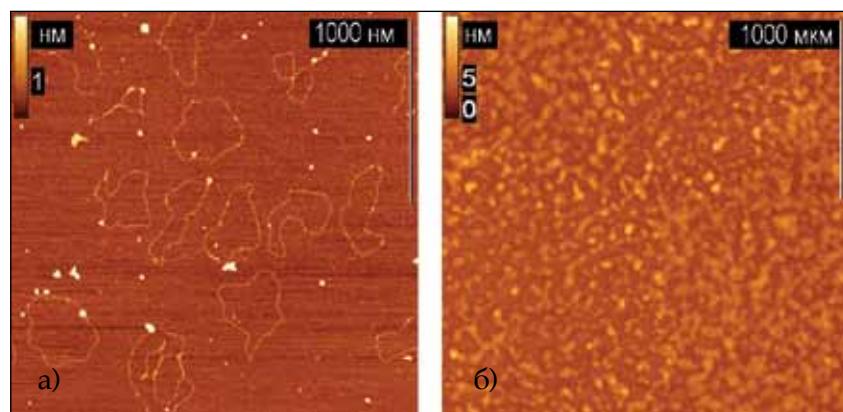


Рис.2. АСМ-изображение ДНК pBR322, нанесенной на слюду (а), обработка этой поверхности ДНКазой (б)

Обработка поверхности слюды с адсорбированной ДНК проводилась нанесением раствора ДНКазы [2] на подложку и его экспонированием в течение нескольких минут. Затем поверхность промывалась дистиллированной водой и высушивалась. После такой обработки на АСМ-изображениях молекулы ДНК не наблюдаются (рис.2б). Вместо этого поверхность равномерно покрыта большим количеством относительно небольших (2–3 нм) частиц, которые, вероятно, являются результатом взаимодействия ДНК с ДНКазой. Таким образом, можно предположить, что адсорбированные на поверхность слюды молеку-

лы ДНК легко доступны для ДНКазы.

АСМ-изображение лямбда-ДНК приведено на рис.3а. Это длинные кольцевые молекулы, контурная длина которых превышает 15 мкм. Обработка поверхности слюды с адсорбированной ДНК проводилась нанесением на подложку раствора рестриктазы [3] в рестриктазном буфере и его экспонированием в течение 20 мин.

После этого поверхность промывалась дистиллированной водой и высушивалась. В результате такой обработки поверхности на АСМ-изображении большинство молекул ДНК оказываются порезанными, причем в ряде случаев места разреза хорошо наблюдаются как прерывание контура адсорбированной молекулы (рис.3б).

¹ Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

² НПП «Центр перспективных технологий»

³ Физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

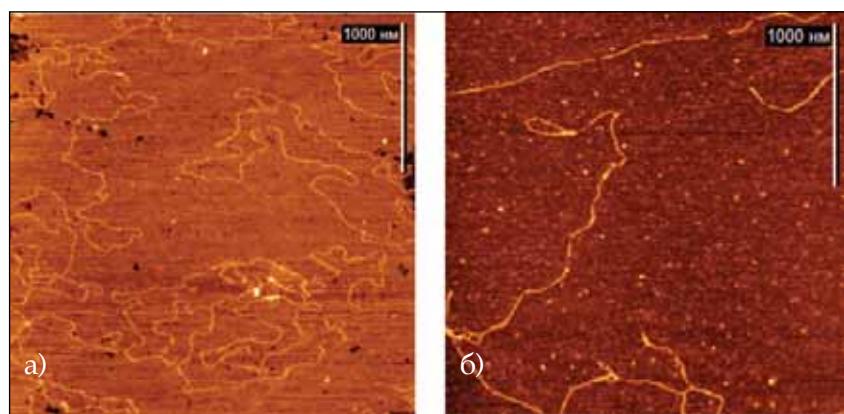


Рис.3. АСМ-изображение лямбда-ДНК, нанесенной на слюду (а), результат обработки поверхности рестриктазой (б)

В спецификации рестриктазного или иного типа, предназначенных для работы с определенным типом ДНК, указано, на какие фрагменты данный фермент разрежет ДНК [4]. В результате измерения длины фрагментов ДНК после рестриктазной обработки

обнаружено хорошее совпадение длин с данными, представленными производителем. Среднее отклонение от длин, известных по данным электрофореза, составило 6%. При этом на поверхности встречались как длинные фрагменты (более 1500 нм), так и ко-

роткие (50 нм). Это позволило предположить, что рестриктаза взаимодействует с адсорбированной на твердую подложку ДНК так же, как в объеме буферного раствора.

Таким образом, на примере двух модельных систем продемонстрировано, что влияние ферментов на адсорбированный на твердую подложку биополимер может быть идентично их влиянию в объеме буферного раствора.

Литература

1. Hansma H.G., Laney D.E. – Biophysical Journal, 70, 1933-1939 (1996).
2. Kunitz M. – J Gen Physiol, 33, 363-377 (1950).
3. Roberts RJ., Murray, Kenneth. CRC Crit. Rev. Biochem., 4 (2), 123-64 (1976).
4. <http://www.taq-dna.com/pcr/Phage-Lambda-DNA-PstI-digest.html>.