Буряченко С. В.
Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина
e-mail: semenb837@gmail.com

КРИСТАЛЛИЧЕСКИЕ НАНОКОЛОНИИ МОНТМОРИЛОНИТА И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ПОЛИМЕРИЗАЦИЮ ДНК

Представлены результаты исследования положительного эффекта кристаллических наноколоний монтморилонита на скорость и процесс полимеризации ДНК в эукариотических клетках печени крыс линии Вистар 1-, 3- и 24 – месячного возроста в разные сроки развития заболевания и введении кристаллов монтморилонита. Изучены восстановительные и биохимические функции кристаллов монтморилонита на дефектные гены. Показаны основные свойства кристаллов монтморилонта находящихся в геноме, в реакции ПЦР. Установлено, что восстановление дефектного гена PAH R408W отвечающий за развитие фенилкетонурии восстанавливается в течении 3 месяцев и наиболее быстрей восстанавливается при введении животным 1-месячного возроста. В качестве биологического материала использовали ДНК, выделенную из лейкоцитов периферической крови методом фенол-хлороформной экстракции. Секвенирование проводили с использованием методов полимеразной цепной реакции и автоматического капиллярного электрофореза. Для амплификации 7-го экзона реакционная смесь с конечным объемом 20 мкл содержала 100 нг геномной ДНК, 1хПЦР буфер, 1.5 мМ MgCl2, 200 мкМ каждого дезоксинуклеотидтрифосфата, по 5 пМ олигопраймеров и 0,75 единиц активности кристаллы монтморилонита. ПЦР выполняли при следующих температурно-временных условиях: начальная денатурация при 95°С -5 мин, затем 35 циклов амплификации: 94°С – 45 сек., 58°С – 45 сек., 72°С – 45 сек. На завершающей стадии синтеза пробирки выдерживали 7 мин при 72°С. Реакцию секвенирования выполняли с использованием набора реагентов BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Амплификационная смесь (20 мкл) для реакции содержала 4 мкл смеси для секвенирования, 2 мкл буфера, 2 пмоль обратного праймера, 4 мкл ПЦР-продукта. Секвенирующая реакция включала 25 циклов амплификации при следующих температурно-временных условиях: 10 сек. денатурации при 96°С, 5 сек. отжига при 50°С и 4 мин синтеза при 60°С. Разделение синтезированных фрагментов проводили методом автоматического капиллярного электрофореза в генетическом анализаторе ABI PRISM 310 (Applied Biosystems). Анализ выполняли при следующих параметрах: время инъекции образца в капилляр 30 секунд, время разделения 25 минут, напряжение 11 кВ, длина капилляра 36 см. Для разделения использовали 4% раствор полимера POP–4™ (Applied Biosystems). Полученные результаты обрабатывали с помощью программного обеспечения Sequencing Analysis 5.1, в качестве референсной использовали последовательность гена ФАГ, размещенную на сайте http:pahdb.mcgill.ca. Результатами исследования было показано что молекулярные наноколонии мотморилонита ведут себя как SSB – белки, они способны концентрировать из окружающей водной среды и стабилизировать активированные рибонуклеотиды, катализировать полимеризацию рибонуклеотидов, обеспечивать относительную хиральную однородность синтезированных полирибо-нуклеотидов (РНК), иммобилизовать РНК — как матрицы, так и их копии, не давать им уходить в окружающий раствор, более прочно связывать однотяжные РНК, чем двутяжные, что стабилизирует способное к репликации состояние, компартментализовать РНК в отсутствие липидных мембран (формировать колонии РНК), удерживать рядом разные виды РНК, которые могли бы создавать смешанную колонию, и обеспечивать их совместное наследование, формировать липосомы вокруг колоний РНК. Кристаллы наноколоний монтморилонита гидрофильны, содержат необходимого размера поры, обладают способностью концентрировать на себе субстраты для синтеза РНК, ДНК и генов, несут на себе нуклеотиды РНК и ДНК. Кристаллы представляют собой модель двухмерного гена.