დავით ძნელაძე

ბიოტექნოლოგიის კვლევის თანამედროვე მეთოდები და აპარატურა

თბილისი
2011

წიგნი წარმოადგენს დამხმარე სახელმძღვანელოს ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა, აგრეთვე სიცოცხლის შემსწავლელ მეცნიერებათა ფაკულტეტების ბაკალავრიატის და მაგისტრატურის სტუდენტებისათვის, ასევე ბიოტექნოლოგიით დაინტერესებულ პირთათვის.

სამაგისტრო პროგრამა "გამოყენებითი ბიომეცნიერებები"

ტემპუსის პროექტი JEP-159340
www.biosciences-tempus.org

ავტორი:
დავით ძნელაძე

რედაქტორი: ნანა დვალიშვილი

სტილისტ-კორექტორი: ლია კაჭარავა

პროექტი განხორციელდა ევროკომისიის ფინანსური მხარდაჭერით. პუბლიკაციის შინაარსზე პასუხს აგებენ მისი ავტორები და ის არ გამოხატავს ევროკომისიის მოსაზრებას

©2011. თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

ISBN 978-9941-0-3994-2

სარჩევი

ჰომოგენიზაცია.....5
მაკრომოლეკულების ფრაქციონირება
და გასუფთავება 6
ცილების ხსნადობა. იონური ძალა.....8
დიალიზი.....10
ცენტრიფუგირება.....12
სპექტროფოტომეტრი.....16
ქრომატოგრაფია.....19
პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია.....28
ელექტროფორეზი.....43
ორგანზომილებიანი ელექტროფორეზი.....50
გენური ინჟინერია.....57
გენურ ინჟინერიაში გამოყენებული ფერმენტები.....59
პოლიმერაზები.....59
უკუტრანსკრიპტაზა.....60
ლიგაზები.....61
ტერმინალურუ ტრანსფერაზა. პოლი- A-პოლიმერაზა.....62
რესტრიქციული ფერმენტები – დახასიათება, კლასიფიკაცია...62
რესტრიქტაზების ნომეკლატურა და დახასიათება.....64
რესტრიქტაზების მოქმედების მექანიზმები.
დნმ-ის მეთილირების სისტემები.....65
რესტრიქციის რუქების აგება.....67
დნმ-ის სეკვენირება,
დნმ-ის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის განსაზღვრა.....72
სენგერის ფერმენტაციული მეთოდი.....73
დნმ-ის ავტომატური სეკვენირება.....74

ჰიბრიდიზაცია - ნუკლეოტიდების სპეციფიკური
თანმიმდევრობის გამოვლენის მაღალმგრძნობიარე
მეთოდი.....77
დნმ-ის კლონირების მეთოდები -
გენომური ბიბლიოთეკები, დნმ-ის in vivo კლონირება.....79
გენის შეყვანა უჯრედში.....81
პროკარიოტული გენების ექსპრესიის რეგულაცია.....81
ეუკარიოტების გენების ექსპრესიის რეგულაცია.....83
ვექტორების ტიპები.....85
ვირუსები.....86
ვიროიდები.....87
ქლოროპლასტური და მიტოქონდრიული დნმ.....87
ტრანსპოზონები.....88
გენის უჯრედში პირდაპირი შეყვანის მეთოდები.....88
ბაქტერიული უჯრედების გენეტიკური ტრანსფორმაცია.....90
გენების შეყვანა ძუძუმწოვრების უჯრედებში.....91
ლიტერატურა.....96
ილუსტრაციები.....99

ბიოტექნოლოგიის კვლევის თანამედროვე მეთოდები და აპარატურა

ცილები და ნუკლეინის მჟავები ორგანიზმის უმთავრესი ქიმიური კომპონენტებია. ცოცხალ ორგანიზმში ისინი როგორც სამშენებლო, ისე სარეგულაციო ფუნქციას ასრულებენ და, შესაბამისად, მათ შესწავლას განსაკუთრებული მნიშვნელობა ენიჭება თანამედროვე ბიოლოგიურ მეცნიერებებში, კერძოდ, ბიოტექნოლოგიაში. მათ შესასწავლად ხშირად საჭირო ხდება საკვლევი მოლეკულის ორგანიზმიდან გამოთავისუფლება და სრული, ან ნაწილობრივი, გასუფთავება. მეცნიერებამ გასუფთავების მრავალი მეთოდი შექმნა. აქ განვიხილავთ რამდენიმე ძირითად მეთოდს.

ჰომოგენიზაცია

ჰომოგენიზაცია, როგორც თავად სიტყვა მიგვანიშნებს, არის პროცესი, რომლის მეშვეობით ცალკეული ქსოვილიდან მათი დაქუცმაცებისა და სტრუქტურების დარღვევის გზით მიიღება ერთგვაროვანი მასა. სასურველია, ეს პროცესი ჩატარდეს ისეთ პირობებში, სადაც მისაღები ბიომოლეკულები შეინარჩუნებენ თავიანთ ფიზიკურ და ქიმიურ თვისებებს. პროცესი წყალხსნარებში მიმდინარეობს, ამასთან, უნდა მოვერიდოთ pH-ის ექსტრემალურ მნიშვნელობებს, ოსმოსურ წნევასა და მაღალ ტემპერატურას. გამოყოფის პროცესების უმეტესი სტადიები უნდა ტარდებოდეს 0-4° C ტემპერატურაზე – ცივ ოთახში ან ყინულზე. ოთახის ტემპერატურის პირობებში, მისაღები ბიომოლეკულები განიცდიან რა სხვადასხვა ჰიდროლიზური ფერმენტების, პროტეაზებისა და ნუკლეაზების ზემოქმედებას, კარგავენ ფიზიკურ და ქიმიურ თვისებებს, ჩვეულებრივ, ექსტრაქციისთვის იყენებენ 0.25M საქაროზას იზოოსმოსურ ხსნარს, რომელიც ფიზიოლოგიურთან მიახლოებული კონცენტრაციით შეიცავს K^+-სა და Mg^{2+}-ს, ხოლო pH-ს ნეიტრალურ (7.4) ნიშნულზე აყენებენ 0.05M ტრისჰიდროქსიმეთილ-ამინომეთანჰიდროქლორიდის (მარილ-მჟავა ტრისის) ბუფერით. ასევე შესაძლებელია სხვა ბუფერული ხსნარების (ძმარმჟავა-აცეტატის, ფოსფატური ბუფერის და სხვ.) გამოყენება, გამოსაყოფი ობიექტის თვისებების გათვალისწინებით: მაგალითად, ფერმენტი პეპსინი, რომელიც შედის კუჭის წვენის შემადგენლობაში, აქტიურია მჟავე გარემოში, ოპტიმალურ აქტივობას კი pH 1.6-ზე ავლენს; ფერმენტ ტრიფსინისათვის, რომელიც წვრილ ნაწლავებში გვხვდება, ოპტომალური აქტივობისათვის pH მნიშვნელობა 6.4-ია; ძვლის ქსოვილის ფერმენტ ტუტეფოსფატაზასათვის კი pH-ის ოპტიმუმის ნიშნული 8.4-ს აღწევს.

როგორც ზემოთ უკვე აღვნიშნეთ, ბიომოლეკულების მისაღებად, პირველ ყოვლისა, საჭიროა უჯრედების დანგრევა – ჰომოგენიზაცია. იმის გათვალისწინებით, როგორია დასამუშავებელი ობიექტი, შეარჩევენ

შესაბამის აპარატურას – ჰომოგენიზატორს. ისეთი ქსოვილების დასამუშავებლად, როგორიცაა, მაგალითად, ტვინის, თირკმლის, ღვიძლის ქსოვილი, ხილის რბილობი ან სხვა, იყენებენ ცვალებადი სიჩქარის ხელსაწყოს, რომელიც გამოსახულია (სურ.1-ზე. გვ. 97.) იგი შედგება შტატივისაგან, მასზე დამაგრებული ამძრავი მექანიზმითა და სამართავი პულტით. ძრავთან მიერთებულია უჟანგავი ფოლადის ღერძი, რომელიც ცილინდრული ფორმის ტეფლონით ბოლოვდება. მაკრატლით, ლანცეტით ან დანით წინასწარ დაქუცმაცებული ქსოვილი თავსდება მინის ცილინდრული ფორმის ჭურჭელში, რომლის დიამეტრი ოდნავ აღემატება ტეფლონის დიამეტრს (0.1-0.2მმ). ამგვარი ჭურჭელი შეიძლება დამზადდეს მინის შპრიცისგან, რომელსაც დახშული ექნება სითხის გამოსასვლელი. ტეფლონის ცილინდრს ათავსებენ ჭურჭელში, ჩართავენ ამძრავ მექანიზმს და ტეფლონიანი ღერძი იწყებს მინის ჭურჭელში ტრიალს. ჭურჭელს ხელით ამოძრავებენ ზევით და ქვევით. ტრიალის პროცესს, რომლის სისწრაფეა 200 – 30 000 ბრ/წთ, სამართავი პულტით აკონტროლებენ. წარმოიქმნება სიბლანტის ხახუნის ძალა, რომელიც დაქუცმაცებულ ქსოვილს გარდაქმნის ერთგვაროვან მასად. მიღებულ მასას ჰომოგენატი ეწოდება. (სურ.1 გვ.99) ჰომოგენიზატორი ცვალებადი სიჩქარით შედარებით უხეში ქსოვილების (კუნთები, მცენარის ფესვები, ფოთლები და სხვა) დასამუშავებლად გამოიყენება სხვადასხვა სახის ჰომოგენიზატორები.

მე-2 სურათზე (გვ. 99) გამოსახულია ე.წ. ჰომოგენიზატორი-დისპერგატორი, რომელშიც ზემოთ აღწერილი აპარატისაგან განსხვავებით, ტეფლონიანი უჟანგავი ფოლადის ღერძის ნაცვლად მაგრდება ასევე უჟანგავი ფოლადის მილი ბასრკბილანებიანი ბოლოთი. მე-3 სურათზე (გვ. 99) გამოსახულია ჰომოგენიზატორი – ბლენდერი, რომელიც შედგება ამძრავი მექანიზმისა და მასზე წამოსაცმელი ჭურჭლისგან. ჭურჭლის ფსკერზე მოთავსებულ მოძრავ, ბასრ დანებს გადაეცემათ ამძრავი მექანიზმის მოძრაობა და ისინი, იწყებენ რა ტრიალს, აქუცმაცებენ ჭურჭელში მოთავსებულ ქსოვილებს.

მაკრომოლეკულების ფრაქციონირება და გასუფთავება

ცილების ექსტრაქციის, ანუ ცილების ხსნად მდგომარეობაში გადასვლის შემდეგ, შესაძლებელია მათი დაცალკევება ინდივიდუალურ ცილის მოლეკულებად. ამ მიზნით მრავალგვარი მეთოდი გამოიყენება: გამოლექვა, თერმული დამუშავება, ქრომატოგრაფია, ელექტროფორეზი და სხვა.

წყალში გახსნისას, ცილის თითოეული მოლეკულა განიცდის ჰიდრატაციას, რაც ნიშნავს, რომ ამ მოლეკულის გარშემო წარმოიქმნება წყლის ე.წ. ჰიდრატაციული გარსი, სადაც წყლის მოლეკულებს აქვთ გარკვეული ორიენტაცია სივრცეში. ჰიდრატაციულ გარსში მონაწილე წყლის მოლეკულები, თავიანთი ქიმიური და ფიზიკური თვისებებით

განსხვავ-დებიან სუფთა წყლისგან; კერძოდ, მათი გაყინვის ტემპერატურა -40°C-ია. ასეთ წყალში ცუდად იხსნება შაქრები, მარილები და სხვა ნივთიერებები. ცილის ხსნარები ხასიათდებიან არამდგრადობით და ჰიდრატაციის დამრღვევი სხვადასხვა ფაქტორის ზეგავლენით, ისინი გამოილექებიან. ამგვარად, ცილის წყალხსნარებში ნებისმიერი წყალწამრთმევი აგენტის დამატებისას ხდება ცილის მოლეკულის დეჰიდრატაცია და გამოლექვა. ამგვარი ფაქტორებია: სპირტები, ტუტე და ტუტემიწათა მეტალთა მარილების კონცენტრირებული ხსნარები.

ჩვეულებრივ, როდესაც საუბარია გამოლექვაზე, გულისხმობენ გამოლექვას ამონიუმის სულფატით. ეს მეთოდი წარმატებით გამოიყენება ასეული წლის განმავლობაში. ადრე იგი გამოიყენებოდა ფრაქციონირებისათვის, ამჟამად კი იყენებენ, როგორც ცილების გამოლექვის იაფ და ხელსაყრელ მეთოდს.

შეიძლება გაჩნდეს კითხვა – რატომ მაინც და მაინც ამონიუმის სულფატი?! ერთნაირი მოლარული კონცენტრაციის შემთხვევაში, პოლივალენტური ანიონები გაცილებით ეფექტურნი არიან მონოვალენტურთან შედარებით, რადგან აქ გადამწყვეტი მნიშვნელობა ენიჭება არა მარილის კონცენტრაციას, არამედ ხსნარის იონურ ძალას. პოლივალენტური კათიონები ხელს უშლიან პოლივალენტური ანიონების მოქმედებას. აქედან გამომდინარე, რომ ოპტიმალური იქნება პოლივალენტური ანიონების შეხამება მონოვალენტურ კათიონებთან. ე.წ. ჰოფმაისტერის რიგი გვაჩვენებს გამოლექვის ეფექტუ-რობას კლებადი მიმდევრობით: **ციტრატი>სულფატი>ფოსფატი>ქლორიდი> ნიტრატი>თიოციანატი.**

ამ რიგის მიხედვით, კლებადია სტაბილიზირების ეფექტი მაშინ, როცა მზარდია მარილის ქაოტროპული თვისებები. ამგვარად, ყველაზე „სასურველი“ ნაერთებია ციტრატი და სულფატი. სულფატი უფრო გამოსადეგია მისი უკეთესი ხსნადობის გამო (მაგალითად, ნორმალურ ტემპერატურაზე, ციტრატისა და სულფატის ამონიუმის მარილთა ხსნადობა უტოლდება, შესაბამისად, 2.5 M-სა და 4.1 M-ს). ამონიუმის სულფატი იწვევს ცილების პრეციპიტაციას ორგვარი მექანიზმით: სულფატის იონები ცილის მოლეკულას ხდიან შედარებით კომპაქტურს (ძნელად ხსნადს) დადებითად დამუხტულ ამინომჟავებთან ურთიერთქმედების ხარჯზე. ეს ურთიერთქმედება გაცილებით ეფექტიურია, როცა pH<pI /pI (იზოელექტრული წერტილი); მეორე მექანიზმი კი არის გაუწყლოება. $(SO_4)_2$ ერთი იონი შეიცავს 13-14 წყლის მოლეკულას მხოლოდ პირველ ჰიდრატულ გარსში და უფრო მეტს – მეორე ჰიდრატულ გარსში. თუ სულფატის ერთი მოლეკულა აკავებს, სულ მცირე, 15 მოლეკულა წყალს, მაშინ 3M ამონიუმის სულფატი დაიკავშირებს 45M წყალს (ანუ ხსნარში წყლის კონცენტრაცია შემცირდება).

ხსნარის იონური ძალა. განვიხილოთ შემდეგი ტოლობა:

$$I = {}^{1}/_{2}\ \Sigma Ci(Zi)^2$$

სადაც **Ci** იონის კონცენტრაციაა, ხოლო **Zi** იონის მუხტი.
1M NaCI –ის შემთხვევაში:

$$I = 1/2\ (1\ (1)\ 2 + 1\ (1)\ 2) = 1$$

1M $(NH_4)_2SO_4$-ის შემთხვევაში:

$$I = 1/2\ (2\ (1)\ 2 + 1\ (1)\ 2) = 3$$

ცილების ხსნადობა

• იონური ძალისა და ტემპერატურის გავლენა

დაბალი იონური ძალის თანაობისას (<0.2M), ცილის ხსნადობა იზრდება მარილის კონცენტრაციის მატებასთან ერთად, რადგან საწინააღმდეგოდ დამუხტული ჯგუფების მიზიდულობის ეკრანირებით ხდება ცილის მოლეკულის „მოდუნება“.

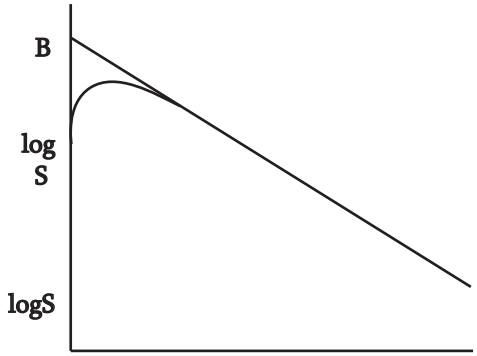
მაღალი იონური ძალის არსებობისას (>0.2M), ცილის ხსნადობა მცირდება გამოლექვისა და გაუწყლოების ხარჯზე. იგი ექსპონენციალურად ეცემა იონური ძალის ზრდასთან მიმართებაში:

logS = B- KI,

სადაც **S [g/l]** – ცილის ხსნადობაა; **I** - იონური ძალა; **B** – იდეალურთან მიახლოებული ხსნადობა და **K** – მარილთა სპეციფიკური კონსტანტა.

K სხვადასხვა ცილისათვის ძალიან მცირედ მერყეობს და არ არის დამოკიდებული **pH**-ზე ან ტემპერატურაზე; **B** ძლიერ დამოკიდებულია თავად ცილებსა და ტემპერატურაზე - ტემპერატურის მომატება იწვევს **B** -ს შემცირებას. ქვემოთ მოყვანილი ხსნადობის მრუდი ასახავს იონური ძალის გავლენას ცილის ხსნადობაზე. იონური ძალის გაზრდისას, ხსნადობა კლებულობს.

იონური ძალა



• pH გავლენა.

დაბალი იონური ძალის თანაობისას **(<0.2M)**, თუ **pH** უტოლდება ცილის იზოელექტრულ წერტილს **(pI)**, ცილის ხსნადობა მინიმალურია. ამონიუმის სულფატის მაღალი კონცენტრაციის პირობებში, ცილის ხსნადობა იზრდება pH-ის ზრდის პარალელურად, რადგან დაბალი **pH**-ის პირობებში, სულფატის იონები ურთიერთობენ რა ცილის დადებითად დამუხტულ ჯგუფებთან, ცილის მილეკულას ანიჭებენ კომპაქტურობას. ამგვარად, ცილების გამოსალექად უმჯობესია შეირჩეს ისეთი პირობები, სადაც **pI>pH**.

შესაძლებელია არა მხოლოდ ცილების, არამედ დეტერგენტების გამოლექვაც. მაგალითად, 0.5%-იანი **Tween 20 და Triton X100** იწყებენ აგრეგირებას 1M ამონიუმის სულფატის თანაობისას. წარმოქმნილი პრეციპიტატი ოდნავ დაბალი სიმკვრივისაა, მარილის ხსნართან შედარებით. ცენტრიფუგირებისას იგი ამოტივტივდება ცილებთან ერთად.

ჩვეულებრივ, 1M კონცენტრაციის შემთხვევაში (გაჯერების 25%) გამოილექება დიდი ნაწილაკები, აგრეგატები ან ძალიან დიდი ზომის ცილის მოლეკულები. კონცენტრაციების გამოყენებადი რიგი ასე გამოიყურება: 0M; 1M(25%); 1.6M(40%); 2.4M(60%); 3.2M(80%).

შესაძლებელია კრისტალური ამონიუმის სულფატის ან მისი ნაჯერი ხსნარის დამატება (მაღალი სიზუსტის დაცვის საჭიროების მიზნით გამოიყენება 4M ხსნარი). პირველი მეთოდი იმ შემთხვევაშია მოსახერხებელი, თუკი სურთ, რომ მიიღონ ამონიუმის სულფატის მაღალი კონცენტრაცია, ან არ სურთ ხსნარის მოცულობის გაზრდა. ნებისმიერ შემთხვევაში, ამონიუმის სულფატის დამატებისას აუცილებელია ხსნარის უწყვეტად (მუდმივად) მორევა, რათა არ მოხდეს მარილის ლოკალური კონცენტრირება.

რაც მაღალია ცილების დენატურირების შესაძლებლობა. ჩვეულებრივ, გამოლექვა მიმდინარეობს $0^{o}C$–ზე, თუმცა, განსაკუთრებულ შემთხვევებში, შესაძლებელია პროცედურის ჩატარება $25^{o}C$-ზეც, რადგან ამონიუმის სულფატი სტაბილურობას ანიჭებს ცილებს და ხელს უშლის ბაქტერიების გამრავლებას.

ცილის პრეციპიტატი ილექება ჭურჭლის ფსკერზე, რადგან მისი სიმკვრივეა 1.29, ხოლო ამონიუმის სულფატის გაჯერებული ხსნარის სიმკვრივე უტოლდება 1.24-ს. ნალექის შეგროვება ხდება ცენტრიფუგირებით. ცილების ნალექს ყოველთვის თან მიჰყვება მარილების გარკვეული რაოდენობა. პრეპარატის გარეცხვა დაუშვებელია, რადგანაც იგი გამოიწვევს ხსნარში ცილების განმეორებით გადასვლას. მარილების მოსაცილებლად ეფექტურია დიალიზის მეთოდი.

დიალიზი

დიალიზი კოლოიდური და მაღალმოლეკულური ხსნარებიდან მასში გახსნილი დაბალმოლეკულური ნივთიერებების მოცილების პროცესია. ეს პროცესი მიმდინარეობს ე.წ. ნახევრადგამტარი მემბრანების საშუალებით. ხშირ შემთხვევაში მემბრანა წაგრძელებული პარკია, რომლის შიგნით ათავსებენ სადიალიზე ხსნარს. ხსნარიანი პარკი თავსდება გამხსნელში (წყალში ან ბუფერში). გაივლიან რა ნახევრადგამტარ მემბრანას, დაბალმოლეკულური ნივთიერებები თანდათანობით გადადიან სადიალიზე ნიმუშიდან გამხსნელში. დროის გარკვეული პერიოდის შემდეგ, მყარდება წონასწორობა და დაბალმოლეკულური ნივთიერების კონცენტრაცია სადიალიზე ხსნარში, უტოლდება მის კონცენტრაციას გამხსნელში.

გამხსნელის რამდენჯერმე შეცვლით შესაძლებელია არასასურველი მინარევების სრული მოცილება. დიალიზის სიჩქარე ძალიან დაბალია – იგი დაახლოებით 24 საათი გრძელდება. პროცესის ხანგრძლივობის შემცირება შეიძლება სადიალიზე პარკის ფართობისა და ტემპერატურის გაზრდით, თუმცა ტემპერატურა, ხშირ შემთხვევაში, ხელისშემშლელი პირობაა ცილების დენატურაციის გამო. დროის შემცირება ასევე შესაძლებელია, თუ გამხსნელიან ჭურჭელს სადიალიზე პარკით მოვათავსებთ მაგნიტურ სანჯღრეველაზე და მოვახდენთ გამხსნელის განუწყვეტელ მორევას. ხსნარს მასში შემავალი ნივთიერებებით, რომლებიც გააღწევენ მემბრანაში, დიალიზატს უწოდებენ.

ცენტრიფუგირება

უჯრედული ორგანელებისა და ბიომოლეკულების დაყოფაში ცენტრიფუგირებას მნიშვნელოვანი როლი ენიჭება. ეს მეთოდი ეფუძნება ცენტრიფუგირებისას წარმოქმნილ ცენტრიდანულ გარემოში დასაყოფი ნაწილაკების მოქმედებას. ცენტრიფუგა არის დანადგარი, რომელიც ორი ძირითადი ნაწილისგან – მოტორისა და როტორისაგან შედგება. როტორი წამოეცმევა მოტორის ღერძზე და ამ ღერძის მეშვეობით იწყებს ბრუნვას. ჰომოგენატი თავსდება ცენტრიფუგის სინჯარებში, რომელიც, თავის მხრივ, თავსდება როტორში და ბრუნავს როტორთან ერთად. ცენტრიდანულ გარემოში სხვადასხვა სიდიდის, ზომისა და სიმკვრივის ნაწილაკები სხვადასხვა სიჩქარით ილექებიან. უნდა გვახსოვდეს, რომ სანამ სინჯარებს როტორში მოვათავსებდეთ, ისინი წყვილ-წყვილად უნდა გავაწონასწოროთ სასწორის გამოყენებით და ერთნაირი წონის წყვილი სინჯარა უნდა მოვათავსოთ როტორის ღრმულებში ერთმანეთის საპირისპიროდ.

ანალიზური/პრეპარატიული ცენტრიფუგირება

განასხვავებენ ორი ტიპის ცენტრიფუგირებას: ანალიზურსა და პრეპარატიულს.

განსხვავება ამ ორ ტიპს შორის დამოკიდებულია იმაზე, თუ რა მიზანს ემსახურება ექსპერიმენტი. ანალიზური ცენტრიფუგირება გულისხმობს დასალექი ნაწილაკების სედიმენტაციის კოეფიციენტის ან მოლეკულური მასის ფიზიკური მახასიათებლების გაზომვას. ანალიზური ცენტრიფუგირებისას ხდება ნაწილაკებზე ოპტიკური დაკვირვება უშუალოდ ცენტიფუგირების პროცესში, რაც საშუალებას იძლევა შევისწავლოთ ნაწილაკები ხსნარში გრავიტაციულ ველში მოძრაობისას. შესასწავლი ნიმუშები ცენტრიფუგირდება სინჯარაში, რომელსაც აქვს ფანჯარა. ფანჯარა მდებარეობს მბრუნავი როტორის პარალელურ სიბრტყეში. როტორის შემობრუნებისას, ნაწილაკების გამოსახულება ოპტიკური სისტემის მეშვეობით პროექტირდება კომპიუტერზე.

სინჯარაში არსებული ხსნარის კონცენტრაცია სხვადასხვა მონაკვეთში განისაზღვრება მასში გამავალი შესაბამისი ტალღის სიგრძის სხივის შთანთქმის უნარით. კომპიუტერში ხდება მიღებული შედეგების დამუშავება.

ცენტრიფუგირების მეორე ტიპს განეკუთვნება პრეპარატიული ცენტრიფუგირება.

ამ შემთხვევაში დალექილი ნაწილაკები შეიძლება გამოყენებულ იქნეს შემდგომი კვლევებისათვის. განასხვავებენ რამდენიმე სახის პრეპარატიულ ცენტრიფუგირებას, მაგალითად, ზონალურს, დიფერენციალურსა და იზოპიკნიკურს.

დიფერენციალური ცენტრიფუგირებისას გადამწყვეტი მნიშვნელობა ენიჭება დასაყოფი ნაწილაკების სიდიდეს. ამ შემთხვევაში არ აქვს მნიშვნელობა როგორ არიან განაწილებული ნაწილაკები დასაცენტრიფუგებელ ხსნარში. თუ მათი ზომები ერთმანეთისაგან განსხვავებულია, განსხვავებული იქნება მათი დალექვის სისწრაფეც. ხანგრძლივი ცენტრიფუგირებისას ყველა ნაწილაკი დაილექება სინჯარის ფსკერზე, მაგრამ თუკი შევარჩევთ ცენტრიფუგირების სიჩქარეს და ხანგრძლივობას, ფსკერზე აღმოჩნდებიან ყველაზე დიდი ზომის ნაწილაკები, ხოლო სუპერნატანტში (სუპერნატანტი ეწოდება ნალექზედა სითხეს) დარჩებიან შედარებით მცირე ზომის ნაწილაკები (სურ. 4. გვ. 100).

სუპერნატანტის განმეორებითი ცენტრიფუგირება გაზრდილ სიჩქარეზე გამოიწვევს სიდიდით მომდევნო ნაწილაკების დალექვას და ა.შ.

ზონალური ცენტრიფუგირების შემთხვევაში ხდება საკვლევი ნიმუშის დაშრევება მასზე უფრო მაღალი სიმკვრივის მქონე ხსნარზე. ზონალური ცენტრიფუგირების არსი ისაა, რომ განსხვავებული

სიდიდის ნაწილაკები ერთჯერადი ცენტრიფუგირების პროცესში დაცალკევდებიან და ჯგუფდებიან ზონებად: დიდი ზომის ნაწილაკები უფრო ადვილად გადალახავენ არსებული ხსნარის სიმკვრივეს და განლაგდებიან ფსკერთან ახლოს; მომცრო ნაწილაკები კი, რომლებსაც მეტი წინააღმდეგობა ხვდებათ ხსნარის სიმკვრივის დასაძლევად, განლაგდებიან ფსკერიდან შედარებით ზემოთ და ა.შ.

იმისათვის, რომ ზონები იყოს ვიწრო და მდგრადი, საჭიროა შევამციროთ ხსნარის **კონვექცია** (convectio (ლათ.) – სითბოს ან ელექრომუხტების გადატანა მოძრავი გარემოს (წყლის, ჰაერის, ორთქლის და მისთ.) დინების გამო). ამის საშუალებას იძლევა კონცენტრაციული გრადიენტი.

განვიხილოთ საქაროზას გრადიენტის მიღების მეთოდი: ცენტრიფუგის სინჯარის ფსკერზე ათავსებენ მაღალი კონცენტრაციის საქაროზას ხსნარს და მას ამატებენ შედარებით დაბალი კონცენტრაციის ხსნარს. ამ პროცედურას რამდენჯერმე იმეორებენ საქაროზას ხსნარის კონცენტრაციის თანდათანობითი კლებით. საბოლოოდ მიიღებენ საქაროზას გრადიენტს, რომელზეც ხდება საკვლევი ნიმუშის დაშრევება (სურ. 5 გვ. 100).

ცენტრიფუგირების შემდეგ ნაწილაკები საკვლევი ნუმუშიდან, თავის ზომების მიხედვით, განლაგდებიან შესაბამისი სიმკვრივის ზონებში (სურ. 6 გვ. 100).

იზოპიკნიკური (თანაბარ სიმკვრივეთა ზოლში) **ცენტრიფუგირება** შეიძლება ჩატარდეს როგორც სიმკვრივის გრადიენტში, ისე გრადიენტის გარეშეც. იმ შემთხვევაში, თუკი ცენტრიფუგირება ტარდება გრადიენტის გარეშე, საკვლევ პრეპარატს თავდაპირველად აცენტრიფუგირებენ ისეთ რეჟიმში, რომ მოხდეს იმ ნაწილაკების გამოლექვა, რომელთა სიდიდე აღემატება საკვლევი ნაწილაკების სიდიდეს. გამოლექილი დიდი ზომის ნაწილაკების მოშორების შემდეგ, ნიმუში სუსპენდირდება საკვლევი ნაწილაკების შესაბაბისი სიმკვრივის არეში და ცენტრიფუგირდება მანამ, სანამ საკვლევი ნაწილაკები არ გამოილექება ფსკერზე, ხოლო მცირე ნაწილაკები ამოტივტივდება ხსნარის ზედაპირზე.

იზოპიკნიკური ცენტრიფუგირების მეორე ხერხის გამოყენებისას, ცენტრიფუგის სინჯარაში წინასწარ იქმნება უწყვეტი, გრადიენტული სიმკვრივე, რომელიც მოიცავს საკვლევი პრეპერატის ყველა კომპონენტის სიმკვრივეთა დიაპაზონს, რის შემდეგაც ხდება ნიმუშის დაშრევება. ცენტრიფუგირება გრძელდება მანამ, სანამ მოტივტივე ნაწილაკის სიმკვრივე არ გაუთანაბრდება შესაბამისი ზონის სიმკვრივეს და ყველა ნაწილაკი არ განლაგდება შესაბამის ზონებში. ამ მეთოდს უწოდეს ზონურ-იზოპიკნიკური, ანუ პეზონალური ცენტრიფუგირება, რადგანაც აქ გადამწყვეტ როლს თამაშობს მოტივტივე ნაწილაკების სიმკვრივე და არა მათი სიდიდე ან ფორმა.

მიტოქონდრიები, ლიზოსომები, პეროქსისომები და მიკროსომები კონცენტრირდებიან, შესაბამისად, 42, 47, 47 და 27%-იანი საქაროზას ზონებში, რომელთა სიმკვრივის მაჩვენებლები, შესაბამისად, არის: 1.18, 1.21, 1.21 და 1.10 გ/სმ^3.

ცენტრიფუგების კლასიფიცირება შესაძლებელია მათი სიჩქარის მაჩვენებლების მიხედვით: დაბალსიჩქარიანია ცენტრიფუგა, რომლის სიჩქარე არ აღემატება 10 000 ბრ/წთ. „ულტრაცენტრიფუგის" ქვეშ იგულისხმება ხელსაწყო, რომელიც ავითარებს 20 000 ბრ/წთ-მდე სიჩქარეს. სუპერ-ულტრაცენტრიფუგის შემთხვევაში, ბრუნვების რიცხვი წუთში აჭარბებს 20 000-ს. აქვე აღსანიშნავია, რომ ცენტრიფუ-გები შეიძლება აღჭურვილნი იყვნენ გაციების სისტემით, რათა არ მოხდეს საკვლევი პრეპარატის (ცილები, ნუკლეინის მჟავები) გადახურება და დაზიანება (სურ. 7. გვ. 101).

როტორები

განასხვავებენ რამდენიმე სახის როტორს. ესენია:

- კუთხური როტორი;
- როტორები თავისუფლად ჩამოკიდებული სინჯარებით ე.წ. ბაკეტროტორი;
- უწყვეტი დინების ანუ ზონალური როტორი.

კუთხური როტორი (სურ. 8 გვ. 102). შესაძლებელია დამზადებული იყოს ალუმინის ან ტიტანისგან. ალუმინის კუთხური როტორები გამოიყენება დაბალი სიჩქარეების დროს, ტიტანის როტორები კი მაღალი სიჩქარეებისათვის არის განკუთვნილი. (სურ. 9გვ.102). ბაკეტროტორები თავისუფლად ჩამოკიდებული სინჯარებით.

სახელწოდება „ბაკეტროტორი" უკავშირდება ინგლისურ სიტყვა "BUCKET"-ს („სათლი").

ე. წ. სათლები თავისუფლად არიან ჩამოკიდებულნი როტორზე ვერტიკალურ მდგომარეობაში. უმცირესი სიჩქარით ბრუნვის დროსაც კი, მათი მდებარეობა იცვლება და ისინი გადადიან ჰორიზონტალურ მდგომარეობაში. ბაკეტროტორებს განასხვავებენ სიჩქარისა და მოცულობის მახასიათებლებით: ზოგიერთი გამიზნულია საშუალო და დაბალ სიჩქარეზე ცენტრიფუგირებისთვის; არსებობს ზემაღალ სიჩქარეზე მომუშავე როტორებიც. რაც შეეხება მოცულობებს, მათი მეშვეობით შესაძლებელია დავაცენტრიფუგიროთ სრულიად განსხვავებული მოცულობის ხსნარები – დაწყებული რამდენიმე მილილიტრით, დამთავრებული რამოდენიმე ლიტრის მოცულობებით. თითოეულ ბაკეტში შესაძლებელია მოთავსდეს ერთი ან რამდენიმე სინჯარა.

უწყვეტი დინების ანუ ზონალური როტორი (სურ. 10. გვ. 103). საშუალებას იძლევა მაღალი ცენტრიდანული ძალის მოქმედებით ერთდროულად დავაცენტრიფუგიროთ საკმაოდ დიდი მოცულობების

უამრავი სინჯარა როტორის მრავალჯერადი ჩართვა-გამორთვის გარეშე. ზონალურ როტორში სინჯარების როლს ასრულებს ოთხი სექტორი, რომელსაც წარმოქმნის ჯვრის ფორმის, ნეიტრალური მასალისგან დამზადებული დეტალი. ამ სექტორებში ხსნარი მოძრაობს როტორთან ერთად და ექვემდებარება რა ცენტრიდანულ ძალას, დასალექი ნაწილაკები მოძრაობენ ცენტრიდან პერიფერიისაკენ და მოიცავენ როტორის მთელ სიმაღლეს. როტორს ეხრახნება მასიური თავსახური, რომელიც მჭიდროდ (ჰერმეტულად) ეხურება როტორს ღარში ჩასმული რეზინის რგოლის საშუალებით. ჯვრის მაგვარი დეტალის სექტორებში გადის ღარები, რომლებიც ცენტრალურ და პერიფერიულ ნაწილებს აკავშირებენ როტორის ზედა ნაწილში მოთავსებულ გადამრთველ მოწყობილობასთან. გადამრთველი მოწყობილობის ფუნქციაა როტორის შევსება დაბალი სიჩქარით (2-3 ათასი ბრ/წთ) ტრიალის დროს, რათა წარმოიქმნას საწყისი გრადიენტი. სიმკვრივე მატულობს როტორის ცენტრიდან პერიფერიისკენ და შენარჩუნდება ცენტრიფუგირების მთელი დროის განმავლობაში.

როგორ გადავიანგარიშოთ ბრ/წთ (rpm) x g -ზე

ხშირად ცენტრიფუგის სიჩქარე გამოისახება ბრუნვების რაოდენობით წუთში (ბრ/წთ). ინგლისურენოვან ლიტერატურაში იგი აღინიშნება, როგორც **rpm** (revolutions per minute). ზოგჯერ, სამეცნიერო ლიტერატურაში, ცენტრიფუგირების სიჩქარე შეიძლება გამოსახული იყოს **rcf** (relative centrifugal force ანუ g-force).

ეს სიდიდე მიუთითებს, თუ რამდენი g-ს განვითარება შეუძლია ცენტრიფუგას 1 წუთის განმავლობაში და წარმოადგენს აჩქარების მუდმივას ყველა ცენტრიფუგისათვის, დამოკიდებლად როტორისა და ცენტრიფუგის ტიპისა.

ცენტრიფუგის სიჩქარის მაჩვენებლებს, ჩვეულებრივ, ბრ/წთ სიდიდით გამოსახავენ. ამდენად, საჭირო ხდება **g**-ს გადაანგარიშება ბრ/წთ-ზე. ამისათვის სარგებლობენ შემდეგი ფორმულით:

$rcf = 0.00001118 \times r \times rpm^2$

r = მბრუნავი რადიუსი სანტიმეტრებში

მბრუნავ რადიუსს შემდეგნაირად ზომავენ:

- ბაკეტროტორის შემთხვევაში სახაზავით იზომება მანძილი როტორის ღერძის ცენტრიდან ერთ-ერთი ბაკეტის (სათლის) ცენტრალურ ნაწილამდე.
- კუთხური როტორის შემთხვევაში, თავდაპირველად უნდა შემოწმდეს, ხომ არ არის როტორზე მითითებული რადიუსი. თუკი მაჩვენებელი არ არის მითითებული, როტორის ღერძის ცენტრიდან ვახდენთ აზომვას როტორის რომელიმე სინჯარის ღრმულის შუა ნაწილამდე.

- დავუშვათ, რომ **rpm** 500-ის ტოლია, მაშინ **rpm²** იქნება 500 X 5000 = 25 000 000. ბრუნვის რადიუსი **r** ტოლია 10სმ-ის. **rpm²** X r = 25 000 000 X 10 = 250 000 000. ამ სიდიდეს თუ გავამრავლებთ 0.0001118-ზე, მივიღებთ 2795g-ს.

სედიმენტაციის თეორიის ზოგიერთი ასპექტი

სედიმენტაცია (დალექვა) არის ნაწილაკების მოძრაობის მიმართულება ხსნარში გრავიტაციის ველის ან ცენტრიდანული ძალის მოქმედებით. სედიმენტაციის სიჩქარე დამოკიდებულია ნაწილაკების მასაზე, სიდიდესა და სიმკვრივეზე, აგრეთვე გარემოს სიმკვრივესა და ნაწილაკებზე მოქმედ ცენტრიდანულ ძალებზე.

ნაწილაკები (ჩვენ შემთხვევაში, მაკრომოლეკულები) მოთავსებულია ცენტრიფუგის სინჯარაში, რომლებიც ტრიალებენ როტორთან ერთად და განიცდიან რადიალური ცენტრიდანული ძალის **(Fც)** მოქმედებას. მექანიკიდან ცნობილია, რომ **Fც=Mώ² r,** ამომგდები ძალის გათვალისწინებით, ხსნარებისთვის **M=V(p - pa)**, სადაც M არის ნაწილაკის მოქმედი მასა, გამოსახული გრამებში (გ), ώ – ბრუნვის კუთხური სიჩქარე (გრადუსი/წმ), r - ბრუნვის რადიუსი (სმ) – p და pa – შესაბამისად, ნაწილაკებისა და გარემომცველი არეს სიმკვრივე (გ/სმ³). V – ნაწილაკების მოცულობა (სმ²). სფეროს ფორმის ნაწილაკებისთვის D დიამეტრით, **V=1/6πD³, მაშინ Fც=1/6πD³(p - pa) ώ² r.**

ნაწილაკი მოძრაობს რადიუსის გასწვრივ υ (სმ/წმ) სიჩქარით. ამასთან, ხახუნის ძალები **(Fხ)** საწინააღმდეგო მიმართულებით მოქმედებენ: **Fხ = *f*υ,** სადაც *f* არის ხახუნის კოეფიციენტი, რომელიც გარემოს სიბლანტისა **ηგ** (იზომება სანტიპუაზებში) და ნაწილაკების ხაზობრივი ზომის პროპორციულია. სტოკსის კანონის თანახმად, სფეროსათვის ***f*=3πηგD.** ცენტრიდანული ძალის გავლენით, ნაწილაკის სიჩქარე გაიზრდება იმ მომენტამდე, სანამ ხახუნის ძალა არ გაუტოლდება ცენტრიდანულ ძალას: **Fც= Fხ ანუ 1/6πD³(p - pa) ώ² r = 3υπგD**ṗ აქედან გამომდინარეობს:

$$\upsilon = \frac{1}{18}\,\frac{D^2 (p - p_a)\,\omega^2 r}{\eta_г}$$

- განხილული დამოკიდებულებიდან შეიძლება დავასკვნათ, რომ:
- ერთნაირი სიმკვრივის მქონე ნაწილაკებიდან დიდი ზომისანი ილექებიან უფრო ადრე, ვიდრე მომცრო ზომის ნაწილაკები.
- დალექვის სიჩქარე **(υ)** ნაწილაკების სიმკვრივის პროპორციულია. ეს განსაკუთრებით კარგად იკვეთება, როდესაც გარემო არის სიმკვრივე **(pa)** უახლოვდება ნაწილაკების სიმკვრივეს **(p)**. შეიძლება ისეთი სიტუაციაც შეიქმნეს, რომ შედარებით მცირე, მაგრამ უფრო მკვრივი ნაწილაკები დიდი ნაწილაკებზე ადრე დაილექონ.

- ნაწილაკების დალექვის სიჩქარე როტორის ბრუნვათა რიცხვის კვადრატის პროპორციულია.
- რაც მეტია გარემო არის სიბლანტე **(ηგ),** მით უფრო ნელა ილექებიან ნაწილაკები.
- დალექვის სიჩქარე როტორის ღერძიდან ნაწილაკებამდე მანძილის **(r)** პროპორციულია. ეს სიდიდე ნაწილაკების გადაადგილებისას იზრდება, ამიტომ მუდმივ პირობებში ნაწილაკების დალექვის სიჩქარე განუწყვეტლივ უნდა იზრდებოდეს. თუკი ეს არასასურველია, მაშინ უნდა გაიზარდოს გარემო არის სიბლანტე და სიმკვრივე, რათა კომპენსირდეს r სიდიდის გაზრდა.

სპექტროფოტომეტრი

სპექტროფოტომეტრია ხსნარებისა და მყარი ნივთიერებების კვლევის ფიზიკურ-ქიმიური მეთოდია, რომელიც სწავლობს სპექტრის შთანთქმას ულტრაიისფერ (200-400ნმ), ხილულ (400-670ნმ) და ინფრაწითელ (>670 ნმ) უბნებში.

აპარატს, რომლის საშუალებითაც ახდენენ სხივის სპექტრული შთანთქმის გაზომვას, სპექტროფოტომეტრი ეწოდება. ეს ხელსაწყო გამოიყენება იმ სხივური ენერგიის გასაზომად, რომელიც გაივლის ამა თუ იმ სუბსტანციაში და შთაინთქმება ამ სუბსტანციის მიერ. სპექტროფოტომეტრი ბიოლოგიაში გამოიყენება, რათა განისაზღვროს, მოცემული ტალღის სიგრძის რა რაოდენობის სხივი შთანთქა საკვლევმა ხსნარმა. გამტარიანობა (T) წარმოადგენს ფარდობას გამავალი სხივისა და დაცემული სხივის რაოდენობებს შორის.

შთანთქმა (A)= – log T.

შთანთქმა მეტად მნიშვნელოვანი პარამეტერია, მით უფრო, რომ იგი ხაზობრივ დამოკიდებულებაშია ნივთიერების კონცენტრაციასთან. ამ დამოკიდებულებას ასახავს ლამბერტ-ბერის კანონი:

A = ebc

სადაც e = ჩაქრობის კოეფიციენტია (პროპორციული მუდმივა, დამოკიდებული შთანთქმის გვარობაზე).

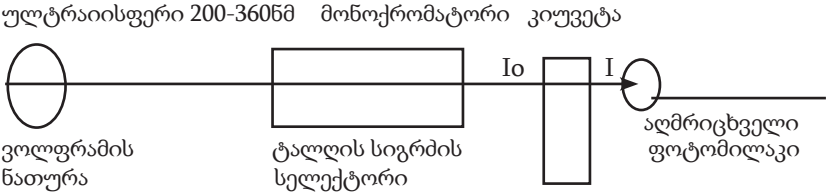
b=კიუვეტის სიგანე. სტანდარტული კიუვეტების სიგანე უმეტესად 1სმ-ს ტოლია, რის გამოც მას არ ითვალისწინებენ გამოთვლებში.

c =კონცენტრაცია

სპექტროფოტომეტრები და კალორიმეტრები გამოიყენება, რათა განისაზღვროს ნივთიერებათა კონცენტრაციები ხსნარებში მათში სხივის გავლისას. სპექტროფოტომეტრში სხივის დასაყოფად იყენებენ პრიზმას, ხოლო კალორიმეტრებში ამ ფუნქციას ფილტრები ასრულებენ. ორივე ხელსაწყოს მუშაობის პრინციპი მარტივია და დაფუძნებულია შერჩეული ტალღის სიგრძის სხივის ნიმუშში გავლისას სხივური ენერგიის შთანთქმის ოდენობის გაზომვაზე. სპექტროფოტომეტრის

აგებულება მოცემულია სურ. 11-ზე (გვ. 93). იგი შედგება ნათურის (სხივის წყარო), მონოქრომატორისა (შეიცავს პრიზმას და პრიზმაში სხივის დაცემის კუთხის შერჩევით, მიიღებენ სასურველ ტალღის სიგრძეს) და ფოტომილაკისაგან (აქ ხდება სხივის მიღება). ფოტომილაკსა და მონოქრომატორს შორის მოთავსებულია კიუვეტების დამჭერი, სადაც თავსდება კიუვეტა საკვლევი ხსნარით.

ყოველი მოლეკულა შთანთქავას გარკვეული ტალღის სიგრძის გამოსხივებულ ენერგიას. მოლეკულები, რომლებიც შთანთქავენ ხილული სპექტრის ტალღებს, პიგმენტების სახელწოდებით არიან ცნობილი. ცილები და ნუკლეინის მჟავები სხივის ულტრაიისფერ უბანში განისაზღვრებიან.



სურ. 11. სპექტროფოტომეტრის აგებულება

კიუვეტაში მოთავსებული ხსნარი შთანთქავს გარკვეულ ენერგიას, მისგან გამოსულ ნარჩენ ენერგიას მიიღებს ფოტომილაკი, ხოლო აღმრიცხველი მის მნიშვნელობას ვოლტაჟის ფლუქტუაციის სახით გამოსახავს.

ვოლტაჟის ფლუქტუაცია შესაძლებელია აისახოს ციფრულად ან შკალაზე, გადაეცეს კომპიუტერს და მოხდეს მისი დამუშავება. ნიმუშის შეფერილობის ინტენსივობა დამიკიდებულია მასში გახსნილი ნივთიერების რაოდენობაზე. მაგალითად, თუ ნიმუშად ავიღებთ წითელი ფერის წყალხსნარს და განვსაზღვრავთ ლურჯი სხივის შთანთქმის სიდიდეს აღნიშნულ ნუმუშში გავლისას, განსასაზღვრი ვოლტაჟის ფლუქტუაცია აისახება ფოტომილაკზე. თუ წითელ შეფარილობას წყლის დამატებით ორჯერ განვაზავებთ, ფერის ინტენსივობა დაახლოებით 1/2-ით შემცირდება, ფოტომილაკზე გენერირებული ვოლტაჟიც განახევრდება. ამრიგად, ფოტომილაკი ფაქტიურად ზომავს სხივის იმ ენერგიას, რომელიც მიაღწევს მილაკამდე, ხოლო ვოლტმეტრი კოთხულობს სხივური ენერგიის ამ რაოდენობას.

თუ ნიმუში შეუფერადებელია, შესაძლებელია მიღებული სხივური ენერგიის მონიტორინგი და მისი გადაყვანა პროცენტულ მაჩვენებელში. ამგვარად, თუ ხდება სხივის 1/2-ის შთანთქმა, ამბობენ, რომ ხსნარს აქვს 50%-იანი განვლადობა. განვლადობა არის ნიმუშში გავლილი სხივის ფარდობითი პროცენტულობა.

პროცენტული განვლადობა, გამოსახული უარყოფითი ლოგარითმით, არის სწორედ შთანთქმა (იგივე, ოპტიკური სიმკვრივე). მონოქრომატორით ხდება გარკვეული ტალღის სიგრძის შერჩევა. შერჩეული ტალღის სიგრძის სხივი გაივლის კიუვეტაში, სადაც მოთავსებულია საკვლევი ნიმუში ან საკონტროლო ხსნარი (ე.წ. „ბლენკი“) და გადაეცემა ფოტომილაკს, ხოლო ვოლტმეტრი ფოტომილაკიდან კითხულობს ამ სიგნალს.

Io = დაცემული სხივი Io ინტენსივობით

I = კიუვეტიდან დამოსული სხივი I ინტენსივობით

სხივის შთანთქმის რაოდენიბრივი ასპექტები აისახება ლამბერტ-ბერის კანონში.

განვლადობა T არის იმ სხივების რაოდენობა, რომლებიც გაივლიან ნივთიერებაში. ამ სიდიდეს ზოგჯერ პროცენტულ განვლადობასაც უწოდებენ:

T = I/Io

%T = I/Io

Io არის ინტენსივობა დაცემული სხივისა, ხოლო I არის გამომავალი სხივის ინტენსივობა. განსაზღვრულ ტალღის სიგრძეში სუბსტანციის მიერ სხივის შთანთქმა დამოკიდებულია სუბსტანციაში სხივის გავლის მანძილზე (სიგანეზე).

განვლადობის უარყოფითი ლიგარითმი – შთანთქმა (A) შთანთქმული სხივის რაოდენობისა და სხივის მიერ განვლილი მანძილის პირდაპირპროპორციულია (ლამბერტის კანონი):

$-\log T = -\log I/Io = A = Kd$

სადაც d არის კიუვეტაში არსებულ ხსნარში სხივის მიერ გავლილი მანძილი, ხოლო K არის მუდმივა.

განვლადობის უარყოფითი ლოგარითმი ასევე პირდაპირ პროპორციულია შთანმთქმელი ნივთიერების კონცენტრაციისა - c, (ბერის კანონი)

$-\log I/Io = -\log T = A = Kc$ $-\log T = A = Edc$

სადაც E არის შთანმთქმელი ნივთიერების რაოდენობის ფიზიკური კონსტანტა

A = Ecd, d ჩვეულებრივ 1 სმ-ს ტოლია.

A = შთანთქმა (იგივე, ოპტიკური სიმკვრივე)

E = მოლარული შთანთქმის კოეფიციენტი

c = სხივის შთანთქმელი ნივთიერების კონცენტრაცია

მეთოდი

1. ჩავრთოთ სპექტოფოტომეტრი და გავახუროთ 10 წუთის განმავლობაში.
2. დავაყენოთ ტალღის სიგრძე ჩვენთვის სასურველ ნიშნულზე.

3. დავრწმუნდეთ, რომ კიუვეტების დამჭერს სახურავი მჭიდროდ აქვს დახურული და სპეციალური რეგულატორით დავაყენოთ ე.წ ბნელი დინება, ამ დროს ვოლტმეტრით ხდება ნულოვანი ანათვლის დაფიქსირება. აღნიშნული ანათვალი გაზომვების უმდაბლესი ანუ ნულოვანი წერტილია.
4. შემდეგ კიუვეტების დამჭერში ჩავდგათ საკონტროლო ხსნარით შევსებული კიუვეტა. კიუვეტის ძირი მჭიდროდ უნდა ეხებოდეს დამჭერს. კიუვეტის კედლები უნდა იყოს ძალზე სუფთა, არ უნდა ემჩნეოდეს მკვლევრის თითის ანაბეჭდები. საკონტროლო ხსნარი, გარდა ძირითადი ნივთიერებისა, უნდა შეიცავდეს ყველა იმ ქიმიურ სუბსტანციას, რასაც შეიცავს საკვლევი ხსნარი. მაგალითად, თუ ვიკვლევთ დნმ-ს ან ცილას, საკონტროლო ხსნარი იქნება მხოლოდ ის არე, რომელშიც გახსნილია დნმ და ცილები, მაგრამ ის თვითონ არ შეიცავს დნმ-ს და ცილებს.
5. სპეციალური რეგულატორით ავითვალოთ 100%-იანი გამტარობა. ეს ანათვალი წარმოადგენს გაზომვების უმაღლეს ზღვარს, სადაც გვაქვს 100%-იანი გამტარობა და ნულოვანი შთანთქმა.
6. ვიღებთ კიუვეტას სპექტროფოტომეტრიდან და კიდევ ერთხელ ვამოწმებთ ნულოვან გამტარობას. თუ სიდიდე არ შეიცვალა, შესაძლებელია საცდელი ნიმუშის განსაზღვრა. თუ სიდიდემ ცვლილება განიცადა, მაშინ ინსტრუმენტის სტაბილიზაციის მიზნით, გავიმეორებთ ზემოთ აღწერილ პროცედურებს.
7. მუშაობის პროცესში აუცილებელია გადამოწმდეს, რამდენად სტაბილურია ნულოვანი და 100%-იანი განვლადობის სიდიდეები.
8. კიუვეტაში ისხმევა საკვლევი ხსნარი, იდგმევა დამჭერში, მჭიდროდ ეხურება თავსახური და ხდება მისი გაზომვა. განვლადობის ცვლილება აისახება მზომზე.
   ეს პროცედურა მეორდება იმდენჯერ, რამდენი ნიმუშიც გვაქვს.

ქრომატოგრაფია

ცილებისა და ნუკლეინის მჟავების გასუფთავების, დიფერენცირებისა და სტრუქტურის ანალიზის ლაბორატორიულ მეთოდებს შორის განსაკუთრებული ადგილი უჭირავს ქრომატოგრაფიის მეთოდებს. ვერც ერთი სხვა მეთოდი ვერ შეედრება ქრომატოგრაფიას რაოდენობრივი დიაპაზონით - დაწყებული პრეპარატული სვეტებით, რომელთა მოცულობა რამდენიმე ლიტრს შეადგენს და რომელზეც შესაძლებელია დაიყოს ნივთიერების რამდენიმე გრამი, ანალიზური სვეტებით დამთავრებული - ნივთიერების უმნიშვნელო რაოდენობის ანალიზისათვის. ეს სწორედ ის ფარგლებია, რომლის ანალიზის შესაძლებლობასაც იძლევა ქრომატოგრაფიის მეთოდი. ასევე შეუდარებლად დიდია

ფიზიკური და ქიმიური მახასიათებლებით ნივთიერებების დაყოფის შესაძლებლობები. მათი დაყოფა დასაშვებია შემდეგი პარამეტრების გათვალისწინებით: მოლეკულის სიდიდე; ბიოპოლიმერების მეორეული და მესამეული სტრუქტურა; ხსნადობა; მოლეკულების ადსორბციული მახასიათებელი; ელექტრული მუხტი და ბიოლოგიური სწრაფვა. აფინურობა სხვა მოლეკულებისადმი. ასეთი მრავალრიცხოვანი პარამეტრებით მოლეკულების ფრაქციონირება მოითხოვს სხვადასხვანაირ მეთოდოლოგიურ მიდგომებსა და აპარატურას.

მიუხედავად ამისა, ერთი პრინციპული თავისებურება საერთოა ყველა ამ მეთოდისათვის: თითოეული მათგანი დაფუძნებულია ორფაზიანი სისტემის არსებობაზე, სადაც ერთი ფაზა უძრავ მდგომარეობაშია, ხოლო მეორე ფაზა პირველ ფაზასთან მიმართებაში გადაადგილდება გარკვეული საჩქარით და ერთი მუდმივი მიმართულებით. უძრავი ფაზით ივსება ქრომატოგრაფიული სვეტი ან ფიქსირდება შუშის (ან პლასტიკურ) ზედაპირზე. ზოგჯერ უძრავ ფაზას წარმოადგენს ფილტრის ქაღალდი ან აცეტილცელულოზის ფირფიტა. მოძრავი ფაზა მუდმივ განახლებას განიცდის, შეედინება რა სისტემაში ერთი განსაზღვრული მხრიდან და გამოედინება მეორე მხარეს. საკვლევი ხსნარის მოლეკულები ამ ორ ფაზას შორის გადანაწილდებიან ფაზებისადმი თავიანთი სწრაფვის ხარისხის მიხედვით. უძრავი ფაზის ნებისმიერ მონაკვეთში ამგვარი გადანაწილება მიისწრაფის დინამიკური წონასწორობისკენ, რომელიც გამუდმებით ირღვევა მობილური ფაზის გადაადგილების გამო. ფაზებს შორის განუწყვეტლივ მიმდინარე მოლეკულების გადანაწილების შედეგად, მოლეკულები მიგრირებენ მობილური ფაზის მიმართულებით. ამ მიგრაციის სიჩქარე მით უფრო მცირეა, რაც მეტია მოლეკულების სწრაფვა უძრავი ფაზისადმი. ფაზებს შორის მოლეკულების გადანაწილება ხდება ერთმანეთისგან დამოუკიდებლად.

თუ საკვლევ ხსნარში არსებულ მოლეკულათა სწრაფვა ორი ფაზის მიმართ განსხვავებულია, მაშინ ისინი მიგრირებენ მობილური ფაზის დინების მიმართულებით, ანუ ქრომატოგრაფიული დაყოფის გზის მთელ სიგრძეზე (მაგალითად, სვეტის სიგრძეზე) სხვადასხვა სიჩქარით, რაც საშუალებას იძლევა ამ გზის ბოლოს მოხდეს მათი ფიზიკური დაყოფა.

მობილური და მოძრავი ფაზების მიმართ სწრაფვით შეიძლება განისაზღვროს, როგორც დასაყოფი მოლეკულების, ასევე ორივე ფაზის ფიზიკური და ქიმიური მახასიათებლები და მათი ბიოლოგიური სპეციფიკურობა. ამ მახასიათებლების მიხედვით ხდება ქრომატოგრაფიული მეთოდების კლასიფიკაცია.

უძრავი ფაზა შეიძლება იყოს მყარი ან თხიერი, ხოლო მობილური – თხიერი ან აირადი. მობილური ფაზის აგრეგატული მდგომარეობის მიხედვით განასხვავებენ „თხევად” და „აირად“ ქრომატოგრაფიას.

გელფილტრაცია

გელფილტრაცია ქრომატოგრაფიის ყველაზე მარტივი მეთოდია. ამ შემთხვევაში დასაყოფ მოლეკულებს არ ესაჭიროებათ რომ ჰქონდეთ სპეციფიკური სწრაფვა უძრავი ან მობილური ფაზებისადმი. უძრავი ფაზა ისეთი ხსნარია, რომელიც მოთავსებულია ფოროვან გრანულებში. ხსნარია მობილური ფაზაც, რომლისთვისაც დამახასიათებელია გრანულებს შორის მოძრაობის უნარი. გრანულების შემადგენელი ფოროვანი მასალის ხსნართან შეჭიდების ძალების მეშვეობით, ხსნარი მათში ხდება უძრავი და არ მიჰყვება მობილური ფაზის დინებას. გელ-ფილტრაციაში გამოყენებული სითხეები მარილხსნარებია, ხოლო გრანულების მასალა – ჰიდროფილური.

ნივთიერების მოლეკულების დიფუზიით გადასვლა მობილური ფაზიდან უძრავ ფაზაში და პირიქით, არავითარ სირთულეს არ წარმოადგენს. განსხვავებული სიტუაციაა გრანულების შემთხვევაში, აქ დიფუზიას ართულებს მოლეკულების შეჯახება გრანულების კედლებთან და არსებული პილიმერის სივრცობრივი ცხაურის ძაფებთან. იმ შემთხვევაში, თუ მოლეკულათა ზომები და პოლიმერის ცხაურის არხების საშუალო დიამეტრი თანაბარია, დიფუზია მეტად გაძნელებულია. შესაძლებელია შეიქმნას ისეთი სიტუაციაც, რომ დიფუზია საერთოდ არ მოხდეს, მოლეკულების საკმაოდ დიდი ზომების გამო. სხვადასხვა სიდიდის მოლეკულების დიფუნდირების ხარისხი უძრავი ფაზის სივრცეში არის ამ მოლეკულების დაყოფის (ფრაქციონირების) გადამწყვეტი ფაქტორი. ნათელია, რომ ამ შემთხვე-ვაში მოლეკულების დაყოფა მოხდება მათი სიდიდის მიხედვით. თუ საკვლევ ხსნარში არის უკიდურესად დიდი მოლეკულები, რომელთა დიფუნდირება სრულიად არ ხდება, მაშინ ისინი გამოვლენ სვეტიდან ან მიაღწევენ ქრომატოგრაფიული ფირფიტის კიდეს მობილური ფაზის წინა ფრონტთან (ელუციის ფრონტთან) ერთად; ხოლო მცირე მოლეკულები, რომლებიც თავისუფლად დიფუნდირებენ გრანულებში, დროის გარკვეულ მონაკვეთში იქნებიან უძრაობის ფაზაში. სტატისტიკურად, დროის ეს მონაკვეთი ერთნაირია ასეთი ზომის ყველა მოლეკულისათვის და დამოკიდებულია ხსნარების მოცულობათა შეფარდებაზე უძრავ და მობილურ ფაზებში. ამგვარად, ყველა მცირე ზომის მოლეკულა, თითქმის ერთდროულად (დროის მცირე სხვაობით) მიაღწევს ქრომატოგრაფიის მანძილის „ფინიშს". დიდი ზომის მოლეკულები ამ მანძილს უფრო სწრაფად გაივლიან. გრანულების მიერ წარმოქმნილი ცხაური არაერთგვაროვნებით გამოირჩევა – მასში არის როგორც დიდი, ისე მცირე ფორები. ამ ფორების ნაწილი „დასაძლევია" სხვადასხვა სიდიდის მოლეკულებისათვის, რომლებიც მეტ-ნაკლები წარმატებით დიფუნდირებენ ფორებში და მათი გამოსვლის სიჩქარე დამოკიდებულია მათი სიდიდის ფარდობითობაზე.

თავდაპირველად ამ მოვლენას ეწოდა გელფილტრაცია, რადგანაც სივრცობრივი ცხაურის მისაღებად გამოიყენებოდა პოლიმერული გელები, მაგრამ ეს გელები საკმაოდ ადვილად დეფორმირდებიან და ამიტომ უვარგისნი არიან მაღალი წნევის ქრომატოგრაფიისთვის. მოგვიანებით ისინი ფოროვანი შუშითა და სილიკაგელით შეცვალეს.

გამანაწილებელი ქრომატოგრაფია

ასე შეიძლება ვუწოდოთ ქრომატოგრაფიის პროცესს, სადაც უძრავი და მობილური ფაზები შეურეველი, ან ნაწილობრივ შერეული სახით არიან წარმოდგენილი. თუკი ასეთ სისტემაში გავხსნით რამე ნივთიერებას, მაშინ გახსნილი ნივთიერების კონცენტრაცია ერთნაირი იქნება გამხსნელებში, თუ ორივე გამხსნელისმაგვარ თვისებებს ატარებს, ანუ ორივეს ერთნაირი **სწრაფვა** აქვთ ამ ნივთიერებისადმი. სხვა შემთხვევაში, ნივთიერების მოლეკულები დაიწყებენ გადასვლა-გადმოსვლას ერთი ხსნარიდან მეორეში, სანამ არ დამყარდება ისეთი წონასწორობა, რომლის დროსაც მოლეკულების შედარებით მაღალი კონცენტრაცია აღმოჩნდება ისეთ ხსნარში, რომელსაც უფრო მაღალი გამხსნელობითი ხარისხი აქვთ. თუ ასეთი ხსნარებით იქნებიან წარმოდგენილი უძრავი და მობილური ქრომატოგრაფიული ფაზები, საკვლევი ნიმუშის ყველა კომპონენტის გადანაწილება ამ ფაზებს შორის მოხდება ფაზების გამხსნელობით ხარისხზე დამოკიდებულებით. რაც უფრო ძლიერი იქნება რომელიმე კომპონენტის სწრაფვა უძრავი ფაზისადმი, მით უფრო ნელა იმოძრავებს იგი სვეტისა თუ ფირფიტის გასწვრივ.

გელფილტრაციის მსგავსად, უძრავი ფაზის ხსნარი შეიძლება იმობილიზირებული იყოს ფოროვანი გრანულების შიგნით ან მჭიდრიდ იყოს დაკავშირებული გაჯირჯვლებული ცელულოზის ძაფებთან; დასაშვებია, იგი თხელი აპკის სახით ფარავდეს მეტალის გრანულებსა და გრანულის შიდა ფორებს. დაკავშირებას ახდენენ დალბობით, სორბციით ან ქიმიური გზით. ქიმიური გზით დაკავშირების შემთხვევაში ე.წ . აპკს წარმოადგენს ნივთიერების მონომოლეკულური შრე, რომელსაც შეუძლია თავისი ზედაპირის სიახლოვეს შეაკავოს დასაყოფი ნარევის მოლეკულები, მისდამი ამ მოლეკულების სწრაფვის ხარისხის შესაბამისად. ამ შემთხვევაში ხსნადობაზე მსჯელობა არ იქნება მართებული და უმჯობესი იქნება, თუ მხოლოდ ცნება „სწრაფვას“ გამოვიყენებთ, ანუ შევაფასებთ, თუ როგორი იქნება მოლეკულების სწრაფვა უძრავი და მობილური ფაზებისადმი.

ხშირად ერთ-ერთი ფაზა ორგანული გამხსნელია, ხოლო მეორე ფაზა – წყალი. ბუნებრივია, ასეთ შემთხვევაში ნივთიერებათა ფრაქციონირება მიმდინარეობს მათი ჰიდროფობიის ხარისხის შესაბამისად. ქრომატოგრაფიის განვითარების პროცესში ჩამოყალიბდა აზრი, რომ „ნორმალური” ეწოდოს ისეთ ფაზათა განლაგებას, სადაც უძრავი ფაზა

წყალია. ჰიდროფილური მატრიცების გაჯირჯვებისას (ჩალბობისას) წყალი ადვილად ფიქსირდება მათზე. ასეთი მატრიცებია, მაგალითად, ცელულოზა, პოლიაკრილამიდი, დექსტრანი, სილიკაგელი, დიატომური მიწა და სხვ. ამ შემთხვევაში მობილური ფაზა შეიცავს ორგანულ გამხსნელებს. ფაზების საპირისპირო განაწილებისას, მყარ მატრიცაზე ფიქსირდება ორგანული გამხსნელის აპკი, ხოლო მობილურ ფაზას წყალი წარმოადგენს. ასეთ ქრომატოგრაფიას უკუფაზური (შებრუნებულფაზური) ეწოდება. ინგლისურენოვან ლიტერატურაში მას RPC-ით (reversed phase chromatography) მოიხსენიებენ.

შებრუნებული ფაზის მაღალი წნევით ქრომატოგრაფიისას, უძრავ ფაზად, ორგანული გამხსნელის ნაცვლად, გამოიყენება სილიკაგელის მყარ მატრიცაზე ქიმიურად მიმაგრებული ცხიმოვანი ან არომატული მოლეკულების მონოშრე.

ადსორბციული ქრომატოგრაფია

ამ შემთხვევაში უძრავი ფაზა მყარი სორბენტია. სორბციისა და დესორბციის წონასწორობა მყარდება საკვლევი ნიმუშის ყველა კომპონენტისათვის, ერთმანეთისგან დამოუკიდებლად. ადსორბციის კოეფიციენტებს შორის განსხვავება განაპირობებს ამ კომპონენტების გადანაწილების სხვაობას სორბენტსა და მობილურ ფაზას შორის. შესაბამისად, თუ რომელიმე კომპონენტი გამოირჩევა სორბენტისადმი უფრო მაღალი სწრაფვით, იგი უფრო ნელა იმოძრავებს სვეტის თუ ფირფიტის გასწვრივ. თუ სორბცია ხორციელდება მხოლოდ სორბენტის გრანულების ზედაპირზე, ადსორბციული ქრომატოგრაფია აქ მხოლოდ იმ შემთხვევაში მიმდინარეობს, თუ სორბენტის მასალა ფოროვანია და სორბციული ზედაპირის უდიდესი ნაწილი მისი გრანულების შიგნითაა მოქცეული, მოლეკულების მოძრაობას აყოვნებს მათი დიფუზია ფორებს შიგნით, როგორც ეს ხდება გელფილტრაციის დროს. ამის მიუხედავად, პროცესის წარმმართველი ძალა სორბციაა.

იონცვლადი ქრომატოგრაფია

ადსორბციული ქრომატოგრაფიის მსგავსად, იონცვლადი ქრომატოგრაფიის დროსაც ხდება მოლეკულების დაკავშირება მყარი, ჰოდროფობური მასალის ზედაპირთან. განსხვავება მხოლოდ ის არის, რომ ამ შემთხვევაში დაყოვნება ხდება არა ადსორბციის გამო, არამედ მას იწვევს საპირისპიროდ დამუხტული იონების ელექტრო-სტატიკური ურთიერთქმედება. გელის გასწვრივ, გრანულების გარე და შიდა ზედაპირებზე განაწილებულია მათთან კოვალენტურად დაკავშირებული იონოგენური ჯგუფები. წყალში მოხვედრისას, ეს ჯგუფები დისოცირდებიან და წარმოქმნიან ერთნაირი მუხტის მქონე უძრავ იონებს. თუ დასაყოფი ნიმუშის მოლეკულებსაც აქვთ

გახსნისას იონიზირების უნარი, მაშინ ისინი ელექტროსტატიკური ურთიერთქმედებით დაუკავშირდებიან უძრავ იონოგენურ ჯგუფებს. ამგვარად, მოხდება მათი დაფიქსირება უძრავ ფაზასთან. ეს კავშირი შექცევადია: ერთი კომპონენტის იონები შეძლება ჩანაცვლებულ იქნან მეორე კომპონენტის იონებით, ან გამოძევებულ იქნან გელში შეყვანილი სპეციალური იონური ელუანტით. პროცესის დროს მიმდინარეობს იონების ცვლა, ამიტომ აღწერილი ტიპის სორბენტებს იონცვლადები ეწოდება.

საკვლევი ხსნარის კომპონენტების ფრაქციონირების შესაძლებლობა განპირობებულია მათი ჯამური მუხტების განსხვავებულობით. ჯამური მუხტი დამოკიდებულია მოლეკულებში იონოგენური ჯგუფების რაოდენობასა და გვარობაზე, ასევე მათი დისოციაციის მაჩვენებელზე. დისოციაციის მაჩვენებელი შეიძლება ვაკონტროლოთ საელუაციო ხსნარის pH-სა და იონური ძალის შერჩევით. რაც უფრო მეტია საკვლევი ხსნარის შემადგენელი კომპონენტის ჯამური მუხტი, მით უფრო ძლიერად უკავშირდება იონცვლად მატრიქსს და, შესაბამისად, ნელა მიგრირებს სვეტის გასწვრივ. აღსანიშნავია, რომ ამ პროცესზე შეიძლება იმოქმედოს მრავალმა დამატებითმა ფაქტორმა (მაგალითად, დიფუზიამ გრანულებში ან ადსორბციამ იონცვლად ფისზე), მაგრამ თუ იონცვლადი მასალა სწორად იქნება შერჩეული (ეს განსაკუთრებით შეეხება მის ფორიანობას), პროცესს მხოლოდ იონური ცვლა წარმართავს.

აფინური ქრომატოგრაფია

შედარებით სუსტი, შექცევადი ურთიერთქმედება ბიოპოლიმერის მოლეკულებსა და სორბენტებს შორის შეიძლება განხორციელდეს ბიოლოგიური სწრაფვის – აფინურობის საშუალებით. ასეთ ურთიერთ-ქმედებებს ვხვდებით შემდეგ შემთხვევებში: ფერმენტი და სუბსტრატი ან ინჰიბიტორი, ანტისხეული და ანტიგენი, ჰორმონი და რეცეპტორი და ა.შ. ბიოლოგიური სწრაფვის მიხედვით ფრაქციონირებისთვის, პროცესში მონაწილე წყვილიდან ერთ-ერთს ქიმიურად აკავშირებენ ბიოაფინური სორბენტის ზედაპირთან. შემდეგ სვეტზე გაატარებენ საკვლევ ნიმუშს. საკვლევი ნიმუშის მოლეკულათაგან სორბენტზე მიმაგრებულ ნივთიერებას დაუკავშირდება მხოლოდ იმ ნივთიერებების მოლეკულები, რომლებსაც გააჩნიათ მისდამი სწრაფვა. დანარჩენი მოლეკულები კი სვეტიდან შეუფერხებლად, დაყოვნების გარეშე გამოვლენ. ბიოლოგიური ურთიერთქმედების ცვლილებით სვეტიდან ხდება დაკავშირებული მოლეკულების ელუცია. ამ ცვლილებებს იწვევენ მარილები, შარდოვანა, დეტერგენტები, კონკურენტი მოლეკულები (სწრაფვის თვალსაზრისით) ან pH-ის ცვლილება. უმეტეს შემთხვევაში, ხდება არა საკვლევი ხსნარის ქრომატოგრაფიის პროცესით ფრაქციონირება, არამედ ერთ-ერთი კომპონენტის გასუფთავება დანარჩენი კომპონენტებისაგან, შერჩევითი სორბციის,

გარეცხვის და შემდგომი დესორბციის გზით. აფინური ქრომატოგრაფია ძალინ მაღალი შერჩევითობით ხასიათდება. ხშირად, მხოლოდ ერთი ქრომატოგრაფიული პროცედურა ნივთიერების 1000-ჯერ გასუთავების საშუალებას იძლევა. ამდენად, გამართლებულია ის შრომატევადი სამუშაო და დანახარჯები, რაც აფინურ ქრომატოგრაფიას უკავშირდება.

ქრომატოგრაფიის კლასიფიკაცია უძრავი ფაზის მდებარეობის მიხედვით

აღნიშნული მახასიათებლით კლასიფიკაცია ძალზედ მარტივია; თუ მინის ან მეტალის სვეტი შევსებულია გელის ფოროვანი გრანულებით ან სორბენტით, ასეთ ქრომატოგრაფიას ეწოდება ქრომატოგრაფია სვეტზე. თანამედროვე კვლევებში ქრომატოგრაფია სვეტებზე მიმდინარეობს ძალზე მაღალი (300-500 ატმოსფერო) წნევის ქვეშ, რაც საშუალებას გვაძლევს შევამციროთ გრანულების დიამეტრი და, აქედან გამომდინარე, სვეტების ზომები და პროცედურის დრო. აღნიშნული შემცირებები ზრდის დაყოფის ხარისხს და შესაძლებლობას იძლევა ჩავატაროთ ძალზე მცირე მოცულობის ნივთიერებათა ანალიზი. მიუხედავად იმისა, რომ ანალიზისთვის საჭიროა ძვირადღირებული აპარატურა და ასევე ძვირადღირებული ფოლადის სვეტები, სერიული ანალიზის ჩასატარებლად ეს დანახარჯები გამართლებულია. ამ სახის ქრომატოგრაფიას ეწოდება მაღალი წნევის თხევადი ქრომატოგრაფია. ინგლისურენოვან ლიტერატურაში იგი აღინიშნება, როგორც HPLC – High Pressure (ზოგ შემთხვევაში – High Performance) Liquid Chromatography.

თუ ქრომატოგრაფიული პროცესი მიმდინარეობს გახსნილ სივრცეში არსებულ დახრილ, სწორ და შედარებით სქელ (რამდენიმე მილიმეტრი სისქის) გრანულების შრეზე, სადაც მობილური ფაზის სითხე მოძრაობს მხოლოდ სიმძიმის ძალის ზემოქმედებით, ასეთ პროცესს ეწოდება ქრომატოგრაფია სქელ შრეში. პრაქტიკულად, ასეთმა მეთოდმა გამოყენება ჰპოვა მხოლოდ გელფილტრაციის დროს.

შუშის ფირფიტაზე მიმაგრებული გრანულების თხელი შრე (0.1 – 0.5 მმ) საშუალებას იძლევა ჩავატაროთ ქრომატოგრაფია თხელ შრეში. ამ პროცესს თხელშრიანი ქრომატოგრაფია ეწოდება. ინგლისურად აღინიშნება, როგორც TLC (Thin Layer Chromatography). მობილური ფაზის მოძრაობა ხდება კაპილარული ძალების საშუალებით.

ცელულოზის სორბენტის თხელი შრის ნაცვლად, დასაშვებია, გამოყენებულ იქნეს ჩვეულებრივი ფილტრის ქაღალდი. ასეთ პროცესს ეწოდება ქრომატოგრაფია ქაღალდზე.

ქაღალდის ნაცვლად, ზოგჯერ მოდიფიცირებული ცელულოზისგან დამზადებულ ფირფიტებს ან პოლიამიდურ ფირფიტებს იყენებენ. ასეთ პროცესს ეწოდება ქრომატოგრაფია ფირფიტაზე.

ფირფიტები ან ქაღალდი შეიძლება განლაგებილი იყოს ჰორიზონტალურად ან ვერტიკალურად. პრეპარატის დატანება ხდება ზოლის ან ლაქის სახით სორბენტის ერთ-ერთ ბოლოზე, რომელიც თავსდება საელუციო ხსნარში ისე, რომ დატანილი ნიმუში დარჩეს ხსნარიდან რამდენიმე მილიმეტრის მოშორებით. ყველა შემთხვევაში, ხსნარის მოძრაობა წარიმართება კაპილარული ძალებით.

სვეტურ ქრომატოგრაფიაში გამოყენებული აპარატურა

განვიხილოთ ჩვეულებრივი, დაბალი წნევის ქრომატოგრაფიაში გამოყენებული აპარატურა და მასალები. მისი ცენტრალურ ელემენტია ქრომატოგრაფიული სვეტი. უმარტივესი სვეტი მინის მილია, რომელსაც ერთი ბოლო დახშული აქვს ნახვრეტიანი საცობით. საცობი დაფარულია ფილტრით, რომელიც აკავებს სორბენტს. მილის მეორე ბოლოდან ხდება სვეტის შევსება სორბენტით, ხოლო შევსების შემდეგ საკვლევი ნიმუშის დაშრევება. აღწერილი სვეტი კუსტარული წარმოებისაა და ნებისმიერ მკვლევარს შეუძლია მისი დამზადება, თუმცა მეტი სიზუსტისა და მოხერხებულობისათვის უმჯობესია გამოვიყენოთ საფირმო სვეტები. საფირმო სვეტებს ორივე ბოლოდან უმაგრდება ე.წ. ადაპტორები. ადაპტორი არის ინერტული მასალის (მაგალითად, ტეფლონის) ღერო, რომელიც თავსდება სვეტში და მჭიდროდ ეკვრება სვეტის კედლებს მასზე წამოცმული რეზინის რგოლის საშუალებით. ადაპტორზე მოთავსებულია ნეილონის, შუშის ან ტეფლონის ფილტრები, რომელთა ფორების სიდიდე გაცილებით მცირეა სორბენტის ნაწილაკებზე, რათა არ მოხდეს ფილტრის გაჭედვა. სასურველია სვეტს ჰქონდეს გამაციებელი სარჩული, ორმაგი კედელი, სადაც შესაძლებელია წყლის განუწყვეტელი ცირკულირება და სორბენტის გაციება. აღნიშნული პროცესი საშუალებას იძლევა დავიცვათ დასაყოფი ნიმუში დენატურაციისაგან.

ქრომატოგრაფიული სასტემის შემადგენელი ნაწილებია: პერისტალტიკური ტუმბო; სპექტროფოტომეტრი; ფრაქციების კოლექტორი; თვითმწერი ან კომპიუტერი; საჭიროების შემთხვევაში, გრადიენტული ელუცია, გრადიენტატორი იხ. (სურ. 12. გვ. 104).

პერისტალტიკური ტუმბო უზრუნველყოფს საელუციო ხსნარის მუდმივ მიწოდებას სვეტის ზედა ბოლოდან და შესაძლებელია მისი სიჩქარის რეგულირება. სვეტიდან გამომავალი ელუატი, სილიკონის მილის საშუალებით შეედინება გამდინარე სპექტროფოტომეტრის კიუვეტაში, რომლის მოცულობაც არ აღემეტება 40 მიკროლიტრს. სპექტრული ანათვლების რეგისტრაცია ხდება თვითმწერის ან კომპიუტერის მაშვეობით. სპექტროფოტომეტრიდან გამომავალი ელუატის შეგროვება ხდება ფრაქციათა კოლექტორის დახმარებით. ის არის აპარატი, რომელზეც მოთავსებულია სინჯარების მწკრივი და წინასწარ შერჩეული პროგრამით ხდება სინჯარების მორიგეობით გადაადგილება სპექტროფოტომეტრიდან ელუატის ნაკადის

გამომავალი საწვეთურისკენ, სადაც ხდება ელუატის შეგროვება სინჯარებში. იონცვლადი ქრომატოგრაფიის დროს, ელუციისთვის საჭიროა იონური გრადიენტის შექმნა. ამ მიზნით გამოიყენება გრადიენტატორი. ის ორი რეზერვუარისგან შემდგარი ზიარი ჭურჭელია. ერთ-ერთში თავსდება დაბალი, ხოლო მეორეში – მაღალი კონცენტრაციის ხსნარი. დაბალი კონცენტრაციის ხსნარის რეზერვუარი მიერთებულია სვეტთან, საიდანაც ხდება სვეტისთვის საელუციო ხსნარის მიწოდება. დაბალი კონცენტრაციის რეზერვუარში უნდა ხდებოდეს ხსნარის განუწყვეტელი მორევა, რათა მოხდეს მაღალი კონცენტრაციის რეზერვუარიდან შემოდინებული ხსნარის გამუდმებული განზავება. მუდმივი შერევა ხორციელდება ელექტრო-ძრავიანი სარეველათი, რომელიც ჩაშვებულია დაბალი კონცენტრაციის რეზერვუარში.

მაღალი წნევის თხევად ქრომატოგრაფიაში გამოყენებული აპარატურა

როგორც ზემოთ უკვე აღვნიშნეთ, ამ შემთხვევაშიც ქრომატოგრაფია მიმდინარეობს მაღალი წნევის ქვეშ (მინიმუმ, 400 ატმოსფეროზე) და მისი ხანგრძლივობაა 10-30 წუთი. ეს განპირობებულია იმით, რომ სვეტები დატენილია გრანულებით, რომელთა სიდიდე 10, 5 და 3 მიკრომეტრია. ამ პროცესში ჩართულია ხელსაწყოები შემდეგი თანმიმდევრობით: საელუციო ხსნარის რეზერვუარი, ტუმბო, ინჯექტორი, სვეტის დამცავი მინის სვეტი, ქრომატოგრაფიული სვეტი, დეტექტორი და რეგისტრატორი. ერთი შეხედვით, ამ შემთხვევაშიც გამოიყენება უკვე ნაცნობი ქრომატოგრაფიული ხელსაწყოები, მაგრამ მათ წაყენებული აქვთ განსხვავებული მოთხოვნები. ყველაზე მეტად ეს ტუმბოს შეეხება. გარდა იმისა, რომ მან უნდა განავითაროს რამდენიმე ასეული ატმოსფერო, მას არ უნდა ჰქოდეს პულსაცია, რათა არ მოხდეს მცირე პიკების აღრევა ფონურ პიკებთან. სპექტროფოტომეტრის კიუვეტის მოცულობა გაცილებით მცირეა. დეტექციის სისტემა უნდა ხასიათდებოდეს სწრაფი რეაგირების უნარით, რათა არ მოხდეს პიკების სახეცვლილება, სვეტები და ქრომატოგრაფიული გაყვანილობა დამზადებულია მეტალისაგან. განსაკუთრებით მოსაფრთხი-ლებელია ქრომატოგრაფიული სვეტი. მისი დაბინძურების თავიდან ასაცილებლად ხდება საელუციო ხსნარის გაფილტვრა მასში ჩაძირული მეტალის ფოროვანი ფილტრების მეშვეობით. ფორების ზომა არ აღემატება 2-5 მიკრომეტრს. გარდა ამისა, სვეტის დაცვას ემსახურება დამცავი მცირე სვეტი. ნიმუშის დატანა ხდება ინჯექტორის საშუალებით, წნევის დაგდების გარეშე. მაღალი წნევის ქრომატოგრაფიაში ტუმბოს გადამწყვეტი როლი ენიჭება. მაღალი წნევის განვითარებისათვის საჭიროება ე.წ. პლუნჟერიანი ტუმბოები.

პლუნჟერი წარმოადგენს დგუშს, რომლის უკუსვლისა და მიწოდების მოძრაობას ახორციელებს ექსცენტრიკი. სითხის ამოწოვისა და მიწოდების ციკლების მონაცვლეობა განპირობებულია ბურთულისებრი სარქველების მუშაობით. პლუნჟერები და სარქველები დამზადებულია საფირონისგან ან ლალისგან. ასეთი ტიპის ტუმბოები პულსირებენ, რადგანაც ხსნარის მიწოდება ყოვნდება პლუნჟერის შეწოვა-მიწოდების ციკლში. ამ მოვლენის აღმოსაფხვრელად გამოიყენება ე.წ. დეფენდერი, რომელიც ხსნარის დამატებითი რეზერვუარია და პლუნჟერის შეწოვის მომენტში სვეტს ხსნარი სწორედ ამ რეზერვუარუდან მიეწოდება. პულსირების გასაუვნებლად, საუკეთესო გადაწყვეტილებაა ორ პლუნჟერიანი ტუმბოს გამოყენება, რომელიც მორიგეობით აწვდის სვეტს საელუციო ხსნარებს და პულსაციის დონეც მინიმუმამდე მცირდება.

განვასხვავებთ ელუციის ორ ტიპს: ელუირება იზოკრატულ რეჟიმში და გრადიენტული ელუირება. იზოკრატული ელუციის დროს იხმარება მუდმივი შემცველობის ერთი ხსნარი, მაგალითად წყლიანი მეთანოლი თანაფარდობით: 30% მეთანოლი და 70% წყალი. უკეთესი დაყოფა მიიღწევა გრადიენტული ელუირებისას. ამ დროს მეთანოლის (ან სხვა ნივთიერების, მაგ., აცეტონიტრილის) პროცენტული შემცველობა თანდათანობით იზრდება (მაგ. მეთანოლის წილი 30%-დან იზრდება 70%-მდე).

გრადიენტის შექმნა შესაძლებელია დაბალი წნევის არეში, ტუმბომდე ჩვეულებრივი გრადიენტატორით, როგორც ეს აღწერილი იყო მაღალი წნევის ქრომატოგრაფიის განხილვისას უმჯობესია გრადიენტი შეიქმნას მაღალი წნევის პირობებში, ანუ ტუმბოების საშუალებით. ამის მიღწევა შესაძლებელია ორი ტუმბოს გამოყენებით და სპეციალური კომპიუტერული პროგრამის დახმარებით.

პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია

მე-20 საუკუნის 70-იან წლებში ნორვეგიელმა მეცნიერმა ჰელიუ კლეპემ გამოთქვა მოსაზრება დნმ-ს ამპლიფიცირების შესახებ, დნმ-ს მოკლე, ერთჯაჭვიანი წყვილი მოლეკულის – ე.წ. პრაიმერის საშუალებით. ამ იდეის დანერგვა პრაქტიკაში ათეული წლის განმავლობაში არ მომხდარა. 1983 წელს ფირმა ჩეტუს-ს თანამშრომელმა კერი მულისმა მოგვაწოდა პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის პრინციპები. მისი თეორიის თანახმად, შესაძლებელი იყო დნმ-ს საკვლევი უბნის ამპლიფიკაცია მისი მრავალჯერადი გაორმაგებით ფერმენტ დნმ-პოლიმერაზას თანაობისას. ამ აღმოჩენისათვის, 1993 წელს კერი მულისს ნობელის პრემის მიენიჭა.

პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის (პჯრ) მეთოდი დაფუძნებულია დნმ-ს კონკრეტული უბნის მრავალჯერად კოპირებაზე ფერმენტ

პოლიმერაზას საშუალებით. ამ შემთხვევაში კოპირება ხდება დნმ-ს კონკრეტული, წინასწარ_ შერჩეული უბნიდან, საკვლევ ნიმუშში მისი არსებობის შემთხვევაში. ცოცხალ ორგანიზმში მიმდინარე დნმ-ს ამპლიფიცირების – რეპლიკაციისგან განსხვავებით, პჯრ-ს საშუალებით ამპლიფიცირდება დნმ-ს მოკლე მონაკვეთები, რომელთა სიგრძე არ აღემატება 3000 ფუძე წყვილს (3Kbp).

პჯრ-ის სარეაქციო კომპონენტები

პჯრ-ის ჩატარებისთვის სარეაქციო არეში საჭიროა შემდეგი კომპონენტების არსებობა:

1. პრაიმერები – ხელოვნურად სინთეზირებული ოლიგონუკლეოტიდები, რომელთა ზომები, როგორც წესი, არ არემატება 14 – 35 ფუძე წყვილს. ისინი საკვლევი დნმ-ს შესაბამისი უბნის იდენტურები არიან.
2. ფერმენტი Taq – პოლიმერაზა, რომელიც დნმ-პოლიმერაზას ანალოგიურია. იგი გამოყოფილი იქნა ბაქტერიიდან **Thermus aquacus,** რომელიც გვხვდება გეიზერებში, 60 °C-ზე მაღალი ტემპერატურის პირობებში.
3. დეზოქსინუკლეოტიდების ნარევი, რომელიც შეიცავს: დეზოქსიადენოზინტრიფოსფატს (dATP), დეზოქსიგუანოზინტრიფოსფატს (dGTP), დეზოქსიციტოზინტრიფოსფატს, (dCTP) და დეზოქსითიმიდინტრიფოსფატს (dTTP). ეს ნივთიერებები შეადგენენ სამშენებლო მასალას ახლადსინთეზირებული დნმ-ს ფრაგმენტებისთვის.
4. Mg^{+2} - ს იონები, რომელიც საჭიროა ნებისმიერი ფერმენტის, მათ შორის taq – პოლიმერაზას მუშაობისთვის.
5. ბუფერი, რომელიც ქმნის პჯრ რეაქციის მიმდინარეობისათვის ხელსაყრელ პირობებს (pH, იონურ ძალა, იონები, დეტერგენტები).
6. დნმ-მატრიცა, რომელიც შეიცავს დნმ-ს იმ უბანს, რომლის ამპლიფიკაციაც უნდა მოხდეს.

რეაქცია ტარდება მცირე ზომის პოლიპროპილენის სინჯარებში. არსებობს 0,2 მკლ და 0,5 მკლ მოცულობის პჯრ-ის სინჯარები (სურ. 13. გვ 104).

0,2 მკლ სინჯარები შეიძლება იყოს დამოუკიდებელი (სურ. 13.გვ.104) და ერთ მწკრივში გაერთიანებული, ერთმანეთთან გადაბმული, რომლებსაც აქვთ ინდივიდუალური სახურავი (სურ. 14. გვ. 104), ან ერთ მწკრივში გარეთიანებული, ერთმანეთთან გადაბმული სახურავით (სურ. 15 გვ. 104).

აღნიშნულ სინჯარების სარეაქციო არით შევსების შემდეგ საჭიროა მათი ე.წ. ამპლიფიკატორში (თერმოციკლერში) მოთავსება. ეს არის ხელსაწყო, რომელიც ახორციელებს ტემპერატურის რეჟიმის

უზრუნველყოფას გაციებითა და გაცხელებით (სურ. 16 და სურ. 17 გვ.105)

ტემპერატურული რეჟიმები იყოფა საფეხურებად, რომელთა ერთიანობას ციკლი ეწოდება. თითოეულო **ციკლის** შემდეგ ხდება ჩვენთვის საინტერესო დნმ-ს მონაკვეთის გაორმაგება. განვიხილოთ ციკლის თითოეული საფეხური (იხ. სურ. 18ა, 18ბ, 18გ. გვ. 105).

1. დენატურაცია. ციკლის ამ ეტაპზე ახდენენ სარეაქციო არეში არსებული დნმ-ის ორმაგი ჯაჭვის დაცალკევებას. ამ პროცესისათვის საჭიროა მაღალი ტემპერატურა – 94-96°C. აღნიშნულ ტემპერატურაზე სარეაქციო ნიმუშის ინკუბირების შედეგად მიიღება დნმ-ის ორი ერთჯაჭვიანი მოლეკულა. ეტაპის ხანგრძლივობა შეადგენს 0,5-2 წუთს. რიგ შემთხვევებში, ციკლის დაწყებას წინ უსწრებს სარეაქციო ნარევის წინასწარი გაცხელება 95-96°C-ზე 2-5 წუთის განმავლობაში, დნმ-ს მოლეკულისა და პრაიმერების სრული დენატურაციის მიზნით. ამ მოვლენას ეწოდება „ცხელი სტარტი" და ხელს უშლის არასპეციფიკური პროდუქტების წარმოქმნას.

2. ანელინგი. ანელინგის სტადიაზე ხდება პირველ სტადიაზე მიღებული დნმ-ის ერთმაგ ჯაჭვებთან პრაიმერების დაკავშირება. ერთი პრაიმერი უკავშირდება ერჯაჭვიანი დნმ-ის შესაბამის უბანს, ხოლო მეორე პრაიმერი ასევე უკავშირდება მეორე ერჯაჭვიანი დნმ-ის შესაბამს უბანს. ამგვარად პრაიმერები შემოსაზღვრავენ დნმ-ის ამპლიფიცირე-ბად მინაკვეთს. დაკავშირება ხდება კომპლემენტარულად, ჩარგაფის წესის მიხედვით, რაც ნიშნავს, რომ ორმაგჯაჭვიან დნმ-ში ადენინის საპირისპიროდ აუცილებლად არის თიმინი, ხოლო გუანინი მუდამ უწყვილდება ციტოზინს. თუ აღნიშნული პირობები არ იქნება დაცული, მაშინ ანელინგი არ განხორციელდება.

როგორც უკვე აღვნიშნეთ, პჯრ-ს სპეციფიკურობა დაფუძნებულია დნმ-მატრიცასა და პრაიმერებს შორის წარმოქმნილ კომპლემენტარულ კომპლექსზე. ეს კომპლექსი რომ წარმოიქმნას, აუცილებელია ტემპერატურული რეჟიმის სწორად შერჩევა. თავის მხრივ, ტემპერატურა დამოკიდებულია პრაიმერის შემადგენლობაზე და თითქმის უტოლდება პრაიმერის ლღობის ტემპერატურას (Tm).

ლღობის ტემპერატურის გამოთვლა შესაძლებელია შემდეგი ფორმულით:

$$T_m = 2\cdot(n_A + n_T) + 4\cdot(n_G + n_C)$$

სადაც nA. nT, nG და nC არის შესაბამისი ნუკლეოტიდების რაოდენობა პრაიმერში.

პრაიმერის შერჩევისას, თუ მისი სიგრძე და ნუკლეოტიდების შემცველობა ან ტემპერატურული რეჟიმი არასწორადაა გათვლილი, რეაქციისას შესაძლებელია არასპეციფიკური კომპლემენტარული კომპლექსების წარმოქმნა მატრიცული დნმ-ს სხვა მონაკვეთებთან, ეს კი

გამოიწვევს სხვა, არასპეციფიკური პროდუქტების წარმოქმნას. ლღობის ტემპერატურის ზედა ზღვარი შეზღუდულია ფერმენტ პოლიმერაზას ტემპერატურული ოპტიმუმით, მისი აქტივობა ეცემა, თუ ტემპერატურა გადააჭარბებს 80°C-ს. პრაიმერების შერჩევისას გათვალისწინებული უნდა იქნას შემდეგი კრიტერიუმები: GC შემცველობა უნდა იყოს დაახლოებით 60%; პრაიმერების ლღობის ტემპერატურათა (Tm) შორის სხვაობა არ უნდა აღემატებოდეს 5°C-ს; ხსნარი არ უნდა შეიცავდეს არასპეციფიკურ მეორად სტრუქტურებს. სასურველია, რომ პრაიმერები ბოლოზე შეიცავდეს გუანინს ან ციტოზინს, რადგანაც ისინი წარმოქმნიან სამ წყალბადურ კავშირს მატრიცული დნმ-ს მოლეკულასთან, რაც ჰიბრიდიზაციას უფრო სტაბილურს ხდის. ტემპერატურული რეჟიმი, პრაიმერების შემცველობიდან გამომდინარე, მერყეობს 50 – 78°C შორის, დრო – 20 წამიდან 1 წუთამდე.

3. პჯრ-ს მესამე ეტაპია ელონგაცია, მიერთებული პრაიმერებიდან დაწყებული, დნმ-ს ჯაჭვის კომპლემენტარული დაგრძელება, რომელიც მიმდინარეობს 5’ ბოლოდან 3’ ბოლოს მიმართულებით. სამშენებლო მასალას ახალი დნმ-ს ჯაჭვების სინთეზისათვის წარმოადგენს საინკუბაციო არეში დამატებული დეზოქსინუკლეოტიდები. სინთეზს აკატალიზებს ფერმენტი ტაქ-პოლიმერაზა, 70-72°C ტემპერატურაზე. ეტაპის ხანგრძლივობაა 20 – 60 წუთი.

ამპლიფიკაციის პირველი ციკლის შემდეგ წარმოქმნილი დნმ-ს ახალი ჯაჭვები ემსახურებიან ამპლიფიკაციის მეორე ციკლს, როგორც დნმ-მატრიცები. ამ დროს წარმოიქმნება დნმ-ს სპეციფიკური ფრაგმენტი – ამპლიკონი. ყოველი შემდგომი ციკლისათვის აღნიშნული ამპლიკონები წარმოადგენენ მატრიცას დნმ-ს ახალი ჯაჭვების სინთეზისათვის. ამგვარად სარეაქციო არეში ხდება ამპლიკონების დაგროვება და მათი რაოდენობა გამოისახება ფორმულით 2n, სადაც n ამპლიფიკაციის ციკლების რაოდენობაა. თუ საწყის სარეაქციო არეში არის ორჯაჭვიანი დნმ-ს მხოლოდ ერთი მოლეკულა, 35 – 40 ციკლის შემდეგ არეში დაგროვდება დაახლოებით 10^8 ამპლიკონის მოლეკულა სურ. 19 (გვ.96).

აღსანიშნავია, რომ ამპლიკონების დაგროვება გეომეტრიული პროგრესიით მიმდინარეობს დროის გარკვეულ მონაკვეთში, რის შემდეგაც იგი ძალზე მცირდება. ამ ეფექტს ეწოდება „პლატოს ეფექტი” და იგი შეიქმნება, როდესაც ამპლიკონების კონცენტრაცია მიაღწევს 0,2-1. პიკომოლ „პლატოს ეფექტზე” გავლენას ახდენს: სუბსტრატების (დეზოქსინუკლეოტიდები და პრაიმერები) უტილიზაცია, რეაგენტების სტაბილურობა (დეზოქსინუკლეოტიდები და ფერმენტები), ინჰიბიტორების რაოდენობა (პიროფოსფატები და დნმ-დუპლექსები), არასპეციფიკური პროდუქტები და პრაიმერ-დიმერები, რომლებიც კონკურირებენ დეზოქსინუკლეოტიდებისთვის, პრაიმერებისა და პოლიმერაზისთვის. რაც უფრო დაბალია საწყისი დნმ-მატრიცის

კონცენტრაცია, მით მეტია „პლატოს ეფექტის” შექმნის რისკი. ეს ეფექტი შეიძლება შეიქმნას მანამდე, სანამ სარეაქციო არეში დაგროვდება შემდგომი ანალიზისთვის საჭირო ამპლიკაციის სპეციფიკური პროდუქტის რაოდენობა.

სურათებზე ნაჩვენებია პჯრ-ს ცალკეული ციკლები და პჯრ-ს პროცესის მიმდინარეობის გრაფიკული გამოსახულება: სურ. 18ა, სურ.18ბ, სურ. 18გ (გვ. 105); სურ. 19 (გვ. 106) პჯრ-ს სქემატური გამოსახულება.

მატრიცული დნმ

პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის ჩასატარებლად, პირველ რიგში, საჭიროა დნმ-ს გამონთავისუფლება (ექსტრაქცია). შესაძლებელია საკვლევი ნიმუში ვადუღოთ 2-3 წუთის განმავლობაში და შემდეგ გამოვიყენოთ ის, როგორც დნმ-მატრიცა. ამასთან, სარეაქციო არეში შეიძლება შევიტანოთ მთელი რიგი ნივთიერებები, რომლებიც ხელს უშლიან პჯრ-ს მიმდინარეობას. პროცესის ნორმალურად წარმართვისათვის უნდა ვისარგებლოთ ნუკლეინის მჟავების მაღალი სისუფთავის სინჯებით. ამგვარი პრეპარატების მიღებისათვის საჭიროა შეირჩეს ნუკლეინის მჟავების გასუფთავების ისეთი მეთოდები, რომელთა გამოყენება გამორიცხავს პრეპარატებში პჯრ-ს ინჰიბიტორების არსებობას. ქვემოთ ჩამოთვლილია ზოგიერთი პჯრ-ინჰიბიტორი:

ინჰიბიტორი	ინჰიბიტორის კონცენტრაცია
ნატრიუმდოდეცილსულფატი	>0,005%
ფენოლი	>0.2%
ეთანოლი	>1%
იზოპროპანოლი	>1%
ნატრიუმის აცეტატი	>5 mM
ნატრიუმის ქლორიდი	>25 mM
EDTA	>0,5 mM
ჰემოგლობინი	>1მგ/მლ
ჰეპარინი	>0,15i.m/მლ
შარდოვანა	>20mM

ბიოლოგიური მასალიდან ნუკლეინის მჟავების გამოსაყოფად აუცილებელია მოხდეს უჯრედის ლიზისი, უჯრედული ნუკლეაზების ინაქტივირება და საჭირო ნუკლეინის მჟავას დანარჩენი უჯრედული მასისგან იზოლირება. ხშირად ლიზისის სათანადოდ წარმართვისათვის საჭირო ხდება რამდენიმე კომპრომისული მეთოდის გაერთიანება. იგი უნდა იყის საკმაოდ ძლიერი, რათა მოხდეს საწყისი მასალის სტრუქტურის (მაგ. ქსოვილების) დაშლა და, ამავდროულად, უნდა იყოს ნატიფი, რათა არ მოხდეს ნუკლეინის მჟავების სტრუქტურის დაზიანება. ლიზისი მოიცავს შემდეგ პროცედურებს:

1. მექანიკური დამუშავება (დაქუცმაცება - იხ. ჰომოგენიზაცია, ჰიპოტონური ლიზისი);
2. ქიმიური დამუშავება (დეტერგენტებით);
3. ცილების ფერმენტული მოშორება (პროტეინაზა K-ს მეშვეობით უჯრედების ლიზისის და ნუკლეაზების ინაქტივაციის შემდეგ, უჯრედული მასა შესაძლებელია მოშორებული იქნეს ფილტრაციითა და დალექვით. უჯრედული ექსტრაქტებიდან ნუკლეინის მჟავების გასუფთავება, ჩვეულებრივ, ორ ან მეტ მეთოდს აერთიანებს. ესენია:

- გამოყოფა/დალექვა;
- ქრომატოგრაფია;
- ცენტრიფუგირება;
- აფინური დაყოფა.

გამოყოფა/დალექვა

გამხსნელებით ექსტრაქცია გამოიყენება ნუკლეინის მჟავების მიმართ, სხვადასხვა მინარევის მოსაცილებლად. მაგალითად, ფენოლ-ქლოროფორმის ნარევი გამოიყენება ცილების მოსაცილებლად. იზოპროპანოლით ან ეთანოლით დალექვა იხმარება ნუკლეინის მჟავების კონცენტრირებისთვის. იმ შემთხვევაში, თუ ნუკლეინის მჟავების შემცველობა დაბალია, პრეციპიტაციის ეფექტურობის გაზრდის მიზნით, ხსნარს შეიძლება დაემატოს გლიკოგენი. ნუკლეინის მჟავების დალექვის სხვა მეთოდები გულისხმობს მათ სელექციურ პრეციპიტაციას მარილების მაღალი კონცენტრაციის გამოყენებით ან ცილების დალექვას pH-ის ცვალებადობით.

ქრომატოგრაფია

ქრომატოგრაფია გულისხმობს დაყოფის სხვადასხვა ტექნოლოგიის გამოყენებას: გელფილტრაცია, იონცვლადი ქრომატოგრაფია, სელექციური ადსორბცია, აფინური ქრომატოგრაფია (იხ. ქრომატოგრაფია). როგორც ეს ზემოთ უკვე იყო აღწერილი, გელ-ფილტრაციის პროცესში მილეკულები დიფუნდირებენ გელის ნაწილაკებში და იყოფიან მოლეკულური მასების კლებადი

თანმიმდევრობით. იონცვლადი ქრომატოგრაფიის შემთხვევაში, ნუკლეინის მჟავები, რომელთაც გააჩნიათ მაღალი უარყოფითი მუხტი, უკავშირდებინ იონცვლად ფისს და ელუირდებიან ჩვეულებრივი მარილის ბუფერით. ადსორბციული ქრომატოგრაფიის შემთხვევაში, ნუკლეინის მჟავები გარკვეული მარილების თანაობისას სელექციურად უკავშირდებიან კრემნიუმის ან შუშის მატარებლებს, მაშინ, როცა სხვა ბიომოლეკულებს არ გააჩნიათ მათთან დაკავშირების უნარი. ელუცია ხდება სუსტი მარილხსნარებით ან წყლის საშუალებით.

ცენტრიფუგირება

ცენტრიფუგირება ნუკლეინის მჟავების გასუფთავების ეფექტური მეთოდია (იხ. ცენტრიფუგირება). მაგალითად, ულტრაცენტრიფუგირება მაღალი აჩქარებით ცეზიუმქლორის გრადიენტში დიდი ხანია გამოიყენება პლაზმიდების გასასუფთავებლად. ხშირად, მინარევებისაგან ნუკლეინის მჟავების გასუფთავების მიზნით, გამოიყენება ცენტრიფუგასთან შეუღლებული სხვა მეთოდებიც; ასეთია, მაგალითად, გელფილტრაცია ცენტრიფუგირებით. ამ დროს ხდება დნმ-სა და რნმ-ს გამოცალკევება დაბალმოლეკულური მინარევებისაგან. ზოგიერთი მეთოდიკა აერთიანებს სელექციურ ადბსორციას ქრომატოგრაფიულ მატრიქსზე და ელუირებას ცენტრიფუგირებით.

აფინური დაყოფა

უკანასკნელ წლებში გამოყენებული ნუკლეინის მჟავების გამოყოფის მეთოდები ეფუძნება აფინურ იმობილიზაციას, შეუღლებულს მაგნიტურ დაყოფასთან. მაგალითად პოლი(A) და ი-რნმ შეიძლება მიმაგრებული იქნას სტრეპტავიდინით დაფარულ მაგნიტურ ნაწილაკებზე, ბიოტინით მონიშნული ოლიგონუკლეოტიდების {ოლიგო (dT)} დახმარებით, რის შემდეგაც ნაწილაკთა კომპლექსი და დაუკავშირებელი მინარევები მოცილდება ხსნარს მაგნიტის საშუალებით. მყარფაზიანი ტექნიკა ძალზე აიოლებს ნუკლეინის მჟავების გასუფთავებას, რადგან შეუძლია მაგნიტური დაყოფის ერთი, სწრაფი ეტაპით. ჩაანაცვლოს რამდენიმე ეტაპი: ცენტრიფუგირება, ექსტრაქცია ორგანული გამხსნელებით და ფაზური დაყოფა,

აქ დაწვრილებით განვიხილავთ ნუკლეინის მჟავების მიღების ერთი-ერთი მეთოდს:

მეთოდი ეფუძნება ცეტილტრიმეთილამონიუმის ბრომიდის (ცტაბ) გამოყენებას, რომელიც შემოთავაზებული იყო 1980წ. მიურეის და ტომპსონის მიერ, ხოლო 1987წ. გამოქვეყნებული იქნა ვაგნერისა და თანამშრომლების მიერ. ეს მეთოდი მოსახერხებელია დნმ-ს გამოსაყოფად მცენარეებიდან და საკვები პროდუქტებიდან. ის განსაკუთრებით ეფექტურია პოლისაქარიდებისა და პოლიფენოლური

ნაერთების მოსაცილებლად, რომლებიც უარყოფითად მოქმედებენ დნმ-ს გასუფთავების ხარისხზე. აღნიშნული მეთოდი ფართოდ გამოიყენება მცენარეთა მოლეკულურ გენეტიკაში. იგი გამოსცადეს მთელ რიგ ექსპერიმენტებში და დაიმკვიდრა ადგილი გენმოდიფიცირებული ორგანიზმების კვლევაში. მეთოდს, საწყისი მასალის თვისებებიდან გამომდინარე, აქვს რამდენიმე მოდიფიკაცია.

მეთოდის პრინციპი შემდეგში მდგომარეობს: ახდენენ უჯრედების ლიზისს სტაბ-ის საშუალებით, რომელიც მარილების სუსტ არეში ნუკლეინის მჟავებთან წარმოქმნის უხსნად კომპლექსს. ამ პირობებში პოლისაქარიდები, ფენოლური ნაერთები და სხვა მინარევები რჩებიან სუპერნატანტში და შეიძლება მათი გადაღვრა. დნმ-ის კომპლექსს ხსნიან მარილის კონცენტრაციის ზრდით და ლექავენ ეთანოლით ან იზოპროპანოლოთ. განვიხილოთ ამ პროცედურის სამი ძირითადი ეტაპი: უჯრედული მემბრანის ლიზისი, გენომური დნმ-ს გამოყოფა და მისი გამოლექვა.

უჯრედული მემბრანის ლიზისი. როგორც უკვე აღვნიშნეთ, დნმ-ს გამოყოფის პირველი ეტაპი უჯრედული და ბირთვული კედლების მთლიანობის დარღვევაა. ამ მიზნით, ჰომოგენიზირებულ ნიმუშს ამუშავებენ საექსტრაქციო ბუფერით, რომელიც შეიცავს ედტა-ს, ტრის-HCl-ს და სტაბ-ს. ცნობილია, რომ ყველა ბიოლოგიური მემბრანა ერთნაირი აგებულებით ხასიათდება და შედგება ლიპიდური და ცილოვანი მოლეკულებისაგან, რომლებიც დაკავშირებულნი არიან ერთმანეთთან არაკოვალენტური კავშირებით. ლიპიდები წარმოქმნიან ორმაგ შრეს, რომელშიც „ჩაძირულია" ცილის მოლეკულები. ლიპიდის მოლეკულა შედგება ჰიდროფილური ნაწილისგან, რომელსაც პირობითად „თავი" ეწოდება და ჰიდროფობული ნაწილისგან, რომელსაც პირობითად „კუდი" ეწოდება. როგორც აღვნიშნეთ, მემბრანების ლიზისი ხორციელდება დეტერგენტი სტაბ-ის მეშვეობით. იმის გამო, რომ ლიპიდებისა და დეტერგენტის ქიმიური შემადგენლობა მსგავსია, ბუფერში არსებულ დეტერგენტს შეუძლია განახორციელოს უჯრედისა და ბირთვის ლიპიდების ე.წ. შებოჭვა – სოლუბილიზაცია. დეტერგენტით ლიპიდების სოლუბილიზაციის მექანიზმი გამოსახულია სურ. 20. (გვ. 106) წარმოქმნილ ლიპიდ-დეტერგენტის კომპლექსში, ისევე, როგორც მემბრანის ლიპიდურ შრეში, „იძირებიან" ცილები და ამგვარად ხდება ნუკლეინის მჟავების გამოთავისუფლება. მარილების, კერძოდ, NaCl-ის განსაზღვრულ კონცენტრაციაზე დეტერგენტი ნუკლეინის მჟავებთან წარმოქმნის უხსნად კომპლექსს. როგორც ცნობილია, EDTA ხელატური აგენტია, რომელიც იკავშირებს მეტალებს, მათ შორის, მაგნიუმსაც. მაგნიუმი არის ფერმენტ ნუკლეაზას კოფაქტორი. ამგვარად, მაგნიუმი - EDTA კომპლექსის ფორმირებით ქვეითდება ნუკლეაზების აქტივობა. ტრის-HCl-ის საშუალებით შესაძლებელია pH-ის სასურველი დონის

შენარჩუნება, რადგანაც pH-ის როგორც მაღალი, ისე დაბალი დონეები აზიანებენ ნუკლეინის მჟავებს. ზემოთ აღწერილი პროცედურების შემდეგ შესაძლებელია დნმ-ს გასუფთავება.

გამოყოფა. ამ ეტაპზე პილისაქარიდები, ფენოლური ნაერთები, ცილები და უჯრედული ლიზატის სხვა კომპონენტები იმყოფებიან ერთ ხსნარში, სტაბ-ნუკლეინის მჟავების კომპლექსთან ერთად. პოლისაქარიდებისა და ფენოლური ნაერთების მოცილება ძალზე მნიშვნელოვანია, რადგან ისინი ფერმენტული რეაქციის ინჰიბიტორებს წარმოადგენენ. მარილის დაბალი კონცენტრაციის პირობებში (0,5 M NaCl) ნუკლეინის მჟავები არ გამოილექება. მათი გამოყოფა ხსნარიდან შესაძლებელია ქლოროფორმის გამოყენებით. ქლოროფორმი ახდენს ცილების დენატურირებას და აადვილებს ორგანული და წყლის ფაზების წარმოქმნას. ჩვეულებრივ, წყლის ფაზა არის ზედა ფაზა, მაგრამ თუ მის სიმკვრივეს გავზრდით მარილის მაღალი კონცენტრაციით (>0,5 M), იგი წარმოქმნის ქვედა ფაზას. ნუკლეინის მჟავები გადანაწილდებიან წყლის ფაზაში. ქლოროფორმით ექსტრაქცია შეიძლება განმეორდეს რამდენჯერმე, სანამ მთლიანად არ მოხდება წყლიანი ფაზის გათავისუფლება მინარევებისგან. როდესაც ნუკლეინის მჟავების კომპლექსი სრულად გასუფთავდება, შესაძლებელია დალექვის ფაზის ჩატარება.

დალექვა. გადამწყვეტ ეტაპზე საჭირო ხდება ნუკლეინის მჟავების გათავისუფლება დეტერგენტისაგან. ამ მიზნით, მიღებულ წყლის ფაზას ამუშავებენ სტაბ-ისა და NaCl-ის მაღალი კონცენტრაციის (>0,8 M) ხსნარით. მარილი აუცილებელია ნუკლეინის მჟავების ნალექის წარმოსაქმნელად. დეტერგენტის მოცილება ხდება სპირტის დამატებით, რომელშიც დეტერგენტი უკეთესად იხსნება, ვიდრე წყალში, ხოლო ნუკლეინის მჟავები სპირტში ნალექის სახით რჩებიან. 70%-იანი სპირტით შემდგომი გარეცხვისას ხდება ნუკლეინის მჟავების დამატებითი გასუფთავება ნარჩენი მარილისგან.

სპექტროფოტომეტრული ანალიზი. დნმ-ს, რნმ-ს ოლიგონუკლეოტიდების და მონონუკლეიდების განსაზღვრა შესაძლებელია უშუალოდ წყალხსნარში სპექტროფოტომეტრის გამოყენებით.

ჩვეულებრივ, ნუკლეინის მჟავების კონცენტრაციას საზღვრავენ 260 ნმ-ის სიგრძის ტალღაზე. მიღებული პრეპარატის სისუფთავე დგინდება შემდეგნაირად: ისაზღვრება შთანთქმა ჯერ 260 ნმ-ზე, შემდეგ - 280 ნმ-ზე, რადგანაც შესაძლო მინარევების (მაგალითად, ცილების) შთანთქმა სწორედ ამ სპექტრში ხდება. შემდეგ გამოითვლიან A_{260}/A_{280}. დნმ-ს სუფთა პრეპარატის მიღებისას ეს ფარდობა 1,7-1,9-ის ტოლია, ხოლო რნმ-თვის ფარდობა დაახლოებით 2-ის ტოლი უნდა იყოს. რაც შეეხება რაოდენობას, დადგენილია, რომ A_{260} შთანთქმისას 1 ოპტიკური ერთეული შეესაბამება 50 მკგ (მიკროგრამ) დნმ-ს. შთანთქმა 230 ნმ ასახავს ნიმუშის დაბინძურებას ისეთი ნივთიერებებით, როგორიცაა

ნახშირწყლები, პეპტიდები, ფენოლები და არომატული ნივთიერებები. ფარდობა A_{260}/A_{230} თითქმის უნდა უტოლდებოდეს 2,2-ს.

შედეგების აღრიცხვა დნმ-ს სპეციფიკური ფრაგმენტის ამპლიფიცირების შემდეგ, მისი გამოვლენა ხდება ელექტროფორეზით აგაროზას გელში, ეთიდიუმბრომიდის თანაობისას, რომელიც უკავშირდება დნმ-ს ფრაგმენტებს და ულტაიისფერი სპექტრის 290-330ნმ-ში იძლევა ზოლოვან ნათებას. პჯრ-ს შედეგად წარმოქმნილი ამპლიკონების ზომების მიხედვით ხდება აგაროზას გელის კონცენტრაციის შერჩევა. ჩვეულებრივ, გელის კინცენტრაციაა 1%-3%-ის ფარგლებში ვარირებს. აგაროზას გელის მისაღებად, შესაბამისი რაოდენობის აგაროზას ემატება წინასწარ შერჩეული ბუფერი (ტბე, ტაე და ა.შ.) და ლღვება მიკროტალღურ ღუმელში ან წყლის აბაზანაზე; აგაროზას სრული გალღობის შემდეგ ცივდება დაახლოებით 60 გრადუსამდე, დაემატება 10მგ/მლ კონცენტრაციის ეთიდიუმბრომიდის ხსნარი – 5 მკლ ყოველ 100 მლ აგაროზაზე. გულდასმით მორევის შემდეგ ისხმება გელის ყალიბის ჭურჭელში. გელის სისქე უნდა იყოს 4-6 მმ. გელის სასტარტო მხარეს ათავსებენ ე.წ. "სავარცხელს" ისე, რომ კბილანების ბოლოებსა და გელის ჭურჭლის ფსკერს შორის გელის სისქე 0,5 – 1 მმ იყოს. გელის გამყარების შემდეგ სავარცხელს ფრთხილად ამოიღებენ, გელს ბუფერით დაფარავენ და წარმოქმნილ ღრმულებში ჩაასხამენ საკვლევი ნიმუშებს. ნიმუშების გელში შეტანა ხდება პიპეტით, რომელსაც ემაგრება წაგრძელებული წვერი.

გელში შეტანამდე, ნიმუშს უმატებენ გელში შესატან ხსნარს 3-5 მკლ-ის ოდენობით. აღნიშნული ხსნარის შემადგენლობა ასეთია: 0.25% ბრომფენოლის ლურჯი, 0,25% ქსილენციანოლი და 40% საქაროზა. ამ ხსნარის შეტანა რეკომენდირებულია: 1 მოცულობა ხსნარი 3-4 მოცულობა საკვლევ ნიმუშზე. მეორე ტიპის ხსნარი: 2% ბრომფენოლბლუ, 30% გლიცერინი ტრის-ედტა – ბუფერში. გლიცერინის და საქაროზას დანიშნულებაა საკვლევი ნიმუშის სიმკვრივის გაზრდა, რათა გელში შეტანისას მოხდეს ნიმუშის ღრმულში დალექვა, ხოლო საღებავების დანიშნულებაა გელში დნმ-ს მოძრაობის კონტროლი: ბრომფენოლბლუ წინ უსწრებს ნებისმიერ ამპლიფიცირებულ ფრაგმენტს (2%-3% გელში 50- 100 ფუძე წყვილის დონეზე მიგრირებს) და აქვს ლურჯი ფერი, ხოლო ქსილენციანოლი, იმავე პროცენტობის გელში შეესაბამება 4000 – 10000 ფუძე წყვილს და აქვს უფრო ღია ლურჯი ფერი.

საკვლევი ნიმუშების პარალელურად, აუცილებელია ერთ-ერთ ღრმულში შეტანილი იქნეს მარკერები – დნმ-ს სხვადასხვა ზომის ფრაგმენტების ნარევი – ე.წ. ლადერი (DNA Ladder). მათთან შედარებით, განისაზღვრება ამპლიფიკატების სიდიდე. ჩვეულებრივ, ლადერის შემადგენლობაში შედის 10 დნმ-ს ფრაგმენტი, დაწყებული 20-100 ფუძე წყვილიდან – 1000-1500-ით დამთავრებული (100-იანი მატების ნაბიჯით).

გელიანი ჭურჭელი უერთდება მუდმივი დენის წყაროს (10-15 ვოლტი/სმ). ფორეზი მიმდინარეობს 20-40წთ-ის განმავლობაში და კონტროლდება საღებავების მიგრირებით. ელექტროფორეზის დამთავრების შემდეგ, გელი თავსდება ტრანსილუმინატორის მინაზე, რომელსაც ქვემოდან მიანათებენ ულტრაიისფერ სხივებს (312 - 345ნმ). ამ სხივების გელში გავლისას დნმ – ეთიდიუმ ბრომიდის კომპლექსი იწყებს ნათებას.

გელის ფოტოსურათისა და კომპიუტერში გადატანის შემდეგ ხდება მიღებული შედეგების დამუშავება (სურ. 21. გვ. 107).

თანამედროვე მეცნიერებამ პჯრ-ს მრავალგვარი ნაირსახეობა შექმნა. მოკლედ განვიხილოთ რამდენიმე მათგანი:

უკუტრანსკრიპტაზული პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია (Reverse transcription polymerase Chain Reaction – RT-PCR). პჯრ-ს ეს ნაირსახეობა საშუალებას იძლევა რნმ-დან მივიღოთ შესაბამისი დნმ. მეთოდი განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია ვირუსების შესწავლისა და დიაგნოსტიკის დროს. ასევე მნიშვნელოვანია კლონირებული დნმ-ბანკების შექმნისას და გენთა ექსპრესიის შესწავლის მიზნით.

მეთოდის პრინციპია რნმ-დან ფერმენტ უკუტრანსკრიპტაზით დნმ-ს სინთეზირება, ხოლო სინთეზირებულ დნმ-ზე საჭირო უბნის ამპლიფიცირება.

აღნიშნული ფერმენტისა და რნმ-ს გარდა, საჭიროა მასალა, რომელიც დნმ-ს ჯაჭვის აწყობას შეუწყობს ხელს. ეს მასალა შეიძლება იყოს ე.წ. შემთხვევითი (რანდომი - Random) თანმიმდევრობის pd(N) რამდენიმე ფუძის შემცველი ნუკლეოტიდი ან ოლიგოთიმინი -oligo(dT). ხშირად იხმარება სპეციფიკური პრაიმერი უკუსინთეზისათვის. რანდომპრაიმერიხშირშემთხვევაშიშეიცავს6,8ან12ფუძეს.შემთხვევითი იმიტომ ეწოდება, რომ ასეთი მცირე ზომის ნუკლეოტიდისათვის სპეციფიკურობა გამორიცხულია და იგი უკავშირდება რნმ-ს მთელ სიგრძეზე, სადაც კი შესაბამისი თანამიმდევრობა შეხვდება, შემდეგ უკუტრანსკტრიპტაზა იწყებს დნმ-ს ჯაჭვის აწყობას მიბმული რანდომპრაიმერებიდან.

ცნობილია, რომ საინფორმაციო რნმ-ს მოლეკულა ტერმინალურ უბანში შეიცავს თანმიმდევრობას, რომელიც რამდენიმე ადენოზინის ფუძისაგან შედგება. ეს შემთხვევა კარგადაა გამოყენებული უკუტრანსკრიფციული პჯრ-ს დროს, როდესაც დნმ-ს ჯაჭვის ასაწყობად გამოიყენება oligo(dT). იგი უკავშირდება რნმ-ს ჯაჭვის poli- A უბანს, საიდანც იწყება დნმ-ს ჯაჭვის დაგრძელება. სპეციფიკური პრაიმერის შემთხვევაში, წყვილი პრაიმერიდან დნმ-ს ჯაჭვის ასაწყობად მხოლოდ უკუ, ანტისენს პრაიმერი გამოიყენება.

უკუტრანსკრიფციული პჯრ შეიძლება იყოს ერთსაფეხურიანი ან ორსაფეხურიანი. ორსაფეხურიანის დროს, პირველ ეტაპზე ხდება მხოლოდ დნმ-ს მიღება და შემდეგ ჩვეულებრივ ტარდება პჯრ. ერთსაფეხურიანის შემთხვევაში კი ორივე რეაქცია ერთ სინჯარაში მიმდინარეობს.

ერთ სინჯარაში რექციის ჩასატარებლად საჭიროა შემდეგი პირობების დაცვა: სანჯარაში ემატება ოთხივე - A, C, G , T ნუკლეოტიდის გაორმაგებული ოდენობა, რადგან მათ იყენებენ, როგორც კომპლემენტური (კ-დნმ-ს) სინთეზისათვის, ასევე ამპლიფიკაციისთვის. სარეაქციო არეს უმატებენ ორივე ფერმენტს: ტაგ-პოლიმერაზას და უკუტრანსკრიფტაზას. რეაქციის თავისებურებიდან გამომდინარე, სარეაქციო არეს ემატება ან რანდომ pd(N), ან oligo(dT) ან ანტისენს პრაიმერი და პჯრ ბუფერი.

რეაქციის დაწყებისთვის საჭიროა ხსნარის გაცხელება 95 გრადუსამდე 5წთ-ის განმავლობაში, რათა მოხდეს რნმ-ს დენატურაცია. უკუტრანსკრიფტაზასათვის ხდება ტემპერატურული რეჟიმის შერჩევა (დაახლოებით 37-45 გრადუსი). ამ რეჟიმში ტარდება უკუტრანსკრიფციის რეაქცია, რომლის ხანგრძლივობა მერყეობს 25წთ-60წთ-იან ინტერვალში. პჯრ ტარდება პრაიმერებთან მისადაგებულ პირობებში.

PCR-RFLP (რფსპ-პჯრ, რესტრიქციის ფრაგმენტის სიგრძის პოლიმორფიზმი) (ინგლისურად - Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism).

აღნიშნული პჯრ-ს ნაირსახეობის დანიშნულებაა მუტაციების აღმოჩენა დნმ-ს საკვლევი უბნის თანმიმდევრობაში. დნმ-ს საჭირო მონაკვეთის ამპლიფიცირების შემდეგ, ამპლიფიკაციის პროდუქტის დამუშავება ხდება ფერმენტებით, რომლებსაც **რესტრიქტაზები** ეწოდება (ქვემოთ დეტალურად განვიხილავთ მათ დანიშნულებას). ამ ფეტმენტებს აქვთ უნარი შეიცნონ დნმ-ს ძალიან მოკლე თანმიმდევრობა და მოახდინონ მისი დაჭრა. ელექტროფორეზის ჩატარების შემდეგ, ვღებულობთ დაჭრილი დნმ-ს გარკვეული სიდიდის მონაკვეთებს. მუტაციის შემთხვევაში, შესაძლებელია რესტრიქტაზების სამიზნე უბნის გაქრობა. ამგვარად, სურათი შეიცვლება და ფერმენტის მიერ გაჭრილი მინაკვეთები გელზე აღარ გამოჩნდება. შესაძლებელია მუტაციის შედეგად ახალი სამიზნეების წარმოქმნაც, რაც ასევე აისახება ელექტროფორეზის სურათზე.

RAPD-PCR რაპდ-პჯრ (პოლიმორფული დნმ-ს რანდომამპლი-ფიკაცია/ ინგლისურად - Random Amplification of Polymorphic DNA)

პჯრ-ს ეს ნაირსახეობა გამოიყენება სხვადასხვა დაავადების, აგრეთვე სახეობებისა და ჯიშების კვლევის დროს. ამ მეთოდის სპეციფიკურობა ისაა, რომ არ არის აუცილებელი, წინასწარ ვიცოდეთ საკვლევი დნმ-ს თანმიმდევრობა. პრაიმერებად გამოიყენება მოკლე, 6-10

ფუძის შემცველი, ნუკლეოტიდები, რომლებიც კომპლემენტარობის შესაბაბისად უერთდებიან საკვლევი დნმ-ის მოლეკულას. ამ პროცესში გამოიყენება არა ორი, არამედ რამდენიმე პრაიმერი. ამიტომ ამპლიფიცირებული მონაკვეთებიც რამდენიმე იქნება. დავუშვათ, საჭიროა ერთმანეთს შევადაროთ ორი ორგანიზმი და გავარკვიოთ, მიეკუთვნებიან თუ არა ისინი ერთსა და იმავე სახეობას. სარეაქციო არეში ყველა საჭირო კომპონენტთან ერთად შეგვაქვს რამდენიმე მოკლე პრაიმერი, რომლებიც ორივე საკვლევ დნმ-ზე მონახავენ შესაბამის მონაკვეთებს, მიუერთდებიან მათ და ამპლიფიცირებენ შესაბამის მონაკვეთებს. ელექტროფორეზის ჩატარების შემდეგ, თუ ორივე ნიმუშისათვის ერთნაირი რაოდენობისა და ზომის ამპლიფიკანტები დაფიქსირდება, შეიძლება ითქვას, რომ ორგანიზმები იდენტურია. იმ შემთხვევაში, თუ ამპლიფიკატებს შორის დაფიქსირდა განსხვავება, ეს მიგვანიშნებს, რომ საკვლევი დნმ-ს მოლეკულები განსხვავებული თანმიმდევრობის არიან და არ მიეკუთვნებიან ერთსა და იმავე სახეობას.

პჯრ რეალურ დროში ანუ რაოდენობრივი პჯრ (ინგლისურად - Real-time PCR (RT-PCR) or quantity RT-PCR (qRT-PCR).

(თვალსაჩინოებისთვის ეწვიეთ - **http://www.hsc.unt.edu/departments/cellbiogen/PPT/CGEN5050/Overview%20of%20Real%20-Time%20PCR.ppt#256,1,Overview of Real -Time PCR)**

რეალურ დროში პოლიმერაზული ჯაჭვური რექციის პრინციპული სხვაობა ჩვეულებრივ პჯრ-სგან არის ის, რომ ამ შემთხვევაში შესაძლებელია ამპლიფიკაციის პროდუქტის დაგროვების რეგისტრაცია ამპლიფიკაციის მიმდინარეობის დროს. ამპლიკონების დაგროვების კინეტიკა დამოკიდებულია საკვლევი მატრიცის ასლების რაოდენობაზე. ამგვარად, შესაძლებელია საკვლევი დნმ-სა და რნმ-ს რაოდენობრივი განსაზღვრა. მიღებული ინფორმაცია განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია ვირუსული და სხვა ინფექციური დაავადებების მკურნალობისას, რადგანაც დაავადებულ ორგანიზმში გამომწვევების (ვირუსები, ბაქტერიები და სხვა მიკროორგანიზმები) კონცენტრაციის ცვლილება მკურნალობის განმავლობაში, შეიძლება გამოვიკვლიოთ ამ გამომწვევების დნმ-ს და რნმ-ს რაოდენობის განსაზღვრით.

აპარატურა –„პჯრ რეალურ დროში"– განსხვავდება ჩვეულებრივი პჯრ-ს აპარატურისგან, იგი შედგება თერმული ციკლერის, ოპტიკური ბლოკის – ფლურესცენციის აღგზნებისა და გამოსხივების ენერგიების რეგისტრაციისთვის და კომპიუტერისგან (შესაბამისი პროგრამული უზრუნველყოფით). ამგვარ აპარატურას მსოფლიოში რამდენიმე მწარმოებელი კომპანია აწარმოებს: „iQ iCycler" („Bio-Rad"), რამდენიმე მიდიფიკაციით „ABI Prism" („Applied Biosystems"), „LightCycler" („Roche"), „SmartCycler" („Cepheid"), Rotor-Gene Q (Qiagen). ისინი განსხვავდებიან საანალიზო ნიმუშების რაოდენობებით (96-ღრმულიანი სტანდარტული

ფორმატი, სპეციალური მინის კაპილარები, მბრუნავ დისკზე განლაგებული სინჯარები და ა.შ). განსხვავდებიან ფლურესცენციის რეგისტრაციის სისტემით, ზოგერთ მათგანში გამოიყენება ლაზერი, სხვა მწარმოებლები გამოიყენებენ სხივის ფართო სპექტრის ფილტრებს. ნაჩვენებია რამდენიმე მათგანის დიზაინი (სურ. 22. გვ. 107).

TaqMan განსაზღვრა (TaqMan Assay)

მოცემული მეთოდი დაფუძნებულია ფერმენტ პოლიმერაზას 5'-ენდონუკლეაზურ აქტივობაზე. სარეაქციო არეს ემატება დნმ-ზონდი, რომლის შემადგენლობაში შედის ფლუროსცენტული საღებავი და ე.წ. ფლურესცენციის ჩამქრობი. ფლურესცენტული საღებავი დაკავშირებულია 5' ბოლოსთან, ხოლო ჩამქრობი 3' ბოლოსთან. 3' ბოლო ასევე შეიცავს ფოსფატურ ჯგუფს. ზონდი უკავშირდება მატრიცულ ნუკლეინის მჟავას კომპლემენტარობის პრინციპით. ჩამქრობი შთანთქავს ფლურესცენტული საღებავის გამოსხივებას, ხოლო 3' ფოსფატური ჯგუფი აბლოკირებს პოლიმერაზას.

პჯრ-ს მიმდინარეობისას, ანელინგის დროს, დნმ-ს ზონდი უკავშირდება მატრიცას. რაც მეტი ამპლიფიკაციის პროდუქტი წარმოიქმნება პჯრ-ს მიმდინარეობისას, მით მეტი ზონდი დაუკავშირდება წარმოქმნილ ამპლიკონებს (სურ. 23. გვ. 108) Taqman განსაზღვრა.

ელონგაციის სტადიაზე ფერმენტ პოლიმერაზათი ხდება დნმ-ის კომპლემენტარული ჯაჭვის დაგრძელება. ფერმენტის ზონდთან მიახლოვების შემდეგ, იწყება ზონდის დაშლა 5' ნუკლეაზური აქტივობით. მგვარად, ხდება ფლორესცენტული საღებავისა და ჩამქრობის დაცილება, რაც იწვევს ნათების მომატებას. ნათების რეგისტრაცია ხდება რელური დროის ამპლიფიკატორით. რაც მეტი ამპლიკონი წარმოიქმნება, მით მეტი გამოსხივების რეგისტრაცია მოხდება.

ზონდები კომპლემენტარული თანმიმდევრობის ბოლოებით (Molecular beacons)

აღნიშნული ზონდები, რომლებსაც მოლეკულურ ბეკონს უწოდებენ, შეესაბამება ნუკლეინის მჟავების ცნობილ თანმიმდევრობებს. იგი ჩაკეტილი ფორმის მოლეკულაა, რომელიც შეიცავს ე.წ. ჩამქრალ ფლუროფორს (fluorophore – მოლეკულის ფუნქციური ჯგუფი, რომელიც იწვევს მოლეკულის ნათებას – ფლურესცენციას). ფლუროფორი იწყებს ფლურესცენციას იმ შემთხვევაში, თუკი ის დაუკავშირდება მატრიცულ ნუკლეინის მჟავას. (სურ. 24. გვ. 108) ბეკონი.

ტიპური მოლეკულური ბეკონი შედგება რამდენიმე ფუძისაგან. ამათგან, შუა ნაწილი კომპლემენტარულია მატრიცული ნუკლეინის

მჟავისა და არ შეიცავს ურთიერთკომპლემენტარულ უბნებს. რამდენიმე ფუძე თითოეულ ბოლოში ერთმანეთის კომპლემენტარულია და არ არიან მატრიცის კომპლემენტარულები. ისინი ბოლოვდებიან ფლუროფორითა და ჩამქრობით. ტიპური მოლეკულური ბეკონის სტრუქტურა იყოფა 4 ნაწილად:

- მარყუჟი – რომელიც შედგება მატრიცის კომპლემენტარული 16-30 ფუძისგან.
- ღერო – ბეკონის სწორხაზოვანი ნაწილი ორივე ბოლოში, ერთმანეთის კომპლემენტარული, 5-7 ფუძით.
- 5'ფლუროფორი – ბეკონის 5' ბოლოში მიერთებული საღებავი, რომელიც იწყებს ფლურესცენციას მატრიცაზე კომპლემენტარული თანამიმდევრობის არსებობის პირობებში.
- 3'ჩამქრობი – ჩამქრობი საღებავი, მიერთებული კოვალენტურად ბეკონის 3'ბოლოზე. როდესაც ბეკონი ჩაკეტილია და წარმოქმნის მარყუჟს, იგი ანეიტრალებს ფლუროფორის ნათებას.

იმ შემთხვევაში, თუ საკვლევი მატრიცული ნუკლეინის მჟავის თანამიმდევრობა დაემთხვევა ბეკონის მარყუჟის თანამიმდევრობას, მოხდება რა მათი ურთიერთკომპლემენტარული ჰიბრიდიზაცია, ფლუროფორი და ჩამქრობი დაშორდებიან ერთმანეთს და ფლუროფორი დაიწყებს ფლუროსცენტულ გამოსხივებას. ამ გამოსხივების რეგისტრაცია ხდება რეალური დროის თერმოციკლერით.

ორი ზონდის გამოყენება ენერგიის რეზონანსული გადაცემით (LightCycler assay)

ამპლიფიკაციის პროდუქტების დაგროვების დეტექციის ეს მეთოდი გამოირჩევა მაღალი სპეციფიკურობით, რადგან ფლურესცენციის მომატება ხდება ამპლიკონებთან ორი ზონდის ერთდროულად დაკავშირების გამო. პრინციპი შემდეგში მდგომარეობს: ზონდ 1-ის 3' ბოლოში არსებული ფლუროფორიდან ენერგია გადაეცემა ზონდ 2-ის 5' ბოლში მდებარე ფლუროფორს. ფლუროფორებს შოროს მანძილი შეადგენს 1-3 ნუკლეოტიდს (სურ. 25 გვ.109) ორი ზონდის გამოყენება.

ორივე ზონდის მატრიცულ დნმ-თან ერთდროულად დაკავშირე-ბისას, პირველი ზონდის გამოსხივებული ენერგია გადაეცემა მეორე ზონდის ფლუროფორს, ხოლო მეორე ფლუროფორიდან გამოსხივებული ენერგია იზომება ხელსაწყოს საშუალებით. ამგვარად, იზრდება ანალიზის სპეციფიკურობა.

პჯრ რეალურ დროში SYBR Green I გამოყენებით.

SYBR Green I წარმოადგენს ასიმეტრიულ ციანიდურ საღებავს, რომელიც გამოიყენება ნუკლეინის მჟავების შესაღებად. უკავშირდება რა დნმ-ს, დნმ- SYBR Green I კომპლექსი შთანთქავს ლურჯ სხივს (λmax

= 488 ნმ) და იძლევა (გამოასხივებს) მწვანე ნათებას (λmax = 522 ნმ). აღნიშნულ მოვლენას ეფუძნება "პჯრ რეალურ დროში" მეთოდის ეს ნაირსახეობა. SYBR Green I უკავშირდება რა მატრიცაზე წარმოქმნილ ორჯაჭვიან დნმ-ს, ფლურესცენცია მკვეთრად მატულობს. (სურ.26. გვ.109) პჯრ რეალურ დროში SYBR Green I გამოყენებით.) უნდა აღინიშნოს, რომ ფლურესცენციის მომატება შესაძლოა დაკავშირებული იყოს როგორც სპეციფიკური პროდუქტის წარმოქმნასთან, ასევე არასპეციფიკურ მოვლენებთან, მაგალითად, პრაიმერ-დიმერის წარმოქმნასთან. ამ მოვლენის თავიდან ასაცილებლად აუცილებელია ამპლიკონების დამატებითი შესწავლა ე.წ. ლღობის მრუდების (melting curves) აგებით.

ლღობის მრუდები

ამ მიზნის მისაღწევად, პჯრ-ის დასრულების შემდეგ ხდება სარეაქციო არის გაცხელება და, პარალელურად, ფლურესცენციის ინტენსივობის მუდმივი გაზომვა. ამპლიფიკაციის პროდუქტის ლღობის ტემპერატურის მიღწევისას ფლურესცენცია მკვეთრად კლებულობს. (სურ. 27. გვ. 109) ლღობის მრუდი.

გრაფიკზე ფლურესცენციის ყოველი მკვეთრი შემცირება შეესაბამება ელექტროფორეზის შედეგად მიღებულ სათანადო ზოლს, ანუ სხვადასხვა ამპლიკონს. ლღობის მრუდების გამოყენება არ შემოიფარგლება მხოლოდ ამპლიკონების დეტექციით. მისი საშუალებით (მაგალითად, ბეკონისა და ტაქმანის შემთხვევაში) შესაძლებელია წერტილოვანი მუტაციის გამოვლენა, რომელიც მოთავსებულია მატრიცული დნმ-სა და ზონდის დაკავშირების უბანში. ასეთი მუტაციის არსებობისას იცვლება ზონდის ლღობის ტემპერატურა და ეს ცვლილება აისახება ლღობის მრუდების გრაფიკზე. თანამედროვე აპარატურაში ეს პროცესი ავტომატიზირებულია და არ მოითხოვს ოპერატორისგან დამატებითი მანიპულაციების ჩატარებას.

ელექტროფორეზი

ელექტროფორეზი არის ცილებისა და ნუკლეინის მჟავების შესწავლის ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი მეთოდი. თანამედროვე კვლევებში, რომლებშიც შეისწავლება ცილებისა და ნუკლეინის მჟავების თვისებები და ფუნქციები, სხვა მეთოდებთან ერთად, ფაქტობრივად, ყოველთვის გამოიყენება ელექრტოფორეზიც. აღნიშნული მეთოდი საშუალებას იძლევა ერთმანეთისგან დავაცალკევოთ მაკრომოლეკულები ისეთი ძირითადი პარამეტრების მიხედვით, როგორიცაა ზომა, მოლეკულური მასა, სივრცითი კონფიგურაცია, მეორეული სტრუქტურა და ელექტრული მუხტი.

მეთოდის არსი შემდეგში მდგომარეობს: მაკრომოლეკულებს, რომლებიც იმყოფებიან ბუფერულ ხსნარში, აქვთ სუმარული ელექტრული მუხტი, რომლის სიდიდე და მნიშვნელობა დამოკიდებულია გარემომცველი არის pH-ზე. იმ შემთხვევაში თუ ამგვარ ხსნარში, რომელსაც წინასწარ მოვათავსებთ საიზოლაციო მასალის მილში (დავუშვათ, მინის მილში) და მასში გავატარებთ ელექტრულ დენს, მაშინ მილაკის გასწვრივ წარმოიქმნება განსაზღვრული ძაბვის გრადიენტი, ანუ ჩამოყალიბდება ელექტრონული ველი. მისი დაძაბულობა იზომება მილაკის ბოლოებს შორის პოტენციალთა სხვაობის შეფარდებით მილაკის სიგრძეზე (ვოლტი/სმ). წარმოქმნილი ველის მოქმედებით მაკრომოლეკულები თავიანთი სუმარული (ჯამური) მუხტით მიგრირებენ კათოდის ან ანოდის მიმართულებით. ამ დროს ხახუნი, რომელიც წარმოიქმნება მაკრომოლეკულების შეხებისას გარემომცველ არესთან, ზღუდავს მიგრაციის სიჩქარეს. ზომებისა და მუხტის სიდიდის მიხედვით, მაკრომოლეკულებს ენიჭებათ სხვადასხვა სიჩქარე.

თანდათან საწყისი პრეპარატი, შედგენილი სხვადასხვა მოლეკულისაგან, იყოფა ერთნაირი მოლეკულების ზონებად, რომლებიც მოძრაობენ ერთი და იმავე სიჩქარით. გარკვეული დრიოს განმავლობაში აღნიშნული ზონები ნაწილდებიან მილაკის მთელ სიგრძეზე. (სურ.28 გვ.110) უმარტივესი ელექტროფორეზის აპარატის სქემა.

სურათზე მუშა მილაკთან ერთად, გამოსახულია ელექტროფორეზული სისტემის სხვა აუცილებელი კომპონენტებიც. უპირველეს ყოვლისა, ეს არის ორი ელექტროდი, (რომლებიც წარმოადგენენ პლატინის მავთულებს) და ამ ელექტროდების რეზერვუარები. რეზერვუარებში მოთავსებული ბუფერული ხსნარებისა და მილაკის საშუალებით ორ ელექტროდს შორის იკვრება ელექტრული წრედი. აღნიშნულ სისტემას აქვს ბევრი ნაკლოვანი მხარე. პირველ რიგში, თვალში საცემია ის გარემოება, რომ ზედა რეზერვუარიდან ბუფერული ხსნარი მილაკის გავლით ჩამოიცლება ქვედა რეზერვუარში. ამ პრობლემის გადაწყვეტა მარტივად შეძლება, თუ მილაკს მივცემთ U ფორმას. ასეთი ხელსაწყოები გამოიყენებოდა მეთოდის განვითარების ადრეულ ეტაპებზე. მთავარი უხერხულობა კონვექციის თავიდან აცილებაა, რომელიც დეფორმაციას უკეთებს და ურევს დაყოფილ ზონებს. ამიტომ თანამედროვე აპარატებში მილაკი ივსება გელით. გელის ჰიდროფილური და სივრცობრივი ცხაური აბრკოლებს სითხის ჩამოღვრასა და კონვექციას. გელში, რომელიც შეიცავს 80-99,5% წყალს, მიგრირებენ მაკრომოლეკულები და ამავე დროს ეჯახებიან გელის პოლიმერის ძაფებს. ეს პროცესი ზრდის ხახუნს და ამცირებს მიგრაციის სიჩქარეს. თუ გელის ცხაურის სივრცობრივი უჯრედების საშუალო დიამეტრი აღმოჩნდება მაკრომოლეკულის ტოლი, მაშინ მიგრაციის სიჩქარე ძალზე ეცემა და შესაძლებელია საერთოდ შეწყდეს, თუ ცილის ან ნუკლეინის მჟავას მოლეკულის სიდიდე განსაკუთრებით დიდია.

დღესდღეობით გამოიყენება პოლიაკრილამიდისა და საქაროზას გელები. პოლიმერის კონცენტრაციის ვარირებით, შესაძლებელია ფორების ფართე დიაპაზონის მქონე გელების მიღება. ამასთან, შესაძლებელია მაკრომოლეკულების ელექტრული მუხტის შეცვლა, ბუფერის pH ვარიირებით, ხოლო მათი კონფიგურაციის ცვლილება შესაძლებელია ბუფერში დენატურაციის აგენტებისა და დეტერგენტების დამატებით. მეთოდში შეტანილი ამგვარი ინოვაციური მოდიფიკაციები ელექტროფორეზულ მეთოდს ხდის ძალზე მოქნილს და სასურველს მაკრომოლეკულების კვლევებისთვის.

გარდა ზემოაღნიშნულისა, ელექტროფორეზულ მეთოდს თან სდევს გარკვეული სირთულეებიც. დასაყოფი მაკრომოლეკულები მაინც რჩება ხსნარში და მათი დიფუზია იწვევს ზონების წაშლას. ამას ემატება ხსნარში ელექტროდენის გატარებისას გამოყოფილი სითბოც. მაკრომოლეკულების მიგრაციის სიჩქარე ელექტრულ ველში დამოკიდებულია ტემპერატურაზე. გელის არათანაბარი გათბობა გამოიწვევს ზონების ცვლილებას და გააძნელებს მათ დაყოფას.

ელექტროფორეზის მიმდინარეობისას გახსნილი მაკრომოლეკულების ზონები უხილავია. პროცესის მიმდინარეობაზე დაკვირვების მიზნით, საკვლევ პრეპარატს უმატებენ საღებავს, რომელსაც ელექტრული მუხტის ისეთივე ნიშანი აქვს, როგორიც დასაყოფ მაკრომოლეკულებს. საღებავი და მაკრომოლეკულები ერთმანეთთან არ რეაგირებენ. საღებავი გადაადგილდება ელექტრულ ველში შეღებილი ზონის სახით. საღებავი იმდაგვარადაა შერჩეული, რომ დასაყოფი მაკრომოლეკულების მიგრაციის სიჩქარე საღებავის მოლეკულების მიგრაციის სიჩქარეზე დაბალი იყოს . როდესაც შეღებილი ზონა მიაღწევს მილაკის ბოლოს, ელექტროფორეზი დასრულებულად ითვლება.

ზონებად დაყოფილი ბიოპოლიმერების დიფუზიის თავიდან ასაცილებლად, უნდა მოხდეს მათი დაუყოვნებელი ფიქსაცია. ამისათვის საჭიროა გელის ამოღება მილაკიდან და მჟავა-სპირტხსნარში მოთავსება, რის შედეგადაც ცილები და ნუკლეინის მჟავები გამოილექებიან იმავე ადგილას, სადაც დასრულდა მათი მიგრაცია ელექტროფორეზის მსვლელობისას. ფიქსაციის შემდეგ საჭიროა დაყოფილი ზონების შეღებვა, რაც მიიღწევა გელის ჩალბობით საღებავ ხსნარში. ამ დროს საღებავი მჭიდროდ უკავშირდება ცილებსა და ნუკლეინის მჟავებს. შემდეგ აუცილებელია ჭარბი საღებავის მოშორება გამორეცხვით.

სურ. 29-ზე (გვ. 110) ნაჩვენებია მილაკში ჩატარებული ელექტროფორეზის პოლიაკრილამიდის შეღებილი გელი, სადაც კარგად ჩანს საწყისი ცილოვანი პრეპარატის დაყოფილი კომპონენტების ვიწრო ზოლები.

თანამედროვე ელექტროფორეზის აპარატებში ცილინდრული შუშის მილაკების ნაცვლად გამოიყენება შუშის თხელი ფირფიტები, რომელთა შორის ასხამენ გელს. ასეთი გელების უპირატესობა ისაა, რომ მათზე

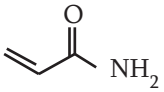
შეიძლება ერთდროულად დაიყოს რამდენიმე პრეპარატი. ჩვეულებრივ, პრეპარატები დაიტანება გელის კიდედან დაწყებული, მის გასწვრივ ერთმანეთისგან თანაბარ მანძილებზე. თითოეული პრეპარატი ელექტრულ ველში იყოფა ცალ-ცალკე, მეზობელი პრეპარატებისგან დამოუკიდებლად და წარმოქმნის საკუთარ დაყოფილ ზონებს.

სურ. 30 (გვ.110)-ზე გამოსახულია ასეთი ფირფიტა, სადაც ნათლად ჩანს პარალელურად დაყოფილი ზონები. თითოეულ ასეთ ზონაში შეღებილი ხაზების სახით შეიმჩნევა სხვადასხვა სიდიდის დაყოფილი ოლიგონუკლეოტიდები.

ფირფიტაზე ელექტროფორეზს კიდევ ერთი უპირატესობა აქვს: გელი ისხმება ერთდროულად, ანუ ბუფერის კონცენტრაცია, შემადგენლობა და ყველა სხვა დანამატის შემცველობა ერთნაირია გელის ნებისმიერ მონაკვეთში. შესაბამისად, ერთნაირი იქნება ელექტრული ველის რეჟიმი. ზემოაღნიშნული შესაძლებლობას იძლევა გელზე დატანილ ყველა პრეპარატს შევუქმნათ ერთნაირი პირობები, რაც აადვილებს მათ შედარებასა და მართებული დასკვნების გაკეთებას. ამ გარემოებებს თუ დავუმატებთ თხელი ფირფიტის უპირატესობას თერმული პროცესის თავიდან აცილების თვალსაზრისით (ცილინდრულ, მსხვილ გელთან შედარებით), ადვილად ასახსნელი ხდება თხელფირფიტიანი ელექტროფორეზის პოპულარობის მიზეზი.

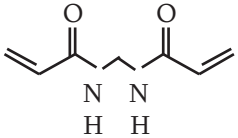
გელები ელექტროფორეზისთვის

პოლიაკრილამიდის გელი



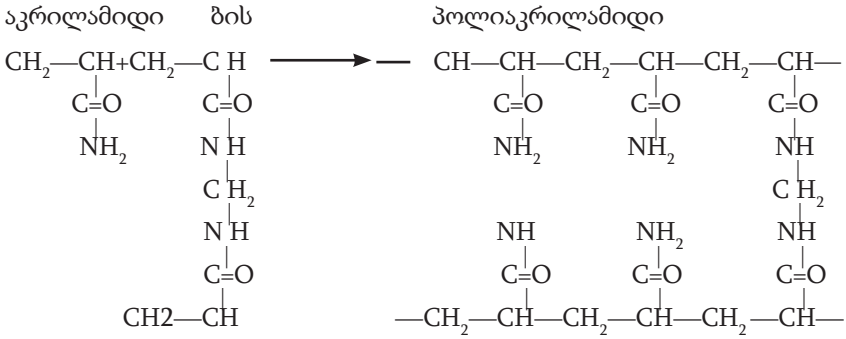
აკრილამიდის მოლეკულა

აკრილამიდი ($CH_2 = CH — CONH_2$) წარმოადგენს თეთრი ფერის კრისტალურ ფხვნილს. ელექტროფორეზისთვის ვარგისია, თუ იგი არ შეიცავს 0.05% მეტ აკრილის მჟავას და მისი 5%-იანი წყალხსნარის pH მნიშვნელობა არის არანაკლებ 5, ხოლო ოპტიკური სიმკვრივე მისი 1%-იანი ხსნარისათვის 290ნმ-ზე, არ აღემატება 0.15-ს. აკრილამიდი მომწამვლელი ნივთიერებაა, იგი მოქმედებს კანზე და ნერვულ სისტემაზე და ამიტომაც მისი აწონვისა და გახსნისას საჭიროა ვიხმაროთ ხელთათმანები, ხოლო პროცედურა ჩავატაროთ ამწოვ კარადაში.



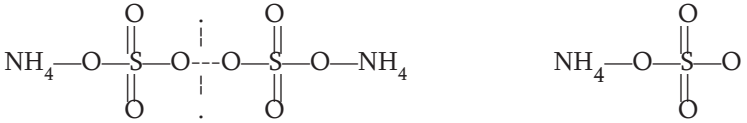
ბისკრილამიდის მოლეკულა

NN'-მეთილენბისაკრილამიდი $(CH_2 = CH — CONH)_2 – CH_2$ გამოიყენება აკრილამიდის ხაზოვანი პოლიმერების დასაკავშირებლად (ჩასაკერად).

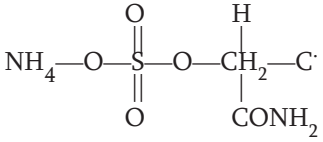


ამონიუმის პერსულფატი თეთრი კრისტალური ნივთიერებაა.

იგი გამოიყენება პოლიმერიზაციის პროცესის ინიცირებისთვის. ჟანგბადის ატომებს შორის კავშირის გაწყვეტის შედეგად, წარმოიქმნება ორი, საკმაოდ სიცოცხლისუნარიანი თავისუფალი რადიკალი, რომლებსაც გააჩნიათ თითო-თითო გაუწყვილებელი ელექტრონი ჟანგბადის ატომთან.



ასეთი რადიკალი ასტიმულირებს აკრილამიდის მოლეკულაში ორმაგი კავშირის გაწყვეტას და იმგვარად უერთდება მათ, რომ კვლავ წარმოიქმნება რადიკალი გაუწყვილებელი ელექტრონით, მაგრამ უკვე ნახშირბადის ატომთან.



ეს რადიკალი, თავის მხრივ, იწვევს ორმაგი კავშირის გაწყვეტას აკრილამიდის სხვა მოლეკულაში ახალი რადიკალის წარმოქმნით და ა.შ. პოლიმერიზაციის ჯაჭვური რეაქცია მანამდე მიმდინარეობს, სანამ ორი რადიკალი არ შეხვდება ერთმანეთს და წარმოქმნის ჩვეულებრივ კოვალენტურ ბმას. ამავე მექანიზმით მზარდ ხაზობრივ პოლიმერში თავისი ერთ-ერთი ვინილის ჯგუფით ჩაერთვება მეთილენის აკრილამიდი. მისი მეორე ბოლო ამავე პრინციპით მოხვდება მეორე ხაზობრივ ჯაჭვში და, ამგვარად, წარმოიქმნება ე.წ. ნაკერი.

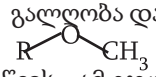
ტეტრამეთილეთილენდიამინი (ტემედი) $(CH_3)_2N—CH_2—CH_2—N(CH_3)_2$ – წარმოადგენს უფერო ხსნარს, კუთრი წონით 0,78 გ/სმ^3 . ტემედი არ არის უშუალოდ პოლიმერიზაციის ინიციატორი, თუმცა ის ემსახურება ამ პროცესს, როგორც კატალიზატორი.

აგაროზა

სიმტკიცისა და მაკროფორიანობის შეფარდება აგაროზას გელებს ხდის შეუცვლელს ისეთი მაკრომოლეკულებისათვის, როგორიცაა ნუკლეინის მჟავები. აგაროზა წარმოადგენს ხაზოვანი პოლისაქარიდის – აგარის განსაკუთრებულად გასუფთავებულ ფრაქციას. აგარი მიიღება ზოგიერთი სახის ზღვის წყალმცენარეებიდან. საქაროზას პოლიმერში მონაცვლეობენ β-D – გალაქტოპირანოზა და 3,6 –ანჰიდრო- α-L – გალაქტოპირამოზა. აგაროზის მოლეკულირი მასაა 10^4 — 10^5. გელის წარმოქმნა ხდება სივრცობრივ ცხაურში ძაფების გადაბმით იონებს შორის არსებული წყალბადური ბმების ხარჯზე.

84 – 96°C ტემპერატურაზე (ზოგიერთი სახის აგაროზისათვის 70°C-ზე) აგაროზას ხსნარი გარდაიქმნება გამჭვირვალე სითხედ, ანუ ლღვება.

აგაროზას ხსნარი გამყარებისას წარმოქმნის გელს, ეს ხდება 36 – 42°C ტემპერატურაზე. შემდეგ შეაცხელებენ, რასაც მოსდევს გაგრილება 50-55°C და ჩასხმა სათანადო ყალიბში. აღსანიშნავია, რომ იგი არ განიცდის თერმულ დეფორმაციებს.

გალღობა და გელის წარმოქმნა დამოკიდებულია აგაროზაში მეტოქსი  ჯგუფების შემცველობაზე, რომელთა რაოდენობაც 3 – 4% აღწევს. ამ ჯგუფების არსებობა აფერხებს გელის წარმოქმნის პროცესს. აგაროზა შეიცავს გოგირდმჟავა ეთერსაც. მათი არსებობა გავლენას ახდენს არა მხოლოდ ლღობასა და გელის წარმოქმნაზე, არამედ თავად ელექტროფორეზის მიმდინარეობის პროცესზე. კონკრეტულად ისინი პასუხისმგებლები არიან ე.წ ენდოსმოსის პროცესზე, რომელიც ხდება ელექტროფორეზის მიმდინარეობისას.

ამ პროცესის არსი შემდეგია:

უარყოფითად დამუხტული გოგირდმჟავას ნაშთი მკვიდრად უკავშირდება აგაროზას პოლიმერის ძაფებს. შესაბამისად, დადებითად დამუხტული იონები ამ დროს იმყოფებიან წყლის ფაზაში და ელექტრული ველის მოქმედებით მიგრირებენ კათოდის მიმართულებით. მათ ადგილს იკავებენ ანოდიდან მომავალი კათიონები. წარმოიქმნება დამატებითი დენი ძლიერ ჰიდრატირებული კათიონებისა, რომლებიც ქაჩავენ გელში არსებულ წყლის მასას და მასთან ერთად გელის წყლოვან ფაზაში გახსნილ მაკრომოლეკულებს. ისინი დრეიფობენ (მიყვებიან) ხსნარს და ხდება ამ მოძრაობის თანხვედრა მოძრაობასთან, რომელიც გამოწვეულია ელექტრული ველით.

აგაროზის გელში ელექტროფორეზისას იყოფიან უარყოფითად დამუხტული მაკრომოლეკულები, რომლებიც მიგრირებენ ანოდისკენ. ენდოსმოსი მიმართულია საწინააღმდეგო მიმართულებით და აუარესებს დაყოფის ხარისხს.

აგაროზას კომერციულ პრეპარატებში სულფატების შემცველობა არ აღემატება 0.5%-ს. აგაროზას პრეპარატები, რომლებიც ხასიათდებიან სუსტად გამოხატული ენდოსმოსით, შეიცავენ 0.3%-ზე ნაკლებ სულფატს. თუ საჭიროა აგაროზას გასუფთავება სულფატის იონისაგან, იგი მუშავდება 0.05%-იან ნატრიუმის ბოროჰიდრატის 1M NaOH და გამოილექება/დაილექება 50%-იანი ეთანოლით. (სურ. 31. გვ.111) ენდოსმოსის გავლენა აგროზას გელში ორჯაჭვიანი დნმ-ს ფრაქციონირებაზე.

თუ როგორ შეიძლება იმოქმედოს ენდოსმოსმა ელექტროფორეზის შედეგებზე, ნაჩვენებია სურ. 31-ზე(გვ.109). ექსპერიმენტში გამოყენებული იყო სამი სახის აგაროზა სხვადასხვა ენდოსმოსური მაჩვენებლით (-mr სიდიდე შესაბამისად 0.081, 0.175 და 0.441). ექსპერიმენტი ჩატარებულია სამ პარალელურ 1% აგაროზას ზოლზე, რომლებზეც იყოფოდა სამი სხვადასხვა ტიპის დნმ: ფაგ FX 174 სუპერსპირალური დნმ, რგოლისებური და სწორხაზოვანი დნმ. ენდოსმოსის ზრდა არა მარტო ამცირებდა მაკრომოლეკულების მიგრაციის სიჩქარეს (სულ მცირე, სამჯერ მაინც), არამედ ცვლიდა მათი ხაზების ფარდობრივ პოზიციას. შეიძლება ითქვას, რომ სხვადასხვა ტიპის დნმ ენდოსმოსის გავლენით განსხვავებულად შეიძლება მოძრაობდეს.

ენდოსმოსის ხარისხი რაოდენობრივად ფასდება როგორც კოეფიციენტი ფარდოფითი მიგრაციისა. მინუსის ნიშანი აღნიშნავს ნუკლეინის მჟავების დრეიფს მათი მოძრაობის საწინააღმდეგოდ.

კოეფიციენტი საჩქარეების ფარდობაა – დაუმუხტავი პოლიმერის მიგრაციის სიჩქარის (მხოლოდ ენდოსმოსის ხარჯზე) ფარდობას სტრუქტურულად მისი მსგავსი პოლიანიონის მოძრაობის სიჩქარესთან, მოცემული ტიპის აგაროზის გელის ელექტროფორეზის დროს.

დაბალი ხარისხის ენდოსმოსის მქონე აგაროზასთვის – აგაროზას ტიპი LE – აღნიშნული კოეფიციენტი არის —m_r= 0,1 — 0,15. HE აგაროზას ტიპისა-თვის დამახასიათებელია ენდოსმისის მაღალი ხარისხი (—m_r = 0,23 — 0,26). ME ტიპის აგაროზას უკავია შუალედური მდგომარეობა ორ მოხსენიებულ აგაროზას ტიპს შორის და მისი ენდოსმოსის ხარისხია (— m_r = 0,15 — 0,2).

აგაროზას კონცენტრაციის შერჩევისას გათვალისწინებული უნდა იქნეს ფრაქციონირებადი მაკრომოლეკულის სიდიდე. საშუალოდ 2%-იანი აგაროზას გელის ფორების სიდიდე დაახლოებით შეესაბამება სფერული ფორმის ბიოპოლიმერის მოლეკულას მოლეკულური მასით 50 მილიონი დალტონი.

აგაროზას შედარებით მაღალი კონცენტრაციები გამოიყენება გელ-ფილტრაციის დროს.

ელექტროფორეზისას გელის ფორები, ისე უნდა იქნეს შერჩეული, რომ მათ შეანელონ მაკრომოლეკულების მიგრაცია ელექტრულ ველში ხახუნის ძალის გავლენით. ამგვარად, ელექტროფორეზისთვის 0.4 – 2%-იანი გელები ყველაზე მეტად გამოსადეგია.

ქვემოთ ჩამოთვლილია ფართოდ გავრცელებული აგაროზას გელების კონცენტრაციების (%-ში) ნიმუშები:

1. ვირუსებისა და პლაზმიდების მაღალმოლეკულური დნმ 0.4
2. რესტრიქციული დნმ (5000-20000 ფუძე-წყვილი) 0.7
3. დენატურირებული ტ-რნმ 1.0
4. რეტროვირუსების ორჯაჭვიანი რნმ (500-5000 ფუძე-წყვილი) 1.5
5. რიბოსობული რნმ 1.75
6. ნატივური ტ-რნმ, რესტრიქციული დნმ (100-1000 ფუძე-წყვილი) 2.0

ორგანზომილებიანი ელექტროფორეზი

მიუხედავად მრავალი თანამედროვე ალტერნატული ტექნოლოგიისა, ორგანზომილებიანი ელექტროფორეზი ამჟამად ერთადერთი მეთოდია, რომელიც რუტინულად გამოიყენება ცილების რთული ნარევის პარალელური, რაოდენობრივი ექსპრესიის შედარებისათვის. მისი საშუალებით შესაძლებელია ინტაქტური ცილების რუკის შექმნა, რომელიც ასახავს ცვლილებებს ცილების ექსპრესიის დონეზე, იზოფორმებისა და პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციების მიხედვით.

ამ მეთოდით ცილების დაყოფა ხდება ორი ერთმანეთისაგან დამოუკიდებელი პარამეტრის მიხედვით, ორ საფეხურად. პირველი საფეხური იზოელექტრული ფოკუსირებაა, რომელიც ყოფს ცილებს იზოელექტრული წერტილების მიხედვით. მეორე საფეხურია, თქვენთვის უკვე ცნობილი, ნატრიუმის დოდეცილ-სულფატის პოლიაკრილამიდის გელელექტროფორეზი, რომლის საშუალებითაც ცილები მოლეკულური წონის მიხედვით იყოფიან. ორგანზომილებიანი ელექტროფორეზის საშუალებით მიღებული ყოველი წერტილი ნიმუშის ცალკეულ ცილოვან მოლეკულას შეესაბამება. ამ მეთოდით შეიძლება ათასობით სხვადასხვა ცილოვანი მოლეკულის დაყოფა. ამავე დროს, თითოეულ მათგანისათვის შესაძლებელია იზოელექტრული წერტილისა და მოლეკულური წონის შესახებ ინფორმაციის მიღება.

ორგანზომილებიანი ელექტროფორეზის მეთოდი პირველად 1975 წელს მეცნიერ ო'ფარელის მიერ იყო შემოთავაზებული. მეთოდის თავდაპირველ ვარიანტში, პირველ საფეხურზე გამოიყენებოდა ვიწრო მილებში კარიერ-ამფოლიტების შემცველი პოლიაკრილამიდის გელი. თუმცა ამ მეთოდის დიდი პერსპექტივა არასოდეს იწვევდა ეჭვს, მაგრამ მის კიდევ უფრო ფართო გამოყენებას რამდენიმე მოდიფიკაციამ შეუწყო ხელი:

1. იმობილიზებული pH-ის გრადიენტებისა და იმობილინების რეაქტივების განვითარებამ ამ მეთოდის პირველ საფეხურს მიანიჭა მაღალი რეზოლუციის უნარი და ასევე მაღალი განმეორებადობის ხარისხი. კარიერ-ამფოლიტების მიერ გენერირებული pH-ის გრადიენტი ჩანაცვლდა იმობილიზებული pH-ის გრადიენტებით. გელები მილაკებში ჩაანაცვლეს პლასტიკურად გამაგრებული გელებით.
2. ორგანზომილებიანი ელექტროფორეზის პროცედურების ავტომატიზაციამ, ისეთების, როგორიცაა გელის გამოსახულების ანალიზი, ცილოვანი წერტილის ამოღება, დაშლა და ნიმუშების მომზადება მასსპექტრომეტრიისათვის, დიდად გააადვილა და მაღალ საფეხურზე აიყვანა ცილების ანალიზი და იდენტიფიკაცია.
3. დამუშავებულია მასსპეტრომეტრიის ახალი მიდგომები, რომლის საშუალებითაც შესაძლებელია პეპტიდებისა და ცილების ძალიან მცირე რაოდენობების ანალიზი და იდენტიფიკაცია
4. ხელმისაწვდომია უფრო ძლიერი და, ამავდროულად, იაფი კომპიუტერული პროგრამები, რომლებიც ეფექტურად უზრუნველ-ყოფენ ორგანზომილებიანი ელექტროფორეგრამების დამუშავებას.
5. ხელმისაწვდომია მთელი რიგი ორგანიზმების გენომის მონაცემები, რაც აადვილებს ორგანზომილებიანი ელექტროფორეზით დაცალ-კევებული ცილოვანი მოლეკულის მაკოდირებელი გენის სწრაფ იდენტიფიკაციას.
6. ყოველდღიურად მატულობს თავისუფლად ხელმისაწვდომი მონაცემები ცილოვანი მოლეკულების ამინომჟავური თანა-მიმდევრობების შესახებ. ასევე ხელმისაწვდომია ორგანზომილებიანი ელექტროფორეგრამები, რაც ექსპერიმენტული მონაცემების ეფექტური შედარებების საშუალებას იძლევა.

ყველაზე უფრო ფართო გამოყენებას ორგანზომილებიანი ელექტრო-ფორეზი პროტეომიკის სფეროში პოულობს.

პირველი მიმართულება – იზოელექტრული ფოკუსირება

იზოელექტრული ფოკუსირება ელექტროფორეზული მეთოდია, რომელიც აცალკავებს ცილებს იზოელექტრული წერტილის მიხედვით. ცილები ამფოტერული მოლეკულებია: ისინი ატარებენ დადებით, უარყოფით ან ნულოვან ჯამურ მუხტს, მათი გარემომცველი არეს pH-ის მიხედვით (სურ. 32. გვ.111) ცილების ჯამური მუხტი წარმოადგენს ყველა ამინომჟავას გვერდითი ჯაჭვების და ამინო და კარბოქსილის ბოლოების უარყოფითი და დადებითი მუხტების ჯამს. იზოელექტრული წერტილი ეს არის pH-ის სპეციფიკური მნიშვნელობა, როდესაც ცილოვანი მოლეკულის ჯამური მუხტი 0-ის ტოლია. ცილები არიან დადებითად დამუხტულები, როდესაც გარემოს pH-ის მნიშვნელობა მათ

იზოელექტრულ წერტილზე დაბალია, აქვთ უარყოფითი მუხტი თუ pH იზოლექტრულ წერტილზე მაღალია. ჩვენ თუ ავაგებთ ჯამური მუხტის გარემომცველ pH-ზე დამოკიდებულების გრაფიკს, მრუდის X ღერძთან გადაკვეთა მოცემული ცილოვანი მოლეკულის იზოელექტრულ წერტილის ტოლი იქნება (სურ. 32.გვ.111) ჯამური მუხტის გარემომცველ pH-ზე დამოკიდებულების გრაფიკი. მრუდის X ღერძთან გადაკვეთა მოცემული ცილოვანი მოლეკულის იზოელექტრულ წერტილის ტოლია.

pH-ის გრადიენტის არსებობა უაღრესად მნიშვნელოვანია იზოელექტრული ფოკუსირებისათვის. pH-ის გრადიენტში და ელექტრული ველის ზეგავლენით, ცილოვანი მოლეკულა მიაღწევს გრადიენტის იმ წერტილს, სადაც მისი ჯამური მუხტი ნულის ტოლი იქნება. ცილოვანი მოლეკულა დადებითი ჯამური მუხტით გადაადგილდება კათოდისაკენ, მისი დადებითი მუხტი თანდათან დაიკლებს და საბოლოოდ მიაღწევს თავისი იზოელეტრული წერტილის შესაბამის ადგილამდე. ცილოვანი მოლეკულა უარყოფითი ჯამური მუხტით გადაადგილდება ანოდისაკენ; პროგრესულად მისი უარყოფითი მუხტი დაიკლებს და საბოლოოდ მივა თავის იზოელეტრული წერტილის შესაბამის ადგილამდე. თუ ცილოვანი მოლეკულა დიფუზიით ჩამოცილდება თავისი იზოელექტრული წერტილის შესაბამის ადგილს, ის მომენტალურად შეიძენს მუხტს და დაბრუნდება უკან. ეს არის იზოელექტრული **ფოკუსირების ეფექტი,** რომლის საშუალებითაც ცილოვანი მოლეკულები კონცენტრირდებიან თავიანთ იზოელექტრული წერტილში და შესაძლებელი ხდება ცილების დაყოფა მუხტის მიხედვით, მცირე განსხვავებების არსებობის საფუძველზე.

გაყოფადობა დამოკიდებულია pH-ის გრადიენტის დახრილობაზე და ელექტრული ველის სიძლიერეზე. ამის გამო იზოელექტრული ფოკუსირება მიმდინარეობს მაღალ ვოლტაჟზე (1000V- ზე მეტი). როდესაც ცილები აღწევენ თავიანთ საბოლოო მდგომარეობას pH-ის გრადიენტში, ამ დროს ძალიან მცირე მოძრაობაა სისტემაში, რასაც მივყავართ ძალიან დაბალ საბოლოო გამტარობამდე (როგორც წესი, მიკროამპერების საზღვარში). მოცემული ნიმუშის იზოელექტრული ფოკუსირება მოცემულ ელექტროფორეზულ სისტემაში ტარდება მუდმივი ვოლტი X საათების განმავლობაში. თუ იზოელექტრული ფოკუსირება ჩატარებულია დენატურირებად პირობებში, მაშინ ყველაზე უფრო მაღალი და მკვეთრი დაყოფადობა მიიღწევა. მთლიანი დენატურაცია და სოლუბილიზაცია მიიღწევა შარდოვანას, დეტერგენტისა და აღმდგენელის ნარევით. ამ დროს თითოეული ცილა მხოლოდ ერთ კონფორმაციაში გვხვდება, აგრეგაციის გარეშე, რაც ამცირებს მოლეკულათაშორის ურთიერთქმედებებს (იხ. შემდეგი ქვეთავი „ნიმუშის მომზადება").

თავდაპირველად იზოელექტრული ფოკუსირება ტარდებოდა კარიერული ამფოლინებით შექმნილი pH-ის გრადიენტის საშუალებით და პოლიაკრილამიდის გელი ჩასხმული იყო შუშის მილებში. კარიერული ამფოლინები წარმოადგენდნენ მცირე ზომის, ხსნად ამფოტერულ მოლეკულებს მაღალი ბუფერული ტევადობით მათი იზოელექტრული წერტილის გარშემო. როდესაც კარიერული ამფოლინების ნარევს მოსდებენ ძაბვას, კარიერული ამფოლინები ყველაზე მაღალი იზოელექტრული წერტილით (ყველაზე დიდი უარყოფითი მუხტით) მიემართებიან ანოდისაკენ; ხოლო ყველაზე დაბალი იზოელექტრული წერტილის მატარებლები (ყველაზე დიდი დადებითი მუხტით) მიემართებიან კათოდისაკენ. სხვა კარიერული ამფოლინები თავსდებიან თავიანთი იზოელექტრული წერტილების მიხედვით ამ ორ ექსტრემალურ წერტილს შორის და აბუფერენ გარემოს შესაბამის pH-ზე. შედეგს წარმოადგენს pH-ის უწყვეტი გრადიენტი.

კარიერული ამფოლიტებით შექმნილი pH-ის გრადიენტს მრავალი შეზღუდვა და პრობლემა ახასიათებდა. ამის სანაცვლოდ, განვითარებული და შემოთავაზებული იყო იმობილიზებული pH-ის გრადიენტი (იპგ). შემდგომში ის 2-განზომილებიანი ფორეზის პირველი მიმართულებისა-თვის იქნა გამოყენებული.

იმობილიზებული pH-ის გრადიენტი იქმნება პოლიაკრილამიდის გელში მჟავე და ფუძე ბუფერული ჯგუფების კოვალენტური ჩართვით. ამ პროცესს ადგილი აქვს, როდესაც პოლიაკრილამიდის გელის ჩასხმა ხდება. იმუბოლინების ბუფერები წარმოადგენენ მოლეკულებს, რომელთაც გააჩნიათ ერთი მჟავური ან ფუძე მაბუფერირებელი ჯგუფი და დაკავშირებული არიან აკრილამიდის მონომერთან. ქვემოთ მოცემულია იმუბოლინის ზოგადი სტრუქტურა, სადაც R სუსტი მჟავე ან ფუძე მაბუფერირებელი ჯგუფია:

$$CH_2{=}\,CH{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}NH{-}R$$

იმობილიზებული pH-ის გრადიენტი ფორმირდება ორი ხსნარის საშუალებით: ერთი შეიცავს აკრილამიდის ბუფერის შედარებით მჟავე ნარევს, ხოლო მეორე – შედარებით ფუძე ბუფერულ ნარევს. ამ ორ ხსნარში სხვადასხვა ბუფერების კონცენტრაცია განაპირობებს წარმოქმნილი pH გრადიენტის ფორმას და საზღვრებს. ორივე ხსნარი შეიცავს აკრილამიდის მონომერებს და კატალიზატორებს. პოლიმერიზაციის პროცესში ბუფერის აკრილამიდური ნაწილი კოპოლიმერიზაციას განიცდის აკრილამიდთან და ბისაკრილამიდთან. სურ. 33 (გვ. 111) წარმოადგენს პოლიაკრილამიდური მატრიქსის გრაფიკულ გამოსახულებას, მასში ჩართული ბუფერული ჯგუფებით: სურ.33. გვ. 111. პოლიაკრილამიდური მატრიქსი, მასში ჩართული ბუფერული ჯგუფებით.

ადვილი ხმარებისათვის და მაღალი ეფექტურობისათვის იმობილინ მშრალი სტრიპ-გელები (ზოლიანი გელები) ფორმირდება პლასტმასაზე. კატალიზატორებისა და არაპოლიმერიზებული მონომერების მოსაშორებლად გელი ირეცხება. ამ კომპონენტებმა შეიძლება განახორციელონ ცილების მოდიფიცირება და შესაბამისად ზეგავლენა მოახდინონ პირველი მიმართულების მიმდინარეობაზე. საბოლოოდ გელი შრება და იჭრება 3მმ-ის სიგანის ზოლებად. ცდის წინ ხდება მათი რეჰიდრატაცია, სპეციალური სარეჰიდრატაციო ხსნარით, რომელიც შეიცავს ყველა აუცილებელ კომპონენტს იზოელექტრული ფოკუსირებისათვის. პროცესი დაბალ ტემპერატურასა და მაღალ ვოლტაჟზე უნდა მიმდინარეობდეს.

ისმის კითხვა: რა უპირატესობები აქვთ იმობილინ მშრალ ზოლოვან გელებს ჩვეულებრივი შუშის გელებთან და კარიერულ ამფოლინებთან შედარებით?! ეს უპირატესობებია:

1. იზოელექტრული ფოკუსირების შედეგი ბევრად უფრო განმეორებადია, რადგან კოვალენტურად დაფიქსირებულ გრადიენტს გადაადგილება არ შეუძლია;
2. პლასტმასაში დაფიქსირებული იმობილინ მშრალი სტრიპ (ზოლოვანი) გელები უფრო ადვილი მოსახმარია. ადვილია მათი ხელში აღება ხელთათმანით ან პინცეტით;
3. პლასტიკა იცავს გელს დაჭმუჭვნისა და გატეხვისაგან;
4. იმობილინ მშრალი სტრიპ-გელების ტექნოლოგია ზრდის ცილების დაყოფის ზღვრულ სიდიდეებს: შესაძლებელია უფრო მჟავე და უფრო ფუძე ცილების დაყოფა;
5. შესაძლებელია უფრო მეტი რაოდენობით ცილების დატანა;
6. ტოქსიკურ აკრილამიდთან კონტაქტი შემცირებულია;
7. იმობილინ მშრალ სტრიპ-გელებს ზუსტად განსაზღვრული სიგრძე გააჩნიათ, რაც გელის ვარიაციას ამცირებს;
8. იმობილინ მშრალი სტრიპ-გელები ეფექტურია pH-ის უკიდურეს ზღვრულ მნიშვნელობებზეც (3 და 11), რაც თითქმის ყველა ცილის დაყოფის საშუალებას იძლევა.

როგორ ავირჩიოთ გელის სიგძე და pH-ის გრადიენტი?

რაც უფრო მეტი სიგრძის არის იმობილინ მშრალი სტრიპ-გელები, მით უფრო მეტია დაყოფის ეფექტურობა. რასაკვირველია, ადვილი მისახვედრია, რომ რაც უფრო ვიწროა pH-ის გრადიენტის საზღვრები, მით უფრო მაღალეფექტიანია ამ საზღვრებში დაყოფის ხარისხი. ცილების ერთი და იმავე ნიმუშის დაყოფა, pH-ის სხვადასხვა გრადიენტის მიხედვით, მოცემულია სურ. 34-ზე (გვ.112). ამ სურათზე მოცემულია თაგვის ღვიძლის ექსტრაქტის ორგანზომილებიანი ელექტროფორეზი

pH-ის სხვადასხვა გრადიენტის გამოყენებით. სხვადასხვა ფერით შემოხაზული უბნები წარმოადგენენ სხვადასხვა ცილოვან ფრაქციას. pH-ის ყველაზე ფართე სპექტრის (3-11) გამოყენებისას დაყოფა სრულყოფილია და წარმოდგენილია ყველა ის ფრაქცია, რომელსაც შეიცავს შეზღუდული pH-ის ყველია გელი ერთად აღებული.

მეორე მიმართულება:

იზოელექტრული ფოკუსირების შემდეგ უნდა განხორციელდეს მეორე მიმართულება ნატრიუმის დოდეცილსულფატის გელელექტროფორეზი (ნდსგე). მისი ჩატარება 4 საფეხურს მოიცავს:

1. სისტემის მომზადება მეორე მიმართულების ელექტრო-ფორეზისათვის;
2. იმობულინ მშრალი სტრიპ-გელების გაწონასწორება – ნდს-ის შემცველ ბუფერში;
3. გაწონასწორებული იმობულინ მშრალი სტრიპ-გელების მოთავსება ნდსგ-გელზე;
4. ელექტროფორეზი.

გაწონასწორების საფეხურის მიზანია იმობულინ მშრალი სტრიპ-გელები გააჯეროს ნდსგე-ის კომპონენტებით. ეს გამაწონასწორებელი ხსნარი შეიცავს ბუფერს, შარდოვანას, გლიცეროლს, აღმდგენელს, ნდს-სა და საღებავს.

გამაწონასწორებელი ბუფერი წარმოდგენილია 75 მმოლი ტრისმარილმჟავათი, pH 8.8. ის ინარჩუნებს იმობულინ მშრალ სტრიპ-გელს ელექტროფორეზისათვის შესაბამის pH–ის დიაპაზონს.

შარდოვანა (6 მოლარული) გლიცეროლთან ერთად ამცირებს ელექტროენდოსმოზის ეფექტს ბუფერის სიბლანტის მომატებით. ელექტრო-ენდოსმოზი განპირობებულია ფიქსირებული მუხტების არსებობით იმუბოლინ მშრალი **სტრიპ**-გელებზე და შეიძლება ხელი შეუშალოს ცილების გადატანას მეორე მიმართულებაზე.

გლიცეროლი (30%) შარდოვანასთან ერთად ამცირებს ელექრო-ენდოსმოსს და აუმჯობესებს ცილების I მიმართულებიდან II-ზე გადატანას.

დიტიოტრეიტოლი (დტტ) ინარჩუნებს დენატურირებული, არაალ-კილირებული ცილების მთლიანად აღდგენილ ფორმას.

ნატრიუმის დოდეცილსულფატი (ნდს) – ახორციელებს ცილების დენატურირებას და წარმოქმნის დამუხტულ ცილა-ნდს კომპლექსებს.

იოდოაცეტამიდი ახორციელებს ცილების თიოლოური ჯგუფების ალკილირებას და ამრიგად, თავიდან აცილებულია მათი თავიდან დაჟანგვა ელექტროფორეზის დროს. ცილების თავიდან დაჟანგვამ შეიძლება გამოიწვიოს უამრავი არტეფაქტი. იოდოაცეტამიდი ასევე ახორციელებს ნარჩენი დიტიოტრეიტოლის ალკიკირებას და ამცირებს

არტეფაქტებს. იოდოაცეტამიდი იხმარება გაწონასწორების II საფეხურზე. ამ საფეხურზე იოდოაცეტამიდის ხმარება ამცირებს ცისტეინის ნაშთების არასასურველ რეაქციებს, რაც ძალიან მნიშვნელოვანია როდესაც დაყოფილ ცილებზე მასსპექტრომეტრია უნდა განხორციელდეს.

ნდდს-ის პოლიაკრილამიდის გელელექტროფორეზის საფუძვლები

ნდდს-ის პოლიაკრილამიდის გელელექტროფორეზი არის მეთოდი, რომლის საშუალებითაც პოლიპეპტიდები მათი მოლეკულური წონის მიხედვით იყოფიან.

„ნიმუშის მომზადება“

ზოგადი სტრატეგია

ორგანზომილებიანი ელექტროფორეზის შედეგებისათვის ნიმუშის შესაბამისად მომზადება ძალზე მნიშვნელოვანია. საწყისი წყაროს მიხედვით, არსებობს ცილოვანი ნიმუშების ტიპებს დიდი ნაირგვარობა, ამიტომ მოცემული ნიმუშის მომზადება ოპტიმალურად უნდა განისაზღვროს. ნიმუშის იდეალურად მომზადებისას უნდა მოხდეს ცილების მთლიანი სოლუბილიზაცია, დეზაგრეგაცია, დენატურაცია და აღდგენა.

ორგანზომილებიანი ფლუორესცენტული დიფერენციალური გელ-ელექტროფორეზისათვის ნიმუშის მომზადება განსხვავებულად მიმდინარეობს.

როდესაც ჩვენ ვირჩევთ ნიმუშის მომზადების სტრატეგიას, გათვიცნობიერებული უნდა გვქონდეს, რა საბოლოო მიზანს ემსახურება ორგანზომილებიანი ელექტროფორეზის ექსპერიმენტი. შესაძლო მიზნად დავსახოთ რაც შეიძლება მეტი ცილოვანი მოლეკულის აღმოჩენა ან მხოლოდ გარკვეული ცილოვანი ჯგუფების იდენტიფიცირება. რა არის უფრო მნიშვნელოვანი მთლიანი ნიმუშის დაყოფა თუ ცხადი განმეორებადი სურათი?

ნიმუშის მომზადების ყოველმა დამატებითმა საფეხურმა შეიძლება გააუმჯობესოს საბოლოო შედეგის ხარისხი, მაგრამ ასევე ყოველმა დამატებითმა საფეხურმა შეიძლება გამოიწვიოს ცილების გარკვეული ჯგუფის სელექციური დაკარგვა.

რთული ცილოვანი კომპლექსიდან, სპეციფიკური ცილების ჯგუფის დასახასიათებლად აუცილებელია, რომ ეს ცილები მთლიანად სოლუბილიზირებულნი იყვნენ ელექტროფორეზის პირობებში. სხვადასხვა ცილების ჯგუფის სოლუბილიზაციისათვის სხვადასხვა პირობაა საჭირო. სოლუბილიზაციის ეფექტურობა დამოკიდებულია უჯრედის დაშლის მეთოდზე, დეტერგენტის არჩევანსა და ხსნარის სხვა კომპონენტებზე. თუ ეს პროცესი ოპტიმიზირებული არ არის, ცილების დაყოფა არასრულია და შეიძლება ინფორმაციის დაკარგვაც მოხდეს.

გენური ინჟინერია

ბიოტექნოლოგიის ერთ-ერთი უმნიშვნელოვანესი ნაწილია გენური ინჟინერია. გენური ინჟინერია სათავეს იღებს მე-20 საუკუნის 70-იანი წლებიდან და მისი დანუშნულებაა ბაქტერიული, საფუარებისა თუ სხვადასხვა ეუკარიოტული უჯრედის გარდაქმნა სხვადასხვა ცილის მწარმოებელ უჯრედად.

ნაწლავის ჩხირის ბაქტერია (E. coli) ისეთი მნიშვნელოვანი ჰორმონების წყაროა, როგორიცაა ინსულინი და სომატოტროპინი. ადრე ინსულინი მიიღებოდა სხვადასხვა ცხოველის კუჭქვეშა ჯირკვლიდან. 100 გრამი ინსულინის მისაღებად საჭირო იყო 800-1000 კგ კუჭქვეშა ჯირკვალი. ძროხის ერთი ჯირკვალი იწონის 200-250 გრამს. აქედან გამომდინარე, მისი ფასი ძალიან მაღალი იყო და დიაბეტით დაავადებული მრავალი პაციენტისთვის – მიუწვდომელი. გარდა ამისა, ცხოველური ინსულინის შემადგენლობა განსხვავდება ადამიანის ინსულინის შემადგენლობისგან და მისი გამოყენება პაციენტებში იწვევდა გარკვეულ გართულებებს. 1978 წელს კომპანია ”Genentech”-ის მკვლევარებმა რეკონსტრუირებული ნაწლავის ჩხირიდან მიიღეს პირველი ხელოვნური ინსულინი. იგი არ შეიცავდა E. coli-ის ენდოტოქსიკურ ცილებს და სხვა მინარევებს, პაციენტებში არ იწვევდა გვერდით მოვლენებს. უკუტრანსკრიფტაზის საშუალებით რნმ-ის მატრიცაზე დნმ-ის კოპირების გზით, ბაქტერიის უჯრედში სინთეზირდა პროინსულინი. პროინსულინის გასუფთავებისა და დახლეჩის შედეგად მიიღეს ნატიური ინსულინი. 1000 ლიტრი კულტურალური ხსნარიდან შეიძლება 200 გრამი ჰორმონის მიღება, რაც შეესაბამება 1600 კგ ღორის ან ძროხის კუჭქვეშა ჯირკვლიდან მიღებული ინსულინის რაოდენობას.

სომატოტროპინი ადამიანის ზრდის ჰორმონია, რომელიც სინთეზირდება ჰიპოფიზში. ჰორმონის ნაკლებობა იწვევს ჰიპოფიზურ ქონდრისკაცობას. ამ პათოლოგიით დაავადებულ ბავშვებში 10 მგ/კგ სომატოტროპინის კვირაში სამჯერადი ინექცია იწვევს წელიწადში 6 სმ-ით ზრდას. ამ ჰორმონს ადრე გამოყოფდნენ გვამებიდან. გამოსავალი შეადგენდა 4-6 მგ-ს ერთ გვამზე. 1980 წელს კომპანია „Genentech“-მა შეიმუშავა ბაქტერიებიდან სომატოტროპინის მიღების ტექნოლოგია. ანალოგიური მეთოდებით მიიღება უსაფრთხო და იაფი ვაქცინები.

რეკომბინანტული დნმ-ის ტექნოლოგიაზე დაფუძნებულია მაღალსპეციფიკური დნმ-ზონდების მიღება, რომელთა მეშვეობით შეისწავლება გენების ექსპრესია ქსოვილებში, გენების ლოკალიზაცია ქრომოსომებში, მონათესავე გენების გამოვლინება. ამ ზონდების საშუალებით ხდება სხვადასხვა დაავადების დიაგნოსტიკა.

რეკომბინანტული დნმ-ის ტექნოლოგიამ საფუძველი დაუდო არატრადიციულ, ე.წ. „ცილა-გენი“ მიდგომას, რომელსაც „შექცევადი გენეტიკაც“ ეწოდება. ამ შემთხვევაში, თავდაპირველად, უჯრედიდან

გამოყოფენ ცილას, შემდეგ ახდენენ ამ ცილის მაკოდირებელი გენის კლონირებასა და მოდიფიცირებას ანუ მიიღებენ გენის მუტირებულ ფორმას, რომელიც კოდირებს ცილის შეცვლილ ფორმას. ახლადმიღებული გენი შეჰყავთ უჯრედში და მისი ექსპრესიის შემთხვევაში მასპინძელი უჯრედი და მისგან წარმოქმნილი უჯრედული თაობები იწყებენ შეცვლილი ცილის სინთეზირებას. ამგვარი მიდგომით შესაძლებელია დეფექტური გენების „გასწორებაც“ და მემკვიდრული დაავადებების მკურნალობაც.

ჰიბრიდული დნმ-ის განაყოფიერებულ კვერცხუჯრედში შეყვანით შესაძლებელია ტრანსგენური ორგანიზმების მიღება, რომლებშიც ექსპრესირებულია მუტანტი გენები და ისინი შთამომავლობასაც გადაეცემიან.

ცხოველთა გენეტიკური ტრანსფორმაცია შესაძლებლობას იძლევა, დადგინდეს ცალკეული გენებისა და მათი ცილოვანი პროდუქტების როლი სხვა გენების აქტივობაში. ასევე შესაძლებელია მათი მნიშვნელობის დადგენა სხვადასხვა პათოლოგიურ პროცესში. გენეტიკური ინჟინერიის დახმარებით გამოყვანილია ვირუსული ინფექციებისადმი მდგრადი ცხოველები, ასევე გამოყვანილია ადამიანისათვის სასარგებლო ნიშან-თვისებების მატარებელი ორგანიზმები. მაგალითად, სომატოტროპინის გენის შემცველი რეკომბინანტული დნმ-ის მიკროინექცია ბოცვრის ზიგოტაში, საშუალებას იძლევა მივიღოთ ტრანსგენური ცხოველი, რომელიც ხასიათდება ამ ჰორმონის ჰიპერპროდუქტიულობით. მიღებული ცხოველები გამოირჩევიან მკვეთრად გამოხატული აკრომეგალიით.

განვიხილოთ გენურ ინჟინერიაში გამოყენებული სისტემები და მეთოდები.

გენური ინჟინერიის მიზანია რეკომბინანტული დნმ-ის ისეთი მოლეკულების კონსტრუირება, რომელთა ჩანერგვა გენეტიკურ აპარატში ორგანიზმს შესძენს ადამიანისთვის სასარგებლო და გამოსადეგ თვისებებს. მაგალითად, „ბიორეაქტორების“ მიღება, ანუ ისეთი მიკროორგანიზმების, მცენარეების ან ცხოველების გამოყვანა, რომელთაც შეეძლებათ აწარმოონ ადამიანისათვის საჭირო ფარმაკოლოგიური ნივთიერებები. გენური ინჟინერია საშუალებას იძლევა მოვახდინოთ გენეტიკური პასპორტიზაცია, ჩავატაროთ დაავადებების სადიაგნოსტიკო გამოკვლევები, შევქმნათ დნმ-ვაქცინები, გენოთერაპიით ვუმკურნალოთ სხვადასხვა დაავადებას.

რეკომბინანტული დნმ-ის ტექნოლოგიაში გამოიყენება შემდეგი მეთოდები:

- დნმ-ის სპეციფიკური დახლეჩა რესტრიქციული ნუკლეაზებით, ცალკეული გენების გამოყოფისა და მანიპულაციების დაჩქარების მიზნით;

- გასუფთავებული გვამებიდან გამოსავლიანობა შეადგენდა 4-6 მგ-ს ერთ გვამზე. 1980 წელს კომპანია დნმ-ის ფრაგმენტის სწრაფი ნუკლეოტიდური სეკვენირება, რაც საშუალება იძლევა დადგინდეს გენის საზღვრები და გენის მიერ კოდირებული ამინომჟავური შემადგენლობა;
- რეკომბინანტული დნმ-ის კონსტრუირება;
- ნუკლეინის მჟავების ჰიბრიდიზაცია, რომელიც საშუალებას იძლევა დიდი სიზუსტით გამოვავლინოთ რნმ-ის და დნმ-ის სპეციფიკური თანმიმდევრობები;
- დნმ-ის ინვიტრო (in vitro) ამპლიფიკაცია პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციით ან კლონირება დნმ-ის ფრაგმენტის ბაქტერიულ უჯრედ-ში შეყვანით, რომელიც აწარმოებს ამ ფრაგმენტის მილიონიბით ასლს; რეკომბინანტული დნმ-ის ჩანერგვა უჯრედში ან ორგანიზმში.

გენურ ინჟინერიაში გამოყენებული ფერმენტები

გენურ ინჟინერიაში ფერმენტებს გადამწყვეტი როლი ენიჭებათ. მხოლოდ ფერმენტებს შეუძლიათ გახლიჩონ დნმ-ის მოლეკულა განსაზღვრულ ადგილებში ან ერთმანეთს მიაკერონ გახლეჩილი მონაკვეთები. მათი საშუალებით ხდება დნმ-ის გაორმაგება, რნმ-დან დნმ-ის მიღება და სხვა. გენური ინჟინერიის ამოცანაა ასეთი ფერმენტების შერჩევა და შესწავლა.

ფერმენტები, რომლებიც გამოიყენებიან გენურ ინჟინერიაში, არ გამოირჩევიან სახეობრივი სპეციფიკურობით, ანუ ისინი უნივერსალურები არიან და მათი გამოყენება შესაძლებელია ნებისმიერი წარმოშობის მქონე ორგანიზმებთან მუშაობისას.

ფერმენტები, რომლებიც მონაწილეობას იღებენ რეკომბინანტული დნმ-ის კონსტრუირებაში, შეიძლება დავყოთ რამდენიმე ჯგუფად:

- დნმ-ის ფრაგმენტირების ფერმენტები – რესტრიქტაზები;
- ფერმენტები, რომლებიც დნმ-ის ასინთეზებენ დნმ-ის მატრიცაზე (პოლიმერაზები) ან რნმ-ის მატრიცაზე (უკუტრანსკრიფტაზები);
- დნმ-ის ფრაგმენტების შემაერთებელი ფერმენტები (ლიგაზები);
- დნმ-ის ფრაგმენტების კიდურა უბნების შემცვლელი ფერმენტები.

პოლიმერაზები

1958 წელს კორნბერგმა და თანამშრომლებმა E.coli-დან გამოყვეს დნმ-პოლიმერაზა. მას ეწოდა დნმ-პოლიმერაზა I (Pol I). ის მონომერული პოლიპეპტიდური ჯაჭვია მოლეკულური წონით – 103 კილოდალტონი და შეიცავს სამ დომენს, რომლებსაც აქვთ სხვადასხვა ფერმენტული აქტივობა: 5’ – 3’ პოლიმერაზული, 5’ – 3’ ეგზონუკლეაზური და 3’ – 5’ ეგზონუკლეაზური. დნმ-პოლიმერაზა ვერ უკავშირდება რგოლოვან ორჯაჭვიან დნმ-ს, თუმცა, დნმ-ის დენატურაციის შემდეგ, შეუძლია

დაუკავშირდეს თითეულ ჯაჭვს თანაფარდობით: ერთი მოლეკულა ფერმენტი – დნმ-ის ყოველ 300 ნუკლეოტიდზე. აღნიშნული ფერმენტი დნმ-ს ორმაგ სპირალს უკავშირდება კიდურა უბნებზე, ხოლო ორმაგი სპირალის ერთჯაჭვიან უბნებს – დახლეჩის წერტილებში.

5' – 3' პოლიმერაზული აქტივობისათვის სავალდებულოა ერთ-ჯაჭვიანი დნმ-ისა და ამ ჯაჭვის კომპლემენტარული ფრაგმენტის (პრაიმერის) არსებობა.

3' – 5' ეგზონუკლეაზური აქტივობით ხდება ერთჯაჭვიანი ან ორჯაჭვიანი დნმ-ის ჰიდროლიზი 3'- OH ბოლოდან. 3' – 5' ნუკლეაზა დიეთერულ კავშირს ხლეჩს მხოლოდ დნმ-ის შეუწყვილებელ უბნებში. ცნობილია, რომ პოლიმერაზული რეაქციის მიმდინარეობისას, მზარდ ჯაჭვში, გარკვეული სიხშირით შეიძლება ჩაერთოს არაკომპლემენტარული ნუკლეოტიდი. პოლიმერაზას არ შეუძლია დაიკავშიროს ნუკლეოტიდი შეუწყვილებელი ბოლოთი. ამ დროს პროცესში ერთვება 3' – 5' ეგზონუკლეაზა, რომელიც ჩამოაცილებს შეცდომით დაკავშირებულ ნუკლეოტიდს და ამ უკანასკნელის ნაცვლად ჩაერთვება საჭირო ნუკლეოტიდი. ამგვარად, ფერმენტის ასეთი აქტივობა დიდ როლს თამაშობს პოლიმერიზაციის სწორად წარმართვაში.

5' – 3' ეგზონუკლეაზური აქტივობით ხდება ორჯაჭვიანი დნმ-ის ერთი ჯაჭვის დეგრადაცია თავისუფალი 5' - ბოლოდან. 3' – 5' ეგზონუკლეაზასგან განსხვავებით, 5' – 3' ეგზონუკლეაზა დიეთერულ კავშირს ხლეჩს დნმ-ის ორჯაჭვიანი მოლეკულის შეწყვილებულ უბნებში. გარდა ამისა 3' – 5' ეგზონუკლეაზა ერთ ჯერზე ჩამოჭრის მხოლოდ ერთ ნუკლეოტიდს, მაშინ, როცა 5' – 3' ეგზონუკლეაზას შეუძლია 5' ბოლოდან ჩამოჭრას 10-ნაშთიანი ნუკლეოტიდი. ნუკლეაზური ჭრის სიჩქარე ერთი თანრიგით გაიზრდება, თუ, იმავდროულად, მიმდინარეობს პოლიმერიზაციის რეაქციაც.

უკუტრანსკრიპტაზა

უკუტრანსკრიპტაზა გამოიყენება რნმ-დან დნმ-ის კომპლე-მენტარული ჯაჭვის ტრანსკრიფციისათვის. რეტროვირუსების შესწავლისას, რომელთა გენომი წარმოდგენილია მხოლოდ ერთჯაჭვიანი რნმ-ით, აღმოჩნდა, რომ მასპინძლის უჯრედში მოხვედრის შემდეგ, რეტროვირუსის გენომის ინტეგრაცია ამ უჯრედში ხდება ორჯაჭვიანი დნმ-ის სახით. გამოითქვა მოსაზრება, რომ უნდა არსებობდეს ვირუს სპეციფიკური ფერმენტი, რომელიც რნმ-მარტიცაზე ასინთეზირებს კომპლემენტარულ დნმ-ს. 1970 წელს სარკომის ვირუსიდან გამოყვეს რნმ-დამოკიდებული დნმ-პოლიმერაზა, რომელსაც უწოდეს უკუტრანსკრიპტაზა ანუ რევერტაზა.

უკუტრანსკრიპტაზა შედგება ორი სუბერთეულისგან - ა-65კდ და ბ-95კდ. ამ ფერმენტს ახასიათებს სამგვარი ფერმენტული აქტივობა:

- დნმ-პოლიმერაზული, მატრიცად იყენებს როგორც რნმ-ს, ასევე დნმ-ს;
- რიბონულკლეაზური, რომელიც ემსახურება რნმ-დნმ ჰიბრიდის შემადგენლობაში წარმოდგენილი რნმ-ს ჰიდროლიზს, მაგრამ არ არის აქტიური ერთ ან ორჯაჭვიან რნმ-ს შემთხვევაში;
- დნმ-ენდონუკლეაზური.

დნმ-პოლიმერაზული და რიბონუკლეაზური აქტივობები აუცილებელია ვირუსული დნმ-ს სინთეზისათვის, ხოლო ენდონუკლეაზა საჭიროა ვირუსული დნმ-ის ინტეგრაციისათვის მასპინძლის უჯრედის გენომში. გასუფთავებული უკუტრანსკრიპტაზა დნმ-ს ასინთეზირებს, როგორც რნმ ისე დნმ-მატრიცაზე. სინთეზის დასაწყება ისევე, როგორც სხვა პოლიმერაზებს, მასაც ესაჭიროება პრაიმერი. პრაიმერის მოვალეობა შეიძლება შეასრულოს ერთჯაჭვიანი რნმ-ის ან ერთჯაჭვიანი დნმ-ის მონაკვეთმა. ამ ფერმენტს ძირითადად იყენებენ რნმ-დან კომპლემენტარული დნმ-ის (კ-დნმ-ის) მისაღებად. უკუტრანსკრიფციის რეაქცია ტარდება სპეციალურად შერჩეულ პირობებში, რიბონუკლეაზური აქტივობის ძლიერი ინჰიბიტორების თანაობისას. რეაქციის შედეგად მიიღება რნმ-ის სრული დნმ-ასლები. პოლი-A -შემცველი რნმ-სათვის პრაიმერად იყენებენ ოლიგო(დტ)-ს (Oligo (dT) primer), ხოლო რნმ-სათვის, რომელიც არ შეიცავს 3'-პოლი-A-ს, გამოიყენება ქიმური სინთეზის გზით მიღებული 3' დაბოლოების კომპლემენტარული ოლიგონუკლეოტიდი.

ლიგაზები

1961 წელს მეზელსონმა და ვეიგლმა ფაგ 1-ის მაგალითზე აჩვენეს, რომ რეკომბინაციის დროს დახლეჩას მოსდევს დნმ-ის მოლეკულების შეერთება. ამ ფაქტის აღმოჩენის შემდეგ დაიწყო ინტენსიური მუშაობა იმ ფერმენტის გამოსაყოფად, რომელებიც ახორციელებენ დნმ-ს ფრაგმენტების „გადაკერებას". ასეთი ფერმენტი აღმოაჩინეს 1967 წელს და ეწოდა დნმ-ლიგაზა. ფერმენტი აკატალიზებს ფოსფოდიეთერული კავშირის სინთეზს ორჯაჭვიანი დნმ-ს მოლეკულაში ანუ დნმ-ლიგაზა შაქრის ნაშთებს შორის კავშირის წარმოქმნით ერთმანეთს „აკერებს" გვერდიგვერდ განლაგებულ ორ ნიკლეოტიდს. დნმ-ლიგაზას არსებობა აუცილებელია დნმ-ის რეპლიკაციისა და რეპარაციის პროცესების წარმართვისათვის.

გენურ ინჟინერიაში გამოიყენება ორი ტიპის დნმ-ლიგაზა, რომლებიც განსხვავდებიან მოქმედების მექანიზმითა და კოფაქტორებზე დამოკიდებულებით. E.Coli-ს დნმ-ლიგაზა კოფაქტორად გამოიყენებს დიფოსფო-პირიდინუკლეოტიდს, ხოლო ფაგ T4-ის ლიგაზა მოიხმარს ატფ-ს, მაგნიუმის იონების თანაობისას. ეს უკანასკნელი უნივერსალურია, რადგან წებოვანი ბოლოების ლიგირების გარდა, აკატალიზებს დნმ-ის ორჯაჭვიანი ფრაგმენტების „ბლაგვი" ბოლოების გადაკერებას. ამიტომაც, გენურ ინჟინერიაში უპირატესად სწორედ ამ ფერმენტს იყენებენ.

ტერმინალური ტრანსფერაზა. პოლი- A-პოლიმერაზა

ტერმინალური ტრანსფერაზა (კიდურა დეზოქსინუკლეოტიდ-ტრანსფერაზა) აღმოაჩინეს ხბოს თიმუსში 1962 წელს.

მაგნიუმის იონების თანაობისას ტერმინალური ტრანსფერაზას სუბსტრატს წარმოადგენს ერთჯაჭვიანი დნმ 3'- OH ბოლოთი ან ორჯაჭვიანი დნმ-ის მოლეკულა შეუწყვილებელი ერთჯაჭვიანი 3'-OH ბოლოთი. იმ შემთხვევაში თუ კოფაქტორად გამოიყენება Co2+, ამ ფერმენტს შეუძლია განახორციელოს "ბლაგვბოლოებიანი" დნმ-ის 3'-OH დაბოლოებაზე დეზოქსინუკლეოტიდების შემოერთების კატალიზი.

ტერმინალური ტრანსფერაზის მიერ წარმართულ რეაქციაში თუ მხოლოდ ერთი სახის დეზოქსინუკლეოტიდს დავამატებთ, მივიღებთ დნმ-ის მოლეკულას, რომელსაც აქვს ჰომოპოლიმერული ერთჯაჭვიანი 3' დაბოლოება. ასევე შესაძლებელია მეორე დნმ-ის მოლეკულის მიღებაც, პირველი მოლეკულის კომპლემენტარული ჰომოპოლიმერული 3'-ბოლოიანი ჯაჭვით. აღნიშნული დნმ-მოლეკულების ორი პრეპარატის შერევით და სათანადო პირობების შექმნით, შესაძლებელია დნმ-ის ჰიბრიდული მოლეკულის მიღება.

1972 წელს სწორედ ტერმინალური დეზოქსინუკლეოტიდ-ტრანსფერაზას დახმარებით განხორციელდა ინვიტრო (in vitro) დნმ-ის მოლეკულის რეკომბინაციის პირველი ექსპერიმენტი.

1973 წელს სიპელიმ E. coli-დან გამოყო პოლი-A-პოლიმერაზა. იგი აკატალიზებს ერთჯაჭვიანი რნმ-ს მოლეკულის 3'-OH ბოლოზე პოლი -A თანმიმდევრობის მიერთებას და გამოიყენება რნმ-ს მოლეკულების მოსამზადებლად, მათგან კომპლემენტარული დნმ-ს მიღების მიზნით.

რესტრიქციული ფერმენტები – დახასიათება, კლასიფიკაცია

მოლეკულურ ბიოლოგიაში მიღებული ტერმინები „რესტრიქტაზა", „რესტრიქციის ენდონუკლეაზა" და „საიტ-სპეციფიკური ენდოდეზოქსი-რიბონუკლეაზა" სინონიმებია.

ყოველი ბაქტერიული ენდონუკლეაზა ცნობს დნმ-ის სპეციფიკურ, მოკლე თანმიმდევრობებს და უკავშირდება მათ. ამ პროცესს თან სდევს დნმ-ის მოლეკულის გახლეჩა ამოცნობილ მონაკვეთში ან რომელიმე სხვა მონაკვეთში, რაც განპირობებულია ფერმენტის ტიპით. რესტრიქციული აქტივობის გარდა, ბაქტერიულ შტამებს კიდევ აქვთ დნმ-ის მეთილირების უნარი. რესტრიქციის მსგავსად, ამ პროცესისათვისაც განმსაზღვრელია დნმ-ის თანმიმდევრობის სპეციფიკურობა. მეთილაზა მეთილის ჯგუფებს უმატებს ადენინის და ციტოზინის ნაშთებს იმავე ადგილზე, რომელსაც რესტრიქციული ფერმენტი უკავშირდება. შედეგად, მეთილირებული ადგილი ხდება რესტრიქციისადმი მდგრადი. ამგვარად მეთილირება დნმ-ს იცავს დახლეჩისგან.

განასხვავებენ რესტრიქტაზების სამ ძირითად ჯგუფს.

ყველა რესტრიქტაზა ამოიცნობს ორმაგსპირალიან დნმ-ის, მაგრამ პირველი ჯგუფის რესტრიქტაზები აწარმოებენ დნმ-ის დახლეჩას განუსაზღვრელ, ნებისმიერ წერტილზე, ხოლო მე-2 და მე-3 ჯგუფის ფერმენტები ამოიცნობენ და ხლეჩენ დნმ-ის მკაცრად განსაზღვრულ უბნებს შიგნით ან ამ უბნებიდან მოშორებულ ფიქსირებულ მონაკვეთებში.

1-ლი და მე-3 ჯგუფის ფერმენტებს გააჩნიათ რთული სუბერთეულე-ბიანი სტრუქტურა და აქვთ ორი ტიპის აქტივობა: ატფ-დამოკიდებული ენდონუკლეაზური და მამოდიფიცირებელი (მეთილაზური).

მე-2 ჯგუფის რესტრიქტაზები შედგებიან ორი სხვადასხვა ცილისგან: რესტრიქციული ენდონუკლეაზასა და მამოდიფიცირებელი მეთილაზასგან, ამიტომ გენურ ინჟინერიაში გამოიყენება მხოლოდ მე-2 ჯგუფის ფერმენტები. მათი გააქტივებისთვის აუცილებელია მაგნიუმის იონები.

დღეისათვის გამოყოფილი და იდენტიფიცირებულია 500-ზე მეტი მე-2 ჯგუფის რესტრიქტაზა. სხვადასხვა მიკროორგანიზმიდან გამო-ყოფილ მე-2 ჯგუფის ფერმენტებს შორის გვხვდება ისეთებიც, რომლებიც ამოიცნობენ დნმ-ს ერთსა და იმავე თანმიმდევრობებს. ასეთ ფერმენტებს იზოშიზომერები ეწოდებათ. განასხვავებენ ჭეშმარიტ იზოშიზომერიას, როდესაც ფერმენტები ამოიცნობენ ერთსა და იმავე ნუკლეოტიდურ თანმიბდევრობას და ხლეჩენ დნმ-ს ერთსა და იმავე წერტილში და ცრუიზოშიზომერიას, როდესაც ფერმენტები ამოიცნობენ დნმ-ის ერთსა და იმავე უბანს, მაგრამ ხლეჩენ ამ უბანს სხვადასხვა წერტილში.

მე-2 ჯგუფის რესტრიქტაზების უმეტესობა ამოიცნობს თანმიმ-დევრობას, რომელიც შეიცავს 4-დან 6-მდე ნუკლეოტიდურ წყვილს. ამი-ტომ ამ ფერმენტებს ყოფენ წვრილად და მსხვილადდამხლეჩ ფერმენ-ტებად. წვრილადდამხლეჩი ფორმა ამოიცნობს ტეტრანუკლეოტიდს და მოლეკულაში ახორციელებს გაცილებით მეტ დახლეჩებს, ვიდრე მსხვილადდამხლეჩი ფორმა, რომელიც ამოიცნობს ექვსი ნუკლეოტიდის წყვილისგან შემდგარ თანმიმდევრობას. ეს იმით აიხსნება, რომ გარკვეული ოთხნუკლეოტიდიანი თანმიმდევრობა გაცილებით ხშირად გვხვდება, ვიდრე ექვსნუკლეოტიდიანი თანმიმდევრობა. მაგალითად, ბაქტერიოფაგ თ7-ის 40 000 წყვილი აზოტოვანი ფუძისაგან შემდგარ დნმ-ში სრულიად არ გვხვდება ისეთი თანმიმდევრობა, რომელსაც ამოიცნობს E. coli-დან გამოყოფილი რესტრიქტაზა R1.

წვრილადდამხლეჩ რესტრიქტაზებს განეკუთვნება Hpa II და Alu (გამოყოფილი Arthrobacter luteus- დან), ხოლო Eco R I (Escherich-ia coli-დან გამოყოფილი რესტრიქტაზა) და Hind III მიეკუთვნებიან მსხვილადდამხლეჩი ფერმენტების ჯგუფს. თუ ვივარაუდებთ, რომ რესტრიქტაზების ამოსაცნობი უბნები დნმ-ის ჯაჭვში განაწილებულია შემთხვევით, მაშინ, თეორიული გამოთვლით, ფერმენტის ოთხი ნუკლეოტიდისაგან შემდგარი ამოსაცნობი უბანი წარმოდგენილი

იქნება ერთხელ ყოველ 256 ფუძე-წყვილის თანმიმდევრობაში. ექვსი ნუკლეოტიდის ამომცნობი ნუკლეაზასათვის ყოველი 4096 ფუძე-წყვილის თანმიმდევრობაში შეგვხვდება ერთი ამოსაცნობი უბანი. იმ შემთხვევაში, თუ რესტრიქციის უბანი მოქცეულია გენის შიგნით, მაშინ რესტრიქტაზებით დამუშავება გამოიწვევს გენის ინაქტივაციას. ამის ალბათობა ძალზე დიდია წვრილადდამხლეჩი რესტრიქტაზების გამოყენებისას და უმნიშვნელოა მსხვილადდამხლეჩი ფერმენტების შემთხვევაში. აქედან გამომდინარე, დაუზიანებელი გენის მისაღებად დახლეჩას აწარმოებენ მიმდევრობით, რამდენიმე მსხვილადდამხლეჩი ტიპის ფერმენტის გამოყენებით ან იყენებენ ე.წ. „არასრული რესტრიქციის“ მეთოდს, რაც გულისხმობს რეაქციის ისეთ პირობებში წარმართვას, რომ დახლეჩა მოხდეს მხოლოდ ერთ უბანში.

რესტრიქტაზების ნომეკლატურა და დახასიათება

1973 წელს სმიტმა და ნათანსმა (მათ 1978 წელს ნობელის პრემია მიენიჭათ) შემოგვთავაზეს რესტრიქტაზების ნომეკლატურა, რომელიც მოიცავს შემდეგ პუნქტებს:

თითოეული ფერმენტის დასახელების აბრივიატურა წარმოებულია ორმაგი დასახელების მიკროორგანიზმისაგან, რომელიც შეიცავს მოცემულ მეთილაზურ-რესტრიქტაზულ სისტემას. როგორც წესი, რესტრიქტაზას პირველი ასო შეესაბამება მიკროორგანიზმის გვარის აღმნიშვნელის პირველ ასოს, რომელსაც ემატება სახეობის აღმნიშვნელი ორი ასო: Streptomyces albus - Sal, Escherichia coli – Eco.

აუცილებლობის შემთხვევაში ემატება სეროტიპის ან შტამის აღნიშვნა, მაგალითად, Eco B.

ერთი და იმავე ბაქტერიული უჯრედის მიერ კოდირებულ, მაგრამ განსხვავებულ რესტრიქციულ-მოდიფიკაციურ სისტემას აღნიშნავენ რომაული ციფრებით: Hind II, Hind I, Hind III (Haemophilus influenzae).

რესტრიქტაზები აღინიშნება ასო R-ით -R hind III, ხოლო მეთილაზები ასო- M-ით - M Hind III.

ახალი რესტრიქტაზების აღმოჩენის გამო რობერტსმა 1978 წელს დამატებები შეიტანა ფერმენტების აღნიშვნის რაციონალურ სისტემაში: თუ ერთმანეთს ემთხვევა რამდენიმე ფერმენტის აბრივიატურა, მაშინ აბრივიატურის პირველი ორი ასო უცვლელი რჩება, ხოლო მესამეს აიღებენ სახეობის აღმნიშვნელი სიტყვის მომდევნო ასოებიდან:

Haemophilus parainfluenzae - Hpa I

Haemophilus parahaemolyticus - Hph I.

ზოგიერთი მათგანი, მაგალითად, Hpa I და Ssp I (იხ. სურ. 35 ა და ბ გვ.113) დნმ-ს ხლეჩს სიმეტრიულად ანუ ორივე ჯაჭვს სიმეტრიულად მოპირდაპირე წერტილებში. სხვები (მაგ.,Pst I, სურ. 35 გ) ხლეჩენ აცდენილად, საფეხურის წარმოქმნით ანუ დნმ-ის ჯაჭვები იხლიჩება ასიმეტრიულად, რამდენიმე ნუკლეოტიდის ცდომილებით.

პირველ შემთხვევაში წარმოიქმნება ე.წ. „ბლაგვი“ ბოლოები, ხოლო მეორე შემთხვევაში – „წებოვანი“ ანუ დნმ-ის ახლადმიღებულ ფრაგმენტებს დახლეჩილ ბოლოებზე უჩნდებათ ერთჯაჭვიანი ურთიერთკომპლემენტარული მონაკვეთები 4-4 ნუკლეოტიდის შემადგენლობით. ასეთი ფრაგმენტები განსაკუთრებით მოსახერხებელია რეკომბინანტული დნმ-ის მისაღებად.

რესტრიქტაზების მოქმედების მექანიზმები. დნმ-ის მეთილირების სისტემები

ხშირად სამიზნეს (ამოსაცნობ ადგილს) წარმოადგენს 4-6 ფუძე წყვილისგან შემდგარი პალინდრომი (ერთნაირად იკითხება მარცხნიდან და მარჯვნიდან). ღესტრიქტაზას ამოსაცნობი წერტილი სიმეტრიულია 180 გრადუსით შემოტრიალებისას ანუ ნუკლეოტიდების თანმიმდევრობა ერთ ჯაჭვზე მარცხნიდან მარჯვნივ ისეთივეა, როგორც მეორე ჯაჭვის თანმიმდევრობა მარჯვნიდან მარცხნივ. სიმეტრია გულისხმობს, რომ ის ადგილები, რომლებიც უნდა მეთილირდნენ, გვხვდება დნმ-ის ორივე ჯაჭვზე. სამიზნეების მეთილირება შეიძლება მოხდეს სრულად (ორივე ჯაჭვზე), ნაწილობრივ (მხოლოდ ერთ ჯაჭვზე) ან საერთოდ არ მოხდეს.

სრულად მეთილირებული უბანი აღარ ექვემდებარება არც რესტრიქციას და არც მოდიფიკაციას. ნაწილობრივ მეთილირებული უბნები ვეღარ შეიცნობა რესტრიქტაზის მიერ, მაგრამ შესაძლებელია მისი შემდგომი მეთილირება და გარდაქმნა სრულად მეთილირებულ უბნად.

არამეთილირებული სამიზნე წარმოადგენს სუბსტრატს რესტრიქტაზებისა ან ინვიტრო (in vitro) მოდიფიკაციისთვის. არამოდიფიცირებული დნმ-ი უჯრედებში განიცდის რესტრიქციას. გახლეჩის რეაქცია ორ ეტაპად მიმდინარეობს, იხლიჩება დნმ-ის ჯერ ერთი, შემდეგ მეორე ჯაჭვი. დახლეჩის წერტილების მიმდებარე უბნებში შეიძლება მოხდეს ეგზონუკლეაზური დეგრადაცია. ამ შემთხვევაში ხდება ატფ-ის ჰიდროლიზი, რომლის მნიშვნელობაც ჯერჯერობით უცნობია.

როგორ ხდება, რომ ფერმენტი ცნობს ერთ სამიზნე უბანს, მაგრამ ხლეჩს სხვა, საკმაოდ მოშორებულ უბანს? უნდა აღვნიშნოთ, რომ ფერმენტი დნმ-თან დაკავშირების შემდეგ მას აღარ სცილდება. თუ ჩავატარებთ ფერმენტის ინკუბაციას მოდიფიცირებულ და არამოდიფიცირებულ დნმ-თან ერთად, იგი დასახლეჩად აირჩევს არამოდიფიცირებულ დნმ-ს. შეიცნობს რა დაკავშირების უბანს, ფერმენტი აღარ სცილდება არამოდიფიცირებულ დნმ-ს, რათა მოძებნოს დასახლეჩი წერტილი. არსებობს ორი ალტერნატიული მოდელი, რომელიც ხსნის ურთიერთკავშირს დაკავშირებად და დასახლეჩ უბნებს შორის. ერთ-ერთი მათგანის თანახმად მოძრაობს ფერმენტი, ხოლო მეორე თეორიის მიხედვით, ხდება დნმ-ის გადაადგილება. იმ შემთხვევაში, თუ დნმ-ის

გასწვრივ გადაადგილდება ფერმენტი, მისი მოძრაობა გაგრძელდება, სანამ ხშირად სამიზნეს (ამოსაცნობ ადგილს) წარმოადგენს 4-6 ფუძე წყვილისგან შემდგარი პალინდრომი (ერთნაირად იკითხება მარცხნიდან და მარჯვნიდან). რესტრიქტაზას ამოსაცნობი წერტილი სიმეტრიულია 180 გრადუსით შემოტრიალებისას ანუ ნუკლეოტიდების თანმიმდევრობა ერთ ჯაჭვზე მარცხნიდან მარჯვნივ ისეთივეა, როგორც მეორე ჯაჭვის თანმიმდევრობა მარჯვნიდან მარცხნივ. სიმეტრია გულისხმობს, რომ ის ადგილები, რომლებიც უნდა მეთილირდნენ, გვხვდება დნმ-ის ორივე ჯაჭვზე. სამიზნეების მეთილირება შეიძლება მოხდეს სრულად (ორივე ჯაჭვზე), ნაწილობრივ (მხოლოდ ერთ ჯაჭვზე) ან საერთოდ არ მოხდეს.

სრულად მეთილირებული უბანი აღარ ექვემდებარება არც რესტრიქციას და არც მოდიფიკაციას. ნაწილობრივ მეთილირებული უბნები ვეღარ შეიცნობა რესტრიქტაზის მიერ, მაგრამ შესაძლებელია მისი შემდგომი მეთილირება და გარდაქმნა სრულად მეთილირებულ უბნად.

არამეთილირებული სამიზნე წარმოადგენს სუბსტრატს რესტრიქტაზებისა ან ინვიტრო (ინ ვიტრო) მოდიფიკაციისთვის. არამოდიფიცირებული დნმ-ი უჯრედებში განიცდის რესტრიქციას. გახლეჩის რეაქცია ორ ეტაპად მიმდინარეობს, იხლიჩება დნმ-ის ჯერ ერთი, შემდეგ მეორე ჯაჭვი. დახლეჩის წერტილების მიმდებარე უბნებში შეიძლება მოხდეს ეგზონუკლეაზური დეგრადაცია. ამ შემთხვევაში ხდება ატფ-ის ჰიდროლიზი, რომლის მნიშვნელობაც ჯერჯერობით უცნობია.

როგორ ხდება, რომ ფერმენტი ცნობს ერთ სამიზნე უბანს, მაგრამ ხლეჩს სხვა, საკმაოდ მოშორებულ უბანს? უნდა აღვნიშნოთ, რომ ფერმენტი დნმ-თან დაკავშირების შემდეგ მას აღარ სცილდება. თუ ჩავატარებთ ფერმენტის ინკუბაციას მოდიფიცირებულ და არამოდიფიცირებულ დნმ-თან ერთად, იგი დასახლეჩად აირჩევს არამოდიფიცირებულ დნმ-ს. შეიცნობს რა დაკავშირების უბანს, ფერმენტი აღარ სცილდება არამოდიფიცირებულ დნმ-ს, რათა მოძებნოს დასახლეჩი წერტილი. არსებობს ორი ალტერნატიული მოდელი, რომელიც ხსნის ურთიერთკავშირს დაკავშირებად და დასახლეჩ უბნებს შორის. ერთ-ერთი მათგანის თანახმად მოძრაობს ფერმენტი, ხოლო მეორე თეორიის მიხედვით, ხდება დნმ-ის გადაადგილება. იმ შემთხვევაში, თუ დნმ-ის გასწვრივ გადაადგილდება ფერმენტი, მისი მოძრაობა გაგრძელდება, სანამ იგი არ აირჩევს დასახლეჩ უბანს. თუ გადაადგილდება დნმ, ფერმენტი რჩება ამოცნობის ადგილზე მიმაგრებული, ხოლო დნმ მიცოცდება ფერმენტის დაკავშირების მეორე ცენტრთან და ეს პროცესი გაგრძელდება მანამ, სანამ ფერმენტი არ შეიცნობს დასახლეჩ უბანს. ელექტრონულ მიკროსკოპული

მონაცემები ცხადყოფს, რომ ფერმენტის დაკავშირება იწვევს მარყუჟის წარმოქმნას დნმ-ში, რომელიც დახლეჩის შემდეგაც რჩება ამოსაცნობ უბანთან დაკავშირებული. ეს მონაცემები ამყარებენ მეორე მოდელის მართებულობას. იგი არ აირჩევს დასახლეჩ უბანს. თუ გადაადგილდება დნმ, ფერმენტი რჩება ამოცნობის ადგილზე მიმაგრებული, ხოლო დნმ მიცოცდება ფერმენტის დაკავშირების მეორე ცენტრთან და ეს პროცესი გაგრძელდება მანამ, სანამ ფერმენტი არ შეიცნობს დასახლეჩ უბანს. ელექტრონულ მიკროსკოპული მონაცემები ცხადყოფს, რომ ფერმენტის დაკავშირება იწვევს მარყუჟის წარმოქმნას დნმ-ში, რომელიც დახლეჩის შემდეგაც რჩება ამოსაცნობ უბანთან დაკავშირებული. ეს მონაცემები ამყარებენ მეორე მოდელის მართებულობას.

რესტრიქციის რუქების აგება

რესტრიქციის ფერმენტები მოლეკულური კვლევების მძლავრი ინსტრუმენტია. ისინი საშუალებას იძლევიან დნმ-ის უზარმაზარი მოლეკულა დავყოთ მრავალ ფრაგმენტად, დაწყებული რამდენიმე ასეულით და დამთავრებული ათასობით ფუძის შემადგენლობით. ელექტროფორეზით შესაძლებელია ამ ფრაგმენტების დაყოფა და შემდგომი შესწავლა.

ელექტროფორეზის მიმდინარეობისას მოკლე ფრაგმენტები მიგრირებენ გაცილებით სწრაფად, ვიდრე გრძელი ფრაგმენტები. ზოგიერთი ფრაგმენტი საერთოდ ვერ აღწევს გელში, სიდიდის გამო. ასეთი ფრაგმენტების დაყოფა და შემდგომი დახასიათება შესაძლებელია ე.წ. "პულს ფილდ გელელექტროფორეზით" (Pulse-Field Gel Electrophoresis (PFGE). აღნიშნული მეთოდით დნმ-ის დიდი ფრაგმენტების დაყოფა მიიღწევა გელზე მოდებული ელექტრული ველის მიმართულების პერიოდული ცვლით. სურ. 36-ზე ნაჩვენებია PFGE სქემატური გამოსახულება.

სურ.36. PFGE სქემატური გამოსახულება
წყვეტილი ხაზებით აღნიშნულია ელექტროდები.
მუქი კვადრატი წარმოადგენს აგაროზის გელს.
ისრებით აღნიშნულია დენის მიმართულებები.

ჩვეულებრივ, აგაროზის ელექტროფრეზის დროს გამოიყენება ორი ელექტროდი, ხოლო, ამ შემთხვევაში, ელექტროფორეზი მიმდინარეობს ექვსი ელექტროდის საშუალებით. ისინი

განლაგებულნი არიან ექვს კუთხედის ფორმით და პარალელური ელექტროდები არიან დაწყვილე-ბული. ელექტროფორეზის მიმდინარეობისას დენი მიეწოდება პარალელურ ელექტროდებს მორიგეობით და მოლეკულები იწყებენ ზიგზაგისებურ მოძრაობას, რაც აადვილებს მათ მიგრირებას გელში. დაბალი პროცენტობის აგაროზის გელში 30-50 კილო ფუძის ნუკლეინის მჟავების ფრაგმენტები მიგრირებენ ერთ ზოლად, PFGE-ის გამოყენებისას ისინი იყოფიან ინდივიდუალურ ფრაქციებად.

რესტრიქციული ფრაგმენტები მიგრაციის პროცესში არ განიცდიან დეგრადირებას, შესაძლებელია მათი გელიდან გამორეცხვა ნატიური სახით. გელის შეღებვით მიღებული თითოეული ზოლი შეესაბამება რესტრიქციულ ფრაგმენტს. გენომის განსაზღვრული უბნის რესტრიქციული ფერმენტების ნაკრებით დამუშავების შედეგად მიღებული ფრაგმენტების სიდიდეების შედარება, რესტრიქციული რუკის შექმნის საშუალებას იძლევა, რომელზეც მითითებული იქნება რესტრიქციის თითოეული წერტილის მდებარეობა.

5000 ნუკლეოტიდური წყვილის (ნ.წ.) სიგრძის დნმ-ის მოლეკულა მუშავდება ცალ-ცალკე ა და ბ რესტრიქტაზებით და ხდება მათი დაყოფა ელექტროფორეზით. ფერმენტი ა დნმ-ს ხლეჩს ოთხ ფრაგმენტად, ზომებით 2100-, 1400-, 1000- და 500 ნ.წ. ფერმენტი ბ იძლევა სამ ფრაგმენტს: 2500, 1300 და 1200 ნ.წ. სურ. 37 (გვ.113). ამ ფერმენტების რესტრიქციის წერტილების განლაგების დასადგენად, შემდეგ ეტაპზე ხდება ორმაგი დახლეჩა ანუ ორივე რესტრიქტაზას ერთდროულად გამოყენება. შედეგად, მიიღება ექვსი ფრაგმენტი, რომელთა ნუკლეოტიდური წყვილების რაოდენობა, შესაბამისად, არის 1900, 1000, 800, 600, 500 და 200.

უკეთესია, თუ მოხდება ერთი-ერთი რესტრიქტაზით მიღებული ფრაგმენტების ელუირება გელიდან და მათი დამუშავება მეორე რესტრიქტაზით. ჩვენს შემთხვევაში ელექტროფორეზი იძლევა ამგვარ სურათს:

ა. რესტრიქციული ფრაგმენტების დამუშავება ბ ფერმენტით იძლევა

შემდეგ შედეგს:

2100 დაიხლიჩა 1900 და 200 ნ.წ.

1400 დაიხლიჩა 800 და 600 ნ.წ.

1000 და 500 ნ.წ. უცვლელი დარჩა

ბ. რესტრიქციული ფრაგმენტების დამუშავება ა ფერმენტით იძლევა

შემდეგ შედეგს:

2500 დაიხლიჩა 1900 და 600 ნ.წ.

1300 დაიხლიჩა 800 და 500 ნ.წ.

1200 დაიხლიჩა 1000 და 200 ნ.წ.

მიღებული შედეგები გვიჩვენებენ, რომ ა რესტრიქციული ფრაგმენტების ბ რესტრიქტაზით დამუშავებისას მიღებული ფრაგმენტები გხვდება ბ რესტრიქციული ფრაგმენტების ა ფერმენტით დამუშავებულ ნიმუშებშიც. სწორედ ურთიერთგადამფარავი ფრაგმენტები წარმოადგენენ რესტრიქციული რუკების გასაღებს. ჩვენს შემთხვევაში, ასეთი ფრაგმენტებია ა ფრაგმენტი 2500 ნ.წ-ით და ბ ფრაგმენტი 2100 ნ.წ-ით, რომლებიც მეორე ფერმენტით დამუშავებისას იძლევიან 1900 ნ.წ-იან ფრაგმენტს.

მიღებული მონაცემებიდან შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ ერთ მხარეს 1900 ნ.წ-იანი ფრაგმენტიდან 200 ნ.წ. მანძილზე განლაგებულია ა რესტრიქტაზის დასახლეჩი წერტილი, ხოლო მეორე მხრიდან იმავე 1900 ნ.წ-იანი ფრაგმენტიდან 600 ნ.წ. მანძილზე მდებარეობს ბ რესტრიქტაზის შემდეგი დასახლეჩი წერტილი სურ. 38 (გვ. 114)

ა ფერმენტით ბ 1200 ფრაგმენტის დამუშავებისას 200-იანი ფრაგმენტი წარმოიქმნება მხოლოდ ერთხელ ანუ 1200-იანი ფრაგმენტი თავსდება მარცხნივ. გავარკვიოთ, როგორ გრძელდება მარჯვენა ნაწილი. სავარაუდოდ, ეს არის ა 1400 ნ.წ-იანი ფრაგმენტი, რადგანაც იგი იხლიჩება ბ ფერმენტით 600 და 800 ნ.წ ფრაგმენტებად. ა 2500 ნ.წ.-იანი ფრაგმენტის მარჯვნივ უნდა მდებარეობდეს 1300 ნ.წ-იანი ფრაგმენტი. მაშინ ლოგიკურია ა 500 ფრაგმენტის არსებობა და ბ 1300 ფრაგმენტის დახლეჩა ა რესტრიქტაზით 600 და 800 ნ.წ-იან ფრაგმენტებად.

რესტრიქციული რუკების შედგენისას გამოიყენება რამდენიმე ფერმენტი, ამიტომ საჭირო ხდება ფერმენტებს შორის რთული შეფარდებების გაანალიზება. პროცედურების გასაადვილებლად შესაძლებელია გამოვიყენოთ არასრული დახლეჩა. განსაზღვრულ პირობებში რესტრიქტაზა ვერ ცნობს და ვერ ხლეჩს დნმ-ის მოლეკულის ყველა უბანს. მაგალითად, ნაწილობრივი დახლეჩისას რესტრიქტაზა ა-ს შეუძლია მოგვცეს 3100-, 1400- და 500 ნ.წ-იანი ფრაგმენტი. ამ მონაცემებს თუ შევუსაბამებთ მთლიანი რესტრიქციის შედეგებს (2100, 1400, 1000 და 500 ნ.წ), ნათელი გახდება, რომ 2100- და 1000 ნ.წ-იანი ფრაგმენტები ერთმანეთის გვერდი-გვერდ არიან განლაგებული. 3500 ნ.წ-იანი ფრაგმენტის მიღება ერთმანეთის გვერდით განალაგებს 2100- და 1400 ფუძეწყვილიან ფრაგმენტებს. სურ. 38 (გვ.114): ფერმენტული რესტრიქციის ანალიზი და დნმ-ის ფრაგმენტის რუქა.

რუკების შედგენის მეორე ხერხია რადიაქტიულად მონიშნული დაბოლოების გამოყენება. კიდურა ფრაგმენტების დადგენა ხდება რადიაქტიული ნიშნულის ჩართვით. ასევე შესაძლებელია ჰიბრიდიზაციის მეთოდის გამოყენება. გადაფარვადი ფრაგმენტები (მოცემულ შემთხვევაში 2100 და 2500 ნ.წ) განიცდიან ჰიბრიდიზაციას.

პირველი რუკა შედგენილი იყო ვირუს SV40-თვის (მაიმუნის ვირუსი, იწვევს ავთვისებიან გარდაქმნებს), რომელიც შედგება 5423 ნ.წ.-საგან. გამოიყენებოდა რესტრიქტაზა Hind- II, რომელიც ვირუსის რგოლოვან დნმ-ს ხლეჩს 11 ფრაგმენტად.

დნმ-ში მათი განლაგების თანმიმდევრობა დადგინდა ფერმენტების კრებულის გამოყენებით. პირველი გახლეჩა იწვევს რგოლოვანი დნმ-ის ხაზობრივ მდგომარეობაში გადაყვანას, რომელიც შემდეგ იხლიჩება უფრო და უფრო მცირე ფრაგმენტებად. ამგვარად, მივიღეთ ვირუსული რგოლისებრი დნმ-ის რესტრიქციული რუკა, რომელზეც დატანილია აღნიშნული რესტრიქტაზის სამიზნე წერტილები. სხვა რესტრიქტაზებით მსგავსი ექსპერიმენტების ჩატარების შედეგად მიიღება რესტრიქციული რუკა, რომელზეც მონიშნული იქნება რესტრიქციის უამრავი წერტილი.

ამგვარი ინფორმაციის ფლობა საშუალებას იძლევა დნმ-ის მოლეკულაში შევისწავლოთ ბიოლოგიურად მნიშვნელოვანი უბნები. რესტრუქციული რუკა ასახავს განსაზღვრულ თანმიმდევრობას ამა თუ იმ უბანზე. ორი ან რამდენიმე მონათესავე გენის რუქების შედარებით, შესაძლებელია მათ შორის ჰომოლოგიის დონის დადგენა. რესტრუქციული რუკების ანალიზით შეიძლება სხვადასხვა ორგანიზმის დნმ-ის განსაზღვრული უბნების ურთიერთშედარება, ნუკლეოტიდების თანმიმდევრობის დადგენის გარეშე. ასეთი შედარებით დადგინდა, რომ ქრომოსომული მონაკვეთები, რომლებიც განაპირობებენ ჰემოგლობინის კოდირებას ადამიანში, შიმპანზეებსა და ორანგუტანში ერთნაირია.

ცხრილში მოცემულია მნიშვნელოვანი რესტრიქტაზების ჩამონათვალი:

ფერმენტი	წყარო	ამოსაცნობი უბანი	გაჭრა
EcoRI	Escherichia coli	5’GAATTC 3’CTTAAG	5’---G AATTC---3’ 3’---CTTAA G---5’
EcoRII	Escherichia coli	5’CCWGG 3’GGWCC	5’--- CCWGG---3’ 3’---GGWCC ---5’
BamHI	Bacillus amyloliquefaciens	5’GGATCC 3’CCTAGG	5’---G GATCC---3’ 3’---CCTAG G---5’
HindIII	Haemophilus influenzae	5’AAGCTT 3’TTCGAA	5’---A AGCTT---3’ 3’---TTCGA A---5’
TaqI	Thermus aquaticus	5’TCGA 3’AGCT	5’---T CGA---3’ 3’---AGC T---5’
NotI	Nocardia otitidis	5’GCGGCCGC 3’CGCCGGCG	5’---GC GGCCGC---3’ 3’---CGCCGG CG---5’
HinfI	Haemophilus influenza	5’GANTCA 3’CTNAGT	5’---G ANTC---3’ 3’---CTNA G---5’
Sau3A	Staphylococcus aureus	5’GATC 3’CTAG	5’--- GATC---3’ 3’---CTAG ---5’

PovII	Proteus vulgaris	5'CAGCTG 3'GTCGAC	5'---CAG CTG---3' 3'---GTC GAC---5'
SmaI	Serratia marcescens	5'CCCGGG 3'GGGCCC	5'---CCC GGG---3' 3'---GGG CCC---5'
HaeIII	Haemophilus aegyptius	5'GGCC 3'CCGG	5'---GG CC---3' 3'---CC GG---5'
HgaI	Haemophilus gallinarum	5'GACGC 3'CTGCG	5'---NN NN---3' 3'---NN NN---5'
AluI	Arthrobacter luteus	5'AGCT 3'TCGA	5'---AG CT---3' 3'---TC GA---5'
EcoRV	Escherichia coli	5'GATATC 3'CTATAG	5'---GAT ATC---3' 3'---CTA TAG---5'
EcoP15I	Escherichia coli	5'CAGCAGN_{25}NN 3'GTCGTCN_{25}NN	5'---CAGCAGN25NN ---3' 3'---GTCGTCN25 NN---5'
KpnI	Klebsiella pneumoniae	5'GGTACC	5'---GGTAC C---3'
	pneumoniae	3'CCATGG	3'---C CATGG---5'
PstI	Providencia stuartii	5'CTGCAG 3'GACGTC	5'---CTGCA G---3' 3'---G ACGTC---5'
SacI	Streptomyces achromogenes	5'GAGCTC 3'CTCGAG	5'---GAGCT C---3' 3'---C TCGAG---5'
SalI	Streptomyces albus	5'GTCGAC 3'CAGCTG	5'---G TCGAC---3' 3'---CAGCT G---5'
ScaI	Streptomyces caespitosus	5'AGTACT 3'TCATGA	5'---AGT ACT---3' 3'---TCA TGA---5'
SpeI	Sphaerotilus natans	5'ACTAGT 3'TGATCA	5'---A CTAGT---3' 3'---TGATC A---5'
SphI	Streptomyces phaeochromogenes	5'GCATGC 3'CGTACG	5'---GCATG C---3' 3'---C GTACG---5'
StuI	Streptomyces tubercidicus	5'AGGCCT 3'TCCGGA	5'---AGG CCT---3' 3'---TCC GGA---5'
XbaI	Xanthomonas badrii	5'TCTAGA 3'AGATCT	5'---T CTAGA---3' 3'---AGATC T---5'

დნმ-ის სეკვენირება, დნმ-ის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის განსაზღვრა

სეკვენირება საშუალებას იძლევა სწრაფად და სრულად განისაზღვროს 100 – 500 ნუკლეოტიდური წყვილის შემცველი სეგმენტების ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობა, რომლებიც წარმოიქმნებიან დნმ-ს რესტრიქტაზული დახლეჩით.

სეკვენირების ერთ-ერთ მეთოდი ე.წ. ქიმიური გზა, ანუ მასკამისა და გილბერტის მეთოდია. ეს მეთოდი დაფუძნებულია დნმ-ის ქიმიურ დეგრადაციაზე. იგი შემოთავაზებული იყო 1976 წელს მაკსამისა და გილბერტის მიერ და მათი სახელები ეწოდა. მეთოდის არსი შემდეგში მდგომარეობს: დნმ-ის ფრაგმენტის ერთ-ერთი ბოლო იცვლება ფოსფორის იზოტოპის 32P დახმარებით. უკანასკნელ დროს რადიაქტიულის ნაცვლად, გამოიყენება ფლუორესცენტული მონიშვნა. ფლუორესცენტული ნივთიერება შეიძლება მივუერთოთ ნუკლეოტიდს, ამასთან სხვადასხვა ნუკლეოტიდს შეიძლება შევუფარდოთ სხვადასხვა შეფერილობა. მონიშნული დნმ-ის პრეპარატი იყოფა ოთხ ნაწილად და თითოეული მათგანი მუშავდება რეაგენტით, რომელიც სპეციფიკურად შლის ოთხიდან ერთ ან ორ ფუძეს. ამასთან რეაქციის პირობა ისეა შერჩეული, რომ მოხდეს მხოლოდ მინიმალური დაზიანება.

დაშლა მიმდინარეობს 2 ეტაპად. პირველ ეტაპზე ხდება აზოტოვანი ფუძის მოდიფიკაცია და მისი შემდგომი ჩამოჭრა. მეორე ეტაპზე ხდება დნმ-ის ჰიდროლიზი ჩამოჭრის ადგილებში. პურინის ფუძეების მოდიფიცირება ხდება დიმეთილსულფოქსიდით. ადენინის ნაშთები მეთილირდებიან აზოტის მესამე პოზიციაზე, ხოლო გუანინისა - მეშვიდე პოზიციაზე. ამგვარი მოდიფიცირების შემდეგ მეთილადენინის მოცილების მიზნით ხდება დნმ-ის დამუშავება 0,1 M HCl-ით $0^{o}C$ -ზე.

$+90^{o}C$-ზე 0,1 M NaOH-ის არეში შემდგომი დამუშავება ფუძის მოხლეჩის ადგილებში იწვევს შაქარ-ფოსფატური კავშირის დარღვევას. დნმ-ის დაზიანებული მოლეკულების პიპერიდინით დამუშავება ახდენს მის ჰიდროლიზს მეთილგუანინის უბნებში. პირიმიდინის ფუძეების მოდიფიცირება ხდება ჰიდრაზინის საშუალებით. უმარილო არეში მოდიფიცირდებიან ციტოზინიც და თიმინიც, ხოლო 2 M NaCl-ის თანაობისას მოდიფიკაციას განიცდის მხოლოდ ციტოზინი. პიპერიდინით შემდგომი დამუშავება იწვევს დნმ-ის მოლეკულის ჰიდროლიზს მოდიფიცირებულ წერტილებში. ქიმიური რეაქციების ჩატარების შედეგად ვიღებთ მონიშნული ფრაგმენტების ნაკრებს, რომელთა სიგრძეებიც განისაზღვრება ჩამოჭრილი ფუძიდან მოლეკულის ბოლომდე. შემდეგ ხდება ოთხივე რეაქციის შედეგად მიღებული ფრაგმენტების ელექტროფორეზი ოთხ სხვადასხვა ხაზზე. შემდეგ ტარდება ავტორადიოგრაფია. ის ფრაგმენტები, რომლებიც შეიცავენ რადიაქტიულ იზიტოპს, რენტგენის ფირზე ტოვებენ დასხივებულ ლაქას. ლაქების განლაგების მიხედვით შესაძლებელია განისაზღვროს მონიშნული ბოლოდან რა მანძილზე მდებარეობს ჩამოხლეჩილი ფუძე და რადგანაც ცნობილია ფუძეების განლაგება გელის ზოლებში, შეიძლება განისაზღვროს მათი ადგილმდებარეობები.

ანალოგიური პროცედურით ხდება სეკვენირება ფლუორესცენტული საღებავების გამოყენებისას.

თუ ოთხივე ნუკლეოტიდისთვის შერჩეულია ოთხი განსხვავებული ფერის საღებავი, მაშინ ელექტროფორეზის ჩატარებისას ყველა ნიმუში დაიტანება ერთ ზოლზე. ამ შემთხვევაში ნუკლეოტიდების განლაგება აღინიშნება სხვადასხვა ფერით, ხოლო გათვლების პროცედურა ადვილად ავტომატიზირდება.

სენგერის ფერმენტაციული მეთოდი

მეორე მეთოდი, რომელიც შემუშავებულია სენგერის მიერ და მისივე სახელს ატარებს, დაფუძნებულია არა ქიმიურ, არამედ ფერმენტაციულ მიდგომაზე. სენგერი იყენებდა დნმ-პოლიმერაზა I-ს. უჯრედში ეს ფერმენტი მონაწილეობს რეპლიკაციის პროცესში და ახორციელებს ახალსინთეზირებულ დნმ-ის ფრაგმენტებს (ოკაზაკის ფრაგმენტების) შორის არსებული სივრცის შევსებას. ინვიტრო (in vitro) ფერმენტის ფუნქციონირებისათვის აუცილებელია დეზოქსირიბონუკლეოტიდფოსფატები (dNTP) და პრაიმერი (სურ. 39 გვ.114) სეკვენირება სენგერის მიხედვით.

ექსპერიმენტში ასევე გამოიყენებოდა სინთეზირებული, მოდიფიცირებული დიდეზოქსირიბონუკლეოტიდები (ddNTP), რომლებშიც 3'-OH ჯგუფი არ არის წარმოდგენილი. დნმ-პოლიმერაზა მოდიფიცირებულ მოლეკულებს, ჩვეულებრივ, ჩართავს დნმ-ში, მაგრამ მათ არ შეუძლიათ ფოსფოდიეთერული კავშირის წარმოქმნა მეზობელ დეზოქსირიბონუკლეოტიდთან 3'-OH ჯგუფის არარსებობის გამო. შედეგად, ჩერდება ელონგაციის პროცესი იმ ადგილზე, სადაც ჩაერთვება დიდეზოქსირიბონუკლეოტიდი. ამის გამო მათ ელონგაციის ტერმინატორებს უწოდებენ.

სენგერის მიხედვით, სარეაქციო არე შედგება: დნმ-ის ჯაჭვის დასადგენი თანმიმდევრობისაგან, პრაიმერისაგნ, რომელიც დნმ-ის ჯაჭვის დაბოლოების კომპლემენტარულია, ოთხიდან ერთ-ერთი ddNTP-სგან, ddNTP-ს შესაბამისი dNTP-სგან, მკაცრად განსაზღვრული თანაფარდობით (რათა არ მოხდეს მათ შორის კონკურენცია) და სამი დანარჩენი dNTP-სგან. მზადდება ოთხი ნარევი, რომელთაგან თითოეული შეიცავს ოთხიდან ერთ-ერთ ddNTP-ს. თითოეულ სინჯარაში წარმოიქმნება დნმ-ის ფრაგმენტების სხვადასხვა სიგრძის ნაკრები. მათი სიგრძეები დამოკიდებულია იმაზე, თუ ჯაჭვის რა ადგილში ჩაერთო დეფექტური ნუკლეოტიდი. მიღებული მონიშნული დნმ-ის ფრაგმენტები იყოფიან პოლიაკრილამიდის გელში, ერთი ნუკლეოტიდის სიზუსტით. ავტორადიოგრაფიის ჩატარების შემდეგ, ოთხივე ნიმუშის ფრაგმენტების განლაგების საფუძველზე დგინდება დნმ-ს ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობა, მზადდება სეკვენირების გელი და ტარდება ელექტროფორეზი.

როგორც უკვე აღვნიშნეთ, რადიაქტიულად ან ფლუოროსცენტულად მონიშნული ერთჯაჭვიანი დნმ-ის ფრაგმენტების დაყოფა ხდება ელექტროფორეზით პოლიაკრილამიდის გელში. სეკვენირებისთვის გამიზნულ გელს უნდა შეეძლოს ერთი ნუკლეიტიდით განსხვავებული ფრაგმენტების დაყოფა. დაყოფა უნდა მიმდინარეობდეს დენატურირებად პირობებში, რათა არ მოხდეს დასაყოფი ფრაგმენტების რენატურიზაცია და მეორეული სტრუქტურების წარმოქმნა. ასეთ პირობებს აკმაყოფილებს 5-8%-იანი გელი, რომელიც შეცავს 7M შარდოვანას. ჩვეულებრივ, ელექტოფორეზი მიმდინარეობს ტრის-ბორატის ბუფერში (89mM Tris-HCI, 8,9mM ბორის მჟავა, 2 Mm ედტა, pH 8.0 – 8.5). ეფექტური დაყოფის მისაღებად, ძაბვა გელის ყოველ სანტიმეტრზე, უნდა შეადგენდეს 30 – 50 ვოლტს. ელექტროფორეზის წარმატებით ჩატარების მნიშვნელოვანი პირობა ტემპერატურის ერთგვაროვნებაა გელის მთლიან ზედაპირზე. გელისა და მინის არათანაბარი გათბობა იწვევს სხვაობებს დნმ-ის ფრაგმენტების მოძრაობის სიჩქარეებში და შედეგად ვღებულობთ სახეცვლილ სურათს. ამისაგან თავის ასარიდებლად გამოიყენება თხელი (ჩვეულებრივ, 0.4 – 0.1 მმ სისქის) გელები და ხდება მინის შეთბობა.

ავტომატურ სეკვენატორებში, პოლიაკრილამიდის ფირფიტული ელექტროფორეზის გარდა, გამოიყენება პოლიაკრილამიდის კაპილარული ელექტროფორეზი. კაპილარი 30-100 სმ სიგრძის მინის მილაკია, რომელიც მოთავსებულია პოლიმერულ პლასტიფიკატორში. კაპილარების მცირე დიამეტრი (50 – 100 მკმ) გელთან შედარებით, ჩვეულებრივ, გაცილებით სწრაფად დაყოფის საშუალებას იძლევა. ამასთან, ჰორიზონტალური დიფუზიის არარსებობის გამო, კაპილარული ელექტროფორეზი გაცილებით დიდი სიზუსტით გამოირჩევა.

დნმ-ის ავტომატური სეკვენირება

ავტომატურ სეკვენირებას საფუძვლად უდევს ზემოთ განხილული ფერმენტული სეკვენირების მეთოდი ddNTP-ის გამოყენებით. ისევე, როგორც სენგერის კლასიკურ შემთხვევაში, ავტომატური სეკვენირებაც ორ ეტაპს მოიცავს: ტერმინირებადი რეაქციის ჩატარება და ამ რეაქციის შედეგად მიღებული დნმ-ის ფრაგმენტების ელექტროფორეზული დაყოფა. როგორც წესი, ავტომატიზაციას ექვემდებარება მხოლოდ მეორე ეტაპი. ამ მეთოდში გამოიყენება მხოლოდ ფლუორესცენტული მონიშვნა. ფლუორესცენტულად ინიშნება პრაიმერი ან ტრანსკრიფციის ტერმინატორი, შემდეგი სქემების მიხედვით: მონიშნული პრაიმერი (ოთხი სხვადასხვა საღებავი) და მოუნიშნავი ტერმინატორი; მონიშნული პრაიმერი (ერთი საღებავი) და მოუნიშნავი ტემინატორი. მონიშნული ტერმინატორების გამოყენებისას ტარდება ოთხი დამოუკიდებელი რეაქცია ოთხი სხვადასხვა ტერმინატორისთვის. ერთი საღებავის

გამოყენების შემთხვევაში, მიღებული დნმ-ის ფრაგმენტების დაყოფა ხდება ოთხ სხვადასხვა ზოლზე (ან კაპილარში); ხოლო, თუ გამოიყენება ოთხი განსხვავებული საღებავი, დაყოფა შეიძლება ჩატარდეს ერთ ზოლში (ან კაპილარში).

ფლუორესცენცია – ეს არის ფენომენი, რომლის დროსაც მოლეკულის მიერ განსაზღვრული ტალღის სიგრძის სინათლის სხივის შთანთქმას მოსდევს უფრო გრძელი ტალღის სიგრძის სინათლის გამოსხივება. ფლუორესცენციის მეთოდის გამოყენების შემთხვევაში, ფლუორესცენტული მოლეკულის ასაგზნებად გამოიყენება მაღალი ინტენსივობის სინათლე. როდესაც მოლეკულა შთანთქავს ფოტონებს (აბსორბცია), მისი ელექტრონები აღიგზნებიან უფრო მაღალ ელექტრონულ დონემდე. ელექტრონების „დასვენების“ შემდეგ ისინი უბრუნდებიან საწყის დონეს. ამ დროს რხევითი ენერგია იკარგება და გამოსხივების სპექტრი იხრება გრძელი სიგრძის ტალღების მიმართულებით (ემისია).

აბსორბციისა და ემისიის სპექტრები დამოკიდებულნი არიან ფლუოროფორის სტრუქტურაზე. ისინი, ასევე, დამოკიდებულნი არიან იმ პირობებზე (მაგ. pH, ტემპერატურა და სხვა), რომლებშიც მოთავსებულია ფლუოროფორის მოლეკულა. ავტომატური სეკვენირების დროს იხმარება ფლუოროფორები, რომლებიც აბსორბცირებენ 450 – 650 ნმ ფარგლებში და გამოასხივებენ 650–825 ნმ. დღესდღეობით, დასინთეზირებულია მრავალი ფლუორესცენტული საღებავი. მაღალი კვანტური გამოსავალის გარდა ისინი უნდა აკმაყოფილებდნენ შემდეგ პირობებს: დნმ-ს მონიშვნისას რაც შეიძლება მცირედ უნდა იცვლებოდეს ელექტროფორეტული ძვრადობა და არ უნდა ხდებოდეს ემისიის სპექტრების გადაფარვა.

პირველი ფლუოროფორები, რომლებიც გამოიყენებოდნენ სეკვენირებისთვის, იყვნენ ფლუორესცეინული (FAM, JOE) და როდამინული (TAMRA, ROX, R110, R6G) საღებავები სურ. 40 (გვ.115) ფლუოროფორები რეკომბინანტული დნმ-ის კონსტრუირება .

რეკომბინანტული დნმ გულისხმობს სხვადასხვა ბიოლოგიური წყაროდან მიღებული ორი ან მეტი დნმ-ის ფრაგმენტის გაერთიანებას in vitro.

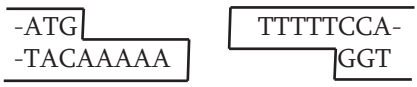
დნმ-ის ფრაგმენტების ჩაკერება დნმ-ის ფრაგმენტის დაბოლოებების გვარობაზე დამოკიდებულებით, შეიძლება განხორციელდეს სამი ძირითადი მეთოდის საშუალებით:

1. ჩაკერება ერთგვაროვანი წებოვანი დაბოლოებებით (რესტრიქტაზულ-ლიგაზური მეთოდი). ეს მეთოდი ყველაზე გავრცელებული და პოპულარულია. ზოგიერთი რესტრიქტაზა (მაგ., Pst I) ამოცნობის უბნიდან მარჯვნივ და მარცხნივ, ერთნაირ მანძილზე, ხლეჩს დნმ-ის მოლეკულას ე.წ. საფეხურის წარმოქმნით. როგორც ვიცით, ამგვარი დაბოლოებები „წებოვანია” და ისინი ურთიერთკომპლემენტარული

არიან. ამგვარად, ერთი და იმავე რესტრიქტაზით დახლეჩილი ფრაგმენტები შეიძლება ადვილად დაუკავშირდნენ ერთმანეთს კომპლემენტარობის პრინციპით (სურ. 41. გვ.115). რესტრიქტაზა-ლიგაზური მეთოდის სქემა.

ამგვარი დაკავშირების შემდეგ, ორმაგი სპირალის მთლიანობა აღარ აღსდგება, რადგანაც რჩება ორი გახლეჩის ადგილი ფოსფოდიეთერულ ჩონჩხში. მათი გადაბმის, ანუ ლიგირების მიზნით, იყენებენ დნმ-ლიგაზას.

2. „ბლაგვი" დაბოლოებების გადაბმა (კონექტორული მეთოდი) დნმ-ლიგაზას საშუალებით ასევე შესაძლებელია „ბლაგვი" ბოლოების გადაბმაც, თუ სარეაქციო არეში ლიგაზაც და „ბლაგვი" ბოლოებიც მაღალი კონცენტრაციით არიან წარმოდგენილი. ამ შემთხვევაში რეაქციას გააჩნია თავისებურებები და ნაკლებად ეფექტურია. პირველად ამგვარი ექსპერიმენტი ჩატარდა 1972წ. პოლ ბერგის მიერ, სტენფორდის უნივერსიტეტში. „წებოვანი" დაბოლოებების მიერთება დნმ-ის „ბლაგვ" ბოლოებთან ასევე შესაძლებელია, თუ გამოვიყენებთ ხბოს თიმუსის ფერმენტს – ტერმინალურ ტრანსფერაზას, რომელიც უერთებს ნუკლეოტიდებს დნმ-ის ჯაჭვის 3'-ბოლოს. თუ in vitro რეკომბინანტულ დნმ-ის ერთ-ერთი ფრაგმენტის 3'-ბოლოს ტერმინალური დეზოქსინუკლეოტიდტრანსფერაზით მივუერთებთ გარკვეული სიგრძის ერთჯაჭვიან ოლიგო (dA)-ს, ხოლო მეორე ფრაგმენტის ბოლოებს – იმავე სიგრძის ოლიგო (dT)-ს, ამ ფრაგმენტების შერევისას ოლიგო (dA)-ს და ოლიგო (dT)-ს შორის წარმოიქმნება წყალბადური კავშირები და მოხდება ორი ფრაგმენტის შერწყმა სურ. 42. ორი ფრაგმენტის კოვალენტურად დაკავშირებისათვის გამოიყენება დნმ-ლიგაზა. აღწერილი პროცედურები შეადგენენ დნმ-ის რეკომბინანტული მოლეკულის მიღების მეორე მეთოდის საფუძველს.



ფრაგმენტი 1. ფრაგმენტი 2. „ჩაკერებული" დნმ

სურ. 42. „წებოვან" ფრაგმენტებთან ოლიგონუკლეიტიდების მიერთება და დნმ-ის გადაკერება

ჩაკერებულმა ოლიგონუკლეოტიდებმა შესაძლებელია გავლენა იქონიონ შეერთებული მოლეკულის ფუნქციაზე, ამიტომ რეკომბინანტული დნმ-ის მოლეკულების მისაღებად, შესაძლებლობის ფარგლებში, უმჯობესია რესტრიქტაზული მეთოდის გამოყენება.

3. არაერთგვაროვანი (არაკომპლემენტარული) „წებოვან" ბოლოებიანი ფრაგმენტების გადაკერება. გვხვდება შემთხვევები, როდესაც საჭიროა სხვადასხვა რესტრიქტაზის მიერ დახლეჩილი, არაკომპლემენტარული

„წებოვან" ბოლოებიანი ფრაგმენტების გადაკერება. ამ დროს გამოიყენება ე.წ. „ლინკერები" (გადამყვანები). „ლინკერები" წარმოადგენენ რესტრიქციის უბნის ქიმიურად სინთეზირებულ ოლიგონუკლეოტიდებს ან მათ კომბინაციას. სინთეზირებულია „გადამყვანების" მრავალი ნაირსახეობა. იგულისხმება, რომ მათი გამოყენებისას გასათვალისწინებელია გენეტიკური ინფორმაციის ექსპრესიის წესების დაცვა. ხშირ შემთხვევაში, „ლინკერების" შუა უბანში ათავსებენ გენეტიკური რეგულაციის რომელიმე ელემენტს, მაგალითად, პრომოტორს ან რიბოსომასთან დამაკავშირებელ მონაკვეთს. ასეთ შემთხვევაში, „ლინკერები" ახდენენ არა მხოლოდ გენების გაერთიანებას, არამედ ემსახურებიან მათ ექსპრესიასაც. არსებობს ლინკერები „ბლაგვი ბოლო – წებოვანი ბოლო". აუცილებლობის შემთხვევაში შეიძლება წებოვანი ბოლოების გადაქცევა „ბლაგვ" ბოლოებად. ამის მისაღწევად ხდება წებოვანი ბოლოს მოცილება ფერმენტ ენდონუკლეაზა S1-ით, რომელიც არღვევს მხოლოდ ერთჯაჭვიან დნმ-ს. შესაძლებელია დნმ-პოლიმერაზა 1-ით წებოვანი ბოლოების კომპლემენტარული ჯაჭვის „მიშენებაც".

ჰიბრიდიზაცია - ნუკლეოტიდების სპეციფიკური თანმიმდევრობის გამოვლენის მაღალმგრძნობიარე მეთოდი

დნმ-ის წყალხსნარის 100°C-ზე გაცხელებით, pH-13-ზე, დნმ-ის ფუძეებს შორის არსებული კომპლემენტარული კავშირები იშლება, ანუ ხდება დნმ-ის დისოციაცია ორ ჯაჭვად. ეს პროცესი შექცევადია, 65°C-ზე ხდება ორმაგი სპირალის აღდგენა. ამ პროცესს ეწოდება რენატურაცია ანუ ჰიბრიდიზაცია. ჰიბრიდიზაცია ხდება ნებისმიერ ერთჯაჭვიან ნუკლეინის მჟავის მოლეკულებს შორის, თუ ეს ჯაჭვები ერთმანეთის კომპლემენტარული არიან: დნმ-დნმ, რნმ-რნმ, დნმ-რნმ. ნუკლეოტიდების გარკვეული თანმიმდევრობის გამოვლინებისათვის საჭიროა კომპლემენტარული ერთჯაჭვიანი დნმ-ის სუფთა პრეპარატის – დნმ-ზონდის – არსებობა. ასეთი ფრაგმენტის მიღება შესაძლებელია კლონირებით ან ქიმიური სინთეზით. იგი შეიძლება შეიცავდეს 15-1000 ნუკლეოტიდს. ამგვარ ზონდებს იყენებენ სხვადასხვა მიზნით. მაგალითად, გენის ექსპრესიის დასადგენად დნმ-ის ზონდი ჰიბრიდიზირდება საკვლევი უჯრედის რნმ-სთან, თუ ჰიბრიდიზაცია არ მოხდება, ეს იმის მაუწყებელია, რომ გენი არ ექსპრესირდება. დნმ-ზონდების საშუალებით ხდება მემკვიდრეობითი დაავადებების დიაგნოსტიკა.

მემკვიდრული დაავადებების გამომწვევი მუტაციები უმეტეს შემთხვევაში რეცესიულია. ავადმყოფობის განვითარება ხდება

იმ შემთხვევაში, თუ დეფექტური გენები გადაცემულია ორივე მშობლიდან. ანომალური ემბრიონის გამოვლინება უმჯობესია მოხდეს დაბადებამდე. ნამგლისებური ანემიის დროს მუტანტი გენი, რომელიც ახორციელებს ბეტა-ჰემოგლობინის კოდირებას, GAG თანმიმდევრობის ნაცვლად, შეიცავს GTG თანმიმდევრობას. ამ დეფექტის გამოვლენის მიზნით, ასინთეზებენ 20 ფუძის შემცველ ფრაგმენტს, რომელიც რადიაქტიულად არის მონიშნული. ამნიონის სითხის ემბრიონული უჯრედებიდან გამოიყოფა დნმ და ჰიბრიზირდება დნმ-ზონდთან. დადებითი შედეგის მიღება მიანიშნებს ემბრიონის დეფექტურობაზე. ანალიზი შემდეგი სქემით მიმდინარეობს (სურ. 43. გვ.116):

1. რესტრიქტიული ენდონუკლეაზების საშუალებით ხდება მაღალმოლეკულური დნმ-ის დაჭრა პატარა ფრაგმენტებად;
2. მიღებული ფრაგმენტები ფრაქციონირდება ელექტროფორეზით აგაროზის გელზე;
3. თუ ბოლოების კომპლემენტარული ჯაჭვის დნმ-ის ზოგიერთი ფრაგმენტის სიდიდე აღემატება 15000 ფუძე წყვილს, ბლოტინგის ჩატარებამდე გელს ამუშავებენ განზავებული მარილმჟავით, დნმ-ის ფრაგმენტების დეპურინიზაციის მიზნით (ეს დნმ-ის ისეთი ცვლილებაა, რომლის დროსაც, ჰიდროლიზის გამო, პურინის ფუძე შორდება დეზოქსირიბოზას). ამ პროცესის დროს დნმ-ს ფრაგმენტი იშლება უფრო პატარა ფრაგმენტებად, რაც აადვილებს მათ გადასვლას გელიდან მემბრანაზე;
4. თუ გამოიყენება გადატანის ტუტე მეთოდი, დნმ-ის გელი თავსდება ტუტე (ჩვეულებრივ, ნატრიუმის ჰიდროქსიდის) ხსნარში დნმ-ის ორმაგი ჯაჭვის დენატურაციის მიზნით. ტუტე გარემოში დენატურირება აუმჯობესებს უარყოფითად დამუხტული დნმ-ის დაკავშირებას დადებითად დამუხტულ მემბრანასთან და ახდენს დნმ-ის ჯაჭვების განცალკევებას, ასევე ანადგურებს ნარჩენ რნმ-ს;
5. ნიტროცელულოზის ან ნეილონის მემბრანა ეფინება გელს, შემდეგ ეფინება ფილტრის ქაღალდის რამდენიმე შრე, რაც უზრუნველყოფს კარგ კონტაქტს გელსა და მემბრანას შორის და ასევე ხელს უწყობს ბუფერული ხსნარის ნელ შედინებას ელექტროფორეზის პერპენდიკულარული მიმართულებით. ამ დროს ხდება დნმ-ის გადაადგილება გელიდან მემბრანაზე და იონცვლადი პროცესის საშუალებით მასთან დაკავშირება;
6. მემბრანა, ჩვეულებრივ, თავსდება ვაკუუმ-ღუმელში 2 საათის განმავლობაში 80°C-ზე, ან მუშავდება ულტრაიისფერი სხივებით, დნმ-ის მემბრანასთან შეუქცევადად დაკავშირების მიზნით. ზოლების ადგილმდებარეობა ფილტრზე ზუსტად შეესაბამება მათ მდებარეობას გელზე;
7. შემდეგ ხდება მემბრანაზე გადმოტანილი დნმ-ის ჰიბრიდიზაცია ერთჯაჭვიან, სპეციფიკური თანმიმდევრობის მქონე დნმ-

ის ფრაგმენტთან, რომელიც მონიშნულია რადიაქტიულად ან ფლუორესცენტულად. იმ შემთხვევაში, თუ მემბრანაზე გადმოტანილი დნმ-ის შემადგენლობაში არსებობს შესაბამისი კომპლემენტარული უბანი, მოხდება ამ უბნის დეტერმინირება. არასპეციფიკური დაკავშირების თავიდან ასაცილებლად გამოიყენება თევზის სპერმის დნმ, რომელიც ბლოკავს მემბრანის ზედაპირსა და სამიზნე დნმ-ს;

8. ჰიბრიდიზაციის შემდეგ მემბრანიდან ნარჩენი დნმ შორდება გარეცხვით. ჰიბრიდიზირებული ნიმუშის ვიზუალიზაცია ხდება ავტორადიოგრაფიულად, რენტგენის ფირზე (რადიოაქტიური ნიშნულის შემთხვევაში), ხოლო თუ გამოყენებულია ფლურესცენტული მონიშვნა, იხმარება გამოვლინების ქრომოგენული მეთოდი.

ეს მეთოდი 1975 წელს შეიმუშავა საუზერნმა და მისივე სახელს ატარებს. ანალიზის ყველაზე თანამედროვე და ზუსტი მეთოდია ე. წ. „მწკრივების“ (Arrey) მეთოდი ჩიპებზე. ჩიპი ფირფიტაა, რომელზეც იმობილიზირებულია დნმ-ის მონიშნული ზონდები. თითოეული ასეთი ჩიპი შეიძლება შეიცავდეს რამოდენიმე ათას ზონდს. საკვლევი ნიმუშის კვლევისას ხდება მისი ინკუბირება ჩიპის ზონდებთან, თუ ნიმუშში არსებობს ზონდის კომპლემენტარული თანმიმდევრობა, ხდება ჰიბრიდიზაცია. ჰიბრიდიზაციის აღმოჩენა შეიძლება სპეციალური დანადგარით, რომელიც დაკავშირებულია კომპიუტერთან და სპეციალური პროგრამა ავტომატურ რეჟიმში ახდენს მიღებული ინფორმაციის დამუშავებას. დნმ-ჩიპები გამოიყენება ინფექციური და მემკვიდრული დაავადებების კომპლექსური კვლევებისათვის, ამა თუ იმ გენის ექსპრესიის გამოსავლენად. გენების ექსპრესიის შესწავლისას დნმ-ს ნაცვლად იყენებენ რნმ-ის ჰიბრიდიზაციის მეთოდს.

დნმ-ის კლონირების მეთოდები – გენომური ბიბლიოთეკები, დნმ-ის in vivo კლონირება

არსებობს დნმ-ის კლონირების ორი მეთოდი, პერველი მეთოდის თანახმად, შესაძლებელია გამოვიყენოთ ბაქტერიული ან საფუვრის უჯრედი და მოვახდინოთ სასურველი დნმ-ის გამრავლება ამ უჯრედებში. მეორე მეთოდია დნმ-ის ინვიტრო (in vitro) ამპლიფიკაცია. მიკროორგანიზმების გამოყენებით (დნმ-ის in vivo კლონირება) შესაძლებელია მივიღოთ ორი ტიპის დნმ-ის ბიბლიოთეკა: გენომური და კლონური (კდნმ).

გენომური ბიბლიოთეკა. თუ რომელიმე ორგანიზმის გენომს დავჭრით, ჩავსვამთ პლაზმიდურ ან ვირუსულ ვექტორში და შევიყვანთ უჯრედში, შესაძლებელი იქნება გენომის ამ ფორმით შენარჩუნება. პლაზმიდური და ვირუსული ვექტორების შექმნის

პრინციპი არ განსხვავდება, ამიტომ განვიხილოთ პლაზმიდური ვექტორის წარმოქმნის მაგალითი. აღსანიშნავია, რომ ვირუსული დნმ-იდან უმჯობესია ფაგური დნმ-ის გამოყენება, რადგანაც მათ უფრო დიდი მოცულობები გააჩნიათ და გენომის დიდი ფრაგმენტების ჩაკერების საშუალებას იძლევიან. გასუფთავებული რგოლოვანი დნმ მუშავდება რესტრიქტაზებით და მიიღება ხაზოვანი დნმ უჯრედული დნმ მუშავდება იმავე რესტრიქტაზებით, ემატება პლაზმიდური დნმ და ლიგაზები. ამგვარად, მიიღება რეკომბინანტული პლაზმიდური დნმ, რომელიც შეიყვანება ბაქტერიულ ან საფუვრის უჯრედში. ხდება პლაზმიდის რეპლიკაცია და მრავალი ასლის მიღება. მრავალი პლაზმიდა შეიცავს ანტიბიოტიკებისადმი მდგრადობის გენს. თუ რეკომბინანტულ პლაზმიდაში წარმოდგენილია ასეთ გენი, მაშინ ასეთი უჯრედების გამოვლენა ძალზე ადვილია, მათი ანტიბიოტიკის შემცველ ნიადაგზე გაზრდით. თითოეული ამგვარი კოლონია ერთი უჯრედისგან წარმოშობილი თაობებია. ერთი კოლონიის პლაზმიდები შეიცავენ გენომური დნმ-ის კლონს, ხოლო პლაზმიდების ერთიანობას შეიძლება ეწოდოს გენომური დნმ-ის ბიბლიოთეკა. ამ მეთოდის ნაკლი ისაა, რომ წარმოიქმნება დნმ-ის ფრაგმენტების უზარმაზარი რაოდენობა. გენომური დნმ-ის გახლეჩას შემთხვევითი ხასიათი აქვს, ამიტომ სრულფასოვან გენებს შეიცავს ფრაგმენტების მხოლოდ ნაწილი. ზოგიერთი ფრაგმენტი შეიძლება შეიცავდეს მხოლოდ გენის მონაკვეთს ან, სულაც, ინტრონულ თანმიმდევრობას.

კდნმ-ის ბიბლიოთეკა. კდნმ-ის მიღება იწყება კომპლემენტარული დნმ-ის სინთეზით რნმ-ის მატრიცაზე, უკუტრანსკრიპტაზის თანაობისას. შემდეგ ტუტე გარემოში ხდება რნმ-ის დაშლა და დნმ-პოლიმერაზისსაშუალებით დნმ-ის კომპლემენტარული ჯაჭვის სინთეზი. ამ შემთხვევაში წარმოიქმნება დნმ-ის ბლაგვბოლოიანი ფრაგმენტები. ამგვარი დნმ „ეკერება“ პლაზმიდაში და შეიყვანება ბაქტერიაში. პლაზმიდის ამპლიფიცირებისას წარმოიქმნება დნმ-ის კომპლემენტარული ასლის კლონი – კდნმ-ი. კლონური დნმ-ის უპირატესობა გენომური დნმ-ის კლონებთან შედარებით ის არის, რომ ცილის მაკოდირებელი ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობა არ არის დარღვეული. ეუკარიოტების გენები შეიცავენ ინტრონებს, რომლებიც უნდა მოცილდნენ ტრანსკრიპტორული რნმ-დან, რათა მოხდეს ამ უკანასკნელის გადაქცევა მატრიცულ რნმ-ად, რასაც მოსდევს სპლაისინგი (შერწყმა). ბაქტერიულ უჯრედებს არ შეუძლიათ რნმ-ის ამგვარი მოდიფიკაციის განხორციელება, ამიტომ კლონირებული გენის ექსპრესიით ცილის მისაღებად, უკეთესია გამოვიყენოთ რნმ-ის მატრიცაზე მიღებული კდნმ-ის ბანკი.

დნმ-ის კლონირების მეთოდი პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციაა, რომლის პრინციპები ზემოთ იყო განხილული.

გენის შეყვანა უჯრედში

რეკომბინანტური გენის უჯრედში შეყვანა შეიძლება მოხდეს ორი გზით: ვექტორის გამოყენებით და პირდაპირი შეყვანით. ვექტორი წარმოადგენს დნმ-ის ან რნმ-ის მოლეკულას, რომელიც ორი კომპონენტისგან შედგება: ვექტორული ნაწილი (მატარებელი) და კლონირებული უცხო გენი. მისი ფუნქციაა შეიტანოს შერჩეული დნმ უჯრედ-რეციპიენტში, ჩართოს იგი გენომში, გააადვილოს ტრანსფორმირებული უჯრედების იდენტიფიკაცია და უზრუნველყოს მოცემული გენის სტაბილური ექსპრესია. ამგვარად, ვექტორი უნდა იყოს პატარა ზომის, უნდა ინარჩუნებდეს სიცოცხლისუნარიანობას მასპინძლის უჯრედში (რეპლიცირებდეს), უნდა განიცდიდეს მრავალჯერად კოპირებას (ამპლიფიკაციას), ექსპრესირებდეს შესაბამის გენს, უნდა შეიცავდეს მარკერულ გენს, რომლის მიხედვითაც მოხდება ჰიბრიდული უჯრედების ამოცნობა, მათი ეფექტიანი სელექციის მიზნით. არჩევენ მარკერული გენების ორ ჯგუფს: 1. სელექციური გენები, პასუხისმგებლები ანტიბიოტიკურ და ჰერბიციდულ მედეგობაზე. ამგვარი უჯრედების სელექციურ არეებზე გაზრდისას, რომელსაც დამატებული ექნება გარკვეული ნივთიერება, არატრანსფორმირებული უჯრედების გამრავლების და დაყოფის ინჰიბიტორი, მიიღება მკვლევრისათვის საინტერესო უჯრედებით გამდიდრებული კოლონია. 2. რეპორტული გენები, რომლებიც აკოდირებენ ცილას, რომელიც აადვილებს ქსოვილებში მის ტესტირებას და, ამავდროულად, ნეიტრალურია უჯრედებისთვის. დღესდღეობით, იყენებენ შემდეგი ცილების რეპორტულ გენებს: -β-გლუკოზიდაზა (GUS), მწვანე ფლუორესცენტული ცილა (GFP), ლუციფერაზა(LUC), ქლორამფენიკოლაცეტილტრანსფერაზა (CAT). ყველაზე ხშირად გამოიყენება GFP (green fluorescent protein), რადგანაც მას ახასიათებს ბუნებრივი ფლუორესცენცია და მის აღმოჩენას რაიმე დამატებითი სუბსტრატები არ ესაჭიროება.

პროკარიოტული გენების ექსპრესიის რეგულაცია

გენისუმთავრესითვისებაექსპრესიაა.გენისექსპრესიაზეპასუხისმგებელია სხვადასხვა გენეტიკური ელემენტი, რომელთა ჩართვა აუცილებელია გენის მატარებელი ვექტორის მოლეკულაში. მრავალი ბაქტერიული გენი განსხვავებული ეფექტიანობით ფუნქციონირებს. მაგალითად, E. coli-ში ცილების ფარდობითი შემცველობა ვარირებს 0.1%-დან 2%-მდე, მათ ფუნქციაზე დამოკიდებულებით; ამასთან ერთად, თითოეული ცილა კოდირდება ერთი გენით. ამგვარი ვარიაციები განპირობებულია გენის ექსპრესიის სისტემის კონტროლით, რომელიც ხორციელდება დნმ-ის ტრანსკრიფციის დონეზე. ამგვარად, გენის

აქტივობა დაკავშირებულია სინთეზირებული მატრიცული რნმ-ის რაოდენობაზე, ანუ ფერმენტ რნმ-პოლიმერაზის აქტივობაზე. დნმ-ის თანმიმდევრობებს, რომლებიც განლაგებულნი არიან სტრუქტურული გენის საწყის უბანზე და განსაზღვრავენ რნმ-პოლიმერაზის აქტივობის დონეს, ეწოდება რეგულატორული თანმიმდევრობები. ერთ-ერთ ასეთ თანმიმდევრობასთან ხდება რნმ-პოლიმერაზას დაკავშირება და მას პრომოტორი ეწოდება. პრომოტორის თანმიმდევრობა განსაზღვრავს ინფორმაციული რნმ-ის სინთეზის ინიციაციის სიხშირეს. ამ თანმიმდევრობაში ერთი ფუძის შეცვლამ შესაძლებელია გამოიწვიოს სიხშირის 1000-ჯერადი შემცირება. პრომოტორი შეიძლება იყოს ძლიერი ან სუსტი. ძლიერი პრომოტორი აინიცირებს რნმ-ის ხშირ სინთეზს. სუსტი – გაცილებით იშვიათ სინთეზს. მეორე მხრივ, პრომოტორი შეიძლება იყოს რეგულირებადი ან არარეგულირებადი. საუკეთესო ვარიანტია ძლიერი, რეგულირებადი პრომოტორის გამოყენება. ზოგიერთი პლაზმიდური ვექტორი შეიცავს პრომოტორს, რომელიც რეგულირდება გენი-რეპრესორის თერმომგრძნობიარე ცილოვანი პროდუქტით. ცილა-რეპრესორი აქტიურია განსაზღვრულ ტემპერატურაზე და აბრკოლებს პრომოტორის მოქმედებას. ტემპერატურის 42°C-მდე აწევით შესაძლებელია პრომოტორის გააქტივება და საჭირო ცილის დიდ რაოდენობით წარმოება. განსაზღვრული სტრუქტურული გენების ტრანსკრიფციის ინტენსივობა დამოკიდებულია ტერმინაციის ეფექტიანობაზე, ანუ რა სიხშირით იწყებს რნმ-პოლიმერაზა რნმ-ის სინთეზს. ნაჩვენებია, რომ გარკვეულ პირობებში, E. coli-ის ოპერონებში, რომლებიც აკონტროლებენ ამინომჟავების ბიოსინთეზს, პრომოტორსა და პირველ სტრუქტურულ გენს შორის წარმოიქმნება ტერმინირების სიგნალი, რომელიც ამცირებს ტრანსკრიფციის ინტენსივობას. ამ მოვლენას ეწოდა ანტენუაცია, ხოლო დნმ-ის უბანს ატენუატორი (შემსუსტებელი). ისევე როგორც რეპრესია, ატენუაციაც დამოკიდებულია შესაბამისი ამინოჟავების არსებობაზე. მაგალითად, რეპრესორის დეფექტით გამოწვეულ ტრიფტოფანდამოკიდებულ მუტანტურ უჯრედებში, ტრიფტოფანის ჭარბი შემცველობის პირობებში 10 რნმ-პოლიმერაზას მოლეკულიდან მხოლოდ 1 გადალახავს ატენუატორს და ამოიცნობს გენის სტრუქტურას. ტრიფტოფანის მოცილება ორჯერ ზრდის გენის ტრანსკრიფციის ეფექტიანობას. რეპრესიისგან განსხვავებით, ანტენუაცია დამოკიდებულია არა თავად ამინომჟავაზე, არამედ ტრიფტოფან- ტ-რნმ-ზე (ამინომჟავა ტრიფტოფანი, მიერთებული შესაბამის ტრნმ-სთან). რეკომბინანტული დნმ-ის პროდუქციულობის ეფექტიანობა გავლენას ახდენს ამ დნმ-ის ასლების რაოდენობაც (ერთ უჯრედზე გაანგარიშებით): რაც უფრო მეტია ასლის რაოდენობა, მით მეტია გენის ჯამური აქტივობა. E. coli-ში ექსპრესიის რეგულაცია ტრანსლაციის დონეზეც ხდება. 6-8 ფუძისგან შემდგარი თანმიმდევრობა,

რომელიც განლაგებულია აუგ-ინიციაციის კოდონის წინ, განსაზღვრავს ტრანსლაციის ეფექტურობას. ეს თანმიმდევრობა არის მატრიცული რნმ-ის რიბოსომასთან დაკავშირების უბანი. როგორც წესი, იგი განლაგებულია 8 ნუკლეოტიდის მანძილზე ინიცირების კოდონიდან და მისი გადაადგილება ნებისმიერი მიმართულებით იწვევს შესაბამისი მატრიცული რნმ-ის ტრანსლაციის ეფექტის დაქვეითებას. ამ თანმიმდევრობას ეწოდება შაინა-დალგარნოს თანმიმდევრობა. ვექტორის შემადგენლობაში ყოველივე ზემოაღნიშნულის გარდა, უნდა შედიოდეს მარკერული გენი, რომლის დახმარებითაც ხდება შეცვლილი უჯრედების სელექცია.

ეუკარიოტების გენების ექსპრესიის რეგულაცია

ეუკარიოტული ორგანიზმების ტრანსკრიფციის რეგულაციის მექანიზმები გაცილებით რთულია. ეუკარიოტების გენების კლონირებისა და სეკვენირების შედეგად აღმოჩენილია სპეციფიკური მიმდევრობები, რომლებიც მონაწილეობენ ტრანსკრიფციასა და ტრანსილაციაში. ეუკარიუტული უჯრედებისთვის დამახასიათებელია:

1. დნმ-ის მოლეკულაში ინტრონებისა და ეგზონების არსებობა;
2. საინფორმაციო რნმ-ის მომწიფება - ინტრონების ამოჭრა და ეგზონების გადაკერება;
3. ტრანსკრიფციის რეგულაციის ერთეულების არსებობა. ასეთებია: ა. 3 ტიპის პრომოტორი. თითოეულ მათგანზე ჯდება სპეციფიკური პოლიმერაზის მოლეკულები: რნმ-პოლიმერაზა 1, რომელიც ახდენს რიბოსომული გენების რეპლიკაციას; რნმ-პოლიმერაზა II, რომელიც ახდენს ცილების სტრუქტურულ გენების რეპლი-კაციას და რნმ-პოლიმერაზა III - მცირე ზომის რნმ-ის მაკოდირებელ გენების რეპლიკაციის ფერმენტი. რნმ-პოლიმერაზა I-ის და რნმ-პოლიმერაზა II-ის პრომოტორები განლაგებულნი არიან ტრანსკრიფციის ინიციაციის უბნის წინ, ხოლო რნმ-პოლიმერაზა III-ის პრომოტორი მოთავსებულია სტრუქტურული გენის ჩარჩოებში; ბ. მოდულატორები, რომელებიც ახდენენ ტრანსკრიფციის დონის გამაძლიერებელი დნმ-ის თანმიმდევრობის რეპლიკაციას; გ. გამაძლიერებლები (ენჰანსერები), რომელებიც რეპლიკაციას უკეთებენ ტრანსკრიფციის დონის გამაძლიერებელ თანმიმდევრობას; დ. ტერმინატორები, რომელებიც რეპლიკაციას უკეთებენ ტრანსილაციისა და ტრანსკრიფციის შემწყვეტ სპეციალურ თანმიმდევრობას.

აღნიშნული თანმიმდევრობები, პირველადი სტრუქტურითა და განლაგებით ინიციაციით კოდონთან მიმართებაში, განსხვავდებიან პროკარიოტული თანმიმდევრობებისგან და ბაქტერიული რნმ-პოლიმერაზა მათ ვერ შეიცნობს. ამგვარად, პროკარიოტულ უჯრედებში

ეუკარიოტული გენების ექსპრესიისათვის საჭიროა, რომ გენები იყვნენ პროკარიოტული რეგულატორული ელემენტების კონტროლის ქვეშ. ამ გარემოების გათვალისწინება აუცილებელია ვექტორების კონსტრუირებისას. სტრუქტურული გენები, რომლებიც განაპირობებენ ეუკარიოტული უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობას, ჩვეულებრივ, ფუნქციონირებენ აქტიურად მოქმედ უჯრედებში. ამა თუ იმ ქსოვილებისა თუ ორგანოსათვის სპეციფიკური გენები ტრანსლაციას განიცდიან მხოლოდ განსაზღვრულ უჯრედებში. მაგალითად, ადამიანის ჰემოგლობინის α - და β - სუბერთეულების მაკოდირებელი გენები ექსპრესირდებიან მხოლოდ ერითროციტების წინამორბედ უჯრედებში. უჯრედული სპეციფიკურობის შესანარჩუნებლად, სტრუქ-ტურული გენების გააქტიურება ან ინჰიბირება მნიშვნელოვანი ფაქტორია. არსებობს ცილოვანი წარმოშობის მრავალი ტრანსკრიფციის ფაქტორი.

უჯრედების მიერ სტრუქტურული გენების ჩართვისა და გამორთვის უნარი უაღრესად მნიშვნელოვანია უჯრედული სპეციფიკურობის შესანარჩუნებლად და ენერგეტიკული რესურსების ეკონომიური მოხმარებისთვის. აქედან გამომდინარე, ცილოვანი ბუნების მქონე ტრანსკრიფიის ფაქტორები უდიდესი მრავალფეროვნებით გამოირჩევა. მათი დიდი ნაწილი უშუალოდ უკავშირდება 10 ნ.წ-ზე ნაკლები სიგრძის მქონე ნუკლეოტიდურ თანმიმდევრობებს, რომლებიც სხვადასხვანაირად იწოდებიან: ბოქსი, მოდული, ინიციაციის ელემენტი, რეგულატორული ელემენტი. პროკარიოტებისაგან განსხვავებით, ეუკარიოტებს ოპერონები არ გააჩნიათ, ანუ ეუკარიოტების თითოეულ სტრუქტურულ გენს აქვს რეგულატორული ელემენტების საკუთარი ნაკრები. ეუკარიოტებში ტრანსკრიფციის რეგულაციაში დნმ - ცილების ურთიერთობების გარდა, მნიშვნელოვან როლს თამაშობს ცილა-ცილა ურთიერთობები. ეუკარიოტული სტრუქტურული გენების რეგულატორული ელემენტების ინდივიდუალობის მიუხედავად, თითოეული მათგანი შეიცავს 8 ნუკლეოტიდისგან შემდგარ პრომოტორულ უბანს (TATA-ბოქსს ანუ ჰოგნესის ბოქსს), CCAAT თანმიმდევრობას (CAT-ბოქსი), GC დინუკლეოტიდიან განმეორებად მონაკვეთს (GC-ბოქსი). ეს ელემენტები მდებარეობენ ინიციაციის უბნიდან, შესაბამისად, 25, 75 და 90 ნ.წ-ის მანძილზე (სურ. 44. გვ. 116).

ეუკარიოტების სტრუქტურული გენის ტრანსკრიფცია TATA -ბოქსთან ტრანსკრიფციის ფაქტორის დაკავშირების შემდეგ იწყება. ტრანსკრიფციის ფაქტორი წარმოადგენს 14-მდე ცილისაგან შემდგარ კომპლექსს. შემდეგ მათ უკავშირდება ტრანსკრიფციის სხვა ფაქტორი და ამგვარად მიღებულ ტრანსკრიფციის კომპლექსს უკავშირდება რნმ-პოლიმერაზა II. რამდენიმე დამატებითი დამხმარე ფაქტორის მონაწილეობით ხდება ტრანსკრიფციის ინიციაცია +1 წერტილზე.

ვექტორების ტიპები

არსებობს ვექტორების რამდენიმე ტიპი.

ბაქტერიული პლაზმიდები. ბაქტერიული დნმ-ი ძირითადად ქრომოსომებშია მოთავსებული. გარდა ქრომოსომული დნმ-ისა, ბაქტერიები დიდი რაოდენობით შეიცავენ რგოლოვან დნმ-ს, რომელთა მოლეკულური მასა მერყეობს 1,5-დან 300 მეგადალტონის ფარგლებში. ამგვარ მოლეკულებს პლაზმიდები ეწოდება. პლაზმიდები, როგორც წესი, შეიცავენ ანტიბიოტიკის მიმართ მედეგობის გენებს და მძიმე მეტალებისადმი მდგრადობის გენებს (R -პლაზმიდები). გარდა აღნიშნული გენებისა, ისინი აგრეთვე შეიცავენ ზოგიერთი ორგანული ნაერთის კატაბოლიზმის მაკონტროლირებელ გენს (მაგ., ბიოდეგრადაციის პლაზმიდები ან D -პლაზმიდები). პლაზმიდური დნმ გაცილებით მცირე ზომისაა ქრომოსომულთან შედარებით, ამიტომ მისი სუფთა სახით გამოყოფა უფრო ადვილია. კალციუმის იონების თანაობისას, ბაქტერიები (რეციპიენტები) ადვილად შთანთქამენ ნებისმიერ პლაზმიდას, იმის მიუხედავად, შეიცავენ თუ არა ისინი მსგავს პლაზმიდას და ამ ბაქტერიების შემდგომ თაობებში შეიძლება აღმოვაჩინოთ შთანთქმული პლაზმიდის მრავალი ასლი. აღსანიშნავია, რომ ბაქტერიული უჯრედი შეიცავს მხოლოდ ერთი ტიპის პლაზმიდებს და ზემოაღწერილი მოვლენა პლაზმიდების შეუთავსებლობის მაგალითია. არსებობს შეუთავსებლობის ჯგუფი - Inc-ჯგუფი (ინგლისურად incompatibility – „შეუთავსებლობა“). ასეთი ჯგუფი შეიძლება აერთიანებდეს რამდენიმე ურთიერთშეთავსებად პლაზმიდას, რომლებიც, ამავდროულად, შეუთავსებელნი არიან სხვა პლაზმიდებთან. ამგვარ პლაზმიდებს აქვთ საერთო თვისებები და თითქმის ჰომოლოგიური დნმ.

უჯრედში პლაზმიდების რაოდენობა შეიძლება მნიშვნელოვნად განსხვავდებოდეს. ეს დამოკიდებულია როგორც უჯრედის, ასევე პლაზმიდის გენეტიკურ თავისებურებაზე. უკონტროლო პირობებში, პლაზმიდები შესაძლებელია გამრავლდნენ მანამდე, სანამ მათი რაოდენობა უჯრედში არ მიაღწევს 10-200 ასლს. სათანადო კონტროლის შემთხვევაში, პლაზმიდები რეპლიცირდებიან იმავე სიჩქარით, რა სიჩქარითაც რეპლიცირდება ქრომოსომა, ბუნებრივია, რომ რეკომბინანტული დნმ-ის კლონირებისთვის პირველი ტიპის პლაზმიდების გამოყენება უფრო მისაღებია, თუმცა, არააუცილებელი, რადგან ქლორამფენიკოლის გამოყენებისას პლაზმიდებს შეუძლიათ გამრავლდნენ ქრომოსომების გაყოფისგან დამოუკიდებლად. ყველაზე ხშირად გამოყენებული პლაზმიდაა pBR 322, რომელიც შექმნილია E. coli-დან მიღებული პლაზმიდის ბაზაზე. იგი შეიცავს ორი ანტიბიოტიკისადმი (ამპიცილინის და ტეტრაციკლინის მიმართ)

მდგრადობის გენს, რომლებიც შეიცავენ რესტრიქციის უბანს. თუ რომელიმე დნმ-ის უცხო ფრაგმენტი ჩაერთვება მედეგობის გენის შემადგენლობაში, ეს გენი ინაქტივირდება, რაც აიოლებს დნმ-ის ფრაგმენტის ჩართვის დეტექციას. ამ დროს, მეორე ანტიბიოტიკისადმი რეზისტენტულობა შენარჩუნებულია. ამგვარად, შესაძლებელია ბაქტერიის იმ კლონის ამოცნობა, რომელიც შეიცავს რეკომბინანტულ პლაზმიდას.

ვირუსები

არსებობს ისეთი ვირუსები, რომლებიც არ იწვევენ უჯრედის სიკვდილს, მაგრამ ერთვებიან მასპინძელი უჯრედის გენომში და მრავლდებიან ამ უჯრედთან ერთად, ან იწვევენ მის უკონტროლო ზრდას და სიმსივნურ უჯრედად გადაქცევას. ასეთ ვირუსებს მიეკუთვნება დნმ-შემცველი ვირუსი SV-40 და პოლიომის ვირუსი. ზოგიერთი რნმ-შემცველი ვირუსის შეყვანა იწვევს ვირუსული ნაწილაკების გამოცალკევებას უჯრედიდან ლიზისის გარეშე. ასეთ ვირუსებს მიეკუთვნებიან სარკომის და შიდსის რეტროვირუსები. ბაქტერიული უჯრედისათვის ვექტორად გამოიყენება ბაქტერიოფაგი. უცხო დნმ-ის ჩანერგვის ვექტორებად ვირუსები მოისაზრება. ვირუსული ინფექციებისას ყოველი უჯრედი იღებს უცხო გენის დიდი რაოდენობის ასლებს. დნმ-ი შეიძლება ისე ჩაკერდეს, რომ იგი განიცდიდეს ვირუსული პრომოტორების ძლიერ გავლენას, რათა უზრუნველყოს გენის ექსპრესიის მაღალი დონე და მიღებული პროდუქტის დიდი რაოდენობა შემდგომი კვლევებისთვის. ბოლო წლებში შექმნილია მრავალრიცხოვანი "შატლი" ვექტორები (Shuttle vectors) და მათი რეკომბინანტული წარმოებულები, რომლებსაც აქვთ რეპლიკაციის უნარი როგორც ცხოველურ, ისე ბაქტერიულ უჯრედებში. მათ აგრეთვე აქვთ ცხოველურ უჯრედში კლონირებული გენის ეფექტიანი ექსპრესირების უნარი. არსებობენ ჰიბრიდული ვექტორები, რომლებიც შეიცავენ ფაგის დნმ-ს და პლაზმიდას. მათ რიცხვს მიეკუთვნებიან კოსმიდები და ფაზმიდები. კოსმიდები ისეთი პლაზმიდური ვექტორებია, რომლებშიც ჩართულია ფაგი-λ-ს გენომი. ფაზმიდებიც ფაგისა და პლაზმიდას ჰიბრიდიზაციით წარმოიქმნებიან. უცხო დნმ-ის ჩაკერების შემდეგ, სპეციფიკური პირობიბის შერჩევით, ისინი ვითარდებიან ფაგებად ან პლაზმიდებად.

ვიროიდები

ვიროიდები ინფექციურ აგენტებია, რომლებიც შეიცავენ ძალიან მოკლე (270 – 300 ნუკლეოტიდის სიგრძის) ერთჯაჭვიან რგოლოვან რნმ-ს. ეს რნმ სამჯერ პატარაა ჩვეულებრივი ვირუსების რნმ-თან შედარებით. ვიროიდები ყველა ცნობილ პათოგენებს შორის ყველაზე

მარტივი და ყველაზე პატარა აგენტები არიან. ვიროიდებთან მუშაობისას მიიღება რნმ-ის ასლი, ერთჯაჭვიანი დნმ-ი, რომელზეც შენდება კომპლემენტარული ჯაჭვი ვირიონის ორჯაჭვიანი დნმ-ის მისაღებად. ამგვარი ორჯაჭვიანი დნმ-ი ჩაშენდება პლაზმიდაში და კლონირებისთვის შეიტანება E. coli-ის უჯრედებში. გენის წაკითხვა იწყება პრომოტორისგან, რომელიც ამოიცნობა რნმ-პოლიმერაზის მიერ. ხდება რნმ-ის მატრიციდან დნმ-ის სინთეზი. სინთეზს ასრულებს გენის ტერმინალური უბანი. პრომოტორის შემდეგ განლაგებულია ტრანსკრიფციის სასტარტო უბანი, რომელსაც მოსდევს გენის ძირითადი თანმიმდევრობა. გენის პრომოტორული უბანი შეიცავს მოკლე ნუკლეოტიდურ თანმიმდევრობას, დამახასიათებელს ბაქტერიული და უმაღლესი ორგანიზმების გენებისათვის. ამგვარი გარემოება განსაზღვრავს რნმ-პოლიმერაზას აქტივობას, რომელიც უერთდება გენის პრომოტორულ უბანს და იწყებს მის წაკითხვას. ვიროიდი აინფიცირებს მასპინძლის ორგანიზმს მთელი სასიცოცხლო ციკლის განმავლობაში და მისი ვექტორად გამოყენების შემთხვევაში, მოსალოდნელია უცხო გენების მუდმივი ექსპრესია მასპინძლის უჯრედებში.

ქლოროპლასტური და მიტოქონდრიული დნმ

აღნიშნული დნმ უჯრედში გენების გადამტანი ვექტორია. ქლოროპლასტები და სხვა პლასტიდები შეიცავენ ერთნაირ გენეტიკურ ინფორმაციას, რომელსაც პლასტომი ეწოდება. უმაღლეს მცენარეებში ის წარმოდგენილია ჩაკეტილი დნმ-ის მოლეკულის სახით და ახორციელებს ცილის 100-მდე ნაირსახეობის სინთეზს. მაგრამ პლასტიდების სინთეზისათვის გაცილებით მეტი ცილაა საჭირო, რომლებიც კოდირდება ბირთვში, სინთეზირდება ციტოპლაზმაში და ერთვება ქლოროპლასტებში. ამგვარად, ფუნქციურად აქტიური ქლოროპლასტის წარმოსაქმნელად საჭიროა გენომისა და პლასტომის შეთანხმებული ექსპრესია. სხვადასხვა ტიპის პლასტიდები შეიცავენ პლასტომების იდენტური ასლების განსხვავებულ რაოდენობას: მაგალითად, 10-20 ასლს შეიცავს ფესვის პლასტიდები, მაშინ, როცა ახალგაზრდა კარტოფილის ქლოროპლასტებში მათი რიცხვი 100-ს აჭარბებს. ამპლიფიკაციის ასეთი დონე, გენური ინჟინერიის ექსპერიმენტებში მათი ვექტორებად გამოყენებისა და უცხო დნმ-ის ექსპრესიის მაღალი ხარისხის გარანტიას იძლევა. მიტოქონდრიული დნმ-ის შემადგენლობაში ვხვდებით პოლიპეპტიდების მაკოდირებელ სტრუქტურულ გენებს, რობოსომისა და სატრანსპორტო რნმ-ის გენებს. მიუხედავად ამისა, მიტოქონდრიული ცილების დიდი ნაწილი ბირთვული გენომის მიერ კოდირდება.

ტრანსპოზონები

ტრანსპოზონები - დნმ-ის სეგმენტები, რომლებიც აკონტროლებენ საკუთარ ტრანსპოზიციას (გადაადგილებას) დნმ-ის ერთი უბნიდან მეორეში, საწყისი უბნის ამოჭრისა და ქრომოსომის სხა უბანში (თუ პლაზმიდაში) შემდგომი ჩანერგვის გზით. ამ მოვლენის მექანიზმები ბოლომდე არ არის გამოკვლეული. ცნობილია, რომ დნმ-ის გადატანას ახდენს ფერმენტი ტრანსპოზაზა. რა არის დნმ-ის სეგმენტების გადაადგილების დანიშნულება? ტრანსპოზიციის ბიოლოგიური არსი შემდეგში მდგომარეობს:

-ხდება სათანადო გენების გაწყვეტა, რაც იწვევს ევოლუციას;

-იცვლება გენების ფუნქციონირების რეგულაცია, რადგანაც ტრანსპოზონები არიან გენების წაკითხვის საწყისის მატარებელნი და ახალ უბნებში შეუძლიათ გააძლიერონ ან დათრგუნონ გენის მუშაობა.

ბაქტერიებში აღმოჩენილია მოძრავი გენების ორი კლასი, რომლებიც განსხვავდება სიგრძითა და ორგანიზაციის სირთულით:

1. ინსერციული თანმიმდევრობა ანუ IS ელემენტი, რომელიც შეიცავს დაახლოებით 1000 ნუკლეოტიდს და მხოლოდ ერთ გენს, პასუხისმგებელს საკუთარ გადაადგილებაზე;
2. 3000-დან 20000-მდე ნუკლეოტიდური წყვილის სიგრძის ტრანსპოზონები, რომლებიც შეიცავენ რიგ დამატებით გენებს, პასუხისმგებლებს სხვადასხვა ტოქსიკური ნივთიერების მიმართ ბაქტერიის მდგრადობაზე.

რადგანაც ტრანსპოზონებს შეუძლიათ გადაადგილება გენომის ერთი უბნიდან მეორეში, ისინი ეფექტიანად გამოიყენებიან ვექტორ-სისტემებად, რეკომბინანტული დნმ-ის გადატანის მიზნით.

გენის უჯრედში პირდაპირი შეყვანის მეთოდები

არსებობს უჯრედში გენის პირდაპირი შეყვანის რამდენიმე მეთოდი: ტრანსფექცია, მიკროინექცია, ელექტროფორაცია, "მინიუჯრედის" მეთოდი, ლიპოსომაში შეფუთვა და ელექტონული ქვემეხი.

ტრანსფექციისას ხდება დნმ-ის ადსორბცია კალციუმის ფოსფატის კრისტალებზე, რომლის შედეგადაც წარმოიქმნება კალციუმის პრეციპიტატი, რომელიც ფაგოციტოზით შთაინთქმება. ტრანსფორმაციის ეფექტიანობის ასამაღლებლად, საკვლევი გენის შემცველ დნმ-ს ემატება არასპეციფიკური დნმ-მატარებელი. ამ მიზნით გამოიყენება ხბოს თიმუსის ან ორაგულის სპერმის დნმ-ი. უჯრედებში შესული დნმ მოიცავს უჯრედების 15-90%-ს, ხოლო დნმ-ის ნაწილი უკავშირდება მემბრანას და ვერ ხვდება უჯრედში. შეყვანიდან რამდენიმე დღის შემდეგ, უჯრედებს შეუძლიათ უცხო გენის ექსპრესირება. ტრანსფექციისთვის ასევე გამოიყენება დიეთილამინოეთილ

დექსტრანი (დეაე-დექსტრანი), პოლიმერი, რომელზეც ადსორბირდება დნმ, თუმცა კალციუმის პრეციპიტატთან შედარებით, ამ შემთხვევაში ტრანსფორმაცია ნაკლებად სტაბილურია.

დნმ-ის მიკროინექცია უჯრედში შესაძლებელი გახდა მას შემდეგ, რაც შეიქმნა 0.1-0.5 მიკრონის მიკროპიპეტი-მანიპულატორი (სურ.45 გვ.117) პლაზმიდები, რომლებიც შეიცავდნენ ჰერპეს ვირუსის თიმიდინკინაზის (თკ) გენის შემცველ ფრაგმენტებს და pBR322 პლაზმიდა ინექცირებულ იქნენ თკ-უჯრედებში (დეფექტურ უჯრედებში, რომლებსაც არ გააჩნიათ თკ-გენი). აღმოჩნდა, რომ თკ-გენი შევიდა ბირთვში და წარმატებით რეპლიცირდა. თანამედროვეი ხელსაწყოებით შესაძლებელია 1 საათის განმავლობაში 1000-მდე უჯრედის დამუშავება, რომელთა 50% -ში წარმატებით ხდება შეყვანილი გენების ინტეგრაცია და ექსპრესია.

ელექტროფორაციის მეთოდი (სურ.46 გვ.117) ემყარება მემბრანების გამტარებლობის შექცევად გაზრდას მაღალი ძაბვის იმპულსების მეშვეობით. ელექტროფორაციის ჩასატარებელ არეს ემატება უჯრედები და შესაყვანი დნმ-ის ფრაგმენტები. არეში ატარებენ მაღალვოლტიან იმპულსებს (ძაბვა 200 – 350 ვატი, იმპულსების ხანგრძლივობა 54 მილიწამი), რომელიც ციტოპლაზმურ მემბრანაში წარმოქმნის ფორებს. ფორების ზომა და არსებობის ხანგრძლივობა საკმარისია დნმ-ის მოლეკულების უჯრედის შიგნით ოსმოსურად შეღწევისათვის. ამ დროს ხდება უჯრედის მოცულობის გაზრდა. ელექტროფორაციამ გენურ ინჟინერიაში ფართო გამოყენება ჰპოვა. მისი საშუალებით განხორციელებულია დნმ-ის მოლეკულების ჩანერგვა უმარტივესების, ძუძუმწოვრების, საფუვრების, ბაქტერიებისა და მცენარეულ უჯრედებში. (სურ. 46.)

"მინიუჯრედები" მიიღება დონორი უჯრედების მიტოზში ბლოკირებით, კოლცემიდის გამოყენებით. კოლცემიდით უჯრედების ხანგრძლივი დამუშავებისას თითოეული ქრომოსომის ირგვლივ ფორმირდება ახალი ბირთვული მემბრანა. ციტოქალაზინი B-თი დამუშავებისა და ცენტრიფუგირების შედეგად, მიიღება მინიუჯრედი, რომელიც წარმოადგენს ციტოპლაზმურ მემბრანაში ინკაფსულირებულ მიკრობირთვს. მიღებული მინიუჯრედები ძალზე მგრძნობიარენი არიან სხვადასხვა მანიპულაციის მიმართ და, ამიტომ, მათთან მუშაობისას საჭიროა სპეციალური „რბილი" პირობების შერჩევა.

ლიპოსომაში შეფუთვა გამოიყენება რესტრიქტაზების მოქმედებისაგან ეგზოგენური გენეტიკური მასალის დასაცავად. ლიპოსომა ფოსფოლიპიდებისაგან შექმნილი სფერული ფორმის გარსია. ის მიიღება ლიპიდების წყალხსნარის ინტენსიური ნჯღრევით ან იმავე წყალხსნარის ულტრაბგერითი დამუშავებით. ცხოველურ და მცენარეულ უჯრედებში დნმ-ის შესაყვანად უპირატესად გამოიყენება ლიპოსომები, რომლებიც შეიცავენ ფოსფატიდილსერინსა და ქოლესტერინს.

ბიოლოგიური ბალისტიკის მეთოდი (ბიოლისტიკა) მცენარეთა ტრანსფორმაციის ყველაზე ეფექური მეთოდია. მეთოდის არსი ისაა, რომ ვოლფრამის უმცირეს ნაწილაკებს, (დიამეტრით 0.6-1.2მკმ), ემატება დნმ-ის ვექტორი, რომელიც შეიცავს ტრანსფორმირებისთვის საჭირო გენურ სტრუქტურებს. დნმ-იანი ვოლფრამის ნაწილაკები დაიტანება ცელოფანის საფენზე და თავსდება ბიოლისტიკური ქვემეხის შიგნით. უჯრედების სუსპენზია შრევდება აგარის არეიან პეტრის ჯამზე და თავსდება ამავე ქვემეხის ქვეშ 10-15 სმ მანძილზე. ქვემეხში, ვაკუუმის ტუმბოს საშუალებით, წნევა ეცემა 0.1 ატმოსფერომდე. წნევის დაცემის მომენტში ხდება ქვემეხიდან ვოლფრამის ნაწილაკების უდიდესი სიჩქარით გამოფრქვევა. გამოფრქვეული ნაწილაკები ხეთქავენ უჯრედის კედლებს და შედიან ციტოპლაზმასა და ბირთვში. ცენტრში განლაგებული უჯრედები იღუპებიან ვოლფრამული ნაწილაკების დიდი რაოდენობისა და მაღალი წნევის გამო, ხოლო ცენტრიდან 0.6 – 1სმ მოთავსებული უჯრედები წარმატებით ტრანსფორმირდებიან. შემდეგ ხდება უჯრედების გადატანა საკვებ არეებზე მათი შემდგომი კულტივირების მიზნით. ამ მეთოდით ტრანსფორმირებულია ისეთი ერთლებნიანი მცენარეები, როგორიცაა სიმინდი, ბრინჯი, ხორბალი, ჭვავი. მიღებულია ტრანსფორმირებული მცენარეების სტაბილური ფორმები. ამავე მეთოდით განხორციელდა დნმ-ის პირდაპირი ტრანსფორმაცია ემბრიოგენულ მტვერში და დიჰაპლოიდური ტრანსგენური მცენარის მიღება.

ბაქტერიული უჯრედების გენეტიკური ტრანსფორმაცია

დღეს E. coli ყველაზე კარგად შესწავლილი უჯრედია. იგი, აგრეთვე, წარმოადგენს კარგად შესწავლილი ფაგების მასპინძელ-უჯრედს. E. coli-ის პროტოპლასტი მოთავსებულია მურეინულ (პეპტიგოგლიკანის) „ტომსიკაში“, რომელიც გარედან ეკვრის უჯრედის მემბრანას და ხელს უშლის დნმ–ის უჯრედში შეღწევას. ამიტომ საჭიროა ისეთი პირობების შექმნა, რომ დნმ-მ შეძლოს უჯრედული კედლის ბარიერის გადალახვა. თავდაპირველად, უჯრედებს ამუშავებენ ლიზოციმით იზოტონურ ხსნარში და ღებულობენ სფეროპლასტებს. გრამ-უარყოფითი ბაქტერიების გარეთა მემბრანის ლიპოპოლისაქარიდული შრე სტაბილიზირებულია ორვალენტიანი კათიონებით, ამიტომ მისი განმუხტვისათვის გამოიყენება ედტა (EDTA), რომელიც იკავშირებს ორვალენტიან კათიონებს. ამ დროს ზოგიერთი ლიპოპოლისაქარიდი გამოთავისუფლდება მემბრანიდან და ლიზოციმს ეძლევა საშუალება მიაღწიოს მურეინულ „ტომსიკამდე“ და მოახდინოს მისი ჰიდროლიზი; ყოველივე ეს კი იწვევს უჯრედული გარსის განვლადობის გაზრდას და დნმ-ის შეაღწევს უჯრედში.

გენების შეყვანა ძუძუმწოვრების უჯრედებში

ძუძუმწოვრების უჯრედებით მანიპულირება შეიძლება დაიყოს ორ ჯგუფად: ექსპერიმენტები სომატურ უჯრედებზე და ექსპერიმენტები სასქესო უჯრედების ტრანსფორმირებისთვის. მეორე შემთხვევაში, მთავარი მიზანი ტრანსგენური ორგანიზმების მიღებაა.

ცხოველურ უჯრედში გენების გადასატანი ვექტორების დახასიათება

უცხო ინფორმაციის ცხოველურ უჯრედში შესაყვანად საუკეთესო გადამტანებია რეტროვირუსების ბაზაზე შექმნილი ვექტორები (მაგ., ვირთაგვის ლეიკოზის ვირუსი). ისინი უზრუნველყოფენ გენების მაღალეფექტურ გადატანას და სამიზნე უჯრედების ქრომოსომებში მათ სტაბილურ ჩართვას. ცხოველური უჯრედების ტრანსფორმაციას ძირითადად რეტროვირუსების მეშვეობით ან დნმ-ის ლიპოსომებში შეფუთვის გზით ახდენენ. ამ მიზნით, შედარებით იშვიათად გამოიყენება ადენოვირუსები, რადგან ისინი იწვევენ ძლიერ იმუნურ პასუხს და შეუძლებელია მათი განმეორებითი შეყვანა. უცხო დნმ-ის შეყვანა in vitro პრაქტიკულად დაძლეული პრობლემაა. ასევე გადაწყვეტილად შეიძლება ჩაითვალოს დნმ-ის in vivo შეყვანა სხვადასხვა ქსოვილის სამიზნე უჯრე-დებში. რაც შეეხება ინტეგრაციის სტაბილურობას, რეგულირებად ექსპრესიასა და უსაფრთხოებას, ამ თვალსაზრისით, აღნიშნული მანიპულაციები საჭიროებენ სერიოზულ კვლევებს. პირველ რიგში, ეს შეეხება ინტეგრაციის სტაბილურობას. დღევანდლამდე, გენომში ინტეგრაცია მიიღწეოდა მხოლოდ რეტროვირუსების ან ადენოასოცირებული ვექტორების გამოყენებით. სტაბილური ინტეგრაციის ეფექტურობის ამაღლებისთვის საჭიროა ისეთი გენური კონსტრუქციების სრულყოფა, როგორიცაა რეცეპტორით განპირობებული სისტემა ან სტაბილური ეპისომური ვექტორების შექმნა (დნმ-ის ისეთი სტრუქტურის შექმნა, რომელსაც შეუძლია ბირთვის შიგნით ხანგრძლივი პერსისტენცია – ორგანიზმში ვირუსების ხანგრძლივად შენარჩუნება). უკანასკნელ დროს დიდი ყურადღება ექცევა ვექტორების შექმნას ძუძუმწოვრების ხელოვნური ქრომოსომების ბაზაზე (MAC - mammalian artificial chromosomes). ამგვარი მინიქრომოსომები, რომლებიც შეიცავენ ჩვეულებრივი ქრომოსომების ყველა ძირითად სტრუქტურას, შენარჩუნდებიან უჯრედებში დიდი ხნის განმავლობაში და შეუძლიათ გადაიტანონ სრულყოფილი გენები და მათი ბუნებრივი რეგულაციის ელემენტები. ამგვარი ხელოვნური ქრომოსომები უკვე შექმნილია საფუვრებისთვის, რადგანაც საფუარას გენომი მთლიანად კარტირებულია.

მოდიფიცირებული უჯრედების იდენტიფიკაციისთვის აუცილებელია მარკერების არსებობა. სომატური უჯრედების ტრანსფორმაციის მიზნით გამოიყენება სელექციური მარკერი. მაგალითად, აქსელისმა და კოლეგებმა კოლუმბიის უნივერსიტეტიდან აღმოფხვრეს თაგვების უჯრედების გენეტიკური დეფექტი. მათ გამოიყენეს ჰერპესის ვირუსის თიმიდინკინაზას გენის შემცველი დნმ-ის ფრაგმენტი, შეურიეს ორაგულის სპერმის დნმ-მატარებელს, დალექილი დნმ შეიყვანეს თაგვების (თკ) უჯრედებში, რომლებსაც არ გააჩნდათ თიმიდინკინაზას გენი. 100000-დან ერთმა უჯრედმა მიიღო ეს გენი. უჯრედები გაამრავლეს სელექციურ არეზე, რომელიც გამრავლების საშუალებას არ აძლევდა (თკ) უჯრედებს და მრავლდებოდნენ და იზრდებოდნენ მხოლოდ აღნიშნული გენის შემცველი უჯრედები.

ძუძუმწოვართა სომატური უჯრედების გენეტიკური ტრანსფორმაცია

ძუძუმწოვრების ტრანსფორმირებული უჯრედების კულტურები გამოიყენება სხვადასხვა ნივთიერების მისაღებად. ცხოველური უჯრედებისკულტურებიგაცილებითარაეკონომიურია,ვიდრებაქტერიული კულტურები. სამაგიეროდ, მათი უპირატესობაა მხოლოდ ძუძუმწოვრებისათვის დამახასიათებელი ცილების მცირე, მაგრამ ძალზე მნიშვნელოვანი მოდიფიკაციების განხორციელება. მაგალითად, რიგი ცილების ფუნქციონირებისათვის აუცილებელია ნახშირწყლების ან ლიპიდების მიერთება. ძუძუმწოვრების უჯრედებისთვის მიერთება სირთულეს არ წარმოადგენს, მაშინ, როცა ბაქტერიულ უჯრედს არ შეუძლია ამგვარი მოდიფიკაციების განხორციელება.

მწარმოებელი უჯრედების შექმნის გარდა, ძუძუმწოვართა სომატური უჯრედების ტრანსფორმაცია საშუალებას იძლევა შევისწავლოთ გენების ექსპრესიის ნატიფი მექანიზმები და მიზანმიმართულად შევცვალოთ ცხოველური უჯრედის გენეტიკური აპარატი, ხოლო აუცილებლობის შემთხვევაში, ადამიანის გენეტიკური აპარატიც, რასაც უდიდესი მნიშვნელობა აქვს სამედიცინო გენეტიკისთვის.

ძუძუმწოვრების უჯრედების კულტურები შეიძლება გამოვიყენოთ ზოგიერთი ვირუსული ანტიგენის მიღების წყაროდ, ადამიანისა და ცხოველების ვაქცინების წარმოების მიზნით. ამგვარი კულტურების შექმნა შესაძლებელია რეკომბინანტული დნმ-ის მეთოდის და ძუძუმწოვართა და ადამიანის უჯრედებისათვის – ექსპრესიის ვექტორების გამოყენებით. დნმ-ვაქცინის ხმარებისას ორგანიზმში შეიყვანება არა ანტიგენი, არამედ ამ ანტიგენის მასინთეზირებელი გენი. ხდება გენის ჩაკერება პლაზმიდაში და ეს პლაზმიდა ორგანიზმში შეიყვანება ჩვეულებრივი ინექციის გზით.

ძუძუმწოვრების გენური ინჟინერია
ტრანსგენური ცხოველების მიღება

თუ დნმ-ს შევიყვანთ მრავალუჯრედიანი ორგანიზმის უჯრედებში, მაშინ, ტრანსფორმაციის პასუხად, შეიცვლება უჯრედების უმნიშვნელო რაოდენობა, რომლებიც მიიღებენ ახალ გენს ან გენების ჯგუფს. მთელი ორგანიზმის შესაცვლელად კი საჭიროა შეიცვალოს სასქესო უჯრედების გენომი, რომელიც ახალ თვისებებს გადასცემს შთამომავლობას. მცენარეებსა და ცხოველებში სასურველია შეიცვალოს ისეთი თვისებები, რომლებიც გაზრდის დაავადებებისადმი მდგრადობას, ახალ გარემოსთან ადაპტირების უნარს, ზრდა-განვითარების სიჩქარეს და სხვა. ამ შემთხვევაში მარკერად შეიძლება გამოყენებული იქნეს რესტრიქციული ფრაგმენტების სიგრძის პოლიმორფიზმი (AFLP), მინისატელიტების ანალიზი, მიკროსატელიტური დნმ-ის ანალიზი (SSR), ჰიბრიდიზაცია და სხვ. შემუშავებულია ძუძუმწოვრების, მწერებისა და მცენარეების ემბრიონულ უჯრედებში გენის შეყვანის მეთოდები. ამფიბიების შესწავლიდან, მეცნიერული კვლევების ვექტორმა გადაინაცვლა თაგვების ემბრიონებისა და კვერცხუჯრედების კვლევებისკენ, რადგან გენეტიკური თვალსაზრისით, ისინი უფრო ადვილი შესასწავლია. კლონირებული გენის მიკროინექცია ხდება თაგვის ახალგანაყოფიერებული კვერცხუჯრედის ერთ ან ორივე პრონუკლეუსში. უფრო ხშირად ირჩევენ მამალი თაგვის პრონუკლეუსს, რადგან მისი ზომები უფრო დიდია. ინექციის შემდეგ კვერცხუჯრედს მყისიერად იმპლანტირებენ სუროგატი დედის კვერცხსავალში და ბლასტოცისტამდე განვითარების საშუალებას აძლევენ, რის შემდეგაც იმპლანტირებენ საშვილოსნოში. შეიძლება გენი შევიყვანოთ სპერმატოზოიდში და შემდეგ მოხდეს განაყოფიერება. ამ მეთოდით იყო ინიცირებული ადამიანის ინსულინისა და ინტერფერონის გენები, ბოცვრის β -გლობინის გენი, ჰერპესის ვირუსის თიმი-დინკინაზის გენი და თაგვის ლეიკემიის ვირუსის კდნმ-ი. ერთი ინექციით შეყვანილი მოლეკულების რიცხვი მერყეობს 100-დან 300 000-მდე, ხოლო მათი სიდიდე 5-დან 50კბ-მდე. როგორც წესი, გადარჩება კვერცხუჯრედების 10-30%, ხოლო ტრანსფორმირებული კვერცხუჯრედებიდან დაბადებული თაგვების რაოდენობამ შეიძლება 10%-იდან 40%-მდე მიაღწიოს. ამგვარად, რეალური ეფექტურობა შეაგდენს 10%-ს. ინექციის შემდეგ უცხო დნმ აღმოჩენილ იქნა, როგორც სომატურ, ასევე სასქესო უჯრედებში. რაც ნიშნავს, რომ ინტეგრაცია მიმდინარეობს ზიგოტის განვითარების ადრეულ სტადიებზე. რამდენიმე შემთხვევაში, ჰეტეროლოგიური დნმ გადაეცემოდა თაგვების სამ თაობას, რაც ინტეგრაციის სტაბილურობის

მაჩვენებელია. დადგენილია, რომ უცხო გენის ექსპრესიის დონე დამოკიდებულია ქრომოსომაში დნმ-ის ინტეგრაციის ადგილზე და მეთილირების ხარისხზე, ასევე ქსოვილების დიფერენცირებაზე. ზოგიერთ შემთხვევაში, მიღწეულია ქსოვილსპეციფიკური ექსპრესია. 1981 წელს კოსტანტინიმ და ლესიმ თაგვის კვერცხუჯრედში განახორციელეს ქრომოსომული დნმ-ის 19 ათას ფუძიანი ფრაგმენტის ინექცია. ეს ფრაგმენტები შეიცავდნენ ბოცვრის β-გლობინის გენს. კვერცხუჯრედი კულტივირდა ბლასტოციტამდე და იმპლანტირდა საშვილოსნოში. იმპლანტირებული კვერცხუჯრედებიდან დაბა-დებულ 24 თაგვს ჩაუტარდა ნაწილობრივი ჰეპატექტომია. ღვიძლის უჯრედების დნმ-ის ანალიზმა აჩვენა, რომ 9 თაგვში, თითო უჯრედზე მოდიოდა β -გლობინის გენის 1-დან 20-მდე ასლი. 4 ტრანსფორმირებული მამლის შეჯვარებით ნორმალურ დედლებთან მიიღეს 18 წიწილა, ამათგან 6 შეიცავდა β- გლობინის გენს. დადგინდა, რომ ძუძუმწოვრების უჯრედებში გენის ინტეგრაციას შემთხვევითი ხასიათი აქვს და არ არის დაკავშირებული ქრომოსომის კონკრეტულ უბანთან. გენი არასტაბილურია და შესაძლებელია დაიკარგოს ან გახდეს ინერტული. გენთან ერთად აუცილებელია რეგულატორული თანმიმდევრობის შეყვანაც. ემბრიონულ უჯრედში გენის შეყვანის მეთოდები საკმაოდ შეზღუდულია. ყოველთვის ვერ ხერხდება უცხო დნმ-ის ქრომოსომის საჭირო უბანში ჩართვა. დამუშავებული მეთოდური მიდგომები ჯერჯერობით არ იძლევა საშუალებას შეიცვალოს მოცემულ გენომში კონკრეტული გენი. ყოველთვის არ არის შესაძლებელი ახალი გენი დავუქვემდებაროთ ორგანიზმის რეგულაციის სისტემას. ტრანსგენეზის დროს შეიძლება წარმოიშვას მოულოდნელი პრობლემებიც. მაგალითად, ცხოველების გენეტიკური ტრანსფორმაციის ერთ-ერთი პირველი სამუშაო ტარდებოდა ზრდის ჰორმონის ჩანერგვაზე. ვირთაგვის ზრდის ჰორმონის გადატანა თაგვებში იწვევდა ცხოველების 2-ჯერ გაზრდას. ასევე წარმატებით დამთავრდა ხარის ზრდის ჰორმონის გენის ჩანერგვა ბოცვრებში. მაგრამ ანალოგიურმა ექსპერიმენტებმა მსხვილფეხა რქოსან პირუტყვზე გამოიწვია მხოლოდ 10-20%-იანი ზრდა. ეს, ალბათ, გამოწვეულია იმით, რომ თაგვებში შენარჩუნებულია გენების ჩართვის ნორმა, რომელიც ზრდის ჰორმონის რაოდენობას, აიძულებს გენოტიპს სრულ, მაქსიმალურ რეალიზაციას. სელექციის გამო, მსხვილფეხა რქოსანი პირუტყვის ორგანიზმი რეაქციის ზედა ზღვარზე მუშაობს და ამიტომაც მოსალოდნელი შედეგი ვერ იქნა მიღებული. ცილის ყველაზე ძლიერი მასინთეზირებელი სისტემა მდებარეობს სარძევე ჯირკვლის უჯრედებში. თუკი უცხო ცილების გენებს დავაყენებთ კაზეინის პრომოტორის კონტროლის ქვეშ, ამ გენების ექსპრესია იქნება სტაბილური და ძლიერი, ხოლო ცილა დაგროვდება რძეში.

უკვე მიღებულია ტრანსგენური ძროხები, რომელთა რძეც შეიცავს ადამიანის ცილა ლაქტოფერინს. ამ ცილის მიღება რეკომენდირებულია დაბალი იმუნორეზისტენტულობის მქონე ადამიანებისთვის, გასტროენტეროლოგიური დაავადებების პროფილაქტიკის მიზნით. მეცნიერები მუშაობენ ისეთი ტრანსგენური მსხვილი რქოსანი საქონლის მისაღებად, რომელთა რძეში იქნება ადამიანის ალბუმინი. ალბუმინი გამოიყენება სისხლის ოსმოსური წნევის შესანარჩუნებლად. ამ ცილის მისაღებად ყოველწლიურად მსოფლიოში მოიხმარება 440 000ლიტრი სისხლის პლაზმა (ღირებულება დაახლოებით 1,5 მილიარდი დოლარი). თითოეულ მეწველ ძროხას წელიწადში შეუძლია აწარმოოს 80კგ-მდე ადამიანის რეკომბინანტული ალბუმინი. ანალოგიური მეთოდების გამოყენებით მიმდინარეობს სამუშაოები ადამიანის ზრდის ჰორმონისა და β - ინტერფერონის მისაღებად. ინგლისში გამოყვანილია ტრანსგენური ცხვარი, რომლის რძეც შეიცავს სისხლის კოაგულაციის ფაქტორს. ტრანსგენური ცხოველები გამოყავთ ქსენოტრანსპლანტაციის (ორგანოთა ტრანსპლანტაცია სხვადასვა სახეობას შორის) მიზნით. ერთ-ერთ ყველაზე პოპულარულ ქსენოტრანსპლანტაციურ ცხოველს ღორი წარმოადგენს, რადგანაც მისი ორგანოების ანატომიური და იმუნოლოგიური მახასიათებლები უახლოვდება ადამიანის მახასიათებლებს. ტრანსპლანტაციის შედეგად, იმუნოშეუთავსებლობის გამო, შეიძლება მივიღოთ ძლიერი იმუნური პასუხი. ორგანოების გადანერგვის დროს ორგანიზმის აგრესიის ერთ-ერთი მთავარი სამიზნე მემბრანის ზედაპირული ცილებია. ტრანსგენურ ღორებში ეს ცილები შეცვლილია ადამიანის ცილებით. ტრანსგენეზის კიდევ ერთ მიმართულება დაავადებებისადმი მდგრადი ცხოველების შექმნაა. მეცხოველეობაში ვაქცინები ფართოდ გამოიყენება, რადგან სელექციის დროს მეტი ყურადღება ექცევა სამეურნოდ გამოსადეგ თვისებებს (მატყლიანობა, ხორციანობა, რძიანობა) და არა ჯანმრთელობას. ამიტომ დაავადებებისადმი მედეგობაზე ზრუნვა გენურ ინჟინერიას დაეკისრა. ინტერფერონები დამცველ ცილებს წარმოადგენენ, რის გამოც, ინტერფერონის გენი მრავალ ცხოველშია გადანერგილი. ტრანსგენური თაგვები არ (ან ძალზე იშვიათად) ავადმყოფობენ, მაგრამ ღორებში ამგვარ ეფექტს ვერ მიაღწიეს. ტრანსგენური ცხოველების გამოყენება შეიძლება მემკვიდრული დარღვევების, აგრეთვე ნერვული სისტემის დაავადებების შესასწავლად. ნორმალური ცხოველების გენომში შეყავთ დაავადების გამომწვევი გენები და ამგვარად ქმნიან ტრანსგენურ ცხოველურ მოდელებს, რომლებზეც შეიძლება გამოიცადოს ფარმაკოლოგიური პრეპარატები, აგრეთვე სხვადასხვა თერაპიული მიდგომა.

ლიტერატურა

1. Остерман Л.А. Методы исследования белкоа и нуклеиновых кислот. – Электрофорез и ультрацентрифугирование. Изд.: Наука. 1981.
2. Остерман Л.А.Хроматография белкоа и нуклеиновых кислот. Изд.: Наука. 1985
3. Сингер М., Берг П. Гены и геномы. Т. 1-2. М.: Мир, 1998.
4. Шмидт В «Оптическая спектроскопия для химиков и биологов», Изд.: Техносфера, М., 2007.
5. Angel Pellicer, Michael Wigler and Richard Axel. The transfer and stable integration of the HSV thymidine kinase gene into mouse cells. Cell, Volume 14, Issue 1, 133-141, 1 May 1978.
6. Bartlett & Stirling—A Short History of the Polymerase Chain Reaction. In: Methods Mol Biol. 226:3-6 (2003).
7. Bernard R. Glick, Jack J. Pasternak. Molecular Biotechnology –Principles and Applications of Recombinant DNA. Second Edition. ASM PRESS. 2002.
8. Bergot B.J., Chakerian V., Connell C.R., Eadie J.S., Fung S., Hershey N.D., Lee L.G., Menchen S.M. and Woo S.L. US patent 5366860. (1989).
9. Costantini F, Lacy E. Introduction of a rabbit beta-globin gene into the mouse germ line. Nature. 1981 Nov 5;294(5836):92-4.
10. Danna K, Nathans D. “Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of Hemophilus influenzae”. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 68 (12): 2913–2917. 1971.
11. Fiers W., Contreras R., Haegemann G., Rogiers R., Van de Voorde A., Van Heuverswyn H., Van Herreweghe J., Volckaert G., Ysebaert M. Complete nucleotide sequence of SV40 DNA. Nature, 273(5658), 113-20. (1978)
12. Frederick J. Dechow “Separation and purification techniques in biotechnology. Noyes Publications. 1989.
13. Guo Xing-Zhong DNA–Protein Interactions. Principles and Protocols. Methods in Molecular Biology. Vol 148. Humana Press. 2003.
14. Harisha S. Biotechnology Procedures and Experiments Handbook. Infinity Science Press LLC. Hingham, Massachusetts. New Delhi, India. 2007.
15. Heather D. VanGuilder, Kent E. Vrana, Willard M. Freeman. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. BioTechniques 44: 619-626. 2008.
16. Jackson DA, Symons RH, Berg P. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci U S 69(10):2904–2909. 1972.

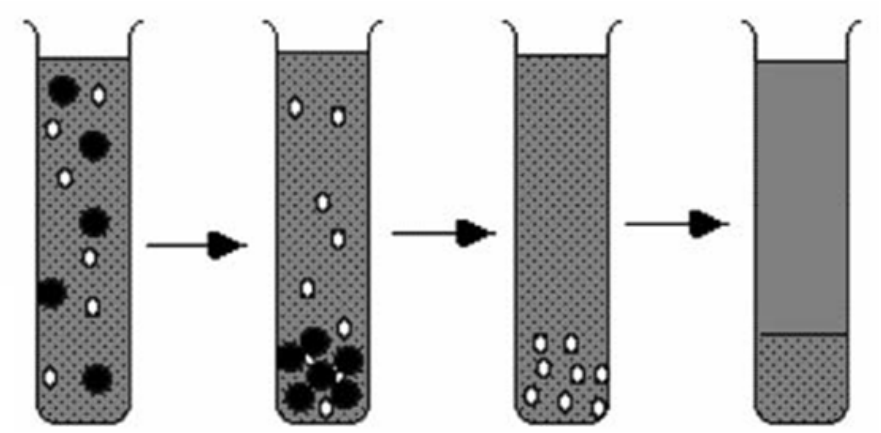
17. Jeffrey M. Becker, Guy A. Caldwell, Eve Ann Zachgo. Biotechnology. A Laboratory Course.Second Edition. Academic Press. 1996.
18. Ju J., Ruan C., Fuller C.W., Glazer A.N., Mathies R.A. Fluorescence energy transfer dye-labeled primers for DNA sequencing and analysis. PNAS USA, 92(10), 4347-4351. (1995)
19. Lee L.G., Spurgeon S.L., Heiner C.R., Benson S.C., Rosenblum B.B., Menchen S.M., Graham R.J., Constantinescu A., Upadhya K.G., and Cassel, J.M. Nucleic Acids Res., 25, 2816-2822. (1997)
20. Lehman, I. R.; Bessman, M. J.; Simms, E. S.; Kornberg, A. "Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid. I. Preparation of Substrates and Partial Purification of an Enzyme from Escherichia coli". J. Biol. Chem. 233 (1): 163–170.1958
21. Maxam A.M., Gilbert W. A new method of sequencing DNA, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 74, p. 560-564. 1977.
22. Mel Dorin and Judy Cummings. PRINCIPLES OF CONTINUOUS FLOW CENTRIFUGATION. Beckman Coulter, Inc.2004.
23. Menchen S.M., Lee L.G., Connell C.R., Hershey N.D., Chakerian A., Woo S. and Fung S. US patent 5188934. (1993)
24. Mujumdar R.B., Ernst L.A., Mujumdar S.R., Lewis C.J., Waggoner A.S. Cyanine dye labeling reagents: sulfoindocyanine succinimidyl esters. Bioconjug Chem., 4, 105-111. (1993)
25. Murray, M.G. and Thompson, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 8. 4321-4325. (1980)
26. Narayanan N., Little G., Lugade A., Gibson J., Prescott C., Raghavachari R., Reimen K., Roemer S., Sutter S., and Draney D., New NIR Dyes: Synthesis, Spectral Properties and Applications in DNA Analyses, S. Daehne et. al., Near-infrared Dyes for High Technology Applications, Kluwer Academic Publishers, 141-158. (1998)
27. Nunnally B.K., He H., Li L.C., Tucker S.A., McGown L.B. Characterization of visible dyes for four-decay fluorescence detection in DNA sequencing. Anal Chem, 69(13), 2392-7 (1997)
28. Reddy V.B., Thimmappaya B., Dhar R., Subramanian K.N., Zain B.S., Pan J., Ghosh P.K., Celma M.L., Weissman S.M. The genome of simian virus 40. Science, 200(4341), 494-502. (1978)
29. Roberts RJ. Restriction and modification enzymes and their recognition sequences. Nucleic Acids Res. 13: 165-200 . 1978...
30. Rosenblum B.B., Lee L.G., Spurgeon S.L., Khan S.H., Menchen S.M., Heiner C.R., Chen S.M. New dye-labeled terminators for improved DNA sequencing patterns. Nucleic Acids Res. 25(22), 4500-4504. (1997),

31. Saiki, RK; Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia". Science 230 (4732): 1350–4. doi:10.1126/science.2999980. PMID 2999980. http://sunsite.berkeley.edu/cgi-bin/ebind2html/pcr/034.1985.
32. Saiki, RK; Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase". Science 239 (4839): 487–91. doi:10.1126/science.2448875. PMID 2448875. http://sunsite.berkeley.edu/cgi-bin/ebind2html/pcr/009. (1988).
33. Sanger F., Niclein S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 74, p. 5463-5467. 1977
34. Shealy D. B., Lipowska M., Lipowski J., Narayanan N., Sutter S., Strekowski L. and Patonay G., Anal. Chem., 67, 247-251 (1995)
35. Smith, H. O., and D. Nathans.. A suggested nomenclature for bacterial host modification systems and their enzymes. J. Mol. Biol. 81:419-423. 1973
36. Southern, Edwin Mellor "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis". Journal of Molecular Biology 98 (3): 503–517. 1975.
37. Tabor S., Richardson C.C. A single residue in DNA polymerases of the Escherichia coli DNA polymerase I family is critical for distinguishing between deoxy- and dideoxyribonucleotides. PNAS USA, 92(14), 6339-6343. (1995)
38. Tu O., Knott T., Marsh M., Bechtol K., Harris D., Barker D., Bashkin J. The influence of fluorescent dye structure on the electrophoretic mobility of end-labeled DNA. Nucleic Acids Res., 26(11), 2797-2802. (1998)
39. Wagner, D.B., Furnier, G.R., Saghay-Maroof, M.A., Williams, S.M., Dancik, B.P. and Allard, R.W. Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pinesand their hybrids. Proceedings of the National Academy of Science USA 84, 2097-2100. 1987.
40. Weiss B.; Richardson CC "Enzymatic Breakage and Joining of Deoxyribonucleic Acid, I. Repair of Single-Strand Breaks in DNA by an Enzyme System from Escherichia coli Infected with T4 Bacteriophage". Proceedings of the National Academy of Sciences 57 (4):.1021–8. 1967

სურ. 1 ჰომოგენიზატორი
ცვალებადი სიჩქარით

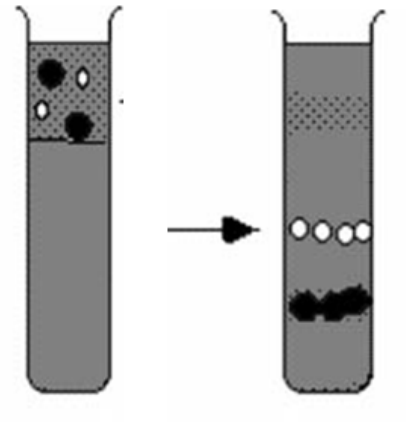
სურ. 2
ჰომოგენიზატორი-დისპერგატორი
ცვალებადი სიჩქარით

სურ.3
ჰომოგენიზატორი-ბლენდერი
ცვალებადი სიჩქარით



სურ. 4 დიფერენციალური ცენტრიფუგირება

სურ. 5 5%-დან 30%-მდე კონცენტრაციის საქაროზას საკვლევი ხსნარის ნიმუში



სურ. 6. ცენტრიფუგირების შედაგად მიღებული ზონები

სურ.7 ცენტრიფუგის ნაირსახეობები

დაბალსიჩქარიანი <10 000ბრ/წთ

ულტრაცენტრიფუგა მაცივრით >20 000 ბრ/წთ

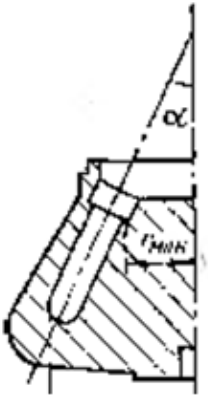
სუპერულტრაცენტრიფუგა
მაცივრით >30 000 ბრ/წთ.

ბეკმანის (Beckman) ანალიზური
ცენტრიფუგა.

სურ. 8 კუთხური როტორები

ალუმინის როტორი

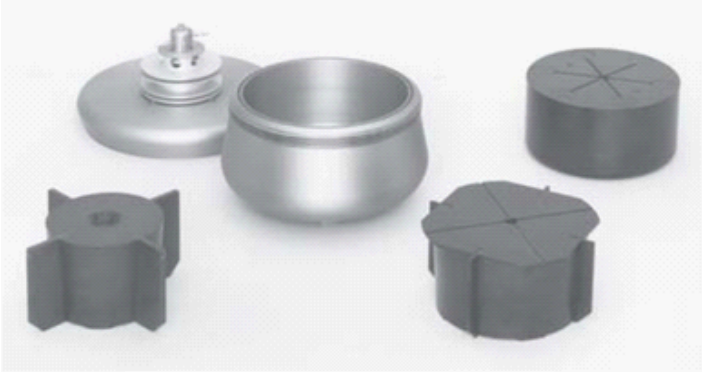
ტიტანის როტორი

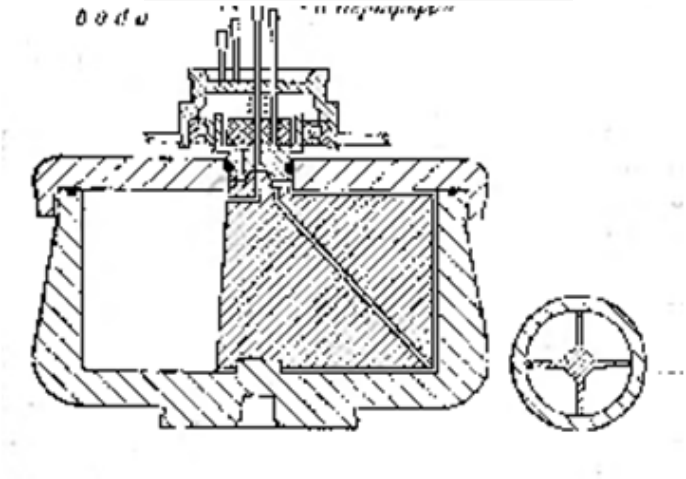


კუთხური როტორის სქემა ჭრილში

სურ. 9 ბაკეტროტორები თავისუფლად ჩამოკიდებული სინჯარებით

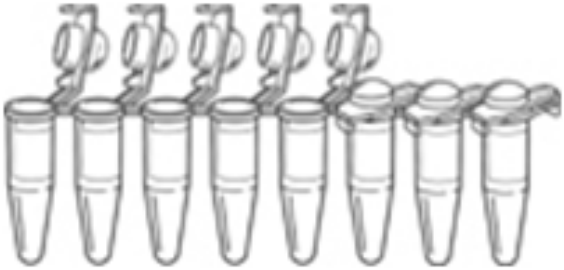
სურ. 10 უწყვეტი დინების ანუ ზონალური როტორი



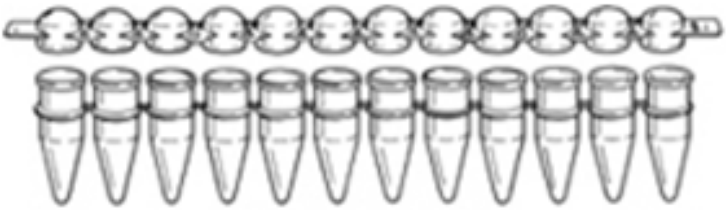


სურ. 12 ქრომატოგრაფიული სისტემა (Bio-Rad)

სურ. 13 პჯრ-ის სინჯარა



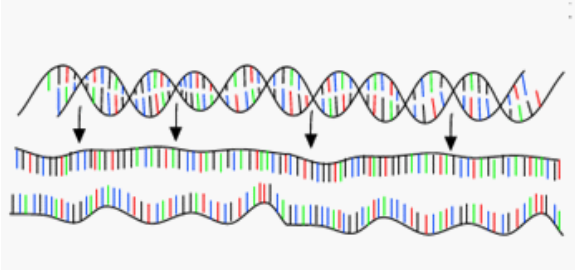
სურ. 14
გადაბმული სინჯარები
ინდივიდუალური სახურავებით



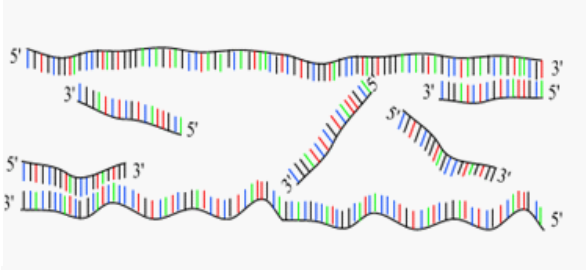
სურ. 15 გადაბმული სინჯარები გადაბმული
სახურავით

სურ.16 თერმოციკლერი

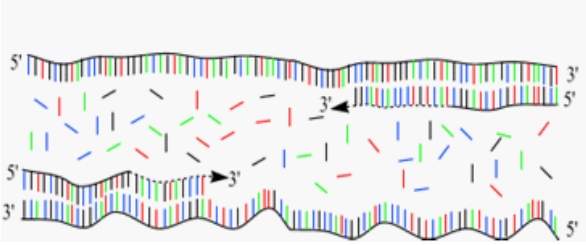
სურ.17 თერმოციკლერის სინჯარების ჩასაწყობი ბლოკი



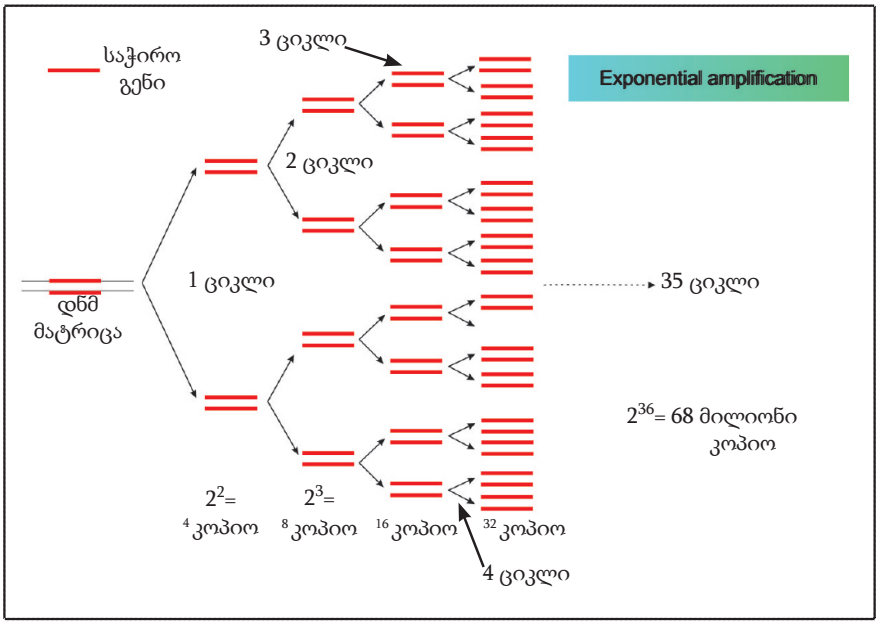
სურ. 18ა - საფეხური 1: დენატურაცია



სურ.18ბ - საფეხური 2: ანელინგი

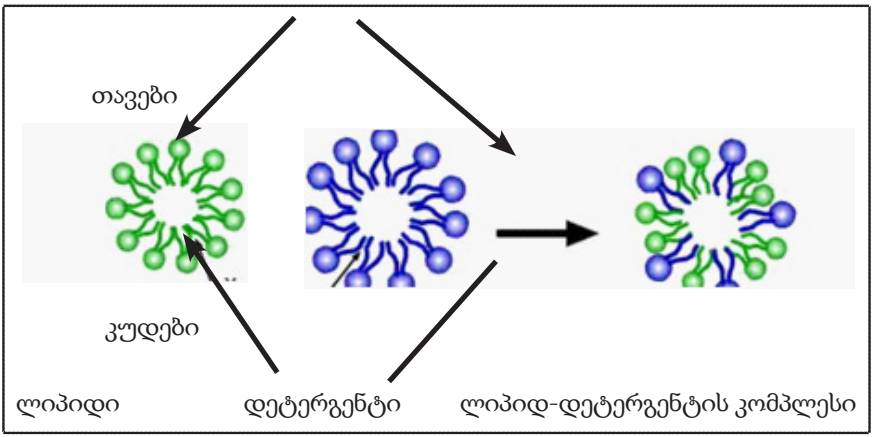


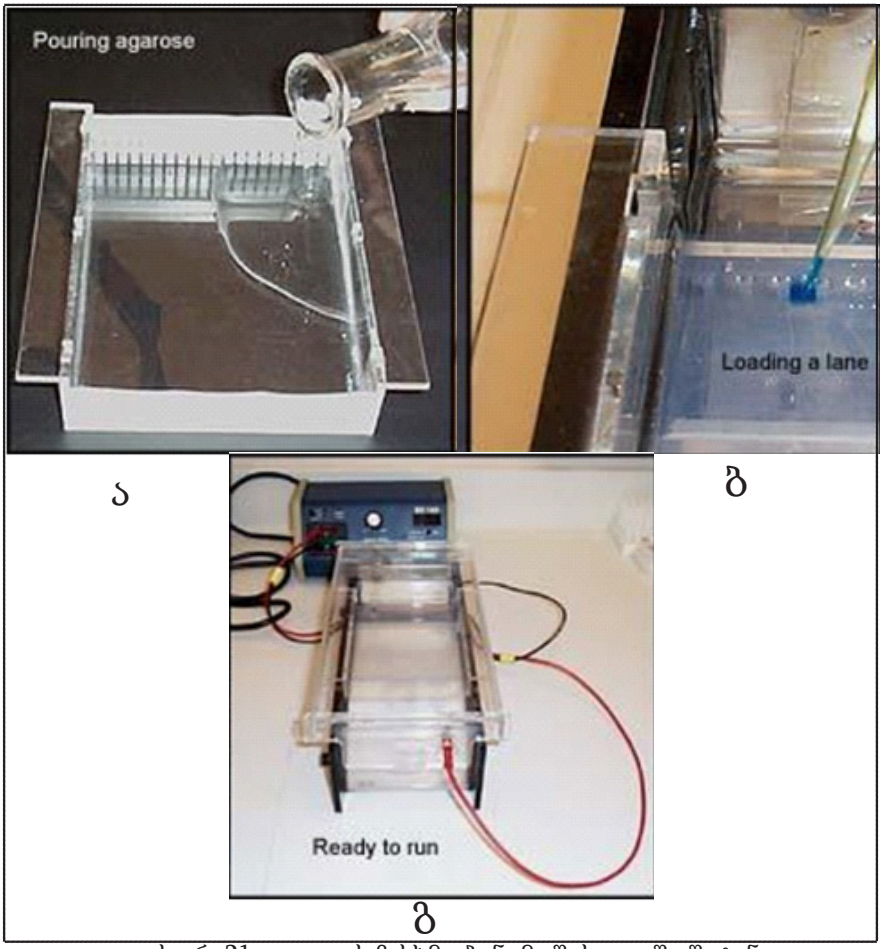
სურ.18გ - საფეხური 3: ჯაჭვის დაგრძელება – ელონგაცია



სურ.19 პჯრ-ს სქემატური გამოსახულება

სურ.20 დეტერგენტით ლიპიდების სოლუბილიზაცია

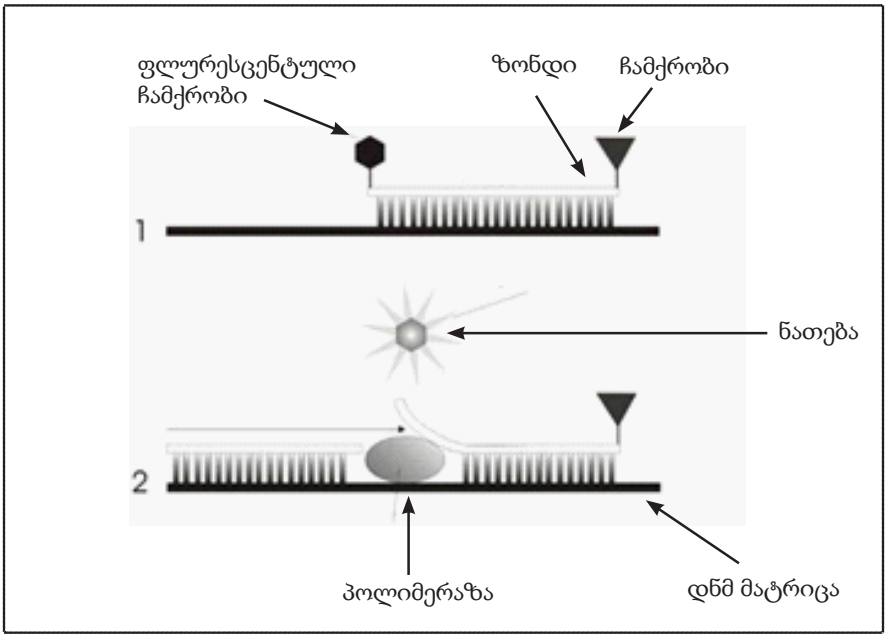




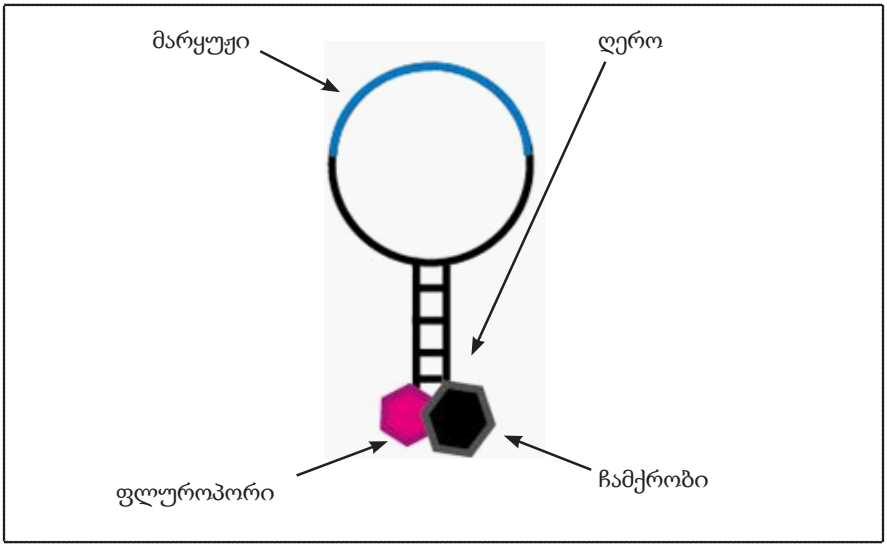
სურ. 21 ა. გელის ჩასხმა, ბ. ნიმუშის გელში შეტანა,
გ. ელექტროფორეზი

სურ. 22- ამპლიფიკატორები ოპტიკური სისტემა

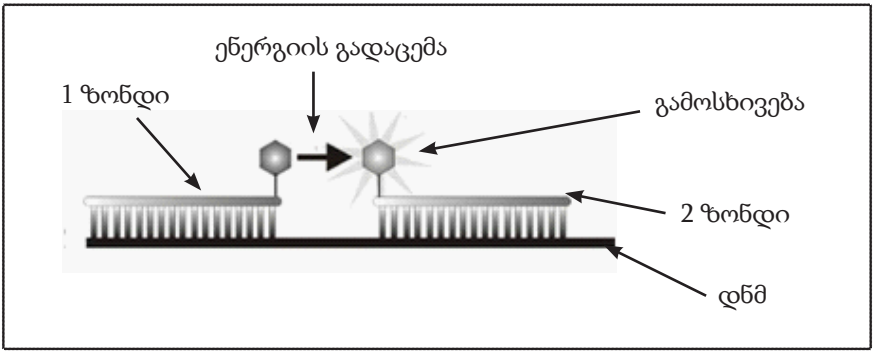
სურ. 23 Taqman განსაზღვრა



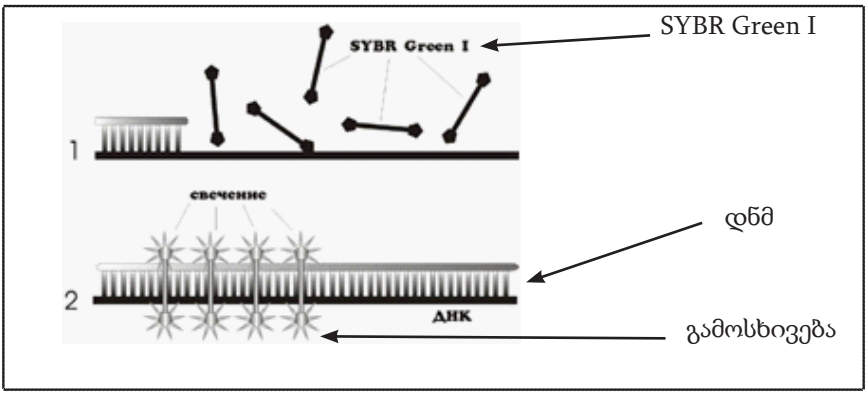
სურ. 24 ბეკონი



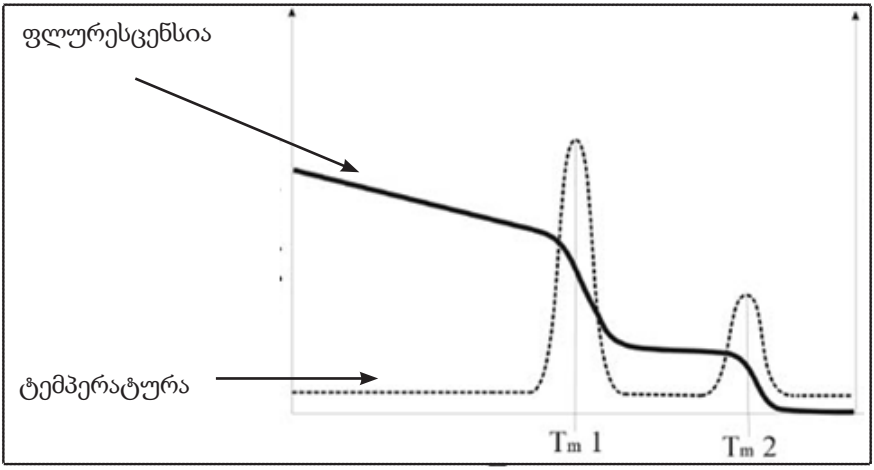
სურ. 25. ორი ზონდის გამოყენება



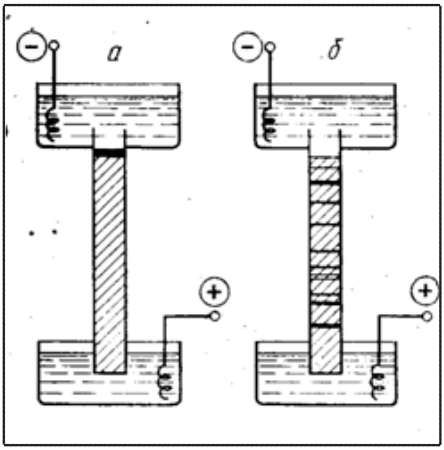
სურ.26 პჯრ რეალურ დროში SYBR Green I გამოყენებით



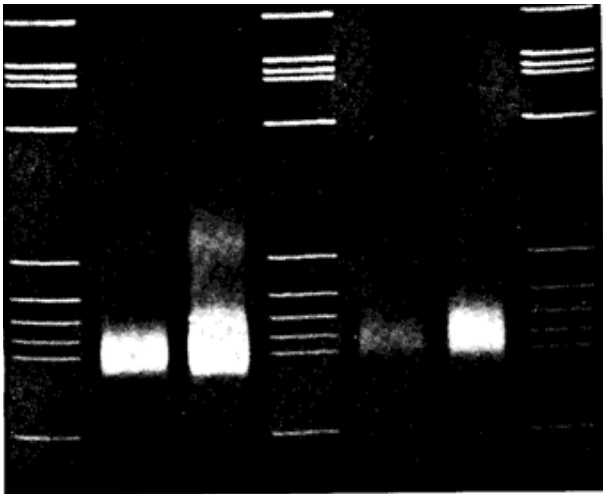
სურ. 27. ლღობის მრუდი



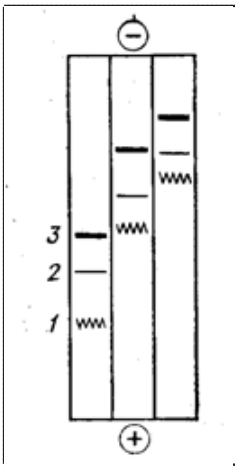
სურ.28 უმარტივესი ელექტროფორეზის აპარატის ქემა



სურ 29
პოლიაკრილამიდის მილაკები ელექტროფორეზის
დასრულების შემდეგ. ჰორიზონტალური ხაზები
– შეღებილი ცილოვანი ზოლები.



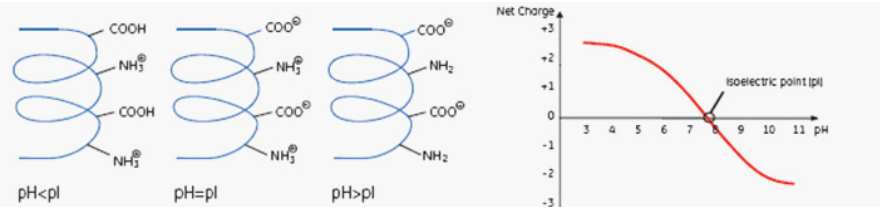
სურ. 30 აგაროზას გელის ფირფიტა დნმ-ს ფრაგმენტების დაყოფის შემდეგ. შეღებილია ლუმინეცენტური საღებავით (ეთიდიუმ ბრომიდით).



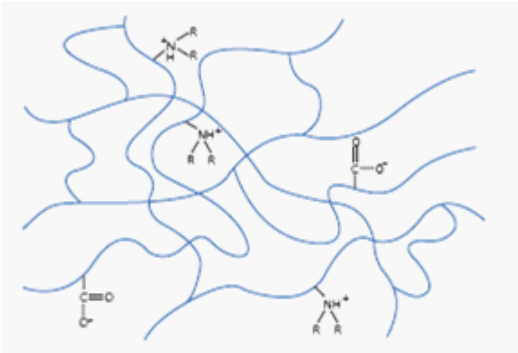
სურ. 31 ენდოსმოსის გავლენა აგროზას გელში ორჯაჭვიანი დნმ-ს ფრაქციონირებაზე

1. სუპერსპირალური დნმ,
2. ხაზობრივი დნმ
3. რგოლოვანი დნმ

ენდოსმოსის ხარისხი იზრდება მარცხნიდან მარჯვნივ.



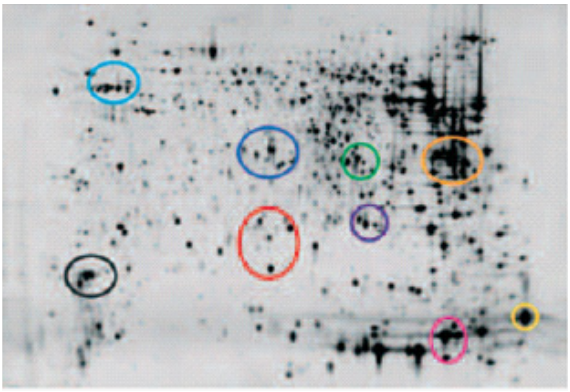
სურ. 32. ჯამური მუხტის გარემომცველ pH_ზე დამოკიდებულების გრაფიკი.
მრუდის X ღერძთან გადაკვეთა მოცემული ცილოვანი მოლეკულის იზოელექტრულ წერტილის ტოლია..



სურ. 33. პოლიაკრილამიდური მატრიქსი, მასში ჩართული ბუფერული ჯგუფებით

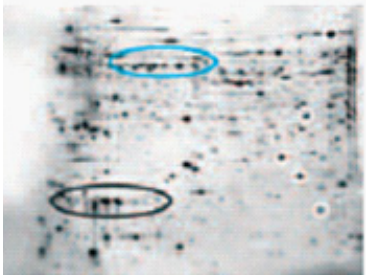
სურ. 34 ა. 100მკლ თაგვის ღვიძლის ექსტრაქტის ორგანზომილებიანი ელექტროფორეზი pH 3-11-ზე

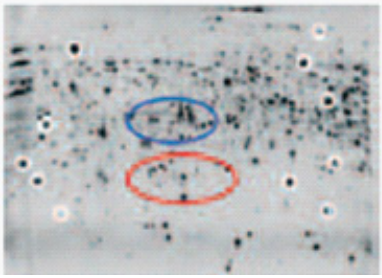
ა



ბ. 100მკლ თაგვის ღვიძლის ექსტრაქტის ორგანზომილებიანი ელექტროფორეზი pH 3-11-ზე
გ. 100მკლ თაგვის ღვიძლის ექსტრაქტის ორგანზომილებიანი ელექტროფორეზი pH 3-5.6-ზე
დ.100მკლ თაგვის ღვიძლის ექსტრაქტის ორგანზომილებიანი ელექტროფორეზი pH 05.3-6.5-ზე
ე. 100მკლ თაგვის ღვიძლის ექსტრაქტის ორგანზომილებიანი ელექტროფორეზი Ph 7-11-ზე

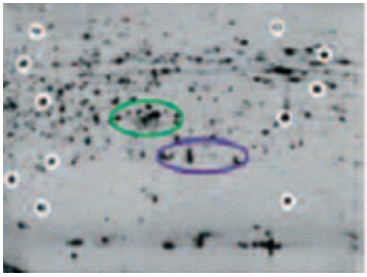
ბ

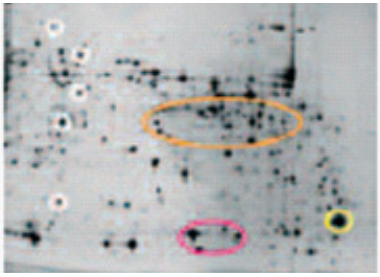




გ

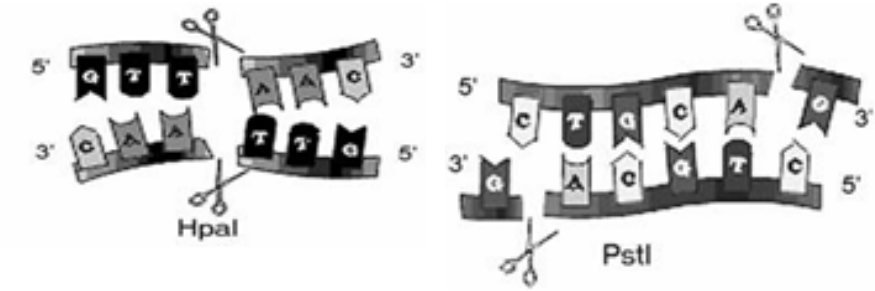
დ



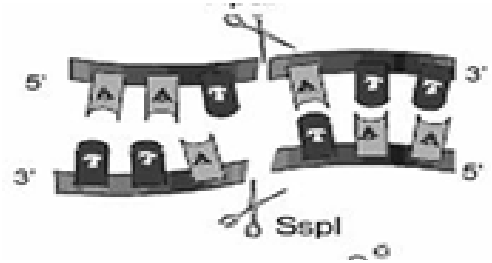


ე

სურ. 35 რესტრიქტაზები სხვადასხვანაირად ხლეჩენ დნმ-ს



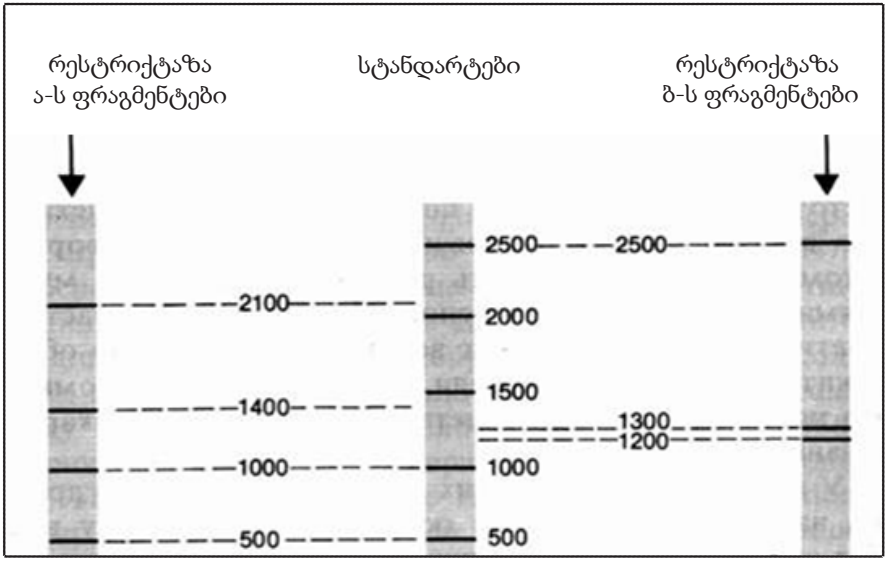
ა



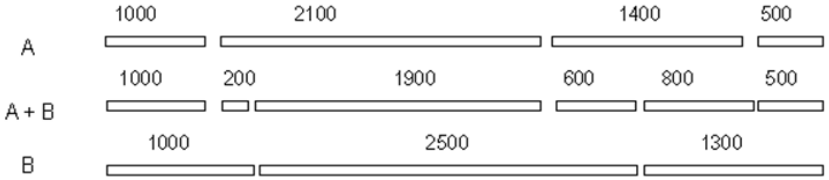
ბ

ბ

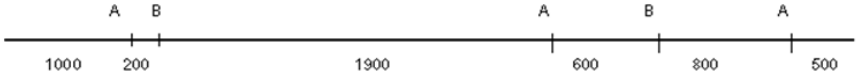
სურ. 37. ა და ბ რესტრიქტაზებით მიღებული ფრაგმენტები



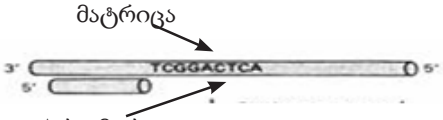
სურ.38 ფერმენტული რესტრიქციის ანალიზი და დნმ-ის ფრაგმენტის რუქა



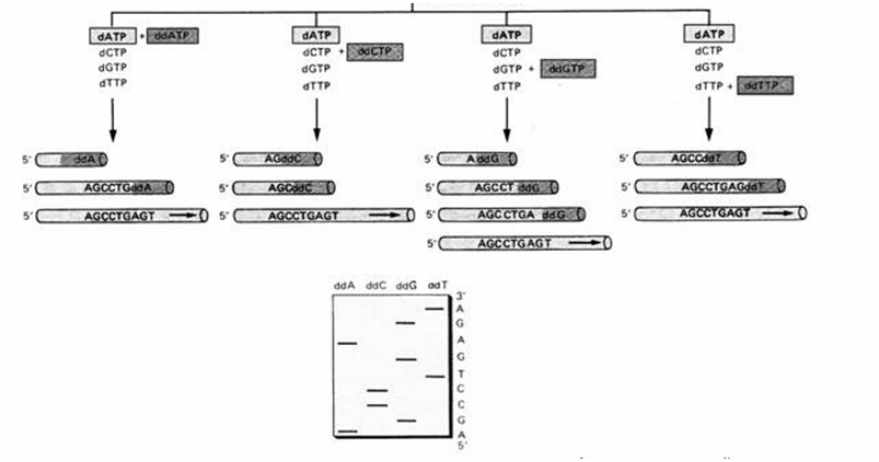
დნმ-ის ფრაგმენტის რუქა



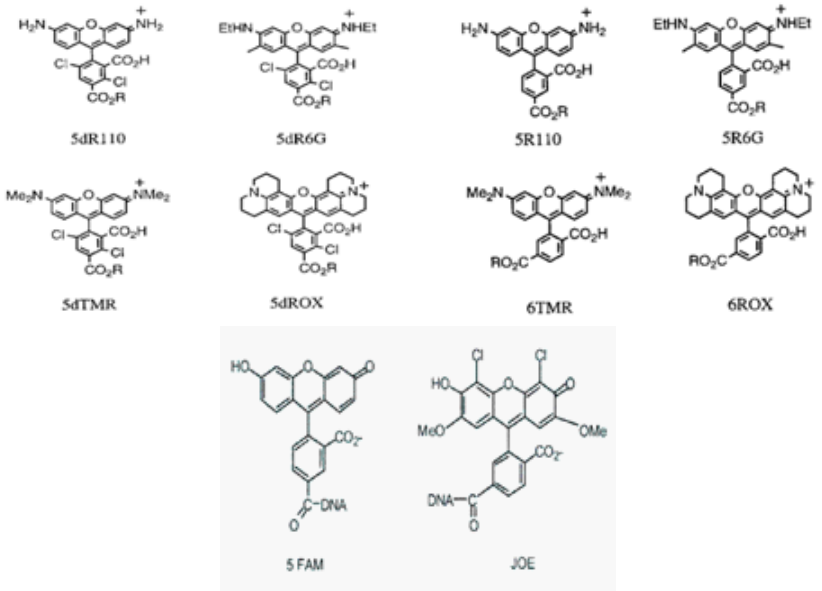
სურ.39 სეკვენირება სენგერის მიხედვით



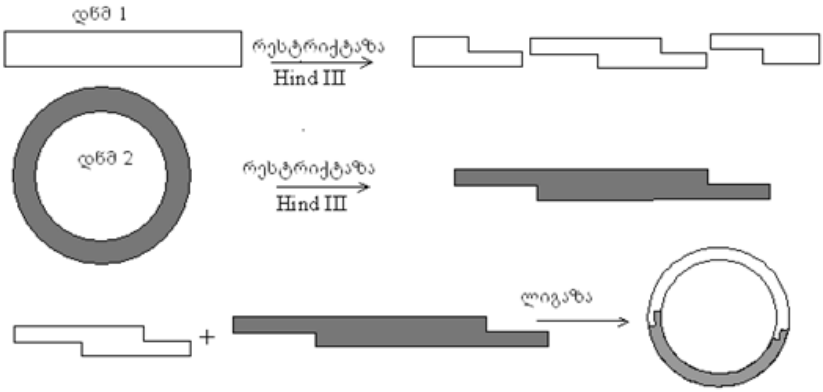
დნმ-პოლიმერაზა 1



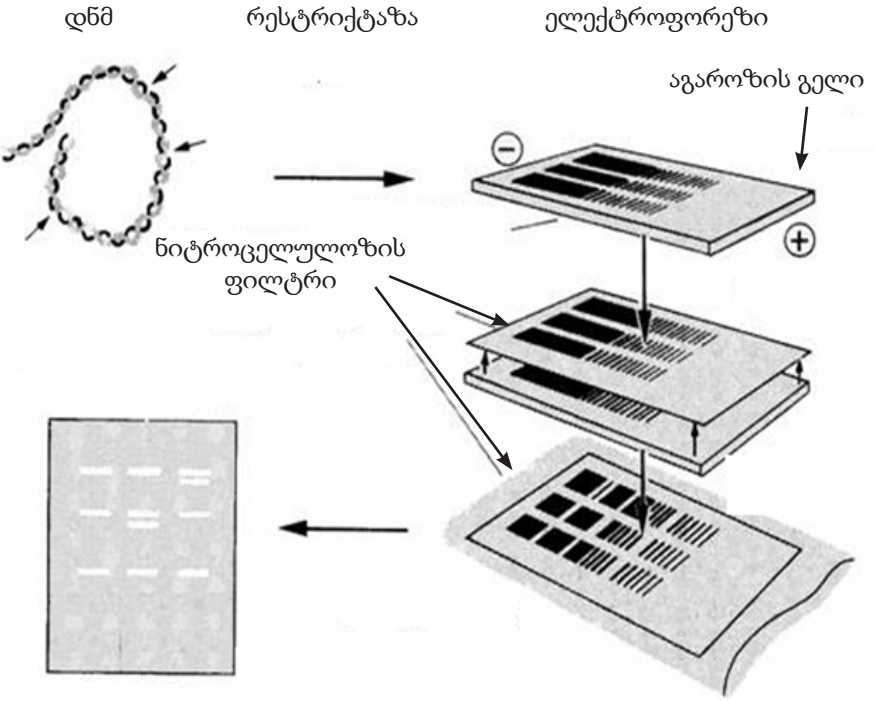
სურ.40 ფლუოროფორები

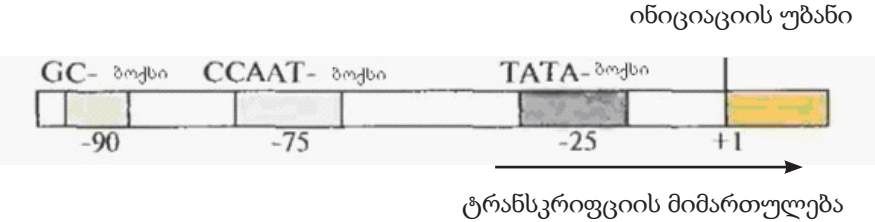


სურ. 41 რესტრიქტაზა-ლიგაზური მეთოდის სქემა



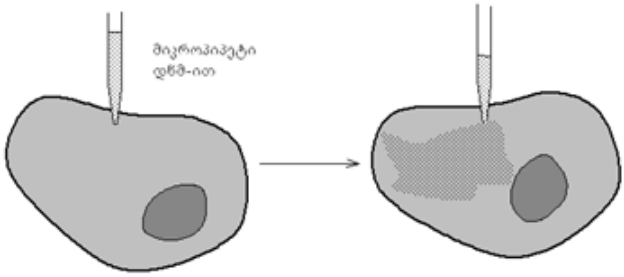
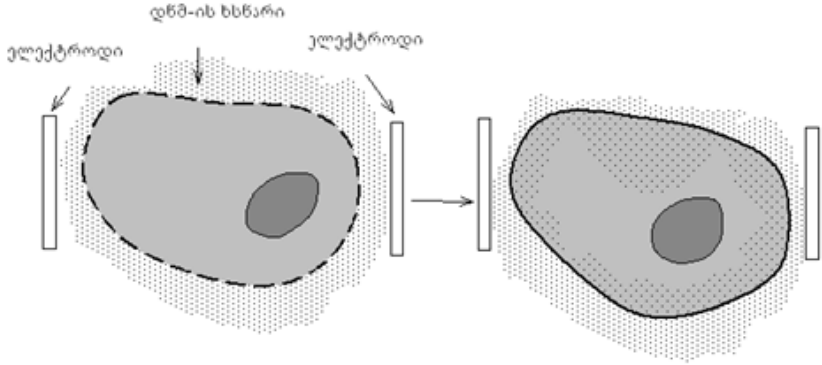
სურ. 43 ჰიბრიდიზაცია





სურ.44 ეუკარიოტების სტრუქტურული გენის რეგულატორული ელემენტები

სურ. 45 დნმ-ის მიკროინექცია



სურ. 46 ელექტროფორაცია