

БИОСИНТЕЗ АРАХИДОНОВОЙ КИСЛОТЫ МИКРОМИЦЕТАМИ (ОБЗОР)

© 2011 г. Э. Г. Дедюхина*, Т. И. Чистякова*, М. Б. Вайнштейн*,**

**Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН, Пуцино, Московская область, 142290*

e-mail: dedeg@rambler.ru

***Пуцинский государственный университет, Пуцино, Московская область, 142290*

Поступила в редакцию 12.04.2010 г.

Арахидоновая кислота (АК, 5,8,11,14-цис-эйкозатетраеновая кислота) широко используется в медицине, фармацевтике, косметике, диетпитании, сельском хозяйстве и других областях. Расширение сфер применения АК и ее низкое содержание в природных источниках (печень свиней, надпочечная железа, яичный желток) диктуют необходимость развития микробиологического производства АК. В обзоре рассматриваются механизмы биосинтеза АК и пути регуляции активности ферментов, вовлеченных в этот процесс. Обобщены данные литературы об этапах микробиологического производства АК, методах селекции активных штаммов-продуцентов, путях физиологической регуляции синтеза АК у микромицетов (влияние фазы роста, состава среды, pH, температуры, аэрации), эффективных технологиях ферментации и выделения конечного продукта. Представлены сведения о полном биотехнологическом процессе получения АК — от подбора штамма до увеличения выхода и очистки продукта.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ НОВЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ МЕЖКЛЕТОЧНОГО ПРОСТРАНСТВА МЕТОДОМ MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

© 2011 г. А. П. Ильина*, О. Г. Куликова*, Д. И. Мальцев*, М. С. Краснов**, Е. Ю. Рыбакова**, В. С. Скрипникова**, Е. С. Кузнецова***, А. К. Буряк***, В. П. Ямскова**,
И. А. Ямсков*

**Институт элементоорганических соединений им. АН. Несмеянова РАН, Москва, 119991*

e-mail: Yamskov@mail.ru

***Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, 119334 e-mail: Yamskova-vp@yandex.ru*

****Институт физической химии и электрохимии им. АН. Фрумкина РАН, Москва, 119991 e-mail: AKBuryak@ipcjrssi.ru*

Поступила в редакцию 12.05.2010 г.

Методом матричной лазерной десорбционной времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF) проведен анализ пептидов, входящих в состав ранее не изученных биорегуляторов, выделенных из межклеточного пространства тканей различных органов млекопитающих, а также растений и грибов. В исследование были включены 15 различных тканей млекопитающих, 13 видов растений и 2 вида грибов. На примере исследования биорегуляторов, выделенных из разных тканей глаза, было показано, что в их состав входят пептидные компоненты с одинаковыми значениями молекулярных масс. В состав биорегуляторов, выделенных из тканей различных органов млекопитающих или разных видов растений и грибов входят пептиды с различными значениями молекулярных масс. Полученные данные свидетельствуют в пользу предположения об основной функции биорегуляторов данной группы — участии в регуляции органно-тканевого гомеостаза в биологических системах.

КЛОНИРОВАНИЕ, ЭКСПРЕССИЯ И ВЫДЕЛЕНИЕ ИЗ *Escherichia coli* БЕЛКА ЧЕЛОВЕКА SURF-6, ТРАНСЛЯЦИОННО СЛИТОГО С ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗОЙ

© 2011 г. М. Ю. Кордюкова, О. В. Зацепина, М. А. Ползиков

Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, 117997

e-mail: zatsepina_olga@mail.ru

Поступила в редакцию 20.07.2010.

Аmplифицировали и клонировали в вектор pGEX-2T кДНК гена *Surf-6* человека (*hSurf-6*) для экспрессии hSURF-6, трансляционно слитого с глутатион-S-трансферазой, в бактериальной системе. Полученный вектор назван pGEX-2T-GST-hSurf-6. На основе штамма *Escherichia coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL получен суперпродукцент химерного белка GST-hSURF-б, выделение и очистку которого производили методом аффинной хроматографии на L-глутатион-сефарозе. В оптимизированных условиях доля рекомбинантного GST-hSURF-6 составляла не менее 15% от суммарного бактериального белка, а из 1 л культуры штамма-продукента выделялось до 7 мг белка. Конечная фракция элюата содержала около 80% GST-hSURF-б. Количество и чистота выделенного белка достаточны для иммунизации животных и получения антител. Белок GST-hSURF-б может быть также использован в качестве аффинного лиганда для выявления белковых партнеров hSURF-6 в клетках человека.

ИЗУЧЕНИЕ НОВОЙ ГРУППЫ БИОРЕГУЛЯТОРОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОДОРОЖНИКА БОЛЬШОГО (*Plantago major* L.)

© 2011 г. М. С. Краснов*, В. П. Ямскова*, Д. В. Маргасюк**, О. Г. Куликова**, А. П. Ильина**, Е. Ю. Рыбакова*, И. А. Ямсков**

*Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва 119334

e-mail: embrmsk@mail.ru

**Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова РАН, Москва, 119991

e-mail: yamskov@mail.ru

Поступила в редакцию 12.05.2010 г.

В листьях подорожника большого (*Plantago major* L.) были обнаружены биорегуляторы, проявляющие физико-химические свойства и биологическую активность, сходные с мембранотропными гомеостатическими тканеспецифическими биорегуляторами, ранее найденными в различных тканях животных. Для изучения специфической активности данных растительных биорегуляторов впервые разработана экспериментальная модель роллерного органотипического культивирования ткани кожи тритона (*Pleurodeles waltl*) *in vitro*. Показано, что изучаемые растительные белки оказывают свойственное данному лекарственному растению ранозаживляющее действие на кожу позвоночных животных *in vitro* и *in vivo*.

AN ACTIVATED BY COBALT ALKALINE AMINOPEPTIDASE FROM *Bacillus mycoides*

© 2011 U. Jankiewicz, A. Wnuk

Department of Biochemistry, Warsaw University of Life Science, 02-776 Warsaw, Poland

e-mail: urszula_jankiewicz@sggw.pl, elmar.jz@tlen.pl

Received May 12, 2010

An intracellular arginine — specific aminopeptidase synthesized by *Bacillus mycoides* was purified and characterized. The purification procedure for studied aminopeptidase consisted of ammonium sulphate precipitation and three chromatographic steps: anion exchange chromatography and gel permeation chromatography. A molecular weight of ~50 kDa was estimated for the aminopeptidase by gel permeation

chromatography and SDS-PAGE. The optimal activity of the enzyme on arginyl- β -naphthylamide as a substrate was at 37°C and pH 9.0. The enzyme showed maximum specificity for basic amino acids: such as Arg and Lys but was also able to hydrolyze aromatic amino acids: Trp, Tyr, and Phe. Co²⁺ ions activated the enzyme, while Zn²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺ and Mn²⁺ inhibited it. The enzyme is a metalloaminopeptidase whose activity is inhibited by typical metalloaminopeptidase inhibitors: EDTA and 1,10-phenanthroline. Analysis of fragments of the amino acid sequence of the purified enzyme demonstrated high similarity to AmpS of *Bacillus cereus* and AP II of *B. thuringensis*.

RECOMBINANT GLYCEROL DEHYDRATASE FROM *Klebsiella pneumoniae* XJPD-LI: INDUCTION OPTIMIZATION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION

© 2011 X. L. Xu^{*,***}, G. L. Zhang^{***}, B. Lv^{**}, Y.-J. Yuan^{*}, and C. Li^{**}

^{*}*School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin, 300072, P.R. China*

e-mail: xuxl@shzu.edu.cn

^{**}*School of Life Science and Technology, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, P.R. China*

e-mail: lichun@bit.edu.cn

^{***}*Key Laboratory for Green Processing of Chemical Engineering of Xinjiang Bingtuan,*

Shihezi University, Xinjiang, 832003, P.R. China

Received July 22, 2010

Glycerol dehydratase (GDHt) is the rate limiting enzyme in the biosynthesis of 1,3-propanediol from glycerol. The optimization of inducing process for recombinant GDHt from *Klebsiella pneumoniae* XJPD-Li carried out to increase specific activity and ratio of soluble form. The optimum condition was inducing under the isopropyl- β -D-thiogalactoside concentration of 0.8 mM and the temperature of 20°C for 3 h. Homogeneity of GDHt then was obtained by affinity chromatography, resulted in 2.11 -fold purification and an overall yield of 47.5%. The optimum pH and reaction temperature of GDHt were pH 8.0 and 45°C, respectively. The K_m for glycerol, 1,2-propanediol, 1,2-ethanediol and coenzyme B₁₂ were 0.48, 1.43, 3.07 mM, and 10.03 nM, respectively. The GDHt showed relatively stable even under temperature of 40°C and a bit blunt to oxygen. The thermo-inactivation kinetic models were fit linear under different temperatures.

ИММОБИЛИЗАЦИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА ГЛЮКОЗОИЗОМЕРАЗЫ В КСЕРОГЕЛЕ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ И СВОЙСТВА ПРИГОТОВЛЕННЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ

© 2011 г. Г. А. Коваленко^{*,**}, Л. В. Перминова^{*}, Т. В. Чуенко^{*}, Л. И. Сапунова^{***},
Е. А. Шляхотко^{***}, А. Г. Лобанок^{***}

^{*}*Институт катализа СО РАН, Новосибирск, 630090 Россия*

e-mail: galina@catalysis.ru

^{**}*Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия*

^{***}*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, 220141 Беларусь*

Поступила в редакцию 13.06.2010 г.

Разработан оригинальный способ иммобилизации нерастущих клеток микроорганизмов в ксерогеле диоксида кремния, содержащем нерастворимые гидроксо соединения кобальта(II). На основе *Escherichia coli* с использованием гена *Arthrobacter nicotianae* сконструирован рекомбинантный штамм—продукт глюкозоизомеразы. Обнаружено, что активность глюкозоизомеразы и стабильность биокатализаторов, приготовленных на основе рекомбинантного штамма *E. coli*, в 3-5 раз выше по сравнению с

биокатализаторами, приготовленными с использованием штамма-донора *A. nicotianaе*. В условиях непрерывного гидролиза 3 М фруктозы при 62—65°C в реакторе с неподвижным слоем время полуинактивации биокатализаторов, приготовленных на основе рекомбинантного штамма и *A. nicotianaе*, было ~60 и ~25 сут соответственно.

АДСОРБЦИОННАЯ ИММОБИЛИЗАЦИЯ КЛЕТОК РОДОКОККОВ В ГИДРОФОБИЗОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ШИРОКОПОРИСТОГО ПОЛИАКРИЛАМИДНОГО КРИОГЕЛЯ

© 2011 г. **М. С. Куюкина***, **И. Б. Ившина***, **Е. В. Рубцова***, **Р. В. Иванов****,
В. И. Лозинский

**Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, 614081*

e-mail: kuyukina@iegm.ru

***Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова РАН, Москва*

Поступила в редакцию 13.06.2010 г.

Исследован процесс адсорбции клеток *Rhodococcus ruber* на колонках с полиакриламидным криогелем (**криоПААГ**), частично гидрофобизованным с помощью различного количества (0,2, 1 и 5 мол. %) химически привитых остатков н-додекана. Определены адсорбционная емкость (1.1×10^9 кл./г) гелевого носителя в отношении клеток родококков и оптимальное содержание (1 мол. %) гидрофобизирующих группировок. Посредством респирометрического метода установлены высокая каталитическая активность и функциональная стабильность иммобилизованных бактериальных клеток. Дыхательная активность иммобилизованных родококков в присутствии модельной смеси углеводов нефти на 12—17% превышала соответствующий показатель для свободных клеток. Жизнеспособность адсорбционно закрепленных в гидрофобизованном криоПААГ клеток родококков сохранялась на уровне 93—95% после полугодического периода хранения. Полученные результаты могут быть использованы при разработке иммобилизованного биокатализатора для направленной трансформации углеводородных соединений и биологической очистки нефтезагрязненной воды.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ - ПРОДУЦЕНТОВ L-АСПАРАГИНАЗ

© 2011 г. **М. В. Покровская**, **В. С. Покровский**, **Н. Н. Соколов**

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича РАМН Москва, 119121

e-mail: vadimpokrovsky@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.05.2010 г.

Разработан специфический, быстрый и простой метод выявления активных продуцентов L-аспарагиназы на твердой среде с использованием дифференциальной среды на основе LB или M9 с 1.5% агара. Каждые 100 мл среды LB или M9 дополнительно содержали 6-7 мл глицерина, 4 г L-аспарагина и 0.2 г CaCO₃, а также диагностические компоненты — 3 мл 0.2 М CuSO₄ • 5H₂O и 2.5 мл 0.1 М K₃Fe(CN)₆, pH 7.6-7.8. Результаты учитывали через 12—20 или 24—48 ч роста штамма при 37°C на соответствующих средах. Красный цвет колоний и окрашенная зона вокруг них указывали на способность исследуемого штамма разрушать аспарагиновые комплексы. Рекомендуемый метод позволяет выявлять штаммы бактерий, продуцирующие L-аспарагиназу с удельной активностью не менее 0.1—3.0 МЕ/мг белка.

СПОСОБНОСТЬ К АНАЭРОБНОМУ РОСТУ И АКТИВНОСТЬ СПИРТОВОГО БРОЖЕНИЯ У МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ

© 2011 г. А. В. Кураков*, К. С. Хидиров**, В. С. Садыкова***, Д. Г. Звягинцев**

* Международный биотехнологический центр МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва 119991

e-mail: kurakov57@mail.ru

** Факультет почвоведения МГУ

*** Биологический факультет МГУ

Поступила в редакцию 12.04.2010 г.

На основе предложенного метода проведено выделение грибов в анаэробных условиях и установлены различия в их численности и видовом составе в разных местообитаниях. На представительной выборке (344 штаммов более 60 видов) определена способность микромицетов разных таксонов к анаэробному росту и спиртовому брожению. Среди грибов, растущих в анаэробных условиях, выявлены виды с высокой, умеренной и низкой активностью брожения. Способность к анаэробному росту и брожению зависела от таксономической принадлежности. В ряде случаев проявление этих свойств зависело от местообитания, из которого штамм был выделен. Максимальный уровень накопления этанола в культуральной жидкости (1.2—4.7%) обнаружен у *Absidia spinosa*, *Aspergillus* sp., *grynny flavus*, *Aspergillus terreus*, *Acremonium* sp., *Mucor circinelloides*, *Mucor* sp., *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. sambucinum*, *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma* sp.

ИОНООБМЕННЫЕ СВОЙСТВА КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК КРАСНОЙ ВОДОРОСЛИ *Phyllophora crispa*

© 2011 г. Н. Р. Мейчик, Н. И. Попова, Ю. И. Николаева, И. П. Ермаков, А. Н. Камнев

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, 119991

e-mail: meychik@mail.ru

Поступила в редакцию 20.06.2010 г.

Исследованы ионообменные свойства клеточных стенок, выделенных из таллома красной водоросли *Phyllophora crispa*. Определены ионообменная способность и коэффициент набухания клеточной стенки при различных рН (2—12) и постоянной ионной силе раствора (10 мМ). Установлено, что поведение клеточных стенок *P. crispa* как ионообменников обусловлено присутствием в их матриксе двух типов катионообменных групп и аминокрупп. Определено количество групп каждого типа и константы их ионизации, а также интервалы рН, в которых катионообменные группы становятся ионизированными и могут принимать участие в обменных реакциях с катионами внешней среды. Высказано предположение, что ионогенные группы с $pK_a \sim 5$ являются карбоксильными группами уоновых кислот, а с $pK_a \sim 7.5$ — карбоксильными группами аминокислотных фрагментов. Определено, что белок является основным компонентом полимерного матрикса клеточных стенок, так как его доля составляла 36%.

ВЫДЕЛЕНИЕ ЭТИЛЕНА И АКТИВНОСТЬ БЕЛКОВОГО ИНГИБИТОРА ПОЛИГАЛАКТУРОНАЗЫ В ПЛОДАХ ЯБЛОНИ И БАНАНА ПРИ ДЕЙСТВИИ СТИМУЛЯТОРОВ И ИНГИБИТОРОВ БИОСИНТЕЗА ЭТИЛЕНА

© 2011 г. Е. А. Буланцева, М. А. Проценко, А. С. Торопкина, Н. П. Кораблёва

Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, Москва, 119071

e-mail: protsenko@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 9.07.2010 г.

Обработка плодов яблони и банана препаратами 2-хлорэтилфосфоновая кислота и этацид индуцировала выделение этилена, вызывая ускорение созревания, а также накопление 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты в плодах яблони. Ингибиторы аминоксиуксусная кислота,

аминоэтоксивинилглицин и CoCl_2 проявляли действие на разных этапах биосинтеза этилена, задерживая физиологический процесс старения, что приводило к увеличению продолжительности хранения. Обработка астаксантином и бутилоксианизолом увеличивала время до появления пика выделения этилена плодами. Содержание белкового ингибитора полигалактуроназы (**БИПГ**) коррелировало с интенсивностью выделения этилена. Поражаемость плодов фитопатогенными микроорганизмами снижалась в результате ингибирования активности полигалактуроназы патогенов. Динамика активности БИПГ в плодах свидетельствует о его важной роли в комплексе процессов созревания.

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ РАСТЕНИЯ-КОНЦЕНТРАТОРЫ И СВЕРХКОНЦЕНТРАТОРЫ МЕДИ И ЕЕ РОЛЬ В МЕТАБОЛИЗМЕ ЭТИХ ВИДОВ

©2011г. М. Я. Ловкова*, Г. Н. Бузук**

*Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, Москва, 119071 Россия

e-mail: inbi@inbi.ras.ru

**Витебский медицинский университет, Витебск, Белоруссия

e-mail: buzukg@mail.ru

Поступила в редакцию 26.04.2010 г.

Методом атомной абсорбции в сочетании со спектрофотометрией проведено тестирование лекарственных растений флоры России (~200 видов) на содержание меди (Cu), выявлены 36 видов — концентраторов и сверхконцентраторов этого элемента. Сопоставлена способность этих видов накапливать Cu с синтезом физиологически активных соединений (**ФАС**), преобладающими среди которых являются алкалоиды и фенольные соединения. Установлено стимулирующее влияние Cu на образование и накопление алкалоидов основных структурных типов — производных хинолизидина, изохинолина, тропана и индола. Обобщены данные о роли Cu-содержащих ферментов в метаболизме алкалоидов, а также фенольных соединений на примере флавоноидов. Обсуждается роль сконцентрированной меди в лечебном эффекте лекарственных растений и возникающей в связи с этим перспективы расширения спектра их применения, особенно в тех случаях, когда направленность действия ФАС и Cu различны.

GLUCOSE OXIDASE-POLYPYRROLE ELECTRODES SYNTHESIZED IN *p*-TOLUENESULFONIC ACID AND SODIUM *p*-TOLUENESULFONATE

© 2011 G. Ozyilmaz, A. T. Ozyilmaz, F. Can

University of Mustafa Kemal, Faculty of Arts and Sciences, Department of Chemistry, 31040 Hatay-Turkey

e-mail: gozyilmaz@gmail.com_

Received May 20, 2010

Amperometric glucose biosensors have been developed based on entrapment on platinum (Pt) electrode using cyclic voltammetry technique in glucose oxidase (GOD) and pyrrole containing *p*-toluenesulfonic acid (pTSA) or sodium *p*-toluenesulfonate (NapTS) as supporting electrolyte solutions. Both of electrolyte solutions were suitable media for the formation and deposition of polypyrrole-GOD (PPy-GOD) layers on Pt substrate. Pt/PPy-GOD electrodes brought about in different morphological properties as well as different electrochemical and biochemical response. The highest responses obtained in pTSA and NapTS electrolytes were observed at pH of 4.5 and 7.0 for Pt/PPy-GOD electrodes, respectively. While linearity was observed between 0.0—1.0 mM glucose substrate for both electrodes, I_{max} value of Pt/PPy-GOD_{NapTS} electrode was approximately twice as high as that of Pt/PPy-GOD_{pTSA} electrode as 25.4 and 14.2 μA , respectively. Five commercial drinks were tested with enzyme electrodes and compared with results obtained spectrophotometrically using glucose kit. Results revealed that Pt/PPy-GOD_{NapTS} electrode exhibited better biosensor response.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ КУЛЬТУР АЦИДОФИЛЬНЫХ ХЕМОЛИТОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

© 2011 г. С. В. Рогатых*, А. А. Докшукина, Т. С. Хайнасова*, С. В. Мурадов*,
И. А. Кофиади****

**Научно-исследовательский геотехнологический центр ДВО РАН, Петропавловск-Камчатский, 683002*

***ЗАО "НПФ ДНК-Технология", Москва, 115478*

e-mail: kofiadi@mail.ru

Поступила в редакцию 12.05.2010 г.

Проведена оценка эффективности нескольких методов очистки ДНК в отношении представителей накопительных культур сообщества ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов, выделенных из сульфидных руд месторождения Шануч (полуостров Камчатка). Протестированы методики очистки ДНК, использующие различные комбинации физических (нагревание до 65—98°C, перетирание с частицами SiO₂), ферментативных (обработка лизоцимом и протеиназой К) и химических (обработка GuSCN, СТАВ и КОН) воздействий на клетки. Оценку эффективности проводили с помощью ПЦР в реальном времени. Наилучший результат был получен для комбинированной методики, основанной на лизирующей активности GuSCN (лизис при 65°C) с последующей очисткой фенолом и хлороформом.

МЕТОД АВТОМАТИЗИРОВАННОГО ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ЕГО РЕАЛИЗАЦИЯ В МИКРОФЛЮИДНОЙ СИСТЕМЕ

**© 2011 г. Д. Д. Мамаев, Д. А. Ходаков, Е. И. Дементьева, И. В. Филатов, Д. А. Юрасов,
А. И. Черепанов, В. А. Василисков, О. В. Смолдовская, Д. В. Зименков, Д. А. Грядун, В. М. Михайлович, А. С. Заседателев**

Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991

e-mail: grad@biochip.ru

Поступила в редакцию 5.06.2010 г.

Разработаны метод и устройство для автоматизированного выделения и очистки нуклеиновых кислот из биологических образцов. Метод включает разрушение бактериальных клеток и/или вирусных частиц (комбинированный ферментативный и химический лизис) и последующую экстракцию с очисткой нуклеиновых кислот на твердофазном сорбенте. Процедура осуществляется в автоматическом режиме внутри микрофлюидного модуля, изолированного от внешней среды, что сводит к минимуму контакт исследователя с потенциально инфекционным образцом и, как следствие, снижает риск заражения персонала. Модуль включает резервуары с лиофилизированными компонентами лизирующих и промывочного буферов; микроколону с твердофазным сорбентом; резервуары, содержащие воду, спирт и водно-спиртовые смеси для растворения сухих компонентов буферов, промывки микроколони и элюции нуклеиновых кислот; микроканалы и клапаны, необходимые для перемещения жидкостей внутри модуля. Модуль помещается в блок управления, осуществляющий подачу давления, нагрев, перемешивание реагентов и перемещение растворов в резервуарах модуля. Устройство способно выполнять эффективное выделение и очистку нуклеиновых кислот за 40 мин, а полученные препараты могут быть использованы непосредственно для проведения ПЦР и анализа с использованием биочипов.

МИКРОЧИПОВАЯ АНАЛИТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ДЛЯ МУЛЬТИПЛЕКСНОГО АНАЛИЗА МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ В МИКРОРЕАКТОРАХ РЕАКТИВАМИ

© 2011 г. Д. В. Наволоцкий^{*,**}, А. В. Перчик^{*}, И. А. Маркьянов^{**}, А. А. Ганеев^{*,**},
М. Н. Сляднев^{*,**}

**Группа компаний "Люмэкс", Санкт-Петербург, Россия, 192029*

***Научно-исследовательский институт химии Санкт-Петербургского государственного университета,
Санкт-Петербург, Россия, 192029*

e-mail: perec@lumex.ru

Поступила в редакцию 12.05.2010 г.

Разработана и оптимизирована микрочиповая аналитическая система, использующая кремниевый чип с иммобилизованными в микрореакторах тест-системами для мультиплексного анализа ДНК методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Предложена методика иммобилизации ПЦР-компонентов тест-системы, выбран стабилизатор и проведена оптимизация состава реакционной смеси для достижения долговременной стабильности микрочипа. Проведена оптимизация подготовки проб с использованием магнитного сорбента и показано, что при содержании целевой ДНК в пробе 2.6×10^4 копий/мл для получения положительной идентификации требуется 60 мин, включая время, затраченное на пробоподготовку модельных проб. Продемонстрированы возможности созданной системы на примере анализа в микрочипе проб с различным содержанием ДНК, достигнуты низкие абсолютные пределы обнаружения (20 копий ДНК в микрореакторе) и высокая воспроизводимость анализа.