

ПУЛЬС-ЭЛЕКТРОФОРЕЗ: ТЕОРИЯ МЕТОДА, ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЙ АРСЕНАЛ И ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ

© Е. С. Насонова

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: noseeta@mail.ru*

Пульс-электрофорез — это метод фракционирования высокомолекулярных ДНК (от 10 т. п. н. до 10 млн п. н.) с помощью электрофореза в агарозном геле в условиях периодически меняющегося по направлению («пульсирующего») электрического поля. Этот метод стал одним из ключевых инструментов современной геномики, поскольку он дает возможность манипулировать ДНК целых хромосом или их протяженных участков. В обзоре кратко рассмотрены теоретические основы метода, описаны существующие варианты установок для пульс-электрофореза, их достоинства и недостатки, обсуждены условия, определяющие эффективность разделения молекул, и перечислены основные направления использования этого метода.

Ключевые слова: пульс-электрофорез, фракционирование ДНК, хромосомная ДНК.

Принятые сокращения: CHEF (Contour-Clamped Homogeneous Electric Field) — электрофорез в контролируемом гомогенном электрическом поле, FIGE (Field Inversion Gel Electrophoresis) — гель-электрофорез с инверсией поля, OFAGE (Orthogonal Field-Alternating Gel Electrophoresis) — ортогональный гель-электрофорез в переменном поле, PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) — гель-электрофорез в пульсирующем поле, или (в устаревшей трактовке) градиентный электрофорез в пульсирующем поле (Pulsed Field Gradient Electrophoresis), RGE (Rotating Gel Electrophoresis) — электрофорез с вращающимся гелем, TAFE (Transverse Alternating-Field Electrophoresis) — электрофорез в попеременно-переменном поле.

Метод электрофореза ДНК в агарозном геле в условиях действия двух поочередно прилагаемых электрических полей, векторы напряженности которых направлены друг относительно друга под тупым углом, получил в англоязычной литературе название «гель-электрофорез в пульсирующем поле» (Pulsed Field Gel Electrophoresis — PFGE). В научной литературе на русском языке этот метод стали называть «пульс-электрофорезом» (Смит и др., 1990), или «пульсфорезом» (Межевая и др., 1993).

В пульсирующем электрическом поле возможно фракционирование крупных молекул ДНК с размерами в очень широком диапазоне: от 10 т. п. н. до 10 млн п. н. (Orbach et al., 1988; Kuspa et al., 1989; Cooney, 1990). В этом диапазоне находится размер хромосомных ДНК прокариот и низших эукариот; следовательно, пульс-электрофорез позволяет манипулировать ДНК целых хромосом или, как в случае высших организмов, их протяженных участков. Именно поэтому данный метод стал одним из ключевых инструментов современной геномики.

В русскоязычной литературе методу пульс-электрофореза посвящены всего два обзора (Смит и др., 1990; Межевая и др., 1993), последний из которых опубликован 15 лет назад. Мы сочли целесообразным подготовить обзор, цель которого: 1) кратко рассмотреть теоретические основы метода; 2) описать существующие на данный момент варианты установок для пульс-электрофореза, их достоинства и недостатки; 3) обсудить условия, опре-

деляющие эффективность разделения молекул; 4) перечислить основные современные направления использования пульс-электрофореза. Этот метод был предложен и совершенствовался в англоязычных странах, поэтому вся связанная с ним терминология исходно является английской. Для многих понятий до сих пор не появилось устоявшихся русских эквивалентов, поэтому мы приводим все термины вместе с их названиями на языке оригинала.

История и теория пульс-электрофореза

Впервые произвести разделение высокомолекулярной ДНК в электрофоретической системе удалось в начале 80-х годов прошлого века Шварцу с соавторами (Schwartz et al., 1982; Schwartz, Cantor, 1984). До работ этих авторов электрофорез крупных молекул ДНК был невозможен в силу двух основных причин. Во-первых, с использованием обычных методов выделения и очистки не могли быть получены препараты интактной ДНК большого размера. Депротенинизированная ДНК целой хромосомы имеет контурную длину порядка нескольких миллиметров при диаметре 20 нм. Такие молекулы с осевым отношением около 10^6 весьма чувствительны к воздействию сил сдвига, в результате чего при использовании обычных методов выделения ДНК они фрагментируются. Во-вторых, в

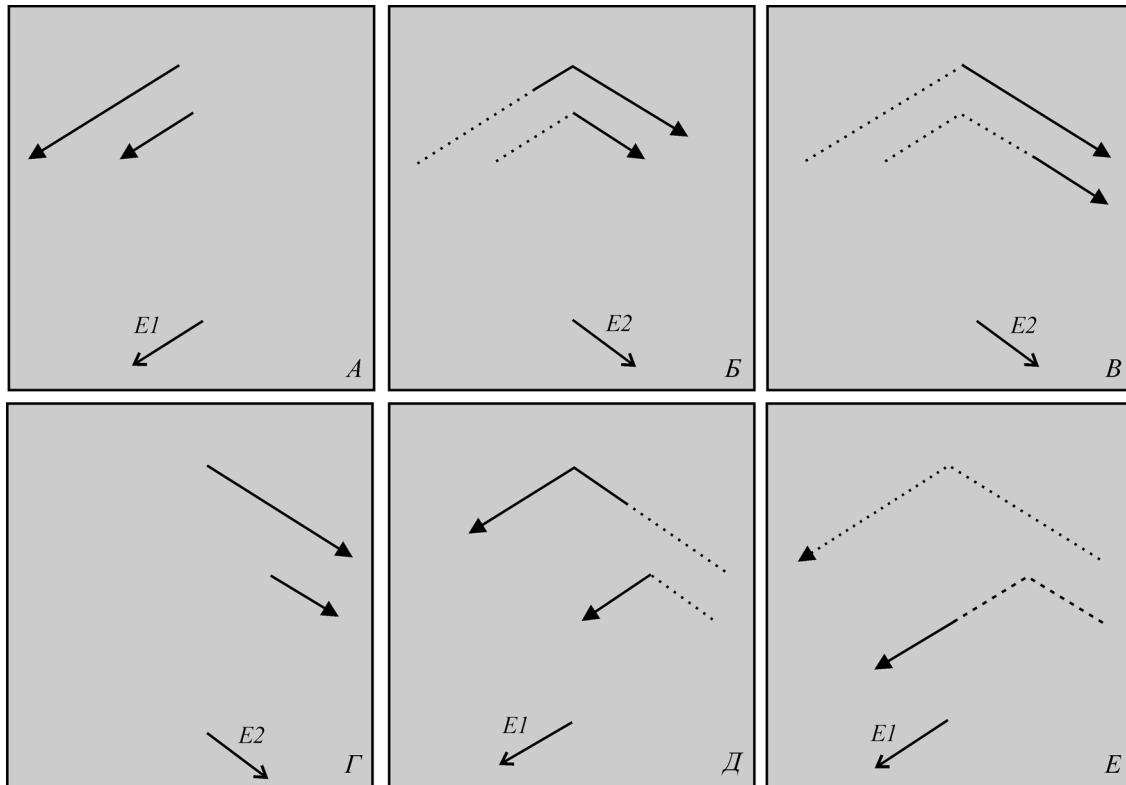


Рис. 1. Схема, показывающая механизм фракционирования молекул ДНК в ходе пульс-электрофореза (по: Gurrieri et al., 1996, модифицировано).

При переключении направления электрического поля молекулы сначала начинают движение своим бывшим «задним концом», «отступая» при этом на расстояние, пропорциональное их размеру (А, Б), только затем начинается поступательное продвижение молекул в геле в новом направлении (В). В результате крупные молекулы отстают от мелких. С каждым очередным изменением направления поля (Г—Е) отставание крупных молекул от мелких увеличивается. E_1, E_2 — векторы напряженности электрического поля. Длинная и короткая стрелки показывают положение в геле длинной и короткой молекулы ДНК соответственно. Пунктирными отрезками обозначена траектория миграции молекул.

ходе обычного электрофореза молекулы ДНК размером более 50 т. п. н. движутся в геле с практически одинаковой скоростью и, следовательно, не фракционируются по размерам.

Для разделения ДНК целых хромосом дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* размером 200—2200 т. п. н. Шварц и соавторы предложили два принципиально новых подхода, позволивших решить проблему очистки и фракционирования таких крупных ДНК. Эти исследователи разработали оригинальную методику, позволяющую экстрагировать интактную хромосомную ДНК из клеток, заключенных в легкоплавкую агарозу, и сконструировали аппарат для электрофореза, в котором крупные молекулы ДНК могли быть разделены в агарозном геле при периодическом изменении направления прилагаемого электрического поля.

Шварц и соавторы связывали эффект разделения молекул в агарозном геле в условиях пульсирующего электрического поля с разным временем переориентации молекул, различающихся по размеру. По мнению этих авторов, при изменении направления приложенного электрического поля более крупные молекулы дольше переориентируются и, следовательно, отстают от более мелких, что и приводит к разделению молекул по размерам. Как показали последующие исследования, эта элегантная гипотеза оказалась не совсем верной. Механизм разделения молекул связан с разными формами движения ДНК в

геле, которые и определяют разную скорость миграции молекул разного размера. Наблюдения окрашенных флуорохромами молекул ДНК показали, что в ходе продвижения в геле под воздействием электрического поля молекулы вытягиваются по направлению вектора напряженности поля (Bustamante et al., 1990; Gurrieri et al., 1996). При смене направления электрического поля вытянутая конформация молекул ДНК сохраняется, молекулы начинают миграцию в новом направлении одним из своих концов. Если угол между векторами напряженности альтернативных полей — так называемый угол переориентации (reorientation angle) — равен 90° , то лидирующим может стать любой конец молекулы: если этот угол меньше 90° , то лидирующим оказывается «передний» на данный момент конец молекулы, а если угол больше 90° , то лидирует «задний» конец молекулы. В установках для пульс-электрофореза применяют углы переориентации больше 90° , поэтому при изменении направления поля молекулы начинают движение в новом направлении своим «задним» концом и, следовательно, вначале им приходится совершать возвратное движение (рис. 1). При этом молекулы «отступают» на расстояние, пропорциональное их размеру и, следовательно, крупные молекулы отстают от мелких. Таким образом, эффективность разделения молекул определяется их размером, а также числом переключений направления поля и продолжительностью периодов его стабильной ориентации (Southern et al., 1987; Southern, Elder, 1995).

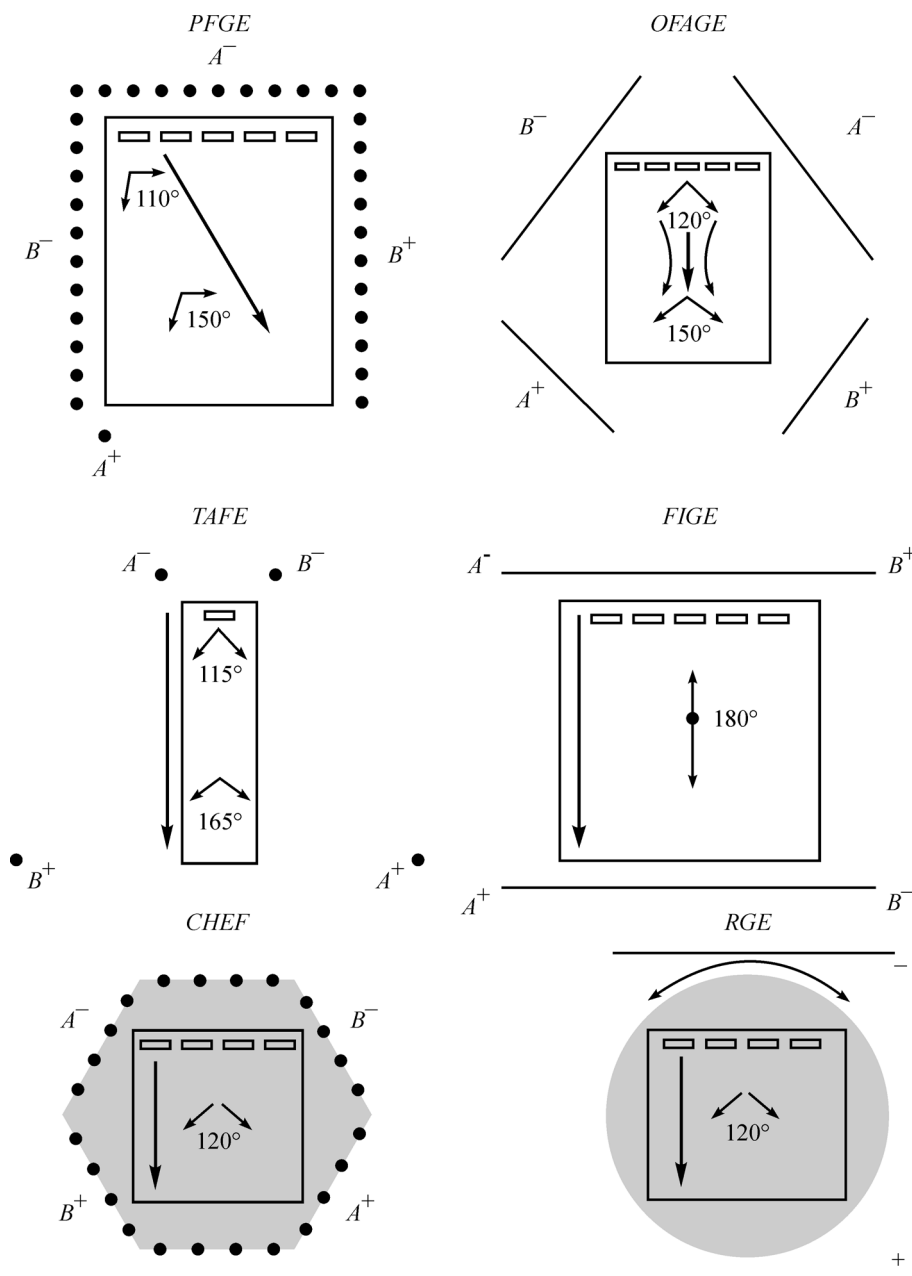


Рис. 2. Схемы основных систем для пульс-электрофореза (по: Lai et al., 1989; Межевая и др., 1993, с изменениями и дополнениями).

Системы с негомогенными полями: *PFGE* — градиентный электрофорез в пульсирующем поле, *OFAGE* — ортогональный гель-электрофорез в переменном поле, *TAFE* — электрофорез в поперечно-переменном поле. Системы с гомогенными полями: *FIGE* — гель-электрофорез с инверсией поля, *CHEF* — электрофорез в контролируемом гомогенном электрическом поле, *RGE* — электрофорез с вращающимся гелем. Короткие тонкие стрелки указывают направление векторов напряженности альтернативных электрических полей, рядом с ними приводится значение угла переориентации; широкие стрелки указывают итоговое направление миграции молекул ДНК. Символы A^+ и A^- , B^+ и B^- обозначают положение электродных пар альтернативных электрических полей. В схемах *PFGE*, *TAFE* и *CHEF* электроды обозначены точками, в схемах *OFAGE*, *FIGE* и *RGE* — отрезками прямых.

Варианты установок для пульс-электрофореза

В первой установке для пульс-электрофореза, созданной Шварцем и Кантором (Schwartz, Cantor, 1984), через определенные промежутки времени производилось переключение направления поля под углом 90° . Гель помещали в камеры для горизонтального электрофореза. Одно электрическое поле было гомогенным по напряженности и создавалось с помощью двух рядов расположенных друг против друга точечных электродов. Второе поле

было негомогенным, для его создания использовали ряд точечных электродов в качестве катода и один точечный электрод в качестве анода (рис. 2).

Шварц и Кантор назвали свою систему «градиентный электрофорез в пульсирующем поле» (Pulsed Field Gradient Electrophoresis — *PFGE*). Авторы считали, что градиент напряженности — это необходимое условие разделения молекул ДНК в пульсирующем поле, поэтому использовали конфигурацию электродов, заведомо приводящую к негомогенности поля. В этой системе угол

между векторами напряженности двух полей варьировал в разных участках геля (от 110 до 150°), поэтому одинаковые по размеру молекулы мигрировали с разными скоростями в зависимости от их исходного положения в геле, что затрудняло сравнение электрофоретических подвижностей ДНК, расположенных на соседних дорожках, в результате чего точно определить размер молекул было невозможно.

В последующие годы было предложено несколько вариантов аппаратов для пульс-электрофореза, которые различались по схеме расположения электродов и соответственно по такому параметру, как угол переориентации молекул ДНК при переключении направления приложения поля. Английская аббревиатура PFGE, предложенная Шварцем и Кантором, в настоящее время применяется для обозначения всей совокупности методов и систем для электрофореза ДНК, использующих принцип пульсирующего электрического поля. Однако поскольку последующие исследования показали, что неомогенность поля не является обязательным условием для успешного проведения пульс-электрофореза, и поскольку в большинстве современных систем используется гомогенное поле, то эта аббревиатура получила новую расшифровку — Pulsed Field Gel Electrophoresis (гель-электрофорез в пульсирующем поле).

Вскоре после выхода в свет работы Шварца и Кантора с описанием первого прибора для пульс-электрофореза Кэрл и Олсон (Carle, Olson, 1984) предложили свою модификацию этого метода, названную авторами «ортогональный гель-электрофорез в переменном поле» (Orthogonal Field-Alternating Gel Electrophoresis — OFAGE). В установке для OFAGE расположение электродов было симметричным, а их длина — неодинаковой. Более длинный электрод использовали в качестве катода, более короткий — в качестве анода, что приводило к созданию неомогенных электрических полей в обоих направлениях. В этой системе в разных частях геля угол переориентации варьировал от 120 до 150°. При использовании этого аппарата в центральной части геля удавалось получить прямые дорожки с фракционированными ДНК, что давало возможность сравнивать электрофоретические подвижности молекул на соседних дорожках. Однако дорожки, расположенные ближе к краям геля, по-прежнему оставались искривленными.

Гардинер и соавторы (Gardiner et al., 1986) предложили систему, в которой гель располагается в камере вертикально и альтернативные электрические поля ориентированы соответственно не вдоль, а поперек геля. Эту систему авторы назвали «электрофорез в поперечно-переменном поле» (Transverse Alternating-Field Electrophoresis — TAFE). Слово «поперечный» («transverse») в названии этого варианта пульс-электрофореза подразумевает направление ориентации вектора напряженности поля по отношению к плоскости геля. Поле в этой системе тоже неомогенно, поскольку угол переориентации от верха к низу геля увеличивается от 115 до 165°, что приводит к уменьшению напряженности поля и скорости миграции ДНК в нижней части геля. Уменьшение скорости движения молекул приводит к эффекту фокусирования полос (self-sharpening effect — Cantor et al., 1988; band sharpening effect — Gardiner, 1992), при котором полосы становятся более узкими и четкими, но при этом они оказываются близко расположенными друг к другу. Фокусирование полос затрудняет стандартизацию условий TAFE и получение воспроизводимых результатов, но может

быть полезно для решения некоторых специальных задач (например, когда требуется добиться хорошего разделения в геле молекул близкого размера). Более того, несмотря на неомогенность электрического поля, в этом вертикальном варианте пульс-электрофореза обеспечена строго прямолинейная миграция молекул, следовательно, все дорожки в геле (в том числе и крайние) остаются прямыми и параллельными. Это обстоятельство весьма удобно для сравнения электрофоретических подвижностей молекул, мигрирующих на разных дорожках в одном геле.

Главными недостатками описанных выше систем пульс-электрофореза были использование неомогенного электрического поля и изменение угла переориентации по мере продвижения молекул в геле. Это приводило к разной скорости миграции молекул ДНК в разных участках геля и — как следствие — к сложностям при оптимизации условий электрофореза, к искривлению дорожек геля (в горизонтальных вариантах PFGE и OFAGE) и к эффекту фокусирования полос (в вертикальном варианте TAFE). Последующие эксперименты показали, что неомогенность поля и градиент напряженности не являются обязательными условиями разделения молекул в ходе пульс-электрофореза, и дальнейшее развитие этой технологии шло по пути разработки систем с гомогенным пульсирующим полем.

Кэрл и соавторы (Carle et al., 1986) предложили использовать обычную горизонтальную камеру с двумя параллельными электродами одинаковой длины, в которой при проведении электрофореза периодически меняется полярность приложенного электрического поля, т. е. угол переориентации составляет 180°. При этом общая тенденция ДНК к движению «вперед» сохраняется за счет того, что длительность приложения поля одной ориентации больше, чем поля противоположной ориентации (или используется разное напряжение того и другого полей). Этот метод получил название «гель-электрофорез с инверсией поля» (Field Inversion Gel Electrophoresis — FIGE). К его несомненным достоинствам относятся простота аппаратной базы (подходят любые камеры для простого электрофореза) и то, что подвижность молекул ДНК не зависит от их местоположения в геле. Недостатком же является нелинейная зависимость между скоростью миграции и размером молекул ДНК, приводящая к эффекту инверсии полос (band inversion effect). Каждому значению времени импульса, через которое осуществляется переключение электрических полей, соответствует определенный диапазон размеров молекул ДНК, которые мигрируют с очень малой скоростью. При этом молекулы с большими и меньшими размерами мигрируют с заметными скоростями. Этот эффект может привести к артефактному фракционированию молекул, поэтому «электрофорез с инверсией поля» не был признан удобным в применении и подходящим для точного определения размеров ДНК.

Чу и соавторы (Chu et al., 1986) разработали аппарат для пульс-электрофореза в контролируемом гомогенном электрическом поле (Contour-Clamped Homogeneous Electric Field — CHEF), в котором скорость и траектория движения молекул ДНК не зависят от их местоположения в геле, дорожки остаются прямыми и не наблюдается ни инверсии зон, ни фокусирования полос. В этой системе точечные электроды расположены по сторонам гексагонального контура. Значения потенциала на разных электродах регулируются на протяжении всего электрофореза таким образом, чтобы обеспечить гомогенность поля в

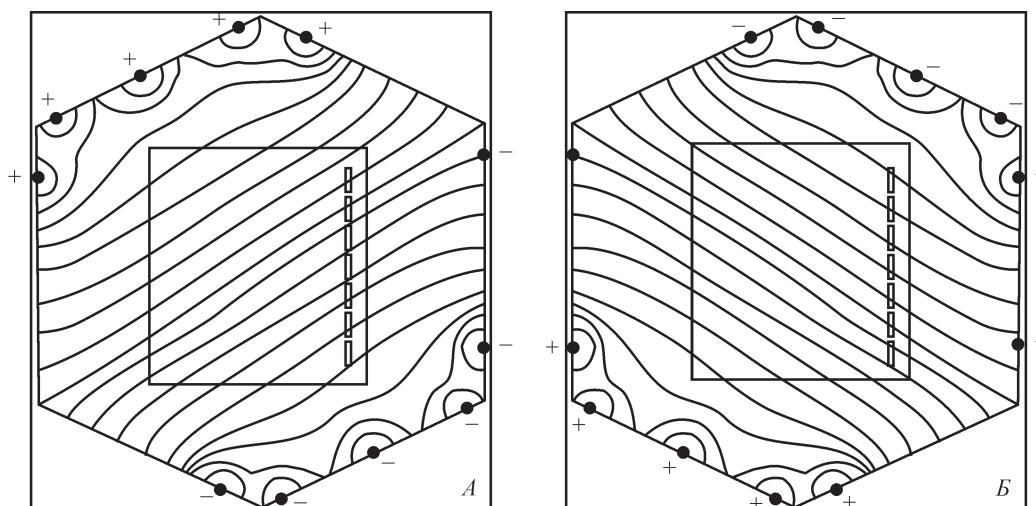


Рис. 3. Схема гомогенного пульсирующего электрического поля, которое создается в установке для CHEF (по материалам описания установки Gene Navigator™ System, Pharmacia Biotech — в настоящее время GE Healthcare Bio-Sciences, Швеция). Показаны силовые линии и электроды, задействованные в каждом из раундов переключения направления электрического поля. А, Б — альтернативные направления вектора напряженности.

каждой точке геля (рис. 3). В результате удается добиться того, что дорожки в CHEF-гелях всегда прямые, а качество разделения ДНК стабильно высокое. Из всех известных вариантов пульс-электрофореза CHEF получил наиболее широкое распространение, так как обеспечивает наиболее эффективное фракционирование молекул ДНК разного размера. Например, именно в этой системе стало возможным практически полное разделение всех хромосом в кариотипе дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. В ранних работах в молекулярном кариотипе дрожжей удалось разрешить только 11—12 полос, некоторые гетерологичные хромосомы комигрировали в одной полосе (Schwartz, Cantor, 1984; Carle, Olson, 1985). Чу и соавторы при исследовании молекулярного кариотипа *S. cerevisiae* наблюдали в CHEF-геле 15 полос. Авторам удалось разделить 14 из 16 хромосом этого организма (Chu et al., 1986).

Кроме приведенных выше вариантов пульс-электрофореза в литературе описаны электрофоретические установки, в которых пульсирующее электрическое поле создается не за счет переключения напряжения на электродных парах, а за счет вращения геля, помещенного на горизонтальную платформу, поворачиваемую на заданный угол через определенные промежутки времени («вращающийся гель в постоянном поле» — Rotating Gel in a Constant Field — RGCF, Anand, 1986; «электрофорез с вращающимся гелем» — Rotating Gel Electrophoresis — RGE, Southern et al., 1987), или в которых гель остается неподвижным, а катод и анод являются частями вращающегося ротора («гель-электрофорез с вращающимся полем» — Rotating Field Gel Electrophoresis — ROFE, Ziegler et al., 1987).

Предложены и некоторые другие модификации пульс-электрофореза, однако большинство наиболее признанных и широко используемых в настоящее время коммерческих установок базируется на принципе CHEF. Такими, например, CHEF-DR® III Pulsed Field Electrophoresis System (Bio-Rad Laboratories, США) и Gene Navigator™ System (Pharmacia Biotech — в настоящее время GE Healthcare Bio-Sciences, Швеция).

Факторы, определяющие эффективность фракционирования молекул

Кроме упомянутых выше факторов, критичных для успешного выделения ДНК и ее фракционирования в пульсирующем поле, таких как использование специальных щадящих методов очистки нативной высокомолекулярной ДНК и особое расположение электродов в электрофорезной камере, существует еще целый ряд параметров, влияющих на подвижность молекул и эффективность их разделения: время пульса и режим его изменения, напряженность поля, угол переориентации вектора напряженности поля, суммарная длительность электрофореза, концентрация агарозы, концентрация и температура буфера; причем все эти параметры взаимосвязаны.

Время пульса (в англоязычной литературе используют целый ряд названий этого параметра: pulse time, switch time, switch interval). Это промежуток времени, через который осуществляется изменение («переключение») направления электрического поля. После первых же опытов по фракционированию ДНК в пульсирующем поле стало понятно, что именно время пульса — это наиболее критичный параметр для успешного разделения молекул. Чем больше размер фракционируемых молекул, тем реже должно производиться переключение электрических полей. Шварц и Кантор объяснили этот эффект тем, что время, необходимое для переориентации молекулы ДНК при переключении направления поля, зависит от ее размера. Исследователи предполагали, что оптимальным временем пульса для молекул ДНК данного размера оказывается такой промежуток времени, за который они успевают переориентироваться и только еще начинают движение в новом направлении. Более крупные молекулы при том же времени пульса не успеют закончить переориентацию и, следовательно, позже начнут мигрировать в новом направлении, т. е. их продвижение в геле будет заторможено. Более короткие молекулы будут мигрировать в одном и том же направлении слишком длительное время (как в случае обычного электрофореза в постоянном поле), и, следовательно, эффективность их разделе-

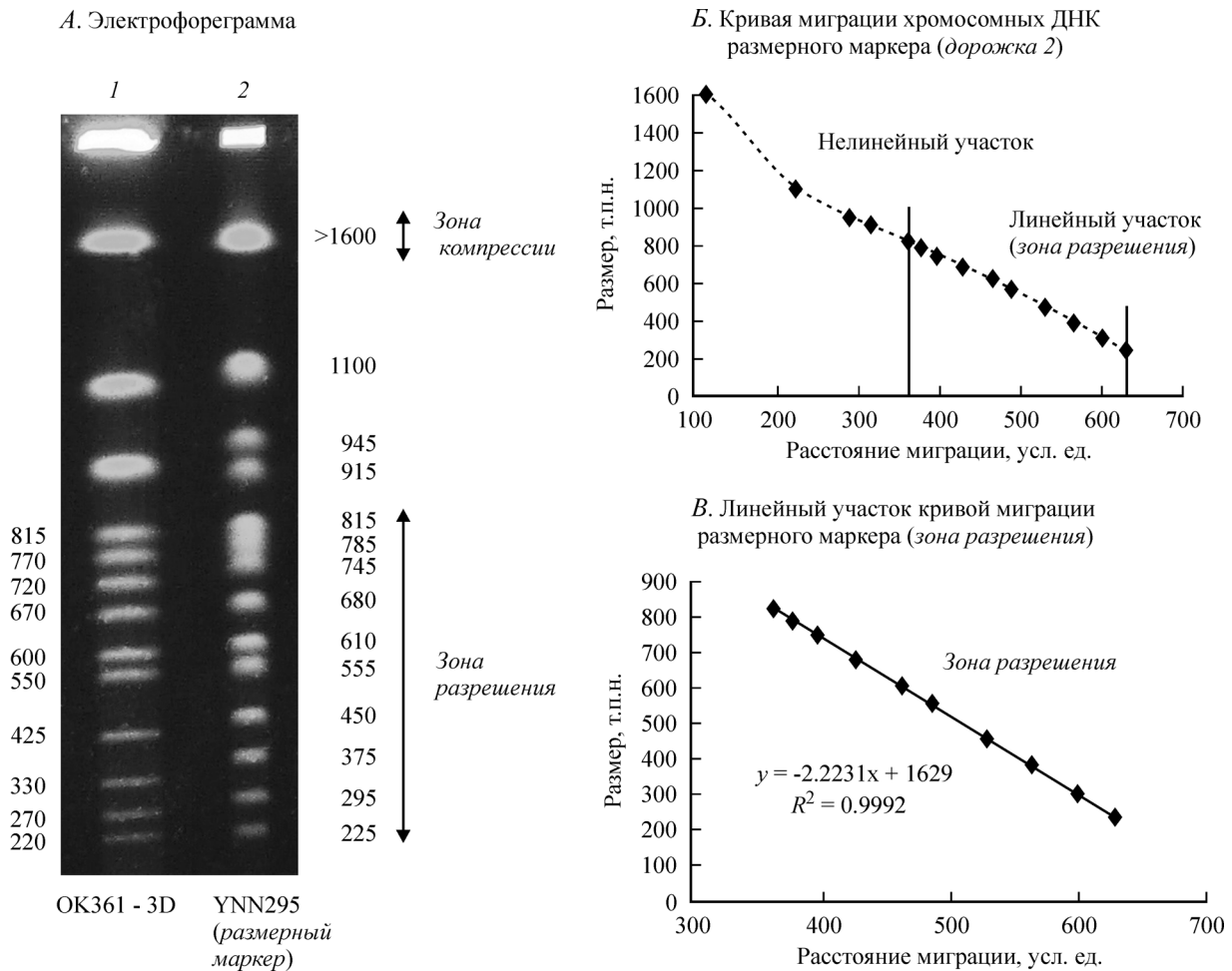


Рис. 4. Пример фракционирования и определения размеров хромосомных ДНК с помощью пульс-электрофореза в режиме возрастания времени пульса.

А — фракционирование хромосомных ДНК дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Дорожка 1 — штамм ОК361-3D; дорожка 2 — штамм YNN295 (Sigma-Aldrich, США), использованный как *размерный маркер*. Пульс-электрофорез проводили в 1%-ном агарозном геле в буфере $0.5 \times$ TBE при 14°C в аппарате для пульс-электрофореза в контролируемом гомогенном электрическом поле CHEF-DR® III Pulsed Field Electrophoresis System (Bio-Rad Laboratories, США). Время пульса возрастало в режиме интерполяции от 60 до 120 с в течение 24 ч при напряженности поля $6 \text{ В} \cdot \text{см}^{-1}$. Б — кривая миграции хромосомных ДНК размерного маркера *S. cerevisiae* YNN295 (пунктирная линия). В — участок кривой, на котором зависимость между скоростью миграции и размером молекул аппроксимируется линейной функцией (зона разрешения). Для этого участка с помощью средств MS Excel построена линия тренда (сплошная линия), определена ее функция (y) и рассчитана величина достоверности аппроксимации (R^2). Используя полученное уравнение, определены размеры хромосомных ДНК штамма ОК361-3D (указанные на рис. А, слева значения получены в результате усреднения данных пяти пульс-электрофорезов). На рис. А, справа приведены размеры хромосомных ДНК маркерного штамма YNN295. Зона компрессии — область в верхней части геля, где комигрируют ДНК, которые не фракционируются при использованных условиях.

ния будет невелика (Schwartz, Cantor, 1984). В соответствии с современными представлениями о механизме миграции молекул ДНК в пульсирующем поле корректнее принимать во внимание время, необходимое для возвратного движения, а не время, необходимое для переориентации (Gurtieri et al., 1996). Однако основная закономерность, прослеженная исследователями на заре становления метода пульс-электрофореза, остается прежней: при неком значении времени пульса только молекулы одного какого-то размерного класса оказываются в оптимальных для разделения условиях и могут быть эффективно фракционированы. Таким образом, для разделения молекул ДНК с широким диапазоном размеров необходимо подобрать режим последовательного возрастания времени пульса (рис. 4, А). Изменение этого параметра в ходе электрофореза называют «рампингом» (ramping, от ramp — изменение по линейному закону). Время пульса может воз-

растать либо непрерывно, либо прерывисто — через ряд дискретных значений. Непрерывное возрастание времени пульса от минимального до максимального из заданных значений в течение заданного промежутка времени получило название «интерполяция» (interpolation, от inter-polare — между двумя полюсами, между двух значений). Альтернативный вариант — ступенчатое возрастание времени пульса — называют «степпингом» (stepping, от step — ступень).

Область в геле после проведения пульс-электрофореза, где достигнуто эффективное разделение молекул ДНК, называют «зоной разрешения» (resolution window). Эффективность разрешения молекул в геле характеризуется расстоянием между полосами с хромосомными ДНК близкого размера (band spacing), а также шириной и четкостью полос (band sharpening). Зависимость между скоростью миграции молекул ДНК и их размером в зоне раз-

решения линейная, поэтому для молекул ДНК, мигрирующих в этой зоне, можно точно определить размер (рис. 4, Б, В).

Напряженность поля. Эффективность разрешения — это функция не только времени пульса, но и напряженности используемого электрического поля. В целом чем больше напряженность поля, тем выше скорость миграции молекул. Однако чем больше размер молекул, тем больше эта зависимость отклоняется от линейной (Cantor et al., 1988). Для разделения молекул размером до 1 млн п. н. используется напряженность поля 6—10 В/см. Чем ниже напряженность поля, тем выше разрешение, но уже диапазон размеров разрешаемых молекул (Birgen et al., 1988). Слишком высокие значения напряженности (выше 10 В/см) приводят к плохому разделению молекул и появлению так называемых шмеров (smears) — зон равномерного окрашивания ДНК, в которых не удается визуально идентифицировать отдельные полосы (Mathew et al., 1988b; Chu, 1990). Для крупных молекул (более 1 млн п. н.) при высоких значениях напряженности поля начинает сказываться эффект захвата (trapping effect) — спонтанная перманентная иммобилизация молекул в геле, обусловленная специфическим необратимым изменением их конформации. В связи с этим для фракционирования таких молекул предпочтительно использовать низкую напряженность поля (1—3 В/см) (Gunderson, Chu, 1991; Gurtieri et al., 1999).

Время пульса и напряженность электрического поля являются взаимосвязанными факторами. Предел разрешающей способности пульс-электрофореза определяется следующей функцией («window function» — Chu, 1990): $W = E^{1.4} \cdot T_p$, где E — напряженность электрического поля, T_p — время пульса. Чем выше значение этой функции, тем больше размер молекул ДНК, которые могут быть эффективно разделены. Очевидно, что разделение молекул ДНК одного и того же размерного диапазона может достигаться при использовании различных значений времени пульса, если величина напряженности электрического поля при этом меняется таким образом, что значение функции W остается неизменным.

Угол переориентации. Этот параметр в некоторых аппаратах для пульс-электрофореза фиксирован, в других его можно варьировать в пределах от 90 до 180°. Показано, что изменение угла переориентации не оказывает заметного влияния на миграцию молекул с размером менее 1 млн п. н. Подвижность более крупных молекул возрастает при уменьшении угла, однако при этом заметно уменьшается разрешение отдельных полос в геле (Clark et al., 1988; Chu, Gunderson, 1991). Эмпирически было установлено, что наилучшее разделение достигается при величине угла более 110° (Cantor et al., 1988), поэтому чаще всего используют угол переориентации 120°.

Концентрация агарозы в геле. Повышение концентрации агарозы в геле при пульс-электрофорезе оказывает менее заметное влияние на подвижность молекул ДНК, чем при электрофорезе в постоянном поле. Установлено, что в геле с концентрацией агарозы 1.2 % молекулы разделяются несколько эффективнее, чем в 0.9%-ном геле. При дальнейшем увеличении концентрации агарозы подвижность молекул ДНК снижается и увеличивается продолжительность электрофореза, но разрешение заметно не улучшается (Mathew et al., 1988a). В связи с этим при разделении молекул, размер которых не превышает 3 млн п. н., стандартно используются гели с концентрацией агарозы 1.0—1.5 %.

Состав и температура электрофорезного буфера. Для пульс-электрофореза обычно используют буферы с высокой ионной силой: ТРИС-боратный (0.5 × ТВЕ) или ТРИС-ацетатный буфер (1 × ТАЕ). Электрофоретическая подвижность молекул ДНК при пульс-электрофорезе сильно зависит от температуры буфера: чем выше температура, тем выше скорость миграции молекул (Mathew et al., 1988a). Обычно пульс-электрофорез проводят при температуре в диапазоне 12—16 °С (Chu, 1990). При более высокой температуре буфера полосы становятся слишком широкими и диффузными, что приводит к заметному снижению разрешения и появлению шмеров. Считается, что повышение температуры буфера приводит либо к формированию конформаций молекул, препятствующих их быстрой переориентации в геле, либо к изменению свойств агарозного матрикса (Mathew et al., 1988a). Таким образом, поддержание постоянной температуры электрофорезного буфера является необходимым условием получения хорошего разделения молекул ДНК.

Области применения метода

Пульс-электрофорез нашел широкое применение в генетике прокариот и эукариот. Использование электрофореза в пульсирующем поле в совокупности с другими молекулярными методами дает возможность установить локализацию клонированных последовательностей на хромосомах, произвести физическое картирование геномов и уточнить тонкую структуру физических и генетических карт хромосом у самых разных объектов. Именно применение пульс-электрофореза для фракционирования высокомолекулярных фрагментов ДНК, полученных при рестрикции нативной ДНК редкощепящими эндонуклеазами, позволило в 1987 г. получить первую карту генома бактерии *Escherichia coli*, штамм K12 (Smith et al., 1987), а 2 года спустя — первую полную рестрикционную карту генома эукариотического организма — дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* (Fan et al., 1989). С тех пор этот метод эффективно используют для картирования геномов эубактерий и архей (Dingwall et al., 1990; Smith, Condemine, 1990; Bautsch, 1992; Fujiwara et al., 1996) и для анализа процесса репликации у этих организмов, в частности для локализации точек начала и конца репликации, определения времени инициации репликации в клеточном цикле и порядка репликации генов, а также для оценки скорости процесса (Pyle, Finch, 1988; Dingwall, Shapiro, 1989; Ohki, Smith, 1989). Сравнение паттернов фрагментов рестрикции ДНК бактериальных хромосом, которые разделяют с помощью пульс-электрофореза, находит и практическое применение, в частности при идентификации штаммов микроорганизмов в медицине, промышленности и сельском хозяйстве (см., например: Correia et al., 1994). Этот метод используют и в молекулярной экологии, например для анализа биоразнообразия вирусов в природных местообитаниях (fingerprinting of viral assemblages — Steward, 2001).

Пульс-электрофорез послужил также мощным стимулом для крупномасштабного картирования целых геномов и индивидуальных хромосом у эукариот. Этот метод используют также при картировании протяженных генов, например гена мышечной дистрофии (Burmeister, Lehmann, 1986). Он позволяет создавать хромосома-специфичные библиотеки, создавать библиотеки на базе искусственных дрожжевых хромосом и производить их скрининг

(Ecker, 1990; Larin, 1995; Ougen, Cohen, 1995; Ragoussis, 1995).

Одно из самых важных направлений применения электрофореза в пульсирующем поле — это молекулярное кариотипирование низших эукариот, размерный диапазон хромосомных ДНК которых хорошо укладывается в границы разрешения этого метода. Молекулярное кариотипирование позволяет не только определить число хромосом и оценить размер генома у исследуемого организма, но и дает возможность изучить динамику его генома, в частности обнаружить хромосомные перестройки и связанный с ними феномен хромосомного полиморфизма, характерный для широкого круга одноклеточных эукариот. Анализ хромосомного набора и динамики генома важен для изучения внутри- и межвидовой кариотипической изменчивости (см., например: Henriksson et al., 2002), для исследования эволюции хромосом у близких видов (см., например: Henriksson et al., 1995; Britto et al., 1998; Fischer et al., 2000, 2006; Dujon, 2006). Сравнение молекулярных кариотипов изолятов грибов и простейших разного происхождения широко используется в клинической диагностике и сельскохозяйственной микробиологии (см., например: Giannini et al., 1986; Taylor et al., 1991, 1999; Fraissinet-Tachet et al., 1996 и др.). Пульс-электрофорез незаменим и на начальном этапе реализации проектов по расшифровке геномов грибов и простейших (Gardner et al., 2002; Eichinger et al., 2005).

Обобщая сказанное, отметим, что структурный и функциональный анализ геномов самых разных организмов не обходится в настоящее время без пульс-электрофореза. Из всех существующих на сегодняшний день модификаций этого метода наиболее универсальной и широко применяемой является пульс-электрофорез в контролируемом гомогенном электрическом поле (Contour-Clamped Homogeneous Electric Field — CHEF). Подвижность молекул и эффективность их разделения в пульсирующем поле зависят от целого ряда взаимосвязанных параметров, наиболее важными из которых являются время пульса и режим его возрастания. Последовательное возрастание времени пульса в режиме степпинга или интерполяции позволяет фракционировать молекулы ДНК разных размерных классов. Возможность эффективно разделять в геле хромосомные ДНК и их крупные фрагменты сделала метод электрофореза в пульсирующем электрическом поле одним из важнейших инструментов современной геномики.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 07-04-00662).

Список литературы

- Межевая Е. В., Степанова В. П., Яровой Б. Ф. 1993. Пульс-электрофорез как новый инструмент в генетике. В кн.: Успехи современной генетики. М.: Наука. 18 : 136—162.
- Смит К., Клко С., Кантор Ч. 1990. Пульс-электрофорез и методы работы с большими молекулами ДНК. В кн.: Анализ генома. Методы. М.: Мир. 58—94.
- Anand R. 1986. Pulsed field gel electrophoresis: a technique for fractionating large DNA molecules. *Trends Genet.* 2 : 278—283.
- Bautsch W. 1992. Bacterial genome mapping by two-dimensional pulsed-field gel electrophoresis (2D-PFGE). In: *Methods in molecular biology*. Totowa: Humana Press. 12 : 185—201.
- Birren B. W., Lai E., Clark S. M., Hood L., Simon M. I. 1988. Optimized conditions for pulsed field gel electrophoretic separations of DNA. *Nucl. Acids Res.* 16 : 7563—7582.
- Britto C., Ravel C., Bastien P., Blaineau C., Pages M., Dedet J. P., Wincker P. 1998. Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. *Gene.* 222 : 107—117.
- Burmeister M., Lehrach H. 1986. Long-range restriction map around the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature.* 324 : 582—585.
- Bustamante C., Gurrieri S., Smith S. B. 1990. Observation of single DNA molecules during pulsed-field gel electrophoresis by fluorescence microscopy. In: *Methods: a companion to methods in enzymology*. San Diego: Acad. Press. 1 : 151—159.
- Cantor C. R., Gaal A., Smith C. J. 1988. High-resolution separation and accurate size determination in pulsed-field gel electrophoresis of DNA. 3. Effect of electrical field shape. *Biochemistry.* 27 : 9216—9221.
- Carle G. F., Frank M., Olson M. V. 1986. Electrophoretic separation of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. *Science.* 232 : 65—68.
- Carle G. F., Olson M. V. 1984. Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal field alternation gel electrophoresis. *Nucl. Acids Res.* 12 : 5647—5664.
- Carle G. F., Olson M. V. 1985. An electrophoretic karyotype for yeast. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 82 : 3756—3760.
- Chu G. 1990. Pulsed-field gel electrophoresis: theory and practice. In: *Methods: a companion to methods in enzymology*. San Diego: Acad. Press. 1 : 129—142.
- Chu G., Gunderson K. 1991. Separation of large DNA by a variable-angle contour-clamped homogeneous electric field apparatus. *Anal. Biochem.* 194 : 439—446.
- Chu G., Vollrath D., Davis R. W. 1986. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science.* 234 : 1582—1585.
- Clark S. M., Lai E., Birren B. W., Hood L. 1988. A novel instrument for separating large DNA molecules with pulsed homogeneous electric fields. *Science.* 241 : 1203—1205.
- Cooney C. A. 1992. Separation and size determination of DNA over a 10—200 kbp range. In: *Methods in molecular biology*. Totowa: Humana Press. 12 : 31—38.
- Correia A., Martin J. F., Castro J. M. 1994. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of the genome of aminoacid producing *Corynebacteria*: chromosome sizes and diversity of restriction patterns. *Microbiology.* 140 : 2841—2847.
- Dingwall A., Shapiro L. 1989. Rate, origin and bidirectionality of *Caulobacter* chromosome replication as determined by pulsed-field gel electrophoresis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 86 : 119—123.
- Dingwall A., Shapiro L., Ely B. 1990. Analysis of bacterial genome organization and replication using pulsed-field gel electrophoresis. In: *Methods: a companion to methods of enzymology*. San Diego: Acad. Press. 1 : 160—168.
- Dujon B. 2006. Yeasts illustrate the molecular mechanisms of eukaryotic genome evolution. *Trends Genet.* 22 : 375—387.
- Ecker J. 1990. PFGE and YAC analysis of the *Arabidopsis* genome. In: *Methods: a companion to methods of enzymology*. San Diego: Acad. Press. 1 : 186—194.
- Fan J. B., Chikashige Y., Smith C. L., Niwa O., Yanagida M., Cantor C. R. 1989. Construction of a *NotI* restriction map of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* genome. *Nucl. Acids Res.* 17 : 2801—2818.
- Fischer G., James S. A., Roberts I., Oliver S., Louis E. 2000. Chromosomal evolution in *Saccharomyces*. *Nature.* 405 : 451—454.
- Fischer G., Rocha E. P., Brunet F., Vergassola M., Dujon B. 2006. Highly variable rates of genome rearrangements between hemiascomycetous yeast lineages. *PLoS Genet.* 2 : 0253—0261.
- Fraissinet-Tachet L., Reymond-Cotton P., Fevre M. 1996. Molecular karyotype of the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Curr. Genet.* 29 : 496—501.

- Fujiwara S., Okuyama S., Imanaka T. 1996. The world of archaea: genome analysis, evolution and thermostable enzymes. *Gene*. 179 : 165—170.
- Gardiner K. 1992. Transverse alternating-field electrophoresis. In: *Methods in molecular biology*. Totowa: Humana Press. 12 : 51—61.
- Gardiner K., Laas W., Patterson D. 1986. Fractionation of large mammalian DNA restriction fragments using vertical pulsed-field gradient gel electrophoresis. *Somatic Cell Mol. Genet.* 12 : 185—195.
- Giannini S. H., Schittini M., Keithly J. S., Warburton P., Cantor C. R., Van der Ploeg L. H. T. 1986. Karyotype analysis of *Leishmania* species and its use in classification and clinical diagnosis. *Science*. 232 : 761—765.
- Gunderson K., Chu G. 1991. Pulsed-field electrophoresis of multimegabase-sized DNA. *Mol. Cell. Biol.* 11 : 3348—3354.
- Gurrieri S., Smith S., Bustamante C. 1999. Trapping of megabase-sized DNA molecules during agarose gel electrophoresis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 96 : 453—458.
- Gurrieri S., Smith S. B., Wells K. S., Johnson I. D., Bustamante C. 1996. Real-time imaging of the reorientation mechanisms of YOYO-labelled DNA molecules during 90° and 120° pulsed field gel electrophoresis. *Nucl. Acids Res.* 24 : 4759—4767.
- Henriksson J., Dujardin J. C., Barnabe C., Brisse S., Timperman G., Venegas J., Pettersson U., Tibayrenc M., Solari A. 2002. Chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi* is mainly progressive and is evolutionarily informative. *Parasitology*. 124 : 277—286.
- Henriksson J., Porcel B., Rydaker M., Ruiz A., Sabaj V., Galanti N., Cazzulo J. J., Frasch A. C., Pettersson U. 1995. Chromosome specific markers reveal conserved linkage groups in spite of extensive chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 73 : 63—74.
- Kuspa A., Vollrath D., Cheng Y., Kaiser D. 1989. Physical mapping of the *Myxococcus xanthus* genome by random cloning in yeast artificial chromosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 86 : 8917—8921.
- Lai E., Birren B. W., Clark S. M., Simon M. I., Hood L. 1989. Pulsed field gel electrophoresis. *Biotechniques*. 7 : 34—42.
- Larin Z. 1995. Functional analysis of mammalian genomes using yeast artificial chromosomes. In: *Pulsed field gel electrophoresis: a practical approach*. New York: IRL Press at Oxford University Press Inc. 139—157.
- Mathew M. K., Smith C. J., Cantor C. R. 1988a. High-resolution separation and accurate size determination in pulsed-field gel electrophoresis of DNA. 1. DNA size standards and the effect of agarose and temperature. *Biochemistry*. 27 : 9204—9210.
- Mathew M. K., Smith C. J., Cantor C. R. 1988b. High-resolution separation and accurate size determination in pulsed-field gel electrophoresis of DNA. 2. Effect of pulse time and electric field strength and implications for models of the separation process. *Biochemistry*. 27 : 9210—9216.
- Ohki M., Smith C. L. 1989. Tracking bacterial DNA replication forks *in vivo* by pulsed field gel electrophoresis. *Nucl. Acids Res.* 17 : 3479—3490.
- Orbach M. J., Vollrath D., Davis R. W., Janofsky C. 1988. An electrophoretic karyotype of *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.* 8 : 1469—1473.
- Ougen P., Cohen D. 1995. Yeast artificial chromosome cloning using PFGE. In: *Pulsed field gel electrophoresis: a practical approach*. New York: IRL Press at Oxford University Press Inc. 95—118.
- Pyle L. E., Finch L. R. 1988. A physical map of the genome of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* Y with some functional loci. *Nucl. Acids Res.* 16 : 6027—6039.
- Ragoussis J. 1995. PFGE analysis of yeast artificial chromosomes. In: *Pulsed field gel electrophoresis: a practical approach*. New York: IRL Press at Oxford University Press Inc. 119—137.
- Schwartz D. C., Cantor C. R. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*. 37 : 67—75.
- Schwartz D. C., Saffran W., Welsh J., Haas R., Goldenberg M., Cantor C. R. 1982. New techniques for purifying large DNAs and studying their properties and packaging. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 47 : 189—195.
- Smith C. L., Condemine G. 1990. New approaches for physical mapping of small genomes. *J. Bacteriol.* 172 : 1167—1172.
- Smith C. L., Econome J. G., Schutt A., Klco S., Cantor C. R. 1987. A physical map of the *Escherichia coli* K12 genome. *Science*. 236 : 1448—1453.
- Southern E. M., Anand R., Brown W. R. A., Fletcher D. S. 1987. A model for the separation of large DNA molecules by crossed field gel electrophoresis. *Nucl. Acids Res.* 15 : 5925—5943.
- Southern E. M., Elder J. K. 1995. Theories of gel electrophoresis of high molecular weight DNA. In: *Pulsed field gel electrophoresis: a practical approach*. New York: IRL Press at Oxford University Press Inc. 1—19.
- Steward G. F. 2001. Fingerprinting viral assemblages by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). In: *Marine microbiology. Methods in microbiology series*. London: Acad. Press. 30 : 85—103.
- Taylor J. L., Borgmann I., Séguin-Swartz G. 1991. Electrophoretic karyotyping of *Leptosphaeria maculans* differentiates highly virulent from weakly virulent isolates. *Curr. Genet.* 19 : 273—277.
- Taylor J. W., Geiser D. M., Burt A., Koufopanou V. 1999. The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strain typing. *Clin. Microbiol. Rev.* 12 : 126—146.
- Ziegler A., Geiger K. H., Ragoussis J., Szalay G. 1987. A new electrophoresis apparatus for separating very large DNA molecules. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 25 : 578—579.

Поступила 4 VI 2008

PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS: THEORY, INSTRUMENTS AND APPLICATIONS

E. S. Nassonova

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
e-mail: nosema@mail.ru

Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) is a powerful technique for the fractionation of high molecular weight DNAs ranging from 10 kb to 10 Mb in size. PFGE separates DNA molecules in agarose gel by subjecting them to electric fields that alternate («pulsate») in two directions. This technology plays a key role in the modern genomics as it allows manipulations of the DNA of whole chromosomes or their large fragments. In this review we discuss: 1) the theory behind PFGE, 2) different instruments based on the principle of pulsed field, their advantages and limitations, 3) factors affecting the mobility of DNA in PFGE gels, 4) practical applications of the technique.

Key words: PFGE, DNA fractionation, chromosomal DNA.