

ПОДГОТОВКА К РАЗРАБОТКЕ ГСО ХАРАКТЕРИСТИК ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЕЩЕСТВ В СЛОЖНЫХ МАТРИЦАХ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Кулябина Е. В.¹, Кулябина Т. В.²

¹ ФГУП «Всероссийский научно-исследовательский институт метрологической службы»
г. Москва, e-mail: kuliabina@vniims.ru

² Независимый эксперт, e-mail: fdsay@mail.ru

Стандартные образцы, используемые при измерении или при оценивании качественных показателей в соответствии с предполагаемым назначением в области биоанализа являются незаменимым звеном обеспечения метрологической прослеживаемости измерений состава, свойств и структуры анализируемых веществ.

Когда мы говорим о стандартных образцах ДНК, РНК, белков, пептидов, психоактивных, сильнодействующих веществ в сложных матрицах, стейкхолдерами являются клинично-диагностические, химико-токсикологические лаборатории, бюро и лаборатории судебно-химической экспертизы, токсикологические лаборатории Центров гигиены и эпидемиологии. Кроме сложности самого анализа, разработчики сталкиваются и с вопросами влияния сложной матрицы – биологическими жидкостями (моча, пот, желчь, цереброспинальная жидкость и т.д.) и тканями (кровь, включая плазму и сыворотку, мышечные волокна, эпителий, хрящевая ткань, нейроны и т.д.).

В рамках подготовки к разработке ГСО характеристик высокомолекулярных веществ в сложных матрицах, применяемых для идентификации и количественного определения целесообразно запланировать и выполнить несколько важных этапов.

Имея практику создания различных ГСО в области физико-химических и биоаналитических измерений, авторы предлагают обобщить полученный опыт и использовать его для эффективного конструирования новых стандартных образцов. В этом докладе рассматривается подготовка создания ГСО ДНК методами генной инженерии с использованием плазмид в качестве молекул векторов. (Например, возьмем всем хорошо известную плазмиду, которую уже много лет используют в качестве молекулы ДНК-вектора. Именно с помощью методов генетической инженерии предлагается разрабатывать ГСО.)

Первый вопрос, который нужно решить – это выбрать востребованную ДНК объекта, ГСО которого актуально создавать, и который мы планируем встроить в плазмиду. Следующим шагом требуется выбрать подходящую цели создания ГСО плазмиду. Как известно они различаются по способности передаваться от одной бактериальной клетки к другой в ходе конъюгации, особенностям репликации, топологии, наличию факторов антибиотикорезистентности, способности индуцировать

перенос генетического материала. Затем следует выбор интересующей матрицы, в которую будет помещен фрагмент ДНК, встроенный в плазмиду.

Одним из этапов подготовки стоит запланировать исследование, посвященное возможности получать вещество для выделения ДНК. Или принять решение о синтезе необходимого участка ДНК, при невозможности работать напрямую с ДНК-содержащим материалом.

Метод создания ГСО предлагаемый авторами – клонирование фрагментов ДНК аналитов в плазмидный вектор.

Следующий вопрос, на который необходимо ответить – это выбрать что именно планируется анализировать, какой характерный участок ДНК нужно выделять или синтезировать?

Далее мы приступаем к определению конкретного типа плазмиды – вектора с определенной длиной и известной последовательностью нуклеотидов, который должен быть линейризованным. При выполнении подготовительных исследований по выбору плазмиды, необходимо учитывать такой немаловажный фактор, как ограниченность времени хранения линейризованных плазмид, вследствие влияния ферментов, расщепляющих нуклеиновые кислоты (например, гидролаз). В тоже время необходимо принимать во внимание особенности кольцевых плазмид, которые несколько сложнее анализировать.

Обязательным этапом создания таких ГСО будет этап подтверждения сиквенсом всех последовательностей нуклеотидов, которые будут выбраны. Таким образом, будет решена задача идентификации. Понятно, что этот шаг потребует разработки и аттестации методики измерений.

Одним из важнейших условий является выбор максимально чистых исходных препаратов. В связи с новыми внешними рисками, возникающими в настоящее время очевидны трудности получения высокочистых веществ из привычных источников, поэтому особое внимание нужно будет уделять проверке чистоты и при необходимости дополнительной очистке.

Что касается сложной матрицы, то ее можно добавлять в конце технологии изготовления. Однако, этот этап не будет последним, последним этапом будет изучение и контроль взаимного влияния матрицы и аналита.

Определение количественных характеристик ГСО также потребует разработки и аттестации методики измерений этих показателей ГСО.

Хранение таких ГСО в виде концентрата плазмиды традиционно осуществляется в замороженном виде. Авторы предлагают рассмотреть как альтернативу (необходимы дополнительные исследования) хранение в высушенном состоянии. Также предлагается рассмотреть варианты использования для хранения традиционных стабилизирующих веществ, нужны дополнительные исследования для подбора новых вариантов.

В качестве примеров можно предложить результаты клонирования с применением линеаризованных векторов, полученных рестрикцией известного вектора длиной несколько тысяч пар нуклеотидов с вставками гена интересующего анализа, разработанные известными западными компаниями (названия не приводятся, так как эта информация будет считаться рекламой).

Таким образом, создание стандартных образцов ДНК, РНК, белков, пептидов, психоактивных, сильнодействующих веществ в сложных матрицах представляет из себя многоплановую, сложную, но вполне решаемую задачу и ФГБУ «ВНИИМС» в тесном взаимодействии со стейкхолдерами приступил к ее решению.