

Ультрочистая вода в исследованиях биологически активных веществ

Все чаще как в фундаментальных исследованиях биологически активных веществ, так и при разработке новых компонентов и препаратов в фармацевтике эксперименты на клетках комбинируют с мультипараметрическими методами измерений. Данный подход совмещения методов молекулярной и клеточной биологии позволяет глубже изучить такие сложные вопросы, как, например, течение заболевания, терапевтический эффект, побочные действия лекарственных средств, а также выявить новые области применения уже известных препаратов и определить воздействие веществ на живой организм

А.А. Хартукова,

специалист по системам водоподготовки,
компания Sartorius

В последнее время все активнее используют мультипараметрические методы измерений для изучения внутриклеточных процессов до или после добавления различных веществ. С одной стороны, они позволяют сократить материальные затраты на проведение единичного исследования, а с другой – требуют чрезвычайно высокой чистоты используемых растворов (в том числе воды). Например, при постановке полимеразной цепной реакции (ПЦР) или культивировании клеток в качестве основы необходима ультрочистая вода.

Компания Sartorius, являясь лидером в области биотехнологий, постоянно работает над совершенствованием биотехнологического и вспомогательного оборудования, а также совместно с ведущими научными организациями тестирует свои продукты в условиях реально работающих лабораторий. Одной из таких работ является исследование, проведенное совместно со специалистами Института экспериментальной медицины Общества Макса Планка (Геттинген, Германия), в котором сверхчистую воду, произведенную с помощью системы arium pro



Рис. 1. Современная система для приготовления ультрочистой воды arium^{pro} VF (производитель Sartorius Lab Instruments)

VF (рис. 1) производства компании Sartorius, применяли в качестве компонента мультипараметрического цитологического анализа (рис. 2).

В данной работе проводили культивирование клеток линии PC12-tet-OFF (PC12-OFF) фирмы Clontech в среде DMEM (Lonza). Далее

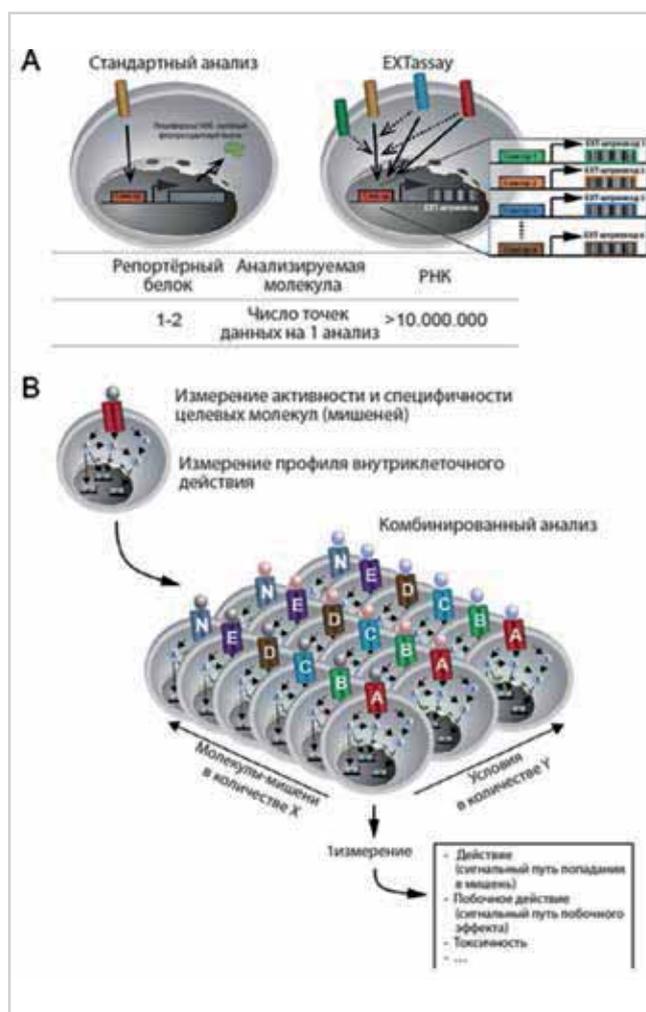


Рис. 2.

А). Специфические анализы позволяют одновременно исследовать различные виды деятельности клеток в процессе одного измерения. В отличие от классических анализов с использованием генов-репортеров, в результате специфических анализов получают более 10 млн точек данных за один эксперимент

Б). Анализы отображают специфичность и профиль воздействия веществ на клетки. Профили воздействия различных молекул-мишеней в количестве X в ходе одного измерения одновременно регистрируются при различных условиях в количестве Y (источник: все иллюстрации предоставлены авторами, если не указано иное)

суспензию трансформировали репортерными векторами и выделяли РНК. После этого из экстрагированной РНК синтезировали кДНК и проводили амплификацию EXT-кДНК с помощью декодирующей ПЦР. Секвенирование репортерных молекул EXT осуществляли по технологии СНП (секвенирование нового поколения, NGS), благодаря которому в процессе одного измерения можно получить обширные наборы данных. Затем проводили обработку результатов. Наиболее полное описание эксперимента приведено [1]. Также его можно запросить в российском офисе компании Sartorius (Russia@sartorius.com).

В рамках данной статьи мы остановимся только на рассмотрении воздействия качества воды на эксперимент.

Ультрачистая вода играет решающую роль в различных процедурах эксперимента со специфическими репортерами: например, после стерилизации в автоклаве ее использовали в целях увлажнения термостата для клеточных культур, чтобы обеспечить стерильное инкубирование клеток. Для определения молекулярно-биологических параметров (например, концентрации ДНК и РНК) также применяли ультрачистую воду.

Помимо этого, ультрачистую воду использовали в процессе подготовки проб к СНП (NGS) (рис. 3): при очистке EXT-репортеров с помощью комплекта для изоляции РНК, при записи кДНК, а также проведении ПЦР для амплификации репортерного материала с целью высокопроизводительного секвениро-

вания. Ультрачистую воду применяли также в заключительных процедурах СНП (NGS), проводимых с помощью устройства Ion Torrent Personal Genome Machine® (секвенатор PGM™) производства фирмы Life Technologies (рис. 4).

Согласно Руководству по эксплуатации для корректной работы секвенатора PGM™ требуется вода высокого качества с удельным сопротивлением 18 Мом • см (см. Руководство по эксплуатации секвенатора Ion Torrent [3]). При отсутствии воды такого качества надежность секвенирования не гарантируется. Свежая ультрачистая вода, полученная с помощью системы arium® pro VF (см. рис. 1), полностью соответствовала заявленным требованиям [2].

Ультрачистая вода, успешно использованная для экспериментов, не имела детектируемого количества РНКазы и ДНКазы (концентрация РНКазы и ДНКазы была ниже предела обнаружения, равного соответственно 20 и 80 нг / мл) и, благодаря низкой концентрации общего органического углерода (< 2 мкг / л) и удельному сопротивлению 18,2 Мом • см (25 °С), обеспечила постоянное стабильное качество, необходимое для проведения экспериментов.

Воду, произведенную с помощью системы arium® pro VF, с успехом использовали для выполнения мультипараметрических анализов и последующих анализов по технологии СНП (NGS). Установлено, что действие биологически активных веществ на клеточном уровне может быть исследовано на базе мультипараметрического профилирования

EXTassay. Проведение мультипараметрических анализов позволило идентифицировать интенсивную дифференциальную сигнальную реакцию между специфическим стимулом и стимулом широкого действия. Это даст возможность больше узнать как о желательных, так и о нежелательных механизмах воздействия биологически активных веществ на клетки еще на ранних стадиях разработки лекарств и тем самым снизить риски и уменьшить затраты на проведение медицинских исследований биологически активных веществ.

Ультрачистую воду с успехом применяли в многочисленных высокочувствительных экспериментах, например, при амплификации генов-репортеров со штрих-кодом посредством ПЦР и СНП (NGS). Благодаря этому ее можно без проблем использовать в молекулярно-биологических исследованиях, для проведения которых необходима вода высокого качества.

Мультипараметрические анализы позволяют выполнить масштабное профилирование клеточных реакций, благодаря чему данный метод нашел широкое приме-

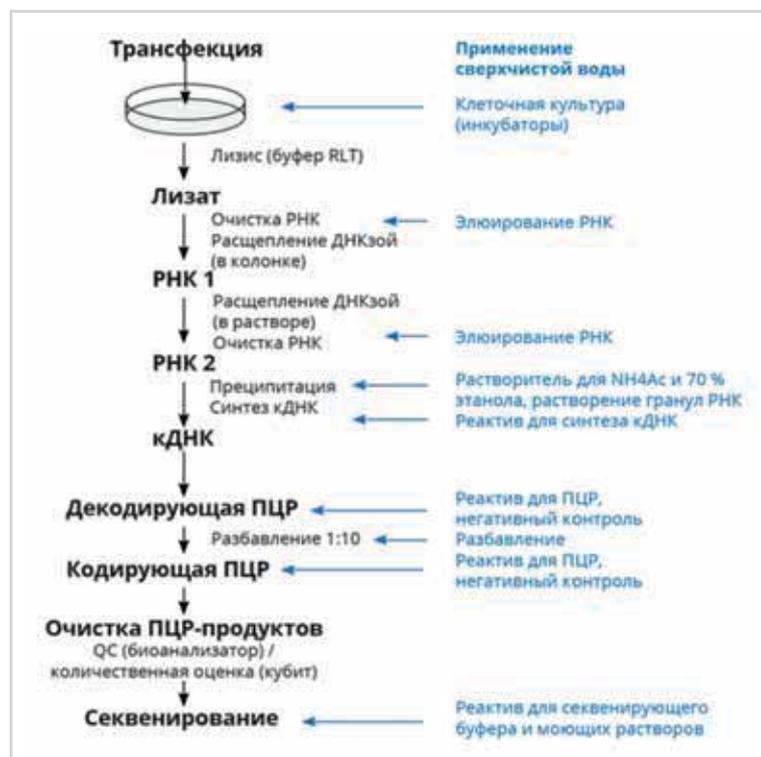


Рис. 3. Процесс работы по подготовке проб к секвенированию; использование ультрачистой воды в отдельных процедурах



Рис. 4. Ion Torrent Personal Genome Machine® – секвенатор PGM™ (источник: лаборатория фирмы Sustasy Bioscience GmbH, Мюнхен)

нение на ранних этапах исследования биологически активных веществ. Проведение таких экспериментов позволяет отличить желательное действие исследуемых веществ от их побочных эффектов. Описанные в работе анализы, основанные на использовании генетических сенсоров с молекулярными репортерами штрих-кода, требуют материалов наивысших стандартов качества [1]. Это было с

успехом продемонстрировано на примере ультра-чистой воды, использованной для проведения различных экспериментальных процедур при выполнении мультипараметрических анализов. ■

Литература:

1. **Botvinnik A, Wichert SP, Fischer TM, Rossner MJ.** Integrated analysis of receptor activation and downstream signaling with EX-Tas-says. *Nat Meth-ods*. 2010 Jan;7 (1):74–80.
2. **Nitzki F, Herbig E.** In situ Hybridis-ierung – Die Bedeutung von Re-inst-wasser für RNA Technologien. *GIT Labor-Fachzeitschrift*. 2013 März; (57.Jahrgang, 3):157–9.
3. **Life Technologies.** Ion PGMTM Sequencing 200 Kit v2 [Internet]. 2013. Available from: <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/4482006> Zuletzt abgerufen am 15.04.2015.



Контактная информация:

ООО «Сарториус РУС»
Тел./факс: +7 (812) 327-53-27.
russia@sartorius.com,
www.sartorius.ru



#passionforscience
Discover it. Share it. Love



arium® mini plus UV

Я люблю свою систему лабораторной водоподготовки, поскольку благодаря ей у меня остается больше времени на исследования.

Единственная компактная система с технологией хранения воды в мешке.

