

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «УЛЬЯНОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт медицины, экологии и физической культуры

Экологический факультет

Кафедра биологии, экологии и физической культуры

***Е.Г. Климентова, В.М. Каменек,
Е.В. Рассадина, Ж.А. Антонова***

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА

**Методические указания
по выполнению лабораторных работ**

Ульяновск, 2018

УДК 621.31:658.382

ББК 68.9

М75

*Печатается по решению Ученого совета ИМЭиФК
Ульяновского государственного университета*

Рецензент – кандидат биологических наук, и.о. зав. кафедрой биологии и химии ФГБОУ ВО «УлГПУ им. И.Н. Ульянова» *О.Е. Беззубенкова*

Авторский коллектив:

Е.Г. Климентова, В.М. Каменек, Е.В. Рассадина, Ж.А. Антонова

М75 **Молекулярная генетика** : методические указания по выполнению лабораторных работ / Е. Г. Климентова [и др.]. – Ульяновск : УлГУ, 2018. – 36 с.

Методические указания по дисциплине «Молекулярная генетика» предназначено в помощь студентам направления подготовки 06.04.01 Биология для выполнения лабораторных работ. Методические указания включают в себя описание общих сведений по работе, оборудования для выполнения работы и хода выполнения работы.

Данное пособие может быть полезно и студентам других направлений подготовки, изучающим вопросы генетики.

УДК 621.31:658.382
ББК 68.9

© Климентова Е.Г., Каменек В.М., Рассадина Е.В.,
Антонова Ж.А., 2018

© Ульяновский государственный университет, 2018

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК	5
1.1 Выделение геномной ДНК из клеток бактерий методом фенолхлороформной экстракции.....	6
1.2 Выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток.....	7
1.3 Доочистка плазмидной ДНК (miniPrep) из бактериальных клеток методом фенол-хлороформной экстракции.	8
1.4 Быстрое выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток для электрофоретического анализа (Real fast MiniPrep).	9
1.5 Быстрое выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток для электрофоретического анализа методом фенол-хлороформной экстракции.....	10
1.6 Выделение ДНК из лейкоцитов крови.....	10
1.7 Выделение ДНК из растительных тканей.....	12
1.8 Выделение ДНК из крови с помощью смолы Chelex.....	14
ГЛАВА 2. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ ДНК	16
2.1 Горизонтальный электрофорез в агарозном геле	21
2.2 Окраска ДНК.....	22
ГЛАВА 3. КЛОНИРОВАНИЕ ДНК	24
3.1 Определение концентрации нуклеиновых кислот.....	25
3.2 Рестрикция	26
3.3 Дефосфорилирование ДНК.....	27
3.4 Лигирование ДНК	28
3.5 Полимеразная цепная реакция.....	29
ГЛАВА 4. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ БАКТЕРИЙ.....	32
4.1 Трансформация плазмидной ДНК клеток <i>E.coli</i> методом теплового шока (химическая трансформация).....	33
4.2 Трансформация плазмидной ДНК клеток <i>E.coli</i> методом электропорации	34
4.3 Трансформация плазмидной ДНК клеток <i>B.subtilis</i> методом голодания (Anagnostopoulous et al., 1961).....	35
Использованная литература	35

ВВЕДЕНИЕ

Работы в области молекулярной генетики подразумевают манипуляцию фрагментами ДНК для исследования генетического аппарата организма, модификации его свойств путем введения измененной (рекомбинантной) ДНК, направленной или случайной модификации собственной ДНК организма и оценки влияния данных изменений на жизнедеятельность клетки.

В основе подходов молекулярной генетики лежат современные физико-химические и биохимические методы, направленные на выделение геномной, плазмидной, митохондриальной или пластидной ДНК, манипуляций с ней с целью модификации, расшифровки последовательности, ее анализа. Для получения геномодифицированных организмов далее проводят манипуляции по введению ДНК в живые клетки-мишени с помощью различных подходов. В результате добиваются того, что ДНК встраивается в геномную ДНК благодаря рекомбинации, трансдукции или трансфекции.

В учебно-методическое пособие включены описания и протоколы стандартных методов выделения ДНК из различных клеток, электрофоретического разделения ДНК, полимеразной цепной реакции. Приводятся наиболее распространенные и общепринятые методики, не требующие дорогостоящих или редких реактивов и материалов либо коммерческих наборов реагентов. Каждый метод содержит теоретическое описание и краткую характеристику метода, назначение этого метода, наиболее важные аспекты его практического использования, целевое назначение необходимых реактивов и оборудования, подробное последовательное описание стадий лабораторных операций.

ГЛАВА 1. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК

Процедура выделения ДНК из клеток и тканей часто является исходным (основным) этапом в исследовании живого организма на молекулярном уровне. При наличии выделенной ДНК, далее становятся возможными ее амплификация (с помощью полимеразной цепной реакции – ПЦР), определение последовательности (секвенирование), рестрикционный анализ, клонирование, гибридизация.

Все живые организмы делятся на про- и эукариот. В клетках бактерий, как правило, существует одна кольцевая хромосома размером от 0.4 до нескольких десятков миллионов пар оснований, упаковка которой достигается за счет суперскрученности. Дополнительно к ней в бактериях встречаются небольшие кольцевые молекулы ДНК – плазмиды. Количество их копий может варьировать от 1 (низкокопийные) до нескольких тысяч (мультикопийные) на клетку. У эукариот геном представлен несколькими линейными молекулами ДНК, которые упаковываются с помощью гистоновых белков. В общем случае, для выделения ДНК клетку необходимо разрушить тем или иным способом, а ДНК очистить от других клеточных компонентов. В случае эукариот, нужно отделить ДНК от белков, входящих в состав нуклеопротеидных комплексов хроматина. При этом важно защитить ДНК от действия нуклеаз и максимально сохранить ее целостность, поскольку длинные линейные молекулы ДНК при их изоляции из клетки неизбежно фрагментируются.

Методы выделения ДНК обычно включают следующие этапы: 1) лизис клеток (или разрушение физическим, механическим способом); 2) ферментативное разрушение белков протеиназами и/или депротеинизацию клеточного лизата с помощью фенола и хлороформа; 3) центрифугирование для удаления денатурированных белков и фрагментов клеточных органелл. Затем ДНК осаждают из раствора этанолом и после центрифугирования растворяют осадок в буферном растворе. Вместе с ДНК частично выделяется и РНК, от которой избавляются с помощью фермента РНКазы. Для лизиса клеток и денатурации белков часто используется детергент додецилсульфат натрия или хаотропный агент гуанидинизотиоцианат. Если нет необходимости в длинных целых фрагментах ДНК, клетки можно разрушить механическим способом путем перетирания со стеклом или речным песком в жидком азоте. Ряд современных методов предусматривает

сорбцию ДНК на гранулах силикагеля в присутствии хаотропных веществ, центрифугирование и последующую элюцию ДНК с гранул в раствор. Некоторые фирмы продают наборы реактивов для выделения ДНК с использованием магнитных частиц, покрытых силикой SiO₂. Некоторые коммерческие наборы предусматривают сорбцию ДНК на мембранах или ионообменных сорбентах. Фенолхлороформный метод экстракции ДНК считается стандартным.

1.1 Выделение геномной ДНК из клеток бактерий методом фенолхлороформной экстракции

1. Культуру бактерий растить ночь на богатой среде (LB, питательный бульон БТН или МПБ) с качанием, 5 мл в пробирке. О выращивании бактерий можно посмотреть в руководствах по микробиологии.

2. Осадить клетки из 5 мл культуры в эппендорф: 1.5 мл культуры перенести в эппендорф, центрифугировать 1-2 мин при 13000 об/мин, надосадочную жидкость вылить, снова добавить 1.5 мл культуры и центрифугировать. Удалить дозатором всю надосадочную жидкость.

3. Ресуспендировать клетки в 500 мкл 10 мМ Трис HCl pH 8.0. Для грам-положительных бактерий:

3.1. Для разрушения клеточной стенки бактерий внести 25-50 мкл раствора лизоцима с концентрацией 20 мг/мл, инкубировать 20-60 мин при 37°C, осторожно перемешивать переворачивая пробирку, суспензия должна стать более прозрачной и коричневее. В случае лактобацилл внести 100 мкл лизоцима с концентрацией 20 мг/мл, инкубировать 1-2 часа при 37°C.

4. Вносить порциями по 10 мкл 10%-ный раствор SDS, осторожно перемешивать, переворачивая пробирку до достижения прозрачного раствора вязкой субстанции (SDS разрушает мембрану клетки и ДНК оказывается в растворе, делая его вязким и тягучим). Если раствор не стал вязким, то значит клетки не разрушились и дальше продолжать не имеет смысла. С ЭТОГО МОМЕНТА ВСЕ ДЕЛАТЬ В ПЕРЧАТКАХ И ПОД ТЯГОЙ 5. Внести 500 мкл смеси фенола, хлороформа и изоамилового спирта (25:24:1) и интенсивно потрясти, чтобы раствор стал как молоко. При этом происходит денатурация белков, переход жиров и липидов в органическую фазу.

6. Центрифугировать 10 мин на максимальной скорости

7. Перенести верхнюю фазу 450 мкл (НЕ ТРОГАЯ БЕЛЫЙ ПРОМЕЖУТОЧНЫЙ СЛОЙ) в 1 мл изопропанола. При этом неизбежно уменьшается до 1/5 объема водной фазы. На практике лучше пожертвовать этим объемом сейчас, чем чистотой препарата впоследствии. Для получения высокоочищенной ДНК повторить п.5-7 2-3 раза.

8. Осторожно намотать ДНК (которая будет выглядеть как вата) на наконечник на 200 мкл, зубочистку или стеклянную палочку. Если ДНК выпало мало, осторожно перемешать содержимое эппендорфа и повторить наматывание ДНК.

9. Опустить наконечник/палочку с ДНК в раствор 96% этанола, затем подсушить. Пересушивать осадок нельзя, в полностью высушенном виде он становится практически нерастворим в воде. Обычно осадки сушат на открытом воздухе не более получаса, под потоком нагретого воздуха. Далее намотанную ДНК опустить в эппендорф с 200-400 мкл деионизованной воды или буфера TE для растворения ДНК.

1.2 Выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток

1. Культуру растить в течение ночи на богатой среде (LB, питательный бульон БТН или МПБ) с качанием, 3 мл в пробирке.

2. Осадить клетки из 3 мл культуры в эппендорф: 1.5 мл культуры перенести в эппендорф, центрифугировать 1-2 мин при 13000 об/мин, надосадочную жидкость вылить, снова добавить 1.5 мл культуры и центрифугировать. Удалить дозатором всю надосадочную жидкость.

3. Клетки ресуспендировать в 200 мкл раствора I. Для грамположительных бактерий:

3.1. Для разрушения клеточной стенки бактерий внести 25-50 мкл лизоцима с концентрацией 20 мг/мл, инкубировать 20-60 мин при 37°C, осторожно перемешивая, суспензия должна стать более прозрачной и коричневой. В случае лактобацилл внести 100 мкл лизоцима с концентрацией 20 мг/мл, инкубировать 1-2 часа при 37°C.

4. Клетки перенести в ледяную баню и внести 400 мкл свежеприготовленного раствора II (0.2M NaOH и 1% SDS). Раствор должен храниться в плотно закрытой таре, для исключения нейтрализации щелочи углекис-

лым газом из воздуха. Осторожно перемешать переворачивая пробирку до получения прозрачного вязкого раствора. На данной стадии происходит лизис клеток, и геномная ДНК оказывается в растворе в расплетенном виде, что и обуславливает вязкость раствора. На данном этапе важно не повредить ее интенсивным встряхиванием.

5. Добавить 300 мкл охлажденного раствора 3 М ацетата калия (29 г ацетата калия, 11 мл ледяной уксусной кислоты и 60 мл воды), осторожно перемешать переворачиванием и инкубировать при температуре -200С в течение 20-30 мин. На данной стадии происходит смена рН раствора в кислую область и геномная ДНК выпадает в осадок в виде белых хлопьев. Плазмидная ДНК ввиду своего малого размера в осадок не выпадает.

6. Смесь центрифугировать на холоду при 12 тыс. об/мин в течение 15 мин для удаления преципитированной геномной ДНК. Иногда полезно разбить стадию на 2: центрифугировать 5 мин, затем пробы заново осторожно перемешать для полного смешения растворов, затем центрифугировать 10 мин.

7. Супернатант (надосадок, надосадоочную жидкость) перенести в чистый эппендорф (лучше дозатором). Проследить чтобы не было белых хлопьев – остатков геномной ДНК. Добавить 600 мкл изопропанола, перемешать и центрифугировать в течение 10 мин при 12 тыс. об/мин.

8. Супернатант вылить. Осадок промыть 96% этанолом (500 мкл внести в эппендорф и затем вылить), высушить при 650С в твердотельном термостате и ресуспендировать в 20 мкл деионизованной воды или буфера TE.

1.3 Доочистка плазмидной ДНК (miniPrep) из бактериальных клеток методом фенол-хлороформной экстракции.

ВСЕ ДЕЛАТЬ В ПЕРЧАТКАХ И ПОД ТЯГОЙ

1. Плазмидную ДНК развести в 500 мкл деионизованной воды, внести 500 мкл смеси фенола и хлороформа (1:1) и интенсивно потрясти, чтобы раствор стал как молоко.

2. Центрифугировать 10 мин на максимальной скорости. 3. Перенести верхнюю фазу 450 мкл (НЕ ТРОГАЯ БЕЛЫЙ ПРОМЕЖУТОЧНЫЙ СЛОЙ) в 1 мл изопропанола, перемешать и центрифугировать 10 мин на максимальной скорости.

3. Осадок промыть 96% этанолом (500 мкл внести в эппендорф и затем вылить), высушить при 650С в твердотельном термостате и ресуспендировать в 20 мкл деионизованной воды или буфера TE.

1.4 Быстрое выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток для электрофоретического анализа (Real fast MiniPrep)

Метод подходит для быстрой оценки наличия плазмиды, ее размера по сравнению с исходным вектором. Качество очистки ДНК достаточно для электрофоретического анализа, но не более того. Удобно использовать для скрининга колоний. Иногда в геле видны рибосомальные РНК, поэтому необходимы отрицательный и положительный контроли.

1. Культуру растить ночь на богатой среде (LB, питательный бульон БТН или МПБ) с качанием, 3 мл в пробирке.

2. Осадить клетки в эппендорф: 1.5 мл культуры перенести в эппендорф, центрифугировать 1-2 мин при 13000 об/мин. Удалить надосадочную жидкость, оставив 50-100 мкл.

3. Клетки ресуспендировать дозатором или на вортексе в 300 мкл раствора TENS.

4. Инкубировать во льду 10 мин.

5. Добавить 150 мкл охлажденного раствора 3 М ацетата калия (29 г ацетата калия, 11 мл ледяной уксусной кислоты и 60 мл воды), размешать в вортексе.

6. Смесь центрифугировать на холоду при 12 тыс. об/мин в течение 10 мин для удаления преципитированной геномной ДНК.

7. Супернатант (надосадок, надосадочную жидкость) перенести в чистый эппендорф (лучше дозатором). Проследить чтобы не было белых хлопьев – остатков геномной ДНК. Добавить 900 мкл 96% этанола, охлажденного до - 200С, перемешать и центрифугировать в течение 5 мин при 12 тыс. об/мин.

8. Супернатант вылить. Осадок промыть 96% этанолом (500 мкл внести в эппендорф и затем вылить), высушить при 650С в твердотельном термостате и ресуспендировать в 20 мкл деионизованной воды или буфера TE.

1.5 Быстрое выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток для электрофоретического анализа методом фенол-хлороформной экстракции

Метод подходит для быстрой оценки наличия плазмиды, ее размера по сравнению с исходным вектором. Качество ДНК достаточно для электрофоретического анализа, но не более того. Удобно использовать для скрининга колоний. Недостаток – необходимость работать с фенолом (необходим вытяжной шкаф), а также в геле видны рибосомальные РНК, поэтому необходимы отрицательный и положительный контроли.

1. Культуру растить ночь на богатой среде (LB, питательный бульон БТН или МПБ) с качанием, 1-3 мл в пробирке.

2. Осадить клетки в эппендорф: 0.5 мл культуры перенести в эппендорф, центрифугировать 1-2 мин при 13000 об/мин. Удалить надосадочную жидкость, оставив 50-100 мкл. 3. Внести 10 мкл 10-кратного буфера для внесения, содержащего додецил сульфат натрия (SDS). Клетки ресуспендировать дозатором или на вортексе в остатках супернатанта. С ЭТОГО МОМЕНТА ВСЕ ДЕЛАТЬ В ПЕРЧАТКАХ И ПОД ТЯГОЙ

4. Внести 50 мкл смеси фенола и хлороформа (1:1) и интенсивно потрясти, чтобы раствор стал как молоко.

5. Центрифугировать 5 мин на максимальной скорости.

6. 10 мкл верхней фазы (НЕ ТРОГАЯ БЕЛЫЙ ПРОМЕЖУТОЧНЫЙ СЛОЙ) использовать для электрофореза.

1.6 Выделение ДНК из лейкоцитов крови

Выделение общей ДНК из животной клетки не представляет особой сложности, поскольку плазмалемма, ядерная и митохондриальная мембраны «растворяются» в присутствии анионного детергента додецилсульфата натрия (SDS), а сложной клеточной стенки у животных в сравнении, к примеру с растениями, нет. Высвободить ДНК из ДНК-белкового комплекса можно с помощью протеиназ или хаотропных солей. Для этой же цели можно провести как и в случае с бактериями фенольную экстракцию ДНК. Другие вещества при последующем осаждении ДНК спиртом останутся в растворе, и избавиться от них несложно.

ДНК можно выделить из любых тканей, клетки которых содержат ядра, но количественный выход из разных тканей может быть различным. Довольно часто для выделения ДНК используют кровь. Лейкоциты крови, в отличие от зрелых эритроцитов, содержат ядра. Общей ДНК, выделенной из 100 мкл цельной крови достаточно для проведения нескольких рестрикций, ПЦР и секвенирования. Митохондриальная ДНК и РНК также присутствуют в получаемом препарате. В приведенной ниже методике для освобождения ДНК от белков используется фенол. Под словом «фенол» биологи-молекулярщики часто подразумевают смесь водонасыщенного раствора фенола с хлороформом 1:1, а не кристаллическое вещество. В смеси с хлороформом фенол работает эффективнее, а изоамиловый спирт гасит пенообразование.

1. К 100 мкл цельной крови добавить 2 объема дистиллированной воды до конечного объема 0.3 мл. Тщательно перемешать и оставить на 15 минут.

2. Пробу центрифугировать в течение 10 минут, 5000 об/мин. Супернатант (надосадок, надосадоочную жидкость) слить.

3. Осадок клеток отмыть двойным объемом буфера SSC, добавив в пробирку 200 мкл 1-кратного SSC. Перемешивание аккуратное.

4. Центрифугировать, как в п.2. Супернатант слить. 5. К осадку добавить 54 мкл 0.2М ацетата натрия и 6 мкл 10%-ного раствора SDS. Осадок клеток тщательно ресуспензировать, т.е. перевести в суспензию вновь с помощью микропипетки или вортекса. Инкубировать при 37°C в течение 0.5–1 ч для прохождения лизиса (разрушения) клеток.

5. Добавить 2 объема буфера TE и провести фенольную депротеинизацию образца. Для этого внести в пробирку равный объем фенол–хлороформной смеси, хорошо встряхнуть и центрифугировать. Отобрать водную фазу (верхний слой) в чистую пробирку, не захватывая интерфазу – белый осадок на линии раздела фаз.

6. Повторить ту же процедуру, что в п. 6, но со смесью хлороформ–изоамиловый спирт для удаления остатков фенола.

7. К очищенному от белков лизату добавить 1/10 объема раствора III, перемешать и высадить ДНК добавив два с половиной объема холодного 96% этанола и поместив образец на 1–2 часа в морозильную камеру при –20С. Можно оставить ДНК под спиртом на ночь.

8. Пробу центрифугировать в течение 10 мин при максимальной скорости микроцентрифуги. Супернатант слить. Осадок промыть 70% спиртом. 10. Высушить осадок ДНК на воздухе и растворить в 20 мкл буфера TE.

1.7 Выделение ДНК из растительных тканей

При выделении ДНК из тканей растений важным фактором является эффективное разрушение клеточных стенок. Многие методы, используемые для этого, приводят к сильной фрагментации ДНК (из-за гидродинамических разрывов в цепи!). Часто приходится находить компромисс между размером ДНК и ее количественным выходом, ведь молекулы ДНК – самые крупные полимерные биомолекулы. Высвобождение высокомолекулярной ДНК из клеток – это только часть задачи, поскольку растительные экстракты содержат большие количества белков, полисахаридов, танинов и пигментов, которые в ряде случаев весьма трудно отделить от ДНК.

Ткани растений обычно разрушают механическим растиранием в присутствии детергентов, растворяющих мембраны клеток, и хелатирующих агентов, подавляющих действие клеточных нуклеаз за счет связывания двухвалентных катионов. От белков ДНП-комплекса избавляются фенольной депротеинизацией образца. Некоторые методики для освобождения ДНК от белков хроматина предусматривают использование протеиназ. После депротеинизации препарат все еще сильно загрязнен полисахаридами. Распространены методы с использованием двух детергентов СТАВ (*cetyl trimethyl ammonium bromid*) и SDS (*sodium dodecyl sulfate*). Метод с использованием СТАВ (Rogers, Bendich, 1985) позволяет получать препараты растительной ДНК с чистотой, достаточной для ПЦР, рестрикционного и гибридизационного анализа. СТАВ хорошо растворяет мембраны клеток. Кроме того, его применение позволяет разделить ДНК и полисахариды, поскольку они отличаются по растворимости в присутствии этого поверхностно-активного вещества. При высоких концентрациях солей нуклеиновые кислоты образуют стабильные, но вместе с тем растворимые комплексы со СТАВ. При снижении концентрации соли ниже 0.4М NaCl происходит выпадение в осадок комплексов СТАВ/нуклеиновая кислота, тогда как

большая часть полисахаридов остается в растворе. Осадок снова растворяют в высокосолевым растворе 1М NaCl и высаживают ДНК спиртом.

Другая методика также предусматривает использование детергентов, в частности SDS, который также осуществляет солиubilизацию биомембран и быструю денатурацию протеинов (при этом инактивируются нуклеазы). Ниже приведена модификация одного из таких методов, изначально разработанного Делапорта с соавт. (*Dellaporta et al., 1985*). Белки и полисахариды в растительных экстрактах при 0°C образуют комплексы с SDS и выпадают в осадок, а нуклеиновые кислоты остаются в растворе. Высокомолекулярная ДНК, очищенная впоследствии от белков фенолом, осажденная спиртом и растворенная в соответствующих буферах, пригодна для рестрикции и ПЦР.

1. Приготовить навеску 200 мг листьев растений, замороженных заранее при -20 °C в морозильнике, либо быстро заморозить навеску в жидком азоте.

2. Образцы растереть в предварительно охлажденной фарфоровой ступке до гомогенного состояния. Если нет жидкого азота, то при растирании к замороженным листьям необходимо добавить 0.1 г оксида алюминия или прокаленного белого речного песка в качестве абразива. В ступку при этом нужно добавить немного буфера для экстракции ДНК (300 мкл). Альтернативно, можно растирать в специальных гомогенизаторах – риболайзерах.

3. Добавить в ступку 700 мкл буфера для экстракции, снова перемешать.

4. Перенести растертую массу в 1.5 мл микропробирку так, чтобы объем составлял примерно 700 мкл (на пробирке есть метка 0.75 мл).

5. Перемешать и инкубировать гомогенат при 65 °C в течение 10 минут.

6. Добавить 220 мкл ацетата калия и поместить пробирку на лед на 20 минут.

7. Центрифугировать пробу в течение 3 минут при скорости 10000 об/мин. Перенести супернатант (надосадочную жидкость) в чистую пробирку.

8. К супернатанту добавить равный объем изопропанола, перемешать и центрифугировать 10 минут при 10000 об/мин для осаждения ДНК.

9. Осадок ДНК промыть 70% этанолом, растворить в 200 мкл буфера TE.

10. Провести процедуру фенольной депротеинизации образца. Для этого внести в пробирку с раствором ДНК равный объем фенол-хлороформной смеси, хорошо перемешать встряхиванием и центрифугировать. Отобрать водную фазу (верхний слой) в чистую пробирку, не захватывая интерфазу. Повторить ту же процедуру со смесью хлороформ-изоамиловый спирт. Отобрать водную фазу с ДНК в чистую пробирку.

11. Высадить ДНК в 2.5 объемами холодного 96% этанола, предварительно прилив к образцу 1/10 объема 3М ацетата К (pH 5.0) или Na (pH 5.2).

12. Пробу центрифугировать в течение 10 мин на максимальной скорости. Супернатант слить. Осадок промыть 70% спиртом.

13. Высушить осадок ДНК на воздухе и растворить в 50 мкл буфера TE.

1.8 Выделение ДНК из крови с помощью смолы Chelex

Основная процедура выделения включает в себя очистку от металло-содержащих соединений и протеинов с последующим кипячением образца в присутствии Chelex 100, затем супернатант непосредственно добавляют в ПЦР смесь.

1. В центрифужную пробирку на 2 мл вносят 1 мл стерильной дистиллированной воды и добавляют 5 мкл крови или 3 мм² материала с засохшей кровью. Тщательно перемешивают.

2. Инкубируют при тщательном перемешивании 20 мин при комнатной температуре (лучше всего использовать ротатор для центрифужных пробирок).

3. Центрифугируют при 10 000 g 3 мин и удаляют супернатант, оставляя (чтобы не взмутить осадок клеток или ткань) 20-30 мкл.

4. Добавляют 5% раствор Chelex-100 до конечного объема 200 мкл (Chelex в натриевой форме, 5% раствор в стерильной дистиллированной воде). Перед добавлением смолу перемешивают до гомогенного состояния пипеткой с широким отверстием.

5. Инкубируют при 56 °С 30 мин и встряхивают в течение 10 сек.

6. Кипятят образец 8 мин при 95 °С, встряхивают в течение 10 сек. и центрифугируют при 10 000 g 3 мин.

7. Для ПЦР берут из полученного супернатанта 20 мкл.

Растворы:

1. Среда LB

2. Буфер TE. 10мМ Tris–HCl, pH 8.0; 1мМ ЭДТА.

3. Насыщенный буфером фенол. В большинстве случаев фенол высокой степени чистоты можно использовать без дополнительной перегонки. Расплавляют фенол при 65 °С в присутствии равного объема 0.1 М трис-НCl, pH 7.8-8.0, содержащего 0.2% 2- меркаптоэтанола (2-МЭ) (ядовит, летуч!, работать под тягой!). Когда фенол полностью расплавится, тщательно перемешивают смесь, отбирают насыщенный фенол (жидкий, нижняя фаза). В таком виде фенол может храниться при 4 °С до 1 мес, замороженный при -20 °С - в течение нескольких месяцев.

4. Смесь фенол–хлороформ-изоамиловый спирт. Водонасыщенный фенол, хлороформ и изоамиловый спирт смешивают в пропорции 25:24:1 по объему.

5. 10% SDS

6. 2М NaCl

7. 10 mM Трис HCl pH 8.0

8. Раствор I: 50 mM глюкозы, 10 mM ЭДТА, 25 mM трис-НCl, pH 8.0, РНКаза А

9. Раствор II: 0.2М NaOH и 1% SDS, смешать 1 мл 2М NaOH, 1 мл 10% SDS и 8 мл деионизованной воды

10. Раствор III: 3 М ацетат калия, 5М уксусная кислота (29 г ацетата калия, 11 мл ледяной уксусной кислоты и 60 мл воды

11. Раствор лизоцима в 10мМ Tris–HCl, 20 мг/мл, хранить при -18 °С.

12. TENS: 10 mM Трис-НCL, pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.1 N NaOH, 0.5% SDS; для приготовления 100 мл взять 1 мл 1 М Трис-НCL, pH 8.0, 200 мкл 0.5 М ЭДТА, pH 8.0, 5 мл 2 М NaOH, 5 мл 10% SDS, довести водой до 100 мл.

13. 10-кратный буфер для «внесения» в лунку геля: 1 мл 2х-кратный TBE или TAE буфер, 200 мкл 10% SDS, 600 мкл глицерина, 200 мкл воды, крупинка бромфенолового синего.

14. Буфер SSC. 3М NaCl; 0.3М цитрат натрия, pH 7,0. Для приготовления концентрированного 20 SSC на 1 л нужно взять: NaCl – 175.3 г; цитрат натрия – 88.2 г. pH раствора доводить обычно не требуется

15. 0.2М ацетат натрия, pH 5.2. Готовится разведением 3М раствора.

16. Буфер для экстракции. 100мМ Tris–HCl, pH 8,0; 50мМ ЭДТА; 500мМ NaCl; 1.25% SDS; 8.3мМ NaOH; 0.83% Na₂S₂O₃

ГЛАВА 2. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ ДНК

Электрофорез – метод разделения макромолекул, различающихся по таким параметрам, как размеры (или молекулярная масса), пространственная конфигурация, вторичная структура и электрический заряд. Физический принцип метода заключается в следующем. Находящиеся в буферном растворе макромолекулы обладают некоторым суммарным электрическим зарядом, величина и знак которого зависит от pH среды. Если через этот раствор, заключенный в канал из изолирующего материала начать пропускать электрический ток, то вдоль канала установится определенный градиент напряжения, т.е. сформируется электрическое поле. Его напряженность измеряется разностью потенциалов по концам канала, отнесенной к его длине (В/с). Под действием поля макромолекулы в соответствии со своим суммарным зарядом мигрируют в направлении катода или анода, причем их трение об окружающую среду ограничивает скорость миграции. В зависимости от величины заряда и размеров молекулы приобретают различные скорости.

Постепенно исходный препарат, состоящий из различных молекул, разделяется на зоны одинаковых молекул, мигрирующих с одинаковой скоростью. В современных приборах рабочий канал заполняют гелем, наличие сетки которого вносит важную дополнительную деталь в электрофоретическую миграцию молекул. Фракционируемые молекулы сталкиваются с нитями полимера, образующую сетку геля, что увеличивает сетку геля и снижает скорость движения молекул. Препятствия для миграции становятся особенно серьезными, если средний размер пространственных ячеек геля оказывается соизмерим с размерами макромолекул. В этом случае решающее влияние на электрофоретическую подвижность различных

макромолекул и степень разделения оказывает соотношение их линейных размеров. Возможна даже такая ситуация, когда особенно крупные молекулы белков или нуклеиновых кислот вообще не могут «протиснуться» через поры геля и их миграция прекратиться.

В настоящее время используют полиакриламидный и агарозный гель. Варьируя концентрацию полимера, можно получать гели с очень широким диапазоном размеров пор. Кроме того, можно изменять электрические заряды макромолекул путем вариации рН буфера, а их конфигурацию путем введения в буфер денатурирующих агентов или детергентов. Все это придает методу электрофореза исключительную гибкость.

В ходе электрофореза зоны макромолекул остаются невидимыми. Для наблюдения за процессом в исходный препарат добавляют краситель, молекулы которого несут электрический заряд того же знака, что и фракционируемые молекулы, но не взаимодействуют с ними. Краситель тоже передвигается в электрическом поле, но уже в виде окрашенной зоны. Его подбирают таким образом, чтобы скорость миграции наиболее подвижных макромолекул была несколько ниже, чем у молекул красителя. Когда окрашенная зона доходит до конца геля, электрофорез прекращают. Разделившиеся зоны биополимеров во избежание их диффузии немедленно фиксируют. Для этого гель извлекают из стеклянной формы и вымачивают в смеси, кислоты выпадают в осадок в том месте, где закончилась их миграция в ходе электрофореза. После фиксации (или одновременно с ней) проводят окрашивание зон путем вымачивания геля в растворе красителя, прочно связывающегося с белком или нуклеиновой кислотой. Излишек красителя удаляют.

Часто используют гели в виде тонких пластин, заполимеризованные между двумя плоскими стеклами. Такие пластины имеют важное преимущество: на них можно одновременно фракционировать несколько препаратов. Обычно их вносят с одного края геля на равных расстояниях друг от друга. Каждый препарат разделяется в электрическом поле независимо от своих соседей, образуя свой набор зон. Кроме того, поскольку гель заливают в форму для полимеризации жидким, то его концентрация, состав буфера и содержание добавок строго одинаковы по всему сечению геля. Следовательно, плотность тока и напряжение электрического поля также одинаковы. Это обеспечивает строго идентичные условия фракционирования.

ния разных препаратов и дает возможность достоверного сопоставления их состава путем сравнения положения полос в параллельных треках.

Разделение фрагментов ДНК происходит из-за наличия у них заряда. Фосфатные остатки у нуклеотидов придают всей ДНК негативный заряд. Это делает ее растворимой в воде и притягивают ее к положительному(+) электроду. Поэтому, если поместить ДНК в электрическое поле, то она будет двигаться от минуса к плюсу. Фрагменты ДНК, имеющие наименьшую длину, приближаются быстрее всего к + электроду, в то время как длинные фрагменты остаются максимально близко к минусу. Наиболее часто используют агарозный гель. Гели различаются по содержанию в них агарозы. Чем больше агарозы тем более мелкие фрагменты ДНК можно разделить. Увеличение концентрации агарозы в геле уменьшает скорость миграции ДНК и позволяет разделять малые фрагменты ДНК. Чем больше напряжение тем быстрее проходит форе́з - но слишком сильное напряжение нагреет буфер а это недопустимо. Конформация ДНК тоже играет важную роль. Релаксированные кольцевые плазмиды (неразрезанные рестриктазами) двигаются с другой скоростью чем линейные или суперскрученные.

Определение размеров производят путем сравнения коммерчески доступных фрагментов ДНК (DNA ladder, маркеры), содержащих линейные фрагменты ДНК известной длины.

Агароза – это особо чистая фракция природного линейного полисахарида агара, который получают из морских красных водорослей (*Gracilaria*, *Gelidium*, *Ahnfeltia*). Гелеобразование идет путем связывания в пространственную сетку пучков нитей за счет водородных связей между ними. Некоторые виды агарозы образуют прочные гели уже при концентрации 0.3%. При температурах 84-96 °С (а у специальных типов – уже при 70 °С) раствор агарозы переходит в прозрачную жидкость – «плавится». Растворы агарозы затвердевают, образуя гель, при значительно более низких температурах (36-42 °С). У легкоплавких типов агарозы эта температура снижается до 30 °С. Такая особенность облегчает манипуляции с расплавленной агарозой - можно не опасаться преждевременного ее застывания в гель. Более того, расплавленную агарозу предварительно охлаждают до 50-55 °С и уже при этой температуре заливают в формы; это удобно и не связано с возникновением значительных тепловых деформаций.

В агарозе неизбежно содержатся и эфиры серной кислоты. Чем меньше в агарозе заряженных сульфогрупп, тем слабее силы электростатического отталкивания между молекулами полимера и выше их способность к связыванию водородными связями. Их присутствие существенно влияет не только на температуры плавления и застывания гелей, но и на сам процесс электрофореза. В частности, именно эфиры серной кислоты обуславливают сильно выраженное при электрофорезе в гелях агарозы явление эндосмоса, суть которого в следующем: отрицательно заряженные остатки серной кислоты неподвижно связаны с полимерными нитями агарозы. Соответствующие им положительные ионы, находясь в водной фазе под действием электрического поля, мигрируют в направлении катода. Их место занимают катионы, которые увлекают за собой всю массу жидкости, находящейся внутри геля, и вместе с ней – растворенные в водной фазе геля макромолекулы. Электрофорезом в агарозном геле чаще всего разделяют отрицательно заряженные макромолекулы, а эндосмос направлен в противоположную сторону и ухудшает разделение. Поэтому агарозу подвергают специальной очистке, и содержание иона сульфата в продажных препаратах не превышает 0.5%. Типы агарозы, отличающиеся слабо выраженным эндосмосом, содержат менее 0.3% сульфата. Наличие заряженных сульфогрупп иногда обуславливает еще и не специфическую сорбцию белков на агарозе, в результате чего полосы расплываются с образованием «хвостов». Степень эндосмоса количественно оценивают с помощью коэффициента относительной миграции ($-m\tau$) – представляющего собой отношение скоростей миграции незаряженного полимера (за счет только эндосмоса) и сходного с ним по структуре полианиона при электрофорезе в агарозе данного типа.

Некоторые типы агарозы по номенклатуре фирмы «Miles»:

тип LE – малая степень эндосмоса $-m\tau = 0.1-0.15$;

тип HE – сильно выраженный эндосмос $-m\tau = 0.23-0.26$.

Агароза с повышенными температурами плавления и гелеобразования (тип HGT) имеет $-m\tau < 0,1$, именно она чаще всего используется для обычного электрофореза. Специальная технологическая обработка (введение оксиэтильных групп) позволяет получать агарозу с малой степенью эндосмоса и пониженными температурами плавления и затвердевания, например тип LGT, 1%-ный раствор такой агарозы остается жидким при физиологической температуре (37 °C); кроме того плавление геля можно

осуществить при температуре более низкой, чем температура денатурации ДНК. Такую агарозу используют для дальнейшей экстракции ДНК из геля после его плавления. Агароза для электрофореза выпускается обычно в виде лиофилизированного порошка. Для приготовления геля выбранной концентрации навеску порошка растворяют в соответствующем буфере и нагревают до 90-95 °С. Перед заливкой в форму раствор агарозы охлаждают до 50 °С. Выбор концентрации агарозы, т.е. пористости ее геля, диктуется размерами фракционируемых макромолекул. Средний размер пор 2%-ного геля агарозы приблизительно соответствует диаметру сферически упакованной молекулы биополимера с массой 50 млн. дальтон. Гели с более высоким содержанием агарозы используют для геля -фильтрации. При электрофорезе поры геля должны быть легко проницаемы для молекул биополимеров, чтобы лишь тормозить их миграцию в электрическом поле за счет трения, поэтому для электрофореза применяют агарозные гели с концентрацией 0.4-2%. Ниже представлены примерные концентрации гелей агарозы в % для некоторых распространенных объектов фракционирования:

Нуклеиновые кислоты обладают значительным по величине отрицательным зарядом, величина которого мало зависит от рН окружающей среды, а отношение заряда к массе практически одинаково для всех нуклеиновых кислот. Поэтому фракционирование идет за счет различия в размерах молекул. Выбор буфера в данной ситуации не играет существенной роли. Используют 0.089М Трис-боратный, 0.05 Трис-фосфатный (редко) и Трис-ацетатный буфер. Электрофорез нуклеиновых кислот сильно зависит от вторичной структуры. Двунитевая молекула имеет более жесткую структуру, труднее изгибается, проходя через пространственную сетку геля. Однако для молекул с молекулярной массой больше 3.5 млн. дальтон ситуация обратная: двунитевая молекула обладает достаточной гибкостью, чтобы проходить через сетку геля, в то время как одонитевая молекула той же длины сворачивается в хаотический клубок такого размера, что ее продвижение затрудняется. Вирусные и митохондриальные двунитевые ДНК, а также плазмиды бактерий могут иметь структуру замкнутого двунитевого кольца. Нативное состояние такого кольца - «сверхскрученное». Кольцо в целом сворачивается в «жгут», что сильно увеличивает его компактность (суперскрученная ДНК). Если же хотя бы в одной нити кольца имеется единичный разрыв, то жгут разворачивается, и силами электростатического отталкивания фосфатных групп кольцо расправляется. Ком-

пактность молекулы становится меньше, размеры увеличиваются (релаксированная ДНК). Суперскрученная ДНК при электрофорезе всегда мигрирует быстрее релаксированной.

Во многих случаях электрофореза бывает желательно оценить молекулярные размеры фракционируемых нуклеиновых кислот. Для этого удобно иметь набор молекул того же типа, но известной длины. В настоящее время имеется большое количество коммерческих маркеров на основе фага лямбда или DNA ladders, дающие при электрофорезе ряд последовательных полос на треке, соответствующих фрагментам определенной массы.

Во многих коммерческих препаратах полосы соответствующие некоторым промежуточным длинам, например, 1 кб, 3 кб содержат большее количество ДНК и поэтому свяжутся интенсивнее, что облегчает идентификацию масс. В лунки геля наносится проба ДНК, уже содержащий индикаторный краситель. Форму с гелем, содержащим нанесенные образцы переносят в камеру для электрофореза, заполненную буфером, камеру подключают к источнику питания (напряжение 1-15 В/см длины геля), и проводят электрофоретическое разделение ДНК в направлении от катода к аноду. Чем ниже напряжение, тем выше разделяющая способность геля, полосы более четкие из-за меньшей диффузии, но электрофорез занимает больше времени. Контроль за электрофоретическим разделением осуществляется визуально по движению полосы красителя. По окончании электрофоретического разделения (когда индикаторный краситель достиг края геля) вынимают гель из формы и просматривают в ультрафиолетовом свете с помощью УФ-транслюминатора (желательно фотографируют).

2.1 Горизонтальный электрофорез в агарозном геле

1. Готовят 1x TBE в объеме, достаточном для заполнения камеры для электрофореза и приготовления геля.

2. Добавляют к 1 x TBE агарозу в количестве, необходимом для получения 0.8 – 2% раствора, и нагревают в микроволновой печи до полного расплавления агарозы. 1% гель является относительно универсальным.

3. Охлаждают смесь до +/- 50 °С. За время охлаждения агарозы, подготавливают заливочный столик и кювету для электрофореза. 21

4. Добавляют к раствору агарозы краситель (см. п. 2.3) и осторожно перемешивают, избегая появления в геле пузырьков воздуха.

5. Теплую агарозу выливают в кювету для геля и равномерно распределяют ее по кювете. Вертикально вставляют гребенку так, чтобы ее зубцы не доставали до дна примерно 1-1.5 мм.

6. Оставляют кювету с агарозным гелем на 30 мин, затем осторожно удаляют гребенку и липкую ленту. Кювету с гелем помещают в электрофорезную камеру, содержащую необходимое количество 1xТБЭ.

7. Подготавливают к электрофорезу образцы исследуемой и маркерной ДНК, для чего смешивают их с буфером для нанесения (5:1). Чтобы получить четкий сигнал при окрашивании бромистым этидием-EtBr, в лунку шириной 5 мм достаточно внести 200 нг маркерной ДНК. Для построения стандартной кривой необходимо использовать маркерные фрагменты, длина которых примерно равна длине исследуемой ДНК.

8. Осторожно вносят в лунки исследуемую и маркерную ДНК. для повышения точности определения размера маркерную ДНК наносят по обе стороны от исследуемой.

9. Проводят электрофорез при градиенте напряженности 1 – 10В на 1 см геля.

10. Просматривают гель в УФ-свете на трансиллюминаторе и фотографируют.

2.2 Окраска ДНК

При электрофорезе используется два типа красителей (лидирующие и флюоресцентные).

В качестве лидирующих красителей используют бромфеноловый синий, оранжевый G, крезоловый красный, ксиленцианол. Эти красители движутся в том же направлении что и ДНК, но с разной скоростью. Зная размер ДНК продукта, можно оценить его положение в геле по положению индикаторных красителей.

Для детекции ДНК в геле используются различные флюоресцентные красители, которые способны связываться с двуцепочечной ДНК и светиться в ультрафиолетовом свете. На сегодняшний день используются разные красители, которые различаются по чувствительности, стоимости и

безопасности. Эти красители могут быть добавлены непосредственно в гель, и тогда гель сразу можно просматривать в трансиллюминаторе. Альтернативно, гель можно окрашивать после проведения электрофореза в водном растворе красителя. Так как все красители способны связываться с ДНК, они являются канцерогенами, и при работе с ними используются перчатки.

Бромистый этидий образует с фрагментами ДНК устойчивое соединение внедрения, проявляющееся в виде светящихся полос при облучении геля УФизлучением с длиной волны 290-330 нм. Это вещество способно встраиваться в двухцепочечные молекулы ДНК и флуоресцировать под ультрафиолетовыми лучами. При помощи цифрового фотоаппарата ДНК-фрагменты записываются и могут быть проанализированы. Бромистый этидий – сильный канцероген, способный проникать через кожу в организм, поэтому следует уделять особое внимание при работе с ним. Также не следует забывать, что бромистый этидий при фореze движется от (+) к (-). Если хочется, чтобы он не уходил из геля, лучше ввести его и в фореzный буфер.

SYBR Green I является одним из наиболее чувствительных красителей, применяемых для детекции двуцепочечных молекул ДНК при электрофорезах в агарозных и полиакриламидных гелях. Чувствительность этого красителя приблизительно в 25 раз выше, по сравнению с наиболее распространенным до настоящего времени бромистым этидием (EtBr). При использовании трансиллюминатора с длиной волны 300 нм, с помощью SYBR Green I может быть детектировано 60 пг двуцепочечной ДНК. Кроме этого, SYBR Green I с успехом может применяться при окрашивании синтетических олигонуклеотидов в полиакриламидных гелях, при этом его чувствительность выше, чем у EtBr в 50-100 раз.

Краситель нуклеиновых кислот **Midori Green** относится к новому безопасному классу красителей, применяемых для визуализации двухцепочечных и одноцепочечных молекул ДНК, а также молекул РНК в агарозном геле. Эти красители нового поколения пришли на смену токсичному бромистому этидию (EtBr, потенциальный мутаген), который обычно используется в гель-электрофорезе для визуализации нуклеиновых кислот. Modori Green Direct используется с голубым светом в гелъдокументирующих системах, а также с обычными ультрафиолетовыми трансиллюминаторами. Пики длины волны возбуждения при этом получаютcя 290 нм и

490 нм, пик эмиссии – 530 нм. Краситель Midori Green Direct не является канцерогеном и в гораздо меньшей степени обладает мутагенными свойствами, чем бромистый этидий. Кроме того, Midori Green Direct не повреждает латексные перчатки и мембрану клеток и относительно безопасен для окружающей среды.

Растворы

1. 10x TBE буфер (Tris-Borate-EDTA): 108 г Трис основного, 55 г борной кислоты, 9.3 г ЭДТА натриевой соли, довести до 1 литра деионизованной водой. рН 8.3 и не требует доведения.

2. 50x TAE , (Tris-Acetate-EDTA): 242 г Трис основного, 57.1 мл ледяной уксусной кислоты, 100 мл 0.5М EDTA, довести до 1 литра деионизованной водой. Довести рН до 8.5. TAE буфер при нагревании (в отличие от TBE) "неустойчив" и чтобы все было ок, следует агарозу растворять в воде, а потом в этот раствор добавлять TAE (50x).

3. Агароза: для 1% геля - смешать 100 мл воды и 1 грамм агарозы в стеклянной посуде. Доведите раствор до кипения в микроволновой печи при высокой мощности. Вытащите сосуд из печи и размешайте до ресуспендирования осевшей агарозы. Охладите до температуры, комфортной для дальнейшей работы. В мерном цилиндре доведите объем дистиллированной водой до 100 мл. В форму для геля установите гребенку под будущие лунки. Влейте охлажденную агарозу в форму.

4. 6x буфер для внесения в лунку геля: 0.25% бромфеноловый синий, 0.25% ксиленцианол, 40% сахара или 40% глицерин в 1x TBE.

5. Бромистый этидий EtBr: для внесения в гель 10 мг/мл в стерильной дистиллированной воде. Для окрашивания гелей 0.1 мг/мл в дистиллированной воде.

ГЛАВА 3. КЛОНИРОВАНИЕ ДНК

КЛОНИРОВАНИЕ в биологии подразумевает метод получения нескольких идентичных организмов путем бесполого (в том числе вегетативного) размножения. Таким способом на протяжении миллионов лет размножаются в природе многие виды растений и животных. Сейчас термин «клонирование» обычно используется в более узком смысле и означает ко-

пирование клеток, генов, антител и даже многоклеточных организмов в лабораторных условиях. Появившиеся в результате бесполого размножения экземпляры по определению генетически одинаковы, однако и у них можно наблюдать наследственную изменчивость, обусловленную случайными мутациями или создаваемую искусственно лабораторными методами. В молекулярной генетике термин «клонировать ген» означает получить большое количество его копий *in vivo*.

Клонирование фрагмента ДНК включает несколько последовательных этапов:

- 1) Получение фрагмента ДНК (с помощью полимеразной цепной реакции, или рестрикции)
- 2) Встраивание клонируемого (чужеродного) фрагмента ДНК в векторную молекулу ДНК (рестрикция и лигирование);
- 3) Проникновение этой конструкции в бактериальную клетку-хозяина (генетическая трансформация);
- 4) Идентификация клеток, содержащих рекомбинантную ДНК, и их отбор (как правило, осуществляется на селективной среде)
- 5) Получение необходимого количества клеток, содержащих рекомбинантную ДНК (собственно клонирование). При необходимости индуцируют экспрессию клонированного гена в клетках-хозяевах и получают кодируемый им белок.

3.1 Определение концентрации нуклеиновых кислот

Для многих методик манипуляции с ДНК (ПЦР, рестрикция, лигирование) необходимо знать ее концентрацию. Довольно часто количественную и качественную оценку препарату выделенной ДНК можно оценить при гельэлектрофорезе, следующим, как правило, сразу за процедурой выделения. Для этого визуально сравнивают на соседних дорожках геля интенсивность свечения в ультрафиолете полученного образца с образцом известной концентрации (с маркерами молекулярной массы, концентрация которых указывается в описании). Определить концентрацию ДНК, а также степень ее чистоты, можно с помощью спектрофотометра, что точнее и быстрее. Для этого измеряют оптическую плотность раствора ДНК при длине волны 260 нм. Нуклеиновые кислоты (НК) поглощают УФ излучение в области 240–290 нм с максимумом при 260 нм. Хромофорами служат

азотистые основания нуклеиновых кислот, особенно пиримидиновые. Пиримидины поглощают УФ свет примерно в 10–20 раз интенсивнее, чем хромофоры белковых молекул – триптофан, тирозин и фенилаланин имеющих максимум поглощения при 280 нм. Для чистых образцов ДНК соотношение оптических плотностей полученных при измерении 260 нм и 280 нм должно быть более 1,8. Оптическая плотность раствора нуклеиновых кислот при длине волны 260 нм, равная 1, соответствует 50 мкг/мл двухцепочечных ДНК и РНК, 40 мкг/мл одноцепочечных ДНК и РНК и 20 мкг/мл олигонуклеотидов. По известной оптической плотности раствора можно рассчитать концентрацию, мкг/мкл, по соответствующим формулам:

для двух цепей полинуклеотидов: $\Delta A_{260} \times \text{разбавление} \times 0.05$;

для одиночных цепей ДНК: $\Delta A_{260} \times \text{разбавление} \times 0.037$;

для одиночных цепей РНК: $\Delta A_{260} \times \text{разбавление} \times 0.04$;

для олигонуклеотидов: $\Delta A_{260} \times \text{разбавление} \times 0.02$,

где ΔA_{260} - разница оптических плотностей раствора нуклеиновых кислот и растворителя, которым практически всегда является стерильная деионизованная вода.

3.2 Рестрикция

Эндонуклеазы рестрикции - это ферменты, которые распознают определенные участки на чужеродной ДНК и разрезают фосфодиэстеразную связь между нуклеотидами. Впервые подобный фермент был получен из *E. coli* (разрезал ДНК в случайных сайтах). Сейчас используются рестриктазы типа II - они обладают только рестрикционной активностью, разрезают ДНК в строго определенных сайтах, не требуют АТФ для проявления активности. Сейчас коммерческие ферменты выпускаются с приложенным оптимальным буфером. Все фирмы – производители имеют свою систему буферов, поэтому необходимо смотреть подходящий буфер на сайте производителя, его концентрацию и условия рестрикции. За единицу активности рестриктазы принимают количество фермента, способное за 1 ч в оптимальных для него условиях полностью гидролизовать 1 мкг ДНК фага λ .

Для проведения успешной рестрикции необходимо соблюдать ряд условий.

1) Использовать корректный буфер (прилагаемый к ферменту)

2) Количество ДНК: От 1 до 10 мкг, поскольку большие количества ДНК увеличивают вязкость раствора, что приводит к ингибированию реакции

3) Количество фермента: 1 единица на 1 мкг ДНК. Избыток фермента может приводить к неспецифическому распознаванию ДНК

4) Объем смеси: от 10 до 50 мкл

5) Время рестрикции – 1-4 часа. В некоторых случаях допускается проводить рестрикцию в течение ночи малым количеством фермента.

1. В микропробирку внести 1 мкг плазмидной ДНК

2. Внести 3 мкл рестрикционного буфера

3. Внести рестриктазу в объеме, соответствующем 1 единице активности,

4. Довести объем смеси до 30 мкл деионизованной водой, и поставить в термостат на 2 часа. Результат рестрикции проверить методом электрофореза.

3.3 Дефосфорилирование ДНК

При использовании только одной рестриктазы большинство молекул вектора будет залипать сама на себя и в результате образуется большое количество исходного вектора, не несущего вставку. Чтобы избежать этого, проводят дефосфорилирование для удаления фосфатных групп с 5'-концов фрагментов ДНК, полученных в результате гидролиза эндонуклеазами рестрикции. Поскольку дефосфорилированные концы не сшиваются ДНКлигазой, то такая обработка позволяет предотвратить самолигирование фрагментов ДНК, например, плазмидных векторов, предназначенных для последующего клонирования. Наиболее часто используется щелочная фосфатаза из кишечника телят (CIP).

1. На 50 мкл реакционной смеси добавить: 5 мкл десятикратного буфера, 0.5-5 мкг ДНК, деионизованная вода – до 50 мкл, 1-2 мкл (5-10 ед.) щелочной фосфатазы (порядка 1-2 ед. на 1 мкг ДНК).

2. Инкубировать в течение 0,5-1 часа при 37°C.

3. Очистить ДНК гель-фильтрацией, на спин-колонках или путем экстракции фенолом-хлороформом с последующим высаживанием 96%-ным этанолом для удаления фосфатазы. Реакцию можно проводить прямо

после реакции рестрикции, внося фосфатазу непосредственно в рестрикционную смесь.

В некоторых случаях бывает удобно использовать термолабильную щелочную фосфатазу из *A. undina* P2. В этом случае необходимо инкубировать при 25°C!!! (Инкубация при 37°C приводит к частичной инактивации фермента).

3.4 Лигирование ДНК

Лигаза (лат. *ligāre* — сшивать, соединять) — фермент, катализирующий соединение двух молекул ДНК с образованием новой фосфорноэфирной связи (лигирование).

Буфер для лигирования как правило поставляется в комплекте с ферментом и содержит АТФ. Поэтому данный буфер не следует размораживать много раз во избежание распада АТФ. При первой разморозке буфера рекомендуется слегка нагреть его (до 35-37 °С) и несколько раз встряхнуть до полного растворения осадка. Затем расфасовать его небольшими объемами (20- 50 мкл) в отдельные пробирки, заморозить и использовать эти аликвоты не более 2-3 раз.

Реакцию лигирования следует проводить в минимальном объеме (10-20 мкл) с целью увеличения концентрации концов ДНК, и, соответственно эффективности сшивки. Рекомендуемая концентрация концов ДНК – от 0.1 до 1 мкМ. Следует учесть, что эффективность сшивки выступающих «липких» концов выше, чем «тупых» концов. Соответственно, более протяженные «липкие» концы сшиваются лучше коротких.

Стандартную реакцию лигирования можно проводить при 16 °С в течение 0.5-2 час. Но в большинстве случаев наилучшие результаты достигаются при инкубировании реакционной смеси в течение ночи при 4-6 °С. Соотношение сшиваемых фрагментов ДНК подбирается экспериментальным путем. Например, при необходимости сшивки векторной плазмиды и фрагмента(ов) геномной ДНК можно использовать соотношения от 1:5 до 1:0.5, соответственно.

1. На 10 мкл реакционной смеси смешать
Реакционный буфер (десятикратный) – 1 мкл;
Фрагмент ДНК 1 (0.1 мг/мл) – 1 мкл;
Фрагмент ДНК 2 (0.1 мг/мл) – 1-5 мкл;

0.5-1 мкл (100 ед.) T4 ДНК лигазы.

Вода (Milli-Q) – до конечного объема 10 мкл

2. Инкубировать в течение 16 час при 4-6 °С.

3. Полученная лигазная смесь используется для трансформации бактерий.

3.5 Полимеразная цепная реакция

ПЦР – полимеразная цепная реакция, в ходе которой амплифицируются определенные участки ДНК. ПЦР была изобретена американским ученым Кэри Мюллисом в 1983 году. Широкие возможности, сравнительная дешевизна и простота ПЦР позволили использовать этот метод генетического анализа в разных областях научных исследований.

Для проведения ПЦР необходимо наличие в реакционной смеси ряда основных компонентов.

Праймеры – искусственно синтезированные олигонуклеотиды, имеющие, как правило, размер от 15 до 30 нуклеотидов, идентичные соответствующим участкам ДНК-мишени. Они играют ключевую роль в образовании продуктов реакции амплификации. Праймеры подбираются по определенным правилам:

1. Размер праймера должен быть 16-25 нуклеотидов. При маленьком размере происходит неспецифическое распознавание ДНК.

2. Разница в температуре плавления праймеров - не более 6 градусов. Упрощенный расчет оптимальной температуры отжига праймера ведут по формулам $T_m = [(A+T) \times 2^\circ\text{C}] + [(G+C) \times 4^\circ\text{C}]$ если суммарная длина олигонуклеотида не превышает 20 оснований и $T_m = 22 + 1.46 \times ([2 \times (G+C)] + (A+T))$ если суммарная длина олигонуклеотида составляет 20-30 оснований. Также можно воспользоваться сервисом от New England Biolabs <http://tmcalsculator.neb.com/> и Минского университета <http://www.bio.bsu.by/molbiol/oligocalc.html>.

3. Количество остатков цитозина и гуанина должно быть 50-60 %. Для улучшения качества отжига рекомендуется подбирать праймеры так, чтобы последние несколько нуклеотидов 3' - конца праймера содержали GC-основания.

4. Отсутствие внутренней вторичной структуры (праймеры не должны быть само- и взаимнокомплиментарными) и отсутствие комплементар-

ности между 3'-концами (чтобы не образовывалось праймер-димеров). **Полимераза** – термостабильный фермент, обеспечивающий достраивание 3'-конца второй цепи ДНК согласно принципу комплементарности. В настоящее время существует множество различных полимераз. В 1975г. Т. Брок и Х.Фриз открыли *Thermus aquaticus* – граммотрицательную палочковидную экстремально термофильную бактерию, а в 1976 г. из нее была впервые выделена Таqполимераза. Данный фермент до сих пор активно используется в лабораториях, так как он относительно дешевый, неприхотлив к контаминации ДНК, обладает высокой процессивностью. Однако его нельзя использовать для клонирования, так как при синтезе данный фермент имеет низкую точность – в среднем наблюдается 1-2 мутации на 1000 нуклеотидов.

В настоящее время на рынке предложены высокоточные полимеразы, такие как Pfu полимераза, Pfuision полимераза, Q-5 полимераза. Эти ферменты обладают 5'-3' экзонуклеазной активностью, за счет которой способны «исправлять» собственные ошибки путем удаления неправильно встроенных нуклеотидов. При их использовании точность синтеза составляет около 1 мутации на 10000 пар оснований.

Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) – дезоксиаденозинтрифосфата (дАТФ), дезоксигуанозинтрифосфата (дГТФ), дезоксицитозинтрифосфата (дЦТФ) и дезокситимидинтрифосфата (дТТФ) – «строительный материал», используемый полимеразой для синтеза второй цепи ДНК.

Буфер – смесь катионов и анионов в определенной концентрации, обеспечивающей оптимальные условия для реакции, а также стабильное значение pH.

ДНК-матрица – подготовленный к внесению в реакционную смесь препарат, который может содержать искомую ДНК, например, ДНК микроорганизмов, служащую мишенью для последующего многократного копирования. При отсутствии ДНК-мишени специфический продукт амплификации не образуется.

Циклический температурный режим

В процессе реакции амплификации ДНК с ней происходит ряд событий, которые обеспечиваются определенными температурными циклами. Каждый цикл амплификации состоит из трех этапов:

1. Денатурация – это переход ДНК из двухнитевой формы в однонитевую при разрыве водородных связей между комплементарными парами оснований под воздействием высоких температур (95 °С).

2. Отжиг – это присоединение праймеров к одноцепочечной ДНК-матрице. Праймеры подбирают так, что они ограничивают искомым фрагмент и комплементарны противоположным цепям ДНК. Температуру отжига подсчитывают для каждого праймера отдельно, а затем устанавливают наиболее низкую из пары праймеров.

3. Элонгация (синтез). После отжига праймеров ДНК-полимераза начинает достраивание второй цепи ДНК с 3'-конца праймера. Температуру в реакционной смеси доводят до оптимума работы фермента, которая с максимальной эффективностью начинает синтез второй цепи ДНК от 3'-конца праймера, связанного матрицей, и движется в направлении от 3' к 5' концу (как правило 72 °С). Эти три этапа многократно повторяются – 25 и более раз, в зависимости от количества ДНК матрицы.

Иногда в случае близкого значения температуры отжига праймеров и температуры оптимума работы фермента, становится возможным использовать двухэтапный ПЦР, совместив отжиг и элонгацию.

«Эффект плато»

Следует заметить, что процесс накопления специфических продуктов амплификации по геометрической прогрессии идет лишь ограниченное время, а затем его эффективность критически падает – достигается «эффект плато». В зависимости от условий и количества циклов реакции амплификации, на момент достижения «эффекта плато» влияют:

Утилизация субстратов (дНТФ и праймеров). Стабильность реагентов (дНТФ и фермента).

Количество ингибиторов, включая пирофосфаты и ДНК-дуплексы. Неспецифические продукты и праймер-димеры, конкурирующие за праймеры, дНТФ и полимеразу.

Концентрация специфического продукта за счет неполной денатурации при высокой концентрации ампликонов.

1) Приготовить ПЦР смесь:

- 10x буфер для полимеразы (поставляется вместе с ферментом) – 2.5 мкл

- ДНК полимеразы – 1 ед. активности

- Смесь дНТФ (10 мМ раствор каждого) – 0.5 мкл
- Праймер 1 (5 мкМ раствор) – 2 мкл
- Праймер 2 (5 мкМ раствор) – 2 мкл
- ДНК-матрица – 0.01 мкг
- H₂O – до 25 мкл

2) Смесь смешать, сбросить на центрифуге, и поставить в амплификатор.

3) Примерная программа амплификации выглядит следующим образом:

1-95 °С – 4 мин (первичное плавление ДНК)

2-95 °С – 30 сек (плавление ДНК)

3-50* °С – 30 сек (отжиг праймеров, *-температура отжига рассчитывается по последовательности праймера

4-72 °С – 60 сек** (синтез ДНК, ** - время элонгации рассчитывается исходя из длины синтезируемого фрагмента, 1000 п.о. в минуту)

Повторять пункты 2-4 30 раз

5-72 °С – 5 мин (достройка незаконченных цепей ДНК)

ГЛАВА 4. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ БАКТЕРИЙ

Трансформацией называется перенос чистой ДНК из одних клеток в другие. Трансформация была открыта бактериологом Ф. Гриффитсом в 1928 г. в опытах с пневмококками.

У пневмококков известно два типа штаммов: S– и R–формы. S–форма характеризуется наличием полисахаридной капсулы, благодаря чему при искусственном культивировании она образует гладкие блестящие колонии; эта форма патогенна для мышей. R–форма не имеет капсулы, при искусственном культивировании она образует шероховатые колонии; эта форма непатогенна для мышей. Но если мышам одновременно ввести убитые S–клетки и живые R–клетки, то мыши погибают. Следовательно, генетические свойства одного штамма влияют на генетические свойства другого штамма. В природных условиях внеклеточная чистая ДНК образуется при гибели (лизисе) прокариот. Способность клетки к трансформации возможна при особом ее состоянии, которое называется компетентностью.

У компетентных клеток изменяется состав клеточной стенки и плазмалеммы: стенка становится пористой, плазмалемма образует многочисленные впячивания, а на внешней поверхности появляются особые антигены – факторы компетентности.

Как правило, трансформация происходит в пределах одного вида прокариот, но при наличии гомологичных генов наблюдается и межвидовая трансформация.

В лаборатории трансформацию используют для введения в клетки бактерий рекомбинантной плазмидной ДНК, в данном случае плазида реплицируется независимо от хромосомной ДНК и обеспечивает экспрессию целевых генов. Также можно вводить генетические конструкции, которые при рекомбинации с хромосомой способны встраиваться в нее и реплицироваться синхронно с ней (интегративные плазмиды), в таком случае на клетку приходится только одна копия гена. Также путем трансформации проводят нокаутирование генов – когда целевой ген заменяют на селективный маркерный ген, например, ген устойчивости к антибиотику.

Огромное количество биологических исследований начинается с того, что в клетку вносится чужеродный генетический материал. Это действие называется генетической трансформацией. С его помощью можно получить генетически модифицированные организмы, включить и выключить отдельные гены, определить влияние какого-нибудь белка на какой-нибудь сложный процесс и так далее.

4.1 Трансформация плазмидной ДНК клеток *E.coli* методом теплового шока (химическая трансформация)

1. Колонию с чашки перенести в 2 мл LB и инкубировать в течение ночи при 370С на качалке со скоростью 200 об/мин.

2. 100 мкл ночной культуры перенести в 10 мл среды LB, выращивать до ОП590=0.6 при 370С на качалке со скоростью 200 об/мин (2-3 часа).

3. Клетки из 1.5 мл культуры собрать центрифугированием в стерильных эппендорфах в течение 1 мин при 13 тыс. об/мин.

4. Клетки ресуспендировать в 200 мкл стерильного раствора 0.1M CaCl₂, поместить в лёд на 2 ч при температуре 40С.

5. К 200 мкл компетентных клеток добавить ДНК и оставить в льду на 20 мин.

6. Клетки поместить в водяную баню или твердотельный термостат на 420С на 3-5 мин.
7. Клетки перенести в лёд на 10 мин.
8. Добавить 800 мкл тёплого LB и инкубировать 1 ч при 370С с качанием.
9. Сделать высевы по 300-500 мкл на LB-агар с соответствующим антибиотиком.

4.2 Трансформация плазмидной ДНК клеток *E.coli* методом электропорации

1. Колонию с чашки перенести в 2 мл LB и инкубировать в течение ночи при 37 0С на качалке со скоростью 200 об/мин.
2. 10 мл инокулята перенести в 100 мл LB и инкубировать с качанием при 370С до ОП600 = 0.5-0.6 (~ 2,5 часа).
3. Клетки собрать центрифугированием в течение 8 мин при 4400 грп, супернатант слить.
4. Клетки отмыть 2 раза холодной (4 0С) дистиллированной водой.
5. Клетки отмыть 2 раза холодным (4 0С) 10% раствором глицерина в дистиллированной воде.
6. Клетки ресуспендировать в 5 мл ледяного, стерильного 10%-ного глицерина. Осторожно перемешать смесь.
7. Разаликвотить клетки порциями по 50μл в эппендорфы, убрать в морозильник на -800С.
8. Электропорационную кювету хорошо промыть (5 мин держать в дистиллированной воде, залить 96%, спирт вылить и поставить сушиться в ламинар под ультрафиолетовые лучи. Перед работой кювету поставить в лёд на 10 мин.
9. Клетки медленно разморозить на льду, добавить ДНК (не более 5 мкл) и осторожно перемешать, перенести в холодную кювету.
10. Условия электропоратора:
 - i) Es 1 для кювет 1 мм (напряжение 1,8 kV; длительность импульса ~5,0 мс)
 - ii) Es 2 для кювет 2 мм (напряжение 2,5 kV; длительность импульса ~5,0 мс).
11. Протереть кювету и поставить ее в прибор Bio-Rad MicroPulser. Установить параметры и нажать кнопку «Pulse». После звукового сигнала, снять кюветку.

12. После электропорации сразу в кювету добавить 400 μ л среды LB (370С). Очень осторожно перемешать, перелить в эппендорф и инкубировать при 37 0С 40 мин. По 200 μ л культуры разлить на чашку с L-агаром и антибиотиком (ампициллин - 100 мкг/мл, канамицин – 10 мкг/мл).

4.3 Трансформация плазмидной ДНК клеток *B.subtilis* методом голодания (Anagnostopolous et al., 1961).

1. Колонию с чашки перенести в 2 мл LB и инкубировать в течение ночи при 37 0С на качалке со скоростью 200 об/мин.

2. 0.5 мл ночной культуры перенести в 4.5 мл среды Спицайзена I и выращивать 4,5 час при 370С с качанием 200 об./мин.

3. 750 мкл культуры внести в 5 мл среды Спицайзена II, добавить 80 мкл MgSO₄ и выращивать 1,5 час при 370С.

4. К 500 мкл компетентных клеток добавить ДНК (5 мкл, 1 мкг), инкубировать 1 ч при 370С, затем на качалке со скоростью 200 об/мин при 370С в течение 1.5 час.

5. посеять на LB-агар с соответствующим антибиотиком.

ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Великов В.А. Молекулярная биология. Практическое руководство: Учеб. пособие для студ. биол. фак. и фак. nano- и биомед. технол., обуч-ся по напр. «Биология (020400)», «Биология-пед (050100)», «Биотехнические системы и технологии (200100)», «Медицинская физика (011200)» и по спец. «Биоинженерия и биоинформатика (020501)». – Саратов: Издательство «Саратовский источник», 2013. – 84 с.: ил.

2. Клонирование. Принципы и методы клонирования. Режим доступа <http://medicalplanet.su/genetica/137.html>

3. Основы электрофореза. Режим доступа http://www.ibmc.msk.ru/content/Education/w-o_pass/ММoB/18a.pdf

4. Учебно-методическое пособие к проведению лабораторных работ и контроля самостоятельной работы студентов по молекулярной биологии Академии биологии и биотехнологии ЮФУ. / О.Ш. Карапетьян, Е.М. Вечканов, И.А. Сорокина, Ростов- на-Дону: Изд-во ЮФУ, 2015. –100с

Программное обеспечение

- операционная система семейства Microsoft Windows Professional 8.1; Windows SL 8.1;
- офисное программное обеспечение - MicrosoftOfficeStd;
- браузеры - Internet Explorer, Mozilla FireFox, Google Chrome, Opera;
- «Антиплагиат ВУЗ»: программная система для обнаружения текстовых заимствований в учебных и научных работах;
- Антиплагиат-интернет: программный комплекс поиска текстовых заимствований в открытых источниках сети интернет.

Базы данных, информационно-справочные и поисковые системы

- Электронный каталог библиотеки УлГУ
- ЭБС «IPRbooks»
- ЭБС «Лань»
- ЭБС «Консультант студента»
- ЭБД РГБ
- <http://www.ievbras.ru>
- <http://www.gpnb.ru>

Директор Издательского центра *Т. В. Филиппова*
Подготовка оригинал-макета *Е. Г. Туженковой*
Печатается в авторской редакции

Подписано в печать 21.03.2018.
Формат 60x84/16. Усл. печ. л. 2,1. Уч.-изд. л. 1,8.
Тираж 100 экз. Заказ 36 /

Оригинал-макет подготовлен
в Издательском центре
Ульяновского государственного университета

Отпечатано в Издательском центре
Ульяновского государственного университета
432017, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42