

ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
Биологический институт  
Кафедра физиологии растений и биотехнологии

**Е.С. Гвоздева, Е.В. Дейнеко,  
А.А. Загорская, Ю.В. Сидорчук,  
Е.А. Уварова, Н.В. Пермякова**

**ПРАКТИКУМ ПО ГЕНЕТИЧЕСКОЙ  
ИНЖЕНЕРИИ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ  
БИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ**

Томск  
2012

**УДК 577.21(076.58)**

**ББК 28.04я73**

**П691**

**Гвоздева Е.С., Дейнеко Е.В., Загорская А.А.,  
Сидорчук Ю.В., Уварова Е.А., Пермякова Н.В.**

**П691** Практикум по генетической инженерии и молекулярной биологии растений. – Томск : Томский государственный университет, 2012. – 96 с. + 8 вклеек

Практикум является руководством к выполнению лабораторных работ по генной инженерии и молекулярной биологии растений и охватывает основные разделы теоретического курса «Генетическая инженерия растений».

Для студентов и аспирантов специальности «Биология», а также всех исследователей, интересующихся генной инженерией и молекулярной биологией растений.

**УДК 577.21(076.58)**

**ББК 28.04я73**

© Томский государственный университет, 2012

© Коллектив авторов, 2012

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- дцДНК – двухцепочечная ДНК  
ед. а. – единицы активности (фермента)  
ИПТГ – изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид  
иРНК – информационная РНК  
кДНК – комплементарная ДНК или ДНК, синтезированная с помощью фермента обратной транскриптазы на мРНК  
мРНК – матричная РНК  
МС – питательная среда Мурасиге и Скуга для выращивания растений в условиях *in vitro*  
о. е. – относительные единицы  
п.н. – пар нуклеотидов  
УФЛ – УФ-лучи  
А – аденин  
С – цитозин  
DMSO – диметилсульфоксид  
DTT – дитиотреитол  
EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота  
G – гуанин  
GFP – зеленый флюоресцентный белок  
КОАс – ацетат калия  
LB – питательная среда для культивирования бактерий  
MOPS – 3-морфолинопансульфоновая кислота  
OD – оптической плотности  
PEG – полиэтиленгликоль  
SDS – додецил сульфат натрия  
Т – тимин  
Tris – (HOCH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub> – трис (гидроксиметил) аминометан, используется как компонент при приготовлении буферных растворов  
YEP – питательная среда для культивирования бактерий  
X-Gluc – 5-бром-4-хлор-3-индолилглюкуронид, 5-бром-4-хлор-3-индоксил-β-D-глюкуроновой кислоты, циклогексиламмонийная соль  
X(Y)-GAL – сахар X-gal, 5-бром-4-хлор-индолил-β-D-галактопиранозид

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Генетическая инженерия растений представляет собой новое направление молекулярной биологии, позволяющее целенаправленно модифицировать растительные геномы путем переноса генов из разных гетерологических систем (вирусов, бактерий, насекомых, животных и человека). С помощью методов генетической инженерии становится возможным искусственно манипулировать фрагментами нуклеиновых кислот (ДНК и РНК), объединяя их по заранее намеченной программе для экспрессии чужеродных генов в растительных клетках.

Технологии создания генетически модифицированных или трансгенных растений включают несколько основных этапов:

- получение изолированных фрагментов ДНК (целевые, маркерные и репортерные гены, промоторы, терминаторы, энхансеры и другие регуляторные элементы);

- создание экспрессионных векторов для экспрессии чужеродных генов (трансгенов) в растительных клетках;

- перенос экспериментально созданных экспрессионных векторов в геном растений;

- отбор трансформированных растительных клеток на селективных средах и регенерация из них полноценных растений-трансформантов;

- оценка трансгенных растений по стабильности экспрессии перенесенных генов, отбор отдельных трансформантов для дальнейшей селекционной доработки и оценка их биобезопасности.

## **ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ, ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТ И ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ В БИОЛАБОРАТОРИИ**

Биолаборатории обычно размещаются в нескольких помещениях, которые в зависимости от объема работы и целевого назначения имеют определенную площадь, строение и оснащение.

В каждой биолаборатории предусмотрены:

а) Комнаты для работы с химическими реактивами и для приготовления питательных сред, буферных растворов и т.д., где имеются лабораторные столы, шкафы вытяжные и для хранения реактивов и посуды, аналитические весы, рН-метр, электроплитки, водяные бани, магнитная мешалка, холодильники и шкафы (стеллажи) для хранения растворов, реактивов и готовых сред и т.д.

б) Помещения для стерилизации инструментов, посуды и питательных сред, в которых расположены сухожаровые шкафы, автоклавы, стеллажи и столы для размещения сред, инструментов и посуды (причем стерильные и нестерильные материалы размещаются отдельно), аппараты для получения дистиллированной и бидистиллированной воды.

в) Моечные комнаты, оснащенные мойками с горячей и холодной водой, аппаратами для получения дистиллированной воды, сосудами с дистиллированной и бидистиллированной водой, сушильными шкафами и стеллажами для хранения посуды.

г) Боксы (ламинарные боксы) или комната для проведения работ с отдельными группами биообъектов (растения, бактерии и т.д.) – посев на питательные среды и пр.

д) Культуральные комнаты:

– световое отделение, где регулируются температура и влажность воздуха, интенсивность освещения, предназначено для выращивания растительных культур на стеллажах с фиксированными и/или передвижными полками или суспензионных культур на шейкерах, роторных установках;

– темновое отделение оснащено тем же оборудованием, что и световое, исключая источники освещения (можно использовать и термостаты).

е) Лабораторные помещения для изучения биообъектов, например растительных культур, где имеются весы, микроскопы, растворы красителей, предметные стекла и т.д.

ж) Помещение с холодильными-морозильными установками для сохранения культур растений, бактерий, выделенных нуклеиновых кислот.

з) Оранжереи и теплицы, в которых выращивают растительный материал, необходимый для исследований, или высаживают растения, полученные в ходе экспериментов.

и) ПЦР-лаборатория, которая обязательно должна быть разделена на три зоны – по числу технологических операций: зона подготовки реакционной смеси («чистая зона»), зона пробоподготовки и электрофоретическая комната. Перемещение пробирок, штативов и пр. должно производиться только в одном направлении, при этом потоки не должны пересекаться (рис. 1).

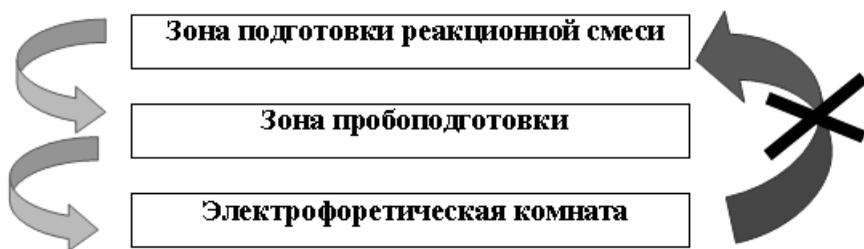


Рис. 1. Устройство ПЦР-лаборатории и возможные варианты перемещения

Все три зоны должны быть изолированными комнатами, снабженными предбоксниками и устройством фильтрации воздуха.

При наличии специальных боксов допускается объединение зоны подготовки реакционной смеси и зоны пробоподготовки, но комната для проведения электрофореза должна размещаться как можно дальше от двух других зон и иметь не связанную с другими зонами систему вентиляции. Это является одним из наиболее категорических требований при организации ПЦР-лаборатории.

Подготовку реакционной смеси следует проводить в ПЦР-боксе, снабженном электрическими розетками, лампами дневного и ультрафиолетового света. Запрещается внесение пробирок с положительными контролями как до, так и после обработки в комнату подготовки реакционной смеси («чистую зону»).

Изучаемый материал необходимо как можно быстрее обработать в комнате пробоподготовки. В эту же комнату должны поступать пробирки с реакционной смесью из «чистой зоны» для внесения в них препаратов ДНК. После этого пробирки помещают в амплификатор и, по окончании

термоциклирования, не открывая крышек, переносят в комнату для электрофореза.

Все производственные комнаты должны быть снабжены необходимым оборудованием и расходными материалами, в том числе халатами, закрепленными за соответствующими помещениями.

к) Кроме того, желательнее предусмотреть отдельные помещения для переодевания и хранения верхней одежды, приема пищи, складское помещение для лабораторных материалов.

Так как большая часть работ по геномной инженерии и молекулярной биологии растений выполняется в стерильных условиях (**ламинар-бокс, боксовые помещения**), то необходимо соблюдать следующие требования:

1. Полы в лаборатории подлежат ежедневной влажной уборке с применением 1%-ного раствора хлорамина.

2. В начале и в конце рабочего дня боксовые помещения и предбоксники облучают бактерицидной лампой в течение 40–60 мин.

3. Перед началом и по окончании работ поверхность стола обрабатывают тампонами, смоченными 96%-ным этиловым спиртом.

4. Запрещается входить в бокс при включенной бактерицидной или ртутно-кварцевой лампе. Работу можно начинать только спустя 30–40 мин после выключения ламп.

5. В боксе и предбокснике не должно быть лишних предметов и оборудования, не предназначенных для работы, загораживающих выход из них и доступ к средствам пожаротушения.

6. Работать в боксе необходимо в спецодежде (халат, шапочка, сменная обувь, иногда – марлевая повязка).

7. Запрещается использовать спецодежду, предназначенную для работы в боксе, если на ней имеются следы от пролитых легковоспламеняющихся или горючих жидкостей.

8. Запрещается иметь в боксе легковоспламеняющиеся и горючие жидкости при работе со спиртовкой, а также исключается использование нательного белья из синтетических материалов.

9. Прежде чем зажечь спиртовую горелку, надо убедиться, что в ней нет неисправностей, что поблизости нет горючих жидкостей (спирт, эфир и др.). Зажигать спиртовку можно только спичкой.

10. Для тушения пожара, возникшего от загорания спирта (спиртовки), можно использовать воду или ткань, обильно смоченную водой.

11. Работы в боксе осуществляются при наличии одновременно не менее двух сотрудников.

При работе **на автоклавах** также необходимо руководствоваться правилами эксплуатации и техники безопасности:



1. К обслуживанию автоклава могут быть допущены лица, достигшие 18 лет, прошедшие специальный инструктаж по безопасному обслуживанию автоклавов и имеющие удостоверение о сдаче технического минимума по их устройству и эксплуатации.

2. Автоклавы с электрическим нагревом должны быть заземлены. Пол стерилизационной у рабочих мест изо-

лируется резиновыми ковриками или деревянными решетками.

3. Персонал, обслуживающий автоклавы, должен вести рабочий журнал, в котором записываются дата, время, режим стерилизации, кто проводил стерилизацию.

4. Открывание крышки автоклава, а также его ремонт разрешается только при полном отсутствии давления в автоклаве.

5. Во время открытия крышки автоклава обслуживающий персонал должен находиться в стороне от крышки.

6. При выгрузке из автоклава или сушильного шкафа стеклянной посуды следует пользоваться матерчатыми рукавицами или трикотажными перчатками.

Работы с использованием **электрооборудования и электроприборов** (шейкеры, электроплитки, водяные бани, микроволновые печи и др.) должны проходить под наблюдением.

При неисправности в работе электроприбора (например, подсветка в микроскопе) необходимо обратиться к преподавателю (лаборанту). Чинить самостоятельно приборы запрещается.

Необходимо ставить **электронагревательные приборы** не на деревянную поверхность стола, а только на теплоизоляционный слой (асбест и др.).

Нельзя ставить на **электроплитку** мокрые колбы и стаканы для нагревания, а также на разогретую плитку холодные колбы и другую стеклянную посуду (даже термостойкую).

Во избежание ожогов при нагревании и прокаливании никогда не следует брать голыми руками нагретые колбы, стаканы, чашки и пр., их необходимо обернуть полотенцем. Также следует принимать меры предосторожности при вытаскивании колбы с кипящей агарозой из **микроволновой печи**, так как при встряхивании колба может резко вскипеть и можно обжечься.

При работе с **водяной баней** нельзя пробовать степень нагрева воды рукой, необходимо следить за тем, чтобы в ней всегда была вода и выставлена нужная температура.

**Шейкер** должен быть заземлен и установлен на ровной горизонтальной поверхности в отдельном помещении.

Включать шейкер следует после правильного и прочного закрепления колб в гнездах, балансирования ее правильной установкой колб. Необходимо убедиться в исправности шейкера, осмотрев при этом все узлы и крепежные детали. По окончании работы следует: отключить шейкер-качалку от электросети и снять колбы; произвести запись в рабочем журнале о замеченных отклонениях в работе.

Запрещается: устанавливать колбы без амортизационных колец; производить запуск шейкера без проверки масла в подшипниках; работать на неисправном и незаземленном шейкере; устанавливать число оборотов выше указанного в паспорте.



Перед тем как проводить центрифугирование, необходимо обратить внимание, какие пробирки подходят к установленному ротору и какие адаптеры нужно установить. Прежде чем поместить центрифужные пробирки в *центрифугу*, их необходимо уравновесить. Не следует останавливать ротор центрифуги рукой.

**Работы с химическими реактивами** требуют аккуратности и соблюдения правил техники безопасности:

Опыты с **ядовитыми веществами** и веществами, которые имеют сильно выраженный запах, можно проводить только в вытяжном шкафу.

Работа с **горючими и легковоспламеняющимися веществами**, горючими жидкостями должна проводиться в вытяжном шкафу и только при включенной вентиляции и при выключенных электроприборах и газовых горелках.

Перегонять и нагревать низкокипящие огнеопасные вещества (ацетон, бензол, эфиры, спирты и т.д.) необходимо в круглодонных колбах, изготовленных из тугоплавкого стекла на водяных или масляных банях, пользуясь при этом обратным холодильником в зависимости от температуры кипения данного вещества.

Отработанные горючие жидкости собирают в специально герметично закрывающуюся тару, которую в конце рабочего дня должны выносить из лаборатории для регенерации или уничтожения этих жидкостей. Для этих целей должны быть разработаны инструкции. **Спуск горючих жидкостей в канализацию запрещается!!!**

В случае разлива огнеопасных жидкостей необходимо немедленно выключить нагревательные приборы. Жидкость следует засыпать песком, который затем убрать деревянным совком и лопатой.

Все работающие с концентрированными *едкими щелочами и кислотами* по приготовлению растворов фенола, формалина, перекиси водорода, хлорамина и др. обязаны пользоваться защитными очками, резиновыми перчатками, прорезиненным фартуком и сапогами.

Запрещается ходить по лаборатории с концентрированными кислотами и щелочами, наливать их нужно только в отведенном для этого месте и необходимо внимательно следить за тем, чтобы реактивы не попадали на лицо, руки и одежду.

При приготовлении растворов серной, азотной и других кислот их необходимо вливать в воду тонкой струйкой при непрерывном помешивании. Доливать воду в кислоту запрещается!!!

При разбавлении концентрированной серной кислоты, смешивании концентрированных серной и азотной кислот и вообще при смешивании веществ, сопровождающемся выделением тепла, пользоваться только толстостенной химической или фарфоровой посудой. Расфасовка кислот производится с применением специальных сифонов и насосов.

Недопустимо засасывать кислоты в пипетку ртом. Для наполнения пипеток следует пользоваться резиновой грушей или другим приспособлением.

Растворять твердые щелочи следует путем медленного добавления их небольшими кусочками к воде при непрерывном перемешивании. Кусочки щелочи нужно брать только щипцами.

Отработанные кислоты и щелочи собираются в специальную посуду, и после нейтрализации сливаются в канализацию или в специально отведенное место. Минеральные кислоты нейтрализуют окисью магния или порошкообразной гашеной известью. Отработанные растворы минеральных кислот и едких щелочей допустимо дегазировать путем их смешивания, прибавляя небольшими порциями более концентрированный раствор к менее концентрированному. Средствами для нейтрализации пролитой щелочи служит борная кислота или уксусная эссенция (одна часть эссенции на восемь частей воды), для кислот – 5%-ный раствор соды.

Разлитые кислоты или щелочь необходимо немедленно засыпать песком или нейтрализовать, после чего провести влажную уборку.

При переливании жидкости нужно использовать воронки.

На всех банках, склянках и на любой другой посуде, в которой хранятся вещества, должны быть указаны их химическое название, молекулярная формула, данные фирмы-производителя, условия хранения, дата, до которой продукт годен к употреблению.

Не следует оставлять открытыми банки с реактивами.

Не загрязнять реактивы во время работы (не путать пробки от склянок, содержащих разные реактивы; избыток взятого реактива не выливать обратно в склянку; пользуясь пипеткой, набирать каждый реактив только предназначенной для этого пипеткой, ни в коем случае не путать их).

Категорически запрещается пробовать химические вещества на вкус. Нюхать вещества можно лишь осторожно, не вдыхая волной грудью, не наклоняясь над сосудом, а направляя к себе пары или газ движением руки.

Сухие реактивы брать с помощью лопаток, пластмассовых или металлических шпателей. Шпатель должен быть всегда сухим и чистым. После расхождения следует его тщательно обтереть. Если реактив «слежался», чтобы его извлечь из банки, используют шпатель (вымытый и прокалённый).

Нельзя держать банку или стакан с реактивом, ее надо поставить на лабораторный стол и только после этого открывать.

При наливания реактивов нельзя наклоняться над сосудом, предотвращая попадание брызг на лицо или одежду.

Если к работе не дано указаний относительно дозировки реактивов, то брать их для проведения опытов необходимо в возможно меньшем количестве.

Для взвешивания химических веществ нужно учитывать диапазон и точность **весов**. С весами нужно обращаться всегда очень осторожно. Без нужды не следует переставлять весы с места на место.

Весы и место около них всегда должны быть чистыми. Если при взвешивании весы случайно окажутся загрязненными, надо немедленно вытереть их (**ни в коем случае не сдуть!!!**). Нужно аккуратно снять чашку (и, если надо, верхний кожух весов); кожух вымыть и насухо протереть; весы протереть влажной тряпкой/салфеткой, насухо вытереть; всё собрать.

Для взвешивания всегда надо пользоваться какой-либо тарой или калькой. Нельзя насыпать непосредственно на чашку весов никаких веществ.

Легколетучие реактивы (такие как РНК-азы, ДНК-азы, протеиназы, бактериальные среды, SDS) взвешиваются с предосторожностями только под тягой, чтобы не загрязнить «окружающую среду».

Особая предосторожность и аккуратность необходимы при работе с **ферментами**, так как это самый уязвимый компонент реакции, требующий определённых рН, соли и температуры. Поэтому он вносится в последнюю очередь, когда все остальные компоненты уже добавлены и **смешаны!!!** В реакцию нужно брать точно указанные (или только чуть большие) количества ферментов. Слишком большие количества ферментов опасно брать в реакцию, так как все ферменты содержат примеси, и иногда избыток фермента не только бесполезен, но и вреден.

Работать нужно с небольшими аликвотами ферментов, а не с исходными пробирками (если с ферментом что-то случится (загрязнение, инактивация), то будет потеряна лишь часть).

Пробирки с растворами ферментов следует хранить в надёжном морозильнике, извлекать из морозильника непосредственно перед внесением и как можно быстрее убирать обратно.

Пробирку с ферментом следует держать пальцами с боков на том уровне, на котором раствора фермента нет. На время проведения работ 0,2–0,5 мл эппендорф с ферментом можно помещать в охлаждённый эппендорф большего объема (например, 1,5 мл) и использовать его как адаптер или помещать в криоштатив (можно обыкновенный штатив для эппендорфов ставить на лед).

Перед тем как открыть пробирку, нужно кратковременным (~2–5") центрифугированием на вортexe сбросить её содержимое на дно.

Для проведения работ в биологических лабораториях используют **стеклянную и пластиковую посуду**.

Пластиковая посуда (чашки Петри, наконечники для автоматических пипеток-дозаторов, пробирки-эппендорфы, центрифужные пробирки и т.д.) выпускается из пластика разного типа, поэтому нужно обращать внимание на маркировку, чтобы знать, какие химические вещества, реагенты и агрессивные смеси данный пластик выдерживает.

Стеклопосуда всегда должна быть чисто вымыта и ополоснута дистиллированной водой.

Запрещается пользоваться разбитой или треснувшей посудой, ставить её непосредственно на огонь и убирать битое стекло незащищенными руками. Битое стекло следует складывать в специально отведенную емкость.

Все работы со стеклянной посудой необходимо проводить в защищенных очках. Во избежание травмирования рук при работе со стеклом руки защищают полотенцем или куском материи.

При смешивании или разбавлении веществ, сопровождаемых выделением тепла, следует пользоваться термостойкой стеклянной или фарфоровой посудой. Нагретый сосуд нельзя закрывать притертой пробкой до тех пор, пока он не охладится.

Во избежание ожогов при нагревании и прокаливании никогда не следует брать голыми руками нагретые колбы, стаканы, чашки и пр., их необходимо обернуть полотенцем. Нагретые колбы нельзя ставить на холодную (мокрую, металлическую) поверхность. Переноса сосуды с горячей жидкостью, надо держать их двумя руками: одной – за дно, другой – за горловину, используя при этом полотенце (чтобы избежать ожогов кистей и пальцев рук).

Размешивать реакционную смесь в сосуде стеклянной палочкой или шпателем надо осторожно, не допуская разлома сосуда, при этом необходимо держать сосуд за горловину.

Любая посуда (пробирки, колбы, стаканы, чашки Петри и пр.), с которой проводятся работы, должна быть подписана. Чаще всего чашки Петри подписываются только снизу (со стороны агара), чтобы не перепутать их, если приходится работать одновременно с двумя чашками. Обычно чашка Петри подписывается два раза.

Первый раз при заливке указываются:

- 1) среда;
- 2) гормоны, антибиотики и другие добавки;
- 3) дата (число и месяц).

Второй раз при высева культуры (калусной культуры растений, бактерий) указываются:

- 4) название культуры, микроорганизмов, плазмиды или библиотеки;
- 5) дата посева.

# ОКАЗАНИЕ ПЕРВОЙ ПОМОЩИ ПРИ НЕСЧАСТНЫХ СЛУЧАЯХ

## Меры первой помощи при ожогах

При термических ожогах на обожженное место нужно положить вату, смоченную слабым раствором марганцовокислого калия.

## Меры первой помощи при порезе

В случае пореза стеклом нужно сначала внимательно осмотреть рану и извлечь из нее осколки стекла, если они есть, а затем обмыть раненное место 2%-ным раствором перманганата калия, смазать йодом и завязать бинтом или заклеить лейкопластырем.

## Меры первой помощи при отравлениях неорганическими веществами

**Азотная кислота.** Свежий воздух, покой, тепло. Вдыхание кислорода. Сульфадимезин или иной сульфаниламидный препарат (2 г), аскорбиновая кислота (0,5 г), кодеин (0,015 г). Искусственное дыхание. Консультация врача.

**Серная кислота.** Свежий воздух. Промыть верхние дыхательные пути 2%-ным раствором питьевой соды. В нос – 2–3 капли 2%-ного раствора эфедрина. Теплое молоко с содой, кодеин (0,015 г) или дионин (0,01 г). При попадании в органы пищеварения смазать слизистую рта 2%-ным раствором дикаина. Промывание желудка большим количеством воды. Внутрь принять: столовую ложку оксида магния на стакан воды каждые 5 мин, яичный белок, молоко, крахмальный клейстер, кусочки сливочного несоленого масла, кусочки льда. Нельзя вызывать рвоту и применять карбонаты. Консультация врача.

При попадании на кожу или одежду кислоты надо смыть ее большим количеством воды, а затем 3–5%-ным раствором питьевой соды или разбавленным раствором аммиака.

**Щелочи.** Вдыхание теплого водяного пара (в воду добавить немного лимонной кислоты). Внутрь – теплое молоко с медом, кодеин (0,015 г) или дионин (0,01 г). Горчичники. При попадании в органы пищеварения смазать слизистые оболочки рта и горла 1%-ным раствором новокаина.

Внутрь – по столовой ложке 1%-ного раствора лимонной кислоты каждые 3–5 мин, крахмальный клейстер с добавлением лимонной или уксусной кислоты, 2–3 столовые ложки растительного масла, кусочки льда. Консультация врача.

При попадании на кожу или одежду щелочи, после смывания ее большим количеством воды, нужно провести обработку 2–3%-ным раствором борной, лимонной или уксусной кислот.

### **Меры первой помощи при отравлениях органическими веществами**

При отравлении эфиром, хлороформом, спиртом: свежий воздух; внутрь 0,03 г фенамина, или 0,1 г коразол, или 30 капель кордиамина, или 0,5 г камфоры. Искусственное дыхание и вдыхание кислорода.

### **Меры первой помощи при поражении электрическим током**

Если пострадавший остается в соприкосновении с токоведущими частями, необходимо немедленно выключить ток с помощью пускателя, или вывернуть охранную пробку, или перерубить токопроводящий провод изолированным инструментом. Пострадавшего, пока он находится под током, нельзя касаться незащищенными руками (без резиновых перчаток). Если пострадавший потерял сознание, после выключения тока нужно немедленно, не дожидаясь врача, делать искусственное дыхание.

#### ***Общие требования к проведению работ:***

1. Необходимо рационально строить свою работу.
2. Все работы проводить точно и аккуратно.
3. Работать следует быстро, но без спешки, которая неизбежно приводит к порче поставленного опыта.

Лабораторный стол нужно содержать в чистоте и не загромождать лишней посудой, реактивами, посторонними предметами.

Выполнять работы в специально отведенных помещениях и на специальном оборудовании.

По окончании работы необходимо привести в порядок лабораторный стол.

Реактивы необходимо расходовать экономно.

Не принимать пищу в лабораторных помещениях и из лабораторной посуды.

Работу с легковоспламеняющимися химическими веществами следует проводить в резиновых перчатках, прорезиненных фартуках и защитных очках, защитной маске.

Во всех лабораториях всегда должны быть ящики с песком, огнетушители и противопожарные одеяла.

Прежде чем приступить к работе, нужно ознакомиться с методикой выполнения и с соответствующими специальными правилами по эксплуатации оборудования или приборов.

Категорически запрещается оставлять действующие приборы без наблюдения.

Запрещается входить в лабораторию в верхней одежде.

Работать в биохимической лаборатории допускается только в специальном халате, так как вероятна возможность загрязнения, порчи одежды при попадании на нее едких реактивов.

# **ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ**



## **Раздел 1. Создание кассет экспрессии чужеродных генов – первый этап в получении генетически модифицированных (трансгенных) растений**

### **1.1. Ферменты, используемые в генной инженерии**

Для создания кассет экспрессии, включающих целевые, маркерные и репортерные гены, а также их регуляторные элементы, используются различные ферменты и методы. В генетической инженерии основными инструментами молекулярного манипулирования являются ферменты, которые можно разделить на три основные группы:

**1. Ферменты, фрагментирующие нуклеотидные последовательности – нуклеазы.** Эти ферменты катализируют гидролитическое расщепление фосфодиэфирных связей в молекулах нуклеиновых кислот с образованием 3'-гидроксильной или 5'-гидроксильной группы. Нуклеазы, расщепляющие молекулы ДНК, получили название ДНКазы, соответственно нуклеазы, расщепляющие РНК, – РНКазы. Известны нуклеазы, способные расщеплять как ДНК, так и РНК. Нуклеазы, катализирующие гидролитическое расщепление фосфодиэфирных связей внутри молекулы ДНК, а также кольцевые молекулы ДНК относятся к эндонуклеазам. При использовании эндонуклеаз исследователи получают набор полинуклеотидных фрагментов различной длины. Экзонуклеазы расщепляют нуклеотидные последовательности с концов цепей, причем некоторые экзонуклеазы способны отщеплять по одному нуклеотиду, тогда как другие – олигонуклеотиды.

В генетической инженерии широко используется особая группа ферментов – эндонуклеазы рестрикции, или рестриктазы. Эти ферменты способны распознавать в молекулах ДНК определенные полинуклеотидные последовательности, которые называются сайтами рестрикции. Рестриктазы с различными сайтами узнавания являются основным инструментом в генетической инженерии. Обычно для расщепления (фрагментации) молекул ДНК используются рестриктазы, распознающие в большинстве случаев палиндромные последовательности, состоящие из 4–8 нуклеотидов. Например, рестриктаза *EcoRI* распознает последовательность нуклеотидов, расположенных в каждой из цепей на равном расстоянии от оси симметрии и комплементарных друг другу (5'-GAATTC-3'). При фрагментации молекул ДНК с использованием ферментов рестриктаз могут образовываться фрагменты с «тупыми» и «липкими» концами.

Если точки расщепления противоположных цепей ДНК в сайте рестрикции смещены друг относительно друга, то в образующихся фрагментах ДНК будут присутствовать выступающие одноцепочечные участки. Такие фрагменты ДНК могут взаимодействовать друг с другом в силу их комплементарности самим себе и друг другу, поэтому их называют «липкими». В «липких» концах выступающим одноцепочечным участком может быть как 5'-, так и 3'-конец. Если точки расщепления обеих цепей ДНК в сайте рестрикции расположены непосредственно друг под другом, то после расщепления молекулы ДНК образуются «тупые» концы, в которых нет выступающих одноцепочечных участков ДНК.

С помощью рестриктаз исследователи могут расщепить молекулы ДНК на фрагменты различной длины – от нескольких сотен до нескольких тысяч оснований. Полученные фрагменты разного размера далее можно разделить с помощью электрофореза в агарозном геле, учитывая, что скорость перемещения фрагментов при электрофоретическом разделении обратно пропорциональна их размерам. После разделения фрагменты ДНК можно элюировать из геля и использовать для дальнейших исследований по определению первичной структуры ДНК и генно-инженерного конструирования.

### ***Работа 1. Гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции***

Оптимальные предельные условия работы каждой рестриктазы описаны в каталогах и на сайтах фирм – производителей ферментов. Исходя из этих сведений, для составления реакции рестрикции выбирается буфер (как правило, наиболее подходящий буфер поставляется фирмой вместе с рестриктазой, в отдельной пробирке), температура проведения реакции и необходимость добавления в реакцию сопутствующих веществ (например, бычий сывороточный альбумин). Ниже даны схема проведения гидролиза и состав реакционной смеси для расщепления плазмидной дцДНК рестриктазой *Bam*HI («СибЭнзим»).

***Материалы и оборудование:*** центрифуга Biosan Combo-Spin FVL-2400N, центрифуга Eppendorf, камера для электрофореза, заливочный столик с гребенками, микроволновая печь или плитка, магнитная мешалка, якорек для магнитной мешалки, источник тока, трансиллюминатор для агарозно-этидиевых гелей, компьютер с установленной программой BioDoc, автоматические пипетки (0,1–10 мкл, 10–100 мкл, 1 мл), наконечники универсальные (0,1–10 мкл, 100–200 мкл, 1 мл), мерные цилиндры

дры (1 000 мл – 1 шт., 50 мл – 1 шт.), мерный стакан (100 мл – 1 шт., 1000 мл – 1 шт.), колба мерная (1 л – 1 шт.), пробирки пластиковые «Eppendorf» объемом 1,5 мл универсальные, штатив для микропробирок на 1,5–2 мл, лента лабораторная «Parafilm M», 6×DNA Loading Dye (краситель – 6×MassRuler™, раствор с красителями для нанесения образцов на гель), раствор бромистого 10 мг/мл этидия, Gene ruler 100 п.н. Plus DNA Ladder 0,5 мкг/мкл, дцДНК, MgCl<sub>2</sub>, Tris-HCl, ЭДТА, CH<sub>3</sub>COOH (ледяная), дистиллированная вода, NaCl, DTT, фермент *VamHI*, агароза, 10×ТАЕ буфер, перчатки латексные или нитриловые, маркеры.

### ***Ход работы:***

Приготовить необходимый набор посуды, инструментов и материалов в лаборатории. Для проведения реакции гидролиза ДНК предварительно подготовить реакционную смесь, суммарный объем которой составляет 100 мкл. Для этого к 20 мкг дцДНК добавить 10 мкл буфера SE-G (состав буфера: 10 мМ Tris-HCl (рН = 7,6 при 25°C); 10 мМ MgCl<sub>2</sub>; 50 мМ NaCl; 1 мМ DTT), 3–5 ед. а. фермента *VamHI* и довести объем дистиллированной водой до 100 мкл. Смесь перемешать на «vortexe», центрифугировать в течение 5 с при 8 000 об./мин и инкубировать в термостате в течение 1 ч при 37°C.

Все операции проводить на лабораторном столе, ферменты либо поместить в лед, либо кратковременно извлекать из морозильной камеры.

Для контроля полноты проведения гидролиза провести электрофорез в 0,8%-ном агарозном геле аликвоты реакционной смеси (5 мкл) и 1 мкл раствора интактной плазмиды (0,5 мкг/мкл). Остальную реакционную смесь заморозить, впоследствии с этой ДНК проводят препаративный электрофорез, элюируют ее из геля и используют для лигирования с целевым фрагментом (описано ниже).

Приготовить 10-кратный ТАЕ (40 мМ Tris – 12,1 г/л; 40 мМ CH<sub>3</sub>COOH – 11 мл/л; 2 мМ ЭДТА – 3,7 г/л). Для этого в стакан на 100 мл налить 2/3 необходимого объема воды, добавить туда навески солей, ледяную уксусную кислоту (**ЭДТА очень плохо растворяется в щелочной среде**), и перемешать раствор на магнитной мешалке до растворения кристалликов солей. Затем переместить раствор в мерную колбу и долить воды до риски, как это полагается делать для нецветных растворов (лишь ниже риски).

100 мл 10-кратного ТАЕ развести в десять раз в мерной колбе, часть буфера залить в форезную камеру (около 500 мл, но зависит от размера камеры). В мерный стакан на 100 мл наливают 50 мл однократного ТАЕ, добавляют 0,4 г агарозы. Гель варить в микроволновой печи при мощно-

сти 500 В – 1 мин (**Не использовать фольгу в качестве крышки для стакана!!!**) или на водяной бане, на плитке до полного растворения крупинки агарозы. Гель остудить до 60–50°C, добавить 1 мкл раствора бромистого этидия и залить в заливочную форму (как правило, размер геля 15×10 см), использовать гребенку, которая формирует карман объемом до 20 мкл.

Пока агарозный гель застывает провести подготовку пробы ДНК – на ленту «Parafilm M», нанести 2 мкл красителя фирменного или 0,25%-ного бромфенолового синего, 30% (вес/объем) глицерина в воде. Затем к каплям красителя добавить 5 мкл ДНК, перемешать пипетированием. После застывания геля пробы нанести в отдельные карманы. Электрофорез проводить 15 мин при напряжении 2 В/см. В случае успешного проведения работы в трансиллюминаторе в УФ-лучах (290–330 нм) на электрофореграмме можно будет увидеть дорожки с продуктом гидролиза ДНК (рис. 2). **Внимание, не включать с трансиллюминатор без закрытого защитного щитка или очков, иначе можно получить ожог роговицы глаз!!!**

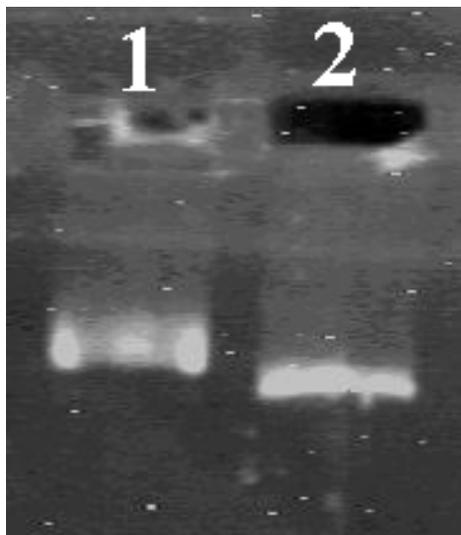


Рис. 2. Электрофорез плазмиды pB1121 в агарозном 0,8%-ном геле: дорожка 1 – интактная плазида; дорожка 2 – плазида, обработанная эндонуклеазой рестрикции *Bam*HI

**2. Ферменты, синтезирующие ДНК на матрице ДНК или РНК.**  
В генетической инженерии для синтеза ДНК на матрице ДНК или РНК

используются ДНК-полимераза I и обратная транскриптаза (ревертаза). Благодаря полимеразной и 5'-3'- и 3'-5'-экзонуклеазным активностям ДНК-полимераза I способна заполнять бреши (разрывы) в ДНК и превращать «липкие» концы в «тупые». Ревертаза используется для получения кДНК на основе обратной транскрипции иРНК в комплементарную ДНК.

**3. Ферменты, лигирующие фрагменты ДНК, – лигазы.** В генетической инженерии для лигирования (связывания) фрагментов молекул ДНК часто используется ДНК-лигаза фага Т4. Этот фермент способен катализировать лигирование одноцепочечных разрывов, липких концов и двухцепочечных фрагментов ДНК с тупыми концами. ДНК-лигазы катализируют образование фосфодиэфирных связей между 5'-фосфатной и 3'-гидроксильной группами соседних дезоксирибонуклеотидов.

## *Работа 2. Лигирование*

**Материалы и оборудование:** центрифуга Biosan Combo-Spin FVL-2400N, автоматические пипетки (0,1–10 мкл, 10–100 мкл, 1 мл), наконечники универсальные (0,1–10 мкл, 100–200 мкл, 1 мл), пробирки пластиковые «Eppendorf» объемом 1,5 мл, криоштатив для пробирок объемом 1,5–2 мл, таймер, холодильник, лигаза Т4 с буфером, маркеры.

### ***Ход работы:***

ДНК вектора (0,2 мкг) гидролизовать эндонуклеазами рестрикции, смешать с эквимольным количеством ДНК целевого фрагмента (например, кДНК), предварительно гидролизованной соответствующими эндонуклеазами рестрикции. **Сайты рестрикции целевого фрагмента подбираются таким образом, чтобы они располагались только по флангам нуклеотидной последовательности и с учетом комплементарности липких концов в векторной ДНК.**

К смеси фрагментов ДНК добавить 5 ед. а. ДНК-лигазы фага Т4 и одну десятую часть от объема реакционной смеси лигазного буфера (10×; состав буфера: 10 mM Tris-HCl (pH = 7,6 при 25°C); 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM NaCl; 1 mM DTT). Полученную смесь инкубировать в течение 30 мин при комнатной температуре или в течение 12 ч при 4°C.

## **1.2. Клонирование генов для генно-инженерного конструирования**

Гены, необходимые для переноса в растительный геном и создания генетически модифицированных или трансгенных растений, могут быть получены двумя путями: в результате их химического синтеза или путем выделения из природных источников. Химический синтез генов возможен только при условии того, что известен нуклеотидный состав (первичная структура) того или иного гена или первичная структура кодируемого геном полипептида.

Из природных источников ген может быть амплифицирован с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) или с использованием обратной транскрипции. Для выделения гена с помощью ПЦР необходимо иметь матрицу (последовательность нуклеотидов) амплифицируемого гена и набор праймеров, комплементарных к фланговым районам этого гена.

Для выделения гена с помощью обратной транскрипции из растительных клеток выделяют иРНК соответствующего гена и используют ее в качестве матрицы для фермента ревертазы. Синтезированная таким образом нуклеотидная последовательность (кДНК) будет отличаться от природного гена отсутствием интронов и регуляторных последовательностей.

Гены также могут быть получены из уже созданных геномных библиотек, которые представляют собой совокупность фрагментов геномной ДНК какого-либо организма или из библиотек кДНК. Общая схема создания библиотеки состоит в том, что геномную ДНК разделяют на фрагменты различной длины с помощью ферментов рестрикции. Затем полученные фрагменты ДНК встраивают в плазмиды, которые вводят в бактериальные клетки. При размножении бактерий число копий плазмид, содержащих встроенный фрагмент ДНК, будет многократно увеличено. С использованием молекулярных зондов из отдельных бактериальных клонов выделяют те, в плазмидных ДНК которых содержится искомым фрагмент.

## **1.3. Введение генов в вектор, обеспечивающий их доставку в клетки растений**

Для доставки чужеродных генов в геном растительной клетки используются специальные векторы – молекулы ДНК, обладающие следующими важными характеристиками. Вектор должен иметь точку начала репликации (ori), т.е. автономно реплицироваться, накапливаться в много-

численных копиях в клетке хозяина и сохраняться в дочерних клетках при делении материнской. Емкость вектора должна быть достаточной для того, чтобы встраивать в него гены и включать для этого сайты рестрикции. Векторы, включающие чужеродные гены, называются рекомбинантными. Для отбора клеток, содержащих рекомбинантный вектор, в него должны быть включены маркерные гены. Для доставки чужеродных генов в клетки растений используют векторы, созданные на основе вирусов и плазмид почвенных бактерий.

Чужеродная ДНК может быть интегрирована в структуру вектора несколькими способами. Например, вектор и чужеродную ДНК, из которой предполагается получить необходимый фрагмент, разрезают с помощью одной и той же рестриктазы. В результате этого образовавшиеся «липкие» концы вектора и ДНК-вставки будут комплементарны друг другу. При их смешивании в присутствии ДНК-лигазы происходит объединение вектора и ДНК-вставки с образованием рекомбинантного вектора. Рекомбинантные векторы также могут быть получены после их разрезания с образованием «тупых» концов и последующим лигированием с чужеродной ДНК с помощью ДНК-лигазы фага T4 по тупым концам.

### ***Работа 3. Выделение плазмидной ДНК в аналитических количествах***

***Материалы и оборудование:*** центрифуга Biosan Combo-Spin FVL-2400N, центрифуга Eppendorf 5415, рН-метр, весы, холодильник, морозильная камера на  $-70^{\circ}\text{C}$ , термостат, термостатируемый шейкер, термостат твердотельный, поддерживающий температуру  $+20\div+95^{\circ}\text{C}$ , автоклав, водоструйный насос, ламинар-бокс, автоматические пипетки (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл, 1–5 мл), мерные цилиндры, колба (50 мл – 1 шт.), стерильные пробирки (3 шт.), пробирки пластиковые «Eppendorf» объемом 1,5 мл, наконечники универсальные (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100 – 1 000 мкл, 1–5 мл), криоштатив для пробирок объемом 1,5–2 мл, лента лабораторная «Parafilm M», таймер, лед, спиртовка, спички, 96%-ный этиловый спирт, 70%-ный этиловый спирт для протирания столешницы, вата, бактериальная петля, фарфоровый стакан, чашки Петри с бактериальными колониями, содержащими плазмидную ДНК; жидкая среда LB, буфер TE $\times$ 1, 3 M NaOAc (pH =5), ЭДТА, глюкоза, изопропанол, Tris, 10 M LiCl, 1% SDS, 5 M NaOH, маркеры.

### *Ход работы:*

Приготовить жидкую среду LB (10 г/л бакто-триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта и 5 г/л NaCl довести 5 М NaOH до pH = 7,4, автоклавируют при 1,2 атм (что соответствует 127°C) в течение 1 ч). Затем в остывшую среду в условиях ламинар-бокса внести соответствующее количество антибиотика и разлить в стерильные пробирки по 5 мл.

Отдельную бактериальную колонию, содержащую плазмидную ДНК, засеять в 5 мл жидкой среды LB и инкубировать 14–16 ч в термостатируемой качалке 180 об./мин при температуре 37°C. С этой стадии можно работать на лабораторном столе. Аликвоту культуры (1,5 мл) перенести в полипропиленовую пробирку Eppendorf (1,5 мл объемом) и центрифугировать 10 с при 8 000 об./мин в центрифуге Eppendorf 5415, супернатант слить, а пробирку с осадком поместить в лед. Затем добавить 100 мкл раствора 1 и суспендировать осадок на встряхивателе, инкубировать 5 мин во льду.

На следующей стадии добавить 200 мкл раствора 2, осторожно перемешать и инкубировать 5 мин при комнатной температуре. Затем в пробирку добавить 200 мкл раствора 3, встряхнуть и инкубировать во льду 30 мин. После этого содержимое пробирки центрифугировать 10 мин при 8 000 об./мин.

Супернатант слить через край в пробирку, содержащую 600 мкл изопропанола, встряхнуть на Vortex и центрифугировать 5 мин при 8 000 об./мин. Супернатант удалить водоструйным насосом или пипеткой, осадок промыть 70%-ным этанолом и подсушить на воздухе, добавить 50 мкл буфера TE×1 (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH = 8,0), суспендировать осадок на Vortex. На следующей стадии добавить 50 мкл 10 M LiCl, встряхнуть на Vortex и инкубировать 5 мин при –70°C, затем центрифугировать 5 мин при 8 000 об./мин, супернатант перенести в пробирку содержащую 150 мкл изопропанола, встряхнуть на Vortex и центрифугировать 5 мин при 8 000 об./мин. Супернатант отобрать водоструйным насосом, а осадок растворить в 100 мкл 0,3 M NaOAc (pH = 7) и добавить 96%-ный этиловый спирт до 1,5 мл, инкубировать 10 мин при –20°C и затем центрифугировать 5 мин при 8 000 об./мин. Супернатант отобрать водоструйным насосом, промыть 70%-ным этиловым спиртом, подсушить в течение 10 мин на воздухе и растворить в 100–150 мкл буфера TE×1. Рестрикцию выделенной плазмиды проводят по протоколу, описанному ранее (работа 1), нарабатывают ДНК-фрагмент с использованием метода ПЦР (работа 16) и проводят лигирование наработанного ДНК-фрагмента и линеализованного вектора согласно протоколу (работа 2).

### **Растворы для выделения плазмидной ДНК:**

**Раствор 1:** 10 мМ EDTA; 25 мМ Tris (именно Tris – ни в коем случае не Tris–HCl, так как Tris–HCl дает кислую реакцию) и 50 мМ глюкозы pH = 8,0.

**Раствор 2:** 0,2 М NaOH и 1% SDS.

**Раствор 3:** 3 М KOAc, pH = 5,0.

Лигазной смесью, в состав которой входят векторные плазмиды, содержащие интегрированный чужеродный ген, трансформируют бактериальные клетки *E. coli*. Методы трансформации *E. coli* были разработаны в конце 70-х – начале 80-х гг. XX в. С тех пор они являются неотъемлемой частью практически всех молекулярно-биологических работ. В настоящее время используется как химическая трансформация, так и электропорация. Каждый из этих методов имеет свои достоинства и свои недостатки, которые надо учитывать при планировании эксперимента по введению ДНК в клетку *E. coli*.

В основу создания методов химической трансформации положено представление о том, что клетки *E. coli* и ДНК эффективно взаимодействуют друг с другом при низких температурах в среде, содержащей двухвалентные катионы. Частота трансформации повышается (порой на порядки) различными способами, например при помощи теплового шока и введения в среду моновалентных катионов.

Явление электропорации основано на том, что мембраны обладают способностью концентрировать электрическое поле. При помещении суспензии клеток в электрическое поле с напряженностью от нескольких сотен до нескольких тысяч вольт на квадратный сантиметр площади и продолжительностью воздействия в течение промежутка времени от десятков микросекунд до десятков миллисекунд удается индуцировать резкое возрастание проводимости клеточных мембран. Установлено, что пребывание клеток в электрическом поле способствует переносу через мембраны макромолекул, размер которых превышает диаметр пор. Таким образом, методом электропорации плазмидную ДНК можно вводить в клетку *E. coli*. Для выполнения этой процедуры необходим электропоратор.

Если сравнивать вышеперечисленные методы между собой, то более дешевым в исполнении является метод химической трансформации, а более эффективным – метод электропорации – обычно частота трансформации клеток (число колоний, образующихся в расчете на 1 мкг плазмиды рBR322) при электропорации составляет  $10^8$ – $10^9$ , в то время как при химической трансформации –  $10^3$ – $0,5 \times 10^8$ . Оба метода крайне чувствительны к качеству воды, используемой для приготовления растворов. Кроме того, для электропорации необходима дополнительная очистка проб ДНК.

За годы, в течение которых *E. coli* являлась «рабочей лошадкой» молекулярной биологии, получены сотни штаммов этой бактерии. Далеко не все они пригодны для амплификации целевых генно-инженерных конструкций. При работе с рекомбинантными ДНК существенным является отсутствие рекомбинации в процессе деления клетки (иначе чужеродные фрагменты будут «выбрасываться» из плазмиды). Кроме того, штамм должен характеризоваться низкой частотой мутагенеза. Для того чтобы выбрать штамм, необходимо обратиться к каталогам фирм, поставляющих *E. coli*, в которых обычно описаны генотипы штаммов. Наиболее часто в генетической инженерии используют следующие штаммы: JM-109, XL-2, XL-10 (GOLD).

#### ***Работа 4. Приготовление компетентных клеток E. coli***

**Материалы и оборудование:** центрифуга Biosan Combo-Spin FVL-2400N, центрифуга с охлаждением на 8 000 об./мин, стаканы для ротора на 50 мл, pH-метр, ламинар-бокс, весы, холодильник, низкотемпературный холодильник на  $-70^{\circ}\text{C}$ , термостат, термостатируемый шейкер, термостат твердотельный, поддерживающий температуру  $+20\text{--}+95^{\circ}\text{C}$ , электрическая плитка, автоклав, водоструйный насос, спектрофотометр, кюветы, автоматические пипетки (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1000 мкл, 1–5 мл), мерные цилиндры (100 мл – 1 шт.), мерные колбы (50 мл – 1 шт.; 100 мл – 1 шт.), мерные стаканы (50 мл – 1 шт.; 100 мл – 1 шт.), пробирки пластиковые «Eppendorf» объемом 1,5 мл, перчатки латексные или нитриловые, наконечники универсальные (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл, 1–5 мл), бактериальные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм, стерильные шприцы, криоштатив для пробирок объемом 1–2 мл, таймер, лед, чашки Петри с бактериальными колониями, содержащими плазмидную ДНК; жидкая среда LB, спиртовка, спички, 96%-ный этиловый спирт, 70%-ный этиловый спирт для протирания столешницы, вата, бактериальная петля, фарфоровый стакан, лента лабораторная «Parafilm M», MOPS, 10 М LiCl, 0,2 М ледяная  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 15%-ный раствор глицерина, KCl,  $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 5 М NaOH, маркеры.

#### ***Ход работы:***

Отдельную бактериальную колонию засеять в 5 мл среды LB (10 г/л бакто-триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта и 5 г/л NaCl довести 5 М NaOH до pH = 7,4, автоклавировать при 1,2 атм ( $127^{\circ}\text{C}$  в течение 1 ч) 14–

16 ч в термостатированной качалке 180 об./мин при температуре 37°C. Утром 500 мкл этой культуры засеять в 50 мл LB и подрастить до оптической плотности  $D_{560} = 0,8$ . Перенести в центрифужные пробирки, охладить во льду в течение 30 мин. Центрифугировать клетки при 4°C 3 000 об./мин в течение 5 мин. Супернатант тщательно удалить, а осадок аккуратно ресуспендировать в 15 мл буфера RF-1. Инкубировать во льду 15 мин и центрифугировать клетки при 4°C и 3 000 об./мин в течение 5 мин. Супернатант тщательно удалить. Осадок очень мягко ресуспендировать в 3 мл буфера RF-2 и инкубировать во льду 15 мин. Клетки расфасовать пипеткой со стерильным наконечником, у которого срезан кончик, в 1,5 мл охлажденные пробирки по 100 мкл и сразу поместить в низкотемпературный холодильник на  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Все работы, кроме центрифугирования и подращивания на качалке проводить в ламинарном боксе.

**Раствор RF-1:**

- 100 мМ KCl (0,74 г на 100 мл);
- 50 мМ  $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  (0,9 г на 100 мл);
- 30 мМ KOAc (2,94 г на 100 мл);
- 10 мМ  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  (1 мл 1 М стока на 100 мл);
- 15%-ный раствор глицерина (вес/объем –15 г на 100 мл);
- pH довести 0,2 М ледяной  $\text{CH}_3\text{COOH}$  до 5,8.

Стерилизовать через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм (**не автоклавировать!**).

**Раствор RF-2:**

- 10 мМ MOPS (1 мл 1 М стока на 100 мл);
- 10 мМ KCl (0,7 г на 100 мл);
- 75 мМ  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  (0,750 мл 1 М стока на 100 мл);
- 15%-ный раствор глицерина (вес/объем);
- pH довести 5 М NaOH до 6,8.

Стерилизовать через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм (**не автоклавировать!**).

## ***Работа 5. Трансформация клеток *E. coli****

***Материалы и оборудование:*** центрифуга Biosan Combo-Spin FVL-2400N, центрифуга на 8 000 об./мин, ламинар-бокс, твердотельный термостат, автоклав, весы, pH-метр, автоматические пипетки (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл, 1–5 мл), пробирки пластиковые «Eppendorf» объемом 1,5 мл, перчатки латексные или нитриловые, сте-

рильные и нестерильные наконечники универсальные (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл, 1–5 мл), криоштатив для пробирок объемом 1–2 мл, таймер, холодильник, лед, бактериальная петля, чашки Петри с агаризованной средой LB с антибиотиками, лента лабораторная «Parafilm M», маркеры.

### ***Ход работы:***

Эффективность трансформации проверить, выбрав плазмиду с известной концентрацией и разбавив ее до  $10^{-3}$  мкг/мкл. В реакцию трансформации взять 100 мкл компетентных клеток, которые предварительно оттаить во льду. К клеткам добавить 10 мкл охлажденной лигазной смеси (приготовление описано ранее), осторожно перемешать и поставить в лед на 30 мин. Затем клетки подвергнуть тепловому шоку при температуре  $42^{\circ}\text{C}$  в течение 2 мин и охладить во льду в течение 10 мин. Клетки засеять на чашки Петри с агаризованной средой LB с необходимым количеством селективных маркеров (антибиотиков и/или индукторов и красителя)<sup>1</sup> и инкубировать в термостате при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 16 ч.

***Среда LB:*** 10 г/л бакто-триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта и 5 г/л NaCl довести 5 М NaOH до pH = 7,4, автоклавировать при 1,2 атм при температуре  $127^{\circ}\text{C}$  в течение 1 ч.

## ***Работа 6. Приготовление электрокомпетентных клеток и их трансформация***

***Материалы и оборудование:*** центрифуга Biosan Combo-Spin FVL-2400N, центрифуга с охлаждением на 8 000 об./мин, стаканы для ротора на 50 мл, рН-метр, морозильная камера на  $-70^{\circ}\text{C}$ , холодильник, ламинар-бокс, весы, термостат, термостат твердотельный, поддерживающий температуру  $+20\div+95^{\circ}\text{C}$ , термостатируемый шейкер, автоклав, водоструйный насос, ФЭК или спектрофотометр, кюветы, электропоратор, электрическая плитка, таймер, автоматические пипетки (0,1–10 мкл,

---

<sup>1</sup> Краситель, индуктор и антибиотики выбираются в зависимости от плазмиды, с которой чаще всего «работает» так называемая «голубая селекция», в этом случае индуктор ИПТГ (изопропил- $\beta$ -D-1-тиогаляктопиранозид используют в качестве аналога аллолактозы, метаболита лактозы, который запускает транскрипцию lac-оперона. Наличие атома серы в ИПТГ предотвращает разложение индуктора. Для индукции лактозного оперона ИПТГ используют в концентрациях от 0,1 до 2 мМ), а краситель X(Y)-GAL – сахар X-gal, 5-бром-4-хлориндолил- $\beta$ -D-галактопиранозид (также сокращенно BCIG) представляет собой органическое соединение, состоящее из галактозы, связанной с замещенным индолом.

1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл, 1–5 мл), мерные цилиндры (100 мл – 1 шт.), мерные колбы (50 мл – 1 шт.; 100 мл – 1 шт.), мерные стаканы (50 мл – 1 шт.; 100 мл – 1 шт.) пробирки пластиковые «Eppendorf» объемом 1,5 мл, перчатки латексные или нитриловые, наконечники универсальные (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл, 1–5 мл), криоштатив для пробирок объемом 1–2 мл, лед, спиртовка, спички, вата, фарфоровый стакан, бактериальная петля, чашки Петри с агаризованной средой LB, колбы или пробирки с жидкой средой LB, 10%-ный раствор глицерина, этанол (96 и 70%), лента лабораторная «Parafilm M», маркеры.

### ***Ход работы:***

Культуру клеток из музейной культуры засеять штрихом на твердую среду и инкубировать в термостате при 37°C в течение 14–16 ч. Затем отдельную колонию пересеять в 5 мл среды LB и инкубировать 14–16 ч в термостатируемой качалке (180 об./мин, 37°C).

2 мл ночной культуры пересеять в 500 мл свежей LB и подрачивать культуру до оптической плотности  $OD_{560} = 0,7-1$ . Все дальнейшие манипуляции проводить на холоду (заранее охладить до 0°C высокоочищенную воду и 10%-ный глицерин). Культуру охладить на льду в течение 5–10 мин и центрифугировать при 4 500 об./мин, слить супернатант и дополнительно центрифугировать в течение 5 мин при 3 000 об./мин. Осадок дважды промыть водой (100 мл) и затем 20 мл 10%-ного глицерина. Добавить 10%-ный глицерин, объем которого равен объему клеток, осадок ресуспендировать и клетки расфасовать в охлажденные пробирки 1,5 мл по 100 мкл и незамедлительно поместить их в низкотемпературный холодильник на –70°C. Переосадить лигазную смесь из этанола в 0,3 М KOAc. Осадок промыть 70%-ным этанолом и подсушить на воздухе, затем растворить в 20 мкл высокоочищенной воды. Процедуру электропорации проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

Для введения генов в векторы, обеспечивающие их доставку в клетки растений, используются бинарная и коинтегративная векторные системы.

Векторный перенос чужеродных генов в геном растений может осуществляться с помощью почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens*, которая в естественных условиях вызывает у двудольных растений образование опухолей (корончатых галлов) в местах проникновения бактерии. Индукция опухолей обусловлена бактериальными плазмидами – Ti-плазмидами (от англ. *tumor inducing*), содержащими гены, необходимые для ее поддержания в бактериальной клетке, участок, непосредственно встраивающийся в геном растения (Т-ДНК область), и гены (vir-область),

принимающие участие в переносе Т-ДНК в растительный геном. В онкогенную область плазмиды входят гены синтеза гормонов ауксина и цитокинина, также имеются гены синтеза производных аминокислот – опинов (нопалинов, октопинов). В экспериментах по трансформации растений используют «разоруженные» Ti-плазмиды, из которых удалены онкогенные гены и гены синтеза опинов. Вместо них в Т-ДНК встраивают целые, а также доминантные селективные и репортерные гены.

Используемые векторы можно разделить на два типа в зависимости от того, где находится область Т-ДНК: на том же репликоне, что и *vir*-гены, или на отдельной плазмиде. В первом случае вектор называют **коинтегративным**, а во втором – **бинарным**. Бинарные векторы, как правило, способны реплицироваться как в *E. coli*, так и в агробактериях. Это позволяет проводить манипуляции в *E. coli*, а затем переносить векторы в штаммы агробактерий, содержащие дополнительную Ti-плазмиду, в которой содержатся только *vir*-гены. Бинарные векторы на основе плазмиды pBI121 содержат в Т-области маркерный ген *nptII* устойчивости к антибиотиком канамицину под контролем промотора гена нопалинсинтазы, ген *uidA* (обеспечивает расщепление β-глюкуронидов) под контролем промотора CaMV35S вируса табачной мозаики. Оба гена экспрессируются в растениях и служат удобными маркерами для отбора трансформантов. Вирулентная плазида-помощник находится в агробактерии. Например, агробактериальный штамм LBA4404 содержит плазмиду pAL4404. В этом штамме также содержится хромосомный ген устойчивости к рифампицину.

Чтобы избежать получения неоднозначных результатов, важно уметь сохранять и вести селекцию специальных бактериальных штаммов. Большинство бактериальных штаммов несет специфичные селективные маркеры, часто внехромосомные. Сохранность маркеров необходимо регулярно тестировать во избежание возможной контаминации, мутации или утраты специфичных плазмид.

## ***Работа 7. Наращивание ночных бактериальных культур***

**Материалы и оборудование:** термостат, термостатируемая качалка, ламинар-бокс, стерильные пробирки с жидкой средой YEP с селективными антибиотиками (2 шт.), чашки Петри с бактериальными колониями на среде YEP с селективными антибиотиками, бактериальная петля, спиртовка, вата, спички, фарфоровый стакан, этанол (96 и 70%), лента лабораторная «Parafilm M», маркеры.

### ***Ход работы:***

В условиях ламинар-бокса с помощью стерильной микробиологической петли перенести отдельную бактериальную колонию (или ее часть) со свежей чашки с селективными антибиотиками в пробирку, содержащую 3 мл стерильной жидкой среды YEP, содержащей те же антибиотики (выбор антибиотика зависит от штамма бактерий). Агробактерию наращивать 20–48 ч при 28°C на термостатируемой качалке с круговым вращением (амплитуда 5–10 см и скорость вращения 150–200 об./мин).

***Среда YEP:*** NaCl 0,5 г, дрожжевой экстракт 1 г, триптон (или пептон) 1 г, растворить в 100 мл воды. Для агаризованной среды добавить 1,5 г агара. Автоклавировать при 1,2 атм при температуре 127°C в течение 1 ч.

## ***Работа 8. Рассев бактериальных культур для получения отдельных колоний***

***Материалы и оборудование:*** термостат, ламинар-бокс, термостатируемая качалка, пробирки с суспензионными бактериальными культурами на среде YEP с селективными антибиотиками, чашки Петри с агаризованной средой YEP с селективными антибиотиками, бактериальная петля, спиртовка, вата, спички, фарфоровый стакан, этанол (96 и 70%), лента лабораторная «Parafilm M», маркеры.

### ***Ход работы***

Поместить стерилизованную микробиологическую петлю в ночную культуру и провести несколько штрихов по поверхности стерильной агаризованной среды YEP, содержащей необходимые антибиотики в чашке Петри. Между проведением штрихов пронести петлю через пламя. Подсушить нанесенные штрихи в приоткрытой чашке Петри в стерильном ламинарном боксе, а затем поместить чашку в термостат в перевернутом положении (крышкой вниз) и инкубировать в термостате 20–48 ч при 28°C.

## ***Работа 9. Длительное хранение бактериальных штаммов***

***Материалы и оборудование:*** термостат, ламинар-бокс, термостатируемая качалка, холодильник на –70°C, автоматическая пипетка (10–100 мкл), мерные цилиндры (100 мл – 1 шт.), мерные колбы (50 мл – 1 шт.; 100 мл – 1 шт.), мерные стаканы (50 мл – 1 шт.; 100 мл – 1 шт.),

пробирки с суспензионными бактериальными культурами на среде YEP с селективными антибиотиками, чашки Петри с агаризованной средой YEP с селективными антибиотиками, бактериальная петля, спиртовка, вата, спички, фарфоровый стакан, этанол (96- и 70%-ный), лента лабораторная «Parafilm M», бактериальные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм, стерильные шприцы, стерильные пробирки пластиковые «Eppendorf» объемом 1,5 мл, стерильные наконечники универсальные (100 мкл), стерильный шпатель Дригальского, глицерин, маркеры

#### ***Ход работы:***

Профильтровать глицерин через фильтр. Приготовить ночную культуру штамма, предназначенного для хранения, как описано ранее. Смешать 600 мкл ночной культуры с 300 мкл стерильного глицерина (до конечной концентрации 30%) в стерильной пробирке типа Eppendorf, перемешать и поместить в холодильник на  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Для получения быстро растущих клеток из находящихся на хранении культур захватить небольшую порцию (50–100 мкл) смеси с помощью пипетки со стерильным носиком, нанести на поверхность стерильной агаризованной среды в чашке Петри и растереть стеклянным стерильным шпателем. Подсушить приоткрытую чашку Петри в стерильном ламинарном боксе, а затем поместить чашку в термостат в перевернутом положении (крышкой вниз) и инкубировать в термостате 20–48 ч при  $28^{\circ}\text{C}$ .

### ***Работа 10. Трансформация клеток агробактерии рекомбинантной плазмидой***

***Материалы и оборудование:*** центрифуга Biosan Combo-Spin FVL-2400N, центрифуга с охлаждением на 8 000 об./мин, стаканы для ротора на 50 мл, рН-метр, морозильная камера на  $-70^{\circ}\text{C}$ , холодильник, ламинар-бокс, весы, термостат, термостат твердотельный, поддерживающий температуру  $+20$ – $+95^{\circ}\text{C}$ , термостатируемый шейкер, автоклав, водоструйный насос, ФЭК или спектрофотометр, кюветы, электрическая плитка, водяная баня, таймер, автоматические пипетки (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл, 1–5 мл), мерные цилиндры (100 мл – 1 шт.), мерные колбы (50 мл – 1 шт., 100 мл – 1 шт.), мерные стаканы (50 мл – 1 шт., 100 мл – 1 шт.) стерильные и нестерильные пробирки пластиковые «Eppendorf» объемом 1,5 мл, перчатки латексные или нитриловые, стерильные и нестерильные наконечники универсальные (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл, 1–5 мл), криоштатив для пробирок

объемом 1–2 мл, лед, спиртовка, 70%-ный этиловый спирт для протирания столешницы, вата, фарфоровый стакан, микробиологическая петля, спички, спирт для спиртовок, стерильный шпатель Дригальского, жидкий азот, сосуд Дьюара, широкогорлый термос, колбы и пробирки с жидкой средой YEP и селективными антибиотиками, чашки Петри с агаризованной средой YEP, содержащей антибиотиками, лента лабораторная «Parafilm M», 20 мМ CaCl<sub>2</sub>.

### ***Ход работы:***

Процедура состоит из двух этапов: получения «компетентных» клеток и непосредственно введения плазмидной ДНК в агробактериальные клетки.

**Этап 1. Получение компетентных клеток *Agrobacterium tumefaciens*.** Нарастить ночную бактериальную культуру в 3 мл стерильной среды YEP, как описано ранее. Перенести 2 мл культуры клеток в колбу с 50 мл стерильной среды YEP и наращивать до OD<sub>600</sub> = 0,5–1,0 о.е. при комнатной температуре (от нескольких часов до ночи). Культуру охладить во льду и центрифугировать 8 мин при 4°C и 3 000 об./мин. Супернатант удалить, осадок ресуспендировать в 2 мл 20 мМ CaCl<sub>2</sub>, охладить во льду и расфасовать по 100 мкл в охлажденные пробирки типа Eppendorf (все в стерильной посуде и пробирках!). Заморозить клетки в жидком азоте: жидкий азот налить в колбу широкогорлого термоса, пробирки поместить в криоштатив и в колбу с азотом, затем непосредственно использовать для трансформации или поместить на хранение в холодильник при –70°C. Замороженные клетки можно хранить несколько месяцев при –70°C и использовать по мере необходимости.

**Этап 2. Трансформация компетентных клеток *Agrobacterium tumefaciens*.** К 200 мкл компетентных клеток *Agrobacterium tumefaciens* (штамм EN105) добавить 1 мкг плазмидной рекомбинантной ДНК, несущей целевой ген. Оттаивать клетки в течение 5 мин на водяной бане при 37°C и добавить 1 мл среды YEP (с антибиотиками), смесь инкубировать 3–5,5 ч при комнатной температуре и перемешивании. Центрифугировать в центрифуге Eppendorf 25 при 3 000 об./мин 5 мин. Осадок ресуспендировать в 100 мкл среды YEP и нанести на чашку с агаризованной средой YEP, содержащей антибиотиками. Поместить чашку в термостат в перевернутом положении (крышкой вниз) и инкубировать в термостате 20–72 ч при 28°C до появления отдельных клонов (рис. 3).

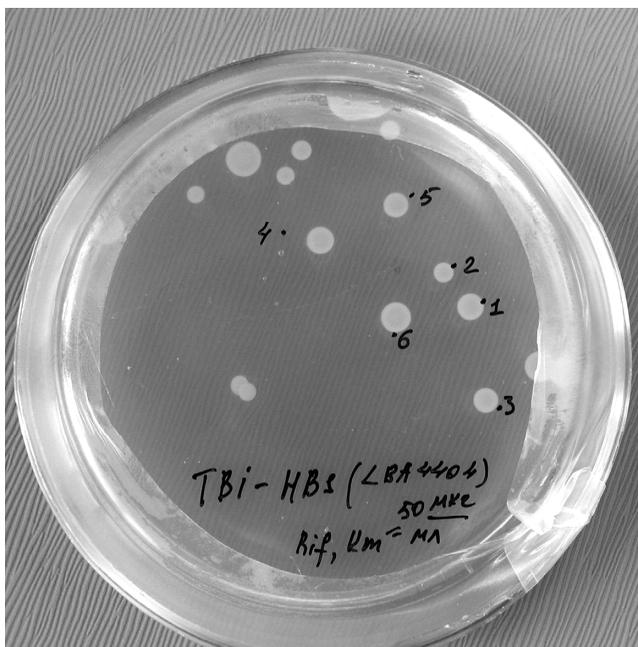


Рис. 3. Клоны агробактерии линии LBA 4404 с геном *TBI-HBsAg*

### **Работа 11. Скрининг агробактериальных клонов**

**Материалы и оборудование:** центрифуга Biosan Combo-Spin FVL-2400N, ламинар-бокс, рН-метр, ПЦР-бокс, камера для электрофореза, заливочный столик, источник тока, трансиллюминатор, весы, термостат, электрическая плитка, водяная баня, морозильная камера на  $-70^{\circ}\text{C}$ , холодильник, автоклав, водоструйный насос, ФЭК или спектрофотометр, кюветы, амплификатор, автоматические пипетки (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл, 1–5 мл), мерные цилиндры (1000 мл – 1 шт., 50 мл – 1шт.), мерный стакан (100 мл –1 шт., 1 000 мл – 1 шт.), колба мерная (1 л – 1 шт.), пробирки пластиковые «Eppendorf» объемом 1,5 мл, микропробирки пластиковые с плоской крышкой «flat cap» для ПЦР «Eppendorf» объемом 0,2 мл, перчатки латексные или нитриловые, стерильные и нестерильные наконечники универсальные (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл, 1–5 мл), криоштатив для пробирок объемом 1–2 мл, штатив «рабочее место» для микропробирок на 0,5 мл,

10×10 мест, лента лабораторная «Parafilm M», таймер, Water nuclease-free (вода) Fermentas, 6×DNA Loading Dye (краситель – 6×MassRuler™ раствор с красителями для нанесения образцов на гель), этидиум бромид, Gene ruler 100 bp Plus DNA Ladder 0,5 мкг/мкл, диДНК, MgCl<sub>2</sub>, Tris-HCl, ЭДТА, дистиллированная вода, NaCl, DTT, фермент *Bam*HI, агароза, TAE буфер для электрофореза (50-кратный), 20 мМ CaCl<sub>2</sub>, интактная плазида, микробиологическая петля, спиртовка, спички, спирт для спиртовок, спирт для обработки столешницы, фарфоровый стакан, шпатель Дригальского, лед, жидкий азот, сосуд Дьюара, широкогорлый термос, чашки Петри с агаризованной средой YEP, содержащей антибиотика, колбы и пробирки с жидкой средой YEP и селективными антибиотиками, маркеры.

### **Ход работы:**

Скрининг клонов, содержащих плазмиду, включающую чужеродный целевой ген, проводят с помощью ПЦР. Плазмидную ДНК, используемую в качестве матрицы в ПЦР, выделяют методом быстрого лизиса агробактериальной культуры. Для этого часть трансформированного агробактериального клона стерильно перенести микробиологической петлей в пробирку типа Eppendorf, содержащую 100 мкл TE-буфера (10 мМ Tris-HCl, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0), инкубировать 15 мин в термостате при 95°C, охладить и отобрать 1,5 мкл в пробирку (объемом 500 мкл) с готовой смесью для ПЦР (буфер, праймеры, комплементарные последовательности целевого гена, dNTP, Taq-полимераза (все компоненты «мастер-микс» поставляются вместе с полимеразой производителем).

Аmplифицированные фрагменты ДНК анализируют при помощи электрофореза в агарозном 1,5%-ном геле в 1×TAE буфере. Оставшуюся часть агробактериального клона, скрининг которого подтвердил содержание в нем рекомбинантной плазмиды, использовать для наращивания в необходимом объеме среды YEP с добавлением антибиотиков и использовать для трансформации растительных клеток.

Для экспрессии в клетках растений гена *TBI-HBsAg* проведен перенос агробактериальные клетки штамма LBA4404 конструкции с геном химерного белка TBI-HBsAg, представленного двумя слитыми фрагментами белков вируса гепатита-В и вируса иммунодефицита человека. Выращенные клоны проверены на наличие встройки методом ПЦР с использованием праймеров (5'-CCGCAATCACCAGTCTCT-3' – в 3'-районе гена *preS2-S*; 5'-GGGTAACGCCAGGGTTTT-3' – фланкирует полилинкер pBinPlus; амплифицированный фрагмент составляет 275 н.п.). Всего получено 25 клонов, в 6 подтверждено наличие искомого фрагмента (рис. 4). Клон № 5 использован для агробактериальной трансформации растений.

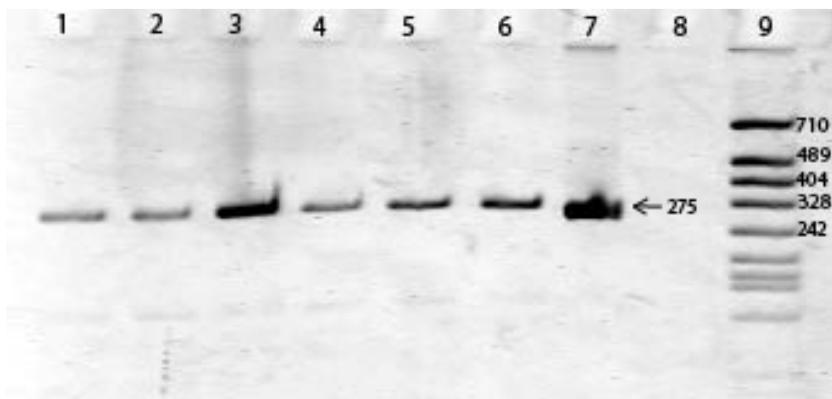


Рис. 4. Электрофореограмма результатов ПЦР-анализа ДНК агробактериальных клонов, содержащих плазмидную конструкцию ТБИ-НБС, с использованием праймеров к гену *preS2-S* в 6%-ном акриламидном геле: дорожки 1–6 – ДНК агробактериальных клонов; 7 – плаزمида, содержащая конструкцию ТБИ-НБС; 8 – отрицательный контроль (не содержит матрицы ДНК); 9 – ДНК плазмиды pBlus, гидролизованная рестриктазой *MspI*

## Раздел 2. Методы доставки чужеродных генов в геном растений

### 2.1. Агробактериальная трансформация

Для двудольных растений существует природный вектор для горизонтального переноса генов – плазмиды почвенных бактерий (агробактерий), Ti-плазмиды *A. tumefaciens* и Ri-плазмиды *Agrobacterium rhizogenes*. В генно-инженерных работах наиболее часто используют генетические конструкции на основе Ti-плазмиды.

В основе процесса заражения растительной клетки лежит перенос части генетического материала Ti-плазмиды, называемого T-областью. Необходимо отметить, что инфицирование возможно только при наличии повреждений на растении, так как в области поранений образуются вещества фенольной природы и низкомолекулярные сахара, которые необходимы для активации бактериальных генов вирулентности (*vir*-генов). Продукты *vir*-генов обеспечивают процессинг T-ДНК и перенос ее в растительную клетку. Вырезание T-области из плазмиды, перенос и интеграция ее в клетку – сложный и не до конца изученный процесс, в котором принимают участие многочисленные белки как бактерии, так и растения-хозяина.

Методики трансформации различаются выбором экспланта, методами селекции трансформированных тканей и регенерации трансформированных растений.

При разработке системы трансформации рассматривают возможность воспроизводимой регенерации растения, поскольку целью большинства экспериментов является получение полноценных, фертильных трансгенных растений. В качестве эксплантов чаще всего используют стерильный растительный материал: сегменты проростков (например, гипокотили, котиледоны, листья), части более зрелых растений, выращенных *in vitro*, а также фрагменты каллусов или агрегаты суспензионных культур.

Селекцию растительных клеток проводят по их способности расти на питательной среде, содержащей антибиотики, в норме токсичные для таких клеток. Из резистентных к антибиотикам клеток с помощью стандартных методов культуры тканей можно регенерировать растения-трансформанты.

### ***Работа 12. Трансформация табака методом листовых дисков***

***Материалы и оборудование:*** ламинар-бокс, термостат, автоматические пипетки (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл, 1–5 мл), стерильные и нестерильные наконечники универсальные (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл, 1–5 мл), мерные цилиндры (1 000, 50, 10 мл), колбы мерные (1 л), стерильные растения табака 5–6-недельного возраста, ночная суспензионная культура *A. tumefaciens*, спиртовка, спички, спирт для спиртовок, спирт для обработки столешницы и инструментов, фарфоровый стакан, чашки Петри со средой, пробирки со средой, стерильные скальпели, стерильные пинцеты, стерильные чашки Петри, стерильная дистиллированная вода, стерильная фильтровальная бумага, лента лабораторная «Parafilm M», маркеры.

#### ***Ход работы:***

Трансформация методом листовых дисков заключается в совместном культивировании эксплантов листьев табака и ночной культуры *Agrobacterium tumefaciens*, во время которого происходит перенос T-ДНК Ti-плазмиды агробактерии в геном растения с последующей регенерацией трансформантов на селективной среде. Состав сред для культивирования тканей табака в условиях *in vitro* представлен в табл. 1 и 2. Процесс получения трансформантов состоит из нескольких этапов.

**1-й этап. Совместное культивирование листовых дисков и агробактерий.** В качестве эксплантов используют листья, полученные от стерильных растений табака 5–6-недельного возраста, выращенных на агаризованной безгормональной среде Мурасиге – Скуга (табл. 1). В условиях ламинарного бокса в стерильной чашке Петри удалить срединную жилку листа, нарезать лист на фрагменты около 1 см<sup>2</sup>, острым скальпелем нанести поранения.

Т а б л и ц а 1

**Состав агаризованной питательной среды Мурасиге – Скуга, мг/л**

Компонент среды	мг/л
KNO <sub>3</sub>	1 900
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1 650
MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	370
CaCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O	440
FeSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	37,3
Na <sub>2</sub> EDTA × 2H <sub>2</sub> O	27,8
KI	0,83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
MnSO <sub>4</sub> × 4H <sub>2</sub> O	22,3
CoCl <sub>2</sub> × 6H <sub>2</sub> O	0,025
CuSO <sub>4</sub> × 5H <sub>2</sub> O	0,025
ZnSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	8,6
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O	0,25
Тиамин HCl	1
Пиридоксин HCl	0,5
Никотиновая кислота	0,5
Сахароза	30 000
Агар	9 000
Дистиллированная вода	До литра
pH	5,8

Подготовленные экспланты аккуратно разложить нижней стороной вверх в чашки Петри на поверхность жидкой среды T0 (табл. 2), предварительно добавив в чашки 2–3 капли ночной культуры *A. tumefaciens* (рис. 5, на вклейке). Чашки Петри оставить на 2 сут в затенённом месте.

**2-й этап. Отмывание эксплантов.** Стерильным носиком отобрать среду из чашки Петри, добавить стерильную дистиллированную воду и листовые диски осторожно перенести в другую чашку Петри со стерильной водой (рис. 6, на вклейке). Экспланты промыть пять раз и перенести в чашки Петри на жидкую среду T1 (табл. 2) с добавлением 20 г/л сахарозы, 500 мг/л цефотаксима для подавления роста *A. tumefaciens*. Чашки оставить на 2 сут в затенённом месте.

**3-й этап. Регенерация трансформантов на селективной среде.** Экспланты промокнуть на стерильной фильтровальной бумаге и перенести в чашки Петри с агаризованной средой Т2 (табл. 2, рис. 7, на наклейке).

По мере образования каллуса экспланты перенести в пробирки со средой Т3 (табл. 2), которая стимулирует побегообразование. Зелёные побеги перенести для укоренения в пробирки со средой Т4 (табл. 2).

Т а б л и ц а 2

**Состав сред для трансформации табака и получения растений-трансформантов**

Компонент среды	Среда Т0 Кокультивация	Среда Т1 Отмывка от агробактерии	Среда Т2 Индукция канамицин-устойчивого каллуса	Среда Т3 Индукция побегообразования	Среда Т4 Укоренение растений-регенерантов
Среда МС	1×	1×	1×	1×	1×
Сахароза	20 г/л	20 г/л	20 г/л	20 г/л	20 г/л
Агар	–	–	7 г/л	7 г/л	7 г/л
БАП	–	–	1 мг/л	0,1 мг/л	–
НУК	–	–	0,1 мг/л	–	–
Цефатоксим	–	500 мг/л	500мг/л	500мг/л	500мг/л
Канамицин	–	–	100 мг/л	100 мг/л	100 мг/л

Укоренившиеся трансформанты перенести в грунт и выращивать при интенсивности освещения 20 тыс. люкс и фотопериоде 18/6 ч (день/ночь).

### ***Работа 13. Трансформация моркови***

**Материалы и оборудование:** ламинар-бокс, термостат, автоклав, автоматические пипетки (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл, 1–5 мл), стерильные и нестерильные наконечники универсальные (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл, 1–5 мл), мерные цилиндры (1 000 мл, 50 мл, 10 мл), колбы мерные (1 л), стерильные мерные стаканы (400 мл – 6 шт.), семена моркови, «Domestos», ночная суспензионная культура *A. tumefaciens*, чашки Петри и пробирки со средой, пробирки с мостиками и жидкой средой, спиртовка, спички, спирт для спиртовок, спирт для обработки столешницы и инструментов, вата, марля, нитки, фарфоровый стакан, стерильные шприцы, стерильные скальпели, стерильные пинцеты и препаровальные иглы, стерильные чашки Петри, стерильная вода, стерильная фильтровальная бумага, стерильные пластиковые контейнеры с грунтом, лента лабораторная «Parafilm M», маркеры.

### ***Ход работы:***

**1-й этап. Индукция эмбриогенного каллуса.** Для получения высокоэмбриогенного каллуса используют зародыши, выделенные из зрелых предварительно набухших семян моркови. Для этого семена моркови, помещенные в марлевые «узелочки», стерилизовать в 25%-ном растворе «Domestos» в течение 25 мин. После этого семена промыть стерильной дистиллированной водой 3–4 раза и разложить на фильтровальную бумагу, смоченную стерильной дистиллированной водой, в предварительно подготовленные стерильные чашки Петри. Чашки Петри закрыть парафильмом и поместить в термостат на 12–14 ч при температуре 22°C для набухания.

Набухшие семена моркови повторно стерилизовать в 50%-ном растворе «Domestos». Стерилизацию проводить в течение 20 мин, затем семена промыть стерильной дистиллированной водой до полного исчезновения запаха хлора (4–5 раз).

Выделение зародышей провести путем надавливания препаральной иглой на основание набухшего семени (рис. 8, на вклейке). Зародыши поместить в пробирки на агаризованную гормональную среду для индукции каллуса (среда № 1, табл. 3) и культивировать в темноте при температуре 25°C в течение 9–10 недель с пассажами на свежие среды того же состава (среда № 1) каждые 3–4 недели.

**2-й этап. Проведение агробактериальной трансформации.** Каллус разделить на небольшие фрагменты (около 3 мм в диаметре), разложить их на фильтровальной бумаге в чашках Петри (рис. 9, на вклейке). На каждый фрагмент каллуса нанести по 5–10 мкл приготовленной суспензии ночной культуры агробактерии. После того, как избыток суспензии впитается фильтровальной бумагой, каллус перенести в чашки Петри (рис. 10, на вклейке) на агаризованную среду для индукции каллуса (среда № 1, табл. 3). Чашки Петри поместить в темноту при температуре 22°C и оставить для прохождения кокультивирования на 3 сут. После прохождения кокультивирования экспланты перенести на питательную среду для индукции канамицин-устойчивого каллуса (среда № 2, табл. 3).

**3-й этап. Получение трансгенных растений – регенерантов моркови.** Культивирование каллусов проводят на среде № 2 при температуре 22°C и освещенности 10 тыс. люкс с пассированием на свежие среды того же состава каждые 3 недели. Через 3–4 пассажа каллусы перенести в пробирки на агаризованные среды для регенерации соматических зародышей (среда № 3, табл. 3). Развивающиеся эмбриониды с хорошо сформировавшейся первой листовой пластинкой перенести на мостики из фильтровальной бумаги в пробирки с жидкой питательной средой (среда № 4, табл. 3) для развития растений-регенерантов.

Формирование растений-регенерантов происходит в течение 4–6 недель (при необходимости проводили пассажи на свежие питательные среды того же состава) (рис. 11, на наклейке).

Таблица 3

**Состав сред для индукции каллуса моркови и получения растений-трансформантов**

Компонент среды	Среда № 1. Индукция каллуса	Среда № 2. Индукция канамицин-устойчивого каллуса	Среда № 3. Индукция соматических зародышей моркови	Среда № 4. Развитие растений-регенерантов моркови	Среда № 5. Развитие растений-регенерантов моркови	Среда № 6. Развитие растений-регенерантов моркови
Среда MS	1×	1×	1×	1×	1×	1×
Сахароза	20 г/л	20 г/л	20 г/л	20 г/л	20 г/л	20 г/л
Агар	7 г/л	7 г/л	7 г/л	7 г/л	7 г/л	-
Кинетин	0,2 мг/л	0,2 мг/л	–	0,1 мг/л	–	–
2,4-Д	0,2 мг/л	0,2 мг/л	–	–	–	–
Цефатоксим	–	500 мг/л	500 мг/л	500 мг/л	500 мг/л	500 мг/л
Канамицин	–	100 мг/л	100 мг/л	100 мг/л	100 мг/л	100 мг/л

После культивирования на жидкой среде (среда № 5 табл. 3) хорошо развитые растения – регенеранты моркови перенести на мостики из фильтровальной бумаги в пробирки большего размера (20×200 мм) с добавлением жидкой питательной среды для укоренения растений (среда № 6, табл. 3; рис. 12, на наклейке).

**4-й этап. Получение корнеплодов генно-модифицированных растений моркови.** Растения с хорошо сформированной розеткой листьев перенести в стерильный грунт (смесь мелкой фракции керамзита и вермикулита в соотношении 10:1) в закрытые пластиковые контейнеры. Через 2–3 недели после формирования хорошо развитой корневой системы провести адаптацию растений к условиям атмосферной влажности.

После развития нескольких листовых пластинок растения моркови перенести в теплицу и поместить в почвогрунт. Выращивать при интенсивности освещения 20 тыс. люкс и фотопериоде 18/6 ч (день/ночь).

### **Работа 14. Трансформация томатов**

**Материалы и оборудование:** ламинар-бокс, термостат, шейкер, автоматические пипетки (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл, 1–5 мл), стерильные и нестерильные наконечники универсальные (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл, 1–5 мл), мерные цилиндры

(1 000, 50, 10 мл), колбы мерные (1 л), стерильные мерные стаканы (400 мл – 6 шт.), семена томатов, ночная культура *A. tumefaciens*, каллусная культура табака, «Domestos», спиртовка, спички, спирт для спиртовок, спирт для обработки столешницы и инструментов, фарфоровый стакан, пробирки, колбы и чашки Петри со средой, стерильные скальпели, стерильные пинцеты, стерильные чашки Петри, стерильная дистиллированная вода, стерильная фильтровальная бумага, лента лабораторная «Parafilm M», маркеры.

**Ход работы:**

**1-й этап. Приготовление питающего слоя.** Трансформация томатов проводится с использованием питающего слоя. Для его приготовления суспензию клеток табака вырастить (используя длительно культивируемую каллусную культуру) в темноте на среде № 1 (рис. 13, на вклейке; табл. 4), проводя субкультивирование в разведении 1:10 каждые 10 дней. За одни сутки до ко-культивации 10-дневную суспензию произвольной плотности раскатать пипеткой с обрезанным носиком на поверхность среды № 2 (табл. 4) по 1,5 мл на каждую чашку. Сверху положить слой стерильной фильтровальной бумаги.

Таблица 4

**Состав сред для трансформации и регенерации томатов**

Компонент среды	Среда № 1. Культивирование суспензии клеток табака	Среда № 2. Прекультивация эксплантов и проведение трансформации	Среда № 3. Проращивание семян томатов	Среда № 4. Регенерация растений	Среда № 5. Укоренение растений
Среда МС	1×	1×	1×	1×	1×
Сахароза	20 г/л	30 г/л	20 г/л	30 г/л	10 г/л
Агар	–	7 г/л	7 г/л	7 г/л	–
pH	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7
Зеатин-рибозид	–	2 мг/л	–	2 мг/л	–
ИУК	–	0,1 мг/л	–	0,1 мг/л	0,1 мг/л
БАП	1 мг/л	–	–	–	–
НУК	0,1 мг/л	–	–	–	–
Кинетин	–	–	–	–	–
Цефотаксим	–	–	–	200 мг/л	200 мг/л
Канамицин	–	–	–	100 мг/л	30 мг/л

**2-й этап. Получение эксплантов.** Семена томатов стерилизовать 20 мин в 25%-ном растворе «Domestos» и поместить на среду № 3. Через 5–7 дней сформировавшиеся котиленоны осторожно отделить от проростков, разрезать на 3 части и поместить верхней стороной вниз на питающий слой. Инкубировать в течение ночи (рис. 14, на вклейке).

**3-й этап. Проведение агробактериальной трансформации.** Ночную суспензионную культуру агробактерии разбавить жидкой средой МС в соотношении 1:3 (10 мл бактериальной суспензии + 30 мл жидкой среды МС). Экспланты поместить в разбавленную суспензию на 20 мин (рис. 15, на вклейке) на шейкер при 120 об./мин. Затем промокнуть стерильной фильтровальной бумагой и перенести снова на питающий слой. Культивировать 2 сут.

**4-й этап. Регенерация трансформантов на селективной среде.** По окончании кокультивирования экспланты перенести на среду № 4 (табл. 4), содержащую цефотаксим и канамицин. Субкультивировать каждые 3 недели (рис. 16, на вклейке). Сформировавшиеся побеги укоренить на среде № 5 (табл. 4).

Укоренившиеся трансформанты перенести в грунт и выращивать при интенсивности освещения 20 тыс. люкс и фотопериоде 18/6 ч (день/ночь).

## 2.2. Биобаллистическая трансформация

Одним из альтернативных агробактериальной трансформации методов доставки чужеродной ДНК в геном растений является метод биобаллистики. Суть его заключается в том, что на поверхности инертных частиц (золотых или вольфрамовых) размером от 0,6 до 1,6 мкм иммобилизуется ДНК, содержащая маркерные и целевые гены. С помощью специального устройства, называемого «генной пушкой», частицы выстреливаются в трансформируемый объект. Как микроскопические пули, частицы пробивают клеточные стенки и мембраны и осуществляют прямую доставку экзогенной ДНК в клетки. Данный метод весьма эффективен для трансформации видов растений, устойчивых к агробактериальной инфекции, например злаков, а также успешно применяется для трансформации внеядерных геномов пластид и митохондрий.

В данном руководстве будет рассмотрен примерный протокол проведения биобаллистической трансформации с использованием «генной пушки» фирмы «BIO-RAD» (рис. 17, на вклейке).

Применение данного метода для доставки экзогенной ДНК в геном растений требует использования расходных материалов, которые представлены на рис. 18 (на вклейке). К расходным материалам относятся мембраны для нанесения микрочастиц, разрывные мембраны, останавливающие сеточки, и собственно золотые или вольфрамовые микрочастицы, называемые микроносителями. На рисунке показано, как выглядит пустой металлический держатель для мембраны-носителя микрочастиц (рис. 18, *а*), а также в собранном виде с мембраной (рис. 18, *б*). Мембрану-носитель микрочастиц вместе с держателем называют макроносителем.

Следует отметить, что процедура биобаллистической трансформации проводится в стерильных условиях, поэтому все расходные материалы, используемые для иммобилизации ДНК, растворы и сама «генная пушка» требуют стерилизации. В идеальном варианте «генная пушка» должна располагаться в ламинарном боксе (см. рис. 17, на вклейке). Процедура биобаллистики подразделяется на три этапа: подготовка микрочастиц, иммобилизация на них ДНК и собственно биобаллистика.

### **Работа 15. Подготовка к биобаллистике**

**Материалы и оборудование:** центрифуга «vortex», центрифуга на 8 000 об./мин, весы, термостат, ламинар-бокс, генная пушка, газовый баллон с гелием, мембрана-носитель, автоклав, сухо-жаровой шкаф, морозильная камера на  $-20^{\circ}\text{C}$ , электрическая плитка, таймер, автоматические пипетки (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл, 1–5 мл), стерильные и нестерильные наконечники универсальные (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл, 1–5 мл), мерные цилиндры (на 50 мл 1 шт.), колбы (на 50 мл 1 шт.), стерильные пластиковые пробирки «Eppendorf» объемом 1,5 мл, бактериальные фильтры 0,22 мкм, стерильные чашки Петри, перчатки стоматологические текстурированные нестерильные, штатив для пробирок объемом 1–2 мл, лента лабораторная «Parafilm M», спиртовка, спички, спирт для спиртовок, спирт для обработки столешницы и инструментов, фарфоровый стакан, стерильные пинцеты, фольга, интактная плазмида в концентрации 1 мкг/мкл, золотые или вольфрамовые частицы, 100%-ный (96%-ный) и 70%-ный этанол, стерильная дистиллированная вода, 50%-ный стерильный глицерин, 2,5 М  $\text{CaCl}_2$ , 0,1 М спермидин, PEG/ $\text{MgCl}_2$ , лед, изопропанол, чашки Петри с растительным материалом (каллусная ткань, листовые экспланты и т.д.), маркеры.

#### **Ход работы:**

**Этап 1. Подготовка (стерилизация) микрочастиц.** Данная процедура подходит для стерилизации как золотых, так и вольфрамовых частиц (Sanford *et al.* Methods in enzymology. 1993. Vol. 217. P. 482–509). Стерилизацию частиц можно проводить в старильном помещении или ламинарном боксе.

1. Взвесить 30 мг частиц в силиконизированной пластиковой пробирке объемом 1,5 мл (подходят пробирки фирмы «Eppendorf»).

2. Добавить к частицам 1 мл 70%-ного этанола (v/v) и интенсивно встряхивать в течение 3–5 мин. Очень удобно использовать для этих целей мини-центрифугу с платформой для встряхивания («vortex»).

3. Оставить частицы в 70%-ном этиловом спирте на 15 мин.

4. Осадить частицы кратковременным центрифугированием при 2 500 об./мин в течение 20–30 с и удалить спирт пипеткой.

5. Добавить к частицам 1 мл стерильной дистиллированной воды.

6. Ресуспендировать золотые частицы в воде интенсивным встряхиванием («vortex») в течение 1 мин.

7. Оставить частицы в воде на 1 мин.

8. Осадить частицы кратковременным центрифугированием и удалить воду пипеткой. Повторить процедуру отмывки трижды. Во время отмывки золотые частицы могут осаждаться на стенках пробирки, что приводит к их потере, поэтому необходимо использовать качественный пластик.

9. После третьей отмывки добавить к частицам 500 мкл 50%-ного стерильного глицерина и очень тщательно ресуспендировать интенсивным встряхиванием. В результате получается суспензия частиц в глицерине с конечной концентрацией (без учета потерь)  $\approx 60$  мг/мл. Частицы в глицерине можно сразу разделить на аликвоты по 50 мкл в стерильные пластиковые пробирки «Eppendorf» объемом 1,5 мл. В таком состоянии вольфрамовые частицы во избежание окисления необходимо хранить при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ , золотые частицы можно хранить при комнатной температуре в течение двух недель, а при  $-20^{\circ}\text{C}$  неограниченно долго.

**Этап 2. Иммунизация ДНК на частицах.** Все действия по иммунизации ДНК на микрочастицы проводят в стерильных условиях ламинарного бокса. В некоторых руководствах рекомендуется все компоненты, используемые для составления смесей, держать на льду. Существует два способа иммунизации ДНК на частицы: с использованием  $\text{CaCl}_2$ /спермидина и PEG/MgCl<sub>2</sub>.

1. Если частицы были заморожены, то их нужно разморозить и тщательно ресуспендировать интенсивным встряхиванием или перемешиванием с использованием системы «vortex» не менее 5 мин. Наличие агломератов частиц в суспензии недопустимо.

2. Если частицы заранее не были поделены, отобрать аликвоту в 50 мкл и перенести в пробирку объемом 1,5 мл.

**Способ с использованием  $\text{CaCl}_2$ /спермидина.** 3. Постоянно перемешивая суспензию частиц на «vortex», последовательно, соблюдая очередность, добавить следующие компоненты:

– 5 мкл ДНК в концентрации 1 мкг/мкл. Важно соблюдать это правило, поскольку при больших концентрациях ДНК частицы агрегируют и потом их не удастся разбить;

– 50 мкл  $\text{CaCl}_2$  в концентрации 2,5 М;

– 20 мкл спермидина в концентрации 0,1 М.

4. Встряхивать на «vortex» в течение 2–3 мин, затем дать частицам осесть в течение 1 мин.

5. Осадить частицы кратковременным (15–20 с) центрифугированием и удалить надосадочную жидкость (достаточно центрифугировать на скорости 2 500 об./мин).

6. Добавить к частицам 140 мкл 70%-ного этанола, ресуспендировать пипетированием, затем осадить частицы кратковременным центрифугированием и удалить надосадочную жидкость.

7. Добавить к частицам 140 мкл 100%-ного этанола (можно использовать 96%-ный этанол), ресуспендировать пипетированием, затем осадить частицы кратковременным центрифугированием и удалить надосадочную жидкость.

8. Добавить к частицам 48 мкл 100%-ного этанола (можно 96%-ного этанола), аккуратно ресуспендировать пипетированием, можно временно встряхнуть на «vortex».

**Способ с использованием PEG/MgCl<sub>2</sub>.** Пункты 1 и 2 см. выше.

3. Постоянно перемешивая суспензию частиц на «vortex», добавить 5 мкл ДНК в концентрации 1 мкг/мкл.

4. Продолжая перемешивать частицы с ДНК на «vortex», по стенке пробирки добавить 10 мкл PEG/  $\text{MgCl}_2$  раствора и перемешивать еще 50–60 с.

5. Инкубировать 20–30 мин при комнатной температуре, кратковременно встряхивая на «vortex» примерно каждые 5 мин.

6. Центрифугировать на микроцентрифуге при 2 500 об./мин при комнатной температуре в течение 30 с.

7. Отобрать надосадочную жидкость пипеткой как можно тщательнее.

8. Добавить к частицам 80 мкл 100%-ного этанола (можно 96%-ного этанола), интенсивно перемешать на «vortex» или несколько раз интенсивно провести дном пробирки по ребристой поверхности, например по металлической решетке. Использовать для обстрела по 8 мкл суспензии.

**Этап 3. Нанесение частиц на мембрану.** Для этого используют мембраны-носители, закрепленные в держателях (см. рис. 18, д, на вклейке). На каждую мембрану нанести по 8 мкл суспензии микрочастиц с иммобилизованной ДНК, распределяя суспензию ровным слоем по диаметру отверстия в держателе. Очень важно суспензию постоянно пипетировать или встряхивать на

«vortex»), чтобы избежать образования агломератов частиц. Правильно подготовленные и распределенные частицы после высыхания спирта должны выглядеть как равномерно мутное пятно на мембране без видимых комочков.

После нанесения на мембрану частицы нужно подсушить в ламинарном боксе в потоке стерильного воздуха в течение часа или в течение 15 мин в вакуумном эксикаторе. Следует помнить, что после сушки мембраны с частицами должны быть использованы для биобаллистики в течение 2 ч.

**Этап 4. Подготовка пушки (Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System) к работе и биобаллистика.** На рис. 19 представлено схематическое устройство геной пушки производства фирмы «BIO-RAD».

#### Стерилизация:

1. Вакуумную камеру пушки, удерживающий колпачок разрывной мембраны, устройством-носителем микрочастиц и полочку для образца (см. рис. 18, на вклейке; рис. 19) стерилизовать разбрызгиванием 96%-ного этанола. Удобно для этой цели использовать обычный опрыскиватель для комнатных растений. Нужно следить, чтобы спирт равномерно покрыл все детали. После обработки все части пушки необходимо просушить от спирта в стерильном потоке ламинарного воздуха.

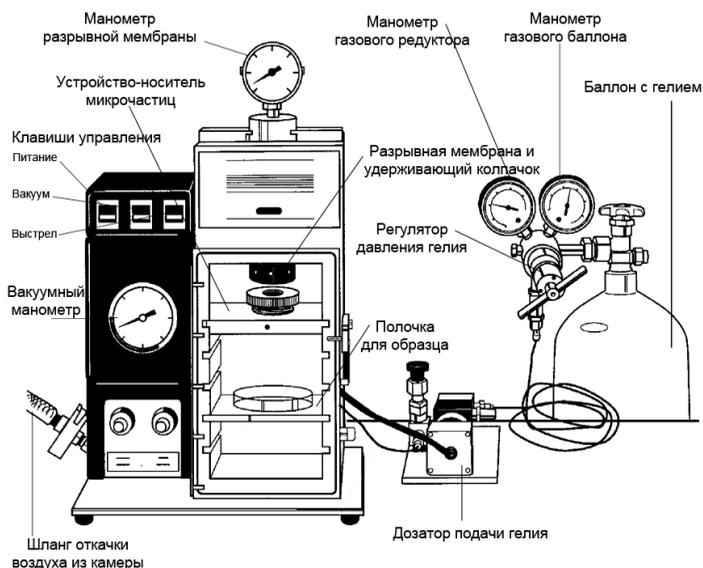


Рис. 19. Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System

2. Такие расходные материалы, как разрывные мембраны, мембраны для микрочастиц вместе с металлическими держателями и останавливающие сеточки (см. рис. 18, на вклейке), стерилизуют непосредственно перед биобаллистикой погружением в изопропанол с последующим тщательным просушиванием в потоке стерильного воздуха в ламинарном боксе в открытых чашках Петри. Расходные материалы удобнее стерилизовать заранее, прожаривая их в сухо-жаровом шкафу при температуре 180°C в течение 2 ч. Перед прожариванием расходные материалы в необходимом количестве раскладывают в чашки Петри и заворачивают в фольгу. Мембраны-носители микрочастиц, собранные с металлическими держателями (см. рис. 19), тоже можно стерилизовать в сухо-жаровом шкафу.

#### **Подготовка пушки к биобаллистике:**

3. Включить пушку (клавиша On/Off) и вакуумный насос (покупается отдельно). Можно использовать пластинчато-роторный насос НВР-4,5Д (быстрота действия – 1,25 л/с; предельный вакуум –  $1,5 \times 10^{-2}$  мм.тр.ст.; двигатель – 0,25 кВт, частота вращения – 3 000 об./мин; масса – 10 кг).

4. Открыть вентиль на верхушке газового баллона и поворачивать регулятор давления гелия, пока показания на манометре газового редуктора не будут на 200 psi<sup>2</sup> больше того давления, при котором вы будете стрелять, т.е. давления, на которое рассчитана выбранная разрывная мембрана (см. рис. 19).

5. Смочить разрывную мембрану в изопропаноле (или взять стерильную, например прожаренную) и поместить в удерживающий колпачок (рис. 20, на вклейке).

6. Навинтить удерживающий колпачок на место и, не прилагая лишних усилий, затянуть его с помощью стального стержня с ручкой (поставляется вместе с пушкой). Следует помнить, что ни в коем случае нельзя затягивать удерживающий колпачок, если в нем нет разрывной мембраны.

7. Собрать устройство-носитель микрочастиц (рис. 20, а–г). Для этого – вставить стерильную останавливающую сеточку в металлическое гнездо на носителе (рис. 20, б);

– поместить мембрану с держателем, покрытую соответствующими частицами, в гнездо над останавливающей сеточкой частицами вниз (рис. 20, в);

– навинтить покрывающий каркасный колпачок (рис. 20, г).

8. Поместить собранное устройство-носитель микрочастиц в камеру на необходимой дистанции от удерживающего колпачка (в самые верхние пазы вакуумной камеры).

---

<sup>2</sup> psi – фунт-сила на кв. дюйм, ед. давления.

Следует помнить, что дистанция между удерживающим колпачком разрывной мембраны и каркасным колпачком устройства-носителя микрочастиц должна равняться диаметру стального стержня, с помощью которого затягивают удерживающий колпачок.

9. Поместить чашку Петри с культурой (каллусами, эксплантами, листьями и т.п.) на подставку и вставить подставку в камеру на необходимом расстоянии от устройства-носителя микрочастиц.

10. Плотно закрыть дверь вакуумной камеры на защелку.

#### **Биобаллистика:**

11. Активировать пушку нажатием клавиши вакуум (VAC) на передней панели пушки в верхнее положение. Это приводит к удалению воздуха из главной камеры. (Следует отметить, что клавиша вакуум имеет три положения: верхнее – VAC, среднее – VENT и нижнее – HOLD).

12. Позволить стрелке вакуумного манометра достигнуть необходимого давления и задержать вакуум при помощи клавиши HOLD путем надавливания ее в нижнее положение.

13. Нажать кнопку FIRE и наблюдать за стрелкой манометра на верхушке пушки (манометр разрывной мембраны). Когда давление гелия достигнет давления разрыва мембраны, произойдет выстрел, разрывная мембрана будет прострелена. Схематически процесс биобаллистики показан на рис. 21. Возникшая ударная волна гелия достигнет мембраны с микрочастицами и придаст им ускорение. Частицы с большой скоростью будут бомбардировать образец, а останавливающая сеточка предотвратит падение мембраны-носителя микрочастиц на образец.

14. После бомбардировки давление в камере выровнять нажатием клавиши VENT в среднее положение.

15. Открыть дверку вакуумной камеры, убрать образец с подставки и закрыть чашку Петри.

16. Вытащить и разобрать устройство-носитель микрочастиц. Удалить мембрану-носитель микрочастиц вместе с держателем и останавливающую сеточку.

17. Отвинтить удерживающий колпачок, содержащий разрывную мембрану, и удалить ее остатки.

18. Для следующего выстрела все повторить, начиная с пункта 5.

#### **Завершение биобаллистики:**

19. После завершения всех бомбардировок закрыть кран на баллоне с гелием и сделать несколько холостых выстрелов (при этом разрывная мембрана не нужна). Задержать клавишу HOLD на необходимом давлении и выстрелить нажатием кнопки FIRE. Операцию повторить несколько раз, пока стрелка на манометре газового редуктора не выйдет на «0».

Таблица 5

**Условия биобаллистики для различных типов клеток и тканей  
по рекомендациям фирмы «BIO-RAD»**

Фаза роста	Плотность клеточной популяции	Осмотические стабилизаторы	Вакуум в камере, мм рт ст	Расстояние до образца, мм	Давление разрыва мембраны, psi	Размер частиц
<b>Бактерии</b>						
От поздней экспоненциальной до ранней стационарной	$10^8$ – $10^9$ на 100 мм чашки Петри	0,75 М сорбитол	29	6	1100	М5 вольфрам
<b>Дрожжи</b>						
Ранняя стационарная	$10^8$ – $10^9$ на 100 мм чашки Петри	0,75 М сорбитол и 0,78 М маннитол	28	6	1300	0,6 мкм золото
<b>Водоросли</b>						
Экспоненциальная	$10^8$ – $10^9$ на 100 мм чашки Петри	–	29	6	1300	0,6 мкм золото
<b>Растения: зародыши</b>						
–	10 эксплантов на 100 мм чашки Петри	–	28	6	1300	1,0 мкм золото
<b>Растения: каллусы и клеточные культуры</b>						
Экспоненциальная	0,75 мл насыщенной суспензии	–	28	9	1100	1,0 мкм золото
<b>Растения: внутриклеточные органеллы</b>						
Экспоненциальная	$5 \times 10^7$ на 100 мм чашки Петри	–	28	6	1300	0,6 мкм золото
<b>Животные: культура ткани</b>						
Экспоненциальная	50–80%–ный слив на 35 мм чашки Петри	–	15	3	1100	1,6 мкм золото
<b>Животные: срезы ткани</b>						
От 1 ч до 4 дней после получения среза	400 мкм среза	–	25	9	1100	1,6 мкм золото

Нажать клавишу VENT в среднее положение, чтобы убрать вакуум и закрыть регуляторную крышку.

20. Выключить пушку и вакуумный насос.

21. Обработать вакуумную камеру, удерживающий колпачок, устройство-носитель микрочастиц 96%-ным этанолом и высушить перед помещением обратно в камеру.

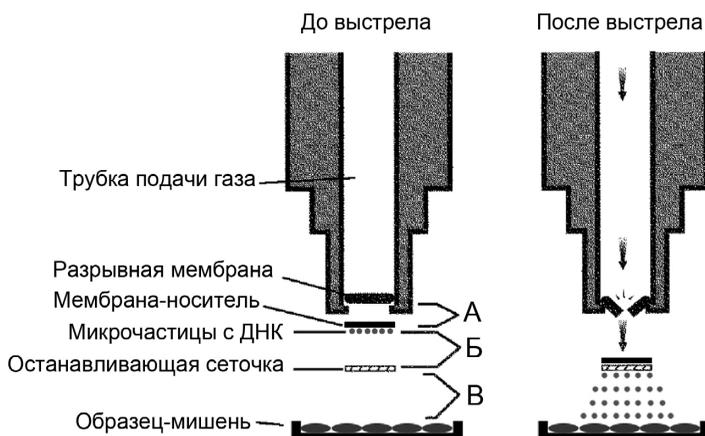


Рис. 21. Схема процесса биобаллистики

**Условия для биобаллистической трансформации.** В табл. 5 приведены примерные условия, подходящие для трансформации различных типов клеток и тканей. Однако в каждом конкретном случае эти условия подбираются и оптимизируются экспериментально.

### Раздел 3. Молекулярные методы анализа трансгенных растений

#### 3.1. ПЦР-анализ

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – это эффективный способ получения *in vitro* большого числа копий специфических нуклеотидных последовательностей. Их амплификация, порой в миллионы раз, достигается в ходе трехэтапного циклического процесса. Для ПЦР конкретного участка ДНК необходимо следующее:

1) два синтетических олигонуклеотидных праймера (длиной примерно 20 п.н.), комплементарные участкам ДНК из противоположных цепей, фланкирующих целевую последовательность, их 3'-гидроксильные концы после отжига с ДНК должны быть ориентированы в противоположные стороны;

2) ДНК-матрица, содержащая участок ДНК, который предполагается амплифицировать;

3) термостабильная ДНК-полимераза (Taq-полимераза), которая не теряет своей активности при температуре 95°C и выше;

4) набор всех четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (dATP, dGTP, dCTP);

5) ионы  $Mg^{2+}$ , необходимые для работы Taq-полимеразы;

6) буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции, pH, ионную силу раствора. Обычно ионы магния уже содержатся в буферном растворе, поставляемом вместе с Taq-полимеразой.

Таким образом, обычно реакционная смесь для амплификации объемом 20 мкл (стандартный объем для одной реакции 15–20 мкл) содержит: по 0,25 пМ праймеров на целевую ДНК; 30 нг ДНК-матрицы; 2 ед. термостабильной Taq-ДНК-полимеразы; 0,2 мМ каждого dNTP; 1,5 мМ  $MgCl_2$ ; 60 мМ Tris-HCl (pH = 8,5), 25 мМ KCl; 10 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанола; 0,1% Тритон X-100.

Успех проведения ПЦР существенно зависит от правильного выбора праймеров. Чтобы минимизировать возможность неправильного спаривания нуклеотидов, праймер должен соответствовать некоторым требованиям:

– он должен быть длиной 20–30 нуклеотидов, что позволяет обеспечить должную специфичность для целевой последовательности, даже для больших геномов;

– не должен содержать повторяющихся последовательностей и повторов одного и того же нуклеотида подряд более 3 раз, так как это может привести к ошибкам спаривания с матричной ДНК;

– не должен содержать трех или более повторяющихся нуклеотидов G или C на 3'-конце, так как это может привести к неправильному спариванию в GC-богатых районах;

– не должен образовывать вторичных структур типа «шпилек»;

– не должен содержать участков, комплементарных самому себе или любому другому содержащемуся в реакции праймеру, чтобы не образовывались димеры праймеров в ходе реакции.

Желательно, чтобы в праймере содержалось больше нуклеотидов G и C, чем нуклеотидов A и T, так как пара GC имеет более высокую температуру плавления и, соответственно, чем больше таких пар в праймере, тем выше температура отжига праймеров в реакции амплификации и специфичность этой реакции. Кроме того, желательно, чтобы температура отжига для первого и для второго праймеров отличалась как можно меньше.

Температура отжига для праймеров длиной до 25 нуклеотидов рассчитывается по следующей формуле:

$$T_0 = (\text{количество G + C}) \times 4^\circ\text{C} + (\text{количество A + T}) \times 2^\circ\text{C}.$$

Подобрать праймеры к известной последовательности ДНК могут помочь различные программы, такие как Oligo, NTI, Lasergene, Primer-Primer. Также существуют бесплатные онлайн-ресурсы, например, Primer-BLAST на сервере NCBI, благодаря которым можно подобрать праймеры к заданной последовательности или дать оценку уже подобранной паре праймеров относительно их специфичности.

Типичная реакция амплификации состоит в многократном повторении следующих трех реакций:

1. **Денатурация.** Первый этап состоит в тепловой денатурации образца ДНК выдерживанием его при температуре  $95^\circ\text{C}$  в течение 30–60 с.

2. **Отжиг (ренатурация).** Температуру смеси медленно понижают до  $\sim 55^\circ\text{C}$  (в зависимости от праймеров), при этом праймеры спариваются с комплементарными последовательностями ДНК. Продолжительность этапа 20–90 с.

3. **Элонгация (синтез).** Температуру повышают до  $\sim 72^\circ\text{C}$ , величины оптимальной для Taq-полимеразы. Начинается синтез комплементарной цепи ДНК-инициируемый 3'-гидроксильной группой праймера. Продолжительность этапа 0,5–3 мин.

Все реакции проводят в пробирках, погруженных в термостат (амплификатор). Смена температурного режима и его поддержание осуществляется автоматически. Чтобы избежать испарения реакционной смеси, в пробирку добавляют высококипящее масло, обычно минеральное. Если используется амплификатор с подогревающейся крышкой, этого делать не требуется.

Кроме того, стандартная процедура ПЦР включает в себя первичное плавление при  $93\text{--}95^\circ\text{C}$  в течение 2–4 мин, которое проводится перед первым циклом. Предварительный прогрев проводится для начальной денатурации матрицы. Если матрица одноцепочечная или является ПЦР-

продуктом, этот этап не проводится. Конечный синтез проводится при 72°C 10 мин для устранения одноцепочечных участков в продукте.

Каждая реакция амплификации с матричной ДНК проводится в индивидуальной чистой пробирке. Каждый реагент и образец отбирается чистым носиком автоматической пипетки. Желательно, чтобы на том столе, где готовят растворы для ПЦР, ранее не выделяли ДНК и не ставили электрофорезы с продуктами ПЦР во избежание заноса посторонней ДНК в реакцию.

Необходимо, чтобы в каждой ПЦР наряду с обычными образцами присутствовали:

- отрицательный контроль. В каждом эксперименте в одну из пробирок не добавляется матричная ДНК. Отсутствие ПЦР-продукта в такой пробирке говорит о чистоте реакционной смеси;

- положительный контроль. В одну из пробирок в качестве матрицы добавляется ДНК, гарантированно несущая тестируемый ген (например, плазида, использованная для создания трансгенной конструкции).

Кроме того, в одну из пробирок в качестве матрицы добавляется ДНК нетрансгенного растения. Отсутствие ПЦР-продукта в данном случае будет свидетельствовать об отсутствии в геномной ДНК растения участков, амплифицируемых с этими праймерами, а наличие этого фрагмента в пробирках с ДНК трансгенных растений в виде матрицы свидетельствует об их трансгенной природе.

Таким образом, для того, чтобы протестировать ДНК 7 трансгенных растений, необходимо приготовить реакционную смесь на 10 реакций: 7 образцов + положительный + отрицательный контроль + образец с ДНК нетрансгенного растения. Обычная реакция амплификации проводится в объеме 15–20 мкл.

### ***Работа 16. Порядок проведения ПЦР и типовой расчет***

***Материалы и оборудование:*** центрифуга «vortex», ПЦР-бокс, амплификатор, холодильник с морозильной камерой на –20°C, автоматические пипетки (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл, 1–5 мл), стерильные и нестерильные наконечники универсальные (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл, 1–5 мл), пробирки пластиковые «Eppendorf» объемом 1,5 мл, микропробирки пластиковые с плоской крышкой «flat cap» для ПЦР «Eppendorf» объемом 0,2 мл (или 0,5 мл – соответственно амплификатору) 11 шт., перчатки стоматологические текстурированные нестерильные, перчатки нитриловые, криштатив для

пробирок объемом 1–2 мл, штатив «рабочее место» для микропробирок на 0,5 мл, 10×10 мест, лента лабораторная «Parafilm M», Water nuclease-free (вода) Fermentas, реактивы для проведения ПЦР-реакции – 10× смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP), 10× реакционный буфер, 10× праймеры, Taq-полимераза, минеральное масло, спиртовка, спички, спирт для спиртовок, спирт для обработки столешницы и инструментов, фарфоровый стакан, стерильные пинцеты, лед, маркеры.

### ***Ход работы:***

Приведем пример расчета и постановки типичной ПЦР для проверки трансгенного статуса полученных растений. Предположим, что исследуемые растения несут в качестве маркерного *nptII* ген устойчивости к антибиотику канамицину. Таким образом, для ПЦР берем следующие праймеры:

- npt1 5'-CGACGTTGCTACTGAAGCG-3';
- npt2 5'-AAGCACGAGGAAGCGGTCAG-3'.

Они ограничивают участок гена *nptII* длиной 487 пар нуклеотидов.

Режим амплификации с этими праймерами следующий:

1. 95°C – 3 мин.
2. 95°C – 30 с.
3. 62°C – 30 с.
4. 72°C – 30 с.
5. Стадии 2–4 повторяются 35 раз.
6. 72°C – 5 мин.

Если прибор имеет нагревающуюся крышку, то крышку следует настроить на 103–105°C.

Растворы для ПЦР как правило готовят в предварительно подготовленном ПЦР-боксе, для этого необходимо протереть столешницу этиловым спиртом и простерилизовать при помощи ультрафиолета. В боксе не должно быть ничего лишнего, только то, что непосредственно требуется для работы в данный момент (рис. 22, на вклейке).

Дальнейшие работы проводятся в ПЦР-боксе в резиновых перчатках.

1. Подписать пробирки на 0,2 или 0,5 мл (в зависимости от используемого амплификатора) и подготовить пробирки с раствором ДНК исследуемых растений (разморозить, если требуется, расставить соответственно подписанным для ПЦР пробиркам и пр.).

2. Приготовить реакционную смесь для проведения ПЦР. Смесь без матрицы и минерального масла приготовить в одной пробирке и затем разнести по индивидуальным.

На 10 реакций понадобится  $15 \times 10 + 10\% = 165$  мкл реакционной смеси. Необходимо взять:

- 16,5 мкл 10× смеси dNTP,
- 16,5 мкл 10× реакционного буфера,
- 16,5 мкл 10х первого и
- 16,5 мкл 10× второго праймеров (или 16,5 мкл 10 × смеси обоих праймеров),
- 10–20 ед. Taq-полимеразы (допустим, это 5 мкл),
- 165 мкл – (16,5 мкл × 4 + 5 мкл) = 94,5 мкл деионизированной автоклавируемой H<sub>2</sub>O (или 110,5 мкл, если изначально были смешаны оба праймера).

Перемешать все компоненты. Taq-полимеразу добавить в последнюю очередь, вынув ее из морозильной камеры холодильника и поместив на лед. Такая предосторожность необходима, чтобы избежать падения активности данного фермента, происходящего при комнатной температуре. Каждый реактив брать из пробирки новым чистым носиком.

3. Полученную реакционную смесь раскапать по 15 мкл в подготовленные пробирки.

4. Добавить в каждую пробирку, кроме пробирки с отрицательным контролем, по 1 мкл матричной ДНК.

5. Добавить минеральное масло, если требуется, чтобы оно полностью покрывало поверхность реакционной смеси, обычно по 20–30 мкл.

6. Поместить пробирки в амплификатор и запустить соответствующий режим, который должен соответствовать праймерам, используемым в реакции (рис. 23, 24, на вклейке).

Если образцы не анализируются сразу после окончания амплификации, их следует поместить в холодильник на –20°C.

### 3.2. Гель-электрофорез нуклеиновых кислот

Электрофорез (от электро- и греч. φορέω – переносить) – это электрокинетическое явление перемещения частиц дисперсной фазы (коллоидных или белковых растворов) в жидкой или газообразной среде под действием внешнего электрического поля.

Основной принцип электрофореза прост: в водном растворе какой-либо соли создается разница потенциалов между двумя разноименно заряженными электродами, при этом положительно заряженные ионы (например, ионы Na<sup>+</sup>) двигаются к катоду «–», отрицательно заряженные (например, Cl<sup>–</sup>) – к аноду «+». По традиции катод и провода, идущие к нему, окрашены в черный цвет, а анод и провода, идущие к нему, – в красный.

Электрофорез в агарозном геле используют для разделения, идентификации и очистки фрагментов ДНК, а также для определения качества интактной плазмиды (не обработанной ферментами). ДНК в геле окрашивают интеркалирующим (чаще всего) или флуоресцирующим красителем. В ультрафиолетовом свете в агарозном геле можно заметить даже 1 нг ДНК.

Скорость миграции ДНК при электрофорезе определяется шестью параметрами:

- размером молекулы ДНК;
- концентрацией геля;
- конформацией молекулы ДНК;
- напряженностью электрического поля;
- составом оснований ДНК;
- температурой геля при проведении электрофореза.

Электрофорез ДНК проводят в трис-боратном (ТВЕ) или трис-ацетатном (ТАЕ) буфере. Исторически сложилось так, что агарозный электрофорез чаще проводят в ТАЕ.

**Окрашивание ДНК в геле.** Удобнее всего для окрашивания ДНК в агарозном геле использовать флуоресцирующий интеркалирующий краситель бромистый этидий. Молекула этого вещества содержит плоскую группу, которая интеркалирует между соседними основаниями ДНК. В результате УФ-излучение, поглощаемое ДНК, передается на краситель и испускается затем в красно-оранжевой области видимого спектра (590 нм). Окрасить ДНК в геле можно несколькими способами: добавить в гель после варки (0,5 мкг/мл), в буфер в электрофорезной камере или покрасить гель после проведения электрофореза. Следует помнить, что в присутствии бромистого этидия подвижность ДНК снижается примерно на 15%, но зато есть возможность контролировать процесс разделения периодически во время проведения электрофореза.

**Бромистый этидий – сильный мутаген, поэтому все манипуляции с ним и окрашенными гелями следует проводить в перчатках!!**

Концентрация агарозного геля, как правило, обратно пропорциональна длине ДНК, для длинных фрагментов (несколько т.п.н.) интактных плазмид обычно используют 0,8%-ный агарозный гель, для фрагментов в несколько сот п.н. используют 1–3%-ные гели. дцДНК обычно мигрирует в геле быстрее, чем линейная или кольцевая ДНК такого же размера.

Разумный компромисс между скоростью и качеством электрофореза для высококачественных или препаративных агарозных электрофорезов – около 2 В/см (можно меньше). Для аналитических агарозных электрофорезов приемлемое качество сохраняется до 6 В/см.

Состав оснований ДНК и температура геля наименьшим образом влияют на скорость и качество агарозного электрофореза.

### ***Работа 17. Анализ результатов ПЦР методом электрофореза в агарозном геле***

**Материалы и оборудование:** центрифуга «vortex», камера для электрофореза, заливочный столик, источник тока, ультрафиолетовый трансиллюминатор, весы, термостат, электрическая плитка или микроволновая печь, холодильник, таймер, автоматические пипетки (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл, 1–5 мл), стерильные и естерильные наконечники универсальные (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл, 1–5 мл), мерные цилиндры (на 10, 50 мл), колбы (на 250 мл), перчатки стоматологические текстурированные нестерильные, перчатки нитриловые, штатив для пробирок объемом 1–2 мл, штатив «рабочее место» для микропробирок на 0,5 мл 10×10 мест, лента лабораторная «Parafilm M», 6×DNA Loading Dye (краситель – 6×MassRuler™ раствор с красителями для нанесения образцов на гель), этидиум бромид, Gene ruler 100 bp Plus DNA Ladder 0,5 мкг/мкл, дистиллированная вода, агароза для электрофореза, 50× TAE (или TBE) буфер, лабораторный журнал, ручка, маркеры, пищевая пленка.

#### ***Ход работы:***

Электрофорез является наиболее простым методом разделения макромолекул по массе, пространственной конфигурации, заряду (под действием внешнего электрического поля). При фракционировании линейных фрагментов ДНК разделение определяется только их размером. Причинами этого являются стабильно отрицательный заряд ДНК и постоянное отношение заряда к массе. Основными параметрами, влияющими на разделение молекул при электрофорезе, являются:

- 1) размер пор, который зависит от вещества, образующего гель, и его концентрации;
- 2) напряженность электрического поля.

Гели для разделения ДНК готовят из акриламида или агарозы. Для разделения фрагментов, значительно различающихся по размерам, лучше использовать гели на основе агарозы. Обычно для разделения продуктов ПЦР реакции используется 1–2%-ный агарозный гель в зависимости от длины амплифицированного фрагмента (чем больше длина, тем ниже концентрация геля). Для окрашивания ДНК после электрофореза исполь-

зуют бромистый этидий – краситель, несущий положительный заряд и внедряющийся между плоскостями соседних пар оснований. Чувствительность метода достаточно высока: в агарозных гелях удается наблюдать полосы, содержащие 10 нг двуцепочечной ДНК.

Электрофорез проводят в одном из двух буферов: ТАЕ или ТВЕ.

Для приготовления 1 л 50× ТАЕ (Трис-Ацетат-ЭДТА) потребуется:

– 242 г трис-основной (**категорически не трис-НС!!!!**);

– 57,1 мл ледяной уксусной кислоты;

– 100 мл 0,5 М ЭДТА;

– дистиллированная вода – до 1 л, рН довести до 8,5.

Для приготовления 1 л 10× ТВЕ (Трис-борат-ЭДТА) необходимо:

– 108 г трис-основной (**категорически не трис-НС!!!!**);

– 55 г борной кислоты;

– 9,3 г  $\text{Na}_4\text{EDTA}$  (заранее приготовленный раствор ЭДТА, титрованный и проавтоклавированный);

– дистиллированная вода – до 1 л. рН буфера равен 8,5 и доведения не требует.

### **Порядок проведения электрофореза:**

1. Для приготовления геля использовать тот же буфер, в котором будет проводиться электрофорез, лучше взятый из одной колбы и одного разведения, так как в геле и буфере должны быть идентичные ионы одинаковой концентрации. Для приготовления 50 мл 1,5%-ного агарозного геля понадобится:

– 1,5 г агарозы;

– 1 мл 50× ТАЕ (или 5 мл 10× ТВЕ, если электрофорез проводится в 1× ТВЕ буфере);

– дистиллированная вода до 50 мл.

Полученную смесь с агарозой плавить в микроволновой печи или на плитке до полного растворения и получения прозрачного раствора. К охлажденной до 50–55°C агарозе добавить бромистый этидий до конечной концентрации 0,5 мкг/мл (на 100 мл р-ра агарозы 10 мкл концентрированного раствора бромистого этидия 5 мкг/мкл). **Осторожно!!! С бромистым этидием необходимо работать в перчатках, соблюдая меры предосторожности, как при работе с мутагенами!**

2. В установленную в горизонтальном положении (при помощи уровня) электрофоретическую кювету или заливочный столик залить раствор агарозы слоем 5–7 мм и сразу же вставить гребенку, оставляя зазор в 0,5–1,0 мм между дном кюветы и гребенкой (рис. 25, на вклейке). Застывание геля при комнатной температуре длится 20–40 мин.

3. Поместить гель в электрофоретическую камеру. Заполнить ее таким количеством  $1 \times$  ТАЕ буфера, чтобы покрыть гель слоем в 3–5 мм.

4. Аккуратно вынуть гребенку.

5. Приготовить и нанести раствор со стандартным маркером молекулярной массы ДНК в лунку геля. В качестве маркера можно использовать фирменные препараты, содержащие фрагменты с молекулярными массами, кратными 100 п.н., а также самостоятельно приготовленные препараты (например, плазида pBlueskript, порезанная рестриктазой MspI). Маркер следует выбирать, основываясь на предполагаемой длине ПЦР-продукта, так как именно по размерам фрагментов маркера мы можем сделать вывод о размерах нашего анализируемого фрагмента (рис. 26, на вклейке). Необходимое количество маркера (обычно 2–5 мкл) смешать с 2 мкл красителя и нанести в лунку. Краситель для нанесения – 30%-ный глицерин, 0,3%-ный бромфеноловый синий, 0,3%-ный кисленцианол.

6. Приготовить анализируемые образцы ДНК для нанесения (рис. 27, на вклейке). К 2 мкл красителя добавить 5–7 мкл ПЦР продукта. Перемешать образец с краской пипетированием и тут же нанести в лунку геля (рис. 28, на вклейке). Записать порядок нанесения образцов в рабочий журнал.

Если ПЦР проводился с использованием минерального масла, то образец следует набрать путем аккуратного прокалывания носиком слоя масла либо добавить равный объем хлороформа и отобрать образец из образовавшейся капли.

Если предполагается использовать образцы повторно, то пробирки необходимо заморозить при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

7. Провести электрофорез при 4–6 В/см на расстояние, необходимое для определения молекулярной массы фрагмента (рис. 29, на вклейке).

8. Аккуратно извлечь гель из камеры, перенести в трансиллюминатор и сфотографировать (рис. 30, на вклейке). **Осторожно! При работе с трансиллюминатором не смотреть на источник УФ-света без защитного экрана или очков!**

9. Определить размеры амплифицированных фрагментов путем сравнения с размерами маркерных фрагментов ДНК.

**Тестирование на наличие растительной ДНК и ее пригодность для ПЦР.** Для этого можно провести ПЦР с праймерами на ген из генома используемого растения. Наличие фрагмента в результате ПЦР будет свидетельствовать о том, что выделенная ДНК действительно принадлежит данному растению.

Праймеры для амплификации геномной ДНК табака:

На ген *NtGA2*:

NtGA1 5'-ACAGTTGCCCTTGCTTATCGC-3';

NtGA2 5'-ТТСААСАСГААССГААСАГАС-3'.

Длина получающегося в результате ПЦР фрагмента 609 п.н.

Праймеры для амплификации геномной ДНК моркови:

На ген экстенсина:

car1 5'-АССТССТССТССТСАССАСТАС-3';

car2 5'-ТААГТТGGCCTCCATCAGTGTC-3'.

Длина итогового фрагмента 249 п.н.

Режим амплификации:

1. 95°C – 3 мин.

2. 60°C – 30 с

3. 72°C – 1 мин.

Повторить этапы 1-3 3 раза (3 цикла).

4. 95°C – 30 с.

5. 62°C – 30 с.

6. 72°C – 1 мин.

Повторить этапы с 4-го по 6-й 32 раза (32 цикла).

**Тестирование на отсутствие агробактерии в межклетниках исследуемых растений.** Для проверки провести ПЦР образцов ДНК исследуемых растений с праймерами на фрагмент гена *A. tumefaciens*:

A<sub>1</sub> 5'-CATGATCGGCCGGCTGACA-3';

A<sub>2</sub> 5'-TGCGCAGGTCGCTTGCTTC-3'.

Длина ПЦР-фрагмента 277 п.н.

Режим амплификации:

1. 95°C – 3 мин.

2. 64°C – 30 с.

3. 72°C – 1 мин.

4. 95°C – 40 с.

5. 64°C – 30 с.

6. 72°C – 1 мин.

Повторить этапы с 4-го по 6-й 3 раза (3 цикла).

7. 95°C – 40 с.

8. 62°C – 30 с.

9. 72°C – 1 мин.

Повторить этапы с 7-го по 9-й 28 раз (28 циклов).

На рис. 31 представлена электрофореграмма разделения продуктов амплификации геномной ДНК трансгенных растений табака. В каждой реакции амплификации участвовали одновременно три пары праймеров. Фрагменты геномной ДНК, обозначенные на дорожках буквой «а», соот-

ветствуют гену *NiGA2*, что подтверждает наличие в образцах геномной ДНК, выделенной из растений табака.

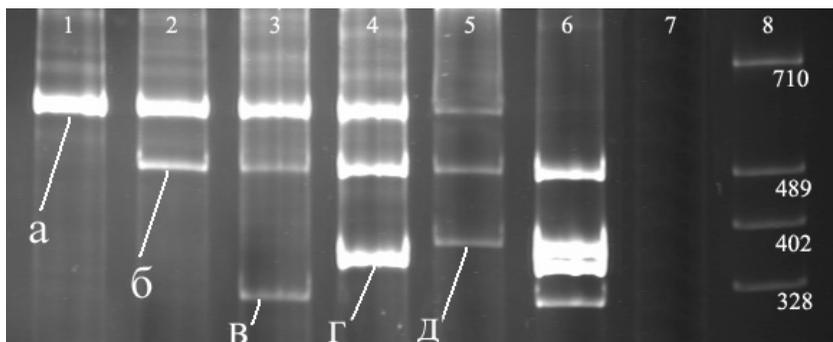


Рис. 31. Электрофореграмма продуктов ПЦР в 6%-ном акриламидном геле: *а* – фрагмент гена *NiGA2* из генома табака; *б* – фрагмент гена *nptII*; *в* – векторный фрагмент BD1/2; *г* – векторный фрагмент BD5/6; *д* – векторный фрагмент BD3/4; дорожки: 1 – ДНК нетрансгенного растения табака линии SRI; 2 – ДНК трансгенного растения Res 36; 3–5 – ДНК трансгенного растения 16.22; 6 – ДНК плазмиды pB121; 7 – отрицательный контроль, без матрицы; 8 – маркер pBlueskript/mspI, указана длина каждого фрагмента

Продукты амплификации, обозначенные на дорожках буквой «б», соответствуют маркерному гену *nptII*, что свидетельствует о трансгенном статусе анализируемых растений. Продукты амплификации, обозначенные буквами «в», «г», «д», соответствуют фрагментам векторной ДНК: «в» – фрагменту BD1/2; «г» – фрагменту BD3/4; «д» – фрагменту BD5/6.

### 3.3. Определение активности репортерных генов

Помимо генов доминантных селективных маркеров, таких, например, как *nptII* или *bar*, необходимых для отбора трансгенных растений, в генетической инженерии используют так называемые репортерные гены. Данные гены, входящие в состав экспрессионных векторов по отдельности или вместе с целевыми генами, весьма удобны для исследования временных или тканевых особенностей их экспрессии. Особенно часто для этих целей используют ген  $\beta$ -глюкуронидазы (*gus*-ген, синонимы: *gusA*, *uidA*) и ген зеленого флуоресцентного белка (*gfp*-ген). Рассмотрим примеры определения активности этих генов в тканях трансгенных растений.

## Работа 18. Гистохимическое выявление GUS-активности

**Материалы и оборудование:** весы аналитические, рН-метр, холодильник с морозильной камерой на  $-20^{\circ}\text{C}$ , автоматические пипетки (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл, 1–5 мл), нестерильные наконечники универсальные (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл, 1–5 мл), стеклянные стаканы на 100 мл – 2–3 шт., пробирки пластиковые «Eppendorf» объемом 1,5 мл, перчатки стоматологические текстурированные нестерильные, фольга, маркеры, NaCl,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , Triton X-100, X-Gluc, DMSO, дистиллированная вода.

### Ход работы:

Субстратом для гистохимического выявления  $\beta$ -глюкуронидазы в тканях и клетках трансгенных растений служит 5-бром-4-хлор-3-индолилглюко-ронид (X-Gluc). При реакции с данным субстратом в области локализации фермента образуется голубой осадок. Для исследования можно использовать тонкие срезы стеблей и черешков листьев растений, целые листья, проростки и каллусные культуры, выращенные *in vitro* и *in vivo*.

В самом простом случае для выявления активности гена *gus* необходимы 4 компонента: трансгенный растительный материал, фосфатный буфер (PBS), 10%-ный раствор тритона X-100 и 1 мМ раствор субстрата X-Gluc.

**PBS-фосфатный буфер.** Для приготовления буфера необходимы: NaCl – 8,2 г,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,264 г,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  – 1,6 г. Растворить соли в дистиллированной воде, довести объем раствора водой до 1 000 мл, довести рН раствора до 7,2.

**Triton X-100.** В качестве стока (маточного раствора) можно использовать 10%-ный раствор. Отвесить в мерном стаканчике 10 г Triton X-100 и довести объем дистиллированной водой до 100 мл. Для окрашивания нужен 0,5%-ный раствор, следовательно, 10%-ный раствор разводят в 20 раз, добавляя фосфатный буфер.

**X-Gluc.** Обычно в реакционной смеси, используемой для гистохимического выявления GUS-активности, концентрация субстрата X-Gluc должна составлять 1 мМ. Можно каждый раз отвешивать реактив на необходимый объем реакционной смеси, но гораздо удобнее разделить реактив на аликвоты. Обычно для окрашивания нескольких образцов, например небольших листьев, вполне достаточно 25 мл реакционной смеси.

Учитывая, что молекулярная масса X-Gluc составляет 521,8 г, для получения его конечной концентрации в 1 мМ необходимо к 25 мл буфера с

Triton X-100 добавить 13 мг X-Gluc. Однако **X-Gluc не растворим в воде или буфере, поэтому его растворяют в реактиве DMSO.**

Например, можно отвесить 130 мг X-Gluc, растворить его в 1 000 мкл DMSO и разделить раствор на 10 пробирок по 100 мкл. Одна такая пробирка расходуется на 25 мл буфера, т.е. когда будет проводиться окрашивание образца, данный объем X-Gluc в DMSO добавляют к 25 мл буфера с Triton X-100.

Необходимо помнить, что X-Gluc чувствителен к температуре и разрушается от действия света, поэтому сам реактив и его раствор в DMSO необходимо хранить при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  в емкости, завернутой в фольгу.

### ***Работа 19. Процедура гистохимического окрашивания***

***Материалы и оборудование:*** весы аналитические, термостат, термостатируемый шейкер, рН-метр, ламинар-бокс, холодильник с морозильной камерой на  $-20^{\circ}\text{C}$ , таймер, автоматические пипетки (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл, 1–5 мл), нестерильные наконечники универсальные (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл, 1–5 мл), стеклянные стаканы на 100 мл – 2–3 шт., пробирки пластиковые «Falkon» объемом 15 мл или 50 мл (количество пробирок и используемый объем зависят от размера и количества образцов), пробирки пластиковые «Eppendorf» объемом 1,5 мл, перчатки стоматологические текстурированные нестерильные, шприцы объемом 20 мл, фольга, спиртовка, спички, спирт для спиртовок, спирт для обработки столешницы и инструментов, фарфоровый стакан, стерильные пинцеты и скальпели, маркеры, растительный материал для анализа (нетрансформированные и трансформированные каллусные ткани, листья и т.д.), фосфатный буфер (PBS), 0,5%-ный раствор Triton X-100, раствор X-Gluc в DMSO, дистиллированная вода, 70%-ный этиловый спирт.

#### ***Ход работы:***

Реакционная смесь готовится следующим образом. В пластиковую пробирку (50 мл) «Falkon» с крышкой отобрать 1,32 мл 10%-ного Triton X-100 и добавить фосфатный буфер (PBS) рН = 7,2 до 25 мл. Разморозить пробирку с субстратом X-Gluc и добавить к 25 мл буфера с Triton X-100. Тщательно перемешать.

Важным моментом при проведении окрашивания является хорошее проникновение реакционной смеси в плотные растительные ткани. Для

этого открытую пробирку с реакционной смесью и исследуемыми образцами ставят в вакуумную камеру и насосом откачивают воздух, что позволяет реакционной смеси проникнуть глубоко в ткани растений и обеспечить качественное окрашивание. Для подобной процедуры удобно использовать вакуумную камеру генной пушки. Однако в самом простом случае достаточно использовать одноразовые шприцы большого объема, например на 20 мл. Процедура довольно проста. Нужно вытащить из шприца поршень, поместить внутрь образец (листья, проростки, плотный каллус и т.п.) и вставить поршень на место. Затем набрать в шприц достаточное количество реакционной смеси, заткнуть пальцем отверстие и вытянуть поршень, создав таким образом вакуум в шприце. Повторить несколько раз. После этого перенести образцы вместе с реакционной смесью из шприца пробирку. **Следует помнить, что все процедуры следует проводить в перчатках.**

Для ускорения гистохимического окрашивания образцы в реакционной смеси нужно инкубировать в термостате при температуре 37°C в течение нескольких часов, можно оставить на ночь.

Хлорофилл, содержащийся в зеленых частях растений, сильно маскирует GUS-окрашивание. В связи с этим хлорофилл нужно отмыть с помощью 70%-ного этилового спирта. Для этого удалить из пробирки реакционную смесь и залить образцы спиртом. Отмывать можно на шейкере.

На рис. 32 и 33 (на вклейке) представлены результаты гистохимического выявления GUS-активности в каллусной ткани и листьях пробирочных растений стабильных трансформантов табака и транзитной экспрессии *gus*-гена, полученной в результате биобаллистики.

## ***Работа 20. Выявление активности GFP***

Зеленый флюоресцентный белок (green fluorescent protein – GFP) в настоящее время является одним из самых распространенных репортерных белков, используемых в трансгенезе. Это можно объяснить наличием у GFP ряда особых свойств:

1. GFP способен флюоресцировать в видимой (зеленой) области спектра при облучении УФЛ ( $\lambda = 488$  нм).
2. Для флюоресценции не требуется субстратов или кофакторов.
3. Белок стабилен и выдерживает обработку протеазами и денатурирующими агентами в течение нескольких часов.
4. Не обладает цитотоксичным эффектом.
5. Детекцию GFP можно осуществлять уже через несколько часов после трансформации. Очень часто GFP используется в качестве флюорес-

центной метки для локализации клеточных белков, не нарушая при этом их функцию.

Длина GFP составляет 238 аминокислот, а молекулярная масса – 27 кДа. Хромофор представляет собой *n*-оксибензилиден-имидазолидинон. В его формировании принимают участие три аминокислоты в позиции 65–57. Хромофор образуется после синтеза белка путем окисления оксибензольной группы тирозина и автокаталитической циклизации. Молекула белка имеет структуру β-«консервной банки» (β-«can»), внутри которой располагается хромофор.

Интересно отметить, что экспериментальные модификации первичной последовательности аминокислот хромофора привели к смещению эмиссионного спектра и созданию группы разноцветных автофлуоресцентных белков (AFP) от желтого до синего. В дополнение к этим белкам используется еще один AFP оранжево-красного цвета – DsRed, выделенный из морской анемоны рода *Discosoma*. Основные характеристики автофлуоресцентных белков приведены в табл. 6 (на вклейке).

**Материалы и оборудование:** микроскоп Axioskop 2 PLUS (Carl Zeiss, Германия), набор фильтров для флуоресцентной микроскопии № 09 (Carl Zeiss, Германия), рН-метр, предметные и покровные стекла, гистологические иглы, пинцет, фосфатный буфер (PBS) с рН = 7,2, марлевые салфетки, фильтровальная бумага.

#### **Ход работы:**

На предметное стекло в каплю PBS-буфера поместить часть листа трансгенного растения или кусочек трансгенной каллусной культуры. Каллус необходимо размачерировать иглой или пинцетом. Накрыть препарат сверху покровным стеклом подходящего размера. При необходимости под покровное стекло можно добавить буферного раствора, чтобы удалить воздух. Поместить предметное стекло под объектив малого увеличения (5× или 10×) и рассмотреть образец в УФ-свете с использованием необходимого набора фильтров. При работе на микроскопах фирмы Carl Zeiss для детекции стандартного GFP-белка используют фильтр № 09. Характеристика этого набора фильтров показана на рис. 34 (на вклейке).

На рис. 35 (на вклейке) представлены результаты по детекции GFP-флуоресценции в листовых тканях и суспензионной культуре клеток трансгенных растений табака, полученных методом агробактериального переноса генов. Детекция проводилась на микроскопе Axioskop 2 PLUS (Carl Zeiss, Германия) с использованием набора фильтров для флуоресцентной микроскопии № 09 (Carl Zeiss, Германия).

## Раздел 4. Анализ наследования трансгенов у трансгенных растений на примере *nptII*-гена у *Nicotiana tabacum*

### 4.1. Анализ проявления маркерного гена *nptII* на селективных средах с антибиотиком канамицином

У трансгенных растений проявление чужеродных генов соответствует доминантным мутациям при полном доминировании, а их наследование подчиняется законам Менделя. Например, проявление маркерного гена *nptII* оценивается на селективной среде с антибиотиком канамицином. Канамицин в растительной клетке избирательно взаимодействует с 30S субъединицами рибосом хлоропластов, что приводит к нарушению синтеза хлорофилла и в итоге к нарушению фотосинтеза. Блокирование фотосинтеза вызывает замедление и остановку дальнейшего развития растений. В течение короткого промежутка времени (2–4 недели) растения на среде с канамицином белеют и погибают (рис. 36, на вклейке).

Бактериальный ген *nptII*, кодирующий фермент неомисинфосфотрансферазу II, обеспечивает устойчивость трансформантов к антибиотику канамицину. Проведение теста на устойчивость трансгенных растений к канамицину позволяет судить о наличии в геноме растения перенесенного гена-маркера *nptII*. Тест основан на анализе соотношений  $Km^+$ - и  $Km^-$ -потомков в поколении от самоопыления исходного трансгенного растения. Соответствие фактического расщепления теоретическому и достоверность различий между группами растений оценивается по критерию  $\chi^2$ . Данный подход достаточно прост и позволяет тестировать большие выборки растений на ранних стадиях онтогенеза в течение короткого промежутка времени (4–6 недель от начала эксперимента). По соотношению канамицин-устойчивых ( $Km^+$ ) и канамицин-неустойчивых ( $Km^-$ ) фенотипов потомков от самоопыления исходных трансформантов можно ориентировочно сделать вывод о числе копий трансгенов, интегрированных в геном растения. Полученные предварительные данные о числе копий подтверждают методами молекулярного анализа.

**Работа 21. Определение числа интегрированных в геном трансгенного растения копий *prtIII*-гена по соотношению  $Km^+$ - и  $Km^-$ -фенотипов**

**Материалы и оборудование:** чашки Петри с растительным материалом, компьютер с программами электронных таблиц «MS Excel 2003» и прикладного пакета «StatSoft», лабораторный журнал, ручка, маркеры.

**Ход работы:**

Определение числа копий трансгена у трансгенных растений проводят по результатам подсчетов числа устойчивых и неустойчивых к антибиоту канамицину проростков трансгенных растений табака, культивируемых на среде с канамицином. Для этих целей используют семена трансгенных растений табака с геном *prtIII*, собранных индивидуально с каждого отдельного растения ( $T_0$ ). Цветки на каждом индивидуальном растении табака предварительно изолируют перед началом раскрытия бутона под марлевыми изоляторами. Через 2–3 дня после изоляции бутона изолятор снимают и ватным тампоном переносят пыльцу из пыльников на рыльце пестика раскрывшегося бутона. Цветки вновь изолируют под марлевыми изоляторами. После созревания семян семенные коробочки с семенами (поколение  $T_1$ ) убирают отдельно с каждого растения и помещают в отдельные пакеты. На каждом пакете отмечают порядковый номер трансгенного растения. Пакеты с семенами рекомендовано хранить в сухом прохладном месте

Т а б л и ц а 7

**Оценка соотношений  $Km^+$ - и  $Km^-$ -потомков от самоопыления трансгенных растений табака на среде с антибиотиком канамицином**

Номер растения	Число растений $F_2$		Расщепление		$\chi^2$
	$Km^+$	$Km^-$	фактическое	теоретическое	
1	173	45	3,8:1	3:1	2,21*
2	158	48	3,3:1	3:1	0,32
3	101	31	3,2:1	3:1	0,16
4	341	20	17,1:1	15:1	0,310*
5	334	9	37,1:1	15:1	7,697
6	248	11	22,5:1	15:1	1,773*

\*Фактическое расщепление соответствует теоретическому при  $\chi^2_{\text{ст},0,05} = 3,64$  (d.f. = 1).

Для определения числа копий (ген *prtIII* кодирует фермент неомисин-фосфотрансферазу, обеспечивающую растениям устойчивость к антибиоту канамицину) семена трансгенных растений табака предварительно стерилизуют. Для этого семена табака ( $T_1$ ) отдельно из каждой коробочки, собранной индивидуально с каждого отдельного трансгенного расте-

ния, помещают в условиях культурального бокса в пакет из фильтровальной бумаги и стерилизуют в 70%-ном этиловом спирте в течение 3–3,5 мин. После стерилизации пакеты распечатывают, семена подсушивают в потоке стерильного воздуха ламинарного бокса и высевают в чашки Петри на среду МС (см. табл. 1) с добавлением 20 г/л сахарозы, 8 г/л агар и антибиотиков в концентрации 100 или 200 мг/л. Через 4–6 недель оценивают реакцию проростков на антибиотик канамицин и подсчитывают соотношение  $Km^+$ - и  $Km^-$ -фенотипов. Если соотношение устойчивых и неустойчивых к антибиотику проростков будет соответствовать теоретически ожидаемому (3:1 или 15:1), то можно сделать предварительный вывод об интеграции в геном анализируемого трансгенного растения одной или двух независимых копий трансгена (см. табл. 7).

## ТЕРМИНОЛОГИЯ

**Амплификация** – увеличение числа копий фрагмента ДНК в результате полимеразной цепной реакции или при репликации вектора в клетках хозяина либо увеличение числа нуклеотидных последовательностей генома в результате дупликаций.

**Бинарная векторная система** – система двух плазмид, используемая для трансформации растений. Включает векторную плазмиду, в которую клонируется чужеродная ДНК, и плазмиду-помощник, которая обеспечивает перенос в растение векторной плазмиды посредством активации *vir*-области, включенной в ее состав.

**Биобаллистика** – способ доставки чужеродной ДНК, помещенной на поверхности золотых (или вольфрамовых) частиц, в цитоплазму растительной клетки с помощью специального прибора – генной пушки.

**Вектор** – искусственно сконструированная рекомбинантная молекула ДНК или природная ДНК, организованная, например, в виде плазмиды, которая способна автономно реплицироваться в клетке-реципиенте. Выполняет функцию переноса чужеродного фрагмента ДНК в клетку-реципиент с целью его клонирования и/или экспрессии.

**Генная пушка** – прибор, используемый для доставки чужеродной ДНК в клетки растений (преимущественно однодольных).

**Гетерологичные белки** – белки, не свойственные определенному природному организму, например рекомбинантные белки человека, синтезируемые трансгенными растениями с трансгенами, кодирующими соответствующие белки человека.

**ДНКаза** – фермент, расщепляющий двуцепочечную ДНК.

**Кассета экспрессии** – нуклеотидная последовательность, включающая один и более структурных генов и их регуляторных элементов, которая переносится в геном растительной клетки как единое целое и обеспечивает экспрессию перенесенных генов.

**Коинтегративная векторная система** – двухплазмидная система для переноса клонированных генов в растительные клетки, основанная на гомологичной рекомбинации клонированных генов с резидентной неонкогенной T1-плазмидой в клетках *A. tumefaciens*.

**Кокультивирование** – совместное культивирование клеток *in vitro*, используемое для их трансформации или селекции.

**Лигирование ДНК** – процесс образования фосфодиэфирной связи между двумя основаниями одной цепи ДНК, разделенными разрывом, с помощью фермента ДНК-лигазы.

«**Липкие**» **концы** – взаимно комплементарные одноцепочечные участки ДНК, выступающие по концам двухцепочечной молекулы.

**Маркерный ген** – ген с четким фенотипическим проявлением (например, ген-*nptII*, кодирующий фермент неомизинфосфотрансферазу II и обеспечивающий трансформированным клеткам растений устойчивость к антибиотику канамицину). В генетической инженерии маркерные гены включают в состав кассет экспрессии и используют для отбора генетически-модифицированных (трансгенных) от нетрансгенных клеток.

**Олигонуклеотид** – короткий (5–20 н.) фрагмент полимерной одноцепочечной ДНК или РНК, мономерным звеном в которых служит нуклеотид.

**Плазида** – внехромосомная кольцевая ДНК, существующая в цитоплазме автономно. В генетической инженерии плазмиды используются в качестве векторов.

**Полилинкер** – искусственная нуклеотидная последовательность в составе клонирующего вектора, включающая уникальные перекрывающиеся сайты узнавания для рестриктаз.

**Промотор** – регуляторный район гена, представленный нуклеотидной последовательностью, прилежащей к началу кодирующей области гена и ответственной за инициацию его транскрипции.

**ПЦР** – полимеразная цепная реакция используется для увеличения количества исследуемого фрагмента ДНК в пробе.

**Праймер** – одноцепочечный олигонуклеотид, комплементарный границе анализируемого участка генома, используемый в качестве затравки в ПЦР.

**Репортерный ген** – ген с четким фенотипическим проявлением, кодирующий легко выявляемый продукт, активность которого в норме в растительной клетке отсутствует. В генетической инженерии используется для того, чтобы подтвердить успешность введения генетической конструкции в геном растительной клетки и ее способность экспрессироваться.

**Рестриктаза** – бактериальный фермент, производящий разрыв в двуцепочечных ДНК после распознавания специфической нуклеотидной последовательности.

**Ревертаза** – обратная транскриптаза (РНК-зависимая ДНК-полимераза), фермент, с помощью которого осуществляется обратная транскрипция, т.е. синтез ДНК на матрице РНК.

**РНКаза (рибонуклеаза)** – фермент, катализирующий деградацию РНК.

**Селективная среда** – среда для культивирования клеток растений после трансформации. Используется для отбора трансформированных (трансгенных) клеток растений.

**Терминатор транскрипции (стоп-кодон)** – нуклеотидная последовательность ДНК, ответственная за прекращение транскрипции.

**T-область** – нуклеотидная последовательность мегаплазмиды *A. tumefaciens*, ограниченная с обеих сторон несовершенными повторами, размером 25 п.н., которая вырезается с помощью специальных ферментов из плазмиды и с помощью транспортного белка переносится в растительную клетку.

**Ti-плазида** – большая или мегаплазида *A. tumefaciens*, используемая в генетической инженерии для агробактериального переноса чужеродной ДНК в геном растений.

**Трансгенные растения** – генетически модифицированные растения, в геном которых интегрированы искусственно созданные гены.

**«Тупые» концы** – концевые участки двуцепочечных фрагментов ДНК, заканчивающихся парой соединенных комплементарных нуклеотидов.

**Фланкирующие области** – области ДНК, располагающиеся по обе стороны от специфического локуса, гена или какой-либо иной нуклеотидной последовательности.

**Целевой ген, или ген интереса,** – нуклеотидная последовательность, включающая кодирующую область того гена, который исследователь предполагает перенести в геном растения.

**Экспрессионный вектор** – рекомбинантный вектор, включающий необходимый набор регуляторных элементов, обеспечивающих экспрессию включенных в него чужеродных генов

**Экспрессия гена (выражение гена)** – проявление записанной в гене генетической информации в форме мРНК и белка с последующим действием образовавшегося продукта на клетку (фенотипическое проявление).

**Электропорация** – метод искусственного переноса чужеродной ДНК в клетки под воздействием электрического поля высокой напряженности (1–15 кВ/см).

**Эндонуклеаза** – фермент, катализирующий разрыв в одно- или двуцепочечной ДНК или РНК.

**Энхансер** – регуляторная последовательность, усиливающая экспрессию генов независимо от ориентации относительно промотора.

**Vir-гены** – нуклеотидная последовательность одной из плазмид *A. tumefaciens*, включающая 8 генов, организованных в виде оперона, координированная экспрессия которых обеспечивает вирулентность *A. tumefaciens*.

## ЛИТЕРАТУРА

### *Основная*

- Глик Б., Пастернак Дж.* Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / пер. с англ. М. : Мир, 2002. 589 с.
- Дрейпер Дж., Скотт Р., Армидж Ф., Уолден Р.* Генная инженерия растений. Лабораторное руководство : пер. с англ. М. : Мир, 1991. 407 с.
- Карначук Р.А., Гвоздева Е.С., Дейнеко Е.В., Шумный В.К.* Биотехнология и генная инженерия растений. Томск, 2006. 256 с.
- Лутова Л.А., Ежова Т.А., Додуева И.Е., Осипова М.А.* Генетика развития растений. СПб. : Н-Л., 2010. 431 с.
- Лутова Л.А.* Биотехнология высших растений. СПб. : Изд-во СПб ун-та, 2002. 227 с.
- Маниатис Т., Фритч Э., Сэмбрук Дж.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М. : Мир, 1984. 480 с.
- Патрушев Л.И.* Искусственные генетические системы. Т. 1. Генная и белковая инженерия. М. : Наука, 2004. 526 с.
- Рыбчин В.Н.* Основы генетической инженерии : учеб. для вузов. СПб.: Изд-во СПбГТУ, 2002. 522 с.
- Скрябин К.Г.* Агробиотехнология в мире. М. : Рост Медиа, 2008. 126 с.
- Тарантул В.З.* Толковый биотехнологический словарь. Русско-английский. М. : Языки славянских культур, 2009. 936 с.
- Чумаков М.И.* Механизм агробактериальной трансформации растений. Саратов : Слово, 2001. 256 с.
- Штерншис М.В., Томилова О.Г., Андреева И.В.* Биотехнология в защите растений. Новосибирск, 2001. 156 с.
- Щелкунов С.Н.* Генетическая инженерия : учеб.-справ. пособие. 3-е изд., испр. и доп. Новосибирск : Сиб. унив. изд-во, 2008. 490 с.
- Murashige T., Skoog F.* A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassay with Tobacco Tissue Culture // *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15, № 13. P. 473-497.
- Sanford et al.* *Methods in enzymology.* 1993. Vol. 217. P. 482–509.

### *Дополнительная*

*Баркли У.* Предотвращение заражения и дезинфекция // Методы общей бактериологии / под общ. ред. Ф. Герхардта и др. М. : Мир, 1984. Т. 3. С. 220–224.

*Власов А.Д., Мурин Б.П.* Единицы физических величин в науке и технике : справочник. М. : Энергоатомиздат, 1990. С. 101.

*Справочник биохимика* / Р. Досон, Д. Элиот, У. Элиот, К. Джонс. М. : Мир, 1991. 544 с.

*Классическая и молекулярная биология.* URL: <http://molbiol.ru>

# **ПРИЛОЖЕНИЯ**



## Подготовка биотехнологической лаборатории к работе

Основным условием культивирования клеток и тканей является соблюдение асептических условий. Асептика – система мероприятий, предупреждающих внесение (попадание) микроорганизмов из окружающей среды в материал для исследования, в питательные среды; предусматривает стерилизацию инструментов и материалов, обработку рук работников, соблюдение особых санитарно-гигиенических правил и приемов работы.

Имеются определенные требования к помещениям, где осуществляются процедуры по выделению тканей из растений, их высадке на питательную среду и т.д. В основном все эти работы проводят в ламинарном боксе. В этом случае асептика достигается обработкой внутренней поверхности УФ-светом от встроенной в бокс кварцевой лампы, подачей стерильного профильтрованного воздуха, направленного из ламинара наружу, и дезинфекцией поверхности стола спиртом.

Само помещение, где располагается бокс, стерилизуется с помощью ультрафиолетовых ламп, влажной уборки с моющими и обеззараживающими веществами (хлорамин, лизол и др.). Работающие в ламинар-боксе должны надевать стерильные халаты с рукавами и плотно прилегающими к руке манжетами, чтобы уменьшить вероятность попадания микроорганизмов с кожи в рабочее пространство бокса (также необходима сменная обувь).

### Ламинарный бокс и техника работы в нем

Все работы с культурой клеток и тканей *in vitro* проводят в стерильных (асептических) условиях в стерильном боксе или ламинар-боксе, стерильными инструментами, в стерильной посуде, на стерильных питательных средах. В случае нарушения стерильности на средах развиваются микроорганизмы (грибы, бактерии), нарушающие состав среды и подавляющие рост растительных эксплантов.

Для стерилизации помещений (боксов для пересадки тканей, культуральных комнат) используют ультрафиолетовое облучение в течение 0,5–2 ч (в зависимости от площади помещения). **Работы в облученном помещении начинают через 15–20 мин после отключения бактерицидных ламп, так как под действием ультрафиолетового излучения двухатомный кислород воздуха становится трехатомным озоном –**

**газом, токсичным для человека!!!** Для достижения максимальной стерильности перед обработкой УФ все поверхности тщательно отмываются моющими средствами, водой и растворами хлорсодержащих веществ, поверхности ламинар-боксов обрабатывают 96%-ным этиловым спиртом. Простерилизованные инструменты, материалы и все, что потребуется для работы, за исключением УФ-чувствительных компонентов (обычно это клеточные культуры растений, микроорганизмы и т.д.) помещают на стол ламинара и включают УФ-излучение. Через 20 мин выключают УФ и включают биофильтры. Для работы в ламинар-боксе надевают стерильный халат и шапочку, руки обрабатывают 70%-ным этиловым спиртом. Пинцеты, скальпели и препаравальные иглы помещают в стакан с 96%-ным этиловым спиртом. Перед каждой манипуляцией инструменты обжигают на пламени спиртовки. Большое значение имеют точность и отработанность движений при проведении асептических манипуляций и четкое продумывание последовательности этапов работы.

## Методы стерилизации

### *Автоклавирование*

Посуду, халаты, вату, бумагу, дистиллированную воду, питательные среды стерилизуют в автоклавах под давлением пара 1–2 атм и температурой 120°C в течение 20–60 мин в зависимости от объема стерилизуемого материала.

Колбы, штативы со средой, вату, бумагу, халаты перед автоклавированием заворачивают в целлофановую бумагу либо помещают в биксы.

Металлические инструменты автоклавировать нельзя, так как под действием пара образуется ржавчина. Поэтому их стерилизуют сухим жаром в термостатах при температуре 160–170°C в течение 1–2 ч.

Чистую посуду и инструменты, предварительно завернутые в бумагу (иногда фольгу), стерилизуют в сухожаровом шкафу при  $t = 160^\circ\text{C}$  в течение 1,5–2 ч. Питательные среды стерилизуют в автоклаве без вакуумных насосов при  $t = 121^\circ\text{C}$  и повышенном давлении 105 кПа<sup>3</sup> (1 ати) в течение 15–45 мин, и при  $t = 126^\circ\text{C}$  (1,5 ати) в течение 10–30 мин.

---

<sup>3</sup> 100 кПа – 0,1 М Па = 1 кгс / см<sup>2</sup> = 1 атм; в микробиологической практике стерилизация в автоклавах осуществляется при температуре в пределах 111–138°C, т.е. от 0,5 до 2,5 ати (добавочное давление).

### Температура насыщенного пара при различном давлении

Давление		Температура, °С
Нормальное, атм	Добавочное, ати	
1,0	–	110
1,0	0,5	111
1,0	0,75	116
1,0	1,0	121
1,0	1,5	126
1,0	2,0	134
1,0	2,5	138

Выбирая режим стерилизации, необходимо учитывать рН среды. При кислой реакции многие вещества, входящие в ее состав, могут подвергнуться гидролизу.

Чем ниже значение рН и выше температура и продолжительнее время стерилизации, тем интенсивнее происходит гидролиз. В результате этого процесса среды с агаром после стерилизации не застывают. Если среда щелочная, то при стерилизации выпадают в осадок соли, железа, карамелизуются и становятся непригодными сахара. В некоторых случаях в процессе стерилизации изменяется рН среды: например, если рН среды с углеводами 7,0, то может произойти ее подкисление до рН 6,0. Чтобы избежать таких негативных явлений, рекомендуется углеводы, фосфаты, соли автоклавировать отдельно в виде более или менее концентрированных растворов в дистиллированной воде при том значении рН, которое обеспечивает целостность вещества. После стерилизации растворы стерильно объединяют в нужном соотношении.

В состав питательных сред могут входить вещества, разрушающиеся при автоклавировании (например, гиббереллины, абсцизовая кислота, витамины, антибиотики, растительные экстракты и т.д.), поэтому их стерилизуют путем холодной фильтрации через бактериальный фильтр. Затем стерильные профильтрованные компоненты добавляют в проавтоклавированную питательную среду, охлажденную до  $t = 40^{\circ}\text{C}$ , в асептических условиях.

Дистиллированную воду, используемую для промывки растительных эксплантов, стерилизуют в автоклаве при повышенном давлении 200 кПа в течение 1 ч.

Колбы с питательными средами должны быть заполнены не более чем на 3/4 объема (при автоклавировании раствор иногда закипает, и нужно, чтобы он при этом не выплёскивался).

Колбы должны быть закрыты НЕПЛОТНО (иначе могут взорваться!!!).

Сразу после автоклавирования агара его нужно смешать, иначе он застынет, как неоднородная субстанция: внизу существенно более концентрированная, чем вверху.

Стерилизация пластика. После автоклавирования нужно сразу же достать банки/коробки с наконечниками/эппендорфами (пока они ещё горячие) и поместить их открытыми под ламинар для просушки (можно/лучше под УФ).

### ***Стерилизация фильтрованием***

Для проведения стерилизации легкоразрушающихся или летучих компонентов (антибиотики, витамины, ферменты и пр.) используются мембранные фильтры. Это диски разного размера, изготовленные на основе нитроцеллюлозы. В зависимости от величины пор фильтры используют для фильтрования и стерилизации. Для стерилизации используют фильтры № 1–4 фирмы «Владипор» (Россия), №№ 5–10 фирмы «СИН-ПОР» (Чехия) и марок VF, VM, VC, SLGS, SLHA, DA фирмы «МИЛЛИ-ПОР» (США).

Чтобы фильтр не забился, не следует через субмикронный фильтр фильтровать грязный или очень мутный раствор. В таких случаях необходимо проводить предварительную фильтрацию через фильтр из стекловолокна. Также недопустимо, чтобы материал мембраны взаимодействовал (растворялся) с фильтруемым раствором (если раствор содержит органические растворители или сильные кислоты/щелочи) или компоненты раствора адсорбировались на мембране (белки, нуклеиновые кислоты и др.).

**Приготовление стерильного глицерина**

Приготовить стерильный глицерин можно двумя способами: во-первых, нагреванием в сушильном шкафу при температуре 180°C в течение 20–40 мин или при температуре 200°C в течение 10–20 мин. Второй способ – стерилизация паром при температуре 120,2°C в течение 2 ч. В этом случае глицерин должен находиться в герметично закупоренном сосуде и затем его еще помещают в специальную стерилизационную коробку, или двухслойную мягкую бязевую упаковку, или пергаментную бумагу.

### Приложение 3

#### Состав агаризованной питательной среды Мурасиге и Скуга, мг/л

Компонент среды	мг/л
$\text{KNO}_3$	1 900
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	370
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	440
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	37,3
$\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$	27,8
KI	0,83
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6,2
$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	22,3
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
Тиамин HCl	1
Пиридоксин HCl	0,5
Никотиновая кислота	0,5
Сахароза	30 000
Агар	9 000
Дистиллированная вода	До литра
pH	5,8

#### Состав среды LB:

- 10 г/л бакто-триптона,
- 5 г/л дрожжевого экстракта,
- 5 г/л NaCl,
- довести 5 М NaOH до pH = 7,4,
- автоклавировать при 1,2 атм (127°C) в течение 1 ч,
- в агаризованную среду LB добавить бакто-агар до концентрации 20 г/л.

#### Состав среды YEP:

- 0,5 г NaCl,
- 1 г дрожжевого экстракта,

– 1 г триптона (или пептона).

Развести в 100 мл дистиллированной воды.

Для агаризованной среды добавить 1,5 г агара.

### Антибиотики

Антибиотик	Среда	Концентрация, мкг/мл	Растворитель	Хранение
<b>Рифампицин</b>	УЕР	50	Этиловый спирт	Холодильник, +4°C
<b>Канамицин</b>	УЕР	50	Стерильная дистиллированная вода	Морозильная камера, -20°C
	Мурасиге – Скуга	200	– // –	– // –
<b>Цефотаксим</b>	Мурасиге – Скуга	500	– // –	– // –

### Приготовление спирта заданной концентрации

Спирты различной концентрации (например, 70%-ный) обычно готовят разведением 95–96%-ного этилового спирта. При этом пользуются правилом Леви или специальными таблицами.

Согласно правилу Леви, для приготовления из двух растворов с неодинаковой концентрацией третьего с промежуточной концентрацией необходимо взять первый раствор в объеме, равном разности концентраций третьего и второго растворов, и добавить к нему второй раствор в объеме, равном разности концентраций первого и третьего растворов.

Например, нужно приготовить 20%-ный спирт из 95%-ного и дистиллированной воды. Исходные растворы имеют концентрацию: первый 95%, второй – 0%. Необходимо получить третий раствор с концентрацией 20%.

Это записывают так:

$$\begin{array}{ccc}
 95 & & 0 \\
 & \searrow & \nearrow \\
 & 20 & \\
 & \nearrow & \searrow \\
 20 & & 75 \\
 (= 20 - 0) & & (= 95 - 20)
 \end{array}$$

Цифра «75» в нижнем ряду (справа) равна разности концентраций первого и третьего растворов (95 – 20). Она указывает, сколько нужно взять миллилитров дистиллированной воды. Цифра 20 в том же ряду равна разности концентраций третьего и второго растворов (20 – 0). Она указывает, сколько нужно взять миллилитров 95%-ного спирта. Итак, нужно взять 20 мл 95%-ного спирта и 75 мл дистиллированной воды для получения 95 мл 20%-ного спирта.

Для получения 70%-ного спирта берут соответственно 70 мл 95%-ного спирта и доводят дистиллированной водой до 95 мл. Так можно получить спирт любой концентрации, которая меньше 95%.

Иногда необходимо получить спирт заданной концентрации из двух спиртов, один из которых имеет концентрацию выше требуемого спирта, а другой – ниже. Например, из двух спиртов – 70%-ного и 20%-ного – нужно приготовить 40%-ный. Поступают так же, как и в первом примере:

$$\begin{array}{ccc}
 70 & & 20 \\
 & \diagdown & / \\
 & 40 & \\
 & / & \diagdown \\
 20 & & 30
 \end{array}$$

$(= 40 - 20)$        $(= 70 - 40)$

Из расчетов видно, что для получения 40%-ного спирта необходимо взять 20 мл 70%-ного и добавить 30 мл 20%-ного. Всего окажется 50 мл 40%-ного спирта.

Для некоторых работ используют и 100%-ный этиловый спирт, который иначе называют абсолютным. Приготовить его из 95–96%-ного можно несколькими способами: 1) при помощи безводной сернокислй меди; 2) дистилляцией спирта, в который добавлена окись кальция.

В лабораторной практике наиболее распространен первый способ.

Сернокислая медь может быть двоякой:

1) полностью обезвоженной; в таком случае она имеет вид аморфного порошка белого или бледно-голубого цвета;

2) в ее состав может входить несколько молекул кристаллизационной воды; это соединение (медный купорос) имеет крупные кристаллы темно-синего цвета.

Обезвоженную сернокислую медь можно сразу использовать для окончательного удаления остатков воды из 95–96%-ного спирта. Медный купорос предварительно измельчают в ступке и осторожно прокаливают в фарфоровой чашке при температуре около 200 °С, не допуская побурения порошка. Для этого массу порошка все время перемешивают. Постепенно соль обезвоживается и приобретает почти белый цвет. После остывания ее используют для обезвоживания спирта.

Обычно на 1 л спирта берут 200–250 г сернокислй меди. Ее насыпают на дно банки с притертой крышкой и заливают 95–96%-ным спиртом. Обезвоженная сернокислая медь поглощает остатки воды в спирте и приобретает голубой цвет. Частично обезвоженный спирт переливают в другую банку со свежей сернокислй медью. Обезвоживание повторяют несколько раз, до полного удаления воды из спирта. Об этом можно судить по цвету сернокислй меди: если соль при заливке спиртом сохраняет белый цвет, то в таком спирте нет больше воды, т.е. он стал абсолютным. Более точно это определяют специальным прибором для измерения концентрации спирта.

Иногда порошок сернокислй меди насыпают в бумажные гильзы из фильтровальной бумаги и по нескольку штук опускают на дно банки со спиртом, чтобы приготовить спирт без мути.

**Следует помнить, что абсолютный спирт, полученный с участием сернокислй меди, ядовит, так как содержит ионы меди!!!** Кроме того, может измениться рН спирта.

**Метрические приставки**

Обозначение		Название	Величина	Обозначение		Название	Величина
международное	русское			международное	русское		
<b>da</b>	<b>да</b>	дека	$10^1$	<b>d</b>	д	деци	$10^{-1}$
<b>h</b>	<b>г</b>	гекто	$10^2$	<b>c</b>	с	санти	$10^{-2}$
<b>k</b>	<b>к</b>	кило	$10^3$	<b>m</b>	м	милли	$10^{-3}$
<b>M</b>	<b>М</b>	мега	$10^6$	<b>μ</b>	мк	микро	$10^{-6}$
<b>G</b>	<b>Г</b>	гига	$10^9$	<b>n</b>	н	нано	$10^{-9}$
<b>T</b>	<b>Т</b>	тера	$10^{12}$	<b>p</b>	п	пико	$10^{-12}$
<b>P</b>	<b>П</b>	пета	$10^{15}$	<b>f</b>	ф	фемто	$10^{-15}$
<b>E</b>	<b>Э</b>	экса	$10^{18}$	<b>a</b>	а	атто	$10^{-18}$
				<b>z</b>	з	zepto	$10^{-21}$

**Кратные и дольные единицы**

Кратные				Дольные			
Величина	Название	Обозначение		Величина	Название	Обозначение	
$10^1$ моль	декамоль	дамоль	damol	$10^{-1}$ моль	децимоль	дмоль	dmol
$10^2$ моль	гектомоль	гмоль	hmol	$10^{-2}$ моль	сантимоль	смоль	cmol
$10^3$ моль	киломоль	кмоль	kmol	$10^{-3}$ моль	миллимоль	ммоль	mmol
$10^6$ моль	мегамоль	Ммоль	Mmol	$10^{-6}$ моль	микромоль	мкмоль	μmol
$10^9$ моль	гигамоль	Гмоль	Gmol	$10^{-9}$ моль	наномоль	нмоль	nmol
$10^{12}$ моль	тераполь	Тмоль	Tmol	$10^{-12}$ моль	пикомоль	пмоль	pmol
$10^{15}$ моль	петамоль	Пмоль	Pmol	$10^{-15}$ моль	фемтомоль	фмоль	fmol
$10^{18}$ моль	эксамоль	Эмоль	Emol	$10^{-18}$ моль	аттомоль	амоль	amol
$10^{21}$ моль	зеттамоль	Змоль	Zmol	$10^{-21}$ моль	zepto-моль	змоль	zmol
$10^{24}$ моль	йоттамоль	Имоль	Ymol	$10^{-24}$ моль	yocto-моль	имоль	ymol

■ – применять не рекомендуется.

Десятичные кратные и дольные единицы образуют с помощью стандартных приставок СИ. Единица измерения *йоктомоль* может использоваться лишь формально, так как столь малые количества вещества должны измеряться отдельными частицами (1 имоль формально равен 0,602 частицы).

Приложение 6

Таблица Менделеева: порядковые номера и атомные веса элементов

Элемент	Символ	№ п/п	A/масса	Элемент	Символ	№ п/п	A/масса
Азот	N	7	14,01	Неодим	Nd	60	20,183
Актиний	Ac	89	227,03	Неон	Ne	10	20,18
Алюминий	Al	13	26,98	Нептуний	Np	93	237,05
Америций	Am	95	243,06	Никель	Ni	28	58,71
Аргон	Ar	18	39,95	Ниобий	Nb	41	92,91
Астат	At	85	210,99	Нобелий	No	102	255
Барий	Ba	56	137,34	Олово	Sn	50	118,69
Бериллий	Be	4	9,01	Осмий	Os	76	190,2
Берклий	Bk	97	247,07	Палладий	Pd	46	106,4
Бор	B	5	10,81	Платина	Pt	78	195,09
Бром	Br	35	79,9	Плутоний	Pu	94	242,06
Ванадий	V	23	50,94	Полоний	Po	84	208,98
Висмут	Bi	83	208,98	Празеодим	Pr	59	140,91
Водород	H	1	1,01	Прометий	Pm	61	145
Вольфрам	W	74	183,85	Протактиний	Pa	91	231,04
Гадолиний	Gd	64	157,25	Радий	Ra	88	226,03
Галлий	Ga	31	69,72	Радон	Rn	86	222,02
Гафний	Hf	72	178,49	Рений	Re	75	186,2
Гелий	He	2	4	Родий	Rh	45	102,91
Германий	Ge	32	72,59	Ртуть	Hg	80	200,59
Гольмий	Ho	67	164,93	Рубидий	Rb	37	85,47
Кюрий	Cm	96	245,07	Рутений	Ru	44	101,07
Диспрозий	Dy	66	162,5	Самарий	Sm	62	150,4
Европий	Eu	63	151,96	Свинец	Pb	82	207,2
Железо	Fe	26	55,58	Сера	S	16	32,06
Золото	Au	79	196,97	Селен	Se	34	78,96

Индий	<b>In</b>	<b>49</b>	<b>114,82</b>	Серебро	<b>Ag</b>	<b>47</b>	<b>107,87</b>
Иридий	<b>Ir</b>	<b>77</b>	<b>192,22</b>	Скандий	<b>Sc</b>	<b>21</b>	<b>44,96</b>
Иттербий	<b>Yb</b>	<b>70</b>	<b>173,04</b>	Стронций	<b>Sr</b>	<b>38</b>	<b>87,62</b>
Иттрий	<b>Y</b>	<b>39</b>	<b>88,91</b>	Сурьма	<b>Sb</b>	<b>51</b>	<b>121,75</b>
Йод	<b>I</b>	<b>53</b>	<b>126,9</b>	Таллий	<b>Tl</b>	<b>81</b>	<b>204,37</b>
Кадмий	<b>Cd</b>	<b>48</b>	<b>112,4</b>	Тантал	<b>Ta</b>	<b>73</b>	<b>180,95</b>
Калий	<b>K</b>	<b>19</b>	<b>39,1</b>	Теллур	<b>Te</b>	<b>52</b>	<b>127,6</b>
Калифорний	<b>Cf</b>	<b>98</b>	<b>249,07</b>	Тербий	<b>Tb</b>	<b>65</b>	<b>158,93</b>
Кальций	<b>Ca</b>	<b>20</b>	<b>40,08</b>	Технеций	<b>Tc</b>	<b>43</b>	<b>98,91</b>
Кислород	<b>O</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	Титан	<b>Ti</b>	<b>22</b>	<b>47,9</b>
Кобальт	<b>Co</b>	<b>27</b>	<b>58,93</b>	Торий	<b>Th</b>	<b>90</b>	<b>232,04</b>
Кремний	<b>Si</b>	<b>14</b>	<b>28,09</b>	Тулий	<b>Tm</b>	<b>69</b>	<b>168,93</b>
Криптон	<b>Kr</b>	<b>36</b>	<b>83,8</b>	Углерод	<b>C</b>	<b>6</b>	<b>12,01</b>
Ксенон	<b>Xe</b>	<b>54</b>	<b>131,3</b>	Уран	<b>U</b>	<b>92</b>	<b>238,03</b>
Курчатовий	<b>Kh</b>	<b>104</b>	<b>260</b>	Фермий	<b>Fm</b>	<b>100</b>	<b>252,08</b>
Лантан	<b>La</b>	<b>57</b>	<b>138,91</b>	Фосфор	<b>P</b>	<b>15</b>	<b>30,97</b>
Литий	<b>Li</b>	<b>3</b>	<b>6,94</b>	Франций	<b>Fr</b>	<b>87</b>	<b>223,02</b>
Лоуренсий	<b>Lr</b>	<b>103</b>	<b>256</b>	Фтор	<b>F</b>	<b>9</b>	<b>18,99</b>
Лютеций	<b>Lu</b>	<b>71</b>	<b>174,97</b>	Хлор	<b>Cl</b>	<b>17</b>	<b>35,45</b>
Магний	<b>Mg</b>	<b>12</b>	<b>24,31</b>	Хром	<b>Cr</b>	<b>24</b>	<b>52</b>
Марганец	<b>Mn</b>	<b>25</b>	<b>54,94</b>	Цезий	<b>Cs</b>	<b>55</b>	<b>132,91</b>
Медь	<b>Cu</b>	<b>29</b>	<b>63,55</b>	Церий	<b>Ce</b>	<b>58</b>	<b>140,12</b>
Менделевий	<b>Md</b>	<b>101</b>	<b>255,09</b>	Цинк	<b>Zn</b>	<b>30</b>	<b>65,37</b>
Молибден	<b>Mo</b>	<b>42</b>	<b>95,94</b>	Цирконий	<b>Zr</b>	<b>40</b>	<b>91,22</b>
Мышьяк	<b>As</b>	<b>33</b>	<b>74,92</b>	Эрбий	<b>Er</b>	<b>68</b>	<b>167,26</b>
Натрий	<b>Na</b>	<b>11</b>	<b>22,99</b>	Эйнштейний	<b>Es</b>	<b>99</b>	<b>254,09</b>

### Способы выражения концентраций растворов

Концентрация – величина, выражающая относительное количество данного компонента в растворе. Чаще всего используют следующие способы выражения концентрации:

Обозначение	Название и определение
$m$	Молярная весовая концентрация (моляльность) – число молей растворённого вещества, приходящееся на 1 000 г растворителя
$C_M$	Молярная объёмная концентрация (молярность) – число молей растворённого вещества, содержащееся в 1 л раствора
$C_N$	Нормальность – число грамм-эквивалентов растворённого вещества, содержащееся в 1 л раствора
$N$	Мольная (или молярная) доля – число молей растворённого вещества, приходящееся на 1 моль раствора
$T$	Титр – число граммов растворённого вещества, содержащееся в 1 мл раствора
$P$	Весовой процент – число граммов растворённого вещества, содержащееся в 100 г раствора
$A$	Число граммов растворённого вещества, приходящееся на 100 г растворителя

**Массовая доля** – отношение массы растворённого вещества к массе раствора. Массовая доля измеряется в долях единицы или в процентах:

$$\omega = \frac{m_1}{m},$$

где  $m_1$  – масса растворённого вещества, г;  $m$  – общая масса раствора, г.

Массовое процентное содержание компонента:

$$m\% = (m_1/\Sigma m_i) \times 100.$$

**Объёмная доля** – отношение объёма растворённого вещества к объёму раствора. Объёмная доля измеряется в долях единицы или в процентах.

$$\nu = \frac{V_1}{V},$$

где  $V_1$  – объём растворённого вещества, л;  $V$  – общий объём раствора, л.

**Молярная концентрация** – количество растворённого вещества (число молей) в единице объёма раствора. Молярная концентрация в системе СИ измеряется в моль/м<sup>3</sup>, однако на практике её гораздо чаще выражают в моль/л или ммоль/л. Также распространено выражение «в молярности». Возможно другое обозначение молярной концентрации  $C_M$  которое принято обозначать  $M$ :

$$C_M = \frac{\nu}{V},$$

где  $\nu$  – количество растворённого вещества, моль;  $V$  – общий объём раствора, л.

**Моль** (обозначение: моль, международное: mol) – единица измерения количества вещества. Соответствует количеству вещества, в котором содержится  $N_A$  частиц (молекул, атомов, ионов или любых других тождественных структурных частиц).  $N_A$  – постоянная Авогадро, равная количеству атомов в 12 граммах нуклида углерода <sup>12</sup>C. Таким образом, количество частиц в одном моле любого вещества постоянно и равно числу Авогадро  $N_A$ .

$$N_A = 6,02214179(30) \times 10^{23}.$$

Моль – это количество вещества, масса которого, выраженная в граммах, численно равняется его молекулярной массе.

Для атомов и ионов величину, аналогичную молю, называют грамм-атомом (г-атом) и грамм-ионом (г-ион). В соответствии с этой терминологией моль является грамм-молекулой сложного вещества.

**Нормальная концентрация** – количество эквивалентов данного вещества в 1 л раствора. Нормальную концентрацию выражают в моль-эquiv/л или г-эquiv/л (имеется в виду моль эквивалентов). Для записи концентрации таких растворов используют сокращения «н» или «N». Например, раствор, содержащий 0,1 моль-эquiv./л, называют децинормальным и записывают как 0,1 н.

$$C_H = C_N = z \cdot C_M = z \cdot \frac{\nu}{V} = \frac{1}{f_{eq}} \cdot \frac{\nu}{V},$$

где  $\nu$  – количество растворённого вещества, моль;  $V$  – общий объём раствора, л;  $z$  – число эквивалентности (фактор эквивалентности  $f_{eq} = 1/z$ ).

**Молярная доля** – отношение количества молей данного компонента к общему количеству молей всех компонентов. Молярную долю выражают в долях единицы:

$$X_j = \frac{\nu_j}{\sum_{i=1}^n \nu_i},$$

где  $\nu_i$  – количество  $i$ -го компонента, моль;  $n$  – число компонентов.

**Моляльность** – количество растворённого вещества (число молей) в 1 000 г растворителя. Измеряется в молях на кг. Так, раствор с концентрацией 0,5 моль/кг называют 0,5-молярным:

$$m = \frac{\nu}{m_2},$$

где  $\nu$  – количество растворённого вещества, моль;  $m_2$  – масса растворителя, кг.

Следует обратить особое внимание, что, несмотря на сходство названий, молярная концентрация и моляльность – величины различные. Прежде всего, в отличие от молярной концентрации, при выражении концентрации в моляльности расчёт ведут на массу растворителя, а не на объём раствора. Моляльность, в отличие от молярной концентрации, не зависит от температуры.

**Титр раствора** – масса растворённого вещества в 1 мл раствора:

$$T = \frac{m_1}{V},$$

где  $m_1$  – масса растворённого вещества, г;  $V$  – общий объём раствора, мл.

### **Формулы перехода от одних выражений концентраций растворов к другим**

От массовой доли к молярности:

$$M = \frac{\rho \omega}{M_1},$$

где  $\rho$  – плотность раствора, г/л;  $\omega$  – массовая доля растворенного вещества в долях от 1;  $M_1$  – молярная масса растворенного вещества, г/моль.

От молярности к нормальности:

$$N = M \cdot z,$$

где  $M$  – молярность, моль/л;  $z$  – число эквивалентности.

От массовой доли к титру:

$$T = 0,001 \rho \cdot \omega,$$

где  $\rho$  – плотность раствора, г/л;  $\omega$  – массовая доля растворенного вещества в долях от 1.

От молярности к титру:

$$T = 0,001 M \cdot M_1,$$

где  $M$  – молярность, моль/л;  $M_1$  – молярная масса растворенного вещества, г/моль.

От молярности к моляльности:

$$m = \frac{1000M}{1000\rho - MM_1},$$

где  $M$  – молярность, моль/л;  $\rho$  – плотность раствора, г/мл;  $M_1$  – молярная масса растворенного вещества, г/моль.

От моляльности к мольной доле:

$$X_i = \frac{M_i}{m_i + 1000 / M_2},$$

где  $m_i$  – моляльность, моль/кг;  $M_2$  – молярная масса растворителя, г/моль.

## СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений .....	3
Предисловие .....	4
Особенности организации, проведения работ и техника безопасности в биологической лаборатории .....	5
Лабораторные работы .....	17
Раздел 1. Создание кассет экспрессии чужеродных генов – первый этап в получении генетически модифицированных (трансгенных) растений .....	19
1.1. Ферменты, используемые в генной инженерии .....	19
Работа 1. Гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции .....	20
Работа 2. Лигирование .....	23
1.2. Клонирование генов для генно-инженерного конструирования .....	24
1.3. Введение генов в вектор, обеспечивающий их доставку в клетки растений .....	24
Работа 3. Выделение плазмидной ДНК в аналитических количествах .....	25
Работа 4. Приготовление компетентных клеток <i>E. coli</i> .....	28
Работа 5. Трансформация клеток <i>E. coli</i> .....	29
Работа 6. Приготовление электрокомпетентных клеток и их трансформация .....	30
Работа 7. Нарращивание ночных бактериальных культур .....	32
Работа 8. Рассев бактериальных культур для получения отдельных колоний .....	33
Работа 9. Длительное хранение бактериальных штаммов .....	33
Работа 10. Трансформация клеток агробактерии рекомбинантной плазмидой .....	34
Работа 11. Скрининг агробактериальных клонов .....	36
Раздел 2. Методы доставки чужеродных генов в геном растений .....	38
2.1. Агробактериальная трансформация .....	38
Работа 12. Трансформация табака методом листовых дисков .....	39
Работа 13. Трансформация моркови .....	41
Работа 14. Трансформация томатов .....	43
2.2. Биобаллистическая трансформация .....	45
Работа 15. Подготовка к биобаллистике .....	46
Раздел 3. Молекулярные методы анализа трансгенных растений .....	52
3.1. ПЦР-анализ .....	52
Работа 16. Порядок проведения ПЦР и типовой расчет .....	56
3.2. Гель-электрофорез нуклеиновых кислот .....	58
Работа 17. Анализ результатов ПЦР методом электрофореза в агарозном геле .....	60
3.3. Определение активности репортерных генов .....	64
Работа 18. Гистохимическое выявление GUS-активности .....	65
Работа 19. Процедура гистохимического окрашивания .....	66
Работа 20. Выявление активности GFP .....	67
Раздел 4. Анализ наследования трансгенов у трансгенных растений на примере <i>nptII</i> -гена у <i>Nicotiana tabacum</i> .....	69
4.1. Анализ проявления маркерного гена <i>nptII</i> на селективных средах с антибиотиком канамицином .....	69
Работа 21. Определение числа интегрированных в геном трансгенного растения копий <i>nptII</i> -гена по соотношению $Km^+$ - и $Km^-$ -фенотипов .....	70
Терминология .....	72
Литература .....	75
Приложения .....	77

*Учебное издание*

**Гвоздева Елена Станиславовна, Дейнеко Елена Викторовна,  
Загорская Алла Алексеевна, Сидорчук Юрий Владимирович  
Пермякова Наталья Владиславовна, Уварова Елена Александровна**

**ПРАКТИКУМ ПО ГЕНЕТИЧЕСКОЙ  
ИНЖЕНЕРИИ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ  
БИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ**

Редактор – К.В. Полькина  
Оригинал-макет А.И. Лелоюр  
Дизайн обложки А.В. Бабенко

Подписано к печати 10.12.2012 г. Формат 60x84<sup>1</sup>/<sub>16</sub>.  
Бумага офсетная. Гарнитура Times.  
Усл. печ. л. 5,6.  
Тираж 50 экз. Заказ № .

Отпечатано на оборудовании  
редакционно-издательского отдела  
Томского государственного университета  
634050, г. Томск, пр. Ленина, 36. Корп. 4. Оф. 011  
Тел. 8+(382-2)–52-98-49