

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

УРАЛЬСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ПЕРВОГО ПРЕЗИДЕНТА РОССИИ Б. Н. ЕЛЬЦИНА

# Н. А. Кутлунина, А. А. Ермошин

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

В ИССЛЕДОВАНИИ РАСТЕНИЙ

Учебно-методическое пособие

Рекомендовано методическим советом УрФУ

для студентов, обучающихся по программам бакалавриата по направлениям подготовки

06.03.01 «Биология», 05.03.06 «Экология и природопользование»

Екатеринбург Издательство Уральского университета

ББК 575.088(07) К95

Р е ц е н з е н т ы:

лаборатория филогенетики и биохронологии Института экологии растений и животных УрО РАН

(заведующий лабораторией доктор биологических наук А. В. Бородин);

А. Х. Баймиев, доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной биологии и нанобиотехнологии;

Б. Р. Кулуев, доктор биологических наук, старший научный сотрудник (Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН)

К95

###### Кутлунина, Н. А.

Молекулярно-генетические методы в исследовании рас- тений : учеб.-метод. пособие / Н. А. Кутлунина, А. А. Ермо- шин ; М-во образования и науки Рос. Федерации, Урал. фе- дер. ун-т. – Екатеринбург : Изд-во Урал. ун-та, 2017. – 142 с.

ISBN 978-5-7996-2142-1

В учебно-методическом пособии рассмотрены современные подходы к молекулярно-генетическим исследованиям растений. Подробно показаны методы анализа изоферментов и нуклеиновых кислот. В пособие включены лабораторные работы для больших и малых спецпрактикумов.

Рекомендуется студентам для самостоятельной работы и выполнения лабораторных работ при изучении дисциплин «Физические методы в биоло- гии», «Филогения и филогеография» и др.

ББК 575.088(07)

*На обложке*:

камера для горизонтального электрофореза и источник тока фирмы Bio-Rad; электрофореграмма ПЦР-продуктов в агарозном геле

ISBN 978-5-7996-2142-1 © Уральский федеральный университет, 2017

2

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

[Предисловие 6](#_TOC_250059)

1. [ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ 8](#_TOC_250058)
   1. Принцип метода электрофореза белков.

Электрофоретическая подвижность 8

1. [2. Классификация электрофоретических методов 11](#_TOC_250057)
   1. [Особенности электрофореза в полиакриламидном геле 14](#_TOC_250056)
   2. [Нативный и SDS-ПААГ-электрофорез 16](#_TOC_250055)
   3. [Диск-электрофорез 17](#_TOC_250054)
   4. [Аллозимный анализ 17](#_TOC_250053)

Лабораторная работа 1

Электрофорез белков в ПААГ в денатурирующих условиях 22

Лабораторная работа 2

Проявление электрофореграмм с помощью красителя кумасси 25

[Лабораторная работа 3](#_TOC_250052)

[Определение молекулярной массы белка в геле 26](#_TOC_250051)

Лабораторная работа 4

Нативный электрофорез. Выявление

изоферментных спектров пероксидазы 27

[Лабораторная работа 5](#_TOC_250050)

[Выявление изоферментных спектров супероксиддисмутазы 29](#_TOC_250049)

[Лабораторная работа 6](#_TOC_250048)

Изоферментный анализ генетического полиморфизма

в популяции растений 30

1. [ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК 35](#_TOC_250047)
   1. [Растительный материал для выделения ДНК 35](#_TOC_250046)
   2. [Особенности выделения ДНК из растительных объектов 35](#_TOC_250045)

Лабораторная работа 7

Метод солевой экстракции ДНК с фенольной депротеинизацией 40

[Лабораторная работа 8](#_TOC_250044)

Выделение суммарной ДНК из растений по Devey et al.

с небольшими модификациями 42

[Лабораторная работа 9](#_TOC_250043)

[Выделение геномной ДНК (с мочевиной) 43](#_TOC_250042)

[Лабораторная работа 10](#_TOC_250041)

Быстрый метод выделение ДНК из растительных тканей 45

[Лабораторная работа 11](#_TOC_250040)

[Выделение ДНК растений с использованием СТАВ 46](#_TOC_250039)

[Лабораторная работа 12](#_TOC_250038)

[Дополнительная очистка ДНК 48](#_TOC_250037)

1. [СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ ПРЕПАРАТОВ ДНК И РНК 50](#_TOC_250036)

[Лабораторная работа 13](#_TOC_250035)

[Спектрофотометрическое определение концентрации ДНК 51](#_TOC_250034)

[Лабораторная работа 14](#_TOC_250033)

[Определение концентрации нуклеиновых кислот микрометодом 53](#_TOC_250032)

1. [ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ 56](#_TOC_250031)
   1. [Суть метода ПЦР 56](#_TOC_250030)
   2. [Модификации метода ПЦР 69](#_TOC_250029)
   3. [Преимущества ПЦР перед другими методами 77](#_TOC_250028)
   4. Практическое применение и перспективы развития метода ПЦР 78

[Лабораторная работа 15](#_TOC_250027)

[Проведение ПЦР-амплификации ДНК с ISSR-праймерами 79](#_TOC_250026)

[Лабораторная работа 16](#_TOC_250025)

[Проведение ПЦР-амплификации ДНК с ITS-праймерами 81](#_TOC_250024)

[Лабораторная работа 17](#_TOC_250023)

[Определение наличия ГМО в продуктах питания 82](#_TOC_250022)

1. [ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ 84](#_TOC_250021)

[Лабораторная работа 18](#_TOC_250020)

Электрофорез в 6 % полиакриламидном денатурирующем геле

и процедура окраски полиакриламидных гелей нитратом серебра 88

Лабораторная работа 19

Электрофорез в 1 % агарозном геле и ТАЕ-буфере 90

[Лабораторная работа 20](#_TOC_250019)

[Выделение ДНК из агарозного геля и ее очистка 91](#_TOC_250018)

1. [СЕКВЕНИРОВАНИЕ 94](#_TOC_250017)
   1. Секвенирование ДНК по Максаму и Гилберту:

метод химической деградации 94

* 1. Секвенирование ДНК по Сэнгеру: «плюс-минус» метод 96

5

* 1. [Секвенирование ДНК по Сэнгеру: метод «терминаторов» 97](#_TOC_250016)
  2. [Автоматическое секвенирование ДНК 101](#_TOC_250015)
  3. [Методы секвенирования нового поколения 101](#_TOC_250014)

[Лабораторная работа 21](#_TOC_250013)

[Подготовка образцов к сиквенсной реакции.](#_TOC_250012)

[Метод прямого переосаждения ДНК в мягких условиях 105](#_TOC_250011)

1. [МЕТОДЫ АНАЛИЗА ДНК. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ 108](#_TOC_250010)
   1. [Особенности растительного генома 108](#_TOC_250009)
   2. [Молекулярные маркеры 109](#_TOC_250008)
   3. [RAPD-анализ 113](#_TOC_250007)
   4. [ISSR-маркирование 114](#_TOC_250006)
   5. [SSR-маркеры 116](#_TOC_250005)
   6. [AFLP-метод 118](#_TOC_250004)

[7.7. SNP 120](#_TOC_250003)

[Список библиографических ссылок 122](#_TOC_250002)

[Глоссарий 126](#_TOC_250001)

[Учебное оборудование 138](#_TOC_250000)

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Биология – самая быстро развивающаяся наука второй поло- вины ХХ и ХХI в. Крупные открытия в биологии (выявление струк- туры ДНК, полимеразная цепная реакция, создание ДНК-чипов, сек- венирование), а также значительно возросшие технические воз- можности позволили сформироваться науке молекулярной биологии и целой группе методов, известных как молекулярные или молеку- лярно-генетические методы. В настоящее время эти методы актив- но применяются не только в биологии, но и в других областях: медицине, криминалистике, археологии.

Современную биологию невозможно представить без молеку- лярно-генетических методов. Первыми были методы, основанные на полиморфизме белков. Изоферментный анализ позволяет выяв- лять уровень полиморфизма популяций, их генетическую структу- ру, определять уровень генетической закрытости или, наоборот, открытости популяций и многое другое. В настоящее время эти ме- тоды продолжают использоваться, но большинство исследователей и лабораторий переходят на анализ полиморфизма нуклеиновых кислот. Отчасти это связано с тем, что белки можно выделять толь- ко из живого материала или из замороженного при температуре

–70–80 оС, тогда как ДНК можно выделять и из живого, и из высушен- ного материала. Кроме того, методы ДНК-анализа позволяют изу- чать как ядерный, так и пластидный и митохондриальный гено- мы. В связи с этим молекулярно-генетические методы, основанные на полимеразной цепной реакции и секвенировании ДНК, актив- но используются в таких областях исследования растений, как:

* генетический полиморфизм природных популяций;
* анализ чистоты сортов;
* выявление гибридов;
* выявление филогенетических связей видов, родов и таксо- нов более высокого уровня;
* анализ транскрипционной активности генов.

6

При изучении обязательных курсов на биологическом факуль- тете студенты знакомятся с современными методами анализа, в том числе молекулярно-генетическими. Выпускники, владеющие этими методами, востребованы в лабораториях и исследовательских цент- рах города, области и региона. В последние годы опубликовано большое количество монографий и пособий, охватывающих широ- кий круг вопросов молекулярной биологии. В то же время каждый научный центр имеет свою специфику, пользуется своими наработ- ками и методиками. Поэтому цель данного учебно-методического пособия – систематизировать методики, которые используются при исследовании растений. Важной особенностью пособия явля- ется наличие теоретических разделов, которые способствуют по- ниманию практического материала и служат опорой при самостоя- тельной работе студентов.

7

При написании пособия использовались монография В. Е. Па- дутова с соавт. (2007), статьи Е. К. Хлесткиной (2011, 2013) и Н. А. Ря- бушкиной с соавт. (2012), а также учебно-методические пособия И. В. Стручковой и Е. А. Кольясовой (2012), В. А. Великова (2013),

«Основы полимеразной цепной реакции» (2012) и др.

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов- бакалавров и магистрантов, изучающих молекулярно-генетические курсы и выполняющих квалификационные работы по соответствую- щей тематике, а также для аспирантов и научных сотрудников.

## ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ

Метод электрофореза, предложенный еще в начале ХХ в., сей- час широко используют в биологии и медицине для разделения бел- ков в исследовательских и клинических целях. С помощью элект- рофореза можно разделить на отдельные компоненты белковую смесь, что позволяет установить молекулярную массу белка или его субъединиц, подтвердить чистоту выделенного белка.

*Электрофорезом* называют движение заряженных частиц в растворе под действием электрического поля.

*Электрофоретический метод* в биохимии – это способ про- странственного разделения молекул, имеющих разный заряд и раз- меры, путем помещения их в электрическое поле.

Результатом проведения электрофореза является *электрофо- реграмма –* картина, полученная после разделения сложной смеси с помощью электрофореза и специфического проявления. Электро- фореграммы белков-ферментов (зимограммы) позволяют изучать изменения активности и изоферментного спектра белков под дей- ствием внешних и внутренних факторов как у растений, так и у дру- гих организмов.

### Принцип метода электрофореза белков. Электрофоретическая подвижность

В растворе белки находятся в виде заряженных частиц. Заряд на поверхности белков возникает в результате диссоциации груп- пировок, находящихся в боковых радикалах аминокислот (карбок- сильных, амино-, имидазольных и других групп), а также при свя- зывании ионов. Так как степень диссоциации группировок зависит от рН раствора, то величина и знак суммарного заряда белковой молекулы зависят от рН среды, а также от ионной силы (интен- сивности электрического поля, создаваемого ионами в растворе).

Для расчета ионной силы следует найти произведение концент- рации каждого иона на квадрат его заряда, сложить все получен- ные величины и итоговую сумму разделить пополам. Если в раство- ре присутствуют два или более электролитов, то вычисляется общая суммарная ионная сила раствора. Для каждого белка существует такое значение рН среды (обозначаемое как *рI –* изоэлектричес- кая точка), при котором положительные и отрицательные заряды ионизированных групп скомпенсированы, поэтому заряд всей бел- ковой молекулы равен нулю. В буфере с рН, равным *рI* изучаемого белка, отсутствие заряда на белковой молекуле делает невозможным ее движение в электрическом поле. Из-за разницы в аминокислот- ном составе разные белки имеют разные значения *рI.* При рН  *pI* молекулы белка приобретают заряд и под действием электрическо- го поля перемещаются к противоположно заряженному электроду – катоду (–) или аноду (+). Например, кислые белки, богатые моноами- нодикарбоновыми аминокислотами (*асп*, *глу*), в слабощелочном буфере приобретут отрицательный суммарный заряд из-за диссо- циации СООН-групп до СОО– и H+ и будут двигаться к аноду.

Для электрофоретического разделения оптимально такое зна- чение рН рабочего буфера, которое обусловливает максимальное различие зарядов разных белков, составляющих исходную смесь, а не их максимальный заряд. Обычно электрофорез проводят в среде (буфере) со значением рН, на 3–4 единицы отличающим- ся от среднего значения *рI* для белков данного типа. Это позволяет добиться хорошей электрофоретической подвижности и вместе с тем сохранить ощутимые различия молекул по заряду. Предпоч- тительно использовать буфер известной и постоянной ионной силы на основе однозарядных ионов. От рабочего буфера также требует- ся существенная емкость, так как локальная концентрация белка в образующихся при разделении смеси зонах скопления молекул может оказаться значительной. Поэтому используют буферы с кон- центрацией не менее 0,1–0,2 *М*.

При проведении электрофореза электрическое поле создают

с помощью источника питания – стабилизированного выпрями- теля, способного давать регулируемое напряжение до 500–1000 В

при силе тока в несколько десятков миллиампер (мА). Напряже- ние на участке электрической цепи равно разности потенциалов на концах этого участка, если на этом участке нет источника сторон- них сил, разделяющих разноименные заряды. При электрофорезе участок электрической цепи – это буфер. Электрофорез проводят в однородном электрическом поле, т. е. поле, напряженность (*E*) которого во всех точках одинакова. Электрический ток пропускают через проводник – буферный раствор, налитый в канал из изоли- рующего материала (например, стекла) или пропитывающий ка- кую-либо поддерживающую среду-носитель (например, бумагу или гель). Сопротивление (*R*) буферного раствора задается двумя фак- торами: концентрацией в нем свободных ионов и их электрофоре- тической подвижностью. Электрофоретической подвижностью (*u*) данной молекулы называют скорость движения заряженной моле- кулы (см/ч) в электрическом поле с напряженностью 1 В/см. Еди- ницей электрофоретической подвижности является см2/ч  В.

Именно различия в электрофоретической подвижности бел- ков, содержащихся в анализируемой смеси, позволяют разделить эти белки в пространстве (в разных зонах электрофореграммы). Скорость (*V)* движения белков к тому или иному электроду снижа- ется из-за их трения об окружающую среду. Сила трения (или, ина- че, сила сопротивления окружающей среды) прямо пропорциональ- на скорости движения белковых молекул. Коэффициент трения белковой молекулы, обозначенный как *f*, зависит от размера, фор- мы, степени гидратированности этой молекулы и от свойств самой среды. При электрофорезе работа силы трения заряженных компо- нентов разделяемой смеси о среду приводит к нагреву геля. Кроме того, образование тепла вызывается прохождением электрического тока. В итоге происходит значительное возрастание температуры, которое ухудшает результаты электрофоретического разделения, так как изменяет вязкость и проводимость среды, увеличивает ско- рость диффузии молекул, способствует испарению летучих компо- нентов, приводит к денатурации белков. Поэтому при проведении электрофореза следует обеспечить охлаждение системы.

Электрофоретическая подвижность белка зависит:

* от самой молекулы: ее размера (молекулярной массы);
* формы, электрического заряда, степени диссоциации и гид- ратации;
* концентрации молекул;
* среды: ее вязкости, рН, температуры и ионной силы;
* характеристик используемого электрического поля.

### Классификация электрофоретических методов

Основными типами электрофореза являются:

* зональный электрофорез;
* изоэлектрическое фокусирование;
* иммуноэлектрофорез.

**Зональный электрофорез** ведется при постоянном (неизме- няющемся) значении рН буферного раствора, заполняющего дан- ный носитель (бумагу, гель, др.). Исследуемый образец наносится пятном или тонким слоем на носитель, по которому и перемеща- ется в электрическом поле.

Усложненным вариантом зонального электрофореза является **диск-электрофорез** (многофазный зональный электрофорез), при ко- тором рН и другие характеристики, постоянные внутри одной «фа- зы», при переходе к другой «фазе» скачкообразно изменяются.

При **изоэлектрическом фокусировании** в среде для электро- фореза создается плавный градиент рН. Белок останавливается в зоне, где значение рН равно его изоэлектрической точке (*pI*). Для создания градиента рН обычно используют раствор полиами- но-поликарбоновых кислот, которым насыщают носитель. В отсут- ствии электрического поля эта смесь обычно имеет рН = 6,5. При на- ложении электрического поля указанные кислоты обеспечивают линейный градиент рН от 3 до 10.

**Иммуноэлектрофорез** сочетает в себе электрофоретическое разделение белков с иммунопреципитацией, основанной на реак- ции «антиген – антитело». Этот тип электрофореза превосходит остальные по чувствительности и разрешающей способности.

*По цели* различают:

* *аналитический* электрофорез (для анализа состава смеси);
* *препаративный* электрофорез (для получения препаратов – значительных количеств чистых веществ).

*По степени денатурации разделяемых белков* различают:

* *нативный* электрофорез;
* электрофорез *в денатурирующих условиях*.

В отличие от нативного электрофореза, электрофорез в денату- рирующих условиях предполагает применение химических реаген- тов, разрушающих пространственную структуру разделяемых белков. *По направлению фракционирования* выделяют электрофорез, при котором белки движутся в *одном* направлении, и *двумерный* электрофорез, при котором сначала происходит разделение в одном направлении, а затем – в направлении, перпендикулярном перво-

му. Двумерный электрофорез позволяет резко увеличить разрешаю- щую способность при разделении смесей, состоящих из большого количества разных белков.

В зависимости от ориентации носителя (геля, бумаги, др.) электрофорез может быть *вертикальным* или *горизонтальным*. *Классификация по типу носителя жидкой фазы* представле-

на в таблице. Первым был разработан электрофорез без какого-ли- бо носителя: электрическая цепь между электродами замыкалась через буферный раствор, в котором и происходило разделение бел- ков. Позднее при электрофорезе начали применять носители жид- кой фазы – полимеры, служащие «каркасом» для буфера. Приме- нение носителей позволило заметно снизить конвекцию (переме- шивание) и, следовательно, повысить качество разделения белков. Носитель может быть в форме порошка, пленки, геля и др. После- дующие разработки были посвящены усовершенствованию свойств носителей.

Идеальный носитель должен:

а) резко снижать конвекцию;

б) быть простым в приготовлении;

в) иметь высокую теплопроводность (при низкой теплопровод- ности трудно охлаждать систему);

**Преимущества и недостатки использования различных носителей при электрофорезе**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Носитель | Преимущества | Недостатки |
| Крахмальный гель (предложен  О. Смитисом) | Первый носитель со свой- ствами молекулярного си- та. Активно препятствует конвекции. Повышает раз- решение | Низкая прозрачность, хруп- кость, размер пор можно менять лишь в небольших пределах. Приготовление качественного геля – тру- доемкий процесс |
| Агарозный гель | Удовлетворительная про- зрачность, высокая плас- тичность (проще резать, удобнее красить и опреде- лять ферментативную ак- тивность прямо в геле), простота изготовления | Из-за отрицательного заря- да на сульфатных и СООН- группах сетки агара возни- кает электроосмос, приво- дящий к неравномерному распределению электри- ческого поля, а иногда – гидростатического давле- ния |
| Полиакриламидный гель – ПААГ (предложен  Л. Орнстейном и Д. Дэвисом) | Химически инертен, мож- но кипятить. Можно за- дать необходимый размер пор и обеспечить свойства молекулярного сита. Вы- сокая прозрачность. Легко готовить. Упругий, проч- ный | На сегодняшний день наи- лучший носитель, но го- товится из акриламида – ядовитого вещества |

г) обладать низкой адсорбционной емкостью и химической инертностью в отношении веществ, подвергаемых электрофорезу; д) не иметь заряда на поверхности частиц, чтобы не вызывать эндоэлектроосмос. Если разделяемые белки заряжены отрицатель- но, то при электрофорезе они должны двигаться к аноду (+), одна- ко эндоэлектроосмос «тянет» их в другую сторону, к катоду (–),

мешая электрофоретическому разделению.

Гели легко принимают разные геометрические формы, поэто- му в названии электрофоретического метода с их использованием

указывают, *какова конфигурация рабочего пространства*. Гель для электрофореза можно заполимеризовать:

* в трубках,
* капиллярах,
* пластинах.

Основной недостаток электрофореза в трубках – это отсутствие теплооттока: температура в центре цилиндра геля оказывается вы- ше, чем у его прилегающей к стеклу поверхности. Это приводит к изгибу белковых зон. На одну трубку наносится одна исследуе- мая проба.

В тонких пластинах также достигается более эффективное от- ведение тепла. Так, при воздушном охлаждении эффективный теп- лоотвод возможен при силе тока 50–100 мА на вертикально распо- ложенную пластину. Кроме того, конфигурация пластины позво- ляет в абсолютно идентичных условиях проводить разделение сразу нескольких (10–13) проб белка. Пластины легко сканировать и удобно разрезать. По сравнению с цилиндрическими гелями геле- вые пластины позволяют значительно уменьшить концентрацию белка в наносимой пробе.

### Особенности электрофореза в полиакриламидном геле

Полиакриламидный гель (ПААГ) обладает многими качества- ми идеального носителя (см. таблицу). Имея свойства молекуляр- ного сита, он обеспечивает электрофоретическое разделение белко- вых смесей не только по заряду, но и по размеру и форме частиц. При электрофорезе в ПААГ крупные молекулы, размеры которых соизмеримы с диаметром пор геля, движутся медленнее, а мелкие молекулы свободно и быстро проходят через поры геля. ПААГ фор- мируют путем сополимеризации акриламида (создающего линей- ную «основу») и N, N-метиленбисакриламида (служащего для по- перечных «сшивок» линейных цепей).

СН2=СН–СО–NН2 СН2=СН–СО–NН–СН2–NН–СО–СН=СН2

Акриламид N, N-метиленбисакриламид

Меняя концентрацию акриламида от 2 до 50 %, можно задать определенную пористость геля. Например, диаметр пор в геле, со- держащем 7,5 % акриламида, равен 5 нм, а в содержащем 30 % ак- риламида – 2 нм. При выборе концентрации геля учитывают сред- нюю молекулярную массу (Mr) разделяемых веществ и форму их молекул.

В результате сополимеризации образуется трехмерная сетка геля. Каждый второй углеродный атом линейной цепи содержит кислотную амидную группу, что обеспечивает гидрофильность полимера. В то же время ПААГ не содержит ионизируемых групп. Для сополимеризации нужны инициаторы и катализаторы (окислительно-восстановительные системы – источники свобод- ных радикалов). Чаще всего используют систему из двух компо-

нентов, представленных ниже:

(NH4)2S2O8 –

персульфат аммония (ПСА),

синоним – надсернокислый аммоний; функция: инициатор полимеризации

(CH3)2N–CH2–CH2–N(CH3)

N, N, N’, N’–

тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД); функция: катализатор образования ПААГ

Механизм действия персульфата: при разрыве связи О–О обра- зуются два свободных радикала, каждый из которых стимулирует разрыв двойной связи в молекуле акриламида и присоединяется к ней, также образуя свободные радикалы. Каждый такой ради- кал, в свою очередь, вызывает разрыв двойной связи и присоедине- ние следующей молекулы акриламида с образованием нового ради- кала и т. д. По такому же механизму в растущую цепочку линей- ного полимера одной из своих концевых винильных групп может встроиться метиленбисакриламид. Если его второй конец встро- ится в состав другой линейной полимерной цепочки, то образует- ся «сшивка». Без агента, индуцирующего поперечные сшивки, в геле образуются лишь продольно расположенные длинные тон- кие волокна.

### Нативный и SDS-ПААГ-электрофорез

В полиакриламидном геле можно проводить как нативный электрофорез, так и электрофорез в денатурирующих условиях (рис. 1.1). Нативный электрофорез в ПААГ служит для разделе- ния не подвергнутых денатурации белков (т. е. белков в нативном состоянии), в том числе в случаях, когда необходимо сохранить ферментативную или любую другую функциональную активность белков. Электрофоретическая подвижность белка в нативном со- стоянии зависит одновременно и от его суммарного заряда, и от мо- лекулярной массы, и от пространственной конфигурации поли- пептидной цепи. Для установления строгой количественной кор- реляции между одним из этих параметров и электрофоретической подвижностью белка нужно исключить влияние всех остальных.

В случае когда требуется фракционировать белки исключи-

тельно по молекулярной массе, применяют ПААГ-электрофорез в денатурирующих условиях. Такая система была разработана У. К. Лэммли. Этот метод позволяет оценить количество полипеп- тидов в белковой смеси, при его использовании достигается очень четкое разделение зон, но активность ферментов полностью или в значительной мере может быть утрачена из-за их денатура- ции. Денатурирующие условия создаются путем обработки пробы трехкратным избытком додецилсульфата натрия, сокращенно – ДСН. Чаще данное вещество обозначают SDS – от английского

«*sodium dodecyl sulfate*». Анион SDS несет отрицательный заряд. Благодаря гидрофобным взаимодействиям анионы SDS сорби- руются на белках пропорционально их объему, превращая любой полипептид в неразветвленный стержень с отрицательным заря- дом, значительно превышающим собственный заряд белковой мо- лекулы. Так как в присутствии SDS соотношение «размер/заряд» становится практически одинаковым для любого белка, разделе- ние происходит исключительно по молекулярной массе. Отметим, что для полной денатурации белки, имеющие S–S-связи, до при- менения SDS обрабатывают -меркаптоэтанолом, имеющим силь- ный неприятный запах, поэтому работы проводят под тягой. В ка-

честве альтернативы -меркаптоэтанолу используют дитиотреитол (С4Н10О2S2), его требуется в 2 раза меньше, он менее летучий и не об- ладает столь специфическим запахом, однако он гораздо дороже.

### Диск-электрофорез

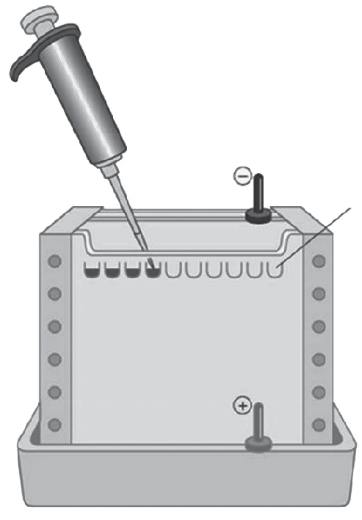
Диск-электрофорез получил свое название от двух английских слов: *discontinuity* (неоднородный, прерывистый) и *discoid* (дис- кообразный). Первое подчеркивает неоднородность электрофоре- тической среды, применяемой в этом методе. Второе описывает случайный признак – дискообразную форму зон разделенных бел- ков в условиях, выбранных первооткрывателями метода. При диск- электрофорезе создают скачкообразные изменения концентрации (и, следовательно, пористости) геля, рН, градиента напряжения.

*Вертикальный* диск-электрофорез предполагает использова- ние двух, а иногда и трех наслаиваемых друг на друга гелевых слоев:

1. концентрирующий гель – крупнопористый гель. Размер его пор ограничивает диффузию, но не обеспечивает гелю свойства молекулярного сита по отношению к разделяемым белкам. Этот гель нужен для электрохимического концентрирования белков пробы, т. е. концентрирующий гель собирает смесь белков перед пере- ходом в разделяющий гель в одну узкую полосу;
2. разделяющий (сепарирующий, разрешающий, «running»- гель) – нижний мелкопористый гель, в котором, собственно, и про- исходит электрофоретическое и молекулярно-ситовое разделение компонентов пробы.

### Аллозимный анализ

Изоферменты, или изозимы, по определению Международной комиссии по биохимической номенклатуре, – это генетически детерминированные множественные молекулярные формы фер- мента, выявляемые у особей одного и того же вида и обладающие одинаковой субстратной специфичностью, но различающиеся



Направление миграции

Лунка

Проба

Рис. 1.1. Вертикальный электрофорез в полиакриламидном геле [Большой лабораторный практикум по биохимии…, c. 53]

своей первичной структурой и физико-химическими свойствами. Генетически гомологичные изозимы, кодируемые аллельными ге- нами одного локуса, предложено называть аллозимами.

Использование электрофоретических вариантов белков как мар- керов генов основано на соответствии последовательностей нук- леотидов в генах и последовательности аминокислот в полипепти- дах. Влияние генных мутаций на первичную структуру белка было установлено уже в первых работах в области биохимической гене- тики популяций. В этих исследованиях было описано аномальное электрофоретическое поведение гемоглобина при серповиднокле- точной анемии у человека [Pauling et al., p. 545]. Доказано наследо- вание этой патологии как простого менделируещего признака и об- наружено, что разница между нормальным и аномальным электро- форетическими типами определяется мутационным замещением глутаминовой кислоты валином в положении 6 глобиновой -цепи. Данные о том, что замены аминокислотных остатков в белках в ре- зультате мутаций могут изменять физико-химические свойства бел- ков, в частности, их электрофоретическую подвижность, легли в ос- нову использования электрофоретических методов для выявления биохимической наследственной изменчивости. Принципиальное

значение имело создание высокоразрешающих анализирующих методов электрофореза белков в крахмальном и полиакриламид- ном гелях.

Электорофоретическое разделение экстрактов белков в геле с последующим гистохимическим окрашиванием с целью их обна- ружения является основным методом исследования изоферментов. Впервые метод гель-электрофореза для анализа изоферментов был использован при изучении эстераз [Hunter, Markert, p. 1294]. В даль- нейшем метод получил широкое применение в силу ряда досто- инств, которые подчеркиваются и в экспериментальных, и в обзор- ных работах [Левитес; Алтухов]. Метод гистохимического окра- шивания позволяет: 1) выявить индивидуальные ферменты на элект- рофореграмме, полученной от смеси белков; 2) анализировать свежеэкстрагированный нативный материал (нет необходимости предварительно фракционировать белки); 3) использовать малое количество материала (несколько миллиграмов ткани), при этом анализировать много проб одновременно и сразу определять их генотипы.

Для проведения электрофоретического анализа изоферментов, или, иначе, аллозимного анализа, образцы тканей гомогенезируют для освобождения из клеток ферментов и других белков, гомоге- нат помещают в стартовые лунки. После этого через гель пропус- кают (обычно в течение нескольких часов) постоянный электри- ческий ток, под действием которого белки начинают перемещать- ся в геле. Скорость и направление их перемещения определяются размерами и суммарным электрическим зарядом соответствую- щих молекул. После выключения тока гель обрабатывают раство- ром, содержащим субстрат, специфически взаимодействующий с исследуемым ферментом, и вещество, реагирующее с продук- том реакции, катализируемой им. В том месте геля, куда пере- местили исследуемый фермент, происходит определенная хими- ческая реакция, которую в общем виде можно записать следую- щим образом:

Субстрат

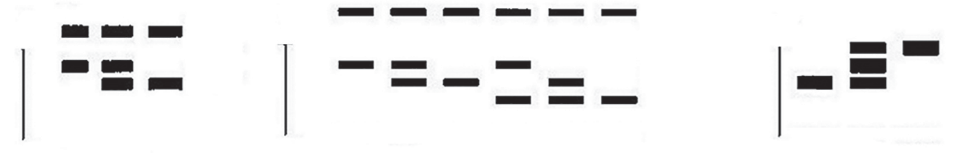
Фермент

Продукт + Краситель  Окрашенная фракция

По числу и расположению окрашенных фракций в геле можно судить о генах, кодирующих данный фермент у каждой особи, содер- жащейся в выборке. Независимая изменчивость в нескольких зо- нах активности предполагает, что эти зоны контролируются отдель- ными локусами. Интерпретация изоферментных спектров связана с представлением о кодоминантном типе наследования аллозимов (в гетерозиготе активны оба аллеля) и субъединичной структуре соответствующих ферментов. Гомозиготные особи, вне зависимос- ти от структуры фермента, имеют на фореграммах однополосный фенотип. Гетерозиготы по локусам, кодирующим мономерные фер- менты, состоящие из одного полипептида, обнаруживают двупо- лосные фенотипы с характерным распределением активности меж- ду полосами в отношении 1 : 1 (рис. 1.2). Для димерных фермен- тов, состоящих из двух инертных субъединиц, электрофоретических вариантов у гетерозигот будет три, учитывая свободную комбина- торику субъединиц, с распределением активности в отношении 1 : 2 : 1 (рис. 1.2). Для гетерозигот тетрамерных ферментов типи- чен пятиполосный фенотип с интенсивностями, распределяющи- мися пропорционально соотношению 1 : 4 : 6 : 4 : 1.

Кроме взаимодействия аллельных продуктов, имеются неко-

торые причины, приводящие к возникновению сложных спектров. Мультимерные ферменты, продукты разных неаллельных генов, нередко образуют межлокусные гетеромультимеры (гетеродимеры, гетеротетрамеры и т. д.). В этом случае на геле появляются допол- нительные «гибридные» зоны активности, промежуточные по по- движности между зонами, контролируемыми отдельными локуса- ми. К усложнению анализа электрофореграмм приводит и наличие так называемых «ноль-аллелей», когда в результате мутаций синтез субъединицы или не происходит, или белок образуется, но не обла- дает ферментной активностью. Эффект такого гена выявляется по отсутствию зоны активности на электрофореграмме, в гетерози- готном состоянии такой аллель может быть обнаружен в случае неполного доминирования нормального аллеля («эффект дозы»). Эффекты дозы гена также выявляются на фореграммах в случае по- липлоидии. Основы генетики изоферментов подробно изложены в ряде оригинальных работ и обзоров [Левитес; Гончаренко; и др.].



+

+

+

– *1 2 3*

– *1 2 3 4 5 6*

– *1 2 3*

*а б в* Рис. 1.2. Генетически контролируемые электрофоретические варианты белков:

*а* – гемоглобин моллюска *Anadara trapezia*: *1*, *3* – гомозиготные генотипы, *2* – ге- терозигота. Локус *Hb*1 мономорфен; *б* – эстераза ракообразного *Mysis relicta*: *1*, *3*, *6* – гомозиготы, *2*, *4*, *5* – гетерозиготы. Фермент имеет мономерную структуру, гетерозиготы выявляются двумя фракциями активности фермента; *в* – 6-фосфо- глюконатдегидрогеназа перепела *Coturnix coturnix*: *1*, *3* – гомозиготы, *2* – гетеро- зигота. Фермент имеет димерную структуру, поэтому у гетерозиготы наблюдается три фракции активности, т. е. формируются гибридные молекулы, представленные средней полосой [Алтухов, с изм.]

Метод аллозимного анализа обладает значительно большей разрешающей способностью при исследовании изменчивости в популяциях, чем разнообразия по морфологическим признакам. Однако и он не оценивает все возможные варианты аллелей, присут- ствующие в популяциях. Аллозимы с одинаковой подвижностью в геле могут кодироваться разными аллелями, тогда как сино- нимичные триплеты, с заменой нуклеотида в третьем положении, не приводят к замещениям аминокислотных остатков, т. е. коди- руют одну и ту же аминокислоту. Также некоторые аминокислот- ные замены не проявляются электрофоретически, поскольку лишь пять из двадцати аминокислот влияют на суммарный заряд белко- вой молекулы, зависящий от соотношения числа отрицательно за- ряженных остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот и поло- жительно заряженных лизина, аргинина и гистидина. Тем не менее электрофоретический анализ изоферментов позволяет не только раз- личать аллельные замены вследствие генных, или точечных, мута- ций, а также мутационно подобных событий – внутрицистронной рекомбинации на уровне полиаллельных генов, но и выявлять эф- фект более крупных реорганизаций генетического материала, к ко- торым относятся хромосомные мутации и мутации полиплои- дии, затрагивающие геном в целом [Алтухов].

Среди других классов наследуемых генетических маркеров ал- лозимы обладают несомненным преимуществом, так как демон- стрируют простое менделевское наследование, т. е. контролируют- ся моногенно (один ген – один фермент) и экспрессируются кодо- минантно, так что в подавляющем большинстве случаев легко диагностируются все генотипы, как гомозиготные, так и гетеро- зиготные. Так как в настоящее время наследование изоферментов уже описано у многих таксонов, при анализе нового организма часто нет необходимости проводить скрещивания, поскольку дан- ные по близкородственным видам дают достаточно надежную ин- формацию о наследовании. Изоферменты как первые из разрабо- танных генетических маркеров широко применяются во многих областях популяционно-генетических исследований и до настоя- щего времени поставляют наиболее значительные массивы дан- ных о генетических процессах в популяциях, особенно в тех облас- тях, где требуются полная генетическая информация (генотипы по кодоминантным локусам).

Лабораторная работа 1 **Электрофорез белков в ПААГ в денатурирующих условиях**

**Материалы и оборудование:** камера для вертикального элект- рофореза, заливочное устройство, источник тока, автоматические пипетки, мерные пробирки на 15мл и 50 мл, наконечники для пи- петок, гребенки для геля.

###### Растворы:

1. 1,5 М буфер для нижнего (разделяющего) геля, рН 8,8–8,9 (18,2 г трис·(трис(гидроксиметил)аминометан) растворить в 100 мл воды, довести рН до 8,8 с помощью НСl конц.);
2. 1,25 М буфер для верхнего (концентрирующего) геля, рН 6,8 (15,1 г трис растворить в 100 мл воды, довести рН до 6,9 с помощью НСl конц.);
3. буфер для проведения электрофореза (электродный, 10), рН 8,2–8,3 (в 1 л воды растворить: 6 г трис, 28,8 г глицина, 2 г доде-

цилсульфата натрия). При использовании буфер разводится деиони- зированной водой в десять раз;

1. 20 % персульфат аммония (ПСА), катализатор полимериза- ции (200 мг ПСА растворить в 1 мл воды). Хранить готовый раст- вор в холодильнике не более недели, беречь от света;
2. 30 % сток-раствор акриламида-бисакриламида (29 г акри- ламида и 1 г метиленбисакриламида растворить в воде и затем довести до 100 мл);
3. 0,65 М буфер для солюбилизации и инкубации белковых проб: а) для неденатурирующих условий: 0,785 г трис, 3 мл 30 % гли- церина, 2,5 мг бромфенолового синего растворить в воде и довести

до 10 мл;

б) для денатурирующих условий: 0,785 г трис, 3 мл 30 % гли- церина, 2,5 мг бромфенолового синего и 1 г ДСН растворить в воде и довести до 10 мл.

Перед использованием оба концентрированных раствора следует развести в 5 раз, добавить 2 мг дитиотреитола (ДTT) на 1 мл буфера.

*Важно! Все растворы для электрофореза готовят на деиони- зированной воде mQ. Примесь ионов тяжелых металлов нарушает поли- меразицию геля*.

###### Ход работы:

1. Приготовление сток-раствора для заливки пробки: смешать 3 мл 30 % акриламида-бисакриламида, 1,5 мл 1,5 М буфера для раз- деляющего геля, 1,5 мл воды. Непосредственно перед заливкой добавить 25 мкл ПСА и 5 мкл ТЕМЕД.
2. Приготовление сток-раствора для концентрирующего геля (5 %): смешать 0,63 мл 1,25 М буфера для концентрирующего геля, 0,83 мл 30 % сток-раствора акриламида-бисакриламида и 3,42 мл воды. Непосредственно перед заливкой добавить 20 мкл ПСА и 3 мкл ТЕМЕД.
3. Приготовление разделяющего геля (10 %): смешать 5 мл 1,5 М буфера для разделяющего геля, 6,6 мл 30 % сток-раствора акрилами- да-бисакриламида и 8,1 мл воды. Непосредственно перед залив- кой добавить на 8 мл раствора 80 мкл ПСА и 8 мкл ТЕМЕД.

Растворы для приготовления гелей без ПСА и ТЕМЕД можно хранить в холодильнике 2–3 недели.

1. Подготовка и денатурация белковых проб. Белки из гомоге- ната тканей желательно экстрагировать буфером для приготовления проб (с SDS). Полученную взвесь центрифугируют при 10 000 g 15 мин и дальше работают с супернатантом. Белковые пробы, по- лученные иным способом, смешивают с буфером для приготовле- ния проб в соотношении 1 : 2 или 1 : 3 (по объему). Затем подготов- ленные пробы погружают в кипящую воду и нагревают 2–5 мин при 95–100 оС.
2. Заливка геля:
   1. Вымыть камеру детергентом, ополоснуть дистиллирован- ной водой, высушить. Собрать камеру для проведения гель-электро- фореза.
   2. Добавить к нужному количеству раствора для пробки не- обходимое количество ПСА и ТЕМЕД. Немедленно залить проб- ку. После окончания полимеризации пробки добавить в раствор для нижнего (разделяющего) геля ПСА и ТЕМЕД.
   3. Немедленно залить нижний (разделяющий) гель. Налить осторожно, не смешивая, водонасыщеный *н*-бутанол (1–2 см).
   4. После завершения полимеризации отобрать *н*-бутанол тон- кой пипеткой, 2–3 раза хорошо сполоснуть получившийся карман дистиллированной водой до удаления запаха спирта, удалить остат- ки воды фильтровальной бумагой, не касаясь геля.
   5. Вставить (не до конца!) гребенку между стеклами (до дна кармана должно остаться 0,5–1 см).
   6. Добавить в раствор для верхнего (концентрирующего) геля ПСА и ТЕМЕД.
   7. Залить верхний (концентрирующий) гель. После полимери- зации установить верхнюю камеру в поддон, залить разбавленный буфер для проведения гель-электрофореза, вытащить гребенку.
   8. Немедленно промыть лунки шприцом с 1 электродным буфером, поправить изогнувшиеся перегородки между карманами (можно иглой шприца).
3. Внести в карманы необходимое количество проб; подсоеди- нить камеру к источнику тока. При разделении в концентрирую- щем геле задать напряжение 50 В, силу тока 50 мА, в разрешаю- щем – соответственно 100 В, 80 мА.

Лабораторная работа 2 **Проявление электрофореграмм с помощью красителя кумасси**

Зоны разделившихся белков необходимо проявить – сделать видимыми невооруженным глазом.

Разделившиеся зоны белков фиксируют осаждением смесью уксусной кислоты и этанола (реже – метанола) или раствором ТХУ и окрашивают, используя раствор красителя. Фиксация предотвра- щает размывание зон из-за диффузии белковых молекул в геле. Ис- пользуют такие красители, как амидочерный, кумасси бриллианто- вый голубой (марки G-250, R-250), нитрат серебра. Интенсивность окраски полос пропорциональна количеству белка в зоне.

По сравнению с другими красителями кумасси имеет следую- щие преимущества:

* его чувствительность выше, чем у амидочерного (для R-250 – 0,3–1,0 мкг, для G-250 – около 10 нг белка в полосе);
* зависимость интенсивности окраски от концентрации белка остается линейной в более широком диапазоне концентраций, чем для амидочерного;
* значительно дешевле и проще в использовании, чем нитрат серебра, и не требует особо чистой дистиллированной воды.

**Материалы и оборудование:** шприц с иглой, лезвие безопас- ной бритвы и скальпель для отделения геля, лоток для окраски геля, шейкер, водяная баня.

###### Растворы и реактивы:

1. кумасси ярко-синий марок R-250 или G-250;
2. этанол (300 мл);
3. ледяная уксусная кислота (150 мл);
4. ТХУ, 12 % раствор (200 мл).

###### Ход работы:

Окраска кумасси ярко-синим R-250, совмещенная с фиксацией.

1. Подготавливают кипящую водяную баню, установленную в вытяжном шкафу.
2. Готовят раствор красителя следующего состава: этанол – 300 мл, ледяная уксусная кислота – 60 мл, кумасси R-250 – 0,7 г. При необходимости фильтруют (под тягой).
3. Гель помещают в стакан и заливают пятикратным (относи- тельно объема геля) объемом раствора красителя. Стакан с гелем помещают на водяную баню в вытяжной шкаф и кипятят 10 мин. При комнатной температуре окраска также возможна, но займет 4–5 ч.
4. Сливают краситель из стакана, промывают гель дистиллиро- ванной водой и заливают 7 % уксусной кислотой. Кипятят на водяной бане 5 мин, затем дважды меняют раствор уксусной кислоты на све- жий и повторяют кипячение. Добавление в раствор кусочков фильт- ровальной бумаги, сорбирующей краситель, ускоряет отмывку.

#### Лабораторная работа 3

### Определение молекулярной массы белка в геле

Белок, четвертичная структура которого состоит из нескольких субъединиц, после обработки концентрированным раствором ани- онного детергента додецилсульфата натрия (SDS) в присутствии

-меркаптоэтанола распадается на отдельные полипептидные це- пи. Белки из единственной субъединицы образуют один полипеп- тид. Взаимодействие любых полипептидов с SDS придает им отри- цательный заряд, что обеспечивает их движение к аноду при ис- пользовании электрофореза в ПААГ. Присутствие додецилсульфата натрия обеспечивает линейную зависимость между молекулярной массой белков и их подвижностью. Чем больше молекулярная масса белка, тем медленнее он продвигается через поры геля и, таким об- разом, за единицу времени проходит меньшее расстояние в геле.

Расстояние, пройденное белком в геле, называется электрофо- ретической подвижностью. Она обозначается Rf и определяется как отношение расстояния от дна лунки до полосы белка к расстоя- нию от дна лунки до лидирующего красителя. Таким образом, всег- да Rf < 1.

Для определения массы неизвестного белка необходимо срав- нить его электрофоретическую подвижность с подвижностью не- скольких белков с известной массой (маркером молекулярных масс).

**Материалы и оборудование:** линейка, ПК, проявленный гель с электрофореграммой белков.

###### Ход работы:

1. Рассмотрите гель. Найдите на нем маркер молекулярных масс, определите по каталогу фирмы-производителя, какую массу име- ют белки-маркеры.
2. С помощью линейки определите длину геля и пробег каждо- го из маркерных белков.
3. Рассчитайте электрофоретическую подвижность для мар- керных пептидов, занесите данные в электронную таблицу.
4. Найдите логарифм молекулярной массы референсных пеп- тидов, постройте график линейной зависимости логарифма массы белка от его электрофоретической подвижности.
5. Выберите на геле в дорожках с образцом интересующие вас белки. Определите их электрофоретическую подвижность. Най- дите, где на полученном графике (см. пункт 4) будет находиться точка искомого белка. Определите массу белка.

Лабораторная работа 4 **Нативный электрофорез. Выявление изоферментных спектров пероксидазы**

Выявление изоферментов пероксидазы проводится в соответ- ствии с описанием, данным в работе А. И. Ермакова с соавт. [Ер- маков и др., с. 41–45]. Визуализация изоформ происходит в виде синих полос на прозрачном геле.

**Материалы и оборудование:** лоток для проявления геля, ав- томатические пипетки и наконечники к ним, камера для верти- кального электрофореза, источник тока, шейкер.

###### Растворы и реактивы:

1. 0,5 % уксусная кислота;
2. тpис-глициновый буфер, рН 8,3 (0,6 г трис, 2,34 г глицина, 0,1 г борной кислоты растворить в 1 л воды);
3. бензидиновый реагент (125 мг основного или солянокисло- го бензидина растворить в 1 мл ледяной уксусной кислоты и пос- ле полного растворения довести объем водой до 50 мл);
4. 0,1 % раствор перекиси водорода (0,5 мл 3 % перекиси водо- рода добавить к 14,5 мл воды).

###### Ход работы:

1. Для проведения электрофореза пробы выравнивают по со- держанию белка (обычно около 10 мкг). Электрофорез проводят в 10 % полиакриламидном геле в неденатурирующих условиях со- гласно методике Лэммли (Laemmli, p. 681), исключая ДСН из всех растворов. Разделение проводят при напряжении 2 В/см2 (см. лабо- раторную работу 1). В качестве электродного буфера используют трис-глициновый буфер (рН 8,3) с добавлением борной кислоты в концентрации 0,1 %.
2. После проведения электрофореза гель помещают в раствор 0,5 % уксусной кислоты. Через 5–10 мин, слив уксусную кислоту, гель заливают свежеприготовленным бензидиновым реагентом и оставляют на шейкере на 20 мин.
3. Бензидиновый реагент удаляют, и гель 1 раз споласкивают 0,5 % раствором уксусной кислоты.
4. Гель заливают 0,1 % раствором перекиси водорода и наблю- дают появление синих полос изоформ пероксидазы. При появле- нии окраски перекись водорода сливают, гель сразу фотографиру- ют или сканируют, так как окраска не устойчива.

#### Лабораторная работа 5

### Выявление изоферментных спектров супероксиддисмутазы

Супероксиддисмутаза (СОД) – один из ключевых ферментов антиоксидантной защиты растений. Он катализирует превращение высокотоксичного супероксидного радикала в менее реакцион- носпособную перекись водорода.

Выявление изоформ супероксиддисмутазы в полиакриламид- ном геле проводят согласно методу, предложенному Бошаном и Фридовичем (Beauchamp, Fridovich, p. 277), с модификациями. Изоформы супероксидиддисмутазы выявляются в виде светлых полос на фиолетовом фоне. Окрашивание геля в фиолетовый цвет обусловлено фотоиндуцированным свободнорадикальным окисле- нием нитросинего тетразолия. Отсутствие окрашивания геля гово- рит об отсутствии свободных радикалов, устранение которых про- исходит за счет активности супероксиддисмутазы.

**Материалы и оборудование:** камера для вертикального элект- рофореза, источник тока, люминесцентная лампа, шейкер, лоток для окрашивания геля, скальпель, автоматические пипетки, нако- нечники.

###### Растворы и реактивы:

1. 50 мМ K-Na-фосфатный буфер, рН 7,8. Для приготовления K-Na-фосфатного буфера необходимы следующие сток-растворы: 0,2 М КН2РО4 (1,36 г КН2РО4 довести до 50 мл водой), 0,2 М NaOH

(400 мг NaOH довести до 50 мл водой). Приготовление 50 мМ

K-Na-фосфатного буфера, рН 7,8: 25 мл 0,2 М КН2РО4 и 22,25 мл 0,2 М NaOH смешать и довести до 100 мл водой. Проверить рН раст-

вора и, если необходимо, скорректировать с помощью концентри- рованной H3PO4 или 5 % NaOH;

1. тpис-глициновый буфер, рН 8,3: 0,6 г трис-аминометана,

2,34 г глицина, 0,1 г борной кислоты растворить в 1 л воды);

1. окрашивающий раствор (45 мг этилендиаминтетрауксус- ной кислоты (ЭДТА) и 1 мг рибофлавина растворить в 40 мл 50 мМ

K-Na-фосфатного буфера (рН 7,8). Непосредственно перед загруз- кой геля добавить 4 мг нитросинего тетразолия.

**Оборудование:** прибор для проведения электрофореза, источ- ник тока, холодильник, люминесцентные лампы, фотоаппарат.

###### Ход работы:

1. Для проведения электрофореза пробы выравнивают по со- держанию белка (обычно около 20 мкг). Разделение белков прово- дят в 10 % полиакриламидном геле в электродном трис-глицино- вом буфере (см. лабораторную работу 1) без додецилсульфата натрия (ДСН), по методу Лэммли [Laemmli, p. 277–278]. Разделение прово- дят при 4° С, помещая камеру в холодильник, останавливая про- цесс разделения сразу после того, как лидирующий краситель пол- ностью выйдет из разделяющего геля и пробки.
2. После электрофореза гель помещают в окрашивающий раст- вор и инкубируют 20 мин в темноте при комнатной температуре. Затем гель переносят в чистую прозрачную емкость и облучают люминесцентными лампами дневного света до появления нужной четкости и интенсивности окрашивания. При этом происходит из- менение окраски геля от светло-желтой до фиолетовой. Изофор- мы супероксиддисмутазы проявляются в виде светлых неокрашен- ных полос.
3. Реакция останавливается выключением света. Гель быстро фотографируют или сканируют.

#### Лабораторная работа 6

**Изоферментный анализ генетического полиморфизма в популяции растений**

**Материалы и оборудование:** свежие или замороженные ор- ганы растений (листья, почки, стебли, луковицы, клубни и др.), цент- рифуга с охлаждением, ступки с пестиками, оксид алюминия, вер- тикальная камера для заливки геля и электрофореза, охлаждающий термостат или ледяные блоки для охлаждения.

Если используются замороженные органы растений, их необ- ходимо растирать в жидком азоте.

###### Растворы:

1. экстрагирующий буфер (на 100 мл): трис-HCI 1М – 10 мл, аскорбиновая кислота – 100 мг, бычий сывороточный альбумин – 20 мг, -аминокапроновая кислота – 20 мг, сахароза – 16 г, Tween- 80 – 1 мл, PVP 2 % – 2 г, -меркаптоэтанола – до 0,1 % (добавляет- ся непосредственно перед экстракцией). Хранится в холодильнике;
2. буфер трис-HCl 8,0 (для покраски): трис – 48,4 г, H2O – око- ло 1 л, HCl – до pH 8,0, H2O – до 2 л;
3. буфер ТЕB 8,0 для камеры: трис – 84 г, ЭДТА (трилон В) –

7,2 г, борная кислота – 60 г, H2O – до 2 л. Перед заливкой в камеру разводить водой 1 : 2. Использовать в качестве нижнего и верхне- го буферов;

1. буфер 8,6 (для заливки гелей): трис – 43 г, ЭДТА – 3,5 г, бор- ная кислота – 22 г, H2O – до 1 л;
2. концентрирующий гель (на 65 мл): раствор акриламида (вер-

хний) – 17 мл, буфер ТЕВ для гелей – 13 мл, вода дистиллирован- ная – 35 мл, персульфат аммония – 54 мг;

1. разрешающий гель (на 200 мл): раствор акриламида (ниж- ний) – 66 мл, буфер ТЕБ для гелей – 62 мл, вода дистиллирован- ная – 72 мл, персульфат аммония – 180 мг;
2. раствор акриламида (нижний): акриламид – 192 г, биакрил- амид – 8 г, H2O – до 1 л;
3. раствор акриламида (верхний): акриламид – 192 г, биакрил-

амид – 16 г, H2O – до 1 л.

###### Растворы для выявления зон активности некоторых фер- ментов (Левитес, 1986)

*Аконитаза* (АКО): 50 мкг *цис*-аконитовой кислоты в 12,5 мл трис-НСl буфер (pH 8,0), содержащего МgCl2 (1М) – 100 мкл, МТТ – 0,5 мл, ФМС – 0,3 мл; довести рН до 7–8, агар (1 %) – 12,5 мл

(температура агара не должна быть выше 45 °С). Добавить перед употреблением НАДФ – 10 мкг, изоцитратдегидрогеназу – 2 мкл; проявляется в термостате при 37 °С.

*Алкагольдегидрогеназа* (АDH): 1 мл этанола в 50 мл трис-НСl буфера (pH 8,0), содержащего НАД – 15 мкг, МТТ – 1 мл, ФМС – 0,5 мл; 37 °С.

*Аспартатаминотрансфераза* (GOT): трис-HCl буфер, рН 8,0 (до 100 мл); пиридоксаль-5-фосфат – 8 мг; *L*-аспарагиновая кисло- та – 340 мг; прочный синий ББ соль – 300 мг; -кетоглутаровая кислота – 150 мг; 37 °С.

*Изоцитратдегидрогеназа* (IDH): 20 мг изоцитрата в 12,5 мл трис-НСl буфера (pH 8,0), содержащего НАДФ – 10 мкг, МgCl2 (1М) – 100 мг, МТТ – 0,5 мл, ФМС – 0,3 мл, агар 1 % – 12,5 мл; 37 °С.

*Формиатдегидрогеназа* (FDH): трис-НСl буфера (pH 8,0) – до 50 мл, формиат – 1 г, аспарагиновая кислота – 200 мг, -кетоглу- таровая кислота – 50 мг, пиридоксаль – 4 мг; непосредственно пе- ред употреблением добавить Fast Blue – 100 мг, если необходимо, профильтровать смесь; 37 °С.

*Фосфоглюкоизомераза* (PGI): трис-НСl буфера (pH 8,0) – 12,5 мл, фруктоза-6-фосфат – 10 мкг, МgCl2 (1М) – 100 мкл, НАДФ – 10 мкг, глюкоза-6-фосфотдегидрогеназа – 4 мкл, МТТ – 0,5 мл, ФМС –

0,3 мл, агар 1 % – 12,5 мл; 37 °С.

*6-фосфоглюконатдегидрогеназа* (6-PGD): трис-НСl буфера (pH 8,0) – 12,5 мл, 6-фосфоглюконовая кислота – 10 мкг, НАДФ – 10 мкг, МgCl2 (1М) – 100 мкл, МТТ – 0,5 мл, ФМС – 0,3 мл, агар – 12,5 мл; 37 °С.

###### Ход работы:

1. Для экстракции ферментов 120–160 мг свежих листьев или других частей растений растереть в 1 мл экстрагирующего буфе- ра в ступке. Гомогенезированный образец перенести в пробирку

«Эппендорф». В том случае, если электрофорез не проводится сразу после экстракции, образцы необходимо хранить в морозильнике.

1. Гомогенезированные образцы центрифугировать 5 мин (13 тыс. об/мин при +4 °С), добавив перед этим 200 мл четырех-

хлористого углерода (ССl4). Все операции проводить таким обра- зом, чтобы температура образцов не превышала 15 °С, иначе ак-

тивность ферментов снижается.

1. Собрать вертикальные камеры и залить их ПААГ гелем. Ниж- ний слой – разделяющий гель, верхний слой – концентрирующий гель. После заливки первого геля наслаивается водонасыщенный *н*-бутанол для более ровной полимеризации. Перед заливкой кон- центрирующего геля устанавливают гребенки, формирующие ячейки для внесения образцов.
2. После полимеризации гребенки вынимаются и камера уста- навливается в ванну с буфером. В саму камеру заливают электрод- ный буфер. Камеру подключают к источнику тока и в течении 10–15 мин проводят предотгонку для удаления из буфера ионов.
3. В каждую ячейку геля самплером аккуратно вносится от 10 до 50 мкл образца, в одну из ячеек вносится краситель (например, хлопчатобумажный голубой). По движению красителя можно отсле- живать движение образцов. Условия электрофореза: температура не должна превышать 15 С; в низкой камере напряжение 150–180 В, сила тока – 299 мА, в высокой камере напряжение 100–220 В, сила тока – 299 мА.
4. Температура в камерах (+10 °С) поддерживается при помо- щи охлаждающего термостата и дополнительных охлаждающих элементов.
5. После электрофореза гели разрезают продольно на 4 слоя с помощью тонкой проволоки. Каждый срез помещают в отдель- ную кювету и окрашивают по соответствующей методике [Леви- тес; Гончаренко и др.].

**Вопросы для самоконтроля**

1. При каких условиях белки не способны перемещаться в электри- ческом поле?
2. Что такое изиозимы и в чем причина их появления?
3. Для чего при электрофорезе в гель и в буферы добавляют додецил- сульфат натрия?
4. Как зависит электрофоретическая подвижность белка от его мо- лекулярной массы?
5. Для чего необходимо получать изоферментные спектры белков?
6. Назовите методы визуализации белковых зон в гелях. Каковы до- стоинства и недостатки данных методов?

34

1. Какие носители могут быть применены для разделения белков электрофоретическим методом? В чем их достоинства и недостатки?
2. Какое вещество используется для получения поперечных сшивок в ПААГ?
3. Какие вещества используются для полимеризации акриламида?
4. Как можно варьировать диаметр пор в полиакриламидном геле?
5. Что такое изоэлектрическое фокусирование?

## 2. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК

### Растительный материал для выделения ДНК

Выделять ДНК можно из свежих или замороженных (при –70–80 оС) растительных образцов, из частей растений, высу- шенных в силикагеле, или из гербарных образцов. Не любой гер- барий подходит для выделения ДНК. Лучшие результаты достига- ются в случае возраста гербария не более 30–40 лет и при условии его правильной и быстрой сушки.

Для выделения ДНК обычно используют листья растений, но в связи с тем, что разные органы растений могут иметь отличия в химическом составе, в том числе в содержании вторичных мета- болитов, необходимо подбирать орган растения, из которого выде- ляется более качественная ДНК.

При выборе частей растения для выделения ДНК необходимо помнить о том, что нужно выбирать участки, не пораженные гриб- ковыми и другими заболеваниями, чтобы избежать загрязнения проб чужеродной ДНК.

Если ДНК из образцов ткани не может быть экстрагирована в ближайшие 48 ч, образец должен быть заморожен при темпера- туре от –20 до –80 оС или подвергнут сушке. Повторение циклов замораживания-оттаивания проводить не рекомендуется из-за воз- можности разрушения ДНК.

### Особенности выделения ДНК из растительных объектов

В основе выделения ДНК лежат как физические, так и химичес- кие процессы. При выделении ДНК из растительных объектов не- обходимо дезактивировать клеточные ферменты, «удалить» запас- ные вещества, например, полисахариды и вторичные метаболиты:

алкалоиды, фенольные соединения, терпены, которые не просто ме- шают выделению ДНК, но и отрицательно влияют на ее качество [Рябушкина и др., с. 12]. Так, определенные группы полисахаридов при выделении ДНК образуют с ней вязкую желеподобную массу. Серьезное негативное воздействие оказывают окислители различ- ной биохимической природы, а также фенольные соединения. В связи с многообразием метаболитов у представителей различ- ных таксонов, а иногда и представителей одного рода растений, одного оптимального протокола изолирования ДНК не существует. В целом выделение ДНК включает обязательные процедуры:

* разрушение клеток или лизис;
* удаление мембранных липидов;
* удаление вторичных метаболитов и запасных веществ;
* удаление белков;
* удаление РНК;
* осаждение ДНК.

Первый этап – **разрушение клеток**, **лизис**. В отличие от кле- ток животных, растительные клетки окружены прочной целлюлоз- ной оболочкой. Активная физическая гомогенизация тканей долж- на разрушить клеточные оболочки, нарушить целостность клеток и внутриклеточных компартментов с целью освобождения компо- нентов этих компартментов, выделения их в экстрагирующий бу- фер. Разрушение тканей осуществляется в процессе растирания в ступке или с использованием гомогенизатора. Вследствие того, что нуклеиновые кислоты легко разрушаются на стадии очистки, время между гомогенизацией пробы и добавлением буфера долж- но быть минимальным.

Растительные ткани содержат большое количество полисаха- ридов, в том числе целлюлозу клеточных стенок, крахмал; полиса- хариды в комплексе с белками, а также белки в комплексе с липи- дами, комплексы белков с нуклеиновыми кислотами, полифенолы и другие соединения. Это значительно затрудняет изолирование ДНК из многокомпонентной смеси, элементы которой могут как физи- чески связывать, так и химически разрушать молекулы нуклеино- вой кислоты. Погружение тканей в жидкий азот с последующей

гомогенизацией облегчает разрушение клеток, тормозя при этом все биохимические и физические процессы, повреждающие ДНК. Если исходная ткань была заморожена, при гомогенизации ни в ко- ем случае не следует допускать ее оттаивания.

Для разрушения клеточных оболочек и мембран гомогенези- рованный образец обрабатывается экстрагирующим буфером, кото- рый обычно содержит EDTA, трис-HCl и CTAB.

**Удаление липидов и мембранных белков.** Гомогенизация тканей в присутствии детергентов (поверхностно активных ве- ществ) и хаотропных агентов способствует высвобождению мемб- ранных липидов, белков и лизису клеток. В буферных растворах детергенты разрушают фосфолипидный слой мембран, переводят в растворимое состояние мембранные белки, тем самым разру- шая липидно-белковые комплексы, при этом ДНК экстрагируется в буфер, т. е. переходит в растворимое состояние. Выбор детерген- тов зависит от целей исследования.

Классический катионный детергент, используемый при экс- тракции ДНК, – ***цетилтриметил бромид аммония*** (CTAB), со- держащийся в экстрагирующем буфере. СТАВ лизирует клеточ- ную мембрану, эффективно разрушает ДНК-белковые комплексы. При определенной концентрации соли (NaCl) CTAB образует не- растворимый комплекс с нуклеиновыми кислотами.

Анионные детергенты, например ***додецилсульфат натрия*** (SDS), при значениях рН ниже изоэлектрической точки белка обра- зуют с белками нерастворимые осадки. ***Додецилсульфат натрия*** и ***меркаптоэтанол*** осаждают белки и полисахариды как нера- створимый комплекс. Меркаптоэтанол разрушает дисульфидные мостики, в том числе и в белках, с нарушением их третичной и чет- вертичной структуры и действует как биологический антиокси- дант, ингибируя окислительные процессы, которые напрямую или косвенно повреждают ДНК. Поскольку наличие дисульфидных мос- тиков поддерживает стабильность нуклеаз, меркаптоэтанол элими- нирует активность освобождаемых при лизисе клеток ферментов. Реже используются неионные детергенты, такие как ***Тритон X-100***, но так как они более «мягкие», белки могут оставаться интактными.

Буфер экстракции может содержать ***дитиотреитол*** (ДTT), который так же, как и меркаптоэтанол, является сильным восста- навливающим агентом. Присутствие ДТТ способствует разруше- нию дисульфидных связей, предотвращая образование димеров

«тиолированной» ДНК в растворе.

Нагревание и присутствующие в буфере для экстракции хао- тропные агенты, такие как соли, денатурируют макромолекулы, на- рушая водородные связи, гидрофобные взаимодействия и силы Ван-дер-Ваальса. Высокие концентрации солей осаждают поли- сахариды, которые в противном случае могут образовывать с ДНК желеобразный комплекс. В присутствии в буфере экстракции ***этилендиаминтетрауксусной кислоты*** (EDТА) – хелатирую- щего агента, связывающего ионы металлов (Mg2+, Ca2+, Fe3+ и др.), происходит дезактивация металл-зависимых ферментов, находя- щихся в растительных экстрактах. Наиболее важным является то, что EDTA связывает магний, являющийся кофактором фермента ДНКазы. При связывании магния снижается активность имеющих- ся ДНК (см.: http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu).

**Удаление вторичных метаболитов.** Растения характеризу- ются накоплением в определенных органах большого количества вторичных метаболитов (в первую очередь это относится к арома- тическим и лекарственным растениям), которые оказывают суще- ственное негативное влияние на процедуры изолирования, а в даль- нейшем могут являться ингибиторами ПЦР-реакции. Полифенолы, присутствующие во многих растениях, при гомогенизации тканей вступают в реакции окисления, ковалентно связываются с белками и нуклеиновыми кислотами, осадок ДНК становится коричневым, такие образцы ДНК непригодны для дальнейших исследований. Связать фенолы и не допустить их взаимодействия с нуклеиновыми кислотами можно с помощью содержащихся в экстрагирующем буфере полимеров: поливинилпирролидона (PVP) или поливинил- поливинилпирролидона (PVPP, модификация PVP с поперечными сшивками).

**Удаление белков.** Степень связывания участков ядерной ДНК

с белковыми комплексами зависит от транскрипционного статуса

этих участков, транскрипционно неактивная ДНК наиболее плотно

«упакована» с соответствующими белками, представляя структу- ру гетерохроматина. Поэтому следующий важный этап – удаление белков с помощью ***протеаз***. Щелочные протеазы гидролизуют белки, в том числе гистоны, связанные с ДНК, ферменты клеточно- го содержимого, в том числе нуклеазы. В качестве примера можно привести широко применяемую протеиназу К, которая эффективно инактивирует нуклеазы, будучи устойчивой при этом к денатури- рующим (SDS, мочевина), хелатирующим (ЭДТА) и сульфгидриль- ным агентам, а также к ингибиторам трипсина и хемотрипсина. Дан- ная протеаза работает в широком диапазоне рН (от 4 до 12 еди- ниц). Более того, денатурирующие агенты повышают доступность пептидных связей белков для протеиназы К. Белки также могут быть осаждены солями: ацетатом аммония, натрия, калия – или до осаждения ДНК экстрагированы смесью фенол/хлороформ.

**Удаление РНК.** Большие количества РНК в образцах ДНК мо- гут связывать Mg+2 и тем самым снижать активность ДНК-поли- меразы в ПЦР и, следовательно, количество продукта реакции. РНК может быть удалена на соответствующем этапе осаждением хлоридом лития или добавлением ***РНКазы*** к растворенному в воде осадку нуклеиновых кислот. Инкубация при 37 °С способствует гид- ролизу РНК в образцах. Затем ДНК должна быть переосаждена спиртом, так как мелкие фрагменты РНК после обработки РНКазой могут послужить «затравками» в ПЦР-реакции.

**Осаждение ДНК.** Нуклеиновые кислоты из экстракционного буфера осаждают охлажденным этанолом или изопропанолом, поскольку полярные молекулы ДНК нерастворимы в неполярном спирте. Концентрация спирта при переосаждении не должна быть меньше 70 % во избежание потерь ДНК.

Если в осажденном концентрированном экстракте ДНК все еще присутствуют ингибиторы ПЦР, может быть использована смесь фенол/хлороформ/изоамиловый спирт; при этом смесь разделяет- ся на фазы: водный раствор, в котором содержатся нуклеиновые кислоты; интерфаза вода/фенол – содержатся белки и углеводы; фаза хлороформ/изоамиловый спирт – растворяются липиды. Водный

экстракт переносится в чистую пробирку, и нуклеиновая кислота может быть осаждена 3 М ацетатом натрия, с последующим про- мыванием осадка в спирте (70 % и 100 % этанол). Фенол, хлороформ и изоамиловый спирт – токсичные соединения и требуют утилиза- ции после использования, поэтому их применение становится все более редким. Коммерческие наборы для выделения ДНК не содер- жат токсичные фенол и хлороформ, но имеют высокую стоимость. ДНК после экстракции может храниться в буферах, совмести- мых с ПЦР. Следует учитывать, что, например, ТЕ-буфер содер- жит ЭДТА, связывающий ионы магния, необходимого для работы ДНК-полимеразы (во время ПЦР-реакции). В стерильной дистил- лированной воде ДНК представляет собой слабую кислоту, что в конечном итоге приводит к авторазрушению. Фосфатные буфе- ры также могут влиять на структуру ДНК. Трис-буфер сам по себе не оказывает влияния на *Taq*-полимеразу, но при внесении ДНК в этом стабилизирующем буфере может сдвинуться рН реакцион-

ной смеси ПЦР.

Экстрагированная ДНК может долгое время храниться при –80 °C. Для непродолжительного хранения ДНК достаточно 4 °С. Крайне не рекомендуется неоднократное замораживание–оттаивание пре- паратов ДНК, ведущее к разрывам молекулы.

Таким образом, метод экстракции ДНК должен быть достаточ- но простым, удобным, недорогим и при этом воспроизводимым. Полученная чистая ДНК должна быть «доступна» для ферментов рестрикции и реакций амплификации, отвечать требованиям по- следующего клонирования, секвенирования, гибридизации и др.

Лабораторная работа 7 **Метод солевой экстракции ДНК с фенольной депротеинизацией**

**Материалы и оборудование:** растительная ткань, заморожен- ная жидким азотом, свежая или высушенная в гербарии или се- ликагеле, ступки с пестиками, центрифуга, микроцентрифужные

пробирки, вытяжной шкаф, твердотельный термостат («Термит»), вортекс.

###### Реактивы:

1. трис-HCl 1 М буфер: H2O – примерно 70 мл, трис – 12,1 г, HCl конц. – 8 мл сразу, затем по 100 мкл до достижения требуемо-

го значения pH (проверить с помощью pH-метра или индикаторной бумаги). Довести водой до 100 мл;

1. ЭДТА (pH 8,0) – 0,5 M: H2O – примерно 70 мл, ЭДТА – 14,6 г. Довести pH сухим NaOH до 8,0. Использовать pH-метр или инди-

каторную бумагу. Довести водой до 100 мл;

1. буфер TE: трис-HCl 1 М (pH 8,0) – 1 мл, ЭДТА 0,5 M (pH 8,0) – 20 мкл, вода бидистиллированая или milliQ – до 100 мл;
2. экстрагирующий буфер: трис-HCl (pH 7,5) – 200 мМ, NaCl – 250 мМ, ЭДТА – 25 мМ, лаурилсульфат или додецилсульфат нат- рия (SDS) – 0,5 %.

###### Ход работы:

1. 30–40 мг растительной ткани гомогенизировать. Для этого растительную ткань заморозить жидким азотом и растереть в ступ- ке с экстрагирующим буфером, а затем помесить в центрифуж- ную пробирку объемом 1,5 мл, залить 500 мкл экстрагирующего буфера. Пробирки поместить в термостат на 10 мин при *Т* = 65 °С.
2. Дать пробиркам остыть и центрифугировать 5 мин при 10 тыс. об/мин.
3. Отобрать супернатант (жидкость) и поместить в другую про- бирку на 1,5 мл, добавить 250 мкл фенола, забуференного 1 М три- сом. Встряхнуть, центрифугировать 5 мин при 15 тыс. об/мин.
4. Отобрать супернатант в другую пробирку, не задевая интер- фазу, добавить равный объем хлороформа, встряхнуть, центрифу- гировать 2–3 мин при 15 тыс. об/мин.
5. Отобрать супернатант в чисту пробирку, добавить 500 мкл изопропанола, тщательно перемешать, поставить в морозильник на 20 мин. Центрифугировать 10 мин при 15 тыс. об/мин, слить супернатант.
6. К осадку добавить 1 мл 70 % этанола, встряхнуть, центри- фугировать 5 мин при 15 тыс. об/мин, слить спирт, повторить опе- рацию.
7. Подсушить осадок в пробирках с открытыми крышками. Раст- ворить ДНК в 200 мкл буфера TE. Хранить в морозильнике.

#### Лабораторная работа 8

**Выделение суммарной ДНК из растений**

**по Devey et al. с небольшими модификациями**

[Semerikov, Lascoux, p. 1114]

**Материалы и оборудование:** растительная ткань, заморожен- ная жидким азотом, свежая или высушенная в гербарии или сели- кагеле, ступки с пестиками, центрифуга, микроцентрифужные про- бирки, вытяжной шкаф, твердотельный термостат («Термит»).

###### Реактивы:

1. экстрагирующий буфер: трис-HCl 1 М (рН 8,0) – 10 мл, ЭДТА 0,5 M (pH 8,0) – 1 мл, полиэтиленгликоль – 10 г, сорбитол – 6,8 г, лаурилсаркозин – 1 г, альбумин бычий сывороточный – 100 мг, ас- корбиновая кислота – 100 мг, Tween-80 – 1 мл, вода – до 100 мл, 2-меркаптоэтанол – 0,1 %, добавляется непосредственно перед ис- пользованием;
2. 5 M NaCl: NaCl – 29 г, H2O – до 100 мл;
3. 10 % CTAB: CTAB – 10 г, вода – до 100 мл. Размешать в хо- лодной воде, а затем слегка подогреть суспензию в микроволно- вой печи или на водяной бане для растворения CTAB.

###### Ход работы:

1. 40–50 мг сухой или 150 мг свежей ткани растереть в ступ- ках. Если ткань была заморожена, растирать нужно в жидком азоте. Добавить 800 мкл экстрагирующего буфера либо, используя пестик, произвести гомогенизацию непосредственно в буфере. Го- могенат тщательно перемешать.
2. В смесь добавить 390 мкл 5 M NaCl и 290 мкл предваритель- но разогретого 10 % CTAB и инкубировать 30 мин при *Т* = 65 °С в твердотельном термостате, периодически перемешивая.
3. Пробирку охладить до комнатной температуры и добавить 300–500 мкл смеси хлороформа и изоамилового спирта (24 : 1), тща- тельно перемешать и центрифугировать 20 мин при 13 тыс. об/мин (*Т* = 18–20 °С). Процедуру повторять до получения прозрачной вод- ной фазы.
4. С помощью дозатора отобрать 500–1000 мкл прозрачной фа- зы в новые пробирки и добавить к ней 600 мкл изопропанола. Да- лее осторожно перемешивать в течение 2 мин. Поместить в хо- лодильник не менее чем на 30 мин, после чего центрифугировать при 13 тыс. об/мин в течение 10 мин.
5. Изопропанол слить и добавить 500 мкл 70 % этанола, переме- шать и центрифугировать 1–2 мин, после чего этанол слить и под- сушивать при открытых крышках пробирок до полного испарения спирта.
6. Растворить в 200 (100) мкл буфера TE. Полученную ДНК хранить при температуре –20 оС при долгосрочном хранении и от 0 до +3 оС – при временном.

#### Лабораторная работа 9

### Выделение геномной ДНК (с мочевиной)

**Материалы и оборудование:** растительная ткань, заморожен- ная жидким азотом, свежая или высушенная в гербарии или сели- кагеле, ступки с пестиками, центрифуга, микроцентрифужные про- бирки, вытяжной шкаф, твердотельный термостат («Термит»), вор- текс, автоматические пипетки, наконечники для пипеток в штативе.

**Растворы:** экстрагирующий буфер (хранить при комнатной температуре): SDS – 2 % (w/v), ЭДTA – 10 мМ, NaCl – 0,35 M, трис- НCl (pH 8,0) – 0,1 M, мочевина – 7 M.

###### Ход работы:

1. Тщательно гомогенизировать образец в 100 мкл экстраги- рующего буфера в пробирке «Эппендорф» с помощью пестика.
2. Довести объем буфером до 300 мкл.
3. Добавить 300 мкл смеси фенол–хлороформ (1 : 1), встряхнуть на вортексе.
4. Цетрифугировать 5 мин при 10 тыс. об/мин.
5. Отобрать верхнюю водную фракцию в новую пробирку, не задевая интерфазу.
6. Добавить равный объем хлороформа, встряхнуть на вортексе.
7. Отцентрифугировать, отобрать верхнюю фазу в новую про- бирку.
8. Добавить двойной объем холодного этанола или равный объем изопропанола и поставить в холодильник на 30 мин.
9. Отделить образовавшийся осадок центрифугированием на мак- симальной скорости 10–15 мин.
10. Осторожно слить супернатант и подсушить осадок на воз- духе.
11. Растворить осадок в 250 мкл ТЕ-буфера, добавить 1/10 объема ацетата натрия (pH 5,2), добавить 2 объема этанола, инкубировать в холодильнике 20 мин. При этом примеси остаются в растворе, а в осадок снова выпадает ДНК.
12. Отделить осадок центрифугированием в течение 10–15 мин., слить супернатант.
13. Осадок промыть 70 % этанолом, отделить центрифугирова- нием, слить спирт.
14. Осушить осадок 96 % этанолом, отделить центрифугирова- нием ДНК.
15. Растворить ДНК в 100 мкл воды или в ТЕ буфера.

#### Лабораторная работа 10

**Быстрый метод выделение ДНК из растительных тканей** [Великов, с. 11]

**Материалы и оборудование:** органы растений (или заморо- женные ткани), микроцентрифуга, морозильник, ступки с пестика- ми, оксид алюминия, песок.

###### Растворы:

* 1. буфер для экстракции: трис-HCl (pH 8,0) – 100 мM, ЭДТА – 50 мM, NaCl – 500 мM, SDS – 1,25 %, NaOH – 8,3 мM, Na2S2O3 – 0,83 %;
  2. 3 М ацетат калия, рН 5,0. На 100 мл: 5 M ацетат калия – 60 мл; CH3COOH ледяная – 11,5 мл; H2O – 28,5 мл;
  3. смесь фенол–хлороформ (1 : 1);
  4. смесь хлороформ–изоамиловый спирт (24 : 1).

###### Ход работы:

1. Взять 200 мг листьев растений, замороженных заранее при –20 оС в морозильнике, либо быстро заморозить навеску в жид- ком азоте.
2. Образцы растереть в предварительно охлажденной фарфо- ровой ступке до гомогенного состояния. Если нет жидкого азота, то при растирании к замороженным листьям необходимо добавить 0,1 г оксида алюминия или прокаленного белого речного песка в качестве абразива. В ступку при этом нужно добавить немного буфера для экстракции ДНК (300 мкл).
3. Добавить в ступку 700 мкл буфера для экстракции, снова перемешать.
4. Перенести растертую массу в микропробирку «Эппендорф» так, чтобы объем составлял примерно 700 мкл (на пробирке есть метка 0,75 мл).
5. Перемешать и инкубировать гомогенат при 65 оС в течение 10 мин.
6. Добавить 220 мкл ацетата калия и поместить пробирку на лед на 20 мин.
7. Центрифугировать пробу в течение 3 мин при скорости 10 тыс. об/мин. Перенести супернатант (надосадочную жидкость) в чистую пробирку.
8. К супернатанту добавить равный объем изопропанола, пере- мешать и центрифугировать 10 мин при 10 тыс. об/мин для осаж- дения ДНК.
9. Осадок ДНК промыть 70 % этанолом, растворить в 200 мкл буфера ТЕ.
10. Провести процедуру фенольной депротеинизации образца. Для этого внести в пробирку с раствором ДНК равный объем фе- нол-хлороформной смеси, хорошо перемешать встряхиванием и центрифугировать. Отобрать водную фазу (верхний слой) в чис- тую пробирку, не захватывая интерфазу. Повторить ту же процеду- ру со смесью хлороформ–изоамиловый спирт. Отобрать водную фазу с ДНК в чистую пробирку.
11. Осадить ДНК 2,5 объемами холодного 96 % этанола, предва- рительно прилив к образцу 1/10 объема 3 М ацетата K (рН 5,0) или Na (pH 5,2).
12. Пробу центрифугировать в течение 10 мин на максимальной скорости. Супернатант слить. Осадок промыть 70 % спиртом.
13. Высушить осадок ДНК на воздухе и растворить в 50 мкл буфера ТЕ.

#### Лабораторная работа 11

### Выделение ДНК растений с использованием СТАВ

Детергент CTAB (цетилтриэтиламмоний бромид, англ. *cetyl triethylammonium bromide*) хорошо растворяет мембраны клеток. Кроме того, его применение позволяет разделять ДНК и полисаха- риды, поскольку они отличаются по растворимости в присутствии CTAB. При высоких концентрациях солей (0,7 М NaCl) нуклеино- вые кислоты образуют стабильные, но вместе с тем растворимые

комплексы со CTAB. При снижении концентрации соли ниже 0,4 М NaCl происходит выпадение в осадок комплексов CTAB/нуклеи- новая кислота, тогда как большая часть полисахаридов остается в растворе. Методики с применением CTAB позволяют получать препараты растительной ДНК, пригодные для рестрикционного и гибридизационного анализов, для Real-time PCR и ряда других ферментативных реакций.

**Материалы и оборудование:** растительная ткань, заморожен- ная жидким азотом, свежая или высушенная в гербарии или сели- кагеле, ступки с пестиками, центрифуга, микроцентрифужные про- бирки, вытяжной шкаф, твердотельный термостат («Термит»).

###### Растворы:

1. лизирующий буфер: CTAB – 2 %, трис-НСl (pH 8,0) – 100 мМ, ЭДТА – 20 мМ, NaCl – 1,4 М;
2. буфер для осаждения: CTAB – 1 %, трис-НСl (pH 8,0) – 50 мМ, ЭДТА – 10 мМ;
3. высокосолевой ТЕ: трис-НСl (pH 8,0) – 10 мМ, ЭДТА – 1 мМ, NaCl – 1,2 М;
4. изопропанол;
5. 70 % этиловый спирт;
6. ТЕ: трис-НСl (pH 8,0) – 10 мМ, ЭДТА – 1 мМ.

###### Порядок работы:

1. 50–100 мг ткани заморозить в жидком азоте и растереть в ступ- ке с жидким азотом до состояния пудры светло-зеленого цвета. Пе- ренести охлажденным шпателем в пробирки «Эппендорф» объемом 1,5 мл. Добавить 100–200 мкл ТЕ и 400 мкл лизирующего буфера. Инкубировать 10–30 мин при 65 оС (можно 1–3 ч).
2. Охладить до комнатной температуры, добавить 400 мкл хло- роформа, смешивать 30 с, центрифугировать 2–5 мин при 12 тыс. об/мин.
3. Отобрать пипеткой верхнюю водную фазу, содержащую ДНК, в чистую пробирку.
4. Добавить двойной объем буфера для осаждения, перемешать и оставить на столе на 10–60 мин (или ночь).
5. Отделить ДНК в настольной центрифуге 5–10 мин при 12 тыс. об/мин, осторожно вылить супернатант.
6. Осадок ДНК растворить в 100 мкл высокосолевого буфера ТЕ. (Если требуется очистка от РНК, то добавить рибонуклеазу А до концентрации 0,2 мг/мл и инкубировать при 37 °С в течение 10–30 мин, затем провести очистку хлороформом: добавить 200 мкл хлороформа, смешивать 30 с, центрифугировать в течение 10 мин при 12 тыс. об/мин и отобрать водную фазу в чистую пробирку.)
7. Осадить ДНК 0,8–1 объемом изопропанола (или 2,5–3 объема- ми этилового спирта); центрифугировать в течение 10 мин при 12 тыс. об/мин.
8. Осадок ДНК промыть 2–3 раза 75 % спиртом, высушить и раст- ворить в 50 мкл воды или ТЕ.

#### Лабораторная работа 12

### Дополнительная очистка ДНК

Дополнительную очистку ДНК применяют при неудовлетво- рительных результатах первой очистки (получение серого или жел- того осадка в пробирке вместо белого после промывки этанолом, наличие примеси РНК и белков).

1. Добавить 1 мкл РНКазы. Встряхнуть пробирки.
2. Поместить в термостат на 30 мин при 37 °С.
3. Добавить 20 мкл 3 М раствора ацетата натрия и 100 мкл хлороформа.
4. Перемешать и процентрифугировать 10 мин при 13 тыс. об/мин.
5. Водную фазу поместить в чистую пробирку и добавить 200 мкл изопропанола.
6. Поместить в холодильник на время от 40 мин до несколь- ких часов.
7. Центрифугировать 10 мин при 13 тыс. об/мин.
8. Слить изопропанол и добавить 200 мкл 70 % этанола, после чего встряхнуть, центрифугировать 1–2 мин при 13 тыс. об/мин и слить этанол.
9. Подсушить и растворить в 200 мкл буфера TE.

49

##### Вопросы для самоконтроля

1. В чем сложности выделения ДНК из растительного материала?
2. С какой целью при выделении ДНК проводится обработка фено- лом и хлороформом?
3. Почему предпочтительнее использовать додецилсульфат натрия, а не Тритон Х-100 при выделении ДНК?
4. Что необходимо сделать, если при осаждении ДНК препарат имеет желтый или коричневый цвет?
5. Как осадить ДНК из раствора?
6. Для чего при выделении ДНК в буфер добавляют меркаптоэтанол и поливенилпиролидон?
7. Почему нежелательно растворять препарат ДНК в дистиллирован- ной воде?
8. Как очистить препарат ДНК от примеси РНК и белков?
9. Какие способы существуют для разрушения клеточной стенки растений?
10. Что такое СТАВ и для чего его применяют?

## 3. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ ПРЕПАРАТОВ ДНК И РНК

Довольно часто количественную и качественную оценку пре- парату выделенной ДНК в первом приближении дают при гель- электрофорезе, следующем, как правило, сразу за процедурой вы- деления. Для этого визуально сравнивают на соседних дорожках геля интенсивность свечения в ультрафиолете полученного образ- ца с образцом известной концентрации.

Определить концентрацию ДНК, а также степень ее чистоты можно с помощью спектрофотометра, что точнее и быстрее. Для это- го измеряют оптическую плотность раствора ДНК при длине волны 260 нм. Одна (каждая) оптическая единица соответствует концент- рации ДНК в 50 мкг/мл. Для расчета можно воспользоваться кальку- лятором на интернет-ресурсе MOLBIOL.RU [[http://www.molbiol.ru]](http://www.molbiol.ru/) или других подобных порталах.

Спектрофотометрия (абсорбционная) – физико-химический метод исследования растворов и твердых веществ, основанный на изучении спектров поглощения в ультрафиолетовой (200–400 нм), видимой (400–760 нм) и инфракрасной (>760 нм) областях спект- ра. Основная зависимость, изучаемая в спектрофотометрии, – зави- симость интенсивности поглощения падающего света от длины волны (). В сооответствии с законом Бугера–Ламберта–Бера опти- ческая плотность раствора прямо пропорциональна концентрации поглощающего вещества. Нуклеиновые кислоты поглощают ультра- фиолетовое (УФ) излучение в области 240–290 нм с максимумом при 260 нм. Хромофорами служат азотистые основания нуклеино- вой кислоты (НК), особенно пиримидиновые. Пиримидины погло- щают УФ-свет примерно в 10–20 раз интенсивнее, чем хромофоры белковых молекул – триптофан, тирозин и фенилаланин.

Для оценки чистоты препарата ДНК, свободного от РНК, про- водят измерения оптической плотности раствора при длинах волн

260, 280 и 235 нм, т. е. на максимумах поглощения растворов ДНК, белков и полисахаридов соответственно. Значение соотношения А260/280 для чистой ДНК должно быть больше, чем 1,8, значение А260/235 – больше, чем 2,2. Загрязнение полисахаридами харак- терно главным образом для препаратов растительной ДНК.

#### Лабораторная работа 13

### Спектрофотометрическое определение концентрации ДНК

Нижний предел концентрации ДНК, которую можно опреде- лить спектрофотометрически, составляет 0,1 мкг/мл. На определе- ние обычно берут аликвоту исследуемого раствора ДНК, к приме- ру, 1 мкл, и разбавляют в 100 и более раз.

Затем пересчитывают полученное значение концентрации раст- вора. Важно, чтобы в разведенном образце было более 10 нг ДНК. Для сравнения, при гель-электрофорезе также можно визуализиро- вать полосу, содержащую от 10 нг ДНК. В образце ДНК не должно быть РНК.

**Оборудование:** спектрофотометр, кварцевая кювета, обра- зец ДНК.

###### Ход работы:

* 1. Взять микропипеткой 1 мкл образца полученной ДНК и раз- бавить препарат, добавив 130 мкл буфера ТЕ, содержащего 100 мМ NaCl (см. прим. 1). Объем образца делают равным 130 мкл, чтобы кривизна поверхности жидкости не влияла на измерения.
  2. Поместить образец разбавленной ДНК в кварцевую кювету.
  3. Измерить поглощение А260. Полученное значение должно лежать в пределах 0,005–2,5 (см. прим. 2). В противном случае нужно разбавлять или концентрировать ДНК (см. прим. 3).
  4. Рассчитать концентрацию ДНК, используя коэффициент пе- ресчета из таблицы, по формуле: *с*, мкг/мл = А260  K.
  5. Измерить поглощение А280 и А235, чтобы оценить степень очистки ДНК от примеси белков и полисахаридов. Отношение

**Коэффициенты для расчета концентрации ДНК**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Кислота | Коэффициент для исследуемого  неразведенного образца, мкг/мл | Коэффициент (1/130) для разведенного образца, мкг/мкл |
| ДНК (двуцепочечная) | 50 | 6,5 |
| ДНК (одноцепочечная) | 37 | 4,81 |
| РНК | 40 | 5,2 |

260/280, так же как и 260/235, должно быть больше, чем 1,8. Для чис- той ДНК характерны значения А260/А280 = 1,8–1,9 и А260/А235 =

= 2,2–2,5, для чистой РНК – значение А260/А280 = 1,9–2,0 (см. прим. 4).

* 1. Откройте главную страницу сайта MOLBIOL.RU [http:// [www.molbiol.ru]](http://www.molbiol.ru/), найдите раздел «Расчеты», выберите пункт «Спект- рофотометрическое определение концентрации ДНК (РНК)» и рас- считайте концентрацию вашего образца с помощью специальной формы.

Примечания:

1. Для растворения ДНК (РНК) можно использовать другие низкосо- левые буферы, но только не воду. К примеру, растворы 100 мM NaCl, 20 мM Na3PO4, 10–100 мM трис-HCl (pH 7,5–9,0) или 100 мM K2HPO4 (pH 8,2) дают

сходные результаты. Измерения в воде приводят к существенным отклоне-

ниям. Ошибка измерения может составлять до 14 %, и отношение A260/ A280 оказывается заниженным.

1. Точность измерения падает при слишком больших и слишком малых значениях А260 из-за нарушений закона светопоглощения. Ошибка при зна- чении 0,05 составляет  18 %, при значении 0,1–1,0  1 %. Измерения при зна- чениях свыше 2,5 недостоверны.
2. Концентрируют ДНК путем ее переосаждения спиртом.
3. Для олигонуклеотидов, поглощение которых ощутимо зависит от их состава, существуют специальные расчеты.
4. Эти значения достоверны, если измерение проводится в буферном растворе (например, ТЕ) при нейтральном значении pH.

#### Лабораторная работа 14

### Определение концентрации нуклеиновых кислот микрометодом

В практической деятельности бывает необходимо производить определение концентрации и качества выделения нуклеиновых кислот сразу в большом числе образцов за короткий промежуток времени. С помощью описанной выше методики макроанализа од- новременно можно анализировать не более 3–4 образцов, при этом значительное время тратится на приготовление разведений НК, что является источником дополнительных погрешностей. Для пре- одоления возникших сложностей применяют микропланшетные спектрофотометры. Ниже приведен пример работы на планшет- ном спектрофотометре-ридере Infinit M200 pro (Tecan) с использо- ванием специального микропланшета Nano Quant plate. Данный прибор позволяет проводить одновременный анализ 16 образцов, ис- пользуя всего 2 мкл неразбавленного раствора нуклеиновых кислот.

**Материалы и оборудование:** планшетный спетрофотометр Infinit M200 pro (Tecan), подключенный к компьютеру, планшет Nano Quant, вата, автоматическая пипетка (самплер) переменного объема на 1–10 мкл, желтые наконечнике в штативе.

**Реактивы:** буфер ТЕ, этанол, дистиллированная вода.

###### Ход работы:

1. Включите персональный компьютер и спектрофотометр. Кнопка включения прибора находится на задней стенке. Когда при- бор включен, на его верхней панели в правом нижнем углу горит зеленый индикатор.
2. Запустите программу «I-control 1–10». Когда программа за- грузится, зайдите на панели управления на вкладку «Instrument», нажмите кнопку «Connect» и выберите в появившемся окне уста- новленную модель прибора. Нажмите «ОК». Теперь прибор готов к работе.
3. В открывшемся диалоговом окне, в нижнем левом углу вы- берите закладку «Applications». У вас автоматически выбрана про-

грамма для определения качества и количества нуклеиновых кис- лот с использованием планшета Nano Quant.

1. В выпадающем меню «Tipe» выберете тип образца, который вы анализируете: деспирализированая геномная ДНК (dsDNA), РНК (RNA), суперспирализированная плазмидная ДНК (ssDNA).
2. Проведите калибровку прибора. Для этого возьмите план- шет, снимите крышку. Нанесите на каждую из лунок по 2 мкл бу- фера ТЕ и накройте планшет крышкой. Поставьте планшет в при- бор, нажав на зеленую кнопку на верхней поверхности спектро- фотометра. Когда планшет установлен в прибор, в диалоговом окне нажмите кнопку «Start Blanking». После завершения калибровки в верхней части диалогового окна кнопка «Start» начнет подсве- чиваться зеленым цветом.
3. Подготовьте планшет к измерению. Для этого откройте его, сотрите сухим ватным тампоном калибровочный буфер, удалите остатки буфера, протерев планшет изнутри тампоном, смоченным в воде, а после – тампоном, смоченным в этаноле. Дайте испарить- ся этанолу.
4. Нанесите образцы для анализа. Вносите по 2 мкл в лунку, используя новый наконечник для каждого образца. После внесе- ния образцов поместите планшет в прибор, нажмите в диалоговом окне кнопку «Start». Через несколько минут измерение будет закон- чено, после чего автоматически откроется электронная таблица, в которой будут указаны: номер лунки, концентрация нуклеиновых кислот в данной лунке (в нГ/мкл, что соответствует мкГ/мл), соотно- шение оптических плотностей при длине волны 260 нм и 280 нм. Это показатель качества и чистоты выделение ДНК. Он должен быть больше, чем 1,8.
5. Очистите планшет от образцов ДНК с помощью ватного

тампона, воды и этанола, как указано в пункте 6, и уберите его в футляр.

1. Сохраните результаты на флеш-карте, закройте программу, отключите прибор и компьютер.

**Вопросы для самоконтроля**

55

1. Каким образом можно оценить качество и количество выделен- ной из образца ДНК?
2. При каких длинах волн поглощают излучение ДНК, РНК, белки и углеводы?
3. Что такое спектрофотометрия?
4. Из какого материала должна быть изготовлена кювета, исполь- зуемая для определения качества и количества нуклеиновых кислот?
5. Какие соотношения оптических плотностей при длине волны 260 нм и 280 нм имеет препарат качественно выделенной и свободной от примесей ДНК?
6. Каковы пределы обнаружения ДНК в агарозном геле после элект- рофореза?

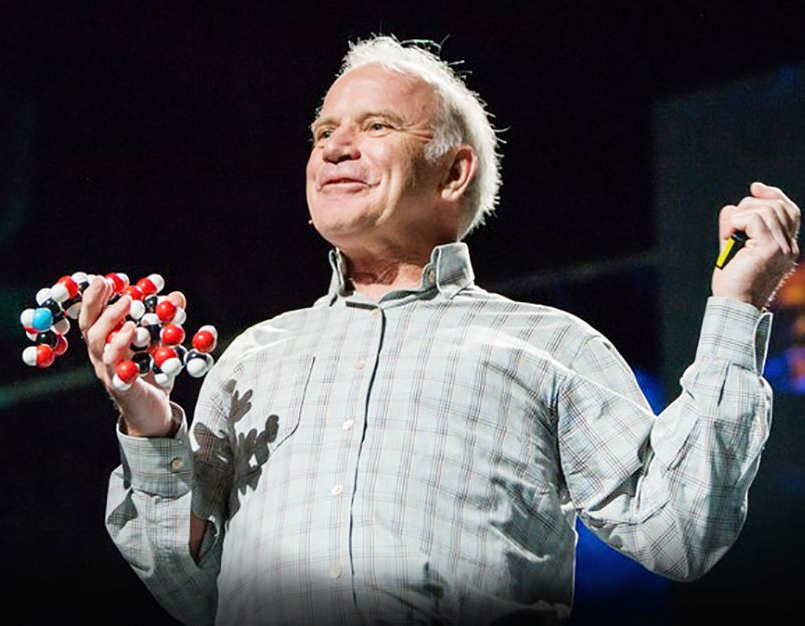
## ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ

### Суть метода ПЦР

**Полимеразная цепная реакция** (**ПЦР**) – метод молекуляр- ной биологии, позволяющий значительно увеличить концентрацию определенных фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологи- ческом материале (пробе).

Кроме амплификации ДНК, ПЦР позволяет проводить ряд дру- гих манипуляций с нуклеиновыми кислотами (сращивание фраг- ментов ДНК) и широко используется в биологической и медицин- ской практике, например, для диагностики заболеваний (наслед- ственных, инфекционных), для установления отцовства, для клони- рования генов.

В основе метода ПЦР лежит способность хорошо известных в молекулярной биологии ферментов, ДНК-полимераз, осуществ- лять направленный синтез второй – комплементарной цепи ДНК по имеющейся матрице одноцепочечной ДНК, наращивая неболь- шую олигонуклеотидную затравку (праймер), комплементарную участку этой матрицы, до размеров в несколько тысяч или даже десятков тысяч звеньев. Повышая температуру, можно добиться оста- новки реакции и последующей денатурации полученной ДНК, т. е. разделения цепей полученной в ходе реакции двуцепочечной ДНК. Если в реакционной смеси присутствует избыток праймера, то значительно снизив температуру, чтобы праймер мог вновь свя- заться с тем же самым комплементарным участком ДНК, и доба- вив новую порцию фермента, можно вновь установить температу- ру, необходимую для реакции полимеризации, и таким образом, проведя реакцию еще раз, увеличить количество ранее полученно- го продукта. Многократное, или циклическое, повторение этой про- цедуры позволяет наработать значительное количество копий участ- ка ДНК, начинающегося с данного праймера. Принципы метода были впервые предложены профессором Г. Корана в 1971 г. Сам метод ПЦР был разработан К. Мюллисом в 1983 г. (рис. 4.1).

Рис. 4.1. Американский биохимик К. Мюллис – нобелевский лауреат 1993 г. в области химии (совместно с М. Смитом)

за изобретение полимеразной цепной реакции

Собственно как метод ПЦР возникла, когда в описанном выше процессе стали использовать не просто ДНК-полимеразу, а так на- зываемую термостабильную ДНК-полимеразу. В начале использо- вания метода после каждого цикла нагревания–охлаждения прихо- дилось добавлять в реакционную смесь ДНК-полимеразу, так как она быстро инактивировалась при высокой температуре. Процеду- ра была неэффективной, требовала много времени и фермента. Затем метод существенно модифицировали за счет использования ДНК-полимеразы из термофильных бактерий. Эти организмы в ходе эволюции приспособились к жизни в горячей воде, и их ферменты наиболее эффективно функционируют при температуре выше 70 °С. Это позволило проводить реакцию копирования ДНК без добав- ления свежей порции фермента после каждого цикла и использо- вать для работы специальные приборы-термостаты с меняющими- ся температурно-временными режимами – термоциклеры или амп-

лификаторы ДНК.

Принципы ПЦР с термостабильными полимеразами были из- ложены в 1988 г. компанией Cetus Corporation [Saiki al., p. 488]). Метод сделал доступными исследования клеточных и молекуляр- ных процессов для тех, кто не работает в области молекулярной био- логии. Внедрение его позволило ускорить реализацию программы

«Геном человека», а также способствовало внедрению в практику

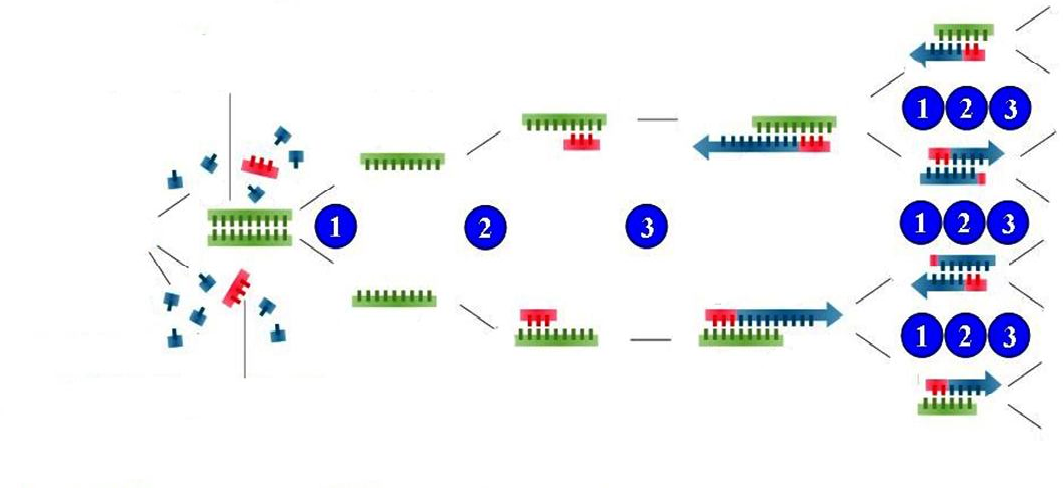
клинической диагностики наследственных и инфекционных забо- леваний высокоэффективных тестов нового поколения.

Метод ПЦР основан на многократном избирательном копиро- вании определенного участка нуклеиновой кислоты ДНК при по- мощи ферментов в искусственных условиях. При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуе- мом образце. В отличие от амплификации ДНК в живых организ- мах (репликации), с помощью ПЦР амплифицируются относитель- но короткие участки ДНК. В обычном ПЦР-процессе длина копи- руемых ДНК-участков составляет не более 3 тыс. пар оснований (3 kbp). С помощью смеси различных полимераз, с использованием добавок и при определенных условиях длина ПЦР-фрагмента мо- жет достигать 20–40 тыс. пар нуклеотидов. Реакция ПЦР проводит- ся в программируемом термостате (амплификаторе) – приборе, в ко- тором происходит достаточно быстро охлаждение и нагревание пробирок (обычно с точностью не менее 0,1 °С). Амплификаторы по- зволяют задавать сложные программы, в том числе с возможностью

«горячего старта» и последующего хранения. Для ПЦР в режиме реального времени выпускают приборы, оборудованные флуорес- центным детектором. Существуют также приборы с автоматичес- кой крышкой и отделением для микропланшетов, что позволяет встраивать их в автоматизированные системы.

Для проведения полимеразной цепной реакции необходимы следующие компоненты (рис. 4.2):

1. праймер («прямой» и «обратный») – это короткий фрагмент нуклеиновой кислоты (олигонуклеотид), комплементарный ДНК- или РНК-мишени, служит затравкой для синтеза комплементарной цепи с помощью ДНК-полимеразы. Затравка необходима ДНК-поли- меразам для начала синтеза новой цепи, с 3*'*-конца (гидроксильной группы) праймера (рис. 4.3). Праймеры имеют, как правило, размер от 15 до 30 пар нуклеотидов (п. н.) и комплементарны соответствую- щим участкам ДНК-мишени. Они играют ключевую роль в обра- зовании продуктов реакции амплификации. Правильно подобран- ные праймеры обеспечивают специфичность и чувствительность



ДНК-матрица

5*'* 3*'*

5*'* 3*'*

5*'* 3*'*

5*'*

3*'*

3*'* 5*'*

Нуклеотиды

3*'* 5*'*

5*'* 3*'*

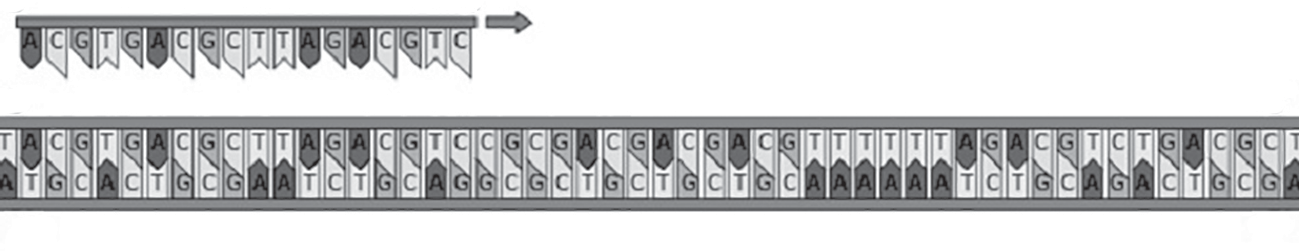
3*'* 5*'*

3*'* 5*'*

3*'* 5*'*

Праймеры, комплементарные противоположным концам разных цепей требуемого фрагмента ДНК

Рис. 4.2. Исходные компоненты ПЦР-смеси [Лекции по биологии, с. 70]:

– денатурация при 94–95 °С;  – отжиг при ~68 °С; – элонгация при 72 °С 5*'* Прямой праймер 3*'*

5*'* 3*'*

3*'* 5*'*

5*'* 3*'*

3*'* 5*'*

3*'* Обратный праймер 5*'*

Рис. 4.3. Пример «прямого» и «обратного» праймеров [Bioinformatics center…]

тест-системы. В случае неверного выбора длины и нуклеотидного состава праймера или температуры отжига возможно образова- ние частично комплементарных комплексов с другими участка- ми матричной ДНК, что может привести к появлению неспеци- фических продуктов. Верхний предел температуры плавления ограничен оптимумом температуры действия полимеразы, актив- ность которой падает при температурах выше 80 °C. При выборе

праймеров желательно придерживаться следующих критериев: GC-состав 40–60 %; близкие *Tm* праймеров (отличия не более чем на 5 °C); отсутствие неспецифических вторичных структур – шпи-

лек и димеров; желательно, чтобы на 3*'*-конце был гуанин или ци- тозин, поскольку они образуют три водородные связи с молекулой матрицы, делая гибридизацию более стабильной. Оптимальные кон- центрации праймеров подбираются эмпирически. В однократной реакционной смеси концентрация праймера обыкновенно варьи- руется в пределах 0,2–0,5 мкМ. Рекомендуется использовать прай- меры с чистотой не менее 95 %;

1. термоустойчивая ДНК-полимераза – термостабильный фер- мент, обеспечивающий достраивание 3-конца второй цепи ДНК согласно принципу комплементарности. Полимераза для использо- вания в ПЦР должна сохранять активность при высокой темпера- туре длительное время, поэтому используют ферменты, выделенные из термофилов, – *Thermus aquaticus* (*Taq*-полимераза), *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*-полимераза), *Pyrococcus woesei* (*Pwo*-полимераза) и др. Одной из первых термостабильных ДНК-полимераз была *Taq*-поли- мераза (особенность *Taq*-полимеразы в том, что в конце синтеза она присоединяет к 3-концу синтезируемой цепи лишний аденин- нуклеотид). Недостаток этой полимеразы заключается в том, что вероятность внесения ошибочного нуклеотида у нее достаточно вы- сока, так как у этого фермента отсутствуют механизмы исправле- ния ошибок (3 5 экзонуклеазная активность). Сейчас применя- ют смеси различных термостабильных полимераз, чтобы добиться одновременно высокой скорости полимеризации и высокой точнос- ти копирования. Например, полимеразы *Pfu* и *Pwo*, выделенные из архей, обладают 3 5 экзонуклеазной активностью, их исполь- зование значительно уменьшает число мутаций в ДНК, но скорость их работы ниже, чем у *Taq*;
2. cмесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ): дезоксиа- денозинтрифосфата (дАТФ), дезоксигуанозинтрифосфата (дГТФ), дезоксицитозинтрифосфата (дЦТФ) и дезокситимидинтрифосфата (дТТФ) – «строительный материал», используемый термостабиль- ной полимеразой для синтеза второй цепи ДНК. Конечная концент- рация каждого дНТФ, как правило, 0,25 мМ;
3. 10 мМ трис-HCl буферный раствор, рН 8–9 (обычно прила- гается к любому коммерческому препарату ДНК-полимеразы и оп- тимизирован для нее). Высокое значение рН нужно из-за того, что при повышении температуры рН трис-буфера падает и при 72 °С составляет ~7,5. В состав буферного раствора для ДНК-полиме- разы входят соли KCl, NaCl для обеспечения необходимой ионной силы раствора; неионный детергент Tween-20 для предотвраще- ния адсорбции молекул ДНК-полимеразы на стенках реакционной посуды (микроцентрифужные пробирки); иногда дополнительно ис- пользуют бычий сывороточный альбумин (БСА), ди- и олигосахари- ды для стабилизации ДНК-полимеразы, формамид (для повышения специфичности гибридизации праймеров с ДНК-матрицей) и др.;
4. катионы Mg2+ как необходимый кофактор ДНК-полимеразы (используют раствор MgCl2 в конечной концентрации 1,5–3 мМ, оптимальную концентрацию подбирают экспериментально в соот-

ветствии с применяемым типом ДНК-полимеразы и числом одновре- менно амплифицируемых продуктов). Увеличение концентрации Mg2+ оказывает очень резкое влияние на специфичность и эффектив- ность ПЦР: увеличивается выход, но уменьшается специфичность. Оптимум зависит от последовательностей матрицы и праймеров;

1. анализируемый образец (ДНК-матрица). Степень очистки ДНК-матрицы не существенна для многих простых приложений ПЦР. Однако для амплификации длинных фрагментов ДНК – более 3 тыс. пар оснований (далее – т. п. о.) нужны высокоочищенные ДНК-матрицы.

Некоторые вещества (ионные детергенты, фенол, этанол, неко- торые реагенты для ДНК-мечения), используемые в различных ме- тодиках для выделения ДНК, даже в небольших количествах мо- гут ингибировать ПЦР.

Целостность ДНК-матрицы важна при амплификации длин- ных фрагментов. Матрица, используемая для получения протяжен- ных ампликонов (5 т. п. о и более), требует высокой степени очист- ки от ДНК. Оптимальной является матрица, хранившаяся не более 1 месяца при температуре +4 °C без заморозки. Не рекомендуется многократно замораживать и размораживать матрицу во избежа- ние ее деградации. При очистке ДНК-матрицы из агарозного геля

избегайте долгой УФ-экспозиции, так как ультрафиолетовое облу- чение приводит к повреждению ДНК.

Для амплификации коротких участков геномной ДНК лучше использовать фрагментированную матрицу. Фрагменты длиной 200–1000 п. о. можно получить путем обработки ДНК ультразву- ком или рестриктазами.

Оптимальная концентрация матрицы в реакции зависит от ис- точника ДНК, степени ее очистки и длины ампликона. Для ампли- фикации длинных фрагментов требуется больше матрицы, однако слишком высокая концентрация ДНК-матрицы в реакционной смеси может ингибировать ПЦР и приводить к неспецифической амплификации.

Цикл ПЦР (амплификация) включает три стадии: денатурацию, отжиг и элонгацию (рис. 4.4).

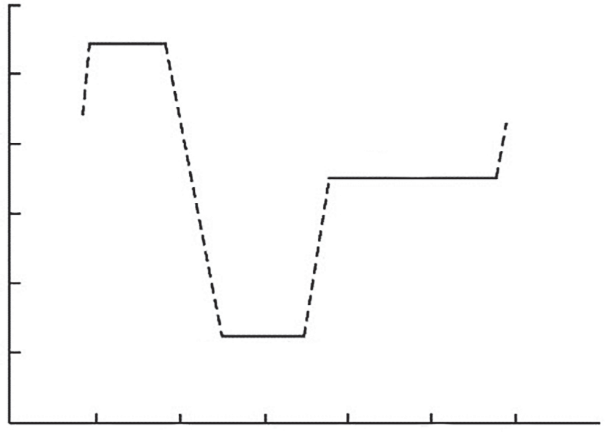
1. Денатурация – расплетение двойной спирали и расхождение полинуклеотидных цепей. Для этого реакционную смесь нагрева- ют до 94–96 °С, в результате чего двухцепочечные молекулы ДНК расплетаются с образованием двух одноцепочечных молекул. Пред- варительный прогрев в течение 2–3 мин рекомендуется для дена- турации геномной или плазмидной ДНК. В остальных случаях ре- комендуется использовать как можно более короткую стадию дена- турации. Оптимальная продолжительность денатурации для фраг- ментов менее 3–5 т. п. о. – 15–20 с, более 5 т. п. о. – до 1 мин.
2. Отжиг – гибридизация праймеров и одноцепочечной ДНК- мишени с образованием двухцепочечных комплексов «праймер– матрица», необходимых для инициации синтеза ДНК из мономе- ров – дезоксирибонуклеотидтрифосфатов. Праймеры подбирают так, что они ограничивают (фланкируют) искомый фрагмент и комп- лементарны противоположным цепям ДНК.

Температура отжига (*Тa*) – это температура, при которой веро- ятность связывания праймера с ДНК-матрицей превосходит 70 %.

Для пары праймеров она на 4–5 °С (по некоторым источникам – на 2–4 °С и даже 1–2 °С) ниже температуры плавления (*Тm*) – тем- пературы, при которой число связанных с ДНК и свободных олиго-

нуклеотидов одинаково. Оптимальная температура отжига должна находиться в пределах 50–65 °С (от 55 до 72 °C).

100



Денатурация

Элонгация

Отжиг праймеров

9 0

8 0

Температура, °С

7 0

6 0

5 0

1 5 3 0 4 5 6 0 7 5 9 0

Время, с

Рис. 4.4. График изменения температуры в пробирке в течение одного цикла полимеразной цепной реакции

[Учебно-методическое пособие…, с. 29]

Рассчитать температуру плавления для подобранных прайме- ров (°С) можно по формулам:

*Тm* = 2(АТ) + 4(ГЦ) – для праймеров до 20 н;

*Тm* = 69,3 + 0,41(% GC) – 650/l – для праймеров более 20 н, где l – длина праймера.

Однако оптимальная температура отжига может отличаться от расчетной. В ряде случаев повышение температуры отжига на 3–5 градусов позволяет повысить специфичность реакции.

Использование праймеров с низкой температурой отжига мо- жет существенно увеличить количество неспецифических продук- тов ПЦР. Разница в температуре отжига в паре праймеров не долж- на превышать 5–6 градусов.

Можно легко подобрать оптимальную температуру отжига, ис- пользуя градиентный термоамплификатор. Для достижения высо- кой специфичности ПЦР рекомендуется использовать праймеры с высокой температурой отжига (например, 65–68 °C).

После отжига праймеров *Taq*-полимераза начинает достраи- вание второй цепи ДНК с 3*'*-конца праймера.

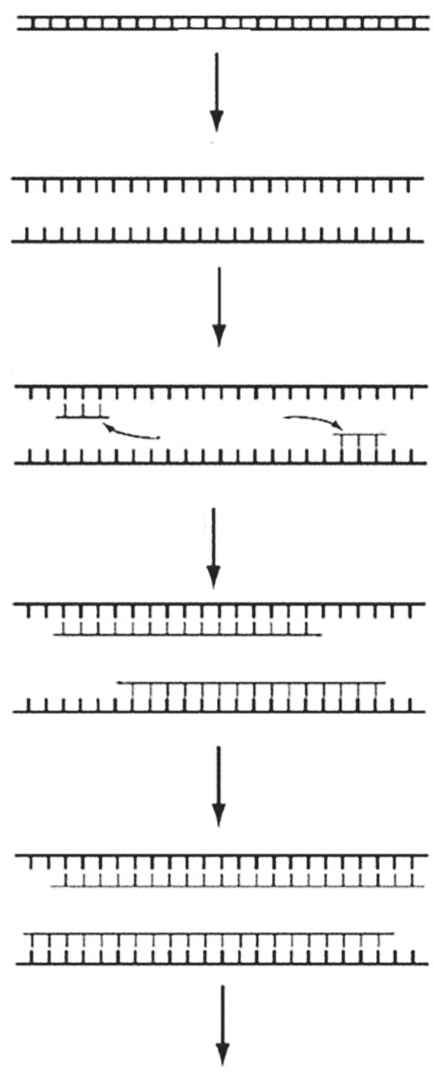
1. Полимеризация (элонгация цепи) – достраивание компле- ментарных цепей ДНК полимеразой в направлении 35, начиная от 3-ОН концов присоединенных праймеров, т. е. матричный син- тез ДНК. Элонгация в большинстве случаев происходит при тем- пературе 72 °C. Время элонгации зависит от длины ДНК-матрицы (1 мин на каждые 1–1,5 т. п. о.). Для увеличения выхода ПЦР- продукта используйте финальную элонгацию на последнем цикле ПЦР в течение 2–3 мин.

Каждая из этих стадий повторяется 25–40 раз, образуя циклы ПЦР. То есть ПЦР имеет циклический характер. В первом и час- тично во втором циклах образуются копии (ампликоны), не соот- ветствующие границам амплифицируемого гена (все ампликоны в первом цикле и часть ампликонов во втором цикле получаются более протяженными в тех участках, где еще не произошло связы- вание второго праймера, ограничивающего рост цепи). Начиная с третьего цикла длина ампликонов становится стандартной, т. е. соответствует числу пар нуклеотидов ДНК-матрицы между 3-кон- цами праймеров. Ампликоны накапливаются в геометрической прогрессии. Процесс имеет цепной характер, так как синтезиро- ванные ампликоны в дальнейшем сами служат матрицей, на кото- рой идет синтез (рис. 4.5). Количество специфического продукта реакции (ограниченного праймерами) при 100 % эффективности теоретически возрастает в геометрической прогрессии по формуле *Р* = 2*n*, где *Р* – количество специфического продукта; *n* – число циклов реакции.

Практически эффективность ПЦР меньше 100 %, поэтому в дей- ствительности *P* = (1 + *E*)*n*, где *P* – количество продукта; *Е* – сред- няя эффективность цикла; а *n* – число циклов реакции. Следует за- метить, что процесс накопления специфических продуктов ампли- фикации по геометрической прогрессии идет лишь ограниченное время, а затем его эффективность критически падает, что связано с так называемым «эффектом плато».

Термин «эффект плато» используют для описания процесса накопления продуктов ПЦР на последних циклах амплификации, когда количество ампликонов достигает 0,3–1 пикомолей. В зави-

3 5



ДНК

5 3

Денатурация ДНК (94 °С)

3 5

5 Отжиг праймеров (50–70 °С)

3

5

5

3

5

Праймеры 5

3

Синтез новой цепи ДНК (элонгация) (72–74 °С)

3

5 3

5

5

3 5

3

3 5

3 5 5 3

5 3

Повтор цикла 25–40 раз

Рис. 4.5. Полимеразная цепная реакция (https://ru.wikipedia.org/wiki/ Полимеразная\_цепная\_реакция, с изм.)

симости от условий и количества циклов реакции амплификации на момент достижения «эффекта плато» влияют:

* утилизация субстратов (дНТФ и праймеров);
* стабильность реагентов (дНТФ и фермента);
* количество ингибиторов, включая пирофосфаты и ДНК-дуп- лексы;
* неспецифические продукты или димеры праймеров, конку- рирующие за праймеры, дНТФ и полимеразу;
* концентрация специфического продукта и неполная денату- рация при высокой концентрации продуктов амплификации.

**Подбор и оптимизация праймеров для ПЦР.** Праймеры ис- пользуют, как правило, попарно и подбирают их таким образом, чтобы они были комплементарны противоположным цепям ДНК в участках, ограничивающих выбранную область, и ориентирова- ны 3*'*-концами в направлении последовательности, которую необхо- димо амплифицировать, т. е. навстречу друг другу. Оптимизация праймеров для ПЦР сводится к их «дизайну» (выбору нуклеотид- ной последовательности) и определению оптимальной температу- ры для их отжига (связывание с ДНК-матрицей). Дизайн праймеров (т. е. выбор определенного участка на ДНК-матрице для связыва- ния с праймером) по известной ДНК-матрице производится в со- ответствии c рекомендациями, приведенными ниже.

**Выбор участка на ДНК-матрице.** Это один из самых важ- ных шагов в планировании эксперимента. Необходимо, чтобы пара праймеров эффективно и специфично связывалась с искомой целе- вой последовательностью. Других вариантов связывания прайме- ров с ДНК-матрицей быть не должно, по крайней мере для той ДНК, которую необходимо выделить из исследуемого материала.

Информацию о последовательности нуклеотидов целевого фраг- мента (или только его концов) можно получить в базе данных между- народного генбанка (доступна на веб-сайте vwvw.ncbi.nlm.nih.gov). Длина целевого фрагмента должна быть в пределах 100–3000 п. н., нижний предел обусловлен возможностью отделения амплифици- рованных фрагментов (ампликоны) от димеров праймеров и дру- гих неспсцифичсских фрагментов на электрофорезе, верхний пре- дел – возможностями *Taq* ДНК-полимеразы, не способной эффек- тивно синтезировать фрагменты большей длины.

###### Вторичная структура праймеров и целевого фрагмента.

Связывание праймеров с матрицей будет затруднено, если в месте

связывания цепь ДНК может образовывать вторичные структуры – гомо-, гетеродимеры и петли. В связи с этим необходимо подби- рать праймеры так, чтобы составляющие пару олигонуклеотиды не содержали в своем составе последовательности из 3 и более нуклеотидов подряд, комплементарных аналогичной последова- тельности этого же (гомодимер) или другого (гетеродимер) прай- мера, а также палиндромных последовательностей, являющихся причиной образования петель. Заранее предвидеть вторичную структуру целевого фрагмента (ампликон) практически невозмож- но, поэтому для его эффективной амплификации часто требуется испытать не одну, а две–четыре и более пар праймеров, пока не бу- дет достигнут искомый результат.

Все более широкое использование таких программ, как Oligo, Generunner, DNA Star и Genefisher, в дизайне праймеров делает выбор условий реакции гораздо более простым. Эти программы позволяют выбирать последовательности, задавать длину прайме- ра, размер продукта, G + C – содержание и т. д., а последующий анализ обеспечивает выбор соответствующих последовательнос- тей праймеров. Без помощи биоинформатики сегодня выбор и ди- зайн праймеров отнимает неоправданно много времени.

**Приготовление реакционной смеси и проведение ПЦР.** В последние 10–15 лет для ПЦР широко применяют готовые к упо- треблению смеси, включающие все необходимые компоненты, кроме праймеров. Для упрощения процедуры приготовления реак- ционной смеси для ПЦР созданы специальные наборы реагентов для амплификации, включающие все необходимые компоненты, в том числе ДНК-полимеразу, которые уже смешаны в нужных про- порциях. В реакционную смесь для ПЦР требуется добавить лишь ДНК-матрицу и праймеры (в некоторых случаях праймеры также могут входить в состав наборов), что существенно экономит рабо- чее время и снижает вероятность ошибок и контаминации. Извест- но, что чувствительность ПЦР может достигать теоретически воз- можного предела (единичная молекула ДНК-матрицы). Это позво- ляет выявлять целевой фрагмент, используя микроскопически малые количества исходного материала. Однако у этой полезной

особенности ПЦР есть и оборотная сторона – высокая степень опасности получения ложноположительных результатов из-за кон- таминации, т. е. загрязнения реакционной смеси посторонней ДНК-матрицей или амплифицированными фрагментами (ампли- конами). Основные причины получения ложноположительных ре- зультатов при постановке ПЦР таковы:

* перекрестная контаминация от пробы к пробе (например, при раскапывании реакционной смеси);
* контаминация рекомбинантными плазмидами, содержащи- ми копии клонированной последовательности целевого фрагмента (эти плазмиды чаще всего используются в качестве положитель- ного контроля ПЦР);
* контаминация ампликонами – наиболее частая причина лож- ноположительных результатов, так как в процессе ПЦР ампли- коны накапливаются в больших количествах и очень легко пере- носятся с аэрозолями, через приборы, инструменты, одежду и т. д. Выполняя основные требования и осуществляя в каждой ПЦР отрицательный контроль разных типов (на процедуру обратной транскрипции, буферный раствор, праймеры), можно практически

исключить ложноположительные результаты ПЦР.

**Детекция результатов ПЦР.** Для анализа ПЦР-амплифици- рованной ДНК существуют разные методы: гель-электрофорез, дот-блот-гибридизация и блот-гибридизация по Саузерну. С их по- мощью можно анализировать большинство ПЦР-продуктов, но аб- солютно точные результаты получают только при секвенировании. Присутствие специфического ПЦР-продукта (амплификона)

в подавляющем большинстве случаев детектируют электрофоре- тическим разделением ПЦР-амплификационной смеси на окра- шенных бромистым этидием агарозном или полиакриламидном гелях. Для такого выявления необходимо не менее 20 нг ДНК. Спе- цифичность полосы амплифицированной ДНК подтверждается ее положением (размерами) по отношению к маркерным фрагментам и ДНК-стандарту. Дополнительные доказательства специфичнос- ти амплификона получают путем расщепления специфическими рестриктазными ферментами или путем гибридизации со специ-

фическим радиоактивным или флуоресцентным олигонуклеотид- ным зондом (см. таблицу).

**Некоторые ингибиторы процесса ПЦР**

|  |  |
| --- | --- |
| Ингибитор | Концентрация ингибиторов |
| SDS | > 0,005 % |
| Фенол | > 0,2 % |
| Этанол | > 1 % |
| Изопропанол | > 1 % |
| Ацетат натрия | > 5 мМ |
| Хлористый натрий | > 25 мМ |
| EDTA | > 0,05 мМ |
| Мочевина | > 20 мМ |

Прямое секвенирование амплифицированной ДНК – также высоконадежный метод доказательства ее специфичности, но при- меняется в основном для определения точечных мутаций генов.

### Модификации метода ПЦР

В настоящее время разработано множество вариантов мето- да ПЦР. Ниже приведено описание некоторых его модификаций.

**Вложенная ПЦР** (гнездовая, англ. *nested PCR*). В данной мо- дификации метода ПЦР во втором раунде полимеразной цепной ре- акции используют две пары праймеров и проводят еще два раунда реакции. В ходе второго раунда праймеры находятся внутри по от- ношению к использованным в первом раунде, а первый продукт ПЦР используется как новая матрица. Такой тип ПЦР представляет собой мощный инструмент для амплификации небольших количеств ДНК из сложных смесей. Однако если нужная матрица имеет ма- лую концентрацию в смеси ДНК-фрагментов, требуется проводить много циклов амплификации и использовать праймеры, которые

могут связаться с другими локусами. Это зачастую приводит к амп- лификации посторонних или неверных последовательностей. Ис- пользование второго набора праймеров (вложенные праймеры), отжигающихся внутри первого продукта ПЦР, позволяет проводить дальнейшую амплификацию с образованием более короткого про- дукта, с более высокой чувствительностью и без потерь специфич- ности. Таким образом, любые нежелательные последовательности ДНК, амплифицированные в ходе первого раунда ПЦР, имеют мень- ше шансов амплифицироваться во втором раунде.

**Случайная полимеразная ПЦР.** Модификация ПЦР, которая позволяет осуществить амплификацию случайных последователь- ностей (с неопределенной структурой) с матрицы, сложных сме- сей ДНК или целых клеток. Существует несколько вариантов про- ведения случайной ПЦР: с единственным случайным праймером (происходит линейное накопление продукта) или при нормальных условиях (экспоненциально). Обычный вариант случайной ПЦР – амплификация с праймером, часть которого имеет определенную последовательность, а другая часть – вырожденную. Включение вырожденных районов в последовательность праймера делает воз- можным его отжиг на множестве сайтов связывания в целевой мат- рице (или матрицах). Вырожденные праймеры образуют продукты ПЦР с различными длиной и последовательностью, покрывающими значительную часть целевой ДНК. Часто используются для ампли- фикации преобладающей ДНК или вставочных последователь- ностей, последовательность и длина которых неизвестны. Менее распространенный вариант случайной ПЦР, когда реакцию прово- дят при низких температурах (например, 30 °С). При этом прайме- ры отжигаются на матрице неверно, приводя к амплификации про- дуктов случайной ПЦР.

**ПЦР с «горячим» стартом** (англ. *hot-start PCR*). Модифика- ция ПЦР, суть которой состоит в предотвращении возможности начала реакции до момента достижения в пробирке условий, обес- печивающих специфический отжиг праймеров. Для этого актив- ность полимеразы в момент постановки ПЦР блокируется антите- лами или имитирующими антитела небольшими молекулами. Пер- вая денатурация обычно проводится при 95 °C в течение 10 мин.

Для предотвращения преждевременного взаимодействия фер- мента с компонентами реакционной смеси и образования неспеци- фических продуктов реакции до момента полного прогрева исполь- зуются легкоплавкий парафин или специальные масла, отделяющие полимеразу от реакционной смеси. В зависимости от ГЦ-состава и размера праймеры имеют определенную температуру плавления, при которой образование водородных связей нестабильно. Если тем- пература системы превышает температуру плавления, праймер не в состоянии удерживаться на цепи ДНК и денатурирует. При со- блюдении оптимальных условий, т. е. температуры отжига, близ- кой к температуре плавления, праймер образует двуцепочечную молекулу только при условии его полной комплементарности и та- ким образом обеспечивает специфичность реакции. Даже если неспецифический отжиг произошел до начала температурного циклирования, в отсутствии фермента элонгации не происходит, а при нагревании комплексы праймер–ДНК денатурируют, поэто- му неспецифические продукты не образуются. В дальнейшем тем- пература в пробирке не опускается ниже температуры плавления, что обеспечивает образование специфического продукта ампли- фикации. Таким образом, ПЦР с «горячим» стартом позволяет ми- нимизировать вероятность образования неспецифических продук- тов ПЦР и возможность получения ложноположительных резуль- татов анализа.

**ПЦР с обратной транскрипцией** (ОТ-ПЦР или РНК-ПЦР). В молекулярной биологии метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (англ. *reverse transcription polymerase chain reaction*) принято обозначать как ОТ-ПЦР. ОТ-ПЦР представ- ляет собой метод амплификации специфического фрагмента рибо- нуклеиновой кислоты (РНК).

Одноцепочечную молекулу РНК превращают в реакции обрат- ной транскрипции в комплементарную ДНК и далее амплифици- руют уже одноцепочечную молекулу ДНК, используя традицион- ную ПЦР. Для превращения последовательности РНК в компле- ментарную ДНК используют обратную транскриптазу. Существуют термостабильные обратные транскриптазы (например, обратная

транскриптаза вируса миелобластоза птиц), которые могут быть использованы в ПЦР.

На первом этапе комплементарная ДНК образуется на матри- це мРНК из dNTP ферментом обратной транскриптазой. Компонен- ты реакции смешиваются с ДНК-праймером и буфером с обрат- ной транскриптазой на один час при 37 °C. После того как обрат- ная транскрипция закончена и образована ДНК на матрице мРНК, следующие циклы производятся по стандартной методике ПЦР. После 30 циклов амплификации образуются миллионы копий нуж- ной последовательности [Глик, Пестернак, 2002].

ОТ-ПЦР обычно используется при изучении вируса иммуно- дефицита человека, так как ВИЧ является ретровирусом и содер- жит РНК. ОТ-ПЦР можно считать чувствительной методикой, с ее помощью может быть обнаружено малое количество молекул РНК. Данный метод ПЦР находит широкое применение в молекуляр- ной биологии и клинических исследованиях, где его можно при- менять для детектирования инфекционных агентов, генетических маркеров, а также опосредованно для выявления белков в малом количестве.

**Метилчувствительная и метилспецифическая ПЦР.** Метил- чувствительная полимеразная цепная реакция (МЧ-ПЦР) основана на использовании рестрикционных эндонуклеаз, чувствительных и нечувствительных к метилированию остатков цитозина. Для ана- лиза метилирования конкретных специфических последователь- ностей используют метилчувствительные рестриктазы. Если фраг- мент ДНК не содержит модифицированных оснований, то гидро- лиз проходит полностью, ПЦР не происходит и, соответственно, ее продукт не определяется. В то же время если в сайте узнавания рестриктазы вместо цитозина присутствует метилцитозин, то гид- ролиз не происходит, и в геле выявляется фрагмент определенной длины. Большим достоинством метода является высокая чувстви- тельность, позволяющая анализировать метилированные аллели в присутствии большого избытка аллелей дикого типа (аналити- ческая чувствительность: 1 метилированная последовательность на 2000 неметилированных).

Метилспецифическая полимеразная цепная реакция (МС-ПЦР) – метод, позволяющий оценить степень метилирования цетозина. Процедура состоит в предварительной обработке тестируемых об- разцов ДНК бисульфитом натрия, что при определенных условиях приводит к дезаминированию цитозина с образованием урацила, тогда как метилированные остатки цитозина остаются неизменны- ми. При последующей ПЦР урацил заменяется на тимин. Таким образом, оказывается возможным конструировать праймеры, изби- рательно амплифицирующие последовательности, содержащие или не содержащие метилированные остатки цитозина. Чувстви- тельность метода: 1 метилированный аллель на 1000 неметилиро- ванных (см.: <http://www.findpatent.ru/patent/240/2405837.html)>

**ПЦР в реальном времени** (англ. *real-time PCR*, *RT-PCR*). В основе метода лежит принцип флуоресцентной детекции про- дуктов ПЦР непосредственно в ходе амплификации. Детекция про- дуктов амплификации проводится прямо в реакционной среде че- рез стенки или крышку закрытой пробирки.

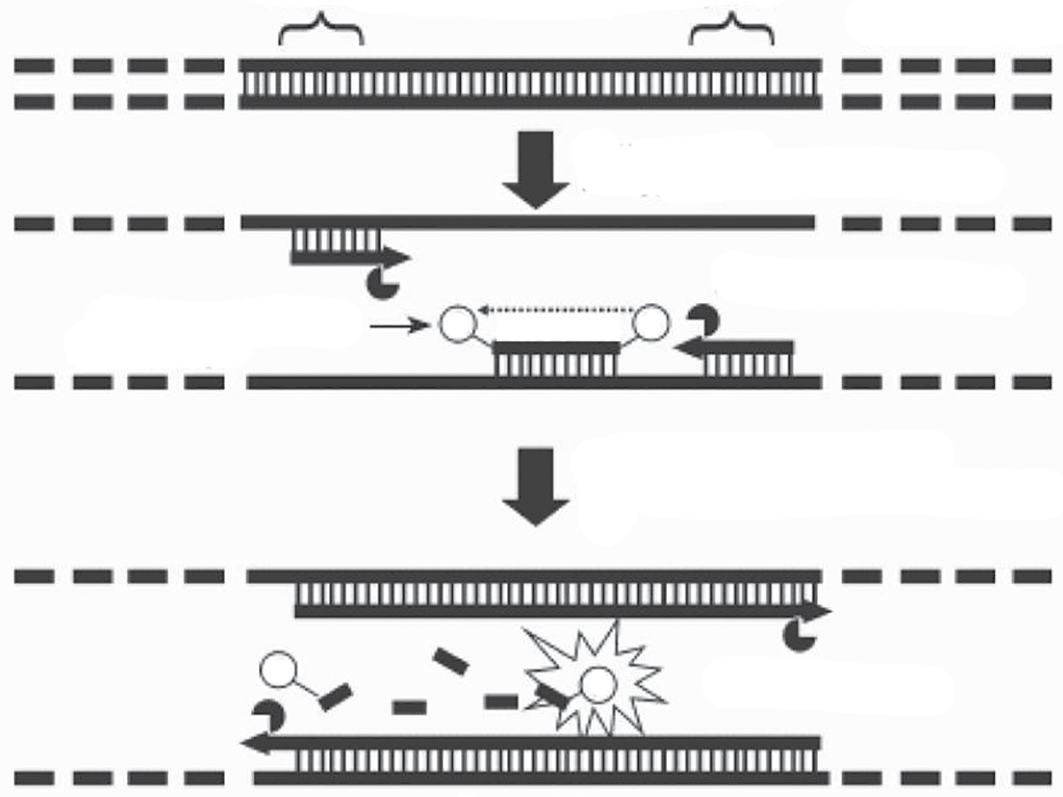
1. В состав реакционной смеси наряду с праймерами и осталь- ными компонентами реакции добавляются специальные флуорес- центные метки (зонды). Флуоресцентный зонд представляет собой олигонуклеотид, комплементарный внутренней последовательнос- ти амплифицируемого фрагмента ДНК возбудителя. На 3*'*-конце зон- да находится флуоресцентная молекула – флуорофор, а на 5*'*-конце расположена молекула-«гаситель» флуоресценции. За счет близости флуорофора и гасителя вся энергия, поглощенная флуорофором, переходит на гаситель по принципу флуоресцентно-резонансного переноса энергии. При этом сигнал флуоресценции отсутствует.
2. В ходе ПЦР при повышении температуры происходит дена- турация ДНК возбудителя, и зонд наряду с праймерами гибридизу- ется с комплементарным участком ДНК.
3. В процессе синтеза новой цепи ДНК фермент ДНК-полимера- за расщепляет этот зонд. При расщеплении зонда флуорофор отде- ляется от «гасителя», расстояние между ними увеличивается, про- цесс тушения флуоресценции становится невозможным. В этот мо- мент можно зарегистрировать флуоресцентный сигнал от флуорофора.

В результате такого принципа неспецифическая амплификация не обнаруживается (см.: [http://www.lytech.ru/articles\_129.htm).](http://www.lytech.ru/articles_129.htm))

Существует два основных подхода к детекции результатов ПЦР в реальном времени: с помощью интеркалирующих красителей и на основе флуоресцентно-меченых олигонуклеотидных зондов. Низкоспецифичная детекция результатов ПЦР-РВ с помощью ин- теркалирующих красителей возможна за счет увеличения флуорес- ценции интеркалирующего красителя при образовании комплекса с двуцепочечной ДНК. Самый популярный краситель на сегодняш- ний день – SYBR Green I. Это чувствительный флуоресцентный ин- дикатор двухцепочечной ДНК. Максимум флуоресценции в комп- лексе с ДНК составляет 521 нм, максимум возбуждения – 497 нм (второй максимум около 254 нм). Хорошо возбуждается стандарт- ным лазером с длиной волны 488 нм.

Более высокой специфичности детекции результатов ПЦР в режиме реального времени можно достигнуть за счет наличия в реакционной смеси дополнительного олигонуклеотида – гибри- дизационного зонда [Бикбулатова и др., c. 53]. Такой зонд «отжига- ется» (комплементарно соединяется с ДНК) на участке амплико- на между прямым и обратным праймером. На разных концах зонда расположены флуорофор и гаситель флуоресценции этого красите- ля. Когда флуорофор и гаситель связаны с олигонуклеотидным зон- дом, наблюдается лишь незначительная флуоресцентная эмиссия. Во время процесса амплификации за счет 5*'*-экзонуклеазной актив- ности *Taq*-полимеразы флуоресцентная метка переходит в раствор, освобождаясь от соседства с гасителем, и генерирует флуоресцент- ный сигнал, усиливающийся в реальном времени пропорциональ- но накоплению амплификата. Таким образом, в случае если ис- пользуемые праймеры «отожгутся» на неспецифических участках с образованием в ходе ПЦР-РВ «нецелевого» продукта, то его по- следовательность не будет иметь участок, комплементарный гибри- дизационному зонду, и, соответственно, «нецелевые» ампликоны не будут регистрироваться как целевые. При этом для такого вари- анта ПЦР-РВ можно одновременно использовать несколько видов флуорофоров и гасителей их флуоресценции (с неперекрывающими

спектрами излучения). Это позволяет осуществлять мультиплекс- ную ПЦР в реальном времени. В ПЦР-РВ используются различные типы флуоресцентных зондов или праймеров, включая TaqMan- зонд, молекулярные маяки и Scorpion-зонд. Каждый из них основан на использовании олигонуклеотида (рис. 4.6).

Участки гибридизации с праймерами

ДНК-мишень

Гибридизационный

ДНК-зонд

Денатурация,

посадка праймеров и зонда

Нет флуоресценции

Q Гашение F

Удлинение праймеров и расщепление зонда полимеразой

Q F Флуоресценция

Ампликоны

Рис. 4.6. Принцип ПЦР в режиме реального времени:

*F* – флуорофор; *Q* – гаситель, блокирующий флуоресценцию [Учебно-методическое пособие…, с. 46]

Для анализа в режиме «реального времени» используют специ- альные ДНК-амплификаторы с оптическим блоком, позволяющие детектировать флуоресценцию внутри реакционной пробирки в ходе реакции. При амплификации образца детектируемый флуоресцент- ный сигнал может состоять из трех последовательных участков: 1 – базовая линия (сигнал не превышает предела детектирования прибора); 2 – экспоненциальная амплификация; 3 – плато. Сигнал флуоресценции в ходе ПЦР возрастает пропорционально количеству продукта амплификации. Мониторинг сигнала позволяет построить кинетическую кривую реакции, при этом момент заметного увели-

чения сигнала и отрыва его от фонового – так называемый порого- вый цикл – зависит от исходного количества ДНК-мишени. Чем больше количество ДНК в образце, тем раньше наблюдается нача- ло роста сигнала флуоресценции и тем меньше пороговый цикл. Главным преимуществом детекции результатов ПЦР в режиме

«реального времени» является возможность проведения количе- ственного анализа. При количественном исследовании образцов каж- дая серия экспериментов сопровождается постановкой амплифика- ции с контрольными образцами, в которых заведомо известно ко- личество копий ДНК (калибровочные образцы). Сравнение кинетики накопления продуктов амплификации в экспериментальных и конт- рольных образцах позволяет оценить концентрацию ДНК в диапа- зоне разведений контрольных препаратов ДНК. Следует отметить, что для выполнения количественного ПЦР-анализа рекомендуется использование препаратов ДНК с высокой степенью очистки, так как присутствие нежелательных примесей (ингибиторов) снижает эффективность амплификации исследуемой и контрольной ДНК. Для контроля точности количественного анализа используют ка- либрованные внутренние контроли.

Часто ПЦР в реальном времени комбинируют с ОТ-ПЦР для из- мерения малых количеств мРНК, что позволяет получать количе- ственную информацию о содержании искомой мРНК в клетке и су- дить об уровне экспрессии гена в отдельной клетке или ткани. Отличительными чертами ПЦР-РВ являются не только возмож- ность количественного определения ДНК/РНК в исследуемом ма- териале, но и отсутствие стадии электрофореза, что позволяет мини- мизировать риск контаминации продуктами ПЦР и таким образом резко уменьшить число ложноположительных результатов. Также менее строгие требования предъявляются к организации ПЦР-лабо- ратории, становятся возможны автоматическая регистрация и ин- терпретация полученных результатов.

Кроме того, возможны и другие варианты ПЦР, получившие наибольшее распространение в научно-исследовательских лабора- ториях, например:

* **ПЦР длинных фрагментов** (англ. *long-range PCR*) – вари- ант ПЦР для амплификации протяженных участков ДНК (10 тыс.

и более оснований). Для реализации данного подхода используют смесь двух полимераз, одна из которых – *Taq*-полимераза с высо- кой процессивностью (способная за один проход синтезировать длинную цепь ДНК), а вторая – ДНК-полимераза с 3*'*–5*'* экзонукле- азной активностью (*Pfu*-полимераза). Она необходима для коррек- тирования ошибок, внесенных *Taq*-полимеразой, при этом некомп- лементарные нуклеотиды удаляются с помощью *Pfu*-полимеразы;

* **ступенчатая ПЦР** (англ. *touchdown PCR*) – с помощью это- го подхода уменьшают влияние неспецифического связывания праймеров. Первые циклы проводят при температуре выше опти- мальной температуры отжига, затем каждые несколько циклов тем- пературу отжига постепенно снижают до оптимальной. Это дела- ется для того, чтобы праймер гибридизовался с комплементарной цепью всей своей длиной; тогда как при оптимальной температуре отжига праймер частично гибридизуется с комплементарной цепью. Частичная гибридизация праймера на геномной ДНК приводит к неспецифической амплификации, если участков связывания для прай- мера достаточно много. В большинстве случаев первые десять ПЦР- циклов можно проводить при температуре отжига в 72–75 °С, а за- тем сразу снизить ее до оптимальной, например, до 60–65 °С.

### Преимущества ПЦР перед другими методами

К преимуществам полимеразной цепной реакции можно отнес- ти следующее:

1. универсальность: при помощи ПЦР можно определять ДНК в любых биологических образцах;
2. метод прямой и позволяет достичь предельно возможной чувствительности;
3. специфичность метода приближается к 100 %;
4. для ПЦР-анализа пригоден любой материал, в том числе и гистологические препараты;
5. метод позволяет определять число копий ДНК в пробе и тем самым наблюдать динамику;
6. метод прост в исполнении, возможна его полная автома- тизация;
7. результаты получают через несколько часов, т. е. в течение одного рабочего дня.

### Практическое применение

**и перспективы развития метода ПЦР**

**Криминалистика.** ПЦР используют для сравнения так назы- ваемых «генетических отпечатков пальцев». Для процедуры необхо- дим образец генетического материала с места преступления: кровь, слюна, сперма, волосы и т. п. Его сравнивают с генетическим ма- териалом подозреваемого. Достаточно совсем малого количества ДНК, теоретически – одной копии. ДНК расщепляют на фрагменты, затем амплифицируют с помощью ПЦР. Полученную с помощью электрофореза картину расположения полос ДНК и называют гене- тическим отпечатком пальцев (англ. *genetic fingerprint*).

**Медицинская диагностика.** ПЦР дает возможность сущест- венно ускорить и облегчить диагностику наследственных и вирус- ных заболеваний. Нужный ген амплифицируют с помощью ПЦР с использованием соответствующих праймеров, а затем секвени- руют для определения мутаций. Вирусные инфекции можно обна- руживать сразу после заражения, за недели или месяцы до того, как проявятся симптомы заболевания.

**Персонализированная медицина.** Иногда лекарства оказы- ваются токсичными или аллергенными для некоторых пациентов. Причины этого заключаются в индивидуальных различиях в вос- приимчивости и метаболизме лекарств и их производных. Эти раз- личия детерминируются на генетическом уровне. Например, у одно- го пациента определенный цитохром (белок печени, отвечающий за метаболизм чужеродных веществ) может быть более активен, у другого – менее. Для того чтобы определить, какой разновидностью цитохрома обладает данный пациент, предложено проводить ПЦР- анализ перед применением лекарства.

**Клонирование генов.** Клонирование генов – это процесс вы- деления гена и получения большого количества продукта данного

гена в результате генно-инженерных манипуляций. ПЦР использу- ется для того, чтобы амплифицировать ген, который затем встав- ляется в вектор – фрагмент ДНК, переносящий чужеродный ген в тот же самый или другой, удобный для выращивания организм. Вставку генов в чужеродный организм обычно используют для по- лучения продукта этого гена – РНК или, чаще всего, белка. Таким образом в промышленных количествах получают многие белки для использования в сельском хозяйстве, медицине и др.

**Секвенирование.** ПЦР является неотъемлемой частью мето- да секвенирования с использованием меченных флуоресцентной меткой или радиоактивным изотопом дидезоксинуклеотидов, так как именно в ходе полимеризации в цепь ДНК встраиваются про- изводные нуклеотидов, меченные флуоресцентной или радиоак- тивной меткой. Присоединение дидезоксинуклеотида к синтези- руемой цепи приводит к обрыву синтеза, позволяя определить по- ложение специфических нуклеотидов после разделения в геле.

#### Лабораторная работа 15

### Проведение ПЦР-амплификации ДНК с ISSR-праймерами

ПЦР проводится в объеме 10–50 мкл. Рабочая концентрация праймеров в реакционной смеси составляет 0,2–1 пМ/мкл. Количе- ство матричной ДНК, добавляемой в реакцию, колеблется в преде- лах от 10 нг (плазмидная ДНК) до 1000 нг (геномная ДНК). Рабочая концентрация *Taq*-полимеразы составляет 0,01–0,05 ед/мкл. Число циклов – 30–40 (45). Считается, что скорость достраивания ДНК *Taq*-полимеразой при ПЦР составляет 1000 нуклеотидов в минуту. Не рекомендуется брать больше чем 50 пМ праймера на про-

бу, иначе возможен неспецифический отжиг и образование прай- мер-димеров.

**Материал и оборудование:** размороженные образцы ДНК, ПЦР-бокс, амплификатор, дозаторы, штативы, пробирки для ПЦР, наконечники.

###### Реактивы:

1. ПЦР-смесь с буфером: вода деионизованная – 12,2 мкл, окра- шенный буфер\* – 4 мкл, праймер – 1 мкл, *Тaq*-полимеразы – 0,4 мкл, dNTP – 0,4 мкл, матричная ДНК – 2 мкл;
2. ПЦР-смесь ScreenMix (Евроген): вода деионизованная – 13 мкл, смесь для ПЦР ScreenMix (Евроген) – 4 мкл, праймер (10 пМ/мкл) – 1 мкл, ДНК (40 нг/мкл) – 2 мкл;
3. \*если буфер не окрашен, краску надо вносить в пробу, нано- симую на гель при электрофорезе.

###### Ход работы:

1. В ПЦР-боксе в пластиковой тонкостенной пробирке на 0,5 (0,2) мл смешать указанные выше компоненты реакционной сме- си. Смесь для ПЦР ScreenMix и праймеры размораживать перед са- мым использованием и быстро убирать в морозильник. При ис- пользовании полимеразы ее следует вносить в последний момент, не допуская нагревания.
2. В каждую пробирку внести 2 мкл предварительно разморо- женной и перемешанной ДНК. Перемешать содержимое пробирки на вортексе.
3. Поместить пробирки в ДНК-амплификатор.
4. Запустить следующий режим ПЦР: предварительная дена- турация матрицы при 94 оС – 5 мин, затем 35 циклов амплифика- ции: 94 оС – 40 с – денатурация; 42–52 оС – 50 с – отжиг праймеров; 72 оС – 40 с – элонгация, полимеризация; затем задать температуру 72 оС – 7 мин (окончательная достройка цепей) и вывести на +5 оС – режим хранения.
5. Температуру отжига праймеров определяют по формулам или (лучше) подбирают экспериментальным путем с помощью про- граммы градиента температур амплификатора.
6. Образцы после ПЦР-реакции можно сразу использовать для детекции результатов с помощью электрофореза или хранить их в морозильнике.

#### Лабораторная работа 16

### Проведение ПЦР-амплификации ДНК с ITS-праймерами

**Материал и оборудование:** размороженные образцы ДНК, ПЦР-бокс, амплификатор, дозаторы, штативы, пробирки для ПЦР, наконечники.

###### Реактивы:

1. смесь для ПЦР-реакции (25 мкл): деионизированная вода – 17 мкл;
2. смесь для ПЦР-реакции ScreenMix (Евроген) – 5 мкл;
3. праймеры pr1 F (прямой – TCC GTA GGT GAA CCT GCG) и ITS4 (обратный – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) – по 0,5 мкл каждого, ДНК – 2 мкл.

###### Ход работы:

1. В ПЦР-боксе в стерильной пластиковой тонкостенной про- бирке на 0,2 мл смешать указанные выше компоненты реакцион- ной смеси. Смесь для ПЦР ScreenMix и праймеры размораживать перед самым использованием и быстро убирать в морозильник.
2. В каждую пробирку внести 2 мкл предварительно разморо- женной и перемешанной ДНК. Перемешать содержимое пробирки на вортексе.
3. Поместить пробирки в ДНК-амплификатор.
4. Запустить следующий режим ПЦР: предварительная дена- турация матрицы при 94 °С – 2 мин; затем 35 циклов: 94 °С – 45 с, 56 °С – 45 с, 72 °С – 60 с, затем 72 °С – 10 мин и вывести на +5 оС – режим хранения.
5. Образцы после ПЦР реакции можно сразу использовать для детекции результатов с помощью электрофореза или хранить их в морозильнике.

#### Лабораторная работа 17

### Определение наличия ГМО в продуктах питания

Генная инженерия широко вошла в нашу повседневную жизнь, однако до сих пор не утихают споры относительно безопасности и этичности использования в пищу генетически модифицирован- ных организмов. Поэтому важно надежно детектировать наличие ГМ-компонентов в продуктах питания. Наиболее надежным, быст- рым и простым способом является проведение ПЦР.

Гены, вводимые в модифицируемый организм, могут быть раз- нообразны, поэтому не всегда удобно определять наличие встрой- ки именно целевого компонента. Гораздо более простым вариан- том является определение наличия в исследуемом организме уни- версальных генетических последовательностей – промотора вируса мозаики цветной капусты (CaMV 35 S) или терминатора из агро- бактерий (*Nos*).

**Оборудование:** амплификатор, ПЦР-бокс, вортекс, камера для горизонтального электрофореза, источник тока, трансиллюми- натор, гель-документатор.

**Реактивы и расходные материалы:** *Taq*-полимераза, буфер для полимеразы, смесь дезоксирибонуклеотидов, праймеры к CaMV 35 S промотору (праймер прямой: 5-GCT CCT ACA AAT GCC ATC A-3; праймер обратный: 5-GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA-3), препараты исследуемой ДНК, ТАЕ-буфер, агароза, штатив «рабочее место», пробирки для проведения ПЦР (0,2 мл или 0,6 мл, в зависимости от марки амплификатора), набор авто- матических пипеток, желтые наконечники в штативе.

###### Ход работы:

1. Из образца исследуемого продукта выделите ДНК одним из опи- санных способов. Определите качество и концентрацию ДНК.
2. Приготовьте смесь для проведения ПЦР из расчета 20 мкл на один образец, учитывая концентрацию стоковых растворов: бу- фер – 10х; смесь нуклеотидов – 50х; *Taq*-полимераза – 5 ед/мкл; прай- меры – по 10 мкМ.
3. Полученную смесь разлейте по 18 мкл в пробирки для про- ведения ПЦР. Внесите 2 мкл препарата исследуемой ДНК.

83

1. Проведите амплификацию по программе: денатурация при 95 °С – 5 мин; 40 циклов амплификации: 95°С – 30 с, 60 °С – 30 с, 72 °С – 40 с; конечная элонгация при 72 оС – 5 мин.
2. Проведите электрофорез ПЦР-продуктов в 2 % агарозном геле на ТАЕ-буфере. Искомый ПЦР-продукт – 118 пар оснований.

**Вопросы для самоконтроля**

1. В чем суть полимеразной цепной реакции? Какой биологический процесс она повторяет?
2. Кто автор метода ПЦР?
3. Какие этапы можно выделить в ПЦР?
4. Как выглядит стандартная программа для ПЦР, из каких этапов она состоит?
5. Что такое праймер?
6. Почему в буфер для ПЦР обязательно должны входить ионы магния?
7. Назовите области применения ПЦР.
8. Что такое ПЦР в реальном времени, какие преимущества у этого метода в сравнении с классическим?
9. Какие разновидности ПЦР вам известны?
10. Что такое контаминация? Каковы ее причины и как с ней бороться?
11. Как рассчитать температуру отжига праймеров?
12. Что такое дизайн праймеров? Каким требованиям должны удовле- творять праймеры?

## ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Разделение нуклеиновых кислот основано на том, что смесь их макромолекул в определенных средах под действием электри- ческого поля делится на ряд фракций (рис. 5.1) в зависимости от размера фрагмента и конформационной структуры (кольцевая форма, линейная и др.). С помощью этой простой техники можно быстро разделить такие смеси фрагментов ДНК, которые не мо- гут быть разделены другими способами, например, центрифуги- рованием в градиенте плотности.

Следует отметить, что наиболее распространенным методом является гель-электрофорез, т. е. фракционирование в специальных гелевых пластинах или блоках. В качестве поддерживающих но- сителей наиболее часто применяют агарозу и полиакриламид.

**Размер молекул ДНК.** Молекулы линейной двухцепочечной ДНК перемещаются в геле предположительно одним концом впе- ред со скоростями, обратно пропорциональными десятичному лога- рифму их молекулярных масс.

**Концентрация геля.** Фрагменты ДНК определенного размера перемещаются в геле, содержащем разные концентрации носите- ля (агароза, полиакриламид), с разными скоростями. Существует прямая зависимость между логарифмом электрофоретической под- вижности ДНК и концентрацией геля. Подвижность макромолекул в полиакриламидном геле обратно пропорциональна среднему размеру пор.

**Конформация ДНК.** Молекулы ДНК, имеющие одинаковую молекулярную массу, но разные конформации, например, кольцевую и линейную, движутся с разными скоростями.

**Напряженность электрического поля.** При низких напря- женностях скорость перемещения фрагментов линейной ДНК про- порциональна приложенному напряжению. Однако с увеличени- ем напряженности электрического поля подвижность фрагментов ДНК с высокой молекулярной массой дифференциально возрастает.

84

85



Катод

Смесь фрагментов ДНК разного размера

Для окраски фрагментов ДНК добавляют бромистый этидий

Визуализация бендов происходит

в УФ-свете

Длинные фрагменты

Источник тока

Ячейки

Гель

Короткие

фрагменты

Анод

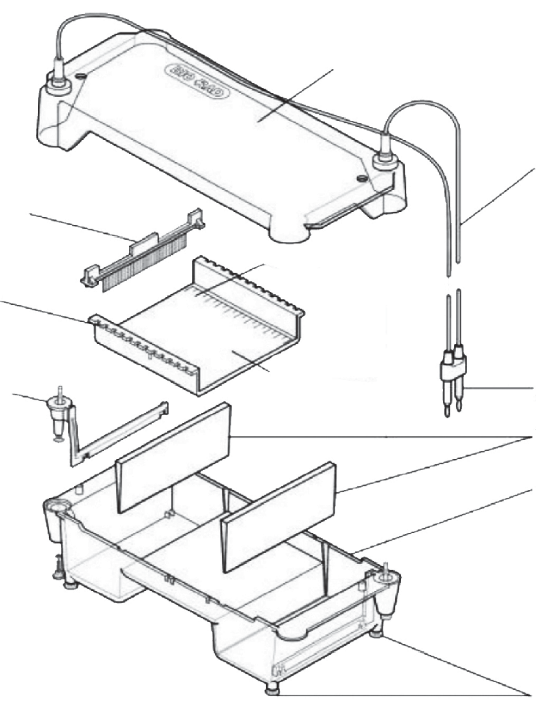
Рис. 5.1. Схема электрофореза ДНК в агарозном геле

Таким образом, с увеличением напряженности область эффективного разделения ДНК в геле снижается. Максимальное разделение фраг- ментов происходит при напряженности, не превышающей 5 В/см.

**Состав оснований и температура.** Электрофоретическое поведение ДНК в агарозных гелях, в отличие от поведения в поли- акриламидных гелях, слабо зависит от состава оснований ДНК или температуры геля. В агарозных гелях в области температур от 4 до 30 °С изменений относительной электрофоретической подвиж- ности фрагментов ДНК разного размера не наблюдается.

Электрофоретическое разделение проводят в вертикальных или горизонтальных электрофоретических камерах (рис. 5.2). Для агарозных гелей чаще применяются горизонтальные камеры, а для полиакриламидных гелей – как горизонтальные, так и вер- тикальные типы камер.

Верхняя крышка



Гребенка Пазы

для гребенки

Разъем для подклю-

чения электродов

Флюоресцентная линейка

УФ-прозрачный лоток для геля

Подводящие провода

Разъем

к блоку питания Заглушки

для заливки геля

Форезная камера

Горизонтирующие опоры камеры

Рис. 5.2. Основные элементы установки

для проведения горизонтального электрофореза в агарозном геле [Учебно-методическое пособие…, с. 86]

После электрофоретического фракционирования гель кладут в кювету, где и производят окрашивание. Для флюоресцирующего окрашивания применяют раствор бромистого этидия (после окрас- ки гель просматривают под ультрафиолетовым светом), а для ана- лиза в спектре видимого света используют окрашивающую смесь, содержащую нитрат серебра.

Минимальное количество ДНК, которое можно обнаружить при фотографировании геля, окрашенного бромистым этидием, со- ставляет 2 нг при ширине полосы 0,5 см. Максимальное количе- ство ДНК, которое можно внести в лунку, зависит от числа фраг- ментов в пробе и их размеров. Если лунка будет переполнена (в полосе указанной ширины будет содержаться более 200 нг ДНК), то полоса окажется расплывчатой и будет иметь шлейф. Этот дефект особенно выражен при разделении крупных фрагментов. При ана- лизе простого набора молекул ДНК вносят 0,20,5 мкг ДНК. Если же пробы содержат очень большое число фрагментов ДНК разных размеров (например, рестрикты), то можно наносить по 5–10 мкг в лунку, не опасаясь существенного снижения разрешающей спо- собности электрофореза.

После окраски проводят фотодокументирование гелей для со- хранения результатов, а также их последующей интерпретации.

Заключительным этапом электрофоретического анализа явля- ется описание спектров – определение количества зон и их обозна- чение. Для типировки каждой фракции используется числовая ве- личина размера (в парах нуклеотидов) фрагментов ДНК, находя- щихся в данной электрофоретической фракции. Вычисление размера молекул ДНК каждой зоны спектра производится на основании сравнения электрофоретической подвижности данной зоны отно- сительно молекул ДНК с известным размером, так называемым элект- рофоретическим маркером. Маркер может представлять собой смесь однотипных или различающихся по размерам молекул ДНК. Однако следует подчеркнуть еще раз, что для каждой фракции маркера известен размер молекул ДНК, которые их составляют. В качестве маркера могут быть использованы рестрикционные фрагменты бак- териофагов, искусственно синтезированные цепочки ДНК, ПЦР-про- дукты с известным размером и др.

Анализ и расчет размера фрагментов проводят с помощью специального программного обеспечения.

#### Лабораторная работа 18

**Электрофорез в 6 % полиакриламидном денатурирующем геле и процедура окраски полиакриламидных гелей нитратом серебра**

**Материалы и оборудование:** вертикальная камера для элект- рофореза, источник тока, шейкер-качалка, ванна для инкубации и окрашивания гелей, амплифицированные образцы, дозаторы.

###### Реактивы:

* 1. состав 6 % денатурирующего акриламидного геля: акрила- мид – 5,7 г, бис-акриламид – 0,3 г, 5х трис-ЭДТА-боратный бу- фер – 20 мл, мочевина (карбамид) – 42 г. Довести объем раствора дистиллированной водой до 100 мл. Перемешать, профильтровать, деаэрировать, затем добавить (непосредственно перед использо- ванием) персульфат аммония (10 % раствор) – 1 мл и тетраметилен- диамин (ТЕМЕD) – 60 мкл;
  2. состав формамидного LD-красителя для нанесения проб на денатурирующий полиакриламидный гель: ксиленцианол – 10 мг, бромфеноловый синий – 10 мг;

3) ЭДТА (0,5 M) – 200 мкл;

1. формамид – 100 мл;
2. состав 10х трис-ЭДТА-боратного (ТВЕ) буфера (рН 8,3): трис – 107,8 г, борная кислота – 55,0 г, ЭДТА (натриевая соль) – 7,4 г, дистиллированная вода – 1000 мл.

П р и м е ч а н и е. При приготовлении 5х трис-ЭДТА-боратного бу- фера объем дистиллированной воды составляет 200 мл.

###### Ход работы:

1. Положить большое стекло на резиновые подставки гладкой стороной вверх.
2. Полностью сухое малое стекло под тягой обработать следую- щим составом: 200 мкл ледяной уксусной кислоты; 1,0 мл этанола;

1 мкл bindsilane (перед использованием перемешать). Раствор за- лить в середину стекла и растереть безворсовой бумажной сал- феткой. Оставить на 10–15 мин.

1. Налить в середину стекла 1–2 мл этанола, распределить эта- нол чистой салфеткой по поверхности и протереть стекло вначале в одном направлении, затем перпендикулярно. Повторить обработ- ку спиртом еще 2 раза. Оставить стекло на 5–10 мин.
2. Положить на большое стекло спэйсеры и поверх них – ма- лое стекло обработанной стороной вниз, прижать зажимами.
3. Залить 6 % акриламидный гель между стеклами, добиваясь отсутствия пустот, после чего аккуратно вставить гребенки ровной стороной, затем добавить зажимов и выжать излишки геля. Оста- вить на 10–15 мин для полимеризации, затем сэндвич из двух сте- кол и геля между ними промыть под краном, убрать гребенки, про- тереть снаружи фильтровальной бумагой.
4. Закрепить сэндвич в вертикальной камере для электрофоре- за. Закрыть клапан между верхней и нижней частями камеры. За- лить в верхнюю и нижнюю часть камеры 1х TBE-буфер.
5. Закрыть камеру и подсоединить к источнику постоянного напряжения (стабилизация по мощности 75 Вт). Производить пред- отгонку в течение 30 мин.
6. Добавить в ПЦР-продукт формамидного LD-красителя из рас- чета 1 : 1. Поставить пробирки с ПЦР-продуктом в амплификатор и включить программу денатурации (85 °C), дать пробиркам про- греться не менее 2 мин. Выключить напряжение, вставить гребенки зубчатой стороной в гель и вытащить, промыть образовавшиеся лунки 10х ТВЕ-буфером из шприца, залить пробы по 2,5–4 мкл в лунки из пипетки.
7. Включить напряжение и проводить электрофорез примерно 2 ч. Затем выключить напряжение, вынуть сэндвич и отделить ма- лое стекло от большого для последующей окраски, не допуская по- вреждения поверхности геля.
8. В кювету с гелем залить фиксирующий раствор (10 % раст- вор уксусной кислоты) и инкубировать 20 мин в качающейся ванне при комнатной температуре.
9. Фиксирующий раствор слить и промыть гель три раза по 5 мин дистиллированной водой.
10. Поместить гель в окрашивающую смесь (0,1 % раствор нит- рата серебра, добавить 1,5 мл формалина на 1 л раствора перед ис- пользованием) и инкубировать 30 мин в качающейся ванне при ком- натной температуре.
11. Вынуть гель из окрашивающей смеси, опустить гель в дис- тиллированную воду (не более чем на 8 с!) и поместить в раствор для проявления (3 % раствор безводного карбоната натрия, 0,03 % NaOH; раствор охладить до 10 °С; непосредственно перед исполь- зованием добавить 1,5 мл формалина и 200 мкл тиосульфата нат- рия на 1 л раствора) и инкубировать, покачивая, до появления чет- ких бурых полосок (в среднем 6–8 мин), после чего быстро доба- вить 10 % раствор уксусной кислоты для гашения. Продолжить покачивание 1–2 мин, затем промыть гель дистиллированной во- дой и оставить сушиться.

Для удаления геля стекло помещают в раствор NaOH (пример-

но 10 г на 1 л воды).

Лабораторная работа 19 **Электрофорез в 1 % агарозном геле и ТАЕ-буфере**

**Материалы и оборудование:** камера для горизонтального электрофореза, источник тока, амплифицированные образцы, доза- торы, наконечники, гель-документатор.

###### Реактивы:

1. состав 1 % агарозного геля: агароза – 1 г, 1x трис-ЭДТА- ацетатный буфер – 100 мл (п р и м е ч а н и е: для 2 % геля – 2 г агарозы на 100 мл);
2. состав 50x трис-ЭДТА-ацетатного (ТАЕ) буфера (рН 8,0): трис – 242,2 г, уксусная кислота – 89,6 мл, ЭДТА (натриевая соль) – 18,616 г. Довести дистиллированной водой до 1 л.

###### Ход работы:

1. Довести раствор агарозы до кипения, охладить до 60 оС, за- тем добавить 5 мкл этидиум бромида.
2. В заливочный столик для камеры вставить гребенки и за- лить гель. Дать гелю остыть (около 30 мин).
3. Вытащить гребенки, установить форму в горизонтальную ка- меру для электрофореза и залить в камеру 1х TAE-буфер.
4. Поместить в лунки по 3–10 мкл раствора ДНК (амплифици- рованного). Если при ПЦР-реакции использовали смесь для ПЦР ScreenMix или окрашенный буфер, краситель добавлять не нужно.
5. Закрыть камеру, подсоединить к источнику постоянного на- пряжения и включить напряжение из расчета 5 В на 1 см длины геля.
6. Остановить электрофорез через 23 ч (время подбирается опытным путем).
7. Вынуть гель из формы и положить на трансиллюминатор (источник УФ-излучения) для просмотра и документации.

#### Лабораторная работа 20

### Выделение ДНК из агарозного геля и ее очистка

**Реактивы:** состав NaI-буфера: NaI  2H20 – 123 г, Na2SO3 – 0,1 г, крезоловый красный (Na) – 0,01 г, H2O (дистиллированная) – до 100 мл.

Цвет раствора довести уксусной кислотой (около 20 мкл) до жел- того. Хранить при комнатной температуре до 2 мес.

###### Ход работы:

1. Вырезать нужную полоску под длинноволновым УФ (360 нм), подложив под гель фольгу, постепенно открывая нужные участки. Поместить полоску в пробирку.
2. Взвесить полоску (вес соответствует объему).
3. При концентрации агарозы в геле 1–1,5 % добавить 3 объема NaI-буфера на 1 объем геля, при концентрации 2 % – 4 объема, при повышении концентрации на 1 % прибавлять один объем.
4. Пробирку с полоской поставить в термостат и инкубировать при 50 oС 5 мин или пока вся агароза не расплавится (время от вре- мени помешивая); убрать из термостата, дать остыть.
5. Если раствор имеет оранжевый или красный цвет, то доба- вить 1 мкл 10 % уксусной кислоты. Раствор должен пожелтеть.
6. Добавить 6 мкл суспензии диоксида кремния (взболтать пе- ред добавлением).
7. Перемешать и ждать 2 мин.
8. Центрифугировать 20–30 с при 13 тыс. об/мин.
9. Жидкость слить. К осадку добавить 160 мкл NaI-буфера, тщательно перемешать, ЦФ – 20 с при 13 тыс. об/мин, убрать супер- натант.
10. Добавить 0,5 мл 70 % этанола, взболтать, ЦФ – 20 с при 13 тыс. об/мин, слить жидкость.
11. Повторить пункт 10.
12. Сушить осадок 20 мин.
13. При низкой концентрации ДНК добавить 15 мкл H2O, при вы- сокой – 25 мкл. Взболтать.
14. Инкубировать 3 мин при 50 oС.
15. ЦФ – 30 с при 13 тыс. об/мин.
16. Перенести супернатант в новую пробирку.
17. Определить концентрацию ДНК (для секвенирования долж- на быть не менее 10 нг/мкл).

###### Приготовление суспензии диоксида кремния

1. Cуспензировать с помощью магнитной мешалки 10 г SiO2 в ~100 мл азотной кислоты в течение 2 ч. Дать отстояться, слить кислоту.
2. Шесть раз промыть в дистиллированной воде.
3. Залить дистиллированной водой в отношении примерно 1 : 1. Хранить суспензию при комнатной температуре до 1 мес.

**Вопросы для самоконтроля**

93

1. Какие гели используются для электрофореза ДНК?
2. Как можно визуализировать ДНК в гелях после электрофореза?
3. Что такое интеркалирующие красители?
4. Какие меры предосторожности надо принимать при проведе- нии электрофореза нуклеиновых кислот?
5. В чем принцип электрофореза НК?
6. Что входит в состав ТАЕ- и ТВЕ-буферов?

## 6. СЕКВЕНИРОВАНИЕ

Еще в 50-е гг. прошлого века были разработаны методы, по- зволяющие определять последовательность аминокислот в поли- пептидной цепи. Поэтому когда был расшифрован генетический код, появилась возможность восстанавливать нуклеотидную последо- вательность транскрибируемой ДНК по аминокислотной последо- вательности соответствующего белка. Однако генетический код является вырожденным. Следовательно, первичная структура ДНК, построенная на основе последовательности аминокислот, не бу- дет однозначной. Кроме того, для эукариот таким способом мож- но восстановить только нуклеотидный состав экзонов, тогда как информация о последовательности интронов теряется в результате слайсинга.

### Секвенирование ДНК по Максаму и Гилберту: метод химической деградации

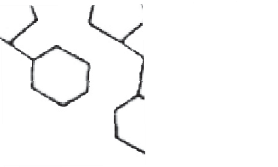
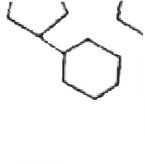
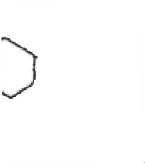
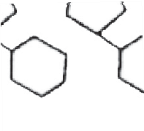
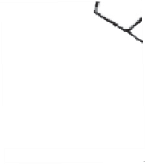
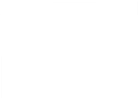
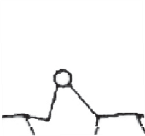
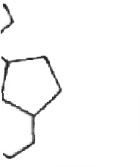
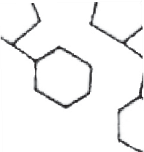
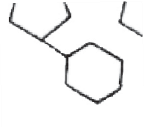
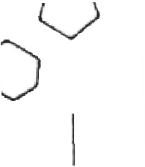
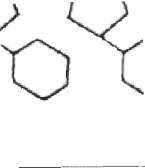
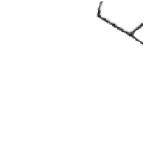
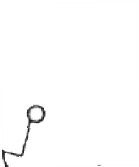
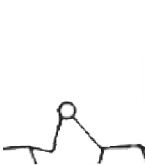
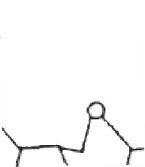
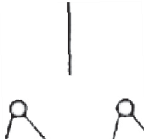
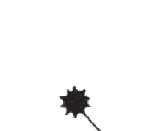
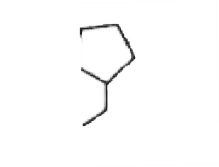
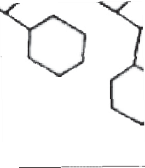
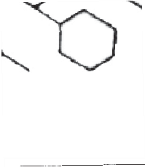
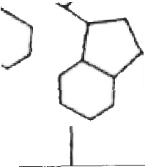
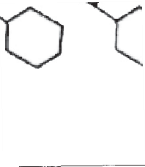
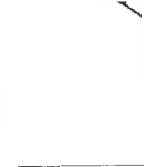
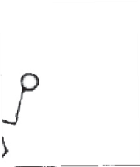
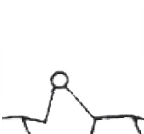
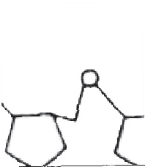
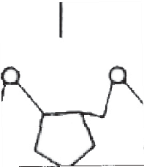
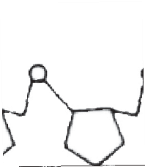
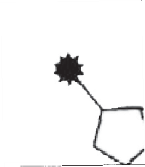
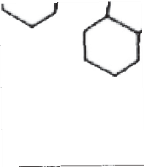
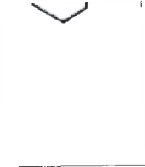
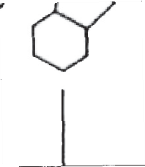
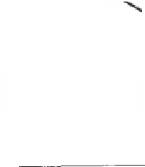
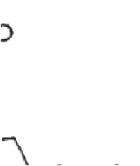
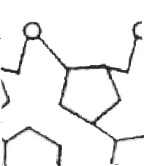
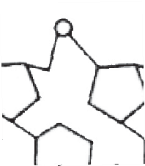
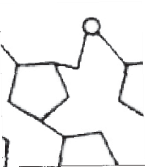
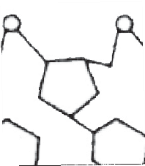
В 1976 г. А. Максамом и У. Гилбертом был разработан метод секвенирования, основанный на специфической химической дегра- дации фрагмента ДНК, радиоактивно меченного с одного конца. Препарат меченной ДНК разделяли на четыре аликвоты и каждую обрабатывали реагентом, модифицирующим одно или два из четы- рех оснований. А. Максам и У. Гилберт предложили модифициро- вать пуриновые основания диметилсульфатом. При этом происхо- дит метилирование адениновых остатков по азоту в положении 3, а гуаниновых по азоту – в положении 7. Обработка образца ДНК соляной кислотой при 0 °С приводит к выщеплению метиладенина. Последующая инкубация при температуре 90 °С в щелочной сре- де вызывает разрыв сахарно-фосфатной цепи ДНК в местах выщеп- ления оснований. Обработка пиперидином приводит к гидролизу образца по остаткам метилгуанина. Пиримидиновые основания

ДНК,

меченная по 5-концу 32Р

Т С С С

G А



Химическая модификация оснований диметилсульфатом

Т С С С

G СH3 А

Высвобождение или замещение прореагировавшего основания

Т С С С

А

Разрыв цепи ДНК

Т С С С

А

Рис. 6.1. Отщепление модифицированных звеньев цепи ДНК после обработки вторичным амином или щелочью [Энциклопедия большой научной библиотеки]

модифицируют гидразином. Если реакцию вести в бессолевой среде, то модифицируются как цитозин, так и тимидин; если обра- ботку вести в присутствии 2М NaCl, то модифицируется лишь ци- тозин. Расщепление цепи ДНК на фрагменты и в этом случае осу- ществляется пиперидином. Условия реакций авторы подбирали таким образом, чтобы в итоге получить полный набор субфрагмен- тов разной длины. Последующий электрофорез в полиакриламид- ном геле позволяет восстановить полную структуру исследуемого фрагмента.

### Секвенирование ДНК по Сэнгеру:

**«плюс-минус» метод**

Первым методом прямого ферментативного секвенирования ДНК стал метод, предложенный Ф. Сэнгером (рис. 6.2) и Д. Коулсо- ном в 1975 г. [Sanger, Coulson, 1975]. В качестве матрицы в реакции полимеразного копирования использовался одноцепочечный фраг- мент ДНК, в качестве праймеров – синтетические олигонуклеоти- ды или природные субфрагменты, получаемые при гидролизе рес- трицирующими эндонуклеазами, а в качестве фермента – фраг- мент Кленова ДНК-полимеразы I (PolI) из *E. coli*. Метод включал два этапа. Сначала в ограниченных условиях проводили полиме- разную реакцию в присутствии всех четырех типов dNTP (один из них был мечен по альфа-положению фосфата), получая на выхо- де набор продуктов неполного копирования матричного фрагмен- та. Смесь очищали от несвязавшихся дезоксинуклеозидтрифосфа- тов и делили на восемь частей. После чего в «плюс»-системе про- водили четыре реакции в присутствии каждого из четырех типов нуклеотидов, а в «минус»-системе – в отсутствие каждого из них. В результате в «минус»-системе терминация происходила пе- ред dNTP данного типа, а в «плюс»-системе – после него. Получен- ные таким образом восемь образцов разделяли с помощью элект- рофореза, «считывали» сигнал и определяли последовательность исходной ДНК (рис. 6.3). Этим способом была секвенирована ко- роткая ДНК фага фХ174, состоящая из 5386 нуклеотидных пар.

Рис. 6.2. Фредерик Сэнгер – английский биохимик, единственный ученый в истории,

получивший две Нобелевские премии по химии – в 1958 и 1980 гг.

### Секвенирование ДНК по Сэнгеру: метод «терминаторов»

В основе метода секвенирования ДНК, разработанного Сэнге- ром и соавт. [Sanger et al., 1977], называемого также методом секве- нирования путем терминации цепи, лежал принцип ферментатив- ного построения комплементарной цепи ДНК по существующей одноцепочечной матрице при происходящем в разных местах цепи ДНК ингибировании ее дальнейшего роста.

Составляющими этого процесса являлись: одноцепочечная мат- рица ДНК; короткая затравочная молекула, комплементарная опре- деленному участку матрицы; ДНК-полимераза (кленовский фраг- мент ДНК-полимеразы *E. сoli*); 2*'*-дезоксинуклеотид 5*'*-трифосфаты (дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ или просто дНТФ); 2*'*, 3*'*-дидезокси- нуклеотид 5*'*-трифосфаты (ддАТФ, ддГТФ, ддТТФ, ддЦТФ или прос- то ддНТФ); реакционный буфер с ионами Mg2+.

Ключевым моментом этого процесса являлась терминация по- строения комплементарной цепи ДНК, происходящая при выборе ДНК-полимеразой модифицированных аналогов природных суб- стратов дидезоксинуклеозидтрифосфатов, являющихся известными

5-

CAGCAT

-5

-3

Матрица

5-



CAGCAT GTCGTA

Кленовский фрагмент ДНК-полимеразы I, праймер, dNTPs, 32P-dATP

-3



-5



Матрица

«Минус»-система: кленовский фрагмент ДНК-полимеразы I

T

G

TCGTA CGTA GTA TA

A

-5

-5



-5



-5



-5



Гетерогенные продукты удлинения праймера

«Плюс»-система:



Т4 ДНК-полимераза

dCTP dGTP d T T P



С

А

dATP dGTP d T T P

dATP dCTP d T T P

dATP dCTP dGTP

d T T P

Т

dCTP



С

dGTP

G

dATP

А



GTCGTA GTCGTA

CGTA CGTA CGTA

A

-5

-5

-5

-5

-5

-5

TCGTA TCGTA

TA TA TA

-5

-5

-5

-5

-5

Гель-электрофорез 8 реакционных смесей



«плюс»- и «минус»-систем

Рис. 6.3. Схема секвенирования по Сэнгеру: «плюс-минус» метод [Энциклопедия большой научной библиотеки]

ингибиторами ДНК-полимеразы. Отсутствие второго гидроксиль- ного остатка в 3*'*-положении рибозного кольца у дидезоксипроиз- водных приводило к невозможности присоединения к ним следую- щего нуклеотида, и рост цепи таким образом прерывался. Такое терминирование происходило одновременно как бы в двух режи- мах: заданном и случайном. Заданность определялась тем, что в од- ной отдельной пробирке наряду со всеми четырьмя дНТФ (один из которых был радиоактивно меченным) присутствовал только один какой-нибудь конкретный ддНТФ, случайность же происходи- ла от того, что включение данного ддНМФ в растущую цепь ДНК было произвольным, но, естественно, с учетом принципа компле- ментарности. То есть возникала некая конкуренция между дНТФ и ддНТФ при их выборе ДНК-полимеразой. Поскольку в четырех реакционных пробирках (по типу оснований – А, С, G и Т) присут- ствовало огромное количество молекул секвенируемой ДНК, во мно- го раз превосходящее ту длину фрагмента, которую могла постро- ить ДНК-полимераза, то по теории вероятности каждое положение этого типа оснований во фрагменте ДНК оказывалось представ- ленным соответствующим ддНМФ.

Другим ключевым моментом являлся гетерогенный размер полученных фрагментов ДНК. Их гетерогенность определялась тем, что все 3*'*-концы фрагментов вновь синтезируемой цепи ДНК во всех четырех реакционных пробирках были терминированы со- ответствующими ддНМФ и, таким образом, представляли собой полный набор всех возможных длин в пределах секвенируемого участка, построенного ДНК-полимеразой. Что касается 5*'*-конца всех этих фрагментов ДНК, принадлежащих новой цепи, то он должен быть для всех фрагментов строго одинаковым и принад- лежать 5*'*-концу исходной затравочной молекулы.

Продукты реакций терминирования подвергались денатура- ции, и уже одноцепочечные меченые фрагменты, имевшие гомо- генный 5*'*-конец и гетерогенные 3*'*-концы, разделялись по длине высоковольтным электрофорезом высокого разрешения в поли- акриламидном геле, позволяющим разделять фрагменты ДНК, отли- чающиеся всего на один нуклеотид, в четырех соседних дорож-

ках, соответствующих специфическим терминирующим реакци- ям, например, в последовательности Т, С, G, А. По завершении элект- рофореза гель экспонировался на рентгеновскую пленку и по про- шествии некоторого времени (обычно от одних до двух суток) с проявленной пленки можно было «читать» последовательность нуклеотидов секвенируемого участка ДНК, начиная с нижней час- ти геля и последовательно поднимаясь вверх по этим четырем до- рожкам, соответствующим одному фрагменту ДНК (рис. 6.4).

5*'*-GTTCCGCGATCG 3*'*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| dATP | dATP | dATP | dATP |
| dCTP | dCTP | dCTP | dCTP |
| dGTP | dGTP | dGTP | dGTP |
| d T T P | d T T P | d T T P | d T T P |
| ddATP | ddCTP | ddGTP | ddTTP |

GCTddA GCTAGCCGddA GCTAGCCGAddA GCTAGCCGAAGCTddA



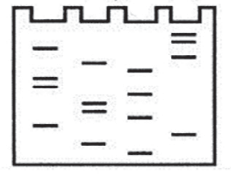
ddC GCTAGddC GCTAGCddC

ddG GCTAddG

GCTAGCCddG GCTAGCCGAAddG

GCddT GCTAGCCGAAGCddT GCTAGCCGAAGCTAddT

GCTAGCCGAAGddC GCTAGCCGAAGCTATddT



A С G T

GCTAGCCGAAGCTATT

Рис. 6.4. Схема секвенирования по Сэнгеру: метод терминации цепи [Энциклопедия большой научной библиотеки]

### Автоматическое секвенирование ДНК

В основе автоматического секвенирования лежит уже упоми- навшийся выше метод ферментативного секвенирования с исполь- зованием терминирующих ddNTP. Как и классический вариант Сэнгера, автоматическое секвенирование включает две стадии: проведение терминирующих реакций и разделение продуктов этих реакций с помощью электрофореза. Как правило, автоматизирова- на лишь вторая стадия, т. е. разделение меченных фрагментов ДНК в ПААГ, получение спектра эмиссии флуорофоров и последующий обсчет собранных данных. Таким образом, автоматическое секвени- рование отличается от современного ему ручного секвенирования только типом используемой метки.

Флуоресцентную метку включают либо в праймер, либо в тер- минатор транскрипции согласно следующим схемам: меченный праймер (четыре разных красителя) и немеченные терминаторы; меченный праймер (один краситель) и немеченные терминаторы; меченные терминаторы (каждый тип терминатора своим красите- лем) и немеченный праймер. Использование меченных праймеров предполагает проведение четырех независимых реакций (отдель- но с каждым из терминаторов) для каждого секвенируемого образ- ца. Использование меченных терминаторов позволяет совместить все четыре реакции в одной пробирке. Если используется един- ственный краситель, то разделение продуктов сиквенсовой реак- ции в геле проводят на четырех разных дорожках. Использование четырех разных красителей позволяет разгонять продукты реак- ции(й) на одной дорожке.

### Методы секвенирования нового поколения

Последние 20 лет доминирует автоматизированное секвениро- вание по методу Сэнгера. Этот метод был использован в глобаль- ных проектах по секвенированию генома человека, различных жи- вотных, бактерий и вирусов. Однако данный метод оказался не под- ходящим для быстрого рутинного секвенирования человеческих геномов в клинических целях. Поэтому появилась необходимость

в изобретении новых технологий полногеномного секвенирования. Автоматизированное секвенирование по Сэнгеру считается «ме- тодом первого поколения», тогда как современные методы назы- ваются «методами нового, или второго, поколения» (Next-Generation Sequencing, NGS). В основе этих технологий находятся различные стратегии, основанные на уникальных комбинациях приготовле- ния ДНК-матриц, секвенирования, визуализации, а также выравни- вания и составления последовательностей (sequences или «сиквен- сов») ДНК [Metzker, 2010]. Основным преимуществом секвенирова- ния нового поколения является рентабельность продукции огромного массива данных за короткое время.

Технология методов секвенирования нового поколения (СНП) позволяет «прочитать» единовременно сразу несколько участков *генома*, что является главным отличием от более ранних методов секвенирования. СНП осуществляется с помощью повторяющихся циклов *удлинения цепи*, индуцированного *полимеразой*, или мно- гократного *лигирования олигонуклеотидов*. В ходе СНП могут генерироваться до сотен мегабаз и гигабаз нуклеотидных последо- вательностей за один рабочий цикл. Несмотря на разные методы получения копий (амплификация) участков генома и на техничес- кую разницу дифференциации различных нуклеотидов в прочтен- ных последовательностях, общая схема работы для всех секвенато- ров одна. Первый этап секвенирования – создание библиотеки слу- чайных последовательностей ДНК, которые можно будет «сшить» с общедоступными адаптерными последовательностями. Второй этап – создание ампликонов с помощью ПЦР, которые будут ис- пользованы как образцы. Третий этап – определение первичной структуры всех фрагментов.

Основные методы секвенирования нового поколения пред-

ставлены в таблице. Более подробно остановимся на трех методах: пиросеквенирование, Illumina и ионное полупроводниковое сек- венирование.

**Пиросеквенирование** – это метод секвенирования ДНК (опре- деление последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК), осно- ванный на принципе «секвенирование путем синтеза». При вклю-

чении нуклеотида происходит детекция высвобождающихся пи- рофосфатов. Технология была разработана Полом Ниреном и его студентом Мустафой Ронаги в Королевском техническом институ- те (Стокгольм) в 1996 г.

«Секвенирование путем синтеза» заключается в том, что для сек- венирования одноцепочечной ДНК ферментативно синтезируют комплементарную цепочку. Метод пиросеквенирования основан на детекции активности фермента ДНК-полимеразы с другим хе- милюминесцентным ферментом. Метод позволяет секвенировать одну цепочку нуклеотидов ДНК путем синтеза комплементарной цепочки, при этом регистрируется присоединение каждого нуклео- тида. Матрица ДНК иммобилизована, растворы нуклеотидов A, C, G и T добавляются и отмываются последовательно после реакции. Свет образуется в тот момент, когда раствор нуклеотидов соответ- ствует первому неспаренному основанию матрицы. Последователь- ность растворов, которые дают хемилюминесцентный сигнал, по- зволяет определить последовательность матрицы.

Матрица одноцепочечной ДНК гибридизуется с праймером и ин- кубируется с ферментами ДНК-полимеразой, АТФ-сульфурилазой, люциферазой и апиразой, а также с субстратами аденозин-5*'*-фос- фосульфатами (APS) и люциферином.

1. Добавление одного из четырех дезоксинуклеозидтрифосфа- тов (dNTP) (в случае dATP добавляют dATPS, который не явля- ется субстратом для люциферазы) инициирует следующий этап. ДНК-полимераза включает правильный комплементарный дезокси- нуклеотид в цепочку. При этом стехиометрически высвобождает- ся пирофосфат (PPi).
2. Фермент АТФ-сульфурилаза количественно превращает PPi в аденозинтрифосфат (АТФ) в присутствии аденозин-5*'*-фосфосуль- фата. АТФ выступает «топливом» для фермента люциферазы, кото- рая превращает люциферин в оксилюциферин, при этом высво- бождается видимый свет, интенсивность которого пропорциональ- на количеству образовавшегося АТФ. Свет образуется в реакции, катализируемой люциферазой, регистрируется камерой и далее ана- лизируется специальной компьютерной программой.
3. Невключенные нуклеотиды и АТФ подвергаются деградации ферментом апиразой, и реакция начинается с новым нуклеотидом. В настоящий момент существуют некоторые ограничения в при- менении данного способа секвенирования. Лимитирующим факто- ром является длина последовательности нуклеотидов, которая со- ставляет около 300–500 нуклеотидов, тогда как длина последова- тельности нуклеотидов, получаемых методом обрыва цепи (например, метод Сэнгера), составляет 800–1000 нуклеотидов. Такие ограниче- ния могут затруднять секвенирование геномов, в частности, бога- тых повторенными последовательностями нуклеотидов. К 2007 г. пиросеквенирование обычно использовали для повторного секве- нирования или ресеквенирования геномов, для которых известна

последовательность нуклеотидов родственного вида.

**Метод Illumina/Solexa** – метод секвенирования нового поко- ления, разработанный компанией Solexa. В основе метода лежит принцип секвенирования путем синтеза:

* одноцепочечные фрагменты ДНК закрепляются на твердой подложке;
* ДНК-зависимая ДНК-полимераза синтезирует комплемен- тарную цепь;
* встраивание каждого нового нуклеотида регистрируется с по- мощью камеры.

В методе Solexa используются 3*'*-модифицированные нуклео- тиды с присоединенными флюоресцентными метками разных цветов. Модификация нуклеотидов не позволяет ДНК-полимеразе присоединить больше одного нуклеотида. Флюоресценция ини- циируется коротким импульсом лазера, и тип присоединенного нук- леотида определяется по цвету флюоресцентной метки. Модифи- кация нуклеотида блокируется (полимераза теперь может двигать- ся дальше), и цикл повторяется снова. В результате удается опреде- лить последовательность ДНК длиной до 250 нуклеотидов. Такую последовательность ДНК называют прочтением или ридом.

Первый секвенатор Genome Analyzer 1G был представлен ком- панией Solexa в 2006 г. Длина прочтения составляла 30–35 нуклеоти- да, можно было получить около 1 Гб информации. HiSeq 2000 (2011 г.)

способен секвенировать 6 человеческих геномов за 11 дней. Длина прочтения составляет 100 нуклеотидов, можно получить 600 Гб информации.

**Ионное полупроводниковое секвенирование** (англ. *ion semi- conductor sequencing*, синонимы: *ion torrent sequencing*, рН-опо- средованное секвенирование) – метод определения последователь- ности ДНК, основанный на обнаружении ионов водорода, которые выделяются во время полимеризации ДНК. Это метод «секвениро- вания при синтезе», в ходе которого комплементарная цепь строит- ся на основе последовательности матричной цепи.

Суть метода заключается в том, что микролунки, содержащие предназначенную для секвенирования молекулу матричной ДНК, наполняют дезоксирибонуклеотидтрифосфатом (dNTP) одного ви- да. Если введенный dNTP является комплементарным к матрице, он включается в растущую цепь, при этом выделяется ион водоро- да, который вызывает повышение электропроводности в ячейке, что является сигналом для детектора. После этого не связавшие- ся нуклеотиды смываются и происходит следующий раунд синте- за, с использованием следующего нуклеотида. Если в последова- тельности матричной цепи присутствует повтор одного нуклеоти- да, несколько молекул dNTP будут присоединены в одном цикле. Это приводит к увеличению количества образовавшихся ионов во- дорода и пропорционально более высокому электрическому сигна- лу. Данная технология отличается от других технологий секвени- рования тем, что не использует модифицированные нуклеотиды и оптические датчики.

Лабораторная работа 21

## Подготовка образцов к сиквенсной реакции.

**Метод прямого переосаждения ДНК в мягких условиях**

[<http://www.genome-centre.ru/downloads/NH4Ac_EtOH.pdf>]

При получении гомогенного ПЦР-продукта, представленного толь- ко одной полосой, без шлейфа, возможно использование прямого

**Сравнение методов секвенирования нового поколения**

106

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Метод | Принцип | Длина одного прочтения, пар оснований | Стоимость секвени- рования  1 млн пар оснований, долл. | Стоимость секвена- тора,  тыс. долл. | Время работы за цикл | Количество прочтений за цикл | Преиму- щества | Недо- статки |
| 454 Life Sciences | Пиросекве- нирование | 400 | 10 | 500 | 7 ч | 1 000 000 | Длина прочтенных геномных участков, скорость | Стоимость, погреш- ность |
| Illumina- SOLEXA | SBS  (sequncing- by-synthesis) | 300 | 0,05–0,15 | 600 | 9 дней | До 3 000 000 000 | Эффек- тивность, стоимость | Скорость |
| IonTorrent | Ионный полу- проводник | 200 | 1 | 50 | 1,5 ч | До 5 000 000 | Стоимость, скорость | Погреш- ность |
| SOLiD | Секвенирова- ние на основе лигирования | 35–50 | 0,13 | 595 | 9 дней | 1 300 000 000 | Стоимость | Скорость |
| Helicos | HeliScope | 2900 | 2 |  | 1 ч | 35 000–75 000 | Длина прочтенных геномных участков, скорость | Низкая производи- тельность при желае- мой малой погрешности, стоимость |

осаждения в мягких условиях для очистки от праймеров и других компонентов ПЦР-реакции, без использования коммерческих наборов.

**Материалы и оборудование:** ПЦР-продукт, цетрифуга, доза- торы, наконечники.

**Реактивы:** смесь NH4Ac + EtOH (конечная концентрация аце- тата аммония – 0,125 M, этанола – 70 %): деионизированная H2O – 4,7 мкл, NH4A 5M – 1,5 мкл, Et OH 96 % – 43,8 мкл.

П р и м е ч а н и е. Смесь следует заранее достать из холодильника, чтобы она нагрелась до комнатной температуры!

###### Ход работы:

* 1. Добавить по 50 мкл смеси ацетата аммония с этанолом на 10 мкл ПЦР-смеси, перемешать на вортексе или переворачиванием.
  2. Высаживание проводить при комнатной температуре в тече- ние 20 мин, затем центрифугировать при 14 тыс. об/мин в течение 20 мин.
  3. Удалить супернатант, осадок промыть в 250–500 мкл 70 % этанола комнатной температуры и высушить в термостате или ва- куумной центрифуге.

П р и м е ч а н и е. При высаживании из большего объема количе- ство этанола для промывки следует увеличить.

* 1. Растворить в деионизованной воде, определить концентра- цию на агарозном геле и использовать аликвоту для постановки сиквенсной реакци.

**Вопросы для самоконтроля**

1. Что такое секвенирование биополимеров?
2. Какие метлоды секвенирования НК вам известны?
3. В чем смысл метода секвенирования по Сэнгеру?
4. Какое практическое значение имеет секвенирование ДНК?
5. Почему перед секвенированием образец ДНК необходимо ампли- фицировать, а после этого – дополнительно очистить?
6. Что позволило автоматизировать процесс секвенирования ДНК по Сэнгеру?

107

## МЕТОДЫ АНАЛИЗА ДНК. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ

В последние десятилетия с введением в генетику растений молекулярных методов исследования появилось представление о молекулярно-генетических механизмах, лежащих в основе на- следования и формирования полезных признаков у растений, были составлены хромосомные карты наиболее важных сельскохозяйст- венных культур с нанесенными на них молекулярными маркера- ми и генами, произошло внедрение молекулярных методов в селек- ционно-генетические исследования, возникло понятие молекуляр- ной паспортизации сортов. Помимо очевидного практического значения применение молекулярных методов позволило существен- но расширить фундаментальные исследования в области генетики и эволюции растений [Хлесткина, 2011, с. 757].

### Особенности растительного генома

Изучение геномов растений – задача значительно более слож- ная, чем исследование генома человека и других животных. Это связано со следующими обстоятельствами:

1. огромные размеры геномов растений: так, у некоторых видов растений они достигают десятков и даже сотен миллиардов пар нуклеотидов; геномы основных хозяйственно важных растений (кроме риса, льна и хлопка) по размерам либо близки к геному человека, либо превышают его во много раз;
2. изменение числа хромосом в широких пределах – от двух у некоторых видов до нескольких сотен у других, причем не удает- ся выявить строгой корреляции между размером генома и числом хромосом;
3. огромное количество полиплоидных форм с близкими, но не идентичными геномами;
4. чрезвычайная обогащенность геномов растений (до 99 %)

«незначащей» ДНК, что резко затрудняет стыковку отсеквениро- ванных фрагментов в общий крупноразмерный участок ДНК;

1. неполное (по сравнению с геномами дрозофилы, человека и мыши) морфологическое, генетическое и физическое картиро- вание хромосом;
2. невозможность выделения в чистом виде индивидуальных хромосом с помощью методов, обычно применяемых с этой целью для хромосом человека и животных;
3. затрудненное хромосомное картирование отдельных генов с помощью гибридизации *in situ*, обусловленной как высоким со- держанием в геномах растений «незначащей» ДНК, так и особен- ностями структурной организации хромосом растений;
4. эволюционная отдаленность растений от животных, что серьезно осложняет использование для изучения геномов расте- ний сведений, полученных при секвенировании генома человека и других животных;
5. длительный процесс размножения большинства растений, что существенно замедляет их генетический анализ.

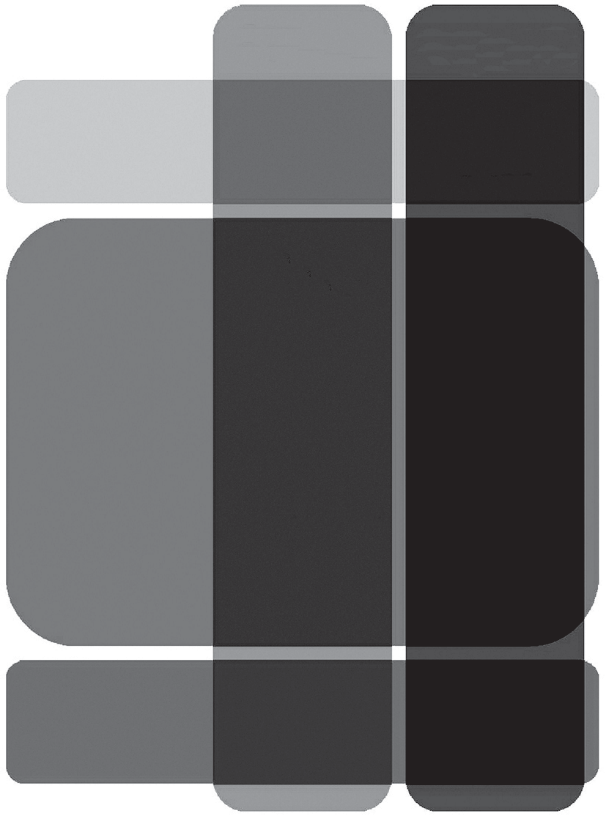
### Молекулярные маркеры

**Молекулярные маркеры** (синоним – **ДНК-маркеры**) – это генетические маркеры, анализируемые на уровне ДНК. ДНК-мар- керы являются третьим поколением генетических маркеров. Им предшествовали **белковые маркеры**, а еще ранее – **классические генетические маркеры.**

В настоящее время насчитывается несколько десятков типов молекулярных маркеров. Их разделяют на три группы, согласно основному методу анализа: 1-я – маркеры, исследуемые с помощью блот-гибридизации; 2-я – с помощью ПЦР и 3-я – с помощью ДНК- чипов.

Данная классификация отражает процесс «эволюции» ДНК- маркеров. Первая из трех перечисленных выше групп представля- ет собой первое поколение ДНК-маркеров, получивших широкое

распространение в 1980-е гг. В 1990-е гг. ключевые позиции заняли ПЦР-маркеры, в 2000-е гг. их существенно потеснили молекуляр- ные маркеры, основанные на использовании ДНК-чипов (рис. 7.1). В последние 2–3 года для анализа полиморфизма ДНК все чаще используют метод прямого секвенирования генома или его отдель- ных участков.



Моно- локусные

Мульти- локусные

Блот- гибридизация

RFLP

1980

Микро- сателлиты1985

SSR1989

RAPD1990

STS1989

ISSR1994

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

SSCP

1989

AFLP

1995

CAPS1993 SSAR1997

SCAR1993

IRAP2006

ДНК-чипы

SNP1998

DArT2001

Рис. 7.1. Схематическая классификация молекулярных маркеров и год их первого упоминания в публикациях:

слева указан основной метод, используемый для анализа данного класса маркеров [Хлесткина, 2013, с. 1045]

К молекулярным маркерам наравне с классическими генети- ческими применяют термины *локус*, *аллель*, *доминантный*, *кодоми- нантный* (рис. 7.2). Молекулярные маркеры подразделяют на моно-

локусные и мультилокусные. Монолокусные маркеры наследуют- ся чаще всего по кодоминантному типу, мультилокусные – по до- минантному. Если метод анализа маркера позволяет выявлять оба аллеля, говорят о кодоминантном типе наследования данного мар- кера (слева), если выявляется только один аллель – о доминант- ном наследовании (справа) (рис. 7.3).

### Основные классы молекулярных маркеров

**AFLP** (amplified fragment length polymorphism) – полиморфизм длины амплифицированных фрагментов.

**CAPS** (cleaved amplified polymorphic sequences) – расщеплен- ные амплифицированные полиморфные последовательности.

**DArT** (diversity array technology) – ДНК-чип технология для изу- чения разнообразия.

**IRAP** (inter-retrotransposon amplified polуmorphism) – полимор- физм амплифицированных последовательностей между ретро- транспозонами.

**ISSR** (inter simple sequence repeats) – межмикросателлитные по- следовательности.

**RAPD** (random amplified polymorphic DNA) – случайно амп- лифицированная полиморфная ДНК.

**RFLP** (restriction fragment length polymorphism) – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов.

**SCAR** (sequence characterized amplified region) – амплифици- рованная область, охарактеризованная нуклеотидной последова- тельностью.

**SNP** (single-nucleotide polymorphism) – однонуклеотидный по- лиморфизм.

**SSAP** (sequence-specific amplification polymorphism) – полимор- физм сиквенс-специфичной амплификации.

**SSCP** (single strand conformation polуmorphism) – полиморфизм конформации одноцепочечной ДНК.

**SSR** (simple sequence repeats) – простые повторяющиеся по- следовательности (микросателлиты).

Генотип 1

Генотип 2

Локус

Генотип 1

Генотип 2

Локус

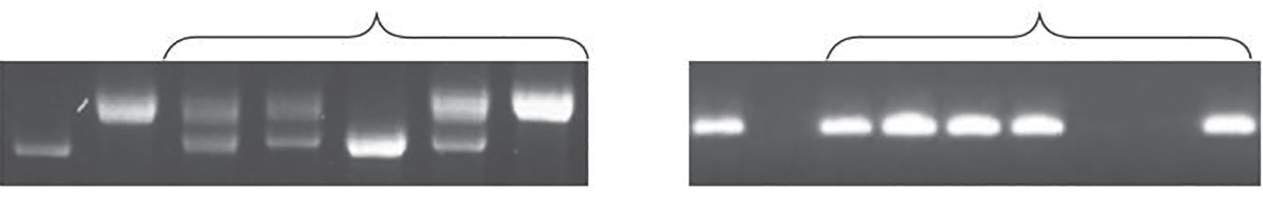
* 1. agggt**c**aagct
  2. agggt**t**aagct

1. ctca**tgtgtgtgtgtgtg**gcatc
2. ctca**tgtgtgtgtgtg**gcatc

*а б*

Рис. 7.2. Причины вариабельности локуса:

*а* – замена нуклеотида; *б* – делеция [Хлесткина, 2013, с. 1046]

F2 F2

P1 P2 P1 P2

*а б*

Рис. 7.3. Кодоминантный (*a*) и доминантный (*б*) тип наследования [Хлесткина, 2013, с. 1046]

При выборе оптимального маркера принято прибегать к сле- дующим критериям оценки:

1. универсальность: какие из последовательностей могут быть амплифицированы и отсеквенированы в максимальном количестве растительных таксонов. В первую очередь этот показатель зави- сит от возможности подобрать универсальные для широкого круга организмов праймеры для амплификации фрагмента, который впо- следствии подлежит секвенированию;
2. качество сиквенса и степень перекрывания: какие из локусов наиболее пригодны для получения перекрывающихся сиквенсов с прямого и обратного праймеров с минимумом неоднозначностей прочтения нуклеотидов или их отсутствием;
3. способность различать виды: какие из локусов дают воз- можность различить как можно большее количество видов. Опти- мальной является ситуация, при которой внутривидовой полимор- физм ниже межвидового, а формы, относящиеся к одному виду,

кластеризуются отдельно от форм других видов. Исходя из пред- ложенных критериев, рассмотрим различные молекулярные мар- керы подробнее [Хлесткина, 2013].

### RAPD-анализ

Случайно амплифицированная полиморфная ДНК (**RAPD – random amplified polymorphic DNA)** – метод амплификации ДНК-сегментов с использованием случайных праймеров (пример- но 10 нуклеотидов), не требует предварительного знания последова- тельности ДНК, однако вследствие стохастической природы ДНК для амплификации важна оптимизация и поддержание соответ- ствующих условий для получения воспроизводимых результатов.

Свойства RAPD-маркеров:

* + высокая чувствительность к изменениям условий реакций;
  + достаточно низкая температура отжига – 37 оС (увеличена вероятность образования продуктов амплификации с большим ко- личеством неспаренных оснований);
  + RAPD-маркеры ведут себя как доминантные и их гетерози- готное состояние на отличается от гомозиготного, поэтому снижа- ется точность оценки при популяционном анализе и при иденти- фикации генетических ресурсов в сравнении с кодоминантными маркерами;
  + присутствие высокоочищенной неконтаминированной ДНК;
  + низкая воспроизводимость результатов ПЦР;
  + необходимость большой выборки (для повышения достовер- ности).

Но все же RAPD-анализ может служить своеобразным экспресс- методом выявления генетического полиморфизма, что особенно актуально для малоизученных таксономических групп, а также как источник уникальных локус-специфичных маркеров. Еще этот метод может применяться в селекции для идентификации сортов и пород [Чесноков, с. 29].

Диагностические возможности RAPD-технологии успешно проиллюстрированы на многочисленных примерах описания

генетического разнообразия микроорганизмов, высших растений, беспозвоночных и позвоночных животных.

Например, в 2010 г. RAPD-маркеры были использованы для вы- явления внутривидового полиморфизма *Lathyrus sativus* L. по ге- нотипу. Использование RAPD-анализа позволило классифициро- вать изученные образцы на внутривидовые группы *L. sativus*, со- ответствующие эколого-географической дифференциации вида и его эволюции как культуры [Бурляева, Вишнякова, с. 754].

### ISSR-маркирование

Межмикросателлитные последовательности **(ISSR – Inter-Simple Sequence Repeat)** – маркеры, которые были разработаны как альтер- натива RAPD-анализу. Мы дадим более полную характеристику этим маркерам по сравнению с предыдущими типами молекуляр- ных маркеров.

Для создания ISSR-маркеров используют праймеры, компле- ментарные микросателлитным повторам (4–12 единицам повтора) и несущие на одном из концов последовательность из двух-четы- рех произвольных нуклеотидов (так называемый «якорь») [Кален- дарь, Глазко] (рис. 7.4).

NNN(CA)n

(CA) nNN Внутренний

повтор (ISSR)

CA-повтор (SSR)

**Геномная ДНК**

CA-повтор (SSR)

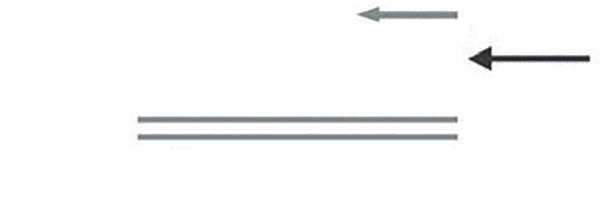
NNN(CA)n

NNNNNNNNNNNNCACACACACANNNNNNNNNNNTGTGTGTGTGNNNNNNNNNNNN

(CA) nNN

NNNNNNNNNNNNCACACACACANNNNNNNNNNNTGTGTGTGTGNNNNNNNNNNNN

ПЦР-продукт



CA-повтор (SSR)

ПЦР-продукт

с праймером с 3-концом

с праймером с 5-концом

Рис. 7.4. Амплификация внутреннего простого повтора (ISSR) с использованием праймеров с 3- и 5-концом [SilkSatdb]

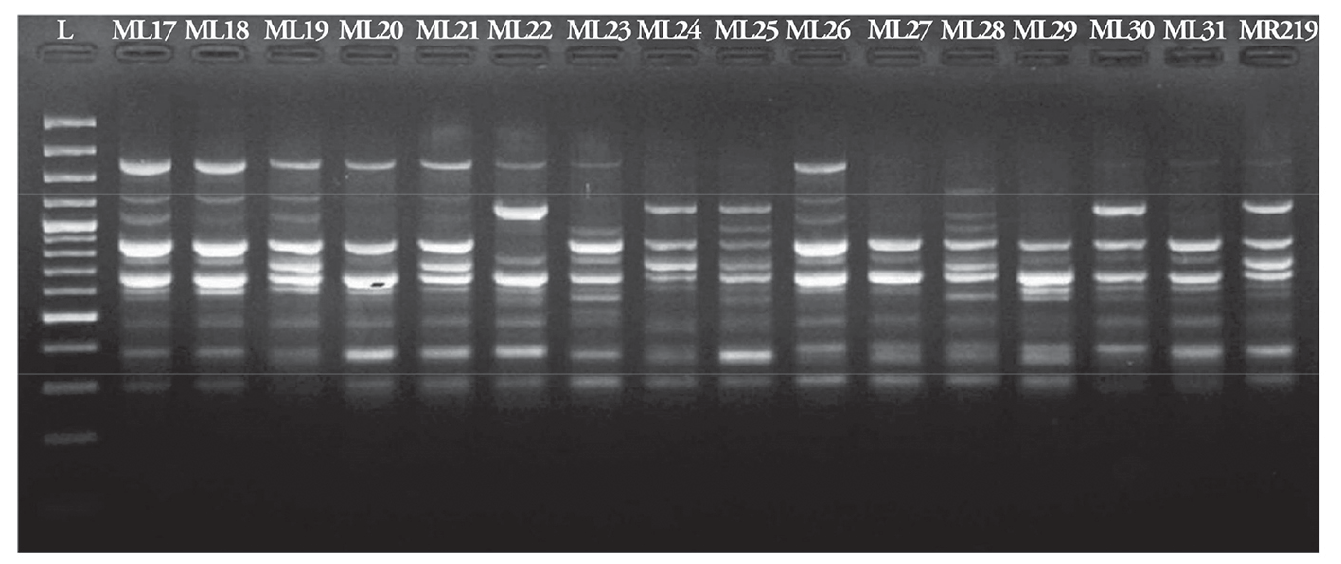
Такие праймеры позволяют амплифицировать фрагменты уникальной ДНК, которые находятся между двумя достаточно близко расположенными микросателлитными последовательнос- тями. В результате амплифицируется большое число фрагментов, представленных на электрофореграмме дискретными полосами (рис. 7.5).

Рис. 7.5. ISSR-профиль мутантных линий риса (ML17–ML31) c праймером ISSR4:

L – Ledder, маркер молекулярного веса; MR219 – контроль [Oladosu et al., p. 260]

Полученные ПЦР-продукты относятся к маркерам доминантно- го типа наследования, полиморфизм которых тестируется по нали- чию/отсутствию полосы. Для создания ISSR-маркеров не требу- ется предварительного знания нуклеотидной последовательности исследуемой ДНК [Новиков].

ISSR-маркеры позволяют одновременно определить изменчи- вость по группе не связанных между собой локусов, что особенно ценно для сохранения и использования генетических ресурсов. Та- кая информация дает возможность оценить генетический дрейф, происходящий в экосистемах, а также эффективно проводить мони- торинг популяций редких и исчезающих видов растений, находя- щихся на охраняемых территориях.

Основные преимущества ISSR-метода:

* + данный метод обладает хорошей воспроизводимостью и мо- жет быть с успехом использован для выявления межвидовой и внут- ривидовой генетической изменчивости, идентификации групп растений различного таксономического ранга, а в ряде случаев и для индивидуального генотипирования;
  + ISSR-маркеры довольно дешевы в использовании, не требу- ют предварительных знаний о последовательности ДНК и вместе с тем дают более воспроизводимые результаты, чем RAPD-марке- ры [Календарь, Глазко].

Следует отметить, что в геномах растений и животных коли- чество микросателлитных повторов очень велико, что делает этот метод удобным для генетического анализа. Микросателлитные по- следовательности окружают многие гены и могут использоваться как якорные последовательности к этим генам.

Но для ISSR-маркеров локализация в геноме продуктов ампли- фикации, так же, как и функция, остаются неизвестными, что явля- ется существенным недостатком этого метода.

ISSR-метод используется для выявления генетического поли- морфизма растительного материала, для идентификации генетичес- кого полиморфизма видов растений с различными целями (класси- фикация, идентификация, паспортизация и т. д.) как в природных популяциях, так и у культурных растений. Помимо оценки биоразно- образия, молекулярные маркеры применяются для исследования происхождения, доместикации видов и их последующей миграции, для географической локализации популяций, имеющих разное гене- тическое происхождение, получения информации по филогенети- ческим взаимоотношениям между видами. ISSR-метод в филоге- нетике подходит главным образом для близкородственных видов.

### SSR-маркеры

Простые повторяющиеся последовательности или микросател- литы **(SSR – simple sequence repeat)** – участки ДНК, состоящие из тандемов повторяющихся единиц: *моно*-, *ди*-, *три*-, *тетра*- или *пента*-нуклеотидов [Календарь, Глазко].

Микросателлиты присутствуют как в некодирующих, так и в ко- дирующих областях генома, а также в хлоропластном и митохонд- риальном геномах. Естественными причинами разнообразия в ко- личестве повторов единиц микросателлитов в геноме являются

«проскальзывание» полимеразы в ходе репликации ДНК и/или не- соответствующий кроссинговер, несовпадение/восcтановление по- вреждений двойной нити ДНК, а также перемещения ретротранс- позонов. Эти вариации приводят к полиморфизму по длине фраг- ментов, выявляемому при электрофорезе (рис. 7.6).

Этот тип генетических маркеров приобрел в последнее десяти- летие большую значимость благодаря таким свойствам, как:

* + мультиаллельная природа;
  + кодоминантный тип наследования;
  + высокая воспроизводимость результатов ПЦР;
  + относительное обилие;
  + высокая пропускная способность;
  + простота автоматизации процесса.

**Алелі**

**1**



Повтори CACACACACACACACACACACA

1. CACACACACACACACACACACACACA



1. CACACACACACACACACACACACACACACACA



**Генотипы**

Прямий праймер Зворотній праймер



1/1 2/2 3/3 1/2 1/3 2/3

Рис. 7.6. Основной принцип микросателлитного анализа [SilkSatdb]

Недостатком является сложность и высокая стоимость разработ- ки праймеров, поскольку для создания праймеров необходимо клони- рование и секвенирование произвольных участков ДНК, выявление микросателлитных повторов и определение фланкирующих облас- тей таких участков генома для определения специфического локуса.

Микросателлиты активно используются при изучении фило- географии, структуры популяций, сортовой идентификации, выяв- лении источника происхождения [Омашева и др., c. 21].

### AFLP-метод

Полиморфизм длины амплифицированных фрагментов **(AFLP – amplified fragment length polymorphism)** является сложным ме- тодом анализа, состоящим из нескольких этапов. В анализе исполь- зуется праймер с искусственно добавленной последовательностью [Календарь, Глазко].

Суть данного метода можно описать следующей схемой (рис. 7.7):

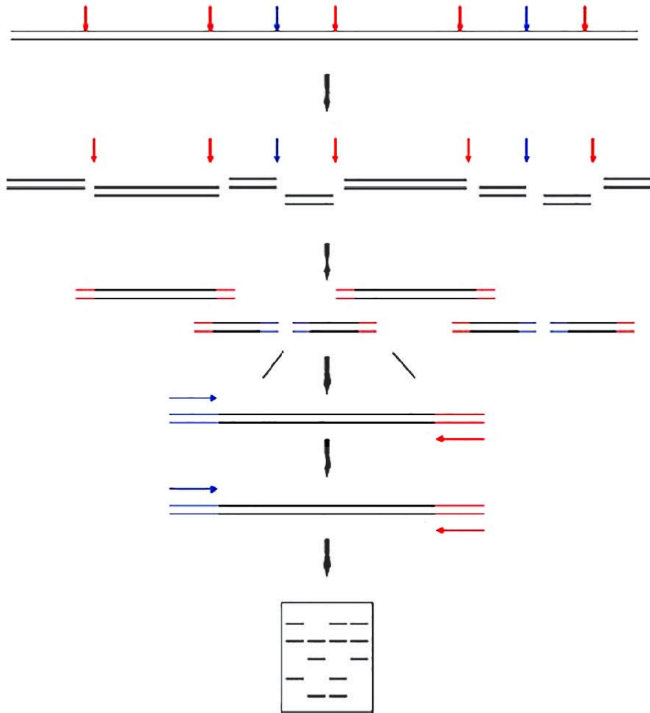
* Геномная ДНК рестрицируется двумя рестриктазами (EcoRI и MseI) с образованием фрагментов с выступающими 3-концами.
* Рестрицированная геномная ДНК легируется с адаптером, со- держащим «липкие» концы для данных рестрикционных сайтов. Таким образом, праймеры состоят из адаптера и последовательнос- ти нескольких нуклеотидов (1–5), специфичных для узнавания фер- ментом рестрикции.
* Далее проводятся две последовательные ПЦР: в первой ПЦР используются праймеры, полностью комплементарные адаптерам EcoRI и MseI, в результате чего образуется большое количество про- дуктов амплификации между адаптерами EcoRI и MseI, которые невозможно дифференцировать с помощью электрофореза. Поэто- му во второй ПЦР праймеры с адаптерами EcoRI и MseI содер- жат на 3-конце дополнительные и некомплементарные адаптерам основания (от 1 до 4) для селективной амплификации.
* Разделение фрагментов ДНК проводят в полиакриламидном геле с радиоактивной или с флуоресцентной меткой.

Получаемый фингерпринт ДНК обычно высокополиморфен и, как правило, хорошо воспроизводим.

Можно перечислить следующие свойства AFLP-анализа:

1. полиморфизм AFLP выше, чем RAPD и ISSR;
2. высокая воспроизводимость результатов;
3. этот метод позволяет определять генетические изменения, вы- званные точечными мутациями в сайтах рестрикции или в участ-

Геномная ДНК



N

N

NN

NNN

1. Ферментативная

рестрикция

1. Лигирование с олигонуклеотидными

адапторами

1. Преамплификация
2. Селективная амплификация
3. Гель-электрофорез

Рис. 7.7. Основной принцип AFLP-анализа [Scitable by nature education]

ках отжига праймеров (присутствие или отсутствие продукта амп- лификации в спектре) и небольшими вставками и (или) делеция- ми внутри рестрикционного фрагмента (изменение размера поло- сы в спектре);

1. молекулярно-генетические маркеры легко картируются на хромосомах.

Воспроизводимость и высокое количество информативных фрагментов в реакции позволяет использовать метод в различных аспектах: изучение генетической идентичности, идентификация сортов и клонов, филогенетические связи, картирование [Чесноков].

### SNP

Типирование аллелей с помощью секвенирования, или установления нуклеотидной последовательности ДНК-локусов, является наиболее точным из всех перечисленных методов. На первом этапе анализа полученные данные спектрограммы продуктов секвенирующей реакции с помощью программного обеспечения преобразуются в последовательность буквенных символов, обозначающих нуклеотиды в молекуле ДНК. Окончательный результат секвенирования может быть представлен в виде отчета, содержащего информацию о нуклеотидной последовательности образца, точности определения каждого из нуклеотидов, параметров электрофоретического разделения и др.

На следующем этапе составляется база данных (см. таблицу) нуклеотидных структур аллелей с указанием их наименования. Затем при проведении анализа каждого нового образца его нуклеотидная последовательность сравнивается с уже имеющимися в базе данных вариантами. В случае полного совпадения генотип исследуемого образца описывается с помощью символов, предложенных для данных аллелей. При появлении нового аллеля ему присваи

**Нуклеотидная последовательность**

**и обозначение аллельных вариантов с указанием типа перестроек**

|  |  |
| --- | --- |
| Название аллеля | Нуклеотидная последовательность вариабельного фрагмента |
| W (аллель дикого типа) | AGGTGACAGTACCGTAAGTCAGTTGCGATTGAACGTGCATG |
| C12A (замена нуклеотида) | AGGTGACAGTA**A**CGTAAGTCAGTTGCGATTGAACGTGCATG |
| del18AA (делеция) | AGGTGACAGTACCG**TG**TCAGTTGCGATTGAACGTGCATG |
| Ins12А (вставка) | AGGTGACAGTAC**A**CGTAAGTCAGTTGCGATTGAACGTGCATG |

П р и м е ч а н и е. В скобках указан тип перестроек.

вается новая буквенная или цифровая символика, которая заносится в базу данных аллельных вариантов. Изучение нуклеотидных последовательностей позволяет установить степень генетического сходства/различия аллелей, их филогенетическую взаимосвязь и т. д. В настоящее время существует большое количество баз данных нуклеотидных последовательностей различных организмов. Наиболее известной является «Генный банк» (Gene Bank), представленный на сайте [http://www.ncbi.nlm.nih.gov.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) Анализ полученных данных секвенирования производится с помощью поисковой системы ВLAST, которая позволяет выявлять как идентичные, так и наиболее сходные гомологичные последовательности [Падутов

и др.].

##### Вопросы для самоконтроля

1. Что такое генетические маркеры?
2. Какую информацию об организме может дать генетическое марки- рование?
3. Что такое RAPD-анализ? Каковы его достоинства и недостатки?
4. Что такое ISSR-анализ? В чем его отличия от RAPD?
5. Назовите методы генетического анализа, основанные на амп- лификации со специфическими праймерами.
6. В чем суть метода RFLP?
7. В чем суть метода AFLP?
8. Как выявить полиморфизм на уровне отдельных нуклеотидов?
9. У вас есть организм с неизвестным геномом. Необходимо оценить степень полиморфизма в его популяции. Какой метод анализа вы будете использовать?
10. Сравните различные методы генетического маркирования. Назови- те их достоинства и недостатки. Каковы области применения данных методов?

121

##### СПИСОК БИБЛИОГРАФИЧЕСКИХ ССЫЛОК

*Алтухов Ю. П.* Генетические процессы в популяциях. М. : Академкни- га, 2003. 432 с.

*Бикбулатова С. М*., *Чемерис Д. А*., *Никоноров Ю. М. и др.* Способы детекции результатов полимеразной цепной реакции в режиме реального времени // Вестн. Башк. ун-та. 2012. Т. 17, № 1. С. 50–67.

Большой лабораторный практикум по биохимии. Ч. 2 : Биохимия бел- ков и пептидов : учеб-метод. пособие для вузов / И. А. Сорокина, Е. М. Веч- канов. Ростов н/Д : КОПИ-ЦЕНТР, 2010. 96 с.

*Бурляева М. О*., *Вишнякова М. А.* Фенотипическое и генотипическое разнообразие *Lathyrus sativus* L. из коллекции ВИР // Вестн. ВОГиС. 2010. Т. 14, № 4. С. 247–259.

*Великов В. А.* Молекулярная биология : практ. руководство. Саратов : Сарат. источник, 2013. 84 с.

*Глик Б.*, *Пастернак Дж*. Молекулярная биотехнология: принципы и применение. М. : Мир, 2002. 589 с.

*Гончаренко Г. Г*., *Падутов В. Е*., *Потенко В. В.* Руководство по иссле- дованию хвойных видов методом электрофоретического анализа изофер- ментов. Гомель : Белорус. НИИ лес. хоз-ва, 1989. 164 с.

*Ермаков А. И.*, *Арасимович В. В*., *Ярош Н. П*. *и др.* Методы биохими- ческого исследования растений. Л. : Агропромиздат, 1987. 430 с.

*Журавлев Ю. Н.* Молекулярные маркеры для сохранения редких ви- дов растений Дальнего Востока // Физиология растений. 1999. Т. 46, № 6. С. 953–964.

*Календарь Р. Н.*, *Глазко В. И.* Типы молекулярно-генетических мар- керов и их применение // Физиология и биохимия культурных растений. 2002. Т. 34. С. 141–156.

*Ковальчук Л. В*., *Игнатьева Г. А*., *Ганковской Л. В.* Иммунология: прак- тикум : учеб. пособие. М. : ГЭОТАР – Медиа, 2010. Ч. 2. 194 с.

*Левитес Е. В.* Генетика изоферментов растений. Новосибирск : Нау- ка, Сиб. отд-ние, 1986. 143 с.

Лекции по биологии : в 2 кн. Ч. 1 : Цитология и генетика / под ред. проф. Т. В. Викторовой. Уфа : Изд-во БГМУ, 2012. 192 с.

Молекулярно-генетические и биохимические методы в современ- ной биологии растений / под ред. Вл. В. Кузнецова. М. : Бином, 2012.

Научно-производственная фирма Литех : [сайт]. URL: http:// [www.lytech.ru/articles\_129.htm](http://www.lytech.ru/articles_129.htm) (дата обращения: 16.11.2012).

*Новиков П. С.* Подбор ISSR-праймеров для фрагментного анализа ДНК сосны обыкновенной // Научному прогрессу – творчество молодых : сб. материалов междунар. молодеж. научн. конф. по естеств.-науч. и техн. дисциплинам, 15–16 апр. 2011 г. : в 3 ч. Йошкар-Ола : Марийский гос. техн. ун-т, 2011. Ч. 3. С. 35–36.

*Омашева М. Е*., *Аубакирова К. П*., *Рябушкина Н. А.* Молекулярные маркеры. Причины и последствия ошибок генотипирования // Биотехно- логия: теория и практика. 2013. № 4. С. 20–28.

Основы полимеразной цепной реакции : метод. пособие / сост. В. В. Зо- рина. М. : ДНК-технологии, 2012. 80 с.

*Падутов В. Е*., *Баранов О. В*., *Воропаев Е. В.* Методы молекулярно- генетического анализа. Минск : Юнипол, 2007. 176 с.

Пособие к практическим занятиям по молекулярной биологии. Ч. 2 : Методы молекулярной диагностики : учеб.-метод. пособие / авт. : А. Д. Пе- ренков, Д. В. Новиков, С. Г. Фомина и др. Н. Новгород : Нижегор. гос. ун-т им. И. Н. Лобачевского, 2015. 44 с.

ПЦР в реальном времени / под. ред. Д. В. Ребрикова. М. : Бином, 2009. *Рябушкина Н. А*., *Омашева М. Е*., *Галиакпаров Н. Н.* Специфика вы- деления ДНК из растительных объектов // Биотехнология. Теория и прак-

тика. 2012. № 2. С. 9–26.

*Стручкова И. В*., *Кальясова Е. А.* Теоретические и практические основы проведения электрофореза белков в полиакриламидном геле : [электрон. учеб.-метод. пособие]. Н. Новгород : Нижегор. гос. ун-т, 2012. 60 с.

Учебно-методическое пособие к проведению лабораторных работ и контроля самостоятельной работы студентов по молекулярной биологии Академии биологии и биотехнологии ЮФУ / О. Ш. Карапетьян, Е. М. Веч- канов, И. А. Сорокина. Ростов н/Д : Изд-во ЮФУ, 2015. 116 с.

*Хлесткина Е. К.* Молекулярные маркеры в генетических исследова- ниях и в селекции // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2013. Т.17, № 4. С. 1044–1054.

*Хлесткина Е. К.* Молекулярные методы анализа структурно-функ- циональной организации генов и геномов высших растений // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2011. Т. 15, № 4. С. 757–768.

*Чесноков Ю. В.* RAPD-анализ коллекционных образцов дикой и куль- турной свеклы (*Beta* L.) // Сельскохозяйственная биология. 2013. № 3. С. 28–35.

Энциклопедия большой научной библиотеки : [сайт]. URL: http:// enc.sci-lib.com/article0001460.html (дата обращения: 03.10.2016).

*Beauchamp C. O.*, *Fridovich I.* Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // Anal. Biochem. 1971. Vol. 44. P. 276–287.

Bioinformatics center. Primer Machin // Birla Institute of Scientific Research : [сайт]. URL: <http://bioinfo.bisr.res.in/cgi-bin/project/primer/index.cgi> (дата обращения: 03.10.2016).

*Devey M. E*., *Bell J. S.*, *Smith D. N*. *et al.* A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD and microsatellite markers // Theor. Appl. Genet. 1996. Vol. 92. P. 673–679.

FindPatent.ru – патентный поиск, 2012–2017 : [сайт]. URL: http:// [www.findpatent.ru/patent/240/2405837.html](http://www.findpatent.ru/patent/240/2405837.html) (дата обращения: 06.11.2016). *Hunter R. L*., *Markert C. L.* Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoreses in starch gels // Science. 1957. Vol. 225.

P. 1294–1295.

*Laemmli U. K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. Vol. 277. P. 680–685.

*Maniatis T.*, *Sambrook J.*, *Fritsch E. F.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor : Laboratory Press, 1989. 321 p.

*Maxam A. M.*, *Gilbert W.* A new method of sequencing DNA // Proc. Natl.

Acad. Sci. USA. 1977. Vol. 74. P. 560–564.

*Metzker M. L.* Sequencing technologies – the next generation // Nat Rev Genet. 2010. Vol. 11. P. 31–46.

*Molnár I*., *KubalákováM*., *Šimková H*. *et al.* Chromosome isolation by flow sorting in *Aegilops umbellulata* and *Ae. comosa* and their allotetra- ploid hybrids *Ae. biuncialis* and *Ae. geniculata* // PLoS ONE. 2011.

*Oladosu Y.*, *Rafii M. Y*., *Abdullah N. et al.* Genetic variability and diversity of mutant rice revealed by quantitative traits and molecular markers // Agro- ciencia. 2015. Vol. 49, № 3. P. 249–266.

*Pauling L.*, *Itano H. A.*, *Singer S. J.*, *Wells I. C.* Sickle cell anemia: a mole- cular disease // Science. 1949. Vol. 110. P. 543–548.

*Saiki R. K*., *Gelfand D. H*., *Stoffel S*. *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a termostable DNA polymerase // Science. 1988. Vol. 239. P. 487–491.

*Sanger F*., *Nicklen S*., *Coulson A. R.* DNA sequencing with chain- terminating inhibitors // Proc. Nati. Acad. Sci. USA. 1977. Vol. 74, № 12. P. 5463–5467.

*Sanger F.*, *Coulson A. R.* A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase // J. Mol. Biol. 1975. Vol. 94. P. 444–448.

125

*Semerikov V. L.*, *Lascoux M.* Nuclear and cytoplasmic variation within and between Eurasian *Larix* species // Amer. J. Bot. 2003. Vol. 90. P. 1113–1123. Scitable by nature education. A collaborative learning space for science : [cайт]. URL: <http://www.cdfd.org.in/SILKSAT/index.php?f=protocol_ssr>(дата

обращения: 03.10.2016).

SilkSatdb. A silkworm microsatellite database : [сайт]. URL: http:// [www.cdfd.org.in/SILKSAT/index.php?f=silkbio](http://www.cdfd.org.in/SILKSAT/index.php?f=silkbio) (дата обращения: 03.10.2016). *Vos P.* AFLP: a new technique for DNA fingerprinting // Nucleic Acids

Research. 1995. Vol. 23. P. 4407–4414.

##### ГЛОССАРИЙ

**Аденин** – азотистое основание, аминопроизводное пурина (6-амино- пурин). Образует две водородные связи с урацилом и тимином (компле- ментарность).

**Аллемли** (от греч.  – друг друга, взаимно) – различные фор- мы одного и того же гена, расположенные в одинаковых участках (локу- сах) гомологичных хромосом и определяющие альтернативные вариан- ты развития одного и того же признака.

**Ампликон** (амплификат) – ПЦР-продукт, образующийся в процессе реакции.

**Амплификатор ДНК** (термоциклер) – прибор, необходимый для про- ведения полимеразной цепной реакции (ПЦР); позволяет задавать нуж- ное количество циклов и выбирать оптимальные временные и температур- ные параметры для каждой процедуры цикла.

**Амплификация** – увеличение числа копий генов (количества ДНК).

**Антикодон** – последовательность из трех нуклеотидов в молекуле транспортной РНК, комплементарная кодирующему триплету в молеку- ле мРНК.

**Банк (библиотека) генов** – полный набор генов данного организ- ма, полученный в составе рекомбинантных ДНК.

**Биополимеры** – класс полимеров, встречающихся в природе в есте- ственном виде. Входящие в состав живых организмов белки, нуклеино- вые кислоты, полисахариды, лигнин. Биополимеры состоят из одинако- вых (или схожих) звеньев-мономеров. Мономеры белков – аминокисло- ты, нуклеиновых кислот – нуклеотиды, полисахаридов – моносахариды.

**Блот-гибридизация** по Саузерну (саузерн-блоттинг) – метод иден- тификации участков ДНК, содержащих комплементарные ДНК-зонду последовательности, среди электрофоретически разделенных фрагмен- тов ДНК, фиксированных на твердом матриксе (нитроцеллюлозных или нейлоновых фильтрах).

**Блоттинг** – перенос молекул ДНК, РНК или белка из геля, в котором шел электрофорез, на фильтр (мембрану).

**Буферный раствор** – раствор, к которому можно добавить умерен- ное количество сильной кислоты или сильного основания без существен- ных изменений его рН (кислотности или щелочности). Обычно буфер- ные растворы состоят из смеси либо слабой кислоты с одной из ее солей, кислой и нормальной соли, либо двух солей кислот.

**Вектор** – самостоятельно реплицирующаяся молекула ДНК, способ- ная включать чужеродную ДНК (гены) и переносить ее в клетки, наслед- ственные свойства которых нужно изменить.

**Вектор для клонирования** – любая небольшая плазмида, фаг или ДНК-содержащий вирус животных, в которые может быть встроена чу- жеродная ДНК.

**Водородная связь** – химическая связь, образующаяся между неко- торыми молекулами, содержащими водород. Атом водорода должен быть связан с электроотрицательным (отталкивающим электроны) атомом; связь возникает между положительным зарядом атома водорода и отри- цательным зарядом атома в прилегающей молекуле. Водородная связь имеется в воде, а также во многих биологических системах.

**Гель** – твердая, часто студнеобразная коллоидная система, состоя- щая из жидкой дисперсионной среды, заключенной в пространствен- ную сетку, образованную соединившимися частицами дисперсной фазы; все плотные ткани организма по структуре представляют собой гели.

**Ген** – последовательность нуклеотидов в ДНК, которая кодирует оп- ределенную РНК.

**Генетический код** – соответствие между триплетами в ДНК (или РНК) и аминокислотами белков.

**Генная инженерия** – совокупность приемов, методов и технологий получения рекомбинантных РНК и ДНК, выделения генов из организма (клеток), осуществления манипуляций с генами и введения их в другие организмы.

**Геном** – общая генетическая информация, содержащаяся в генах ор- ганизма, или генетический состав клетки.

**Генотип** – 1) вся генетическая информация организма; 2) генети- ческая характеристика организма по одному или нескольким изучае- мым локусам.

**Ген-регулятор** – ген, кодирующий регуляторный белок, активирую- щий или подавляющий транскрипцию других генов.

**Ген-репортер** – ген, чей продукт определяется с помощью простых и чувствительных методов и чья активность в тестируемых клетках в нор- ме отсутствует. Используется в генно-инженерных конструкциях для под- тверждения наличия вектора.

**Ген-усилитель** (энхансер) – короткий сегмент ДНК, который влияет на уровень проявления (экспрессии) определенных генов, увеличивая час- тоту инициации и транскрипции.

**Гибридизация ДНК**, гибридизация нуклеиновых кислот – соедине- ние *in vitro* комплементарных одноцепочечных нуклеиновых кислот в одну молекулу. При полной комплементарности объединение происхо- дит легко и быстро, а в случае частичной некомплементарности слия- ние цепочек замедляется, что позволяет оценить степень комплементар- ности. Возможна гибридизация ДНК-ДНК и ДНК-РНК.

**Гуанин** – азотистое основание, аминопроизводное пурина (2-ами- но-6-оксопурин), является составной частью нуклеиновых кислот. В ДНК при репликации и транскрипции образует три водородные связи с цито- зином (комплементарность). Впервые выделен из гуано.

**ДНК-дактилоскопия** или геномная дактилоскопия – система науч- ных методов биологической идентификации индивидуумов (организ- мов) на основе уникальности последовательности чередования нуклео- тидов в цепочке ДНК каждого живого существа (за исключением однояй- цевых близнецов), своеобразного «генетического отпечатка», остающегося индивидуальным и неизменным на протяжении всей жизни индивидуу- ма (организма)

**Делеции** (от лат. *deletio* – уничтожение) – хромосомные перестрой- ки, при которых происходит потеря участка хромосомы. Делеция может быть следствием разрыва хромосомы или результатом неравного крос- синговера. По положению утерянного участка хромосомы делеции клас- сифицируют на внутренние (интерстициальные) и концевые (терми- нальные).

**Денатурация** (лат. *denaturatus*: *de*- – приставка, означающая отделе- ние, удаление и *nature* – природа, естество) – лишение естественных свойств. Денатурация биополимеров – изменение структуры их молекул, приводящее к потере их естественных свойств.

**ДНК-фингерпринтирование**, DNA fingerprinting, DNA fingerprint technique (от англ. *finger* – палец и *print* – печать, оттиск, отпечаток) –

метод создания генетических «отпечатков пальцев», основанный на ана- лизе полиморфизма ДНК.

**ДНК-полимераза** – фермент, участвующий в репликации ДНК. Фер- менты этого класса катализируют полимеризацию дезоксирибонуклео- тидов вдоль цепочки нуклеотидов ДНК, которую фермент «читает» и ис- пользует в качестве шаблона. Тип нового нуклеотида определяется по прин- ципу комплементарности с шаблоном, с которого ведется считывание. Собираемая молекула комплементарна шаблонной моноспирали и иден- тична второму компоненту двойной спирали. Выделяют ДНК-зависимую ДНК-полимеразу (КФ 2.7.7.7), использующую в качестве матрицы одну из цепей ДНК, и РНК-зависимую ДНК-полимеразу (другое название – об- ратная транскриптаза, КФ 2.7.7.49), способную также к считыванию ин- формации с РНК (обратная транскрипция). ДНК-полимеразу считают хо- лоферментом, поскольку для нормального функционирования она тре- бует присутствия ионов магния в качестве кофактора. В отсутствие ионов магния о ней можно говорить как об апоферментe. ДНК-полимераза на- чинает репликацию ДНК, связываясь с отрезком цепи нуклеотидов. Сред- нее количество нуклеотидов, присоединяемое ДНК-полимеразой за один акт связывания/диссоциации с матрицей, называют процессивностью.

**Гены «домашнего хозяйства»** (англ. *housekeeping genes*) – это гены, необходимые для поддержания важнейших жизненных функций орга- низма, которые экспрессируются практически во всех тканях и клетках на относительно постоянном уровне. Гены домашнего хозяйства функ- ционируют повсеместно, на всех стадиях жизненного цикла организма. Основной функцией данных генов в организме является обеспечение про- цессов репликации (удвоения) ДНК, транскрипции, трансляции, анаболиз- ма и катаболизма (гликолиз, цикл Кребса, глюконеогенез, расщепление белков, жиров и углеводов, биосинтез аминокислот и нуклеотидов и др.).

**Зональный электрофорез** – электрофорез, проводящийся при по- стоянном (неизменяющемся) значении рН буферного раствора, запол- няющего данный носитель (бумагу, гель и др.). Исследуемый образец на- носится пятном или тонким слоем на носитель, по которому и перемеща- ется в электрическом поле.

**Зонд генетический** – короткий отрезок ДНК или РНК известной струк- туры или функции, меченный каким-либо радиоактивным или флуорес- центным соединением.

**Изменчивость** – вариабельность (разнообразие) признаков среди пред- ставителей данного вида.

**Индуктор** – фактор (вещество, свет, теплота), вызывающий транскрип- цию генов, находящихся в неактивном состоянии.

**Интеграза** – фермент, осуществляющий внедрение какого-либо гене- тического элемента в геном через специфический сайт.

**Интрон** – некодирующий участок гена, который транскрибируется, а затем удаляется из предшественника мРНК при ее редактировании – сплайсинге.

**Ионная сила раствора** – мера интенсивности электрического поля, создаваемого ионами в растворе. Полусумма произведений из концент- рации всех ионов в растворе на квадрат их заряда.

**Кассета экспрессионная** – фрагмент ДНК, содержащий все необхо- димые генетические элементы для экспрессии внедренного в него гена.

**кДНК** – однонитевая ДНК, синтезируемая *in vivo* по матрице РНК с помощью обратной транскриптазы.

**Кодон** – тройка расположенных подряд нуклеотидных остатков в ДНК или РНК, кодирующая определенную аминокислоту или являющаяся сиг- налом окончания трансляции.

**Комплементарность** (в генетике) – свойство азотистых оснований об- разовывать с помощью водородных связей парные комплексы аденин- тимин (или урацил) и гуанин-цитозин при взаимодействии цепей нук- леиновых кислот.

**Контиг** – в секвенировании группа из нескольких последовательно соединенных участков ДНК.

**Лигаза** – фермент, образующий фосфодиэфирную связь между дву- мя полинуклеотидами.

**Лизис** – распад клетки, вызванный разрушением ее оболочки.

**Линкер** – короткий синтетический олигонуклеотид, применяемый для соединения фрагментов ДНК *in vitro*; обычно содержит участок узна- вания определенной рестриктазой.

**Липкие концы** – комплементарные однонитевые участки ДНК, рас- положенные на концах молекул ДНК.

**Локус** – участок ДНК (хромосомы), где расположена определенная генетическая детерминанта.

**Маркерный ген** – ген в рекомбинантной ДНК, кодирующий селек- тивный признак.

**Матричная рибонуклеиновая кислота** (мРНК, синоним – информа- ционная РНК, иРНК) – РНК, содержащая информацию о первичной структуре (аминокислотной последовательности) белков.

**Метилазы, метилтрансферазы** – ферменты, присоединяющие ме- тильную группу (–CH3) к определенным азотистым основаниям в ДНК, РНК и к определенным аминокислотным остаткам белков.

**Микросателлиты** (или простые короткие повторы) – варьирую- щие участки (локусы) в ядерной ДНК и ДНК органелл (митохондрий и пластид), состоящие из повторяющихся фрагментов длиной от 1 до 6 пар оснований.

**Мобильные генетические элементы** – последовательности ДНК, ко- торые могут перемещаться внутри генома.

**Молекулярная биология** – комплекс биологических наук, изучаю- щих механизмы хранения, передачи и реализации генетической инфор- мации, строение и функции нерегулярных биополимеров (белков и нуклеи- новых кислот).

**Молекулярная масса** – сумма масс атомов, входящих в состав данной молекулы; выражается в атомных единицах массы (а. е. м.).

**Мутация** – стойкое (т. е. такое, которое может быть унаследовано потомками данной клетки или организма) преобразование генотипа, происходящее под влиянием внешней или внутренней среды.

**Наследственность** – способность организмов передавать свои при- знаки и особенности развития потомству.

**Нуклеазы** – большая группа ферментов, гидролизующих фосфоди- эфирную связь между субъединицами нуклеиновых кислот. Различают несколько типов нуклеаз в зависимости от их специфичности: экзонуклеа- зы и эндонуклеазы, рибонуклеазы и дезоксирибонуклеазы (катализируют гидролиз связей между нуклеотидами только в ДНК), рестриктазы и неко- торые другие.

**Обратная транскриптаза** (также известная как ревертаза или РНК-за- висимая ДНК-полимераза) – фермент, катализирующий синтез ДНК на мат- рице РНК в процессе, называемом обратной транскрипцией. Называется так потому, что большинство процессов транскрипции в живых организмах происходит в другом направлении, а именно с молекулы ДНК синтези- руется РНК-транскрипт.

**Олигонуклеотид** – короткий фрагмент ДНК или РНК, получаемый либо путем химического синтеза, либо расщеплением более длинных по- линуклеотидов. Используются в качестве зондов или праймеров.

**Оператор** – это последовательность нуклеотидов ДНК, с которой свя- зывается регуляторный белок-репрессор или активатор. Оператор нахо- дится между промотором и структурными генами. Он может быть связан с особым белком-репрессором, который не дает двигаться РНК-полиме- разе по цепи ДНК и препятствует синтезу ферментов. Таким образом, гены могут включаться и выключаться в зависимости от наличия в клетке со- ответствующих белков-репрессоров.

**Оперон** – функциональная единица генома у прокариот, в состав ко- торой входят цистроны (гены, единицы транскрипции), кодирующие сов- местно или последовательно работающие белки и объединенные под од- ним (или несколькими) промоторами. Опероны по количеству цистронов делят на моно-, олиго- и полицистронные, содержащие соответственно только один, несколько или много цистронов (генов). Характерными при- мерами оперонной организации генома прокариот являются лактозный опе- рон, триптофановый, пиримидиновый и *bgl* опероны у *Escherichia coli.* На- чинается и заканчивается оперон регуляторными областями – промотором в начале и терминатором в конце, кроме этого каждый отдельный цистрон может иметь в своей структуре собственный промотор и/или терминатор.

**Плазмиды** – это двуцепочечные ДНК-молекулы, которые существу- ют в клетках независимо от генома и способные реплицироваться авто- номно. Иногда плазмиды могут встраиваться в состав генома клетки-хо- зяина. Плазмиды были найдены в клетках представителей всех трех вет- вей живого мира: *Archea*, *Bacteria*, *Eukarya.*

**Полилинкер** – короткая искусственная нуклеотидная последова- тельность, содержащая несколько уникальных перекрывающихся сайтов узнавания для рестрикционных эндонуклеаз. Вводится в состав клони- рующего вектора для встраивания в него чужеродных фрагментов ДНК.

**Полимераза** – фермент, главной биологической функцией которого является синтез полимеров нуклеиновых кислот. ДНК-полимераза и РНК- полимераза синтезируют молекулы ДНК и РНК соответственно, в основ- ном путем комплементарного копирования родительских цепей ДНК или РНК.

**Праймер** – это короткий фрагмент нуклеиновой кислоты (олигонук- леотид), комплементарный ДНК- или РНК-мишени, служит затравкой

для синтеза комплементарной цепи с помощью ДНК-полимеразы (при реп- ликации ДНК). Затравка необходима ДНК-полимеразам для инициации синтеза новой цепи, с 3*'*-конца (гидроксильной группы) праймера. ДНК-по- лимераза последовательно добавляет к 3*'*-концу праймера нуклеотиды, комплементарные матричной цепи.

**Промотор** – в генетике это последовательность нуклеотидов ДНК, узнаваемая РНК-полимеразой как стартовая площадка для начала специ- фической, или осмысленной, транскрипции. У прокариот промотор вклю- чает ряд мотивов, важных для узнавания его РНК-полимеразой. Промотор асимметричен, что позволяет РНК-полимеразе начать транскрипцию в правильном направлении и указывает на то, какая из двух цепей ДНК будет служить матрицей для синтеза РНК.

**Процессинг РНК** (посттранскрипционные модификации РНК) – со- вокупность процессов в клетках эукариот, которые приводят к превраще- нию первичного транскрипта в зрелую РНК. В зависимости от типа РНК (матричные, рибосомные, транспортные, малые ядерные) их предшествен- ники подвергаются разным последовательным модификациям. Напри- мер, предшественники матричных РНК подвергаются кэпированию, сплай- сингу, полиаденилированию, метилированию и иногда редактированию. Процессинг – это процесс превращения транскрипта (пре-иРНК, получен- ной при транскрипции) в зрелую иРНК, пригодную для трансляции. Стадии процессинга: 1) кэпирование: к 5*'*-концу транскрипта присоединяется кэп (англ. «шапочка»), состоящая из модифицированного гуанина; 2) полиаде- нирование: к 3*'*-концу транскрипта присоединяется от 100 до 200 адени- новых нуклеотидов; 3) сплайсинг – это процесс вырезания из транскрипта нужных участков и склеивания их между собой. У эукариот из транскрипта выбрасывается в среднем 5/6 длины.

**Регулон** – система генов, разбросанных по всему геному, но подчиняю- щихся общему регуляторному белку.

**Рекомбинантная ДНК** – ДНК, образованные объединением *in vitro* (в пробирке) двух или более фрагментов ДНК, выделенных из различных биологических источников. Ключевыми в этом определении являются слова «фрагмент ДНК» и «объединение *in vitro*», что указывает на сущ- ность генетической инженерии и ее отличие от всех остальных методов получения гибридных (или химерных) организмов, таких как генетическая селекция, эмбриональная инженерия и т. д. Фрагменты ДНК, в том числе и фрагменты, содержащие гены, получают с использованием ферментов рестриктаз. Рестриктазы могут образовывать фрагменты как с тупыми,

так и с липкими концами. Сшивка фрагментов ДНК производится тремя основными методами, зависящими от того, какие концы имеют фрагмен- ты сшиваемых ДНК. Рекомбинантная ДНК-молекула ДНК получена в ре- зультате объединения *in vitro* чужеродных (в природе никогда вместе не существующих) фрагментов ДНК с использованием методов генной инженерии.

**Рекомбинация** *in vitro* (in vitro recombination) (лат. *re*- – приставка, обозначающая повторность действия или противоположное действие и *combinatio* – соединение; лат. *in vitro* – в пробирке) – приемы, исполь- зуемые в генной инженерии, заключающиеся в искусственных операци- ях *in vitro*, которые приводят к созданию новых рекомбинантных моле- кул ДНК.

**Ренатурация** – обратный переход молекулы биополимера, например, белка или нуклеиновой кислоты, из денатурированного (неактивного) состояния в нативное (биологически активное).

**Репликон** – молекула или участок ДНК или РНК, реплицирующийся из одной точки начала репликации.

**Репрессор** – регуляторный белок, подавляющий транскрипцию ге- нов регулируемого им оперона в результате связывания с оператором.

**Рестриктазы** (от лат. *restrictio* – ограничение) – группа ферментов, относящихся к классу гидролаз, катализирующих реакцию гидролиза нуклеиновых кислот.

**Рестрикционная карта** – линейное изображение последовательнос- ти ДНК, которое показывает расположение сайтов узнавания специфи- ческих рестрикционных ферментов.

**Рестрикционный анализ** – установление мест расщепления одной или несколькими рестриктазами конкретной нуклеотидной последова- тельности ДНК.

**Рибонуклеазы** – ферменты класса гидролаз, катализирующие гид- ролиз фосфодиэфирных связей между нуклеозидами в РНК.

**Водородный показатель**, pH – мера активности (в очень разбавлен- ных растворах она эквивалентна концентрации) ионов водорода в раство- ре, количественно выражающая его кислотность.

**Сайт рестрикции** (участок узнавания) – короткая последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК, которая распознается ферментом эндонук-

леазой рестрикции-модификации (рестриктазой). Рестриктаза связывается с молекулой ДНК в точке расположения сайта рестрикции и перерезает цепочку нуклеотидов внутри сайта или в непосредственной близости от него.

Ферменты рестрикции выработаны бактериями в процессе эволюции с целью разрушения чужеродной ДНК, способной проникнуть внутрь клет- ки и вызвать ее трансформацию. Размер сайта рестрикции различных рестриктаз составляет, как правило, 4–6 нуклеотидов. Сайты рестрикции в ДНК самой бактерии замаскированы посредством метилирования ос- татков А и С.

**Секвенирование биополимеров** (белков и нуклеиновых кислот – ДНК и РНК) – определение их аминокислотной или нуклеотидной после- довательности. В результате секвенирования получают формальное опи- сание первичной структуры линейной макромолекулы в виде последо- вательности мономеров в текстовом виде. Размеры секвенируемых участ- ков ДНК обычно не превышают 100 пар нуклеотидов (next-generation sequencing) и 1000 пар нуклеотидов при секвенировании по Сэнгеру.

**Спейсер** (ДНК-спейсер) — нетранскрибируемая последовательность ДНК между тандемно повторяющимися генами, как, например, в рРНК у эукариот.

**Сплайсинг** – процесс вырезания определенных нуклеотидных по- следовательностей из молекул РНК и соединения последовательностей, сохраняющихся в «зрелой» молекуле, в ходе процессинга РНК.

**Тимин** (5-метилурацил) – производное пиримидина, одно из пяти азо- тистых оснований. Присутствует во всех живых организмах, где вместе с дезоксирибозой входит в состав нуклеозида тимидина, который может фосфорилироваться 1–3 остатками фосфорной кислоты с образованием нуклеотидов тимидинмоно (ди-, три-) фосфорной кислоты (ТМФ, ТДФ и ТТФ). Дезоксирибонуклеотиды тимина входят в состав ДНК, в РНК на его месте располагается рибонуклеотид урацила. Тимин комплементарен аденину, образуя с ним 2 водородные связи.

**Транскрипция** – процесс синтеза РНК с использованием ДНК в ка- честве матрицы, происходящий во всех живых клетках. Другими словами, это перенос генетической информации с ДНК на РНК.

**Транскрипт** – молекула РНК, образующаяся в результате транскрип- ции (экспрессии соответствующего гена или участка ДНК). Примерами транскриптов являются: мРНК, рРНК, тРНК, малые РНК.

**Обратная транскриптаза** (также известная как ревертаза или РНК-за- висимая ДНК-полимераза) – фермент, катализирующий синтез ДНК на мат- рице РНК в процессе, называемом обратной транскрипцией.

**Трансляция** – процесс синтеза белка из аминокислот на матрице информационной (матричной) РНК (иРНК, мРНК), осуществляемый рибосомой.

**Транспозоны** – это участки ДНК организмов, способные к передви- жению (транспозиции) и размножению в пределах генома. Транспозоны также известны под названием «прыгающие гены» и являются примера- ми мобильных генетических элементов.

**Ультрафиолетовое излучение** – электромагнитное излучение, зани- мающее спектральный диапазон между видимым и рентгеновским излу- чениями. Длины волн УФ-излучения лежат в интервале от 10 до 400 нм.

**Цитозин** – азотистое основание, производное пиримидина. С рибо- зой образует нуклеозид цитидин, входит в состав нуклеотидов ДНК и РНК. Во время репликации и транскрипции по принципу комплементарности образует три водородные связи с гуанином.

**Экзон** – участок гена (ДНК) эукариот, несущий генетическую ин- формацию, кодирующую синтез продукта гена (белка). Соответствующие экзону участки ДНК, в отличие от интронов, полностью представлены в молекуле информационной РНК, кодирующей первичную структуру белка.

**Экзонуклеазы** – белки из группы нуклеаз, отщепляющие концевые мононуклеотиды от полинуклеотидной цепи путем гидролиза фосфо- диэфирных связей между нуклеотидами.

**Экспрессия генов** – это процесс, в ходе которого наследственная информация от гена (последовательности нуклеотидов ДНК) преобразу- ется в функциональный продукт – РНК или белок.

**Электрофорез** – это движение заряженных частиц в растворе под дей- ствием электрического поля.

**Электрофореграмма** – картина, полученная после разделения слож- ной смеси с помощью электрофореза и специфического проявления.

**Электрофоретическая подвижность** (*u*) данной молекулы – это ско- рость движения заряженной молекулы (выражаемая в см/ч) в электри- ческом поле с напряженностью 1 В/см. Изоэлектрическая точка – такое

значение рН среды (обозначаемое как р*I*), при котором положительные и отрицательные заряды ионизированных групп скомпенсированы, по- этому заряд всей белковой молекулы равен нулю.

137

**Эндонуклеазы** – белки из группы нуклеаз, расщепляющие фосфо- диэфирные связи в середине полинуклеотидной цепи.

##### УЧЕБНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

1. **RealTime амплификатор многофункциональный CFX96 Touch, BioRad (США).** Предназначен для проведения ПЦР в реальном времени. Позволяет проводить мультиплексный анализ до 5 мишеней в 96 пробах одновременно.
2. **Амплификатор T100 1861096, BioRad (США).** Прибор для про- ведения ПЦР. Функция температурного градиента. Нагреваемая крышка с автоматической регулировкой высоты. 96-луночный формат реакцион- ного блока.
3. **ПЦР-бокс BS UV-Cleanerbox BioSan (Латвия).** Предназначен для организации изолированного от внешней среды пространства в ПЦР-лабораториях. Две УФ-лампы (15 Вт) дезинфицируют рабочий объем бокса в течение 15–30 мин. Боксы оснащены бактерицидными проточ- ными рециркуляторами воздуха, обеспечивающими постоянное обезза- раживание внутри бокса во время работы. Эффективность работы более 99 % за цикл.
4. **Электрофорезная горизонтальная камера Sub-Cell Model 192, 25  25, 26 и 51 лунка, 1,5 мм, заливочный столик, Bio-Rad (США).** При- меняется для горизонтального электрофореза ДНК. Можно работать с ге- лями длиной до 25 см. При такой длине гелей возможно использовать 4 или более 51-луночных гребенок и одновременно анализировать образцы с двух 96-луночных планшетов. Имеются порты для рециркуляции буфе- ров для Southern и Northern анализа. УФ-прозрачная подложка для геля снабжена флуоресцентной линейкой; гель можно заливать как непосред- ственно на подложке с использованием наклонных заслонок, так и с по- мощью заливочного столика; возможно использование подложек различ- ной длины.
5. **Электрофорезная горизонтальная камера Sub-Cell GT Cell, 15  20 см, 15 и 20 лунок, 1,5 мм, заливочный столик, Bio-Rad (США).** Для разделения до 120 образцов. УФ-прозрачная подложка для геля снаб- жена флуоресцентной линейкой; гель можно заливать как непосредствен- но на подложке с использованием наклонных заслонок, так и с помощью заливочного столика; возможно использование подложек различной длины.
6. **Источник питания PowerPac Basic 10–300 В, 4–400 мА.** Предна- значен для создания тока определенной силы и напряжения и подключе- ния одной или нескольких камер для электрофореза фрагментов ДНК или белков, а также для подключения горизонтальной камеры Sub-Cell GT Cell.
7. **Источник питания для электрофореза Power Pac Power Supply Universal 10–2500 мА, 10–500 В, 1–500 Вт.** Проведение вертикального и горизонтального фореза, блоттинг. Предназначен для подключения го- ризонтальной камеры Sub-Cell Model 192.
8. **Система гель-документирования GelDoc XR Plus BioRad 1708195.** Используется для получения, сохранения и анализа изображения гелей. Области применения системы: детекция нуклеиновых кислот, вестерн- блоттинг, 2-D электрофорез, дот-блоттинг, денситометрия, подсчет числа колоний. Комплект поставки включает CCD-камеру, трансиллюминатор (УФ-свет и видимый свет), защитный колпак («темную комнату»), фильтр EtBR/SYBR Geen BP, защиту от УФ-излучения, источник питания, FireWire- карту для компьютера, комплект кабелей для коммутации и оригиналь- ный софт Quantity One.
9. **Центрифуга Eppendorf 5804** (в комплекте 4 ротора: для микропроби- рок, луночных планшетов, стрипов и пробирок). Предназначена для раз- деления жидкостей разных удельных плотностей и отделения жидкости от осадка. Может использоваться при выделении ДНК, на разных стадиях ДНК-анализа, при анализе белков. Максимальная скорость – до 14 тыс. об/мин (до 20 800 g); максимальная вместимость – 6  85 мл, 4  100 мл; тип емкос- тей – до 100 мл, планшеты, стрипы, предметные стекла; встроенный кон- денсатоотводчик; функция «FastTemp»; сохранение в памяти до 35 программ; 10 режимов разгона и торможения для защиты чувствительных образцов; автоматическое отключение при дисбалансе. Все роторы и аксессуары автоклавируются (121 °С, 20 мин).
10. **Центрифуга MiniSpin Plus с дополнительным ротором для стри- пов.** Предназначена для разделения жидкостей разных удельных плот- ностей и отделения жидкости от осадка. Используется при небольших объемах работы. Для микропробирок 121,5/2,0 мл, «Элпендорф». Вмес- тимость – 12  1,5/2,0 мл; максимальное ускорение – до 14 тыс. об/мин (до 14 100 g).
11. **Микроцентрифуга вортекс «Микроспин» FV-2400, BioSan (Латвия).** Предназначена для перемешивания образцов, реактивов и прай- меров. FV-2400 является центрифугой «открытого типа» (без крышки), что

повышает скорость проведения операций центрифугирования и ресуспен- дирования. Обеспечивает возможность одновременного перемешивания и разделения образцов за счет модулей центрифугирования и переме- шивания, выполненных единым блоком. Постоянная скорость вращения – 2400 об/мин. Два режима работы – непрерывный и импульсный. Формат роторов – 0,2/0,5/1,5 мл.

1. **Твердотельный термостат «Термит» (Россия).** Термостат «Тер- мит» представляет собой твердотельный термостат для научных и клини- ко-диагностических исследований, рассчитанный на использование про- бирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл и 0,5 мл. Необходим для про- цедур, связанных с нагревом образцов, например, при выделении ДНК. Технические характеристики: число пробирок «Эппендорф» объемом 1,5 мл – 40 шт., 0,5 мл – 28 шт.; диапазон рабочих температур – от окру- жающей до 99 °С; отсчет времени – от 1 до 99 мин; точность поддержания температуры ± 1,0 °C; дискретность задания температуры – 1,0 °C.
2. **Весы OHAUS AV 264 C** (260 г, цена деления – 0,1 мг, ветрозащита, автокалибровка). Аналитические весы, используемые для точного взве- шивания небольших количеств образцов или химических веществ.
3. **Весы OHAUS портативные SPS 202F** (цена деления – 200 г, 0,01 г ). Относятся к простым весам. Модели до 600 г комплектуются калибровочной гирей. 6 моделей с НПВ от 210 до 6000 г и дискретностью от 0,01 до 1 г.
4. **Морозильник LGUex 1500, –26 °С, вертикальный, 139 л, Liebherr (Австрия).** Предназначен для хранения образцов ДНК, праймеров, реак- тивов, ферментов. Температурный диапазон – от –9 °С до –26 °С.

У ч е б н о е и з д а н и е

Кутлунина Наталья Анатольевна Ермошин Александр Анатольевич

# МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ИССЛЕДОВАНИИ РАСТЕНИЙ

Учебно-методическое пособие

Заведующий редакцией *М. А. Овечкина* Редактор *Н. В. Чапаева* Корректор *Н. В. Чапаева*

Компьютерная верстка *Г. Б. Головина*

Подписано в печать 20.09.17. Формат 6084/16.

Бумага офсетная. Цифровая печать.

Уч.-изд. л. 7,5. Усл. печ. л. 8,37. Тираж 50 экз. Заказ 131.

Издательство Уральского университета Редакционно-издательский отдел ИПЦ УрФУ 620083, Екатеринбург, ул. Тургенева, 4

Тел.: +7 (343) 389-94-79, 350-43-28

E-mail: [rio.marina.ovechkina@mail.ru](mailto:rio.marina.ovechkina@mail.ru)

Отпечатано в Издательско-полиграфическом центре УрФУ 620083, Екатеринбург, ул. Тургенева, 4

Тел.: +7 (343) 358-93-06, 350-58-20, 350-90-13

Факс: +7 (343) 358-93-06

[http://print.urfu.ru](http://print.urfu.ru/)

Для заметок

Для заметок

