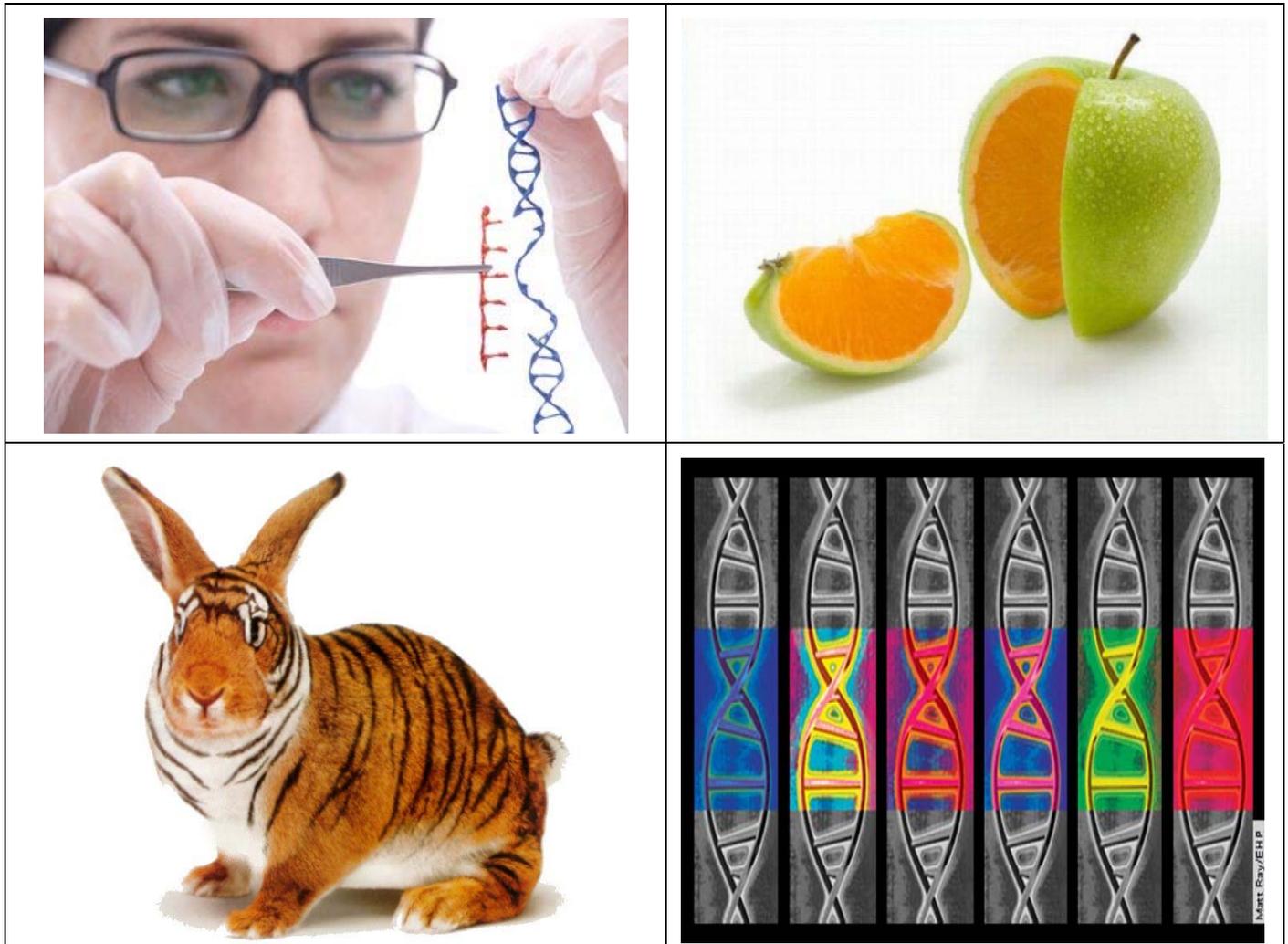


ОСНОВЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ



Лабораторный практикум

Ижевск 2012

Министерство Образования и Науки Российской Федерации
ФГБОУ ВПО «Удмуртский Государственный Университет»
Кафедра Биохимии и Биотехнологии

О.В. Шлык-Кернер

Основы генетической инженерии

Лабораторный практикум

Ижевск 2012

УДК 008.001 (075)
ББК 79.0 я 7

Рекомендовано к изданию Учебно-методическим советом УдГУ

Рецензент: доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биологии и экологии ИГМА **В.А. Глумова**

Шлык-Кернер О.В.

Основы генетической инженерии: лабораторный практикум. Ижевск: Издательство «Удмуртский университет», 2012. 56с.

Данное практическое руководство включает различные методики, применяющиеся в генетической инженерии – одной из основных техник в экспериментальной и практической молекулярной биологии. В практикуме приводятся информация о технике проведения работ и прописи методик в логическом порядке, который необходим для понимания практической молекулярной биологии.

Лабораторный практикум адресован преподавателям и студентам специалитета, бакалавриата и магистратуры биолого-химического факультета и факультета медицинской биотехнологии при изучении дисциплин «Молекулярная биология», «Молекулярная биотехнология» и «Молекулярная биология клетки». Также этот лабораторный практикум может быть рекомендован учителям школ для обучения старшеклассников.

О.В. Шлык-Кернер, 2012
ФГБОУ ВПО «Удмуртский государственный университет», 2012

Содержание

Предисловие.....	5
Введение.....	6
Основы лабораторной работы.....	8
Работа 1. Размножение бактериальных штаммов и обращение с ними.....	11
Работа 2. Выделение геномной ДНК из лука.....	14
Работа 3. Очистка нуклеиновых кислот.....	18
Работа 4. Полимеразная цепная реакция.....	22
Работа 5. Гель-электрофорез.....	26
Работа 6. Рестриктный анализ ДНК.....	31
Работа 7. Реакция дефосфорилирования.....	34
Работа 8. Проведение реакции лигирования ДНК.....	36
Работа 9. Трансформация бактерий <i>E. coli</i> плазмидной ДНК.....	39
Работа 10. Выделение плазмидной ДНК.....	43
Краткий словарь.....	47
Список рекомендованной литературы.....	49
Тестовое задание для самоконтроля по дисциплине молекулярная биология.....	50

Предисловие

Достижения современной биологии, которая стала междисциплинарной наукой, привели к формированию физико-химической биологии и комплекса новейших направлений биотехнологии. Открытия в биологии влияют на многие сферы человеческой деятельности и все в большей степени становятся востребованными и способными решать ключевые проблемы жизнеобеспечения человека. Кроме того, биотехнология обеспечивает управляемое получение полезных продуктов для различных сфер человеческой деятельности, базируясь на ферментативных, клеточных и других системах различной степени организации и сложности. Эти достижения биологии и особенно биотехнологии не возможны без знаний методов генной инженерии. Генетическая инженерия, как известно, – высокотехнологичный процесс, основанный на фундаментальных научных знаниях и требующий высококвалифицированных кадров и мощной научно-технической базы. Поэтому будущим специалистам в качестве основы для проведения исследований в области генетической инженерии необходимо иметь теоретическое представление об основных этапах генного клонирования.

Более того, сегодня важнейшими требованиями к подготовке специалистов в области естествознания является овладение практическими навыками. Знание теоретической молекулярной биологии в наше время является недостаточным условием для проведения научных исследований, для работы в клинических лабораториях и на биотехнологических производствах. В связи с этим, появилась потребность в написании данного практического руководства. Лабораторный практикум предназначен, прежде всего, для студентов биологов и биотехнологов, слушающих курс лекций по молекулярной биологии, а также для преподавателей читающих курсы, связанные с молекулярной биологией. Практикум может быть рекомендован учителям старших классов лицеев и гимназий для демонстрации опытов по выделению генетического материала из клеток разных организмов. Данное практическое руководство включает различные методики, применяющиеся в генной инженерии, в частности, технологии рекомбинантных ДНК – одной из основных техник в экспериментальной и практической молекулярной биологии, которая используется рутинно во многих лабораториях мира.

Пособие организовано таким образом, чтобы легко было понять логику технологии генного клонирования (генетической инженерии). В начале пособия даётся введение, в котором приводится краткое описание и схема техники генного клонирования. В первом разделе, который называется «Основы лабораторной работы», приводится вводный материал, включающий в себя правила работы в биологической лаборатории. Далее все разделы руководства подразделены на темы и занятия, построенные по единому принципу. В каждом разделе пособия сначала приводится введение, позволяющее студентам получить основные представления о предмете. Затем ставятся задачи работы, приводятся необходимые материалы и оборудование, и дается пропись самой методики. В практикуме приводится информация о технике проведения работ и прописи методик в логическом порядке, который необходим студентам, начинающим постигать столь сложную и интересную науку. Материал, излагаемый в пособии, дополнен цветными иллюстрациями, что делает его более понятным и доступным. Для удобства уважаемых читателей перед списком литературы, приводится краткий словарь терминов, упоминающихся в практикуме, позволяющий расширить знания по техникам молекулярной биологии. Более того, в тексте работ, встречаются ссылки на интересные факты с использованием методов генной инженерии. В конце лабораторного практикума приводится тест для самоконтроля по лекционным курсам молекулярной биологии.

Надеюсь, что этот практикум поможет Вам в понимании молекулярной биологии и пробудит интерес к экспериментальной работе на молекулярном уровне.

Введение

Молекулярная биология – отрасль науки, исследующая жизнь на молекулярном уровне. Она находится в тесном сотрудничестве с другими областями биологии и химии, особенно генетикой и биохимией. Молекулярная биология в основном изучает взаимодействия между различными системами клетки, включая взаимодействия между ДНК, РНК и биосинтезом белка, а так же механизмы регуляции этих взаимодействий. Исследователи в молекулярной биологии используют определенный набор методов и техник, позволяющих изучать молекулярные взаимодействия не только на качественном, но и количественном уровне.

Одним из самых основных методов молекулярной биологии, является техника рекомбинантных ДНК (молекулярное клонирование). Генетическая инженерия – перспективное направление современной молекулярной биологии, имеющее большое научное и практическое значение и лежащее в основе современной биотехнологии. С помощью этой техники фрагменты ДНК, кодирующие интересующие нас белки, вводят в быстро реплицирующиеся генетические элементы (плазмиды или вирусы). Полученные в результате генетических манипуляций рекомбинантные ДНК (векторы) могут быть перенесены в бактериальные клетки (трансформация) или в клетки животных (трансфекция). Следует отметить, что клонирование молекул стало возможным благодаря открытию целой серии ферментов, оказавшихся незаменимыми инструментами для манипулирования генами. Тем более что практически полностью отсутствуют химические методы, позволяющие получать, модифицировать и амплифицировать молекулы ДНК, представляющие интерес для молекулярного биолога.

С конца 1950-ых до начала 1960-ых, молекулярные биологи научились характеризовать, изолировать, и управлять молекулярными компонентами клеток и организмов. Эти компоненты включают: ДНК – хранителя генетической информации; РНК – близкого родственника ДНК, функции которой колеблются от существования в качестве временной рабочей копии ДНК до, фактически, самостоятельного фермента, а так же компонента аппарата трансляции белков; белки – как главный структурный и функциональный тип клеточных молекул.

Формальной датой рождения генной инженерии считают 1972 г., когда группа П. Берга в США создали первую рекомбинантную молекулу ДНК (*рекДНК*), объединившую в своем составе генетический материал из трех источников: полный геном онкогенного вируса обезьян *SV40*, часть генома умеренного бактериофага λ и гены лактозного оперона *E. coli*. Сконструированная рекомбинантная молекула не была исследована функционально, т.к. у авторов этой работы возникли опасения, что методы генетической инженерии могут привести к возникновению микроорганизмов, опасных для здоровья человека, например, бактерий *E. coli*, способных перенести онкогенные вирусы в кишечник человека. Поэтому международным научным сообществом было принято решение проводить такие исследования под строжайшим контролем со стороны государства.

Любой ген и продукты его экспрессии (РНК и белки) стали доступны для исследования структуры и функций; появилась возможность исследовать гигантские геномы высших организмов и целенаправленно изменять их структуру. В практическом отношении стало возможным направленное создание организмов с новыми (в том числе не встречающимися в природе) комбинациями наследственных свойств, что трудно (или невозможно) сделать обычными методами – гибридизацией, мутагенезом и др. Основными задачами, стоящими перед генетической инженерией сегодня, являются борьба с болезнями и производство продовольствия. Методы генетической инженерии стали незаменимыми в фармакологии. Они позволили получать ценные лекарственные препараты, используя живые организмы в качестве биореакторов. Генно-инженерные методы находят все более широкое применение в медицине, став основой генотерапии (лечения генами), помогающей излечивать многие наследственные заболевания.

В работах по генетической инженерии используются как методы классической генетики, так и самые современные более тонкие методы молекулярной генетики (такие как выделение и идентификация генов, их секвенирование, картирование, химический и ферментативный синтез, ПЦР-анализ, блот-гибридизация, генный нокаут, генная дактилоскопия и др.).

Для понимания этапов генетической инженерии нужно сначала понять картину технологии в целом (рис. 1).

Основными этапами генной инженерии являются следующие:

1. Получение нужного гена (трансгена), намеченного для переноса. Ген может быть выделен из естественных источников (из подходящего генома организма) или геномной библиотеки. Он может быть синтезирован искусственно: химическим путем (по имеющейся последовательности нуклеотидов) или ферментативным путем с использованием механизма обратной транскрипции (синтез кДНК на матрице мРНК с помощью обратной транскриптазы), получен с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

2. Создание специальных генетических конструкций – векторов (переносчиков), в составе которых гены (трансгены) будут внедряться в геном другого вида или клонированы в клетках про- или эукариот. Клонирование предполагает получение большого числа копий фрагментов ДНК, идентичных исходному.

3. Генетическая трансформация, т.е. перенос и включение генетических векторов (рекДНК) в клетки-мишени хозяина (реципиента).

4. Молекулярная селекция – отбор клонов, несущих рекДНК, осуществляющейся с использованием различных маркерных генов, которые находятся в векторной молекуле наряду с трансгеном.

5. Выращивание измененных клеток в целые трансгенные организмы.

Ниже приводятся некоторые из этих процедур, используемые в молекулярной биологии, изучив которые вы познакомитесь с главными биологическими молекулами поближе.

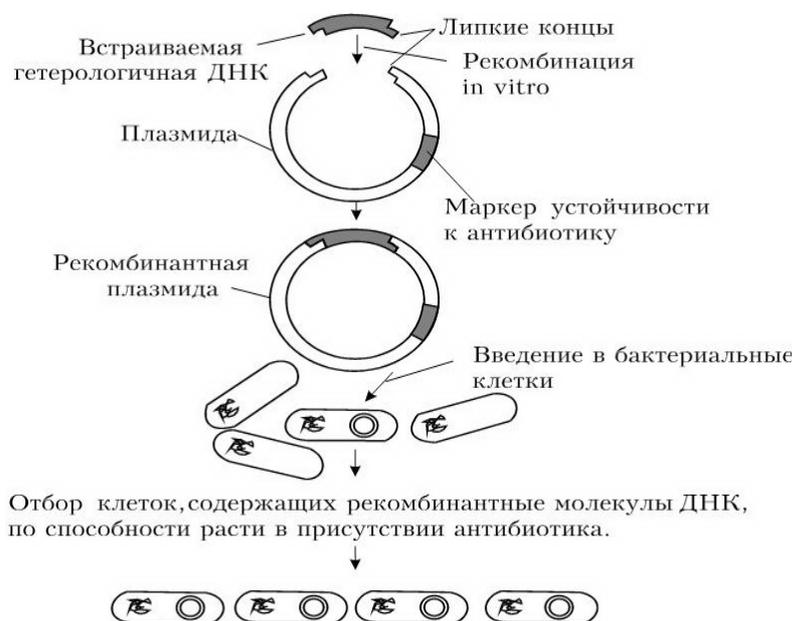


Рис. 1. Схема построения рекомбинантных молекул ДНК и введения их (трансформация) в бактериальные клетки

Основы лабораторной работы

В этом разделе приводится вводный материал для работы в биологической лаборатории, а также правила стерильной работы в лабораториях молекулярной биологии и биотехнологии.

Выращивание клеточных культур, используемых в биотехнологии и фундаментальных молекулярно-биологических исследованиях, проводят в условиях полной асептики, т.е. стерильно. Особое внимание следует обратить на чистоту посуды, предназначенной для приготовления питательных сред и их компонентов; на подготовку объектов к пересадке и культивированию.

Стеклянная и пластмассовая посуда. Большинство клеточных культур в лабораторных условиях выращивают в пробирках, колбах Эрленмейера различного объема и чашках Петри одно- или многократного использования (рис. 2).



Рис. 2. Колбы Эрленмейера различного объема и чашки Петри, диаметром 100 мм

Вначале посуду тщательно моют с использованием детергентов, а стеклянную посуду иногда с раствором двуххромовокислого калия в серной кислоте (хромпика). Вымытую посуду ополаскивают водопроводной, затем дистиллированной водой и высушивают в сушильном шкафу. Чтобы избежать заражения стерильной посуды из воздуха, *перед стерилизацией* их закрывают ватными пробками, заворачивают в оберточную бумагу или закрывают фольгой (у стаканов и колб достаточно завернуть только горлышко). Затем посуду можно стерилизовать двумя способами:

1. Посуду выдерживают в автоклаве под давлением в течение 20-40 минут при температуре 100-130°C. Продолжительность автоклавирования зависит от его режима: при давлении 0,5 атмосферы – 20-40 минут, при 1 атм. – 15 минут.

2. При *сухом способе стерилизации* чашки Петри, колбы, стаканы, завернутые в плотную бумагу, стерилизуют в сушильном шкафу при температуре 140°C в течение 2 часов, при температуре 180°C – 30 минут. При более высоких температурах ватные пробки буреют, а бумага становится ломкой.

Особенно важно иметь в наличии стерилизованные пробирки фирмы Эппендорф и сменные наконечники для автоматических пипеток (рис. 3). Такую посуду можно использовать для всех процедур, обычно выполняемых при молекулярном клонировании; при этом значительной потери материала в результате адсорбции на её поверхности не происходит.



Рис. 3. Пластмассовые пробирки Эппендорф, объёмом 0,2, 0,5 и 1,5 мл и пластмассовые сменные наконечники (носики) различного объёма

Работа в ламинарном боксе. Все операции, связанные с разливом питательных сред, пересадкой клеточных культур, тканей, микроорганизмов, ведут в специальных комнатах или ламинарных боксах. Ламинарный бокс (ламинар) - приспособление для работы в стерильных условиях (рис. 4). Асептические условия в ламинаре создаются с помощью тока воздуха. Ламинарное движение воздуха - движение, при котором потоки воздуха двигаются параллельно, обтекая препятствие равномерными слоями. Ток воздуха, проходя через ламинар, движется к исследователю, что позволяет освободить внутреннее пространство ламинара от спор микроорганизмов.



Рис. 4. Ламинарный бокс (ламинар) - приспособление для работы в стерильных условиях

Подготовка бокса к работе. В специальных комнатах (микробиологических боксах) проводят влажную уборку с дезинфицирующими агентами. Для надежности стерилизации перед началом работы помещение лаборатории и внутреннее пространство ламинара облучают УФ-лучами. Облучение ультрафиолетовыми лучами (260 нанометров) - наиболее часто используется в лабораториях для стерилизации помещений, настольных боксов. При длительном воздействии эти лучи вызывают гибель всех бактерий. Бактерии погибают очень быстро, а споры грибов значительно медленнее. Поэтому в боксах устанавливают бактерицидные лампы, которые включаются на 10-30 минут за 1 час до работы. Кроме того, реко-

мендуется проводить профилактическое облучение боксов в течение 2 часов. Непосредственно перед работой необходимо протереть настольный бокс или внутренние поверхности ламинара 70% этиловым спиртом, разложить в нем необходимые инструменты и материалы: спирт в закрытой посуде, спиртовку (горелку), спички, простерилизованный инструмент и посуду.

Питательные среды. Успех в культивировании объектов зависит от правильного выбора питательной среды и тщательности её приготовления. В питательной среде должны присутствовать все элементы, необходимые для построения компонентов живых клеток в доступной для усвоения форме. В больших количествах клеткам необходимы макроэлементы: углерод, азот, кислород, водород, фосфор, сера, калий, кальций, магний. Помимо макроэлементов, клетки в незначительных количествах нуждаются также и в некоторых микроэлементах: натрий, марганец, никель, кобальт, хлор, цинк, медь, кремний, молибден, бор, ванадий и некоторые другие. Снабжение клеток кислородом и водородом осуществляется за счет расщепления углеводов. Углерод является составной частью всех органических соединений и его источники многочисленны и многообразны: чаще всего сахара, многоатомные спирты и органические кислоты.

Стерилизация питательных сред. Автоклавирование питательных сред для выращивания культур тканей проводят *после их разлива* в пробирки или колбы под давлением 0,7-0,8 атм. при температуре 115-120°C в течение 15-30 минут в автоклавах (рис. 5). Если в результате стерилизации среда помутнела, следовательно, неправильно выбран режим стерилизации. Органические жидкости, не выносящие нагревания (такие как антибиотики, глюкоза и т.д.), освобождаются от бактерий при пропускании через стерильные мелкопористые бактериальные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм.



Рис. 5. Паровой автоклав, предназначенный для стерилизации лабораторной посуды и питательных сред. Бывают как в настольном так и в напольном вариантах

Работа 1. Размножение бактериальных штаммов и обращение с ними

Микробиологические методики, которые используются в молекулярной биологии, очень просты и не должны представлять затруднений для тех, кто владеет основными приёмами работы в стерильных условиях. Чаще всего приходится сталкиваться с двумя трудностями: с перекрёстным загрязнением штаммов и с утратой или появлением новых генетических маркёров. Оба эти затруднения можно свести к минимуму, если проводить очистку колоний, а затем проверять генотип штамма. Чашки с несоответствующей культурой, как и любые чашки, загрязнённые плесенью или другими грибами, нужно отобрать, проавтоклавировать и утилизировать в соответствии с правилами работы с биологическим материалом.

Бактерии легко могут быть выращены в лабораторных условиях, поэтому некоторые из них играют важную роль в генетических исследованиях. Кишечная палочка (*Escherichia coli*, *E. coli*, по имени автора Теодора Эшериха) – грамтрицательная палочковидная бактерия, которая является частью нормальной флоры кишечника человека и животных. Кишечная палочка является одним из самых изученных прокариотических микроорганизмов и одним из самых важных объектов биотехнологии и микробиологии (рис. 6).

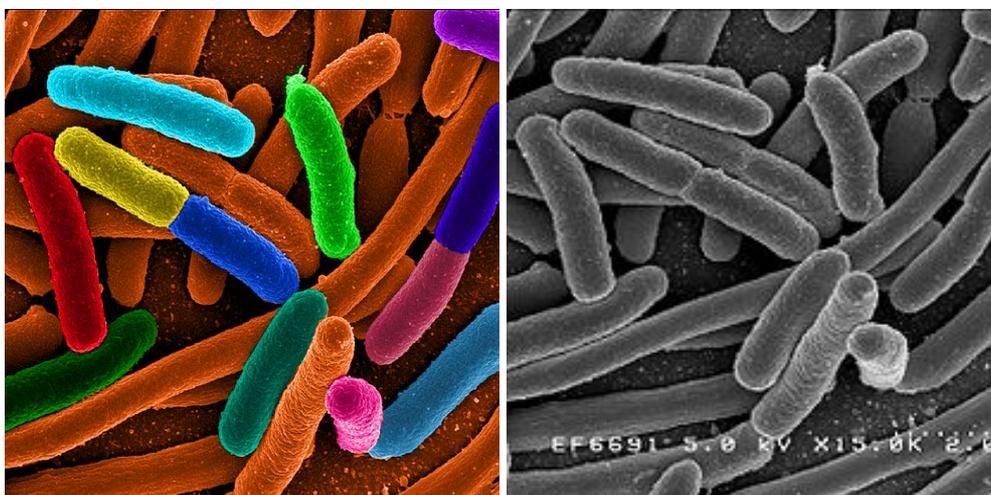


Рис. 6. Фотография бактерий кишечной палочки, сделанная с помощью сканирующего электронного микроскопа

В идеальных условиях культура *E. coli* растёт экспоненциально. Скорость роста культуры зависит от среды, генотипа штамма, температуры и аэрации. По мере увеличения плотности культуры скорость деления клеток снижается до тех пор, пока бактерии не достигнут такой концентрации, при которой они больше уже не делятся, но остаются жизнеспособными.

Наилучшей аэрации культуры достигают в том случае, если поместить колбу или пробирку в ротационную качалку или на вращающуюся платформу. Объём сосуда должен, по крайней мере, в четыре раза превышать объём содержащейся в нём среды, чтобы его можно было энергично встряхивать (на ротационной качалке при 200 об/мин).

Задачи

1. Получить основные навыки работы с лабораторными микроорганизмами.
2. Научиться выделять изолированные колонии (кишечной палочки в этом случае), что необходимо для дальнейшей работы.

Материалы и оборудование

Следующие материалы необходимы для каждого студента или пары студентов:

Материалы	Оборудование
1. Триптон	1. Чашки Петри (100 мм)
2. Дрожжевой экстракт	2. Колба Эрленмейера на 1000 мл
3. NaCl	3. Автоклав
4. NaOH	4. Спиртовка, спички
5. Агар.	5. Металлическая петля.

Методика выращивания культуры клеток кишечной палочки.

В чистой колбе Эрленмейера приготовьте среду **LB** (Лурия-Бертани):

Добавьте следующие компоненты к 800 мл H₂O:

10 г триптона;

5 г дрожжевого экстракта;

10 г NaCl.

Доведите до pH 7,5 с помощью NaOH (~ 400 мкл 2,5M NaOH)

Доведите объем до 1 л дистиллированной H₂O

Закройте колбу ватно-марлевой пробкой, сверху пробку накройте фольгой.

Простерилизуйте среду в автоклаве.

Для приготовления твёрдой среды, нужно добавить 15 г агара *до того* как компоненты будете доводить водой и автоклавировать.

После автоклавирования, охладите среду до 55°C если будете добавлять термолabile вещества (например, антибиотики или глюкозу). Разлейте проавтоклавированную среду по чашкам прямо из колбы, наливая примерно 30-35 мл в стеклянную чашку Петри (в одноразовую пластиковую чашку наливать примерно 20-25 мл) диаметром 100 мм. Если образуются пузырьки, то, не дожидаясь пока застынет агар, следует провести раскалённой иглой по поверхности пузырей. Как правило, прежде чем использовать чашки с приготовленной средой, их следует выдержать в течение 1 суток при комнатной температуре, чтобы не происходила конденсация паров воды, и крышки не запотевали. Также, готовые чашки можно упаковать в пластиковый пакет и хранить в холодильнике при 4°C. Перед использованием их необходимо выдержать закрытыми при комнатной температуре для того чтобы они полностью просохли в течение 2 часов, или открытыми под ламинаром в течение 1 часа. Избыток влаги приводит к расплыванию колоний бактерий и заражению их спорами грибов.

Выделение отдельных колоний (рассев штрихом).

1. Простерилизуйте металлическую петлю в пламени, пока она не накалится до светлокрасного цвета. Охладите её на воздухе (можно для более быстрого охлаждения воткнуть её в стерильную агаризованную среду).

2. Охлаждённой петлёй захватите бактерии со старой чашки (рис. 6А.). Коснитесь петлёй отдельной, хорошо изолированной колонии, выросшей на поверхности твёрдой среды. Нанесите прилипшие к петле бактерии штрихом на верхний сегмент чашки с агаром.

3. Один раз проведите петлёй поперёк первичного штриха и расseyте прилипшие к петле бактерии по свежей области агаризованной среды.

4. Затем снова проведите петлёй поперёк на этот раз вторичного штриха и снова расseyте прилипшие к петле бактерии по свежей области агаризованной среды. В результате вы должны получить (если всё сделано правильно) на следующий день отдельные колонии бактерий. (рис. 6Б.).

А.



Б.



Рис. 6. Колонии кишечной палочки на чашках Петри

А. Разросшиеся колонии кишечной палочки на питательной среде с агаром в чашке Петри

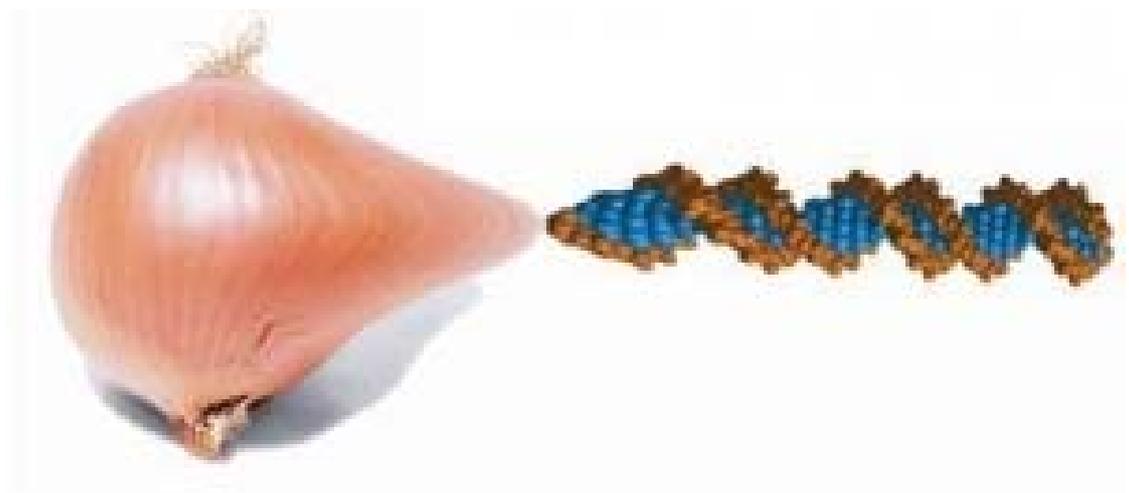
Б. Отдельные колонии бактерий *E. coli* на поверхности агаризованной среды LB

5. Чашку с посеянными бактериями поместите в термостат при температуре 37°C.
6. Достаньте чашку из инкубатора, проверьте наличие колоний и зафиксируйте результаты.
7. В течение нескольких недель, колонии большинства штаммов бактерий, могут храниться на поверхности агаризованной среды, если чашки плотно заклеить парафильмом и держать перевернутыми при 4°C в холодильнике или холодной комнате.



Джессика Коллинз, появившаяся на свет в штате Вирджиния, стала знаменитой еще до своего рождения. Первый ребенок в мире, чей пол был заранее «запрограммирован» по желанию родителей, положил начало «дизайнерскому» направлению в индустрии деторождения. Ученые и пресса стали всерьез обсуждать возможность выбирать для своего ребенка цвет глаз и волос, рост и форму носа, «заказывать» здоровые гены и гены, отвечающие за определенные черты характера.

Работа 2. Процедура очистки геномной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из лука.



Когда вы слышите о ДНК, то для большинства студентов-биологов ДНК-это абстракция. Вы можете знать и помнить названия и структуру азотистых оснований и знать все об истории открытия ДНК, но пока вы не начали работать с ДНК фактически, она остается странным и таинственным веществом.

Цель этой лабораторной работы состоит в том, чтобы преподать вам личный опыт "общения" с ДНК, очищая её из растительной ткани. Вы начнете с целой луковицы и закончите относительно чистой ДНК, содержащей буквально миллионы генов. Очищенная ДНК может быть сохранена в спирте или высушена. Вы фактически будете держать в ваших руках ключ к контролю развития организма и его структуры.

Гомогенизация.

Прежде, чем выделить ДНК из ядер клеток тканей лука, клеточные стенки, плазматические и ядерные мембраны должны быть разрушены. Этот результат достигается гомогенизацией тканей лука в блендере. При этом, детергент, содержащийся в гомогенизационном буфере, разрушает клеточную мембрану и превращает в эмульсию липиды и белки клетки, разрушая полярные и гидрофобные взаимодействия, которые скрепляют клеточную мембрану. Далее, ДНК может быть отделена от хромосомных белков химическими компонентами, содержащимися в буфере для гомогенизации, которые осаждают белки из раствора.

Задачи:

1. Познакомиться с физическими свойствами ДНК, выделив её из живой ткани.
2. Изучить каждый шаг процедуры выделения, поскольку это касается физических и биохимических особенностей генетического материала.

Материалы и оборудование.

Следующие материалы необходимы для каждого студента или пары студентов:

Материалы	Оборудование
1. Буфер для гомогенизации 100 мл (додецил сульфат натрия-5г, хлорид натрия-0.877г, цитрат натрия-0.41г, ЭДТА-0.029г.)	1. Блендер/гомогенизатор 2. 60°C водяная баня 3. Ёмкость со льдом, 4. Весы (0.1-граммовая шкала)

Продолжение таблицы

2. Средняя луковица 3. 95%-ый этанол выдержанный при -20 °С.	5. Перчатки, нож, воронка, марля (4 слоя) 6. Цилиндр на 100 мл (для этанола), 7. стакан на 250 мл, стакан на 500 мл 8. стакан на 100 мл, стеклянная палочка
---	--

Методика выделения геномной ДНК из тканей лука для качественного анализа.

1. Наденьте перчатки, порежьте луковицу среднего размера на кубики, не более 3 см шириной (рис. 7). Перчатки предотвращают попадание ферментов дезоксирибонуклеазы с Ваших рук в образец ДНК и не допускают разрушения ДНК на маленькие фрагменты.

2. Взвесьте 50 г нарезанного кубиками лука. Перенесите весь взвешенный материал в стакан объёмом 500 мл.



Рис. 7. Нарезка луковицы на кубики нужного размера

3. Добавьте 100 мл буфера для гомогенизации к нарезанному кубиками луку и инкубируйте стакан на водяной бане в течение 15 минут (**не больше!**). Эта термообработка смягчает ткань лука и делает возможным проникновение буфера для гомогенизации (рис. 8). Эта процедура также денатурирует многие ферменты, которые могли бы помешать процедуре выделения.



Рис. 8. Нарезанный лук в гомогенизирующем буфере, размягчённый после термообработки

4. Быстро охладите ваш образец до 15-20°C в ледяной ёмкости (в смеси льда и воды). Эта процедуру нужно проводить приблизительно 6 минут для предотвращения ДНК денатурации.

5. Вылейте свой охлажденный образец в блендер (рис. 9) или оставьте в этом же стакане на 500 мл (если блендер без стакана) и закройте крышкой. Гомогенизируйте в течение 45 секунд на низкой скорости, затем 30 секунд на высокой скорости. Гомогенизация разрушает клеточную мембрану и освобождает содержимое клеток (углеводы, белки, жиры, и нуклеиновые кислоты).



Рис. 9. Блендер, предназначенный для гомогенизации тканей лука

6. Вылейте гомогенат из блендера в стакан на 250 мл. Оставьте его в ледяной ёмкости на 15-20 минут.

7. Пропустите гомогенат через четыре слоя марли в новый стакан на 100 мл, следя за тем, чтобы пена осталась на марле.

Осаждение ДНК.

Гомогенат должен содержать только ДНК и компоненты среды для гомогенизации. Из компонентов, находящихся в гомогенате, только ДНК не растворима в этаноле выдержанном в морозильной камере. Поэтому, когда этот «ледяной» этанол добавляется к гомогенату, все компоненты гомогената растворяются – кроме ДНК.

Если инструкциям следовали тщательно, и молекулярная структура ДНК осталась неповрежденной, генетический материал должен выпасть в осадок как толстая, волокнистая, белая масса, которую можно намотать на стеклянную палочку или железную петлю (рис. 10).



Рис. 10. Геномная ДНК, намотанная на железную петлю

Если же ДНК была повреждена, она также выпадет в осадок, но как белая, бесформенная масса, которая не может быть собрана на стеклянную палочку.

8. Поместите свой стакан с отфильтрованным гомогенатом в ёмкость со льдом. Оставьте его охлаждаться, пока температура гомогената не достигнет 10-15°C (приблизительно 10-15 минут).

9. Отмерьте 80 мл этанола (охлаждённого предварительно в морозилке при -20°C) в мерный охлаждённый цилиндр на 100 мл. Медленно добавляйте этанол по краю стакана на 100 мл или мензурки (рис. 11), пока белая, волокнистая ДНК не выпадет в осадок.



Рис. 11. Добавление этанола по краю мензурки (также может быть мерный стакан на 100 мл)



Рис. 12. Белые волокнистые нити ДНК, выпавшие в осадок

Возможно, не потребуются всех 80 мл спирта, чтобы осадить ДНК.

10. Попробуйте намотать волокнистую ДНК на стеклянную палочку, вращая ее в стакане только в одном направлении (рис. 12).

11. Полученную ДНК можно хранить в холодильнике для демонстрации качественного выделения ДНК. Также с этой ДНК можно провести электрофорез на агарозном геле и продемонстрировать отличие геномной от плазмидной ДНК.

Работа 3. Препаративная очистка геномной ДНК из клеток бактерий *E. coli* и цианобактерий *Synechocystis* PCC 6803

Одной из самых важных процедур в молекулярной биологии является очистка нуклеиновых кислот. Например, если нам нужно выделить из модельного организма, такого как *E. coli* или цианобактерии *Synechocystis* PCC 6803 (рис. 13), ген, который нас интересует, или изучить все гены организма, то необходимо начинать наше исследование с выделения геномной ДНК из этих организмов.



Рис. 13. Культуры клеток: кишечной палочки и сине-зелёных водорослей *Synechocystis* PCC 6803 на чашках Петри и в культуральных колбах

Экстракция фенолом и хлороформом.

Препараты геномной ДНК очищают с помощью экстракции водных растворов нуклеиновых кислот фенолом и (или) хлороформом. Такую процедуру используют и там, где нужно инактивировать и удалить все ферменты и РНК, применяемые на одном из этапов клонирования, прежде чем перейти к следующему. Если же нуклеиновые кислоты выделяют из сложных смесей молекул, таких, как клеточные лизаты, то необходимо прилагать дополнительные усилия. В этих случаях, прежде чем проводить экстракцию органическими растворителями, чаще всего удаляют большинство белков гидролизом их протеолитическими ферментами, такими, как проназа или протеиназа К (Табл. 1), которые активны в отношении широкого спектра нативных белков.

Таблица 1

Свойства ферментов использующихся для лизиса клеток

Ферменты	Основной раствор (в H ₂ O), мг/мл	t° хранения	Концентрация в реакции, мг/мл	Буфер для реакции	t° инкубации	Предварительная обработка
Проназа	20	-20 °С	1	0,01 М Трис, рН 7,8 0,01 М ЭДТА 0,5% SDS	37°С	Самопереваривание – 2 ч при 37°С
Протеиназа К	20	-20 °С	0,05	0,01 М Трис, рН 7,8 0,005 М ЭДТА 0,5% SDS	37°С	Не требуется

Стандартным способом удаления белков из растворов нуклеиновых кислот является однократная экстракция сначала смесью фенола и хлороформа (1:1) а затем двукратная экстракция хлороформом. Достоинство этой процедуры в том, что при использовании двух органических растворителей депротеинизация протекает более эффективно. Хотя фенол активно денатурирует белки, он не полностью ингибирует РНК-азную активность, и в нём растворяются молекулы РНК, содержащие длинные последовательности poly(A).

Обе эти проблемы (удаление белков и РНК) решаются при использовании смеси фенола и хлороформа (1:1). В результате последней экстракции хлороформом из препарата нуклеиновой кислоты удаляют остатки фенола. Под «хлороформом» понимается смесь хлороформа и изоамилового спирта (24:1, по объёму), а под «фенолом» – фенол, уравновешенный буфером и содержащий 0,1% оксихинолина и 0,2% меркаптоэтанола.

Задачи

1. Научиться работать с модельными организмами, клетки которых используют для научных исследований.
2. Получить достаточное количество (нг) препаративной геномной ДНК.

Материалы и оборудование

Следующие материалы необходимы для каждого студента или пары студентов:

Материалы	Оборудование
<ol style="list-style-type: none"> 1. Лизис-буфер 10 мл (10мМ Трис-НCl pH 7,5, 10мМ ЭДТА pH 7,5, 0,1М NaCl, 2% ДСН, 0,2 мг/мл протеиназа К). 2. Фенол/хлороформ (1:1). 3. Хлороформ. 4. 95%-ый ледяной этанол. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Настольная центрифуга (Эппендорф). 2. Автоматические пробирки, носики. 3. Спектрофотометр. 4. Кюветы.

Методика препаративного выделения геномной ДНК.

Вырастите культуры клеток кишечной палочки (*E. coli*) в питательной среде LB и цианобактерий *Synechocystis* PCC 6803 в среде BG-11. Кишечную палочку посеите в среду из отдельной колонии и выращивайте ночь при встряхивании на качалке при 37°C. Цианобактерии выращивайте в среде BG-11 в течение недели в зависимости от показания оптической плотности (ОП₇₅₀). Для получения достаточного количества ДНК ОП₇₅₀ должно быть в пределах 1-1,5.

Перенесите 1,5 мл выросшей культуры *E. coli* из культуральной колбы в 1,5 мл пробирку Эппендорф и отцентрифугируйте на максимальной скорости (12000-14000 об/мин) в течение 1 минуты чтобы осадить клетки. Культуру цианобактерий объёмом 3 мл (два раза по 1,5 мл) отберите в стерильную пластиковую пробирку и осадите центрифугированием в течение 2 минут при 11600 об/мин.

1. Отбросьте супернатант.

Примечание. Удалите так много супернатанта, как только сможете, не нарушая клеточного осадка.

2. Ресуспендируйте клеточный осадок в 300 мкл буфера для лизиса и встряхните на вортексе, чтобы полностью растворить осадок.

3. Инкубируйте клеточный лизат 1 час при 60°C.

Предостережение! Фенол является едкой жидкостью, которая вызывает тяжелые ожоги. Хлороформ – канцерогенное вещество. Надевайте перчатки, очки и лабораторный халат,

и держите пробирки плотно закрытыми. Для безопасности, работайте с этими веществами только под вытяжкой.

4. Добавьте равный объем смеси фенол/хлороформ (1:1) и смешайте хорошо, переворачивая пробирку, пока фазы полностью не смешаются.

Примечание. Не встряхивайте пробирку на вортексе – это может разрушить ДНК.

5. Отцентрифугируйте полученную смесь лизата и фенола с хлороформом 2 минуты при комнатной температуре (все шаги должны выполняться при комнатной температуре, если не обозначено иначе). Появится белый слой (слой белка) в промежуточной фазе. Геномная ДНК будет находиться в верхней водной фазе (рис. 14).

6. Тщательно и аккуратно перенесите верхнюю водную фазу в новую пробирку. Для небольших (<200 мкл) объемов используйте автоматическую пипетку с подходящим наконечником. Промежуточную фазу и нижнюю органическую фазу отбросьте.

7. Добавьте равный объем хлороформа для удаления остатков фенола и повторите смешивание фаз, центрифугирование и отбор верхней фазы как в пунктах 4-6.

8. **Выборочно:** Добавьте равный объем хлороформа. Повторите стадию 7

9. Осадите полученную ДНК из водной фазы этанолом и соберите её, как описано ниже.



Рис. 14. Схема очищения геномной ДНК из клеточного лизата с помощью фенола

Осаждение ДНК этанолом или изопропанолом.

Наиболее часто используемый метод концентрирования ДНК – осаждение ее этанолом. Осадок ДНК, образующийся при низкой температуре (-20°C или ниже) в присутствии умеренной концентрации моновалентных катионов (солей), собирают центрифугированием и вновь растворяют в соответствующем буфере, доводя до желаемой концентрации. Эта процедура является быстрой и количественной, даже если ДНК присутствует в нанограммах.

1. Определите объем раствора ДНК.

2. Хорошо размешайте. Добавьте точно 2 объема охлажденного во льду этанола и снова хорошо размешайте. Охладите до -20°C .

3. Оставьте при низкой температуре, чтобы ДНК выпала в осадок. Обычно для этого требуется 30-60 мин при -20°C , но когда размер ДНК мал (<1 kb) или когда она присутствует в небольших количествах (<0,1 мкг/мл), нужно увеличить время выдерживания или понизить температуру до -70°C .

4. Центрифугируйте при 0°C . В большинстве случаев достаточно центрифугировать 10 мин при 12000 об/мин. Однако при работе с раствором ДНК низкой концентрации или содержащим очень мелкие фрагменты ДНК, может потребоваться более интенсивное центрифугирование (например, 30 мин при 30000 об/мин в роторе Beckman SW50.1).

5. Удалите надосадочную жидкость. Оставьте пробирку в перевернутом положении на листе фильтровальной бумаги, чтобы как следует стекла вся жидкость. Фильтровальной бумагой удалите все капли со стенок пробирки.

6. Растворите осадок ДНК в соответствующем объеме ТЕ буфера или стерильной деионизированной воды. Несколько раз ополосните буфером стенки пробирки, чтобы собрать всю ДНК. Для ускорения растворения осадка можно прогреть пробу при 37°C в течение 5 мин.

Примечания

а) Вместо двух объемов этанола для осаждения ДНК можно взять 1 объем изопропанола. Преимущество такой замены состоит в меньшем объеме центрифугируемой жидкости. Но изопропанол менее летуч, чем этанол, поэтому его следы труднее удалить из раствора; кроме того, некоторые растворенные соединения, такие как сахароза или NaCl, легче осаждаются вместе с ДНК при использовании изопропанола, особенно при -70°C. В общем, если не требуется сводить к минимуму объем жидкости, осаждение предпочтительнее проводить этанолом.

б) Для удаления примесей, захватываемых осадком, можно промыть осадок ДНК раствором 70%-го этанола. Чтобы при промывании не потерять часть ДНК, заполняйте пробирку 70%-м этанолом не более чем на 2/3. Встряхивайте непродолжительное время и центрифугируйте так, как описано выше. Осадок, остающийся после промывания 70%-м этанолом, не очень прочно связан со стенками пробирки, поэтому будьте очень осторожны при удалении надосадочной жидкости.

в) Очень короткие молекулы ДНК (<200 пар оснований) плохо осаждаются этанолом. Однако эффективность их осаждения значительно увеличивается, если, предварительно к раствору ДНК добавить MgCl₂ до концентрации 0,01 М.

г) Как правило, ДНК, осажденная этанолом, легко вновь растворяется в буферах с низкой ионной силой, таких, как буфер ТЕ. Поэтому предпочтительнее растворять ДНК в малом объеме буфера низкой ионной силы, а затем доводить ионную силу до соответствующего значения. Можно также растворять осадок ДНК водой, если этот образец хранить при температуре -20°C не больше полугода. Также предпочтительнее растворять ДНК в воде, если вы собираетесь использовать её для реакций клонирования или ПЦР (полимеразная цепная реакция).



Южнокорейские генетики экспериментально доказали возможность управляемого «перепрограммирования» сложных организмов. Они вывели линию клонированных собак, которые светятся под воздействием ультрафиолета, если в их организме присутствует специальное вещество. В ДНК собаки был вставлен ген GFP, отвечающий за синтез зелёного флуоресцентного белка, причём он работал, только если в пищу животного добавляли включающий его препарат. Эта способность передалась от самки некоторым её щенкам уже без всякого вмешательства генетиков. Данные исследования имеют большие перспективы для борьбы с заболеваниями человека, такими как болезнь Альцгеймера или Паркинсона, ведь собакам тоже присущи многие из них, а ген свечения может быть заменён любым другим геном.

Работа 4. Полимеразная цепная реакция

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) позволяет за небольшое время увеличить количество ДНК известной последовательности в геометрической прогрессии (*in vitro*). ПЦР была изобретена в 1983 году американским биохимиком Кэри Мюллисом. Первая публикация по методу ПЦР появилась в ноябре 1985 года в журнале Science. Через 8 лет после этого, т.е. в 1993 году, за изобретение метода ПЦР, К. Мюллис получил Нобелевскую премию.

Для протекания этой реакции необходимы четыре ключевых компонента. Во-первых, служащая матрицей молекула ДНК, содержащая исследуемый фрагмент. Во-вторых, ДНК-полимераза (фермент для производства копий ДНК). В-третьих – динуклеотидтрифосфаты (дНТФ), используемые ДНК-полимеразой для синтеза ДНК. И, в-четвертых, два праймера – два коротких сегмента однонитевой нуклеиновой кислоты, комплементарных началу исследуемого фрагмента ДНК (обычно это последовательности из 15-20 оснований). Присоединяясь к ДНК матрице, праймеры позволяют запустить синтез ДНК, поскольку ДНК-полимераза способна только добавлять звенья (рис. 15). Праймеры можно заказать в биохимической компании или синтезировать с помощью автоматизированного аппарата, задав программу требуемой последовательности нуклеотидов.

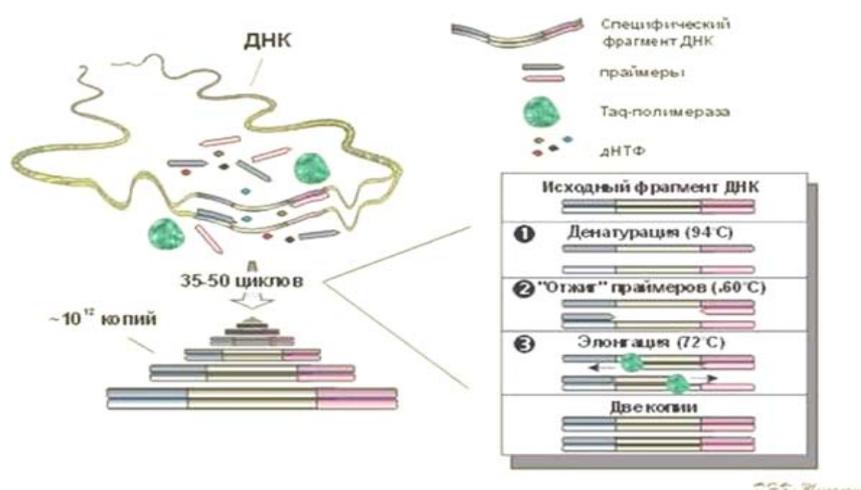


Рис. 15. Принцип полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Можно сказать, что метод ПЦР имитирует в пробирке естественную репликацию ДНК, повторяющуюся много раз – столько, сколько это необходимо для исследования. Метод включает несколько этапов. Сначала происходит расплетание двойной спирали ДНК, расхождение нитей ДНК и последующее комплементарное дополнение (достройка) обеих нитей с помощью специального фермента. Репликация ДНК может начаться не в любой точке, а только в определенных «стартовых блоках» – коротких двунитевых участках. Для проведения такого процесса используют две генетические пробы – праймеры, которые служат в качестве затравки для синтеза второй цепи на однонитевой ДНК. Праймеры – это искусственно синтезированные короткие нуклеотидные последовательности (15-30 нуклеотидов), комплементарные концам размножаемых (амплифицируемых) участков нитей ДНК. Чтобы иметь нужные праймеры, необходимо знать нуклеотидную последовательность того участка ДНК, который требуется размножить. Сначала двунитевую ДНК нагревают до температуры около 90-95°C. ДНК денатурирует и комплементарные нити ДНК расходятся. Далее к обеим нитям ДНК по принципу комплементарности присоединяют (отжигают) праймеры, в результате чего образуются короткие двунитевые – «стартовые блоки». Праймеры присоединяются в

направлении с 3'-конца цепочки ДНК, по одному на каждую цепь, поэтому достраивание новой цепи ДНК в последующих циклах происходит в ограниченном праймерами участке ДНК (Рис. 16). Следующая стадия заключается в удлинении новой цепочки ДНК посредством присоединения имеющихся в реакционной смеси дезоксирибонуклеотидтрифосфатов.

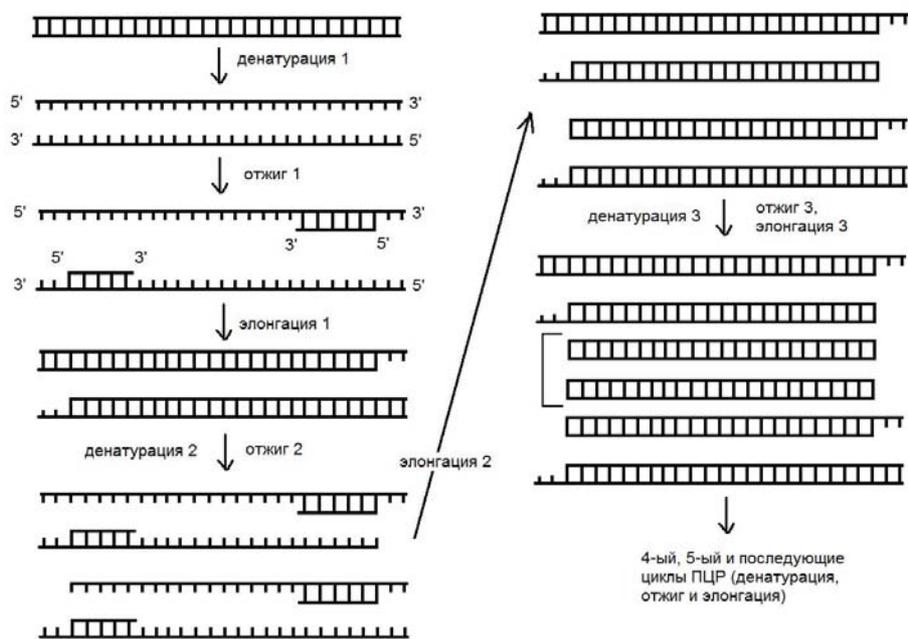


Рис. 16. Схема прохождения циклов полимеразной цепной реакции

Процесс удлинения (элонгации) начинается от праймеров и осуществляется при помощи фермента – ДНК-полимеразы при температуре 72°C. Полимераза осуществляет синтез вторых цепей ДНК на каждой из двух денатурированных цепей после нового прогрева. Вновь синтезированные фрагменты ДНК служат в качестве матрицы для синтеза новых нитей в следующем цикле амплификации. Процедура ПЦР включает несколько высокотемпературных этапов, поэтому используются термостабильные ДНК-полимеразы, например, специфический бактериальный фермент – *Taq*-полимераза, устойчивая к высоким температурам. В ходе реакции последовательно меняют температуру: при температуре 90-95°C происходит разделение цепей ДНК, при температуре 40-60°C – присоединение праймера (отжиг), при температуре 72°C – синтез цепей ДНК. Термостабильные ДНК-полимеразы выделяются из термостойких бактерий, живущих в горячих источниках при температурах до 90°C. Чаще всего это *Taq*-полимераза бактерий *Thermus aquanticus*, *Tth*-полимераза (*Thermus thermophilus*), *Pwo*-полимераза (*Pyrococcus woesei*). В настоящее время в ПЦР часто используются смеси полимераз с различными свойствами, включая искусственно полученные модификации природных ферментов.

Процесс ПЦР требует постоянной смены циклов с несколькими разными температурами, поэтому современные аппараты для ПЦР – термоциклеры (амплификаторы) (рис. 17) – работают в режиме быстрого изменения температуры реакционной смеси по заданной программе и способны амплифицировать фрагмент ДНК длиной от 100 до 3000 пар оснований в течение нескольких часов, начиная с пикограммовых количеств ДНК (что оптимально для прохождения реакции). В крайнем случае, можно использовать в качестве исходного материала ДНК из одной клетки, например – из клетки спермы, и получить более 100 млрд. копий исследуемого фрагмента.



Рис. 17. Амплификатор – прибор, обеспечивающий периодическое охлаждение и нагревание пробирок, необходимый для проведения ПЦР

Задачи

1. Понять принципы, лежащие в основе ПЦР.
2. Научиться проводить ПЦР и пользоваться амплификатором.

Материалы и оборудование

Следующие материалы необходимы для каждого студента или пары студентов

Материалы	Оборудование
<ol style="list-style-type: none"> 1. ДНК-матрица 2. 2 праймера 3. ПЦР Буфер 4. MgCl₂ 5. дНТФ-ы 6. Таq Полимераза 7. Стерильная вода. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Амплификатор 2. Стерильные пробирки. 3. Стерильные наконечники.

Состав ПЦР-буфера может быть разным в зависимости от компании производителя. Многие производители готовят смеси, содержащие ПЦР-буфер, хлорид магния и дНТФ-ы.

Методика приготовления типичной ПЦР реакции.

Компоненты	Концентрация	V в реакции (на 100 мкл)
ПЦР-Буфер	10x	10 мкл
MgCl ₂ (1-4 mM)	25 mM	10 мкл
дНТФ-ы (50-200 мкМ)	10 mM	2 мкл
Праймеры №1 и №2	10 мкМ	по 1 мкл
Таq-полимераза	5 Ед/мкл	1 мкл
Матрица (ДНК)	~10 пг	x мкл
H ₂ O	mQ	до 100 мкл

Все перечисленные компоненты реакции смешайте в пробирке Эппендорф на 0,2 или 0,5 мл, используя для каждого компонента новый стерильный наконечник. Объём реакции может быть от 20 до 100 мкл. Учтите при смешении компонентов, что вода должна быть стерильная.

Параметры типичной ПЦР.

Установите нужную температуру и количество циклов на амплификаторе. Воспользуйтесь предложенными типичными параметрами. Учтите только, что температура отжига X (annealing) зависит от последовательности праймеров, а длительность этапа элонгации Y и количество циклов зависит от размера ДНК матрицы.

Стадия	Параметры (t° , время)
I.	$T_{\text{den}} = 95^{\circ}\text{C}$, 1'
II. (25-30 циклов)	$T_{\text{den}} = 94^{\circ}\text{C}$, 10"
	$T_{\text{ann}} = X$, 30"
	$T_{\text{elon}} = 72^{\circ}\text{C}$, Y
III.	$T = 72^{\circ}\text{C}$, 45'
IV.	$T = 4^{\circ}\text{C}$ (можно на ночь)

По окончании амплификации достаньте пробирки из прибора и полученные продукты реакции вместе с ДНК-маркером (стандартом) нанесите на агарозный гель. После проведения электрофореза образцы просмотрите под ультрафиолетовым светом. Если данные результаты необходимы для дальнейшей работы, тогда гель с разделёнными на нём ДНК образцами нужно сфотографировать.



За последние годы осуществлена частичная расшифовка генома дафнии *Daphnia pulex*, в 2011г. был завершён его черновик. Геном дафнии состоит из 200 миллионов нуклеотидов, но при этом содержит около 30,9 тысяч генов — больше, чем у других до сих пор изученных многоклеточных животных (например в геноме человека около 20-25 тысяч генов). Геному дафнии оказался свойственен высокий темп генных дупликаций, что привело к созданию многочисленных генных кластеров. Более трети продуктов генов, обнаруженных в геноме дафнии, не имеют известных гомологов в протеомах других организмов. Наиболее крупные амплифицированные генные семейства также характерны только для этой эволюционной линии.

Работа 5. Гель-электрофорез в агарозном геле

В начале 70-ых годов было показано, что с помощью гель-электрофореза можно определить длину и чистоту молекул ДНК. Этот метод прост, так как каждый нуклеотид в молекуле нуклеиновой кислоты обладает отрицательным зарядом, который заставляет молекулы двигаться к положительному электроду. Были разработаны специальные полиакриламидные гели, с помощью которых удается разделить фрагменты ДНК длиной до 500 нуклеотидов, отличающиеся даже на один нуклеотид. Поскольку поры в полиакриламидном геле для больших молекул ДНК слишком малы, для их разделения по размеру были разработаны специальные гели на основе агарозы (полисахарид, выделяемый из морских водорослей). Оба эти метода разделения ДНК широко используются для аналитических и препаративных целей.

Электрофорез в агарозном геле – стандартный метод, используемый для разделения, идентификации и очистки фрагментов ДНК (рис. 18, 19). С помощью этой простой техники можно быстро разделить такие смеси фрагментов ДНК, которые не могут быть разделены другими способами, например центрифугированием в градиенте плотности.

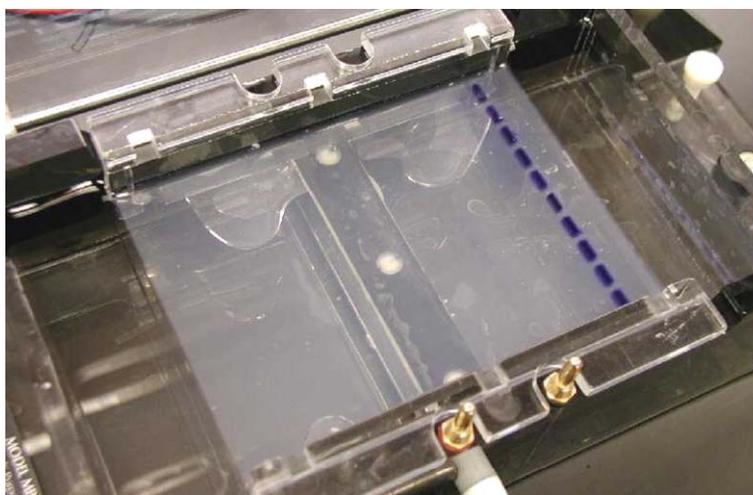


Рис. 18. Агарозный гель электрофорез с нанесёнными образцами

Кроме того, при разделении в геле непосредственно следят за положением ДНК, так как полосы ДНК в геле можно окрашивать флуоресцирующим и интеркалирующим в ДНК красителем – бромистым этидием в низкой концентрации. Просматривая прокрашенный гель в ультрафиолетовом свете, можно заметить даже низкие концентрации (~20 нг) ДНК (рис.20, 21)

Скорость миграции ДНК через агарозный гель при электрофорезе определяется пятью главными параметрами, рассмотренными ниже.

1. **Размер молекул ДНК.** Молекулы линейной двухцепочечной ДНК перемещаются в геле со скоростями, обратно пропорциональными десятичному логарифму их молекулярных масс (Helling et al., 1974)

2. **Концентрация агарозы.** Фрагменты ДНК данного размера перемещаются в геле, содержащем разные концентрации агарозы, с разными скоростями.

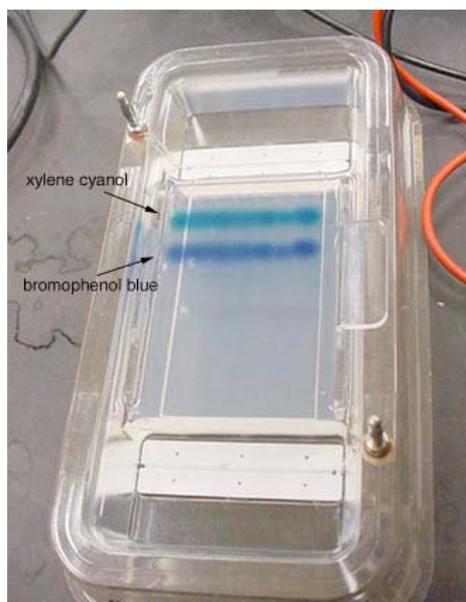


Рис. 19. Разделение красителей, содержащихся в буфере во время электрофореза

Между логарифмом электрофоретической подвижности ДНК m и концентрацией геля t существует прямая зависимость, описанная уравнением:

$$\log(m) = \log(m_0) - Kr \times t,$$

где m_0 – свободная электрофоретическая подвижность молекул, а константа Kr – коэффициент замедления, который зависит от свойств геля, а также от величины и формы движущихся молекул. Таким образом, применяя гели разных концентраций, можно разделить большой набор фрагментов ДНК, различающихся по размеру (Табл. 2).

Таблица 2.

Область эффективного разделения молекул ДНК в зависимости от концентрации агарозы в геле

Количество агарозы в геле, %	Область эффективного разделения линейных молекул ДНК, kb
0,3	60-5
0,6	20-1
0,7	10-0,8
0,9	7-0,5
1,2	6-0,4
1,5	4-0,2
2,0	3-0,1

3. **Конформация ДНК.** ДНК, имеющие одинаковую молекулярную массу, но разные конформации, например кольцевая неповрежденная (форма I), кольцевая с одноцепочечным разрывом (форма II) и линейная (форма III), движутся в агарозном геле с разными скоростями. Относительная подвижность трех указанных форм зависит главным образом от концентрации агарозы в геле, а также и от таких факторов, как сила тока, ионная сила буфера или плотность сверхспиральных витков в форме I. Чаще всего линейная форма (форма III) мигрирует медленнее всех (рис. 20).

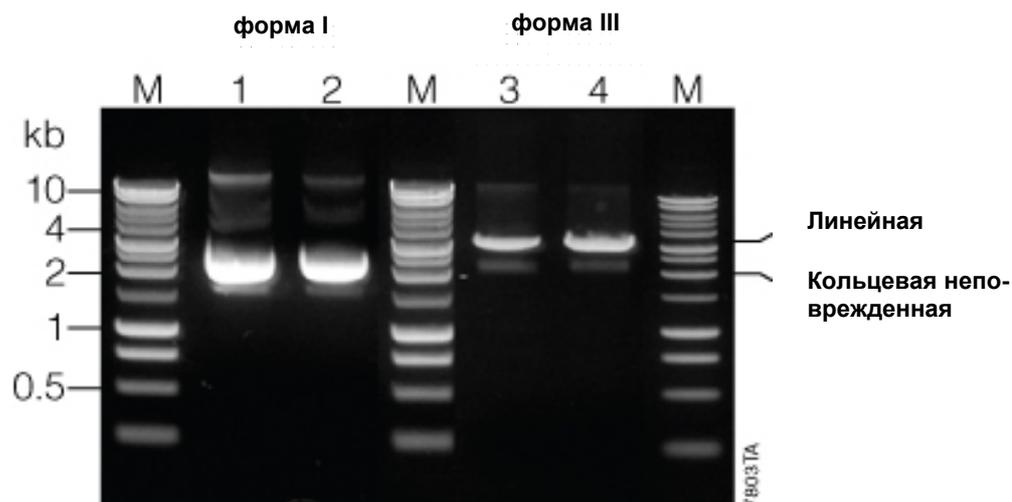


Рис. 20. Фотография агарозного геля с нанесёнными образцами линейной и кольцевой плазмидными ДНК

4. **Напряженность электрического поля.** При низких напряженностях скорость перемещения фрагментов линейной ДНК пропорциональна приложенному напряжению. Однако с увеличением напряженности электрического поля подвижность фрагментов ДНК с высокой молекулярной массой дифференциально возрастает. Следовательно, с увеличением напряженности область эффективного разделения ДНК в агарозном геле снижается. Максимальное разделение фрагментов происходит при напряженности, не превышающей 5 В/см.

5. **Состав оснований и температура.** Электрофоретическое поведение ДНК в агарозных гелях слабо зависит от состава оснований ДНК или температуры геля. В агарозных гелях в области температур от 4 до 30°C изменения относительной электрофоретической подвижности фрагментов ДНК разного размера не наблюдается. Обычно электрофорез в агарозных гелях ведут при комнатной температуре. Однако следует отметить, что гели, содержащие менее 0,5% агарозы, очень мягкие, поэтому с ними лучше работать при 4°C – в этих условиях они становятся более плотными.

6. **Буферы.** Для электрофореза обычно применяют буферы, содержащие трис-ацетат, трис-борат или трис-фосфат в концентрации 50 мМ и имеющие рН 7,5-7,8. Чаще всего их готовят в виде концентрированных растворов (50x для трис-ацетата) и хранят при комнатной температуре.

7. **Агароза.** Существует много различных марок агарозы. Даже в пределах одной марки из разных упаковок могут сильно различаться. Наиболее подходящей для общих целей считается агароза типа II – низкоэндоосмотическая агароза. Она легко плавится, давая прозрачные растворы; получающиеся из нее гели упруги даже при низких концентрациях. Однако в агарозе типа II имеется примесь сульфатированных полисахаридов, ингибирующих некоторые ферменты (лигазы, полимеразы и рестриктазы). Поэтому фрагменты ДНК, элюированные из таких гелей, необходимо хорошо очистить, прежде чем использовать их в качестве матриц или субстратов для этих ферментов.

8. **Окраска ДНК в агарозных гелях.** Наиболее удобный метод визуализации ДНК в агарозных гелях – окрашивание ее флуоресцирующим красителем бромистым этидием. Молекула этого вещества содержит плоскую группу, которая интеркалирует между соседними основаниями ДНК. В результате такой интеркаляции в непосредственной близости от оснований краситель связывается с ДНК, что сопровождается увеличением интенсивности флуоресценции (рис. 21). УФ-излучение, поглощаемое ДНК в области 260 нм и передаваемое на

краситель (или же излучение, поглощаемое самим красителем при длинах волн 302 и 366 нм), испускается затем в красно-оранжевой области видимого спектра (590 нм).

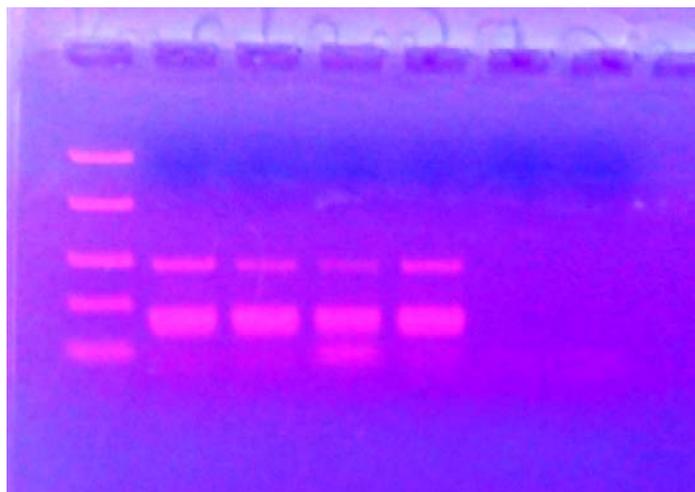


Рис. 21. Фотография агарозного геля, окрашенного бромистым этидием и сфотографированного при УФ-излучении

Обычно раствор бромистого этидия (коммерчески производимый – 0,5 мкг/мл) добавляют и в гель, и в электрофоретический буфер. В его присутствии электрофоретическая подвижность линейной двухцепочечной ДНК снижается примерно на 15%, но зато при этом появляется возможность наблюдать за процессом разделения непосредственно под источником УФ-излучения во время или в конце разделения. Можно также проводить электрофорез в отсутствие бромистого этидия и окрашивать ДНК уже после завершения разделения. В последнем случае гель помещается в электрофорезный буфер или воду, содержащие бромистый этидий, на 45 мин при комнатной температуре.

Предостережение! Бромистый этидий – сильный мутаген. Все манипуляции с гелями и растворами, содержащими краситель, необходимо проводить в перчатках.

Буфер для внесения проб. Буферы для внесения проб представляют собой растворы высокой плотности, например глицерин, которые позволяют легко вводить пробы в лунки геля. Они содержат также красители, что позволяет легко визуально следить за электрофорезом (рис. 18, 19). Краситель синий цвета, находящийся в буфере для нанесения образцов помогает следить за образцом, для того чтобы ДНК не выбежала из геля. При нанесении буфер проявляется как синий цвет, но на самом деле он состоит из двух (или иногда трёх) различных красителей (рис. 19). Первый, бромфеноловый синий, «быстрый синий». Эта краска бежит с той же самой подвижностью как и маленький фрагмент ДНК. Вторая, ксилен цианол, «медленный синий», она бежит с той же самой подвижностью как большой фрагмент ДНК.

Примечание. Бромфеноловый синий и ксилен цианол не взаимодействуют с фрагментами ДНК.

Задачи

1. Приготовить агарозный гель 1% концентрации агарозы.
2. Научиться вносить образцы в гель и определять разделение и размер ДНК образцов.

Материалы и оборудование

Следующие материалы необходимы для каждого студента или пары студентов:

Материалы	Оборудование
1. Агароза 2. Буфер трис ацетат (ТАЕ x50) (242 г Триса, 57,1 мл CH ₃ COOH, 100 мл ЭДТА рН 8,0) 3. Раствор бромистого этидия 4. ДНК-маркер	1. Аппарат для горизонтального электрофореза 2. Источник тока 3. UV-столик 4. Стерильные наконечники.

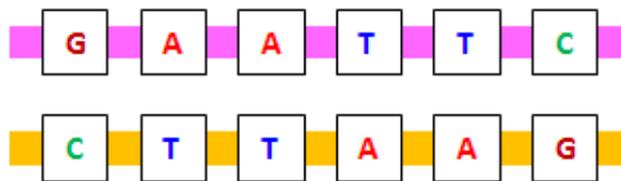
Методика приготовления агарозного геля и проведения электрофореза.

1. Добавьте рассчитанное количество порошка агарозы в отмеренный объем электрофорезного буфера в термостойкой колбе.
 2. Нагрейте взвесь в бане с кипящей водой или в микроволновой печи до тех пор, пока агароза не растворится. Агарозу доведите до кипения, и кипятите 30-60'' (вынимайте из микроволновой печи осторожно – может резко вскипеть).
 3. Остудите раствор до 50-60°C и добавьте бромистый этидий (из водного раствора, содержащего 10 мг/мл и хранящегося при 4°C в светонепроницаемом сосуде) до конечной концентрации 0,5 мкг/мл.
 4. Установите гребенку в ванночку для агарозы. Необходимо, чтобы между дном лунки и основанием геля оставался слой агарозы толщиной 0,5-1,0 мм, т.е. чтобы дном лунки служил агарозный гель.
 5. После того как гель полностью затвердеет (через 30-45 мин при комнатной температуре), осторожно удалите гребенку и поместите гель в электрофорезную ванночку.
 6. Добавьте достаточное количество электрофорезного буфера (при необходимости содержащего 0,5 мкг/мл бромистого этидия), так чтобы гель был закрыт слоем буфера толщиной 1 мм.
 7. Смешайте пробы с буфером для нанесения пробы, содержащим 5-10% глицерина, 7% сахарозы или 2,5% фикола и краситель (0,025% бромфенолового синего или ксилорцианола) и внесите их в лунки геля под электрофорезный буфер. Обычно буфер для нанесения проб готовят в виде раствора 6-10-кратной концентрации. Его смешивают с пробой, а затем осторожно вливают в лунку с помощью автоматической микропипетки.
 8. Подсоедините электроды к источнику напряжения. Напряженность при проведении разделения в агарозных гелях составляет 1-8 В/см. Маркерный краситель движется с той же скоростью, что и фрагменты ДНК, содержащие указанные в табл. 2 число пар оснований.
 9. По окончании разделения выньте пластинку с гелем из ванночки и поместите гель вместе с пластинкой в красящий раствор (1 мкг/мл бромистого этидия). Будьте осторожны! Гель хрупок и легко соскальзывает с пластинки. После 15 мин прокрашивания выньте пластину вместе с гелем и промойте в воде в течение 20 мин.
 10. Жидкость с пластинки удалите с помощью фильтровальной бумаги и переложите пластинку на стекло трансиллюминатора (UV-столик), пропускающее ультрафиолет.
- Предостережение!** Работая с ультрафиолетовым излучением необходимо предохранять глаза и кожу от ожогов. Надевайте очки!

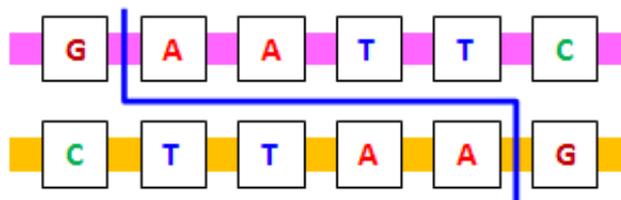
Работа 6. Рестриктивный анализ ДНК

Рестриктирующие эндонуклеазы (или рестриктазы) – это ферменты, «узнающие» определенные последовательности (сайты рестрикции) в двухцепочечной ДНК и расщепляющие молекулу ДНК в этих сайтах. Их выделяют преимущественно из прокариотических клеток. Рестриктазы можно разделить на три группы. Ферменты типа I и типа III обладают модифицирующей (метилирующей) активностью и АТФ-зависимой рестриктирующей активностью (внесение разрывов), проявляемой одним и тем же белком. Ферменты обоих типов узнают неметилированные последовательности в ДНК-субстрате, но ферменты типа I вносят случайные разрывы, в то время как ферменты типа III разрезают ДНК в специфических участках.

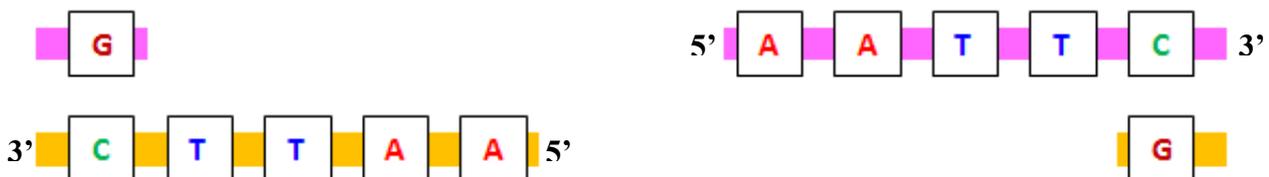
Системы рестрикции – модификации типа II включают два отдельных фермента: рестриктирующую эндонуклеазу и модифицирующую метилазу. Было выделено большое число ферментов рестрикции типа II, многие из которых используются в молекулярном клонировании. Эти ферменты разрезают ДНК внутри или около своих сайтов, которые обычно имеют 4-6 нуклеотидов и обладают осью симметрии 2-го порядка. Например, фермент *EcoRI* узнает последовательность гексануклеотидов (см. последовательность ниже)



Подобно многим другим ферментам рестрикции, *EcoRI* вносит разрыв не точно по оси симметрии 2-го порядка, а в точках двух цепей ДНК, отстоящих друг от друга на 4 нуклеотида:



В результате такого разрыва образуются фрагменты ДНК с выступающими липкими 5'-концами.



Каждый такой конец может взаимодействовать с любым другим концом, комплементарным ему. Таким образом, любые молекулы ДНК, содержащие сайты рестрикции, можно соединять с другими молекулами и в результате получать рекомбинантные молекулы.

Многие ферменты рестрикции, подобно *EcoRI*, катализируют разрывы, в результате которых образуются фрагменты ДНК с выступающими 5'-концами; под действием других (например, *PstI*) – с выступающими 3'-липкими концами, в то время как третьи (например, *HpaI*) разрезают ДНК по оси симметрии с образованием фрагментов с тупыми концами (рис. 22).

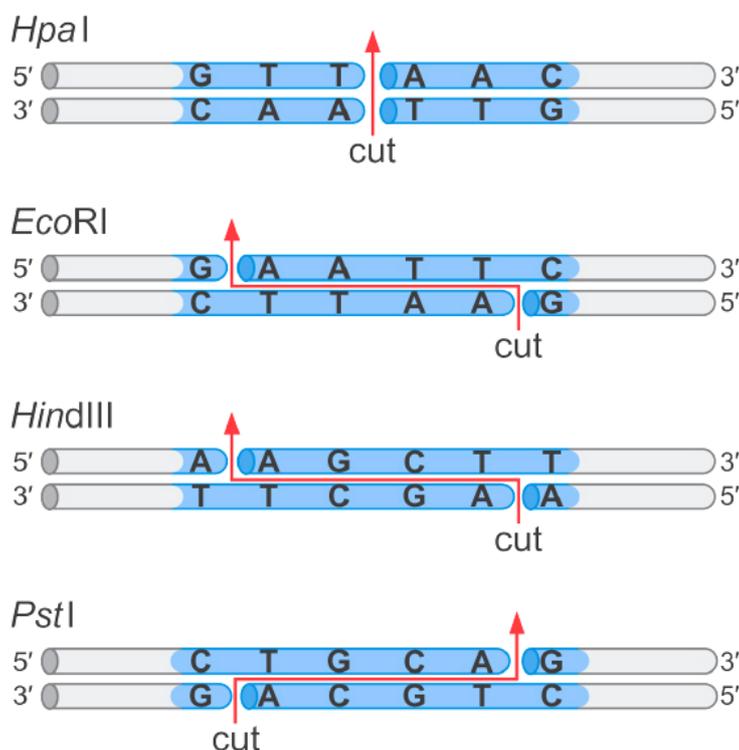


Рис. 22. Иллюстрация сайтов рестрикции для ферментов с липкими 3' и 5' и тупыми концами

Для каждого фермента рестрикции существуют оптимальные условия реакции, которые приводятся в описании, прилагаемом фирмой-изготовителем. Основные переменные параметры – это температура инкубации и состав буфера. К температурному режиму предъявляются достаточно жесткие требования, тогда как различия между буферами чаще всего лишь незначительны. Чтобы не готовить отдельный буфер для каждого фермента, удобно разделить ферменты на три группы: ферменты, лучше всего функционирующие при высокой ионной силе ферменты, для которых желательны ее средние значения; ферменты, функционирующие предпочтительно в буферах с низкой ионной силой.

Задачи

1. Усвоить теоретические основы рестриционного анализа ДНК как основного этапа клонирования.
2. Провести эффективно реакцию рестрикции ДНК

Материалы и оборудование

Следующие материалы необходимы для каждого студента или пары студентов

Материалы	Оборудование
1. Вектор (например pBluescript). 2. Рестриктазы (например EcoRI, BamHI, XbaI). 3. Буфер для рестрикции	1. Настольная центрифуга (Эппендорф). 2. Стерильные пробирки и носики

Методика проведения расщепления ДНК рестриктазами.

Реакционная смесь обычно содержит 0,2-1 мкг ДНК в объеме 20 мкл или менее.

1. Добавьте воду к раствору ДНК в стерильной пробирке фирмы Эппендорф до объема 17 мкл и перемешайте.

2. Добавьте 2 мкл соответствующего буфера 10-кратной концентрации и перемешайте, слегка постукивая по пробирке пальцем.

3. Добавьте 1 Ед. рестриктазы (около 1 мкл) и перемешайте, слегка постукивая по пробирке пальцем. (1 Ед. фермента – это количество фермента, необходимое для полного расщепления 1 мкг ДНК за 1 ч в определенном буфере и при определенной температуре в объеме 20 мкл). Как правило, расщепление рестриктазами, проводимое в течение более длительных периодов времени или при избытке фермента, не приводит к осложнениям, если в препарате фермента отсутствуют примеси ДНК-азы или экзонуклеазы. В имеющихся в продаже препаратах рестриктаз такие примеси обнаруживаются редко.

4. Инкубируйте смесь при подходящей температуре в течение необходимого времени.

5. Остановите реакцию добавлением 0,5 М ЭДТА, pH 7,5, до конечной концентрации 10 мМ.

Если ДНК анализируют сразу в геле, добавьте 6 мкл буфера для нанесения, перемешайте смесь встряхиванием и нанесите расщепленную ДНК на гель.

Если обработанная рестриктазой ДНК нуждается в очистке, экстрагируйте ее один раз смесью фенол-хлороформ, один раз хлороформом и осадите этанолом.

Примечания: Рестриктазы – дорогие ферменты! Связанные с ними затраты могут быть сведены к минимуму, если следовать приведенным ниже правилам.

а) Чтобы отобрать небольшое количество фермента из упаковки с концентрированным раствором рестриктазы, быстро коснитесь кончиком стеклянной микропипетки разового пользования (на 5 мкл) поверхности раствора фермента. Таким способом можно отобрать всего 0,1 мкл раствора фермента.

б) Рестриктазы стабильны при хранении при -20°C в буфере, содержащем 50% глицерина. При проведении расщепления ДНК рестриктазами приготовьте реакционную смесь, содержащую все компоненты, кроме фермента. Достаньте из морозильника фермент и сразу же поместите его в лед. Работайте как можно быстрее, чтобы фермент находился вне морозильника минимальное время. Сразу же после использования поместите фермент обратно в морозильник.

в) Используйте минимальные объемы реакционной смеси, уменьшая в ней количество воды, насколько это возможно. Проверьте, однако, чтобы объем внесенной рестриктазы составлял менее 1/10 конечного объема реакционной смеси, иначе активность фермента может ингибироваться глицерином.

г) Когда ДНК необходимо обработать двумя или более рестриктазами, реакцию можно проводить одновременно при условии, что оба фермента функционируют в одном и том же буфере. В противном случае первым следует использовать фермент, функционирующий в буфере с более низкой ионной силой. После этого в реакционную смесь можно добавить необходимое количество соли и второй фермент (ферменты) и продолжить инкубацию.

Работа 7. Проведение реакции дефосфорилирования вектора.

Реакция дефосфорилирования иногда необходима, чтобы предотвратить замыкание (защипывания) вектора на себя, особенно в тех случаях, когда для рестрикции вектора использовался один фермент рестрикции. В реакции дефосфорилирования главный компонент — фермент фосфатаза (рис. 25), который обладает широкой специфичностью, то есть она способна гидролизовать самые различные эфиры фосфорной кислоты.

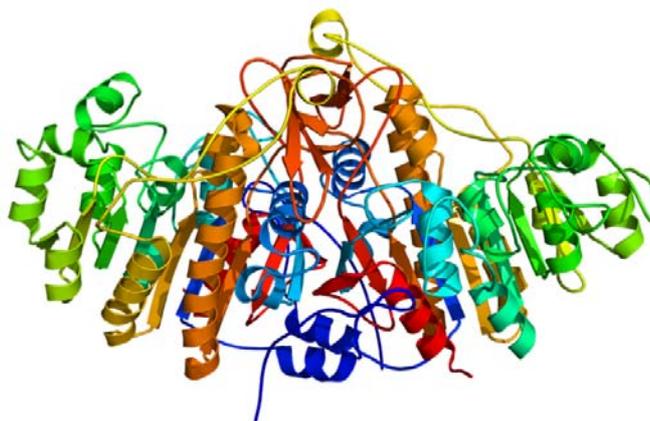


Рис. 25. Пространственная третичная структура щелочной фосфатазы

Обычно фирмы предлагают три продукта для проведения реакции дефосфорилирования ДНК:

1. Стабильный фермент, который функционирует при различных условиях и во многих коммерческих буферах: бактериальная щелочная фосфатаза (BAP).
2. Термочувствительный фермент, который инактивируется при нагревании до 68°C: щелочная фосфатаза из кишечника телёнка (CIP).
3. В некоторых случаях в реакциях клонирования (см. словарь), предпочитают использовать кислую фосфатазу, выделенную из креветок (SAP).
4. В реакциях клонирования чаще используются второй и третий ферменты, так как их можно легко инактивировать CIP нагреванием при 68°C в буфере, содержащем додецил сульфат натрия, а SAP полностью и необратимо инактивируется нагреванием при 65°C в течение 15 минут. Напротив, так как первый фермент термостабилен, то саму реакцию следует проводить при 68°C для подавления активности экзонуклеазы часто загрязняющей препараты фермента. Более того, для удаления следовых количеств BAP следует проводить очистку ДНК с помощью многократных экстракций смесью фенол-хлороформ или гель-электрофореза. Поэтому в большинстве случаев предпочтительнее использовать фермент CIP.

Задачи

1. Понять принципы и механизмы реакции дефосфорилирования.
2. Провести реакцию дефосфорилирования с использованием щелочной фосфатазы.

Материалы и оборудование

Следующие материалы необходимы для каждого студента или пары студентов

Материалы	Оборудование
<ol style="list-style-type: none"> 1. Щелочная фосфатаза CIP либо SAP. 2. 10x Буфер для фосфатазы. 3. Деионизированная, стерильная H₂O. 4. Додecilсульфат натрия. 5. Плазмидный вектор (растворённый в H₂O). 6. Буфер (10x) STE 10мМ трис-HCl pH 8,0, 1M NaCl и 10мМ ЭДТА. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Настольная центрифуга (Эппендорф). 2. Стерильные пробирки и носики. 3. Водяная баня. 4. Термоблок.

Методика проведения реакции дефосфорилирования.

1. Проведите полную обработку ДНК подходящим ферментом рестрикции. Экстрагируйте ДНК смесью фенол-хлороформ и осадите её этанолом. Если рестриктаза закуплена у коммерческих производителей, то следуйте их инструкциям по инаktivации специфической рестриктазы.

2. Растворите ДНК в минимальном объёме трис-HCl pH 8,0. Добавьте 5 мкл буфера для CIP (10x), доведите объём реакции в пробирке до 48 мкл, добавьте фермент CIP (см. Примечание 1).

3. Для дефосфорилирования выступающих 5' концов инкубируйте смесь при 37°C в течение 30 мин, добавьте вторую аликвоту CIP и продолжайте инкубацию ещё 30 мин.

4. Для дефосфорилирования ДНК с тупыми концами или с укороченными 5' концами инкубируйте смесь 15 мин при 37°C и 15 мин при 56°C. Потом добавьте вторую аликвоту CIP и проведите инкубацию при тех же температурах.

5. Добавьте к реакционной смеси 40 мкл H₂O, 10 мкл буфера (10x) STE и 5 мкл (10%) додecilсульфата натрия. Прогрейте ДНК при 68°C в течение 15 мин. Поместите ДНК вектора на агарозный гель и почистите из геля. Если нет такой возможности, то проведите экстракцию ДНК вектора смесью фенол-хлороформа и осаждение ДНК этанолом (см. работу 3). Теперь очищенный вектор можно использовать в реакции с лигазой (лигирования).

Примечание 1: для удаления концевых фосфатов из 1 пмоль 5' концов ДНК (1 пмоль 5' концов линейной ДНК размером 4 kb равен 1,6 мкг) требуется 0,01 единица CIP.

Примечание 2: при покупке коммерчески производимых CIP или SAP (щелочная фосфатаза из креветок), смотрите и следуйте вложенной инструкции к данному ферменту.



Голубой цвет глаз — это результат мутации в гене **HERC2**, из-за которой у носителей такого гена снижена выработка меланина в радужной оболочке глаза. Возникла эта мутация примерно 6—10 тыс. лет назад в северо-западной части черноморского побережья, так что все люди с голубыми глазами могут считаться родственниками.

Работа 8. Проведение реакции лигирования ДНК.

Фермент-ДНК-лигаза участвует в реакциях ДНК репарации и ДНК репликации. Кроме того, ДНК лигаза широко применяется в лабораториях молекулярной биологии для экспериментов по генетической рекомбинации. Очищенная ДНК лигаза используется в генном клонировании для сшивания (лигирования) молекул ДНК, чтобы получить рекомбинантную ДНК.

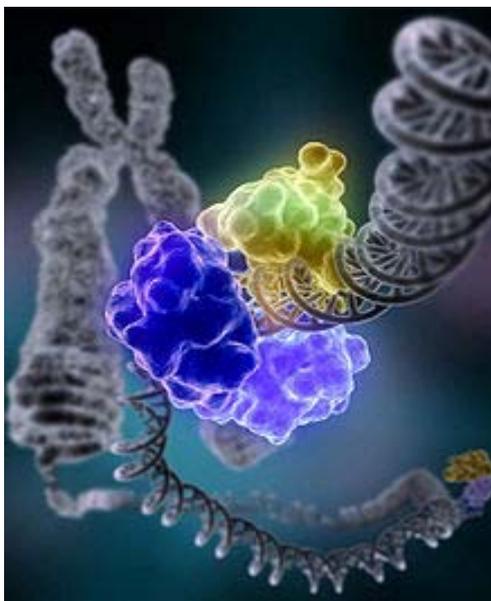


Рис. 23. ДНК-лигаза, репарирующая повреждение хромосомы

В 1961 г. М. Мезельсон и Дж. Вейгл на примере фага лямбда показали, что ДНК рекомбинация (кроссинговер) включает разрыв и последующее восстановление молекул ДНК (рис. 23). Эта работа дала импульс поиску ферментов, участвующих в процессе рекомбинации. Вскоре при изучении фагов лямбда и Т4 были выявлены фагоспецифичные нуклеазы, необходимые для осуществления фаговой рекомбинации. Это указывало на правильность предложенной гипотезы о механизме кроссинговера. Начались интенсивные поиски фермента, участвующего в воссоединении расщеплённых рестриктазами ДНК. В 1967 г. независимо в нескольких лабораториях был открыт фермент, названный ДНК-лигазой, который катализирует синтез фосфодиэфирной связи в двухцепочечной ДНК.

Удалось обнаружить два типа ДНК-лигаз: фермент, синтезируемый в клетках *E. coli*, и фермент, появляющийся в клетках *E. coli*, инфицированный фагом Т4. Они различались по потребностям в кофакторах. ДНК-лигаза *E. coli* в качестве кофактора требует дифосфопиридиннуклеотид, в то время как лигаза фага Т4-аденозинтрифосфат (АТФ). Кроме того, ДНК-лигаза фага Т4 в отличие от первой способна катализировать реакцию воссоединения двухцепочечных ДНК с тупыми концами. Поэтому в настоящее время в генно-инженерных экспериментах предпочитают использовать ДНК-лигазу фага Т4, как более универсальный фермент.

ДНК-лигаза фага Т4 является мономерным полипептидом с молекулярной массой 68 кДа (рис. 24) и катализирует образование фосфодиэфирной связи между прилегающими 5'-фосфатным и 3'-гидроксильным концами цепей ДНК.



Рис. 24. Третичная структура фермента лигазы

При этом возможны два типа реакций:

1. Лигирование липких концов: субстраты этой реакции-двухцепочечные молекулы ДНК с одноцепочечными, полностью комплементарными липкими концами. Частным случаем такой реакции является лигирование так называемого ника-разрыва в одной из нитей двухцепочечной ДНК.

2. Лигирование тупых концов: субстраты же этой реакции-двухцепочечные молекулы ДНК с тупыми концами. Таким образом, ДНК-лигаза фага Т4 обеспечивает ковалентное соединение любых двухцепочечных фрагментов ДНК, для которых имеется возможность состыковать 5'-р и 3'-ОН концы. Поэтому она является одним из важнейших ферментов, на использовании которых основаны современные методы рекомбинации молекул ДНК *in vitro*.

Обычно, реакция лигирования используется для соединения интересующего нас гена (вставки) и плазмиды (вектор). Полученная таким образом рекомбинантная ДНК в последующем используется для трансформации бактерий. Оба компонента ДНК (вставка и вектор) в реакции лигирования должны присутствовать в эквимольных количествах около 100мг/мл. Как правило, вставку и вектор индивидуально подвергают рестрикции, чтобы получить комплементарные липкие или тупые концы, затем обе молекулы ДНК добавляются в реакцию лигирования, где лигаза сшивает их. Если концентрация плазмиды по отношению к вставке в реакции лигирования слишком высока тогда будут получены лишние «пустые» моно и полимерные плазмиды. Если соотношение слишком низко тогда, результатом может быть избыток линейных и плазмидных гомо- и гетерополимеров.

Задачи

1. Научиться рассчитывать молярное соотношение вставки и вектора так как оно может иметь существенный эффект на результат лигирования и последующей трансформации.
2. Провести самостоятельно реакцию лигирования с использованием ДНК-лигазы фага Т4.

Материалы и оборудование

Следующие материалы необходимы для каждого студента или пары студентов

Материалы	Оборудование
1. ДНК T4 лигаза. 2. 10x Буфер для ДНК T4 Лигазы. 3. Деионизированная, стерильная H ₂ O. 4. Очищенный, линейаризованный вектор (растворённый в H ₂ O). 5. Очищенная, линейаризованная вставка (растворённая в H ₂ O).	1. Настольная центрифуга (Эппендорф). 2. Стерильные пробирки и носики. 3. Вортекс

Методика проведения реакции лигирования.

Вычисление соотношения вставки к вектору проводится по формуле:

$$\text{масса вставки (нгр)} = 6 \times \left(\frac{\text{длина вставки (п.о.)}}{\text{длина вектора (п.о.)}} \right) \times \text{масса вектора (нгр)},$$

где *масса вставки* и *масса вектора* в нанограммах (нгр), *длина вставки* и *длина вектора* в парах оснований (п.о.)

Объём реакционной смеси составляет обычно 10 мкл (можно также использовать бóльшие объёмы смеси для лигирования).

1. Добавьте соответствующее количество деионизированной H₂O в стерильную пробирку Эппендорф на 0,5 или 1,5 мл.
2. Добавьте 1 мкл 10x буфера для T4 лигазы в пробирку к реакционной смеси (перед тем как забирать в пипетку все растворы кроме ферментов, желательнее их встряхнуть на вортексе для получения гомогенного раствора).
3. Обратите внимание на то, что буфер содержит АТФ, так что повторные циклы замораживания-оттаивания могут разрушить АТФ, таким образом, уменьшая эффективность лигирования
4. Добавьте соответствующее количество ДНК вставки в пробирку.
5. Добавьте соответствующее количество ДНК вектора в пробирку. Добейтесь того, чтобы соотношение (insert:vector) было 3:1 (~10 нгр вектора). В конце добавьте 0,5 мкл фермента T4 ДНК-лигазы.
6. Обратите внимание что лигаза, как и большинство ферментов, находится в растворе глицерина, который имеет тенденцию оставаться на кончике. Чтобы добавить только 0,5 мкл, просто коснитесь кончиком поверхности раствора фермента, добавьте в реакционную смесь и хорошо перемешайте.
7. Затем поместите пробирку с 10 мкл раствора в термостат при 22,5°C и выдержите в течение 30 минут.
8. По окончании реакции денатурируйте лигазу при 65°C в течение 10 минут.
9. Можно хранить реакционную смесь при -20°C.



Родившаяся в 1993 году американская девочка Брук Гринберг по своим физическим и умственным параметрам до сих пор является младенцем. Её рост — 76 см, вес — 7 кг, зубы — молочные. Анализы медиков показали, что в её генах, отвечающих за старение, нет мутаций. Однако учёные не теряют надежды с помощью новых исследований этой девочки приблизиться к пониманию причины старения людей.

Работа 9. Трансформация клеток кишечной палочки (*Escherichia coli*) плазмидной ДНК

Кишечную палочку считают универсальным организмом для синтеза чужеродных белков. В *E. coli* исследователи вводят гены при помощи плазмидных векторов, что позволяет осуществлять биосинтез белков для промышленной ферментации. Также разработаны системы для синтеза в *E. coli* рекомбинантных белков.

Работа Стенли Нормана Коэна и Герберта Бойера (1972 год) на *E. coli*, с использованием векторов (плазмид) и эндонуклеаз рестрикции для создания рекомбинантной ДНК, находится у истоков современной биотехнологии. Одним из первых примеров использования технологии рекомбинантных ДНК является синтез аналога инсулина человека. Модифицированные *E. coli* используют при разработке вакцин синтеза иммобилизованных ферментов и решения других задач.

Для введения в клетки бактерий чужеродной ДНК необходимо наличие так называемого клонирующего вектора, т. е. автономно реплицирующегося в клетках фрагмента ДНК. Большая часть известных векторов сконструирована на основе имеющихся в клетках бактерий внехромосомальных элементов типа плазмид или бактериофагов.

При их создании и использовании придерживаются следующих критериев:

1. вектор должен быть небольшим в связи с тем, что эффективность трансформации клеток-хозяев снижается по мере увеличения размера плазмиды до 15 тысяч пар нуклеотидов (т. п. н.) и выше.
2. вектор должен быть хорошо охарактеризован относительно числа генов и их расположения, а также сайтов рестрикции и нуклеотидной последовательности.
3. вектор должен легко реплицироваться в клетке-хозяине.
4. вектор должен иметь один или несколько селективных маркеров (генов), позволяющих легко отличить клетки, несущие вектор, от нетрансформированных клеток;
5. идеальный вектор должен дополнительно содержать маркер, который может быть активирован или инактивирован путем встраивания фрагментов гетерологичной ДНК;
6. вектор должен содержать максимальное число уникальных сайтов рестрикции, в которые может быть осуществлена вставка гетерологичной ДНК.

Большая серия векторных плазмид, обозначенных символом *pBR* (рис. 26), создана на основе репликона природной плазмиды *ColEI* путем его объединения с генами устойчивости к антибиотикам.

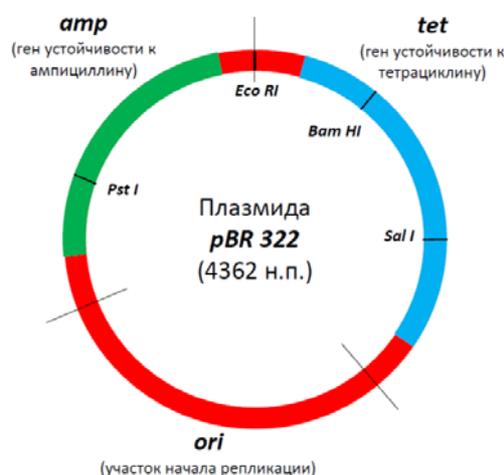


Рис. 26. Плазмидная ДНК, представляющая из себя клонирующий вектор *pBR322*

Генетическая карта одного широко распространенного вектора этой серии, *pBR322*, изображена на рис. 26. Длина плазмиды *pBR322* – 4361 пар нуклеотидов (п.н.). Она несет гены устойчивости к антибиотикам ампициллину (*Amp^r*) и тетрациклину (*Tc^r*) и сигнал начала репликации (*ori*), обеспечивающий репликацию только в клетках энтеробактерий. В плазмиде имеются уникальные сайты рестрикции для *Bam*HI и *Sal*I в гене *Tc^r*, один *Pst*I-сайт – в гене *Amp^r*. Следует иметь в виду, что встраивание в плазмиду клонируемых фрагментов ДНК по сайтам рестрикции, расположенным в генах *Amp^r* и *Tc^r*, будет нарушать их целостность. По такому признаку легко различить клетки, не содержащие плазмиды (не растут в присутствии *Amp* и *Tc*), клетки с плазмидой, не содержащей вставки (растут в присутствии обоих антибиотиков) и клетки с рекомбинантными плазмидами (в зависимости от локализации вставки растут на среде с одним из антибиотиков).

Плазмидные вектора вводят в реципиентные клетки методом генетической трансформации, т.е. путем переноса с помощью изолированной ДНК. Эффективность трансформации бактерий зависит от их способности пропускать ДНК через клеточную стенку. Для некоторых видов бактерий, например *Bacillus subtilis*, *Haemophilus influenzae*, трансформация естественна. Такие клетки, как у организма *E. coli*, гидролизуют линейную трансформирующую ДНК. Поэтому их трансформация происходит только у штаммов *recBC sbcB*, поскольку у них нарушена система деградации ДНК.

Бактериальные клетки, способные к трансформации и трансфекции, называются компетентными. Культуру, содержащую такие клетки, называют культурой в стадии компетентности. Компетентность в большинстве работ принято связывать с начальными этапами – адсорбцией и поглощением ДНК клеткой. Компетентные клетки кишечной палочки готовят в лаборатории путём обработки раствором хлоридом кальция (рис. 27) для приготовления аликвот химически компетентных клеток. Обработка химическим агентом делает мембрану клеток частично проницаемой для чужеродной ДНК.

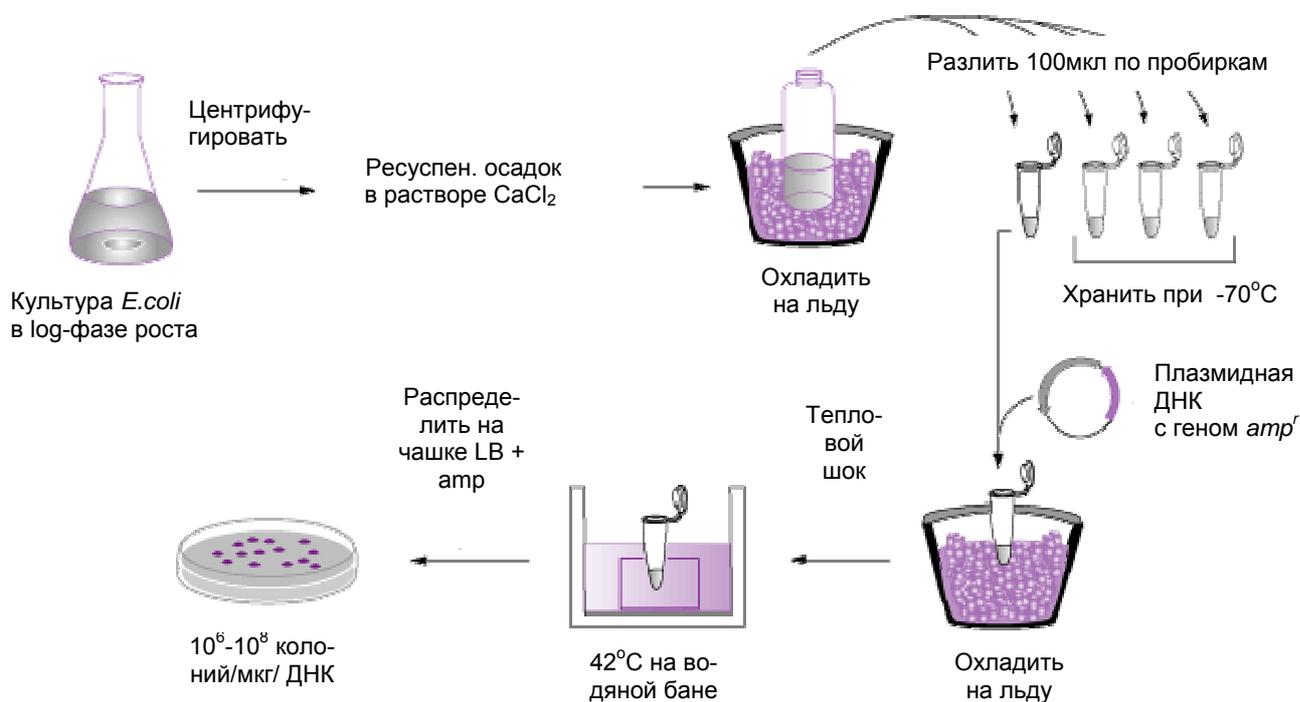


Рис. 27. Процедура приготовления химически компетентных клеток и трансформации методом теплового шока

Трансформация *E. coli* посредством плазмидной и бактериальной ДНК отличается некоторыми особенностями адсорбции и поглощения ДНК по сравнению с трансформацией у других бактерий и осуществима только в лабораторных условиях. Видимо, трансформирующая ДНК при этом на начальных стадиях претерпевает гораздо меньшие изменения, чем у тех бактерий, для которых трансформация является естественным процессом; она почти не фрагментируется и не образует однонитевых молекул.

В качестве реципиентных клеток в большинстве случаев используют штаммы DH5 α и Top10 (*recA1- endA1- hsdR17*). Мутация *hsdR*, блокируя клеточную систему рестрикции, предохраняет тем самым клонируемые фрагменты от действия рестриктазы EcoK. Мутации *endA* и *recA* предотвращают расщепление трансформирующей ДНК клеточными нуклеазами. После проникновения плазмидной ДНК в клетку нет последующего включения этой ДНК в хромосому.

Задачи

1. Приготовить химически компетентные клетки кишечной палочки.
2. Научиться проводить трансформацию клеток *E. coli* плазмидной ДНК.

Материалы и оборудование

Следующие материалы необходимы для каждого студента или пары студентов:

Материалы	Оборудование
1. 50 мл раствора 0,1М CaCl ₂	1. Орбитальный шейкер.
2. Глицерол	2. Термостат
3. Среда LB	3. Настольная центрифуга (Эппендорф)
4. Ампициллин 100 мг/мл	4. Пробирки, носики, чашки Петри

Методика приготовления Ca²⁺ компетентных клеток *E. coli*.

1. Посейте отдельную колонию в 5 мл среды LB в стерильную пластиковую пробирку на 15 или 50 мл. Выращивайте, встряхивая на качалке в течение 12 часов при 37°C.
2. Следующим утром используйте 1 мл этой культуры чтобы перенести её в 100 мл среды LB, находящейся в колбе на 250 мл.
3. Встряхивайте при 37°C в течение 1,5-3 часов. Затем отберите аликвоту этой культуры и померьте оптическую плотность при 600 нм. Культура должна иметь ОП₆₀₀ ~ 0,35-0,45.
4. Поместите клетки на холод в течение 10 минут (старайтесь с этого момента всё время держать их на холоде).
5. Соберите клетки центрифугированием в большой центрифуге в течение 3 минут при 3000 об/мин.
6. Отбросьте супернатант и аккуратно ресуспендируйте осадок в 10 мл холодного 0,1М CaCl₂ (клетки восприимчивы к механическому разрушению, поэтому пипетируйте их мягко).
7. Инкубируйте клетки на льду 15 минут
5. Центрифугируйте клетки как в 5 пункте.
6. Отбросьте снова супернатант и мягко ресуспендируйте на холоде в 5 мл раствора 0,1М CaCl₂ содержащего 15%-го глицерола.

Примечание: Если вы не собираетесь замораживать клетки, а хотите использовать их немедленно, то ресуспендируйте клетки только в 1-2 мл (в зависимости от нужного объёма клеток для экспериментов).

7. Распределите по пробиркам (100 мкл/на пробирку). Заморозьте при -70°C.

Трансформация Ca^{2+} компетентных клеток методом теплового шока.

1. Поместите ~1 мкг плазмидной ДНК или весь объём реакции лигации в пробирку. Добавьте ~100 мкл компетентных клеток. Сделайте вторую пробирку только с 100 мкл компетентных клеток, без ДНК для отрицательного контроля.

2. Инкубируйте в течение 10 минут на льду.

3. Поместите пробирки на водяную баню и держите при температуре 42°C в течение 90 сек. Поместите на 10 мин. обратно на лёд.

4. Добавьте 900 мкл среды LB в пробирки. Встряхивайте при 37°C в течение 1 часа.

5. Распределите 100-1000 мкл клеток по поверхности чашки с твёрдой LB + ампицилин из обеих пробирок.

6. Поместите эти чашки в термостат при 37°C и проверьте эффективность трансформации на следующее утро.

У вас на чашке с ДНК, при условии правильно выполненного эксперимента, должен вырасти «газон» колоний (рис. 28), а на чашке с отрицательным контролем, не должно вырасти никаких колоний.



Рис. 28. Чашка Петри с колониями трансформантов на селективной агаризованной среде.

Чашка с колониями трансформантов хранится в холодильнике перевернутая дном вверх. Колонии могут использоваться в дальнейшем для выделения плазмидной ДНК. Далее эту ДНК возможно применять для реакции рестрикции.



В 1820 году в Бразилии спонтанная мутация на одном из кустов апельсинового дерева привела к появлению апельсинов без косточек, известных как Navel orange. Размножаться этот сорт мог только путём прививания, поэтому все существующие сегодня в мире деревья навели являются клоном того самого бразильского дерева.

Работа 10. Выделение плазмидной ДНК из клеток *E. coli*

Плазмиды – дополнительные факторы наследственности, расположенные в клетках вне хромосом и представляющие собой кольцевые (замкнутые) или линейные молекулы ДНК (рис. 29). Для выделения плазмидной ДНК пользуются многими методами. Все они включают три основных этапа: рост бактерий и амплификацию плазмиды; сбор бактерий и их лизис; очистку плазмидной ДНК. Различают так называемые мини, миди и макси препаративную очистку ДНК на основе исходного объема культуры и выделяемых количеств плазмидной ДНК. Амплификацию плазмид производят при выращивании бактерии-хозяина в богатой среде в присутствии антибиотика.

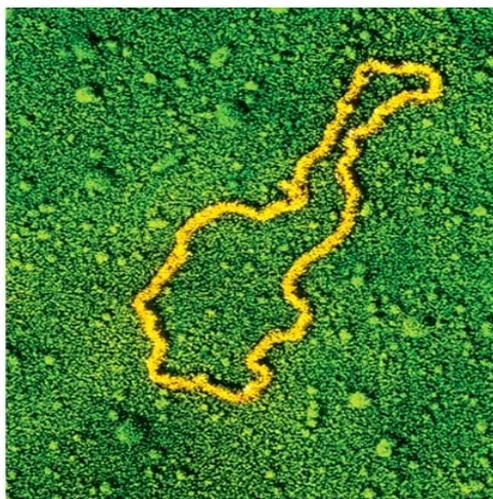


Рис. 29. Электронная фотография плазмидной ДНК

Лизис клеток.

Разрушения бактерий для последующего выделения биологически активной ДНК можно добиться разными способами.

При использовании механических способов происходят многочисленные разрывы ДНК. Поэтому лучше использовать химические способы лизиса. У многих бактерий лизис наступает после добавления анионного детергента додецилсульфата (или лаурилсульфата). В частности, так можно разрушить бактерии кишечной группы, пневмококки и гемофильные бактерии.

Додецилсульфат не только разрушает клетки, но и денатурирует некоторые белки. Однако затем он должен быть полностью удален из лизата (что и достигается при последующих обработках), так как его примесь в трансформирующей ДНК мешает самому процессу трансформации. Однако, некоторые грамположительные бактерии нельзя разрушить только додецилсульфатом или другими поверхностно-активными веществами. Вначале нужно удалить клеточную стенку и затем применить тот или иной детергент.

Для разрушения клеточной стенки чаще всего применяют лизоцим. При концентрациях, которые чаще всего применяются для разрушения бактериальных клеток (50-500 мкг/мл), функции лизоцима сводятся к разрушению клеточной стенки, в результате чего образуются хрупкие протопласты, легко разрушаемые детергентами. При больших концентрациях лизоцим может, видимо, влиять на связь ДНК с цитоплазматической мембраной и даже связываться с ДНК, осаждая ее. Кроме лизоцима, для той же цели употребляют проназу. Проназа способствует более полному гидролизу белка и, как следствие, лучшей последующей депротеинизации ДНК.

При разрушении бактерий в лизате в числе прочих ферментов появляются дезоксирибонуклеазы. Они, если действие их чем-либо не блокировано, могут тут же разрушить ДНК. Обычно от них защищаются, добавляя вещества, которые связывают ионы магния, требующиеся для работы большинства ДНК-аз. Например, вещества, связывающие ионы магния (ЭДТА, цитрат), которые добавляют при лизисе клеток для инактивации дезоксирибонуклеаз и предохранения выделяющейся ДНК, подавляют поглощение ДНК компетентными клетками.

Додецилсульфат и дезоксихолат также подавляют трансформацию. Лизоцим и проназа, остающиеся в лизате, сами могут лизировать компетентные клетки. В ряде случаев от нежелательных примесей, мешающих трансформации, можно избавиться за счет его разведения. Также для депротеинизации лизата при выделении ДНК используют обработку фенолом, который осаждает додецилсульфат и инактивирует все белки, в том числе и дезоксирибонуклеазы.

Вещество	Эффект
ЭДТА	разрыхляет наружную мембрану, ингибирует нуклеазы
Лизоцим	разрушает клеточную стенку
Додецилсульфат натрия (ДСН, SDS)	разрушает цитоплазматическую мембрану, денатурирует белки, ингибирует нуклеазы

Существуют различные методики лизиса. Лизис кипячением (Holmes, Quigley, 1981) и лизис щелочью (Birnboim, Doly, 1979), отличаются высокой эффективностью и в случае малых плазмид (>10 kb) дают выход 2-3 мг/л. Лизис под действием SDS (Godson, Varnek, 1973) сравнительно более мягкий, и им следует пользоваться в случае больших плазмид (<10 kb).

Очистка ДНК.

В этих методах очистки так или иначе используют два основных различия между ДНК *Escherichia coli* и плазмидной ДНК:

- 1) хромосома *E. coli* по размеру много больше ДНК плазмид, обычно используемых в качестве векторов;
- 2) основная масса ДНК *E. coli* выделяется из клеток в виде фрагментированных линейных молекул, тогда как большинство плазмидной ДНК экстрагируется в виде ковалентно замкнутых кольцевых молекул.

Поэтому большинство методов очистки включают осаждения, при которых из препарата удаляются преимущественно длинные цепи ДНК *E. coli*, случайно захваченные обломки лизированных клеток. Методики эти основаны также на использовании свойств кольцевой замкнутой ДНК.

Каждая из комплементарных цепей плазмидной ДНК представляет собой ковалентно замкнутое кольцо, поэтому цепи нельзя отделить друг от друга (не разорвав одну из них) в тех условиях, при которых происходит разрыв большинства водородных связей в ДНК, например при нагревании или при выдерживании в умеренно щелочных растворах (до pH 12,5).

Щелочной метод выделения бактериальных плазмид

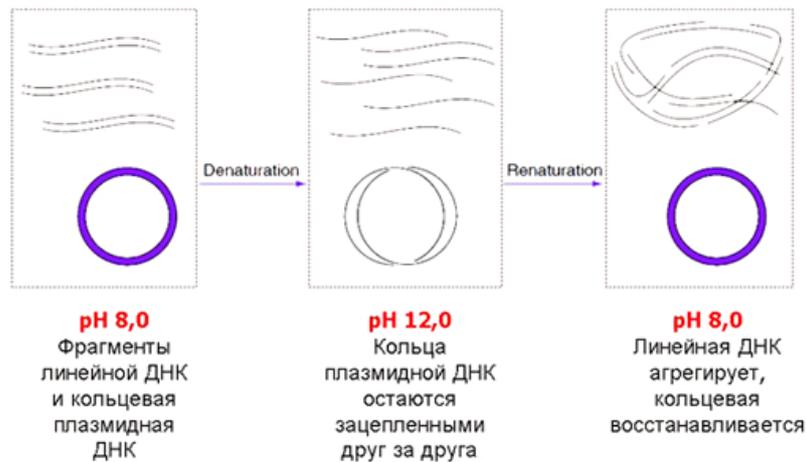


Рис. 30. Иллюстрация щелочного метода выделения цепи двуцепочечной плазмидной ДНК. При этом кольца остаются связанными друг с другом, поскольку плазмиды имеют кольцевую форму

При охлаждении или возвращении к нейтральному pH замкнутые кольцевые молекулы вновь принимают нативную конформацию, тогда как ДНК *E. coli* остается денатурированной (рис. 30).

Расщепление рестриктирующими эндонуклеазами, лигирование, трансформация и даже секвенирование ДНК можно проводить теперь, используя относительно малоочищенные препараты плазмидной ДНК, полученные из небольших объемов культуры – минипрепы (до 10 мл). Плазмидную ДНК выделяют из больших объемов культуры (миди- и максипрепы) лишь в тех случаях, когда нужны значительные ее препараты (например, в опытах по гибридизации для отбора специфических мРНК или когда нужно пометить 5'-концы фрагментов ДНК с помощью полинуклеотидкиназы).

Описанные ниже методики можно успешно использовать для выделения разнообразных плазмид из различных штаммов бактерий. Вообще говоря, чем меньше плазида, тем лучше достигаемые результаты. Однако все плазмиды, обычно используемые при клонировании, относительно невелики и приведенные ниже методы дают хорошие результаты.

Задачи

1. Приготовить все растворы для выделения плазмидной ДНК, для того чтобы не покупать дорогостоящие киты.
2. Научиться проводить процедуру выделения плазмидной ДНК без использования китов.

Материалы и оборудование

Следующие материалы необходимы для каждого студента или пары студентов:

Материалы	Оборудование
1. Среда LB + подходящий антибиотик 2. Буфер P1: 50мМ глюкозы, 10мМ ЭДТА, 25мМ Трис рН 8,0. Хранить при температуре +4°C. 3. Буфер P2: 0,2н NaOH, 1% ДСН. 4. Буфер P3: 3М KOAc рН 6,0. На 100 мл раствора: 60 мл 5М KOAc (49,07 г KOAc в 100 мл H ₂ O), 11,5 мл CH ₃ COOH и 28,5 мл H ₂ O	1. Термостат на 37°C. 2. Стерильные пробирки, носики. 3. Центрифуга.

Методика выделения плазмидной ДНК из культуры клеток кишечной палочки.

1. Нарастите культуру в 5 мл среды LB + подходящий антибиотик при 37°C в течение 20-24 часов.

2. Перенесите культуру в 1,5 мл пробирку Эппендорф и осадите клетки (дважды) на скорости 1200 об\мин в течение 1 минуты в настольной центрифуге.

3. Отбросьте супернатант. Удалите остатки жидкости, перевернув пробирку на бумажную салфетку.

4. Добавьте 100 мкл ресуспендирующего буфера (буфер P1) в каждую пробирку и перемешайте энергично.

5. Добавьте 100 мкл буфера для лизиса (буфер P2) и смешайте, мягко перевернув пробирку несколько раз.

Осторожно! Раствор должен быстро стать прозрачным и содержать большое количество вязкого бактериального материала, если произошёл лизис.

6. Добавьте 150 мкл нейтрализующего буфера (буфер P3) и перемешайте, мягко переворачивая пробирку несколько раз. На этом этапе бактериальная хромосомная ДНК обычно выглядит как белый осадок.

7. Центрифугируйте пробирки на высокой скорости (12000-14000 об\мин.) в течение 10 минут.

8. Тщательно перенесите супернатант (попытайтесь не потревожить белого осадка) в новую маркированную пробирку Эппендорф на 1,5 мл пипеткой на 1 мл.

9. Добавьте 2,5-3 объема абсолютного холодного этанола (выдержанного при -20°C) в каждую пробирку и перемешайте, мягко переворачивая пробирку несколько раз.

10. Осадите центрифугированием плазмидную ДНК (прозрачный осадок) на скорости 14000 об\мин в течение 10 минут.

11. Отбросьте супернатант и удалите остающуюся жидкость в максимально возможной степени, переворачивая пробирку на лист бумаги. Подержите пробирку на воздухе и просушите в течение 10 мин.

Примечание. При такой процедуре выделения достаточно много РНК присутствует в образце ДНК, что может стать проблемой для последующих реакций, например, для рестрикции плазмидной ДНК. Поэтому добавляют 1-5 мкл РНК-азы (на 1 мг/мл) к раствору в котором проводится рестрикция. Или, можно добавить РНК-азу непосредственно к ресуспендирующему буферу (буфер P1) до конечной концентрации 1 мг/мл.



В 2006 году тайваньские учёные вывели зелёных светящихся поросят. Для этого в ДНК-цепочку эмбриона ввели ген зелёного флуоресцентного белка, позаимствованного у флуоресцирующей медузы. Светится у свинок не только кожа, но и все внутренние органы. Основная цель такого эксперимента — возможность визуального наблюдения за развитием тканей при пересадке стволовых клеток.

Краткий словарь

Амплификатор ДНК (термоциклер) – прибор, необходимый для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР); позволяет задавать нужное количество циклов и выбирать оптимальные временные и температурные параметры для каждой процедуры цикла.

Амплификация — увеличение числа копий генов (количества ДНК).

Амплификация ДНК – выборочное копирование определенного участка ДНК.

Антибиотик — вещество, подавляющее рост клеток или убивающее их. Обычно антибиотики блокируют одну из стадий синтеза белков или нуклеиновых кислот.

Биотехнология – применение знаний о биологических процессах в реальной жизни, используя определенные манипуляции с живыми организмами, особенно на генетическом уровне, для производства потенциально выгодной продукции.

Буферы – растворы для приготовления реакционных смесей, в которых ферменты проявляют оптимальную активность.

Вектор (плазида) – автономно реплицирующаяся (копирующая сама себя) молекула ДНК та, в которую можно встроить чужеродную ДНК (вставка). Таким образом чужеродные фрагменты ДНК трансформируются (переносятся) и затем размножаются в клетке - хозяине.

Ген — последовательность нуклеотидов в ДНК, которая обуславливает определенную функцию в организме или обеспечивает транскрипцию другого гена.

Генная инженерия – манипуляции с генетическим материалом организма (ДНК) с помощью введения или устранения определенных генов.

Генетическая регуляция – механизмы тщательного контроля (регуляции) экспрессии генов обеспечивающие адаптацию организмов к различным условиям среды. Эти механизмы также предотвращают энергетически невыгодное перепроизводство ненужных белков. Например, гены вовлеченные в транспорт и распад питательных веществ являются примером генов, находящихся под таким контролем (регуляцией).

Гибридизация ДНК — образование в опыте двуцепочечной ДНК или дуплексов ДНК:РНК в результате взаимодействия комплементарных нуклеотидов.

ДНК-маркеры – гидролизаты плазмидных и фаговых ДНК, предназначенные для использования в качестве стандартов молекулярных весов в обычном и импульсном гелеэлектрофорезах.

Клон — группа генетически идентичных клеток, возникших неполовым путем от общего предка.

Клонирование ДНК — разделение смеси рекомбинантных молекул ДНК путем их введения в клетки методом трансформации или инфекции. Одна бактериальная колония представляет собой клон, все клетки которого содержат одну и ту же молекулу рекомбинантной ДНК.

Клонирование клеток — их разделение путем посева на питательном агаре и получение колоний, содержащих потомство от изолированной клетки.

Наборы (киты) – наборы реактивов для различных молекулярно-биологических методов.

Пластик – лабораторная пластиковая посуда (наконечники, пробирки, штативы).

Праймеры – короткие ДНК затравки, используемые в реакциях ПЦР.

Препараты (препаративная) ДНК – высокоочищенные препараты геномных, плазмидных и фаговых ДНК.

Секвенирование – услуга по определению нуклеотидной последовательности плазмидных ДНК и ПЦР-продуктов на автоматическом секвенаторе.

Синтез праймеров – синтез высокоочищенных олигонуклеотидов требуемой последовательности.

Технология рекомбинантных ДНК – процесс расщепления и воссоединения генов и их фрагментов как средство выделения генов из организмов или изменения их структуры и функции.

Трифосфаты – ферментативно синтезированные дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, предназначенные для использования в ПЦР и других молекулярно-биологических работах.

Ферменты нуклеинового обмена – ферменты взаимодействующие с нуклеиновыми кислотами, способные модифицировать их различным образом: полимеризовать, гидролизовать, лигировать и т.п.

Экспрессия гена— процесс реализации информации, закодированной в гене. Состоит из двух основных стадий — транскрипции и трансляции.

Электрофорез — разделение электрически заряженных полимеров в электрическом поле. Обычно ведется в гелях (гель-электрофорез), чтобы зоны разделяемых молекул не размывались тепловым движением.

Эндонуклеазы рестрикции – сайт-специфические дезоксирибонуклеазы, взаимодействующие со строго определенными короткими нуклеотидными последовательностями двухцепочечной ДНК и расщепляющие фосфодиэфирные связи обеих цепей в определенном месте участка узнавания или рядом с ним.

Список рекомендованной литературы

Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак - М.: Мир, 2002. - 589 с., ил.

Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. / Т. Маниатис, Э.Фрич, Дж. Сэмбрук - М.: Мир, 1984. - 480 с., ил.

Основы генетической инженерии. 2 изд. В.Н. Рыбчин СПб.: Изд-во СПбГТУ, 2002. - 522 с.

Генетическая инженерия: учеб.-справ. пособие. - 2-е изд., испр. и доп.—Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2004. - 496 с., ил.

Практическая Молекулярная Биология. URL: <http://molbiol.edu.ru>.

В заключение прилагается тест по молекулярной биологии на проверку остаточных знаний. На каждый вопрос даётся только один правильный ответ.

ТЕСТ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ ПО ДИСЦИПЛИНЕ «МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ»

1. Молекулярная биология изучает:

- А. протекание биологических процессов на молекулярном уровне;
- Б. строение клетки;
- В. морфологическое и физиологическое многообразие бактерий и вирусов.

2. Функции мембран:

- А. регуляция обмена между клеткой и средой, разделительная функция, рецепторная;
- Б. транспортная функция, электрическая;
- В. верны оба варианта ответа.

3. Общая формула аминокислот:

- А.
$$\begin{array}{c} \text{NH} - \text{CH} - \text{COOH} \\ | \\ \text{R} \end{array}$$
- Б.
$$\begin{array}{c} \text{NH}_2 - \text{CH} - \text{CH} \\ | \\ \text{R} \end{array}$$
- В.
$$\begin{array}{c} \text{NH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\ | \\ \text{R} \end{array}$$

4. Аминокислоты могут проявлять свойства:

- А. кислот;
- Б. оснований;
- В. верны оба варианта ответа.

5. Окончание полипептида, содержащее аминогруппу, называется:

- А. С – конец;
- Б. N – конец;
- В. пептидная связь.

6. Мономерами белков являются:

- А. нуклеотиды;
- Б. нуклеосомы;
- В. аминокислоты.

7. Нуклеотид – это мономер

- А. белков;
- Б. нуклеиновых кислот;
- В. жиров.

8. Простые белки состоят:

- А. только из нуклеотидов;
- Б. только из аминокислот;
- В. из аминокислот и небелковых соединений.

9. Защитную функцию выполняют белки:

- А. Цитоскелета;
- Б. Иммуноглобулины;
- В. Гормоны.

10. В строении белков различают:

- А. два уровня организации молекулы;
- Б. три уровня организации молекулы ;
- В. четыре уровня организации молекулы.

11. Полипептид образуется путем:

- А. взаимодействия аминогрупп двух соседних аминокислот;
- Б. взаимодействия аминогруппы одной аминокислоты и карбоксильной группы другой аминокислоты;
- В. взаимодействия карбоксильных групп двух соседних аминокислот.

12. Степень спирализации белка характеризует:

- А. первичную структуру белка;
- Б. вторичную структуру белка;
- В. третичную структуру белка;

13. Четвертичная структура белка характерна для:

- А. олигомерных белков;
- Б. фибриллярных белков;
- В. глобулярных белков.

14. Белки актин и миозин выполняют функцию:

- А. транспортную;
- Б. защитную;
- В. сократительную.

15. ДНК содержит:

- А. рибозу, остаток фосфорной кислоты, одно из четырех азотистых оснований: аденин, гуанин, цитозин, тимин;
- Б. дезоксирибозу, остаток фосфорной кислоты, одно из четырех азотистых оснований: аденин, гуанин, цитозин, тимин;
- В. дезоксирибозу, остаток фосфорной кислоты, одно из четырех азотистых оснований: аденин, гуанин, цитозин, урацил.

16. Генетический код был открыт:

- А. Гамовым
- Б. Гриффитом
- В. Очоа

17. Специфичность генетического кода состоит в:

- А. кодировании аминокислот более чем двумя различными триплетами;
- Б. кодировании каждым триплетом только одной аминокислоты;
- В. наличии единого кода для всех живущих на земле существ.

18. Вырожденность генетического кода – это:

- А. кодирование одним триплетом только одной аминокислоты;
- Б. кодирование одним триплетом одной либо нескольких аминокислот;
- В. кодирование одной аминокислоты несколькими триплетами.

19. Универсальность генетического кода – это:

- А. наличие единого кода для всех существ на Земле;
- Б. кодирование одним триплетом одной либо нескольких аминокислот;
- В. кодирование одной аминокислоты несколькими триплетами.

20. Возможных триплетов:

- А. 64;
- Б. 28;
- В. 72.

21. Основания, расположенные комплементарно друг другу:

- А. А – Т; Г – Ц;
- Б. А – Ц; Г – Т;
- В. А – Г; Ц – Т.

22. К первичной структурной организации ДНК относится:

- А. трехмерная спираль;
- Б. две комплементарные друг другу антипараллельные полинуклеотидные цепи;
- В. полинуклеотидная цепь.

23. Вторичная структура ДНК была открыта:

- А. Натансом и Смитом
- Б. Уотсоном и Криком
- В. Эвери, Мак-Леодом и Мак-Карти

24. РНК в ядре сосредоточено в:

- А. ядерной оболочке;
- Б. ядрышке;
- В. нуклеоплазме.

25. Информация о строении белка передается в цитоплазму:

- А. матричной РНК;
- Б. транспортной РНК;
- В. рибосомной РНК.

26. Процессинг – это:

- А. Синтез РНК;
- Б. Созревание РНК;
- В. Созревание ДНК.

27. Репликация – это:

- А. копирование ДНК с образованием 2-х идентичных дочерних молекул;
- Б. процесс переписывания информации с ДНК на РНК;
- В. процесс синтеза белка.

28. В репликации ДНК участвует совокупность ферментов и белков, которые образуют:

- А. репликазу;
- Б. рестриктазу;
- В. реплисому.

29. Основной фермент репликации:

- А. ДНК-полимераза;
- Б. геликаза;
- В. лигаза.

30. Начало репликации связано с образованием:

- А. репликационной вилки и глазка;
- Б. праймеров;
- В. фрагментов ДНК на ведущей и отстающей цепи.

31. За расплетение молекулы ДНК ответственен фермент:

- А. ДНК – полимеразы;
- Б. лигазы;
- В. геликазы.

32. Механизм репликации ДНК является:

- А. полуконсервативным;
- Б. консервативным;
- В. неконсервативным.

33. Для осуществления процесса репликации в нуклеоплазме необходимо наличие:

- А. нуклеозидмонофосфатов;
- Б. нуклеозиддифосфатов;
- В. нуклеозидтрифосфатов.

34. Синтез дочерних цепей ДНК осуществляется:

- А. от 5' конца к 3' концу;
- Б. от 3' конца к 5' концу;
- В. на ведущей и отстающей цепях направление синтеза противоположно.

35. Фрагмент Оказаки – это:

- А. короткий участок отстающей цепи ДНК;
- Б. длинный участок ведущей цепи ДНК;
- В. участок материнской цепи ДНК.

36. Репликация ДНК у эукариот протекает:

- А. быстрее, чем у прокариот;
- Б. медленнее, чем у прокариот;
- В. с такой же скоростью, как у прокариот.

37. Транскрипция – это:

- А. Процесс самокопирования ДНК с образованием двух идентичных дочерних молекул;
- Б. Процесс переписывания информации, содержащейся в РНК, в форме ДНК.
- В. Процесс переписывания информации, содержащейся в ДНК, в форме РНК.

38. Основной фермент транскрипции:

- А. ДНК-полимераза;
- Б. РНК-полимераза;
- В. рестриктаза.

39. В процессе транскрипции участвует:

- А. только одна из двух цепей материнской молекулы ДНК – смысловая;
- Б. только одна из двух цепей материнской молекулы ДНК – антисмысловая;
- В. любая из двух цепей материнской молекулы ДНК.

40. Участок ДНК, с которым связывается РНК-полимераза, называется:

- А. промотор;
- Б. терминатор;
- В. транскриптон.

41. В закрытом комплексе РНК-полимеразы и материнской цепи ДНК:

- А. цепь ДНК расплетена;
- Б. цепь ДНК не расплетена;
- В. цепь ДНК разрушена.

42. Кодон инициации – участок цепи, определяющий:

- А. конец синтеза мРНК;
- Б. начало транскрипции РНК;
- В. последовательность нуклеотидов в РНК.

43. Терминация осуществляется в результате:

- А. замедления движения РНК-полимеразы;
- Б. ускорения движения РНК-полимеразы;
- В. сплетения цепей материнской молекулы ДНК.

44. В результате транскрипции образуется:

- А. только матричная РНК;
- Б. только транспортная РНК;
- В. все типы РНК клетки.

45. Синтез белка обозначают термином:

- А. репликация;
- Б. транскрипция;
- В. трансляция;

46. Основной фермент трансляции:

- А. ДНК-полимераза;
- Б. аминоксил-тРНК-синтетаза;
- В. лигаза.

47. Рибосомы в процессе трансляции соединяются в структуру, называемую:

- А. шероховатая ЭПС;
- Б. полисома;
- В. полимер.

48. Кодон инициации кодирует аминокислоту:

- А. лизин;
- Б. аспарагин;
- В. метионин.

49. Участок на большой субчастице рибосомы, где локализуется строящийся пептид, называется:

- А. аминоацильный;
- Б. пептидильный;
- В. иницирующий.

50. Процесс элонгации в трансляции – это:

- А. начало синтеза белка;
- Б. удлинение полипептидной цепи белка;
- В. окончание синтеза белка.

59. Изменение последовательности нуклеотидов в ДНК – это:

- А. хромосомная мутация;
- Б. генная мутация;
- В. геномная мутация.

Учебное издание

Шлык-Кернер Оксана Владимировна

ОСНОВЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Лабораторный практикум

Подписано в печать 05.12.12. Формат 60x84 1/8.

Печать офсетная. Усл. печ. л. 6,4.

Тираж 40 экз. Заказ №

Издательство «Удмуртский университет»
426034, г. Ижевск, ул. Университетская, 1, корп.4