

**федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства
здравоохранения Российской Федерации
(Сеченовский Университет)**

Институт фармации им. А.П. Нелюбина
Кафедра биотехнологии

Методические материалы по дисциплине:

Генная инженерия

основная профессиональная образовательная программа высшего
профессионального образования - программа специалитета

06.05.01 Биоинженерия и биоинформатика

федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования

**Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М.
Сеченова**

**Министерства здравоохранения Российской Федерации
(Сеченовский Университет)**

Кафедра биотехнологии

РУКОВОДСТВО ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ЗАНЯТИЙ

ПО ДИСЦИПЛИНЕ

«ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ»

для студентов направления «Биоинженерия и биоинформатика»

СОДЕРЖАНИЕ

1. ПОЛУЧЕНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК.....	5
1.1. ПОДГОТОВКА ШТАММА КЛЕТОК <i>E. COLI</i>	7
1.1.1. Лабораторная работа №1. Подготовка компетентных клеток <i>E. coli</i>	7
1.1.2. Лабораторная работа №2. Трансформация.....	11
1.2. ВЫДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК (КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ТРАНСФОРМАНТОВ, ЛИЗИС КЛЕТОК, ВЫДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМИДЫ)	15
1.2.1. Лабораторная работа №3. Культивирование трансформированного штамма	18
1.2.2. Лабораторная работа №4. Лизис клеток <i>E. coli</i> и выделение плазмидной ДНК	19
2. ОЧИСТКА И РЕСТРИКЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК.....	23
2.1. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №5. ОТДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК ОТ РНК И БЕЛКОВ	23
2.2. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №6. РЕСТРИКЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ПЛАЗМИДЫ	25
2.2.1. Расщепление ДНК рестриктазами (описание типичного эксперимента) .	27
2.2.2. Проведение реакции рестрикции	28
2.3. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №7. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ	29
ПРАВИЛА РАБОТЫ В ЛАБОРАТОРИИ И ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ.....	39
ОСНОВНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К ПОМЕЩЕНИЯМ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ РАБОТ	39
ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ И ПРАВИЛА ПРОВЕДЕНИЯ ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ	40

Введение

В современной науке и технологии одно из лидирующих направлений отводится биотехнологии и, в частности, генетической инженерии как основному ее инструменту. В этой области объединены различные методы, позволяющие:

- встраивать *in vitro* в геном фрагменты ДНК из любых организмов;
- вводить полученные гибридные молекулы в перmissive клетки (как прокариотические, так и эукариотические);
- амплифицировать и
- экспрессировать в клетках клонированные чужеродные гены,
- которые при необходимости можно интегрировать в геном клеток.

С помощью данной методологии удастся преодолевать межвидовые барьеры, существующие в природе при передаче генетической информации, и создавать совершенно новые генетические комбинации.

Методами генетической инженерии получены новые штаммы:

- 1) бактерий
- 2) дрожжей
- 3) линии культур клеток животных, с высокой эффективностью продуцирующие биологически активные вещества белковой природы, витамины, аминокислоты, многие из которых используют в дальнейшем в медицине и ветеринарии.

Около 200 новых диагностических препаратов уже введены в медицинскую практику, и более 100 генно-инженерных лекарственных веществ находятся на стадии клинического изучения. Среди них лекарственные формы в значительной степени облегчающие течение артрозов, сердечно-сосудистых заболеваний, некоторых опухолевых процессов, болезней обмена веществ и тяжелейших патологий, вызванных наследственными дефектами генома человека. Генноинженерные исследования вносят уникальный вклад в изучение структурно-функциональной организации геномов различных организмов.

Значительный объем исследований в биотехнологии, использующих генноинженерные приемы, был выполнен на клетках прокариотической системы *Escherichia coli*, поэтому первичное знакомство студентов с этой областью начинается с выполнения лабораторного проекта, использующего этот

микроорганизм в качестве клеток «хозяина». В лабораторном проекте на системе вектор-хозяин студенты учатся получать компетентные клетки, трансформировать их, наращивать клеточный материал для выделения и очистки плазмидной ДНК, ставить эксперименты для рестрикционного анализа плазмиды.

Приступая к лабораторным занятиям, студент должен иметь четкое представление о структуре и свойствах основных биологических полимеров, молекулярных основах передачи и реализации генетической информации в клетках, процессах репликации, транскрипции и трансляции у прокариот, ферментативных реакциях с участием нуклеиновых кислот.

1. Получение плазмидной ДНК

Генная (генетическая) инженерия – совокупность приемов, методов и технологий получения рекомбинантных РНК и ДНК, выделения генов из организма (клеток), осуществления манипуляций с генами и введения их в другие организмы. Генная инженерия служит для получения желаемых качеств изменяемого организма, в том числе и таких комбинаций признаков, которые не встречаются в природе. Будучи новым этапом развития генетики, генная инженерия использует достижения микробиологии, биохимии, биоорганической химии и молекулярной биологии. Основой генной инженерии является возможность выделять (или создавать *de novo*) и передавать чужеродный генетический материал в клетки про- и эукариотических организмов с помощью так называемых **генетических векторов**.

Наибольшее распространение получили генетические векторы на основе **плазмид** – внехромосомных генетических элементов, представляющих собой кольцевые ковалентнозамкнутые молекулы двухцепочечной ДНК (рис. 1). Плазмиды способны к автономной репликации в клетке, часто несут «необязательные» для нормальной жизнедеятельности и размножения бактерий в благоприятных условиях гены, которые можно заменить чужеродным генетическим материалом. Вследствие небольшого размера (обычно 2,5-200 тыс. п.н.) плазмидную ДНК можно отделить от хромосомной ДНК. Помимо плазмид существуют и другие генетические векторы, например, векторы на основе бактериофагов, фазмиды, искусственные хромосомы.

Каждый тип векторов имеет свои биологические особенности и подходит для определенной цели. Плазмиды используют, как правило, для **трансформации** бактерий – направленного переноса и внедрения в генетическую систему клетки небольшого фрагмента чужеродной ДНК, содержащего один или несколько генов (рис. 2). Реципиентная клетка, в которой происходит экспрессия чужеродного генетического материала, а значит и проявление несвойственного ранее фенотипического признака, называется **трансформантом**.

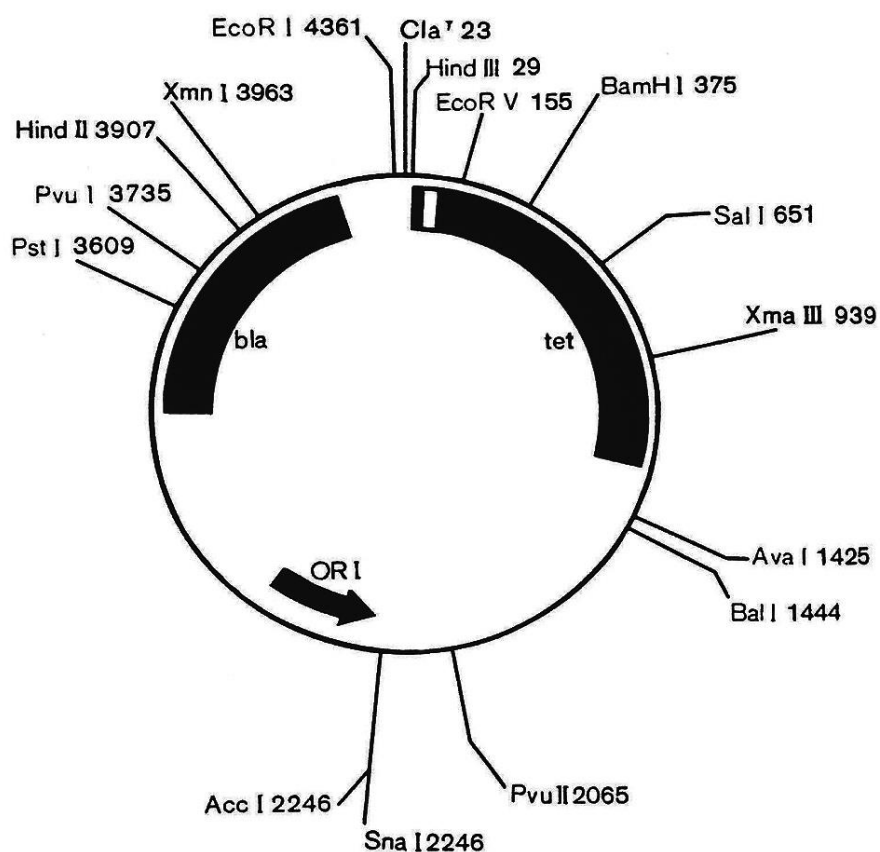


Рис. 1. Плазмида pBR 322. Данная плазмида содержит два гена, определяющие устойчивость к двум антибиотикам: тетрациклину (ген *tet*) и ампициллину (ген *bla*).

Успешное осуществление трансформации определяется использованием необходимого в каждом случае вектора, подходящих штаммов бактерии-реципиента и созданием специфических условий, в которых популяция клеток проявляет максимальную **компетентность** – способность клетки принимать ДНК из окружающей среды внутрь себя.

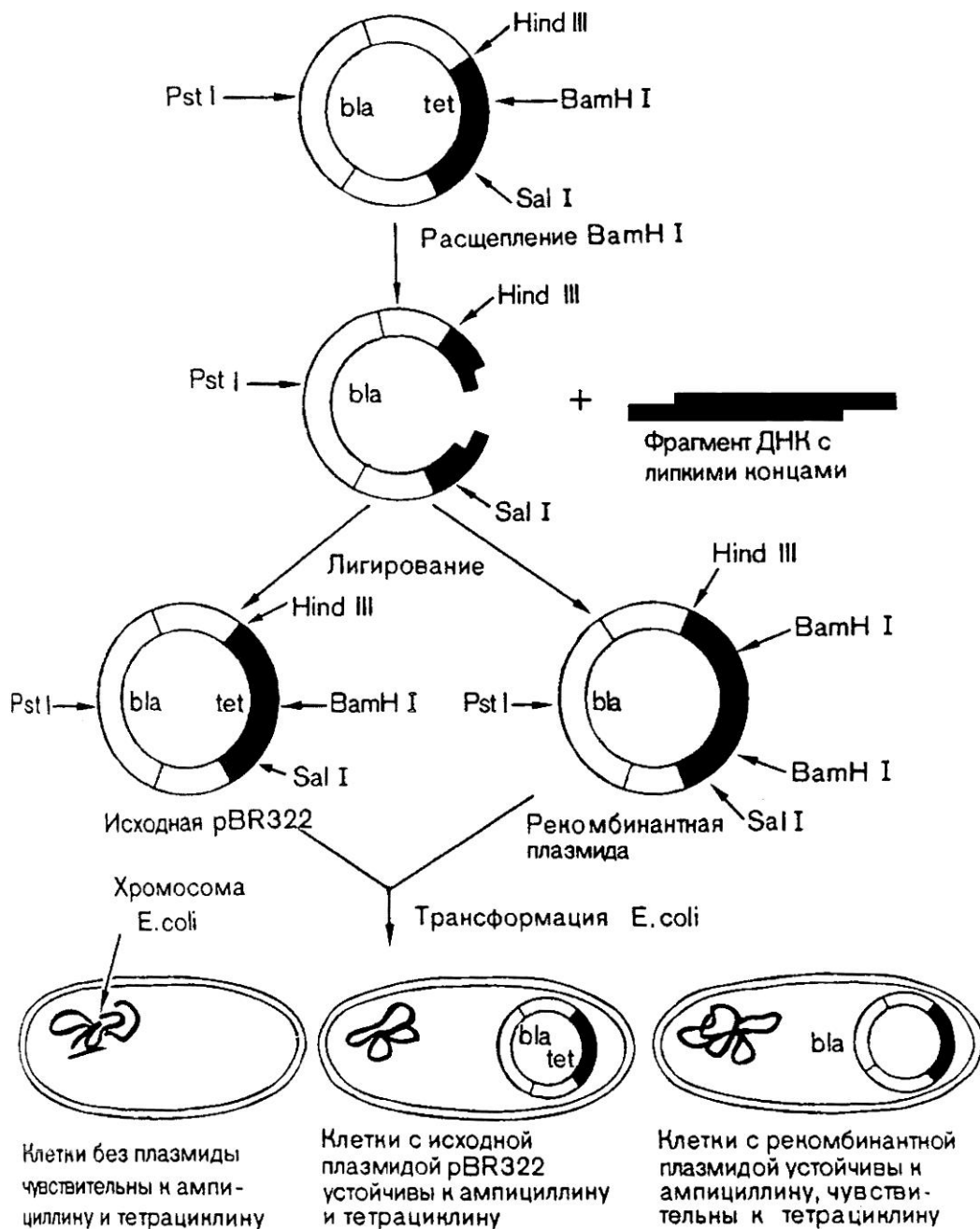


Рис. 2. Клонирование чужеродного генетического материала в *E. coli*. Схема использования плазмиды pBR 322 для отбора клеток *E. coli*, подвергнувшихся трансформации рекомбинантной плазмидой.

1.1. Подготовка штамма клеток *E.coli*.

1.1.1. Лабораторная работа №1. Подготовка компетентных клеток *E. coli*

Компетентность клеток *E. coli* зависит от множества факторов, среди которых важнейшими являются фаза в цикле роста культуры микроорганизмов, состав

питательной среды, физико-химические условия культивирования (аэрация, рН и т.д.), генотип выбранного штамма *E. coli*.

Строение клеточной стенки и цитоплазматической мембраны (ЦПМ) бактериальной клетки в нормальных условиях таково, что исключает проникновение крупных полимерных молекул, каковыми и являются молекулы чужеродной ДНК (молекулярная масса плазмид составляет миллионы Да), Это тем более верно для грамотрицательных бактерий, к которым относят *E. coli*. У грамотрицательных бактерий клеточная стенка помимо слоя из специфического пептидогликана муреина включает наружный слой – наружную мембрану, сходную по строению с ЦПМ. Таким образом, содержимое цитоплазмы и собственно генетический материал *E. coli* надежно защищен цитоплазматической мембраной, муреиновой прослойкой и наружной мембраной. Поэтому неудивительно, что компетентность интактных клеток крайне мала.

Чтобы повысить компетентность клеток *E. coli* при проведении трансформации прибегают к их обработке различными агентами, влияющими на проницаемость стенки и ЦПМ, или добиваются повышения компетентности с помощью определенных физических воздействий (электропорации, бомбардировки микрочастицами золота и т.д.). Но наибольшее распространение в силу своей универсальности, воспроизводимости и легкости в реализации получил метод проведения трансформации при помощи обработки клеток раствором CaCl_2 и последующим тепловым «шоком».

Реактивы и материалы

а) Минимальная питательная среда М 9 (на 1 л):

K_2HPO_4 6 г;

KH_2PO_4 3 г;

NaCl 0,5 г;

NH_4Cl 1 г;

довести рН до 7,5, проавтоклавируют, охладить и стерильно добавить следующие компоненты:

1 М раствор MgSO_4 2 мл;

20% раствор глюкозы 10 мл;

1 М раствор CaCl₂ 1 мл.

Три последних раствора стерилизуются по отдельности фильтрованием или автоклавированием.

б) Обогащенная питательная среда УТ (на 1 л):

Триптон 8 г;

Дрожжевой экстракт 5 г;

NaCl 5 г.

pH среды доводится до 7,5 с помощью 1 М раствора NaOH, после чего среда автоклавировается.

в) 100 мМ раствор CaCl₂

г) Штамм *E. coli* XL-1.

д) Колотый лед.

Приборы и принадлежности

Горелки, воздушный термостат с подвижной платформой с гнездами для колб (качалка для перемешивания образцов), колбы или пробирки для культивирования, центрифуга, весы, стерильные микропробирки, наконечники для микропипеток, автоматические микропипетки, фильтровальная бумага.

Ход работы

Все растворы, питательные среды, микропробирки и наконечники для автоматических микропипеток должны быть предварительно простерилизованы. Операции с исходным штаммом, засев питательной среды, культивирование реципиентного штамма следует осуществлять с соблюдением правил асептики. Получение компетентных клеток, также как и саму трансформацию, желательно осуществлять в стерильном ламинарном боксе или, как минимум, над пламенем горелки, протерев предварительно рабочую поверхность стола и руки спиртом.

1. Небольшое количество суспензии клеток реципиентного штамма *E. coli*, выросшей и хранящейся на среде М 9, стерильно переносится в пробирку или колбу с богатой питательной средой УТ. Данная процедура называется засевом

питательной среды или инокулированием. Объем инокулята составляет, обычно, 1-10% от объема свежей питательной среды (в данном случае рекомендуется брать 1%, поскольку большее количество «старых» клеток *E. coli* и продуктов их метаболизма может снизить компетентность). Инокулированную колбу помещают в воздушный термостат при 37°C с умеренным перемешиванием. Попадая в благоприятные условия, клетки *E. coli* через некоторое время начинают размножаться. Середина логарифмической фазы роста культуры наступает приблизительно через 2-4 ч.

2. Пробирка с раствором CaCl_2 помещается в лед.

3. Культура клеток *E. coli*, достигшая логарифмической фазы роста, извлекается из термостата и центрифугируется. Для этого необходимо стерильно отобрать несколько микропробирок по 1,5 мл суспензии клеток. Уравновесить микропробирки попарно и центрифугировать 10 мин при 2000 об/мин.

4. Микропробирки извлекаются из центрифуги пинцетом. Надосадочная жидкость сливается, микропробирки переворачиваются на стерильную фильтровальную бумагу для удаления остатков культуральной жидкости. Для полного удаления жидкости необходимо постучать микропробиркой по бумаге.

5. В микропробирки с клетками *E. coli* стерильно внести 0,5 мл охлажденного раствора CaCl_2 . Для этого:

- снять колпачок микропробирки с раствором CaCl_2 , простерилизовать горлышко в пламени горелки, проведя им несколько раз непосредственно над пламенем горелки (но не касаясь пламени, чтобы избежать плавления полипропилена!);
- отобрать микропипеткой с надетым стерильным наконечником 0,5 мл раствора CaCl_2 ;
- повторно простерилизовать горлышко микропробирки и закрыть колпачок;
- открыть микропробирку с клетками *E. coli* и простерилизовать горлышко в пламени горелки;
- внести раствор CaCl_2 в микропробирку с клетками *E. coli*;
- повторно простерилизовать горлышко микропробирки и закрыть колпачок.

Примечание. Данной техники стерильной работы придерживаются при любых отборах проб и внесении аликвот, а также при посевах, пересевах и инокулировании культур микроорганизмов.

6. Ресуспендировать клетки в растворе CaCl_2 , энергично постукивая пальцем по дну микропробирки.

7. Микропробирки поместить в лед на 20 мин.

8. Отцентрифугировать клетки при 2000 об/мин за 5 мин.

9. Осторожно слить надосадочный раствор CaCl_2 , не затрагивая клетки.

10. Стерильно внести 0,2 мл раствора CaCl_2 . Процедуру внесения повторить, как описано выше.

11. Ресуспендировать клетки в растворе CaCl_2 .

12. Поместить микропробирки в лед на 20 мин.

Примечание. Для максимальной эффективности трансформации (получения максимально компетентных клеток) следует брать клетки *E. coli* в середине логарифмической фазы роста культуры. Для этого, обычно заранее, строится кривая роста данного штамма *E. coli* в данных условиях культивирования и калибровочная кривая зависимости оптической плотности суспензии клеток от концентрации клеток. Требуемая для трансформации концентрация клеток составляет приблизительно $5 \cdot 10^7$ клеток/мл, что соответствует середине логарифмической фазы роста *E. coli* на богатой питательной среде УТ. В дальнейшем наступление середины логарифмической фазы контролируется непосредственно по оптической плотности суспензии клеток. Необходимо учитывать, что различные штаммы даже одного вида бактерий имеют различные параметры роста, а также характеризуются разными калибровочными кривыми.

Эффективность трансформации повышается в 4-6 раз при выдерживании суспензии клеток в растворе CaCl_2 при 4°C в течение 12-24 ч, поэтому иногда рекомендуют суспензию клеток *E. coli* выдерживать в течение ночи в указанных условиях. Обработанные раствором CaCl_2 клетки *E. coli* сохраняют компетентность в течение 6-8 суток при хранении клеточной суспензии при $0-4^\circ\text{C}$.

1.1.2. Лабораторная работа №2. Трансформация

Клонирование генов, получившее широкое применение, невозможно без введения сконструированных *in vitro* рекомбинантных молекул ДНК в клетки.

В аспекте введения ДНК в клетки различают методы трансформации и трансфекции.

Понятие «трансформация» относится к процессу, в результате которого экзогенная ДНК проникает в реципиентную клетку и вызывает наследственные изменения этой клетки. Трансформацию могут осуществлять как целые молекулы ДНК, так и их фрагменты.

Собственно процесс трансформации как процесс внедрения чужеродной ДНК можно разделить на несколько стадий: контакт плазмиды с поверхностью клетки; проникновение плазмидной ДНК в клетку; репликация плазмиды в клетке реципиента.

Как уже отмечалось, лимитирующей процесс трансформации стадией является проникновение плазмидной ДНК в клетки. В основе выбранного нами механизма трансформации *E. coli* плазмидной ДНК лежит переход бактериальной клетки в состояние компетентности, обеспечивающий поглощение ДНК, то есть проникновение ее через клеточную стенку и ЦПМ внутрь бактерии. Методика получения компетентных клеток и последующей трансформации с участием плазмиды, реализуемая в практикуме, включает в себя использование ионов Ca^{2+} и теплового «шока» при 42°C. В результате такой обработки фосфолипидный слой мембран бактерии претерпевает изменения, за счет чего и достигается временная проницаемость оболочки клетки *E. coli*. Считается, что при этом образуются разрывы во внешней мембране клеток. Эти «дыры» представляются наиболее вероятными кандидатами на роль каналов для прохождения ДНК через мембрану.

Даже при соблюдении идеальных условий подготовки компетентных клеток и проведения трансформации далеко не каждая клетка принимает плазмиду и далеко не каждая плазида попадает в клетку. Трансформантов в клеточной суспензии содержится существенно меньше, чем нетрансформировавших клеток. Обычно нормальным считают эксперимент, в котором трансформирована 1 клетка из 10000. Соответственно возникает трудность выделения нужных нам клеток, принявших плазмиду. Наиболее просто данная задача решается применением плазмид, несущих какой-либо маркер, например, ген устойчивости к антибиотику. Реципиентный штамм при этом не должен обладать устойчивостью к этому антибиотику. Плазида

pBR 322 содержит ген, отвечающий за синтез β -лактамазы – фермента, расщепляющего ампициллин. Клетки, принявшие плазмиду, то есть трансформанты, приобретают устойчивость к ампициллину и могут расти на среде, содержащей данный антибиотик. При высеве на агаризованную среду, содержащую ампициллин, из смеси трансформировавшихся и нетрансформировавшихся клеток только первые дадут колонии и могут быть выделены. Данный прием называют селекцией трансформантов по признаку устойчивости к антибиотику.

Реактивы и материалы

- а) Компетентные клетки *E. coli* штамм JM 109.
- б) Плазмидная ДНК, раствор 0,05 мкг/мкл в TE-буфере.
- в) Обогащенная питательная среда УТ жидкая и агаризованная. Для приготовления агаризованной питательной среды к жидкой среде необходимо добавить агар-агар из расчета 15 г/л непосредственно перед автоклавированием.
- г) Ампициллин. Концентрированный раствор ампициллина 100 мг/мл готовится растворением натриевой соли ампициллина в дистиллированной воде, стерилизуется фильтрованием и хранится в аликвотах при -20°C . Рабочая концентрация антибиотика при проведении трансформации 50-199 мкг/мл.
- д) Колотый лед.

Приборы и принадлежности

Стерильные пробирки, автоматические микропипетки, наконечники для них, чашки Петри, шпатели Дригальского, горелка, водяной термостат, воздушный термостат, качалка.

Ход работы

Все процедуры, касающиеся подготовки чашек Петри со средой, содержащей антибиотик, посева и культивирования микроорганизмов, а также проведения собственно трансформации следует осуществлять с соблюдением правил стерильной работы.

1. Внести в 200 мкл суспензии компетентных клеток *E. coli* в растворе CaCl₂ 50 нг плазмидной ДНК. Объем вносимого раствора зависит от концентрации плазмидной ДНК и составляет, обычно 1-4 мкл.

2. Осторожно перемешать содержимое микропробирки, вращая руку с микропробиркой «восьмеркой».

3. Поместить микропробирки в лед на 20 мин.

4. Подвергнуть клетки *E. coli* тепловому шоку в течение 90 с при 42°C в водяном термостате.

5. Извлечь микропробирки из термостата и поместить в лед для быстрого охлаждения до комнатной температуры.

6. Добавить в каждую микропробирку по 800 мкл обогащенной питательной среды.

7. Инкубировать пробы с умеренным перемешиванием в течение 37°C 40-60 мин. За это время клетки восстанавливаются после теплового шока и начинают размножаться. Причем в клетках, принявших плазмиду, она реплицируется, и начинается экспрессия генов устойчивости к антибиотикам.

8. За время инкубации необходимо подготовить чашки Петри со средой, содержащей антибиотик. Для этого в расплавленную а затем охлажденную до ~50°C агаризованную питательную среду стерильно вносят раствор антибиотика в таком количестве, чтобы концентрация последнего стала 50 мкг/мл. Вносить антибиотик желательно непосредственно перед разливом питательной среды по чашкам Петри, когда температура питательной среды составляет 40-45°C.

9. Аккуратно перемешав содержимое колбы для равномерного распределения антибиотика, питательную среду с ампициллином разливают по чашкам Петри. При температуре ниже 40-30°C агаризованная питательная среда застывает.

10. Поочередно отобрать по 50, 100 и 200 мкл клеточной суспензии после трансформации и регенерации для внесения на отдельные чашки Петри с обогащенной агаризованной питательной средой, содержащей антибиотик.

11. Осторожно распределить суспензию по поверхности питательной среды.

12. Растереть суспензию клеток по поверхности питательной среды шпателем Дригальского.

13. Закрывать чашки Петри, подписать и поместить в воздушный термостат на 12-16 часов при 37°C.

Оценка результатов эксперимента

Чашки Петри после инкубирования в термостате анализируют на предмет наличия колоний антибиотикоустойчивых клонов *E. coli*, принявших плазмиду, то есть трансформированных. Оценивают компетентность полученных ранее клеток, исходя из количества выросших колоний, объема внесенного на чашку материала, объема клеточной суспензии и количества плазмидной ДНК, взятой для трансформации. Компетентность выражают как количество клеток, принявших плазмиду, отнесенных к 1 мкг плазмидной ДНК, взятой для трансформации. Например, на чашке выросло 500 колоний, засев осуществляли 50 мкл, объем клеточной суспензии после трансформации по данной методике составляет $200 + 800 = 1000$ мкл, количество внесенной ДНК 50 нг. Тогда компетентность будет $(500/50) \cdot 1000 / (50 \cdot 10^{-3}) = 2 \cdot 10^5$ трансформантов/мкг плазмидной ДНК.

1.2. Выделение плазмидной ДНК (культивирование трансформантов, лизис клеток, выделение плазмиды)

При засеве свежей питательной среды даже небольшим количеством клеток микроорганизмов начинается развитие популяции или рост культуры микроорганизмов. Некоторое время концентрация клеток остается на начальном уровне. Эту фазу роста культуры называют **лаг-фазой** или фазой адаптации. Продолжительность лаг-фазы зависит от предшествующих условий культивирования, возраста инокулята, состава питательной среды. За время лаг-фазы активируются необходимые метаболические пути, синтезируются биополимеры, клетка готовится к первому делению.

Размножение бактерий осуществляется делением родительской клетки на две дочерние. После каждого акта деления численность популяции микроорганизмов возрастает таким образом в два раза. Время, прошедшее с момента одного деления до другого, то есть время цикла деления, называется временем генерации. Для *E. coli* время генерации составляет 20-60 минут в зависимости от штамма и условий

культивирования. В благоприятных условиях количество клеток в популяции возрастает по экспоненциальному закону. Данную фазу роста культуры микроорганизмов называют **экспоненциальной** или **логарифмической фазой**. Однако при таком бурном росте питательная среда истощается по одному или сразу нескольким компонентам питания.

С другой стороны, в культуральной жидкости накапливаются продукты метаболизма, некоторые из которых токсичны для микроорганизмов. Культура замедляет рост (**фаза замедления роста**) и вскоре численность клеток перестает расти, стабилизируясь на определенном уровне (**стационарная фаза**). Если не вносить дополнительных элементов питания в среду и не отводить продукты метаболизма – начинается фаза **отмирания культуры**. Часть клеток лизирует, количество жизнеспособных клеток падает.

Бактериальная культура за короткий отрезок времени, например за ночь, может увеличить численность клеток в тысячи и миллионы раз. Исследователям довольно удобно работать с такими быстрорастущими культурами. Выделение плазмидной ДНК основано на культивировании трансформантов, то есть бактерий, несущих плазмиду, в благоприятных условиях, на богатых питательных средах с последующим контролируемым лизисом клеток микроорганизмов.

Как уже отмечалось, плазида является автономно реплицирующейся в клетке хозяина молекулой ДНК, к тому же клетка несет обычно много копий плазмиды, поэтому при делении обе дочерние клетки, как правило, содержат плазмиду. Тем не менее, при длительном культивировании возможно появление клеток *E. coli*, потерявших плазмиду.

Для получения препарата плазмидной ДНК, способной вызывать трансформацию компетентных клеток, важно не только нарастить как можно больше бактериальной биомассы, но и своевременно и аккуратно выделять плазмиду. Содержимое цитоплазмы бактериальной клетки (в частности, *E. coli*), где собственно и локализованы плазмиды, отделено от окружающей среды ЦПМ и прочной клеточной стенкой (рис. 3). Поэтому выделение плазмиды начинается со стадии лизиса бактериальных клеток. Существует довольно много приемов, позволяющих разрушить клеточную стенку бактерий, вызвав тем самым выход наружу

содержимого цитоплазмы, то есть лизис. Это и механическое разрушение клеток при перетирании или продавливании сквозь отверстия меньше диаметра самой клетки, и ультразвуковое воздействие, и многократное повторение процедуры замораживания–оттаивания, термический или осмотический шок. Перечисленные методы редко применяют при выделении плазмидной ДНК, поскольку они либо повреждают плазмиду, либо весьма трудоемки, или не гарантируют легкое проведение последующих стадий выделения и очистки. Наиболее распространены химические методы лизиса бактериальных клеток, например с применением щелочного раствора детергента.

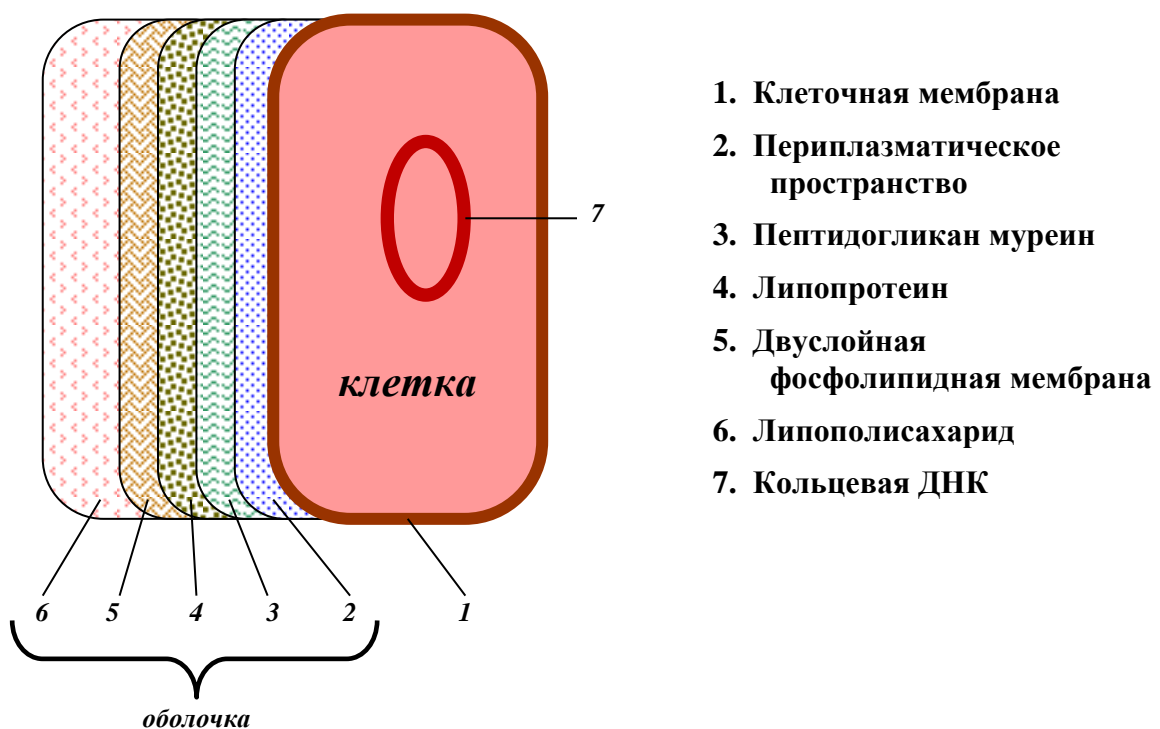


Рис. 3. Клеточное строение бактерии *Escherichia coli*.

Задача выделения и очистки плазмиды осложняется еще и тем, что содержание плазмидной ДНК в клетке обычно невелико. В цитоплазме присутствует большая по размеру хромосомная ДНК, а также другие биополимеры, в первую очередь РНК и белки. Среди последних необходимо отметить ферменты, осуществляющие расщепление нуклеиновых кислот, в частности ДНК. Высокая активность нуклеаз при длительном проведении выделения может свести на нет все усилия

экспериментатора. Поэтому все операции нужно проводить быстро, растворы охлаждать (активность ферментов падает при понижении температуры), иногда в реакционную смесь вводят этилен-диамин-тетраацетат (ЭДТА), образующий комплекс с ионами Mg^{2+} , что снижает активность ДНКаз.

1.2.1. Лабораторная работа №3. Культивирование трансформированного штамма

Реактивы и материалы

- а) Чашки Петри с колониями *E. coli* после трансформации.
- б) Богатая питательная среда УТ.
- в) Стерильный концентрированный раствор ампициллина 100 мг/мл.

Приборы и принадлежности

Колбы для культивирования, воздушный термостат, качалка, микробиологические петли, горелки, стерильные микропробирки, наконечники, автоматические микропипетки, фильтровальная бумага, центрифуга, весы.

Ход работы

1. В колбу с простерилизованной богатой питательной средой УТ вносится раствор антибиотика с таким расчетом, чтобы его конечная концентрация составила 50 мкг/мл. Среда тщательно перемешивается. Внесение антибиотика и все последующие процедуры следует проводить с соблюдением стерильности.

2. Чашки Петри с высеянными после проведенной трансформации клетками *E. coli*, проведенные 12-16 ч в термостате, анализируют на предмет наличия колоний антибиотикорезистентных микроорганизмов. Поскольку резистентность определяется геном устойчивости к ампициллину в плазмиде, значит, мы имеем дело с потомством трансформированной клетки *E. coli*. Колонии отмечаются и нумеруются.

3. Стерильной микробиологической петлей (простерилизованной в пламени горелки и охлажденной) отдельно взятую колонию с чашки Петри переносят в колбу

с питательной средой и ресуспендируют клетки микроорганизмов, аккуратно потряхивая микробиологической петлей в жидкости.

4. Засеянные колбы подписывают и помещают в термостат на устройство, обеспечивающее умеренное перемешивание. Инкубацию при 37°C осуществляют как правило в течение ночи (10-14 ч).

5. Чашки Петри с неиспользованными колониями микроорганизмов «парафильмируют» и хранят в холодильнике при 4°C.

6. После ночного культивирования биомассу *E. coli* отделяют от культуральной жидкости центрифугированием. Для этого из колбы в микропробирки стерильно отбирают по 2 мл клеточной суспензии, попарно уравнивают на центрифужных весах и центрифугируют в течение 5 мин при 4000 об/мин.

7. Надосадочную жидкость осторожно удаляют. Микропробирки переворачивают на фильтровальную бумагу для просушивания. После чего закрывают и либо лизируют, либо хранят в морозильнике при -20°C.

1.2.2. Лабораторная работа №4. Лизис клеток *E. coli* и выделение плазмидной ДНК

Реактивы и материалы

- а) Биомасса клеток *E. coli*, несущих плазмиду.
- б) GTE-буфер (глюкоза – трис-(гидроксиметил)-аминометан гидрохлорид (Трис-НСI) – ЭДТА) – имеет состав 50 мМ глюкозы, 25 мМ Трис-НСI, 10 мМ ЭДТА, рН 8,0.
- в) 1% раствор додецилсульфата натрия (SDS) в 0,2 М растворе NaOH.
- г) 3 М раствор ацетата натрия (или калия), рН раствора доводят до 4,8 ледяной уксусной кислотой.
- д) Изопропанол.
- е) 80%-ный этанол.
- ж) TE-буфер рН 7,4 (Трис-НСI – ЭДТА) – имеет состав 10 мМ Трис-НСI (рН довести до 7,4 с помощью 1 М раствора НСI); 1 мМ ЭДТА рН 8,0.
- з) Колотый лед.

Приборы и принадлежности

Центрифуга, весы, вакуумный эксикатор, микропробирки ($V = 1,5$ мл), наконечники, автоматические микропипетки.

Ход работы

Проводимые в данной работе процедуры не требуют стерильности, однако необходимо тщательно соблюдать общие принципы и правила работы с химическими соединениями. Помимо удовлетворения требованиям техники безопасности аккуратная работа нужна еще и потому, что человеческие потожировые выделения, биологические жидкости содержат ДНК и/или ферменты, деполимеризующие нуклеиновые кислоты. Нельзя касаться внутренних поверхностей микропробирок, в которых проходит эксперимент или хранятся какие-либо реакционные растворы, и наконечников для пипеток руками. Желательно использовать одноразовые перчатки и пинцет. При неаккуратной работе экспериментальные результаты могут быть искажены.

В ходе этого эксперимента неоднократно возникает необходимость отделения плохо фильтрующихся (мелкодисперсных) осадков. С этой целью применяется высокоскоростное осадительное центрифугирование, когда под действием центробежной силы твердая фаза осаждается и уплотняется на дне (иногда частично на стенке) центрифужной пробирки. Находящуюся над осадком жидкость либо сливают, либо аккуратно с помощью пипетки переносят в чистую пробирку. Если при этом туда (в чистую пробирку) попала какая-то (пусть даже очень незначительная) часть Вашего осадка центрифугирование следует повторить.

Примечание. Для осадительного центрифугирования, реализуемого на лабораторном столе, используются центрифуги, развивающие скорость до 15000 об/мин. Недостатком этих моделей является отсутствие охлаждающих систем.

1. Биомассу *E. coli*, хранившуюся в замороженном состоянии, медленно размораживают во льду. Все процедуры лизиса, выделения и очистки целесообразно проводить на холоде, то есть используя охлажденные растворы и реагенты, поэтому заранее в лед помещаются пробирки с требуемыми растворами (кроме 1% SDS).

2. В каждую микропробирку с клетками *E. coli* добавляют по 100 мкл предварительно охлажденного во льду раствора GTE.

3. Осадок аккуратно ресуспендируют и оставляют суспензию на 5 мин при комнатной температуре.

4. В микропробирки вносят по 200 мкл раствора SDS в 0,2 М растворе NaOH. Микропробирки закрывают и плавно (!) перемешивают содержимое.

5. Микропробирки помещают в лед на 5 мин. Щелочной раствор детергента лизирует клетки *E. coli*, разрушая бактериальную мембрану и клеточную стенку, суспензия при этом становится практически прозрачной с незначительной молочной опалесценцией. Вязкость раствора существенно возрастает из-за выхода биополимеров из клеток.

6. В микропробирки вносят 150 мкл предварительно охлажденного во льду 3 М раствора ацетата натрия (или калия) и перемешивают содержимое, резко встряхивая закрытую микропробирку.

7. Микропробирки помещают в лед на 5 мин. Ацетат натрия осаждает белки, а также высокомолекулярную (хромосомную) ДНК бактерий, находящуюся в комплексе с белками.

8. Микропробирки попарно уравнивают на центрифужных весах.

9. Осадок отделяется центрифугированием при 12000 об/мин в течение 5 мин.

10. Из каждой микропробирки отбирается 400 мкл надосадочной жидкости. При этом нельзя допускать попадания осадка в отбираемую пробу. Супернатант содержит нуклеиновые кислоты и низкомолекулярные белки, не выпавшие в осадок при обработке раствором ацетата натрия.

11. В отобранную пробу вносится 400 мкл изопропанола. Содержимое микропробирок интенсивно перемешивают.

12. Микропробирки выдерживают при комнатной температуре 2 мин. Изопропанол осаждает нуклеиновые кислоты достаточно быстро, поэтому важно не оставлять микропробирки надолго на данной стадии выделения плазмидной ДНК, так как через некоторое время начинается осаждение примесных белков.

13. Отцентрифугировать попарно уравновешенные микропробирки при 12000 об/мин в течение 5 мин. Нуклеиновые кислоты осаждаются в виде маленького белого пятнышка на дне микропробирки. При малом количестве исходного материала или небольшом количестве плазмидной ДНК в клетках осадок

практически незаметен невооруженным глазом. Эксперимент при этом следует продолжить.

14. Надосадочную жидкость осторожно сливают, не нарушая целостность осадка. Микропробирки переворачивают на фильтровальную бумагу для подсушивания, постукивая при этом по дну, добиваясь удаления капелек жидкости.

15. Далее осадок нуклеиновых кислот промывают водным раствором этанола, удаляя низкомолекулярные органические соединения и соли. Для этого в каждую микропробирку вносится по 200 мкл 80%-ного этанола. Микропробирки оставляют во льду на 3 мин.

16. Микропробирки попарно уравнивают и центрифугируют при 12000 об/мин в течение 3 мин.

17. Надосадочную жидкость аккуратно сливают и микропробирки переворачивают на фильтровальную бумагу для подсушивания.

18. Полностью осадок в открытых микропробирках высушивают в вакуумном эксикаторе в течение 20 мин для полного удаления влаги и паров спирта.

19. В микропробирки добавляют небольшое количество ТЕ-буфера. Количество вносимого ТЕ-буфера зависит от массы полученного осадка и составляет обычно от 20 до 50 мкл. Точный количество буфера обговаривается с преподавателем.

20. Осадок аккуратно растворяют в буфере, визуально проверяют полноту растворения ДНК.

Полученный на этой стадии раствор плазмидной ДНК в ТЕ-буфере может достаточно долго храниться при температуре -20°C . Также необходимо отметить, что помимо плазмидной ДНК раствор содержит РНК и примесные количества белков *E. coli*, которые не удается полностью отделить по данной методике выделения плазмиды.

Оценка результатов эксперимента

Полученную плазмидную ДНК используют для следующих работ по очистке плазмиды, рестрикционному анализу плазмиды, а также для проведения трансформации. Наличие, гомогенность и идентичность полученных образцов

плазмидной ДНК проверяют электрофоретическим методом (см. работу по идентификации плазмидной ДНК методом гель-электрофореза в агарозе, п. 2.3).

2. Очистка и рестрикционный анализ плазмидной ДНК

2.1. Лабораторная работа №5. Отделение плазмидной ДНК от РНК и белков

Целью работы является удаление из полученного ранее раствора плазмидной ДНК примесные количества РНК и белков. Для решения этой задачи используют следующие способы:

1. Высокоскоростное центрифугирование исследуемого раствора ДНК в течение 48 ч в градиенте хлористого цезия.
2. Обращенно-фазовой хроматографии подвергают пролизированную клеточную массу (после ее полного лизиса с помощью SDS) на различных сорбентах.
3. Поэтапное удаление примесей с использованием различных химических реагентов: 5 М хлористого лития, раствора РНК-азы, фенола, эфира.

В данной работе предлагается использовать третий способ.

Реактивы и материалы

- а) Раствор плазмидной ДНК (хранится при -20°C).
- б) ТЕ-буфер (10 мМ Трис-НС, 1 мМ ЭДТА, рН 7,5)
- в) 5 М раствор хлористого лития
- г) Раствор РНК-азы (концентрация 10 мг/мл в 10 мМ буфере Трис-НСI, добавить 15 мМ NaCl). Раствор прогреть в течение 15 мин при 100°C , медленно охладить до комнатной температуры, разделить на порции и хранить при -20°C .
- д) 96%-ный этанол
- е) Фенол, насыщенный ТЕ-буфером (перегнать фенол, собирая по каплям в буфер)
- ж) Этиловый эфир
- з) 3 М ацетат натрия, рН 5,5 (довести ледяной уксусной кислотой до рН 5,5)
- и) Колотый лед

Приборы и принадлежности

Центрифуга для работы с микропробирками (типа Eppendorf), весы для уравнивания пробирок, термостат на 37°C, холодильник на -20°C, вакуумный эксикатор, микропробирки, наконечники, автоматические микропипетки, штативы.

Ход работы

1. Разморозить микропробирки с плазмидной ДНК и довести объем в микропробирках до 150 мкл ТЕ-буфером.
2. Добавить равный объем 5 М хлористого лития, встряхнуть и поместить микропробирки в холодильник на -20°C на 15 мин.
3. Уравновесить микропробирки и центрифугировать в течение 10 мин со скоростью 12000 об/мин.
4. Супернатант аккуратно (не затронув осадка) перенести в чистую микропробирку.
5. 96%-ный этанол охладить в холодильнике (-20°C).
6. Добавить охлажденный спирт к супернатанту (п. 4) в количестве, превышающем объем супернатанта в 1,5-2 раза. Встряхнуть микропробирку и поместить на 20 мин в тот же холодильник (-20°C).
7. Уравновесить пробы и центрифугировать в течение 10 мин со скоростью 14000 об/мин.
8. Супернатант слить, осадок подсушить.
9. Растворить осадок в 50 мкл ТЕ-буфера.
10. Добавить 3-5 мкл раствора РНК-азы (концентрация 10 мг/мл).
11. Поместить пробы на 40-60 мин в термостат с температурой 37°C.
12. Довести объем в каждой микропробирке до 150 мкл буфером ТЕ.
13. Добавить в каждую микропробирку 150 мкл раствора фенола, насыщенного буфером.
14. Встряхивать микропробирки в течение 3 мин.
15. Выдержать микропробирки на льду в течение 3 мин.
16. Уравновешенные микропробирки центрифугировать в течение 3 мин со скоростью 10000 об/мин.

17. Осторожно с помощью микропипетки (желательно на 100 мкл) отобрать верхнюю, водную фракцию, содержащую ДНК, и перенести ее в чистую микропробирку.
18. Повторить обработку фенолом еще один раз (п.п. 13-17).
19. Добавить в микропробирки по 150 мкл эфира и встряхивать их в течение 3 мин.
20. Оставить пробы на 3 мин во льду.
21. Уравновесить микропробирки и центрифугировать в течение 3 мин со скоростью 10000 об/мин.
22. Удалить из пробирок верхнюю фракцию, содержащую эфир.
23. Обработку эфиром повторить дважды (п.п. 19-22).
24. После последнего удаления эфира в течение 5 мин оставить микропробирки открытыми.
25. Добавить к пробам 15 мкл 3 М CH_3COONa , pH 5,5 и перемешать.
26. Добавить 300 мкл охлажденного 96%-ного этанола, тщательно перемешать.
27. Оставить пробы на ночь в холодильнике при $+4^\circ\text{C}$.
28. На следующий день центрифугировать 5 мин извлеченные из холодильника ($+4^\circ\text{C}$) и уравновешенные пробы со скоростью 10000 об/мин.
29. Осторожно слить растворы из пробирок, не повредив осадок.
30. Высушить осадок в вакуумном эксикаторе в течение 20 мин.
31. Добавить небольшое количество (от 10 до 40 мкл) Трис-буфера, содержащего ЭДТА (TE-буфера) и растворить осадок.

2.2. Лабораторная работа №6. Рестрикционный анализ плазмиды

Целью работы является тестирование выделенной и очищенной плазмидной ДНК с помощью рестрикционного анализа с последующим проведением электрофореза.

Рестрикционное «разрезание» ДНК ферментами **рестриктазами** или гидролиз ДНК с помощью **эндонуклеаз рестрикции** может служить тестом или контролирующим экспериментом, указывающим на качество проведенной очистки ДНК. Если плазида полностью отделена от примесей, то реакция гидролиза

проходит очень эффективно, а электрофоретический анализ продуктов рестрикции дает предсказуемую картину.

Ферменты рестрикции – это эндонуклеазы, расщепляющие фосфодиэфирные связи двухцепочечных ДНК по специфическим сайтам. Известно более 600 рестриктаз, они выделяются из различных бактерий и делятся на 5 классов. В генной инженерии часто используются эндонуклеазы рестрикции 2-го класса, узнающие палиндромные последовательности из 4-6, иногда 8 нуклеотидов – они называются **сайтами рестрикции** (табл. 1). Образующиеся после действия рестриктаз фрагменты имеют либо **липкие концы**, например, используемая в данной работе рестриктаза *BamH I / Hind III* расщепляет последовательность GGATCC, образуя фрагменты с идентичными липкими 5-концами, либо **тупые концы**.

Оптимальные условия реакции для рестриктаз даются в описании фирмы-изготовителя. Очень строго должны соблюдаться температура инкубации и состав буфера. Рестриктазы – очень дорогие ферменты, поэтому работа с ними (приготовление растворов, разведение исходных растворов) требуют очень большой аккуратности.

Буферные растворы для реакции рестрикции готовят с низкой, средней или высокой ионной силой (0 мМ хлорида натрия, для средней и высокой ионной силы концентрации хлорида натрия равны 50 и 100 мМ, концентрация остальных компонентов такие же, как и при низкой ионной силе). Буферные растворы готовят в 10-кратной концентрации, их можно хранить 1-2 недели просто на холоду или неограниченно долго при –20°C. Ферменты рестрикции неустойчивы при комнатной температуре, их необходимо хранить при –20°C, а при использовании держать во льду.

Названия рестриктаз даются по названию микроорганизма, из которого данный фермент был выделен (первый слог или буква из **родового** названия, второй слог – **видового**, буквы и цифры в конце — обозначение **штамма** и **номера** фермента, если таковых было выделено несколько). Например, рестриктаза *BamH I* получена из *Bacillus amyloliquefaciens H*; другой пример: рестриктаза *Hind II* получена из *Haemophilus influenzae Rd*.

Таблица 1. Эндонуклеазы рестрикции, наиболее широко используемые в генной инженерии.

<i>BamH I</i>	G↓ GATC C C CTAG↑ G	<i>Aha III</i>	TTT↓ AAA AAA↑ TTT
<i>Bgl II</i>	A↓ GATC T T CTAG↑ A	<i>Alu I</i>	AG↓ CT TC↑ GA
<i>EcoR I</i>	G↓ AATT C C TTAA↑ G	<i>Hae III</i>	GG↓ CC CC↑ GG
<i>fd III</i>	A↓ AGCT T T TCGA↑ A	<i>Hinc II</i>	GTT↓ GAC CAA↑ CTG
<i>Hpa II</i>	C↓ CG G G GC↑ C	<i>Hind II</i>	GTPy↓ PuAC CAPu↑ PyTG
<i>Kpa I</i>	G↓ GTAC C C CATG↑ G	<i>Hpa I</i>	GTT↓ AAC CAA↑ TTG
<i>Pst I</i>	C↓ TGCA G G ACGT↑ C	<i>Pa II</i>	GG↓ CC CC↑ GG
<i>Se LI</i>	C↓ TCGA C C AGCT↑ G	<i>Pvu II</i>	CAG↓ CTG GTC↑ GAC

2.2.1. Расщепление ДНК рестриктазами (описание типичного эксперимента)

Реакционная смесь содержит 0,2-1 мкг ДНК в 20 мкл.

Ход работы

1. Добавьте воду к раствору ДНК в стерильной микропробирке до объема 18 мкл и перемешайте.
2. Добавьте 2 мкл буфера 10-кратной концентрации, перемешайте, постукивая по микропробирке пальцами.
3. Добавьте 1 ед. рестриктазы, перемешайте (1 ед. рестриктазы – это такое количество фермента, которое необходимо для полного расщепления 1 мкг ДНК в

течение 1 ч в определенном буфере и при определенной температуре в объеме 20 мкл).

4. Проводите инкубацию при подходящей температуре в течение необходимого времени.

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

Если ДНК предстоит анализировать электрофоретическим методом сразу в геле, то добавляют 6 мкл красителя в буфере, перемешивают смесь встряхиванием и наносят расщепленную ДНК на гель. Если обработанная рестриктазой ДНК нуждается в очистке, то проводят ее экстракцию один раз смесью фенол-хлороформ, затем только хлороформом и осаждают ДНК этанолом.

2.2.2. Проведение реакции рестрикции

В этом эксперименте плазмидная ДНК, выделенная из трансформированных клеток, расщепляется рестриктазами. Полученные фрагменты подвергаются электрофорезу в агарозном геле, окрашиваются и анализируются в УФ-свете.

Реактивы и материалы

- а) Плазмидная ДНК
- б) *BamH I* / *Hind III*-рестриктаза
- в) Смеси для рестрикции готовят в 4-х микропробирках на 1,5 мл:
 - А. Выделенная в предыдущем эксперименте плазида рBR 322
 - В. Выделенная плазида рBR 322, *BamH I* / *Hind III*
 - С. Стандарт плазмиды рBR 322, *BamH I* / *Hind III*
 - Д. Стандарт плазмиды рBR 322, без ферментов
- г) Колотый лед

Приборы и принадлежности

Термостат на 37°C, холодильник на -20°C, микропробирки, носики, автоматические микропипетки на 1-100 мкл, центрифуга, весы.

Ход работы

Примечание. Во время выполнения стадий 3-8 все реагенты хранить на льду. Реакционные микропробирки могут находиться в штативе.

1. Смешать реагенты в соответствии со схемой (А.,В,С,Д).
2. Добавить по 5 мкл выделенной ДНК в микропробирки А и В (при добавлении одних и тех же реактивов наконечники микропипеток можно не менять).
3. Используя новый наконечник, добавить по 5 мкл стандарта плазмиды рВR 322 в микропробирки С и D.
4. Заменить наконечник и добавить по 2 мкл рестрикционного буфера и РНК-азы в каждую микропробирку (буфер должен быть добавлен до ферментов). Можно использовать в этой операции один и тот же наконечник при условии, что Вы не касались растворов, уже находящихся в пробирках.
5. Добавить новым наконечником по 2 мкл раствора *BamH I / Hind III* в микропробирки В и С.
6. Используя новый наконечник, добавить соответствующие объемы воды (до равного объема во всех исследуемых пробах).
7. Закрыть крышки и центрифугировать 1-2 с (12000 об/мин). Все компоненты рестрикционной смеси соберутся на дне микропробирки.
8. Осторожно постучать пальцами по микропробирке для перемешивания смеси и поместить микропробирки в термостат на 37°C.
9. Инкубировать микропробирки 20 мин (более длительное инкубирование может привести к деградации плазмидной ДНК нуклеазами, присутствующими в препарате выделенной ДНК).

На этой стадии инкубационные смеси могут быть оставлены при -20°C.

2.3. Лабораторная работа №7. Электрофорез в агарозном геле

Электрофорез (ЭФ) в агарозном геле – стандартный метод, используемый для разделения, идентификации и очистки фрагментов ДНК. С помощью этой простой и высокочувствительной процедуры можно обнаружить 1 нг ДНК в окрашенном бромистым этидием геле в УФ-свете, а также возможно быстро разделить такие

смеси фрагментов ДНК, которые не могут быть разделены другими способами, например, центрифугированием в градиенте плотности. Кроме того, при разделении в геле возможно прямое наблюдение за положением ДНК, так как полосы ДНК в геле окрашивают флуоресцирующим и интеркалирующим в ДНК красителем – бромистым этидием в низкой концентрации.

Принцип электрофоретического разделения заключается в том, что растворы макромолекул (в нашем случае раствор ДНК) в буферных системах обладают некоторым суммарным электрическим зарядом (в данном эксперименте отрицательным). Когда включают прибор (источник тока), через гель в пластине (находящейся в камере) пропускают электрический ток и заряженные макромолекулы нашего образца начинают перемещаться в электрическом поле пластины. При этом молекулы одинакового заряда двигаются в геле фронтом, образуя дискретные полосы.

Агароза – это линейный полисахарид, образующийся из чередующихся остатков β -D-галактопиранозы и 3,6-ангидридо- α -L-галактопиранозы, соединённых 1→4 β -галактозидной связью (рис. 4). Молекулярная масса агарозы составляет 10^4 - 10^5 Да.

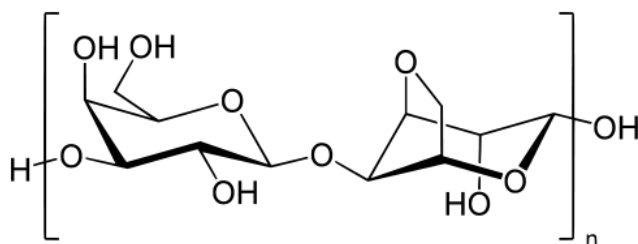


Рис. 4. Полимерная структура агарозы.

Скорость движения ДНК через агарозный гель при ЭФ определяется пятью главными параметрами:

1. Размер молекул ДНК. Молекулы линейной двухцепочечной ДНК перемещаются в геле одним концом вперед со скоростями, обратно пропорциональными десятичному логарифму их молекулярных масс.
2. Концентрация агарозы. Фрагменты ДНК определенного размера перемещаются в геле, содержащем разные концентрации агарозы, с разными

скоростями. Применяя гели разных концентраций, можно разделить большой набор фрагментов ДНК, различающихся по размеру.

3. Конформация ДНК. ДНК, имеющие одинаковую молекулярную массу, но разные конформации, например, кольцевая неповрежденная форма, кольцевая с одноцепочечным разрывом и линейная формы движутся в агарозном геле с разными скоростями. Эти скорости будут зависеть от концентрации агарозы в геле, силы тока, ионной силы буфера.

4. Напряженность электрического поля. При низкой напряженности скорость перемещения фрагментов линейной ДНК пропорциональна приложенному напряжению, но 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 ДНК и температура. Обычно электрофорез в агарозных гелях ведут при комнатной температуре и относительная электрофоретическая подвижность фрагментов ДНК разного размера в области температур от 4 до 30°C не изменяется.

Приспособления для проведения электрофореза в геле

В настоящее время чаще всего используют гели в виде горизонтальных пластинок. Эта система имеет ряд преимуществ: 1) можно применять низкие концентрации агарозы, так как гель поддерживается снизу; 2) можно готовить гели в виде пластинок самых разных размеров; 3) удобна разливка и хранение геля и различные манипуляции с ним; 4) для постановки электрофореза в геле можно применять прочные и недорогие аппараты.

Установка для проведения электрофореза включает:

- источник тока,
- камеру
- пластины для заливки геля (или кассеты)

- гребенки
- УФ-лампы.

Основная часть аппарата – кювета длиной 14,5 или 20 см из прозрачной для УФ акриловой пластмассы толщиной 4-7 мм. Гель размещается на отдельной стеклянной пластинке, которую устанавливают на платформе таким образом, что гель находится под самой поверхностью электрофорезного буфера. Сопротивление геля проходящему электрическому току мало отличается от сопротивления буфера, поэтому по гелю проходит значительная доля тока.

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; наиболее часто используют Трис-ацетатный буфер, хотя его буферная емкость довольно низка, а при длительном использовании буфер истощается (анод становится щелочным, а катод – кислотным). В связи с этим рекомендуется рециркуляция буфера между водным и катодным резервуаром. Ниже приведена таблица приготовления буферов, используемых при ЭФ (табл. 2).

Табл. 2. Буферы, используемые при электрофорезе в геле агарозы.

Буфер	Рабочие растворы	Концентрированные растворы (на 1 л)
Трис-ацетат (ТАЕ)	0,04 М Трис-ацетат, 0,002 М ЭДТА (50х)	242 г Трис, 57,1 мл лед. СН ₃ СООН, 100 мл 0,5 М ЭДТА, рН 8,0
Трис-фосфат (ТРЕ)	0,08 М Трис-фосфат (10х), 0,008 М ЭДТА	108 г Трис, 15,5 мл 85%-ной фосфорной кислоты, 40 мл 0,5 М ЭДТА, рН 8,0
Трис-борат (ТВЕ)	0,089 М Трис-борат (5х), 0,089 М борная кислота, 0,002 М ЭДТА	54 г Трис, 27,5 г борной кислоты, 20 мл 0,5 М ЭДТА, рН 8,0

Приготовление агарозных гелей.

Среди различных марок агарозы предпочтительно использовать агарозу типа П – низкоэндоосмотическую агарозу. Она легко плавится, дает прозрачные растворы, получающиеся из нее гели упруги даже при низких концентрациях.

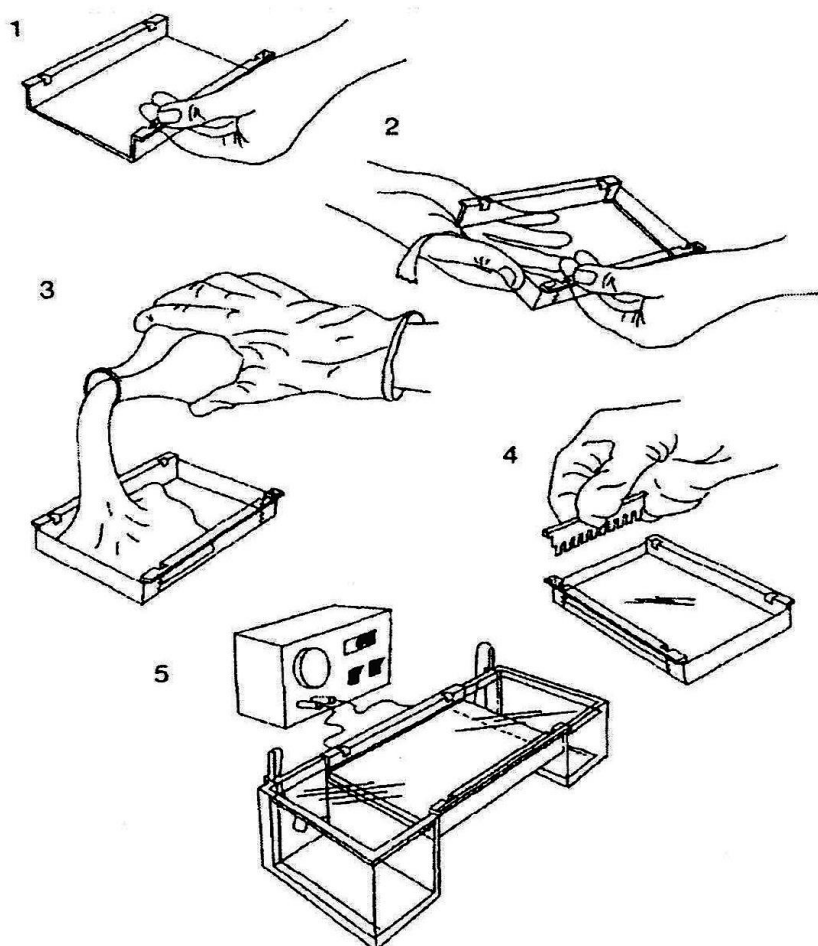


Рис. 5. Приготовление агарозного геля и электрофорез. 1 – кассета для заливки раствора агарозы; 2 – заклеивание торцов кассеты; 3 – заливка кассеты «расплавленным» раствором агарозы; 4 – вставка гребенки; 5 – электрофорез.

Процедура приготовления геля (рис. 5).

1. Добавить рассчитанное количество порошка агарозы в отмеренный объем электрофоретического буфера (в данной работе – ТВЕ-буфер).

2. Нагреть взвесь в бане с кипящей водой до тех пор, пока агароза не растворится.

3. Охладить раствор до 50°C и добавить 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. Заклеить клейкой лентой концы кассеты для заливки гелей и вставить гребенку (рис. 5 (2) и (4)). Гребенку можно вставлять и после заливки кассеты, как показано на рисунке, но при этом существует риск преждевременного застывания геля и формирования неровного ряда ячеек.

5. Осторожно налить раствор агарозы, охлажденный до 50°C в кассету на глубину около 4 мм (агароза должна быть достаточно охлаждена, чтобы можно было держать колбу в руках) (рис. 5 (3)). Гель должен покрывать около 1/3 высоты зубьев гребенки.

6. Не двигать кассету до тех пор, пока гель не затвердеет. Как только агароза затвердеет (10-15 мин), она перестанет быть прозрачной.

7. После затвердевания снять клейкую ленту. Поместить кассету в электрофоретическую камеру таким образом, чтобы гребенка располагалась ближе к катоду (отрицательный электрод).

8. Заполнить камеру буфером так, чтобы гель был покрыт слоем буфера толщиной 1 мм. Буфер используется многократно; не выливайте буфер после использования.

9. Осторожно удалите гребенку, не повредив гель (буферный раствор облегчает выполнение этой операции). Ячейки в геле после удаления гребенки должны быть заполнены буфером.

Количество материала, используемого для электрофореза.

Максимальное количество ДНК, которое можно внести в лунку, зависит от числа фрагментов в пробе и их размеров. Минимальное количество ДНК, которое можно обнаружить при фотографировании геля, окрашенного бромистым этидием, составляет 2 нг при ширине полосы 0,5 см – обычная ширина лунки. Если лунка будет переполнена и в полосе указанной ширины будет более 200 нг ДНК, то полоса

окажется расплывчатой и будет иметь шлейф. Этот дефект особенно выражен при разделении крупных фрагментов ДНК.

При анализе простого набора молекул ДНК в 0,5 см лунку вносят 0,2-0,5 мкг ДНК. Если же пробы содержат очень большое число фрагментов ДНК (например, «рестрикты» ДНК млекопитающих), то можно наносить по 5-10 мкг в лунку, не опасаясь существенного снижения разрешающей способности электрофореза.

Приготовление образцов для анализа плазмидной ДНК, выделенной из клеток (п. 1.2.2. или п. 2.1):

1. Внести в пробирку от 5 до 10 мкл раствора плазмидной ДНК (количества в мкл каждый раз отличаются и зависят от качества и количества плазмидной ДНК в осадке и растворе в предыдущем эксперименте).

2. Добавить к раствору ДНК 3-5 мкл лидирующего красителя. Красители могут быть разными, в нашем эксперименте – это краситель оранжевый Ж в глицерине; он, продвигаясь по матрице (в данном случае – по агарозе) опережает и ДНК, и РНК, то есть **лидирует**.

3. Перемешать полученную смесь.

Приготовление образцов после проведения рестрикции плазмидной ДНК (п. 2.2.2.)

1. Извлечь инкубационные смеси после проведения рестрикции из термостата и добавить по 1 мкл красителя в каждую.

2. Закрыть крышки пробирок и центрифугировать 1-2 с (проверить симметричное положение пробирок в роторе!) для смешивания красителя с раствором.

Проведение электрофореза:

1. Нанести микропипеткой содержимое каждой микропробирки с образцом ДНК в отдельные ячейки геля. Пластина в момент внесения образца должна находиться в камере, заполненной электролитом. Кусок черной бумаги под электрофоретической камерой позволяет более четко видеть ячейки. Выполните следующие советы:

- твердо зафиксируйте двумя руками пипетку над ячейкой;
- будьте осторожны, чтобы не повредить ячейку наконечником пипетки;
- осторожно выдавите образец в ячейку. Если наконечник пипетки расположен над центром ячейки, то раствор будет опускаться на ее дно.

2. Закрыть камеру и присоединить к аноду (красный-красный), а катод к катоду (черный-черный). Проверьте, чтобы оба электрода присоединены к одному каналу источника тока.

3. Выставить напряжение 100 вольт и включить прибор.

4. Вскоре после начала электрофореза становится заметным движение красителей к положительному полюсу (аноду) – видны две цветные полосы (или одна).

5. Длительность электрофореза – 20-40 мин; хорошее разделение происходит, когда первый краситель пройдет 4-8 см от старта. Можно поставить напряжение 25-50 вольт и проводить электрофорез несколько часов. Однако при более длительном сроке красители и ДНК могут выйти из геля в буфер.

6. Выключить источник тока и отсоединить камеру.

7. Осторожно достать гель из камеры и поместить его в ванночку. Можно завернуть гель в тонкую пленку и хранить ночь при 5°C, однако ДНК диффундирует в геле и полосы становятся размытыми.

Окраска бромистым этидием.

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 краситель связывается с ДНК, что сопровождается увеличением

интенсивности флуоресценции. УФ-излучение, поглощаемое ДНК в области 260 нм и передаваемое на краситель (или же излучение, поглощаемое самим красителем при длинах волн 300 и 360 нм) испускается затем в красно-оранжевой области видимого спектра.

Бромистый этидий можно использовать для обнаружения как одно-, так и двухцепочечных нуклеиновых кислот, к последним средство красителя заметно больше.

Обычно бромистый этидий (0,5 мкг/мл) добавляют и в гель, и в электрофорезный буфер. В присутствии красителя электрофоретическая подвижность двухцепочечной ДНК снижается примерно на 15%, но при этом можно наблюдать за процессом разделения непосредственно под источником УФ-излучения во время или в конце разделения.

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

Проведение окрашивания геля бромистым этидием:

1. Надеть резиновые перчатки и залить гель раствором бромистого этидия (1 мкг/мл).
2. Оставить гель окрашиваться в течение 5-10 мин. Время окрашивания зависит от толщины геля; осторожно покачивать окрашиваемый гель для более быстрой диффузии бромистого этидия.
3. Использовать воронку при сливе бромистого этидия, который может применяться многократно.
4. Промыть гель водой для удаления избытка бромистого этидия – хлорированная вода инактивирует следы бромистого этидия.
5. Полученные окрашенные полосы можно сфотографировать или анализировать в специальном денситометре.

Оценка результатов эксперимента

Возможные варианты увиденного на электрофореграмме представлены на рис. 6.

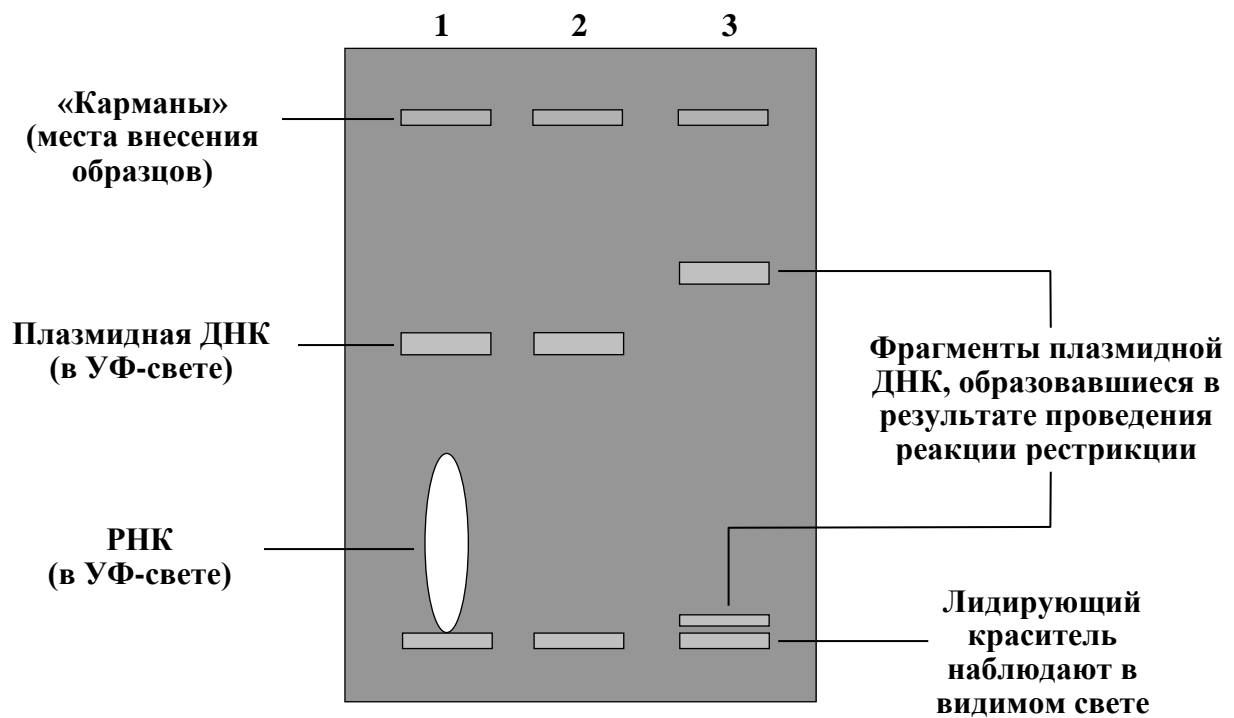


Рис. 6. Схематическое изображение электрофореграммы препаратов ДНК. Дорожка 1 – плазмидная ДНК без очистки; дорожка 2 – плазмидная ДНК после очистки; дорожка 3 – фрагменты ДНК после проведения рестрикционного анализа.

Вывод: если полученные результаты идентичны представленным выше, то эксперимент прошел успешно.

ПРАВИЛА РАБОТЫ В ЛАБОРАТОРИИ И ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

1. Подготовка к выполнению работы и организация рабочего места. В рабочей тетради должна быть записана цель предстоящей работы, принципы используемых методов, названия реагентов, приборов и кратко – в виде плана – должен быть изложен ход работы.

2. Следующий этап работы – получение экспериментальных данных и возможные замечания, наблюдения по ходу эксперимента. В этой части работы необходимо все операции выполнять аккуратно и технически грамотно как в отношении обращения с микроорганизмами, так и при работе с приборами. Будьте осторожны при работе с источниками УФ света (необходимо использовать защитные очки), при работе с вредными для здоровья реагентами пользуйтесь перчатками.

3. Заключительная часть работы — запись результатов и выводов; в этой части возможно построение графиков, таблиц, рисунков, соответствующих результатам.

ОСНОВНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К ПОМЕЩЕНИЯМ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ РАБОТ

Микробиологическая часть генноинженерного практикума должна иметь: основное помещение – для работы с микроорганизмами, а также вспомогательное – для подготовки к ней.

Поверхности столов и пол должны быть покрыты легко моющимся материалом (пластиком, линолеумом). Стены (на высоту 170 см от пола) должны быть окрашены в светлые тона масляной краской, либо покрыты кафелем.

Оба помещения должны быть просторными с хорошим естественным освещением. Свет на лабораторные столы должен падать слева или прямо. Окна

должны быть ориентированы на север или северо-запад чтобы обеспечивать равномерное рассеянное освещение.

В рабочем помещении находятся приборы, лабораторная посуда, пинцеты, чашки Петри, специальное место для окраски препаратов. Бактерицидные лампы в таких помещениях должны быть установлены под потолком или непосредственно в ламинарных шкафах.

Во вспомогательном помещении находятся сушильные шкафы, автоклавы, моечная.

В воздухе, на поверхности предметов и одежде много разнообразных микроорганизмов, механической грязи и пыли, поэтому пол, стены, мебель в лабораторном помещении обрабатывают пылесосом и протирают раствором различных дезинфицирующих средств. Многократная обработка пылесосом достаточно эффективна (12-ти кратная обработка пылесосом удаляет ~97% микроорганизмов). Дезинфицирующими веществами являются: кислоты, щелочи, соли аммония и соли тяжелых металлов, альдегиды, кетоны, спирты, амины и перекиси.

Приложение 3.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ И ПРАВИЛА ПРОВЕДЕНИЯ ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ

Основные понятия теории седиментации

Любая частица, будь то молекула белка, нуклеиновой кислоты или крупный белковый комплекс, вращаясь в роторе центрифуги испытывает действие радиально направленной центробежной силы $F_{ц}$. Величина центробежной силы описывается следующим уравнением:

$$F_{ц} = M\omega^2 r,$$

где M – действующая масса частицы, ω – угловая скорость вращения, r – радиус вращения.

С учетом выталкивающей силы для жидкости масса выражается следующим уравнением:

$$M=V(\rho-\rho_c),$$

где ρ – плотность частицы, ρ_c – плотность среды, V – объем частицы.

Для сферической частицы с диаметром D , объем можно выразить следующим уравнением:

$$V=\frac{1}{6}\pi D^3,$$

$$\text{тогда } F_{ц}=\frac{1}{6}\pi D^3(\rho-\rho_c)\omega^2 r.$$

Частица движется вдоль оси радиуса со скоростью v , при этом ей противодействует сила трения, выражающаяся уравнением:

$$F_T=f v,$$

где f – коэффициент трения, пропорциональный вязкости среды η_c и линейному размеру частицы.

Для сферы коэффициент трения будет:

$$f=3\pi\eta_c D.$$

Со временем центробежная сила будет уравновешена нарастающей силой трения, в таком случае:

$$F_{ц}=F_T,$$

$$\text{или } \frac{1}{6}\pi D^3(\rho-\rho_c)\omega^2 r=3\pi\eta_c Dv.$$

$$\text{Отсюда } v=\frac{1}{18} (D^2(\rho-\rho_c)\omega^2 r)/\eta_c,$$

$$\text{где } \omega=2\pi n/60=2\pi N*1000/60.$$

N – угловая скорость, тыс. об/мин, n – угловая скорость, об/мин;. Тогда, подставляя $\omega^2=1,097 \cdot 10^4 N^2$, получим:

$$v=k(D^2(\rho-\rho_c)N^2 r)/\eta_c,$$

$$\text{где } k=1,097 \cdot 10^4/19.$$

Из полученного уравнения можно сделать следующие выводы:

1. Скорость осаждения v пропорциональна плотности частицы;
2. При одинаковых плотностях быстрее оседают частицы большего размера, чем мелкого;
3. Скорость оседания частиц пропорциональна квадрату числа оборотов роторов;
4. С увеличением вязкости среды η_c уменьшается скорость оседания;
5. Скорость оседания пропорциональна расстоянию частицы от оси вращения ротора (r).

Процедура центрифугирования образцов

1. Включить центрифугу (рис. 6), установить необходимые параметры центрифугирования (количество об/мин, температуру, время);
2. Используя весы, приготовить противовесы для образцов;
3. Разместить образцы и противовесы к ним в центрифуге;
4. Закрыть крышку центрифуги;
5. Запустить центрифугу;
6. Дождаться окончания центрифугирования, открыть крышку, достать образцы.



Рис. 6. Центрифуги Eppendorf 5810 (слева) и 5810R (справа).

Правила уравнивания образцов в центрифуге

1. Количество образцов (исследуемых + противовесы) должно быть кратно двум или трем. В первом случае одинаковые по массе образцы располагаются в роторе центрифуги напротив друг друга, на разных концах диаметра ротора (рис. 7, А); во втором случае образцы располагаются в вершинах равностороннего треугольника, в центре которого располагается ось вращения (рис. 7, Б).
2. Противовесы подбираются по массе с помощью весов.

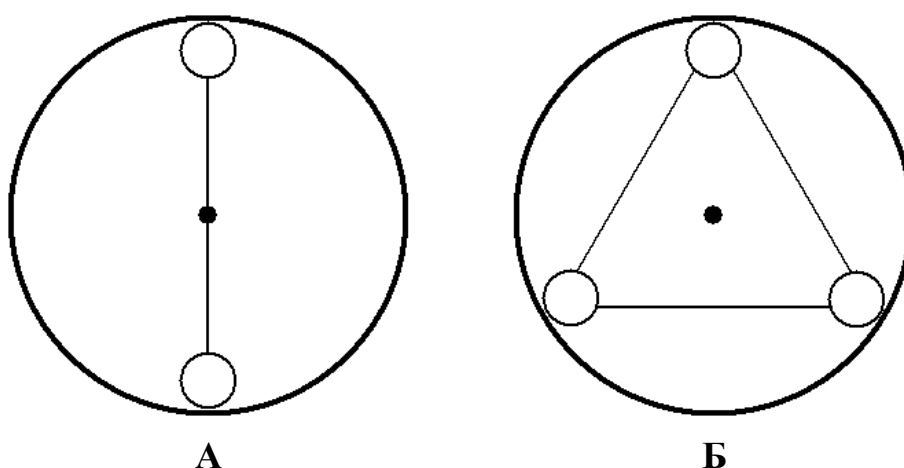


Рис. 7. Способы уравнивания образцов в центрифуге.

