

Саратовский государственный университет
им. Н.Г. Чернышевского

В.А. Великов

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ. ПРАКТИЧЕСКОЕ РУКОВОДСТВО

Учебно-методическое пособие
для студентов биологического факультета и факультета нано-
и биомедицинских технологий, обучающихся по направлениям
«Биология (020400)», «Биология-пед (050100)», «Биотехнические системы
и технологии (200100)», «Медицинская физика (011200)»
и по специальности «Биоинженерия и биоинформатика (020501)»

САРАТОВ
2012

УДК 577.21
ББК 28.070+28.04
В27

Великов В.А.

В27 Молекулярная биология. Практическое руководство: Учеб. пособие для студ. биол. фак. и фак. нано- и биомед. технол., обучающихся по напр. «Биология (020400)», «Биология-пед (050100)», «Биотехнические системы и технологии (200100)», «Медицинская физика (011200)» и по спец. «Биоинженерия и биоинформатика (020501)». – Саратов, 2012. – 79 с.: ил.
ISBN

В учебно-методическое пособие включены работы для практикума по молекулярной биологии. Каждая работа содержит краткие теоретические сведения, информацию о необходимом оборудовании и материалах, данные о подготовке растворов реагирующих веществ и методике проведения эксперимента.

Для студентов биологического факультета и факультета нано- и биомедицинских технологий.

Рецензенты

Доктор биологических наук, профессор С.А.Староверов
Доктор биологических наук, профессор А.С.Кашин

Пособие подготовлено на кафедре биохимии и биофизики биологического факультета Саратовского государственного университета
Публикуется по решению Учебно-методической комиссии биологического факультета СГУ

УДК 577.21
ББК 28.070+28.04

© Великов В.А., 2012

СОДЕРЖАНИЕ

В в е д е н и е	5
Тема 1. ВЫДЕЛЕНИЕ ОБЩЕЙ ДНК ИЗ КЛЕТОК.....	6
<i>Работа 1.1.</i> Выделение ДНК из бактерий.....	6
<i>Работа 1.2.</i> Выделение ДНК из лимфоцитов крови.....	9
<i>Работа 1.3.</i> Выделение ДНК из растительных тканей.....	11
Тема 2. СПЕКТОФОТОМЕТРИЯ ПРЕПАРАТОВ ДНК И РНК.....	14
<i>Работа 2.1.</i> Спектрофотометрическое определение концентрации ДНК.....	14
<i>Работа 2.2.</i> Концентрирование ДНК путем переосаждения спиртом.....	16
Тема 3. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ	18
<i>Работа 3.1.</i> Подготовка агарозного геля.....	18
<i>Работа 3.2.</i> Гель-электрофорез ДНК.....	20
Тема 4. ВЫДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ И ФАГОВОЙ ДНК.....	22
<i>Работа 4.1.</i> Минипрепаративное выделение плазмидной ДНК (минипреп)	22
<i>Работа 4.2.</i> Выделение плазмидной ДНК из больших объемов (максипреп)	25
<i>Работа 4.3.</i> Выделение репликативной формы RF фага M13	27
<i>Работа 4.4.</i> Выделение одноцепочечной ДНК фага M13.....	28
Тема 5. РЕСТРИКЦИЯ ДНК	30
<i>Работа 5.1.</i> Рестрикция плазмидной и фаговой ДНК	31
<i>Работа 5.2.</i> Рестрикция геномной ДНК эукариот	33
Тема 6. ПЦР.....	35
<i>Работа 6.1.</i> Подбор праймеров для ПЦР.....	36
<i>Работа 6.2.</i> Проведение ПЦР-амплификации ДНК	38
<i>Работа 6.3.</i> Расчет праймеров и параметров ПЦР с помощью	39
специальных программ.....	39
Тема 7. КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНОВ	41
<i>Работа 7.1.</i> Подготовка ДНК вектора и гена.....	42
<i>Работа 7.2.</i> Лигирование ДНК вектора и гена	43
<i>Работа 7.3.</i> Рестрикционное картирование вставки в плазмиде	45
Тема 8. ТРАНСФОРМАЦИЯ БАКТЕРИЙ.....	47
<i>Работа 8.1.</i> Приготовление компетентных клеток <i>E.coli</i>	47
<i>Работа 8.2.</i> Трансформация <i>E.coli</i>	49
<i>Работа 8.3.</i> Подготовка электрокомпетентных клеток <i>E.coli</i>	50
<i>Работа 8.4.</i> Электропорация	51
Тема 9. ВЫДЕЛЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА.....	53
<i>Работа 9.1.</i> Индуцированная экспрессия клонированных генов	53
<i>Работа 9.2.</i> Выделение белка из периплазмы клеток <i>E.coli</i>	54
<i>Работа 9.3.</i> Диализ препарата	56

Тема 10. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКА	57
<i>Работа 10.1.</i> Метод Бредфорд	57
<i>Работа 10.2.</i> Метод Лоури	58
<i>Работа 10.3.</i> Концентрирование белков путем осаждения ТХУ	59
<i>Работа 10.4.</i> Определение концентрации белка по собственной флуоресценции ...	60
Тема 11. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ	61
<i>Работа 11.1.</i> Приготовление растворов и заливка ПААГ	61
<i>Работа 11.2.</i> Гель-электрофорез белков	64
<i>Работа 11.3.</i> Окрашивание белков Coomassie R-250	65
Тема 12. РАСЧЕТЫ В РАБОТЕ С БЕЛКАМИ	67
<i>Работа 12.1.</i> Трансляция нуклеотидной последовательности	67
<i>Работа 12.2.</i> Предсказание нуклеотидной последовательности по аминокислотной	68
<i>Работа 12.3.</i> Анализ последовательности белка	69
Список рекомендуемой литературы	70
Приложения	71

Введение

В учебно-методическое пособие для практикума по молекулярной биологии включены описания и протоколы стандартных методов исследования, отдельное внимание при этом уделено методам молекулярного клонирования. Приведены наиболее распространенные и общепринятые методики, не требующие дорогостоящих или редких реактивов либо коммерческих наборов реагентов. Работы распределены по отдельным темам, выбор конкретной работы зависит от направления подготовки или специальности студента.

Каждая работа содержит теоретические сведения и краткую характеристику метода, наиболее важные аспекты его практического использования, целевое назначение необходимых реактивов и оборудования, подробное поэтапное описание лабораторных операций. Все подобранные для практикума бактериальные штаммы, рекомбинантные конструкции, векторы и гены являются безопасными, распространенными и доступными.

Работы в практикуме расположены в определенной логической последовательности, хотя и построены на разном фактическом материале. Как правило, сначала необходимо выделить общую ДНК из клеток интересующего организма, затем приготовить векторную ДНК для клонирования нужного гена, потом проанализировать полученную ДНК методом электрофореза, провести ее обработку рестриктазами, осуществить процедуру клонирования гена в клетках бактерий-продуцентов и, наконец, выделить из клеток рекомбинантный белок. Целевой белок впоследствии необходимо проанализировать методом электрофореза, определить его концентрацию и при необходимости дополнительно очистить. С помощью метода ПЦР можно осуществить клонирование гена или скрининг плазмид, содержащих рекомбинантную ДНК. Расчеты в работе с белками помогут в решении конкретных задач, стоящих перед исследователем. Справочные сведения и наглядный материал представлены в приложениях.

При подготовке данного учебно-методического пособия использованы материалы из следующих источников: Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed.(v.1-3), Cold Spring harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY, 1989; Глик Б., Пастернак Дж. *Молекулярная биотехнология. Принципы и применение*. М.: Мир, 2002; *Генная инженерия растений: Лаб. рук-во/Пер. с англ. Под ред. Дж. Дрейпера и др.* М.: Мир, 1991; Великов В.А., Кузнецов П.Е. *Практикум по молекулярной биологии. Методы биоинженерии/Под ред. В.В. Игнатова*. Саратов: Изд-во Сарат. ун-та, 2006; материалы интернет-ресурсов «MOLBIOL.RU – Классическая и молекулярная биология» (<http://www.molbiol.ru>), «Практическая молекулярная биология» (<http://www.molbiol.edu.ru>) «US National Library of Medicine» (<http://www.pubmed.com>).

Тема 1. ВЫДЕЛЕНИЕ ОБЩЕЙ ДНК ИЗ КЛЕТОК

Процедура выделения ДНК из клеток и тканей часто является исходным (основным) этапом в молекулярно-биологических исследованиях. Клетку необходимо разрушить тем или иным способом, а высвободившиеся нуклеиновые кислоты очистить от других клеточных компонентов. Прежде всего, нужно отделить ДНК от белков, входящих в состав нуклеопротеидных комплексов (хроматина). При этом важно защитить ДНК от действия нуклеаз и попытаться максимально сохранить ее целостность, поскольку длинные линейные молекулы ДНК при их изоляции из клетки неизбежно фрагментируются.

Большинство методов выделения ДНК обычно включают следующие этапы: лизис клеток (или разрушение физическим, механическим способом), ферментативное разрушение белков протеиназами и/или депротеинизацию образца с помощью фенола и хлороформа, центрифугирование для удаления денатурированных белков и фрагментов клеточных органелл. Затем ДНК осаждают из раствора, как правило, этанолом и после удаления надосадочной жидкости растворяют в буферном растворе. Вместе с ДНК выделяется и РНК, от которой при необходимости можно избавиться с помощью РНКазы.

Некоторые методики предусматривают сорбцию ДНК на гранулах силикагеля, центрифугирование и последующую элюцию с гранул в раствор. Ряд фирм продает наборы реактивов для выделения ДНК с магнитными частицами, покрытыми SiO_2 . Некоторые коммерческие наборы предусматривают сорбцию ДНК на мембранах. В ряде методов используется гуанидин изотиоцианат, денатурирующий белки, как и фенол.

Визуальная оценка количества и качества полученной ДНК проводится при стандартной процедуре гель-электрофореза (тема 3) путем сравнения с препаратами ДНК известной концентрации. Спектрофотометрический анализ дает более точную количественную и качественную характеристику полученного образца ДНК (тема 2).

Работа 1.1. Выделение ДНК из бактерий

Метод выделения из клеток бактерий общей (или тотальной) ДНК с использованием додецилсульфата натрия, протеиназ и фенола (Dhaese et al., 1979) является широко распространенным методом. Метод простой и надежный, существует в большом числе модификаций. Наряду с хромосомной ДНК выделяется также плазмидная и фаговая ДНК при их наличии в клетке, а также РНК.

Плазматическая мембрана бактериальной клетки в этом методе разрушается действием детергента додецилсульфата натрия (SDS, sodium dodecyl sulfate) – одного из самых распространённых поверхностно-активных

веществ. Целостность пептидогликанового слоя (муреинового мешка) тоже нарушается. Белки удаляют из лизата путем обработки фенолом, который денатурирует белки, но не действует на нуклеиновые кислоты. Другие органические компоненты клетки и низкомолекулярные вещества теряются при высаживании ДНК из раствора этанолом. Осадок нуклеиновых кислот, полученный после центрифугирования образца, растворяют в специальном буфере для хранения ДНК – буфере TE. Входящий в его состав хелатирующий реагент – этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) предотвращает воздействие клеточных нуклеаз на ДНК, поскольку связывает двухвалентные катионы Mg^{2+} , необходимые для их работы.

Материалы и оборудование

Основное оборудование для проведения молекулярно-биологических исследований: миницентрифуга, центрифуга для больших объемов, источник тока для проведения электрофореза, камеры для электрофореза, трансиллюминатор, микропипетки-дозаторы (сэмплеры) с одноразовыми наконечниками, ДНК-амплификатор, электропоратор, спектрофотометр, термостатируемая качалка-шейкер, УФ-облучатель, термостат.

Для проведения работ необходимо также следующее лабораторное оборудование: вытяжной шкаф, ламинарный бокс, высокоскоростная мультифункциональная центрифуга, холодильник, морозильник, весы, дистиллятор, деионизатор, рН-метр, водяная баня, электроплитка, СВЧ-печь, сушильный шкаф, стеклянная и пластиковая лабораторная посуда.

Для работы 1.1 необходим штамм энтеробактерии кишечной палочки *Escherichia coli XL-1* или штамм почвенной бактерии *Azospirillum brasilense Sp245*. Характеристика всех бактериальных штаммов и плазмид, используемых в данном практикуме, приведена в прил. 1,2.

Растворы

- *Среда 2YT*. На 1 л: триптон – 16 г; дрожжевой экстракт – 8 г; NaCl – 5 г. Довести до 1 л дистиллированной водой, рН среды 7,0. Для получения твердой среды в нее добавляют перед автоклавированием агар до 1,5%.
- *5% SDS*. 5%-ный раствор додецилсульфата натрия (или лаурилсульфата, саркозила, N-laurylsarcosine) в TE-буфере.
- *Проназа*. Раствор 5 мг/мл в TE-буфере.
- *Буфер TE*. 10мМ Tris-HCl, рН 8,0; 1 мМ ЭДТА.
- *5M NaCl*. Растворить 292,5 г NaCl в 800 мл дистиллированной воды и довести объем до 1 л.
- *Смесь фенол-хлороформ*. Водонасыщенный фенол (насыщенный 0,1M Tris-HCl, рН 8,0) смешивают в пропорции 1:1 с заранее приготовленной смесью хлороформ-изоамиловый спирт.
- *Смесь хлороформ-изоамиловый спирт*. Вещества смешивают в пропорции 24:1 по объему.

Методика

1. Произвести посев отдельной колонии штамма бактерии *E.coli XL-1* (или *A.brasilense Sp245*) в пробирку с 5 мл богатой питательной 2YT среды и растить культуру бактериальных клеток в течение ночи с аэрацией при 37°C (или 30°C, соответственно)^а.
2. Перенести 1,5 мл культуры в микроцентрифужную пластиковую пробирку типа Eppendorf объемом 1,7 мл и осадить клетки центрифугированием в течение 5 мин при 10000 об/мин. Заметьте, что это наиболее часто используемая скорость для миницентрифуги, ее устанавливают по умолчанию, если не указана другая скорость.
3. Удалить супернатант (вылить питательную среду через край: не бойтесь! осадок плотный) и ресуспензировать клетки в 300 мкл буфера TE с помощью микропипетки.
4. Добавить к суспензии клеток 100 мкл 5%-ного раствора SDS и перемешать.
5. Добавить 150 мкл р-ра проназы (5мг/мл) и перемешать.
6. Инкубировать 1 (0,5) ч при 37°C. Происходит лизис клеток и гидролиз белков.
7. Высадить нуклеиновые кислоты из раствора спиртом. Для этого добавить в пробирку равный объем изопропанола (550 мкл) и центрифугировать в течение 10 минут. (При необходимости после добавления спирта можно прерваться, поместив пробирки в холодильник до следующего занятия. Под спиртом ДНК может храниться долгое время).
8. Отобрать микропипеткой остатки жидкости из пробирки. Растворить осадок в 500 мкл буфера TE и провести депротеинизацию образца (пп. 9–12).
9. Добавить к раствору равный объем (500 мкл) смеси фенол–хлороформ, хорошо встряхнуть до образования стойкой эмульсии.
10. Разделить водную и органическую фазы путем центрифугирования в течение 5 мин. Фенол остается внизу, водная фаза с растворенной ДНК – вверху. Белки контактируя с фенолом денатурируют, становятся нерастворимыми в воде и собираются на границе раздела двух фаз – в интерфазе.
11. Перенести микропипеткой водную фазу, содержащую ДНК, в чистую 1,7 мл пробирку. При отборе важно не засасывать в наконечник интерфазу – плотный слой белесого цвета между водной и органической фазами, в которой находятся белки^б.
12. Провести еще одну экстракцию белков из водной фазы и избавиться от примеси фенола. Для этого добавить к раствору равный объем смеси хлороформ–изоамиловый спирт, перемешать и центрифугировать в течение 3 мин. Водную фазу перенести в чистую пробирку^б.

13. Оценить микропипеткой-дозатором или по меткам на пробирке получившийся объем водной фазы и добавить 1/25 объема 5М NaCl до конечной концентрации 0,2М. Затем добавить 3 объема холодного (-20°C) этанола для осаждения ДНК, точнее ее натриевой соли. Оставить на 1–2 ч в морозильнике при температуре -20°C . Можно оставлять ДНК под спиртом и дольше, до того времени, как образец потребуется.
14. Осадить нуклеиновые кислоты центрифугированием в течение 10 мин. Слить супернатант и промыть осадок спиртом. Для этого добавить к осадку 1 мл холодного 70% этанола и снова центрифугировать при 10000 об/мин в течение 3 мин^в.
15. Слить 70% этанол, перевернуть пробирки на фильтровальную бумагу. После того как вся жидкость стечет, пробирку с осадком нуклеиновых кислот (ДНК и РНК^г) немного подсушить на воздухе до исчезновения запаха спирта^д. Растворить осадок в 50 мкл буфера TE. Для электрофореза ДНК достаточно 5–10 мкл полученного образца (тема 3).

Примечания

^а О выращивании бактерий см. в руководствах по микробиологии. Некоторые сведения представлены в данном пособии только там, где это необходимо.

^б Некоторый объем водной фазы при этом неизбежно теряется (до 1/5 объема). На практике лучше пожертвовать этим объемом сейчас, чем чистой препаратом впоследствии.

^в Допускается просто слить спирт, без центрифугирования.

^г Избавиться от РНК при необходимости можно с помощью РНКазы (см. работу 5.1). Примесь РНК в препарате ДНК не влияет на прохождение ПЦР или рестрикции.

^д Пересушивать осадок нельзя, в полностью высушенном виде он практически нерастворим в воде. Обычно осадки сушат на открытом воздухе не более получаса, под потоком нагретого воздуха или в твердотельном микротермостате достаточно 5 мин.

Работа 1.2. Выделение ДНК из лейкоцитов крови

Изоляция ДНК из животной клетки не представляет особой сложности, поскольку плазматическая мембрана легко разрушается действием детергента додецилсульфата натрия SDS, а сложной клеточной стенки у животных в сравнении с растениями нет (см. работу 2.2). Освободить ДНК от белков хроматина можно с помощью протеиназ. Для этой же цели можно провести, как и в случае с бактериальными клетками, фенольную депротеинизацию образца.

ДНК можно выделить из любых тканей, клетки которых содержат ядра, но количественный выход, к примеру из мышечной и хрящевой ткани будет разным. Довольно часто для выделения ДНК используют кровь. Лейкоциты крови, в отличие от зрелых эритроцитов, содержат ядра. Общей ДНК,

выделенной из 100 мкл цельной крови достаточно для проведения нескольких рестрикций, ПЦР и секвенирования. Митохондриальная ДНК также присутствует в получаемом препарате. В приведенной ниже методике для освобождения от белков используется фенол. В смеси с хлороформом фенол работает эффективнее, под словом «фенол» в молекулярной биологии часто подразумевают смесь водонасыщенного фенола с хлороформом 1:1.

Материалы и оборудование

Образцы крови, миницентрифуга, морозильник, термостат. микропипетки-дозаторы с наконечниками, микропробирки пластиковые.

Растворы

- *Буфер SSC*. 3М NaCl; 0,3М цитрат натрия, рН 7,0. Для приготовления концентрированного 20× SSC на 1 л нужно взять: NaCl – 175,3 г, цитрат натрия – 88,2 г. рН раствора доводить обычно не требуется, либо используют HCl.
- *3М ацетат натрия, рН 5,2*. На 40 мл: растворить 9,85 г ацетата натрия в 20 мл воды, довести рН до 5,2 ледяной уксусной кислотой.
- *0,2М ацетат натрия, рН 5,2*. Готовится разведением 3М раствора.
- *10% раствор SDS*. Растворить 100 мг в 10 мл дистиллированной воды.
- *Буфер TE* (работа 1.1).
- *Смесь фенол-хлороформ* (работа 1.1).
- *Смесь хлороформ-изоамиловый спирт* (работа 1.1).

Методика

1. К 100 мкл цельной крови ^а добавить 2 объема дистиллированной воды до конечного объема 0,3 мл. Тщательно перемешать и оставить на 15 минут.
2. Пробу центрифугировать в течение 10 минут, 5000 об/мин. Супернатант слить.
3. Осадок отмыть двойным объемом буфера SSC, добавив 200 мкл 1-кратного SSC. Перемешивание аккуратное.
4. Центрифугирование как в п.2.
5. К осадку добавить 54 мкл 0,2М ацетата натрия ^б и 6 мкл 10%-ного раствора SDS. Осадок тщательно ресуспензировать (перевести в суспензию вновь). Инкубировать 0,5–1 час при 37°C ^в.
6. Добавить 2 объема буфера TE и провести фенольную депротеинизацию образца. Для этого добавить равный объем фенол-хлороформной смеси, хорошо перемешать и центрифугировать. Отобрать водную фазу (верхний слой) в чистую пробирку, не захватывая интерфазу.
7. Повторить ту же процедуру, что в п. 6, но со смесью хлороформ-изоамиловый спирт.
8. К образцу добавить 1/10 объема 3М ацетата натрия (рН 5,2) перемешать и высадить ДНК тремя объемами холодного 96% этанола, поместив образец

на 1–2 часа в морозильную камеру при -20°C . Можно оставить под спиртом на ночь.

9. Пробу центрифугировать в течение 10 мин на максимальной скорости. Супернатант слить.
10. Высушить осадок ДНК на воздухе и растворить в 20 мкл буфера TE^г.

Примечания

^а Содержание общей ДНК лейкоцитах составляет 30–60 мкг/мл крови.

^б Соль лучше добавлять до фенольной депротеинизации образца, т.к. экстракция фенолом в низкосолеовом буфере может снизить выход ДНК из-за значительных потерь.

^в После инкубации при 37°C можно прерваться на 1–2 дня, поместив пробу в холодильник на $+4^{\circ}\text{C}$.

^г В состав многих буферных растворов входит трис-гидрохлорид Tris-HCl, поскольку в них размножается микрофлора. Стоковый (концентрированный, от англ. stock – запас) раствор Tris-гидрохлорида с нужным значением pH получают путем титрования соляной кислотой Tris-основания (Tris-OH, гидроксиметиламинометана).

Работа 1.3. Выделение ДНК из растительных тканей

При выделении ДНК из клеток и тканей растений важным фактором является эффективное разрушение клеточных стенок. К сожалению, многие методы, используемые для этого, приводят к значительной фрагментации ДНК. Часто приходится находить компромисс между размером ДНК и ее количественным выходом. Высвобождение высокомолекулярной ДНК из клеток – это только часть задачи, поскольку растительные экстракты содержат большие количества полисахаридов, танинов и пигментов, которые в ряде случаев весьма трудно отделить от ДНК. Под каждый новый растительный объект методику часто приходится адаптировать экспериментальным путем.

Ткани растений обычно разрушают механическим способом в присутствии детергентов, растворяющих мембраны, и хелатирующих агентов, подавляющих действие клеточных нуклеаз за счет связывания двухвалентных катионов. От белков нуклеопротеидного комплекса избавляются фенольной депротеинизацией. Некоторые методики предусматривают использование протеиназ для освобождения ДНК от белков хроматина. После депротеинизации препарат все еще сильно загрязнен полисахаридами. Если требуется большое количество чистой ДНК для масштабных работ, то препараты могут быть очищены ультрацентрифугированием в градиенте плотности хлористого цезия.

Существуют методы с использованием детергентов СТАВ (cetyl trimethyl ammonium bromid) и SDS (sodium dodecyl sulfate). Метод с использованием СТАВ (Rogers, Bendich, 1985) позволяет получать препараты

растительной ДНК с чистотой, достаточной для рестрикционного, гибридизационного анализа и ПЦР. СТАВ хорошо растворяет мембраны клеток. Кроме того, его применение позволяет разделить ДНК и полисахариды, поскольку они отличаются по растворимости в присутствии этого поверхностно-активного вещества. При высоких концентрациях солей нуклеиновые кислоты образуют стабильные, но вместе с тем растворимые комплексы со СТАВ. При снижении концентрации соли ниже 0,4М NaCl происходит выпадение в осадок комплексов СТАВ/нуклеиновая кислота, тогда как большая часть полисахаридов остается в растворе. Осадок снова растворяют в высокосолевым растворе 1М NaCl и высаживают очищенную ДНК этанолом.

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

Материалы и оборудование

Основное оборудование для молекулярно-биологических исследований (работа 1.1). Вегетирующие растения кукурузы, петунии, табака (или замороженные ткани).

Растворы

- *Буфер для экстракции.* 100мМ Трис–HCl, pH 8,0, 50мМ ЭДТА, 500мМ NaCl, 1,25% SDS, 8,3мМ NaOH, 0,83% Na₂S₂O₃.
- *3М ацетат калия, pH 5,0.* На 100 мл: 5М ацетат калия – 60 мл, CH₃COOH ледяная – 11,5 мл, H₂O – 28,5 мл.
- *Смесь фенол-хлороформ* (работа 1.1).
- *Смесь хлороформ-изоамиловый спирт* (работа 1.1).

Методика

1. Для работы взять 200 мг предварительно замороженных листьев растений. Либо быстро заморозить навеску в жидком азоте.
2. Образцы растереть в предварительно охлажденной ступке до гомогенного состояния. Если нет жидкого азота, то при растирании к замороженным листьям необходимо добавить 0,1 г оксида алюминия или прокаленного белого речного песка^a в качестве абразива. В ступку при растирании хорошо при этом добавить немного экстрагирующего буфера (300 мкл).

3. Добавить в ступку 700 мкл буфера для экстракции, снова хорошо перемешать.
4. Перенести растертую массу в 1,7 мл микропробирку так, чтобы объем составлял примерно 700 мкл (на пробирке есть метка 0,75 мл).
5. Перемешать и инкубировать при 65°C в течение 10 минут.
6. Добавить 220 мкл ацетата калия и поместить на лед на 20 минут.
7. Центрифугировать в течение 3 минут при скорости 10000 об/мин. Перенести супернатант (надосадочную жидкость) в новую пробирку.
8. К супернатанту добавить равный объем изопропанола, перемешать и повторить центрифугирование для осаждения ДНК.
9. Осадок ДНК промыть 70% этанолом, растворить в 200 мкл буфера TE.
10. Провести процедуру фенольной депротеинизации образца ДНК. Для этого внести в пробирку с раствором ДНК равный объем фенол–хлороформной смеси, хорошо перемешать и центрифугировать. Отобрать водную фазу (верхний слой) в чистую пробирку, не захватывая интерфазу. Повторить ту же процедуру со смесью хлороформ–изоамиловый спирт. Отобрать водную фазу в чистую пробирку^б.
11. Высадить ДНК^в тремя объемами холодного 96% этанола, прибавив к образцу 1/10 объема 3М ацетата калия (рН 5,0) или натрия (рН 5,2) и поместив образец на 1–2 часа в морозильную камеру (–20°C).
12. Пробу центрифугировать в течение 10 мин на максимальной скорости. Супернатант слить.
13. Высушить осадок ДНК на воздухе и растворить в 50 мкл буфера TE^г.

Примечания

^а По нашему опыту лучше использовать песок, мацерирующий ткани растений легче и быстрее. Примесь песка из образца уйдет при первом центрифугировании.

^б После экстракции фенолом и хлороформом всегда уменьшается полученный объем водной фазы. Небольшое нарушение объемной пропорции 1:1 на деле не очень важно (на практике лучше этим не пренебрегать). Но если водной фазы останется слишком мало (меньше 100 мкл) требуется добавить перед хлороформом TE-буфер до исходного объема, иначе потом будет неудобно ее отбирать и потери возрастут.

^в При методе с использованием SDS получается высокомолекулярная ДНК со средним размером фрагментов около 50 kb (kilo base pairs, тысяч пар нуклеотидов, т.п.н.). Полученная ДНК годится для рестрикции и ПЦР без дополнительной очистки.

^г В буфере TE можно хранить ДНК в холодильнике при +4°C сроком до нескольких месяцев. Для более длительного хранения растворов ДНК в замороженном виде в морозильнике при –20°C ее растворяют в бидистиллированной или деионизованной воде. Использовать воду вместо TE-буфера удобно, поскольку не будет необходимости переосаждать ДНК перед постановкой реакций, требующих ионов Mg²⁺ (магний нужен большинству специфичных к ДНК ферментов), но замораживание-размораживание неизбежно ведет к ухудшению качества препарата. Лучше всего из буфера TE исключить ЭДТА и замораживать в этом буферном растворе, поскольку бидистиллят, к примеру, имеет слабокислый показатель рН, что для ДНК нежелательно. В глубокой заморозке при –70°C особо ценные образцы ДНК могут быть заложены на хранение на годы.

Тема 2. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ ПРЕПАРАТОВ ДНК И РНК

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

Определить концентрацию ДНК, а также степень ее чистоты, можно с помощью спектрофотометра, что точнее и быстрее. Одна (каждая) оптическая единица при длине волны 260 нм (A_{260} – максимум поглощения ДНК) соответствует концентрации ДНК в растворе 50 мкг/мл. Для расчета можно воспользоваться калькулятором на интернет-ресурсе MOLBIOL.RU (<http://www.molbiol.ru>) или других подобных ресурсах.

Спектрофотометрия (абсорбционная) – физико-химический метод исследования растворов и твердых веществ, основанный на изучении спектров поглощения в ультрафиолетовой (200–400 нм), видимой (400–760 нм) и инфракрасной (>760 нм) областях спектра. Основная зависимость, изучаемая в спектрофотометрии – это зависимость интенсивности поглощения падающего света от длины волны. Нуклеиновые кислоты поглощают УФ-излучение в области 240–290 нм с максимумом адсорбции при 260 нм. Хроматофорами служат азотистые основания ДНК, особенно пиримидиновые. Пиримидины поглощают УФ-свет примерно в 10–20 раз интенсивнее, чем хроматофоры белковых молекул – триптофан, фенилаланин и тирозин.

Для оценки чистоты препарата ДНК проводят измерения оптической плотности раствора при длинах волн 260, 280 и 235 нм, т.е. на максимумах поглощения для ДНК, белков и полисахаридов, соответственно. Значение соотношения $A_{260}/280$ для чистой ДНК должно быть больше 1,8, значение $A_{260}/235$ должно быть больше 2,2. Загрязнение полисахаридами характерно главным образом для препаратов растительной ДНК. Лигнин в противоположность другим углеводам имеет ароматическое строение и поэтому поглощает УФ-излучение.

Работа 2.1. Спектрофотометрическое определение концентрации ДНК

Нижний предел концентрации ДНК, которую можно определить спектрофотометрически, составляет 0,1 мкг/мл. Обычно берут аликвоту исследуемого образца ДНК, к примеру 1 мкл, и разбавляют в 100 и более раз, а затем пересчитывают полученное значение.

Важно чтобы в разведенном образце было более 10 нг ДНК. Для сравнения, при гель-электрофорезе ДНК также можно визуализировать полосу, содержащую от 10 нг ДНК и выше.

Материалы и оборудование

Геномная ДНК из бактерий, крови или растений кукурузы с неизвестной концентрацией, спектрофотометр, образец ДНК любого происхождения с известной концентрацией.

Растворы

- Раствор ДНК с неизвестной концентрацией в буфере TE.
- Раствор ДНК фага лямбда в буфере TE с концентрацией 1 мг/мл.

Методика

1. Взять микропипеткой на анализ 1 мкл образца полученной ДНК и разбавить препарат, добавив 130 мкл буфера TE, содержащего 100мМ NaCl^a. Объем образца делают равным 130 мкл, чтобы кривизна поверхности жидкости не влияла на измерения.
2. Поместить образец разбавленной ДНК в «маленькую» (100 мкл) ячейку.
3. Измерить поглощение A₂₆₀. Полученное значение должно лежать в пределах 0,005–2,5^b. В противном случае нужно разбавлять или концентрировать ДНК^b.
4. Рассчитать концентрацию ДНК, используя коэффициент пересчета из табл. 1 по формуле:

$$C[\text{мкг/мл}] = A_{260} \times K$$

Таблица 1. Расчет концентрации ДНК и РНК

	К (для исследуемого р-ра) [мкг/мл]	K _{1:130} (для разведенного образца) [мкг/мкл]	Коэффициент для пересчета
ДНК двухцепочечная	50	6,5	7,7
ДНК одноцепочечная	37 ^г	4,81	7,7
РНК	40	5,2	7,7

5. Измерить поглощение A₂₈₀ и A₂₃₅, чтобы оценить степень очистки ДНК от примеси белков и полисахаридов. Отношение 260/280, также как и 260/235 должно быть больше чем 1,8. Для чистой ДНК характерны значения A₂₆₀/A₂₈₀ = 1,8–1,9 и A₂₆₀/A₂₃₅ = 2,2–2,5. Для чистой РНК значение A₂₆₀/A₂₈₀ = 1,9–2,0^д.

6. Откройте главную страницу сайта MOLBIOL.RU (<http://www.molbiol.ru>).
7. На главной странице найдите раздел «Расчеты», выберите пункт «Спектрофотометрическое определение концентрации ДНК (РНК)» и рассчитайте концентрацию вашего препарата ДНК с помощью специальной формы.

Примечания

^а Для растворения ДНК можно использовать другие низкосолевые буферы, но только не воду. К примеру, растворы 100мМ NaCl, 20мМ Na₃PO₄, 10–100мМ Tris–HCl (pH 7,5–9,0) или 100мМ KHP0₄ (pH 8,2) дают сходные результаты. Измерения в воде приводят к существенным отклонениям. Ошибка измерения составляет до 14% и отношение A₂₆₀/A₂₈₀ оказывается заниженным.

^б Точность измерения падает при слишком больших и при слишком малых значениях A₂₆₀. Ошибка составляет при значении 0,05 прибл. 18%, при значении 0,1–1,0 прибл. 1%. При значениях свыше 2,5 измерения концентрации недостоверны.

^в Концентрируют ДНК путем ее переосаждения спиртом (работа 2.2).

^г Для олигонуклеотидов, поглощение которых сильно зависит от их состава, существуют специальные расчеты.

^д Эти значения достоверны, если измерение проводится в буферном растворе (например, TE) при нейтральном значении pH.

Работа 2.2. Концентрирование ДНК путем осаждения спиртом

Наиболее часто используемый метод концентрирования ДНК – осаждение ее этанолом. Растворив полученный осадок в меньшем объеме буферного раствора, получают более концентрированный препарат ДНК. При переосаждении ДНК спиртом происходит ее дополнительная очистка.

Этиловый спирт как водоотнимающее средство снижает растворимость нуклеиновых кислот (их солей) в воде. Как ДНК, так и РНК агрегирует в 70% этаноле в присутствии соли. Агрегация проходит лучше при пониженной температуре и для неё требуется некоторое время. Образовавшиеся агрегаты осаждаются центрифугированием. На осаждение ДНК из раствора берут как минимум 2 объема этанола или 1 объем изопропанола, Для высаживания ДНК из значительных объемов в целях экономии можно брать 0,6 объемов изопропанола.

Помимо спиртов для осаждения нуклеиновых кислот применяют также полиэтиленгликоль PEG, цетилтриметиламмоний бромид СТАВ и другие вещества, однако спиртовое осаждение является стандартной процедурой.

Материалы и оборудование

Образец ДНК любого происхождения с низкой концентрацией, спектрофотометр, гликоген.

Растворы

- 5М NaCl. Растворить 292,5 в воде, доведя объем до 1 л.
- 3М ацетат натрия, рН 5,2 (тема 1).
- Раствор гликогена в воде 10 мг/мл.
- 96% этанол.
- 70% этанол.

Методика

1. Довести концентрацию соли в препарате до 0,2М NaCl (или до 0,3М ацетата натрия), используя концентрированные стоковые растворы этих солей. Чаще всего к раствору ДНК добавляют 1/25 объема раствора 5М NaCl (или 1/10 объема раствора 3М ацетата натрия, рН 5,2), поскольку эти растворы всегда под рукой.
2. Если концентрация ДНК низкая, требуется добавить какой-либо соосаждитель, например гликоген, до конечной концентрации 50 мкг/мл ^а.
3. Добавить 2,5 объема холодного 96% этанола ^б, имеется в виду объём вместе с солью.
4. Инкубировать от 5 мин при комнатной температуре до выдерживания в морозильнике при -20°C в течение ночи ^в в зависимости от концентрации ДНК.
5. Центрифугировать на максимальной скорости миницентрифуги в течение 5 минут. Препараты ДНК с низкой концентрацией центрифугируют в течение 1–2 часов при скорости 27000 об/мин с охлаждением (при 4°C).
6. Сполоснуть осадок ДНК холодным 70%-ным этанолом. Чтобы при промывании не потерять часть ДНК заполняйте пробирку не более чем на 2/3. Перемешайте содержимое переворачиванием пробирки несколько раз, слейте спирт и поместите пробирку в перевернутом виде на фильтровальную бумагу, чтобы стекли остатки спирта.
7. Подсушить осадок на воздухе.
8. Растворить в буфере TE или H_2O .

Примечания

^а Рабочие концентрации других соосаждителей; гРНК – 5-10 мкг/мл, линейный полиакриламид – 10-20 мкг/мл.

^б Вместо этанола можно использовать изопропанол. В этом случае добавляется не 2,5 объема, а 1 объем. Осаждение изопропанолом имеет только одно преимущество перед этанольным - пробирки могут быть меньшего объема. Основной недостаток – изопропанол менее летуч и последующая промывка 70% этанолом является обязательной. Осаждение спиртами ДНК, особенно низкомолекулярной и в малой концентрации, улучшается, если добавить MgCl_2 до конечной концентрации 10мМ.

^в Было показано, что увеличение времени инкубации, равно как и понижение температуры, не оказывает существенного влияния на эффективность осаждения ДНК. Это справедливо для растворов с концентрацией более 20 нг/мл, однако этот подход по традиции соблюдается. Наиболее заметный эффект даёт увеличение времени центрифугирования до 1 часа при $+4^{\circ}\text{C}$, когда ДНК мало.

Тема 3. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Электрофорез – это электрокинетическое явление перемещения частиц дисперсной фазы (коллоидных растворов) в жидкой среде под действием электрического поля. Впервые это явление было открыто профессорами Московского университета П.А. Страховым и Ф.Ф. Рейссом в 1809 году.

Электрофорез в агарозном геле является стандартным методом для разделения, идентификации и очистки интактных молекул ДНК и их фрагментов (высокомолекулярная хромосомная ДНК всегда фрагментируется при изоляции из клетки).

ДНК – слабая кислота, поэтому она движется к аноду (от «-» к «+»). За движением ДНК (РНК) в пластине геля можно следить, так как полосы, формируемые при движении молекулами одного размера, можно окрашивать флуоресцентным красителем – бромистым этидием ($\lambda_{\max} = 590$ нм). Молекулы красителя интеркалируют в ДНК, т.е. встраиваются между соседними парами нуклеотидов, что сопровождается флуоресценцией окрашенной ДНК в УФ-свете. Такая окраска обеспечивает высокую чувствительность – 10 нг ДНК можно увидеть в виде полосы (ДНК-бэнд) красно-оранжевого цвета. Оптимальная длина волны прибора для визуализации ДНК – трансиллюминатора составляет 305–320 нм.

Для окрашивания ДНК используют и другие флуоресцентные красители, в частности SYBR Green ($\lambda_{\max} = 497$ нм).

Скорость миграции ДНК (РНК) через поры агарозного геля при электрофорезе определяется размером молекул и их конформацией. Молекулы линейной двухцепочечной ДНК перемещаются в геле со скоростями обратно пропорциональными десятичному логарифму их молекулярных масс. Впереди мигрируют низкомолекулярные фрагменты, молекулы большего молекулярного веса движутся более медленно. Из нативных молекул быстрее всего движется тРНК размером 70–90 нуклеотидов и 5S рибосомная РНК размером 120 нуклеотидов. Наиболее крупные фрагменты геномной (хромосомной) ДНК могут достигать размеров 100000 п.н. Для определения размера фрагментов используют маркеры молекулярного веса, которые наносят в соседние лунки геля.

Работа 3.1. Подготовка агарозного геля

Приготовление агарозного геля. Агароза легко плавится при нагревании в электрофорезном буфере. При застывании водного расплава агарозы получают прозрачные гели. Лунки (слоты, карманы) для нанесения образцов на гель формируются путем вставки тefлоновой гребенки с зубьями в незастивший гель и ее извлечением после полимеризации гелевой пластины.

Концентрация агарозы в геле. Скорость движения ДНК в порах геля зависит от концентрации агарозы. Зная размер смеси фрагментов, можно подбором концентрации добиться их наилучшего разделения (табл. 2).

Таблица 2. Зависимость эффективности разделения фрагментов ДНК от количества агарозы в геле

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

Окраска ДНК в агарозных гелях. Для визуализации ДНК применяют ее окрашивание бромистым этидием EtBr (3,8-Диамино-5-этил-6-фенил-фенантридиум бромид). Этидиум бромид добавляют в расплав агарозы перед полимеризацией пластины геля. Молекулы красителя интеркалируют (встраиваются) между соседними парами нуклеотидов ДНК. Максимум поглощения (адсорбция) EtBr наблюдается при длине волны 300 и 360 нм, а испускание (эмиссия) происходит в красно-оранжевой области видимого спектра с максимумом 590 нм.

Материалы и оборудование

Агароза, форма для заливки геля (плашка), гребенка. Можно в качестве формы использовать крышку от иммунологического планшета.

Растворы

- *5× буфер TBE.* На приготовление 1 л буфера: Tris-ОН (аминометан) – 54 г; борная кислота – 27,5 г; 0,5М ЭДТА (рН 8,0) – 20 мл.
- *EtBr.* Раствор 10 мг/мл в воде. Хранить в темноте в холодильнике.

Методика

1. Взвесить рассчитанное количество порошка агарозы (1 г на 100 мл 1% геля^a) и поместить в химический термостойкий стакан. Налить в стакан 20 мл 5× электрофорезного буфера TBE и довести до 100 мл водой.
2. Нагреть смесь на электроплитке или СВЧ-печи до полного расплавления.
3. Охладить до 50–60°C (стакан можно держать в руках), добавить EtBr до конечной концентрации 0,5 мкг/мл. На 100 мл геля взять 5 мкл из раствора с концентрацией 10 мг/мл^b.

4. Вылить гель в форму, предварительно вставив гребенку.
5. После того как гель полностью полимеризуется (30–40 мин) осторожно удалить гребенку, покачивая ее из стороны в сторону и потянув вверх.

Примечания

^а Расход геля для различных типов плашек: плашка размером 11×11 см примерно 110–140 мл, крышка от иммунологического планшета – около 30 мл.

^б Бромистый этидий – мутаген, необходимо работать в перчатках и соблюдать меры предосторожности! Краситель разрушается на свету, поэтому гели хранят непродолжительное время в темноте в холодильнике.

Работа 3.2. Гель-электрофорез ДНК

Электрофорезные буферы. Обычно применяют буферы, содержащие 50 мМ Tris–ацетат, Tris–борат или Tris–фосфат с pH 7,5–8,0. Чаще всего их готовят концентрированными и хранят при комнатной температуре. Tris–фосфатный и Tris–боратный буферы имеют большую емкость и дают более хорошее разрешение, но если дальше нужно проводить гибридизацию или сиквенс ДНК используется Tris–ацетатный буфер.

Напряжённость поля. Эффективное разделение фрагментов ДНК происходит при напряженности, не превышающей 5 В/см геля. С увеличением напряженности эффективность разделения ДНК ухудшается. При повышенной температуре молекулы ДНК особенно легко теряют краситель EtBr, что происходит, если проводить электрофорез при высоком напряжении. Этидиум бромид при электрофорезе движется от «+» к «-», т.е. в направлении, обратном движению ДНК. Чтобы он не уходил из геля, когда, к примеру, ДНК внесена в малом количестве, нужно ввести его прямо в буфер.

Подвижность разных форм ДНК. Двухцепочечные молекулы ДНК, имеющие одинаковую молекулярную массу, но разные конформации будут двигаться с разной скоростью. Так, кольцевая суперспирализованная форма плазмиды, кольцевая с одноцепочечным разрывом и линейная форма плазмиды движутся в геле с разными скоростями (прил. 9).

В 1% агарозном геле одноцепочечная ДНК движется примерно на 10% быстрее, чем двухцепочечная ДНК того же размера. Эта ДНК (и РНК) окрашивается бромистым этидием примерно в 4–5 раз слабее, то есть для того чтобы полосы имели одинаковую интенсивность свечения в УФ-свете требуется взять одноцепочечной ДНК примерно в 5 раз больше.

Буфер для нанесения образцов. ДНК в лунки геля вносят в буфере, содержащем глицерин или сахарозу, чтобы она сразу опустилась на дно лунки, а не растворилась в электрофорезном буфере. Чтобы следить за прохождением фронта форе́за в буфер добавляют специальные красители. Электрофоретическая подвижность бромфенолового синего лежит в районе

100 оснований, это лидирующий краситель. Подвижность ксиленианола (зеленого цвета) находится в районе 460 оснований.

Количество ДНК на дорожку геля. Нижний предел визуализации определяется используемым методом детекции. Если применяется окрашивание EtBr, то можно увидеть в полоске шириной 5 мм от 10 нг ДНК. Слишком большое количество ДНК («перегруз», >1 мкг) на дорожке приводит к изменению подвижности полосы в геле, которая движется быстрее, и к размыванию полос. Количество ДНК, которое можно внести в лунку, зависит от числа фрагментов ДНК в пробе и их размеров. Обычно вносят 0,2–0,5 мкг ДНК в лунку.

Геномная ДНК в отличие от плазмидной и фаговой всегда дает шлейф из фрагментов разного размера. В УФ-свете наблюдается равномерное окрашивание по всей длине геля, так называемый «шмер» (от англ. smear – пятно, мазок).

Материалы и оборудование

Агарозный гель, раствор ДНК бактериального, растительного или животного происхождения, полученный в работах 1.1–1.3 (0,5 мг/мл), маркер молекулярного веса (коммерческий препарат) или ДНК фага лямбда, гидролизованная рестриктазой *HindIII*.

Растворы

- 10x буфер для нанесения образцов: 0,025 г бромфенолового синего; 4 мл глицерина; 5 мл 0,5 М ЭДТА, рН 8,0; довести до 10 мл дистиллятом.

Методика

1. Поместить плашку с гелем в электрофорезную камеру, залить электрофорезный буфер (1×) так, чтобы он полностью покрыл агарозу^а.
2. Смешать 10 мкл раствора ДНК с 1 мкл 10-ти кратного буфера для нанесения образцов в пробирке, в лунке малого иммунологического планшета или просто на поверхности тефлоновой гребенки.
3. Нанести образец(ы) микропипеткой в лунку геля.
4. Нанести маркер молекулярного веса в лунку геля.
5. Включить напряжение 100 В и провести электрофорез в течение 1,5–2 ч (до выхода лидирующего красителя бромфенолового синего из геля).
6. Вынуть плашку и посмотреть гель в УФ-свете.
7. Сфотографировать гель цифровой фотокамерой^б.

Примечания

^а Слой буфера над агарозой должен быть до 5 мм, иначе гель может «обсохнуть».

^б Агарозные гели с ДНК, в отличие от полиакриламидных с белками, следует фотографировать сразу, поскольку при хранении полосы ДНК (ДНК-бэнды) быстро становятся размытыми из-за диффузии.

Тема 4. ВЫДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ И ФАГОВОЙ ДНК

Плазмида – внехромосомный самовоспроизводящийся генетический элемент (фактор наследственности) бактерий и некоторых других организмов, в частности дрожжей. Большинство векторов для клонирования ДНК получено на основе плазмид, бактериофагов или вирусов эукариот. Векторы составляют основу как генетической, так и белковой инженерии. Кроме того, рекомбинантная ДНК применяется в клеточной инженерии, молекулярной диагностике заболеваний и генной терапии.

Плазмида представляет собой кольцевую (реже линейную) двухцепочечную молекулу ДНК, способную к автономной репликации в клетке организма-хозяина.

Среди методов выделения плазмидной ДНК наиболее распространены разновидности метода щелочного лизиса клеток бактерий, разработанного Бирнбоймом и Доли в 1979 году (Birnboim, Doly, 1979). Они позволяют легко отделить плазмидную ДНК от высокомолекулярной хромосомной ДНК. Пептидогликан (муреин) клеточной стенки разрушают лизоцимом, а клеточную мембрану растворяют детергентом SDS в щелочных условиях при значении pH около 12,5. Хромосомная ДНК при этом фрагментируется и денатурирует необратимо. Плазмидная ДНК также денатурирует, но не фрагментируется ввиду ее небольшого размера, и обе цепи ДНК остаются сцепленными. После понижения pH при добавлении раствора ацетата калия с pH 5,0, обе цепи плазмиды ренатурируют друг с другом. Одноцепочечные фрагменты хромосомы из разных клеток ренатурируют (гибридизуются) случайным образом и образуют высокомолекулярный творожистый осадок. Этот осадок легко отделяется центрифугированием от оставшейся в растворе плазмиды, которую затем осаждают этанолом.

Репликативная форма фагов, существующая внутри инфицированных клеток бактерий, также представляет собой молекулы двухцепочечной кольцевой ДНК и может быть выделена методом щелочного лизиса клеток.

Работа 4.1. Минипрепаративное выделение плазмидной ДНК (минипреп)

Приведенный протокол представляет собой модификацию метода щелочного лизиса клеток бактерий. Это лучший метод для получения плазмидной ДНК высокого качества. Его достоинствами являются простота и высокая скорость, которая сравнима только с выделением ДНК на микроколонках. Количества получаемой ДНК достаточно для нескольких рестрикций. При масштабных объемах используют процедуру максипреп, описанную в работе 4.2, также основанную на этом методе.

Плазмида pBR322, ДНК которой предполагается получить – один из первых векторов молекулярного клонирования (Bolivar, Rodrigues, 1983).

Материалы и оборудование

Штамм кишечной палочки *E.coli XL-1*, трансформированный плазмидой pBR322 (см. прил. 1, 4), миницентрифуга, качалка-шейкер.

Растворы

- *Раствор I* для выделения плазмидной ДНК: 50мМ глюкоза; 100мМ Tris-HCl (pH 8,0); 10мМ ЭДТА. Хранить при +4°C, перед использованием добавить лизоцим до 5 мг/мл.
- *Раствор II*^а. 0,2N NaOH; 1% SDS. Готовить перед использованием, допускается недлительное хранение при комнатной температуре в плотно закрытой пластиковой посуде.
- *Раствор III*. 3М ацетат калия, pH 5,0. На 100 мл: 5М ацетат калия – 60 мл, CH₃COOH ледяная – 11,5 мл, H₂O – 28,5 мл.
- *Смесь фенол-хлороформ* (работа 1.1)
- *Смесь хлороформ-изоамиловый спирт* (работа 1.1).
- *Ампициллин*. Раствор 100 мг/мл в воде.

Методика

1. Вырастить культуру клеток *E.coli* с плазмидой pBR322 в 5 мл питательной среды 2YT (тема 1), содержащей 100 мкг/мл антибиотика ампициллина при 37°C в течение 16–24 ч на качалке-шейкере при скорости 200–300 об/мин.
2. Осадить клетки из культуральной среды. Для этого поместить 1,5 мл «ночной культуры» *E.coli* в 1,7 мл микроцентрифужную пробирку, центрифугировать в течение 2 мин при 10000 об/мин. Удалить супернатант выливанием через край. Повторить осаждение клеток в эту же пробирку ещё 2 раза.
3. Центрифугировать 10 с дополнительно, отобрать остатки культуральной среды микропипеткой.
4. Ресуспензировать осадок в 200 мкл раствора I с помощью микропипетки или вортекса. Оставить при комнатной температуре на 5 мин^б.
5. Добавить 400 мкл раствора II, сразу же резко встряхнуть, перевернуть 5 раз. Происходит лизис бактерий и щелочная денатурация ДНК. Поместить образцы на лед (0°C) на 5 мин^в.
6. Добавить 300 мкл холодного раствора III, 5 раз перевернуть пробирку и оставить на льду на 5 мин^г.
7. Центрифугировать в течение 5 мин при максимальной скорости центрифуги для осаждения хромосомной ДНК.
8. Супернатант, содержащий плазмидную ДНК, перенести в новую пробирку, содержащую 500 мкл изопропанола (высаживает ДНК, как и

- этанол), смешать переворачиванием пробирки, оставить на 10 мин на столе.
9. Осадить плазмиду центрифугированием в течение 10 мин при максимальной скорости центрифуги, супернатант затем вылить через край, а остатки после короткого центрифугирования отобрать микропипеткой.
 10. Плазмидный осадок растворить в 100 мкл TE-буфера.
 11. Раствор плазмидной ДНК необходимо подвергнуть дальнейшей очистке – провести фенольную депротеинизацию образца. Для этого добавить 100 мкл смеси фенол–хлороформ, хорошо перемешать и разделить фазы центрифугированием (10 мин, 10000 об/мин).
 12. Перенести верхнюю водную фазу в новую пробирку, добавить 100 мкл смеси хлороформ–изоамиловый спирт (она удаляет остатки фенола), хорошо перемешать и разделить органическую и водную фазы центрифугированием (3 мин, 10000 об/мин).
 13. Отобрать верхнюю водную фазу, добавить 1/10 объема холодного ацетата калия и высадить ДНК этанолом. Для этого добавить 1 мл холодного (–20°C) этанола и поместить образец на лед или в морозильник не менее чем на 15 мин. На этой стадии можно прерваться, в холоде под спиртом ДНК может храниться достаточно долго.
 14. Осадить плазмидную ДНК центрифугированием (10 мин, 10000 об/мин).
 15. Добавить к осадку 1 мл 70 % этанола для промывки ДНК и центрифугировать (3 мин, 10000 об/мин).
 16. Слить супернатант, перевернуть пробирки на фильтр и подсушить на воздухе в течение 0,5 ч. Растворить в 50–100 мкл воды. На электрофорез взять 5–10 мкл.
 17. При необходимости для удаления РНК из образца провести его обработку РНКазой. Следует добавить к полученному препарату 1/100 объема раствора РНКазы (10 мг/мл) и выдержать 0,5–1 ч при температуре 37°C. РНКазу затем удалить фенольной депротеинизацией подобно тому, как описано выше для клеточных белков.

Примечания

^а Раствор II должен быть свежеприготовленным. Хранить его можно лишь ограниченное время, до нескольких недель. Важно, чтобы в процессе хранения CO₂ из воздуха не нейтрализовал NaOH. Емкость должна быть с плотно завинчивающейся крышкой, лучше пластиковой, поскольку стекло растворяется в щелочи.

^б Это время необходимо для работы лизоцима. Если лизоцим не добавлен (клетки кишечной палочки удовлетворительно лизируются и без его добавления), можно сразу переходить к следующему пункту.

^в Превышение времени денатурации чревато тем, что плазида денатурирует необратимо – одно кольцо сдвинется относительно другого так далеко, что достигнет локально устойчивого состояния. Необратимо денатурированные плазмиды вполне годятся для сиквенса, но они не режутся рестриктазами и обладают аномальной подвижностью.

^Г Происходит нейтрализация щелочной среды. Геномная ДНК регибридуется случайным образом, образуя большие сети, кольцевая же плазмидная ДНК благополучно ренатурирует. Важно, чтобы нейтрализация была полной, не оставалось областей с вязким раствором. Нужно смешивать раствор вначале мягко, чтобы не фрагментировать геномную ДНК, но после того как она уже ассоциирует (приблизительно через 1 мин) встряхнуть посильнее. Растворы I, II, III для достижения нужного значения pH всегда используются в объемной пропорции 1:2:1,5.

Работа 4.2. Выделение плазмидной ДНК из больших объемов (максипреп)

Метод предназначен для получения значительных количеств плазмидной ДНК высокого качества. Это бывает необходимо при продолжительной масштабной работе с определенными векторами, рекомбинантными конструкциями или клонированными генами. Приведенный ниже метод также представляет собой модификацию метода щелочного лизиса бактериальных клеток. В определенном смысле процедура выделения ДНК сводится к пропорциональному увеличению количества исходного материала и объемов реагирующих растворов.

В приведенной работе предполагается получить ДНК ценного вектора в значительных количествах. Плазида pBluescript II KS+ (Stratagene) – это вектор для клонирования и секвенирования, используется и как вектор для экспрессии. Кроме того, эта плазида (фагида) способна упаковываться в фаговые частицы в присутствии хелперного фага, поскольку имеет *ori* фага M13. Плазида pBluescript II KS+ характеризуется существенно более высоким числом копий на клетку по сравнению с плазмидой pBR322 (см. прил. 1).

Материалы и оборудование

Центрифуга для больших объемов. Весы для уравнивания. Штамм кишечной палочки *E.coli* XL-1 с плазмидой pBluescript II KS+ (см. прил. 5).

Растворы

- *Раствор I* (работа 4.1).
- *Раствор II* (работа 4.1).
- *10 М ацетат аммония*. Растворить 770 г в 800 мл воды, довести до 1 л.
- *Ампициллин* (работа 4.1).

Методика

1. Вырастить ночную культуру бактерий при 37°C в 100–500 мл богатой питательной среды 2YT, содержащей 100 мкг/мл ампициллина в течение 20–24 ч при скорости роторной качалки-шейкера 200–300 об/мин.
2. Центрифугировать при 4000 об/мин 10–15 мин при 4°C, слить среду.

3. Центрифугировать при 4000 об/мин в течение 1 мин, отобрать микропипеткой остатки жидкости.
4. Ресуспензировать осадок клеток в 10 (или 5) мл раствора I.
5. Добавить 1 мл (или 0,5) свежеприготовленного раствора I с лизоцимом (10 мг/мл). Оставить на столе на 15 мин.
6. Добавить 20 (или 10) мл раствора II, вылить резко, смешать. Оставить при 0°C на 5 мин.
7. Добавить 1 (или 0,5) мл холодного 10М ацетата аммония^a (добавлять микропипеткой по каплям), смешать. Оставить при 0°C на 5 мин.
8. Центрифугировать при 5000 об/мин в течение 10 мин при 4°C.
9. Супернатант отобрать микропипеткой, разделить на две центрифужные пробирки, добавить к каждой по 12,5 мл изопропанола. Делать это на весах. Оставить на столе на 10 мин для высаживания ДНК.
10. Центрифугировать при 5000 об/мин, 4°C, 10 мин, отбросить супернатант.
11. Центрифугировать при комнатной температуре 3 мин, отобрать остатки жидкости. Осадок плазмидной ДНК не подсушивать!
12. Суспензировать осадок в каждой микроцентрифужной пробирке в 400 мкл 2М ацетата аммония, объединить в одной 1,7 мл пробирке. Оставить при комнатной температуре на 5 мин.
13. Центрифугировать при комнатной температуре 10 мин.
14. Супернатант перенести в пробирку с равным объемом (800 мкл) изопропанола^b. Оставить на столе на 10 мин.
15. Центрифугировать при комнатной температуре 5 мин.
16. Сполоснуть осадок 70% этанолом.
17. Растворить плазмидную ДНК в 0,2–1 мл H₂O. Для электрофореза достаточно взять 5–10 мкл^b.

Примечания

^a Использование ацетата аммония вместо ацетата калия в качестве раствора III позволяет существенно уменьшить объемы при центрифугировании.

^b Использование изопропанола для высаживания ДНК из раствора также позволяет уменьшить объемы. При масштабных работах важно минимизировать расход реагентов. Обычно для высаживания ДНК используют равный объем изопропанола (минимум 0,6 V) или двойной объем этанола (как минимум).

^b Подвижность плазмидных форм для небольших плазмид приведена в прил. 9. Сначала идет суперспиральная форма, при очень высоких концентрациях перед ней можно увидеть сверхсуперспираль. Затем движется линейная (встречается в старых препаратах или у начинающих исследователей при нарушении протоколов), и потом релаксированная форма плазмиды (двухцепочечная кольцевая с разрывом в одной цепи). Это основные формы. Выше над этими формами можно видеть димерную суперспиральную форму. Еще выше по направлению к лунке иногда видны остатки хромосомной ДНК. При рестрикции все формы плазмиды переводятся в одну полосу, соответствующую линейной форме (остатки хромосомы при рестрикции дают шлейф из фрагментов, чаще всего невидимый).

Работа 4.3. Выделение репликативной формы RF фага M13

Бактериофаги (фаги) – вирусы бактерий; размножаются внутри клеток бактерий, что вызывает их лизис. С химической точки зрения представляют собой нуклеопротеиды: фаг состоит из белковой оболочки (капсида), покрывающей одно- или двухцепочечную молекулу ДНК, или, реже, РНК.

Близкородственные нитевидные фаги M13, f1, fd и др. с вирионами, содержащими одноцепочечную ДНК относятся к умеренным – они не лизируют клетки, на которых размножаются (паразитируют). Векторы на основе нитевидных фагов удобны для секвенирования, так как из фаговых частиц можно выделить одноцепочечную ДНК. Интерес к этим векторам обусловлен еще и тем, что эти фаги составляют основу метода фаг-дисплея – одного из основных методов белковой инженерии, лучшего аффинного метода для изучения белок-белковых взаимодействий. Клонирование генов осуществляют в двухцепочечную ДНК нитевидных фагов, существующую внутри клеток инфицированной популяции бактерий. Если при клонировании “сшить” какой-либо ген с геном III белка оболочки фага, то рекомбинантный белок будет презентирован на поверхности фаговой частицы (McCafferty et al., 1990) в виде фьюжен-конструкта (англ. fusion – слияние, сплав).

Выделение двухцепочечной кольцевой (репликативной, RF) формы фага M13 из клеток *E.coli* может быть проведено по любому из методов, используемых при выделении плазмид. Выход ДНК из 50 мл культуры клеток *E.coli*, зараженных фагом, составляет 10–25 мкг. Фаг M13 инфицирует только F+ штаммы кишечной палочки, поскольку сорбируется на F-пилях.

Приведена методика заражения (трансфекции) клеток кишечной палочки фагом M13 с последующей наработкой RF-формы и выделением двухцепочечной ДНК.

Материалы и оборудование

F+ штамм кишечной палочки *E.coli* XL-1 (TG-1, JS5 или другой), фаг M13 K07 в буфере TE с титром 10^{13} частиц /мл.

Растворы

- Раствор I (работа 3.1)
- Раствор II (работа 3.1)
- 10 М ацетат аммония. Растворить 770 г в 800 мл воды и довести до 1 л.
- Канамицин. Раствор 100 мг/мл в воде.

Методика

1. Вырастить культуру F+ штамма *E.coli* в 5 мл жидкой среды 2YT в течение ночи. Количество клеток может достичь при этом 10^{10} клеток/мл.
2. Заразить культуру фагом в соотношении 10:1 (на 1 бактериальную клетку должно приходиться до 10 фаговых частиц). Для этого необходимо в

пробирку к бактериальным клеткам добавить 10 мкл суспензии фаговых частиц.

3. Инкубировать без качания 1 ч при 37°C. За это время фаг M13 K07 сорбируется на половых пиллях, проникнет в клетку и начнется синтез его репликативной формы.
4. Добавить в 500 мл свежей среды 2YT необходимый антибиотик ^a (500 мкл раствора канамицина с концентрацией 100 мг/мл), перелить туда зараженные фагом клетки *E.coli*.
5. Растить культуру с аэрацией в течение ночи при 37°C.
6. Клетки осадить центрифугированием при 4000 об/мин в течение 10–15 мин. Слить супернатант с культуральной средой в чистую колбу ^b.
7. Выделить из осажденных клеток двухцепочечную кольцевую ДНК репликативной формы фага по протоколу максипреп (работа 4.2).

Примечания

^a Фаг M13 K07 является рекомбинантным и имеет ген канамицин-устойчивости (см. прил.1). Фаг M13 дикого типа и векторный фаг M13 mp18 растут без антибиотика.

^b В культуральной жидкости содержатся вышедшие из клеток фаговые частицы. Их легко можно выделить, как описано в работе 4.4, пропорционально увеличив при этом объемы. Титр фаговых частиц определяют путем трансфекции (заражения) клеток *E.coli* и посева на агаризованную питательную среду.

Работа 4.4. Выделение одноцепочечной ДНК фага M13

Вышедшие из инфицированных клеток *E.coli* в культуральную среду фаговые частицы сравнительно легко можно выделить. Сначала клетки отделяют центрифугированием, а фаги затем высаживают из культуральной среды полиэтиленгликолем.

Одноцепочечная ДНК нитевидных бактериофагов заключена в белковый капсид. Белки можно денатурировать и удалить путем обработки фенолом, а высвободившуюся ДНК высадить из раствора этанолом. Небольшого количества супернатанта объемом 1,5 мл из-под инфицированных клеток кишечной палочки обычно достаточно для проведения электрофореза и секвенирования.

Материалы и оборудование

Инфицированные фагами клетки *E.coli*, ампициллин, этанол.

Растворы

- Раствор PEG/NaCl. Водный раствор 20% PEG–6000; 2,5M NaCl.
- Ампициллин. Раствор 100 мг/мл в воде.
- TE-буфер (работа 1.1).

- Смесь фенол–хлороформ (работа 1.1).
- Смесь хлороформ–изоамиловый спирт (работа 1.1).

Методика

1. Перенести 10 мкл инфицированных фагом клеток кишечной палочки, находящихся в логарифмической фазе роста в жидкой питательной среде 2YT, в 2,5 мл среды 2YT с антибиотиком ^а. Можно также взять со свежей чашки одну колонию петлём.
2. Инкубировать на качалке-шейкере при 200–300 об/мин при 37°C в течение ночи с хорошим аэрированием
3. Отобрать 1,5 мл культуры и поместить в 1,7 мл пробирку типа Eppendorf.
4. Центрифугировать при комнатной температуре 5–10 минут.
5. Отобрать супернатант в чистую пробирку и добавить 1/10 объема PEG/NaCl (150 мкл).
6. Оставить при 0°C на 15 мин.
7. Центрифугировать 5 мин на максимальной скорости микроцентрифуги.
8. Удалить супернатант микропипеткой.
9. Ресуспензировать осадок в 400 мкл буфера TE ^б.
10. Добавить равный объем смеси фенол–хлороформ, хорошо перемешать встряхиванием и центрифугировать в течение 5 мин. Происходит разделение фаз. ДНК находится в верхней водной фазе, фенол внизу, а в интерфазе – денатурированные белки.
11. Отобрать около 300–350 мкл верхней водной фазы, стараясь не захватывать интерфазу, в чистую пробирку.
12. Добавить равный объем смеси хлороформ–изоамиловый спирт, встряхнуть и центрифугировать 5 мин. Происходит разделение фаз, остатки фенола растворяются в нижней органической фазе.
13. Отобрать около 250–300 мкл верхней водной фазы, стараясь не захватывать интерфазу, в чистую пробирку
14. Добавить 1 мл 96% этанола и центрифугировать 10 мин при максимальной скорости микроцентрифуги.
15. Удалить супернатант, промыть осадок ДНК холодным 70% этанолом. Растворить ДНК в 10 мкл H₂O ^в.

Примечания

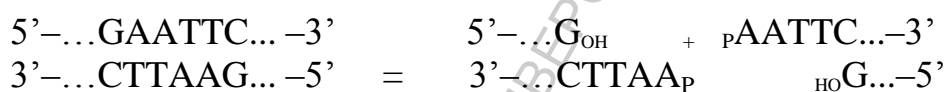
^а Обязательно должна присутствовать селекция против незараженных бактерий. Фаги семейства M13 (в отличие от фага лямбда) не лизируют зараженные ими бактерии. Они реплицируются, упаковываются и выходят из бактерий, не мешая им делиться; лишь размножаются такие клетки процентов на 30–40 медленнее. Однако, метаболическая нагрузка на бактериальную клетку столь велика, что если какая-то клетка окажется незараженной, то она легко обгонит инфицированных в росте и размножении.

^б На этом этапе можно прерваться, поставив препарат в холодильник на +4°C на ночь. На следующий день провести очистку ДНК бактериофага от компонентов белкового капсида с помощью фенола, денатурирующего протеины.

Тема 5. РЕСТРИКЦИЯ ДНК

Эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы) широко используются в работах по картированию геномов, клонированию генов, идентификации ДНК, определению родства и других работах в качестве «молекулярных ножниц». Рестриктазы расщепляют молекулы ДНК в определенных нуклеотидных последовательностях, называемых сайтами узнавания. Это сайт-специфические эндонуклеазы, способные делать разрывы внутри цепи ДНК, в отличие от экзонуклеаз, деградирующих ДНК с концов. Первые рестриктазы были выделены Смитом (Smith, 1970; Smith, Nathans, 1973), само же явление рестрикции-модификации ДНК впервые было обнаружено Лурия (Luria, 1952) при изучении размножения фагов на разных штаммах бактерий.

Рестриктазы II типа узнают палиндромные последовательности нуклеотидов – последовательности, имеющие ось симметрии второго порядка. Так, сайт узнавания рестриктазы EcoRI из шести нуклеотидов –GAATTC– на комплементарной цепи ДНК в том же 5'→3' направлении читается так же. Точка разрезания находится между G и первым A. Образующийся при рестрикции 5'-выступающий «липкий конец» имеет в длину 4 нуклеотида:



Эти ферменты, как правило, работают в форме димера, причем каждая субъединица белка гидролизует одну цепь ДНК независимо от другой. Однако на одноцепочечной ДНК они работают значительно медленнее. В зависимости от относительного расположения разрыва на комплементарных цепях ДНК образующиеся рестрикты обладают либо 5'-выступающими (EcoRI, BamHI, HindIII), либо 3'-выступающими (PstI) липкими концами. Большинство рестриктаз дают 5'-выступающие липкие концы (прил. 3).

На активность ферментов может влиять ряд факторов – температура инкубации, ионный состав буфера, метод выделения ДНК и соответственно степень ее загрязнения, а также уровень метилирования ДНК и специфичность метилирования. Результаты рестрикции оценивают с помощью электрофореза в агарозном геле.

Небольшие по размеру молекулы плазмидной или вирусной ДНК при гидролизе определенной рестриктазой дают строго определенное ограниченное количество рестриктов (прил. 3). Препараты геномной ДНК из-за большого количества рестрикционных сайтов и фрагментации ДНК при ее выделении дают при электрофорезе шлейф из фрагментов.

Система рестрикции-модификации ДНК – это ферментативная система бактерий, состоящая из двух белков (рестриктазы и метилазы), специфичных к одному и тому же сайту узнавания. Эта система разрушает попадающую в клетку чужеродную ДНК. Основная её функция – защита клетки от проникновения чужеродного генетического материала, прежде всего от бактериофагов и плазмид. Защита бактериального генома от собственной рестриктазы осуществляется с помощью метилирования аденина или цитозина соответствующим ферментом. Метилированные сайты рестриктаза разрезать не способна.

Для любой ДНК с известной первичной структурой можно определить число и локализацию всех сайтов рестрикции с помощью специальных компьютерных программ для рестрикционного картирования, к примеру, программы RestrictionMapper (<http://www.restrictionmapper.org>).

Работа 5.1. Рестрикция плазмидной и фаговой ДНК

Буферы. Абсолютно необходимым кофактором для работы рестриктазы являются ионы Mg^{2+} . Буферную емкость обеспечивает Tris-HCl. β -меркаптоэтанол или дитиотрейтол стабилизирует фермент. Различают высокосолевой (100мМ NaCl), среднесолевой (50мМ NaCl) и низкосолевой (без NaCl) буферы. Фирмы-поставщики вместе с ферментом продают и необходимый буфер в концентрированном виде.

Объем реакционной смеси. Удобно проводить рестрикцию в объеме 20–50 мкл, когда раствор ДНК, 10× буфер (2–5 мкл соответственно) и фермент смешивают в пробирке и доводят до конечного объема бидистиллятом.

Активность и количество фермента. Каждый препарат фермента обладает определенной активностью. 1 единица активности фермента полностью гидролизует 1 мкг ДНК фага λ за 1 ч при 37°C. Коммерческие препараты обычно имеют активность 10–20 ед/мкл и требуют разведения. Гидролиз ДНК осуществляют 2–3-кратным избытком рестрикционных эндонуклеаз, т.е. на каждый 1 мкг ДНК берут 2–3 ед. активности фермента.

Температура и время инкубации. Большинство ферментов работают при 37°C (кроме ферментов из термофильных бактерий). При комнатной температуре скорость работы существенно снижается. Более длительная, чем 1 ч, инкубация бывает необходимой, если гидролиз по каким-либо причинам произошел не полностью. При неполной рестрикции на электрофореграмме видны полосы, соответствующие полоскам нерезанного контроля.

Материалы и оборудование

Раствор ДНК плазмиды pBR322 (1 мг/мл), раствор ДНК фага λ (1 мг/мл), эндонуклеаза рестрикции EcoRI с активностью 10 ед/мкл.

Растворы

- 10× буфер для рестриктазы *EcoRI*. 500мМ Tris–HCl, pH 7,5; 100мМ MgCl₂; 1000мМ NaCl; 10мМ ДТТ.
- 10× буфер для нанесения образца на гель (тема 3).

Методика

1. Приготовить реакционную смесь (конечный объем 20 мкл) в 1,5 мл пластиковой пробирке: 10× буфер – 2 мкл, раствор ДНК (1 мг/мл) – 2 мкл, вода – 15 мкл.
2. Тщательно перемешать, осадить смесь на дно пробирки коротким центрифугированием.
3. Добавить 1 мкл раствора рестриктазы *EcoRI*, разведенного соответствующим буфером и содержащего 2–3 единицы активности, собрать смесь коротким центрифугированием.
4. Инкубировать 1 ч^а при рекомендуемой температуре.
5. Остановить реакцию добавлением 1 мкл 200мМ ЭДТА или прогреванием при 65°C в течение 5 мин^б.
6. Добавить к образцу 1/10 объема раствора для нанесения на гель, перемешать пипетированием и нанести в лунки геля. В растворе для нанесения полученные образцы ДНК можно некоторое время хранить в холодильнике.
7. Провести электрофорез ДНК при напряжении в 100 В в течение 1,5–2 ч и оценить результаты, просмотрев гель в УФ-свете. Сфотографировать гель.

Примечания

^а Время инкубации допускается увеличивать до 2-х и более часов для полноты гидролиза. Коммерческие препараты ферментов, как правило, не содержат примесей нуклеаз и поэтому не обладают неспецифической нуклеазной активностью. Однако при слишком длительной инкубации для некоторых рестриктаз возможно проявление star-активности или активности со звездочкой, т.е. снижение специфичности гидролиза ДНК. Это приведет к появлению «шмера» вместо четких полос на электрофореграмме.

^б Помимо прочего, в прогретых препаратах идет лучшее разделение рестриктов с близким молекулярным весом, для которых иногда бывает характерно «залипание». Часто такие фрагменты начинают разделяться на два ДНК-бэнда только ближе к концу геля. Такое можно увидеть для *EcoRI*-фрагментов ДНК фага λ размером 5804 и 5643 нуклеотидов.

^в Число сайтов рестрикции в кольцевой ДНК точно соответствует числу получаемых рестриктов. При полном *EcoRI*-гидролизе плазмиды pBR322 получится один рестрикционный фрагмент, при рестрикции фага фага λ получится 6 рестрикционных фрагментов. Если ДНК-бэндов в геле больше, то это свидетельствует о неполном гидролизе ДНК («недорестрикция»).

Работа 5.2. Рестрикция геномной ДНК эукариот

Хромосомная ДНК эукариот в сравнении с плазмидной, фаговой или митохондриальной содержит очень большое количество сайтов рестрикции. Кроме того, она всегда фрагментируется случайным образом при выделении, ее препараты труднее очистить от белков, полисахаридов и других веществ. Помимо этого, степень ее метилирования может сильно варьироваться, что оказывает сильное влияние на работу эндонуклеаз.

Обычно берут 3–5-кратный избыток фермента на 1 мкг ДНК и проводят рестрикцию в течение 2–6 ч или оставляют на ночь. 10 мкг ДНК большинства высших растений соответствует 10^6 – 10^7 геномам. Концентрацию ДНК в растворе можно определить либо путем сравнения с известным стандартом при электрофорезе в агарозном геле, либо путем измерения оптической плотности разведенной аликвоты раствора ДНК.

При обработке геномной ДНК рестриктазами, узнающими палиндромы из шести нуклеотидов (EcoRI, BamHI, PstI и другие распространенные рестриктазы), образуются рестрикты размером от десятков нуклеотидов до 20–30 kb. Таким образом, при полном рестрикционном гидролизе ДНК эукариот получаются сотни тысяч и миллионы рестрикционных фрагментов. При электрофорезе подвергшаяся частичному или глубокому расщеплению геномная ДНК дает шлейф из фрагментов разного размера. Визуализировать на электрофореграмме нужный фрагмент можно только с помощью ДНК-гибридизации, используя радиоактивно- или флуоресцентно-меченый олигонуклеотидный зонд.

Так называемые «мелкощепящие» рестриктазы, узнающие палиндромы из 4 нуклеотидов (Sau3A и др.), порежут геномную ДНК на более мелкие фрагменты и в еще большем количестве. В зависимости от преследуемых целей по эффективному разделению высоко- или низкомолекулярных фрагментов ДНК используют гели с разной концентрацией агарозы (тема 3).

Материалы и оборудование

Геномная ДНК из растений с неизвестной концентрацией. Рестриктаза BamHI, спектрофотометр, образец ДНК любого происхождения с известной концентрацией.

Растворы

- 10× буфер для рестриктазы BamHI. 100мМ Tris-HCl (pH 8,0); 50мМ MgCl₂; 1000мМ KCl; 0,02% Triton X-100.
- 10× буфер для нанесения образца на гель (тема 3).

Методика

1. Определите концентрацию ДНК с помощью спектрофотометра.

2. Оцените чистоту препарата путем измерения оптической плотности при длинах волн 260, 280 и 235 нм, т.е. на максимумах поглощения для ДНК, белков и полисахаридов, соответственно. Для чистой ДНК характерны значения $A_{260}/A_{230} = 2,2-2,5$ и $A_{260}/A_{280} = 1,8-1,9$.
3. Гидролизуйте 1 мкг тотальной ДНК табака в 50 мкл реакционной смеси в течение 6 ч ^а, отбирая через каждый час аликвоту в 10 мкл и останавливая в ней реакцию, добавлением 1 мкл буфера для нанесения образца ^б.
4. Проведите электрофорез ДНК-рестриктаз. Используйте в качестве контроля нерезанный образец ДНК. Сфотографируйте гель.

Примечания

^а При длительной инкубации некоторые рестриктазы могут проявлять star-активность (звездную, вторичную, штриховую активность), т.е. снижать свою специфичность и гидролизовать сайты с одним или несколькими «неправильными» нуклеотидами. Это необходимо учитывать, если впоследствии предполагается проводить клонирование.

^б Можно остановить (временно затормозить) реакцию помещением пробирки в лед. В этом случае при необходимости (неполный гидролиз, «недорестрикция») ее легко можно возобновить. Если же она останавливалась с помощью ЭДТА, присутствующей в буфере для нанесения образца на гель, то нужно снова добавить ионы магния в эквимольном количестве в реакционную смесь.

Тема 6. ПЦР

ПЦР, полимеразная цепная реакция – это многократное копирование определенного фрагмента ДНК *in vitro* с помощью ДНК-полимеразы, селективная амплификация ДНК. Границы фрагмента задают нуклеотидными последовательностями праймеров, поэтому копированию подвергается только определенный ген (ДНК-мишень), а не вся ДНК как при репликации *in vivo*. Основоположником метода считается Кэрри Муллис (Mullis, 1985).

ПЦР включает три стадии: 1) *денатурацию ДНК* – расплетение двойной спирали и расхождение цепей, 2) *отжиг* – гибридизацию праймеров (синтетических олигонуклеотидов) с одноцепочечной ДНК с образованием двухцепочечных комплексов «праймер-матрица», необходимых для инициации синтеза ДНК, 3) *полимеризацию* – достраивание (удлинение, элонгацию) комплементарных цепей в направлении 5'→3', начиная от участков присоединения праймеров.

Многократное (циклическое) повторение этих трех стадий приводит к экспоненциальному обогащению реакционной смеси молекулами ДНК-мишени, поскольку в каждом новом цикле в качестве матрицы выступает не только исходная ДНК, но и вся ДНК, синтезированная в предыдущих циклах. Поэтому реакция относится к цепным. Протекание ПЦР, т.е. переход от стадии к стадии и от цикла к циклу, регулируется изменением температуры.

Температура денатурации ДНК определяется ионной силой используемого буфера и концентрацией денатурирующих агентов, если они есть. Чем ниже ионная сила и чем выше концентрация денатурирующих ДНК агентов, тем ниже температура, при которой происходит денатурация. Для любой высокомолекулярной геномной ДНК обычно задают 95°C. Для продуктов амплификации, а тем более комплексов «праймер-матрица» эта температура ниже.

Температура отжига праймера – температура, при которой возможно связывание праймерного олигонуклеотида с одноцепочечной ДНК-матрицей при охлаждении реакционной смеси, следующем за стадией денатурации. Для каждого конкретного праймера она рассчитывается отдельно и лежит в пределах 50–65°C. Задается на 3 градуса ниже расчетной для гарантированного отжига праймера на матрицу. Это переменная температура.

Температура элонгации зависит от типа используемой ДНК-полимеразы. Для Taq-полимеразы из термофильной бактерии *Thermus aquaticus* оптимум температуры составляет 72°C.

Коммерческие фирмы продают наборы реактивов для проведения ПЦР, где все компоненты реакции, за исключением праймеров и матрицы, уже смешаны в нужных концентрациях (см. работу 6.2) и расфасованы в тонкостенные пробирки. В том числе добавлен и фермент, индуцируемый нагревом и потому неактивный. Задача исследователя состоит в том, чтобы

добавить в пробирку ДНК-матрицу и специфичные праймеры в нужном количестве, поставить пробирки в амплификатор и задать нужный режим.

Работа 6.1. Подбор праймеров

Праймеры – синтетические олигонуклеотиды, состоящие из 16–30 оснований. Они комплементарны участкам ДНК, между которыми находится последовательность-мишень. Праймер является обязательным компонентом, необходимым для работы ДНК-полимеразы, к его 3'-ОН концу полимеразы присоединяет нуклеотиды, комплементарные матрице.

Праймер к 5'-концу гена называют прямым (forward, For), к 3'-концу гена – обратным (reverse, Rev). В базах данных нуклеотидных последовательностей приведена только одна цепь ДНК, по ней подбирают прямой праймер (от 3'-конца которого будет расти именно эта цепь). Обратный праймер подбирают для комплементарной цепи, но также в направлении 5'→3'.

В приведенной ниже работе требуется «вручную», без использования специальных программ подобрать праймеры для амплификации гена НАДН-дегидрогеназы гадюки Никольского (*Vipera nikolskii*) и составить режим ПЦР.

Ход работы

1. Найдите информацию о первичной структуре гена НАДН-дегидрогеназы гадюки обыкновенной, по которой можно подобрать праймеры для ПЦР-амплификации этого гена у других видов гадюк. Для этого откройте сайт US National Library of Medicine (<http://www.pubmed.com>).
2. Введите латинское название организма и интересующий ген (*Vipera berus NADH dehydrogenase*).
3. Выберите опцию «Nucleotide» и нажмите «Enter».
4. Скопируйте информацию в файл. Один из сиквенсов (англ. sequence – последовательность) для примера приведен на рис.1.
5. Подберите праймеры для ПЦР, прямой и обратный. Для прямого праймера достаточно выбрать короткий отрезок гена вблизи его 5'-конца с оптимальной длиной около 20 нуклеотидов. Для подбора обратного праймера нужно восстанавливать комплементарную цепь ДНК. Любую нуклеотидную последовательность записывают в направлении 5'→3'^a.
6. Расчитайте температуру отжига ваших праймеров и составьте режим ПЦР.

Рис.1. Ген НАДН-дегидрогеназы гадюки обыкновенной *V.berus*

```
LOCUS      AY321075          1007 bp    DNA       linear    VRT 04-MAR-2005
DEFINITION Vipera berus NADH dehydrogenase subunit 2 (ND2) gene, partial cds;
mitochondrial gene for mitochondrial product.
ACCESSION  AY321075
VERSION    AY321075.1  GI:36938860
KEYWORDS   .
SOURCE     mitochondrion Vipera berus
ORGANISM   Vipera berus
```

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Lepidosauria; Squamata; Scleroglossa; Serpentes; Colubroidea; Viperidae; Viperinae; Vipera.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1007)
AUTHORS Garrigues, T., Dauga, C., Ferquel, E., Choumet, V.R. and Failloux, A.
TITLE Molecular phylogeny of Vipera and related genus
JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1007)
AUTHORS Garrigues, T. and Dauga, C.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (01-JUN-2003) IMI, Institut Pasteur, Paris, France
/organism=«Vipera berus»
/organelle=«mitochondrion»
gene <1..>1007
/gene=«ND2»
CDS <1..>1007
/gene=«ND2»
/codon_start=2
/transl_table=2
/product=«NADH dehydrogenase subunit 2»
/protein_id=«AAQ86880.1»

translation=«PMSWITITISIFMTTTLITMTTHWLMAWTCLEINTLSMIPVISK
TNHPRATEATTKYFLTQTLASITILSMTTLNALNTSNWEINLTTESTTMKIITLALMM
KMAAAPFHFWLPEVAQGATTLTALTILTWQKIAPLAILLATHNNTNLTLILSSAILS
LVGGLGGLNQTQLRKLMAFSSIAHTGWILATITLAPNISTLTFMIYTMTPIFLILN
LSSSATIKDMGTLWTTSPYFMMTMLLITLSLTGLPPLTGFMKWLILNKMVTFNMTLE
ATLMAMSSLPSTLYLMRLTYTMAMTIPPHPSLMPMKWRTHKNNTILPLTLSTMMILLC»

ORIGIN

1 tcccatatcc tgaattacaa tcaccattag cattttcatg accaccacct taattacat
61 aacaacacac tgactcatag catgaacatg tctggaaatc aatactttat ctataatccc
21 agttatctct aaaactaatc acccccgggc gacagaagca acaacaaat acttctcac
181 acaaacccta gcctccatca ccacccatc tataacaaca ctaaatagcac ttaatacctc
241 caactgagag attaacctaa caacagaatc aacaacaata aaaattatta ccctagcact
301 aataataaaa atagctgcag caccattcca cttttgatta ccagaagtag cgcaaggcgc
361 cacaacacta actgccctaa ccacccctac ctgacaaaaa attgcccccc tcgccatcct
421 attagccacc cataacaaca caaacctac aatcctaagc tcatcagcta tcctatctgt
481 cttagtcggt ggccttgagg gcctcaatca aactcaacta cgaaaactaa tagctttttc
541 atcaatcgct cacactggct gaactcttagc tactattact ctagcccca atatttcaac
601 ccttaccttc ataacttata caataaccac aataccatc tttcttattc tcaacctttc
661 atcgtcagca acaattaaag acataggaac tttatgaacc acttctccct actttataat
721 aaccatactt ctaaccatct tatccctcac agggctgccc ccacttacag ggtttatacc
781 aaaatgactt atcctaaata aatagttac cttcaacata accctagaag ccaccctaat
841 ggccatatcc tcccttcaa gcctgtacct ttatatacgc ctaacatata ccatagccat
901 aactatccca cccaccct cacttatacc gataaaatga cgaacaacc ataaaaacaa
961 cactatctta ccctcactc tatcaacaat aataattctt ctctgcc

Правила подбора праймеров

- Размер праймера должен составлять 16–25 нуклеотидов.
- Содержание CG-пар должно быть 50–60 %.
- Разница в температуре отжига обоих праймеров – не более 6°C.
- Праймеры не должны быть само- и взаимно- комплементарными.
- Нуклеотиды 3'-конца праймера должны быть строго комплементарны матрице (замены возможны на 5'-конце длинных праймеров⁶).

Расчет температуры отжига праймера

Для точного расчета оптимальной температуры отжига существует множество различных программ и алгоритмов. Упрощенный расчет можно провести по формулам:

$$T_a = [(A+T) \times 2^\circ\text{C}] + [(G+C) \times 4^\circ\text{C}] \quad (\text{если длина} \leq 20 \text{ оснований})$$

$$T_a = 22 + 1,46 [(2 \times (G+C)) + (A+T)] \quad (\text{если длина составляет } 20\text{--}30 \text{ оснований})$$

Примечания

^a Не забывайте об антипараллельности цепей ДНК при подборе обратного праймера. Если он будет иметь нужный состав, но другую полярность, ПЦР-продукт получен не будет. Такой праймер (параллельный) не будет отжигаться на матрицу.

^б Олигонуклеотид любого состава может быть по заказу синтезирован специализированной фирмой. По желанию заказчика в его состав введут флуоресцентную метку. На его 5'-конец при заказе можно добавить какие-либо нуклеотиды, к примеру, нуклеотиды сайта узнавания определенной рестриктазы. 3'-конец праймера подвергать модификации нельзя (если речь не идет об аллель-специфичной ПЦР).

Работа 6.2. Проведение ПЦР-амплификации ДНК

ПЦР проводится в объеме 10–50 мкл. Рабочая концентрация праймеров в реакционной смеси составляет 0,2–1 пМ/мкл. Количество матричной ДНК, добавляемой в реакцию, колеблется в пределах от 10 нг (плазмидная ДНК) до 1000 нг (геномная ДНК). Рабочая концентрация Taq-полимеразы составляет 0,01–0,05 ед/мкл. Число циклов – 30. Считается, что скорость достраивания ДНК Taq-полимеразой при ПЦР составляет 1000 нуклеотидов в минуту.

Оптимальная концентрация праймеров подбирается эмпирически, но она не должна быть больше 50 пМ на пробирку – иначе начнется неспецифический отжиг праймеров, а также образование праймер-димеров.

Обычно задают следующий режим работы ДНК-амплификатора:

1. $T_d = 95^\circ\text{C}$, от 1 мин – предварительная денатурация матрицы
2. 25–30 циклов ПЦР:
 - $T_d = 95^\circ\text{C}$, от 10 с – денатурация (denaturation)
 - $T_a = 50\text{--}65^\circ\text{C}$, от 30 с – отжиг праймеров (annealing)
 - $T_e = 72$, от 1 мин – элонгация, полимеризация (elongation)
3. $T = 72^\circ\text{C}$, от 1 мин. – достройка незавершенных цепей
4. $T = 4^\circ\text{C}$. – режим хранения

В качестве примера приведена методика ПЦР-амплификации гена НАДН-дегидрогеназы гадюки Никольского (Великов с соавт., Вестник Саратовского госагроуниверситета, 2006, №3).

Материалы и оборудование

ПЦР-амплификатор, ДНК гадюки Никольского *Vipera berus* (40 нг/мкл), праймеры (5 пМ/мкл), смесь нуклеотидов dNTP-mix, раствор хлорида магния, Taq-полимераза (5 ед/мкл), концентрированный 10х ПЦР-буфер.

Растворы

- *Реакционная смесь*. Подготовка смеси в объеме 20 мкл:
1. 10х ПЦР-буфер (200мМ Tris-HCl, pH 8,4; 500мМ KCl; 0,01% Tween 20) – 2 мкл,
 2. 2 мМ dNTP mix (смесь из всех 4 дезоксирибонуклеозидтрифосфатов с концентрацией по 2 мМ каждого) – 2 мкл,
 3. 25 мМ раствор $MgCl_2$ – 2 мкл,
 4. Праймер ND2 For: 5'-GCATTTTCATGACCACCACC-3' – 2 мкл,
 5. Праймер ND2 Rev: 5'-GAGTGAGGGGTAAGATAGTG-3' – 2 мкл,
 6. Матричная ДНК (40 нг/мкл) – 3 мкл,
 7. Вода деионизованная – 6,8 мкл,
 8. Taq-полимераза – 0,2 мкл.

Методика

1. В стерильной 0,5 мл пластиковой тонкостенной пробирке смешать указанные выше компоненты, довести объем при помощи деионизованной воды до 20 мкл. Перемешать, осадить коротким центрифугированием.
2. Наслоить на реакцию смесь немного минерального масла (приблизительно 30 мкл пипеткой или каплей) для предотвращения испарения. Если ДНК-амплификатор имеет нагреваемую крышку, то масло добавлять не нужно. Поместить пробирки в ДНК-амплификатор.
3. Установить следующий режим ПЦР: предварительная денатурация матрицы при 95°C – 5 мин, затем 30 циклов амплификации: 95°C – 30 с, 57°C – 30 с, 72°C – 1 мин, затем задать температуру 72°C – 5 мин (окончательная достройка цепей) и вывести на 4°C – режим хранения. Расчетная температура отжига данных праймеров составляет 60°C для каждого, реальная задана на 3°C ниже для гарантированного отжига.
4. Просмотреть результаты ПЦР в УФ-свете и сфотографировать гель (фотографию электрофореграммы см. в прил. 8).

Работа 6.3. Расчет праймеров и параметров ПЦР с помощью специальных программ

Имея некоторый опыт в постановке ПЦР в целях экономии времени для подбора праймеров и расчета параметров реакции можно использовать коммерческие программные продукты, а также интернет-ресурсы. В

частности сайт MOLBIOL.RU – это профессиональная интернет-территория для русскоязычных молекулярных биологов, биохимиков, биоинженеров (<http://www.molbiol.ru>).

Выложенная на сайте MOLBIOL.RU специальная форма поможет рассчитать параметры ПЦР, программы для подбора праймеров на этом сайте, к сожалению, нет.

Рассчитать (подобрать) праймеры для ПЦР-амплификации конкретной ДНК можно с помощью других интернет-ресурсов. В частности, можно использовать программу Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>) или другие программы.

В приведенной ниже работе предлагается ознакомиться с ресурсами в сети интернет, где можно провести расчеты для ПЦР, т.е. получить практические навыки в работе с подобными программами.

Ход работы

1. Откройте сайт программы Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>). Введите в специальное окно нуклеотидную последовательность гена НАДН-дегидрогеназы гадюки обыкновенной (источник – <http://www.pubmed.com>).
2. Нажмите «Pick Primers» и программа по умолчанию автоматически подберет вам несколько пар праймеров. Расчетная длина ПЦР-продукта при этом составит около 200 п.н. Это удобно для выявления какого-либо гена, но не подходит для других работ, когда нужен полноразмерный ген.
3. Проанализируйте подобранные компьютером пары праймеров и выберите, на ваш взгляд, наиболее подходящую пару.
4. Задайте длину амплифицируемого участка ДНК, к примеру, 851–1000 п.н., и подберите праймеры.
5. Задайте один из праймеров, к примеру, праймер ND2 For из работы 6.2, и подберите второй. Для этого вставьте последовательность праймера в специальное окно и нажмите «Pick Left Primer».
6. Прделайте те же операции с праймером ND2 Rev и со своими (работа 6.1).
7. Задайте дополнительные требования к праймерам и проведите расчет.
8. Откройте главную страницу сайта MOLBIOL.RU (<http://www.molbiol.ru>).
9. На главной странице найдите раздел «Расчеты», выберите пункт «Расчет параметров ПЦР».
10. Вводя в специальные окна варьирующие параметры, такие как длина ПЦР-продукта, молярное количество праймеров, Taq-полимеразы и другие параметры рассчитайте, сколько нуклеотидов израсходуется в реакции и каков возможный максимальный выход ПЦР-продукта.
11. Определите число циклов достаточное для завершения реакции при «идеальном» удвоении.
12. Ознакомьтесь с комментариями к расчетам. Обратите внимание на то, что расчет ведется для идеальных условий, когда в качестве матрицы берется 0,5 мкг геномной ДНК человека. Эти данные носят оценочный характер.

Тема 7. КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНОВ

Клонирование гена – это получение содержащего рекомбинантную ДНК клона бактерий или дрожжей, из клеток которого можно выделять ДНК конкретного гена или продукт этого гена (целевой белок) в значительных количествах. Клонирование генов – основа генной инженерии или технологии рекомбинантной ДНК, как ее называли раньше. Рекомбинантную ДНК впервые получил Пол Берг с сотр. (Berg et al., 1972). Общеизвестно прикладное значение этой технологии, однако, ее значение для фундаментальной науки не меньше. Эту технологию изначально называют молекулярным клонированием, поскольку изолированная из генома конкретная ДНК обеспечивает синтез белковых молекул только одного типа. В сравнении с геномной ДНК это отдельный молекулярный клон, отдельная «молекулярная машина» по производству белка.

Клонирование гена проводят путем его включения в вектор. Вектор – это кольцевая молекула ДНК (плазмиды, вируса, бактериофага), способная к автономной репликации в выбранной для клонирования системе клеток. ДНК гена и вектора, гидролизованные одной рестриктазой с образованием комплементарных «липких концов», ковалентно соединяют в одну кольцевую молекулу помощью фермента ДНК-лигазы. Вектор с клонированным геном вводят в клетки бактерий или дрожжей, где он может реплицироваться автономно, т.е. независимо от хромосомы и в большом числе копий. Плазида рBluescript II, к примеру, может присутствовать в каждой клетке бактериальной популяции клеток *E.coli* в количестве до 300 копий. Нарастивая клетки полученного клона-продуцента можно получать нужный белок в неограниченных количествах. Это, по определению, неисчерпаемый ресурс. Употребляя термин «суперпродуцент» подчеркивают высокий уровень продукции целевого белка, который может составлять до четверти веса клетки.

Стратегия клонирования для каждого конкретного гена разрабатывается индивидуально. Правильно разработанная стратегия определяет половину успеха (подбор вектора, системы отбора, необходимых рестриктаз и других ферментов, подход к скринингу клонотеки, предварительная изоляция гена и многое другое). Процедуру клонирования генов в самом общем виде можно условно разбить на несколько этапов:

- * подготовка ДНК вектора,
- * подготовка ДНК гена,
- * лигирование ДНК гена и плазмиды,
- * трансформация клеток *E.coli* лигазной смесью,
- * отбор трансформированных клонов,
- * проверка отобранных клонов на наличие вставки гена в векторе,
- * проверка экспрессии клонированного гена.

Появление метода ПЦР существенно упростило задачу клонирования генов, поскольку позволяет изолировать и накопить ДНК интересующего гена еще до стадии лигирования с векторной ДНК, а не искать нужный рекомбинантный клон в библиотеке генов организма среди множества других; скрининг клонотеки – задача не из легких, которая под силу только опытному исследователю. По сути дела при ПЦР и получаются миллионы молекулярных клонов какого-то участка ДНК, разве что дальше размножаться (а главное экспрессироваться) эта ДНК не может без включения в вектор и введения в клетку.

Работа 7.1. Подготовка ДНК вектора и гена

Кольцевую ДНК вектора расщепляют рестриктазой по какому-либо уникальному, т.е. единственному на молекулу ДНК сайту в полилинкере. Полилинкер или мультиклональный сайт, имеет нуклеотидные последовательности сайтов узнавания для нескольких рестриктаз (прил. 5). ДНК гена также «вырезают» из хромосомы с помощью этой же выбранной рестриктазы, чтобы получить комплементарные липкие концы. В случае клонирования ПЦР-продукта к нему с помощью особого фермента присоединяют липкие концы из адениловых нуклеотидов PolyA и используют специальный вектор для клонирования с PolyT-концами.

В качестве несложного примера ниже приведена методика клонирования (точнее переклонирования) гена левансахаразы *sacB* сенной палочки *Bacillus subtilis* в плазмиду pBluescript II SK+ из рекомбинантной плазмиды pSUP106::*nptI-sacB-sacR* (Великов с соавт., Биотехнология, 2004, Т.3).

Материалы и оборудование

Рестриктаза BamHI, ДНК плазмиды pBluescript II SK+ (1 мг/мл) или штамм *E.coli* с указанной плазмидой, ДНК плазмиды pSUP106::*nptI-sacB-sacR* (1 мг/мл) или штамм *E.coli* с плазмидой, плотная фильтровальная бумага.

Растворы

- 10× буфер для рестриктазы BamHI (тема 4).
- Среда 2YT (тема 1).
- Ампициллин (тема 1).

Методика

Подготовка вектора

1. Нарастить биомассу клеток штамма *E.coli*, содержащих вектор pBluescript II SK+ в объеме 500 мл питательной среды.

2. Провести препаративное выделение плазмиды, как описано в теме 4.
3. Провести рестрикцию 2 мкг полученной плазмидной ДНК рестриктазой BamHI (тема 5).
4. Провести электрофорез для контроля полноты рестрикции через 1 ч инкубации. На геле должна быть видна только одна полоса. Свечение нескольких полос свидетельствует о неполном гидролизе. В этом случае следует продолжить инкубирование еще 1 ч.
5. Переосадить гидролизованную ДНК этанолом и растворить в 20 мкл деионизованной воды. Обработать вектор щелочной фосфатазой CIP для предотвращения лигирования вектора «самого на себя» необязательно, так как отбор будет вестись по маркеру кассеты – на канамицин-устойчивость.

Подготовка гена

1. Вырезать кассету *nptI-sacB-sacR* по сайту BamHI из рекомбинантной плазмиды. Для этого провести рестрикцию 1 мкг плазмиды pSUP106::*nptI-sacB-sacR* подобно тому, как описано в теме 5.
2. Провести электрофорез в агарозном геле.
3. Вырезать под УФ-светом^а из геля скальпелем полоску агарозы с фрагментом ДНК, соответствующим по размеру кассете, или конструктору, как его называют еще. Это нижняя полоса на геле с размером 3,8 kb, верхняя полоса размером 9,6 kb – это вектор pSUP106.
4. Выделить ДНК кассеты из геля^б с помощью коммерческого набора DNA Extraction Kit (Fermentas) или каким-либо другим известным способом. Приемлемый выход ДНК (до 50%) получается при центрифугировании вырезанного из геля кусочка с полоской ДНК, помещенного в кулечек из плотного фильтра внутри проколотой пластиковой пробирки, вставленной в другую пробирку. Агароза остается на фильтре, а ДНК попадает в нижнюю пробирку.

Примечание

^а Необходимо минимизировать воздействие УФ-излучения на ДНК во избежание образования тиминовых димеров.

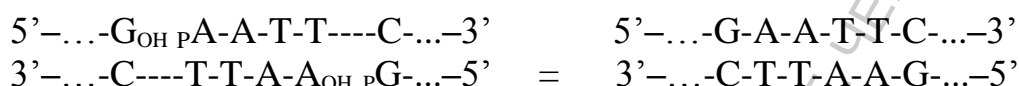
^б Можно не отделять большой и малый фрагменты один от другого при лигировании, а клонировать оба вместе и лишь впоследствии отбирать плазмиды со вставкой нужного размера. В приведенном простом случае будет получаться всего два типа плазмид со вставкой, имеющей нужный размер.

Работа 7.2. Лигирование ДНК вектора и гена

Рестрикционные фрагменты ДНК вектора и гена нужно ковалентно объединить в одну двухцепочечную кольцевую молекулу ДНК, ввести рекомбинантную ДНК в клетку кишечной палочки и размножить полученный клон. Лигирование («сшивание») фрагментов ДНК проводят с помощью фермента ДНК-лигазы. Для этого смешивают рестрицированную одной и той

же рестриктазой ДНК плазмиды и гена, добавляют лигазный буфер, ДНК-лигазу фага Т4, АТФ и инкубируют смесь при 16°C от 2 ч для рутинного лигирования до 12 ч для лигирования с целью получения библиотек генов (клонотек).

ДНК-лигаза фага Т4 катализирует образование фосфодиэфирной связи между 3'-ОН группой и 5'-фосфатом на соседних (сближенных, «отожженных») комплементарных «липких концах» в присутствии АТФ и ионов Mg^{2+} :



Некоторые рестриктазы имеют разные сайты узнавания, но дают одинаковые липкие концы. При таком лигировании полученная ДНК не будет резаться ни одной из двух использованных рестриктаз. Но гибридный сайт может резаться третьей рестриктазой. Так, фермент *Sau3A* разрежет сайт, полученный при лигировании *BamHI*- и *BglII*- рестрикционных фрагментов ДНК (см. прил. 3).

Материалы и оборудование

ДНК-лигаза фага Т4, ДНК плазмиды *pBluescript II SK+*, обработанная рестриктазой *BamHI*, ДНК плазмиды *pSUP106::nptI-sacB-sacR*, гидролизованная рестриктазой *BamHI* или малый фрагмент плазмиды.

Растворы

- 10x буфер для Т4 ДНК-лигазы. 400мМ Tris-HCl (pH 7,8); 100мМ $MgCl_2$; 100мМ ДТТ, 5мМ АТФ.
- Среда 2YT (тема 1)
- Канамицин. Раствор 100 мг/мл в воде.

Методика

1. Смешать рестрицированную ДНК плазмиды и гена в соотношении от 1:2 до 1:10. Молярное количество ДНК вставки должно превышать количество молекул ДНК вектора для «конкуренции» за вектор с целью повышения выхода рекомбинантов. Существует оптимум концентраций вектора и вставки. Использование слишком низких концентраций вставки вызовет преимущественное самолигирование вектора, слишком высоких – преимущественное образование конкатемеров. Общая концентрация ДНК в реакционной смеси не должна превышать 10 мкг/мл.
2. Добавить к смеси 10x лигазный буфер^а – 2 мкл, ДНК-лигазу фага Т4 в количестве 1–2 единиц^б, довести до 20 мкл деионизованной водой.
3. Инкубировать смесь при 16°C от 2 до 12 ч^в.
4. Переосадить лигазную смесь спиртом.

5. Провести трансформацию клеток *E. coli* с отбором на канамицине.
6. Отобранные клоны анализировать электрофорезом и рестрикцией.

Примечания

^а ДНК-лигаза фага T4 удовлетворительно работает во многих рестриктазных буферах после добавления 0,5 мМ АТФ. Проявляет при этом 75–100% активности. Т.е. после рестрикции можно сразу ставить лигазную реакцию, рестриктазную активность подавляют в этом случае предварительным прогревом образца.

^б Для лигирования по тупым концам необходимо брать 5 ед. ДНК-лигазы. При таком лигировании дополнительно в лигазную смесь добавляют 2 мкл 50% ПЭГ–4000 или 1 мкл 100 мМ спермидина для вязкости и уменьшения флуктуаций слоев жидкости.

^в В новых векторах серии ТОРО для лигирования применяют ДНК-топоизомеразу. Эти векторы очень удобны для клонирования ПЦР-продуктов, которые не нужно при этом подвергать предварительной рестрикции, либо наращивать концы из *polyA*. Время лигирования в таких системах составляет 5–10 мин.

Работа 7.3. Рестрикционное картирование вставки в плазмиде

Лигирование рестрикционных фрагментов ДНК во многом случайный процесс. В идеале один фрагмент ДНК вектора и один фрагмент ДНК вставки должны соединиться друг с другом и замкнуться в кольцо. На самом деле среди продуктов лигирования встречаются самые разнообразные сочетания с различным количеством фрагментов в разных ориентациях. Другое дело, что не все они затем селектируются. Отбор рекомбинантных клонов в приведенном примере можно вести как по маркеру вектора (*Ap*), так и по маркеру вставки (*Km*), что значительно удобнее.

При отборе по маркеру ампициллин-устойчивости вектора будут селектированы клоны с исходным «пустым» вектором и с вектором, содержащим вставку (возможно, не одинарную или делетированную), причем в обеих возможных ориентациях (только одна ориентация бывает при клонировании по сайтам двух разных рестриктаз). Проверить наличие вставки и ее ориентацию можно рестрикционным картированием. В приведенном конкретном случае для выбраковки клонов без вставки можно использовать так называемую «синя-белую селекцию», основанную на использовании гена β -галактозидазы *LacZ* вектора *pBluescript II*. Принцип селекции представлен в прил. 9.

При отборе по маркеру канамицин-устойчивости вставки, клоны с исходным вектором элимируются, что упрощает анализ трансформантов. Ориентация вставки в приведенном примере тоже не важна, так как ген *sacB* в конструкторе находится под собственным промотором (с регуляторной областью *sacR*) и будет экспрессироваться, находясь на любой из двух цепей ДНК. Кроме того, этот ген придает грамм-отрицательным бактериям

чувствительность к сахарозе, т.е. отобранные рекомбинантные клоны не должны расти на среде с 2YT, содержащей 5% сахарозы.

Материалы и оборудование

Рестриктаза *Bam*HI, рестриктаза *Eco*RI, плазмидная ДНК из клонов-трансформантов.

Растворы

- Среда 2YT (тема 1).
- 10× буфер для рестриктазы *Bam*HI (тема 5).
- Канамицин, раствор 100 мг/мл.

Методика

1. После проведения трансформации клеток *E.coli* лигазной смесью отсеять полученные клоны на свежую агаризованную среду 2YT с антибиотиком канамицином (100 мкг/мл).
2. Нарастить отдельные клоны в 5 мл жидкой среды с антибиотиком.
3. Выделить ДНК из отдельных клонов процедурой минипреп.
4. Провести электрофорез и выбросить бесплазмидные клоны (канамициновый маркер встроился в хромосому) и клоны, содержащие плазмиды, не превышающие по размеру исходный вектор или меньше его (с делециями).
5. ДНК из 5–10 клонов гидролизовать рестриктазой *Bam*HI.
6. Провести электрофорез ДНК с маркерами молекулярного веса для контроля размера вставки.
7. Определить ориентацию вставки с помощью второй рестриктазы. Для этого гидролизовать ДНК рестриктазой *Eco*RI, имеющей сайт внутри вставки ближе к гену *prtI*. Должно получиться два типа картин рестрикции для разных плазмид одинакового размера.
8. Заложить рекомбинантные клоны с обеими ориентациями вставки на хранение.

Тема 8. ТРАНСФОРМАЦИЯ БАКТЕРИЙ

Трансформацию бактерий очищенной ДНК впервые осуществили Мандел и Хига (Mandel, Higa, 1970). При инкубации ДНК фага лямбда с клетками *E.coli* в растворе CaCl_2 при температуре 0°C произошло проникновение ДНК фага внутрь бактериальных клеток, что в дальнейшем привело к размножению фаговых частиц и лизису клеток бактериальной культуры. То есть произошло то же, что и при инфекции природным фагом. Однако в норме «голую» ДНК бактериальные клетки поглощать не способны (за исключением гемофильных бактерий).

Последующее развитие метода шло эмпирическим путем. Современная процедура включает получение так называемых «компетентных» клеток, способных воспринимать чужеродную ДНК, «тепловой шок», при котором ДНК проникает внутрь клетки, и отбор трансформированных клеток путем выращивания бактериальной культуры в селективных условиях.

Плазмиды при проведении трансформации попадают только в очень небольшую часть (0,01–5%) клеток. Поэтому используют генетические селективные маркеры для отбора реципиентных клеток, несущих рекомбинантную ДНК, например, гены устойчивости к антибиотику. Многие векторы содержат ген устойчивости к ампициллину *bla*. Он кодирует фермент β -лактамазу, который инактивирует ампициллин (см. прил. 3,4). После трансформации такой плазмидой клетки высевают на твердую питательную среду (питательный агар), содержащую ампициллин. При этом выживают и образуют колонии только те клетки, в которые попала плаزمиды и в результате синтезируется активная β -лактамаза. Другие плазмидные векторы несут гены устойчивости к канамицину, тетрациклину и др. (прил.1).

Таким образом, получившие рекомбинантную плазмиду, т.е. трансформированные, т.е. измененные по сравнению с исходными клетки приобретают способность размножаться на питательных средах, содержащих антибиотики. В то время как на остальные клетки антибиотики оказывают бактериостатическое или бактерицидное действие.

Разработанные позднее методы электропорации клеток обладают более высокой эффективностью по сравнению с Ca^{2+} трансформацией. Эти методы требуют специального оборудования для «электропробоя» мембран клеток – электропораторов (работы 8.3–8.4).

Работа 8.1. Приготовление компетентных клеток *E.coli*

Приведенная процедура предполагает получение компетентных клеток *E.coli* путем их инкубации при низкой температуре в растворе, содержащем катионы Ca^{2+} (Inoue, Nojima, Okayama, 1996). Помимо Ca^{2+} в раствор

добавляют различные вещества, чтобы повысить уровень трансформации. Приобретшие компетентность «кальциевые клетки» следует использовать сразу (работа 8.2). Если по каким-то причинам это сделать невозможно, то 1–2 дня максимум они могут храниться на льду в холодильнике, пока полностью не утратят компетентность. Поэтому их лучше заморозить в жидком азоте и хранить при -70°C . Все работы с компетентными клетками проводят на холоде, используя поддоны с колотым льдом или снегом.

Материалы и оборудование

Штамм кишечной палочки *E. coli XL-1*, диметилсульфоксид ДМСО.

Растворы

- *Среда SOB*. 2% триптон; 0,5% дрожжевой экстракт; 10мМ NaCl; 2,5мМ KCl; 10мМ MgCl₂; 10мМ MgSO₄.
- *Буфер ТВ*. 10мМ HEPES (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая к-та, можно исп. PIPES или BES); 15мМ CaCl₂; 55мМ MnCl₂; 250мМ KCl.

Методика

1. Рассеять бактерии штрихом на чашку с селективной агаризованной средой SOB, выращивать при 37°C в течение ночи.
2. Несколько колоний (10–12), диаметром приблизительно 2–3 мм, поместить в 40 мл среды SOB в колбе на 0,5–1 л. Растить при интенсивном встряхивании на качалке при скорости вращения 200–300 об/мин до оптической плотности $\text{OD}_{600} = 0,6$ при температуре 37°C ^a. Обычно на это требуется 2–2,5 ч. Все дальнейшие манипуляции проводить на льду.
3. В 50 мл центрифужную пробирку поместить 30 мл культуры, оставить при 0°C на 10–15 мин.
4. Центрифугировать при 3000 об/мин при 4°C 10 мин, слить супернатант.
5. Центрифугировать 3000 об/мин при 4°C в течение 20 с, тщательно удалить остатки жидкости.
6. Суспензировать в 10 мл буфера ТВ, оставить при 0°C на 10–15 мин.
7. Повторить п. 4 и п. 5.
8. Ресуспензировать осадок клеток в 2 мл буфера ТВ.
9. Добавить ДМСО до 3,5% (70 мкл), оставить при 0°C на 10–15 мин.
10. Повторить п. 4 и п. 5.
11. Разлить по 100 мкл в охлажденные 1,7 мл полипропиленовые пробирки^б.

Примечания

^a При выращивании бактерий при 37°C получается компетентность среднего уровня. При выращивании при 18°C компетентность клеток получается выше, но время роста суспензии клеток до нужной плотности удлиняется до нескольких суток.

Работа 8.2. Трансформация *E.coli*

Для трансформации используют компетентные клетки и очищенную плазмидную ДНК. ДНК добавляют к клеткам и выдерживают на льду некоторое время, необходимое для сорбции ДНК на поверхности клеток. Затем проводят кратковременный тепловой шок при 42°C, при котором ДНК проникает внутрь клетки, добавляют к клеткам питательный бульон и засевают на агаризованной питательной среде, содержащей антибиотик. В результате экспрессии плазмидных генов антибиотико-устойчивости трансформированные клетки приобретают способность расти на средах с антибиотиками. На плотной питательной среде вырастают колонии только из тех клеток, которые получили плазмиду (трансформантов). Не все трансформанты могут быть рекомбинантами, т.е. могут быть трансформированы исходным «пустым» вектором, если для предотвращения этого явления не применялись специальные процедуры. Например, экспериментаторы используют для рестриционного гидролиза ДНК два разных фермента или обрабатывают ДНК вектора щелочной фосфатазой СР, чтобы вектор не мог лигироваться «сам на себя». Можно отличить колонии рекомбинантных клонов и после высева клеток на питательный агар процедурой так называемой «сине-белой селекции» (см. прил. 5,6).

Приведенная далее процедура трансформации является стандартной. До появления электропораторов широко применялась в практике молекулярно-биологических исследований и используется до настоящего времени.

Материалы и оборудование

Компетентные Ca^{2+} клетки кишечной палочки *E.coli* XL-1, раствор плазмидной ДНК pBR322 (0,5 мкг/мл).

Растворы

- Среда SOC. На 100 мл: в среду SOB (работа 6.1) добавить 20% глюкозы – 5 мл, 1М MgCl_2 – 1 мл, 1М MgSO_4 – 1 мл.
- 0,5М *b*-меркаптоэтанол.

Методика

1. Приготовить раствор плазмидной ДНК pBR322 с концентрацией 5 нг/мл. Для этого из концентрированного 100× стокового раствора (0,5 мкг/мл) взять 1 мкл и добавить к 100 мкл деионизованной воды.
2. Оттаять во льду 0,5М *b*-меркаптоэтанол и аликвоту компетентных клеток (так называемых «кальциевых клеток»).
3. К аликвоте компетентных клеток добавить 4 мкл 0,5М *b*-меркаптоэтанола и 2 мкл (10 пг) плазмидной ДНК.
4. Оставить при 0°C на 20–60 мин без встряхивания для осаждения ДНК на поверхности клеток.

5. Провести тепловой шок при 42°C в течение 30 с ^а. После этого сразу поместить пробирку в лед на 2 мин.
6. Добавить 400 мкл среды SOC и встряхивать на шейкере при 37°C полчаса.
7. Высеять 50 мкл из суспензии клеток на чашку с агаром 2YT, содержащим 100 мкг/мл ампициллина ^б.
8. Оценить на следующий день эффективность трансформации. Если на чашке Петри выросло N колоний, то эффективность трансформации равна $N \times 10^6$ колоний на 1 мкг ДНК ^в.

Примечания

^а Многие методики рекомендуют более продолжительный тепловой шок (до 3 мин).

^б Посев на агаризованные среды производится следующим образом. Поместить аликвоту суспензии клеток на поверхность подсушенного питательного агара. Простерилизовать в пламени спиртовки стеклянный шпатель. Охладить его. Растереть клетки шпателем по поверхности агара до полного исчезновения остатков жидкости.

^в Если требуется получить как можно больше колоний при разумной плотности, например при создании библиотеки, то нужно высеять на питательный агар 10–50 мкл для определения титра, а оставшиеся клетки хранить в течение ночи при 0°C. Титр при этом не изменяется. На следующий день рассчитать количество клеток на высеивание и высеять на селективную среду.

Работа 8.3. Подготовка электрокомпетентных клеток *E.coli*

Электропорация – эффективный физический метод введения ДНК в бактериальные клетки, а также в культивируемые клетки растений (протопласты), животных и человека. Основатель метода – Эберхард Нойман. Показано, что в оптимальных условиях количество трансформантов может достигать 80% среди выживших клеток бактерий. Для обычной Ca^{2+} трансформации эта цифра не сопоставима, недостижима.

Метод основан на том, что под действием краткосрочного (порядка 5 мс) импульса с напряжением около 2,5 кВ в мембране клетки *E.coli* образуются временные поры, через которые ДНК проникает внутрь клетки.

Напряженность электрического поля, продолжительность его действия, концентрация трансформирующей ДНК, плотность суспензии реципиентных клеток для каждой культуры клеток подбирают экспериментально, с тем, чтобы достичь при «электропробое» мембран высокого процента поглощения ДНК выжившими клетками.

Процедура очень эффективная, однако, для нее требуется очень чистый препарат ДНК, не содержащий солей. С неочищенными препаратами либо проскакивает искра, либо компетентность резко падает, становясь низкой.

Для подготовки электрокомпетентных клеток их несколько раз отмывают в растворе криопротектора (глицерин) на холоде и быстро замораживают в жидком азоте.

Материалы и оборудование

Штамм кишечной палочки *E. coli XL-1*.

Растворы

- Среда YENB. 0,75% дрожжевой экстракт (Бакто), 0,8% Nutrient Broth, pH 7,5. Эту среду можно заменить средой 2YT без значительного ухудшения результатов.
- 10% глицерин.

Методика

1. Снять петлей с чашки с соответствующим селективным антибиотиком несколько (5–20) колоний бактерий, поместить в 500 мл предварительно прогретой до 37°C жидкой среды YENB, находящейся в 2 л колбе.
2. Растить культуру в течение приблизительно 8 ч на качалке при 200–300 об/мин при 37°C до достижения оптической плотности OD600=0,7 (годится диапазон 0,5–1,0). Культуру охладить в течение 5 мин при 0°C. Все дальнейшие манипуляции проводить на холоду. Необходимо заранее охладить деионизованную воду и глицерин.
3. Центрифугировать при 4500 об/мин 10 мин, затем слить жидкость, дополнительно центрифугировать 5 с при 3000 об/мин и отобрать остатки жидкости.
4. Два раза промыть клетки 100 мл 10% глицерина. Для этого центрифугировать 7 мин при 4500 об/мин, слить жидкость, дополнительно центрифугировать 5 с при 3000 об/мин и отобрать остатки жидкости.
5. Промыть 20 мл 10% глицерина.
6. Добавить объем 10% глицерина, равный объему клеток (должно получиться припл. 0,7–2,0 мл суспензии), ресуспензировать.
7. Разлить по аликвотам полученные компетентные клетки. Одна аликвота на электропорацию составляет 50 мкл, поэтому объем должен быть кратен 50. Использовать сразу или заморозить в жидком азоте. Замороженные клетки можно продолжительное время хранить при –70°C.

Работа 8.4. Электропорация

В специальную кювету с зазором между электродами 1–2 мм добавляют электрокомпетентные клетки и очищенную плазмидную ДНК, пропускают высоковольтный импульс и немедленно добавляют к клеткам порцию жидкой

питательной среды. Затем клетки засевают на питательный агар с антибиотиком.

Компетентные Ca^{2+} -клетки можно трансформировать неочищенной лигазной смесью и вообще любой ДНК, находящейся в умеренно-солевом буфере. В случае электрокомпетентных клеток ДНК должна быть очищена, поскольку высокая концентрация соли способна вызвать искровой разряд в ячейке электропоратора.

Поскольку электропоратор является глубокоспециализированным прибором, к нему прилагаются детальные инструкции по осуществлению трансформации клеток разного типа.

Материалы и оборудование

Электропоратор, кюветы для электропоратора (с зазором 2 мм), раствор плазмидной ДНК pBluescript II SK+ (0,5 мкг/мл) обессоленный или переосажденная спиртом лигазная смесь.

Методика

1. Кювету заранее охладить во льду или в холодильнике в течение 5–10 мин.
2. Оттаять необходимое количество клеток во льду. Встряхнуть.
3. Перенести аликвоту ДНК^a в количестве 10 пг (2 мкл раствора 0,5 мкг/мл, разведенного в 100 раз) в пробирку и добавить 40 мкл компетентных клеток.
4. Смешать наконечником, не пипетировать.
5. Перенести кювету в ячейку электропоратора.
6. Установить параметры электропорации: 2,5 кВ при зазоре кюветы 2 мм.
7. Провести импульс, нажав соответствующую кнопку. Обычно получается время импульса порядка 5 мс, значение обязательно проверить.
8. Добавить в кювету 1 мл среды SOC (работа 8.2) и пипетировать 2–3 раза.
9. Перенести порированные клетки в пробирку, инкубировать при качании в течение 0,5–1 ч при 37°C^b.
10. Высеять аликвоту в 50–100 мкл на 2YT-агар с нужным антибиотиком.

Примечания

^a От солей в препарате ДНК можно избавиться микродиализом. Можно переосадить ДНК и хорошо промыть осадок. Самый простой способ избавиться от фермента лигазы при трансформации лигазной смесью – инактивировать ее нагревом.

^b Это время необходимо для возобновления биохимических процессов и начала экспрессии генов устойчивости к антибиотикам.

Тема 9. ВЫДЕЛЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА

Гены клонируют либо с собственными регуляторными элементами (промоторами, терминаторами и др.) в векторах для клонирования, либо структурную часть гена подстраивают генно-инженерными методами под какой-либо регулируемый промотор в векторах для экспрессии. В этом случае экспрессию гена сравнительно легко регулировать. В норме он, как правило, репрессирован. Нарботка рекомбинантного белка начинается лишь после добавления определенного индуктора в питательную среду для культивирования клеток-продуцентов. Очень часто в векторах для экспрессии используют промотор *LacZ* гена β -галактозидазы *E.coli* (см. прил. 6). Индуктором экспрессии белка с этого промотора является негидролизующий аналог лактозы – изопропил- β -D-тиогалактозид (ИПТГ). Добавление глюкозы в среду репрессирует синтез белка.

Некоторые векторные системы, использующие для экспрессии клонированного гена не аппарат клетки-хозяина, а весьма процессивные РНК-полимеразы бактериофагов, также индуцируются с помощью ИПТГ. Так, в штамме *E.coli BL(DE3)* ИПТГ-индуцируемый ген РНК-полимеразы (рекомбинантный, с промотором *lacZ*) находится в хромосоме штамма-хозяина, а промотор Т7-полимеразы и целевой ген находится на какой-либо плазмиде серии рЕТ (см. прил. 1). В таких системах отсутствует «фоновая» экспрессия. Транскрипция клонированного гена возможна лишь после индукции.

Далее приведены протоколы методов индуцирования синтеза рекомбинантного белка в бактериях, выделения белка из периплазмы и его очистки диализом.

Работа 9.1. Индуцированная экспрессия клонированных генов

Ниже приведена методика индукции синтеза рекомбинантных миниантител клетками клона-суперпродуцента. Миниантитела scFv – это рекомбинантные белки, состоящие из ковалентно сшитых переменных доменов легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов (scFv – single chain Fragments variable). Для примера взят клон-продуцент миниантител scFv. Это штамм *E.coli JS5*, содержащий фагмиду рHEN1 с клонированным геном миниантитела, специфичного к белку вирулентности VirE2 из почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens* (Великов с соавт., Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2006. №1).

С помощью приведенной методики можно работать с любой другой рекомбинантной конструкцией, имеющей промотор гена *LacZ*.

Оборудование и материалы

Штамм *E.coli* JS5, содержащий фагмиду рНЕН1 с геном рекомбинантного миниантитела scFv.

Растворы

- *Среда 2YT* (тема 1).
- *Ампициллин*. Раствор 100 мг/мл в воде.
- *40% глюкоза*.
- *1М ИПТГ*. Раствор 154 мг/мл в воде.
- *50 мМ NaCl*.

Методика

1. Посеять клетки клона кишечной палочки, содержащие плазмиду с геном миниантитела scFv в 10 мл среды 2YT, содержащей 100 мкг/мл антибиотика ампициллина и 1 % глюкозы. Для этого в пробирку с культурой добавить 10 мкл стокового раствора ампициллина и 250 мкл 40% глюкозы. Нарастивать в течение ночи с аэрацией при 37°C.
2. Ночную культуру развести в 100 раз той же средой (вылить 10 мл в колбу с 1 л среды) и растить при 25°C до оптической плотности 0,5 при 600 нм.
3. Клетки осадить в центрифуге при 4000 об/мин в течение 10 мин.
4. Ресуспензировать клетки в 50 мл 50 мМ раствора NaCl для отмывки.
5. Снова осадить клетки при 4000 об/мин в течение 10 мин.
6. Добавить к клеткам индуктор. Для этого ресуспензировать осадок клеток сначала в малом объеме, а затем в 1 л среды 2YT, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 1мМ ИПТГ. Для получения необходимых конечных концентраций добавить в колбу 1000 мкл стокового раствора антибиотика и 1000 мкл стокового раствора ИПТГ.
7. Клетки инкубировать в течение 3 ч при 25°C с аэрацией при встряхивании на шейкере. При пониженной по сравнению с 37°C температуре лучше идет накопление рекомбинантного белка и не бывает самолизиса культуры при суперпродукции. Остановить рост бактериальной культуры, поставив колбу в холодильник на +4°C, после чего выделить рекомбинантные миниантитела.

Работа 9.2. Выделение белка из периплазмы клеток *E. coli*

Для получения целевого белка клетки клонов-продуцентов размножают, помещая их в свежую питательную среду. Среда должна содержать селективный антибиотик, иначе бактерии могут потерять рекомбинантную плазмиду. Нарботка рекомбинантного белка начинается лишь после добавления индуктора. По мере роста культуры возрастает суммарное

количество белка за счет увеличения числа клеток в популяции. Оно достигает насыщения в позднелогарифмической фазе роста культуры.

Для удобства последующего отделения целевого белка от других клеточных белков его можно направить в периплазму клетки после завершения синтеза в цитоплазме, используя при клонировании соответствующий вектор. Периплазматическое пространство – это пространство между наружной цитоплазматической мембраной и оболочкой клетки (пептидогликановым слоем). Для этого рекомбинантная конструкция должна за промотором содержать нуклеотидные последовательности, кодирующие соответствующий лидерный пептид, например, лидер гена пектатлиазы *pelB* фитопатогенной бактерии *Erwinia carotovora*. При трансляции получается ковалентносшитый fusion-белок (фьюжен: лидерный пептид – целевой белок), который накапливается в периплазме клетки. Лидерный пептид на свойства целевого белка существенного влияния не оказывает. Из периплазмы клеток накопленный белок выделяется сравнительно просто. Он выходит в раствор после помещения клеток в высокосолевого буфер. Приведен обратный метод выделения периплазматических белков.

Оборудование и материалы

Штамм *E.coli* JS5, содержащий фагмиду рHEN1 с клонированным геном миниантитела scFv, высокоскоростная центрифуга.

Растворы

- Боратный раствор. 200мМ борат натрия; 60мМ NaCl; 1мМ ЭДТА.
- Ингибитор протеиназ PMSF. Раствор 1 мг/мл.
- Ингибитор протеиназ лейпептин. Раствор 1 мг/мл.

Методика

1. Культуру клеток после завершения времени инкубации с индуктором охладить во льду в течение 20 мин. За это время прекращаются основные биохимические процессы, не будет продуктов незавершенного синтеза.
2. Охлажденную во льду культуру клеток осадить центрифугированием в течение 10 мин при 10 000 об/мин при 4°C.
3. Супернатант слить, а к осадку клеток добавить 10 мл охлажденного 200мМ бората натрия с 160мМ NaCl и 1мМ ЭДТА. Тщательно пипетировать. Клетки «сморщиваются» в высокосолевого буфере, scFv при этом «выдавливаются» из периплазмы в раствор.
4. Избавиться от клеток вместе со всеми цитоплазматическими белками центрифугированием в течение 10 мин при 4000 об/мин. В супернатанте останутся только белки периплазмы с преобладанием целевого белка.
5. Супернатант очистить от клеточного дебриса центрифугированием при 20000 об/мин в течение 30 мин. Добавить в препарат белка ингибитор

сериновых протеаз PMSF или лейпептин (1 мкл стокового раствора на 1 мл препарата белка).

Работа 9.3. Диализ препарата

Выделенный боратным методом периплазматический белок содержит значительные количества низкомолекулярных примесей, прежде всего солей. Избавиться от них можно диализом препарата. Раствор белка помещают в диализный мешок, стенки которого представляют собой полупроницаемую мембрану, не пропускающую молекулы размером более 15–20 кДа, и погружают в буфер. Объем буфера должен многократно превышать объем мешка. Низкомолекулярные вещества в результате осмоса могут проходить через мембрану в буфер. Обессоленный раствор белка остается в мешке.

Материалы и оборудование

Препарат белка, диализный мешок, стакан на 2000 мл, стеклянная палочка или пипетка.

Растворы

- *Буфер PBS.* На приготовление 1 л: NaCl – 5,84 г; Na₂HPO₄ – 4,72 г; NaH₂PO₄ × H₂O – 2,64 г; pH 7,2.

Методика

1. Перенести с помощью микропипетки раствор белка в диализный мешок.
2. Завязать мешок и с помощью отрезка резиновой трубки укрепить на середине стеклянной палочки или пипетки.
3. Опустить мешок в доверху наполненный 1000 мл стакан с буфером PBS, положив стеклянную палочку на края стакана. Поставить на магнитную мешалку, размещенную в холодильнике.
4. На следующее утро сменить буфер и диализовать еще в течение 4–6 ч.
5. Определить концентрацию белка. Полученные миниантитела scFv можно использовать при иммунодоте и блоттинге.

Тема 10. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКА

Основными методами для определения концентрации белка являются следующие методы: 1) биуретовая реакция с использованием щелочного раствора соли меди, 2) метод Лоури с применением реактива Лоури-Фолина, 3) измерение оптической плотности в УФ-области спектра при 280 нм (полоса поглощения ароматических групп) или 205–220 нм (полоса поглощения пептидных групп), 4) связывание красителя кумасси бриллиантового синего Coomassie R-250 – метод Бредфорд.

Метод Бредфорд (Bradford, 1976) и метод Лоури (Lowry, 1951) – два самых известных аналитических метода. Первый метод проще и быстрее. По надёжности методы одинаковые, использование обоих методов может понадобиться для контроля.

Работа 10.1. Метод Бредфорд

Краситель Coomassie R-250 при растворении в фосфорной кислоте имеет красно-коричневую окраску, но при связывании с белком она изменяется. Краситель реагирует с аргинином и гидрофобными аминокислотными остатками, связанная форма имеет голубую окраску ($\lambda_{\max} = 595$ нм). Таким образом, увеличение адсорбции раствора при длине волны, равной 595 нм, пропорционально количеству белка в растворе.

Метод заключается в добавлении красителя к белку и измерению оптической плотности. Полученные значения сравнивают с калибровочной кривой, построенной по белку с известной концентрацией, чаще всего по бычьему сывороточному альбумину (БСА).

По сравнению с методом Лоури метод Бредфорд отличается большей чувствительностью при такой же точности. Даёт хорошее значение концентрации белка в пределах от 2 мкг/мл до 120 мкг/мл.

Материалы и оборудование

Спектрофотометр, кюветы, раствор БСА (10 мг/мл), раствор исследуемого белка, краситель кумасси R-250.

Растворы

- *Реагент Бредфорд.* На 1 л: 100 мг кумасси R-250 растворить в 50 мл спирта и добавить 100 мл ортофосфорной кислоты, довести до 1 л водой и профильтровать через бумажный фильтр. Реагент очень чувствителен к белку (1–2 мкг/мл). Все должно быть абсолютно чистым, иначе раствор посинеет и его можно будет вылить. Чистый раствор имеет коричневый цвет и синее при наличии белка.

Методика

1. Довести объём образца до 0,5 мл водой.
2. Добавить 0,5 мл реагента Бредфорд.
3. Перемешать и ждать развития окраски (от 5 с, но не более 30 мин).
4. Измерить OD₅₉₅ в 1 мл кювете.
5. Рассчитать концентрацию белка по калибровочной кривой, построенной по БСА.

Работа 10.2. Метод Лоури

Метод Лоури столь же широко распространен и надежен как метод Бредфорд, но более продолжителен по времени.

В щелочной среде ионы Cu^{2+} образуют комплекс с пептидными связями, переходя в Cu^+ . Одновалентные ионы меди реагируют с реактивом Фолина, образуя нестабильный продукт, переходящий в молибденовую синь с максимумом адсорбции при 750 нм. Увеличение адсорбции при 750 нм пропорционально концентрации белка. Метод очень чувствителен к наличию в растворе посторонних восстановителей, что затрудняет его использование при определении белка в неочищенных препаратах. Чувствительность к белку – 10–100 мкг/мл.

Материалы и оборудование

Спектрофотометр, кюветы, тщательно вымытые и просушенные, раствор БСА (10 мг/мл), раствор исследуемого белка.

Растворы

- Реагенты А и В для метода Лоури: раствор А – 2% Na_2CO_3 ; раствор В – 5% $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ в 1% цитрате Na.
- 50 % трихлоруксусная кислота (ТХУ). Хранить в темноте под тягой.
- Реактив Фолина. Приготовление реактива на 1 л: 100 г $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ и 25 г $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ растворить в 700 мл воды в круглодонной колбе на 1 л, снабженной пришлифованным обратным холодильником Либиха. Прибавить 50 мл 50%-ной H_3PO_4 и 100 мл HCl (конц.). Поместить в колбу несколько капилляров (центров кипения) и кипятить в течение 10 ч. Затем прибавить 150 г Li_2SO_4 , 50 мл воды и неск. капель брома. Отсоединив обратный холодильник кипятить содержимое колбы под тягой 15 мин для удаления избытков брома. Охладить, довести водой до 1 л., перелить в склянку из темного стекла.

Методика

1. Довести объём образца до 0,8 мл водой.

2. Добавить 0,2 мл 50% ТХУ (конечная концентрация 10%), перемешать.
3. Подождать 10 мин, центрифугировать 10 мин при 14000 об/мин.
4. Супернатант слить и добавить к осадку 150 мкл 1М NaOH, 50 мкл 10% SDS, 0,75 мл раствора D (смесь А и В, 50:1), 50 мкл реактива Фолина. Перемешать и ждать развития окраски 30 мин.
5. Измерить OD₇₅₀ в 1 мл кювете.
6. Рассчитать концентрацию белка по калибровочной кривой.

Работа 10.3. Концентрирование белков путем осаждения ТХУ

Метод осаждения белков трихлоруксусной кислотой полезен, когда концентрация белка в растворе слишком мала для анализа или объем раствора слишком велик, чтобы нанести нужное количество белка в лунку геля при гель-электрофорезе. Осадок растворяют в меньшем объеме буфера, концентрируя раствор белка.

Материалы и оборудование

ТХУ, дезоксихолат натрия, раствор белка БСА, раствор исследуемого белка.

Растворы

- Трихлоруксусная кислота (ТХУ).
- 0,15% дезоксихолат натрия. Хранить при комнатной температуре.

Методика

1. Если минимальная концентрация белка порядка 5 мкг/мл, то к раствору белка добавить 1/10 объема 100% ТХУ.
2. Если минимальная концентрация белка меньше 1 мкг/мл, то к раствору белка добавить 1/10 объема 0,15% дезоксихолата натрия, выдержать 10 мин при комнатной температуре и добавить 1/20 первоначального объема 100% ТХУ.
3. Инкубировать 30 мин на льду или 15 мин при -20°C .
4. Центрифугировать 5 мин при максимальной скорости микроцентрифуги.
5. Отобрать супернатант пипеткой.
6. Далее можно: (а) растворить в 50–100 мкл 0,1N NaOH; (б) промыть 1 мл смеси этанол–эфир 1:1. Для полного удаления остатков ТХУ промывать нужно тщательно, несколько раз подряд.
7. Центрифугировать на максимальной скорости микроцентрифуги. Супернатант отбросить. Осадок белка подсушить на воздухе, после чего растворить в буфере PBS.

Работа 10.4. Определение концентрации белка по собственной флуоресценции

Метод полезен при очень низких концентрациях белка. Не требует предварительного окрашивания, так как белок обладает собственной флуоресценцией, обусловленной флуоресценцией триптофановых и тирозиновых остатков.

Материалы и оборудование

Спектрофлуориметр, кварцевая кювета объемом 3 мл, микропипетка, пробирки, буферный раствор, раствор белка в буферном растворе, навеска белка для калибровки 9 мг.

Методика

1. Получить спектр флуоресценции раствора исследуемого белка с длиной волны возбуждения 280 нм, сканирование эмиссии в интервале 310–360 нм. Режим сканирования (флуоресценция, по регистрации, усреднение 25, коррекция полная, шаг 1 нм, оптимальная чувствительность ФЭУ) определяется по значению в максимуме флуоресценции при выключенной коррекции (10–90 единиц). Если в области 330–340 нм (при полной коррекции) наблюдается пик интенсивности флуоресценции, то определение концентрации возможно, в противном случае концентрация белка слишком низкая и его нужно концентрировать.
2. Записать значение интенсивности флуоресценции I и длину волны эмиссии λ в максимуме кривой флуоресценции. Снять спектр для буфера в отсутствие белка с теми же параметрами. Записать значение интенсивности флуоресценции I_0 на найденной длине волны λ . Вычислить значение $I-I_0$.
3. Используя буферный раствор, приготовить методом последовательного разведения растворы белка для калибровки с концентрациями 3×10^0 мг/мл... 3×10^{-6} мг/мл с шагом 1 порядок, каждый объемом по 2,7 мл. Для каждого раствора определить $I-I_0$, затем, используя MS Excel построить калибровочный график зависимости концентрации белка от $I-I_0$.
4. По калибровочному графику определить концентрацию исследуемого белка.

Тема 11. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ

Электрофорез в геле – один из стандартных молекулярно-биологических методов. Молекулы белка при любом значении рН, отличном от их изоэлектрической точки, обладают зарядом, что обеспечивает их подвижность в электрическом поле. Разделяют белки в полиакриламидных гелях (ПААГ), имеющих по сравнению с агарозными гелями меньший размер пор. Гель образуется в результате полимеризации мономерных молекул акриламида в присутствии N,N'-метилена-бис-акриламида, формирующего поперечные сшивки. Варьированием концентрации мономеров можно добиваться получения пор различного размера.

Гель состоит из зон концентрирующего и разрешающего геля. Выбор % акриламида в разрешающем геле зависит от размеров белка – для крупных белков используют гели с низкой концентрацией акриламида, менее крупные белки разделяют в мелкопористых гелях. Заливка геля и электрофоретическое разделение белков в пластине геля происходит в вертикальном положении.

Разработано большое количество модификаций метода электрофореза белков в ПААГ для решения разных задач и для различных белков и пептидов. Наиболее распространённой разновидностью является электрофорез белков в денатурирующих условиях в присутствии додецилсульфата натрия по Лэммли (Laemmli, 1970). Далее приведена одна из модификаций этого метода.

Работа 11.1. Приготовление растворов и заливка ПААГ

Подготовка к электрофорезу белков по сравнению с электрофорезом ДНК занимает больше времени. Полиакриламидный гель обычно готовят заранее, используя для этого стоковые растворы.

Концентрирующий гель обычно имеет концентрацию от 2 до 8% полиакриламида и значение рН 6,8. Разделяющий гель имеет концентрацию полиакриламида от 5 до 20% и рН в районе 8,5–8,9. Выбор плотности геля зависит от молекулярных масс исследуемых белков. В качестве электродного буфера чаще всего используют Tris–глициновый или Tris–боратный буфер с рН 8–9.

Материалы и оборудование

Аппарат для вертикального электрофореза, источник постоянного тока, стеклянные пластины с вырезом и без выреза, гребенки, спейсеры, шприц для нанесения образцов, реактивы для приготовления ПААГ.

Растворы

1. Электродный буфер (200 мл)

Tris (аминометан)	3,03 г
Глицин	14,44 г
SDS	1,0 г
H ₂ O (дистиллированная, деионизированная)	до 200 мл,
pH 8,4±0.1,	

SDS добавлять последним, после pH-метра, перемешивая о стенку.

2. Раствор AA (акриламида)/ бисAA (бисакриламида)

AA	30,0 г
бисAA	0,8 г
H ₂ O (дистиллированная, деионизированная)	до 100 мл

3. Буфер 1 (для концентрирующего геля)

Tris (солянокислый)	6,06 г
SDS	0,4 г
H ₂ O (дистиллированная, деионизированная)	до 100 мл
pH 6,8	

4. Буфер 2 (нижний буфер для разделяющего геля)

Tris (аминометан)	18,17 г
SDS	0,4 г
H ₂ O (дистиллированная, деионизированная)	до 100 мл
pH 8,8	

5. БФС (бромфеноловый синий) 2 мг

H ₂ O (дистиллированная, деионизированная)	до 4 мл
---	---------

6. Краситель (0,125% кумасси бриллиантовый синий R-250)

кумасси R-250	1,25 мг
Этанол	5 мл
Уксусная к-та (10%)	1 мл
H ₂ O (дистиллированная, деионизированная)	до 10 мл

7. Отмывающий раствор I (50% этанол, 10% уксусная к-та)

Уксусная к-та (10%)	10 мл
Этанол (50%)	50 мл
H ₂ O (дистиллированная, деионизированная)	до 100 мл

Перед использованием развести в 5 раз

8. Отмывающий раствор II (5% этанол, 10% уксусная к-та)

Уксусная к-та (10%) 35 мл
 Этанол (50%) 25 мл
 H₂O (дистиллированная, деионизированная) до 100 мл
перед использованием развести в 5 раз

2× буфер для образцов

Глицерин 15% 7,5 мл
 β-меркаптоэтанол 2,5 мл
 SDS 1,15 г
 Tris (гидрохлорид) 0,38 г
 H₂O (дистиллированная, деионизированная) до 25 мл
 pH 6,8

10% ТХУ.

5% ПСА (персульфат аммония).

ТЕМЕД (N,N,N,N-тетраметилэтилендиамин).

Методика

Подготовка стекол для заливки полиакриламидного геля

1. Приготовить две стеклянные пластины – с вырезом и без выреза.
2. Взять стекло с вырезом и поместить по его краям два спейсера. От толщины спейсеров между двумя стеклами будет зависеть толщина геля.
3. Сверху положить на спейсеры стекло без выреза. Осторожно поставить собранную конструкцию в камеру вертикально так, чтобы можно было залить гель в полость между стеклами. Стекло без выреза должно быть обращено к исследователю. Закрепить конструкцию зажимами.

Приготовление геля

1. Для приготовления разделяющего геля смешать компоненты (за исключением ТЕМЕД и ПСА) в соответствии с данными, приведенными в табл. 3. Полученную смесь тщательно перемешать.

Таблица 3. Подготовка разделяющего геля

Компонент	3%	6%	10%	25%
Р-р АА/бисАА	0,5 мл	3 мл	4,95 мл	11,25 мл
Буфер 2	1,25 мл	3,75 мл	3,75 мл	3,75 мл
H ₂ O	3,25 мл	8,25 мл	6,3 мл	0 мл
ТЕМЕД	10 мкл	15 мкл	15 мкл	15 мкл
ПСА 5%	30 мкл	45 мкл	45 мкл	45 мкл
V общий	5 мл	15 мл	15 мл	15 мл

2. Добавить последовательно ТЕМЕД и ПСА и тщательно перемешать полученный раствор, при этом важно, чтобы в процессе перемешивания не образовывались пузырьки с газом.

3. Полученный раствор разделяющего геля залить между стеклянными пластинами так, чтобы уровень не превышал 3 см от верхнего края пластин.
4. Осторожно наслоить на раствор разделяющего геля тонкий слой метанола или деионизированной воды и оставить гель застывать (до 20 мин).
5. Приготовить раствор концентрирующего геля как указано в табл. 4.
6. Удалить слой метанола или воды с поверхности застывшего разделяющего геля фильтровальной бумагой.
7. Наслоить на поверхность застывшего разделяющего геля раствор концентрирующего геля, и немедленно после этого вставить гребенку между стеклянными пластинами.

Таблица 4. Подготовка концентрирующего геля

Компонент	6%	10%	20%	25%
Р-р АА/бисАА	4 мл	3,3 мл	13,34 мл	7,5 мл
Буфер 2	5 мл	2,5 мл	5 мл	2,5 мл
H ₂ O	11 мл	4,2	1,66 мл	0
ТЕМЕД	40 мкл	10 мкл	40 мкл	10 мкл
ПСА 5%	120 мкл	30 мкл	120 мкл	30 мкл
V общий	20 мл	10 мл	20 мл	10 мл

8. Оставить гель застывать в течение 20 мин.

Подготовка камеры к электрофорезу

1. Поставить электрофорезную камеру на ровную горизонтальную поверхность. Добавить электродный буфер в верхнюю емкость камеры так, чтобы уровень буфера был на 0,5 см выше уровня геля.
2. Добавить электродный буфер в нижний поддон камеры.
3. Осторожно удалить гребенку и промыть лунки электрофорезным буфером с помощью шприца.

Работа 11.2. Проведение электрофореза белков

Молекула белка в растворе имеет некий средний целочисленный заряд (положительный или отрицательный) при любом значении рН, отличающемся от его изоэлектрической точки. Этим обеспечивается передвижение молекул белка в полиакриламидном геле под действием внешнего электрического поля. Кроме заряда на подвижность влияет размер белковых молекул.

Электрофорез проводят обычно при нейтральных или слабощелочных значениях рН, когда большинство белков мигрирует к аноду, так же как мигрирует при электрофорезе ДНК. За прохождением электрофореза следят по движению красителя бромфенолового синего (БФС). БФС идет с фронтом фореза, впереди него белков нет.

Материалы и оборудование

Электрофорезная камера с гелем, источник тока, образцы белков для анализа, маркеры молекулярного веса.

Растворы

- 2× буфер для нанесения образцов (работа 11.1).
- Раствор БФС (работа 11.1).

Методика

1. Подготовить образцы так, чтобы общая концентрация белка была не больше 10 мг/мл. 10 мкл образца разбавить 2× буфером для нанесения образцов в два раза, добавить 4 мкл раствора БФС на 20 мкл каждого образца.
2. С помощью гамильтоновского шприца или микропипетки-дозатора нанести по 10 мкл полученных образцов в лунки геля.
3. Подключить электрофорезную камеру к источнику тока, соблюдая полярность.
4. Провести электрофоретическое разделение белков при постоянном токе 20 мА, 60 В для одного геля и 60 мА, 150 В для другого геля. Повышать напряжение надо при прохождении БФС до разделяющего, нижнего геля. В этих условиях электрофорез длится 40–50 мин.
5. По достижению красителем нижнего края геля отключить ток.
6. Вынуть пластину с гелем из электрофорезной камеры.
7. Осторожно вынуть спейсеры, находящиеся между стеклами.
8. Отделить гель от стекол, окрасить.

Работа 11.3. Окрашивание белков Coomassie R–250

Обработка гелей после электрофореза включает окрашивание и отмывку. Гель заливают трихлоруксусной кислотой, тщательно отмывают водой и помещают в раствор красителя кумасси бриллиантового голубого (Coomassie R–250). Молекулы красителя связываются с аргинином и гидрофобными аминокислотными остатками. Связанная форма имеет голубую окраску с максимумом поглощения при 595 нм, поэтому на геле видны полосы белка с разной интенсивностью окраски, коррелирующей с количеством белка.

После окрашивания белковых полос гель необходимо отмыть от несвязавшегося красителя. Отмывают гели в растворах этанола и уксусной кислоты.

Материалы и оборудование

Полиакриламидный гель с результатами электрофоретического разделения белков.

Растворы

- 10% ТХУ (работа 11.1).
- Раствор кумасси R-250 (работа 11.1).
- Отмывающий раствор I (работа 11.1).
- Отмывающий раствор II (работа 11.1).

Методика

1. Сразу после электрофореза поместить гель в емкость для отмывки, залить 10% ТХУ, оставить на 30–60 мин.
2. Добавить воду, хорошо промыть, слить воду.
3. Поместить гель в раствор кумасси для окрашивания на 1–1,5 ч.
4. Слить раствор кумасси и залить гель отмывающим раствором I на 1–1,5 ч.
5. Удалить отмывающий раствор I.
6. Поместить гель в отмывающий раствор II, и оставить на время пока с геля не исчезнет фон. В процессе проявления геля рекомендуется 2–3 раза менять отмывающий раствор II.

ТЕМА 12. РАСЧЕТЫ В РАБОТЕ С БЕЛКАМИ

Располагая информацией о первичной структуре ДНК можно получить достаточно много информации о кодируемом ею белке. И, наоборот, по белку можно восстановить ДНК, что, конечно, сложнее. Методы компьютерных расчетов и молекулярного моделирования подчас позволяют получить более быстрый и точный результат, чем прямые эксперименты. Разумеется, это нисколько не уменьшает роль прямого эксперимента, особенно в тех случаях, когда отсутствуют изученные белки-гомологи и проверенные алгоритмы для расчетов.

В приведенных ниже работах предлагается ознакомиться с ресурсами в сети интернет, где выложены программы для различных расчетов, связанных с белками. Содержательная часть работ может меняться или вообще быть произвольной, поскольку их главная цель – практические навыки в работе с подобными ресурсами.

Одним из наиболее известных специальных сайтов в русскоязычном сегменте интернета является сайт MOLBIOL.RU – Классическая и молекулярная биология. Сайт основан в 2000 году, стабильно функционирует и продолжает интенсивно развиваться. Работая с программами необходимо следовать приведенным на сайте инструкциям, простым и понятным.

Для более детального анализа конкретного белка можно использовать базы данных аминокислотных последовательностей, такие как Swiss-Prot, NCBI Protein Database и другие интернет-ресурсы в области биоинформатики, геномики и протеомики. Нужно заметить, что основная часть белков в базах данных получена путем «трансляции *in silico*», т.е. белки аннотированы по нуклеотидным сиквенсам.

Работа 12.1. Трансляция нуклеотидной последовательности

Выложенная на сайте MOLBIOL.RU форма осуществляет трансляцию нуклеотидной последовательности в выбранных рамках считывания. Можно выбирать несколько рамок одновременно, также можно использовать одно- и трехбуквенный код для обозначения аминокислот. Различные специальные манипуляции с нуклеотидной последовательностью можно выполнить с помощью особой формы.

Ход работы

1. Откройте главную страницу сайта MOLBIOL.RU (<http://www.molbiol.ru>).
2. На главной странице найдите раздел «Расчеты».
3. Ознакомьтесь с разделами данной страницы, выберите пункт «Трансляция нуклеотидной последовательности».

4. «Транслируйте» в качестве примера ген НАДН-дегидрогеназы гадюки Никольского. На рис. 2 представлен сиквенс этого гена, полученный в лаборатории молекулярной биологии СГУ им. Н.Г. Чернышевского (Великов с соавт., Вестник Саратовского госагроуниверситета, 2006; Ефимов с соавт., Генетика, 2008).

Рис. 2. Ген НАДН-дегидрогеназы гадюки Никольского, субъединица 2 (GenBank: EU625372.1)

```
1  tgactcatag  catgaacatg  tctggaaatc  aatactttat  ctataatccc  agttatctct
61  aaaactaatc  acccccgggc  gacagaagca  acaacgaaat  acttctctac  acaaacccta
121  gcctccatca  ccatacctatc  tataacaaca  ctaaatgcac  ttaataacctc  caactgagaa
181  attagcctaa  caacagaatc  aacaacaata  aaaattatta  ccctagcact  aataataaaa
241  atagctgcag  caccattcca  cttttgatta  ccagaggtag  cacaaggcgc  cacaacacta
301  actgccttaa  ccataccttac  ctgacaaaaa  attgccccac  tcgccatcct  attagctgcc
361  cataatagca  caaaccttac  aatcctgagc  tcgtcggcta  tcctgtctgt  cttagtcggt
421  ggccttggag  gcctcaatca  aaccacaacta  cgaaaactaa  tagctttttc  atcaatcgct
481  cacactggct  gaatcttagc  tactattact  ctagcccca  atatttcaac  ccttgccttc
541  ataatctata  caataactac  aatacccatc  tttcttattc  tcaacatttc  atcgtcagct
601  acaattaaag  acataggaac  tttatgaacc  acttctccct  actttataat  aaccatgctt
661  ctaatcatct  tatccctcac  agggctgccc  ccacttacag  ggtttatacc  aaaatgactt
721  atcctaaata  aatagttac  cttcaacata  accctagaag  ccacccta
```

5. Вводя последовательность какого-либо гена, обращайтесь внимание на то, что игнорируются любые знаки, кроме принятых для обозначения нуклеотидов – agctuswrymkhbdvn. Запомните обозначения нуклеотидов, отличных от agct (прил. 10).
6. Транслируйте еще несколько предложенных генов. Нуклеотидные последовательности всех известных на данный момент генов доступны в базе данных GenBank, размещенной на сайте Национального центра биотехнологической информации США (National Center for Biotechnology Information, US National Library of Medicine – <http://www.pubmed.com> или <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

Работа 12.2. Предсказание нуклеотидной последовательности по аминокислотной

Форма поможет предсказать нуклеотидную последовательность по аминокислотной. При этом учитывается частота встречаемости кодонов в исследуемом организме.

Ход работы

- Откройте главную страницу сайта MOLBIOL.RU (<http://www.molbiol.ru>).
- На главной странице найдите раздел «Расчеты».
- Ознакомьтесь с разделами данной страницы, выберите пункт «Предсказание нуклеотидной последовательности по аминокислотной».

5. Предскажите нуклеотидную последовательность для белка бычьего сывороточного альбумина БСА. Его аминокислотная последовательность представлена на рис. 3. Однобуквенные обозначения аминокислот приведены в прил. 11.

Рис. 3. Аминокислотная последовательность белка БСА (GenBank: NM180992)

«MKWVTFISLLLLFSSAYSARGVFRDRTHKSEIAHRFKDLGEEHFKGLVLI AFSQYLQQCPFD
EHVKLVNELTEFAKTCVADESHAGCEKSLHTLFGDELCKVASLRETYGDMADCCEKQEPERN
ECFLSHKDDSPDLPKLPDPNTLCDEFKADEKFKFWGKYLVEIARRHPYFYAPELLYYANKYN
GVFQECQAEDKGACLLPKIETMREKVLTSARQRLRCASIQKFGERALKAWSVARLSQKFP
KAEFVEVTKLVTDLTKVHKECCHGDLLCADDRADLAKYICDNQDTISSKLECCDKPLLEK
SHCIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDKDVCKNYQEAKDAFLGSFLYEYSRRHPEYAVSVLLR
LAKEYEATLECCAKDDPHACYSTVFDKCLKHLVDEPQNLIKQNCQFEKLG EYGFQNALIVR
YTRKVPQVSTPTLVEVSRSLGKVGTRCCTKPESEMPCTEDYLSLILNRLCVLHEKTPVSEK
VTKCCTESLVNRRPCFSALTPDETYVPKAFDEKLFTHADICTLPDTEKQIKKQTALVELLK
HKPKATEEQKLTVMENFVAFVDKCCAADDKEACFAVEGPKLVVSTQTALA»

Работа 12.3. Анализ аминокислотной последовательности белка

Специальная программа, доступная на сайте MOLBIOL.RU, поможет проанализировать последовательность белка: рассчитать длину, брутто-формулу, молекулярную массу, изоэлектрическую точку и другие параметры. Для расчета молекулярной массы меченого белка необходимо отметить нужные изотопы. На странице «Help» можно узнать о погрешности и алгоритме расчета. Некоторые справочные сведения о белках приведены в прил. 12.

Ход работы

1. Откройте главную страницу сайта MOLBIOL.RU (<http://www.molbiol.ru>).
2. На главной странице найдите раздел «Расчеты».
3. Ознакомьтесь с разделами данной страницы, выберите пункт «Анализ последовательности белка».
4. Введите последовательность белка НАДН-дегидрогеназы гадюки обыкновенной (работа 6.1), выберите необходимые пункты и нажмите «Расчет». Брутто-формула и длина белка рассчитываются независимо от выбранных пунктов.
5. Проанализируйте еще несколько предложенных белков.

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки. М.: Мир, 1994. Т. 1–3.

Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. М.: Мир, 2002..

Спирин А.С. Молекулярная биология. Рибосомы и биосинтез белка. М.: Академия, 2011.

Степанов В.М. Молекулярная биология. Структура и функции белков. М.: Изд-во МГУ, 2005.

Коничев А.С., Севастьянова Г.А. Молекулярная биология. М.: Академия, 2008.

Эллиот В., Эллиот Д. Биохимия и молекулярная биология. М.: Академ-книга, 2006.

Сингер М., Берг П. Гены и геномы. М.: Мир, 1998. Т. 1–2.

Маниатис Т., Фритч И., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.

Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия: Учеб.-справ. пособие. Новосибирск: Наука, 2004.

Генная инженерия растений: Лаб. рук-во / Пер. с англ.; Под ред. Дж. Дрейпера и др. М.: Мир, 1991.

Белясова Н. Биохимия и молекулярная биология. М.: Книжный дом, 2004.

Коничев А.С., Севастьянова Г.А. Основные термины молекулярной биологии. Учебное пособие. М.: Колос, 2006.

Коничев А.С. Биохимия и молекулярная биология. Словарь терминов. М.: Дрофа, 2008.

Практическая молекулярная биология (<http://www.molbiol.edu.ru>).

MOLBIOL.RU – Классическая и молекулярная биология (<http://www.molbiol.ru>).

US National Library of Medicine (<http://www.pubmed.com>).

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Характеристика плазмид и бактериофагов, приведенных в руководстве

Наименование	Маркер	Размер	Число копий на клетку <i>E.coli</i>	Характеристика
pBR322	Ap ^r Tc ^r	4,4 kb	ок.20	Один из первых векторов для клонирования ДНК
pBluescript II	Ap ^r	2,96 kb	до 300	Вектор для клонирования и секвенирования. Имеет ori фага M13 и ген <i>lacZ</i>
M13	-	6,4 kb	ок.100	Нитевидный фаг дикого типа с одноцепочечной ДНК. Умеренный, заражает только F+ клетки <i>E.coli</i>
M13 K07	Km ^r	6,5 kb	ок.100	Рекомбинантный фаг-помощник. Несет ген канамицин-устойчивости. Дефектен по упаковке в вирионы
M13 mp18	-	7,25 kb	ок.100	Фаговый вектор для клонирования и секвенирования
λ (Lambda)	-	48,5 kb	ок.100	Лизирующий фаг с двухцепочечной ДНК, упакованной в белковый капсид икосаэдрической формы. Дикий тип. Способен переходить в лизогенное состояние
pSUP106	Cm ^r Tc ^r	9,6 kb	до 40	Вектор широкого круга хозяев. Поддерживается в клетках многих грам-отрицательных бактерий
pSUP106:: <i>sacB</i>	Cm ^r Km ^r	14,4 kb	до 40	Содержит встроенную по BamHI-сайту 3,8 kb кассету с геном левансахаразы <i>sacB</i> из бактерии <i>Bacillus subtilis</i> .
pHEN1	Ap ^r	4,5 kb	ок.100	Вектор для фагового дисплея антител. Фагида. Способен упаковываться в вирионы в присутствии фага-помощника M13 K07
pHEN1:: <i>scFv</i>	Ap ^r	5,4 kb	ок.100	Содержит клонированный ген <i>scFv</i> , кодирующий синтез одноцепочечных рекомбинантных миниантител определенной специфичности
pET30	Km ^r	5,4 kb	ок.100	Вектор для экспрессии белков (имеет промотор РНК-полимеразы фага T7)

Примечание. Ap^r – устойчивость к ампициллину, Km^r – устойчивость к канамицину, Cm^r – устойчивость к хлорамфениколу, Tc^r – устойчивость к тетрациклину

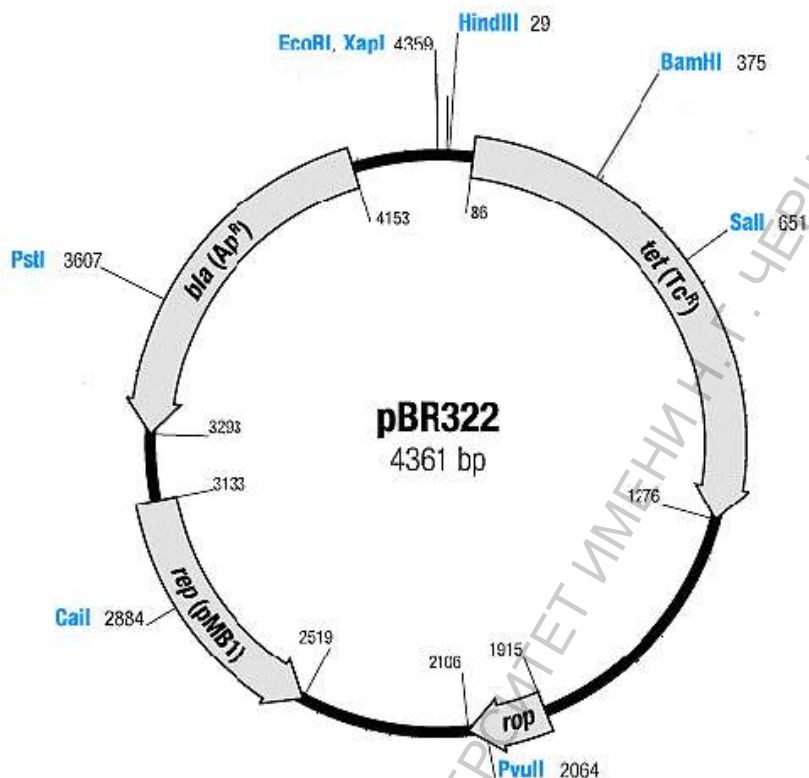
Приложение 2. Характеристика штаммов бактерий, приведенных в руководстве

Штамм	Генотип	Характеристика
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	<i>SupE44 hsd R17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻ F⁺ [pro AB⁺ lac I^q LacZ \wedge M15 Tn10 (Tc^r)]</i>	Широко используемый штамм-хозяин для различных векторов
<i>E. coli</i> TG1	<i>SupE \wedge (hsd M mcr B) 5(rk⁻ mk⁻) thi \wedge (lac-pro AB) F⁺ [tra D36 pro AB⁺ lac I^q LacZ \wedge M15]</i>	Штамм-хозяин для нитевидных фагов, удобен для наработки фаговых (и фагмидных) частиц
<i>E. coli</i> JS5	<i>Ara D39 \wedge (ara leu) 7967 \wedge (lac) x74 galU galK hsdR12 (rk⁻ mk⁻) mcr A mcr BC rpsL (str^r) thi rec A1 [F⁺::Tn10 (Tc^r) pro AB lac I^q Lac Z \wedge M15]</i>	Штамм-хозяин для нитевидных фагов и фагмид, удобен для наработки «растворимых» одноцепочечных рекомбинантных миниантител scFv
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F- <i>ompT hsdS (rB⁻ mB⁻) gal dcm rne131 (DE3)</i>	Штамм-хозяин для экспрессии рекомбинантных белков с помощью T7 РНК-полимеразы (на векторе необходим T7 промотор)
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS	F- <i>ompT hsdS (rB⁻ mB⁻) gal dcm rne131 (DE3) pLysS (Cm^r)</i>	Содержит плазмиду pLysS с геном синтеза ингибитора T7 полимеразы, обеспечивающим отсутствие «фоновой» экспрессии, если нет индукции
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp245	Штамм дикого типа, прототроф	Модельный штамм для изучения ассоциативной азотфиксации
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	Штамм дикого типа, прототроф	Модельный штамм для изучения механизмов трансгеноза растений

Приложение 3. Сайты узнавания некоторых рестриктаз

Фермент	Сайт узнавания и точка разрезания (указана апострофом)	Количество сайтов в ДНК		
		pBR322	M13 mp18	Lambda
BamHI	G'GATCC	1	1	5
BglII	A'GATCT	-	1	6
EcoRI	G'AATTC	1	1	5
EcoRII	'CC(A/T)GG	6	7	71
EcoRV	GAT'ATC	1	-	21
HindIII	A'AGCTT	1	1	7
KpnI	G'GTACC	-	1	2
NotI	GC'GGCCGC	-	-	-
PstI	CTGCA'G	1	1	28
Sau3A	'GATC	22	7	16
SmaI	CCC'GGG	-	1	3
XhoI	C'TCGAG	-	0	1

Приложение 4. Рестрикционная карта плазмиды pBR322



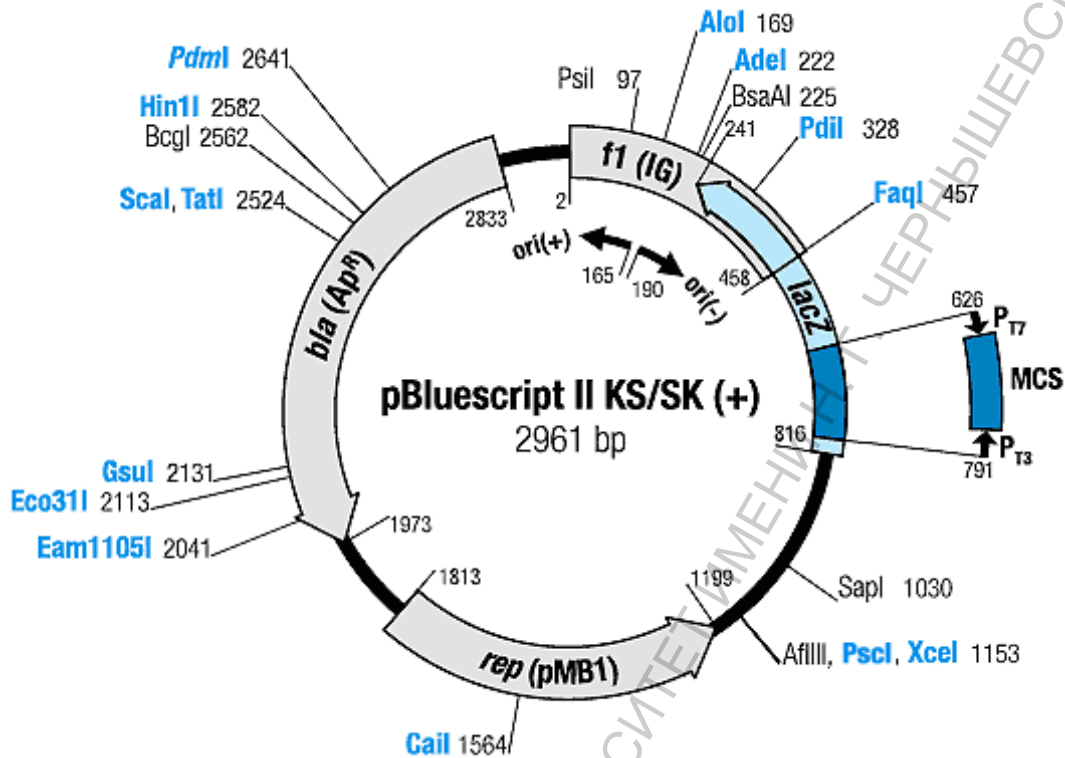
Обозначения:

- rep* (pMB1) – ori репликации плазмиды pMB1 (ориджин, точка начала репликации, репликатор),
- bla* (Ap^r) – ген устойчивости к ампициллину (β -лактамаза),
- tet* (Tc^r) – ген устойчивости к тетрациклину,
- rop* – область контроля копийности (repressor of primers).

Цифры возле обозначения сайтов узнавания рестриктаз соответствуют номеру первого нуклеотида в сайте. Отсчет ведется от первого нуклеотида Т в сайте EcoRI. Показаны только уникальные сайты.

Ген устойчивости к ампициллину инактивируется при клонировании по сайту распространенной рестриктазы PstI (и некоторым другим), к тетрациклину – по сайту рестриктазы BamHI (и некоторым другим).

Приложение 5. Рестрикционная карта плазмиды pBluescript II



Обозначения:

- rep* (pMB1) – ori репликации плазмиды pMB1 (репликон ColE1),
- bla* (Ap^r) – ген устойчивости к ампициллину (β-лактамаза),
- f1* (IG) – ori репликации фага M13,
- LacZ* – ген β-галактозидазы, N-концевая часть,
- P_{T3} – промотор фага T3,
- P_{T7} – промотор фага T7,
- MCS – полилинкер, мультиклональный сайт (multiple cloning site).

Порядок расположения сайтов для распространенных рестриктаз в полилинкере (начиная от промотора P_{T7}):

pBluescript II SK(+)

KpnI, XhoI, SalI, HindIII, EcoRI, PstI, SmaI, BamHI, XbaI, NotI, SacI;

pBluescript II KS(+)

SacI, NotI, XbaI, BamHI, SmaI, PstI, EcoRI, HindIII, SalI, XhoI, KpnI.

Универсальные праймеры для секвенирования:

M13/pUC sequencing primer (-20)

5'- G TAA AAC GAC GGC CAG T-3' (перед промотором P_{T7});

M13/pUC reverse sequencing primer (-26)

5'- CAG GAA ACA GCT ATG AC -3' (перед промотором P_{T3}).

Приложение 6. Схема устройства и использования лактозного оперона *E.coli*



Индукция гена β-галактозидазы. Фермент β-галактозидаза расщепляет дисахарид лактозу на галактозу и глюкозу. Индуктор лактозного оперона – лактоза. Она связывается с репрессором и способствует его диссоциации с промоторно-операторной зоны, обеспечивая прохождение транскрипции. Негидролизующий аналог лактозы ИПТГ – изопропил-β-D-тиогалактозид – также может выступать индуктором.

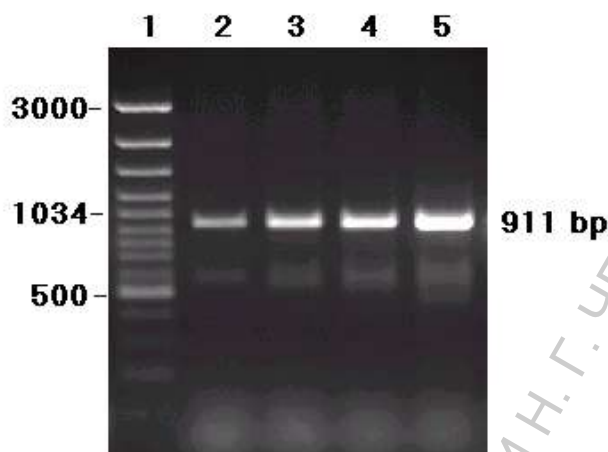
Сине-белая селекция при клонировании. β-галактозидаза способна расщеплять субстрат X-gal (5-бром-4-хлор-3-индоллил-β-D-галактозид) на галактозу и индольное соединение голубой окраски. Колонии бактерий на питательном агаре с X-gal и ИПТГ (по 40 мкг/мл) имеют голубую окраску. При клонировании под промотор гена *lacZ* происходит инактивация гена, что приводит к появлению обычных («белых») колоний. При трансформации *E.coli* продуктами лигазной реакции плазмиды со вставками дают белые колонии, без вставок – голубые.

Явление α - комплементации. Синтез активного фермента в бактериальных клетках будет происходить, если его N-концевая часть кодируется плазмидой (например pBluescriptII или др.), а C-концевая часть – встроенным в хромосому *E.coli* F-фактором. В этом случае штамм-хозяин должен иметь мутацию *lacI^f LacZ ΔM15* (конститутивный синтез репрессора I^f и N-концевая делеция гена β-галактозидазы). Это позволяет располагать на векторе не весь ген *lacZ*, а только его часть.

Приложение 7. Некоторые соотношения между количеством, размером и оптической плотностью для нуклеиновых кислот

1 ОЕ ₂₆₀	ДНК двухцепоч.	50 мкг
1 ОЕ ₂₆₀	ДНК одноцепоч.	37 мкг
1 ОЕ ₂₆₀	РНК одноцепоч.	40 мкг
1 мкг	ДНК двухцепоч.	3,08 мкМ фосфата
1 мкг	ДНК двухцепоч. (размером 1 kb)	3,08 нМ 5'-концов
1 мкг	ДНК двухцепоч. (размером 1 kb)	9,3x10 ¹¹ молекул
1 пМ	ДНК плазмиды pBR322	2,83 мкг
1 пМ	ДНК 5'-концов линейной pBR322	1,4 мкг
1 пМ	ДНК двухцепоч. (размером 1 kb)	650 нг
1 kb	ДНК двухцепоч.	650 kDa
1 kb	ДНК одноцепоч.	330 kDa
1 kb	РНК одноцепоч.	340 kDa

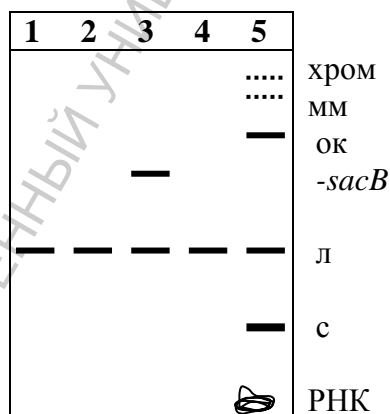
Приложение 8. Электрофореграмма продуктов ПЦР-амплификации гена НАДН-дегидрогеназы гадюки Никольского



Обозначения дорожек:

1. – маркер молекулярного веса 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas). Размер фрагментов ДНК, начиная сверху: 3000, 2000, 1500, 1200, 1034, 900, 800, 700, 600, 500 пар нуклеотидов;
2-5. – ПЦР-продукт (ампликон) гена НАДН-дегидрогеназы размером 911 п.н.

Приложение 9. Движение различных форм плазмидной ДНК при электрофорезе на примере ДНК плазмиды рBluescript II



Обозначения:

- 1 – рестрицированная Eco31I;
2 – рестрицированная BamHI;
3 – с кассетой *nptI-sacB-sacR*, рестрицированная BamHI;
4 – рестрицированная PstI;
5 – нативный препарат.

Формы плазмиды:

- л – линейная (с разрывом в обеих цепях ДНК); с – суперспиральная кольцевая; ок – открытая кольцевая (с разрывом в одной цепи ДНК); мм – димерная и мультимерные; хром – остатки хромосомной ДНК; *sacB* – кассета *nptI-sacB-sacR*.

Приложение 10. Стандартные обозначения полиморфных позиций нуклеотидов

Символ	Полиморфная позиция	Пояснение
R	A или G	puRine
Y	C или T	pYrimidine
M	A или C	aMino
K	G или T	Keto
S	C или G	сильное /Strong/ взаимодействие- три
W	A или T	слабое /Weak/ взаимодействие - две
H	(A, C, T) но не G	H следует за G в алфавите
B	(C, G, T) но не A	B следует за A в алфавите
V	(A, C, G) но не T(U)	V следует за T(U) в алфавите
D	(A, G, T) но не C	D следует за C в алфавите
N	(A, G, C, T)	любое основание / Nucleotide

Приложение 11. Однобуквенные обозначения аминокислот

Аланин	A	Лейцин	L
Аргинин	R	Лизин	K
Аспарагин	N	Метионин	M
Аспарагиновая кислота	D	Фенилаланин	F
Цистеин	C	Пролин	P
Глутамин	Q	Серин	S
Глутаминовая кислота	E	Треонин	T
Глицин	G	Триптофан	W
Гистидин	H	Тирозин	Y
Изолейцин	I	Валин	V

Приложение 12. Некоторые соотношения между размером, количеством, оптической плотностью и молярной концентрацией для белков

Конверсия: масса/моли

Молекулярный вес белка Mw (kDa)	1 мкг данного белка -	1 нМ данного белка -
10	100 пМ, 6×10^{13} молекул	10 мкг
50	20 пМ, $1,2 \times 10^{13}$ молекул	50 мкг
100	10 пМ, 6×10^{12} молекул	100 мкг
150	6,7 пМ, 4×10^{12} молекул	150 мкг

Конверсия: ДНК/белок

Размер ДНК	Молекулярный вес белка Mw (kDa)	Количество аминокислотных остатков
270 bp	10 kDa	90
0,9 kb	33,3 kDa	300
1 kb	37 kDa	333
1,35 kb	50 kDa	450

A280 некоторых белков с концентрацией 1 мг/мл

Белок	Концентрация	A280
IgG	1 мг/мл	1,35
IgM	1 мг/мл	1,20
IgA	1 мг/мл	1,30
Белок А	1 мг/мл	0,17
Авидин	1 мг/мл	1,50
Стрептавидин	1 мг/мл	3,40
БСА	1 мг/мл	0,70

Учебное издание

Великов Владимир Александрович

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ.
ПРАКТИЧЕСКОЕ РУКОВОДСТВО**

Учебно-методическое пособие
для студентов биологического факультета и факультета nano- и
биомедицинских технологий, обучающихся по направлениям
«Биология (020400)», «Биология-пед (050100)», «Биотехнические системы
и технологии (200100)», «Медицинская физика (011200)»
и по специальности «Биоинженерия и биоинформатика (020501)»

Формат издания: Электронный