Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЛИНИНГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

А. С. Бурбах
Е. В. Кривопускова

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

Учебно-методическое пособие по выполнению лабораторных работ,
обучающихся в бакалавриате по направлению подготовки
19.03.01 Биотехнология

Калининград
Издательство ФГБОУ ВО «КГТУ»
2023

УДК 577.2

Рецензент
кандидат биологических наук, доцент кафедры водных биоресурсов и аквакультуры ФБОУ ВО «КГТУ» О. Е. Гончаренок

Бурбах, А. С.

Молекулярная биология: учеб.-методич. пособие по выполнению лабораторных работ для студ. бакалавриата по напр. подгот. 19.03.01 Биотехнология / А. С. Бурбах, Е. В. Кривопускова. – Калининград: Изд-во ФГБОУ ВО «КГТУ», 2023. – 110 с.

В учебно-методическом пособии «Молекулярная биология» представлен перечень заданий для выполнения лабораторных работ, включающий в себя описание методики выполнения исследований, общую информацию, объясняющую суть лабораторной работы и актуальность ее выполнения, рекомендации по выполнению, а также задания и вопросы для текущего контроля. В пособии описываются современные методики проведения молекулярных исследований биологического материала.

Табл. 11, рис. 29, список лит. – 7 наименований

Учебно-методическое пособие по выполнению лабораторных работ рекомендовано к изданию в качестве локального электронного методического материала для использования в учебном процессе методической комиссией института рыболовства и аквакультуры ФГБОУ ВО «КГТУ» 28 августа 2023 г., протокол № 16

Учебно-методическое пособие по выполнению лабораторных работ рекомендовано к изданию в качестве локального электронного методического материала для использования в учебном процессе методической комиссией института агроинженерии и пищевых систем ФГБОУ ВО «КГТУ» 29 июня 2022 г., протокол № 5

УДК 577.2

© Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Калининградский государственный технический университет», 2023 г.
© Бурбах А. С., Кривопускова Е. В., 2023 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 4
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1. «ОЗНАКОМЛЕНИЕ С ОСНОВНЫМИ ПРИБОРАМИ И ОБОРУДОВАНИЕМ ДЛЯ ПРАКТИКУМА ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ» 7
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2. «КОДИРОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ В КЛЕТКЕ» 11
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3 «АНАЛИЗ ДНК МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ» 23
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4. «ВЫДЕЛЕНИЕ И ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ЭУКАРИОТ КЛАССИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ И С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СОРБЕНТОВ» 33
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5. «ВЫДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК ИЗ РЕКОМБИНАНТНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК» 52
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6. «ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ И КАЧЕСТВА ПРЕПАРАТОВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ МЕТОДОМ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ» 57
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 7. «ПОСТАНОВКА ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ» 63
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 8. «ДНК–ДНК-ГИБРИДИЗАЦИЯ» 74
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 9. «КЛОНИРОВАНИЕ ФРАГМЕНТОВ ДНК В КЛЕТКАХ E. COLI» 82
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 10. «ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ДНК» 88
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 11. «ИНФОРМАЦИОННЫЙ ПОИСК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БАЗ ДАННЫХ ИНТЕРНЕТА» 95
СПИСОК РЕКОМЕНДОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ 109

ВВЕДЕНИЕ

Учебно-методическое пособие по выполнению лабораторных работ разработано для направления подготовки 19.03.01 Биотехнология (профиль программы «Пищевая биотехнология») по дисциплине «Молекулярная биология» входящей в «Математический и естественнонаучный модуль», обязательной части основной профессиональной образовательной программы высшего образования.

Цель освоения дисциплины «Молекулярная биология» является формирование систематизированных знаний и умений в области молекулярной биологии, особенностей строения и свойств молекул, молекулярные механизмы передачи генетической информации, строение и состав генома прокариотических и эукариотических организмов, ее достижений и перспектив развития в области пищевой биотехнологии.

В результате изучения дисциплины студент должен:

знать:

– генетику, химическую организацию, строение и функции клетки эукариотов и прокариотов;

– строение, состав и физиологическую роль клеточной стенки и цитоплазматической мембраны;

– внутриклеточные органеллы;

– основные классы биомолекул (белки, нуклеиновые кислоты, липиды, углеводы), их биологические функции в клетке;

– молекулярные механизмы передачи генетической информации;

– структуру биологических мембран;

– организацию биосинтетических процессов в клетках эукариот и прокариот;

– строение и состав генома прокариотических и эукариотических организмов;

– рекомбинацию генов;

– молекулярный инструментарий генной инженерии;

уметь:

– анализировать роль внутриклеточных компонентов, биополимеров;

– выявлять взаимосвязь биохимических процессов в клетке;

владеть:

– основными современными методами и приемами проведения экспериментальных исследований.

Дисциплина опирается на профессиональные компетенции, знания, умения и навыки в области молекулярных исследований обучающихся, полученные на предыдущем уровне образования и компетенций, полученных при изучении таких дисциплин как: «Биология», «Биология гидробионтов», «Химия» и т. д.

Студенты, приступающие к изучению данной дисциплины для успешного ее освоения, должны иметь представления о механизмах хранения, передачи и реализации генетической информации, строение и функции сложных высоко-

молекулярных соединений, составляющих клетку: нерегулярных биополимеров (белков и нуклеиновых кислот), а также о современных методах проведения молекулярных исследований.

Дисциплина «Молекулярная биология» формирует компетенции, используемые студентами в дальнейшей профессиональной деятельности, а также является базой при изучении таких дисциплин как «Общая пищевая биотехнология», «Биологически активные добавки и композиции из сырья животного происхождения», «Функциональные технологические добавки в биотехнологии продуктов из сырья животного происхождения» и др., а также при подготовке выпускной квалификационной работы бакалавра.

Методические рекомендации определяют планирование, организацию и проведение лабораторных работ по учебной дисциплине, которые относятся к основным видам учебных занятий и составляют важную часть теоретической и профессиональной практической подготовки.

Выполнение студентом лабораторных работ направлено на:

– обобщение, систематизацию, углубление, закрепление полученных теоретических знаний по конкретным темам дисциплины «молекулярная биология»;

– формирование умений применять полученные знания на практике, реализацию единства интеллектуальной и практической деятельности;

– развитие интеллектуальных умений у будущих специалистов: аналитических, проектировочных, конструктивных и др.;

– выработку при решении поставленных задач таких профессионально значимых качеств, как самостоятельность, ответственность, точность, творческая инициатива.

В предлагаемых материалах дан перечень лабораторных работ, рассмотрены их основные дидактические цели, формируемые умения и навыки, содержание. Раскрыта структура проведения лабораторной работы.

Лабораторные занятия – это одна из разновидностей практического занятия, являющаяся эффективной формой учебных занятий в организации высшего образования. Лабораторные занятия имеют выраженную специфику в зависимости от темы дисциплины «Молекулярная биология», углубляют и закрепляют теоретические знания.

Лабораторные занятия дают наглядное представление об изучаемых явлениях и процессах, студенты осваивают постановку и ведение эксперимента, учатся умению наблюдать, оценивать полученные результаты, делать выводы и обобщения. Следовательно, ведущей целью лабораторных работ является овладение техникой эксперимента, умение решать практические задачи путем постановки опыта. Для всех лабораторных работ, которые выполняют студенты в рамках дисциплины, в данном учебно-методическом пособии представлены рекомендации по подготовки к ним и их выполнению, а также порядок ее выполнения и форму отчета. Лабораторные занятия проводятся в составе академической группы с разделением на подгруппы.

Лабораторные занятия – существенный элемент учебного процесса в организации высшего образования, в ходе которого обучающиеся фактически впервые сталкиваются с самостоятельной практической деятельностью в конкретной области. Данный вид занятий, как и другие виды практических занятий, являются средним звеном между углубленной теоретической работой обучающихся на лекциях, семинарах и применением знаний на практике. Эти занятия удачно сочетают элементы теоретического исследования и практической работы. Выполняя лабораторные работы, студенты лучше усваивают программный материал, так как многие определения и формулы, казавшиеся отвлеченными, становятся вполне конкретными, происходит соприкосновение теории с практикой, что в целом содействует пониманию сложных вопросов науки и становлению студентов как будущих специалистов.

Перед выполнением лабораторной работы проводится проверка знаний студентов – их теоретической готовности к выполнению задания.

Задания для выполнения лабораторных работ носят репродуктивный и частично-поисковый характер.

Работы, носящие репродуктивный характер, отличаются тем, что при их проведении студенты пользуются методическими указаниями, в которых указаны: цель работы, теоретический материал, задания, порядок выполнения работы, контрольные вопросы, основная и дополнительная литература.

Работы, носящие частично-поисковый характер, отличаются тем, что при проведении студенты не пользуются подробными инструкциями, им не задан порядок выполнения необходимых действий, выбор способов выполнения работы, инструктивной и справочной литературы.

Формы организации студентов для проведения лабораторных работ зависят от задания и могут носить групповой или индивидуальный характер.

При групповой форме организации занятий одна и та же работа выполняется бригадами по 2–5 человек.

При индивидуальной форме организации занятий каждый студент выполняет индивидуальное задание.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1. «ОЗНАКОМЛЕНИЕ С ОСНОВНЫМИ ПРИБОРАМИ И ОБОРУДОВАНИЕМ ДЛЯ ПРАКТИКУМА ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ»

Стремительное развитие современной физико-химической биологии тесно связано с усовершенствованием и широким применением таких методов, как центрифугирование, электрофорез, хроматография, полимеразная цепная реакция (ПЦР), а также методов генной инженерии. В связи с этим для выполнения молекулярно-биологических работ на современном уровне требуется соответствующее приборное оснащение. Основными требованиями к оборудованию являются надежность, простота в эксплуатации и эффективность при достижении искомого результата.

Цель работы. Ознакомиться с приборами и оборудованием для практикума по молекулярной биологии и сформировать первоначальные навыки обращения с ними.

Оборудование и материалы. Основные приборы и оборудование, необходимые для выполнения практических работ по молекулярной биологии, представлены в таблице 1.

Задания:

1. Посмотрите видеоматериал и отметьте в тетради основные правила поведения в лаборатории молекулярной биологии и основное оборудование, необходимое для выполнения исследований.

2. Используя данные таблицы 1 и видеоматериалов, сделайте записи в тетради о целевом назначении каждого прибора, особенностях работы с ним и технике безопасности.

3. На основании заполненной таблицы и просмотренных видеоматериалов подготовьте список необходимого оборудования для функционирования лаборатории.

Таблица 1 – Основные приборы и оборудование для практических работ по молекулярной биологии

Название	**Предназначение**	**Кратная характеристика**	**Особенности работы и меры безопасности**
Термоциклер (ДНК–амплификатор, программируемый термостат)	Предназначен для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) и других термоциклических процессов	Прибор имеет встроенный микрокомпьютер и может программироваться на поддержание определенной температуры в течение заданного времени, переход к другому температурному шагу и повторение температурных циклов необходимое число раз. Программное обеспечение позволяет контро-	В процессе работы прибора нельзя: 1) перекрывать вентиляционные отверстия; 2) прикасаться к термоблоку (по избежание ожогов)

Название	Предназначение	Кратная характеристика	Особенности работы и меры безопасности
		лировать состояние прибора, регистрировать процесс амплификации в реальном времени, сохранять и редактировать рабочие программы управления термоциклическими процессами	
Термостат твердотельный	Предназначен для термостатирования микропробирок	Прибор относится к термостатам, в котором рабочий нагревательный модуль выполнен из металла и имеет отверстия для установки микропробирок определенного размера и формы (чаще всего 0,5 мл и 1,5 мл с коническим дном и 2,0 мл с круглым дном) и обеспечивает термостатирование в диапазоне температур: от комнатной (или ниже комнатной при наличии функции охлаждения) до 99-120 ºС, Особенности конструкции гарантируют быстрый выход на заданную температуру и точность ее поддержания до 0,1ºС.	Не дотрагиваться до нагревательного модуля (во избежание ожогов)
Камера для горизонтального электрофореза	Предназначена для разделения молекул нуклеиновых кислот в агарозном геле в постоянном электрическом поле	В комплект входят: кювета для заливки геля; аппликаторы (гребенки) для формирования лунок в геле. Имеет встроенные электроды и клеммы для подключения к источнику постоянного тока	В кювету для заливки геля нельзя наливать горячий расплав агарозы, во избежание ее деформации. При проведении электрофореза нельзя открывать крышку камеры без предварительного отключения от источника тока
Источник постоянного тока	Предназначен для подсветки геля после электрофореза светом определенного спектра и визуализации фраг-	Прибор регулируется в режиме стабилизации напряжения, тока или мощности независимо от изменения сопротивления нагрузки. Как правило	Не включать без нагрузки

Название	Предназначение	Кратная характеристика	Особенности работы и меры безопасности
	ментов нуклеиновых кислот и белков	имеет сигнализацию о перегрузке	
Трансиллюминатор	Предназначен для подсветки геля после электрофореза светом определенного спектра и визуализации фрагментов нуклеиновых кислот и белков	Конструкция прибора обеспечивает равномерную освещенность, а чрезвычайно малый прогрев светофильтра позволяет достаточно долго рассматривать гель, не опасаясь «расплывания» зон. Прибор имеет встроенный таймер, комплектуется кабинетом для непосредственного наблюдения гелей с защитным экраном	После просмотра геля светофильтр трансиллюминатора необходимо досуха протирать мягкой салфеткой
Гель-документирующая видеосистема	Предназначена для получения цифрового изображения гелей, их первичной обработки и хранения в памяти ПК	Система снабжена цифровой фота-видеокамерой, позволяющей наблюдать гель через ПО на мониторе ПК и делать его цифровые фотографические изображения. В первую очередь применяется для визуализации фрагментов ДНК в ультрафиолетовом свете, небезопасном для глаз	При работе с гидросистемой необходимо следить за правильностью ее подключения, не допускать загрязнения светофильтра и объектива
Микроцентрифуга-вертекс	Предназначена для встряхивания, перемешивания и центрифугирования микропробирок (0,5–2,0 мл) на небольших скоростях вращения ротора (до 2 тыс. об./мин)	Устройство представляет собой центрифугу для малых объемов жидкости с функцией встряхивания	Включать прибор только при уравновешенном роторе, нельзя прикасаться к ротору во время центрифугирования
Высокоскоростная микроцентрифуга	Предназначена для центрифугирования микропробирок (0,5–2,0 мл) на больших скоростях (до 15–20 тыс. об./мин и выше)	Устройство представляет собой центрифугу для малых объемов жидкости. Скорость вращения регулируется плавно, имеется встроенный таймер, часто снабжена функцией охлаждения и регулировкой плавности разгона и торможения ротора	Включать прибор только при уравновешенном роторе и закрытой крышке центрифуги

Название	Предназначение	Кратная характеристика	Особенности работы и меры безопасности
Автоматические дозаторы переменного объема	Предназначены для отбора и внесения необходимых объемов жидкости	Дозаторы (автоматические пипетки) позволяют с высокой точностью отбирать и вносить объемы различных жидкостей при использовании одноразовых наконечников соответствующего объема, снабжения механизмом сбрасывания отработанного наконечника	Использовать только в пределах объема, указанных на корпусе дозатора, и с предназначенными для него наконечниками

4. На основании полученного списка оборудования с использованием сайтов производителей и поставщиков (https://www.helicon.ru/, https://www.nv-lab.ru/, https://www.laboratorii.com/, https://www.moslabo.ru/) конкретизируйте список с указанием цены на выбранную модель оборудования и страны изготовителя. Проведите калькуляцию затрат на приобретение минимального набора оборудования для работы лаборатории молекулярной биологии.

№	Наименование оборудования	Модель оборудования	Производитель	Цена

Контрольные вопросы:

1. В каком документе указан минимальный комплект оборудования для оснащения ПЦР-лаборатории?
2. Какие требования предъявляются к помещениям, в которых планируется создание ПЦР-лаборатории?
3. Какие виды флуориметров для ПЦР существуют?
4. Какие виды центрифуг необходимы для укомплектования ПЦР-лаборатории?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2. «КОДИРОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ В КЛЕТКЕ»

ЗАНЯТИЕ 1. «ПРИНЦИП КОМПЛЕМЕНТАРНОСТИ»

Молекула ДНК состоит из двух спирально закрученных вокруг общей оси длинных полинуклеотидных цепей, соединенных водородными связями. Нуклеотид как мономер состоит из азотистого основания, сахара пентозы и остатка фосфорной кислоты. Азотистые основания делятся на 2 группы: пуриновые (аденин и гуанин) и пиримидиновые (тимидин, цитозин и урацил). В ДНК отсутствует урацил, в РНК – тимидин. Азотистые основания образуют между собой водородные связи в строгом соответствии: **А-Т, Г-Ц** в молекуле ДНК и А-У, Г-Ц – в РНК (Рисунок 1).

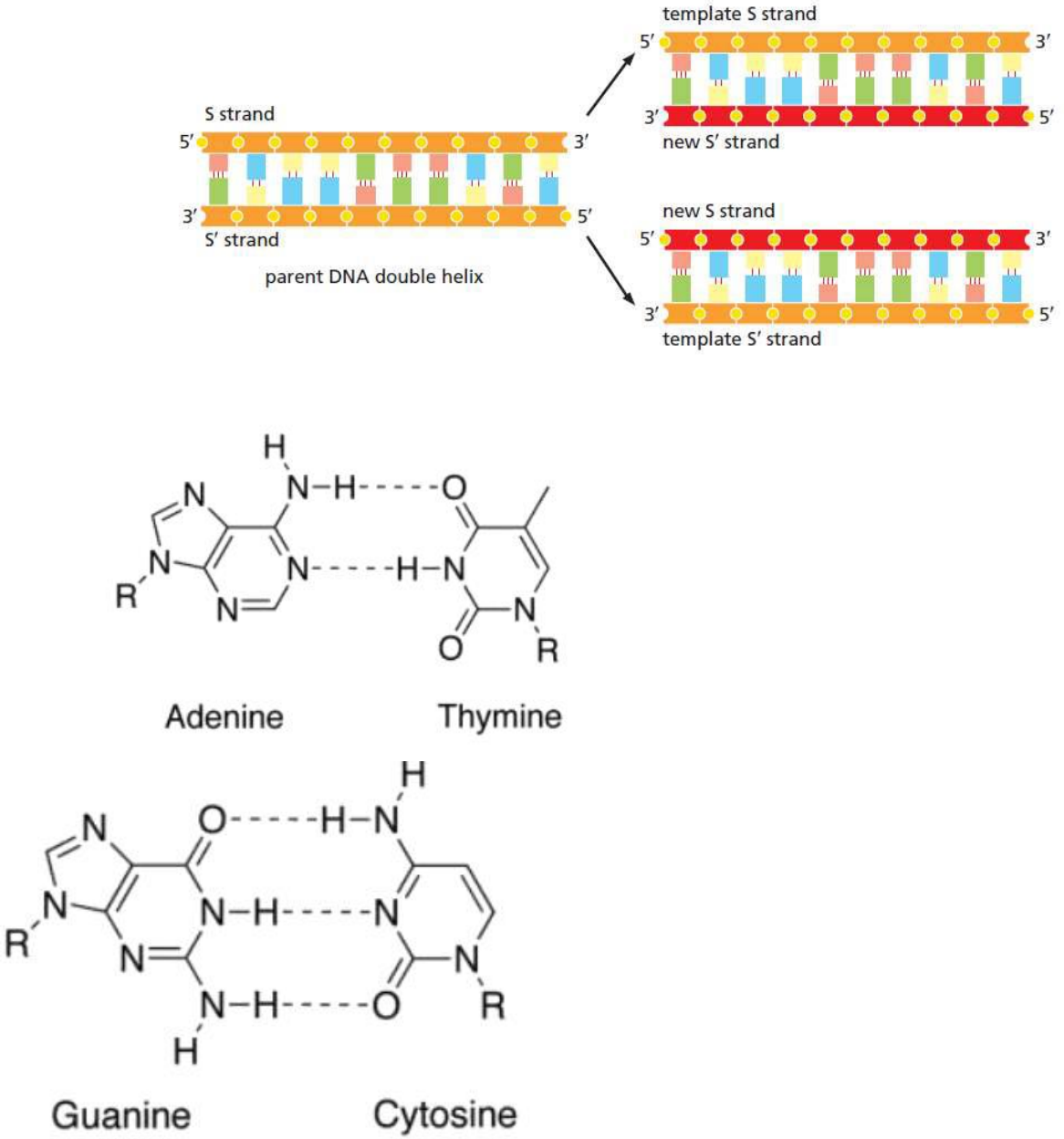


Рисунок 1 – «Принцип комплементарности»

Такое соответствие носит название «принцип комплементарности», который лежит в основе передачи генетической информации:

1) с ДНК на ДНК (реакция редупликации – самоудвоения).

2) с ДНК на информационную РНК (иРНК) – реакция транскрипции.

3) взаимодействия иРНК (кодон) с тРНК (антикодон) в реакции трансляции, т.е. реакции синтеза белка на рибосоме.

Все три реакции носят название матричных.

Нуклеотидный состав ДНК обнаруживает определенные закономерности (правила Чаргаффа):

1 Количество аденина равно количеству тимина, а гуанина – цитозину: А=Т, Г=Ц;

2 Количество пуринов равно количеству пиримидинов: А+Г=Т+Ц.

Правила Чаргаффа, наряду с данными рентгеноструктурного анализа, сыграли решающую роль в расшифровке структуры молекулы ДНК Дж. Уотсоном и Ф. Криком в 1953 г. и установлении ее параметров.

Параметры молекулы ДНК:

Диаметр спирали – 2 нм.

Шаг ДНК состоит из 10 пар нуклеотидов.

Длина нуклеотида=0,34 нм.

Средняя молекулярная масса нуклеотида = 300 а.е.м. (атомных единиц массы).

Цель работы: ознакомиться с принципом комплементарности и правилами Чаграффа.

Задание.

На основании теоретических данных о кодировании информации в клетке решите ниже представленные задачи.

Пример оформления решения.

Молекула ДНК состоит из 1000 нуклеотидов, какова ее длина? Какова длина иРНК, построенной на данной молекуле ДНК?

РЕШЕНИЕ. Поскольку молекула ДНК двухцепочечная, то чтобы узнать, сколько нуклеотидов в одной цепи, надо 1000:2 = 500 пар нуклеотидов. Зная длину нуклеотида в цепи, можно вычислить длину ДНК:500 х 0,34 нм = 170 нм. Такую же длину будет иметь иРНК, так как она строится на одной цепи ДНК.

ОТВЕТ: длина ДНК = длине иРНК = 170 нм.

Фрагмент нуклеотидной цепи ДНК имеет последовательность ААГТГАЦ. Определите нуклеотидную последовательность второй цепи и общее число водородных связей, которые образуются между двумя цепями.

РЕШЕНИЕ. По принципу комплементарности А всегда стоит в паре с Т, а Г всегда образует пару с Ц, значит можно достроить вторую цепь ДНК, она будет такая ТТЦАЦТГ. Теперь можно посчитать количество водородных связей, которые поддерживают эту молекулу. Между А и Т две водородные связи, между Г и Ц – три водородные связи. Всего водородных связей будет: 2х4 + 3х3 =17.

ОТВЕТ: 17 водородных связей между двумя цепями ДНК.

Задачи для решения.

1 В молекуле ДНК содержится 30 нуклеотидов с тимином. Определите, сколько нуклеотидов с аденином содержат дочерние молекулы ДНК, образующиеся в процессе редупликации, объясните полученные результаты.

2 Молекула иРНК состоит из 300 нуклеотидов. Какова длина и масса этой молекулы?

3 В молекуле ДНК 20 % гуаниловых нуклеотидов. Определите процентное содержание Ц, Т, А и длину молекулы ДНК, если в ней всего 300 нуклеотидов.

4 Две комплементарные цепи в молекуле ДНК соединяются водородными связями. Определите число нуклеотидов с аденином, тимином, гуанином и цитозином в ДНК, 10 нуклеотидов которой, соединяются между собой двумя водородными связями, а 40 нуклеотидов – тремя водородными связями.

5 В молекуле иРНК: 22 % аденина, 36 % гуанина, 15 % цитозина и 27 % урацила. Сколько и каких нуклеотидов будет в двухцепочечной молекуле ДНК, на которой была синтезирована иРНК?

6 В молекуле ДНК 13 % адениловых нуклеотидов, сколько в ней содержится гуаниловых нуклеотидов?

7 Определите процентное содержание нуклеотидов с аденином, тимином, гуанином и цитозином участка молекулы ДНК, в которой 80 нуклеотидов соединяются между собой двумя водородными связями и 40 нуклеотидов – тремя водородными связями. Объясните полученные результаты.

8 В молекуле ДНК содержится 20 % тимидиловых нуклеотидов. Определите процентное содержание в этой молекуле цитидиловых нуклеотидов.

9 Участок молекулы иРНК имеет длину 272 нм. Определите количество нуклеотидов, содержащихся в этом участке молекулы.

10 Участок молекулы ДНК состоит из 50 пар нуклеотидов. Определите длину этого участка.

11 Участок молекулы ДНК содержит 230 гуаниловых нуклеотидов, что составляет 32 % от общего их количества. Определить, сколько в данном фрагменте содержится тимидиловых, цитидиловых и адениловых нуклеотидов, какова длина и масса данного фрагмента ДНК.

Контрольные вопросы:

1. В чем заключается принцип комплементарности?
2. Перечислите правила Чаграффа.
3. В чем разница молекул ДНК и РНК?
4. Какие параметры имеет молекула ДНК?

ЗАНЯТИЕ 2. «НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ»

Нуклеиновые кислоты – сложные высокомолекулярные соединения, имеющиеся во всех клетках живых организмов и являющиеся материальными носителями наследственной информации. Нуклеиновые кислоты играют веду-

щую роль не только в хранении, но и в передаче наследственной информации и реализации её в ходе индивидуального развития каждого организма.

Нуклеиновые кислоты – самые большие молекулы в клетках живых организмов. Они представляют собой линейные полимеры огромной молекулярной массы. Длина молекул нуклеиновых кислот может составлять несколько метров, однако они многократно скручены (спирализованы) и образуют компактные структуры, что позволяет им занимать относительно небольшой объём.

Нуклеиновые кислоты входят в состав клеток всех живых существ на Земле. Различают два типа нуклеиновых кислот: *рибонуклеиновые (РНК)* и *дезоксирибонуклеиновые (ДНК*). РНК и ДНК были обнаружены в ядрах клеток и поэтому их назвали *нуклеиновыми,* то есть *ядерными*. Молекулы ДНК содержат всю генетическую информацию, в них закодирован состав всех белков организма. Однако ДНК непосредственно в синтезе белков не участвует. Перенос генетической информации от ДНК к белкам выполняет РНК.

В состав ДНК и РНК входят пятичленные углеводы (пентозы): ДНК содержит *дезоксирибозу*, а РНК – *рибозу* (Рисунок 2).

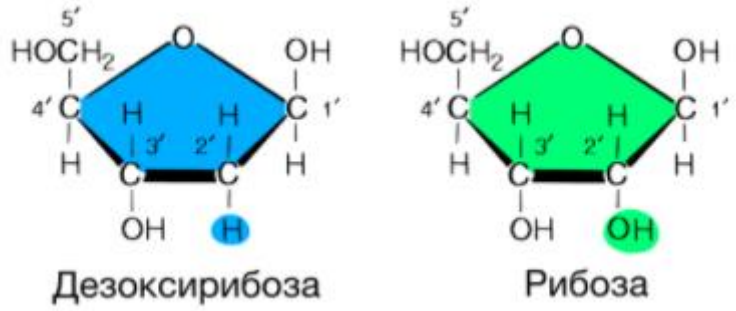


Рисунок 2 – Состав и строение нуклеиновых кислот

Рибонуклеиновые кислоты – нуклеиновые кислоты, получаемые при поликонденсации рибонуклеотидов, в состав молекул которых входят остатки рибозы.

Дезоксирибонуклеиновые кислоты – продукты поликонденсации дезоксирибонуклеотидов, в состав молекул которых входят остатки дезоксирибозы.

Молекулы сахара играют структурную роль, составляют «скелет» нуклеиновой кислоты. С каждой молекулой сахара соединена одна молекула азотистого основания.

Азотистые основания – гетероциклические органические соединения, которые являются производными пиримидина и пурина.

Для сокращенного обозначения азотистых оснований пользуются большими латинскими или русскими буквами. К азотистым основаниям относят аденин (**А**), гуанин (**Г**), цитозин (**Ц)**, которые входят в состав как ДНК, так и РНК. Тимин (**Т**) входит в состав только ДНК, а урацил (**У**) встречается только в РНК.

Аденин и гуанин являются производными *пурина*, а цитозин, тимин и урацил – производными *пиримидина* (Рисунок 3).

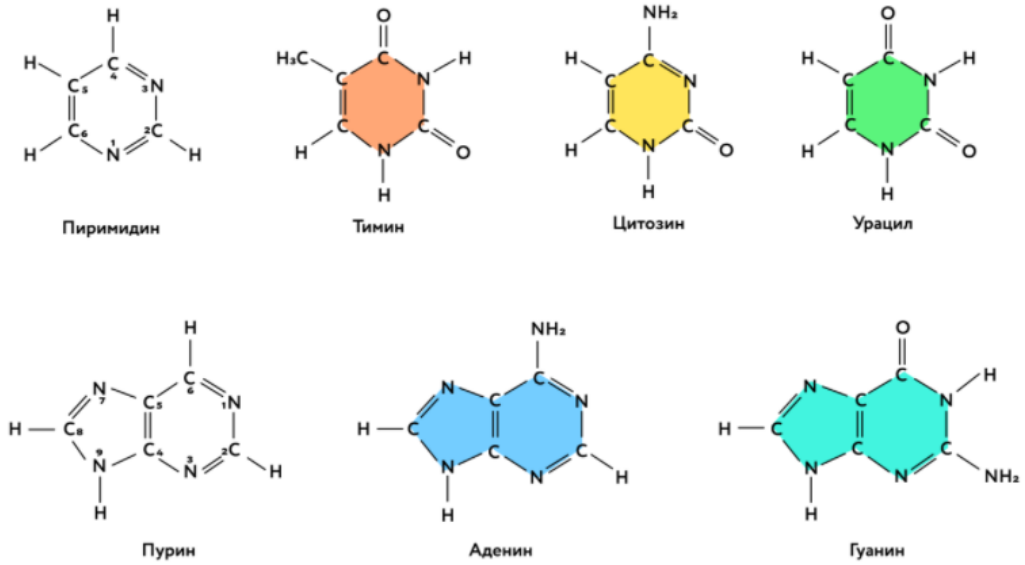


Рисунок 3 – Пиримидиновые и пуриновые азотистые основания

Именно азотистые основания являются носителями наследственной информации.

Первичная структура ДНК и РНК

Первичную структуру ДНК и РНК составляет последовательность *нуклеотидов* в нуклеотидной цепи. Специфическое чередование звеньев – *нуклеотидов* – определяет запись наследственной информации в клетках. Молекулы углевода соединяются между собой в молекулу нуклеиновой кислоты остатками фосфорной кислоты. Скелет полинуклеотидной цепи состоит из углеводных и фосфатных остатков, в которых гетероциклические азотистые основания соединены с углеводами посредством гликозидной связи (Рисунок 4).

Рисунок 4 – Строение полинуклеотидной цепи

Каждые три последовательно расположенных нуклеотида кодируют какую-то одну аминокислоту, а порядок следования нуклеотидов в цепях ДНК каждого организма уникален, как уникальна и наследственная информация любого организма.

Нуклеотиды составлены из трёх соединенных друг с другом молекул: азотистого основания, пентозы и остатка фосфорной кислоты (Рисунок 5).

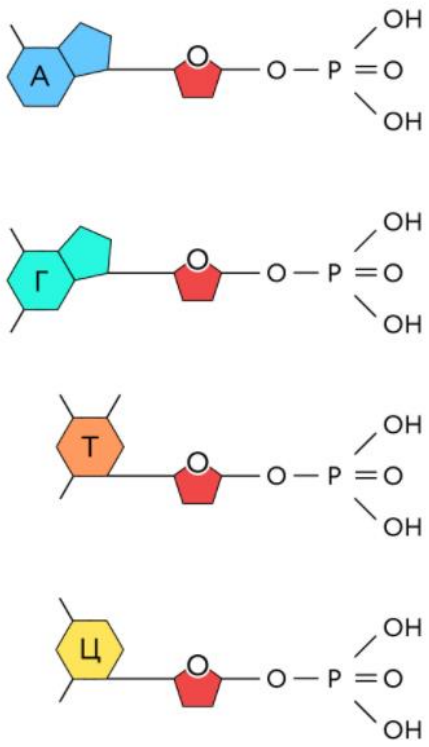


Рисунок 5 – Строение нуклеотидов

Каждая из трёх частей играет свою роль в нуклеиновых кислотах. Самая главная принадлежит азотистым основаниям – именно они являются носителями наследственной информации. Молекулы сахара играют структурную роль – они составляют остов, фундамент нуклеиновой кислоты. С каждой молекулой сахара соединена одна молекула азотистого основания. Разные молекулы сахара соединены между собой в единую гигантскую молекулу нуклеиновой кислоты остатками фосфорной кислоты.

В результате частичного гидролиза нуклеотидов происходит отщепление остатка фосфорной кислоты и образуются *нуклеозиды*. Молекулы нуклеозидов состоят из остатка пуринового или пиримидинового основания, связанного с остатком рибозы или дезоксирибозы (Рисунок 6).

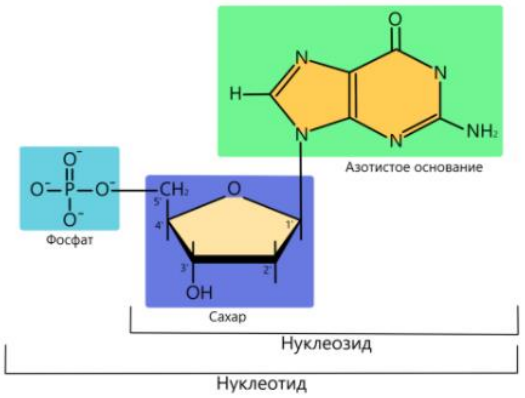


Рисунок 6 – Нуклеозид в составе нуклеотида

Нуклеозиды – азотистые основания, соединенные ковалентной связью с остатком рибозы или дезоксирибозы, образуют N-гликозиды.

Нуклеотиды – нуклеозиды, в которых к 5'-гидроксильной группе моносахарида присоединены одна или несколько фосфатных групп.

Названия нуклеозидам дают по имени азотистого основания, входящего в их состав. Например, нуклеозид аденозин включает аденин, тимидин – тимин, уридин – урацил.

Вторичная структура ДНК и РНК

В подавляющем большинстве случаев молекула ДНК построена из двух полинуклеотидных цепей, скрученных друг с другом. Спираль ДНК закручивается вправо, общий виток составляет нм, расстояние между цепочками нм. Модель двойной спирали ДНК была предложена в 1953 г. Дж. Уотсоном и Ф. Криком.

В ДНК встречаются четыре основных типа азотистых оснований: аденин (**А**), гуанин (**Г**), цитозин (**Ц**) и тимин (**Т**). В состав РНК вместо тимина входит другое, близкое ему по строению основание – урацил (**У**).

Цепочки в молекуле ДНК соединяются между собой по строго определённым правилам в соответствии с *принципом комплементарности*: тимин (**Т**) образует водородные связи только с аденином (**А**), цитозин (**Ц**) – с гуанином (**Г**). Таким образом, в каждой паре оснований, связанных водородными связями, одно из оснований всегда пуриновое, другое – пиримидиновое.

Комплементарность – пространственная взаимодополняемость (взаимное соответствие) поверхностей взаимодействующих молекул или их частей, приводящая, как правило, к образованию вторичных (Ван-дер-Ваальсовых, водородных, ионных) связей между ними.

Строго определённые правила сочетания оснований в пары (комплементарность тимина аденину и цитозина гуанину) стали понятными после изучения размеров двойной спирали ДНК. Оказалось, что диаметр двойной спирали по всей её длине постоянен. Постоянство этого размера спирали может быть обеспечено лишь при единственном сочетании оснований в паре. Только в том случае, когда тимин соединён с аденином, а цитозин с гуанином, получаются пары оснований одинаковой длины (Рисунок 7).

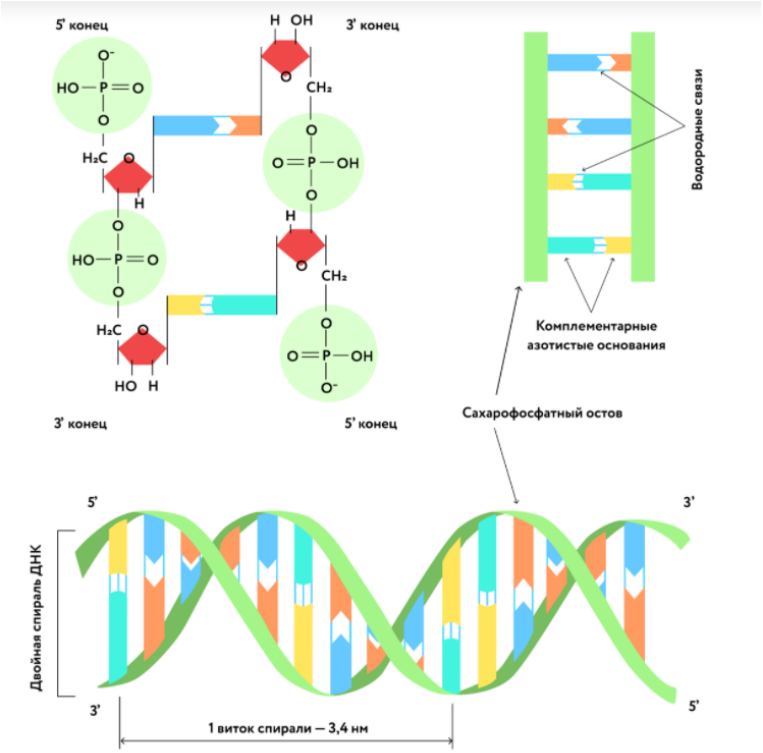


Рисунок 7 – Строение молекулы ДНК

Двуспиральная структура с комплементарными полинуклеотидными цепями обусловливает возможность самоудвоения (репликации) молекулы ДНК.

Молекула рибонуклеиновой кислоты (РНК), в отличие от молекулы ДНК, построена из одной полинуклеотидной цепи. Отдельные участки цепи РНК образуют спирализованные петли – «шпильки», образующиеся за счёт водородных связей между комплементарными азотистыми основаниями А-У и Г-Ц (Рисунок 8).

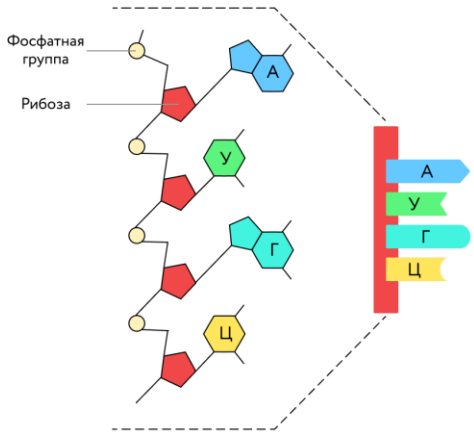


Рисунок 8 – Молекула РНК

Участки цепи РНК в таких спиральных структурах антипараллельны, но не всегда полностью комплементарны, в них встречаются неспаренные нуклеотидные остатки или даже одноцепочечные петли, не вписывающиеся в двойную спираль. Наличие спирализованных участков характерно для всех типов РНК.

Третичная структура ДНК и РНК

Двухцепочечная спираль ДНК в пространстве может подвергаться дальнейшей укладке в определенную третичную структуру – суперспираль. Суперспиральная конформация ДНК характерна для хромосом высших организмов. Подобная третичная структура стабилизируется за счёт ковалентных связей с остатками аминокислот, входящих в состав тех белков, которые образуют нуклеопротеидный комплекс. За счёт того, что молекула ДНК упакована в компактную структуру, она занимает всего 1/5 объёма клетки. Например, длина ДНК хромосомы человека достигает 8 см, а упакована так, что умещается в хромосоме с длиной 5 нм.

Третичная структура РНК возникает за счёт взаимодействия спирализованных элементов вторичной структуры. Так, возможно образование дополнительных водородных связей между нуклеотидными остатками, достаточно удалёнными друг от друга, или связей между ОН-группами остатков рибозы и основаниями. Третичная структура РНК стабилизируется ионами двухвалентных металлов, например, ионами Mg^{2+}, связывающимися не только с фосфатными группами, но и с основаниями (Рисунок 9).

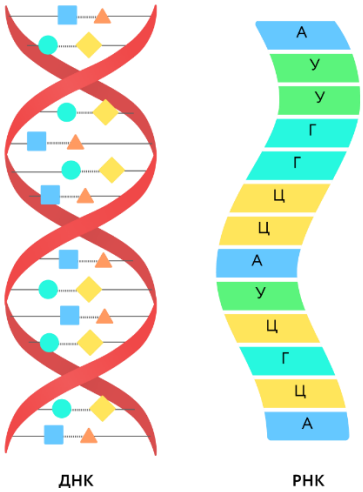


Рисунок 9 – Молекулы ДНК и РНК

Различия между ДНК и РНК

Таким образом, между ДНК и РНК можно выделить **три основных различия**:

1. ДНК содержит моносахарид дезоксирибозу, РНК – рибозу, у которой по сравнению с дезоксирибозой есть дополнительная гидроксильная группа. Эта группа увеличивает вероятность гидролиза молекулы, т. е. уменьшает стабильность молекулы РНК.

2. Нуклеотидом, комплементарным аденину, в ДНК является тимин, а в РНК – урацил, представляющий собой неметилированную форму тимина.

3. ДНК существует в форме двойной спирали, состоящей из двух отдельных молекул, а молекулы РНК в среднем гораздо короче и преимущественно одноцепочечные.

Цель работы: ознакомиться с особенностями передачи информации через нуклеиновые кислоты.

Задания:

1. Установите соответствие между признаками и видами нуклеиновых кислот:

Признаки нуклеиновых кислот		Виды нуклеиновых кислот	
А	Хранит наследственную информацию	1	ДНК
Б	Копирует наследственную информацию и передает ее к месту синтеза белка	2	иРНК
В	Является матрицей для синтеза белка	3	тРНК
Г	Состоит из двух цепей		
Д	Переносит аминокислоты к месту синтеза белка		
Е	Специфична по отношению к аминокислоте		

2. Установите соответствие между характеристиками нуклеиновых кислот и их видами: к каждой позиции в первом столбце подберите соответствующую позицию из второго столбца

Характеристика		Виды нуклеиновых кислот	
А	Синтезируется в ядрышке	1	иРНК
Б	Кодирует последовательность аминокислот	2	тРНК
В	Формирует каркас рибосомы	3	рРНК
Г	Переносит аминокислоты к месту синтеза		
Д	Присоединяет к себе аминокислоту		

3. Ответьте на вопросы. Схема строения какого вещества изображена на рисунке ниже? Какие разновидности этого вещества существует? В чем состоит его участие в обмене веществ?

4. Ответьте на вопросы. Как изменится соотношение нуклеотидов ДНК, копией которой является следующая мРНК – УУГГАЦЦГГУУА, если произошли следующие изменения: после первого триплета был вставлен тимин, после второго и третьего – аденин.

Контрольные вопросы:

1. В чем заключается принцип комплементарности?
2. Перечислите правила Чаргаффа.
3. В чем разница молекул ДНК и РНК?
4. Какие параметры имеет молекула ДНК?

ЗАНЯТИЕ 3. «МАТРИЧНЫЕ ПРОЦЕССЫ В КЛЕТКЕ»

Передача генетической информации при делении клетки, от родителя к потомству, либо через векторы происходит благодаря матричным процессам – синтезе одной биомолекулы, несущей информацию, на основе матрицы другой биомолекулы.

Центральная догма молекулярной биологии – обобщающее наблюдаемое в природе правило реализации генетической информации: информация передается от нуклеиновых кислот к белку, но не в обратном направлении.

Кто сформулировал данное правило и когда? Френсис Крик, 1958 год (Рисунок 10).

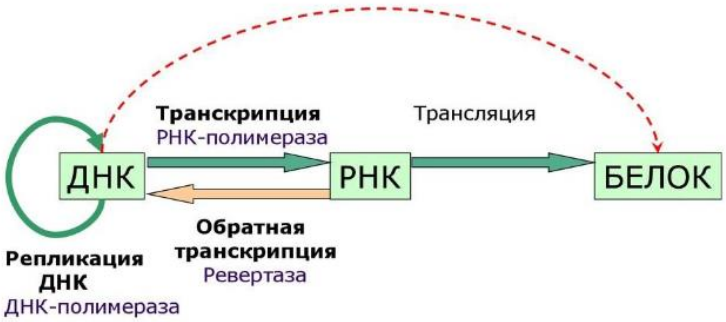


Рисунок 10 – Передача генетической информации

Переход генетической информации последовательно от ДНК к РНК и затем от РНК к белку является универсальным для всех без исключения клеточных организмов, лежит в основе биосинтеза макромолекул.

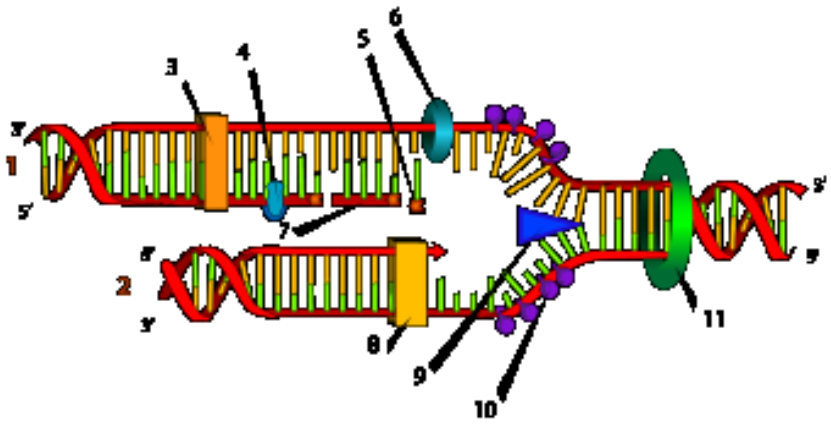
Репликации генома соответствует информационный переход ДНК – ДНК.

В природе встречаются также переходы РНК-РНК и РНК-ДНК (например, у некоторых вирусов), а также изменение конформации белков (*пространственная конфигурация белка (т. е. его третичная и четвертичная структура*), передаваемое от молекулы к молекуле.

Цель работы: рассмотреть механизмы матричных процессов, провести моделирование матричных процессов.

Задания:

1. Перерисуйте рисунок, указанный ниже, в тетрадь и обозначьте основные компоненты и ферменты репликации. С помощью пластилина смоделируйте репликационную вилку прокариот.



2. Используя рисунок 11, укажите особенности в транскрипции и трансляции у прокариот и эукариот, данные занесите в таблицу.

Прокариоты	Эукариоты
Транскрипция	
Трансляция	

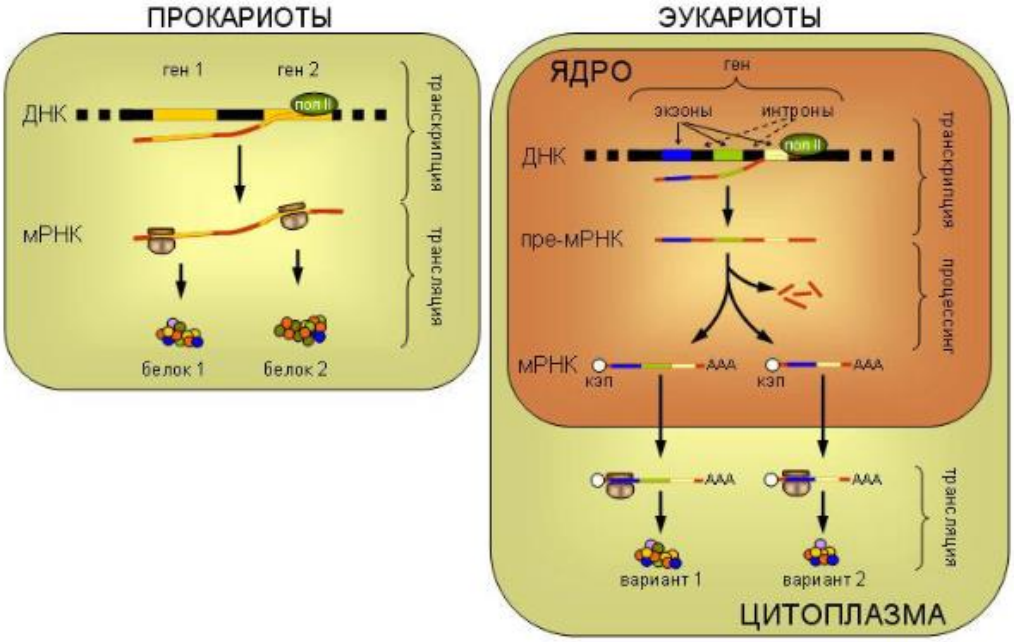


Рисунок 11 – Процессы транскрипции и трансляции у эукариот и прокариот

Контрольные вопросы:

1. В чем заключается принцип комплементарности?
2. Перечислите правила Чаргаффа.
3. В чем разница молекул ДНК и РНК?
4. Какие параметры имеет молекула ДНК?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3 «АНАЛИЗ ДНК МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ»

Для визуализации результатов операций, проводимых с ДНК, таких как выделение, рестрикция, полимеразная ценная реакция (ПЦР), молекулярное клонирование, наиболее часто используют электрофорез.

Электрофорез – метод разделения макромолекул (в том числе молекул и фрагментов ДНК) в геле по размеру и заряду в постоянном электрическом поле. Существует два вида электрофореза: горизонтальный и вертикальный.

Для проведения горизонтального электрофореза используют пластину агарозного геля необходимой концентрации с добавлением специального красителя ДНК, например, **бромида этидия.**

На скорость движения ДНК в геле в процессе электрофореза влияют несколько факторов, таких как концентрация агарозы в геле, заряд молекулы и напряженность электрического поля.

Концентрация агарозы в геле. Агарозный гель – пористая структура, причем увеличение концентрации агарозы в геле приводит к уменьшению размеров его пор. Это позволяет при помощи геля с разной концентрацией агарозы разделять линейные молекулы ДНК в широком диапазоне их размеров, вплоть до 60 тыс. пар нуклеотидов (п.н.).

Существует зависимость длины разделяемых фрагментов ДНК от концентрации агарозы в геле:

Концентрация агарозы, %	0,3	0,5	0,6	0,7	0,8
Длина фрагментов ДНК, тыс. п.н.	5–60	1–30	1–20	0,8–12	0,6–10
Концентрация агарозы, %	0,9	1,0	1,2	1,5	2,0
Длина фрагментов ДНК, тыс. п.н.	0,5–8	0,5–7	0,4–6	0,2–3	0,1–2

Заряд молекулы. Поскольку каждый из нуклеотидов молекулы ДНК несет остаток ортофосфорной кислоты со свободной гидроксильной группой, в нейтральной и особенно в слабощелочной среде молекула ДНК приобретает отрицательный заряд и способность перемещаться в электрическом поле в направлении от катода (отрицательный электрод) к аноду (положительный электрод). Электрофоретическая подвижность молекулы ДНК существенно снижается с увеличением ее длины.

Напряженность электрического поля. На скорость движения заряженных молекул ДНК в геле влияет напряженность электрического поля, определяемая напряжением постоянного электрического поля, подаваемого на электроды. Данные, приведенные на рисунке 12, свидетельствуют о наличии обратно пропорциональной зависимости между длиной пробега ДНК в геле и напряженностью электрического поля.

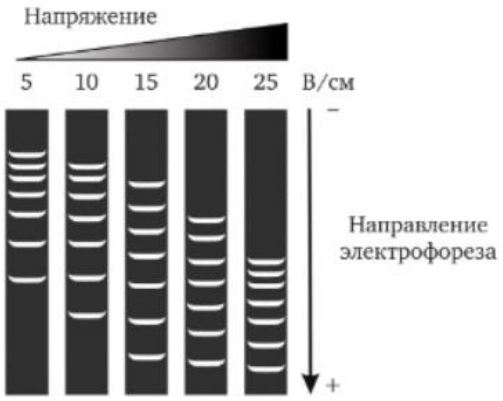


Рисунок 12 – Скорость движения линейных молекул ДНК в зависимости от величины напряженности электрического поля: светлые зоны – мигрирующие в геле молекулы ДНК разного размера

Число полученных электрофореграмм различно, поэтому разделение фрагментов ДНК для аналитических целей (только с целью детекции ДНК) с максимальным разрешением рекомендуют проводить при напряжении 10–15 В/см, а для препаративных (если ДНК будет в дальнейшем выделена из геля и использована, например, для клонирования) – при ~5 В/см.

Линейные молекулы ДНК одного размера движутся в геле с одинаковой скоростью. Однако подвижность суперспирализованных и кольцевых молекул ДНК отличается от подвижности линейных молекул того же размера. Таким образом, методом электрофореза можно фракционировать три формы молекул ДНК бактерий:

- суперспирализованную (нативная молекула, стабилизированная белками);
- кольцевую;
- линейную (расщепленная рестриктазой кольцевая молекула).

Разделение трех типов молекул ДНК в одном геле выглядит следующим образом (по подвижности от катода к аноду):

1. (-) Катод.
2. Кольцевая молекула ДНК.
3. Линейная молекула ДНК.
4. Суперспирализованная молекула ДНК.
5. (+) Анод.

При постановке электрофореза можно определить размер (молекулярную массу) только линейной ДНК. Для этого в одну из лунок геля наносят стандарт, в качестве которого используют специальные маркеры молекулярной массы (смесь фрагментов ДНК с известными значениями молекулярных масс).

Логарифм относительной молекулярной массы маркера линейно связан с его электрофоретической подвижностью Rf – величиной, равной отношению расстояний, пройденных маркером и красителем (фронтом растворителя). По калибровочному графику зависимости логарифма относительных молекулярных масс маркеров от Rf, находят относительную молекулярную массу каждого

компонента образца ДНК. Относительная молекулярная масса двухцепочечных нуклеиновых кислот измеряется в числе пар нуклеотидов, одноцепочечных – в числе нуклеотидов.

Разделение линейных молекул. Для разделения линейных двухцепочечных молекул ДНК используют гели с различной концентрацией агарозы от 0,3 до 2 % соответствующее определенному размеру молекул ДНК (Таблица 2).

Таблица 2 – Соотношение гелей с различной концентрацией агарозы и размеров, разделяемых ДНК.

% агарозы	0.3	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0	1.2	1.5	2.0
Размер ДНК тыс. п.н.	5-60	1-30	1-20	0.8-12	0.6-10	0.5-8	0.5-7	0.4-6	0.2-3	0.1-2

Нижний предел размеров ДНК определяется (в основном) диффузией полосы в геле. В гелях с низкой концентрацией агарозы фрагменты небольших размеров ДНК разделяются, но четкость разделения полос не высокая.

Верхний предел размеров ДНК находится в прямой зависимости от напряженности поля, при которой проводится электрофорез. Чем меньше напряженность поля, тем более эффективно можно разделить длинные молекулы ДНК с большей молекулярной массой.

Разделение суперскрученных и кольцевых молекул. Относительная подвижность линейных и кольцевых молекул зависит от условий электрофореза: концентрации агарозного геля в %, скорости электрофореза (например, нельзя пользоваться линейным маркером для оценки размера кольцевых молекул).

Суперскрученные молекулы ДНК имеют меньшую подвижность, поэтому для их разделения используются более высокие значения напряжения и низкое содержание агарозы в геле.

В таблице 3 приведено примерное соотношение подвижностей при умеренной (~6 В/см) скорости электрофореза (в скобках – при более быстром разгоне).

В присутствии 0.5 мкг/мл бромистого этидия разрешение релаксированной и суперскрученной ДНК увеличивается примерно в 20 раз при повышении ионной силы трис-боратного буферного раствора до 4 ТВЕ. Того же увеличения можно добиться, понижая концентрацию бромистого этидия.

Таблица 3 – Примерное соотношение подвижностей суперскрученных молекул ДНК в зависимости от концентрации агарозы в геле.

Размер суперскрученных. ДНК [тыс. п.н.]	Размер линейной ДНК [тыс. п.н.] для различных концентраций, (%) агарозного геля			
	0.7 %	1 %	1.5 %	2 %
2	1.2	1.3	1.3 (1.6)	1.5 (1.0)
3	1.7	1.8	2 (2.4)	2.9 (1.8)
4	2.2	2.3	2.7 (3.7)	-

Размер суперскрученных. ДНК [тыс. п.н.]	Размер линейной ДНК [тыс. п.н.] для различных концентраций, (%) агарозного геля			
	0.7 %	1 %	1.5 %	2 %
5	2.7	2.9	3.5 (5.5)	-
6	3.2	3.5	5 (8.5)	-
7	3.9	4.2	8.5 (>12)	-
8	4.4	5.0	>12	-
9	5.1	5.9	-	-
10	5.8	6.8	-	-
12	7	8.7	-	-

Разделение одноцепочечных ДНК. В процессе разделения на 1 % агарозном геле одноцепочечная ДНК в электрическом поле движется быстрее (примерно на 10 %), чем двухцепочечная ДНК того же размера. Однако, одноцепочечная ДНК окрашивается бромистым этидием заметно слабее, чем двухцепочечная примерно в 4–5 раз. В связи с этим, для получения одинаковой интенсивности окраски полос, необходимо использовать примерно в 5 раз больше образца одноцепочечной ДНК.

Для разделения цепей ДНК, нужно либо непосредственно перед электрофорезом прогреть испытуемые образцы примерно 1 мин при температуре 100 ^{o}C, либо добавить к образцу раствор натрия гидроксида до получения концентрации 0,1 М раствора и выдержать примерно 5–10 мин при комнатной температуре или при температуре 37 ^{o}C.

Для контроля скорости движения ДНК в геле, а также для определения времени окончания процесса электрофореза применяют краску-лидер (специальный краситель, например, **бромфеноловый синий**), которая перемещается в геле, немного опережая макромолекулы ДНК, двигающиеся в процессе электрофореза.

Для визуализации результатов электрофореза используют краситель бромид этидия, который вносят в процессе приготовления геля. Данное вещество встраивается (интеркалирует) в молекулы ДНК плоскими ароматическими группами. После окончания электрофореза, продолжающегося от 10 мин до 1 ч, гель помещают на светофильтр трансиллюминатора, пропускающего свет в диапазоне 254–400 нм. Краситель начинает флуоресцировать в оранжево-красной области видимого спектра (590 нм), при этом становится видна ДНК.

Внимание! Используемый в качестве красителя бромид этидия является мутагенным веществом. При работе с ним необходимо использовать резиновые или латексные перчатки.

Методы вертикального и горизонтального электрофореза принципиально сходны, однако в последнем случае вместо агарозного используют полиакриламидный гель (ПААГ) и процесс электрофореза проходит вертикально. Электрофорез в ПААГ характеризуется высокой разрешающей способностью. Кроме того, акриламид является токсичным веществом. Приготовить ПААГ значи-

тельно сложнее, чем агарозный гель. В связи с этим в работе с ДНК преимущественно используют метод горизонтального электрофореза в агарозном геле.

Цель работы. Ознакомиться с методом горизонтального электрофореза ДНК в агарозном геле.

Оборудование и материалы.

1. Прибор для горизонтального электрофореза.
2. Источник постоянного тока.
3. Электрическая плитка или СВЧ-печь.
4. Гель-документирующая видеосистема.
5. Автоматические дозаторы переменного объема с наконечниками.
6. Колба мерная вместимостью 1 л.
7. Колба коническая вместимостью 0,5 л.
8. Цилиндр мерный вместимостью 250 мл.
9. Кристаллизатор.
10. Реагенты для электрофореза: смесь для приготовления электродного ТВЕ-буфера (Трис-борат-ЭДТЛ), агароза, раствор бромида этидия; раствор краски лидера (бромфеноловый синий).
11 Проба исследуемой плазмидной ДНК.
12. ДНК-маркер молекулярный масс.
13. Перчатки резиновые или латексные неопудренные.
14. Теплоизолирующая рукавица
15. Вода дистиллированная.

Ход работы.

Приготовление рабочего буферного раствора для электрофореза. Навески реагентов или готовую смесь для приготовления 1х электродного ТВЕ-буфера (трис-борат-ЭДТА) буфера, состоящую из 10,8 г основания трис и 5,5 г борной кислоты полностью переносят в мерную колбу, растворяют в 900 мл дистиллированной воды, прибавляют 20 мл 0,5 М ЭДТА (pH 8,0) и доводят объем полученного раствора до 1 л дистиллированной водой.

Подготовка камеры для электрофореза к работе. Пользуясь встроенными уровнями и винтовыми ножками, камеру устанавливают строго горизонтально, наливают в нее буфер для электрофореза. Для формирования гелевой пластины собирают кювету, в нее помещают аппликатор (гребенку) для формирования лунок в толще геля (Рисунок 13). Регулируемую высоту аппликатора выставляют таким образом, чтобы расстояние от дна кюветы до каждого из зубцов составляло 1–2 мм. В зависимости от числа анализируемых проб одновременно можно установить одну, две или три гребенки.

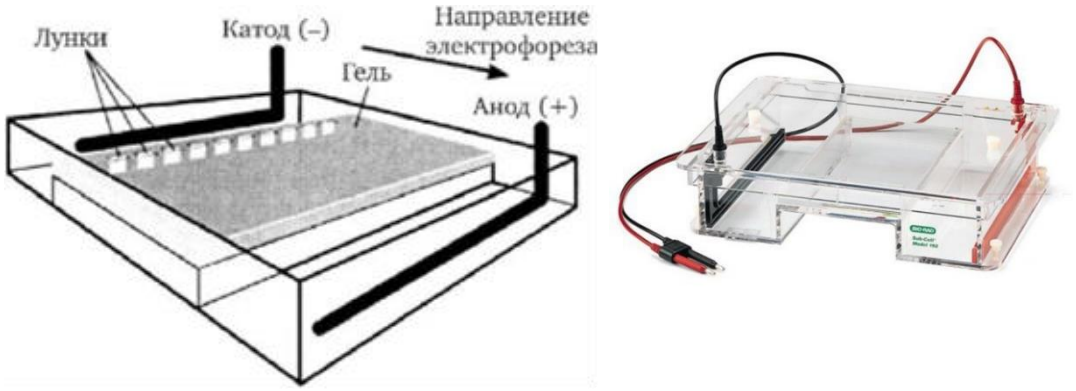


Рисунок 13 – Электрофорезная камера с агарозным гелем

Приготовление агарозного геля. Навеску агарозы, необходимую для приготовления 1%-ного геля (1,5 г), полностью переносят в коническую стеклянную колбу вместимостью 250–500 мл, добавляют 150 мл рабочего раствора буфера для электрофореза и перемешивают. Суспензию агарозы в колбе доводят до кипения в СВЧ-печи или на электроплитке, периодически помешивая (колбу держать, только надев на руку теплоизолирующую рукавицу). Продолжают нагревание до тех пор, пока содержимое колбы не станет совершенно прозрачным (обычно еще 1 мин). Расплав охлаждают до температуры 55–60 °С, добавляют 10 мкл раствора бромида этидия, перемешивают (работу проводят в латексных или резиновых перчатках) и налипают на столик для заливки геля (см. описание к прибору для электрофореза), не допуская образования воздушных пузырьков, так, чтобы толщина слоя была не менее 5 мм, а зубцы гребенок были погружены в гель не менее чем на 4 мм. Гель полностью застывает через 15–20 мин. Столик с готовым агарозным гелем и гребенками переносят в камеру для электрофореза, в которую наливают рабочий раствор буфера для электрофореза так, чтобы покрыть гелевую пластину слоем в 2–3 мм. Извлекают гребенки из агарозного геля легким и плавным движением вверх, стараясь не повредить образовавшиеся лунки.

Проведение электрофореза. В лунки застывшего агарозного геля (под слой буфера!) осторожно вносят по 3 мкл раствора исследуемых образцов ДНК. В соседнюю лунку геля вносят 3 мкл маркера молекулярных масс фрагментов ДНК. В одну или две (по краям пластины геля) свободные лунки вносят 2–3 мкл краски-лидера. Закрывают крышку прибора для электрофореза и подключают его к источнику постоянного тока, строго соблюдая полярность электродов и учитывая, что движение фрагментов ДНК происходит в направлении от катода к аноду (от «минуса» к «плюсу»). Молекулы ДНК одинакового размера (и одинакового заряда) движутся единым фронтом, образуя в геле дискретные невидимые полосы. Чем меньше размер молекул, тем быстрее они движутся от катода (-) к аноду (+). Постепенно исходный образец ДНК, состоящий из разных макромолекул, разделяется на зоны, распределенные по длине пластинки.

Процесс электрофореза отслеживают по перемещению в геле красителя – заряженного низкомолекулярного вещества, которое вносят в каждую лунку

перед началом электрофореза. На вольтметре источника постоянною тока устанавливают напряжение 120–150 В. В таком режиме процесс электрофореза продолжают около 30 мин, ориентируясь на фронт пробега краски-лидера (приблизительно на 3 см).

По окончании электрофореза источник напряжения отключают, снимают крышку прибора, пластину агарозного геля осторожно переносят на светофильтр (просмотровый столик) УФ-трансиллюминатора для детекции (работу проводят в перчатках). Включают трансиллюминатор. Зоны ДНК, окрашенные бромидом этидия, светятся при УФ-облучении.

Внимание! Во избежание повреждения сетчатки глаз ультрафиолетовым излучением наблюдать зоны ДНК следует только через защитное стекло из комплектна трансиллюминатора или защитные (стеклянные) очки.

Полученные результаты регистрируют визуально или с использованием гель-документирующей видеосистемы, пользуясь инструкцией к ней. Если образец представляет собой дискретный набор макромолекул разного размера, то после проведения электрофореза образуются четкие полосы, расположенные на пластинке одна под другой в соответствии с их размером.

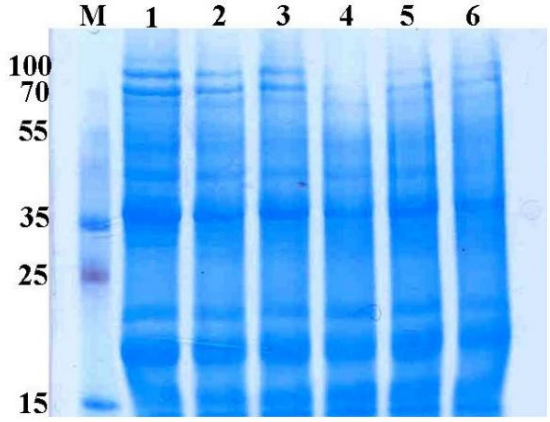


Рисунок 1 – Электрофореграмма образцов соевого шрота

М – белковый маркер; 1 – исходный соевый шрот; образцы, экструдированные при температурах: 2 – 120°С; 3 – 130°С; 4 – 140°С; 5 – 150°С; 6 – 160°С

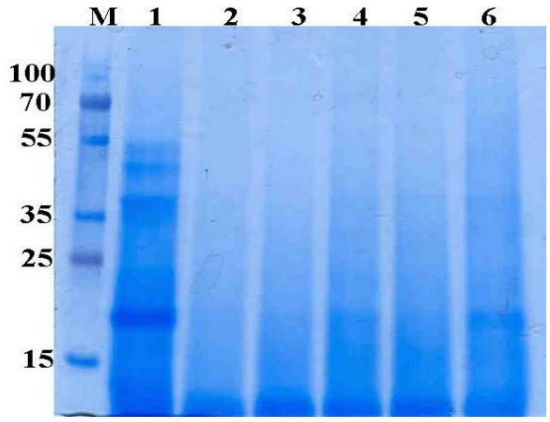


Рисунок 2 – Электрофореграмма гидролизатов соевого шрота и его экструдатов

М – белковый маркер; 1 – исходный шрот; образцы, экструдированные полученные при температуре: 2 – 120°С, 3 – 130°С, 4 – 140°С, 5 – 150°С; 6 – 160°С

Рисунок 14 – Электрофореграммы различных образцов

Задания.

1. Поместить схему или фотографию электрофореграммы в тетрадку, пронумеровать дорожки и сделать подписи к ним (Рисунок 15).

2. На примере электрофореграммы отварной рыбы (Рисунок 15) и таблицы 4 определить видовую принадлежность анализируемых образцов (столбец 4 и 7).

Строка 1 – набор стандартных белков для градуировки;

Строка 2 – референс-образец горбуши отварной;

Строка 3 – референс-образец горбуши-сырца;

Строка 5 – референс-образец семги отварной;

Строка 6 – референс-образец семги-сырца.

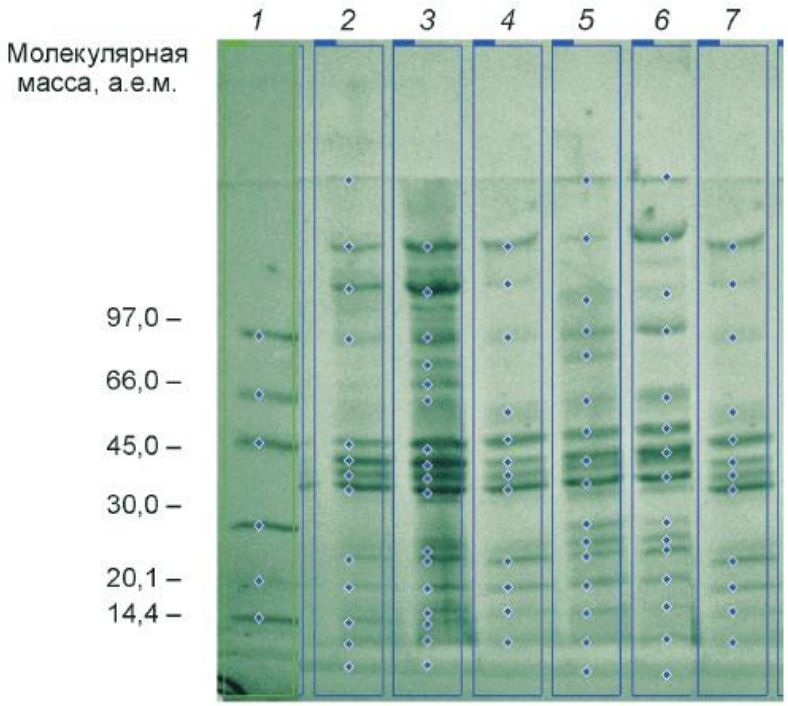


Рисунок 15 – Электрофореграмма отварной рыбы

Таблица 4 – Молекулярная масса ММ маркерных белков анализируемого образца и референс-образцов в а.е.м.

Анализируемый образец			Референс-образцы			
1-я проба	2-я проба	Среднее значение ММ	из горбуши		из семги	
			отварной	сырца	отварной	сырца
-	-	-	-	-	50,53	51,60
41,39	41,29	41,34	41,54	41,83	44,08	44,39
38,08	38,00	38,04	37,29	38,03	36,14	36,68
34,67	34,70	34,69	33,96	34,67	-	-
22,07	22,20	22,14	22,07	22,29	24,93	25,19
-	-	-	-	-	13,43	13,69

3. На примере электрофореграммы крабовой палочки (Рисунок 16) и таблицы 5 определить видовую принадлежность анализируемого образца (столбец 6).

Строка 1 – набор стандартных белков для градуировки;
Строка 2 – референс-образец рыбных палочек из налима;
Строка 3 – референс-образец рыбных палочек из камбалы;
Строки 4, 5 – референс-образец рыбных палочек из путассу.

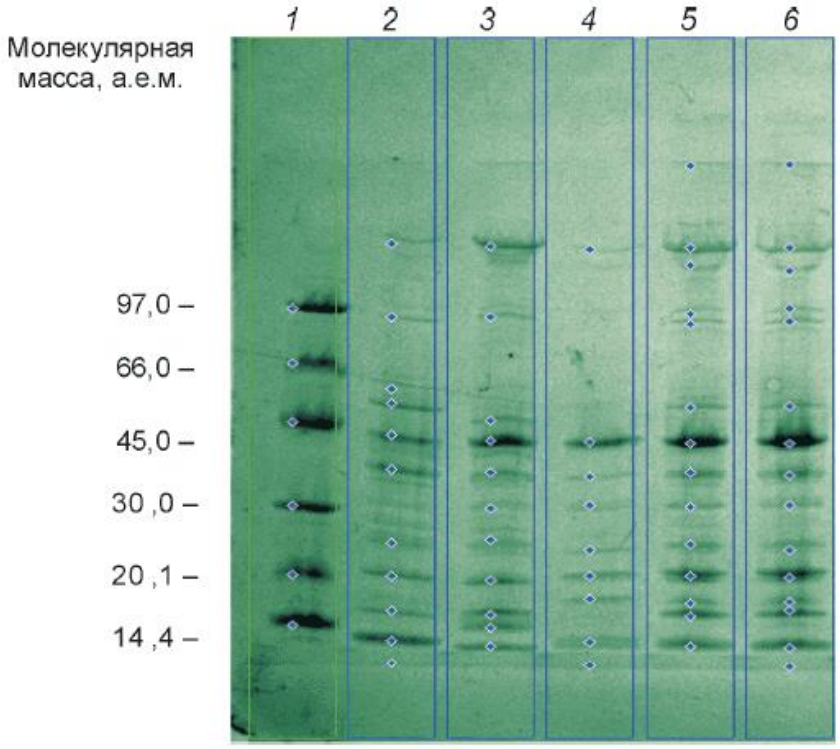


Рисунок 16 – Электрофореграмма крабовых палочек

Таблица 5 – Молекулярная масса ММ маркерных белков анализируемого образца и референс-образцов в а.е.м.

Молекулярная масса анализируемого образца			Молекулярная масса референс-образцов рыбных палочек		
1-я проба	2-я проба	среднее значение ММ	из налима	из камбалы	из путассу
247,5	247,3	247,4±0,01	643,3	239,0	249,8
141,1	141,1	141,1	149,4	138,1	141,1
82,6	82,8	82,7±0,01	87,1	90,4	86,4
50,0	49,5	49,7±0,03	48,7	55,1	49,7
39,9	39,9	39,9	40,9	47,0	39,9
33,5	33,9	33,7±0,02	34,0	34,2	33,7
27,9	27,6	27,7±0,02	28,2	28,9	27,9
22,5	22,9	22,7±0,02	23,25	25,1	22,1
19,4	19,4	19,4	-	23,1	19,3
17,0	17,2	17,1±0,01	16,0	14,5	17,2

Контрольные вопросы:

1. Какой принцип лежит н основе метода электрофореза?

2. Какая масса агарозы необходима для приготовления 150 мл 2,5%-ного геля?

3. Какой концентрации агарозный гель нужно использовать для разделения методом электрофореза фрагментов ДНК размером 350 и 150 п.н.?

4. В каком направлении и почему движутся молекулы ДНК при проведении электрофореза?

5. От каких факторов зависит скорость движения молекул ДНК в агарозном геле в процессе электрофореза?

6. Почему нужно избегать образования в геле пузырьков воздуха?

7. За счет чего происходит визуализация ДНК в геле?

8. Каким образом можно контролировать движение молекул ДНК в геле во время электрофореза?

9. На каких этапах проведения электрофореза необходимо работать в перчатках и почему?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4. «ВЫДЕЛЕНИЕ И ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ЭУКАРИОТ КЛАССИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ И С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СОРБЕНТОВ»

Выделение (экстракция) нуклеиновых кислот эукариот сопряжено с определенными трудностями, связанными с особенностями молекулярной структуры ДНК и РНК, их функциями и внутриклеточной локализацией.

Для выделения геномной ДНК эукариот необходимо: 1 – разрушить клеточные стенки; 2 – разрушить клеточную и ядерную мембраны; 3 – отделить ДНК от белков; 4 – очистить ДНК от примесей низкомолекулярных веществ.

Разрушение клеточных стенок. Основным компонентом клеточных стенок животных и растений являются полисахариды, а эти макромолекулы не только механически мешают очистке ДНК, но и обладают химическим сродством к нуклеиновым кислотам. Полисахаридная оболочка клеток весьма прочная, особенно у растений, так как она в основном состоит из целлюлозы – химически и механически стойкого полимера. Кроме полисахаридов, преимущественно у растений, в составе как клеточной стенки, так и вакуолей имеются легко полимеризующиеся (в данном случае осмоляющиеся) в присутствии окислителей (в частности, кислорода воздуха) соединения, такие как смоляные кислоты, фенолы, танины. Особенно высокого уровня содержание таких соединений достигает в коре ряда древесных (хвойные, косточковые) и у некоторых травянистых видов растений, поэтому выделение ДНК в этих случаях наиболее затруднительно и требует присутствия химических антиоксидантов.

У животных клеточная стенка не обладает столь жесткой структурой и химически более стабильна, однако для экстракции ДНК и здесь имеется ряд ограничений. В частности, следует избегать использования тканей, богатых липидами, так как экстракт ДНК – водный раствор, поэтому липиды (жиры) будут мешать ее растворению. Следует избегать экстракции ДНК из ногтей, когтей, волос и половых клеток (особенно икринок и яиц), в которых удельное содержание ДНК очень низкое. Кроме того, на покровах тела животных и на наружных тканях растений весьма высока вероятность присутствия посторонней ДНК, принадлежащей, например, микроорганизмам, водорослям, грибам, мелким животным или их сообществам, постоянно обитающим или случайно попавшим на данный организм. Поэтому для выделения ДНК следует использовать только специально обработанные стерильные ткани или ткани, извлеченные из основной массы экспериментального материала с помощью стерильных инструментов. Иногда в подобных случаях можно захватить чужеродную ДНК эндопаразитов. Если имеются основания для подобных подозрений, фрагменты используемых для экстракции ДНК тканей следует подвергнуть микроскопированию, чтобы убедиться в отсутствии в них эндопаразитов.

Для разрушения клеточных стенок при выделении ДНК используют преимущественно ионные детергенты, такие как додецилсульфат натрия (ДДС-Na) и смесь изомеров алкилтриметиламмоний бромида (CTAB).

Разрушение клеточной и ядерной мембран. Внутри клеток геномная

ДНК целиком сосредоточена в ядре, клеточная и ядерная мембраны полностью деградируют после обработки суспензии клеток детергентом. Именно по этой причине детергент или композиция из нескольких детергентов – обязательный компонент любого раствора для экстракции ДНК.

Отделение ДНК от белков. ДНК представлена в клетке комплексом с белками, связанными с нуклеиновой кислотой как слабыми водородными, так и сильными электростатическими и ковалентными связями. Кроме того, белки как высокомолекулярные природные полимеры при выделении ДНК часто механически «сплетаются» с ней. Некоторые белки-ферменты могут расщеплять ДНК, и при их совместной с ДНК экстракции может произойти химическая (ферментативная) деградация нуклеиновой кислоты. Поэтому получить препарат геномной ДНК совершенно без примеси белков и повреждений практически не удается, тем более что большинство способов очистки от белка основаны на их денатурации фенолом, что может нарушить целостность первичной структуры самой нуклеиновой кислоты. Для обезжиривания препаратов и освобождения их от фенола используют хлороформ.

Очистка ДНК от примесей низкомолекулярных веществ. Выделить ДНК из животных тканей значительно проще, чем из растительных, так как ее удельное содержание в животных клетках (0,25 % массы клетки, например, у млекопитающих) в среднем выше, чем в растительных (0,01–0,1 %). Кроме того, в вакуолях растительных клеток могут накапливаться химически активные вещества, способные взаимодействовать во внеклеточной среде с образованием разнообразных продуктов (отличных от уже упомянутых смол). Такие вещества, как гликоалкалоиды, танины, фенолы, ряд катионов тяжелых металлов способны ингибировать широко распространенные в практике молекулярной биологии, но весьма «прихотливые» к составу реакционной среды ферменты (рестриктазы, лигазы, ДНК-полимеразы). В таком случае использование экстрагированной ДНК становится невозможным. Поэтому очистка ДНК от низкомолекулярных соединений, которую производят путем переосаждения (перекристаллизации) нуклеиновой кислоты спиртом, является обязательным этапом (или несколькими этапами) выделения ДНК из растительных тканей.

Методы выделения ДНК условно делят на **аналитические и препаративные**, это разделение зависит от количества требуемой ДНК. Эти методы различаются величиной навесок исходного материала, объемами растворов реагентов. Экстракцию ДНК из растительных тканей предлагается проводить препаративным методом (хотя представленную методику можно успешно применять и в аналитических целях), а из животных – препаративно-аналитическим. Главное условие – строгое соблюдение исходно установленных соотношений навесок и объемов реагентов.

Препарат выделенной ДНК (учитывая вероятное присутствие в нем ферментов, способных разрушать нуклеиновые кислоты, а также особенности молекулярной структуры ДНК) рекомендуется хранить в замороженном состоянии. Причем замораживание препарата следует проводить при температуре минус 56 С и ниже, чтобы оно не сопровождалось кристаллизацией и льдообразо-

ванием, что может стать причиной разрывов нитевидных молекул ДНК. Для таких целей можно использовать специальные низкотемпературные морозильные камеры – криогенераторы, криостаты или кельвина-торы. Препарат ДНК можно хранить и в бытовой морозильной камере (минус 18 °С) при условии, что размораживание будет проводиться нечасто. Другой способ – хранение ДНК в виде осадка в неводной среде, чаще всего под 70%-ным этанолом. Спиртовой осадок ДНК компактен и практически не подвержен механическому и ферментативному разрушениям, так как подавляющее большинство ферментов неактивно в спиртовом растворе.

ЗАНЯТИЕ № 1. «ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ЖИВОТНЫХ ОРГАНИЗМОВ С ДДС-NA»

Цель занятия. Освоить один из «классических» методов выделения и очистки ДНК из животных объектов с помощью ДДС-Na.

Оборудование и материалы.

1 Термостат («водяная баня»).

2 Центрифуга до 10 000 об./мин для пробирок вместимостью 10–15 мл.

3 Фарфоровые ступки с пестиками.

4 Весы лабораторные на 0,01–10 г.

5 Пробирки центрифужные вместимостью до 15 мл с завинчивающейся крышкой.

6 Образец животных тканей массой 100 мг.

7 Жидкий азот в сосуде Дьюара.

8 1 М трис-HCl буферный раствор, pH 8,0.

9 5 М раствор NaCl*.

10 0,5 М раствор ЭДТА-Na, pH 8,0.

11 10%-ный раствор ДДС-Na.

12 ТЕ-буфер* (10 мМ трис-HCl, 1 мМ ЭДТА-Na pH 8,0*).

13 Деионизованная вода.

14 Смесь хлороформ + изоамиловый спирт (24:1), насыщенная ТЕ-буфером pH 8,0**.

15 Фенол перегнанный, насыщенный ТЕ-буфсром pH 8,0*.

16 Раствор протеиназы К (20 мг/мл, готовить на стерильной деионизованной воде)***.

17. Раствор рибонуклеазы (РНКазы) А (10 мг/мл, готовить на стерильной деионизованной воде, после растворения препарата раствор выдержать 15 мин на кипящей водяной бане для инактивации ДПКаз)*.

18 Изопропанол.

19 10 М раствор ацетата аммония.

20 96%-ный этанол.

21. 70%-ный этанол

Примечание: * хранить при температуре 2–8 °С; ** хранить в темноте при температуре 2–8 °С; *** хранить при температуре -18 °С.

Ход работы.

*Приготовление экстрагирующего буфера***.** Внимание! Использовать только свежеприготовленный раствор.

1. Смешивают отдельные компоненты экстрагирующего буфера DB (от англ, англ, *digestion buffer*) в соответствии с требуемым объемом конечного раствора, исходя из указанных пропорций (

Таблица 6).

Таблица 6 – Состав и приготовление экстрагирующего буфера DB

Компонент	Конечный объем раствора, мл				
	10	20	30	50	80
Деионизованная вода, мл	8,6	17,3	25,8	43,5	69,6
1 М трис-HCl pH 8, мл	0,1	0,2	0,3	0,5	0,8
5 М NaCl, мл	0,2	0,4	0,6	1,0	1,6
0,5 М ЭДТА-Na pH 8, мл	0,5	1,0	1,5	2,5	4
10%-ный ДДС-Na, мл	0,5	1,0	1,5	2,5	4
Раствор протеиназы К, мкл	50	100	150	250	400
Раствор РНКазы А, мкл	6	12	18	30	48

2. Полученный раствор перемешивают и используют в течение 1 ч.

Выделение и очистка ДНК.

1 Навеску тканей животных (100 мг) помещают в фарфоровую ступку, заливают жидким азотом и очень быстро растирают (не допуская оттаивания) до состояния мелкого порошка. Полностью переносят порошок в центрифужную пробирку объемом до 15 мл, добавляют 3 мл свежеприготовленного буфера DB, пробирку закрывают, содержимое перемешивают, несколько раз перевернув пробирку.

2 Пробирку инкубируют на водяной бане при 56 °С в течение 2–3 ч (или при 65 °С в течение 1 ч), периодически перемешивая содержимое.

3 По окончании инкубации в пробирку добавляют 3 мл смеси хлороформ + изоамиловый спирт и эмульгируют содержимое, переворачивая пробирку.

4 Пробирку центрифугируют 5 мин при 10 000 g. Верхнюю водную фазу полностью отбирают в чистую пробирку, не захватывая нижней фазы и твердой интерфазы. Если на поверхности водной фазы видна пленка жира (капли, хлопья), необходимо повторить п. 3 и 4.

5 В пробирку с водной фазой (раствор ДНК) добавляют 3 мл фенола, насыщенного ТЕ-буфером, эмульгируют содержимое, переворачивая пробирку. *Не затягивать эту стадию, так как возможно разрушение ДНК!.*

6 Пробирку центрифугируют 2 мин при 10 000 g**.** Верхнюю водную фазу полностью отбирают в чистую пробирку, не захватывая нижней фазы и твердой интерфазы.

7 В пробирку с водной фазой добавляют 1,5 мл фенола и 1,5 мл смеси хлороформ + изоамиловый спирт и эмульгируют содержимое, переворачивая пробирку.

8 Пробирку центрифугируют 2 мин при 10 000 *g*. Верхнюю водную фазу полностью отбирают в чистую пробирку.

9 В пробирку с водной фазой добавляют 3 мл смеси хлороформ + изоамиловый спирт, хорошо эмульгируют содержимое, переворачивая пробирку в течение 1–2 мин для полной экстракции остатков фенола.

10 Пробирку центрифугируют 2 мин при 10 000 g.

11 Повторяют п. 8–10. Верхнюю водную фазу полностью отбирают в чистую пробирку.

12 В пробирку с водной фазой добавляют 750 мкл 10 М раствора ацетата аммония, аккуратно перемешивают, затем сразу добавляют 6 мл 96%-ного этанола и снова аккуратно перемешивают, осторожно наклоняя и переворачивая пробирку. При этом из прозрачного раствора выпадает ДНК в виде осадка из белых хлопьев, так называемая «медуза». Если этого не происходит, то пробирку оставляют при минус18 °С на 1–3 ч, можно на ночь, но не более.

13 Образец центрифугируют при 10 000 g в течение 2–5 мин, в зависимости от количества выделенной ДНК.

14 Супернатант полностью удаляют, осадок промывают, ополоснув небольшим количеством (100 мкл) сначала 70%-ного, а затем дважды 96%-ного этанола.

15 Осадок высушивают в открытых пробирках при 56 °С в течение 5–7 мин.

16 К высушенному осадку добавляют 150 мкл ТЕ-буфера и оставляют растворяться в течение ночи при температуре 2–8 °С

Хранить полученный раствор ДНК *лучше при минус 18* °С, *не допуская частого размораживания, или более краткое время при 2–8 °С!*

Задания.

1 Получить препарат ДНК из ткани животного.

2 Составить описание выделения ДНК из 2 г животной ткани для препаративных целей (например, гибридизации).

Контрольные вопросы:

1 Какой детергент используют для экстракции ДНК? Каково его назначение?

2 Почему pH экстрагирующего буфера должен быть равен 8?

3 Почему пробирку с осадком ДНК необходимо переворачивать осторожно?

4 Для чего используют фенол и хлороформ?

ЗАНЯТИЕ № 2. «СТАВ-ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ РАСТЕНИЙ»

Цель занятия. Освоить классический метод выделения и очистки ДНК из растительных объектов с помощью СТАВ.

Оборудование и материалы.

1 Термостат (водяная баня).

2 Центрифуга до 5000 g для пробирок вместимостью до 15 мл.

3 Микроцентрифуга до 10 000 g для микропробирок вместимостью до 1,5 мл.

4 Термостат твердотельный для микропробирок вместимостью до 1,5 мл.

5 Фарфоровые ступки с пестиками.

6 Весы лабораторные на 0,01–10 г.

7 Пробирки центрифужные вместимостью 15 мл с завинчивающейся крышкой.

8 Микропробирки вместимостью 1,5 мл.

9 Образец свежих растительных тканей (листья, молодые побеги, кожура плодов).

10 Жидкий азот в сосуде Дьюара.

11 1 М трис-HCl буферный раствор pH 8,0*.

12 5 М раствор NaCl*.

13 0,5 М раствор ЭДТА-Na pH 8,0*.

14 р-меркаптоэтанол*.

15 СТАВ (смесь изомеров алкилтриметиламмоний бромида).

16 ТЕ-буфер* (10 мМ трис-HCl, 1 мМ ЭДТА-Na pH 8,0).

17 Деионизованная вода.

18 Смесь хлороформ + изоамиловый спирт (24:1), насыщенная ТЕ-буфером, pH 8,0**.

19 Фенол перегнанный, насыщенный ТЕ-буфером pH 8,0**.

20 Раствор РНКазы А (10 мг/мл, готовить на стерильной деионизованной воде, после растворения препарата РНКазы А раствор выдержать 15 мин на кипящей водяной бане для инактивации ДНКаз) *.

21 Изопропанол.

22 3 М раствор ацетата натрия.

23 96%-ный этанол.

24 70%-ный этанол.

Примечание: * хранить при температуре 2–8 °С; ** хранить в темноте при температуре 2–8 °С; *** хранить при температуре -18 °С.

Ход работы.

Приготовление экстрагирующего буфера (СТАВ– буфер). Внимание! Использовать только свежеприготовленный раствор.

1. Смешивают отдельные компоненты СТАВ-буфера в герметично закрывающейся посуде (например, пластиковом флаконе с завинчивающейся крыш-

кой) в соответствии с требуемым объемом конечного раствора, исходя из указанных пропорций (можно рассчитать самостоятельно) (Таблица 7).

Таблица 7 – Состав и приготовление CTAB-буфера

Компонент	Конечный объем раствора, мл				
	10	20	30	50	80
Деионизованная вода, мл	7,3	14,6	21,9	36,5	58,4
1 М трис-HCl pH 8, мл	1,0	2,0	3,0	5,0	8,0
5 М NaCl, мл	1,4	2,8	4,2	7,0	11,2
0,5 М ЭДТА-Na pH 8, мл	0,20	0,40	0,60	1,0	1,6
Р-Меркаптоэтанол, мл	0,10	0,20	0,30	0,50	0,8
CTAB, г	0,10	0,20	0,30	0,50	0,80

2. Раствор перемешивают, нагревают смесь до 65 °С на водяной бане до полного растворения CTAB, используют готовый раствор в течение 1 ч (до употребления не давать раствору остыть!).

Выделение ДНК.

1 Помещают в фарфоровую ступку 2 г свежей растительной ткани (лучше листья), заливают жидким азотом и очень быстро растирают (не допуская оттаивания) до состояния мелкого порошка.

2 Полностью переносят порошок в центрифужную пробирку вместимостью до 15 мл, добавляют 9 мл свежеприготовленного и нагретого до 65 °С CTAB-буфера, пробирку закрывают, содержимое перемешивают, несколько раз перевернув пробирку.

3 Пробирку инкубируют 60 мин при 65 °С на водяной бане, каждые 10–15 мин содержимое перемешивают, несколько раз перевернув пробирку.

4 Охлаждают пробирку 4–5 мин при комнатной температуре.

5 К гомогенату добавляют 4,5 мл смеси хлороформ + изоамиловый спирт, пробирку закрывают, содержимое перемешивают, несколько раз перевернув пробирку, до образования стойкой белесой взвеси.

6 Пробирку центрифугируют 20 мин при 5000 g (скорость вращения рассчитывают в соответствии с диаметром ротора).

7 Верхнюю водную фазу полностью отбирают в чистую центрифужную пробирку вместимостью до 15 мл.

8 Добавляют в пробирку 10 мкл раствора РНКазы А, инкубируют 40 мин при 37 °С.

9 По окончании инкубации в пробирку добавляют 6 мл изопропанола (предварительно охлажденного до минус 8 °С), содержимое очень аккуратно перемешивают, плавно переворачивая закрытую пробирку несколько раз до полного объединения фаз. В процессе перемешивания должен появиться заметный осадок ДНК в виде рыхлого комка – «медузы». Если этого не происходит, оставляют пробирку при минус 18 °С на 1–3 ч, можно на ночь (16–18 ч), но не более.

10 Осадок ДНК извлекают из пробирки, намотав его на стеклянный капилляр, и переносят в чистую микропробирку вместимостью 1,5 мл. Если намотать осадок на капилляр не удается, центрифугируют его 1 мин при 5000 g, супернатант полностью удаляют.

11 Осадок ДНК сушат на воздухе 7–10 мин, как можно более полно удалив перед этим с осадка всю жидкость.

12 Добавляют к осадку 500 мкл стерильной деионизованной воды и оставляют растворяться в течение ночи при температуре 2–8 °С.

Очистка ДНК фенолом и хлороформом.

1 К раствору ДНК добавляют 500 мкл фенола, насыщенного ТЕ-буфером (для этого раствор ДНК предварительно переносят в микропробирку вместимостью 1,5 мл, если это не сделано ранее). Пробирку несколько раз переворачивают до образования стойкой взвеси, а затем выдерживают в таком состоянии еще 1 мин.

2 Микропробирку центрифугируют 5 мин при 10 000 g, супернатант полностью переносят в чистую микропробирку, не задевая нижней фенольной фазы и твердой интерфазы.

3 Добавляют к раствору 250 мкл фенола и 250 мкл смеси хлороформ + изоамиловый спирт. Пробирку несколько раз переворачивают до образования стойкой взвеси, а затем выдерживают в таком состоянии еще 1 мин.

4 Микропробирку центрифугируют 5 мин при 10 000 g, супернатант полностью переносят в чистую микропробирку, не задевая нижней фенольной фазы и твердой интерфазы.

5 Добавляют к раствору 500 мкл смеси хлороформ + изоамиловый спирт. Пробирку несколько раз переворачивают до образования стойкой взвеси, а затем выдерживают в таком состоянии еще 1 мин.

6 Микропробирку центрифугируют 5 мин при 10 000 g, супернатант полностью переносят в чистую микропробирку, не задевая нижней фенольной фазы и твердой интерфазы.

7 Добавляют в пробирку 50 мкл 3 М раствора ацетата натрия, аккуратно перемешивают и сразу добавляют 1 мл 96%-ного этанола. Аккуратно перемешивают содержимое, плавно переворачивая пробирку несколько раз до полного объединения фаз. В процессе перемешивания должна появиться «медуза». Если этого не происходит, то оставляют пробирку при минус 18 °С на 1–3 ч, можно на ночь, но не более.

8 Микропробирку центрифугируют при 10 000 g в течение 1–3 мин, в зависимости от компактности «медузы» (чем она плотнее, тем меньше).

9 Супернатант полностью удаляют, осадок промывают, ополоснув небольшим количеством (100 мкл) сначала 70%-ного, а затем дважды 96%-ного этанола.

10 Сушат осадок в открытых пробирках при 56 °С в течение 5–7 мин.

11 Добавляют к осадку 300 мкл ТЕ-буфера и оставляют растворяться в течение ночи при температуре 2–8 °С.

Хранить полученный раствор ДНК лучше при минус 18 °С, не допуская частого размораживания, или в противном случае при 2–8 °С.

Задания.

1 Получить препарат растительной ДНК.

2 Составить описание выделения ДНК из 100 мг растительной ткани для аналитических целей (например, ПЦР).

Контрольные вопросы:

1 Чем отличаются процессы экстракции ДНК из растительных и животных тканей?

2 Почему для экстракции растительной ДНК требуется осаждение (а иногда и многократное осаждение) из раствора? В чем смысл этой процедуры?

3 Почему недопустимо многократное размораживание водного раствора ДНК в ходе хранения?

ЗАНЯТИЕ № 3. «ВЫДЕЛЕНИЕ ТОТАЛЬНОЙ РНК ПО ШЕРРЕРУ»

Этот классический метод применяют для выделения тотальной РНК из любых животных тканей, а также из клеток бактерий, например, кишечной палочки (Escherichia coli). Принцип метода заключается в том, что при обработке ткани водонасыщенным фенолом, содержащим 0,5%-ный раствор додецилсульфата натрия, в водную фазу при 4 °С переходят и ДНК, и РНК. Однако при нагревании до 50–60 °С ДНК остается в связанном состоянии и в водную фазу переходит только РНК.

Цель занятия. Ознакомиться с классическим методом выделения тотальной РНК по Шерреру.

Оборудование и материалы.

1 Центрифуга рефрижераторная до 4500 g.

2 Гомогенизатор.

3 Термостат (водяная баня).

4 Шприц стеклянный вместимостью 50 мл.

5 Воронка Бюхнера диаметром 65 мм.

6 Ступка фарфоровая.

7 Колба коническая вместимостью 200 мл.

8 2%-ный раствор NaOH.

9 0,2%-ный раствор додецилсульфата натрия.

10 96%-ный этанол.

11 0,5 н. хлорная кислота.

12 Фенол свежеперегнанный водонасыщенный.

13 Поливинилсульфат.

14 0,01 М ацетатный буфер pH 5.2 (смешивают 10,5 мл 0,02 М раствора уксусной кислоты и 39,5 мл 0,02 М раствора ацетата натрия и доводят объем водой до 100 мл).

15 Хлорид магния.

16 Реактив для растворения РНК: 0,05 М NaCl, 0,01 М ацетат натрия, 0,0001 М $MgCl_2$.

17 Жидкий азот.

18. Лед.

19. Свежая ткань животного.

Ход работы.

1 Ткань животного предварительно промывают для инактивации поверхностных нуклеаз сначала 2%-ным водным раствором гидроксида натрия, затем 0,2%-ным раствором ДДС-Na и, наконец, дистиллированной водой. Эту операцию проводят на воронке Бюхнера: на 1 г ткани берут по 50 мл указанных растворов.

2 В фарфоровую ступку помещают 1 г промытой ткани, измельчают с жидким азотом в тонкий порошок, после чего растирают в ступке с 10 мл 0,01 М ацетатного буфера (pH 5,2), содержащего 0,1 мМ $MgCl_2$, 0,5%-ный ДДС-Na и 2 мкг/мл поливинилсульфата (ингибитор активных РНКаз), в течение 30 мин при повторном замораживании и оттаивании. Если нет жидкого азота, то ткань предварительно измельчают в гомогенизаторе, затем переносят в фарфоровую ступку, охлажденную льдом, и проводят растирание, как описано выше.

3 Полученную вязкую суспензию переносят в стакан, прибавляют 10 мл свежеперегнанного водонасыщенного горячего фенола (60 °С) и взбалтывают в течение 3 мин на водяной бане при 60 °С.

4 Смесь охлаждают во льду и центрифугируют при 4500 g и температуре 4 °С в течение 30 мин. В результате центрифугирования образуется три слоя: верхний водный, промежуточный, нижний фенольный.

5 Водный слой осторожно отсасывают шприцем в колбу и дважды обрабатывают водонасыщенным фенолом, предварительно нагретым до 60 °С, проводя каждый раз быстрое охлаждение и центрифугирование при 4500 g и температуре 4 °С в течение 30 мин. После каждого центрифугирования водный слой отбирают и обрабатывают далее, а фенольный отбрасывают.

6 Для осаждения РНК к водному слою добавляют два объема 96%-ного этанола. Осадок РНК формируется в течение нескольких часов при 0 °С.

7 Осадок отделяют центрифугированием в течение 10 мин при 4500 g и температуре 0 °С, спирт отбирают, а осадок РНК растворяют в 5 мл 0,05 М раствора хлорида натрия, содержащего 0,01 мМ ацетата натрия и 0,1 мМ хлорида магния.

8 Из полученного раствора PI HC снова осаждают двумя объемами 96%-ного этанола. Осадок РНК выпадает за 1,5–2 ч при температуре минус 10 ^{0}С.

9 Осадок РНК либо хранят под спиртом, либо отделяют центрифугированием, спирт отбрасывают, а осадок снова растворяют в 5 мл раствора, содержащего хлорид натрия, ацетат натрия и хлорид магния, и хранят в холодильнике без замораживания.

Задание.

Получить препарат тотальной РНК из ткани животного.

Контрольные вопросы

1 Какой принцип лежит в основе метода выделения тотальной РНК по Шерреру?

2 Что обеспечивает инактивацию РНКаз и сохранность РНК при выделении ее данным методом?

ЗАНЯТИЕ № 4. «ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ СООТНОШЕНИЙ РАБОСОМАЛЬНЫХ И ТРАНСПОРТНЫХ РНК МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ»

Для фракционирования тотальной РНК используют методы ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы, колоночную хроматографию и электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ).

Особого внимания из перечисленных методов заслуживает метод электрофореза в ПААГ. Преимущество этого метода состоит в том, что можно контролировать величину пор синтетического геля и одновременно проводить анализ большого количества образцов. Для фракционирования РНК используют гель с низкой концентрацией акриламида (1,8–3,5 %). Электрофорез в ПААГ с концентрацией акриламида 2,4 % позволяет разделить суммарную РНК на три фракции: две высокомолекулярные и одну низкомолекулярную. Наиболее прост в исполнении диск-электрофорез РНК на колонках ПААГ.

Цель занятия. Научиться фракционировать РНК и определять содержание различных РНК.

Оборудование и материалы.

1 Спектрофотометр.

2 Микрофотометр.

3 Источник питания для электрофореза.

4 Прибор для вертикального электрофореза.

5 Термостат (водяная баня).

6 Шприц стеклянный вместимостью 50 мл.

7 Трубки стеклянные с внутренним диаметром 0,5–0,6 см.

8 Колбы мерные вместимостью 100 и 1000 мл.

9 Автоматические дозаторы переменного объема с наконечниками.

10 Препарат РНК, выделенный по методу Шеррера.

11 Цианогум-41 (или акриламид и N,N'-метилен-бис-акриламид).

12 Тетраметилэтилендиамин (ТЕМЭД).

13 10%-ный раствор персульфата аммония.

14 40%-ный раствор сахарозы.

15 0,25%-ный раствор бром фенолового синего.

16 трис-ацетатный буфер pH 7,8 (0,12 М трис, 0,06 М ацетат натрия, 0,003 М ЭДТА-Na, pH довести до 7,8 ледяной уксусной кислотой, для чего потребуется около 6 мл этого реактива).

17 0,5 М хлорная кислота.
18 1 М уксусная кислота.
19 0,2%-ный раствор метиленового синего и 0,4 М ацетатном буфере.

Ход работы.

Приготовление геля. Для этой цели используют цианогум-41, представляющий собой смесь 95%-ного акриламида и 5%-ного N,N'-метилен-бис-акриламида. Фракционирование суммарной РНК, выделенной по методу Шеррера, проводят методом электрофореза в полиакриламидном геле с концентрацией акриламида 2,4 %. К 2,53 г цианогума-41 (или к 2,4 г акриламида и 0,13 г N,N'-метилен-бис-акриламида) добавляют 33,3 мл трис-ацетатного буфера (pH 7,8), 50 мл дистиллированной воды и 0,08 мл ТЕМЭД. Смесь тщательно перемешивают, добавляют (1,8 мл 10%-ного раствора персульфата аммония, доливают воду до метки (100 мл), еще раз хорошо перемешивают и заполняют этим раствором стеклянные трубки для электрофореза с внутренним диаметром 0,5–0,6 см и длиной 7–8 см. Процесс полимеризации проводят без доступа кислорода, для чего после добавления в колонку полимеризуемой смеси наслаивают на нее буферный раствор. Перед заполнением электрофоретической камеры трис-ацетатный буферный раствор (pH 7,8) разбавляют дистиллированной водой в соотношении 1:2.

Нанесение образца РНК на гель. После полной полимеризации геля на его поверхность наслаивают 0,01–0,05 мл раствора, содержащего 30–60 миг РНК, 40%-ный раствор сахарозы (конечная концентрация 20 %) и 0,01 мл 25%-ного водного раствора бромфенолового синего. Сахароза повышает плотность раствора РНК, вносимого в колонку, по отношению к плотности буфера, и обеспечивает надежный контакт испытуемого образца с поверхностью геля.

Концентрацию РНК в испытуемой смеси определяют следующим образом: к 0,1 мл раствора, содержащего РНК, добавляют 5 мл 0,5 н. раствора хлорной кислоты и проводят гидролиз на кипящей водяной бане п течение 20 мин, затем измеряют оптическую плотность гидролизата на спектрофотометре при 270 и 290 нм. Концентрацию РНК, мкг/мл, определяют по формуле

$$C_{\text{мкг/мл}} = \frac{(A_{270} - A_{290}) * 10{,}5}{0{,}19},$$

где А – оптическая плотность при соответствующей длине волны; 10,5 – коэффициент пересчета, выведенный на основании теоретического расчета содержания фосфора в РНК; 0,19 – коэффициент, соответствующий содержанию 1 мкг РНК в 1 л раствора, полученный при замере на спектрофотометре содержания фосфора нуклеиновых кислот указанной концентрации.

Проведение электрофореза и обнаружение РНК. Электрофорез проводят при силе тока 5 мА на колонку и температуре 0–3 °С в течение 60 мин. После его окончания гели извлекают из трубок, фиксируют и окрашивают. Фиксацию проводят 1 М раствором уксусной кислоты в течение 15 мин, а окрашивание – 0,2%-ным раствором метиленового синего в 0,4 М ацетатном буфере (pH 4,7) в

течение 4 ч. Краситель с той части колонки, которая не содержала нуклеиновых кислот, многократно отмывают водой в течение 8–12 ч.

Полученные электрофореграммы фотографируют и денситометрируют (Рисунок 17). Площадь пика, соответствующую каждой фракции РНК, рассчитывают по формуле

$$A = \frac{lgh * a}{2},$$

где А – содержание фракции РНК, условные единицы; lg h – десятичный логарифм высоты пика; а – основание пика, мм.

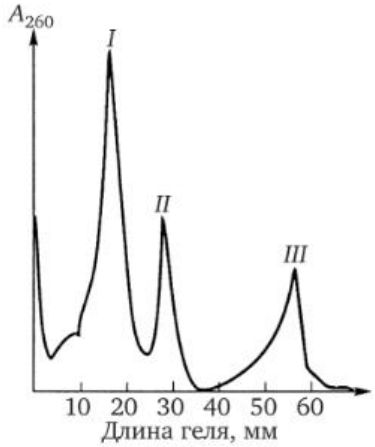


Рисунок 17 – Денситограмма, полученная с электрофореграммы РНК, выделенной из диапаузирующей грены (яиц) тутового шелкопряда (2,4 %-ный полиакриламидный гель, трис-ацетатный буфер, pH 7,8):
I– 26S РНК; II – 19S РНК; III – 4S РНК

Суммируя величины А, полученные для всех фракций, находят общее содержание РНК в условных единицах и рассчитывают далее процентное содержание каждой фракции РНК. Зная количество РНК в образце, нанесенном на колонку, вычисляют содержание каждой фракции РНК (Таблица 8).

Таблица 8 – Характеристика электрофоретических фракций РНК из животных тканей

Номер фракции	Вид РНК	h	Igh	a	A	Содержание каждой фракции РНК, % общей РНК
I	рРНК	154	2,1875	31	33,91	52,03
II	рРНК	112	2,0492	17	17,42	26,73
III	тРНК	70	1,8451	15	13,84	21,24
Всего					65,17	100

Задания.

1 Провести фракционирование тотальной РНК методом электрофореза D 11ЛЛГ.

2 Рассчитать содержание каждой фракции РНК (%).

ЗАНЯТИЕ № 5. «ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНСТАНТЫ СЕДИМЕНТАЦИИ РНК МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ»

В результате широкого применения электрофореза в ПЛАГ для фракционирования белков и нуклеиновых кислот установлено, что электрофоретическая подвижность биополимеров обратно пропорциональна константе седиментации, а, следовательно, и относительной молекулярной массе. Если в исследуемом образце имеется компонент с известной относительной молекулярной массой (или константой седиментации), то можно рассчитать значения указанных величин для других компонентов. В качестве образцов РНК с известной константой седиментации используют рибосомальные РНК, выделенные из кишечной палочки E. coli (соответственно 23S и 16S) или из печени крысы (соответственно 28S и 18S).

Цель занятия. Научиться определять константу седиментации (или относительной молекулярной массы) РНК методом электрофореза в полиакриламидном геле.

Ход работы.

На три колонки с ПААГ наносят 0,01–0,05 мл раствора, содержащего 30–60 мкг РНК, выделенной из анализируемой ткани животного или клеток бактерий, на две другие – столько же РНК из печени крысы и РНК из E. coli. Колонки помещают в общий электрофоретический блок и проводят электрофорез. Условия проведения электрофореза и обработки колонок с полиакриламидным гелем аналогичны тем, что указаны в занятии № 4.

Задания.

1 Определить относительную электрофоретическую подвижность каждой фракции РНК по отношению к краске-лидеру.

2 На основании полученных данных построить график зависимости электрофоретической подвижности от константы седиментации для фракции РНК печени крысы и E. coli. Для этого по оси ординат отложить величины константы седиментации (28S и 18S, 23S и 16S) или значения относительной молекулярной массы РНК, по оси абсцисс – их относительную электрофоретическую подвижность.

3 По величине электрофоретической подвижности высокомолекулярных фракций РНК анализируемой ткани определить константы седиментации этих фракций или значения относительных молекулярных масс.

ЗАНЯТИЕ № 6. «ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СОРБЕНТОВ»

В настоящее время наряду с классическими методами широкое применение нашли методы выделения нуклеиновых кислот, использующие принцип их сорбции – десорбции в процессе выделения и очистки. ДНК или РНК, полученные в результате клеточного лизиса, связываются с сорбентом и в таком состоянии проходят все стадии очистки, а затем в результате элюции переходят в

раствор. В качестве сорбента широко применяют частицы $Si0_2$, а в ряде случаев – частицы железа, покрытые слоем $Si0_2$.

Производится целый ряд коммерческих наборов реагентов для выделения нуклеиновых кислот методом сорбции. Использование таких наборов обеспечивает минимальные потери и высокое качество выделенной нуклеиновой кислоты при минимальных затратах времени и позволяет исключить из процесса вредные для здоровья человека вещества (все компоненты наборов в применяемых концентрациях нетоксичны) и стандартизировать выход ДНК.

Производителей таких наборов несколько, среди них есть зарубежные (например, компании Promega, Thermo Fisher Scientific и др.) и отечественные («Интерлабсервис», «Силекс-М» и др.), причем каждый из них предлагает целую линейку наборов для разных целей, таких как выделение геномной ДНК животных, митохондриальной ДНК, ДНК микроорганизмов, ДНК растений из пищевых продуктов и т. д. В зависимости от процедуры выделения наборы также различаются: одни предназначены для ручного выделения ДНК, другие – для роботизированного посредством автоматических процессоров магнитных частиц (в этом случае используются частицы железа, покрытые $Si0_2$ или другим сорбентом).

Тем не менее в основе протокола выделения и очистки ДНК или РНК такими наборами лежат очень похожие процедуры. В первую очередь это лизис клеток, механический при встряхивании образца с мельчайшими бусинами из инертного материала (стекло, нержавеющая сталь и пр.), химический при использовании гуанидин тиоцианата или других солей гуанидина, ферментативный при участии гидролитических ферментов (протеиназы, амилазы, РНКазы или ДНКазы, в зависимости от назначения). Следующий этап – сорбция, прямая, когда сорбент связывает нуклеиновую кислоту, или обратная, когда сорбент извлекает молекулы белков и полисахаридов, загрязняющие препарат нуклеиновой кислоты, а сама она осаждается изопропанолом или этанолом. Следующий этап – промывка сорбента или при обратной сорбции – осадка нуклеиновой кислоты, и наконец последний – перевод ее в раствор деионизованной воды, ТЕ-буфера или другой подходящий для конкретных задач буфер.

Манипуляции с сорбентом практически всегда осуществляются в небольших объемах, поэтому подобные методы выделения и очистки нуклеиновых кислот могут считаться только аналитическими, однако при необходимости обрабатывать большое количество различных образцов и становлении процедуры получения препаратов ДНК рутинным этапом серийного анализа коммерческие наборы реагентов становятся просто незаменимыми.

Цель работы. Освоить методы выделения нуклеиновых кислот с использованием сорбентов.

Оборудование и материалы.

1 Термостат твердотельный для микропробирок до 65 °С.

2 Микроцентрифуга высоскоростная до 10 000 g.

3 Микроцентрифуга-вортекс для микропробирок.

4 Автоматические дозаторы переменного объема с наконечниками.

5 Микропробирки вместимостью 1,5 мл.

6 Цилиндр мерный вместимостью 200–500 мл.

7 Пестик-гомогенизатор для микропробирок вместимостью 1,5 мл.

8 Перчатки латексные неопудренные.

9 96%-ный этанол.

10 Вода дистиллированная.

11 Образец свежей животной или растительной ткани для выделения ДНК и РНК.

12 Набор реагентов Diatom DNA Prep 100, включающий: Lysis reagent (лизирующий реагент), Saline buffer (10x солевой буфер), NucleoS (суспензия сорбента), ExtraGeneE (ОкстраГен Е, суспензия смеси ионообменников) или аналогичный.

13 Набор реагентов Diatom RNA Prep 100, включающий: RNA Lysis Reagent (лизирующий реагент), ExtraGeneE (ЭкстраГен Е), суспензия смеси ионообменников, NucleoS. (суспензия сорбента для РНК), Saline buffer (5x солевой буфер) или аналогичный.

Внимание! *При использовании аналогичного набора реагентов для выделения и очистки нуклеиновых кислот необходимо пользованная инструкцией производи теля, предложенная ниже пропись относится только к вышеназванным наборам.*

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАБОРА DIATOM DNA PREP 100

Набор реагентов Diatom DNA Prep 100 эффективен для выделения высокомолекулярной геномной ДНК (40–50 тыс. п.н.) как прокариот, так и эукариот и обеспечивает высокую чистоту выделенной ДНК. Потери ДНК при выделении не превышают 20 %. Очищенная ДНК может быть использована в дальнейшем для любых молекулярно-биологических исследований (например, амплификации методом ПЦР).

Ход работы.

1 Содержимое флакона с концентратом солевого буфера полностью переносят в мерный цилиндр, доводят объем раствора до 100 мл дистиллированной водой, а затем до 300 мл 96%-ным этанолом и перемешивают. *Хранить рабочий раствор солевого буфера следует в плотно закрытой емкости при температуре 2–8 °С.*

2 Вносят исследуемую пробу (образец свежей животной или растительной ткани) в микропробирку вместимостью 1,5 мл.

3 Добавляют в пробирку 400 мкл лизирующего реагента, гомогенизируют пробу с помощью пестика-гомогенизатора до однородного состояния.

Внимание! *Долгое хранение лизирующего реагента при температуре 2–8 °С может привести к кристаллизации, в этом случае перед использованием его необходимо подогреть на водяной бане или в термостате (50–60 °С) и перемешать до полного растворения осадка.*

4 Инкубируют пробу в термостате 40–60 мин при 65 °С.

5 По окончании инкубации содержимое пробирки встряхивают на вортексе.

Внимание! *Если содержимое пробирки полностью затвердело во время инкубации в термостате (например, если выделение ДНК производилось из муки или других высококрахмалистых продуктов), в эту же пробирку необходимо добавить еще 200 мкл лизирующего реагента и тщательно встряхнуть на вортексе.*

6 Центрифугируют пробирку 10 мин при 10 000 g. Надосадочную жидкость, не задевая осадка, полностью отбирают с помощью автоматического дозатора и переносят в чистую пробирку.

7 Добавляют в пробирку 20 мкл суспензии сорбента. Перед использованием сорбент следует суспендировать на вортексе до исчезновения осадка.

8 Содержимое пробирки встряхивают на вортексе и выдерживают 7–10 мин, периодически перемешивая содержимое переворачиванием плотно закрытой пробирки 5–6 раз.

9 Центрифугируют 1 мин при 5000 g.

10 Надосадочную жидкость удаляют при помощи автоматического дозатора или декантацией.

11 К осадку добавляют 200 мкл лизирующего реагента, содержимое пробирки встряхивают на вортексе до полного суспендирования осадка.

12 Добавляют в пробирку 800 мкл рабочего раствора солевого буфера, содержимое перемешивают, переворачивая пробирку 5–6 раз.

13 Центрифугируют 10–20 сек при 2000 g.

14 Надосадочную жидкость удаляют при помощи автоматического дозатора или декантацией.

15 К осадку добавляют 1 мл рабочего раствора солевого буфера, содержимое пробирки встряхивают на вортексе до полного суспендирования осадка.

16 Центрифугируют 10–20 сек при 2000 g.

17 Надосадочную жидкость удаляют при помощи автоматического дозатора или декантацией.

18 Повторяют операции, изложенные в п. 15–17.

Внимание! *В последний раз надосадочную жидкость необходимо удалить как можно более полно, не задевая при этом осадка.*

19 Осадок сушат 5–7 мин при 65 °С.

20 К высушенному осадку добавляют 75 мкл ЭкстраГена Е.

Внимание! *Перед использованием ЭкстраГен Е необходимо полностью суспендировать, переворачивая плотно закрытый флакон 5–6 раз.*

21 Встряхивают содержимое пробирки на вортексе до полного суспендирования осадка.

22 Выдерживают пробирку 10 мин при 65 °С, содержимое пробирки еще раз встряхивают на вортексе.

23 Центрифугируют пробирку 1 мин при 10 000 g.

24 Надосадочную жидкость (экстракт ДНК) целиком переносят в чистую пробирку, ни в коем случае не задевая осадка и не допуская попадания сорбента в пробирку.

Хранить полученный раствор ДНК при минус 18 °С, а при частом использовании – при 2–8 °С.

ВЫДЕЛЕНИЕ РНК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАБОРА DIATOM RNA PREP 100

Набор реагентов Diatom RNA Prep 100 применяют для выделения тотальной РНК из клеток как прокариот, так и эукариот. Очищенная РНК может быть использована в дальнейшем для проведения реакции обратной транскрипции.

Ход работы.

1 Содержимое флакона с концентратом солевого буфера полностью переносят в мерный цилиндр, доводят объем раствора до 50 мл дистиллированной водой, а затем до 300 мл 96%-ным этанолом и перемешивают.

Хранить рабочий раствор солевого буфера следует в плотно закрытой емкости при температуре 2–8 °С.

2 Вносят исследуемую пробу (образец свежей животной или растительной ткани) в микропробирку объемом 1,5 мл.

3 Добавляют в пробирку 400 мкл лизирующего реагента и перемешивают.

4 Инкубируют пробу в течение 20 мин в термостате при 65 °С.

5 Добавляют в пробирку 20 мкл суспензии сорбента.

Перед использованием сорбент следует суспендировать на вортексе до исчезновения осадка!

6 Содержимое пробирки встряхивают на вортексе и выдерживают 7–10 мин, периодически перемешивая содержимое переворачиванием плотно закрытой пробирки 5–6 раз.

7 Добавляют в пробирку 800 мкл рабочего раствора солевого буфера, содержимое перемешивают, переворачивая пробирку 5–6 раз.

8 Центрифугируют 10–20 сек при 5000 g.

9 Надосадочную жидкость удаляют при помощи автоматического дозатора или декантацией.

10 К осадку добавляют 1 мл рабочего раствора солевого буфера, содержимое пробирки встряхивают на вортексе до полного суспендирования осадка.

11 Центрифугируют 10–20 сек при 5000 g.

12 Надосадочную жидкость удаляют при помощи автоматического дозатора или декантацией.

13 Повторяют операции, изложенные в п. 10–12.

Внимание! В последний раз надосадочную жидкость необходимо удалить как можно более полно, не задевая при этом осадка.

14 Осадок сушат 5–7 мин при 65 °С.

15 К высушенному осадку добавляют 100 мкл ЭкстраГенаЕ и суспендируют содержимое пробирки на вортексе дважды, но 5–10 сек с интервалом в 15 мин до получения гомогенной суспензии.

Внимание! Перед использованием ЭкстраГенЕ необходимо полностью суспендировать и отбирать при перемешивании.

16 Центрифугируют пробирку 1 мин при 10 000 g.

17 Надосадочную жидкость (раствор РНК) целиком переносят в чистую пробирку.

Хранить полученный раствор РНК не рекомендуется, желательно сразу использовать для ОТ!

Задания.

1 Получить препарат ДНК растительного происхождения.

2 Получить препарат РНК растительного происхождения.

Контрольные вопросы

1 Каковы основные этапы выделения и очистки нуклеиновых кислот при использовании методов сорбции?

2 Каково действие гуанидин тиоцианата?

3 С какой целью применяется солевой буфер?

4 Какова роль суспензии ионообменников?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5. «ВЫДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК ИЗ РЕКОМБИНАНТНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК»

Бактерии, помимо хромосомной ДНК, несут один или более небольших генетических элементов – плазмид, которые реплицируются независимо от хромосомной ДНК и обладают рядом специфических свойств, позволяющих использовать их в генетической инженерии. Плазмиды бактерий представляют собой двухцепочечные замкнутые кольцевые молекулы ДНК, размер которых варьирует от 1 до 200 тыс. п.н. (для сравнения – размер бактериальной хромосомы составляет около 3 млн п.н.).

Основное свойство плазмид – их способность к автономной репликации. При этом некоторые плазмиды (например, pUC, pGEM) реплицируются с образованием большого числа копий. Данный процесс осуществляется при наличии в плазмиде одного или нескольких сайтов начала репликации – *ori-сайтов*, а также генов, продукты которых принимают участие в этом процессе. Кроме того, плазмиды могут содержать гены устойчивости к антибиотикам (например, к ампициллину – ген $\boldsymbol{amp^r}$) или другие маркерные гены, что позволяет проводить их эффективный отбор по данному признаку (Рисунок 18).

Методы выделения плазмид основываются на уникальных свойствах (термостабильность, химическая устойчивость) суперспирализованных молекул ДНК. Условия подбирают таким образом, чтобы денатурировать хромосомную ДНК и РНК клеток. Для этого клеточный лизат либо кратковременно нагревают до 100 °С, либо обрабатывают щелочным раствором (pH 12,5). При последующей ренатурации в результате охлаждения или нейтрализации раствора суперспирализованная плазмидная ДНК полностью восстанавливает исходную структуру, а различные участки длинных цепей хромосомной ДНК частично ренатурируют случайным образом, образуя крупный осадок в комплексе с белками и детергентом, который осаждают последующим центрифугированием. Суперспирализованная плазмидная ДНК остается в растворе; ее обычно осаждают изопропиловым или этиловым спиртом и в случае необходимости подвергают дальнейшей очистке.

Успех выделения во многом зависит от правильного выращивания культуры клеток, содержащих плазмиды – если плазмид в клетках мало, даже самое тщательное выполнение методики не даст удовлетворительного результата. Для этого нужно представлять, что происходит с бактериальной плазмидсодержащей культурой в различных фазах ее роста. Как правило, содержание плазмид в клетке оказывается максимальным в самом начале стационарной фазы роста. При дальнейшем культивировании в популяции накапливаются бесплазмидные клетки, и выход плазмидной ДНК из таких культур снижается. В логарифмической фазе роста бесплазмидных клеток обычно нет, но число копий плазмиды на единицу биомассы меньше, кроме того, препараты, выделенные из логарифмических культур, содержат очень большое количество РНК и белка, поэтому плазмидную ДНК из таких культур всегда значительно сложнее качественно очистить. Ни в коем случае нельзя выращивать плазмидсодержащие клетки без

селекции на поддержание плазмиды – большинство плазмид в той или иной степени нестабильны и могут легко утрачиваться при снятии селекции. Наконец, на выход плазмид существенное влияние оказывает среда культивирования. Так, например, повышение концентрации хлорида натрия в стандартном LB-бульоне с 5 до 10 г/л увеличивает выход плазмидной ДНК примерно на 30 %. Еще один важный момент – выбор штамма для наработки плазмидной ДНК. Желательно выделять плазмиду из *endA* штаммов *E. coli*, дефектных по гену эндонуклеазы. Приводимая ниже методика не убирает полностью белки, в том числе и эндонуклеазы, из препарата ДНК, в результате чего ДНК, выделенная этим методом из $endA^+$ штаммов, получается низкого качества и может быстро разрушаться при хранении. Ряд других мутаций, таких как *recA*, также повышают качество плазмидной ДНК. Стабильно хорошего качества ДНК выделяется из штаммов XL1-Blue и DH5a, которые также хорошо использовать и для трансформации.

Для выделения плазмид используют клеточные культуры, как растущие в жидкой среде, содержащей соответствующий антибиотик, так и полученные наращиванием одной снятой с агара бактериальной колонии.

Для выделения плазмидной ДНК (пДНК) чаще всего используется представленный ниже щелочной метод, обладающий рядом преимуществ по сравнению с другими методами выделения пДНК: он недорогой, быстрый и позволяет получить ДНК высокого качества.

Принцип метода. В щелочных условиях происходит денатурация (разделение цепей) линейных молекул хромосомной ДНК, а кольцевые молекулы плазмидной ДНК этому процессу практически не подвергаются из-за своей компактной структуры, обусловленной суперскрученностью и малыми размерами. При нейтрализации клеточного экстракта в присутствии солей высокой концентрации происходит реассоциация одноцепочечных молекул хромосомной ДНК с образованием нерастворимых комплексов, которые выпадают в осадок. Таким образом, происходит разделение хромосомной и плазмидной ДНК. Удаление клеточной РНК и белков в процессе осаждения происходит под действием детергента (ДДС-Na) и (или) гидролитических ферментов (РНКазы, протеиназы).

Методом щелочного лизиса хорошо выделяются относительно небольшие (до 10–15 т.н.п.) плазмиды, с меньшим выходом можно выделить более крупные (до 20–30 т.н.п) плазмиды.

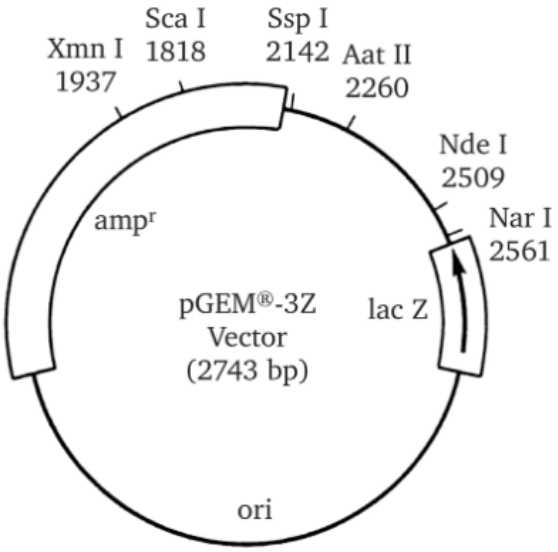


Рисунок 18 – Схема строения плазмидного вектора pGem-3Z:
Размер вектора – 2743 п.н. атр^r – ген устойчивости к ампициллину, lac Z – фрагмент лактозного оперона кишечной палочки, ori – точка начала репликации (стрелкой показано направление репликации. Штрихами обозначены сайты рестрикции различными рестриктазами)

Цель работы: Ознакомиться со щелочным методом выделения плазмидной ДНК.

Оборудование и материалы:

1. Микроцентрифуга высокоскоростная (до 10 000 g).
2. Термостат твердотельный для микропробирок вместимостью 0,5–1,5 мл.
3. Автоматические дозаторы переменного объема с наконечниками.
4. Микропробирки вместимостью 1,5 мл.
5. Термостат твердотельный с функцией охлаждения для микропробирок вместимостью до 1,5 мл.
6. Петля микробиологическая.
7. ТЕ-буфер (10 мМ трис-HCl, 1 мМ ЭДТА-Na pH 8).
8. 5 М раствор ацетата калия pH 4,8.
9. Изопропанал.
10. 70%-ный этанол.
11. ДНК плазмиды pGEM-7Zf.
12. ДНК плазмиды pGEM-3Z с концентрацией 0,2; 0,5; 1,0 мкг/мкл.
13. Для проведения электрофореза используются материалы и оборудование, представленные в предыдущих работах.

Ход работы.

1. Готовят рабочие растворы 1 и 2 для выделения плазмидной ДНК (Таблица 9 и 10).

Таблица 9 – Раствор 1 для выделения плазмидной ДНК

Запасной раствор	Рабочий раствор (1 мл)	
	требуемый объем	конечная концентрация
1 М *трис*-MCI pH 8	25 мкл	25 мМ
0.5 М ЭДТА-Na, pH 8	20 мкл	10 мМ
Вода дистиллированная	До 1 мл (0,55 мкл)	–

Таблица 10 – Раствор 2 для выделения плазмидной ДНК

Запасной раствор	Рабочий раствор (1 мл)	
	требуемый объем	конечная концентрация
1 М NaOH	0,4 мл	0,2 М
10%-ный ДДС-Na	0,2 мл	1 %
Вода	1,4 мл	–

2. Колонии клеток кишечной палочки, выращенные на твердой питательной среде (при 37 °С в течение ночи), собирают при помощи микробиологической петли с 1/8–1/10 части поверхности чашки Петри, суспендируют в 500 мкл дистиллированной воды в микропробирке вместимостью 1,5 мл.

3. Суспензию клеток центрифугируют 3 мин при 4000 g.

4. Супернатант отделяют декантацией, осадок ресуспендируют в 200 мкл раствора 1 и выдерживают 5–7 мин при комнатной температуре.

5. К клеточной суспензии прибавляют 400 мкл раствора 2 и перемешивают быстрым пятикратным переворачиванием закрытой пробирки без встряхивания (содержимое при этом должно быть вязким и прозрачным), затем пробирку выдерживают 5 мин при 0–4 °С.

6. К суспензии добавляют 200 мкл 5 М раствора ацетата калия (pH 4,8), содержимое пробирки перемешивают до формирования творожистого осадка, а затем выдерживают 5 мин при 4 °С в термостате с функцией охлаждения.

7. Содержимое пробирки центрифугируют 5 мин при 10 000 *g*.

8. Супернатант переносят в чистую микропробирку вместимостью 1,5 мл, добавляют 600 мкл изопропанола (для осаждения ДНК) и аккуратно перемешивают, плавно переворачивая плотно закрытую пробирку.

9. Полностью однородный раствор инкубируют 10–15 мин при комнатной температуре до появления беловатой хлопьевидной взвеси в толще прозрачного раствора.

10. Содержимое пробирки центрифугируют 10 мин при 10 000 *g*.

11. Супернатант полностью удаляют, а полученный осадок ДНК промывают в 100 мкл 70%-ного этанола, который затем полностью удаляют из пробирки.

12. Осадок ДНК подсушивают при 37 °С, поместив открытую пробирку в термостат на 10 мин.

13. Высушенный осадок ДНК растворяют в 100 мкл буфера ТЕ.

14. Контроль качества выделенной ДНК производят с помощью электрофореза в агарозном геле. При этом для нанесения на гель требуется 5 мкл рас-

твора полученной пДНК. В качестве контрольных образцов вносят 5 мкл образцов ДНК плазмиды pGEM-3Z (2743 п.н.) в концентрации 0,2; 0,5; 1,0 мкг/мкл, а также 5 мкл ДНК плазмиды pGF.M-7Zf (3000 п.н.)

15. Полученные результаты регистрируют визуально или с помощью гель-документирующей видеосистемы.

Задания.

Задача 1. В результате разрезания плазмиды pBR322 (длина 4361 п.н.) рестриктазой AccBSII образовались два фрагмента длиной 2560 п.н. и 1801 п.н. Определите массу фрагмента длиной 1801 п.н., если известно, что масса исходной плазмиды составляла 1000 нг.

Задача 2. Плазмида pBluescript содержит 2961 пар оснований. Эндонуклеаза рестрикции узнает сайт HaeIII распознает сайт GGCC. Предположим, что нуклеотиды в плазмиде распределены случайно, количество А=Т=Ц=Г. Сколько сайтов рестрикции в данной плазмиде могла бы иметь данная рестриктаза? Введите число предполагаемых сайтов рестрикции.

Задача 3. Плазмида содержит 4000 пар оснований. Эндонуклеаза рестрикции узнает сайт HaeIII распознает сайт GGCC. Предположим, что нуклеотиды в плазмиде распределены случайно, количество А=Т=Ц=Г. Сколько сайтов рестрикции в данной плазмиде могла бы иметь данная рестриктаза? Введите число предполагаемых сайтов рестрикции.

Задача 4. Плазмида содержит 3000 пар оснований. Эндонуклеаза рестрикции узнает сайт HaeIII распознает сайт GGCC. Предположим, что нуклеотиды в плазмиде распределены случайно, количество А=Т=Ц=Г. Сколько сайтов рестрикции в данной плазмиде теоретически имеет данная рестриктаза?

Задача 5. Исследователь пытался экспрессировать ген в бактериальной клетке. Для этого кДНК гена была клонирована в плазмиду. Клетки бактерий были трансформированы полученной плазмидой. Вечером исследователь понял, что забыл добавить на чашку Петри, куда были помещены трансформированные бактерии, антибиотик. Что увидит исследователь в чашке Петри на следующий день?

Выберите все подходящие ответы из списка

1. Чашку Петри, на которой не выросли бактерии.
2. Чашку Петри с нетрансформированными бактериями, так как антибиотик требовался для трансформации.
3. Переполненную чашку Петри, на которой выросли нетрансформированные и трансформированные бактерии.
4. Чашку Петри с отдельными колониями трансформированных и нетрансформированных бактерий.

Контрольные вопросы

1. Какими формами представлена Д1Ж бактериальной клетки?
2. Какие участки плазмид отвечают за репликацию?
3. Каков принцип щелочного метода разделения плазмидной и хромосомной ДНК?
4. Какие вещества применяют для очистки ДНК от РНК и белков?
5. Какое вещество используют для осаждения ДНК?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6. «ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ И КАЧЕСТВА ПРЕПАРАТОВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ МЕТОДОМ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ»

Наиболее распространенными методами оценки выделенных нуклеиновых кислот являются следующие методы:

1) электрофорез в акриламидном или агарозном геле;

2) спектрофотометрическая оценка по уровню поглощения;

3) флуориметрическая оценка с использованием флуоресцентных красителей;

4) гибридизация со специфическим зондом;

5) полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Измерение поглощения при 260 нм (A_{260}) для РНК и ДНК с использованием спектрофотометрии является общераспространенным и простым способом.

Для оценки чистоты и качества нуклеиновых кислот при спектрофотометрическом измерении, чистоту образца определяют, исходя из соотношения оптических плотностей при длинах волн 230, 260 и 280 нм.

Нуклеиновые кислоты имеют максимум поглощения при длине волны 260 нм, большинство белков – при 280 нм. Поглощение на длине волны 230 нм характерно для органических соединений и хаотропных солей. Например, изотиоцианата гуанидина, который очень часто используют для выделения РНК.

При помощи закона Бугера – Ламберта – Бера возможно соотнести концентрация молекул, поглощающих излучение с количеством поглощенного света. На длине волны 260 нм средний коэффициент экстинкции для двуцепочечной ДНК составляет 0,020 $(\text{мкг/мл})^{-1}$ см^{-1}, для одноцепочечной ДНК 0,027 $(\text{мкг/мл})^{-1}$ см^{-1}, для одноцепочечной РНК 0,025 $(\text{мкг/мл})^{-1}$ см^{-1} и для коротких одноцепочечных олигонуклеотидов коэффициент экстинкции зависит от длины и соотношения азотистых оснований (около 0,030 $(\text{мкг/мл})^{-1}$ см^{-1}). Отсюда, оптическая плотность равная 1 соответствует концентрации двуцепочечной ДНК около 50 мкг/мл, 40 мкг/мл одноцепочечных ДНК и РНК и 20 мкг/м олигонуклеотидов.

Спектрофотометрический способ определения концентрации нуклеиновых кислот применяет при концентрациях до 2ОД (оптических плотностей). Более точные коэффициенты экстинкции требуются для определения концентрации олигонуклеотидов, и могут быть предсказаны при помощи модели ближайшего соседства.

По известной оптической плотности раствора можно рассчитать концентрацию, мкг/мкл, по соответствующим формулам:

– для двух цепей полинуклеотидов – (ΔA_{260} * разбавление * 50)/1000;

– для одиночных цепей ДНК – (ΔA_{260} * разбавление * 37)/1000;

– для одиночных цепей РНК – (ΔA_{260} * разбавление * 40)/1000;

– для олигонуклеотидов – (ΔA_{260} * разбавление * 20)/1000,

где ΔA_{260} – разница оптических плотностей раствора нуклеиновых кислот и растворителя, которым практически всегда является стерильная деионизованная вода.

ΔA_{260} деионизованной воды равна нулю, поэтому воду используют для установления «оптического нуля» спектрофотометра, работа которого основана на сравнении двух потоков света: один – через растворитель, другой – через раствор. Применение стерильной воды связано с тем, что присутствие в растворителе микрофлоры или ферментов, разрушающих нуклеиновые кислоты (ДНКазы, РНКазы), может привести к получению ошибочных результатов измерений.

Разбавление исходных растворов требуется для получения результатов измерений, лежащих в пределах шкалы оптической плотности спектрофотометра, так как с этим связана точность расчета концентраций нуклеиновых кислот. Указанное соответствие, установленное эмпирически, приведено далее:

Значение ΔA_{260}	**Ошибка, %**
~0,005	~18,0
~0,01	~9,0
0,1-1,0	~1,0
0,3-0,7	~1,0
>2,5	Требуется большее разбавление

Расчет концентрации олигонуклеотидных праймеров для ПЦР осложняется тем, что конечные данные нужно выразить в молярных, а не массовых единицах, т. е. не мкг/мкл или нг/мкл, а в пкмоль/ мкл. Можно точно рассчитать молярную массу каждого из используемых праймеров (для этого имеется ряд специальных компьютерных программ), но, как показывает практика, высокой точности здесь не требуется, вполне достаточно знать число нуклеотидов в праймере и получить соотношение пкмоль:нг из данных, представленных далее:

Число звеньев олигонуклеотида	100 нг соответсвует n пкмолям
15	20
16	18,87
17	17,54
18	16,67
19	15,87
20	14,93
24	12,50
27	11,11
30	10

Качество препарата нуклеиновой кислоты проще всего установить, сняв весь спектр поглощения ее раствора в ультрафиолетовой области (при условии, что полученный раствор бесцветен). Никаких значительных пиков поглощения, кроме пика, полученного при 260 нм, быть не должно, а сам пик при этом дол-

жен иметь классическую форму (Рисунок 19). Однако это неудобно, так как построение полного спектра поглощения – процесс длительный и не может быть использован для массовых измерений.

Как показывает практика, вполне достаточно сопоставить значения оптической плотности раствора нуклеиновых кислот, полученные в двух точках: при 260 и 280 нм, где растворы чистой ДНК или РНК поглощают очень мало, зато примеси становятся хорошо «заметными». В частности, водный раствор белка преимущественно поглощает именно при 280 нм, а, следовательно, при увеличении его доли в растворе нуклеиновой кислоты значение A_{260}/A_{280} уменьшается.

Белковые примеси практически всегда присутствуют в препаратах высокомолекулярных нуклеиновых кислот, выделенных из природных объектов. Присутствие других примесей, смещающих значение A_{260}/A_{280} в сторону уменьшения ДНК, менее вероятно, но для повышения качества ДНК или РНК в таких препаратах рекомендуется произвести экстракцию примесей фенолом и хлороформом.

ДНК и белок незначительно поглощают п области спектра с длиной волны менее 260 нм, но в растворе могут присутствовать и другие соединения, в том числе биогенного происхождения, например, полисахариды. Присутствие в растворе нуклеиновых кислот таких соединений можно выявить по смещению значения A_{260}/A_{280} от оптимального в сторону увеличения, однако избавиться от них полностью практически невозможно. Можно лишь свести их содержание к минимуму путем переосаждения ДНК или РНК из раствора в присутствии высокой концентрации солей (рекомендуется ацетат натрия, калия или аммония, хлорид лития).

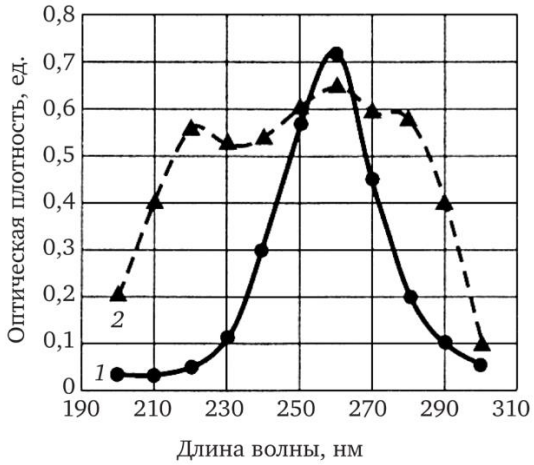


Рисунок 19 – Спектры поглощения чистого и загрязненного белками и полисахаридами растворов ДНК:
1 – чистый раствор ДНК; 2 – загрязненный раствор ДНК

Таким образом, раствор нуклеиновых кислот считается чистым, т. е. не содержащим белков и других примесей в аналитически значимых количествах, при значениях величины A_{260}/A_{280} в эмпирически установленных пределах 1,8–

1,9 для раствора РНК, 1,9–2 для раствора ДНК. Для ПЦР и секвенирования пригодны растворы ДНК со значениями A_{260}/A_{280}, равными 1,6–2.

Значение менее 1,8 может указывать на загрязнение образца полипептидами, более 2 – на возможную деградацию и наличии свободных нуклеотидов.

Во всех остальных случаях лучше исследовать спектр поглощения более детально или определить параметры чистоты используемых растворов нуклеиновых кислот другими методами.

Отношение 260:280 позволяет определить примесь нуклеиновых кислот в растворах белков и примесей белков в растворах нуклеиновых кислот:

% белка	% нуклеиновой кислоты	отношение 260:280
100	0	0,57
95	5	1,06
90	10	1,32
70	30	1,73

Стоит отметить, что ввиду простоты данный метод определения концентрации и оценки качества препаратов нуклеиновых кислот с самого начала его опубликования сразу стал настолько популярен, что к настоящему времени применяется повсеместно, а производители спектрофотометрической техники освоили выпуск простых устройств для автоматизированного измерения величины A_{260}/A_{280} и концентрации ДНК/РНК со встроенным калькулятором для расчета искомых величин. Не требуется даже двух кювет, оптический нуль поглощения растворителя выставляется на основе внутренней калибровки. Такие устройства как, например, серия NanoDrop производства компании Thermo Fisher Scientific, позволяют производить измерения совсем без кювет в капле раствора объемом от 2 до 0,5 мкл, что не только ускоряет рабочий процесс, но и сильно экономит препарат нуклеиновой кислоты.

Цель работы. Освоить метод определения концентрации и степени чистоты растворов нуклеиновых кислот методом спектрофотометрии.

Оборудование и материалы.

1. Спектрофотометр с комплектом кварцевых кювет вместимостью 1 мл (длина оптического пути 1 см).

2. Растворы ДНК, РНК, олигонуклеотидов *(можно использовать, например, препараты, полученные выделением нуклеиновых кислот из природных объектов; ПЦР фрагмент, очищенный методом препаративного электрофореза;* смеси *олигонуклеотидных праймеров для ПЦР).*

3. Коммерческие препараты высокомолекулярных ДНК и РНК.

4. Стерильная деионизованная вода.

Ход работы.

Определение концентрации и качества препарата геномной ДНК.

1. Для разведения образца геномной ДНК в 50 раз в чистую микропробирку вместимостью 1,5 мл вносят 20 мкл раствора ДНК, добавляют 980 мкл стерильной деионизованной воды и осторожно перемешивают.

2. Переносят разбавленный раствор ДНК в кварцевую кювету спектрофотометра, в другую (контрольную) кювету вносят стерильную деионизованную воду, использованную для разведения образца ДНК.

3. Производят измерение оптической плотности (поглощения, абсорбции) раствора ДНК против растворителя (воды) при 260 нм (ΔA_{260}).

4. Изменяют длину волны спектрофотометра на 280 нм и вновь производят измерение оптической плотности раствора ДНК (ΔA_{280}).

5. Рассчитывают концентрацию ДНК в растворе, мкг/мкл, по формуле:

$C = (\Delta A_{260} * \text{разбавление} * 50)/1000$.

6. Определяют чистоту препарата ДНК по формуле $\Delta A_{260}/ \Delta A_{280}$ и делают вывод о возможности использования препарата в дальнейшем.

Определение концентрации и качества препарата ПЦР–фрагмента (предварительно очищенного методом препаративного электрофореза).

1. Для разведения образца продукта ПЦР в 20 раз в чистую микропробирку вместимостью 1,5 мл вносят 50 мкл раствора ДНК, добавляют 950 мкл стерильной деионизованной воды и осторожно перемешивают.

2. Далее проводят процедуру спектрофотометрирования как в п. 2–4 (см. Определение концентрации и качества препарата геномной ДНК).

3. Рассчитывают концентрацию ПЦР-фрагмента в растворе, мкг/мкл, по формуле:

$C = (\Delta A_{260} * \text{разбавление} * 50)/1000$.

4. Определяют чистоту препарата ПЦР-фрагмента по формуле $\Delta A_{260}/ \Delta A_{280}$ и делают вывод о возможности использования препарата в дальнейшем.

Определение концентрации и качества препарата РНК.

1. В чистую микропробирку вместимостью 1,5мл вносят 50 мкл раствора РНК, добавляют 950 мкл стерильной деионизованной воды и осторожно перемешивают.

2. Переносят разбавленный раствор РНК в кварцевую кювету, в другую такую же кювету вносят стерильную деионизованную воду, использованную для разведения образца РНК.

3. Измеряют оптическую плотность раствора РНК в сравнении с растворителем (воды) при 260 нм (ΔA_{260}).

4. Рассчитывают концентрацию РНК в растворе, мкг/мкл, по формуле:

$C = (\Delta A_{260} * \text{разбавление} * 40)/1000$.

Определение концентрации и качества олигодезоксирибонуклеотидов (праймеров для ПЦР).

1. В чистую микропробирку вместимостью 1,5 мл вносят 50 мкл раствора олигонуклеотидов, добавляют 950 мкл стерильной деионизованной воды и осторожно перемешивают.

2. Переносят разбавленный раствор олигонуклеотидов в кварцевую кювету, в другую такую же кювету вносят стерильную деионизованную воду, использованную для разведения образца.

3. Производят измерение оптической плотности раствора олигонуклеотидов против растворителя (воды) при 260 нм (ΔA_{260}).

4. Рассчитывают концентрацию олигонуклеотидов в растворе, мкг/мкл, по формуле:

$C = (\Delta A_{260} * \text{разбавление} * 20)/1000$

и с использованием данных в таблице переводят массовые единицы в молярные.

Задания.

1. Рассчитайте концентрацию образца двухцепочной ДНК, одноцепочных РНК И ДНК и олигонуклеотидов:

№ образца	Разбавление	ΔA_{260}	ΔA_{280}
№1 (двухцепочная ДНК)	10	1,78	2,57
№2 (одноцепочная РНК)	5	2,58	1,32
№3 (одноцепочная ДНК)	7	6,54	3,54
№4 (олигонуклеотиды)	12	1,24	0,88

2. Оцените ошибку измерений оптической плотности каждого образца и предложите вариант ее устранения. При необходимости пересчитайте концентрацию.

3. Оцените пригодность образцов для дальнейшего исследований.

По соотношению $\Delta A_{260}/ \Delta A_{280}$ определите примесь белков в исследуемых растворах нуклеиновых кислот.

Контрольные вопросы:

1. В чем принцип метода спектрофотометрического определения концентраций нуклеиновых кислот?

2. Есть ли отличие в поглощении растворов ДНК и РНК с одинаковой концентрацией?

3. Можно ли использовать для спектрофотометрии нуклеиновых кислот широко распространенные пластиковые кюветы?

4. Почему обязательно нужно использовать стерильную деионизованную воду для разведения растворов нуклеиновых кислот?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 7. «ПОСТАНОВКА ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ»

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – метод амплификации (умножение числа копий) фрагментов нуклеиновых кислот *in vitro,* с помощью которого можно избирательно и быстро получить миллионы копий, определенных (целевых) нуклеотидных последовательностей. Этот метод, разработанный К. Мюллисом и Р. Сайки в 1985–1988 гг., был назван выдающимся изобретением века, а авторам его присудили Нобелевскую премию. Внедрение ПЦР позволило ускорить целый спектр фундаментальных исследований в области молекулярной биологии, нацеленных на поиск и характеристику определенных генов и регуляторных элементов генома, реализацию программы «Геном человека», а также способствовало внедрению в практику клинической и ветеринарной диагностики наследственных и инфекционных заболеваний высокоэффективных тестов нового поколения.

В ПЦР для амплификации фрагментов ДНК используют термоустойчивую ДНК-полимеразу из термофильной бактерии *Thermus aquaticus* (*Taq*-полимеразу), которая в присутствии четырех видов дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (дАТФ, дГТФ, дЦТФ, дТТФ) и коротких 20–30-членных затравок (праймеры) осуществляет синтез комплементарных последовательностей ДНК. В качестве матрицы для ПЦР используют тотальную ДНК или чаще ее фрагменты, полученные из исследуемого материала. В ходе ПЦР проводят термическую денатурацию молекулы (фрагмент) ДНК при 93–95 °С, после чего пробы быстро охлаждают до 60–70 °С, что дает возможность праймерам связаться с одноцепочечной ДНК. Праймеры связываются с одноцепочечной ДНК по правилу комплементарности, это происходит раньше, чем отдельные цепи ДНК взаимодействуют между собой ввиду меньших размеров и более высокой подвижности праймеров в растворе, и служат для двух целей: инициируют работу *Taq* -полимеразы и одновременно ограничивают рост цепи ДНК. Элонгация (удлинение, наращивание) праймеров *Taq*-полимеразой происходит при температуре 72–74 °С – оптимальной для активности этого фермента. Синтез ампликонов ПЦР имеет циклический характер: по окончании стадии элонгации ДНК снова денатурируют нагреванием, затем снова следует стадия отжига праймеров и снова их элонгация. В первом и частично во втором циклах образуются копии (ампликоны), не соответствующие границам амплифицируемого фрагмента ДНК, так как матрицей для амплификации служит в основном исходная «материнская» ДНК, но уже начиная с третьего цикла длина ампликонов становится постоянной, соответствующей числу пар нуклеотидов ДНК-матрицы между 3'-концами праймеров. Процесс развивается как цепная реакция, каждая из двух синтезированных копий дает начало новой копии, их число удваивается после каждого цикла, в результате ампликоны накапливаются в геометрической прогрессии. Повторяя циклы амплификации 35–45 раз, можно примерно за 1,5 ч получить миллиарды копий гена (общее число – 2^n, где n – число циклов амплификации) (Рисунок 20).

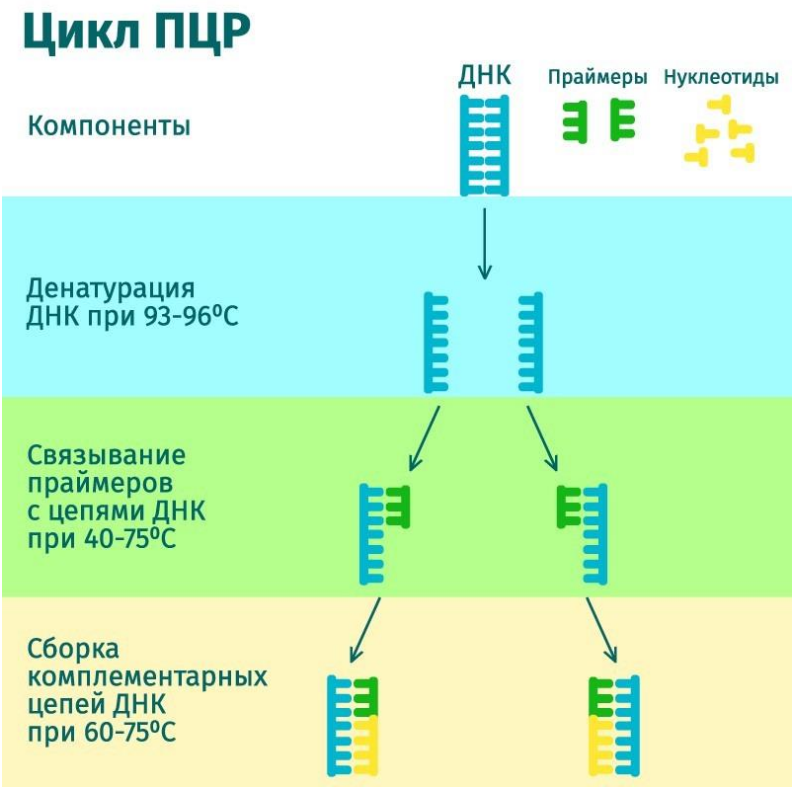


Рисунок 20 – Схематическое изображение полного цикла ПЦР

Подбор и оптимизация праймеров для ПЦР. Чаще всего праймеры используют попарно и подбирают их таким образом, чтобы они были комплементарны противоположным цепям ДНК в участках, ограничивающих выбранную область, и ориентированы 3'-концами в направлении последовательности, которую необходимо амплифицировать, т. е. навстречу друг другу (Рисунок 21).

Рисунок 21 – Схема расположения праймеров на ДНК-матрице для избирательной

Оптимизация праймеров для ПЦР сводится к их «дизайну», а именно выбору нуклеотидной последовательности в качестве целевой матрицы и определению оптимальной температуры для их отжига (связывания с ДНК-матрицей). В некоторых случаях для ПЦР подбираются не одна, а сразу несколько пар праймеров, нацеленных на одну или разные матричные ДНК. Этот прием позволяет амплифицировать одновременно несколько фрагментов ДНК, что при-

меняется, например, при разработке мультиплексных тест-систем для анализа качественного состава пищевых продуктов (наличия генно-модифицированных ингредиентов, видовой идентификации мясного сырья и пр.) с целью повышения его производительности или для «геномной дактилоскопии» – идентификации личности сразу по большому количеству локусов и аллелей, что позволяет снизить вероятность случайного совпадения их набора у разных индивидуумов практически до нуля.

Отдельная система праймеров используется для ПЦР с детекцией продуктов в реальном времени или real time PCR *(real time* – реальное, текущее время, англ.). Помимо праймеров в этом процессе участвуют олигонуклеотидные зонды, которые комплементарны целевому фрагменту между праймерами, но инициаторами синтеза не являются. Они служат в качестве своеобразных молекулярных датчиков процесса амплификации благодаря включенной в их структуру композиции флуоресцентного красителя (флуорофора) и его «тушителя» – молекулы, поглощающей энергию флуорофора и трансформирующей ее в свет другой длины волны или тепловое излучение. Многообразие олигонуклеотидных зондов и схем их взаимодействия с синтезируемой цепью ДНК великое множество, но общим является механизм разрушения зонда или изменения его вторичной структуры в ходе синтеза ампликона, что ведет к физическому разобщению тушителя и флуорофора и появлению его флуоресценции. Флуоресценцию флуорофора регистрирует встроенная в термоциклер фотосистема, данные, получаемые ею после каждого цикла поступают в компьютер, где накапливаются, сравниваются между собой, и если будет выявлено экспоненциальное усиление сигнала флуоресценции от цикла к циклу, то оно является свидетельством амплификации целевого фрагмента. ПЦР с детекцией в реальном времени тоже может быть мультиплексной, только число одновременных реакций ограничено техническими возможностями детектора, имеющего лишь небольшое число светофильтров (оптических каналов) регистрации флуоресценции – как правило, от 2 до 4, максимум – 6.

Дизайн праймеров производится в соответствии со следующими рекомендациями.

Выбор участка на ДНК-матрице. Это один из самых важных шагов в планировании эксперимента. Необходимо, чтобы пара праймеров эффективно и специфично связывалась с искомой целевой последовательностью. Других вариантов связывания праймеров с ДНК-матрицей быть не должно, по крайней мере для той ДНК, которую необходимо выделить из исследуемого материала (например, в пробах из крови человека будет присутствовать ДНК человека, возможно также ДНК некоторых микроорганизмов и простейших, но маловероятно присутствие геномной ДНК другого животного и тем более растения).

Информацию о последовательности нуклеотидов целевого фрагмента (или только его концов) можно получить в базе данных международного генбанка (доступна на веб-сайте www.ncbi.nlm.nih.gov). Длина целевого фрагмента должна быть в пределах 100– 3000 п.н., нижний предел обусловлен возможностью отделения амплифицированных фрагментов (ампликоны) от димеров

праймеров и других неспецифических фрагментов на электрофорезе, верхний предел – возможностями *Taq*ДНК-полимеразы, не способной эффективно синтезировать фрагменты большей длины. Впрочем, при необходимости можно воспользоваться и другими ферментами или их композициями, доступными в настоящее время и позволяющими существенно увеличить длину ампликона. В частности, фермент, полученный из ультра-термофильной морской археи Pyrococcus furiosus, Pfu-полимераза одна или в сочетании с Taq-полимеразой способна синтезировать фрагменты до 10 000 п.н., а лучшие коммерческие препараты рекомбинантных ДНК-полимераз – до 40 000 п.н. и более.

Оптимальная длина праймеров. Этот показатель определяется возможностью отжига праймера одновременно по всей его длине и находится между 16 и 25 нуклеотидами и в среднем составляет 18–20 нуклеотидов.

Содержание ГЦ (GC), %. Это отношение числа нуклеотидов гуанидина и цитозина (суммарно) к общему числу нуклеотидов праймера. Необходимо подбирать последовательность праймера так, чтобы значение величины GC (%) находилось между 35 и 65 (некоторые источники предлагают 45–55) и было приблизительно одинаковым у праймеров, составляющих пару для ПЦР. Ни в коем случае не должно оказаться несколько (3 и более) оснований Г и Ц подряд, особенно на 3'-конце праймера: это сильно снижает его специфичность. В идеале все четыре нуклеотида должны быть более или менее равномерно распределены по всей длине праймера.

Температура отжига (T_{ann}, °C). Это температура, при которой вероятность связывания праймера с ДНК-матрицей превосходит 70 %. Для пары праймеров она на 4–5 °С (по некоторым источникам на 2–4 °С) ниже температуры плавления (T_m, °С) – температуры, при которой число связанных с ДНК и свободных олигонуклеотидов одинаково. Оптимальная температура отжига должна находиться в пределах 50–70 °С (хотя в некоторых случаях может быть и ниже) и не может различаться у праймеров, составляющих пару для ПЦР, более чем на 4 °С.

Рассчитать температуру плавления для подобранных праймеров (°С) можно по формулам:

- $T_m = 2(АТ) + 4(ГЦ)$ – для праймеров до 20 н.;
- $T_m = 69{,}3 + 0{,}41$ (% ГЦ) – 650/l – для праймеров более 20 н., где l – длина праймера.

Ориентировочную температуру отжига для каждой пары праймеров можно рассчитать, исходя из минимальной температуры плавления (на 2–4 °С ниже), рассчитанной для каждого их двух праймеров, но точно ее установить можно только эмпирически по результатам серии ПЦР, проведенных с разной температурой отжига, начиная с расчетной и ниже с шагом 1–2 °С

Вторичная структура праймеров и целевого фрагмента. Связывание праймеров с матрицей будет затруднено, если в месте связывания цепь ДНК может образовывать вторичные структуры – гомо-, гетеродимеры и петли. В связи с этим необходимо подбирать праймеры так, чтобы составляющие пару олигонуклеотиды не содержали в своем составе последовательности из трех и

более нуклеотидов подряд, комплементарных аналогичной последовательности этого же (гомодимер) или другого (гетеродимер) праймера, а также палиндромных последовательностей, являющихся причиной образования петель. Заранее предвидеть вторичную структуру целевого фрагмента (ампликон) практически невозможно, поэтому для его эффективной амплификации часто требуется испытать не одну, а две–четыре и более пар праймеров, пока не будет достигнут искомый результат.

Одновременно учесть все перечисленные особенности праймеров в процессе их дизайна сейчас помогают специализированные компьютерные программы, такие как разные версии Oligo, Primer Premier и др., а также онлайн-сервисы, например, «Олигокалькулятор».

Расчет количества праймеров для ПЦР-смеси. Производители, синтезирующие праймеры на заказ, как правило, указывают концентрацию праймера в полученном растворе, например, 33 пмоль/мкл или 33 мМ. Для приготовления реакционной смеси требуется, как правило, 5–10 ммоль каждого из праймеров. Исходя из этой величины и концентрации праймера, определяют объем исходного раствора праймера, который необходимо добавить в реакционную смесь, но формуле:

$$\text{Объем раствора праймера, мкл} = \frac{\text{Требуемое кол} - \text{во праймера, пмоль}}{\text{Концентрация праймер, пмоль/мкл}}.$$

При этом нет необходимости оперировать с очень малыми объемами (1 мкл и менее) раствора праймеров и других компонентов реакционной смеси для ПЦР, поскольку это практически невозможно реализовать. Объем исходного раствора праймеров рассчитывают и добавляют к суммарному объему реакционной смеси, приготовленному для 10 и более реакций, или разбавляют исходный раствор стерильной деионизованной водой до требуемой концентрации и смешивают оба праймера в одной пробирке *(только аликвоты, а не весь объем исходных растворов праймеров!)*

Приготовление реакционной смеси и проведение ПЦР. Помимо ДНК-полимеразы (1 ед. акт/реакцию), праймеров и ДНК– матрицы в реакционной смеси должны присутствовать:

1) смесь всех четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов в конечной концентрации, как правило, 0,25 мМ каждого;

2) катионы Mg^{2+} как необходимый кофактор ДНК-полимеразы (используют раствор $MgCl_2$ в конечной концентрации 1,5–3 мМ, оптимальную концентрацию подбирают экспериментально в соответствии с применяемым типом ДНК-полимеразы и числом одновременно амплифицируемых продуктов);

3) 5–10 мМ трис-HCl буферный раствор pH 8–10 (обычно прилагается к любому коммерческому препарату ДНК– полимеразы и оптимизирован для нее);

4) соли KCl, NaCl для обеспечения необходимой ионной силы раствора входят в состав буферного раствора для ДНК-полимеразы;

5) неионный детергент Tween20 для предотвращения адсорбции молекул ДНК-полимеразы на стенках реакционной посуды (как правило, пробирки из полиэтилена);

6) иногда дополнительно бычий сывороточный альбумин (БСА), ди- и олигосахариды для стабилизации ДНК-полимеразы, формамид (для повышения специфичности гибридизации праймеров с ДНК-матрицей) и др.

Таким образом, очевидно, что типичная процедура «сборки» смеси для ПЦР весьма сложна (доступна только опытному оператору), продолжительна (что критично для сохранения реагентов в незагрязненном состоянии) и требовательна к точности (иначе невозможно обеспечить воспроизведение результатов). Поэтому еще 15–20 лет назад для ПЦР стали широко применять и успешно применяют до сих пор готовые к употреблению жидкие или сухие смеси, включающие все необходимые компоненты, кроме праймеров (коммерческие тест-системы, предназначенные для обнаружения определенной ДНК, например, ДНК патогенной микрофлоры, содержат также и праймеры) и ДНК-матрицы.

Известно, что чувствительность ПЦР может достигать теоретически возможного предела – единичные молекулы ДНК-матрицы. Это позволяет выявлять целевой фрагмент, используя микроскопически малые количества исходного материала. Однако у этой полезной особенности ПЦР есть и оборотная сторона – высокая степень опасности получения ложноположительных результатов из-за контаминации, т. е. загрязнения реакционной смеси посторонней ДНК– матрицей или амплифицированными фрагментами (ампликонами).

Основные причины получения ложноположительных результатов при постановке ПЦР таковы:

– перекрестная контаминация от пробы к пробе (например, в процессе обработки клинических образцов или при раскапывании реакционной смеси);

– контаминация рекомбинантными плазмидами, содержащими копии клонированной последовательности целевого фрагмента (эти плазмиды чаще всего используются в качестве положительного контроля ПЦР)

– контаминация ампликонами – наиболее частая причина ложноположительных результатов, так как в процессе ПЦР ампликоны накапливаются в больших количествах и очень легко переносятся с аэрозолями и при касании поверхностей, приборов, инструментов, одежды и т. д. Поэтому пробирки после амплификации необходимо открывать только в изолированном помещении, а при вхождении в него требуется в обязательном порядке надевать поверх основной спецодежды дополнительно халат, перчатки, шапочку и ничего из помещения не выносить без предварительной обработки ультрафиолетом и (или) хлорсодержащими дезинфицирующими средствами

В целом при подготовке смеси для ПЦР и препаратов ДНК главное требование – соблюдение аккуратности и внимательности, использование одноразовых наконечников для дозаторов и пробирок, зонирование лаборатории для ПЦР на отдельные помещения (для выделения ДНК, для проведения ПЦР, для постановки электрофореза) и использование в них отдельного набора инстру-

ментов и оборудования, строгая однонаправленная передача материалов и реагентов, обязательная утилизация всех рабочих аликвот растворов реагентов и расходных материалов при выявлении контаминации наряду с обработкой оборудования и открытых поверхностей во всех помещениях лаборатории для ПЦР

Цель работы. Ознакомиться с методикой проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Оборудование и материалы.

1. Термоциклер (ДНК-амплификатор).

2. Микроцентрифуга-вортекс (до 2000 g).

3. Термостат твердотельный с функцией охлаждения для микропробирок вместимостью 0,5–1,5 мл.

4. УФ-бокс.

5. Автоматические дозаторы переменного объема с наконечниками.

6. Материалы и оборудование для проведения электрофореза, представленные в практической работе № 2.

7. Коммерческий набор реагентов для амплификации ДНК: микропробирки, содержащие смесь для ПЦР; ПЦР-растворитель; смесь праймеров (например, для определения фрагмента гена 18S рРНК) готовят самостоятельно или входит в состав смеси; положительный контроль (раствор стандартной ДНК) подбирается самостоятельно или входит в состав смеси; масло минеральное.

8. Растворы ДНК матрицы (образцы ДНК, выделенные из прокариота или эукариот).

9. Вода дистиллированная.

10. Перчатки резиновые или латексные, неопудренные.

Ход работы.

Внимание! Все манипуляции производить только в перчатках! Наконечники для автоматического дозатора необходимо использовать однократно!

1. Вес компоненты реакционной смеси перед работой выставляют в термостат с функцией охлаждения, настроенный на температуру не выше 8°С. Все манипуляции с компонентами производят в УФ-боксе. В одной 0,5 мл микропробирке последовательно смешивают:

- 50 мкл реакционного буфера (10х);
- 50 мкл готовой смеси 2,5 mM dNTP по 10 мкл праймеров, например, для определения гена 18S рРНК:

– прямой праймер (1): 5’-AGC CAT GCA TGT GTA AGT ATG AAC G-3',

– обратный праймер (2): 5'-GCC CGG TAT TGT TAT TTA TTG TCA CT-3' (концентрация праймеров желательна около 1 опт. ед./мл);

- 5 мкл фермента (*Taq*-полимераза);
- 300 мкл стерильной деионизованной воды (можно использовать ампулированную воду для инъекций).

Полученную смесь перемешивают в закрытой пробирке на вортексе, капли со стенок пробирки и крышки стряхивают. Смесь рекомендуется использо-

вать немедленно, при необходимости ее можно хранить не более 2–3 ч. Готовой смеси достаточно для проведения 10 реакций, для большего или меньшего числа реакций указанные объемы компонентов пропорционально увеличивают или уменьшают.

2. Извлекают из пакета и выставляют в штатив «рабочее место» необходимое количество чистых микропробирок для ПЦР (на 0,5 или 0,2 мл в зависимости от используемого термоциклера). В каждую вносят по 40 мкл полученной смеси для ПЦР.

3. В одну из микропробирок со смесью добавляют 5 мкл воды, ТЕ-буфера или другого растворителя из набора реагентов, использованного для выделения ДНК, пробирка маркируется как «отрицательный контроль» (К-) или холостая проба.

4. Во вторую микропробирку со смесью добавляют 5 мкл раствора, содержащего около 10 нг стандартной очищенной ДНК-матрицы. Например, с праймерами на 18S рРНК можно использовать коммерческий препарат ДНК из эритроцитов цыпленка. Эта пробирка маркируется как «положительный контроль» (К+).

5. Во все оставшиеся микропробирки со смесью добавляют по 5 мкл препаратов ДНК, выделенных из каких-либо природных объектов. Концентрацию ДНК в таких препаратах необходимо предварительно определить и оптимизировать. Пробирки гак же маркируют произвольным способом.

6. Во все микропробирки добавляют по 20–25 мкл (две капли) минерального масла и плотно закрывают крышечками.

7. Пробирки центрифугируют 5–7 сек. при 2000g. При этом отдельные капли ПЦР-смеси, случайно оказавшиеся на стенках и крышке пробирки, должны быть сброшены на дно, а сверху ровно наслоено минеральное масло.

8. Пробирки с готовой ПЦР-смесью помещают в амплификатор и запускают программу' амплификации:

94 °С – 3 мин;

35 циклов, включающих:

– 94 °С (денатурация) – 40 сек.,
– 58 °С (отжиг праймеров) – 30 сек.,
– 72 °С (элонгация) – 40 сек.,
– 72 °С – 4 мин.

9. По окончании амплификации пробирки извлекают из амплификатора, помещают в штатив и переносят в зону для электрофореза продуктов ПЦР. ПЦР-продукты (ампликоны) можно использовать в других практических работах и хранить в течение 1–2 нед. при минус 18 °С.

10. Детекцию результатов ПЦР производят с помощью электрофореза в агарозном геле.

11. Полученные результаты регистрируют визуально или с помощью гель-документирующей видеосистемы

Задания.

1. Подобрать пару праймеров для амплификации фрагмента ДНК длиной около 1000 п.н. по заданной матрице:

35S промотор вируса мозаики цветной капусты
(регистрационный номер ген. банка X04879)

5'-gaattcccgatcctatctgtcacttcatcaaaaggacagtagaaaaggaaggtggcactacaaatgccatcattgcgat
aaaggaaaggctatcgttcaagatgcctctgccgacagtggtcccaaagatggacccccacccacgaggactatccttcg
caagacccttcctctatataaggaagttcatttcatttagcatcgtggaaaaagaagacgttccaaccacgtcttcaaagcaa
gtggattgatgtgatatctccactgacgtaagggatgacgcacaatcccggagaggacacgctgaaatcaccagtctctct
ctacaagatctctagacgatcgtttcgcatg-3'

2. Лаборант-исследователь подготовил реакционную смесь для полимеразной цепной реакции (ПЦР), добавил в пробирку следующие компоненты:

– Двукратный буфер для ПЦР (с Mg^{2+})
– ДНК-матрица
– Прямой праймер

Затем лаборант отвлекся, а когда вернулся к протоколу, задумался, каких компонентов не хватает в реакционной смеси.

Определите, какие компоненты из нижеперечисленных нужно добавить в реакционную смесь:

1) дезоксигуанозинтрифосфат;
2) РНК-матрица;
3) РНК-зависимая ДНК-полимераза;
4) дезокситимидинтрифосфат;
5) дезоксиаденозинтрифосфат;
6) дезоксицитидинтрифосфат;
7) ДНК-зависимая РНК-полимераза;
8) ДНК-зависимая ДНК-полимераза;
9) обратный праймер;
10) дезоксиуридинтрифосфат.

Пояснения к ответу

Необходимо выбрать компоненты, которые являются субстратами ДНК-полимеразы и принимают участие в репликации ДНК.

3. Рассчитайте температуру плавления для следующих праймеров:

– длина праймера составляет 18 нуклеотидов, из них к пиримидиновым основания относятся 10;

– длина праймера составляет 24 нуклеотида, из них к пуриновым основаниям относятся 16;

– длина праймера составляет 16 нуклеотидов, из них к пуриновым относятся 6.

4. Рассчитайте количество праймера для ПЦР-смеси. Для проведения ПЦР в лаборатории используются праймеры с концентрацией 68мМ и 55мМ. Для приготовления рекреационной смеси используется 7мМоль каждого праймера.

5. Смесь для проведения ПЦР состоит из нескольких компонентов. Перед началом эксперимента часто нужно сначала приготовить рабочий раствор. Обычно в лаборатории имеются стоковые (исходные) растворы компонентов, необходимых для проведения ПЦР. Даны концентрации стоковых растворов:

• ДНК-полимераза, 1.5 ед/мкл;
• смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов, 10 мМ каждого;
• прямой праймер, 6 мкМ;
• обратный праймер, 3.75 мкМ;
• матрица ДНК, 50 нг/мкл;
• хлорид магния, 30 мМ;
• Tween 20, 1.25 %;
• Трис pH 8.5, 0.3 М;
• хлорид калия, 0.25 М.

Определите, какой объем стоковых растворов и воды следует добавить в реакционную смесь, если известно, что конечный объем реакционной смеси 25 мкл.

Сопоставьте компоненты реакционной смеси и их финальные концентрации и объем данного компонента, который следует добавить в реакционную смесь для достижения заданной концентрации:

1. вода деионизованная	а. 4 мкл
2. ДНК-полимераза, 0.03 ед/мкл	б. 3.75 мкл
3. нуклеозидтрифосфаты, 0.4 мМ каждого	в. 2.0 мкл
4. прямой праймер, 300 нМ	г. 1.25 мкл
5. обратный праймер, 300 нМ	д. 1.0 мкл
6. матрица ДНК, 4.5 нг/мкл	е. 3 мкл
7. хлорид магния, 3 мМ	ж. 0.5 мкл
8. Tween 20, 0.15%	з. 2.5 мкл
9. Трис pH 8.5, 45 мМ	и. 2.25 мкл
10. хлорид калия, 40 мМ	л. 4.75 мкл

Пояснения к ответу

Следует вычислить разведение стокового раствора до финальной концентрации, определить объем добавляемого стокового раствора, соотнести объем и компонент.

Контрольные вопросы:

1. Каков принцип метода ПЦР?
2. Из каких этапов состоит цикл ПЦР?
3. Из каких компонентов состоит реакционная смесь?

4. Каковы основные причины получения ложноположительных результатов при проведении ПЦР?

5. Какие контроли и с какой целью используют при постановке ПЦР?

6. В какой очередности осуществляют внесение образцов и контроля ей в ПЦР-смесь?

7. Как должны выглядеть зоны положительного и отрицательного ПЦР-контролей на геле?

8. В каком случае образцы следует считать положительными или отрицательными?

9. В каком случае результаты ПЦР анализа считаются недействительными?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 8. «ДНК–ДНК-ГИБРИДИЗАЦИЯ»

Методы гибридизации нуклеиновых кислот основаны на способности олиго– и полинуклеотидов образовывать двухцепочечную структуру за счет образования водородных связей между остатками комплементарных азотистых оснований: аденин + тимин (или урацил) и гуанин + цитозин. При соблюдении определенных условий, исключающих случайное неканоническое взаимодействие нуклеотидов, методы гибридизации нуклеиновых кислот позволяют выявить гомологию первичной структуры интересующей нас нуклеиновой кислоты (мишень) и зонда – олигонуклеотида с известной первичной структурой. Мишенью может служить, например, нативная ДНК (дот-гибридизация от англ, *dot* – точка, точечный), а также рестрикционные фрагменты ДНК (Саузерн-гибридизация) или фракционированные с помощью электрофореза молекулы РНК (Нозерн-гибридизация), а зондом – чаще всего ПЦР-продукт или рестрикционный фрагмент, меченный радиоактивным изотопом (чаще ^{32}Р или ^{33}Р) или флуоресцентным красителем для его последующей детекции. Использование радиоактивных изотопов становится все менее популярным из-за невозможности длительного хранения меток, трудностей детекции продуктов ядерного распада и определенного вреда, наносимого здоровью систематической работой с ними. Однако флуоресцентное мечение также имеет свои недостатки, это прежде всего высокая термолабильность как самой молекулы флуорофора, так и химической связи флуорофора с зондом, которая нарушается при нагревеохлаждении, детекции коротковолновым или УФ-светом, а также в ходе длительного хранения.

К отдельной категории методов гибридизации следует отнести гибридизацию *in situ,* проводимую непосредственно на живом объекте, точнее, внутри прозрачных для детекции клеток, тканей, органов. Основное предназначение этого метода – определение клеточной и тканевой локализации РНК- или ДНК-мишени с уже известной первичной структурой или распределения определенных последовательностей ДНК в хромосомах. Метод позволяет установить, например, тканеспецифичность вирусов и бактерий (по распределению их наследственного материала по клеткам и тканям организма-хозяина), экспрессии определенных генов (по наличию мРНК) и т. д.

Дот-гибридизация – самая простая разновидность ДНК – ДНК-гибридизации (мишень и зонд являются молекулами ДНК). ДНК-мишень не подвергают каким-либо модификациям, а только плавят (денатурируют) при 65 °С в 0,1–0,5 М растворе щелочи и закрепляют на специальной подложке – нитроцеллюлозной или нейлоновой мембране, реже на кварцевом стекле (Рисунок 22, 23, 24). Готовую мембрану с нанесенной на нее мишенью можно использовать многократно.

Рисунок 22 – Радиоавтограф мембраны после Нозерн-гибридизации, мишень – мРНК из растений разных фенотипов Arabidopsis thaliana, зонд ^{32}P-меченый олигонуклеотид

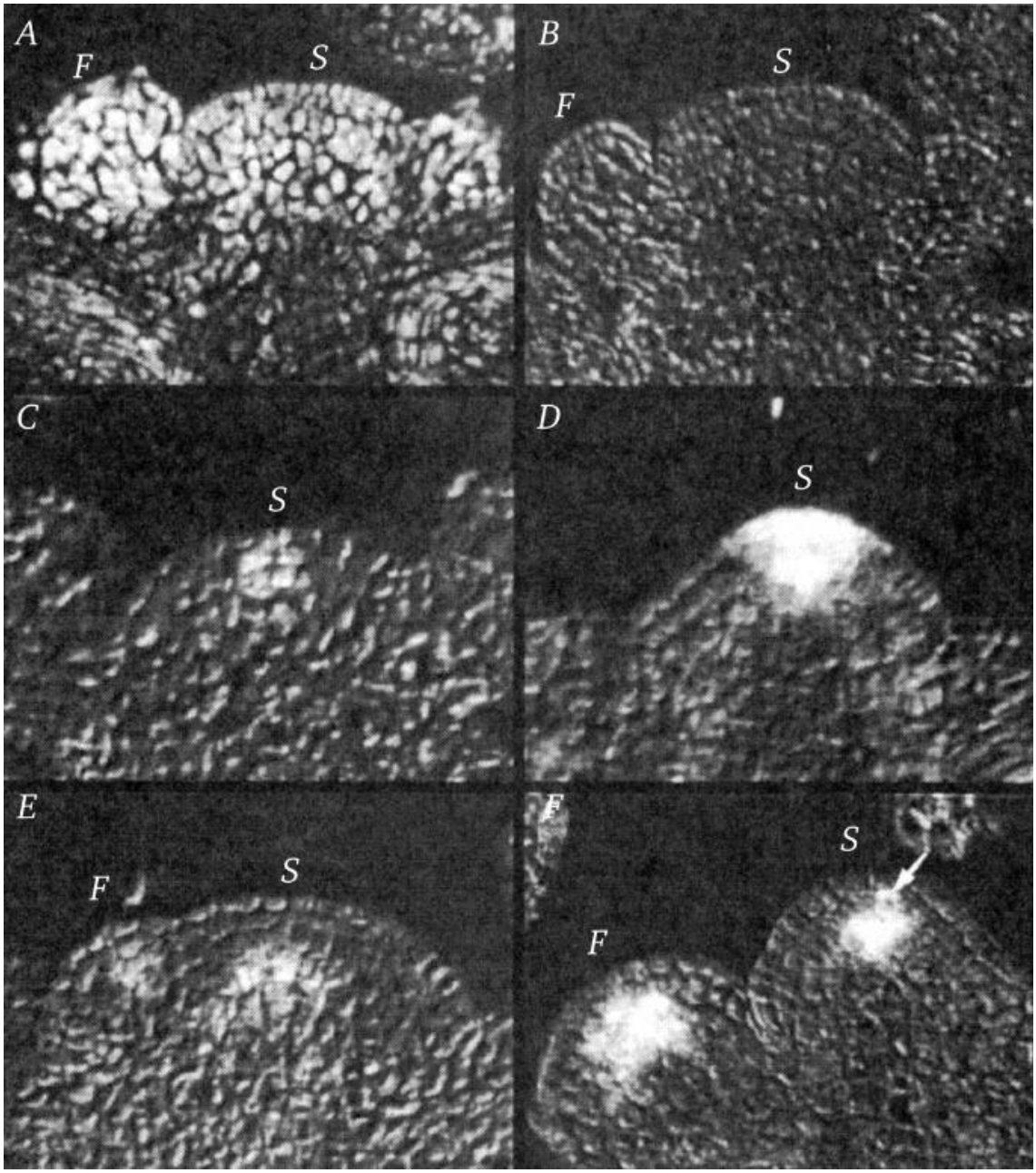


Рисунок 23 – Микрофотографии кончика корня Arabidopsis thaliana со светящимися (флуоресцирующими) участками – локализацией искомой мРНК (Ishiguro et al., 2002):
A–F– последовательные стадии роста корня;
S – главный корень; F – боковой корень

ДНК-зонд денатурируют тем же способом, затем раствор нейтрализуют и немедленно используют для гибридизации, в ходе которой гибридизационный раствор свободно омывает мембрану. При наличии протяженных гомологичных участков у мишени и зонда расплавленная ДНК, кроме реассоциации, может образовывать гетеродуплексы, состоящие из одной цепи ДПК-мишени и другой – ДНК-зонда (Рисунок 24).

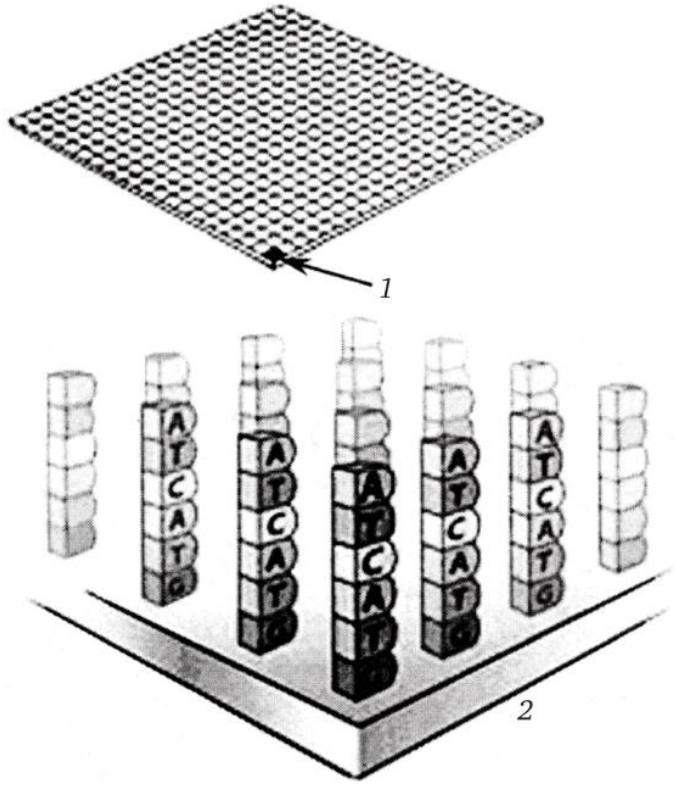


Рисунок 24 – Схематичное изображение фрагмента поверхности мембраны с ДНК-мишенью – одноцепочечной ДНК (сайт http://affymetrix.com) *1* –фрагмент поверхности (общий вид); *2* – увеличенная одноцепочная ДНК-мишень

Если гомология мишени и зонда недостаточна для образования прочного гетеродуплекса, зонд вместе с меткой будет смыт с мембраны. Если же эта связь образована не менее чем 70 % пар нуклеотидов от всей длины зонда, она сохранится в ходе последующих отмывок мембраны и будет выявлена после детекции – радиоавтографии или флуореграфии в точках, где нанесена соответствующая ДНК-мишень. Степень гомологии мишени и зонда, необходимую для их прочного взаимодействия, можно намеренно варьировать, создавая более или менее жесткие условия: чем выше температура, pH, концентрация денатурирующих агентов (мочевина, формамид и др.), тем большая гомология требуется для гибридизации. Для того чтобы полностью исключить возможность связывания зонда с самой мембраной и создания фона, мешающего детекции, свободную от мишеней поверхность мембраны в ходе предгибридизации «закрывают» заведомо негомологичной ДНК (например, ДНК спермы лосося). Однако эта процедура может помешать эксперименту, если нет уверенности в различии первичной структуры у негомологичной ДНК и ДНК-мишени или

ДНК-зонда. Поэтому некоторые исследователи намеренно не производят предгибридизацию.

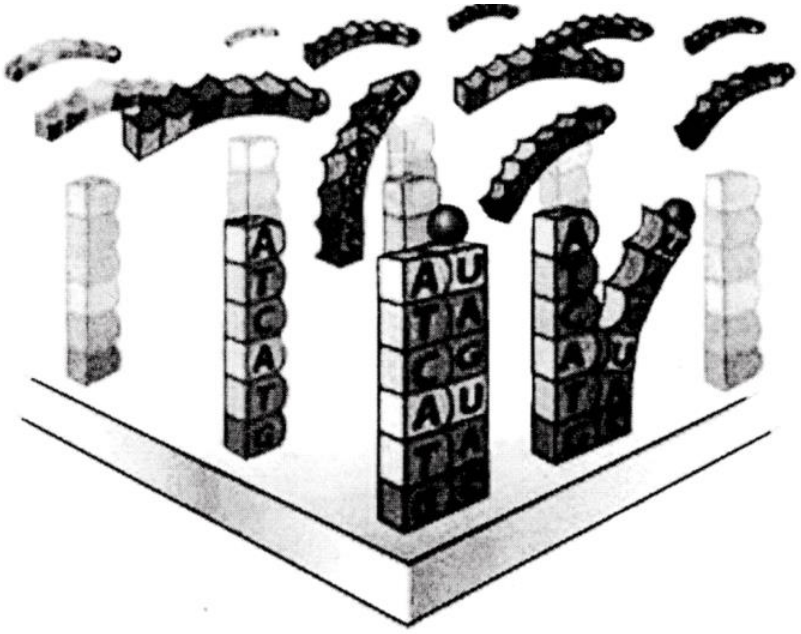


Рисунок 25 – Образование гетеродуплексов гомологичными ДНК-мишенью и ДНК-зондом несущим метку

В зависимости от чувствительности и разрешающей способности приборов для детекции меченой ДНК число мишеней, нанесенных на мембрану или другую подходящую основу, может сильно варьировать: от одного-двух до десятков и сотен тысяч, при этом линейные размеры основы для гибридизации могут не превышать размеров стандартного предметного стекла. Разумеется, отдельные мишени в последнем случае становятся микроскопическими (чип-гибридизация), и результат гибридизации детектируют уже в специализированных приборах – чип-детекторах. Более того, использование в одной гибридизации сразу нескольких зондов, меченных разными флуорофорами (различаются «цветом» – длиной волны испускаемого света), повышает плотность результатов четырехкратно, поскольку в этом случае точки образования гетеродуплексов можно дифференцировать не только по расположению мишеней на подложке, но и по цвету (т. е. соответствующей последовательности нуклеотидов) связанного зонда (Рисунок 25 и 26).

Таблица 11 – Значения максимумов поглощения (абсорбции) и испускания света (эмиссии) некоторых флуорофоров

Название	Абсорбция, нм	Эмиссия, нм
FAM	490-495	515–520
R110	500–505	525–530
JOE	520–525	550–555
R6G	525–530	555–560
TAMRA	SSO–555	580–585

Название	Абсорбция, нм	Эмиссия, нм
ROX	580–585	605–610
Cy5	650–655	665–670
IRDye700	685–690	710–715
IRDye40	765–770	785–790
IRDye41	795–800	820–825
IRDyeSOO	795–800	820–825

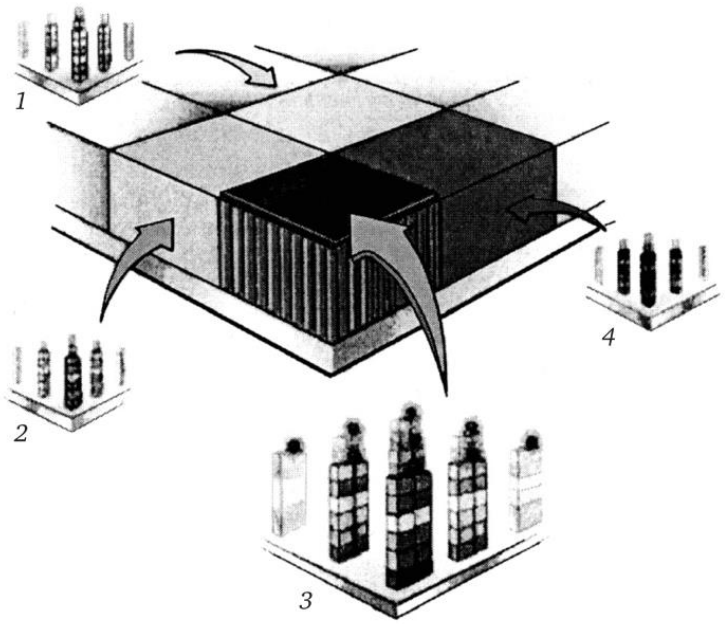


Рисунок 26 – Результат ДНК–ДНК-гибридизации мишени с использованием четырех разных зондов (1–4), меченных разными флуорофорами (сайт http://affymetrix.com). Результаты гибридизации зондов, выявляемые по различной флуоресценции, изображены от светло-серого до черного

Гибридизацию с использованием микрочипов, изготовленных промышленным способом, и соответствующих чип-детекторов, оснащенных лазерными сканерами, сейчас широко используют в медицине для диагностики вирусных и бактериальных инфекций, наследственных (генетических) заболеваний; в пищевой промышленности для видовой идентификации растительного и животного сырья и качественного определения генетически модифицированных источников; в криминалистике для идентификации личности и, наконец, в фундаментальной науке для расшифровки геномов, построения генетических карт, исследования генеалогии и эволюции человека по распределению генетических мутаций у отдельных особей и для других крупномасштабных исследований.

В то же время практически во всех молекулярно-биологических лабораториях практикуются значительно более простые и менее технологичные разновидности метода ДНК–ДНК-гибридизации из-за их относительной простоты и одновременно высокой информативности.

Цель работы. Ознакомиться с методом дот-гибридизации на нейлоновой мембране.

Материалы и оборудование.

1. Гибридизатор или воздушный термостат.
2. Гель-документирующая видеосистема (с отраженным УФ-светом).
3. Латексные неопудренные перчатки.
4. Нейлоновая мембрана *Hybond*-К .
5. Фильтровальная бумага.
6. Полиэтиленовый пакет с герметичной застежкой или центрифужная пробирка вместимостью 15 мл с крышкой для проведения гибридизации.
7. Раствор ДНК-мишени: 5–10 мкг/мкл (например, ДНК, выделенная из прокариот или эукариот).
8. Раствор ДНК-зонда: 5–10 мкг/ мкл (например, ПЦР-продукт, полученный с ДНК растительного или животного происхождения специфичными для гена 18S рРНК олигонуклеотидными праймерами и каким-либо одним из дНТФ, меченным красителем FAM).
9. Денатурирующий раствор: 1,5 М NaCl, 0,5 М NaOH.
10. Нейтрализующий раствор: 3 М ацетатный буфер pH 5,5.
11. 1М раствор NaOH.
12. 0,4 М раствор NaOH.
13. 1 М раствор HCl.
14. 0,1%-ный раствор ДДС–Na.
15. Предгибридизационный раствор: 5х раствор Денхарда (готовится из 100х запасного раствора Денхарда: 2%-ный фиколл 400, 2%-ный поливинилпирролидон М.м. 360 000, 2%-ный БСА), 5х раствор SSPE (готовится из 20х запасного раствора SSPE: 3,6 М NaCl, 0,2 М $Na_3(P0_4)_2$, 0.02М ЭДТЛ-Na, pH 8,3), 0,2%-ный ДДС–Na, 500мкг/мл негомологичной ДНК.
16. Отмывочный раствор: 5 мМ $Na_3(POj_2$, 1 мМ ЭДТА-Na, 0,2 %-ный ДДС-Na, pH 7,0.
17. 0,2 М трис-HCl буфер, pH 7,5.

Ход работы.

Внимание! Все операции с мембраной производить только в перчатках!

Подготовка мембраны для дот-гибридизации.

1. Отрезают фрагмент нейлоновой мембраны *Hybond* + размером приблизительно 2 х 4 см.
2. С помощью автоматического дозатора наносят на мембрану по 10 мкг каждой из ДНК-мишеней, растворенных в 1–2 мкл деионизованной воды.

Внимание! Образовавшиеся влажные пятна не должны наползать друг на друга!

4. Помещают мембрану на фильтровальную бумагу, смоченную денатурирующим раствором выдерживают 5 мин.
5. Помещают мембрану на фильтровальную бумагу, смоченную нейтрализующим раствором выдерживают 5 мин

6. Сушат мембрану 30 мин при комнатной температуре, положив на фильтровальную бумагу, затем 60 мин при 80 ºС в термостате, поместив в него мембрану вместе с подложкой.

*Предгибридизация (*при использовании фрагмента гена 18S рРНК не применяется).

1. Добавляют к предгибридизационному раствору 1/10 объема 1 М раствора NaOH, инкубируют 10 мин при 65 °С (предгибридизационный раствор используют из расчета 4 мл на 100 $см^2$ мембраны).

2. Нейтрализуют раствор добавлением 1/10 объема 1 М соляной кислоты.

3. Наливают полученный раствор в полиэтиленовый пакет (под размер мембраны или чуть больше) с застежкой или центрифужную пробирку с крышкой. Помещают внутрь мембрану, инкубируют 1 ч при 65 °С.

Гибридизация и отмывка мембраны.

1. В полученный гибридизационный раствор добавляют 20 мкл ДНК-зонда и проводят повторную денатурацию, как описано в предгибридизации (п. 1, 2). Если предгибридизацию не проводили, то продолжают гибридизацию с ДНК-зондом, как описано в предгибридизации (п. 1–3) для негомологичной ДНК.

2. Переносят мембрану в отмывочный раствор (из расчета 250 мл на 100 $см^2$) и отмывают, переминая пакет или вращая руками пробирку с мембраной в течение 30 мин, повторяют процедуру еще раз.

3. Проводят детекцию результатов гибридизации с использованием, например, гель-документирующей системы в УФ-свете.

Внимание! Если мембрану предполагается использовать повторно, не дают ей высохнуть! Хранить мембрану следует в герметичном пакете на фильтровальной бумаге, смоченной отмывочным раствором.

Очистка («раздевание») мембраны для ее повторного использования.

1. Промывают мембрану в 0,1%-ном растворе ДДС– Na 15–20 мин при 65 ^{0}С и постоянном помешивании; в случае выявления большого количества метки на мембране рекомендуется промыть ее в 0,4 М растворе NaOH (30 мин при 45 °С и постоянном помешивании).

2. Помещают мембрану в 0,2 М *трис*-HC1 буфер pH 7,5 с 0,1 х SSPE и 0,1%-ный ДДС–Na на 30 мин при 45 °С.

3. Хранят мембрану в запаянном пластиковом пакете с 2 х раствором SSPE при 4 °С.

Задания.

1. Сделать вывод о гомологии последовательности гена 18S рРНК животных, растений и микроорганизмов.

2. Определить, в какой «цвет» будет окрашена мишень после проведения гибридизации предложенной ниже молекулы ДНК с четырьмя разными зондами. Мишень (показана только одна цепь молекулы):

5'-atgagtacaatctaaatcccttaacgaggatccattggagggcaagtctggtgccagcagccgcg gtaattccagctccaatagcgtatatttaagttgttgcagttaaaaagctcgtagttgaaccttgggatgggtc ggccggtccgcctttggtgtgcattggtcggcttgtcccttcggtcggcgatacgctcctggtcttaattggccgg gtcgtgcctccggcgctgttactttgaagaaattagagtgctcaaagcaagcctacgctctggatacattagcatgggat aacatcataggatttcgatcctattgtgttggcttcgggatcggagtaatgattaacagggacagtcgggggcattcgtat ttcatagtcagaggtgaaattcttggatttatgaaagacgaacaactgcgaaagcatttgccaaggatgtttt cattaatcaa-gaacgaaagttgggggctcgaagacgatcagataccgtcctagtc tcaaccataaacgatgccgac-cagggatcagcggatgttgcttataggactccgctggcaccttatgagaaatcaaagttttt-gggttccgggggggagtatggtcgcaaggc tgaaacttaaaggaattgacggaagg gcaccaccaggagtg-gagcctgcggcttaat-3'

Зонды (синтетические одноцепочечные олигонуклеотиды): 5'(FAM)-aaaagatgacggtcaagacctcgtcctttctctctt-B'

5'(DOE)-ctaattctccgtcacccgtt-3';

5'(TAMRA)-aaagtaacagcgccggaggcacgaccc-3'

5'(Cy5)-tcgcggcgacgtgggtggttcgcc-3'

Контрольные вопросы:

1. Что называют мишенью и зондом, каково их назначение?
2. Зачем ДНК-мишень и ДНК-зонд подвергают денатурации перед нанесением на мембраны?
3. Почему точно так же обрабатывают PI 1K и одноцепочечные синтетические олиго-ДНК-зонды, если они участвуют в гибридизации?
4. Почему в ходе работы не используется предгибридизация с ДНК из спермы лосося?
5. Почему необходимо обязательно использовать перчатки при обращении с мембраной для гибридизации?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 9. «КЛОНИРОВАНИЕ ФРАГМЕНТОВ ДНК В КЛЕТКАХ E. COLI»

Клонирование – биотехнологический процесс, позволяющий получать идентичные копии фрагментов ДНК, генетически идентичные клетки или организмы в практически неограниченном количестве. Клонирование ДНК позволяет из единичного фрагмента ДНК получить большое количество его копий, достаточное, чтобы выделить этот фрагмент как химически чистое вещество и проанализировать его (секвенировать или экспрессировать входящие в его состав элементы). Есть два основных подхода к клонированию ДНК:

– клонирование ДНК in *vivo* (с использованием живой системы – вирусов, клеток микроорганизмов, чаще всего *E. coli,* и дрожжей; в англоязычной и переводной литературе такие клопы ДНК чаще называют искусственными хромосомами, соответственно virus, bacteria и yast artificial chromosome, сокращенно VAC, BAC и YAC);

– амплификация методом ПЦР (клонирование ДНК *in vitro).*

ПЦР – более удобный для исследователей подход, так как система *in vitro* более предсказуема и технологична, однако этот метод имеет два серьезных недостатка. Во-первых, используя ПЦР, нельзя клонировать достаточно протяженные фрагменты ДНК. Так, при использовании специальной высокопроцессивной и точной ДНК-полимеразы (например, PfuДНК-полимеразы) длина амплифицируемых фрагментов превышает 10 тыс. п.н., а при использовании «обычной» TaqДНК-полимеразы она составляет не более 3–4 тыс. п.н., а чаще только 1–2 тыс. п.н. Во-вторых, система *in vitro* не защищена от ошибок, которые допускают любые полимеразы в процессе матричного синтеза ДНК (TaqДНК-полимераза – 2–3 нуклеотида на каждые 10 тыс. п.н.), эти ошибки, воспроизводясь с каждым циклом ПЦР, накапливаются вместе с целевым фрагментом.

В отличие от ПЦР, фрагмент ДНК, клонированный в живой системе (in vivo), особенно в бактериальной или дрожжевой клетке, воспроизводится с гораздо большей точностью, поскольку ошибки, допускаемые ДНК-полимеразой, исправляются ферментами системы ДНК-репарации (так, частота ошибок ДНК, клонированной в E. coli, составляет 1 нуклеотид на 106 п.н., в дрожжах – 1 нуклеотид на 10^7–10^8 п.н.). Длина фрагмента, клонированного в бактериальных клетках, может составлять около 100 тыс. п.н., а в дрожжевых клетках она практически не ограничена (может достигать размера целой хромосомы – около 1 млн п.н.). Основной недостаток клонирования *in vivo* – низкая технологичность, а именно сложность и многостадийность процесса, зависящего от большого числа факторов, связанных с жизнедеятельностью клеточных культур, которые нужно предварительно готовить, постоянно поддерживать, наращивать, что занимает значительное время.

Процесс клонирования ДНК *in vivo* состоит из нескольких этапов:

– подготовка фрагмента ДНК и вектора для его клонирования;

– получение рекомбинантной ДНК (гибридизация и лигирование);

– трансфекция и трансформации клеток;

– отбор трансформированных клонов, наращивание клеточной массы;
– выделение продуктов клонирования (Рисунок 27).

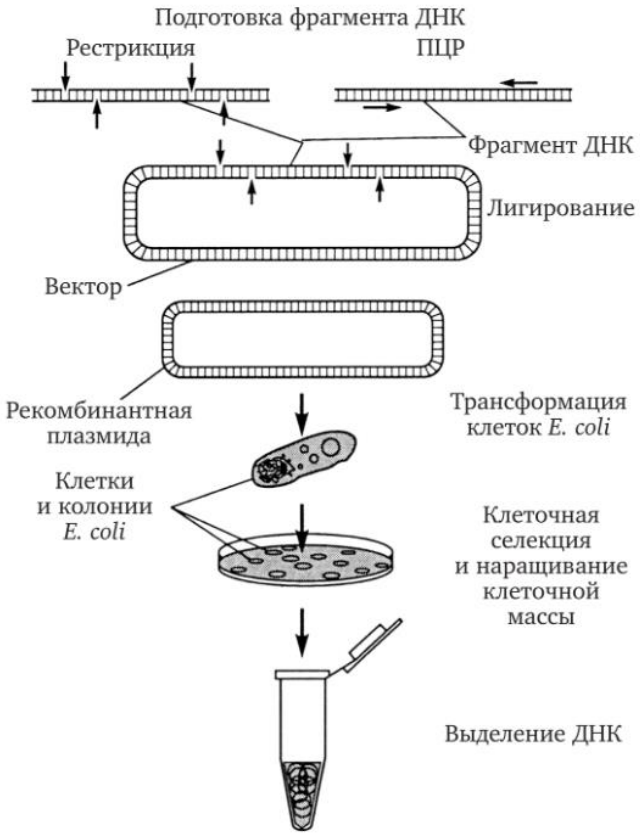


Рисунок 27 – Схема процесса клонирования фрагмента ДНК *in vivo* в клетках *E.*coli

Фрагмент ДНК, вырезанный с помощью рестриктазы (фермент, катализирующий разрывы в цепях ДНК) или полученный с помощью ПЦР, соединяется с молекулой вектора (молекула ДНК, предназначенная для создания рекомбинантной плазмиды и переноса ее в бактериальную клетку) с помощью ДНК-лигазы (фермент, сшивающий одноцепочечные разрывы ДНК).

Рестриктазу подбирают таким образом, чтобы на векторе имелся только один сайт рестрикции, и такой же сайт выбирают в исходной ДНК (если фрагмент получают путем рестрикции) или воспроизводят на 3'-конце олигонуклеотидного праймера для ПЦР.

Клонируемый фрагмент ДНК и ДНК-вектор должны остаться нетронутыми после специфичного действия рестриктазы, поскольку только в этом случае будет соблюдаться необходимое для лигирования условие – наличие липких концов ДНК-вектора и комплементарных им липких концов ДНК-фрагмента. В некоторых случаях, когда для формирования рекомбинантной плазмиды используется ПЦР-фрагмент, можно обойтись вообще без рестрикции. Дело в том, что TaqДНК -полимераза, достигнув 5'-конца матрицы, добавляет к 3'-концу синтезируемого фрагмента некоторое количество нуклеотидов А, формируя так называемый поли(А)-хвост – одноцепочечную ДНК. Для по-

ли(А)-лигирования создан ряд линейных векторов с поли(Т)-хвостами, к которым по правилу комплементарности присоединяются хвосты ПЦР фрагмента, а лигаза, неспецифичная к последовательности сшиваемой ДНК, сращивает концы вектора и ПЦР-фрагмента, образуя кольцевую молекулу ДНК – рекомбинантную плазмиду.

Полученная рекомбинантная ДНК (рекомбинантная плазмида или искусственная бактериальная хромосома – BAC) используется для трансформации бактериальной клетки, в которой при каждом делении синтезируются новые копии рекомбинантной ДНК. Накопившуюся плазмидную ДНК выделяют особым образом, не захватывая геномной ДНК бактерии и по возможности отделяя от других бактериальных плазмид. Для этого применяют несколько методов, например, ультрацентрифугирование в градиенте плотности CsCl, гельфильтрацию или сорбционную хроматографию. В настоящей работе для выделения плазмид будет использован более простой, но широко распространенный метод щелочного лизиса

Методы клонирования ДНК *in vivo* и *in vitro* не следует противопоставлять: они очень удачно дополняют друг друга. ПЦР – удобный метод получения фрагмента ДНК для последующего клонирования и наработки в больших (миллиграммовых) количествах и в чистом виде, например, для секвенирования, гибридизации (в роли мишени или зонда), использования в качестве ДНК-стандартов или создания геномных библиотек (клонотек). Кроме того, ПЦР в силу относи тельной простоты и оперативности используют для поэтапного контроля процесса клонирования *in vivo*. В то же время клонирование фрагментов ДНК производят необязательно с целью амплификации ДНК-продукта. Искусственные хромосомы в трансформированных ими клетках бактерий или дрожжей могут экспрессироваться (транскрибироваться) подобно геномной ДНК, а их транскрипты использоваться для биосинтеза белков (при соответствии генетического кода и регуляторных сигналов ДНК хозяина и чужеродной). Таким образом, клоны могут служить источником как РНК, так и целевого белка. Последнее направление очень перспективно и уже используется в промышленной биотехнологии (например, для получения инсулина человека с помощью микроорганизмов).

Для оптимальной работы используемых для клонирования ферментов необходимо строгое соблюдение определенных условий реакции. Формирование искусственной хромосомы – также непростой процесс, требующий точного знания последовательности нуклеотидов вектора и наличия его в чистом виде. Кроме того, желательно, чтобы вектор включал маркерный фрагмент, необходимый для детекции его правильного формирования и факта трансформации им бактериальных клеток, а также для последующей селекции только трансформированных штаммов, несущих вставку целевой ДНК. Такими маркерными фрагментами чаще всего служат гены устойчивости к антибиотикам (например, ампициллину) и реже гены хроматофоров или флюорофоров (например, зеленого белка медузы), которые окрашивают трансформированные клоны. Поэтому оптимальным для практической работы является использование готовых к упо-

треблению наборов реагентов, в частности препаратов рестриктаз с соответствующими готовыми буферными растворами и наборов для лигирования (вектор с точно определенной структурой, препарат ДНК-лигазы, соответствующий ей буферный раствор и описание процедуры лигирования). Сейчас также доступны готовые штаммы бактериальных клеток (в лиофилизированном или замороженном состоянии), специально подготовленные для успешной трансформации (так называемые компетентные клетки с нарушенной клеточной стенкой или вообще без нее, лишенные собственных плазмид).

Для выделения плазмидной ДНК предлагаются коммерческие наборы, основанные на сорбции-десорбции ДНК с суспендированным или нанесенным на полупроницаемую мембрану сорбентом. Однако изложенный ниже метод щелочного лизиса менее сложен в использовании и достаточно широко применяется в молекулярно-биологических лабораториях, особенно для препаративных целей.

Цель работы. Научиться основным приемам клонирования фрагментов ДНК.

Оборудование и материалы.

1. Термостат твердотельный для микропробирок вместимостью 1,5 мл.
2. Термостат твердотельный с функцией охлаждения для микропробирок вместимостью 1,5 мл.
3. Центрифуга рефрижераторная до 3000g для пробирок вместимостью 50 мл.
4. Клеточный инкубатор (микробиологический термостат-«качалка»).
5. Ламинарный бокс.
6. Термостат (водяной банк).
7. ПЦР-фрагмент гена 18S рРНК, очищенный методом электрофореза и элюированный из геля с помощью набора Diatom DNA Elution.
8. Набор реагентов для лигирования pCEM-T («Promega Co»).
9. Суспензионная культура клеток кишечной палочки *E.*coli в среде LB.
10. Жидкая культуральная среда LBЭ: 10 г бактотриптона, 5 г дрожжевого экстракта, 10 г NaCl; донести 1 М раствором NaOH до pH 7,5, водой до 1 л, автоклавировать 40 мин под давлением 1 тех. атм (760 мм рт. ст.).
11. Агаризованная культуральная среда LB с ампициллином: 15 г бактоагара на 1 л жидкой среды LB, растворить агар при кипячении в микроволновой печи, автоклавировать 40 мин под давлением 1 тех. атм, охладить до 50–66 ºС, добавить 200 мг натриевой соли ампициллина и перемешать для полного растворения, готовую среду сразу же разлить по чашкам Петри (10–25 мл на каждую в зависимости от диаметра), чашки со средой закрыть, после застывания перевернуть, хранить завернутыми в кальку при 2–8 ºС.
12. 50 мМ раствор $CaC1_2$ (стерильный).
13. 100 мМ раствор $CaC1_2$ (стерильный).
14. 2 М раствор глюкозы.
15. 1 М *трис-HCl* буфер pH 8.
16. 0,5 М раствор ЭДТА–Na pH 8.

17. 1 М раствор NaOH
18. 10%-ный раствор ДДС–Na.
19. 10 М раствор ацетата аммония.
20. 2 М раствор ацетата аммония.
21. Изопропанол.
22. ТЕ-буфер (10 мМ трис-HCl, 1 мм ЭДТА–Na pH 8).
23 Деионизованная вода.

Ход работы.

Внимание! Все работы с культурами клеток E.coli производить в ламинарном боксе во избежание их загрязнения посторонней микрофлорой .

Подготовка рекомбинантной ДНК для клонирования.

В качестве целевого фрагмента ДНК предлагается использовать ПЦР-фрагмент гена 18S рРНК, очищенный методом элюции с геля после электрофореза. Для прямого лигирования рекомендуется использовать линейный вектор с поли(Т)– хвостами, такой, например, как pGEM-T. Процедура лигирования производится в точном соответствии с протоколом к используемому набору реагентов

Подготовка препарата компетентных клеток E.coli.

Этот препарат необязательно производить каждый раз заново: можно использовать готовые препараты при условии хранения культуры при минус 70 ºС.

1. Наращивают ночную культуру *E. coli* в 10 мл среды LB (16–18 ч при 37 °С).

2. Суспендируют 1,5 мл ночной культуры *E. coli* в 40 мл среды LB, предварительно подогретой до 37 ºС.

3. Инкубируют суспензию при постоянном перемешивании при 37 ºС до тех пор, пока оптическая плотность суспензии, измеренная при 600 нм против чистой среды LB, не достигнет значения около 0,4–0,6 (обычно на это требуется 2,5–3 ч).

4. Переносят суспензию в центрифужную пробирку вместимостью 50 мл и помещают в лед на 20 мин.

5. Центрифугируют клеточную суспензию 15 мин при 3000 g и 4ºС.

6. Осторожно, как можно более полно удаляют супернатант, к осадку добавляют 20 мл стерильного и охлажденного на льду 50 мМ раствора $CaC1_2$, осадок очень осторожно суспендируют (с помощью стеклянной пинетки с оплавленным концом).

7. Помещают пробирку в лед на 20 мин.

8. Центрифугируют клеточную суспензию 15 мин при 3000 g и 4 ºС.

9. Осторожно, как можно более полно удаляют супернатант, к осадку добавляют 4 мл стерильного и охлажденного на льду 100 мМ раствора $CaC1_2$, осадок очень осторожно суспендируют (с помощью стеклянной пипетки с оплавленным концом).

10. Готовый препарат компетентных клеток распределяют по отдельным микропробиркам (по 20 мкл).

Внимание! Хранить препарат при 2–8°С не более 18 ч или при минус 70 °С не более 2 мес.

Трансформация клеток E. coli, селекция трансформированных штаммов и наращивание клеточной массы.

1. К 20 мкл препарата компетентных клеток добавляют 40 нг плазмидной Д1IK (рассчитывают требуемый объем раствора реакционной смеси в соответствии с описанием к используемому набору реагентов для лигирования).

2. Смешивают жидкости очень осторожным и мягким встряхиванием.

3. Помещают суспензию в лед на 30 мин.

4. Производят «тепловой шок»: нагревают суспензию клеток до 42°С на водяной бане, выдерживают 40 сек и снова помещают в лед на 10 мин.

5. Добавляют к суспензии 80 мкл жидкой среды LB, аккуратно перемешивают и инкубируют 2–4 ч в клеточном инкубаторе при 37 °С и постоянном перемешивании со скоростью 225 g.

6. Высевают клетки на агаризованную среду LB с ампициллином, для этого переносят всю клеточную суспензию на поверхность среды в чашке Петри и равномерно распределяют ее с помощью шпателя.

7. Инкубируют чашки при 37 ºС в течение ночи (16–18 ч).

8. Отбирают с помощью микробиологической петли одну из колоний трансформированных клеток (трансформированные клетки, не содержавшие рекомбинантной плазмиды, не обладают устойчивостью к ампициллину и не растут на среде с этим антибиотиком) и переносят клетки в 10 мл жидкой среды LB.

9. Инкубируют в течение ночи (16–18 ч) в клеточном инкубаторе при 37 °С и постоянном перемешивании со скоростью 225 *g*. Готовую ночную культуру используют немедленно.

Выделение плазмидной ДНК.

1. Отбирают 1,5 мл ночной культуры трансформированных клеток в микропробирку вместимостью 1,5 мл, центрифугируют 30 сек при 5000 *g*, супернатант удаляют. Повторяют это еще 2 раза в той же пробирке для увеличения массы осадка.

2. Центрифугируют дополнительно 10 сек при 5000 *g*, супернатант полностью удаляют.

3. Далее выделение плазмидной ДНК проводят согласно методике.

Задания.

1. Получить клонированный фрагмент ДНК в виде рекомбинантной ДНК.

2. Измерить концентрацию ДНК и охарактеризовать качество полученного препарата спектрофотометрическим методом. Сделать вывод о пригодности полученного материала для последующей молекулярно-биологической работы.

Контрольные вопросы:

1. Как действуют ДНК-лигазы?
2. Какова роль ДНК-лигаз в живой клетке?
3. Каковы оптимальные условия реакции лигирования?
4. Каковы основные этапы процесса клонирования ДНК?
5. Какую роль играют лигаза, рестриктраза, ДНК-полимераза в процессе клонирования?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 10. «ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ДНК»

Первичная структура ДНК – последовательность составляющих ее нуклеотидов. Чаще всего имеется в виду прямая (ведущая) цепь молекулы ДНК. Она не служит матрицей для синтеза РНК (нсматричная цепь ДНК), и обычно структуру именно этой цепи приводят в данных по строению ДНК или отдельных генов, при этом слева располагают 5'-, а справа 3'-конец цепи.

Определение последовательности нуклеотидов ДНК, или секвенирование (от англ, sequence – последовательность), – важнейший элемент расшифровки геномов, молекулярной идентификации живых организмов, выявления структуры и функций генов, производства направленных изменений наследственной информации и др. Первым методом секвенирования ДНК стал прямой ферментативный метод, предложенный Ф. Сэнджером и Д. Коулсоном в 1975 г. В качестве матрицы в реакции полимеразного копирования использовался одноцепочечный фрагмент ДНК, в качестве праймеров – синтетические олигонуклеотиды или фрагменты, полученные при гидролизе ДНК рестриктазами, а в качестве фермента – фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I (Pol I) из E. coli. Метод включал два этапа. На первом этапе проводили полимеразную реакцию в присутствии всех четырех типов дНТФ (один из которых радиоактивно мечен ^{33}P), получая на выходе набор продуктов неполного копирования матричной ДНК. На втором этапе эти продукты очищали от несвязавшихся дезоксирибонуклеозидтрифосфатов и использовали для серии полимеразных реакций либо только с каким-то одним дНТФ в каждой («плюс» система), либо с тремя дНТФ, исключая те, что участвовали в «плюс» системе («минус» система). В результате во всех реакциях в определенный момент происходило прерывание синтеза, причем в «плюс» системе – сразу после включения единственного участвующего в реакции дНТФ, в «минус» системе, где такой дНТФ отсутствовал, – перед ним. Полученные таким образом восемь образцов подвергали электрофорезу, радиоавтографировали его и определяли последовательность исходной ДНК. Этим способом, например, была секвенирована ДНК фага φX174, состоящая из 5386 п.н.

Позже данный метод значительно усовершенствовали благодаря возможности использования специфических терминаторов синтеза ДНК – 2',3'-дидезоксирибонуклеозидтрифосфатов (ддНТФ). Метод стал гораздо технологичнее и в несколько модифицированном виде применяется до сих пор, будучи реализованным в автоматическом режиме. В основе метода лежит также фер-

ментативное копирование матричной ДНК с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I из E. coli при использовании синтетических олигонуклеотидных праймеров, при этом специфическую терминацию синтеза обеспечивают добавлением в реакционную смесь помимо четырех типов дНТФ (один из них мечен ^{33}P) одного из ддНТФ (ддАТФ, ддТТФ, ддЦТФ или ддГТФ), который включается в растущую цепь ДНК и таким образом обрывает ее дальнейший рост из-за отсутствия 3'-ОН-группы. Продукты реакции, так же, как и в «плюс»-«минус» системе, подвергают электрофорезу, при этом чем короче фрагмент, тем дальше он смещается от старта электрофореза. В итоге последовательность нуклеотидов считывают с радиоавтографа в направлении от фронта к старту и в соответствии с тем, какой из ддНТФ был использован для получения набора фрагментов на каждой из четырех дорожек электрофореграммы (Рисунок 28).

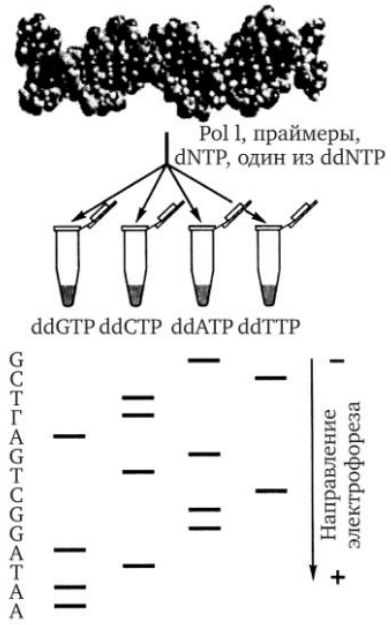


Рисунок 28 – Схема секвенирования ДНК методом Сэнджера с использованием терминаторов синтеза: Pol I –ДНК-полимераза I, ddATP, ddTTP, ddGTP и ddCTP – использованный в реакции дидезоксирнбонуклеозидтрифосфат (ддАТФ, ддТТФ, ддГТФ, ддЦТФ соответственно). Внизу слева приведена нуклеотидная последовательность секпенирусмого фрагмента ДНК

В настоящее время для получения меченых фрагментов ДНК используют не радиоактивную, а флуоресцентные метки, включенные непосредственно в ддНТФ и подобранные таким образом, чтобы длины волн испускаемого ими света различались. Это позволяет проводить все четыре реакции в одной пробирке и разделять продукты на одной дорожке геля, а детектировать их с использованием соответствующих светофильтров. Кроме того, для проведения реакции теперь используют термостабильные и высокоточные ферменты, обладающие высокой процессивностью и позволяющие секвенировать ДНК в ходе ПЦР. Последнее очень важно для повышения чувствительности и соответственно уменьшения количества требуемой для секвенирования ДНК. Кроме того, электрофорез и детекцию субфрагментов ДНК реализуют сейчас в авто-

матическом режиме с помощью приборов для капиллярного электрофореза с лазерными детекторами высокого разрешения. Время секвенирования существенно сократилось (до 1,5–2 ч), а последовательность нуклеотидов, которую можно расшифровать за один прием, увеличилась (до 600–700 п.н.).

Другой метод, предложенный А. Максамом и У. Гилбертом, основан на специфической химической деградации фрагмента ДНК, радиоактивно-меченого с одного конца. После концевого мечения препарат ДНК разделяли на четыре аликвоты и каждую обрабатывали реагентом, модифицирующим одно или два из четырех оснований. В частности, пуриновые остатки метилировали диметилсульфатом, затем метиладенин отщепляли соляной кислотой, а метилгуанин – пиперидином при температуре 0 °С. Полученный препарат инкубировали при 90 °С в щелочной среде и тем самым разрывали сахарофосфатную цепь в местах отщепления оснований. Пиримидиновые основания модифицировали гидразином. Если реакцию вести в бессолевой среде, то модифицируются как цитозин, так и тимидин, если в присутствии 2М NaCl – только цитозин. Расщепление цепи ДНК на фрагменты и в этом случае осуществляют пиперидином. Условия реакций подбирали таким образом, чтобы получить в итоге полный набор субфрагментов разной длины. Последующий электрофорез в полиакриламидном геле позволял восстановить полную структуру исследуемого фрагмента. Теоретически этот метод можно было бы автоматизировать, причем не только процедуру электрофореза, но и все подготовительные стадии обработки ДНК, однако широкого распространения метод не получил и в настоящее время практически не используется.

Цель работы. Ознакомиться с секвенированием ДНК методом Ф. Сэнджера.

Оборудование и материалы.

1. Термостат твердотельный для микропробирок вместимостью 0,5–1,5 мл.
2. Микроцентрифуга до 12 000 *g*.
3. Автоматические дозаторы переменного объема с наконечниками.
4. Термостат (водяная баня).
5. Вакуумная установка, собранная из водоструйного насоса и круглодонной колбы на 200 мл с притертой крышкой.
6. Прибор для вертикального электрофореза в ПАЛГ (лучше специальный, предназначенный для электрофореза нуклеиновых кислот пластиной размером 20х50 см. принудительным охлаждением и возможностью формировать гель толщиной 1 мм и менее).
7. Вакуумный термостат.
8. Микропробирки вместимостью 0,5–0,6 мл.
9. ДНК-матрица для секвенирования (например, ПЦР-продукт, полученный с ДНК растительного или животного происхождения специфичными для гена 18S рРНК олигонуклеотидными праймерами и очищенный методом электрофореза и элюции ДНК из геля.

10. Раствор праймера для секвенирования, 2,22 нг/мкл [может использоваться любой из тех, что были взяты для получения ДНК-матрицы на основе гена 18S рРНК (см. ранее), однако для удобства чтения последовательности лучше взять прямой праймер, гомологичный 3'-концу обратной (матричной) цепи ДНК-матрицы, в этом случае прочитанная последовательность будет соответствовать прямой цепи ДНК)].

11. Набор реагентов для секвенирования (например, T7 Sequencing Kit производства Pharmacia).

12. 2 М раствор NaOH.

13. 3 М ацетатный буферный раствор pH 4,5.

14. Стерильная деионизованная вода.

15. Абсолютный (100%-ный) этанол.

16. 96%-ный этанол.

17. 70%-ный этанол.

18. 7х буферный раствор для отжига (280 мМ *трис-HC1* буферный раствор pH 7,5,100 мМ $MgCl_2$,350 мМ NaCl).

19. Стоп-раствор (95%-ный деионизованный формамид 20 мМ ЭДТА–Na pH 7,5, 0,1%-ный бромфеноловый синий, 0,1%-ный ксилеицианол).

20. 6%-ный раствор акриламида (5,7%-ный акриламид, 0,3%-ный метилен-бис-акриламид, 48%-ная мочевина, 1хТВЕ-буфер).

21. 25%-ный раствор персульфата аммония.

22. ТЕМЭД.

23. Фиксирующий раствор: 10%-ная уксусная кислота, 10%-ный метанол.

24. Бумага ватман 3ММ.

25. Фильтровальная бумага.

26. ТВЕ буфер pH 8,0: *трис* – 10,8 г, борная кислота – 5,5 г, ЭДТА–Na_2 х $2H_2O$ – 0,93 г, вода –до 1 л.

Ход работы (по методу Сэнджера с использованием терминаторов синтеза в интерпретации с применением комплекта реагентов Pharmacia Co).

Проведение реакции секвенирования.

1. Готовят раствор ДНК с концентрацией 350–400 нг/мкл (можно использовать продукт ПЦР после его элюции из агарозного геля, в микропробирку вносят 8 мкл готового раствора ДНК.

2. Добавляют 2 мкл 2 М раствора NaOH, интенсивно перемешивают и инкубируют 10 мин при комнатной температуре для денатурации ДНК.

3. Добавляют 3 мкл 3 *М* ацетатного буферного раствора и 7 мкл стерильной деионизованной воды, перемешивают и добавляют 60 мкл 96%-ного этанола, еще раз аккуратно перемешивают.

4. Центрифугируют 10 мин при 12 000g, супернатант полностью удаляют, осадок ДНК аккуратно ополаскивают 20 мкл 70%-ного этанола, высушивают на воздухе в открытой пробирке, а затем растворяют в 10 мкл стерильной деионизованной воды.

5. Добавляют 2 мкл раствора праймера (2,22 нг/мкл) и 2 мл 7х буфера для отжига. Нагревают смесь до 65 °С, выдерживают при этой температуре 2 мин и медленно охлаждают при комнатной температуре (не менее 30 мин).

6. Разделяют смесь на четыре пробирки, подписав каждую в соответствии с названием нуклеотидов (например, А, Т, Г и Ц). Следуя инструкции к используемому набору реагентов для секвенирования, проводят реакцию синтеза-мечения субфрагментов ДНК (например, при использовании T7 Sequencing Kit добавляют в каждую из четырех пробирок с ДНК-матрицей 2,5 мкл смеси дНТФ, 1 мкл соответствующего ддНТФ с меткой, 2 мкл раствора labelling mix, 1 мкл 300 мМ раствора дититреитола, 2 мкл раствора Т7 ДПК-полимеразы (1,5 ед. акт/мкл); аккуратно перемешивают пипетированием; инкубируют 2–5 мин при температуре 4 °С; по 4,5 мкл смеси отбирают и вносят в новые пробирки с 2,5 мкл раствора termination mix, предварительно маркированные и нагретые до 37 °С; выдерживают еще 2–5 мин при 37 °С; добавляют по 5 мкл стоп-раствора, аккуратно перемешивают пипетированием, до использования хранят при температуре минус 18 °С).

Приготовление геля для секвенирования и проведение электрофореза.

1. Тщательно отмывают стеклянные пластины прибора для электрофореза, используя детергенты, ополаскивают сначала дистиллированной водой, затем 96%-ным этанолом.

Внимание! С этого момента со стеклянными пластинами работать только в перчатках!

Пластины сушат на воздухе и протирают фильтровальной бумагой до блеска.

2. Одну из стеклянных пластин (лучше переднюю – с вырезом для гребенки) силиконизируют путем обработки 4%-ным раствором дихлордиметилсилана в гексане (равномерно распределяют жидкость по всей поверхности стекла из расчета 0,5 мл на 100 $см^2$ пластаны), высушивают на воздухе при комнатной температуре, однократно ополаскивают дистиллированной водой, затем абсолютным этанолом, снова высушивают и протирают фильтровальной бумагой.

3. Собирают камеру для заливки геля толщиной слоя 0,25–1 мм.

4. Готовят смесь для формирования геля-пробки (для герметизации камеры). Для этого аккуратно смешивают на холоде 7 мл 6%-ного раствора акриламида, 30 мкл 25%-ного раствора персульфата аммония и 30 мкл ТЕМЭДа (объемы рассчитаны на пластину геля площадью 20 х 50 см толщиной 0,5 мм).

5. Располагают камеру для геля горизонтально, заливают гель-пробку в нижнюю часть камеры на 4–5 см. Гель должен формироваться примерно 5 мин при комнатной температуре, если для этого нужно больше времени, следует увеличить объемы персульфата аммония и ТЕМЭДа в смеси для приготовления геля.

6. Готовят смесь для основного геля. Для этого аккуратно смешивают на холоде 70 мл 6%-ного раствора акриламида, 90 мкл 25%-ного раствора персульфата аммония и 90 мкл ТЕМЭДа (объемы рассчитаны на пластину геля

площадью 20 х 50 см, толщиной 0,5 мм). С помощью водоструйного насоса смесь вакуумируют, доводят до закипания и кипятят на холоде еще 1 мин для полного удаления растворенных газов.

7. Устанавливают камеру для геля под углом около 10° к горизонту и аккуратно заливают внутрь смесь для основного геля, не допуская образования пузырей. Помещают в заполненную камеру гребенки для формирования лунок толщиной 0,25 мм (длина зубцов должна быть не менее 10 мм). Гель полимеризуется 30 ± 5 мин при комнатной температуре, если для этого требуется больше времени, необходимо увеличить объемы персульфата аммония и ТЕМЭДа в приготавливаемой для геля смеси. Готовый гель можно хранить 1 ч при комнатной температуре или в течение ночи при 2–8 °С плотно завернутым в полиэтиленовую пленку для предотвращения высыхания.

8. Удаляют гребенку из геля, собирают камеру для электрофореза (от катода к аноду), заливают в нее 1 х ТВЕ-буфер, включают напряжение (1800 В на пластину геля шириной 20 см и толщиной 0,5 мм) и проводят процесс предэлектрофореза, пока температура геля и буфера не достигнет 55 °С.

9. Выключают напряжение. Промывают лунки путем инъекции в них 1 х ТВЕ-буфера с помощью автоматической дозатора.

10. Пробирки с реакционными смесями А, Т, G и С помещают в кипящую воду на 2–3 мин для денатурации ДНК, после чего вносят в лунки геля по 3 мкл каждой пробы.

11. Включают напряжение (1800 В на пластину геля шириной 20 см и толщиной 0,5 мм) и продолжают электрофорез до тех пор, пока краситель ксиленцианол (сине-голубого цвета) не опустится на 5 см ниже линии старта. Необходимо поддерживать температуру буфера и геля на уровне 50–55 °С.

12. По окончании электрофореза выключают напряжение, разбирают прибор и удаляют силиконизированную стеклянную пластину с поверхности геля. Гель должен остаться на противоположной пластине.

Обработка гелевой пластины и визуализация результата.

1. Гель вместе со стеклянной пластиной погружают на 15–20 мин в фиксирующий раствор.

2. Переносят гель на лист ватмана ЗММ и сушат 75 мин в вакуумном термостате при температуре 85 °С.

3. Визуализируют субфрагменты на геле в соответствии с использованной меткой (радиоавтографию на рентгеновской пленке или сканирование в УФ-свете для детекции флуорофоров).

4. Прочитывают последовательность нуклеотидов в ДНК-матрице в направлении, противоположном электрофорезу.

Задания.

1. Определить первичную последовательность ДНК, электрофорез субфрагментов которой приведен на рисунке 29.

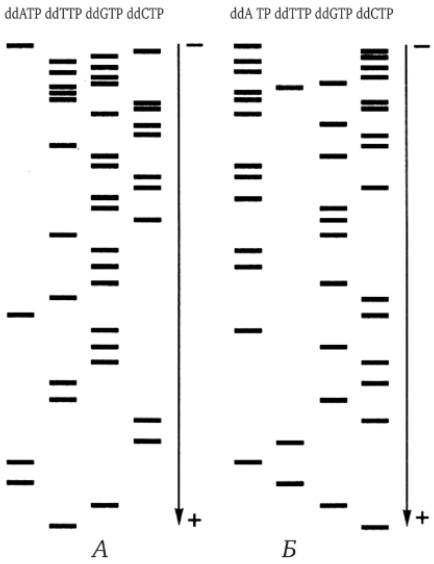


Рисунок 29 – Схема радиоавтографа, полученного при секвенировании фрагмента ДНК: *А* – прямая цепь; *Б* – обратная цепь ddATP, ddTTP, ddGTP и ddCTP – использованный в реакции дидезоксирибонуклеозидтрифосфат (ддАТФ, ддТТФ, ддГТФ, ддЦТФ соответственно); стрелка – направление электрофореза (от катода к аноду)

2. Используя интернет-базы данных (например, NCBI), установить наиболее близкие гомологии с первичными структурами фрагментов, которые определены в результате секвенирования или по изображенному на рисунке 29 радиоавтографу.

Контрольные вопросы:

1. Каковы альтернативные методы определения первичной структуры ДНК?
2. В чем заключаются основные модификации метода Ф. Сэнджера, позволившие автоматизировать процесс секвенирования ДНК?
3. Что является основным ограничением для секвенирования фрагмента ДНК за один этап?
4. Как осуществляют секвенирование последовательностей ДНК, превышающих длину 500–700 п.н.?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 11. «ИНФОРМАЦИОННЫЙ ПОИСК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БАЗ ДАННЫХ ИНТЕРНЕТА»

Информационная сеть Интернет стала обычным атрибутом окружающей нас действительности. Однако для неподготовленного пользователя далеко не все ее возможности очевидны. Прежде всего необходимо знать, к каким ресурсам следует обращаться с той или иной целью, соответствующие электронные адреса (хотя их можно найти с помощью специальных поисковых систем). Затем нужно сформулировать цель поиска в одном или нескольких ключевых словах, в крайнем случае в одной короткой фразе и, наконец, вооружившись временем и терпением, разобрать свалившуюся на ваш компьютер уйму ссылок, в большей или меньшей степени похожих на то, что вы искали. Успех поиска определяется вашими способностями сформулировать запрос, сориентироваться в полученной информации и, выбрав какие-то новые ориентиры, быстро разработать новую или усовершенствовать старую стратегию поиска.

Самый простой пример – поиск научных статей по теме исследования, а также по авторам или названиям определенных организмов. Наиболее короткий путь – сайты (или электронные страницы) каких-либо библиотек соответствующей специализации. В частности, среди русскоязычных источников популярны сайты.

Помимо литературы, в Интернете имеются базы данных иного рода. Наиболее яркий пример – NCBI (http: //www.ncbi.nlm.nih.gov/). Это крупный ресурс, включающий в себя в том числе библиотеку PubMed, но наиболее ценен он огромной коллекцией последовательностей ДНК, начиная от коротких фрагментов с неустановленными функциями, фрагментов генов или генов-гомологов до целых хромосом и даже генов с указанием определенных генов. Пользуясь этой коллекцией, можно подобрать последовательности, характеризующие определённый вид живого организма, или решать обратную задачу – выявить уже опубликованные гомологии для известных последовательности и установить ее предполагаемую роль в геноме. Аналогичную работу можно проводить с РНК, а также, что наиболее интересно, устанавливать их взаимоотношения и быстро находить соответствующие ссылки на литературу.

Цель работы. Научиться работать с базами генетических данных и проводить анализ на наличие мутаций.

Задание 1. Поиск нуклеотидной последовательности гена (на примере гена CALR)

В конце прошлого и начале текущего столетия геном человека был расшифрован и для большинства хромосом были составлены цитогенетические карты. Всю полученную информацию можно получить при обращении к соответствующим базам данных. Ген – структурная и функциональная единица наследственности живых организмов. На сегодняшний день известно примерно 25 тыс. генов, которые кодируют информацию о структуре белков и РНК в геноме человека. Ген состоит из последовательности нуклеотидов: аденина (А),

тимина (T), гуанина (G) и цитозина (C). Поиск нуклеотидной последовательности гена – необходимый этап работы любого специалиста, работающего в области молекулярной биологии. Умение работы с последовательностью гена нужно, например, при подборе праймеров с целью дальнейшей оценки интересующего фрагмента ДНК на предмет наличия мутаций или каких-либо специфических последовательностей в гене (промоторы, стоп- и старт-кодоны, полиА-последовательности и др.). Ниже приведен пример тех действий, с помощью которых можно найти последовательность интересующего нас гена.

Ход работы.

1. Зайти на сайт базы NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

2. В левом окне выбрать «Gene», в правом окне написать общепринятое название нужного гена на английском языке (например, CALR) и кликнуть «Search». В окне будут показаны ссылки на данный ген для разных организмов и их ID. Также здесь указаны номер хромосомы, на которой локализован данный ген и номера нуклеотидов, соответствующих расположению гена на этой хромосоме. В частности, выбираем вариант гена CALR для человека (Homo sapiens (human)). ID этого гена в геноме человека – 811. Номер хромосомы, на которой расположен ген, – 19. Номера нуклеотидов гена в хромосоме: 12938600–12944490. Но при работе с этой нумерацией обязательно нужно учитывать, что она соответствует определенному номеру сиквенса данной хромосомы (NC). Так, в приведенном примере вариант сиквенса – это NC_000019.10.

3. Далее нужно кликнуть на вариант гена CALR для человека (Homo sapiens (human). В появившемся окне кликнуть на «Full Report» и выбрать «Gene Table».

4. Далее кликнуть закладку «GenBank». В появившемся окне представлена последовательность гена CALR.

Последовательность искомого гена дана в виде перечня нуклеотидов только одной цепи ДНК в направлении 5’→3’. Нуклеотиды представлены по 10 шт. в каждом столбце и по 6 столбцов в каждой строке. Нумерация нуклеотидов сквозная, независимо от места расположения стартового кодона и начала экзонов и интронов.

Задание 2. Поиск мРНК гена (на примере гена CALR)

мРНК (матричная рибонуклеиновая кислота) – это РНК, которая содержит информацию о первичной структуре белков. мРНК синтезируется на основе ДНК в ходе транскрипции, после чего используется в ходе трансляции как матрица для синтеза белков. Таким образом, мРНК играет важную роль в экспрессии генов. Умение находить нуклеотидную последовательность мРНК гена необходимо, например, при подборе праймеров на участок мРНК с целью качественной или количественной оценки экспрессии генов. Ниже приведен пример тех действий, с помощью которых можно найти последовательность мРНК интересующего нас гена.

Ход работы.

1. Зайти на сайт базы NCBI. В левом окне выбрать «Gene», в правом окне написать общепринятое название нужного гена на английском языке (например, CALR) и кликнуть «Search».

2. Найти вариант гена CALR для человека (Homo sapiens (human)) и кликнуть его. Далее нажать «Full Report» и выбрать «Gene Table». В появившемся окне представлен единственный для данного гена вариант мРНК с соответствующим номером NM_004343.3.

Важно: в данном случае для гена CALR представлена одна мРНК с номером NM_004343.3, но для других генов может быть сразу несколько последовательностей мРНК (под разными номерами NM), полученных при секвенировании соответствующих последовательностей разными группами ученых. Обычно нужно выбирать NM с наименьшим номером. Кроме NM в списке присутствуют ссылки на последовательности мРНК с номерами NX, это те последовательности, которые предсказаны при использовании биоинформатических программ.

3. Далее кликнуть «+» для «Exon table for RefSeq mRNA NM_004343.3…».

В появившемся окне будет более подробная информация о составе мРНК под соответствующим номером NM_004343.3 (количество экзонов, общее количество нуклеотидов в каждом из экзонов, а также количество кодирующих нуклеотидов в каждом экзоне). Кроме того, на данной странице дана информация о количестве интронов, аминокислот в соответствующем белке и др. Для просмотра последовательности нуклеотидов мРНК кликнуть на «NM_004343.3». В появившемся окне увидим последовательность мРНК гена CALR. Последовательность мРНК дана в виде перечня нуклеотидов (A, G, C и T вместо U) в направлении 5’→3’. Нуклеотиды представлены по 10 шт. в каждом столбце и по 6 столбцов в каждой строке. Нумерация нуклеотидов сквозная, независимо от места расположения стартового кодона и начала экзонов.

Задание 3. Определение количества экзонов и интронов в составе гена (на примере гена CALR) и поиск нуклеотидной последовательности какого-либо экзона или интрона (например, 9-го экзона гена CALR)

Экзон – кодирующий участок гена, сохраняющийся в молекуле зрелой мРНК. В генах экзоны чередуются с интронами. Интрон – некодирующий участок гена, находящийся между кодирующими областями (экзонами) и удаляемый из первичного РНК-транскрипта в процессе сплайсинга. Поиск нуклеотидной последовательности экзонов или интронов необходим, например, для того, чтобы оценить протяженность данных участков с целью установления соотношения длины, кодирующей и некодирующей областей гена. Также это важно при подборе праймеров с целью качественной оценки экспрессии генов (наличия процесса транскрипции), а также количественной оценки ее уровня. Ниже приведен пример тех действий, с помощью которых можно определить количе-

ство экзонов и интронов в составе гена, а также поиска нуклеотидной последовательности какого-либо экзона или интрона определенного гена.

Ход работы.

1. Зайти на сайт базы NCBI. В левом окне выбрать «Gene», в правом окне написать общепринятое название нужного гена на английском языке (например, CALR) и кликнуть «Search».

2. В появившемся окне нажать на «Full Report» и выбрать «Gene Table». В появившемся окне представлен единственный для данного гена вариант мРНК с соответствующим номером NM_004343.3.

3. Далее кликнуть «+» для «Exon table for RefSeq mRNA NM_004343.3…». В открывшейся таблице даны ссылки на все экзоны и интроны нужного гена с указанием их размеров в bp (base pair). При этом важно отметить, что в состав некоторых экзонов могут входить некодирующие нуклеотиды; в столбце «Length(bp)» можно увидеть, сколько нуклеотидов в каждом экзоне являются кодирующими, т. е. транслируются в белок. Кликая на соответствующие ссылки в столбце «Coding», можно отдельно просмотреть последовательность только кодирующих участков экзонов.

Сравните для примера последовательность кодирующей и некодирующей частей какого-либо экзона. Где могут располагаться некодирующие нуклеотиды?

4. Для того чтобы просмотреть всю нуклеотидную последовательность 9-го экзона гена CALR, нужно кликнуть на 9-й экзон, который в цифровом обозначении представлен как 12943713 – 12944490 (номера нуклеотидов в хромосоме).

В появившемся окне мы видим нуклеотидную последовательность всего (включая кодирующие и некодирующие участки) 9-го экзона гена

Таким же образом, кликая на соответствующие ссылки, можно просмотреть нуклеотидную последовательность только кодирующей части какого-либо экзона, а также последовательность всех интронов. Обычно количество интронов на один меньше количества экзонов. Так, в составе гена CALR имеются 9 экзонов и 8 интронов.

Нужно отметить, что, изменяя номера нуклеотидов в разделе «Change region shown» (в правой части окна) можно изменить область просматриваемого региона.

! Важно отметить, что бывают случаи, когда длина какого-либо экзона составляет всего лишь несколько нуклеотидов. В таких случаях некоторые ученые считают такой участок экзоном и, соответственно, присваивают этому экзону определенный порядковый номер. Другие же ученые не считаются с таким коротким экзоном и исключают его из общей нумерации. Все это приводит к возникновению путаницы при чтении научной литературы в отношении, например, расположения каких-либо известных мутаций в конкретном экзоне конкретного гена. Так, например, такая ситуация наблюдается в литературе в отношении 12/13 экзона в гене ASXL1, в котором локализованы

соматические мутации, ассоциированные в том числе, с онкогематологическими заболеваниями. В частности, ряд ученых при написании статей учитывают расположенный левее экзон № 3 длиной 3 нуклеотида, тогда как другие не учитывают его.

То есть клинически значимые мутации в гене ASXL1 в некоторых статьях описывают как мутации, расположенные в 12-м экзоне, в других же – как в 13-м. Например, в данной публикации авторы указывают, что клинически значимые мутации располагаются в 12-м экзоне.

В другом случае авторы в своей статье упоминают о проблеме с путаницей в нумерации экзонов. В частности, они пишут, что большинство мутаций в гене ASXL1 случаются в 13-м экзоне, который в большинстве изданий обозначается как 12-й.

Таким образом, при изучении литературы относительно номера интересующего экзона и др. всегда нужно всегда сопоставлять информацию из разных публикаций, а не ориентироваться лишь на какой-либо один источник.

Задание 4. Просмотр мРНК гена с подсвечиванием отдельно каждого экзона (например, выделение 9-го экзона гена CALR)

После того как приобретен навык нахождения нуклеотидной последовательности мРНК и отдельно экзонов и интронов, можно научиться выделять область отдельно одного экзона. Это очень удобно, например, когда нужно сопоставить длину какого-либо конкретного экзона с длиной всей остальной кодирующей области гена. Это можно сделать с помощью специальных инструментов, позволяющих каким-либо образом выделить интересующий нас участок ДНК. Например, в разных базах предоставляется функция выделения отдельного экзона с помощью окрашивания контрастным цветом. Также с помощью этих инструментов можно просмотреть расположение стартового кодона, регуляторных участков, транслируемую область гена и др.

Ход работы.

1. Зайти на сайт базы NCBI. В левом окне выбрать «Nucleotide», в правом окне написать общепринятое название нужного гена на английском языке (например, CALR) и кликнуть «Search».

2. В появившемся окне выбрать вариант мРНК CALR для человека (Homo sapiens (human)) с нужным номером NM (см. ранее) и кликнуть на него.

3. В появившемся окне представлена вся последовательность мРНК CALR для человека (Homo sapiens (human)) с выбранным номером NM

4. Для того чтобы в данной последовательности всей мРНК CALR подкрасить отдельный экзон и просмотреть его на фоне всей остальной последовательности, нужно кликнуть на любую из активных надписей «exon», находящихся слева. После такой манипуляции один из экзонов будет подсвечен.

Номер подсвеченного экзона уточняем в самой нижней части страницы, где нажатием кнопки «→» или ««←» можно подсветить и просмотреть любой из экзонов.

В нижней части окна указано, что выделен второй экзон из всех 9 экзонов мРНК CALR.

Задание 5. Поиск того нуклеотида в составе геномной ДНК и мРНК, после которого расположены определенный полиморфизм (SNP) или мутация с определенным rs (например, соматическая мутация c.1154_1155insTTGTC в гене CALR, rs65476509)

Термин SNP (single nucleotide polymorphisms) соответствует русскому термину «однонуклеотидные полиморфизмы» (ОНП). В данном случае важны три обстоятельства.

1. Термины SNP/ОНП объединяет не только действительно однонуклеотидные изменения первичной структуры ДНК (замены, инсерции и делеции). К этой же группе SNP/ОНП относят и другие замены, делеции и инсерции, которые затрагивают небольшие участки нуклеотидной последовательности; это может быть и два, и три, и более нуклеотидов.

2. Нет строгого разделения между понятиями «полиморфизм» и «мутация». Чаще всего разделение основано на распространенности возникшего изменения первичной структуры ДНК в популяции. Те изменения, которые присутствуют в популяции более чем в 1 % случаев, чаще относят к полиморфизмам; другие, присутствующие реже, чем в 1 % случаев, – к мутациям.

3. Для исключения путаницы в нумерации нуклеотидов при обозначении выявленных изменений первичной структуры ДНК большинству хорошо изученных полиморфизмов и мутаций присвоены определенные идентификационные номера RefSNP (rs). Такие номера имеют многие полиморфизмы, а также гаметические и соматические мутации.

Ниже приведен пример тех действий, с помощью которых можно найти позицию того нуклеотида в составе геномной ДНК и мРНК, после которого расположен определенный полиморфизм или мутация (SNP) с определенным rs. Найдем, например, тот нуклеотид в составе гена CALR, после которого располагается клинически значимая соматическая мутация c.1154_1155insTTGTC, rs65476509.

Ход работы.

1. Зайти на сайт базы NCBI. В левом окне выбрать «SNP», в правом окне написать общепринятое название нужного гена на английском языке (например, CALR). Также в поле слева можно выбрать тип интересующей мутации (в нашем случае выбираем «in del»). Количество показанных на странице мутаций лучше выбрать 200. Далее кликнуть «Apply» и «Search».

2. Ссылку на интересующую мутацию можно найти на открывшейся странице: либо по номеру rs данной мутации (если нам это известно), либо поиском (сочетание «горячих» клавиш «CTRL» и «F») последовательности нуклеотидов, которые добавляются или выпадают в случае мутации типа «in del». В нашем случае происходит вставка (insertion) пяти нуклеотидов TTGTC. Находим, что данная мутация имеет свой идентификационный номер rs. В частности, rs для выбранной мутации – 765476509.

3. Кликнув на rs 765476509, можно перейти на страницу с описанием подробной информации о данном SNP (или, как в нашем случае, – соматической мутации).

Из краткой информации о данной мутации на странице поиска SNP мы видим, что искомый нами нуклеотид в составе гена CALR, после которого располагается клинически значимая соматическая мутация c.1154_1155insTTGTC (rs65476509), – это A.

4. Далее нам нужно найти цифирное обозначение данного нуклеотида A в составе геномной ДНК, после которого расположен определенные полиморфизм или мутация (SNP) с определенным rs. Для этого необходимо скопировать в буфер обмена небольшую область (несколько нуклеотидов) до или после этого нуклеотида без учета мутации, т. е. как в первичной последовательности ДНК.

5. Далее открываем последовательность гена (в нашем случае гена CALR) как ранее было показано (см. задание 1). Находясь на данной странице с помощью сочетания «горячих» клавиш «CTRL» и «F» задаем поиск ранее скопированной последовательности GGAGGA и находим её.

Цифирное обозначение найденного нуклеотида в составе гена CALR определяем исходя из нумерации нуклеотидов, расположенной слева от всех столбцов. Интересующий нас нуклеотид A имеет номер 5214.

6. Аналогичным образом можно определить цифирное обозначение данного нуклеотида A в составе мРНК, после которого расположен определенный полиморфизм или мутация (SNP) с определенным rs. Для этого также нужно скопировать в буфер обмена небольшую область (несколько нуклеотидов) до или после этого нуклеотида без учета мутации, т. е. как в геномной ДНК. Далее открываем последовательность мРНК (в нашем случае гена CALR), как ранее было показано (см. задание 2).

7. Находясь на данной странице, с помощью сочетания «горячих» клавиш «CTRL» и «F» снова задаем поиск ранее скопированной последовательности GGAGGA и находим её.

8. Цифирное обозначение найденного нуклеотида в составе мРНК CALR (конкретно для мРНК с NM_004343.3) определяем, исходя из нумерации нуклеотидов, расположенной слева от всех столбцов. Интересующий нас нуклеотид A имеет номер 1234, т. е. вставка TTGTC происходит между 1234-м и 1235-м положениями нуклеотидов. В то же время та соматическая мутация, нуклеотид перед которой мы изначально искали, имеет обозначение c.1154_1155insTTGTC (rs65476509), т. е. различие представленной на сайте NCBI и рассчитанной нами позиции нуклеотида A составляет 80. Такая ситуация возникла в результате того, что в данном конкретном случае для мРНК с NM_004343.3, кроме основного участка мРНК, была отсеквенирована последовательность размером в 80 нуклеотидов, расположенных слева от стартового кодона ATG. Нуклеотиды стартового кодона ATG и располагаются в позициях 80, 81 и 82 соответственно.

Кроме того, пути номера нуклеотида в составе мРНК, который подвергается мутации или после которого возникает мутация, можно посмотреть, кликнув на rs765476509. В появившемся окне представлена информация относительно искомого полиморфизма или мутации. Просматриваем далее вниз и находим информацию о том, что вставка нуклеотидов при интересующей нас мутации происходит между 1234-м и 1235-м нуклеотидами (для NM_004343.3).

Задание 6. Поиск последовательности аминокислот белка, транслированного с интересующего гена (например, CALR)

Белки (протеины, полипептиды) – это высокомолекулярные органические вещества, состоящие из альфа-аминокислот, соединённых в цепочку пептидной связью. В живых организмах аминокислотный состав белков определяется генетическим кодом, при синтезе белков в большинстве случаев используется 20 стандартных аминокислот. Множество их комбинаций создают молекулы белков с большим разнообразием свойств. Кроме того, аминокислотные остатки в составе белка часто подвергаются посттрансляционным модификациям, которые могут возникать и до того, как белок начинает выполнять свою функцию, и во время его «работы» в клетке.

В настоящее время для большинства изученных белков организма человека известны кодирующие их гены. При изучении какого-либо гена важно уметь находить соответствующую нуклеотидной последовательности гена аминокислотную последовательность белка. Например, это важно при оценке влияния какой-либо вновь выявленной мутации на изменения аминокислотной последовательности белка и соответственно на свойства белка. И, наоборот, при изучении какого-либо белка необходимо иметь информацию как о первичной его структуре, так и о возможных изменениях структуры и свойств гена, кодирующего данный белок, поскольку такие изменения (мутации) могут приводить к изменению как физико-химических свойств белка, так и уровня его экспрессии.

Ход работы.

1. Зайти на сайт базы NCBI. В левом окне выбрать «Gene», в правом окне написать общепринятое название нужного гена на английском языке (например, CALR) и кликнуть «Search». Найти вариант гена CALR для человека (Homo sapiens (human)) и кликнуть на него.

2. В появившемся окне нажать на «Full Report» и выбрать «Gene Table». В появившемся окне кликнуть закладку «GenBank». В появившемся окне мы видим не только последовательность гена CALR (см. задание 1), но и последовательность аминокислот в соответствующем белке. При этом все аминокислоты даны в однобуквенном коде и в виде сплошной последовательности без разделения на какие-либо фрагменты представленного белка. При необходимости данная последовательность легко может быть скопирована в другую программу.

3. Поскольку на странице могут быть представлены несколько вариантов последовательностей белка (разные CDS), то нужно выбирать ту CDS, которая

соответствует нужной мРНК. В данном случае мРНК с номером NM_004343.3 соответствует белок с номером NP_004334.1. Данное соответствие можно посмотреть, например, на следующей странице (см. задание 3). Также здесь указано, что количество аминокислот для данного варианта белка CALR (номер белка NP_004334.1, соответствующий номеру мРНК с номером NM_004343.3), равно 417. При этом указано, что общее количество нуклеотидов, входящих в состав девяти представленных экзонов, равно 1911. Количество же нуклеотидов, входящих в состав только кодирующих участков из всех девяти представленных экзонов, равно 1254 (суммарное количество нуклеотидов в столбце «Coding»). Путем деления данного числа на 3 (одна аминокислота кодируется тремя нуклеотидами) получаем число 418, что точно соответствует указанному количеству аминокислот в данном белке: 417 плюс стартовый кодон.

Что касается CDS, нужно отметить, что эта кодирующая область гена (from coding DNA sequence) представляет собой ту часть ДНК гена или РНК, состоящую из экзонов, которая кодирует белок. Область ограничена с 5’-конца стартовым кодоном и с 3’-конца стоп-кодоном. CDS – это часть транскрипта мРНК, которая транслируется рибосомой. Эта последовательность отлична от кДНК, поскольку кДНК содержит 5’– и 3’-UTR (нетранслируемые последовательности), которые не являются частью CDS (они транскрибируются, но не транслируются). В связи с этим CDS будет почти всегда начинаться с кодона AUG и останавливаться на одном из трех кодов STOP (UAA, UGA, UAG).

Если необходимо не просто найти последовательность аминокислот в белке, но также просмотреть соответствие аминокислот в белке нуклеотидам из кодирующих областей экзонов, то удобнее использовать другой подход. Для выполнения поставленной задачи нужно каким-либо путем перейти на страницу, где будут представлены обе цепи ДНК интересующего нас участка хромосомы, где закодирована информация о выбранном белке. Например, можно воспользоваться тем путем, который мы использовали в задании 5.

4. Зайти на сайт базы NCBI. В левом окне выбрать «SNP», в правом окне написать общепринятое название нужного гена на английском языке (например, CALR). Также в поле слева можно выбрать тип интересующей мутации (в нашем случае выбираем «in del»). Количество показанных на странице мутаций лучше выбрать 200. Далее кликнуть «Apply» и «Search».

5. Ссылку на интересующую мутацию можно найти на открывшейся странице либо по номеру rs данной мутации (если нам это известно), либо поиска последовательности нуклеотидов, которые добавляются или выпадают в случае мутации типа «in del». В нашем случае происходит вставка (insertion) пяти нуклеотидов TTGTC. Находим, что данная мутация имеет свой идентификационный номер rs, в частности, rs для выбранной мутации – 765476509.

6. Кликнув на rs765476509, переходим на страницу с описанием подробной информации о данном SNP (или, как в нашем случае, – соматической мутации).

7. Пролистываем далее вниз до того момента, как будут представлены нуклеотидные последовательности обеих цепей ДНК и выделенной цветом мутацией rs765476509.

8. Кликаем на «Tools».

9. Выбираем «Sequence Text View». В появившемся окне представлена нуклеотидная последовательность гена, а также транслированная с неё соответствующая последовательность аминокислот. При этом очень важно, что в данном случае можно увидеть все кодирующие и некодирующие участки нуклеотидной последовательности гена, т. е. те нуклеотиды, которые входят в кодоны и транслируются в аминокислоты, обязательно снизу подписаны буквами соответствующих аминокислот. Также видим, что некоторые экзоны могут начинаться не целым кодоном, а одним или двумя нуклеотидами, включенными в кодон, первые нуклеотиды которого (1 или 2) расположены в области предыдущего экзона. По этой причине количество нуклеотидов в некоторых экзонах содержит количество нуклеотидов, некратное трем.

Таким образом, данный путь удобен, когда необходимо просмотреть соответствие нуклеотидной и аминокислотной последовательности. Тогда же, когда нужно просто скопировать аминокислотную последовательность интересующего белка, лучше воспользоваться первым предложенным нами вариантом.

Задание 7. Поиск информации о какой-либо мутации или полиморфизме в базе NCBI

Достаточно часто возникают ситуации, когда необходимо просмотреть какую-либо область последовательности ДНК на предмет наличия полиморфизмов или мутаций, ранее уже зафиксированных учеными. Возможно, им уже присвоен rs и описаны ассоциации данных изменений первичной структуры с изменениями структуры белка и наличием определенных клинических проявлений. Такая задача возникает при интерпретации результатов, полученных при секвенировании как методом Сенгера, так и NGS (Next-Generation Sequencing).

Например, при анализе последовательности гена CALR методом секвенирования нового поколения NSG на платформе MiSeq (ILLUMINA) после обработки полученных результатов программа выявила у пациента изменения первичной структуры ДНК и присвоила этому изменению такое обозначение, как c.1128_1129ins CTTTGCTT в гене CALR. Поскольку из данных литературы нам известно, что в исследуемом гене CALR не только имеются полиморфизмы (не имеющие клинического значения), но и могут возникать соматические мутации, ассоциированные с развитием хронических миелопролиферативных заболеваний, то очень важно найти всю возможную информацию о выявленном изменении структуры ДНК. В первую очередь необходимо выяснить, имеет ли данная мутация rs (RefSNP), является ли эта мутация герминальной или соматической и др.

Для выяснения наличия rs в отношении выявленного изменения первичной структуры ДНК можно использовать следующий предложенный нами алгоритм. Важно отметить, что если изменения структуры ДНК находятся в ко-

дируемой области, то для поиска нужной информации о мутации удобнее работать с последовательностью мРНК.

Сначала необходимо сопоставить цифирное обозначение нуклеотида в мРНК (это положение нуклеотида либо определяется программой, либо находится вручную) для выявленной мутации с последовательностью мРНК (учитывая соответствующей номер NM) в базе NCBI.

В нашем случае программа после обработки результатов NSG определила мутацию в гене CALR для варианта NM_004343.3 как c.1128_1129ins CTTTGCTT. Учитывая, что обычно стартовый кодон в предложенных вариантах последовательности мРНК (разные NM) расположен не самого начала отсеквенированной последовательности, то нам нужно найти цифирное обозначение нуклеотида, после которого возникла мутация c.1128_1129ins CTTTGCTT для варианта мРНК с NM_004343.3. Для этого ищем последовательность мРНК.

Ход работы.

1. Зайти на сайт базы NCBI. В левом окне выбрать «Gene», в правом окне написать общепринятое название нужного гена на английском языке CALR и кликнуть «Search».

2. Найти вариант гена CALR для человека (Homo sapiens (human)) и кликнуть на него.

3. В появившемся окне нажать на «Full Report» и выбрать «Gene Table». Нам представлен единственный для данного гена вариант мРНК с соответствующим номером NM_004343.3.

4. Кликнуть «+» для «Exon table for RefSeq mRNA NM_004343.3…». Для просмотра последовательности нуклеотидов мРНК кликнуть на «NM_004343.3». В появившемся окне представлена последовательность мРНК гена CALR.

5. Далее нужно найти кодирующую область (CDS) в мРНК. Для этого в открытом окне находим CDS и кликаем на нее.

В появившемся окне цветом выделена кодирующая область гена CALR. На экране видно, что нуклеотиды стартового кодона ATG располагаются в позициях 80, 81 и 82 соответственно. Следовательно, кодирующая область в варианте мРНК под номером «NM_004343.3» начинается с 80-го нуклеотида.

6. Далее нужно найти цифирное обозначение нуклеотида, после которого располагается мутация c.1128_1129insCTTTGCTT в мРНК. Так как кодирующая последовательность начинается с 80-го нуклеотида, то нужный нам нуклеотид имеет положение 1208 (1128 + 80 = 1208). Находим его в последовательности мРНК. Это нуклеотид С.

7. На следующем этапе нам нужно найти это положение в графическом изображении мРНК (NM_004343.3). Для этого открываем в новом окне базу NCBI, в левом окне выбираем вариант SNP, а в правом окне пишем название нужного гена на английском языке CALR и кликаем «Search».

8. В появившемся окне приведен список всех известных на сегодняшний день rs для гена CALR. Нам необходимо кликнуть на NM_004343.3 в любой из

представленных вариантов rs. В данном случае, например, нажимаем на NM NM_004343.3 в первом предложенном варианте rs 9978.

Здесь представлено графическое изображение мРНК гена CALR, включая последовательность нуклеотидов мРНК, границы экзонов данного гена, соответствующие данным участкам последовательности аминокислот, а также последовательное расположение всех изменений структуры ДНК (РНК), которым уже присвоен номер rs.

9. Для решения нашей задачи, а в частности поиска номера rs для выявленной методом NGS мутации c.1128_1129ins CTTTGCTT для варианта мРНК с NM_004343.3, в поле, расположенное правее поля «Find», вводим циферное положение нуклеотида 1208, рассчитанное нами ранее исходя из положения стартового нуклеотида ATG, и кликаем на «Find».

В результате открывается отмеченный нами ранее нуклеотид C в положении 1208.

Далее можем посмотреть, имеются ли какие-либо ранее обнаруженные изменения структуры ДНК, которые начинаются с нуклеотида C в позиции 1208 (возможно, им уже присвоен rs). Данная информация, а также информация обо всех известных rs в этой области представлена ниже графического изображения нуклеотидной последовательности ДНК (РНК). В частности, указан номер rs, а далее имеется либо красный (в случае мутации по типу замены), либо сиреневый прямоугольник (в случае мутации по типу indel), которые расположены четко под тем нуклеотидом, с которого начинается полиморфизм (или мутация).

В нашем случае с позиции 1208 не начинается ни красный, ни сиреневый нуклеотид, т. е. можно предположить, что мы впервые выявили мутацию c.1128_1129ins CTTTGCTT, которая на сегодняшний день не имеет rs, и, скорее всего, в научной литературе мы также не найдем описания ассоциации данной мутации с каким-либо клиническим состоянием пациента.

В то же время нужно отметить, что искомый нами нуклеотид C в позиции 1208 входит в область мутации по типу indel (c.1104_1137del34 – /GGAGGAGGAAGAAGACAAGAAACGCAAAGAGGAG), имеющую rs773371516. В этом случае происходит делеция 34 нуклеотидов.

Несмотря на то, что выявленная нами методом NGS мутация c.1128_1129ins CTTTGCTT не имеет rs, все же можно предположить, будет ли эта мутация иметь какое-либо клиническое значение. Во-первых, нужно обратить внимание на расположенные рядом варианты rs. Просмотрев информацию о соответствующих этим номерам мутациях, можно предположить о схожем влиянии выявленной нами мутации на фенотип. Во-вторых, учитывая то, что выявленная нами мутация подразумевает вставку восьми нуклеотидов и это число не кратно трем, нужно понимать, что данная мутация однозначно приводит к изменению аминокислотной последовательности (сдвиг рамки считывания) и даже, возможно, образованию стоп-кодона, что, в свою очередь, однозначно влияет на фенотип белка и, скорее всего, на протекание биохимических реакций, участником которых является данный белок.

10. Кроме изложенного способа просмотра информации обо всех известных полиморфизмах и мутациях с присвоенным номером rs можно также воспользоваться иным путем. Например, для того чтобы просмотреть списком информацию обо всех известных изменениях первичной структуры ДНК для гена F5, нужно пройти следующий путь.

Зайти на сайт базы NCBI. В левом окне выбрать «SNP», в правом окне написать общепринятое название нужного гена на английском языке F5 и кликнуть «Search».

В открывшемся окне представлена информация о том, что всего на сегодняшний день известны 9 796 вариантов различных полиморфизмов в последовательности данного гена F5, информация представлена на 490 страницах.

11. Чтобы просмотреть информацию о полиморфизмах в более компактном варианте, нужно нажать на поле «GeneView».

На открывшейся странице приведена информация обо всех более 9 000 полиморфизмах в данном гене, которые имеют rs. При этом вся информация представлена последовательно и в соответствии с порядком расположения полиморфизмов в цепи ДНК и порядком расположения аминокислот в белке.

Данные приведены в виде таблицы, в которой отображено достаточно много информации по каждому полиморфизму, в том числе: позиция в хромосоме и в мРНК для того нуклеотида, который либо сам включен в полиморфный участок (в случае однонуклеотидных замен и делеций), либо находится на границе, после которой начинается полиморфизм (в случае инсерции); частота встречаемости гетерозигот; наличие 3D-структуры; наличие данных об ассоциации с клиническими проявлениями; значение полиморфизма в развитии заболевания (патогенное, доброкачественное или др.); тип мутации (миссенс, нонсенс или др.); нуклеотид, который представлен как полиморфный в базе «dbSNP»; остаток аминокислоты, который затронут в результате мутации; позиция нуклеотида в кодоне; позиция аминокислоты в составе белка и ссылки на статьи об интересующем полиморфизме в базе NCBI.

Задание 8. Определение частоты встречаемости какого-либо полиморфизма или мутации в различных популяциях (на примере полиморфизма в гене F5 (фактор Лейдена) rs6025)

Найти информацию о распространенности полиморфизмов и мутаций можно в разных источниках. Но поскольку частота встречаемости может очень сильно варьировать в зависимости от популяции, то для получения более полной информации по данному вопросу лучше всего воспользоваться браузером из базы NCBI «1000Genome», где отражена распространенность всех хорошо изученных полиморфизмов и мутаций в разных популяциях.

Ход работы.

1. Открываем базу NCBI. В левом окошечке выбираем «SNP», в правом – вводим rs необходимой нам мутации (в данном случае rs6025) и нажимаем «Search».

2. Далее нажимаем на выбранный номер rs.

3. Далее опускаемся вниз и переходим по ссылке «[here]» в проект «1000Genome».

В открывшемся окне нужно выбрать интересующий нас столбец, содержащий информацию о распространенности полиморфизма rs6025 в разных популяциях. Слева представлены варианты выборок из различных популяций, для которых определена частота данного полиморфизма.

Полученный в ходе данного проекта «1000Genome» результат может быть представлен как частота или количество мутантных аллелей или же как частота или количество мутантных образцов в исследуемой популяции.

Также для поиска информации о частоте встречаемости мутаций и полиморфизмов можно использовать базу-браузер EXAC (Exome Aggregation Consortium).

Контрольные вопросы:

1. Как осуществляется поиск нуклеотидной последовательности гена?
2. В чем разница поиска ДНК и мРНК?
3. Как определяется количество экзонов и интронов в составе гена?
4. Как производиться поиск мутации в гене на основании имеющейся нуклеотидной последовательности?
5. Опишите процедуру поиска последовательности аминокислот белка, транслированного с заданного гена.
6. Как осуществляется поиск мутации или полиморфизма в информационной базе?

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

Основная литература:

1. Якупов, Т. Р. Молекулярная биотехнология. Биоинженерия: учеб. пособие / Т. Р. Якупов. – Казань: ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ, 2018. – 157 с.

2. Молекулярная биология: учеб. пособие / О. В. Кригер, С. А. Сухих, О. О. Бабич [и др.]. – Кемерово: КемГУ, 2017. – 93 с. – ISBN 979-5-89289-100-3. – Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. – URL: https://e.lanbook.com/book/103922.

3. Резяпкин, В. И. Основы молекулярной биологии: практикум: учеб. пособие / В. И. Резяпкин. – 4-е изд., перераб. – Гродно: ГрГУ им. Янки Купалы, 2022. – 43 с. – ISBN 978-985-582-476-4. – Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. – URL: https://e.lanbook.com/book/262376.

Дополнительная литература:

1. Баженова, И. А. Основы молекулярной биологии. Теория и практика: учеб. пособие для вузов / И. А. Баженова, Т. А. Кузнецова. – 3-е изд., стер. – Санкт-Петербург: Лань, 2022. – 140 с. – ISBN 978-5-507-44783-1. – Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. –
URL: https://e.lanbook.com/book/242981

2. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – Москва: Мир, 2002. – 589 с, ил. – ISBN 5-03-003328-9.

3. Баженова, И. А. Основы молекулярной биологии. Теория и практика: учеб. пособие / И. А. Баженова, Т. А. Кузнецова. – Санкт-Петербург [и др.]: Лань, 2018. – 139 с.: ил. – Электрон.-библ. система www.e.lanbook.com. – Библиогр.: с. 132–137 (65 назв.). – ISBN 978-5-8114-2698-9 (в пер.).

4. Сергеева, Н.Т. Биохимия: метод. указания и темы курсовых работ для студентов механико-технол. факультета 240902.65 – Пищевая биотехнология и 260501.65 – Технология продуктов обществ. питания, бакалавров – 260100.62 – Технология продуктов питания / Н. Т. Сергеева; Калинингр. гос. техн. ун-т. – Калининград: КГТУ, 2008. – 23 с.

Локальный электронный методический материал

Анна Сергеевна Бурбах
Екатерина Владимировна Кривопускова

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

Редактор С. Кондрашова

Уч.-изд. л. 9,2. Печ. л. 6,9.

Издательство федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Калининградский государственный технический университет»,
236022, Калининград, Советский проспект, 1