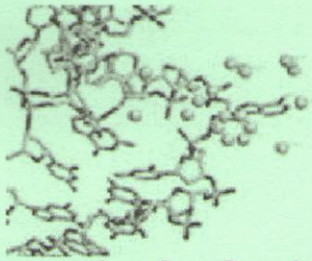


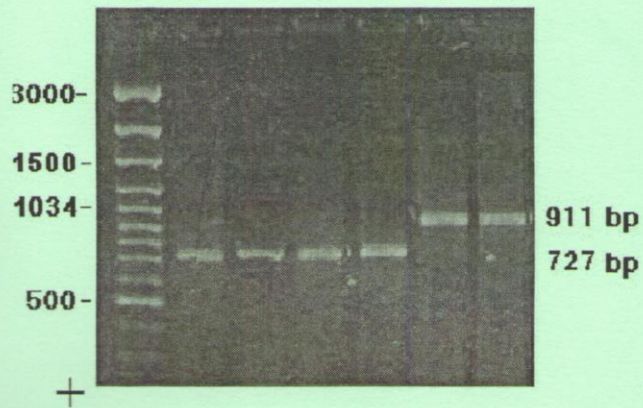
В.А. Великов

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

ПРАКТИЧЕСКОЕ
РУКОВОДСТВО



1 2 3 4 5 6 7



ФГБОУ ВПО «САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ. Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

В.А. Великов

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ. ПРАКТИЧЕСКОЕ РУКОВОДСТВО

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

САРАТОВ 2013

УДК 577.21
ББК 28.070+28.04
В27

Великов В.А.

В27 Молекулярная биология. Практическое руководство: Учеб. пособие для студ. биол. фак. и фак. нано- и биомед. технол., обуч-ся по напр. «Биология (020400)», «Биология-пед (050100)», «Биотехнические системы и технологии (200100)», «Медицинская физика (011200)» и по спец. «Биоинженерия и биоинформатика (020501)». – Саратов: Издательство «Саратовский источник», 2013. – 84 с.: ил.

ISBN 978-5-91879-250-6

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

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

Рецензенты

Доктор биологических наук, профессор С.А. Староверов

Доктор биологических наук, профессор А.С. Кашин

Пособие подготовлено на кафедре биохимии и биофизики биологического факультета СГУ для реализации учебных курсов «Молекулярная биология» и «Экспериментальные методы молекулярной биологии»

Публикуется по решению Учебно-методической комиссии биологического факультета СГУ

УДК 577.21
ББК 28.070+28.04

ISBN 978-5-91879-250-6

© Великов В.А., 2013

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	5
Тема 1. ВЫДЕЛЕНИЕ ОБЩЕЙ ДНК ИЗ КЛЕТОК.....	6
<i>Работа 1.1.</i> Выделение ДНК из бактерий.....	6
<i>Работа 1.2.</i> Выделение ДНК из лимфоцитов крови.....	9
<i>Работа 1.3.</i> Выделение ДНК из растительных тканей.....	11
<i>Работа 1.4.</i> Концентрирование ДНК путём осаждения спиртом.....	14
Тема 2. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ ПРЕПАРАТОВ ДНК, РНК И БЕЛКА.....	16
<i>Работа 2.1.</i> Спектрофотометрическое определение концентрации ДНК.....	16
<i>Работа 2.2.</i> Определение концентрации белка по собственной флуоресценции.....	18
Тема 3. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ	20
<i>Работа 3.1.</i> Приготовление агарозного геля.....	20
<i>Работа 3.2.</i> Гель-электрофорез ДНК.....	22
Тема 4. ВЫДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ И ФАГОВОЙ ДНК.....	24
<i>Работа 4.1.</i> Минипрепаративное выделение плазмидной ДНК (минипреп).....	24
<i>Работа 4.2.</i> Выделение плазмидной ДНК в больших объёмах (максипреп).....	27
<i>Работа 4.3.</i> Выделение репликативной формы RF фага M13.....	29
<i>Работа 4.4.</i> Выделение одноцепочечной ДНК фага M13.....	30
Тема 5. РЕСТРИКЦИЯ ДНК	32
<i>Работа 5.1.</i> Рестрикция плазмидной и фаговой ДНК	33
<i>Работа 5.2.</i> Рестрикция геномной ДНК эукариот	35
Тема 6. ПЦР.....	37
<i>Работа 6.1.</i> Подбор праймеров для ПЦР.....	38
<i>Работа 6.2.</i> Проведение ПЦР-амплификации ДНК	40
<i>Работа 6.3.</i> Расчёт праймеров и параметров ПЦР с помощью специальных программ.....	41
Тема 7. КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНОВ	43
<i>Работа 7.1.</i> Подготовка ДНК вектора и гена.....	44
<i>Работа 7.2.</i> Лигирование ДНК вектора и гена	45
<i>Работа 7.3.</i> Рестрикционное картирование вставки ДНК в плазмиде.....	47
Тема 8. ТРАНСФОРМАЦИЯ БАКТЕРИЙ.....	49
<i>Работа 8.1.</i> Приготовление компетентных клеток <i>E.coli</i>	49
<i>Работа 8.2.</i> Трансформация <i>E.coli</i>	51
<i>Работа 8.3.</i> Подготовка электрокомпетентных клеток <i>E.coli</i>	52
<i>Работа 8.4.</i> Электропорация <i>E.coli</i>	53
Тема 9. ВЫДЕЛЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА.....	55
<i>Работа 9.1.</i> Индуцированная экспрессия клонированных генов	55
<i>Работа 9.2.</i> Выделение белка из периплазмы клеток <i>E.coli</i>	57
<i>Работа 9.3.</i> Диализ препарата белка.....	58

Тема 10. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКА	59
<i>Работа 10.1.</i> Метод Бредфорда.....	59
<i>Работа 10.2.</i> Метод Лоури.....	60
<i>Работа 10.3.</i> Концентрирование белков путем осаждения ТХУ.....	61
Тема 11. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ	62
<i>Работа 11.1.</i> Приготовление растворов и заливка ПААГ.....	62
<i>Работа 11.2.</i> Гель-электрофорез белков.....	66
<i>Работа 11.3.</i> Окрашивание белков <i>Coomassie R-250</i>	67
Тема 12. РАСЧЁТЫ В РАБОТЕ С БЕЛКАМИ.....	68
<i>Работа 12.1.</i> Трансляция нуклеотидной последовательности.....	68
<i>Работа 12.2.</i> Предсказание нуклеотидной последовательности по.....	
аминокислотной.....	69
<i>Работа 12.3.</i> Анализ последовательности белка.....	70
Список рекомендуемой литературы.....	71
Приложения.....	72

Введение

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

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

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

При подготовке учебно-методического пособия использовались частично материалы из следующих источников: Sambrook J., Russel D. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. (v.1), Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001; Глик Б., Пастернак Дж. *Молекулярная биотехнология. Принципы и применение*. М.: Мир, 2002; *Генная инженерия растений: Лаб. рук-во / Пер. с англ. Под ред. Дж. Дрейпера и др.* М.: Мир, 1991; Великов В.А., Кузнецов П.Е. *Практикум по молекулярной биологии. Методы биоинженерии / Под ред. В.В. Игнатова*. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2006; материалы интернет-ресурсов «MOLBIOL.RU – Классическая и молекулярная биология» (<http://www.molbiol.ru>), «Практическая молекулярная биология» (<http://www.molbiol.edu.ru>), «National Center for Biotechnology Information» (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed.com>).

Тема 1. ВЫДЕЛЕНИЕ ОБЩЕЙ ДНК ИЗ КЛЕТОК

Процедура выделения ДНК из клеток и тканей часто является исходным (основным) этапом в исследовании живого организма на молекулярном уровне. От ДНК напрямую или через белки-ферменты зависят все биосинтезы и катаболизм клетки. Клетку необходимо разрушить тем или иным способом, а хромосомную ДНК очистить от других клеточных компонентов. Прежде всего, нужно отделить ДНК от белков, входящих в состав нуклеопротеидных комплексов хроматина. При этом важно защитить ДНК от действия нуклеаз и максимально сохранить её целостность, поскольку длинные линейные молекулы ДНК при их изоляции из клетки неизбежно фрагментируются.

Методы выделения ДНК обычно включают следующие этапы: 1) лизис клеток (или разрушение физическим, механическим способом); 2) ферментативное разрушение белков протеиназами и/или депротеинизацию клеточного лизата с помощью фенола и хлороформа; 3) центрифугирование для удаления денатурированных белков и фрагментов клеточных органелл. Затем ДНК осаждают из раствора этанолом и после центрифугирования растворяют осадок в буферном растворе. Вместе с ДНК частично выделяется и РНК, от которой избавляются с помощью фермента РНКазы.

Для лизиса клеток и денатурации белков часто используется детергент додецилсульфат натрия и хаотропный агент гуанидинизотиоцианат. Ряд современных методов предусматривает сорбцию ДНК на гранулах силикагеля в присутствии хаотропных веществ, центрифугирование и последующую элюцию ДНК с гранул в раствор. Некоторые фирмы продают наборы реактивов для выделения ДНК с использованием магнитных частиц, покрытых силикой SiO₂. Некоторые коммерческие наборы предусматривают сорбцию ДНК на мембранах или ионообменных сорбентах. Фенол-хлороформный метод экстракции ДНК считается стандартным.

Количественная и качественная оценка образца полученной ДНК осуществляется при последующей стандартной процедуре электрофореза ДНК в агарозном геле (тема 3) путём визуального сравнения с образцами известной концентрации. Спектрофотометрическое определение даёт более точную характеристику препарату ДНК (тема 2).

Работа 1.1. Выделение ДНК из бактерий

Выделение общей или тотальной ДНК из клеток бактерий с использованием додецилсульфата натрия, протеиназ и фенола (*Dhaese et al., 1979*) является достаточно распространённым подходом. Метод простой и надёжный, существует в ряде модификаций, как и многие другие методы.

Наряду с хромосомной ДНК выделяется также плазмидная и фаговая ДНК при их наличии в клетке, а также РНК, от которой несложно избавиться.

Плазматическая мембрана бактериальной клетки в этом методе разрушается под действием детергента додецилсульфата натрия (*SDS, sodium dodecyl sulfate*) – одного из самых распространённых поверхностно-активных веществ, или ПАВ. Целостность пептидогликанового слоя, так называемого муреинового мешка, при этом тоже нарушается. Путём обработки бактериального лизата фенолом, который денатурирует протеины, но не действует на нуклеиновые кислоты, удаляют все белки, в том числе белки нуклеоида. Другие органические соединения клетки и низкомолекулярные вещества теряются при высаживании ДНК этанолом, поскольку остаются в растворе. Полученный в результате центрифугирования образца осадок нуклеиновых кислот, дезоксирибонуклеиновой и рибонуклеиновой, растворяют в специальном буфере для хранения ДНК – буфере TE. Входящий в его состав хелатирующий агент – этилендиаминтетрауксусная кислота (*ЭДТА*) предотвращает воздействие на ДНК клеточных нуклеаз, поскольку связывает необходимые для их работы катионы Mg^{2+} .

Материалы и оборудование

Основное оборудование для проведения молекулярно-биологических исследований: микроцентрифуга, центрифуга для больших объёмов, термостатируемая качалка-шейкер, вортекс, термостат, источник тока, камеры для электрофореза, УФ-трансиллюминатор, термостат твердотельный для микропробирок, рН-метр, ДНК-амплификатор, электропоратор, спектрофотометр, микропипетки-дозаторы с одноразовыми наконечниками.

Для проведения практических работ необходимо также следующее лабораторное оборудование: ламинарный бокс, вытяжной шкаф, сушильный шкаф, холодильник, морозильник, весы, дистиллятор, электроплитка, СВЧ-печь, УФ облучатель, лабораторный пластик и посуда.

Для работы 1.1 необходим штамм энтеробактерии кишечной палочки *Escherichia coli* XL1–Blue (*StratageneTM*) или штамм почвенной бактерии азоспириллы *Azospirillum brasilense* Sp245. Характеристики используемых в практикуме бактериальных штаммов и плазмид приведены в приложениях.

Растворы

- *Среда 2YT*. На 1 л: триптон – 16 г; дрожжевой экстракт – 8 г; NaCl – 5 г. Довести до 1 л дистиллированной водой, рН среды 7,0. Для получения твёрдой среды в неё добавляют перед автоклавированием агар до 1,5%.
- *5% SDS*. 5%-ный раствор додецилсульфата натрия (лаурилсульфата, саркозила, *N-laurylsarcosine*) в буфере TE.
- *Проназа*. Раствор 5 мг/мл в буфере TE.
- *Буфер TE*. 10мМ Tris–HCl, рН 8,0; 1мМ ЭДТА.
- *5M NaCl*. Растворить 292,5 г NaCl в 800 мл воды и довести объём до 1 л.

- *Смесь фенол-хлороформ*. Водонасыщенный фенол (насыщенный после перегонки 0,1М Tris–HCl, pH 8,0) смешивают в пропорции 1:1 с заранее приготовленной смесью хлороформ–изоамиловый спирт.
- *Смесь хлороформ–изоамиловый спирт*. Вещества смешивают в пропорции 24:1 по объёму.

Методика

1. Произвести отдельной колонией посев бактерий штамма *E.coli* XL1–Blue (или *A.brasilense* Sp245) в пробирку с 5 мл жидкой питательной среды 2YT и растить культуру бактериальных клеток в течение ночи с аэрацией при 37°C (или 30°C, соответственно)^a.
2. Перенести микропипеткой 1,5 мл культуры в микроцентрифужную пластиковую пробирку типа *Eppendorf* объёмом 1,7 мл. Осадить клетки центрифугированием в течение 5 мин при 10000 об/мин. Заметьте, что это наиболее часто используемая скорость для микроцентрифуги, её устанавливают по умолчанию, если не указана другая скорость.
3. Удалить супернатант (вылить питательную среду через край: не бойтесь! осадок плотный). Добавить к осадку 300 мкл буфера TE и с помощью микропипетки перевести клетки в суспензию вновь (ресуспензировать).
4. Добавить к суспензии клеток 100 мкл 5%-ного раствора SDS и перемешать переворачиванием пробирки 3 раза.
5. Добавить 150 мкл р-ра проназы (5мг/мл) и перемешать.
6. Инкубировать 1 (0,5) ч в термостате при температуре 37°C. Происходит лизис клеток и ферментативный гидролиз белков.
7. Высадить нуклеиновые кислоты из лизата спиртом. Для этого добавить в пробирку равный объём изопропанола (550 мкл) и центрифугировать в течение 10 минут. (После добавления спирта при необходимости можно прерваться; не центрифугировать пробу сразу, а убрать её в холодильник. «Под спиртом» ДНК может храниться долгое время).
8. После центрифугирования отобрать микропипеткой остатки жидкости из пробирки. Растворить осадок нуклеиновых кислот в 500 мкл буфера TE и провести депротеинизацию образца, т.е. очистку ДНК от белков (пп. 9–12).
9. Добавить к раствору равный объём (500 мкл) смеси фенол–хлороформ и хорошо встряхнуть до образования стойкой эмульсии.
10. Разделить водную и органическую фазы путём центрифугирования в течение 5 мин. Фенол остается внизу, водная фаза с растворённой ДНК – сверху. Денатурированные фенолом белки диссоциируют с ДНК, теряют растворимость и собираются при центрифугировании на границе раздела фаз – в интерфазе. Т.е. идёт экстракция ДНК из ДНП-комплекса.
11. Перенести микропипеткой водную фазу, содержащую ДНК, в чистую 1,7 мл пробирку. При отборе важно не засасывать наконечник интерфазу – плотный слой белёсого цвета между водной и органической фазами в которой находятся агрегаты денатурированных молекул белков^b.

12. Провести ещё одну экстракцию ДНК хлороформом и избавиться от примеси фенола. Для этого добавить в пробирку с образцом равный объём смеси хлороформ–изоамиловый спирт, перемешать и центрифугировать в течение 3 мин. Водную фазу перенести в чистую пробирку.
13. Оценить микропипеткой-дозатором или по меткам на пробирке получившийся объём водной фазы и добавить 1/25 объёма 5М NaCl до конечной концентрации соли 0,2М. Затем добавить 2,5 объёма холодного (–20°C) этанола для осаждения ДНК, точнее её натриевой соли. Оставить на 1–2 ч в морозильнике при температуре –20°C. Можно оставлять ДНК под спиртом и дольше, до того времени как образец потребуется.
14. Осадить нуклеиновые кислоты центрифугированием в течение 10 мин при максимальной скорости микроцентрифуги. Слить супернатант и промыть осадок. Для этого добавить к осадку 1 мл холодного 70% этанола и снова центрифугировать в течение 3 мин^б.
15. Слить 70% этанол, перевернуть пробирки на фильтровальную бумагу. После того как вся жидкость стечет, пробирку с осадком нуклеиновых кислот (ДНК и РНК^г) немного подсушить на воздухе до исчезновения запаха спирта^д. Растворить осадок в 50 мкл буфера TE. Для электрофореза ДНК (тема 3) достаточно 5–10 мкл образца.

Примечания

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

^б Некоторый объём водной фазы при этом неизбежно теряется, до 1/5 объёма. На практике лучше пожертвовать этим объёмом сейчас, чем чистотой препарата впоследствии. Фенол – токсичное раздражающее вещество, необходимо исключить контакт с кожей и работать с микроколичествами, соблюдая меры предосторожности.

^в Допускается просто слить 70 % спирт, без центрифугирования.

^г Избавиться от РНК при необходимости можно с помощью фермента РНКазы (см. работу 4.1). Примесь РНК в препарате ДНК не влияет на рестрикцию или ПЦР.

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

Работа 1.2. Выделение ДНК из лейкоцитов крови

Изоляция общей ДНК из животной клетки не представляет особой сложности, поскольку плазмалемма, ядерная и митохондриальная мембраны «растворяются» в присутствии анионного детергента додецилсульфата натрия (SDS), а сложной клеточной стенки у животных в сравнении к примеру с растениями нет (см. работу 2.2). Высвободить ДНК из ДНК-белкового комплекса можно с помощью протеиназ или хаотропных солей.

Для этой же цели можно провести как и в случае с бактериями фенольную экстракцию ДНК. Другие вещества при последующем осаждении ДНК спиртом останутся в растворе, и избавиться от них несложно.

ДНК можно выделить из любых тканей, клетки которых содержат ядра, но количественный выход из разных тканей может быть различным. Довольно часто для выделения ДНК используют кровь. Лейкоциты крови, в отличие от зрелых эритроцитов, содержат ядра. Общей ДНК, выделенной из 100 мкл цельной крови достаточно для проведения нескольких рестрикций, ПЦР и секвенирования. Митохондриальная ДНК и РНК также присутствуют в получаемом препарате. В приведённой ниже методике для освобождения ДНК от белков используется фенол. Под словом «фенол» биологи-молекуляры часто подразумевают смесь водонасыщенного фенола с хлороформом 1:1, а не кристаллическое вещество. В смеси с хлороформом фенол работает эффективнее, а изоамиловый спирт гасит пенообразование.

Материалы и оборудование

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

Растворы

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

Методика

1. К 100 мкл цельной крови ^а добавить 2 объёма дистиллированной воды до конечного объёма 0,3 мл. Тщательно перемешать и оставить на 15 минут.
2. Пробу центрифугировать в течение 10 минут, 5000 об/мин. Супернатант (надосадок, надосадоочную жидкость) слить.
3. Осадок клеток отмыть двойным объёмом буфера SSC, добавив в пробирку 200 мкл 1-кратного SSC. Перемешивание аккуратное.
4. Центрифугирование как в п.2. Супернатант слить.
5. К осадку добавить 54 мкл 0,2М ацетата натрия ^б и 6 мкл 10%-ного раствора SDS. Осадок клеток тщательно ресуспензировать, т.е. перевести в суспензию вновь с помощью микропипетки или вортекса. Инкубировать при 37°C в течение 0,5–1 ч для прохождения лизиса (разрушения) клеток.

6. Добавить 2 объёма буфера TE и провести фенольную депротеинизацию образца. Для этого внести в пробирку равный объём фенол–хлороформной смеси, хорошо встряхнуть и центрифугировать. Отобрать водную фазу (верхний слой) в чистую пробирку, не захватывая интерфазу.
7. Повторить ту же процедуру, что в п. 6, но со смесью хлороформ-изоамиловый спирт.
8. К очищенному от белков лизату добавить 1/10 объёма 3М ацетата натрия, рН 5,2, перемешать и высадить ДНК добавив два с половиной объёма холодного 96% этанола и поместив образец на 1–2 часа в морозильную камеру при -20°C . Можно оставить ДНК под спиртом на ночь.
9. Пробу центрифугировать в течение 10 мин при максимальной скорости микроцентрифуги. Супернатант слить. Осадок промыть 70% спиртом.
10. Высушить осадок ДНК на воздухе и растворить в 20 мкл буфера TE^В.

Примечания

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

^б Соль всегда нужно добавлять к образцу до фенольной депротеинизации, т.к. экстракция фенолом в низкосолеваемом буфере может снизить выход ДНК из-за потерь.

^в В состав многих буферных растворов входит трис-гидрохлорид (Tris–HCl), поскольку трис не допускает развитие микрофлоры в подобном буфере в сравнении с другими буферными системами. Стоковый (от англ. *stock* – запас) концентрированный раствор кислой соли Tris–HCl с нужным значением рН получают титрованием трис-основания (Tris–OH, трис(гидроксиметил)аминометан) соляной кислотой.

Работа 1.3. Выделение ДНК из растительных тканей

При выделении ДНК из тканей растений важным фактором является эффективное разрушение клеточных стенок. Многие методы, используемые для этого, приводят к сильной фрагментации ДНК (из-за гидродинамических разрывов в цепи!). Часто приходится находить компромисс между размером ДНК и её количественным выходом, ведь молекулы ДНК – самые крупные полимерные биомакромолекулы. Высвобождение высокомолекулярной ДНК из клеток – это только часть задачи, поскольку растительные экстракты содержат большие количества белков, полисахаридов, танинов и пигментов, которые в ряде случаев весьма трудно отделить от ДНК.

Ткани растений обычно разрушают механическим растиранием в присутствии детергентов, растворяющих мембраны клеток, и хелатирующих агентов, подавляющих действие клеточных нуклеаз за счёт связывания двухвалентных катионов. От белков ДНП-комплекса избавляются фенольной депротеинизацией образца. Некоторые методики для освобождения ДНК от белков хроматина предусматривают использование протеиназ. После депротеинизации препарат всё ещё сильно загрязнён полисахаридами.

Если требуется большое количество чистой ДНК, то образцы очищают ультрацентрифугированием в градиенте плотности хлористого цезия.

Распространены методы с использованием двух детергентов СТАВ (*cetyl trimethyl ammonium bromid*) и SDS (*sodium dodecyl sulfate*). Метод с использованием СТАВ (Rogers, Bendich, 1985) позволяет получать препараты растительной ДНК с чистотой, достаточной для ПЦР, рестрикционного и гибридизационного анализа. СТАВ хорошо растворяет мембраны клеток. Кроме того, его применение позволяет разделить ДНК и полисахариды, поскольку они отличаются по растворимости в присутствии этого поверхностно-активного вещества. При высоких концентрациях солей нуклеиновые кислоты образуют стабильные, но вместе с тем растворимые комплексы со СТАВ. При снижении концентрации соли ниже 0,4М NaCl происходит выпадение в осадок комплексов СТАВ/нуклеиновая кислота, тогда как большая часть полисахаридов остается в растворе. Осадок снова растворяют в высокосолевым растворе 1М NaCl и высаживают ДНК спиртом.

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

Материалы и оборудование

Растения кукурузы, петунии, табака (или замороженные ткани), микроцентрифуга, морозильник, ступки с пестиками, оксид алюминия, песок.

Растворы

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

Методика

1. Приготовить навеску 200 мг листьев растений, замороженных заранее при –20°C в морозильнике. Либо быстро заморозить навеску в жидком азоте.
2. Образцы растереть в предварительно охлажденной фарфоровой ступке до гомогенного состояния. Если нет жидкого азота, то при растирании к замороженным листьям необходимо добавить 0,1 г оксида алюминия или

- прокалённого белого речного песка ^а в качестве абразива. В ступку при этом нужно добавить немного буфера для экстракции ДНК (300 мкл).
3. Добавить в ступку 700 мкл буфера для экстракции, снова перемешать.
 4. Перенести растёртую массу в 1,7 мл микропробирку так, чтобы объём составлял примерно 700 мкл (на пробирке есть метка 0,75 мл).
 5. Перемешать и инкубировать гомогенат при 65°C в течение 10 минут.
 6. Добавить 220 мкл ацетата калия и поместить пробирку на лёд на 20 минут.
 7. Центрифугировать пробу в течение 3 минут при скорости 10000 об/мин. Перенести супернатант (надосадочную жидкость) в чистую пробирку.
 8. К супернатанту добавить равный объём изопропанола, перемешать и центрифугировать 10 минут при 10000 об/мин для осаждения ДНК.
 9. Осадок ДНК промыть 70% этанолом, растворить в 200 мкл буфера TE.
 10. Провести процедуру фенольной депротеинизации образца. Для этого внести в пробирку с раствором ДНК равный объём фенол–хлороформной смеси, хорошо перемешать встряхиванием и центрифугировать. Отобрать водную фазу (верхний слой) в чистую пробирку, не захватывая интерфазу. Повторить ту же процедуру со смесью хлороформ–изоамиловый спирт. Отобрать водную фазу с ДНК в чистую пробирку ^б.
 11. Высадить ДНК ^в 2,5 объёмами холодного 96% этанола, предварительно прилив к образцу 1/10 объёма 3М ацетата К (pH 5,0) или Na (pH 5,2).
 12. Пробу центрифугировать в течение 10 мин на максимальной скорости. Супернатант слить. Осадок промыть 70% спиртом.
 13. Высушить осадок ДНК на воздухе и растворить в 50 мкл буфера TE ^г.

Примечания

^а По нашему опыту лучше использовать песок, мацерирующий ткани растений быстрее. Примесь песка или Al₂O₃ уйдет из образца при первом центрифугировании.

^б После экстракции белков фенолом и хлороформом всегда уменьшается объём водной фазы. Небольшое нарушение объёмной пропорции 1:1 на деле не очень важно, однако на практике лучше этим не пренебрегать. Если водной фазы останется слишком мало (меньше 100 мкл) требуется перед хлороформом добавить TE-буфер до исходного объёма, иначе потом будет неудобно отбирать верхнюю фазу и потери ДНК возрастут.

^в При методе с использованием SDS получается высокомолекулярная ДНК со средним размером фрагментов около 50 kb (*kilo base pairs*, тысяч пар нуклеотидов, т.п.н.). В препарате – хромосомная, хлоропластная и митохондриальная ДНК, а также РНК.

^г В буфере TE можно хранить ДНК в холодильнике при +4°C сроком до нескольких месяцев. Для более длительного хранения ДНК в замороженном виде её растворяют в бидистиллированной или деионизованной воде. Использовать воду вместо TE-буфера удобно, поскольку не будет необходимости пересаживать ДНК перед постановкой реакций, требующих ионов Mg²⁺, необходимых специфичным к ДНК ферментам. Однако замораживание-размораживание неизбежно ведёт к одно-/двух-цепочечным разрывам в цепи ДНК. Лучше всего из буфера TE исключить ЭДТА и заморозить в нём, поскольку бидистиллят, к примеру, имеет слабокислый показатель pH, что для ДНК нежелательно. В глубокой заморозке при –70°C можно заложить ДНК на хранение на годы.

Работа 1.4. Концентрирование ДНК путем осаждения спиртом

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

Этиловый спирт как водоотнимающее средство снижает растворимость нуклеиновых кислот (их солей ^a) в воде. ДНК (РНК) агрегирует в 70% этаноле в присутствии соли, нейтрализующей фосфатные группы. Агрегация НК проходит лучше при пониженной температуре и для неё требуется некоторое время. Образовавшиеся агрегаты осаждают центрифугированием.

На осаждение ДНК из раствора берут 2,5 объема этанола или 1 объем изопропанола. При значительных масштабах работ в целях экономии допускается брать 0,6 объема изопропанола как минимум. Нужно помнить, что 70% – это оптимум концентрации этилового спирта для преципитации нуклеиновых кислот. Если концентрация этанола будет низкой, то ДНК в кристаллическое состояние (холестерические жидкие кристаллы) не перейдет, если высокой – в осадок вместе с ней выпадут оставшиеся белки и другие примеси. Оптимальная ионная сила раствора для осаждения ДНК составляет 0,2М NaCl; при её понижении ДНК будет преципитировать хуже.

ДНК после высаживания нужно перевести в раствор с нейтральным или слабощелочным показателем рН среды, если предполагается хранение.

Помимо спиртов для осаждения нуклеиновых кислот применяют также полиэтиленгликоль PEG, цетилтриметиламмоний бромид СТАВ и другие хаотропные вещества. Стандартная процедура – спиртовое осаждение.

Материалы и оборудование

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

Растворы

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

Методика

1. Довести концентрацию соли в препарате до 0,2М NaCl (или до 0,3М ацетата натрия), используя концентрированные стоковые растворы этих солей. Чаще всего к раствору ДНК добавляют 1/25 объема 5М NaCl или 1/10 объема 3М ацетата натрия, рН 5,2, поскольку эти растворы всегда есть под рукой у исследователя ДНК и белков ^b.

2. Если концентрация ДНК низкая, то требуется добавить какой-либо соосаждитель, например гликоген, до конечной концентрации 50 мкг/мл ^б.
3. Прибавить к раствору ДНК 2,5 объёма холодного 96% этанола ^г, учитывая объём добавленного раствора соли.
4. Инкубировать при комнатной температуре от 5 мин и до выдерживания в течение ночи ^д при -20°C в зависимости от концентрации ДНК.
5. Центрифугировать при максимальной скорости микроцентрифуги в течение 10 минут. (Препараты ДНК с низкой концентрацией осаждают в течение 1–2 часов в высокоскоростной центрифуге с охлаждением при скорости 27000 об/мин и постоянной температуре $+4^{\circ}\text{C}$).
6. Промыть осадок ДНК холодным 70%-ным этанолом ^е. Для этого перемешать содержимое переворачиванием пробирки несколько раз, слить спирт и поместить пробирку в перевёрнутом виде на фильтровальную бумагу, чтобы стекли остатки спирта. Подсушить осадок.
7. Растворить ДНК в буфере TE или H_2O .

Примечания

^а Любая ДНК и РНК в растворе (коллоидном) это не кислота, а соль нуклеиновой кислоты. И катион у неё тот же, что и у соли, в присутствии которой она осаждалась.

^б Ацетаты, цитраты, сульфаты являются космотропными солями, цианаты – хаотропные соли. Для осаждения ДНК из растворов, содержащих SDS, чаще всего применяется NaCl, поскольку другие соли высаживают SDS существенно лучше.

^в Рабочие концентрации других соосаждителей: тРНК – 5–10 мкг/мл, линейный полиакриламид – 10–20 мкг/мл.

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

^д Было показано, что увеличение времени инкубации, равно как и понижение температуры, не оказывает существенного влияния на эффективность осаждения ДНК. Это справедливо для растворов ДНК с концентрацией более 20 нг/мл, однако такой подход по традиции часто соблюдается. Когда ДНК очень мало наиболее заметный эффект даёт увеличение времени центрифугирования до 1 часа при $+4^{\circ}\text{C}$, а не время нахождения ДНК «под спиртом» или низкая температура инкубации, вплоть до -70°C .

^е Пробирку нужно заполнять 70% спиртом не более чем на 2/3. Хорошо будет перед сливанием 70% спирта центрифугировать пробу в течение 2–3 мин при максимальной скорости центрифуги: осадки хоть и плотные, но их можно случайно вылить вместе с разбавленным спиртом. Такое иногда случается, особенно если ДНК плохо очищена от белков, без которых она никогда не существует *in vivo*. В клетке ДНК – это всегда ДНП, и вне клетки также покрыта белковыми молекулами (вирус, бактериофаг). В работе с ДНК качественные показатели важнее количественных.

Тема 2. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ ПРЕПАРАТОВ ДНК, РНК И БЕЛКОВ

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

Определить концентрацию ДНК, а также степень её чистоты, можно с помощью спектрофотометра, что точнее и быстрее. Для этого измеряют оптическую плотность раствора ДНК при длине волны 260 нм. Одна (каждая) оптическая единица соответствует концентрации ДНК в 50 мкг/мл. Для расчёта можно воспользоваться калькулятором на интернет-ресурсе MOLBIOL.RU (<http://www.molbiol.ru>) или других подобных порталах.

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

Для оценки чистоты препарата ДНК, свободного от РНК, проводят измерения оптической плотности раствора при длинах волн 260, 280 и 235 нм, т.е. на максимумах поглощения растворов ДНК, белков и полисахаридов, соответственно. Значение соотношения $A_{260/280}$ для чистой ДНК должно быть больше 1,8, значение $A_{260/235}$ должно быть больше, чем 2,2. Загрязнение полисахаридами характерно, главным образом, для препаратов растительной ДНК. В состав лигнина, в отличие от других углеводов, входят ароматические группировки атомов, и поэтому лигнин поглощает УФ излучение.

Работа 2.1. Спектрофотометрическое определение концентрации ДНК

Нижний предел концентрации ДНК, которую можно определить спектрофотометрически, составляет 0,1 мкг/мл. На определение обычно берут аликвоту (лат. *aliquoties* – несколько частей, кратный) исследуемого раствора ДНК, к примеру, 1 мкл и разбавляют в 100 и более раз.

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

Материалы и оборудование

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

Растворы

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

Методика

1. Взять микропипеткой на анализ 1 мкл образца полученной ДНК и разбавить препарат, добавив 130 мкл буфера TE, содержащего 100мМ NaCl^а. Объём образца делают равным 130 мкл, чтобы кривизна поверхности жидкости не влияла на измерения.
2. Поместить образец разбавленной ДНК в «маленькую» (100 мкл) ячейку.
3. Измерить поглощение A_{260} . Полученное значение должно лежать в пределах 0,005–2,5^б. В противном случае нужно разбавлять или концентрировать ДНК^в.
4. Рассчитать концентрацию ДНК, используя коэффициент пересчёта из табл. 1 по формуле: $C[\text{мкг/мл}] = A_{260} \times K$

Таблица 1. Расчёт концентрации ДНК и РНК

	К (для исследуемого р-ра) [мкг/мл]	$K_{1:130}$ (для разведённого образца) [мкг/мкл]
ДНК двухцепочечная	50	6,5
ДНК одноцепочечная	37 ^г	4,81
РНК	40	5,2

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

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

Примечания

^а Для растворения ДНК (РНК) можно использовать другие низкосолевые буферы, но только не воду. К примеру, растворы 100мМ NaCl, 20мМ Na₃PO₄, 10–100мМ Tris–HCl (pH 7,5–9,0) или 100мМ K₂HPO₄ (pH 8,2) дают сходные результаты. Измерения в воде приводят к существенным отклонениям. Ошибка измерения может составлять до 14% и отношение A₂₆₀/A₂₈₀ оказывается заниженным.

^б Точность измерения падает при слишком больших и слишком малых значениях A₂₆₀ из-за нарушений закона светопоглощения. Ошибка при значении 0,05 составляет ≈ 18%, при значении 0,1–1,0 ≈ 1%. Измерения при значениях свыше 2,5 недостоверны.

^в Концентрируют ДНК путём её переосаждения спиртом (работа 1.4).

^г Для олигонуклеотидов, поглощение которых ощутимо зависит от их состава, существуют специальные расчёты.

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

Работа 2.2. Определение концентрации белка по собственной флуоресценции

Спектрофотометрические методы определения белка основаны на измерении поглощения или испускания света в ультрафиолетовой области спектра. Для абсорбционной УФ-спектрофотометрии белков существуют некоторые проблемы, поэтому гораздо чаще определяют связавшиеся с определёнными красителями белки колориметрически в видимой области спектра (см. тему 10), либо в УФ свете измеряют эмиссию.

Растворы белка обладают поглощением в интервалах длин волн 270–290 и 200–225 нм. Поглощение при 280 нм определяется присутствием в молекуле белка ароматических аминокислот – тирозина, триптофана и в меньшей степени фенилаланина. Абсорбция при $\lambda=210$ нм, обусловленная пептидными связями в белках, практически в 20 раз выше, чем при 280 нм.

Поскольку поглощение в ультрафиолетовой области при 210 нм обусловлено в основном пептидными связями, то для разных белков величина поглощения различается незначительно. Определение общего белка в сыворотке крови с помощью прямой фотометрии при длине волны 210 нм обеспечивает получение результатов, сравнимых с биуретовым методом и методом Кьельдаля. Однако данный метод применяется сравнительно редко из-за необходимости использования кювет, не поглощающих при 210 нм, и монохроматора, что удорожает метод.

В сравнении с фотометрией при $\lambda=210$ нм точность и специфичность методов определения белков, основанных на поглощении при $\lambda=280$ нм, невелика, поскольку содержание тирозина и триптофана может колебаться в различных белках. Кроме того, присутствие в сыворотке крови свободных аминокислот – триптофана и тирозина, а также мочевой кислоты и билирубина, поглощающих при 280 нм, вносит определённую погрешность. В связи с этим данный метод не используют для прямого определения содержания общего белка в сыворотке крови. Однако для препаратов белка с той или иной степенью очистки его удобно использовать (прил. 17). Примесь нуклеиновых кислот и нуклеотидов будет влиять на определение.

Кроме адсорбции в УФ свете измеряют также эмиссию. Приведённый ниже метод полезен при очень низких концентрациях белка, имеющегося в малых количествах. Главное, что он не требует предварительного окрашивания полученного образца белка (необратимого, см. тему 10), так как раствор белка обладает собственной флуоресценцией.

Материалы и оборудование

Спектрофлуориметр, кварцевая кювета объёмом 3 мл, микропипетка, буферный раствор, раствор белка в буферном растворе, навеска 9 мг белка бычьего сывороточного альбумина (БСА) для калибровки.

Методика

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

Тема 3. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

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

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

ДНК – это слабая кислота, поэтому она движется к аноду («+») за счёт отрицательно заряженных фосфатных групп. За движением ДНК (РНК) в пластине геля можно следить, так как полосы окрашенной флуоресцентными красителями ДНК, формируемые молекулами одного размера при продвижении через поры геля, видны в УФ свете. Для окрашивания ДНК применяют краситель бромистый этидий *EtBr* ($\lambda_{\max} = 590$ нм). Молекулы *EtBr* интеркалируют в молекулы ДНК, т.е. встраиваются между соседними парами нуклеотидов. Интенсивность флуоресценции связанного *EtBr* в 20 раз выше, чем свободного. Такая окраска обеспечивает высокую чувствительность: от 10 нг ДНК можно увидеть в виде полоски оранжевого цвета. Применяют и другие красители, в частности *SYBR Green* ($\lambda_{\max} = 497$ нм). Длина волны прибора для визуализации ДНК УФ-трансиллюминатора – 305–320 нм.

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

Работа 3.1. Приготовление агарозного геля

Заливка геля. Агароза легко плавится при нагревании до 95°C (в электрофорезном буфере). При выливании расплава в форму и его застывании получают прозрачные упругие гели. Лунки (карманы) для внесения ДНК на гель-электрофорез формируются путём вставки тefлоновой гребёнки с зубьями в незастывший гель и её извлечением после полимеризации пластины геля.

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

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

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

Окраска ДНК в агарозных гелях. Для визуализации ДНК применяют её окрашивание бромистым этидием *EtBr* (3,8-диамино-5-этил-6-фенил-фенантридиум бромид). Молекулы красителя интеркалируют (встраиваются) между соседними парами нуклеотидов ДНК. Этидиум бромид добавляют обычно в расплав агарозы до полимеризации гелевой пластины. Максимум поглощения *EtBr* наблюдается при длинах волн 300 и 360 нм, а эмиссия происходит в красно-оранжевой области видимого спектра при 590 нм.

Материалы и оборудование

Агароза, гребёнка, форма для заливки горизонтального геля (т.н. «плашка»), можно использовать крышку от иммунологического планшета).

Растворы

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

Методика

1. Взвесить рассчитанное количество порошка агарозы (1 г для подготовки 100 мл 1% геля^а) и высыпать в химический термостойкий стакан. Налить в стакан 20 мл 5× электрофорезного буфера TBE и довести до 100 мл водой.
2. Нагреть смесь на электроплитке или СВЧ-печи до полного расплавления.
3. Охладить расплав до 50–60°C (стакан можно держать в руках). Добавить *EtBr* до конечной концентрации 0,5 мкг/мл: лаборанту следует взять 5 мкл из стокового раствора *EtBr* с концентрацией 10 мг/мл^б на 100 мл расплава.
4. Установить гребёнку ≈ в 1 см от края формы. Вылить расплав, перемешав.

5. После того как гель полностью полимеризуется (30 мин) осторожно удалить гребёнку, покачивая её из стороны в сторону и потянув вверх.

Примечания

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

^б Бромистый этидий – потенциально опасное вещество из-за возможности связывания с ДНК и стимулирования разрывов в ДНК при освещении ультрафиолетом. Строгих доказательств нет, однако некоторые продукты его окисления ферментами печени обладают небольшой, но заметной мутагенной активностью. Необходимо работать в резиновых перчатках, соблюдая меры предосторожности! Избегать контакта с кожей! *EtBr* разрушается на свету, поэтому гели непродолжительное время хранят в темноте при +4°C.

Работа 3.2. Гель-электрофорез ДНК

Буфер для нанесения образцов на гель. Раствор ДНК в лунки геля вносят в буфере, содержащем глицерин или сахарозу, чтобы ДНК сразу опустилась на дно лунки, а не растворилась в электрофорезном буфере ещё до включения тока и вхождения в гель. Чтобы следить за прохождением фронта фореа в буфер добавляют специальные красители. Электрофоретическая подвижность бромфенолового синего (БФС) лежит в районе 100 оснований. Синее пятно БФС движется на уровне тРНК, это лидирующий краситель. Подвижность ксиленианола (КЦ, зеленого цвета) лежит в районе 460 нуклеотидов.

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

Геномная ДНК в отличие от плазмидной и фаговой всегда дает шлейф из фрагментов разного размера. В УФ свете наблюдается равномерное окрашивание по всей длине геля, так называемый «шмер» (от англ. *smear* – пятно, мазок). На дорожке 3 в прил. 13 можно видеть такой шлейф.

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

Напряжённость поля. Эффективное разделение фрагментов ДНК происходит при напряжённости, не превышающей 5 В/см геля. С увеличением напряжённости эффективность разделения ДНК ухудшается.

При повышенной температуре молекулы ДНК особенно легко теряют краситель *EtBr*, что происходит, если проводить электрофорез при высоком напряжении. Этидиум бромид при электрофорезе движется от «+» к «-», т.е. в направлении, обратном движению ДНК. Чтобы он не уходил из геля, когда, к примеру, ДНК внесена в малом количестве, нужно ввести его прямо в буфер.

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

В 1% агарозном геле одноцепочечная ДНК (и РНК) движется примерно на 10% быстрее, чем двухцепочечная ДНК того же размера. Эта ДНК (РНК) окрашивается бромистым этидием примерно в 4–5 раз слабее, что необходимо учитывать при визуальной оценке результатов электрофореза.

Материалы и оборудование

Агарозный гель, раствор ДНК бактериального, растительного или животного происхождения, полученный в работах 1.1–1.3, маркер молекулярного веса (коммерческий препарат) или ДНК фага λ , рестрицированная *HindIII*, источник тока, камера для э/фореза, УФ-транслюминатор.

Растворы

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

Методика

1. Поместить плашку с гелем в электрофорезную камеру, залить 1× буфер ТВЕ (работа 3.1) так, чтобы он полностью покрыл агарозу^а.
2. Смешать 10 мкл раствора ДНК и 1 мкл 10× буфера для нанесения образцов на гель в пробирке, в лунке малого иммунологического планшета или просто на поверхности тефлоновой гребёнки. Тщательно пипетировать.
3. Нанести образец(ы) микропипеткой в лунку геля.
4. Нанести маркер молекулярного веса в соседнюю лунку геля.
5. Включить источник тока и провести электрофорез при напряжении 100 В в течение 1,5–2 ч (до выхода лидирующего красителя БФС из геля).
6. Отключить ток, вынуть плашку и просмотреть гель в УФ свете.
7. Сфотографировать гель цифровой фотокамерой^б (фото см. в прил. 13).

Примечания

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

^б Агарозные гели с ДНК, в отличие от полиакриламидных с белками, следует фотографировать сразу, поскольку при хранении полосы ДНК (ДНК-бэнд) становятся размытыми из-за диффузии. Как показывает опыт на следующее утро полосы нечёткие.

Тема 4. ВЫДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ И ФАГОВОЙ ДНК

Плазмида – внехромосомный самовоспроизводящийся генетический элемент (фактор наследственности) бактерий и некоторых других организмов, в частности дрожжей. Все векторы для клонирования ДНК получены на основе плазмид либо вирусов. Векторы составляют основу как генетической, так и белковой инженерии. Кроме того, рекомбинантную ДНК, т.е. ДНК вектора, объединённую с нужной исследователю ДНК, применяют в клеточной инженерии, инженерной энзимологии, генной терапии и др.

Плазмида представляет собой кольцевую (очень редко – линейную) двухцепочечную молекулу ДНК, способную к автономной репликации в клетке организма-хозяина. Векторная плазмида – переносчик ДНК.

Среди методов выделения плазмидной ДНК наиболее распространены разновидности метода щелочного лизиса клеток бактерий, разработанного Бирнбоймом и Доли в 1979 году (*Birnboim, Doly, 1979*). Они позволяют легко отделить плазмидную ДНК от высокомолекулярной хромосомной ДНК. Пептидогликан (муреин) клеточной стенки разрушают лизоцимом, а мембрану клетки-хозяина растворяют детергентом SDS в щелочных условиях при значении рН около 12,5. Хромосомная ДНК при этом фрагментируется и денатурирует необратимо. Плазмидная ДНК также денатурирует, но не фрагментируется ввиду её небольшого размера и обе цепи ДНК остаются сцепленными. При понижении рН после добавления раствора ацетата калия с рН 5,0, обе цепи плазмиды ренатурируют друг с другом. Одноцепочечные фрагменты хромосомы из разных клеток ренатурируют (регибридизуются) случайным образом и образуют высокомолекулярный творожистый осадок. Этот осадок легко отделяется центрифугированием от оставшейся в растворе плазмиды, которую затем осаждают этанолом. Поскольку *in vivo* ДНК не бывает свободной от белков, то необходима депротеинизация образца.

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

Работа 4.1. Минипрепаративное выделение плазмидной ДНК (минипреп)

Приведённый протокол представляет собой одну из модификаций метода щелочного лизиса клеток бактерий. Это один из лучших методов для получения плазмидной ДНК высокого качества. Его достоинствами являются простота и высокая скорость, сравнимая только с выделением ДНК на микроколонках. Количество ДНК достаточно для нескольких рестрикций. При масштабных проектах используют процедуру максипреп (работа 4.2).

Плазмида pBR322, препарат ДНК которой предполагается получить, – один из первых векторов молекулярного клонирования (*Bolivar et al., 1977*).

Материалы и оборудование

Штамм *E.coli* XL1–Blue (*StratageneTM*), трансформированный плазмидой pBR322 (см. прил. 1, 4), микроцентрифуга, шейкер.

Растворы

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

Методика

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

9. Осадить плазмиду центрифугированием в течение 10 мин при максимальной скорости центрифуги, супернатант затем вылить через край, а остатки после короткого центрифугирования отобрать микропипеткой.
10. Плазмидный осадок растворить в 100 мкл ТЕ-буфера (можно 200 мкл).
11. Раствор плазмидной ДНК необходимо подвергнуть дальнейшей очистке – провести фенольную депротеинизацию образца. Для этого добавить в пробирку равный объём смеси фенол–хлороформ, хорошо перемешать и разделить фазы центрифугированием (10 мин, 10000 об/мин).
12. Перенести верхнюю водную фазу в новую пробирку, добавить равный объём смеси хлороформ–изоамиловый спирт (помимо денатурации протеинов она удаляет остатки фенола), хорошо перемешать и разделить органическую и водную фазы центрифугированием в течение 3 мин.
13. Отобрать верхнюю водную фазу, добавить 1/10 объёма холодного раствора 3М ацетата калия, рН 5,0 и высадить ДНК этанолом. Для этого добавить в пробирку 1 мл холодного (–20°C) этанола и поместить образец на лёд или в морозильник не менее чем на 15 мин. На этой стадии можно прерваться: под спиртом очищенная ДНК, в принципе, может храниться годами. Но все три формы плазмиды, судя по опыту, перейдут в линейную форму.
14. Осадить плазмидную ДНК центрифугированием (10 мин, 10000 об/мин).
15. Добавить к осадку 1 мл 70% этанола для промывки осадка ДНК и центрифугировать 3 мин.
16. Слить супернатант, перевернуть пробирки на фильтр и подсушить осадок на воздухе в течение 0,5 ч. Растворить в 50–100 мкл воды. На электрофорез следует взять 5–10 мкл образца.
17. Провести при необходимости обработку образца рибонуклеазой для удаления РНК. Следует добавить к полученному препарату плазмиды 1/100 объёма раствора РНКазы А (10 мг/мл в 10 мМ Tris–HCl (рН 7,4), 15 мМ NaCl) и выдержать 0,5–1 ч при 37°C. РНКазу затем можно удалить с помощью фенола, если нужно. На ДНК этот фермент влияния не оказывает.

Примечания

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

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

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

^г Происходит нейтрализация щелочной среды. Хромосомная ДНК регибридуется случайным образом, образуя большие сети, кольцевая же плазмидная ДНК благополучно

ренатурирует «сама на себя». Важно, чтобы нейтрализация была полной, не оставалось областей с вязким раствором. Нужно смешивать раствор вначале мягко, чтобы не фрагментировать геномную ДНК, но после того как она уже ассоциирует (приблизительно через 1 мин) надо встряхнуть посильнее. Растворы I, II, III для достижения нужного результирующего значения рН используются в объёмной пропорции 1:2:1,5.

Работа 4.2. Выделение плазмидной ДНК в больших объёмах (максипреп)

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

В данной работе предполагается получить в значительных количествах ценную векторную ДНК. Фагмида pBluescript II KS+ – это вектор компании *Stratagene*TM, используемый для клонирования, секвенирования и экспрессии. Кроме того, эта фагмида (от слов *фаг* + *плазмида*) в отличие от обычных плазмид способна «упаковываться» в фаговые частицы в присутствии в клетке фага-помощника, поскольку она имеет *ori* фага M13, а фаговые белки для сборки вирионов поставляют хелпер. Вектор pBluescript II характеризуется более высоким числом копий на клетку чем плазмида pBR322 (см. прил. 1, 5).

Материалы и оборудование

Центрифуга для больших объёмов, весы, штамм кишечной палочки *E.coli* XL1–Blue, содержащий фагмиду pBluescript II KS+.

Растворы

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

Методика

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

4. Ресуспензировать осаждённые клетки в 10 (или 5) мл раствора I.
5. Добавить 1 мл (или 0,5) свежеприготовленного раствора I с лизоцимом. Оставить на столе на 15 мин. (Клетки *E.coli* лизируются и без лизоцима).
6. Добавить 20 (или 10) мл раствора II, сразу интенсивно перемешать. Оставить на льду при 0°C на 5 мин.
7. Добавить 10 (или 5) мл холодного 10М ацетата аммония^a (добавлять микропипеткой по каплям), смешать. Оставить при 0°C на 5 мин.
8. Центрифугировать при 5000 об/мин в течение 10 мин при +4°C.
9. Супернатант отобрать микропипеткой, разделить на две центрифужные пробирки, добавить к каждой по 12,5 мл изопропанола. Делать это нужно на весах. Оставить на столе на 10 мин для высаживания ДНК.
10. Центрифугировать при 5000 об/мин, 4°C, 10 мин, отбросить супернатант.
11. Центрифугировать при комнатной температуре 3 мин, отобрать остатки жидкости. Осадок плазмидной ДНК не подсушивать!
12. Растворить осадок в каждой микроцентрифужной пробирке в 400 мкл 2М ацетата аммония, объединить в одной 1,7 мл пробирке. Оставить при комнатной температуре на 5 мин (осаждение полисахаридов, белков).
13. Центрифугировать при комнатной температуре 10 мин.
14. Супернатант перенести в пробирку с равным объёмом (800 мкл) изопропанола^б. Оставить на столе на 10 мин.
15. Центрифугировать при комнатной температуре 5 мин.
16. Сполоснуть осадок 70% этанолом.
17. Растворить плазмидную ДНК в 0,2–1 мл H₂O. Для электрофореза достаточно взять 5–10 мкл раствора^в.

Примечания

^a Использование ацетата аммония вместо ацетата калия в качестве раствора III позволяет существенно уменьшить объёмы при центрифугировании. Кроме того, в присутствии ацетата аммония осаждаются полисахариды из раствора, а также белки (см. п.12). Это позволяет исключить из протокола работу с фенолом.

^б Использование изопропанола для высаживания ДНК из раствора позволяет уменьшить объёмы. При масштабных работах важно минимизировать расход реагентов. Обычно используют равный объём изопропанола (минимум 0,6 V, для этанола – 2 V).

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

Работа 4.3. Выделение репликативной формы RF фага M13

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

Близкородственные нитевидные фаги M13, f1, fd и др. с вирионами, содержащими одноцепочечную ДНК относятся к умеренным – они не лизируют клетки, на которых размножаются (паразитируют). Векторы на основе нитевидных фагов удобны для секвенирования, поскольку из фаговых частиц можно выделить одноцепочечную ДНК +-цепей. Интерес к этим фагам обусловлен ещё и тем, что они составляют основу метода фагового дисплея – одного из основных аффинных методов белковой инженерии для изучения белок-белковых взаимодействий наряду с дрожжевыми двугибридными системами и белковыми микрочипами. Клонирование генов осуществляют в двухцепочечную ДНК нитевидного фага, существующую внутри клеток инфицированной популяции бактерий как плазида. Если при клонировании «сшить» какой-либо ген с фаговым геном III (или VIII), кодирующем белок капсида gp3 (gp8), то полученный при трансляции гибридный белок будет презентирован на поверхности зрелого вириона в виде фьюжен-конструкта (англ. *fusion* – слияние, сплав). Такой фаг, а равно и библиотека генов в векторе M13 называется «фаг-дисплей», поскольку это дисплей пептидов на поверхности фаговых частиц (*McCafferty et al., 1990*).

Выделение двухцепочечной кольцевой репликативной (RF) формы фага M13 из клеток *E.coli* может быть проведено по любому из методов, используемых при выделении плазмид. Фаг M13 инфицирует только F+ штаммы кишечной палочки, поскольку сорбируется на F-пилях.

Приведена методика заражения (трансфекции) клеток *E.coli* фагом M13 с последующей наработкой RF-формы для получения двухцепочечной ДНК.

Материалы и оборудование

F+ штамм кишечной палочки *E.coli* XL1–Blue (TG-1, JS5 или другой), фаг M13 K07 в буфере TE с титром 10^{13} частиц /мл, центрифуга, шейкер.

Растворы

- Раствор I (работа 4.1)
- Раствор II (работа 4.1)
- 10 М ацетат аммония. Растворить 770 г в 800 мл воды и довести до 1 л.
- Канамицин. Раствор 100 мг/мл в воде.

Методика

1. Вырастить культуру клеток F+ штамма *E.coli* в 5 мл жидкой среды 2YT в течение ночи. Число клеток при этом может достигь 10^{10} клеток/мл.

2. Заразить культуру фагом в соотношении 10:1 (на 1 бактериальную клетку должно приходиться порядка 10 фаговых частиц). Для этого необходимо в пробирку к клеткам добавить 10 мкл суспензии фаговых частиц.
3. Инкубировать без качания 1 ч при 37°C. За это время фаг M13 K07 сорбируется на F-пилях, проникнет в клетку и начнётся синтез его RF. Эффективность трансфекции *E.coli* выше трансформации (тема 8).
4. Добавить в 500 мл свежей среды 2YT необходимый антибиотик ^a (500 мкл раствора канамицина с концентрацией 100 мг/мл), перелить туда заражённые фагом клетки *E.coli*.
5. Растить культуру с аэрацией в течение ночи при 37°C.
6. Клетки осадить центрифугированием при 4000 об/мин в течение 10–15 мин. Слить супернатант с культуральной средой в чистую колбу ^б.
7. Выделить из осаждённых клеток двухцепочечную кольцевую ДНК репликативной формы фага по протоколу минипреп (работа 4.1).

Примечания

^a Фаг M13 K07 (Viera, Messing, 1987) является рекомбинантным и имеет ген канамицин-устойчивости (см. прил. 1). Фаг M13 «дикого типа» растят без антибиотика.

^б В культуральной жидкости содержатся вышедшие из клеток фаговые частицы. Их легко можно выделить, как описано в работе 4.4, пропорционально увеличив при этом объёмы. Титр фаговых частиц определяют путём трансфекции клеток *E.coli* и последующего посева клеток на агаризованную питательную среду с антибиотиком.

Работа 4.4. Выделение одноцепочечной ДНК фага M13

Вышедшие из инфицированных клеток *E.coli* в культуральную среду фаговые частицы (вирионы) сравнительно просто можно выделить. Сначала клетки отделяют центрифугированием, а фаговые (а также фагмидные) частицы высаживают из культуральной среды полиэтиленгликолем (PEG).

Линейная молекула одноцепочечной ДНК каждого вириона заключена в белковый капсид. Размер ДНК фага «дикого типа» составляет 6407 нукл. Капсид включает примерно 2700 молекул белка gp8 и по несколько молекул белков gp3, gp6, gp7 и gp9, присоединяющихся к +-цепи ДНК в процессе самосборки фаговой частицы. Размеры частиц – 895 нм в длину и 6 нм в толщину. Белки можно денатурировать и затем удалить, используя фенол или другие хаотропные агенты, разрушающие третичную структуру макромолекул, а высвободившуюся ДНК высадить из раствора этанолом. Выход ДНК фага из культуральной среды объемом 1,5 мл из-под инфицированной культуры *E.coli* достаточен для фореза и секвенирования.

Материалы и оборудование

Инфицированная фагом M13 K07 культура *E.coli*, шейкер.

Растворы

- Раствор PEG/NaCl. Водный раствор 20% PEG–6000; 2,5М NaCl.
- Смесь фенол–хлороформ (работа 1.1).
- Смесь хлороформ–изоамиловый спирт (работа 1.1).

Методика

1. Перенести 10 мкл инфицированных фагом клеток кишечной палочки из культуры, находящейся в логарифмической фазе роста в жидкой питательной среде, в 2,5 мл питательной среды 2YT с антибиотиком ^а. Можно также взять одну колонию петлёй со свежей чашки с 2YT-агаром.
2. Инкубировать культуру на качалке-шейкере при скорости 200–300 об/мин и температуре 37°C в течение ночи с хорошим аэрированием.
3. Отобрать 1,5 мл культуры и поместить в 1,7 мл пробирку типа *Eppendorf*.
4. Осадить клетки центрифугированием в течение 5–10 минут.
5. Отобрать супернатант в чистую пробирку и добавить 1/10 объёма PEG/NaCl (150 мкл) для осаждения фагов. Оставить при 0°C на 15 мин.
6. Центрифугировать 5 мин на максимальной скорости микроцентрифуги.
7. Удалить супернатант микропипеткой.
8. Ресуспензировать осадок фаговых частиц в 400 мкл буфера TE ^б.
9. Добавить равный объём смеси фенол–хлороформ, хорошо перемешать встряхиванием и центрифугировать в течение 5 мин. Происходит экстракция ДНК из ДНП-комплекса. ДНК находится в верхней водной фазе, фенол внизу, а в интерфазе – денатурированные белки.
10. Отобрать около 300–350 мкл верхней водной фазы стараясь не захватывать интерфазу в чистую пробирку.
11. Добавить равный объём смеси хлороформ–изоамиловый спирт, встряхнуть и центрифугировать 5 мин. Происходит разделение фаз, остатки фенола растворяются в нижней органической фазе.
12. Отобрать около 250–300 мкл водной фазы в чистую пробирку.
13. Добавить 1 мл 96% этанола и центрифугировать 10 мин, 13000 об/мин.
14. Удалить супернатант, промыть осадок. Растворить ДНК в 10 мкл H₂O.

Примечания

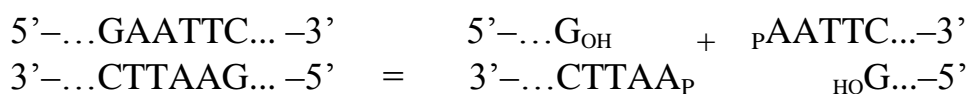
^а Обязательно должна присутствовать селекция против незараженных бактерий. Фаги семейства M13 в отличие от фага лямбда не лизируют заражённые ими клетки. Они реплицируются, упаковываются в вирионы и выходят из клеток, не мешая им делиться; лишь размножаются инфицированные бактерии процентов на 30–40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

^б На этом этапе можно прерваться, убрав препарат в холодильник. На следующий день провести очистку ДНК от компонентов белкового капсида, денатурировав протеины фенолом, разрушающим третичную структуру макромолекулы (переход – глобула-цепь).

Тема 5. РЕСТРИКЦИЯ ДНК

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

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



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

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

Небольшие по размеру молекулы плазмидной или вирусной ДНК при ферментативном гидролизе с помощью какой-либо рестриктазы дают строго определённое ограниченное количество рестриктов (прил. 3, 13). Препараты геномной ДНК из-за большого количества рестрикционных сайтов и неизбежной фрагментации ДНК при её изоляции из клеток дают при электрофорезе шлейф из фрагментов ДНК или «шмер» (прил. 13).

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

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

Работа 5.1. Рестрикция плазмидной и фаговой ДНК

Активность и количество фермента. Каждый препарат фермента обладает определённой активностью. 1 единица активности рестриктазы полностью гидролизует 1 мкг ДНК фага λ за 1 ч при 37°C. Коммерческие препараты обычно имеют активность 10–20 ед/мкл и требуют разведения. Гидролиз ДНК осуществляют 2–3-кратным избытком фермента, т.е. на 1 мкг ДНК берут 2–3 единицы. Хранят рестриктазы при –20°C в 50% глицерине.

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

Объём реакционной смеси. Удобно проводить рестрикцию в объёме 20–50 мкл, когда раствор ДНК, 10× буфер и фермент смешивают в пробирке и доводят до конечного объёма бидистиллированной или деионизованной водой. Для ферментативных реакций всегда берут высокоочищенную воду.

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

Материалы и оборудование

Раствор ДНК плазмиды pBR322 (1 мг/мл), раствор ДНК фага λ (1 мг/мл), рестриктаза EcoRI (10 ед/мкл), термостат, оборудование для фореза.

Растворы

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

Методика

1. Перед постановкой реакции (пп. 6–12) с помощью программы рестрикционного картирования RestrictionMapper можно узнать число сайтов рестрикции *EcoRI* в молекуле ДНК фага λ и их размер. Это нужно для того чтобы представлять, что можно будет увидеть на электрофореграмме. Нуклеотидную последовательность фага можно получить в базе данных *GenBank* так, как описано далее (пп. 2–5).
2. Откройте главную страницу сайта Национального центра биотехнологической информации США (National Center for Biotechnology Information, US National Library of Medicine – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> или <http://www.pubmed.com>). Введите запрос «Enterobacteria phage lambda, complete genome». Выберите вкладку «Nucleotide» и нажмите «Enter». Скопируйте полную нуклеотидную последовательность бактериофага λ, состоящую из 48502 н.п. (GenBank, NC_001416.1).
3. Откройте программу RestrictionMapper (<http://www.restrictionmapper.org>). Введите в специальное окно нуклеотидную последовательность фага λ.
4. Выберите опцию «Selected individual Enzymes», выберите фермент «*EcoRI*» и нажмите «Map Sites». Видно, что сайтов рестрикции 5, причем указан номер позиции нуклеотида в точке разрезания. Фрагментов получится 6, поскольку ДНК линейная. Можно узнать размеры всех рестриктов, нажав кнопку «Virtual Digest». Запишите эти размеры.
5. Прделайте ту же работу с плазмидой pBR322, задав запрос «Cloning vector pBR322», или воспользуйтесь прил. 3, 4.
6. Приготовьте реакционную смесь объемом 20 мкл в 1,7 мл пластиковой пробирке: 10× буфер – 2 мкл, раствор ДНК (1 мг/мл) – 1 мкл, вода – 16,7 мкл.
7. Тщательно перемешайте смесь пипетированием или встряхиванием, осадите капли со стенок пробирки коротким центрифугированием.
8. Достаньте фермент из морозильника, сразу поставьте пробирку в лёд. Наберите микропипеткой нужный объем раствора белка, содержащего 3 единицы активности (0,3 мкл). Добавьте фермент к образцу ДНК и снова быстро уберите рестриктазу в морозильник на –20°C. Перемешайте и соберите жидкость со стенок пробирки коротким центрифугированием.
9. Инкубируйте пробу 1 ч^a при рекомендуемой температуре 37°C.
10. Остановите реакцию добавлением 1 мкл 200мМ ЭДТА или прогреванием реакционной смеси при 65°C в течение 5–10 мин^b.

11. Добавьте к препарату резаной ДНК 1/10 объёма 10× буфера для нанесения образца на гель, перемешайте пипетированием и внесите ДНК в лунки геля. В этом буфере полученные образцы ДНК можно некоторое время хранить в холодильнике.
12. Проведите электрофорез ДНК при напряжении в 100 В в течение 1,5–2 ч и оцените результаты, просмотрев гель в УФ свете^В. Сфотографируйте гель.

Примечания

^а Время инкубации допускается увеличивать до 2-х и более часов для полноты гидролиза. Коммерческие препараты ферментов, как правило, не содержат примесей нуклеаз и поэтому не обладают неспецифической нуклеазной активностью. Однако при слишком длительной инкубации для некоторых рестриктаз возможно проявление *star*-активности или активности со звёздочкой, т.е. снижение специфичности гидролиза ДНК (для *EcoRI** – NAATTN). Это приведёт к появлению «шмера» вместо чётких полос в геле.

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

^в Число сайтов рестрикции в кольцевой ДНК точно соответствует числу получаемых рестриктов. При полном *EcoRI*-гидролизе плазмиды pBR322 получится один рестрикционный фрагмент. При рестрикции линейной ДНК фага λ (5 сайтов) получится 6 рестрикционных фрагментов с размерами 21226, 7421, 5804, 5643, 4878, 3530 п.н. Если фрагментов в образце (паттерне) видно больше, то это всегда свидетельствует о неполном гидролизе ДНК, т.е. наличии промежуточных продуктов гидролиза («недорестрикция»).

Работа 5.2. Рестрикция геномной ДНК эукариот

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

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

При обработке геномной ДНК рестриктазами, узнающими палиндромы из шести нуклеотидов (*EcoRI*, *BamHI*, *PstI* и другие распространённые рестриктазы), образуются рестрикты размером от десятков нуклеотидов до 20–30 kb. Таким образом, при полном рестрикционном гидролизе ДНК

эукариот получается огромное число рестриктов, десятки и сотни тысяч. При электрофорезе подвергшаяся частичному или глубокому расщеплению геномная ДНК даёт шлейф из фрагментов разного размера. Визуализировать нужный фрагмент возможно только с помощью блот-переноса ДНК на нитроцеллюлозный или нейлоновый фильтр и гибридизации ДНК по Саузерну с радиоактивно- или флуоресцентно-меченым зондом.

Так называемые «мелкощепящие» рестриктазы, узнающие палиндромы из 4 нуклеотидов (*Sau*IIIА и др.), порежут геномную ДНК на более мелкие фрагменты и в большем количестве. Для эффективного разделения высоко- или низкомолекулярных фрагментов ДНК используют разные гели (тема 3).

Материалы и оборудование

Геномная ДНК из растений табака (кукурузы, петунии) с неизвестной концентрацией, рестриктаза *Bam*HI, образец ДНК с известной концентрацией, спектрофотометр, термостат, оборудование для электрофореза.

Растворы

- 10× буфер для рестриктазы *Bam*HI: 100мМ Tris–HCl, рН 8,0; 50мМ MgCl₂; 1000мМ KCl; 0,02% Triton X–100.
- 10× буфер для нанесения образца на гель (тема 3).

Методика

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

Примечания

^а При длительной инкубации некоторые рестриктазы могут проявлять *star*-активность (звездную, вторичную, штриховую активность), т.е. гидролизовать сайты с одним или несколькими «неправильными» нуклеотидами. Это необходимо учитывать, если планируется осуществлять молекулярное клонирование (англ. *Molecular cloning*).

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

Тема 6. ПЦР

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

ПЦР включает три циклически повторяющиеся стадии (см. прил. 15):

1) *денатурацию ДНК* – расплетение двойной спирали и расхождение полинуклеотидных цепей;

2) *отжиг праймеров* – гибридизацию праймеров и одноцепочечной ДНК-мишени с образованием двухцепочечных комплексов «праймер-матрица», необходимых для инициации синтеза ДНК из мономеров – дезоксирибонуклеозидтрифосфатов;

3) *полимеризацию* – достраивание (удлинение, элонгацию) комплементарных цепей ДНК ферментом ДНК-полимеразой в направлении 5'→3' начиная от 3'-ОН концов присоединённых праймеров. Т.е. матричный синтез ДНК (нем. *matrize*, от латинского *matrix* – матка, источник, начало).

Многократное (циклическое) повторение этих трёх стадий приводит к экспоненциальному обогащению реакционной смеси молекулами ДНК-мишени, поскольку в каждом новом цикле в качестве матрицы выступает не только исходная ДНК, но и вся ДНК, синтезированная в предыдущих циклах. Поэтому реакция относится к цепным. Теоретически за N циклов может получиться 2^N молекул ДНК-мишени. Протекание ПЦР, т.е. переход от стадии к стадии и от цикла к циклу, регулируется изменением температуры.

Температура денатурации ДНК. Для любой высокомолекулярной геномной ДНК обычно задают 95°C. Для продуктов амплификации, а тем более комплексов «праймер-матрица» эта температура ниже.

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

Температура элонгации зависит от типа используемого фермента. Для ферментативной активности ДНК-полимеразы *Taq* из термофильной бактерии *Thermus aquaticus* температурный оптимум составляет 72°C.

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

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

Работа 6.1. Подбор праймеров

Праймеры – синтетические олигонуклеотиды, состоящие из 16–30 оснований. Они комплементарны участкам ДНК, между которыми находится последовательность-мишень. Праймер (англ. *primer*) является обязательным компонентом («затравка»), необходимым для работы ДНК-полимеразы: к его 3'-ОН концу фермент присоединяет нуклеотиды, комплементарные матрице.

Праймер к 5'-концу гена называют прямым (*forward, For*), к 3'-концу гена – обратным или встречным (*reverse, Rev*). В базах данных нуклеотидных последовательностей приведена только одна цепь ДНК – значащая, та, что транскрибируется в виде мРНК. По ней подбирают прямой праймер, т.е. тот праймер, от которого будет расти именно эта цепь. Обратный праймер подбирают для комплементарной цепи, но также в направлении 5'→3'.

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

Ход работы

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

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

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

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

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

REFERENCE 2 (bases 1 to 1007)
 AUTHORS Garrigues,T. and Dauga,C.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (01-JUN-2003) IMI, Institut Pasteur, Paris, France
 /organism=«*Vipera berus*» /organelle=«mitochondrion»

gene <1..>1007
 /gene=«ND2»

CDS <1..>1007
 /gene=«ND2»
 /codon_start=2
 /transl_table=2
 /product=«NADH dehydrogenase subunit 2»
 /protein_id=«AAQ86880.1»

translation=«PMSWITITISIFMTTTLITMTTHWLMAWTCLEINTLSMIPVISK
 TNHPRATEATTKYFLTQTLASITILSMTTLNALNTSNWEINLTTESTTMKIITLALMM
 KMAAAPFHFWLPEVAQGATTLTALTILTQKIAPLAILLATHNNTNLTLILSSAILS
 LVGGLGGLNQTQLRKLMAFSSIAHTGWILATITLAPNISTLTFMIYTMTTMPIFLILN
 LSSSATIKDMGTLWTTSPYFMMTMLLTLISLTGLPPLTGFMKWLILNKMVTFNM
 TLEATLMAMSSLP
 SLYLYMRLTYTMAMTIPPHPSLMPMKWRRTTHKNNTILPLTLSTMMILLC»

ORIGIN

```

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

```

Правила подбора праймеров

- Размер праймера должен составлять 16–25(30) нуклеотидов.
- CG-состав должен лежать в пределах 50–60 %.
- Разница в температуре отжига обоих праймеров – не более 6°C.
- Праймеры не должны быть само- и взаимно- комплементарными.
- Нуклеотиды 3'-конца праймера должны быть строго комплементарны матрице (замены возможны на 5'-конце длинных праймеров⁶).

Расчёт температуры отжига праймера

Для точного расчёта оптимальной температуры существует множество программ и алгоритмов. Упрощенный расчёт можно провести по формулам:

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

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

Примечания

^а Не забывайте об антипараллельности цепей ДНК при подборе обратного праймера. Если он будет иметь нужный состав, но другую полярность ПЦР-продукт получен не будет. Такой праймер (параллельный) не будет отжигаться на матрицу, т.е. образование гибридного комплекса олиго-/полинуклеотид невозможно.

^б Олигонуклеотид любого состава может быть по заказу синтезирован специализированной фирмой. По желанию заказчика в его состав введут флуоресцентную метку. На его 5'-конец при заказе можно добавить какие-либо нуклеотиды, к примеру, нуклеотиды сайта узнавания определённой рестриктазы. Компания примет заказ и на сиквенс полученного ПЦР-продукта: праймер для его секвенирования уже есть в наличии.

Работа 6.2. Проведение ПЦР-амплификации ДНК

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

Оптимальная концентрация праймеров часто подбирается эмпирически (расчёт см. в раб. 6.3). Не рекомендуется брать больше чем 50 пМ на пробу, иначе возможен неспецифический отжиг и образование праймер-димеров.

Обычно задают следующий режим работы ДНК-амплификатора:

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

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

Материалы и оборудование

ПЦР-амплификатор, ДНК (общая) гадюки Никольского *Vipera nikolskii* (40 нг/мкл), праймеры (10 пМ/мкл), смесь нуклеотидов *dNTP-mix* (2мМ), раствор хлорида магния (25мМ), *Taq*-полимераза (5 ед/мкл), 10х ПЦР-буфер.

Растворы

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

Методика

1. В стерильной пластиковой тонкостенной пробирке на 0,5 (0,2) мл смешать указанные выше компоненты, довести объём при помощи деионизованной воды до 20 мкл. Фермент добавлять последним, сразу убрать на $-20^{\circ}C$!
2. Центрифугировать 15 с. Нанести поверх реакционной смеси немного минерального масла для предотвращения испарения (≈ 30 мкл пипеткой или каплей). Если ДНК-амплификатор имеет нагреваемую крышку, то масло добавлять не нужно. Поместить пробирки в ДНК-амплификатор.
3. Запустить следующий режим ПЦР: предварительная денатурация матрицы при $95^{\circ}C$ – 5 мин, затем 30 циклов амплификации: $95^{\circ}C$ – 30 с, $57^{\circ}C$ – 30 с, $72^{\circ}C$ – 1 мин, затем задать температуру $72^{\circ}C$ – 5 мин (окончательная достройка цепей) и вывести на $+4^{\circ}C$ – режим хранения. Расчётная температура отжига обоих праймеров составляет $60^{\circ}C$, реальная задана на $3^{\circ}C$ ниже для гарантии отжига и последующего «удлинения праймера».
4. Провести электрофорез ДНК, сфотографировать гель (фотографию электрофореграммы см. в прил. 11, размер ампликона 911 п.н.). При Real-Time PCR форез не проводят, за процессом следят по флуоресценции.

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

Имея некоторый опыт в постановке ПЦР в целях экономии времени для подбора праймеров можно использовать коммерческие программные

продукты, а также интернет-ресурсы. Аналогично можно произвести другие расчёты, связанные с ПЦР. В частности сайт MOLBIOL.RU – это профессиональная интернет-территория для русскоязычных молекулярных биологов, генетиков, биохимиков, биофизиков, биоинженеров (<http://www.molbiol.ru>). Выложенная на сайте специальная форма поможет рассчитать параметры ПЦР, программы для подбора праймеров на сайте нет.

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

В приведённой ниже работе предлагается ознакомиться с интернет-порталами, где можно произвести расчёты для ПЦР (англ. PCR – Polymerase Chain Reaction), т.е. получить практические навыки в работе с программами.

Ход работы

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

Тема 7. КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНОВ

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

Клонирование гена проводят путем его включения в вектор. Вектор – это кольцевая молекула ДНК (плазмиды, вируса, бактериофага), способная к автономной репликации в выбранной системе клеток. ДНК гена и вектора, гидролизованные одной рестриктазой с образованием комплементарных «липких концов», ковалентно соединяют в одну кольцевую молекулу с помощью фермента ДНК-лигазы. Полученную рекомбинантную ДНК вводят в клетки бактерий, где она может реплицироваться автономно, т.е. независимо от хромосомы и в большом числе копий. Фагмида pBluescript II, к примеру, может присутствовать в каждой клетке популяции *E.coli* в количестве 300 копий. Культивируя клетки полученного клона-продуцента можно получать нужный белок в неограниченных количествах. Это, по определению, неисчерпаемый ресурс. Употребляя термин «суперпродуцент» подчеркивают высокий уровень синтеза клеткой-хозяином целевого белка.

Стратегия клонирования для каждого конкретного гена разрабатывается индивидуально. Правильно разработанная стратегия определяет половину успеха (подбор вектора и необходимых рестриктаз, система отбора, скрининг клонов, предварительная изоляция гена и многое другое). Процедуру клонирования можно разбить на несколько этапов:

- * подготовка ДНК вектора (рестрикция),
- * подготовка ДНК гена (рестрикция, ПЦР, синтез гена),
- * лигирование («сшивание») ДНК гена и вектора,
- * трансформация клеток *E.coli* продуктами лигазной реакции,
- * отбор трансформированных клонов *E.coli*,
- * проверка отобранных клонов на наличие вставки ДНК гена в векторе,
- * проверка экспрессии клонированного гена.

Общая схема молекулярного клонирования представлена в прил. 14.

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

Гены с известной (!) первичной структурой также можно «собрать» *in vitro* из синтетических олигонуклеотидов. При ПЦР нужно знать или верно предполагать только нуклеотидные последовательности праймеров.

Работа 7.1. Подготовка ДНК вектора и гена

Кольцевую ДНК вектора расщепляют рестриктазой по какому-либо уникальному, т.е. единственному на молекулу ДНК сайту в полилинкере. Полилинкер или мультиклональный сайт имеет нуклеотидные последовательности сайтов узнавания для нескольких рестриктаз (прил. 5). ДНК гена также «вырезают» из хромосомы с помощью этой же выбранной рестриктазы, чтобы получить комплементарные липкие концы.

В случае клонирования ПЦР-продукта к нему с помощью особого фермента присоединяют липкие концы из адениловых нуклеотидов *PolyA* и применяют *PolyT*-вектор рAL-TATM (*Евроген*). Новый метод ферментативных ассамблей перекрывающихся фрагментов ДНК (*Gibson assembly, 2009*) позволяет лигировать нерестрицированную ДНК, в том числе ПЦР-продукты.

В работах 7.1–7.3 в качестве несложного примера приведена схема клонирования (точнее переклонирования) гена левансахаразы *sacB* сенной палочки *Bacillus subtilis* в вектор рBluescript II из рекомбинантной плазмиды рSUP106::*nptI-sacB-sacR* (*Великов с соавт., Биотехнология, 2004, Т.3*).

Материалы и оборудование

Рестриктаза *Bam*HI, ДНК фагмиды рBluescript II SK+ (1 мг/мл) или штамм *E.coli* с указанной фагмидой, ДНК плазмиды рSUP106::*nptI-sacB-sacR* (1 мг/мл) или штамм *E.coli* с этой плазмидой, плотная фильтровальная бумага.

Растворы

- 10× буфер для рестриктазы *Bam*HI (тема 4).

Методика

Подготовка вектора

1. Нарастить биомассу клеток штамма-хозяина *E.coli* XL1–Blue, содержащего вектор рBluescript II SK+ в объёме 500 мл питательной среды.

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

Подготовка гена

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

Примечания

^a Необходимо минимизировать воздействие УФ-излучения на ДНК во избежание образования тиминовых димеров, что может повлиять на молекулярное клонирование.

^б Можно не отделять большой и малый фрагменты один от другого при лигировании, а клонировать оба вместе и лишь впоследствии отбирать плазмиды со вставкой ДНК нужного размера. В приведённом простом случае будет получаться всего два типа рекомбинантных плазмид – с нужным размером 6,8 kb и более крупных (12,6 kb).

^в Более высокий процент извлечения ДНК из кусочка геля даёт бохимическое разрушение агарозы ферментом агаразой, электроэлюция ДНК или использование легкоплавкой агарозы. В последнем случае гель плавят нагреванием, добавляют холодный буфер TBE, осаждают хлопья агарозы центрифугированием, а ДНК высаживают спиртом.

Работа 7.2. Лигирование ДНК вектора и гена

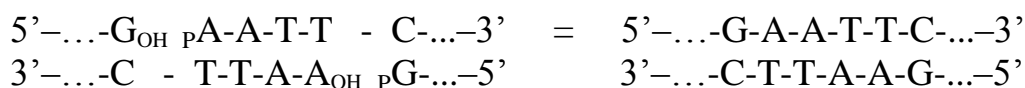
Рестрикционные фрагменты ДНК вектора и гена нужно ковалентно объединить в одну двухцепочечную кольцевую молекулу ДНК, ввести вектор

с «чужеродной ДНК» (англ. *foreign DNA* либо *transgene*) в клетку *E.coli* и размножить полученный клон. В качестве клеток-хозяев используют и другие бактерии, а также пивные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. В отличие от *E.coli* в клетках этих эукариотических микроорганизмов возможен пост-трансляционный процессинг эукариотического белка («созревание»). Микробиологические манипуляции с бактериями и дрожжами схожие.

Лигирование («сшивание») фрагментов ДНК проводят с помощью фермента ДНК-лигазы. Для этого смешивают рестрицированную одной и той же рестриктазой ДНК плазмиды и гена, добавляют лигазный буфер, ДНК-лигазу фага Т4, АТФ и инкубируют смесь при 16°C от 2 ч для рутинного лигирования до 12 ч для лигирования с целью получения библиотек генов.

Такая «рекомбинация *in vitro*» даёт рекомбинантную (гибридную) ДНК.

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



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

Приведена стандартная процедура лигирования ДНК-рестриктов, широко используемая при создании искусственных генетических программ.

Материалы и оборудование

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

Растворы

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

Методика

1. Смешать рестрицированную ДНК плазмиды и гена в соотношении от 1:2 до 1:10. Молярное количество ДНК вставки должно превышать количество

молекул ДНК вектора для «конкуренции» за вектор с целью повышения выхода рекомбинантов. Существует оптимум концентраций вектора и вставки. Использование слишком низких концентраций вставки вызовет преимущественное самолигирование вектора, слишком высоких – преимущественное образование конкатемеров. Общая концентрация ДНК в реакционной смеси не должна превышать 10 мкг/мл.

2. Добавить к смеси 10× лигазный буфер^а – 2 мкл, ДНК-лигазу фага Т4 в количестве 1–2 единиц^б, довести до 20 мкл деионизованной водой.
3. Инкубировать смесь при 16°C от 2 до 12 ч^в.
4. Переосадить лигазную смесь спиртом.
5. Провести трансформацию клеток *E. coli* с отбором клонов на канамицине.
6. Отобранные клоны проанализировать на наличие рекомбинантной ДНК электрофорезом и рестрикцией (возможен скрининг и с помощью ПЦР).

Примечания

^а ДНК-лигаза фага Т4 удовлетворительно работает во многих рестриктазных буферах после добавления 0,5мМ АТФ. Проявляет при этом 75–100% активности. Т.е. после рестрикции можно сразу ставить лигазную реакцию. Подавляют рестриктазную активность в этом случае предварительным прогревом образца.

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

^в В новых векторах серии ТОРО™ TA Cloning® Kit (*Invitrogen™, Life Technologies*) для лигирования ДНК применяют ДНК-топоизомеразу I. Эти векторы очень удобны для клонирования ПЦР-продуктов, которые не нужно при этом подвергать предварительной рестрикции, либо наращивать концы из *PolyA*. Время лигирования составляет 5–10 мин.

Работа 7.3. Рестрикционное картирование вставки ДНК в плазмиде

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

При отборе по маркеру ампициллин-устойчивости вектора будут селективированы клоны *E. coli* с исходным «пустым» вектором и с вектором, содержащим вставку, возможно, не одинарную или делетированную. Причём в обеих возможных ориентациях (только одна ориентация бывает при клонировании по сайтам двух разных рестриктаз). Проверить наличие вставки ДНК в вектор и её ориентацию можно рестрикцией. Нужно заметить что в

приведённом конкретном случае для выбраковки клонов без вставки можно использовать и так называемую «сине-белую селекцию», основанную на использовании гена β -галактозидазы *LacZ* вектора pBluescript II (прил. 6, 15).

При отборе по маркеру канамицин-устойчивости вставки клетки с исходным вектором элимируются, что упрощает анализ трансформантов. Ориентация вставки в приведенном примере тоже не важна, так как ген *sacB* в конструкторе находится под собственным промотором с регуляторной областью *sacR* и будет экспрессироваться, находясь на любой из двух цепей ДНК (в других случаях важно попасть в рамку чтения!). Кроме того, ген *sacB* придаёт грамм-отрицательным бактериям чувствительность к сахарозе, т.е. отобранные клоны не должны расти на 2YT-агаре, содержащем 5% сахарозы.

Материалы и оборудование

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

Растворы

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

Методика

1. После проведения процедуры трансформации компетентных клеток *E.coli* лигазной смесью посеять клетки шпателем на свежую агаризованную среду 2YT с антибиотиком канамицином (100 мкг/мл).
2. Отсеять 20 выросших на следующий день колоний на эту же среду.
3. Нарастить отдельные клоны в 5 мл жидкой среды 2YT с антибиотиком.
4. Выделить плазмидную ДНК из отдельных клонов процедурой минипреп.
5. Провести электрофорез плазмидной ДНК, отбраковать аномальные клоны.
6. ДНК из 10 клонов гидролизовать рестриктазой *Bam*HI (вырезать вставку).
7. Провести электрофорез резаной ДНК с маркерами молекулярного веса для контроля размера вставки ДНК (3,8 kb). Клоны с аномальными вставками «чужеродной ДНК» следует выбросить.
8. Определить ориентацию вставки с помощью второй рестриктазы ^a. Для этого гидролизовать ДНК плазмид рестриктазой *Eco*RI, имеющей сайт узнавания внутри кассеты ближе к гену *nptI*, чем к *sacR*. Среди разных плазмид одного размера должно получиться два типа картин рестрикции.
9. Заложить рекомбинантные клоны *E.coli* с обеими ориентациями вставки ДНК в векторе pBluescript II на хранение.

Примечание

^a Чтобы вставка ДНК в вектор происходила только в одной ориентации нужно использовать для рестрикции два разных фермента.

Тема 8. ТРАНСФОРМАЦИЯ БАКТЕРИЙ

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

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

Плазмиды при проведении трансформации *E.coli* попадают только в очень небольшую часть (0,01–5%) клеток. Для отбора трансформированных клеток, несущих рекомбинантную ДНК, используют селективные маркеры, например, гены устойчивости к антибиотику. Многие векторы содержат ген устойчивости к ампициллину *bla*. Он кодирует фермент β -лактамазу, который разрушает лактамное кольцо ампициллина (прил. 3, 4). После осуществления процедуры трансформации бактерии высеивают на питательный агар, содержащий ампициллин. При этом выживают и образуют колонии только те клетки, в которые попала плазида и синтезируется активная β -лактамаза. Эти клоны *E.coli* называют трансформантами. Другие векторы несут гены устойчивости к канамицину, тетрациклину (см. прил. 1).

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

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

Работа 8.1. Приготовление компетентных клеток *E.coli*

Приведённая процедура предполагает получение компетентных клеток *E.coli* путём их инкубации при низкой температуре в растворе, содержащем катионы Ca^{2+} (*Inoue, Nojima, Okayama, 1996*). Чтобы повысить уровень

трансформации помимо CaCl_2 в раствор добавляют различные вещества. Приобретшие компетентность «кальциевые клетки» следует использовать сразу (работа 8.2). Если по каким-то причинам это сделать невозможно, то 1–2 дня максимум они могут храниться в холодильнике при $+4^\circ\text{C}$, пока полностью не утратят компетентность. Поэтому их лучше быстро заморозить в жидком азоте и хранить при -70°C . Все работы с компетентными клетками проводят на холоде, используя поддоны с мелкоколотым льдом или снегом.

Материалы и оборудование

Штамм *E.coli* XL1–Blue, диметилсульфоксид (ДМСО).

Растворы

- *Среда SOB*. 2% триптон; 0,5% дрожжевой экстракт; 10мМ NaCl; 2,5мМ KCl; 10мМ MgCl_2 ; 10мМ MgSO_4 .
- *Буфер ТВ*. 10мМ HEPES (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота, можно исп. PIPES или BES); 15мМ CaCl_2 ; 55мМ MnCl_2 ; 250мМ KCl.

Методика

1. Рассеять бактерии штрихом на чашку с селективной агаризованной средой SOB, выращивать при 37°C в течение ночи.
2. Несколько колоний *E.coli* (10–12) диаметром приблизительно 2–3 мм поместить в 40 мл среды SOB в колбе на 0,5–1 л. Растить при интенсивном встряхивании на качалке при скорости вращения 200–300 об/мин до оптической плотности $\text{OD}_{600} = 0,6$ при температуре 37°C ^a. Обычно на это требуется 2–2,5 ч. Все дальнейшие манипуляции проводить на льду.
3. В 50 мл центрифужную пробирку поместить 30 мл культуры клеток, оставить при 0°C на 10–15 мин.
4. Центрифугировать 10 мин, 3000 об/мин, $+4^\circ\text{C}$. Слить супернатант.
5. Центрифугировать 20 с, 3000 об/мин, $+4^\circ\text{C}$. Удалить жидкость пипеткой.
6. Суспензировать в 10 мл буфера ТВ, оставить при 0°C на 10–15 мин.
7. Повторить п. 4 и п. 5.
8. Ресуспензировать осадок клеток в 2 мл буфера ТВ.
9. Добавить криопротектор ДМСО до 3,5% (70 мкл), оставить при 0°C на 10–15 мин.
10. Повторить п. 4. Ресуспензировать клетки в остатках жидкости.
11. Разлить по 100 мкл в охлаждённые 1,7 мл пробирки. Использовать «кальциевые клетки» сразу или заморозить в жидком азоте.

Примечание

^a При выращивании бактерий при температуре 37°C получается компетентность среднего уровня. При росте культуры *E.coli* при 18°C компетентность клеток получается выше, но время роста до нужной плотности удлиняется до нескольких суток.

Работа 8.2. Трансформация *E.coli*

Для трансформации *E.coli* используют компетентные клетки и очищенную плазмидную ДНК или «лигазную смесь». ДНК добавляют к клеткам и выдерживают на льду некоторое время для сорбции ДНК на клеточной поверхности. Затем проводят кратковременный «тепловой шок» при 42°C, при котором ДНК проникает внутрь клеток *E.coli* из-за резкого повышения текучести мембран и локальных инверсий, добавляют питательный бульон и рассеивают бактерии на агаризованной питательной среде, содержащей антибиотик. В результате экспрессии плазмидных генов антибиотико-устойчивости трансформированные клетки приобретают способность расти на средах с антибиотиками. На плотной питательной среде вырастают за 1–2 суток хорошо видимые колонии ($\approx 10^4$ – 10^5 клеток), но только из тех клеток, которые получили плазмиду. Т.е. клоны-трансформанты.

Не все трансформанты являются рекомбинантами, т.е. могут быть трансформированы исходным («пустым») вектором, если не применялись специальные процедуры для предотвращения такой возможности. Биологи-молекулярщики, к примеру, используют для рестрикционного гидролиза ДНК два разных фермента или обрабатывают ДНК вектора щелочной фосфатазой, чтобы вектор не мог лигироваться «сам на себя». Можно отличить колонии клонов-рекомбинантов и уже после высева клеток на питательный агар процедурой так называемой «сине-белой селекции» (см. прил. 5, 6, 14).

Приведенная далее процедура трансформации является стандартной. До появления электропораторов широко применялась в практике молекулярно-био(техно)логических исследований и используется до настоящего времени.

Материалы и оборудование

Компетентные «кальциевые клетки» кишечной палочки *E.coli* XL1–Blue, раствор плазмидной ДНК pBR322 (0,5 мкг/мл), микротермостат.

Растворы

- Среда SOC. На 100 мл: в среду SOB (работа 8.1) внести 5 мл 20% глюкозы.
- 0,5М β-меркаптоэтанол.

Методика

1. Приготовить раствор плазмидной ДНК pBR322 с концентрацией 5 нг/мл. Для этого из концентрированного 100× стокового раствора (0,5 мкг/мл) взять 1 мкл и добавить к 100 мкл деионизованной воды.
2. Оттаять во льду 0,5М β-меркаптоэтанол (антиоксидант, восстановитель дисульфидных связей) и аликвоту «кальциевых клеток».
3. К аликвоте 100 мкл компетентных клеток добавить 4 мкл 0,5М β-меркаптоэтанол и 10–50 пг (2–10 мкл) приготовленного раствора ДНК pBR322.

4. Оставить пробирку при 0°C на 20–30 мин без встряхивания для осаждения ДНК на поверхности клеток.
5. Провести тепловой шок при 42°C в течение 30 с^а на водяной бане или в микротермостате. После этого сразу поместить пробирку в лёд на 1–2 мин.
6. Добавить 400 мкл среды SOC и встряхивать на шейкере при 37°C полчаса.
7. Высеять аликвоту 50 мкл из суспензии клеток на чашку с агаром 2YT, содержащим 100 мкг/мл ампициллина^б.
8. Оценить на следующий день эффективность трансформации. Если на чашке Петри выросло N колоний, то эффективность трансформации равна $N \times 10^6$ колоний на 1 мкг ДНК^в.

Примечания

^а Ряд протоколов рекомендуют более продолжительный тепловой шок (до 3 мин).

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

^в Если требуется получить как можно больше колоний на 2YT-агаре, например при создании библиотеки, то нужно высеять на чашку Петри 10–50 мкл суспензии для определения титра, а оставшиеся клетки хранить в течение ночи при 0°C. Титр при этом не изменяется. На следующий день рассчитать количество клеток на высеив и посеять бактерии шпателем на селективный агар. Максимальная эффективность трансформации может составлять 10^7 – 10^8 клеток-трансформантов на 1 мкг ДНК плазмиды.

Работа 8.3. Подготовка электрокомпетентных клеток *E.coli*

Электропорация – эффективный физический метод введения ДНК в бактериальные клетки, а также в культивируемые клетки растений (протопласты), грибов, животных и человека. Основатель метода – Эберхард Нейман (*Neuman, 1982*). Показано, что в оптимальных условиях количество трансформантов может достигать значения 80% от числа выживших клеток бактерий. Для обычной «химической» трансформации эта цифра не достижима, она может доходить до 10^9 – 10^{10} на 1 мкг ДНК. Появление метода электропорации клеток способствует интенсивному продвижению технологий биоинженерии, являющихся частью приоритетного направления развития науки и техники РФ «Технологии живых систем».

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

Процедура очень эффективная, однако для неё требуется очень чистый обессоленный препарат ДНК. При работе с неочищенными препаратами либо проскакивает искра, либо компетентность резко падает, становясь низкой.

Для подготовки «электрокомпетентных клеток» их несколько раз отмывают в растворе криопротектора (глицерин) на холоде и быстро замораживают в жидком азоте, либо используют сразу.

Материалы и оборудование

Штамм кишечной палочки *E. coli* XL1–Blue, глицерин.

Растворы

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

Методика

1. Снять петлёй с чашки с соответствующим селективным антибиотиком несколько (5–20) колоний бактерий, поместить в 500 мл предварительно прогретой до 37°C жидкой среды YENB, находящейся в 2 л колбе.
2. Растить культуру в течение приблизительно 8 ч на качалке при 200–300 об/мин при 37°C до достижения оптической плотности $OD_{600}=0,7$ (годится диапазон 0,5–1,0). Культуру охладить в течение 5 мин во льду при 0°C. Все дальнейшие манипуляции проводить на холоде, во льду или холодильнике при +4°C. Необходимо заранее охладить деионизованную воду и глицерин.
3. Центрифугировать при 4500 об/мин 10 мин при +4°C, затем слить культуральную жидкость, дополнительно центрифугировать 5 с при 3000 об/мин и отобрать остатки питательной среды микропипеткой.
4. Два раза промыть клетки в 100 мл холодного 10% глицерина. Сначала ресуспензировать клетки с помощью микропипетки и вортекса. Затем центрифугировать 7–10 мин при 4500 об/мин при +4°C. Слить жидкость. Дополнительно центрифугировать 5 с при 3000 об/мин и отобрать остатки.
5. Промыть клетки в 20 мл 10%-ного глицерина, аналогично п. 4.
6. Добавить к осадку 10% глицерин в объёме, равном объёму клеток (должно получиться прибл. 0,7–2,0 мл суспензии), ресуспензировать.
7. Разлить по аликвотам полученные компетентные клетки. Одна аликвота на электропорацию составляет 50 мкл, поэтому объём должен быть кратен 50. Использовать сразу или заморозить в жидком азоте. Замороженные клетки можно продолжительное время хранить при –70°C.

Работа 8.4. Электропорация *E. coli*

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

питательной среды. Затем клетки рассеивают шпателем на питательный агар с антибиотиком и инкубируют сутки до появления хорошо видимых колоний.

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

Напряжённость электрического поля, продолжительность его действия, концентрация ДНК и плотность суспензии реципиентных клеток для каждой клеточной культуры, отличной от *E.coli*, подбирают экспериментально, с тем, чтобы достичь высокого процента поглощения ДНК клетками и их выживания после «электропробоя» биомембран.

Поскольку электропоратор является высокоспециализированным прибором, то к нему прилагаются детальные инструкции по проведению трансформации клеток разного типа (производители *Bio-Rad*, *Eppendorf*).

Материалы и оборудование

Электропоратор, кюветы для электропоратора (с зазором 2 мм), «электрокомпетентные клетки» *E.coli* XL1–Blue, раствор ДНК фагмиды pBluescript II SK+ (0,5 мкг/мл) или лигазная смесь.

Методика

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

Примечания

^a От солей в препарате ДНК можно избавиться микродиализом. Или переосадить ДНК и хорошо промыть осадок. Самый простой способ защититься от попадания лигазы в клетки при трансформации лигазной смесью – инактивировать её нагревом.

^b Это время необходимо для возобновления биохимических процессов в клетке и начала транскрипции генов устойчивости к антибиотикам и сопряжённой трансляции.

Тема 9. ВЫДЕЛЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА

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

Некоторые векторные системы, использующие для транскрипции клонированного гена не аппарат клетки-хозяина, а весьма процессивные РНК-полимеразы бактериофагов, также индуцируются с помощью ИПТГ. Так, в штамме *E.coli* BL21(DE3) индуцируемый ген РНК-полимеразы фага T7 (рекомбинантный, с промотором *LacZ*-типа) находится в хромосоме клетки-хозяина, а целевой ген под промотором фага T7 находится на какой-либо плазмиде серии pET (*Novagene*TM, прил. 1, 2). В таких системах полностью отсутствует «фоновая» экспрессия, поскольку транскрипция и сопряжённая с ней трансляция клонированного гена возможны только после индуцированного синтеза фаговой РНК-полимеразы. Клонирование гена в плазмиды pET30a, pET30b и pET30c обеспечит гарантированное попадание вставки ДНК в нужную рамку чтения, поскольку эти плазмиды отличаются инсерцией 0, 1 или 2 нуклеотидов за промотором фага T7.

В работах 9.1–9.3 приведены протоколы методов для индуцирования синтеза рекомбинантного белка в клетках *E.coli* с промотора *LacZ*, выделения белка из периплазмы бактериальных клеток и его очистки диализом.

Работа 9.1. Индуцированная экспрессия клонированных генов

Для получения целевого белка клетки клонов-продуцентов размножают, помещая их в свежую питательную среду. Среда должна содержать селективный антибиотик, иначе бактерии могут потерять рекомбинантную плазмиду. Нарботка рекомбинантного белка начинается лишь после добавления индуктора. По мере роста бактериальной культуры возрастает суммарное количество целевого белка за счёт активной транскрипции-трансляции клонированного гена и увеличения числа клеток в популяции. Оно достигает насыщения в позднелогарифмической фазе роста культуры.

Приведена методика индукции синтеза миниантител определённой специфичности клетками клона-суперпродуцента. Миниантитела scFv – это рекомбинантные белки, состоящие из ковалентно сшитых переменных доменов легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов (scFv – single chain Fragments variable). Клон-суперпродуцент – это клон штамма *E.coli* JS5, содержащий рекомбинантную фагмиду рHEN1 с геном миниантитела, специфичного к белку вирулентности VirE2 почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens* (Великов с соавт., *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*, 2006, №1). Рекомбинантные ScFv нужной специфичности получают технологией фаг-дисплея – Antibody Phage Display.

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

Оборудование и материалы

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

Растворы

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

Методика

1. Посеять клетки штамма *E.coli* JS5 (рHEN1::scFv), содержащие фагмиду с клонированным геном миниантитела в 10 мл среды 2YT. Среда должна содержать 100 мкг/мл антибиотика ампициллина и 1 % глюкозы. Для этого в пробирку с культурой добавить 10 мкл стокового раствора ампициллина и 250 мкл 40% глюкозы. Наращивать в течение ночи с аэрацией при 37°C.
2. Ночную культуру развести в 100 раз той же средой (вылить 10 мл в колбу с 1 л среды) и растить при 25°C до оптической плотности 0,5 при 600 нм.
3. Клетки осадить в центрифуге при 4000 об/мин в течение 10 мин.
4. Ресуспензировать клетки в 50 мл 50мМ раствора NaCl для отмывки от глюкозы.
5. Снова осадить клетки при 4000 об/мин в течение 10 мин.
6. Добавить к отмываемым клеткам индуктор. Для этого ресуспензировать осадок клеток сначала в малом объёме, а затем в 1 л среды 2YT, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 1мМ ИПТГ. Для получения необходимых конечных концентраций добавить в 1-литровую колбу 1000 мкл стокового раствора антибиотика и 1000 мкл стокового раствора индуктора ИПТГ.

7. Клетки инкубировать в течение 3 ч при 25°C на шейкере. При пониженной по сравнению с 37°C температуре накопление рекомбинантного белка идёт лучше и не бывает самолизиса культуры при суперпродукции.
8. Остановить рост бактериальной культуры, поставив колбу в холодильник на +4°C, после чего выделить рекомбинантные миниантитела.

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

Для удобства последующего отделения целевого белка от других белков *E.coli* его можно направить в периплазму клетки сразу после завершения синтеза в цитоплазме на рибосомах. Периплазматическое пространство – это пространство между наружной цитоплазматической мембраной и оболочкой клетки (пептидогликановым слоем). Для этого при клонировании используют соответствующий вектор. Генно-инженерная конструкция должна за промотором *LacZ* («под промотором») содержать нуклеотидные последовательности, кодирующие определённый лидерный пептид. Например, лидер гена пектатлиазы *pelB* бактерии *Erwinia carotovora*.

Этот лидер есть в фагмиде рНЕН1 (Hoogenboom et al., 1991). При трансляции конструктора получается ковалентносшитый *fusion*-белок (фьюжен: лидерный пептид – целевой белок), который накапливается в периплазме клетки и, поэтому, отделить его от внутриклеточных белков будет несложно. Хроматографии для этого не потребуется. Лидерный пептид на свойства целевого белка существенного влияния не оказывает. Из периплазмы клеток накопленный протеин легко выделить. Он просто выходит в раствор после помещения клеток в высокосолевого буфер. Приведён боратный метод выделения периплазматических белков.

Оборудование и материалы

Штамм *E.coli* JS5, содержащий фагмиду рНЕН1 с клонированным геном миниантитела scFv, высокоскоростная центрифуга.

Растворы

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

Методика

1. Культуру клеток после завершения времени инкубации с индуктором охладить во льду в течение 20 мин. За это время прекращаются основные биохимические процессы, не будет продуктов незавершённого синтеза.
2. Охлаждённую во льду культуру клеток осадить центрифугированием в течение 10 мин при 10000 об/мин при +4°C.

3. Супернатант слить, а к осадку клеток добавить 10 мл охлаждённого 200мМ бората натрия с 160мМ NaCl и 1мМ ЭДТА. Тщательно пипетировать. Клетки как бы «сморщиваются» в высокосолевым буфере, scFv при этом «выдавливаются» из периплазмы в раствор.
4. Избавиться от клеток вместе со всеми цитоплазматическими белками центрифугированием в течение 10 мин при 4000 об/мин. В супернатанте останутся только белки периплазмы с преобладанием целевого белка.
5. Супернатант очистить от клеточного дебриса центрифугированием при 20000 об/мин в течение 30 мин. Добавить в препарат белка ингибитор сериновых протеаз PMSF или лейпептин, 1 мкл стока на 1 мл препарата.

Работа 9.3. Диализ препарата белка

Выделенный боратым методом периплазматический белок содержит значительные количества низкомолекулярных примесей, прежде всего солей. Избавиться от них можно диализом препарата. Раствор белка помещают в диализный мешок, стенки которого представляют собой полупроницаемую целлюлозную мембрану, не пропускающую молекулы размером более 15–20 kDa. Мешок погружают в буферный раствор. Объём наружного буфера должен многократно превышать объём мешка. Низкомолекулярные вещества в результате осмоса могут проходить через мембрану в буфер. Обессоленный раствор белка, молекулы которого имеют размер больше чем 20 kDa, остается в диализном мешке.

Материалы и оборудование

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

Растворы

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

Методика

1. Перенести с помощью микропипетки раствор белка в диализный мешок.
2. Завязать мешок и с помощью отрезка резиновой трубки или резиновой полоски закрепить на середине стеклянной палочки или пипетки.
3. Опустить мешок в доверху наполненный 1000 мл стакан с фосфатным буфером PBS, положив стеклянную палочку на края стакана. Поставить стакан на размещённую в холодильнике магнитную мешалку и включить.
4. На следующее утро заменить буфер свежим и диализовать еще 4–6 ч.
5. Определить концентрацию белка. Полученные миниантитела scFv пригодны для иммунодота, блоттинга и иммунодиффузии.

Тема 10. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКА

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

Метод Бредфорда (*Bradford, 1976*) и метод Лоури (*Lowry, 1951*) – два наиболее известных аналитических метода. Статья Лоури с соавт. (*Lowry et al., J.Biol.Chem., 1951, V.193, P.265–275*) является самой цитируемой научной статьёй в мире. По надёжности оба этих колориметрических метода одинаковы, использование обоих может понадобиться для контроля.

Работа 10.1. Метод Бредфорда

Краситель *Coomassie Brilliant Blue R-250* при растворении в фосфорной кислоте имеет красно-коричневую окраску (анионная форма), но при связывании с аргинином и гидрофобными аминокислотными остатками белка развивается голубая окраска ($\lambda_{\max} = 595$ нм, катионная форма). Таким образом, увеличение абсорбции раствора при длине волны равной 595 нм пропорционально количеству белка в растворе.

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

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

Материалы и оборудование

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

Растворы

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

Методика

1. Довести объём образца до 0,5 мл водой.
2. Добавить 0,5 мл реагента Бредфорда.
3. Перемешать и ждать развития окраски (от 5 с, но не более 30 мин).
4. Измерить A_{595} в 1 мл кювете.
5. Рассчитать концентрацию белка по калибровочной кривой, построенной по БСА.

Работа 10.2. Метод Лоури

Метод Лоури основан на образовании окрашенных продуктов реакции ароматических аминокислот с реактивом Фолина в сочетании с биуретовой реакцией на пептидные связи.

В щелочной среде при взаимодействии сульфата меди II с пептидными группами белка $-\text{CO}-\text{NH}-$ образуются комплексные соединения фиолетовой окраски, ионы Cu^{2+} при этом переходят в Cu^+ . Одновалентные ионы меди реагируют с реактивом Фолина, образуя нестабильный продукт, переходящий в молибденовую синь с максимумом поглощения при 750 нм. Увеличение абсорбции при 750 нм пропорционально концентрации белка.

Метод очень чувствителен к наличию в растворе посторонних восстановителей, что затрудняет его использование при определении белка в неочищенных препаратах. Чувствительность к белку – 10–100 мкг/мл.

Материалы и оборудование

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

Растворы

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

Методика

1. Довести объём образца до 0,8 мл водой.
2. Добавить 0,2 мл 50% ТХУ (конечная концентрация 10%), перемешать.
3. Подождать 10 мин, центрифугировать 10 мин при 14000 об/мин.
4. Супернатант слить и добавить к осадку 150 мкл 1М NaOH, 50 мкл 10% SDS, 0,75 мл раствора D (смесь А и В, 50:1), 50 мкл реактива Фолина. Перемешать и ждать развития окраски 30 мин.
5. Измерить A_{750} в 1 мл кювете.
6. Рассчитать концентрацию белка по калибровочной кривой.

Работа 10.3. Концентрирование белков путем осаждения ТХУ

Метод осаждения белков трихлоруксусной кислотой полезен, когда концентрация белка в коллоидном растворе слишком мала для анализа или объём раствора слишком велик, чтобы нанести нужное количество белка в лунку геля при электрофорезе. Осадок растворяют в меньшем объёме буфера, концентрируя, таким образом, раствор белка.

Материалы и оборудование

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

Растворы

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

Методика

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

Тема 11. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ

Гель-электрофорез – один из стандартных молекулярно-биологических методов анализа. Молекулы белка в растворе обладают зарядом при любом значении рН, отличном от их изоэлектрической точки. Это обуславливает их подвижность в электрическом поле. Разделяют белки в полиакриламидных гелях (ПААГ), имеющих по сравнению с агарозными гелями меньший размер пор. Гель образуется в результате полимеризации мономерных молекул акриламида в присутствии N,N'-метилена-бис-акриламида, формирующего поперечные сшивки. Варьированием концентрации мономеров можно добиваться получения пор различного размера. ПАА-гели плотнее агарозных, устойчивы к кипячению в воде, пластичные и менее ломкие.

ПААГ состоит из зон концентрирующего и разрешающего геля. Концентрация акриламида в разрешающем геле зависит от размеров белка – для крупных белков используют гели с низкой концентрацией, начиная от 5% и выше, менее крупные белки разделяют в мелкопористых гелях, содержащих до 20–25% акриламида. Заливка геля и электрофоретическое разделение белков в пластине геля происходит в вертикальном положении.

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

Работа 11.1. Приготовление растворов и заливка ПААГ

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

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

Материалы и оборудование

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

Растворы

<u>1. Электродный буфер (200 мл)</u>	
Tris–ОН (трис(гидроксиметил)аминометан)	3,03 г
Глицин	14,44 г
SDS	1,0 г
Н ₂ О (бидистиллированная, деионизированная, здесь и далее)	до 200 мл
<i>pH 8,4, р-р глицина титруют до нужного знач. pH сухим Tris; SDS добавлять последним, после доведения pH</i>	
<u>2. Раствор АА /бисАА</u>	
АА (акриламид)	30,0 г
бисАА (N,N'-метилден-бис-акриламид)	0,8 г
Н ₂ О	до 100 мл
<u>3 Буфер 1 (для концентрирующего геля)</u>	
Tris–HCl (трис-гидрохлорид)	6,06 г
SDS	0,4 г
Н ₂ О	до 100 мл
<i>pH 6,8, титровать 4–6 н HCl, перед добавлением SDS</i>	
<u>4 Буфер 2 (нижний буфер для разделяющего геля)</u>	
Tris–ОН (трис(гидроксиметил)аминометан)	18,17 г
SDS	0,4 г
Н ₂ О	до 100 мл
<i>pH 8,8, титровать до нужного значения HCl, перед SDS</i>	
<u>5 БФС (бромфеноловый синий)</u>	
БФС	2 мг
Н ₂ О	до 4 мл
<u>6. Краситель (0,125% кумасси R–250)</u>	
Coomassie Brilliant Blue R–250 (у G–250 разрешение меньше)	1,25 мг
Этанол	5 мл
Уксусная к-та (10%)	1 мл
Н ₂ О	до 10 мл
<u>7. Отмывающий раствор I (50% этанол, 10% уксус. к-та)</u>	
Уксусная к-та (10%)	10 мл
Этанол (50%)	50 мл
Н ₂ О	до 100 мл
<i>Перед использованием развести в 5 раз</i>	
<u>8 Отмывающий раствор II (5% этанол, 10% уксусная к-та)</u>	

Уксусная к-та (10%)	35 мл
Этанол (50%)	25 мл
H ₂ O	до 100 мл
<i>Перед использованием развести в 5 раз</i>	
<i>2× буфер для образцов</i>	
Глицерин 15%	7,5 мл
β-меркаптоэтанол	2,5 мл
SDS	1,15 г
Tris-HCl (трис-гидрохлорид)	0,38 г
H ₂ O, pH 6,8	до 25 мл
<ul style="list-style-type: none"> - <u>10% ТХУ</u>, - <u>5% ПСА (персульфат аммония)</u>, - <u>ТЕМЕД (N,N,N,N-тетраметилэтилендиамин)</u>. 	

Методика

Подготовка стёкол для заливки полиакриламидного геля

1. Взять стекло с вырезом и поместить по его боковым краям два спейсера.
2. Сверху положить на спейсеры стекло без выреза. Осторожно поставить собранную конструкцию в камеру вертикально так, чтобы можно было залить гель в полость между стеклами. Стекло без выреза должно быть обращено наружу, к исследователю. Закрепить конструкцию зажимами.
3. Расплавить 3% агарозу, охладить до 50–60°C и залить тонким слоем (5 мм) дно электрофорезной ячейки во избежание протекания гелевого раствора.

Заливка геля

1. Для приготовления разделяющего геля смешать компоненты ^a (за исключением ТЕМЕД и ПСА) в соответствии с данными, приведёнными в табл. 3 (для разных объёмов!). Полученную смесь тщательно перемешать ^б.

Таблица 3. Подготовка разделяющего геля

Компонент	3%	6%	10%	20%
Р-р АА/бисАА	1 мл	3 мл	4,95 мл	13,34 мл
Буфер 2	2,5 мл	3,75 мл	3,75 мл	5 мл
H ₂ O	6,5 мл	8,25 мл	6,3 мл	1,66 мл
ТЕМЕД	10 мкл	15 мкл	15 мкл	40 мкл
ПСА 5%	30 мкл	45 мкл	45 мкл	120 мкл
<i>V общий</i>	<i>10 мл</i>	<i>15 мл</i>	<i>15 мл</i>	<i>20 мл</i>

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

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

Таблица 4. Подготовка концентрирующего геля

Компонент	6%	10%
Р-р АА/бисАА	2 мл	3,3 мл
Буфер 1	2,5 мл	2,5 мл
H ₂ O	5,5 мл	4,2
ТЕМЕД	20 мкл	10 мкл
ПСА 5%	60 мкл	30 мкл
<i>V общий</i>	<i>10 мл</i>	<i>10 мл</i>

8. Оставить гель застывать в течение 20 мин ^В. Удобно отлить немного из остатков гелевого раствора в 1,7 мл пробирку и использовать этот раствор как индикатор полимеризации.

Подготовка камеры к электрофорезу

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

Примечания

^а Готовый стоковый раствор для геля нужной концентрации без ТЕМЕД и ПСА можно хранить в холодильнике около года. Акриламид токсичен, работать в перчатках!

^б В 15% ПАА-гелях эффективно разделяются белки с диапазоном молекулярных масс 10–45 kDa, в 10% гелях – 14–205 kDa, в 7,5% – 24–205 kDa, в 5% – 36–205 kDa.

^в Готовые гели можно хранить в холодильнике в обёрнутом виде, не вынимая гребёнки. Однако разделяющий и концентрирующий гели имеют разные буферы, поэтому лучше залитый гель использовать сразу.

Работа 11.2. Проведение электрофореза белков

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

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

Материалы и оборудование

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

Растворы

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

Методика

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

Примечание

^а Для придания стёклам гидрофобных свойств для лучшего отделения геля их зачастую предварительно силиконируют с использованием bind-silane и repel-silane.

Работа 11.3. Окрашивание белков *Coomassie R-250*

Обработка полиакриламидных гелей после электрофореза включает окрашивание и отмывку от несвязавшегося красителя. Гель заливают трихлоруксусной кислотой, тщательно отмывают водой и помещают в раствор красителя кумасси бриллиантового голубого *Coomassie R-250*.

Молекулы красителя связываются с аргинином и гидрофобными аминокислотными остатками. Связанная форма имеет синюю окраску, поэтому на геле видны полосы белка с разной интенсивностью окраски, коррелирующей с количеством белка.

После окрашивания белковых полос гель необходимо отмыть от несвязавшегося красителя *Coomassie R-250*. Отмывают гели в растворах этанола (или метанола – яд!) и уксусной кислоты.

Материалы и оборудование

Полиакриламидный гель с результатами электрофореза белков.

Растворы

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

Методика

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

Примечания

^a Чувствительность на порядок выше даёт окрашивание белков ионами серебра. После обработки геля уксусной кислотой и этанолом в растворе I, тщательной промывки этанолом и водой гель переносят на 30 минут в 5 объёмов 0,1% раствора AgNO₃. Затем после промывки водой помещают в такой же объём 0,28М карбоната натрия с добавлением до 0,02% формальдегида. Окрашенные полосы белка появляются через несколько минут. Следует дождаться наилучшего контраста и остановить реакцию промывкой в 10% уксусной кислоте.

^b Как альтернатива: гель заливают холодной водой (200–300 мл), и кипятят ~5'.

ТЕМА 12. РАСЧЁТЫ В РАБОТЕ С БЕЛКАМИ

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

В приведённых ниже работах предлагается ознакомиться с ресурсами в сети интернет, где выложены программы для различных расчётов, связанных с белками и нуклеиновыми кислотами. Содержательная часть работ может меняться или вообще быть произвольной, поскольку их главная цель – практический опыт в использовании специальных интернет-порталов.

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

Для более детального молекулярного анализа конкретного белка и для множественного выравнивания белков следует использовать информацию из баз данных аминокислотных последовательностей, таких как *Swiss-Prot*, *NCBI Protein Database* и других ресурсов в области биоинформатики, геномики и протеомики. Нужно заметить, что основная часть белков, представленных в биомедицинских базах данных, получена путём «трансляции *in silico*». Т.е. белки аннотированы по нуклеотидным сиквенсам.

Работа 12.1. Трансляция нуклеотидной последовательности

Выложенная на сайте MOLBIOL.RU программа осуществляет трансляцию нуклеотидной последовательности в выбранных рамках считывания. Можно выбирать несколько рамок одновременно, также можно использовать одно- и трёхбуквенный код для обозначения аминокислот. Различные специальные манипуляции с нуклеотидной последовательностью, такие как вывод комплементарной цепи или поиск редких кодонов, можно выполнить с помощью особой формы.

Ход работы

1. Откройте главную страницу сайта MOLBIOL.RU (<http://www.molbiol.ru>). Ознакомьтесь с разделами данной страницы.

2. На главной странице найдите раздел «Расчёты».
3. Выберите вкладку «Трансляция нуклеотидной последовательности».
4. «Транслируйте» в качестве примера ген НАДН-дегидрогеназы гадюки Никольского. На рис. 2 представлен неполный сиквенс этого гена, полученный в Лаборатории молекулярной биологии Саратовского государственного университета им. Н.Г.Чернышевского (*Великов с соавт., Вестник Саратовского госагроуниверситета, 2006, №3; Ефимов с соавт., Генетика, 2008, №2*). Сравнение полученного результата с аминокислотной последовательностью НАДН-дегидрогеназы гадюки обыкновенной выявляет различия по 6 аминокислотам (см. прил. 16).

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

```

1 tggctcatag catggacatg tctggaatc aatactttat ctataatccc agttatctct
61 aaaactaatc acccccgggc gacagaagca acaacgaaat acttcctcac acaaacccta
121 gcctccatca ccatacctatc tataacaaca ctaaatgcac ttaatacctc caactgagaa
181 attagcctaa caacagaatc aacaacaata aaaattatta ccctagcact aataataaaa
241 atagctgcag caccattcca cttttgatta ccagaggtag cacaaggcgc cacaacacta
301 actgccctaa ccatacctac ctgacaaaaa attgcccac tcgccatcct attagctgcc
361 cataatagca caaaccttac aatcctgagc tcgtcggcta tcctgtctgt cttagtcggt
421 ggccttgag gcctcaatca aaccsaacta cgaaaactaa tagctttttc atcaatcgct
481 cacactggct gaatccttagc tactattact ctagcccca atatttcaac ccttgccttc
541 ataatctata caataactac aatacccatc tttcttattc tcaacatttc atcgtcagct
601 acaattaaag acataggaac tttatgaacc acttctccct actttataat aacctgctt
661 ctaatcatct tatccctcac agggctgccc ccacttacag ggtttatacc aaaatgactt
721 atcctaaata aaatagttac cttcaacata accctagaag ccacccta

```

5. Транслируйте ещё несколько предложенных генов. Нуклеотидные последовательности всех известных на данный момент генов доступны в базе данных *GenBank*, размещённой на сайте Национального центра биотехнологической информации США (National Center for Biotechnology Information, US National Library of Medicine – <http://www.pubmed.com> или <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).
6. Вводя последовательность какого-либо гена, обращайтесь внимание на то, что игнорируются любые знаки, кроме принятых для обозначения нуклеотидов – agctuswrymkhbdvn. Запомните обозначения нуклеотидов, отличных от agct (прил. 8). Строчные буквы лучше различимы при письме.

Работа 12.2. Предсказание нуклеотидной последовательности по аминокислотной

Программа поможет предсказать нуклеотидную последовательность по аминокислотной. При этом учитывается частота встречаемости кодонов в исследуемом организме. Можно использовать одно- или трёхбуквенный код для аминокислот, U или T для нуклеиновых кислот.

Ход работы

1. Откройте главную страницу сайта MOLBIOL.RU (<http://www.molbiol.ru>).
2. На главной странице найдите раздел «Расчёты».
3. Выберите вкладку «Предсказание нуклеотидной последовательности по аминокислотной» и загрузите форму.
4. Предскажите нуклеотидную последовательность для белка бычьего сывороточного альбумина БСА. Его аминокислотная последовательность представлена на рис. 3. В прил. 9, 10 приведены однобуквенные обозначения аминокислот и генетический код. На сайте MOLBIOL.RU эти справочные сведения, а также другая полезная информация размещены в разделе «Справочник».

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

```
«MKWVTFISLLLLFSSAYSARGVFRDRTHKSEIAHRFKDLGEEHFKGLVLIAFSQYLQQCPFD
EHVKLVNELTEFAKTCVADESHAGCEKSLHTLFGDELCKVASLRETYGDMADCCKEQEPERN
ECFLSHKDDSPDLPKLPDPNTLCDEFKADEKKFWGKYLIEIARRHPYFYAPELLYYANKYN
GVFQECQAEDKGACLLPKIETMREKVLTSARQRLRCASIQKFGERALKAWSVARLSQKFP
KAEFVEVTKLVTDLTKVHKECCHGDLLECADDRADLAKYICDNQDTISSKLKECCDKPLLEK
SHCIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDKDVCKNYQEAKDAFLGSFLYEYSRRHPEYAVSVLLR
LAKEYEATLEECCAADDPHACYSTVFDKLLHLVDEPQNLIKQNCQDFEKLGEYGFQNALIVR
YTRKVPQVSTPTLVEVSRSLGKVGTRCCTKPESEMPCTEDYLSLILNRLCVLHEKTPVSEK
VTKCCTESLVNRRPCFSALTPDETYVPKAFDEKLFTHADICTLPDTEKQIKKQTALVELLK
HKPKATEEQKTKVMENFVAFVDKCCAADDKEACFAVEGPKLVVSTQTALA»
```

Работа 12.3. Анализ аминокислотной последовательности белка

Специальная программа, доступная на сайте MOLBIOL.RU, поможет проанализировать последовательность белка: рассчитать длину, брутто-формулу, молекулярную массу, изоэлектрическую точку и другие параметры. Для расчёта молекулярной массы меченого белка необходимо отметить нужные изотопы. На странице «Help» можно узнать о погрешности и алгоритме расчёта. В прил. 17 приведены некоторые наиболее общие справочные сведения о белках.

Ход работы

1. Откройте главную страницу сайта MOLBIOL.RU (<http://www.molbiol.ru>).
2. На главной странице найдите раздел «Расчёты».
3. Выберите вкладку «Анализ последовательности белка».
4. Введите в форму последовательность белка НАДН-дегидрогеназы гадюки обыкновенной (см. работу 6.1), выберите необходимые пункты и нажмите «Расчёт». Брутто-формула и длина белка рассчитываются независимо от выбранных пунктов.
5. Проанализируйте ещё несколько предложенных белков.

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки. М.: Мир, 1994. Т. 1–3.
- Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. М.: Мир, 2002.
- Спирин А.С. Молекулярная биология. Рибосомы и биосинтез белка. М.: Академия, 2011.
- Степанов В.М. Молекулярная биология. Структура и функции белков. М.: Изд-во МГУ, 2005.
- Коничев А.С., Севастьянова Г.А. Молекулярная биология. М.: Академия, 2008.
- Эллиот В., Эллиот Д. Биохимия и молекулярная биология. М.:Академкнига, 2006.
- Белясова Н. Биохимия и молекулярная биология. М.:Книжный дом, 2004.
- Сингер М., Берг П. Гены и геномы. М.: Мир, 1998. Т. 1–2.
- Маниатис Т., Фритч И., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.:Мир, 1984.
- Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия: Учеб.-справ. пособие. Новосибирск: Наука, 2004.
- Генная инженерия растений: Лаб. рук-во / Пер. с англ.; Под ред. Дж. Дрейпера и др. М.: Мир, 1991.
- Практическая молекулярная биология (<http://www.molbiol.edu.ru>).
- MOLBIOL.RU – Классическая и молекулярная биология (<http://www.molbiol.ru>).
- National Center for Biotechnology Information / US National Library of Medicine (<http://www.pubmed.com>).

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Характеристика плазмид и бактериофагов, приведенных в руководстве

Наименование	Маркер	Размер	Число копий на клетку <i>E.coli</i>	Характеристика
pBR322	Ap ^r Tc ^r	4,4 kb	≈ 20	Рекомбинантная плаزمида. Один из первых векторов молекулярного клонирования
pBluescript II	Ap ^r	2,96 kb	до 300	Вектор для клонирования и секвенирования. Фагмида. Имеет <i>ori</i> фага M13 и ген <i>lacZ</i>
M13	–	6,4 kb	≈ 100	Нитевидный фаг дикого типа с одноцепочечной ДНК. Умеренный. Заражает только F ⁺ клетки <i>E.coli</i>
M13 K07	Km ^r	6,5 kb	≈ 100	Рекомбинантный фаг-помощник. Имеет ген канамицин-устойчивости. Дефектен по упаковке в вирионы
M13 mp18	–	7,25 kb	≈ 100	Фаговый вектор для клонирования и секвенирования. Имеет MCS.
λ (Lambda)	–	48,5 kb	≈ 100	Лизирующий фаг с двухцепочечной ДНК, упакованной в белковый капсид икосаэдрической формы. Дикий тип. Способен переходить в лизогенное состояние
pSUP106	Cm ^r Tc ^r	9,6 kb	до 40	Вектор широкого круга хозяев. Плазмида. Поддерживается в клетках многих грам-отрицательных бактерий
pSUP106:: <i>sacB</i>	Cm ^r Km ^r	14,4 kb	до 40	Содержит встроенную по <i>VamH1</i> -сайту 3,8 kb кассету (конструкт) с геном левансахаразы <i>sacB</i> из бактерии <i>Bacillus subtilis</i>
pHEN1	Ap ^r	4,5 kb	≈ 100	Вектор для фагового дисплея антител. Фагмида. Способен упаковываться в вирионы в присутствии в клетках фага-помощника M13 K07
pHEN1:: <i>scFv</i>	Ap ^r	5,4 kb	≈ 100	Содержит клонированный ген <i>scFv</i> , кодирующий синтез одноцепочечных рекомбинантных миниантител определенной специфичности
pET30	Km ^r	5,4 kb	≈ 100	Плазмид-вектор для экспрессии белков. Имеет промотор РНК-полимеразы фага T7

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

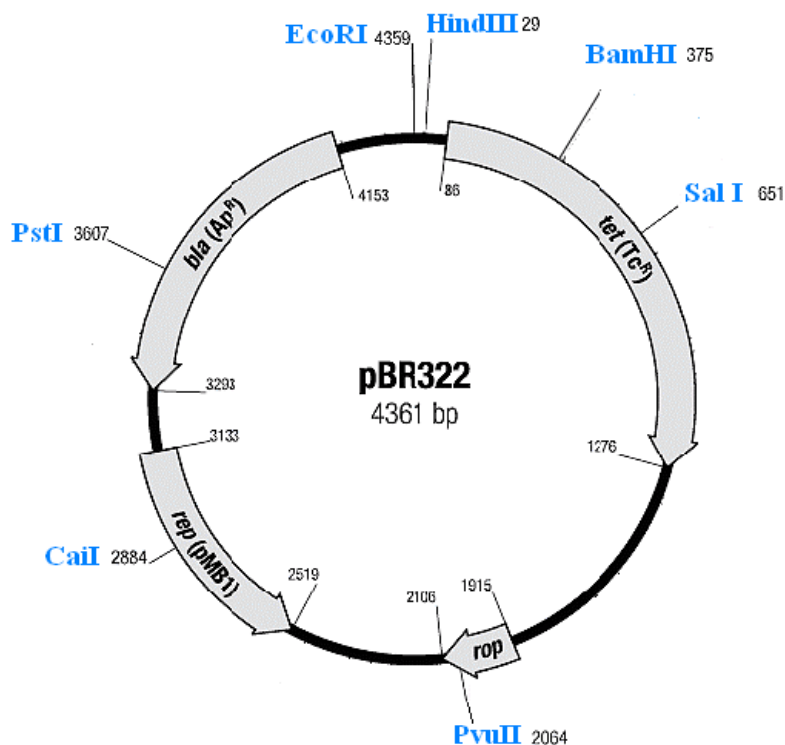
Приложение 2. Характеристика штаммов бактерий, приведенных в руководстве

Штамм	Генотип	Характеристика
<i>Escherichia coli</i> XL1–Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^qZΔM15 Tn10(Tet^R)</i>]	Широко используемый штамм-хозяин для различных векторов
<i>E. coli</i> TG1	<i>supE thi-1 Δ(lac-roAB) Δ(mcrB-hsdSM)5(r_K- m_K-)</i> [F' <i>traD36 proAB lacI^qZΔM15</i>]	Штамм-хозяин для нитевидных фагов, удобен для наработки фаговых (и фагмидных) частиц
<i>E. coli</i> JS5	<i>ara D139 Δ(ara leu) 7967 Δ(lac) x74 galU galK hsdR12 (rk⁻ mk⁻) mcrA mcr BC rpsL (Str^R) thi rec A1</i> [F' ::Tn10 (Tet ^R) <i>proAB lac I^q LacZ ΔM15</i>]	Штамм-хозяин для нитевидных фагов и фагмид, удобен для наработки «растворимых» одноцепочечных рекомбинантных миниантител scFv
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>dcm ompT hsdS(r_B- m_B-)</i> <i>gal λ</i> (DE3)	Штамм-хозяин для экспрессии рекомбинантных белков с помощью T7 РНК-полимеразы (на векторе необходим T7 промотор)
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS(r_B- m_B-)</i> <i>gal dcm λ</i> (DE3) [pLysS Cm ^R]	Содержит плазмиду pLysS с геном синтеза ингибитора T7 РНК-полимеразы, обеспечивающим отсутствие «фоновой» экспрессии, если нет индукции
<i>Erwinia carotovora</i> B15	Штамм дикого типа, прототроф, почвенный изолят	Фитопатогенный микроорганизм (мягкая гниль картофеля)
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp245	Штамм дикого типа, прототроф, почвенный изолят	Модельный штамм для изучения ассоциативной азотфиксации
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	Штамм дикого типа, прототроф, почвенный изолят	Модельный штамм для изучения механизмов трансгеноза растений

Приложение 3. Сайты узнавания некоторых рестриктаз

Фермент	Сайт узнавания и точка разрезания (указана стрелкой)	Количество сайтов в ДНК		
		pBR322	M13 mp18	Lambda
<i>Bam</i> HI	G [↓] GATCC	1	1	5
<i>Bgl</i> II	A [↓] GATCT	–	1	6
<i>Sau</i> IIIА	[↓] GATC	22	7	16
<i>Eco</i> RI	G [↓] AATTC	1	1	5
<i>Eco</i> RII	[↓] CC(A/T)GG	6	7	71
<i>Eco</i> RV	GAT [↓] ATC	1	–	21
<i>Hind</i> III	A [↓] AGCTT	1	1	7
<i>Kpn</i> I	G [↓] GTACC	–	1	2
<i>Not</i> I	GC [↓] GGCCGC	–	–	–
<i>Pst</i> I	CTGCA [↓] G	1	1	28
<i>Sma</i> I	CCC [↓] GGG	–	1	3
<i>Xho</i> I	C [↓] TCGAG	–	–	1

Приложение 4. Рестрикционная карта плазмиды pBR322



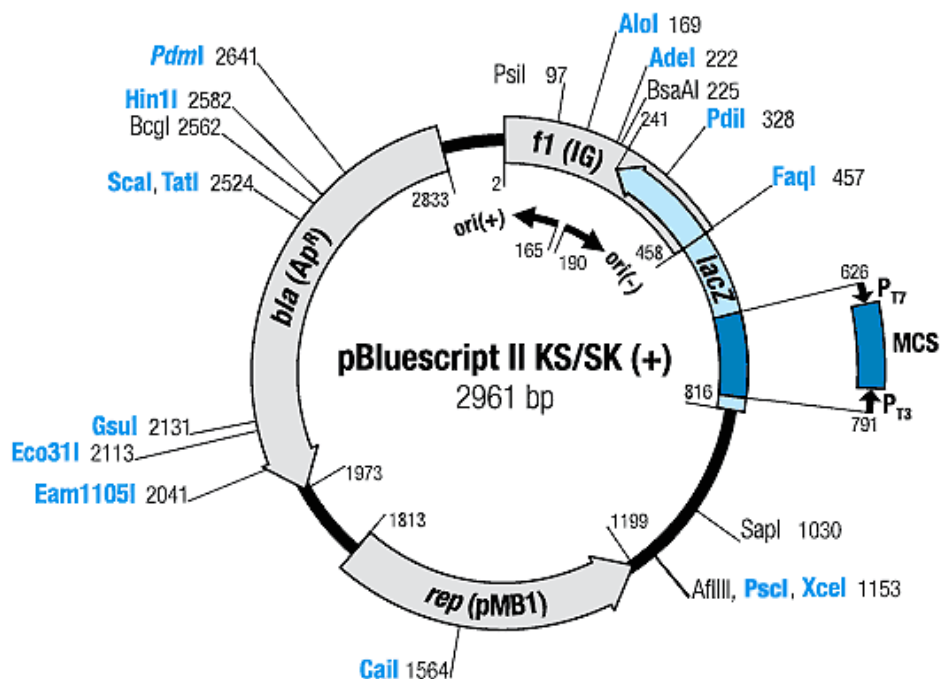
Обозначения:

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

Цифры возле обозначения сайтов узнавания рестриктаз соответствуют номеру первого нуклеотида в сайте. Отсчёт ведётся от первого нуклеотида Т в сайте узнавания рестриктазы *EcoRI*. Показаны только уникальные сайты, причём для небольшого числа из множества рестриктаз, способных гидролизовать ДНК плазмиды pBR322 (≈ 50).

Ген устойчивости к ампициллину (полусинтетический антибиотик из группы пенициллинов, лактамное кольцо которого способна разрушать β -лактамаза) инактивируется при клонировании ДНК по сайту рестриктазы *PstI*. Ген устойчивости к антибиотику тетрациклину, кодирующий защитный белок – по сайту рестриктазы *BamHI*. Инсерционная инактивация этих генов при вставке «чужеродной ДНК» позволяет выявлять рекомбинантные плазмиды, поскольку у трансформированной такой плазмидой клетки исчезает устойчивость к тому или другому антибиотику, в то время как ко второму антибиотику сохраняется.

Приложение 5. Рестрикционная карта фагмиды pBluescript® II (Stratagene)



Обозначения:

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

Порядок расположения сайтов рестрикции в полилинкере MCS, начиная от промотора P_{T7} (ориентация полилинкера):

pBluescript II SK(+)

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

pBluescript II KS(+)

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

Универсальные праймеры для секвенирования:

M13/pUC sequencing primer (– 20)

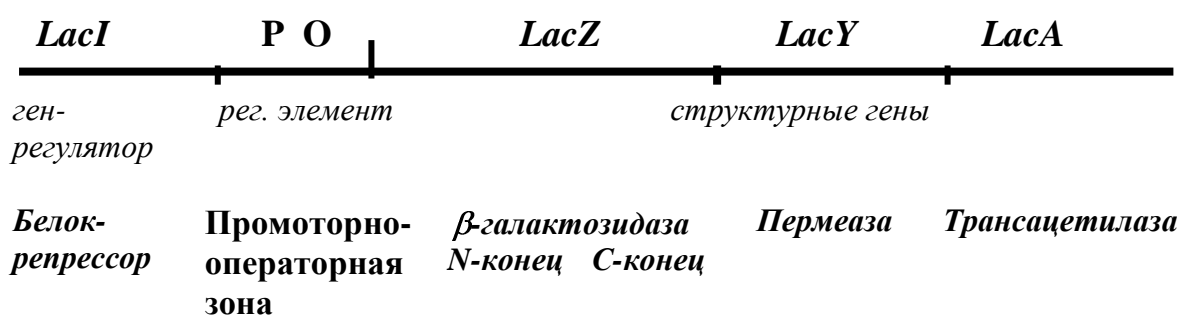
5'–GTAAAACGACGGCCAGT–3' (перед промотором P_{T7});

M13/pUC reverse sequencing primer (– 26)

5'–CAGGAAACAGCTATGAC–3' (перед промотором P_{T3}).

Примечание. Как +-цепь, так, в принципе, и -цепь ДНК фагмиды pBluescript® II может быть «упакована» в белковый капсид с получением вириона (фаговой частицы) после инфицирования клетки *E.coli* с этой фагмидой особым фагом-помощником. Одноцепочечная ДНК из вирионов удобна для секвенирования. Можно также секвенировать двухцепочечную ДНК фагмиды со вставкой «чужеродной ДНК» (или трансгена) по обеим цепям, для точности. При этом используют по отдельности тот или другой универсальный праймер.

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



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

Сине-белая селекция при клонировании. бета-галактозидаза способна расщеплять субстрат X-gal (5-бром-4-хлор-3-индолил-бета-D-галактозид) на галактозу и индольное соединение голубой окраски. Колонии бактерий на питательном агаре с X-gal и ИПТГ (по 40 мкг/мл) имеют голубую окраску. При клонировании под промотор гена *lacZ* происходит инактивация гена, что приводит к появлению обычных («белых») колоний. При трансформации *E.coli* продуктами лигазной реакции получение клеткой плазмиды со вставкой «чужеродной ДНК» приведёт к появлению обычной, а не голубой колонии.

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

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

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

Приложение 8. Стандартные обозначения полиморфных позиций нуклеотидов

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

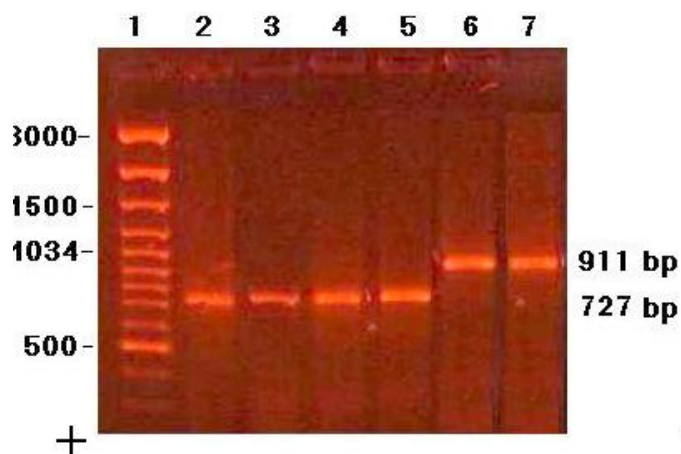
Приложение 9. Однобуквенные обозначения аминокислот

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

Приложение 10. Генетический код

Первое основание кодона	Второе основание кодона				Третье основание кодона
	U	C	A	G	
U	F (Phe)	S (Ser)	Y (Tyr)	C (Cys)	U
	F (Phe)	S (Ser)	Y (Tyr)	C (Cys)	C
	L (Leu)	S (Ser)	STOP	STOP	A
	L (Leu)	S (Ser)	STOP	W (Trp)	G
C	L (Leu)	P (Pro)	H (His)	R (Arg)	U
	L (Leu)	P (Pro)	H (His)	R (Arg)	C
	L (Leu)	P (Pro)	Q (Gln)	R (Arg)	A
	L (Leu)	P (Pro)	Q (Gln)	R (Arg)	G
A	I (Ile)	T (Thr)	N (Asn)	S (Ser)	U
	I (Ile)	T (Thr)	N (Asn)	S (Ser)	C
	I (Ile)	T (Thr)	K (Lys)	R (Arg)	A
	<u>M (Met)</u>	T (Thr)	K (Lys)	R (Arg)	G
G	V (Val)	A (Ala)	D (Asp)	G (Gly)	U
	V (Val)	A (Ala)	D (Asp)	G (Gly)	C
	V (Val)	A (Ala)	E (Glu)	G (Gly)	A
	V (Val)	A (Ala)	E (Glu)	G (Gly)	G

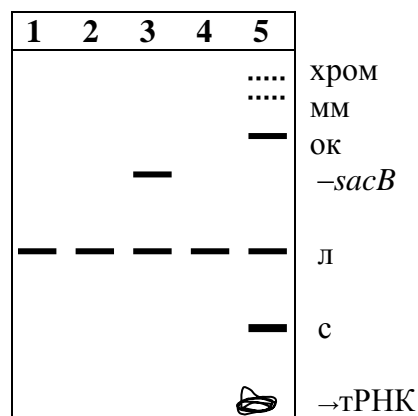
Приложение 11. Электрофореграмма продуктов ПЦР-амплификации гена НАДН-дегидрогеназы гадюки Никольского и гена 12S рибосомной рРНК



Обозначения дорожек:

1. – маркер молекулярного веса *100bp DNA Ladder Plus (Fermentas)*. Размеры фрагментов ДНК, начиная сверху: 3000, 2000, 1500, 1200, 1034, 900, 800, 700, 600, 500 п.н.;
- 2-5. – ПЦР-продукт гена 12S рРНК размером 727 п.н.;
- 6-7. – ПЦР-продукт гена НАДН-дегидрогеназы размером 911 п.н.

Приложение 12. Движение различных форм плазмидной ДНК при гель-электрофорезе



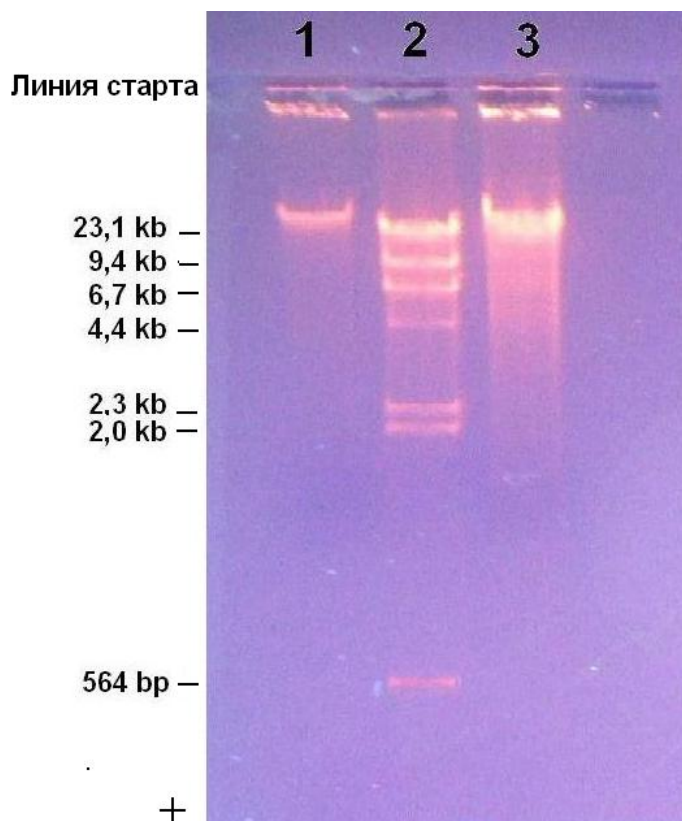
Обозначения дорожек:

1. – плазмидная ДНК pBluescript II, рестрицированная ферментом *Eco31I*;
2. – рестрицированная *BamHI*;
3. – с кассетой *nptI-sacB-sacR*, рестрицированная *BamHI*;
4. – рестрицированная *PstI*;
5. – нативный препарат плазмидной ДНК pBluescript II.

Формы плазмиды:

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

Приложение 13. Электрофореграмма продуктов рестрикции ДНК фага лямбда и геномной ДНК *E.coli*



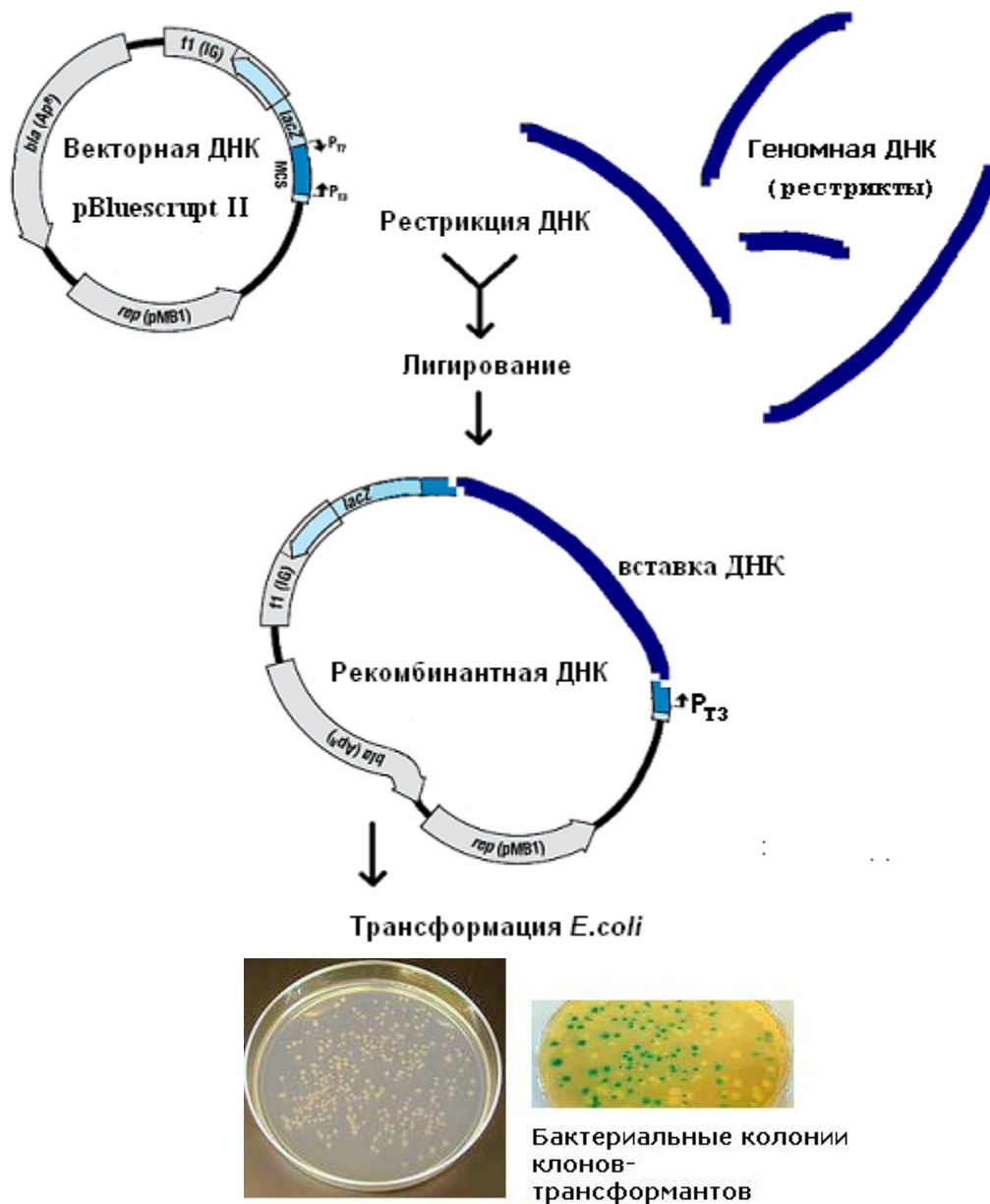
Обозначения дорожек:

1. – нативная ДНК фага λ размером 48502 п.н.;
2. – ДНК фага λ , гидролизованная рестриктазой *Hind*III;
3. – тотальная ДНК *E.coli*, гидролизованная рестриктазой *Hind*III (неполный гидролиз)

Примечание. При гель-электрофорезе сравнивают электрофоретическую подвижность фрагментов ДНК или нативных молекул ДНК, находящихся в одной конформации: линейную форму сравнивают с линейной, суперспиральную – с суперспиральной, одноцепочечную – с одноцепочечной и т.д. Здесь нативная ДНК фага лямбда тоже линейная, хотя его репликативная форма в клетках *E.coli* замкнута в кольцо благодаря *cos*-сайтам.

Наиболее крупные фрагменты ДНК размером 23,1kb и 48,5kb эффективно не разделяются, поскольку использован 1,5% агарозный гель (см. тему 3). Низкомолекулярные фрагменты окрашиваются слабее, так как связывают меньше бромистого этидия *EtBr*, уходящего из ДНК при форефе к катоду. Здесь фрагмент размером 564 н.п. дорисован, поскольку был малозаметен, хотя молярные концентрации всех рестрикционных фрагментов одинаковы. При повышении общей концентрации ДНК верхние фрагменты постепенно сольются в одно яркое пятно.

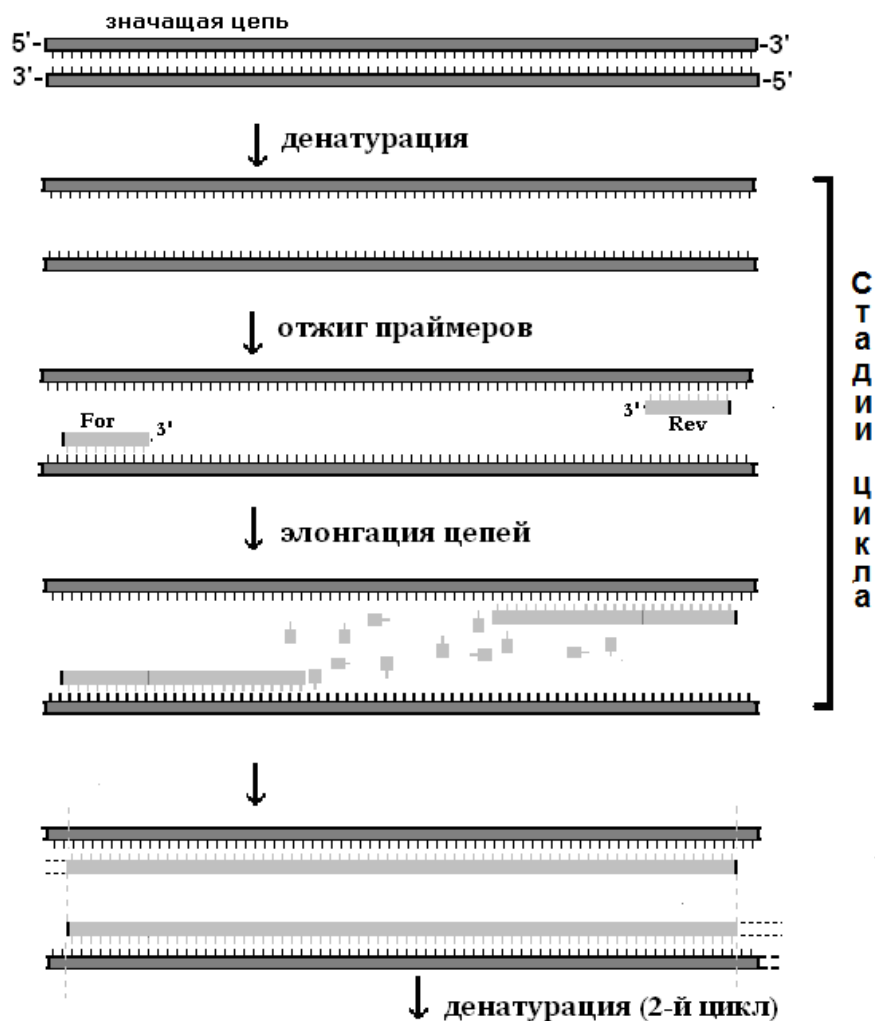
Приложение 14. Схема клонирования ДНК



Примечание. В приведённой схеме кроме скрининга плазмид по размеру возможна «сине-белая селекция» рекомбинантной ДНК. При клонировании под промотор фага Т3 (P_{T3}) нарушается целостность гена *LacZ* и фермент β -галактозидаза в клетках не синтезируется. После высева клеток бактериальной культуры, трансформированной продуктами лигазной реакции на питательный агар с ампициллином, хромогенным субстратом X-gal и индуктором ИПТГ вырастают бактериальные колонии двух типов. Колонии с голубой окраской будут содержать «пустой» вектор, а обычные «белые» колонии – рекомбинантную ДНК. В каждой колонии $\approx 10^4$ – 10^5 клеток.

Гибридные молекулы ДНК называют рекомбинантными молекулами, потому что объединение клонируемой и векторной ДНК является не чем иным, как рекомбинацией *in vitro*.

Приложение 15. Общая схема ПЦР



Примечание. Приведён только первый цикл ПЦР. Первая одноцепочечная молекула ДНК строго определённого размера, от 5'-концевого нуклеотида одного праймера до нуклеотида, комплементарного 5'-концевому нуклеотиду другого праймера, появляется только после второго цикла. Первая двухцепочечная молекула ДНК такого размера – после третьего цикла. Затем ПЦР-продукт, или ампликон, с определённым числом пар нуклеотидов начинает накапливаться в последующих циклах. Ампликон имеет фиксированный размер, поскольку матрица теперь ограничена, её дальнейшее сканирование ДНК-полимеразой невозможно и матричный синтез биополимера обрывается.

В результате этой ферментативной реакции из единичных молекул ДНК-мишени синтезируется *de novo* в микрограммовых количествах и в миллионах копий определённая ДНК, или амплификат. Другими словами, происходит селективная амплификация ДНК *in vitro* (англ. *amplify* – увеличивать, расширять). *In vivo* миллион копий ДНК получается за миллион митозов.

Теоретический предел обнаружения ДНК с помощью метода ПЦР (одна молекула) и практический минимум фактически совпадают, либо находятся близко один от другого. Для сравнения: иммуноферментный анализ на присутствие патогенного микроба требует биоматериала, по меньшей мере, из сотни клеток.

**Приложение 16. Сравнение аминокислотных последовательностей
НАДН-дегидрогеназы гадюки Никольского и гадюки обыкновенной**

>>>QUERY, 256 aa vs TMP.q2 library
>>QUERY

(335 aa)

97.7% identity (99.6% similar) in 256 aa overlap (1-256:24-279)

[Entrez Lookup](#) [Re-search database](#) [General re-search](#)

```

                10      20      30      40      50
QUERY1          WLMAWTCLEINTLSMIPVISKTNHPRATEATTKYFLTQTLASITILSMTTLNALNTS
                :
QUERY2 PMSWITITISIFMTTTLITMTTHWLMAWTCLEINTLSMIPVISKTNHPRATEATTKYFLTQTLASITILSMTTLNALNTS
                10      20      30      40      50      60      70      80

        60      70      80      90      100     110     120     130
QUERY   NWEISLTTTESTTMKIIITLALMMKMAAAPFHFWLPEVAQGATTLTALTILTWQKIAPLAILLAHNSTNLTLSSSAILSV
        :
QUERY   NWEINLTTTESTTMKIIITLALMMKMAAAPFHFWLPEVAQGATTLTALTILTWQKIAPLAILLATHNNTNLTLSSSAILSV
                90      100     110     120     130     140     150     160

        140     150     160     170     180     190     200     210
QUERY   LVGGLGGLNQTQLRKLMFASSIAHTGWILATITLAPNISTLAFMIYTMPTMPIFLILNISSSATIKDMGTLWTTSFYFMM
        :
QUERY   LVGGLGGLNQTQLRKLMFASSIAHTGWILATITLAPNISTLAFMIYTMPTMPIFLILNLSSSATIKDMGTLWTTSFYFMM
                170     180     190     200     210     220     230     240

        220     230     240     250
QUERY   TMLLIILSLTGLPPLTGFMKWLILNKMVTFNMTLEATL
        :
QUERY   TMLLTILSLTGLPPLTGFMKWLILNKMVTFNMTLEATLMAMSSLSPLYLYMRLTYTMAMTIPPHPSLMPMKWRTHKNN
                250     260     270     280     290     300     310     320

```

256 residues in 1 query sequences
335 residues in 1 library sequences

Function used was FASTA [36.3.6 Sep, 2012(preload9)]

Примечание. Приведены результаты попарного выравнивания (alignment) аминокислотных последовательностей НАДН-дегидрогеназы двух видов гадюк. Верхняя строка *Vipera nikolskii*, нижняя строка *Vipera berus*. Программа FASTA3х.

Выявляется 6 различий среди 256 сравниваемых аминокислотных остатков (76% от полной аминокислотной последовательности белка). Так, в позиции № 62/85 у гадюки Никольского стоит серин (S), в то время как у обыкновенной гадюки – аспарагин (N, различие Ser↔Asn). Другие различия – Ala↔Thr (поз. 120), Ser↔Asn (поз. 123), Tyr↔Thr (поз. 179), Ile↔Leu (поз. 196), Ile↔Thr (поз. 222).

Результаты сравнения опровергают мнение некоторых учёных о том, что гадюка Никольского является всего лишь чёрной формой гадюки обыкновенной. Это утверждение вступает в противоречие с данными молекулярного анализа важнейших биополимеров клетки: накопившиеся различия в митохондриальном белке у этих гадюк – результат их обособленной эволюции.

Приложение 17. Некоторые соотношения между размером, количеством, оптической плотностью и молярной концентрацией для белков

Конверсия: масса/моли

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

Конверсия: ДНК/белок

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

A₂₈₀ некоторых белков с концентрацией 1 мг/мл

Белок	Концентрация	A ₂₈₀
IgG	1 мг/мл	1,35
IgM	1 мг/мл	1,20
IgA	1 мг/мл	1,30
Белок А	1 мг/мл	0,17
Авидин	1 мг/мл	1,50
Стрептавидин	1 мг/мл	3,40
БСА	1 мг/мл	0,70

Учебное издание

Великов Владимир Александрович

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ.
ПРАКТИЧЕСКОЕ РУКОВОДСТВО

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

Корректор К.В. Федотова
Оригинал-макет подготовил В.А. Великов

Подписано в печать 21.01.2013. Формат 60×84 1/16.
Бумага офсетная. Печать трафаретная.
Объем усл. печ. л. 4,65 (5). Уч.-изд. л. 4,5. Тираж 300. Заказ 145

Издательский центр «Наука»
Типография АВП «Саратовский источник»
410012, Саратов, ул. Кутякова 138 Б
т. (8452) 52-05-93