Методы
генетической
инженерии

Т. Маниатис
Э. Фрич
Дж. Сэмбрук

Молекулярное клонирование

Перевод с английского
под редакцией
акад. А. А. Баева
и д-ра биол. наук
К. Г. Скрябина

Москва «Мир» 1984

T. Maniatis
Harvard University
E.E. Fritsch
Michigan State University
J. Sambrook
Cold Spring Harbor Laboratory

Molecular Cloning

A laboratory Manual

Cold Spring Harbor Laboratory
1982

Методы
генетической
инженерии

Т. Маниатис
Э. Фрич
Дж. Сэмбрук

Молекулярное клонирование

Перевод с английского
под редакцией
акад. А. А. Баева
и д-ра биол. наук
К. Г. Скрябина

Москва «Мир» 1984

ББК 28.04
М 23
УДК 575+576.80/85

Маниатис Т. и др.

М 23 Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: Пер. с англ./Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. — М.: Мир, 1984. — 480 с., ил.

Монография американских ученых Маниатиса, Фрича и Сэмбрука представляет собой как бы продолжение книги Р. Девиса «Генетика бактерий». Методическое руководство посвящено описанию методов молекулярного клонирования ДНК. Детально изложена техника получения и культивирования штаммов бактерий и вирусов, выделение ДНК бактериофага λ и плазмидной ДНК; даны характеристики ферментов, употребляемых при молекулярном клонировании. Рассмотрены также методы выделения, очистки и анализа мРНК, идентификации и анализа рекомбинантных клонов ДНК, векторы экспрессии клонированной ДНК в *E. coli*.

Предназначена для молекулярных биологов, биохимиков, генетиков, микробиологов, вирусологов.

М $\frac{2001040000-108}{041(01)-84}$ 131—84, ч. 1

ББК 28.04
57.023

Редакция литературы по биологии

© 1982 by Cold Spring Harbor Laboratory
© Перевод на русский язык, «Мир», 1984

ПРЕДИСЛОВИЕ РЕДАКТОРОВ ПЕРЕВОДА

«Молекулярное клонирование» — не совсем обычная книга. Ее особенность заключается в том, что она несомненно станет настольной книгой, но не на письменном, а на химическом столе экспериментатора, имеющего дело с получением и анализом рекомбинантных молекул ДНК.

Предлагаемая вниманию читателей книга необычна еще и тем, что в ней описаны методы, разработанные и испытанные в различных лабораториях мира, и только затем собранные воедино группой ученых, организовавших практикум в Колд-Спринг-Харбор.

Таким образом, можно считать эту книгу коллективным трудом многочисленного сообщества ученых, разработавших методические основы генетической инженерии.

Перед каждым новым методическим разделом приводится краткое введение, позволяющее начинающим исследователям получить основные представления о предмете.

Сегодня нет нужды говорить о тех многочисленных приложениях, которые имеют методы молекулярного клонирования. Это и фундаментальные аспекты организации генетического материала живой клетки, и прикладные задачи, решаемые биотехнологией — создание промышленных производств интерферона, гормонов, вакцин и т. д. с использованием методов генетической инженерии.

Это делает предлагаемую издательством «Мир» книгу полезной для молекулярных биологов, молекулярных генетиков, генных инженеров и т. д. — для всех, кто ставит перед собой задачу экспериментального изучения биологии гена.

Перевод книги выполнен Ю. Н. Зографом (предисловие и гл. 1—3), Т. Ю. Переслени (гл. 4, 6, 7), В. Д. Филипповым (гл. 5, 8—12, приложения) и В. В. Кульгускиным (гл. 9).

А. А. Баев
К. Г. Скрябин

ПРЕДИСЛОВИЕ

Это руководство зародилось как подборка лабораторных методик, которыми пользовались в 1980 г. на курсах по молекулярному клонированию генов эукариот в Колд-Спринг-Харбор. В то время эти методики применялись у нас в лабораториях, но были рассредоточены по рабочим журналам многих исследователей. В 1981 г. было решено создать более полное и современное руководство, чтобы не только использовать его на следующих курсах по молекулярному клонированию, но по возможности и опубликовать. Так как методы эти существуют во множестве вариантов, мы составили свод «согласованных методик», фотокопировали их и во время курсов 1981 г. разослали по разным лабораториям. Затем зимой 1981—1982 гг. это руководство было существенно переработано: исправлены некоторые методики и рисунки, добавлены новые методики и даже целые новые главы.

Однако область, к которой относится данное руководство, продолжает развиваться и сейчас, после создания этой окончательной редакции. Все время изобретаются новые методы, а старые методики постоянно изменяются в соответствии с новыми потребностями. Хотя в это руководство мы включили лишь тщательно проверенные и успешно используемые в наших лабораториях методики, их нельзя считать безупречными. Поэтому мы с благодарностью примем предложения по их улучшению и рассмотрим сообщения о любых новых методиках.

Постоянное усовершенствование методик приводит к тому, что не всегда удается установить, кто же является их автором. В тексте мы старались по возможности указывать, кто именно разработал ту или иную методику, но нередко проследить пути развития конкретного метода оказалось невозможным. Поэтому мы приносим свои извинения всем тем, кого не смогли поблагодарить за идею, методику или пропись и выразить им нашу признательность. Основная цель состояла в том, чтобы собрать методики, проверить их и изложить суть с максимальной четкостью. Мы редко вносили в них какие-либо изменения и лишь в исключительных случаях составляли прописи заново. Поэтому предлагаемое руководство в значительной мере основывается на материале, разработанном другими исследователями, и именно их нужно благодарить.

Так как первоначально это руководство было написано для исследователей, не имеющих опыта работы в области молекулярного клонирования, много места в нем уделено изложению основ этой науки. В предлагаемой редакции, однако, подробно изложены почти все конкретные методические приемы, используемые в настоящее время в молекулярном клонировании. Поэтому мы надеемся, что как новички, так и «ветераны» клонирования найдут в этой книге ценный для себя материал.

На бумаге молекулярное клонирование представляется весьма простым методом, однако осуществить его на практике оказывается труднее. Большинство методик состоит из множества отдельных этапов, и подводные камни, имеющиеся на любом из них, могут завести экспериментатора в тупик. Чтобы справиться со всеми трудностями, нужно хорошо понимать те принципы, которые лежат в основе каждой методики. Мы приводим необходимую для этого информацию и ссылки, которые могут оказаться полезными в случае затруднений. Само собой разумеется также, что результаты каждого этапа методики следует проверять, чтобы убедиться в успехе реакции.

Это руководство не могло бы появиться без помощи и советов сотрудников наших и многих других лабораторий. Мы хотим поблагодарить Джона Фиддса, Мэри-Джейн Гесинг, Дэвида Голдберга, Стива Хьюджеса, Дэвида Иш-Горовица, Майка Мэтьюза, Пэтти Рейчэл, Джоэ Сордже, Джима Стрингера, Ричарда Трейзмана и Найгел Уитл. Мы особенно признательны Эргу Эфстратиадису за плодотворное обсуждение и критику гл. 7; Брайану Сиду за разрешение включить описание его неопубликованной методики скрининга библиотек посредством рекомбинации (гл. 10) и за многие другие полезные предложения; Дугу Хэнэхану за советы по трансформации (гл. 8); Брайану Робертсу за предложения по методам отбора гибридов и клонирования кДНК; Дугу Мелтону за предоставление методики инъекции в овоциты *Xenopus;* Рони Грину за предложения по усовершенствованию многих методик; Нине Ирвин за предоставление критической антологии методов, применяемых для экспрессии генов эукаротических белков в бактериях (гл. 12); Ричу Робертсу за предоставление результатов анализа последовательности плазмиды pBR322 с помощью ЭВМ; Барбаре Бахман за просмотр и исправление списка штаммов *E. coli;* Тому Броукеру, Луизе Чоу, Джеффу Инглеру и Джиму Гэррелсу за прекрасные фотографии, выполненные для обложки нашей книги.

Мы благодарны также всем участникам курсов по молекулярному клонированию 1980 и 1981 гг. Это была прекрасная группа учащихся, которые продирались сквозь дебри первых двух редакций этого руководства и сделали много полезных замечаний. Мы признательны Нэнси Гопкинс, которая помогла нам на первом году преподавания этого курса и убедила нас, что

создание руководства — сто́ящая задача. В 1981 г. вести курс нам помогал Дуг Энгел, который многое сделал для усовершенствования этого руководства. В успех обоих курсов внесли свой вклад ассистенты, которыми летом 1980 г. были Катарин О'Коннелл и Хелен Дорис Келлер, а в 1981 г. — Сьюзен Ванде Вауде, Пол Бейтс и Майкл Вейсс.

Мы хотим поблагодарить Пэтти Беркли и Мерилин Гудвин за их оптимизм и терпение при перепечатывании следующих друг за другом вариантов рукописи. Над рисунками для этого руководства с огромной самоотверженностью и упорством трудились наши художники Фрэн Цефалу и Майк Оклер. Джоан Эберт следила за многочисленными ссылками, которые постоянно добавлялись или исключались из рукописи, и составила список литературы. Мы благодарны также заведующей отделом публикаций лаборатории Колд-Спринг-Харбор Нэнси Форд за ее одобрение и поддержку. Наконец, эта книга не смогла бы появиться без спокойного, расторопного и дипломатичного Дуга Оуэна, который подготовил рукопись к печати и помог нам во многих других отношениях.

Том Маниатис
Эд Фрич
Джо Сэмбрук

Глава 1

СИСТЕМЫ ВЕКТОР — ХОЗЯИН

Для клонирования фрагментов чужеродной ДНК и размножения их в *Escherichia coli* могут использоваться четыре типа векторов:

бактериофаг λ	космиды
плазмиды	бактериофаг M13

Хотя эти векторы значительно различаются по величине и структуре, все они обладают следующими общими свойствами:

1. Они могут автономно реплицироваться в *E. coli* (т. е. являются в полном смысле репликонами), даже если ковалентно соединены с фрагментом чужеродной ДНК.
2. Их легко отделить от нуклеиновых кислот бактерии и очистить.
3. Они содержат несущественные для размножения в бактериях области ДНК. Встроенная в эти области чужеродная ДНК реплицируется и размножается так, как будто бы она является обычным компонентом вектора.

Каждый тип вектора имеет свои биологические особенности, которые делают его наиболее пригодным для определенных целей. В этой главе мы опишем клонирующие векторы и обсудим принципы их использования в молекулярном клонировании.

ПЛАЗМИДЫ

Плазмиды представляют собой внехромосомные генетические элементы, которые встречаются во множестве видов бактерий. Это двухцепочечные замкнутые кольцевые молекулы ДНК, размер которых варьирует от 1 до более чем 200 kb[1]. Плазмиды часто содержат гены, кодирующие такие ферменты, которые при определенных условиях оказываются полезными для бактерии-хозяина. Среди фенотипических признаков, сообщаемых бактериям различными плазмидами, можно отметить следующие:

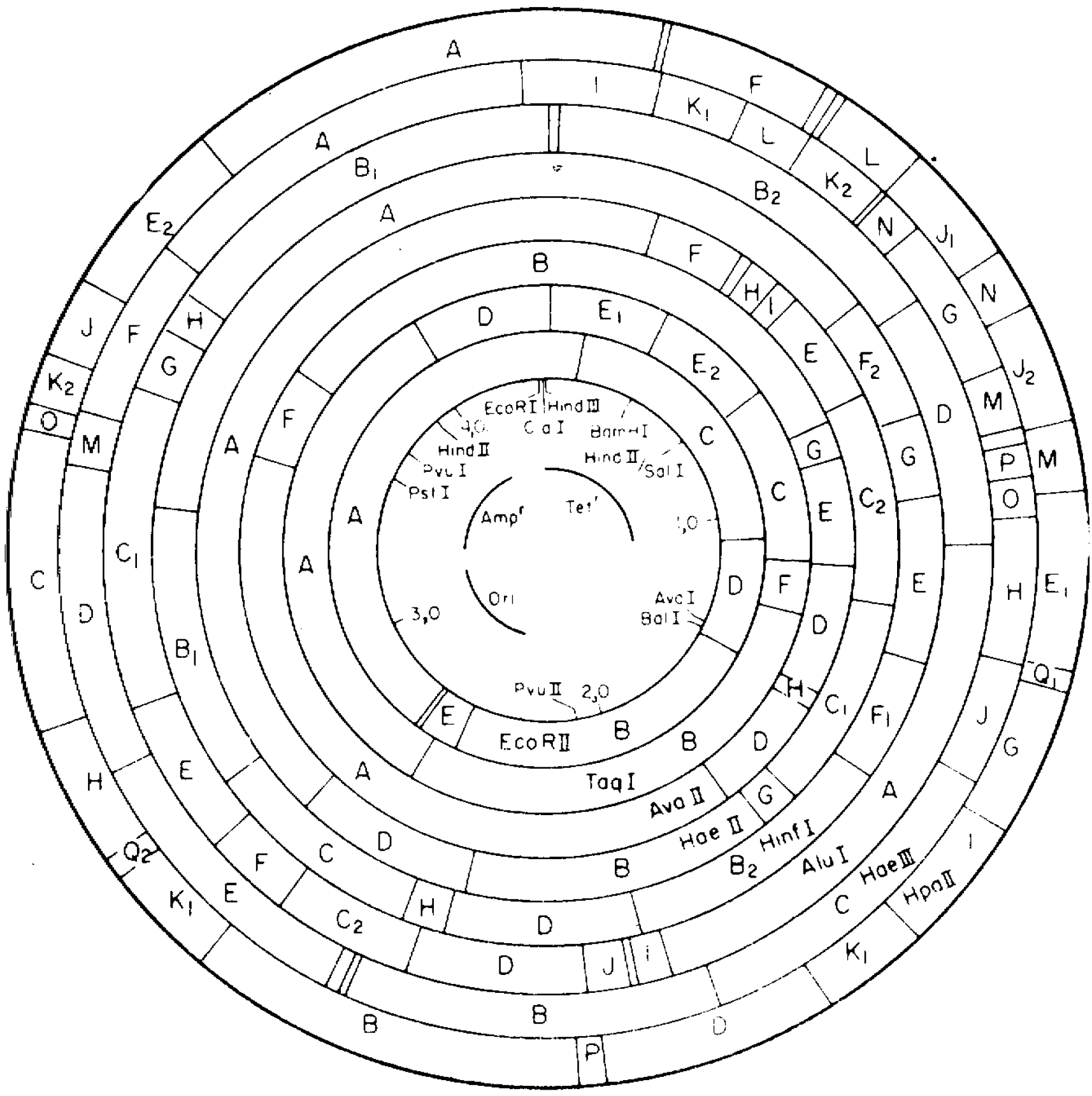
устойчивость к антибиотикам
способность к синтезу антибиотиков

---

[1] От англ. *kilobases* — тысяча пар оснований. — *Прим. перев.*

расщепление сложных органических соединений
образование колицинов
образование энтеротоксинов
образование ферментов рестрикции и модификации.

В природе многие плазмиды передаются новым хозяевам посредством процесса, аналогичного конъюгации бактерий. В ла-

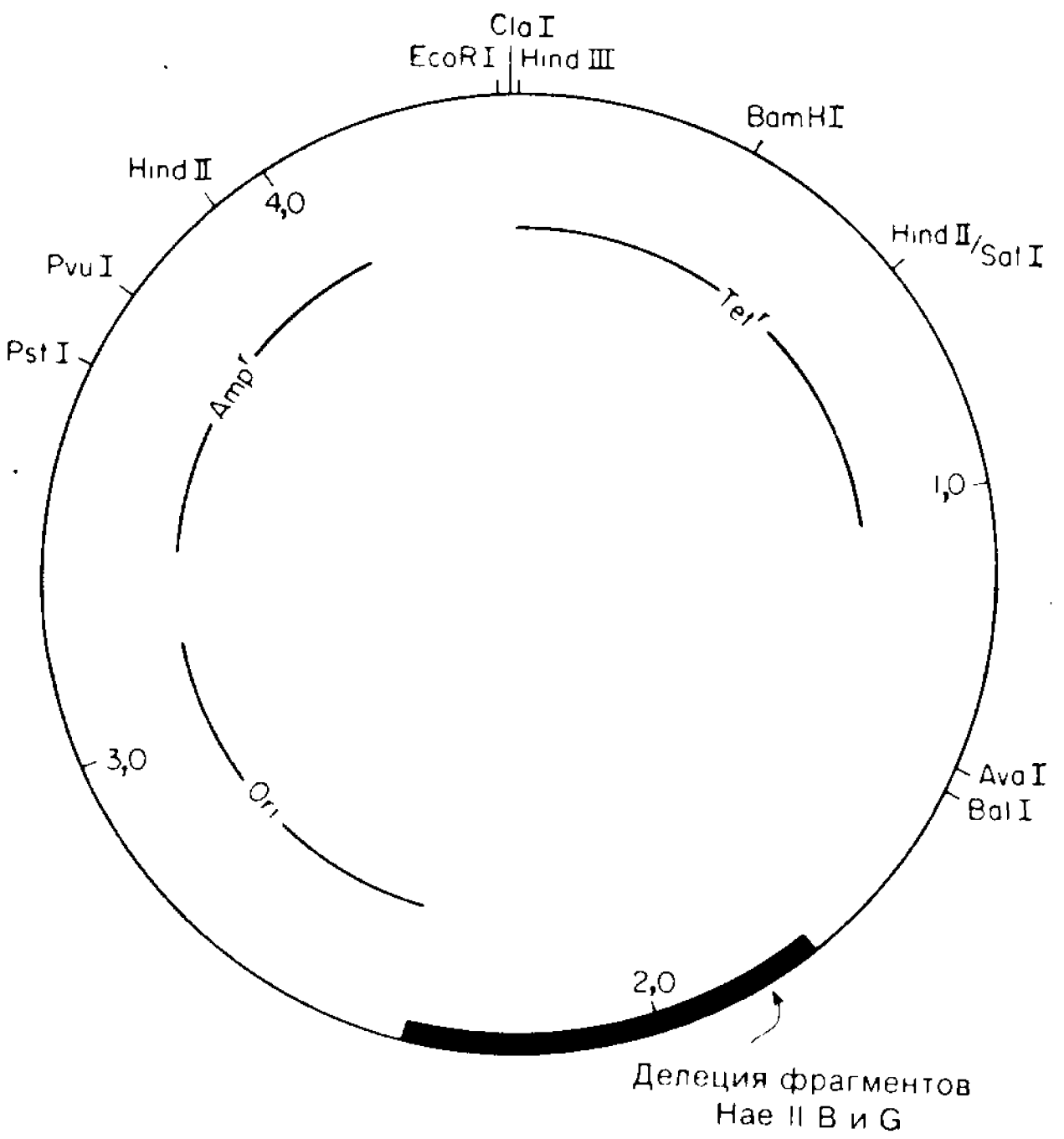


pBR322

Размер: 4,3 kb
Репликон: ColE1, релаксированный
Селективные маркеры: Amp^r, Tet^r
Единичные сайты: AvaI, PstI, BamHI, PvuII, ClaI, SalI, EcoRI, HindIII
Инактивация в результате вставки: Amp^r — PstI. Tet^r — BamHI, HindIII (варьирует), SalI
Литература: Bolivar et al., 1977; Sutcliffe, 1978, 1979
Примечание: pBR322 является наиболее широко используемым плазмидным вектором, применяемым для самых разных целей клонирования. Известна полная нуклеотидная последовательность этой плазмиды (Sutcliffe, 1979)

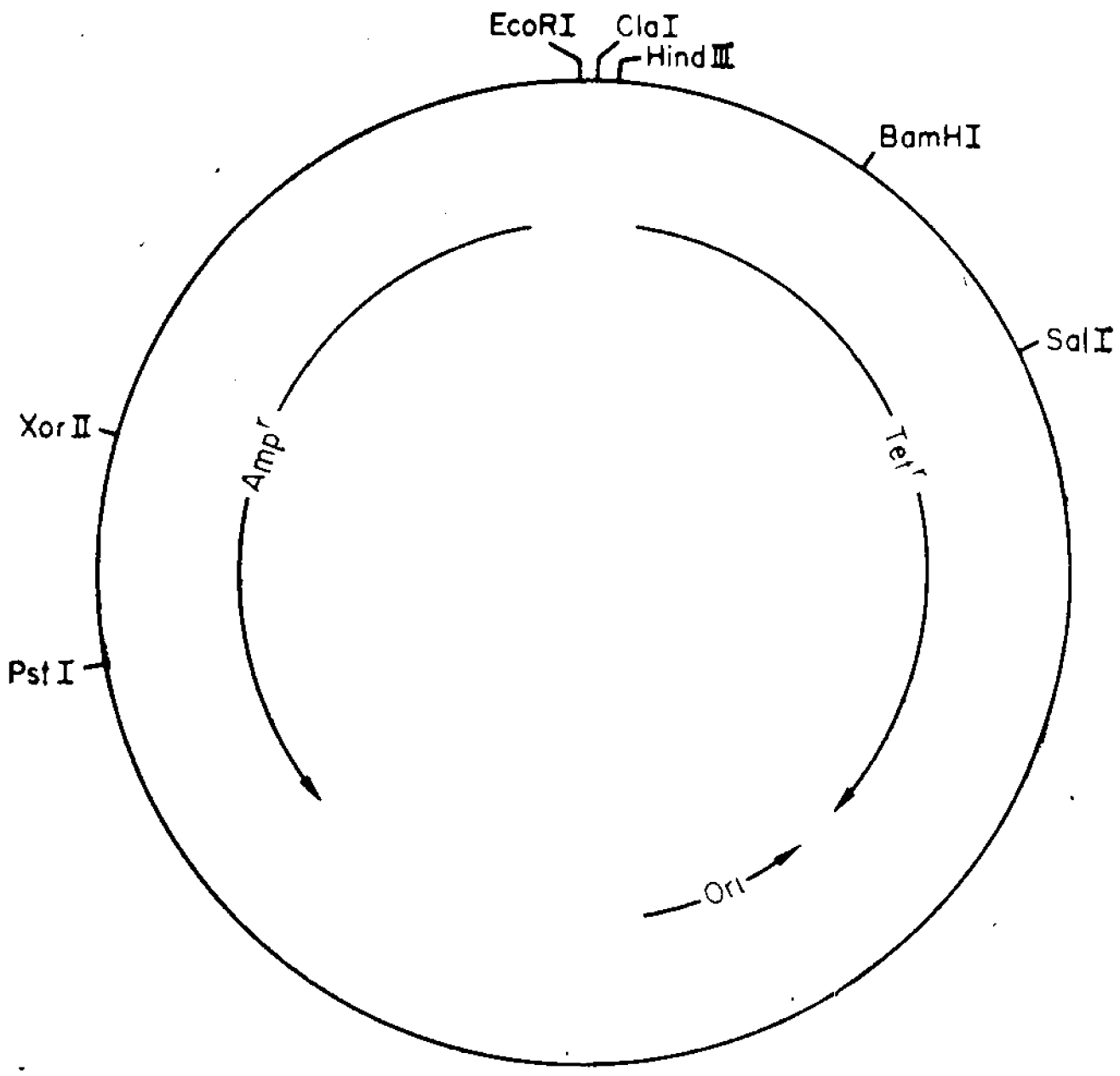
боратории, однако, плазмиды можно передавать бактериям путем искусственного процесса, названного трансформацией. В этом случае их вводят в бактерии, которые обработаны так, что некоторые клетки временно оказываются проницаемыми для небольших молекул ДНК. Плазмида сообщает реципиентам новый фенотипический признак (например, устойчивость к антибиотику), что дает возможность проводить простой отбор успешно трансформированных бактерий.

Как правило, репликацию плазмидной ДНК осуществляет тот же набор ферментов, что и дупликацию бактериальной хромосомы. Некоторые плазмиды находятся под строгим контролем. Это означает, что их репликация сопряжена с репликацией хо-



pAT153

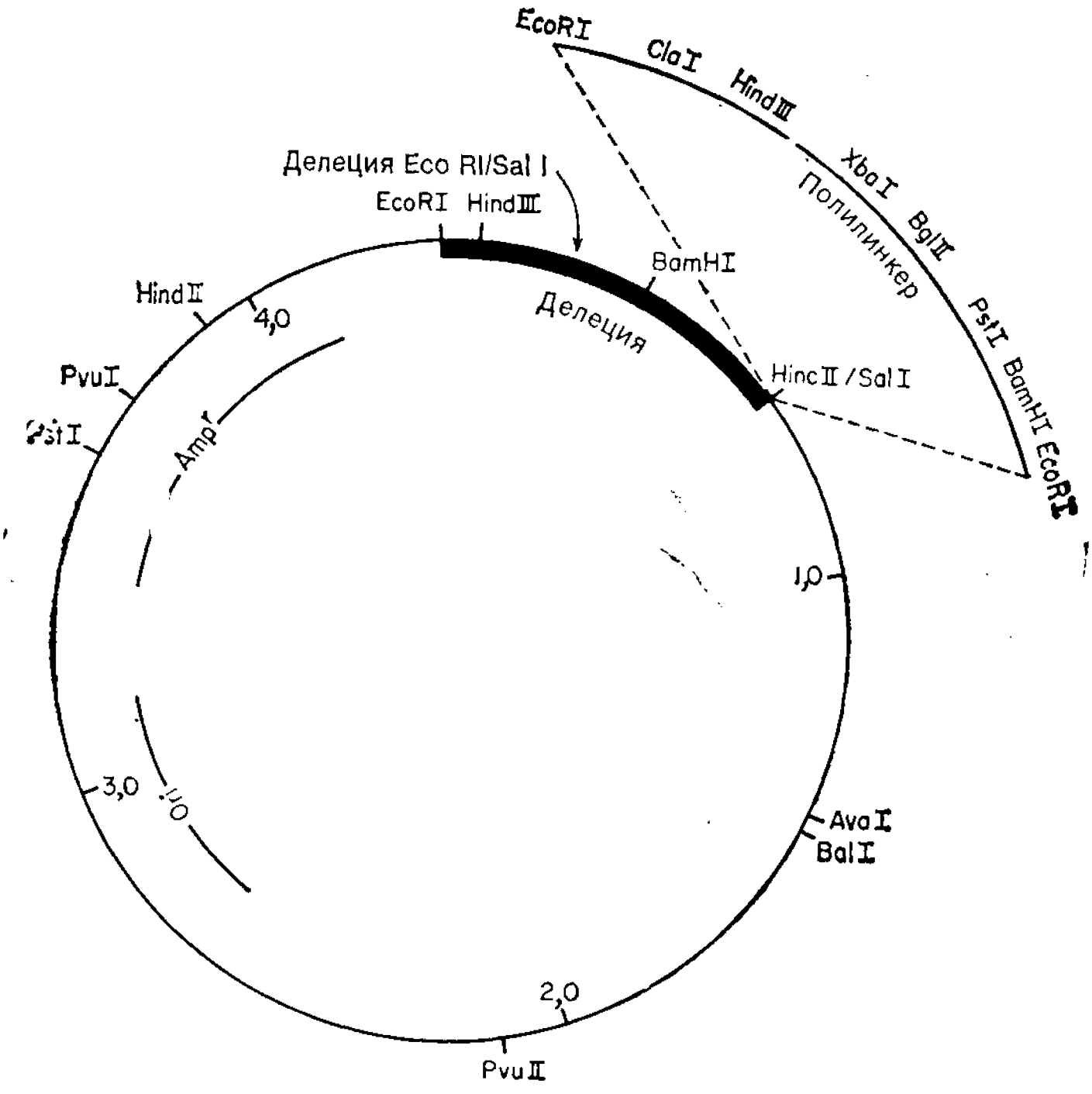
Размер: 3,6 kb
Репликон: ColE1, релаксированный
Селективные маркеры: Amp^r, Tet^r
Единичные сайты: AvaI, PstI, BamHI, ClaI, SalI, EcoRI, HindIII
Инактивация в результате вставки: Amp^r — PstI. Tet^r — BamHI, HindIII (варьирует), SalI
Литература: Twigg, Sherratt, 1980
Примечание: pAT153 — это вариант плазмиды pBR322, представленный большим числом копий



pXf3

Размер: 3,16 kb
Репликон: ColE1, релаксированный
Селективные маркеры: Amp^r, Tet^r
Единичные сайты: EcoRI, ClaI, HindIII
Инактивация в результате вставки: Tet^r—BamHI, SalI. Amp^r—PstI, XorII
Литература: Sutcliffe, 1978; D. Hanahan, личное сообщение
Примечание: Плазмида pXf3 — производная плазмиды pBR322, в которой содержащий репликон фрагмент ThaI-A соединен с фрагментом AvaI—Sau3A, кодирующим устойчивость к ампициллину и тетрациклину. В результате образуется плазмида длиной примерно 3160 пар оснований

зяина, так что в каждой бактериальной клетке присутствует лишь одна или по крайней мере немного копий плазмиды (см. обзор Novick et al., 1976). Число же копий плазмид, находящихся под ослабленным контролем, составляет 10—200. Но что особенно важно, число копий плазмид с ослабленным контролем в клетке можно увеличить до нескольких тысяч, если подавить синтез белков хозяина (например, обработав клетки хлорамфениколом) (Clewell, 1972). В отсутствие синтеза белка репликация плазмид с ослабленным контролем продолжается, а репликация хромосомной ДНК и плазмид, находящихся под строгим контролем, прекращается.

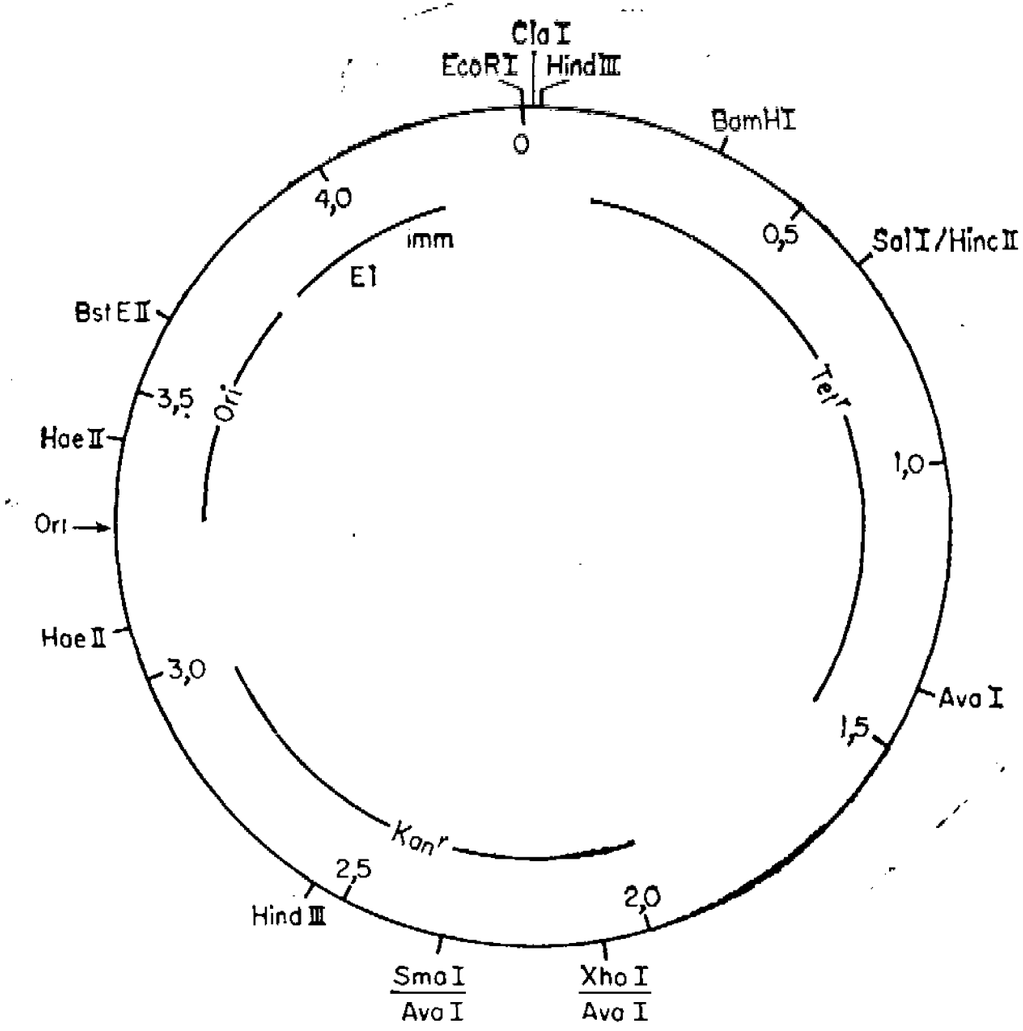


plink 322

Размер: 3,8 kb
Репликон: ColE1, релаксированный
Селективный маркер: Amp^r
Единичные сайты: ClaI, HindIII, XbaI, BglII, BamHI. Плазмида plink322 — производная плазмиды pBR322 — содержит полилинкер, что повышает число сайтов, которые можно использовать при клонировании
Литература: B. Seed (неопубликованные данные)
Последовательность полилинкера:

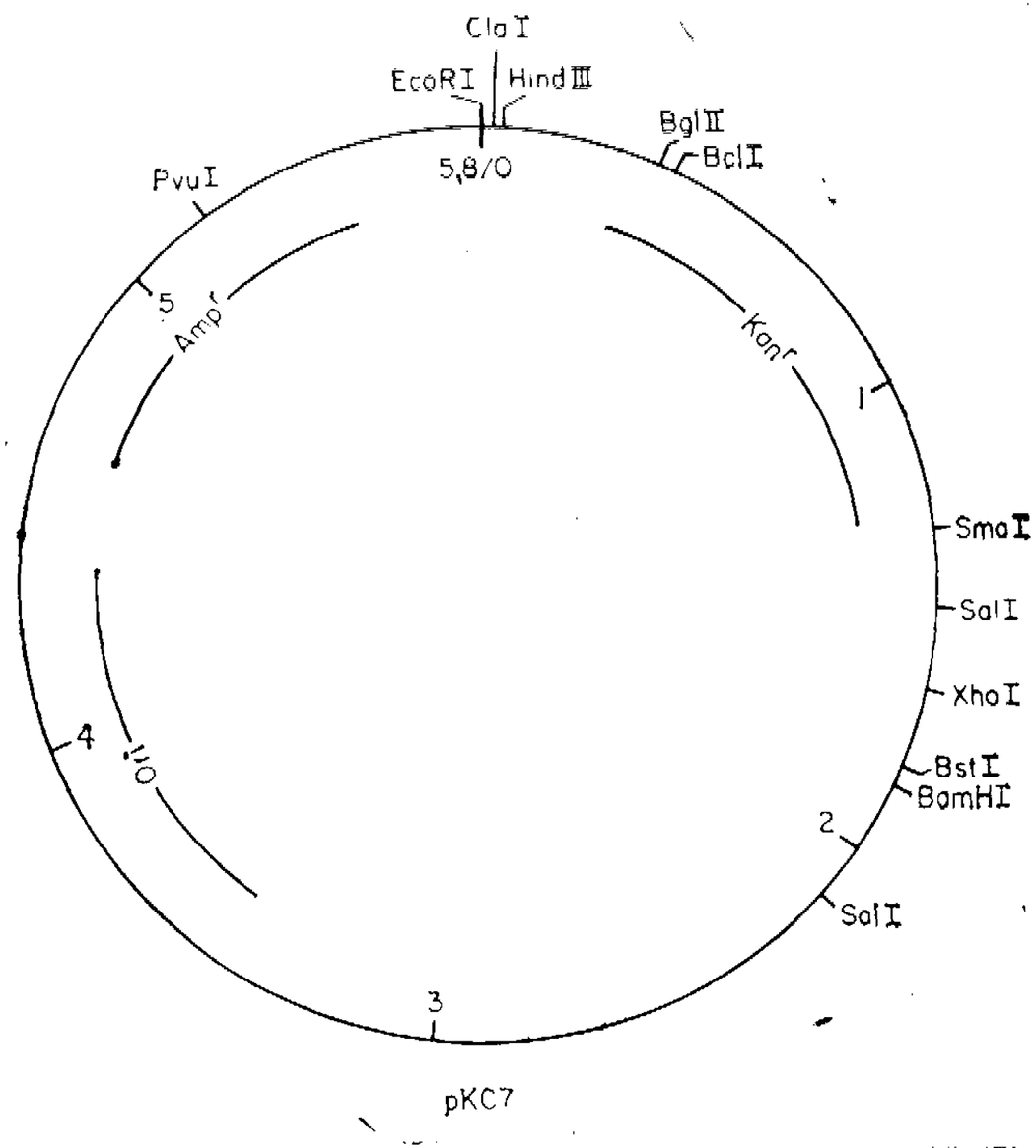
```
GAATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTTCTAGAGATCTTCCATACCTACC
|_____|                  |____|  |_______|
 EcoRI                    ClaI   HindIII |____|
                                          XbaI |_____|
                                                BglII

AGTTCTCCGCCTGCAGCAATGGCAACGTTGCCCGGATCCGGTCGCGCGAATTC
          |_____|              |_____|              |_____|
           PstI                BamHI                EcoRI
```



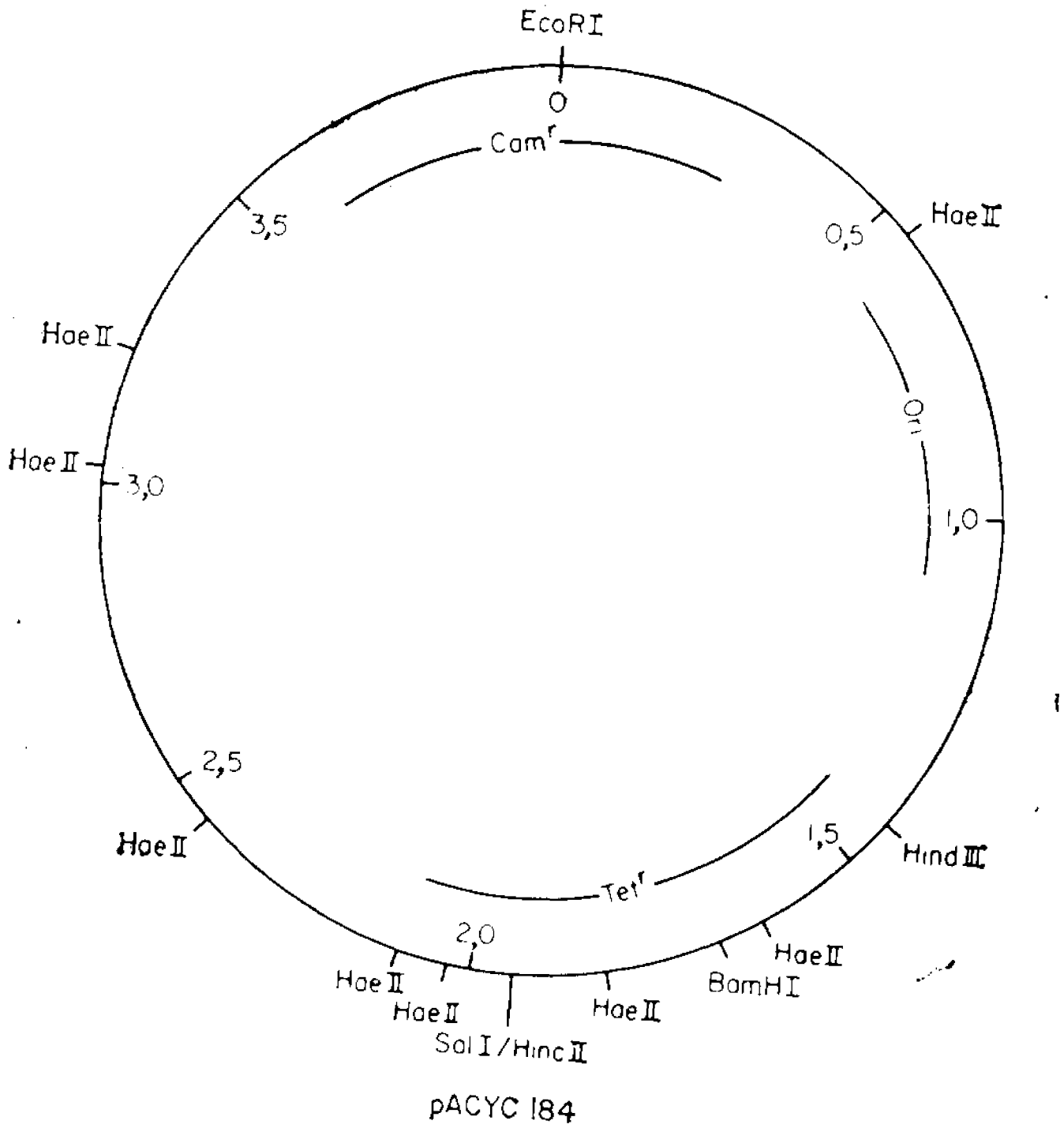
pMK16

Размер: 4,6 kb
Репликон: ColE1, релаксированный
Селективные маркеры: ColE1 imm, Kan^r, Tet^r
Единичные сайты: BamHI, SmaI, EcoRI, XhoI, HincII, SalI, BstEII. Вставка в сайт BstEII препятствует репликации
Инактивация в результате вставки: Tet^r—BamHI, HincII, SalI.
Kan^r—SmaI, XhoI. Вставка чужеродной ДНК в сайт XhoI инактивирует ген Kan^r
Литература: Kahn et al., 1979
Примечание: Это наиболее одходящий вектор для клонирования фрагментов ДНК с SmaI- или XhoI-концами



pKC7

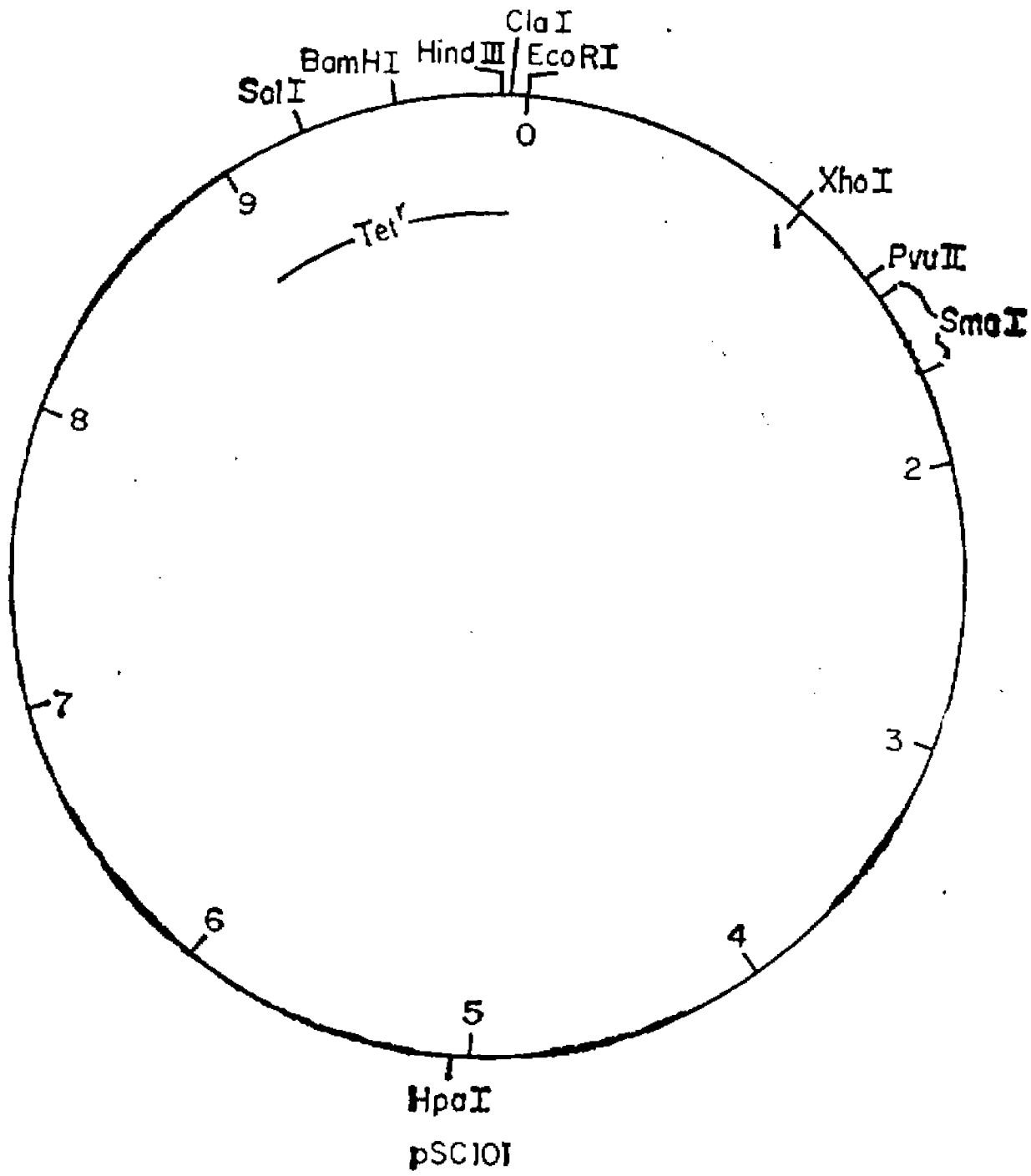
Размер: 5,8 kb
Репликон: ColE1, релаксированный
Селективные маркеры: Amp^r, Kan^r
Единичные сайты: SmaI, XhoI, BstEII, BamHI, PvuI, EcoRI, HindIII, BglII, BclI
Инактивация в результате вставки: Kan^r—BclI, BglII (варьирует), Amp^r—PvuI
Литература: Rao, Rogers, 1979
Примечание: Вставка чужеродной ДНК в сайт BglII инактивирует ген Kan^r



pACYC 184

Размер: 4,0 kb
Репликон: p15A, со строгим контролем
Селективные маркеры: Cam^r, Tet^r
Единичные сайты: BamHI, EcoRI, HindIII, SalI
Инактивация в результате вставки: Cam^r—EcoRI. Tet^r—BamHI, HindIII, SalI
Литература: Chang, Cohen, 1978
Примечание: Уникальное свойство этой плазмиды заключается в том, что вставка в сайт EcoRI инактивирует маркер Cam^r

Для того чтобы плазмиду можно было использовать в качестве вектора, она должна обладать следующими свойствами. Плазмида должна быть небольшого размера, и ее репликация должна находиться под ослабленным контролем. Чтобы можно было выявлять трансформантов и поддерживать плазмиду в бактериальной популяции, она должна нести один или несколько таких маркеров, по которым можно вести отбор. Наконец, плазмида должна содержать единичный уникальный сайт для одного фермента рестрикции (или единичные сайты для нескольких рестриктирующих ферментов) в области, которая не существенна для репликации плазмиды. Лучше, если эти сайты рестрикции, куда можно вставить чужеродную ДНК, находятся внутри генов, кодирующих маркеры, по которым можно вести

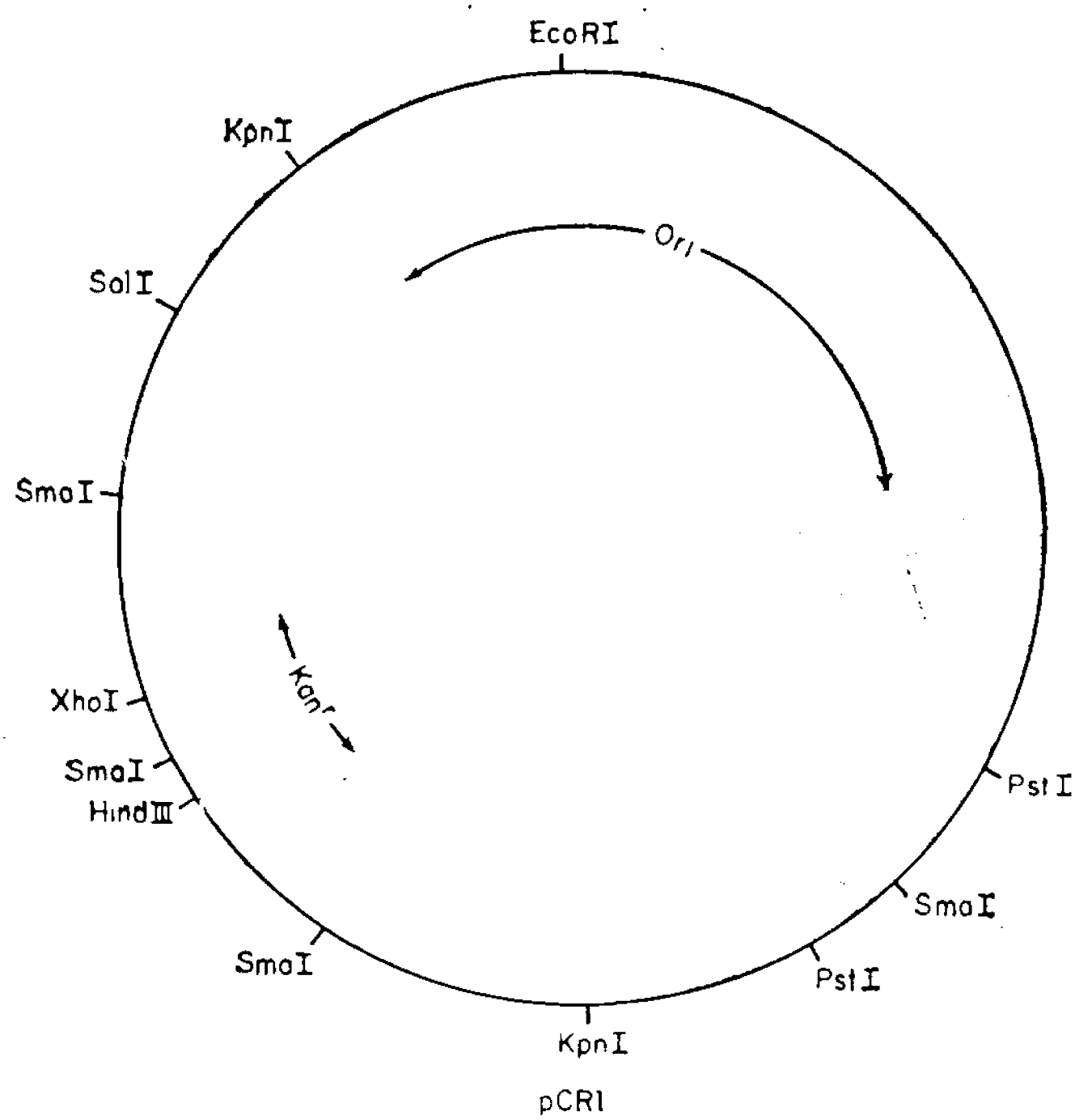


Размер: **9,09 kb**
Репликон: со строгим контролем, малое число копий
Селективные маркеры: Tet^r
Единичные сайты: **EcoRI, HindIII, BamHI, SalI, XhoI, PvuII, SmaI**
Инактивация в результате вставки: **Tet^r—HindIII, BamHI, SalI**
Литература: Cohen, Chang, 1973, 1977
Примечание: **У плазмиды pSC101 не обнаружено никакой гомологии с pCRI**

отбор. Тогда вставка фрагмента чужеродной ДНК приведет к инактивации этого гена.

Ниже мы опишем несколько разных клонирующих векторов, обладающих многими из этих свойств (см. обзоры Bolivar, Backman, 1979; Bernard, Helinski, 1980). Наиболее широко используется вектор pBR322 — плазмида с ослабленной регуляцией репликации, в которой есть гены устойчивости к ампициллину и к тетрациклину, а также несколько удобных сайтов рестрикции (Bolivar et al., 1977) (с. 10). Известна полная нуклеотидная последовательность плазмиды pBR322 (Sutcliffe, 1978). Она приведена в Приложении Б.

Недавно созданы две плазмиды, производные pBR322, пре-

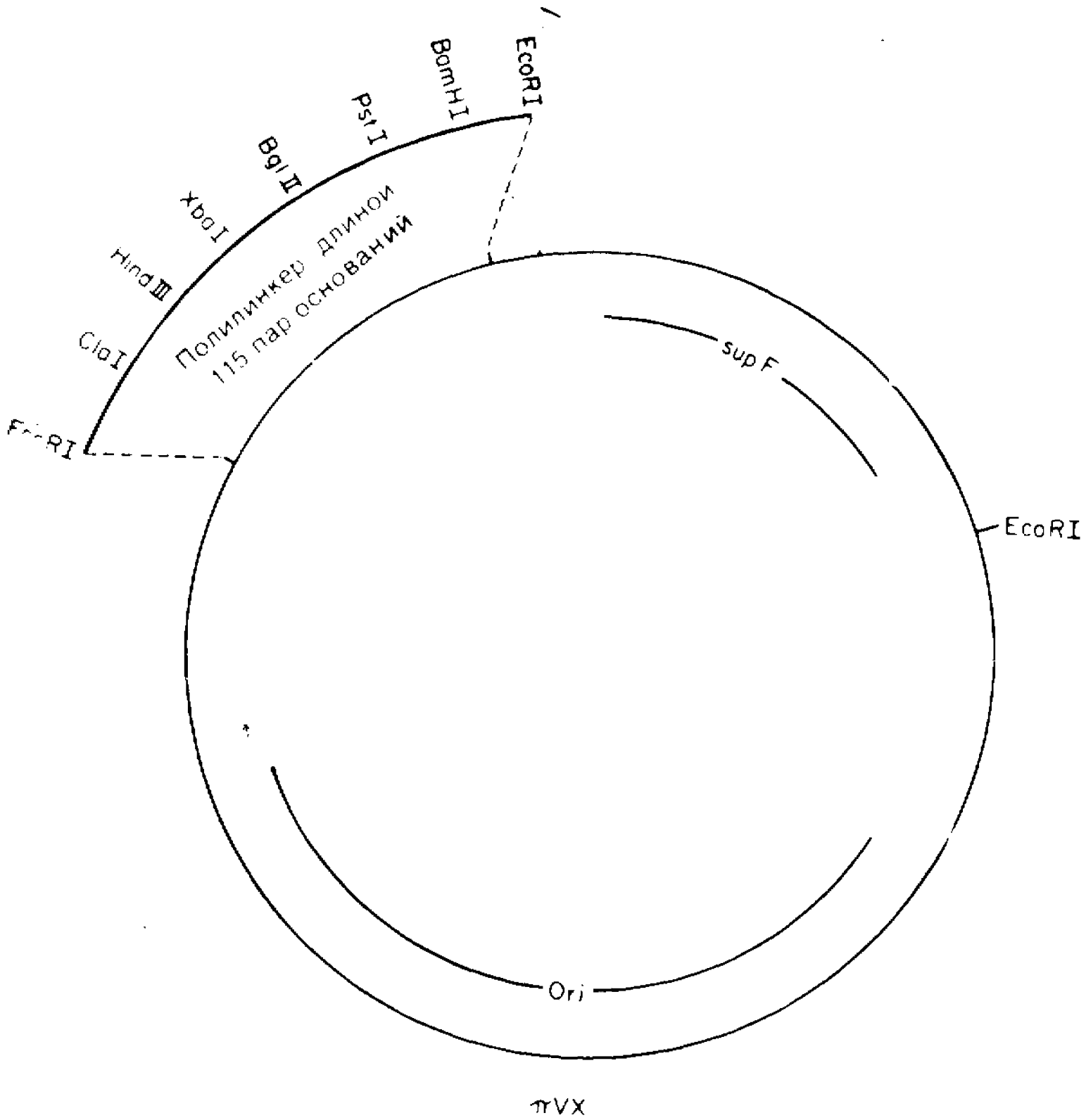


pCR1

Размер: 11,4 kb
Репликон: ColE1, релаксированный
Селективные маркеры: Kan^r
Единичные сайты: EcoRI, HindIII
Инактивация в результате вставки: Kan^r—HindIII
Литература: Armstrong et al., 1972; Covey et al., 1976
Примечание: У плазмиды pCR1 не обнаружено никакой гомологии с pSC101

имущество которых заключается в том, что они реплицируются с образованием еще большего числа копий. Одна из них, плазмида pAT153 (Twigg, Sherratt, 1980), получена в результате делетирования *Hae*IIB- и G-фрагментов (A. Cowie, E. Ruley, личное сообщение), включающих ту область генома плазмиды, которая осуществляет регуляцию числа копий (см. рисунок на с. 11). Число копий плазмиды pAT153 в клетке оказывается в 1,5—3 раза больше числа копий pBR322. Вторая производная плазмида, pXf3 (D. Hanahan, неопубликованные данные), еще меньше, чем плазмида pAT153 (см. рисунок на с. 12).

Небольшие плазмиды обладают многими преимуществами. С ДНК таких плазмид легче оперировать, так как они меньше повреждаются под действием различного рода сил физической природы и их рестрикционные карты проще. Кроме того, меньшие по размерам плазмиды, как правило, оказываются пред-



Размер: 902 пары оснований
Репликация: релаксированная?
Селективный маркер: supF
Единичные сайты: ClaI, HindIII, BglII, PstI, BamHI
Литература: B. Seed (неопубликованные данные)
Примечание: Эта плазмида состоит из трех EcoRI-фрагментов: фрагмента длиной 508 пар, полученного из плазмиды pMB1; синтетического гена тирозиновой супрессорной тРНК размером 207 пар; полилинкера длиной 115 пар, который содержит перечисленные выше сайты
Последовательность полилинкера: См. карту плазмиды plink322

ставленными большим числом копий. Это приводит к тому, что при гибридизации с применением радиоактивных зондов повышается возможность выявления тех бактерий, которые содержат чужеродные последовательности ДНК. Уменьшение размера плазмиды, однако, может привести к элиминации пригодных для клонирования сайтов. Например, у плазмиды pX13 отсутствуют *Ball*- и *Aval*-сайты, которые есть у pBR322 и pAT153. Для расширения спектра пригодных для клонирования сайтов в некоторые небольшие плазмиды вводят полилинкеры. Полилинкеры представляют собой сегменты ДНК, содержащие расположен-

ные рядом сайты для нескольких рестриктирующих ферментов. Схема содержащей полилинкер плазмиды plink 322 (B. Seed, неопубликованные данные) приведена на с. 13.

Приведены также схемы плазмид, которые используются не столь часто, как pBR322 и ее производные, но тем не менее весьма полезны для некоторых определенных целей клонирования. Например, единичные сайты рестрикции для *Sma*I и *Xho*I в плазмиде pMK16 находятся в гене, кодирующем устойчивость к канамицину (с. 13). Плазмиды pKC7 и pACYC184 (с. 14—15) содержат удобные для клонирования сайты внутри гена, кодирующего устойчивость к хлорамфениколу. Большие плазмиды pCR1 (11,4 kb) и pSC101 (9,9 kb; с. 16—17) обычно в экспериментах по клонированию не используются, но замечательны тем, что не гибридизуются друг с другом. Поэтому можно клонировать фрагменты ДНК из одного источника в pSC101, из другого в pCR1, а затем проводить опыты по перекрестной гибридизации между встроенными ДНК без каких-либо помех со стороны последовательностей самих плазмид. Возможно, наиболее специализированной из всех плазмид является плазмида πVX. Ее используют для отбора из популяции рекомбинантных бактериофагов λ тех фагов, которые содержат последовательности ДНК, гомологичные встроенному в эту плазмиду сегменту чужеродной ДНК (B. Seed, неопубликованные данные) (с. 18).

Клонирование в плазмидах

В принципе методика клонирования в плазмидных векторах очень проста. ДНК плазмиды расщепляют рестриктирующей эндонуклеазой и соединяют in vitro с чужеродной ДНК. Затем получающимися в результате рекомбинантными плазмидами трансформируют бактерии. На самом деле плазмидный вектор следует подбирать очень тщательно, чтобы максимально облегчить выявление и характеристику рекомбинантов. Основная трудность заключается в том, чтобы различить те плазмиды, которые содержат последовательности чужеродной ДНК, и молекулы ДНК вектора, которые замкнулись в кольцо, не захватив клонируемые последовательности. Количество последних можно в некоторой степени снизить, подбирая концентрации чужеродной ДНК и ДНК вектора при лигировании. Кроме того, существуют методы (они описаны ниже), специально разработанные для того, чтобы еще более снизить повторное замыкание в кольцо плазмиды, или для того, чтобы отличить рекомбинанты от нерекомбинантов с помощью генетических методик.

Инактивация в результате вставки

Этот метод может быть использован в случае тех плазмид, которые содержат два или несколько маркеров устойчивости к антибиотикам (рис. I.Г). Очищенную плазмидную ДНК и ту

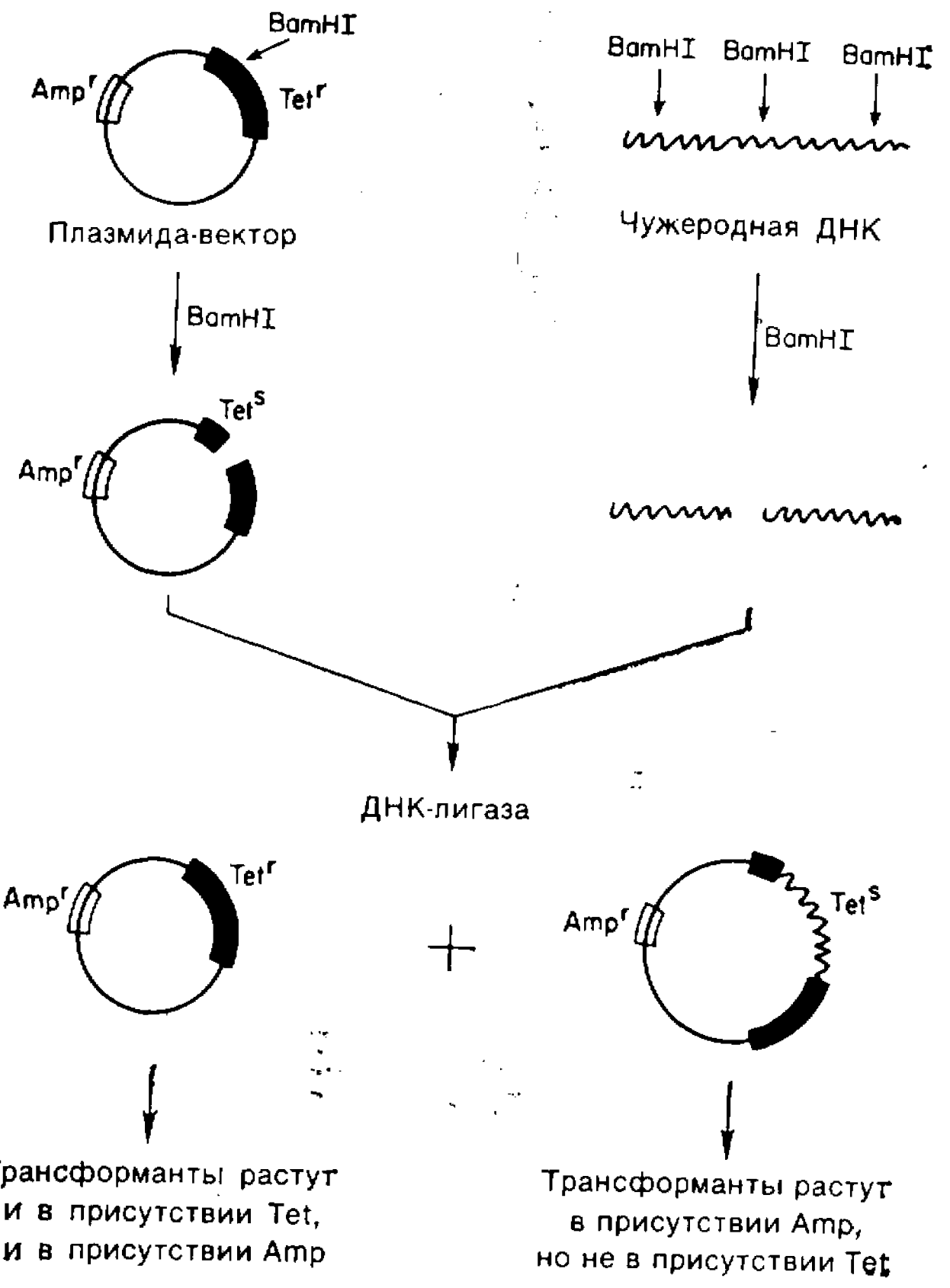


Рис. 1.1. Инактивация в результате вставки.

ДНК, которая должна быть встроена, расщепляют таким рестриктирующим ферментом, который, как в приведенном примере, узнает в плазмиде уникальный сайт, расположенный внутри гена устойчивости к тетрациклину. Проводят лигирование этих двух ДНК в соответствующих концентрациях и лигированной смесью трансформируют, например, чувствительные к ампициллину клетки *E. coli,* так что они становятся устойчивыми к этому антибиотику. Некоторые из колоний, выросших в присутствии ампициллина, будут содержать рекомбинантные плазмиды; другие же будут содержать плазмидную ДНК, которая в процессе лигирования замкнулась в кольцо, не захватив чужеродной ДНК. Чтобы различить эти два типа трансформантов, много колоний наносят штрихами на одинаковые участки чашки с ампициллином и чашки с тетрациклином (рис. 1.2). Те колонии, которые выживают и вырастают в присутствии тетрациклина, со-

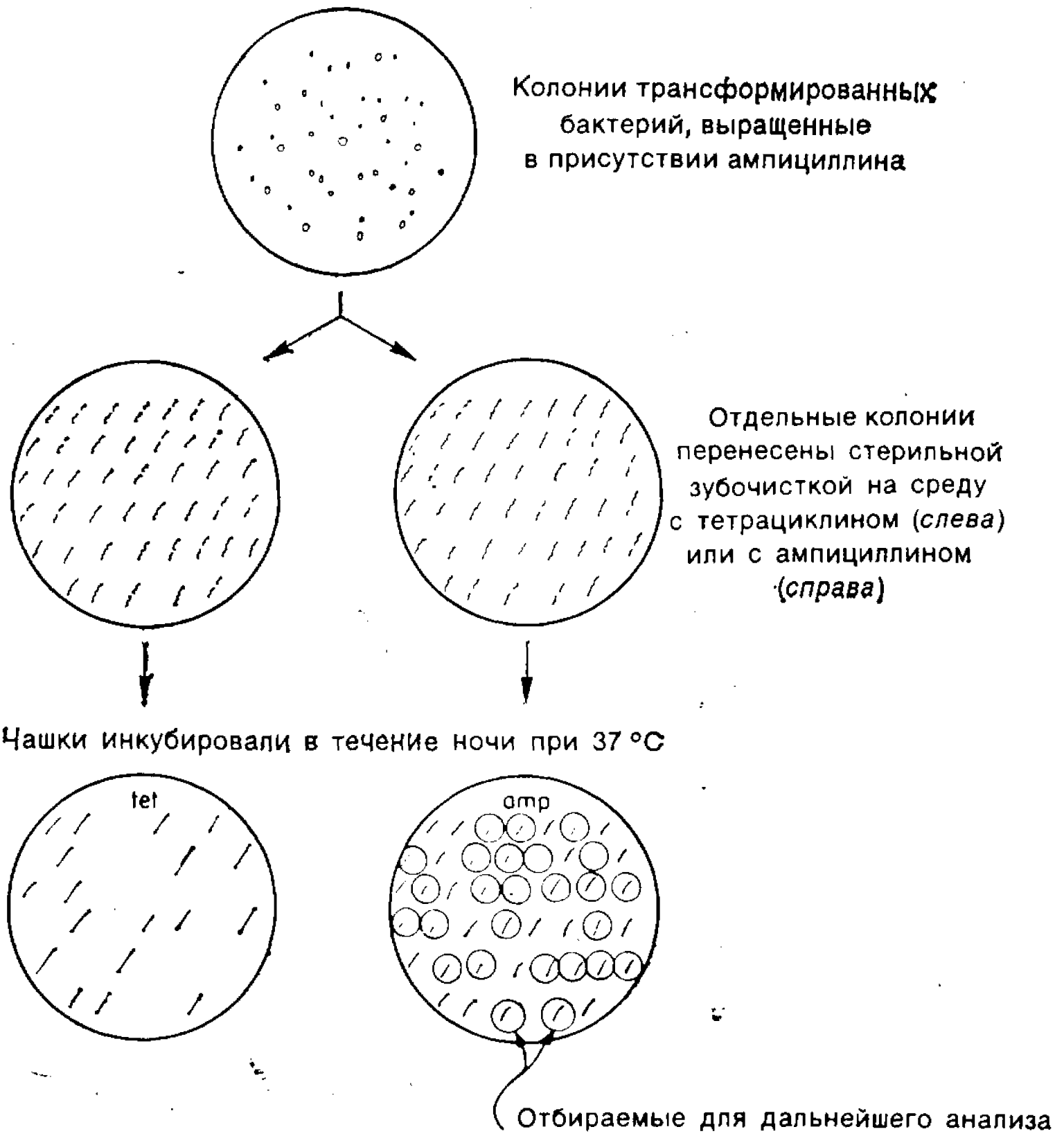


Рис. 1.2. Выявление вставок чужеродной ДНК по инактивации кодируемых плазмидой генов устойчивости к антибиотикам.

держат плазмиды с активным геном устойчивости к тетрациклину. В таких плазмидах вряд ли есть вставки чужеродной ДНК. Те же колонии, которые вырастают лишь на чашке с ампициллином, содержат плазмиды с неактивными генами устойчивости к тетрациклину. В этих плазмидах, вероятно, есть чужеродные последовательности ДНК.

В некоторых случаях разработаны методы, позволяющие использовать положительный отбор для выявления в популяции, в основном устойчивой к антибиотику, тех бактерий, которые к этому антибиотику чувствительны. Пользуясь ими, можно отбирать рекомбинантные плазмиды, у которых ген устойчивости к антибиотику инактивирован в результате вставки в него чуже-

родной последовательности ДНК. Наиболее удобная из таких систем описана в работах Bochner et al., 1980; Maloy, Nunn, 1981. Эти авторы разработали среды с липофильными хелатными соединениями — фузаровой или хинальдиновой кислотой. На таких средах можно проводить прямой положительный отбор клонов Tet^s из популяции бактерий Tet^s и Tet^r. Для большинства штаммов *E. coli* примерно 90% колоний, выросших на среде с тетрациклином и фузаровой кислотой, оказываются Tet^s, если их высевать на среды, содержащие лишь тетрациклин. Таким способом можно из популяции бактерий, трансформированных pBR322 или pAT153, отбирать такие клетки, которые содержат плазмиды со вставками в сайты для *Bam*HI или *Sal*I.

Аналогичная методика была разработана и для отбора бактерий, чувствительных к паромомицину (Slutsky et al., 1980). Она позволяет проводить отбор производных pMK16 со вставками в сайтах для *Sma*I или *Xho*I (Kahn et al., 1979).

Хотя вставка чужеродных последовательностей ДНК в ген устойчивости к антибиотику почти всегда инактивирует этот ген, известен по крайней мере один случай, когда при этом ген остается активным. Вставка сегмента кДНК препроинсулина крысы в сайт *Pst*I плазмиды pBR322 не инактивирует ген устойчивости к ампициллину (Villa-Komaroff et al., 1978). По-видимому, в этом случае встраиваемый небольшой кусок чужеродной ДНК не изменяет рамки считывания гена устойчивости к ампициллину, и образующийся в результате «составной» белок сохраняет β-лактамазную активность.

Клонирование фрагментов в определенной ориентации

Большинство векторных плазмид содержит по одному уникальному сайту узнавания для двух или более рестриктирующих ферментов. Например, плазмида pBR322 содержит по одному сайту для рестриктаз *Hind*III и *Bam*HI (рис. 1.3). С помощью электрофореза в агарозном геле можно выделить больший фрагмент плазмидной ДНК, получающийся при расщеплении ее этими двумя рестриктирующими ферментами, и лигировать его с сегментом чужеродной ДНК, липкие концы которого совместимы с концами фрагмента, образующегося при расщеплении ферментами *Bam*HI и *Hind*III. Получающийся в результате этого кольцевой рекомбинант используют затем для трансформации *E. coli* в устойчивый к ампициллину штамм. Так как одноцепочечные концы разрывов, вызванных *Hind*III и *Bam*HI, некомплементарны друг другу, не может происходить эффективного замыкания в кольцо большого фрагмента вектора, и он трансформирует клетки *E. coli* очень слабо. Поэтому большинство устойчивых к ампициллину колоний содержит плазмиды с встроенными между сайтами *Hind*III и *Bam*HI сегментами чу-

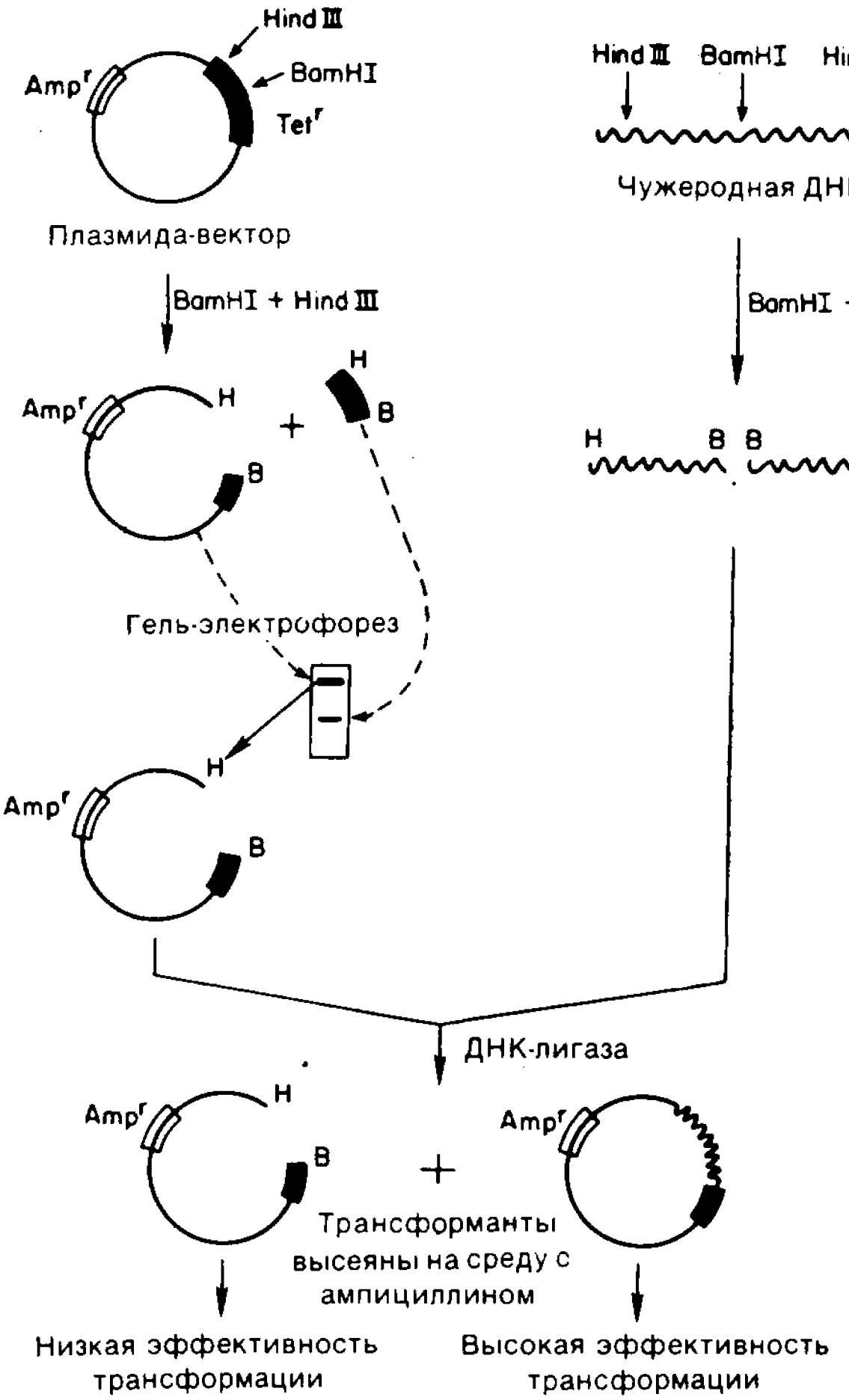


Рис. 1.3. Клонирование фрагментов в определенной ориентации.

жеродной ДНК. В зависимости от сегмента чужеродной ДНК и от локализации сайтов рестрикции в векторе можно, конечно, использовать различные комбинации ферментов.

Обработка фосфатазой линейной ДНК плазмиды-вектора

В процессе лигирования ДНК-лигаза будет катализировать образование фосфодиэфирной связи между соседними нуклеотидами лишь тогда, когда один из них содержит 5′-фосфатную группу, а другой — 3′-гидроксильную группу. Поэтому повторное замыкание в кольцо плазмидной ДНК можно свести к минимуму, если удалить 5′-фосфаты на обоих концах линейной ДНК

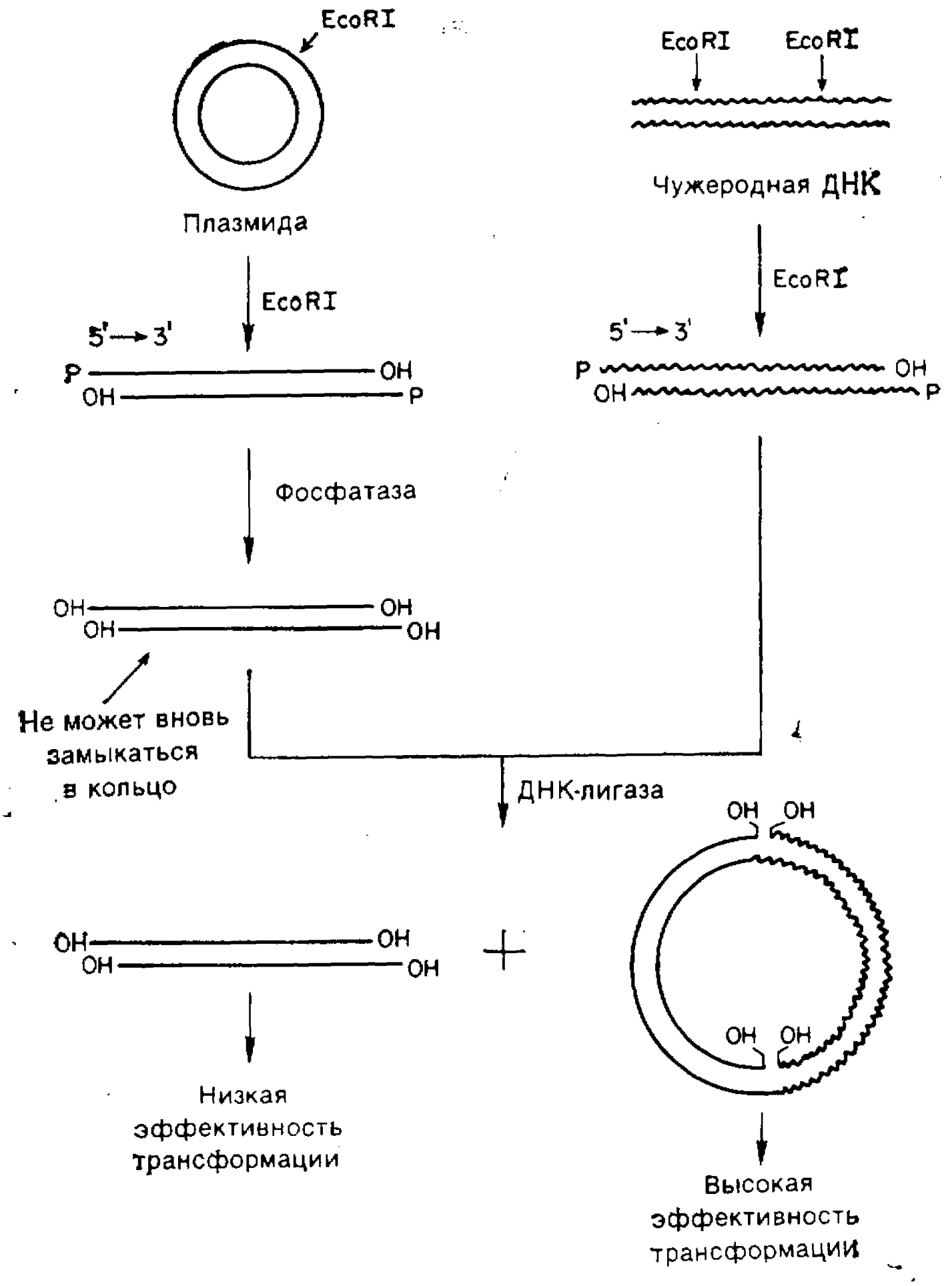


Рис. 1.4. Использование фосфатазы для предотвращения повторного замыкания в кольцо ДНК вектора.

плазмиды, обработав ее бактериальной щелочной фосфатазой или фосфатазой из кишечника крупного рогатого скота (Seeburg et al., 1977; Ulrich et al., 1977). В результате ни одна из цепей дуплекса не сможет образовать фосфодиэфирной связи, и в то же время сохранивший 5′-концевые фосфаты сегмент чужеродной ДНК можно эффективно лигировать с такой дефосфорилированной плазмидной ДНК. В результате образуется открытая кольцевая молекула, содержащая два одноцепочечных разрыва (рис. 1.4). Так как эффективность трансформации кольцевой ДНК (даже содержащей одноцепочечные разрывы) гораздо вы-

ше, чем линейной плазмидной ДНК, то большинство трансформантов будет содержать рекомбинантные плазмиды. Методика обработки плазмидной ДНК фосфатазой приведена на с. 141.

Сложности, возникающие при клонировании в плазмидах больших фрагментов ДНК

Соотношение трансформантов, содержащих рекомбинантные плазмиды, и трансформантов с повторно замкнутым в кольцо вектором может зависеть также от размера встраиваемой чужеродной ДНК. Как правило, чем больше вставка чужеродной ДНК, тем ниже эффективность трансформации. Поэтому при клонировании больших фрагментов ДНК (> 10 kb) особенно важно принять все возможные меры для снижения повторного замыкания в кольцо молекул вектора. Но и в этом случае фон оказывается довольно высоким, и обычно для выявления рекомбинантных трансформантов необходимо использовать гибридизацию in situ (Grunstein, Hogness, 1975; Hanahan, Meselson, 1980).

БАКТЕРИОФАГ λ

С тех пор как впервые было показано, что бактериофаг λ можно использовать в качестве вектора (Murray, Murray, 1974; Rambach, Tiollais, 1974; Thomas et al., 1974), на его основе сконструировано большое число разнообразных векторов (см. обзор Williams, Blattner, 1980). Чтобы эффективно использовать эти векторы, необходимо знать основы молекулярной биологии бактериофага λ (более исчерпывающую информацию см. в работах Herskowitz, 1973; Hendrix et al., 1982).

Бактериофаг λ представляет собой вирус, содержащий двухцепочечную ДНК. Его геном имеет размер около 50 kb (рис. 1.5). ДНК в частицах бактериофага λ находится в виде линейных двухцепочечных молекул с одноцепочечными комплементарными концами длиной по 12 нуклеотидов (липкие концы). Вскоре после проникновения в бактерию-хозяина эти концы слипаются, ДНК замыкается в кольцо и в течение ранней стадии инфекции транскрибируется уже как кольцевая молекула. В ходе этой стадии происходит выбор одного из двух альтернативных путей репликации вируса (рис. 1.6). 1. При литическом развитии кольцевая ДНК многократно реплицируется в клетке, синтезируются большие количества продуктов генов бактериофага, образуются и созревают частицы вирусного потомства. В конце концов клетка лизируется, высвобождая много новых инфекционных вирусных частиц. 2. При лизогенном же развитии геном инфицирующего бактериофага встраивается в ДНК бактерии-

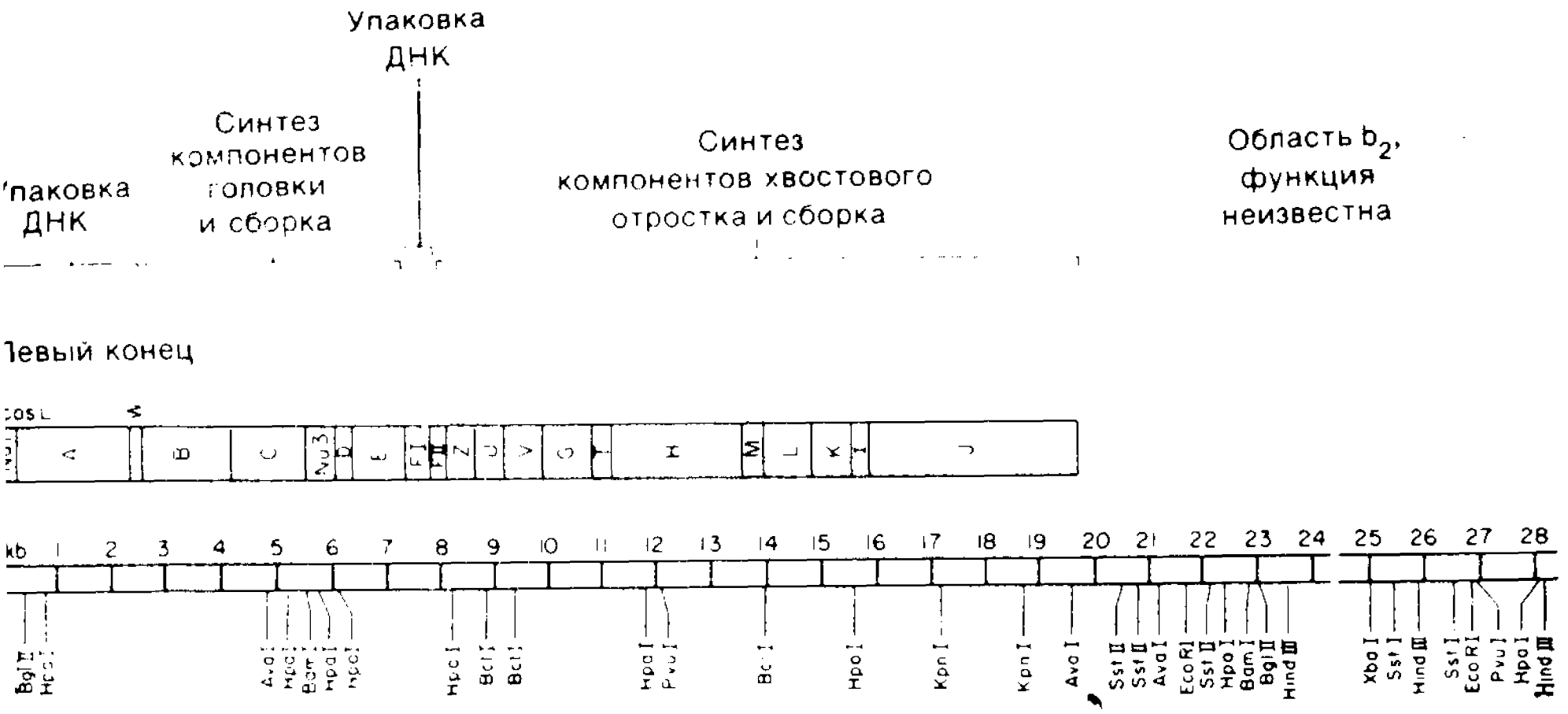


Рис. 1.5. Физическая и генетическая карты бактериофага λ дикого типа. Вверху — литического и лизогенного путей развития. Далее приведена генетическая карта, функции каждого из этих генов см. в работе Hendrix et al., 1982). Внизу приведены молекулы в тысячах пар оснований (kb). Отмечены сайты расщепления рестриктазами. Подробности см. в работе Уильямса и Блаттнера (Williams, Blattner, 1980).

хозяина, последовательно реплицируется и передается клеткам-потомкам как обычный хромосомный ген.

Ниже подробнее описаны те гены и их продукты, которые участвуют в этих двух путях развития бактериофага λ.

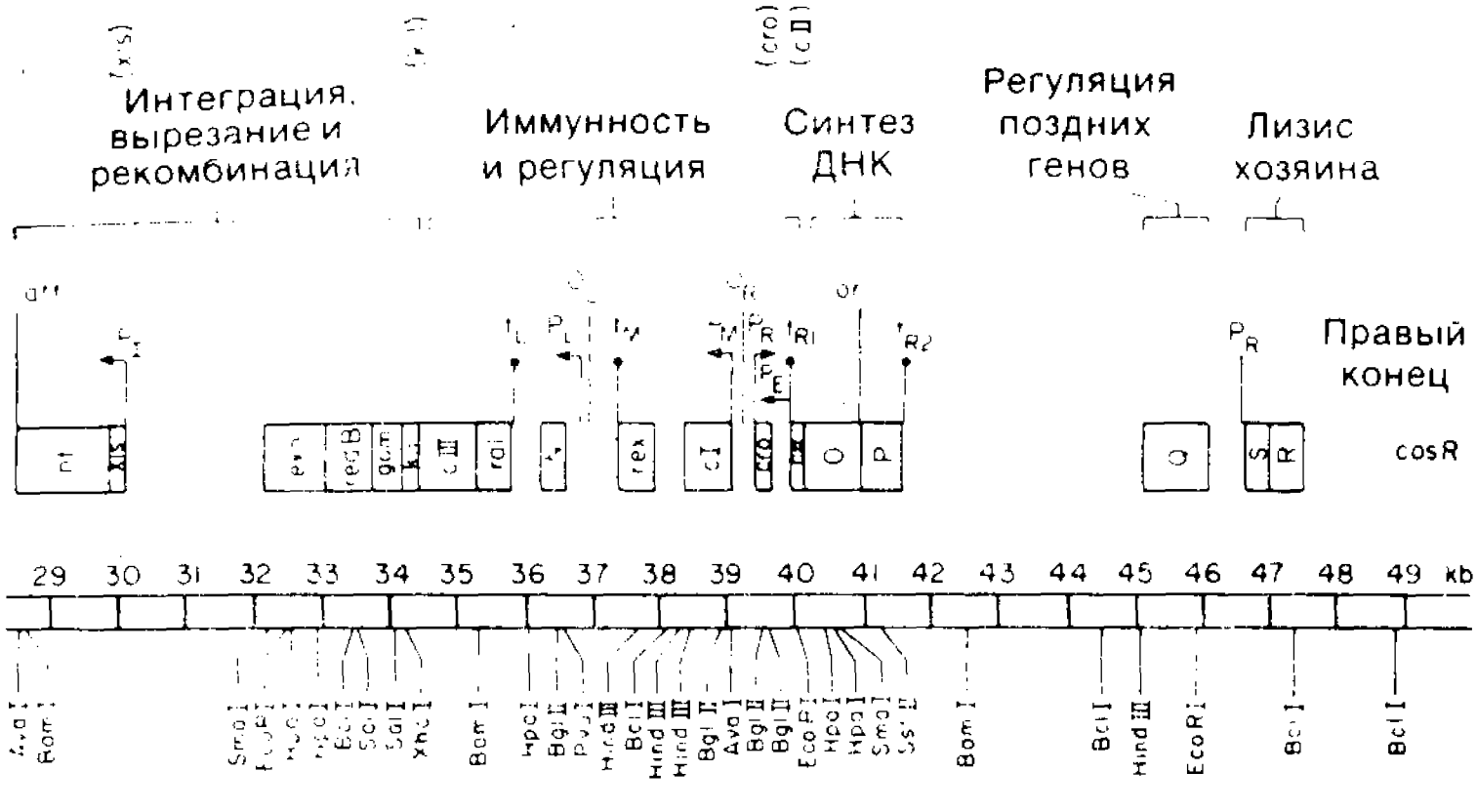
Литический цикл

Немедленная ранняя транскрипция

В начале инфекции транскрипция инициируется на двух промоторах, p_L и p_R, которые расположены непосредственно слева и справа от гена *c*I (кодирующего репрессор) (рис. 1.7). Терминация получающихся при этом «немедленных ранних» РНК происходит в конце генов *N* и *cro* соответственно в сайтах t_L и t_{R1}, хотя рост некоторых правосторонних транскриптов продолжается и далее, через гены *O* и *P* (которые кодируют белки, участвующие в репликации ДНК) и заканчивается в сайте t_{R2}. Левосторонний транскрипт кодирует белок *N*, действие которого необходимо для следующей стадии инфекции.

Задержанная ранняя транскрипция

Белок *N* нейтрализует активность фактора терминации ρ клетки-хозяина и позволяет транскрипции пройти через ранние терминаторы t_L, t_{R1} и t_{R2} в остальную область ранних генов. По-



ху указано обычное расположение генов, кодирующих различные функции ли-
на которой показано положение отдельных генов бактериофага λ (описание
ведена физическая карта ДНК фага λ. Указаны расстояния от левого конца
триктирующими эндонуклеазами. Подробная карта рестрикции приведена в

этому белок *N* является положительным регуляторным элемен-том, активность которого необходима для литического развития бактериофага, обладающего сайтом t_{R2}. Мутанты N^- могут, однако, расти (хотя и относительно плохо), если в результате делеции у них удален сайт t_{R2}. Такие фаги называют мутантами *nin* (*N*-independent — *N*-независимыми).

Репликация ДНК

В течение ранней стадии инфекции кольцевая ДНК фага λ реплицируется двунаправленно в виде структур Кэрнса (или θ-форм). Эта репликация начинается в единственной точке инициации репликации (*ori*) (рис. 1.7), для активации которой необходимы два кодируемых вирусом белка — *O* и *P*. Позднее начинается репликация по типу катящегося кольца (чем определяется переход от структур Кэрнса к катящемуся кольцу — неизвестно) и образуются катенированные линейные молекулы ДНК. В процессе упаковки ДНК продукт гена *A* фага λ расщепляет эти катенаты в сайтах *cos*L и *cos*R, в результате чего получаются те линейные молекулы ДНК единичной длины с липкими концами, которые и оказываются в зрелых частицах бактериофага.

Поздняя транскрипция

Начинающийся с p_R ранний транскрипт кодирует белок *cro*. Накопившись в процессе инфекции, этот белок связывается с o_L и o_R, подавляет присоединение РНК-полимеразы и тем са-

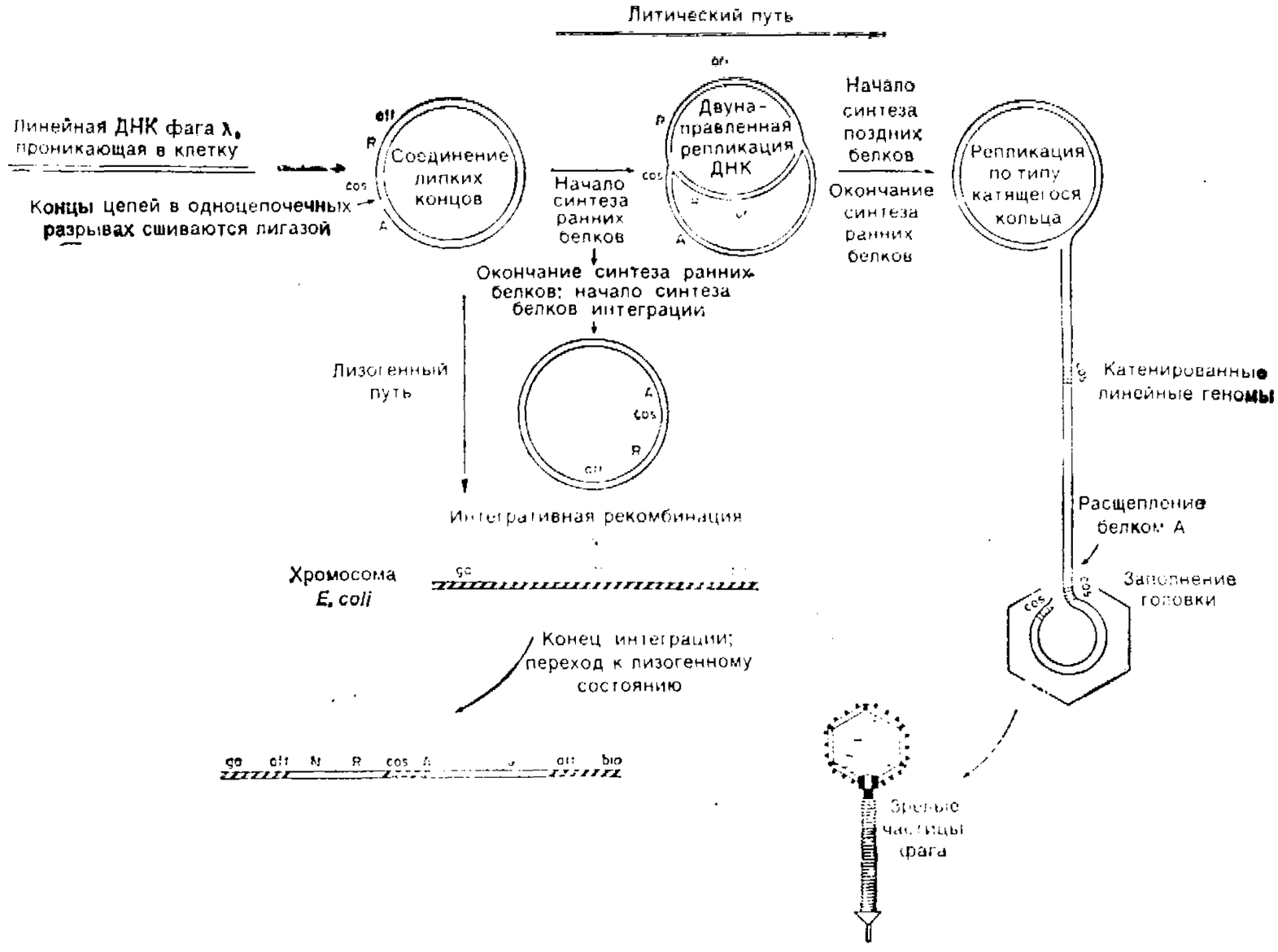


Рис. 1.6. Схема жизненного цикла бактериофага λ. Проникающая в бактерию-хозяина линейная двухцепочечная ДНК фага λ изображена двойной линией. Для литического пути развития, который указан горизонтальной стрелкой, необходимо функционирование как ранних, так и поздних генов. Для лизогенного же пути, который указан вертикальной стрелкой, нужны функции лишь ранних генов.

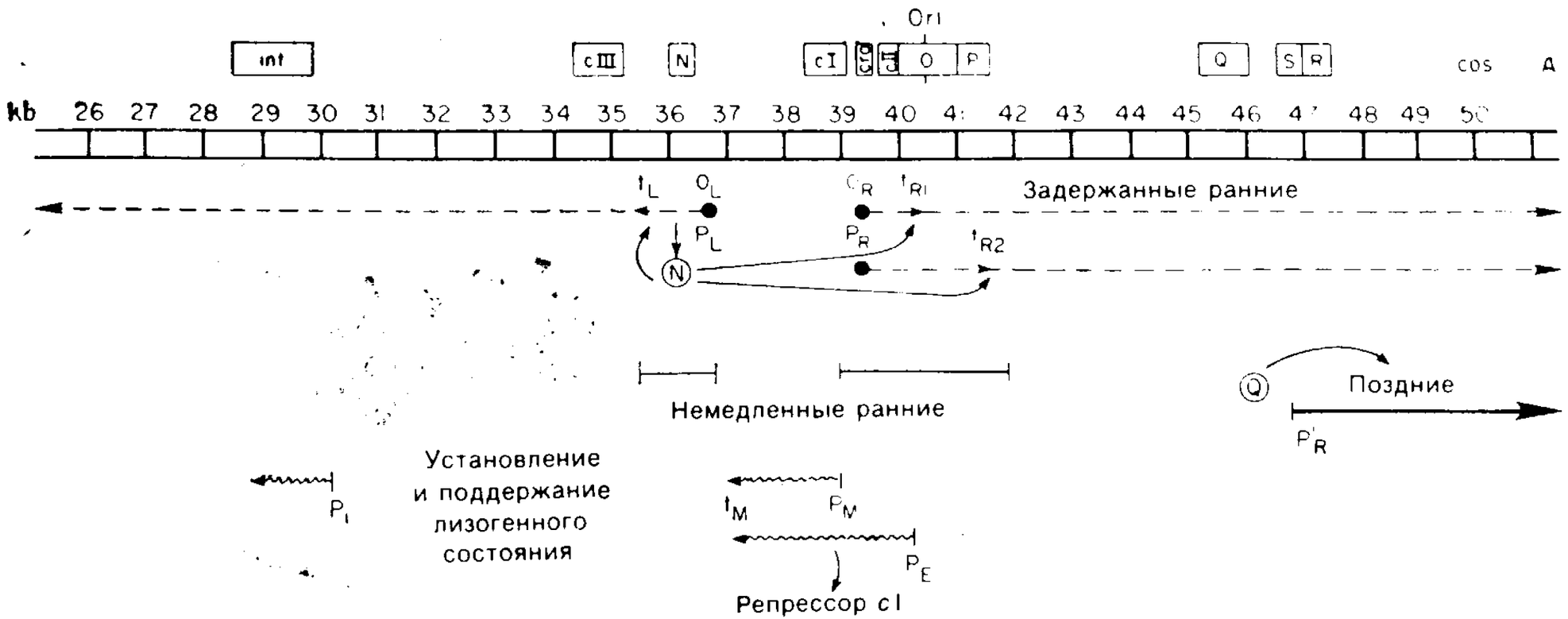


Рис. 1.7. Схема регуляции генов бактериофага λ. Прямоугольниками над картой указаны те гены или сайты ДНК, которые участвуют в регуляции активности генов фага λ (обсуждение функций этих генов см. в тексте). ● промоторы; - - - → продукты транскрипции; t_L, t_{R1} и t_{R2} — сайты терминации, зависимой от фактора ρ; N — продукт гена N, который снимает терминацию в сайтах t_L, t_{R1} и t_{R2}; Q — продукт гена Q, активатор поздней транскрипции с промотора p_R'; ←∿∿— — транскрипты, которые кодируют генные продукты, участвующие в установлении и поддержании лизогенного состояния.

мым выключает транскрипцию с промоторов p_L и p_R. К этому времени, однако, образуется другой регуляторный белок — Q, причем в количествах, достаточных для того, чтобы началась транскрипция поздних генов. Белок Q действует как положительный регулятор синтеза РНК с промотора p'_R, который используется для транскрипции всей поздней области, содержащей многочисленные гены, ответственные за сборку головки и хвостового отростка и за лизис клетки.

Сборка

Два основных компонента зрелых частиц — головка и хвостовой отросток — собираются по отдельности.

Самым ранним из выявленных при сборке головки предшественником является «обнесенная лесами» предголовка (рис. 1.8). Дальнейшее созревание предголовок, в ходе которого происходят удаление белка, выполняющего функцию «лесов», и протеолитическое расщепление других компонентов, зависит от функционирования белка *groE* бактерии-хозяина. В результате получаются структуры, названные предголовками. На первом этапе упаковки ДНК в предголовку участвуют два белка, *Nu*1 и *A*, которые связываются с катенированной линейной ДНК вблизи левого сайта *cos*, но не с самим этим сайтом. Затем такой комплекс присоединяется к определенной области предголовки. В присутствии белка *FI* ДНК укладывается внутри предголовки, размер которой при этом увеличивается примерно на 20%. Когда головка оказывается заполненной, снаружи капсида присоединяется белок *D* («*decoration*» — белок «наружной отделки»), который «обжимает» головку вокруг ДНК. В процессе упаковки левый и правый сайты *cos* на катенированной линейной ДНК оказываются рядом у входа в головку, где они и расщепляются наискосок под действием *ter*-функции белка *A* с образованием липких концов длиной по 12 нуклеотидов. Наконец, заполненные головки объединяются с независимо образованными хвостовыми отростками.

Лизис

Для лизиса клетки-хозяина и высвобождения потомства фага необходимы два фаговых белка, *R* и *S*. Особенно часто используются мутанты по белку *S*, так как при этом внутри клеток накапливаются большие количества фаговых частиц и тем самым повышается выход фага. Мутанты S^- можно высвободить, лизируя клетки хлороформом.

Лизогенизация

В небольшой части зараженных клеток не развертывается литический цикл, а активируется иной путь развития, приводящий к интеграции ДНК фага λ в геном бактерии-хозяина. Вы-

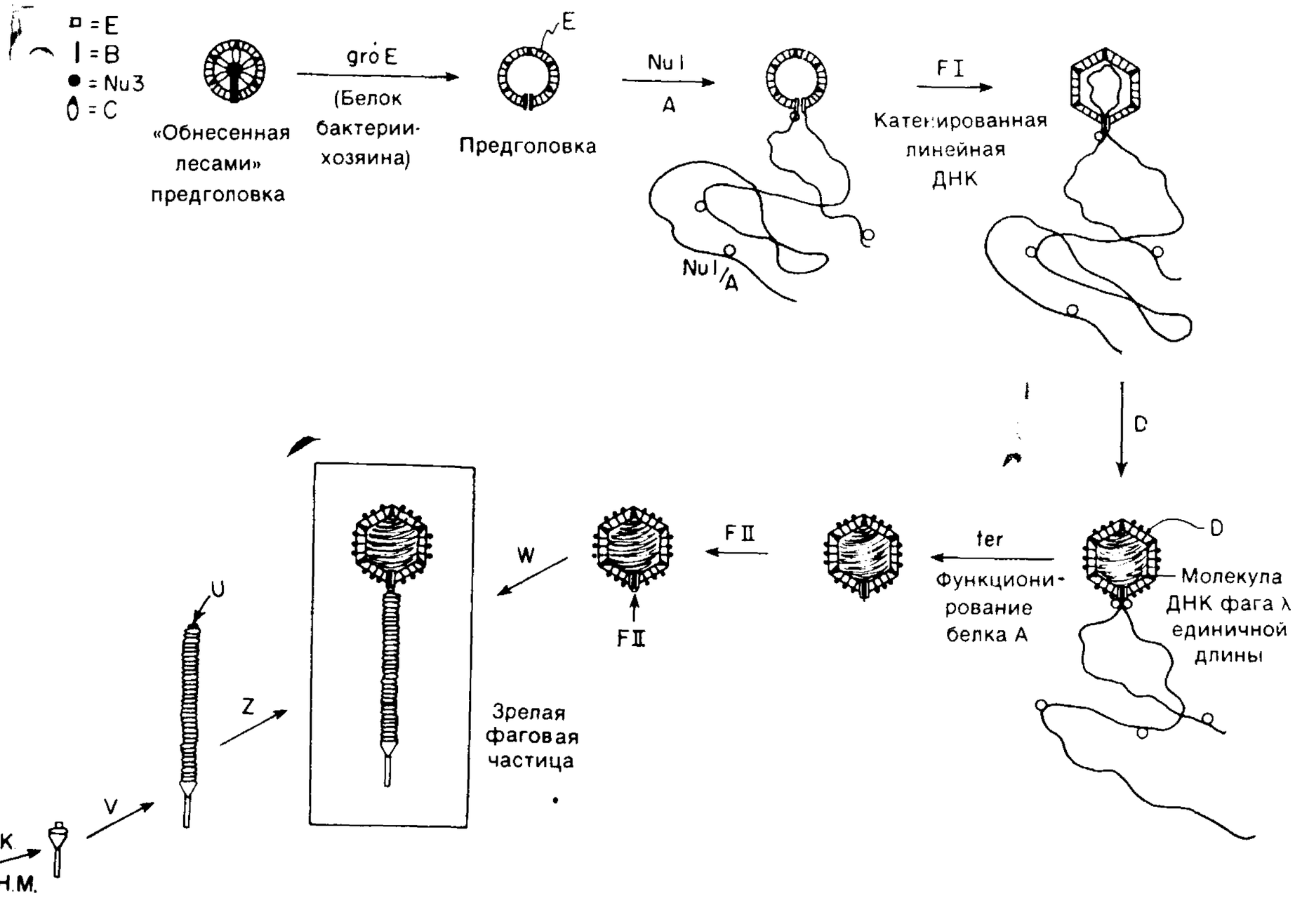


Рис. 1.8. Схема сборки бактериофага λ. Указаны белки, функционирующие на каждом этапе сборки (подробности см. в тексте и в работе Hohn, 1979).

бор между литическим и лизогенным путями развития зависит от сложного баланса многочисленных факторов хозяина и бактериофага в зараженной клетке. Для установления лизогенного состояния белки, кодируемые генами *c*II и *c*III (транскрипция которых контролируется соответственно промоторами p_R и p_L), активируют левостороннюю транскрипцию с промоторов p_E и p_I, так что происходит экспрессия генов *c*I и *int*. Продукт гена *c*I представляет собой репрессор ранней транскрипции, а вследствие этого он блокирует и экспрессию поздних генов. Белок *int* узнает последовательности в *att*-сайтах геномов бактерии и бактериофага и катализирует разрыв и воссоединение, в результате чего вирусная ДНК встраивается в хромосому хозяина.

В интегрированном состоянии репрессирована транскрипция почти всего вируса; экспрессируется лишь ген *c*I. Образующийся продукт этого гена подавляет транскрипцию ранних генов, а кроме того, регулирует и свой собственный синтез. В низкой концентрации продукт гена *c*I вызывает повышение активности промотора p_m — промотора поддержания лизогенного состояния. Высокие концентрации репрессора подавляют транскрипцию с этого промотора. Все эти эффекты обусловлены тем, что продукт гена *c*I связывается с тремя сайтами по 17 нуклеотидов в области o_L и o_R (Johnson et al., 1979).

Бактериофаги с мутациями в генах *c*I, *c*II или *c*III не способны к лизогенизации, поэтому они образуют прозрачные бляшки. Бактериофаги с температурочувствительной мутацией в гене *c*I способны устанавливать и поддерживать лизогенное состояние, лишь пока клетки размножаются при такой температуре, при которой сохраняется способность продукта гена *c*I репрессировать транскрипцию с промоторов p_L и p_R. Можно индуцировать литическое развитие также и профагов, содержащих ген репрессора *c*I дикого типа. Обычно после воздействий, повреждающих ДНК, продукт гена *c*I расщепляется белком, который кодируется геном *recA* хозяина. Как только репрессор повреждается, начинается транскрипция с промоторов p_L и p_R. Затем синтезируется белок *xis*, который вызывает рекомбинацию *att*-сайтов и вырезает ДНК профага из хромосомы хозяина. После этого следует обычный литический цикл.

Конструирование векторов на основе бактериофага λ

На первый взгляд кажется, что из-за большой величины и сложности генома бактериофага λ использование его в качестве вектора не должно быть перспективным. ДНК этого фага содержит по несколько сайтов для многих наиболее полезных для клонирования рестриктирующих ферментов. Часто эти сайты располагаются в тех областях генома, которые существенны для литического развития вируса. Более того, частицы фага не мо-

гут включить такие молекулы ДНК, которые намного длиннее генома самого вируса, и потому, казалось бы, фаг λ можно использовать в качестве вектора лишь для небольших сегментов чужеродной ДНК.

Эти сложности, однако, не столь непреодолимы, как может показаться. Во-первых, центральная треть генома вируса, расположенная между генами *J* и *N* (рис. 1.5), несущественна для литического развития. Проведенные несколько лет назад исследования специализированных трансдуцирующих фагов показали, что с помощью генетических манипуляций in vivo эту область можно заменить любым из многочисленных сегментов ДНК *E. coli* (Campbell, 1971). Очевидно, что бактериофаг λ не нашел бы такого широкого применения в качестве вектора, а возможно, и вообще не был бы использован в этом качестве, если бы не была детально известна структура таких трансдуцирующих фагов и экспрессия их генов.

Во-вторых, знание генетики рестрикции и модификации ДНК позволило отобрать in vivo такие производные λ, у которых удалены все сайты *Eco*RI в существенных областях генома вируса. Поочередным пассированием на штамме *E. coli* K и на штамме K, несущем плазмиду, которая кодирует *Eco*RI, были выделены штаммы фага λ, обладающие лишь одной или двумя мишенями для *Eco*RI, притом в несущественной области генома (Murray, Murray, 1974; Rambach, Tiollais, 1974; Thomas et al., 1974).

Такой метод отбора in vivo оказался успешным лишь потому, что можно было выращивать фаг в хозяевах, синтезирующих интересующий нас рестриктирующий фермент. Чтобы получить векторы, которые можно было бы использовать с другими рестриктирующими ферментами, нужны были иные методы. Так, были сконструированы производные λ с сегментами ДНК из других лямбдоидных фагов (например, φ80), которые либо содержали, либо не содержали желаемые сайты-мишени. Позднее в результате усовершенствования методов упаковки ДНК λ в фаговые частицы оказалось возможным элиминировать нежелательные сайты-мишени уже in vitro. Для этого ДНК бактериофага λ обрабатывают рестриктирующим ферментом, «пережившие» такую обработку молекулы упаковывают in vitro в частицы и размножают в клетках *E. coli*. После нескольких таких последовательных циклов получают фаги с геномами, которые в результате мутаций утратили сайты-мишени, но сохранили инфекционность (Murray, 1977).

С помощью этих подходов, использованных как по отдельности, так и в различных сочетаниях, создано большое число векторов, способных включить в разнообразные рестрикционные сайты чужеродную ДНК и размножить ее (см. Williams, Blattner, 1980). Производные, имеющие единственный сайт-мишень, в который встраивается чужеродная ДНК, называют *инсерци-*

онными векторами. Те же, которые обладают двумя сайтами с находящимся между ними участком, который можно вырезать и заменить чужеродной ДНК, называют *векторами замещения.*

Клонирование с помощью векторов на основе бактериофага λ включает несколько этапов:

1. ДНК вектора подвергают полному расщеплению соответствующим рестриктирующим ферментом. В случае векторов замещения правое и левое «плечи» отделяют от центральных «балластных» фрагментов с помощью центрифугирования в градиенте плотности или с помощью электрофореза в геле.

2. Затем плечи вектора лигируют в присутствии фрагментов чужеродной ДНК, концы которых подходят к концам плеч.

3. Получающиеся в результате рекомбинантные ДНК упаковывают in vitro в жизнеспособные частицы бактериофага, которые образуют бляшки на соответствующих хозяевах.

4. Затем выявляют те рекомбинантные фаги, которые несут нужные последовательности чужеродной ДНК. Как правило, для этого используют гибридизацию нуклеиновых кислот.

Выбор подходящего вектора

Единого вектора на основе бактериофага λ, который был бы пригоден для клонирования любых фрагментов ДНК, не существует. Поэтому необходимо тщательно выбрать из имеющихся векторов тот, который лучше всего подходит для данной задачи. Этот выбор зависит от типа используемого рестриктирующего фермента (ферментов) и от размера встраиваемого фрагмента чужеродной ДНК.

Для литического развития фага необходимы лишь примерно 60% генома вируса (левое плечо длиной ~20 kb, включающее гены $A-J$, которые ответственны за синтез головки и хвостового отростка, и правое плечо от промотора p_R до сайта *cos* R включительно). Поэтому среднюю часть генома, которая несущественна для литического цикла развития, можно заменить чужеродной ДНК. Однако жизнеспособность фага резко снижается, если в частицу упакована ДНК длиннее 105% или короче 78% генома фага дикого типа. Поэтому важно подобрать такое сочетание вектора и чужеродной ДНК, чтобы размер ДНК рекомбинантного фага укладывался в эти пределы. Иногда эти ограничения несут с собой определенные преимущества. После удаления у некоторых векторов замещения центральной «балластной» части образованный при слиянии левого и правого плечей геном с делецией оказывается слишком коротким, чтобы он мог упаковаться. Поэтому при использовании таких векторов происходит отбор рекомбинантных фагов. Более того, у некоторых векторов «балластный» фрагмент сообщает фагу легко выявляемый фенотипический признак. Например, существуют век-

торы с фрагментом ДНК *E. coli*, кодирующим β-галактозидазу. Такие векторы при высеве их на газон клеток *lac*⁻ в присутствии хромогенного субстрата 5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-галактозида (Xgal) образуют ярко-синие бляшки. При использовании для клонирования таких векторов бóльшая часть гена β-галактозидазы замещается чужеродной ДНК. Получающиеся при этом рекомбинантные фаги можно выявить по тому, что они образуют на газоне бактерий *lac*⁻ в присутствии Xgal бесцветные бляшки (см. Miller, 1972).

Наконец, существуют такие векторы, при конструировании которых используют тот факт, что рост фага λ дикого типа в клетках, лизогенных по фагу P2, ограничен. Такой фенотип фага λ обозначается Spi (sensitive to **P2** interference — чувствительность к подавлению фагом P2). Однако штаммы λ, у которых отсутствуют два участвующих в рекомбинации гена (*red* и *gam*), но есть последовательность *chi*, имеют фенотип Spi⁻ и хорошо растут в клетках, лизогенных по P2 (Zissler et al., 1971). (Как будет обсуждаться ниже, сайт *chi* служит субстратом при рекомбинации, катализируемой системой *recA*.) При клонировании в таких векторах, как λL47.1, λ1059 или λBF101 (см. с. 58—59, 62- 63, 64—65 соответственно), из них удаляется «балластный» фрагмент с генами *red* и *gam*. Образующиеся в результате рекомбинантные фаги оказываются Spi⁻, и их можно выявить или отобрать по их способности развиваться в клетках *E. coli recA*⁺, лизогенных по P2.

Первоначально мутации *chi* были обнаружены как супрессоры фенотипа «мелкие бляшки», которые нормально образуются при высеве бактериофага *red*⁻ *gam*⁻ на штаммах *E. coli* дикого типа. Позднее Сталь и др. (Stahl et al., 1975; Stahl, 1979) обнаружили, что мутации *chi* являются горячими точками *rec*-зависимой рекомбинации. Поэтому супрессию фенотипа «мелкие бляшки» можно объяснить следующим образом.

Обычно продукт гена *gam* бактериофага λ выводит из строя очень активную экзонуклеазу, кодируемую системой *recBC* хозяина. В отсутствие продукта гена *gam* экзонуклеаза *recBC* вызывает деградацию катенированной линейной ДНК фага λ, которая образуется при репликации по типу катящегося кольца. В этом случае субстратом при упаковке в частицы бактериофага могут служить лишь устойчивые к экзонуклеазе кольцевые замкнутые димеры, образующиеся при репликации через θ-форму и при последующей рекомбинации. В отсутствие мутации *chi* этот процесс рекомбинации оказывается неэффективным, и потому образуются мелкие бляшки.

Так как большинство векторов на основе бактериофага λ после удаления «балластной» ДНК оказываются *red*⁻*gam*⁻, для создания представительных библиотек необходимо наличие мутации *chi* в одном из плеч фаговой ДНК. Поскольку во всех до

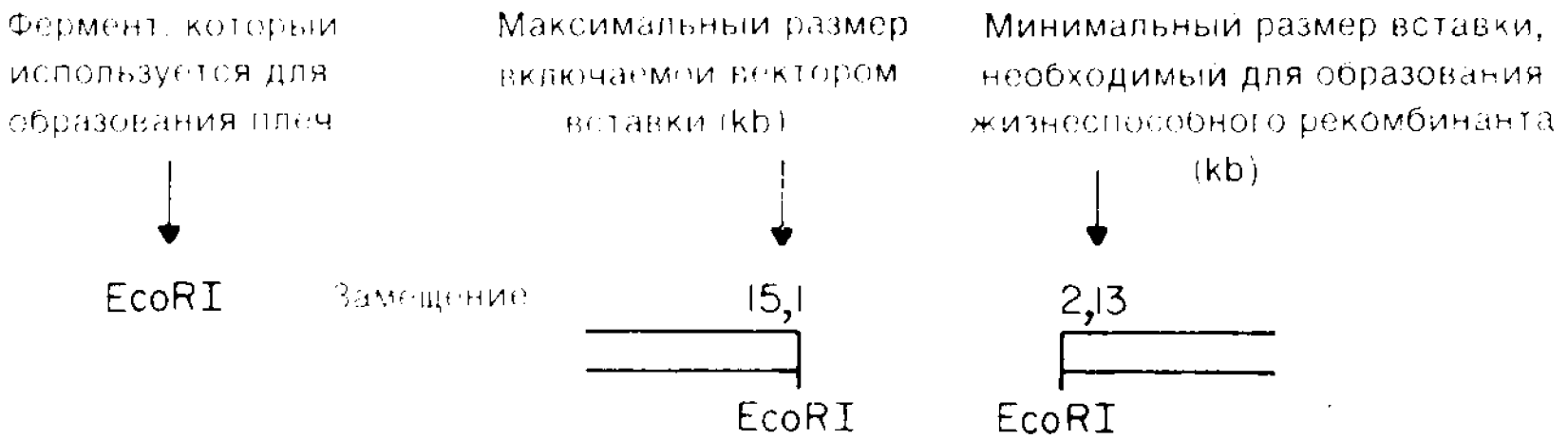
сих пор изученных эукариотических ДНК обнаружены последовательности *chi*, некоторые рекомбинантные фаги будут содержать вставки, случайно несущие такие последовательности. Поэтому у рекомбинантов, созданных на основе векоторов без сайта *chi* и становящихся после замещения «балластного» фрагмента gam^- (например, вектор λ Харон 28), размер бляшек сильно варьирует. Более того, те рекомбинанты, которые со вставкой случайно получили сайт *chi*, обладают селективным преимуществом по сравнению с теми, кто такого сайта не получил, и в результате при амплификации библиотек они оказываются представленными в избыточном количестве. Этого осложнения можно избежать, если использовать такие векторы, как λ1059 и λL47.1, которые содержат сайты *chi* соответственно в правом и в левом плечах. Поэтому бляшки рекомбинантов в этом случае получаются примерно одинаковыми по величине.

Заметим, что почти все векторы замещения при удалении «балластного» фрагмента утрачивают ген *gam*. Поэтому рекомбинанты, полученные при использовании этих векторов, нужно размножать на бактериях $recA^+$. Единственное исключение составляет вектор λsep6-lac5, у которого гены *red* и *gam* находятся в правом плече. Рекомбинанты, образованные при использовании этого вектора, являются Spi^+, и их можно размножать на бактериях с мутациями $recA^-$.

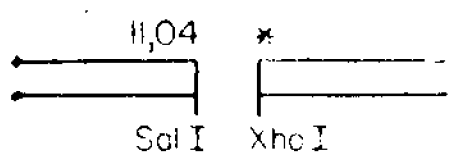
Карты векторов на основе бактериофага λ

Все карты векторов на основе бактериофага λ изображаются следующим образом. Сверху приводится шкала в тысячах пар оснований (kb). На следующей строке указываются сайты рестрикции и положение основных генов в ДНК фага λ дикого типа. Ниже приводится сама карта вектора. Светлыми прямоугольниками изображаются те области вектора, которые получены от ДНК фага λ дикого типа. Они располагаются непосредственно под соответствующими участками карты фага дикого типа. Над этими светлыми прямоугольниками указываются специфические мутации (например, *Wam* или *ts*). Над светлыми прямоугольниками буквами «х» обозначаются те рестрикционные сайты, которые в процессе создания вектора при отборе in vivo или in vitro удаляются из последовательности дикого типа. Одиночной чертой указываются делеции последовательности λ дикого типа. Вставки и замещения обозначаются прямоугольниками с косой штриховкой (вставки из *E. coli*), с горизонтальной штриховкой (вставки из фага φ434), прямоугольниками с точками (замещения или вставки из фага λ) или зачерненными прямоугольниками (вставки из фага φ21). Пунктиром обозначаются сопутствующие делеции последовательности λ дикого типа. На карте вектора указываются те сайты рестрикции, которых нет в ДНК фага

λ дикого типа. Под картой вектора справа приводится примерное расстояние [в парах оснований от левого (L) конца] различных сайтов рестрикции для широко используемых рестриктаз. Приводятся наиболее достоверные данные, хотя точность даже их довольно невелика. Ниже карты вектора слева дается таблица возможных комбинаций ферментов, которые удобно использовать для клонирования в этом векторе. Отмечается также, оказывается ли вектор в данном случае вектором замещения или инсерционным вектором. Правее рисуются схемы клонирующих переносчиков, получающихся при расщеплении вектора соответствующими рестриктазами. Над каждой схемой указываются максимальные (слева) и минимальные (справа) размеры фрагментов (в kb), которые можно клонировать в данном случае.



В некоторых случаях, когда левое и правое плечи вектора получены при расщеплении разными рестриктазами, на схеме ставится звездочка (*). Она указывает на то, что вставка чужеродной ДНК нужна не только для того, чтобы величина генома рекомбинанта оказалась достаточной для упаковки, но и для того, чтобы было возможно эффективное соединение левого плеча вектора с правым при лигировании:



В табл. 1.1 описаны многие генетические маркеры, используемые в векторах на основе бактериофага λ.

КОСМИДЫ

Создание библиотек в векторах на основе бактериофага λ оказалось эффективным способом выделения специфических фрагментов ДНК из сложных геномов эукариот. Однако ограниченная емкость клонирующих векторов на основе бактериофага λ (<23 kb) иногда создает препятствие на этом пути: некоторые гены оказываются слишком большими, чтобы их можно было

Таблица 1.1. Генетические маркеры, используемые в векторах на основе бактериофага λ

*lac*5 *bio*1 *bio*256	Замещения из областей *lac* и *bio E. coli*
att^{80} imm^{80} QSR^{80}	Замещения из бактериофага ϕ 80
imm^{21}	Замещение из бактериофага ϕ 21
int^{29}	Замещение из бактериофага ϕ 29
KH100	Вставка, содержащая сайт для *Eco*RI
pacI 29	Плазмиды ColE1 с клонированными *att*-сайтами бактериофага λ
BW1	Делеция, приводящая к утрате сайта для *EcoRI* в гене *O*
*b*1007	Делеция области *b*, повреждающая *att*-сайт и потому препятствующая лизогенизации
KH53	Делеция в области бактериофага ϕ 80, аналогичной области *c*I фага λ, в результате чего эффективно предотвращается лизогенизация
KH54	Делеция в области *rex-c*I, которая эффективно препятствует лизогенизации
nin 5	Делеция, которая удаляет сайт t_{R2} терминации транскрипции и тем самым приводит к тому, что задержанная ранняя транскрипция становится независимой от продукта гена *N*
nin L 44	Делеция, удаляющая сайт *Bam*HI вблизи гена *ral*
*c*I857	*ts*-Мутация, приводящая к термолабильности продукта гена *c*I
chi	Специализированные сайты в бактериофаге λ, необходимые для рекомбинации

клонировать в виде одного фрагмента ДНК. Например, ген α-2 коллагена цыпленка длиной около 38 kb (Vogeli et al., 1980; Wozney et al., 1981) был выделен из генома в виде набора перекрывающихся клонов (Ohkubo et al., 1980). Кроме того, возможность клонирования больших по размерам фрагментов ДНК существенно облегчила бы трудоемкий процесс поэтапного размещения перекрывающихся клонов вдоль хромосомы.

Векторами, специально предназначенными для клонирования больших фрагментов эукариотической ДНК, являются космиды, которые были впервые сконструированы Коллинзом и Хоном (Collins, Hohn, 1978). Космидные клонирующие векторы обязательно обладают следующими свойствами: 1) несут маркер устойчивости к какому-либо лекарственному препарату и имеют точку инициации репликации плазмиды; 2) содержат единичные сайты для одной или нескольких рестриктаз, которые можно использовать для клонирования; 3) включают фрагмент ДНК, содержащий лигированные липкие концы (*cos*) бактериофага λ; 4) обладают столь малым размером, что способны включать фрагменты эукариотической ДНК длиной до 45 kb.

Основные принципы клонирования в космидах проиллюстрированы на рис. 1.9. Сначала составляют смесь для лигирования, содержащую в высокой концентрации расщепленные какой-нибудь рестриктазой ДНК космиды и чужеродную ДНК. Среди продуктов лигирования будут катенаты, в которых чужеродная ДНК соединена с молекулами космиды таким образом, что оба сайта *cos* находятся в одной ориентации и вся плазмида оказывается между этими двумя сайтами *cos*. Когда такие молекулы упаковывают in vitro в частицы фага (с. 283—286), то находящиеся по краям чужеродной ДНК сайты *cos* под действием функции *ter* белка *A* бактериофага λ расщепляются, а расположенная между ними ДНК упаковывается в зрелые частицы бактериофага. При заражении *E. coli* такими частицами рекомбинантная ДНК попадает в клетку и с помощью фаговых липких концов замыкается в кольцо. Такой рекомбинант содержит полную копию генома космиды, и потому он реплицируется как плазмида и происходит экспрессия маркера устойчивости к данному лекарственному препарату.

При упаковке рекомбинантных молекул в частицы бактериофага происходит отбор рекомбинантов с общей длиной (т. е. суммарной длиной космиды и чужеродной ДНК) 40—50 kb. Оптимально сконструированные космидные векторы имеют длину 4—6 kb (Hohn, Collins, 1980; Meyerowitz et al., 1980; Ish-Horowicz, Burke, 1981), поэтому они могут включить фрагмент чужеродной ДНК длиной до 45 kb.

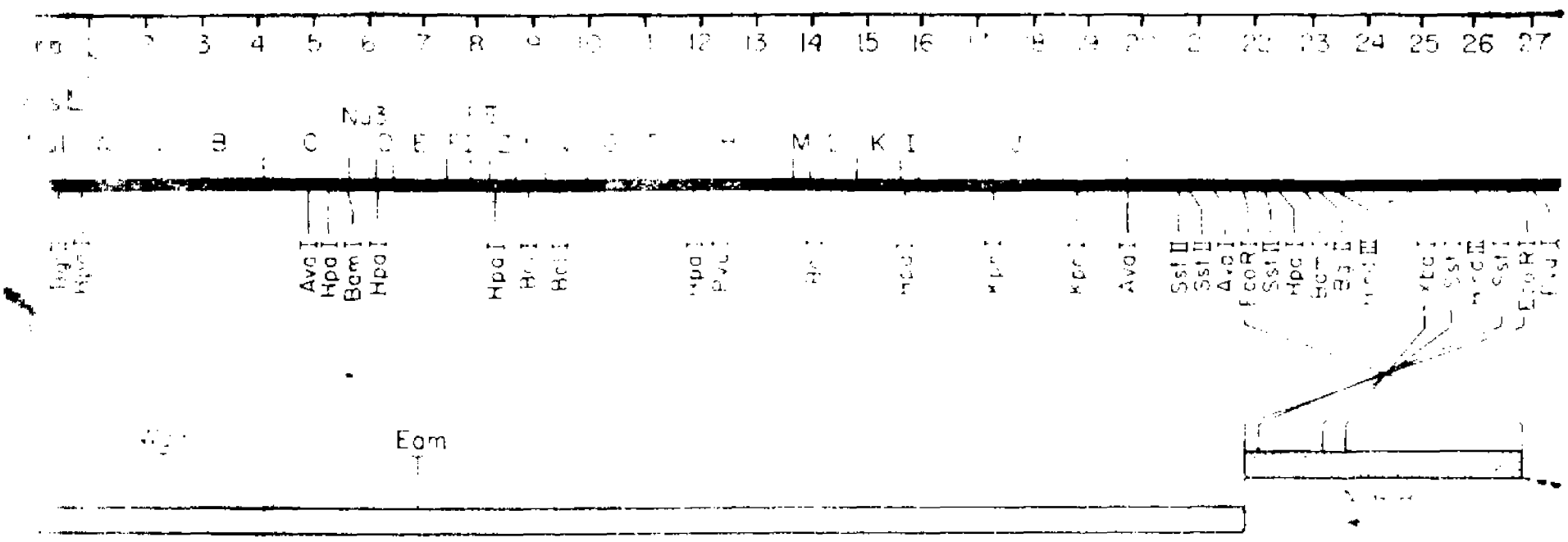
Несмотря на преимущества, которые несет с собой возможность клонировать фрагменты ДНК больших размеров, космиды пока не заменили бактериофаг λ в качестве вектора, используемого для создания библиотек геномных ДНК эукариот. Это связано с рядом технических трудностей, которые удалось разрешить лишь недавно. Затруднения эти состоят в следующем.

1. Происходит лигирование векторов друг с другом; внутримолекулярная рекомбинация между двумя или более векторами в составе одной космиды может привести к выщеплению такого космидного вектора, который будет реплицироваться быстрее, а это приведет к постепенной утрате космиды при сегрегации.

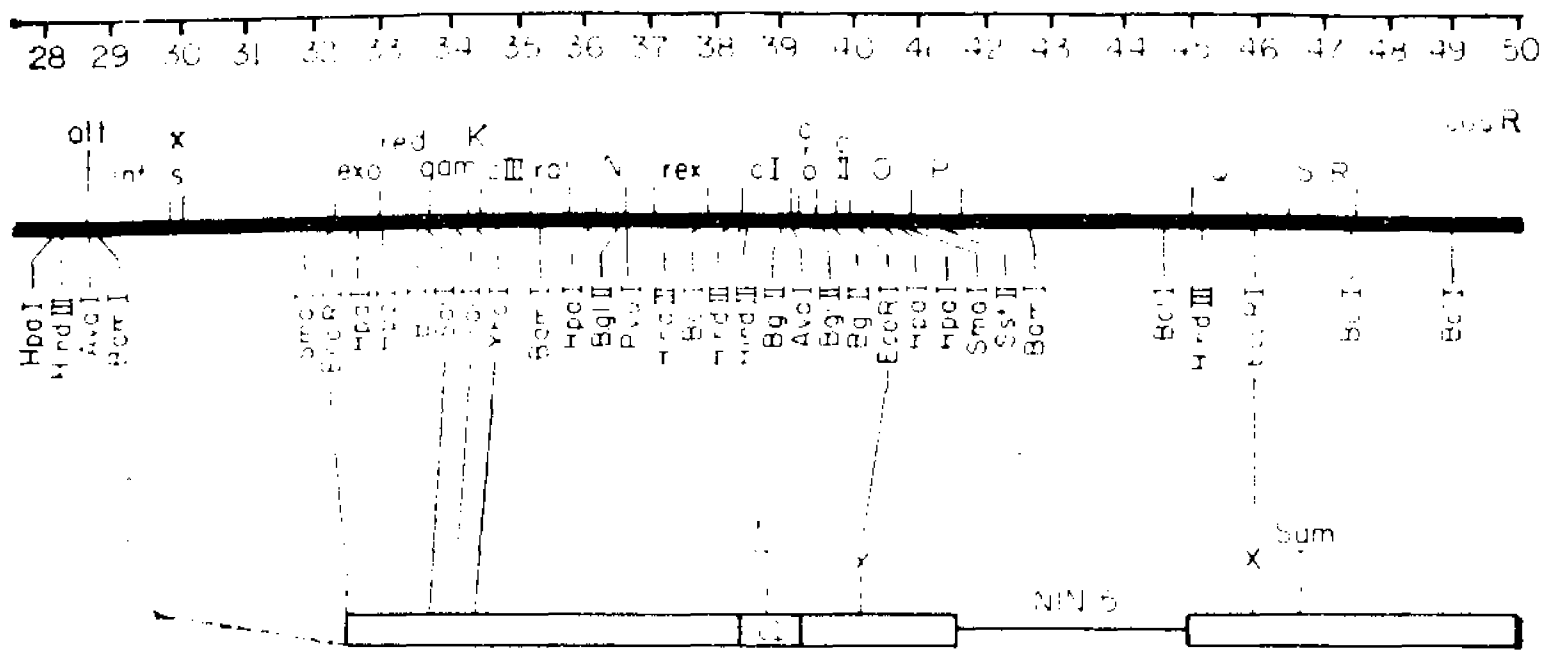
2. Получается «свалка», т. е. встраивание в одну и ту же молекулу вектора двух или более таких фрагментов, которые не были рядом в исходном геноме.

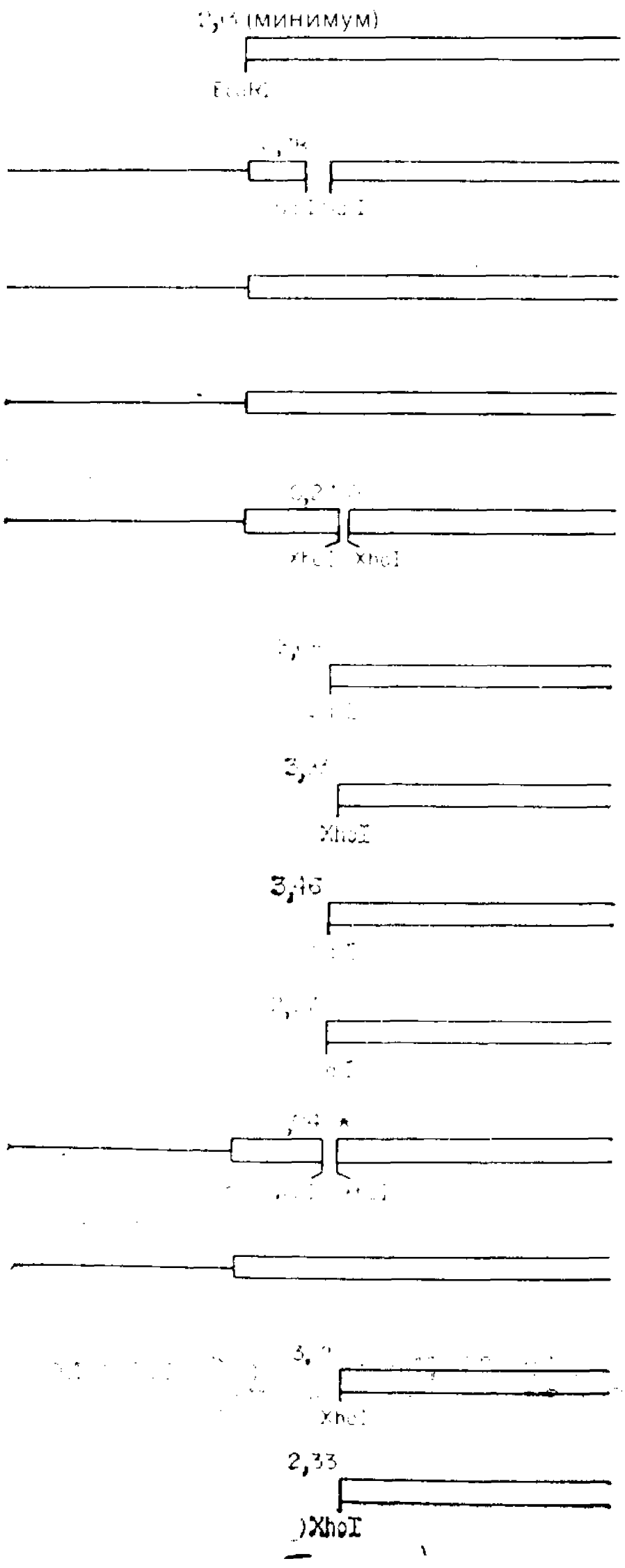
3. Сложно проводить скрининг большого числа колоний бактерий.

Первую проблему можно разрешить, если линеаризованную плазмидную ДНК обработать щелочной фосфатазой, что предотвратит лигирование молекул векторной ДНК друг с другом (Meyerowitz et al., 1980; Grosveld et al., 1981). Используя такую процедуру, удалось создать библиотеку ДНК *D. melanogaster* в космиде MUA-3 размером 4,4 kb (Meyerowitz et al., 1980).



Фрагмент	Вставка/замещение	
E… F1	Замещение	(максимум) 15,13
Sa… I	Замещение	
…I	Замещение	
Xba I	Вставка	
Xho I	Вставка	
E… Sa… I	Замещение	
E… Xho I	Замещение	
Ss… I Sa… I	Замещение	
Xba I Sa… I	Замещение	
Sa… I Xho I	Замещение	
Ss… I Xba I	Замещение	
Ss… I Xho I	Замещение	
Xba I Xho I	Замещение	

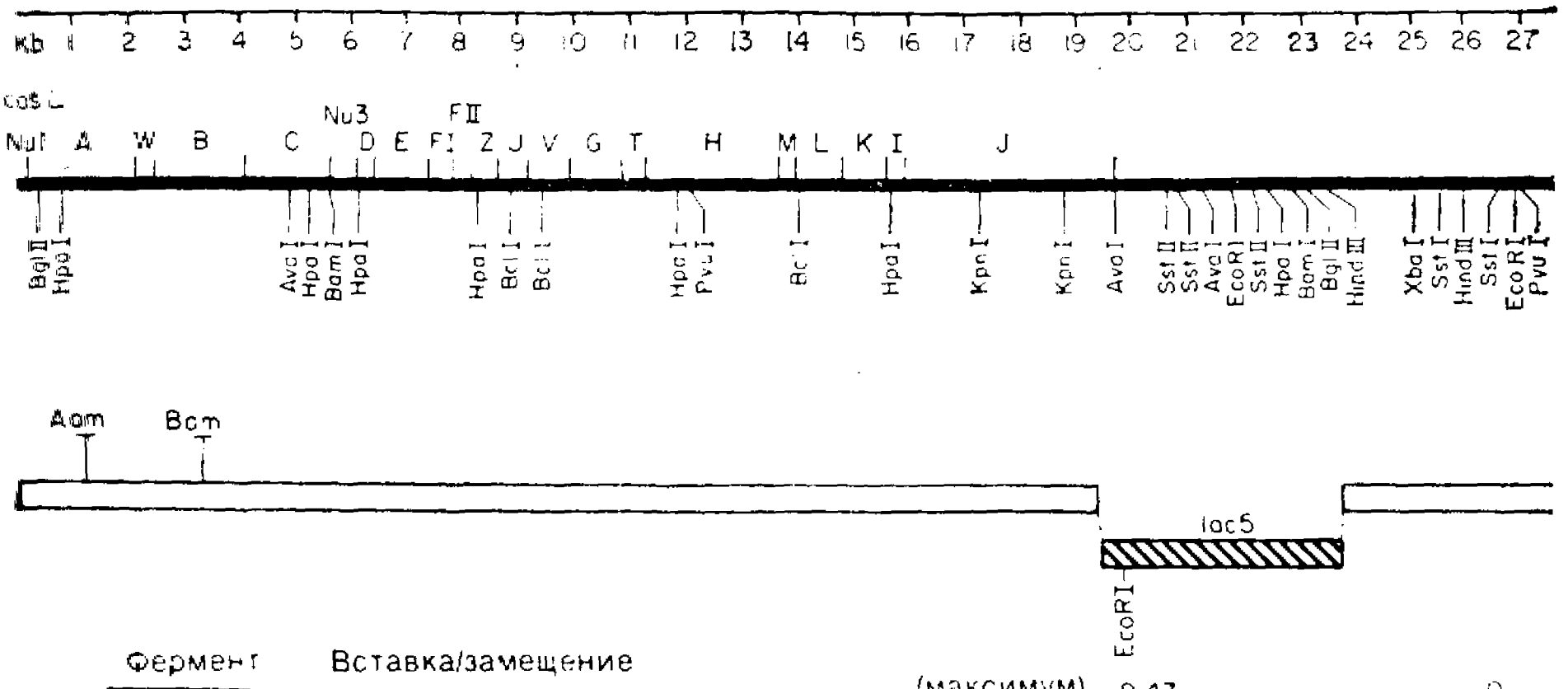




Положение сайтов рестрикции

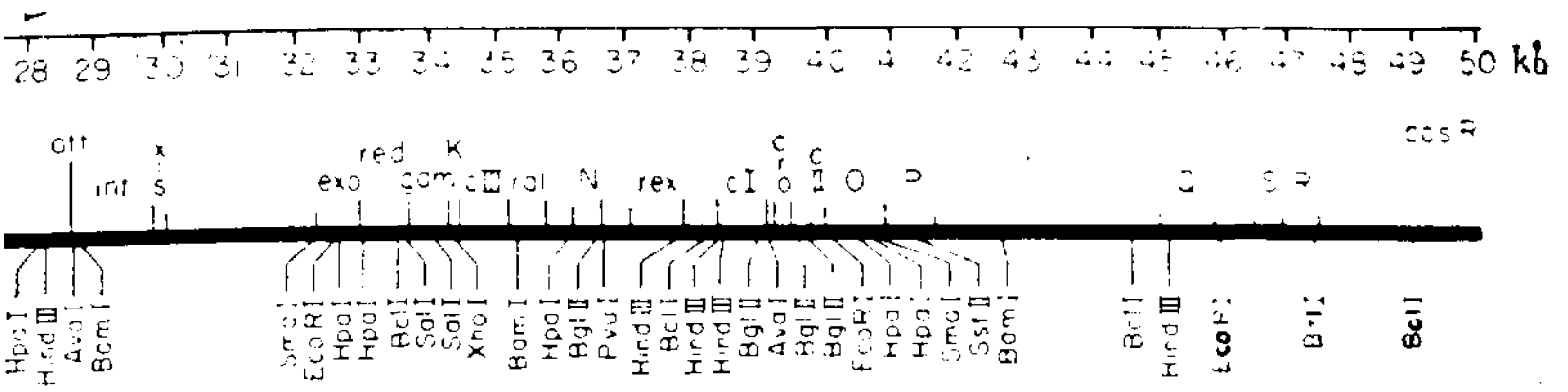
L конец	0
Bgl II	470
Bam I	5560
Kpn I	17430
Kpn I	18950
EcoRI	21710
Sst I	21930
Hind III	22660
Sst I	23040
Xba I	23310
Hind III	24630
Bgl II	25340
Bam I	25430
EcoR1	26560
Sal I	27610
Sal I	28110
Xho I	28370
Bam I	29370
Hind III	31800
Hind III	32380
Bgl II	33020
Bgl II	33680
Bgl II	33740
Hind III	36260

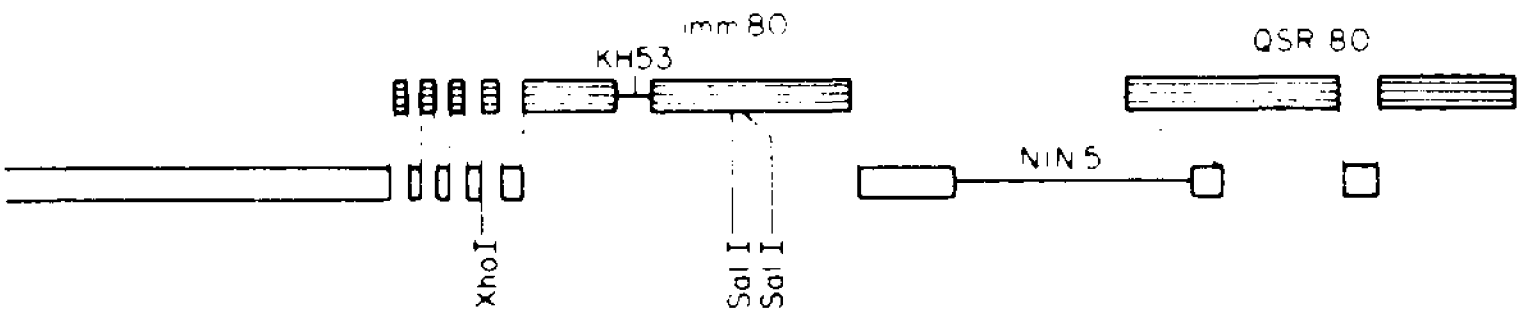
λgt WES-λB
Общая длина: 40,4 kb
Генетические маркеры: Wam403, Eam1100, Sam100, cI_{857}ts. Нуждается в бактерии-хозяине с супрессором supF
Литература: Leder P., Tiemeier D., Enquist L., 1977, Science, **196**, 175
Примечание: Этот вектор широко используется для клонирования EcoRI-фрагментов средних размеров. Он получен из исходного фага λgt-λB (Struhl et al., 1976)

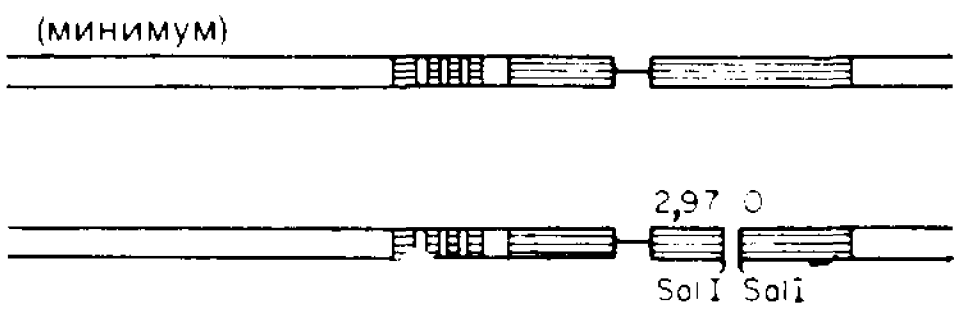


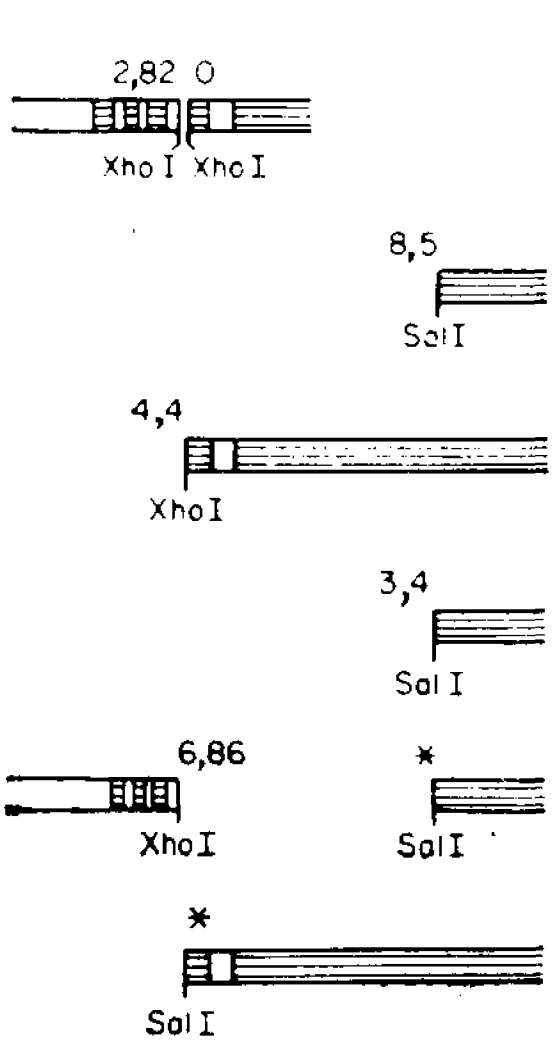
Фермент	Вставка/замещение
EcoRI	Замещение
SalI	Замещение
XboI	Вставка
XhoI	Вставка
EcoRI / SalI	Замещение
EcoRI / XhoI	Замещение
XboI / SalI	Замещение
XhoI / SalI	Замещение
XboI / SalI	Замещение

Харон 3А
Общая длина: 48,3 kb
Генетические маркеры: Aam32, Bam1, lac+, imm80. Нуждается в бактерии-хозяине с супрессором sulI. Образует голубые бляшки в чашках с Xgal







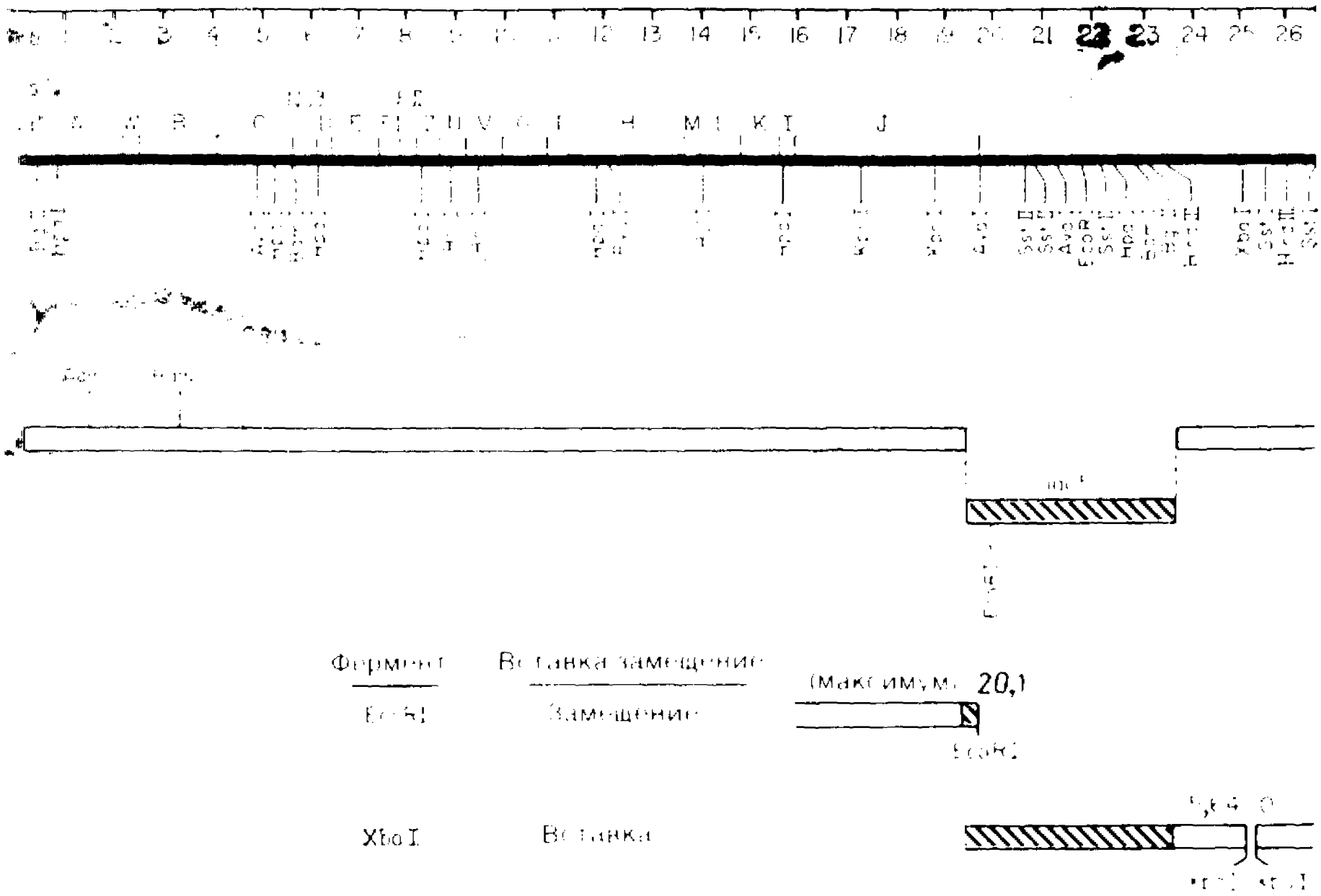


Положение сайтов рестрикции

L-конец	0
BglII	470
BamI	5560
KpnI	17430
KpnI	18950
EcoRI	19940
SstI	21040
XbaI	24960
SstI	25230
HindIII	25620
SstI	26340
EcoRI	26570
HindIII	27920
BamI	28510
BglII	33810
XhoI	34560
BglII	34690
KpnI	37440
BglII	38170
SalI	38450
SalI	38610
KpnI	39250
BglII	40190
BamI	42260
SstI	42410
HindIII	42450
BamI	42760
KpnI	44650
BglII	44710
SstI	46270
BamI	46690
BglII	46870
R-конец	48180

Литература: Blattner F. et al., 1977, Science, **196**, 161: Williams B., Blattner F., 1979, J. Virol., **29**, 555; de Wet J. et al., 1980, J. Virol., **33**, 401

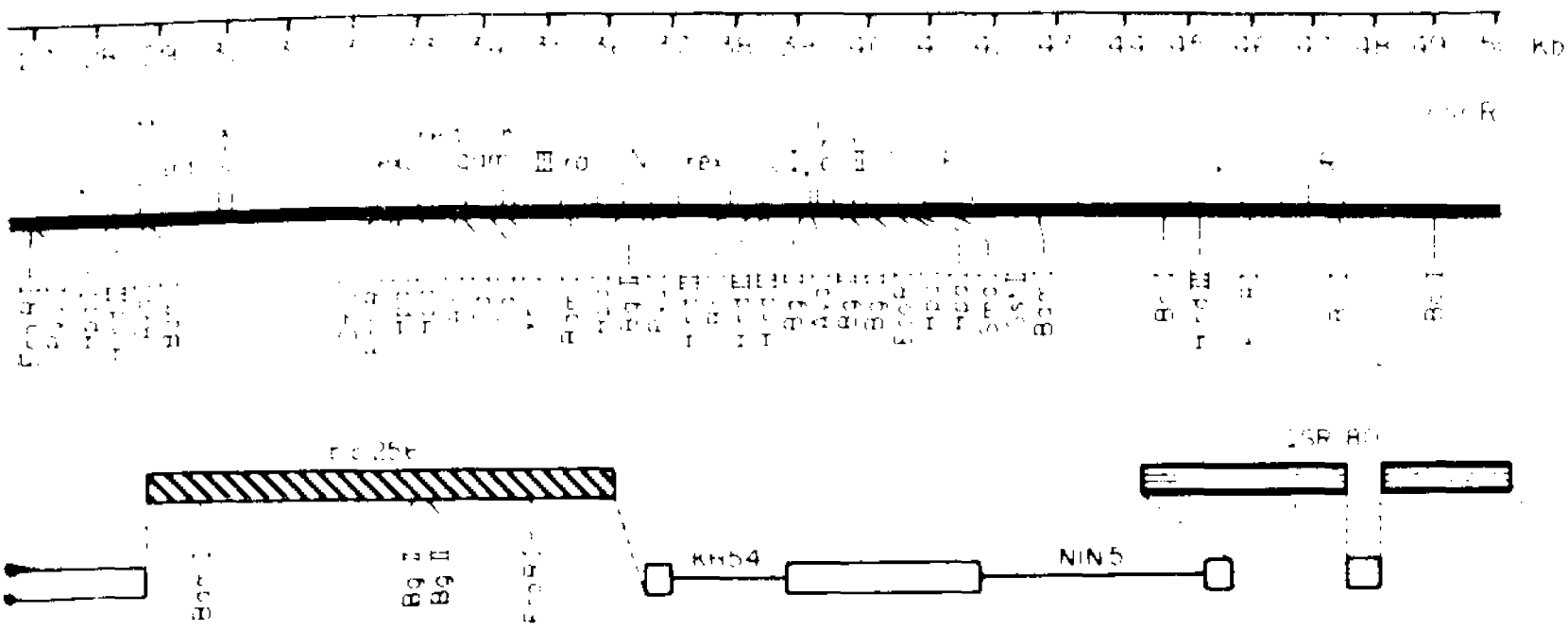
Примечание: Этот вектор используется для создания библиотек, полученных при полном расщеплении эукариотической ДНК рестриктазой EcoRI



Харон 4A
Общая длина: 45,4 kb
Генетические маркеры: Aam 32, Bam1, lac5, bio256, ∇KH54, ∇NIN5, ϕ80 QSR
Образует голубые бляшки в чашках с Xgal. Нуждается в бактерии-хозяине с супрессором suIII

Трудности, связанные со второй проблемой, можно свести к минимуму, если с космидным вектором лигировать фрагменты эукариотической ДНК определенной длины (30—45 kb). Встраивание в одну космиду двух или более таких фрагментов приведет к образованию молекулы, которая окажется слишком большой, чтобы она могла упаковаться в частицу бактериофага λ.

Недавно был описан другой метод клонирования в космидах, обходящий первые две из указанных трудностей (Ish-Horowicz, Burke, 1981). В соответствии с предложенной процедурой, которая была разработана для вектора pJB8 и схематически изображена на рис. 1.10, препарат космидного вектора разделяют на две порции, каждую из которых расщепляют своим рестриктирующим ферментом; первый из этих ферментов делает разрыв с одной стороны от последовательности *cos*, а второй — с другой стороны от этой последовательности. Получающиеся в результате линейные молекулы ДНК дефосфорилируют, обрабатывая щелочной фосфатазой. Именно это дефосфорилирование предотвращает образование при лигировании тандемов векторов и снижает фон бактериальных колоний, содержащих космиды без



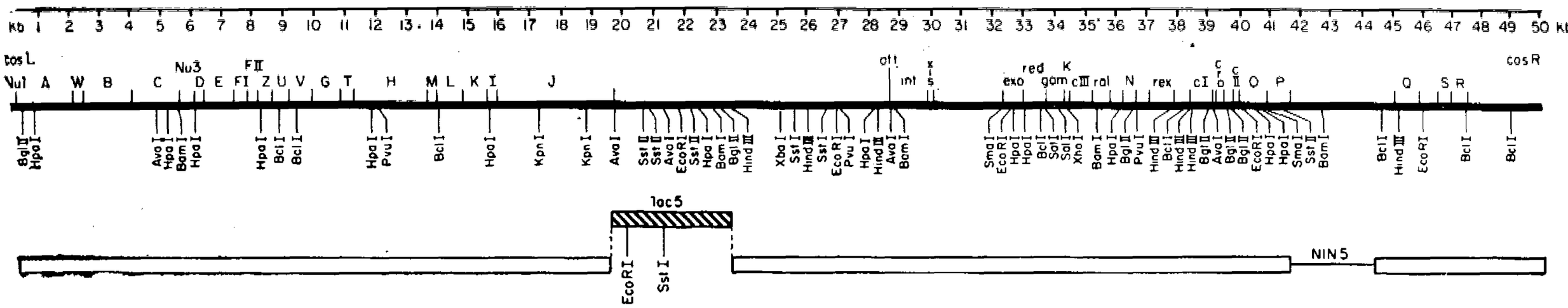


Положение сайтов рестрикции			
L-конец	0	EcoRI	34320
BglII	470	BglII	35960
BamI	5560	BglII	36320
KpnI	17430	BglII	36970
KpnI	18950	BglII	37030
EcoRI	19940	BamI	39440
SstI	21040	SstI	39590
XbaI	24960	HindIII	39630
SstI	25230	BamI	39940
HindIII	25620	KpnI	41830
SstI	26340	BglII	41890
EcoRI	26570	SstI	43450
HindIII	27920	BamI	43870
BamI	28920	BglII	44050
BglII	32510	R-конец	45360
BglII	32640		

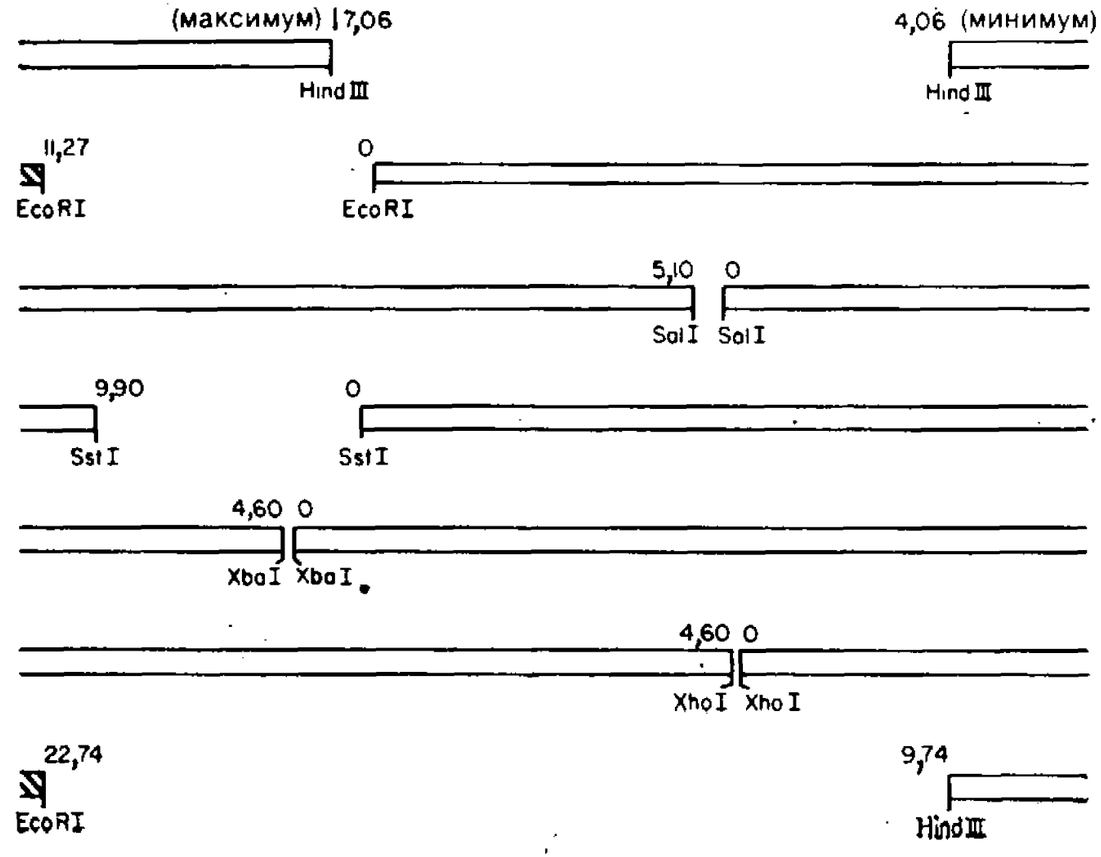
Литература: Blattner F. et al., 1977, Science, **196**, 161; Williams B., Blattner F., 1979, J. Virol., **29**, 555; de Wet J. et al., 1980, J. Virol., **33**, 401

Примечание: Этот вектор широко используется для создания библиотек фрагментов эукариотической ДНК размером 15—20 kb

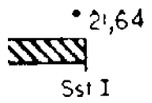
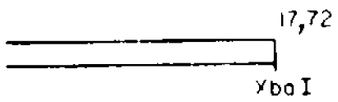
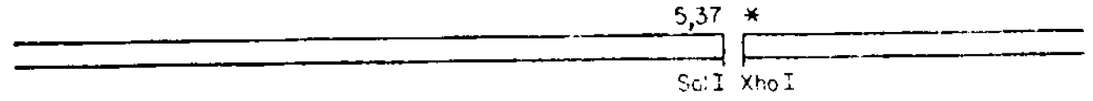
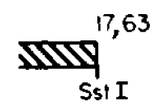
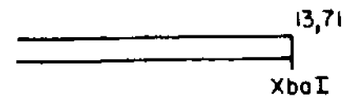
вставок. Затем обе дефосфорилированные ДНК расщепляют рестриктазой *Bam*HI и смешивают их, чтобы получить липкие концы, которые можно лигировать с фрагментами эукариотической ДНК, полученными при частичном расщеплении рестриктазой *Mbo*I или *Sau*3A с последующим дефосфорилированием. При такой процедуре получается лишь один тип способных упаковываться молекул, которые содержат фрагмент с «левым» сайтом *cos*, вставку длиной 32—42 kb и фрагмент с «правым» сайтом *cos*. Вектор pJB8 обладает тем дополнительным преимуществом, что он содержит два сайта для *Eco*RI, расположенных с обеих сторон от *Bam*HI-сайта недалеко от него. Это позволяет почти точно вырезать встроенную ДНК. Методику эту, однако, легко приспособить и к другим существующим космидным векторам (с. 68—69). Эффективность метода достаточно высока, и при его использовании получают более $5 \cdot 10^5$ клонов

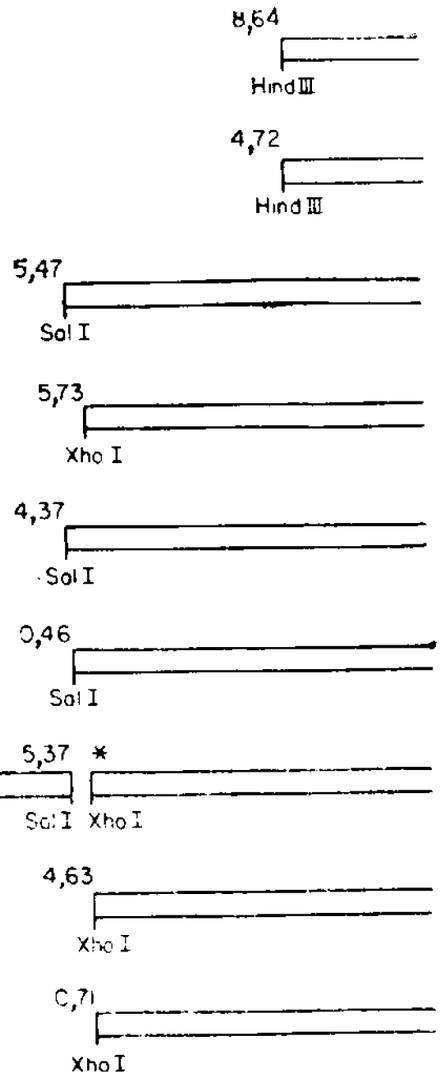


Фермент	Вставка/замещение
Hind III	Замещение
EcoRI	Замещение
Sal I	Замещение
Sst I	Замещение
Xba I	Вставка
Xho I	Вставка
EcoRI/Hind III	Замещение

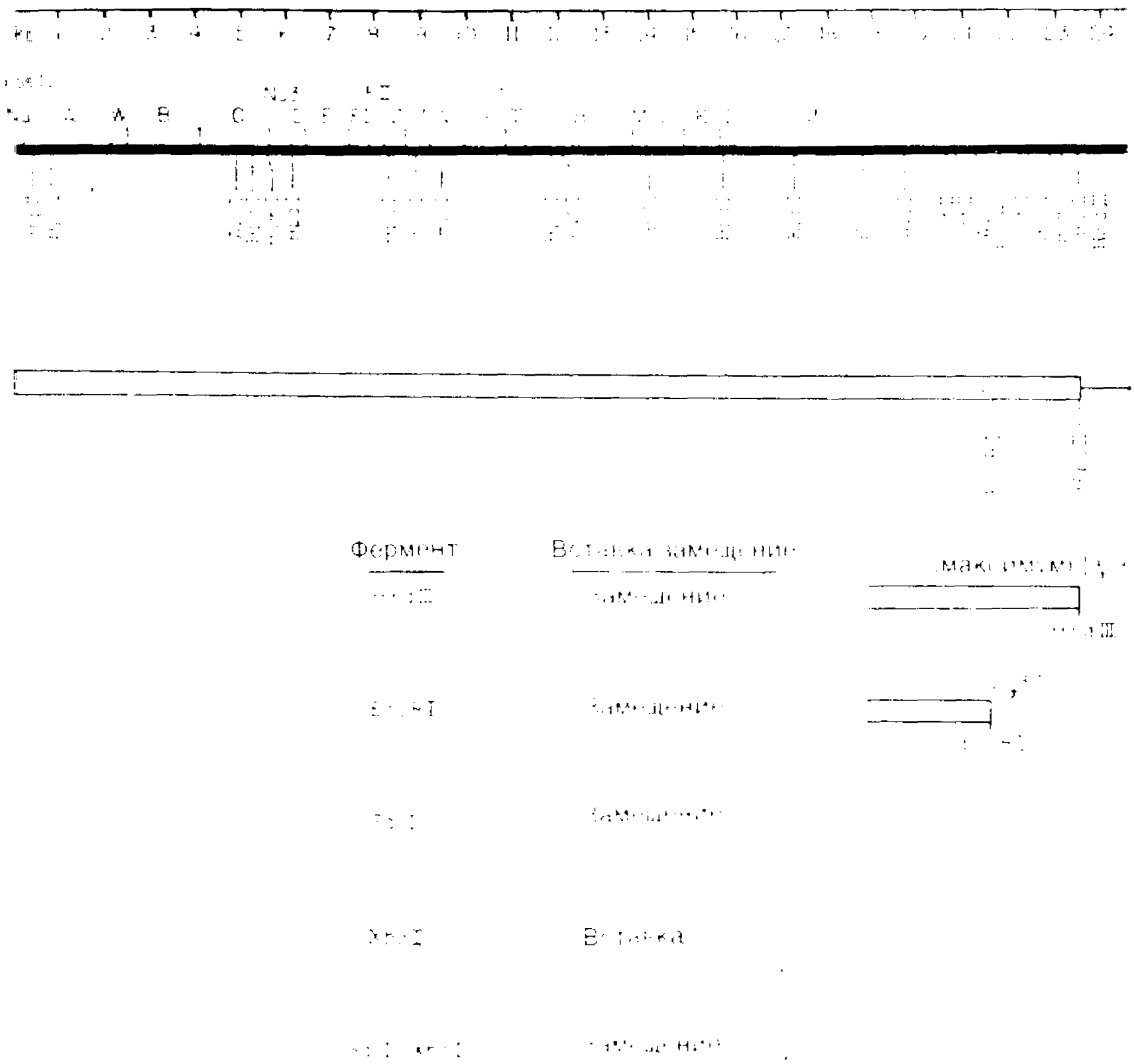


Положение сайтов рестрикции	
L-конец	0
Bgl II	470
Bam I	5560
Kpn I	17430
Kpn I	18950
EcoRI	19940
Sst I	21040
Xba I	24960
Sst I	25230
Hind III	25620
Sst I	26340
EcoRI	26570
Hind III	27920
Bam I	28510
Sal I	33310
Sal I	33820
Xho I	34080
Bam I	35070
Bgl II	36280
Hind III	37500
Hind III	38080
Bgl II	38730
Bgl II	39380
Bgl II	39440
R-конец	46400

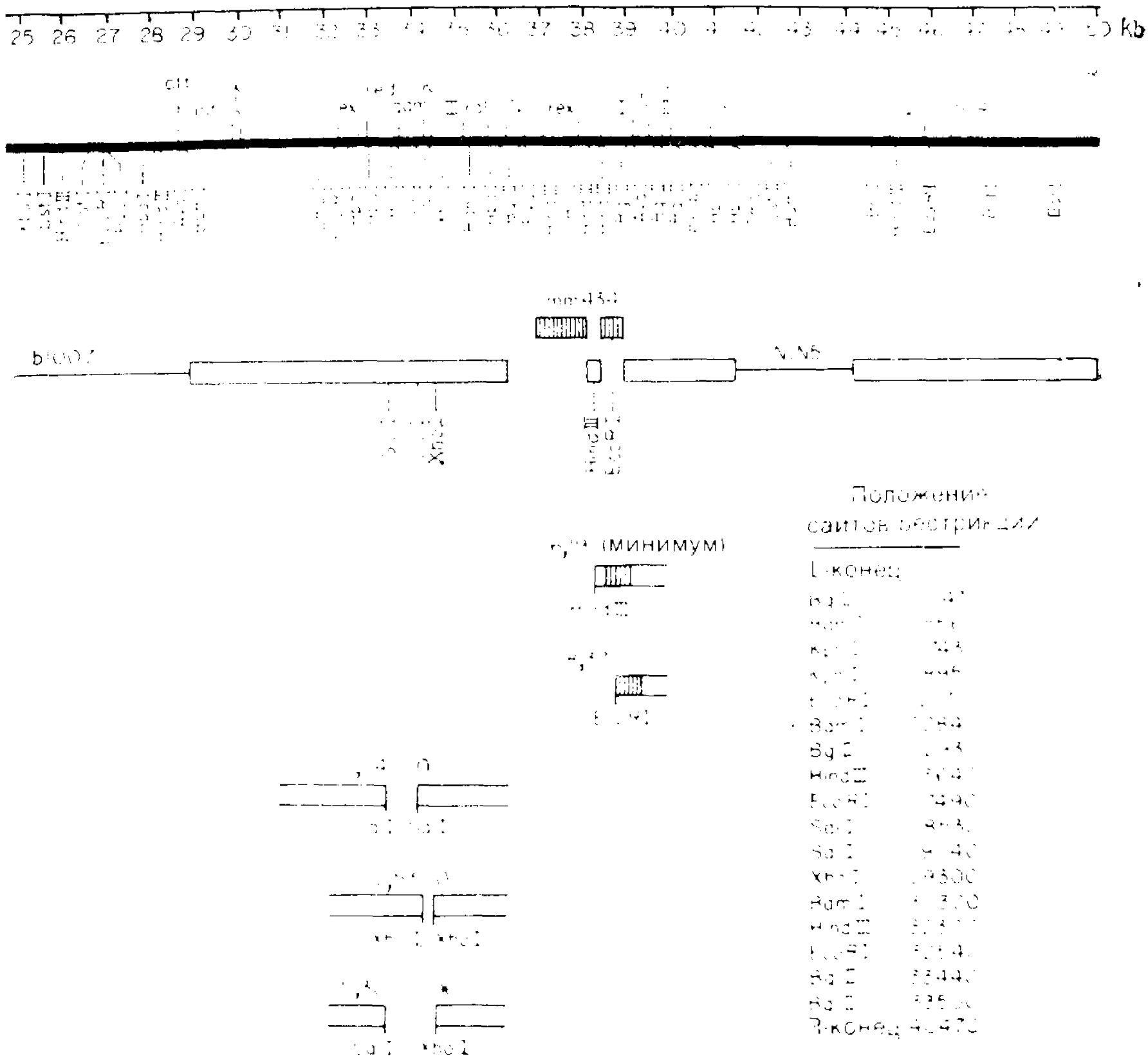
Sst I / Hind III	Замещение	
Xba I / Hind III	Замещение	
EcoRI / Sal I	Замещение	
EcoRI / Xho I	Замещение	
Sst I / Sal I	Замещение	
Xba I / Sal I	Замещение	
Sal I / Xho I	Замещение	
Sst I / Xho I	Замещение	
Xba I / Xho I	Замещение	



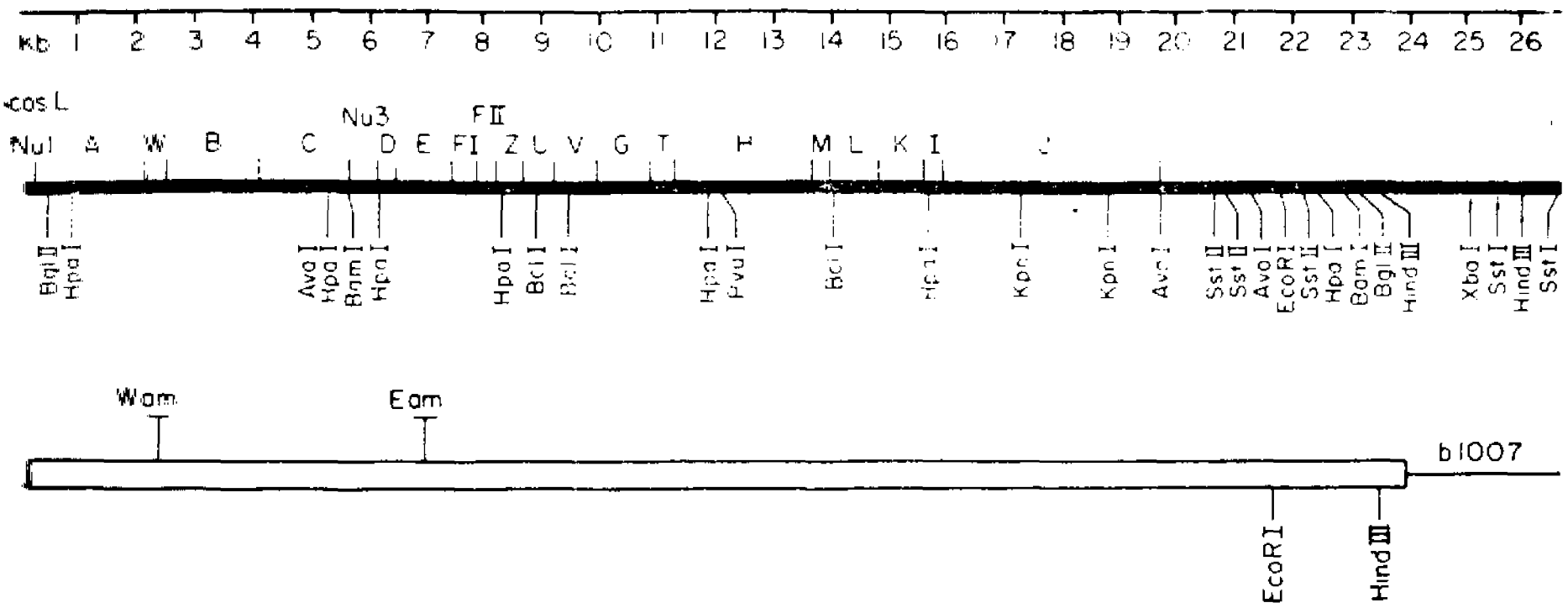
Харон 17
Общая длина: 46,4 kb
Генетические маркеры: lac5, NIN5, cIam, Fec⁻. Образует голубые бляшки в чашках с Xgal. Образует лизогены в бактериях-хозяевах с супрессором suII или suIII
Литература: Williams B. G., Blattner F. R., 1979, J. Virol., **29**, 555

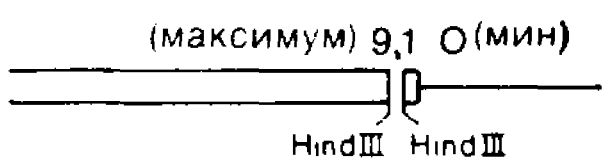
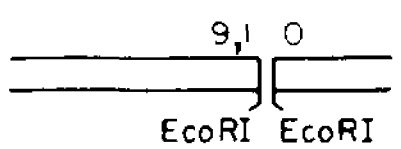
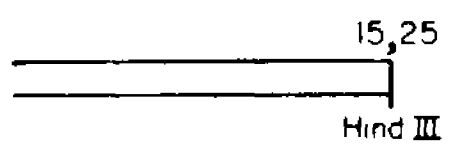
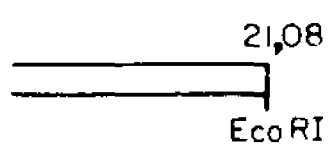
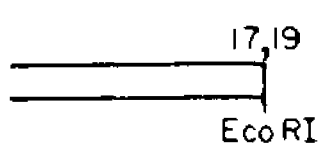


Харон 20
Общая длина: 40,36 kb

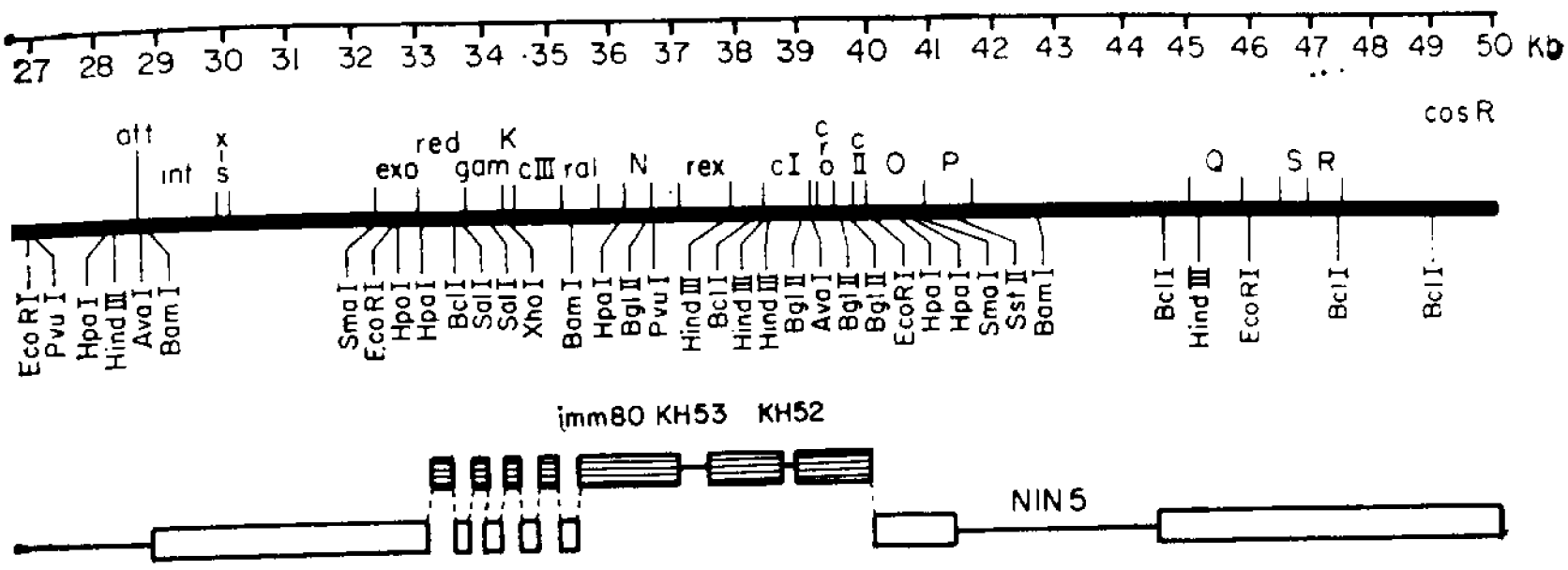


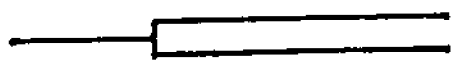
Генетические маркеры: b1007, NIN5, imm434
Литература: Williams B., Blattner F., 1979, J. Virol., **29**, 555



Фермент	Вставка/замещение	
Hind III	Вставка	
EcoRI	Вставка	
Sal I	Вставка	
Xho I	Вставка	
EcoRI / Hind III	Замещение	
Hind III / Sal I	Замещение	
Hind III / Xho I	Замещение	
EcoRI / Sal I	Замещение	
EcoRI / Xho I	Замещение	
XhoI / SalI	Замещение	

Харон 21A
Общая длина: 41,7 kb
Генетические маркеры: Wam403, Eam1100, imm80, ∇b1007, ∇KH53, ∇KH52, ∇NIN5. Нуждается в бактерии-хозяине с супрессором supE или supF

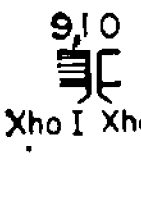


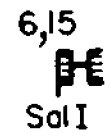


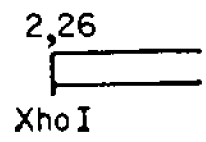
Положение сайтов рестрикции

L-конец	0
BglII	470
BamI	5560
KpnI	17430
KpnI	18950
EcoRI	21710
BamI	22840
BglII	22930
HindIII	23640
BglII	29030
XhoI	29790
BglII	29910
KpnI	32660
BglII	33390
SalI	33680
KpnI	34320
BglII	35260
R-конец	41890

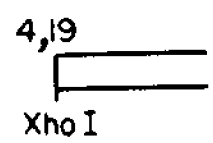








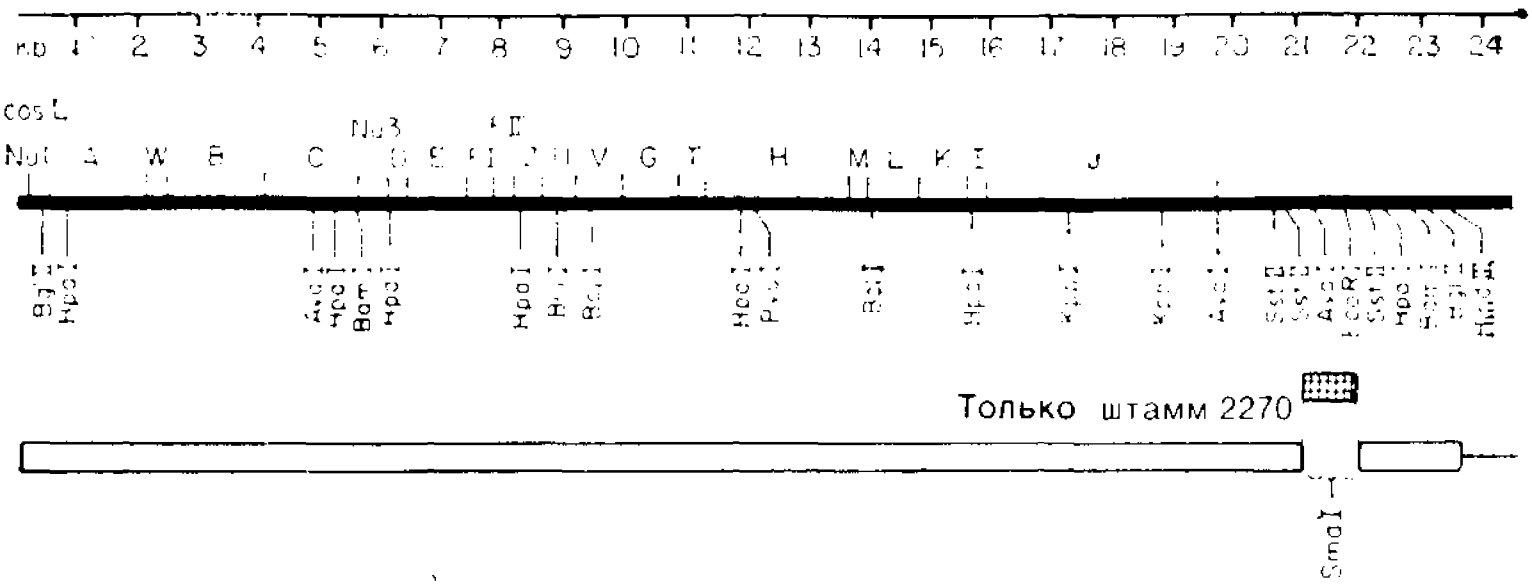






Литература: Ф. Блаттнер и др. Заявка на систему вектор — хозяин для клонирования ДНК. Приложение IX. Данные о Хароне 21A

Примечание: Этот бактериофаг широко используется в качестве вектора для *Hind*III-фрагментов. Он содержит амбер-мутации, и потому его удобно использовать при рекомбинационном скрининге с плазмидой πVX



Харон 28

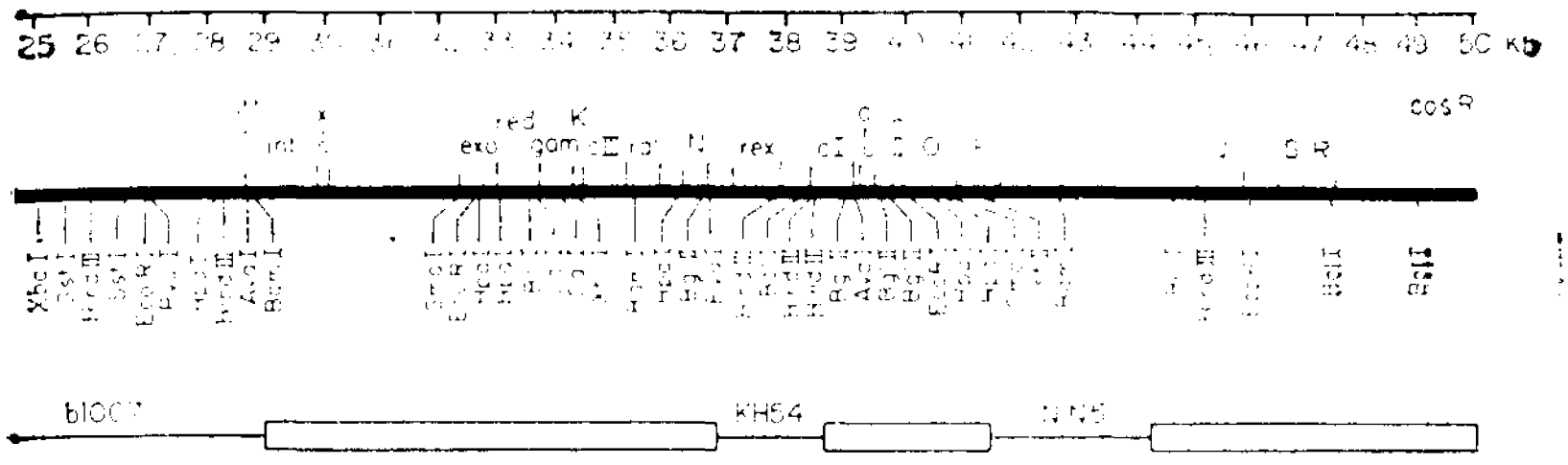
Общая длина: штамм 2221 — 39,39 kb
штамм 2270 — 40,29 kb (в левом плече содержит вставку неизвестного происхождения длиной около 900 пар)

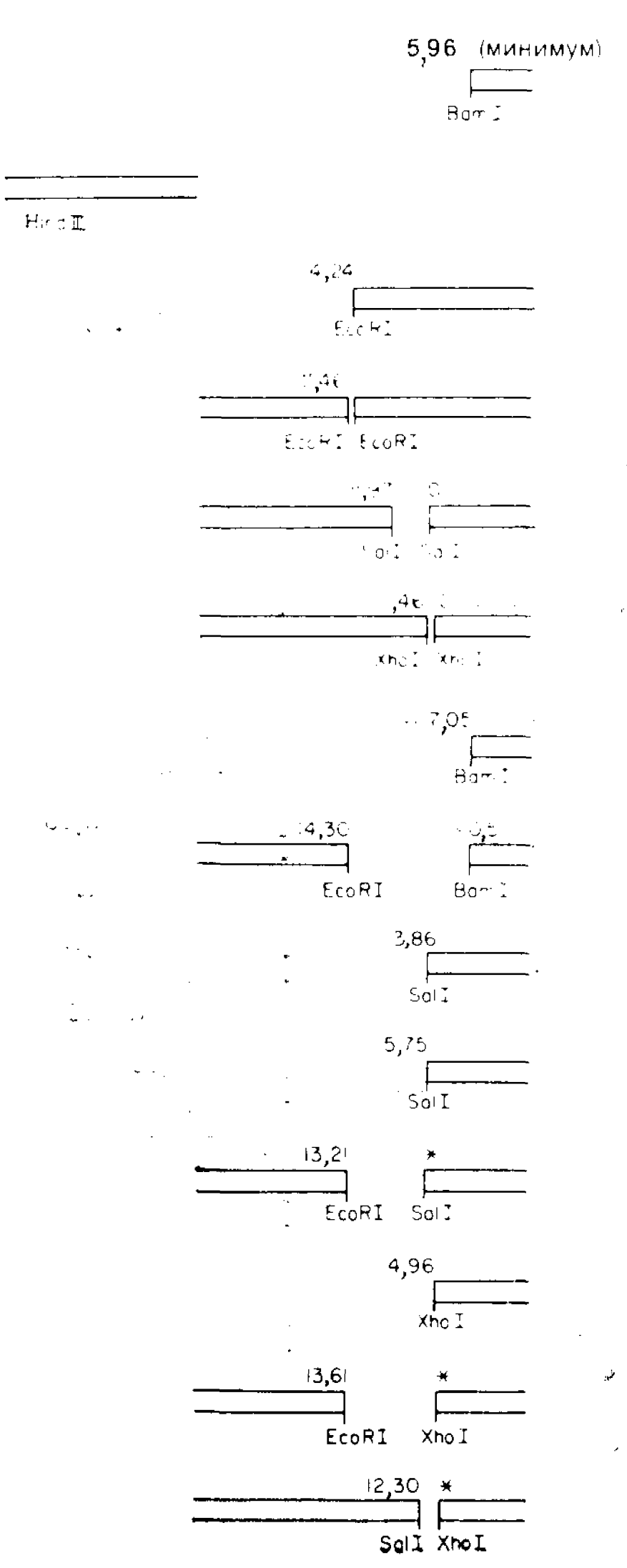
Генетические маркеры: b1007, KH54, NIN5

Литература: Rimm D. et al., 1980, Gene, **12**, 301

Примечание: До недавнего времени это был единственный фаговый вектор, который можно было применять для клонирования фрагментов с *Bam*HI-концами. Он используется для создания библиотек фрагментов, полученных при частичном расщеплении эукариотической ДНК рестриктазой *Mbo*I (Liu et al., 1980). Отсутствие в этом векторе *chi*-сайтов приводит к большим вариациям размера бляшек рекомбинантов (подробности см. в тексте). Недавно были получены другие векторы для клонирования *Bam*HI-фрагментов (например, L47.1 и BF101), поэтому Харон 28 стал использоваться для клонирования таких фрагментов гораздо реже

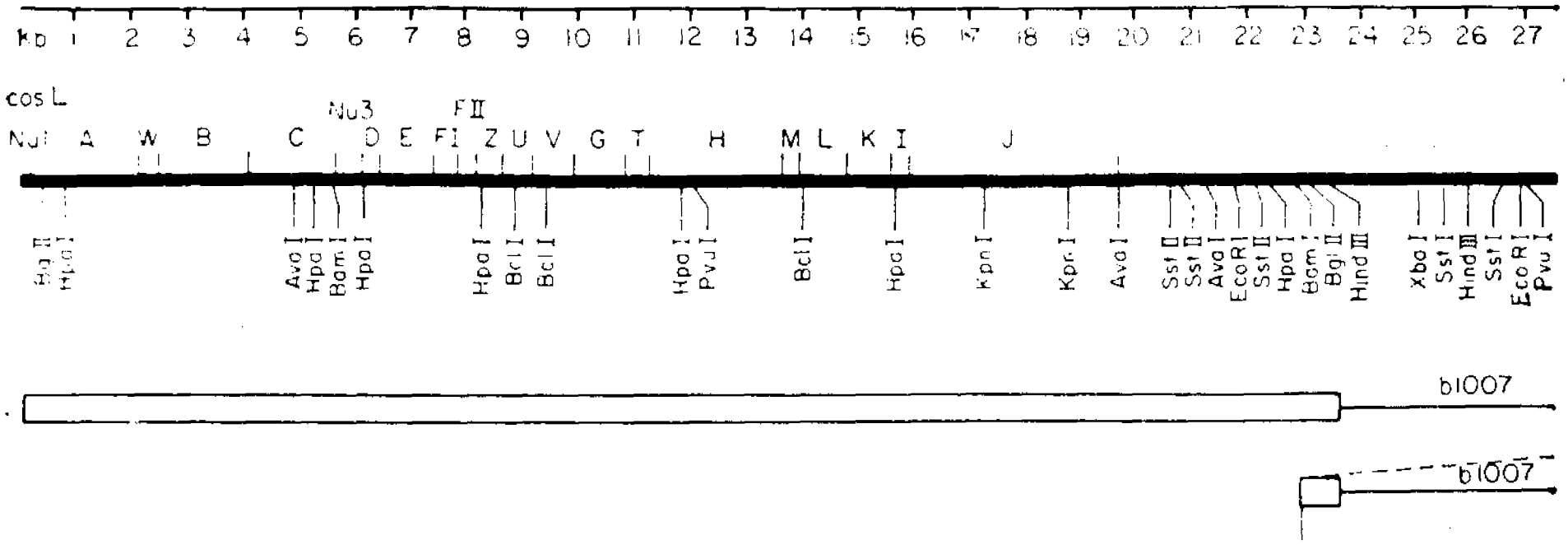
Фермент	Вставка/замещение	(максимум) 18,91
BamHI	Замещение	BamHI
HindIII	Вставка	HindIII
(штамм 2221)	Замещение	EcoRI
(штамм 2270)	Вставка	
SalI	Замещение	
XhoI	Замещение	
EcoRI/BamHI (штамм 2221)	Замещение	20,05 EcoRI
EcoRI/BamHI (штамм 2270)	Замещение	
HindIII/SalI	Замещение	16,89 HindIII
EcoRI/SalI (штамм 2221)	Замещение	18,75 EcoRI
EcoRI/SalI (штамм 2270)	Замещение	
EcoRI/XhoI (штамм 2221)	Замещение	17,91 EcoRI
EcoRI/XhoI (штамм 2270)	Замещение	
SalI/XhoI	Замещение	





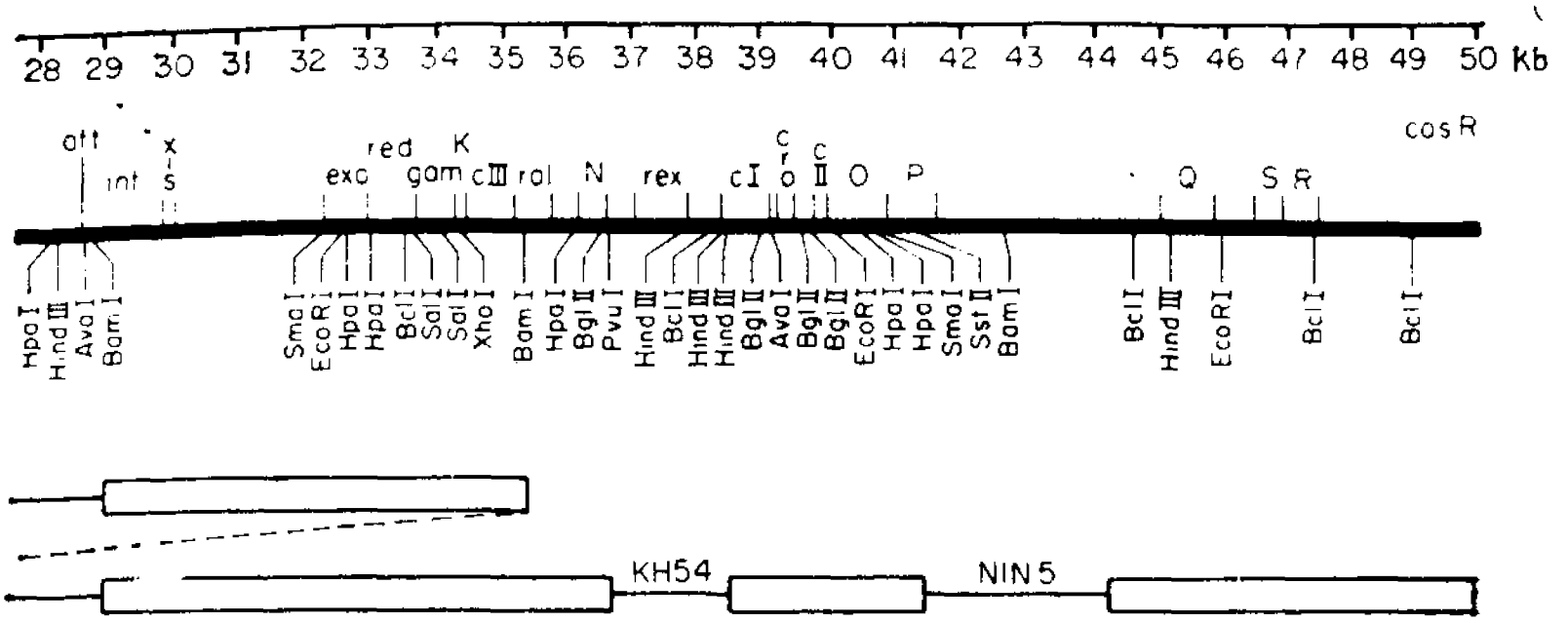
Положение сайтов рестрикции

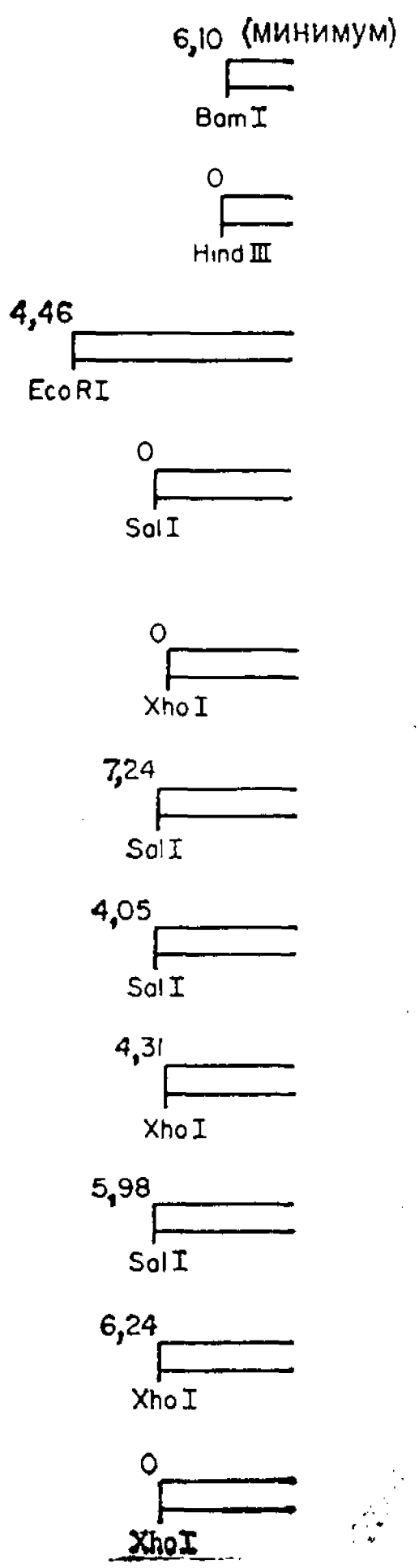
L-конец	0
Bgl II	4?3?
Hpa I	(5?)
Ava I	4837
Hpa I	5430
Hpa I	5770
Hpa I	6020
Hpa I	8260
Bcl I	8890
Bcl I	9400
Hpa I	11710
Pvu I	12060
Bcl I	14000
Kpn I	17290
Hpa I	18790
Sma I	19660
Sst I	20360
Sst II	20780
Ava I	21090
Sst II	21880
Hpa I	23400
Bam I	23900
Bgl II	24660
Hind III	24360
Sma I	28080
EcoRI	28210
Hpa I	28280
Hpa I	28680
Bcl I	29200
Sal I	29240
Sal I	29740
Xho I	30000
Bam I	31000
Hpa I	31760
Bgl II	32220
Pvu I	32280
Bgl II	32500
Ava I	32620
Bgl II	33160
Bgl II	33220
Hpa I	34020
Hpa I	34240
Sma I	34300
Sst II	34830
Bcl I	35310
Bcl I	38080
Bcl I	39650
R-конец	40230



Фермент	Вставка/замещение	
Bam I	Замещение	(максимум) 19,10 — Bam I
Hind III	Замещение	11,67 — Hind III
EcoRI	Замещение	17,46 — EcoRI
Sal I	Замещение	12,18 — Sal I
Xho I	Замещение	11,67 — Xho I
EcoRI / Sal I	Замещение	20,24 — EcoRI
Hind III / Sal I	Замещение	17,05 — Hind III
Hind III / Xho I	Замещение	17,31 — Hind III
EcoRI / Sal I	Замещение	18,98 — EcoRI
EcoRI / Xho I	Замещение	19,24 — EcoRI
Sal I / Xho I	Замещение	12,43 — Sal I

Харон 30
Общая длина: 46,76 kb



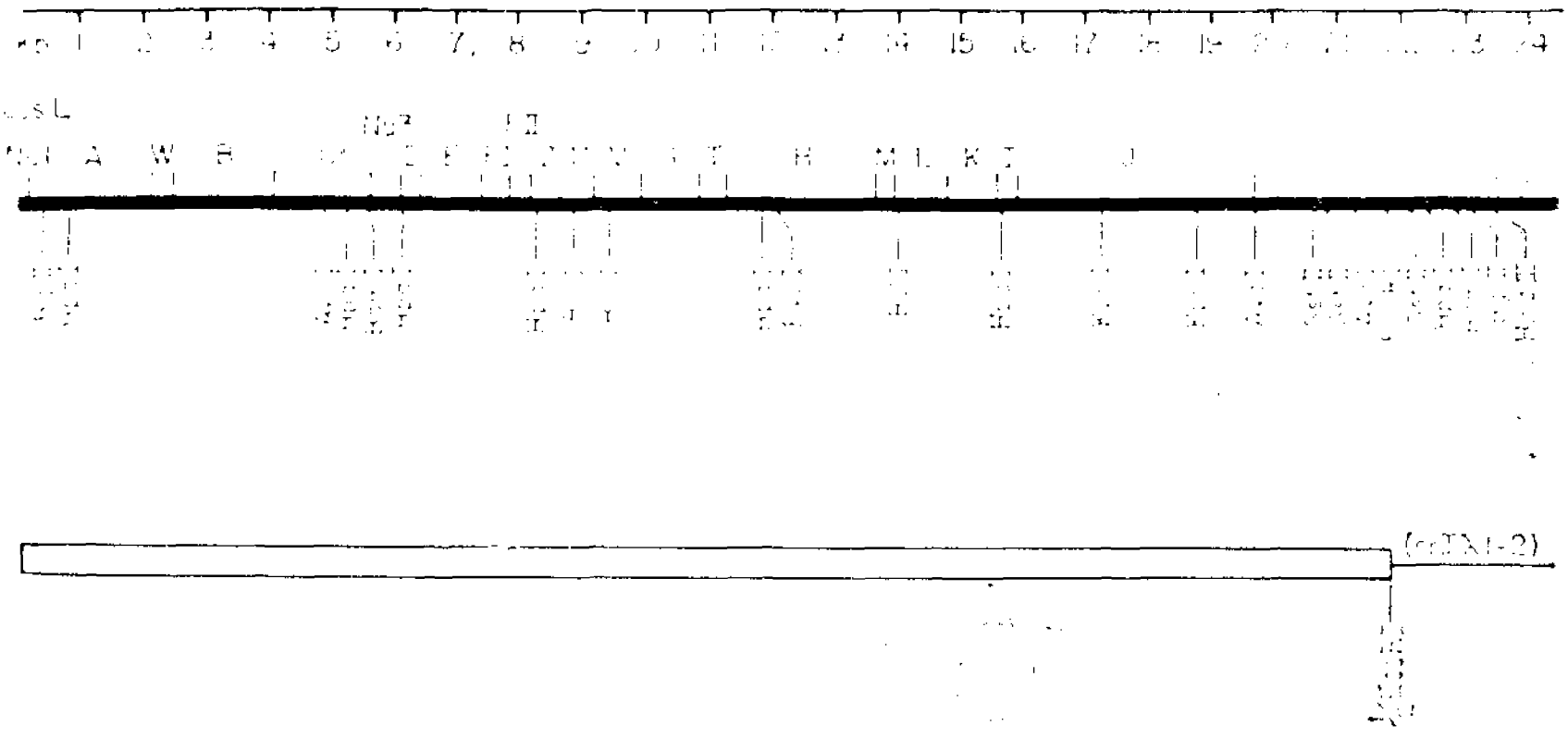


Положение сайтов рестрикции

L.-конец	0	BamI	37520
BglII	470	HpaI	38290
HpaI	750	BglII	38740
AvaI	4830	PvuI	38810
HpaI	5330	BglII	39040
HpaI	5770	AvaI	39150
HpaI	6020	BglII	39690
HpaI	8260	BglII	39750
BclI	8890	HpaI	40540
BclI	9400	HpaI	40770
HpaI	11710	SmaI	40830
PvuI	12060	SstII	41360
BclI	14000	BclI	41840
KpnI	17290	BclI	44610
KpnI	18790	BclI	46170
SmaI	19660	R-конец	46760
SstII	20600		
SstII	20810		
AvaI	21290		
EcoRI	21520		
SstII	21920		
HpaI	22200		
BamI	22670		
BglII	22760		
HindIII	23460		
SmaI	27180		
EcoRI	27310		
HpaI	27380		
HpaI	27780		
BclI	28300		
SalI	28340		
SalI	28840		
XhoI	29100		
BamI	30100		
BglII	30190		
HindIII	30900		
SmaI	34600		
EcoRI	34740		
HpaI	34810		
HpaI	35210		
BclI	35730		
SalI	35760		
SalI	36270		
XhoI	36530		

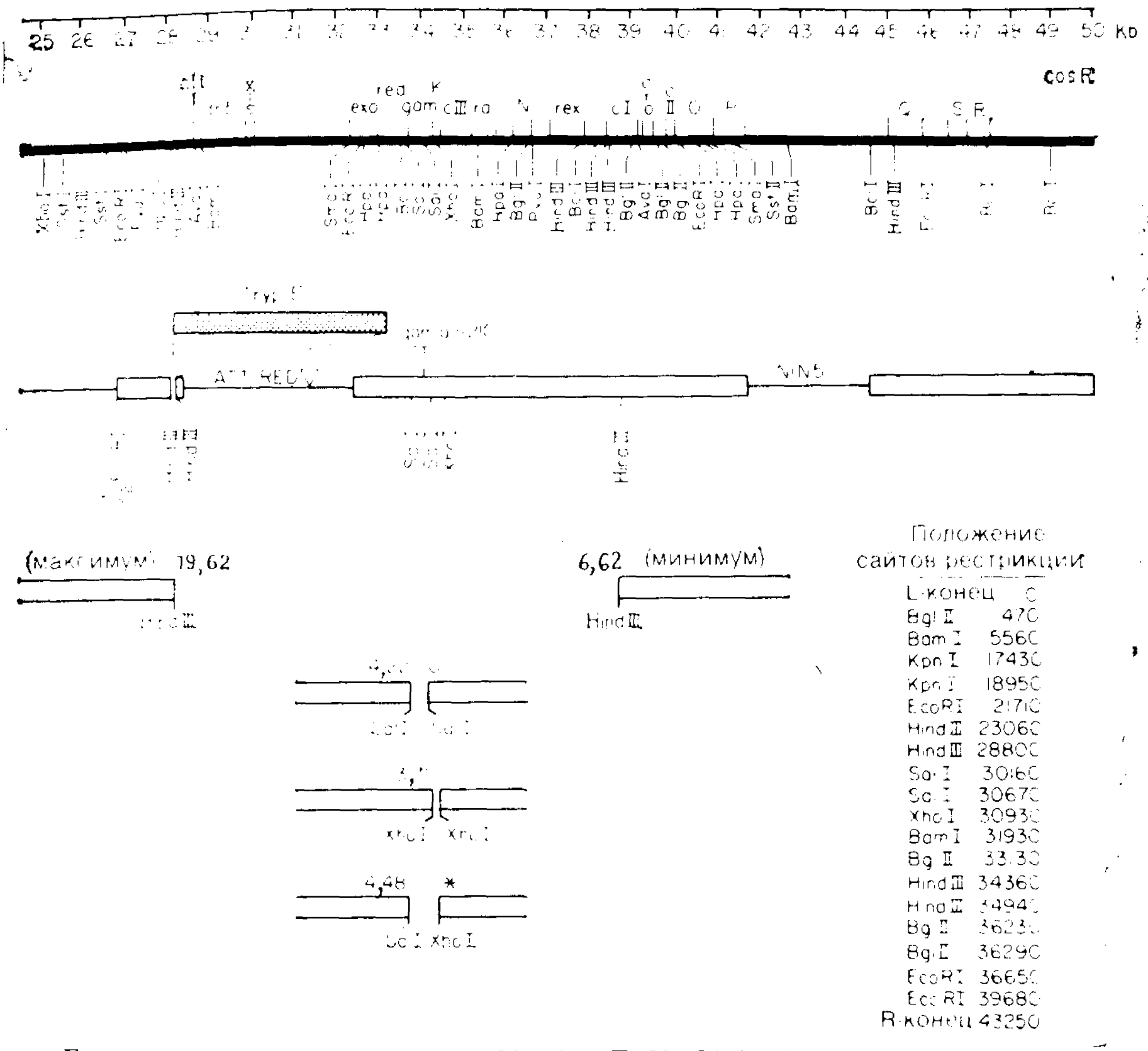
Генетические маркеры: b1007, KH54, NIN5, dup1(sbh2-3)

Литература: Rimm D. et al., 1980, Gene, **12**, 301

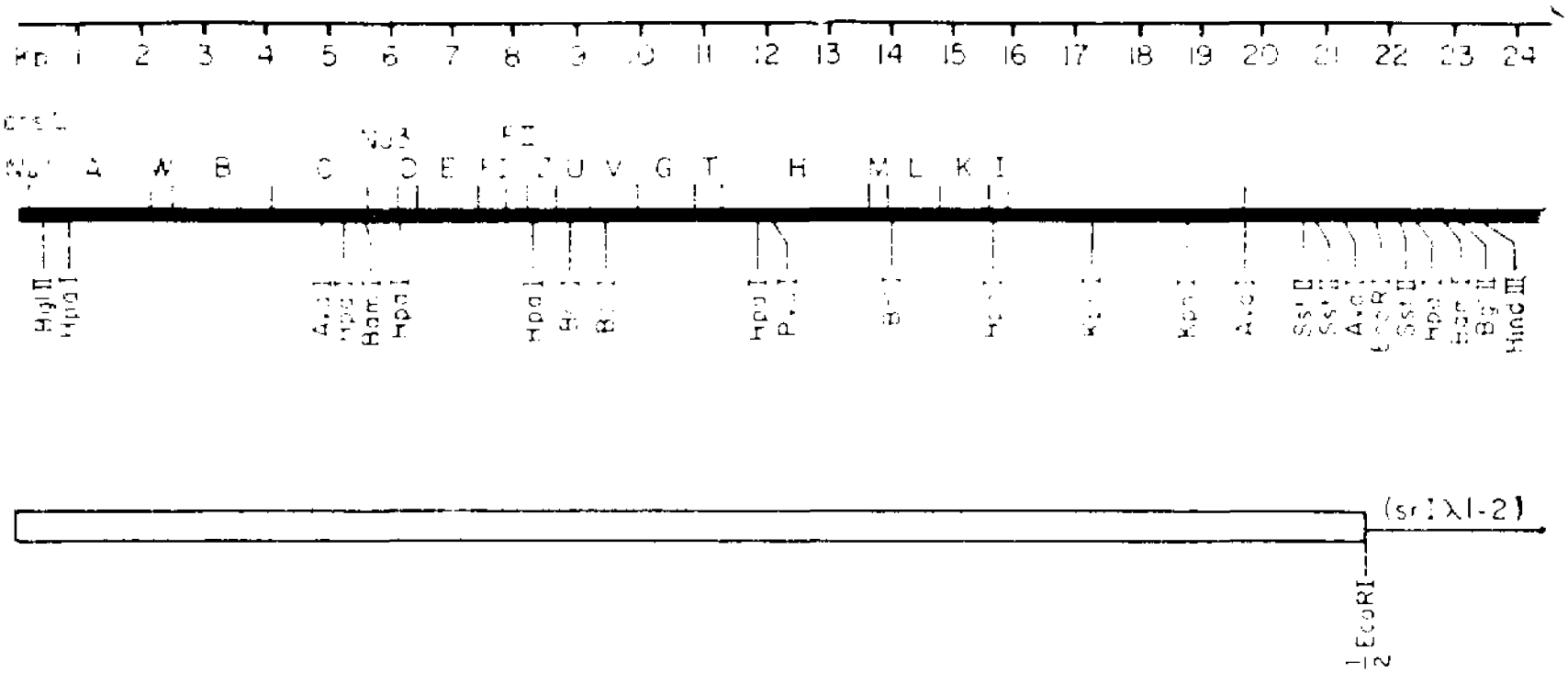


Фермент	Вставка/замещение
[illegible]	Замещение
[illegible]	Замещение
[illegible]	Вставка
[illegible]	Замещение

λ709
Общая длина: 43,25 kb

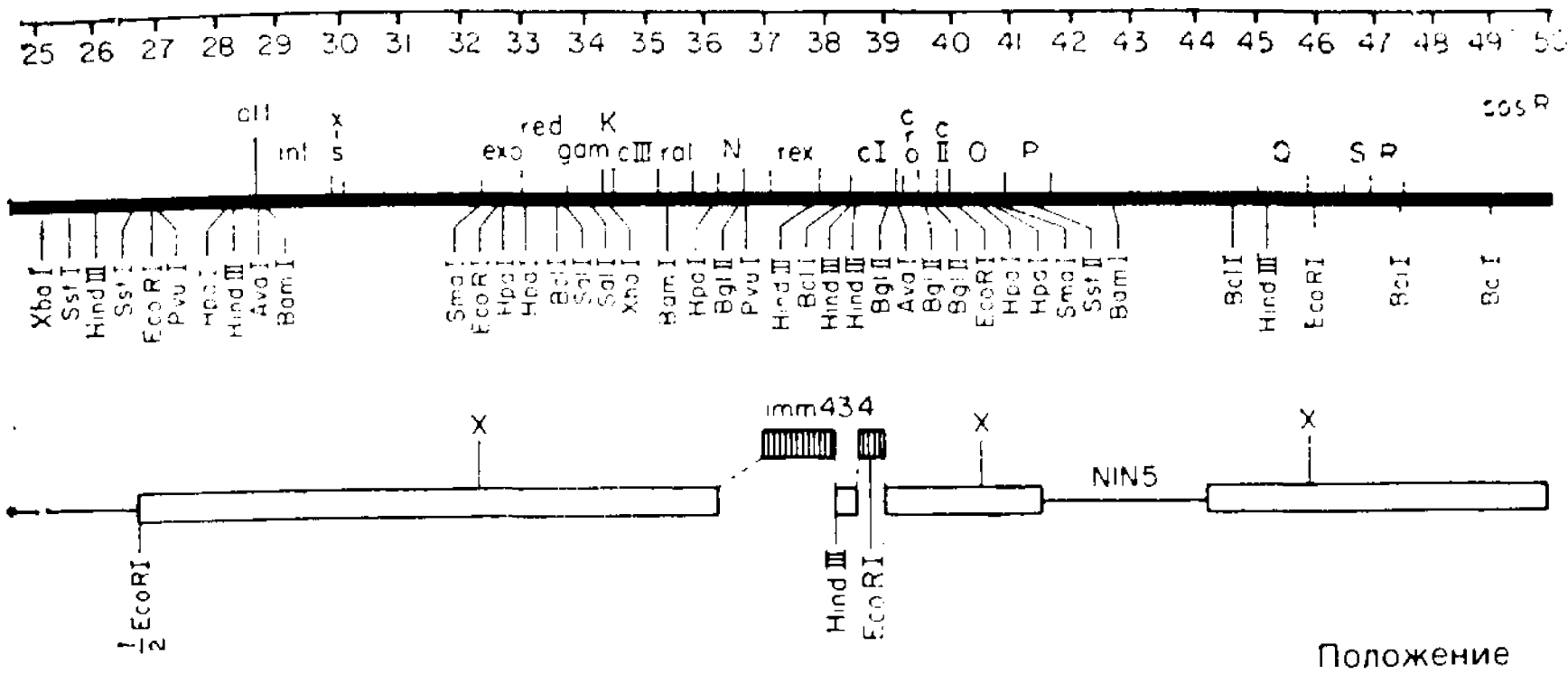


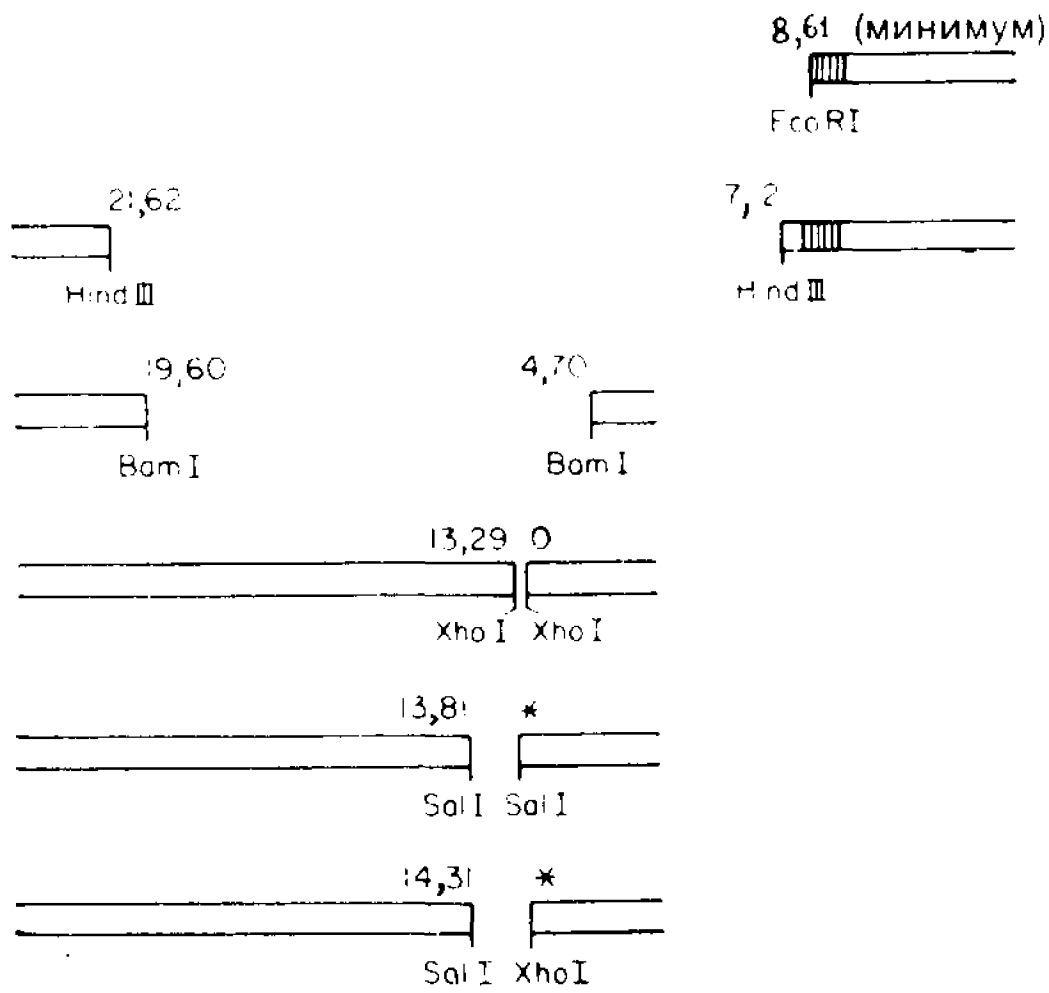
Генетические маркеры: gam am210, trypE, NIN5 (srIλ1-2)∇
Литература: Murray N. et al., 1977, Molec. Gen. Genet., **150**, 53



Фермент	Вставка/замещение	(максимум) 24,1
EcoRI	Замещение	EcoRI
HindIII	Замещение	
BamI	Замещение	
XhoI	Вставка	
SalI	Замещение	
SalI/XhoI	Замещение	

λL47.1
Общая длина: 40,6 kb
Генетические маркеры: (srIλ1-2)$^{\nabla}$, imm434 cI^{-}, NIN5, chiA 131





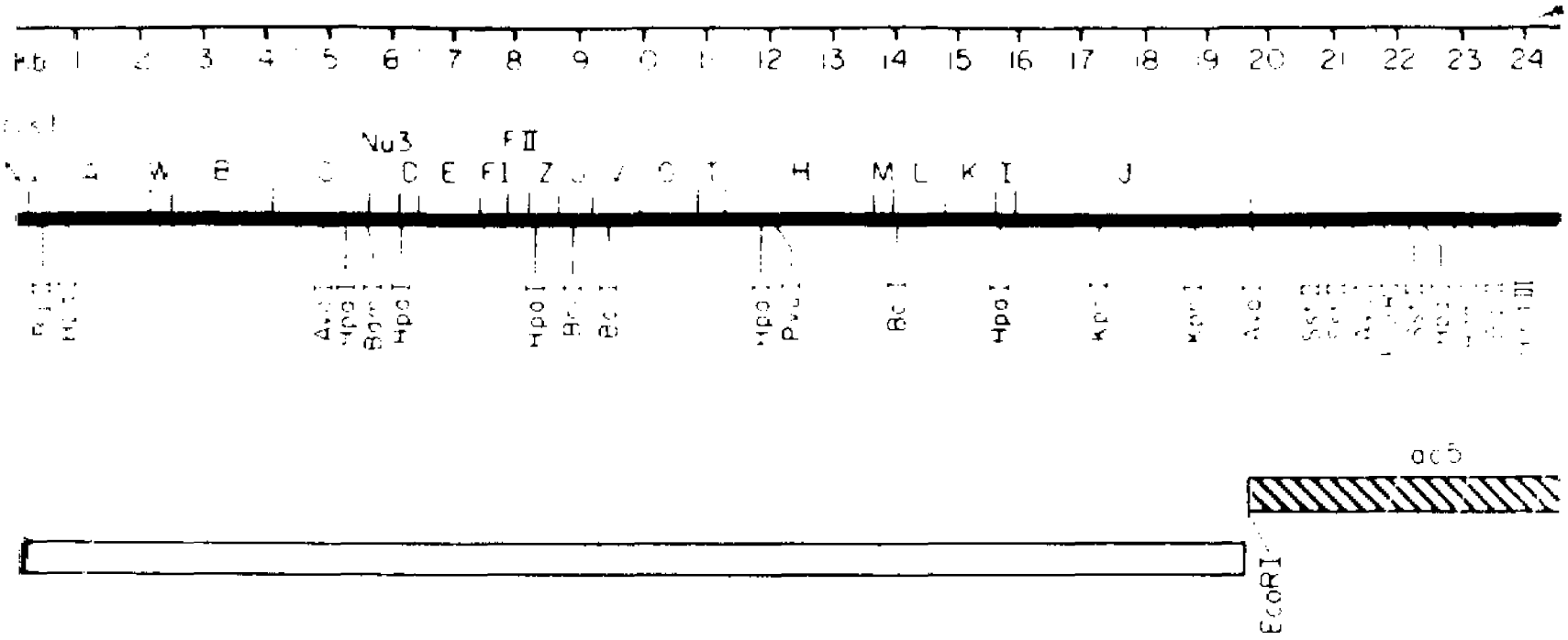
Положение сайтов рестрикции

L-конец	C
Bgl II	470
Kpn I	17430
Kpn I	18950
EcoRI	21710
Hind III	23089
Bam I	23586
Sal I	28403
Sal I	28933
Xho I	29 9[illegible]
Bam I	30 4[illegible]
Hind III	32433
EcoRI	33027
Bgl II	33750
Bgl II	33816

R-конец 40620

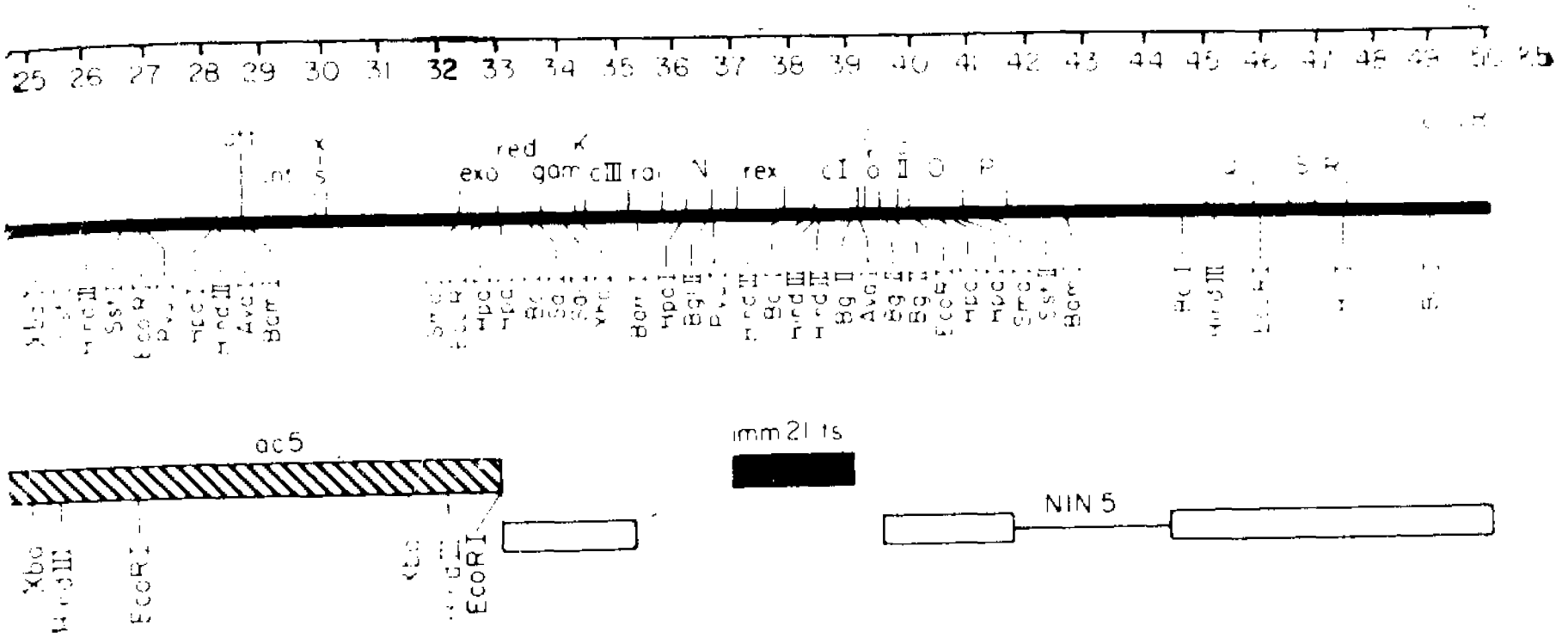
Литература: Loenen W. A., Brammar W. J., 1980, Gene, **10**, 249

Примечание: Весьма универсальный вектор, который можно использовать для клонирования больших *Eco*RI-, *Hind*III- и *Bam*HI-фрагментов



Фермент	Вставка/замещение	(Макс. им. м. 18,5
EcoRI	Замещение	
Sal I	Замещение	
Sst I	Замещение	
Xho I	Вставка	
EcoRI / Sal I	Замещение	
EcoRI / Xho I	Замещение	
Sst I / Sal I	Замещение	
Sst I / Xho I	Замещение	

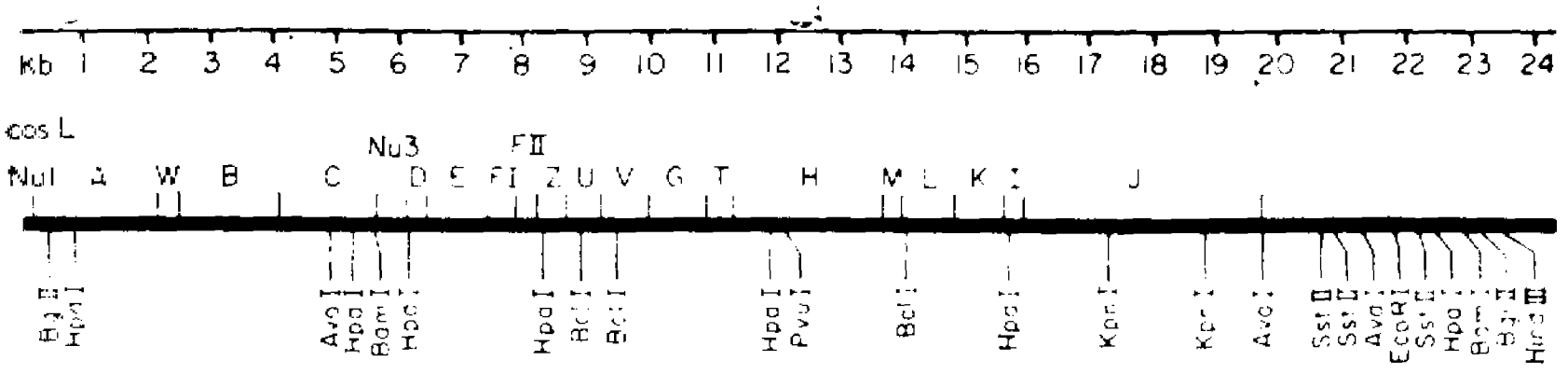
λsep6-lac5
Общая длина: 44,3 kb
Генетические маркеры: lac5, imm21 ts, NIN5
Литература: E. Meyerowitz, A. Rambach, неопубликованные данные



Положение сайтов рестрикции

L-конец	0
Bgl II	4470
Bam I	5560
Kpn I	17430
Kpn I	18950
EcoRI	19940
Xba	[illegible]
HindIII	[illegible]
EcoRI	[illegible]
Xba	[illegible]
HindIII	[illegible]
EcoRI	[illegible]
Sal I	[illegible]
Sal I	[illegible]
Xho I	[illegible]
Bgl II	[illegible]
Bgl II	[illegible]
R конец	[illegible]

Примечание: Этот вектор интенсивно использовали Хогнесс и др. при создании библиотек ДНК *Drosophila*. Существует производный фаг (λsep6-1ac5Δ), который содержит амбер-мутации в генах *A* и *B* (D. Goldberg, неопубликованные данные). Рекомбинанты обоих фагов необходимо выращивать на хозяевах *recA*+



Фермент	Вставка/замещение
BamI	Замещение

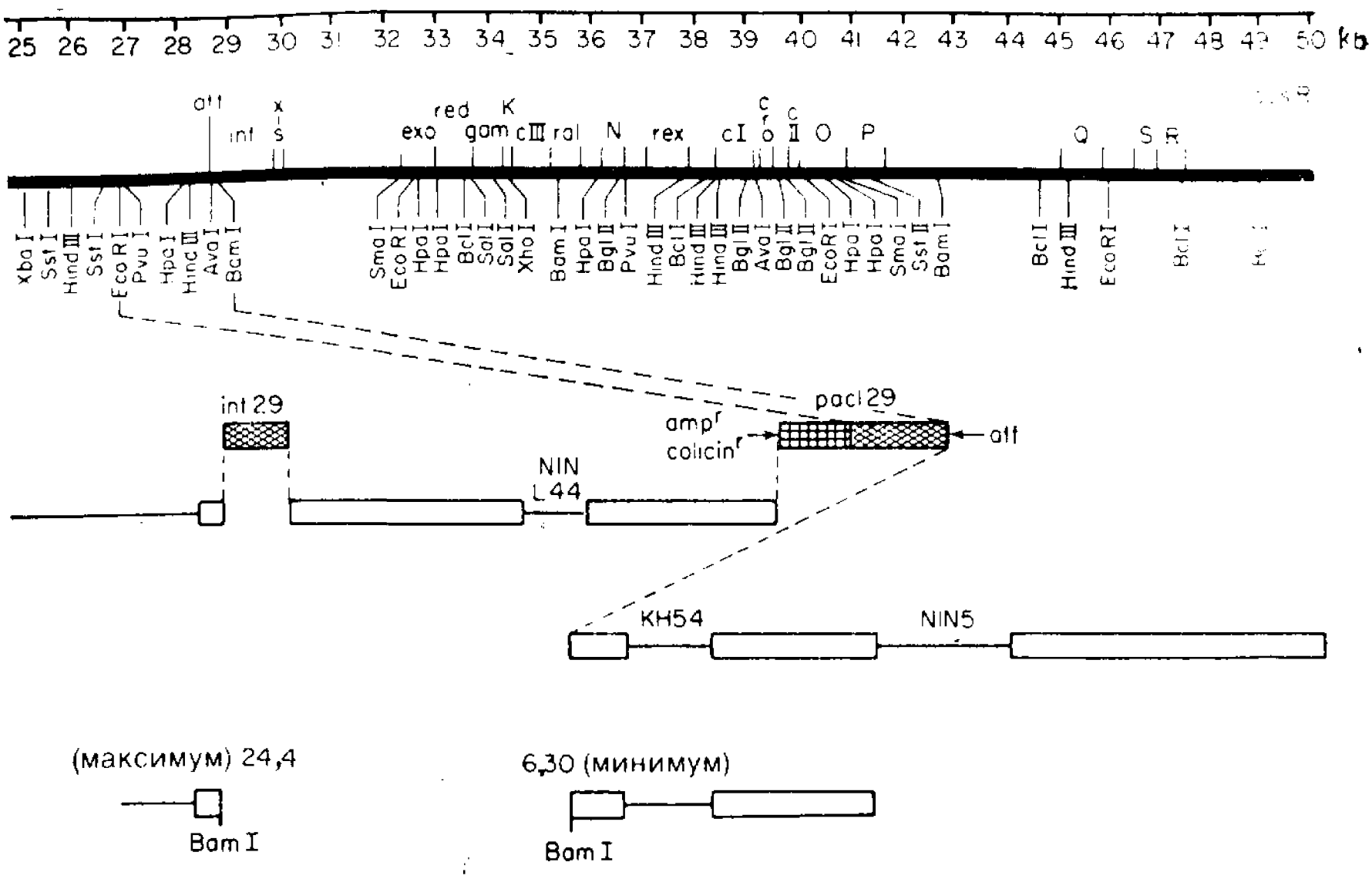
λ1059
Общая длина: 44,0 kb
Генетические маркеры: hλ sBam 1° b189 (int29, NIN L44, c1857, pac129) Δ (int-cIII) KH54 sR1 4° NIN5 chi3
Замещение «балластного» фрагмента (содержащего гены *red* и *gam*) чужеродной ДНК приводит к изменению фенотипа фага со Spi$^+$ на Spi$^-$
Литература: Karn et al., Proc. Natl. Acad. Sci. US, **71**, 5172, 1980

Карта фага λ1059

Это вектор для клонирования больших *Bam*HI-фрагментов, в котором замещение «балластного» фрагмента (содержащего гены *red* и *gam*) чужеродной ДНК приводит к изменению фенотипа фага со Spi$^+$ на Spi$^-$. Вектор содержит область начала репликации ДНК плазмиды pBR322, что позволяет ему размножаться в лизогенных по фагу λ клетках в виде плазмиды (фаз-

на 1 мкг встраиваемой ДНК *D. melanogaster* (Ish-Horowicz, Burke, 1981).

Третья проблема, связанная с трудностью проверки большого числа бактериальных колоний на присутствие искомых последовательностей ДНК, была разрешена после разработки методики

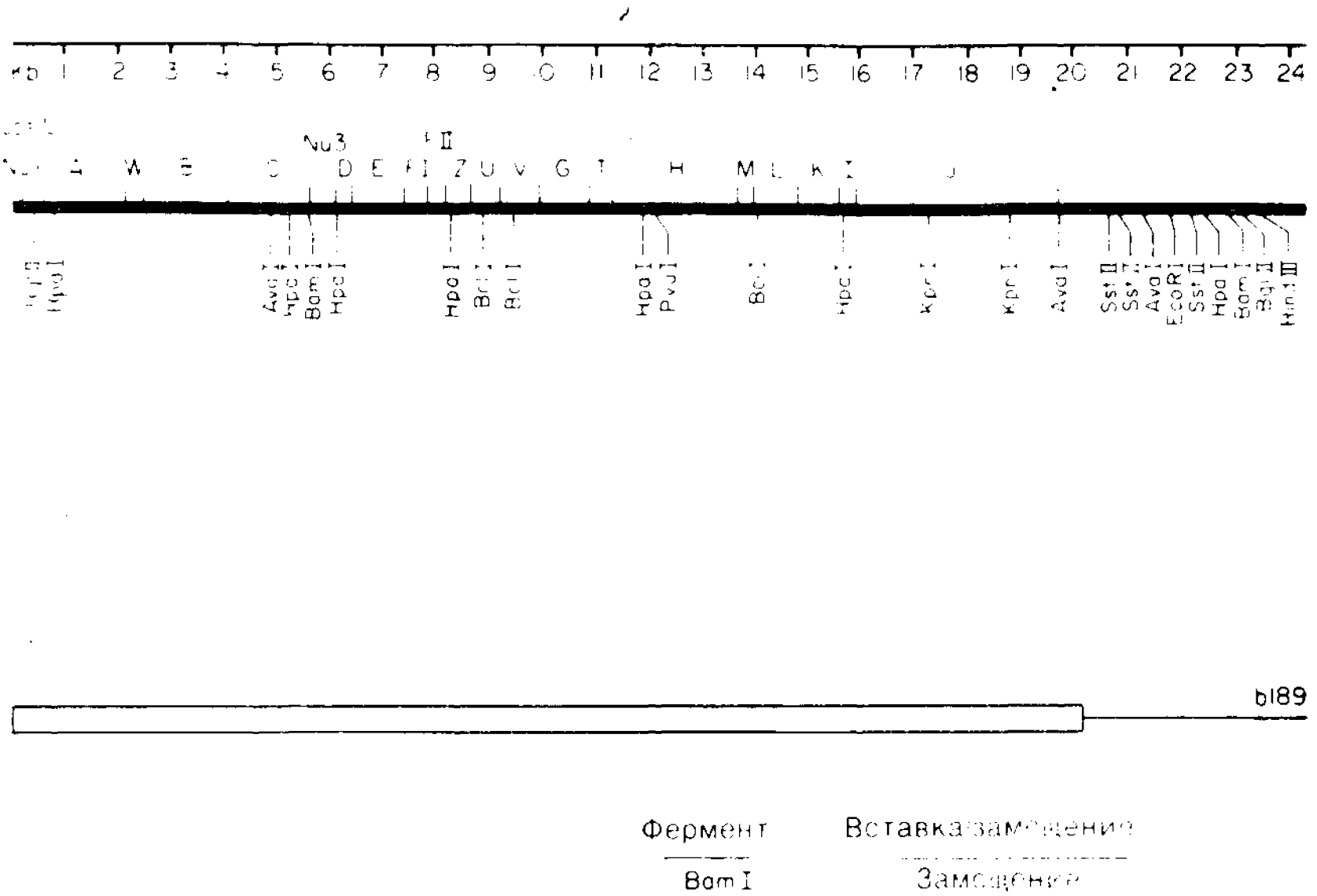


миды). Наличие этой последовательности, однако, затрудняет скрининг библиотек с использованием в качестве зондов фрагментов, полученных из рекомбинантных плазмид. Даже после очистки в геле такие фрагменты неизбежно содержат небольшие количества последовательностей pBR322, которые гибридизуются с бляшками нерекомбинантных фагов.

Еще одна трудность, возникающая при работе с этим вектором, заключается в том, что происходят спонтанные перестройки, приводящие к появлению в препарате родительского фага производных Spi⁻ (с частотой 0,1%). Как полагают, эти производные образуются в результате опосредованных *int* делеций, распространяющихся от сайта *att* внутрь области *spi*. Такая интерпретация подтверждается тем, что в препаратах производного *int*⁻ фага λ1059 (λBF101) отсутствуют спонтанные фаги Spi⁻

скрининга при высокой плотности колоний (с. 297) (Hanahan, Meselson, 1980).

Первыми, кто продемонстрировал возможность клонирования больших фрагментов ДНК в космидах, были Ройал с сотрудниками (Royal et al., 1979). Им удалось выделить из созданной в



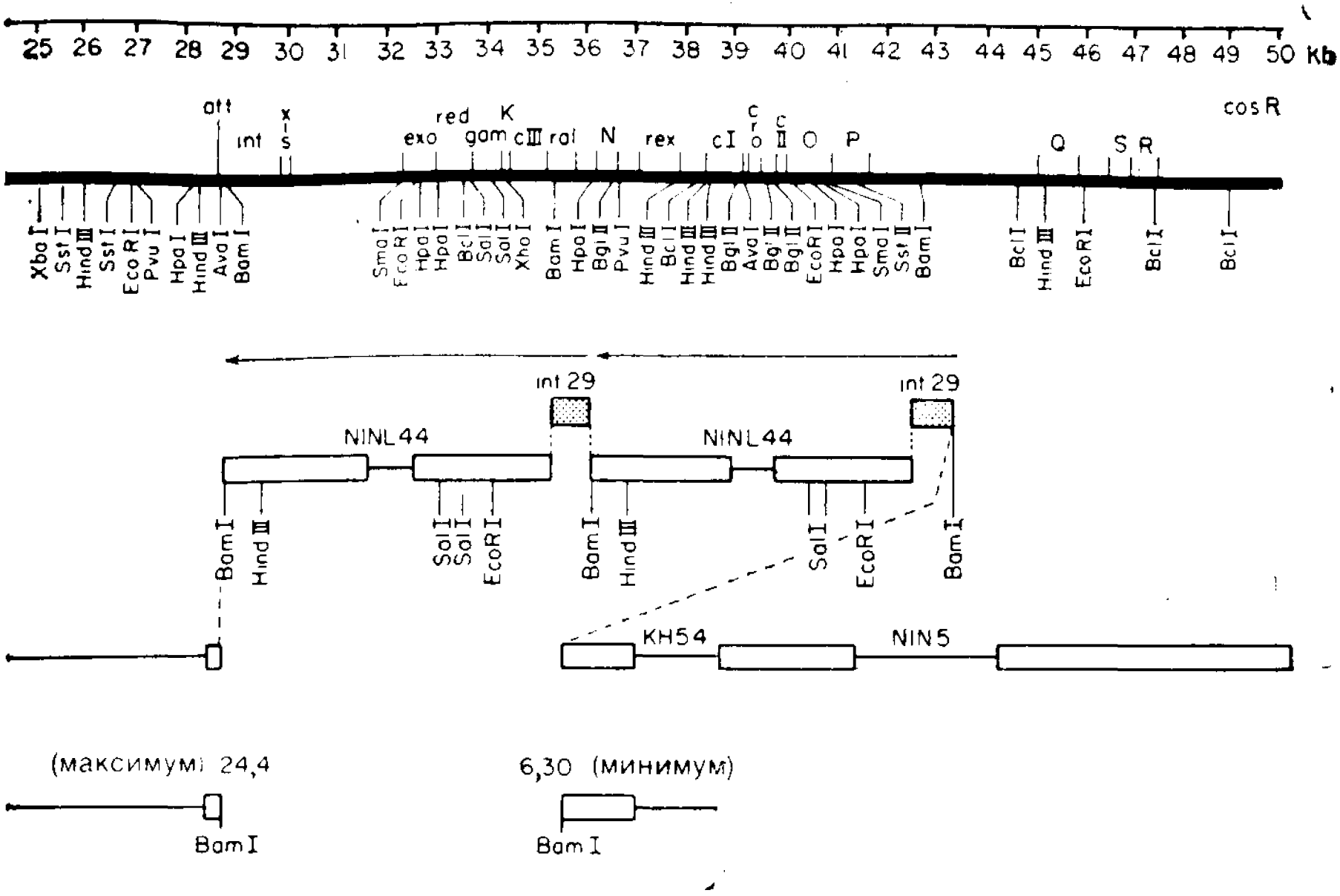
λBF101
Общая длина: 46,0 kb
Генетические маркеры: sBam 1° b189 dupl[int29, NIN L44, cI857 Δ(sIIIindIII 4-HindIII 3 pac129)] KH54, sR1 4° NIN5 chi3
Литература: N. Neff, неопубликованные данные
Примечание: Этот вектор получен из фага λ1059 Нормой Нефф. Внутренний «балластный» фрагмент дуплицирован и две его копии интегрированы тандемно в ориентации, противоположной той, в которой он был в фаге λ1059. Это приводит к инактивации гена *int*. Вектор следует выращивать на хозяине *recA*⁻ (например, на штамме KRO), чтобы сохранялся дуплицированный балластный фрагмент. Замещение этого фрагмента (содержащего гены *red* и *gam*) чужеродной ДНК приводит к тому, что генотип фага изменяется с Spi⁺ на Spi⁻
Приблизительные размеры рестрикционных фрагментов (kb)

*Bam*HI	*Hind*III	*Eco*RI
~20,0	~21,5	~25,0
8,3	8,3	8,3
8,3	11,6	9,2
9,4	4,6	3,6

Карта фага λBF101

Этот вектор получен из фага λ1059, который был изменен в двух отношениях. Во-первых, удален *Hind*III-фрагмент, содержащий последовательность

космидах библиотеки ДНК цыпленка два перекрывающихся фрагмента, которые вместе охватывают более 46 kb этой ДНК и содержат ген овальбумина и два овальбуминоподобных гена. Позднее были созданы космидные библиотеки ДНК *Drosophila* (Meyerowitz et al., 1980; Ish-Horowicz, Burke, 1981), мыши (Cattaneo et al., 1981) и человека (Grosveld et al., 1981). Насколько



плазмиды pBR322, с тем чтобы устранить трудности, обусловленные гибридизацией нерекомбинантных фагов (см. карту фага λ1059). Во-вторых, образовавшийся «балластный» *Bam*HI-фрагмент инвертирован и дуплицирован, и тем самым инактивирован ген *int* (ср. карты фагов λ1059 и λBF101). Ген ***int*** инактивируют для того, чтобы исключить спонтанный фон фагов Spi⁻ в препарате родительского фага (см. карту фага λ1059). Препараты этого фага следует выращивать на штамме KRO *recA*⁻, чтобы предотвратить гомологичный, но неравный кроссинговер между дуплицированными *Bam*HI-фрагментами.

ценным является создание библиотеки ДНК человека в космидах, можно судить хотя бы по тому, что таким образом удалось выделить ряд перекрывающихся фрагментов ДНК, содержащих кластеры генов β-глобина (Grosveld et al., 1981) и генов α-глобина (P. Charney, неопубликованные данные). Последние из этих рекомбинантов, выделенные с использованием самых современных методов клонирования в космидах, оказались стабильными при размножении в бактериях.

В заключение можно сказать, что клонирование в космидах разработано настолько хорошо, что в некоторых случаях является наилучшим из всех известных методов (например, при вы-

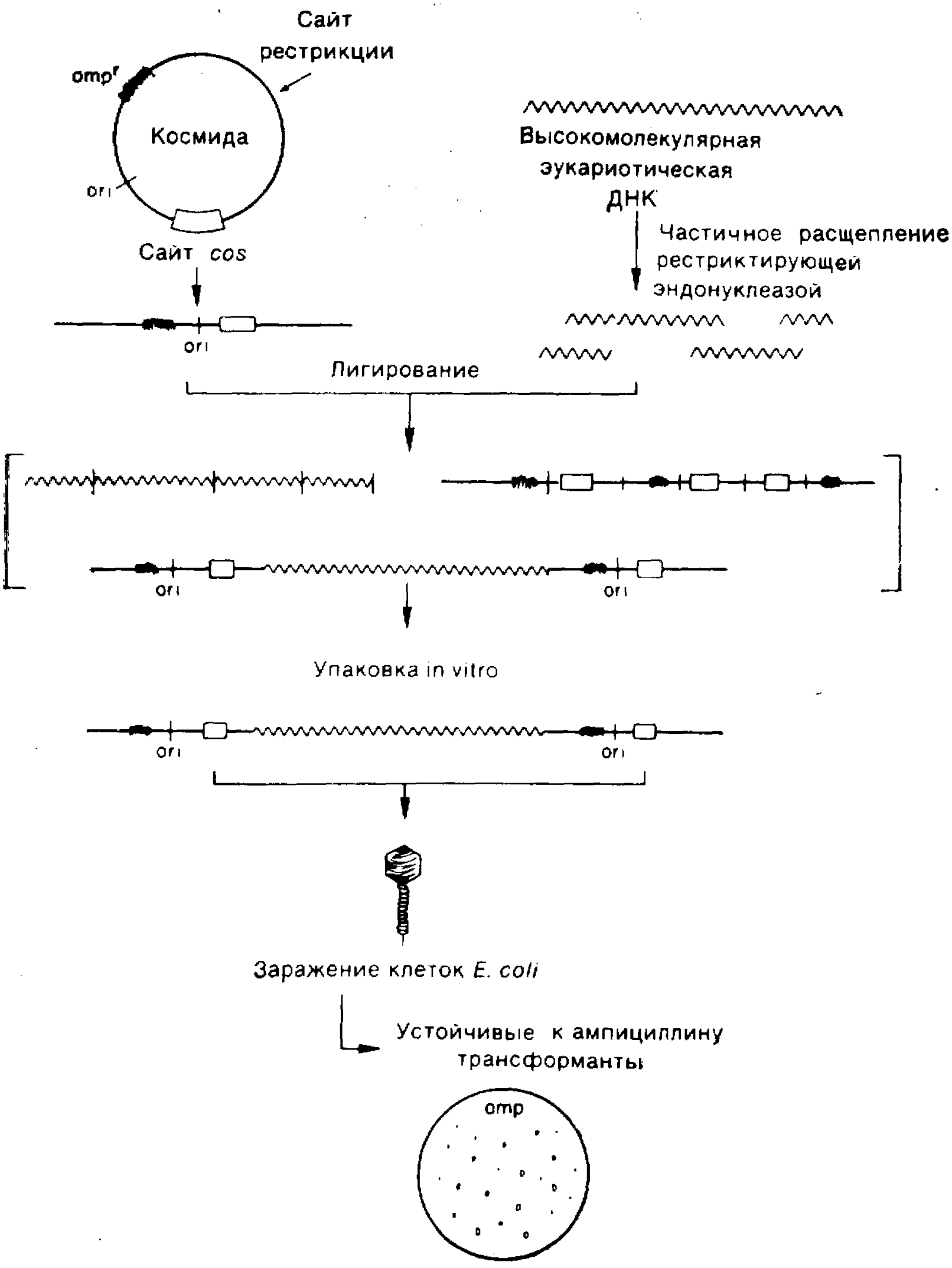


Рис. 1.9. Клонирование в космидах.

делении больших генов или для проведения экспериментов по прослеживанию последовательности в хромосомах). Тем не менее бактериофаг λ, по-видимому, и впредь будет самым лучшим вектором для рутинного создания библиотек эукариотических ДНК благодаря своей высокой эффективности и большей универсальности.

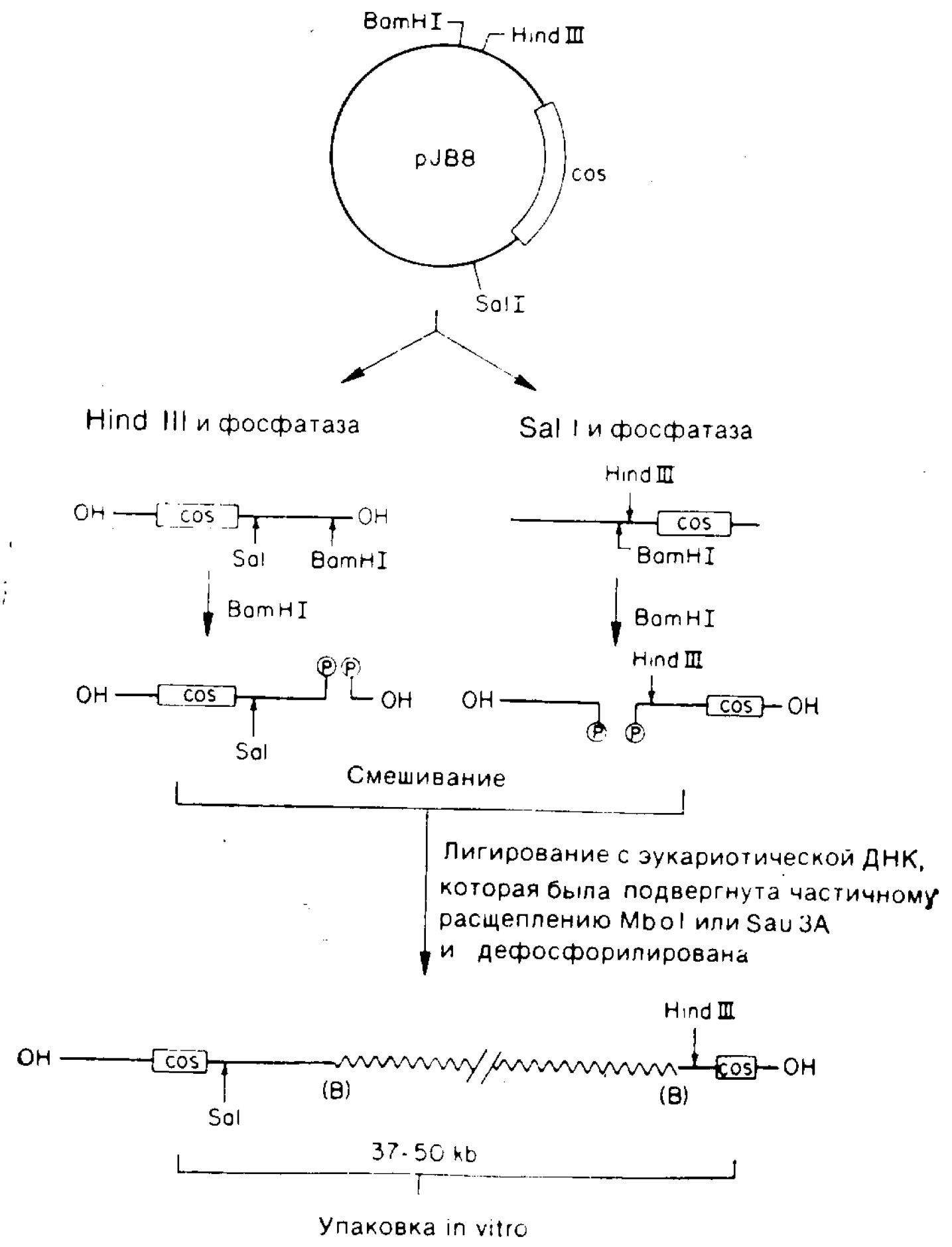
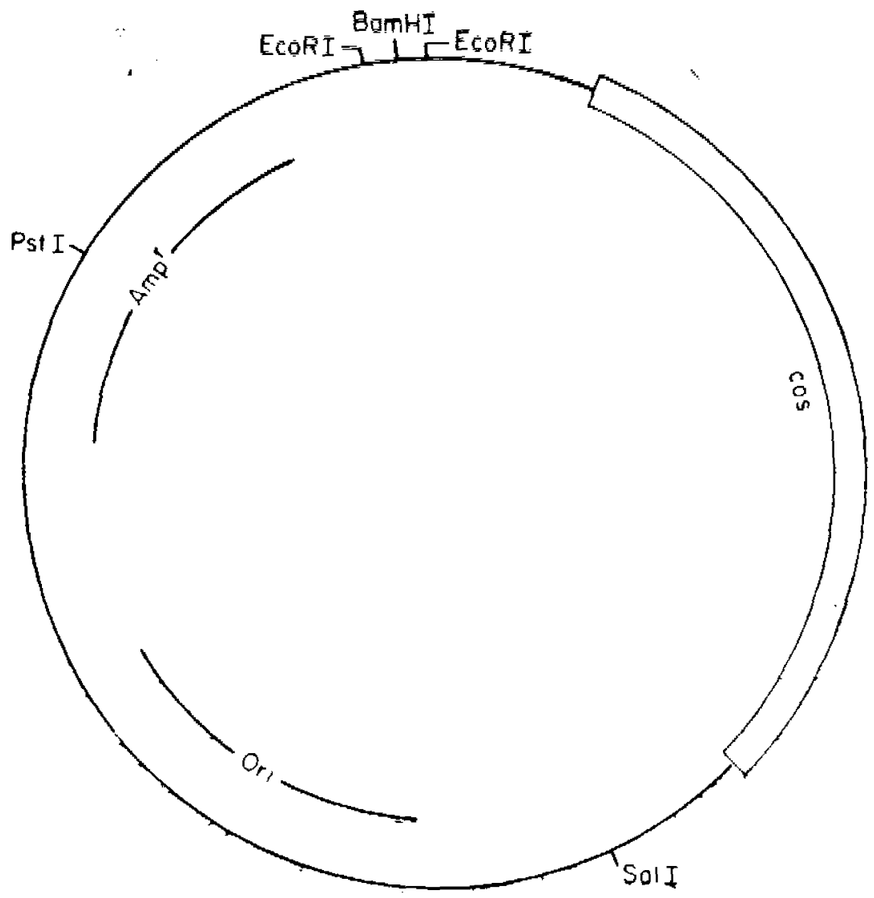


Рис. 1.10. Эффективное клонирование в космидах (Ish-Horowicz, Burke, 1981).

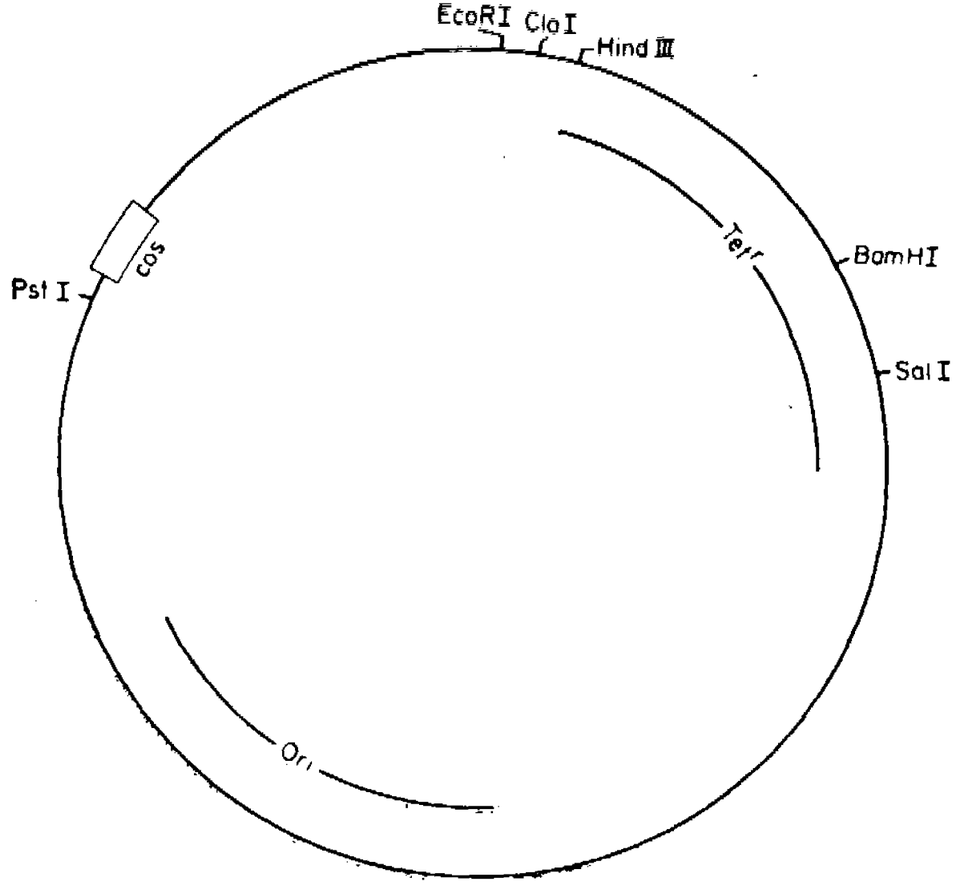
БАКТЕРИОФАГИ, СОДЕРЖАЩИЕ ОДНОЦЕПОЧЕЧНУЮ ДНК

Из векторов-бактериофагов, содержащих одноцепочечную ДНК, наиболее совершенными в настоящее время являются векторы на основе фага M13. Последний представляет собой нитевидный бактериофаг с кольцевой замкнутой ДНК длиной около 6500 нуклеотидов (Denhardt et al., 1978). Фаг M13 адсорбируется на F-пилях *E. coli* и потому способен заражать лишь мужские клетки бактерий (штаммы F′ или Hfr). После проникновения в клетку одноцепочечная ДНК фага превращается в двухцепочечную репликативную форму (РФ), которую можно выделить из клеток и использовать в качестве вектора для клонирования



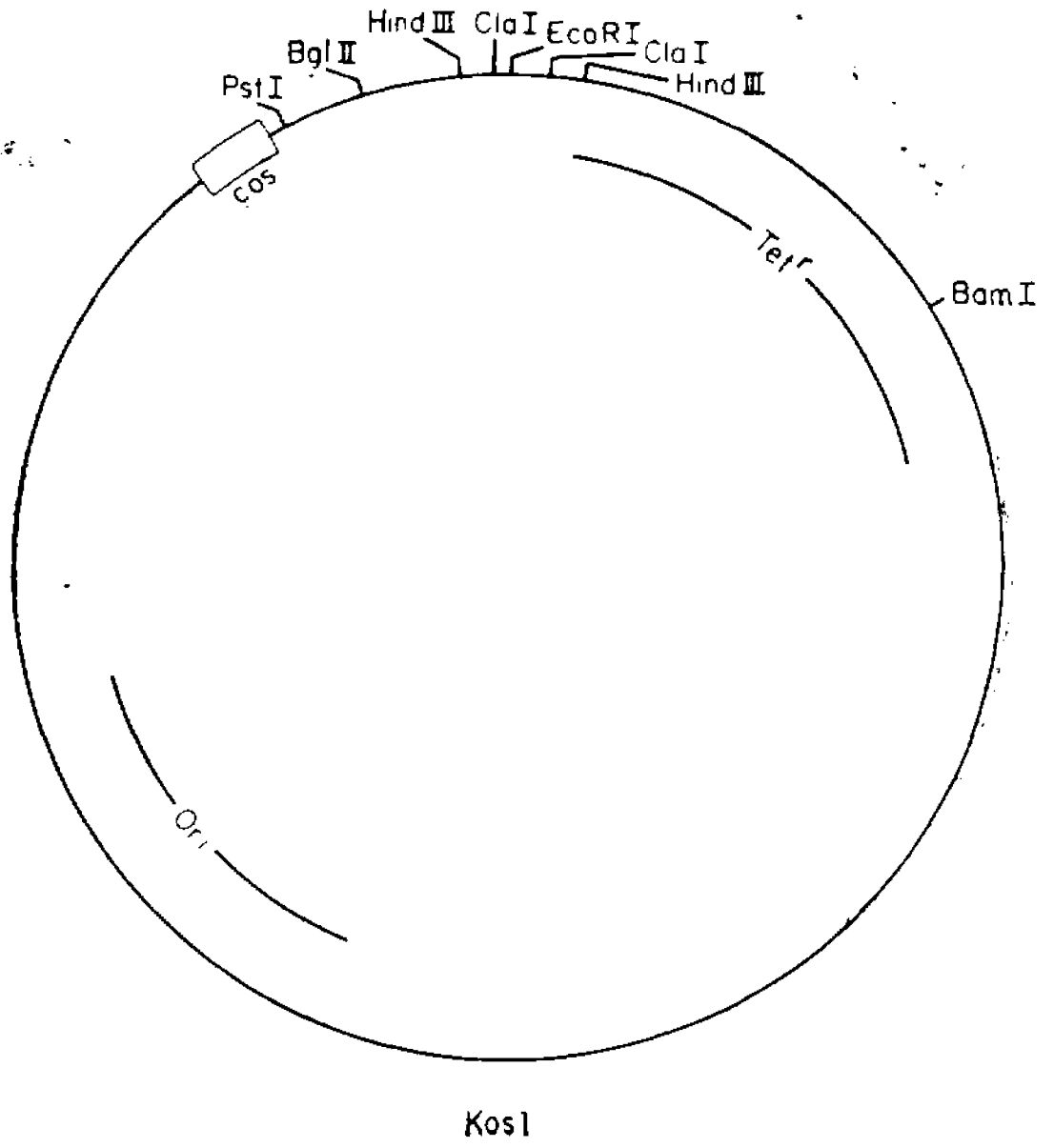
pJB8

Размер: 5,4 kb
Репликон: ColE1, релаксированный
Селективный маркер: Amp^r
Единичные сайты: BamHI, EcoRI, SalI
Литература: Ish-Horowicz, Burke, 1981
Примечание: Космидный вектор, который используется для клонирования больших *Eco*RI- или *Bam*HI-фрагментов с помощью методики, разработанной Иш-Горовицем и Берке (Ish-Horowicz, Burke, 1981)



MUA-3

Размер: 4,7 kb
Репликон: ColE1, релаксированный
Селективный маркер: Tet^r
Единичные сайты: PstI, EcoRI, ClaI
Литература: Meyerowitz et al., 1980
Примечание: Космидный вектор, пригодный для клонирования больших *Eco*RI-фрагментов



Размер: 4,0 kb
Репликон: ColE1, релаксированный
Селективный маркер: Tet^r
Единичные сайты: EcoRI, BglII, PstI, HindIII, ClaI
Литература: P. F. R. Little, неопубликованные данные
Примечание: Космидный вектор, пригодный для клонирования больших рестрикционных фрагментов в сайте *Bgl*II. Инвертированный повтор около сайта *Eco*RI приводит к тому, что у некоторой доли молекул (<5%) в этой области оказываются небольшие делеции

двухцепочечной ДНК. После того как в клетке накапливается 100—200 копий РФ, синтез ДНК фага M13 становится асимметричным и образуются большие количества лишь одной из двух цепей ДНК, а именно той, которая в конце концов войдет в состав зрелых фаговых частиц. Эти частицы непрерывно выделяются зараженными клетками. Хотя клетки при заражении фагом M13 не погибают, их рост несколько подавляется, и потому этот вирус образует на бактериальном газоне мутные бляшки.

Основное преимущество фага M13 как вектора заключается в том, что выделяемые клеткой частицы бактериофага содержат одноцепочечную ДНК, гомологичную одной из двух комплементарных цепей клонируемой ДНК. Такую ДНК можно использовать в качестве матрицы для определения последовательности ДНК по методу Сэнгера с использованием дидезоксинуклеотидов (Sanger et al., 1977). Разработаны векторы M13 и специфические ДНК-затравки (см. ниже), позволяющие провести сек-

венирование из отдельного клона последовательности до 350 оснований (Sanger et al., 1977; Anderson et al., 1980). Быстрое секвенирование длинных участков ДНК удается осуществить путем секвенирования перекрывающихся клонированных фрагментов (Gingeras et al., 1979; Anderson et al., 1981). Кроме того, клоны M13 можно использовать как источник одноцепочечных ДНК-зондов для отбора РНК, а также в качестве субстрата при мутагенезе in vitro (Itakura, Riggs, 1980).

Основная трудность при клонировании в M13 связана с нестабильностью больших вставок ДНК. Как правило, клонированные последовательности длиной более 1000 нуклеотидов нестабильны, и при размножении такого бактериофага появляются делеции. Однако вставки длиной 300—400 нуклеотидов оказываются достаточно стабильными, чтобы их можно было применять в указанных выше целях.

Векторы на основе бактериофага M13

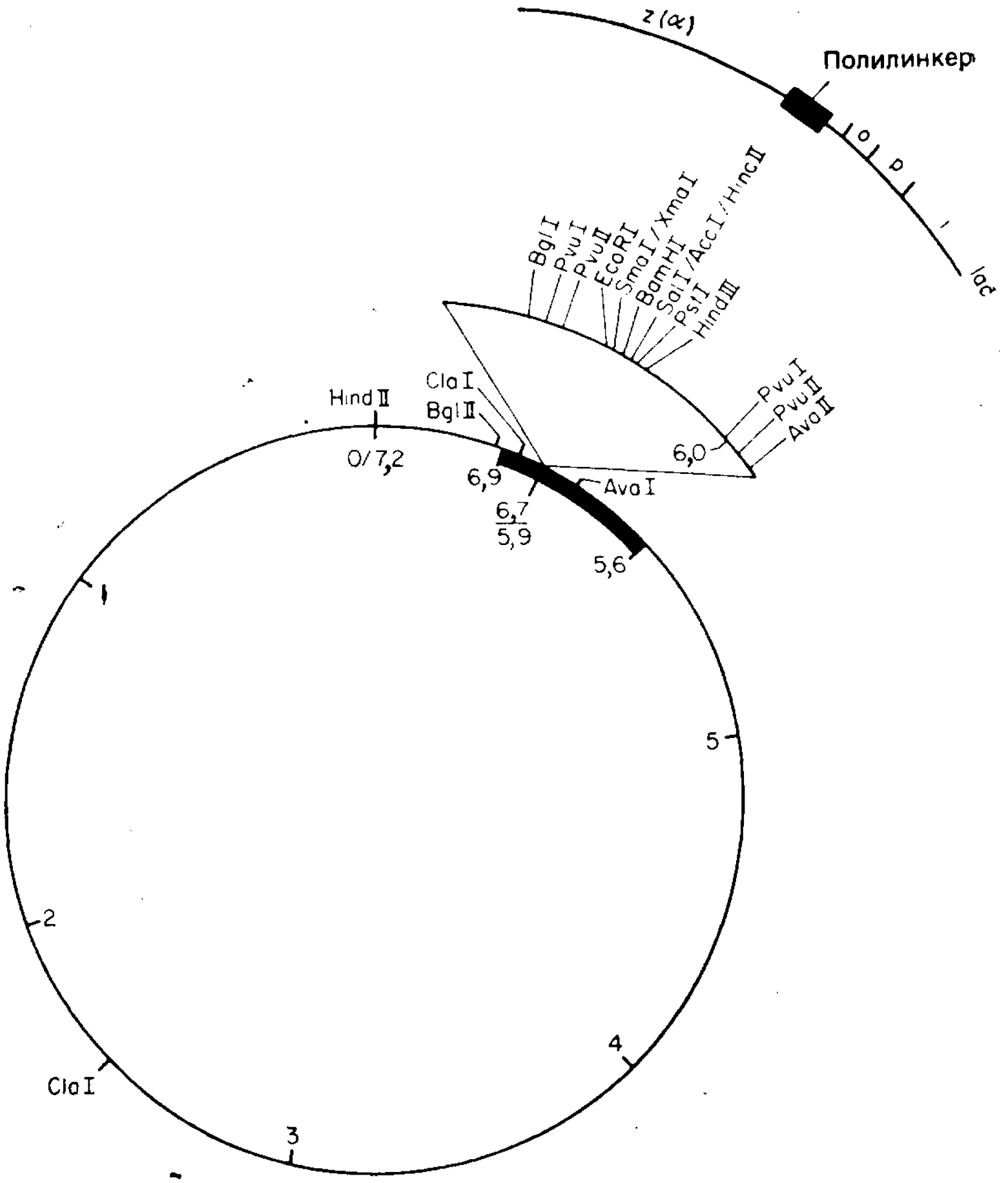
За исключением участка длиной 507 нуклеотидов, названного межгенной последовательностью (МП), весь геном фага M13 содержит генетическую информацию, необходимую для репликации этого вируса. Показано, что в участок МП можно встраивать чужеродную ДНК, и это не влияет на жизнеспособность фага. В производных M13, сконструированных для использования в качестве клонирующих переносчиков, в эту область встроены последовательности двух типов.

1. Первая из них представляет собой фрагмент *lac*-оперона *E. coli*, содержащий регуляторную область и последовательность

Таблица 1.2. Векторы M13 и используемые для клонирования сайты

Вектор	Сайты для клонирования	Источник данных
mp2	*Eco*RI[1]	Gronenborn, Messing, 1978
mp5	*Eco*RI-*Hind*III-*Eco*RI[2]	J. Messing, личное сообщение
mp7	*Eco*RI-*Bam*HI-*Sal*I-*Pst*I-*Sal*I-*Bam*HI, *Eco*RI	Messing et al., 1981
mp8	*Eco*RI-*Sma*I-*Bam*HI-*Sal*I-*Pst*I-*Hind*III	J. Messing, личное сообщение
mp9	*Hind*III-*Pst*I-*Sal*I-*Bam*HI-*Sma*I-*Eco*RI[3]	J. Messing, личное сообщение

[1]) Этот сайт появился не при включении линкерной последовательности, а в результате мутации, индуцировавшей сайт для *Eco*RI в пятом кодоне гена β-галактозидазы.
[2]) Структура сайта для клонирования в векторе mp5 сложнее, чем здесь показано. Этот сайт состоит из нескольких линкеров, расположенных тандемно и ограниченных с обеих сторон по крайней мере двумя линкерами *Eco*RI.
[3]) В векторе mp9 полилинкер находится в ориентации, противоположной его ориентации в mp8.



M13 mp8

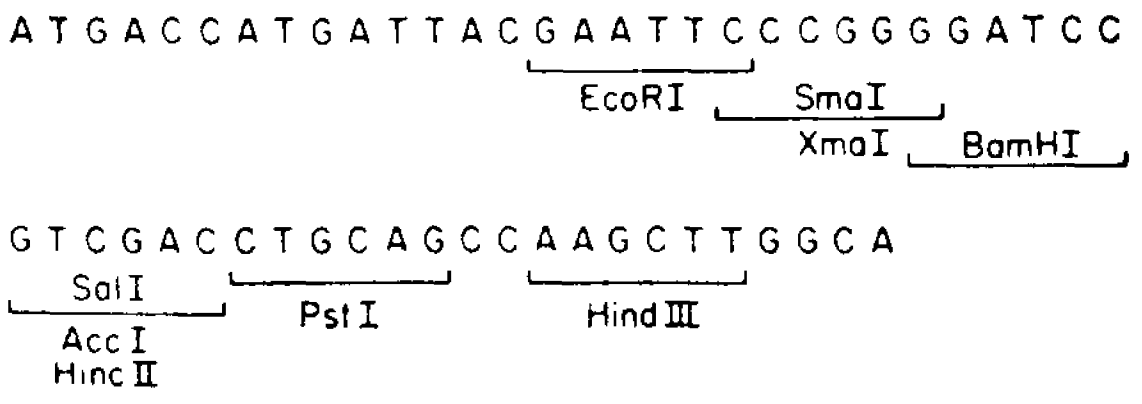


Рис. 1.11. Этот клонирующий вектор (mp8) создан Д. Мессингом на основе фага M13. Он содержит полилинкер, и потому в нем можно клонировать разнообразные фрагменты ДНК, полученные при расщеплении рестриктирующими эндонуклеазамн. Вставка в полилинкер фрагмента чужеродной ДНК инактивирует ген β-галактозидазы, что позволяет очень просто выявлять те фаги, которые содержат такие вставки (по инактивации α-комплементации).

гена *Z*, которая кодирует первые 146 аминокислот β-галактозидазы. Образуемая в зараженных клетках аминоконцевая часть β-галактозидазы способна комплементировать («α-комплементация») с дефектной β-галактозидазой, которая кодируется мутантным геном в F-факторе клетки-хозяина. В результате такой комплементации получается активная β-галактозидаза, и если фаг и клетки выращивают в присутствии индуктора изопропилтиогалактозида (IPTG) и хромогенного субстрата Xgal, то бляшки приобретают голубую окраску.

2. Последовательность второго типа представляет собой небольшой фрагмент ДНК (полилинкер), встроенный в «аминоконцевую» часть гена β-галактозидазы и содержащий используемые для клонирования единичные сайты для нескольких рестриктаз. Эта вставка не влияет на способность образующегося фрагмента β-галактозидазы комплементировать с мутантной β-галактозидазой клетки. Однако встраивание в эту область дополнительного фрагмента ДНК нарушает комплементацию. Содержащие такой дополнительный фрагмент фаги образуют на среде с IPTG и Xgal бесцветные бляшки. Схема канонического клонирующего вектора M13 приведена на рис. 1.11. Клонирующие векторы M13 различаются в основном находящимися в полилинкере рестрикционными сайтами. В табл. 1.2 перечислены сайты для клонирования, содержащиеся в используемых в настоящее время векторах.

Специфические небольшие фрагменты ДНК, которые используются в качестве затравок при секвенировании клонированных ДНК, теперь субклонируют в плазмидах (Anderson et al., 1980) или синтезируют химическим путем (Rothstein et al., 1980), и они имеются в продаже. Эти затравки гомологичны области гена β-галактозидазы, расположенной в векторе M13 непосредственно рядом с областью полилинкера.

ВЫВОДЫ

Как уже говорилось в начале этой главы, четыре типа векторов — плазмиды, бактериофаг λ, космиды и бактериофаг M13 — обладают особыми биологическими и физическими свойствами, позволяющими использовать их для решения различных задач клонирования. Отличительные свойства и основные применения каждого из этих четырех типов векторов суммированы в табл. 1.3.

Космиды и различные штаммы бактериофага λ способны включать большие фрагменты чужеродной ДНК, и потому они используются как векторы для конструирования и размножения библиотек геномных ДНК эукариот. Однако они довольно неудобны в качестве векторов для работы с небольшими фрагментами ДНК и для их подробного анализа и, по крайней мере в

Таблица 1.3. Основные применения различных векторов в клонировании

	Плазмиды	Бактериофаг	Космиды	Бактериофаги с одноцепочечной ДНК
Клонирование больших фрагментов ДНК	±[1)]	+	+	—
Создание геномных библиотек	—	+	+	—
Создание библиотек кДНК	+	—	—	—
Обычное субклонирование	+	—	—	—
Создание новых конструкций ДНК	+	—	—	—
Секвенирование	+	—	—	+
Создание одноцепочечных зондов	—[2)]	—	—	+
Аиализ экспрессии чужеродных генов в *E. coli*	+	—	—	—

[1)] Хотя четкого верхнего предела размера ДНК, которую можно клонировать в плазмидных векторах, не существует, эффективность трансформации и выход ДНК рекомбинантных плазмид, содержащих вставки ДНК более 10 kb, оказываются очень низкими.

[2)] Сконструирован плазмидный вектор, содержащий в одной цепи ДНК последовательность poly(dA), а в другой — poly(dT) (Hayashi et al., 1980). После клонирования в этом векторе цепи линеаризованной рекомбинантной ДНК можно разделить с помощью хроматографии на oligo(dT)- и oligo(dA)-целлюлозе.

настоящее время, не подходят для создания библиотек кДНК.

Векторы для клонирования, содержащие одноцепочечную ДНК, используются главным образом при получении матриц для секвенирования методом терминирования цепей по Сэнгеру с использованием дидезоксинуклеотидов и как источник отдельных цепей ДНК для гибридизации нуклеиновых кислот. Относительная нестабильность вставок ДНК размером 1 kb не позволяет использовать одноцепочечные бактериофаги для большинства других целей.

Плазмиды широко используются в самых разнообразных процедурах клонирования. Они способны включать фрагменты ДНК средних размеров, что позволяет применять такие векторы для субклонирования библиотек геномных ДНК, созданных на основе космид или бактериофага λ. Плазмиды содержат много удобных сайтов рестрикции, что неоценимо при создании новых конструкций ДНК. Это единственные векторы, удобные для клонирования кДНК. Наконец, создано большое число плазмид, в которых кодирующие участки клонируемой ДНК можно поставить под контроль очень эффективных бактериальных промоторов. Такие векторы, свойства которых подробно описаны в гл. 12, используют для анализа экспрессии чужеродных генов в *E. coli*.

В Приложении В приведен список использованных в этом руководстве бактериальных штаммов.

Глава 2

РАЗМНОЖЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ШТАММОВ И ВИРУСОВ И ОБРАЩЕНИЕ С НИМИ

Микробиологические методики, которые используются при молекулярном клонировании, очень просты и не должны представлять затруднений для тех, кто владеет основными приемами работы в стерильных условиях. Чаще всего приходится сталкиваться с двумя трудностями: с перекрестным загрязнением штаммов и с утратой или появлением новых генетических маркеров. Оба эти затруднения можно свести к минимуму, если проводить очистку колоний или бляшек, а затем проверять генотип штамма. Следует избегать последовательного пассирования штаммов и получать культуры, с которыми ведется работа, из проверенных основных культур, содержащихся на длительном хранении.

Даже в лучших лабораториях, где работа ведется на самом высоком уровне, может произойти загрязнение культур, и важно проверять культуры на появление бактериальных колоний с измененными морфологией, цветом или запахом, а препараты фага на появление бляшек необычного размера или на образование бляшек на необычных хозяевах. Чашки с несоответствующей культурой, как и любые чашки, загрязненные плесенью или другими грибами, нужно отобрать, проавтоклавировать и выбросить.

ПРОВЕРКА ШТАММА

При получении нового штамма бактерии или бактериофага его нужно рассеять и отобрать отдельные колонии или бляшки. Затем нужно вырастить культуры в небольшом объеме и соответствующим образом проверить генотип этого штамма. В книге Миллера (Miller, 1972) подробно описано, как следует проводить такую проверку бактерий. Соответствующие генетические тесты для бактериофагов обычно приводятся в той публикации, где описано, как создан данный штамм и как его размножают. Перечень генетических маркеров, которые часто приходится проверять, приведен в табл. 2.1. Структура ДНК векторов должна быть подтверждена при расщеплении в аналитических пробах этих ДНК соответствующими рестриктирующими ферментами.

Таблица 2.1. Генетические маркеры

Маркер	Проверяемая характеристика
Маркеры ауксотрофности (например, потребность в тимидине, диаминопимелиновой кислоте, биотине)	Способность клеток расти на минимальных средах с добавками или без них
Метаболические маркеры (например, способность сбраживать лактозу, галактозу)	Способность клеток расти на минимальных средах, содержащих соответствующий сахар в качестве единственного источника углерода, или способность образовывать окрашенные колонии на средах, содержащих соответствующие красители или хромогенные субстраты
Устойчивость к лекарственным препаратам (например, к тетрациклину, ампициллину, канамицину, стрептомицину, налидиксовой кислоте)	Способность клеток расти на средах, содержащих один или несколько лекарственных препаратов
supE и *supF* (супрессоры амбер-мутаций)	Способность культуры допускать образование бляшек бактериофагами, нуждающимися в *supE*, *supF* или в обоих этих супрессорах
Амбер-мутации в бактериофагах	Способность образовывать бляшки лишь на бактериях, содержащих супрессоры *supE* или *supF*; для проверки локализации амбер-мутации можно использовать тест на комплементацию с такими бактериофагами, которые заведомо содержат амбер-мутации в определенных генах

ВЫДЕЛЕНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ КОЛОНИЙ

РАССЕВ ШТРИХОМ

1. Простерилизуйте платиновую петлю в пламени, пока она не накалится до светло-красного цвета. Охладите ее на воздухе (петлю можно охладить быстрее, погрузив ее в стерильную воду или среду или воткнув в стерильную агаризованную среду).

2. Охлажденной петлей захватите бактерии. Коснитесь петлей отдельной, хорошо изолированной колонии, выросшей на поверхности твердой среды. Перенесите прилипшие к петле бактерии в стерильную пробирку, содержащую 1 мл жидкой среды. Перемешайте содержимое пробирки с помощью смесителя Vortex, чтобы диспергировать сгустки бактерий.

3. Простерилизуйте петлю в пламени, охладите ее и погрузите в полученную суспензию бактерий. Нанесите прилипшие к петле бактерии штрихом на сегмент чашки с агаризованной средой (рис. 2.1). Простерилизуйте петлю в пламени и охладите ее, погрузив в свободный от бактерий участок агаризованной

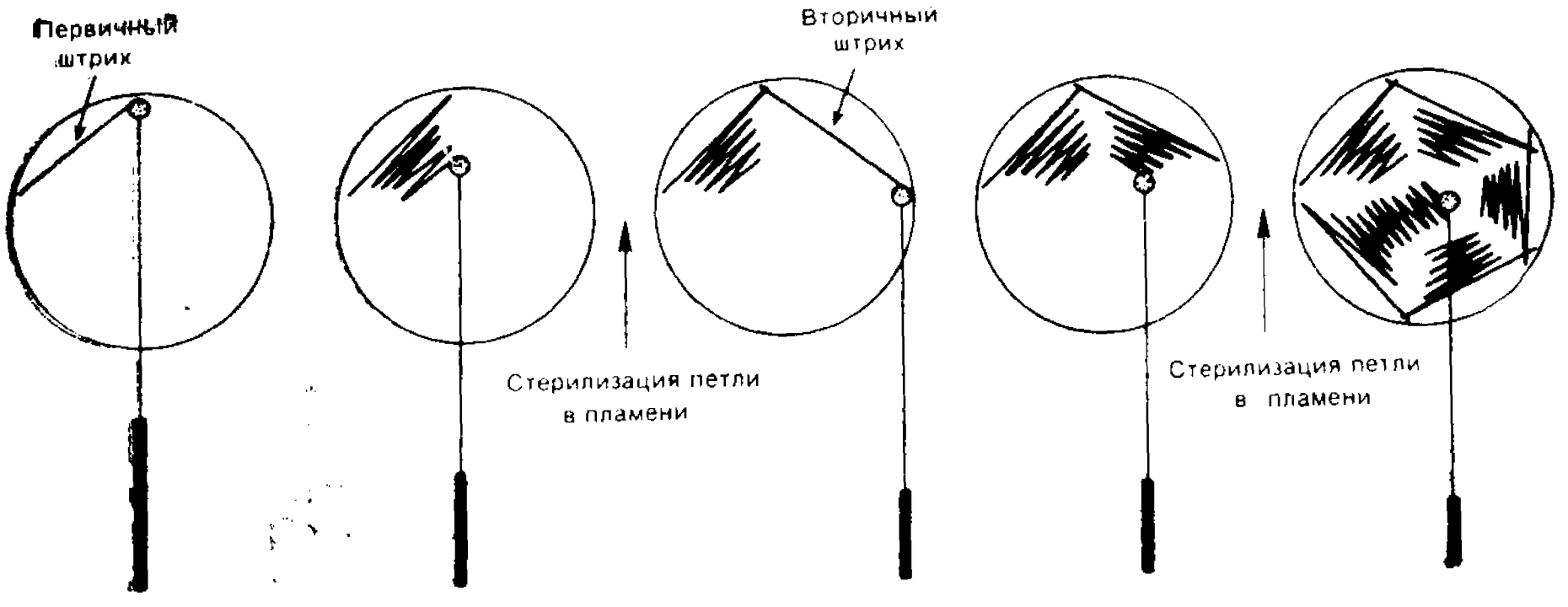


Рис. 2.1.

среды. Один раз проведите петлей поперек одного из концов первичного штриха и рассейте прилипшие к петле бактерии по свежей области агаризованной среды.

4. Вновь простерилизуйте петлю и проведите штрих с конца вторичного штриха.

5. Последовательно повторите этап 3 еще два раза.

6. Накройте чашку крышкой. Надпишите дно чашки и проинкубируйте ее в перевернутом положении при подходящей температуре (обычно при 37 °С) в течение 16—24 ч. В области последнего штриха должны проявиться отдельные, отстоящие друг от друга на достаточном расстоянии колонии.

Примечание. Так как каждая колония представляет собой потомство одной бактериальной клетки, генетически чистую культуру можно получить, коснувшись колонии стерильной петлей и перенеся клетки в чашку, столбик или жидкую среду. Можно также переносить колонии, используя стерильную пастеровскую пипетку или микропипетку. Для этого стерильную пипетку погружают сквозь колонию бактерий в лежащую под ней агаризованную среду. Получившуюся агаровую пробку вместе с колонией всасывают в пипетку, пользуясь надетой на нее резиновой грушей. Эту пробку вместе с бактериями выдувают затем в стерильный сосуд с питательной средой.

ВЫСЕВ НА ЧАШКИ

1. Стерильной петлей перенесите бактерии с агарового косяка или из жидкой культуры в стерильную пробирку с 3,0 мл стерильной среды, содержащей 0,7% агара. Пробирку держите в водяной бане при 47 °С, чтобы агар не затвердел.

2. Перемешайте содержимое пробирки с помощью смесителя Vortex, чтобы не осталось сгустков бактерий. Обожгите петлю в пламени, охладите ее, погрузите в пробирку и все, что

забралось петлей, перенесите во вторую пробирку, с мягкой агаризованной средой.

3. Последовательно повторите этап 2 два или три раза. Содержимое каждой пробирки с мягким агаром вылейте на отдельную чашку с застывшим нижним агаром. Осторожно повращайте чашку, чтобы расплавленный агар распределился по всей ее поверхности. Закройте чашку крышкой и надпишите ее.

4. После того как верхний агар затвердеет при комнатной температуре, переверните чашки и проинкубируйте их в течение 16—24 ч при температуре, подходящей для высеянного штамма бактерий.

5. В одной или нескольких чашках окажутся отдельные колонии, которые можно отобрать уколом, как это описано выше, и использовать как исходный материал для получения чистой культуры бактерий.

РАСТИРАНИЕ

1. Перенесите бактерии с агарового косяка или из жидкой культуры в пробирку с 1 мл жидкой среды. Тщательно перемешайте содержимое пробирки с помощью смесителя Vortex, чтобы диспергировать все сгустки бактерий.

2. Пользуясь стерильной микропипеткой, разведите суспензию клеток, перенеся 10 мкл суспензии из первой пробирки в свежую пробирку с 1 мл среды.

3. Последовательно повторите этап 2 два или три раза.

4. Из каждого разведения нанесите небольшую каплю (10—50 мкл) в центр чашки с застывшей агаризованной средой. Разотрите клетки по всей поверхности среды изогнутой стерильной стеклянной палочкой, осторожно перемещая ее взад и вперед по поверхности агара и одновременно поворачивая чашку рукой или используя вращающуюся платформу. Стеклянный шпатель можно простерилизовать, погрузив его в стакан с 95%-ным этанолом и воспламенив затем спирт в пламени бунзеновской горелки. После этого сначала охладите шпатель на воздухе, а затем коснитесь им поверхности чашки со стерильной агаризованной средой.

Предостережение. Не ставьте стакан с этанолом вблизи зажженной бунзеновской горелки. Не погружайте в стакан с этанолом горячий стеклянный шпатель.

ВЫРАЩИВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ШТАММОВ. ОБРАЩЕНИЕ С НИМИ

ВЫРАЩИВАНИЕ БАКТЕРИЙ

В идеальных условиях культура *Escherichia coli* растет экспоненциально. Скорость роста культуры зависит от среды, генотипа штамма, температуры и аэрации. По мере увеличения плот-

ности культуры скорость деления клеток снижается до тех пор, пока бактерии не достигнут такой концентрации (насыщающей плотности), при которой они больше уже не делятся, но остаются жизнеспособными.

Чаще всего за скоростью роста бактериальной культуры следят, отбирая из нее через определенные промежутки времени пробы и измеряя оптическую плотность (D) при длине волны 600 нм. ($D_{600}=1$ примерно соответствует $8\cdot10^8$ клетка/мл.) Можно также выращивать бактерии в сосудах, снабженных специально изготовленными боковыми отводами, которые помещены прямо в денситометр.

Так как точное соотношение между оптической плотностью и числом бактерий для *E. coli* несколько варьирует от штамма к штамму, для точных определений желательно построить калибровочную кривую зависимости числа жизнеспособных бактерий от D_{600} для каждой культуры.

Наилучшей аэрации культур достигают в том случае, если поместить колбу или пробирку в ротационную качалку или на вращающуюся платформу. Объем сосуда должен по крайней мере в четыре раза превышать объем содержащейся в нем среды, чтобы его можно было энергично встряхивать (на ротационной качалке при 250 об/мин; на вращающейся платформе при 100 об/мин).

КРАТКОВРЕМЕННОЕ ХРАНЕНИЕ

В течение нескольких недель колонии большинства штаммов бактерий могут храниться на поверхности агаризованной среды, если чашки плотно заклеить парафильмом и держать перевернутыми при 4 °С.

ХРАНЕНИЕ В ТЕЧЕНИЕ НЕ ОЧЕНЬ ДЛИТЕЛЬНОГО ПЕРИОДА

Большинство штаммов бактерий можно хранить в течение 1—2 лет в столбиках. Такие культуры обычно приготавливают в небольших флаконах с завинчивающимися пробками, содержащих 2—3 мл агаризованной среды. Культуру в них вносят стерильной прямой платиновой проволочкой. Ее обмакивают в плотную жидкую культуру бактерий, а затем погружают в глубь агаризованной среды. В течение ночи инкубируют столбик при нужной температуре, причем крышка флакона при этом должна быть завернута неплотно. Затем крышку туго завинчивают и аккуратно заклеивают парафильмом, чтобы среда не подсыхала. Столбик с культурой хранят в темноте при комнатной температуре.

ДЛИТЕЛЬНОЕ ХРАНЕНИЕ

Бактерии можно хранить в течение многих лет при низкой температуре в среде, содержащей глицерин в концентрации 15%, без существенного снижения жизнеспособности.

1. Внесите отдельную бактериальную колонию в сосуд с 5—10 мл жидкой среды и подрастите культуру в течение ночи.

2. Перенесите 0,85 мл ночной культуры в стерильный флакон с 0,15 мл стерильного глицерина. Закройте флакон крышкой и перемешайте содержимое, пользуясь смесителем Vortex.

3. После этого культура может храниться в глицерине при —20 °С в течение нескольких лет, не утрачивая жизнеспособности. Суспензию с глицерином можно хранить также и при —70 °С. В этом случае жизнеспособные бактерии можно извлекать из суспензии в течение многих лет после того, как она была заморожена. Жизнеспособные бактерии можно просто соскребать стерильной платиновой петлей или проволочкой с поверхности замороженного столбика. После этого замороженную суспензию можно опять поместить в морозильную камеру. Замораживать следует по несколько флаконов каждой культуры.

ОЧИСТКА БЛЯШЕК БАКТЕРИОФАГА λ

ПРИГОТОВЛЕНИЕ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ВЫСЕВА

1. Засейте отдельной колонией бактерий 50 мл богатой среды (например, NZCYM или LB) с 0,2%-ной мальтозой в колбе на 250 мл и проинкубируйте в течение ночи. Выросшие в присутствии мальтозы бактерии эффективнее адсорбируют бактериофаг λ, чем выросшие без мальтозы. Этот сахар индуцирует мальтозный оперон, включающий ген *lam*B, который кодирует рецептор фага λ.

2. Отцентрифугируйте клетки при 4000 g в течение 10 мин при комнатной температуре.

3. Слейте надосадочную жидкость и ресуспендируйте осадок клеток в стерильном 0,01 М $MgSO_4$ (0,4 объема исходной культуры). Результаты получаются стабильнее, если ресуспендированные клетки разводить до определенной концентрации (обычно соответствующей оптической плотности $D_{600}=2$, т. е. примерно до $1{,}5\cdot10^9$ клетка/мл).

4. Хранить клетки следует при 4 °С. Такой суспензией бактерий можно пользоваться до 3 нед. Однако эффективность посева оказывается выше, если пользоваться свежими клетками (в течение первых 2 сут.).

РАССЕВ БАКТЕРИОФАГА λ ШТРИХОМ ДО ОТДЕЛЬНЫХ БЛЯШЕК

1. Добавьте 0,1 мл препарата бактерий для высева к 3,0 мл мягкой агаризованной среды, находящейся в водяной бане при 47 °С. Вылейте суспензию бактерий в мягком агаре на чашку с

нижним агаром NZCYM или LB. Чтобы поверхность агара стала плотнее, чашки после этого можно выдержать в течение 1 ч при 4 °С.

2. Погрузите прямую платиновую проволочку в препарат бактериофага или в отдельную бляшку и затем осторожно проведите этой проволочкой штрихи по поверхности застывшей агаризованной среды.

3. Переверните чашку и проинкубируйте ее при 37 °С. Бляшки появятся примерно через 8 ч инкубации.

ВЫСЕВ БАКТЕРИОФАГА λ

1. Приготовьте последовательные разведения препарата бактериофага в 10 раз в среде SM. Перенесите по 0,1 мл каждого анализируемого разведения в две аналитические пробирки размером 13×100 мм.

2. Добавьте в каждую такую пробирку по 0,1 мл суспензии бактерий для высева. Перемешайте содержимое пробирки, встряхнув ее или поместив в смеситель Vortex. Проинкубируйте 20 мин при 37 °С, чтобы частицы бактериофага адсорбировались на клетках.

3. Добавьте в первую пробирку 3,0 мл среды (при 47 °С) с расплавленным 0,7%-ным агаром или агарозой, осторожно перемешайте в смесителе Vortex и сразу же вылейте в заранее надписанную чашку, содержащую 30—35 мл застывшей нижней агаризованной среды. Старайтесь, чтобы при этом не образовывались пузырьки воздуха. Осторожно повращайте чашку, чтобы бактерии и верхний агар (агароза) равномерно распределились по ней. Проделайте то же самое с каждой пробиркой.

4. Закройте чашки и оставьте их на 5 мин при комнатной температуре, чтобы застыл верхний агар (агароза). Переверните чашки и инкубируйте их при 37 °С. Бляшки начнут появляться примерно через 8 ч. Подсчитывать их или отбирать уколом следует через 12—16 ч инкубации.

Примечание. Хотя титр фага в лизатах жидких культур или препаратах бактериофага λ, полученных в чашках, может сильно варьировать, большинство их содержит от 10^9 до 10^{11} частиц фага в 1 мл.

ОТБОР БЛЯШЕК УКОЛОМ

1. Поместите 1,0 мл среды SM в полипропиленовую пробирку размером 13×100 мм. Добавьте 1 каплю хлороформа.

2. Пастеровской пипеткой с надетой на нее резиновой грушей или микропипеткой проткните выбранную бляшку до конца нижнего агара. Осторожно отпуская грушу, захватите в пипетку бляшку вместе с подстилающим агаром.

3. Выдуйте этот кусочек агара в 1,0 мл среды SM с 1 каплей хлороформа. Оставьте на 1—2 ч при комнатной температуре, чтобы частицы бактериофага диффундировали из агара. В среднем бляшка дает 10^6—10^7 инфекционных фаговых частиц. Такой препарат можно неограниченно долго хранить при 4 °С в среде SM с хлороформом без утраты инфекционности.

Примечание. Так как бактериофаг λ может диффундировать через верхний агар на значительное расстояние, выбирайте лишь такие бляшки, которые находятся от других достаточно далеко. По той же причине желательно отбирать бляшки вскоре после того, как вырос бактериальный газон и стали проявляться бляшки бактериофага.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ ФАГА λ ИЗ ОТДЕЛЬНЫХ БЛЯШЕК

Для получения препаратов фага из отдельных бляшек пользуются обычно двумя методами: методом *лизатов на чашках,* когда фаг размножается в бактериях, растущих в мягком агаре, и методом *жидких культур в небольшом объеме,* когда фаг размножается в жидкой среде.

Хотя выход вируса в обоих случаях оказывается примерно одинаковым, первый метод имеет то преимущество, что можно следить за тем, успешно ли растет бактериофаг, просто наблюдая за степенью слияния бляшек на чашках.

Фаголизаты на чашках

Для получения максимального выхода нужно высевать столько бактериофага, чтобы внешние кромки растущих бляшек соприкоснулись примерно через 12 ч инкубации. Обычно для достижения такого сплошного лизиса на чашку диаметром 85 мм (56,7 $см^2$) достаточно внести 10^5 бляшкообразующих единиц (БОЕ). К концу периода роста на чашке не должно быть пятен — незараженных участков.

Метод 1

1. Смешайте 10^5 БОЕ бактериофага (или 1/20 ресуспендированной бляшки) с 0,1 мл суспензии бактерий для высева. Инкубируйте 20 мин при 37 °С.

2. Добавьте 3,0 мл расплавленного верхнего агара (агарозы) при 47 °С, перемешайте и вылейте все в надписанную заранее чашку диаметром 85 мм, содержащую 30 мл застывшего нижнего агара NZCYM или LB. Наилучшие результаты получаются при использовании свежеприготовленных чашек, но и в более старых чашках (разлитых за 1—4 сут до опыта) выходы оказываются удовлетворительными.

3. Переверните чашку и проинкубируйте ее в течение 8—12 ч, пока лизис не станет сплошным.

4. Переверните чашку обратно, добавьте к ее содержимому 5 мл среды SM и проинкубируйте в течение нескольких часов при 4 °С, время от времени осторожно покачивая.

5. Пастеровской пипеткой отберите из чашки как можно больше среды SM. Налейте 1 мл свежей среды SM и на 15 мин поставьте чашку наклонно, чтобы вся жидкость стекла к одному краю. Опять отберите из чашки среду SM и добавьте ее к той среде, которая была собрана в первый раз. Чашку выкиньте.

6. К собранной среде SM добавьте 0,1 мл хлороформа. Непродолжительное время перемешайте с помощью смесителя Vortex и отцентрифугируйте при 4000 g в течение 10 мин при 4 °С.

7. Соберите надосадочную жидкость и добавьте хлороформ до концентрации 0,3%. Если препарат хранится при 4 °С, титр бактериофага в нем (примерно 10^{10} част./мл) обычно не изменяется.

Метод 2

1. Смешайте 10^5 частиц бактериофага (или 1/20 ресуспендированной бляшки) с 0,1 мл суспензии бактерий для высева. Проинкубируйте 20 мин при 37 °С.

2. Добавьте 3,0 мл расплавленного 0,5%-ного верхнего агара (агарозы), перемешайте и вылейте все в надписанную заранее чашку диаметром 85 мм с 30 мл нижнего агара.

3. Проинкубируйте чашки в течение 8—12 ч при 37 °С не переворачивая.

4. По достижении сплошного лизиса аккуратно соскоблите стерильным стеклянным шпателем мягкий верхний агар (агарозу) и соберите его в стерильную центрифужную пробирку.

5. Налейте в чашку 5 мл среды SM, чтобы смыть оставшийся верхний агар (агарозу), и слейте этот смыв в ту же центрифужную пробирку.

6. Добавьте хлороформ (0,1 мл) и перемешайте содержимое пробирки, встряхивая или вращая ее в течение 15 мин при 37 °С.

7. Отцентрифугируйте в течение 10 мин при 4000 g и 4 °С.

8. Соберите надосадочную жидкость, добавьте хлороформ до концентрации 0,3% и храните полученный препарат при 4 °С. Титр фага в препарате должен быть около 10^{10} част./мл.

Примечание. Основные препараты важных штаммов бактериофага λ (например, векторов), у которых проверены генотипы, следует хранить при температуре —70 °С. Для этого нужно добавить к препарату бактериофага диметилсульфоксид (DMSO) до конечной концентрации 7% (по объему). Осторожно перемешать смесь и поместить сосуд в жидкий азот. Когда содержимое его замерзнет, нужно перенести сосуд в морозильную

камеру, где поддерживается температура —70 °С, для длительного хранения. Чтобы отобрать нужное количество препарата бактериофага, можно поскоблить поверхность замерзшей жидкости стерильной иглой № 18. Для получения бляшек бактериофага λ следует нанести этот материал штрихом на поверхность чашки с индикаторными бактериями (с. 79).

ЖИДКИЕ КУЛЬТУРЫ НЕБОЛЬШОГО ОБЪЕМА[1]

1. Смешайте в стерильной полипропиленовой пробирке на 15 мл 0,1 мл свежей ночной культуры бактерий и примерно $3 \cdot 10^6$ частиц бактериофага (1/2—1/3 ресуспендированной бляшки).
2. Проинкубируйте смесь 20 мин при 37 °С, чтобы произошла адсорбция бактериофага.
3. Добавьте 4 мл среды NZCYM или LB и проинкубируйте смесь, интенсивно встряхивая ее, при 37 °С в течение 6—12 ч, пока культура не лизирует. Лучше всего при этом поместить пробирку в термостатированную качалку или на вращающуюся платформу.
4. После того как произойдет лизис, добавьте хлороформ до концентрации 1% и проинкубируйте смесь еще 15 мин.
5. Отцентрифугируйте ее при 4000 g в течение 10 мин при 4 °С.
6. Отберите надосадочную жидкость, добавьте к ней хлороформ до концентрации 0,3% и храните ее при 4 °С. Титр фага в препарате должен быть около 10^{10} част./мл.

СРЕДЫ И АНТИБИОТИКИ

ЖИДКИЕ СРЕДЫ

Среда NZCYM

На 1 л:

NZ-амин[2]	10 г
NaCl	5 г
Казаминовые кислоты	1 г
Дрожжевой экстракт	5 г
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2 г

Доведите pH до 7,5 с помощью NaOH.

Среда NZYM

Идентична среде NZCYM, но не содержит казаминовых кислот.

---

[1] Leder et al., 1977.

[2] Гидролизат казеина тип А, поставляемый фирмой Humko Scheffield Chemical Division of Kraft, Inc., 1099 Wall St. West, Lynnhurst, NJ 07071.

Среда LB (Лурия-Бертани)

На 1 л:

Триптон	10 г
Дрожжевой экстракт	5 г
NaCl	10 г

Доведите pH до 7,5 с помощью NaOH.

Среда M9

На 1 л:

Na_2HPO_4	6 г
KH_2PO_4	3 г
NaCl	0,5 г
NH_4Cl	1 г

Доведите pH до 7,4, проавтоклавируйте и затем добавьте:

1 M $MgSO_4$	2 мл
20%-ная глюкоза	10 мл
1 M $CaCl_2$	0,1 мл

Эти растворы следует стерилизовать по отдельности фильтрованием (глюкоза) или автоклавировать.

Среда M9CA

Идентична среде M9, но содержит еще и казаминовые кислоты (20 г/л).

Среда χ1776

На 1 л:

Триптон	25 г
Дрожжевой экстракт	7,5 г
1 M трис-HCl, pH 7,5	20 мл

Проавтоклавируйте смесь, охладите и добавьте:

1 M $MgCl_2$	5 мл
1%-ная диаминопимелиновая кислота	10 мл
0,4%-ный тимидин	10 мл
20%-ная глюкоза	25 мл

Хлористый магний следует стерилизовать отдельно автоклавированием, а остальные ингредиенты стерилизовать по отдельности фильтрованием.

Среда SOB

На 1 л:

Триптон	20 г
Дрожжевой экстракт	5 г
NaCl	0,5 г

Доведите pH до 7,5 с помощью KOH и проавтоклавируйте. Непосредственно перед использованием добавьте 20 мл 1 М $MgSO_4$, проавтоклавированного отдельно.

Концентрированные среды

Некоторые среды (например, LB, NZYM и NZCYM) можно готовить и хранить в концентрированном виде (5×). При необходимости среду нужной концентрации можно быстро приготовить, разведя такой концентрат стерильной водой.

Мальтоза

Часто в среду для выращивания бактерий, которые потом будут использоваться для высева бактериофага λ, добавляют мальтозу (0,2%). Приготовьте следующий раствор:

Мальтоза	20 г
H_2O	до 100 мл

Простерилизуйте раствор фильтрованием. Добавьте 1 мл стерильного 20%-ного раствора мальтозы на 100 мл среды.

SM

Эта среда используется для хранения и для разведения фага. На 1 л:

NaCl	5,8 г
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2 г
1 М трис-HCl, pH 7,5	50 мл
2%-ная желатина	5 мл

Проавтоклавируйте среду и храните порциями по 50 мл.

Примечание. Все описанные выше жидкие среды после стерилизации можно хранить при комнатной температуре неограниченно долго.

Среды, содержащие агар или агарозу

Приготовьте жидкие среды в соответствии с приведенными выше прописями. Непосредственно перед автоклавированием добавьте (на 1 л) один из следующих ингредиентов:

Агар Bacto	15 г (для чашек)
Агар Bacto	7 г (для верхнего агара)
Агароза (тип 1, с низким электроэндоосмосом)	15 г (для чашек)
Агароза	7 г (для верхней агарозы)

Прежде чем разливать среду по чашкам, проавтоклавируйте ее и перед тем, как добавлять термолабильные вещества (например, антибиотики), охладите до 55 °С. После этого ее можно

разливать по чашкам прямо из флакона, наливая примерно 30—35 мл в чашку Петри диаметром 85 мм. Если образуются пузырьки, то, не дожидаясь, пока застынет агар, следует провести по его поверхности огнем бунзеновской горелки.

Как правило, прежде чем использовать чашки, их следует выдержать в течение 1—2 сут при комнатной температуре, чтобы не происходила конденсация паров воды и крышки не запотевали. Избыток влаги приводит к расплыванию бляшек бактериофага или колоний бактерий.

Верхняя агароза и верхний агар

Эффективность посева бактериофага λ одинакова при использовании как верхнего агара, так и верхней агарозы. Однако для некоторых целей (например, если бактериофаг будет переноситься с чашек на нитроцеллюлозные фильтры для скрининга с помощью гибридизации) лучше использовать верхнюю агарозу, поскольку она не так легко, как верхний агар, прилипает к фильтру и выхватывается им.

Удобнее приготовить большую порцию стерильного верхнего агара (агарозы). Ее можно расфасовать по 50 мл во флаконы объемом 100 мл, плотно закупорить их и хранить неограниченно долго при комнатной температуре. Содержимое флакона можно расплавить непосредственно перед использованием, поместив флакон примерно на 10 мин в кипящую водяную баню или поставив его на 1—1,5 мин в микроволновую печь. В любом случае перед нагреванием пробку флакона следует приоткрыть. Далее флакон нужно перенести в водяную баню на 47 °С, выдержать там в течение 20 мин и использовать верхний агар (агарозу).

АНТИБИОТИКИ

Ампициллин

Приготовьте водный раствор натриевой соли ампициллина с концентрацией 25 мг/мл. Простерилизуйте раствор фильтрованием и храните порциями при —20 °С.

Для чашек. После автоклавирования охладите среду до 55 °С и добавьте ампициллин до конечной концентрации 35—50 мкг/мл. Чашки с ампициллином можно хранить при 4 °С лишь в течение 1—2 нед.

Хлорамфеникол

Растворите сухой хлорамфеникол в 100%-ном этаноле, так чтобы концентрация антибиотика составляла 34 мг/мл. Если хранить раствор при —20 °С, то хлорамфеникол не разрушается по крайней мере в течение года.

Таблица 2.2. Антибиотики: механизм их действия и механизм устойчивости к ним

Антибиотик	Механизм действия	Механизм устойчивости
Ампициллин (Ap)	Производное пенициллина, которое убивает растущие клетки, блокируя терминальную реакцию синтеза клеточной стенки бактерий	Ген устойчивости (*bla*) кодирует периплазматический фермент β-лактамазу, который расщепляет β-лактамовое кольцо этого антибиотика
Хлорамфеникол (Cm)	Бактериостатический агент, который блокирует синтез белка у бактерий, связываясь с 50S-субчастицами рибосом и препятствуя образованию пептидной связи	Ген устойчивости (*cat*) кодирует ацетилтрансферазу, которая ацетилирует этот антибиотик и тем самым инактивирует его
Колицин E1 (Col E1)	Относится к бактериоцинам, летальным для штаммов бактерий, у которых нет гена устойчивости; колицин E1 вызывает летальные изменения мембраны у бактерий-мишеней	Ген устойчивости (*cea*) кодирует продукт, который неизвестным пока образом блокирует действие колицина
Канамицин (Km)	Бактерицидный агент, который связывается с 70S-рибосомами и приводит к ошибкам при считывании мРНК	Ген устойчивости (*kan*) кодирует фермент, который вызывает модификацию этого антиобиотика, что препятствует связыванию его с рибосомами
Стрептомицин (Sm)	Бактерицидный агент, который связывается с 30S-субчастицами рибосом и приводит к ошибкам при считывании информационной РНК	Ген устойчивости (*str*) кодирует фермент, который модифицирует этот антибиотик, что препятствует связыванию его с рибосомами
Тетрациклин (Tc)	Бактериостатический агент, который блокирует синтез белка у бактерий, связываясь с 30S-субчастицами рибосом	Ген устойчивости (*tet*) кодирует белок, модифицирующий мембрану бактерий, что препятствует проникновению этого антибиотика в клетку

Для чашек. После автоклавирования охладите среду до 55 °C и непосредственно перед тем, как разливать ее, добавьте хлорамфеникол до конечной концентрации 10 мкг/мл. Храните чашки при 4 °C и используйте их в течение 1—5 сут.

Канамицин

Приготовьте водный раствор канамицинсульфата с концентрацией 25 мг/мл. Простерилизуйте его фильтрованием и храните порциями при —20 °C.

Для чашек. После автоклавирования охладите среду до 55 °C и добавьте канамицин до конечной концентрации 50 мкг/мл.

Стрептомицин

Приготовьте водный раствор стрептомицинсульфата с концентрацией 20 мг/мл. Простерилизуйте его фильтрованием и храните порциями при —20 °С.

Для чашек. После автоклавирования охладите среду до 55 °С и добавьте стрептомицин до конечной концентрации 25 мкг/мл.

Тетрациклин

Приготовьте раствор тетрациклингидрохлорида с концентрацией 12,5 мг/мл в смеси этанол — вода (50% по объему). Простерилизуйте его фильтрованием и храните порциями при —20 °С в темноте (например, во флаконах, обернутых алюминиевой фольгой).

Для чашек. После автоклавирования охладите среду до 55 °С и добавьте тетрациклин до конечной концентрации 12,5—15,0 мкг/мл. Так как тетрациклин разрушается на свету, чашки следует хранить при температуре 4 °С в темноте.

Примечание. Ионы магния являются антагонистами тетрациклина. Поэтому для выращивания бактерий в присутствии этого антибиотика лучше использовать среды без солей магния (например, среду LB). Если нужна более богатая среда, то можно использовать среду χ1776, в которую вместо хлористого магния добавлен хлористый натрий (6 г/л).

Глава 3

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК БАКТЕРИОФАГА λ И ПЛАЗМИД

ПОЛУЧЕНИЕ БАКТЕРИОФАГА λ В БОЛЬШИХ КОЛИЧЕСТВАХ

Существуют два метода получения больших количеств бактериофага λ. В первом из них бактерии заражают с низкой множественностью и засевают такой зараженной культурой большой объем среды. Сначала концентрация бактериофага в культуре оказывается низкой, и незараженные клетки в ней продолжают делиться в течение нескольких часов. Однако в результате последовательных циклов инфекции образуются все большие и большие количества бактериофага. В конце концов все бактерии оказываются зараженными, и культура полностью лизирует. Следует иметь в виду, однако, что уже небольшое изменение соотношения между количеством фага и клеток при первичной инфекции сильно сказывается на конечном выходе бактериофага. Кроме того, оптимальное соотношение фага и клеток неодинаково для разных штаммов бактериофага λ и бактерий. Тем не менее, приложив некоторые усилия, этот метод можно применять для большинства комбинаций вируса и клеток-хозяев.

Второй метод включает индукцию лизогенных бактерий. Эта методика дает наилучшие результаты, если бактериофаг обладает температурочувствительным репрессором (*cIts*). В этом случае можно индуцировать развитие фага по литическому пути, просто повысив на некоторое время температуру, при которой выращивают культуру. Метод этот очень прост, но, конечно, его можно использовать лишь в случае таких бактериофагов, которые приводят к образованию стабильных лизогенов. Среди таких фагов имеется несколько полезных штаммов. Это штамм *c*1857*ts* Sam7, для которого характерен большой выход фаговой ДНК и который может использоваться для получения ДНК стандартной молекулярной массы (маркера), а также штамм λgt-λC, применяющийся в качестве вектора. Большинство же других используемых в настоящее время векторов не может приводить к образованию лизогенов.

ЗАРАЖЕНИЕ

Эта методика представлена множеством вариантов. Однако у нас наилучшие результаты получаются при использовании описываемой ниже процедуры (Blattner et al., 1977; Maniatis et al., 1978).

Для получения бактериофага из 2 л культуры зараженных бактерий проделайте следующее.

1. Посейте отдельную колонию соответствующей бактерии-хозяина в 100 мл среды NZCYM в колбе на 500 мл. Проинкубируйте смесь в течение ночи при 37 °С при интенсивном встряхивании.

2. Измерьте D_{600} культуры. Определите концентрацию клеток, считая, что $D_{600}=1$ соответствует концентрации $8\cdot10^8$ клетка/мл.

3. Отберите четыре пробы по 10^{10} клеток в каждой. Осадите клетки центрифугированием при 4000 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Слейте надосадочную жидкость.

4. Каждый осадок бактерий ресуспендируйте в 3 мл среды SM.

5. Добавьте бактериофаг и быстро перемешайте смесь. Количество добавляемого бактериофага является существенным. Если штамм бактериофага λ размножается хорошо (например, фаг λgtWES-λB), то к каждой суспензии, содержащей 10^{10} клеток, добавляйте по $5\cdot10^7$ частиц бактериофага. Если же бактериофаг растет относительно плохо (например, фаги серии Харон), то лучше увеличить количество добавляемого фага до $5\cdot10^8$ частиц. Однако эти правила не являются жесткими, и не исключено, что множественность заражения, которая даст наилучшие результаты при данных условиях, можно будет найти лишь опытным путем.

6. Проинкубируйте смесь 20 мин при 37 °С, периодически встряхивая.

7. Внесите каждую из проб, включающих по 10^{10} клеток, в колбу на 2 л, содержащую 500 мл предварительно прогретой при 37 °С среды NZCYM. Проинкубируйте смесь при 37 °С, интенсивно встряхивая. Параллельный рост бактерий и бактериофага, который должен происходить, приведет через 9—12 ч к лизису культуры.

Полностью лизировавшая культура содержит значительные количества обломков бактерий как в виде легкого осадка, так и в виде более крупных волокнистых сгустков. Если такую культуру посмотреть на просвет, то не видно шелковистости и перепадов показателя преломления, характерных для плотной нелизировавшей бактериальной культуры.

8. Если на глаз не удается определить, произошел ли лизис, то проделайте следующее. Отберите из каждой зараженной

культуры в стеклянные пробирки по две пробы (по 1 мл). К одной из них добавьте 1—2 капли хлороформа. Проинкубируйте обе пробирки 5—10 мин при 37 °С, периодически встряхивая. Сравните вид этих культур, рассматривая пробирки на просвет. Если заражение было почти полным, но клетки еще не лизировали, то хлороформ разрушит клетки, мутная культура просветлеет и станет полупрозрачной. В этом случае приступайте к этапу 9. Если же лизиса не произойдет, то иногда положение можно спасти, добавив к каждой культуре еще по 500 мл прогретой до 37 °С среды NZCYM. Инкубацию следует продолжить еще 2—3 ч, встряхивая как можно интенсивнее.

9. Добавьте в каждую колбу по 10 мл хлороформа и продолжайте инкубировать и встряхивать колбу еще 30 мин.

10. Переходите к очистке бактериофага λ (этап 1, с. 92).

ИНДУКЦИЯ[1]

Для получения бактериофага λ из 2 л культуры индуцированных бактерий выполните следующие операции.

1. Рассейте штрихом соответствующие лизогенные бактерии на две чашки со средой NZCYM. Одну из чашек проинкубируйте при 30 °С, а другую — при 42 °С. Колонии должны вырасти только в той чашке, которая инкубируется при 30 °С.

2. Отберите уколом отдельную колонию из той чашки, которая инкубировалась при 30 °С, и засейте ею 100 мл среды NZCYM в колбе на 500 мл. Проинкубируйте в течение ночи при 30 °С при сильной аэрации.

3. Определите D_{600} ночной культуры и засейте четыре порции по 500 мл среды NZCYM, прогретой до 30 °С, таким количеством ночной культуры, чтобы начальная оптическая плотность составляла 0,05.

4. Проинкубируйте смесь при 30 °С, интенсивно встряхивая ее, до тех пор, пока D_{600} не достигнет 0,5. Важно индуцировать культуру непосредственно на этой стадии, так как при дальнейшем росте бактерий выход фага может оказаться значительно ниже.

5. Индуцируйте культуру, проинкубировав ее 15 мин в водяной бане на 45 °С при постоянном встряхивании.

6. Проинкубируйте индуцированную культуру при 38 °С еще в течение 2,5—5 ч при энергичном встряхивании.

7. В небольших пробах из этих культур проверьте развитие бактериофага. Для этого отберите в стеклянные пробирки по две пробы (по 1 мл) из каждой индуцированной культуры. В одну из пробирок добавьте 1—2 капли хлороформа. Обе пробирки проинкубируйте в течение 5—10 мин при 37 °С, время от

[1] Pirrotta et al., 1971.

времени встряхивая. Сравните эти культуры, разглядывая их на просвет. Если лизоген индуцирован нормально, то обработанная хлороформом культура просветлеет, а необработанная останется мутной. В таком случае переходите к этапу 8. Если же лизиса нет, то повторно проверьте используемый лизоген (этап 1) и начните эксперимент сначала.

8а. Если фаг несет ген *S* дикого типа, то лизис индуцированных бактерий должен произойти спонтанно. В этом случае добавьте к каждой культуре по 10 мл хлороформа и продолжайте инкубировать их в течение еще 30 мин. Затем переходите к очистке бактериофага λ (этап 1, с. 92).

8б. Если фаг несет амбер-мутацию в гене *S*, то спонтанного лизиса не произойдет. Частицы бактериофага останутся внутри бактерии-хозяина до тех пор, пока не будет добавлен хлороформ. Зараженные клетки можно сконцентрировать центрифугированием и лизировать в небольшом объеме жидкости, чтобы не работать с большими объемами фаголизата.

Осадите бактерии центрифугированием при 4000 g в течение 10 мин при 4 °С. Ресуспендируйте осадок бактерий в буфере следующего состава: 10 мМ трис-HCl, pH 7,4, 50 мМ NaCl, 5 мМ $MgCl_2$. Добавляйте 10—20 мл этого буфера в расчете на 1 л исходной культуры.

Добавьте 10 капель хлороформа. Хорошо перемешайте с помощью смесителя Vortex и оставьте на 30 мин при комнатной температуре.

Чтобы удалить ДНК, освобождающуюся из лизировавших клеток, добавьте кристаллическую панкреатическую ДНКазу до конечной концентрации 0,2 мкг/мл и проинкубируйте 5 мин при комнатной температуре.

Удалите обломки клеток центрифугированием при 12 000 g в течение 15 мин. Соберите содержащую бактериофаг надосадочную жидкость. Переходите к очистке бактериофага λ (этап 8, с. 93).

ОЧИСТКА БАКТЕРИОФАГА λ[1]

1. Охладите лизировавшие культуры до комнатной температуры и добавьте панкреатическую ДНКазу и панкреатическую РНКазу, каждую до конечной концентрации 1 мкг/мл. Проинкубируйте смесь в течение 30 мин при комнатной температуре. Для расщепления освободившихся из лизировавших бактерий нуклеиновых кислот, которые в противном случае могут быть захвачены частицами бактериофага, достаточно использовать неочищенные, имеющиеся в продаже препараты этих ферментов.

2. Добавьте сухой хлористый натрий до конечной концентрации 1 М (29,2 г/500 мл культуры). Растворите, помешивая круговыми движениями. Оставьте стоять во льду на 1 ч.

[1] Yamamoto et al., 1970.

3. Удалите обломки клеток центрифугированием при 11 000 g в течение 10 мин при 4 °С. Слейте надосадочную жидкость в чистую колбу.

4. Добавьте сухой полиэтиленгликоль (ПЭГ 6000) до конечной концентрации 10% (по объему) (50 г/500 мл надосадочной жидкости). Растворите его при комнатной температуре, медленно перемешивая на магнитной мешалке.

Примечание. Некоторые исследователи предпочитают добавлять полиэтиленгликоль одновременно с хлористым натрием (этап 2). В этом случае можно опустить стадию центрифугирования (этап 3). Такой метод применяется, если бактериофаг размножается хорошо и титр его в исходной лизировавшей культуре выше $2 \cdot 10^{10}$ част./мл.

5. Охладите колбу в ледяной бане и оставьте там по крайней мере на 1 ч, чтобы частицы бактериофага осели.

6. Соберите осевшие частицы бактериофага центрифугированием при 11 000 g в течение 10 мин при 4 °С. Слейте надосадочную жидкость и поставьте центрифужные стаканчики наклонно. Оставьте их в таком положении на 5 мин, чтобы оставшаяся жидкость стекла с осадка. Отсосите эту жидкость пипеткой.

7. Пользуясь пипеткой с широким отверстием с надетой на нее резиновой грушей, осторожно ресуспендируйте осадок бактериофага в среде SM (8 мл на каждые 500 мл надосадочной жидкости). Тщательно обмойте стенки центрифужных стаканчиков, так как к ним прилипает осадок фага, особенно если стаканчики старые.

8. Добавьте к суспензии бактериофага равный объем хлороформа и перемешайте с помощью смесителя Vortex в течение 30 с. Разделите органическую и водную фазы центрифугированием при 1600 g в течение 15 мин при 4 °С. Соберите содержащую бактериофаг водную фазу.

9. Измерьте объем собранной жидкости и добавьте 0,5 г/мл сухого хлористого цезия. Осторожно перемешайте.

10. После того как хлористый цезий растворится, осторожно наслоите суспензию бактериофага на ступенчатый градиент хлористого цезия, заранее приготовленный в прозрачных центрифужных пробирках для ротора Beckman SW41 или SW27 (или аналогичных центрифуг) (табл. 3.1).

Ступенчатые градиенты можно приготовить, либо осторожно наслаивая последовательно друг на друга растворы с уменьшающейся плотностью, либо подслаивая раствор большей плотности под предыдущий слой. Нанесите метку снаружи пробирки на уровне границы между слоем с $\rho = 1{,}50$ г/мл и слоем с $\rho = 1{,}45$ г/мл (рис. 3.1).

11. Отцентрифугируйте препарат в роторе SW41 или SW27 при 22 000 об/мин в течение 2 ч при 4 °С.

Таблица 3.1. Растворы хлористого цезия (100 мл), приготовленные на среде SM, для формирования ступенчатого градиента

Плотность ρ, г/мл	CsCl, г	SM, мл	Показатель преломления η
1,45	60	85	1,3768
1,50	67	82	1,3815
1,70	95	75	1,3990

12. На границе между слоями с плотностями 1,45 и 1,50 г/мл должна быть видна голубоватая полоса частиц бактериофага. Можно поместить за пробиркой черный экран и направить свет сверху. Это часто помогает разглядеть полосу при низком выходе бактериофага.

13. На уровне полосы бактериофага наклейте на пробирку полоску липкой ленты. Затем проткните стенку пробирки через липкую ленту иглой для инъекций № 21 и соберите бактериофаг (рис. 3.2). Можно также отобрать материал полосы сверху, пользуясь микропипеткой или пастеровской пипеткой.

Будьте внимательны и не загрязните бактериофаг материалом других разделившихся в градиенте полос. Они содержат обломки бактерий и компоненты несобравшихся частиц бактериофага.

14. Добавьте к суспензии бактериофага такое количество раствора хлористого цезия (1,5 г/мл в SM), чтобы заполнить прозрачную пробирку от роторов 50Ti, SW50.1 или подобных им. Отцентрифугируйте препарат при 38 000 об/мин в течение 24 ч при 4 °С (в роторе 50 Ti) или при 35 000 об/мин в течение 24 ч при 4 °С (в роторе SW 50.1).

15. Соберите материал полосы с частицами бактериофага, как было описано выше. Храните его в растворе хлористого цезия при 4 °С в плотно закупоренной пробирке.

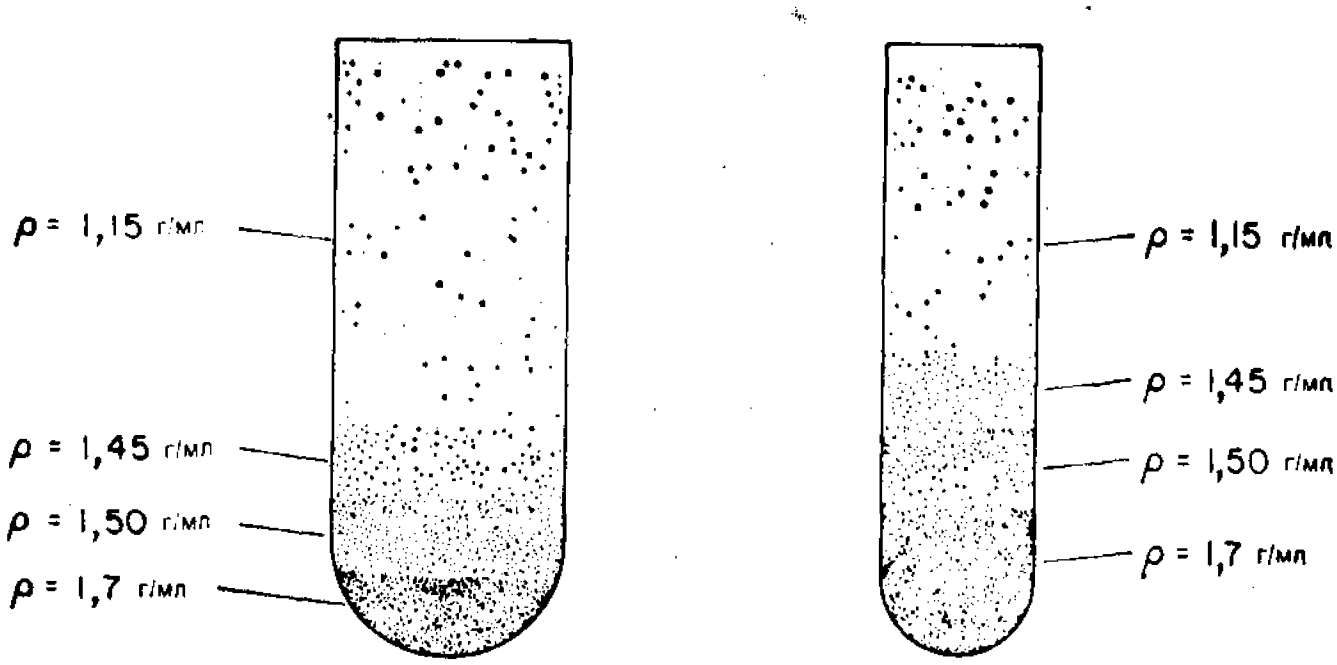


Рис. 3.1. Градиенты хлористого цезия для очистки бактериофага λ. Частицы бактериофага образуют видимую полосу на границе между слоями хлористого цезия с плотностями 1,45 и 1,50 г/мл.

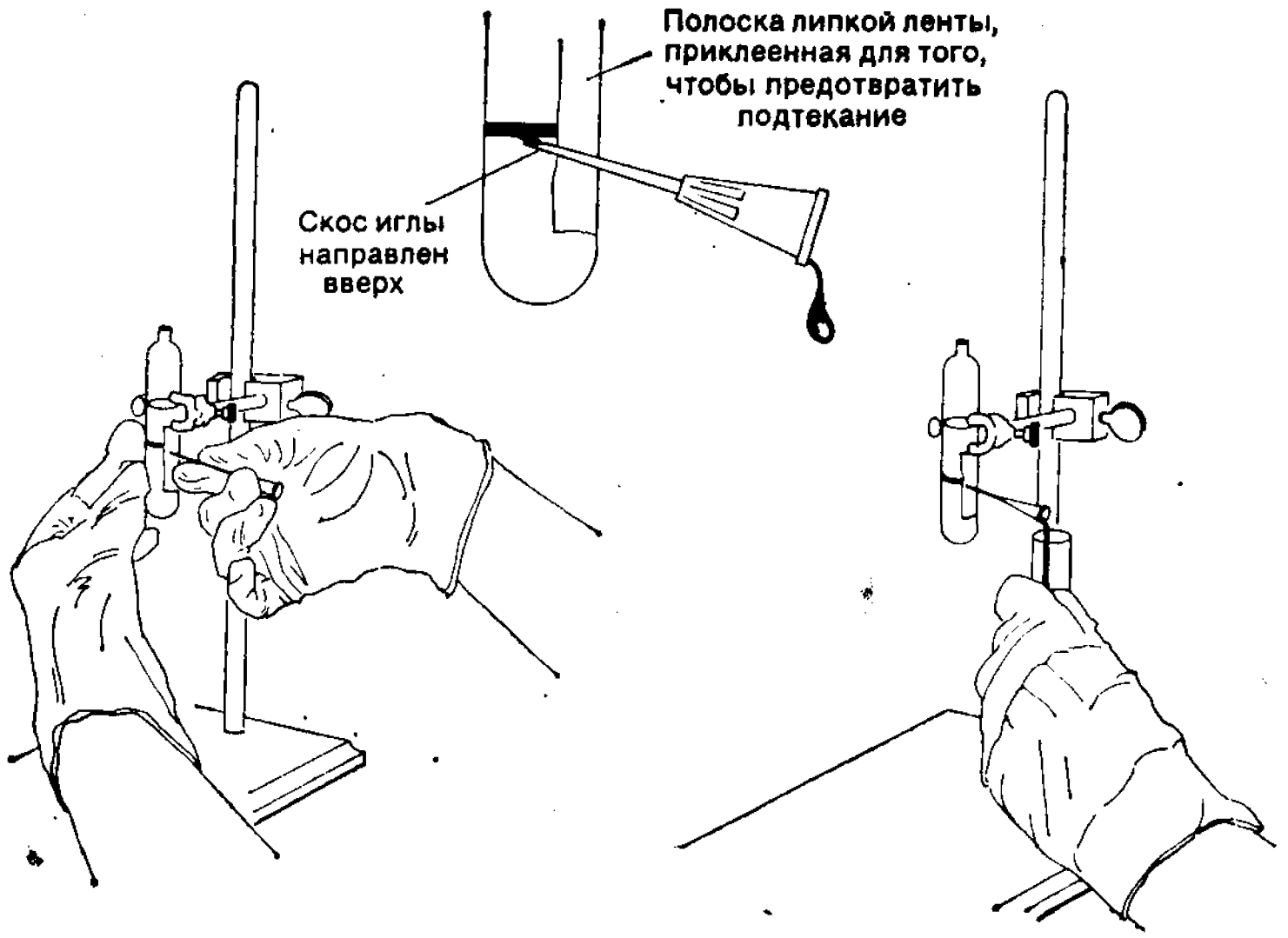


Рис. 3.2. Отбор бактериофага с помощью прокалывания стенки пробирки.

Примечания. 1. Бактериофаг λ чрезвычайно чувствителен к ЭДТА, и для предотвращения его разрушения важно, чтобы на всех этапах очистки присутствовали ионы Mg^{2+} (в концентрации 10—30 мМ).

2. Если выход очищенного фага оказывается низким, то следует выяснить, на каком этапе происходят потери. Для этого нужно определить число инфекционных частиц бактериофага в пробах, отобранных на разных стадиях очистки.

Другие методы очистки бактериофага λ

Описанный выше метод очистки бактериофага является, по сути, методом, предложенным Ямамото и др. в 1970 г. (Yamamoto et al., 1970). С годами в него было внесено много изменений, а некоторые стадии были исключены совсем. Ниже приводятся три слегка модифицированные процедуры.

Осаждение частиц фага

1. Проведите очистку по Ямамото до стадии 8 включительно (экстракция хлороформом) (с. 92—93).
2. Соберите частицы бактериофага центрифугированием при 25 000 об/мин в течение 2 ч при 4 °С в роторе Beckman SW27 (или аналогичном ему).
3. Слейте надосадочную жидкость. На дне пробирок должен быть виден стекловидный осадок частиц бактериофага. В каж-

дую пробирку добавьте по 1—2 мл среды SM и оставьте их на ночь при 4 °С. Можно поместить пробирки на качающуюся платформу.

4. На следующее утро осторожно пипетируйте раствор, чтобы ресуспендировать все частицы бактериофага.

Хотя таким способом получаются не такие чистые препараты, как при равновесном центрифугировании в градиенте, их можно использовать как источник ДНК для получения плеч молекулы ДНК бактериофага λ.

Приступайте к выделению ДНК со стадии 5 (с. 97).

Ступенчатый градиент глицерина[1]

1. Проведите очистку по Ямамото до стадии 6 включительно (с. 92—93).

2. Ресуспендируйте осадок фага в буфере ТМ (50 мМ трис-HCl, pH 7,8, и 10 мМ $MgSO_4$), добавляя 5—10 мл буфера в расчете на 1 л исходной культуры.

3. Один раз проведите экстракцию суспензии бактериофага хлороформом.

4. Приготовьте ступенчатый градиент глицерина в прозрачных пробирках для ротора Beckman SW41 (или подобных ему):

а) на дно пробирки налейте пипеткой 3 мл буфера ТМ, содержащего глицерин в концентрации 40%;

б) сверху осторожно наслоите 4 мл буфера ТМ, содержащего глицерин в концентрации 5%;

в) на раствор с глицерином осторожно наслоите суспензию бактериофага;

г) заполните пробирку доверху буфером ТМ.

5. Отцентрифугируйте препарат при 35 000 об/мин и 4 °С в течение 60 мин.

6. Слейте надосадочную жидкость и ресуспендируйте осадок бактериофага в буфере ТМ (1 мл в расчете на 1 л исходной культуры).

7. Добавьте панкреатическую ДНКазу и панкреатическую РНКазу до конечных концентраций 5 и 1 мкг/мл соответственно. Проинкубируйте 30 мин при 37 °С.

8. Добавьте ЭДТА (0,5 М, pH 8,0) до конечной концентрации 20 мМ.

9. Приступайте к выделению ДНК со стадии 5 (с. 97).

Равновесное центрифугирование в хлористом цезии

Когда имеют дело с небольшими количествами препарата бактериофага (полученными из 1 л или менее), то центрифугирование в ступенчатом градиенте хлористого цезия можно опустить.

---

[1] Методика из работы Vande Woude et al., 1979, с модификациями.

1. После экстракции хлороформом (стадия 8) измерьте объем водной фазы и добавьте сухой хлористый цезий в расчете 0,75 г на 1 мл. Осторожно перемешивайте до полного растворения.

2. Когда хлористый цезий растворится, перенесите суспензию бактериофага в пробирку от ультрацентрифуги. Можно использовать пробирки как для углового ротора, так и для бакет-ротора. Заполните пробирку доверху буфером ТМ с хлористым цезием (0,75 г/мл).

3. Проведите центрифугирование и соберите бактериофаг, как это описано на с. 94.

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК БАКТЕРИОФАГА λ

1. Удалите хлористый цезий из препарата очищенного бактериофага посредством диализа при комнатной температуре в течение 1 ч против 1000-кратного объема буфера следующего состава: 10 мМ NaCl, 50 мМ трис-HCl, pH 8,0, 10 мМ $MgCl_2$.

2. Перенесите диализный мешок в сосуд со свежим буфером и диализуйте еще в течение 1 ч.

3. Перенесите суспензию бактериофага в центрифужную пробирку такого объема, чтобы она заполнилась лишь на треть.

4. Добавьте ЭДТА (0,5 М, pH 8,0) до конечной концентрации 20 мМ.

5. Добавьте проназу до конечной концентрации 0,5 мг/мл или же протеиназу К до конечной концентрации 50 мкг/мл.

6. Добавьте SDS (основной водный раствор, 20% по объему) до конечной концентрации 0,5%. Перемешайте содержимое пробирки, несколько раз перевернув ее.

7. Проинкубируйте препарат 1 ч при 37 °С (в случае проназы) или при 65 °С (в случае протеиназы К).

8. Добавьте равный объем насыщенного буфером фенола (с. 388). Перемешайте содержимое пробирки, несколько раз перевернув ее. Разделите фазы путем центрифугирования при 1600 g в течение 5 мин при комнатной температуре. Перенесите водную фазу в чистую пробирку, пользуясь пипеткой с широким носиком.

9. Один раз экстрагируйте водную фазу смесью насыщенного буфером фенола и хлороформа (50 : 50).

10. Соберите водную фазу, как это описано выше, и экстрагируйте ее один раз равным объемом хлороформа.

11. Перенесите водную фазу в диализный мешок.

12. Проведите диализ в течение ночи при 4 °С последовательно против трех 1000-кратных объемов буфера ТЕ (10 мМ трис-HCl, pH 8,0, и 1 мМ ЭДТА).

ВЫДЕЛЕНИЕ БОЛЬШИХ КОЛИЧЕСТВ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК

Для выделения плазмидной ДНК пользуются многими методами. Все они включают три основных этапа: рост бактерий и амплификацию плазмиды; сбор бактерий и их лизис; очистку плазмидной ДНК.

В этих методах очистки так или иначе используют два основных различия между ДНК *Escherichia coli* и плазмидной ДНК: 1) хромосома *E. coli* по размеру много больше ДНК плазмид, обычно используемых в качестве векторов; 2) основная масса ДНК *E. coli* выделяется из клеток в виде фрагментированных линейных молекул, тогда как большинство плазмидной ДНК экстрагируется в виде ковалентно замкнутых кольцевых молекул.

Поэтому большинство методов очистки включают осаждения, при которых из препарата удаляются преимущественно длинные цепи ДНК *E. coli,* случайно захваченные обломками лизированных клеток. Методики эти основаны также на использовании свойств кольцевой замкнутой ДНК. Каждая из комплементарных цепей плазмидной ДНК представляет собой ковалентно замкнутое кольцо, поэтому цепи нельзя отделить друг от друга (не разорвав одну из них) в тех условиях, при которых происходит разрыв большинства водородных связей в ДНК, например при нагревании или при выдерживании в умеренно щелочных растворах (до pH 12,5). При охлаждении или возвращении к нейтральному pH замкнутые кольцевые молекулы вновь принимают нативную конформацию, тогда как ДНК *E. coli* остается денатурированной.

Плазмидная ДНК ведет себя отлично от ДНК *E. coli* также и при равновесном центрифугировании в градиентах хлористого цезия, содержащих какой-нибудь интеркалирующий краситель в насыщающей концентрации, например бромистый этидий или дийодистый пропидий. Ковалентно замкнутые кольцевые ДНК связывают меньше такого красителя, чем линейная ДНК, и потому в градиентах хлористого цезия, содержащих интеркалирующий агент, оказываются в зонах с более высокой плотностью (Radloff et al., 1967). Эту методику используют, если необходима высокая степень очистки плазмидной ДНК. Однако по мере развития методов работы с рекомбинантными ДНК для многих целей оказалось уже необязательным проводить очистку больших количеств плазмидной ДНК до такой степени, чтобы препарат был гомогенным. Например, расщепление рестриктирующими эндонуклеазами, лигирование, трансформация и даже секвенирование ДНК можно проводить теперь, используя относительно малоочищенные препараты плазмидной ДНК, полученные из небольших объемов культуры (около 10 мл). Плазмидную ДНК выделяют из больших объемов культуры лишь в тех случаях, когда нужны значительные ее количества (например,

в опытах по гибридизации для отбора специфических мРНК или когда нужно пометить 5′-концы фрагментов ДНК с помощью полинуклеотидкиназы).

Описанные ниже методики можно успешно использовать для выделения разнообразных плазмид из различных штаммов бактерий. Вообще говоря, чем меньше плазмида, тем лучше достигаемые результаты. С увеличением молекулярной массы плазмиды ее свойства становятся все ближе к свойствам ДНК хозяина. Выделение плазмид, размер которых превышает 25 kb, сильно затрудняется и выход оказывается невысоким. Однако все плазмиды, обычно используемые при клонировании, относительно невелики и приведенные ниже методы дают хорошие результаты.

РОСТ БАКТЕРИЙ И АМПЛИФИКАЦИЯ ПЛАЗМИДЫ

Амплификация в богатой среде

В течение многих лет считали, что амплификация плазмид в присутствии хлорамфеникола происходит эффективно лишь при выращивании бактерии-хозяина в синтетической среде. Однако приводимая ниже процедура дает воспроизводимо высокие выходы (>2 мг плазмиды на 1 л культуры) при использовании штаммов *E. coli,* содержащих плазмиды с репликоном ColE1.

1. Засейте 10 мл среды LB, содержащей соответствующий антибиотик, отдельной колонией бактерии. Проинкубируйте в течение ночи при температуре 37 °C при интенсивном встряхивании.

2. На следующее утро посейте 0,1 мл ночной культуры в 25 мл среды LB с соответствующим антибиотиком в колбе на 100 мл. Проинкубируйте при 37 °C при интенсивном встряхивании до тех пор, пока культура не достигнет поздней логарифмической фазы ($D_{600}=0{,}6$).

3. Внесите 25 мл культуры в поздней логарифмической фазе в 500 мл среды LB с соответствующим антибиотиком, предварительно прогретой до 37 °C в колбе на 2 л. Проинкубируйте ровно 2,5 ч при 37 °C при энергичном встряхивании. D_{600} культуры должна составить примерно 0,4.

4. Добавьте 2,5 мл раствора хлорамфеникола (34 мг/мл в этаноле). Конечная концентрация хлорамфеникола в культуре должна быть 170 мкг/мл.

5. Проинкубируйте при 37 °C при интенсивном встряхивании еще 12—16 ч.

Амплификация в минимальной среде

Хотя в настоящее время эта процедура (Clewell, Helinski, 1972) в значительной степени вытеснена той, которая была приведена выше, ее все еще можно использовать в случае релаксированных плазмид с репликонами, отличными от ColE1.

1. Отобрав отдельную колонию, выросшую в присутствии соответствующего антибиотика, засейте ею 10 мл богатой среды (например, LB) с этим антибиотиком. Инкубируйте в течение ночи.

2. Посейте 2,5 мл ночной культуры в колбу объемом 2 л, содержащую 500 мл минимальной среды (M9) с соответствующим антибиотиком. Проинкубируйте при 37 °C при интенсивном встряхивании до тех пор, пока D_{600} культуры не достигнет 0,4—0,5. Очень важно, чтобы концентрация клеток не была выше, так как при этом снизится эффективность амплификации.

3. Добавьте 2,5 мл раствора хлорамфеникола (34 мг/мл в этаноле). Продолжайте инкубацию еще в течение 12—16 ч.

СБОР БАКТЕРИЙ И ЛИЗИС

Сбор бактерий

1. Соберите бактериальные клетки центрифугированием при 4000 g в течение 10 мин при 4 °C. Слейте надосадочную жидкость.

2. Промойте клетки 100 мл охлажденного во льду буфера STE (0,1 M NaCl, 10 мМ трис-HCl, pH 7,8, 1 мМ ЭДТА).

Лизис

Ниже приведены три различные методики лизиса. Первые две, лизис кипячением и лизис щелочью, отличаются высокой эффективностью и в случае малых плазмид (<10 kb) дают выход 2—3 мг/л. Третий метод сравнительно более мягкий, и им следует пользоваться в случае больших плазмид (>10 kb).

Лизис кипячением[1]

1. Ресуспендируйте осадок бактерий, полученный из культуры объемом 500 мл, в 10 мл буфера STE (0,1 M NaCl, 10 мМ трис-HCl, pH 8,0, 0,1 мМ ЭДТА). Перенесите смесь в колбу Эрленмейера на 50 мл.

2. Добавьте 1 мл свежеприготовленного раствора лизоцима (20 мг/мл в 10 мМ трис-HCl, pH 8,0).

Примечание. Лизоцим не будет работать эффективно, если pH раствора ниже 8,0.

3. Пользуясь зажимом, подержите колбу Эрленмейера над открытым огнем бунзеновской горелки до тех пор, пока жидкость в ней не начнет кипеть. Колбу все время встряхивайте.

---

[1] Holmes, Quigley, 1981.

4. Сразу же перенесите колбу в большую баню (объемом 2 л) с кипящей водой. Держите колбу в кипящей воде в течение 40 с.

5. Охладите колбу, поместив ее на 5 мин в ледяную баню.

6. Перенесите вязкое содержимое колбы в центрифужную пробирку (от ротора Beckman SW41 или аналогичного ему). Отцентрифугируйте при 25 000 об/мин в течение 30 мин при 4 °С.

7. Очистите плазмидную ДНК равновесным центрифугированием в градиенте хлористого цезия с бромистым этидием (с. 103).

Лизис щелочью[1]

1. Ресуспендируйте полученный из 500 мл культуры осадок бактерий в 10 мл раствора I, содержащего лизоцим в концентрации 5 мг/мл.

Раствор I. 50 мМ глюкоза, 25 мМ трис-HCl, pH 8,0, 10 мМ ЭДТА.

Раствор I можно приготовить порциями примерно по 100 мл, проавтоклавировать в течение 15 мин при давлении $7 \cdot 10^4$ Па и хранить при 4 °С. Сухой лизоцим следует растворять в нем непосредственно перед использованием.

2. Перенесите суспензию в полиаллломерные пробирки от ротора Beckman SW27 (или аналогичного ему). Оставьте на 5 мин при комнатной температуре.

3. Добавьте 20 мл свежеприготовленного раствора II. Закройте пробирку сверху парафильмом и перемешайте содержимое, несколько раз осторожно перевернув пробирку. Поставьте на 10 мин в лед.

Раствор II. 0,2 н. NaOH, 1% SDS.

Раствор II следует готовить из исходных растворов 10 н. NaOH и 20% SDS.

4. Добавьте 15 мл охлажденного во льду 5 М ацетата калия, pH 4,8, приготовленного следующим образом: к 60 мл 5 М ацетата калия добавьте 11,5 мл ледяной уксусной кислоты и 28,5 мл H_2O. Получающийся раствор является 3 М по калию и 5 М по ацетату. Закройте пробирку сверху парафильмом и перемешайте содержимое, несколько раз резко перевернув пробирку. Оставьте во льду на 10 мин.

5. Отцентрифугируйте в роторе Beckman SW27 (или аналогичном ему) при 20 000 об/мин в течение 20 мин при 4 °С. Бактериальная ДНК и обломки клеток должны образовать на дне пробирки плотный осадок.

6. Перенесите по равному объему ($\sim$18 мл) надосадочной жидкости в две пробирки Corex объемом по 30 мл.

---

[1] Эта процедура описана Бирнбоймом и Доли (Birnboim, Doly, 1979) и модифицирована Иш-Горовицем (личное сообщение).

7. Добавьте в каждую пробирку 0,6 объема (~12 мл) изопропанола. Хорошо перемешайте и оставьте на 15 мин при комнатной температуре.

8. Осадите ДНК центрифугированием в роторе Sorvall при 12 000 g в течение 30 мин при комнатной температуре.

Примечание. Если центрифугирование проводить при 4 °С, то может выпасть в осадок соль.

9. Слейте надосадочную жидкость. Промойте осадок 70%-ным этанолом при комнатной температуре. Слейте как можно больше этанола, затем высушите осадок нуклеиновой кислоты, поместив пробирки на короткое время в вакуумный испаритель.

10. Растворите осадки в буфере ТЕ, pH 8,0, чтобы суммарный объем смеси составлял 8 мл.

11. Очистите плазмидную ДНК, проведя равновесное центрифугирование в градиенте плотности хлористого цезия с бромистым этидием (с. 103).

Примечание. Как ни удивительно, этот метод дает хорошие результаты также и в случае плазмид, которые были амплифицированы в присутствии хлорамфеникола. При длительной обработке клеток этим лекарственным препаратом образуются плазмиды, ДНК которых частично замещена рибонуклеотидными последовательностями. Так как эти небольшие последовательности должны расщепляться щелочью, можно ожидать, что при использовании этой методики получатся препараты, в которых необычно много кольцевых молекул с одноцепочечными разрывами. Однако в наших препаратах ДНК разрывы содержались менее чем в 5% молекул.

Лизис под действием SDS[1]

1. Ресуспендируйте осадок бактерий в 10 мл охлажденного во льду буфера следующего состава: 10%-ная сахароза, 50 мМ трис-HCl, pH 8,0. Перенесите суспензию в пробирку Oak Ridge на 30 мл.

2. Добавьте 2 мл свежеприготовленного раствора лизоцима (10 мг/мл в 0,25 М трис-HCl, pH 8,0).

3. Добавьте 8 мл 0,25 М ЭДТА. Перемешайте, несколько раз перевернув пробирку. Поместите в лед при 0 °С на 10 мин.

4. Добавьте 4 мл 10%-ного SDS. *Быстро* перемешайте стеклянной палочкой, чтобы SDS равномерно распределился по суспензии бактерий, но в то же время достаточно *осторожно,* чтобы не повредить освобождающуюся бактериальную ДНК.

5. Сразу же добавьте 6,0 мл 5 М NaCl (конечная концентрация 1 М). Вновь осторожно, но тщательно перемешайте. Поместите в лед по крайней мере на 1 ч.

---

[1] Godson, Vapnek, 1973.

6. Чтобы удалить высокомолекулярную ДНК и обломки бактерий, отцентрифугируйте в течение 30 мин при 30 000 об/мин при 4 °С в роторе Beckman 50Ti (или аналогичном ему).

7. Слейте и сохраните надосадочную жидкость. Осадок, который должен быть твердым и плотным, выбросьте.

8. Проведите две экстракции надосадочной жидкости смесью фенол/хлороформ и одну экстракцию хлороформом. После каждой экстракции переносите водную фазу в чистую пробирку.

9. Перенесите водную фазу в стеклянный центрифужный стакан на 250 мл. Добавьте 2 объема (~60 мл) этанола. Хорошо перемешайте. Оставьте на 1—2 ч при —20 °С или на 15 мин при —70 °С.

10. Осадите нуклеиновые кислоты центрифугированием при 1500 g в течение 15 мин при 4 °С.

11. Вылейте надосадочную жидкость. Промойте осадок 70%-ным этанолом при комнатной температуре. Слейте как можно больше этанола. Высушите осадок, поместив стаканы на короткое время в вакуумный испаритель.

12. Растворите ДНК в буфере ТЕ, pH 8,0, чтобы суммарный объем смеси был равен 8 мл.

13. Очистите плазмидную ДНК с помощью равновесного центрифугирования в градиенте хлористого цезия с бромистым этидием.

ОЧИСТКА КОВАЛЕНТНО ЗАМКНУТОЙ КОЛЬЦЕВОЙ ДНК РАВНОВЕСНЫМ ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕМ В ГРАДИЕНТЕ ХЛОРИСТОГО ЦЕЗИЯ С БРОМИСТЫМ ЭТИДИЕМ

1. Измерьте объем раствора ДНК. На каждый миллилитр добавьте точно 1 г сухого хлористого цезия. Осторожно перемешивайте до тех пор, пока соль не растворится.

2. На каждые 10 мл раствора с хлористым цезием добавьте 0,8 мл раствора бромистого этидия (10 мг/мл в H_2O). Конечная плотность раствора должна составить 1,55 г/мл ($\eta = 1{,}3860$), а концентрация бромистого этидия должна быть примерно 600 мкг/мл.

Примечание. Всплывающие на поверхность раствора пушистые пурпурные хлопья представляют собой комплексы бромистого этидия с бактериальными белками.

3. Перенесите раствор хлористого цезия (вместе с белковыми хлопьями) в центрифужные пробирки от ротора Beckman 50 или 65. Заполните пробирки доверху вазелиновым маслом.

4. Отцентрифугируйте при 45 000 об/мин в течение 36 ч при 20 °С.

5. При обычном освещении должны быть видны две полосы ДНК. Верхняя полоса — это линейная бактериальная ДНК и кольцевая плазмидная ДНК с одноцепочечными разрывами.

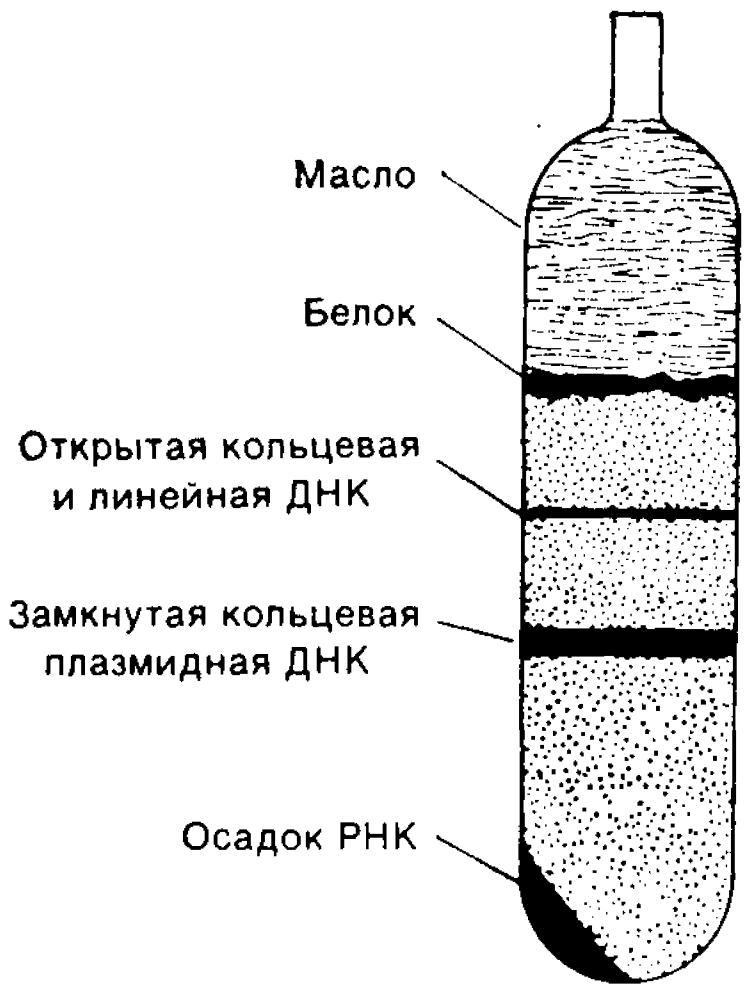


Рис. 3.3.

Нижняя полоса — кольцевая ковалентно замкнутая плазмидная ДНК (рис. 3.3).

6. Снимите с пробирки крышку. Соберите материал нижней полосы ДНК в стеклянную пробирку с помощью иглы № 21 для подкожных инъекций, проколов ею сбоку стенку пробирки, как это описано на с. 94.

7. Удалите бромистый этидий следующим образом:
   а) добавьте равный объем 1-бутанола, насыщенного водой, или изоамилового спирта;
   б) энергичным пипетированием смешайте обе фазы;
   в) отцентрифугируйте при 1500 g в течение 3 мин при комнатной температуре;
   г) перенесите нижнюю водную фазу в чистую стеклянную пробирку;
   д) повторите экстракцию 4—6 раз, пока не исчезнет розовая окраска у водной фазы.

8. Проведите диализ водной фазы против нескольких смен буфера ТЕ (pH 8,0).

УДАЛЕНИЕ РНК ИЗ ПРЕПАРАТОВ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК

Для некоторых целей (например, для расщепления рестриктазой *Bal*31 или для мечения 5′-концов рестрикционных фрагментов плазмидной ДНК с помощью полинуклеотидкиназы) необходимы препараты ДНК, не содержащие примеси низкомолекулярной РНК. Хотя по массе такая примесь составляет небольшую часть препарата плазмидной ДНК, полученного с помощью

равновесного центрифугирования в градиенте хлористого цезия с бромистым этидием, число молекул низкомолекулярной РНК может быть относительно велико и 5′-концы этих молекул могут составлять значительную часть всех 5′-концов, образующихся после обработки препарата рестриктирующей эндонуклеазой.

РНК удаляют из препаратов плазмиды любым из следующих способов.

Центрифугирование в 1 М NaCl[1]

1. Измерьте объем раствора ДНК. Добавьте 0,1 объема 3 М ацетата натрия, pH 5,2, а затем 2 объема этанола. Хорошо перемешайте и поместите на холод (—20 °С).

2. Соберите ДНК центрифугированием. Слейте этанол и высушите осадок ДНК, поместив пробирки на короткое время в вакуумный испаритель.

3. Растворите ДНК в буфере ТЕ, pH 8,0, в концентрации не ниже 100 мкг/мл.

4. Добавьте РНКазу, свободную от ДНКазы (с. 397), до конечной концентрации 10 мкг/мл. Проинкубируйте при комнатной температуре в течение 1 ч.

5. В центрифужную пробирку от ротора Beckman SW50.1 (или аналогичного ему) налейте 4 мл раствора 1 М NaCl+ТЕ. Поверх раствора 1 М NaCl наслоите 1 мл обработанной РНКазой плазмидной ДНК. Если останется место, заполните пробирку доверху буфером ТЕ. Отцентрифугируйте 6 ч при 40 000 об/мин при 20 °С в роторе Beckman SW50.1. Плазмидная ДНК осядет на дно пробирки, в то время как рибонуклеотиды останутся в надосадочной жидкости.

6. Слейте надосадочную жидкость. Растворите осадок плазмидной ДНК в желаемом объеме ТЕ.

Хроматография на биогеле А-150[2]

1. Обработайте препарат плазмидной ДНК РНКазой, как это описано выше (этапы 1—4).

2. Проведите одну экстракцию равным объемом уравновешенного буфером фенола.

3. Наслоите 1 мл водной фазы на колонку с биогелем А-150 (1 см×10 см), уравновешенным буфером ТЕ, pH 8,0, с 0,1%-ным SDS.

4. Нанесите ДНК на колонку; подсоедините к колонке резервуар с ТЕ+0,1%-ный SDS и сразу же начинайте собирать фракции объемом по 0,5 мл.

---

[1] B. Seed, неопубликованные данные.

[2] Модификация процедуры, разработанной ДеНото и Гудмэном (F. De Noto, H. Goodman, неопубликованные данные).

5. После сбора 15 фракций перекройте выход из колонки. Чтобы определить, в каких фракциях содержится плазмидная ДНК, проанализируйте по 10 мкл каждой фракции с помощью электрофореза в 0,7%-ном агарозном геле или по флуоресценции бромистого этидия (см. Приложение А).

6. Слейте вместе те фракции, которые содержат плазмидную ДНК. Осадите ДНК этанолом, как это было сделано на этапах 1—3.

Примечание. Удалить из колонки с биогелем А-150 всю плазмидную ДНК очень трудно. Чтобы исключить возможность загрязнения, используйте колонку лишь один раз.

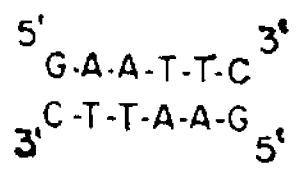
Глава 4

ФЕРМЕНТЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В МОЛЕКУЛЯРНОМ КЛОНИРОВАНИИ

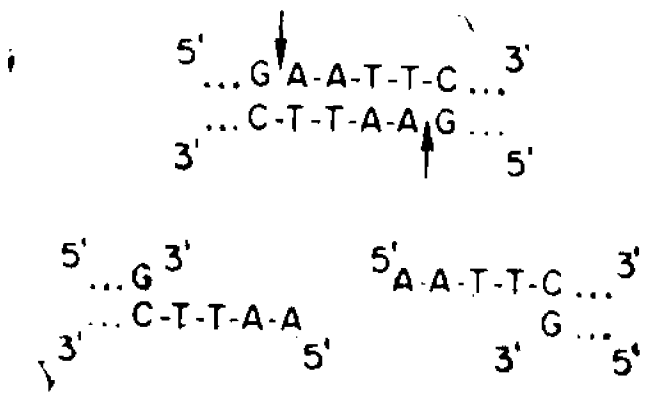
ФЕРМЕНТЫ РЕСТРИКЦИИ

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

Системы рестрикции — модификации типа II включают два отдельных фермента: рестриктирующую эндонуклеазу и модифицирующую метилазу. Было выделено большое число ферментов рестрикции типа II (Roberts, 1982), многие из которых используются в молекулярном клонировании. Эти ферменты разрезают ДНК внутри или около своих сайтов, которые обычно имеют 4—6 нуклеотидов и обладают осью симметрии 2-го порядка. Например, фермент *Eco*RI узнает последовательность гексануклеотидов



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

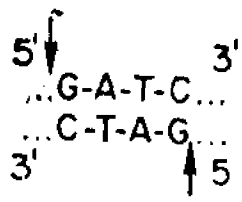


В результате такого разрыва образуются фрагменты ДНК с выступающими липкими 5′-концами. Каждый такой конец может взаимодействовать с любым другим концом, комплементарным ему. Таким образом любые молекулы ДНК, содержащие сайты рестрикции, можно соединять с другими молекулами и в результате получать рекомбинантные молекулы.

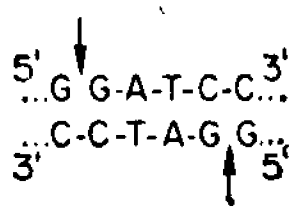
Многие ферменты рестрикции, подобно *Eco*RI, катализируют разрывы, в результате которых образуются фрагменты ДНК с выступающими 5′-концами; под действием других (например, *Pst*I) — с выступающими 3′-липкими концами, в то время как третьи (например, *Bal*I) разрезают ДНК по оси симметрии с образованием фрагментов с тупыми концами.

ИЗОШИЗОМЕРЫ

Обычно разные ферменты рестрикции узнают разные последовательности (табл. 4.1). Однако имеется несколько примеров выделенных из разных источников ферментов, вносящих разрывы в одинаковые последовательности-мишени. Такие ферменты называют изошизомерами. Кроме того, было обнаружено, что некоторые ферменты узнают тетрануклеотидные последовательности. Иногда такие тетрануклеотиды находятся внутри гексануклеотидных последовательностей-мишеней для других ферментов. Например, рестриктазы *Mbo*I и *Sau*3A узнают последовательность



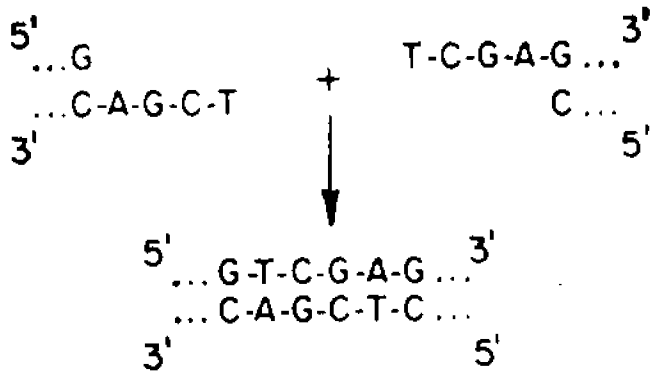
в то время как рестриктаза *Bam*HI узнает последовательность



Из предположения, что участки узнавания рестриктирующих эндонуклеаз распределены вдоль цепи ДНК случайно, следует, что тетрануклеотидная мишень для *Mbo*I и *Sau*3A должна встречаться в среднем один раз на каждые 4^4 (т. е. 256) нуклеотидов, тогда как гексануклеотидная мишень для *Bam*HI должна встречаться один раз на 4^6 (т. е. 4096) нуклеотидов. Фрагменты ДНК, полученные при полном или частичном расщеплении эукариотической ДНК рестриктазами *Mbo*I и *Sau*3A, можно, следовательно, клонировать или субклонировать в составе вектор-

ной ДНК (такой, как ДНК бактериофага λ или pBR322), обработанной *Bam*HI. Следует иметь в виду, что в большинстве случаев соединение *Mbo*I- и *Bam*HI-фрагментов не приводит к восстановлению сайта для *Bam*HI. Поэтому расщеплением рекомбинантной молекулы рестриктазой *Bam*HI обычно не удается выделить *Mbo*I-фрагмент, встроенный в *Bam*HI-вектор.

В некоторых случаях в результате сшивания фрагментов, полученных с помощью двух разных рестриктаз, образуются гибриды, не содержащие сайтов рестрикции ни для одного из этих ферментов. К примеру, при сшивании фрагментов, полученных с помощью рестриктаз *Sal*I (G↓TCGAC) и *Xho*I (C↓TCGAC), образующийся гибрид не расщепляется ни *Sal*I, ни *Xho*I:



МЕТИЛИРОВАНИЕ

Большинство штаммов *E. coli* содержит два фермента, метилирующих ДНК: метилазу *dam* и метилазу *dcm*.

Метилаза dam. Этот фермент метилирует атом N^6 аденина в последовательности $^{5'}GATC^{3'}$ (Hattman et al., 1978). Такая последовательность входит в состав сайтов рестрикции для нескольких рестриктаз (*Pvu*I, *Bam*HI, *Bcl*I, *Bgl*II, *Xho*II, *Mbo*I, *Sau*3A) и части сайтов рестрикции для *Cla*I (1 сайт из 4), *Xba*I (1 сайт из 16), *Taq*I (1 сайт из 16), *Mbo*II (1 сайт из 16) и *Hph*I (1 сайт из 16). Влияние метилирования, осуществляемого *dam*-метилазой, на расщепление ДНК этими ферментами суммировано в табл. 4.2.

Ингибирование метилазой *dam* расщепления прокариотической ДНК рестриктазой *Mbo*I не приводит к практическим осложнениям, поскольку *Sau*3A узнает ту же последовательность, что и *Mbo*I, но не зависит от метилирования, осуществляемого метилазой *dam*. (Следует иметь в виду, что эукариотическая ДНК не метилируется в положении N^6 аденина, и поэтому *Mbo*I и *Sau*3A могут быть использованы с равным успехом.) Однако, когда необходимо расщепить прокариотическую ДНК по всем возможным сайтам рестриктазами *Cla*I, *Xba*I, *Taq*I, *Mbo*II или *Hph*I или расщепить полностью рестриктазой *Bcl*I, ее необходимо получать из *dam*$^-$-штаммов *E. coli* (Marinus, 1973; Backman, 1980; Roberts et al., 1980; McClelland, 1981; J. Brooks, неопубликованные данные).

Таблица 4.1. Ферменты рестрикции

Фермент	Изошизомеры	Ионная сила[1)]	Температура инкубации, °С	Последовательность, узнаваемая ферментом	Ферменты, вызывающие образование комплементарных липких концов[2)]
*Acc*I		Средняя	37	GT↓(AG/CT)AC	*Acy*I[3)], *Asu*II[3)], *Cla*I[3)], *Hpa*II[3)], *Taq*I[3)]
*Acy*I			**37**	G(A/G)↓CG(T/C)C	*Acc*I[3)], *Asu*II, *Cla*I, *Hpa*II, *Taq*I
*Alu*I		»	**37**	AG↓CT	Тупые[4)]
*Aos*I			37	TGC↓GCA	»
*Apy*I	Atul, EcoRII		37	CC↓(A/T)GG	
*Asu*I			37	G↓GNCC	
*Asu*II			37	TT↓CGAA	*Acc*I[3)], *Acy*I, *Cla*I, *Hpa*II, *Taq*I
*Atu*II			37	CC↓(A/T)GG	
*Ava*I		»	37	G↓PyCGPuG	*Sal*I[3)], *Xho*I[3)], *Xma*I[3)]
*Ava*II		»	37	G↓G(A/T)CC	*Sau*961[3)]
*Avr*II		Низкая	37	CCTAGG	
*Bal*I			37	TGG↓CCA	Тупые
*Bam*HI		Средняя	37	G↓GATCC	*Bcl*I, *Bgl*II, *Mbo*I, *Sau*3A, *Xho*II
*Bbv*I		Низкая	37	GC(T/A)GC	
*Bcl*I		Средняя	60	T↓GATCA	*Bam*HI, *Bgl*II, *Mbo*I, *Sau*3A, *Xho*II
*Bgl*I		»	37	GCCNNNN↓NGGC	
*Bgl*II		Низкая	37	A↓GATCT	*Bam*HI, *Bcl*I, *Mbo*I, *Sau*3A, *Xho*II
*Bpa*I			37	GT↓(C/A)(G/T)AC	
*Bst*EII		Средняя	60	G↓GTNACC	

*Bst*NI		Низкая	60	CC↓$\binom{A}{T}$GG	
*Cla*I			37	AT↓CGAT	*Acc*I[3], *Acy*I, *Asy*II, *Hpa*II *Taq*I
*Dde*I		Средняя	37	C↓TNAG	
*Dpn*I	*Sau*3A	»	37	G^{Me}A↓TC	Тупые
*Eco*RI		Высокая	37	G↓AATTC	
*Eco*B			37	TGANNNNNNNNTGCT	
*Eco*K			37	AACNNNNNNGTGC	
*Eco*PI			37	AGACC	
*Eco*RI[1)]			37	$\binom{A}{G}\binom{A}{G}$A↓T$\binom{T}{C}\binom{T}{C}$	»
*Eco*R1			37	↓AATT	*Eco*RI
*Eco*RII	*Atu*I, *Apy*I	»	37	↓CC$\binom{A}{T}$GG	
*Fnu*4HI		Низкая	37	GC↓NGC	
*Fnu*DII	*Tha*I	»	37	CG↓CG	Тупые
*Hae*I		»	37	$\binom{A}{T}$GG↓CC$\binom{T}{A}$	
*Hae*II		»	37	PuGCGC↓Py	
*Hae*III		Средняя	37	GG↓CC	»
*Hga*I		»	37	GACGCNNNNN↓ CTGCGNNNNNNNNN[1)]	
*Hgi*AI		Высокая	37	G$\binom{T}{A}$GC$\binom{T}{A}$↓C	
*Hha*I	*Cfo*I	Средняя	37	GCG↓C	
*Hinc*II		»	37	GTPy↓PuAC	»
*Hind*II		»	37	GTPy↓PuAC	»
*Hind*III		»	37—55	A↓AGCTT	

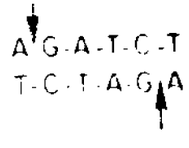
Продолжение

Фермент	Изошизомеры	Ионная сила[1)]	Температура инкубации, °С	Последовательность, узнаваемая ферментом	Ферменты, вызывающие образование комплементарных липких концов[2)]
*Hinf*I		Средняя	37	G↓ANTC	
*Hpa*I		Низкая	37	GTT↓AAC	»
*Hpa*II		»	37	C↓CGG	*Acc*I[3], *Acy*I, *Asu*II, *Cla*I, *Taq*I
*Hph*I		»	37	GGTGANNNNNNNN↓ CCACTNNNNNNN[1)]	
*Kpn*I		»	37	GGTAC↓C	*Bam*HI, *Bcl*I, *Bgl*II, *Xho*II
*Mbo*I	*Sau*3A	Высокая	37	↓GATC	
*Mbo*II		Низкая	37	GAAGANNNNNNNN↓ CTTCTNNNNNNN[1)]	
*Mnl*I		Высокая	37	CCTC	
*Msp*I		Низкая	37	C↓CGG C↓C^{Me}GG	
*Mst*I			37	TGCGCA	
*Pst*I		Средняя	21—37	CTCGA↓G	
*Pvu*I		Высокая	37	CGATCG	
*Pvu*II		Средняя	37	CAG↓CTG	Тупые
*Rsa*I		»	37	GT↓AC	»
*Sac*I	*Sst*I	Низкая	37	GAGCT↓C	
*Sac*II		»	37	CCGC↓GG	
*Sac*III		Высокая	37	ACGT	
*Sal*I		»	37	G↓TCGAC	*Ava*I[3)], *Xho*I
*Sau*3A		Средняя	37	↓GATC G^{Me}ATC	*Bam*HI, *Bcl*I *Bgl*II, *Mbo*I, *Xho*II
*Sau*961		»	37	G↓GNCC	
*Sma*I	XmaI	(1)	37	CCC↓GGG	Тупые
*Sph*I			37	GCATG↓C	
*Sst*I	SacI	Низкая	37	GAGCT↓C	
*Sst*II		»	37	CCGC↓GG	
*Sst*III		Высокая	37	ACGT	
*Taq*I		Низкая	65	T↓CGA	*Acc*I[3)], *Acy*I, *Asu*II, *Cla*I, *Hpa*II
*Tha*I	FnuDII	»	60	CG↓CG	Тупые

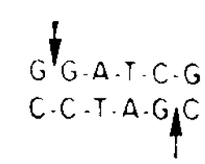
*Xba*I		Высокая	37	T↓CTAGA	
*Xho*I		»	37	C↓TCGAG	*Ava*I[3], *Sal*I
*Xho*II			37	$\binom{A}{G}$↓GATC$\binom{T}{C}$	*Bam*HI, *Bcl*I, *Bgl*II, *Mbo*I, *Sau*3A
*Xma*I	Sma I	Низкая	37	C↓CCGGG	*Ava*I[3]
*Xma*III			37	C↓GGCCG	
*Xor*II	PvuI, RshI	»	37	CGATC↓G	

[1]) См. табл. 4.4.

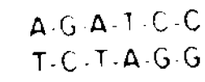
[2]) В этом столбце приведены ферменты, вызывающие образование концов, которые могут быть сшиты с концами, полученными с помощью ферментов первого столбца. В некоторых случаях, однако, образовавшийся гибридный участок не может быть расщеплен ни одним из исходных ферментов. Например, *Bgl*II расщепляет последовательность



а *Bam* HI расщепляет последовательность



Оба фермента приводят к образованию фрагментов ДНК с идентичными выступающими липкими 5′-концами. Эти концы могут быть сшиты вместе с образованием гибридного участка, который не способен узнать ни один из двух ферментов:



Аналогичная ситуация наблюдается с рестриктазами *Sal*I и *Xho*I.

[3]) При обработке ДНК ферментами, расщепляющими вырожденные последовательности, образуются популяции фрагментов ДНК с различающимися концевыми последовательностями. Эти концевые последовательности могут сшиваться только в некоторых комбинациях.

[4]) Фрагменты с тупыми концами, полученные с помощью этих ферментов, могут быть пришиты к любым другим аналогичным фрагментам.

Таблица 4.2. Влияние метилирования, осуществляемого метилазой *dam*, на расщепление ДНК

Сайт рестрикции	Рестриктаза	GATC[1])	$G^{me}ATC$
G↓GATCC	*Bam*HI	+	+
T↓GATCA	*Bcl*I	+	—
A↓GATCT	*Bgl*II	+	+
↓GATC	*Mbo*I	+	—
↓GATC	*Sau*3A	+	+
CGAT↓CG	*Pvu*I	+	+
Pu↓GATCPy	*Xho*II	+	+
AT↓CGAT	*Cla*I	+	—[2])
T↓CTAGA	*Xba*I	+	—[3])
T↓CGA	*Taq*I	+	—[4])
GAAGA	*Mbo*II	+	—[5])
GGTGA	*Hph*I	+	—[6])
$G^{me}ATC$	*Dpn*I	—	+[7])

[1]) «+» обозначает наличие разрыва; «—» обозначает отсутствие разрыва.

[2]) Когда сайт рестрикции для *Cla*I входит в состав последовательности $ATCG^{me}ATC$.

[3]) Когда сайт рестрикции для *Xba*I входит в состав последовательности $TCTAG^{me}ATC$.

[4]) Когда сайт рестрикции для *Taq*I входит в состав последовательности $TCG^{me}ATC$.

[5]) Когда сайт рестрикции для *Mbo*II входит в состав последовательности $GAAG^{me}ATCNNNNNN$.

[6]) Когда сайт рестрикции для *Hph*I входит в состав последовательности $GGTG^{me}ATC$.

[7]) Следует иметь в виду, что фермент *Dpn*I расщепляет только ДНК, метилированную метилазой *dam*.

Таблица 4.3. Влияние метилирования на расщепление ДНК млекопитающих[1])

Рестриктаза	Расщепляемая последовательность	Нерасщепляемая последовательность
*Hha*I	GCGC	$G^{me}CGC$
*Hpa*II	CCGG	$C^{me}CGG$
*Msp*I	$CCGGC^{me}CGG$	$^{me}CCGG$
*Sal*I	GTCGAC	$GT^{me}CGAC$
*Taq*I	$TCGAT^{me}CGA$	—[2])
*Xho*I	CTCGAG	$CT^{me}CGAG$

[1]) Van der Ploeg, Flavell, 1980.

[2]) Последовательность TCGA расщепляется независимо от того, метилирован цитозин или нет.

Метилаза dcm. Этот фермент метилирует атом C^5 цитозина в последовательностях $^{5'}C^{me}CAGG^{3'}$ или $^{5'}C^{me}CTGG^{3'}$ (Marinus, Morris, 1973; May, Hattman, 1975). Метилирование, осуществляемое *dcm*, влияет в основном на работу *Eco*RII. В большинстве случаев это не создает дополнительных препятствий, поскольку

*Bst*NI узнает ту же последовательность, что и *Eco*RII (хотя разрезает ДНК в другой точке последовательности).

Если не представляется возможным заменить *Eco*RII на *Bst*NI, то необходимо выделять ДНК из *dcm*$^-$-штаммов *E. coli* (Marinus, 1973; Backman, 1980; Roberts et al., 1980).

Помимо четырех обычных оснований ДНК млекопитающих содержит остатки 5-метилцитозина. Они располагаются в основном в направлении к 5′-концу от остатков G. Хотя метилирована только часть пар C_pG, общая картина метилирования высокоспецифична (Bird, Southern, 1978). Поэтому любая конкретная пара C_pG метилирована либо в большинстве клеток данной популяции, либо в их небольшой части. Влияние метилирования на расщепление ДНК млекопитающих распространенными рестриктазами продемонстрировано в табл. 4.3.

РАСЩЕПЛЕНИЕ ДНК РЕСТРИКТИРУЮЩИМИ ЭНДОНУКЛЕАЗАМИ

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

В соответствии с таким делением необходимо готовить только три исходных буфера (табл. 4.4).

Таблица 4.4. Буферы, используемые при расщеплении ДНК рестриктирующими эндонуклеазами (мМ)

Ионная сила буфера	NaCl	Трис-HCl, pH 7,5	$MgCl_2$	Дитиотрейтол
Низкая	0	10	10	1
Средняя	50	10	10	1
Высокая	100	50	10	1

Примечание. Поскольку фермент *Sma*I плохо работает во всех приведенных выше буферах, для него следует приготовить специальный буфер следующего состава 20 мМ KCl, 10 мМ трис-HCl, pH 8,0, 10 мМ $MgCl_2$ и 1 мМ дитиотрейтол.

Обычно все буферные растворы, приведенные в табл. 4.4, готовят в виде исходных растворов 10-кратной концентрации, которые можно хранить при 4 °С в течение 1—2 нед или при —20 °С неопределенно долгое время.

Проведение расщепления ДНК рестриктазами

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

1. Добавьте воду к раствору ДНК в стерильной пробирке фирмы «Эппендорф» (будем называть ее в дальнейшем эппендорфовской) до объема 18 мкл и перемешайте.

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

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

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

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

Если ДНК анализируют сразу в геле, добавьте 6 мкл красителя в буфере для нанесения I (с. 400), перемешайте смесь встряхиванием и нанесите расщепленную ДНК на гель.

Если обработанная рестриктазой ДНК нуждается в очистке, экстрагируйте ее один раз смесью фенол — хлороформ, один раз хлороформом и осадите этанолом (подробное описание см. на с. 405).

Примечания

Рестриктазы — дорогие ферменты! Связанные с ними затраты могут быть сведены к минимуму, если следовать приведенным ниже советам.

А. Многие имеющиеся в продаже препараты рестриктаз поставляются в виде концентрированных растворов. Часто для расщепления 10 мкг ДНК за 1 ч бывает достаточно 1 мкл препарата. Чтобы отобрать небольшое количество фермента из упаковки, быстро коснитесь кончиком стеклянной микропипетки разового пользования (на 5 мкл) поверхности раствора фермента. Таким способом можно отобрать всего 0,1 мкл раствора фермента. Или же можно присоединить к шприцу фирмы «Гамильтон» объемом 1 мкл пластмассовый шланг (длиной

1 см) и использовать его для отбора объемов 0,1 мкл. После отбора каждой пробы пластмассовый шланг выбрасывают.

Б. Рестриктазы стабильны при хранении при —20 °С в буфере, содержащем 50% глицерина. При проведении расщепления ДНК рестриктазами приготовьте реакционную смесь, содержащую все компоненты, кроме фермента. Достаньте из морозильника фермент и сразу же поместите его в лед. При каждом отборе фермента используйте чистую стерильную пипетку. Загрязнение фермента ДНК или другим ферментом может привести к дополнительным затратам времени и средств. Работайте как можно быстрее, чтобы фермент находился вне морозильника минимальное время. Сразу же после использования поместите фермент обратно в морозильник.

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

Г. Часто количество фермента может быть уменьшено за счет увеличения времени реакции. При обработке больших количеств ДНК это дает значительную экономию. Для контроля степени расщепления во время реакции можно отбирать небольшие аликвоты и анализировать их в мини-геле (с. 167).

Д. При обработке большого числа проб ДНК одним и тем же ферментом рассчитайте его общее необходимое количество. Отберите нужное количество раствора фермента из упаковки и смешайте его с необходимым количеством воды и буфера (10×) для рестрикции. Внесите аликвоты смеси фермент — буфер в реакционные смеси.

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

Ж. Если объем реакционной смеси при проведении рестрикции слишком велик для его нанесения в ячейку геля, ДНК можно сконцентрировать следующим простым способом. После остановки реакции добавлением ЭДТА добавьте $^2/_3$ объема 5 М ацетата аммония и 2 объема этанола. Охлаждайте в бане с сухим льдом и метанолом в течение 5 мин, затем процентрифугируйте 5 мин в центрифуге Эппендорф. Отбросьте надосадочную жидкость, содержащую основную часть белка. Быстро высушите осадок под вакуумом. Растворите ДНК в подходящем объеме буфера ТЕ, pH 7,6 (с. 393).

ДРУГИЕ ФЕРМЕНТЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В МОЛЕКУЛЯРНОМ КЛОНИРОВАНИИ

Помимо рестриктирующих эндонуклеаз в молекулярном клонировании обычно используют и многие другие ферменты. Их свойства описаны в последующих разделах. В некоторых случаях мы приводим прописи с описаниями условий специфических ферментативных реакций. В других мы отсылаем читателя к руководствам, в которых можно найти прописи нужных методик. Наконец, для создания полной картины мы даем описание свойств нескольких ферментов, которые иногда используются в молекулярном клонировании, но не являются необходимыми для проведения описанных в этом руководстве экспериментов. Детальное описание практического использования таких ферментов читатель может найти в цитируемых работах.

ДНК-ПОЛИМЕРАЗА I *E. coli*

Ник-трансляция ДНК

ДНК-полимераза I *E. coli* присоединяет нуклеотидные остатки к 3′-гидроксильному концу, который образуется при разрыве (по-английски — nick) одной из цепей двухцепочечной молекулы ДНК. Кроме того, благодаря своей 5′⟶3′-экзонуклеазной активности фермент может удалять нуклеотиды с 5′-конца, образующегося при разрыве. Удаление нуклеотидов с 5′-конца разрыва и последовательное добавление нуклеотидов к 3′-концу приводят к перемещению разрыва вдоль цепи ДНК (ник-трансляции) (Kelley et al., 1970). Заменяя нуклеотиды, формирующие цепь ДНК, на радиоактивные, можно получить меченную ^{32}P ДНК с удельной активностью, превышающей 10^8 имп/(мин·мкг) (Maniatis et al., 1975; Rigby et al., 1977).

1. Обычно реакционная смесь содержит 1 мкг ДНК в объеме 50 мкл. Однако реакцию можно проводить и в меньших объемах, вплоть до 5 мкл.

2. ДНК-полимераза I *E. coli* может работать в смеси с dNTP в таких низких концентрациях, как 2 мкМ, однако более эффективно фермент синтезирует ДНК при бóльших концентрациях субстратов. Исходя из соображений экономии, реакции ник-трансляции проводят при минимальных концентрациях (2 мкМ) меченых dNTP и существенно более высоких концентрациях (20 мкМ) немеченых dNTP. Таким образом, в реакционной смеси объемом 50 мкл содержится 1 нмоль каждого из немеченых dNTP и 100 пмоль каждого из меченых dNTP. Удельная активность полученной в результате ник-трансляции ДНК зависит в свою очередь от соотношения в реакционной смеси меченых и немеченых dNTP. Когда требуется высокая ($>10^8$ имп/мин на

ДНК-полимераза I (E.coli)

Фермент состоит из одной полипептидной цепи (мол. масса 109 000), обладающей тремя типами ферментативной активности (Kelley, Stahl, 1976).

Активность	Реакция	Матрица-затравка или субстрат
5′ → 3′ Полимеразная	$ДНК_{OH} + pNTP \xrightarrow{Mg^{++}} ДНК\text{-}(pN)_n + nPPi$	Одноцепочечная матрица; затравка с 3′-OH-концом
Например:	$\begin{matrix}5'\ pC\text{-}pC\text{-}pG_{OH}\\ 3'\ Gp\text{-}Gp\text{-}Cp\text{-}Tp\text{-}Ap\text{-}Tp\text{-}Cp\text{-}Gp\text{-}Ap\end{matrix}$ + dATP, dCTP, dGTP, TTP $\xrightarrow{Mg^{++}}$ $\begin{matrix}5'\ pC\text{-}pC\text{-}pG\text{-}pA\text{-}pT\text{-}pA\text{-}pG\text{-}pC\text{-}pT\\ 3'\ Gp\text{-}Gp\text{-}Cp\text{-}Tp\text{-}Ap\text{-}Tp\text{-}Cp\text{-}Gp\text{-}Ap\end{matrix}$	
5′ → 3′ Экзонуклеазная	дцДНК $\xrightarrow{Mg^{++}}$ $\begin{matrix}5'\ pN_{OH}\\ pNpN_{OH}\\ pNpNpN_{OH}\end{matrix}$ + ДНК	Деградирует двухцепочечную ДНК, начиная со свободного 5′-OH-конца
Например:	$\begin{matrix}5'\ pC\text{-}pG\text{-}pC\text{-}pA\text{-}pT\text{-}pC\text{-}pT\\ 3'\ Gp\text{-}Cp\text{-}Gp\text{-}Cp\text{-}Gp\text{-}Tp\text{-}Ap\text{-}Gp\text{-}Ap\end{matrix}$ $\xrightarrow{Mg^{++}}$ $\begin{matrix}pC\text{-}pA\text{-}pT\text{-}pC\text{-}pT\\ Gp\text{-}Cp\text{-}Gp\text{-}Cp\text{-}Gp\text{-}Tp\text{-}Ap\text{-}Gp\text{-}Ap\end{matrix}$ + pC + pG	
3′ → 5′ Экзонуклеазная	дцДНК $\xrightarrow{Mg^{++}}$ $5'\ pN_{OH}$ оцДНК	Деградирует двухцепочечную или одноцепочечную ДНК, начиная с свободного 3′-OH-конца; активность на двухцепочечной ДНК блокируется 5′ → 3′-полимеразной активностью
Например:	$\begin{matrix}5'\ pC\text{-}pG\text{-}pC\text{-}pA\text{-}pT\text{-}pC\text{-}pT\ 3'\\ Gp\text{-}Cp\text{-}Gp\end{matrix}$ $\xrightarrow{Mg^{++}}$ $\begin{matrix}5'\ pC\text{-}pG\text{-}pC_{OH}\\ Gp\text{-}Cp\text{-}Gp\ 3'\end{matrix}$ + pA + pC + pT	

Применение

1. Внесение метки в ДНК с помощью ник-трансляции.
2. При синтезе второй цепи кДНК с целью клонирования первоначально был использован голофермент (Efstratiadis et al., 1976), который в настоящее время заменен на обратную транскриптазу или фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I.

1 мкг ДНК) удельная активность ДНК (например, для исследования библиотек рекомбинантных ДНК или для обнаружения уникальных последовательностей эукариотической ДНК при гибридизации по Саузерну) в реакции ник-трансляции должно участвовать по 200 пмоль каждого из четырех dNTP, меченных ^{32}P в α-положении (уд. акт. > 800 Ки/ммоль).

Для большинства других целей разумно использовать один dNTP, меченный ^{32}P в α-положении, и три немеченых dNTP, или разбавлять каждый [α-^{32}P]dNTP соответствующим количеством немеченого dNTP.

3. Большинство поступающих в продажу препаратов [α-^{32}P]dNTP выпускается в виде концентрированных водных растворов, которые можно непосредственно добавлять в реакционную смесь для проведения ник-трансляции. Удельная активность этих препаратов колеблется от 400 до 2000 Ки/ммоль. При использовании [α-^{32}P]dNTP, растворенных в смеси этанол — вода, этанол и воду удаляют, как описано на с. 401.

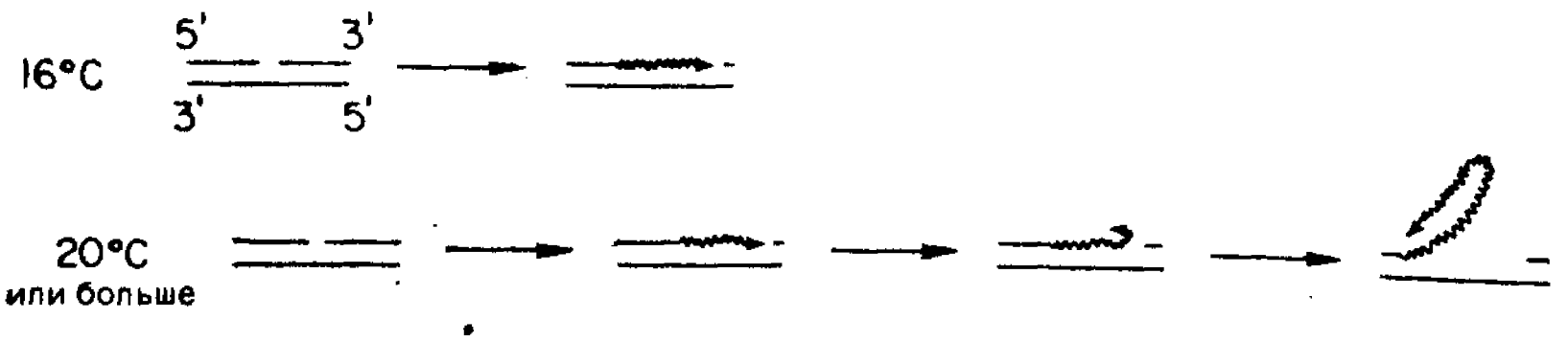
4. Реакцию ник-трансляции проводят в следующей смеси: 5 мкл буфера (10×) для ник-трансляции, 1 мкг ДНК, 1 нмоль каждого (1 мкл 1 мМ раствора) немеченого dNTP (при необходимости), 100 пмоль [α-^{32}P]dNTP и H_2O до объема 44 мкл. Смесь охлаждают до 0 °С. Разводят в 10 000 раз небольшое количество исходного раствора ДНКазы (1 мг/мл) в охлажденном буфере для ник-трансляции, содержащем 50%-ный глицерин. Разбавленный фермент стабилен при хранении при —20 °С в этом буфере (с. 397).

5. Добавляют в реакционную смесь 0,5 мкл разбавленной ДНКазы I (0,1 мкг/мл) и перемешивают с помощью встряхивания.

6. Добавляют 5 ед. (Richardson et al., 1964) ДНК-полимеразы I *E. coli* и перемешивают.

7. Инкубируют при 16 °С в течение 60 мин.

Примечание. Если реакцию проводят при более высокой температуре, в результате копирования ДНК-полимеразой новосинтезированной цепи может образоваться значительное количество «схлопнувшейся» ДНК.



9. Реакцию останавливают добавлением 2 мкл 0,5 М ЭДТА.

10. Используя связывание с DE-81 или осаждение с помощью

ТХУ (с. 414), определяют процент [α-^{32}P]dNTP, включившихся в ДНК.

11. Отделяют ник-транслированную ДНК от невключившихся dNTP на микроколонке с сефадексом G-50 обычной хроматографией или хроматографией с использованием центрифугирования (с. 407—410).

Примечания

А. Удельная активность ник-транслированной ДНК зависит не только от удельной активности dNTP, но и от степени замещения нуклеотидов матрицы. Степень замещения можно регулировать, изменяя количество ДНКазы I, участвующей в реакции. Цель этого процесса — подобрать условия для включения в ДНК около 30% [α-^{32}P]dNTP.

Размер ДНК после ник-трансляции также зависит от количества добавленной в реакционную смесь ДНКазы I и количества примесей ДНКазы в препарате ДНК-полимеразы I. Поскольку содержание нуклеазных примесей сильно различается в разных партиях ДНК-полимеразы I и ДНКазы I, поступающих в продажу, каждый новый препарат фермента необходимо проверить следующим образом.

Необходимо провести пять реакций ник-трансляции. В каждую реакционную смесь следует внести ДНК-полимеразу I и различные количества ДНКазы (табл. 4.5).

Для определения процента [α-^{32}P]dNTP, включившегося в ДНК, используют связывание с DE-81 или осаждение с помощью ТХУ (с. 414).

Таблица 4.5

Пробирка	ДНКаза I, мкл	
	0,01 мкг/мл	0,1 мкг/мл
1	0	0
2	1	0
3	2	0
4	4	0
5	0	1

Размер ДНК определяют с помощью электрофореза в щелочном агарозном геле (с. 174).

Выбирают концентрацию ДНКазы I, при которой в ДНК включается около 30% [α-^{32}P]dNTP. Цепи меченой ДНК должны иметь длину 400—800 нуклеотидов.

Б. В результате ник-трансляции обычно образуется равномерно меченная ДНК (Rigby et al., 1977); это указывает на то, что любые отклонения при внесении разрывов ДНКазой I (Ehrlich et al., 1973) или при синтезе ДНК-полимеразой слишком малы, чтобы существенно изменить характер распределения метки в ДНК.

В. Ферменты, используемые при ник-трансляции, чувствительны к примесям агарозы. Поэтому перед ник-трансляцией ДНК, элюированной с агарозного геля, ее следует тщательно очистить, как описано в гл. 5.

Г. В некоторых случаях (например, для анализа гибридов ДНК — РНК с помощью нуклеазы S1) желательно получать ник-транслированную ДНК, длина которой значительно превышает 400—800 нуклеотидов. С этой целью:

1) проведите реакцию ник-трансляции с использованием оптимального количества ДНКазы I, определив его, как описано выше;

2) добавьте 2 мкл 0,5 М ЭДТА. Для инактивации ДНК-полимеразы и ДНКазы смесь прогрейте при 70 °С в течение 5 мин;

3) добавьте 150 мкл 10 мМ $MgCl_2$ и 20 мкл буфера (10×) для лигирования (сшивания; с. 135);

4) Добавьте 2 ед. лигазы фага Т4;

5) проинкубируйте при комнатной температуре в течение 2 ч;

6) после ник-трансляции и обработки лигазой отделите ДНК от невключившихся dNTP колоночной хроматографией на сефадексе G-50 или хроматографией с использованием центрифугирования (с. 407—410);

7) определите размер ДНК методом электрофореза в щелочном агарозном геле (с. 174);

8) при необходимости выделите ДНК требуемого размера после разделения в щелочном агарозном геле.

Исходные растворы

Буфер (10×) для ник-трансляции имеет состав: 0,5 М трис-HCl, pH 7,2, 0,1 М $MgSO_4$, 1 мМ дитиотрейтол и 500 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина (BSA, Pentax Fraction V). Разделите буфер на небольшие аликвоты и храните при —20 °С.

ДНКаза I. Приготовьте исходный раствор, содержащий 1 мг/мл фермента в 0,15 М NaCl и 50%-ном глицерине. (Электрофоретически чистую ДНКазу I производит фирма Worthington Biochemicals.) Разделите раствор на небольшие аликвоты и храните их при —20 °С. Раствор дезоксинуклеозидтрифосфатов имеет состав: 1 мМ dATP, 1 мМ dGTP, 1 мМ dCTP и 1 мМ TTP.

Исходные растворы приготовьте, как описано на с. 396.

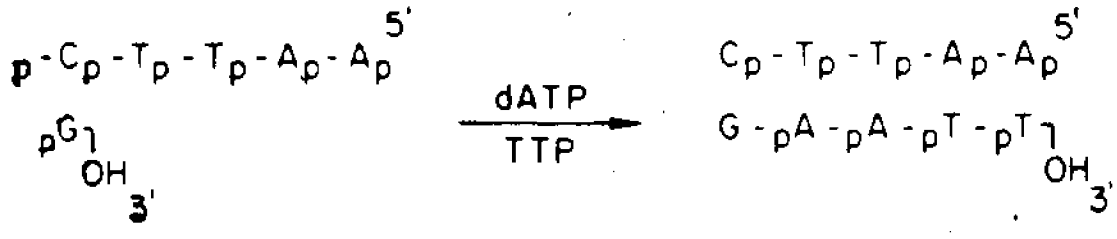
ДНК-полимераза I E. coli. Большинство фирм, продающих препараты фермента, поставляет их в буфере, содержащем 50%-ный глицерин. Обычно в 1 мкл препарата содержится 5 ед. фермента. [Определение 1 ед. фермента дано Ричардсоном и др. (Richardson et al., 1964).]

ФРАГМЕНТ КЛЕНОВА ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ I

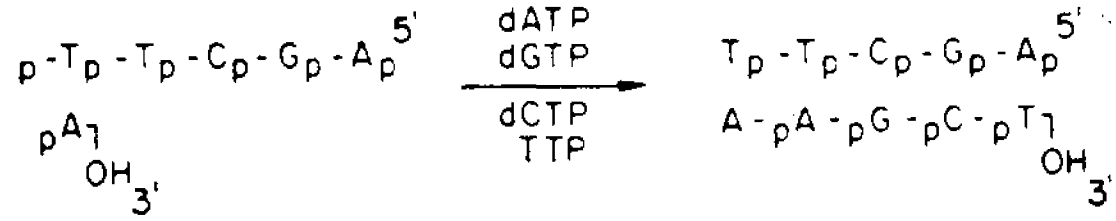
Достраивание укороченных 3′-концов двухцепочечной ДНК

Условия реакции идентичны используемым при ник-трансляции ДНК, за исключением того, что а) вместо голофермента используют фрагмент Кленова ДНК-полимеразы *E. coli*; б) не используют ДНКазу; в) обычно меченым является только один из четырех dNTP.

Какие dNTP следует вносить в реакционную смесь, зависит от последовательности оснований выступающих 5′-концов цепей ДНК. Например, для достраивания укороченных 3′-концов ДНК, образующихся при расщеплении рестриктазой *Eco*RI, в реакции должны участвовать только dATP и TTP:



Вместе с тем для достраивания укороченных концов, образовавшихся при расщеплении рестриктазой *Hin*dIII, необходимо присутствие всех четырех dNTP:



Наконец, для репарации концов, образовавшихся после обработки ДНК нуклеазой S1 или рестриктазой *Bal*31, в реакции должны участвовать все четыре dNTP.

Обычно в реакционной смеси содержится 1 мкг ДНК в объеме 20 мкл. Однако реакция хорошо протекает в очень широком диапазоне концентраций ДНК (1—500 мкг/мл).

1. Смешайте 1 мкг ДНК, 2 мкл буфера (10×) для ник-трансляции, 2 нмоль каждого (1 мкл 2 мМ раствора) немеченого dNTP (при необходимости), 2 пмоль (уд. акт. 400 Ки/ммоль) [α-^{32}P]dNTP, 1 ед. фрагмента Кленова ДНК-полимеразы и H_2O до объема 25 мкл.

2. Проинкубируйте при комнатной температуре в течение 30 мин.

3. Остановите реакцию добавлением 1 мкл 0,5 М ЭДТА. Проэкстрагируйте один раз смесью фенол — хлороформ (с. 403).

4. Отделите ДНК от невключившихся dNTP на микроколонках с сефадексом G-50 обычной хроматографией или хроматографией с использованием центрифугирования (с. 407—410).

Большой фрагмент ДНК-полимеразы I

*Eco*II (фрагмент Кленова)

Фермент состоит из одной полипептидной цепи (мол. масса 76 000), полученной при расщеплении нативной ДНК-полимеразы I субтилизином (Jacobsen et al., 1974). Этот пептид обладает 5′ → 3′-полимеразной и 3′ → 5′-экзонуклеазной активностями нативной ДНК-полимеразы I, но у него отсутствует 5′ → 3′-экзонуклеазная активность.

Активность **Реакция**

5′ → 3′ Полимераза

$$\text{ДНК}_{OH} + n\text{dNTP} \xrightarrow{Mg^{++}} \text{ДНК}(\text{pdN})_n + n^{PP_i}$$

Матрица-затравка или субстрат

Например:

5′ ...pC-pC-pG... / ...Gp-Gp-Cp-Tp-Ap-Tp-Cp-Gp-Ap... 3′ + dATP, dCTP, dGTP, TTP, Mg^{++}

Одноцепочечная матрица-затравка с 3′-OH-концом

5′ ...pC-pC-pG-pA-pT-pA-pG-pC-pT 3′ / ...Gp-Gp-Cp-Tp-Ap-Tp-Cp-Gp-Ap... 5′

3′ → 5′ Экзонуклеаза

$$\text{дцДНК, оцДНК} \xrightarrow{Mg^{++}} 5\,\text{pN}_{OH}$$

Разрушает двухцепочечную или одноцепочечную ДНК, начиная со свободного 3′-OH-конца; активность на двухцепочечной ДНК блокируется 5′ → 3′-полимеразной активностью.

Применение

1. Достраивание укороченных 3′-концов, образовавшихся при расщеплении ДНК ферментами рестрикции, например:

5′ ...pC-pC$_{OH}$ / ...Gp-Gp-Ap-Ap-Tp-Tp... 3′ —(Фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I; dATP, TTP, Mg^{++})→ 5′ ...pC-pC-pT-pT-pA-pA... / ...Gp-Gp-Ap-Ap-Tp-Tp... 3′

2. Концевое включение метки в фрагменты ДНК (при использовании [^{32}P] dNTP в реакциях достраивания концов).
3. Синтез второй цепи кДНК при клонировании.
4. Определение нуклеотидной последовательности ДНК при использовании дидезокси-системы Сэнгера (Sanger et al., 1977).
5. Одно время 3′ → 5′-экзонуклеазную активность фрагмента Кленова использовали для расщепления выступающих 3′-концов ДНК, образованных при ее обработке некоторыми рестриктазами. Позже для этой цели стали использовать ДНК-полимеразу фага T4, обладающую более высокой 3′ → 5′-экзонуклеазной активностью.

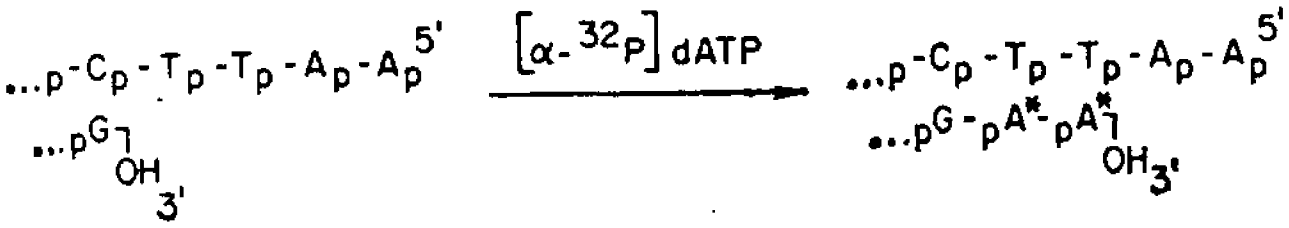
Быстрое концевое включение метки в ДНК[1]

Условия проведения реакции сходны с условиями реакции достраивания укороченных 3′-концов двухцепочечной ДНК, за исключением следующих моментов.

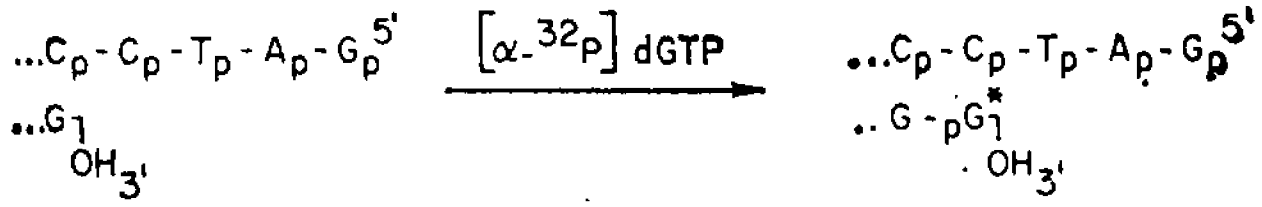
а) Обычно используют только один [α-^{32}P]dNTP.

б) Реакцию можно проводить сразу же после расщепления ДНК рестриктазой. В удалении рестриктазы, ее инактивации или смене буферов нет необходимости.

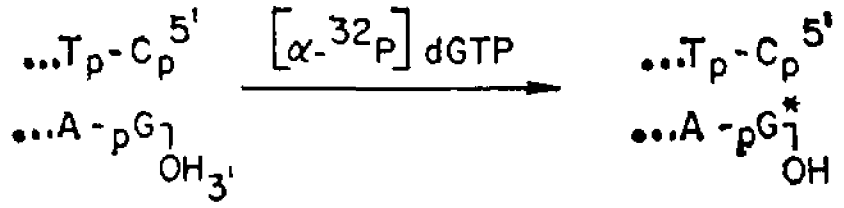
в) То, с каким [α-^{32}P]dNTP проводят реакцию, зависит от последовательности оснований выступающих 5′-концов ДНК. Например, концы, образовавшиеся при расщеплении ДНК рестриктазой *Eco*RI, могут быть помечены [α-^{32}P]dATP:



Концы, образовавшиеся при расщеплении ДНК рестриктазой *Bam*HI, могут быть помечены [α-^{32}P]dGTP:



В фрагменты ДНК с тупыми концами метку вводят путем замещения нуклеотидов на 3′-гидроксильном конце:



ДНК с выступающими 3′-концами нельзя эффективно пометить с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*. Для введения метки в такие молекулы используют ДНК-полимеразу фага T4 (с. 127).

1. Обработайте ДНК (до 1 мкг) нужным ферментом рестрикции в 25 мкл соответствующего буфера.

2. Добавьте 2,0 мкКи соответствующего [α-^{32}P]dNTP.

3. Добавьте 1 ед. фрагмента Кленова ДНК-полимеразы *E. coli* и инкубируйте смесь в течение 10 мин при комнатной температуре.

---

[1] Drouin, 1980.

4. Нанесите ДНК с концевой меткой непосредственно на гель или отеделите меченую ДНК от не включившихся dNTP на микроколонках с сефадексом G-50 обычной хроматографией или хроматографией с использованием центрифугирования (с. 407—410).

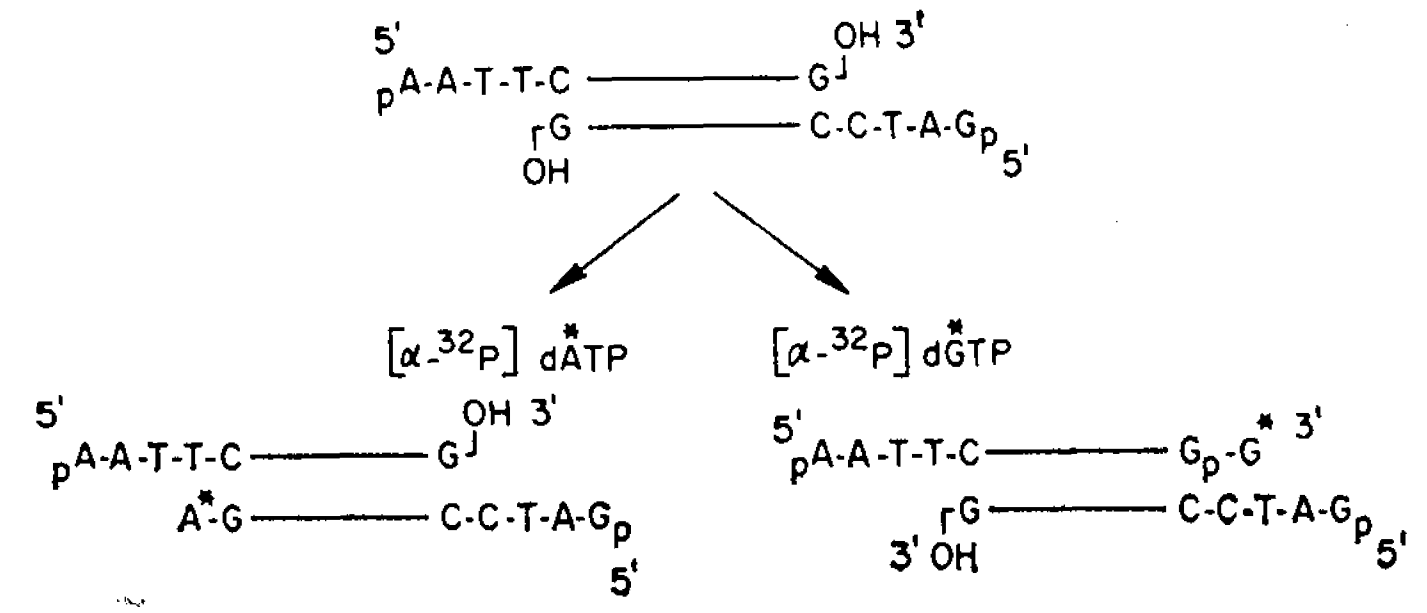
Примечания

А. Этот метод является предпочтительным для получения фрагментов меченой ДНК, которые можно использовать в качестве маркеров для определения размеров молекул при гель-электрофорезе. Поскольку метка включается во фрагменты ДНК пропорционально их молярным концентрациям, а не размерам, и большие, и маленькие фрагменты, полученные при рестрикции, метятся в равной степени. Поэтому для локализации фрагментов ДНК, которые слишком малы, чтобы их можно было обнаружить при окрашивании бромистым этидием, используют радиоавтографию.

Б. Метод с успехом можно применять и для малоочищенных препаратов ДНК (например, микропрепаратов плазмид; см. с. 332 и далее).

В. При использовании меченой ДНК для определения ее нуклеотидной последовательности по методу Максама — Гилберта или для картирования мРНК с помощью нуклеазы S1 количество меченого dNTP должно быть увеличено до 250 пмоль. После инкубации реакционной смеси в течение 15 мин при комнатной температуре добавляют по 2 нмоль каждого из четырех немеченых dNTP (т. е. по 1 мкл 2 мМ раствора) и продолжают инкубацию в течение еще 5 мин при комнатной температуре. Такое разбавление немечеными дезоксинуклеозидтрифосфатами приводит к полному достраиванию всех укороченных 3′-концов, причем все молекулы меченой ДНК имеют одинаковую длину.

Г. Выбрав подходящий меченый dNTP, можно пометить только один конец двухцепочечной молекулы ДНК. Например, если ДНК с одного конца расщепили рестриктазой *Hin*dIII, а с другого — рестриктазой *Bam*HI, ее можно избирательно пометить, внося в реакционную смесь [α-^{32}P]dATP или [α-^{32}P]dGTP.

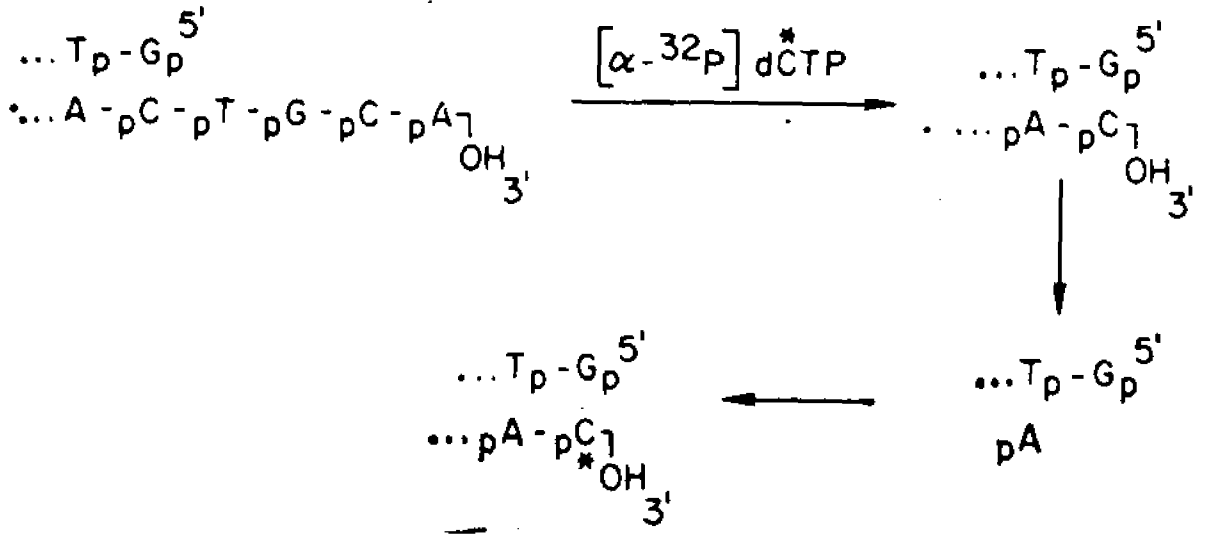


ДНК-ПОЛИМЕРАЗА ФАГА Т4

Приведенные ниже прописи методик взяты из статьи О'Фаррела (O'Farrell, 1981).

Быстрое концевое включение метки в ДНК

ДНК-полимераза фага Т4, как и фрагмент Кленова ДНК-полимеразы *E. coli*, может быть использована для введения метки в нормальные или укороченные 3′-концы ДНК. Однако ДНК-полимераза фага Т4 обладает большей 3′⟶5′-экзонуклеазной активностью, чем фрагмент Кленова, и поэтому ее использование предпочтительно для введения метки в молекулы ДНК с выступающими 3′-концами:

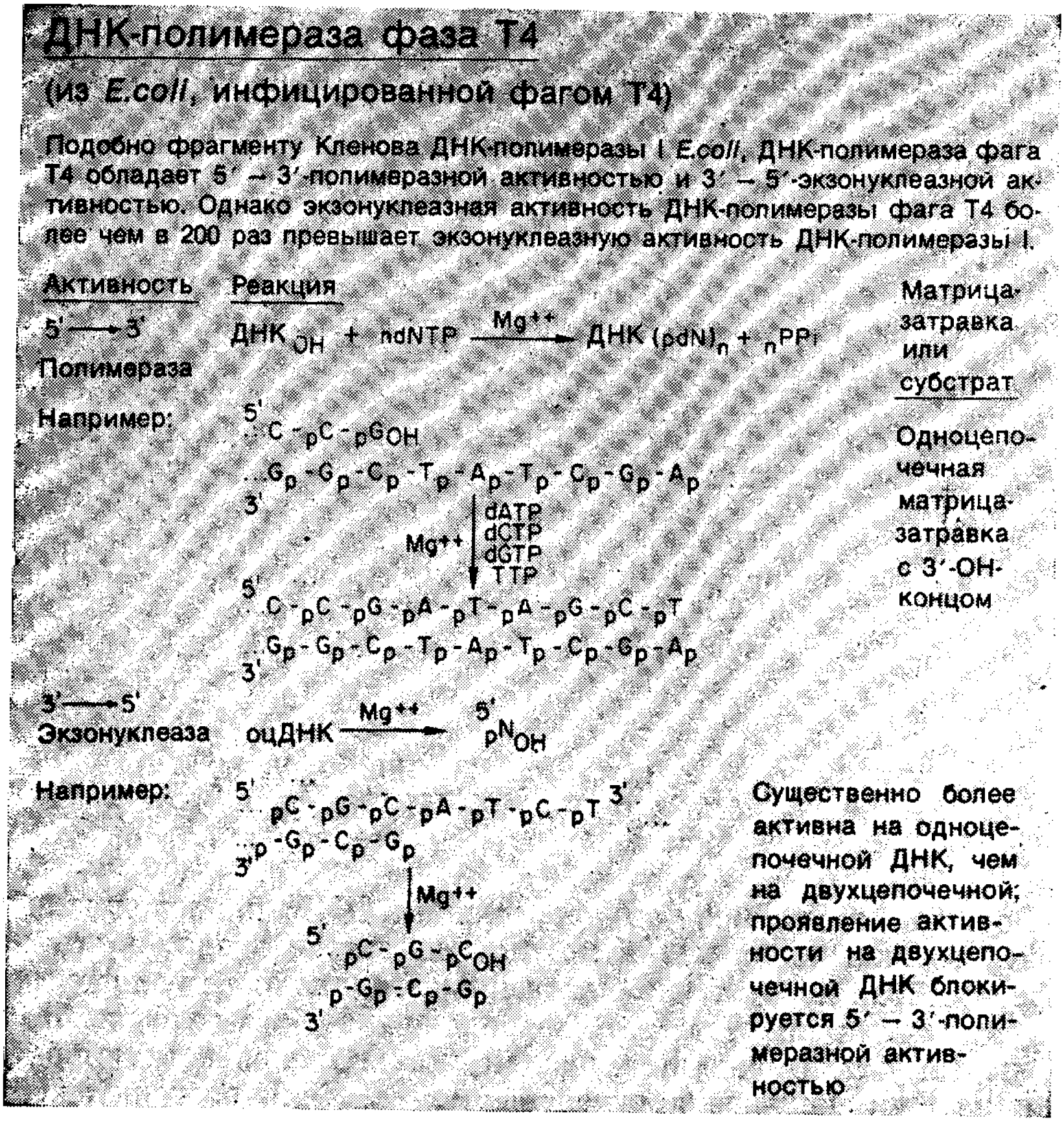


Во многих случаях для рестрикции ДНК и последующего концевого включения метки можно использовать один и тот же буфер (состав которого приведен ниже). Однако не все ферменты рестрикции работают в буфере для ДНК-полимеразы фага Т4, поэтому рекомендуется предварительно провести пробные реакции с имеющейся партией фермента. Если рестриктаза не работает в буфере для ДНК-полимеразы фага Т4, рестрикцию и концевое включение метки в ДНК необходимо проводить в два этапа. В этом случае проведите расщепление ДНК в подходящем буфере для рестриктазы, удалите фермент экстракцией смесью фенол — хлороформ, осадите ДНК этанолом, вновь растворите ее в буфере ТЕ и добавьте необходимое количество буфера (10×) для ДНК-полимеразы фага Т4. *Буфер (10×) для ДНК-полимеразы фага Т4* имеет состав: 0,33 М трис-ацетат, pH 7,9, 0,66 М ацетат калия, 0,10 М ацетат магния, 5 мМ дитиотрейтол и 1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (BSA Pentax Fraction V).

Исходный буфер (10×) следует разделить на небольшие аликвоты и хранить в замороженном состоянии при —20 °С.

1. Смешайте 0,5—2,0 мкг ДНК, 2 мкл буфера (10×) для ДНК-полимеразы фага Т4 и H_2O до объема 19 мкл.

2. Добавьте нужный фермент рестрикции и инкубируйте смесь в течение необходимого времени.



3. Добавьте непосредственно в реакционную смесь 1 мкл 2 мМ раствора трех dNTP (например, 2 мМ dGTP, 2 мМ dATP, 2 мМ TTP).

4. Добавьте около 2 мкКи водного раствора четвертого dNTP, меченного ^{32}P в α-положении (в приведенном выше примере таким dNTP служит [α-^{32}P]dCTP).

5. Добавьте 1 мкл (2,5 ед.) ДНК-полимеразы фага Т4.

6. Инкубируйте в течение 5 мин при 37 °С.

7. Добавьте 1 мкл 1 мМ раствора немеченого четвертого dNTP (в рассматриваемом случае dCTP) и проинкубируйте смесь еще в течение 10 мин.

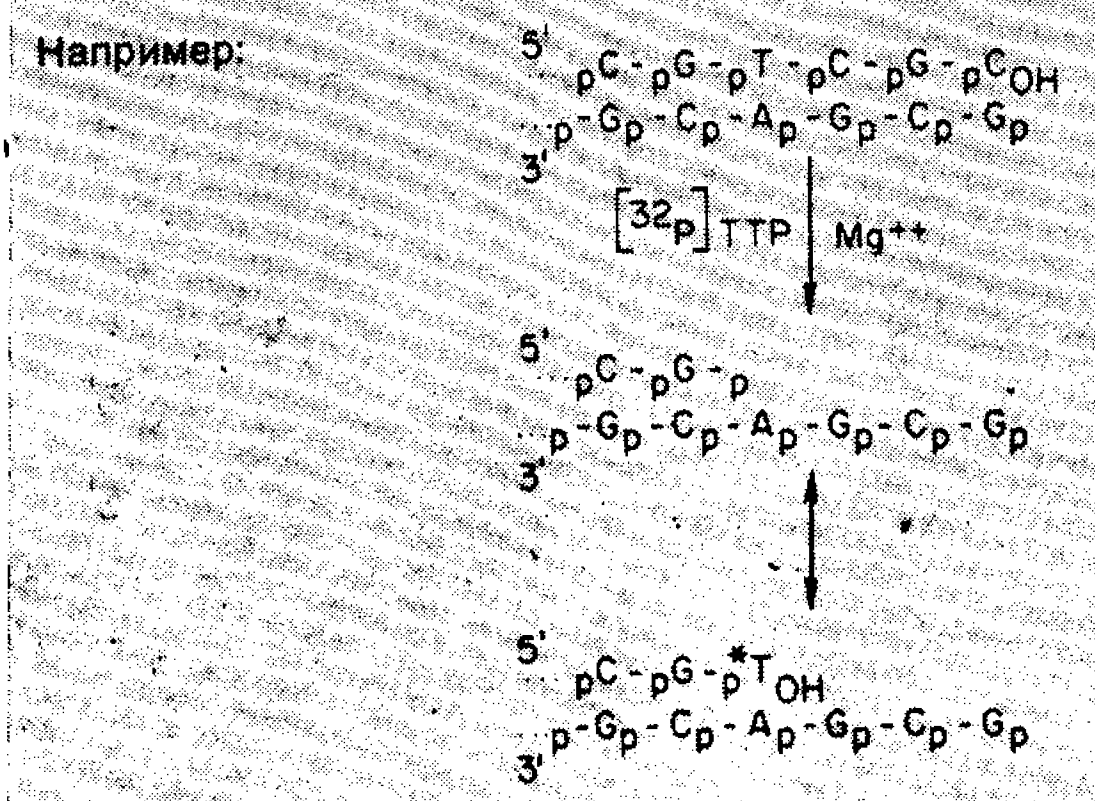
8. Остановите реакцию прогреванием смеси при 70 °С в течение 5 мин.

В присутствии dNTP проявлению 3′-экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы фага Т4 по отношению к двухцепочечной ДНК препятствует реакция полимеризации. Поэтому про-

Реакция обмена

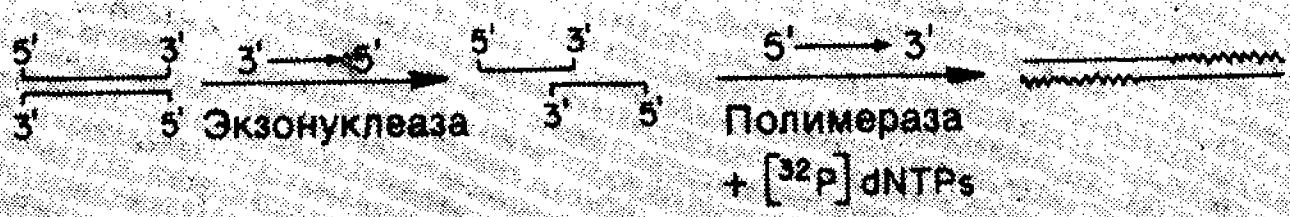
В присутствии только одного dNTP в результате 3′ → 5′-экзонуклеазной активности фермента происходит деградация двухцепочечной ДНК, начиная с 3′-ОН-конца до основания, комплементарного внесенному dNTP. Далее с этого места начинается непрерывная серия реакций синтеза и обмена.

Например:



Применение

1. Концевое включение метки в фрагменты ДНК с выступающими 5′-концами (реакция достраивания).
2. Концевое включение метки в фрагменты ДНК с тупыми концами или с выступающими 3′-концами (реакция обмена).
3. Включение метки в фрагменты ДНК, используемые в качестве гибридизационных зондов, методом частичного расщепления двухцепочечной ДНК 3′ → 5′-экзонуклеазой с последующим достраиванием в присутствии [32P] dNTP (O'Farrell et al., 1980).



4. Определение нуклеотидной последовательности ДНК «плюс — минус»-методом (Sanger, Coulson, 1975).

дукт описанной выше реакции представляет собой молекулу с тупыми концами с мечеными нуклеотидами непосредственно на конце ДНК или очень близко от него.

Более интенсивное включение метки можно получить с помощью реакции замещения. Сначала фермент за счет своей 3′-экзонуклеазной активности расщепляет двухцепочечную ДНК с образованием молекул с укороченными 3′-концами. При последующем добавлении меченых dNTP частично расщепленные мо-

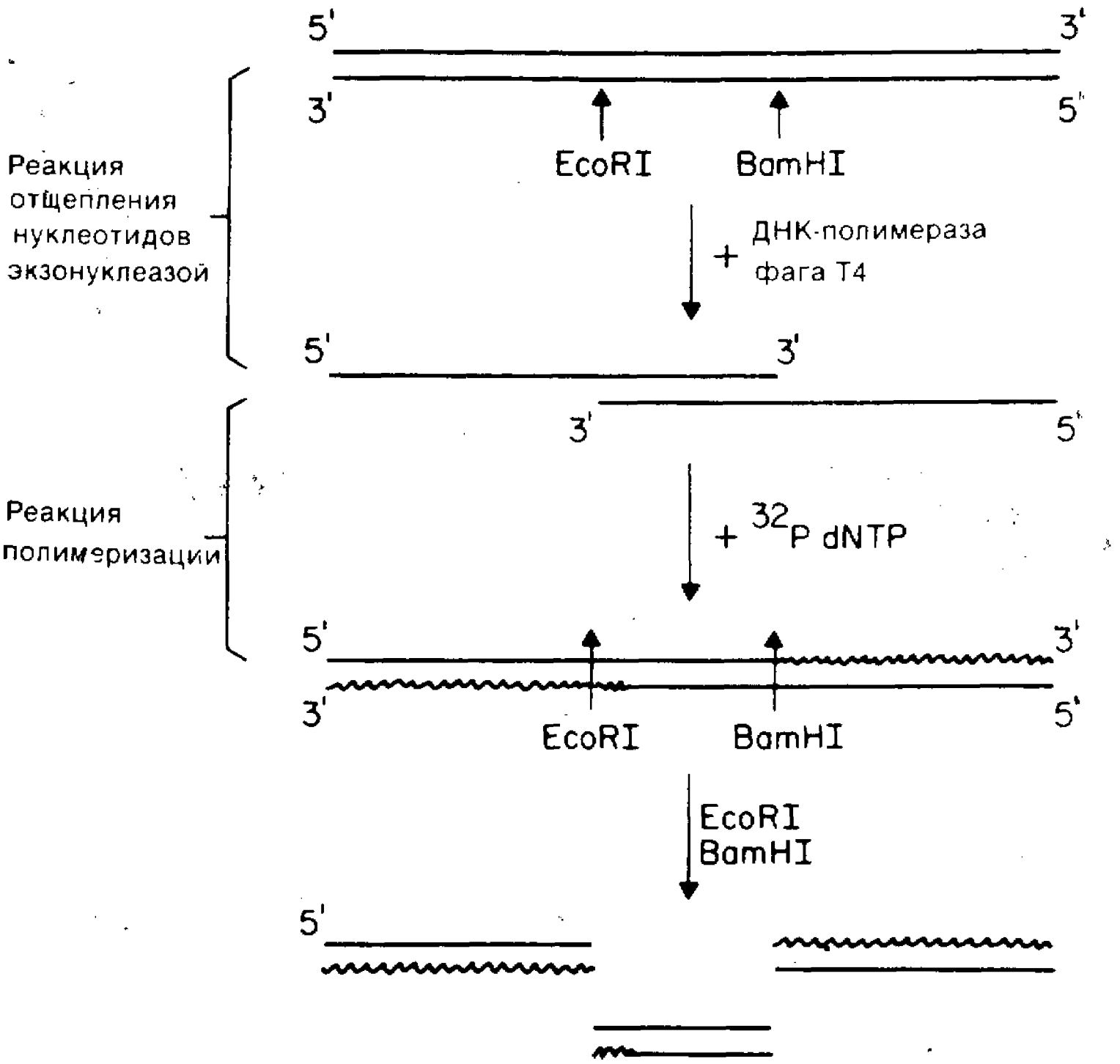


Рис. 4.1.

лекулы ДНК служат матрицами-затравками, которые в результате полимеразной реакции превращаются в интактную двухцепочечную ДНК. Полученные с помощью этого метода радиоактивные молекулы с высокой удельной активностью используют главным образом в качестве гибридизационных зондов. Они обладают двумя преимуществами по сравнению с зондами, полученными методом ник-трансляции. Во-первых, у таких молекул отсутствуют шпилечные структуры, которые могут образовываться при ник-трансляции и служить причиной артефактов. Во-вторых, с помощью обработки соответствующими рестриктазами из них легко можно получить зонды, специфичные по отношению к одной из цепей ДНК (рис. 4.1).

Однако в отличие от ник-трансляции при использовании этого метода не происходит равномерного распределения метки вдоль цепи ДНК. Кроме того, за счет своей 3′-экзонуклеазной активности фермент существенно быстрее разрушает одноцепочечную ДНК, чем двухцепочечную. Поэтому после достижения ферментом середины молекулы она распадается на две одноцепочечные половины, которые затем быстро разрушаются. Таким

образом, важно остановить экзонуклеазную реакцию прежде, чем фермент достигнет центра молекулы. В силу этого при использовании метода синтеза путем замены нуклеотидов образуется популяция молекул, полностью меченных на концах, но с постепенным убыванием количества метки по направлению к центру молекулы. Таким образом, максимально возможная степень включения метки во все фрагменты ДНК, полученные при рестрикции, определяется минимальным размером фрагментов в смеси.

Синтез ДНК путем замены нуклеотидов

1. Смешайте 0,2—0,5 мкг ДНК, 2 мкл буфера (10×) для ДНК-полимеразы фага Т4 и H_2O до объема 20 мкл.

2. Добавьте нужный фермент рестрикции и инкубируйте в течение необходимого времени.

3. Добавьте в реакционную смесь ДНК-полимеразу фага Т4. Количество добавленного фермента и соотношение количеств фермента и ДНК в реакционной смеси определяют скорость расщепления экзонуклеазой.

Отношение (ед. фермента/мкг ДНК)	Скорость нуклеотидного отщепления с каждого 3′-конца, $мин^{-1}$
0,62	10
1,25	20
1,75	30
2,5	40

Примечание. При отношении фермент/ДНК, превышающем 2,5, скорость экзонуклеазного расщепления перестает линейно зависеть от этого отношения.

4. Рассчитайте число молей отщепленных нуклеотидов, используя следующую формулу:

$$M = D\frac{N}{B},$$

где M — число молей отщепленных нуклеотидов; D — количество ДНК, участвующей в реакции (выраженное в молях нуклеотидов); N — число нуклеотидов, отщепленных с одного конца ДНК; B — число пар оснований в ДНК (для дезоксирибонуклеотидов 1 моль = 330 г).

5. Добавьте в реакционную смесь 1 мкл 2 мМ раствора смеси трех dNTP (например, 2 мМ dGTP, 2 мМ dATP, 2 мМ TTP).

6. Добавьте четвертый dNTP, меченный ^{32}P в α-положении (уд. акт. не менее 400 Ки/ммоль), в количестве, по меньшей мере эквивалентном числу молей нуклеотидов, отщепленных экзонуклеазой от ДНК. Инкубируйте при 37 °С в течение 1 ч.

7. Добавьте 1 мкл 2 мМ раствора четвертого dNTP. Инкубируйте при 37 °С еще 15 мин.

8. Отделите меченую ДНК от невключившихся dNTP на микроколонках с сефадексом G-50 обычной хроматографией или хроматографией с использованием центрифугирования (с. 407—410).

Примечание. При использовании меченого [α-^{32}P]dNTP с удельной активностью 400 Ки/ммоль удельная активность замещенных последовательностей составляет $\sim 7 \cdot 10^8$ имп/(мин·мкг).

ВКЛЮЧЕНИЕ МЕТКИ В 5′-КОНЦЫ ДНК С ПОМОЩЬЮ ПОЛИНУКЛЕОТИДКИНАЗЫ ФАГА Т4

Прямая реакция; использование в качестве матрицы молекул ДНК с выступающими 5′-концами[1]

1. Смешайте 1—50 пмоль дефосфорилированной ДНК (5′-концы), 10 мкл буфера I (10×) для киназы, 50 пмоль (150 мкКи) [γ-^{32}P]ATP (уд. акт. 3000 Ки/ммоль), 10—20 ед. Т4-полинуклеотидкиназы, H_2O до объема 50 мкл.

Инкубируйте при 37 °С в течение 30 мин.

Буфер I (10×) для киназы имеет состав: 0,5 М трис-HCl, pH 7,6, 0,1 М $MgCl_2$, 50 мМ дитиотрейтол, 1 мМ спермидин и 1 мМ ЭДТА.

2. Добавьте 2 мкл 0,5 М ЭДТА. Экстрагируйте один раз смесью фенол — хлороформ и осадите ДНК этанолом.

3. Вновь растворите ДНК в 50 мкл ТЕ, pH 7,9.

4. Отделите меченую ДНК от невключившегося [γ-^{32}P]ATP на микроколонках с сефадексом G-50 обычной хроматографией или хроматографией с использованием центрифугирования (с. 407—410).

Примечания

А. 1 моль 5′-концов = 0,5 моль ДНК.

Например, 1 моль линейной ДНК плазмиды pBR322 = 3,2 × $\times 10^6$ г, 1 моль 5′-концов линейной ДНК pBR322 = $1{,}6 \cdot 10^6$ г, 1 пмоль 5′-концов линейной ДНК pBR322 = 1,6 мкг.

Б. Спермидин стимулирует включение [γ-^{32}P]ATP и ингибирует нуклеазу, присутствующую в некоторых препаратах полинуклеотидкиназы.

В. Концентрация ATP в реакции должна быть равна по меньшей мере 1 мкМ.

---

[1] Maxam, Gilbert, 1980.

Полинуклеотидкиназа фага Т4

(из *E.coli*, инфицированной фагом Т4)

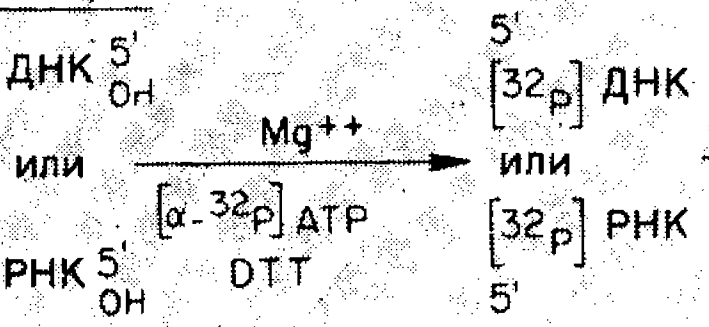
Фермент катализирует перенос γ-фосфата ATP на 5′-OH-конец ДНК или РНК (Richardson, 1971).

Активность

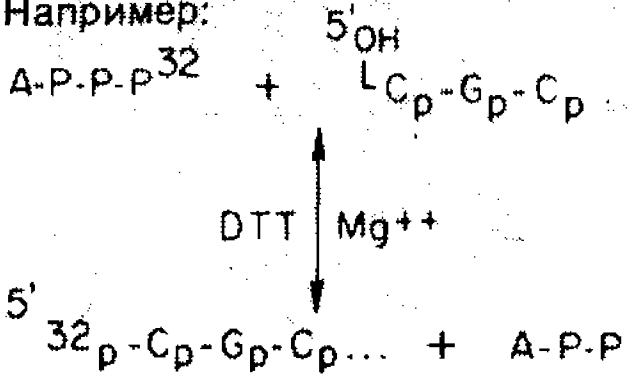
Киназа (прямая реакция)

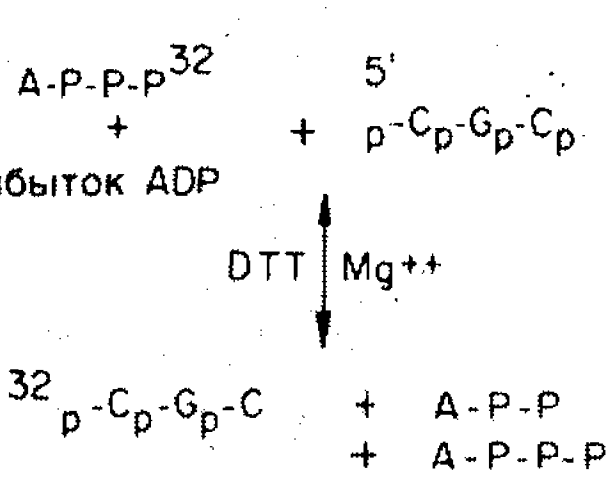
Киназа (реакция обмена)

Реакция



Например:





Субстрат

Одно- или двухцепочечная ДНК с 5′-OH-концом

Одно- или двухцепочечная ДНК с 5′-фосфатом на конце.

Избыток ADP стимулирует реакцию обмена, вызывая перенос концевого 5′-фосфата с ДНК на ADP. Затем ДНК вновь фосфорилируется за счет переноса меченого γ-фосфата в [α-32P] ATP (Berkner, Folk, 1977).

Применение

1. Включение метки в 5′-концы ДНК для определения нуклеотидной последовательности по методу Максама — Гилберта (Maxam, Gilbert, 1977).
2. Фосфорилирование синтетических линкеров и различных фрагментов ДНК, у которых отсутствует концевой 5′-фосфат перед лигированием.

Г. Для удаления низкомолекулярных нуклеиновых кислот дефосфорилированную ДНК следует тщательно очистить с помощью гель-электрофореза или центрифугирования в градиенте плотности. Несмотря на то что такие примеси могут составлять лишь небольшую часть нуклеиновых кислот в препарате, их вклад в содержание 5′-концов значителен. Если не удалить примеси низкомолекулярных ДНК и РНК, то они будут основными

видами нуклеиновых кислот, которые окажутся меченными в результате реакции с полинуклеотидкиназой.

Д. Ионы аммония — сильные ингибиторы полинуклеотидкиназы. Поэтому перед проведением реакции с полинуклеотидкиназой не следует растворять ДНК в буферах, содержащих соли аммония, или осаждать ее из них.

Прямая реакция; использование в качестве матриц молекул ДНК с тупыми или укороченными 5′-концами

Молекулы ДНК с тупыми или укороченными 5′-концами метятся с помощью полинуклеотидкиназы менее эффективно, чем молекулы ДНК с выступающими 5′-концами. Эффективность включения метки можно повысить следующим способом.

1. Смешайте 1—50 пмоль дефосфорилированной ДНК (5′-концы), 4 мкл раствора, имеющего состав: 0,2 М трис-HCl, pH 9,5, 10 мМ спермидин, 1 мМ ЭДТА, и H_2O до объема 40 мкл. Нагрейте до 40 °С и быстро охладите во льду.

2. Добавьте 5 мкл киназного буфера (10×) для тупых концов.

Киназный буфер (10×) для тупых концов имеет состав: 0,5 М трис-HCl, pH 9,5, 0,1 М $MgCl_2$, 50 мМ дитиотрейтол и 50%-ный глицерин.

3. Добавьте по меньшей мере 50 пмоль [γ-^{32}P]АТР (уд. акт. 3000 Ки/моль) в объеме 5 мкл.

4. Добавьте 20 ед. полинуклеотидкиназы фага Т4.

5. Перемешайте и инкубируйте при 37 °С в течение 30 мин.

6. Добавьте 2 мкл 0,5 М ЭДТА.

7. Экстрагируйте один раз смесью фенол — хлороформ.

8. Добавьте к водной фазе 5 мкл 3 М ацетата натрия, pH 5,2, и осадите ДНК этанолом.

9. Вновь растворите ДНК в 50 мкл буфера ТЕ, pH 7,6.

10. Отделите меченую ДНК от невключившегося [γ-^{32}P]АТР на микроколонках с сефадексом G-50 обычной хроматографией или хроматографией с использованием центрифугирования (с. 407—410).

Прямая реакция; использование в качестве матриц синтетических линкеров[1]

1. Растворите количество линкеров, соответствующее одной оптической единице при 260 нм ($D_{260}=1$) по инструкции фирмы-изготовителя, в 100 мкл буфера ТЕ, pH 7,6.

2. Смешайте 4 мкл (~2 мкг) линкеров (0,5 мг/мл); 6,6 пмоль (20 мкКи) [γ-^{32}P]АТР (уд. акт. >3000 Ки/моль), 1 мкл киназного буфера (10×) для линкеров и H_2O до объема 9 мкл.

[1] Maniatis et al., 1978.

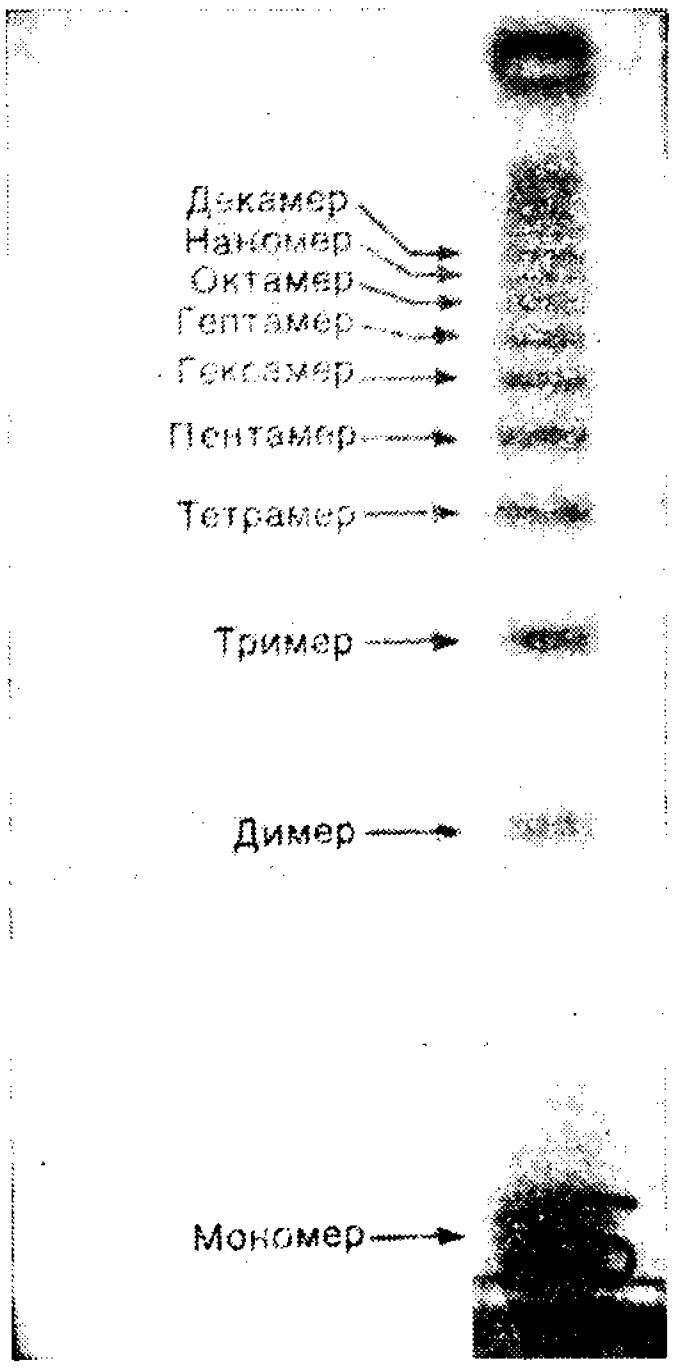


Рис. 4.2.

Добавьте 1 мкл (10 ед.) полинуклеотидкиназы.

Киназный буфер (10×) для линкеров имеет состав: 0,7 М трис-HCl, pH 7,6, 0,1 М $MgCl_2$ и 50 мМ дитиотрейтол.

3. Инкубируйте при 37 °С в течение 15 мин.

4. Добавьте 1 мкл киназного буфера (10×) для линкеров, 1 мкл 10 мМ АТР, 7 мкл H_2O и 1 мкл (10 ед.) полинуклеотидкиназы. Инкубируйте еще 30 мин при 37 °С. Обработанные киназой линкеры храните при —20 °С.

5. Проверьте способность обработанных киназой линкеров к лигированию (сшиванию) следующим образом:

а) Смешайте 5 мкл линкеров, обработанных киназой, 1 мкл буфера (10×) для лигирования, 3 мкл H_2O и 1 мкл ДНК-лигазы фага Т4. Инкубируйте при 4 °С в течение 4 ч.

Буфер (10×) *для лигирования* имеет состав: 0,66 М трис-HCl, pH 7,6, 50 мМ $MgCl_2$, 50 мМ дитиотрейтол и 10 мМ АТР.

б) Прогрейте смесь при 65 °С в течение 15 мин (для инактивации лигазы).

в) Отберите 5 мкл раствора обработанных киназой и лигазой линкеров в чистую пробирку. Добавьте 10 мкл H_2O, 2,5 мкл

буфера (10×) для рестрикции и 10 ед. рестриктазы. Инкубируйте при 37 °С в течение 1 ч.

г) В 10%-ном акриламидном геле проведите электрофорез линкеров: не обработанных лигазой, но обработанных киназой (2 мкл); обработанных лигазой и киназой (5 мкл); обработанных лигазой, киназой и рестриктазой (5 мкл). Для приготовления геля и проведения электрофореза используйте буфер TBE (0,5×). Проводите электрофорез до тех пор, пока бромфеноловый синий не дойдет до середины геля.

д) Накройте гель пленкой Saran Wrap и для получения радиоавтографа экспонируйте его при —70 °С. Радиоавтограф линкеров, обработанных лигазой и киназой, должен выглядеть, как показано на рис. 4.2.

Реакция обмена; использование в качестве матриц молекул ДНК с выступающими фосфорилированными 5′-концами

Эта процедура (Berkner, Folk, 1977) занимает меньше времени, чем прямая реакция, поскольку для нее не требуется дефосфорилирования ДНК. Мы, однако, находим ее менее эффективной.

1. Смешайте 1—50 пмоль ДНК с 5′-концевыми фосфатными группами, 5 мкл буфера (10×) для реакции обмена, 3 мкл 5 мМ ADP, 100 пмоль (т. е. 30 мкл раствора с уд. акт. 10 мКи/мл), [γ-^{32}P]ATP (уд. акт. 3000 Ки/моль), H_2O до объема 50 мкл и 1 мкл (20 ед.) полинуклеотидкиназы фага T4.

Буфер (10×) для реакции обмена имеет состав: 0,5 М имидазол-HCl, pH 6,6, 0,1 М $MgCl_2$, 50 мМ дитиотрейтол, 1 мМ спермидин и 1 мМ ЭДТА.

2. Инкубируйте при 37 °С в течение 30 мин.
3. Добавьте 2 мкл 0,5 М ЭДТА.
4. Экстрагируйте один раз смесью фенол — хлороформ.
5. Добавьте к водной фазе 5 мкл 3 М ацетата натрия, pH 5,2, и осадите ДНК этанолом.
6. Вновь растворите ДНК в 50 мкл буфера, pH 7,6.
7. Отделите меченую ДНК от невключившегося [γ-^{32}P]ATP на микроколонках с сефадексом G-50 обычной хроматографией или хроматографией с использованием центрифугирования (с. 407—410).

РНК-ЗАВИСИМАЯ ДНК-ПОЛИМЕРАЗА

РНК-зависимая ДНК-полимераза (обратная транскриптаза) в основном используется для транскрипции мРНК с образованием двухцепочечной ДНК, которая может быть встроена в прокариотические векторы. Детальное описание этого метода при-

РНК-зависимая ДНК-полимераза (обратная транскриптаза)

(из вируса миелобластоза птиц)

Фермент состоит из двух полипептидов, один из которых обладает и 5′ → 3′-полимеразной активностью, и специфической по отношению к РНК — ДНК-гибридам двусторонней рибоэкзонуклеазной активностью (Verma, 1977).

Активность

5′ → 3′-ДНК-полимераза

Реакция

$ДНК_{OH}$ или $РНК_{OH}$ + ndNTP

Mg++

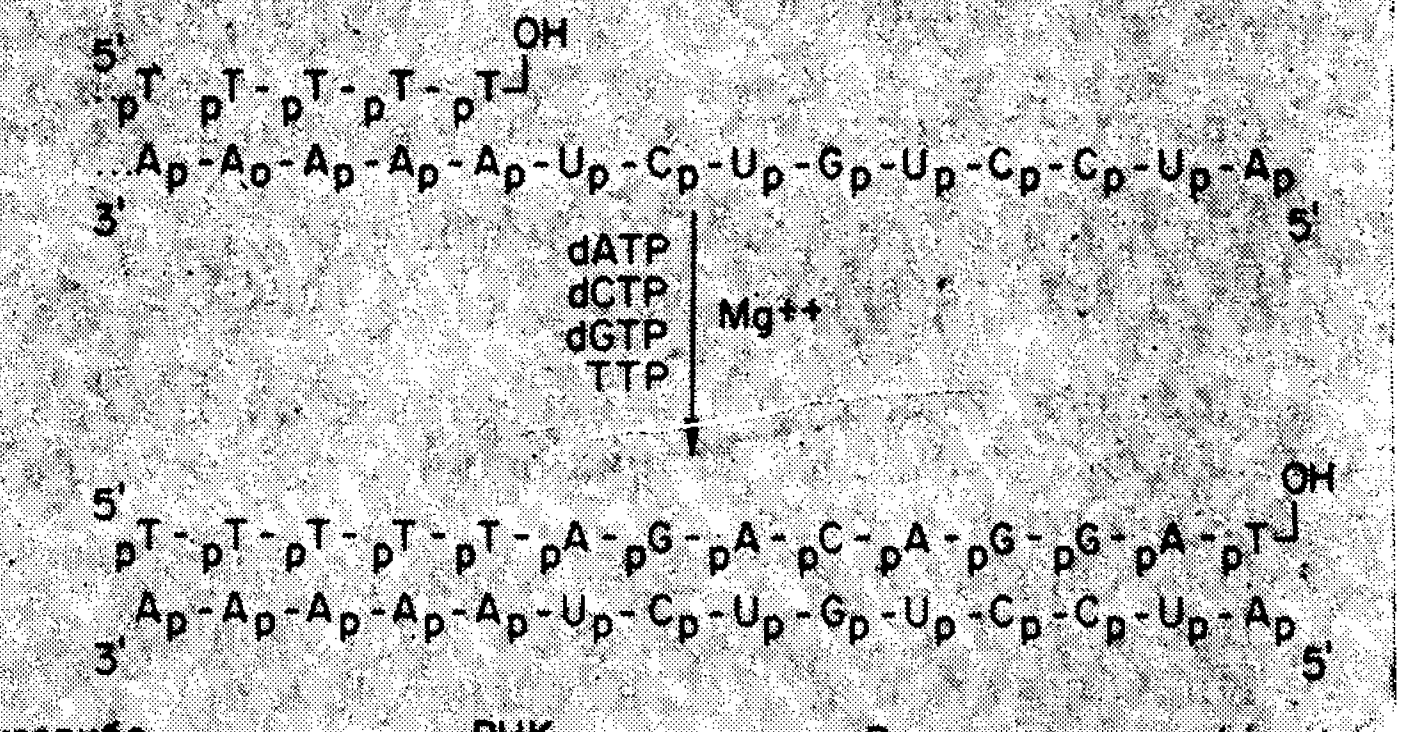
$ДНК\text{-}(pdN)_n + nPP_i$

или

$РНК\text{-}(pdN)_n + nPP_i$

Матрица-затравка или субстрат

РНК- или ДНК-матрица РНК- или ДНК-затравка с 3′-OH-концом



5′ → 3′-экзорибонуклеаза

РНК

ДНК

ДНК

+ Олигорибонуклеотиды

Вызывает специфическую деградацию РНК в ДНК — РНК-гибриде, осуществляемую в двух направлениях.

Применение

1. Синтез кДНК для клонирования (и первой, и второй цепи) или для использования в качестве гибридизационных зондов.
2. Концевое включение метки в фрагменты ДНК с выступающими 5′-концами (реакция достраивания).

ведено в гл. 7. Обратная транскриптаза также может быть использована для синтеза на матрицах РНК или одноцепочечной ДНК зондов, применяемых в экспериментах по гибридизации. Затравками в таких реакциях могут служить oligo (dT) (гл. 7) или набор большого числа случайно выбранных олигодезоксинуклеотидов («рассеянные» олигонуклеотиды; Taylor et al., 1976). Разнообразие этих олигонуклеотидов достаточно велико, чтобы некоторые из них оказались комплементарными последовательностям оснований в матричной нуклеиновой кислоте. После гибридизации с матрицей такие олигонуклеотиды служат затравками для обратной транскриптазы. Поскольку разные олигонуклеотиды связываются с разными участками матрицы, все ее последовательности будут представлены в синтезированной ДНК с равной частотой (по крайней мере теоретически). Кроме того, «рассеянные» олигонуклеотиды могут служить затравками при использовании в качестве матрицы любой одноцепочечной ДНК или РНК. В отличие от этого oligo(dT) связываются только с последовательностями poly(A), что приводит к синтезу ДНК, в которой преимущественно представлены последовательности, комплементарные 3′-концу мРНК-матрицы.

Приготовление олигодезоксинуклеотидной затравки

1. Растворите примерно 1 г имеющегося в продаже препарата ДНК тимуса теленка в 30 мл 20 мМ трис-HCl, pH 7,4, 10 мМ $MgCl_2$.

2. Добавьте 2 мг сухой панкреатической ДНКазы и перемешайте смесь с помощью встряхивания. Вязкость раствора должна быстро уменьшиться.

3. Инкубируйте при 37 °С в течение 30 мин.

4. Добавьте 3 мл 10%-ного SDS и 1,5 мл проназы (20 мг/мл).

5. Инкубируйте при 37 °С в течение 45 мин.

6. Удалите белки с помощью двух экстракций смесью фенол — хлороформ.

7. Перенесите водную фазу в пробирку из стекла пирекс. Денатурируйте ДНК нагреванием в течение 15 мин в кипящей водяной бане. Быстро охладите раствор, погрузив пробирку в ледяную баню.

8. Добавьте 0,6 мл 5 М NaCl (конечная концентрация 0,1 М) и нанесите раствор на колонку (свободный объем 20 мл) с ДЭАЭ-целлюлозой (Whatman DE-52), уравновешенную раствором 5 мМ трис-HCl, pH 7,4, 1 мМ ЭДТА и 0,1 М NaCl.

9. Промойте колонку приблизительно 300 мл того же буфера. D_{260} фракций в конце промывания должно быть не более 0,05.

10. Соберите затравку, промывая колонку раствором 5 мМ трис-HCl, pH 7,4, 1 мМ ЭДТА и 0,3 М NaCl до полного элюиро-

вания материала, поглощающего при 260 нм. Для этого обычно требуется около 150 мл элюирующего буфера.

11. Сконцентрируйте затравку осаждением этанолом в течение нескольких часов при —20 °С.

12. Осадите затравку центрифугированием (2000 g, 20 мин при 0 °С). После высушивания осадка под вакуумом растворите затравку в 1 мл H_2O. Измерьте D_{260} при разбавлении препарата в соотношении 1 : 1000. Выход затравки колеблется между 5 и 30% от препарата к препарату. Доведите концентрацию затравки до 50 мг/мл, разделите препарат на небольшие аликвоты и храните в замороженном состоянии при —20 °С.

13. Проверьте затравку в реакции с обратной транскриптазой в присутствии и в отсутствие матрицы (см. ниже). Количество импульсов включившееся в ДНК в отсутствие матрицы, должно составлять менее 1% количества импульсов, включившихся в ее присутствии.

Получение гибридизационных зондов при использовании обратной транскриптазы и «рассеянной» затравки

Это наиболее предпочтительный метод для синтеза меченных ^{32}P зондов с высокой удельной активностью на матрицах одноцепочечных ДНК или РНК.

1. Смешайте 1,0 мкг матрицы (линейной двухцепочечной или одноцепочечной ДНК или РНК) с 20 мкл воды. Прогрейте смесь при 100 °С на кипящей водяной бане в течение 5 мин. Быстро охладите в ледяной бане.

2. Добавьте 10 мкл раствора ДНК-затравки из тимуса теленка или спермы лосося (50 мг/мл), 20 мкл буфера (5×) для «рассеянной» затравки, 2 мкл 2 мМ раствора каждого из немеченых dNTP, 250 пмоль (100 мкКи) [α-^{32}P]dNTP (уд. акт. 400 Ки/ммоль, 200 ед. обратной транскриптазы и H_2O до объема 100 мкл.

Буфер (5×) для «рассеянной» затравки имеет состав 0,25 М трис-HCl, pH 8,1, 10 мМ дитиотрейтол, 25 мМ $MgCl_2$ и 0,2 М KCl.

3. Перемешайте и инкубируйте при 37 °С в течение 1 ч.

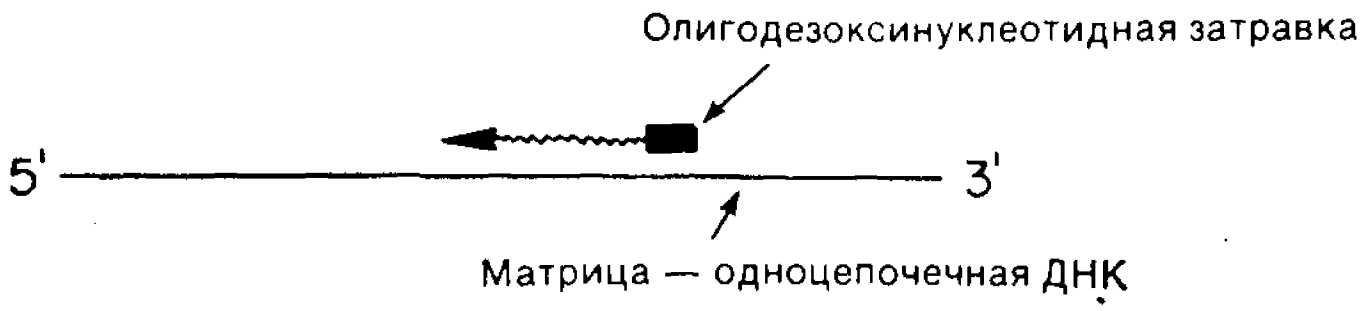
4. Добавьте 2 мкл 0,5 М ЭДТА. Отделите ДНК от невключившихся dNTP на колонках с сефадексом G-50 обычной хроматографией или хроматографией с использованием центрифугирования (с. 407—410). В ДНК должно включиться около 30% [α-^{32}P]dNTP.

Примечания

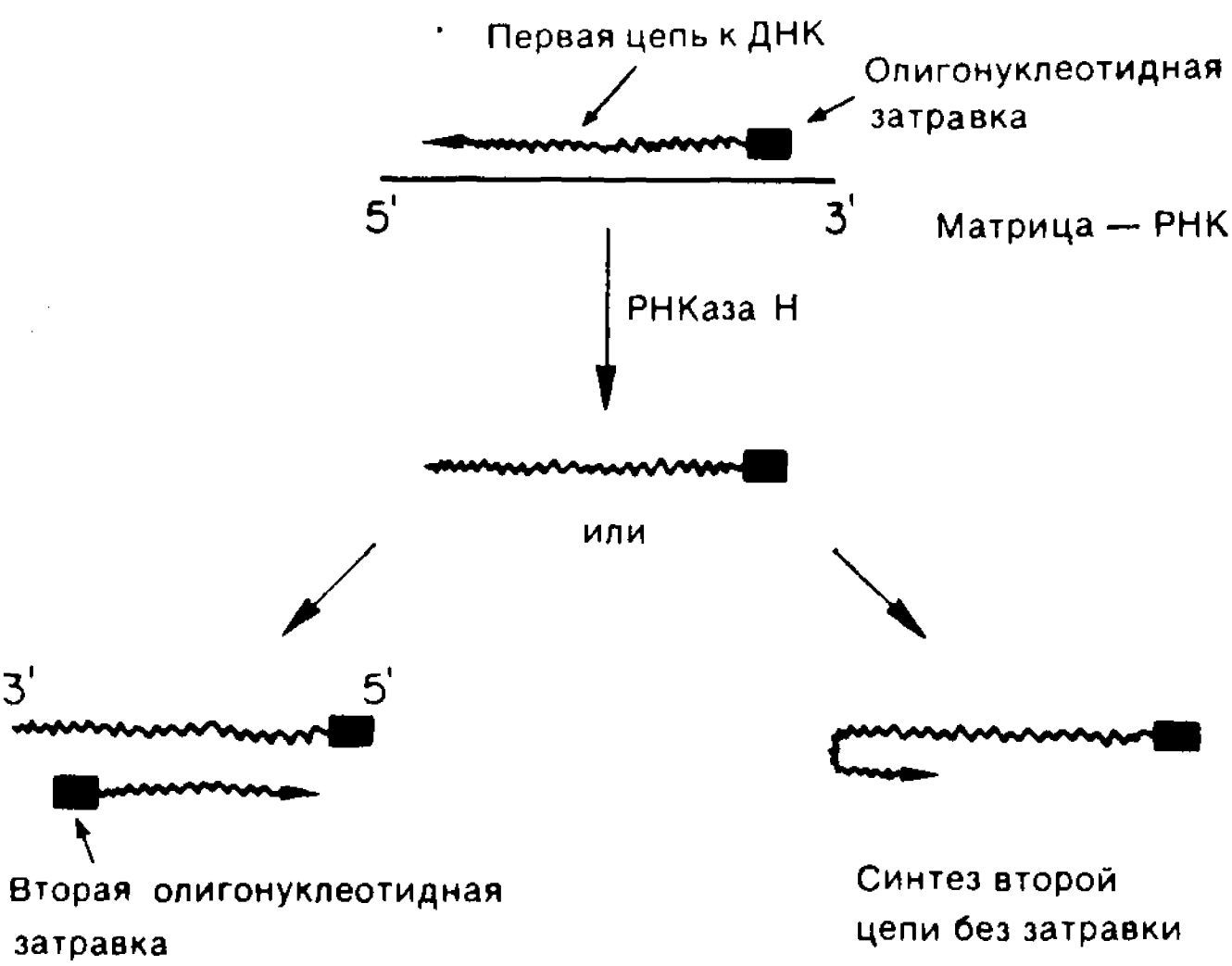
А. По окончании реакции РНК-матрицы могут быть удалены следующим образом. После добавления ЭДТА (стадия 4) добавьте 12 мкл 3 М NaOH и инкубируйте смесь в течение 12 ч

при 37 °С. Щелочной раствор затем можно непосредственно нанести на колонку с сефадексом G-50, уравновешенную буфером ТЕ, pH 7,6.

Б. Гибридизационные зонды, синтезированные с помощью обратной транскриптазы на ДНК, представляют собой одноцепочечные копии матриц:



Однако зонды, получаемые на матрицах РНК, включают и одноцепочечные, и двухцепочечные молекулы, которые синтезируются с помощью двух различных механизмов:



Из двух возможных реакций беззатравочный синтез второй цепи протекает с существенно меньшей эффективностью, и молекулы со шпильками составляют менее 2—3% общего количества меченной ^{32}P ДНК. При необходимости синтез второй цепи (как беззатравочный, так и с экзогенной затравкой) можно ингибировать, добавляя в реакционную смесь актиномицин D в конечной концентрации 1 мг/мл. В присутствии актиномицина D включение [α-^{32}P]dNTP в ДНК уменьшается примерно на 50%.

ДЕФОСФОРИЛИРОВАНИЕ ДНК

Концевые 5′-фосфаты могут быть удалены из ДНК обработкой бактериальной щелочной фосфатазой (BAP) или щелочной фосфатазой из кишечника теленка (CIP) (Chaconas, van de Sande, 1980). Значительное преимущество последнего фермента состоит в том, что он может быть полностью инактивирован нагреванием до 68 °C в буфере с SDS, тогда как первый фермент термостабилен. В связи с последним обстоятельством реакции с BAP обычно проводят при 68 °C для подавления активности экзонуклеазы, часто загрязняющей препараты фермента. Для удаления следовых количеств BAP требуется проводить очистку ДНК с помощью многократных экстракций смесью фенол — хлороформ или гель-электрофореза. Поэтому в большинстве случаев предпочтительнее использовать фермент CIP.

1. Проведите полную обработку ДНК подходящим ферментом рестрикции. Экстрагируйте ДНК один раз смесью фенол — хлороформ и осадите ее этанолом.

2. Растворите ДНК в минимальном объеме 10 мМ трис-HCl, pH 8,0. Добавьте 5 мкл буфера (10×) для CIP, H_2O до объема 48 мкл и CIP (см. примечание ниже).

Для удаления концевых фосфатов из 1 пмоль 5′-концов ДНК (1 пмоль 5′-концов линейной ДНК размером 4 kb равен 1,6 мкг) требуется 0,01 ед. CIP.

Буфер (10×) для CIP имеет состав: 0,5 М трис-HCl, pH 9,0, 10 мМ $MgCl_2$, 1 мМ $ZnCl_2$ и 10 мМ спермидин.

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

Для дефосфорилирования ДНК с тупыми концами или с укороченными 5′-концами инкубируйте смесь 15 мин при 37 °C и 15 мин при 56 °C. Затем добавьте вторую аликвоту CIP и повторите инкубацию при тех же температурах.

3. Добавьте 40 мкл H_2O, 10 мкл буфера (10×) STE и 5 мкл 10%-ного SDS. Прогрейте при 68 °C в течение 15 мин.

Буфер (10×) STE (TNE) имеет состав: 10 мМ трис-HCl, pH 8,0, 1 М NaCl и 10 мМ ЭДТА.

4. Дважды экстрагируйте смесью фенол — хлороформ и дважды хлороформом.

5. Проведите хроматографию водной фазы на уравновешенной буфером TE колонке с сефадексом G-50 с использованием центрифугирования (с. 407—410).

6. Осадите ДНК этанолом. Теперь ее можно использовать в реакциях с лигазой или киназой.

Щелочная фосфатаза

[из бактерий (BAP); из кишечника теленка (CAP)]

Фермент катализирует отщепление 5′-фосфатных остатков ДНК, РНК, рибо- и дезоксирибонуклеозидтрифосфатов.

Активность	Реакция		Субстраты
Фосфатаза	$5'_{p}$ДНК или $5'_{p}$РНК	→ $5'_{OH}$ДНК / $5'_{OH}$РНК	Одно- или двухцепочечная ДНК или РНК / Рибо- и дезоксирибонуклеозидтрифосфаты

Применение

1. Отщепление 5′-фосфатов от ДНК или РНК перед включением 5′-концевого ^{32}P.
2. Отщепление 5′-фосфатов от фрагментов ДНК для предотвращения сшивания концов одной молекулы.

Примечания

А. CIP обычно поставляется в виде суспензии в сульфате аммония. Если сульфат аммония не удаляют в конце реакции путем пропускания реакционной смеси через сефадекс G-50, он осаждается этанолом. Для удаления сульфата аммония требуется многократное промывание осадка 70%-ным этанолом. Это важно, поскольку ионы аммония ингибируют активность полинуклеотидкиназы.

Подготовьте CIP для использования следующим образом:

1) отцентрифугируйте суспензию фермента в сульфате аммония в течение 1 мин при 4 °С в центрифуге Эппендорф;

2) отбросьте надосадочную жидкость, а осадок растворите в минимальном объеме воды; при хранении в таком виде при 4° С фермент стабилен не менее месяца.

Б. Если тепловая инактивация в присутствии SDS оказывается недостаточной, для связывания двухвалентных ионов цинка добавьте тринитроуксусную кислоту до концентрации 10 мМ. В отсутствие ионов цинка фермент CIP более термолабилен.

НУКЛЕАЗА *Bal*31

Нуклеаза *Bal*31 постепенно разрушает 3′- и 5′-цепи ДНК. При подходящих условиях можно контролировать степень расщепления молекулы линейной ДНК с двух концов.

Скорость отщепления нуклеотидов с 5′- и 3′-концов двухце-

почечной ДНК под действием *Bal*31 определяется по формуле

$$\frac{dM_t}{dt} = -2V_m M_n/[K_M + S_0],$$

где M_t — молекулярная масса линейной двухцепочечной ДНК через t минут после начала расщепления; V_m — максимальная скорость реакции (выраженная в молях отщепленных нуклеотидов на 1 л в 1 мин); M_n — средняя молекулярная масса натриевой соли мононуклеотида (принятая за 330); K_M — константа Михаэлиса — Ментен (выраженная в молях концов двухцепочечной ДНК на 1 л); S_0 — моли концов двухцепочечной ДНК/л при $t=0$ (остается постоянной, пока значительная часть молекул полностью не деградирует).

При концентрации фермента 40 ед./мл $V_m = 2{,}4 \cdot 10^{-5}$ (моль отщепленных нуклеотидов)/(л·мин) и $K_M = 4{,}9 \cdot 10^{-9}$ моль двухцепочечных концов)/л.

Если принять, что величина V_m изменяется пропорционально разбавлению фермента, то скорость деградации фрагмента ДНК размером 2 kb в 100 мкл реакционной смеси, содержащей 10 мкг ДНК и 0,5 ед. фермента, равна

$$\frac{-2 \cdot (5/40) \cdot (2{,}4 \cdot 10^{-5}) \cdot 330}{4{,}9 \cdot 10^{-9} + 1{,}5 \cdot 10^{-7}} = \frac{-(1/4) \cdot 2{,}4 \cdot 10^{-5} \cdot 330}{1{,}549 \cdot 10^{-7}} =$$

$$= -1{,}31 \cdot 10^4 \text{ дальтон/(мин·молекулу ДНК)} =$$

$$= -19 \text{ пар оснований/(мин·молекулу ДНК)} =$$

$$= -10 \text{ пар оснований/(мин·конец двухцепочечной ДНК)}.$$

В большинстве случаев (т. е. когда расщепляемые ДНК имеют в длину менее 10 kb и когда концентрация ДНК в реакционной смеси превышает 20 мкг/мл) значением K_M в знаменателе уравнения можно пренебречь.

Наличие возможности контролировать скорость расщепления, осуществляемого *Bal*31, и тот факт, что для работы фермента абсолютно необходим кальций и поэтому его активность может быть полностью ингибирована EGTA, позволили разработать очень простой метод картирования сайтов рестрикции в небольших фрагментах ДНК (Legerski et al., 1978) (см. ниже).

При проведении реакции с *Bal*31 в разные моменты времени отбирают пробы и переносят их в *EGTA*. После обработки этих проб подходящими ферментами рестрикции можно наблюдать исчезновение рестриктов в определенном порядке. Используя ДНК, на одном конце которой находятся векторные последовательности (с известной рестрикционной картой), а на другом — некартированные последовательности, можно различить фраг-

Нуклеаза Bal 31

(из *Alteromonas espejiana* Bal 31)

Фермент обладает двумя видами активности (Lau, Gray, 1979) и является: 1) высокоспецифичной по отношению к одноцепочечным участкам эндодезоксирибонуклеазой и экзонуклеазой, катализирующей отщепление небольших олигонуклеотидов и мононуклеотидов с 5′- и с 3′-концов двухцепочечной ДНК (обе цепи ДНК гидролизуются примерно с одинаковой скоростью); 2) эндонуклеазой, специфически расщепляющей одноцепочечные участки (сходной с нуклеазой S1).

Активность	Реакция	Субстраты
Эндодезоксирибонуклеаза/ экзонуклеаза	5′ 3′ / 3′ 5′ —Ca++→ 5′ 3′ / 3′ 5′ + Олиго- и мононуклеотиды	Двухцепочечная ДНК с тупыми или выступающими концами
Эндонуклеаза, специфичная по отношению к одноцепочечным участкам	оцДНК —Ca++→ Олиго- и мононуклеотиды	Одноцепочечная ДНК

Применение

1. Отщепление нуклеотидов с концов двухцепочечной ДНК. Образуются укороченные молекулы, которые могут быть присоединены к синтетическим линкерам или векторам с помощью полидезоксирибонуклеотид-синтетазы фага T4.
2. Картирование сайтов рестрикции в ДНК (Legerski et al., 1978).

менты, находящиеся на двух концах, и установить порядок расположения фрагментов в некартированной ДНК.

ДНК, обработанную *Bal*31, можно также использовать и для последующего клонирования. После репарации фрагментом Кленова ДНК-полимеразы *E. coli* к ДНК добавляют синтетические линкеры и затем встраивают ее в подходящий плазмидный вектор. Таким способом можно получить серию делеций, начиная с определенной концевой точки ДНК.

Картирование сайтов рестрикции в ДНК с помощью нуклеазы *Bal*31[1]

1. Используя уравнение, приведенное на с. 142, рассчитайте время, необходимое для отщепления от ДНК требуемого количества нуклеотидов.

2. Осадите ДНК этанолом. Растворите ее в BSA (500 мкг/мл).

3. Добавьте равный объем буфера (2×) для *Bal*31.

*Буфер (2×) для Bal*31 имеет состав: 24 мМ $CaCl_2$, 24 мМ $MgCl_2$, 0,4 М NaCl, 40 мМ трис-HCl, pH 8,0, и 2 мМ ЭДТА.

4. Инкубируйте при 30 °С в течение 3 мин.

5. Добавьте необходимое количество *Bal*31.

6. В соответствующие моменты времени отбирайте пробы из реакционной смеси. Добавьте EGTA (из 0,2 М раствора, pH 8,0) до конечной концентрации 20 мМ. Поставьте пробы в лед.

7. Далее имеются два варианта обработки проб:

а) Для уменьшения концентрации NaCl с 0,2 М до 66 мМ аликвоты пробы можно разбавить в три раза водой. После добавления $^1/_{10}$ объема буфера для рестрикции (приготовленного без NaCl) добавляют нужную рестриктазу и проводят с ней реакцию в течение необходимого времени. Затем аликвоты анализируют с помощью гель-электрофореза.

Примечание. EGTA специфически связывает двухвалентные ионы кальция и, следовательно, ингибирует активность *Bal*31, существенно не влияя на расщепление ДНК рестриктирующими эндонуклеазами.

б) ДНК, расщепленную *Bal*31, можно очистить с помощью экстракции смесью фенол — хлороформ и осаждения этанолом. После промывания 70%-ным этанолом осадки ДНК растворяют в подходящем буфере и обрабатывают рестриктазой. Этот метод используют в том случае, когда рестриктаза ингибируется 66 мМ NaCl.

Клонирование фрагментов ДНК, обработанной *Bal*31

1. Проведите обработку ДНК нуклеазой *Bal*31 в течение необходимого времени. Где это возможно, проведите обработку рестриктазами, чтобы убедиться в совпадении реальной скорости расщепления, осуществляемого *Bal*31, с вычисленной по формуле (см. выше).

Примечания. Часто бывает полезно провести контрольную реакцию с ДНК, для которой известна полная рестрикционная карта. Время, за которое определенные фрагменты исчезают из

---

[1] Legerski et al., 1978.

Нуклеаза S1

(из *Aspergillus oryzae*)

Фермент расщепляет одноцепочечную ДНК (Vogt, 1973) с образованием 5'-фосфорилированных моно- и олигонуклеотидов. Двухцепочечные ДНК и РНК, а также гибриды ДНК — РНК относительно устойчивы к действию фермента. Однако при обработке двухцепочечных нуклеиновых кислот очень большими количествами нуклеазы S1 они расщепляются полностью.

Активность

Нуклеаза, специфичная по отношению к одноцепочечным участкам нуклеиновых кислот

Реакция

оцДНК или оцРНК

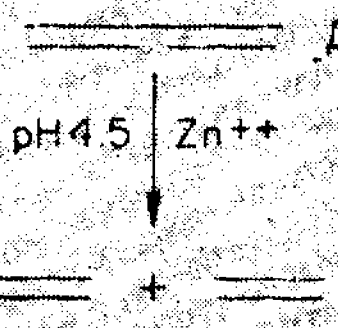
pH 4.5 | Zn++

$5'_{pdN}$ или $5'_{prN}$

Субстраты

Одноцепочечная ДНК или РНК; фермент более активен по отношению к ДНК, чем к РНК

Фермент в небольших количествах расщепляет двухцепочечные нуклеиновые кислоты в районе одноцепочечных разрывов или небольших пробелов (Kroeker, Kowalski, 1978). Например:



Применение

1. Анализ структуры гибридов ДНК — РНК (Berk, Sharp, 1978). Подробное описание этого метода приведено в работе Фавалоро и др. (Favaloro et al., 1980).
2. Отщепление одноцепочечных концевых участков от фрагментов ДНК для получения тупых концов.
3. Расщепление петли шпильки, образовавшейся при синтезе двухцепочечной кДНК.

Нуклеаза из проростков золотистой фасоли

Фермент расщепляет одноцепочечную ДНК до моно- или олигонуклеотидов с фосфатными группами на 5′-концах (Laskowski, 1980). Двухцепочечные ДНК и РНК, а также гибриды ДНК — РНК довольно устойчивы к действию фермента. Однако при обработке очень большими количествами нуклеазы двухцепочечные нуклеиновые кислоты расщепляются полностью (Kroeker, Kowalski, 1978).

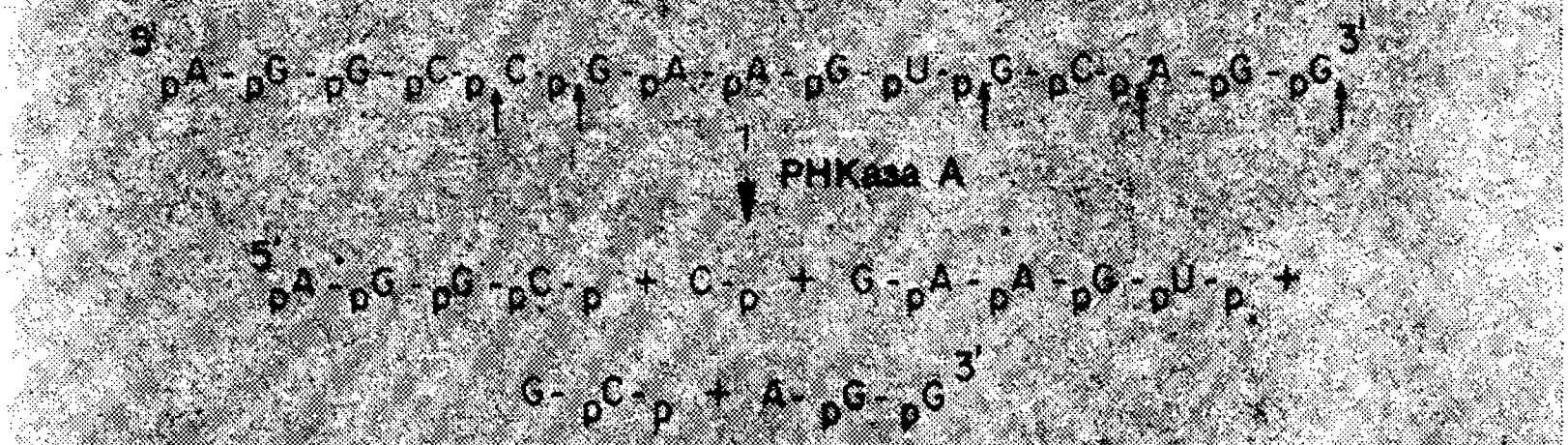
Несмотря на то, что нуклеаза из проростков золотистой фасоли и нуклеаза S1—ферменты со сходными физическими и каталитическими свойствами, имеются указания на то, что первая обладает меньшей нуклеазной активностью. Например, было показано, что нуклеаза S1 расщепляет цепь ДНК напротив разрыва в дуплексе, тогда как нуклеаза из золотистой фасоли атакует место разрыва не раньше, чем его длина увеличится до размера нескольких нуклеотидов (Kroeker, Kowalski, 1978).

Применение

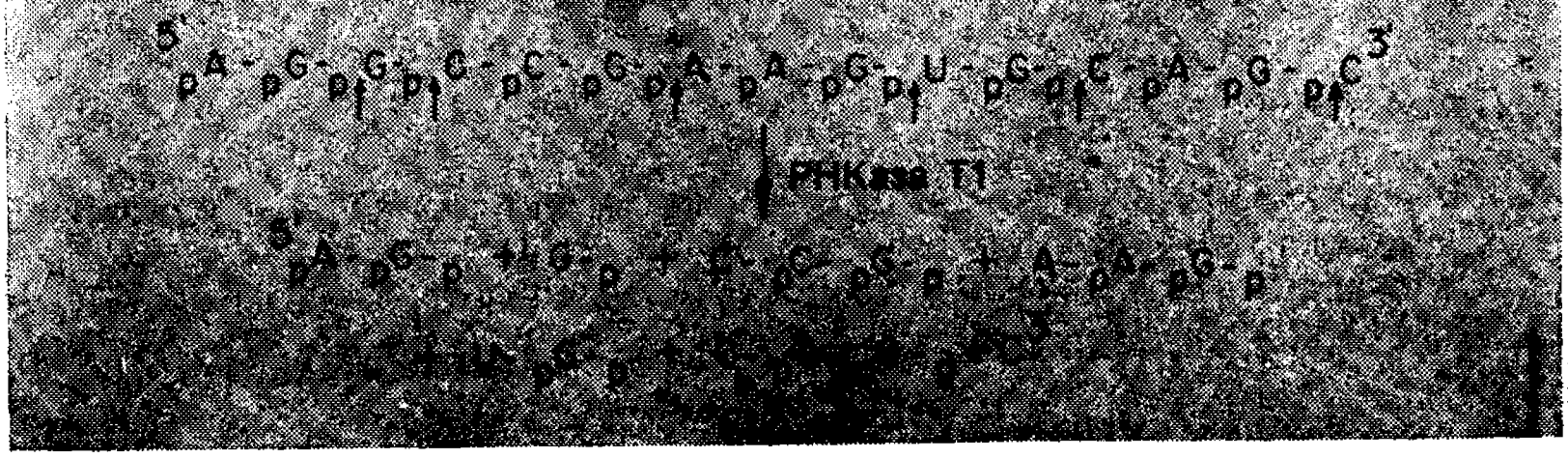
1. Превращение выступающих концов ДНК в тупые.

Рибонуклеазы

1. Рибонуклеаза А (из бычьей поджелудочной железы). Фермент представляет собой эндорибонуклеазу, специфически воздействующую на 3′-фосфатную группу пиримидиновых нуклеотидов и расщепляющую 5′-фосфатную связь с соседним нуклеотидом. Конечные продукты реакции — пиримидин-3′-фосфаты и олигонуклеотиды с концевыми пиримидин-3′-фосфатами (Davidson, 1972). Например:



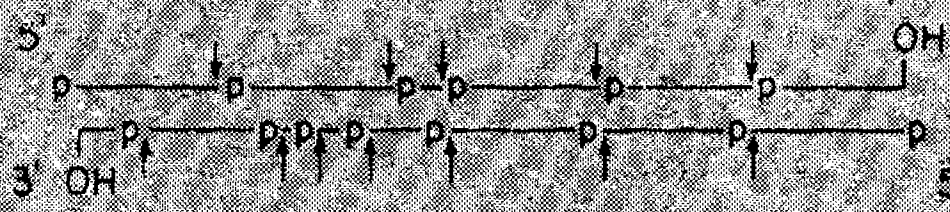
2. Рибонуклеаза Т1 (из *Aspergillus oryzae*). Фермент предоставляет собой эндорибонуклеазу, специфически воздействующую на 3′-фосфатные группы гуанозиновых нуклеотидов и расщепляющую 5′-фосфатную связь с соседним нуклеотидом. Конечные продукты реакции — гуанозин-3′-фосфаты и олигонуклеотиды с концевыми гуанозин-3′-фосфатными группами (Davidson, 1972). Например:



Дезоксирибонуклеаза I (ДНК I)

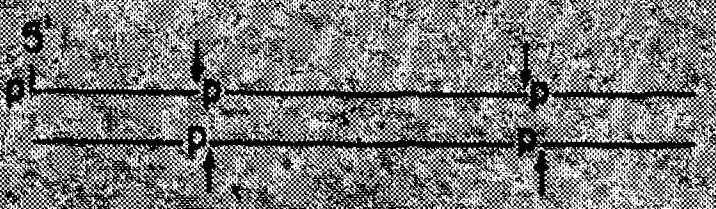
(из бычьей поджелудочной железы)

Фермент представляет собой эндонуклеазу, гидролизующую двух- или одноцепочечную ДНК с образованием сложной смеси от моно- до олигонуклеотидов с 5′-фосфатными концами.



В присутствии ионов Mg^{++} ДНКаза I воздействует независимо на каждую цепь ДНК, при этом места разрывов располагаются случайным образом.

В присутствии ионов Mn^{++} ДНКаза I расщепляет обе цепи ДНК примерно в одном и том же месте (Melgar, Goldthwaite, 1968)



с образованием фрагментов ДНК, имеющих тупые концы или выступающие концы длиной в один или два нуклеотида.

Экзонуклеаза VII

(из E.coli)

Фермент представляет собой экзонуклеазу, последовательно отщепляющую небольшие олигонуклеотиды с 3′- и 5′-концов одноцепочечной ДНК (Chase, Richardson, 1964). Экзонуклеаза VII не требует присутствия ионов Mg^{++} и работает в присутствии ЭДТА.

Активность	Реакция	Субстраты
Экзонуклеаза	5′ 3′ / 3′ 5′ → 5′ 3′ + 3′ 5′ или 5′ 3′ / 3′ 5′ → 5′ 3′ + 3′ 5′	Одноцепочечная ДНК

Применение

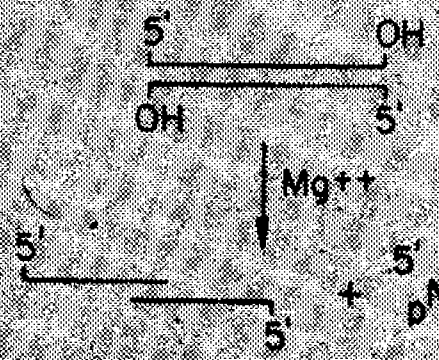
1. Выделение кДНК, встроенной в плазмидный вектор с помощью присоединения концевых последовательностей dA- · dT (Goff, Berg, 1978).
2. Картирование положения интронов и экзонов в ДНК (Berk, Sharp, 1978).

Экзонуклеаза III (из *E.coli*)

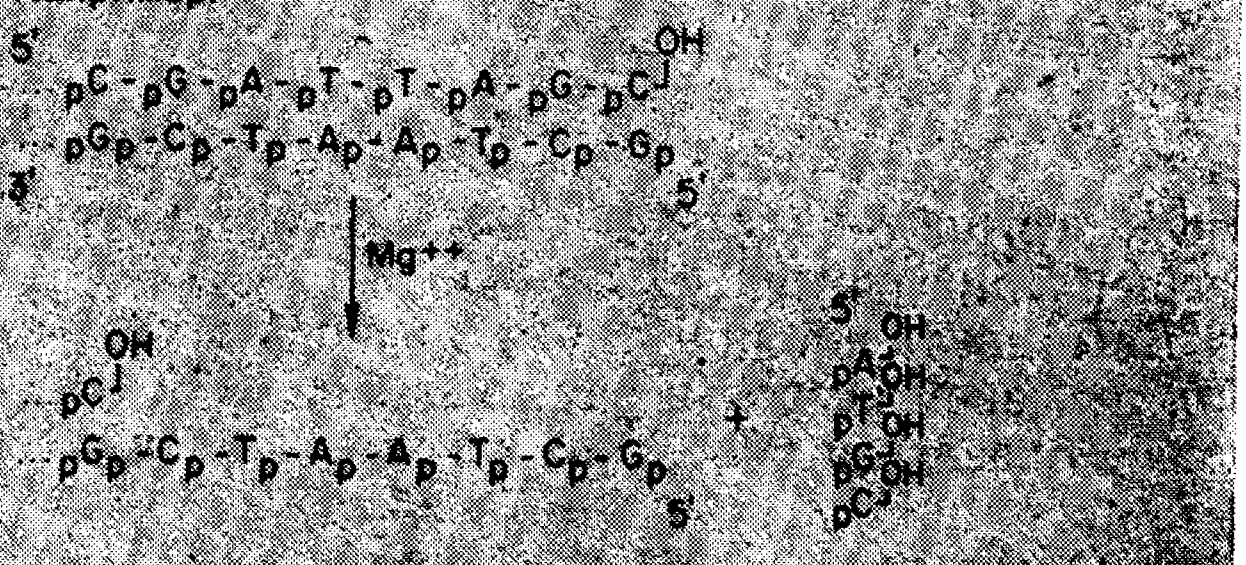
Фермент катализирует последовательное удаление 5′-мононуклеотидов двухцепочечной ДНК, имеющей 3′-OH-конец, в направлении 3′ → 5′ (Wiess, 1976). Он обладает также тремя другими активностями: активностью эндонуклеазы, специфически расщепляющей апуриновую ДНК, активностью РНКазы H (Rogers, Weiss, 1980) и 3′-фосфатазной активностью.

Активность — **Реакция** — **Субстраты**

Экзонуклеаза

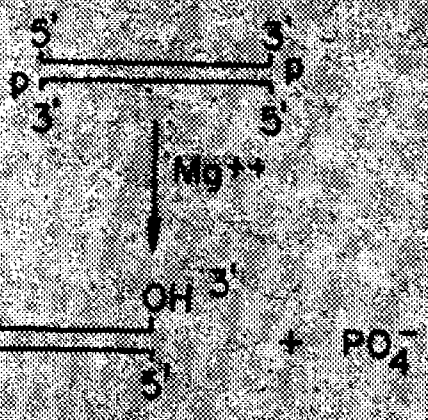


Например:

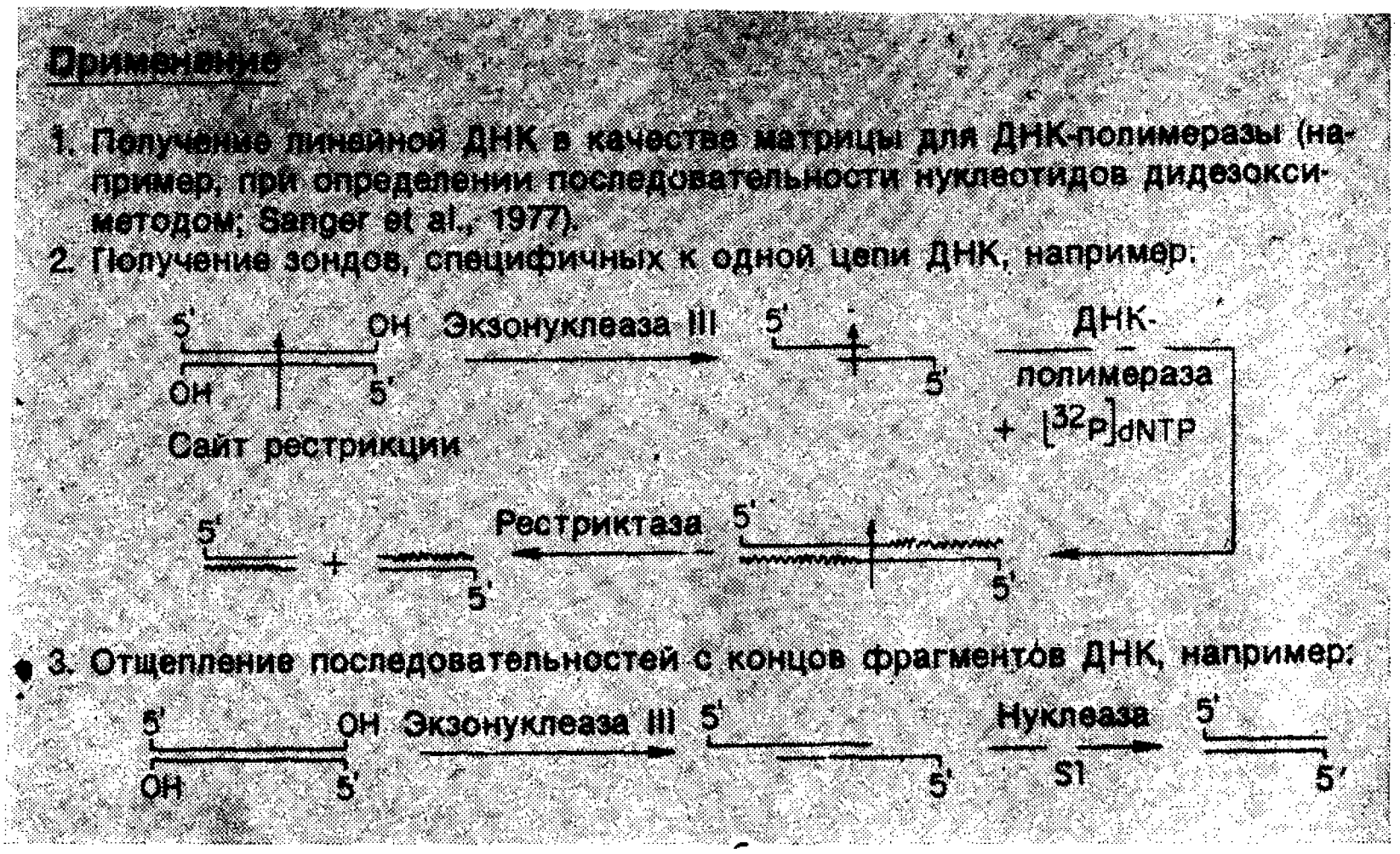


Двухцепочечная ДНК с 3′-OH-концами

+ 3′-Фосфатаза



Двух- или одноцепочечная ДНК с 3′-фосфатным концом



смеси рестриктов, должно соответствовать вычисленной скорости расщепления нуклеазой *Bal*31.

*Bal*31 активна при таких низких температурах, как 16 °С. Более низкая скорость расщепления ДНК в подобных условиях может оказаться полезной, когда с концов ДНК требуется удалить всего несколько нуклеотидов.

2. Остановите реакцию с помощью EGTA, проведите очистку ДНК смесью фенол — хлороформ и осадите ее этанолом.

3. Поскольку отщепление нуклеотидов с 3′- и 5′-концов ДНК происходит не одновременно, в каждый момент времени только часть молекул ДНК в реакционной смеси имеет тупые концы, подходящие для лигирования. Поэтому ДНК, обработанная *Bal*31, должна быть репарирована в реакции достраивания концов с использованием фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* (с. 123). Если расщеплению *Bal*31 подвергалась меченая ДНК, то для облегчения наблюдения за ДНК на последующих стадиях (особенно на стадии 6) реакцию репарации следует проводить с одним меченным ^{32}P и тремя немечеными dNTP.

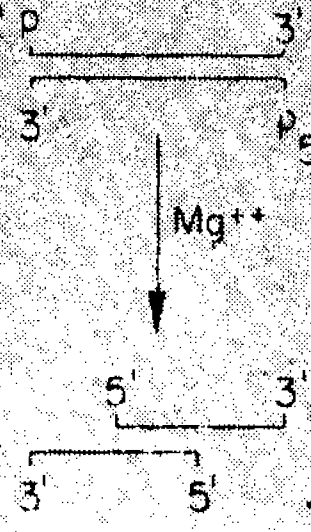
Экзонуклеаза фага λ

(из клеток *E.coli*, инфицированных фагом λ)

Фермент катализирует последовательное отщепление 5′-мононуклеотидов от двухцепочечной ДНК с 5′-концевой фосфатной группой (Little et al., 1967).

Активность — Экзонуклеаза

Реакция

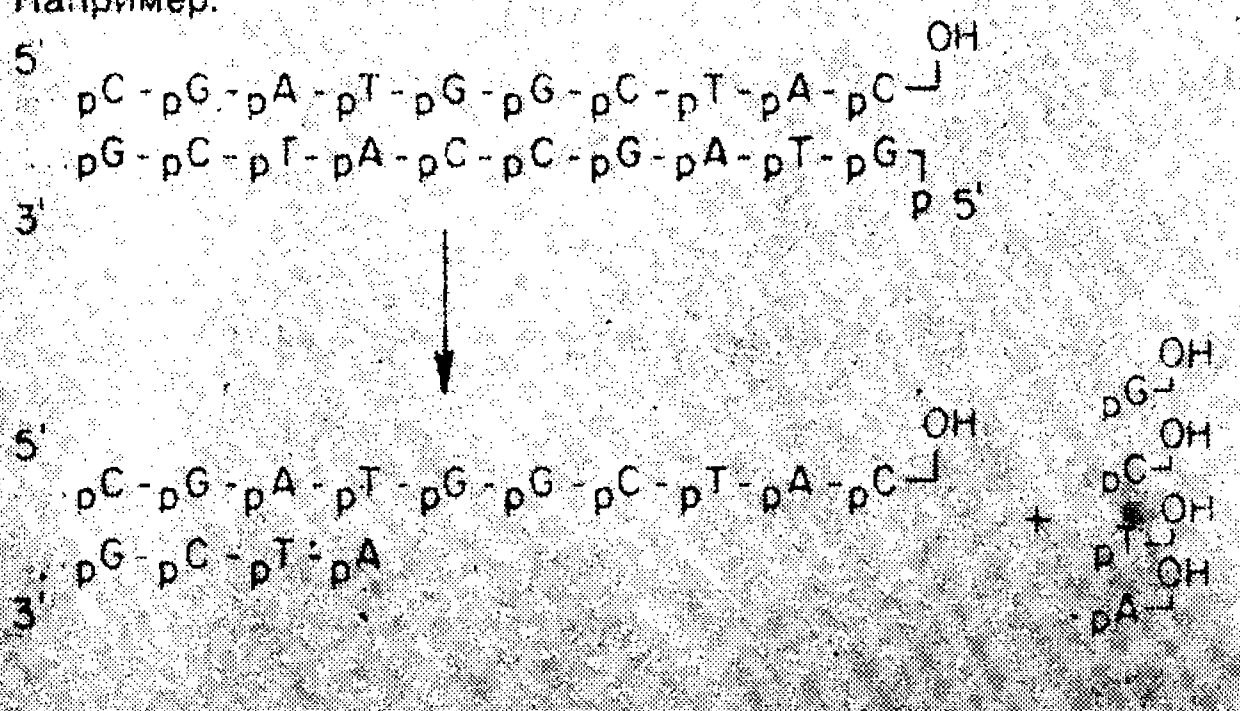


Субстраты

Двухцепочечная ДНК с 5′-концевой фосфатной группой

Двухцепочечная ДНК с выступающими 5′-концами

Например:



Применение

1. Подготовка ДНК для определения ее нуклеотидной последовательности дидезоксиметодом (Sanger et al., 1977).
2. Удаление выступающих 5′-концов двухцепочечной ДНК перед реакцией с терминальной трансферазой.

Poly(A)-полимераза (из *E.coli*)

Фермент катализирует присоединение AMP-полимеров (полученных из ATP) к свободному 3′-OH-концу РНК (Sippel, 1973).

Активность	Реакция	Субстраты
Poly(A)-полимераза	5′ РНК OH 3′ + ATP (Mg++, Mn++) → 5′ РНК $A_pA_p(A_p)_nA$ OH	Одноцепочечная РНК со свободным 3′-OH-концом

n может достигать величины 10^4

Применение

1. Подготовка poly(A)-РНК для клонирования. Например:

poly (A)-РНК —(poly(A)-полимераза)→ 5′ РНК $(A)_n$ —(Синтез кДНК с oligo(dT) в качестве затравки)→

Подробное описание метода приведено в работе Гетинга и др. (Gething et al., 1980).

2. Включение метки в 3′-конец РНК с помощью [α-^{32}P] ATP для получения гибридизационных зондов.

ДНК-лигаза фага Т4

(из клеток *E.coli*, инфицированных фагом Т4)

Фермент, состоящий из одной полипептидной цепи (мол. масса 68 000), катализирует образование фосфодиэфирной связи между соседними 3′-ОН- и 5′-фосфатным концами ДНК (Weiss et al., 1968).

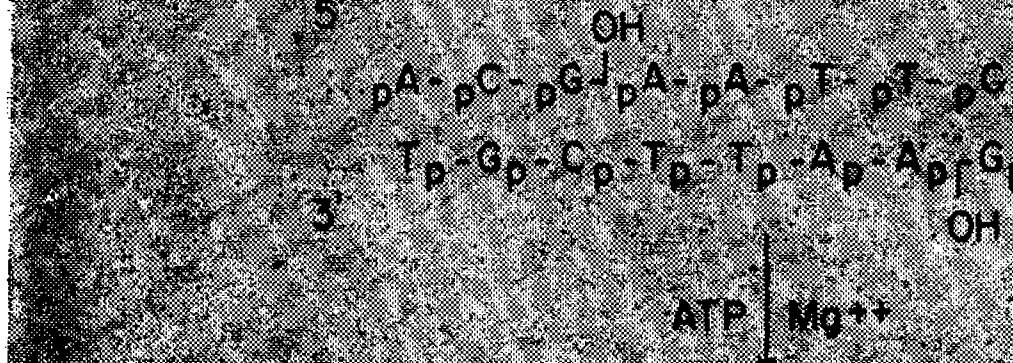
Активность

Реакция

Субстраты

Сшивание липких концов

Например:

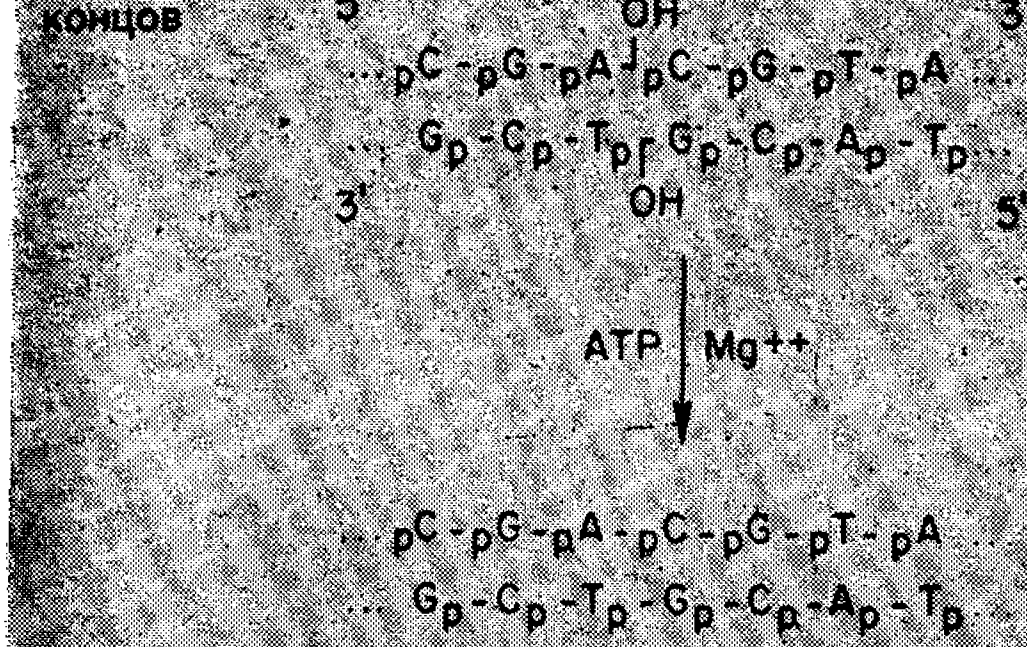


а) Двухцепочечные молекулы ДНК с комплементарными липкими концами, которые спариваются друг с другом и соединяются 3′-ОН- и 5′-фосфатными концевыми группами

б) ДНК с одноцепочечными разрывами

Сшивание тупых концов

Например:



Двухцепочечные ДНК с 5′-фосфатными и 3′-ОН-тупыми концами в высоких концентрациях.

Применение

1. Сшивание молекул ДНК с совместимыми липкими концами.
2. Сшивание двухцепочечных молекул ДНК с тупыми концами друг с другом или с синтетическими линкерами. Активность ДНК-лигазы фага Т4 по отношению к молекулам ДНК с тупыми концами может быть повышена примерно в 20 раз при добавлении РНК-лигазы фага Т4 (Sugino et al., 1977).

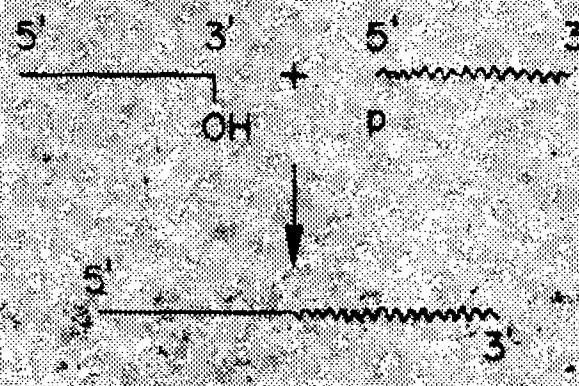
РНК-лигаза фага Т4

(из клеток *E.coli*, инфицированных фагом Т4)

Фермент катализирует ковалентное соединение фосфорилированных по 5′-концу одноцепочечных ДНК или РНК с одноцепочечными ДНК или РНК, имеющими 3′-гидроксильные группы (Sugino et al., 1977).

Активность **Реакция** **Субстраты**

Лигаза



Одноцепочечные ДНК и РНК

Применение

РНК-лигаза фага Т4 повышает эффективность сшивания двухцепочечных молекул ДНК с тупыми концами, катализируемого ДНК-лигазой фага Т4 (Sugino et al., 1977).

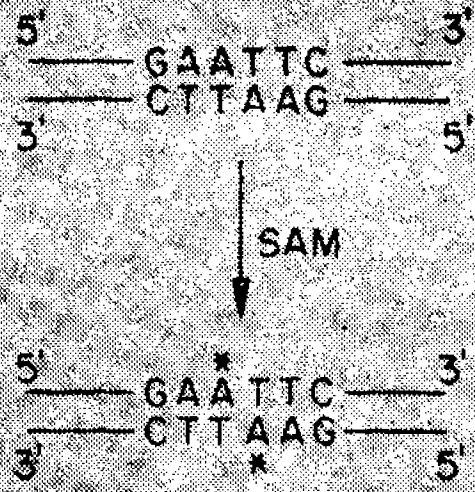
Метилаза *Eco* RI

(из *E.coli*)

Фермент катализирует перенос метильных групп с S-аденозилметионина (SAM) на аденины последовательности узнавания (сайта рестрикции) *Eco* RI, отмеченные значком *. Преобразование аденина в 6-метиламинопурин защищает ДНК от расщепления рестриктазой *Eco*RI (Greene et al., 1975).

Активность **Реакция** **Субстрат**

Метилаза



5'
...GAATTC...
...CTTAAG...
3'
5'

Применение

Защита естественных сайтов рестрикции для *Eco* RI в ДНК, которая клонируется с помощью присоединения синтетических линкеров. Например, во время конструирования библиотек эукариотической ДНК, метилазу *Eco* RI использовали для модификации сайтов рестрикции для *Eco* RI в фрагментированной ДНК. Затем к концам модифицированной ДНК добавляли синтетические линкеры, несущие сайты рестрикции для *Eco* RI. Линкеры отщепляли с помощью *Eco* RI и встраивали фрагменты ДНК в плечи ДНК бактериофага λ (Maniatis et al., 1978).

Терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза (терминальная трансфераза)

(из тимуса теленка)

Фермент катализирует присоединение дезоксинуклеотидов к 3′-ОН-концу молекул ДНК (Bollum, 1974).

Активность	Реакция	Матрица-затравка или субстрат
Терминальная трансфераза	оцДНК$_{OH}$ + ndNTP $\xrightarrow{Mg^{++}}$ ДНК-(pdN)$_n$ + nPP$_i$	Одноцепочечная ДНК с 3′-ОН-концом (или двухцепочечная ДНК с выступающим 3′-ОН-концом)
Терминальная трансфераза	дцДНК$_{OH}$ + ndNTP $\xrightarrow{Co^{++}}$ ДНК-(pdN)$_n$ + nPP$_i$	В присутствии ионов Co^{++} в качестве кофактора матрицей служит двухцепочечная ДНК с тупыми концами или ДНК с укорочечным 3′-ОН-концом (Roychoudhury et al., 1976).

Применение

1. Присоединение комплементарных концевых гомополимерных последовательностей к вектору и к кДНК (гл. 7).
2. Включение метки в 3′-концы фрагментов ДНК с помощью меченного ^{32}P 3′-дезоксинуклеозида (Tu, Cohen, 1980) или 3′-рибонуклеозиде (Wu et al., 1976). Для введения метки в составе рибонуклеозида используют [α-^{32}P]rNTP с последующей обработкой щелочью.

4. Присоедините к репарированной ДНК фосфорилированные синтетические линкеры (с. 354).

Примечание. После реакции с фрагментом Кленова и перед проведением реакции с лигазой в очистке ДНК нет необходимости.

5. Для расщепления линкеров или каких-либо сайтов рестрикции обработайте ДНК подходящим ферментом (ферментами) рестрикции.

6. Отделите ДНК от фрагментов линкеров хроматографией на сефарозе CL-4B (с. 407—409).

7. Пришейте ДНК к плазмидному вектору, расщепленному подходящим ферментом (ферментами) рестрикции (с. 351).

8. Проведите трансформацию клеток *E. coli* (гл. 8).

Примечание. Нуклеазу *Bal*31 не следует замораживать. Храните фермент при 4 °С.

Глава 5

ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ

Электрофорез в агарозном геле — стандартный метод, используемый для разделения, идентификации и очистки фрагментов ДНК. С помощью этой простой техники можно быстро разделить такие смеси фрагментов ДНК, которые не могут быть разделены другими способами, например центрифугированием в градиенте плотности. Кроме того, при разделении в геле прямо следят за положением ДНК, так как полосы ДНК в геле можно окрашивать флуоресцирующим и интеркалирующим в ДНК красителем — бромистым этидием в низкой концентрации. Просматривая прокрашенный гель в ультрафиолетовом свете, можно заметить даже 1 нг ДНК (Sharp et al., 1973).

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

Размер молекул ДНК. Молекулы линейной двухцепочечной ДНК перемещаются в геле предположительно одним концом вперед (Fisher, Dingman, 1971; Aaij, Borst, 1972) со скоростями, обратно пропорциональными десятичному логарифму их молекулярных масс (Helling et al., 1974) (рис. 5.1).

Концентрация агарозы. Фрагменты ДНК данного размера перемещаются в геле, содержащем разные концентрации агарозы, с разными скоростями. Между логарифмом электрофоретической подвижности ДНК μ и концентрацией геля τ существует прямая зависимость, описываемая уравнением

$$\lg \mu = \lg \mu_0 - K_r \tau,$$

где μ_0 — свободная электрофоретическая подвижность, а константа K_r называется коэффициентом замедления и зависит от свойств геля, а также от величины и формы движущихся молекул. Таким образом, применяя гели разных

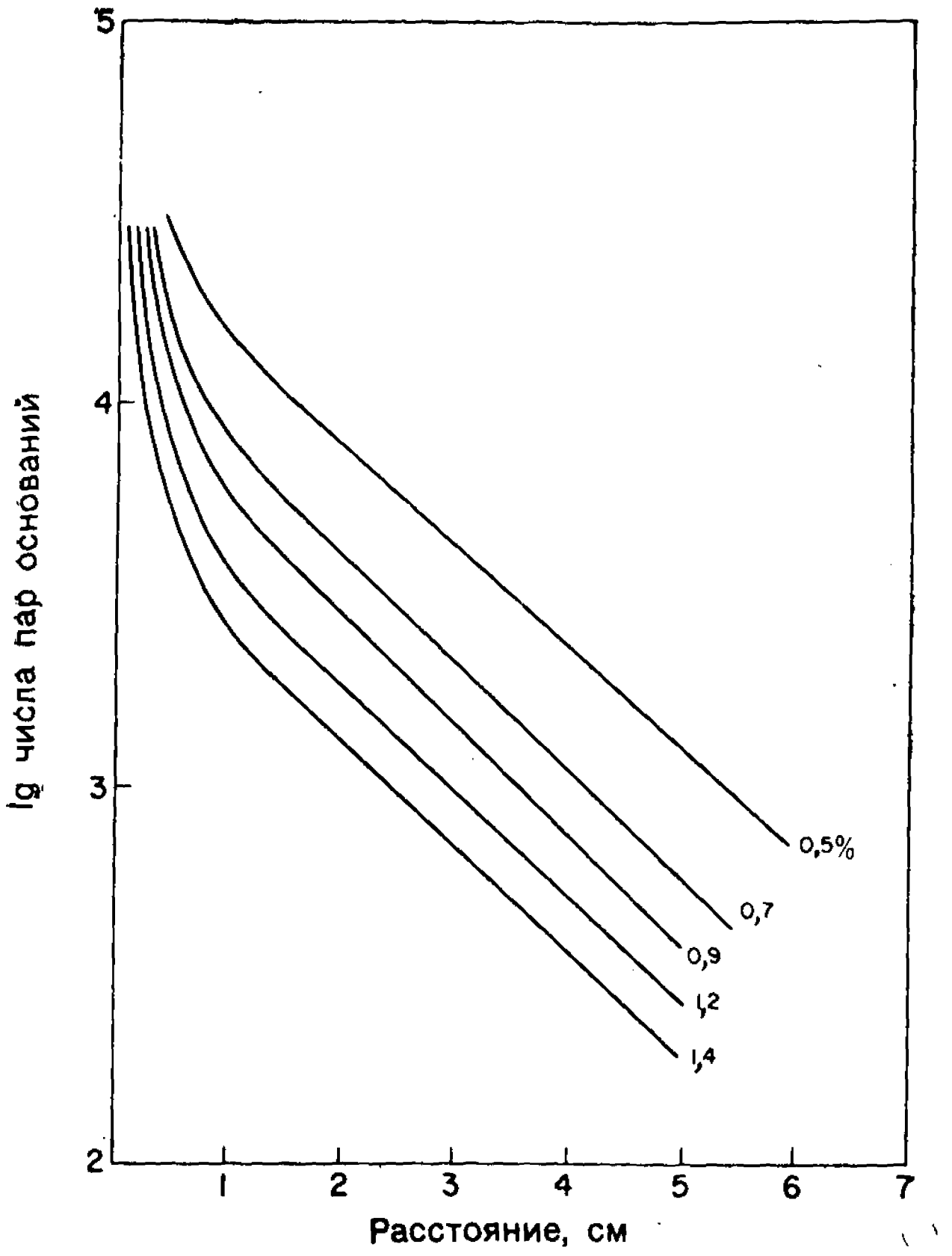


Рис. 5.1. Зависимость скорости движения фрагментов ДНК при электрофорезе в геле от их размеров.

концентраций, можно разделить большой набор фрагментов ДНК, различающихся по размеру.

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

Конформация ДНК. ДНК, имеющие одинаковую молекулярную массу, но разные конформации, например кольцевая неповрежденная (форма I), кольцевая с одноце-

почечным разрывом (форма II) и линейная (форма III), движутся в агарозном геле с разными скоростями (Thorne, 1966, 1967). Относительная подвижность трех указанных форм зависит главным образом от концентрации агарозы в геле, а также и от таких факторов, как сила тока, ионная сила буфера или плотность сверхспиральных витков в форме I (Johnson, Grossman, 1977). В одних условиях форма I перемещается быстрее, а в других — медленнее, чем форма III. Чтобы однозначно определить конформацию ДНК, необходимо провести ее электрофорез в присутствии возрастающих концентраций бромистого этидия. С увеличением концентрации красителя число его молекул, связанных с ДНК, растет. При этом отрицательные сверхспиральные витки в молекулах формы I постепенно исчезают, а скорость движения ДНК в геле уменьшается. При некоторой критической концентрации свободных молекул красителя, когда в ДНК больше не остается сверхспиральных витков, скорость движения формы I достигает минимальной величины. Последующее добавление новых порций бромистого этидия приводит к образованию положительных сверхспиральных витков, в результате чего подвижность формы I начинает быстро возрастать. Подвижности формы II и формы III в описанных условиях снижаются, хотя и по-разному, вследствие нейтрализации зарядов и увеличения жесткости молекул ДНК под влиянием бромистого этидия. Для большинства препаратов ДНК, находящейся в форме I, критическая концентрация бромистого этидия находится в области 0,1—0,5 мкг/мл.

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

Состав оснований и температура. Электрофоретическое поведение ДНК в агарозных гелях [в отличие от поведения в полиакриламидных гелях (Allett et al., 1973)] слабо зависит от состава оснований ДНК (Thomas, Davis, 1975) или температуры геля. В агарозных гелях в области температур от 4 до 30 °С изменения относительной электрофоретической подвижности фрагментов ДНК разного размера не наблюдается. Обычно электрофорез в агарозных гелях ведут при комнатной температуре. Однако следует

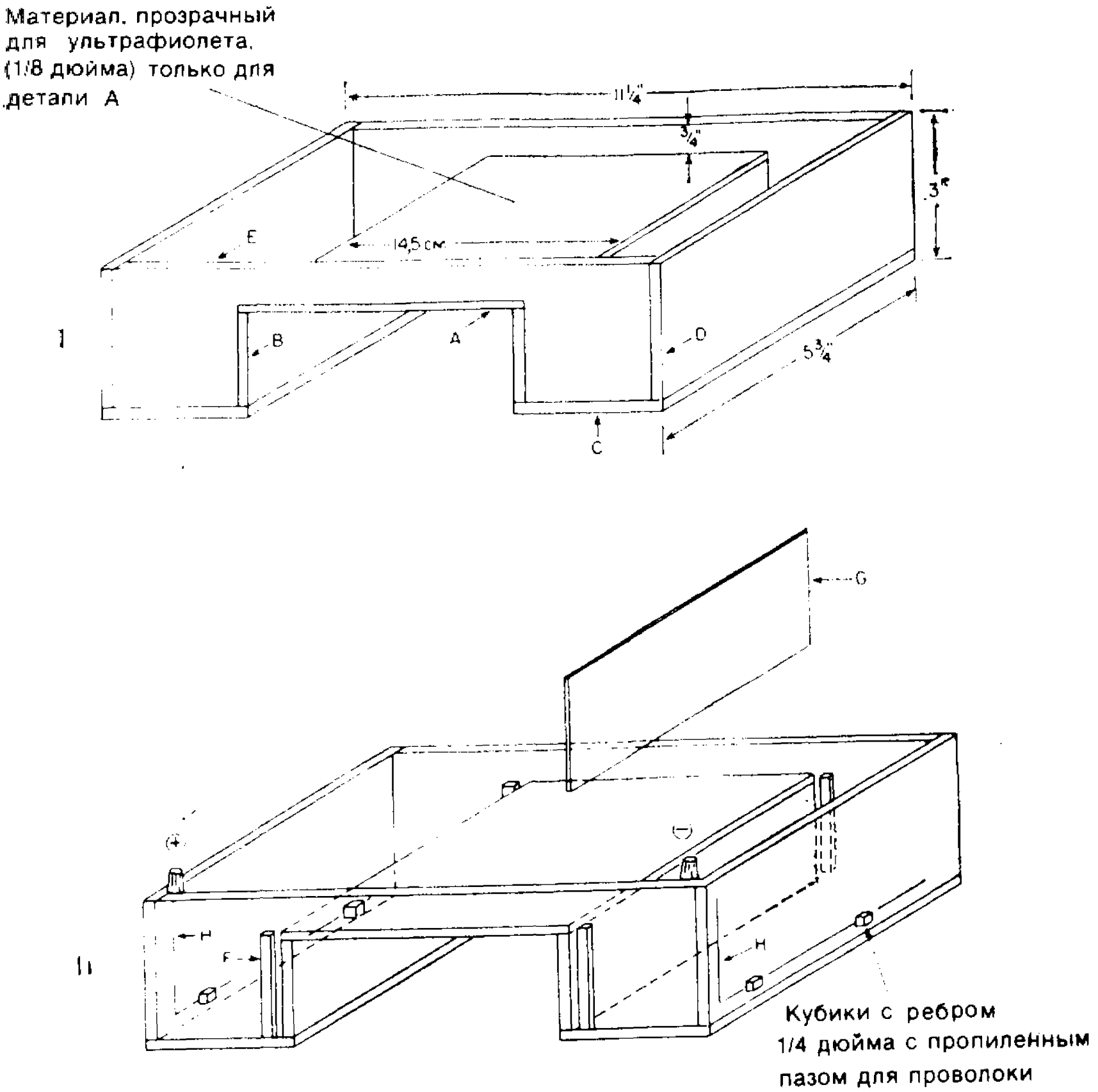


Рис. 5.2. Система для проведения гель-электрофореза, разработанная в лаборатории Дэвиса.

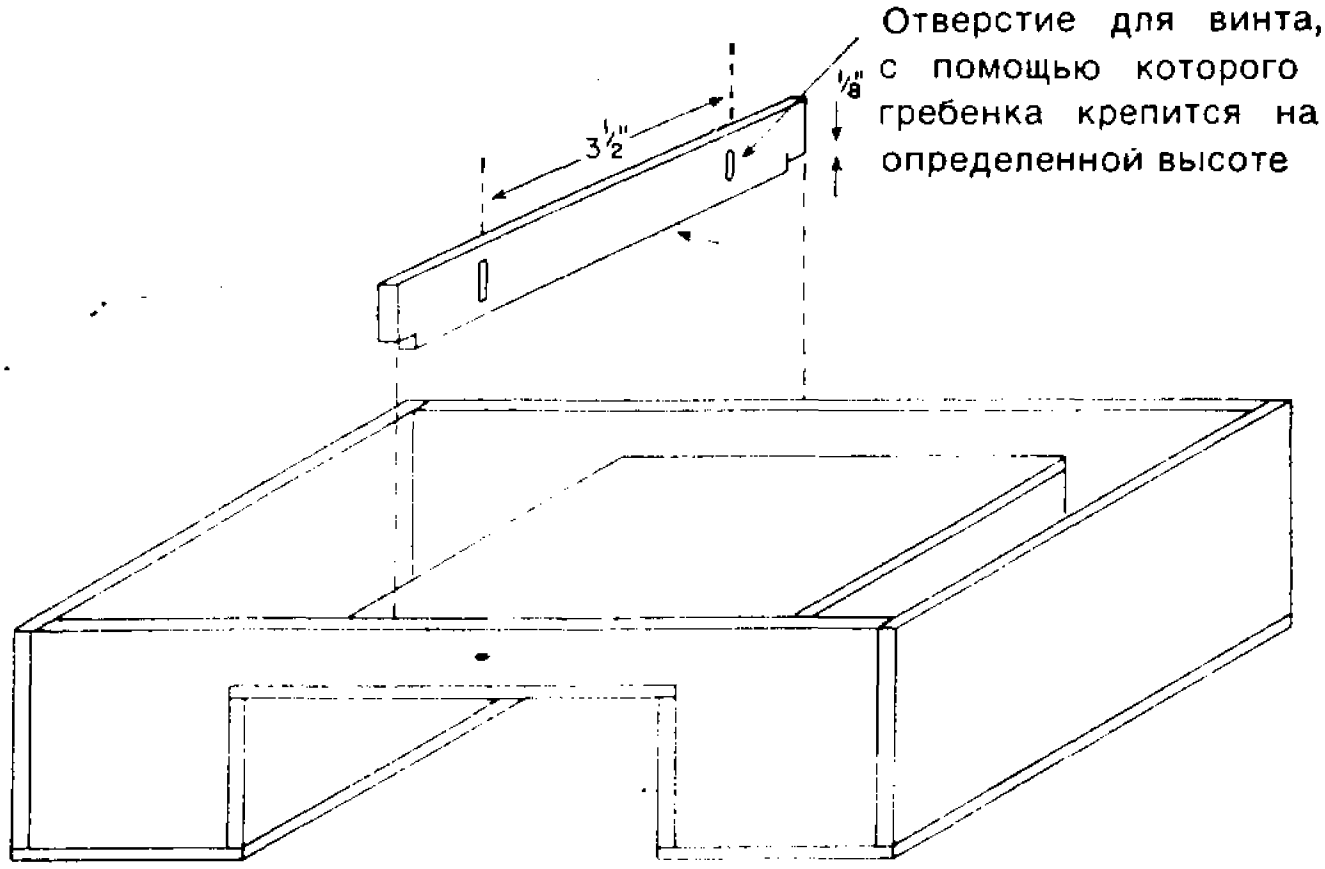
I. Кювета для геля длиной 14,5 см.
Материал: прозрачная акриловая пластмасса толщиной $^1/_4$ дюйма (1 дюйм = =2,5 см) или прозрачная для ультрафиолета акриловая пластмасса толщиной $^1/_8$ дюйма.

Список деталей

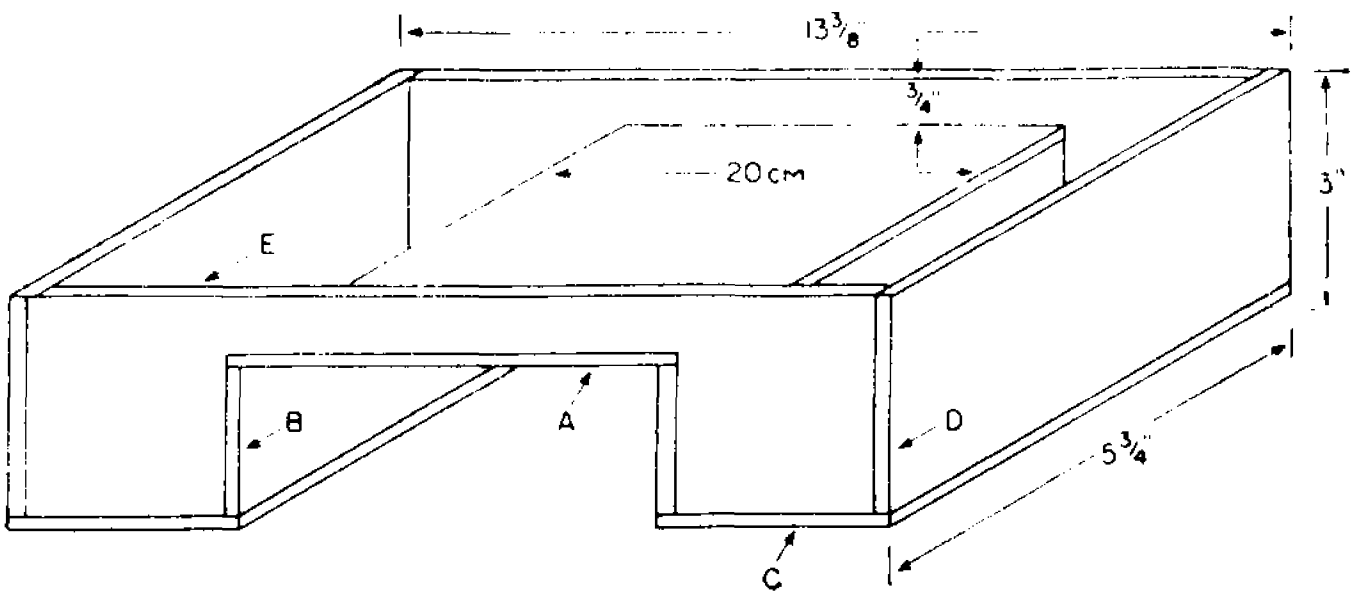
Обозначение	Размер (в дюймах)	Количество
A	$^1/_8 \times 5^3/_4 \times 5^3/_4$	1 (материал, прозрачный для ультрафиолета)
B	$^1/_4 \times 5^3/_4 \times 1^3/_8$	2
C	$^1/_4 \times 5^3/_4 \times 3$	2
D	$^1/_4 \times 5^3/_4 \times 2^3/_4$	2
E	$^1/_4 \times 2^3/_4 \times 10^3/_4$	2

II. Кювета для геля длиной 14,5 см.
Материал: прозрачная акриловая пластмасса толщиной $^1/_8$ дюйма.

III



IV



Список деталей

Обозначение	Размер (в дюймах)	Количество
F	$1/8 \times 1/4 \times 2$	4
G	$1/8 \times 2 \times 5 1/4$	2
H	0,040×0,002 (платиновая проволока)	

III. Кювета для геля длиной 14,5 см. Деталь вверху — держатель гребенки. Материал: прозрачная акриловая пластмасса толщиной $1/4$ дюйма. Размер: $1/4 \times 7/8 \times 5 3/4$ дюйма.

IV. Модель Дэвиса. Кювета для геля длиной 20 см.

Материал: прозрачная акриловая пластмасса толщиной $1/4$ дюйма или прозрачная для ультрафиолета акриловая пластмасса толщиной $1/8$ дюйма.

Список деталей

Обозначение	Размер (в дюймах)	Количество
A	$1/8 \times 5 3/4 \times 7/8$	1 (материал, прозрачный для ультрафиолета)
B	$1/4 \times 5 3/4 \times 1 7/8$	2
C	$1/4 \times 5 3/4 \times 3$	2
D	$1/4 \times 5 3/4 \times 2 3/4$	2
E	$1/4 \times 2 3/4 \times 12 7/8$	2

отметить, что гели, содержащие менее 0,5% агарозы, очень мягкие, поэтому с ними лучше работать при 4 °С — в этих условиях они становятся более плотными.

ПРИСПОСОБЛЕНИЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В ГЕЛЕ

За 15 лет, прошедших после изобретения электрофореза в агарозном геле, было предложено множество конструкций электрофорезных аппаратов. В настоящее время чаще всего используют гели в виде горизонтальных пластинок. Эта система имеет по крайней мере четыре преимущества: 1) можно применять низкие концентрации агарозы в связи с тем, что весь гель поддерживается снизу; 2) можно готовить гели в виде пластинок самых разных размеров; 3) хранение и разливка гелей, а также последующие манипуляции с ними достаточно просты; 4) для постановки электрофореза в гелях можно применять прочные и недорогие аппараты.

При проведении электрофореза в горизонтальном геле используются разнообразные кюветы (рис. 5.2). Большинство из них представляет собой модификации прибора. предложенного Шефнером, в котором гель размещается на отдельной стеклянной пластинке. Пластинку устанавливают на платформе таким образом, что гель находится под самой поверхностью электрофорезного буфера. Сопротивление геля проходящему электрическому току мало отличается от сопротивления буфера, поэтому по гелю проходит значительная доля тока.

БУФЕРЫ

Для электрофореза обычно применяют буферы, содержащие трис-ацетат, трис-борат или трис-фосфат в концентрации 50 мМ и имеющие pH 7,5—7,8 (табл. 5.1). Чаще всего их готовят в

Таблица 5.1. Буферы, используемые при электрофорезе

Буфер	Рабочие растворы	Концентрированные растворы (на 1 л)
Трис-ацетат (TAE)	0,04 М трис-ацетат (50×): 0,002 М ЭДТА	242 г триса, 57,1 мл ледяной уксусной кислоты, 100 мл 0,5 М ЭДТА, pH 8,0
Трис-фосфат (TPE)	0,08 М трис-фосфат (10×): 0,008 М ЭДТА	108 г триса, 15,5 мл 85%-ной фосфорной кислоты (1,679 мкг/мл), 40 мл 0,5 М ЭДТА, pH 8,0
Трис-борат (TBE)	0,089 М трис-борат (5×): 0,089 М борная кислота, 0,002 М ЭДТА	54 г триса, 27,5 г борной кислоты, 20 мл 0,5 М ЭДТА, pH 8,0

виде концентрированных растворов и хранят при комнатной температуре.

Исторически сложилось так, что чаще других используют трис-ацетат, хотя его буферная емкость довольно низка, и при продолжительных электрофорезах он истощается (анод становится щелочным, а катод — кислотным). В связи с этим обстоятельством рекомендуется предусмотреть возможность рециркуляции буфера между катодным и анодным резервуарами. Трис-фосфатный и трис-боратный буферы обеспечивают хорошее разделение фрагментов ДНК в равной степени и имеют значительно более высокую буферную емкость, чем трис-ацетатный. Рециркуляция этих буферов необязательна. Дополнительное, хотя и не особенно важное преимущество трис-фосфата состоит в том, что гели, приготовленные на нем, растворимы в хаотропных агентах, таких, как перхлорат натрия или йодид калия. Это свойство лежит в основе метода (теперь мало используемого) выделения фрагментов ДНК из гелей.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ АГАРОЗНЫХ ГЕЛЕЙ

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

Ниже приведено описание приготовления агарозных гелей (рис. 5.3 и 5.4).

1. Добавьте рассчитанное количество порошка агарозы в отмеренный объем электрофорезного буфера.

Таблица 5.2. Буферы для нанесения проб

Тип буфера	Буфер (6×)	Температура хранения
I	0,25% бромфенолового синего, 0,25% ксилолциа-нола, 40% (вес/объем) сахарозы в H_2O	4 °C
II	0,25% бромфенолового синего, 0,25% ксилолциа-нола, 15% фикола (тип 400) в H_2O	Комнатная
III	0,25% бромфенолового синего, 0,25% ксилолциа-нола, 30% глицерина в H_2O	4 °C
IV	0,25% бромфенолового синего, 40% (объем/вес) сахарозы в H_2O	4 °C

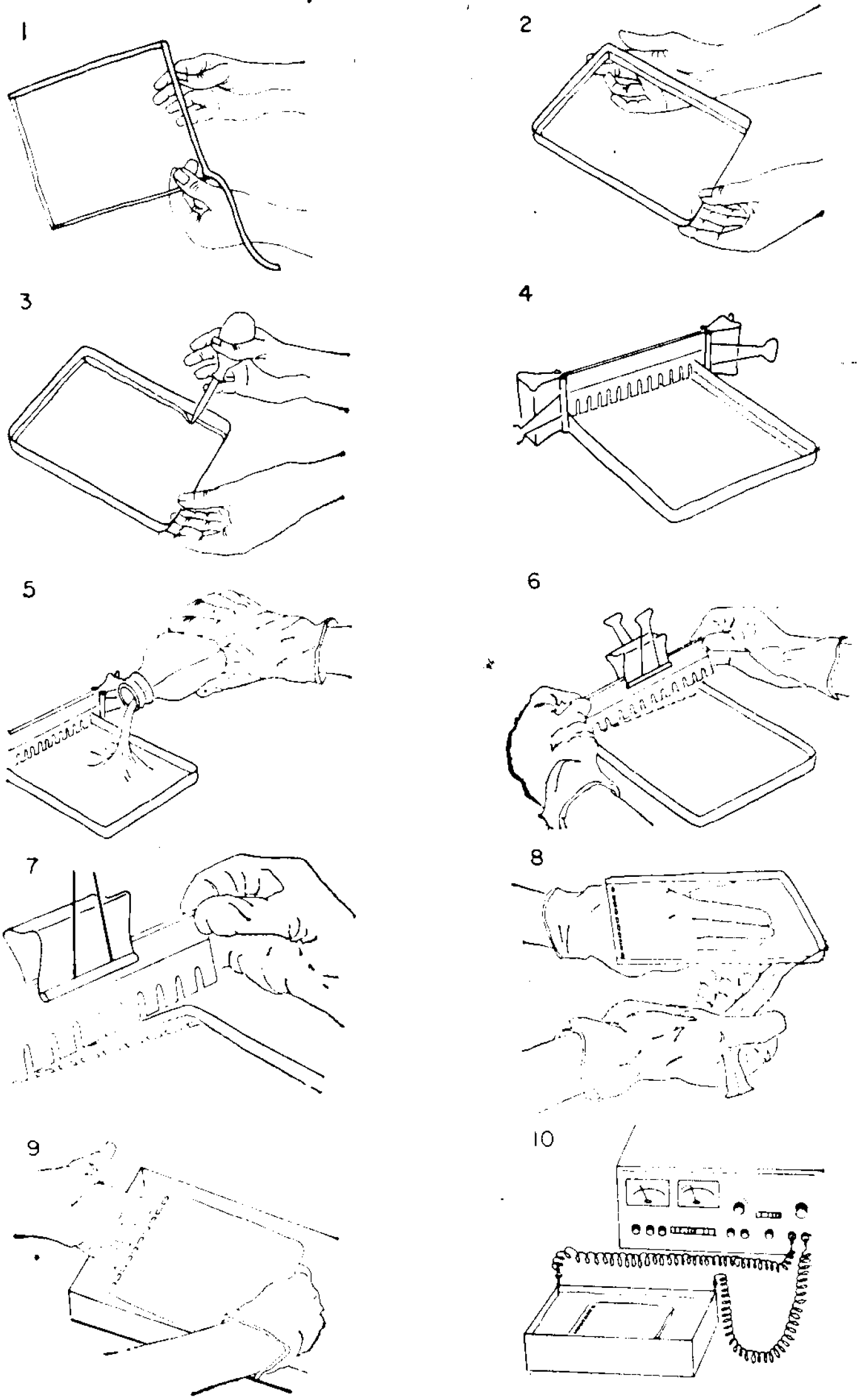


Рис. 5.3. Метод заливки гелей, разработанный в лаборатории Шефнера. Числами указана очередность операций.

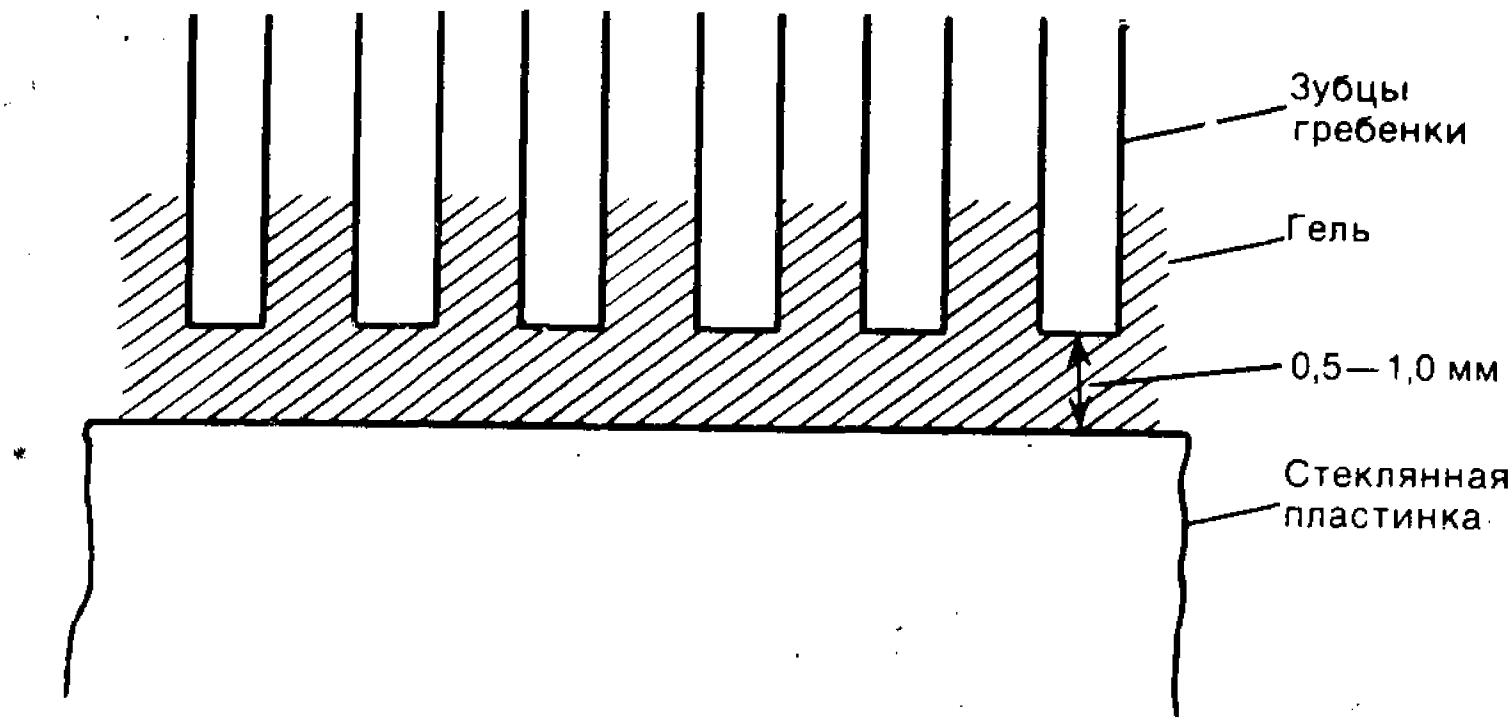


Рис. 5.4. Гребенка, вставленная в гель.

2. Нагревайте взвесь в бане с кипящей водой или в микроволновой печи до тех пор, пока агароза не растворится.

3. Остудите раствор до 50 °С и добавьте бромистый этидий (из водного раствора, содержащего 10 мг/мл и хранящегося при 4 °С в светонепроницаемом сосуде) до конечной концентрации 0,5 мкг/мл.

4. Приклейте к краям чистой сухой стеклянной пластинки липкую ленту так, чтобы образовалась форма (рис. 5.3).

5. Пастеровской пипеткой налейте по краям формы небольшое количество раствора агарозы.

6. Когда этот расплав затвердеет, вылейте в форму остальной теплый раствор агарозы и немедленно вставьте рядом с одним из концов геля гребенку, от зубцов которой в геле останутся лунки для проб. Необходимо, чтобы между дном лунки и основанием геля оставался слой агарозы толщиной 0,5—1,0 мм, т. е. чтобы дном лунки служил агарозный гель (рис. 5.4).

7. После того как гель полностью затвердеет (через 30—45 мин при комнатной температуре), осторожно удалите гребенку и липкую ленту и поместите гель в электрофорезную кювету.

8. Добавьте достаточное количество электрофорезного буфера (при необходимости содержащего 0,5 мкг/мл бромистого этидия; табл. 5.1), так чтобы гель был закрыт слоем буфера толщиной 1 мм.

9. Смешайте пробы с буфером для нанесения пробы, содержащим 5—10% глицерина, 7% сахарозы или 2,5% фикола и краситель (0,025% бромфенолового синего или ксилолцианола) и внесите их в лунки геля под электрофорезный буфер. Обычно буфер для нанесения проб (табл. 5.2) готовят в виде раствора 6—10-кратной концентрации. Его смешивают с про-

бой, а затем осторожно вливают в лунку с помощью обычной или автоматической микропипетки (Eppendorf или Gilson) или пастеровской пипетки.

Максимальное количество ДНК, которое можно внести в лунку, зависит от числа фрагментов в пробе и их размеров. Минимальное количество ДНК, которое можно обнаружить при фотографировании геля, окрашенного бромистым этидием (см. ниже), составляет 2 нг при ширине полосы 0,5 см (обычная ширина лунки). Если лунка будет переполнена и в полосе указанной ширины будет содержаться более 200 нг ДНК, то полоса окажется расплывчатой и будет иметь шлейф. Этот дефект особенно выражен при разделении крупных фрагментов ДНК.

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

ОКРАСКА ДНК В АГАРОЗНЫХ ГЕЛЯХ

Наиболее удобный метод визуализации ДНК в агарозных гелях — окрашивание ее флуоресцирующим красителем бромистым этидием (Sharp et al., 1973). Молекула этого вещества содержит плоскую группу, которая интеркалирует между соседними основаниями ДНК. В результате такой интеркаляции в непосредственной близости от оснований краситель связывается с ДНК, что сопровождается увеличением интенсивности флуоресценции. УФ-излучение, поглощаемое ДНК в области 260 нм и передаваемое на краситель (или же излучение, поглощаемое самим красителем при длинах волн 300 и 360 нм), испускается затем в красно-оранжевой области видимого спектра (590 нм).

Бромистый этидий можно использовать для обнаружения как двух-, так и одноцепочечных нуклеиновых кислот (ДНК и РНК). Однако сродство красителя к одноцепочечной нуклеиновой кислоте гораздо меньше, чем к двухцепочечной; поэтому флуоресценция в первом случае оказывается более слабой.

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

ния. В последнем случае гель помещают в электрофорезный буфер или воду, содержащие бромистый этидий, на 45 мин при комнатной температуре. Обесцвечивания обычно не требуется, но при определении очень малых количеств ДНК (<10 нг) лучше снизить фоновую флуоресценцию, обусловленную несвязанным бромистым этидием, выдержав окрашенный гель в 1 мМ $MgSO_4$ в течение 1 ч при комнатной температуре.

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

ФОТОГРАФИРОВАНИЕ

Фотографии гелей можно сделать в проходящем или отраженном УФ-свете (рис. 5.5).

Наибольшей чувствительностью обладает пленка Polaroid Type 57 или 667 (3000 ед. ASA). При наличии мощного источника УФ-излучения (более 2500 мкВт/см^2) и хороших линз для получения изображения полос, содержащих всего лишь 10 нг ДНК, достаточно экспозиции пленки в течение нескольких секунд. При длительной экспозиции и мощном источнике УФ-излучения можно обнаружить даже 1 нг ДНК.

МИНИ-ГЕЛИ

Недавно предложены методы очень быстрого анализа небольших количеств ДНК с помощью электрофореза в агарозном геле (техника мини-гелей разработана в лаборатории Хогнесса). В продаже имеются аппараты разных типов, но большинство из них представляет собой лишь уменьшенную копию обычных аппаратов, описанных выше. Продающиеся фирмами миниатюрные камеры для электрофореза очень дороги, так как при изготовлении очень маленьких гребенок и других деталей необходима тонкая обработка материала. Вместе с тем в лаборатории можно сконструировать и недорогие аппараты.

Удобная электрофорезная камера для мини-гелей представляет собой небольшую ($2^1/_2 \times 6^1/_2$ дюйма) полистироловую защелкивающуюся коробочку (1 дюйм = 2,5 см). Каждый электрод сделан из платиновой проволоки длиной 4 дюйма и приклеен в соответствующем месте силиконовым клеем. В центре коробочки приклеена платформа, состоящая из четырех склеенных друг с другом стопкой стекол размером 2×3 дюйма (рис. 5.6).

Гель (10—12 мл), представляющий собой расплавленный раствор агарозы (0,5—2,0%) с добавлением бромистого этидия (0,5 мкг/мл), наливают на верхнее стекло размером 2×3 дюйма. Для разливки геля лучше брать пипетку с отбитым

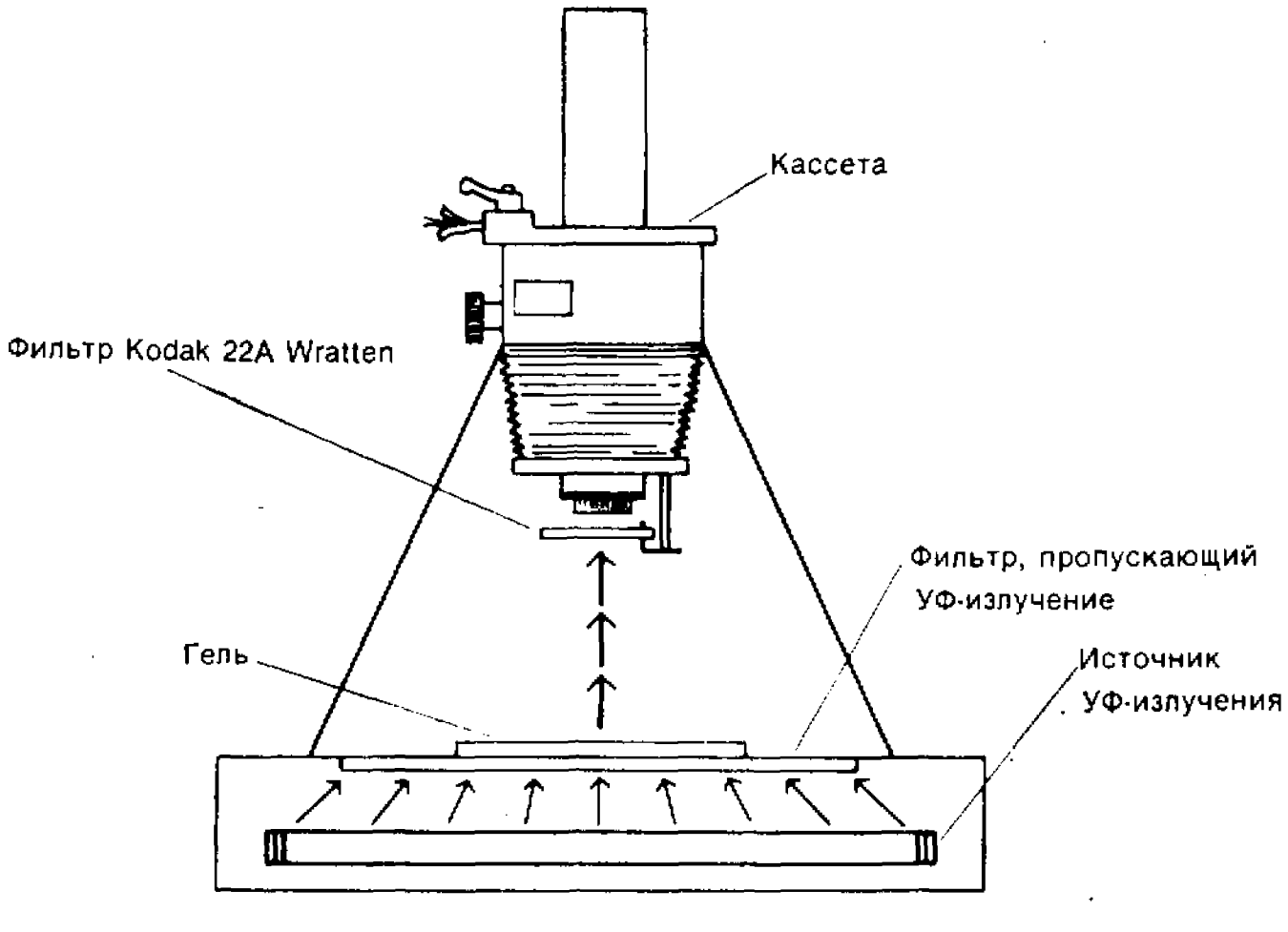


Рис. 5.5. Фотографирование полос ДНК в геле.

кончиком. В каждой пластинке геля делают 8 лунок (2,5× ×1 мм) с помощью миниатюрной гребенки стандартного образца. Удобно готовить одновременно несколько пластинок, ставя длинную гребенку над стеклами, размещенными бок о бок на полоске парафильма.

Каждая лунка вмещает 3—5 мкл жидкости в зависимости от толщины геля. Как правило, в лунку вносят 10—20 нг ДНК в 2—3 мкл буфера для нанесения проб. Обычно электрофорез проводят в течение 30 мин при высокой напряженности (15 В/см

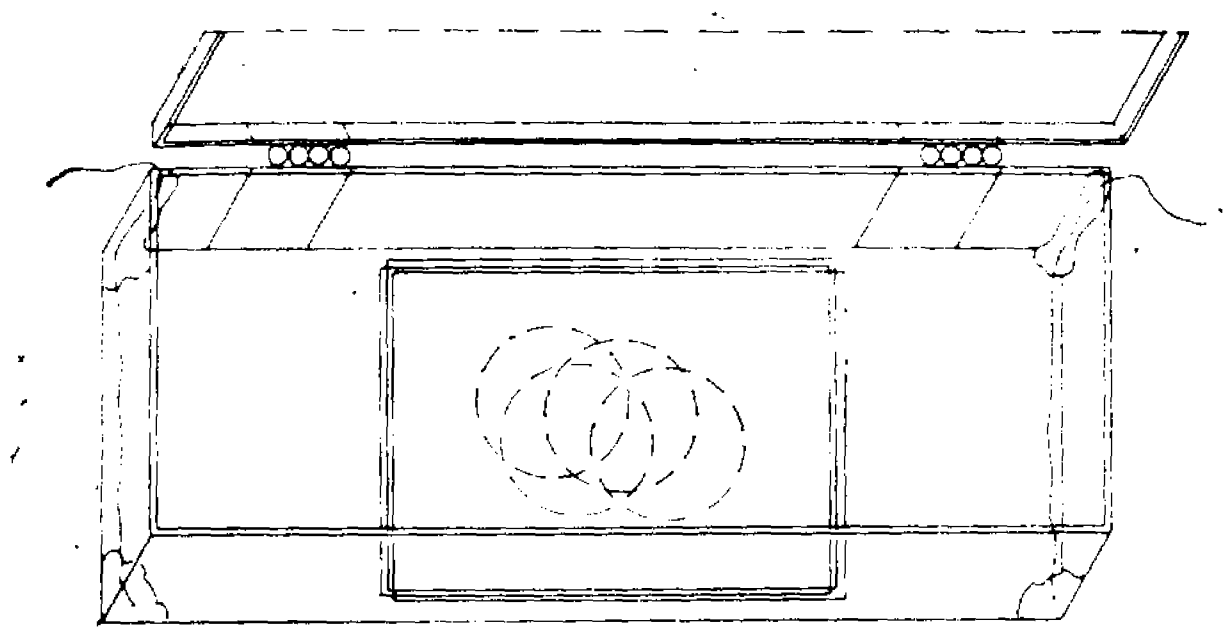


Рис. 5.6. Камера для мини-электрофореза.

и выше). За это время бромфеноловый синий проходит почти всю длину геля. Гель фотографируют так, как описано выше. Мини-гели особенно полезны при клонировании, когда необходимо получить быстрый ответ, для того чтобы перейти к очередному этапу.

ИЗВЛЕЧЕНИЕ ДНК ИЗ АГАРОЗНЫХ ГЕЛЕЙ

Для извлечения ДНК из агарозных гелей предложено много способов (Southern, 1975; Wu et al., 1976; Smith, 1980), но ни один из них не является абсолютно удовлетворительным. При этом возникают две основные проблемы. Во-первых, большинство сортов агарозы загрязнено сульфатированными полисахаридами, экстрагируемыми из геля вместе с ДНК; они сильно ингибируют многие ферменты (рестриктирующие эндонуклеазы, лигазы, киназы, полимеразы), часто используемые на последующих этапах клонирования. Во-вторых, эффективность экстракции ДНК из агарозных гелей зависит от молекулярной массы ДНК. Фрагменты длиною менее 1 kb могут быть извлечены с практически количественным выходом. С увеличением молекулярной массы ДНК выход постепенно снижается, так что при извлечении фрагментов крупнее 20 kb он редко превышает 20%.

В нашей лаборатории успешно применялись следующие методы.

Электроэлюирование в диализные трубки

1. Проведите разделение в геле и установите местоположение интересующей вас полосы, используя лампу, испускающую длинноволновый ультрафиолет, чтобы свести к минимуму повреждающий эффект излучения на ДНК.

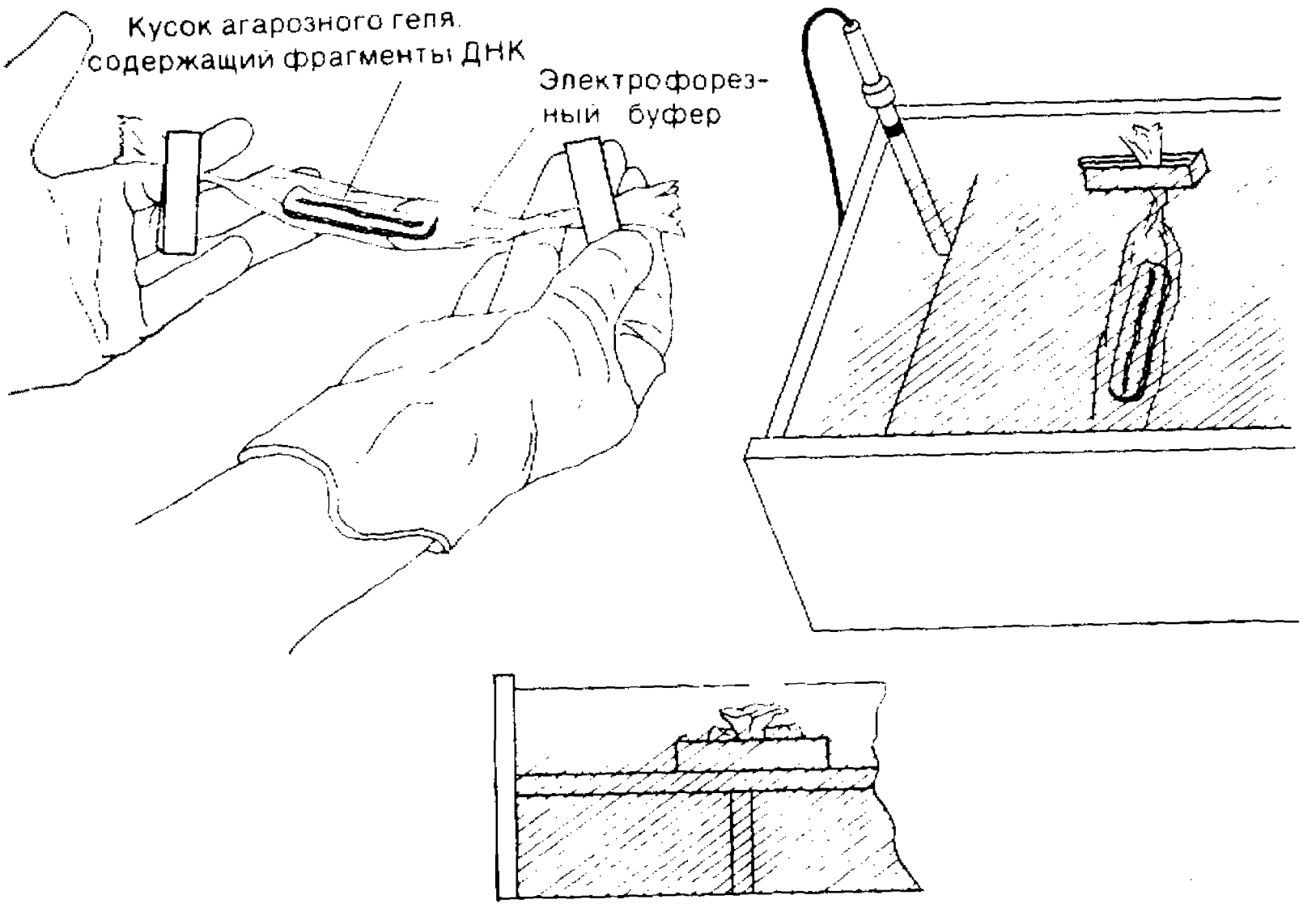


Рис. 5.7. Метод диализа, впервые предложенный Мак-Доннеллом и др. (McDonnell et al., 1977).

2. Вырежьте острым скальпелем кусок агарозы, в котором располагается полоса.

3. Сфотографируйте гель после вырезания полосы, чтобы получить документальное свидетельство того, что будет элюирована нужная полоса.

4. Заполните диализную трубку доверху (о способе приготовления диализных трубок см. с. 401) буфером ТВЕ (0,5×). Наколите вырезанный кусок геля на острие пинцета и перенесите его в трубку.

5. После того как кусок геля опустится на дно трубки, удалите бо́льшую часть буфера, оставив его ровно столько, чтобы он закрывал гель. Завяжите трубку выше геля, так чтобы в буфере не осталось пузырьков воздуха (рис. 5.7).

6. Погрузите трубку в электрофорезную кювету, заполненную буфером ТВЕ (0,5 ×). Включите электрический ток (обычно 100 В) на 2—3 ч. За это время ДНК выходит из геля и локализуется на внутренней стенке диализной трубки.

7. Смените направление тока на 2 мин, чтобы ДНК со стенок диализной трубки перешла в раствор.

8. Откройте трубку и тщательно соберите весь имеющийся в ней буфер. Промойте трубку небольшим объемом буфера ТВЕ (0,5×), используя пастеровскую пипетку.

9. Поместите кусок геля на 30 мин в буфер ТВЕ (0,5×), содержащий бромистый этидий (0,5 мкг/мл). Просмотрите

гель в ультрафиолете и убедитесь, что ДНК элюировалась полностью.

10. Очистите ДНК одним из следующих методов.

Пропускание через ДЭАЭ-сефацель

1. Добавьте к ДЭАЭ-сефацелю буфер, содержащий 10 мМ трис-HCl, pH 7,6, 1 мМ ЭДТА и 60 мМ NaCl.
2. Поместите 0,6 мл взвеси ДЭАЭ-сефацеля (этого количества достаточно для связывания 20 мкг ДНК) в маленькую колонку. Наиболее удобны для этой цели колонки Dispocolumns, выпускаемые фирмой Bio-Rad.
3. Промойте колонку последовательно 3 мл буфера ТЕ, pH 7,6, содержащего 0,6 М NaCl, 3 мл буфера ТЕ и 3 мл буфера ТЕ, содержащего 0,1 М NaCl.
4. Нанесите на колонку ДНК в гелевом буфере; соберите раствор, прошедший через колонку, и еще раз пропустите его через ту же колонку.
5. Промойте колонку дважды 1,5 мл буфера ТЕ, содержащего 0,3 М NaCl.
6. Элюируйте ДНК, трижды пропуская через колонку 0,5 мл буфера ТЕ, содержащего 0,6 М NaCl.
7. Экстрагируйте собранный элюат фенолом и хлороформом (по одному разу).
8. Осадите ДНК этанолом.

Прямая экстракция

Этот метод пригоден для большинства, но не для всех марок агарозы.

1. Пропустите ДНК, экстрагированную из геля в буфере ТВЕ (0,5×), через силиконированную стеклянную вату, набитую в пастеровскую пипетку, чтобы удалить кусочки геля.
2. Экстрагируйте элюат дважды фенолом и по одному разу смесью фенол — хлороформ и хлороформом.
3. Осадите ДНК этанолом.
4. Растворите осадок в 200 мкл H_2O, добавьте 25 мкл 3 М ацетата натрия, pH 5,2, и снова осадите ДНК этанолом.
5. Промойте осадок один раз 70%-ным этанолом.
6. Высушите осадок и растворите его в соответствующем объеме буфера ТЕ, pH 7,6.

Электроэлюирование в ванночку

ДНК можно также элюировать из горизонтального геля в ванночку, вырезанную в геле. Этот метод предложен в лаборатории Хогнесса.

1. Проведите разделение и, просмотрев гель в длинноволновом ультрафиолете, установите местоположение интересующей вас полосы.

2. Острым скальпелем или лезвием бритвы вырежьте ванночку перед передним краем полосы. Длина и ширина ванночки должны быть на 2 мм больше длины и ширины полосы.

3. Заполните ванночку электрофорезным буфером и еще раз проведите электрофорез.

4. Каждые 2—3 мин отбирайте жидкость из ванночки, заполняйте ее свежим буфером и продолжайте электрофорез до тех пор, пока вся ДНК, находившаяся в полосе, не переместится из геля в жидкость.

5. Собранную ДНК очистите хроматографией на ДЭАЭ-сефацеле или прямой экстракцией, как описано выше.

Хотя этот метод извлечения ДНК из агарозных гелей дает хороший выход, он требует много времени и постоянного внимания. Метод, описанный ниже, лишен указанных недостатков.

Электрофорез на диализную мембрану[1]

1. Проведите разделение в геле и найдите нужную полосу в длинноволновом ультрафиолете.

2. С помощью острого скальпеля или лезвия сделайте надрез в геле впереди полосы так, чтобы надрез был в обе стороны на 2 мм длиннее полосы.

3. Отрежьте кусочек бумаги ватман 3 ММ и кусочек одинарной мембраны шириной в размер лунки и длиной немного больше толщины геля. Погрузите бумагу и мембрану на 5 мин в электрофорезный буфер.

4. С помощью пинцета с широкими концами раздвиньте стенки надреза и введите в него бумагу ватман 3 ММ, наложенную на диализную мембрану, так чтобы бумага была ближе к полосе ДНК.

5. При удалении пинцета из надреза проследите за тем, чтобы при схождении стенок надреза в нем не осталось пузырьков воздуха.

6. Продолжайте электрофорез до тех пор, пока полоса ДНК не переместится в бумагу.

7. Когда вся ДНК перейдет из геля на бумагу, выключите ток. Проделайте разогретой докрасна иглой отверстие в дне 400-мкл микроцентрифужной пробирки и поместите ее в 1,5-мл эппендорфовскую пробирку. Крышки обеих пробирок удалите.

8. Выньте бумагу и диализную мембрану из геля и поместите их в 400-мкл пробирку. Центрифугируйте 15 с и отберите элюат из 1,5-мл пробирки.

---

[1] Girvitz et al., 1980.

9. Добавьте в 400-мкл пробирку, в которой находится бумага и диализная мембрана, 100 мкл элюирующего буфера (0,2 М NaCl, 50 мМ трис, pH 7,6, 1 мМ ЭДТА и 0,1% SDS).

10. Отцентрифугируйте, как указано выше, и соберите элюат.

11. Повторите стадии 9 и 10 еще два раза.

12. Экстрагируйте собранные элюаты фенолом один раз. Отберите водную фазу и повторите экстракцию смесью фенол — хлороформ и хлороформом.

13. Осадите ДНК этанолом. Промойте осадок 70%-ным этанолом, высушите его и вновь растворите в небольшом объеме буфера ТЕ, pH 7,6.

Примечания. а) Изложенная процедура рассчитана на элюирование ДНК из одной полосы шириной около 5—10 мм. Для более широких полос объемы используемых жидкостей должны быть соответственно увеличены.

б) Недавно предложена сходная процедура (Dretzen et al., 1981), в соответствии с которой ДНК собирают на полоски ДЭАЭ-целлюлозной бумаги. Авторы сообщают, что таким образом можно извлекать ДНК не только из агарозного, но и из акриламидного геля, причем собранную ДНК не нужно очищать на колонках с ДЭАЭ-сефацелем перед последующим использованием в ферментативных реакциях.

Извлечение ДНК из легкоплавкой агарозы

Существуют сорта агарозы, в молекулы которой введены гидроксиэтильные группы. Такая агароза образует гель при 30 °С и плавится при 65 °С, т. е. при температуре более низкой, чем температура плавления большинства ДНК. На этих свойствах агарозы основан простой метод извлечения ДНК из гелей (Weislander, 1979).

1. Растворите легкоплавкую агарозу в электрофорезном буфере нагреванием при 70 °С. Остудите до 37 °С и добавьте бромистый этидий до конечной концентрации 0,5 мкг/мл. Разлейте агарозу и выдержите гель при 4 °С, чтобы он хорошо затвердел.

2. Нанесите пробы ДНК и проводите электрофорез при 4 °С, следя за тем, чтобы гель не расплавился во время разделения. Электрофоретические характеристики легкоплавких и обычных агарозных гелей одинаковы.

3. Вырежьте нужные кусочки геля и залейте их пятью объемами 20 мМ трис-HCl, pH 8,0, 1 мМ ЭДТА.

4. Прогрейте смесь при 65 °С 5 мин, чтобы расплавить гель.

5. Экстрагируйте пробу с расплавленным гелем равным объемом фенола при комнатной температуре. Соберите водную фазу после центрифугирования при 20 °С и снова экстра-

гируйте ее вначале смесью фенол — хлороформ, а затем хлороформом.

6. Осадите ДНК этанолом. Обычно ДНК получается достаточно чистой и может служить субстратом для рестриктаз, лигаз и других ферментов. При необходимости ее можно подвергнуть дальнейшей очистке хроматографией на ДЭАЭ-сефацеле, как описано выше.

ЩЕЛОЧНЫЕ АГАРОЗНЫЕ ГЕЛИ

Щелочные агарозные гели (McDonnell et al., 1977) используются: 1) для определения размеров цепей ДНК в гибридах ДНК — РНК, устойчивых к нуклеазе S1 (см. с. 201, а также работу Favaloro et al., 1980); 2) для выяснения размеров первой и второй цепей ДНК, синтезированных обратной транскриптазой (с. 228); 3) для определения активности ферментов, вызывающих образование одноцепочечного разрыва, в экспериментах по молекулярному клонированию; 4) для калибровки реагентов, используемых в экспериментах с переносом одноцепочечного разрыва в ДНК (с. 121).

В связи с тем что при добавлении NaOH к горячему раствору агарозы происходит гидролиз полимера, гели готовят на нейтральном незабуференном растворе (50 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА), а щелочной электрофорезный буфер к ним добавляют перед разделением.

1. Добавьте рассчитанное количество порошка агарозы к отмеренному количеству NaCl (50 мМ) и ЭДТА (1 мМ).

2. Нагрейте взвесь в бане с кипящей водой или в микроволновой печи до растворения агарозы.

3. Остудите раствор до 50 °С, разлейте гель и поместите его в электрофорезную кювету согласно прописи на с. 163—166.

4. Добавьте необходимый объем щелочного электрофорезного буфера, так чтобы над гелем высота слоя была 3—5 мМ.

Щелочной электрофорезный буфер имеет состав: 30 мМ NaOH и 1 мМ ЭДТА.

Прежде чем наносить пробы ДНК, дайте буферу впитаться в гель в течение по крайней мере 30 мин.

5. В пробах, предназначенных для анализа в щелочных агарозных гелях, ДНК осадите этанолом и растворите ее в 10—20 мкл щелочного буфера для нанесения проб.

Щелочной буфер для нанесения проб имеет состав: 50 мМ NaOH, 1 мМ ЭДТА, 2,5%-ный фикол типа 400 (Pharmacia) и 0,025%-ный бромкрезоловый зеленый.

6. Прежде чем наносить пробы, удалите излишек щелочного электрофорезного буфера, покрывающего гель. Оставшийся буфер должен покрывать гель слоем толщиной 1 мм.

7. Внесите в гель пробы ДНК. Электрофорез нужно проводить при напряженности не менее 7,5 В/см, пока краситель не переместится примерно на 8 см (около 15 В·ч/см).

Поскольку бромкрезоловый зеленый быстро диффундирует из щелочного геля в электрофорезный буфер, сразу после того, как краситель войдет из лунки в гель, на поверхность геля следует положить стекло.

8. При постановке электрофореза в щелочных гелях анализируемую ДНК нередко метят с помощью ^{32}P, который можно обнаружить радиоавтографически. Когда разделение закончилось, гель вынимают из кюветы и выдерживают 30 мин в 7%-ной ТХУ при комнатной температуре. Затем его помещают на стеклянную пластинку и несколько часов сушат под слоями бумаги ватман 3ММ, положив сверху другую стеклянную пластинку. Высушенный гель заворачивают в пленку Saran Wrap и радиоавтографируют при комнатной температуре или при —70 °С с усиливающим экраном (см. рис. П.3, с. 413).

Если используют немеченую ДНК, то гель выдерживают в течение 1 ч в нейтрализующем растворе (1 М трис-HCl, pH 7,6, 1,5 М NaCl). Затем ДНК можно перенести на нитроцеллюлозный фильтр, как описано на с. 344—345, и выявить с помощью гибридизации в эксперименте с ^{32}P.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

Полиакриламидные гели используют для анализа и выделения фрагментов ДНК, имеющих длину менее 1 kb (Maniatis et al., 1975). Гели могут содержать разные концентрации полиакриламида (от 3,5 до 20%) в зависимости от размера анализируемых фрагментов.

Акриламид, %	Область эффективного разделения, число нуклеотидов
3,5	100—1000
5,0	80—500
8,0	60—400
12,0	40—200
20,0	10—100

Полиакриламидные гели заливают между двумя стеклянными пластинами, разделенными прокладками. При этом основная часть раствора акриламида не контактирует с воздухом, и полимеризация подавляется кислородом лишь в узком слое по краям геля. Длина полиакриламидных гелей может составлять от 10 до 100 см в зависимости от характера разделения, требующегося в эксперименте; разделение ведут только в вертикальном геле.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПОЛИАКРИЛАМИДНЫХ ГЕЛЕЙ

1. Приготовьте исходные растворы. Для приготовления *30%-ного акриламида* смешайте 29 г акриламида, 1 г N,N′-метиленбисакриламида и воду до 100 мл.

Предостережение. Акриламид высокотоксичен. При работе с ним используйте перчатки и маску. Состав *трис-боратного электрофорезного буфера* (TBE) см. в табл. 5.1.

Для приготовления *3%-ного персульфата аммония* смешайте 0,3 г персульфата аммония (твердое вещество, которое необходимо хранить при 4 °С) и воду до 10 мл.

Раствор можно хранить при 4 °С не больше недели.

2. Рассчитайте требуемый объем раствора акриламида. Прописи, представленные в табл. 5.3, составлены для 100 мл раствора.

Таблица 5.3. Полиакриламидные гели

Реагенты	Полиакриламидный гель, %				
	3,5	5,0	8,0	12,0	20,0
30%-ный акриламид	11,6	16,6	26,6	40,0	66,6
H_2O	76,3	71,3	61,3	47,9	21,3
3%-ный персульфат аммония	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1
Буфер (10×)	10,0	10,0	10,0	10 0	10,0
Общий объем, мл	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

3. Поместите нужное количество раствора в колбу с боковым отводом. Дегазируйте раствор, подсоединив колбу к вакуумному насосу (вакуум устанавливайте медленно). Во время дегазации взбалтывайте раствор в колбе до тех пор, пока не перестанут выделяться пузырьки воздуха.

4. Приготовьте стеклянные пластины для заливки геля. Вплоть до недавнего времени при разливке полиакриламидных гелей использовали пáры пластин, формы которых показаны на рис. 5.8 (вверху).

Для этих пластин характерны два недостатка. Они имеют небольшие выступы — «кроличьи ушки», которые отличаются хрупкостью. Такие пластины трудно изготовить — поэтому они довольно дороги. В настоящее время гели обычно заливают между пластинами, изображенными на рис. 5.8 внизу (пластины без «кроличьих ушек» предложены Барнесом и модифицированы Баллоком и Джелинасом).

Перед тем как поместить затвердевший гель в электрофорезную кювету, следует заполнить полость между внутренней пластиной и прозрачной подложкой полосками поролона, кото-

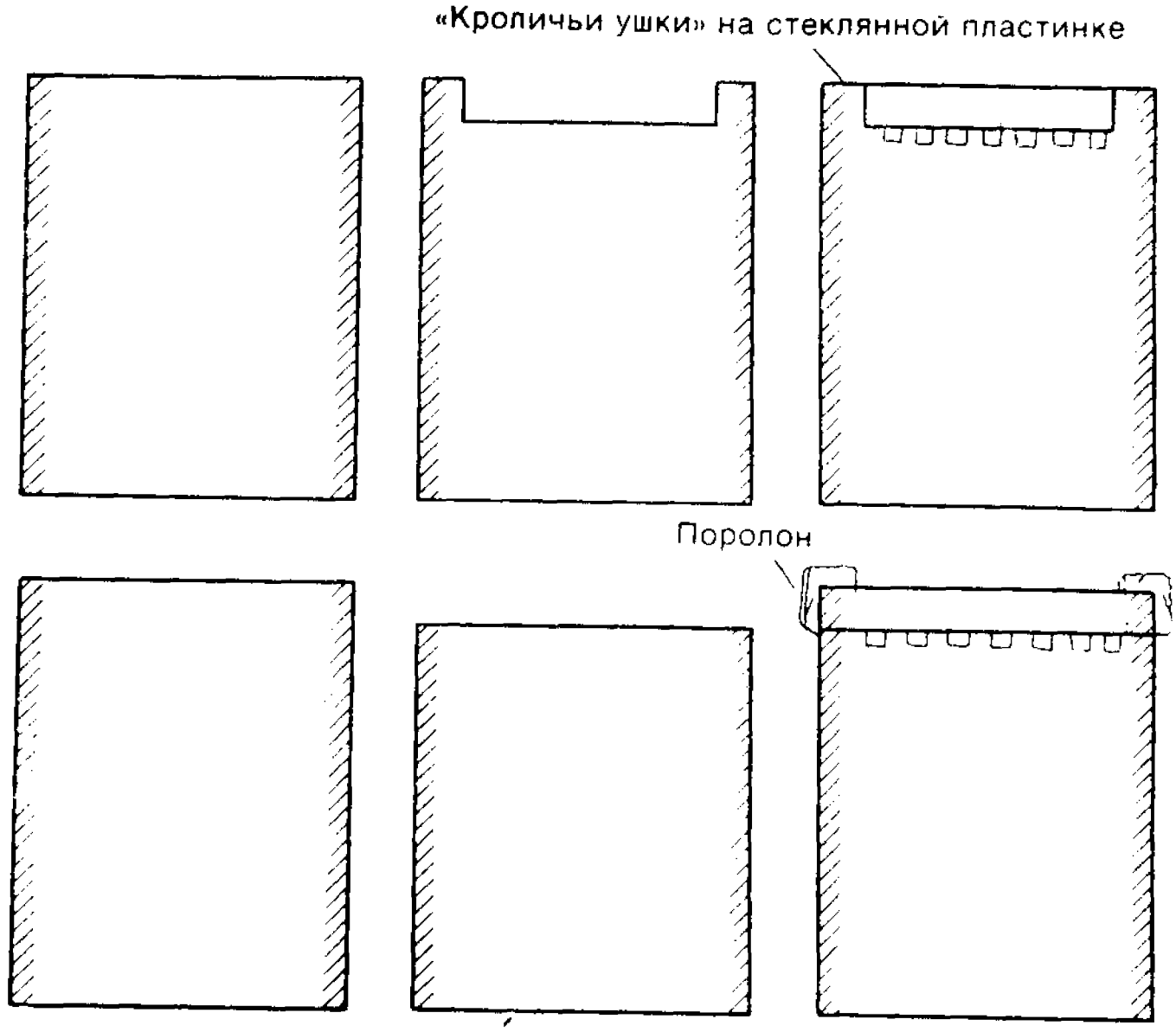


Рис. 5.8. Пластины с «кроличьими ушками» и без них для полиакриламидного геля. *Слева* — наружные пластины; *в середине* — внутренние пластины; *справа* — внутренняя и наружная пластины, сложенные вместе; показано также положение лунок в геле.

рый обычно используют в качестве прокладки в спальных мешках. Поролон продают фирмы спортивных товаров (например, фирма Eastern Mountain Sports). Его можно нарезать на куски желаемой величины. Если полоски поролона сильно сдавить и уложить очень плотно, то они образуют между основной пластиной и прозрачной подложкой водонепроницаемую прослойку.

Вымойте стеклянные пластины в растворе теплого детергента и хорошо ополосните сначала водопроводной, а затем деионизированной водой. Держите пластины за торцы, чтобы на их рабочих поверхностях не оставались жирные следы от пальцев. Обмойте пластины этанолом и дайте им высохнуть.

Положите более крупную наружную пластину на стол и разместите по ее краям разделительные полоски. Несколько мазков вазелина помогают удерживать эти полоски на нужном месте во время выполнения последующих этапов.

Наложите сверху внутреннюю пластину. По всей длине снизу и по бокам проклейте пластины изоляционной лентой, чтобы внутренняя полость стала водонепроницаемой.

5. Помните, что акриламид токсичен и быстро проникает в кожу. Поэтому перед работой наденьте перчатки и выполняйте

Таблица 5.4. Движение красителей-маркеров в полиакриламидных гелях

Гель, %	Бромфеноловый синий[1])	Ксилолцианол[1])
3,5	100	460
5,0	65	260
8.0	45	160
12,0	20	70
20,0	12	45

[1]) Числа обозначают приблизительные размеры фрагментов ДНК (пары оснований), вместе с которыми движется краситель.

указанные ниже манипуляции на подносе, чтобы пролившийся акриламид не попал на ваше рабочее место. К 100 мл дегазированного акриламида добавьте по 30 мкл TEMED (N,N, N′N′-тетраметилэтилендиамина), размешайте и сразу же вылейте смесь в пространство между двумя пластинами. Заполните его почти доверху. Оставшийся раствор акриламида храните при 4 °С, чтобы снизить скорость полимеризации. Если пластины хорошо вымыты и заклеены, то между ними не должны оставаться пузырьки воздуха и не должно быть течи.

6. Немедленно вставьте подходящую гребенку, стараясь не занести пузырьков воздуха. Основания зубцов должны располагаться немного выше верха стеклянной пластины.

7. После того как произойдет полимеризация акриламида (60 мин при комнатной температуре), если гель сильно осел, добавьте дополнительную порцию акриламида.

8. Удалите гребенку и сейчас же сполосните лунки водой. Снимите клейкую ленту со дна геля.

9. Прикрепите гель к электрофорезной камере зажимами и скрепками. Подложите прокладки из поролона, как показано на рис. 5.8.

10. Заполните резервуар электрофорезным буфером (1×). Загнутой пастеровской пипеткой или шприцем удалите пузырьки воздуха, скопившиеся под гелем.

11. С помощью пастеровской пипетки налейте в лунки электрофорезный буфер. Если этого не сделать, то полосы ДНК будут расплывчатыми и неровными.

12. Внесите микропипеткой пробы ДНК. Емкость полиакриламидного геля достаточно высока, так что можно наносить до 1 мкг ДНК на полосу в лунку размером 0,5×0,2 см.

13. Подсоедините электроды к источнику напряжения (положительный вывод нужно подключить ко дну резервуара). Напряженность при проведении разделения в полиакриламидных гелях обычно составляет 1—8 В/см. При более высокой напряженности могут изогнуться полосы ДНК или расплавить-

ся небольшие фрагменты ДНК. Маркерный краситель движется в полиакриламидном геле, приготовленном на буфере ТВЕ (1×), с той же скоростью, что и фрагменты ДНК, содержащие указанное в табл. 5.4 число пар оснований (Maniatis et al., 1975).

14. По окончании разделения выньте пластины из кюветы и снимите с них липкую ленту. Положите гель и две стеклянные пластины на стол. Приподнимите угол верхней пластины и осторожно снимите ее, оставив гель на нижней пластине. Удалите прокладки.

15. Поместите гель вместе с нижней стеклянной пластиной в красящий раствор (0,5 мкг/мл бромистого этидия в буфере ТВЕ (1×). Будьте осторожны! Гель хрупок и легко соскальзывает с пластины. После 45 мин прокрашивания выньте пластину вместе с гелем. Избыток жидкости лучше удалять с помощью бумажных салфеток, а не фильтровальной бумаги. Заверните гель и стеклянную пластину в пленку Saran Wrap.

16. Теперь можно легко сфотографировать гель, переложив его с пластины на стекло, пропускающее ультрафиолет. Полиакриламид тушит флуоресценцию бромистого этидия, поэтому невозможно обнаружить полосу, содержащую меньше 10 нг ДНК.

ВЫДЕЛЕНИЕ ФРАГМЕНТОВ ДНК ИЗ ПОЛИАКРИЛАМИДНЫХ ГЕЛЕЙ[1]

1. Проведите электрофорез в полиакриламидном геле и окрасьте его, как описано выше в п. 15.

2. В длинноволновом ультрафиолете найдите нужную полосу ДНК.

3. Вырежьте полосу лезвием.

4. Перенесите кусок геля на стекло и разрежьте его бритвой на мелкие кусочки. Поместите их в маленькую пробирку и добавьте 1 объем элюирующего буфера (0,5 М ацетат аммония и 1 мМ ЭДТА, pH 8,0).

5. Закройте пробирку и проинкубируйте ее при 37 °С в течение ночи, если можно, с вращением.

6. Отцентрифугируйте пробу при 10 000 g 10 мин при 20 °С. Соберите надосадочную жидкость, стараясь не захватывать акриламид. Это удобно делать пастеровской пипеткой с загнутым кверху кончиком.

7. Добавьте к осадку еще 0,5 объема элюирующего буфера, быстро встряхните и снова отцентрифугируйте. Две надосадочные жидкости объедините.

8. Удалите оставшиеся фрагменты акриламида, пропустив раствор через небольшую колонку из стеклянной ваты, помещенной в кончик пастеровской пипетки.

---

[1] Maxam, Gilbert, 1977.

9. Осадите ДНК этанолом.
10. Растворите ДНК в 200 мкл буфера. Добавьте 25 мкл 3 М ацетата натрия, pH 5,2, и снова осадите ДНК.
11. Промойте осадок 70%-ным этанолом; высушите под вакуумом и растворите в небольшом объеме буфера ТЕ, pH 7,9.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ С РАЗДЕЛЕНИЕМ ЦЕПЕЙ

В ряде случаев (например, при определении последовательности по Максаму — Гилберту или при гибридизации с РНК, представленными малым числом копий) необходимо разделить фрагменты ДНК на отдельные цепи. Часто это можно сделать путем электрофореза денатурированной ДНК в нейтральной агарозе (Hayward, 1972) или в полиакриламидных гелях (Maxam, Gilbert, 1977). Точно неизвестно, почему комплементарные цепи ДНК движутся в геле с разными скоростями. Не исключено, что они обладают разными вторичными структурами, образующимися в результате спаривания оснований внутри цепей, и это сообщает им разные электрофоретические подвижности. Вместе с тем иногда обе цепи перемещаются с одной и той же скоростью даже при продолжительном электрофорезе. К сожалению, невозможно предсказать, будут или не будут различаться скорости перемещения комплементарных цепей ДНК в геле. Для каждого типа фрагментов это необходимо выяснять экспериментальным путем.

Цепи фрагментов ДНК длиной менее 1 kb разделяют в полиакриламидных гелях (Szalay et al., 1977; Maxam, Gilbert, 1980), а цепи более длинных фрагментов — в агарозных гелях (Hayward, 1972; Tibbetts et al., 1974; Dunn, Sambrook, 1980).

РАЗДЕЛЕНИЕ ЦЕПЕЙ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

Фрагменты ДНК, содержащие более 200 нуклеотидов

1. Приготовьте гель, содержащий 5% (вес/объем) акриламида и 0,1% N,N′-метиленбисакриламида в буфере, состоящем из 50 мМ трис-бората, pH 8,3, и 1 мМ ЭДТА.

После того как гель полностью полимеризуется (для этого необходимо 1—2 ч вследствие малого количества сшивающего агента), прежде чем наносить ДНК, следует провести предварительный электрофорез при 8 В/см в течение 1—2 ч.

2. Осадите фрагменты ДНК этанолом и дважды промойте осадок 70%-ным этанолом, чтобы удалить соли.
3. Растворите ДНК в 40 мкл смеси, содержащей 30% (вес/объем) DMSO, 1 мМ ЭДТА, 0,05% ксилолцианола, 0,05% бромфенолового синего.
4. Прогрейте при 90 °С в течение 2 мин. Быстро охладите в ледяной воде.

5. Немедленно нанесите пробу и проведите электрофорез при 8 В/см. Разделение продолжайте до тех пор, пока быстрее других движущаяся двухцепочечная форма фрагментов ДНК не достигнет конца геля (время, необходимое для этого, определяют эмпирически в предварительном опыте).

6. Определите местоположение ДНК, окрасив гель с помощью бромистого этидия (с. 179) или проведя радиоавтографию (с. 412).

7. Извлеките разделенные цепи из геля, как описано на с. 169.

Фрагменты ДНК длиной меньше 200 нуклеотидов

Цепи небольших фрагментов ДНК разделяют в 8%-ном полиакриламидном геле (Maxam, Gilbert, 1977).

1. Приготовьте гель, содержащий 8% (вес/объем) акриламида и 0,24% (вес/объем) N,N′-метиленбисакриламида, в буфере, состоящем из 50 мМ трис-бората, pH 8,3, и 1 мМ ЭДТА.

После того как гель полностью полимеризуется, необходимо провести предварительный электрофорез при 8 В/см в течение 1—2 ч (до нанесения ДНК).

2. Осадите ДНК этанолом и дважды промойте осадок 70%-ным этанолом, чтобы удалить соли.

3. Растворите ДНК в 50 мкл смеси, содержащей 0,3 М NaOH, 10% глицерина и 0,05% бромфенолового синего.

4. Нанесите пробу на гель и сразу же проводите электрофорез при 8 В/см до тех пор, пока быстрее других перемещающаяся двухцепочечная форма ДНК не пройдет всю длину геля (это время определяют в предварительном эксперименте).

5. Как правило, разделение небольших молекул ДНК проводят, используя меченные ^{32}P фрагменты ДНК. Закончив разделение, снимите одну из стеклянных пластин, заверните гель в пленку Saran Wrap и проведите радиоавтографию при комнатной температуре или при —70 °С с усиливающим экраном (с. 412 и далее).

6. Экстрагируйте из геля разделенные цепи ДНК, как описано на с. 169.

РАЗДЕЛЕНИЕ ЦЕПЕЙ В АГАРОЗНЫХ ГЕЛЯХ

Этот метод служит для разделения цепей фрагментов ДНК длиной более 1 kb (Hayward, 1972).

1. Вырежьте из препаративного агарозного геля полоски агарозы, содержащие определенные фрагменты ДНК.

2. Поместите их в 0,3 М NaOH на 30 мин при комнатной температуре.

3. Промойте полоски ледяной дистиллированной водой, несколько раз сменяя ее.

4. Поместите полоски в лунки такого же размера, вырезанные в заранее приготовленном горизонтальном агарозном геле. Гель приготовьте на буфере, состоящем из 36 мМ трис-HCl, pH 7,7, 30 мМ NaH_2PO_4 и 1 мМ ЭДТА.

Все щели между агарозными полосками и стенками лунок заполните раствором расплавленной агарозы.

5. Налейте 50 мкл красителя в одну из пустых лунок геля (табл. 5.2).

6. Проведите электрофорез при 1,5 В/см до тех пор, пока бромфеноловый синий не продвинется до половины длины геля.

7. Если требуется извлечь из геля немеченую ДНК, то его следует окрасить, выдержав 45 мин в электрофорезном буфере, содержащем 1,0 мкг/мл бромистого этидия. В связи с тем что бромистый этидий имеет относительно низкое сродство к одноцепочечной ДНК и при этом наблюдается слабая флуоресценция, при таком окрашивании трудно обнаружить менее 0,1 мкг одноцепочечной ДНК.

Если ДНК мечена ^{32}P, то гель нужно завернуть в пленку Saran Wrap и оставить для экспозиции с усиливающим экраном либо при комнатной температуре, либо при —70 °С. После обнаружения ДНК ее можно извлечь из геля электроэлюированием, как описано на с. 169.

При необходимости гель можно погрузить в раствор, состоящий из 0,5 М триса, pH 7,6, и 1,5 М NaCl на 1 ч и затем перенести ДНК на лист нитроцеллюлозы для гибридизации (Southern, 1975; с. 344).

Примечания. А. При электрофорезе с разделением цепей каждый фрагмент ДНК обычно дает три полосы. Одна из них содержит нативную двухцепочечную ДНК, образующуюся в результате отжига двух одиночных цепей после нанесения ДНК на гель. Две другие полосы (значительно более слабые и менее заметные, чем первая) представлены двумя разделившимися цепями.

Б. Нативная двухцепочечная ДНК движется в агарозном геле значительно медленнее, а в полиакриламидном геле быстрее, чем одноцепочечная ДНК.

В. Концентрация одноцепочечной ДНК, наносимой на гель, должна быть как можно более низкой, чтобы ренатурация была минимальной. Используйте толстые гели (0,3—0,5 см) с лунками шириной 2—3 см.

Г. Маркеры для электрофореза с разделением цепей можно приготовить путем введения метки в укороченные 3′-гидроксильные концы фрагментов ДНК, как описано на с. 123. Перед нанесением на гель маркеры следует подвергнуть денату-

рации нагреванием или обработкой щелочью точно так же, как и опытные образцы.

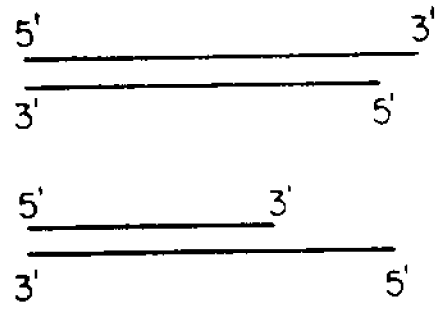
Д. При использовании агарозного геля для разделения цепей предпочтительнее проводить электрофорез денатурированной ДНК в толстом слое агарозного геля. При этой процедуре сводится к минимуму вероятность ренатурации комплементарных цепей ДНК. Можно использовать и обычные способы нанесения проб на гель, хотя они, как правило, менее эффективны.

1) Осадите ДНК спиртом и дважды промойте осадок 70%-ным этанолом.
2) Растворите ДНК в растворе, содержащем 0,1 М NaOH, 1 мМ ЭДТА, 8% сахарозы и 0,05% бромфенолового синего.
3) Нанесите пробы на гель и тотчас же проводите электрофорез, как описано выше.

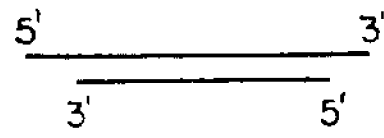
РАЗДЕЛЕНИЕ ЦЕПЕЙ КОРОТКИХ ДВУХЦЕПОЧЕЧНЫХ ДНК ЭЛЕКТРОФОРЕЗОМ В ДЕНАТУРИРУЮЩИХ ПОЛИАКРИЛАМИДНЫХ ГЕЛЯХ

Как указывалось выше, не всегда удается разделить цепи денатурированных двухцепочечных ДНК электрофорезом в неденатурирующих гелях. Альтернативный способ разделения включает применение рестриктирующих ферментов для получения фрагментов двухцепочечной ДНК с цепями неодинаковой длины. Цепи разделяют в соответствии с их размером, проводя электрофорез в денатурирующих полиакриламидных гелях.

Например, можно подобрать фермент, после обработки которым появляется тупой конец и конец с 3′- или 5′-выступающей цепью



или два фермента, после обработки которыми появляется 3′-выступающий участок на одном конце и 5′-выступающий участок на другом:



В зависимости от использованных ферментов можно получить цепи ДНК, различающиеся по размеру на 2—8 нуклеотидов. Как известно, в денатурирующих полиакриламидных гелях, применяемых при определении последовательности оснований

в ДНК, разделяются фрагменты, различающиеся по длине всего на один нуклеотид; следовательно, еще более различающиеся по длине цепи двухцепочечной ДНК разделить легко.

1. Проведите расщепление ДНК соответствующим ферментом и введите в 3′- или 5′-концы метку ^{32}P согласно процедуре, описанной на с. 123. Если ДНК хорошо охарактеризована и все фрагменты могут быть разделены гель-электрофорезом, проведите экстракцию смесью фенол — хлороформ и осадите ее этанолом. Растворите ДНК в 20 мкл смеси, состоящей из 90%-ного формамида (очищенного, как описано на с. 396), буфера TBE (с. 400), 0,02%-ного бромфенолового синего и 0,02%-ного ксилолцианола. Если в результате рестрикции ожидается появление сложного набора фрагментов, то следует вначале очистить нужный фрагмент в неденатурирующем полиакриламидном геле и только после этого проводить разделение цепей электрофорезом в денатурирующем полиакриламидном геле.

2. Нагрейте раствор до 90 °С, чтобы денатурировать ДНК, и быстро охладите в ледяной воде. Немедленно внесите раствор ДНК в лунку полиакриламидного геля, содержащего 7—8 М мочевину (см. ниже). В лунку шириной 3 см, сделанную в геле толщиной 0,7 мм, можно вносить до 2 мкг ДНК.

3. Гель приготовьте, как описано на с. 176, на растворе, который содержит 20 частей акриламида на 1 часть бисакриламида, 8 М мочевину и буфер TBE (с. 400).

Для расчета концентрации полиакриламида, необходимой для разделения цепей фрагментов ДНК разного размера, пользуйтесь приведенными ниже данными.

Полиакриламид, %	Размер фрагментов ДНК, число нуклеотидов
4	>200
5	80—200
8	40—100
12	10—50

4. Проводите электрофорез при 20 В/см до тех пор, пока маркерный краситель не продвинется на необходимое расстоя-

Таблица 5.5. Размер фрагментов ДНК (число нуклеотидов), перемещающихся вместе с красителем-маркером в денатурирующих полиакриламидных гелях

Полиакриламид, %	Бромфеноловый синий	Ксилолцианол
5	35	130
6	26	106
8	19	70—80
10	12	55
20	8	28

ние (табл. 5.5). Чтобы получить максимальное разделение цепей, нужно дать фрагментам ДНК пройти почти всю длину геля.

Примечание. Когда в пробе имеется высокая концентрация соли, образуется солевой фронт, движущийся вместе с бромфеноловым синим.

5. Локализуйте ДНК радиоавтографией. Извлеките ДНК из геля, как описано на с. 169.

Примечание. Данная процедура описана в нескольких работах (Akusjarvi, Pettersson, 1978; Treisman, 1980; Pluciennic-zak, Streeck, 1981).

Глава 6

ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И АНАЛИЗ мРНК ИЗ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

Типичная клетка млекопитающего содержит $\sim 10^{-5}$ мкг РНК, 80—85% которой составляет рибосомная РНК (в основном 28S, 18S и 5S), а 10—15% приходится на долю различных низкомолекулярных РНК (транспортные, низкомолекулярные ядерные и т. д.). РНК каждого из этих типов характеризуется определенным размером молекул и последовательностью оснований и может быть выделена практически в чистом виде с помощью гель-электрофореза, центрифугирования в градиенте плотности или ионообменной хроматографии. В отличие от этого мРНК, составляющая от 1 до 5% всей РНК клетки, гетерогенна как по размеру (от 200 до нескольких тысяч оснований), так и по последовательности оснований. Однако практически все мРНК млекопитающих имеют на 3′-конце poly (A)-фрагмент, длина которого достаточна для очистки мРНК с помощью аффинной хроматографии на oligo-(dT)-целлюлозе; получаемая при этом физически гетерогенная популяция молекул в совокупности кодирует все полипептиды, синтезируемые клеткой.

Ключевые моменты при получении хороших препаратов эукариотических мРНК — это сведение к минимуму рибонуклеазной активности на начальных стадиях выделения и исключение возможности случайного внесения следовых количеств рибонуклеазы со стеклянной посуды и из растворов. В последующих четырех разделах мы акцентируем на этом особое внимание. Содержание этих разделов имеет существенное значение для успешного выделения мРНК из клеток млекопитающих.

1. Использование экзогенных ингибиторов РНКаз

В настоящее время наибольшее распространение получили два типа ингибиторов РНКазы: ванадилрибонуклеозидные комплексы и РНКазин.

Ванадилрибонуклеозидные комплексы. Комплексы, образованные ионом оксованадия и любым из четырех рибонуклеозидов, являются аналогами РНК, временно связывающимися со

многими РНКазами и практически полностью подавляющими их активность (Berger, Birkenmeier, 1979). Четыре ванадилрибонуклеозидных комплекса добавляют к интактным клеткам и используют их в концентрации 10 мМ на всех стадиях выделения и очистки РНК. Это обеспечивает высокий выход РНК, получаемой в форме, которую можно эффективно транслировать в бесклеточной системе синтеза белка. При необходимости ванадилрибонуклеозидные комплексы могут быть удалены из препарата РНК с помощью многократной экстракции фенолом, содержащим 0,1% 8-гидроксихинолина.

Ванадилрибонуклеозидные комплексы получают следующим образом (Berger, Birkenmeier, 1979).

1. Растворите 0,5 ммоль одного из четырех рибонуклеозидов в 8 мл воды в кипящей водяной бане.

2. Пропуская через раствор газообразный азот, добавьте 1 мл 2 М сульфата ванадия.

3. Доведите pH до ~6,0, добавляя по каплям 10 М NaOH.

4. Доведите pH точно до 7,0, добавляя по каплям 1 М NaOH в атмосфере газообразного азота в водяной бане. По мере образования комплексов раствор меняет окраску с синей на темно-зеленую.

5. Доведите объем до 10 мл; разделите раствор на небольшие аликвоты и храните при —20 °С в атмосфере газообразного азота. Концентрация образовавшегося комплекса 200 мМ. Перед использованием разбавьте раствор в соотношении 1 : 20.

Имеющиеся в продаже препараты ванадилрибонуклеозидных комплексов производят исследовательские лаборатории Бетезды (Bethesda Research Laboratories, P. O. Box 577, Gaithersburg, M. D. 20760).

РНКазин. РНКазин — белок (мол. масса ~40 000), сильный ингибитор РНКазы, выделенный из печени крысы и плаценты человека. РНКазин эффективно ингибирует РНКазу при трансляции в бесклеточной системе (Scheel, Blackburn, 1979) и обратной транскрипции мРНК (de Martynoff et al., 1980). Так же как и ванадилрибонуклеозидные комплексы, РНКазин можно использовать в ферментативных реакциях. Его преимущество перед ванадилрибонуклеозидными комплексами состоит в том, что он легко экстрагируется фенолом.

Имеющиеся в продаже препараты РНКазина производит фирма Biotec (Biotec Inc., 2800 Fish Hatchery Rd., Madison, WI 53711).

2. Методы разрушения клеток с одновременной инактивацией нуклеаз

Белки легко растворяются в растворах сильных хаотропных агентов, таких, как гуанидинхлорид и гуанидинизотиоцианат (Cox, 1968). При разрушении клеточных структур после утраты

регулярных вторичных структур происходит быстрое отделение нуклеопротеинов от нуклеиновых кислот. Даже РНКаза — фермент, устойчивый ко многим видам сильных физических воздействий (таких, как кипячение), — неактивна в присутствии 4 М гуанидинизотиоцианата и восстановителей, подобных β-меркаптоэтанолу (Sela et al., 1957). Поэтому комбинация этих соединений может быть использована для выделения недеградированной РНК из богатых РНКазой тканей, например поджелудочной железы (Chirgwin et al., 1979).

Гуанидинизотиоцианат получают следующим образом.

1. В банку с гуанидинизотиоцианатом (100 г; фирма Eastman Laboratory and Special Chemicals или Fluka) добавьте 100 мл деионизованной H_2O, 10,6 мл 1 М трис-HCl, pH 7,6, и 10,6 мл 2 М ЭДТА. Перемешивайте в течение ночи при комнатной температуре.

2. Для улучшения растворения прогревайте раствор при непрерывном перемешивании при 60—70 °С в течение 10 мин. При этом часто остается осадок нерастворившегося материала, который удалите центрифугированием при 3000 g в течение 10 мин при 20 °С.

3. К надосадочной жидкости добавьте 21,2 мл 20%-ного саркозила (лаурилсаркозината натрия) и 2,1 мл β-меркаптоэтанола и доведите объем до 212 мл, используя стерильную H_2O.

4. Профильтруйте через фильтр Nalgene и храните при 4 °С в плотно закрытой склянке из коричневого стекла.

3. Использование свободной от РНКазы стеклянной и пластмассовой посуды

Имеющаяся в лабораториях стерильная пластмассовая посуда полностью лишена РНКазы и может быть использована для выделения и хранения РНК без предварительной обработки. Однако обычная лабораторная стеклянная посуда часто оказывается источником загрязнения РНКазой, и ее следует прокалить при 250 °С в течение 4 ч или более. Помимо этого, некоторые исследователи обрабатывают стеклянную посуду в течение 12 ч при 37 °С раствором 0,1%-ного диэтилпирокарбоната — сильного, но не абсолютного ингибитора РНКазы (Fedorcsak, Ehrenberg, 1966). Перед использованием посуды, обработанной таким способом, важно удалить следы диэтилпирокарбоната с помощью нагревания до 100 °С в течение 15 мин (Kumar, Lindberg, 1972) или автоклавирования. В противном случае существует опасность, что остаточный диэтилпирокарбонат инактивирует РНК в результате карбоксиметилирования.

Весьма разумно отделить стеклянную и пластмассовую посуду, которая будет использована только для экспериментов с

РНК, отчетливо пометить ее и хранить в специально отведенном месте.

Основной потенциальный источник загрязнения РНКазой — это руки экспериментатора. Немного пользы принесет тщательная очистка посуды от загрязнений, если не позаботиться о том, чтобы РНКаза не попала в пробу с пальцев. Поэтому на всех этапах подготовки материалов и растворов, используемых для выделения и анализа РНК, и во время всех манипуляций с участием РНК следует надевать перчатки.

4. Тщательное приготовление растворов

Все растворы следует готовить, используя прокаленную стеклянную посуду, дистиллированную в стеклянном сосуде и автоклавированную воду и сухие реактивы, предназначенные для работы с РНК и отбираемые прокаленными шпателями. Когда это возможно, растворы следует обрабатывать 0,1%-ным диэтилпирокарбонатом по меньшей мере в течение 12 ч и автоклавировать (15 мин, влажный жар). Обратите внимание на то, что диэтилпирокарбонат нельзя использовать для обработки растворов, содержащих трис. В присутствии трис-буферов он крайне нестабилен и быстро распадается до этанола и двуокиси углерода.

ВЫДЕЛЕНИЕ мРНК ИЗ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Приведенный ниже метод представляет собой модификацию метода Фавалоро и др. (Favaloro et al., 1980), используемого для выделения мРНК из клеток млекопитающих, растущих в монослойной тканевой культуре. Однако он также может быть использован и для выделения мРНК из клеток, растущих в суспензии, или из любой ткани млекопитающих, которую можно диспергировать до единичных клеток.

1. Удалите ростовую среду и три-четыре раза промойте клеточные монослои охлажденным во льду фосфатным буфером, приготовленным на физиологическом растворе (PBS). Добавьте в каждую чашку по 2 мл охлажденного во льду PBS и поставьте чашки на лед.

2. С помощью специального резинового шпателя снимите поочередно из каждой чашки слой клеток. Пипеткой с широким носиком перенесите клеточную суспензию в центрифужную пробирку Corex и оставьте ее во льду, пока не будут сняты клетки из всех чашек.

3. Центрифугируйте суспензию при 2000 g 6 мин при 4 °С.

4. Удалите надосадочную жидкость с помощью отсасывания и ресуспендируйте осадок клеток в охлажденном во льду лизирующем буфере (из расчета 0,25 мл буфера на чашку диаметром 85 мм).

Лизирующий буфер содержит 0,14 М NaCl, 1,5 мМ $MgCl_2$, 10 мМ трис-HCl, pH 8,6, 0,5% NP-40 и 1000 ед./мл РНКазина или 10 мМ ванадилрибонуклеозидных комплексов.

5. Перемешайте в течение 10 с и затем наслоите суспензию клеток на равный объем лизирующего буфера, содержащего сахарозу (24%; вес/объем) и NP-40 (1%). Оставьте смесь во льду на 5 мин.

6. Центрифугируйте при 10 000 g 20 мин при 4 °С в бакет-роторе.

7. Отберите непрозрачный верхний (цитоплазматический) слой и добавьте равный объем буфера РК (2×). Буфер РК (2×) имеет состав: 0,2 М трис-HCl, pH 7,5, 25 мМ ЭДТА, 0,3 М NaCl и 2%-ный (вес/объем) SDS. Добавьте протеиназу К до конечной концентрации 200 мкг/мл. Перемешайте и инкубируйте смесь при 37 °С в течение 30 мин.

Примечание. Если необходимо выделить также и ядерную РНК, удалите прозрачную сахарозную фазу и ресуспендируйте находящийся на дне центрифужной пробирки осадок ядер в лизирующем буфере (0,25 мл буфера на чашку диаметром 85 мм). Добавьте равный объем буфера (2×) и протеиназу К до конечной концентрации 200 мкг/мл. Разрушение ядер и фрагментирование освобождающейся ДНК достигаются многократным продавливанием вязкого раствора через шприц со стерильной иглой для подкожных инъекций № 19. Инкубируйте при 37 °С в течение 30 мин.

8. Удалите белки однократной экстракцией смесью фенол — хлороформ.

9. Отберите водную фазу, добавьте к ней 2,5 объема этанола и оставьте при —20 °С по меньшей мере на 2 ч.

10. Центрифугируйте при 5000 g в течение 10 мин при 0 °С. Отбросьте надосадочную жидкость и промойте осадок 75%-ным этанолом, содержащим 0,1 М ацетат натрия, pH 5,2.

11. Вновь растворите нуклеиновые кислоты в небольшом объеме (из расчета 50 мкл на чашку диаметром 85 мм) раствора 50 мМ триса-HCl, pH 7,5, и 1 мМ ЭДТА. Затем добавьте $MgCl_2$ до конечной концентрации 10 мМ и РНКазин или ванадилрибонуклеозидные комплексы до конечной концентрации соответственно 2000 ед./мл или 2 мМ. Добавьте панкреатическую ДНКазу I (Worthington, свободную от РНКазы, DPFF), из которой РНКаза была удалена методом хроматографии на агарозе-5′-(4-аминофенилфосфорил)-уридин - 2′(3′) - фосфате (Miles), как описано Максвеллом и др. (Maxwell et al., 1977), или путем адсорбции на макалоиде (Schaffner, 1982) (с. 398). Инкубируйте в течение 30 мин при 37 °С.

12. Добавьте ЭДТА и SDS до конечных концентраций 10 мМ и 0,2% соответственно.

13. Один раз экстрагируйте раствор смесью фенол — хлороформ.

14. Добавьте ацетат натрия, pH 5,2, до 0,3 М и осадите нуклеиновые кислоты двумя объемами этанола. Храните РНК в 70%-ном этаноле при —70 °С.

Цитоплазматическую РНК можно далее очистить и освободить от примесей олигодезоксирибонуклеотидов методом хроматографии на oligo(dT)-целлюлозе (с. 193).

Примечания

А. Олигодезоксирибонуклеотиды, загрязняющие препараты ядерной РНК, можно удалить следующим образом:

1) ресуспендируя осадок в 20%-ном ацетате натрия с помощью многократного пипетирования;

2) центрифугируя суспензию в течение 10 мин в центрифуге Эппендорф;

3) удаляя надосадочную жидкость, растворяя осадок в буфере ТЕ и осаждая РНК этанолом.

Б. Как правило, цитоплазматическую РНК можно очистить методом хроматографии на oligo(dT)-целлюлозе без обработки ДНКазой.

ВЫДЕЛЕНИЕ СУММАРНОЙ РНК КЛЕТКИ

Ниже приведены два метода, используемые для выделения РНК из клеток, которые трудно фракционировать на цитоплазму и ядра (например, замороженные кусочки тканей), или из клеток, особенно богатых РНКазой (например, клеток поджелудочной железы).

Горячий фенольный метод с использованием гуанидина[1]

1. К кусочку ткани или отмытому осадку клеток, помещенному в пластмассовую центрифужную пробирку разового пользования, добавьте 4 М гуанидинизотиоцианат (приготовленный, как описано на с. 188). На 10^7 клеток возьмите 1 мл гуанидинизотиоцианата, а на 1 г ткани — 5 мл.

Примечание. Для кусочков ткани может потребоваться их измельчение с помощью гомогенизатора Omnimixer или Polytron.

2. Доведите температуру смеси до 60 °С и, поддерживая ее, наполните вязкой суспензией шприц с иглой для подкожных инъекций № 18. Сильным нажатием выдавите суспензию обратно в пробирку. Повторяйте эту процедуру до тех пор, пока

[1] Feramisco et al., 1982.

вязкость суспензии не уменьшится за счет фрагментирования освободившейся хромосомной ДНК.

3. Добавьте равный объем фенола, предварительно нагретого до 60 °С, и продолжайте продавливать эмульсию через шприц.

4. Добавьте 0,5 объема раствора, содержащего 0,1 М ацетат натрия, pH 5,2, 10 мМ трис-HCl, pH 7,4, и 1 мМ ЭДТА.

5. Добавьте равный объем смеси хлороформ — изоамиловый спирт (24 : 1) и энергично встряхивайте в течение 10—15 мин, поддерживая температуру 60 °С.

6. Охладите смесь во льду и центрифугируйте при 2000 g в течение 10 мин при 4 °С.

7. Отберите водную фазу и вновь экстрагируйте ее смесью фенол — хлороформ.

8. Отцентрифугируйте смесь, отберите водную фазу и дважды вновь экстрагируйте ее хлороформом.

9. Добавьте 2 объема этанола и оставьте смесь при —20 °С на 1—2 ч.

10. Осадите РНК центрифугированием при 12 000 g в течение 20 мин при 4 °С.

11. Растворите осадок в первоначальном объеме (стадия 1) раствора, имеющего состав: 0,1 М трис-HCl, pH 7,4, 50 мМ NaCl, 10 мМ ЭДТА и 0,2% SDS.

Добавьте протеиназу К до конечной концентрации 200 мкг/мл. Инкубируйте 1—2 ч при 37 °С.

12. Нагрейте смесь до 60 °С. Добавьте 0,5 объема фенола, предварительно нагретого до 60 °С, и перемешайте. Добавьте 0,5 объема хлороформа и интенсивно перемешивайте при 60 °С в течение 10 мин.

13. Охладите смесь во льду и центрифугируйте при 2000 g в течение 10 мин при 4 °С.

14. Проведите еще одну экстракцию смесью фенол — хлороформ при 60 °С и затем дважды экстрагируйте хлороформом при комнатной температуре.

15. Осадите нуклеиновые кислоты этанолом с последующим центрифугированием и промойте осадок 70%-ным этанолом. Храните РНК в 70%-ном этаноле при —70 °С.

16. Растворите РНК в стерильной воде. Выход РНК составляет около 5—10 мг на $5 \cdot 10^8$ клеток.

Метод с использованием гуанидина и хлористого цезия[1]

1. К кусочку ткани или осадку клеток добавьте 5 объемов смеси, имеющей состав: 6 М гуанидинизотиоцианат, 5 мМ цитрат натрия, pH 7,0, 0,1 М β-меркаптоэтанол и 0,5%-ный саркозил.

[1] Glisin et al., 1974; Ullrich et al., 1977.

Гомогенизируйте ткань или суспендируйте осадок клеток.

2. Добавьте по 1 г хлористого цезия на каждые 2,5 мл гомогената.

3. Наслоите гомогенат на 1,2 мл раствора 5,7 М CsCl в 0,1 М ЭДТА, pH 7,5, в полиалломерную (или эквивалентную ей) пробирку ротора SW 50.1 Beckman. (Можно использовать центрифужные пробирки другого типа; см. Chirgwin et al., 1979).

4. Центрифугируйте при 30 000 об/мин в течение 20 ч при 20 °С. Этот метод основан на том, что плавучая плотность РНК в хлористом цезии значительно выше, чем у других макромолекул клетки. Во время центрифугирования РНК образует осадок на дне пробирки, в то время как бóльшая часть ДНК и белка располагается в верхней ее части.

5. Отбросьте надосадочную жидкость, тщательно высушите стенки центрифужной пробирки и растворите осадок РНК в смеси, содержащей 10 мМ трис-HCl, pH 7,4, 5 мМ ЭДТА, 1%-ный SDS.

6. Экстрагируйте один раз смесью хлороформ — 1-бутанол (4 : 1) и перенесите водную фазу в чистую пробирку. Вновь экстрагируйте органическую фазу равным объемом раствора, имеющего состав: 10 мМ трис-HCl, pH 7,4, 5 мМ ЭДТА и 1%-ный SDS.

Обе водные фазы объедините.

7. Добавьте 0,1 объема 3 М ацетата натрия, pH 5,2, и 2,2 объема этанола. Оставьте смесь при —20 °С по меньшей мере на 2 ч. Осадите РНК центрифугированием.

8. Растворите осадок в 1 мл H_2O и переосадите этанолом. Храните РНК в 70%-ном этаноле при —70 °С.

ПОЛУЧЕНИЕ poly(A)+-РНК

Разработано несколько методов разделения полиаденилированных и неполиаденилированных РНК. Наиболее предпочтительный метод — хроматография на oligo(dT)-целлюлозе (Edmonds et al., 1971; Aviv, Leder, 1972), которую можно приготовить, как описано Джилхэмом (Gilham, 1964), или купить. На одном миллилитре oligo(dT)-целлюлозы можно фракционировать до 10 мг РНК.

1. Уравновесьте oligo(dT)-целлюлозу стерильным буфером для нанесения РНК. Для стерилизации этого буфера смешайте необходимые количества исходных растворов триса, хлорида натрия и ЭДТА, не содержащих РНКазы, и автоклавируйте. Добавьте 20%-ный исходный раствор SDS, прогретый при 65 °С в течение 1 ч. Вместо триса можно использовать 0,05 М цитрат натрия, и тогда буферы для нанесения РНК и SDS могут быть обработаны диэтилпирокарбонатом.

Буфер для нанесения РНК имеет состав: 20 мМ трис-HCl, pH 7,6 0,5 М NaCl, 1 мМ ЭДТА и 0,1%-ный SDS.

2. Заполните oligo(dT)-целлюлозой колонку объемом 1 мл, приготовленную из пастеровской пипетки, или Dispocolumn. Промойте ее тремя объемами колонки каждого из следующих растворов: а) стерильной H_2O, б) 0,1 М NaOH и 5 мМ ЭДТА; в) стерильной H_2O.

3. Убедитесь, что pH жидкости на выходе колонки меньше 8,0.

4. Промойте колонку пятью объемами стерильного буфера для нанесения РНК.

5. Растворите РНК в стерильной воде и прогрейте в течение 5 мин при 65 °С. Добавьте равный объем буфера для нанесения (2×), охладите пробу до комнатной температуры и нанесите на колонку. Соберите несвязавшийся материал, снова прогрейте при 65 °С, охладите и повторно нанесите на колонку.

6. Промойте колонку 5—10 объемами буфера для нанесения с последующим промыванием четырьмя объемами этого же буфера, содержащего 0,1 М NaCl.

Примечание. Определяйте D_{260} каждой фракции, сходящей с колонки. Вначале при прохождении через колонку poly(A)$^-$-РНК значения D_{260} будут очень высокими. В последующих фракциях материал, поглощающий при 260 нм, будет отсутствовать или его будет очень мало.

7. Элюируйте poly (A)$^+$-РНК 2—3 объемами колонки стерильного раствора, имеющего состав: 10 мМ трис-HCl, pH 7,5, 1 мМ ЭДТА и 0,05%-ный SDS.

При необходимости элюированную poly(A)$^+$РНК можно повторно очистить с помощью хроматографии на oligo(dT)-целлюлозе. Для этого доведите концентрацию хлорида натрия в растворе элюированной РНК до 0,5 М и повторите стадии 5—7.

8. Добавьте ацетат натрия (3 М, pH 5,2) до конечной концентрации 0,3 М. Осадите РНК 2,2 объема этанола при —20 °С. Промойте осадок 70%-ным этанолом.

9. Растворите осадок в стерильной воде. Выход poly(A)$^+$-РНК должен достигать 1—5 мкг на 10^7 клеток. Регенерируйте колонку последовательными промываниями гидроксидом натрия, водой и буфером для нанесения, как описано выше в пп. 2—4.

Примечания

А. В случае, когда на oligo(dT)-целлюлозе необходимо обработать много проб РНК, более эффективным может оказаться проведение адсорбции и элюирования нескольких проб одновременно. После растворения РНК в буфере для нанесения

(стадия 5) добавьте по 0,3 г сухого порошка oligo(dT)-целлюлозы на каждые 0,5 мг РНК. Отцентрифугируйте смесь при 1500 g 4 мин при 15 °С и промойте oligo(dT)-целлюлозу 4—5 раз 5 мл буфера для нанесения при комнатной температуре. Элюируйте poly(A)+-РНК, промывая oligo(dT)-целлюлозу 4 раза по 1 мл стерильным раствором, имеющим состав: 10 мМ трис-HCl, pH 7,5, 1 мМ ЭДТА и 0,05%-ный SDS.

Далее продолжайте, начиная со стадии 8 (см. выше).

Б. Натриевая соль додецилсульфата обладает относительно низкой растворимостью, что может затруднять протекание его раствора через колонки. Этого можно избежать, заменив в составе буфера для нанесения хлорид натрия хлоридом лития.

В. РНК следует хранить в 70%-ном этаноле при —70 °С.

ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗ РНК

Существуют две системы, наиболее часто используемые при определении молекулярной массы РНК и разделении РНК различных размеров для осуществления переноса «Northern» или трансляции in vitro:

1) электрофорез в агарозных гелях после денатурации РНК глиоксалем и диметилсульфоксидом;

2) электрофорез в агарозных гелях, содержащих гидроксид метилртути или формальдегид.

В обоих случаях РНК полностью денатурирована и скорость ее перемещения в геле прямо пропорциональна логарифму молекулярной массы.

Электрофорез РНК, денатурированной глиоксалем и диметилсульфоксидом[1]

1. В стерильной эппендорфовской пробирке смешайте 2,7 мкл 6 М глиоксаля, 8,0 мкл диметилсульфоксида (DMSO), 1,6 мкл 0,1 М NaH_2PO_4, pH 7,0, и 3,7 мкл РНК (до 20 мкг). Глиоксаль обычно получают в виде 40%-ного раствора (6 М). Поскольку на воздухе он легко окисляется, перед использованием раствор глиоксаля необходимо деионизовать, обрабатывая ионообменной смолой (Bio-Rad AG501-X8) до тех пор, пока его pH не станет нейтральным. После этого раствор хранят при температуре —20 °С, разделив его на небольшие аликвоты, в плотно закрытых пробирках.

Раствор фосфата натрия готовят следующим образом а) растворяют 0,1 моль NaH_2PO_4 в минимальном объеме воды; б) доводят pH раствора до 7,0 концентрированной фосфор-

[1] Mc Master, Carmichael, 1977.

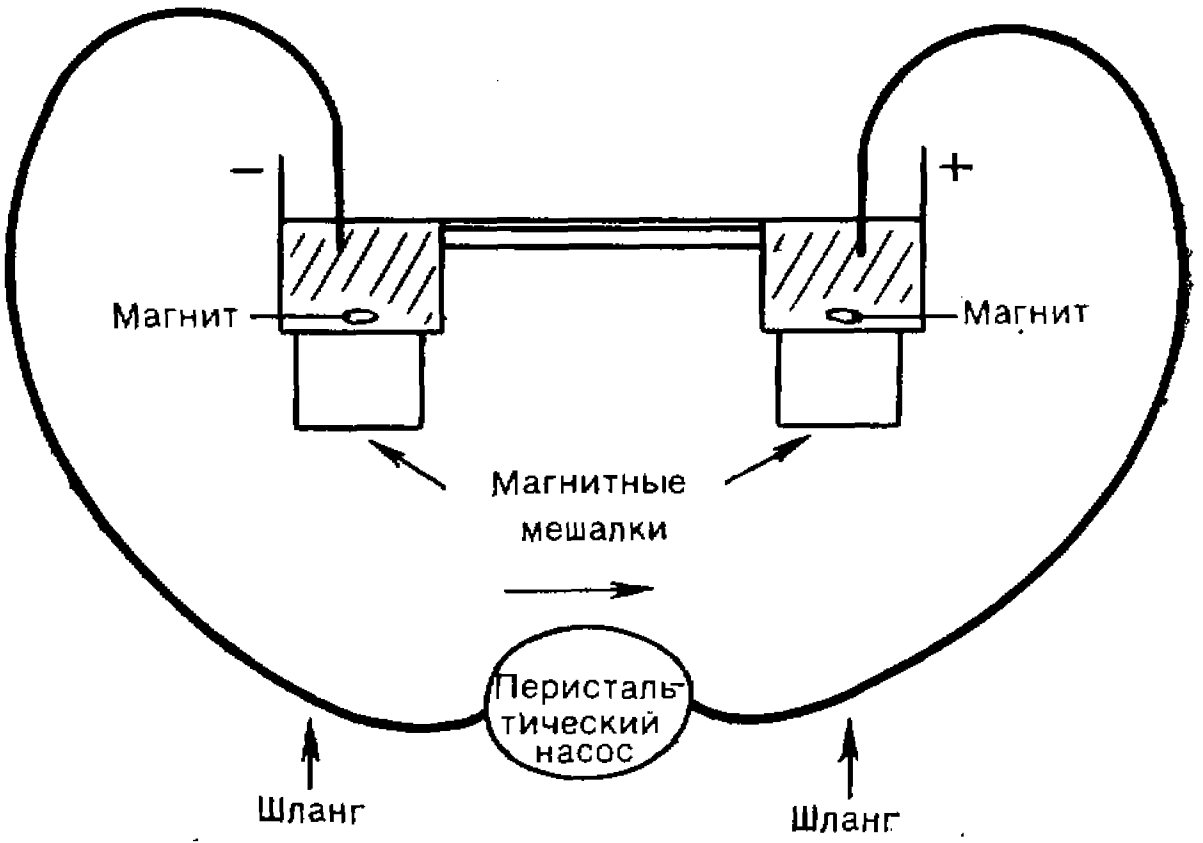


Рис. 6.1.

ной кислотой; в) доводят объем раствора водой до 1 л и автоклавируют.

2. Инкубируйте раствор РНК при 50 °С в течение 60 мин в плотно закрытой пробирке.

3. Во время инкубации РНК приготовьте горизонтальный агарозный гель. Для РНК размером до 1 kb используйте 1,4%-ную агарозу; для РНК бóльших размеров — 1%-ную агарозу. Готовьте гели и проводите электрофорез в 0,01 М NaH_2PO_4, pH 7,0.

Примечание. Поскольку глиоксаль вступает в реакцию с бромистым этидием, готовят гели и ведут электрофорез в отсутствие этого красителя.

4. Охладите раствор РНК до 20 °С, добавьте 4 мкл буфера для нанесения и немедленно наносите пробу. В качестве маркеров для определения молекулярной массы используйте глиоксилированные РНК (например, 18S- и 28S-рибосомные РНК; глобиновую 9S-мРНК).

Буфер для нанесения проб имеет состав: 50%-ный глицерин, 0,01 М NaH_2PO_4, pH 7,0 и 0,4%-ный бромфеноловый синий.

5. Через гель, погруженный в буфер, пропускайте ток при напряженности поля 3—4 В/см. Необходимо постоянно перемешивать буфер (рис. 6.1) для поддержания величины pH в допустимых пределах (при pH>8 глиоксаль диссоциирует из комплекса с РНК). Вместо этого можно менять буфер каждые 30 мин.

6. В конце электрофореза гель можно покрасить бромистым этидием (водным раствором с концентрацией 0,5 мкг/мл) и сфотографировать, как описано на с. 167.

Перенос глиоксилированной РНК на нитроцеллюлозные фильтры

После окончания электрофореза глиоксилированную РНК можно сразу перенести с агарозных гелей на нитроцеллюлозные фильтры; никакой дальнейшей обработки геля не требуется (Thomas, 1980). Гель приводят в соприкосновение с нитроцеллюлозным фильтром и осуществляют перенос так, как это описано на с. 344 и далее.

Примечания

а) Буфером при переносе (блоттинге) служит SSC (20×; 3 М NaCl и 0,3 М трехзамещенный цитрат натрия).

б) Нитроцеллюлозные фильтры следует замочить в воде, а непосредственно перед использованием выдержать 5 мин в растворе SSC (20×).

в) Перенос РНК происходит менее эффективно, если гель предварительно замачивали в буфере SSC (20×) или РНК была окрашена бромистым этидием.

г) Полный перенос РНК происходит за 15—24 ч.

д) Перед высушиванием не следует промывать фильтр более разбавленными растворами, иначе основная часть РНК будет потеряна.

е) Фильтры высушивают при комнатной температуре и прокаливают в вакуумном сушильном шкафу при 80 °С в течение 2 ч.

Электрофорез РНК в гелях, содержащих формальдегид[1]

1. Приготовьте рабочий буфер для электрофореза и формальдегид. *Рабочий буфер* имеет состав: 0,2 М морфолинпропансульфокислота (MOPS), pH 7,0, 50 мМ ацетат натрия и 1 мМ ЭДТА, pH 8,0. На свету или при автоклавировании этот буфер со временем желтеет. С изменением цвета его свойства заметно не меняются.

Формальдегид (мол. масса 30,03) обычно поступает в продажу в виде 37%-ного водного раствора (12,3 М). Проверьте pH концентрированного раствора, который должен быть больше 4,0. Работать с концентрированным раствором формальдегида и хранить его следует в вытяжном шкафу.

2. Приготовьте гель, расплавив агарозу в воде, а затем охладив раствор до 60 °С. Добавьте рабочий буфер (10×) и формальдегид так, чтобы конечная концентрация буфера была в

---

[1] Lehrach et al., 1977; Goldberg, 1980; Seed, Goldberg, неопубликованные данные.

10 раз меньше, а для формальдегида составляла 2,2 М. (Одна часть исходного раствора формальдегида должна быть разбавлена 4,6 частями раствора агарозы.)

Примечание. Фракционирующие свойства формальдегидных гелей для различных концентраций агарозы были исследованы Лерачем и др. (Lehrach et al., 1977).

3. Приготовьте пробу, смешав в стерильной эппендорфовской пробирке 4,5 мкл РНК (не более 20 мкг), 2 мкл рабочего буфера (10×), 3,5 мкл формальдегида, 10 мкл формамида. Инкубируйте при 55 °С 15 мин.

Примечание. Формамид легко окисляется на воздухе, и его следует деионизовать, обрабатывая ионообменной смолой (Bio-Rad AG501-X8) до достижения нейтрального pH. Затем его перекристаллизовывают при 0 °С и хранят при —20 °С, разделив на небольшие аликвоты, в плотно закрытых пробирках.

4. Добавьте 2 мкл стерильного буфера для нанесения проб.

Буфер для нанесения проб имеет состав: 50%-ный глицерин, 1 мМ ЭДТА, 0,4%-ный бромфеноловый синий и 0,4%-ный ксилолцианол.

5. Нанесите пробы РНК на гель. Удобными маркерами для определения молекулярной массы РНК служат фрагменты ДНК, полученные путем рестрикции. Их обработку и электрофорез следует проводить точно так же, как и в случае препаратов РНК. Целесообразно использовать меченые ДНК-маркеры или маркеры, которые можно обнаружить с помощью меченого гибридизационного зонда, поскольку флуоресценция бромистого этидия в денатурированных формальдегидом нуклеиновых кислотах слишком слаба. Если такие маркеры отсутствуют, можно использовать следующую методику:

а) Нанесите на гель достаточное количество ДНК, чтобы на полосу приходилось по меньшей мере 50—100 нг ДНК.

б) До стадии щелочного гидролиза (см. ниже) вырежьте из геля полосы, содержащие маркеры, и промойте водой в течение 2 ч, меняя ее 4—5 раз.

в) Промойте полосы 0,1 М ацетатом аммония в течение 1 ч, меняя раствор 2 раза.

г) Окрашивайте 1 ч раствором бромистого этидия (0,5 мкг/мл) в 0,1 М ацетате аммония и 0,1 М β-меркаптоэтаноле.

д) Отмывайте краску в течение 45 мин раствором 0,1 М ацетата аммония и 0,01 М β-меркаптоэтанола.

Перенос РНК, денатурированной формальдегидом, на нитроцеллюлозу

1. После окончания электрофореза промойте гель в течение 5 мин в нескольких сменах воды.

Примечание. Гели, содержащие формальдегид, более лом-

кие, чем неденатурирующие агарозные гели. При обращении с ними следует соблюдать осторожность.

2. Вымочите гель в избытке 50 мМ NaOH и 10 мМ NaCl в течение 45 мин при комнатной температуре.

Примечание. Частичный щелочной гидролиз улучшает перенос высокомолекулярной РНК.

3. Нейтрализуйте гель, вымачивая его в 0,1 М трис-HCl, pH 7,5, в течение 45 мин при комнатной температуре.

4. Вымочите гель в буфере SSC (20×) в течение 1 ч.

5. Перенесите РНК на нитроцеллюлозу с помощью метода, описанного на с. 197. Полный перенос происходит за 3—4 ч.

6. По окончании переноса промойте фильтр раствором SSC (3×), просушите его на воздухе 1—2 ч и затем прокалите в течение 3—4 ч при 80 °С под вакуумом.

Электрофорез РНК в гелях, содержащих гидроксид метилртути[1]

Гидроксид метилртути взаимодействует преимущественно по аминным связям уридина и гуанозина в РНК. Поскольку в норме эти связи участвуют в спаривании оснований по правилу Уотсона — Крика, гидроксид метилртути является эффективным денатурирующим агентом, полностью разрушающим вторичную структуру РНК.

Гидроксид метилртути вступает также в обратимую реакцию с различными молекулами небольшого размера, например

$$CH_3HgOH + RSH \longrightarrow CH_3HgSR + H_2O.$$

Отсюда следует, что сульфгидрильные соединения могут быть использованы для устранения взаимодействия CH_3Hg^+ с нуклеиновыми кислотами.

Предостережение. Гидроксид метилртути — чрезвычайно токсичное и летучее соединение. Поэтому все операции по приготовлению гелей, проведению электрофореза, разрезанию гелей и обработке срезов следует проводить в вытяжном шкафу. Со всеми твердыми и жидкими отходами необходимо обращаться как с токсичными веществами и удалять их соответствующим образом.

1. Приготовьте гель (концентрация агарозы 1—1,5% в зависимости от размера исследуемой РНК) в рабочем буфере. Гидроксид метилртути в состав рабочего буфера не входит. Это соединение электрически нейтрально и не может быстро двигаться в геле.

Рабочий буфер имеет состав: 50 мМ борная кислота, 5 мМ борат натрия и 10 мМ сульфат натрия.

[1] Bailey, Davidson, 1976.

Примечание. Не следует использовать буферные растворы, содержащие азотистые основания, ЭДТА или ионы хлора, так как эти вещества взаимодействуют с гидроксидом метилртути.

2. Смешайте равные объемы раствора РНК (в стандартную щель размером 0,6 см можно вносить не более 10 мкг РНК) и буфера (2×) для нанесения.

Буфер (2×) для нанесения РНК содержит 25 мкл гидроксида метилртути, 500 мкл рабочего буфера (4×), 200 мкл 100%-ного глицерина, 275 мкл H_2O и 0,2% (вес/объем) бромфенолового синего.

3. Нанесите пробы на гель и пропускайте ток в течение 12—16 ч при напряженности поля 1,5 В/см. Во избежание образования в геле градиента pH буфер следует перемешивать.

4. По окончании электрофореза РНК можно окрасить, инкубируя гель в течение 30 мин в 0,5 М ацетате аммония с 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Аммониевая соль связывает метилртуть и улучшает взаимодействие красителя с РНК.

5. С гелей, содержащих метилртуть, РНК можно перенести на нитроцеллюлозные фильтры. Перенос РНК оказывается мало эффективным, если гель предварительно был замочен в SSC (20×) или РНК была окрашена бромистым этидием.

Элюирование РНК из агарозных гелей, содержащих гидроксид метилртути[1]

1. Гель готовят и проводят электрофорез, как описано выше, за исключением того, что в данном случае используют легкоплавкую агарозу (Wieslander, 1979).

2. После электрофореза вымочите гель в 0,1 М дитиотрейтоле в течение 30—40 мин.

3. Разрежьте гель на полоски шириной примерно 3 мм. Окрашенные полосы, содержащие 18S- и 28S-рибосомную РНК и 9S-глобиновую РНК, могут служить ориентирами при определении молекулярной массы интересующих экспериментатора фракций.

4. К каждому срезу геля добавьте примерно 4 объема 0,5 М ацетата аммония, предварительно нагретого до 65 °С. Убедитесь, что объем буфера для экстракции достаточен для полного расплавления геля. В противном случае при последующей экстракции фенолом и хлороформом агароза перейдет в водную фазу.

5. Прогрейте смесь при 65 °С до расплавления геля, энергично встряхивая ее.

6. Экстрагируйте расплавленный гель фенолом при комнатной температуре. Центрифугируйте при 2000 g в течение 10 мин

---

[1] Lemischka et al., 1981.

при 4 °С. Во время экстракции фенолом и хлороформом агароза превращается в порошок, который после центрифугирования образует интерфазный слой.

7. Вновь экстрагируйте водную фазу еще два раза хлороформом. Повторные экстракции хлороформом необходимы для удаления агарозы.

8. Осадите РНК этанолом и промойте осадок 70%-ным этанолом с 0,05 М ацетатом аммония.

Примечание. Экстрагированная РНК хорошо транслируется в бесклеточной системе синтеза белка и служит эффективной матрицей для синтеза кДНК в реакции с обратной транскриптазой.

Окрашивание РНК после переноса на нитроцеллюлозные фильтры

Этот метод может быть использован для определения размера РНК, перенесенной на нитроцеллюлозный фильтр, и эффективности переноса (Efstratiadis, неопубликованные данные). Для окрашивания из прокаленного фильтра может быть вырезана полоса; альтернативный вариант состоит в том, что после гибридизации и экспозиции с рентгеновской пленкой окрашивают весь фильтр целиком.

1. Вымочите высушенный фильтр в 5%-ной уксусной кислоте в течение 15 мин при комнатной температуре.

2. Перенесите фильтр на 5—10 мин при комнатной температуре в раствор, содержащий 0,5 М ацетат натрия, pH 5,2, и 0,04%-ный метиленовый синий.

3. Промойте фильтр в воде в течение 5—10 мин. Маркерные РНК (28S- и 18S-рибосомные РНК и 9S-глобиновая мРНК) проявляются в виде полос, а суммарная poly(A)$^+$-РНК млекопитающих — в виде пятна.

КАРТИРОВАНИЕ РНК С ПОМОЩЬЮ НУКЛЕАЗЫ S1

Картирование с помощью нуклеазы S1 используют для определения положений концов молекул РНК и точек сплайсинга внутри них относительно специфических участков в ДНК-матрице (например, положений точек расщепления рестриктирующей эндонуклеазой). Этот метод основан на данных Кейзи и Дэвидсона (Casey, Davidson, 1977), свидетельствующих о том, что можно подобрать условия гибридизации, сводящие к минимуму образование гибридов ДНК—ДНК, но способствующие образованию гибридов ДНК — РНК. Эти гибриды затем обрабатывают нуклеазой S1, специфически расщепляющей одноцепочечные участки нуклеиновых кислот, и анализируют с помощью электрофореза в геле (Berk, Sharp, 1977).

Несмотря на существование более тонких методов (например, на РНК при использовании затравки могут быть синтезированы кДНК-копии и затем определены их последовательности) (Ghosh et al., 1978; Reddy et al., 1978), данные, полученные с помощью нуклеазы S1, оказываются достаточно точными для большинства случаев. Кроме того, этот метод быстрый, простой и чрезвычайно чувствительный: с его помощью можно обнаружить количество материала, эквивалентное одной молекуле РНК на клетку.

В приведенном ниже методе в общем виде описана простейшая техника картирования с помощью нуклеазы S1. Более детальное описание с подробным анализом тонкостей этого метода приводится в отличном обзоре Фавалоро и др. (Favaloro et al., 1980).

1. Смешайте в стерильной эппендорфовской пробирке 0,1—1,0 мкг ДНК и 0,5—500 мкг РНК. При необходимости добавьте тРНК-носитель, чтобы общее количество РНК достигало 100—200 мкг.

Примечание. Количество ДНК, используемое в реакции гибридизации, зависит от ее молекулярной массы. Для фрагментов длиной около 5 kb требуется 0,1 мкг ДНК; в случае более коротких фрагментов количество ДНК следует пропорционально уменьшить.

Необходимое количество РНК зависит от концентрации интересующих исследователя последовательностей. Для обнаружения последовательностей, присутствующих в небольших количествах, в гибридизационную смесь объемом 50 мкл можно внести до 250 мкг РНК. Такие количества ДНК и РНК являются подходящими для гибридизации в объеме 50 мкл. Если компоненты реакции имеются в ограниченном количестве, то объем гибридизационной смеси можно уменьшить до 10 мкл. Для облегчения манипуляций на последующих стадиях гибридизацию целесообразно проводить в объеме 50 мкл или меньше.

2. Осадите смесь ДНК и РНК этанолом (при —70 °С, 15 мин).

3. Ресуспендируйте осадок в 30 мкл буфера для гибридизации (см. ниже). Многократно набирайте пипеткой и выдувайте из нее смесь, чтобы не осталось сомнений в полном растворении осадка.

Буфер для гибридизации имеет состав: 40 мМ PIPES, pH 6,4, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0, 0,4 М NaCl и 80%-ный формамид.

Примечания. а) Используйте динатриевую соль PIPES.

б) Используйте формамид, деионизованный с помощью ионообменной смолы (Bio-Rad AG501-X8), перекристаллизованный при 0 °С и хранящийся в виде небольших аликвот в плотно закрытых пробирках.

4. Для денатурации ДНК поместите пробирки в водяную баню с температурой 72 °С на 10—15 мин. [Успешно были использованы и более высокие температуры (75—85 °С).]

5. Быстро перенесите пробирки в водяную баню с необходимой для гибридизации температурой. При переносе не допускайте охлаждения пробирок до температуры ниже температуры гибридизации.

Температуру гибридизации, зависящую от содержания в ДНК G—C-пар, выбирают так, чтобы свести к минимуму образование гибридов ДНК—ДНК, не препятствуя в то же время ДНК — РНК-гибридизации. Ниже указаны примерные температуры гибридизации для ДНК с различным содержанием G+C:

G+C, %	Температура гибридизации, °С
41	49
49	52
58	60

Рекомендуется провести реакции гибридизации при разных температурах, чтобы подобрать оптимальную температуру для используемой РНК.

6. Проведите гибридизацию в течение 3 ч. Откройте крышку пробирки с гибридизационной смесью, оставляя пробирку погруженной в воду. Быстро добавьте 0,3 мл холодного буфера для нуклеазы S1 (обычно содержащего 100—1 000 ед./мл нуклеазы S1). Хорошо перемешайте и инкубируйте в течение необходимого времени при соответствующей температуре (см. примечание ниже).

Буфер для нуклеазы S1 имеет состав: 0,28 М NaCl, 0,05 М ацетат натрия, pH 4,6, 4,5 мМ $ZnSO_4$ и 20 мкг/мл одноцепочечной ДНК-носителя.

Примечание. Обработку разных РНК — ДНК-гибридов проводили при различных температурах и концентрациях нуклеазы S1. Инкубация при 20 °С сводит к минимуму расщепление участков РНК, соответствующих петлям в ДНК (это существенно для анализа с помощью электрофореза в нейтральном геле). Для полного расщепления при использовании денатурирующих гелей могут потребоваться более высокие температуры (37—45 °С). Как правило, для каждого гибрида РНК — ДНК следует подбирать оптимальные условия обработки нуклеазой S1 и температуру инкубации.

7. Охладите реакционную смесь до 0 °С. Для остановки реакции добавьте 50 мкл 4,0 М ацетата аммония, 0,1 М ЭДТА.

8. Экстрагируйте один раз смесью фенол — хлороформ. Добавьте 20 мкг тРНК-носителя. Осадите равным объемом изопропанола (при —70 °С, 15 мин).

9. Растворите осадок в 40 мкл буфера ТЕ, pH 7,4.

10. Добавьте 10 мкл буфера для нанесения на гель (смесь 50%-ного глицерина и 0,2%-ного бромкрезолового зеленого) и хорошо перемешайте.

11. Нанесите половину пробы на нейтральный агарозный гель. Добавьте в оставшуюся часть пробы NaOH до конечной концентрации 0,05 М и нанесите ее на щелочной агарозный гель.

12. После электрофореза перенесите ДНК с обоих гелей на нитроцеллюлозные фильтры, как описано на с. 344 и далее. (Щелочной гель не требует вымачивания в денатурирующем растворе.)

13 Проведите гибридизацию ДНК, иммобилизованной на фильтре, с соответствующим ^{32}P-ДНК-зондом.

Глава 7

СИНТЕЗ И КЛОНИРОВАНИЕ кДНК

Ферментативный синтез двухцепочечной кДНК на poly(A)$^+$-мРНК и встраивание этой ДНК в бактериальные плазмиды стало основным методом молекулярной биологии эукариот (см. обзоры Efstratiadis, Villa-Komaroff, 1979; Williams, 1981). Несмотря на то, что было предложено множество различных способов синтеза двухцепочечных ДНК — копий мРНК, наиболее распространенный метод включает: синтез первой цепи кДНК с помощью обратной транскриптазы (РНК-зависимой ДНК-полимеразы), удаление РНК-матрицы щелочным гидролизом, синтез второй цепи ДНК в реакции с ДНК-полимеразой I E. coli или обратной транскриптазой (с использованием в качестве затравки шпильки на 3′-конце первой цепи ДНК) и, наконец, расщепление петли, связывающей первую и вторую цепи кДНК, нуклеазой S1, специфически разрушающей одноцепочечные участки нуклеиновых кислот. В этой главе мы суммируем важные методические аспекты каждого этапа синтеза двухцепочечной кДНК и затем рассматриваем методики, необходимые для присоединения кДНК к плазмидным клонирующим векторам.

СИНТЕЗ кДНК

СИНТЕЗ ПЕРВОЙ ЦЕПИ кДНК

К настоящему времени опубликован ряд статей, содержащих описания оптимальных условий синтеза «полноразмерных» кДНК-транскриптов (Efstratiadis et al., 1976; Buell et al., 1978; Retzel et al., 1980). Поскольку различные мРНК имеют различную матричную активность, условия, оптимальные для транскрипции одного вида мРНК, могут оказаться неподходящими для другого вида. Обычно при работе с гетерогенными популяциями мРНК используют условия, обеспечивающие максимальный общий выход кДНК. Важное значение при этом имеют описываемые ниже параметры.

Обратная транскриптаза

Наиболее существенным фактором при синтезе длинных кДНК является качество обратной транскриптазы, используемой в реакции. До последнего времени получением обратной транскриптазы занимался в основном доктор Дж. В. Берд (Life Sciences, Inc., 1509½ 49 th Street South, St. Petersburg, FL 33707), предоставлявший этот фермент по контракту Национальным институтам здравоохранения (NIH). После завершения научной программы NIH фирма Life Sciences, Inc. начала открытую продажу фермента. Обратная транскриптаза поступает также в продажу из Исследовательских лабораторий Бетесды (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MD) и фирмы Boehringer Mannheim Biochemicals (Indianapolis, IN).

Несмотря на то что качество этих ферментов в целом хорошее, количество примеси РНКазы в них варьирует от партии к партии. (Некоторые поставщики сами определяют содержание примеси РНКазы и предоставляют эти данные.) Этот недостаток можно устранить с помощью дополнительной очистки фермента (Marcus et al., 1974; Faras, Dibble, 1975; Kacian, 1977; Myers et al., 1980) или использования в реакции обратной транскрипции сильных ингибиторов РНКазы, таких, как ванадилрибонуклеозидные комплексы или РНКазин. Многие факторы, считавшиеся ранее существенными для эффективного синтеза полноразмерных кДНК-транскриптов, в действительности сводятся к защите РНК-матрицы от действия РНКаз (Buell et al., 1978; Retzel et al., 1980). Например, ранее считали, что добавление пирофосфата натрия или рибонуклеозидтрифосфатов повышает эффективность считывания РНК обратной транскриптазой (Kacian et al., 1972). Однако при использовании высокоочищенной обратной транскриптазы добавление этих соединений не дает никакого эффекта (Retzel et al., 1980).

Другим фактором, важным для достижения наибольшего выхода полноразмерной кДНК, является соотношение количеств обратной транскриптазы и мРНК-матрицы (Friedman, Rosbash, 1977). При данном количестве матрицы выход и размер кДНК-транскрипта увеличиваются с увеличением количества обратной транскриптазы. В одной из работ максимальный выход полноразмерных транскриптов был достигнут при соотношении 80 ед. фермента на 1 мкг матрицы, т. е. при 30—60-кратном превышении концентрации фермента над концентрацией матрицы (Friedman, Rosbash, 1977). Такое превышение может быть достигнуто при использовании в реакции высокоочищенного фермента и ингибиторов РНКазы.

pH

Оптимальным для эффективного включения предшественников и получения полноразмерных транскриптов является pH 8,3.

Отклонение на ±0,5 единицы pH приводит к 5-кратному уменьшению выхода полноразмерных транскриптов. Из множества опробованных буферных систем лучшей оказалась система с трис-буфером.

Одновалентные катионы

На транскрипционную активность различных матриц существенно влияет ионный состав среды. При использовании ионов калия получают более длинные транскрипты, чем в случае ионов натрия. Оптимальная концентрация ионов калия как с точки зрения общего выхода продукта, так и длины синтезируемой кДНК составляет 140—150 мМ.

Двухвалентные катионы

Двухвалентные катионы абсолютно необходимы для обеспечения активности обратной транскриптазы. Ферментативная активность отсутствует при концентрациях ионов $Mg^{2+}<4$ мМ; оптимальная концентрация этих ионов для синтеза полноразмерных транскриптов составляет 6—10 мМ.

Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты

Для эффективного синтеза кДНК особенно важно использовать высокие концентрации каждого из четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (dNTP; Efstratiadis et al., 1976; Retzel et al., 1980). Если концентрация хотя бы одного из них падает ниже 10—50 мкМ, выход полноразмерных транскриптов значительно уменьшается. При использовании РНК вируса миелобластоза птиц (AMV) в качестве матрицы максимальный выход полноразмерных кДНК достигался при концентрации всех четырех dNTP 75 мкМ (Retzel et al., 1980). Однако, поскольку при концентрации dNTP в диапазоне от 0,1 до 1 мМ наблюдается слабое ингибирование транскрипции или оно вообще отсутствует, обычно используют dNTP в концентрации 200—250 мкМ.

СИНТЕЗ ВТОРОЙ ЦЕПИ кДНК

По невыясненным до настоящего времени причинам на 3′-концах одноцепочечных кДНК могут образовываться структуры типа шпилек, которые можно использовать в качестве затравки при синтезе второй цепи кДНК с помощью ДНК-полимеразы I *E. coli* или обратной транскриптазы (рис. 7.1). Несмотря на существование множества предположений относительно структуры шпилек на конце кДНК и механизма их образования, это явление полностью еще не изучено.

Условия, при которых с помощью ДНК-полимеразы I была впервые синтезирована полноразмерная двухцепочечная кДНК

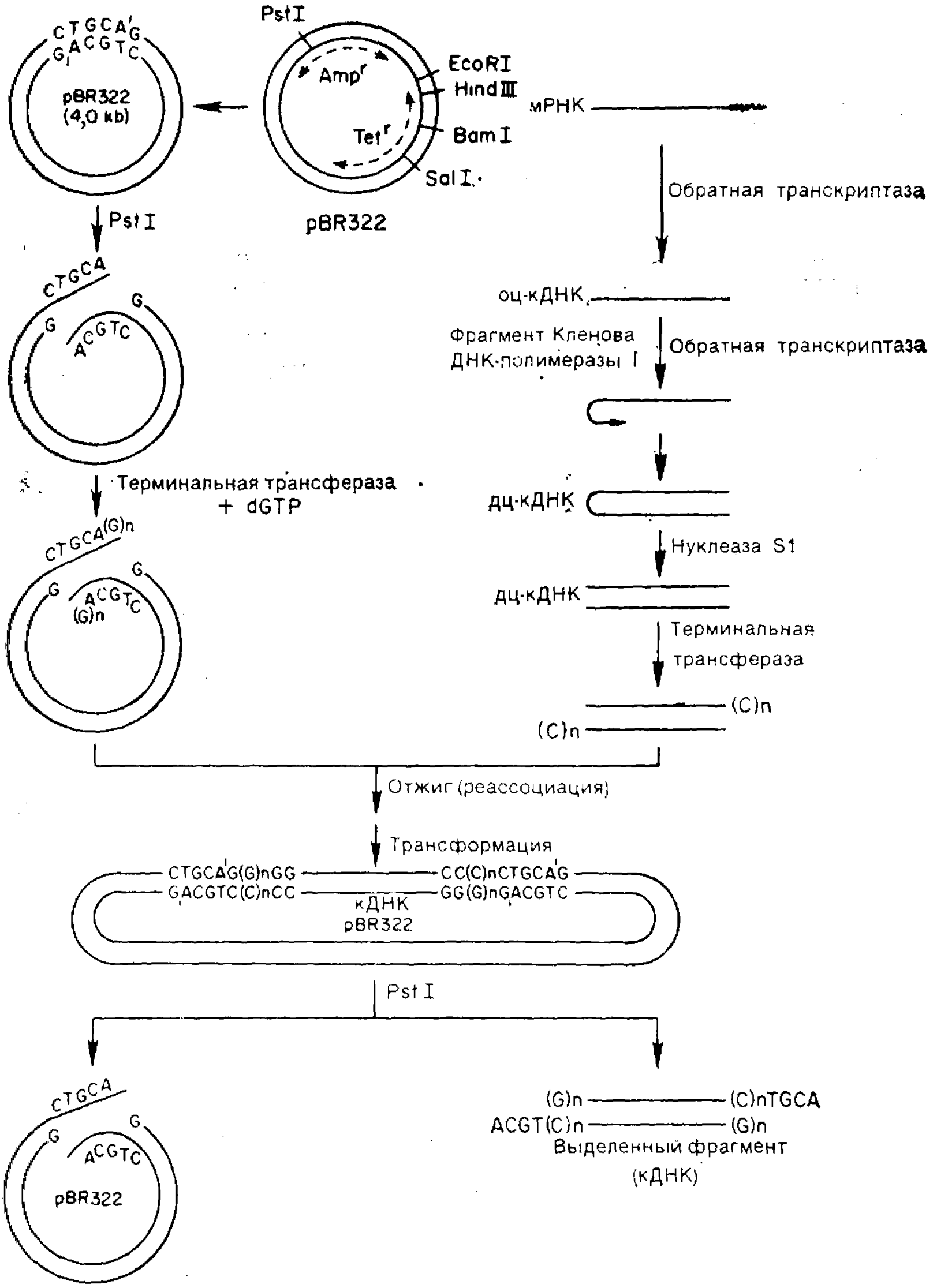


Рис. 7.1. Синтез второй цепи кДНК.

(Efstratiadis et al., 1976), широко используются и сейчас (Wickens et al., 1978). Коротко о методе: реакцию проводят при pH 6,9, чтобы свести к минимуму 5′→3′-экзонуклеазную активность ДНК-полимеразы I, и при 15 °C для уменьшения вероятности схлопывания синтезируемой ДНК. Для синтеза второй цепи кДНК был также успешно использован фрагмент Кленова ДНК-

полимеразы I, у которого отсутствует 5′→3′-эзонуклеазная активность.

Многие исследователи для синтеза второй цепи кДНК использовали обратную транскриптазу в условиях, аналогичных ранее описанным для синтеза первой цепи кДНК. Несмотря на одно сообщение о том, что обратную транскриптазу из вируса миелобластоза птиц (AMV) нельзя использовать для синтеза второй цепи иммуноглобулиновой кДНК (Rougeon, Mach, 1976), успешное проведение большого числа экспериментов по синтезу второй цепи с помощью обратной транскриптазы указывает на то, что это затруднение не носит общего характера. Мы рекомендуем использовать оба фермента последовательно. Смысл этого метода, предложенного Эфстратиадисом, заключается в том, что ДНК-полимераза I и обратная транскриптаза могут задерживаться или останавливаться на различных последовательностях. Таким образом, вторые цепи, частично синтезированные одним ферментом, могут быть завершены другим.

РАСЩЕПЛЕНИЕ ПЕТЛИ ШПИЛЬКИ НУКЛЕАЗОЙ S1

По окончании синтеза кДНК первая и вторая цепи остаются ковалентно связанными петлей шпильки, служившей затравкой при синтезе второй цепи (Efctratiadis et al., 1976). Эта петля может быть расщеплена нуклеазой S1, специфически разрушающей одноцепочечные участки нуклеиновых кислот. Образующиеся при этом концы не всегда оказываются полностью тупыми, и для повышения эффективности клонирования их достраивают с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* (Seeburg et al., 1977). Затем либо двухцепочечную ДНК фракционируют по размеру и самые крупные молекулы встраивают в бактериальные плазмиды, либо клонируют весь спектр молекул двухцепочечных ДНК для создания библиотеки кДНК.

МОЛЕКУЛЯРНОЕ КЛОНИРОВАНИЕ ДВУХЦЕПОЧЕЧНОЙ кДНК

Существует множество методов связывания двухцепочечной кДНК с плазмидными векторами (Efstratiadis, Villa-Komaroff, 1979; Maniatis 1980; Williams, 1981). К наиболее распространенным относятся следующие методы:

1. *Добавление к двухцепочечной кДНК и к плазмидной ДНК комплементарных гомополимерных последовательностей.* За счет образования водородных связей между комплементарными гомополимерными «хвостами» вектор и двухцепочечная кДНК соединяются, образуя открытые кольцевые гибридные молекулы, способные трансформировать клетки *E. coli.* Для стабилизации рекомбинантных плазмид в клетках *E. coli* формирование замк-

нутой кольцевой ДНК с помощью ферментативного сшивания не обязательно.

2. *Присоединение синтетических связывающих участков (линкеров) к концам двухцепочечной кДНК.* После расщепления подходящей рестриктазой молекулы кДНК встраивают в плазмидную ДНК, также расщепленную соответствующим ферментом.

ПРИСОЕДИНЕНИЕ ГОМОПОЛИМЕРНЫХ КОНЦЕВЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Присоединение концевых последовательностей dA·dT

Терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза из тимуса теленка, катализирующая присоединение дезоксинуклеотидов к 3′-ОН-концам одно- и двухцепочечных ДНК, впервые была использована Венсинком и др. (Wensink et al., 1974) для встраивания рекомбинантной ДНК в клетки *E. coli* методом присоединения dA·dT (Jackson et al., 1972; Lobban, Kaiser, 1973). В оригинальной методике с 5′-концов двухцепочечной ДНК удаляли небольшое количество нуклеотидов, так чтобы оставались выступающими одноцепочечные 3′-ОН-концы, которые служили эффективными матрицами для терминальной трансферазы. Необходимость в этом этапе отпала, когда было показано, что в присутствии ионов кобальта терминальная трансфераза может использовать и не выступающие 3′-концы (Roychoudhury et al., 1976). Обычно присоединяют от 50 до 150 остатков dA к линейной векторной ДНК и соответствующее количество остатков dT к двухцепочечной кДНК.

Двухцепочечная кДНК, встроенная в плазмиды с помощью присоединения dA·dT, может быть вырезана из плазмиды и возвращена в исходное состояние одним из трех способов. Первый способ включает расщепление рекомбинантной плазмидной ДНК нуклеазой S1 в мягких денатурирующих условиях, когда в основном происходит плавление dA·dT-линкеров (Hofstetter et al., 1976). Этот эффект достигается за счет включения формамида (20—50%) в буфер для нуклеазы S1 и проведения расщепления при повышенной температуре (37—55 °С). Эффективность реакции зависит от длины участков dA·dT: встроенные ДНК с короткими линкерами трудно вырезать. Оптимальные условия (включая концентрации ДНК и фермента) следует устанавливать эмпирически для каждого клона кДНК. В некоторых случаях более высокий выход встроенной ДНК и меньшее количество побочных продуктов расщепления удается получить при использовании вместо нуклеазы S1 нуклеазы из золотистой фасоли (Phaseolus aureus), специфически расщепляющей одноцепочечные участки нуклеиновых кислот (Green, неопубликованные данные). Это может быть обусловлено относительно высо-

кой специфичностью нуклеазы из золотистой фасоли по отношению к АТ-богатым двухцепочечным ДНК (Johnson, Laskowski, 1970).

Другой метод, редко используемый, включает превращение плазмидной ДНК в линейные двухцепочечные молекулы при использовании фермента рестрикции, не вносящего разрывов во встроенную ДНК (Goff, Berg, 1978). Линейную ДНК затем денатурируют и быстро ренатурируют, позволяя схлопнуться остаткам dA и dT, находящимся по обе стороны встроенной кДНК. После этого векторную ДНК удаляют обработкой экзонуклеазой VII *E. coli,* расщепляющей одноцепочечную ДНК и в 5′→3′-, и в 3′→5′-направлениях. Дуплексы dA·dT затем плавят, а две цепи встроенной ДНК подвергают отжигу с образованием двухцепочечной ДНК.

Еще один подход — встраивание двухцепочечной ДНК в участок плазмиды, непосредственно окруженный двумя гексануклеотидными сайтами рестрикции; например, в плазмиде pBR 322 сайты рестрикции для ферментов *Eco*RI, *Cla*I и *Hin*d III находятся внутри области размером 30 нуклеотидных пар. Таким образом, двухцепочечная кДНК, встроенная в сайт рестрикции *Cla*I методом концевого присоединения dA·dT, может быть вырезна рестриктазами *Eco*RI и *Hin*dIII.

В принципе целостность сайтов рестрикции для *Hin*dIII может быть восстановлена путем расщепления плазмидной ДНК рестриктазой *Hin*dIII, концевого присоединения oligo (dT) и отжига с двухцепочечной кДНК, имеющей dA-концы. После этого встроенную кДНК можно удалить из плазмиды с помощью обработки *Hin*dIII. По неизвестным причинам этим методом пользовались только в редких случаях.

Присоединение концевых последовательностей dC·dG

В настоящее время наиболее широко применяемый метод клонирования кДНК с использованием концевого присоединения гомополимерных последовательностей включает добавление концов dG к плазмиде и комплементарных концов dC к кДНК (Villa-Komaroff et al., 1978; Rowekamp, Firtel, 1980). С помощью этого метода получают клоны, из которых легко может быть удалена встроенная ДНК. Такие плазмиды, как pBR 322 или pAT153, расщепляются ферментом *Pst*I, который вносит разрывы в последовательность

$$^{5'}C—T—G—C—A—G^{3'}$$
$$_{3'}G—A—C—G—T—C_{5'}$$

оставляя выступающие 3′-концы. Добавление к линейной плазмидной ДНК короткой последовательности из остатков dG приводит к восстановлению сайта рестрикции для *Pst*I на каждом

конце встроенной ДНК, которая, следовательно, может быть удалена из плазмиды обработкой *Pst*I (рис. 7.1). На практике эффективность восстановления целостности сайта рестрикции для *Pst*I зависит от качества рестриктазы *Pst*I, использованной для превращения ДНК плазмиды pBR322 в линейную форму, и от качества терминальной трансферазы. Если с выступающего 3′-конца следовыми количествами экзонуклеазы удаляется предпоследний остаток, последующее добавление остатков dG не приведет к восстановлению последовательности узнавания для *Pst*I. Тем не менее при соблюдении необходимой осторожности до 80—90% рекомбинантных плазмид, сконструированных этим методом, содержат встроенные фрагменты, окруженные сайтами рестрикции для *Pst*I.

Недавно было определено число остатков dA·dT и dG·dC, необходимое для наиболее эффективной трансформации ДНК (Peacock et al., 1981). Как правило, число остатков, приходящееся на плазмиду, должно примерно совпадать с числом остатков, приходящимся на кДНК, составляя ~100 добавленных остатков на каждую молекулу ДНК в случае присоединения dA·dT и около 20 остатков в случае присоединения dG·dC (Peacock et al., 1981). Интересно, что бактериальные штаммы значительно различаются по эффективности трансформации. Штамм *RR*1 (*recA*$^+$-штамм *E. coli*) дает в 10 раз больше рекомбинантных клонов с кДНК, полученных методом концевого присоединения dA·dT, чем *recA*$^-$-штамм HB101. В том же эксперименте интактная ДНК плазмиды pBR322 трансформировала оба штамма с одинаковой эффективностью (Peacock et al., 1981). Таким образом, можно предположить, что бактериальная система *recA* участвует в репарации открытых кольцевых гибридных молекул ДНК, содержащих на концах гомополимерные последовательности.

СИНТЕТИЧЕСКИЕ ЛИНКЕРЫ

Другой метод присоединения двухцепочечной кДНК к плазмидным векторам основан на использовании синтетических линкеров, содержащих один или несколько сайтов рестрикции. Двухцепочечную кДНК, полученную, как описано ранее, обрабатывают ДНК-полимеразой бактериофага T4 или ДНК-полимеразой I *E. coli* — ферментами, расщепляющими выступающие одноцепочечные 3′-концы благодаря своей 3′→5′-экзонуклеазной активности и достраивающими укороченные таким образом 3′-концы благодаря полимеразной активности. Сочетание этих активностей приводит к образованию молекул кДНК с тупыми концами, которые далее инкубируют с большим избытком линкерных молекул в присутствии ДНК-лигазы бактериофага T4— фермента, способного катализировать сшивание молекул ДНК

с тупыми концами. В результате этой реакции образуются молекулы кДНК, несущие на концах полимерные линкерные последовательности. Затем эти молекулы разрезают определенным ферментом рестрикции и пришивают к плазмидному вектору, в который также был внесен разрыв соответствующим ферментом.

Двухцепочечные молекулы кДНК с синтетическими липкими концами будут, конечно, взаимодействовать друг с другом столь же активно, как и с векторной ДНК. Кроме того, сам вектор может снова замкнуться в кольцо, увеличив тем самым число плазмид, не участвующих в рекомбинации. Эти трудности в значительной степени могут быть преодолены с помощью обработки линейной плазмиды фосфатазой (с. 141) и(или) присоединения различных линкеров к разным концам кДНК. По оригинальной методике (Kurtz, Nicodemus, 1981) к кДНК одновременно присоединяли два разных линкера. Можно было ожидать, что в результате этого процесса 50% молекул кДНК будут иметь на обоих концах одинаковые линкеры; такие молекулы не могут быть встроены в плазмидную ДНК с помощью направленного клонирования. На практике эта цифра оказывается даже выше, поскольку один из линкеров почти всегда присоединяется к кДНК быстрее, чем другой. Эту проблему можно разрешить, добавляя к кДНК один линкер до расщепления петли

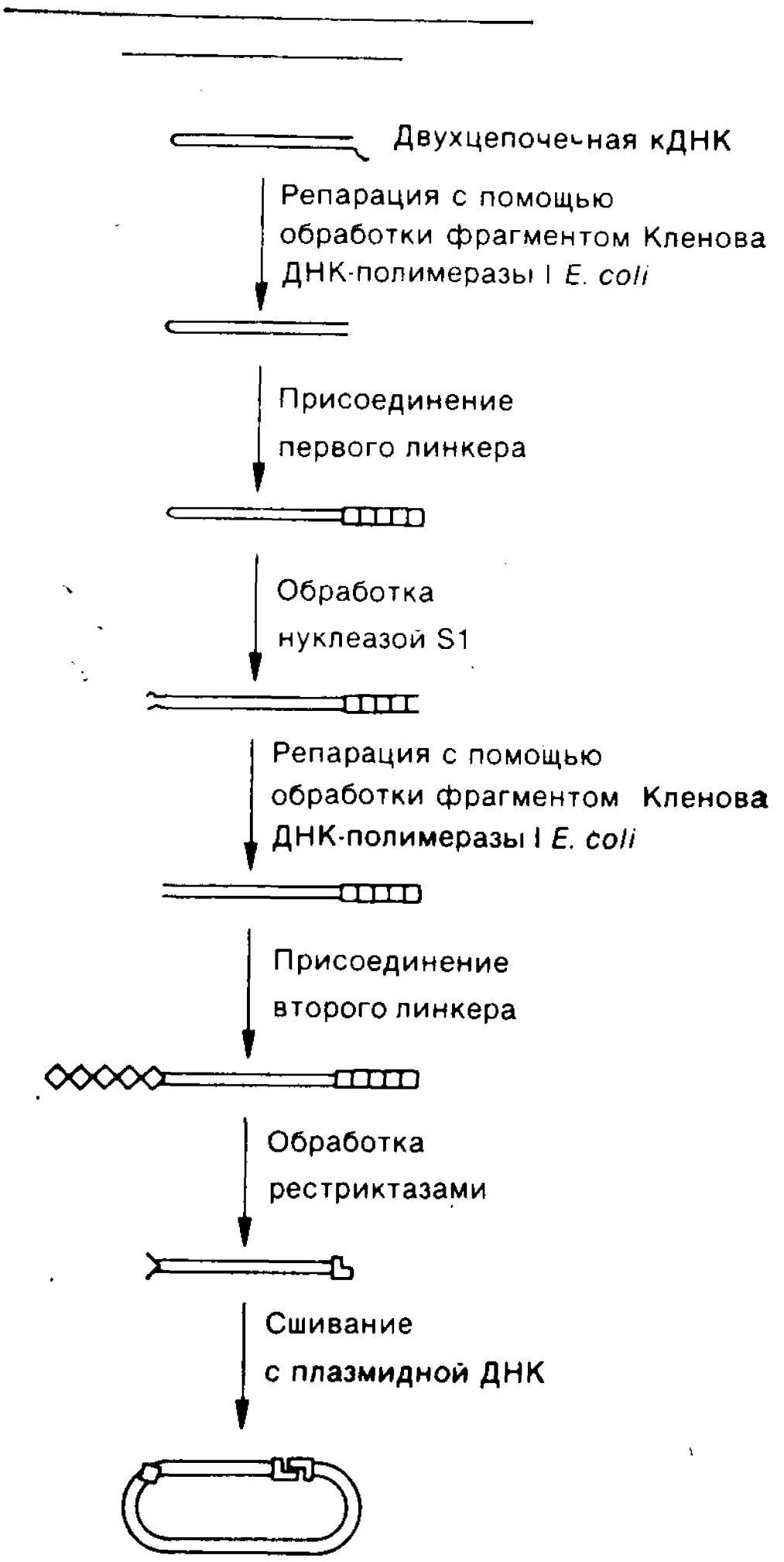


Рис. 7.2. Клонирование кДНК методом последовательного присоединения синтетических линкерных ДНК.

шпильки нуклеазой S1, а другой после расщепления. кДНК с двумя линкерами затем может быть обработана подходящим ферментом рестрикции и встроена в плазмидный вектор с помощью направленного клонирования (рис. 7.2).

Этим методом можно встраивать в векторы кДНК в правильной ориентации, позволяющей осуществлять экспрессию встроенных последовательностей в бактериальной клетке (гл. 12). Он позволяет также идентифицировать интересующие исследователя клоны путем отбора бактериальных колоний по наличию материала, вступающего в реакцию со специфической антисывороткой к определенному продукту гена. Значение такой техники исследования особенно возрастает в случае клонирования мРНК, представленных в геноме малым числом копий, для которых отсутствуют нуклеиновые кислоты — зонды.

При описанном подходе возникает одно затруднение, связанное с тем, что двухцепочечные гибриды кДНК — линкерная ДНК должны быть обработаны подходящими ферментами рестрикции для образования липких концов (Scheller et al., 1977). Если двухцепочечная кДНК содержит один или несколько сайтов рестрикции хотя бы для одной рестриктазы, она будет разрезана и затем клонирована как два или несколько фрагментов ДНК, что затруднит анализ структуры полноразмерной кДНК. Это препятствие можно преодолеть, либо используя синтетические линкеры с сайтами рестрикции для ферментов, как правило, не вносящих разрывы в ДНК млекопитающих (например, *Sal*I), либо добавляя метилазу *Eco*RI для защиты ДНК от воздействия рестриктазы *Eco*RI, либо применяя вместо линкеров синтетические адаптеры. Адаптеры — это короткие синтетические двухцепочечные кДНК, один конец которых тупой, а другой липкий (например, липкий конец для *Hin*dIII). Молекулы адаптера после присоединения 5′-фосфатной группы к их тупому концу и 3′-гидроксильной группы к их липкому концу будут взаимодействовать с двухцепочечной кДНК с тупыми концами, но не друг с другом. В отличие от линкеров перед присоединением адаптеров к двухцепочечной кДНК их не надо расщеплять рестриктазами.

ДРУГИЕ МЕТОДЫ КЛОНИРОВАНИЯ кДНК

Большинство охарактеризованных к настоящему времени клонов, содержащих кДНК, было сконструировано при помощи описанных выше методов. Далее мы в сжатой форме описываем три других метода клонирования кДНК. Применимость первого метода — клонирования гибридов мРНК — кДНК — ограничена его низкой эффективностью. Второй метод включает синтез второй цепи кДНК при использовании в качестве затравки олигонуклеотидов, тогда как по треьему методу синтезируются

первая и вторая цепи кДНК с плазмидой в качестве затравки. Несмотря на то что последние два метода пока не нашли широкого применения и мы сами не имеем непосредственного опыта их использования, опубликованные данные указывают на то, что они служат эффективными способами получения клонов, содержащих полноразмерную кДНК.

Клонирование гибридов мРНК—кДНК

Этот метод клонирования кДНК включает трансформацию клеток *E. coli* гибридами мРНК—кДНК, пришитыми к плазмидным векторам (Wood, Lee, 1976; Zain et al., 1979). В клетке бактерии-хозяина мРНК удаляется и заменяется на ДНК. После синтеза первой цепи кДНК обычным способом к гибриду мРНК—кДНК присоединяют последовательность dA, после чего его отжигают с плазмидой, имеющей концевую dT-последовательность. Поскольку эффективность присоединения концевой последовательности к 3′-ОН-группе РНК как минимум в 10 раз меньше, чем эффективность аналогичной реакции с ДНК, бóльшая часть добавленных к гибриду остатков dA присоединяется к 3′-концу цепи ДНК. Присоединение другого конца гибрида к вектору, по-видимому, осуществляется за счет образования водородных связей между природной poly(A)-последовательностью на 3′-конце мРНК и концевой dT-последовательностью плазмиды. Этот метод с практической точки зрения имеет два преимущества: во-первых, нет необходимости в синтезе второй цепи кДНК и, во-вторых, не требуется расщеплять шпильку в молекуле ДНК нуклеазой S1. Кроме того, теоретически этот метод позволяет клонировать последовательности, находящиеся на 5′-конце мРНК (которые обычно теряются при обработке нуклеазой S1). В то же время его основной недостаток состоит в том, что он по меньшей мере в 10 раз менее эффективен, чем клонирование двухцепочечной кДНК, и поэтому не подходит для получения большого числа клонов с кДНК.

Синтез второй цепи кДНК с использованием в качестве затравки олигонуклеотидов

При синтезе второй цепи кДНК затравкой обычно служат структуры типа шпильки, находящиеся на 3′-конце первой цепи. Другой метод состоит в прямом присоединении к концу кДНК последовательности oligo(dT) (Rougeon et al., 1975) или oligo (dC) (Land et al., 1981). Затем при использовании в качестве затравки соответственно oligo(dA)- или oligo(dG)-последовательности синтезируется вторая цепь, в результате чего образуется двухцепочечная кДНК, окруженная с двух сторон двухцепочечными гомополимерными последовательностями. После

этого к двухцепочечной ДНК присоединяют концевую oligo(dC)-последовательность и встраивают ДНК в плазмиду, разрезанную *Pst*I и несущую концевую последовательность oligo(dG).

Основное преимущество этого метода состоит в том, что в нем отсутствует сложная операция расщепления петли шпильки в двухцепочечной кДНК нуклеазой S1. Это повышает эффективность клонирования полноразмерной двухцепочечной кДНК. Потенциальная опасность этого метода связана с тем, что даже высокоочищенные препараты терминальной трансферазы загрязнены примесями нуклеаз, специфически расщепляющих одноцепочечные участки нуклеиновых кислот. По всей вероятности, последнее препятствие можно преодолеть, присоединяя концевую последовательность к первой цепи кДНК, находящейся в составе ДНК — РНК-гибрида.

Синтез первой и второй цепей кДНК с использованием в качестве затравки плазмиды

Недавно Окаяма и Берг (Okayama, Berg, 1982) опубликовали новый метод высокоэффективного клонирования полноразмерной двухцепочечной кДНК. Метод включает следующие стадии (рис. 7.3).

1. Сначала к плазмиде-затравке для синтеза кДНК присоединяют терминальной трансферазой концевую последовательность oligo(dT). Затем путем расщепления вторым ферментом с последующими электрофорезом в агарозном геле и хроматографией на oligo(dA)-целлюлозе (рис. 7.3, *А*) получают фрагмент, содержащий один из dT-концов, точку начала репликации бактериальной ДНК и ген устойчивости к ампициллину.

2. Получают линкерную ДНК с концевой последовательностью oligo(dG), присоединяя терминальной трансферазой эту последовательность к *Pst*I-фрагменту ДНК и затем разделяя два конца вторым ферментом. Нужный концевой фрагмент очищают методом электрофореза в агарозном геле (рис. 7.3, *Б*).

3. Вектор-затравку с концевой dT-последовательностью гибридизуют с poly(A)-мРНК при молярном соотношении 1,5 : 3 (мРНК : вектор-затравка) и с помощью обратной транскриптазы синтезируют первую цепь кДНК (рис. 7.3, *В*).

4. К 3′-концу синтезированной кДНК, все еще связанной водородными связями с мРНК-матрицей, присоединяют концевые oligo(dC)-последовательности. Последовательности dC, присоединившиеся к другому концу вектора, затем удаляют с помощью рестриктирующей эндонуклеазы.

5. Плазмиду, содержащую в своем составе кДНК — мРНК-гибрид с oligo(dC)-последовательностью на конце, отжигают и сшивают с линкерной ДНК, имеющей концевую oligo(dG)-последовательность.

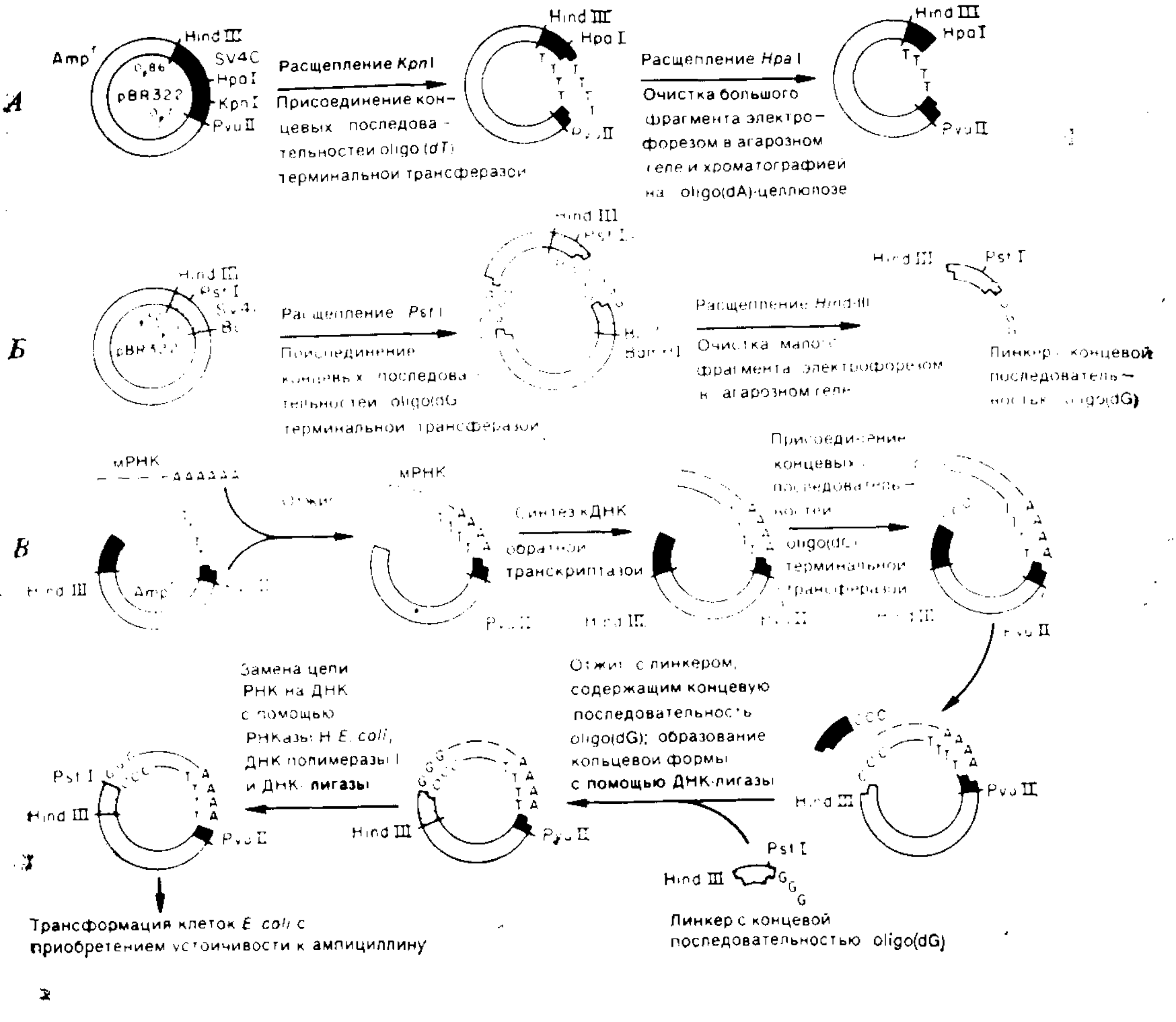


Рис. 7.3. Получение плазмидной затравки (*А*) и линкерной ДНК с концевой oligo(dG)-последовательностью (*Б*). В. Стадии конструирования рекомбинантов плазмида—кДНК. Светлые частн колец — ДНК pBR322; черные сегменты или сегменты с точками — ДНК вируса SV-40. Числа, расположенные рядом с обозначениями сайтов рестрикции, — соответствующие координаты на карте ДНК вируса SV40.

6. Цепь мРНК заменяют на ДНК, используя совместное действие ферментов: РНКазы Н, разрушающей цепь РНК в гибриде РНК—ДНК; ДНК-полимеразы I *E. coli,* осуществляющей репарацию разрывов во второй цепи кДНК; ДНК-лигазы, катализирующей замыкание в кольцо молекулы ДНК за счет образования ковалентных связей.

Окаяма и Берг обнаружили, что большинство полноразмерных или близких к ним по размеру молекул кДНК превращается в двухцепочечную кДНК; при этом эффективность трансформации составляет около 100 000 трансформантов на 1 мкг исходной мРНК. Считается, что избирательное клонирование длинных кДНК-транскриптов обусловлено их преимущественным использованием терминальной трансферазой. Окаяма и Берг выдвигают предположение о том, что более короткие цепи кДНК

в гибридах мРНК—ДНК плохо узнаются терминальной трансферазой и подвергаются контрселекции. Вообще говоря, при разработке этого метода клонирования кДНК были использованы α- и β-глобиновые мРНК кролика, однако авторы отмечают, что с его помощью были получены также клоны с кДНК, которые соответствуют мРНК большого размера (6500 нуклеотидов), представленным в клетке небольшим числом копий.

ОБЩИЕ ПОДХОДЫ К КЛОНИРОВАНИЮ кДНК

мРНК, ПРЕДСТАВЛЕННЫЕ В КЛЕТКЕ БОЛЬШИМ ЧИСЛОМ КОПИЙ

Первоначально клонирование кДНК использовалось для получения копий таких мРНК, как глобиновая или овальбуминовая, присутствующих в клетке в больших количествах. В подобных случаях интересующая исследователя РНК составляет 50—90% всей poly(A)$^+$-цитоплазматической РНК, выделенной из клеток определенных специфических типов. Поэтому никакой дальнейшей очистки специфических типов мРНК перед синтезом двухцепочечной кДНК и ее клонированием не требуется.

Для идентификации клонов с кДНК, соответствующими таким мРНК, искомые последовательности ДНК в трансформированных бактериальных клетках выявляют с помощью гибридизации с нуклеиновыми кислотами. Гибридизационные зонды представляют собой либо меченную ^{32}P одноцепочечную кДНК, синтезированную in vitro с помощью обратной транскриптазы на матрице мРНК, богатых представляющими интерес последовательностями, либо частично фрагментированную мРНК с концевой меткой. Можно считать, что изучаемые последовательности мРНК представлены в клонированных двухцепочечных кДНК и в гибридизационном зонде пропорционально частоте их встречаемости в исходной популяции. В случае овальбумина и глобина и им подобных белков вероятность того, что колония, интенсивно гибридизующаяся с зондом, содержит искомые последовательности ДНК, достаточно велика.

Доказательство подлинности клона можно получить одним из трех способов:

1. Продемонстрировав, что клонированная кДНК способна гибридизоваться с определенной мРНК из исходной популяции молекул мРНК. Обычно клонированную кДНК иммобилизуют на нитроцеллюлозном фильтре и гибридизуют с мРНК, находящейся в растворе. После тщательного промывания фильтра мРНК выделяют из гибрида и транслируют в бесклеточной системе синтеза белка (гибридизация/селекция; Goldberg et al., 1979).

2. Показав, что клонированная кДНК способна гибридизоваться с представляющей интерес мРНК и тем самым ингибировать ее трансляцию in vitro (подавление трансляции гибридом; Paterson et al., 1977).

3. Прямым определением последовательности нуклеотидов в ДНК. Когда известна аминокислотная последовательность белкового продукта, проще всего проверить, соответствует ли аминокислотная последовательность белка нуклеотидной последовательности клонированной кДНК. Недавно были разработаны быстрые методы определения последовательности оснований в фрагментах ДНК, клонированных в плазмидах, с помощью техники Максама—Гилберта (Maxam, Gilbert, 1977) или Маата — Смита (Maat, Smith, 1978; Froschauf et al., 1980).

мРНК, ПРЕДСТАВЛЕННЫЕ В КЛЕТКЕ МАЛЫМ ЧИСЛОМ КОПИЙ

С повышением точности методов эффективного включения рекомбинантных плазмид, содержащих кДНК, в клетки *E. coli* (Hanahan, Meselson, 1980) и методов исследования большого числа трансформированных бактериальных колоний для обнаружения в них «чужих» последовательностей ДНК (Hanahan, неопубликованные данные) стало возможным клонировать мРНК, представленные в клетке сравнительно малым числом копий.

Используемые в настоящее время подходы включают конструирование большого числа клонов, содержащих ДНК, комплементарную суммарной poly(A)$^+$-мРНК клетки, и идентификацию клонов с изучаемой кДНК. Полный набор клонов с кДНК, полученных с определенного препарата poly(A)$^+$-РНК, называется библиотекой кДНК.

Обычная клетка млекопитающего содержит от 10 000 до 30 000 различных последовательностей мРНК (Davidson, 1976). Уильямс (Williams, 1981) определил число клонов, необходимое для получения полной библиотеки кДНК фибробластов человека, содержащих около 12 000 различных последовательностей мРНК. Класс мРНК, представленных малым числом копий (менее 14 копий на клетку), составляет примерно 30% всех мРНК и включает около 11 000 различных видов мРНК. Таким образом, минимальное число клонов, необходимое для полного представительства последовательностей мРНК с малым числом копий, составляет $11\,000/0{,}30 \simeq 37\,000$. Если учесть различия при проведении экспериментов и преимущественное клонирование определенных последовательностей, то для увеличения вероятности включения в библиотеку каждого клона следует получать значительно бóльшие количества рекомбинантов. Количество клонов, необходимое для того, чтобы каждая последовательность с малым числом копий была представлена в библиотеке

с определенной вероятностью, подчиняется соотношению

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-1/n)},$$

где N — необходимое количество клонов, P — желаемая вероятность (обычно 0,99), n — часть всей популяции молекул мРНК, приходящаяся на долю определенного вида мРНК с малым числом копий.

Таким образом, для достижения 99%-ной вероятности включения в библиотеку определенной мРНК с малым числом копий из фибробластов человека имеем $P=0{,}99$, $n=1/37\,000$, $N=170\,000$. Эти цифры находятся в пределах возможностей существующих методов, поскольку техника присоединения концевых гомополимерных и двух линкерных последовательностей позволяет получить от $1\cdot10^5$ до $6\cdot10^5$ колоний на 1 мкг двухцепочечной кДНК.

Важной проблемой, однако, остается обнаружение последовательностей мРНК, представленных крайне малым числом копий, методом гибридизации колоний in situ (Gergen et al., 1979; Williams, Lloyd, 1979; Dworkin, Dawid, 1980). Несколькими авторами было подсчитано, что клоны, содержащие всего 0,05—0,1% всех молекул мРНК, могут быть идентифицированы при использовании в качестве зонда меченой in vitro мРНК (или кДНК.) Однако на практике оказывается, что при работе с доступными в обычных условиях количествами зонда и проведении гибридизации и радиоавтографии в течение приемлемых временны́х интервалов чрезвычайно трудно обнаружить клоны с кДНК, комплементарной видам мРНК, присутствующим в исходной популяции молекул в количестве, меньшем чем 1/200.

К настоящему времени не разработано общего метода клонирования таких молекул. Однако существует несколько методических приемов, которые могут быть использованы по отдельности или в комбинации для решения проблем идентификации клонов с кДНК, комплементарными РНК — минорным компонентам всей популяции молекул, для которых отсутствуют гибридизационные зонды.

Фракционирование молекул мРНК по размеру

К наиболее простым методам фракционирования молекул мРНК в соответствии с их размерами относится центрифугирование в градиенте плотности сахарозы или электрофорез в геле в денатурирующих условиях (с. 195—201). Затем каждую фракцию мРНК транслируют in vitro и идентифицируют интересующий белковый продукт с помощью комбинации методов иммунопреципитации и электрофореза в SDS-полиакриламидном геле. Степень обогащения сильно различается для разных мРНК

и зависит от соотношения размеров данной мРНК и основной части молекул в популяции. В лучшем случае достигают 10-кратного обогащения, однако для клонирования мРНК может быть достаточно и этого.

Другой подход — создание библиотеки ДНК, комплементарных популяции мРНК, частично обогащенной данной мРНК, например методом центрифугирования в градиенте плотности сахарозы. Вслед за центрифугированием проводят скрининг (исследуют библиотеку) путем гибридизации с зондами, синтезированными в реакции обратной транскрипции на матрице — еще более обогащенной нужным видом мРНК популяции молекул, которую получили с помощью фракционирования в градиенте плотности и электрофореза в денатурирующих гелях. Цель этого подхода — уменьшить библиотеку до доступного для обработки числа клонов с кДНК, которые можно исследовать по одному или небольшими сериями путем отбора по способности гибридизоваться с зондом.

Синтетические олигодезоксинуклеотиды

Очистка мРНК, присутствующей в низких концентрациях, может оказаться трудной и сложной. При наличии данных о частичной или полной аминокислотной последовательности представляющего интерес белка целесообразно использовать метод, включающий химический синтез олигонуклеотидов, комплементарных мРНК. Последовательность таких олигонуклеотидов получают из подходящей короткой последовательности аминокислот (Wu, 1972.) По существу, из известной полипептидной последовательности отбираются области, богатые аминокислотами, кодируемыми либо одним кодоном (например, метионин— AUG; триптофан — UGG,) либо двумя кодонами (например, фенилаланин — UUU, UUC; тирозин — UAU, UAC; гистидин— CAU, CAC). Зная частоту встречаемости различных вырожденных кодонов (например, глутамин обычно кодируется кодоном CAG) и учитывая возможность образования пар G·T, часто удается уменьшить число вариантов олигонуклеотидных последовательностей до приемлемой величины. Такие олигонуклеотиды затем синтезируют in vitro с помощью фосфодиэфирного метода (Agarwal et al., 1972) или более эффективного фосфотриэфирного метода (Hsiung et al., 1979). При инкубации этих олигонуклеотидов с суммарной poly(A)-мРНК в тщательно подобранных условиях гибридизации они образуют гибриды только с полностью комплементарными им видами мРНК. Поэтому такие синтетические олигонуклеотиды могут быть использованы в качестве затравок в реакции обратной транскрипции с нефракционированной poly(A)$^+$-РНК при синтезе одноцепочечных зондов для скрининга библиотек кДНК (Chan et al., 1979; Noyes

et al., 1979; Goeddel et al., 1980a; Houghton et al., 1980). Если синтетические олигодезоксинуклеотиды имеют достаточную длину (14—20 нуклеотидов), то их можно непосредственно использовать в качестве зондов для обнаружения в библиотеках кДНК клонов, содержащих интересующие исследователя последовательности (Montgomery et al., 1978; Goeddel et al., 1980a; Suggs et al., 1981).

Удобный подход — химический синтез смеси олигонуклеотидов, в которой представлены все возможные комбинации кодирования небольшого участка аминокислотной последовательности определенного белка (Wallace et al., 1979, 1981). Один из таких олигонуклеотидов образует совершенный гибрид с двухцепочечной ДНК, в то время как другие — гибриды с ошибками спаривания. При подборе достаточно жестких условий гибридизации стабильным окажется только совершенный гибрид. Такой подход был недавно применен для выделения клонированных последовательностей кДНК, кодирующих β_2-микроглобулин человека (Suggs et al., 1981). Следует иметь в виду, что условия, используемые при скрининге колоний путем гибридизации, значительно более жесткие, чем при гибридизации затравки с мРНК. Поэтому в качестве гибридизационных зондов олигонуклеотиды оказываются гораздо более специфичными, чем в качестве затравок при синтезе кДНК на матрице мРНК.

Олигонуклеотиды, комплементарные кодирующей части мРНК, ни при каких условиях не могут служить затравками для синтеза полноразмерных молекул кДНК в реакциях обратной транскрипции. Поэтому такие олигонуклеотиды крайне редко используются в качестве затравок для синтеза кДНК с целью клонирования. Их основное достоинство состоит в том, что они служат высокоспецифичными гибридизационными зондами или могут быть использованы для их получения. В результате чувствительность скрининга библиотек кДНК возросла настолько, что легко могут быть выявлены клоны для мРНК, представленных в клетке крайне малым числом копий.

Дифференциальная гибридизация

Этот метод используется, когда имеются два препарата мРНК, содержащие много общих последовательностей, но отличающиеся друг от друга наличием или отсутствием нескольких интересующих исследователя видов мРНК. Примерами таких родственных пар могут служить мРНК, выделенные из клеток до и после воздействия на них тепловым ударом (heat shock), лекарственными препаратами или гормонами. В простейшем варианте этого метода на двух препаратах poly(A)$^+$-РНК in vitro синтезируют меченные ^{32}P кДНК. Основная часть последовательностей кДНК для обоих препаратов совпадает. Однако

кДНК, синтезированная на матрице РНК из индуцированных клеток, содержит дополнительные последовательности, комплементарные новым видам poly(A)+-РНК. Оба препарата затем используются для скрининга библиотеки кДНК, созданной для мРНК, которую выделяют из индуцированных клеток. Колонии, специфически гибридизующиеся с зондом-кДНК из индуцированных клеток, скорее всего содержат клонированные копии индуцированных мРНК. Примерами индуцибельных генов, клонированных таким способом, служат индуцируемые галактозой гены дрожжей (St. John, Davis, 1979) и гены интерферона из фибробластов человека (Taniguchi et al., 1980a). Этот метод был также использован для идентификации клонов с кДНК, комплементарными мРНК, появляющимся на разных стадиях развития *Xenopus laevis* (Dworkin, David, 1980), *Dictyostelium discoideum* (Williams, Lloyd, 1979; Rowekamp, Firtel, 1980) и морских ежей (Lasky et al., 1980).

Клоны с кДНК, соответствующими мРНК, появляющимся на разных стадиях развития, могут быть также идентифицированы при использовании другого вида дифференциальной гибридизации. Популяция молекул кДНК, обогащенная характерными для определенной стадии развития последовательностями, используется в качестве зонда для исследования библиотеки генов или кДНК (Timberlake, 1980; Zimmerman, 1980). Такое обогащение осуществляется путем «каскадной гибридизации», при которой кДНК, синтезированная на матрице мРНК из клеток, находящихся на одной стадии развития (стадия 1), гибридизуется с 20-кратным избытком мРНК из клеток, находящихся на другой стадии развития (стадия 2). Гибрид мРНК—кДНК затем выделяют с помощью хроматографии на гидроксилапатите. Эту процедуру повторяют еще два раза, используя 50- и 100-кратный избыток мРНК из клеток на стадии 2. Не вступившую в гибридизацию фракцию кДНК гибридизуют со 100-кратным избытком мРНК из клеток на стадии 1 и выделяют гибрид на гидроксилапатите. После расщепления мРНК с помощью щелочного гидролиза кДНК, сильно обогащенную последовательностями, специфическими для стадии 1, используют в качестве зонда для исследования библиотеки кДНК стадии 1.

Иммунологический метод очистки полисом

Один из подходов к обогащению популяции молекул мРНК специфическими последовательностями состоит в очистке определенных полисом в реакции между антителами и синтезируемыми полипептидными цепями (Cowie et al., 1961). Ограничение этого метода, в оригинале включающего иммунопреципитацию полисом, состоит в том, что могут быть использованы лишь мРНК, кодирующие такие обильно продуцируемые белки, как

овальбумин (Palacios et al., 1972) и иммуноглобулин (Schechter, 1973). Попытки применить метод к мРНК, представленным в клетке меньшим числом копий, оказались неудачными (Flick et al., 1978). Однако использование в последнее время иммуноаффинных колонок (Schutz et al., 1977) и колонок с сефарозой, связанной с белком А (Shapiro, Young, 1981), значительно улучшает метод. Например, мРНК поверхностного антигена трипаносомы, представленная в клетке сравнительно большим количеством копий, была очищена с помощью взаимодействия полисом с гетерогенной антисывороткой к поверхностному антигену с последующим выделением комплекса на колонке с сефарозой, связанной с белком А (Shapiro, Young, 1981). Виды мРНК, представленные в клетке меньшим числом копий, теперь можно выделять, совместно используя сефарозу, связанную с белком А, и моноклональные антитела. Корман и др. (Korman et al., 1982) использовали моноклональные антитела к тяжелой цепи HLA-DR-антигена человека для выделения соответствующей мРНК, составляющей всего 0,01—0,05% всей мРНК клетки. Эти исследователи сообщают о 2000—3000-кратной очистке мРНК антигена HLA-DR. Очищенная мРНК далее может быть использована для получения кДНК-зонда для скрининга всей библиотеки кДНК или непосредственно для получения клона, содержащего двухцепочечную кДНК.

МЕТОДЫ КЛОНИРОВАНИЯ кДНК

На следующих страницах мы детально описываем два метода клонирования кДНК с использованием как присоединения концевых гомополимерных последовательностей dG·dC, так и техники двойных линкеров. Оба метода были нами успешно использованы для создания библиотек кДНК, в которых, по-видимому, представлены все копии мРНК, выделенных из различных типов клеток млекопитающих.

Метод присоединения концевых гомополимерных последовательностей объединяет методики, опубликованные несколькими группами авторов, в частности Эфстратиадисом и Вилла-Комаровой (Efstratiadis, Villa-Komaroff, 1979), Ровекампом и Фиртелем (Rowekamp, Firtel, 1980) и Робертсом (Roberts, личное сообщение). Метод с использованием последовательного присоединения линкеров — это неопубликованная модификация Фиддесом методики Куртца и Никодемуса (Kurtz, Nicodemus, 1981).

СИНТЕЗ ДВУХЦЕПОЧЕЧНОЙ кДНК

Условия, приведенные ниже, являются оптимальными для синтеза кДНК на матрице гетерогенных популяций мРНК. При этом индивидуальные виды мРНК могут транскрибироваться обратной транскриптазой с различной эффективностью.

Синтез первой цепи кДНК

1. Выделите poly(A)$^+$-мРНК из исследуемых клеток с помощью методов, описанных в гл. 6. Чтобы оптимальным образом синтезировать достаточное количество двухцепочечной кДНК для создания библиотеки, требуется около 10 мкг poly (A)$^+$-РНК. Однако реакция будет идти (хотя и с меньшей эффективностью) и при меньшем количестве матрицы. Перед проведением реакции следует убедиться в отсутствии деградации poly(A)$^+$-РНК с помощью электрофореза в геле (гл. 6), используя в качестве маркеров 18S- и 28S-рРНК и очищенную 9S-глобулиновую мРНК. После окрашивания гелей бромистым этидием или нитроцеллюлозных фильтров метиленовым синим poly(A)$^+$-РНК выявляют в виде сплошного пятна ($\sim$10S—30S) с расположением большинства молекул в области 16S—18S. Обычно в препаратах poly(A)$^+$-РНК даже после двух циклов очистки на oligo(dT)-колонках присутствует рРНК. По ширине полос рРНК можно ориентировочно судить о степени деградации мРНК.

2. Приготовьте стерильные исходные буферы и растворы для синтеза первой цепи кДНК: 1 М трис-HCl, pH 8,3 при 42 °С (pH следует измерять при 42 °С, так как pH триса зависит от температуры); 1 М KCl; 250 мМ $MgCl_2$; 700 мМ β-меркаптоэтанол (добавьте 50 мкл концентрированного 14 М раствора к 950 мкл H_2O); раствор dNTP [содержащий все четыре dNTP (20 мМ) в 0,01 М трис-HCl, pH 8,0]; затравка oligo(dT)$_{12-18}$ (1 мг/мл в H_2O); 100 мМ гидроксид метилртути (процедура приготовления раствора и необходимые при работе с ним предосторожности описаны в гл. 6).

3. Определите необходимый объем раствора обратной транскриптазы из вируса миелобластоза птиц. На 10 мкг poly(A)$^+$-мРНК требуется около 40 ед. обратной транскриптазы. Препараты фермента чаще всего имеют концентрацию 5—20 ед./мкл.

Необходимо учесть вклад буфера, в котором хранится препарат фермента, в конечный состав реакционной смеси. Например, стандартный буфер для хранения обратной транскриптазы содержит 200 мМ фосфат калия, pH 7,2. Поэтому для получения оптимальной концентрации моновалентного катиона (140—150 мМ K^+) количество исходного раствора хлорида калия, вносимого в реакционную смесь при добавлении больших объемов обратной транскриптазы, должно быть соответственно уменьшено. Кроме того, чтобы предотвратить снижение конечного pH реакционной смеси (оптимальное значение pH 8,3) при добавлении фосфатного буфера, pH 7,2, используют относительно высокую концентрацию триса (100 мМ).

Для длительного хранения обратную транскриптазу разделяют на небольшие аликвоты и оставляют при температуре

—70 °С. При температуре —20 °С со временем происходит диссоциация субъединиц фермента. Поэтому при —20 °С хранят только рабочие растворы фермента.

4. Поскольку многие партии обратной транскриптазы загрязнены РНКазой, обычно в реакционную смесь вводят сильные ингибиторы РНКазы (РНКазин или ванадилрибонуклеозидные комплексы). Хотя оба типа ингибиторов достаточно эффективны, РНКазин имеет небольшое преимущество, поскольку он легко может быть удален с помощью одной экстракции смесью фенол—хлороформ. РНКазин следует использовать в конечной концентрации 0,5 ед./мкл.

Ванадилрибонуклеозидные комплексы готовят следующим образом. Непосредственно перед использованием разморозьте исходный раствор (200 мМ; с. 186), отцентрифугируйте его в течение 2 мин (в центрифуге Эппендорф) и разбавьте водой до концентрации 10 мМ. Конечная концентрация ванадилрибонуклеозидных комплексов в реакционной смеси — 1 мМ; в более высоких концентрациях они ингибируют обратную транскриптазу.

5. В автоклавированной эппендорфовской пробирке высушите примерно по 50 пмоль (~40 мкл) каждого из четырех [α-^{32}P]dNTP (уд. акт. 800 Ки/ммоль; поставляется в виде 50%-ного водно-спиртового раствора).

В данном случае [α-^{32}P]dNTP, растворенные в этаноле, имеют некоторое преимущество перед dNTP, поставляемыми в виде стабилизированных водных растворов, содержащих tricene-буфер, pH 6,0. Последние занимают почти треть объема реакционной смеси и могут изменить pH реакции.

Если в наличии имеются только водные растворы [α-^{32}P]dNTP, в реакционную смесь следует внести следующие изменения:

а) Приготовить раствор, содержащий три немеченых dNTP в концентрации 20 мМ и один немеченый dNTP в концентрации 10 мМ. Внести 2,5 мкл этого раствора на 50 мкл реакционной смеси.

б) Добавить к реакционной смеси 10 мкл (100 мкКи) [α-^{32}P]dNTP, присутствующего в растворе dNTP в низкой концентрации.

6. Выберите объем реакционной смеси. Наиболее удобный объем 50 мкл. С меньшими объемами труднее работать. Наличие примесей в радиоактивных трифосфатах (особенно после хранения в течение времени, превышающего период полураспада) может привести к ингибированию реакции.

В случае бóльших объемов реакционной смеси для достижения той же степени включения в ДНК требуются бóльшие количества [α-^{32}P]dNTP, что неоправданно дорого.

а) К высушенным радиоактивным трифосфатам добавьте 10 мкл (10 мкг) мРНК (1 мг/мл) и 1 мкл 100 мМ гидроксида метилртути. Дайте смеси постоять 10 мин при комнатной температуре. При такой обработке РНК денатурирует и выход полноразмерной кДНК, синтезируемой на некоторых мРНК-матрицах, увеличивается.

б) Добавьте 2 мкл 700 мМ β-меркаптоэтанола и 5 мкл 10 мМ ванадилрибонуклеозидных комплексов (или 2 мкл РНКазина, 25 ед.). Оставьте при комнатной температуре на 5 мин. β-Меркаптоэтанол, необходимый для стабилизации обратной транскриптазы, здесь добавляют для связывания ионов ртути, так как в противном случае эти ионы будут ингибировать обратную транскрипцию.

в) Добавьте 10 мкл (10 мкг) oligo $(dT)_{12-18}$ (1 мг/мл), 5 мкл 1 М трис-HCl, pH 8,3, 7 мкл 1 М KCl, 2 мкл 250 мМ $MgCl_2$, 2,5 мкл 20 мМ смеси dNTP и H_2O до конечного объема 50 мкл.

г) Добавьте 2 мкл (40 ед.) обратной транскриптазы, хорошо перемешайте с помощью встряхивания и быстро отцентрифугируйте в центрифуге Эппендорф для удаления пузырьков, образующихся из-за присутствия тритона Х-100 в буфере для хранения фермента. Инкубируйте при 42 °С в течение 1—3 ч. Конечные концентрации реагентов, используемых для синтеза первой цепи, составляют: 10 мМ трис-HCl, pH 8,3, 10 мМ $MgCl_2$, 140 мМ KCl, 100 мкг/мл oligo$(dT)_{12-18}$, 2 мМ гидроксид метилртути, 20 мМ β-меркаптоэтанол, 1 мМ ванадилрибонуклеозидные комплексы или 0,5 ед./мл РНКазина, 1 мМ каждого dNTP, 100 мкг/мл poly$(A)^+$-РНК, 400—800 ед./мл обратной транскриптазы.

7. Остановите реакцию добавлением 2 мкл 0,5 М ЭДТА, pH 8,0, с последующим добавлением 25 мкл 150 мМ NaOH.

Примечание. Важно, чтобы концентрация ЭДТА была достаточной для связывания двухвалентных ионов магния; в противном случае при добавлении гидроксида натрия будет образовываться нерастворимый комплекс гидроксида магния с ДНК.

8. Для гидролиза мРНК инкубируйте смесь 1 ч при 65 °С или 8 ч при 37 °С.

9. Нейтрализуйте раствор добавлением 25 мкл 1,0 М трис-HCl, pH 8,0, и 25 мкл 1,0 н. HCl.

10. Определите суммарную радиоактивность, полученную в реакции, и радиоактивность материала, осаждаемого ТХУ, как описано на с. 414.

11. Определите выход кДНК на основании процента включившихся dNTP. Теоретически можно синтезировать количество кДНК, равное количеству РНК-матрицы. На практике выход кДНК при синтезе первой цепи в реакции с обратной транс-



Рис. 7.4.

криптазой обычно не превышает 10—30% количества добавленной poly(A)$^+$-РНК.

12. Экстрагируйте оставшуюся часть пробы равным объемом смеси фенол — хлороформ. После центрифугирования перенесите водную фазу в чистую эппендорфовскую пробирку. Вновь экстрагируйте органическую фазу равным объемом 10 мМ трис-HCl, pH 8,0, 100 мМ NaCl и 1 мМ ЭДТА. Обе водные фазы объедините.

13. Отделите кДНК от невключившихся dNTP и продуктов щелочного гидролиза матрицы с помощью хроматографии на сефадексе G-100 следующим способом. Нанесите объединенные водные фазы на колонку (свободный объем ~2 мл), заполненную сефадексом G-100. Соберите фракции по 0,2 мл и определите их радиоактивность, используя эффект Черенкова. Объедините радиоактивные фракции исключенного объема колонки (рис. 7.4). Отберите аликвоту (20 000 имп/мин) кДНК для анализа с помощью гель-электрофореза. Осадите оставшуюся часть кДНК этанолом. Невключившиеся dNTP могут быть также удалены методом колоночной хроматографии с использованием центрифугирования (с. 409).

14. Определите размер первой цепи кДНК методом электрофореза в 1,4%-ном щелочном агарозном геле (с. 174).

Нанесите на гель 20 000 имп/мин кДНК. В качестве маркеров для определения молекулярной массы используйте смесь фрагментов ДНК плазмиды pBR322, полученных с помощью рестриктирующей эндонуклеазы и несущих на конце метку (с. 125). Нанесите на гель 3000 имп/мин маркеров. Проводите электрофорез до тех пор, пока бромкрезоловый зеленый не пройдет половину длины геля.

Зафиксируйте ДНК, дважды погружая гель на 30 мин в раствор 7%-ной ТХУ.

Быстро промойте гель в воде и промокните для удаления избытка жидкости. Оберните гель пленкой Saran Wrap и проведи-

те радиоавтографию, экспонируя его с рентгеновской пленкой (Kodak XR или эквивалентной ей) при комнатной температуре в течение нескольких часов без усиливающего экрана.

Если синтез первой цепи прошел успешно, на пленке проявится радиоактивное пятно, соответствующее кДНК (размером от 100 нуклеотидов до величины самых больших молекул в препарате РНК). За исключением тех случаев, когда poly(A)$^+$-РНК была выделена из дифференцированных клеток, содержащих один или несколько видов мРНК, представленных очень большим числом копий, полосы, соответствующие специфическим мРНК, не обнаруживаются.

Синтез второй цепи кДНК

1. Осадите первую цепь кДНК центрифугированием (10 мин при 4 °С в центрифуге Эппендорф).

2. Ресуспендируйте кДНК в 50 мкл H_2O. Добавьте 50 мкл буфера (2×) для синтеза второй цепи. Отберите 4 мкл для последующего анализа с помощью нуклеазы S1 и гель-электрофореза.

Буфер (2×) для синтеза второй цепи имеет состав: 0,2 М HEPES, pH 6,9, 20 мМ $MgCl_2$, 5 мМ дитиотрейтол, 0,14 М KCl и 1 мМ каждый из четырех dNTP.

3. Добавьте в реакционную смесь 20—50 ед. фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* на каждый микрограмм одноцепочечной кДНК. Объем вносимого фермента не должен превышать 15% объема всей реакционной смеси, иначе синтез второй цепи кДНК может ингибироваться глицерином и фосфатом, содержащимися в буфере для хранения фермента. Концентрация фермента во многих имеющихся в продаже препаратах весьма низкая (1—2 ед./мкл), и для внесения в реакционную смесь нужного количества фермента часто оказывается необходимым увеличить ее объем.

Инкубируйте при 15 °С в течение 20 ч. Такая длительная инкубация позволяет ферменту «найти» молекулы одноцепочечной кДНК со шпильками на 3′-концах. По-видимому, такие структуры очень нестабильны и присутствуют в молекулах только временно; поэтому, чтобы начать синтез второй цепи кДНК, фермент должен «ожидать» и «ловить» молекулы с такой маловероятной конфигурацией. Некоторые исследователи до начала синтеза второй цепи кДНК денатурируют первую цепь обработкой гидроксидом метилртути. Мы не обнаружили, что такая обработка приводит к изменению эффективности синтеза или размера двухцепочечного кДНК-продукта.

4. Остановите реакцию добавлением 2,0 мкл 0,5 М ЭДТА.

5. Отберите из реакционной смеси две аликвоты по 2,0 мкл для дальнейшего анализа с помощью гель-электрофореза. Экст-

рагируйте оставшуюся часть пробы равным объемом смеси фенол — хлороформ. Отделите двухцепочечную кДНК от невключившихся dNTP хроматографией на сефадексе G-50, как описано на с. 407—410. Осадите ДНК этанолом.

6. Даже если распределение молекул популяции двухцепочечной кДНК по размеру правильно, крайне маловероятно, чтобы синтез второй цепи завершился для всех молекул. Укороченные двухцепочечные кДНК появляются, по-видимому, из-за присутствия в матрице последовательностей, на которых полимераза Кленова задерживается или останавливается (strong-stop-последовательности). Поскольку полимераза Кленова и обратная транскриптаза останавливаются в разных точках матрицы, можно увеличить выход полноразмерной двухцепочечной кДНК, проводя после реакции с фрагментом Кленова реакцию с обратной транскриптазой.

7. Растворите кДНК в 20 мкл H_2O. Добавьте 5 мкл 1 М трис-HCl, pH 8,3, 7 мкл 1 М KCl, 2 мкл 250 мМ $MgCl_2$, 2,5 мкл раствора, содержащего все четыре dNTP в концентрации 20 мМ, 2 мкл 700 мМ β-меркаптоэтанола, воду до 48 мкл и 2 мкл (40 ед.) обратной транскриптазы. Инкубируйте при 42 °С в течение 1 ч.

8. Остановите реакцию добавлением 2,0 мкл 0,5 М ЭДТА. Отберите две аликвоты по 1 мкл для анализа с помощью гель-электрофореза. Экстрагируйте оставшуюся часть пробы равным объемом смеси фенол — хлороформ. Отделите двухцепочечную кДНК от несвязавшихся dNTP хроматографией на сефадексе G-50, как описано на с. 407—410. Осадите двухцепочечную кДНК этанолом.

9. Нанесите пробы, отобранные на стадиях 2 (2 мкл из аликвоты объемом 4 мкл), 5 и 8, на щелочной 1,4%-ный агарозный гель. Проведите электрофорез и определите местоположение кДНК с помощью радиоавтографии, как описано на с. 174. В качестве маркеров для определения молекулярной массы используйте набор фрагментов ДНК плазмиды pBR322 с концевой меткой (с. 125 и далее).

Если синтез второй цепи прошел успешно, длина двухцепочечной кДНК, вычисленная по скорости ее движения в щелочном геле, примерно в два раза больше длины первой цепи. Это связано с тем, что первая и вторая цепи ковалентно связаны петлей шпильки.

РАСЩЕПЛЕНИЕ НУКЛЕАЗОЙ S1

Необходимое количество нуклеазы S1 определяют с помощью серии калибровочных реакций, для проведения каждой из которых требуется около 2000 имп/мин меченной ^{32}P двухцепочечной кДНК.

1. Растворите двухцепочечную кДНК в 50 мкл раствора 1 мМ

трис-HCl, pH 7,6, и 0, 1 мМ ЭДТА. Определите радиоактивность, используя эффект Черенкова.

2. Отберите из раствора аликвоту, содержащую 10 000 имп/мин ^{32}P. Добавьте 10 мкл буфера (10×) для нуклеазы S1 и воду в количестве, необходимом, чтобы объем смеси был равен 100 мкл. Оставшуюся часть двухцепочечной кДНК замороzьте.

Внесите в пять эппендорфовских пробирок аликвоты по 20 мкл. К каждой аликвоте добавьте 0, 1, 2, 4 или 6 ед. нуклеазы S1. Инкубируйте при 37 °С в течение 30 мин. *Буфер (10×) для нуклеазы S1* имеет состав: 2 М NaCl, 0,5 М ацетат натрия, pH 4,5, 10 мМ $ZnSO_4$ и 5%-ный глицерин.

3. Для остановки реакции добавьте 1 мкл 0,5 М ЭДТА. Исследуйте каждую пробу в 1,4%-ном щелочном геле, используя в качестве маркеров для определения молекулярной массы фрагменты ДНК плазмиды pBR322 с концевой меткой (с. 125). Обязательно нанесите на гель и одноцепочечную кДНК, которая была оставлена для этой цели.

Определите местоположение ДНК с помощью радиоавтографии. Для того чтобы быстрее получить результат, следует: а) фиксировать гель в 7%-ной ТХУ (30 мин, дважды меняя кислоту); б) быстро промыть гель водой; в) высушить гель на бумаге ватман 3ММ или: а) вымочить гель в течение 45 мин в 0,5 М трис-HCl, pH 7,5, и 1,0 М NaCl; б) перенести ДНК на нитроцеллюлозный фильтр по методу Саузерна (Southern blotting) (с. 344 и далее). Проведите радиоавтографию высушенного геля или нитроцеллюлозного фильтра, экспонируя их с рентгеновской пленкой Kodak XR (или ей эквивалентной) с усиливающим экраном. Экспозиция в течение ночи при —70 °С должна быть достаточной. При обработке ДНК нуклеазой S1 в возрастающем количестве образуются популяции молекул с уменьшающимся средним размером. Выберите концентрацию фермента, при которой средний размер молекул в популяции совпадает с размером одноцепочечной кДНК.

Примечание. Цейтлин и Эфстратиадис (Zeitlin, Efstratiadis, личное сообщение) предложили другой метод калибровки реакции с нуклеазой S1. Он основан на наблюдении, что плазмида PML-21 (Hershfield et al., 1974) содержит обращенный повтор размером 1,05 kb, который является частью элемента Tn*903*, обусловливающего устойчивость к канамицину (Sim et al., 1979). Метод включает получение с помощью рестриктазы линейной плазмидной ДНК, ее денатурацию кипячением и быстрым охлаждением, расщепление нуклеазой S1 и анализ полученного продукта в неденатурирующем и денатурирующем агарозных гелях. На успешное расщепление указывает наличие дискретной полосы, соответствующей олигонуклеотиду из 1,05 kb, как в неденатурирующем, так и в денатурирующем геле.

а) Проведите расщепление 10 мкг ДНК PML-21 рестриктазой *Eco*RI в 100 мл буфера для *Eco*RI. Имейте в виду, что *Eco*RI не вносит разрывов в обращенный повтор (1 мкг плазмидной ДНК эквивалентен 100 нг шпилечной ДНК).

б) Добавьте 900 мкл H_2O, перемешайте и разделите пробу на аликвоты по 100 мкл.

в) Денатурируйте ДНК кипячением, а затем быстро охладите пробы, погрузив их в баню с сухим льдом и спиртом.

г) После оттаивания растворов ДНК во льду добавьте в каждую пробирку по 100 мкл охлажденного во льду буфера (2×) для нуклеазы S1, содержащего 0, 10, 20, 40, 60, 80 или 100 ед. нуклеазы S1. Инкубируйте при 37 °С в течение 30 мин. Обычно для расщепления 1 мкг денатурированной ДНК плазмиды PML-21 требуется 50 ед. нуклеазы SI.

д) Проведите электрофорез 25 мкл каждой пробы в нейтральном и денатурирующем 2%-ных агарозных гелях. Выявите ДНК с помощью окраски бромистым этидием.

4. Проведите расщепление оставшейся двухцепочечной кДНК необходимым количеством нуклеазы S1.

5. Остановите реакцию добавлением 2 мкл 0,5 М ЭДТА. Добавьте 2 М основной трис до конечной концентрации 0,05 М. Экстрагируйте раствор один раз смесью фенол—хлороформ. Осадите ДНК этанолом.

6. Вновь растворите кДНК в 18 мкл буфера ТЕ, pH 8,0. Добавьте 2 мкл 3 М NaCl. Фракционируйте кДНК на классы по размеру молекул, пропустив ее через колонку объемом 1 мл с сефарозой CL-4B (с. 407—409), уравновешенную 10 мМ трис-HCl, pH 8,0, 0,3 М NaCl и 1 мМ ЭДТА. Соберите фракции по 50 мкл. Проведите электрофорез аликвот из каждой фракции в щелочном агарозном геле (1,4%). В качестве маркеров для определения молекулярной массы используйте набор фрагментов ДНК плазмиды pBR322 с концевой меткой. Определите местоположение кДНК с помощью радиоавтографии, как описано в стадии 2. Объедините фракции, содержащие молекулы кДНК длиной более 0,5 kb. Осадите кДНК этанолом.

КЛОНИРОВАНИЕ ДВУХЦЕПОЧЕЧНОЙ кДНК

Присоединение концевой гомополимерной последовательности poly(dG) к векторной ДНК

1. Обработайте 55 мкг векторной ДНК (pBR322, pAT153 или pXf3) рестриктазой *Pst*I. Убедитесь в полном расщеплении с помощью электрофореза небольшого количества материала в 1%-ном агарозном мини-геле.

2. Проведите очистку линейной ДНК методом электрофореза в препаративном агарозном геле (1%). (Во избежание перегрузки геля щель должна иметь 4 см в длину и 4 мм в глубину.)

3. Экстрагируйте ДНК из геля с помощью электрофоретического элюирования, как описано на с. 169 и далее. Эта стадия очистки имеет важное значение по двум причинам. Во-первых, удаляются любые РНК или низкомолекулярные ДНК, загрязняющие плазмидную ДНК или рестриктазу. Во-вторых, линейная плазмидная ДНК отделяется от кольцевых молекул, не расщепленных рестриктазой *Pst*I. Эти молекулы существенно повышают фоновый уровень нерекомбинантных трансформантов при трансформации клеток *E. coli* препаратом векторной ДНК.

4. Растворите линейную плазмидную ДНК в 55 мкл H_2O. Добавьте 55 мкл буфера (2×) для присоединения концевых последовательностей.

Буфер (2×) для присоединения концевых последовательностей имеет состав: 0,4 М какодилат калия, 50 мМ трис-HCl, pH 6,9, 4 мМ дитиотрейтол, 1 мМ $CoCl_2$, 2 мМ [^{3}H]dGTP (уд. акт. 12 Ки/ммоль) и 500 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина. (Какодилат калия получают разбавлением 1 М раствора, пропущенного через колонку с Chelex, уравновешенную ионами калия.)

5. Перенесите 10 мкл раствора ДНК в чистую пробирку и инкубируйте в течение 10 мин при 37 °С. Оставшуюся часть раствора храните при —20 °С.

6. Добавьте к аликвоте объемом 10 мкл 2 ед. терминальной трансферазы. Перемешайте и продолжайте инкубацию при 37 °С.

7. Отберите аликвоты объемом 1 мкл после инкубации в течение 0, 1, 2, 5, 10, 20, 30 и 40 мин. Нанесите аликвоты на фильтры DE-81. Промойте фильтры и измерьте радиоактивность, как описано на с. 414. Подсчитайте число остатков dG, приходящихся на один конец.

8. Инкубируйте оставшиеся 100 мкл линейной плазмидной ДНК при 37 °С в течение 10 мин. Добавьте 20 ед. терминальной трансферазы и инкубируйте в течение времени, необходимого для присоединения 15—20 остатков dG к каждому концу.

9. Остановите реакцию, охладив смесь до 0 °С. Добавьте 10 мкл 0,5 М ЭДТА, pH 8,0. Экстрагируйте один раз смесью фенол — хлороформ.

10. Отделите ДНК с гомополимерными концами от низкомолекулярных примесей с помощью хроматографии на колонке с сефадексом G-100, уравновешенной буфером для отжига. Храните ДНК в виде аликвот при —20 °С.

Примечание. Сефадекс G-100 нельзя применять при сочетании гель-фильтрации с центрифугированием, поскольку его гранулы при центрифугировании разрушаются. *Буфер (10×) для отжига* имеет состав: 1 М NaCl, 0,1 М трис-HCl, pH 7,8 и 1 мМ ЭДТА.

11. Для проверки биологической активности вектора с присоединенными концами, а также отсутствия в нем примесей неразрезанной плазмидной ДНК без гомополимерных концов следует провести пробный отжиг и трансформацию клеток *E. coli*.

а) Добавьте 20—30 dC-остатков к небольшому (200—500 пар оснований) фрагменту ДНК, используя метод, описанный выше для присоединения dG-концов.

б) Поставьте следующие реакции отжига. *В пробирку А* внесите 0,1 мкг неразрезанной плазмидной ДНК, воды до объема 18 мкл и 2 мкл буфера (10×) для отжига. *В пробирку Б* внесите 0,1 мкг вектора с концевой dG-последовательностью, воды до объема 18 мкл и 2 мкл буфера (10×) для отжига. *В пробирку В* внесите 0,1 мкг вектора с концевой dG-последовательностью, 0,01 мкг встраиваемой ДНК с концевой dG-последовательностью, воды до объема 18 мкл и 2 мкл буфера (10×) для отжига.

в) Прогрейте смесь при 65° в течение 5 мин и проведите отжиг ДНК, инкубируя ее при 57 °С в течение 1—2 ч. Трансформируйте штамм RR1 *E. coli* (гл. 8). Эффективность трансформации только вектором с концевой dG-последовательностью должна быть в 100 раз меньше по сравнению с трансформацией кольцевой плазмидой.

Эффективность трансформации рекомбинантной плазмидой (пробирка В) должна быть как минимум в 10 раз выше, чем в случае трансформации только вектором с концевой dG-последовательностью.

Присоединение концевой гомополимерной последовательности poly(dC) к двухцепочечной кДНК

1. Определите количество синтезированной двухцепочечной кДНК, исходя из количества [α-^{32}P]dCTP, включившегося в кДНК во время синтеза первой цепи. Вычислите общее количество синтезированных молекул, исходя из распределения молекул двухцепочечной кДНК по размеру. Поскольку точно определить размер обычно не представляется возможным, а количество двухцепочечной кДНК ограничено, для определения скорости присоединения гомополимерных концов dC используют 5 мкг плазмидной ДНК, превращенной в линейную форму рестриктазой *Pst*I. Это не так странно, как кажется. При проведении реакций с терминальной трансферазой фермент присутствует в огромном избытке, поэтому число присоединяемых остатков, по существу, не зависит от концентрации ДНК.

Проведите серию калибровочных реакций с терминальной трансферазой с участием 0,5 мкг линейной плазмидной ДНК и 2 ед. терминальной трансферазы, в точности соблюдая условия, описанные на с. 232, и используя [^{3}H]dCTP вместо dGTP.

Инкубируйте пробы 30 с, 1, 2 и 4 мин. Нанесите аликвоты на фильтры DE-81. Промойте фильтры и измерьте радиоактивность, как описано на с. 414. Подсчитайте, сколько остатков dG присоединилось к каждому концу.

2. Осадите двухцепочечную кДНК центрифугированием в течение 10 мин при 4 °С в центрифуге Эппендорфа. Быстро высушите осадок ДНК под вакуумом.

3. Растворите двухцепочечную кДНК в 25 мкл H_2O. Добавьте 25 мкл буфера (2×) для присоединения концевых последовательностей, содержащего [^{3}H]dCTP (с. 233). Инкубируйте в течение 10 мин при 37 °С.

4. Добавьте по 5 ед. терминальной трансферазы на каждый микрограмм двухцепочечной кДНК, участвующей в реакции. Инкубируйте в течение времени, необходимого для присоединения 15—20 остатков dC, определенного по результатам калибровочных реакций.

5. Остановите реакцию, охладив смесь до 0 °С. Добавьте 10 мкл 0,5 М ЭДТА, pH 8,0. Проведите одну экстракцию смесью фенол — хлороформ.

6. Отделите ДНК с присоединенными концевыми последовательностями от низкомолекулярных примесей хроматографией на колонке с сефадексом G-100, уравновешенным буфером для отжига, или хроматографией на сефадексе G-50 с использованием центрифугирования (с. 409). Храните ДНК при —20 °С.

ОТЖИГ ВЕКТОРА И ДВУХЦЕПОЧЕЧНОЙ кДНК

1. Смешайте эквимолярные количества кДНК с концевыми dC-последовательностями и вектор с dG-последовательностями в конечной концентрации 1 нг/мкл в буфере для отжига.

Буфер для отжига имеет состав: 0,1 М NaCl, 10 мМ трис-HCl, pH 7,8, и 1,0 мМ ЭДТА.

2. Прогрейте смесь 5 мин при 65 °С и проведите отжиг, инкубируя смесь при 57 °С в течение 1—2 ч. После отжига храните ДНК при —20 °С.

3. Проведите трансформацию штамма RR1 *E. coli*, используя методику, описанную на с. 242—243.

КЛОНИРОВАНИЕ ДВУХЦЕПОЧЕЧНОЙ кДНК С ПОМОЩЬЮ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОГО ПРИСОЕДИНЕНИЯ ЛИНКЕРОВ

1. Синтезируйте первую и вторую цепи кДНК, как описано выше. (Не обрабатывайте двухцепочечную ДНК со шпилькой нуклеазой S1.)

2. Приготовьте два набора линкеров, обработанных киназой, как описано на с. 354 и далее.

3. Для увеличения количества молекул с полностью тупыми концами двухцепочечную кДНК со шпилькой обработайте фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* в присутствии всех четырех dNTP.

Растворите около 2 мкг двухцепочечной кДНК в 11 мкл буфера ТЕ, pH 7,4. Добавьте 2 мкл буфера (10×) для репарации, 1,25 мкл 1,0 мМ dATP, 1,25 мкл 1,0 мМ dCTP, 1,25 мкл 1,0 мМ dGTP, 1,25 мкл 1,0 мМ TTP и 1 ед. (~1 мкл) фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I. Инкубируйте смесь в течение 30 мин при комнатной температуре. *Буфер (10×) для репарации* имеет состав: 0,5 М трис-HCl, pH 7,4, 70 мМ $MgCl_2$ и 10 мМ дитиотрейтол.

4. Первый линкер присоединяется к тупому концу двухцепочечной кДНК со шпилькой, т. е. к концу, соответствующему 3′-концу исходной мРНК. Следует добавлять достаточное количество обработанных киназой линкеров, чтобы между ними и двухцепочечной кДНК соблюдалось отношение 1:1.

В конце реакции репарации (стадия 3) добавьте 30 мкл буфера (2×) для лигирования тупых концов. Затем добавьте: 2 мкг линкеров, обработанных киназой (4 мкл), 10 ед. полинуклеотидлигазы фага Т4 (по Вейсу) (~1 мкл) и 20 ед. РНК-лигазы (2 мкл). Инкубируйте 12—16 ч при 4 °С. *Буфер (2×) для лигирования тупых концов* имеет состав: 50 мМ трис-HCl, pH 7,4, 10 мМ $MgCl_2$, 10 мМ дитиотрейтол, 0,5 мМ спермидин, 2 мМ АТР, 2,5 мМ хлористый гексаминокобальт и 20 мкг/мл BSA[1]. Этот буфер следует хранить в виде небольших аликвот при —20 °С.

5. Остановите реакцию добавлением 2 мкл 0,5 М ЭДТА. Экстрагируйте один раз смесью фенол—хлороформ. Осадите ДНК этанолом.

6. Растворите двухцепочечную кДНК в 45 мкл раствора 1 мМ трис-HCl, pH 7,6, и 0,1 мМ ЭДТА. Проведите расщепление петли шпильки нуклеазой S1, как описано на с. 230 и далее.

7. Остановите реакцию добавлением 2 мкл 0,5 М ЭДТА и 2,5 мкл 1 М основного триса. Экстрагируйте один раз смесью фенол—хлороформ.

8. Отделите двухцепочечную кДНК от низкомолекулярных примесей хроматографией на сефадексе G-100. Осадите двухцепочечную кДНК этанолом.

9. Проведите репарацию двухцепочечной кДНК фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli,* как описано для стадии 3 (см. выше).

10. Добавьте второй, обработанный киназой линкер, как описано для стадии 4 (см. выше).

---

[1] BSA — бычий сывороточный альбумин.

11. Разбавьте реакционную смесь для присоединения второго линкера так, чтобы состав буфера стал подходящим для расщепления ДНК с линкерами соответствующими ферментами рестрикции. Добавьте по 50 ед. каждого фермента на каждый микрограмм участвующего в реакции линкера. Инкубируйте в течение 6—8 ч при необходимой температуре.

12. Остановите реакцию добавлением ЭДТА до конечной концентрации 10 мМ. Экстрагируйте один раз смесью фенол—хлороформ. ДНК осадите этанолом.

13. Вновь растворите двухцепочечную кДНК в 10 мкл H_2O. Добавьте 10 мкл раствора, содержащего 0,6 М NaCl, 20 мМ трис-HCl, pH 8,0, и 2 мМ ЭДТА. Фракционируйте кДНК на классы по размеру, пропуская ее через колонку с сефарозой CL-4B объемом 1 мл, уравновешенную тем же буфером. Соберите фракции объемом по 50 мкл. Проведите электрофорез аликвот из каждой фракции в щелочном агарозном геле (1,4%), используя в качестве маркеров для определения молекулярной массы набор фрагментов ДНК плазмиды pBR322 с концевой меткой. Определите местоположение кДНК с помощью радиоавтографии (с. 412). Объедините фракции, содержащие молекулы кДНК размером более 0,5 kb. ДНК осадите этанолом.

14. Приготовьте векторную ДНК следующим образом. Обработайте 50 мкг плазмиды подходящими растриктазами. Проведите очистку требуемого фрагмента ДНК с помощью гель-электрофореза (гл. 5) или центрифугирования в градиенте сахарозы, как описано Куртцем и Никодемусом (Kurtz, Nicodemus, 1981). Градиент [10—40% (вес/объем) сахарозы в 10 мМ трис-HCl, pH 7,9, 1 мМ ЭДТА и 1 М NaCl] можно наслоить обычным способом в центрифужную пробирку ротора Beckman SW41 или приготовить с помощью трех циклов замораживания при —70 °С и оттаивания при 4 °С 20%-ного (вес/объем) раствора сахарозы в том же буфере.

В одну пробирку с градиентом сахарозы можно внести до 100 мкг ДНК. Ее центрифугируют в течение 34 ч при 40 000 об/мин в роторе SW41 при 4 °С. Начиная со дна пробирки, собирают фракции по 0,4 мл и анализируют аликвоты по 15 мкл методом электрофореза в агарозном геле. Объединяют фракции, содержащие векторную ДНК, разбавляют их в три раза водой для уменьшения концентрации сахарозы и ДНК осаждают этанолом.

Для проверки биологической активности векторной ДНК и отсутствия в ней примесей неразрезанной линейной плазмидной ДНК проводят пробное сшивание и трансформацию клеток *E. coli*.

а) Приготовьте небольшой фрагмент ДНК (0,2—0,5 kb) с концами, соответствующими концам вектора.

б) Проведите следующие реакции лигирования (сшивания) в трех пробирках. В пробирку А внесите 0,1 мкг неразрезанной плазмидной ДНК, воду до объема 18 мкл, 2 мкл буфера (10×) для лигирования, 5 ед. Вейса лигазы. В пробирку Б внесите 0,1 мкг векторной ДНК, воды до объема 18 мкл и 2 мкл буфера (10×) для лигирования, 5 ед. Вейса лигазы. В пробирку В внесите 0,1 мкг векторной ДНК, 0,01 мкг небольшого фрагмента ДНК, воду до объема 18 мкл и 2 мкл буфера (10×) для лигирования, 5 ед. Вейса лигазы. Инкубируйте все пробы при 4 °С в течение 12—16 ч. *Буфер (10×) для лигирования* имеет состав: 0,5 М трис-HCl, pH 7,4, 0,1 М $MgCl_2$, 0,1 М дитиотрейтол, 10 мМ спермидин, 10 мМ АТР, 1 мг/мл BSA.

в) Трансформируйте штамм DH1 или HB101 *E. coli* (гл. 8) 10 нг пришитой к вектору ДНК.

Эффективность трансформации клеток *E. coli* векторной ДНК (пробирка Б) должна быть в 10^4 ниже, чем в случае нерасщепленной плазмиды. Эффективность трансформации реконструированной плазмидой (пробирка В) должна быть в 10—100 раз выше, чем в случае одного вектора.

15. Смешайте нужное количество вектора с двухцепочечной кДНК так, чтобы их молярное соотношение составило 5 : 1. Прогрейте смесь при 68 °С в течение 10 мин. Охладите во льду. Добавьте воду и буфер (10×) для лигирования так, чтобы конечная концентрация векторной ДНК составила 1,5 мкг/мл, а концентрация буфера стала бы однократной.

16. Добавьте в реакционную смесь полинуклеотидлигазу фага Т4 из расчета 10 ед. Вейса на каждый микрограмм векторной ДНК. Инкубируйте в течение 12—16 ч при 12 °С.

17. Добавьте ЭДТА до конечной концентрации 10 мМ. Экстрагируйте один раз смесью фенол — хлороформ и осадите ДНК этанолом.

18. Проведите трансформацию штамма DH1 *E. coli,* используя одну из методик, приведенных в гл. 8.

Глава 8

ВВЕДЕНИЕ ДНК ПЛАЗМИД И БАКТЕРИОФАГА λ В КЛЕТКИ *E. coli*

Главный этап в молекулярном клонировании — введение рекомбинантной ДНК в бактериальные клетки. Раньше этот процесс был малоэффективным и плохо воспроизводимым. Теперь в руках исследователей имеются эффективные и воспроизводимые методы трансформации бактерий молекулами плазмидной ДНК и упаковки ДНК бактериофага λ in vitro в инфекционные вирусные частицы.

ТРАНСФОРМАЦИЯ *E. coli* ПЛАЗМИДНОЙ ДНК

В основе большинства методов бактериальной трансформации лежит наблюдение (Mandel, Higa, 1970), согласно которому обработка бактерий хлористым кальцием увеличивает эффективность поглощения ими ДНК бактериофага λ. В 1973 г. было установлено, что подобным же образом дело обстоит и с плазмидной ДНК (Cohen et al., 1973). С тех пор предложены различные варианты основного метода, разработанные с целью увеличения эффективности трансформации у разных штаммов бактерий. Выход трансформантов в большинстве случаев составляет 10^5—10^7 на 1 мкг интактной ДНК pBR322. В последнее время найдены условия (Hanahan, неопубликованные данные; см. с. 242), в которых штамм *E. coli* χ1776 воспроизводимо дает 10^7—10^8 трансформантов на 1 мкг интактной ДНК pBR322. Как ни впечатляюща такая эффективность, но все же следует отдавать себе отчет, во-первых, в том, что компетентна (т. е. способна поглощать плазмидную ДНК) только очень небольшая фракция клеток, и, во-вторых, в том, что в трансформации успешно участвует лишь 1 из приблизительно 10 000 молекул ДНК.

После проникновения в бактерию происходит репликация плазмидной ДНК и начинается экспрессия маркеров устойчивости к лекарственным препаратам, в результате чего трансформанты приобретают устойчивость к антибиотику.

Бактерия способна поглощать ДНК в течение короткого периода времени, но в результате выдерживания с агентами, повышающими эффективность трансформации, большинство

бактериальных штаммов приобретает способность сохранять состояние компетентности на протяжении 1—2 дней. Компетентные клетки штамма χ1776 можно приготовить в больших количествах, проверить и хранить замороженными. Правда, клетки этого штамма прихотливы и требуют дорогостоящей ростовой среды. По этой причине их чаще всего используют только для начальной трансформации и скрининга, а затем переходят на плазмидную ДНК, получаемую в небольших количествах (с. 332), и ею трансформируют клетки более обычных штаммов.

ТРАНСФОРМАЦИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ ХЛОРИСТОГО КАЛЬЦИЯ

Этот способ трансформации бактерий плазмидной ДНК применяется наиболее часто (Mandel, Hida, 1970). Выход трансформантов составляет 10^5—10^7 на 1 мкг интактной ДНК pBP322 при использовании штамма *E. coli* HB101.

1. Внесите в 500-мл колбу 100 мл бульона L и 1 мл ночной культуры бактерий. Выращивайте клетки при 37 °С с интенсивным перемешиванием до плотности $\sim 5 \cdot 10^7$ клетка/мл. Обычно это занимает 2—4 ч. Для одной пробы на трансформацию требуется 3 мл клеток.

Примечание. Соотношение между оптической плотностью и числом жизнеспособных бактерий в 1 мл культуры варьирует от штамма к штамму. Например, для штаммов *rec*$^+$ (χ1776, MM284) концентрации $5 \cdot 10^7$ клетка/мл соответствует $D_{550} = 0{,}2$, а для штаммов *rec*$^-$ (DH1, HB101) концентрации $5 \cdot 10^7$ клетка/мл соответствует $D_{550} = 0{,}5$. Калибровочную кривую зависимости D_{550} от числа бактерий в 1 мл культуры следует строить для каждого нового штамма *E. coli*, применяемого в работе.

2. Охладите культуру во льду (10 мин). Отцентрифугируйте суспензию клеток при 4000 g в течение 5 мин при 4 °С.

3. Удалите надосадочную жидкость. Ресуспендируйте клетки в половине начального объема охлажденного во льду стерильного раствора 50 мМ $CaCl_2$ + 10 мМ трис-HCl, pH 8,0.

4. Поместите суспензию клеток в ледяную баню на 15 мин, а затем отцентрифугируйте суспензию при 4000 g в течение 5 мин при 4 °С.

5. Удалите надосадочную жидкость. Ресуспендируйте клетки в 1/15 начального объема охлажденного во льду стерильного раствора 50 мМ $CaCl_2$ + 10 мМ трис-HCl, pH 8,0. Распределите аликвоты объемом 0,2 мл по предварительно охлажденным пробиркам. Клетки можно хранить при 4 °С 12—24 ч.

Примечание. Для максимальной эффективности трансформации очень важно, 1) чтобы бактерии находились в логарифмической фазе роста и чтобы во время обработки хлористым кальцием плотность суспензии была низкой; 2) чтобы клетки выдерживались при 4 °С 12—24 ч. За это время эффектив-

ность трансформации возрастает в 4—6 раз (Dagert, Ehrlich, 1979). Через 48 ч она снизится до первоначального уровня.

6. Добавьте ДНК в буфере, применяемом для реакции с лигазами (лигазный буфер), или в буфере ТЕ. Размешайте и инкубируйте смесь во льду 30 мин. Для каждой пробы можно брать до 40 нг ДНК (соответственно 100 мкл лигазного буфера или буфера ТЕ). Увеличение количества ДНК или объема буфера приводит к снижению эффективности трансформации.

7. Перенесите пробы в водяную баню (42 °С) на 2 мин.

8. Добавьте в каждую пробирку по 1,0 мл бульона L и инкубируйте 30 мин при 37 °С (при тетрациклиновой селекции) или 1 ч (при ампициллиновой или канамициновой селекции) без качания. За это время в бактериях пройдет процесс восстановления и начнется экспрессия генов устойчивости к антибиотикам.

9. Высейте удобное количество клеток на плотную селективную среду, используя методику растирания (распределения клеток шпателем) или методику верхнего агара (с. 77). В последнем случае трансформантов получается несколько больше.

Если селекцию ведут на устойчивость к тетрациклину, то трансформационную смесь можно целиком высеять в одну чашку. При селекции на устойчивость к ампициллину в чашку следует высевать только часть культуры (найденную эмпирически), так как число вырастающих трансформантов увеличивается не пропорционально высеваемому объему, возможно, из-за накопления в среде токсичных веществ, выделяемых убитыми антибиотиком клетками. Кроме того, при селекции на устойчивость к ампициллину плотность высеваемой суспензии должна быть низкой, а чашки нужно перенести через 16—24 ч из термостата в холодильник (4 °С). Дело в том, что ампициллин разрушается β-лактамазой, секретируемой устойчивыми трансформантами, поэтому при густом засеве или длительной инкубации вокруг колоний трансформантов вырастут сателлитные колонии, сформированные чувствительными к антибиотику клетками.

10. Оставьте чашки при комнатной температуре, пока не затвердеет верхний агар или не впитается жидкость.

11. Переверните чашки и инкубируйте их при 37 °С. Колонии должны появиться через 12—16 ч.

ТРАНСФОРМАЦИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ ХЛОРИСТОГО КАЛЬЦИЯ И ХЛОРИСТОГО РУБИДИЯ

Этот метод (*Kushner,* 1978) больше всего подходит для штамма *E. coli* SK1590 (приложение В). Эффективность трансформации других штаммов *E. coli* также выше, чем та, которая достигается при использовании предыдущего метода.

1. В 500-мл колбу внесите 100 мл бульона и 0,5 мл ночной культуры бактерий. Наращивайте клетки при 37 °С с интенсивным перемешиванием до плотности $\sim 5 \cdot 10^7$ клетка/мл (см. примечание к стадии 1, с. 240). Для каждой пробы требуется 2 мл клеток.

2. Отцентрифугируйте аликвоты по 2 мл культуры ($1 \cdot 10^8$ клеток) в стерильных 15-мл корексовых пробирках при 4000 g в течение 10 мин при 4 °С.

3. Удалите надосадочную жидкость. Осторожно ресуспендируйте осадок в 1 мл стерильного раствора, содержащего 10 мМ MOPS (морфолинопропансульфоновой кислоты), pH 7,0, и 10 мМ RbCl.

4. Осадите клетки центрифугированием при 4000 g в течение 10 мин при 4 °С.

5. Удалите надосадочную жидкость. Осторожно ресуспендируйте клетки в 1 мл раствора, содержащего 0,1 М MOPS, pH 6,5, 50 мМ $CaCl_2$ и 10 мМ RbCl.

6. Поместите бактерии в лед на 15 мин.

7. Соберите клетки центрифугированием при 4000 g в течение 10 мин при 4 °С.

8. Удалите надосадочную жидкость как можно более полно. Осторожно ресуспендируйте осадок в 0,2 мл стерильного раствора, содержащего 0,1 М MOPS, pH 6,5, 50 мМ $CaCl_2$ и 10мМ RbCl.

9. Добавьте 3 мкл диметилсульфоксида (Spectroquality DMSO; Matheson, Coleman and Bell) и 1—200 нг ДНК в 10 мкл (или меньше) буфера ТЕ, pH 8,0.

Примечание. Продукты окисления DMSO сильно подавляют трансформацию. Поэтому свежий раствор спектрально чистого DMSO хранят в замороженном виде при —70 °С в аликвотах по 0,5 мл. Аликвоты используют только один раз, а оставшуюся часть выбрасывают.

10. Поместите пробы в лед на 30 мин.

11. Перенесите их в водяную баню с температурой 43—44 °С на 30 с.

12. Добавьте бульон L до объема 5 мл. Инкубируйте 60 мин при 37 °С без качания.

13. Сделайте посев на селективную среду, как описано на с. 77. При необходимости перед посевом клетки можно сконцентрировать центрифугированием.

ТРАНСФОРМАЦИЯ КЛЕТОК *E. coli* χ1776

Описанный ниже метод является наиболее эффективным из всех имеющихся (Hanahan, неопубликованные данные). Его пропись можно во всех деталях использовать только для *E. coli* χ1776. С некоторыми небольшими изменениями (см. при-

мечание на с. 244) он пригоден и для ряда других штаммов *E. coli* (MM294), C600, DH1, но не для HB101). Правда, в последнем случае эффективность трансформации несколько ниже.

1. Разведите 1 мл ночной культуры штамма χ1776 *E. coli* 100 мл бульона для выращивания χ1776 в 500-мл колбе. Инкубируйте при 37 °C с интенсивной аэрацией до плотности $5 \cdot 10^7$ клетка/мл ($D_{550}=0{,}2$; см. примечание к п. 1, с. 240). Обычно для этого требуется 3—4 ч роста. Для одной трансформационной пробы необходимо 5 мл культуры.

Примечание. Штамм χ1776 очень чувствителен к детергентам, поэтому можно использовать только очень тщательно вымытую стеклянную или пластмассовую посуду. Не забудьте также, что для роста χ1776 нужны диаминопимелиновая кислота и тимидин (с. 390).

2. Отцентрифугируйте клетки при 4000 g в течение 5 мин при 4 °C.

3. Удалите надосадочную жидкость. Осторожно ресуспендируйте клетки в 0,2 объема ледяного буфера, используемого при трансформации χ1776. Поместите суспензию в лед на 5 мин.

Буфер, используемый при трансформации χ1776, pH 5,8, имеет состав: 100 мМ RbCl, 45 мМ $MnCl_2$, 10 мМ $CaCl_2$, 5 мМ $MgCl_2$, 0,5 мМ LiCl, 35 мМ ацетат калия, pH 6,2 и 15%-ная сахароза (Shwartz-Mann).

Приготовление буфера. Сделайте раствор, содержащий все компоненты, за исключением RbCl и $MgCl_2$. Добавьте твердые RbCl и $MgCl_2$ и осторожно доведите pH раствора до 5,8 разведенной уксусной кислотой. Простерилизуйте раствор фильтрованием и заморозьте аликвоты при —20 °C.

4. Отцентрифугируйте клетки при 4000 g в течение 5 мин при 4 °C.

5. Удалите надосадочную жидкость. Осторожно ресуспендируйте клетки в 0,04 объема исходной культуры охлажденного льдом буфера, используемого при трансформации. Внесите по 0,2 мл суспензии в предварительно охлажденные пробирки и оставьте их во льду на 5 мин.

6. В каждую пробирку добавьте 6 мкл DMSO (Spectroquality DMSO; Matheson, Coleman and Bell; см. примечание к п. 9, с. 242). Поместите пробы в лед на 15 мин.

Примечание. Компетентные клетки можно приготовить впрок и хранить при —70 °C следующим образом. Приготовьте клетки, как описано в п. 1—6, а затем разлейте порциями по 200 мкл в стерильные эппендорфовские пробирки. Как можно быстрее заморозьте каждую аликвоту в сухом льду с этанолом и храните при —70 °C. По мере надобности размораживайте каждую аликвоту, помещая ее на 30 мин в лед, и продолжайте трансформацию с п. 9. При хранении клеток при —70 °C они

остаются компетентными для трансформации по крайней мере в течение 6 мес (это не относится к штаммам DH1, C600 или MM294).

7. Быстро заморозьте клетки, поместив пробирку на 20 с в смесь сухой лед— этанол (—55 °С).

8. Быстро разморозьте клетки, поместив пробирку в воду комнатной температуры. Когда клетки оттают, перенесите пробирку в ледяную баню на 5 мин.

9. Добавьте 7 мкл DMSO, перемешайте и поместите пробирку в лед на 5—10 мин.

10. Добавьте 1—25 нг ДНК в 1—10 мкл буфера для лигирования или буфера ТЕ, pH 7,4. Поместите пробу в ледяную баню на 10—30 мин.

11. Быстро заморозьте клетки, опустив пробирку на 30—60 с в баню с сухим льдом и этанолом.

12. Быстро разморозьте клетки, поместив пробирку в воду комнатной температуры. Сразу после оттаивания перенесите пробирку в ледяную баню.

13. Быстро нагрейте клетки, опустив пробирку на 1 мин в водяную баню с температурой 42 °С или на 2 мин в баню с температурой 37 °С.

14. Добавьте 1 мл бульона для выращивания χ1776 и инкубируйте 30 мин (при тетрациклиновой селекции) или 1 ч (при ампициллиновой или канамициновой селекции) при 37 °С без перемешивания.

15. Сделайте посев клеток на селективную среду, как описано на с. 77.

Примечания.

А. Данный метод можно использовать и для других штаммов *E. coli* (например, DH1, C600, MM294), если не добавлять в буфер для трансформации $MgCl_2$ и LiCl и опустить стадии 7 и 11 (быстрое замораживание). Эффективность трансформации в этих условиях составляла 10^7—10^8 трансформантов на 1 мкг сверхспиральной ДНК pBR322.

Б. По неизвестной причине этот метод не дает хороших результатов с *E. coli* HB101.

УПАКОВКА ДНК БАКТЕРИОФАГА λ IN VITRO

Упаковка ДНК бактериофага λ вначале проводилась с использованием смесей экстрактов из бактерий, зараженных мутантами бактериофага λ по генам, контролирующим сборку фаговых частиц (Becker, Gold, 1975). Позднее метод был улучшен и модифицирован в ряде лабораторий, и теперь эффективность упаковки воспроизводимо достигает 10^7—10^8 фаговых частиц на 1 мкг интактной ДНК λ. В инфекционные вирусные частицы упаковывается приблизительно 0,05—0,5% молекул ДНК λ, присутствующих в реакционной смеси.

Этапы упаковки ДНК бактериофага λ и влияние различных мутаций на сборку фаговых частиц схематично представлены на рис. 1.8.

Белок E является главным компонентом головки бактериофага; он необходим для сборки самого раннего из идентифицированных предшественников. Мутанты, лишенные белка E, накапливают все компоненты вирусной капсиды.

Белок D размещается на наружной стороне головки и участвует в сопряженных процессах внедрения ДНК λ в предшественника головки и последующего созревания головки. Мутанты по гену *D* накапливают незрелые предголовки, но не могут осуществить этап внедрения ДНК λ в головку.

Белок A необходим для внедрения ДНК λ в головку бактериофага и расщепления конкатенанов — предшественников ДНК — на участках липких концов (*cos*). Мутанты по гену *A* также накапливают пустые предголовки. Из клеток, инфицированных мутантами A^- и E^- или D^- и E^-, получают дополняющие друг друга (комплементирующие) экстракты; кроме того, экстракт, приготовленный из клеток, зараженных мутантом A^-, можно дополнить очищенным белком A дикого типа.

Экстракты обычно готовят из клеток, лизогенных по бактериофагу λ соответствующего генотипа (амбер-мутации в генах *A*, *D* или *E*). Лизогены несут также следующие мутации.

1) Мутацию c*Its*857, отвечающую за температурочувствительность молекулы репрессора фага λ. У этого мутанта ДНК фага λ поддерживается в лизогенном состоянии, если бактерии хозяина растут при 32 °C; рост бактериофага индуцируется при повышении температуры до 42—45 °C, при которой инактивируется репрессор, кодируемый геном *c*I.

2) Амбер-мутацию *S*am7 в гене *S* бактериофага, контролирующем лизис клетки. Эта мутация обусловливает накопление компонентов капсиды в клетках бактерий $SuIII^-$ через 2—3 ч после индукции лизогена c*Ist*857.

3) Делецию в области *b* (*b*2 или *b*1007) генома бактериофага, захватывающую участок присоединения (*att*) ДНК λ к бактериальному геному. Эта мутация частично снижает эффективность упаковки эндогенных молекул ДНК λ в экстрактах, приготовленных из индуцированных клеток.

4) Мутации *red*3 (у фага λ) и *recA* (у *E. coli*), инактивирующие генерализованные рекомбинационные системы бактериофага λ и хозяина и благодаря этому сводящие к минимуму рекомбинацию между эндогенной ДНК фага λ, содержащейся в экстракте, и экзогенно добавляемыми рекомбинантными геномами.

Лизогенные бактерии, предназначенные для получения экстрактов для упаковки, обычно выращивают при 30—32 °C до середины экспоненциальной фазы, индуцируют литические

функции, инактивируя репрессорный белок *c*I повышением температуры до 45 °С, и подращивают культуры 2—3 ч при 38—39 °С, что приводит к накоплению компонентов, необходимых для упаковки. Затем готовят клеточные экстракты.

Две прописи, представленные ниже, являются наиболее простыми из тех, что опубликованы. Обе они дают возможность получить высокоэффективные экстракты для упаковки. Преимущество прописи I состоит в том, что упаковываются рекомбинантные молекулы разных размеров. Ее главный недостаток— относительно высокий уровень фоновых бляшек, наблюдающийся в некоторых опытах, который обусловлен упаковкой эндогенной ДНК фага λ. Достоинствами прописи II являются простота, высокая эффективность, низкий фон и селекция молекул рекомбинантной ДНК по размеру.

Существуют также две другие, несколько более усложненные методики приготовления упаковочных экстрактов. Одна из них (Sternberg et al., 1977) является эффективной, но предполагает получение двух разных экстрактов и довольно сложную процедуру упаковки. В другой (Faber et al., 1978) необходимо очищать белок А бактериофага λ и готовить два разных экстракта.

ПОДДЕРЖАНИЕ И ПРОВЕРКА ЛИЗОГЕННЫХ КУЛЬТУР

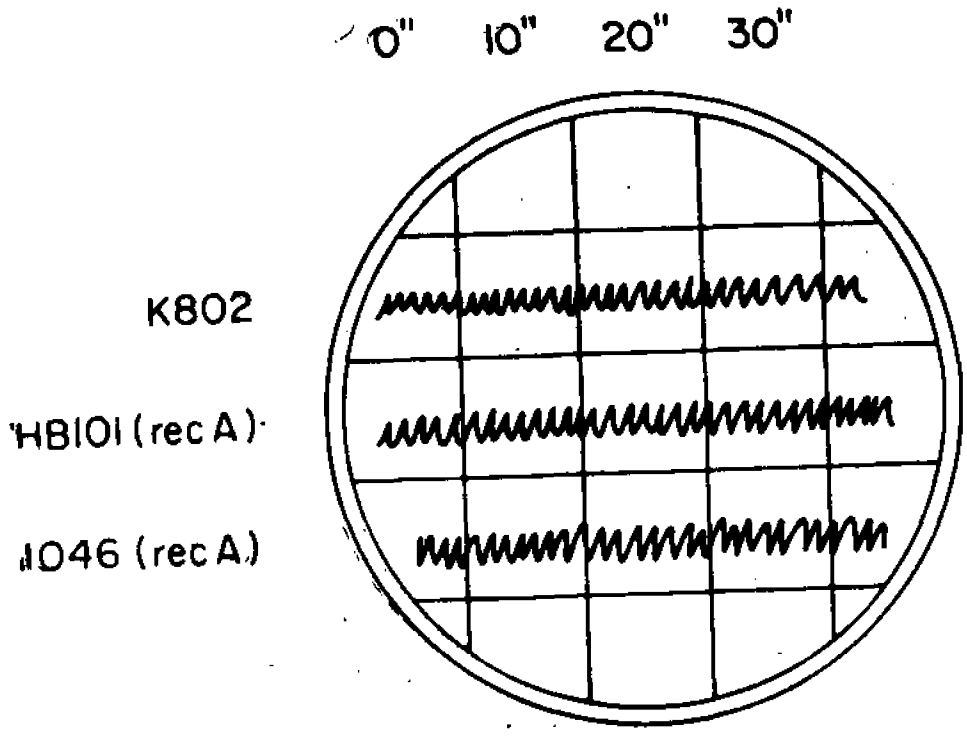
Успешное приготовление упаковочных экстрактов зависит от наличия специфических мутаций в геноме бактериофага λ, поэтому особые усилия должны быть направлены на выращивание и поддержание лизогенов бактериофага λ. Мы рекомендуем соблюдать следующие предосторожности.

1. Основные штоки [1] *E. coli* BHB2690 и BHB2688 следует хранить в глицерине при —70 °С, как описано в гл. 1. Экстракты нужно готовить из материала, отсеянного прямо из этих штоков в соответствии с приведенной ниже методикой.

2. Необходимо убедиться в наличии мутации, сообщающей температурочувствительность продукту гена *c*I. Для этого сделайте посев штрихом со штоков *E. coli* BHB2690 и BHB2688 в чашки с L-бульоном (2 чашки для каждого штамма). Инкубируйте одну чашку каждого штамма при 30—32 °С, а другую при 42 °С. Бактерии должны расти только в чашках, инкубируемых при 32 °С. Приготовьте ночную культуру (выращивание при 32 °С) каждого штамма из материала, взятого из отдельной колонии, и еще раз проверьте их, высеяв аликвоты в чашки, инкубируемые при 32 и 42 °С, как описано ниже. Если бак-

---

[1] Штоком называют запасную культуру данного штамма, хранящуюся в соответствующих условиях. — *Прим. ред.*



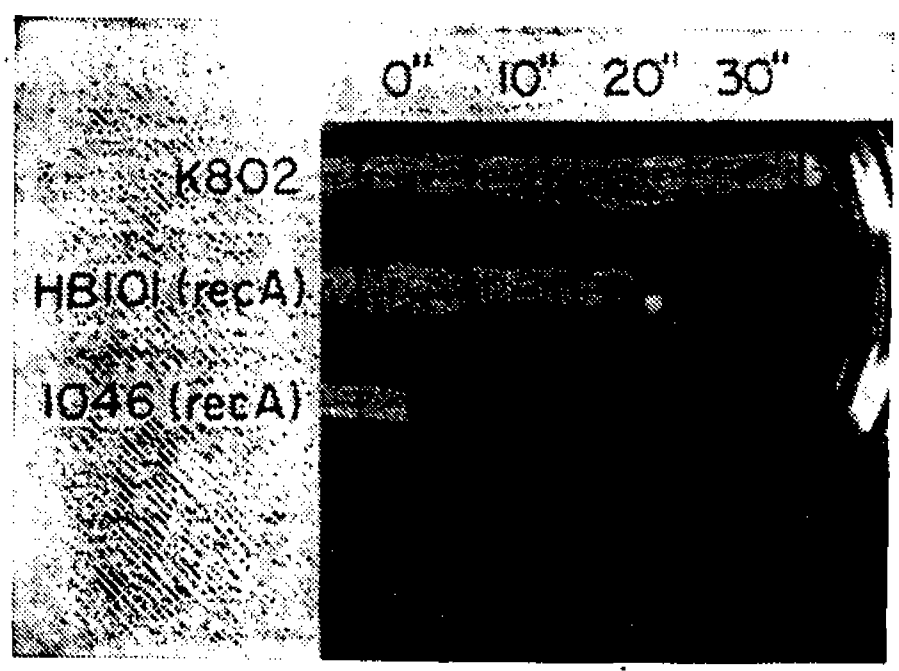


Рис. 8.1. Посев штрихом на агар штаммов *E. coli recA*$^-$ и дикого типа.

терии растут только при 32 °С, оставшуюся часть ночных культур можно использовать в качестве посевного материала для получения бактерий, из которых будут приготовлены экстракты.

3. Выбирайте для работы мелкие колонии. Мутанты *recA*$^-$ растут медленно. Ревертанты формируют более крупные колонии. При необходимости функцию *recA* можно проверить следующим образом.

а) Сделайте посев штрихом проверяемого штамма, известного штамма *recA*$^-$ и штамма *E. coli* дикого типа в чашку, как показано на рис. 8.1 (*вверху*).

б) Прикройте $^3/_4$ каждого штриха листом плотной бумаги и облучите поверхность агара небольшой дозой УФ-света (10 с). Затем сдвиньте бумагу так, чтобы открытой оставались половины штрихов, и снова облучите. Наконец, откройте $^3/_4$ штрихов и облучите последний раз. Оставшаяся четверть каждого штриха должна остаться необлученной. Оставьте чашки в

термостате при 32 °С; на следующий день они должны выглядеть так, как показано на рис. 8.1 (*внизу*).

Мутация *recA* блокирует репарацию УФ-индуцированных повреждений, так что облученные клетки *recA*$^-$ не растут. Разные мутанты *recA*$^-$ гибнут при разных дозах УФ-излучения (ср. штаммы *E. coli* HB101 и 1046).

ПРИГОТОВЛЕНИЕ УПАКОВОЧНЫХ ЭКСТРАКТОВ; МЕТОДИКА I

По этой методике лизогены *E. coli* BHB2690 (*D*am) и BHB2688 (*E*am) выращивают отдельно, индуцируют, смешивают, концентрируют и замораживают по порциям. ДНК, которая должна быть упакована, добавляют прямо в пробирку, содержащую упаковочный экстракт (Hohn, 1979).

1. Приготовьте субкультуры из основных штоков *E. coli* BHB2690 и BHB2688 и проверьте их генотипы, как описано на с. 246.

2. Определите D_{600} ночной культуры каждого штамма (50 мл). Для получения свежей культуры каждого штамма внесите в 2-л колбы по 500 мл среды M9, подогретой до 32 °С, и клеточную суспензию до начальной оптической плотности $D_{600} \simeq 0{,}1$.

3. Растите клетки при 32 °С с интенсивным перемешиванием до тех пор, пока D_{600} каждой из культур не увеличится до 0,3 (2—3 ч роста, если начальная $D_{600} \simeq 0{,}1$). Важно, чтобы во время индукции клетки находились в середине логарифмической фазы роста.

4. Индуцируйте лизоген, поместив колбы в водяную баню на 45 °С. Непрерывно перемешивайте культуры в течение 15 мин. По другой методике культуру индуцируют, помещая колбы в водяную баню с качалкой на 65 °С. Как только температура культуры достигает 45 °С, колбы переносят в водяную баню на 45 °С и оставляют на 15 мин.

5. Инкубируйте индуцированные клетки 2—3 ч при 38—39 °С с интенсивной аэрацией. Проверьте, произошла ли индукция, добавляя каплю хлороформа к небольшому объему культуры; последняя должна просветлеть через несколько минут (с. 90—91).

6. Смешайте две культуры, охладите их в бане с ледяной водой и соберите бактерии центрифугированием при 4 °С в течение 10 мин при 4000 g.

7. Отбросьте надосадочную жидкость. Промойте клетки в 300 мл холодной среды M9, не содержащей казаминокислот. Соберите бактерии центрифугированием, как описано выше.

8. Отбросьте надосадочную жидкость. Все остальные этапы следует проводить в холодной комнате. Переверните центрифужную пробирку и дайте жидкости стечь с осадка. Удалите

капли среды пастеровской пипеткой. Протрите стенки центрифужной пробирки бумажной салфеткой.

9. С помощью силиконированной пастеровской пипетки ресуспендируйте клетки в 0,004 исходного объема (т. е. клетки из 1 л культуры в 4 мл) свежеприготовленного буфера СН. Он отличается от буфера, используемого при упаковке космид (с. 281), тем, что содержит путресцин и, следовательно, способствует упаковке молекул ДНК бóльших размеров (Hohn, 1979).

Буфер СН имеет состав: 40 мМ трис-HCl, pH 8,0, 1 мМ спермидин, 1 мМ путресцин, 0,1%-ный β-меркаптоэтанол и 7%-ный DMSO (Spectropure; Matheson, Coleman and Bell).

10. Перенесите суспензию бактерий в маленькую стеклянную пробирку. Если суспензия гомогенная, для внесения аликвот по 50 мкл в предварительно охлажденные 1,5-мл эппендорфовские пробирки можно использовать автоматическую пипетку. Кончик пипетки нужно срезать, чтобы увеличить диаметр отверстия, иначе не удастся набрать вязкую суспензию. Работайте быстро и периодически встряхивайте бактериальную суспензию.

11. После переноса каждой аликвоты закройте пробирку и опустите ее в жидкий азот.

12. Выньте пинцетом пробирки из жидкого азота и немедленно поместите аликвоты в кельвинатор на —70 °С.

Экстракты, приготовленные и хранящиеся подобным образом, стабильны по крайней мере в течение 6 мес.

УПАКОВКА IN VITRO; МЕТОДИКА I

1. Смешайте 0,1—1,0 мкг ДНК, растворенной в 5 мкл 66 мМ трис-HCl, pH 7,9, +10 мМ $MgCl_2$, соответствующий объем буфера СН [см. примечание а) ниже] и 1 мкл 0,1 М АТР, pH 7,5. Смесь оставьте во льду.

Примечание. а) Каждую партию экстрактов необходимо титровать, чтобы определить оптимальный объем для упаковки. При титровании к стандартной смеси для упаковки, содержащей 0,5 мкг интактной ДНК бактериофага λ и 50 мкл экстракта, добавляют разные количества буфера СН (0—50 мкл), содержащего 1,5 мМ АТР. Изменяя оптимальное разведение, можно иногда увеличить эффективность упаковки на порядок и больше. Для титрования разных партий экстрактов используйте один и тот же препарат ДНК фага λ, который должен храниться в аликвотах при —20 °С.

б) 0,1 М АТР приготовьте следующим образом: растворите 60 мг АТР в 0,8 мл H_2O. Доведите pH до 7,0 с помощью 0,1 М NaOH. Доведите объем водой до 1,0 мл. Храните раствор в малых аликвотах при —70 °С.

2. Достаньте из кельвинатора три пробирки с упаковочными экстрактами и поместите их в лед. Лучше не ставить более

трех реакций упаковки одновременно. Пока экстракты еще заморожены, добавьте к ним смесь, приготовленную на стадии 1. Когда экстракты оттают, хорошо размешайте содержимое пробирок запаянной капиллярной пипеткой.

Примечание. ДНК необходимо смешивать с экстрактами, как только они оттают, потому что сборка компонентов фага начинается сразу после лизиса клеток, который происходит во время оттаивания. Этот этап является критическим. Если экстракт оттает прежде, чем завершится размешивание, высвобождающаяся бактериальная ДНК увеличит вязкость содержимого пробирки, и эффективное размешивание добавленной фаговой ДНК станет невозможным.

3. Инкубируйте смеси 60 мин при 37 °С.

4. Достаньте из кельвинатора еще несколько пробирок с экстрактами для упаковки. Поместите их в лед. Добавьте в каждую пробирку по 5 мкл панкреатической ДНКазы (100 мкг/мл) и 2,5 мкл 0,5 М $MgCl_2$. Когда экстракты оттают, перемешайте содержимое пробирок и поставьте их в лед на 5—10 мин. В каждую пробу добавьте по 20 мкл второго упаковочного экстракта (содержащего панкреатическую ДНКазу и $MgCl_2$). Хорошо перемешайте и инкубируйте еще 30 мин при 37 °С. Во время инкубации встряхивайте пробирку щелчком каждые несколько минут.

Примечания. а) Добавление второй порции экстракта увеличивает эффективность упаковки в 2—5 раз, вероятно, благодаря внесению дополнительных фаговых компонентов, необходимых для некоторых этапов морфогенеза после сборки головки.

б) Добавление ДНКазы приводит к быстрому снижению вязкости раствора. Если вязкость заметно не снижается, добавьте еще одну порцию панкреатической ДНКазы и инкубируйте еще 5 мин.

5. Добавьте в каждую пробу 1 мл буфера SM и 5 мкл хлороформа. Перемешайте и удалите клеточные обломки центрифугированием в центрифуге Эппендорф в течение 30 с. Протитруйте число жизнеспособных частиц бактериофага в надосадочной жидкости, как описано на с. 80. Фаговые частицы остаются стабильными в течение нескольких недель в смеси для упаковки, содержащей буфер SM и хлороформ.

Примечание. В связи с тем что компоненты экстрактов для упаковки могут ингибировать процесс инфекции бактерий фаговыми частицами, объем смеси для упаковки, высеваемой в чашку, ограничен. Степень ингибирования определяют эмпирически для каждой партии экстрактов. Для этого смесь для упаковки, в которой отсутствует ДНК, смешивают с известным числом инфекционных частиц, добавляют увеличивающиеся объемы упаковочных экстрактов и 1 мл буфера SM и после

10-мин инкубации при комнатной температуре делают посевы для определения титра бактериофага. Обычно ингибирование оказывается заметным только в тех случаях, когда в одну чашку диаметром 85 мм высевают более 1/10 объема пробы.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ЭКСТРАКТОВ ДЛЯ УПАКОВКИ; МЕТОДИКА II[1]

Обработка ультразвуком экстракта из индуцированных клеток BHB2690 (донор предголовки)

1. Получите субкультуру из основного штока *E. coli* BHB2690. Проверьте генотип клеток, как описано на с. 246.

2. Измерьте D_{600} 100-мл ночной культуры и внесите в 2-л колбу с 500 мл бульона NZM, подогретого до 32 °C, столько клеток, чтобы D_{600} была $\leqslant 0{,}1$. Инкубируйте с аэрацией при 32 °C до $D_{600}=0{,}3$ (2—3 ч инкубации). Важно, чтобы во время индукции культура находилась в середине экспоненциальной фазы роста.

3. Индуцируйте лизогены, поместив колбы в водяную баню с температурой 45 °C. Непрерывно перемешивайте культуры в течение 15 мин.

Можно также индуцировать культуру, поместив колбу в качалку с водяной баней на 65 °C. Как только температура внутри колбы поднимется до 45 °C, перенесите культуру на 15 мин в водяную баню с температурой 45 °C.

4. Инкубируйте индуцированные клетки при 38—39 °C 2—3 ч с интенсивной аэрацией. Убедитесь в эффективности индукции добавлением капли хлороформа к небольшой пробе, взятой из культуры; проба должна просветлеть в течение нескольких минут.

5. Соберите клетки центрифугированием при 4 °C в течение 10 мин при 4 000 g.

6. Удалите жидкость как можно полнее. Оставшуюся среду отберите пастеровской пипеткой. Протрите стенки центрифужной пробирки бумажной салфеткой.

7. Добавьте 3,6 мл свежеприготовленного буфера, используемого при обработке клеток ультразвуком. Тщательно ресуспендируйте осадок и перенесите полученную гомогенную суспензию в маленькую чистую пластмассовую пробирку (Falcon № 2054 или 2057).

Буфер, используемый при обработке клеток ультразвуком, имеет состав: 20 мМ трис-HCl, pH 8,0, 1 мМ ЭДТА и 5 мМ β-меркаптоэтанол.

---

[1] Scalenghe et al., 1978; Hohn, неопубликованные данные.

8. Обработайте содержимое пробирки короткими импульсами (по 10 с) ультразвука максимальной мощности. Пробирку поместите в воду со льдом; температура буфера не должна превышать 4 °С. В промежутках между импульсами ультразвука (20—30 с) пробы охлаждайте.

Ультразвуком обрабатывают до тех пор, пока раствор не просветлеет, а его вязкость не уменьшится.

Примечание. Число кратковременных обработок ультразвуком является критическим. Просветление раствора и уменьшение его вязкости не всегда легко обнаружить. Чтобы найти оптимальную продолжительность обработки ультразвуком, отберите аликвоты суспензии через определенные промежутки времени и проверьте в отдельных реакциях сборки.

9. Перенесите обработанную пробу в центрифужную пробирку и удалите обломки клеток центрифугированием при 12 000 g в течение 10 мин при 4 °С.

10. К надосадочной жидкости (3 мл) добавьте равный объем холодного буфера, используемого при обработке ультразвуком, и $^1/_6$ объема свежеприготовленного упаковочного буфера. Распределите аликвоты по 15 мкл в охлажденные (4 °С) 1,5-мл эппендорфовские пробирки. Закройте крышки пробирок, опустите пробирки в жидкий азот, а затем перенесите их в кельвинатор на —70 °С для продолжительного хранения.

Упаковочный буфер имеет состав: 6 мМ трис-HCl, pH 8,0, 50 мМ спермидин, 50 мМ путресцин, 20 мМ $MgCl_2$, 30 мМ АТР [см. примечание б) с. 249], 30 мМ β-меркаптоэтанол.

Замораживание/оттаивание лизата из индуцированных клеток BHB2688 (донор упаковочного белка)

1. Получите субкультуру из основного штока *E. coli* BHB2688. Проверьте генотип клеток, как описано на с. 246.

2. Измерьте D_{600} в 100-мл ночной культуре и внесите в три 2-л колбы по 500 мл бульона NZM, подогретого до 32 °С, и ночную культуру до $D_{600} \leqslant 0{,}1$. Инкубируйте с аэрацией при 32 °С до $D_{600} \simeq 0{,}3$ (2—3 ч).

3. Индуцируйте лизоген, поместив колбы в водяную баню с температурой 45 °С. Постоянно перемешивайте содержимое колб в течение 15 мин (см. п. 4, с. 248).

4. Инкубируйте индуцированные клетки при 38—39 °С 2—3 ч с интенсивной аэрацией. Убедитесь в эффективности индукции добавлением капли хлороформа к небольшому объему культуры: в течение нескольких минут должно наступить просветление.

5. Соберите клетки центрифугированием при 4000 g в течение 10 мин при 4 °С.

6. Удалите жидкость как можно полнее. Капли оставшейся среды отберите пастеровской пипеткой. Протрите стенки пробирки бумажной салфеткой.

7. Ресуспендируйте клетки, собранные из трех колб, в холодном растворе сахарозы (общий объем суспензии 3 мл). По 0,5 мл суспензии распределите в 6 охлажденных (4 °С) эппендорфовских пробирок. Добавьте в каждую 25 мкл свежеприготовленного холодного раствора лизоцима. Осторожно перемешайте. Быстро закройте пробирки и опустите их в жидкий азот.

Раствор сахарозы содержит 10% сахарозы в 50 мМ трис-HCl, дН 8,0. *Раствор лизоцима* содержит 2 мг/мл лизоцима в 0,25 М трис-HCl, pH 8,0.

8. Выньте линцетом пробирки из жидкого азота. Поместите их в лед для оттаивания экстракта. Добавьте 25 мкл свежеприготовленного упаковочного буфера (п. 10, с. 252) в каждую пробирку и перемешайте ее содержимое.

9. Объедините оттаявшие экстракты в центрифужной пробирке и отцентрифугируйте их при 48 000 g в течение 1 ч при 4 °С.

10. Внесите по 10 мкл надосадочной жидкости в охлажденные (4 °С) эппендорфовские пробирки. Немедленно закройте их и опустите в жидкий азот. Когда все аликвоты будут заморожены, выньте пробирки из жидкого азота и сразу же перенесите в кельвинатор на —70 °С для длительного хранения.

Примечание. При желании обработанный ультразвуком экстракт можно объединить с экстрактом, подвергшимся замораживанию и оттаиванию. Вначале приготовьте экстракт, обработанный ультразвуком, заморозьте его в аликвотах по 15 мкл в открытых эппендорфовских пробирках и поставьте их в штативе в жидкий азот. В каждую пробирку добавьте по 10 мкл экстракта, подвергшегося замораживанию и оттаиванию. Закройте ее и опустите в жидкий азот. Храните при —70 °С.

Основная трудность в приготовлении комбинированных экстрактов состоит в необходимости манипулировать с замороженными пробирками и вносить пипеткой в пробирки при —70 °С 10 мкл лизата, подвергшегося замораживанию/оттаиванию. Эффективность упаковки при использовании экстрактов, приготовленных комбинированием до или после замораживания, одинакова.

Упаковка in vitro; методика II

1. Выньте пробирки из кельвинатора и дайте экстрактам оттаять во льду. Лизат, подвергавшийся замораживанию/оттаиванию, оттаивает первым. Перенесите его в пробирку с еще не оттаявшим обработанным ультразвуком экстрактом.

2. Осторожно перемешайте. Когда объединенные экстракты почти полностью оттаят, добавьте исследуемую ДНК (не больше 1 мкг, растворенного в 5 мкл 10 мМ трис-HCl, pH 7,9, и 10 мМ $MgCl_2$). Размешайте запаянной капиллярной пипеткой и инкубируйте 1 ч при комнатной температуре.

3. Добавьте 0,5—1 мл буфера SM и каплю хлороформа и размешайте. Отцентрифугируйте пробы в центрифуге Эппендорф (30 с) и определите титр фаговых частиц в надосадочной жидкости, как описано на с. 80.

Примечания. а) Каждую партию экстрактов необходимо проверить со стандартным препаратом интактной ДНК бактериофага λ.

б) В экстрактах, приготовленных по этому методу, упаковываются ДНК только определенного размера (Sternberg et al., 1977). Рекомбинантные ДНК, составляющие по длине 90 или 80% ДНК фага λ дикого типа, упаковываются соответственно в 20 или 50 раз хуже, чем ДНК λ дикого типа.

в) Один и тот же упаковочный буфер может использоваться для упаковки как бактериофага λ, так и космид.

г) См. примечание к разд. «Упаковка in vitro; методика I», с. 249.

Глава 9

ПОЛУЧЕНИЕ ГЕНОМНЫХ БИБЛИОТЕК

ГЕНОМНЫЕ БИБЛИОТЕКИ В ВЕКТОРАХ, ПОЛУЧЕННЫХ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИОФАГА λ

Для клонирования определенных фрагментов эукариотических геномных ДНК (эгДНК) в векторах, полученных на основе бактериофага λ (λ-векторах), используются два метода. Первый метод был разработан прежде, чем появились эффективные методы для упаковки ДНК фага λ в частицы бактериофага in vitro. Он заключается в следующем. Сначала для клонирования получают препарат эгДНК, сильно обогащенный последовательностями, представляющими интерес для экспериментатора. В этом случае после полного расщепления суммарной эгДНК подходящими рестриктазами проводят препаративное разделение получившихся фрагментов гель-электрофорезом (Tilghman et al., 1977; Edgell et al., 1979; Tonegawa et al., 1977), колоночной хроматографией в обращенной фазе (Hardies, Wells, 1976; Landy et al., 1976) или комбинацией обеих методик (Tilghman et al., 1977). После разделения фракции, содержащие нужные фрагменты ДНК, идентифицируют гибридизацией с подходящими зондами ДНК или РНК и используют для клонирования в λ-векторе только фрагменты ДНК из фракций, давших положительный результат. Поскольку, используя вышеназванные методики для фракционирования ДНК, получают 100—300-кратное обогащение суммарного препарата ДНК последовательностями для клонирования, число рекомбинантных фагов, которые нужно получить и проанализировать на присутствие искомых последовательностей ДНК, может быть значительно уменьшено.

Развитие эффективных методов упаковки ДНК фага λ in vitro (Hohn, Murray, 1977; Sternberg et al., 1977) и методик гибридизации in situ (Benton, Davis, 1977) избавило экспериментаторов от необходимости проводить обогащение исходного препарата ДНК нужными последовательностями. В настоящее время, как правило, получают библиотеку всего генома эукариотического организма, а затем гибридизацией in situ находят рекомбинантные фаги, содержащие нужные последовательности ДНК.

Библиотеки эгДНК можно получать двумя способами. В первом случае осуществляют полное расщепление эгДНК подходящими рестриктазами и образовавшиеся фрагменты вставляют в соответствующий λ-вектор (Smithies et al., 1978). Этот метод имеет два недостатка. Во-первых, если нужный фрагмент эгДНК имеет один или несколько сайтов рестрикции для использованной рестриктазы, то после полного расщепления он будет проклонирован в виде двух или более кусков. К тому же, если нужная последовательность эгДНК содержится в фрагменте ДНК, большем, чем может вместить λ-вектор, она вообще может быть не проклонирована. Во-вторых, после полного расщепления многими рестриктазами, узнающими гексануклеотидные последовательности, средний размер образующихся фрагментов невелик (~4 kb), из-за чего при клонировании такого препарата эгДНК получается очень большое число рекомбинантных бактериофагов и процедура поиска нужных последовательностей становится трудоемкой и дорогой.

Обоих недостатков можно избежать, если клонировать большие (~20 kb) молекулы ДНК, полученные случайной фрагментацией эгДНК (Maniatis et al., 1978). Так как после случайной фрагментации эгДНК для клонирования используются довольно длинные фрагменты, число рекомбинантных бактериофагов, которые нужно получить и проанализировать, чтобы с достаточно высокой вероятностью обнаружить уникальную последовательность эукариотического генома, не превышает одного миллиона. В этом случае можно быть уверенным, что «неудачное» расположение сайтов рестрикции в эгДНК не приведет при клонировании к систематической потере некоторых последовательностей эгДНК, и поэтому нет необходимости знать до клонирования распределение сайтов рестрикции около или внутри клонируемой последовательности. Кроме того, получение геномных библиотек из препаратов эгДНК, расщепленной случайным образом, позволяет «перемещаться» вдоль эукариотического генома, чего нельзя делать, работая с геномной библиотекой, полученной из фрагментов ДНК после полного расщепления препарата исходной эгДНК рестриктазами. Число различных клонов, которое можно получить при случайной фрагментации эгДНК, практически бесконечно, поэтому, используя рекомбинантный клон для поиска других клонов, содержащих последовательности эгДНК, перекрывающиеся с последовательностями исходного клона, можно «перемещаться» вдоль генома.

Примечание. Вероятность обнаружения определенной

последовательности эгДНК, представленной в библиотеке, может быть вычислена по формуле

$$N = \frac{\ln (1 - P)}{\ln (1 - f)},$$

где P —вероятность, f — доля эукариотического генома в одном рекомбинантном фаге, а N — число рекомбинантов, которое нужно проанализировать, чтобы обнаружить нужную последовательность (Clarke, Carbon, 1976). Например, чтобы получить уникальный фрагмент эгДНК из библиотеки фрагментов длиной 17 kb (представляющей геном млекопитающего, содержащий $3 \cdot 10^9$ пар оснований) с вероятностью 99% ($P = 0{,}99$), число анализируемых рекомбинантов должно быть:

$$N = \frac{\ln (1 - 0{,}99)}{\ln (1 - 1{,}7 \cdot 10^4 / 3 \cdot 10^9)} = 8{,}1 \cdot 10^5.$$

Основные этапы получения таких геномных библиотек схематически изображены на рис. 9.1 и кратко состоят в следующем.

1. ДНК λ-вектора замещения, способного принимать вставки длиной до 20 kb, расщепляют рестриктазой; правый и левый концевые фрагменты, несущие всю генетическую информацию, необходимую для литического пути развития фага (гл. 1), отделяют от внутренних инертных фрагментов фракционированием по размеру.

2. Препарат высокомолекулярной эукариотической ДНК фрагментируют случайным образом, но так, чтобы присутствовала популяция молекул со средним размером ~20 kb. Единственным методом, позволяющим фрагментировать ДНК действительно случайным образом, независимо от нуклеотидного состава, является гидродинамический метод. Однако с ДНК, фрагментированной гидродинамически, необходимо проводить добавочные ферментативные операции, а именно: репарирование концов, метилирование, лигирование с линкерами, удаление линкеров. Они требуются для того, чтобы получить у фрагментов липкие концы, комплементарные концам λ-вектора (Maniatis et al., 1978). Вместе с тем популяцию фрагментов, близкую к случайной, можно получить и при использовании частичного расщепления эгДНК рестриктазами, узнающими часто встречающиеся тетрануклеотидные последовательности. Такой препарат ДНК можно клонировать непосредственно без дополнительных фраментативных операций.

Однако в популяции фрагментов эгДНК, полученной таким образом, не все последовательности эукариотичес-

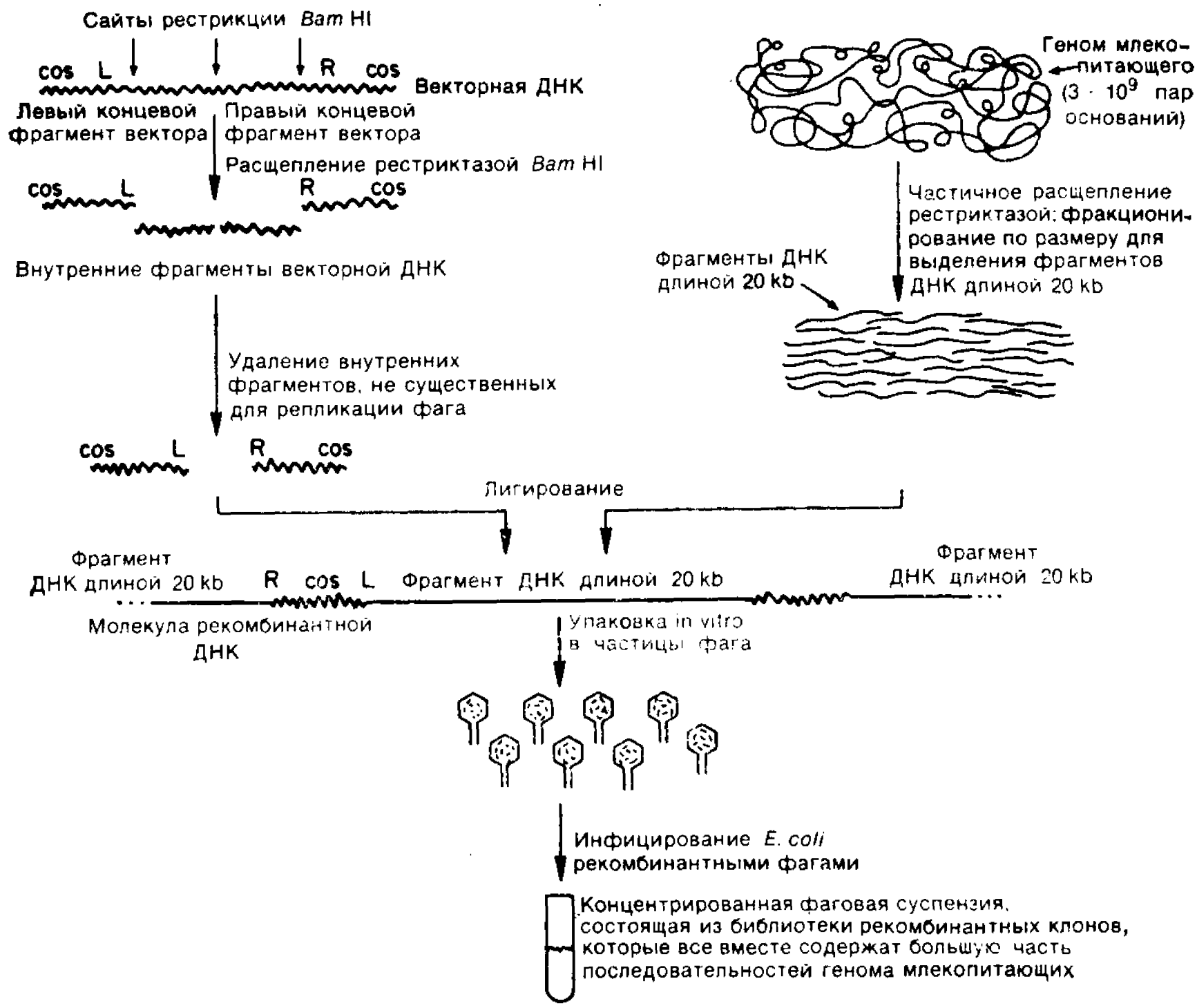


Рис. 9.1. Схема получения библиотеки эукариотической ДНК, фрагментированной случайным образом. Слева вверху — приготовление фрагментов векторной ДНК. Справа вверху — приготовление фрагментов эукариотической ДНК. Внизу — получение и амплификация рекомбинантных бактериофагов. В результате лигирования соответствующих фрагментов векторной ДНК и эукариотической ДНК получают конкатамерные рекомбинантные молекулы ДНК с помощью ДНК-лигазы бактериофага T4. Эти конкатамерные молекулы служат субстратом в реакции упаковки in vitro, в процессе которой различные рекомбинантные молекулы ДНК упаковываются в отдельные частицы бактериофага. После амплификации путем выращивания в *E. coli* получают лизат, содержащий библиотеку рекомбинантных клонов, которые в совокупности включают большую часть последовательностей, присутствующих в геноме млекопитающих.

кого генома представлены одинаково, и тому есть три причины. Во-первых, концы образующихся фрагментов распределены среди последовательностей эгДНК не равномерно, а в соответствии с распределением сайтов рестрикции. Число потенциальных концов практически равно общему числу сайтов рестрикции в эгДНК. Во-вторых, хотя в основной части эгДНК сайты рестрикции распределены случайно, для высокоповторяющейся ДНК или сателлитной ДНК это не так (Botchan et al., 1974). Такие

факторы, как локальные вариации содержания G+C и присутствие повторяющихся последовательностей в ДНК, могут привести к изменению случайного распределения сайтов рестрикции. В-третьих, в случае фага λ и некоторых вирусов эукариот не во всех сайтах рестрикции ДНК расщепляются с одинаковой эффективностью (Sambrook, неопубликованные данные). Возможно, что такими же свойствами обладает эукариотическая ДНК, хотя экспериментальные данные, подтверждающие это, отсутствуют. Итак, концы фрагментов распределены среди потенциальных участков расщепления неравномерно; в свою очередь сайты рестрикции распределены среди ДНК также неравномерно (из-за наличия повторяющихся последовательностей и вариаций содержания G+C). Тем не менее в геноме эукариот число потенциальных сайтов рестрикции так огромно, а размер клонируемых фрагментов (~20 kb) так велик по сравнению со средним расстоянием между потенциальными сайтами расщепления (256 пар оснований), что образующуюся популяцию фрагментов, хотя она и не является случайной в математическом смысле, для большинства практических целей можно считать популяцией со случайным распределением концов.

Препарат расщепленной ДНК фракционируют в градиенте плотности сахарозы или гель-электрофорезом с целью выделения молекул ДНК длиной ~20 kb. Подробно эти вопросы обсуждаются в работах Сида и соавторов (Seed, 1982; Seed et al., в печати).

3. Смесь фрагментированной эгДНК и концевых фрагментов вектора обрабатывают лигазой для получения длинных конкатамерных молекул, которые затем упаковывают в головки фага λ по методике упаковки ДНК in vitro (гл. 8). Эти рекомбинантные бактериофаги размножают выращиванием в *E. coli*. Полученную таким образом библиотеку можно хранить и использовать в течение долгого времени, что позволяет осуществлять поиск многих генов.

Цель описываемого метода состоит в том, чтобы получить библиотеку рекомбинантных клонов, в которой по возможности представлены все последовательности клонируемой эгДНК. Тем не менее по целому ряду причин некоторые последовательности могут быть представлены слабо или совсем отсутствовать. Например, если участки узнавания для использованных рестриктаз расположены очень далеко от интересующей экспериментатора последовательности или, наоборот, очень близко друг к другу внутри ее, то вероятность получения фрагмента, содер-

жащего эту последовательность и имеющего размер, приемлемый для клонирования, мала. Более того, определенные участки эукариотического генома могут содержать последовательности, пагубно влияющие на рост фага, и, следовательно, они утрачиваются при получении библиотеки. Наконец, в некоторых случаях присутствие тандемно повторяющихся последовательностей в клонированной ДНК эукариот ведет к делеции этих последовательностей в результате рекомбинаций при размножении фага (Arnheim, Kuehn, 1979; Fritsch et al., 1980; Lauer et al., 1980).

Получение библиотеки рекомбинантных ДНК состоит из следующих этапов.

1. Приготовление экстрактов для упаковки ДНК в частицы фага λ in vitro.
2. Подготовка векторной ДНК (выделение концевых фрагментов λ-вектора).
3. Получение фрагментированной эгДНК.
4. Лигирование в смеси векторной и фрагментированной эгДНК и упаковка лигированного препарата ДНК в частицы фага λ in vitro.
5. Амплификация полученных рекомбинантных фаговых частиц.

Приготовление экстрактов для упаковки in vitro обсуждается в гл. 8. Этапы 2—5 подробно описаны ниже.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ВЕКТОРНОЙ ДНК

Для того чтобы успешно использовать λ-векторы для получения рекомбинантных библиотек, необходимо удалить средний фрагмент ДНК фага λ и вместо него вставить фрагмент чужеродной ДНК длиной 15—20 kb. В зависимости от того, какой вектор собираются использовать для клонирования, пригодны несколько методик. Ниже описаны две методики выделения концевых фрагментов λ-вектора центрифугированием в градиенте плотности.

Концевые фрагменты можно также выделить с помощью электрофореза в легкоплавкой 0,5%-ной агарозе. После электрофореза ДНК экстрагируют из геля и очищают, как описано на с. 173. Однако выход концевых фрагментов, выделенных по этой методике, значительно ниже, чем при использовании центрифугирования в градиенте плотности.

Центрифугирование в градиенте плотности сахарозы

Ниже описывается стандартный метод, с помощью которого выделяют концевые фрагменты ДНК любого вектора (Maniatis et al., 1978).

1. Обработайте ДНК λ-вектора в концентрации ⩾150 мкг/мл рестриктазой в двух- или трехкратном избытке в течение 1 ч. Остановите реакцию охлаждением реакционной смеси до 0 °С. Отберите аликвоту (~0,5 мкг) и после прогревания в течение 10 мин при 65 °С (для разделения липких концов ДНК фага λ) проанализируйте электрофорезом в 0,5%-ном агарозном геле, используя в качестве маркера интактную ДНК фага λ. При неполном расщеплении нагрейте реакционную смесь до 37 °С и, добавив рестриктазу, продолжите инкубацию.

Примечание. Иногда ДНК вектора можно обработать еще одной рестриктазой, расщепляющей только центральный фрагмент, но не концевые фрагменты (например, рестриктазой *Sal*I при клонировании по сайтам рестрикции для *Bam*HI вектора λBF101). Цель этого приема — свести к минимуму загрязнение препарата концевых фрагментов ДНК фага λ интактной ДНК.

2. Если по результатам электрофореза расщепление полное, проэкстрагируйте препарат дважды смесью фенол — хлороформ (1 : 1) и осадите ДНК этанолом. Растворите осадок в буфере ТЕ до концентрации ДНК 150 мкг/мл. Отберите аликвоту (0,2 мкг) и храните ее при 4 °С. Если необходимо, на этом этапе препарат расщепленной ДНК можно хранить при —20 °С.

3. К препарату ДНК добавьте $MgCl_2$ до концентрации 0,01 М и инкубируйте при 42 °С в течение 1 ч. Во время этой инкубации происходит отжиг липких концов ДНК фага λ. Отберите аликвоту и проанализируйте электрофорезом в агарозе полноту отжига. В качестве маркеров используйте интактную ДНК фага λ и отобранную на этапе 2 аликвоту, прогретую при 68 °С в течение 10 мин.

Примечания. а) При проведении аналитического гель-электрофореза следует избегать высокого напряжения и буферов с большим электрическим сопротивлением, так как перегрев агарозы может привести к плавлению липких концов ДНК фага во время электрофореза.

б) Альтернативный вариант описанной методики состоит в том, что перед обработкой рестриктазой липкие концы ДНК λ-вектора лигируют. В этом случае ДНК инкубируют при 42 °С в 0,1 М трис-HCl, pH 8,0, и 10 мМ $MgCl_2$ в течение 1 ч, затем добавляют необходимые компоненты буфера для лигирования (1×; с. 415), вносят лигазу и еще инкубируют препарат в течение 1—2 ч при 37 °С. После мягкой экстракции смесью фенол— хлороформ (1: 1) осадите ДНК этанолом, растворите в подходящем буфере и обработайте рестриктазой.

4. Приготовьте два градиента плотности сахарозы 10—40% объемом 38 мл в ультрацентрифужных пробирках для ротора SW27 Beckman (или ему эквивалентного). Растворы

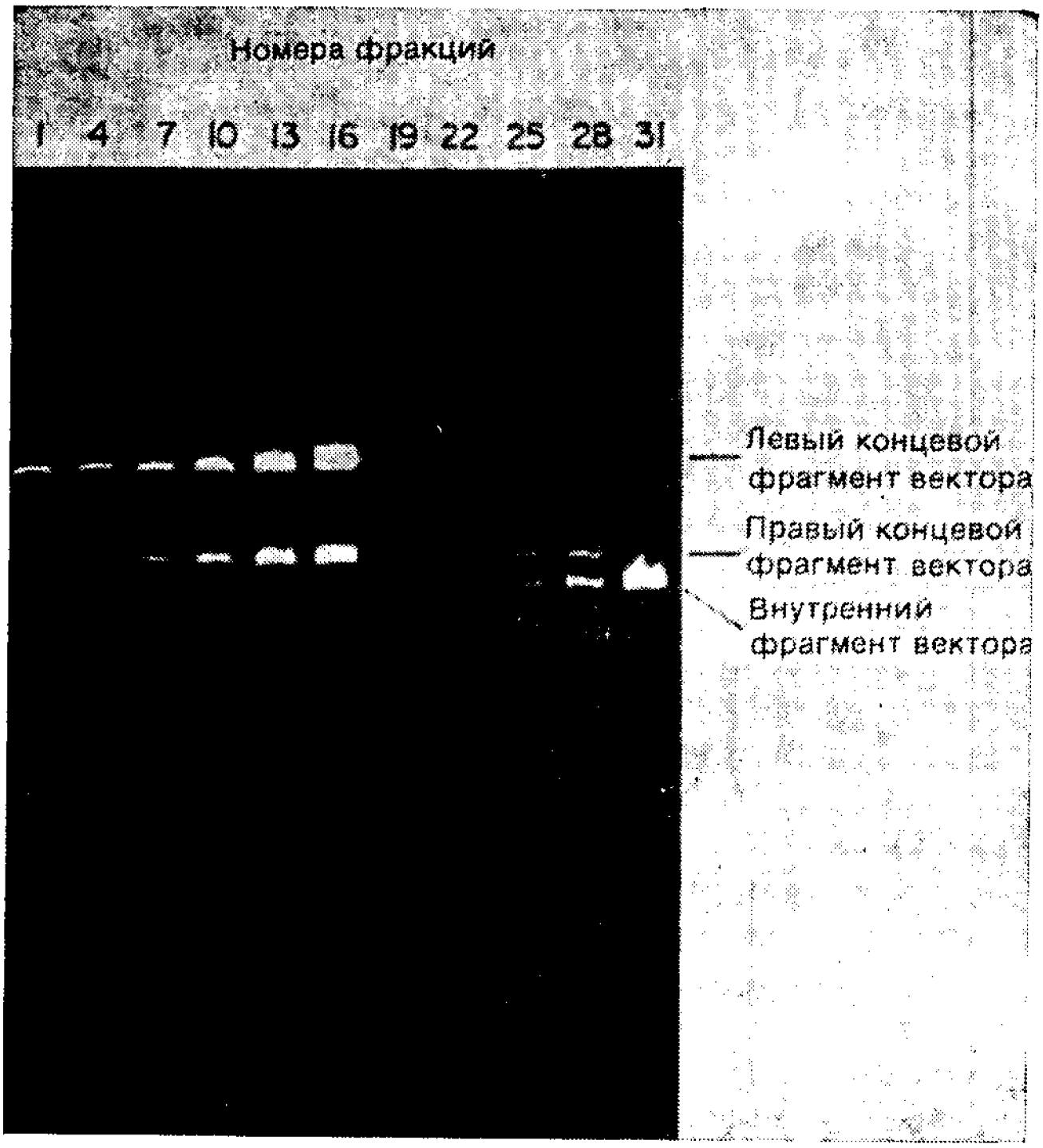


Рис. 9.2. Выделение концевых фрагментов ДНК бактериофага λ с помощью центрифугирования в градиенте плотности сахарозы. В данном эксперименте ДНК λ-вектора Харон 28 расщепляли *BamHI*, отжигали и центрифугировали в градиенте плотности сахарозы 10—40%, фракции которого собирали, как описано в тексте. Аликвоты из каждой третьей фракции недолго прогревали при 68 °С и анализировали электрофорезом в 0,5%-ном агарозном геле. На рисунке указаны положения левого (23,5 kb) и правого (9 kb) концевых фрагментов и положение внутреннего фрагмента (6,5 kb). Фракции 1—16, содержащие ассоциированные концевые фрагменты, объединяли.

сахарозы приготовьте на буфере, имеющем состав: 1 М NaCl, 20 мМ трис-HCl, pH 8,0, и 5 мМ ЭДТА.

5. На каждый градиент в объеме, не превышающем 500 мкл, нанесите не более чем 60—70 мкг отожженной обработанной рестриктазой ДНК бактериофага λ. Нанесение больших количеств ДНК приводит к перегрузке градиента плотности сахарозы и может ухудшить разделение концевых и внутренних фрагментов бактериофага λ. Центрифугируйте при 26000 об/мин в течение 24 ч при 15 °С в роторе SW27 Beckman (или ему эквивалентном).

6. После центрифугирования пробирку проколите снизу и соберите фракции по 0,5 мл.

7. Из каждой третьей фракции отберите аликвоты по 15 мкл и разбавьте их 35 мкл H_2O. Добавьте 8 мкл красителя для нанесения на гель (с. 400) и, прогрев пробы при 68 °С в течение 5 мин, проанализируйте отобранные фракции электрофорезом в 0,5%-ном геле агарозы. В качестве маркеров возьмите интактную ДНК λ-вектора и ДНК λ-вектора, расщепленную подходящими рестриктазами. В препаратах маркеров концентрации соли и сахарозы должны быть подобны концентрациям этих веществ в градиенте плотности сахарозы, чтобы сравнение подвижностей было корректным. После электрофореза сфотографируйте гель и объедините фракции, содержащие отожженные концевые фрагменты (рис. 9.2). Следует соблюдать осторожность, чтобы не внести в препарат отожженных концевых фрагментов фракции, явно содержащие нерасщепленную ДНК бактериофага λ, или фракции с большим количеством неотожженных концевых фрагментов.

8. Отдиализуйте объединенные фракции против большого объема буфера ТЕ при 4 °С в течение 12—16 ч как минимум с одной сменой буфера. После диализа необходимо убедиться, что объем пробы возрос в 2—3 раза. Проэкстрагируйте пробу несколько раз 2-бутанолом (с. 407) для уменьшения объема примерно до 5 мл и осадите ДНК этанолом. Если же объем пробы после объединения фракций невелик, то ДНК можно осадить спиртом без диализа пробы, просто разбавив образец буфером ТЕ так, чтобы концентрация сахарозы уменьшилась при этом до ~10%.

9. Промойте осадок 70%-ным спиртом и растворите ДНК в буфере ТЕ в концентрации 300—500 мкг/мл.

10. Измерьте точно концентрацию ДНК и проверьте чистоту препарата электрофорезом в 0,5%-ном агарозном геле. Храните препарат ДНК при —20 °С в аликвотах по 1—5 мкг.

Центрифугирование в градиенте плотности ацетата калия

Преимущество этого метода, разработанного сравнительно недавно (Seed, неопубликованные данные), состоит в том, что отпадает необходимость в электрофоретическом анализе фракций градиента. Однако при его использовании экспериментатор лишен возможности отбирать фракции. Перед проведением препаративного опыта желательно поставить пробный эксперимент.

1. Обработайте ДНК λ-вектора подходящими рестриктазами и приготовьте препарат отожженных концевых фрагментов, как описано в п. 1—3 на с. 261.

2. Приготовьте градиенты плотности ацетата калия объемом 38 мл (5—20%) в ультрацентрифужных пробирках для ротора SW27 Beckman (или ему эквивалентного). Ацетат калия растворите в 10 мМ трис-HCl, pH 8,0, и 5 мМ ЭДТА. Градиент

плотности приготовьте, подслаивая более тяжелый раствор под более легкий через иглу, опущенную на дно пробирки.

3. Нанесите на каждый градиент не более 100 мкг отожженных концевых фрагментов; бóльшие количества нанесенной ДНК могут ухудшить разделение внутренних и концевых фрагментов ДНК фага λ.

4. Центрифугируйте при 27 000 об/мин в течение 16 ч при 20 °С в роторе SW27 Beckman (или ему эквивалентном). В этих условиях отожженные концевые фрагменты λ-вектора образуют осадок на дне пробирки, в то время как внутренние фрагменты остаются в верхней части градиента.

5. Отберите максимально возможное количество надосадочной жидкости и осушите стенки пробирки кусочком ваты или бумажного полотенца. Растворите осадок ДНК в 0,5 мл буфера ТЕ, pH 7,9. Как правило, после этого можно приступать к обработке лигазой. Если же в препарате сохранилось слишком много соли, необходимо ДНК переосадить этанолом и промыть осадок 70%-ным этанолом. После этого концевые фрагменты можно растворить в небольшом объеме (250 мкл) буфера ТЕ, pH 7,9, и анализировать электрофорезом в 0,5%-ном агарозном геле.

6. Измерьте точную концентрацию ДНК и храните препарат при —20 °С в аликвотах по 1—5 мкг.

Примечание. В градиенты плотности обоих типов можно ввести бромистый этидий в концентрации 2 мкг/мл. В этом случае положение разных видов ДНК можно определить визуально. Имея практический опыт, можно объединить фракции градиента, содержащие отожженные концевые фрагменты, без предварительного анализа электрофорезом в агарозном геле. При этом нужно помнить, что концевые фрагменты ДНК, полученные таким образом, перед дальнейшей обработкой ферментами нужно проэкстрагировать три раза изоамиловым спиртом для удаления бромистого этидия.

Проверочная обработка лигазой отожженных концевых фрагментов λ-вектора

Способность отожженных концевых фрагментов λ-вектора лигироваться проверяют следующим образом.

1. Смешайте 1 мкг отожженных концевых фрагментов, 1 мкл буфера (10×) для лигирования (с. 415) и 10 мкл H_2O.

2. Отберите две аликвоты по 1 мкл (0,1 мкг каждая) для использования в качестве маркеров при электрофорезе. Добавьте ДНК-лигазу бактериофага Т4 (10—50 единиц Вейса) к остальной части препарата и инкубируйте 12—16 ч при 12 °С.

3. Отберите еще две аликвоты по 1 мкл. Добавьте 10 мкл буфера ТЕ ко всем четырем аликвотам. Прогрейте по одной

аликвоте из п. 2 и 3 при 68 °С в течение 10 мин. К каждой пробе добавьте 3 мкл буфера для нанесения на гель (буфер I, с. 400) и нанесите все четыре пробы на 0,5%-ный агарозный гель. Если лигирование пройдет успешно, бóльшая часть концевых фрагментов λ-вектора должна превратиться в катенаты длиной $\geqslant$42 kb.

ВЫДЕЛЕНИЕ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ ДНК ИЗ КЛЕТОК, РАСТУЩИХ В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ[1]

1. Промойте клетки, растущие в монослое, охлажденным во льду солевым раствором, забуференным трисом (трис-солевой буфер, или TBS). Используя стеклянную палочку с куском резиновой трубки, насаженной на конце (чтобы не повредить клетки), отберите клетки в небольшой объем TBS. Осадите клетки центрифугированием при 1500 g в течение 10 мин при 4 °С.

TBS содержит 8 г NaCl, 0,38 г KCl, 3 г триса, 0,015 г фенолового красного и до 800 мл H_2O.

Доведите pH до 7,4 1 н. HCl, а объем до 1 л. Простерилизуйте автоклавированием.

2. Суспендируйте осажденные клетки в охлажденном льдом буфере в концентрации 10^8 клетка/мл.

3. Добавьте 10 объемов раствора, содержащего 0,5 М ЭДТА, pH 8,0, 100 мкг/мл протеиназы К и 0,5% саркозила.

4. Поместите суспензию лизированных клеток в водяную баню с температурой 50 °С на 3 ч и периодически плавными движениями перемешивайте вязкий раствор.

5. Аккуратно, избегая резких встряхиваний, проэкстрагируйте ДНК три раза равным объемом фенола. После центрифугирования фенол присутствует в верхней фазе, а ДНК — в нижней.

Отберите фенол и, насколько возможно, интерфазу. Если необходимо, проэкстрагируйте интерфазу добавочной порцией фенола и буфера. Обе водные фазы объедините.

6. После третьей экстракции отдиализуйте ДНК против 4 л раствора 50 мМ трис-HCl, pH 8,0, 10 мМ ЭДТА, 10 мМ NaCl, несколько раз меняя буфер. Диализ продолжайте до тех пор, пока D_{270} диализата не будет превышать 0,05. Препарат в диализном мешке должен иметь возможность увеличить свой объем в три раза.

7. Обработайте пробу РНКазой, свободной от ДНКазы, в концентрации 100 мкг/мл (с. 397) при 37 °С в течение 3 ч.

8. Осторожно без резких встряхиваний проэкстрагируйте препарат два раза смесью фенол — хлороформ (1 : 1).

---

[1] Blin, Stafford, 1976.

9. Проведите исчерпывающий диализ препарата против буфера ТЕ.

10. Измерьте точную концентрацию ДНК и проанализируйте аликвоту препарата электрофорезом в 0,3%-ном агарозном геле. Молекулы ДНК должны иметь размер больше 100 kb и перемещаться медленнее, чем маркерная интактная ДНК фага. Храните ДНК при 4 °С.

Примечания. А. ДНК можно также выделить из тканей, используя модифицированный вариант изложенной выше методики.

1) Измельчите ткань с помощью скальпеля или ножниц.

2) Налейте жидкий азот в гомогенизатор Уорринга из нержавеющей стали.

3) Внесите измельченную ткань в азот и гомогенизируйте до тех пор, пока ткань не превратится в тонкий порошок (1—5 мин на максимальной скорости).

4) Дайте жидкому азоту испариться и добавьте к порошку ~10 объемов лизисного раствора (п. 3).

5) Далее следуйте п. 4—10, как описано выше.

Б. Если ДНК необходимо дополнительно очистить и сконцентрировать, то проведите центрифугирование препарата в градиенте плотности CsCl до равновесия ($\rho = 1{,}70$ г/см^3) в роторе Type-40 Beckman (или эквивалентном ему) при 33 000 об/мин в течение 60—70 ч при 15 °С. Соберите фракции градиента раскапыванием через иглу от шприца большого диаметра (№ 16), вставленную сбоку около дна пробирки (см. рис. 3.2). Соберите фракции, имеющие высокую вязкость, т. е. содержащие ДНК, и отдиализуйте их против буфера ТЕ, pH 7,9.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ФРАГМЕНТОВ ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ ДНК ДЛИНОЙ ~20 kb

В настоящее время наиболее удобный метод для создания библиотек эукариотических ДНК в λ-векторах состоит в том, что клонируют фрагменты ДНК, полученные частичным расщеплением высокомолекулярной геномной ДНК подходящими рестриктазами, узнающими последовательность из четырех нуклеотидов и дающими при расщеплении липкие концы (Maniatis et al., 1978).

Подбор условий для частичного расщепления высокомолекулярной ДНК

1. Приготовьте реакционную смесь, содержащую 10 мкг эукариотической ДНК в рестриктазном буфере объемом 150 мкл. Смесь тщательно перемешайте, перевернув пробирку несколько раз.

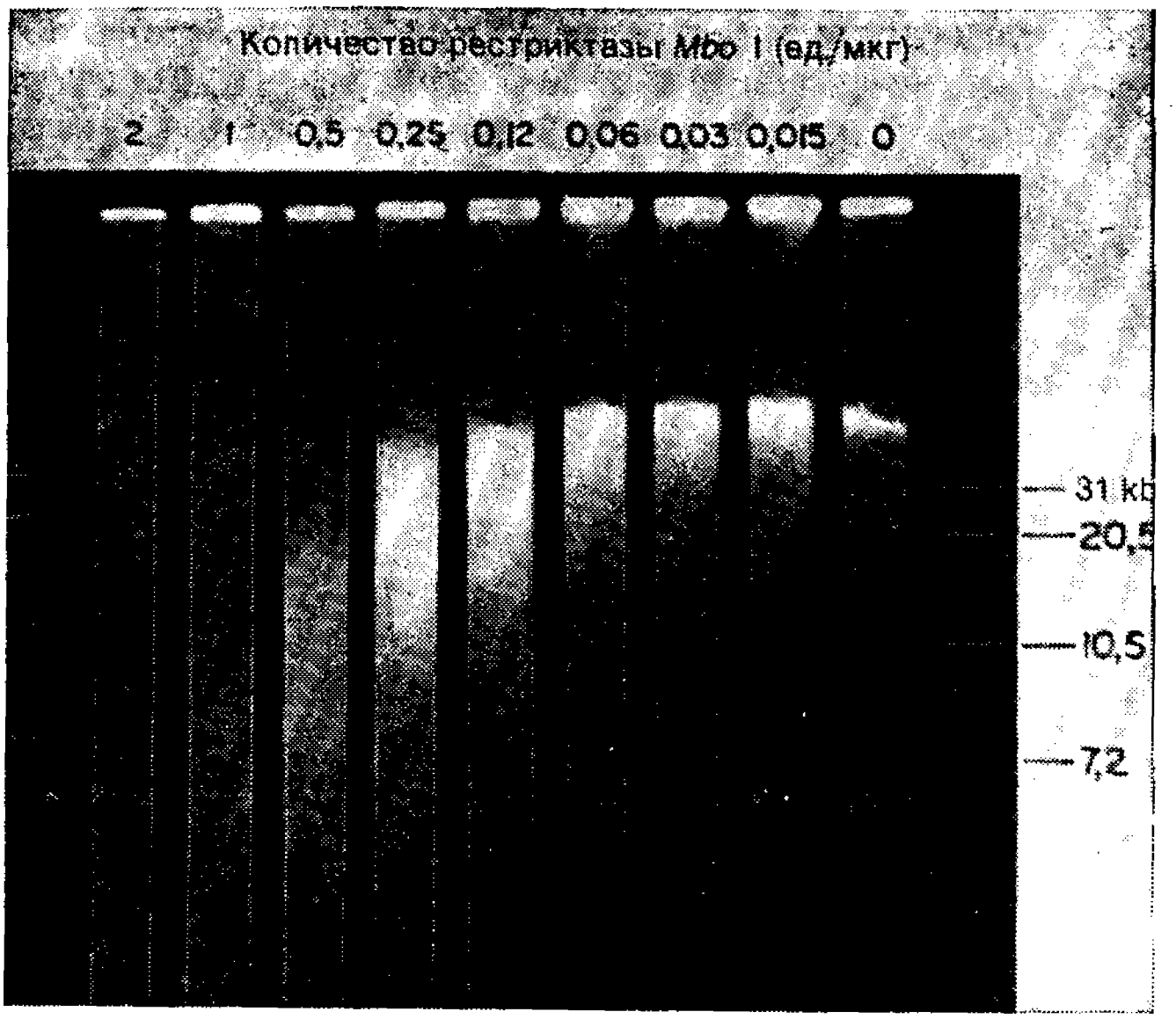


Рис. 9.3. Подбор условий для частичного расщепления высокомолекулярной ДНК. В эксперименте, результаты которого представлены на рисунке, 1 мкг высокомолекулярной ДНК расщепляли разными количествами рестриктазы *Mbo*I в течение 1 ч при 37 °С. После расщепления препараты анализировали электрофорезом, используя в качестве маркеров фрагменты фага λ с известной молекулярной массой. Условия расщепления, при которых образуется максимальное количество фрагментов ДНК с длинами в диапазоне 15—20 kb, определяли по интенсивности флуоресценции. При проведении препаративного опыта для получения максимального количества молекул в выбранном диапазоне использовали половинную концентрацию фермента *Mbo*I на 1 мкг ДНК.

2. Внесите раствор ДНК в 9 эппендорфовских пробирок: в первую пробирку — 30 мкл, в пробирки № 2—8 — по 15 мкл, а остаток раствора ДНК — в девятую пробирку. Все пробирки охладите во льду.

3. К раствору ДНК в пробирке № 1 добавьте 4 ед. рестриктазы и как следует перемешайте смесь. 15 мкл реакционной смеси из пробирки № 1 перенесите в пробирку № 2, в результате чего концентрация фермента в ней станет 1 ед. на 1 мкг ДНК. Хорошо перемешайте и продолжите серию двухкратных разведений до пробирки № 8 включительно (в пробирку № 9 ничего не добавляйте).

4. Инкубируйте в течение 1 ч при 37 °С.

5. Остановите реакцию охлаждением до 0 °С и добавлением ЭДТА до конечной концентрации 20 мМ.

6. К каждой пробе добавьте 3 мкл буфера для нанесения на гель (буфер I) и все пробы проанализируйте электрофоре-

зом в 0,4%-ном агарозном геле. У правого и левого края электрофорезной пластины нанесите маркеры хорошего качества, размер которых лежит в диапазоне 10—30 kb (для этой цели подходят мультимеры pBR322, с. 415). Электрофорез проводите медленно (1—2 В/см) до тех пор, пока краситель бромфеноловый синий не начнет выходить из геля.

7. Сфотографируйте гель. Для анализа используйте только непередержанные негативы (рис. 9.3). По маркерам определите количество фермента, необходимое для того, чтобы после расщепления рестриктазой получить максимальную интенсивность флуоресценции в зоне, соответствующей фрагментам 15—20 kb. Для этого закрывают зоны геля, не содержащие ДНК нужного размера, и, сравнив все дорожки, выбирают степень расщепления, дающую максимальное количество ДНК желаемого размера. Нужно учитывать, что интенсивность флуоресценции связана с распределением ДНК по массе, поэтому для того, чтобы получить максимальное число молекул в желаемом диапазоне, нужно использовать половину количества фермента, дающего максимальное количество флуоресценции (Seed, Parker, Davidson, в печати).

Примечание. Альтернативным и столь же хорошим методом определения условий частичного расщепления является проведение реакции с одним количеством фермента, но в течение разных промежутков времени. В этом случае перед добавлением фермента необходимо все препараты нагреть до температуры инкубации.

Препаративное выделение частично расщепленной ДНК

1. Используя подобранные оптимальные условия (с. 266), расщепите рестриктазой 250—500 мкг высокомолекулярной эукариотической ДНК. Значения концентрации фермента, времени, температуры инкубации и концентрации ДНК должны быть идентичны значениям соответствующих параметров аналитической реакции.

2. После расщепления проанализируйте аликвоту ДНК (1 мкг) электрофорезом в 0,4%-ном агарозном геле, чтобы убедиться в том, что продукты расщепления имеют правильное распределение по размерам.

3. Основной препарат ДНК проэкстрагируйте два раза смесью фенол — хлороформ и ДНК осадите этанолом. Осадок промойте 70%-ным спиртом.

4. Растворите ДНК в 500 мкл буфера ТЕ.

5. Если расщепление дало нужное распределение фрагментов ДНК по размеру, приготовьте градиент плотности сахарозы 10—40% объемом 38 мл в полиалломерных пробирках для ротора Beckman SW27 (или ему эквивалентного). Растворы са-

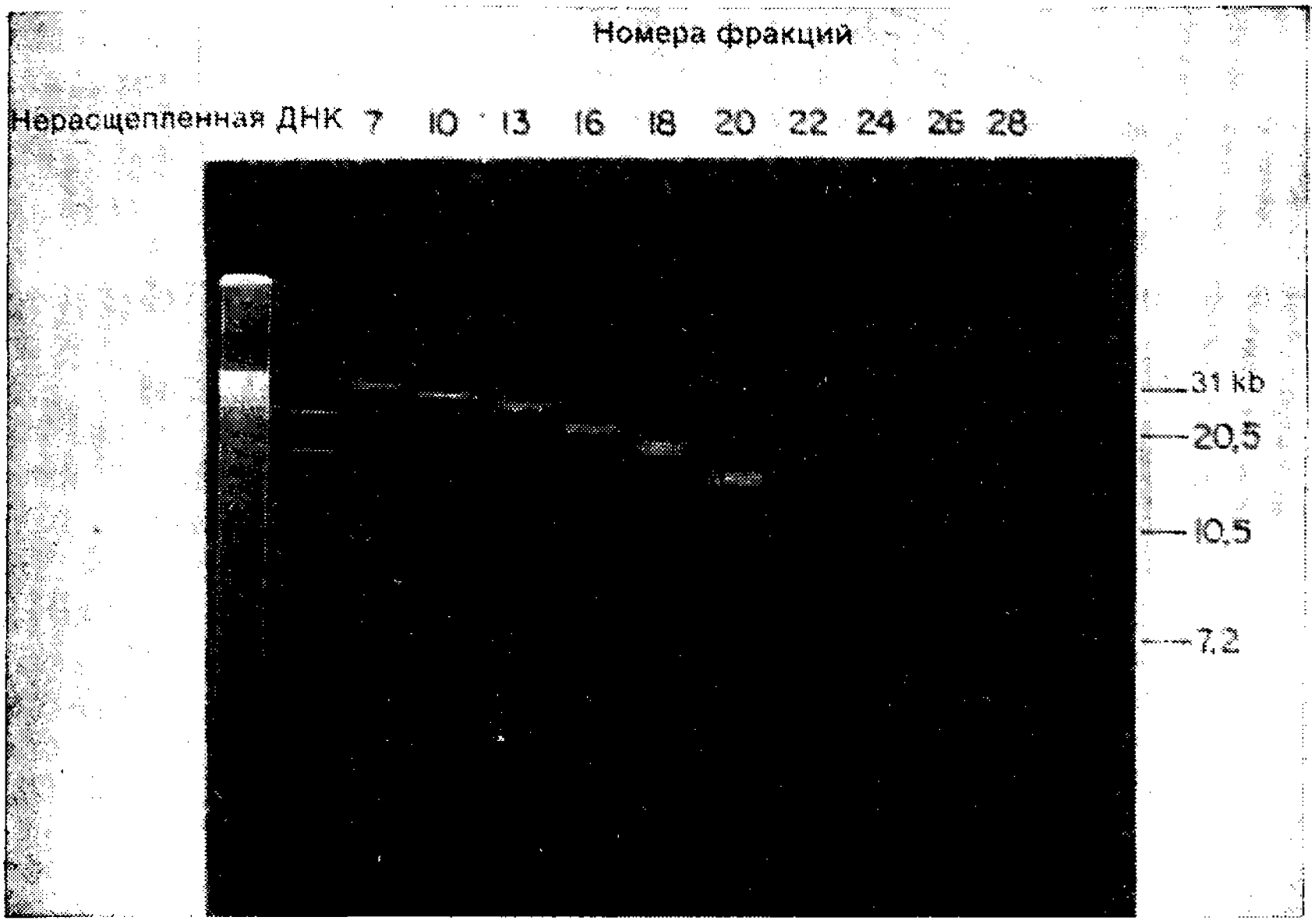


Рис. 9.4. Препаративное выделение фрагментов эукариотической ДНК длиной ~20 kb. В данном эксперименте эукариотическую ДНК частично расщепляли рестриктазой *Mbo*I и фракционировали центрифугированием в градиенте плотности сахарозы, как описано в тексте. Аликвоты отобранных фракций анализировали электрофорезом в 0,4%-ном агарозном геле. Фракции 13—16 объединяли и использовали для получения библиотеки фрагментов эукариотической ДНК длиной 15—20 kb в λ-векторе Харон 28.

харозы готовят на буфере, имеющем состав: 1 М NaCl, 20 мМ трис-HCl, pH 8,0, и 5 мМ ЭДТА. Прогрейте препарат ДНК при 68 °С в течение 10 мин, охладите до 20 °С и нанесите на градиент плотности сахарозы. Проведите ультрацентрифугирование при 26 000 об/мин в течение 24 ч при 20 °С.

6. Соберите фракции (0,5 мл) с помощью иглы, введенной через дно пробирки.

7. Из каждой третьей фракции градиента плотности отберите 10 мкл и смешайте с 10 мкл H_2O и 5 мкл красителя I для нанесения на гель (с. 400). Проанализируйте пробу электрофорезом в 0,1%-ном агарозном геле, используя в качестве маркеров мультимеры pBR322 (с. 415) или фрагменты ДНК фага λ. Для того чтобы сравнение подвижностей компонентов было корректным, концентрацию соли и сахарозы в маркерах необходимо сделать такой же, как и в препаратах (рис. 9.4).

8. После электрофореза объедините фракции градиента плотности сахарозы, содержащие фрагменты ДНК размером 15—20 kb и отдиализуйте против 4 л буфера ТЕ, pH 7,8, при

4 °С в течение 12—16 ч; буфер смените не раньше, чем через 4—6 ч. Препарат в диализном мешке должен иметь возможность увеличить свой объем в два-три раза.

9. После диализа раствор ДНК проэкстрагируйте несколько раз равным объемом 2-бутанола до тех пор, пока объем препарата не уменьшится до 5—8 мл (с. 407), и осадите ДНК этанолом. Если объем объединенных фракций ДНК достаточно мал, ДНК можно осадить спиртом без предварительного диализа, разбавив препарат буфером ТЕ, pH 7,8, так, чтобы концентрация сахарозы уменьшилась до 10%.

10. Растворите осадок ДНК в буфере ТЕ до концентрации 300—500 мкг/мл и аликвоту (0,5 мкг ДНК) проанализируйте электрофорезом в 0,4%-ном агарозном геле с маркерами. Убедитесь, что объединенные фракции содержат фрагменты ДНК нужного размера.

11. Проведите пробное лигирование фрагментов ДНК длиной 15—20 kb, как описано на с. 273.

Примечание. Фрагменты эукариотической ДНК длиной 15—20 kb можно выделить с помощью препаративного электрофореза в 0,4%-ном агарозном геле. Разделение фрагментов ДНК разного размера в этом случае лучше, чем при использовании градиента плотности сахарозы, но выход ДНК при экстракции из агарозы меньше. На одну дорожку агарозного геля (12× ×0,4 см) нужно наносить не более 400—500 мкг частично расщепленной ДНК. Электрофорез проводите медленно (1—2 В/см) и по его завершении проанализируйте окрашенный гель с помощью длинноволнового ультрафиолета. Экстракция ДНК с помощью электроэлюирования и очистка выделенной ДНК описаны в гл. 6.

ЛИГИРОВАНИЕ И УПАКОВКА

Теория лигирования

При проведении реакции лигирования нужно учитывать два важных параметра: отношение концевых фрагментов вектора к потенциальным вставкам и концентрацию ДНК каждого вида. Оптимальные величины для обоих этих параметров можно оценить теоретически, предположив, что все молекулы ДНК, присутствующие в реакционной смеси, являются совершенными. Поскольку реально в эксперименте это случается не часто, полезно ставить пробную реакцию для проверки качества каждой новой партии концевых фрагментов и потенциальных вставок.

Лучшим субстратом для упаковки ДНК in vitro в частицы фага λ является конкатамерная форма ДНК (левый концевой фрагмент — вставка — правый концевой фрагмент). Каждый концевой фрагмент ДНК фага λ имеет два различных липких

конца: один (*cos*-конец) комплементарен только последовательности *cos* на конце другого концевого фрагмента, а другой (*ct*-конец) комплементарен обоим концам вставки и второму концу другого концевого фрагмента. Чтобы получить максимальный выход нужных конкатамеров, *ct*-концы каждого из трех типов ДНК (правый концевой фрагмент, левый концевой фрагмент, вставка) должны присутствовать в эквимолярных концентрациях. Поскольку каждый концевой фрагмент фага λ содержит один *ct*-конец, тогда как потенциальная вставка — два *ct*-конца, отношение молекул в реакции должно быть 2 : 1 : 2 (левый концевой фрагмент — вставка — правый концевой фрагмент), т. е. молярное отношение отожженных концевых фрагментов к потенциальной вставке должно быть 2 : 1.

Большое значение имеет также абсолютная концентрация ДНК в смеси для лигирования. Она должна быть достаточно высокой, чтобы преимущественно лигировались разные молекулы и образовывались конкатамеры, тогда как лигирование разных концов одной молекулы, приводящее к циклизации, было бы минимальным. В литературе подробно обсуждается влияние концентрации ДНК и размера молекул ДНК на природу продуктов, образующихся в реакции лигирования (Dugaiczyk et al., 1975; см. также Focus, vol. 2, nos. 2 и 3, опубликовано Bethesda Research Labs). Ниже приводится краткий теоретический анализ реакции лигирования. Отношение циклизованных продуктов лигирования к конкатамерным зависит от двух параметров — j и i. Параметр j представляет собой эффективную концентрацию одного конца молекулы в некотором объеме, содержащем другой конец той же молекулы. Его вычисляют при условии, что двухцепочечная молекула ДНК ведет себя как случайный клубок; таким образом, величина j обратно пропорциональна длине молекулы ДНК (чем длиннее ДНК, тем меньше вероятность взаимодействия ее концов).

Частота, с которой встречаются два конца одной молекулы, может быть вычислена из уравнения

$$j = \left(\frac{3}{2\pi lb}\right)^{3/2} \text{ конец/мл}, \qquad (1)$$

где l — длина молекулы ДНК в сантиметрах (для ДНК бактериофага λ $l = 13{,}2 \cdot 10^{-4}$ см), а b — длина фрагмента ДНК, образующего случайный клубок. Величина b зависит от ионной силы буфера, влияющей на жесткость ДНК (для ДНК бактериофага λ, растворенной в буфере для лигирования, $b = 7{,}7 \cdot 10^{-6}$ см).

Уравнение (1) удобнее использовать в другой форме:

$$j = j\lambda\left(\frac{MW\lambda}{MW}\right)^{3/2} = \frac{5{,}5 \cdot 10^{22}}{(MW)^{3/2}} \text{ [конец/мл]}, \qquad (2)$$

где $j\lambda = 3{,}22 \cdot 10^{11}$ конец/мл, а $MW\lambda = 30{,}8 \cdot 10^6$. Следует отметить, что j не зависит от концентрации ДНК и постоянна для молекулы ДНК данной длины.

Если j описывает эффективную концентрацию двух концов одной и той же молекулы, то i есть мера концентрации всех комплементарных концов в растворе. Для двухцепочечной линейной ДНК с липкими концами

$$i = 2N_0M \cdot 10^{-3} \text{ конец/мл}, \qquad (3)$$

где N_0 — число Авогадро, а M — молярная концентрация ДНК.

Если молекула ДНК не имеет комплементарных концов, то концентрация каждого конца

$$i = N_0M \cdot 10^{-3} \text{ конец/мл}. \qquad (4)$$

Теоретически, если $j = i$, то вероятность образования конкатамеров равна вероятности образования колец. При $j > i$ образуются преимущественно кольца, а при $i > j$ — главным образом конкатамеры.

Для молекул ДНК с молекулярными массами в диапазоне $1 \cdot 10^6 - 4 \cdot 10^6$ (1,5 kb) эти теоретические выводы были проверены экспериментально. Было обнаружено, что при $j = i$ доминирующим продуктом реакции являются конкатамеры, а кольца образуются в заметных количествах, только если j в несколько раз больше, чем i. Основная причина различий между предсказываемыми и наблюдаемыми результатами состоит, по-видимому, в том, что уравнения описывают равновесную ситуацию. Реально в реакции лигирования как концентрация, так и размер продуктов изменяются во времени. Таким образом, хотя эти величины полезны для оценки условий реакции, оптимальные условия необходимо подбирать экспериментально.

Теперь рассмотрим лигирование концевых фрагментов бактериофага λ и потенциальных вставок эукариотической ДНК при образовании субстрата для упаковки ДНК in vitro в частицы бактериофага. Для получения длинных конкатамеров концентрацию ДНК выберем такой, чтобы выполнялось условие $j \ll i$ как для концевых фрагментов фага λ, так и для потенциальных вставок. Учтем также, что относительные молярные количества концевых фрагментов и вставок в реакционной смеси должны относиться как 2 : 1. Далее можно вывести величины j для концевых фрагментов и потенциальных вставок, предполагая, что размер отожженных концевых фрагментов составляет 31kb ($1{,}9\ 10^7$ Д) и что средний размер потенциальной вставки составляет 20kb ($1{,}25 \cdot 10^7$ Д). Делая соответствующие подстановки в уравнение (2), получаем

$$j_{\text{кф}} = 6{,}6 \cdot 10^{11} \text{ конец/мл},$$

$$j_{\text{в}} = 1{,}25 \cdot 10^{12} \text{ конец/мл},$$

где $j_{кф}$ — эффективная концентрация концевых фрагментов, а $j_в$ — эффективная концентрация вставок. Эти величины отличаются друг от друга в 2 раза. Поскольку нам нужно, чтобы выполнялось условие $j \ll i$, в последующих вычислениях будем использовать большую из двух величин. Выберем величину i, являющуюся мерой концентрации *всех* липких концов (ct-концов в реакции), такой, чтобы

$$i/j_в = 10.$$

При этом в реакции должно наблюдаться образование преимущественно конкатамеров:

$$i = (10)\, j_в = (10)\, 1{,}25 \cdot 10^{12} = 1{,}25 \cdot 10^{13} \text{ конец/мл.} \qquad (5)$$

Поскольку $i = i_в + i_{кф}$,

$$i = (2N_0M_в + 2N_0M_{кф}) \cdot 10^{-3} \text{ конец/мл.}$$

Как отмечалось выше, мы выбрали $M_{кф} = 2M_в$, так что

$$i = (2N_0M_в + 2N_0 \cdot 2M_в) \cdot 10^{-3} \text{ конец/мл} = 6N_0M_в \cdot 10^{-3} \text{ конец/мл.} \qquad (6)$$

Подставляя величины для i [уравнение (5)] и N_0, мы находим, что

$$M_в = 3{,}5 \cdot 10^{-9}\text{M} \ (43 \text{ мкг/мл}),$$
$$M_{кф} = 2M_в = 7{,}0 \cdot 10^{-9}\text{M} \ (135 \text{ мкг/мл}).$$

Таким образом, для получения оптимального выхода конкатамерных рекомбинантных молекул ДНК, подходящих для упаковки ДНК in vitro в частицы бактериофага λ, реакционная смесь должна содержать 43 мкг/мл вставок и 135 мкг/мл концевых фрагментов.

Проведение пробного лигирования и упаковки

Если в распоряжении экспериментатора имеется достаточное количество препаратов концевых фрагментов λ-вектора, вставок и экстракта для упаковки, следует провести несколько пробных опытов по лигированию и упаковке, для того чтобы определить оптимальное отношение концевых фрагментов к вставке, которое дает наибольшее число молекул, способных упаковываться в частицу фага. Хотя теоретически это отношение равно 2 : 1 (концевые фрагменты : вставки, с. 270), реально в препарате некоторые молекулы могут быть лишены липких концов, вследствие чего эффективная концентрация концов, способных к лигированию, может быть меньше, чем следует из расчетов. Для пробной реакции лигирования удобно использовать следующие молярные отношения концевых фрагментов к вставке: 4 : 1, 2 : 1 и 0,5 : 1.

1. *Постановка пробной реакции лигирования.* Каждая проба должна содержать 2,0 мкг ДНК в объеме 10 мкл. Необходимо поставить контрольную пробу, содержащую только концевые фрагменты (1,5 мкг), для оценки фонового образования частиц фага, вызываемого загрязнением препарата концевых фрагментов внутренними фрагментами или интактной ДНК фага λ. Для проведения реакции лигирования смешайте соответствующие препараты ДНК, 1,1 мкл буфера для лигирования (10×; с. 415) и воду до конечного объема 10 мкл. Отберите аликвоту из каждой пробы (1 мкл), добавьте ее к 10 мкл буфера ТЕ, pH 7,9, и сохраните для электрофоретического анализа.

2. Добавьте к реакционной смеси ДНК-лигазу бактериофага Т4 (1—2 ед. Вейса) и инкубируйте 12—16 ч при 12°С.

3. Отберите по аликвоте из каждой пробы (1 мкл) и внесите их в 10 мкл буфера ТЕ, pH 7,9. Прогрейте эти аликвоты вместе с аликвотами, отобранными на стадии 1, при 68°С в течение 5 мин для денатурации любых липких концов фага λ, не подвергшихся лигированию. Проанализируйте аликвоты в 0,4%-ном агарозном геле, используя в качестве маркеров мультимеры pBR322 (с. 415) и интактную ДНК фага λ.

4. Если реакция лигирования прошла успешно, то почти вся ДНК должна иметь размер, не меньший, чем интактная ДНК фага λ. Используйте 3 мкл из каждой пробы как субстрат для упаковки ДНК in vitro в частицы фага λ (гл. 8). При этом одну пробу обязательно поставьте без ДНК для измерения фонового образования частиц, которое возможно в экстракте без экзогенной ДНК. Вторым важным контролем является упаковка стандартного препарата ДНК бактериофага λ.

5. Измерьте титр фагов в каждой реакции упаковки, как описано на с. 80.

6. Сосчитайте число рекомбинантных фаговых частиц, полученных в каждой реакции упаковки. Из этих результатов определите оптимальное отношение концевых фрагментов к потенциальным вставкам в реакции лигирования. Используйте данное отношение в последующем препаративном опыте по лигированию и упаковке рекомбинантных ДНК.

Примечания. А. Остатки препаратов, полученных в пробных опытах по лигированию и упаковке, нужно сохранять, так как часто именно из них можно получить достаточное количество рекомбинантных фагов для библиотеки.

Б. Некоторые λ-векторы в качестве внутреннего фрагмента содержат сегмент ДНК *E. coli,* кодирующий β-галактозидазу. Фаги с такой ДНК при посеве на газоне бактерий *lac*⁻ в присутствии хромогенного субстрата — 5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-галактозида (Xgal) — образуют голубые бляшки, а рекомбинантные бактериофаги, в которых внутренний фрагмент замещен фрагментом чужеродной ДНК, образуют обычные белые

бляшки. Поэтому цвет бляшек можно использовать в качестве критерия, позволяющего различать рекомбинантные бактериофаги и родительский вектор.

1) Для приготовления суспензии индикаторных бактерий используйте *lac*⁻-штамм *E. coli,* чувствительный к бактериофагу λ, например CSH18 (с. 79).

2) Растворите Xgal в диметилформамиде в концентрации 20 мг/мл и храните этот раствор при 4 °С.

3) Расплавьте верхний агар или верхнюю агарозу как обычно (в буферах NZYCM или LB). Охладив расплав до 47 °С, добавьте к нему Xgal до конечной концентрации 40 мкг/мл (500-кратное разведение концентрированного раствора).

4) Сделайте посев исходной суспензии рекомбинантного бактериофага на клетки *lac*⁻ *E. coli,* которые растут в верхнем агаре или агарозе, содержащей Xgal. В нижний слой агара Xgal добавлять не обязательно. Параллельно оттитруйте препараты известных фагов *lac*⁺ (например, Харон 4А) и *lac*⁻ (например, Харон 21А).

5) Через 9—15 ч инкубации при 37 °С бактериофаг *lac*⁻ образует бесцветные бляшки, а бактериофаг *lac*⁺ — голубые.

Препаративное лигирование и упаковка

1. Препаративная реакция ставится в условиях, о которых говорится в п. 6, с. 274. Как и в аналитическом варианте, необходима контрольная проба, в которой присутствуют только концевые фрагменты вектора. Перед реакцией лигирования и после нее отберите аликвоты для анализа гель-электрофорезом. Во время аналитического электрофореза препаративный образец храните при 4 °С.

2. Если реакция лигирования прошла успешно, проведите упаковку лигированной ДНК в частицы фага, используя необходимое количество порций экстракта для упаковки. Лучше одновременно работать не больше чем с двумя или тремя порциями экстракта, так чтобы во время смешивания с лигированной ДНК экстракты не оттаивали до конца. Обязательно поставьте контрольную пробу на упаковку без ДНК, чтобы измерить фон, даваемый экстрактами. Другим необходимым контролем является упаковка стандартного препарата ДНК бактериофага λ. В каждой пробе измерьте титр бактериофага, как описано на с. 80.

3. Вычислите общее число полученных рекомбинантных бактериофагов и их концентрацию в упаковочном экстракте. Если концентрация окажется больше чем ~ 400 000 рекомбинантных бактериофагов на 1 мл, то полученный препарат достаточно концентрирован, и его можно непосредственно исполь-

зовать для амплификации рекомбинантных фагов (с. 277 и далее). Если же препарат недостаточно концентрирован, то его можно сконцентрировать и очистить ультрацентрифугированием в ступенчатом градиенте плотности CsCl, как описано ниже.

Концентрирование рекомбинантных бактериофагов ультрацентрифугированием в ступенчатом градиенте плотности CsCl

1. Объедините пробы для упаковки и центрифугированием при 5000 об/мин в течение 5 мин при 4 °С удалите обломки клеток. Измерьте объем надосадочной жидкости и добавьте твердый CsCl в количестве 0,5 г/мл, после чего доведите объем до 7,5 мл или до объема, кратного 7,5 мл, используя буфер SM, содержащий твердый CsCl в количестве 0,5 г/мл.

2. В ультрацентрифужной пробирке (для ротора SW41 или эквивалентного ему) приготовьте ступенчатый градиент плотности CsCl, состоящий из трех слоев растворов CsCl объемом по 1,5 мл с плотностями 1,7, 1,5 и 1,45 г/см^3 (все растворы готовятся на буфере SM, с. 94). Положение границы между слоями растворов с плотностями 1,45 и 1,5 г/см^3 отметьте на наружной части пробирки фломастером.

3. На верхнюю часть градиента аккуратно наслоите суспензию бактериофага и центрифугируйте при 32 000 об/мин в течение 1,5 ч при 4 °С. В результате центрифугирования частицы бактериофага собираются на границе между слоями растворов CsCl с плотностями 1,5 и 1,45 г/см^3. Так как число частиц бактериофага слишком мало, чтобы образовывать видимую полосу, проткните пробирку около нижней части слоя раствора с плотностью 1,5 г/см^3 и соберите фракции объемом 0,4 мл. 5 мкл раствора 1000-кратного разведения из каждой фракции нанесите на газон индикаторных бактерий и по максимальному числу бляшек определите фракции, содержащие частицы бактериофага.

4. Объедините фракции, содержащие частицы бактериофага, и добавьте стерильную желатину до концентрации 0,02%. Отдиализуйте в течение ночи при 4 °С против буфера, имеющего состав: 0,1 М NaCl, 50 мМ трис-HCl, pH 7,5, и 10 мМ $MgSO_4$, с одной сменой буфера. Диализную трубку хорошо промойте дистиллированной водой, проавтоклавируйте и промойте стерильным буфером для диализа.

5. После диализа перенесите суспензию бактериофага в пробирку и промойте диализную трубку небольшим объемом буфера SM. Измерьте титр полученной суспензии фаговых частиц (библиотеки клонов), которая в таком виде готова для амплификации.

АМПЛИФИКАЦИЯ БИБЛИОТЕКИ

Амплификацию библиотеки рекомбинантных бактериофагов осуществляют путем выращивания препарата для посева (с. 81) непосредственно из смеси для упаковки или из концентрированной суспензии бактериофагов, полученной центрифугированием в градиенте плотности (Maniatis et al., 1978).

1. Смешайте аликвоту смеси для упаковки или концентрированной суспензии частиц бактериофага, содержащую 10 000—20 000 рекомбинантных бактериофагов в объеме 50 мкл, с 0,2 мл среды с реципиентными бактериями для посева (с. 79). Инкубируйте при 37 °С в течение 20 мин.

2. С каждой аликвотой инфицированных бактерий смешайте 6,5 мл расплавленного верхнего агара или агарозы и сделайте посев в чашки Петри со свежезалитым нижним агаром (диаметр чашек 150 мм). В другом варианте 450 000 частиц бактериофага можно смешать с 14 мл реципиентных бактерий и 75 мл верхнего агара или агарозы и высеять смесь на 500 мл нижнего агара в стеклянной стерильной чашке размером 23×33 см.

3. Инкубируйте при 37 °С не больше чем 8—10 ч. Во время инкубации нужно следить, чтобы бляшки не вырастали до размеров, при которых они касались бы друг друга. Благодаря выращиванию в течение указанного короткого времени, во-первых, сводится к минимуму возможность инфекции бактерий двумя различными рекомбинантными фагами (это снижает возможность рекомбинации между повторяющимися последовательностями, содержащимися в различных рекомбинантных фагах, и тем самым уменьшает возможность «перетасовки» последовательностей клонируемой ДНК) и, во-вторых, уменьшается возможность изменений в популяции бактериофагов (количественного представительства разных клонов), которые происходят из-за различий в скоростях роста разных рекомбинантов.

4. После инкубации залейте чашки 12 мл буфера SM (или 150 мл, если используются чашки размером 23×33 см). Оставьте чашки при 4 °С на ночь в горизонтальном положении.

5. Суспензию бактериофага из каждой чашки перенесите в стерильную полипропиленовую пробирку. Промойте чашки 4 мл буфера SM и добавьте хлороформ до 5%. Инкубируйте 15 мин при комнатной температуре, периодически встряхивая.

6. Удалите обломки клеток и агара центрифугированием при 4000 g в течение 5 мин при 4 °С.

7. Надосадочную жидкость перенесите в стеклянную пробирку или колбу и добавьте хлороформ до 0,3%. Затем разделите ее на аликвоты и храните при 4 °С. Титр библиотеки не изменяется на протяжении нескольких лет.

Примечание. В некоторых случаях полезно исключать амплификацию и проводить анализ рекомбинантных бактериофагов прямо в смеси для упаковки с целью поиска тех частиц фага, которые содержат интересующие экспериментатора последовательности ДНК. Например, если нужный рекомбинант плохо растет, то при амплификации библиотеки он может быть сильно «недопредставлен». Если исключать амплификацию, то такие рекомбинанты можно обнаружить и выделить, даже если они образуют очень маленькие бляшки. В таком случае порции смеси для упаковки высевают непосредственно и образовавшиеся бляшки анализируют на присутствие нужных последовательностей ДНК, как описано в гл. 10.

ПОЛУЧЕНИЕ ГЕНОМНЫХ БИБЛИОТЕК В КОСМИДНЫХ ВЕКТОРАХ

Для клонирования в космидных векторах применимы многие из методик, используемых для получения геномных библиотек в λ-векторах. В обоих случаях большие фрагменты эукариотической ДНК получают квазислучайной фрагментацией и затем их лигируют с векторной ДНК с образованием катенатов, которые могут быть упакованы в частицы фага λ. Как говорилось выше, библиотеки, полученные в λ-векторах, хранят и размножают в форме таких рекомбинантных фаговых частиц. Но при клонировании в космидах эти частицы служат только переносчиками рекомбинантной молекулы ДНК, посредством которых ДНК эффективно вводится в бактерии, где эти рекомбинантные ДНК размножаются, как большие плазмиды. Если каждая бактерия в популяции несет рекомбинантную космиду одного типа, то нужно получить и сохранить около 350 000 трансформантов для того, чтобы данная уникальная последовательность эукариотической ДНК была представлена в библиотеке с вероятностью 99% (см. уравнение на с. 257).

В настоящее время лучший метод для получения библиотек эукариотической ДНК в космидных векторах состоит в том, что клонируют фрагменты ДНК, полученные при неполном расщеплении высокомолекулярной эукариотической ДНК рестриктазами, узнающими последовательность из четырех нуклеотидов и дающими при расщеплении липкие концы. В обеих методиках, описанных ниже, геномную ДНК частично расщепляют рестриктазами *Mbo*I или *Sau*3A и клонируют в *Bam*HI-сайте космиды pJB8 (гл. 1). Отличие между методиками заключается в способе предотвращения самоконкатамеризации и упаковки векторной ДНК.

В одном случае (Meyerowitz et al., 1980; Grosveld et al, 1981) линейную векторную ДНК просто обрабатывают фосфатазой; в другом (Ish-Horowicz, Burke, 1981), включающем большее число ферментативных обработок, используют моди-

фицированный вариант направленного клонирования. Вторая методика более эффективна, хотя для получения библиотек рекомбинантных ДНК была успешно использована как та, так и другая.

КЛОНИРОВАНИЕ В КОСМИДНЫХ ВЕКТОРАХ, ОБРАБОТАННЫХ ФОСФАТАЗОЙ

Основные этапы этого метода схематически представлены на рис. 9.5.

Приготовление векторной ДНК

1. Обработайте 20 мкг кольцевой замкнутой ДНК pJB8, приготовленной по методу, описанному в гл. 3, рестриктазой BamHI в двух- или трехкратном избытке в течение 1 ч. Остановите реакцию охлаждением до 0 °С. Отберите аликвоту (0,3 мкг) и проанализируйте ее электрофорезом в 0,8%-ном агарозном геле вместе с 0,3 мкг нерасщепленной ДНК pJB8. Если расщепление прошло неполно, прогрейте реакционную смесь до 37 °С, добавьте еще фермент и продолжите инкубацию.

2. После завершения расщепления проэкстрагируйте пробу смесью фенол — хлороформ (1 : 1) и осадите ДНК этанолом. Ресуспендируйте ДНК в 200 мкл 10 мМ трис-HCl, pH 8.0. Отберите аликвоту 5 мкл (~0,5 мкг) и храните ее при —20 °С.

3. К остальной части пробы добавьте 200 ед. (активность определяется по гидролизу АТР) фосфатазы из кишечника теленка (с. 141) и инкубируйте 30 мин при 37 °С.

4. Добавьте 1 мкл 0,5 М ЭДТА и проэкстрагируйте ДНК три раза фенолом и один раз хлороформом. Осадите ДНК этанолом.

5. Суспендируйте осадок ДНК в 20 мкл буфера ТЕ, pH 8,0, и проведите пробное лигирование для определения эффективности фосфатазной обработки.

Поставьте три пробы, содержащие: а) 0,5 мкг ДНК, обработанной фосфатазой; б) 0,5 мкг ДНК, обработанной фосфатазой, и 0,5 мкг ДНК бактериофага λ, расщепленной *Bam*HI; в) 0,5 мкг ДНК pJB8, расщепленной *Bam*HI, но не обработанной фосфатазой (например, аликвоту, отобранную в п. 2).

К каждой пробе добавьте 1 мкл буфера для лигирования (10×; с. 415) и до 10 мкл H_2O.

Отберите аликвоту (2 мкл) и храните ее при 4 °С. К остальной части пробы добавьте 0,5 ед. ДНК-лигазы бактериофага Т4 и инкубируйте 4—8 ч при 12 °С. После инкубации из каждой

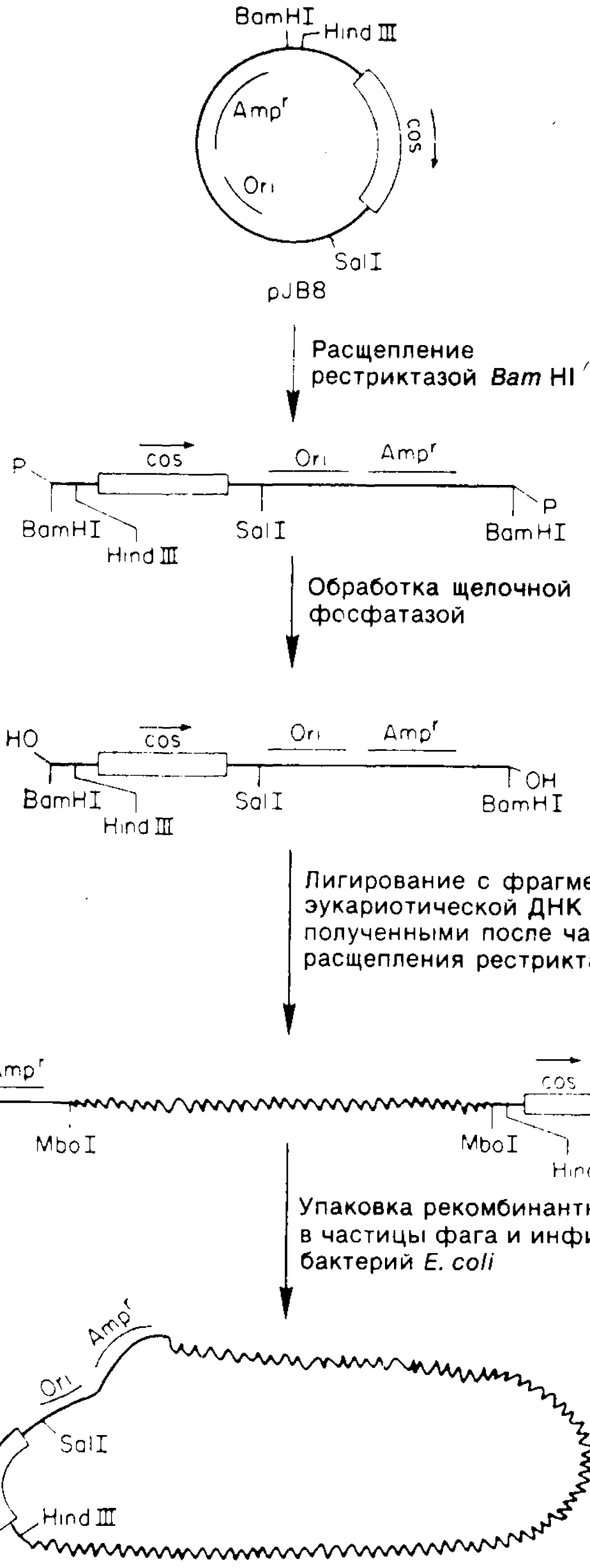


Рис. 9.5. Клонирование в векторах, обработанных фосфатазой. ДНК плазмиды pJB8 расщепляли рестриктазой *Bam*HI и дефосфорилировали щелочной фосфатазой для получения вектора с выступающими 5′-концами, которые затем можно лигировать с фрагментами эукариотической ДНК длиной 35—45 kb, полученными частичным расщеплением рестриктазами *Mbo*I или *Sau*3A. Образующиеся конкатамеры служат субстратом для упаковки in vitro в частицы бактериофага λ. После введения в *E. coli* космида рециклизуется и реплицируется в форме большой плазмиды. Плазмида содержит ген β-лактамазы, придающий бактерии-хозяину устойчивость к ампициллину.

пробы отберите аликвоту (2 мкл) и все 6 аликвот проанализируйте электрофорезом в 0,7%-ном агарозном геле. Остатки проб заморозьте при —20 °С.

В препаратах ДНК, обработанных фосфатазой, лигированного материала не должно быть, тогда как бóльшая часть ДНК, не обработанной фосфатазой, должна превратиться в мультимеры. Поскольку дефосфорилированные одноцепочечные выступающие концы ДНК могут лигироваться с комплементарными липкими концами, имеющими на 5′-конце фосфат, по крайней мере часть космидной ДНК, обработанная фосфатазой, должна лигироваться с фрагментами ДНК бактериофага λ, расщепленными *Bam*HI. Если пробное лигирование дало хороший результат, то дефосфорилированную ДНК следует разделить на аликвоты и хранить при —20 °С.

Частичное расщепление эукариотической ДНК рестриктазами *Mbo*I и *Sau*3A

Эукариотическую ДНК, частично расщепленную рестриктазами *Mbo*I или *Sau*3A, можно получить по методике, описанной подробно на с. 266 и далее. Поскольку для клонирования в космидных векторах нужны большие фрагменты ДНК, препарат ДНК перед расщеплением рестриктазами должен содержать молекулы очень большого размера (≥100 kb). После частичного расщепления препарат ДНК фракционируют электрофорезом в 0,3—0,4%-ном агарозном геле и для экстракции ДНК берут зону геля, содержащую молекулы длиной 30—45 kb. В качестве маркеров используют ДНК фага λ разного размера или мультимеры плазмиды pBR322.

Постановка реакций лигирования и упаковки

Для того чтобы убедиться, что оба конца каждой потенциальной вставки соединены с космидой, лигирование должно проводиться с векторной ДНК, обработанной фосфатазой и присутствующей в 10-кратном молярном избытке по сравнению с фрагментами эукариотической ДНК длиной 30—45 kb. Эффективное образование конкатамеров в реакции лигирования происходит при концентрации ДНК больше чем 200 мкг/ мл (с. 270).

1. Смешайте 1,5 мкг векторной ДНК, обработанной фосфатазой, 3 мкг фрагментов эукариотической ДНК длиной 35—45 kb, 2 мкл буфера для лигирования (10×; с. 415) и до 20 мкл H_2O. Конечная концентрация ДНК составляет 225 мкг/мл. Отберите аликвоту (1 мкл) из этой смеси и храни-

те ее при 4 °С. Добавьте 20—200 ед. Вейса ДНК-лигазы фага Т4 к остатку реакционной смеси и инкубируйте ночь при 12 °С.

2. После реакции отберите аликвоту (1 мкл) и вместе с аликвотой, отобранной в п. 1, проанализируйте ее в 0,4%-ном агарозном геле. Если лигирование прошло успешно, то некоторые молекулы эукариотической ДНК должны превратиться в высокомолекулярные конкатамеры, а большинство векторной ДНК должно остаться нелигированной.

3. Проведите упаковку лигированной ДНК в частицы бактериофага λ, как описано на с. 273—275, причем в одной пробе используйте не более чем 0,5 мкг ДНК. В качестве контроля поставьте пробу с аликвотами, отобранными на стадии 5 (с. 279).

Для клонирования в космидах экстракты для упаковки следует готовить по методике II или I (гл. 8), используя буфер, содержащий спермидин, но не путресцин. При исключении из экстракта для упаковки путресцина молекулы ДНК разного размера упаковываются с разной эффективностью. Так, например, ДНК с длиной, составляющей 80% длины ДНК бактериофага λ, упаковывается в 200 раз менее эффективно, чем ДНК фага дикого типа. Поэтому в отсутствие путресцина будут упаковываться космиды, содержащие только большие вставки.

4. По завершении реакции упаковки к каждой пробе добавьте 0,5—1,0 мл буфера SM и храните их при 4 °С. Из каждой пробы отберите 10 мкл и смешайте с 0,1 мл буфера SM и 0,2 мл свежей ночной культуры *E. coli* 1046 или DH1, выращенной в присутствии 0,2% мальтозы. Штаммы 1046 и DH1 более «надежные» *recA*$^-$-штаммы, чем HB101, и поэтому при их использовании рекомбинация между повторяющимися последовательностями клонированной эукариотической ДНК может уменьшиться. После смешивания фага и бактерий проинкубируйте пробы в течение 20 мин при 37 °С. В это время происходит адсорбция бактериофага. Затем добавьте 1 мл L-бульона и проинкубируйте еще 45 мин.

Сделайте посев 0,5 и 0,1 мл бактериальной культуры, зараженной фагом, в чашки Петри с агаром, содержащим ампициллин. После инкубации чашек в течение ночи при 37 °С сосчитайте число бактериальных колоний. Каждый микрограмм рекомбинантной лигированной ДНК (состоящей из эукариотической и космидной ДНК) должен давать $5 \cdot 10^3$—$5 \cdot 10^4$ бактериальных колоний.

5. Отберите несколько индивидуальных колоний и из каждой нарастите небольшой объем ночной культуры (~5 мл). Из 4—5 мл каждой бактериальной культуры выделите плазмидную ДНК с помощью лизиса в щелочных условиях (с. 333). Обработайте плазмидную ДНК рестриктазами и определите размер образующихся фрагментов гель-электрофорезом.

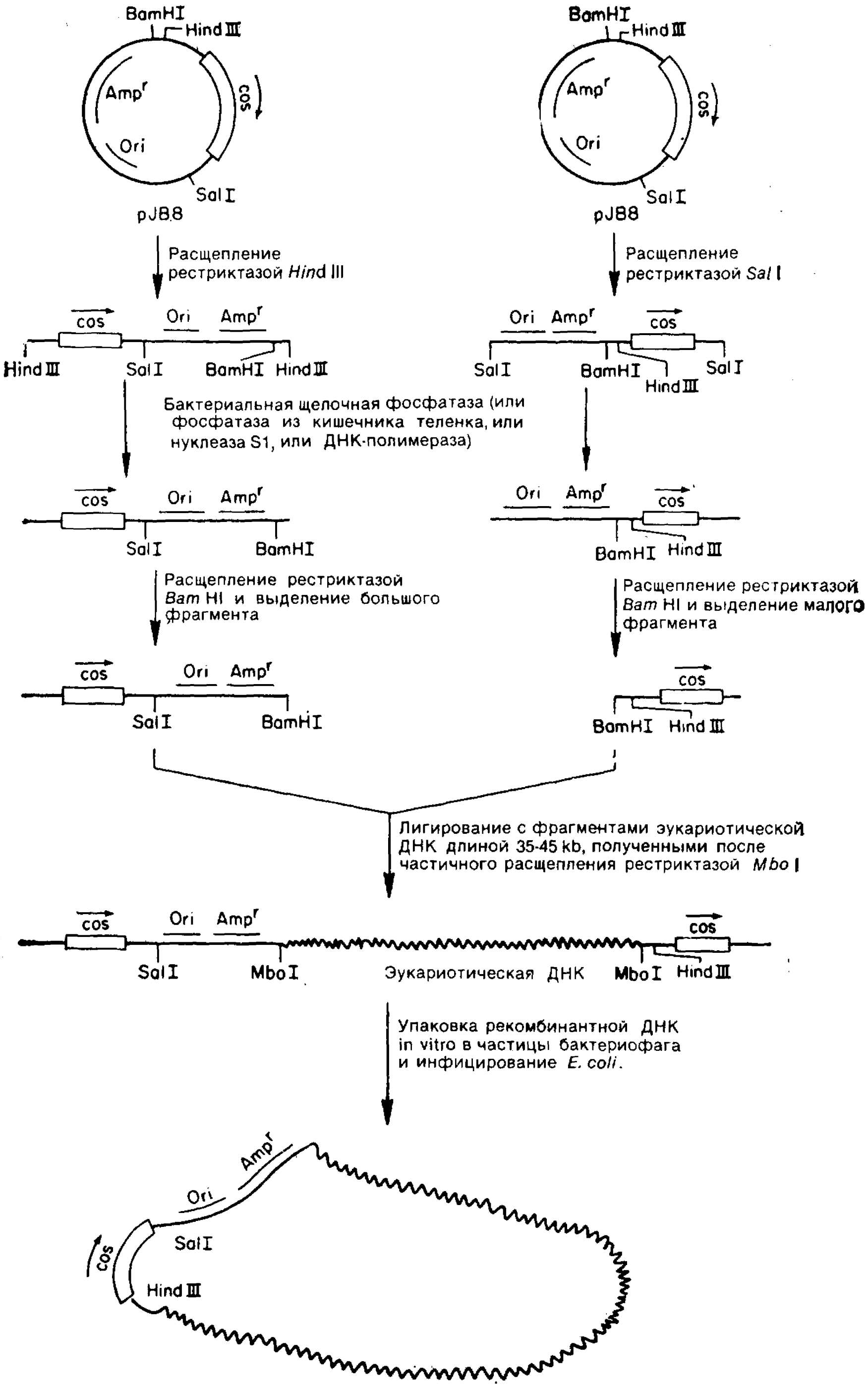
КЛОНИРОВАНИЕ В КОСМИДНЫХ ВЕКТОРАХ, РАСЩЕПЛЕННЫХ ДВУМЯ РЕСТРИКТАЗАМИ И ОБРАБОТАННЫХ ФОСФАТАЗОЙ

Принципы этой методики, разработанной Иш-Горовицем и Бёрке (Ish-Horowicz, Burke, 1981), описаны в гл. 1. Космидный вектор в двух пробах расщепляют рестриктазами *Hin*d III и и *Sal*I, сайты рестрикции которых расположены по обе стороны от *cos*-сайта. Одной из ферментативных обработок выступающие одноцепочечные концы образующихся молекул лишают способности лигироваться. Для этого чаще всего используют щелочную фосфатазу, но можно также использовать нуклеазу S1 или фрагмент Кленова ДНК полимеразы *E. coli*. Затем линейные молекулы ДНК расщепляют рестриктазой *Bam*HI и с помощью гель-электрофореза выделяют фрагменты, содержащие *cos*-последовательность. Выделенные фрагменты лигируют с фрагментами эукариотической ДНК, образованными в результате частичного расщепления рестриктазами *Mbo*I или *Sau*3A, для получения простых конкатамеров, которые служат субстратом в реакции упаковки. Предварительное разрушение выступающих одноцепочечных концов, появляющихся под действием первого фермента, мешает образованию более сложных конкатамеров.

В исходной методике Иш-Горовиц и Бёрке не проводили селекцию молекул ДНК нужного размера для вставки в космидный вектор. Вместо этого они расщепляли высокомолекулярную эукариотическую ДНК рестриктазой *Mbo*I до тех пор, пока не получали популяцию молекул со средним размером 35—45 kb. Далее они дефосфорилировали ДНК щелочной фосфатазой для предотвращения соединения небольших фрагментов ДНК, благодаря чему получали большие молекулы ДНК, способные упаковываться в частицы бактериофага λ. Мы модифицировали исходную методику, включив этап выделения молекул нужного размера и исключив обработку щелочной фосфатазой. Эти модификации улучшают эффективность системы и уменьшают возможность получения космид, содержащих последовательности ДНК, не граничащие друг с другом в исходном эукариотическом геноме. Этот модифицированный вариант схематически представлен на рис. 9.6 и подробно описан ниже.

Приготовление векторной ДНК

1. В двух пробах (по 20 мкг) расщепите кольцевую замкнутую ДНК pJB8 рестриктазами: в одной рестриктазой *Hin*dIII, а в другой рестриктазой *Sal*I, используя двух- или трехкратный избыток фермента и инкубируя 1 ч при 37 °С. Остановите реакцию охлаждением до 0 °С, отберите аликвоты по 0,3 мкг


BamHI
Hind III
Amp^r
cos
Ori
Sal I
pJB8
Расщепление рестриктазой Hind III
Расщепление рестриктазой Sal I
Ori Amp^r
cos
Hind III
Sal I
BamHI
Бактериальная щелочная фосфатаза (или фосфатаза из кишечника теленка, или нуклеаза S1, или ДНК-полимераза)
Расщепление рестриктазой Bam HI и выделение большого фрагмента
Расщепление рестриктазой Bam HI и выделение малого фрагмента
Лигирование с фрагментами эукариотической ДНК длиной 35-45 kb, полученными после частичного расщепления рестриктазой Mbo I
Mbo I
Эукариотическая ДНК
Упаковка рекомбинантной ДНК in vitro в частицы бактериофага и инфицирование E. coli.

из каждой пробы и проанализируйте электрофорезом в 0,8%-ном агарозном геле вместе с нерасщепленной ДНК pJB8. Если расщепление прошло неполностью, прогрейте пробы до 37 °С, добавьте еще порцию фермента и продолжите инкубацию.

2. Если расщепление прошло полностью, проэкстрагируйте препараты смесью фенол — хлороформ и осадите ДНК этанолом. Затем осадки ДНК растворите в 200 мкл 10 мМ трис-HCl, pH 8,0, и, отобрав аликвоты по 5 мкл (0,5 мкг), заморозьте их при —20 °С.

3. К оставшейся части препаратов добавьте щелочную фосфатазу (по 200 ед., определенных по гидролизу ATP; см. с. 141) и инкубируйте при 37 °С (если используется щелочная фосфатаза из кишечника теленка) или при 68 °С (если используется щелочная бактериальная фосфатаза).

Примечание. В зависимости от того, какой космидный вектор и какая рестриктаза используются, можно применять другие методы инактивации липких концов, например обработку нуклеазой S1 или достраивание двухцепочечного конца ДНК с помощью фрагмента Кленова ДНК полимеразы *E. coli*. Дефосфорилирование укороченного 5′-конца, несущего фосфор, относительно неэффективно; поэтому выступающий 3′-конец следует разрушить нуклеазой S1 или нуклеазой из золотистой фасоли.

4. Добавьте 1 мкл 0,5 М ЭДТА, проэкстрагируйте препарат три раза фенолом, один раз хлороформом и осадите спиртом.

5. Растворите осадок ДНК в 50 мкл буфера ТЕ, pH 8,0, и поставьте три проверочные реакции лигирования, как описано на с. 279 в п. 5, для проверки эффективности фосфатазной обработки [важно иметь в виду, что в реакции в) фрагменты ДНК бактериофага λ должны образовываться при расщеплении рестриктазами *Hin*dIII и *Sal*I]. Во время проведения проверочной реакции лигрования основную часть препарата следует хранить при —20 °С.

Рис. 9.6. Клонирование в космидных векторах, обработанных двумя рестриктазами. Эта методика представляет собой модифицированный вариант методики Иш-Горовица и Бёрке (Ish-Horowicz, Burke, 1981). После расщепления ДНК pJB8 рестриктазами *Hin*dIII или *Sal*I и инактивации выступающих концов (например, щелочной фосфатазой) линейную векторную ДНК расщепляют *Bam*HI. Затем выделяют оба векторных фрагмента, содержащих *cos*-последовательность, и лигируют их с фрагментами эукариотической ДНК длиной 35—45 kb, полученными частичным расщеплением ДНК рестриктазами *Mbo*I или *Sau*3A. Важно отметить, что между двумя *cos*-последовательностями содержится полный набор плазмидных последовательностей. Для упаковки in vitro в частицы бактериофага λ в качестве субстрата используются конкатамеры. После проникновения в бактерии *E. coli* космидная ДНК рециклизуется и реплицируется в форме большой плазмиды. Плазмида содержит β-лактамазный ген, который придает клетке-хозяину устойчивость к ампициллину.

6. Если проверочная реакция лигирования дала хороший результат, к основной части препарата добавьте 10 мкл рестриктазного буфера (10×), 40 мкл H_2O и двух- или трехкратный избыток *Bam*HI.

Икубируйте 1 ч при 37 °С. Аликвоту из каждой реакции проанализируйте электрофорезом в 0,8%-ном агарозном геле.

7. Если расщепление прошло полностью, то разделите фрагменты ДНК основного препарата электрофорезом в 0,8%-ной агарозе и выделите с помощью электроэлюирования (с. 169 и далее) больший из двух фрагментов, полученных расщеплением *Bam*HI и *Hin*dIII, и меньший из двух фрагментов, полученных при расщеплении *Bam*HI и *Sal*I.

8. Выделенные фрагменты ДНК растворите в 20 мкл буфера ТЕ, pH 7,9, и оцените количество ДНК в препарате по флуоресценции бромистого этидия (с.411).

Неполное расщепление эукариотической ДНК рестриктазами *Mbo*I или *Sau*3A

Приготовьте эукариотическую ДНК для клонирования, частично расщепив ее *Mbo*I или *Sau*3A (с. 266 и далее) и выделив с помощью электрофореза фрагменты ДНК длиной 35—45 kb (с. 169 и далее).

Постановка реакции лигирования и упаковка лигированной ДНК in vitro в частицы бактериофага λ

Общая концентрация ДНК в реакции лигирования должна быть больше чем 120 мкг/мл, для того чтобы обеспечить образование смешанных конкатамеров между космидными векторами и эукариотической ДНК (см. обсуждение на с. 270 и далее). Более того, молярное отношение векторных молекул к потенциальным вставкам должно быть 1 : 1 : 1, поскольку требуемый конкатамер представляет собой вектор 1 (*Bam*HI/*Hin*dIII) — вставка — вектор 2 (*Bam*HI/*Sal*I).

1. Поставьте реакции лигирования в двух пробах. В состав первой пробы входят: 3 мкг фрагментов эукариотической ДНК длиной 35—45 kb, 0,15 мкг *Hin*dIII/*Bam*HI-фрагментов вектора pJB8, 0,15 мкг *Sal*I/*Bam*HI-фрагментов вектора pJB8, 2 мкл лигазного буфера (10×, с. 415) и до 20 мкл H_2O. В состав второй пробы входят: 0,3 мкг *Hin*dIII/*Bam*HI-фрагментов вектора pJB8, 0,3 мкг *Sal*I/*Bam*HI-фрагментов вектора pJB8, 2 мкл лигазного буфера (10×) и до 20 мкл H_2O. Из каждой пробы отберите аликвоты по 2 мкл и храните их при 4 °С. Добавьте в каждую пробу 20—200 ед. Вейса ДНК-лигазы бактериофага Т4 и инкубируйте ночь при 12 °С.

2. В конце реакции лигирования отберите еще по одной аликвоте (2 мкл) из каждой пробы и проанализируйте их вместе с аликвотами, отобранными на стадии 1, электрофорезом в 0,4%-ном агарозном геле. Если лигирование прошло успешно, то часть эукариотической ДНК должна превратиться в высокомолекулярные конкатамеры.

3. Проведите упаковку и амплификацию, как описано на с. 273—275 и в следующем разделе.

АМПЛИФИКАЦИЯ, ХРАНЕНИЕ И АНАЛИЗ КОСМИДНЫХ БИБЛИОТЕК

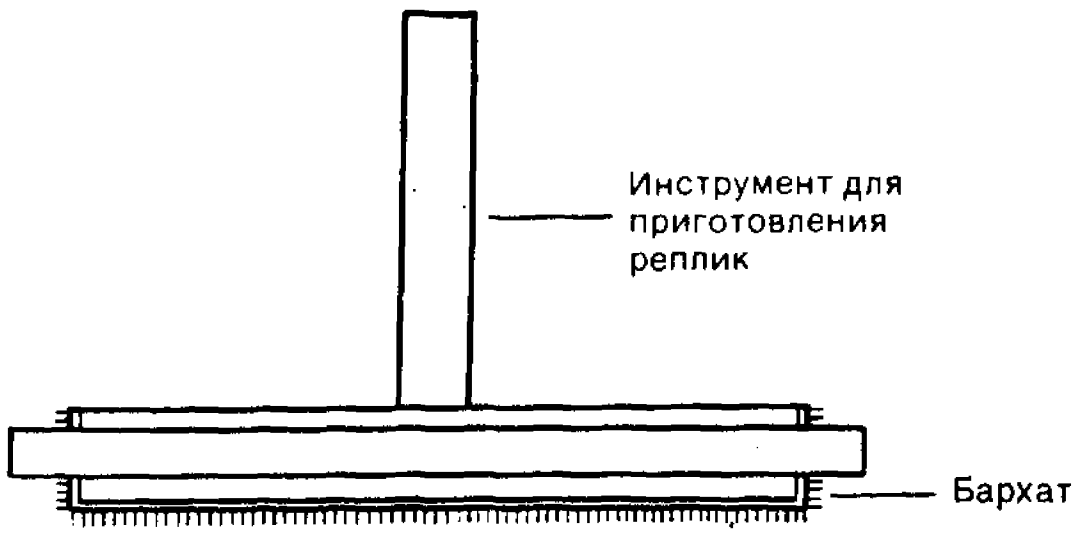
После упаковки в частицы бактериофага λ космиды стабильны в течение достаточно долгого периода времени при 4 °С. Однако постоянные космидные библиотеки могут быть получены и сохраняться неопределенно долгое время только в бактериях. Метод, описываемый ниже, предназначен для поддержания библиотеки в жизнеспособном состоянии. При его использовании сведена к минимуму вероятность изменений в популяции бактерий из-за различий в скорости роста или жизнеспособности бактерий, несущих разные космиды.

Получение фильтров-реплик

В этом методе бактериальные колонии выращивают на нитроцеллюлозных фильтрах, лежащих на агаре в чашках ($\sim 10^4$ колоний на фильтр диаметром 150 мм; 30—50 фильтров в библиотеке), и затем их замораживают прямо на фильтрах, как описано в работе (Hanahan, Meselson, 1980). После выращивания колоний с набора основных фильтров готовят фильтры-реплики для скрининга и размножения библиотеки.

1. Приготовьте чашки агара с нитроцеллюлозными фильтрами (миллипоры, не содержащие тритона, HATF). Для чашек диаметром 85 мм используют фильтры диаметром 82 мм, а для чашек диаметром 150 мм — фильтры диаметром 127 мм. Сухие фильтры пронумеруйте мягким карандашом или шариковой ручкой. Аккуратно опустите фильтры на поверхность воды до тех пор, пока они не намокнут, после чего погрузите их в воду, выньте, положите между двумя сухими фильтрами из ватмана 3ММ, оберните алюминиевой фольгой и стерилизуйте автоклавированием (30 мин при давлении 10^5 Па). Пачка стерильных фильтров может храниться при комнатной температуре в запаянном полиэтиленовом мешке. При необходимости стерильный фильтр выньте стерильным пинцетом в стерильных условиях, положите на поверхность агара в чашке, выдержанной один день после заливки, очистите, переверните и снова поместите в чашку номером вверх.

2. Смешайте аликвоту смеси для упаковки, содержащей $\sim 2 \cdot 10^4$ упакованных космид, с 200 мкл свежей ночной куль-



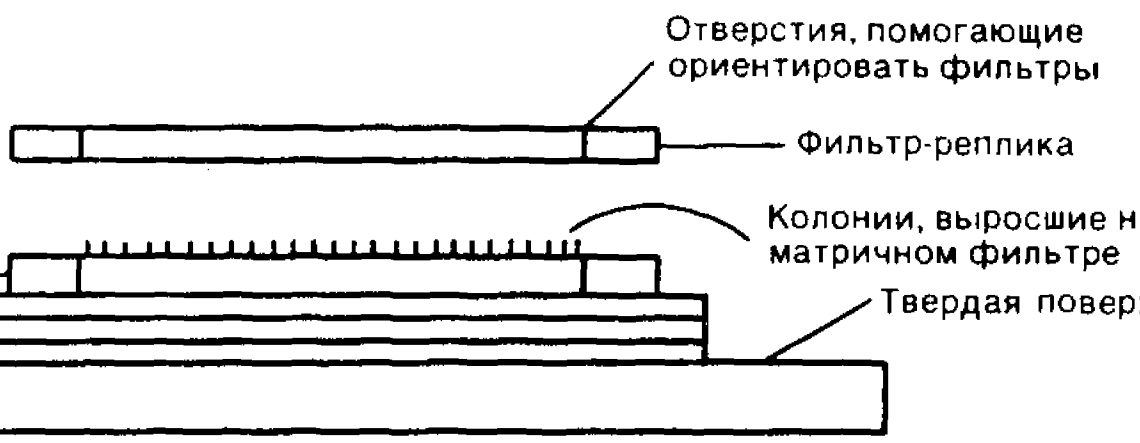


Рис. 9.7.

туры *E. coli* 1046 или DH1, выращенной в присутствии 0,2% мальтозы. Инкубируйте 20 мин при 37 °С. Если в больших количествах смеси для упаковки присоединение частиц бактериофага к бактериям ингибируется или если мала концентрация упакованных плазмид, может понадобиться предварительная очистка частиц бактериофага центрифугированием в ступенчатом градиенте плотности CsCl (с. 276).

3. К каждой инфицированной культуре добавьте 1 мл L-бульона. Продолжите инкубацию при 37 °С еще 45 мин.

4. Нанесите 500 мкл культуры инфицированных клеток в центр фильтра, лежащего в чашке Петри, и равномерно распределите жидкость по поверхности фильтра стерильной стеклянной палочкой. На краю фильтра оставьте пространство, свободное от бактерий, шириной 2—3 мм. Инкубируйте чашку при 37 °С до тех пор, пока не вырастут маленькие колонии (диаметром 0,1—0,2 мм). Обычно инкубация продолжается 8—10 ч.

5. Если необходимо, на этом этапе можно приготовить фильтры-реплики с полученных основных фильтров (см. п. 7 ниже). Если в этом нет необходимости, перенесите фильтры в чашку, содержащую среду с агаром и глицерином (25%), и инкубируйте 2 ч при 37 °С.

6. Тщательно запечатайте чашки парафильмом, положите их в полиэтиленовый мешок, заплавьте его и храните в пере-

вернутом положении при —20 °С. Фильтры-реплики можно получить после оттаивания основных чашек при комнатной температуре (также в перевернутом положении).

7. Фильтры-реплики приготовьте следующим образом.

а) Заранее приготовьте пачку стерильных фильтров из ватмана 3ММ (из расчета один фильтр из ватмана на каждый фильтр из нитроцеллюлозы плюс несколько запасных).

б) Выньте основной нитроцеллюлозный фильтр с колониями бактерий из чашки, в которой он хранился, и положите его на влажный фильтр из ватмана 3ММ вверх стороной с выросшими колониями.

в) Пронумерованный влажный стерильный нитроцеллюлозный фильтр положите на основной нитроцеллюлозный фильтр.

г) Оба фильтра крепко прижмите друг к другу, используя инструмент для приготовления реплик с помощью бархата (рис. 9.7).

д) Иглой от шприца сделайте ряд отверстий в обоих фильтрах для того, чтобы ориентировать их друг относительно друга.

е) Аккуратно разделите фильтры. Положите фильтр-реплику на свежий агар в чашку Петри и инкубируйте при 37 °С, пока не появятся колонии.

ж) Основной нитроцеллюлозный фильтр положите в чашку Петри на свежезалитый агар, содержащий 25% глицерина. Инкубируйте 1 ч при 37 °С, а затем заморозьте, как описано выше в п. 6. Фильтры-реплики можно использовать для повторного получения фильтров-реплик и для поиска нужных колоний с помощью гибридизации in situ. Их можно хранить при —20 °С.

Амплификация космидных библиотек в жидкой культуре

Выращивание космидных библиотек в жидкой культуре удобнее и проще, чем серийная репликация бактериальных колоний на нитроцеллюлозных фильтрах. Однако в этом случае существует опасность изменения состава библиотеки, поскольку в жидкой среде бактерии растут в смешанной популяции и бактерии, содержащие разные космиды, могут расти с разной скоростью.

1. Инфицируйте 200 мкл ночной культуры *E. coli* штамма 1046 приблизительно $2 \cdot 10^4$ частицами упакованных космид, как описано в п. 2 (с. 287).

2. К каждой аликвоте клеток *E. coli,* инфицированных космидами, добавьте 20 мл L-бульона, содержащего 25 мкг/мл ампициллина. Инкубируйте при 37 °С с встряхиванием до тех пор, пока культура не достигнет середины логарифмической фазы.

3. Добавьте стерильный 100%-ный глицерин до конечной концентрации 15%, тщательно перемешайте и разлейте в стерильные пробирки по 1 мл клеточной суспензии. Клетки, приготовленные точно по этой методике, при хранении при —20 °С жизнеспособны более года.

4. Для анализа библиотеки гибридизацией in situ сделайте посев аликвоты из каждой исходной пробирки либо на нитроцеллюлозный фильтр, либо на агар, как описано в гл. 10. Плазмида pJB8 содержит репликон *Col*E1, вследствие чего она обладает ослабленным контролем репликации. Тем не менее число копий космид на клетку довольно мало из-за их огромного размера. Поэтому, для того чтобы получить сильный гибридизационный сигнал, полезно проводить амплификацию с хлорамфениколом.

Глава 10

ИДЕНТИФИКАЦИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ КЛОНОВ

Для идентификации рекомбинантной плазмиды или бактериофагов λ, несущих определенные последовательности эукариотической ДНК, обычно используют три метода.

Первый и наиболее общий метод заключается в гибридизации in situ бактериальных колоний или бактериофаговых бляшек со специфическими зондами ДНК или РНК, меченными ^{32}P. Данный метод отличается быстротой и может быть использован для проверки большого числа объектов: в одном эксперименте можно провести скрининг до $5 \cdot 10^5$—$1 \cdot 10^6$ бляшек или колоний, причем от начального этапа (высев рекомбинантов) до конечного (очистка бактериофага или колоний, представляющих интерес) проходит всего 1—2 нед.

В основе второго метода обнаружения клонов кДНК, несущих последовательности, комплементарные индивидуальной мРНК, лежит гибридизационная селекция. Клонированные ДНК денатурируют, иммобилизуют на твердой матрице и гибридизуют с препаратами мРНК. Дуплекс РНК—ДНК нагревают для освобождения мРНК, которую затем добавляют в бесклеточные белоксинтезирующие системы или вводят в ооциты *Xenopus* для трансляции. Продукты трансляции идентифицируют иммунопреципитацией и(или) электрофорезом в SDS-полиакриламидном геле, а в редких случаях — с помощью биологических проб.

Хотя второй метод часто используется лишь для подтверждения результатов идентификации клонов кДНК, выделенных с помощью других критериев, недавно с его помощью из библиотеки мышиных кДНК были выделены клоны, кодирующие β_2-микроглобулин, мРНК которого составляет всего лишь 0,03% суммарной клеточной мРНК (Parnes et al., 1981). После 10-кратного обогащения мРНК последовательностями, кодирующими β_2-микроглобулин, с помощью центрифугирования в градиенте плотности сахарозы была создана библиотека кДНК, содержащая 10^4 клонов. Она была разделена на пулы, каждый из которых состоял из 14 клонов, имеющих независимое происхождение. ДНК, выделенную из четырех таких пулов, гибридизовали с РНК, которая транслировалась in vitro с об-

разованием β_2-микроглобулина, обнаруживаемого в реакции иммунопреципитации. Затем путем субклонирования из пулов выделяли индивидуальные клоны, специфичные по отношению к β-микроглобулину. Вся эта процедура очень трудоемка, и ее применение оправданно только при работе с мРНК, которую можно сильно обогатить путем физического фракционирования. Но каким бы трудным ни был этот метод и какие бы ограничения не имел, он тем не менее является наиболее распространенной процедурой при идентификации клонов кДНК, соответствующих мРНК, представленным малым числом копий. Практическое значение метода несколько возрастает благодаря тому, что очень небольшие количества плазмидных ДНК могут быть использованы в качестве гибридизационных зондов.

Третий быстрый и чувствительный метод скрининга библиотек, получаемых в бактериофагах λ путем рекомбинации у *E. coli,* разработан совсем недавно (Seed, неопубликованные данные). В соответствии с этим методом последовательность ДНК, которая должна использоваться в качестве зонда, клонируется в малой плазмиде (πVX), несущей селектируемый маркер в виде амбер-супрессора тирозиновой тРНК. Бактерии трансформируются рекомбинантной плазмидой, а затем инфицируются популяцией бактериофагов, содержащих библиотеку последовательностей эукариотической ДНК. Вектор, использованный для построения этой библиотеки, несет амбер-мутации в плечах ДНК фага λ. Если последовательности ДНК, клонированной в плазмиде, соответствуют последовательностям ДНК, включенной в геном бактериофага, то может произойти гомологичная рекомбинация. При этом образуются новые бактериофаги, которые несут копию супрессорного гена тирозиновой тРНК. Такие бактериофаги легко обнаружить по способности к росту в штаммах *E. coli,* не имеющих амбер-супрессора. В отличие от двух первых методов обязательным условием третьего является наличие сегмента ДНК, гомологичного отыскиваемому гену, уже в клонированной форме. Следовательно, он полезен только как способ вторичного скрининга.

ГИБРИДИЗАЦИЯ IN SITU БАКТЕРИАЛЬНЫХ КОЛОНИЙ ИЛИ ФАГОВЫХ БЛЯШЕК

Для гибридизации колоний (Grunstein, Hognes, 1975) необходимо перенести бактерии с агара в чашке на нитроцеллюлозный фильтр. Затем колонии лизируют, а высвободившуюся ДНК фиксируют на фильтре прогреванием. После гибридизации с зондом, меченным ^{32}P, фильтр подвергают радиоавтографическому анализу. Колонии, ДНК которых дает положительный радиоавтографический ответ, собирают для дальнейшей работы.

При гибридизации бляшек (Benton, Davis, 1977) нитроцеллюлозный фильтр накладывают на поверхность агара в чашке, содержащей бляшки бактериофага, так, чтобы произошел прямой контакт между бляшками и фильтром. Молекулы неупакованной фаговой ДНК, присутствующие в бляшках, остаются на фильтре и гибридизуются, как описано выше.

СКРИНИНГ НЕБОЛЬШОГО ЧИСЛА БАКТЕРИАЛЬНЫХ КОЛОНИЙ

Процедура, описанная ниже (Grunstein, Hognes, 1975), используется в том случае, когда нужно провести скрининг небольшого числа (100—200) колоний, растущих в нескольких чашках с агаром. Колонии переносят одновременно на агар в контрольной чашке и на нитроцеллюлозный фильтр, лежащий на поверхности агара во второй чашке. После подращивания колонии на нитроцеллюлозном фильтре лизируют щелочью. Щелочь нейтрализуют, а денатурированную плазмидную ДНК фиксируют на фильтре прогреванием. Контрольные чашки хранят при 4 °С до получения результатов скрининга.

1. Поместите нитроцеллюлозный фильтр (Millipore HAWP) в чашку с агаром, содержащим антибиотик. В данной процедуре необязательно использовать стерильные фильтры или фильтры, освобожденные от тритона; их применяют только в тех случаях, когда высевается небольшое число бактерий. Следует отметить, однако, что работать с фильтрами необходимо в перчатках, так как жирные отпечатки пальцев препятствуют смачиванию фильтра и нарушают перенос ДНК.

2. Стерильными зубочистками перенесите индивидуальные колонии бактерий, предназначенные для скрининга, на фильтр, а затем в контрольную чашку с агаром, содержащим антибиотик. Делайте небольшие штрихи (2—3 мм в длину) или переносите колонии точками в виде сетки. В обеих чашках каждую колонию нужно перенести на идентичные места. В одну чашку диаметром 85 мм можно отсеять до 100 колоний. В завершение в обе чашки переносят колонию, содержащую нерекомбинантную плазмиду (например, pBR322). Этот негативный контроль часто оказывается полезным, а иногда и необходимым, чтобы выявить фон неспецифической гибридизации.

3. Переверните чашки и инкубируйте их при 37 °С до тех пор, пока ширина штрихов не достигнет 0,5—1,0 мм. На этой стадии, когда бактерии продолжают быстро расти, фильтр можно перенести в чашку с агаром, содержащим хлорамфеникол (10 мкг/мл). Инкубируйте еще 12 ч при 37 °С. Этот этап амплификации необходим только в том случае, если ожидается, что число копий рекомбинантных плазмид будет низким [например, если в плазмиду внедрился крупный фрагмент (>10kb)

чужеродной ДНК]. Обычно последовательности клонированных ДНК можно очень легко обнаружить гибридизацией без предшествующей амплификации рекомбинантной плазмиды.

4. Пометьте нитроцеллюлозный фильтр в трех или более местах, проколов его и агар под ним иглой № 18, насаженной на шприц, содержащий водостойкие черные чернила (Higgins India Ink). Пометьте также агар в контрольной чашке примерно в тех же трех точках.

5. Заклейте контрольную чашку парафильмом и храните ее при 4 °С в перевернутом положении, пока не будут получены результаты гибридизационного эксперимента.

6. Лизируйте бактерии и иммобилизуйте высвободившуюся ДНК на нитроцеллюлозном фильтре одним из двух изложенных ниже способов. Постарайтесь избежать попадания какого-либо раствора на верхнюю поверхность фильтра и попадания пузырьков воздуха под фильтр.

Связывание высвобождающейся ДНК; способ I

1. Отрежьте 4 куска бумаги ватман 3ММ так, чтобы они точно подходили ко дну четырех стеклянных ванночек (20× ×20 см). Пропитайте один кусок бумаги 10%-ным SDS. Избыток жидкости слейте.

2. Пинцетом с тупыми концами выньте нитроцеллюлозный фильтр из чашки и поместите его (колониями вверх) на 3 мин на бумагу 3ММ, пропитанную SDS. Эта обработка не является обязательной, но она, по-видимому, усиливает гибридизационный сигнал. Возможно, это происходит благодаря ограничению диффузии плазмидной ДНК во время денатурации и нейтрализации (Fritsch, Boyer, неопубликованные данные).

3. Перенесите фильтр на второй лист бумаги 3ММ, насыщенный денатурирующим раствором (0,5 М NaOH, 1,5 М NaCl), и оставьте его там на 5 мин. При перенесении фильтра из одной ванночки в другую жидкость с его нижней стороны удаляйте, прикасаясь им к краю первой ванночки.

4. Перенесите фильтр на третий лист бумаги 3ММ, насыщенный нейтрализующим раствором (1,5 М NaCl, 0,5 М трис-HCl, pH 8,0), и оставьте его там на 5 мин.

5. Перенесите фильтр на четвертый лист бумаги 3ММ, насыщенный буфером SSPE (2×), и оставьте его там на 5 мин.

Буфер SSPE обычно готовят в виде концентрированного раствора (20×), имеющего состав: 3,6 М NaCl, 200 мМ NaH_2PO_4, pH 7,4, и 20 мМ ЭДТА, pH 7,4.

6. Положите фильтр (колониями вверх) на лист сухой бумаги 3ММ. Дайте ему подсохнуть при комнатной температуре в течение 30—60 мин.

7. Положите фильтр между двумя листами сухой бумаги 3ММ и прогрейте этот «сэндвич» в течение 2 ч при 80 °С в вакуумной печи.

8. Гибридизуйте фильтр с зондом, меченным ^{32}P, как описано на с. 298.

Связывание освобождающейся ДНК; способ II[1]

1. Нанесите 0,75 мл 0,5 М NaOH на кусок пленки Saran Wrap. Положите на жидкость фильтр, растянув пленку так, чтобы он равномерно увлажнился. Оставьте фильтр в этом положении на 2—3 мин.

2. Промокните фильтр сухим бумажным полотенцем и повторите стадию 1, используя новый кусок пленки Saran Wrap и свежий раствор 0,5 М NaOH.

3. Промокните фильтр сухим полотенцем и перенесите его на новый кусок Saran Wrap с 0,75 мл 1 М трис-HCl, pH 7,4. Через 5 мин досуха промокните фильтр полотенцем и повторите данную процедуру.

4. Промокните фильтр и поместите его на пленку Saran Wrap с 0,75 мл раствора 1,5 М NaCl и 0,5 М трис-HCl, pH 7,4. Через 5 мин промокните фильтр и перенесите его на лист бумаги 3ММ. Просушите фильтр при комнатной температуре в течение 30—60 мин.

5. Положите фильтр между двумя листами бумаги 3ММ и прогрейте 2 ч при 80 °С в вакуумной печи.

6. Гибридизуйте фильтр с зондом, меченным ^{32}P, как описано на с. 301 и далее.

Примечание. Фильтры, не использованные немедленно в реакциях гибридизации, следует неплотно завернуть в алюминиевую фольгу и хранить в вакууме при комнатной температуре.

ПЕРЕПЕЧАТЫВАНИЕ КОЛОНИЙ НА НИТРОЦЕЛЛЮЛОЗНЫЕ ФИЛЬТРЫ

Метод I

Этим методом (Hanahan, Meselson, 1980) пользуются в том случае, когда заранее знают, что потребуется скрининг большого числа колоний. Бактерии высевают на свободные от детергента нитроцеллюлозные фильтры прямо из трансформационной смеси и перепечатывают колонии с фильтра на фильтр.

1. Пронумеруйте сухие нитроцеллюлозные фильтры мягким карандашом или шариковой ручкой и простерилизуйте их, как

[1] Hanahan, неопубликованные данные.

описано на с. 287. Один фильтр должен быть контролем, а два — репликами.

2. Пользуясь стерильным пинцетом с тупыми концами, положите стерильный фильтр пронумерованной стороной вниз в чашку на суточный агар, содержащий необходимый антибиотик. Снимите фильтр, переверните его и положите в ту же чашку пронумерованной стороной вверх.

3. Ресуспендируйте бактерии в малом объеме жидкости (<0,2 мл, до 50 000 бактерий, если используется 137-мм фильтр; <0,1 мл, до 15 000 бактерий, если используется 82-мм фильтр). Распределите жидкость по поверхности фильтра стерильным шпателем, оставляя по краям фильтра 2—3-мм зону, свободную от бактерий. Оставьте чашки при комнатной температуре до тех пор, пока не впитается вся жидкость.

4. Переверните чашки и инкубируйте их при 37 °С, пока не появятся очень мелкие колонии (диаметром 0,1 мм); инкубация занимает примерно 8—10 ч.

5. Заранее приготовьте листы бумаги ватман 3ММ, простерилизованные в автоклаве (из расчета один на каждый фильтр плюс запасные).

6. Смочите пронумерованный стерильный нитроцеллюлозный фильтр (Millipore HAWP), приложив его к поверхности агара, содержащего необходимый антибиотик. Подержите его на агаре пронумерованной стороной вверх. Подберите фильтры таким образом, чтобы номера на фильтрах-репликах соответствовали номерам на матричных фильтрах (фильтрах с колониями).

7. С помощью стерильного пинцета с тупыми концами осторожно снимите матричный фильтр с первой чашки и положите его на листы ватмана 3ММ колониями вверх.

8. Осторожно наложите второй, намокший фильтр (пронумерованной стороной вниз) на матричный фильтр, стараясь не сдвигать их после того, как они придут в контакт друг с другом. Надавите на верхний фильтр болванкой для перепечатывания колоний с надетым на нее куском бархата (рис. 9.7).

9. Пометьте наложенные друг на друга фильтры, проколов их в некоторых местах иглой № 18. Аккуратно снимите второй фильтр и поместите его в свою чашку колониями вверх.

10. Сделайте вторую реплику с матричного фильтра подобным образом. Отметьте реплики по отверстиям, имеющимся в матричном фильтре. Перенесите обратно оба фильтра в чашки, из которых они были взяты. Если матричный фильтр предназначен для печатания более двух реплик, то его следует проинкубировать несколько часов, чтобы регенерировать колонии. Вообще лучше всего делать только 2 реплики с одного матричного фильтра, так как желательно избежать размазывания колоний.

11. Инкубируйте чашки (матричные и реплики) при 37 °С

до тех пор, пока диаметр колоний не достигнет 1—2 мм. В матричных чашках колонии вырастают до желаемого размера довольно быстро, за 6—8 ч.

На этой стадии, пока бактерии продолжают быстро расти, фильтры с репликами можно перенести в чашки с агаром, содержащим хлорамфеникол (10 мкг/мл), и инкубировать еще 12 ч при 37 °С. Как отмечалось на с. 293, этот этап амплификации необходим только в том случае, если ожидается небольшое число копий рекомбинантной плазмиды.

12. Заклейте матричные чашки парафильмом и храните перевернутыми при 4 °С до получения результатов реакции гибридизации.

13. Лизируйте бактерии и иммобилизуйте высвободившуюся ДНК на фильтрах с помощью одного из двух способов, описанных на с. 294—295.

Метод II

Этот метод применяется для того, чтобы одновременно перенести большое число бактериальных колоний с поверхности агара в чашках на нитроцеллюлозные фильтры. Он пригоден для работы с колониями любого размера, но наилучшие результаты зарегистрированы в том случае, когда размеры колоний составляют 0,1—0,2 мм; при этом наблюдаются более резкие сигналы гибридизации и колонии меньше размазываются. Используя данную технику, можно проверить до 10^4 колоний в 150-мм чашке.

1. Выньте чашки из термостата, когда диаметр колоний достигнет 0,1—0,2 мм, и выдержите их 1—2 ч при 4 °С в перевернутом положении.

2. Пометьте сухой нитроцеллюлозный фильтр (Millipore HAWP) мягким карандашом или шариковой ручкой и положите его пронумерованной стороной вниз на поверхность агара, так чтобы он пришел в контакт с бактериальными колониями. Когда фильтр станет совершенно мокрым, проколите его и агар под ним в трех или более асимметричных точках иглой № 18, насаженной на шприц, содержащий водостойкие черные чернила.

Предпочтительнее использовать стерильные фильтры, но можно обойтись и нестерильными, если колонии в матричных чашках больше не будут перепечатываться.

3. Снимите фильтр пинцетом с тупыми концами.

4. На этой стадии возможны следующие варианты:

а) Бактерии, приставшие к фильтру, можно сразу же лизировать и высвободившуюся ДНК иммобилизовать на фильтре с помощью одного из двух способов, описанных на с. 294—295.

б) Фильтр можно поместить колониями вверх на поверхность свежего агара, содержащего необходимый антибиотик. После инкубации, продолжающейся несколько часов, крупные колонии (2—3 мм) лизируются. Эта процедура необходима только в том случае, если колонии плохо или неравномерно отпечатались на фильтре. Однако такое случается редко.

в) Фильтр можно перенести на свежий агар, содержащий хлорамфеникол (10 мкг/мл). Как уже указывалось, эта амплификация проводится только тогда, когда ожидается небольшое число копий рекомбинантной плазмиды.

г) Фильтр можно использовать для приготовления второй реплики. Его помещают колониями вверх на поверхность свежего агара, содержащего необходимый антибиотик. Второй, сухой нитроцеллюлозный фильтр аккуратно кладут на первый и прижимают к нему. В таком положении оба фильтра инкубируют несколько часов при 37 °С. Если нужно, плазмиды амплифицируют, проводя дальнейшую инкубацию в чашке с агаром, содержащим хлорамфеникол. В таком же положении (в виде «сэндвича») фильтры находятся во время проведения последующих стадий — лизиса бактерий и нейтрализации, и только перед окончательным промыванием их разъединяют (Ish-Horowicz, Burke, 1981).

5. Инкубируйте матричную чашку 10—12 ч при 37 °С, чтобы регенерировать колонии. Заклейте чашку парафильмом и храните при 4 °С в перевернутом положении.

СКРИНИНГ БЛЯШЕК БАКТЕРИОФАГА λ ПУТЕМ ГИБРИДИЗАЦИИ[1]

Для скрининга библиотеки ДНК млекопитающих (сложность генома $3 \cdot 10^9$ пар оснований) необходимо проверить не менее 300 000 рекомбинантных бляшек. В табл. 10.1 приведены максимальные числа бляшек, которые можно проверить в чашках разных размеров.

При выращивании культуры в кристаллизаторе ДНК из фаговых бляшек переносят на один большой лист нитроцеллюлозы. Манипулировать с фильтром большого размера нелегко, поэтому иногда для выполнения операций требуется участие двух человек. Прокалывать фильтр и агарозу следует во многих точках, иначе будет трудно найти на матрице бляшки, давшие гибридизационный сигнал.

В приведенной методике даны объемы, рассчитанные на скрининг примерно 50 000 бляшек в чашке Петри диаметром 150 мм.

---

[1] Benton, Davis, 1977.

Таблица 10.1. Число бляшек в чашках разных размеров

Размер чашки	Общая площадь, см²	Объем нижнего агара, мл	Объем суспензии индикаторных бактерий, мл	Объем верхней агарозы, мл	Максимальное число бляшек на чашку
Чашка Петри диаметром 90 мм	63,9	30	0,1	2,5	15 000
Чашка Петри диаметром 150 мм	176,7	80	0,3	6,5	50 000
Лоток 200×300 мм	600	300	1,2	25	200 000

1. Смешайте аликвоты смеси для упаковки или штока бактериофага λ, содержащие до 50 000 фаговых частиц, в объеме 50 мкл или меньше с 0,3 мл высеваемых бактерий (с. 80). Инкубируйте 20 мин при 37 °С.

2. Добавьте 6,5 мл расплавленной (50 °С) верхней агарозы (0,7%) и вылейте в чашку (150-мм) с агаром. Чашки должны быть сухими, иначе верхняя агароза отойдет вместе с фильтром. Обычно для этого берут двухсуточные чашки, дополнительно подсушенные несколько часов при 37 °С со слегка открытыми крышками. Во влажную погоду чашки следует выдержать от одного до нескольких дней при 41 °С.

Примечание. Не используйте для верхнего слоя вместо агарозы агар, так как он еще легче, чем агароза, отстает от нижнего слоя.

3. Инкубируйте при 37 °С, пока диаметр бляшек не достигнет примерно 1,5 мм и бляшки не начнут сливаться друг с другом (10—12 ч роста). В чашках не должно наблюдаться сплошного лизиса.

4. Охладите чашки, выдержав их по крайней мере 1 ч при 4 °С, чтобы верхняя агароза затвердела.

5. Пронумеруйте сухие нестерильные нитроцеллюлозные фильтры (Millipore HAWP) мягким карандашом или шариковой ручкой.

6. При комнатной температуре положите круглый сухой нитроцеллюлозный фильтр на верхнюю агарозу, так чтобы он пришел в прямой контакт с бляшками. Старайтесь не захватить пузырьков воздуха. Работайте с фильтром в перчатках: жирные пятна от пальцев препятствуют смачиванию фильтра и нарушают перенос ДНК. Пометьте фильтр и агар под ним иглой № 18, насаженной на шприц, содержащий черные водостойкие чернила.

Как только фильтр приходит в контакт с верхней агарозой, он очень быстро намокает, и фаговая ДНК быстро переносится на него. Поэтому не сдвигайте фильтр после того, как произошел контакт. Самый легкий способ положить фильтр в

чашку следующий: фильтр берут за края и слегка касаются серединой фильтра поверхности агарозы в центре чашки; при этом он постепенно намокает и остальная часть фильтра сама прилипает к агарозе.

Убедитесь, что фильтр помечен асимметрично и что метки видны и на агарозе. Нужно внести достаточное количество чернил, чтобы метка была заметна при наложении второго фильтра, но слишком обильное окрашивание нежелательно.

7. Через 30—60 с снимите первый фильтр пинцетом с тупыми концами и погрузите его (с ДНК на верхней стороне) в ванночку с денатурирующим раствором (1,5 М NaCl, 0,5 М NaOH) на 30—60 с. Перенесите фильтр в нейтрализующий раствор (1,5 М NaCl, 0,5 М трис-HCl, pH 8,0) на 5 мин. Ополосните фильтр в буфере SSPE (2×; с. 294) и положите подсохнуть на ватман 3ММ.

8. В ту же чашку положите второй сухой фильтр и пометьте чернилами в тех же точках. Через 1—2 мин снимите его. Денатурируйте ДНК и нейтрализуйте, как описано в п. 7.

Обычно первый фильтр держат в чашке 30—60 с, а каждый последующий на 30 с дольше или до тех пор, пока весь фильтр не намокнет. С одной чашки можно приготовить до семи реплик (Benton, Davis, 1977).

Если при снятии фильтра с ним захватилась часть агарозы, удалите ее, осторожно прополоснув фильтр в денатурирующем растворе.

9. Когда все фильтры высохнут, положите их между листьями бумаги ватман 3ММ. Фиксируйте ДНК 2-ч прогреванием при 80 °С в вакуумной печи. Избегайте перегрева, иначе фильтры могут стать ломкими.

10. Гибридизуйте фильтры с зондом, меченным ^{32}P (с. 301).

Примечание. Фильтры, не использованные немедленно в реакциях гибридизации, следует неплотно завернуть в алюминиевую фольгу и хранить в вакууме при комнатной температуре.

СКРИНИНГ ПУТЕМ ГИБРИДИЗАЦИИ ПОСЛЕ АМПЛИФИКАЦИИ in situ БЛЯШЕК БАКТЕРИОФАГА λ

Предложена модификация метода скрининга Бентона и Дэвиса (Woo et al., 1978; Woo, 1979), в соответствии с которой перед гибридизацией проводят амплификацию бактериофагов прямо на нитроцеллюлозном фильтре. При этом фильтр обогащается фаговой ДНК, и радиоавтографический сигнал от положительных клонов становится более сильным. Таким образом, амплификация повышает уровень сигнала над шумом и позволяет сократить время экспозиции при радиоавтографии.

1. Высейте бактериофаги, предназначенные для скрининга, как описано на с. 298.

2. Приготовьте свежую ночную культуру бактерий-хозяев.
3. Приготовьте пронумерованные стерильные нитроцеллюлозные фильтры (Millipore HAWP).
4. Когда диаметр бляшек достигнет 0,2 мм, выньте чашки из термостата и охладите при 4 °С в течение 1 ч.
5. Разведите ночную культуру в 10 раз свежей средой. Окуните стерильные фильтры по очереди в разведенную суспензию клеток. Выньте их и дайте полностью высохнуть на стерильном листе бумаги ватман 3ММ в ламинаре, в потоке воздуха (обычно для этого требуется 1—2 ч).
6. Осторожно положите нитроцеллюлозный фильтр, импрегнированный бактериями, на поверхность агара в одной из чашек. Пометьте фильтр и агар под ним тушью. Поставьте чашку в холодильник на 5 мин, чтобы произошел перенос бактериофагов.
7. Снимите фильтр с поверхности агара и положите его на свежий агар вверх той стороной, которая контактировала с бляшками бактериофага.
8. Повторите стадии 5 и 6 со вторым фильтром, импрегнированным бактериями.
9. Заверните матричные чашки в парафиновую пленку (парафильм) и храните при 4 °С в перевернутом виде до получения результатов реакции гибридизации.
10. Инкубируйте чашки с репликами при 37 °С в течение 6—12 ч. За это время на фильтре вырастает газон бактерий с бляшками.
11. Пропитайте до насыщения лист бумаги ватман 3ММ раствором 0,5 М NaOH и 1,5 М NaCl в чашке Петри или в лотке. Слейте избыток жидкости. Выньте фильтр из чашки и поместите его на этот лист (бляшками вверх) на 5 мин.
12. Перенесите фильтр на лист ватмана 3ММ, пропитанный раствором 0,5 М трис-HCl, pH 8,0, и 1,5 М NaCl, а затем на лист ватмана 3ММ, пропитанный буфером SSPE (2×).
13. Высушите фильтры в потоке воздуха (1 ч) и прогрейте их (2 ч) при 80 °С в вакууме.
14. Гибридизуйте фильтры с зондом, меченным ^{32}P, как описано на с. 301.

ГИБРИДИЗАЦИЯ ДНК ИЛИ РНК, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НА ФИЛЬТРАХ С РАДИОАКТИВНЫМИ ЗОНДАМИ

Существует много методов гибридизации радиоактивных зондов в растворах с ДНК или РНК, иммобилизованными на нитроцеллюлозных фильтрах. Эти методы различаются между собой: 1) используемыми растворителями и температурами (инкубация при 68 °С в водном растворе или при 42 °С в 50%-ном формамиде); 2) объемами растворителей и продолжительно-

стями гибридизации (большие объемы для таких продолжительных периодов, как 3 сут, или минимальные объемы для 4-ч гибридизации); 3) степенью и характером перемешивания (постоянное покачивание или без него); 4) концентрацией меченого зонда и его удельной активностью; 5) использованием различных соединений (например, декстрансульфата), увеличивающих скорость реассоциации нуклеиновых кислот; 6) интенсивностью промывания после гибридизации.

Выбор метода зависит от личных наклонностей исследователя. Мы в свою очередь хотели бы обратить внимание на следующие моменты.

1. Гибридизация в 50%-ном формамиде при 42 °С имеет преимущества перед гибридизацией в водном растворе при 68 °С: она протекает в более мягких условиях, проще в исполнении, растворитель легче выпаривается. Гибридизация в 80%-ном формамиде протекает приблизительно в 3—4 раза медленнее, чем в водном растворе (Casey, Davidson, 1977). Если предположить, что существует линейная зависимость между скоростью гибридизации и концентрацией формамида, то скорость реакции в 50%-ном формамиде должна быть в 2 раза меньше скорости в водном растворе.

2. Чем меньше объем растворителя, используемого в реакции гибридизации, тем лучше. С уменьшением объема растворителя скорость реассоциации нуклеиновых кислот увеличивается, при этом объем необходимого зонда можно сократить настолько, что ДНК, связанная с фильтром, будет служить двигателем реакции. Все эти факторы важны при обнаружении клонов мРНК, представленных малым числом копий. Вместе с тем объем жидкости должен быть достаточным, чтобы фильтр был всегда покрыт пленкой раствора для гибридизации.

3. Постоянное движение раствора, содержащего меченый зонд, через фильтр необязательно даже для реакций, протекающих с участием ДНК, иммобилизованной на фильтре. Но если в гибридизации одновременно используют много фильтров, то встряхивание желательно для того, чтобы предотвратить слипание фильтров друг с другом.

4. Кинетику реакции гибридизации трудно предсказать, исходя из теоретических соображений, хотя бы потому, что точная концентрация иммобилизованной нуклеиновой кислоты и доступность ее для гибридизации неизвестны.

Для зондов, приготовленных ник-трансляцией (переносом одноцепочечного разрыва) в двухцепочечной ДНК, полезно знать следующее правило. Гибридизацию следует проводить до тех пор, пока не будет достигнута величина $(1 \div 3)\ C_0 t_{1/2}$. Для 1 мкг зонда, имеющего сложность 5 kb и содержащегося в 10 мл раствора для гибридизации, величина $C_0 t_{1/2}$ достигается

через 2 ч. Чтобы определить время полуренатурации для любого другого зонда, нужно только ввести соответствующие значения в уравнение

$$\frac{1}{X}\cdot\frac{Y}{5}\cdot\frac{Z}{10}\cdot 2 = \text{Количество часов, за которое достигается } C_0t_{1/2},$$

где X — количество добавленного зонда (мкг); Y — сложность ДНК зонда (для большинства зондов сложность пропорциональна длине зонда в единицах kb); Z — объем пробы (мл).

Если в результате гибридизации было достигнуто значение $3\cdot C_0t_{1/2}$, то количество зонда, доступного для дополнительной гибридизации на фильтре, пренебрежимо мало. Для зондов, состоящих из одноцепочечной кДНК, время гибридизации может быть уменьшено, так как в отсутствие в растворе дополнительной цепи ДНК легче протекает гибридизация с ДНК, находящейся на фильтре.

5. В присутствии декстрансульфата скорость ассоциации нуклеиновых кислот увеличивается, так как они исключаются из объема раствора, занимаемого полимером, т. е. возрастает их эффективная концентрация. В присутствии 10% декстрансульфата скорость ассоциации увеличивается в 10 раз (Wahl et al., 1979).

Хотя добавление декстрансульфата полезно при определении нуклеотидных последовательностей в условиях, когда скорость гибридизации является лимитирующим фактором, для большинства целей оно необязательно. С декстрансульфатом трудно работать из-за его высокой вязкости; кроме того, в его присутствии появляется высокий фон.

6. Условия промывания должны быть как можно более строгими. Например, следует выбирать такую комбинацию температуры и концентрации солей, чтобы температура была немного ниже (на 5 °С) величины T_m изучаемого гибрида. Часто температуру и ионную силу подбирают эмпирически в предварительных экспериментах, в которых блотты геномной ДНК, полученные по Саузерну (с. 344 и далее), гибридизуют с зондами, представляющими интерес, а затем проводят промывание в разных условиях.

ГИБРИДИЗАЦИЯ НА НИТРОЦЕЛЛЮЗНЫХ ФИЛЬТРАХ, СОДЕРЖАЩИХ РЕПЛИКИ ФАГОВЫХ БЛЯШЕК И БАКТЕРИАЛЬНЫХ КОЛОНИЙ

Представленные ниже прописи предназначены для а) двух нитроцеллюлозных фильтров размером 20×30 см или б) 30 круглых фильтров диаметром 82 мм. При проведении реакций гибридизации с использованием другого числа фильтров или фильтров другого размера необходимо сделать соответствующие пересчеты.

1. Положите прогретые фильтры на поверхность налитого в ванночку раствора SSC (6×). Когда они достаточно промокнут снизу, погрузите их в раствор на 5 мин.

2. Перенесите фильтры а) в прямоугольную плоскодонную пластмассовую коробку (22×32 см) или б) в круглый стеклянный кристаллизатор и сложите их там стопкой.

3. Добавьте а) 300 мл или б) 100 мл промывающего раствора. Инкубируйте 1—2 ч при 42 °С.

На этой и последующих стадиях круглые фильтры, находящиеся в кристаллизаторе, следует взбалтывать, чтобы предотвратить их слипание. Для этого кристаллизатор ставят на крутящуюся платформу. Большие прямоугольные фильтры могут оставаться неподвижными.

Промывающий раствор удаляет с фильтров среду, кусочки агарозы, остатки бактерий.

Промывающий раствор имеет состав: 50 мМ трис-HCl, pH 8,0, 1 М NaCl, 1 мМ ЭДТА и 0,1%-ный SDS.

4. Слейте промывающий раствор. Инкубируйте фильтры 4—6 ч при 42 °С в а) 100—150 мл или б) 60 мл раствора для предгибридизации.

Фильтры должны быть полностью покрыты этим раствором. Во время предгибридизации те участки нитроцеллюлозного фильтра, на которых произошло неспецифическое присоединение одно- или двухцепочечной ДНК, насыщаются немеченой ДНК из спермы лосося, SDS или компонентами раствора Денхардта. Если в качестве зонда используется меченная ^{32}P кДНК или РНК, то в раствор для предгибридизации и гибридизации следует добавить poly(A) в концентрации 1 мкг/мл, чтобы исключить возможность неспецифического связывания зонда с Т-богатыми последовательностями, часто встречающимися в эукариотических ДНК.

Раствор для предгибридизации содержит 50% формамида, раствор Денхардта (5×), буфер SSPE (5×), 0,1% SDS и 100 мкг/мл денатурированной ДНК из спермы лосося.

После того как растворятся все компоненты смеси для предгибридизации, отцентрифугируйте ее при 1000 g в течение 15 мин при 15 °С или профильтруйте через бумагу ватман 1ММ на бюхнеровской воронке. Простерилизуйте раствор фильтрованием через фильтр Nalgene и храните его замороженным при —20 °С в 25-мл аликвотах.

Формамид. Формамид большинства марок характеризуется достаточной чистотой, и его можно использовать без дополнительных обработок. Но если формамид пожелтел, его необходимо деионизовать, размешав на магнитной мешалке со смолой дауэкс XG8 в течение 1 ч, и дважды профильтровать через бумагу ватман 1ММ. Деионизованный формамид рекомендуется хранить небольшими порциями в азоте при —70 °С.

Раствор Денхардта (50×) содержит 5 г фикола, 5 г поливинилпирролидона, 5 г BSA (Pentax, фракции V) и до 500 мл воды.

Буфер SSPE (20×): см. с. 294.

Денатурированная ДНК из спермы лосося. Растворите ДНК (Sigma Type-III, натриевая соль) в воде в концентрации 10 мг/мл. Если ДНК плохо растворяется, размешайте раствор на магнитной мешалке в течение 2—4 ч при комнатной температуре. Чтобы уменьшить молекулярную массу ДНК, пропустите ее несколько раз через иглу № 18. Прокипятите раствор ДНК в течение 10 мин и храните при —20 °С в небольших порциях. Перед употреблением прогрейте его 5 мин в кипящей водяной бане и быстро охладите в воде со льдом.

5. Денатурируйте меченную ^{32}P ДНК зонда 5-мин прогреванием при 100 °С. Добавьте денатурированную ДНК зонда в раствор для предгибридизации, покрывающий фильтры. Инкубируйте при 42 °С до достижения (1÷3) $C_0t_{1/2}$ (с. 302). Во время гибридизации сосуды с фильтрами плотно закрывайте, чтобы предотвратить потерю жидкости путем испарения.

6. После завершения гибридизации слейте раствор для гибридизации. Промойте фильтры 3—4 раза по 5—10 мин большими объемами (300—500 мл) буфера SSC (2×) и 0,1%-ным SDS при комнатной температуре. Во время промывания по крайней мере один раз переверните фильтры. Ни на одном из этапов промывания фильтры не должны высыхать.

7. Дважды промойте фильтры по 1—1,5 ч в а) 500 мл или б) 300 мл раствора SSC (1×) и 0,1%-ного SDS при 68 °С. На этом этапе обработки фон обычно бывает достаточно низким, и фильтры можно выложить на пленку. Если же фон остается высоким или требуется более жесткая промывка, то следует выдержать фильтры в течение 60 мин в а) 500 мл или б) 300 мл раствора SSC (0,2×) и 0,1%-ном SDS при 68 °С.

8. Высушите фильтры в потоке воздуха на листе бумаги ватман 3ММ при комнатной температуре. Приклейте фильтры (пронумерованной стороной вверх) пластырем к листам бумаги ватман 3ММ и разместите в разных точках этих же листов кусочки пластыря, помеченные радиоактивными чернилами. Эти метки дадут возможность точно совместить радиоавтографы с фильтрами.

Радиоактивные чернила — это водостойкие черные чернила, к которым добавлено небольшое количество ^{32}P. Мы считаем, что удобно готовить чернила трех сортов: очень «горячие» (>2000 имп/с в мини-счетчике); «горячие» (>500 имп/с) и «холодные» (>50 имп/с). Чернила наносят на пластырь перьевой ручкой.

9. Заверните бумагу 3ММ и фильтры в пленку Saran Wrap, приложите к рентгеновской пленке (Kodak XR или подобной

ей) и экспонируйте ночь при —70 °С с усиливающим экраном (с. 412 и далее).

10. После проявления совместите пленку с фильтрами по меткам, оставленным радиоактивными чернилами. Пером отметьте на пленке положение асимметричных точек, соответствующих точкам на фильтрах. Закрепите на пленке лист кальки. Отметьте на ней положение сигналов гибридизации. Другим цветом отметьте положение асимметричных точек. Снимите кальку с пленки. Найдите и отметьте положительные колонии или бляшки, совмещая точки на кальке с точками на чашках.

Нитроцеллюлозные фильтры некоторых сортов настолько разбухают и изменяют форму во время гибридизации, что бывает трудно совместить две группы точек. Эту трудность можно частично преодолеть, если фильтры перед употреблением проавтоклавировать (с. 287).

11. Каждую положительную (т. е. радиоактивную) бляшку снять, как описано в гл. 2, и перенести в 1 мл буфера SM, содержащего каплю хлороформа. Часто бывает так, что при совмещении фильтра и чашки не удается точно определить местоположение гибридизационной бляшки. В этом случае берут кусочек агара, содержащий сразу несколько бляшек. Материал, полученный в результате элюирования фаговых частиц из этого кусочка, высевают в чашку (обычно 50 мкл из разведения 10^{-2}), так чтобы получить около 500 бляшек в чашке диаметром 850 мм. Их еще раз проверяют гибридизацией. Одиночную положительную бляшку перекалывают для приготовления штока (с. 80).

Каждую положительную колонию бактерий следует перколоть стерильной зубочисткой в 2 мл среды, содержащей необходимый антибиотик. Затем бактерии снова высевают в чашку с таким расчетом, чтобы получить около 300 колоний в чашке диаметром 85 мм. Если исходную колонию взяли из зоны, где колонии были расположены не очень густо, то следует отсеять в 2 мл среды небольшое число вторичных колоний и подрастить их в течение ночи. Выделять и анализировать плазмиды из этих бактериальных культур следует одним из методов, описанных в гл. 11. Если материал для анализа брали из зоны с густым расположением колоний, то лучше вначале провести скрининг вторичных колоний с помощью гибридизации и только после этого выделять и анализировать плазмидную ДНК.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ КЛОНОВ кДНК ГИБРИДИЗАЦИОННОЙ СЕЛЕКЦИЕЙ

Специфические мРНК можно очистить из суммарной клеточной мРНК путем гибридизации с вирусной или клонированной ДНК, предварительно денатурированной и иммобилизован-

ной на нитроцеллюлозных фильтрах (Prives et al., 1974; Paterson, 1977; Harpold et al., 1978; Ricciardi et al., 1979; Parnes et al., 1981) или на активированной целлюлозной бумаге (Goldberg et al., 1979; Seed, 1982). Нитроцеллюлозные фильтры приготовить довольно просто, и они связывают больше ДНК, чем целлюлоза, но в процессе гибридизации становятся хрупкими и постепенно высвобождают ДНК. Активированную целлюлозную бумагу труднее приготовить, но зато ее можно использовать многократно, потому что она связывает ДНК необратимо.

ГИБРИДИЗАЦИОННАЯ СЕЛЕКЦИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДНК, СВЯЗАННОЙ С НИТРОЦЕЛЛЮЛОЗОЙ

Приступая к скринингу клонов с помощью гибридизационной селекции, нужно иметь в виду следующие моменты.

1. Для обнаружения специфического белка путем трансляции in vitro с последующей иммунопреципитацией и (или) электрофорезом в SDS-полиакриламидном геле требуется как минимум 0,10 нг индивидуальной мРНК.

2. Эффективность метода гибридизационной селекции очень низка; она варьирует между 10 и 30% для разных мРНК. Таким образом, из каждого микрограмма мРНК, участвующего в реакции гибридизации, в функциональной форме можно выявить только 0,1—0,3 мкг.

3. Если средняя длина вставок в библиотеке кДНК, находящейся в плазмиде pBR322, составляет 800 пар оснований, то на комплементарные к мРНК участки рекомбинантной плазмидной ДНК, связанной с фильтром, должно приходиться 10% ее массы. Поэтому теоретически гибридизационной селекцией можно обнаружить очень малые количества рекомбинантной плазмидной ДНК, а именно 10 нг (0,1 нг·10·10). Однако опыт показывает, что испольэовать такое малое количество ДНК нельзя из-за слишком малой скорости реакции гибридизации. Для того чтобы реакция гибридизации протекала с достаточной скоростью, с фильтром должно быть связано около 1,0 мкг каждой рекомбинантной плазмиды. Это количество ДНК составляет лишь 1/10—1/20 того количества, которое может быть связано с фильтром. Следовательно, нанося на фильтр приблизительно 20 мкг смеси разных ДНК, можно одновременно анализировать до 20 плазмид.

Связывание ДНК с нитроцеллюлозой[1]

1. Растворите ДНК в воде в концентрации 500 мкг/мл.
2. Прогрейте при 100 °С в течение 10 мин.

[1] Parnes et al., 1981.

3. Быстро охладите пробу во льду. Добавьте равный объем 1 М NaOH и инкубируйте 20 мин при комнатной температуре.

4. Используя стерильный скальпель и работая в перчатках, нарежьте лист нитроцеллюлозного фильтра (Millipore HAWP) на квадраты со стороной 3 мм. Разложите их на чистую сторону парафильма.

5. Нейтрализуйте пробу ДНК 0,5 объема буфера, имеющего состав: 1 М NaCl, 0,3 М цитрат натрия, 0,5 М трис-HCl, pH 8,0, и 1М HCl. Хорошо смешайте и сразу же охладите пробу во льду.

6. Нанесите автоматической микропипеткой по 5 мкл раствора ДНК на каждый из фильтров. Дайте жидкости впитаться и нанесите еще по 5 мкл. Повторяйте процедуру до тех пор, пока на каждый фильтр не будет нанесено ~20 мкг ДНК.

7. Просушите фильтры в потоке воздуха в течение 1 ч.

8. Поместите сухие фильтры в стерильную коническую 50-мл пробирку с завинчивающейся крышкой. Дважды промойте их 50 мл буфера SSC (6×) при комнатной температуре и разложите на чистом листе парафильма.

9. Промокните фильтры бумажным полотенцем. Дайте им высохнуть в потоке воздуха в течение 1 ч.

10. Поместите сухие фильтры в стерильную стеклянную пробирку, неплотно закройте ее металлической крышкой и прогрейте 2 ч при 80 °С в вакуумной печи. Храните фильтры при комнатной температуре под вакуумом.

Гибридизация и элюирование РНК

1. Поместите фильтры, которые содержат ДНК, предназначенную для гибридизации, в небольшой силиконированный стеклянный сосудик или стерильную 1,5-мл эппендорфовскую пробирку.

2. Если в опыт взяли новые фильтры, ранее не использовавшиеся в реакции гибридизации, то добавьте 1 мл H_2O и прогрейте их в бане с кипящей водой в течение 1 мин. Затем охладите их в ледяной воде и удалите H_2O отсасыванием. Добавьте 1 мл H_2O и размешайте кратковременным встряхиванием. Удалите H_2O отсасыванием.

В результате этой процедуры элюируется ДНК, плохо связанная с фильтром.

Если фильтры уже использовали в опытах по гибридизационной селекции, то их надо последовательно промыть: а) 1 мл буфера SSC (2×) и 0,1 н. NaOH (30 мин при комнатной температуре); б) пятью 1-мл аликвотами буфера SSC (2×) (перемешайте с помощью вортекса 10 с; буфер удалите отсасыванием); в) 1 мл H_2O.

В результате этой обработки удаляется РНК, которая не элюировалась с ДНК, связанной с фильтром, во время предыдущей гибридизационной селекции.

3. Приготовьте раствор для гибридизации. Количество используемого раствора для гибридизации нужно свести к минимуму.

Раствор для гибридизации имеет состав: 100—500 мкг/мл poly(A)$^+$-мРНК, 65% (объем/объем) деионизованного формамида (с. 304), 20 мМ 1,4-пиперазиндиэтансульфоновая кислота (PIPES; pH 6,4), 0,2% SDS, 0,4 М NaCl и 100 мкг/мл тРНК из печени теленка (Boehringer-Mannheim).

4. Прогрейте раствор для гибридизации при 70 °С в течение 10 мин.

5. Добавьте его к фильтрам и инкубируйте при 50 °С в течение 3 ч.

6. После гибридизации удалите раствор для гибридизации отсасыванием и добавьте к фильтрам 1 мл промывающего раствора (10 мМ трис, pH 7,6, 0,15 М NaCl, 1 мМ ЭДТА, 0,5% SDS). Промывающий раствор должен быть заранее подогрет до 65 °С; эта же температура должна поддерживаться во время промывания.

7. Перемешайте пробу на вортексе несколько секунд и удалите промывающий буфер отсасыванием.

8. Повторите промывание (стадии 6 и 7) еще 9 раз.

9. Дважды промойте тем же буфером, но без SDS.

10. Перенесите фильтры в силиконированную полипропиленовую пробирку подходящего размера.

11. Добавьте 300 мкл H_2O и 30 мкг тРНК из печени теленка на каждые 0,5 см^2 поверхности фильтра.

12. Поместите пробирки в кипящую воду на 1 мин и быстро заморозьте пробы в бане из сухого льда и этанола.

13. Разморозьте пробы во льду и удалите фильтры. Экстрагируйте элюированную РНК равным объемом смеси фенол — хлороформ. Осадите РНК, добавив 60 мкл 2 М ацетата натрия (pH 5,2) и 1 мл этанола. Поставьте пробирку в баню из сухого льда и этанола на 20 мин. Соберите РНК 10-мин центрифугированием в центрифуге Эппендорф.

14. Дважды промойте осадок 70%-ным этанолом.

15. Высушите осадок в вакуумном эксикаторе и растворите его в 5 мкл H_2O для проведения трансляции in vitro.

16. Высушите фильтры в потоке воздуха и храните их под вакуумом при комнатной температуре до очередного использования.

Примечания. а) В экспериментальных условиях, описанных выше, было выделено много различных мРНК. Однако термостабильность гибридов ДНК — РНК может варьировать в очень широких пределах в зависимости от содержания G+C в гиб-

риде. Таким образом, приведенные выше условия не являются универсальными, и для того, чтобы отобрать какую-либо индивидуальную мРНК с максимальной эффективностью, может оказаться необходимым несколько изменить температуру гибридизации, концентрацию формамида и температуру промывания.

б) Нитроцеллюлозные фильтры можно использовать в гибридизационных экспериментах до трех раз. Однако их эффективность от раза к разу снижается, возможно, из-за потерь ДНК. Если требуется максимальная чувствительность, то следует использовать новые фильтры.

Приготовление пула плазмидной ДНК

1. Вырастите индивидуальные клоны рекомбинантной кДНК в течение ночи в 1 мл среды, содержащей соответствующий антибиотик.

2. Инокулируйте по 0,1 мл каждой из насыщенных культур в 125-мл колбы, содержащие 25 мл богатой среды (LB или среды для выращивания χ1776). Инкубируйте смешанную культуру при 37 °С до $D_{600} \simeq 0{,}7$ (примерно 2 ч роста).

3. Добавьте хлорамфеникол до конечной концентрации 170 мкг/мл. Продолжайте инкубацию еще 12—16 ч.

4. Выделите ДНК из культуры методом щелочного лизиса, описанным на с. 333.

Приготовление диазобензилоксиметильной бумаги

В отличие от нитроцеллюлозы, к которой ДНК присоединяется в результате гидрофобных взаимодействий, производные целлюлозы, содержащие диазобензилоксиметильные (DBM) группы, ковалентно связывают ДНК и РНК (Noyes, Stark, 1975; Alwine et al., 1977). Как показано на рис. 10.1, бумага ватман 50 реагирует с хлоридом *м*-нитробензилоксиметилпиридиния (NBM) с образованием *м*-аминобензилоксиметильной (ABM) бумаги. ABM-бумагу затем активируют кислотой и нитритом натрия, в результате чего образуется диазобензилоксиметильная бумага (DBM-бумага). Соль диазония может ковалентно присоединять одноцепочечную ДНК.

Предостережение. Этапы 2—5 следует проводить в хорошо вентилируемом вытяжном шкафу.

1. Нарежьте бумагу ватман 50 так, чтобы она подходила ко дну квадратной (20×20 см) пирексовой ванночки.

2. Приготовьте раствор, содержащий (из расчета на 1 $см^2$ бумаги) 2,3 мг NBM (1-*м*-нитробензилоксиметилпиридинийхлорида), 0,7 мг ацетата натрия · 3 H_2O и 28,5 мкл H_2O.

Примечание. NBM поставляется фирмой Gallard-Schleisinger Chemical Mfg. Corp. (584 Mineola Ave., Carle Place, NY 11514).

3. В вытяжном шкафу равномерно распределите раствор по бумаге, удалите пузырьки воздуха пальцами (работайте в перчатках) и осторожно втирайте раствор в бумагу до тех пор, пока она не высохнет. (По мере высыхания бумага становится белой и непрозрачной.)

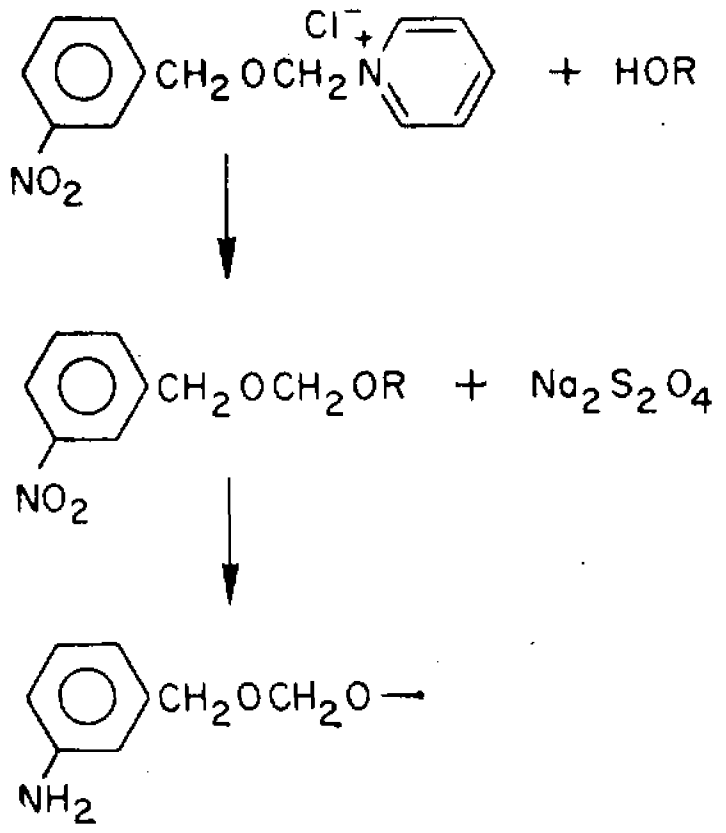


Рис. 10.1. Химический синтез *м*-аминобензилоксиметильной (ABM) бумаги. HOR — молекула целлюлозы.

4. Инкубируйте бумагу при 60 °С в течение 10 мин. Прежде чем перейти к последующим стадиям, убедитесь, что бумага стала совершенно сухой.

5. Прогрейте бумагу при 130—135 °С в течение 30—40 мин. (Остерегайтесь возгорания!)

6. Промойте бумагу несколько раз дистиллированной водой. Промывание занимает в общей сложности около 20 мин.

7. Промойте бумагу три раза ацетоном (20 мин) и высушите ее в потоке воздуха.

8. Бумага стабильна продолжительное время, если хранится завернутой в пленку Saran Wrap при 4 °С.

Активация ABM-бумаги

1. Поместите лист бумаги в стеклянную ванночку (при 60 °С в вытяжном шкафу). Добавьте по 0,4 мл 20%-ного водного раствора дитионита натрия на каждый квадратный сантиметр бумаги. Инкубируйте 30 мин.

2. Промойте бумагу большим объемом (500—1000 мл) дистиллированной воды.

3. Промойте бумагу один раз 500 мл 30%-ной (объем/объем) уксусной кислоты.

4. Промойте бумагу несколько раз дистиллированной водой со сменой через каждые 5 мин.

5. Перенесите бумагу в охлажденный на льду раствор 1,2 М HCl (0,3 мл на 1 $см^2$ бумаги).

6. На каждые 100 мл раствора HCl добавьте, размешивая, 2,7 мл раствора $NaNO_2$ (10 мг на 1 мл H_2O), приготовленного перед самым использованием. Оставьте стеклянную ванночку во льду на 30 мин.

7. Теперь бумага активирована. Ее можно завернуть в пленку Saran Wrap и хранить при —70 °С несколько месяцев без заметной потери активности.

Нанесение ДНК на DBM-бумагу

1. Способность DBM-бумаги связывать одноцепочечную ДНК составляет 15—25 мкг/$см^2$ (т. е. значительно ниже, чем у нитроцеллюлозы).

2. Растворите 10 мкг ДНК в 100 мкл буфера ТЕ, добавьте 50 мкл 1 М NaOH и прокипятите 5 мин.

3. Добавьте (в указанном порядке) 30 мкл 2 М ацетата натрия, pH 5,2, 40 мкл 1 М HCl и 500 мкл этанола. Выдержите при —70 °С в течение 15 мин.

4. Соберите ДНК 5-мин центрифугированием в центрифуге Эппендорф. Растворите ДНК в 25 мкл H_2O и прогрейте раствор в течение 1 мин при 100 °С. Быстро заморозьте его, опустив в баню с сухим льдом и этанолом.

5. Стерильным лезвием или резцом нарежьте DBM-бумагу, обработанную HCl, на квадраты со стороной 5 мм или маленькие круги.

6. Промойте нарезанную DBM-бумагу дважды охлажденной льдом дистиллированной водой и более двух раз 20 мМ ацетатом натрия, pH 4,0.

7. Удалите избыток жидкости с DBM-бумаги с помощью кусочка ватмана 3ММ.

8. Нанесите 25 мкл ДНК (10 мкг) на квадрат DBM-бумаги. Подсушите бумагу в потоке воздуха и выдержите 12—16 ч в закрытой эппендорфовской пробирке.

9. Промойте бумагу 3 раза водой, 4 раза 0,4 н. NaOH и 5 раз снова водой.

10. Намочите бумагу буфером для предгибридизации, подогретым до 42 °С.

Буфер для предгибридизации имеет состав: 50% деионизованного формамида (с. 304), 0,1% SDS, 0,6 М NaCl, 80 мМ трис-HCl, pH 7,8, и 4 мМ ЭДТА.

11. Инкубируйте бумагу при 65 °С в течение 1 ч в буфере для элюирования.

Буфер для элюирования имеет состав: 99% (объем/объем) деионизованного формамида (с. 304) и 10 мМ трис-HCl, pH 7,8.

12. Промойте бумагу в буфере для предгибридизации (200 мкл/фильтр).

Гибридизация и элюирование

1. Приготовьте раствор для гибридизации, имеющий состав: 50—100 мкг на 1 мл poly(A)$^+$-РНК, 50% (объем/объем) деионизованного формамида (с. 0327), 0,1% SDS, 0,6 М NaCl, 80 мМ трис-HCl, pH 7,8, и 4 мМ ЭДТА.

Количество раствора для гибридизации следует свести к минимуму. Как правило, используют 1,5-мл эппендорфовские пробирки или силиконированные стеклянные флаконы.

2. Прогрейте раствор для гибридизации при 70 °С в течение 10 мин.

3. Внесите фильтры в раствор для гибридизации и инкубируйте при 37 °С в течение 18 ч.

4. Когда реакция гибридизации завершится, перенесите кусочки DBM-бумаги в новую пробирку.

5. Промойте бумагу, встряхивая ее при 37 °С с 1 мл буфера для промывания (10 раз). После каждого промывания удаляйте буфер, отсасывая его стерильной пастеровской пипеткой.

Буфер для промывания содержит 50% (объем/объем) деионизованного формамида, буфер SET (0,2×) и 0,1% SDS.

Буфер SET (20×) имеет состав: 3 М NaCl, 0,4 М трис-HCl, pH 7,8, и 20 мМ ЭДТА.

6. Элюируйте РНК из гибрида ДНК—РНК, инкубируя фильтр в 200 мкл буфера для элюирования при 65 °С в течение 5 мин.

Буфер для элюирования имеет состав: 99% (объем/объем) деионизованного формамида и 10 мМ трис-HCl, pH 7,8.

7. Перелейте элюат в новую пробирку. Добавьте 200 мкл H_2O, 40 мкл 2 М ацетата натрия, pH 5,2, 15 мкг тРНК из печени теленка (Boehringer, Mannheim) и 1100 мкл этанола. Оставьте пробирку в смеси сухой лед — этанол на 20 мин.

8. Соберите РНК центрифугированием (10 мин в центрифуге Эппендорф). Промойте осадок дважды 70%-ным этанолом.

9. Растворите РНК в 5 мкл H_2O и добавьте ее в смесь для трансляции в бесклеточной системе (с. 315).

10. Промойте фильтры дважды водой. Высушите их в потоке воздуха и храните в вакууме при комнатной температуре. Фильтры можно снова использовать в гибридизационной селекции, если промыть их следующим образом: а) 0,1 н. NaOH, 20 мин при комнатной температуре; б) водой 6 (раз); в) буфером для гибридизации. Если фильтры регенерированы подоб-

ным образом, то их можно использовать в нескольких циклах гибридизационной селекции без заметного снижения эффективности этой процедуры.

Приготовление 2-аминофенилтиоэфирной бумаги

Недавно разработан способ получения одного из типов ариламиновой бумаги для диазотирования и связывания нуклеиновых кислот (Seed, 1982). Бутандиолдиглицидиловый эфир (BDG; Aldrich, 12, 419-2) реагирует с бумагой ватман 50 с образованием оксиранцеллюлозы, которая затем в щелочном растворе присоединяет *о*-аминотиофенол, давая *о*-аминофенилтиоэфирную (АРТ) целлюлозу (рис. 10.2). АРТ-бумага готовится проще, и она более стабильна, чем АВМ-бумага; ее диазотированная форма (DPT-бумага) также более стабильна, чем диазотированная форма АВМ-бумаги (DBM-бумага).

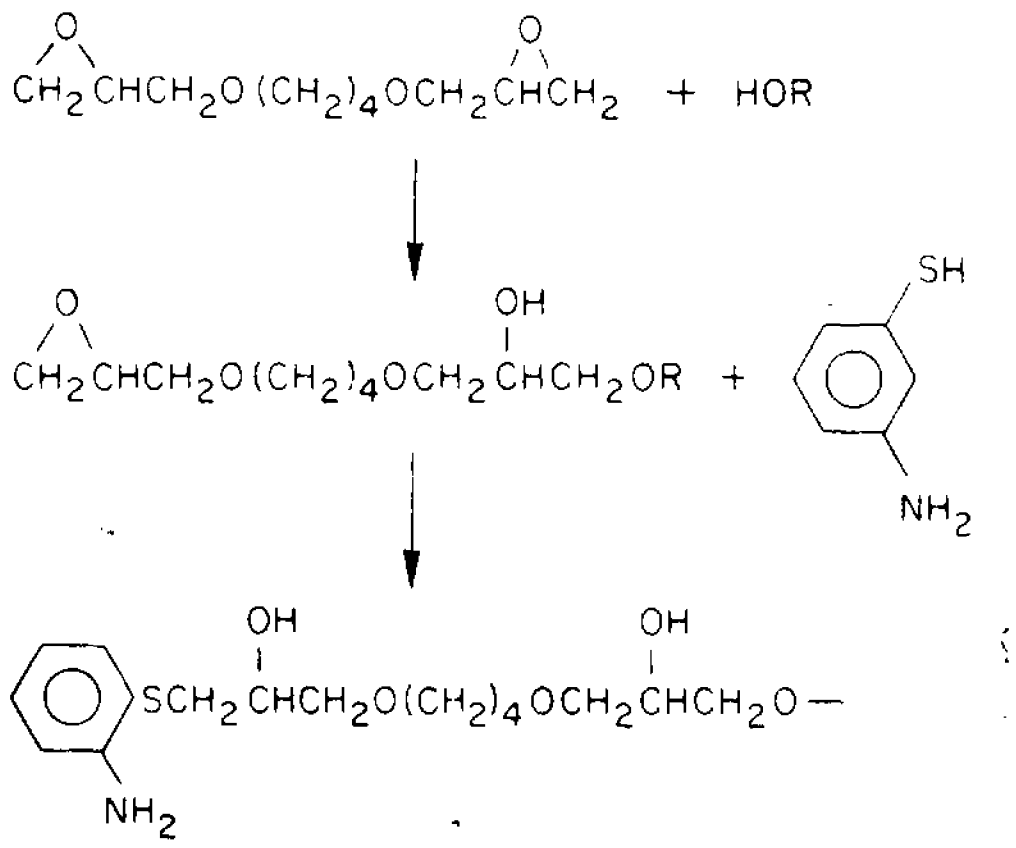


Рис. 10.2. Химический синтез *о*-аминофенилтиоэфирной (АРТ) бумаги. HOR — молекула целлюлозы.

Предостережение. Все последующие операции (вплоть до конечного промывания водой) нужно проводить в хорошо вентилируемом вытяжном шкафу. Необходимо также защищать кожу. Для этой цели лучше всего подходят неопреновые перчатки. 1,4-Бутандиолдиглицидиловый эфир (BDG) поставляется фирмой Aldrich (12, 419-2). Возможно, он обладает канцерогенной активностью, поэтому с ним следует обращаться осторожно. 2-Аминотиофенол (фирма Aldrich, 12, 313-7) также токсичен.

1. Нарежьте фильтровальную бумагу ватман 50 на листы желаемого размера и положите их (примерно 20 г) в полиэтиленовый пакет.

2. Добавьте в пакет 70 мл 0,5 М NaOH, затем 30 мл BDG. Герметично запечатайте пакет, оставив в нем 100—200 мл воздуха, чтобы можно было хорошо перемешивать содержимое. Встряхивайте пакет на ротационной качалке (ось вращения в плоскости пакета) 12—16 ч при 30 об/мин.

3. Избыток реактива слейте в контейнер для отходов и оставьте в нем для инактивации по крайней мере на 2 сут.

4. Выньте листы бумаги из пакета и опустите поочередно в 500 мл раствора, приготовленного путем растворения 2-аминотиофенола (до 2% по объему) в этаноле и последующего добавления равного объема 0,5 М NaOH. Оставьте бумагу в этом растворе на 2 ч.

5. Промойте бумагу, погружая ее в этанол и взбалтывая последний. Затем промойте ее 0,1 М HCl. Повторите цикл 3 раза. Продолжительность каждого цикла должна быть около 15 мин.

6. Промойте бумагу водой в течение 1—2 ч.

7. Промойте бумагу этанолом.

8. Высушите бумагу в потоке воздуха. Высушенные кусочки бумаги следует хранить при —20 °С. Методика нанесения ДНК на АРТ-бумагу описана на с. 312.

Примечания. Другая эффективная и простая процедура обработки бумаги 2-аминотиофенолом заключается в следующем.

а) Выполните стадии 1 и 2.

б) Добавьте 10 мл 2-аминотиофенола к 40 мл этанола.

в) Добавьте смесь б) к содержимому полиэтиленового пакета и переходите к стадии 3.

г) Запечатайте пакет и поместите его на ротационную качалку на 10 ч, после чего переходите к стадии 6.

ТРАНСЛЯЦИЯ РНК, ОТОБРАННОЙ ГИБРИДИЗАЦИЕЙ, В ЛИЗАТАХ РЕТИКУЛОЦИТОВ

РНК, отобранную в реакции гибридизации и снятую с фильтров, можно транслировать в бесклеточных экстрактах или в ооцитах лягушки, а образующийся белок можно обнаружить иммунопреципитацией или определить по биологической активности. Наборы компонентов для трансляции in vitro, приготовленных из лизатов ретикулоцитов или экстрактов зародышей пшеницы, поставляются фирмами New England Nuclear (NEN) и Bethesda Research Labs (BRL). Однако мы обнаружили, что эффективность имеющихся в продаже наборов для трансляции значительно ниже эффективности наборов, приготовленных в лаборатории. Поэтому мы включили в данное руководство краткое описание методики приготовления лизата ретикулоцитов кролика, предоставленной Робертсом, и методики инъецирования ооцитов лягушки, предоставленной Мелтоном.

Приготовление лизата ретикулоцитов кролика

1. Сделайте подкожную инъекцию ацетилфенилгидразина (1,2%-ный раствор, нейтрализованный до pH 7,5 с помощью 1 M HEPES, pH 7,0) шести кроликам (вес каждого 2—3 кг) по следующей схеме: 1,0 мл в 1-й день, 1,6 мл во 2-й день, 1,2 мл в 3-й день, 1,6 мл в 4-й день, 2,0 мл в 5-й день.

2. На 7-й и 8-й день возьмите у кроликов кровь следующим образом. Протрите ухо ватой, пропитанной ксилолом, и новым лезвием сделайте надрез в задней ушной вене в середине уха. Возьмите от каждого кролика 50—60 мл крови, собирая ее во флакон с 50 мл охлажденного нормального физиологического раствора, содержащего 0,001% гепарина.

3. Отфильтруйте кровь через марлю, а затем отцентрифугируйте при 2000 g в течение 5 мин. Промойте осажденные клетки 3 раза нормальным физиологическим раствором. Последнее центрифугирование проведите при 5000 g.

4. Измерьте объем осажденных клеток и лизируйте их при 0 °C, добавив равный объем холодной воды. Через 1 мин отцентрифугируйте лизат при 20 000 g в течение 20 мин.

5. Разделите надосадочную жидкость на 0,5-мл аликвоты и заморозьте их при —70 °C. Лизат стабилен при этой температуре в течение нескольких месяцев.

Обработка лизата ретикулоцитов микрококковой нуклеазой

Цель обработки заключается в том, чтобы разрушить эндогенную мРНК. В этом случае трансляционная активность лизата ретикулоцитов будет полностью зависеть от экзогенных мРНК. Микрококковая нуклеаза активна только в присутствии ионов кальция и перестает функционировать при добавлении ЭГТА. Последующая трансляция нормально протекает в присутствии как ЭГТА, так и инактивированной микрококковой нуклеазы.

1. Приготовьте следующие основные растворы:

а) 50 мМ $CaCl_2$;

б) 100 мМ ЭГТА, pH 7,0;

в) микрококковая нуклеаза 150 000 ед./мл; хранится в 50 мМ глицине, pH 9,2, и 5 мМ $CaCl_2$;

г) креатинфосфокиназа, тип I; 40 ед./мл в 50%-ном глицерине;

д) геминовый раствор; 4 мг/мл в этиленгликоле.

Геминовый раствор приготовьте следующим образом:

а) Растворите 20 мг гемина в 400 мкл 0,2 М KOH. Добавляйте гемин небольшими порциями и встряхивайте после добавления каждой порции.

б) Добавьте 600 мкл H_2O и 100 мкл 1 М трис-HCl, pH 7,8. Доведите pH до 7,8, добавляя 0,1 М HCl, если потребуется.

в) Добавьте 4 мл этиленгликоля и размешайте смесь встряхиванием.

г) Отцентрифугируйте при 5000 g в течение 5 мин и нерастворимый осадок отбросьте.

2. Добавьте к 100 частям лизата ретикулоцитов 1 часть геминового раствора, 2 части раствора $CaCl_2$ и перемешайте.

3. Добавьте 0,05 части микрококковой нуклеазы (150 000 ед./мл) и перемешайте. Инкубируйте 15 мин при 20 °С.

4. Добавьте 2 части 100 мМ ЭГТА и перемешайте.

5. Добавьте 0,4 части креатинфосфокиназы (40 ед./мл) и перемешайте. Разделите обработанный лизат на порции по 250—500 мкл и храните их при —70 °С.

Примечание. Гемин включают в состав лизата ретикулоцитов потому, что он сильно подавляет действие ингибитора фактора инициации F1f2a. В отсутствие гемина синтез белка в лизате ретикулоцитов прекращается вскоре после начала инкубации.

Трансляция в лизате ретикулоцитов

1. Составьте следующую смесь для трансляции (мкл):

100 мМ спермидин	200
800 мМ креатинфосфат	400
5 мМ смесь аминокислот (без метионина)	200
1 М дитиотрейтол	80
500 мМ HEPES pH 7,4	1600
H_2O	710
	3190

Разлейте эту смесь по 50—100 мкл и храните аликвоты при —70 °С.

В состав 5 мМ смеси аминокислот (без метионина) входят все аминокислоты, за исключением метионина, в концентрации 5 мМ.

2. Стандартная реакционная смесь содержит 2 мкл смеси для трансляции, 2 мкл 1 М KCl, 0,5 мкл 32,5 мМ ацетата магния, 10 мкл ^{35}S-метионина (100 мкКи), 10 мкл лизата ретикулоцитов, обработанного микрококковой нуклеазой, 0,5 мкл H_2O и 1 мкл РНК.

Инкубируйте 1 ч при 37 °С.

Примечания. а) Оптимальная концентрация KCl в реакциях трансляции оказывается разной для разных препаратов лизата ретикулоцитов и разных мРНК. Количество KCl, необходимое для достижения максимальной эффективности трансляции, следует определять для каждой новой партии лизата ретикуло-

цитов, используя стандартный препарат мРНК. Необходимо также найти наиболее эффективную концентрацию KCl для каждой отдельной мРНК.

б) В реакционную смесь можно добавлять до 10 мкг суммарной цитоплазматической РНК или 0,2 мкг poly(A)$^+$-РНК, прежде чем будет достигнуто насыщение. Обычно при использовании poly(A)$^+$-РНК получают более четкие результаты, чем при использовании суммарной цитоплазматической РНК.

в) При использовании насыщающих количеств мРНК включение ^{35}S-метионина в кислотонерастворимый материал стимулируется примерно в 10—25 раз. В оптимальных условиях на 25 мкл смеси для трансляции должно включиться $(3 \div 5) \cdot 10^6$ имп/мин ^{35}S-метионина.

г) Если раствор ^{35}S-метионина сконцентрировать выпариванием, то в реакционную смесь можно вносить большее количество радиоактивности.

3. Продукты реакции трансляции in vitro можно анализировать иммунопреципитацией и(или) электрофорезом в SDS-полиакриламидном геле. Хорошее описание иммунопреципитационных методов можно найти в статье Кесслера (Kessler, 1981). Имеется также детальное описание стандартных методов электрофореза в SDS-полиакриламидных гелях (Laemmli, 1970; Maizel, 1971).

В табл. 10.2 и в приведенной ниже прописи указаны количества ингредиентов, требующиеся для приготовления полиакриламидных гелей разной пористости.

Для приготовления *полиакриламидного геля* смешайте 1,7 мл 30%-ного акриламида, 0,7 мл 2%-ного бисакриламида, 1,25 мл 1 М трис-HCl, pH 6,9, 50 мкл 20%-ного SDS, 6,35 мл H_2O, 25 мкл TEMED и 50 мкл 10%-ного персульфата аммония.

Примечания. а) Персульфат аммония нестабилен в водном растворе. Через каждые несколько дней следует делать новый раствор и хранить его при 0 °С.

б) Акриламид токсичен и может проникать через кожу. Работая с ним (с сухим веществом или раствором), надевайте перчатки.

в) Высокоочищенный акриламид дорог. Более дешевый реактив нетрудно очистить следующим образом.

1в) Растворите акриламид в H_2O (30%, вес/объем).

2в) Добавьте 20 г смолы МВ-1 (Mallinckrodt) на 1 л раствора. Встряхивайте при комнатной температуре в течение ночи.

3в) Профильтруйте раствор через фильтровальную бумагу ватман 1ММ. Храните в плотно закрытых флаконах.

Таблица 10.2. SDS-полиакриламидные разделяющие гели

Ингредиенты	Отношение содержания акриламида (%) к содержанию бисакриламида (мг/мл)						
	5 : 2,6	7,5 : 1,95	10 : 1,3	12,5 : 1,0	15,0 : 0,86	17,5 : 0,73	20 : 0,65
30%-ный акриламид (мл)	5,0	7,5	10,0	12,5	15,0	17,5	20,0
2%-ный бисакриламид (мл)	3,9	2,9	2,0	1,5	1,3	1,1	1,0
1 М трис-HCl, pH 8,7 (мл)	11,2	11,2	11,2	11,2	11,2	11,2	11,2
20%-ный SDS (мл)	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
H_2O (мл)	9,45	8,25	6,65	4,65	2,35	—	—
TEMED (мкл)	25	25	25	25	25	25	25
10%-ный персульфат аммония (мкл)	100	100	100	100	100	100	100

ТРАНСЛЯЦИЯ мРНК, ИНЪЕЦИРОВАННОЙ В ООЦИТЫ ЛЯГУШКИ

Во время оогенеза у лягушки *Xenopus* в незрелых яйцах — ооцитах в больших количествах накапливаются ферменты, органеллы и предшественники. Так, например, ооцит содержит на 200 000 рибосом и на 10 000 молекул тРНК больше, чем соматическая клетка (см. обзор Laskey, 1980). Эти запасы в норме используются во время ранних периодов развития лягушки и идут на формирование головастика. Они биологически активны и образуют чувствительную тест-систему для трансляции экзогенной мРНК.

Впервые возможность использования ооцитов для трансляции продемонстрировали Гердон и его сотрудники (Gurdon et al., 1971). В их экспериментах ооциты синтезировали гемоглобин, после того как в них была инъецирована 9S-РНК из ретикулоцитов и гемин. Как показали последующие исследования, синтез соответствующего белка в живых ооцитах направляется любой из инъецированных эукариотических мРНК, но не прокариотическими мРНК (см. обзор Lane, Knowland, 1975).

Ферменты ооцитов не только участвуют в трансляции инъецированных мРНК с образованием белков, но и правильно модифицируют последние. Модификации заключаются в расщеплении белков-предшественников, фосфорилировании и гликозилировании (Berridge, Lane, 1976; Colman et al., 1981; Mathews et al, 1981). А в случаях, когда мРНК кодирует секреторные белки (например, интерферон), вновь синтезированные белки секретируются из ооцитов (Colman, Morser, 1979; Colman et al., 1981).

Таким образом, по сравнению с большинством систем трансляции in vitro ооциты представляют собой наиболее полную систему для исследования всех реакций, связанных с синтезом и секрецией белка.

Молекулы мРНК, инъецированные в ооциты, стабильны и эффективно транслируются. Например, время полужизни глобиновой мРНК, инъецированной в ооциты, составляет более двух недель (Gurdon et al., 1973). Следовательно, ооциты можно культивировать много суток, и в течение всего этого времени они продолжают синтезировать белки на инъецированных мРНК. Интересно, что ооциты транслируют инъецированные мРНК гораздо эффективнее, чем бесклеточные системы. В частности, глобиновая мРНК кролика транслируется в ооцитах в 100—1000 раз эффективнее, чем в лизате ретикулоцитов. Скорость трансляции при этом сравнима со скоростью трансляции, протекающей в нормальных неповрежденных ретикулоцитах: ооциты обладают $^1/_4$ эффективности неповрежденных ретикулоцитов (Gurdon et al., 1971).

Методы

Животные

Взрослых самцов и самок *Xenopus laevis* поставляет ряд фирм (в том числе K. Evans, 716 Northside, Ann Arbor, MI 48105). Лягушек можно держать в любом сосуде с водой без аэрации при 18—22 °С. Для поддержания здоровой колонии достаточно дважды в неделю кормить их кусочками печени и сердца быка.

Приготовление ооцитов

Ооциты получают из здоровых взрослых самок *Xenopus*. Лягушку анестезируют, помещая на 10—30 мин в раствор этил-*м*-аминобензоата в воде (1 : 1000, вес/объем). Небольшой разрез (1 см) снизу на брюшной стороне открывает доступ к яичнику лягушки. После удаления сегмента яичника разрез можно зашить, после чего лягушка быстро выздоравливает в воде. Как правило, от одной самки получают ооциты для 3—5 отдельных экспериментов.

Яичник рекомендуется немедленно поместить в модифицированный физиологический раствор Барта (MBS-H) и разделить на небольшие группы по 5—20 крупных ооцитов с помощью миниатюрного пинцета.

Ооциты хранят при 19 °С в MBS-H несколько дней, на протяжении которых они остаются пригодными для экспериментов по трансляции.

Раствор Барта (MBS-H) имеет состав: 88 мМ NaCl, 1 мМ KCl, 0,33 мМ Ca $(NO_3)_2$, 0,41 мМ $CaCl_2$, 0,82 мМ $MgSO_4$, 2,4 мМ $NaHCO_3$ и 10 мМ HEPES, pH 7,4.

Часто для подавления роста бактерий в MBS-H добавляют бензилпенициллин (10 мг/л) и стрептомицинсульфат (10 мг/л).

Приготовление РНК

РНК выделяют из клеток любым стандартным методом. Для увеличения концентрации мРНК в инъецируемом растворе полезно, но не обязательно выделять poly(A)$^+$-РНК. Обычно РНК выделяют экстракцией фенол — хлороформом (1 : 1), а затем осаждают этанолом. РНК растворяют в дистиллированной воде, MBS-H или растворе для инъекции с небольшим содержанием солей. Не следует употреблять детергенты, так как они очень токсичны для ооцитов.

Инъекция РНК

РНК инъецируют в крупные, зрелые ооциты (стадии V и VI по Dumont, 1972) с помощью тонкой микропипетки, микро-

шприца и бинокулярного микроскопа. Конструкция удобной пипетки для инъекции описана Гердоном (Gurdon, 1974). Ооциты помещают на предметное стекло, подсушивают бумажной салфеткой и кладут стекло на коробку со льдом, которую ставят на предметный столик микроскопа. До введения пипетки и в процессе введения ооциты придерживают миниатюрным пинцетом с тупыми концами.

Когда пипетка проникнет в ооцит, в него с помощью микрошприца вводят 30—50 нл раствора РНК (до 500 нг). Инъецируемый материал дозируют, маркируя пипетку чернилами и следя за движением мениска. Сразу после инъекции ооциты переносят в среду MBS-H и инкубируют при 19 °С чаще всего в течение 24—48 ч.

Включение радиоактивной метки

Из среды MBS-H ооциты поглощают экзогенные изотопы. Для включения метки в белки можно использовать радиоактивные аминокислоты, такие, как ^{3}H-гистидин, ^{3}H-лейцин, ^{3}H-пролин, ^{3}H-валин или ^{35}S-метионин. Радиоактивные изотопы обычно высушивают в вакууме и растворяют в среде MBS-H до 0,5—0,2 мкКи/мл. До начала включения метки необходимо удалить поврежденные ооциты. Ооциты с инъецированными мРНК удобнее всего метить в ячейках микротитровальных чашек, содержащих 2—10 мкл радиоактивного предшественника на ооцит.

Экстракция меченых белков

Белки можно экстрагировать из ооцитов, в которые инъецирована мРНК, гомогенизируя 5 ооцитов в 200 мкл 75 мМ трис-HCl, pH 6,8, 1%-ного β-меркаптоэтанола, 1%-ного SDS и 1 мМ фенилметилсульфонилфторида. После 5-мин центрифугирования при комнатной температуре в микроцентрифуге при 10 000 g образуются две фазы: верхняя, содержащая меченые белки, и нижняя, содержащая желток и пигментные гранулы. Надосадочную жидкость разводят буфером и анализируют с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (Laemmli, 1970).

Белки, секретируемые инъецированными ооцитами, можно выделить из инкубационной среды, осадив их 0,2 объема холодной ТХУ (50%, вес/объем) в присутствии белка-носителя (BSA, 2 мкг). Осадки собирают центрифугированием, промывают холодным ацетоном и сушат, а затем растворяют в буфере (Colman, Morser, 1979) для гель-электрофореза. Описаны методы субклеточного фракционирования ооцитов (на связанную с мембранами и цитозольную фракции) (Zehavi-Willner, Lane, 1977: Colman et al., 1981).

СКРИНИНГ БИБЛИОТЕКИ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК В БАКТЕРИОФАГЕ λ МЕТОДОМ РЕКОМБИНАЦИИ У *Escherichia coli*

ПРИНЦИП РЕКОМБИНАЦИОННОЙ СЕЛЕКЦИИ

В соответствии с данным методом (Seed, неопубликованные результаты) последовательности зонда вставляют в очень мелкий плазмидный вектор πVX и вводят в клетки бактерий, способные к рекомбинации. Затем эти клетки заражают фагами, несущими геномные библиотеки. Те бактериофаги, которые несут последовательности, гомологичные последовательностям зонда, приобретают в результате реципрокной рекомбинации интегрированную копию плазмиды. Бактериофаги с интегрированными плазмидами можно выделить из пула бактериофагов в соответствующих селективных условиях.

Нуклеотидная последовательность ДНК πVX и ее рестрикционная карта представлены на рис. 10.3 и 10.4. Плазмида πVX имеет три функциональных сегмента: сайт начала репликации (~0,6 kb), взятый из репликона pMB1; амбер-супрессорный ген тирозиновой тРНК (синтетический ген *supF*); полилинкер, или короткую последовательность, несущую множество сайтов рестрикции, используемых для вставки клонированных фрагментов. Плазмида πVX поддерживается в *E. coli* селекцией на амбер-супрессорную функцию в клетках, содержащих также плазмиду p3 (60 kb; производная от RP1), которая несет амбер-мутацию в генах ампициллиновой и тетрациклиновой устойчивости (рис. 10.5). В результате трансформации плазмидой πVX клеток, уже имеющих плазмиду p3, они приобретают устойчивость и к ампициллину, и к тетрациклину. В отсутствие πVX плазмида p3 поддерживается в популяции бактерий селекцией на устойчивость к канамицину.

После того как ДНК зонда проклонирована в πVX, инфицируют бактерии, содержащие рекомбинантную микроплазмиду, библиотекой рекомбинантных бактериофагов λ, сконструированной на основе вектора, несущего по крайней мере две амбер-мутации в важных генах. Если последовательность эукариотической ДНК, клонированной в πVX, гомологична последовательности, встроенной в бактериофаг, то в результате реципрокной рекомбинации вся микроплазмида встроится в бактериофаг. Этот бактериофаг в отличие от исходных может размножаться в клетках Su^- благодаря амбер-супрессору, привнесенному микроплазмидой. В клетках Su^- могут также размножаться бактериофаги, у которых одновременно ревертировали обе амбер-мутации, имевшиеся в плечах. Но частота спонтанных двойных реверсий очень низка, поэтому доля потомков, способ-

```
GAATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTTCTAGAGATCTTCCATACCTACCAGTTCTCCGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCCCGGATC   100
CGGTCGCGCGAATTCTTTCGGACTTTTGAAAGTGATGGTGGTGGGGGAAGGATTCGAACCTTCGAAGTCGATGACGGCAGATTTAGAGTCTGCTCCCTTT   200
GGCCGCTCGGGAACCCCACCACGGGTAATGCTTTTACTGGCCTGCTCCCTTATCGGGAAGCGGGGCGCATCATATCAAATGACGCGCCGCTGTAAAGTGT   300
TACGTTGAGAAAGAATTCGGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAAC   400
CCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTC   500
TCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCC   600
CGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGG   700
ATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGC   800
TGAAGCCAGTTCCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCC   902
```

Рис. 10.3. Полная нуклеотидная последовательность плазмиды πVX. Последовательность начинается сайтом рестрикции *Eco*RI, отмеченным стрелкой на рис. 10.4. (*внизу*), и продолжается вдоль кольцевой молекулы по часовой стрелке.

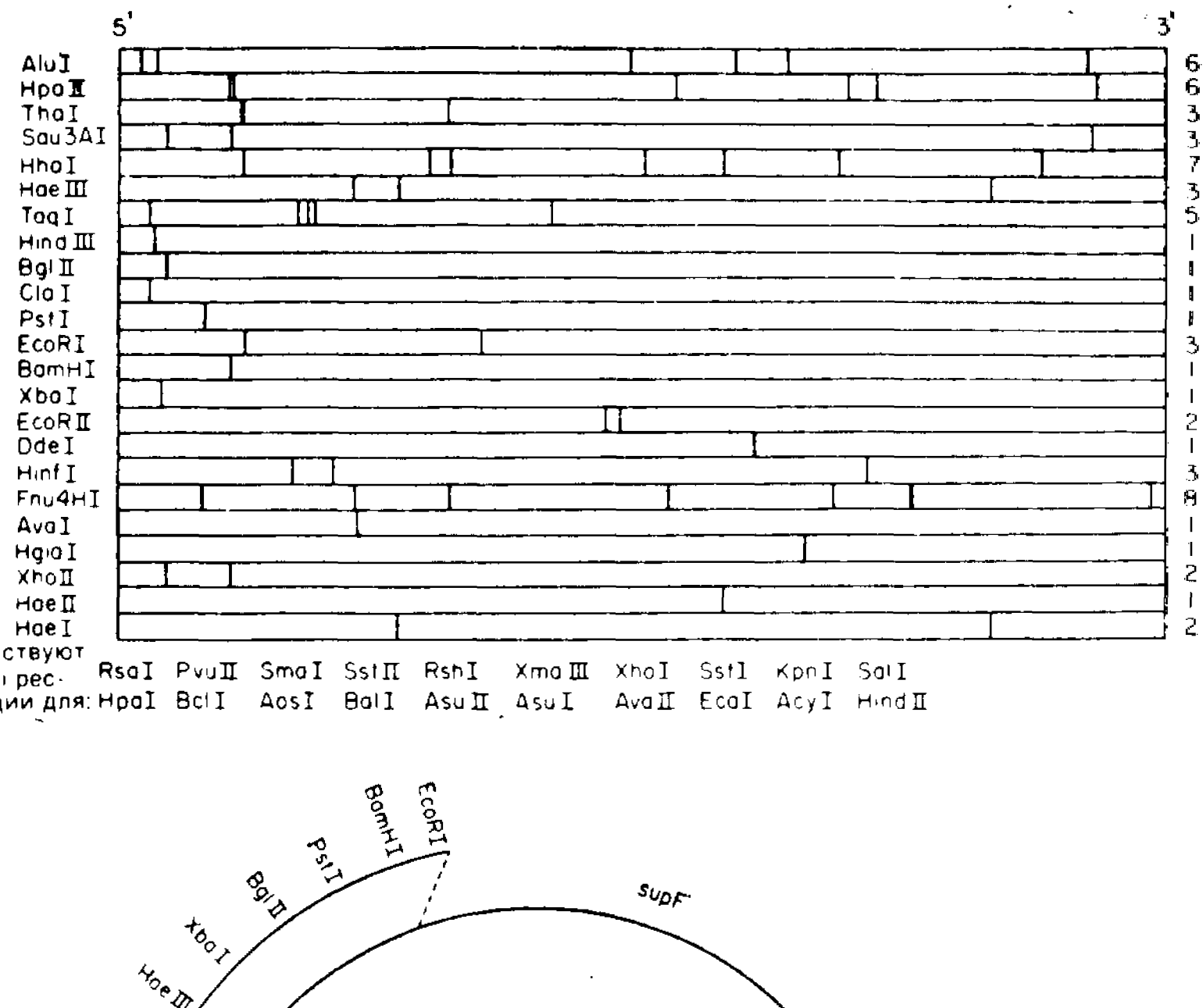


Рис. 10.4. Полная рестрикционная карта микроплазмиды πVX. На верхней схеме показана локализация всех известных сайтов рестрикции в последовательности ДНК πVX по данным компьютерного анализа. Кольцевая плазмида πVX переходит в линейную в результате разрыва молекулы в сайте *Eco*RI, отмеченном стрелкой между точкой начала репликации *Col*EI и полилинкерной частью (*нижняя схема*). Карта располагается вдоль плазмидной ДНК по часовой стрелке. Число сайтов, узнаваемых различными рестриктазами, обозначено справа от линейной карты (*вверху*).

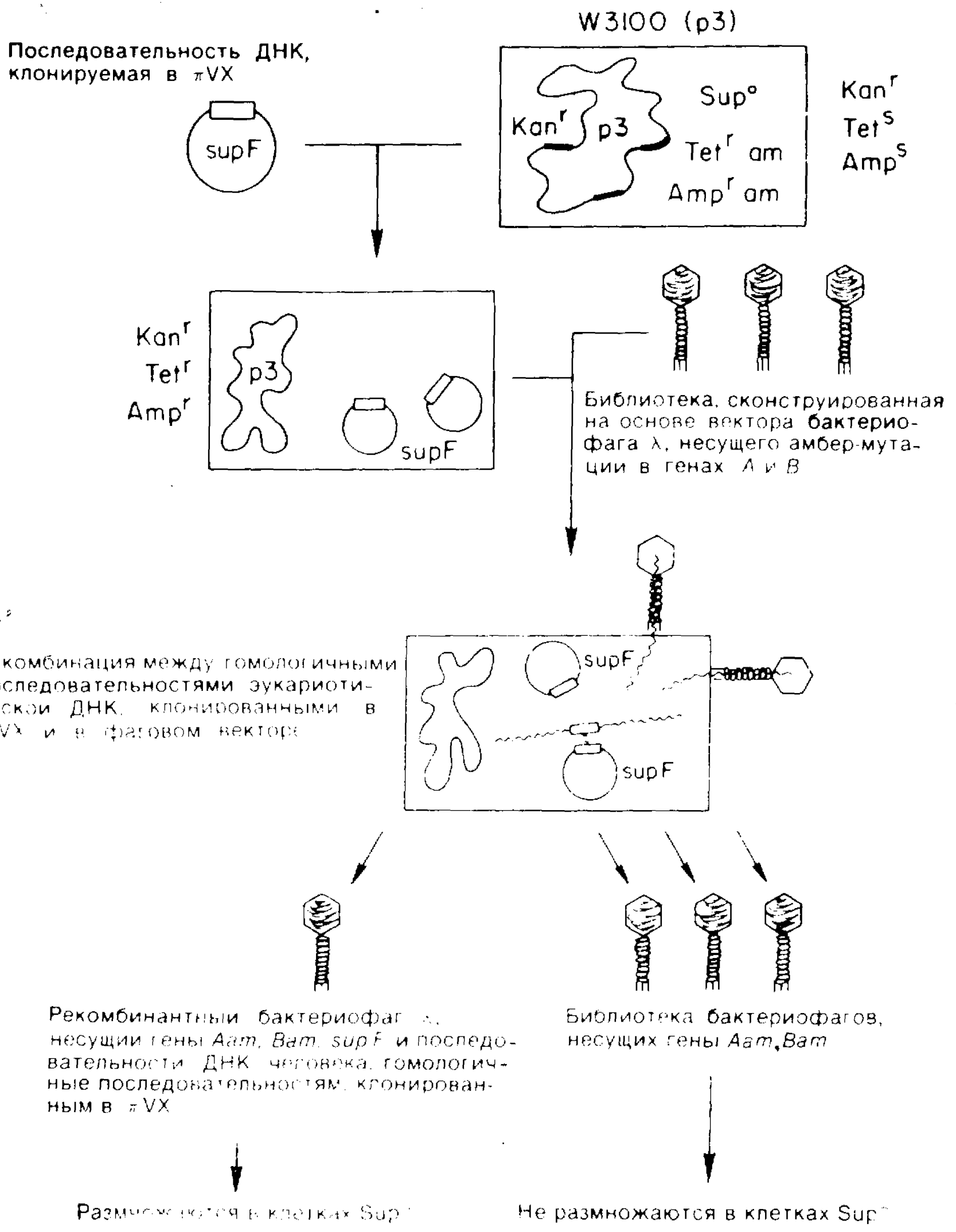


Рис. 10.5. Клонирование в **πVX** рестрикционного фрагмента, содержащего последовательность зонда. Гибридной плазмидой, содержащей функционирующий ген *supF*, путем супрессии амбер-мутации в генах *tet* и *bla* резидентной плазмиды p3 трансформируют штамм *E. Coli* W3110r⁻m⁺(p3), в результате чего он приобретает устойчивость к тетрациклину и ампициллину. Затем популяцию трансформированных клеток заражают библиотекой рекомбинантов бактериофага λ, содержащих фрагменты ДНК млекопитающего, которые вставлены в вектор, несущий амбер-мутации в генах *A* и *B*. Если последовательность ДНК млекопитающего, клонированная в πVX, гомологична последовательности, клонированной в инфицирующем бактериофаге, то может произойти рекомбинация, в результате которой образуется фаговый геном с функционирующим геном *supF* из плазмиды πVX. Такой бактериофаг способен размножаться в клетках Su⁻.

ных расти в клетках Su^-, не превышает в отсутствие рекомбинации с πVX величины 10^{-10}—10^{-12}. Частота рекомбинаций в клетках, несущих πVX, частично зависит от длины гомологичного сегмента ДНК, присутствующего в геномах как бактериофага, так и рекомбинантной плазмиды. Гомологичный сегмент длиной 0,5 kb рекомбинирует с частотой не менее 10^{-3}. Таким образом, если даже только один бактериофаг из 10^5 частиц библиотеки млекопитающего содержит желаемую гомологичную последовательность, то ожидаемая частота рекомбинаций (10^{-8}) будет значительно выше частоты реверсий.

ШТАММЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В СКРИНИНГЕ С УЧАСТИЕМ πVX

В скрининге с помощью плазмиды πVX используются следующие три штамма бактерий: 1) $W3110r^-m^+$, Su^-, спонтанный ревертант thy^+ штамма $W3110r^-m^+$, thy^-; 2) $W3110r^-m^+$ (p3), содержащий *tra*$^-$-производную pLM2 [плазмида pLM2, имеющая две амбер-мутации, в свою очередь является производной RP1 (Mindich et al., 1978)]; 3) $W3110r^-m^+$(p3) (πVX).

Штаммы, несущие πVX или ее производные, следует выращивать в присутствии тетрациклина (7,5 мкг/мл) и ампициллина (12,5 мкг/мл).

ПРИГОТОВЛЕНИЕ πVX

πVX можно выделить из $W3110r^-m^+$(p3) (πVX) одним из методов, описанных в гл. 3. Выход составляет обычно около 50 мкг/л.

Вектор πVX отделяют от плазмиды p3, инкубируя смешанный препарат плазмидных ДНК с одной или двумя рестриктазами, дающими нужные концы, и выделяя фрагмент πVX электрофорезом в 1%-ном агарозном геле.

ТРАНСФОРМАЦИЯ КЛЕТОК $W3110r^-$ m^+(p3)

Наилучший способ трансформации $W3110r^-m^+$(p3) предложили Дэгерт и Эрлих (Dagert, Ehrlich, 1979). Этим способом получают до 10^7 трансформантов на 1 мкг сверхспиральной формы pBR322. Селективная среда должна содержать 15 мкг/мл тетрациклина и 25 мкг/мл ампициллина. Иногда среди компетентных клеток попадаются бактерии с хромосомными супрессорами; их число будет минимально, если для трансформации брать 24-ч компетентные клетки.

ВЫСЕВ ФАГОВЫХ БИБЛИОТЕК НА КЛЕТКИ $W3110r^-$ m^+(p3)

Для инфицирования 0,25 мл ночной культуры клеток, несущих мини-плазмиду, можно брать до 10^6 рекомбинантных бактериофагов. Этот объем затем высевают в чашку диаметром

85 мм, содержащую 7,5 мкг/мл тетрациклина и 12,5 мкг/мл ампициллина.

Бактериофаги, собранные в этой чашке (гл. 3), высевают на клетки Su^-. Для инфицирования 0,25 мл ночной культуры $W3110r^-m^+$ Su^- можно взять до $5 \cdot 10^9$ частиц бактериофага.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕСТЫ НА БАКТЕРИОФАГ, СОДЕРЖАЩИЙ СУПРЕССОРНЫЙ ГЕН

Чтобы выявить присутствие супрессорного гена в бактериофагах, полученных из клеток Su^-, используют два штамма бактерий. Клетки NK5486 несут амбер-мутацию в β-галактозидазном гене *lac*-оперона (*lacZ*am). При заражении клеток NK5486 бактериофагами, содержащими супрессорный ген, происходит супрессия амбер-мутации в гене *lacZ*, и в присутствии хромогенного субстрата 5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-галактозида (Xgal) образуются голубые бляшки. Это определение, которое удобно проводить в виде спот-теста, должно сопровождаться негативным и позитивным контролями с использованием бактериофагов Su^- и бактериофагов, заведомо содержащих супрессор.

Другим штаммом, используемым для тестирования супрессорной активности, является *E. coli* AB1157, содержащий амбер-мутацию в гене *recA*. Клетки $recA^-$ не поддерживают рост рекомбинантных бактериофагов *fec* (гл. 1), если эти бактериофаги не содержат супрессорного гена. Таким образом, бактериофаги fec^-, содержащие супрессор, образуют бляшки, а бактериофаги fec^-, не имеющие супрессора, не дают бляшек. Это определение также удобно проводить в виде спот-теста.

ТЕСТИРОВАНИЕ СИСТЕМЫ πVX

Для тестирования системы πVX ставят опыт по реконструкции (рис. 10.6) с использованием бактериофага λ Харон 4A с мутациями *A*am и *B*am, библиотеки геномной ДНК человека, приготовленной в векторе λ Харон 4A, и рекомбинантного клона (λHβG1), содержащего область β-глобинового гена человека. λHβG1 выделен из библиотеки, приготовленной в λ Харон 4A. Из плазмидных штаммов используют микроплазмидные векторы πVX и πβΔP. Вектор πβΔP содержит последовательность размером 0,6 kb, расположенную на расстоянии 2 kb от 5′-конца β-глобинового гена человека. Каждый из штаммов бактериофага выращивают на бактериях, несущих либо πVX, либо πβΔP, а затем лизаты тестируют на бактериофаги, которые несут супрессорный ген, делая посев на бактерии Su^-. Бактериофаги, размножающиеся в клетках с плазмидой πVX, не дают потомства, способного расти в клетках Su^-, из-за отсутствия гомологии между вектором πVX и геномами любого из бактериофагов. Точно так же рост λ Харон 4A на клетках с

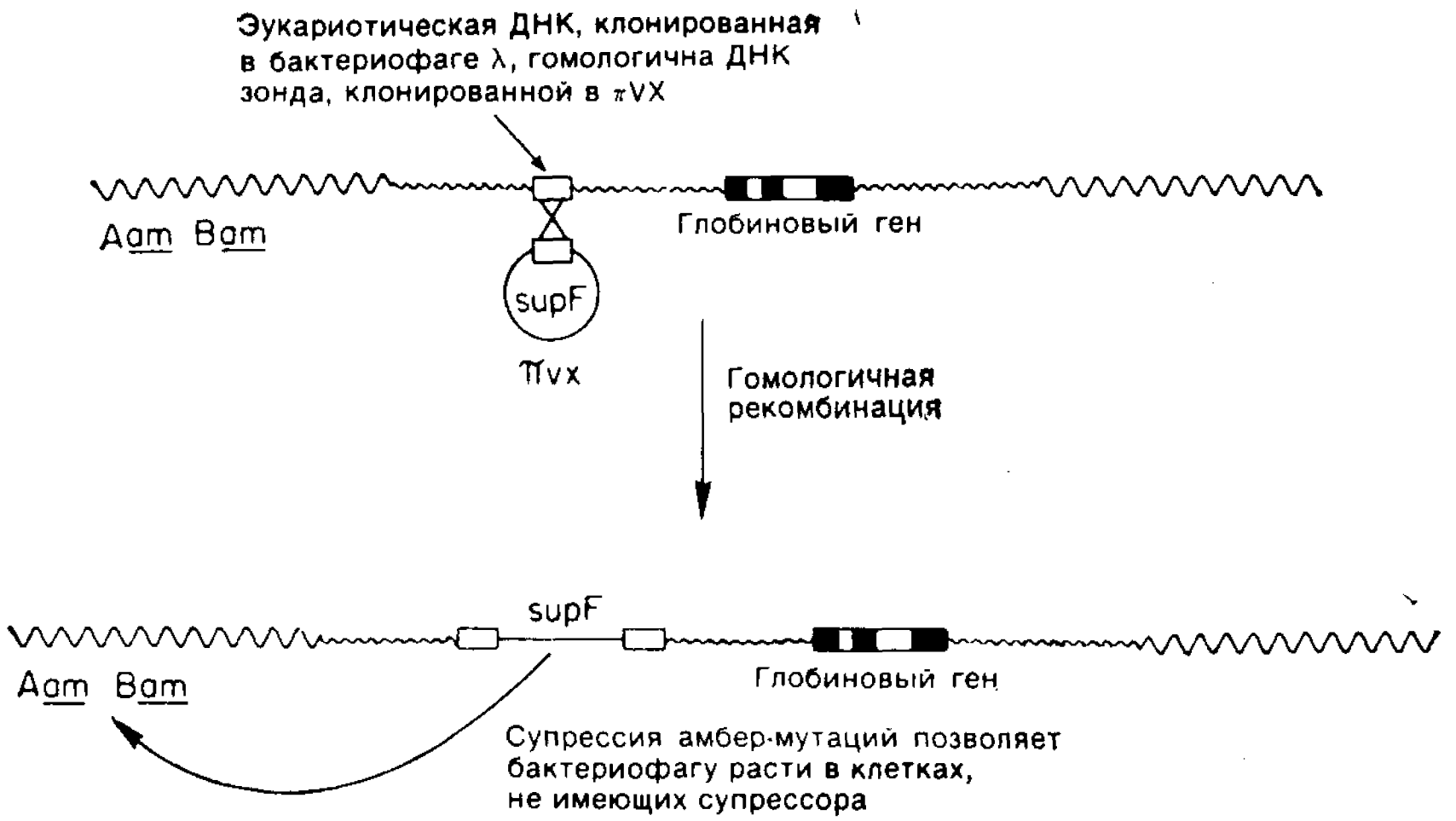


Рис. 10.6. На верхней схеме изображено рекомбинационное событие с участием производной πVX-плазмиды, содержащей последовательность, расположенную на карте вблизи от глобинового гена. В результате рекомбинации 1) удваивается последовательность зонда и 2) ген *supF* встраивается в хромосому бактериофага λ. Подавляя проявление амбер-мутаций в генах *A* и *B* фага λ, встроившийся супрессор позволяет рекомбинантному фагу расти на газоне клеток Su^-.

πβΔP не приводит к появлению фага Su^+. Рост λHβG1 и амплификация библиотеки в клетках с πβΔP сопровождается выходом бактериофагов, способных расти на клетках Su^- с частотами 10^{-3} и 10^{-8} соответственно. Эти бактериофаги тестируют затем на присутствие супрессорного гена и фрагмента ДНК из области β-глобинового гена.

1. Приготовьте ночные культуры двух бактериальных штаммов $W3110r^-m^+(p3)$ (πVX) и $W3110r^-m^+(p3)$ (πβΔP).

2. Получите штоки высокого титра следующих бактериофагов:

а) библиотеки фрагментов ДНК человека, клонированных в бактериофаге λ Харон 4A;

б) рекомбинантного бактериофага λHβG1, содержащего сегмент ДНК, включающий в себя последовательность, клонированную в πβΔP;

в) бактериофага λ Харон 4A.

3. Приготовьте один набор штоков на чашках с клетками $W3110r^-m^+(p3)$ (πVX), а другой — на чашках с клетками $W3110r^-m^+(p3)$ (πβΔP), как описано ниже.

а) Добавьте 0,2 мл ночной культуры $W3110r^-m^+(p3)$ (πVX) в каждую из семи пробирок № 1—7.

б) Добавьте 0,2 мл ночной культуры $W3110r^-m^+(p3)$ (πVX) в каждую из семи пробирок № 8—14.

Затем добавьте бактериофаги по следующей схеме:

Номер пробирки	Количество частиц фага, формирующих бляшку	Бактериофаг
1	$4 \cdot 10^5$	λHβG1
2	$4 \cdot 10^5$	λ Харон 4А
3—7	$1 \cdot 10^6$	Библиотека ДНК человека
8	$4 \cdot 10^5$	λHβG1
9	$4 \cdot 10^5$	λ Харон 4А
10—14	$1 \cdot 10^6$	Библиотека ДНК человека

Инкубируйте 20 мин при 37 °С. Добавьте 3 мл расплавленного агара (47 °С) и сделайте посев содержимого каждой пробирки на свежий нижний агар (чашки диаметром 85 мм), содержащий 7,5 мкг/мл тетрациклина и 12,5 мкг/мл ампициллина. Инкубируйте при 37 °С.

4. Засейте на ночь культуры K802(*su*II) и W3110r$^-$m$^+$(p3) (Su$^-$).

5. Соберите фаги со штоков в чашках (с. 81) и протитруйте их на K802(*su*II) и W3110r$^-$m$^+$(p3) (Su$^-$). Ожидаемые титры приведены в табл. 10.3.

Таблица 10.3. Титры бактериофагов (число единиц, формирующих бляшки, на 1 мл)

Исходная бактерия-хозяин	Бактериофаг	Посев на	
		K802(*su*II)	W3110r−m+(p3) (Su−)
W3110 r$^-$m$^+$ (p3) (πβΔP)	λHβG1	10^{10}	10^7
	λ Харон 4А	10^{10}	0
	Библиотека	10^{10}	10^2
W3110 r$^-$m$^+$ (p3) (πVX)	λHβG1	10^{10}	<10
	λ Харон 4А	10^{10}	<10
	Библиотека	10^{10}	<10

6. Засейте на ночь культуры AB1157 и K5624. Приготовьте чашки, содержащие хромогенный субстрат Xgal (с. 274).

7. Возьмите 1 бляшку из чашки λHβG1/Su$^-$ и 5 бляшек из чашки библиотека/Su$^-$ и элюируйте бактериофаги с помощью буфера SM (с. 81). Из каждой бляшки необходимо отобрать около 10^6 частиц. Высейте по 100—200 частиц каждого фага на газоны с AB1157 и K5486 (на чашках с Xgal), чтобы выявить присутствие супрессорного гена (с. 274).

8. Приготовьте мини-лизаты бактериофагов, выращенных на W3110r$^-$m$^+$(p3) (Su$^-$), по методу, описанному в гл. 11. Приготовьте небольшие количества фаговых ДНК.

9. Обработайте ДНК в каждой пробе ферментом *Eco*RI и сравните образующиеся фрагменты с фрагментами, полученными из ДНК λHβG1 (электрофорезом в 1%-ном агарозном

геле). ДНК λHβG1 должна дать полосы 0,5; 3,1; 2,25; 1,75; 5,2 и 3,1 kb, а также левое (20 kb) и правое (10 kb) плечи ДНК фага λ Харон 4А. У рекомбинантов между λHβG1 и πβΔP вместо фрагмента 5,2 kb должны появиться 4 новых фрагмента длиной 3,6; 2,7; 0,6 и 0,2 kb.

Примечание. Фрагменты длиной 0,6 и 0,2 kb трудно обнаружить из-за их слишком малого размера.

ПРИМЕНЕНИЕ СИСТЕМЫ πVX

Благодаря системе πVX исследователи имеют в своем распоряжении мощный метод быстрого выделения бактериофагов, содержащих последовательности, гомологичные клонированному фрагменту ДНК. Она особенно удобна, когда нужно изолировать множественные мутанты или дивергентные гомологи проклонированного гена. Кроме того, ее можно использовать в тех случаях, когда из библиотеки нужно отобрать плохо растущие бактериофаги, содержащие желательные последовательности, или бактериофаги, представленные в геномной библиотеке с относительно низкой частотой. Например, с помощью системы πVX удалось обнаружить в существующей библиотеке генома человека ряд новых бактериофагов, содержащих β-глобиновые гены, которые были пропущены во время скрининга, многократно проводившегося обычным гибридизационным методом.

Система πVX обладает двумя недостатками. Во-первых, фрагмент ДНК, используемый в качестве зонда, необходимо клонировать в πVX до того, как проводится скрининг библиотеки. Во-вторых, в результате рекомбинационного события происходит неестественное прерывание последовательностей эукариотической ДНК. Нежелательные эффекты такого прерывания можно свести к минимуму, если выбрать фрагмент зонда, соответствующий одному из концов интересующей последовательности и не перекрывающий его, или использовать больше одного фрагмента в случае, когда точное расположение интересующих последовательностей в сегменте ДНК неизвестно. При наличии рекомбинантного бактериофага несложно проклонировать в πVX один или несколько сегментов эукариотической вставки. Учитывая это обстоятельство, во втором цикле скрининга можно получать бактериофаги, которые не имеют перерывов в изучаемой последовательности.

При использовании системы πVX нужно особенно заботиться о том, чтобы избежать заражения библиотек бактериофагами, не имеющими амбер-мутаций. Во избежание напрасной траты времени на исследование «фальшивых» рекомбинантов высевайте предположительно рекомбинантные бактериофаги на бактерии *lacZ*am или *recA*am, как описано выше.

Глава 11

АНАЛИЗ РЕКОМБИНАНТНЫХ КЛОНОВ ДНК

В этой главе изложено несколько методов, которые широко используются для анализа клонов рекомбинантной ДНК, а также даны прописи быстрого выделения небольших количеств фаговых или плазмидных ДНК, построения рестрикционных карт в последовательностях ДНК, представляющих интерес (и рядом с ними), и субклонирования фрагментов ДНК в плазмидных векторах.

БЫСТРОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ПЛАЗМИД ИЛИ БАКТЕРИОФАГА λ

Существует несколько способов быстрого выделения ДНК бактериофагов или плазмид, выращенных из отдельных бляшек или колоний. Они дают возможность получить чистую ДНК в количестве, достаточном для изучения с помощью рестриктирующих нуклеаз, гель-электрофореза, блоттинга по Саузерну или определения нуклеотидной последовательности. Таким образом бляшки или колонии, обнаруженные гибридизационным анализом, можно детально быстро охарактеризовать и подготовить для последующего использования в экспериментах по клонированию.

БЫСТРОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ НЕБОЛЬШИХ КОЛИЧЕСТВ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК

За последние годы появилось много методов выделения плазмидной ДНК из небольших объемов культур, полученных из отдельной колонии бактерий. Некоторые из этих методов слишком трудоемки, другие плохо воспроизводимы, третьи пригодны лишь для отдельных штаммов *E. coli*. Два метода, описанных ниже, отличаются быстротой, дают возможность работать одновременно с несколькими пробами, подходят для всех обычно используемых штаммов *E. coli* и дают высокий выход плазмид. Как правило, из 1,5 мл неамплифицированной ночной культуры, несущей такие плазмиды, как pXf3 или pAT153, получают 2—3 мкг плазмидной ДНК.

Метод с использованием кипячения[1]

1. Внесите в 5 мл среды, содержащей соответствующий антибиотик, материал из одной бактериальной колонии. Инкубируйте при 37 °С в течение ночи при интенсивном перемешивании.

2. Отлейте 1,5 мл культуры в эппендорфовскую пробирку. Центрифугируйте 1 мин в центрифуге Эппендорф. Остальную часть ночной культуры сохраняйте при 4 °С.

3. Отберите среду путем отсасывания, оставив осадок бактерий как можно более сухим.

4. Ресуспендируйте осадок в 0,35 мл раствора, содержащего 8% сахарозы, 0,5% тритона X-100, 50 мМ ЭДТА, pH 8,0, и 10 мМ трис-HCl, pH 8,0.

5. Добавьте 25 мкл свежеприготовленного раствора лизоцима (10 мг/мл в 10 мМ трис-HCl, pH 8,0). Перемешайте встряхиванием (3 с).

6. Поместите пробирку в баню с кипящей водой на 40 с.

7. Сразу после этого центрифугируйте в течение 10 мин при комнатной температуре в центрифуге Эппендорф.

8. Удалите осадок из пробирки зубочисткой.

9. Добавьте к надосадочной жидкости 40 мкл 2,5 М ацетата натрия и 420 мкл изопропанола. Перемешайте встряхиванием и выдержите 15 мин в бане с сухим льдом и этанолом.

10. Центрифугируйте 15 мин при 4 °С в центрифуге Эппендорф.

11. Высушите осадок и растворите его в 50 мкл буфера ТЕ, pH 8,0, содержащего РНКазу (50 мкг/мл), свободную от ДНКазы. Инкубируйте 10 мин при 37 °С. В результате этой обработки удаляется РНК, которая может маскировать небольшие фрагменты ДНК в агарозных гелях.

12. Перенесите 10 мкл раствора в новую эппендорфовскую пробирку. Добавьте 1,2 мкл соответствующего буфера и 1 ед. соответствующей рестриктазы. Инкубируйте 1—2 ч при необходимой температуре. Остальной раствор храните в небольших порциях при —20 °С.

13. Проанализируйте фрагменты ДНК с помощью гель-электрофореза.

Метод щелочного лизиса[2]

1. Внесите в 5 мл среды, содержащей соответствующий антибиотик, одну колонию бактерий. Инкубируйте при 37 °С в течение ночи при интенсивном встряхивании.

---

[1] Holmes, Quigley, 1981.

[2] Эта пропись, составленная Иш-Горовицем, является модификацией метода Бирнбойма и Доли (Birnboim, Doly, 1979).

2. Внесите 1,5 мл культуры в эппендорфовскую пробирку и центрифугируйте ее 1 мин в центрифуге Эппендорф. Остальную ночную культуру храните при 4 °С.

3. Отберите среду пипеткой, оставив осадок как можно более сухим.

4. Ресуспендируйте осадок встряхиванием в 100 мкл охлажденного во льду раствора, содержащего 50 мМ глюкозу, 10 мМ ЭДТА, 25 мМ трис-HCl, pH 8,0, и 4 мг/мл лизоцима. Лизоцим добавляйте в раствор в виде порошка в последнюю очередь.

5. Выдержите 5 мин при комнатной температуре. В это время пробирку можно не закрывать.

6. Добавьте 200 мкл свежеприготовленного, охлажденного во льду раствора, содержащего 0,2 н. NaOH и 1% SDS. Закройте пробирку крышкой и перемешайте содержимое, быстро переворачивая ее 2—3 раза (без встряхивания). Оставьте пробирку во льду на 5 мин.

7. Добавьте 150 мкл охлажденного во льду раствора ацетата калия, pH 4,8, приготовленного следующим образом: к 60 мл 5 М ацетата калия добавьте 11,5 мл ледяной уксусной кислоты и 28,5 мл H_2O. Концентрация калия в пробе 3М, а концентрация ацетата 5 М.

Закройте пробирку крышкой, осторожно встряхивайте ее в перевернутом положении в течение 10 с и затем оставьте во льду на 5 мин.

8. Центрифугируйте 5 мин в центрифуге Эппендорф при 4 °С.

9. Перенесите надосадочную жидкость в новую пробирку.

10. Добавьте равный объем смеси фенол — хлороформ и перемешайте встряхиванием. После 2 мин центрифугирования в центрифуге Эппендорф перенесите надосадочную жидкость в новую пробирку.

11. Добавьте 2 объема этанола при комнатной температуре. Перемешайте встряхиванием и оставьте при комнатной температуре на 2 мин.

12. Центрифугируйте 5 мин в центрифуге Эппендорф при комнатной температуре.

13. Удалите надосадочную жидкость. Оставьте пробирку в перевернутом положении на бумажном полотенце, чтобы могла стечь вся жидкость.

14. Добавьте 1 мл 70%-ного этанола. Быстро встряхните, а затем отцентрифугируйте.

15. Снова удалите всю надосадочную жидкость. Быстро высушите осадок в вакуумном эксикаторе.

16. Добавьте 50 мл буфера ТЕ, pH 8,0, содержащего панкреатическую РНКазу (20 мкл/мл), свободную от ДНКазы, и быстро встряхните.

17. Отберите 10 мкл раствора в новую эппендорфовскую пробирку. Добавьте 1,2 мкл соответствующего буфера и 1 ед. рестриктазы. Инкубируйте 1—2 ч при соответствующей температуре. Остальной раствор храните при —20 °С.

18. Проанализируйте фрагменты ДНК с помощью гель-электрофореза.

Быстрое разрушение колоний для определения вставок в плазмиды

Для того чтобы установить наличие вставки в плазмидной ДНК, часто оказывается достаточным определить размер ДНК, не проводя расщепления рестриктирующей эндонуклеазой. Методика, описанная ниже, позволяет получить ДНК в количестве, достаточном для нанесения в одну лунку агарозного геля (Barnes, 1977).

1. Вырастите бактериальные колонии большого размера (2—3 мм) на агаризованной среде, содержащей соответствующий антибиотик.

2. Перенесите небольшую часть колонии стерильной зубочисткой в контрольную чашку, а остальную часть — в эппендорфовскую пробирку или в ячейку микротитровальной чашки, содержащую 25 мкл смеси: 50 мМ NaOH, 0,5% SDS, 5 мМ ЭДТА и 0,025% бромкрезолового зеленого (разрушающий буфер). Размельчите колонию, осторожно размешивая суспензию зубочисткой.

3. Закройте пробирку крышкой или заклейте микротитровальную ячейку изоляционной лентой и проинкубируйте при 68 °С в течение 45—60 мин.

4. Добавьте 2,5 мкл 25%-ного фикола и нанесите смесь на 0,7%-ный агарозный гель без бромистого этидия.

5. После электрофореза окрасьте гель, выдержав его 45 мин в растворе бромистого этидия (0,5 мкг на 1 мл H_2O).

В отсутствие бромистого этидия скорость перемещения сверхспиральной ДНК более точно отражает ее молекулярную массу, чем в его присутствии.

БЫСТРОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ НЕБОЛЬШИХ КОЛИЧЕСТВ ДНК БАКТЕРИОФАГА λ

Метод лизатов на чашках[1]

1. Перенесите пастеровской пипеткой отдельную, четко изолированную бляшку (с. 80) в 1 мл буфера SM, содержащего 1 каплю хлороформа, и оставьте на 4—6 ч при 4 °С.

[1] Fritsch, неопубликованные данные.

За это время фаговые частицы диффундируют из верхней агарозы.

2. Смешайте 50—100 мкл фаговой суспензии ($\sim 10^5$ частиц) со 100 мкл индикаторных бактерий (с. 79). Инкубируйте 20 мин при 37 °С. Добавьте 2,5 мл расплавленной 0,7%-ной верхней агарозы и распределите смесь по поверхности свежеприготовленной среды NZCYM с 1,5%-ной агарозой в 85-мм чашке.

Примечание. Не используйте агар, потому что большинство сортов агара содержит сильный ингибитор рестриктирующих эндонуклеаз.

3. Переверните чашку и инкубируйте ее при 37 °С в течение 9—14 ч до тех пор, пока бляшки не покроют почти всю поверхность среды.

4. Добавьте 5 мл буфера SM прямо на поверхность среды и элюируйте бактериофаги, постоянно умеренно покачивая чашку 1—2 ч при комнатной температуре.

5. Отберите буфер SM в 12-мл полипропиленовую центрифужную пробирку и удалите остатки бактерий центрифугированием при 8000 g в течение 10 мин при 4 °С.

6. Отберите надосадочную жидкость и добавьте РНКазу А и ДНКазу I (каждый фермент до конечной концентрации 1 мкг/мл). Инкубируйте 30 мин при 37 °С.

7. Добавьте равный объем раствора, содержащего 20% (вес/объем) полиэтиленгликоля и 2 М NaCl в буфере SM, и инкубируйте 1 ч при 0 °С (в бане со льдом). Этот раствор можно приготовить заранее и хранить при 4 °С.

8. Соберите частицы бактериофага центрифугированием при 10 000 g в течение 20 мин при 4 °С.

9. Удалите надосадочную жидкость отсасыванием. Оставьте пробирку в перевернутом положении на бумажном полотенце, чтобы стекла оставшаяся жидкость.

10. Добавьте 0,5 мл буфера SM и ресуспендируйте частицы бактериофага встряхиванием.

11. Центрифугируйте при 8000 g в течение 2 мин при 4 °С.

12. Перенесите надосадочную жидкость в новую эппендорфовскую пробирку. Добавьте 5 мкл 10%-ного SDS и 5 мкл 0,5 М ЭДТА, pH 8,0. Инкубируйте 15 мин при 68 °С.

13. Проведите экстракцию (по одному разу) фенолом, смесью фенол — хлороформ (1 : 1) и хлороформом. Перенесите водную фазу каждый раз в новую эппендорфовскую пробирку.

14. К последней водной фазе добавьте равный объем изопропанола. Выдержите при —70 °С в течение 20 мин. После оттаивания центрифугируйте в центрифуге Эппендорф 15 мин при 4 °С.

15. Промойте осадок 70%-ным этанолом. Высушите его и растворите в 50 мкл буфера ТЕ, pH 8,0.

16. Отберите 10 мкл раствора в новую эппендорфовскую пробирку. Добавьте 1,2 мкл соответствующего буфера и 1—2 ед. рестриктазы. Инкубируйте 1—2 ч при соответствующей температуре. Остальной препарат храните при —20 °С.

17. Проанализируйте фрагменты ДНК гель-электрофорезом.

Примечания. а) Иногда расщеплению способствует добавление панкреатической РНКазы (20 мкг/мл), свободной от ДНКазы. б) Инфекционность ДНК, приготовленной указанным способом и упакованной in vitro, идентична инфекционности более высокоочищенной ДНК бактериофага λ, полученной другими способами.

Жидкая культура[1]

1. Одну хорошо изолированную бляшку перенесите (с. 79) в 1 мл буфера SM, содержащего каплю хлороформа, и проинкубируйте при 4 °С в течение 4—6 ч для того, чтобы фаговые частицы диффундировали из агарозы в раствор.

2. Смешайте 0,5 мл суспензии бактериофага (примерно $3 \cdot 10^6$ частиц) и $1{,}6 \cdot 10^8$ клеток бактерий, находящихся в стационарной фазе, в 25-мл пробирке. Инкубируйте 15 мин при 37 °С.

Имеет значение не только абсолютное количество частиц бактериофага и клеток бактерий, но и отношение между ними. Лучше всего использовать штоки бактериофагов или элюаты бляшек известного титра.

3. Добавьте 4 мл среды NZCYM. Инкубируйте при 37 °С с перемешиванием примерно 9 ч. Культура должна просветлеть и сгустков клеточных остатков должно быть очень мало.

4. Добавьте к культуре 0,1 мл хлороформа и оставьте ее на качалке еще на 15 мин при 37 °С. Перенесите лизат в 5-мл полиэтиленовую центрифужную пробирку. Центрифугируйте при 8000 g в течение 10 мин при 4 °С.

5. Далее продолжайте по методу с использованием лизата в чашке со стадии 6 (с. 82).

КАРТИРОВАНИЕ УЧАСТКОВ, РАСЩЕПЛЯЕМЫХ РЕСТРИКТИРУЮЩИМИ ЭНДОНУКЛЕАЗАМИ

Существует несколько способов картирования участков, в которых ДНК расщепляется рестриктазами. Для того чтобы получить точную, детальную и полезную для работы карту, чаще всего нельзя ограничиваться только одним из них. Наи-

[1] Leder et al., 1977.

более употребительными являются следующие способы: 1) одновременное расщепление несколькими рестриктазами; 2) последовательное расщепление выделенного фрагмента второй рестриктазой; 3) частичное расщепление немеченой ДНК или ДНК, меченной по определенному концу; 4) частичное расщепление ДНК экзонуклеазами с последующим расщеплением рестриктазой.

Какой из этих методов использовать в каждом конкретном случае, зависит как от размера ДНК, так и от требуемой детализации. Например, при картировании ДНК размером более 2—3 kb сначала анализируют фрагменты, образующиеся в результате одновременного действия пары редко расщепляющих рестриктаз (например, ферментов, узнающих гексануклеотидные последовательности).

По размерам образующихся ДНК обычно удается определить относительное местоположение по крайней мере некоторых участков расщепления. С увеличением числа парных комбинаций ферментов увеличивается число определяемых участков вплоть до получения окончательной картины. Разрешение карт, построенных подобным способом, зависит от точности, с которой можно определять размеры фрагментов ДНК относительно размеров маркеров. Но даже в наилучших условиях трудно построить крупномасштабную карту с точностью до 100—200 пар оснований. Чтобы построить подробную карту, необходимо выделить отдельный фрагмент ДНК, расщепить его несколькими ферментами, узнающими тетрануклеотидные последовательности, и определить размер фрагментов электрофорезом в полиакриламидном геле.

На всех этапах картирования полезно начинать анализ от фиксированной точки (например, от одного из концов линейной ДНК). Для этой цели разработаны два метода. Первый включает в себя частичное расщепление меченного по концу фрагмента ДНК (Smith, Birnstiel, 1976). Если достигнуты такие условия, что в среднем на молекулу приходится только одно расщепление, то образуется лестница дискретных меченых фрагментов ДНК. Размеры этих фрагментов отражают расстояния между меченым концом ДНК и данным сайтом рестрикции. Разность длин двух соседних фрагментов ДНК в геле соответствует расстоянию между соседними сайтами рестрикции.

Второй метод основан на использовании экзонуклеазы, атакующей двухцепочечную ДНК (например, *Bal*31). Фрагмент ДНК инкубируют с экзонуклеазой, ДНК выделяют в разное время от начала инкубации и затем расщепляют одной или несколькими рестриктазами. Фрагменты исчезают из гидролизата в порядке, соответствующем расположению сайтов рестрикции в ДНК (Legerski et al., 1978; см. с. 144 и далее).

КАРТИРОВАНИЕ С ПОМОЩЬЮ ОДИНОЧНОГО ИЛИ МНОЖЕСТВЕННОГО РАСЩЕПЛЕНИЯ

1. Расщепите клонированную ДНК такими рестриктазами, о которых известно, что они разрывают молекулу лишь в небольшом числе сайтов во вставке и для которых точно определены места расщепления вектора. Каждой рестриктазой обработайте отдельную аликвоту (5 мкг) ДНК и анализируйте пробы (0,5 мкл) электрофорезом в 0,9%-ном агарозном геле вместе с маркерами соответствующего размера. Неиспользованные объемы проб храните при —20 °С. Сосчитайте число полос ДНК, видимых в каждом гидролизате, измерьте расстояние каждой полосы от старта и рассчитайте молекулярные массы ДНК.

2. Обработайте аликвоты (0,5 мкг) каждого первичного гидролизата дополнительными рестриктазами, выбирая те из них, которые действуют лишь на небольшое число участков вставки.

Может оказаться необходимым: а) очистить ДНК из первичного гидролизата путем экстракции смесью фенол — хлороформ и осаждением этанолом или б) развести ДНК, если вторая рестриктаза плохо работает в буфере, использованном для первичного гидролиза.

Снова определите с помощью гель-электрофореза размеры продуктов расщепления, но на этот раз кроме маркеров известного размера нанесите на гель пробы первичного гидролизата.

Таким путем можно убедиться, что расщепление первой рестриктазой было полным. Если продукты первичного и вторичного гидролиза внести в соседние лунки, то будут хорошо заметны небольшие различия в скоростях перемещения фрагментов ДНК.

Для линейной ДНК число фрагментов после двойного расщепления равно числу фрагментов, образуемых первым ферментом, плюс число фрагментов, образуемых вторым ферментом, минус 1.

Для кольцевой ДНК число фрагментов после двойного расщепления равно числу фрагментов, образуемых первым ферментом, плюс число фрагментов, образуемых вторым ферментом.

Если число наблюдаемых фрагментов меньше ожидаемого, то это может быть результатом наличия очень мелких фрагментов или дублетов (двух фрагментов, перемещающихся в агарозном или полиакриламидном геле с одинаковыми скоростями).

Для построения карт на основании этих данных используют метод проб и ошибок, а также логические рассуждения (Lawn

et al., 1978). Полную картину получают в том случае, когда для всех сайтов рестрикции определяют надежные, логически согласующиеся друг с другом места расположения.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ

Для выделения фрагментов ДНК из гелей существует несколько методов (гл. 5); все они позволяют получить препараты, которые могут расщепляться рестриктазами. Но если предполагается использовать метод последовательного расщепления, то лучше всего выделять ДНК из гелей, приготовленных из легкоплавкой агарозы. Кусочек геля, содержащий фрагмент ДНК, можно растворить при 65 °С, не денатурируя ДНК, затем охладить до 37 °С и инкубировать со второй рестриктазой. Этот способ позволяет проводить последовательное расщепление ДНК быстро и эффективно (Parker, Seed, 1980).

1. Растворите легкоплавкую агарозу в электрофорезном буфере (TBE или TAE, с. 399) и приготовьте гель обычным способом. Прочность затвердевших гелей из легкоплавкой агарозы меньше прочности обычных агарозных гелей, поэтому лучше разливать их и ставить электрофорез на холоду. Гель можно готовить с бромистым этидием или без него.

Примечание. Не используйте электрофорезные буферы, содержащие фосфат: они изменяют характеристики плавления агарозы.

2. Нанесите пробу ДНК и поставьте электрофорез обычным способом.

3. Закончив электрофорез, окрасьте ДНК, если это необходимо, поместив гель в водный раствор бромистого этидия (0,5 мкг/мл) на 30 мин. Подержите гель 10 мин в воде, чтобы отмыть краситель, и просмотрите его в длинноволновом ультрафиолете. Найдите нужную полосу ДНК и вырежьте ее лезвием бритвы, захватив как можно меньше геля.

Вырезав полосу ДНК, сфотографируйте гель.

4. Поместите вырезанный кусочек геля в маленькую пробирку и добавьте 10 объемов холодной воды. Выдержите пробирку при 4 °С в течение 1—2 ч. За это время бóльшая часть электрофорезного буфера и свободный бромистый этидий диффундируют из геля.

5. Удалите избыток жидкости и храните кусочек геля при 4 °С в плотно закрытой пробирке.

6. Когда потребуется, расплавьте гель при 65 °С (2—5 мин), после чего либо перенесите всю пробу в водяную баню на 37 °С, либо разлейте аликвоты в пробирки, подогретые до 37 °С. Добавьте 0,1 объема соответствующего буфера для рестрикции, подогретого до 37 °С.

7. Добавьте свободный от нуклеаз бычий сывороточный альбумин (BSA) из 10%-ного раствора до конечной концентрации

0,1% [при желании BSA можно смешать с буфером для рестрикции (10×) и добавить вместе с ним].

8. Добавьте рестриктазу. Для полного расщепления ДНК в присутствии легкоплавкой агарозы необходимо добавлять в 2—3 раза больше фермента, чем обычно. Инкубируйте в течение соответствующего времени.

9. Реакционную смесь прогрейте при 65 °С в течение 5 мин, добавьте буфер для нанесения пробы [буфер I (с. 400)] и внесите пробу в лунку горизонтального геля, приготовленного из обычной агарозы. Легкоплавкая агароза должна затвердеть в лунках до начала электрофореза. К контрольным пробам, содержащим маркерную ДНК, следует добавить (до внесения их в гель) легкоплавкую агарозу и BSA примерно в тех же концентрациях, в каких они содержатся в опытных пробах.

10. Поставьте электрофорез, окрасьте гель и сфотографируйте его.

Примечания. а) ДНК, высвобождающуюся из расплавленного геля, уже нельзя сконцентрировать, поэтому количество ДНК, наносимой на второй гель, зависит от объема кусочка геля и количества ДНК, наносимой на гель из легкоплавкой агарозы. Для достижения оптимальной эффективности в лунку геля из легкоплавкой агарозы следует наносить как можно больше ДНК в минимальном объеме, а вырезанный кусочек геля нужно очищать от излишней агарозы. Во многих случаях полезно сконцентрировать ДНК после первого расщепления экстракцией фенолом и осаждением этанолом.

б) ДНК можно полностью расщепить в присутствии даже 1,2% легкоплавкой агарозы.

ЧАСТИЧНОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ

Для картирования сайтов рестрикции в ДНК проводят частичные расщепления двух типов. Цель первого метода — сравнить размеры продуктов частичного и полного расщепления и решить, какие фрагменты могут соседствовать друг с другом в исходной молекуле ДНК.

К сожалению, этот метод имеет ограниченное применение, так как число возможных продуктов частичного расщепления быстро растет с увеличением числа сайтов рестрикции.

Например, в линейной молекуле ДНК имеет место следующее соотношение:

Число сайтов рестрикции:	1	2	3	4	5	6
Число возможных продуктов частичного расщепления:	0	2	5	9	14	20

Вообще число продуктов частичного расщепления F в линейной молекуле ДНК, содержащей N сайтов рестрикции, можно

найти по формуле

$$F_{N+1}=\frac{N^2+3N}{2}.$$

Картина сильно упрощается, если фрагмент ДНК несет на одном конце метку, а продукты частичного расщепления определяют радиоавтографически (Smith, Birnstiel, 1976). В этом случае: 1) число меченых продуктов частичного расщепления равно числу сайтов рестрикции в ДНК; 2) меченые фрагменты образуют простые перекрывающиеся серии с общим меченым концом; 3) восходящий порядок фрагментов в геле прямо соответствует расположению сайтов рестрикции в молекуле ДНК; 4) продукты частичного расщепления несколькими разными ферментами можно анализировать одновременно в одном геле, так что относительные положения сайтов рестрикции можно получить на основании одной радиоавтографии.

Методы включения метки (^{32}P фосфатных групп) в фрагменты выделенной ДНК в 5′-концы в присутствии полинуклеотидкиназы и [γ-^{32}P]ATP или в укороченные 3′-концы в присутствии [α-^{32}P]dNTP и фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* даны в гл. 4. Меченую ДНК асимметрично расщепляют с помощью подходящей рестриктазы на 2 фрагмента, которые выделяют гель-электрофорезом и картируют по отдельности методом частичного расщепления.

Ниже следует описание метода концевого включения метки в плазмидную ДНК, расщепленную рестриктазами, дающими укороченные 3′-концы. После включения метки эту ДНК можно картировать одним из методов, описанных выше.

Быстрый метод включения метки в укороченные 3′-концы в мини-препараты плазмидной ДНК[1]

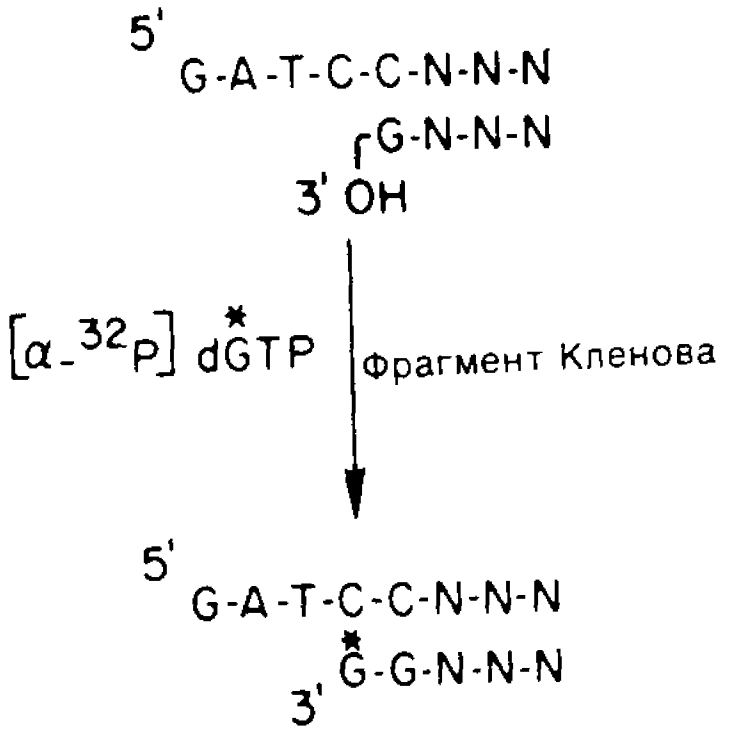
1. Приготовьте плазмидную ДНК из 1,5 мл ночной культуры бактерий с использованием процедуры щелочного лизиса (с. 333).

2. Расщепите ДНК рестриктазой, дающей укороченные 3′-концы в соответствующей позиции. Смешайте 10 мкл ДНК, 1,2 мкл буфера для рестрикции (10×) и 1 ед. рестриктазы. Инкубируйте 1—2 ч при соответствующей температуре.

3. Добавьте 10 мкКи (около 1 мкл) подходящего [α-^{32}P]dNTP (400 Ки/моль) в стабилизированной водной форме. Нуклеотид должен быть комплементарен первому неспаренному нуклеотиду удлиненного 5′-конца; например, при

[1] Drouin, 1980.

включении метки в конец, образованный *Bam*HI, в реакционную смесь добавляют [α-^{32}P]dGTP:



4. Добавьте 0,2 мкл (примерно 1—2 ед.) фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*. Инкубируйте 30 мин при 20 °С.

5. Отделите меченую ДНК от свободных нуклеотидов, пропустив смесь через колонку с сефадексом G-75 или проведя хроматографию на сефадексе G-50 с использованием центрифугирования (приложение А). Меченую ДНК можно затем картировать методом частичного расщепления второй рестриктазой.

Примечания. а) Реакция концевого включения метки хорошо идет в любом буфере для рестрикции.

б) Этот метод концевого включения метки можно также использовать в том случае, когда требуется идентифицировать небольшие фрагменты (<200 пар оснований) в гидролизатах плазмидной ДНК. В этом случае нанесите около 1/10 реакционной смеси прямо в лунку агарозного или акриламидного геля. После электрофореза заверните гель в пленку Saran Wrap и экспонируйте с рентгеновской пленкой для получения радиоавтографов (с. 412).

Частичное расщепление ДНК, содержащей концевую метку

Частичное расщепление ДНК, содержащей концевую метку, проще всего провести по несколько измененным методикам, изложенным на с. 266. Поскольку в данном случае в реакции используется очень малое количество ДНК, содержащей концевую метку, следует добавить определенное количество ДНК-носителя (обычно используют ДНК плазмид или бактериофага λ), чтобы можно было легче контролировать скорость расщеп-

ления [Smith, Birnstiel, 1976 с модификацией Энгеля (Engel, личное сообщение)].

1. Смешайте $\sim 10^4$ имп/мин ДНК, меченной по 3′- или 5′-концу (растворенной в $\leqslant 8$ мкл H_2O), 1 мкг ДНК-носителя, 1 мкл буфера для рестрикции (10×), до 10 мкл H_2O и 1—2 ед. рестриктазы.

2. Инкубируйте при 37 °С, отбирая 1,8-мкл аликвоты через 2, 5, 10, 15 и 30 мин от начала инкубации и перенося их в 1 мкл 0,5 М ЭДТА.

На этом этапе нужно объединить все аликвоты, чтобы увеличить вероятность обнаружения бедно представленных продуктов частичного расщепления.

3. Добавьте 2 мкл красителя I и внесите 5 мкл объединенной пробы в одну лунку 5%-ного полиакриламидного геля и еще 5 мкл в лунку 1,4%-ного агарозного геля. В качестве маркера используйте смесь меченных по концам (10^4 имп/мин) фрагментов ДНК pBR322.

4. Проводите электрофорез до тех пор, пока бромфеноловый синий не продвинется на две трети длины дорожки в каждом геле.

5. Заверните гели в пленку Saran Wrap и экспонируйте их с рентгеновской пленкой при —70 °С для получения радиоавтографов (с. 412 и далее).

Примечание. Однозначные результаты легко получить для фрагментов очищенной ДНК, содержащих гетерологичные концы (например, после обработки ДНК *Bam*HI и *Eco*RI), которые можно пометить в отдельных реакциях с разными дезоксинуклеозидтрифосфатами ([$(\alpha$-^{32}P]dGTP в случае концов после расщепления *Bam*HI и [α-^{32}P]dATP в случае концов после расщепления *Eco*RI). Поскольку в каждой реакции метится только один из двух концов ДНК, частичное расщепление можно проводить без дальнейшей обработки фрагмента ДНК.

Картирование путем расщепления ДНК, обработанной экзонуклеазой

Построение карт путем расщепления рестриктазой ДНК, деградированной до разных уровней в результате инкубации с *Bal*31, описано на с. 145 и далее.

ПЕРЕНОС ПО САУЗЕРНУ

Методы, описанные на предыдущих страницах, позволяют построить карту, на которой указаны порядок расположения сайтов рестрикции и размеры образующихся фрагментов. Что касается локализации отдельных последовательностей ДНК в

этих фрагментах, то ее обычно устанавливают методом переноса, предложенным Саузерном (Southern, 1975). Фрагменты ДНК, разделенные по размерам с помощью агарозного гель-электрофореза, сначала денатурируют, а затем переносят на нитроцеллюлозный фильтр и иммобилизуют. При переносе на фильтр относительные положения фрагментов ДНК в геле сохраняются. ДНК, связанную с фильтром, гибридизуют с ДНК или РНК, меченными ^{32}P, и на радиоавтографе находят положение любых полос, комплементарных радиоактивному зонду. Этот метод можно использовать не только для локализации специфических последовательностей в клонированной ДНК, но и для идентификации последовательностей в гидролизатах суммарной эукариотической ДНК (Botchan et al., 1976; Jeffreys, Flavell, 1977). Метод, описанный ниже, приложим (с небольшими модификациями) как к геномной, так и к клонированной ДНК.

ПЕРЕНОС ДНК С АГАРОЗНЫХ ГЕЛЕЙ НА НИТРОЦЕЛЛЮЛОЗНУЮ БУМАГУ

1. По завершении электрофореза окрасьте ДНК бромистым этидием и сфотографируйте гель. Иногда полезно поместить рядом с гелем линейку, чтобы прямо на фотографии определять расстояние, пройденное данной полосой ДНК.

Чтобы определить нуклеотидную последовательность вставки с помощью гибридизации по Саузерну, вполне достаточно 0,5 мкг ДНК рекомбинантного бактериофага λ или 0,2 мкг рекомбинантной плазмидной ДНК. Для анализа последовательности ДНК млекопитающего (гаплоидный геном включает $3 \cdot 10^9$ пар оснований), представленной единичной копией, необходимо взять 10 мкг суммарной ДНК.

2. Перенесите гель в стеклянный кристаллизатор и удалите лезвием все ненужные участки геля.

3. Денатурируйте ДНК, выдержав гель в нескольких объемах 1,5 М NaCl и 0,5 М NaOH в течение 1 ч при комнатной температуре с постоянным перемешиванием или качанием.

Примечание. Некоторые исследователи предпочитают после электрофореза, прежде чем проводить щелочную денатурацию, частично гидролизовать ДНК кислотной апуринизацией, помещая гель дважды на 15 мин в 0,25 н. HCl при комнатной температуре (Wahl et al., 1979). Это способствует переносу крупных фрагментов ДНК. Важно, однако, чтобы гидролиз не зашел слишком далеко; в противном случае ДНК расщепится на короткие фрагменты (<300 пар оснований), которые не смогут прочно связаться с фильтром. В большинстве случаев вполне достаточно времени, в течение которого окрашенная бромистым этидием ДНК облучается УФ-светом; эта процеду-

ра обеспечивает эффективный перенос ДНК размером до 20 kb.

4. Нейтрализуйте гель, поместив его в 1 М трис-HCl, pH 8,0, и 1,5 М NaCl (несколько объемов) на 1 ч при комнатной температуре с постоянным покачиванием или перемешиванием.

5. Оберните кусок плексигласа или стопку стеклянных чашек бумагой ватман 3ММ. Поместите эту обернутую бумагой подставку в большой кристаллизатор. Подставка должна быть длиннее и шире, чем гель. Налейте в чашку буфер SSC (10×; с. 395) почти до верха подставки и гладкой стеклянной палочкой снимите все пузырьки воздуха с бумаги 3ММ.

Примечание. В качестве буфера для переноса можно использовать также буфер SSPE(20×).

6. Переверните гель нижней стороной кверху. Положите его на мокрую бумагу 3ММ. Между бумагой и гелем не должно быть пузырьков воздуха.

7. Отрежьте лист нитроцеллюлозного фильтра (Schleicher and Schuell BA 85 или Millipore HAHY) такого размера, чтобы его стороны были на 1—2 мм больше сторон геля. При работе с нитроцеллюлозой пользуйтесь перчатками и пинцетом.

8. Поместите нитроцеллюлозный фильтр на поверхность раствора SSC(2×) и держите до тех пор, пока не промокнет его нижняя сторона. После этого погрузите фильтр в этот раствор и подержите там 2—3 мин.

Скорости намокания разных сортов нитроцеллюлозы сильно различаются. Если фильтр не пропитался раствором в течение нескольких минут, его нужно заменить новым, потому что перенос ДНК на неравномерно намокшую нитроцеллюлозу будет ненадежным.

Примечание. Нитроцеллюлоза не намокает в тех местах, в которых к ней прикасались пальцами!

9. Поместите мокрый нитроцеллюлозный фильтр на гель, так чтобы одна сторона фильтра немного выдавалась за линию, на которой располагаются лунки. Удалите все пузырьки воздуха, которые остаются между гелем и фильтром.

10. Намочите в буфере SSC(2×) два листа бумаги ватман 3ММ, вырезанных точно по размеру геля, и положите их поверх нитроцеллюлозного фильтра. Снова удалите все пузырьки воздуха.

11. Нарежьте стопку бумажных полотенец (высотой 5—8 см) немного меньшего размера, чем листы бумаги 3ММ, и поместите их на эти листы. На стопку полотенец поставьте стеклянную чашку с грузом 500 г (рис. 11.1). Вся эта процедура необходима для того, чтобы вызвать движение жидкости из резервуара через гель и нитроцеллюлозу. При этом фрагменты ДНК элюируются из геля и переходят на нитроцеллюлозную

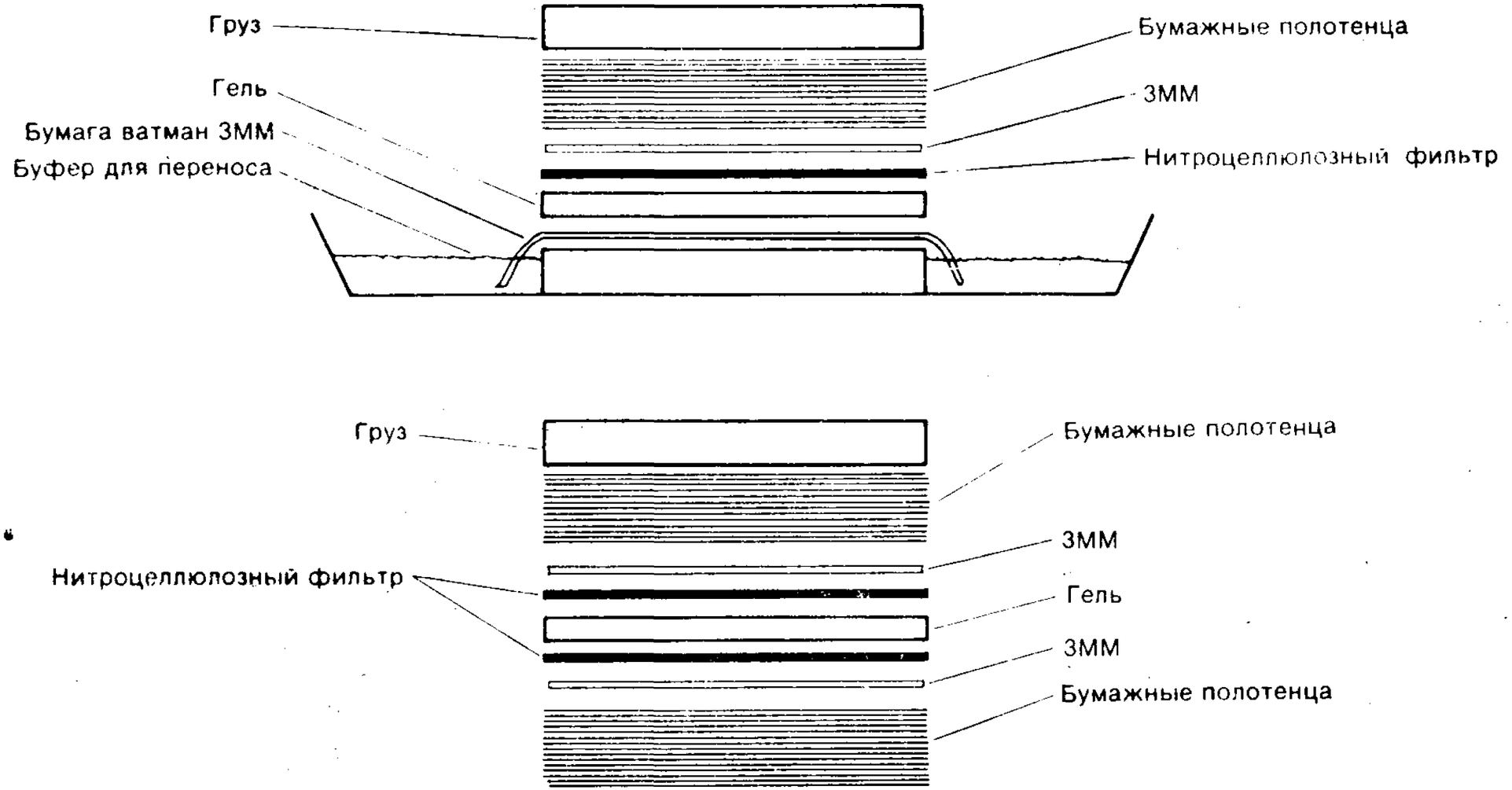


Рис. 11.1. Способы переноса ДНК из агарозного геля на нитроцеллюлозный фильтр. *Вверху:* наиболее распространенная система переноса ДНК (объяснения см. в тексте). *Внизу:* система переноса ДНК с одного геля на два нитроцеллюлозных фильтра; буфером для переноса служит жидкость, находящаяся в самом агарозном геле.

бумагу. Многие исследователи делают водонепроницаемую перегородку вокруг геля из пленки Saran Wrap, чтобы предотвратить небольшую циркуляцию жидкости между бумажными полотенцами и бумагой 3ММ, находящейся под гелем.

12. Перенос ДНК должен продолжаться 12—24 ч. Мокрые полотенца следует заменять новыми.

Скорость переноса ДНК зависит от размера фрагментов ДНК и пористости геля. Перенос мелких фрагментов ДНК (<1 kb) из 0,8%-ной агарозы заканчивается через 1—2 ч, а перенос фрагментов, превышающих 15 kb, продолжается 15 ч и больше.

13. Снимите полотенца и бумагу 3ММ с геля. Переверните обезвоженный гель и фильтр и положите их (гель сверху) на сухой лист бумаги 3ММ. Отметьте положение лунок геля на фильтре очень мягким карандашом или шариковой ручкой.

14. Снимите гель. Пропитайте фильтр раствором SSC(6×) при комнатной температуре (5 мин).

15. Дайте стечь с фильтра избытку жидкости и высушите его при комнатной температуре на листе бумаги 3ММ.

16. Поместите сухой фильтр между двумя листами бумаги 3ММ и прогрейте его при 80 °С в вакууме в течение 2 ч.

Если фильтр не предназначен для немедленного употребления в гибридизационных экспериментах, его следует хранить при комнатной температуре в вакууме между листами бумаги 3ММ.

Примечания. а) Процедура, описанная выше и проиллюстрированная на рис. 11.1 (вверху), является наиболее широко распространенным способом переноса ДНК из гелей на фильтры. Еще один метод, возможно лучший из остальных, показан на рис. 11.1 (внизу): ДНК переносится с одного геля сразу на два нитроцеллюлозных фильтра. Перенос небольших фрагментов (<5 kb) происходит в этой системе очень быстро и в основном завершается через 3—4 ч. Однако единственным источником переносящего буфера здесь служит жидкость, находящаяся в геле; поэтому перенос высокомолекулярных фрагментов ДНК (>10 kb) оказывается малоэффективным.

б) Маркерные ДНК, гибридизующиеся с радиоактивным зондом, служат как ориентиром на фильтре, так и эталоном для сравнения по размеру фрагментов ДНК на радиоавтографе. Количество ДНК в маркерной лунке должно быть равным количеству ДНК в опытных лунках или немного превосходить его.

ГИБРИДИЗАЦИЯ НА ФИЛЬТРАХ ПО САУЗЕРНУ

1. Положите прогретый фильтр на поверхность раствора SSC(6×). Когда он промокнет снизу, погрузите его в этот раствор на 2 мин.

2. Поместите мокрый фильтр в полиэтиленовый пакет, который можно запечатать с помощью нагревания.

3. Внесите в пакет подогретый до 68 °С раствор для предгибридизации из расчета 0,2 мл на 1 см² нитроцеллюлозного фильтра.

Раствор для предгибридизации содержит буфер SSC(6×), 0,5% SDS, раствор Денхардта (5×; см. с. 396) и 100 мкг/мл денатурированной ДНК из спермы лосося.

4. Выдавите как можно больше воздуха из пакета. Запечатайте открытый конец пакета с помощью нагревания. Инкубируйте пакет 2—4 ч, погрузив его в водяную баню на 68 °С.

При достижении температуры раствора для предгибридизации 68 °С на поверхности фильтра часто образуются небольшие пузырьки воздуха. Важно удалять эти пузырьки, время от времени встряхивая жидкость в пакете, иначе компоненты раствора для предгибридизации не будут равномерно покрывать фильтр.

5. Выньте пакет из водяной бани. Вскройте его, отрезав один угол ножницами. Слейте раствор для предгибридизации как можно полнее.

6. Пастеровской пипеткой внесите в пакет раствор для гибридизации. Его должно быть достаточно для того, чтобы фильтр намок (50 мкл на 1 см² фильтра).

Раствор для гибридизации содержит буфер SSC(6×), 0,01 М ЭДТА, денатурированную ДНК, меченную ^{32}P (зонд), раствор Денхардта (5×), 0,5% SDS и 100 мкг/мл денатурированной ДНК из спермы лосося.

Типичные условия гибридизации на фильтрах по Саузерну даны в табл. 11.1.

Таблица 11.1. Условия гибридизации на фильтрах по Саузерну

ДНК на фильтре	Удельная активность ДНК зонда, имп/мин·мкг	Количество добавленного зонда	Время гибридизации, ч
Фрагменты клонированной ДНК (~100 нг/фрагмент)	10^7	10^5—10^6 имп/мин (0,01—0,1 мкг)	3—4
Суммарная эукариотическая ДНК (10 мкг)	10^8	$1 \cdot 10^7$—$5 \cdot 10^7$ имп/мин (0,1—0,5 мкг)	12—16

7. Удалите из пакета как можно больше воздуха. Заплавьте отрезанный угол, проследив, чтобы в пакете осталось как можно меньше пузырьков воздуха.

8. Инкубируйте пакет, погруженный в водяную баню на 68 °С, столько времени, сколько необходимо для гибридизации.

9. Выньте пакет из бани и быстро разрежьте его вдоль трех

сторон. Наденьте перчатки, выньте фильтр и немедленно погрузите его в ванночку, содержащую раствор SSC(2×) и 0,5% SDS (при комнатной температуре).

Примечание. Не допускайте высыхания фильтров ни на одном из этапов промывания.

10. Через 5 мин перенесите фильтр в другую ванночку, содержащую раствор SSC(2×) и 0,1% SDS, и инкубируйте 15 мин при комнатной температуре, иногда слегка покачивая ванночку.

11. Перенесите фильтр в плоскодонную пластмассовую коробку, содержащую раствор SSC(0,1×) и 0,5% SDS. Инкубируйте 2 ч при 68 °С, слегка покачивая. Смените буфер и продолжайте инкубировать еще 30 мин.

Примечание. Если гомология между зондом и ДНК, связанной с фильтром, слабая, то отмывку следует проводить в менее жестких условиях. Вообще отмывка должна проводиться при температуре (T_m —12 °С).

Полезно использовать следующие соотношения:

а) $T_m = 69{,}3 + 0{,}41\,(G+C)\,\%$ (Marmur, Doty, 1962).

б) T_m двухцепочечной ДНК снижается на 1 °С с увеличением на 1% числа неспаренных оснований (Bonner et al., 1973).

в) $T_m\mu_2 - T_m\mu_1 = 18{,}5 \lg\frac{\mu_2}{\mu_1}$, где μ_1 и μ_2 — ионные силы двух растворов (Dove, Davidson, 1962).

12. Высушите фильтр при комнатной температуре на листе бумаги ватман 3ММ.

13. Заверните фильтр в пленку Saran Wrap и экспонируйте его с рентгеновской пленкой для получения радиоавтографов (с. 412).

Примечание. Гибридизацию можно также проводить в следующих условиях: а) в плоскодонных пластмассовых коробках; б) в буферах, содержащих формамид; при увеличении концентрации формамида на 1% T_m двухцепочечной ДНК понижается на 0,7 °С (McConaughy et al., 1969; Casey, Davidson, 1977).

СУБКЛОНИРОВАНИЕ МАЛЫХ ФРАГМЕНТОВ ДНК В ПЛАЗМИДНЫХ ВЕКТОРАХ

Субклонирование фрагментов ДНК из рекомбинантов, первоначально сконструированных на основе фаговых или плазмидных векторов, представляет собой одну из наиболее распространенных процедур в молекулярном клонировании ДНК. С ее помощью получают хорошо определяемые гибридизационные зонды, а также большие количества специфических фрагментов ДНК для определения нуклеотидной последовательности. Она помогает упростить задачу построения подробных

карт сайтов рестрикции и конструирования рекомбинантных плазмид, которые несут новые комбинации фрагментов чужеродной ДНК.

Как уже указывалось, главная трудность клонирования в плазмидах заключается в том, чтобы отличить желаемые рекомбинанты от кольцевой векторной ДНК. Эту трудность можно преодолеть: 1) выбирая такое соотношение между векторной ДНК и ДНК-вставкой, которое благоприятствует межмолекулярному, а не внутримолекулярному лигированию, либо 2) клонируя способом инактивации вставкой или направленной вставки. Если эти процедуры дополняются скринингом по методу Грунстайна — Хогнесса (Grunstein — Hognes), то субклонирование фрагментов в плазмидах не представляет особой проблемы.

СУБКЛОНИРОВАНИЕ ФРАГМЕНТОВ ДНК С ЛИПКИМИ КОНЦАМИ

1. Смешайте 200 нг линейной плазмидной ДНК (обработанной фосфатазой, если необходимо) и трехкратный молярный избыток фрагмента, используемого для субклонирования. Осадите ДНК из смеси этанолом и промойте осадок.

2. Растворите ДНК в 8 мкл буфера ТЕ, pH 8,0. Добавьте 1 мкл буфера для лигирования (10×; с. 415). Сохраните аликвоту (1 мкл) для последующего анализа с помощью гель-электрофореза. Добавьте 10 ед. Т4-лигазы и перемешайте кратковременным встряхиванием. Инкубируйте 8 ч при 12 °С (при наличии липких концов, образованных после действия *Eco*RI) или при 16—20 °С (при наличии липких концов, появившихся в результате действия других рестриктаз.)

3. После лигирования отберите вторую аликвоту (1 мкл). Проанализируйте обе аликвоты с помощью электрофореза в агарозном геле, чтобы убедиться в эффективности лигирования.

4. 2,5 мкл оставшейся пробы используйте для трансформации бактерий к устойчивости к антибиотику и найдите нужные колонии гибридизацией, методом инактивации вставкой или путем анализа структуры плазмид, выделенных одним из экспресс-методов, описанных на с. 335 и далее.

Примечание. Иногда приходится субклонировать рестрикционный фрагмент, один из концов которого является выступающим, а другой — тупым. Подобная задача возникает, например, при субклонировании в pBR322 фрагмента ДНК с концами, образованными в результате действия *Eco*RI и *Hae*III. Подходящий вектор можно подготовить, расщепив плазмиду рестриктазой *Hin*dIII и дополнив укороченную цепь в выступающем конце с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I. Затем ДНК расщепляют *Eco*RI и очищают электрофорезом в агарозном геле или хроматографией на сефарозе CL-4B

(с. 408). Элюируемую векторную ДНК, содержащую один тупой и один липкий (образовавшийся под действием *Eco*RI) конец, лигируют с *Eco*RI/*Hae*III-фрагментом. Поскольку концы векторной ДНК не могут лигироваться друг с другом, большинство трансформированных клеток несет плазмиды, содержащие желаемые вставки.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В СУБКЛОНИРОВАНИИ СИНТЕТИЧЕСКИХ ЛИНКЕРОВ

Иногда для клонирования фрагментов ДНК удобно использовать синтетические ДНК-линкеры (например, при клонировании кДНК или при субклонировании фрагментов, имеющих тупые концы). Хотя последние можно клонировать после прямого лигирования с линейной плазмидной ДНК, имеющей тупые концы, эффективность этого процесса невелика по трем причинам. Во-первых, K_M для Т4-лигазы почти в 100 раз выше в случае тупых концов ДНК по сравнению с липкими. Следовательно, для лигирования ДНК, имеющей тупые концы, необходимы высокие концентрации лигазы и концов ДНК (бóльшие чем 1 мкМ), а значит, и очень большие количества рестриктазы. Во-вторых, при лигировании тупых концов часть плазмидного вектора вновь принимает кольцевую форму. И в-третьих, из-за высокой концентрации фрагментов, предназначенных для клонирования, многие рекомбинантные плазмиды содержат более одной вставки чужеродной ДНК.

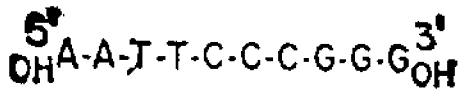
При клонировании фрагмента ДНК, содержащего тупые концы, лучше всего использовать синтетические двухцепочечные ДНК-линкеры (Bahl et al., 1976; Scheller et al., 1977). Такие синтетические ДНК с тупыми концами содержат один или несколько сайтов рестрикции, в которых после расщепления соответствующей рестриктазой образуются липкие концы (см. рис. 7.2). Синтетические линкеры, содержащие сайты рестрикции для многих рестриктаз, производятся на продажу рядом фирм.

При клонировании фрагментов ДНК с тупыми концами с помощью синтетических линкеров ставят две реакции лигирования. Сначала пришивают к фрагменту ДНК линкеры, которые сами имеют тупые концы. Поскольку синтетические линкеры очень короткие (8—12 пар оснований), в реакции лигирования легко создать высокую концентрацию тупых концов. Реакция протекает в нужном направлении благодаря высокой концентрации линкеров (20—50 мкг/мл), а концентрация клонируемого фрагмента может быть относительно низкой.

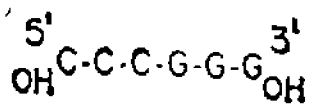
После пришивания синтетических линкеров ДНК расщепляют соответствующей рестриктазой, чтобы получить липкие концы, которые могли бы присоединиться к фрагменту линей-

ной плазмидной ДНК, имеющей комплементарные концы. Эффективность лигирования с чужеродной ДНК повышается после дефосфорилирования 5′-конца плазмидной ДНК.

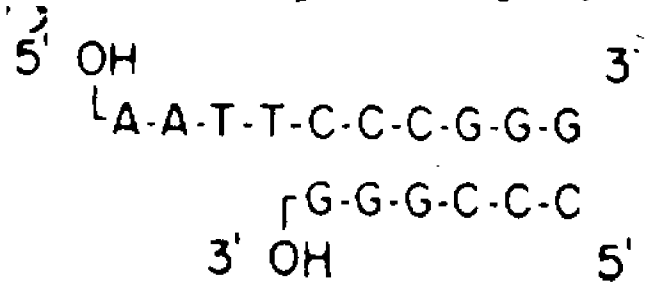
Кроме синтетических линкеров применяют синтетические адапторы, представляющие собой специально синтезированные сайты рестрикции, при использовании которых нет необходимости в предварительной обработке рестриктазой (Bahl, Wu, 1978). Например, *Eco*RI- адаптор представляет собой последовательность



а *Sma*I-адаптор представляет собой последовательность



Чтобы сформировать *Eco*RI-сайт, *Sma*I-адаптор сначала фосфорилируют, чтобы он мог лигироваться с фрагментом, имеющим тупые концы и предназначенным для клонирования, а затем отжигают с *Eco*RI-адаптором, в результате чего образуется дуплекс



Тупой конец этого адаптора может лигироваться, а выступающий конец не может из-за наличия 5′-гидроксильной группы. По завершении лигирования тупого конца выступающий 5′-гидроксильный конец фосфорилируют в присутствии полинуклеотидкиназы. После этого *Eco*RI-адапторный рестрикционный фрагмент можно эффективно лигировать с плазмидной ДНК, переведенной в линейное состояние рестриктазой *Eco*RI и обработанной фосфатазой.

Превращение выступающих 5′-концов в тупые[1]

Укороченную цепь выступающего конца можно заполнить, используя ДНК-полимеразную активность фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli.*

1. Составьте смесь, содержащую рестрикционный фрагмент (до 1 мкг ДНК в 10 мкл), 1 мкл 2 мМ раствора всех четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов, 2,5 мкл буфера для никтрансляции (10×; с. 122) и H_2O до 25 мкл.

2. Добавьте 2 ед. фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I. Перемешайте и инкубируйте 15—30 мин при 22 °С. Прогрейте 5 мин при 70 °С, чтобы инактивировать фермент.

[1] Wartell, Reznikoff, 1980.

3. Лигируйте фрагмент ДНК, имеющий тупые концы, с синтетическими фосфорилированными линкерами, как описано ниже.

ДНК с тупыми концами выделять в чистом виде нет необходимости, так как реакции наращивания укороченного конца и лигирования могут протекать последовательно в одной и той же реакционной смеси.

Превращение выступающих 3′-концов в тупые

Из рестрикционных фрагментов с выступающими 3′-концами можно получить фрагменты с тупыми концами с помощью 3′-экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы фага Т4. В присутствии всех четырех dNTP ДНК-полимераза фага Т4 удаляет неспаренные 3′-концы рестрикционных фрагментов до тех пор, пока не достигнет первой комплементарной пары оснований, если присутствует соответствующий комплементарный dNTP (с. 127 и далее). ДНК-полимераза *E. coli* также способна катализировать эту реакцию, но предпочтительнее использовать полимеразу фага Т4, потому что ее 3′-экзонуклеазная активность в 1000 раз выше.

1. Составьте следующую смесь: рестрикционный фрагмент (до 1 мкг ДНК в 10 мкл), 2 мкл буфера (10×) для полимеразы фага Т4, до 19 мкл H_2O, 1 мкл 2 мМ раствора всех четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов и 1 мкл (~2,5 ед) ДНК-полимеразы фага Т4. *Буфер (10×) для полимеразы фага Т4* имеет состав: 0,33 М трис-ацетат, pH 7,9, 0,66 М ацетат калия, 0,10 М ацетат магния, 5,0 мМ дитиотрейтол и 1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (BSA Pentax Fraction V).

2. Инкубируйте 5 мин при 37 °С.

3. Добавьте 1 мкл 0,5 М ЭДТА. Экстрагируйте один раз смесью фенол-хлороформ. Осадите ДНК этанолом.

4. Соберите ДНК центрифугированием. Промойте осадок 70%-ным этанолом и снова отцентрифугируйте.

5. Высушите осадок, а затем растворите ДНК в 20 мкл буфера ТЕ, pH 7,6.

6. Лигируйте фрагмент ДНК, имеющий тупые концы, с фосфорилированными линкерами, как описано ниже.

Присоединение синтетических линкеров

Большинство линкеров, поставляемых фирмами, имеет 5′-гидроксильные концы. Поскольку для ДНК-лигазы фага Т4 нужны 5′-фосфорилированные концы, прежде чем присоединять линкеры к ДНК, их необходимо фосфорилировать. Киназная и лигазная реакции могут протекать последовательно в одной и той же реакционной смеси (Maniatis et al., 1978). Как отмечалось выше, критическими факторами при лигировании тупых концов являются концентрация концов (1 мкМ; этой концент-

рации соответствуют 50 мкг/мл линкеров) и концентрация лигазы. Реакцию рекомендуется ставить в минимальном объеме.

1. Смешайте 1 мкл линкер-киназного буфера (10×), 1 мкл линкеров (1,0—2,0 мкг) и 6 мкл H_2O. *Линкер-киназный буфер* (10×) имеет состав: 0,66 М трис-HCl, pH 7,6, 10 мМ АТР, 10 мМ спермидин, 0,1 М $MgCl_2$, 150 мМ DTT и 2 мг/мл желатины или BSA.

2. Добавьте 2 ед. ДНК-киназы фага Т4 и инкубируйте 1 ч при 37 °С.

3. Добавьте эту реакционную смесь непосредственно к 10 мкл такого же буфера, содержащего 0,4 мкг рестрикционного фрагмента с тупыми концами.

4. Добавьте 2 мкл (1 ед.) ДНК-лигазы фага Т4. Инкубируйте при 22 °С в течение 6 ч.

5. Добавьте 1 мкл 0,5 М ЭДТА. Экстрагируйте один раз смесью фенол — хлороформ. Осадите ДНК этанолом. Соберите ДНК центрифугированием. Промойте осадок 70%-ным этанолом и снова отцентрифугируйте.

6. Высушите осадок, растворите ДНК в 90 мкл буфера ТЕ.

7. На следующем этапе необходимо расщепить ДНК, соединенную с линкерами, соответствующим ферментом, чтобы получить липкие концы. Это кажется простой задачей, однако она сопряжена с двумя трудностями. Во-первых, из-за высокой молярной концентрации линкеров необходимо добавлять большие количества рестриктазы, чтобы осуществить полное расщепление. Во-вторых, отщепленные линкеры могут присоединиться к вектору, давая высокий фон «нерекомбинантных» плазмид. Для достижения наилучшего результата следует отделить фрагмент ДНК от линкеров до и после расщепления. Это можно сделать гельфильтрационной хроматографией (на сефарозе CL-4B) или гель-электрофорезом. Поскольку не обязательно отщеплять все линкеры, которые присоединились к фрагменту ДНК, рестрикционное расщепление проводят без предварительного удаления нелигированных или лигированных на себя линкеров. Затем фрагмент ДНК, предназначенный для клонирования и часто имеющий на концах больше одного линкера, отделяют от отщепленных линкеров препаративным гель-электрофорезом или хроматографией на сефарозе CL-4B.

8. Добавьте 10 мкл буфера (10×) для рестрикции и 20 ед. рестриктазы. Инкубируйте несколько часов при соответствующей температуре.

9. Добавьте 2 мкл 0,5 М ЭДТА. Экстрагируйте один раз смесью фенол — хлороформ.

10. Соберите надосадочную жидкость и добавьте 6,0 мкл 5 М NaCl. Нанесите ее на 5-мл колонку с сефарозой CL-4B, уравновешенной буфером ТЕ, pH 7,6, содержащим 0,3 моль/л NaCl. Соберите 12 фракций по 0,3 мл и по 50 мкл из

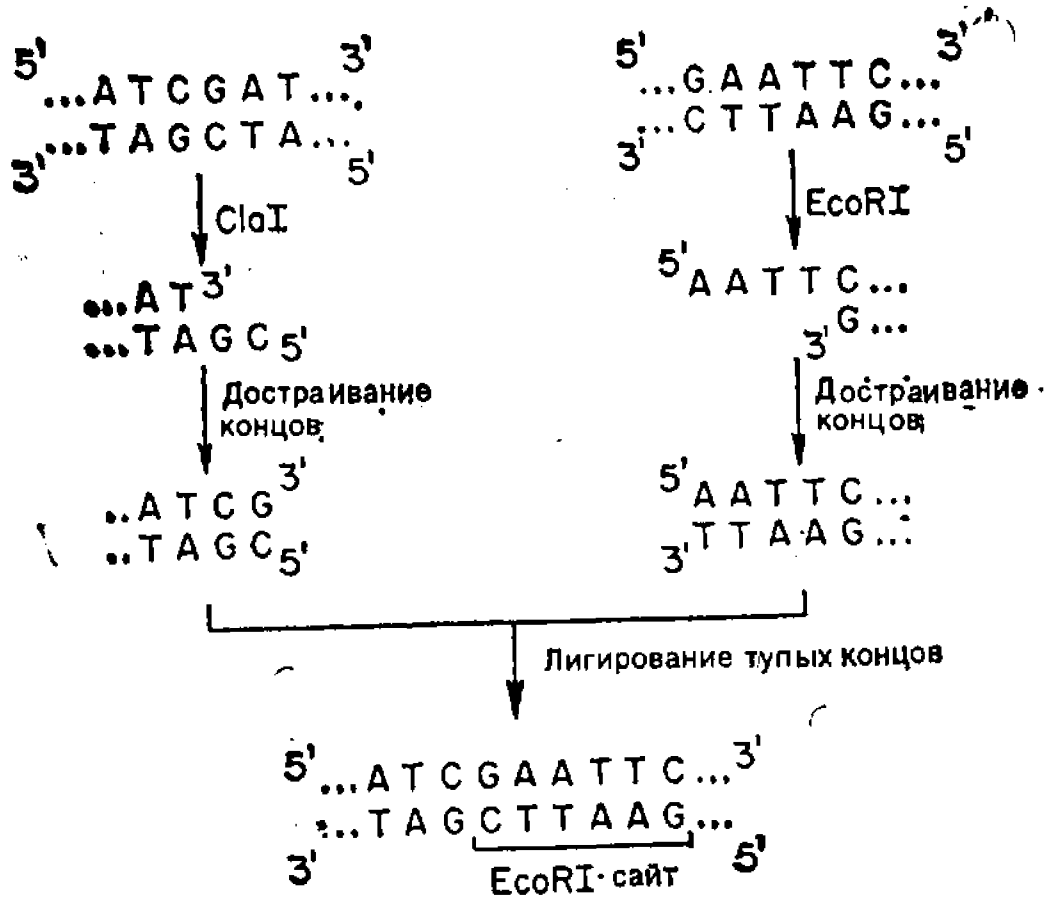
каждой фракции проанализируйте с помощью агарозного гель-электрофореза. Соберите фракции, содержащие фрагменты ДНК. Осадите ДНК этанолом.

11. Лигируйте фрагмент и плазмидную ДНК и трансформируйте бактерии, как описано в гл. 8.

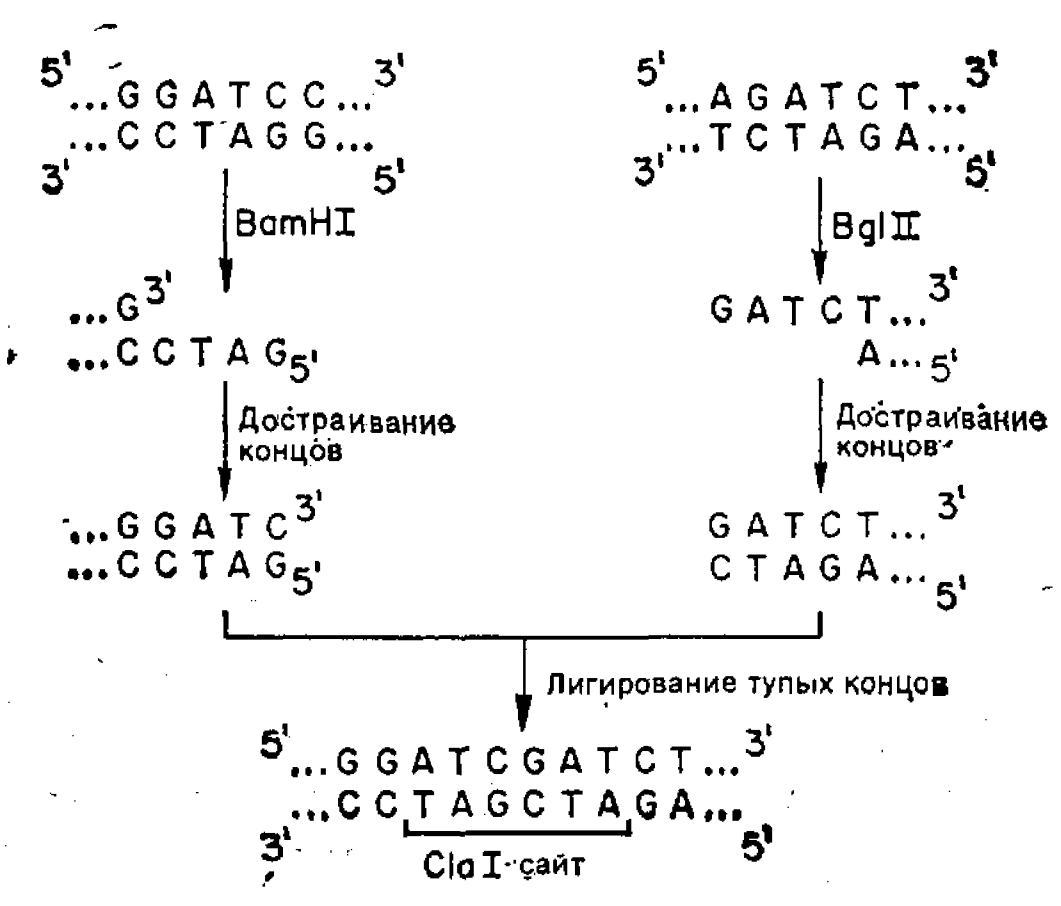
СОЗДАНИЕ САЙТОВ РЕСТРИКЦИИ ЛИГИРОВАНИЕМ МОЛЕКУЛ ДНК, ИМЕЮЩИХ ТУПЫЕ КОНЦЫ

Если достроить укороченные цепи выступающих концов, образованных рестриктазами, и лигировать образующиеся фрагменты ДНК с тупыми концами, то часто удается регенерировать один или оба первоначальных сайта рестрикции. В ряде случаев при этом возникают совершенно другие сайты.

Ниже дан пример регенерирования сайта:



А вот пример образования нового сайта:



Создание и регенерация сайтов рестрикции является чрезвычайно полезным делом, потому что открывает возможность для проведения скрининга нужных рекомбинантных клонов. Кроме того, наличие сайта рестрикции в месте соединения фрагментов означает, что они при необходимости могут быть в любое время отделены друг от друга.

Чтобы быстро решить вопрос о возможности создания или регенерации сайтов рестрикции при лигировании двух фрагментов, имеющих тупые концы, полезно использовать специальные таблицы. Табл. 11.2 показывает, какое основание требуется для регенерации или создания сайта рестрикции после достраивания укороченного конца (например, чтобы регенерировать *Bcl*I-сайт, заполненный *Bcl*I-конец нужно лигировать с фрагментом ДНК, имеющим остаток A на 5′-конце).

В табл. 11.3 можно найти основание 5′-конца, образованного в результате расщепления двухцепочечной ДНК рестриктазой и последующей репарации.

Таблица 11.2. 5′-Концевое основание, необходимое для завершения сайта рестрикции[1)]

Рестриктаза, под действием которой образовался конец	Необходимое основание	Рестриктаза, под действием которой образовался конец	Необходимое основание
*Bcl*I	A	*Xma*III	G
*Taq*I	A	*Ava*II	C
*Xba*I	A	*Bam*HI	C
*Bgl*I	T	*Bst*EII	C
*Hin*dIII	T	*Eco*RI	C
*Dde*I	G	*Hin*fI	C
*Hpa*II	G	*Sal*I	C
*Xho*I	G	*Sau*961	C
*Xma*I	G		

[1)] Концы, образовавшиеся в результате действия *Bcl*I, *Bgl*I, *Bam*HI, *Mbo*I или *Sau*3A, могут достраиваться и лигироваться друг с другом с образованием *Cla*I-сайта.

БЫСТРОЕ ВЫПОЛНЕНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНЫХ ЭТАПОВ КЛОНИРОВАНИЯ

Часто при конструировании плазмид необходимо провести несколько последовательных ферментативных реакций. При этом не всегда требуется выделять ДНК в чистом виде экстракцией смесью фенол — хлороформ и осаждением ДНК после каждой реакции этанолом. Полезно руководствоваться следующими правилами.

1. Многие ферменты инактивируются при нагревании. Например, после 15-мин инкубации при 70 °C инактивируются все полимеразы, лигазы и почти все обычно используемые рестриктазы, за исключением *Bam*HI, *Bcl*I, *Bst*NI, *Hin*dIII, *Sal*I, *Taq*I и *Tha*I. Так как большинство ферментов особенно термола-

Таблица 11.3. 5′-Основание после репарации конца

Основание	Рестриктаза
A	*Eco*RI, *Hin*dIII, *Hin*fI, *Hpa*I[1)], *Rsa*I[1)]
T	*Dde*I, *Mst*II, *Sal*I, *Xho*I
G	*Ava*II, *Bam*HI, *Bcl*I, *Bgl*II, *Bst*EII, *Hae*II[1)], *Mbo*I, *Mst*I[1)], *Pst*I[2)], *Sac*II[2)], *Sau*3A, *Sau*961, *Sma*I[1)], *Xma*II
C	*Alu*I[1)], *Bal*I[1)], *Cla*I, *Fnu*DII[1)], *Hgi*AI[2)], *Hha*I[2)], *Hpa*II, *Kpn*I[2)], *Nar*I, *Pru*I[1)], *Pvu*II[1)], *Sac*I[2)], *Sph*I[2)], *Stu*I[1)], *Taq*I, *Xba*I, *Sma*I

[1)] Под действием фермента образуется тупой конец, репарации не требуется.
[2)] Под действием фермента образуется выступающий 3′-конец, который следует удалить обработкой нуклеазой S1, нуклеазой из золотистой фасоли или ДНК-полимеразой фага T4.

бильно в отсутствие двухвалентных катионов, перед прогреванием в реакционную смесь следует добавлять достаточное количество ЭДТА, чтобы связать все двухвалентные катионы.

Примечание. Бактериальная щелочная фосфатаза при нагревании до 70 °C не инактивируется (с. 141).

2. Большинство рестриктаз можно инактивировать добавлением диэтилпирокарбоната (DEPC) до конечной концентрации 0,1% (т. е. при добавлении 0,01 объема 10%-ного раствора DEPC в этаноле) и нагреванием в течение 20 мин при 37 °C или в течение 10 мин при 56 °C. Чтобы не допустить снижения pH в результате выделения CO_2 при разложении DEPC, раствор нужно охладить во льду и на каждый 1 мкл DEPC добавить 5 мкл 1 М трис-HCl, pH 8,0.

3. В смеси с ферментами ДНК можно быстро осадить добавлением а) достаточного количества ЭДТА для связывания присутствующих двухвалентных катионов; б) 0,4 объема 5 М ацетата аммония и в) двух объемов изопропанола. После 10-мин выдерживания при комнатной температуре ДНК можно собрать центрифугированием. Белки не осаждаются изопропанолом в присутствии 2 М ацетата аммония.

Примечание. Эту процедуру нельзя применять перед киназной реакцией, так как полинуклеотидкиназа фага T4 сильно ингибируется ионами аммония.

Глава 12

ВЕКТОРЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ КЛОНИРОВАННОЙ ДНК В *E. coli*

Векторы для экспрессии содержат последовательности ДНК, которые необходимы для транскрипции клонированных копий генов и трансляции их мРНК в клетках *E. coli*. Такие векторы были использованы не только для экспрессии эукариотических генов в *E. coli*, но и для увеличения выхода продуктов клонированного гена.

Для экспрессии клонированного гена в *E. coli* необходимы следующие условия.

1. Кодирующая область гена не должна прерываться последовательностями интрона.

2. Ген должен находиться под контролем такого промотора *E. coli*, который эффективно узнается РНК-полимеразой *E. coli*.

3. мРНК должна быть относительно стабильной и эффективно транслируемой. Кроме того, чужеродный белок, продуцируемый в клетках *E. coli*, не должен быстро деградировать под влиянием бактериальных протеаз, в противном случае его выделение из клеток окажется невозможным.

ПРОМОТОРЫ

Промотором называют последовательность ДНК, в которой РНК-полимераза присоединяется к ДНК, благодаря чему может начаться синтез РНК. Разные промоторы работают с разной эффективностью: сильные промоторы вызывают инициацию синтеза мРНК с высокой частотой, слабые промоторы контролируют синтез транскриптов, представленных малым числом копий. При сравнении последовательностей нескольких различных промоторов были выявлены две консервативные области, одна из которых отстоит примерно на 10 пар оснований [—10-область, или прибнов-бокс (Pribnow, 1975)], а другая примерно на 35 пар оснований (—35-область) вперед от начала транскрипции [см. обзор (Rosenberg, Court, 1979)]. Считается, что эти две области важны для определения силы промотора: му-

тации, снижающие частоту транскрипции, обычно уменьшают степень гомологии консервативных последовательностей. Не исключено, что сила промотора зависит также и от менее консервативных его областей. Кроме того, на эффективность функции промотора влияет число нуклеотидов, разделяющих консервативные последовательности. Например, мутации, связанные с изменением числа нуклеотидов между областями —10 и —35 (обычно 16—19 нуклеотидов) *lac*-промотора (de Crombrugghe et al., 1971; Stefano, Gralla, 1982) и β-лактамазного промотора (Jaurin et al., 1981), влияют на силу промотора. По-видимому, существует оптимальное расстояние между консервативными областями, которое является либо общим для всех промоторов, либо специфическим для каждого индивидуального промотора.

Единственный верный тест на эффективность промотора состоит в измерении частоты инициации синтеза соответствующей мРНК. Однако эту величину трудно выявить в опытах in vivo, поэтому об эффективности промотора часто судят косвенно по количеству синтезированного белка, кодируемого данной мРНК. Основная трудность, возникающая при сравнении промоторов данным методом, заключается в том, что разные мРНК содержат различные нетранслируемые лидерные последовательности на 5′-концах, которые могут влиять на эффективность трансляции мРНК. Следовательно, уровень синтеза белкового продукта может зависеть как от силы промотора, так и от строения и длины нетранслируемой лидерной последовательности или от комбинации обоих этих факторов.

Несмотря на подобные трудности, четко установлено, что многие гены *E.coli* контролируются относительно слабыми промоторами. Экспрессию этих генов можно увеличить, если поместить их после эффективных промоторов (например, *lac*uv5, *trp, tac,* гибридного промотора *trp-lac*uv5, λp_L, *ompF, bla*). Эукариотические промоторы функционируют в *E.coli* очень плохо либо вообще не функционируют. Эффективный синтез эукариотических белков наблюдался только в тех случаях, когда кодирующую последовательность помещали под контроль сильного промотора *E.coli.*

Наиболее удобными для выражения чужеродных генов в *E.coli* являются сильные и вместе с тем регулируемые промоторы. Сцепление гена с сильным нерегулируемым промотором особенно нежелательно, если продукт клонируемого гена токсичен для клеток *E.coli.* Кроме того, конститутивно высокий уровень транскрипции может влиять на репликацию плазмидной ДНК и приводить к плазмидной нестабильности (Remaut et al., 1981). Эта проблема перестает существовать при наличии эффективных терминаторов позади промотора. Действительно, сильные промоторы (например, некоторые промоторы бактерио-

фага T5), находящиеся в плазмиде, стабилизируются, если за ними следует сильный терминирующий сигнал (Gentz et al., 1981).

Векторы с промотором p_L бактериофага λ

Промотор p_L бактериофага λ представляет собой сильный, хорошо регулируемый промотор, который был использован в нескольких векторах для экспрессии (Hedgpeth et al., 1978; Bernard et al., 1979; Remaut et al., 1981; Shimatake, Rosenberg, 1981). Ген, кодирующий температурочувствительный λ-репрессор (например, λ*c*I*ts*857), либо может входить в состав клонирующего вектора, либо поставляется профагом, находящимся в бактериальной хромосоме (Bernard et al., 1979). При низкой температуре (31 °C) промотор p_L поддерживается в репрессированном состоянии продуктом гена *c*I. Если подавить активность репрессора повышением температуры культивирования, то промотор p_L будет регулировать синтез больших количеств мРНК. Ниже описаны несколько векторов, в которых используется промотор λp_L.

pPLa2311

Вставка ДНК в *Pst*I-сайт плазмиды pPLa2311 (Remaut et al., 1981; рис. 12.1) приводит к инактивации плазмидного гена, детерминирующего устойчивость к ампициллину (*bla*). Следовательно, трансформированные клетки, устойчивые к канамицину и чувствительные к ампициллину, по всей вероятности, имеют вставки чужеродной ДНК в *Pst*I-сайте. Промотор λp_L направляет синтез больших количеств мРНК, кодирующей продукт экспрессируемого гена, если вставка чужеродной ДНК правильно ориентирована.

pPLa8

Вектор pPLa8 сконструирован путем введения *Bam*HI-линкера в *Pst*I-сайт плазмиды pPLa2311 (Remaut et al., 1981). Бактерии, несущие pPLa8, чувствительны к ампициллину, так что для скрининга рекомбинантных плазмид, несущих чужеродную ДНК в *Bam*HI-сайте, нельзя использовать тест, основанный на инактивации вставкой.

pKC30

Показано (Shimatake, Rosenberg, 1981), что плазмида pKC30 направляет синтез больших количеств токсичного белка (в данном случае — продукта гена *c*II бактериофага λ; рис.

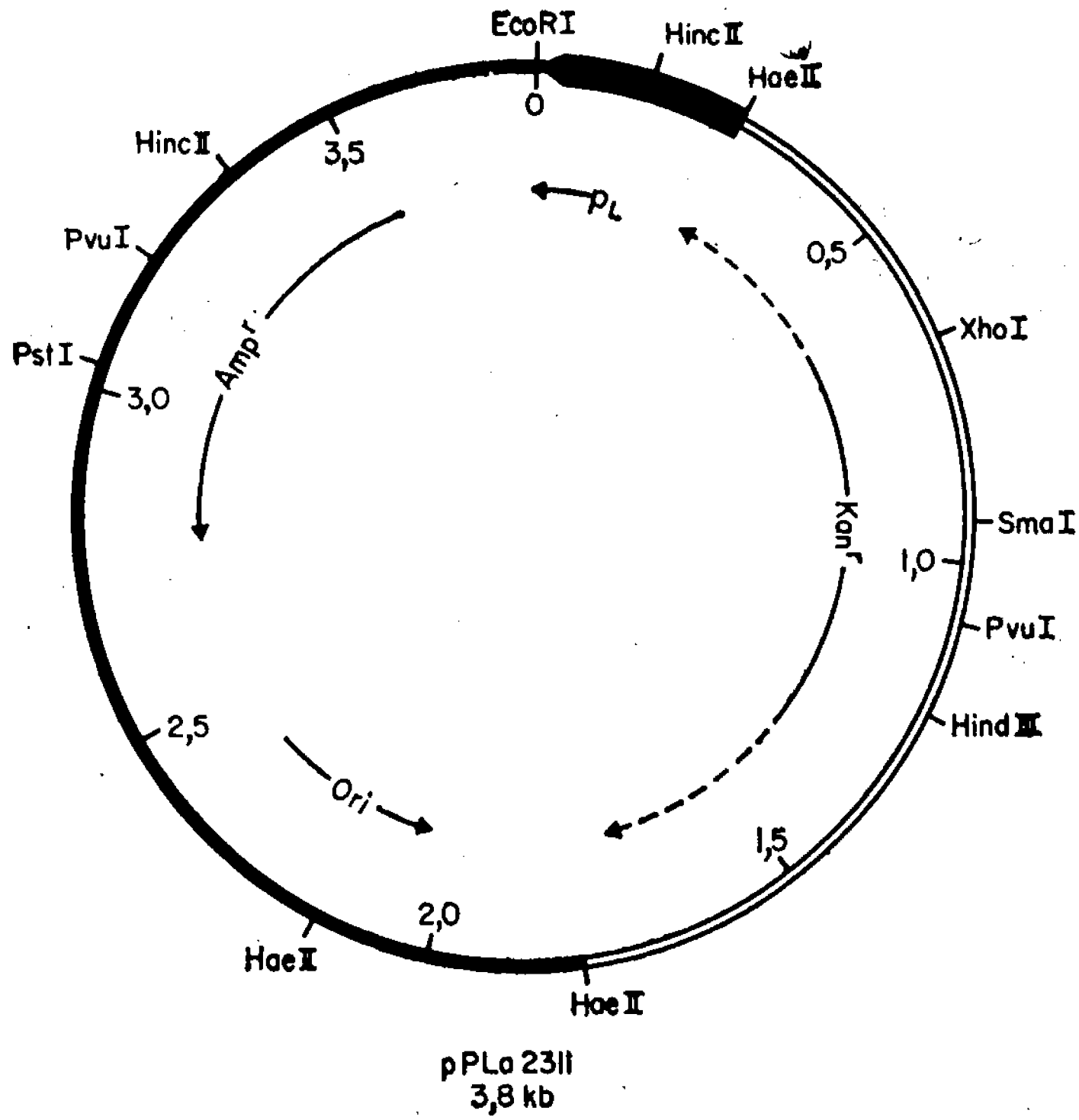


Рис. 12.1. Плазмида pPLa2311 длиной 3,8 kb, имеющая по одному сайту для *Eco*RI и *Pst*I и несущая p_L-промотор бактериофага λ. Жирная стрелка в верхней части кольца показывает расположение области p_L и направление транскрипции. Зачерненная более тонкая линия соответствует ДНК, взятой из pBR322. Светлая двойная линия показывает область, несущую ген устойчивости к канамицину (направление его считывания неизвестно). Вставка чужеродной ДНК в *Pst*I-сайт инактивирует ген устойчивости к ампициллину. Гены, вставленные в *Pst*I-сайт или в *Eco*RI-сайт, могут регулироваться при введении рекомбинантной плазмиды в температурочувствительные λ-лизогенные клетки (*cIts*857). Клетки, несущие эту плазмиду, выращивают до поздней логарифмической фазы при 32 °С, после чего температуру повышают до 42 °С. В результате сдвига температуры инактивируется продукт гена *c*I и включается промотор p_L. Плазмида pPLa8 имеет структуру, сходную со структурой плазмиды pPLa2311, за исключением того, что в первой в *Pst*I-сайт вставлен *Bam*HI-линкер (Remaut et al., 1981).

12.2), который в нормальных условиях продуцируется бактериофагом λ в малых количествах и подвергается быстрой деградации.

Плазмида содержит *Hpa*I-сайт, расположенный через 321 пару оснований после начала транскрипции бактериофага λ (рис. 12.2). Если ген *c*II бактериофага λ клонируется в этом сайте в правильной ориентации, то лизогенная клетка (в которой резидентный профаг производит λ-репрессор) может транс-

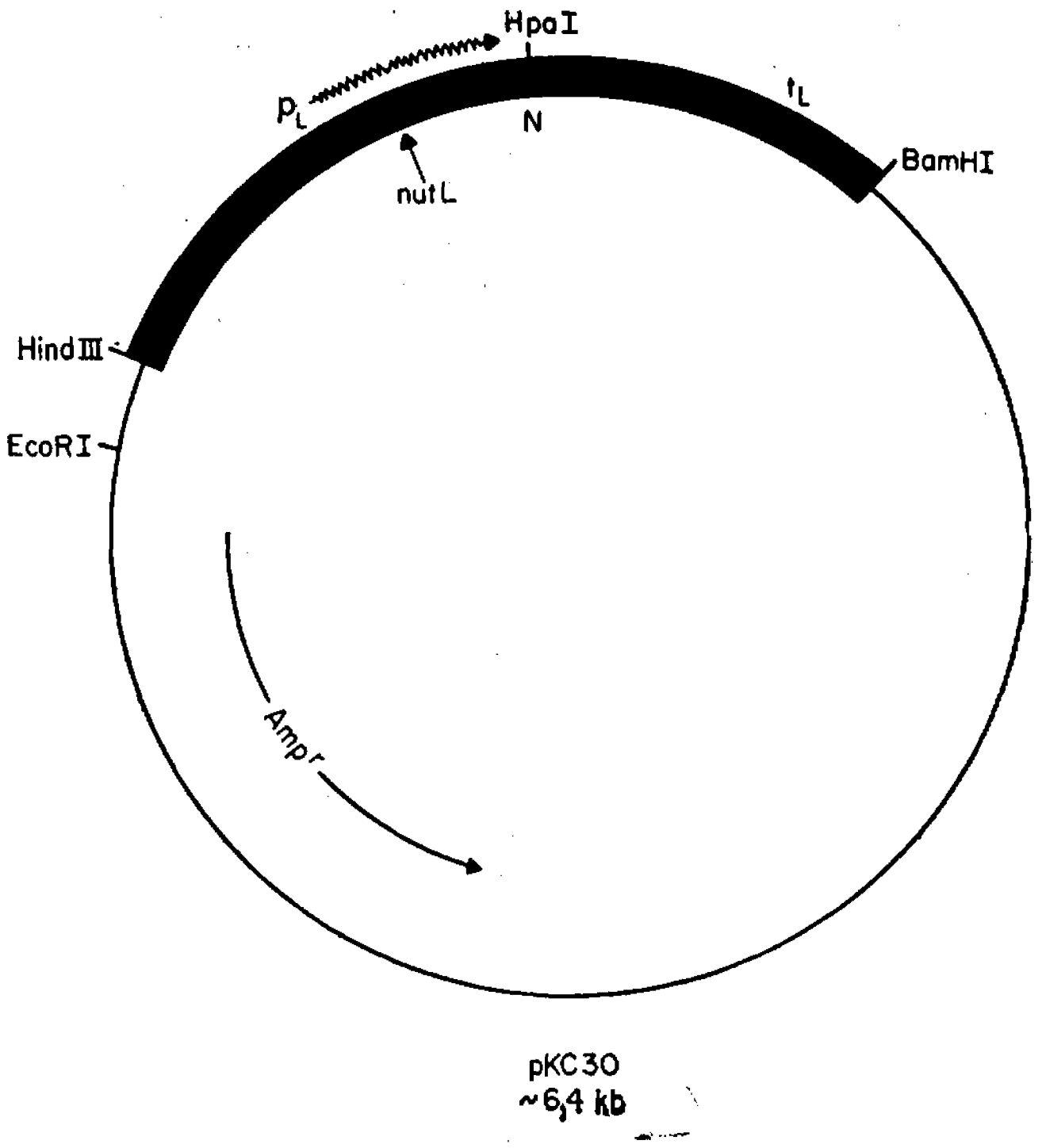


Рис. 12.2. Плазмида pKC30 длиной ~6,4 kb, имеющая промотор p_L бактериофага λ и сайт рестрикции для *Hpa*I, который расположен на расстоянии 321 нуклеотида после сайта начала транскрипции p_L. Эта плазмида является производной плазмиды pBR322 и содержит фрагмент *Hind*III—*Bam*HI (широкая черная линия), взятый из ДНК бактериофага λ и вставленный между сайтами *Hind*III и *Bam*HI в границах гена устойчивости к тетрациклину. Вставка содержит промоторный сигнал p_L, сайт узнавания для продукта гена *N* (*nut*L), сам ген *N* и сильный, зависимый от ρ сигнал терминации транскрипции t_L. *Hpa*I-сайт лежит в пределах кодирующей области *N*-гена. Последовательности, вставленные в *Hpa*I-сайт, могут регулироваться при введении рекомбинантной плазмиды в температурочувствительные λ-лизогенные клетки (*cIts*857). Клетки выращивают до поздней логарифмической фазы при 32 °C, а затем температуру поднимают до 42 °C, чтобы инактивировать продукт гена *c*I и включить промотор p_L. Представленный вектор использован для синтеза белка λ*c*II, достигшего такого уровня, что этот белок составлял 4% суммарного белка клетки (Shimatake, Rosenberg, 1981).

формироваться с высокой эффективностью, а нелизогенная вообще не может трансформироваться (Shimatake, Rosenberg, 1981). В нелизогенной клетке отсутствует репрессор *c*I, подавляющий синтез продукта гена *c*II, а конститутивный синтез больших количеств этого белка оказывается летальным для *E.coli*. Тот факт, что лизогенная клетка, несущая плазмиду, не гибнет, показывает, что интегрированная копия бактериофага

λ производит достаточное количество репрессора, чтобы снизить экспрессию гена *c*II до нелетального уровня.

Продукт гена *c*II, находящегося в плазмиде, можно получить в больших количествах (до 4% суммарного клеточного белка), если повысить температуру в культуре лизогенных клеток, содержащих дефектный профаг с температурочувствительной мутацией в репрессорном гене (λ*c*I*ts*857). Для интенсивной продукции белка *c*II необходим также продукт гена *N* бактериофага λ. Возможно, *N*-белок блокирует терминацию транскрипции в ρ-зависимом сайте терминации транскрипции t_{RI}, расположенном на карте перед геном *c*II (гл. 1).

Другие промоторы

Экспрессия клонированных генов в бактериях может контролироваться и другими промоторами.

1. Ген *ompR* кодирует белок, участвующий в позитивной регуляции. Этот белок контролирует экспрессию гена *ompF*, детерминирующего основной белок наружной мембраны *E.coli*. Выделен холодочувствительный штамм с мутацией в гене *ompR*. В клетках этого штамма транскрипцию промотора *ompF* можно активировать повышением температуры культивирования (Silhavy, личное сообщение).

2. Промотор *trp* регулируется репрессором *trp* и может индуцироваться добавлением в среду культивирования 3-индолилуксусной кислоты (Morse et al., 1970) или голоданием по триптофану (Miller, Reznikoff, 1978).

3. *lac*-Промотор регулируется *lac*-репрессором и может индуцироваться добавлением в бактериальную культуру индуктора — изопропил-β-D-тиогалактозида (IPTG) (Miller, Reznikoff 1978).

4. Наконец, сконструирован гибридный промотор, состоящий из области *trp*-35, присоединенной к области *lac*-10 и *lac*-оператору (de Boer et al., 1982). Этот сильный гибридный промотор *trp-lac* (или *lac*-промотор) регулируется *lac*-репрессором.

Как указывалось выше, при помещении гена, не имеющего сильного промотора, после одного из перечисленных или других сильных промоторов *E.coli* в клетках наблюдается усиленный синтез белка, кодируемого этим геном (Selker et al., 1977; Backman, Ptashne, 1978).

УЧАСТКИ СВЯЗЫВАНИЯ РИБОСОМ

Чтобы получить высокие уровни экспрессии генов в клетках *E.coli*, необходимо использовать не только сильные промоторы, позволяющие производить большие количества мРНК, но и участки связывания рибосом, которые могли бы обеспечить

эффективную трансляцию. У *E.coli* участок связывания рибосомы включает инициирующий кодон (AUG) и последовательность из 3—9 нуклеотидов, расположенную на 3—11 нуклеотидов перед инициирующим кодоном (Shine, Dalgarno, 1975; Steitz, 1979). Эта последовательность, называемая SD-последовательностью (SD — первые буквы фамилий исследователей Shine и Dalgarno), комплементарна 3′-концу 16S-рРНК *E.coli*. Предполагают, что связывание рибосомы с мРНК достигается путем спаривания SD-последовательности мРНК и соответствующей последовательности на 3′-конце 16S-рРНК (Steitz, 1979).

На эффективность трансляции мРНК влияют следующие факторы.

1. Степень комплементарности между SD-последовательностью и 3′-концом 16S-рРНК.

2. Расстояние и, возможно, характер последовательности между SD-последовательностью и кодоном AUC (Roberts et al., 1979 a, b; Guarente et al., 1980 a, b). Удалось измерить уровень экспрессии генов в плазмидах в условиях, когда указанное расстояние постепенно изменяется, и определить оптимальное расстояние между SD-последовательностью гена *trpL* и триплетом ATG двух генов (Goeddel, неопубликованные данные). При сравнении различных мРНК было обнаружено, что в области, занимающей положение от —20 до +13 (за нулевую позицию был принят А в кодоне AUG), имеются статистически предпочтительные последовательности (Gold et al., 1981). Показано также, что лидерные последовательности сильно влияют на трансляцию (Roberts et al., 1979 a, b).

3. Нуклеотид, следующий за триплетом AUG; он влияет на связывание рибосом (Taniguchi, Wessman, 1978).

ЭКСПРЕССИЯ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ ГЕНОВ

Многие векторы, описанные ниже, сконструированы для того, чтобы поместить гены вслед за промотором. Однако для эффективной экспрессии эукариотического гена требуется также наличие в ДНК бактерии участка, ответственного за связывание рибосом. Эту проблему решают следующими двумя путями.

Векторы, экспрессирующие гены несоставных эукариотических белков

Первый метод обеспечения бактериальным участком связывания рибосом включает синтез белка, который инициируется в триплете AUG эукариотической мРНК и не содержит бактериальных последовательностей на своем NH_2-конце. Для этого вначале вставляют сайт рестрикции непосредственно перед

триплетом ATG гена, подлежащего экспрессии, а затем клонируют ген в аналогичном сайте рестрикции, следующем сразу за SD-последовательностью (Goeddel et al., 1979 a, 1980 b; Edman et al., 1981).

В результате образуется «гибридный» участок связывания рибосом (Backman, Ptashne, 1978), состоящий из бактериальной SD-последовательности и триплета ATG гена, подлежащего экспрессии. Синтезируемый при этом белок не является составным. Если последовательность ДНК, подлежащая экспрессии, не содержит кодона ATG, его следует включить химическим путем (Goeddel et al., 1979 a; Davis et al., 1981).

Например, зрелая форма гормона роста человека (HGH) не начинается с метионина, потому что в норме он синтезируется в виде предшественника с сигнальным пептидом на NH_2-конце, отщепляемым при секреции. Чтобы сконструировать плазмиду, ответственную за образование зрелой формы HGH в *E. coli,* в вектор, содержащий *Eco*RI-сайт непосредственно после *lac*-промотора и SD-последовательности, вставляют химически синтезированную ДНК, содержащую *Eco*RI-сайт, кодон ATG и первые 24 кодона зрелого HGH (наряду с кДНК, кодирующей остальную часть HGH). SD-последовательность отделена от химически синтезированного ATG одиннадцатью парами оснований, образовавшимися при лигировании *Eco*RI-концов. Сконструированная плазмида детерминирует синтез HGH под контролем *lac*-промотора.

Другой способ введения кодона ATG в клонируемый ген и образования бактериального участка связывания рибосом заключается в использовании вектора pAS1, описанного ниже. В этом векторе промотор λp_L, SD-последовательность λcII и кодон ATG непосредственно соединяются с концом эукариотического гена (кодирующего NH_2-конец белка, подлежащего экспрессии).

Экспрессия гена будет эффективной, если расстояние между бактериальной SD-последовательностью и кодоном ATG эукариотического гена является оптимальным (см. обзор Guarente et al., 1980 a). Существует метод, обеспечивающий оптимальное размещение промоторного фрагмента (Roberts et al., 1979 a, b). Его сущность кратко заключается в следующем. Уникальный сайт рестрикции размещают в плазмиде перед инициирующим кодоном на расстоянии 100 пар оснований. Затем плазмидную ДНК расщепляют по этому сайту и обрабатывают экзонуклеазой в разной степени. После этого в плазмиду вставляют фрагмент ДНК, несущий промотор и SD-последовательность. В результате образуется серия плазмид, содержащих SD-последовательность на разных расстояниях от инициирующего кодона. При этом используются специальные фрагменты ДНК, получившие название «портативные промоторные фрагменты». В их

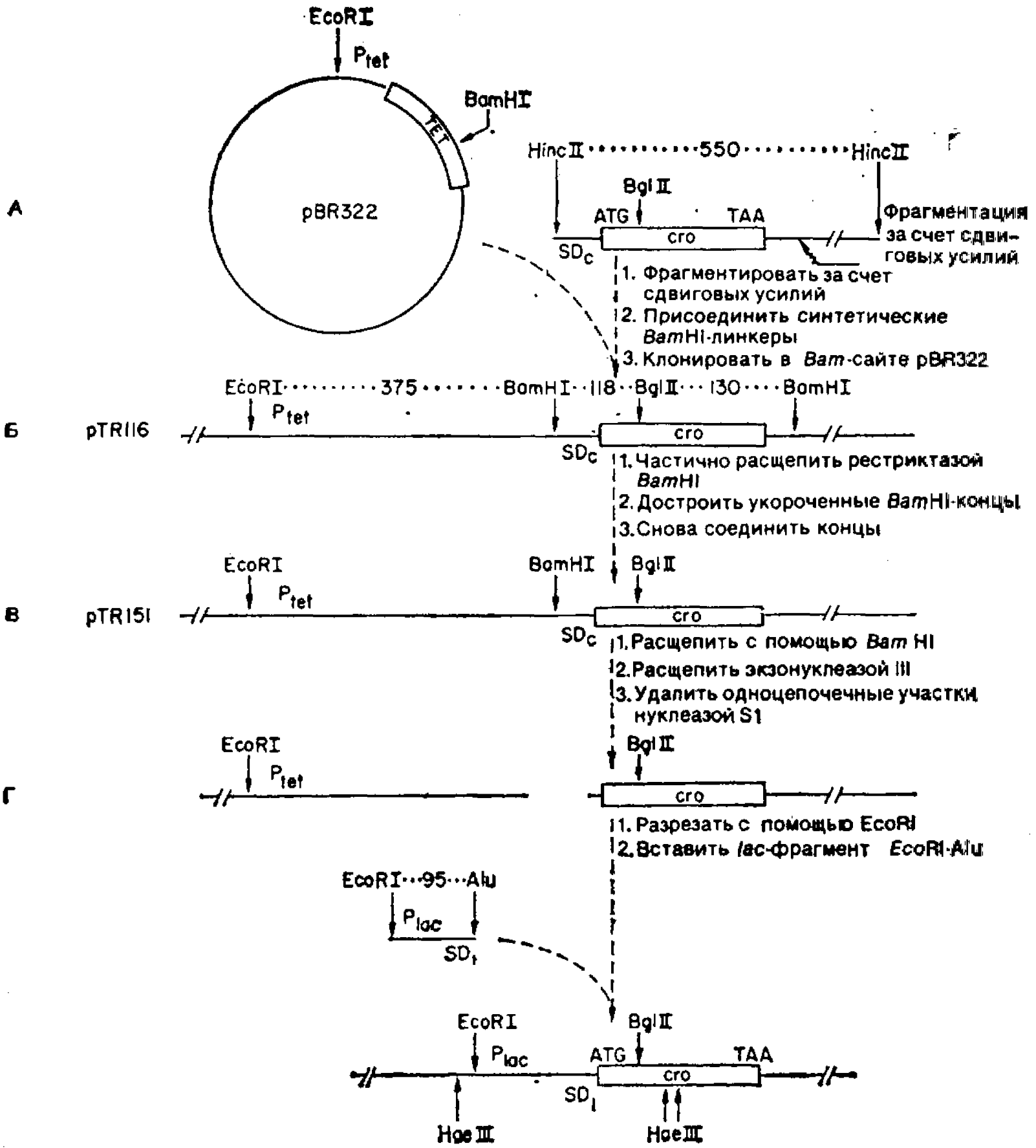


Рис. 12.3. Схема эксперимента с использованием портативного промотора. Показано приблизительное положение некоторых сайтов рестрикции для плазмиды pBR322, для фрагмента ДНК, несущего ген *cro* фага λ, и для фрагмента ДНК, несущего промотор *lac*-оперона (о получении этого фрагмента см. Backmann, Ptashne, 1978). Указано положение промоторов *tet* и *lac*, а также генов *tet* и *cro*. SD_c и SD_l обозначают последовательности Шайна—Дальгарно в генах *cro* и *lacZ* соответственно. AUG и UAA обозначают сигналы начала и конца трансляции белка *cro*. Расстояния указаны в парах оснований. *А*. Фрагмент ДНК, несущий ген *cro*, укорачивают за счет сдвиговых усилий с целью удаления ряда контрольных элементов λ вблизи 3′-конца гена, и более мелкий фрагмент вставляют в сайт *Bam*HI плазмиды pBR322 с помощью *Bam*HI-линкеров. *Б*. Элиминация *Bam*HI-сайта вблизи от конца гена *cro*, кодирующего карбоксильный конец белка. *В*. Плазмиду расщепляют по сайту *Bam*HI и разные количества ДНК удаляют обработкой экзонуклеазой III и нуклеазой S1. *Г*. Частично укороченную плазмиду разрезают в сайте *Eco*RI и в нее вставляют *lac*-промотор (несущий мутацию uv5, наделяющую его независимостью от катаболитного активатора) путем лигирования по липким *Eco*RI-концам и тупым концам (*Alu*-конец *lac*-промотора и тупой конец укороченной плазмиды). Эффективность этапов *В* и *Г* довольно высокая — около 200—400 плазмид из 1 мкг плазмиды pTP151 (по Roberts et al., 1979a, с модификациями).

число входит фрагмент, содержащий портативный промотор *lac*uv5 и SD-последовательность гена *lacZ* и используемый для экспрессии некоторых прокариотических и эукариотических генов в *E. coli* (рис. 12.3) (Backman, Ptashne, 1978; Roberts et al., 1979 b; Guarente et al., 1980 a,b; Taniguhi et al., 1980 b).

Ниже обсуждается ряд других векторов, используемых для продуцирования эукариотических белков, не соединенных с бактериальными пептидами.

p*tac* 12

Плазмиду p*tac*12, которая содержит гибридный промотор *tac* (рис. 12.4), можно использовать таким же образом, как портативный промотор *lac*uv5 (Amann, Brosius, личное сообщение). Однако промотор *tac* эффективнее промотора *lac*uv5; его следует использовать в штамме бактерий, содержащем мутацию в гене *lac*I, которая вызывает сверхпродукцию *lac*-репрессора (*lac*I^q). Но даже в таком штамме транскрипция с промотора *tac* и обычного промотора *lac* в присутствии многих копий плазмиды полностью не репрессирована (обсуждение см. в работе de Boer et al., 1982).

Поскольку экспрессия некоторых чужеродных белков невыгодна для *E. coli*, целесообразно довести экспрессию чужеродного гена до максимума с помощью портативного промотора *lac*, а затем использовать плазмиду с оптимальным расстоянием между SD-последовательностью и ATG для конструкции производной плазмиды, несущей более сильный промотор *tac*. Лучше всего этого достигают путем использования рестриктазы *Hpa*II для выделения фрагмента ДНК (в нем закодированы прибнов-бокс и лидерная последовательность *lac*, а также часть кодирующей области гена) из плазмиды, в которой промотор *lac*uv5 находится перед эукариотическим геном. Этот фрагмент затем вставляют в *Cla*I-сайт плазмиды pEA300 (рис. 12.5; Amann, Brosius, личное сообщение). Таким образом *lac*-промотор заменяется промотором *tac* без изменения лидерной последовательности или расстояния между SD-последовательностью и ATG. Плазмида pEA300 несет сигналы терминации транскрипции от оперона *rrnB*, расположенного после того сайта, в который вставлен ген.

p*trpL* 1

Плазмида p*trpL*1 несет другой портативный промоторный фрагмент, который можно использовать таким же образом, как портативные промоторы *lac* и *tac* (рис. 12.6) (Edman et al., 1981).

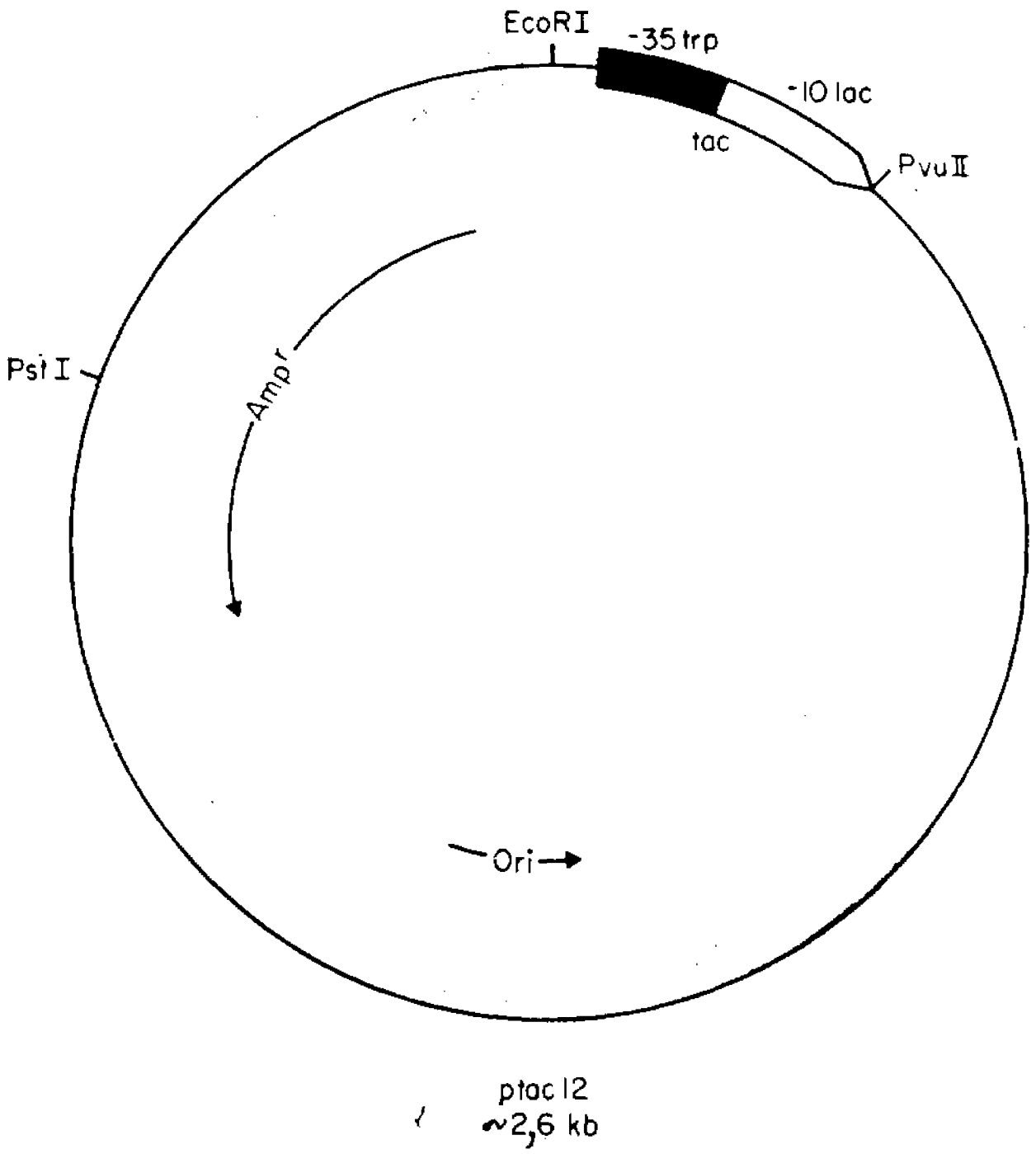


Рис. 12.4. Плазмида p*tac*12 длиной ~2,6 kb, имеющая портативный гибридный промотор *trp-lac(tac)* (Amann, Brosius, личное сообщение). Фрагмент (~260 пар оснований), содержащий промотор, выделен после расщепления этой плазмиды рестриктазами *Eco*RI и *Pvu*II. Эта ДНК кодирует *tac*-промотор и лидерные последовательности *lac*. Сайт *Pvu*II располагается на расстоянии 5 пар оснований за SD-последовательностью гена *lacZ*. Фрагмент портативного промотора вставлен впереди инициирующего кодона гена, подлежащего экспрессии (как показано на рис. 12.3). Промотор *tac* является сильным, поэтому, для того чтобы репрессировать транскрипцию, рекомбинантные плазмиды, содержащие портативный промотор, следует вводить в штамм *lacI*^{q}.

pAS1

В другой системе, применяемой для синтеза чужеродных белков, не соединенных с бактериальными пептидами *E. coli*, используют вектор pAS1 (рис. 12.7; Shatzman, Rosenberg, личное сообщение), который несет не только промотор (λp_L) и SD-последовательность, но и кодон ATG, отстоящий от SD-последовательности на обычном расстоянии, таком же, как в гене λ*c*II. Поэтому данный вектор особенно полезен для экспрессии эукариотических последовательностей, не имеющих кодона ATG. Плазмиду pAS1 расщепляют по сайту *Bam*HI и инкубируют в присутствии нуклеазы из золотистой фасоли для

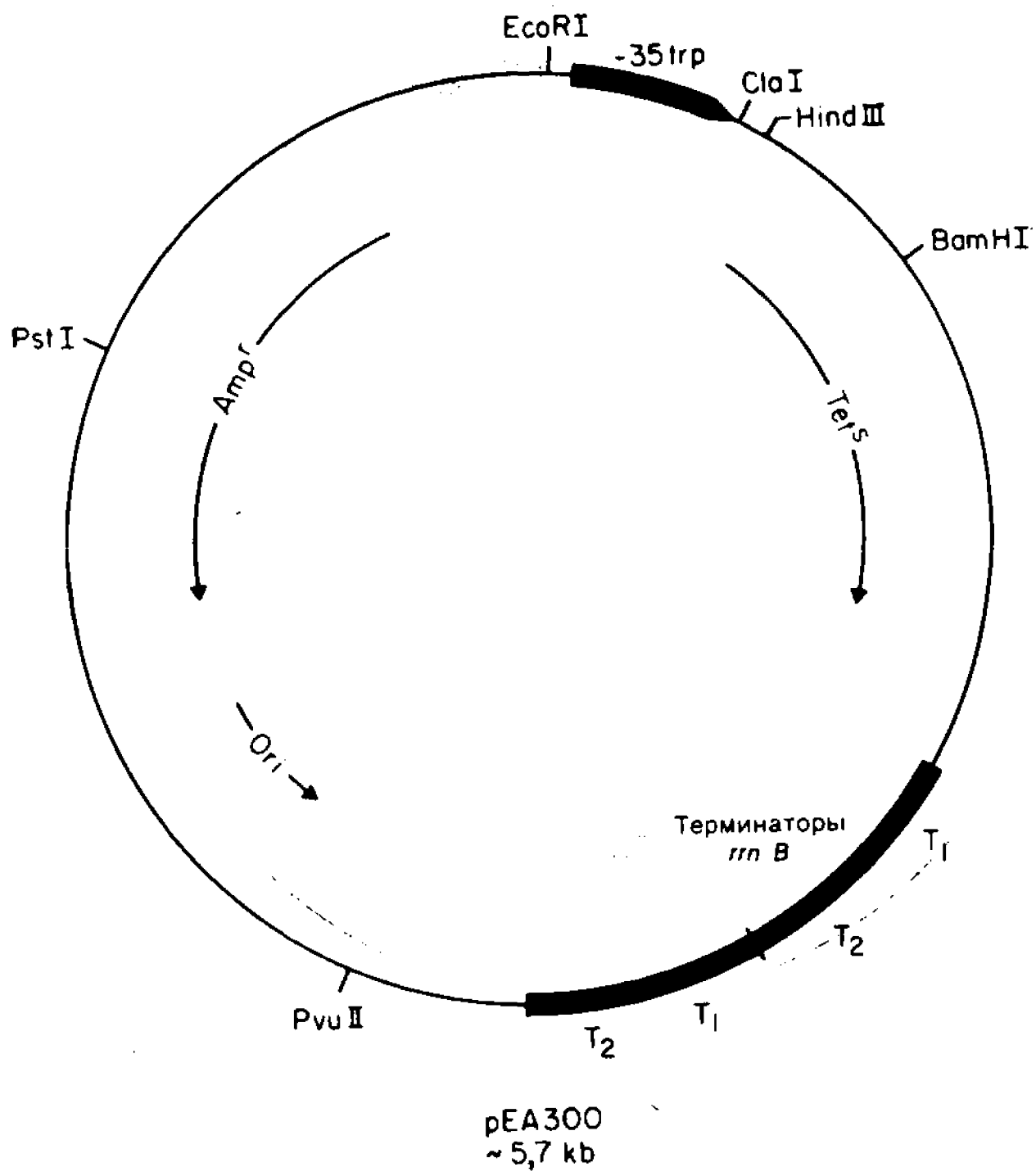


Рис. 12.5. Плазмида pEA300 длиной ~5,7 kb, содержащая фрагмент последовательностей *trp* из 192 пар оснований, клонированный в *Cla*I-сайте pBR322. Разрезая плазмиду рестриктазой *Cla*I и вставляя *Hpa*II-фрагмент, взятый из плазмиды, имеющей промотор *lac*uv5, конструируют промотор *tac*. Кроме того, pEA300 несет за промотором 2 фрагмента из 500 пар оснований, каждый из которых содержит по 2 терминатора *rrnB*, расположенных тандемно (Amann, Brosius, личное сообщение)

создания тупых концов непосредственно вслед за ATG. Этот ATG можно затем присоединить путем лигирования тупых концов к фрагменту ДНК, кодирующему белок, подлежащий экспрессии.

Данный метод требует создания тупого конца непосредственно перед определенным кодоном (Panayotatos, Truong, 1981; Shatzman, Rosenberg, личное сообщение). Эта задача решается следующим образом (рис. 12.8).

1. Вставьте два уникальных сайта рестрикции перед кодирующей последовательностью, подлежащей экспрессии.

Сайт 1 должен после расщепления рестриктазой дать выступающий конец длиной 4 нуклеотида; шестой нуклеотид этого сайта в конце концов станет первым нуклеотидом второго кодона белка, подлежащего экспрессии.

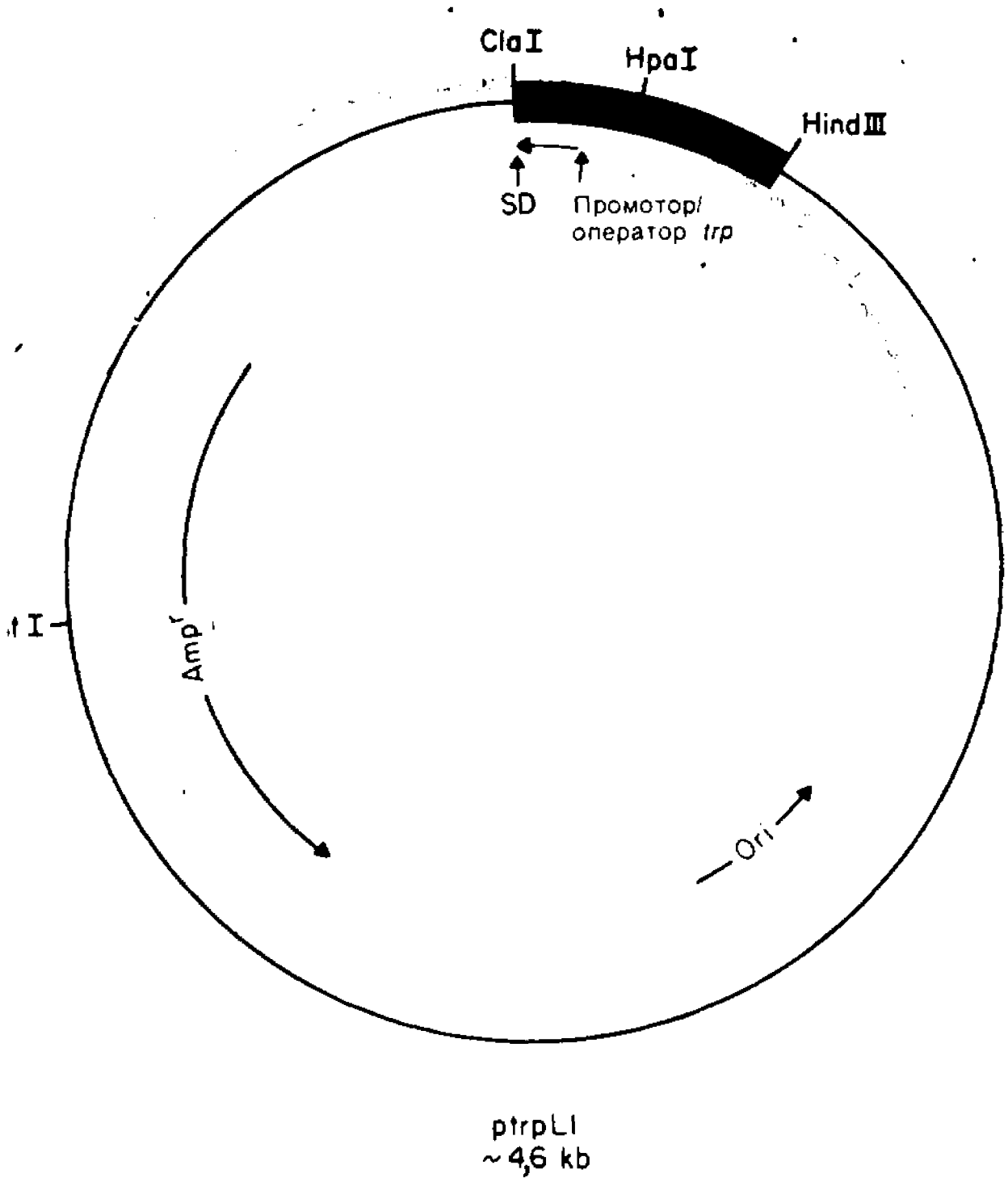


Рис. 12.6. Плазмида p*trpL*1 длиной ~4,6 kb, содержащая последовательность, которую можно использовать как портативный *trp*-промотор. Чтобы использовать промотор, плазмиду разрезают в *Cla*I-сайте (3 пары оснований за SD-последовательностью *trpL*). После заполнения выступающих концов с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы плазмиду расщепляют рестриктазой *Hind*III и выделяют промоторный фрагмент. Его можно поместить впереди гена, подлежащего экспрессии. Плазмиду можно также прямо использовать в качестве вектора для экспрессии, вставляя в ее *Cla*I-сайт фрагмент ДНК, включающий в себя сайт рестрикции, расположенный сразу перед кодоном ATG гена, подлежащего экспрессии, и кодирующую последовательность этого гена (Edman et al., 1981).

Сайт 2 должен лежать между сайтом 1 и началом гена, располагаясь ближе к началу гена, чем к сайту 1.

2. Расщепите ДНК в сайте 2 и укоротите ее нуклеазой *Bal*31, чтобы образовалась популяция молекул, оканчивающихся вблизи от выбранного кодона.

3. Расщепите ДНК в сайте 1.

4. Репарируйте ДНК фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*, чтобы создать тупой конец, содержащий 5 из 6 нуклеотидов сайта рестрикции 1.

5. Вновь замкните ДНК в кольцо путем лигирования и

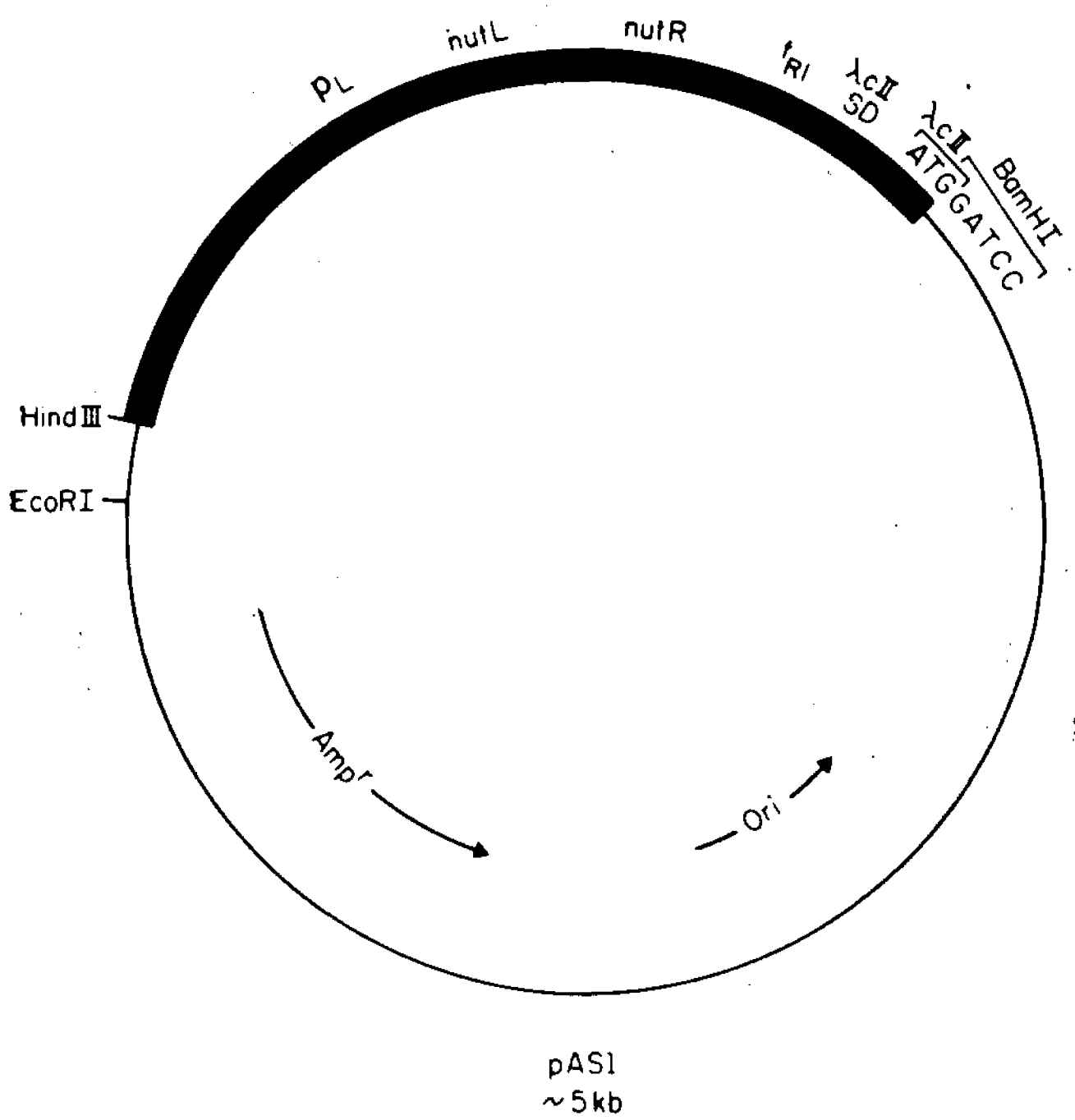


Рис. 12.7. Плазмида pAS1 длиной ~5 kb, содержащая промотор p_L бактериофага λ и единичный *Bam*HI-сайт, в который частично включен кодон ATG гена λ*c*II. Эта плазмида является производной плазмиды pKC30 (рис. 12.2), в *Hpa*I-сайт которой вставлен ген λ*c*II. Затем ген *c*II укорачивают обработкой экзонуклеазой до инициирующего кодона ATG (G в ATG является первым нуклеотидом *Bam*HI-сайта). Для экспрессии гена, не имеющего инициирующего кодона, pAS1 расщепляют рестриктазой *Bam*HI, а затем обрабатывают нуклеазой из золотистой фасоли, чтобы удалить выступающие одноцепочечные концы. Лигирование образующихся тупых концов с фрагментом ДНК, также содержащим тупые концы и начинающимся со второго кодона гена, подлежащего экспрессии, приводит к тому, что этот ген включается в рамку считывания с ATG. Гены, вставленные подобным образом, регулируются при введении рекомбинантной плазмиды в температурочувствительные клетки, лизогенные по фагу λ (*cIts*857). Клетки выращивают до поздней логарифмической фазы при 32 °C, после чего температуру повышают до 42 °C, чтобы инактивировать репрессор и включить промотор p_L. Вставленный ген может также регулироваться действием белка *N* на участки *nut*L и *nut*R путем снятия сигнала терминации в области t_{RI} (Shatzman, Rosenberg, личное сообщение).

используйте полученную плазмиду для трансформации бактерий к устойчивости к антибиотику.

6. Проведите скрининг индивидуальных колоний на присутствие плазмид с регенерированным сайтом рестрикции 1. Такая регенерация происходит тогда, когда случайно в результате действия нуклеазы *Bal*31 образуется молекула ДНК с концевой парой оснований, подходящей для завершения сайта 1.

В эту субпопуляцию попадут те плазмиды, последний нуклеотид которых является первым нуклеотидом второго кодона гена, подлежащего экспрессии.

7. Расщепите одну из этих плазмид в сайте 1 и обработайте ее нуклеазой из золотистой фасоли, чтобы образовался тупой конец, непосредственно предшествующий первому нуклеотиду второго кодона. Затем расщепите ее рестриктазой, атакующей сайт, расположенный за геном, чтобы получить фрагмент ДНК, который можно было бы вставить в плазмиду pAS1 после кодона ATG.

Векторы, с помощью которых экспрессируются гены составных эукариотических белков

Наблюдались случаи, когда последовательности эукариотической ДНК экспрессировались с образованием составного белка, NH_2-конец которого был закодирован прокариотическими, а карбоксильный конец — эукариотическими последовательностями. Хотя составные белки обычно менее желательны, чем неизмененные эукариотические белки, все же они имеют некоторые полезные свойства.

1. Многие из них более стабильны в бактериях, чем нативный эукариотический белок (Itakura et al., 1977; Goeddel et al., 1979 b; Davis et al., 1981).

2. Составной белок может секретироваться экспрессирующими бактериями, если эукариотическая ДНК присоединена к бактериальной последовательности, которая кодирует сигнальный пептид, обеспечивающий экспорт белков через мембрану (Talmadge et al., 1980). Правда, это было продемонстрировано только в одном случае.

3. Иногда составной белок можно подвергнуть химической обработке для того, чтобы высвободить эукариотический пептид в биологически активной форме (Goeddel et al., 1979 b; Shine et al., 1980).

4. Составные белки можно использовать как антигены (см., например, Kleid et al., 1981).

Рамка считывания транслируемых эукариотических последовательностей, подлежащих экспрессии, должна совпадать с рамкой считывания прокариотического гена, с которым соединяются эти последовательности. Ряд векторов содержит сайты, расщепляемые рестриктазами с образованием всех трех возможных рамок считывания прокариотической последовательности (Charnay et al., 1978; Talmadge et al., 1980; Tacon et al., 1980; Silhavy, личное сообщение). К другим векторам нужно присоединить синтетические линкеры, для того чтобы рамка считывания не нарушалась вставкой эукариотического гена (Shine et al., 1980). В любом случае ДНК, кодирующая ген,

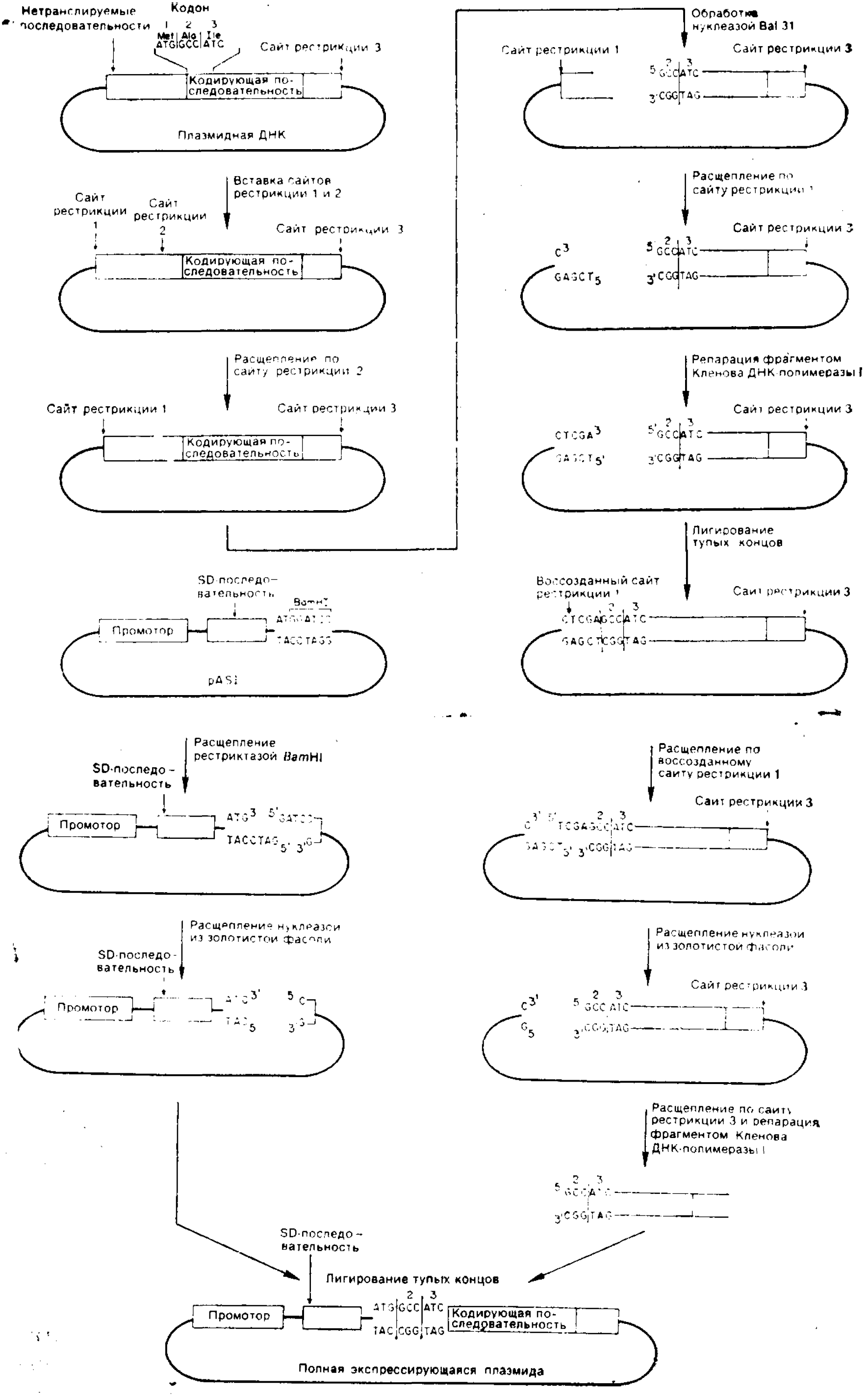


Рис. 12.8. Метод создания тупого конца непосредственно перед отдельным нуклеотидом в сегменте клонированной ДНК (детали см. в тексте на с. 0418).

подлежащий экспрессии, должна содержать сайт рестрикции, который можно было бы использовать для осуществления слияния; если такой сайт отсутствует, то его следует ввести путем экзонуклеазной обработки и последующего присоединения линкера.

pOP203-13

Плазмиду pOP203-13 (Fuller, 1981; рис. 12.9) используют для конструирования составных генов, продукты которых содержат только несколько аминокислот, закодированных прокариотической последовательностью (Fraser, Bruce, 1978). Вставка кодирующей последовательности, подлежащей экспрессии, в *Eco*RI-сайт pOP203-13 обеспечивает синтез составного

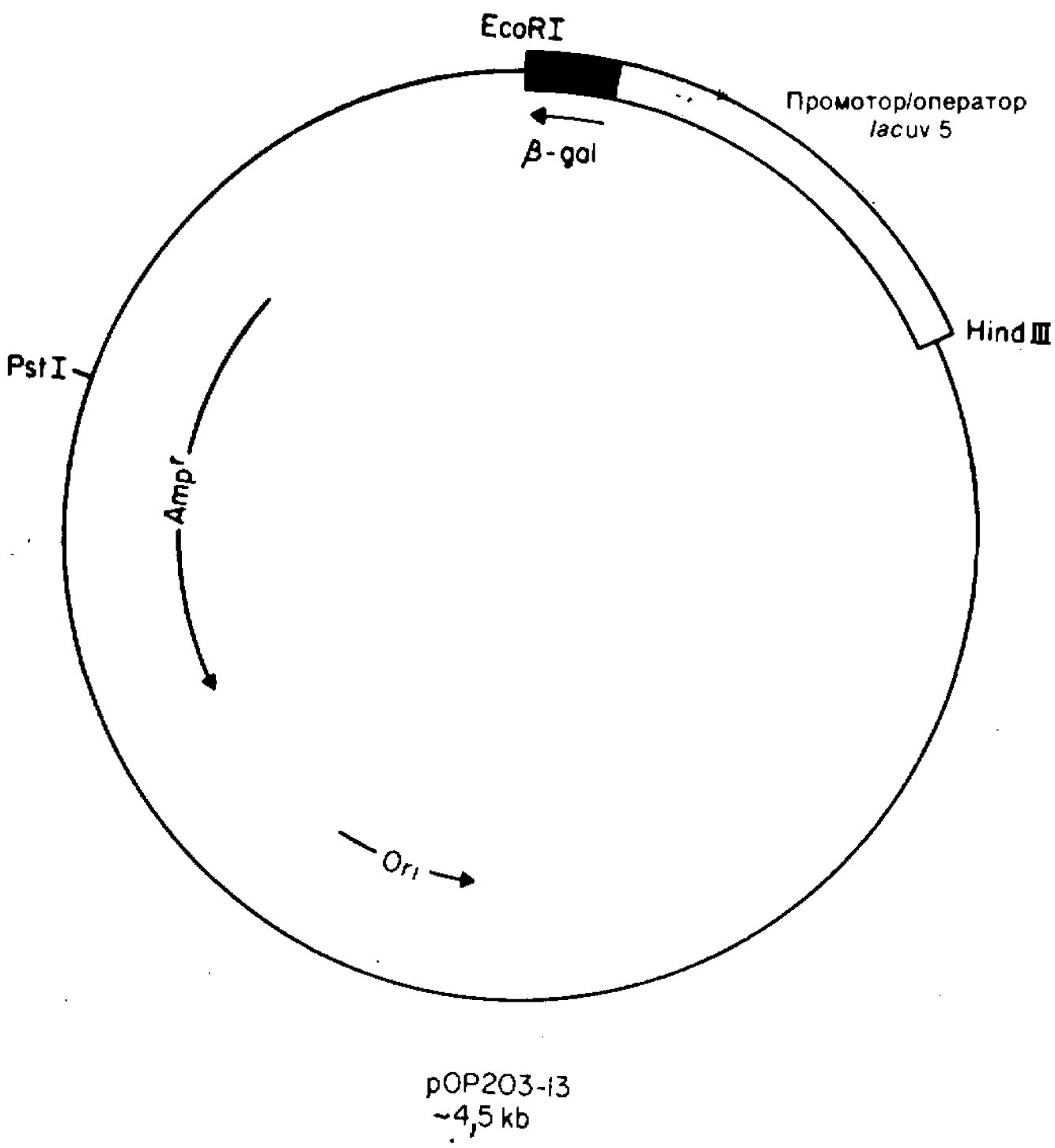


Рис. 12.9. Плазмида pOP203-13 длиной ~4,5 kb, содержащая промотор *lac*uv5 и единичный *Eco*RI-сайт. Последовательности, введенные в этот сайт с сохранением его рамки считывания, будут транслироваться с образованием составного белка, содержащего 7 аминокислот β-галактозидазы и несколько NH_2-концевых аминокислот, кодируемых *Eco*RI-линкером (Fuller, 1981). Эта плазмида использована для синтеза белка β-галактозидаза—овальбумин цыпленка (Fraser, Bruce, 1978) и белка β-галактозидаза—гемагглютинин вируса гриппа человека (Heiland, Gething, 1981).

белка, который содержит первые семь аминокислот β-галактозидазы, несколько аминокислот, кодируемых *Eco*RI-линкером, и аминокислоты эукариотического полипептида. Вектор для экспрессии имеет не только промотор *lac*uv5, который может регулироваться *lac*-репрессором в штамме *lac*I^q *E. coli*, но и участок связывания рибосом, заимствованный от гена *lacZ*. К синтезируемому белку, подлежащему экспрессии, добавляется лишь несколько аминокислот β-галактозидазы; поэтому составной белок, синтезируемый с участием этого вектора, больше напоминает нативный белок, чем составные белки, полученные с использованием векторов, описанных ниже. Плазмиду pOP203-13 использовали для синтеза в *E. coli* белка, состоящего из N-концевой последовательности β-галактозидазы и соединенного с ней большого сегмента гемагглютинина вируса гриппа (Heiland, Gething, 1981).

pLC24

Эта плазмида (рис. 12.10) содержит сильный промотор p_L бактериофага λ и направляет синтез составных белков, состоящих из 98 аминокислот полимеразы фага MS2 и полипептида, кодируемого последовательностью чужеродной ДНК, вставленной в сайты *Bam*HI или *Hin*dIII. С помощью плазмиды pLC24 синтезированы такие составные белки, как полимераза фага MS2 — интерферон фибробластов человека (Derinck et al., 1980) и полимераза фага MS2—VP1 вируса ящура (Küpper et al., 1981). Образование этих составных белков удобно контролировать, регулируя активность промотора p_L в лизогенных клетках, содержащих профаг λ*c*1*ts*857.

p*trp*ED 5-1

Эта плазмида (рис. 12.11) предназначена для синтеза гена составного белка, содержащего продукт гена *trpD* и чужеродный полипептид, кодирующая последовательность которого введена в *Hin*dIII-сайт гена *trpD* (Hallewell, Emtage, 1980). Плазмида p*trpED*5-1 была модифицирована таким образом, что чужеродные последовательности могли быть вставлены в любую из трех рамок считывания (Tacon et al., 1980). В присутствии аттенуатора *trp* транскрипция в условиях репрессии оказывается очень слабой; поэтому данная плазмида полезна для клонирования генов, продукты которых токсичны для *E. coli*. Составной белок, получаемый с помощью этого вектора, содержит около 15% последовательности полипептида *trpD*. Удлиненный полипептидный фрагмент *trpD* стабилен в клетках *E. coli*, возможно, потому что он ассоциирован с продуктом гена *trpE* (Hallewell, Entage, 1980). Стабильность составного

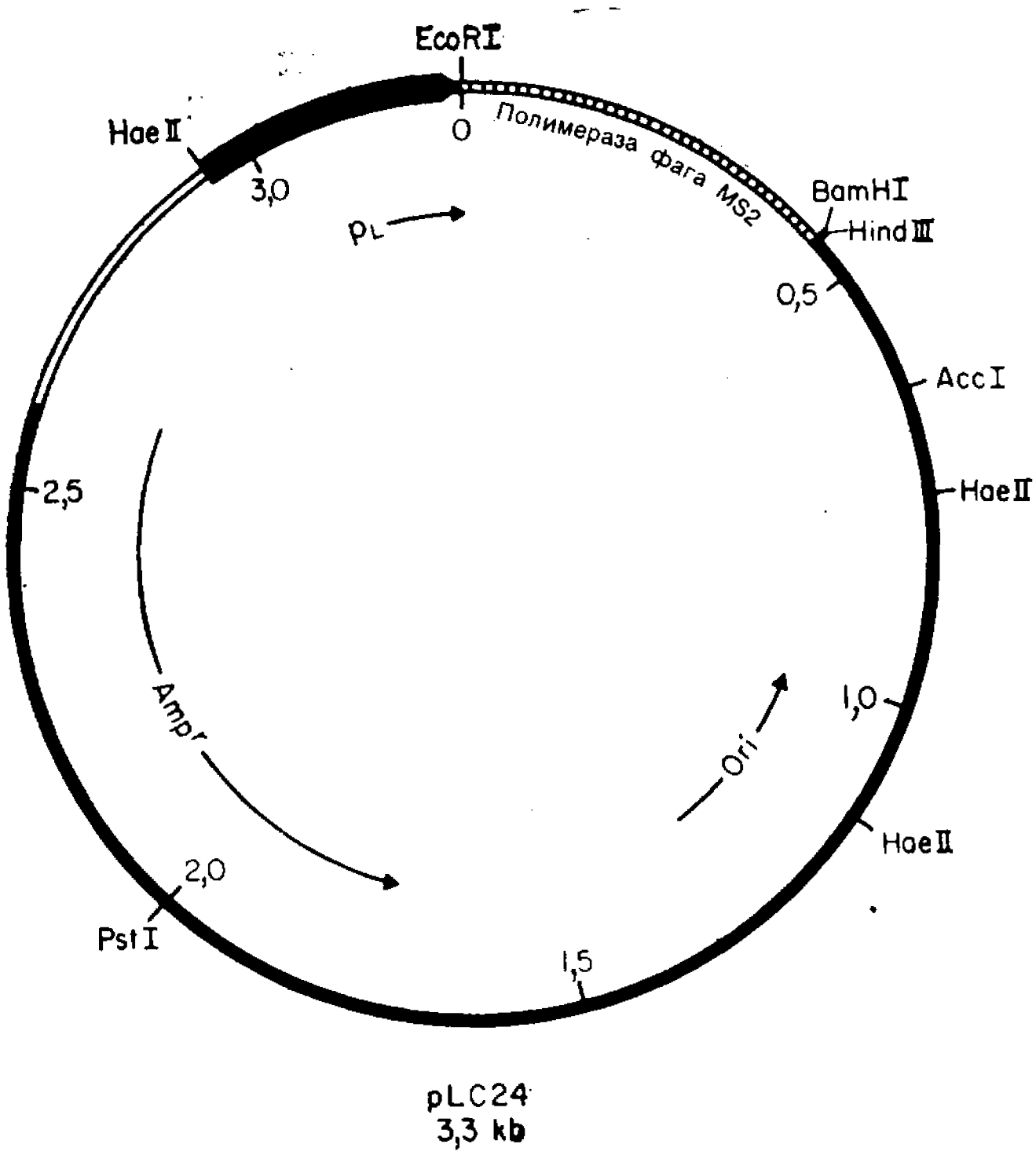


Рис. 12.10. Плазмида pLC24 длиной 3,3 kb, содержащая промотор p_L бактериофага λ и участок связывания рибосом полимеразного гена бактериофага MS2. Составной белок, содержащий 98 аминокислот полимеразы фага MS2, синтезируется, если чужеродный ген вставлен в рамку считывания в сайты *Bam*HI или *Hind*III. Как и в случае других плазмид, содержащих промотор p_L, вставленные гены могут регулироваться температурой в лизогенных клетках λ*cIts*857 (Remaut et al., 1981). Плазмида pLC24 использована для синтеза составных белков, образованных полимеразой фага MS2 и интерфероном фибробластов человека (Derynck et al., 1980), а также полимеразой фага MS2 и VP1 вируса ящура (Küpper et al., 1981).

белка, образованного в результате соединения полипептида *trpD* и продукта чужеродного гена, также можно объяснить ассоциацией с продуктом гена *trpE*.

pNCV

Два других вектора были созданы для обеспечения синтеза больших составных белков с целью стабилизации продуктов чужеродных генов. Один из них, плазмиду pNCV (рис. 12.12), использовали для производства стабильного гемагглютинина вируса гриппа человека (Davis et al., 1981) и антигенов VP3

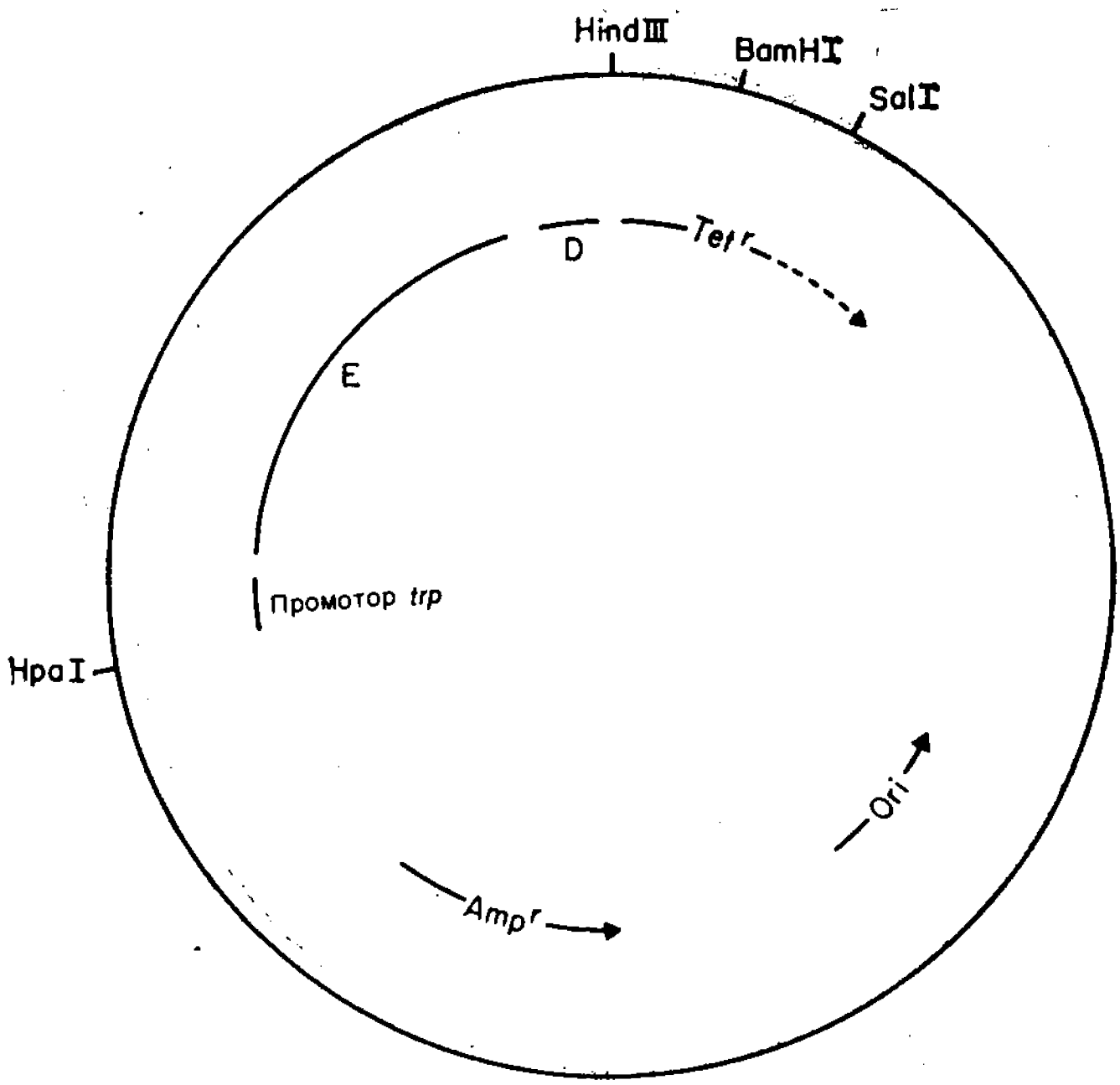


Рис. 12.11. Плазмида *ptrpED*5-1 длиной ~6,7 kb, содержащая *trp*-промотор и предназначенная для продукции составных белков, имеющих 15% (75 аминокислот) белка *trpD* на NH_2-конце. Индукция *trp*-оперона 3-индолилуксусной кислотой приводит по крайней мере к 50-кратному увеличению выхода продуктов *trp*-гена. В условиях репрессии белки *trp* (и любые составные белки, в которые они включены) синтезируются относительно слабо (в этой плазмиде имеется *trp*-аттенуатор). Для образования составных белков, относительно стабильных в *E. coli,* гены вводят в *Hind*III-сайт (Hallewell, Emtage, 1980). Для каждой из трех возможных рамок считывания существует отдельная плазмида (Tacon et al., 1980).

вируса ящура (Kleid et al., 1981). Стабильность была следствием соединения белка *trpLE,* кодируемого геном *trp*Δ*LE*1413, с вирусным белком (Goeddel et al., 1980 b). Вектор был сконструирован путем замены терминирующего кодона в *trpLE* на синтетическую ДНК, кодирующую два сайта рестрикции: *Eco*RI и *Pst*I. Последовательность, кодирующая чужеродный белок, может быть вставлена в один из этих сайтов. Вектор не имеет области *trp*-аттенуатора, в результате чего сильный *trp*-промотор всегда частично дерепрессирован, даже при наличии избытка триптофана в среде.

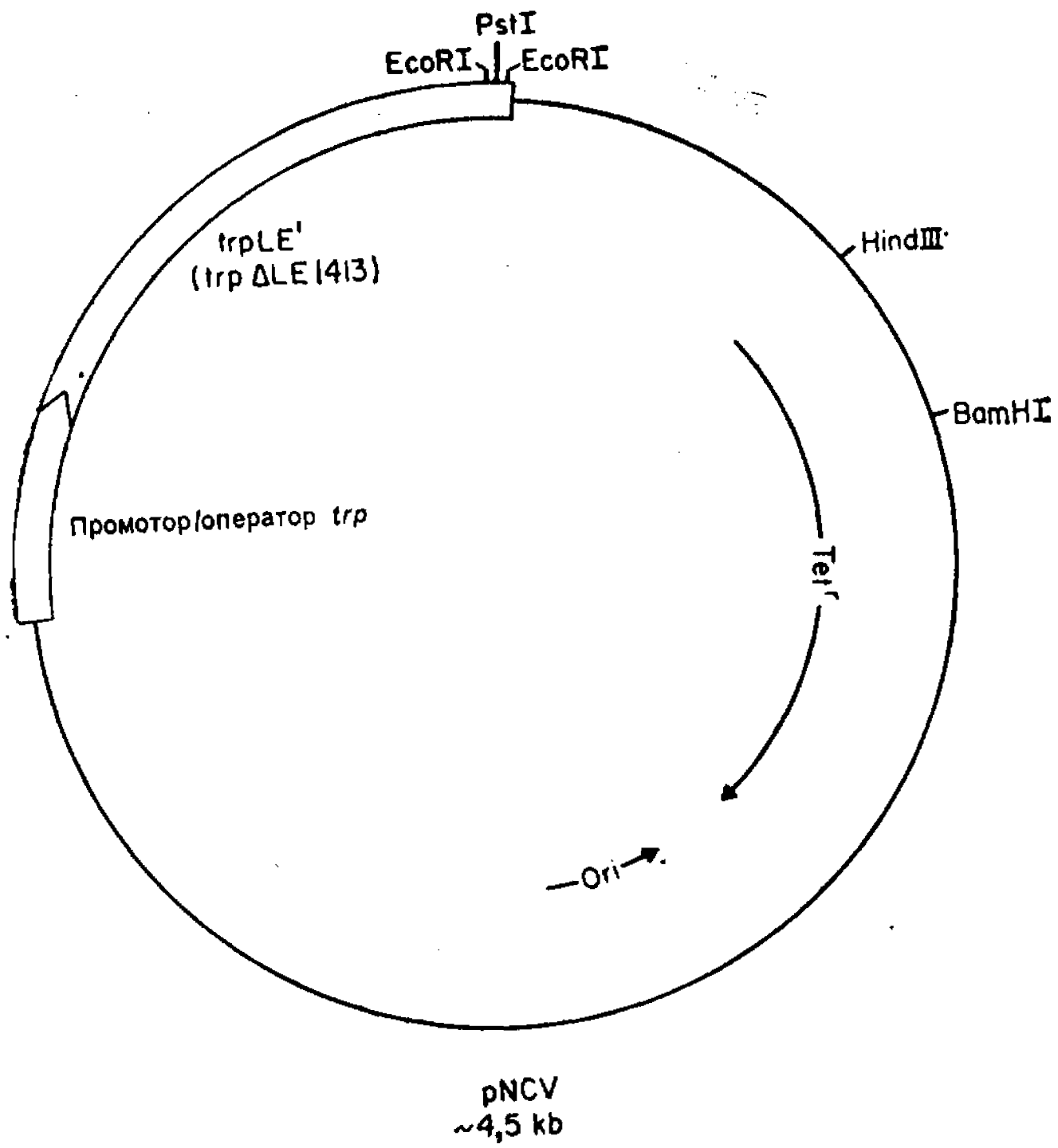


Рис. 12.12. Плазмида pNCV длиной ~4,5 kb, которая детерминирует синтез составных белков, содержащих бóльшую часть составного белка *trpLE*. Ген, представляющий интерес, может быть вставлен в уникальные сайты *Eco*RI и *Pst*I. *trp*-Промотор не содержит аттенуаторной области и частично индуцируется даже в присутствии триптофана. Данный вектор был использован для продукции стабильных составных белков, содержащих наряду с белком *trpLE* интерферон лейкоцитов человека (Goeddel et al., 1980b), гемагглютинин вируса гриппа человека (Davis et al., 1981) и VP3 вируса ящура (Kleid et al., 1981).

pβ-*gal*13C

Еще одним вектором для экспрессии, в котором для стабилизации чужеродных генных продуктов используется большой составной белок, является плазмида pβ-*gal*13C (рис. 12.13; Goeddel et al., 1979b). Последовательности чужеродной ДНК клонируются в единичном *Eco*RI-сайте гена *lacZ*, поэтому чужеродный белок присоединяется к первым 1005 аминокислотам β-галактозидазы (Goeddel et al., 1979b). Этот же вектор использован для синтеза гибридного белка, состоящего из β-галактозидазы и β-эндорфина (Shine et al., 1980).

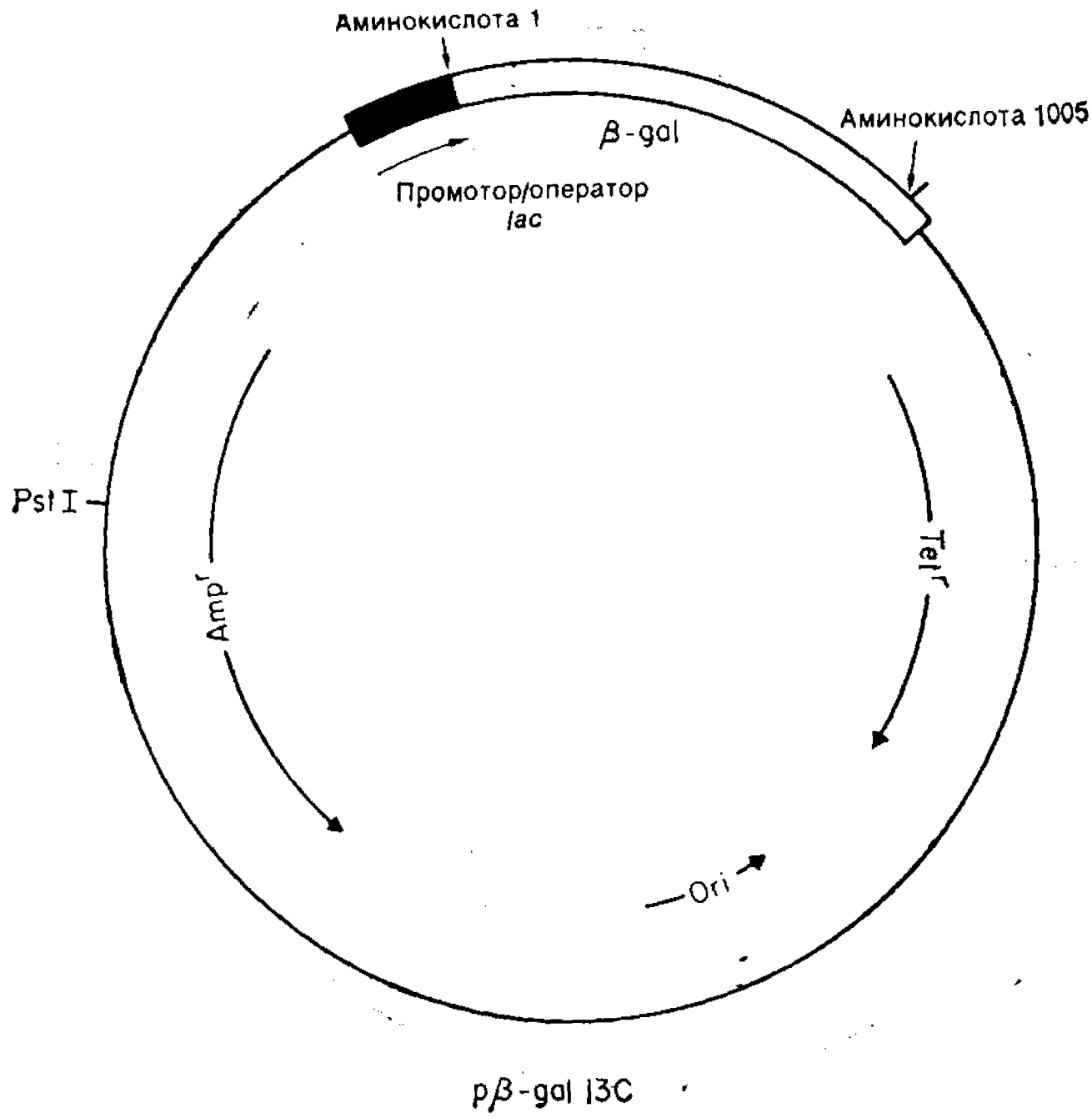


Рис. 12.13. Плазмида pβ-*gal*13C длиной ~7 kb, содержащая крупный фрагмент гена *lacZ*, кодирующего β-галактозидазу. Вставка фрагментов ДНК в рамку считывания единственного *Eco*RI-сайта может обеспечить образование более стабильного белка, чем нативный эукариотический белок в бактериях. Векторы, предназначенные для экспрессии генов с образованием составных белков, содержащих на NH_2-конце 1005 аминокислот β-галактозидазы, использовали для получения составных белков, содержащих пептиды инсулина человека (Goeddel et al., 1979b), антигенные детерминанты гемагглютинина вируса гриппа человека (Davis et al., 1981), соматостатин (Itakura et al., 1977) и поверхностный антиген вируса гепатита B (Charney et al., 1980). Некоторые составные белки, содержащие β-галактозидазу, оказались нерастворимыми.

pKT287

Продолжается изучение вопроса о возможности использования составных белков для обеспечения выхода чужеродных белков из бактерий. Сконструирована серия векторов, в которых последовательности ДНК могут быть вставлены в каждую из трех рамок считывания сайта *Pst*I, расположенного в гене *bla* плазмиды pBR322 (рис. 12.14; Talmadge et al., 1980). На основании этих векторов можно получать составные белки, содержащие от 4 до 27 аминокислот NH_2-конца пенициллиназы. Первые 23 аминокислоты, закодированные геном *bla*, составляют сигнальный полипептид β-лактамазы. Нуклеотидная последовательность, детерминирующая проинсулин, и соеди-

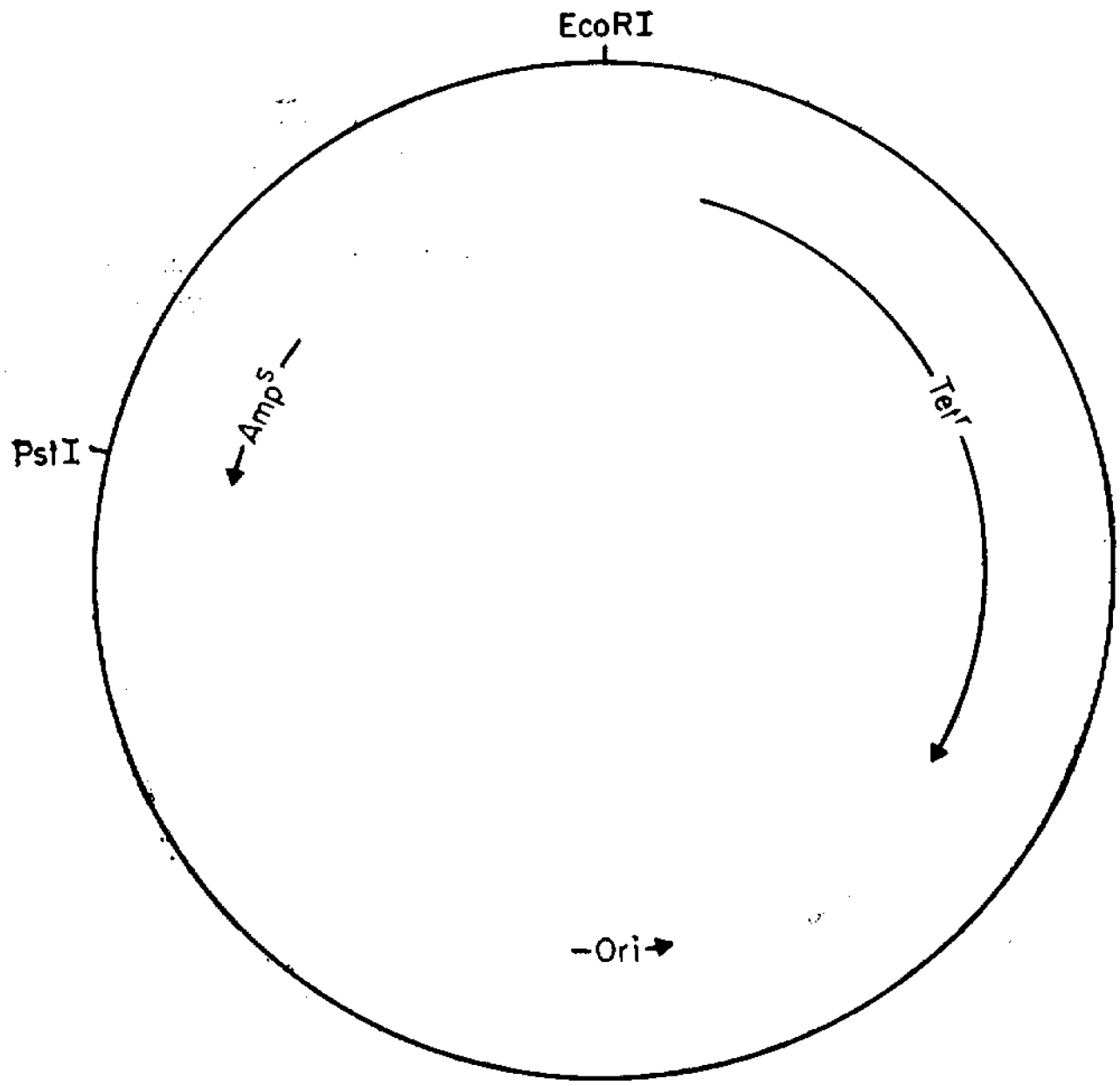


Рис. 12.14. Плазмида pKT287 длиной ~4 kb, содержащая промотор β-лактамазного гена. Если ген вставлен в рамку считывания *Pst*I-сайта, то синтезируется составной белок, содержащий лидерную последовательность. Сконструированы также другие плазмиды, в которых *Pst*I-сайт расположен в разных положениях в пределах (или после) последовательностей, кодирующих сигнальный пептид. Эти плазмиды были созданы путем разрыва pBR322 по сайту *Pst*I, расщепления ДНК нуклеазой *Bal*31 и вставки линкера *Pst*I (Talmadge et al., 1980).

няющаяся с этим лидерным геном, отвечает за синтез белка, 50% (или больше) которого подвергается процессингу и секретируется в периплазму (Talmadge et al., 1980). Сигнальная последовательность, обычно свойственная проинсулину, функционирует и в клетках *E. coli,* обеспечивая секрецию проинсулина (Talmadge et al., 1981). Однако некоторые другие эукариотические белки, имеющие лидерные последовательности (например, пре-β-интерферон человека), не подвергаются процессингу в бактериях (Taniguchl et al., 1980 b).

pMH621

Этот вектор также можно использовать для секреции составных белков из бактерий (рис. 12.15; Hall, Silhavy, 1981 a, b; Silhavy, личное сообщение). Если в *Bgl*II-сайт вставить чуже-

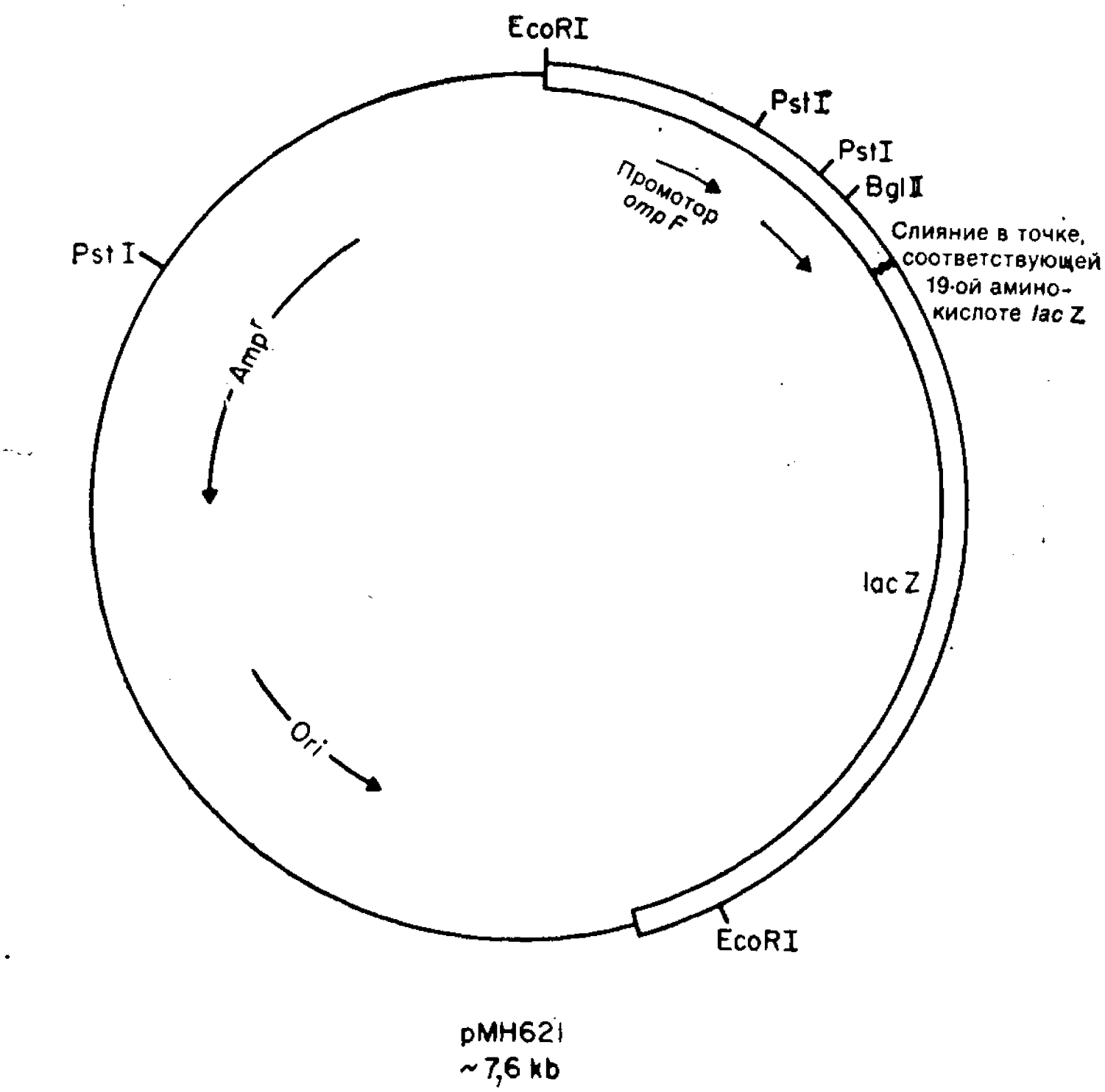


Рис. 12.15. Плазмида pMH621 длиной ~7,6 kb, содержащая *ompF*-промотор (*ompF* — это ген, кодирующий главный белок наружной мембраны, который присутствует в количестве до 100 000 копий на клетку). Вставки фрагментов в рамку считывания *Bgl*II-сайта сопровождаются синтезом составного белка, содержащего сигнальный пептид *ompF* и 12 NH_2-концевых аминокислот зрелого белка *ompF*. Возможно, такие составные белки переносятся на наружную мембрану *E. coli*. Промотор находится под позитивным контролем. Выделены мутанты, у которых экспрессия *ompF*-промотора регулируется сдвигом температуры [Silhavy, личное сообщение; основную информацию можно найти в работе (Hall, Silhavy, 1981a, b)].

родную кодирующую последовательность, то будет синтезироваться составной белок, имеющий сигнальную последовательность гена *ompF E. coli,* и двенадцатиаминокислотный полипептид зрелого белка *ompF,* присоединенный к чужеродному белку. В *Bgl*II-сайт плазмиды pMH621 было вставлено несколько полилинкеров (гл. 1), чтобы обеспечить возможность внедрения чужеродной ДНК с помощью разных сайтов рестрикции с сохранением правильной рамки считывания, а также возможность направленного внедрения ДНК. Этот вектор позволяет получить очень много составного белка, так как белок наружной

мембраны, кодируемый геном *ompF,* синтезируется в количестве, достигающем 100 000 копий на клетку. В штамме, имеющем холодочувствительную мутацию в позитивном регуляторном гене *ompR,* высокий уровень синтеза составного белка наблюдается только при повышенной температуре (минимальная экспрессия при 30 °С). Гибридные белки, вероятно, экспортируются из цитоплазмы, так как они содержат сигнальный полипептид *ompF.* Неизвестно, однако, достаточно ли наличия одного сигнального полипептида для обеспечения экспорта. По аналогии с уже описанным β-лактамазным вектором (pKT287) можно предположить, что плазмида pMH621 дает возможность продуцировать зрелые белки, лидерные последовательности которых подвергаются процессингу. Возможно, благодаря этой системе белки переносятся на поверхность клетки.

МАКСИМИЗАЦИЯ ЭКСПРЕССИИ КЛОНИРОВАННЫХ ГЕНОВ

Об интенсивности экспрессии чужеродного гена в клетках *E. coli* обычно судят по данным соответствующих функциональных (Struhl, Davis, 1977; Chang et al., 1978) или иммунологических определений (Broome, Gilbert, 1978; Heiland, Gething, 1981). Однако в тех случаях, когда пытаются довести синтез генного продукта до максимума, такие определения могут оказаться громоздкими и дорогостоящими. Чтобы преодолеть эту трудность в случае образования одного отдельного (несоставного) эукариотического белка, используют метод, в котором чужеродную ДНК присоединяют к соответствующему фрагменту гена *lacZ* (Guarente et al., 1980 b). Этот метод позволяет идентифицировать плазмиды, в которых клонированный ген эффективно транскрибируется и транслируется, даже если белок, кодируемый клонированным геном, не имеет определяемой активности. При этом используется плазмида pLG, содержащая ДНК *lacZ,* в которой закодирован ферментативно активный фрагмент карбоксильного конца β-галактозидазы. Сама β-галактозидаза не синтезируется, потому что плазмида не несет промотора и SD-последовательности этого гена. Ген, подлежащий экспрессии, присоединяется к 5′-концу гена *lacZ* с сохранением рамки считывания. Образующийся составной ген кодирует гибридный белок, который в большинстве случаев имеет β-галактозидазную активность, но не может экспрессироваться, так как не имеет промотора и SD-последовательности (если предшествующая последовательность взята из эукариотического гена). Перед составным геном можно в соответствующем месте поместить фрагмент портативного промотора. Оптимально расположенные фрагменты промотора должны обеспе-

чивать интенсивный синтез составного белка, обладающего β-галактозидазной активностью. Плазмиды с оптимально расположенными фрагментами промотора можно обнаружить, если после трансформации *Lac*⁻-бактерий отобрать клетки, обладающие β-галактозидазной активностью в чашках с лактозным индикатором. Затем эти плазмиды можно использовать для воссоздания неслившегося эукариотического гена, экспрессирующегося с высокой интенсивностью (Guarente et al., 1980 a, b).

УВЕЛИЧЕННАЯ ДОЗА ГЕНА

Если какой-либо ген экспрессируется с высокой интенсивностью, то фрагмент ДНК, содержащий промотор, участок связывания рибосом и этот ген, можно перенести в плазмиду, число копий которой достигает очень большой величины и без хлорамфениколь ной амплификации. С этой целью создан индуцируемый температурой вектор «безудержной репликации» pKN402 (Uhlin et al., 1979) — небольшая плазмида, производная R1*drd*19. Сконструировано несколько производных плазмиды pKN402, имеющих дополнительные сайты для клонирования, которые можно использовать для встраивания чужеродной ДНК (Bittner, Vapnek, 1981). Один из векторов, производных плазмиды pKN402, — вектор pAS2 — оказался особенно полезным для получения больших количеств белка, детерминируемого клонированным геном (Brent, Ptashne, 1981; Poteete, неопубликованные данные; Sancar, личное сообщение). В плазмиде pAS2 клонируется фрагмент ДНК, содержащий *lac*- или *lac*-промотор и экспрессируемый ген. Культуры штамма *lac*I^q, несущего плазмиду, несколько часов выращивали при 42 °С (за это время число копий плазмиды увеличивалось более чем до 1000 на клетку), а затем *lac*-репрессор инактивировали добавлением изопропил-β-D-тиогалактозида. С помощью этого метода получили очень большое увеличение выхода продукта клонированного гена. Подобным же образом можно использовать химерную плазмиду pKC16, состоящую из термоиндуцибельного бактериофага λ и ColE1 (Rao, Rogers, 1978). Плазмида pKC16 содержит гены устойчивости к ампициллину и канамицину, часть ДНК бактериофага λ (участки λ*N*, λ*P*, *ori* и ген λ*c*I*ts*857, кодирующий температурочувствительный репрессор) и сегмент ColE1, в который входят области репликации и иммунности. Когда температура в бактериальной культуре поднимается до 42 °С, включается транскрипция фага λ, работает система репликации λ и число копий плазмиды возрастает до 250 на клетку (Rao, Rogers, 1978). Таким способом удалось значительно увеличить выход экзонуклеазы III при клонировании гена *exo*III (Rao, Rogers, 1978).

РЕЗЮМЕ

Для осуществления эффективной транскрипции и трансляции клонированных генов созданы разнообразные векторы, часть из которых была рассмотрена выше. В этих векторах использованы сильные промоторы. В связи с тем что пока нет единого метода сравнительной оценки эффективности промоторов, выбор промотора в каждом случае является произвольным. Самая важная характеристика промотора, которую следует принимать во внимание, — способность регулировать транскрипцию, так как слишком интенсивный синтез генных продуктов может оказаться токсичным для клеток *E. coli*.

Известно несколько типов сигналов в ДНК, влияющих на эффективность трансляции. Если чужеродный ген экспрессируется с образованием нативного, отдельного белка, то для достижения эффективной трансляции необходимо: 1) чтобы кодон ATG этого гена находился на оптимальном расстоянии от бактериальной SD-последовательности [это расстояние подбирается эмпирически; обзор см. в работе (Guarente et al., 1980a)], 2) чтобы ген размещался позади SD-последовательности и его кодон ATG занимал вполне определенное расстояние от этой последовательности (см., например, Goeddel et al., 1979 a) или 3) чтобы ген был присоединен к кодону ATG, содержащемуся в векторе (Shatzman, Rosenberg, личное сообщение). Остается неизученным вопрос о том, будет ли влиять на экспрессию замещение нуклеотидов в области, отделяющей SD-последовательность от кодона ATG в участке связывания рибосом, и изменение последовательности ДНК, следующей за ATG. Известно только, что область ДНК, находящаяся между SD-последовательностью и кодоном ATG, влияет на количество синтезируемого белка (Backman, Ptashne, 1978).

Если нативный белок не стабилен в клетках *E. coli*, то желательно, чтобы генные продукты представляли собой части составного белка, особенно когда есть возможность отщепить нативный белок от очищенного составного белка химическим путем (см., например, Goeddel et al., 1979 b) или когда белок вызывает образование антител (см., например, Kleid et al., 1981). Некоторые белки стабилизируются в том случае, если они синтезируются в клетках *E. coli* в больших количествах (Shimatake, Rosenberg, 1981).

Векторы, в которых чужеродные гены присоединяются к ДНК, кодирующей сигнальный пептид, могут оказаться полезными для выведения (экспорта) белков из цитоплазмы, особенно если во время экспорта сигнальный пептид отщепляется. Экспорт белков может помочь при их последующей очистке, а также предохранить белки от цитоплазматических протеаз. Однако до сих пор не выяснены факторы, которые определяют

возможность секреции данного белка, соединенного с соответствующим лидерным пептидом.

В большинстве случаев экспрессия эукариотических генов в *E. coli* не достигает ожидаемого уровня. В дополнение к уже упомянутым факторам, влияющим на уровень экспрессии, можно назвать такие, как вторичная структура и стабильность мРНК, а также характер кодонов, участвующих в трансляции. Во всяком случае, весь комплекс условий, требующихся для оптимизации экспрессии, пока еще не выявлен, поэтому при необходимости получить экспрессию гена каждого нового белка исследователь сталкивается с новыми проблемами.

ПРИЛОЖЕНИЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ А. БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

В этом приложении мы собрали ряд биохимических методик, которые часто используются в молекулярном клонировании; они являются основой многих прописей, приведенных в книге.

СТЕКЛЯННАЯ И ПЛАСТМАССОВАЯ ПОСУДА

Всю стеклянную и пластмассовую посуду следует стерилизовать автоклавированием. Особенно важно иметь в наличии стерилизованные эппендорфовские пробирки и сменные наконечники для автоматических пипеток. Такую посуду можно использовать для всех процедур, обычно выполняемых при молекулярном клонировании; при этом значительной потери материала в результате абсорбции на ее поверхности не происходит. В некоторых случаях (например, при использовании очень малых количеств одноцепочечной ДНК или при определении нуклеотидной последовательности по методу Максама — Гилберта) рекомендуется использовать стеклянную или пластмассовую посуду, покрытую тонкой пленкой силикона. Ниже приведена простая методика силиконирования небольших предметов, таких как пипетки, пробирки, стаканы и т. п. О силиконировании крупных предметов, таких как чашки, см. примечания ниже.

Силиконирование стеклянной и пластмассовой посуды[1]

1. Поместите предметы, предназначенные для силиконирования, в большой стеклянный эксикатор.
2. Добавьте 1 мл дихлордиметилсилана в стаканчик, находящийся в эксикаторе.
3. Подсоедините эксикатор к вакуумному насосу и включите насос на 5 мин.
4. Выключите вакуумный насос и быстро впустите воздух в эксикатор. Это обеспечивает однородное распределение газообразного дихлордиметилсилана.

[1] Seed, неопубликованные данные.

5. Снова включите вакуумный насос и создайте вакуум в эксикаторе.

6. Закройте систему и оставьте эксикатор под вакуумом на 2 ч.

7. Откройте эксикатор, перед использованием прогрейте посуду при 180 °С в течение 2 ч. Перед употреблением пластмассовую посуду очень хорошо промойте водой.

Примечания. а) С дихлордиметилсиланом — токсичным и высоколетучим соединением — следует работать только в вытяжном шкафу.

б) Большие стеклянные предметы удобно силиконировать, погружая их в 5%-ный раствор дихлордиметилсилана в хлороформе. Затем их многократно промывают водой и прогревают перед использованием 2 ч при 180 °С.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ РЕАГЕНТОВ

Фенол

Многие марки имеющегося в продаже водонасыщенного фенола можно использовать без перегонки. Если же фенол имеет красноватую или желтую окраску, следует перегнать его при 160 °С, чтобы удалить примеси, вызывающие разрывы или сшивки в молекулах РНК и ДНК. То же относится к фенолу в кристаллической форме. Водонасыщенный и перегнанный фенол рекомендуется хранить при —20 °С в небольших порциях, желательно под газообразным азотом.

Перед употреблением фенол достают из холодильника, выдерживают при комнатной температуре и плавят при 68 °С. Затем добавляют 8-оксихинолин до конечной концентрации 0,1%. Это желтое соединение является антиоксидантом; оно частично ингибирует РНКазу и слабо связывает ионы металлов (Kirby, 1956). Кроме того, желтая окраска позволяет легко определять фенольную фазу.

Расплавленный фенол несколько раз насыщают равным объемом буфера (обычно 1,0 М трис-HCl, pH 8,0, а затем 0,1 М трис-HCl, pH 8,0+0,2% β-меркаптоэтанола) до тех пор, пока pH водной фазы не станет $>7{,}6$. Раствор фенола, насыщенный буфером, можно хранить при 4 °С в течение месяца.

Предостережение. Фенол является едкой жидкостью и вызывает тяжелые ожоги. Работая с ним, следует надевать предохранительные очки и перчатки. При попадании на кожу, его нужно смыть большим объемом воды и вымыть то место, куда попал фенол, водой с мылом. Нельзя промывать кожу этанолом.

Хлороформ: изоамиловый спирт (24 : 1)

Смесь хлороформа и изоамилового спирта (24 : 1, по объему) используют для удаления белков из препаратов нуклеиновых кислот. Хлороформ денатурирует белки, а изоамиловый спирт уменьшает пенообразование во время экстракции, в результате чего происходит более четкое разделение водной и органической фаз.

Ни один из этих реагентов не требует обработки перед использованием. Смесь стабильна и может храниться в закрытом сосуде при комнатной температуре.

Эфир, насыщенный водой

Эфир применяется для экстракции следов фенола или других органических веществ из водных растворов нуклеиновых кислот. Следы эфира, остающиеся после экстракции, можно легко удалить нагреванием до 68 °С или пропусканием через пробу слабого потока газообразного азота. Чтобы предупредить потерю воды из пробы во время экстракции и подавить образование свободных радикалов, возникающих при хранении эфира и вредно влияющих на ДНК, эфир насыщают водой.

Смешайте равные объемы этилового эфира (безводного) и дистиллированной воды в сосуде с завинчивающейся крышкой. Хорошо взболтайте (плотно завернув крышку) и оставьте на время при комнатной температуре в вытяжном шкафу. Эфир образует верхнюю фазу.

Предостережение. Эфир очень летуч и чрезвычайно легко воспламеняется. С ним необходимо работать (и хранить его) во взрывобезопасном шкафу.

ЖИДКИЕ СРЕДЫ

Среда NZCYM

На 1 л:

NZ-амин[1]	10 г
NaCl	5 г
Дрожжевой экстракт	5 г
Казаминовые кислоты	1 г
$MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$	2 г

Доведите pH до 7,5 с помощью NaOH.

Среда NZYM

Такая же, как NZCYM, но без казаминовых кислот.

---

[1] Гидролизат казеина типа А, поставляемый Humko Sheffield Chemical Division of Kraft, Inc. 1099 Wall St. West, Lafayette, NJ 07071.

Среда LB (Luria—Bertani)

На 1 л:

Бакто-триптон	10 г
Бакто-дрожжевой экстракт	5 г
NaCl	10 г

Доведите pH до 7,5 с помощью NaOH.

Среда M9

На 1 л:

Na_2HPO_4	6 г
KH_2PO_4	3 г
NaCl	0,5 г
NH_4Cl	1 г

Доведите pH до 7,5, проавтоклавируйте, охладите и добавьте следующие компоненты:

1 M $MgSO_4$	2 мл
20%-ная глюкоза	10 мл
1 M $CaCl_2$	1 мл

Три последних раствора стерилизуйте по отдельности фильтрованием (раствор глюкозы) или автоклавированием.

Среда M9CA

Такая же, как среда M9, но с добавлением казаминовых кислот (20 г/л).

Среда для клеток χ1776

На 1 л:

Бакто-триптон	25 г
Бакто-дрожжевой экстракт	7,5 г
1 M трис-HCl, pH 7,5	20 мл

Проавтоклавируйте, охладите, а затем добавьте следующие компоненты:

1 M $MgCl_2$	5 мл
1%-ная диаминопимелиновая кислота	10 мл
0,4%-ный тимидин	10 мл
20%-ная глюкоза	25 мл

$MgCl_2$ стерилизуйте отдельно автоклавированием, а другие компоненты стерилизуйте по отдельности фильтрованием.

Среда SOB

На 1 л:

Бакто-триптон	20 г
Дрожжевой экстракт	5 г
NaCl	0,5 г

Доведите pH до 7,5 с помощью KOH и простерилизуйте автоклавированием. Перед использованием добавьте 20 мл 1 М $MgSO_4$, простерилизованного отдельно автоклавированием.

Среды, содержащие агар или агарозу

Приготовьте жидкую среду согласно прописям, приведенным выше. Перед автоклавированием добавьте (в расчете на 1 л) одно из следующих веществ:

Бакто-агар	15 г (для чашек)
Бакто-агар	7 г (для верхнего слоя)
Агароза (Type-1, низкий электроэндоосмос)	15 г (для чашек)
Агароза	7 г (для верхнего слоя)

Когда готовят чашки, прежде чем добавлять термолабильные вещества (например, антибиотики), среду, содержащую агар или агарозу, следует простерилизовать автоклавированием и остудить до температуры 55 °С. Среду наливайте в чашки прямо из сосуда по 30—35 мл на чашку Петри диаметром 85 мм. Если на поверхности агара остаются пузырьки воздуха, коснитесь поверхности пламенем бунзеновской горелки до того, как агар успевает затвердеть.

Концентрированные среды

Некоторые среды (например, LB, NZYM, NZCYM) можно приготовить и хранить в 5-кратной концентрации. После этого среду можно быстро приготовить, разведя соответствующим объемом стерильной воды.

РАСТВОРЫ ДЛЯ РАБОТЫ С БАКТЕРИОФАГОМ λ

Мальтоза

Мальтозу (0,2%) часто добавляют в среду при выращивании бактерий, предназначенных для высева в чашки с бактериофагом λ. 20 г мальтозы растворяют в воде, доводя объем раствора до 100 мл (стерилизация фильтрованием).

Добавляют 1 мл стерильной 20%-ной мальтозы на каждые 100 мл среды.

Среда SM

Эту среду используют для хранения и разведения фага. На 1 л:

NaCl	5,8 г
$MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$	2 г
1 М трис-HCl, pH 7,5	50 мл
2%-ная желатина	5 мл

Простерилизуйте автоклавированием и храните в порциях по 50 мл.

АНТИБИОТИКИ

Ампициллин

Концентрированный раствор. 25 мг/мл натриевой соли ампициллина растворите в воде. Простерилизуйте фильтрованием и храните в аликвотах при —20 °С.

Рабочая концентрация 35—50 мкг/мл.

Хлорамфеникол

Концентрированный раствор. 34 мг/мл растворите в 100%-ном этаноле. Храните при —20 °С.

Рабочая концентрация: для амплификации плазмид 170 мкг/мл; для селекции устойчивых бактерий 30 мкг/мл.

Канамицин

Концентрированный раствор. 25 мг/мл растворите в воде. Простерилизуйте фильтрованием и храните в аликвотах при —20 °С.

Рабочая концентрация 50 мкг/мл.

Налидиксовая кислота

Концентрированный раствор. 20 мг/мл растворите в воде. Простерилизуйте фильтрованием и храните в аликвотах при —20 °С.

Рабочая концентрация 20 мкг/мл.

Стрептомицин

Концентрированный раствор. 20 мг/мл растворите в воде. Простерилизуйте фильтрованием и храните в аликвотах при —20 °С.

Рабочая концентрация 25 мкг/мл.

Тетрациклин

Концентрированный раствор. 12,5 мг/мл тетрациклингидрохлорида растворите в смеси этанол — вода (50%, по объему). Храните при —20 °С.

Примечание. Тетрациклин чувствителен к свету, поэтому растворы и чашки, содержащие антибиотик, храните в темноте.

Рабочая концентрация 12,5—15,0 мкг/мл. Ионы магния являются антагонистами тетрациклина. Для селекции бактерий, устойчивых к тетрациклину, используйте среду без солей магния (например, среду LB).

Таблица П.1. Концентрации кислот и оснований для препаратов, поступающих в продажу

	Концентрация				
	молекулярная масса	моль/г	г/л	%, по весу	Плотность, г/см³
Уксусная кислота, ледяная	60,05	17,4	1046	99,5	1,05
Уксусная кислота	60,05	6,27	376	36	1,045
Муравьиная кислота	46,02	23,4	1080	90	1,20
Соляная кислота	36,5	11,6	424	36	1,18
		2,9	105	10	1,05
Азотная кислота	63,02	15,99	1008	71	1,42
		14,9	938	67	1,40
		13,3	837	61	1,37
Хлорная кислота	100,5	11,65	1172	70	1,67
		9,2	923	60	1,54
Фосфорная кислота	80	18,1	1445	85	1,70
Серная кислота	98,1	18.0	1766	96	1,84
NH_4OH	35,0	14,8	251	28	0,898
KOH	56,1	13,5	757	50	1,52
		1,94	109	10	1,09
NaOH	40,0	19,1	763	50	1,53
		2,75	111	10	1,11

ПРИГОТОВЛЕНИЕ БУФЕРОВ И РАСТВОРОВ

При приготовлении буферов и растворов соблюдайте следующие правила.

1. Используйте самые чистые из имеющихся реактивов.
2. Готовьте все растворы на бидистиллированной деионизованной воде.
3. По возможности стерилизуйте все растворы автоклавированием или фильтрованием через 0,22-мкм фильтр.

Растворы

TE

pH 7,4

10 мМ трис-HCl, pH 7,4
1 мМ ЭДТА, pH 8,0

Таблица П.2. Приготовление основных растворов

Раствор	Метод приготовления	Примечания
1 М трис	Растворите 121,1 г триса в 800 мл H_2O. Доведите pH до необходимого значения добавлением конц. HCl	Если 1 М раствор имеет желтую окраску, вылейте его и достаньте трис лучшего качества
	Приблизительное количество конц. HCl (мл):	Некоторые электроды дают неправильный pH раствора трис; в этом случае их необходимо заменить новыми, позволяющими правильно измерять pH
pH 7,4	70	
pH 7,6	60	
pH 8,0	42	
	Перед окончательным доведением pH дайте раствору остыть до комнатной температуры. Доведите объем раствора до 1 л. Разлейте на порции и простерилизуйте автоклавированием	
0,5 М ЭДТА, pH 8,0	Добавьте 186,1 г двухзамещенной соли ЭДТА·2 H_2O к 800 мл H_2O. Интенсивно размешайте на магнитной мешалке. Доведите pH до 8,0 с помощью NaOH (~20 г NaOH). Разлейте на порции и простерилизуйте автоклавированием	Динатриевая соль ЭДТА не растворяется до тех пор, пока pH раствора не будет доведен добавлением NaOH приблизительно до 8,0
5 М NaCl	Растворите 292,2 г NaCl в 800 мл H_2O. Доведите объем до 1 л. Разлейте на порции и простерилизуйте автоклавированием	
1 М $MgCl_2$	Растворите 203,3 г $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ в 800 мл H_2O. Доведите объем до 1 л. Разлейте на порции и простерилизуйте автоклавированием	$MgCl_2$ чрезвычайно гигроскопичен. Покупайте его небольшими расфасовками (например, по 100 г) и вскрытые упаковки долго не храните
3 М ацетат натрия, pH 5,2	Растворите 408,1 г ацетата натрия·3 H_2O в 800 мл H_2O. Доведите pH до 5,2 ледяной уксусной кислотой. Доведите объем до 1 л. Разлейте на порции и простерилизуйте автоклавированием	
1 М дитиотрейтол (DTT)	Растворите 3,09 г DTT в 20 мл 0,01 М ацетата натрия, pH 5,2. Простерилизуйте фильтрованием, разлейте на порции по 1 мл и храните при —20 °C	Не автоклавируйте DTT или растворы, содержащие DTT

Продолжение

Раствор	Метод приготовления	Примечания
β-Меркаптоэтанол (BME)	Обычно выпускается в виде 14,4 М раствора. Храните в темной бутыли при 4 °С.	Не автоклавируйте BME или растворы, содержащие BME
10%-ный додецилсульфат натрия (SDS), называемый также лаурилсульфатом натрия	Растворите 100 г электрофоретически чистого SDS в 900 мл H_2O. Нагрейте до 68 °С, чтобы ускорить растворение. Доведите pH до 7,2 добавлением нескольких капель конц. HCl. Доведите объем до 1 л. Разлейте на порции	Наденьте маску при взвешивании SDS. 10%-ный SDS стерилизовать нет необходимости
1 М ацетат магния	Растворите 214,46 г ацетата магния·4 H_2O в 800 мл H_2O. Доведите объем до 1 л. Простерилизуйте фильтрованием	
5 М ацетат аммония	Растворите 385 г ацетата аммония в 800 мл H_2O. Доведите объем до 1 л. Простерилизуйте фильтрованием	
5 М ацетат калия	К 60 мл 5 М ацетата калия добавьте 11,5 мл ледяной уксусной кислоты и 28,5 мл H_2O. Концентрация калия такого раствора составляет 3 М, а концентрация ацетата 5 М	
SSC (20×)	Растворите 175,3 г NaCl и 88,2 г цитрата натрия в 800 мл H_2O. Доведите pH до 7,0, добавив несколько капель 10 н. NaOH. Доведите объем до 1 л. Разлейте на порции и простерилизуйте автоклавированием	
SSPE (20×)	Растворите 174 г NaCl, 27,6 г $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ и 7,4 г ЭДТА в 800 мл H_2O. Доведите pH до 7,4 с помощью NaOH (~6,5 мл 10 н. раствора). Доведите объем до 1 л. Разлейте на порции и простерилизуйте автоклавированием	
Бромистый этидий, 10 мг/мл	Добавьте 1 г бромистого этидия к 100 мл H_2O. Размешивайте на магнитной мешалке несколько часов, пока краситель не растворится. Заверните колбу в алюминиевую фольгу или перелейте в темную склянку и храните при 4 °С	Бромистый этидий — сильный мутаген. При его взвешивании наденьте перчатки и маску
Трихлоруксусная кислота (ТХУ), 100%-ный раствор	В колбу, содержащую 500 г ТХУ, добавьте 227 мл H_2O. Концентрация ТХУ в таком растворе составляет 100% (вес/объем)	

pH 7,6

10 мМ трис-HCl, pH 7,6
1 мМ ЭДТА, pH 8,0

pH 8,0

10 мМ трис-HCl, pH 8,0
1 мМ ЭДТА, pH 8,0

STE (называемый также TNE)

10 мМ трис-HCl, pH 8,0
100 мМ NaCl
1 мМ ЭДТА, pH 8,0

Формамид (деионизованный)

Добавьте к 50 мл формамида 5 г смешанной катионо-анионообменной смолы [например, AG501-X8 (Bio-Rad), 20—50 меш]. Размешивайте 30 мин при комнатной температуре. Дважды профильтруйте через фильтровальную бумагу ватман № 1. Разлейте аликвоты по 1 мл и храните при —20 °С.

Раствор Денхардта (50×)

Фикол	5 г
Поливинилпирролидон	5 г
BSA (Pentax Fraction V)	5 г
H_2O	до 500 мл

Профильтруйте через нальгеновый фильтр. Разделите на аликвоты по 25 мл и храните при —20 °С.

10%-ный бычий сывороточный альбумин (BSA)

BSA (Pentax Fraction V)	1 г
H_2O	10 мл

Разделите на аликвоты и храните при —20 °С.

ATP (0,1 М)

Растворите 60 мг ATP в 0,8 мл H_2O. Доведите pH до 7,0 с помощью 0,1 М NaOH. Доведите объем водой до 1 мл. Разделите раствор на малые аликвоты и храните при —70 °С.

Рибо- и дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (~10 мМ)

Растворите рибонуклеозидтрифосфаты (NTP) или дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dNTP) прямо в продажной упаковке так, чтобы приблизительная концентрация их была 10 мМ.

Таблица П.3. Спектрофотометрические характеристики рибо- и дезоксирибонуклеозидтрифосфатов

Основание	Длина волны, нм	Коэффициент экстинкции[1]) ε, $M^{-1} \cdot см^{-1}$
A	259	$1,54 \cdot 10^4$
G	253	$1,37 \cdot 10^4$
C	271	$9,1 \cdot 10^3$
U	262	$1,0 \cdot 10^4$
T	260	$7,4 \cdot 10^3$

[1]) Для кюветы с длиной оптического пути 1 см поглощение равно ε/М.

Доведите pH до 7,0, используя разведенный раствор (0,05 М) трис-HCl, автоматическую микропипетку и бумагу для измерения pH. Аликвоту нейтрализованного NTP или dNTP разведите соответствующим образом и определите оптическую плотность при длине волны, данной в табл. П.3. Определите истинную концентрацию, используя данные, приведенные в таблице. Заморозьте растворы в малых аликвотах при —20 °С.

ФЕРМЕНТЫ

Лизоцим

Концентрированный раствор. Лизоцим растворите в воде до концентрации 50 мг/мл. Разлейте на аликвоты и храните при —20 °С. Выбрасывайте каждую аликвоту после использования, не замораживайте ее снова.

РНКаза, свободная от ДНКазы

Растворите пакреатическую РНКазу (РНКазу А) в концентрации 10 мг/мл в 10 мМ трис-HCl, pH 7,5 и 15 мМ NaCl. Прогрейте 15 мин при 100 °С и медленно охладите до комнатной температуры. Разлейте порциями и храните при —20 °С.

ДНКаза, свободная от РНКазы

К сожалению, многие поступающие в продажу препараты панкреатической ДНКазы I, даже те, которые имеют метку «свободные от РНКазы», содержат примесь РНКазы, достаточную для того, чтобы вызвать значительную деградацию высокомолекулярной РНК. Два метода, описанные ниже, позволяют освободиться от примеси РНКазной активности.

Аффинная хроматография на агарозе с присоединенным к ней 5′-(4-аминофенилфосфорил)уридин-2′(3′)-фосфатом[1]

[1] Maxwell et al., 1977.

1. Уравновесьте 10 мл агарозо-5′(4-аминофенилфосфорил)уридин-2′(3′)-фосфата (поставляемого фирмой Miles-Yeda Laboratories) 0,02 М ацетатом натрия, pH 5,2. Приготовьте колонку объемом 25 мл.

2. Растворите 20 мг панкреатической ДНКазы I (DPFF, Worthington Biochemicals) в 1 мл 0,02 М ацетата натрия, pH 5,2.

3. Нанесите раствор ДНКазы I на колонку и элюируйте 0,02 М ацетатом натрия, pH 5,2, при комнатной температуре. Собирайте 1-мл фракции в безРНКазные пробирки (с. 188) до тех пор, пока с колонки не элюируется весь материал, поглощающий при 280 нм.

4. Объедините фракции, содержащие белок. Измерьте D_{280} и рассчитайте концентрацию белка (1 $D_{280} \simeq 1$ мг/мл белка). Разделите препарат фермента на небольшие порции и храните при —20 °С.

Адсорбция на макалоиде

Макалоид — это глина, адсорбирующая РНКазу. Он поставляется фирмой National Lead Company, Hauston, Texas и готовится следующим образом (Shaffner, 1982).

а) Суспендируйте 0,5 г порошкообразного макалоида в 50 мл стерильного 60 мМ трис-HCl, pH 7,6. Прогрейте при 100 °С в течение 5 мин с постоянным встряхиванием.

б) Отцентрифугируйте при комнатной температуре в течение 5 мин при 2500 g.

в) Удалите надосадочную жидкость. Вязкий осадок ресуспендируйте в 40 мл стерильного 50 мМ трис-HCl, pH 7,6.

г) Повторите центрифугирование и промывание еще 2 раза.

д) Отцентрифугируйте суспензию в течение 15 мин при 3500 g.

е) Ресуспендируйте осадок в 30 мл стерильного 50 мМ трис-HCl, pH 7,6. Конечная концентрация макалоида составляет 16 мг/мл. Суспензию можно долгое время хранить при 4 °С.

Суспензию макалоида используют для удаления примесей РНКазы, имеющихся в препарате ДНКазы, следующим образом.

1. Растворите 100 мг ДНКазы I (DPFF, Worthington Biochemicals) в 5 мл смеси, содержащей 20 мМ трис-HCl, pH 7,5 50 мМ NaCl, 1 мМ дитиотрейтол, 100 мкг/мл BSA и 50% глицерина.

2. Добавьте 15 мл охлажденного во льду 50 мМ трис-HCl, pH 7,6, и осторожно размешайте.

3. Добавьте 7,0 мл охлажденной во льду, хорошо диспергированной суспензии макалоида и размешивайте на вращающейся платформе 30 мин при 4 °С.

4. Центрифугируйте при 0 °С в течение 10 мин при 8000 g. Отберите надосадочную жидкость в новую пробирку.

5. Добавьте еще 7,0 мл суспензии макалоида и размешайте, как на стадии 3.

6. Центрифугируйте 15 мин при 12 000 g.

7. Осторожно отберите надосадочную жидкость и смешайте ее с равным объемом охлажденного во льду стерильного глицерина.

8. Разлейте небольшими аликвотами и храните при —20 °С. Концентрация ДНКазы I должна составлять ~3,0 мг/мл.

БУФЕРЫ ДЛЯ РАСЩЕПЛЕНИЯ РЕСТРИКТАЗАМИ

Низкосолевой буфер

10 мМ трис-HCl, pH 7,5
10 мМ $MgCl_2$
1 мМ дитиотрейтол

Среднесолевой буфер

50 мМ NaCl
10 мМ трис-HCl, pH 7,5
10 мМ $MgCl_2$
1 мМ дитиотрейтол

Высокосолевой буфер

100 мМ NaCl
50 мМ трис-HCl, pH 7,5
10 мМ $MgCl_2$
1 мМ дитиотрейтол

Буфер для *Sma I*

20 мМ KCl
10 мМ трис-HCl, pH 8,0
10 мМ $MgCl_2$
1 мМ дитиотрейтол

ЧАСТО ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ЭЛЕКТРОФОРЕЗНЫЕ БУФЕРЫ

Трис-ацетатный (TAE)

Рабочий раствор
0,04 М трис-ацетат
0,002 М ЭДТА

Концентрированный основной раствор (50×)

На 1 л:

Трис	242 г
Ледяная уксусная кислота	57 мл
0,5 М ЭДТА, pH 8,0	100 мл

Трис-фосфатный (TPE)

Рабочий раствор
0,08 М трис-фосфат
0,008 М ЭДТА
Концентрированный основной раствор (10×)
На 1 л:

Трис	108 г
85%-ная фосфорная кислота (1,679 мг/мл)	15,1 мл
0,5 М ЭДТА, pH 8,0	40 мл

Трис-боратный (TBE)
Рабочий раствор
0,089 М трис-борат
0,089 М борная кислота
Концентрированный основной раствор (5×)
На 1 л:

Трис	54 г
Борная кислота	27,5 г
0,05 М ЭДТА, pH 8,0	20 мл

ЧАСТО ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ БУФЕРЫ ДЛЯ НАНЕСЕНИЯ ПРОБ НА ГЕЛЬ

Буферы для нанесения проб представляют собой растворы высокой плотности, которые позволяют легко вводить пробы в лунки геля. Они содержат также красители, что позволяет легко визуально следить за электрофорезом.

Тип I

Буфер (6×)
0,25%-ный бромфеноловый синий
0,25%-ный ксилолцианол
40%-ная (вес/объем) сахароза в H_2O
Храните при 4 °С.

Тип II

Буфер (10×)
0,25%-ный бромфеноловый синий
0,25%-ный ксилолцианол
25%-ный фикол (тип 400) в H_2O
Храните при комнатной температуре.

Тип III

Буфер (6×)
0,25%-ный бромфеноловый синий
0,25%-ный ксилолцианол
30%-ный глицерин в H_2O
Храните при 4 °С.

Тип IV

Буфер (6×)
0,25%-ный бромфеноловый синий
40%-ная (вес/объем) сахароза в H_2O
Храните при 4 °С.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ДИАЛИЗНЫХ ТРУБОК

1. Разрежьте трубку на куски подходящей длины (10—20 см).
2. Прокипятите 10 мин в большом объеме 2%-ного бикарбоната натрия и 1 мМ ЭДТА.
3. Промойте трубки дистиллированной водой.
4. Прокипятите 10 мин в дистиллированной воде.
5. Дайте им остыть и храните при 5 °С. Следите за тем, чтобы трубки были всегда погружены в воду.
6. Перед использованием промойте трубки изнутри и снаружи дистиллированной водой. Всегда работайте с трубками в перчатках.

Примечание. Вместо 10-мин кипячения в воде (стадия 4) трубки можно проавтоклавировать 10 мин в неплотно закрытом сосуде с водой.

ВЫСУШИВАНИЕ НУКЛЕОТИДОВ, МЕЧЕННЫХ ^{32}P, В СМЕСИ ЭТАНОЛ — ВОДА

Большинство имеющихся в продаже препаратов [^{32}P]dNTP — это концентрированные стабилизированные водные растворы, которые можно добавлять прямо в реакционную смесь. Однако некоторые фирмы поставляют [^{32}P]dNTP, растворенные в 50%-ном этаноле, который можно удалить перед использованием выпариванием.

1. С помощью автоматической микропипетки внесите в эппендорфовскую пробирку точный объем препарата [^{32}P]dNTP.
2. Заткните пробирку комочком ваты и закройте двумя или тремя слоями парафильма (рис. П.1).
3. Сделайте в парафильме частые проколы иглой.
4. Поместите пробирку в стаканчик или подставку и выпаривайте [^{32}P]dNTP под вакуумом досуха при комнатной температуре или в лиофилизаторе.

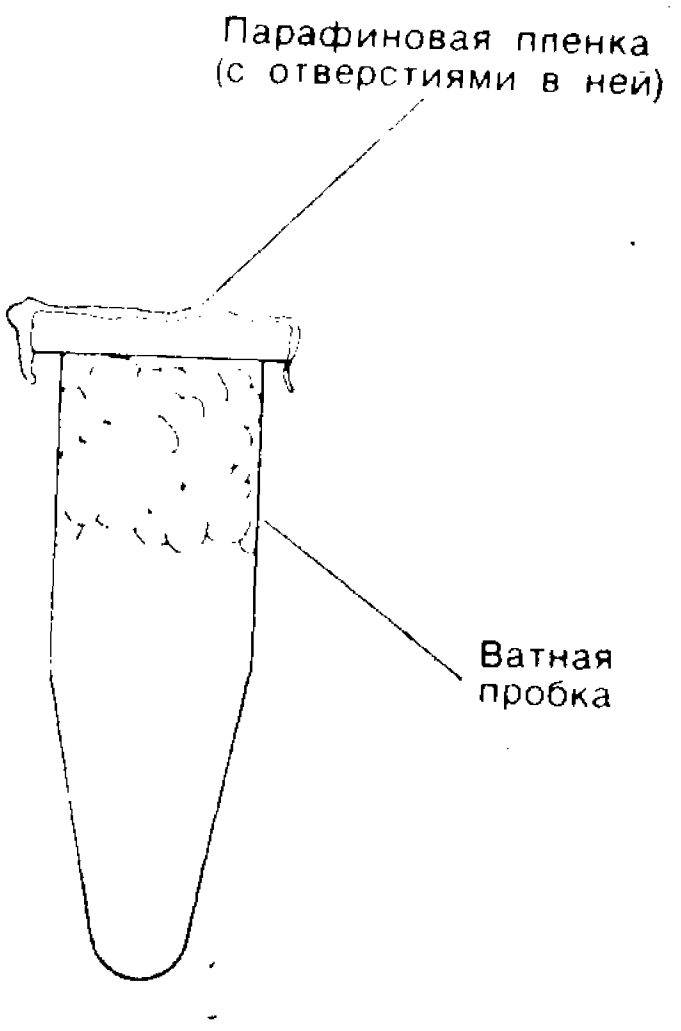


Рис. П.1.

5. Удалите парафильм и вату (выбросьте их в контейнер для радиоактивных отходов). Добавьте в пробирку 5 мкл H_2O и 15 с встряхивайте ее.

6. Добавьте в пробирку остальные компоненты реакционной смеси. Смешайте встряхиванием и инкубируйте, как указано в соответствующей прописи.

Примечания. а) Стадии 1—3 можно опустить, если использовать вакуумный испаритель быстрого действия, в котором не происходит разбрызгивания содержимого пробирки по стенкам.

б) Там, где возможно, при работе с материалом, содержащим ^{32}P, для защиты от излучения следует пользоваться прозрачным экраном.

ОЧИСТКА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Одной из самых важных процедур в молекулярном клонировании является очистка нуклеиновых кислот. Ключевой этап — удаление белков — часто проводят с помощью экстракции водных растворов нуклеиновых кислот фенолом и(или) хлороформом. Такую экстракцию используют там, где нужно инактивировать и удалить ферменты, применяемые на одном из этапов клонирования, прежде чем перейти к следующему. Если же нуклеиновые кислоты выделяют из сложных смесей молекул, таких, как клеточные лизаты, то необходимо прилагать дополнительные усилия. В этих случаях (гл. 9), прежде чем проводить экстракцию органическими растворителями, чаще всего удаляют большинство белков гидролизом их протеолитическими

Таблица П.4. Протеолитические ферменты

	Основной раствор (в H_2O), мг/мл	Температура хранения, °С	Концентрация в реакции, мг/мл	Буфер для реакции	Температура, °С	Предварительная обработка
Проназа[1)]	20	—20	1	0,01 М трис, pH 7,8 0,01 М ЭДТА 0,5% SDS	37	Самопереваривание в течение 2 ч при 37 °С
Протеиназа К	20	—20	0,05	0,01 М трис, pH 7,8 0,005 М ЭДТА 0,5% SDS	37	Не требуется

[1)] Препараты проназы часто содержат примесь ДНКазы или РНКазы. Эти активности могут быть устранены двухчасовой инкубацией основного раствора при 37 °С.

ферментами, такими, как проназа или протеиназа К (табл. П.4), которые активны в отношении широкого спектра нативных белков.

Экстракция фенолом и хлороформом

Стандартным способом удаления белков из растворов нуклеиновых кислот является однократная экстракция вначале фенолом, затем смесью фенола и хлороформа (1 : 1) и наконец хлороформом. Достоинство этой процедуры заключается в том, что при использовании двух органических растворителей депротеинизация протекает более эффективно. Хотя фенол активно денатурирует белки, он не полностью ингибирует РНКазную активность, и в нем растворяются молекулы РНК, содержащие длинные последовательности poly(A) (Brawerman et al., 1972). Обе эти проблемы решаются при использовании смеси фенола и хлороформа (1 : 1). В результате последней экстракции хлороформом из препарата нуклеиновой кислоты удаляют остатки фенола.

Напомним, что под «хлороформом» понимается смесь хлороформа и изоамилового спирта (24 : 1, по объему), а под «фенолом» — фенол, уравновешенный буфером и содержащий 0,1% оксихинолина и 0,2% β-меркаптоэтанола (с. 388).

1. Смешайте пробу ДНК с равным объемом фенола или смеси фенол — хлороформ в полипропиленовой пробирке с пластмассовой крышкой.

2. Размешивайте содержимое пробирки, пока не образуется эмульсия (см. примечание ниже).

3. Центрифугируйте 3 мин при 1600 g или 15 с в центрифуге Эппендорф при комнатной температуре. Если органическая и водная фазы разделились не достаточно хорошо, отцентрифу-

гируйте еще раз более продолжительное время или при большей скорости.

4. Перенесите пипеткой верхний водный слой в новую полипропиленовую пробирку. Для небольших (<200 мкл) объемов используйте автоматическую пипетку с подходящим наконечником. Промежуточную фазу и нижнюю органическую фазу отбросьте.

Примечание. Для уменьшения потерь материала можно вновь экстрагировать интерфазу и органическую фазу следующим образом. После того как отобрана первая водная фаза, добавьте к промежуточной и органической фазам равный объем буфера ТЕ, pH 7,8. Хорошо размешайте и разделите фазы центрифугированием. Объедините первую и вторую водные фазы и переходите к стадии 5.

5. Добавьте равный объем смеси фенола и хлороформа (1 : 1). Повторите стадии 2—4.

6. Добавьте равный объем хлороформа и повторите стадии 2—4.

7. Осадите ДНК этанолом и соберите ее, как описано на с. 405.

Примечания. Органическую и водную фазы можно смешивать встряхиванием при выделении небольших ДНК (<10 kb) или слабым качанием при выделении ДНК среднего размера (10—30 kb).

При выделении крупных ДНК (>30 kb) необходимо соблюдать особую предосторожность, чтобы избежать механических разрывов.

а) Для смешивания водной и органической фаз следует медленно крутить пробирку (20 об/мин).

б) Переносить ДНК из одной пробирки в другую следует пипеткой с расширенным носиком.

в) ДНК не следует осаждать этанолом (стадия 7). Вместо этого нужно удалить следы хлороформа либо длительным диализом раствора ДНК против больших объемов холодного буфера TNE, либо экстракцией эфиром, насыщенным водой.

Экстракция фенола и хлороформа эфиром, насыщенным водой

Для удаления следов фенола или хлороформа из растворов ДНК можно использовать эфир. Эфир очень летуч и легко воспламеняется. Поэтому работать с ним и хранить его следует во взрывобезопасном химическом шкафу.

1. Добавьте к пробе ДНК равный объем эфира, насыщенного водой. Размешайте и оставьте стоять на 2—5 мин для разделения органической и водной фаз.

2. Удалите верхний слой (плотность эфира меньше плотности воды).

3. Повторите стадии 1 и 2 с нижним слоем, содержащим ДНК.

4. Удалите следы эфира нагреванием раствора ДНК при 68 °С в течение 5—10 мин с перемешиванием или пропусканием струи газообразного азота над поверхностью раствора в течение 10—30 мин.

5. Осадите ДНК этанолом или (в случае высокомолекулярной ДНК) отдиализуйте раствор против холодного буфера ТЕ, pH 7,8, содержащего 0,1 М NaCl.

КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Осаждение этанолом или изопропанолом

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

1. Определите объем раствора ДНК.

2. Доведите до необходимой концентрацию моновалентных катионов либо путем разведения буфером ТЕ, pH 8,0, если в растворе ДНК имеется высокая концентрация солей, либо путем добавления одного из солевых растворов, фигурирующих в табл. П.5.

3. Хорошо размешайте. Добавьте точно 2 объема охлажденного во льду этанола и снова хорошо размешайте. Охладите до —20 °С.

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

5. Центрифугируйте при 0 °С. В большинстве случаев достаточно центрифугировать 10 мин в центрифуге Эппендорф или при 12 000 g. Однако при работе с раствором ДНК низкой концентрации или содержащим очень мелкие фрагменты ДНК может потребоваться более интенсивное центрифугирование (например, 30 мин при 30 000 об/мин в роторе Beckman SW50.1).

6. Удалите надосадочную жидкость. Оставьте пробирку в перевернутом положении на листе фильтровальной бумаги, чтобы как следует стекла вся жидкость. Капиллярной пипет-

Таблица П.5. Солевые растворы

Соль	Концентрированный раствор	Конечный раствор
Ацетат натрия	2,5 М, pH 5,2	0,25 М
Хлорид натрия	5,0 М	0,1 М
Ацетат аммония	10,5 М	2,0 М

кой удалите все капли со стенок пробирки. Следы надосадочной жидкости можно удалить кратковременным (1—2 мин) выдерживанием в вакуумном эксикаторе или лиофилизаторе.

7. Растворите осадок ДНК (часто невидимый) в соответствующем объеме буфера. Хорошо ополосните буфером стенки пробирки или поскребите их запаянной пипеткой, чтобы собрать всю ДНК. Для ускорения растворения осадка можно прогреть пробу при 37 °С в течение 5 мин.

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

б) Для удаления примесей, захватываемых осадком, можно промыть осадок ДНК раствором 70%-ного этанола. Чтобы при промывании не потерять часть ДНК, заполняйте пробирку 70%-ным этанолом не более чем на $^2/_3$. Встряхивайте непродолжительное время и центрифугируйте так, как описано выше. Осадок, остающийся после промывания 70%-ным этанолом, не очень прочно связан со стенками пробирки, поэтому будьте очень осторожны при удалении надосадочной жидкости.

в) Очень короткие молекулы ДНК (<200 пар оснований) плохо осаждаются этанолом. Однако эффективность их осаждения значительно увеличивается, если предварительно к раствору ДНК добавить $MgCl_2$ до концентрации 0,01 М.

г) Как правило, ДНК, осажденная этанолом, легко вновь растворяется в буферах с низкой ионной силой, таких, как буфер ТЕ. Трудности с растворением могут возникать в тех случаях, когда непосредственно к осадку добавляют буферы, содержащие $MgCl_2$ или >0,1 М NaCl. Поэтому предпочтительнее растворять ДНК в малом объеме буфера низкой ионной силы, а затем доводить ионную силу до соответствующего значения. Если же проба плохо растворяется в малом объеме,

то добавьте больший объем буфера и повторите осаждение этанолом.

д) Для осаждения из раствора РНК требуются несколько более высокие концентрации этанола (2,5 объема), чем для осаждения ДНК.

е) Трифосфаты можно отделить от ДНК двумя последовательными осаждениями из раствора ДНК, содержащего 2 М ацетат аммония.

Концентрирование экстракцией бутанолом

Во время экстракции водных растворов такими растворителями, как вторичный бутиловый спирт (2-бутанол) или *н*-бутиловый спирт (1-бутанол), часть молекул воды (но не ДНК или других растворенных веществ) переходит в органическую фазу. Проводя несколько циклов экстракции, можно значительно уменьшить объем раствора ДНК. Этот метод концентрирования ДНК используют для уменьшения объема разведенных растворов ДНК до таких значений, при которых ДНК можно легко осадить этанолом.

1. Добавьте равный объем 2-бутанола к пробе ДНК и хорошо размешайте.

Примечание. При добавлении слишком большого объема 2-бутанола может произойти обезвоживание, и ДНК выпадет в осадок.

2. Отцентрифугируйте при 1600 g в течение 1 мин. Удалите верхнюю фазу (2-бутанол).

3. Повторите стадии 1 и 2 до достижения желаемого объема.

4. Дважды экстрагируйте пробу водонасыщенным эфиром, чтобы удалить 2-бутанол. Эфир удалите выпариванием.

Примечание. Экстракция 2-бутанолом не приводит к удалению солей, поэтому их концентрация возрастает пропорционально уменьшению объема раствора. Следовательно, нужно снизить концентрацию буфера диализом или собрать ДНК, осадив ее этанолом.

ХРОМАТОГРАФИЯ НА СЕФАДЕКСЕ G-50

Этот способ отделения высокомолекулярной ДНК от более мелких молекул с помощью гель-фильтрации чаще всего используют для очистки ДНК, меченной при ник-трансляции или при репарации укороченных 3′-концов. Его применяют также на некоторых этапах синтеза двухцепочечной кДНК, при присоединении линкеров к тупым концам ДНК и вообще тогда, когда необходимо изменить состав буфера, в котором растворена ДНК.

Применяют два метода: обычную хроматографию на колонках и центрифугирование через сефадекс G-50, упакованный в соответствующие колонки.

Приготовление сефадекса G-50

Медленно добавьте 30 г сефадекса G-50 (среднего) к 250 мл буфера ТЕ, pH 8,0, в 500-мл стакане или колбе. Убедитесь в однородности суспензии. Оставьте на ночь при комнатной температуре, или прогрейте 1—2 ч при 65 °С, или проавтоклавируйте в течение 15 мин под давлением $\sim 10^5$ Па. Дайте остыть до комнатной температуры.

Удалите надосадочную жидкость, добавьте к осадку в таком же объеме буфер ТЕ, pH 8,0, и храните при 4 °С в сосуде с завинчивающейся крышкой.

Хроматография на колонках

1. Приготовьте колонку с сефадексом G-50 в подходящей 5-мл стеклянной пипетке, заткнутой стерильной стеклянной ватой. Промойте колонку несколькими объемами буфера ТЕ, pH 8,0.

2. Нанесите на колонку пробу ДНК (в объеме 200 мкл или меньше). Промойте пробирку, в которой находилась ДНК, приблизительно 100 мкл буфера ТЕ, pH 8,0, и также нанесите их на колонку. Подсоедините к колонке резервуар с буфером ТЕ, pH 8,0, так чтобы скорость потока составляла около 0,5 мл/мин.

3. Соберите в эппендорфовские пробирки 12—15 фракций (по 0,5 мл). Если ДНК имеет метку ^{32}P, то измерьте радиоактивность в каждой пробирке, используя переносной мини-счетчик, или по Черенкову в жидком сцинтилляционном счетчике.

ДНК не включается в гранулы сефадекса и выходит в исключенном объеме (обычно составляющем 30% общего объема колонки). Таким образом, первый пик радиоактивности дают нуклеотиды, включенные в ДНК, а следующий за ним пик — свободные [^{32}P]dNTP.

4. Соберите радиоактивные фракции, составляющие первый пик, и храните их при —20 °С. Иногда на практике обходятся без сбора фракций, определяя положение в колонке включенных в ДНК и свободных [^{32}P]dNTP с помощью переносного мини-счетчика. Первый пик собирают в стерильную полипропиленовую пробирку по мере его выхода из колонки. Затем дно колонки снимают, резервуар для буфера отсоединяют, а колонку выбрасывают в сосуд для радиоактивных отходов.

Предостережение. Между исследователем и колонкой должен находиться прозрачный экран, защищающий от радиоактивного излучения.

Примечание. Для отделения ДНК от мелких олигонуклеотидов или для грубого фракционирования ДНК по размеру

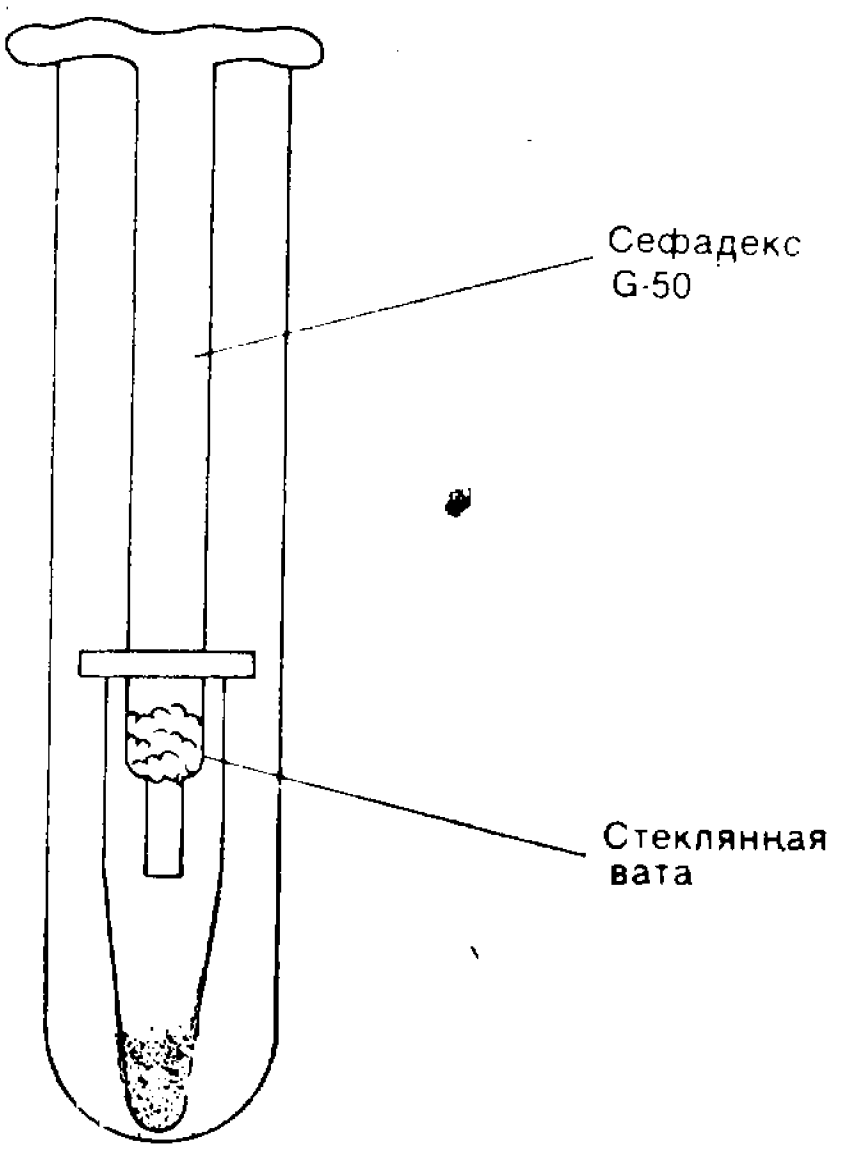


Рис. П.2.

(с. 220) используют разнообразные наполнители (сефадекс G-75, G-100, сефарозу CL-4B и т. п.). В соответствующих местах текста указано, какой именно наполнитель лучше всего подходит для каждого конкретного случая.

Метод хроматографии на колонке с центрифугированием

Этот метод оказывается полезным, когда имеют дело с несколькими одновременно меченными препаратами ДНК или когда необходимо заменить буфер, в котором растворена ДНК.

1. Заткните дно подходящего 1-мл шприца одноразового пользования небольшим кусочком стерильной стеклянной ваты и приготовьте колонку (объем 0,9 мл) из сефадекса G-50, который уравновешен буфером TE, pH 8,0, содержащим 0,1 M NaCl (STE).

2. Вставьте колонку в стеклянную центрифужную пробирку, как показано на рис. П.2. Отцентрифугируйте при 1600 g в течение 4 мин. Не обращайте внимания на изменение вида колонки. Обычно сефадекс оседает на дно в результате центрифугирования. Добавьте еще сефадекса, чтобы довести объем до 0,9 мл.

3. Добавьте 0,1 мл буфера STE и центрифугируйте точно такое же время и при точно той же скорости, как на стадии 2.

4. Повторите стадию 3.

5. Нанесите на колонку пробу ДНК в общем объеме 0,1 мл (для доведения объема используйте буфер STE).

6. Снова отцентрифугируйте колонку точно такое же время и при точно той же скорости, как раньше. При этом в эппендорфовской пробирке соберется 100 мкл жидкости, вытекшей из колонки (рис. П.2).

7. Не включившиеся в ДНК [^{32}P]dNTP останутся в колонке, которую следует выбросить. Меченую ДНК отбирают из эппендорфовской пробирки.

Примечание. а) Если центрифугируемую колонку используют для смены буфера, то ее следует 4—6 раз промыть (стадия 3) соответствующим буфером, чтобы уравновесить сефадекс G-50.

б) Сефадекс G-100 не годится для хроматографии с центрифугированием колонки, так как его гранулы при этом разрушаются.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДНК И РНК

Для определения количества ДНК или РНК в препаратах широко применяются два метода. Если проба содержит чистое вещество (т. е. незагрязненное другими нуклеиновыми кислотами, белками, фенолом или агарозой), то простым и точным является фотометрическое определение, основанное на измерении величины поглощения УФ-излучения основаниями нуклеиновых кислот. Если количество ДНК или РНК очень мало или если проба содержит примеси, то о количестве нуклеиновых кислот можно судить по интенсивности флуоресценции бромистого этидия.

Спектрофотометрическое определение ДНК или РНК

Для определения количества ДНК или РНК измеряют поглощение раствора в областях с длинами волн 260 и 280 нм. Измерение при 260 нм позволяет рассчитать концентрацию нуклеиновой кислоты в пробе. Оптическая плотность $D=1$ соответствует приблизительно 50 мкг/мл двухцепочечной ДНК, 40 мкг/мл одноцепочечной ДНК и РНК и 20 мкг/мл олигонуклеотидов. Отношение величины D, измеренной при 260, к величине D, измеренной при 280 нм (D_{260}/D_{280}), позволяет судить о чистоте нуклеиновой кислоты. Чистые препараты ДНК и РНК имеют отношение D_{260}/D_{280}, равное 1,8 и 2,0 соответственно. Если препарат содержит примесь белка или фенола, то D_{260}/D_{280} значительно меньше значений, указанных выше, и точное измерение количества нуклеиновой кислоты в данном случае невозможно.

Определение количества двухцепочечной ДНК по флуоресценции бромистого этидия

Иногда ДНК присутствует в количестве (<250 нг/мл), недостаточном для спектрофотометрического определения, или ее раствор содержит примеси других УФ-поглощающих веществ, мешающих точному анализу. Быстрый способ оценки количества ДНК в таких пробах заключается в измерении флуоресценции бромистого этидия, интеркалированного в молекулу ДНК. Поскольку величина флуоресценции пропорциональна общей массе ДНК, количество ДНК в пробе можно определить, сравнивая выход флуоресценции пробы и серии стандартов. Этим методом можно определить до 1—5 нг ДНК.

Метод определения концентрации ДНК на пластиковой пленке

1. Натяните пластиковую пленку на окно УФ-излучателя или на лист черной бумаги.
2. Нанесите на эту пленку 1—5 мкл пробы, содержащей ДНК.
3. Нанесите рядом в определенном порядке равные объемы стандартных растворов, содержащих ДНК в возрастающих концентрациях (0,5—20 мкг/мл).
4. К каждой капле добавьте равный объем буфера ТЕ, содержащего 2 мкг/мл бромистого этидия. Смешайте растворы пипеткой.
5. Сфотографируйте капли, осветив их источником коротковолнового ультрафиолета (с. 167). Оцените концентрацию ДНК в пробе, сравнив интенсивность флуоресценции в пробе и в стандартных растворах.

Метод определения концентрации ДНК в чашке с агарозой

Не исключено, что примеси, присутствующие в пробе ДНК, усиливают или тушат флуоресценцию. Чтобы обойти эту трудность, пробы ДНК можно наносить на поверхность 1%-ной агарозной пластины, содержащей 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Оставьте гель при комнатной температуре на несколько часов, чтобы мелкие молекулы примесей имели возможность диффундировать в агарозу. Сфотографируйте гель, как указано выше.

Метод мини-геля

Электрофорез в мини-геле (с. 167) является быстрым и удобным способом измерения количества ДНК с одновременным анализом ее физического состояния. Этот метод следует выбирать в том случае, когда существует вероятность присутствия в пробах значительных количеств РНК.

1. Смешайте 2 мкл пробы ДНК с 0,4 мкл буфера для нанесения IV (краситель — только бромфеноловый синий; с. 401) и нанесите эту смесь на 0,8%-ный агарозный мини-гель, содержащий 0,5 мкг/мл бромистого этидия.

2. Смешайте 2 мкл каждого из серии стандартных растворов ДНК (0,5—50 мкг/мл) с 0,4 мкл буфера для нанесения. Нанесите пробы на гель.

Примечание. Стандартный раствор ДНК должен содержать ДНК приблизительно такого же размера, какой имеет неизвестная ДНК.

3. Проводите электрофорез до тех пор, пока бромфеноловый синий не продвинется приблизительно на 1—2 см.

4. Удалите краситель из геля, погрузив последний на 5 мин в электрофорезный буфер, содержащий 0,01 М $MgCl_2$.

5. Сфотографируйте гель в коротковолновом УФ-свете. Сравните интенсивности флуоресценции неизвестной и стандартных ДНК и определите количество ДНК в пробе.

РАДИОАВТОГРАФИЯ

Радиоактивные нуклеиновые кислоты можно обнаружить радиоавтографией или жидкостной сцинтилляционной спектроскопией. Для большинства целей точные количественные измерения не обязательны, поэтому методы радиоавтографии предпочтительнее: они имеют большую чувствительность, дают более высокое разрешение, помогают выявить артефакты, не обнаруживаемые в счетчиках, и при их применении не разрушается проба. Как правило, при радиоавтографии используют изотоп ^{32}P, и все последующие описания даны для него. Об использовании других изотопов, обладающих менее интенсивным β-излучением, можно прочитать в работе (Bonner, Laskey, 1975).

1. Прикрепите радиоавтографируемый материал (рис. П.3) пластырем или клейкой лентой к подложке из картона или бумаги ватман 3ММ.

2. Приклейте кусочки пластыря, помеченные радиоактивными чернилами, в нескольких местах по краям пробы.

Радиоактивные чернила готовят в виде смеси небольшого количества ^{32}P и водостойких черных чернил. Удобно делать чернила трех видов: очень «горячие» (>2000 имп/с на мини-счетчике), «горячие» (500—2000 имп/с) и «холодные» (50—500 имп/с).

Чернила соответствующего вида наносите на кусочек пластыря перьевой ручкой.

3. Когда чернила высохнут, заверните пробу и подложку в пленку Saran Wrap. Это предотвратит загрязнение усиливающего экрана и кассеты, а также прилипание пробы к рентгеновской пленке.

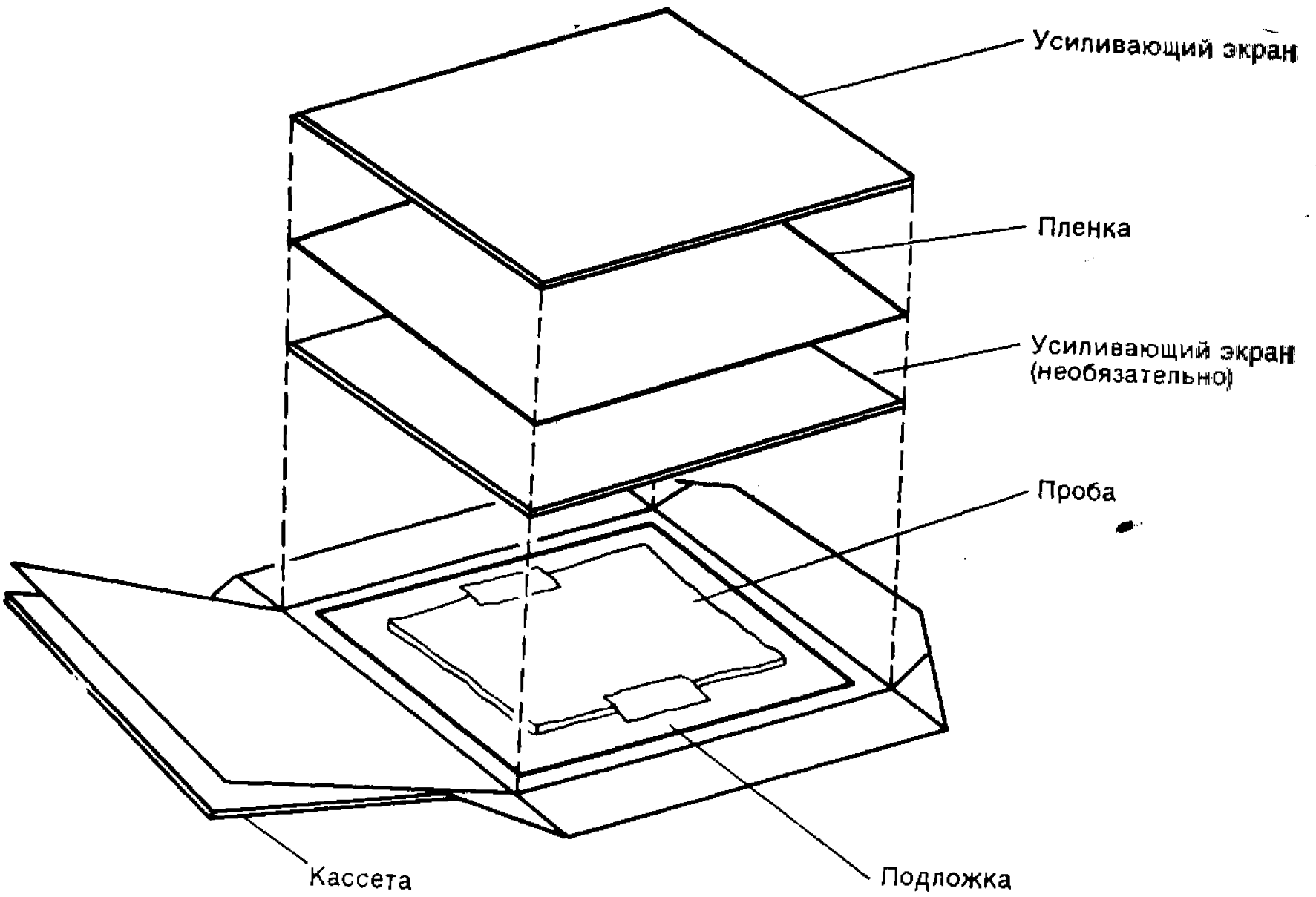


Рис. П.3.

4. Поместите пробу в темной комнате в кассету и накройте ее листом рентгеновской пленки. Прочно закрепите пробу и пленку клейкой лентой. Экспонируйте пленку от нескольких часов до нескольких дней. Метка ^{32}P с интенсивностью от 1000 до 5000 имп/мин в полосе шириной 1 см дает изображение после экспонирования в течение 12—16 ч.

Наиболее универсальной пленкой является Kodak X-Omat AR, имеющая высокочувствительную эмульсию, нанесенную с двух сторон на бесцветную основу. Она может быть проявлена в автоматическом режиме или вручную.

Жидкий проявитель для рентгеновских пленок Kodak	5 мин
Баня, содержащая 3%-ную уксусную кислоту, или водяная баня для прекращения проявления	1 мин
Быстрый фиксаж Kodak	10 мин
Проточная вода	15 мин

Пленку сушат в теплой камере или при комнатной температуре.

Примечание. Чувствительность пленки можно увеличить с помощью усиливающего экрана (Swanstrom, Shank, 1978).

С помощью наилучшей из имеющихся комбинаций пленки и экрана — два усиливающих экрана (Dupont Cronex Lighting-Plus) с пленкой Kodak X-Omat AR, экспонируемой при —70 °С, — чувствительность увеличивается в 8—10 раз (для ^{32}P). При использовании одного экрана вместо двух чувствительность увеличивается в 4—5 раз. Экраны и пленки нужно размещать так, как показано на рис. П.3. Глянцевая сторона обоих экранов должна быть обращена к пленке.

Подавляющее большинство событий, регистрируемых пленкой в этой системе, как и в обычной радиоавтографии, представляет собой длинноволновые фотоны — результат флуоресценции, появляющейся при взаимодействии с экраном излучения, испускаемого распадающимся атомом ^{32}P (Laskey, Mills, 1977). Почернение пленки при низкой интенсивности облучения характеризуется нелинейностью, и в этом случае экспозицию проводят довольно дюлго при —70 °С. Предварительная экспозиция пленки (Laskey, Mills, 1977) не повышает чувствительности обнаружения ^{32}P при использовании кальцийвольфрамового экрана при —70 °С.

а) Кассету вместе с рентгеновской пленкой, пробой и экраном заворачивают в алюминиевую фольгу и помещают в кельвинатор при —70 °С на соответствующий период времени. Между кассетами следует проложить алюминиевые листы, чтобы предотвратить попадание излучения от других проб. На стопку кассет нужно положить груз, чтобы хорошо прижать пробы к пленке. Если этого не сделать, получится размытое, нерезкое изображение.

б) Кассету вынимают из кельвинатора (это делают в перчатках), быстро достают пленку и сейчас же проявляют ее во избежание образования конденсата на пленке.

в) Если нужно получить другой радиоавтограф, немедленно положите новую пленку и как можно быстрее поместите кассету и экраны в кельвинатор. Если за это время успел образоваться конденсат, оставьте пробу и экраны в помещении, чтобы они прогрелись до комнатной температуры. Прежде чем помещать новую пленку, вытрите их, удалив весь конденсат.

ИЗМЕРЕНИЕ РАДИОАКТИВНОСТИ В НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТАХ

Осаждение трихлоруксусной кислотой (ТХУ)

1. Нанесите известный объем (до 10 мкл) пробы в центр диска из стекловолокна ватман GF/C (диаметр диска 2,4 см).

2. Пробу такого же объема внесите в пробирку, содержащую 100 мкл раствора ДНК из спермы лосося (500 мкг/мл в 20 мМ

ЭДТА). Добавьте 5 мл охлажденной во льду 10%-ной ТХУ, размешайте и охладите во льду в течение 15 мин.

3. Соберите осадок, отфильтровав раствор через другой диск из стекловолокна. Промойте фильтр 6 раз 5 мл охлажденной во льду 10%-ной ТХУ, а затем 5 мл 95%-ного этанола.

4. Высушите оба фильтра под лампой накаливания. Поместите фильтры в сцинтилляционные флаконы. Просчитайте радиоактивность в сцинтилляционной жидкости на основе толуола. На первом фильтре измеряют общую радиоактивность в пробе, на втором — радиоактивность, включенную в нуклеиновые кислоты. С помощью этой процедуры количественно осаждаются нуклеиновые кислоты длиной более 20 нуклеотидов.

Примечание. ТХУ готовят, как описано на с. 395.

Абсорбция на фильтрах DE-81

1. Нанесите известный объем (до 5 мкл) пробы в центр каждого из двух 2,4-см дисков из бумаги ватман DE-81.

2. Промойте один из дисков (6 раз по 5 мин) 0,5 М Na_2HPO_4, затем дважды водой (по 1 мин на каждое промывание) и дважды 95%-ным этанолом (по 1 мин на каждое промывание).

3. Высушите оба диска под лампой накаливания. Просчитайте радиоактивность в водной сцинтилляционной жидкости типа Aquasol (New England Nuclear). Непромытый фильтр дает общую радиоактивность в пробе, промытый — только радиоактивность, включенную в нуклеиновые кислоты.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ МУЛЬТИМЕРОВ ПЛАЗМИД, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В КАЧЕСТВЕ МАРКЕРОВ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАСС[1]

1. Прогидролизуйте полностью плазмидную ДНК рестриктазой, расщепляющей только в одном сайте с образованием выступающих концов.

2. Экстрагируйте гидролизат смесью фенол — хлороформ и осадите ДНК этанолом.

3. Растворите ДНК в буфере ТЕ, pH 7,5, до концентрации примерно 500 мкг/мл. Прогрейте 5 мин при 56 °С и охладите во льду.

4. Добавьте 0,1 объема буфера (10×) для лигирования.

Буфер (10×) для лигирования имеет состав 0,66 М трис-HCl, pH 7,5 50 мМ $MgCl_2$, 50 мМ дитиотрейтол и 10 мМ АТР.

[1] Seed, неопубликованные данные.

5. Добавьте примерно 1 ед. (единицы Вейса) ДНК-лигазы фага Т4 на 1 мкг ДНК. Инкубируйте 5 мин при 12 °С (для концов, образованных *Eco*RI) или при 16 °С (для концов, образованных другими рестриктазами).

6. Охладите реакционную смесь до 0 °С и отберите аликвоту. Прогрейте ее 5 мин при 68 °С и проанализируйте с помощью электрофореза в 0,4%-ном агарозном мини-геле, чтобы определить эффективность лигирования. Если получился желаемый набор маркеров разного размера, очистите остальную ДНК, как описано выше. Если же эффективность лигирования недостаточна, нагрейте пробу до соответствующей температуры и продолжайте инкубацию.

Примечание. Другой способ заключается в том, чтобы лигировать линейную ДНК полностью при высокой концентрации и выделить в чистом виде образовавшиеся конкатенаты осторожной экстракцией фенолом и хлороформом. Затем конкатенаты подвергают частичному расщеплению той же рестриктазой, которую использовали для первоначального гидролиза. Преимущество этого подхода состоит в том, что реакция рестрикции иногда контролируется легче, чем реакция лигирования.

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПО МАКСАМУ — ГИЛБЕРТУ

Ниже мы описываем в сокращенной форме химические реакции, предложенные Максамом и Гилбертом для специфической модификации оснований и расщепления ДНК. Более детальное описание и основательное обсуждение методов выделения асимметрично меченых фрагментов ДНК и приготовления гелей дано Максамом и Гилбертом в работе, опубликованной в руководстве Methods in Enzymology (1980), **65** (часть 1), с. 497.

Реагенты

Диметилсульфат (DMS) (Aldrich Chemical Co.)
Гидразин (HZ) (Eastman Kodak)
Муравьиная кислота
Пиперидин (Fisher Scientific), 10 М концентрированный раствор;
перед употреблением развести до 1,0 М
95%-ный этанол
70%-ный этанол
Дистиллированная вода
1 М уксусная кислота
0,3 М ацетат натрия, pH 5,2
5 М NaCl

1,2 н. NaOH
1 мМ ЭДТА
тРНК, концентрированный раствор содержит 1 мг в 1 мл дистиллированной воды

Буферы

Буфер DMS

50 мМ какодилат натрия, pH 8,0
1 мМ ЭДТА

Доводить pH обычно нет необходимости.

Смесь с DMS для остановки реакции (DMS-стоп)

1,5 М ацетат натрия, pH 7,0
1,0 М меркаптоэтанол
100 мкг/мл тРНК

Смесь с гидразином для остановки реакции (HZ-стоп)

0,3 М ацетат натрия
0,1 мМ ЭДТА
25 мкг/мл тРНК

Буфер для нанесения проб на гель

8%-ный по объему деионизованный или перекристаллизованный формамид
50 мМ трис-борат, pH 8,3
1 мМ ЭДТА
0,1%-ный (вес/объем) ксилолцианол
0,1%-ный (вес/объем) бромфеноловый синий

Примечание. Фильтровать вышеуказанные буферы не требуется. Но если раствор оказывается мутным, то профильтруйте его через 0,45-мкм нитроцеллюлозный фильтр.

Гели для определения нуклеотидной последовательности

20%-ный акриламид

Акриламид	96,5 г
Метилен-бис-акриламид	3,35 г
Мочевина ультрачистая	233,5 г
Буфер TBE (5×)	100 мл
H_2O	до 500 мл

Смесь с мочевиной

Мочевина	233,5 г
Буфер TBE (5×)	100 мл
H_2O	до 500 мл

Буфер TBE (5×)

Трис	54 г
Борная кислота	27,5 г
0,5 М ЭДТА, pH 8,0	20 мл

Таблица П.6. Определение нуклеотидной последовательности ДНК с концевыми метками[1)]

Этап	G	G и A	T и C	C	A>C
Смешайте	200 мкл буфера	10 мкл H_2O	10 мкл H_2O	15 мкл 5 М NaCl	100 мкл } 2 н. NaOH 1 мМ ЭДТА
	5 мкл [^{32}P] ДНК	10 мкл [^{32}P] ДНК	10 мкл [^{32}P] ДНК	5 мкл [^{32}P] ДНК	5 мкл [^{32}P] ДНК
Охладите до	0 °C	0 °C	0 °C	0 °C	Прогрейте 6 мин при 90 °C
Добавьте	1мкл DMS	50 мкл муравьиной кислоты	30 мкл HZ	30 мкл HZ	150 мкл 1 н. уксусной кислоты
					5 мкл тРНК (1 мг/мл)
					750 мкл 95%-ного этанола
Инкубируйте	20 °C, 3—4 мин	20 °C, 5 мин	20 °C, 5 мин	20 °C, 5 мин	
Добавьте	50 мкл DMS-стоп	180 мкл HZ-стоп	200 мкл HZ-стоп	200 мкл HZ-стоп	
	750 мкл этанола	750 мкл этанола	750 мкл этанола	750 мкл этанола	
Выдержите при	—70 °C, 10—15 мин	—70 °C, 10—15 мин	—70 °C, 10—15 мин	—70 °C, 10—15 мин	—70 °C, 10—15 мин
Центрифугируйте	10 мин	10 мин	10 мин	10 мин	10 мин
Добавьте к осадку	250 мкл 0,3 М ацетата натрия	250 мкл 0,3 М ацетата натрия	250 мкл 0,3 М ацетата натрия,	250 мкл 0,3 М ацетата натрия	250 мкл 0,3 М ацетата натрия
	750 мкл этанола	750 мкл этанола	750 мкл этанола	750 мкл этанола	750 мкл этанола

Выдержите при	—70 °C, 10—15 мин	—70 °C, 10—15 мин	—70 °C, 10—15 мин	—70 °C, 10—15 мин	—70 °C, 10—15 мин
Центрифугируйте	10 мин	10 мин	10 мин	10 мин	10 мин
Осадок промойте	70%-ным этанолом	70%-ным этанолом	70%-ным этанолом	70%-ным этанолом	70%-ным этанолом
Высушите под вакуумом					
К осадку добавьте	100 мкл 1,0 М пиперидина	100 мкл 1,0 М пиперидина	100 мкл 0,1 М пиперидина	100 мкл 1,0 М пиперидина	100 мкл 1,0 М пиперидина
Прогрейте при	90°, 30 мин	90 °C, 30 мин	90 °C, 30 мин	90 °C, 30 мин	90 °C, 30 мин
Лиофилизуйте					
Добавьте	10 мкл H_2O	10 мкл H_2O	10 мкл H_2O	10 мкл H_2O	10 мкл H_2O
Лиофилизуйте					
Добавьте	10 мкл H_2O	10 мкл H_2O	10 мкл H_2O	10 мкл H_2O	10 мкл H_2O
Лиофилизуйте					
Добавьте	10 мкл буфера для нанесения	10 мкл буфера для нанесения	10 мкл буфера для нанесения	10 мкл буфера для нанесения	10 мкл буфера для нанесения
Прогрейте при	90 °C, 1 мин	90 °C, 1 мин	90 °C, 1 мин	90 °C, 1 мин	90 °C, 1 мин
Охладите во льду					
Нанесите на гель					

[1]) Реакции следует проводить в силиконированных эппендорфовских пробирках.

Чтобы приготовить 8%-ный гель, смешайте в небольшой колбе

20%-ный акриламид	20 мл
Смесь с мочевиной	30 мл
10%-ный персульфат аммония (свежерастворенный в воде)	0,4 мл

Налейте раствор в 50-мл шприц и добавьте 50 мкл TEMED. Быстро размешайте и вылейте содержимое шприца (надевать иглу не надо) в заранее подготовленную форму для геля.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б. ПЛАЗМИДА pBR322

НУКЛЕОТИДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ПЛАЗМИДЫ pBR322

Общая длина плазмиды pBR322 составляет 4362 нуклеотида; в последовательности, приведенной ниже, нуклеотиды пронумерованы по часовой стрелке, начиная с единичного *Eco*RI-сайта. Нуклеотид 1 — первый тимидиновый остаток в *Eco*RI-сайте:

G—A—A—T—T—C

Нуклеотидная последовательность плазмиды pBR322 определена Сатклиффом (Sutcliffe, 1978, 1979).

10	20	30	40	50
TTCTCATGTT	TGACAGCTTA	TCATCGATAA	GCTTTAATGC	GGTAGTTTAT
AAGAGTACAA	ACTGTCGAAT	AGTAGCTATT	CGAAATTACG	CCATCAAATA

60	70	80	90	100
CACAGTTAAA	TTGCTAACGC	AGTCAGGCAC	CGTGTATGAA	ATCTAACAAT
GTGTCAATTT	AACGATTGCG	TCAGTCCGTG	GCACATACTT	TAGATTGTTA

110	120	130	140	150
GCGCTCATCG	TCATCCTCGG	CACCGTCACC	CTGGATGCTG	TAGGCATAGG
CGCGAGTAGC	AGTAGGAGCC	GTGGCAGTGG	GACCTACGAC	ATCCGTATCC

160	170	180	190	200
CTTGGTTATG	CCGGTACTGC	CGGGCCTCTT	GCGGGATATC	GTCCATTCCG
GAACCAATAC	GGCCATGACG	GCCCGGAGAA	CGCCCTATAG	CAGGTAAGGC

210	220	230	240	250
ACAGCATCGC	CAGTCACTAT	GGCGTGCTGC	TAGCGCTATA	TGCGTTGATG
TGTCGTAGCG	GTCAGTGATA	CCGCACGACG	ATCGCGATAT	ACGCAACTAC

260	270	280	290	300
CAATTTCTAT	GCGCACCCGT	TCTCGGAGCA	CTGTCCGACC	GCTTTGGCCG
GTTAAAGATA	CGCGTGGGCA	AGAGCCTCGT	GACAGGCTGG	CGAAACCGGC

310	320	330	340	350
CCGCCCAGTC	CTGCTCGCTT	CGCTACTTGG	AGCCACTATC	GACTACGCGA
GGCGGGTCAG	GACGAGCGAA	GCGATGAACC	TCGGTGATAG	CTGATGCGCT

360	370	380	390	400
TCATGGCGAC	CACACCCGTC	CTGTGGATCC	TCTACGCCGG	ACGCATCGTG
AGTACCGCTG	GTGTGGGCAG	GACACCTAGG	AGATGCGGCC	TGCGTAGCAC

410	420	430	440	450
GCCGGCATCA	CCGGCGCCAC	AGGTGCGGTT	GCTGGCGCCT	ATATCGCCGA
CGGCCGTAGT	GGCCGCGGTG	TCCACGCCAA	CGACCGCGGA	TATAGCGGCT

460	470	480	490	500
CATCACCGAT	GGGGAAGATC	GGGCTCGCCA	CTTCGGGCTC	ATGAGCGCTT
GTAGTGGCTA	CCCCTTCTAG	CCCGAGCGGT	GAAGCCCGAG	TACTCGCGAA

510	520	530	540	550
GTTTCGGCGT	GGGTATGGTG	GCAGGCCCGT	GGCCGGGGGA	CTGTTGGGCG
CAAAGCCGCA	CCCATACCAC	CGTCCGGGCA	CCGGCCCCCT	GACAACCCGC

560	570	580	590	600
CCATCTCCTT	GCATGCACCA	TTCCTTGCGG	CGGCGGTGCT	CAACGGCCTC
GGTAGAGGAA	CGTACGTGGT	AAGGAACGCC	GCCGCCACGA	GTTGCCGGAG

610	620	630	640	650
AACCTACTAC	TGGGCTGCTT	CCTAATGCAG	GAGTCGCATA	AGGGAGAGCG
TTGGATGATG	ACCCGACGAA	GGATTACGTC	CTCAGCGTAT	TCCCTCTCGC

660	670	680	690	700
TCGACCGATG	CCCTTGAGAG	CCTTCAACCC	AGTCAGCTCC	TTCCGGTGGG
AGCTGGCTAC	GGGAACTCTC	GGAAGTTGGG	TCAGTCGAGG	AAGGCCACCC

710	720	730	740	750
CGCGGGGCAT	GACTATCGTC	GCCGCACTTA	TGACTGTCTT	CTTTATCATG
GCGCCCCGTA	CTGATAGCAG	CGGCGTGAAT	ACTGACAGAA	GAAATAGTAC

760	770	780	790	800
CAACTCGTAG	GACAGGTGCC	GGCAGCGCTC	TGGGTCATTT	TCGCCGAGGA
GTTGAGCATC	CTGTCCACGG	CCGTCGCGAG	ACCCAGTAAA	AGCCGCTCCT

810	820	830	840	850
CCGCTTTCGC	TGGAGCGCGA	CGATGATCGG	CCTGTCGCTT	GCGGTATTCG
GGCGAAAGCG	ACCTCGCGCT	GCTACTAGCC	GGACAGCGAA	CGCCATAAGC

860	870	880	890	900
GAATCTTGCA	CGCCCTCGCT	CAAGCCTTCG	TCACTGGTCC	CGCCACCAAA
CTTAGAACGT	GCGGGAGCGA	GTTCGGAAGC	AGTGACCAGG	GCGGTGGTTT

910	920	930	940	950
CGTTTCGGCG	AGAAGCAGGC	CATTATCGCC	GGCATGGCGG	CCGACGCGCT
GCAAAGCCGC	TCTTCGTCCG	GTAATAGCGG	CCGTACCGCC	GGCTGCGCGA

960	970	980	990	1000
GGGCTACGTC	TTGCTGGCGT	TCGCGACGCG	AGGCTGGATG	GCCTTCCCCA
CCCGATGCAG	AACGACCGCA	AGCGCTGCGC	TCCGACCTAC	CGGAAGGGGT

1010	1020	1030	1040	1050
TTATGATTCT	TCTCGCTTCC	GGCGGCATCG	GGATGCCCGC	GTTGCAGGCC
AATACTAAGA	AGAGCGAAGG	CCGCCGTAGC	CCTACGGGCG	CAACGTCCGG

1060	1070	1080	1090	1100
ATGCTGTCCA	GGCAGGTAGA	TGACGACCAT	CAGGGACAGC	TTCAAGGATC
TACGACAGGT	CCGTCCATCT	ACTGCTGGTA	GTCCCTGTCG	AAGTTCCTAG

1110	1120	1130	1140	1150
GCTCGCGGCT	CTTACCAGCC	TAACTTCGAT	CACTGGACCG	CTGATCGTCA
CGAGCGCCGA	GAATGGTCGG	ATTGAAGCTA	GTGACCTGGC	GACTAGCAGT

1160	1170	1180	1190	1200
CGGCGATTTA	TGCCGCCTCG	GCGAGCACAT	GGAACGGGTT	GGCATGGATT
GCCGCTAAAT	ACGGCGGAGC	CGCTCGTGTA	CCTTGCCCAA	CCGTACCTAA

```
      1210        1220        1230        1240        1250
GTAGGCGCCG  CCCTATACCT  TGTCTGCCTC  CCCGCGTTGC  GTCGCGGTGC
CATCCGCGGC  GGGATATGGA  ACAGACGGAG  GGGCGCAACG  CAGCGCCACG

      1260        1270        1280        1290        1300
ATGGAGCCGG  GCCACCTCGA  CCTGAATGGA  AGCCGGCGGC  ACCTCGCTAA
TACCTCGGCC  CGGTGGAGCT  GGACTTACCT  TCGGCCGCCG  TGGAGCGATT

      1310        1320        1330        1340        1350
CGGATTCACC  ACTCCAAGAA  TTGGAGCCAA  TCAATTCTTG  CGGAGAACTG
GCCTAAGTGG  TGAGGTTCTT  AACCTCGGTT  AGTTAAGAAC  GCCTCTTGAC

      1360        1370        1380        1390        1400
TGAATGCGCA  AACCAACCCT  TGGCAGAACA  TATCCATCGC  GTCCGCCATC
ACTTACGCGT  TTGGTTGGGA  ACCGTCTTGT  ATAGGTAGCG  CAGGCGGTAG

      1410        1420        1430        1440        1450
TCCAGCAGCC  GCACGCCGCG  CATCTCGGGC  AGCGTTGGGT  CCTGGCCACG
AGGTCGTCGG  CGTGCGGCGC  GTAGAGCCCG  TCGCAACCCA  GGACCGGTGC

      1460        1470        1480        1490        1500
GGTGCGCATG  ATCGTGCTCC  TGTCGTTGAG  GACCCGGCTA  GGCTGGCGGG
CCACGCGTAC  TAGCACGAGG  ACAGCAACTC  CTGGGCCGAT  CCGACCGCCC

      1510        1520        1530        1540        1550
GTTGCCTTAC  TGGTTAGCAG  AATGAATCAC  CGATACGCGA  GCGAACGTGA
CAACGGAATG  ACCAATCGTC  TTACTTAGTG  GCTATGCGCT  CGCTTGCACT

      1560        1570        1580        1590        1600
AGCGACTGCT  GCTGCAAAAC  GTCTGCGACC  TGAGCAACAA  CATGAATGGT
TCGCTGACGA  CGACGTTTTG  CAGACGCTGG  ACTCGTTGTT  GTACTTACCA

      1610        1620        1630        1640        1650
GTTCGGTTTC  CGTGTTTCGT  AAAGTCTGGA  AACGCGGAAG  TCAGCGCCCT
GAAGCCAAAG  GCACAAAGCA  TTTCAGACCT  TTGCGCCTTC  AGTCGCGGGA

      1660        1670        1680        1690        1700
GCACCATTAT  GTTCCGGATC  TGCATCGCAG  GATGCTGCTG  GCTACCCTGT
CGTGGTAATA  CAAGGCCTAG  ACGTAGCGTC  CTACGACGAC  CGATGGGACA

      1710        1720        1730        1740        1750
GGAACACCTA  CATCTGTATT  AACGAAGCGC  TGGCATTGAC  CCTGAGTGAT
CCTTGTGGAT  GTAGACATAA  TTGCTTCGCG  ACCGTAACTG  GGACTCACTA

      1760        1770        1780        1790        1800
TTTTCTCTGG  TCCCGCCGCA  TCCATACCGC  CAGTTGTTTA  CCCTCACAAC
AAAAGAGACC  AGGGCGGCGT  AGGTATGGCG  GTCAACAAAT  GGGAGTGTTG
```

1810	1820	1830	1840	1850
GTTCCAGTAA	CCGGGCATGT	TCATCATCAG	TAACCCGTAT	CGTGAGCATC
CAAGGTCATT	GGCCCGTACA	AGTAGTAGTC	ATTGGGCATA	GCACTCGTAG

1860	1870	1880	1890	1900
CTCTCTCGTT	TCATCGGTAT	CATTACCCCC	ATGAACAGAA	ATTCCCCCTT
GAGAGAGCAA	AGTAGCCATA	GTAATGGGGG	TACTTGTCTT	TAAGGGGGAA

1910	1920	1930	1940	1950
ACACGGAGGC	ATCAAGTGAC	CAAACAGGAA	AAAACCGCCC	TTAACATGGC
TGTGCCTCCG	TAGTTCACTG	GTTTGTCCTT	TTTTGGCGGG	AATTGTACCG

1960	1970	1980	1990	2000
CCGCTTTATC	AGAAGCCAGA	CATTAACGCT	TCTGGAGAAA	CTCAACGAGC
GGCGAAATAG	TCTTCGGTCT	GTAATTGCGA	AGACCTCTTT	GAGTTGCTCG

2010	2020	2030	2040	2050
TGGACGCGGA	TGAACAGGCA	GACATCTGTG	AATCGCTTCA	CGACCACGCT
ACCTGCGCCT	ACTTGTCCGT	CTGTAGACAC	TTAGCGAAGT	GCTGGTGCGA

2060	2070	2080	2090	2100
GATGAGCTTT	ACCGCAGCTG	CCTCGCGCGT	TTCGGTGATG	ACGGTGAAAA
CTACTCGAAA	TGGCGTCGAC	GGAGCGCGCA	AAGCCACTAC	TGCCACTTTT

2110	2120	2130	2140	2150
CCTCTGACAC	ATGCAGCTCC	CGGAGACGGT	CACAGCTTGT	CTGTAAGCGG
GGAGACTGTG	TACGTCGAGG	GCCTCTGCCA	GTGTCGAACA	GACATTCGCC

2160	2170	2180	2190	2200
ATGCCGGGAG	CAGACAAGCC	CGTCAGGGCG	CGTCAGCGGG	TGTTGGCGGG
TACGGCCCTC	GTCTGTTCGG	GCAGTCCCGC	GCAGTCGCCC	ACAACCGCCC

2210	2220	2230	2240	2250
TGTCGGGGCG	CAGCCATGAC	CCAGTCACGT	AGCGATAGCG	GAGTGTATAC
ACAGCCCCGC	GTCGGTACTG	GGTCAGTGCA	TCGCTATCGC	CTCACATATG

2260	2270	2280	2290	2300
TGGCTTAACT	ATGCGGCATC	AGAGCAGATT	GTACTGAGAG	TGCACCATAT
ACCGAATTGA	TACGCCGTAG	TCTCGTCTAA	CATGACTCTC	ACGTGGTATA

2310	2320	2330	2340	2350
GCGGTGTGAA	ATACCGCACA	GATGCGTAAG	GAGAAAATAC	CGCATCAGGC
CGCCACACTT	TATGGCGTGT	CTACGCATTC	CTCTTTTATG	GCGTAGTCCG

2360	2370	2380	2390	2400
GCTCTTCCGC	TTCCTCGCTC	ACTGACTCGC	TGCGCTCGGT	CGTTCGGCTG
CGAGAAGGCG	AAGGAGCGAG	TGACTGAGCG	ACGCGAGCCA	GCAAGCCGAC

2410	2420	2430	2440	2450
CGGCGAGCGG	TATCAGCTCA	CTCAAAGGCG	GTAATACGGT	TATCCACAGA
GCCGCTCGCC	ATAGTCGAGT	GAGTTTCCGC	CATTATGCCA	ATAGGTGTCT

2460	2470	2480	2490	2500
ATCAGGGGAT	AACGCAGGAA	AGAACATGTG	AGCAAAAGGC	CAGCAAAAGG
TAGTCCCCTA	TTGCGTCCTT	TCTTGTACAC	TCGTTTTCCG	GTCGTTTTCC

2510	2520	2530	2540	2550
CCAGGAACCG	TAAAAAGGCC	GCGTTGCTGG	CGTTTTTCCA	TAGGCTCCGC
GGTCCTTGGC	ATTTTTCCGG	CGCAACGACC	GCAAAAAGGT	ATCCGAGGCG

2560	2570	2580	2590	2600
CCCCCTGACG	AGCATCACAA	AAATCGACGC	TCAAGTCAGA	GGTGGCGAAA
GGGGGACTGC	TCGTAGTGTT	TTTAGCTGCG	AGTTCAGTCT	CCACCGCTTT

2610	2620	2630	2640	2650
CCCGACAGGA	CTATAAAGAT	ACCAGGCGTT	TCCCCCTGGA	AGCTCCCTCG
GGGCTGTCCT	GATATTTCTA	TGGTCCGCAA	AGGGGGACCT	TCGAGGGAGC

2660	2670	2680	2690	2700
TGCGCTCTCC	TGTTCCGACC	CTGCCGCTTA	CCGGATACCT	GTCCGCCTTT
ACGCGAGAGG	ACAAGGCTGG	GACGGCGAAT	GGCCTATGGA	CAGGCGGAAA

2710	2720	2730	2740	2750
CTCCCTTCGG	GAAGCGTGGC	GCTTTCTCAA	TGCTCACGCT	GTAGGTATCT
GAGGGAAGCC	CTTCGCACCG	CGAAAGAGTT	ACGAGTGCGA	CATCCATAGA

2760	2770	2780	2790	2800
CAGTTCGGTG	TAGGTCGTTC	GCTCCAAGCT	GGGCTGTGTG	CACGAACCCC
GTCAAGCCAC	ATCCAGCAAG	CGAGGTTCGA	CCCGACACAC	GTGCTTGGGG

2810	2820	2830	2840	2850
CCGTTCAGCC	CGACCGCTGC	GCCTTATCCG	GTAACTATCG	TCTTGAGTCC
GGCAAGTCGG	GCTGGCGACG	CGGAATAGGC	CATTGATAGC	AGAACTCAGG

2860	2870	2880	2890	2900
AACCCGGTAA	GACACGACTT	ATCGCCACTG	GCAGCAGCCA	CTGGTAACAG
TTGGGCCATT	CTGTGCTGAA	TAGCGGTGAC	CGTCGTCGGT	GACCATTGTC

2910	2920	2930	2940	2950
GATTAGCAGA	GCGAGGTATG	TAGGCGGTGC	TACAGAGTTC	TTGAAGTGGT
CTAATCGTCT	CGCTCCATAC	ATCCGCCACG	ATGTCTCAAG	AACTTCACCA

2960	2970	2980	2990	3000
GGCCTAACTA	CGGCTACACT	AGAAGGACAG	TATTTGGTAT	CTGCGCTCTG
CCGGATTGAT	GCCGATGTGA	TCTTCCTGTC	ATAAACCATA	GACGCGAGAC

3010	3020	3030	3040	3050
CTGAAGCCAG	TTACCTTCGG	AAAAAGAGTT	GGTAGCTCTT	GATCCGGCAA
GACTTCGGTC	AATGGAAGCC	TTTTTCTCAA	CCATCGAGAA	CTAGGCCGTT

3060	3070	3080	3090	3100
ACAAACCACC	GCTGGTAGCG	GTGGTTTTTT	TGTTTGCAAG	CAGCAGATTA
TGTTTGGTGG	CGACCATCGC	CACCAAAAAA	ACAAACGTTC	GTCGTCTAAT

3110	3120	3130	3140	3150
CGCGCAGAAA	AAAAGGATCT	CAAGAAGATC	CTTTGATCTT	TTCTACGGGG
GCGCGTCTTT	TTTTCCTAGA	GTTCTTCTAG	GAAACTAGAA	AAGATGCCCC

3160	3170	3180	3190	3200
TTCTGACGCTC	AGTGGAACGA	AAACTCACGT	TAAGGGATTT	TGGTCATGAG
AGACTGCGAG	TCACCTTGCT	TTTGAGTGCA	ATTCCCTAAA	ACCAGTACTC

3210	3220	3230	3240	3250
ATTATCAAAA	AGGATCTTCA	CCTAGATCCT	TTTAAATTAA	AAATGAAGTT
TAATAGTTTT	TCCTAGAAGT	GGATCTAGGA	AAATTTAATT	TTTACTTCAA

3260	3270	3280	3290	3300
TTAAATCAAT	CTAAAGTATA	TATGAGTAAA	CTTGGTCTGA	CAGTTACCAA
AATTTAGTTA	GATTTCATAT	ATACTCATTT	GAACCAGACT	GTCAATGGTT

3310	3320	3330	3340	3350
TGCTTAATCA	GTGAGGCACC	TATCTCAGCG	ATCTGTCTAT	TTCGTTCATC
ACGAATTAGT	CACTCCGTGG	ATAGAGTCGC	TAGACAGATA	AAGCAAGTAG

3360	3370	3380	3390	3400
CATAGTTGCC	TGACTCCCCG	TCGTGTAGAT	AACTACGATA	CGGGAGGGCT
GTATCAACGG	ACTGAGGGGC	AGCACATCTA	TTGATGCTAT	GCCCTCCCGA

3410	3420	3430	3440	3450
TACCATCTGG	CCCCAGTGCT	GCAATGATAC	CGCGAGACCC	ACGCTCACCG
ATGGTAGACC	GGGGTCACGA	CGTTACTATG	GCGCTCTGGG	TGCGAGTGGC

3460	3470	3480	3490	3500
GCTCCAGATT	TATCAGCAAT	AAACCAGCCA	GCCGGAAGGG	CCGAGCGCAG
CGAGGTCTAA	ATAGTCGTTA	TTTGGTCGGT	CGGCCTTCCC	GGCTCGCGTC

3510	3520	3530	3540	3550
AAGTGGTCCT	GCAACTTTAT	CCGCCTCCAT	CCAGTCTATT	AATTGTTGCC
TTCACCAGGA	CGTTGAAATA	GGCGGAGGTA	GGTCAGATAA	TTAACAACGG

3560	3570	3580	3590	3600
GGGAAGCTAG	AGTAAGTAGT	TCGCCAGTTA	ATAGTTTGCG	CAACGTTGTT
CCCTTCGATC	TCATTCATCA	AGCGGTCAAT	TATCAAACGC	GTTGCAACAA

```
      3610        3620        3630        3640        3650
GCCATTGCTG  CAGGCATCGT  GGTGTCACGC  TCGTCGTTTG  GTATGGCTTC
CGGTAACGAC  GTCCGTAGCA  CCACAGTGCG  AGCAGCAAAC  CATACCGAAG

      3660        3670        3680        3690        3700
ATTCAGCTCC  GGTTCCCAAC  GATCAAGGCG  AGTTACATGA  TCCCCCATGT
TAAGTCGAGG  CCAAGGGTTG  CTAGTTCCGC  TCAATGTACT  AGGGGGTACA

      3710        3720        3730        3740        3750
TGTGCAAAAA  AGCGGTTAGC  TCCTTCGGTC  CTCCGATCGT  TGTCAGAAGT
ACACGTTTTT  TCGCCAATCG  AGGAAGCCAG  GAGGCTAGCA  ACAGTCTTCA

      3760        3770        3780        3790        3800
AAGTTGGCCG  CAGTGTTATC  ACTCATGGTT  ATGGCAGCAC  TGCATAATTC
TTCAACCGGC  GTCACAATAG  TGAGTACCAA  TACCGTCGTG  ACGTATTAAG

      3810        3820        3830        3840        3850
TCTTACTGTC  ATGCCATCCG  TAAGATGCTT  TTCTGTGACT  GGTGAGTACT
AGAATGACAG  TACGGTAGGC  ATTCTACGAA  AAGACACTGA  CCACTCATGA

      3860        3870        3880        3890        3900
CAACCAAGTC  ATTCTGAGAA  TAGTGTATGC  GGCGACCGAG  TTGCTCTTGC
GTTGGTTCAG  TAAGACTCTT  ATCACATACG  CCGCTGGCTC  AACGAGAACG

      3910        3920        3930        3940        3950
CCGGCGTCAA  CACGGGATAA  TACCGCGCCA  CATAGCAGAA  CTTTAAAAGT
GGCCGCAGTT  GTGCCCTATT  ATGGCGCGGT  GTATCGTCTT  GAAATTTTCA

      3960        3970        3980        3990        4000
GCTCATCATT  GGAAAACGTT  CTTCGGGGCG  AAAACTCTCA  AGGATCTTAC
CGAGTAGTAA  CCTTTTGCAA  GAAGCCCCGC  TTTTGAGAGT  TCCTAGAATG

      4010        4020        4030        4040        4050
CGCTGTTGAG  ATCCAGTTCG  ATGTAACCCA  CTCGTGCACC  CAACTGATCT
GCGACAACTC  TAGGTCAAGC  TACATTGGGT  GAGCACGTGG  GTTGACTAGA

      4060        4070        4080        4090        4100
TCAGCATCTT  TTACTTTCAC  CAGCGTTTCT  GGGTGAGCAA  AAACAGGAAG
AGTCGTAGAA  AATGAAAGTG  GTCGCAAAGA  CCCACTCGTT  TTTGTCCTTC

      4110        4120        4130        4140        4150
GCAAAATGCC  GCAAAAAAGG  GAATAAGGGC  GACACGGAAA  TGTTGAATAC
CGTTTTACGG  CGTTTTTTCC  CTTATTCCCG  CTGTGCCTTT  ACAACTTATG

      4160        4170        4180        4190        4200
TCATACTCTT  CCTTTTTCAA  TATTATTGAA  GCATTTATCA  GGGTTATTGT
AGTATGAGAA  GGAAAAAGTT  ATAATAACTT  CGTAAATAGT  CCCAATAACA
```

4210	4220	4230	4240	4250
CTCATGAGCG	GATACATATT	TGAATGTATT	TAGAAAAATA	AACAAATAGG
GAGTACTCGC	CTATGTATAA	ACTTACATAA	ATCTTTTTAT	TTGTTTATCC

4260	4270	4280	4290	4300
GGTTCCGCGC	ACATTTCCCC	GAAAAGTGCC	ACCTGACGTC	TAAGAAACCA
CCAAGGCGCG	TGTAAAGGGG	CTTTTCACGG	TGGACTGCAG	ATTCTTTGGT

4310	4320	4330	4340	4350
TTATTATCAT	GACATTAACC	TATAAAAATA	GGCGTATCAC	GAGGCCCTTT
AATAATAGTA	CTGTAATTGG	ATATTTTTAT	CCGCATAGTG	CTCCGGGAAA

4360	4362
CGTCTTCAAG	AA
GCAGAAGTTC	TT

САЙТЫ РЕСТРИКЦИИ В ПЛАЗМИДЕ pBR322

В первой колонке даны обозначения сайтов рестрикции в кольцевой ДНК по часовой стрелке, начиная с участка ДНК, следующего сразу за единичным *Eco*RI-сайтом. Во второй колонке дан порядковый номер первого нуклеотида последовательности, узнаваемой рестриктазой. В четвертой колонке указан порядковый номер крайнего (5′) нуклеотида расщепляемого участка. В последней колонке приведена нуклеотидная последовательность узнаваемого сайта.

Tth111II	7	CUTS?	7	TGTTTG
Alu I	15	CUTS@	16	AG^CT
Cla I	23	CUTS@	24	AT^CGAT
Taq I	24	CUTS@	24	T^CGA
Hind III	29	CUTS@	29	A^AGCTT
Alu I	30	CUTS@	31	AG^CT
HgiC I	76	CUTS@	76	G^GCACC
Hha I	101	CUTS@	103	GCG^C
Mnl I	115	CUTS?	115	CCTC
HgiC I	119	CUTS@	119	G^GCACC
Hph I	126	CUTS?	126	TCACC
ScrF I	130	CUTS?	130	CCNGG
EcoR II	130	CUTS@	129	^CCTGG
Fok I	133	CUTS?	133	GGATG
SfaN I	134	CUTS?	134	GATGC
Hpa II	161	CUTS@	161	C^CGG
Rsa I	164	CUTS@	165	GT^AC
ScrF I	170	CUTS?	170	CCNGG
Hpa II	170	CUTS@	170	C^CGG
Cau II	170	CUTS@	171	CC^GGG
Asu I	172	CUTS@	172	G^GNCC
Hae III	173	CUTS@	174	GG^CC
Mnl I	175	CUTS?	175	CCTC
EcoR V	185	CUTS@	189	GATAT^C
SfaN I	204	CUTS?	204	GCATC
Fnu4H I	226	CUTS@	227	GC^NGC
Bbv I	226	CUTS?	226	GCTGC
Hae II	232	CUTS@	236	AGCGC^T
Hha I	233	CUTS@	235	GCG^C
SfaN I	247	CUTS?	247	GATGC
Mst I	260	CUTS@	262	TGC^GCA
Hha I	261	CUTS@	263	GCG^C
HgiA I	276	CUTS@	280	GAGCA^C
Cfr I	295	CUTS@	295	T^GGCCG
Gdi II	295	CUTS@	295	T^GGCCG
Hae III	296	CUTS@	297	GG^CC
NspB II	297	CUTS@	300	GCCG^C
Fnu4H I	297	CUTS@	298	GC^NGC
NspB II	300	CUTS@	303	GCCG^C
Fnu4H I	300	CUTS@	301	GC^NGC
Taq I	339	CUTS@	339	T^CGA
FnuD II	346	CUTS@	347	CG^CG
Mbo I	349	CUTS@	348	^GATC
BamH I	375	CUTS@	375	G^GATCC
Xho II	375	CUTS@	375	G^GATCC
Mbo I	376	CUTS@	375	^GATC
Mnl I	379	CUTS?	379	CCTC
Hpa II	387	CUTS@	387	C^CGG
Hga I	390	CUTS?	390	GACGC
SfaN I	393	CUTS?	393	GCATC
Cfr I	399	CUTS@	399	T^GGCCG
Gdi II	399	CUTS@	399	T^GGCCG
Hae III	400	CUTS@	401	GG^CC
Nae I	401	CUTS@	403	GCC^GGC
Hpa II	402	CUTS@	402	C^CGG
SfaN I	405	CUTS?	405	GCATC
Hph I	408	CUTS?	408	TCACC
Hpa II	411	CUTS@	411	C^CGG
Nar I	413	CUTS@	414	GG^CGCC
Hae II	413	CUTS@	417	GGCGC^C
Acy I	413	CUTS@	414	GG^CGCC
HgiC I	413	CUTS@	413	G^GCGCC
Hha I	414	CUTS@	416	GCG^C
Nar I	434	CUTS@	435	GG^CGCC
Hae II	434	CUTS@	438	GGCGC^C
Acy I	434	CUTS@	435	GG^CGCC
HgiC I	434	CUTS@	434	G^GCGCC
Hha I	435	CUTS@	437	GCG^C
Hph I	453	CUTS?	453	TCACC
Mbo II	464	CUTS?	464	GAAGA
Mbo I	467	CUTS@	466	^GATC
HgiJ II	471	CUTS@	475	GGGCT^C
HgiJ II	485	CUTS@	489	GGGCT^C
Hae II	494	CUTS@	498	AGCGC^T
Hha I	495	CUTS@	497	GCG^C
Asu I	524	CUTS@	524	G^GNCC
Hae III	524	CUTS@	525	GG^CC
Cfr I	530	CUTS@	530	T^GGCCG
Gdi II	530	CUTS@	530	T^GGCCG
Hae III	531	CUTS@	532	GG^CC
ScrF I	533	CUTS?	533	CCNGG
Hpa II	533	CUTS@	533	C^CGG
Cau II	533	CUTS@	534	CC^GGG
Nar I	547	CUTS@	548	GG^CGCC
Hae II	547	CUTS@	551	GGCGC^C
Acy I	547	CUTS@	548	GG^CGCC
HgiC I	547	CUTS@	547	G^GCGCC
Hha I	548	CUTS@	550	GCG^C
Sph I	561	CUTS@	565	GCATG^C
NspC I	561	CUTS@	565	GCATG^C
NspB II	577	CUTS@	580	GCGG^C
Fnu4H I	577	CUTS@	578	GC^NGC
NspB II	580	CUTS@	583	GCGG^C
Fnu4H I	580	CUTS@	581	GC^NGC
HgiA I	586	CUTS@	590	GTGCT^C
Hae III	595	CUTS@	596	GG^CC
Mnl I	597	CUTS?	597	CCTC
Fnu4H I	614	CUTS@	615	GC^NGC
Bbv I	614	CUTS?	614	GCTGC
HinF I	631	CUTS@	631	G^ANTC
Hga I	648	CUTS?	648	GCGTC
Acc I	650	CUTS@	651	GT^CGAC
Hind II	650	CUTS@	652	GTC^GAC
Sal I	650	CUTS@	650	G^TCGAC
Taq I	651	CUTS@	651	T^CGA
SfaN I	657	CUTS?	657	GATGC
Alu I	685	CUTS@	686	AG^CT
Hpa II	693	CUTS@	693	C^CGG
Hha I	700	CUTS@	702	GCG^C
FnuD II	701	CUTS@	702	CG^CG
NspB II	721	CUTS@	724	GCCG^C
Fnu4H I	721	CUTS@	722	GC^NGC
Mbo II	737	CUTS?	737	TCTTC
HgiC I	765	CUTS@	765	G^GTGCC
Nae I	768	CUTS@	770	GCC^GGC
Hpa II	769	CUTS@	769	C^CGG
Bbv I	772	CUTS?	772	GCAGC
Fnu4H I	772	CUTS@	773	GC^NGC
Hae II	774	CUTS@	778	AGCGC^T
Hha I	775	CUTS@	777	GCG^C
Mnl I	796	CUTS?	796	GAGG
Asu I	798	CUTS@	798	G^GNCC
Ava II	798	CUTS@	798	G^GACC
Hha I	815	CUTS@	817	GCG^C
FnuD II	816	CUTS@	817	CG^CG
Mbo I	825	CUTS@	824	^GATC
Hae III	829	CUTS@	830	GG^CC
HinF I	851	CUTS@	851	G^ANTC
Mnl I	864	CUTS?	864	CCTC
Asu I	886	CUTS@	886	G^GNCC
Ava II	886	CUTS@	886	G^GTCC
Hae I	917	CUTS@	919	AGG^CCA
Hae III	918	CUTS@	919	GG^CC
Bgl I	928	CUTS@	934	GCCNNNN^NGGC
Nae I	928	CUTS@	930	GCC^GGC
Hpa II	929	CUTS@	929	C^CGG
NspB II	937	CUTS@	940	GCGG^C
Fnu4H I	937	CUTS@	938	GC^NGC
Xma III	938	CUTS@	938	C^GGCCG
Gdi II	938	CUTS@	938	C^GGCCG
Cfr I	938	CUTS@	938	C^GGCCG
Hae III	939	CUTS@	940	GG^CC
Hga I	943	CUTS?	943	GACGC
FnuD II	945	CUTS@	946	CG^CG

Hha I	946	CUTS@	948	GCG^C
Nru I	971	CUTS@	973	TCG^CGA
FnuD II	972	CUTS@	973	CG^CG
Hga I	975	CUTS?	975	GACGC
FnuD II	977	CUTS@	978	CG^CG
Mnl I	980	CUTS?	980	GAGG
Fok I	986	CUTS?	986	GGATG
Hae I	989	CUTS@	991	TGG^CCT
Hae III	990	CUTS@	991	GG^CC
HinF I	1005	CUTS@	1005	G^ANTC
Mbo II	1008	CUTS?	1008	TCTTC
Hpa II	1019	CUTS@	1019	C^CGG
NspB II	1022	CUTS@	1025	GCGG^C
Fnu4H I	1022	CUTS@	1023	GC^NGC
SfaN I	1025	CUTS?	1025	GCATC
Fok I	1031	CUTS?	1031	GGATG
SfaN I	1032	CUTS?	1032	GATGC
FnuD II	1038	CUTS@	1039	CG^CG
Hae I	1046	CUTS@	1048	AGG^CCA
Hae III	1047	CUTS@	1048	GG^CC
ScrF I	1058	CUTS?	1058	CCNGG
EcoR II	1058	CUTS@	1057	^CCAGG
Alu I	1088	CUTS@	1089	AG^CT
Mbo I	1097	CUTS@	1096	^GATC
FnuD II	1104	CUTS@	1105	CG^CG
NspB II	1105	CUTS@	1108	GCGG^C
Fnu4H I	1105	CUTS@	1106	GC^NGC
Taq I	1126	CUTS@	1126	T^CGA
Mbo I	1128	CUTS@	1127	^GATC
Asu I	1135	CUTS@	1135	G^GNCC
Ava II	1135	CUTS@	1135	G^GACC
Mbo I	1143	CUTS@	1142	^GATC
Bgl I	1162	CUTS@	1168	GCCNNNN^NGGC
NspB II	1162	CUTS@	1165	GCCG^C
Fnu4H I	1162	CUTS@	1163	GC^NGC
Mnl I	1166	CUTS?	1166	CCTC
HgiA I	1173	CUTS@	1177	GAGCA^C
Nar I	1204	CUTS@	1205	GG^CGCC
Hae II	1204	CUTS@	1208	GGCGC^C
Acy I	1204	CUTS@	1205	GG^CGCC
HgiC I	1204	CUTS@	1204	G^GCGCC
Hha I	1205	CUTS@	1207	GCG^C
NspB II	1207	CUTS@	1210	GCCG^C
Fnu4H I	1207	CUTS@	1208	GC^NGC
Mnl I	1227	CUTS?	1227	CCTC
FnuD II	1233	CUTS@	1234	CG^CG
Hga I	1239	CUTS?	1239	GCGTC
FnuD II	1243	CUTS@	1244	CG^CG
ScrF I	1257	CUTS?	1257	CCNGG
Hpa II	1257	CUTS@	1257	C^CGG
Cau II	1257	CUTS@	1258	CC^GGG
Asu I	1259	CUTS@	1259	G^GNCC
Hae III	1260	CUTS@	1261	GG^CC
Mnl I	1265	CUTS?	1265	CCTC
Taq I	1267	CUTS@	1267	T^CGA
Nae I	1282	CUTS@	1284	GCC^GGC
Hpa II	1283	CUTS@	1283	C^CGG
NspB II	1286	CUTS@	1289	GCGG^C
Fnu4H I	1286	CUTS@	1287	GC^NGC
HgiC I	1288	CUTS@	1288	G^GCACC
Mnl I	1292	CUTS?	1292	CCTC
HinF I	1303	CUTS@	1303	G^ANTC
Hph I	1306	CUTS?	1306	TCACC
Mst I	1355	CUTS@	1357	TGC^GCA
Hha I	1356	CUTS@	1358	GCG^C
FnuD II	1388	CUTS@	1389	CG^CG
Hga I	1389	CUTS?	1389	GCGTC
EcoP15t3	1403	CUTS?	1403	CAGCAG
Bbv I	1405	CUTS?	1405	GCAGC
Fnu4H I	1405	CUTS@	1406	GC^NGC
NspB II	1408	CUTS@	1411	GCCG^C
Fnu4H I	1408	CUTS@	1409	GC^NGC
FnuD II	1414	CUTS@	1415	CG^CG
NspB II	1415	CUTS@	1418	GCGG^C
Fnu4H I	1415	CUTS@	1416	GC^NGC
Hha I	1418	CUTS@	1420	GCG^C
SfaN I	1420	CUTS?	1420	GCATC
Ava I	1424	CUTS@	1424	C^TCGGG
Bbv I	1429	CUTS?	1429	GCAGC
Fnu4H I	1429	CUTS@	1430	GC^NGC
Asu I	1438	CUTS@	1438	G^GNCC
Ava II	1438	CUTS@	1438	G^GTCC
ScrF I	1441	CUTS?	1441	CCNGG
EcoR II	1441	CUTS@	1440	^CCTGG
Bal I	1443	CUTS@	1445	TGG^CCA
Hae I	1443	CUTS@	1445	TGG^CCA
Cfr I	1443	CUTS@	1443	T^GGCCA
Hae III	1444	CUTS@	1445	GG^CC
Mst I	1453	CUTS@	1455	TGC^GCA
Hha I	1454	CUTS@	1456	GCG^C
Mbo I	1460	CUTS@	1459	^GATC
HgiA I	1464	CUTS@	1468	GTGCT^C
Mnl I	1478	CUTS?	1478	GAGG
Asu I	1480	CUTS@	1480	G^GNCC
Ava II	1480	CUTS@	1480	G^GACC
ScrF I	1483	CUTS?	1483	CCNGG
Cau II	1483	CUTS@	1484	CC^CGG
Hpa II	1484	CUTS@	1484	C^CGG
HinF I	1524	CUTS@	1524	G^ANTC
Hph I	1527	CUTS?	1527	TCACC
FnuD II	1536	CUTS@	1537	CG^CG
Fnu4H I	1558	CUTS@	1559	GC^NGC
Bbv I	1558	CUTS?	1558	GCTGC
Fnu4H I	1561	CUTS@	1562	GC^NGC
Bbv I	1561	CUTS?	1561	GCTGC
Dde I	1580	CUTS@	1580	C^TNAG
Mbo II	1600	CUTS?	1600	TCTTC
FnuD II	1633	CUTS@	1634	CG^CG
Hae II	1643	CUTS@	1647	AGCGC^C
Hha I	1644	CUTS@	1646	GCG^C
Hpa II	1664	CUTS@	1664	C^CGG
Xho II	1666	CUTS@	1666	G^GATCT
Mbo I	1667	CUTS@	1666	^GATC
SfaN I	1672	CUTS?	1672	GCATC
Fok I	1680	CUTS?	1680	GGATG
SfaN I	1681	CUTS?	1681	GATGC
Fnu4H I	1684	CUTS@	1685	GC^NGC
Bbv I	1684	CUTS?	1684	GCTGC
Hae II	1726	CUTS@	1730	AGCGC^T
Hha I	1727	CUTS@	1729	GCG^C
Dde I	1742	CUTS@	1742	C^TNAG
Asu I	1759	CUTS@	1759	G^GNCC
Ava II	1759	CUTS@	1759	G^GTCC
NspB II	1765	CUTS@	1768	GCGG^C
Fnu4H I	1765	CUTS@	1766	GC^NGC
SfaN I	1768	CUTS?	1768	GCATC
Mnl I	1792	CUTS?	1792	CCTC
ScrF I	1811	CUTS?	1811	CCNGG
Hpa II	1811	CUTS@	1811	C^CGG
Cau II	1811	CUTS@	1812	CC^GGG
NspC I	1815	CUTS@	1819	GCATG^T
SfaN I	1846	CUTS?	1846	GCATC
Mnl I	1850	CUTS?	1850	CCTC
Mnl I	1906	CUTS?	1906	GAGG
SfaN I	1909	CUTS?	1909	GCATC
Tth111II	1921	CUTS?	1921	CAAACA
Asu I	1948	CUTS@	1948	G^GNCC
Hae III	1948	CUTS@	1949	GG^CC
Alu I	1998	CUTS@	1999	AG^CT
Hga I	2003	CUTS?	2003	GACGC
FnuD II	2005	CUTS@	2006	CG^CG
Fok I	2008	CUTS?	2008	GGATG
HinF I	2030	CUTS@	2030	G^ANTC
Xmn I	2030	CUTS?	2030	GAANNNNTTC

Alu I	2055	CUTS@	2056	AG^CT
Bbv I	2064	CUTS?	2064	GCAGC
Fnu4H I	2064	CUTS@	2065	GC^NGC
Pvu II	2065	CUTS@	2067	CAG^CTG
Alu I	2066	CUTS@	2067	AG^CT
Fnu4H I	2067	CUTS@	2068	GC^NGC
Bbv I	2067	CUTS?	2067	GCTGC
Mnl I	2071	CUTS?	2071	CCTC
FnuD II	2074	CUTS@	2075	CG^CG
Hha I	2075	CUTS@	2077	GCG^C
FnuD II	2076	CUTS@	2077	CG^CG
Hph I	2084	CUTS?	2084	GGTGA
Hph I	2093	CUTS?	2093	GGTGA
Mnl I	2101	CUTS?	2101	CCTC
NspC I	2109	CUTS@	2113	ACATG^C
Bbv I	2113	CUTS?	2113	GCAGC
Fnu4H I	2113	CUTS@	2114	GC^NGC
Alu I	2115	CUTS@	2116	AG^CT
ScrF I	2119	CUTS?	2119	CCNGG
Cau II	2119	CUTS@	2120	CC^CGG
Hpa II	2120	CUTS@	2120	C^CGG
Alu I	2134	CUTS@	2135	AG^CT
Fok I	2149	CUTS?	2149	GGATG
SfaN I	2150	CUTS?	2150	GATGC
ScrF I	2154	CUTS?	2154	CCNGG
Hpa II	2154	CUTS@	2154	C^CGG
Cau II	2154	CUTS@	2155	CC^GGG
Hha I	2178	CUTS@	2180	GCG^C
FnuD II	2179	CUTS@	2180	CG^CG
Hga I	2180	CUTS?	2180	GCGTC
Hha I	2208	CUTS@	2210	GCG^C
Bbv I	2210	CUTS?	2210	GCAGC
Fnu4H I	2210	CUTS@	2211	GC^NGC
Tth111 I	2218	CUTS@	2221	GACN^NNGTC
Acc I	2245	CUTS@	2246	GT^ATAC
Sna I	2245	CUTS?	2245	GTATAC
NspB II	2263	CUTS@	2266	GCGG^C
Fnu4H I	2263	CUTS@	2264	GC^NGC
SfaN I	2266	CUTS?	2266	GCATC
Rsa I	2281	CUTS@	2282	GT^AC
Dde I	2284	CUTS@	2284	C^TNAG
HgiA I	2290	CUTS@	2294	GTGCA^C
HgiE II	2294	CUTS?	2294	ACCNNNNNNGGT
Nde I	2296	CUTS?	2296	CATATG
SfaN I	2321	CUTS?	2321	GATGC
SfaN I	2342	CUTS?	2342	GCATC
Hae II	2348	CUTS@	2352	GGCGC^T
Hha I	2349	CUTS@	2351	GCG^C
Mbo II	2353	CUTS?	2353	TCTTC
Mnl I	2363	CUTS?	2363	CCTC
HinF I	2374	CUTS@	2374	G^ANTC
Fnu4H I	2379	CUTS@	2380	GC^NGC
Bbv I	2379	CUTS?	2379	GCTGC
Hha I	2382	CUTS@	2384	GCG^C
Fnu4H I	2397	CUTS@	2398	GC^NGC
Bbv I	2397	CUTS?	2397	GCTGC
NspB II	2400	CUTS@	2403	GCGG^C
Fnu4H I	2400	CUTS@	2401	GC^NGC
Alu I	2415	CUTS@	2416	AG^CT
HinF I	2449	CUTS@	2449	G^ANTC
NspC I	2474	CUTS@	2478	ACATG^T
Hae I	2487	CUTS@	2489	AGG^CCA
Hae III	2488	CUTS@	2489	GG^CC
Hae I	2498	CUTS@	2500	AGG^CCA
Hae III	2499	CUTS@	2500	GG^CC
ScrF I	2501	CUTS?	2501	CCNGG
EcoR II	2501	CUTS@	2500	^CCAGG
Hae III	2517	CUTS@	2518	GG^CC
NspB II	2518	CUTS@	2521	GCGG^C
Fnu4H I	2518	CUTS@	2519	GC^NGC
FnuD II	2520	CUTS@	2521	CG^CG
SfaN I	2562	CUTS?	2562	GCATC
Taq I	2574	CUTS@	2574	T^CGA
Hga I	2576	CUTS?	2576	GACGC
Mnl I	2589	CUTS?	2589	GAGG
ScrF I	2622	CUTS?	2622	CCNGG
EcoR II	2622	CUTS@	2621	^CCAGG
ScrF I	2635	CUTS?	2635	CCNGG
EcoR II	2635	CUTS@	2634	^CCTGG
Alu I	2641	CUTS@	2642	AG^CT
Mnl I	2646	CUTS?	2646	CCTC
Hha I	2652	CUTS@	2654	GCG^C
NspB II	2673	CUTS@	2676	GCCG^C
Fnu4H I	2673	CUTS@	2674	GC^NGC
Hpa II	2681	CUTS@	2681	C^CGG
Hae II	2718	CUTS@	2722	GGCGC^T
Hha I	2719	CUTS@	2721	GCG^C
Dde I	2749	CUTS@	2749	C^TNAG
Alu I	2777	CUTS@	2778	AG^CT
HgiA I	2788	CUTS@	2792	GTGCA^C
Fnu4H I	2816	CUTS@	2817	GC^NGC
Bbv I	2816	CUTS?	2816	GCTGC
Hha I	2819	CUTS@	2821	GCG^C
Hpa II	2828	CUTS@	2828	C^CGG
HinF I	2845	CUTS@	2845	G^ANTC
ScrF I	2853	CUTS?	2853	CCNGG
Cau II	2853	CUTS@	2854	CC^CGG
Hpa II	2854	CUTS@	2854	C^CGG
Bbv I	2881	CUTS?	2881	GCAGC
Fnu4H I	2881	CUTS@	2882	GC^NGC
EcoP15t3	2882	CUTS?	2882	CAGCAG
Bbv I	2884	CUTS?	2884	GCAGC
Fnu4H I	2884	CUTS@	2885	GC^NGC
Mnl I	2913	CUTS?	2913	GAGG
Hae I	2950	CUTS@	2952	TGG^CCT
Hae III	2951	CUTS@	2952	GG^CC
Hha I	2993	CUTS@	2995	GCG^C
Alu I	3034	CUTS@	3035	AG^CT
Mbo I	3041	CUTS@	3040	^GATC
Hpa II	3044	CUTS@	3044	C^CGG
Tth111II	3048	CUTS?	3048	CAAACA
HgiE II	3055	CUTS?	3055	ACCNNNNNNGGT
Tth111II	3081	CUTS?	3081	TGTTTG
Tth111II	3087	CUTS?	3103	CAAGCA
Bbv I	3090	CUTS?	3090	GCAGC
Fnu4H I	3090	CUTS@	3091	GC^NGC
EcoP15t3	3091	CUTS?	3091	CAGCAG
FnuD II	3101	CUTS@	3102	CG^CG
Hha I	3102	CUTS@	3104	GCG^C
Xho II	3115	CUTS@	3115	G^GATCT
Mbo I	3116	CUTS@	3115	^GATC
Mbo II	3124	CUTS?	3124	GAAGA
Xho II	3126	CUTS@	3126	A^GATCC
Mbo I	3127	CUTS@	3126	^GATC
Mbo I	3135	CUTS@	3134	^GATC
Hga I	3154	CUTS?	3154	GACGC
Dde I	3158	CUTS@	3158	C^TNAG
Xho II	3212	CUTS@	3212	G^GATCT
Mbo I	3213	CUTS@	3212	^GATC
Mbo II	3215	CUTS?	3215	TCTTC
Hph I	3218	CUTS?	3218	TCACC
Xho II	3224	CUTS@	3224	A^GATCC
Mbo I	3225	CUTS@	3224	^GATC
Aha III	3231	CUTS@	3233	TTT^AAA
Aha III	3250	CUTS@	3252	TTT^AAA
Mnl I	3313	CUTS?	3313	GAGG
HgiC I	3315	CUTS@	3315	G^GCACC
Dde I	3324	CUTS@	3324	C^TNAG
Mbo I	3330	CUTS@	3329	^GATC
HinF I	3362	CUTS@	3362	G^ANTC
Mnl I	3394	CUTS?	3394	GAGG
Asu I	3409	CUTS@	3409	G^GNCC
Hae III	3409	CUTS@	3410	GG^CC
Fnu4H I	3418	CUTS@	3419	GC^NGC

Bbv I	3418	CUTS?	3418	GCTGC
FnuD II	3431	CUTS@	3432	CG^CG
EcoP I t	3435	CUTS?	3435	AGACC
Hph I	3445	CUTS?	3445	TCACC
Hpa II	3448	CUTS@	3448	C^CGG
Bgl I	3481	CUTS@	3487	GCCNNNN^NGGC
Hpa II	3482	CUTS@	3482	C^CGG
Asu I	3488	CUTS@	3488	G^GNCC
Hae III	3489	CUTS@	3490	GG^CC
Hha I	3495	CUTS@	3497	GCG^C
Asu I	3505	CUTS@	3505	G^GNCC
Ava II	3505	CUTS@	3505	G^GTCC
Mnl I	3524	CUTS?	3524	CCTC
ScrF I	3549	CUTS?	3549	CCNGG
Hpa II	3549	CUTS@	3549	C^CGG
Cau II	3549	CUTS@	3550	CC^GGG
Alu I	3555	CUTS@	3556	AG^CT
Mst I	3587	CUTS@	3589	TGC^GCA
Hha I	3588	CUTS@	3590	GCG^C
Fnu4H I	3607	CUTS@	3608	GC^NGC
Bbv I	3607	CUTS?	3607	GCTGC
Pst I	3608	CUTS@	3612	CTGCA^G
SfaN I	3614	CUTS?	3614	GCATC
Alu I	3655	CUTS@	3656	AG^CT
Hpa II	3659	CUTS@	3659	C^CGG
Mbo I	3671	CUTS@	3670	^GATC
Mbo I	3689	CUTS@	3688	^GATC
Alu I	3718	CUTS@	3719	AG^CT
Asu I	3727	CUTS@	3727	G^GNCC
Ava II	3727	CUTS@	3727	G^GTCC
Mnl I	3730	CUTS?	3730	CCTC
Pvu I	3734	CUTS@	3737	CGAT^CG
Mbo I	3735	CUTS@	3734	^GATC
Cfr I	3755	CUTS@	3755	T^GGCCG
Gdi II	3755	CUTS@	3755	T^GGCCG
Hae III	3756	CUTS@	3757	GG^CC
NspB II	3757	CUTS@	3760	GCCG^C
Fnu4H I	3757	CUTS@	3758	GC^NGC
Bbv I	3784	CUTS?	3784	GCAGC
Fnu4H I	3784	CUTS@	3785	GC^NGC
SfaN I	3824	CUTS?	3824	GATGC
Hph I	3841	CUTS?	3841	GGTGA
Rru I	3845	CUTS@	3847	AGT^ACT
Rsa I	3846	CUTS@	3847	GT^AC
Dde I	3864	CUTS@	3864	C^TNAG
NspB II	3879	CUTS@	3882	GCGG^C
Fnu4H I	3879	CUTS@	3880	GC^NGC
ScrF I	3900	CUTS?	3900	CCNGG
Cau II	3900	CUTS@	3901	CC^CGG
Hpa II	3901	CUTS@	3901	C^CGG
Acy I	3903	CUTS@	3904	GG^CGTC
Hga I	3904	CUTS?	3904	GCGTC
Hind II	3906	CUTS@	3908	GTC^AAC
FnuD II	3924	CUTS@	3925	CG^CG
Hha I	3925	CUTS@	3927	GCG^C
Aha III	3942	CUTS@	3944	TTT^AAA
HgiA I	3949	CUTS@	3953	GTGCT^C
Xmn I	3962	CUTS?	3962	GAANNNNTTC
Mbo II	3970	CUTS?	3970	TCTTC
Xho II	3992	CUTS@	3992	G^GATCT
Mbo I	3993	CUTS@	3992	^GATC
Xho II	4009	CUTS@	4009	A^GATCC
Mbo I	4010	CUTS@	4009	^GATC
Taq I	4018	CUTS@	4018	T^CGA
EcoK t1	4025	CUTS?	4025	AACNNNNNNGTGC
HgiA I	4034	CUTS@	4038	GTGCA^C
Mbo I	4046	CUTS@	4045	^GATC
Mbo II	4048	CUTS?	4048	TCTTC
SfaN I	4054	CUTS?	4054	GCATC
Hph I	4067	CUTS?	4067	TCACC
Hph I	4082	CUTS?	4082	GGTGA
NspB II	4108	CUTS@	4111	GCCG^C
Fnu4H I	4108	CUTS@	4109	GC^NGC
Mbo II	4157	CUTS?	4157	TCTTC
FnuD II	4256	CUTS@	4257	CG^CG
Hha I	4257	CUTS@	4259	GCG^C
Acy I	4285	CUTS@	4286	GA^CGTC
Dde I	4290	CUTS@	4290	C^TNAG
Mnl I	4341	CUTS?	4341	GAGG
Asu I	4343	CUTS@	4343	G^GNCC
Hae III	4343	CUTS@	4344	GG^CC
Mbo II	4353	CUTS?	4353	TCTTC
EcoR I	4360	CUTS@	4360	G^AATTC

ФРАГМЕНТЫ РЕСТРИКЦИИ ДНК pBR322

В приведенном списке указано: 1) число сайтов, расщепляемых данной рестриктазой; 2) номера нуклеотидов, опреляющих начало каждого фрагмента рестрикции; 3) длина каждого фрагмента рестрикции; 4) название фрагмента. →

```
          ===#=== Acc I     HAS   2 SITES ===#===
 651...  1595 BASES...B     ¦     2246...  2767 BASES...A
2246...  2767 BASES...A     ¦      651...  1595 BASES...B

          ===#=== Acy I     HAS   6 SITES ===#===
 414...    21 BASES...F     ¦     1205...  2699 BASES...A
 435...   113 BASES...E     ¦      548...   657 BASES...B
 548...   657 BASES...B     ¦     4286...   490 BASES...C
1205...  2699 BASES...A     ¦     3904...   382 BASES...D
3904...   382 BASES...D     ¦      435...   113 BASES...E
4286...   490 BASES...C     ¦      414...    21 BASES...F

          ===#=== Afl II    HAS   0 SITES ===#===

          ===#=== Aha III   HAS   3 SITES ===#===
3233...    19 BASES...C     ¦     3944...  3651 BASES...A
3252...   692 BASES...B     ¦     3252...   692 BASES...B
3944...  3651 BASES...A     ¦     3233...    19 BASES...C

          ===#=== Alu I     HAS  16 SITES ===#===
  16...    15 BASES...O     ¦     1089...   910 BASES...A
  31...   655 BASES...C     ¦     3719...   659 BASES...B
 686...   403 BASES...E     ¦       31...   655 BASES...C
1089...   910 BASES...A     ¦     3035...   521 BASES...D
1999...    57 BASES...L     ¦      686...   403 BASES...E
2056...    11 BASES...P     ¦     2135...   281 BASES...F
2067...    49 BASES...M     ¦     2778...   257 BASES...G
2116...    19 BASES...N     ¦     2416...   226 BASES...H
2135...   281 BASES...F     ¦     2642...   136 BASES...I
2416...   226 BASES...H     ¦     3556...   100 BASES...J
2642 ..   136 BASES...I     ¦     3656...    63 BASES...K
2778...   257 BASES...G     ¦     1999...    57 BASES...L
3035...   521 BASES...D     ¦     2067...    49 BASES...M
3556...   100 BASES...J     ¦     2116...    19 BASES...N
3656...    63 BASES...K     ¦       16...    15 BASES...O
3719...   659 BASES...B     ¦     2056...    11 BASES...P

          ===#=== Apa I     HAS   0 SITES ===#===

          ===#=== Asu I     HAS  15 SITES ===#===
 172...   352 BASES...C     ¦     1948...  1461 BASES...A
 524...   274 BASES...E     ¦     3727...   616 BASES...B
 798...    88 BASES...L     ¦      172...   352 BASES...C
 886...   249 BASES...F     ¦     1480...   279 BASES...D
1135...   124 BASES...K     ¦      524...   274 BASES...E
1259...   179 BASES...J     ¦      886...   249 BASES...F
1438...    42 BASES...N     ¦     3505...   222 BASES...G
1480...   279 BASES...D     ¦     4343...   191 BASES...H
1759...   189 BASES...I     ¦     1759...   189 BASES...I
1948...  1461 BASES...A     ¦     1259...   179 BASES...J
3409...    79 BASES...M     ¦     1135...   124 BASES...K
3488...    17 BASES...O     ¦      798...    88 BASES...L
3505...   222 BASES...G     ¦     3409...    79 BASES...M
3727...   616 BASES...B     ¦     1438...    42 BASES...N
4343...   191 BASES...H     ¦     3488...    17 BASES...O

          ===#=== Asu II    HAS   0 SITES ===#===

          ===#=== Ava I     HAS   1 SITES ===#===
1424...  4362 BASES...A     ¦     1424...  4362 BASES...A

          ===#=== Ava II    HAS   8 SITES ===#===
 798...    88 BASES...G     ¦     1759...  1746 BASES...A
 886...   249 BASES...E     ¦     3727...  1433 BASES...B
1135...   303 BASES...C     ¦     1135...   303 BASES...C
1438...    42 BASES...H     ¦     1480...   279 BASES...D
1480...   279 BASES...D     ¦      886...   249 BASES...E
1759...  1746 BASES...A     ¦     3505...   222 BASES...F
3505...   222 BASES...F     ¦      798...    88 BASES...G
3727...  1433 BASES...B     ¦     1438...    42 BASES...H
```

```
          ===#=== Ava III   HAS   0 SITES ===#===

          ===#=== Avr II    HAS   0 SITES ===#===

          ===#=== Bal I     HAS   1 SITES ===#===
1445... 4362 BASES...A      |     1445... 4362 BASES...A

          ===#=== BamH I    HAS   1 SITES ===#===
 375... 4362 BASES...A      |      375... 4362 BASES...A

          ===#=== Bbv I     HAS  21 SITES ===#===
 226...  388 BASES...D      |     3784...  804 BASES...A
 614...  158 BASES...K      |      772...  633 BASES...B
 772...  633 BASES...B      |     2397...  419 BASES...C
1405...   24 BASES...Q      |      226...  388 BASES...D
1429...  129 BASES...L      |     1684...  380 BASES...E
1558...    3 BASES...S      |     3090...  328 BASES...F
1561...  123 BASES...M      |     2884...  206 BASES...G
1684...  380 BASES...E      |     3418...  189 BASES...H
2064...    3 BASES...T      |     3607...  177 BASES...I
2067...   46 BASES...P      |     2210...  169 BASES...J
2113...   97 BASES...N      |      614...  158 BASES...K
2210...  169 BASES...J      |     1429...  129 BASES...L
2379...   18 BASES...R      |     1561...  123 BASES...M
2397...  419 BASES...C      |     2113...   97 BASES...N
2816...   65 BASES...O      |     2816...   65 BASES...O
2881...    3 BASES...U      |     2067...   46 BASES...P
2884...  206 BASES...G      |     1405...   24 BASES...Q
3090...  328 BASES...F      |     2379...   18 BASES...R
3418...  189 BASES...H      |     1558...    3 BASES...S
3607...  177 BASES...I      |     2064...    3 BASES...T
3784...  804 BASES...A      |     2881...    3 BASES...U

          ===#=== Bcl I     HAS   0 SITES ===#===

          ===#=== Bgl I     HAS   3 SITES ===#===
 934...  234 BASES...C       |    1168... 2319 BASES...A
1168... 2319 BASES...A       |    3487... 1809 BASES...B
3487... 1809 BASES...B       |     934...  234 BASES...C

          ===#=== Bgl II    HAS   0 SITES ===#===

          ===#=== BstE II   HAS   0 SITES ===#===

          ===#=== Cau II    HAS  10 SITES ===#===
 171...  363 BASES...E       |     534...  724 BASES...A
 534...  724 BASES...A       |    2155...  699 BASES...B
1258...  226 BASES...I       |    2854...  696 BASES...C
1484...  328 BASES...G       |    3901...  632 BASES...D
1812...  308 BASES...H       |     171...  363 BASES...E
2120...   35 BASES...J       |    3550...  351 BASES...F
2155...  699 BASES...B       |    1484...  328 BASES...G
2854...  696 BASES...C       |    1812...  308 BASES...H
3550...  351 BASES...F       |    1258...  226 BASES...I
3901...  632 BASES...D       |    2120...   35 BASES...J

          ===#=== Cfr I     HAS   6 SITES ===#===
 295...  104 BASES...F       |    1443... 2312 BASES...A
 399...  131 BASES...E       |    3755...  902 BASES...B
 530...  408 BASES...D       |     938...  505 BASES...C
 938...  505 BASES...C       |     530...  408 BASES...D
1443... 2312 BASES...A       |     399...  131 BASES...E
3755...  902 BASES...B       |     295...  104 BASES...F

          ===#=== Cla I     HAS   1 SITES ===#===
  24... 4362 BASES...A       |      24... 4362 BASES...A

          ===#=== Dde I     HAS   8 SITES ===#===
1580...  162 BASES...H       |    4290... 1652 BASES...A
1742...  542 BASES...B       |    1742...  542 BASES...B
2284...  465 BASES...D       |    3324...  540 BASES...C
```

2749...	409	BASES...F		2284...	465 BASES...D
3158...	166	BASES...G		3864...	426 BASES...E
3324...	540	BASES...C		2749...	409 BASES...F
3864...	426	BASES...E		3158...	166 BASES...G
4290...	1652	BASES...A		1580...	162 BASES...H

===#=== EcoR I HAS 1 SITES ===#===

4360...	4362	BASES...A		4360...	4362 BASES...A

===#=== EcoR II HAS 6 SITES ===#===

129...	928	BASES...C		2634...	1857 BASES...A
1057...	383	BASES...D		1440...	1060 BASES...B
1440...	1060	BASES...B		129...	928 BASES...C
2500...	121	BASES...E		1057...	383 BASES...D
2621...	13	BASES...F		2500...	121 BASES...E
2634...	1857	BASES...A		2621...	13 BASES...F

===#=== EcoR V HAS 1 SITES ===#===

189...	4362	BASES...A		189...	4362 BASES...A

===#=== FnuD II HAS 23 SITES ===#===

347...	355	BASES...E		2521...	581 BASES...A
702...	115	BASES...M		3432...	493 BASES...B
817...	129	BASES...J		4257...	452 BASES...C
946...	27	BASES...S		1634...	372 BASES...D
973...	5	BASES...V		347...	355 BASES...E
978...	61	BASES...R		2180...	341 BASES...F
1039...	66	BASES...Q		3925...	332 BASES...G
1105...	129	BASES...K		3102...	330 BASES...H
1234...	10	BASES...U		1244...	145 BASES...I
1244...	145	BASES...I		817...	129 BASES...J
1389...	26	BASES...T		1105...	129 BASES...K
1415...	122	BASES...L		1415...	122 BASES...L
1537...	97	BASES...O		702...	115 BASES...M
1634...	372	BASES...D		2077...	103 BASES...N
2006...	69	BASES...P		1537...	97 BASES...O
2075...	2	BASES...W		2006...	69 BASES...P
2077...	103	BASES...N		1039...	66 BASES...Q
2180...	341	BASES...F		978...	61 BASES...R
2521...	581	BASES...A		946...	27 BASES...S
3102...	330	BASES...H		1389...	26 BASES...T
3432...	493	BASES...B		1234...	10 BASES...U
3925...	332	BASES...G		973...	5 BASES...V
4257...	452	BASES...C		2075...	2 BASES...W

===#=== Fnu4H I HAS 42 SITES ===#===

227...	71	BASES...X		4109...	480 BASES...A
298...	3	BASES...j		3091...	328 BASES...B
301...	277	BASES...D		1766...	299 BASES...C
578...	3	BASES...k		301...	277 BASES...D
581...	34	BASES...e		3880...	229 BASES...E
615...	107	BASES...Q		2885...	206 BASES...F
722...	51	BASES...b		3419...	189 BASES...G
773...	165	BASES...H		773...	165 BASES...H
938...	85	BASES...T		2519...	155 BASES...I
1023...	83	BASES...U		3608...	150 BASES...J
1106...	57	BASES...Z		2674...	143 BASES...K
1163...	45	BASES...d		1430...	129 BASES...L
1208...	79	BASES...W		1562...	123 BASES...M
1287...	119	BASES...N		1287...	119 BASES...N
1406...	3	BASES...l		2401...	118 BASES...O
1409...	7	BASES...i		2264...	116 BASES...P
1416...	14	BASES...h		615...	107 BASES...Q
1430...	129	BASES...L		2114...	97 BASES...R
1559...	3	BASES...m		3785...	95 BASES...S
1562...	123	BASES...M		938...	85 BASES...T
1685...	81	BASES...V		1023...	83 BASES...U
1766...	299	BASES...C		1685...	81 BASES...V
2065...	3	BASES...n		1208...	79 BASES...W
2068...	46	BASES...c		227...	71 BASES...X
2114...	97	BASES...R		2817...	65 BASES...Y
2211...	53	BASES...a		1106...	57 BASES...Z

2264...	116	BASES...P		2211...	53 BASES...a
2380...	18	BASES...g		722...	51 BASES...b
2398...	3	BASES...o		2068...	46 BASES...c
2401...	118	BASES...O		1163...	45 BASES...d
2519...	155	BASES...I		581...	34 BASES...e
2674...	143	BASES...K		3758...	27 BASES...f
2817...	65	BASES...Y		2380...	18 BASES...g
2882...	3	BASES...p		1416...	14 BASES...h
2885...	206	BASES...F		1409...	7 BASES...i
3091...	328	BASES...B		298...	3 BASES...j
3419...	189	BASES...G		578...	3 BASES...k
3608...	150	BASES...J		1406...	3 BASES...l
3758...	27	BASES...f		1559...	3 BASES...m
3785...	95	BASES...S		2065...	3 BASES...n
3880...	229	BASES...E		2398...	3 BASES...o
4109...	480	BASES...A		2882...	3 BASES...p

===#=== Fok I HAS 6 SITES ===#===

133...	853	BASES...B		2149...	2346 BASES...A
986...	45	BASES...F		133...	853 BASES...B
1031...	649	BASES...C		1031...	649 BASES...C
1680...	328	BASES...D		1680...	328 BASES...D
2008...	141	BASES...E		2008...	141 BASES...E
2149...	2346	BASES...A		986...	45 BASES...F

===#=== Gdi II HAS 5 SITES ===#===

295...	104	BASES...E		938...	2817 BASES...A
399...	131	BASES...D		3755...	902 BASES...B
530...	408	BASES...C		530...	408 BASES...C
938...	2817	BASES...A		399...	131 BASES...D
3755...	902	BASES...B		295...	104 BASES...E

===#=== Hae I HAS 7 SITES ===#===

919...	72	BASES...E		2952...	2329 BASES...A
991...	57	BASES...F		1445...	1044 BASES...B
1048...	397	BASES...D		2500...	452 BASES...C
1445...	1044	BASES...B		1048...	397 BASES...D
2489...	11	BASES...G		919...	72 BASES...E
2500...	452	BASES...C		991...	57 BASES...F
2952...	2329	BASES...A		2489...	11 BASES...G

===#=== Hae II HAS 11 SITES ===#===

236...	181	BASES...G		2722...	1876 BASES...A
417...	21	BASES...K		1730...	622 BASES...B
438...	60	BASES...I		1208...	439 BASES...C
498...	53	BASES...J		778...	430 BASES...D
551...	227	BASES...F		2352...	370 BASES...E
778...	430	BASES...D		551...	227 BASES...F
1208...	439	BASES...C		236...	181 BASES...G
1647...	83	BASES...H		1647...	83 BASES...H
1730...	622	BASES...B		438...	60 BASES...I
2352...	370	BASES...E		498...	53 BASES...J
2722...	1876	BASES...A		417...	21 BASES...K

===#=== Hae III HAS 22 SITES ===#===

174...	123	BASES...L		3757...	587 BASES...A
297...	104	BASES...M		1949...	540 BASES...B
401...	124	BASES...K		1445...	504 BASES...C
525...	7	BASES...V		2952...	458 BASES...D
532...	64	BASES...P		2518...	434 BASES...E
596...	234	BASES...G		3490...	267 BASES...F
830...	89	BASES...N		596...	234 BASES...G
919...	21	BASES...S		1048...	213 BASES...H
940...	51	BASES...R		4344...	192 BASES...I
991...	57	BASES...Q		1261...	184 BASES...J
1048...	213	BASES...H		401...	124 BASES...K
1261...	184	BASES...J		174...	123 BASES...L
1445...	504	BASES...C		297...	104 BASES...M
1949...	540	BASES...B		830...	89 BASES...N
2489...	11	BASES...U		3410...	80 BASES...O
2500...	18	BASES...T		532...	64 BASES...P
2518...	434	BASES...E		991...	57 BASES...Q

2952...	458	BASES...D		940...	51 BASES...R
3410...	80	BASES...O		919...	21 BASES...S
3490...	267	BASES...F		2500...	18 BASES...T
3757...	587	BASES...A		2489...	11 BASES...U
4344...	192	BASES...I		525...	7 BASES...V

===#=== Hga I HAS 11 SITES ===#===

390...	258	BASES...H		3904...	848 BASES...A
648...	295	BASES...F		3154...	750 BASES...B
943...	32	BASES...K		1389...	614 BASES...C
975...	264	BASES...G		2576...	578 BASES...D
1239...	150	BASES...J		2180...	396 BASES...E
1389...	614	BASES...C		648...	295 BASES...F
2003...	177	BASES...I		975...	264 BASES...G
2180...	396	BASES...E		390...	258 BASES...H
2576...	578	BASES...D		2003...	177 BASES...I
3154...	750	BASES...B		1239...	150 BASES...J
3904...	848	BASES...A		943...	32 BASES...K

===#=== HgiA I HAS 8 SITES ===#===

280...	310	BASES...F		2792...	1161 BASES...A
590...	587	BASES...D		1468...	826 BASES...B
1177...	291	BASES...G		4038...	604 BASES...C
1468...	826	BASES...B		590...	587 BASES...D
2294...	498	BASES...E		2294...	498 BASES...E
2792...	1161	BASES...A		280...	310 BASES...F
3953...	85	BASES...H		1177...	291 BASES...G
4038...	604	BASES...C		3953...	85 BASES...H

===#=== HgiC I HAS 9 SITES ===#===

76...	43	BASES...H		1288...	2027 BASES...A
119...	294	BASES...D		3315...	1123 BASES...B
413...	21	BASES...I		765...	439 BASES...C
434...	113	BASES...F		119...	294 BASES...D
547...	218	BASES...E		547...	218 BASES...E
765...	439	BASES...C		434...	113 BASES...F
1204...	84	BASES...G		1204...	84 BASES...G
1288...	2027	BASES...A		76...	43 BASES...H
3315...	1123	BASES...B		413...	21 BASES...I

===#=== HgiE II HAS 2 SITES ===#===

2294...	761	BASES...B		3055...	3601 BASES...A
3055...	3601	BASES...A		2294...	761 BASES...B

===#=== HgiJ II HAS 2 SITES ===#===

475...	14	BASES...B		489...	4348 BASES...A
489...	4348	BASES...A		475...	14 BASES...B

===#=== Hha I HAS 31 SITES ===#===

103...	132	BASES...N		3104...	393 BASES...A
235...	28	BASES...d		1729...	348 BASES...B
263...	153	BASES...J		3590...	337 BASES...C
416...	21	BASES...e		3927...	332 BASES...D
437...	60	BASES...X		2384...	270 BASES...E
497...	53	BASES...Y		948...	259 BASES...F
550...	152	BASES...K		4259...	206 BASES...G
702...	75	BASES...U		1456...	190 BASES...H
777...	40	BASES...Z		2821...	174 BASES...I
817...	131	BASES...O		263...	153 BASES...J
948...	259	BASES...F		550...	152 BASES...K
1207...	151	BASES...L		1207...	151 BASES...L
1358...	62	BASES...W		2210...	141 BASES...M
1420...	36	BASES...a		103...	132 BASES...N
1456...	190	BASES...H		817...	131 BASES...O
1646...	83	BASES...T		2995...	109 BASES...P
1729...	348	BASES...B		2077...	103 BASES...Q
2077...	103	BASES...Q		2721...	100 BASES...R
2180...	30	BASES...c		3497...	93 BASES...S
2210...	141	BASES...M		1646...	83 BASES...T
2351...	33	BASES...b		702...	75 BASES...U
2384...	270	BASES...E		2654...	67 BASES...V
2654...	67	BASES...V		1358...	62 BASES...W

2721...	100	BASES...R		437...	60 BASES...X
2821...	174	BASES...I		497...	53 BASES...Y
2995...	109	BASES...P		777...	40 BASES...Z
3104...	393	BASES...A		1420...	36 BASES...a
3497...	93	BASES...S		2351...	33 BASES...b
3590...	337	BASES...C		2180...	30 BASES...c
3927...	332	BASES...D		235...	28 BASES...d
4259...	206	BASES...G		416...	21 BASES...e

===#=== HinD II HAS 2 SITES ===#===

652...	3256	BASES...A		652...	3256 BASES...A
3908...	1106	BASES...B		3908...	1106 BASES...B

===#=== HinD III HAS 1 SITES ===#===

29...	4362	BASES...A		29...	4362 BASES...A

===#=== HinF I HAS 10 SITES ===#===

631...	220	BASES...H		3362...	1631 BASES...A
851...	154	BASES...I		2845...	517 BASES...B
1005...	298	BASES...F		1524...	506 BASES...C
1303...	221	BASES...G		2449...	396 BASES...D
1524...	506	BASES...C		2030...	344 BASES...E
2030...	344	BASES...E		1005...	298 BASES...F
2374...	75	BASES...J		1303...	221 BASES...G
2449...	396	BASES...D		631...	220 BASES...H
2845...	517	BASES...B		851...	154 BASES...I
3362...	1631	BASES...A		2374...	75 BASES...J

===#=== Hpa I HAS 0 SITES ===#===

===#=== Hpa II HAS 26 SITES ===#===

161...	9	BASES...Y		3901...	622 BASES...A
170...	217	BASES...G		2154...	527 BASES...B
387...	15	BASES...X		3044...	404 BASES...C
402...	9	BASES...Z		1811...	309 BASES...D
411...	122	BASES...O		3659...	242 BASES...E
533...	160	BASES...K		1019...	238 BASES...F
693...	76	BASES...R		170...	217 BASES...G
769...	160	BASES...L		1283...	201 BASES...H
929...	90	BASES...Q		2854...	190 BASES...I
1019...	238	BASES...F		1484...	180 BASES...J
1257...	26	BASES...V		533...	160 BASES...K
1283...	201	BASES...H		769...	160 BASES...L
1484...	180	BASES...J		1664...	147 BASES...M
1664...	147	BASES...M		2681...	147 BASES...N
1811...	309	BASES...D		411...	122 BASES...O
2120...	34	BASES...T		3549...	110 BASES...P
2154...	527	BASES...B		929...	90 BASES...Q
2681...	147	BASES...N		693...	76 BASES...R
2828...	26	BASES...W		3482...	67 BASES...S
2854...	190	BASES...I		2120...	34 BASES...T
3044...	404	BASES...C		3448...	34 BASES...U
3448...	34	BASES...U		1257...	26 BASES...V
3482...	67	BASES...S		2828...	26 BASES...W
3549...	110	BASES...P		387...	15 BASES...X
3659...	242	BASES...E		161...	9 BASES...Y
3901...	622	BASES...A		402...	9 BASES...Z

===#=== Hph I HAS 12 SITES ===#===

126...	282	BASES...F		2093...	1125 BASES...A
408...	45	BASES...J		453...	853 BASES...B
453...	853	BASES...B		1527...	557 BASES...C
1306...	221	BASES...I		4082...	406 BASES...D
1527...	557	BASES...C		3445...	396 BASES...E
2084...	9	BASES...L		126...	282 BASES...F
2093...	1125	BASES...A		3218...	227 BASES...G
3218...	227	BASES...G		3841...	226 BASES...H
3445...	396	BASES...E		1306...	221 BASES...I
3841...	226	BASES...H		408...	45 BASES...J
4067...	15	BASES...K		4067...	15 BASES...K
4082...	406	BASES...D		2084...	9 BASES...L

	===#=== Kpn I	HAS	0 SITES	===#===	
	===#=== Mbo I	HAS	22 SITES	===#===	
348...	27 BASES...P		1666...	1374 BASES...	A
375...	91 BASES...J		4045...	665 BASES...	B
466...	358 BASES...C		466...	358 BASES...	C
824...	272 BASES...F		3329...	341 BASES...	D
1096...	31 BASES...O		1142...	317 BASES...	E
1127...	15 BASES...S		824...	272 BASES...	F
1142...	317 BASES...E		3734...	258 BASES...	G
1459...	207 BASES...H		1459...	207 BASES...	H
1666...	1374 BASES...A		3224...	105 BASES...	I
3040...	75 BASES...L		375...	91 BASES...	J
3115...	11 BASES...U		3134...	78 BASES...	K
3126...	8 BASES...V		3040...	75 BASES...	L
3134...	78 BASES...K		3688...	46 BASES...	M
3212...	12 BASES...T		4009...	36 BASES...	N
3224...	105 BASES...I		1096...	31 BASES...	O
3329...	341 BASES...D		348...	27 BASES...	P
3670...	18 BASES...Q		3670...	18 BASES...	Q
3688...	46 BASES...M		3992...	17 BASES...	R
3734...	258 BASES...G		1127...	15 BASES...	S
3992...	17 BASES...R		3212...	12 BASES...	T
4009...	36 BASES...N		3115...	11 BASES...	U
4045...	665 BASES...B		3126...	8 BASES...	V
	===#=== Mbo II	HAS	11 SITES	===#===	
464...	273 BASES...F		2353...	771 BASES...	A
737...	271 BASES...G		3215...	755 BASES...	B
1008...	592 BASES...D		1600...	753 BASES...	C
1600...	753 BASES...C		1008...	592 BASES...	D
2353...	771 BASES...A		4353...	473 BASES...	E
3124...	91 BASES...J		464...	273 BASES...	F
3215...	755 BASES...B		737...	271 BASES...	G
3970...	78 BASES...K		4157...	196 BASES...	H
4048...	109 BASES...I		4048...	109 BASES...	I
4157...	196 BASES...H		3124...	91 BASES...	J
4353...	473 BASES...E		3970...	78 BASES...	K
	===#=== Mlu I	HAS	0 SITES	===#===	
	===#=== Mnl I	HAS	26 SITES	===#===	
115...	60 BASES...T		3730...	611 BASES...	A
175...	204 BASES...I		2913...	400 BASES...	B
379...	218 BASES...G		1478...	314 BASES...	C
597...	199 BASES...J		2646...	267 BASES...	D
796...	68 BASES...R		2101...	262 BASES...	E
864...	116 BASES...P		2363...	226 BASES...	F
980...	186 BASES...K		379...	218 BASES...	G
1166...	61 BASES...S		3524...	206 BASES...	H
1227...	38 BASES...X		175...	204 BASES...	I
1265...	27 BASES...Z		597...	199 BASES...	J
1292...	186 BASES...L		980...	186 BASES...	K
1478...	314 BASES...C		1292...	186 BASES...	L
1792...	58 BASES...U		1906...	165 BASES...	M
1850...	56 BASES...W		4341...	136 BASES...	N
1906...	165 BASES...M		3394...	130 BASES...	O
2071...	30 BASES...Y		864...	116 BASES...	P
2101...	262 BASES...E		3313...	81 BASES...	Q
2363...	226 BASES...F		796...	68 BASES...	R
2589...	57 BASES...V		1166...	61 BASES...	S
2646...	267 BASES...D		115...	60 BASES...	T
2913...	400 BASES...B		1792...	58 BASES...	U
3313...	81 BASES...Q		2589...	57 BASES...	V
3394...	130 BASES...O		1850...	56 BASES...	W
3524...	206 BASES...H		1227...	38 BASES...	X
3730...	611 BASES...A		2071...	30 BASES...	Y
4341...	136 BASES...N		1265...	27 BASES...	Z
	===#=== Mst I	HAS	4 SITES	===#===	
262...	1095 BASES...B		1455...	2134 BASES...	A
1357...	98 BASES...D		262...	1095 BASES...	B

```
1455... 2134 BASES...A     |    3589... 1035 BASES...C
3589... 1035 BASES...C     |    1357...   98 BASES...D

          ===#=== Nae I    HAS   4 SITES ===#===
 403...  367 BASES...B     |    1284... 3481 BASES...A
 770...  160 BASES...D     |     403...  367 BASES...B
 930...  354 BASES...C     |     930...  354 BASES...C
1284... 3481 BASES...A     |     770...  160 BASES...D

          ===#=== Nar I    HAS   4 SITES ===#===
 414...   21 BASES...D     |    1205... 3571 BASES...A
 435...  113 BASES...C     |     548...  657 BASES...B
 548...  657 BASES...B     |     435...  113 BASES...C
1205... 3571 BASES...A     |     414...   21 BASES...D

          ===#=== Nco I    HAS   0 SITES ===#===

          ===#=== Nde I    HAS   1 SITES ===#===
2296... 4362 BASES...A     |    2296... 4362 BASES...A

          ===#=== Nru I    HAS   1 SITES ===#===
 973... 4362 BASES...A     |     973... 4362 BASES...A

          ===#=== NspB II  HAS  21 SITES ===#===
 300...    3 BASES...T     |    2676... 1084 BASES...A
 303...  277 BASES...E     |    4111...  551 BASES...B
 580...    3 BASES...U     |    1768...  498 BASES...C
 583...  141 BASES...I     |    1418...  350 BASES...D
 724...  216 BASES...G     |     303...  277 BASES...E
 940...   85 BASES...N     |    3882...  229 BASES...F
1025...   83 BASES...O     |     724...  216 BASES...G
1108...   57 BASES...Q     |    2521...  155 BASES...H
1165...   45 BASES...R     |     583...  141 BASES...I
1210...   79 BASES...P     |    2266...  137 BASES...J
1289...  122 BASES...K     |    1289...  122 BASES...K
1411...    7 BASES...S     |    3760...  122 BASES...L
1418...  350 BASES...D     |    2403...  118 BASES...M
1768...  498 BASES...C     |     940...   85 BASES...N
2266...  137 BASES...J     |    1025...   83 BASES...O
2403...  118 BASES...M     |    1210...   79 BASES...P
2521...  155 BASES...H     |    1108...   57 BASES...Q
2676... 1084 BASES...A     |    1165...   45 BASES...R
3760...  122 BASES...L     |    1411...    7 BASES...S
3882...  229 BASES...F     |     300...    3 BASES...T
4111...  551 BASES...B     |     580...    3 BASES...U

          ===#=== NspC I   HAS   4 SITES ===#===
 565... 1254 BASES...B     |    2478... 2449 BASES...A
1819...  294 BASES...D     |     565... 1254 BASES...B
2113...  365 BASES...C     |    2113...  365 BASES...C
2478... 2449 BASES...A     |    1819...  294 BASES...D

          ===#=== Pst I    HAS   1 SITES ===#===
3612... 4362 BASES...A     |    3612... 4362 BASES...A

          ===#=== Pvu I    HAS   1 SITES ===#===
3737... 4362 BASES...A     |    3737... 4362 BASES...A

          ===#=== Pvu II   HAS   1 SITES ===#===
2067... 4362 BASES...A     |    2067... 4362 BASES...A

          ===#=== Rsa I    HAS   3 SITES ===#===
 165... 2117 BASES...A     |     165... 2117 BASES...A
2282... 1565 BASES...B     |    2282... 1565 BASES...B
3847...  680 BASES...C     |    3847...  680 BASES...C

          ===#=== Sac I    HAS   0 SITES ===#===

          ===#=== Sac II   HAS   0 SITES ===#===

          ===#=== Sal I    HAS   1 SITES ===#===
 650... 4362 BASES...A     |     650... 4362 BASES...A
```

```
          ===#=== Sau I     HAS   0 SITES ===#===

          ===#=== Sca I     HAS   0 SITES ===#===

          ===#=== ScrF I    HAS  16 SITES ===#===
  130...   40 BASES...N     |     2853...  696 BASES...A
  170...  363 BASES...D     |     3900...  592 BASES...B
  533...  525 BASES...C     |      533...  525 BASES...C
 1058...  199 BASES...J     |      170...  363 BASES...D
 1257...  184 BASES...K     |     3549...  351 BASES...E
 1441...   42 BASES...M     |     2154...  347 BASES...F
 1483...  328 BASES...G     |     1483...  328 BASES...G
 1811...  308 BASES...H     |     1811...  308 BASES...H
 2119...   35 BASES...O     |     2635...  218 BASES...I
 2154...  347 BASES...F     |     1058...  199 BASES...J
 2501...  121 BASES...L     |     1257...  184 BASES...K
 2622...   13 BASES...P     |     2501...  121 BASES...L
 2635...  218 BASES...I     |     1441...   42 BASES...M
 2853...  696 BASES...A     |      130...   40 BASES...N
 3549...  351 BASES...E     |     2119...   35 BASES...O
 3900...  592 BASES...B     |     2622...   13 BASES...P

          ===#=== SfaN I    HAS  22 SITES ===#===
  134...   70 BASES...O     |     2562... 1052 BASES...A
  204...   43 BASES...R     |     4054...  442 BASES...B
  247...  146 BASES...K     |     1032...  388 BASES...C
  393...   12 BASES...T     |      657...  368 BASES...D
  405...  252 BASES...E     |      405...  252 BASES...E
  657...  368 BASES...D     |     1420...  252 BASES...F
 1025...    7 BASES...V     |     1909...  241 BASES...G
 1032...  388 BASES...C     |     3824...  230 BASES...H
 1420...  252 BASES...F     |     2342...  220 BASES...I
 1672...    9 BASES...U     |     3614...  210 BASES...J
 1681...   87 BASES...M     |      247...  146 BASES...K
 1768...   78 BASES...N     |     2150...  116 BASES...L
 1846...   63 BASES...P     |     1681...   87 BASES...M
 1909...  241 BASES...G     |     1768...   78 BASES...N
 2150...  116 BASES...L     |      134...   70 BASES...O
 2266...   55 BASES...Q     |     1846...   63 BASES...P
 2321...   21 BASES...S     |     2266...   55 BASES...Q
 2342...  220 BASES...I     |      204...   43 BASES...R
 2562... 1052 BASES...A     |     2321...   21 BASES...S
 3614...  210 BASES...J     |      393...   12 BASES...T
 3824...  230 BASES...H     |     1672...    9 BASES...U
 4054...  442 BASES...B     |     1025...    7 BASES...V

          ===#=== Sna I     HAS   1 SITES ===#===
 2245... 4362 BASES...A     |     2245... 4362 BASES...A

          ===#=== Sph I     HAS   1 SITES ===#===
  565... 4362 BASES...A     |      565... 4362 BASES...A

          ===#=== Stu I     HAS   0 SITES ===#===

          ===#=== Taq I     HAS   7 SITES ===#===
   24...  315 BASES...E     |     2574... 1444 BASES...A
  339...  312 BASES...F     |     1267... 1307 BASES...B
  651...  475 BASES...C     |      651...  475 BASES...C
 1126...  141 BASES...G     |     4018...  368 BASES...D
 1267... 1307 BASES...B     |       24...  315 BASES...E
 2574... 1444 BASES...A     |      339...  312 BASES...F
 4018...  368 BASES...D     |     1126...  141 BASES...G

          ===#=== Tth111 I  HAS   1 SITES ===#===
 2221... 4362 BASES...A     |     2221... 4362 BASES...A

          ===#=== Tth111II  HAS   5 SITES ===#===
    7... 1914 BASES...A     |        7... 1914 BASES...A
 1921... 1127 BASES...C     |     3103... 1266 BASES...B
 3048...   33 BASES...D     |     1921... 1127 BASES...C
```

```
3103... 1266 BASES...B    ¦    3081...   22 BASES...E

        ===#=== Xba I     HAS   0 SITES ===#===

        ===#=== Xho I     HAS   0 SITES ===#===

        ===#=== Xho II    HAS   8 SITES ===#===
 375... 1291 BASES...B    ¦    1666... 1449 BASES...A
1666... 1449 BASES...A    ¦     375... 1291 BASES...B
3115...   11 BASES...H    ¦    3224...  768 BASES...C
3126...   86 BASES...E    ¦    4009...  728 BASES...D
3212...   12 BASES...G    ¦    3126...   86 BASES...E
3224...  768 BASES...C    ¦    3992...   17 BASES...F
3992...   17 BASES...F    ¦    3212...   12 BASES...G
4009...  728 BASES...D    ¦    3115...   11 BASES...H

        ===#=== Xma I     HAS   0 SITES ===#===

        ===#=== Xma III   HAS   1 SITES ===#===
 938... 4362 BASES...A    ¦     938... 4362 BASES...A

        ===#=== Xmn I     HAS   2 SITES ===#===
2030... 1932 BASES...B    ¦    3962... 2430 BASES...A
3962... 2430 BASES...A    ¦    2030... 1932 BASES...B
```

ПРИЛОЖЕНИЕ В.
ЧАСТО ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ШТАММЫ[1)]

Штамм	Генотип	Примечания
C600	F⁻, *thi-1, thr-1, leuB6, lacY1, tonA21, supE44*, λ⁻	Известен также как CR34 (Appleyard, 1954)
DP50, *supF*	F⁻, *tonA53, dapD8, lacY1, glnV44 (supE44)*, Δ(*gal-uvrB)47*, λ⁻, *tyrT58 (supF58), gyrA29*, Δ(*thyA57*), *hsdS3*	Известен также как штамм λ2098, сконструированный Перейрой в лаборатории Кертиса в качестве EK2-хозяина для выделения и размножения рекомбинантов бактериофага λ. В настоящее время в соответствии с измененными правилами NIH вместо него в качестве хозяина для фага λ используют другие, легче растущие штаммы *E. coli* (Leder et al., 1977; Bachmann, личное сообщение)
χ1776	F⁻, *tonA53, dapD8, minA1, glnV44 (supE42)*, Δ(*gal-uvrB)40*, λ⁻, *minB2, rfb-2, gyrA25, thyA142, oms-2, metC65, oms-1, (tte-1)*, Δ(*bioH-asd)29, cycB2, cycA1, hsdR2*	Первоначально сконструирован как EK2-хозяин для некоторых плазмид. Хотя по правилам NIH штамм χ1776 использовать необязательно, он привлекает высокой эффективностью трансформации (Curtiss et al., 1977; Bachmann, личное сообщение; Hanachan, личное сообщение)
LE392	F⁻, *hsdR514*(r_k^-, m_k^-), *supE44, supF58, lacY1* или Δ(*lacIZY)6, galK2, galT22, metB1, trpR55*, λ⁻	su⁺-Штамм обычно используется для размножения векторов бактериофага λ и их рекомбинантов. LE392 приготовлен Энквистом из штамма ED8654 (Brock et al., 1976; Murray et al., 1977; Bachmann, личное сообщение)
HB101	F⁻, *hsdS20*(r_B^-, m_B^-), *recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20* (Sm^r), *xyl-5, mtl-1, supE44*, λ⁻	Этот штамм, гибрид *E. coli* K-12×*E. coli* B, часто используется в качестве реципиента в трансформации и является хорошим хозяином для плазмид, используемым для их накопления и очистки (Boyer, Roulland-Russoix, 1969; Bolivar, Bachmann, 1979; Bachmann, личное сообщение)
RR1	F⁻, такой же, как HB101, но *recA*⁺	Этот штамм, сконструированный Родригесом, является *resA*⁺-производным штамма HB101. Он с высокой эффективностью трансформируется плазмидным вектором, ассоциированным с кДНК по гомополимерным концам (Bolivar et al., 1977; Peacock et al., 1981; Bachmann, личное сообщение)

Продолжение

Штамм	Генотип	Примечания
C-1A	**Штамм дикого типа**	Клон штамма *E. coli* C дикого типа, поддерживаемый на минимальной среде в течение нескольких лет. *E. coli* C является F^--штаммом и не имеет системы рестрикции и модификации хозяина. В качестве su^--хозяина он используется в тестах на комплементацию с амбер-мутантами бактериофага λ (Bertani, 1968; Bachmann, личное сообщение; Blattner, личное сообщение)
CSH18	*Δ(lac pro), supE, thi⁻* (*F′lacZ⁻proA⁺B⁺*)	Супрессорный штамм, используемый для скрининга рекомбинантов, возникающих в векторах бактериофага λ, несущих ген *lac*. Эти векторы, содержащие ген *lac* во вставленном фрагменте, образуют голубые бляшки в присутствии хромогенного субстрата *Xgal;* рекомбинанты, в которых вставленный фрагмент заменен чужеродной ДНК, дают белые бляшки (Miller, 1972; Williams, Blattner, 1979)
DH1	F^-, *recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17* ($r_к^-$, $m_к^+$), *supE44, recA1?*, λ^-	*recA*⁻-Хозяин, используемый для высева и выращивания плазмид и космид; он является *gyrA*-, *recA*-производным штамма MM294, скрещенным со штаммом KL 16-99 (Low, 1968; Meselson, Yuan, 1968; Hanahan, личное сообщение)
1046	*recA⁻, supE, supF, hsdS⁻, met⁻*	*recA*⁻-Хозяин, используемый для высева и выращивания космид (Cami, Kourilsky, 1978)
Kro	*recA⁻*	Штамм, используемый для размножения λ BF101
SK1590	*gal, thi, sbcB15, endA, hsdR4, hsdM+*	Штамм, обеспечивающий высокую эффективность трансформации (Kushner, 1978)
AB1157	*recA99, thr-1, leu-6, thi-1, lacY1, galK2, ara-14, xyl-5, mtl-1, proA2, his-4, argE3, str-31, tsx-33*	Штамм, используемый в методике λVX-скрининга для обнаружения бактериофага, содержащего амбер-супрессорный ген (Seed, личное сообщение)
NK5486	*thyA⁻, rha⁻*, Sm^r, *lacZam*	Штамм, используемый в методике λVX-скрининга для обнаружения бактериофага, содержащего амбер-супрессорный ген; известен также как штамм J6139 (Gross, Gross, 1969; Seed, личное сообщение)

Продолжение

Штамм	Генотип	Примечания
K802	*hsdR*+, *hsdM*+, *gal*−, *met*−, *supE*	Штамм *su*+, обычно используемый для размножения векторов бактериофага λ и их рекомбинантов (Wood, 1966)
W3110 r−m+	F−, *hsdR*−, *hsdM*+	Штамм *su*+, выведенный Ледербергом из штамма W3110 (Campbell et al., 1978)
W3110 r−m+ (p3)	F−, *hsdR*−, *hsdM*+, p3 [*kan*r, *tet*s, *amp*s (*tet*r am, *amp*r am)]	Производный штамма W3110 r−m+, содержащий *tra*−-мутант плазмиды RP1, которая несет 2 мутации и является производной плазмиды phHM$_2$ (Mindich et al., 1978)
W3110 r−m+ (p3) (πVX)	F−, *hsdR*−, *hsdM*+, p3, πVX(*kan*r, *tet*r, *amp*r)	Этот штамм — производный штамма W3110 r−m+(p3) — содержит миниплазмиду πVX, которая несет мутацию *supF* (Seed, неопубликованные данные)
Q358	*hsdR*k−, *hsdM*k+, *supF*, *ϕ80*r	*su*+-Хозяин, используемый для роста вектора бактериофага λ 1059 (Karn et al., 1980)
Q359	*hsdR*k−, *hsdM*k+, *supF*, *ϕ80*, P2	*su*+-Хозяин, используемый для обнаружения Spi−-рекомбинантов бактериофага λ (Karn et al., 1980)
BHB2688	(N205 *recA*− [γ*imm*434, c*Its*, *b2*, *red*−, *E*am, *S*am/γ])	γ-Лизогенный штамм, используемый для приготовления экстрактов для упаковки (Hohn, Murray, 1977; Hohn, 1979)
BHB2690	(N205 *recA*− [γ*imm*434, c*Its*, *b2*, *red*−, *D*am, *S*am/γ])	γ-Лизогенный штамм, используемый для приготовления экстрактов для упаковки (Hohn, Murray, 1977; Hohn, 1979)
JM103	Δ(*lac pro*), *thi*, *strA*, *supE*, *endA*, *sbcB*, *hsdR*−, F′*traD36*, *proAB*, *lacI*q, *ZΔM15*	Штамм-хозяин для выращивания фага M13, содержащего одноцепочечную ДНК, и его рекомбинантов (Messing et al., 1981)

[1]) Все штаммы, за исключением особо отмеченных, принадлежат к группе *E. coli* K-12.

ЛИТЕРАТУРА

Aaij C., Borst P., 1972. The gel electrophoresis of DNA, Biochim. Biophys. Acta, **269**, 192.

Agarwal K.-L., Yamakazi A., Fashion P. J., Khorana H. G., 1972. Chemical synthesis of polynucleotides, Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., **11**, 451.

Akusjärvi G., Pettersson U., 1978. Nucleotide sequence at the junction between the coding region of the adenovirus 2 hexon messenger RNA and its leaser sequence, Proc. Natl. Acad. Sci., **75**, 5822.

Allett B., Jeppesen P. G. N., Katagiri K. J., Delius H., 1973. Mapping the DNA fragments produced by cleavage of λ DNA with exonuclease RI, Nature, **241**, 120.

Alwine J. C., Kemp D. J., Stark G. R., 1977. Method for defection of specific RNas in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethl-paper and hybridization with DNA probes, Proc. Natl. Acad. Sci., **74**, 5350.

Anderson S., 1981. Shotgun DNA sequencing using cloned DNAse I-generated fragments, Nucleic Acids Res., **9**, 3015.

Anderson S., Gart M. J., Mayol L., Young I. G., 1980. A short primer for sequencing DNA cloned in the single-strand phage vector M13mp1, Nucleic Acids Res., **8**, 1731.

Appleyard R. K., 1954. Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly lysogenic strain derived from *Escherichia coli* K12, Genetics, **39**, 440.

Armstrong K. A., Hershfield V., Helinski D. R., 1972. Gene cloning and containment properties of plasmid col E1 and its derivatives, Science, **196**, 172.

Arnheim M., Kuehn M., 1979. The genetic behavior of a cloned mouse ribosomal DNA segment mimics mouse ribosomal gene evolution, J. Mol. Biol., **134**, 743.

Aviv H., Leder P., 1972. Purification of biologically active globin messenger RNA by chromotography on oligothymidylic acid-cellulose, Proc. Natl. Acad. Sci., **69**, 1408.

Backman K., 1980. A cautionary note on the use of certain restriction endonucleases with methylated substrates, Gene, **11**, 169.

Backman K., Ptashne M., 1978. Maximizing gene expression on a plasmid using recombination in vitro, Cell, **13**, 65.

Bahl C. P., Wu R., 1978. Cloned seventeen-nucleotide-long synthetic lactose operator is biologically active, Gene, **3**, 123.

Bahl C. P., Marians K. J., Wu R., Slawinsky J., Narang S. A., 1976. A. general method for inserting specific DNA sequences, Gene, **1**, 81.

Bailey J. M., Davidson N., 1966. Methylmercury as a reversible denaturing agent for agarose gel electrophoresis, Anal Biochem., **70**, 75.

Barnes W. M., 1977. Plasmid detection and sizing in single colony lysates, Science, **195**, 393.

Becker A., Gold M., 1975. Isolation of the bacteriophage lambda A-gene protein, Proc. Natl. Acad. Sci., **72**, 581.

Benton W. D., Davis R. W., 1977. Screening λgt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ, Science, **196**, 180.

Berger S. L., Birkenmeier C. S., 1979. Inhibition of intractable nucleases with ribonucleoside-vanadyl complexes: Isolation of messenger ribonucleic acid from resting lymphocytes, Biochemistry, **18**, 5143.

Berk A. J., Sharp P. A., 1977. Sizing and mapping of early adenovirus mRNAs by gel electrophoresis of S1 endonuclease digested hybrids, Cell, **12**, 721.

Berk A. J., Sharp P. A., 1978. Structure of the adenovirus 2 early mRNAs, Cell, **14**, 695.

Berkner K. L., Folk W. R., 1977. Polynucleotide kinase exchange reaction *Eco*R1 cleavage and methylation of DNAs containing modified pyrimidines in the recognition sequence, J. Biol. Chem., **252**, 3176.

Bernard H. U., Helinski D. R., 1980. Bacterial plasmid cloning vehicles. In: Genetic engineering (Setlow J. K. and Hollaender A., eds.), vol. 2, p. 133, Plenum Press, New York.

Bernard H.-M., Remaut E., Hershfield M. V., Das H. K., Helinski D. R., Yanofsky C., Franklin N., 1979. Construction of plasmid cloning vehicles that promote gene expression from the bacteriophage lambda p_L promoter, Gene, **5**, 59.

Berridge M. V., Lane C. D., 1976. Translation of *Xenopus* liver messenger RNA in *Xenopus* oocytes: Vitellogenin synthesis and conversion to yolk platelet proteins, Cell, 8, 283.

Bird A. P., Southern E. M., 1978. Use of restriction enzymes to study eukaryotic DNA methylation: 1. The methylation pattern in ribosomal DNA from *Xenopus laevis*, J. Mol. Biol., **118**, 27.

Birnboim H. C., Doly J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, Nucleic Acids Res., 7, 1513.

Bittner M., Vapnek D., 1981. Versatile cloning vectors derived from the runaway-replication vector pKM402, Gene, **15**, 31.

Blattner F. R., Williams B. G., Blechl A. E., Denniston-Thompson K., Faber H. E., Furlong L.-A., Grunwald D. J., Kiefer D. O., Moore D. D., Sheldon E. L., Smithies O., 1977. Charon phages: Safer derivatives of bacteriophage lambda for DNA cloning, Science, **196**, 161.

Blin N., Stafford D. W., 1976. Isolation of highmolecular-weight DNA, Nucleic Acids Res., **3**, 2303.

Bochner B. R., Huang H. C., Schieven G. L., Ames B. N., 1980. Positive selection for loss of tetracycline resistance, J. Bacteriol., **143**, 926.

Bolivar F., Backman K., 1979. Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors, Methods Enzymol., **68**, 245.

Bolivar F., Rodriguez R. L., Greene P. J., Betlach M. C., Heynecker H. L., Boyer H. W., Crosa J.H.,Falkow S., 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system, Gene, **2**, 95.

Bollum F. J., 1974. Terminal deoxynucleotidyl transferase, The enzymes, **10**, 145.

Bonner W. M., Laskey R. A., 1974. A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels, Eur. J. Biochem., **46**, 83.

Bonner T. I., Brenner D. J., Neufeld B. R., Britten R. J., 1973. Reduction in the rate of DNA reassociation by sequence divergence, J. Mol. Biol., **81**, 123.

Botchan M., McKenna G., Sharp P. A., 1974. Cleavage of mouse DNA by a restriction enzyme as a clue to the arrangement of genes, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **38**, 383.

Botchan M., Topp W., Sambrook J., 1976. The arrangement of simian virus 40 sequences in the DNA of transformed cells, Cell, **9**, 269.

Boyer H. W., Roulland-Dussoix D., 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*, J. Mol. Biol., **41**, 459.

Brawerman G., Mendecki J., Lee S. Y., 1972. A procedure for the isolation of mammalian messenger ribonucleic acid, Biochemistry, **11**, 637.

Brent R., Ptashne P., 1981. Mechanism of action of the *Lex*A gene product, Proc. Natl. Acad. Sci., 78, 4204.

Broome S., Gilbert W., 1978. Immunological screening method to detect specific translation products, Proc. Natl. Acad. Sci., **75**, 2746.

Buell G. N., Wickens M. P., Payvar F., Schimke R. T., 1978. Synthesis of full length cDNAs from four partially purified oviduct mRNAs, J. Biol. Chem., **253**, 2471.

Cami B., Kourilsky P., 1978. Screening of cloned recombinant DNA in bacteria by in situ colony hybridization, Nucleic Acids Res., **5**, 2381.

Campbell A., 1971. Genetic structure. In: The bacteriophage lambda (Hershey A. D., ed.), p. 13, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. [Имеется перевод: Фаг лямбда. — М.: Мир: 1975, с. 21.]

Campbell J., Richardson C. C., Studier F. W., 1978. Genetic recombination and complementation between bacteriophage T7 and cloned fragments of T7 DNA, Proc. Natl. Acad. Sci., **75**, 2276.

Casey J., Davidson N., 1977. Rates of formation and thermal stabilities of RNA : DNA and DNA : DNA duplexes at high concentrations of formamide, Nucleic Acids Res., **4**, 1539.

Cattaneo R., Gorski J., Mack B., 1981. Cloning of multiple copies of immunoglobulin variable kappa genes in cosmid vectors, Nucleic Acids Res., **9**, 2777.

Chaconas G., van de Sande J. H., 1980. 5′-^{32}P Labeling of RNA and DNA restriction fragments, Methods Enzymol., **65**, 75.

Chan S. J., Noyes B. E., Agarwal K. L., Steiner D. F., 1979. Construction and selection of recombinant plasmids containing full-length complementary DNAs corresponding to rat insulins I and II, Proc. Natl. Acad. Sci., **76**, 5036.

Chang A. C. Y., Cohen S. N., 1977. Genome construction between bacterial species in vitro: Replication and expression of *Staphylococcus* plasmid gene in *Escherichia coli*, Proc. Natl. Acad. Sci., **71**, 1030.

Chang A. C. Y., Cohen S. N., 1978. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid, J. Bacteriol., **134**, 1141.

Chang A. C. Y., Nunberg J. H., Kaufman R. J., Erlich H. A., Schimke R. T., Cohen S. N., 1978. Phenotypic expression in *E. coli* of a DNA sequence coding for mouse dihydrofolate reductase, Nature, **257**, 617.

Charnay P., Perricaudet M., Galibert F., Tiollais P., 1978. Bacteriophage lambda and plasma vectors, allowing fusion of cloned genes in each of the three translation phases, Nucleic Acids Res., **5**, 4479.

Charnay P., Gervais M., Louise A., Galibert F., Tiollais P., 1980. Biosynthesis of hepatitis B virus surface antigen in *Escherichia coli*, Nature, **286**, 893.

Chase J. W., Richardson C. C., 1964. Exonuclease VII of *Escherichia coli*, J. Biol. Chem., **249**, 4545.

Chirgwin J. M., Przybyla A. E., MacDonald R. J., Rutter W. J., 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease, Biochemistry, **18**, 5294.

Clarke L., Carbon J., 1976. A colony bank containing synthetic ColE1 hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome, Cell, **9**, 91.

Clarke L., Hitzeman R., Carbon J., 1979. Selection of specific clones from colony banks by screening with radioactive antibody, Methods Enzymol., **68**, 436.

Clewell D. B., 1972. Nature of Col E_1 plasmid replication in *Escherichia coli* in the presence of chloramphenicol, J. Bacteriol., **110**, 667.

Clewell D. B., Helinski D. R., 1972. Effect of growth conditions on the formation of the relaxation complex of supercoiled ColE1 deoxribonucleic acid and protein in *Escherichia coli*, J. Bacteriol., **110**, 1135.

Cohen S. N., Chang A. C. Y., 1973. Recircularization and autonomous replication of a sheared R-factor DNA segment in *Escherichia coli* transformants, Proc. Natl. Acad. Sci., **70**, 1293.

Cohen S. N., Chang A. C. Y., 1977. Revised interpretation of the origin of the pSC101 plasmid, J. Bacteriol., **132**, 734.

Cohen S. N., Chang A. C. Y., Hsu L., 1973a. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA, Proc. Natl. Acad. Sci., **69**, 2110.

Cohen S. N., Chang A. C. Y., Royer H. W., Helling R. B.. 1973b. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro, Proc. Natl. Acad. Sci., **70**, 3240.

Collins J., Hohn B., 1978. Cosmids: A type of plasmid gene-cloning vector that is packageable in vitro in bacteriophage λ heads, Proc. Natl. Acad. Sci., 75, 4242.

Colman A., Morser J., 1979. Export of proteins from oocytes of *Xenopus laevis*, Cell, **17**, 517.

Colman A., Lance C. D., Craig R., Boulton A., Mohun T., Morser J., 1981. The influence oftopology and glycosylation on the fate of heterologous secretory proteins made in *Xenopus* oocytes, Eur. J. Biochem., **113**, 339.

Covey C., Richardson D., Carbon J., 1976. A method for the deletion of restriction sites in bacterial plasmid deoxyribonucleic acid, Mol. Gen. Genet., **145**, 155.

Cox R. A., 1968. The use guanidinium chloride in the isolation of nucleic acids, Methods Enzymol., **12B**, 120.

Curtiss R., III, Inoue M., Pereira D., Hsu J. C., Alexander L., Rock L., 1977. Construction in use of safer bacterial host strains for recombinant DNA research. In: Molecular cloning of recombinant DNA (Scott W. A. and Werner R., eds.), p. 248, Academic Press, New York.

Dagert M., Ehrlich S. D., 1979. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells, Gene, **6**, 23.

Davidson E., 1976. Gene activity in early development, Academic Press, New York.

Davidson J. N., 1972. The biochemistry of nucleic acids (7th ed.), Academic Press, New York.

Davis A. R., Nayak D. P., Ueda M., Hiti A. L., Dowbenko D., Kleid D. G., 1981. Expression of antigenic determinants of the hemagglutinin gene of a human influenza virus in *Escherichia coli*, Proc. Natl. Acad. Sci., **78**, 5376.

de Boer H. A., Comstock L. J., Yansura D. G., Heynecker H. L., 1982. Construc- research. In: Molecular cloning of recombinant DNA (Scott W. A. and tion of a tandem *trp-lac* promoter and a hybrid *trp-lac* promoter for efficient and controlled expression of the human growth hormone gene in *Escherichia coli*. In: Promoter structure and function (Rodriguez R. L. and Chamberlain M. J., eds.), Praeger Publishers, New York (in press).

de Crombrugghe B., Chen B., Gottesman M., Pastan I., Varmus H. E., Emmer M., Perlman R., 1971. Regulation of *lac* mRNA synthesis in a soluble cell-free system, Nat. New Biol., **230**, 37.

de Martynoff G., Pays E., Vassart G., 1980. The synthesis of a full-length DNA complementary to thyroglobulin 33S mRNA, Biochem. Biophys. Res. Commun., **93**, 645.

Denhardt D. J., Dressler D., Ray D. S., eds., 1978. The single-stranded DNA phages, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Derynck R., Remaut E., Saman E., Stanssens P., De Cleroq B., Contente J., Fiers W., 1980. Expression of human fibroblast interferon gene in *Escherichia coli*, Nature, **287**, 193.

de Wet J. R., Daniels D. L., Schroeder J. L., Williams B. G., Denniston-Thompson K., Moore D. D., Blattner F. R., 1980. Restriction maps for twentyone charon vector phages, J. Virol., **33**, 401.

Dove W. F., Davidson N., 1962. Cation effects on the denaturation of DNA, J. Mol. Biol., **5**, 467.

Dretzen G., Bellard M., Sassone-Corsi P., Chambon P., 1981. A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels, Anal. Biochem., **112**, 295.

Drouin J., 1980. Cloning of human mitochondrial DNA in *Escherichia coli*, J. Mol. Biol., **140**, 15.

Dugaiczyk A., Boyer H. W., Goodman H. M., 1975. Ligation of *Eco*RI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures, J. Mol. Biol., **96**, 171.

Dumont J., 1972. Oogenesis in *Xenopus laevis,* J. Morphol., **136**, 153.

Dunn A. R., Sambrook J., 1980. Mapping viral mRNAs by sandwich hybridization, Methods Enzymol., **65**, 468.

Dworkin M. D., Dawid I. B., 1980. Use of a cloned library for the study of abundant polyA+ RNA during *Xenopus laevis* development, Dev. Biol., **76**, 449.

Edgel M. H., Weaver S., Haigwood N., Hutchison C. A., III, 1979. Gene enrichment. In: Genetic engineering (Setlow J. K. and Hollander A., eds.), vol. 1, p. 37, Plenum Press, New York.

Edman J. C., Hallewell R. A., Valenzuela P., Goodman H. M., Rutter W. J., 1981. Synthesis of hepatitis B surface and core antigens in *E. coli,* Nature, **291**, 503.

Edmonds M., Vaughn M. H., Jr., Nakazato H., 1971. Polyadrenylic acid sequences in the heterogeneous nuclear RNA and rapidly-labeled polyribosomal RNA of HeLa cells: Possible evidence for a precursor relationship, Proc. Natl. Acad. Sci., **68**, 1336.

Efstratiadis A., Villa-Komaroff L., 1979. Cloning of double-stranded DNA. In: Genetic engineering (Setlow J. K. and Hollander A., eds.), vol. 1, p. 15, Plenum Press, New York.

Efstratiadis A., Kafatos F. C., Maxam A. M., Maniatis T., 1976. Enzymatic in vitro synthesis of globin genes, Cell, **7**, 279.

Ehrlich S. D., Bertazzoni U., Bernardi G., 1973. The specificity of pancreatic deoxyribonuclease, Eur. J. Biochem., **40**, 143.

Faber H. E., Kiefer D., Blattner F. R., 1978. Application to the National Institutes of Health for Ek2 certification of a host-vector system for DNA cloning. Supplement X. Data on in vitro packaging method.

Faras A. J., Diebble N. A., 1975. RNA-directed DNA synthesis by the DNA polymerase of Rous sarcoma virus: Structural and functional identification of 4S primer RNA in uninfected cells, Proc. Natl. Acad. Sci., **72**, 859.

Favaloro J., Freisman R., Kamen R., 1980. Transcription maps of polyoma virus-specific RNA: Analysis by two-dimensional nuclease S1 gel mapping, Methods Enzymol., **65**, 718.

Fedorcsak I., Ehrenberg L., 1966. Effects of diethyl-pyrocarbonate and methyl methanesulfonate on nucleic acids and nucleases, Acta Chem. Scand., **20**, 107.

Feramisco J. R., Helfman D. M., Smart J. E., Burridge K., Thomas G. P., 1982. Coexistence of vinculin-like protein of higher molecular weight in smooth muscle, J. Biol. Chem. (in press).

Fisher M. P., Dingman C. W., 1971. Role of molecular conformation in determining the electrophoretic properties of polynucleotides in agaroseacrylamide composite gels, Biochemistry, **10**, 895.

Fraser T. H., Bruce B. J., 1978. Chicken ovalbumin is synthesized and secreted by *Escherichia coli,* Proc. Natl. Acad. Sci., **75**, 5936.

Friedman E.Y.,Rosbash M., 1977. The synthesis of high yields of full-length reverse transcripts of globin mRNA, Nucleic Acids Res., **4**, 3455.

Frischauf A. M., Garoff H., Lehrach H., 1980. A subcloning strategy for DNA sequence analysis, Nucleic Acids Res., **8**, 5541.

Fritsch E. F., Caron R. M., Maniatis T., 1980. Molecular cloning and characterization of the human β-like globin gene cluster, Cell, **19**, 959.

Fuller F., 1981. Determination and comparative analysis of two collagen mRNA and propertide sequences. Ph. D. thesis, Dept. of Biochemistry and Molecular Biology, Harvard University, Cambridge, Massachusetts.

Gallo R. C., Blattner W. A., Reitz M. S., Jr., Ito T., 1982. HTLV: The virus of adult T-cell leukemia in Japan and elsewhere, Lancet, **1**, 6830.

Gentz R., Langner A., Chang A. C. Y., Cohen S. N., Bujard H., 1981. Cloning and analysis of strong promoters is made possible by the downstream placement of a RNA tormination signal, Proc. Natl. Acad. Sci., **78**, 4936.

Gergen J. P., Stern R. H., Wensink P. C., 1979. Filter replicas and permanent collections of recombinant DNA plasmids, Nucleic Acids Res., **7**, 2115.

Gethings M. J., Bye J., Skehel J., Waterfield M., 1980. Cloning and DNA sequence of double stranded copies of haemmagglutinin genes from H2 and H3 strains elucidates antigenic shift and drift in human influenza virus, Nature, **287**, 301.

Ghosh P. K., Reddy V. B., Swinscoe J., Lebowitz P., Weissman S. M., 1978. Heterogeneity and 5′-terminal structures of the late RNAs of simian virus 40, J. Mol. Biol., **126**, 813.

Gilham P. T., 1964. Synthesis of polynucleotide celluloses and their use in the fractionation of polynucleotides, J. Am. Chem. Soc., **86**, 4982.

Gingeras T. R., Milazzo J., Sciaky D., Roberts R. J., 1979. Computer programs used on the sequencing of the Ad2 virus genome, Nucleic Acids Res., **7**, 529.

Girvitz S. C., Bacchetti S., Rainbow A. J., Graham F. L., 1980. A rapid and efficient procedure for the purification of DNA from agarose gels, Anal. Biochem., **106**, 492.

Glišin V., Crkvenjakov R., Byus C., 1974. Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation, Biochemistry, **13**, 2633.

Godson G. N., Vapnek D., 1973. A simple method of preparing large amounts of ϕX174 RFI supercoiled DNA, Biochim. Biophys. Acta, **299**, 516.

Goeddel D. V., Sheppard H. M., Yelverton E., Leung D., Crea R., 1980a. Synthesis of human fibroblast interferon by *E. coli*, Nucleic Acids Res., **8**, 4057.

Goeddel D. V., Heyneker H. L., Hozumi T., Arentzen R., Itakura K., Yansura D. G., Ross M. J.. Miozzari G., Crea R., Seeburg P. H., 1979a. Direct expression in *Escherichia coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone, Nature, **281**, 544.

Goeddel D. V., Kleid D. G., Bolivar F., Heyneker H. L., Yansura D. G., Crea R., Hirose T., Kraszewski A., Itakura K., Riggs A., 1979b. Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin, Proc. Natl. Acad. Sci., **76**, 106.

Goeddel D. V., Yelverton E., Ullrich A., Heynecker H. L., Miozzari G., Holmes W., Seeburg P. H., Dull T., May L., Stebbing N., Crea R., Maeda S., McCandliss R., Sloma A., Tabor J. M., Gross M., Familletti P. C., Pestka S., 1980b. Human leukocyte interferon produced by *E. coli* is biologically active, Nature, **287**, 411.

Goff S., Berg P., 1978. Excision of DNA segments introduced into cloning vectors by the poly-dA·dt joining method, Proc. Natl. Acad. Sci., **75**, 1767.

Gold L., Pribnow D., Schneider T., Shinedling S., Singer B. S., Stromo G., 1981. Translational initiation in prokaryotes, Annu. Rev. Microbiol., **35**, 365.

Goldberg D. A., 1980. Isolation and partial characterization of the *Drosophila* alcohol dehydrogenase gene, Proc. Natl. Acad. Sci., **77**, 5794.

Goldberg M. L., Lefton R. P., Stark G. R., Williams J. G., 1979. Isolation of specific RNAs using DNA covalently linked to diazobenzyloxymethylcellulose on paper, Methods Enzymol., **68**, 206.

Greene P. J., Poonian M. S., Nussbaum A. L., Tobias L., Garfin D. E., Boyer H. W., Goodman H. M., 1975. Restriction and modification of a self complementary substrate octa nucleotide containing the Eco RI, J. Mol. Biol., **99**, 237.

Gronenborn B.,Messing J. N., 1978. Methylation of single-stranded DNA in vitro introduces new restriction endonuclease cleavage sites, Nature, **272**, 375.

Grosveld F. G., Dahl H.-H. M., deBoer E., Flavell R. A., 1981. Isolation of β-globin-related genes from a human cosmid library, Gene, **13**, 227.

Gross J., Gross M., 1969. Genetic analysis of an *E. coli* strain with a mutation affecting DNA polymerase, Nature, **224**, 1166.

Grunstein M., Hogness D., 1975. Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. Proc. Natl. Acad. Sci., **72**, 3961.

Guarente L., Roberts T. M., Ptashne M., 1980a. technique for expressing eukaryotic genes in bacteria, Science, **209**, 1428.

Guarente L., Lauer G., Roberts T. M., Ptashne M., 1980b. Improved methods for maximizing expression of a cloned gene: A bacterium that synthesizes rabbit β-globin, Cell, **20**, 543.

Gurdon J. B., 1974. The control of gene expression in animal development, Clarendon Press, Oxford.

Gurdon J. B., Lingrel J. B., Marbaiz G., 1973. Message stability in injected frog oocytes: Long life of mammalian and globin messages, J. Mol. Biol., **80**, 539.

Gurdon J. B., Lane C. D., Woodland H. R., Maraik G., 1971. Use of frog eggs in oocytes for the study of mRNA and its translation in living cells, Nature, **233**, 177.

Hall M. N., Silhavy T. J., 1981a. The *ompB* locus and the regulation of the major outer membrane porin proteins of *Escherichia coli*, J. Mol. Biol., **146**, 23.

Hall M. N., Silhavy T. J., 1981b. Genetic analysis of the *ompB* locus in *Escherichia coli* K-12, J. Mol. Biol., **151**, 1.

Hallewell R. A., Emtage S., 1980. Plasmid vectors containing the tryptophan operon promoter suitable for efficient regulated expression of foreign genes, Gene, **9**, 27.

Hanahan D., Meselson M., 1980. A protocol for high density screening of plasmids in χ1776, Gene, **10**, 63.

Hardies S. C., Wells R. D., 1976. Preparative fractionation of DNA restriction fragments by reverse phase column chromatography, Proc. Natl. Acad. Sci., **73**, 3117.

Harpold M. M., Dobner P. R., Evans R. M., Bancroft F. C., 1978. Construction and identification by positive hybridization translation of a bacterial plasmid containing a rat hormone structural gene sequence, Nucleic Acids Res., **5**, 2039.

Hattman S., Brooks J. E., Masurekar M., 1978. Sequence specificity of the P1 modification methylase (M Eco P1) and the DNA methylase (M Eco *dam*) controlled by the *Escherichia coli dam* gene, J. Mol. Biol., **126**, 367.

Hayashi K., 1980. A cloning vehicle suitable strand separation, Gene, **11**, 109.

Hayward G. S., 1972. Gel electrophoretic separation of the complementary strands of bacteriophage DNA, Virology, **49**, 342.

Hedgpeth J., Ballivet M., Eisen H., 1978. Lambda phage promoter used to enhance expression of a plasmid-cloned gene, Mol. Gen. Genet., **163**, 197.

Heiland I., Gething M.-J., 1981. Cloned copy of the haemagglutinin gene codes for human influenza antigenic determinants in *E. coli*, Nature, **292**, 851.

Helling R. B., Goodman H. M., Boyer H. W., 1974. Analysis of R.*Eco*RI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis, J. Virol., **14**, 1235.

Hendrix R. W., Roberts J. W., Stahl F. W., Weisberg R. A., 1982. Lambda II. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (in press).

Hershfield V., Boyer H. W., Yanofsky C., Lovett M. A., Helinski D. R., 1974. Plasmid ColE1 as a molecular vehicle for cloning and amplification of DNA, Proc. Natl. Acad. Sci., **71**, 3455.

Herskowitz I., 1973. Control of gene expression in bacteriophage lambda, Annu. Rev. Genet., **7**, 289.

Hofstetter H., Schambock A., Vanden-Berg J., Weissman C., 1976. Specific excision of the inserted DNA segment from hybrid plasmids constructed by the poly(dA)·poly(dT) method, Biochim. Biophys. Acta, **454**, 587.

Hohn B., 1979. In vitro packaging of λ and cosmid DNA, Methods Enzymol., **68**, 299.

Hohn B., Collins J., 1980, A small cosmid for efficient cloning of large DNA fragments, Gene, **11**, 291.
Hohn B., Murray K., 1977. Packaging recombinant DNA molecules into bacteriophage particles in vitro, Proc. Natl. Acad. Sci., **74**, 3259.
Holmes D. S., Quigley M., 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids, Anal. Biochem., **114**, 193.
Houghton M., Stewart A. G., Dole S. M., Emtage J. S., Eaton M. A. W., Smith J. C., Patel T. P., Lewis H. M., Poorter A. G., Birth J. R., Cartwright T., Carey N. H., 1980. The aminoterminal sequence of human fibroblast interferon as deduced from reverse transcripts obtained using synthetic oligonucleotide primers, Nucleic Acids Res., **8**, 1913.
Hsiung H. M., Brosseau R., Michnicwicz J., Narang S. A., 1979. Synthesis of human insulin gene. I. Development of a reversed-phase chromatography in the modified triester method. Its application in the rapid and efficient synthesis of eight deoxyribonucleotide fragments constituting human insulin A DNA, Nucleic Acids Res., **6**, 1371.
Hutton J. A., 1977. Renaturation kinetics and thermostability of DNA in aqueous solutions of formamide and urea, Nucleic Acids Res., **4**, 3537.
Ish-Horowicz D., Burke J. F., 1981. Rapid and efficient cosmid vector cloning, Nucleic Acids Res., **9**, 2989.
Itakura K., Riggs A. D., 1980. Chemical DNA synthesis and recombinant DNA studies, Science, **209**, 1401.
Itakura K., Hirose T., Crea R., Riggs A. D., Heynecker H. L., Bolivar F., Boyer H. W., 1977. Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin, Science, **198**, 1056.
Jackson D. A., Symons R. H., Berg P., 1972. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of simian virus 40: Circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*, Proc. Natl. Acad. Sci., **69**, 2904.
Jacobsen H., Klenow H., Ovargaard-Hansen K., 1974. The N-terminal amino-acid sequences of DNA polymerase I from *Escherichia coli* and of the large and the small fragments obtained by a limited proteolysis, Eur. J. Biochem., **45**, 623.
Jaurin B., Grundström T., Edlund T., Normark S., 1981. The *E. coli* β-lactamase attenuator mediates growth-rate-dependent regulation, Nature, **290**, 321.
Jeffreys A. J., Flavell R. A., 1977. A physical map of the DNA regions flanking the rabbit β-globin gene, Cell, **12**, 429.
Johnson A. D., Meyer B. J., Ptashne M., 1979. Interaction between DNA-bound repressors govern regulation by λ phage repressor, Proc. Natl. Acad. Sci., **76**, 5061.
Johnson P. H., Grossman L. I., 1977. Electrophoresis of DNA in agarose gels. Optimizing separations of conformational isomers of double and single-stranded DNAs, Biochemistry, **16**, 4217.
Johnson P. H., Laskowski M., Sr., 1970. Mung bean nuclease I. II. Resistance of double stranded deoxyribonucleic acid and susceptibility of regions rich in adenosine and thymidine to enzymatic hydrolysis, J. Biol. Chem., **245**, 891.
Kacian D. L., 1977. Methods for assaying reverse transcriptase, Methods Virol., **6**, 143.
Kacian D. L., Spiegelman S., Banks A., Ferada M., Metaforda S., Dow L. Marks P. A., 1972. In vitro synthesis of DNA components of human genes for globins, Nat. New Biol., **235**, 167.
Kahn M., Kolter R., Thomas C., Figursky D., Meyer R., Remaut D., Helinski D. R., 1979. Plasmid cloning vehicles derived from plasmids ColEl, F. r6K, RK2, Methods Enzymol., **68**, 268.
Karn J., Brenner S., Barnett L., Cesareni G., 1980. Novel bacteriophage λ cloning vector, Proc. Natl. Acad. Sci., **77**, 5172.
Kelley W. S., Stump K. H., 1979. A rapid procedure for isolation of large quantities of *Escherichia coli* DNA polymerase I utilizing a λ pol A transducing phage, J. Biol. Chem., **254**, 3206.

Kelly R. G., Gozzarelli N., Deutscher M. P., Lehman I. R., Kornberg A., 1970. Enzymatic synthesis of deoxiribonucleic acid, **J. Biol. Chem., 245, 39.**

Kessler S. W., 1981. Use of protein-A-bearing staphylococci for the immune precipitation and isolation of antigens from cells, Methods Enzymol., **73, 442.**

Kirkby K. S., 1956. A new method for the isolation of nucleic acids from mammalian tissues, Biochem. J., **64**, 405.

Kleid D. G., Yansura D., Small B., Dowbenko D., Moore D. M., Grubman M. J., McKercher P. D., Morgan D. O., Robertson B. H., Bachrach H. L., 1981. Cloned viral protein vaccine for foot-and-mouth disease: Responses in cattle and swine, Science, **214**, 1125.

Klenow H., Henningsen I., 1970. Selective elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from *Escherichia coli* β limited proteolysis, Proc. Natl. Acad. Sci., **65**, 168.

Korman A. J., Knudsen P. J., Kaufman J. F., Strominger J. L., 1982. cDNA clones for the heavy chain of *HLA-DR* antigens obtained after immunopurification of polysomes by monoclonal antibody, Proc. Natl. Acad. Sci., **79**, 1844.

Kumar A., Lindberg U., 1972. Characterization of messenger ribonucleoprotein and messenger RNA from KB cells, Proc. Natl. Acad. Sci., **69**, 681.

Küpper H., Keller W., Kurz C., Forss S., Schaller H., Franze R., Strohmaier K., Marquardt O., Zaslovsky V. G., Hofschneider P. H., 1981. Cloning of cDNA of major antigen of foot-and-mouth disease virus and expression in *E. coli*, Nature, **289**, 555.

Kurtz D. T., Nicodemus C. F., 1981. Cloning of α2μ globulin DNA using a high efficiency technique for the cloning of trace messenger RNAs, Gene, **13**, 145.

Kushner S. R., 1978. An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1-derived plasmids. In: Genetic engineering (Boyer H. B. and Nicosia S., eds.), p. 17, Elsevier/North-Holland, Amsterdam.

Laemmli U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4, Nature, **227**, 680.

Land H. M., Grez H., Hansen H., Lindermaier W., Schuetz G., 1981. 5′-terminal sequences of eukaryotic mRNA can be cloned with high efficiency, Nucleic Acids Res., **9**, 2251.

Landy A., Foeller C., Reszelback R., Dudock D., 1976. Preparative fractionation of DNA restriction fragments by high pressure column chromotography on RPC5, Nucleic Acids Res., **3**, 2575.

Lane C., Knowland J., 1975. The injection of mRNA into living cells: The use of frog oocytes for the assay of mRNA in the study of the control of gene expression. In: The biochemistry of animal development (Weber R., ed.), vol. 3, p. 145, Academic Press, New York.

Laskey R. A., 1980. The use of intensifying screensor organic scintillators for visualizing radioactive molecules resolved by gel electrophoresis, Methods Enzymol., **65**, 363.

Laskey R. A., Mills A. D., 1977. Enhanced autoradiographic detection of ^{32}P and ^{125}I using intensifying screens and hypersensitized film, FEBS Lett., **82**, 314.

Laskowski M., Sr., 1980. Purification and properties of the mung-bean nuclease, Methods Enzymol., **65**, 263.

Lasky L. A., Lev Z., Xin J.-H., Britten R. J., Davidson E. H., 1980. Messenger RNA prevalence in sea urchin embryos measured with cloned cDNAs, Proc. Natl. Acad. Sci., **77**, 5317.

Lau P. P., Gray H. B., Jr., 1979. Extracellular nucleases of Alteromonas espejiana Bal 31.IV. The single strand specific deoxyriboendonuclease activity as a probe for regions of altered secondary structure in negatively and positively supercoiled closed circular DNA, Nucleic Acids Res., **6**, 331.

Lauer J., Shen C.-K. J., Maniatis T., 1980. The chromosomal arrangement of human α-like globin genes. Sequence homology and β-globin gene deletions, Cell, **20**, 119.

Lawn R. M., Fritsch E. F., Parker R. C., Blake G., Maniatis T., 1978. The isolation and characterization of a linked δ- and β-globin gene from a cloned library of human DNA, Cell, **15**, 1157.

Leder P., Tiemeier D., Enquist L., 1977. EK2 derivatives of bacteriophage lambda useful in the cloning of DNA from higher organisms: The λgt*WES* system, Science, **196**, 175.

Legerski R. J., Hodnett J. L., Gray H. B., Jr., 1978. Extracellular nucleases of pseudomonas *Bal*31. III. Use of the double-strand deoxyriboexonuclease activity as the basis of a convenient method for the mapping of fragments of DNA produced by cleavage with restriction enzymes, Nucleic Acids Res., **5**, 1445.

Lehrach H., Diamond D., Wozney J. M., Boedtker H., 1977. RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination, Biochemistry, **16**, 4743.

Lemischka I. R., Farmer S., Racaniello V. R., Sharp P. A., 1981. Nucleotide sequence and evolution of a mammalian α-tubulin messenger RNA, J. Mol. Biol., **151**, 101.

Littauer U. Z., Sela M., 1962. An ultracentrifugal study of the efficiency of some macromolecular inhibitors of ribonuclease, Biochim. Biophys. Acta, **61**, 609.

Little J. W., Lehman I. R., Kaiser A. D., 1967. An exonuclease induced by bacteriophage λ, J. Biol. Chem., **242**, 672.

Liu C.-P., Tucker P. W., Mushinski J. F., Blattner F. R., 1980. Mapping of heavy gene chains for mouse immunoglobulins M and D, Science, **209**, 1401.

Lobban P. E., Kaiser A. D., 1973. Enzymatic end-to-end joining of DNA molecules, J. Mol. Biol., 78, 453.

Loenen W. A., Brammar W. J., 1980. A bacteriophage lambda vector for cloning large UNA fragments made with several restriction enzymes, Gene, **10**, 249.

Low B., 1968. Formation of merodiploids in matings with a class of Rec recipient strains of *Escherichia coli* K12, Proc. Natl. Acad. Sci., **60**, 160.

Maat J., Smith A. J. H., 1978. A method for sequencing restriction fragments with dideoxynucleoside triphosphates, Nucleic Acids Res., **5**, 4537.

Maizel J. V., Jr., 1971. Polyacrylamide gel electrophoresis of viral proteins, Methods Virol., **5**, 180.

Maloy S. R., Nunn W. D., 1981. Selection for loss of tetracycline resistance by *Escherichia coli*, J. Bacteriol., **145**, 1110.

Mandel M., Higa A., 1970. Calcium deendent bacteriophage DNA infection, J. Mol. Biol., **53**, 154.

Maniatis T., 1980. Recombinant DNA. In: Cell biology (Prescott D. M., ed.), Academic Press, New York.

Maniatis T., Jeffrey A., Kleid D. G., 1975. Nucleitide sequence of the rightward operator of phage λ, Proc. Natal. Acad. Sci., **72**, 1184.

Maniatis T., Kee S. G., Efstratiadis A., Kafatos F. C., 1976. Amplification and characterization of a β-globin gene synthesized in vitro, Cell, **8**, 1630.

Maniatis T., Hardison R. C., Lacy E., Lauer J., O'Connell C., Quon D., Sim D. K., Efstratiadis A., 1978. The isolation of structural genes from libraries of eucaryotic DNA, Cell, **15**, 687.

Marcus S. L., Modak M. J., Cavaliere L. F., 1974. Purification of avian myeloblastosis virus DNA polymerase by affinity chromotography on polycytidylate-agarose, J. Virol., **14**, 853.

Marinus M. G., 1973. Location of DNA methylation genes on the *Escherichia coli* K-12 genetic map, Mol. Gen. Genet., **127**, 47.

Marinus M. G., Morris N. R., 1973. Isolation of deoxyribonucleic acid methylase mutants of *Escherichia coli* K-12, J. Bacteriol., **114**, 1143.

Marmur J., Doty P., 1962. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature, J. Mol. Biol., **5**, 109.

Mathews J., Brown J., Hall T., 1981. Phaseolin mRNA is translated to yield glycosilated polypeptides in *Xenopus* oocytes, Nature, **294**, 175.

Maxam A. M., Gilbert W., 1977. A new method for sequencing DNA, Proc. Natl. Acad. Sci., **74, 560.**

Maxam A. M., Gilbert W., 1980. Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages, Methods Enzymol., 65, 499.

Maxwell I. H., Maxwell F., Hahn W. E., 1977. Removal of RNase activity from DNase by affinity chromotography on agarose-coupled aminophenylphosphoryl-uridine 2′(3′)-phosphate, Nucleic Acids Res., **4**, 241.

May M. S., Hattman S., 1975. Analysis of bacteriophage deoxyribonucleic acid sequences methylated by host- and R-factor-controlled enzymes, J. Bacteriol., **123**, 768.

McClelland M., 1981. Purification and characterization of two new modification methylases; *MClaI* from *Caryophanon latum* L and *MTaqI* from *Thermus aquaticus* YTI, Nucleic Acids Res., **9**, 6795.

McConaughy B. L., Laird C. D., McCarthy B. J., 1969. Nucleic acid reassociation in formamide, Biochemistry, **8**, 3289.

McDonnell M. W., Simon M. N., Studier F. W., 1977. Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels, J. Mol. iBol., **110**, 119.

McMaster G. K., Carmichael G. G., 1977. Analysis of single and double-stranded nucleic acids on polyacrilamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange, Proc. Natl. Acad. Sci., **74**, 4835.

Melgar E., Goldthwaite D. A., 1968. Deoxyribonucleic acid nucleases. II. The effects of metals on the mechanism of action of deoxyribonuclease I, J. Biol. Chem., **243**, 4409.

Meselson M., Yuan R., 1968. DNA restriction enzyme from *E. coli*, Nature, **217**, 1110.

Messing J., Crea R., Seeburg P. H., 1981. A system for shotgun DNA sequencing, Nucleic Acids Res., **9**, 309.

Meyerowitz E. M., Guild G. M., Prestidge L. S., Hogness D. S., 1980. A new cosmid vector and its use, Gene, **11**, 271.

Miller J. H., ed., 1972. Experiments in molecular genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Miller J. H., Reznikoff W. S., eds., 1978. The operon, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Mindich L., Cohen J., Weisburd M., 1978. Isolation of nonsense suppressor mutants in *Pseudomonas*, J. Bacteriol., **126**, 177.

Miyoshi I., Fujishita M., Taguchi H., Ohtsuki Y., Akogi T., Morimoto Y. M., Nagasaki A., 1982. Caution against blood transfusions from donors serositive to adenovirus T-cell leukaemiaassociated antigens, Lancet, **1**, 683.

Molloy G. R., Sporn M. B., Kelly D. W., Perry R. P., 1972. Localization of polyadrenytic acid sequences in messenger ribonucleic acid of mammalian cells, Biochemistry, **11**, 3256.

Montgomery D. L., Hall B. D., Gillam S., Smith M., 1978. Identification and isolation of the yeast cytochrome c gene, Cell, **14**, 673.

Morse D. E., Mostellar R. D., Yanofsky C., 1970. Dynamics of synthesis, translation, and degradation of *trp* operon messenger RNA in *E. coli*, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **34**, 725.

Mount D. W., 1971. Isolation and genetic analysis of a strain of *Escherichia coli* K-12 with an amber *recA* mutation, J. Bacteriol., **107**, 388.

Murray K., 1977. Application of bacteriophage lambda in recombinant RNA research. In: Molecular cloning of recombinant DNA (Werner S., ed.), vol. 13, p. 133, Academic Press, New York.

Murray N. E., Murray K., 1974. Manipulation of restriction targets in phage λ to form receptor chromosomes for DNA fragments, Nature, **251**, 476.

Murray K., Murray N. E., 1975. Phage lambda receptor chromosomes for DNA fragments made with restricittion endonuclease III of *Haemophilus influenzae* and restriction endonuclease I of *Escherichia coli*, J. Mol. Biol., **98**, 551.

Murray N. E., Brammer W. J., Murray K., 1977. Lamboid phages that simplify the recovery of in vitro recombinants, Mol. Gen. Genet., **150**, 53.

Myers J. C., Ramirez F., Kacian D. L., Flood M., Spiegelman S., 1980. A simple purification of avian myeloblostosis virus reverse transcriptase for full-length transcription of 35S RNA, Anal. Biochem., **101**, 88.

Norgard M. V., Keem K., Monohan J. J., 1978. Factors affecting the transformation of *Escherichia coli* strain χ1776 by pBR322 plasmid DNA, Gene, **3**, 279.

Novick R. P., Clowes R. C., Cohen S. N., Curtiss R., III, *Datta N., Falkow S.*, 1976. Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal, Bacteriol. Rev., **40**, 168.

Noyes B. E., Stark G. R., 1975. Nucleic acid hybridization using DNA covalently coupled to cellulose, Cell, **5**, 301.

Noyes B. E., Mevarech M., Stein R., Agarwal K. L., 1979. Detection and partial sequence analysis of gastrin mRNA by using an oligodeoxynucleotide probe, Proc. Natl. Acad. Sci., **76**, 1770.

O'Farrell P., 1981. Replacement synthesis method of labeling DNA fragments, Bethesda Research Labs Focus, **3(3)**, 1.

O'Farrell P. H., Kutter E., Nalcanishi M., 1980. A restriction map of the bacteriophage T4 genome, Mol. Gen. Genet., **179**, 421.

Ohkubo H., Vogeli G., Mudryj M., Avvedimento V. E., Sullivan M., Pastan I., deCrombrugghe B., 1980. Isolation and characterization of overlapping genomic clones covering the chicken α2 type 1 collagen gene, Proc. Natl. Acad. Sci., **77**, 7059.

Okayama H., Berg P., 1982. High-efficiency cloning of full-lenght cDNA, Mol. Cell. Biol., **2**, 161.

Palacios R., Palmiter R. D., Schimke R. T., 1972. Identification and isolation of ovallumin-synthesizing polysomes, J. Biol. Chem., **247**, 2316.

Palmiter R. D., Christensen A. K., Schimke R. T., 1970. Organization of polysomes from pre-existing ribosomes in chick oviduct by a secondary administration of either estradiol or progesterone, J. Biol. Chem., **245**, 833.

Panayotatos N., Truong K., 1981. Specific deletion of DNA sequences between preselected bases, Nucleic Acids Res., **9**, 5679.

Parker R. C., Seed B., 1980. Two-dimensional agarose gel electrophoresis «Sea Plaque» agarose dimension, Methods Enzymol., **65**, 358.

Parnes J. R., Velan B., Felsenfeld A., Ramanathan J., Ferrini U., Appella E., Sidman J. G., 1981. Mouse β_2 microglobulin cDNA clones: A screening procedure for cDNA clones corresponding to rare mRNAs, Proc. Natl. Acad. Sci., **78**, 2253.

Paterson B. M., Roberts B. E., Kuff E. L., 1977. Structural gene identification and mapping by DNA mRNA hybrid-arrested cell-free translation, Proc. Natl. Acad. Sci., **74**, 4370.

Peacock S. L., McIver C. M., Monohan J. J., 1981. Transformation of *E. coli* using homopolymerlinked plasmid chimeras, Biochim. Biophys. Acta, **655**, 243.

Pirrotta V., Ptashne M., Chadwick P., Steinberg R., 1971. The isolation of repressors. In: Procedures in nucleic acid research (Cantoni G. L. and Davies D. R., eds.), vol. 2, p. 703, Harper and Row, New York.

Pluclenniczak A., Streeck R. E., 1981. An alternative procedure for the strand separation of DNA fragments, FEBS Lett., **124**, 72.

Pribnow D., 1975. Nucleotide sequence of an RNA polymerase binding site at an early T7 promoter, Proc. Natl. Acad. Sci., **72**, 784.

Prives C. L., Aviv H., Paterson B. M., Roberts B. E., Rozenblatt S., Revel M., Winocour E., 1974. Cell free translation of messenger RNA of simian vi-

rus 40: Synthesis of the major capsid protein, Proc. Natl. Acad. Sci., **71**, 3020.

Radloff R., Bauer W., Vinograd J., 1967. A dye-buoyant-density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA; The closed circular DNA in HeLa cells, Proc. Natl. Acad. Sci., **57**, 1514.

Rambach A., Tiollais P., 1974. Bacteriophage λ having *Eco*R1 endonuclease sites only in the nonessential region of the genome, Proc. Natl. Acad. Sci., **71**, 3927.

Rao R. N., Rogers S. G., 1978. A thermoinducible λ phage-ColEl plasmid chimera for the overproduction of gene products from cloned DNA segments, Gene, **3**, 247.

Rao R. N., Rogers S. G., 1979. Plasmid pKC7: A vector containing ten restriction endonuclease sites suitable for cloning DNA segments, Gene, **7**, 79.

Reddy V. B., Ghosh P. K., Lebowitz P., Piatek M., Weissman S. M., 1979. Simian virus 40 early mRNAs. I. Genomic localization of 3′ and 5′ termini and two major splices in mRNA from transformed and lytically infected cells, J. Virol., **30**, 279.

Reddy V. B., Thiminappaya B., Dhar R., Subramanian K. N., Zain B. S., Pan J., Ghosh P. K., Celma M. L., Weissman S. M., 1978. The genome of simian virus 40, Science, **200**, 494.

Remaut E., Stanssens P., Fiers W., 1981. Plasmid vectors for hight-efficiency expression controlled by the p_l promoter of coliphage lambda, Gene, **15**, 81.

Retzel E. F., Collet M. S., Faras A. J., 1980. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid by the avian retrovirus reverse transeriptase in vitro: Optimum conditions required for transcription of large ribonucleic acid templates, Biochemistry, **19**, 513.

Ricciardi R. P., Miller J. S., Roberts B. E., 1979. Purification and mapping of specific mRNAs by hybridization selection and cell free translation, Proc. Natl. Acad. Sci., **76**, 4927.

Richardson C. C., 1971. Polynucleotide kinase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4, Proc. Nucleic Acid Res., **2**, 815.

Richardson C. C., Schildlkraut C. L., Vasken Aposhian H., Kornberg A., 1964. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid, J. Biol. Chem., **239**, 222.

Rigby P. W. J., Dieckmann M., Rhodes C., Berg P., 1977. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I, J. Mol. Biol., **113**, 237.

Rimm D. L., Horness D., Kucera J., Blattner F. R., 1980. Construction of coliphage lambda Charon vectors with *Bam*Hl cloning sites, Gene, **12**, 301.

Robert-Guroff M., Nakao Y., Notake K., Ito Y., Sliski A., Gallo R. C., 1982. Natural antibodies to human retrovirus HTLV in a cluster of Japanese patients with adenovirus T-cell leukemia, Science, **215**, 975.

Roberts R., 1982. Restriction and modification enzymes and their recognition sequences, Nucleic Acids Res., **10**, R117.

Roberts T. M., Kacich R.. Ptashne M., 1979a. A general method for maximizing the expression of a cloned gene, Proc. Natl. Acad. Sci., **76**, 760.

Roberts T. M., Bikel I., Yocum R. R., Livingston D. M., Ptashne M., 1979b. Synthesis of simian virus 40 t antigen in *Escherichia coli*, Proc. Natl. Acad. Sci., **76**, 5596.

Roberts T. M., Swanberg S. L., Poteete A., Riedel G., Backman K., 1980. A plasmid cloning vehicle allowing a positive selection for inserted fragments, Gene, **12**, 123.

Rogers S. G., Weiss B., 1980. Exonuclease III of *Escherichia coli* K-12, an AP endonuclease, Methods Enzymol., **65**, 201.

Rosenberg M., Court D., 1979. Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription, Annu. Rev. Genet., **13**, 319.

Rothstein R. J., Lau L. F., Bahl C. P., Narang S. A., Wu R., 1980. Synthetic adaptors for cloning DNA, Methods Enzymol., **68**, 98.

Rougeon F., Mach B., 1976. Stepwise biosynthesis in vitro of globin genes from globin mRNA by DNA polymerase of avian myeloblastosis virus, Proc. Natl. Acad. Sci., **73**, 3418.

Rougeon F., Kourilsky P., Mach B., 1975. Insertion of rabbit β-globin gene sequence into an *E. coli* plasmid, Nucleic Acids Res., **2**, 2365.

Rowekamp W., Firtel R. A., 1980. Isolation of developmentally regulated genes from *Dictyostelium, Dev. Biol.*, **79**, 409.

Royal A., Garapin A., Cami B., Perrin F., Mandel J. L., LeMeur M., Bregegigae F., Gannon F., LePennec J. P., Chambon P., Kourelsky P., 1979. The ovalbumin gene region: Common features in the organization of three genes expressed in chicken oviduct under hormonal control, Nature, **279**, 125.

Roychoudhury R., Jay E., Wu R., 1976. Terminal labeling and addition of homopolymer tracts to duplex DNA fragments by terminal deoxynucleotidyl transferase, Nucleic Acids Res., **3**, 101.

Sanger F., Coulson A. R., 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase, J. Mol. Biol., **94**, 441.

Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R., 1977. DNA sequecing with chain-terminating inhibitors, Proc. Natl. Acad. Sci., **74**, 5463.

Scalenghe F., Buscaglia M., Steinheil C., Crippa M., 1978. Large seale isolation of nuclei and nucleoli from vitellogenic oocytes of *Xenopus laevis,* Chromosoma, **66**, 299.

Schaffner W., 1982. Purification of DNase I from RNase by macaloid treatment, Anal. Biochem. (in press).

Schechter I., 1973. Biologically and chemically pure mRNA coding for a mouse immunoglobulin L-chain prepared with the aid of antibodies and immobilized oligothymidine, Proc. Natl. Acad. Sci., **70**, 2256.

Scheel G., Blackburn P., 1979. Role of mammalian RNAse inhibitor in cell-free protein synthesis, Proc. Natl. Acad. Sci., **46**, 4898.

Scheller R. H., Dickerson R. E., Boyer H. W., Riggs A. D., Itakus K., 1977. Chemical synthesis of restriction enzyme recognition sites useful for cloning, Science, **196**, 177.

Schutz G., Kieval S., Groner B., Sippel A. E., Kurtz D. T., Feigelson P., 1977. Isolation of specific messenger RNA by adsorption to matrixbound antibody, Nucleic Acids Res., **4**, 71.

Seeburg P. H., Shine J., Marshall J. A., Baxter J. D., Goodman H. M., 1977. Nucleotide sequence and amplification in bacteria of structural gene for rat growth hormone, Nature, **220**, 486.

Seed B., 1982. Diazotizable arylamine cellulose papers for the coupling and hybridization of nucleic acids, Nucleic Acids Res., **10**, 1799.

Seed B., Parker R., Davidson N., 1982. Representation of DNA in recombinant DNA partial digest libraries, Gene (in press).

Sela M., Anfinsen C. B., Harrington W. F., 1957. The correlation of ribonuclease activity with specific aspects of teritary structure, Biochim. Biophys. Acta, **26**, 506.

Selker E., Brown K., Yanofsky C., 1977. Mitomycin C-induced expression of *trpA* of *Salmonella typhimurium* inserted into the plasmid ColE1, J. Bacteriol., **129**, 388.

Shapiro S. Z., Young J. R., 1981. An immunochemical method for mRNA purification, J. Biol. Chem., **256**, 1495.

Sharp P. A., Sugden B., Sambrook J., 1973. Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose, Biochemistry, **12**, 3055.

Sheller R. H., Dickerson R. E., Boyer H. W., Riggs A. D., Itakura K., 1977. Chemical synthesis of restriction enzyme recognition sites useful for cloning, Science, **196**, 177.

Sheppard H. M., Yelverton E., Goeddel D. V., 1982. Increased synthesis in *E. coli* of fibroblast and leukocyte interferons through alterations in ribosome-binding sites, DNA, **1**, 125.

Shimatake H., Rosenberg M., 1981. Purified λ regulatory protein *c*II positively activates promoters for lysogenic development, Nature, **292**, 128.

Shine J., Dalgarno L., 1975. Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes, Nature, **254**, 34.

Shine J., Fettes I., Lan N. C. Y., Roberts J. L., Baxter J. D., 1980. Expression of cloned β-endorphin gene sequences by *Escherichia coli*, Nature, **285**, 456.

Sim G. K., Kafatos S. C., Jones C. W., Koehler M. D., Efstratiadis A., Maniatis T., 1979. Use of a cDNA library for studies on evolution and developmental expression of chorion multigene family, Cell, **18**, 1303.

Sippel A. E., 1973. Purification and characterization of adenosine triphosphate: Ribonucleic acid adenyltransferase from *Escherichia coli*, Eur. J. Biochem., **37**, 31.

Slutsky A. M., Rabinovitch P. M., Yakubov L. Z., Sineokaya I. V., Stepanov A. I., Gordeyev V. K., 1980. Direct selection of DNA inserts in plasmic gene of kanamycin resistance, Mol. Gen. Genet., **180**, 487.

Smith H. O., 1980. Recovery of DNA from gels, Methods Enzymol., **65**, 371.

Smith H. O., Bernstiel M. L., 1976. A simple method for DNA restriction site mapping, Nucleic Acids Res., **3**, 2387.

Smithies O., Blechl A. E., Denniston-Thompson K., Newell N., Richards J. E., Slightom J. L., Tucker B. W., Blattner F. R., 1978. Cloning human fetal γ-globin and mouse α-type globin DNA: Characterization and partial sequencing, Science, **202**, 1284.

Southern E., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, J. Mol. Biol., **98**, 503.

Southern E., 1980. Gel electrophoresis of restriction fragments, Methods Enzymol., **69**, 152.

Stahl F. W., 1979. Special sites in generalized recombination, Annu. Rev. Genet., **13**, 7.

Stahl F. W., Crasemann J. M., Stahl M. M., 1975. Rec-mediated recombinational hot spot activity in bacteriophage lambda. III. Chi mutations are site mutations stimulating reo-mediated recombination, J. Mol. Biol., **94**, 203.

Steitz J. A., 1979. Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA. In: Biological regulation and development (Goldberger R. F., ed.), vol. 1, p. 349, Plenum Press, New York.

Stephano J. E., Gralla J. D., 1982. Spacer mutations in the *lacP*^{s} promoter, Proc. Natl. Acad. Sci., **79**, 1069.

Sternberg N., Tiemeier D., Enquist L., 1977. In vitro packaging of a λ dam vector containing *Eco*R1 DNA fragments of *Escherichia coli* and phage P1, Gene, **1**, 255.

St. John T. P., Davis R. W., 1979. Isolation of galactose-inducible DNA sequeces from *Saccaromyces cerevisiae* by differential plaque filter hybridization, Cell, **16**, 443.

Struhl K., Davis R. W., 1977. Production of a functional eukaryotic enzyme in *Escherichia coli*: Cloning and expression of the yeast structural gene for imidazole glycerolphosphate dehydratase (*his3*), Proc. Natl. Acad. Sci., **74**, 5255.

Struhl K., Cameron J. R., Davis R. W., 1976. Functitonal genetic expression of eukaryotic DNA in *Escherichia coli*, Proc. Natl. Acad. Sci., **73**, 1471.

Suggs S. V., Wallace R. B., Hirose T., Kawashima E. H., Itakura K., 1981. Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: Isolation of cloned cDNA sequences for human β-microglobulin, Proc. Natl. Acad. Sci., **78**, 6613.

Sugino A., Goodman H. M., Heyneker H. L., Shine J., Boyer H. W., Cozzarelli N. R., 1977. Interaction of bacteriophage T4 RNA and DNA ligases in joining of duplex DNA at base-paired ends, J. Biol. Chem., **252**, 3987.

Sutcliffe J. G., 1978. pBR322 restriction map marked from the DNA sequence: Accurate DNA size markers up to 4361 nucleotide pairs long, Nucleic Acids Res., **5**, 2721.

Sutcliffe J. G., 1979. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **43**, 77.

Swanstrom R., Shank P. R., 1978. X-ray intensifying screens greatly enhance the detection by autoradiography of the radioactive isotopes ^{32}P and ^{125}I, Anal. Biochem., **86**, 184.

Szalay A. A., Grohmann K., Sinsheimer R. L., 1977. Separation of the complementary strands of DNA fragments on polyacrylamide gels, Nucleic Acids Res., **4**, 1569.

Tacon W., Carey N., Amtage S., 1980. The construction and characterization of plasmid vectors suitable for the expression of all DNA phases under the control of the *E. coli* tryptophan promoter, Mol. Genet., **177**, 427.

Talmadge K., Brosius J., Gilbert W., 1981. An «internal» signal sequence directs secretion and processing of proinsulin in bacteria, Nature, **294**, 176.

Talmadge K., Stahl S., Gilbert W., 1980. Eukaryotic signal sequence transports insulin antigen in *Escherichia coli*, Proc. Natl. Acad. Sci., **77**, 3369.

Taniguchi T., Weissman C., 1978. Site-directed mutations in the initiator region of the bacteriophage Qβ coat cistron and their effect on ribosome binding, J. Mol. Biol., **118**, 533.

Taniguchi T., Fuijii-Kuriyama Y., Muramatsu M., 1980a. Molecular cloning of human interferon cDNA, Proc. Natl. Acad. Sci., **77**, 4003.

Taniguchi T., Guarente L., Roberts T. M., Kimelman D., Douhan J., III, Ptashne M., 1980b. Expression of the human fibroblast interferon gene in *Escherichia coli*, Proc. Natl. Acad. Sci., **77**, 5230.

Taylor J. M., Illmensee R., Summers J., 1976. Efficient transcription of RNA into DNA by avian sarcoma virus polymerase, Biochim. Biophys. Acta, **442**, 324.

Thomas M., Davis R. M., 1975. Studies on the cleavage of bacteriophage λ DNA with *Eco*RI restriction endonuclease, J. Mol. Biol., **91**, 315.

Thomas M., Cameron J. R., Davis R. W., 1974. Viable molecular hybrids of bacteriophage lambda and eukaryotic DNA, Proc. Natl. Acad. Sci., **71**, 4579.

Thomas P. S., 1980. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose, Proc. Natl. Acad. Sci., **77**, 5201.

Thorne H. V., 1966. Electrophoretic separation of polyoma virus DNA from host cell DNA, Virology, **29**, 234.

Thorne H. V., 1967. Electrophoretic characterization and fractionation of polyoma virus DNA, J. Mol. Biol., **24**, 203.

Tibbetts C., Pettersson U., Johansson K., Philpson L., 1974. Relationship of mRNA from productively infected cells to the complementary strands of adenovirus type 2 DNA, J. Virol., **13**, 370.

Tilghman S. M., Tiemeer D. C., Polsky F., Edgell M. H., Seidman J. G., Leder A., 1977. Cloning specific segments of the mammalian genome: Bacteriophage λ containing mouse globin and surrounding sequences, Proc. Natl. Acad. Sci., **74**, 4406.

Timberlake W. E., 1980. Developmental gene regulation in *Aspergillus nidulans*, Dev. Biol., **78**, 497.

Tonegawa S., Brack C., Hozumi N., Schuller R., 1977. Cloning on the immunoglobulin variable region gene from mouse embryo, Proc. Natl. Acad. Sci., **74**, 3518.

Treisman R., 1980. Characterization of polyoma late mRNA leader sequences by molecular cloning and DNA sequence analysis, Nucleic Acids Res., **8**, 4867.

Tu C.-P. D., Cohen S. N., 1980. 3-End labeling of DNA with [α^{32}P]cordycepin-5′-triphosphate, Gene, **10**, 177.

Twigg A. J., Sherratt D., 1980. Trans-complementable copy-number mutants of plasmid ColEl, Nature, **283**, 216.

Uhlin B. E., Molin S., Gustafsson P., Nordstrom K., 1979. Plasmids with temperature-dependent copy number for amplification of cloned genes and their products, Gene, **6**, 91.

Ullrich A., Shine J., Chirgwin J., Pictet R., Tischer E., Rutter W. J., Goodman H. M., 1977. Rat insulin genes: Construction of plasmids containing the coding sequences, Science, **196**, 1313.

van der Ploeg L. H. T., Flavell R. A., 1980. DNA methylation in the human γδβ-globin locus in erythroid and nonerythroid tissues, Cell, **19**, 947.

Vande Woude G. F., Oskarsson M., Enquist L. W.. Nomura S., Fischinger P. J., 1979. Cloning of integrated Moloney sarcoma proviral DNA sequences in bacteriophage λ, Proc. Natl. Acad. Sci., **76**, 4464.

Verma I. M., 1977. The reverse transcriptase, Biochim. Biophys. Acta, **473**, 1.

Villa-Komaroff L., Efstratiadis A., Broome S., Lomedico P., Tizard R., Naker S. P., Chick W. L., Gilbert W., 1978. A bacterial clone synthesizing proinsulin, Proc. Natl. Acad. Sci., **75**, 3727.

Vogeli G., Avedimento E. V., Sullivan M., Maizel J. V., Jr., Lazano G., Adams S. L., Postan L., deCrombrugge B., 1980. Isolation and characterization of genomic DNA coding for a2 type I collagen, Nucleic Acids Res., **8**, 1823.

Vogt V. M., 1973. Purification and further properties of single strand specific nuclease from *Aspergillus oryzae*, Eur. J. Biochem., **33**, 192.

Wahl G. M., Stern M., Stark G. R., 1979. Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzloxymethal-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate, Proc. Natl. Acad. Sci., **76**, 3683.

Wallace R. B., Johnson N. J., Hirose T., Miyake M., Kawashima E. H., Itakura K., 1981. The use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes. II. Hybridization of oligonucleotides of mixed sequence to rabbit β-globin DNA, Nucleic Acids Res., **9**, 879.

Wallace R. B., Schaffer J., Murphy R. F., Bonner J., Hirose T., Itakura K., 1979. Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to Φ×1974 DNA: The effect of single base pair mismatch, Nucleic Acids Res., **6**, 3543.

Wartell R. M., Reznikoff W. S., 1980. Cloning DNA restriction endonuclease fragments with protruding, single-stranded ends, Gene, **9**, 307.

Weislander L., 1979. A simple method to recover intact high molecular weight RNA and DNA after electrophoretic separation in low gelling temperature agarose gels, Anal. Biochem., **98**, 305.

Weiss B., 1976. Endonuclease II of *Escherichia coli* is exonuclease III, J. Biol. Chem., **251**, 1896.

Weiss B., Richardson C. C., 1967. Enzymatic breakwage and joining of deoxyribonucleic acid, III. An enzyme-adenylate intermediate in the polynucleotide ligase reaction, J. Biol. Chem., **242**, 427.

Weiss B., Jacquemin-Sablon A., Live T. R., Fareed G. C., Richardson C. C., 1968. Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4, J. Biol. Chem., **243**, 4543.

Wensink P. C., Finnegan D. J., Donelson J. E., Hogness D. S., 1974. A system for mapping DNA sequences in the chromosomes of *Drosophila melanogaster*, Cell, **3**, 315.

Wickens M. P., Buell G. N., Schimke R. T., 1978. Synthesis of double-stranded DNA complementary to lysozyme, ovomucord, and ovalbumin mRNAs, J. Biol. Chem., **253**, 2483.

Williams B. G., Blattner F. R., 1979. Construction and characterization of the hybrid bacteriophage lambda charon vectors for DNA cloning, J. Virol., **29**, 555.

Williams B. G., Blattner F. R., 1980. Bacteriophage λ vectors for DNA cloning. In: Genetic engineering (Setlow J. K. and Hollaender A., eds.), vol. 2, p. 201, Plenum Press, New York.

Williams J. G., 1981. The preparation and screening of a cDNA clone bank. In: Genetic engineering (Williamson R., ed.), vol. 1, p. 2, Academic Press, New York.

Williams J. G., Lloyd M. M., 1979. Changes in the abundance of polyadenylated RNA during slime mold development measured using cloned molecular hybridization probes, J. Mol. Biol., **129**, 19.

Woo S. L. C., 1979. A sensitive and rapid method for recombinant phage screening, Methods Enzymol., **68**, 389.

Woo S. L. C., Dugaiczyk A., Tsai M.-J., Lai E. C., Catterall J. F., O'Malley B. W., 1978. The ovalbumin gene: Cloning of the natural gene, Proc. Natl. Acad. Sci., **75**, 3688.

Wood K. O., Lee J. C., 1966. Integration of synthetic globin genes into an *E. coli* plasmid, Nucleic Acids Res., **3**, 1961.

Wood W. B., 1966. Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*: Bacterial mutations affected the restriction and modification of DNA, J. Mol. Biol., **16**, 118.

Wozney J., Hanahan D., Morimoto R., Boedtker H., Doty P., 1981. Fine structural analysis of the chicken pro α2 collagen gene, Proc. Natl. Acad. Sci., **78**, 712.

Wu R., 1972. Nucleotide sequence analysis of DNA, Nat. New Biol., **236**, 198.

Wu R., Jay E., Roychoudburg R., 1976. Nucleotide sequence analysis of DNA, Methods Cancer Res., **12**, 87.

Yamamoto K. R., Alberts B. M., Benzinger R., Lawhorne L., Treiber G., 1970. Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification, Virology, **40**, 734.

Zain S., Sambrook J., Roberts R. J., Keller W., Fried M., Dunn A. R., 1979. Nucleotide sequence analysis of the leader segments in a cloned copy of adenovirus-2 fiber mRNA, Cell., **16**, 851.

Zasloff M., Ginder G. D., Felsenfeld G., 1979. A new method for the purification and identification of covalently closed circular DNA molecules, Nucleic Acids Res., **5**, 1139.

Zehavi-Willner T., Lane C., 1977. Subcellular compartmentation of albumin and globin made in oocytes under the direction of injected messenger RNA, Cell, **11**, 683.

Zimmerman C. R., Orr W. C., Leclerc R. F., Barnard E. C., Timberlake W. E., 1980. Molecular cloning and selection of genes regulated in *Aspergillus* development, Cell, **21**, 709.

Zissler J., Singer E., Schaefer F., 1971. The role of recombination in growth of bacteriophage lambda. I. The gamma gene. In: The bacteriophage lambda (Hershey A. D., ed.), p. 455, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

Агар, приготовление сред 85, 391
Агароза легкоплавкая 173, 200
— — извлечение ДНК 173
— — — фрагментов, полученных расщеплением рестриктазами 340
— низкоэндоосмотическая 163
— приготовление сред 85
— содержание примесей 163, 169
— с присоединенным 5′-(4-аминофенилфосфорил)-уридин-2′(3′)-фосфатом 397—398
— типы 163
Агарозный гель, извлечение ДНК 169
— — легкоплавкий 173, 200, 340
— — мини-гели 167
— — перенос фрагментов ДНК на нитроцеллюлозную бумагу 345
— — приготовление 163
— — разделение цепей ДНК 180
— — фотографирование 167
— — щелочной, применение 174
— — элюирование РНК 200
Адапторы синтетические, использование в субклонировании 353
Аденин, метилирование *dam*-метилазой 109
Аденозинтрифосфат *см.* АТР
Акриламид 175, 319
Активированная целлюлозная бумага 310
— — — преимущества и недостатки для гибридизационной селекции 307
Амбер-мутанты, функциональные тесты 75
Амбер-мутации в генах ампициллиновой и тетрациклиновой устойчивости 323
— — гене *S*, ингибирование лизиса зараженных клеток 92
— — — *lacZ* штамма NK 5488 *E. coli* 327, 328
Аммоний, ингибирование полинуклеотидкиназы 134, 142
Ампициллин, количества, добавляемые к средам 86
— приготовление и хранение растворов 86, 87, 392
Амплификация библиотеки рекомбинантных бактериофагов 277
— бляшек бактериофага λ 300
— космидных библиотек 287
— — — в жидкой культуре 289
— плазмид в присутствии хлорамфеникола 12, 14, 99
Антибиотики, механизм действия 87
АТР, приготовление и хранение основного раствора 396
— — раствора, используемого при упаковке ДНК in vitro 249, 396
АТР-зависимая рестриктирующая активность ферментов типа I и III 107
Ацетат аммония 358, 395
— калия, центрифугирование в градиенте плотности, разделение концевых фрагментов ДНК 264
— магния 88, 95, 394, 395
— натрия 394, 395
Ацетилфенилгидразин, использование 316
АВМ-бумага 310, 311
АРТ-бумага 314

Бактериальная щелочная фосфатаза, применение 141
Бактериальные генотипы 443—445
— штаммы 443
Бактерии, аэрация культуры 77
— выделение отдельных колоний, высев на чашки 76
— — — — рассев штрихом 75
— — — — растирание 77
— для высева бактериофага λ 79
— извлечение из суспензии после длительного хранения 79
— хранение в течение не очень длительного периода 78
— — длительное 79
— — кратковременное 78

Бактериофаг M13, векторы для клонирования 70—73
— — свойства 67
— — схема канонического клонирующего вектора 71
— λ, амплификация библиотеки 277
— — — бляшек in situ 300
— — белок A, роль в сборке вирусной частицы 27—30
— — — — функция в упаковке ДНК in vitro 245
— — — — *ter*-функция 30
— — — *cro*, роль в литическом цикле 30
— — — D, роль в сборке вирусной частицы 30
— — — — функция в упаковке ДНК in vitro 245
— — — FI, роль в сборке вирусной частицы 30
— — — *int*, роль в интеграции ДНК 32
— — — N, роль положительного регулятора транскрипции 27, 363, 364, 366, 372
— — — O, роль в репликации ДНК 27
— — — P, роль в репликации ДНК 27
— — — Nu1, роль в сборке частиц 30
— — — Q, положительный регулятор синтеза РНК 30
— — — R, лизис клетки-хозяина 30
— — — S, лизис клетки-хозяина 30, 92
— — — *xis*, функция вырезания ДНК 32
— — бляшки, высев и отбор уколом 79, 80
— — вектор замещения 34
— — — λL47.1, карта 58—59
— — — λ1059, карта 62—63
— — — λBF101, карта 64—65
— — — λgtWES.λB, карта 41
— — — λsep6-1ac5, карта 60—61
— — — λ709, карта 56—57
— — — с фрагментом ДНК *E. coli* 35
— — — харон 3A, карта 42—43
— — — — 4A, карта 44—45
— — — — 17, карта 46—47
— — — — 20, карта 48—49
— — — — 21A, карта 50—51
— — — — 28, карта 52—53
— — — — 30, карта 54—55
— — векторы с промотором p_L 361
— — ген *cI*, мутации 32, 89
— — — — роль в лизогенизации 32
— — — *cII*, роль в лизогенизации 32
— — — — в векторах для экспрессии 362
— — генетические маркеры 38
— — использование в векторах для экспрессии 361, 363, 372, 376
— — рецептор, индуцируемый мальтозой 79
— — сбор полос после центрифугирования в градиенте хлористого цезия 94, 95
— — сборка, схема 31
— — — in vitro 30
— — фаголизаты на чашках 81
— — физическая и генетическая карты 26
— — центрифугирование в градиенте плотности ацетата калия 263
— — — — — — сахарозы 260
— — чувствительность к ЭДТА 95
— — штаммы, устойчивые к *Eco*RI 33
— — экзонуклеазы 151
— — *chi*-последовательность 35
— — *spi*-фенотин 35
— — *ter*-функция 30
«Безудержная репликация» 384
Библиотеки геномные 255
— — получение в космидных векторах 278
Биогель A-150, использование для удаления РНК из препаратов плазмидной ДНК 105
Блоттинг ДНК *см.* Перенос ДНК на нитроцеллюлозные фильтры
Бляшки бактериофага, использование цвета для различения рекомбинантных бактериофагов и родительских векторов 275
— — M13 72
— — λ, очистка, рассев штрихом 79
— — — ярко-синие 35
Бромистый этидий, визуальное определение положения разных видов ДНК 98, 264
— — критическая концентрация 159
— — метод приготовления и хранение основного раствора 395
— — мутаген 167
— — окрашивание полос ДНК в геле 157, 167, 179
— — — РНК 198, 200
— — определение количества двухцепочечной ДНК 411
— — определение конформации ДНК при электрофорезе в агарозном геле 159

— — равновесное центрифугирование в градиенте хлористого цезия 103
— — реакция с глиоксалем 196
— — снижение электрофоретической подвижности ДНК в агарозном геле 166
— — удаление из растворов ДНК 104, 264
— — флуоресценция 166
Бромкрезоловый зеленый, использование для щелочных агарозных гелей 174, 175
Бромфеноловый синий, относительная скорость миграции фрагментов ДНК 179, 184
— — содержание в буфере для нанесения пробы 163, 165, 400
Буфер высокосолевой 399
— для гелей 417
— — гибридизации ДНК—РНК 202
— — ДНК-лигазы фага Т4 135, 238
— — ДНК-полимеразы фага Т4 127, 354
— — киназы 132
— — лигирования 135, 236
— — — тупых концов 236
— — нанесения проб 163, 165, 400
— — ник-трансляции 122
— — нуклеазы S1 203, 231
— — отжига 233
— — переноса РНК из геля на нитроцеллюлозные фильтры 197, 198
— — предгибридизации 304, 312
— — присоединения концевых последовательностей 233
— — «рассеянной» затравки 139
— — репарации 235
— — рестриктаз 115, 399
— — синтеза второй цепи кДНК 229
— — синтеза первой цепи кДНК 227
— — упаковки ДНК in vitro 249, 251
— — электрофореза в агарозном геле 162, 199
— — — — — — содержащем гидроксид метилртути 199
— — — — — — — TAE 162, 399
— — — — — — — TBE 162
— — — — — — — TPE 162
— — элюирования 313
— — *Bal*31 145
— используемый при обработке клеток ультразвуком 251
— — — трансформации 243
— киназный для линкеров 135, 355
— — — тупых концов ДНК 134
— — — реакции обмена 136
— лизирующий, выделение мРНК из клеток млекопитающих 190
— линкер-киназный 355
— низкосолевой 399
— рециркуляция при электрофорезе в агарозном геле 163
— среднесолевой 399
— трис, метод приготовления 394
— щелочной электрофорезный 174
— — для нанесения проб 174
— CH 249
— DMS 416
— PK 190
— SSPE 294, 395
— STE 396
Буферы электрофорезные 399
Бычий сывороточный альбумин (BSA), получение и хранение основного раствора 396
— — — количество в растворе *Денхардта* 305, 396
b2-Делеция 245

Ванадилрибонуклеозидные комплексы, ингибиторы РНКазы 186
— — использование при синтезе кДНК 206
— — удаление из препарата РНК 187
Ватман GF/C, измерение радиоактивности нуклеиновых кислот 414
Векторы бактериофага M13 *см.* Бактериофаг M13
— бактериофага λ см. Бактериофаг λ
— используемые для экспрессии клонированной ДНК в *E. coli* 359
— космидные, получение геномных библиотек 278
— — направленное клонирование 283
— — обработанные фосфатазой, клонирование 279
— — pJB8, карта 68
— — — метод клонирования 44, 285
— общие свойства 9
— плазмидные *см.* Плазмиды
— присоединение концевой гомополимерной последовательности poly(dG) к ДНК 232
— экспрессирующие гены несоставных эукариотических белков 365
Верхний агар 86
Верхняя агароза 86
Вырезание ДНК из плазмид 210, 211

β-Галактозидаза, *lac*-оперон *E. coli* 70—72
— — — в некоторых векторах фага λ 35
Гели для определения нуклеотидной последовательности 417
Гемагглютинин вируса гриппа, синтез составного белка *E. coli* 376, 377
Геминовый раствор 316
Генетические маркеры, используемые при проверке штамма бактерий 75
Геномные библиотеки в векторах фага λ 255
— — в космидных векторах 278
— — возможность «перетасовки» последовательностей 277
Гибридизационная селекция 291
— — использование нитроцеллюлозных фильтров и активированной целлюлозной бумаги 307, 310
— — приготовление пула плазмидной ДНК 310
— — трансляция РНК в лизатах ретикулоцитов 315
— — условия для гибридизации РНК 308
— — элюирование РНК 308
— — эффективность 307
Гибридизация 202, 250
— в присутствии декстрансульфата 303
— выбор температуры в зависимости от содержания G—C-пар в ДНК 203
— ДНК—РНК 202, 301
— каскадная 223
— на фильтрах по Саузерну 348
— — — получение зондов в реакции замещения с ДНК-полимеразой фага Т4 130
— — — при использовании обратной транскриптазы и «рассеянной» затравки 137, 139
— — — — ник-трансляции ДНК 120
Гибриды мРНК—кДНК, клонирование 215
Гидроксид метилртути, использование при синтезе первой цепи кДНК 225, 227
— — предостережение при работе 199
— — эффективный денатурирующий агент РНК 199
8-Гидроксихинолин 187
Глиоксаль, денатурация РНК перед электрофорезом 195
— очистка 195
Глицерин в среде, длительное хранение бактерий 79
— ингибирование рестриктаз 117
— ступенчатый градиент для очистки фага λ 96
Глюкоза, стерилизация растворов 84, 390
Гомополимерные последовательности 233
— — присоединение к векторной ДНК 232
— — — — кДНК 210, 211
— — — с помощью терминальной трансферазы 210
Гуанидинизотиоцианат, выделение РНК 187, 191
— получение 188
Гуанидинхлорид, выделение мРНК 187
(G+C)-содержание в ДНК и температура плавления 350

Дезоксинуклеозидтрифосфаты (dNTP), включение ^{32}P 226
— высушивание в смеси этанол—вода 401
— получение и хранение основных растворов 397
— спектрофотометрические характеристики 397
Дезоксирибонуклеаза. *См. также* ДНКаза I
— получение и хранение основного раствора 397
— удаление РНКазной активности адсорбцией на макалоиде 398
— — — — аффинной хроматографией 397
Декстрансульфат 303
Денатурация РНК глиоксалем 195
— — диметилсульфоксидом 195
Денатурирующий полиакриламидный гель 183
— раствор для гибридизации in situ 294, 300
Дефосфорилирование ДНК 141
— — очистка 133
Диализные трубки, приготовление 401
— — электроэлюирование ДНК из агарозного геля 169, 172
Дийодистый пропидий 98
Диметилсульфоксид, денатурация РНК перед электрофорезом 195
— добавление к препарату фага λ при длительном хранении 82
— хранение 242

Дитиотрейтол, метод получения и хранение основного раствора 394
Дифференциальная гибридизация, клонирование кДНК 222
Дихлордиметилсилан, силиконирование стеклянной и пластмассовой посуды 388
— токсичность 388
Диэтилпирокарбонат, инактивация рестриктаз 358
— ингибирование РНКазы 188, 189
— обработка стеклянной посуды и растворов 188, 189
ДНК, выделение высокомолекулярной эукариотической из клеток 265
— гель-фильтрация 407
— количественное определение 410
— — — по флуоресценции бромистого этидия 411
— — — спектрофотометрическое 410
— концентрирование экстракцией бутанолом 407
— методика определения нуклеотидной последовательности по Максаму — Гилберту 416
— осаждение изопропанолом 406
— — этанолом 405
— удаление бромистого этидия из растворов 104
— хроматография на колонке с центрифугированием 409
ДНКаза I, использование для приготовления олигонуклеотидной затравки 138
— свойства 148
— хранение разбавленного раствора 120, 122
ДНК-лигаза фага Т4, активность 135, 153, 238
— — — эффективность лигирования ДНК с тупыми и липкими концами 352
ДНК-полимераза *E. coli*, активность и использование 119
— — — образование «схлопнувшейся» ДНК 120, 208
— — — при ник-трансляции 118
— — — примеси ДНКазы 121
— — — фрагмент Кленова 124, 343, 353
— — — — — достраивание укороченных 3′-концов ДНК 123, 353
— — — — — концевое включение метки в ДНК 125
— — — — — синтез второй цепи кДНК 229
— — — экзонуклеазная активность 208
ДНК-полимераза фага Т4, активность 127, 128, 354
— — — включение метки в ДНК 127
— — — превращение выступающих 3′-концов в тупые 354
— — — реакция замещения в синтезе ДНК 129—131
— — — 3′⟶5′-экзонуклеазная активность 127
ДНК—РНК-гибриды, анализ с помощью нуклеазы S1 203
— — — клонирование 215
ДЭАЭ-сефагель, очистка ДНК после элюции из агарозного геля 171
ДЭАЭ-целлюлоза, приготовление олигодезоксинуклеотидной затравки 138
DBM-бумага 310—313

Escherichia coli, ген *gam* и *rec*BC-система 35
— — — *gro*, роль при сборке бактериофага λ 30
— — генотипы часто используемых штаммов 443
— — метилирование ДНК 109, 115
— — образование «схлопнувшейся» ДНК 120
— — штамм 1046, использование для получения космидных библиотек 282, 288
— — — AB1157, генотип 444
— — — — тестирование супрессорной активности 328
— — — BHB2688, генотип 445
— — — — приготовление упаковочных экстрактов, 246, 248
— — — BHB2690, генотип 445
— — — — приготовление упаковочных экстрактов 246, 248
— — — C-1a, генотип 444
— — — C600, генотип 443
— — — — трансформация 244
— — — CSH18, генотип 443
— — — Lac⁻, чувствительный к фагу λ 275
— — — DHI 282, 288, 444
— — — — трансформация 243, 244
— — — DP50, *sypE*, генотип 443
— — — HB101 240, 443
— — — JM103, генотип 445
— — — KH802 (suII) 330, 445
— — — Kro, генотип 444
— — — LE392, генотип 443
— — — MM294, трансформация 244
— — — NK5486, тестирование супрессорной активности 328
— — — Q358, генотип 445

— — — Q359, генотип 445
— — — RR1, генотип 443
— — — — эффективность трансформации ДНК 212, 238
— — — SK1590, генотип 444
— — — — трансформация с применением хлористого кальция и хлористого рубидия 241
— — — W3110r⁻m⁺, генотип 445
— — — — использование в скрининге с участием πVx 327
— — — W3110r⁻m⁺(p3), генотип 445
— — — — использование в скрининге с участием πVx 327
— — — W3110r⁻m⁺(p3)(πVx), генотип 445
— — — — использование в скрининге с участием πVx 327
— — — χ1776 239, 242, 243, 446
— — — χ2098 443

Загрязнение штаммов, проверка культуры 74
Замкнутые кольцевые ДНК, свойства 98
— — — скорость миграции через агарозный гель при электрофорезе 158
Замораживание/оттаивание лизата 252
Затравки олигонуклеотидные, синтез 138
— — рассеянные 138
— oligo(dT), применяемые для синтеза зондов при гибридизации 137, 138
Золотистая фасоль, нуклеаза 147, 210
Зонды, применяемые при гибридизации 138, 139

Изоамиловый спирт, удаление белков из нуклеиновых кислот 389
— — — бромистого этидия из растворов ДНК 104, 264
Изопропанол, использование для осаждения ДНК в присутствии ацетата аммония 358
Изопропилтиогалактозид (IPTG), использование при клонировании векторов фага M13 72
Изопропил-β-D-тиогалактозид, инактивация *lac*-репрессора 384
Изошизомеры 108, 115

Иммунопреципитация 318
Инактивация в результате вставки 19
— ферментов нагреванием 358
Инсерционные векторы, определение 33—34
Интеркалирующие красители, бромистый этидий 98
— — дийодистый пропидий 98
Интерферон фибробластов человека 376
Ионная сила, зависимость от нее температуры плавления двухцепочечной ДНК 350

Канамицин, количества добавляемые к среде 19, 87, 323
— механизм действия 87
— приготовление и хранение растворов 87, 392
Картирование сайтов рестракции 337
— — — в ДНК с помощью нуклеазы *Bal*31 144, 338
— — — последовательное расщепление ДНК 340
— — — с помощью одиночного или множественного расщепления 337, 339
— — — частичное расщепление ДНК, содержащих концевую метку 342, 343
Каскадная гибридизация 223
Киназа (полинуклеотидкиназа фага T4) 132
Кипячение, лизис бактериальных клеток 100
— метод получения плазмидных ДНК в небольших количествах 333
Кислотная апуринизация ДНК 345
Кислоты, концентрации для препаратов, поступающих в продажу 393
Колицин E1, механизм действия 87
Компетентные бактериальные штаммы 240
Комплементарная ДНК (кДНК), вырезание из плазмид 210, 211
— — клонирование гибридов мРНК—кДНК 212, 215, 218
— — присоединение гомополимерных концевых последовательностей 210
— — синтез 206, 225
— — — второй цепи 207, 214, 215, 229, 230
— — — первой и второй цепей с использованием в качестве затравки плазмиды 216
— — — — цепи, образование шпилек 207

— — число копий мРНК 218, 219
Конкатамеры, образование при лигировании, максимальный выход 270, 271
— препаративное лигирование и упаковка 275
— проведение пробного лигирования и упаковки 273
Конформации ДНК (формы I, II, III) 159, 166
Концевое включение метки 342
— — — в ДНК, картирование участков, расщепляемых рестриктазами, 337, 342, 343
— — — с помощью ДНК-полимеразы фага T4 128
— — — — — — полинуклеотидкиназы фага T4 132, 133
— — — — — — фрагмента Кленова ДНК-полимеразы *E. coli* 125, 343
Концевые фрагменты бактериофага λ, выделение 260
— — — — лигирование 264, 270
Концентрированные среды 85
Копии плазмид, число 12, 16—18
Космидные векторы 39, 68, 69
— — клонирование 279
— — pJB8 44, 68, 279, 280
Космиды, амплификация библиотек 287, 289
— методика получения геномных библиотек 278
— направленное клонирование 383
— обработка фосфатазой 39
— определение 38
— приготовление векторной ДНК для клонирования 279, 283
— принципы клонирования 39
— упаковка in vitro в частицы фага λ 281, 286
Красители, бромкрезоловый зеленый 174
— бромфеноловый синий 163
— движение в полиакриламидном геле 178, 184
— ксилолцианол 163
— маркеры в полиакриламидном геле 178, 179, 184
Креатинфосфокиназа 316

β-Лактамазный промотор, мутации 360
Лигирование, буфер 135, 238
— ДНК с тупыми концами 352
— — — — — создание сайтов рестрикции 356
— теория 270
Лизаты ретикулоцитов кролика 316
— — — приготовление 316
— — — трансляция 317
Лизирующий буфер 190
Лизис бактериальных клеток кипячением 100
— — — щелочью 101
— — — SDS 102
— — колоний при гибридизации in situ 294
— клеток, инфицированных фагом λ 91
Лизогенизация, роль бактериальных генов 32
Лизоцим, приготовление и хранение основного раствора 397
Липкие концы ДНК бактериофага λ, плавление 265
— — — — — размер 25
— — — — — расщепление ДНК белком A в процессе литической инфекции 28, 30
— — ферменты, вызывающие их образование 110—112
— — типы 108
Lac-промотор 360
— — экспрессия клонированных генов в бактериях 364, 368, 369, 375, 376, 380, 384
*Lac*uv5, портативный промотор, использование в векторах для экспрессии 367, 368
*Lam*B, ген *E. coli*, кодирующий рецептор фага λ 79

Макалоид, приготовление и применение 398
Мальтоза, индукция оперона, кодирующего рецептор фага λ 79
— стерилизация растворов 85, 391
Маркеры, используемые в векторах фага λ 38
β-Меркаптоэтанол, хранение основного раствора 395
6-Метиладенин 109
Метилаза *dam* 109
— *dcm* 114
— *Eco* RI 154
Метиленовый синий, окрашивание РНК на нитроцеллюлозных фильтрах 201
Метилирование аденина метилазой *dam* 109
— влияние на расщепление рестриктазами ДНК млекопитающих 114
— последовательности GATC 109, 114

2-Метилцитозин в ДНК млекопитающих 114
Метка в ДНК, введение с помощью ДНК-полимеразы фага Т4 127, 128
— — — — — — ник-трансляции 118
— — — — — — полинуклеотидкиназы фага Т4 132, 134, 136
— — — — — — фрагмента Клёнова ДНК-полимеразы *E. coli* 125, 343
Микрококковая нуклеаза, ингибирование ЭГТА 316—317
— — обработка лизата ретикулоцитов 316
Мини-гели, электрофорез в агарозном геле 167
Минимальная среда, амплификация плазмид 100
— — состав 83, 84
Морфолинпропансульфокислота (MOPS), приготовление буфера для электрофореза РНК 197
мРНК в клетках млекопитающих 186, 219
— фракционирование по размеру 220
Мультимеры плазмид, использование в качестве маркеров молекулярных масс 415

Направленное клонирование в космидных векторах 283
— — — плазмидах 22
Немедленная ранняя транскрипция ДНК фага λ 26
Несоставные эукариотические белки 365
Ник-трансляция ДНК, буфер 122
— — ДНК-полимеразой *E. coli* 118
— — образование «схлопнувшейся» ДНК 120
— — размер продукта 121, 122
Нитроцеллюлозные фильтры, амплификация in situ бляшек бактериофагов 300
— — гибридизационная селекция, связывание ДНК 307
— — гибридизация и элюирование РНК 308
— — не содержащие тритона, выращивание бактериальных колоний 287, 292, 396
— — отмывка после гибридизации 303
— — перенос ДНК по Саузерну 345
— — перепечатывание бактериальных колоний 295, 297
— — получение реплик 287
— — прогревание после связывания ДНК 295
— — радиоавтография 305
— — связывание ДНК 307, 310
— — стерилизация 287
— — хранение 295
Нуклеаза *Bal*31, активность и применение 144, 338
— — ингибирование EGTA 143, 145
— — скорость отщепления нуклеотидов 142
— S1 активность и применение 146, 203, 231
— — картирование РНК 201
— — — сайтов рестрикции в ДНК 144
— — клонирование фрагментов ДНК 145
— — расщепление петли шпильки кДНК 209
Нуклеотидная последовательность, определение методом Максама — Гилберта 416

Обесцвечивание окрашенных гелей 167
Обратная транскриптаза, активность и применение 136, 137
— — примеси РНКазы 206, 226
— — синтез второй цепи кДНК 207, 229
— — — кДНК 137
— — — первой цепи кДНК 205, 225
— — соотношение фермента и мРНК-матрицы 206
Одноцепочечная ДНК 67
Олигодезоксинуклеотиды 221
— удаление из препаратов РНК 191
Ооциты, трансляция мРНК 319, 320
— *Xenopus*, свойства 319
Оптическая плотность, определение количества нуклеиновых кислот 410
— — — концентрации нуклеозидтрифосфатов в растворах 397
— — во время роста бактерий 78, 240
Органические реагенты, приготовление 388
Отбор полос бактериофага при центрифугировании в градиенте плотности 95, 276
Отдельные колонии, выделение 75
— — — высев на чашки 76
— — — рассев штрихом 75
— — — растирание 77
Отжиг 233, 235

— вектора и двухцепочечной кДНК 235
— липких концов фага λ 261
Oligo (dT)-колонки, синтез первой цепи кДНК 225
Oligo(dT)-целлюлоза, выделение цитоплазматической РНК 191

Панкреатическая ДНКаза, активность 148
— — использование для приготовления олигодезоксинуклеотидной затравки 138
— — — при ник-трансляции ДНК 121
— — — — упаковке ДНК фага λ in vitro 250
Перенос ДНК на нитроцеллюлозные фильтры 345, 348, 349
— — по Саузерну 344, 345
— — условия отмывки 350
— РНК из геля на нитроцеллюлозные фильтры 197, 198
Перепечатывание колоний на нитроцеллюлозные фильтры 295
Персульфат аммония, хранение раствора 318
Плазмида p3 323
— pACY184 15
— pAS1 366, 369, 372
— pAS2 384
— pAT153 11, 16, 17
— pβ-gal13C 379, 380
— pBR322 10, 16, 18, 19, 268, 420—432
— pCR1 17, 19
— pEA300 368, 370
— pJB8 44, 68, 278—280, 283, 284
— pKC7 14, 19
— pKC16 384
— pKC30 361, 363
— pKN402 384
— pKT287 380, 381
— pLC24 376, 377
— pLG 383
— plink322 13, 19
— pMH621 381, 382
— pMK16 13, 19
— pML-21 231
— pNCV 377, 379
— pOP203-13 375
— pPLa8 361
— pPLa2311 361, 362
— pSC101 16, 19
— ptac12 368
— ptrpED5-1 376, 378
— ptrpL1 368, 371
— pTR116 367
— pTR151 367
— pXf3 12, 18
— πVX 18, 292, 325
— — нуклеотидная последовательность 324, 325
— — применение в скрининге библиотек бактериофагов 331
— — приготовление 327
— — свойства 19, 292, 323, 325
Плазмиды, амплификация в присутствии хлорамфеникола 12, 14, 99, 293
— выделение ДНК в больших количествах 98
— — — — небольших количествах 333
— — — — — — щелочной лизис 333
— — — очистка 98
— — — примеси РНК в препаратах 104, 105
— вырезание кДНК 210, 211
— клонирование, инактивация в результате вставки 19
— — фрагментов в определенной ориентации 22
— мультимеры, использование в качестве маркеров молекулярных масс 415
— обработка фосфатазой 23
— общие свойства 9, 10
— ослабленный контроль репликации 12
— приготовление пула для гибридизационной селекции 310
— признаки, сообщаемые бактериям 9, 10
— рекомбинантные, положительный отбор 21
— репликация 12
— строгий контроль репликации 12
— субклонирование малых фрагментов ДНК 350
— число копий 12
Поздняя транскрипция фага λ 27
Показатель преломления растворов хлористого цезия 94
— — — — — с бромистым этидием 103
Полиакриламидный гель, выделение фрагментов ДНК 179
— — для определения нуклеотидной последовательности 417
— — приготовление 175
Поливинилпирролидон в растворе Денхардта 305, 396
Полилинкеры в плазмиде pMH621 18, 382
— — — plink322 19

— — — λVX 323
Полинуклеотидкиназа фага T4, активность 132, 134
— — — включение метки в 5′-концы ДНК 132
— — — ингибирование ионами аммония 134, 142
— — — киназный буфер для линкеров 135
— — — присоединение синтетических линкеров 355
— — — прямая реакция 132—136
— — — реакция обмена 133, 136
Полисомы, иммунологический метод очистки 223
Полиэтиленгликоль, очистка бактериофага 93
Портативный вектор для экспрессии 367, 368
Последовательности, узнаваемые рестриктазами 110—112
Предгибридизация, буфер 304, 312, 349
Прибнов-бокс 359
Приготовление упаковочных экстрактов 248, 251
Прогревание нитроцеллюлозных фильтров 295
Проинсулин в составном белке, синтез 380—381
Промотор бактериофага λ p_L, инициация ранней транскрипции 26
— — — — регуляция, использование в векторах для экспрессии 360, 361, 363, 365, 366, 372, 376, 380
— — — p'_R, поздняя транскрипция 27, 30
— β-лактамазы 360
— определение 359
— портативный, использование в векторах для экспрессии 360, 361, 364, 367, 368
— *lac* 360
— — экспрессия клонируемых генов 364, 368, 369, 375, 380, 381
— *lac* uv5, экспрессия клонируемых генов 368
— *omp* F 364, 382
— *tac* 364, 368, 369, 370.
— *trp* 364, 368, 378, 389
Проназа, выделение бактериальных ДНК 97
— приготовление и хранение основного раствора 403
Протеиназа К, выделение высокомолекулярной эукариотической ДНК 265
— — — ДНК бактериофага λ 97
— — — мРНК из клеток млекопитающих 190, 192
— — приготовление и хранение основного раствора 403
Путресцин, приготовление упаковочных растворов 249, 282
Poly(A)-полимераза, активность и применение 152
Poly(A)$^+$-РНК, выделение хроматографией на oligo(dT)-целлюлозе 193

Рабочий буфер для геля, содержащего гидроксид метилртути 199
— — — электрофореза РНК 197
Равновесное центрифугирование в градиенте плотности, выделение РНК 193
— — — — — концентрирование рекомбинантных бактериофагов 276
— — — — — очистка бактериофага λ 93, 96
— — — — — — кольцевой ДНК 103
— — — — — — эукариотической ДНК 266
Радиоавтография 230, 412
Радиоактивные чернила 305, 412
Разделение цепей ДНК 180
— — — в агарозных гелях 181
— — фрагментов ДНК более 200 нуклеотидов 180
— — — — менее 200 нуклеотидов 181
Рассеянные олигонуклеотидные затравки 138
Раствор для разрушения колоний 335
— *Денхардта* 305, 396
Растворы, приготовление основных 394—395
Расщепление ДНК рестриктирующими эндонуклеазами 115, 116
Реакция замещения 34, 129—131
— обмена 136
Реверсия амбер-мутаций, размножение бактериофагов 327
Регенерация DBM-бумажных фильтров после гибридизации 313
Регуляция промоторной активности в векторах для экспрессии 360, 361
— — — — — — — *lac*-промотор 364, 368, 369, 375, 376, 380, 381, 384
— — — — — — — *omp*F-промотор 364, 382
— — — — — — — p_L-промотор 361, 362, 363, 372, 376

— — — — — — — — *trp*-промотор 364, 368, 376, 378, 379
Рекомбинация в экстрактах для упаковки 245
— у *E. coli*, метод скрининга библиотек, получаемых в бактериофаге λ 292, 323
Репарация 236
Репликация 316, 318
— ДНК фага λ 27
— плазмид, строгий контроль 12
Репрессор бактериофага λ 32
— — — регуляция транскрипции генов, клонируемых в векторах экспрессии с промотором p_L 361, 363, 372, 376
Рестриктаза *Bal*31 142—145
— *Bam*HI 108
— *Eco*RII 114
— *Mbo*I 108, 109, 114, 281
— *Mbo*II 109, 114
— *Msp*I 114
— *Sal*I 114
— *Sau*3A 108, 109, 114, 281
— *Xba*I 109, 114
— *Xha*I 114
— *Hho*II 114
— *Hpa*I, *Hpa*II 114
Рибонуклеаза *см.* РНКаза
— A 147
— T1 147
Рибонуклеотидные последовательности в плазмидных ДНК 102
Рибонуклеозидтрифосфаты, приготовление и хранение основного раствора 397
Рибосомы, участки связывания 364
— — — SD-последовательности 365
РНК, гель-электрофорез 195
— методы окрашивания в агарозном геле 198
— — — на нитроцеллюлозных фильтрах 201
— осаждение этанолом 407
— щелочной гидролиз в агарозном геле 198
— элюирование из агарозных гелей 200
РНКаза, ингибиторы 186, 206, 226
— — использование при синтезе кДНК 206, 226
— приготовление и хранение основного раствора 397
— примесь в препаратах обратной транскриптазы 206, 226
— удаление ДНКазной активности 397
— — следов из стеклянной посуды 188
РНКазин, ингибитор РНКазы 186, 187, 206, 226
— использование при синтезе кДНК 206, 226
— удаление из растворов РНК 186
РНК-зависимая ДНК-полимераза, активность и применение 136, 137
РНК-лигаза фага T4, активность и применение 154
recA-Мутанты, инактивация генерализованных рекомбинационных систем 245
— различия по эффективности трансформации ДНК 212
recBC-система *E. coli* и продукт гена *gam* фага λ 35
rrB-оперон, терминатор транскрипции 368

Сателлитные ДНК, распределение сайтов рестрикции 258
— колонии 241
Сахароза, центрифугирование в градиенте плотности 291
— — — — — приготовление векторной ДНК 260
Сефадекс G-50, гель-фильтрация ДНК 407—410
Сигнальный полипептид, обеспечивающий экспорт белков через мембрану 373, 380—382, 385
Силиконирование посуды 387
Синтез первой и второй цепи кДНК 207, 208, 214, 229, 230
Синтетические адапторы, использование в субклонировании 353
— линкеры, использование в субклонировании плазмидных векторов 352
— — — при клонировании кДНК 212
— — матрица при получении меченых ДНК 134
— — отделение от ДНК 355
— — последовательное присоединение, клонирование кДНК 213, 235
— — способность к лигированию 135, 355
— — фосфорилирование 135, 355
— олигодезоксинуклеотиды, клонирование кДНК 221
Скрининг бляшек бактериофага λ путем гибридизации 298
Случайная фрагментация эукариотических геномных ДНК 256, 257, 259

Составные белки 373
— — β-галактозидаза и β-эндорфин 379
— — гемагглютинин вируса гриппа и β-галактозидаза 376, 380
— — инсулин и β-галактозидаза 380
— — интерферон фибробластов и полимераза фага MS2 376
— — определение 366
— — проинсулин и β-лактамаза 380
— — соматостатин и β-галактозидаза 380
— — стабильность в бактериях 375, 376
Сперма лосося, денатурированная ДНК 305
Спермидин, стимуляция полинуклеотидкиназы 132
Среда жидкая 389
— — LB 84, 390
— — M9 84, 100, 390
— — M9CA 84, 390
— — NZCYM 83, 389
— — NZYM 83, 389
— — SM 85, 392
— — SOB, 84, 391
— концентрированная 85, 391
— содержащая агар или агарозу 85, 391
— хранение 85
Стабильность эукариотических белков в бактериях 373, 376
Стерилизация пламенем 75
— стеклянной и пластмассовой посуды 387
— этанолом 77
Стерильность при работе с бактериями и фагами 74
Стрептомицин, способ действия 87
— приготовление и хранение раствора 88, 392
Субклонирование малых фрагментов ДНК в плазмидных векторах 350
— — — — с липкими концами 351
Субтилизин, расщепление нативной ДНК-полимеразы I *E. coli* 124
Сульфатированные полисахариды, примесь в агарозе типа II 163, 169
Супрессоры, характеристика 75
— тирозиновой тРНК в плазмиде 292
«Схлопнувшаяся» ДНК, образование при ник-трансляции 120
— — — — синтезе кДНК 208
SDS, приготовление основного раствора 395
SDS-полиакриламидный гель, ингредиенты 321
— — состав 318
— — электрофоретический анализ продуктов трансляции in vitro 318
SSC(20×), приготовление раствора 395

Температура плавления двухцепочечной ДНК 350
Терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза, активность и применение 155
— — присоединение концевых последовательностей dA·dT к ДНК 210
— — — — — — — — векторной ДНК 232
Терминатор транскрипции в векторах для экспрессии 361, 363, 364, 366, 372
Терминация транскрипции РНК в бактериофаге λ 26
Тетрациклин, ингибирование активности ионами Mg^{2+} 88, 393
— механизм действия 87
— приготовление и хранение растворов 88, 393
Токсичный белок, синтез плазмидами 360, 361, 376
Трансдуцирующие фаги 33
Транскрипция задержанная ранняя 26
— немедленная ранняя 26
— поздняя 27
— клонированных копий генов 359
Трансляция 315, 317
— мРНК, факторы, влияющие на ее эффективность 365
Трансформация 243
— плазмидной ДНК 239
— с применением хлористого кальция 240
— — — — — и хлористого рубидия 241
— эффективность в бактериальных штаммах 25, 212
Тринитроуксусная кислота, связывание ионов цинка 142
Трис-буфер, метод приготовления 394
Трис-солевой буфер 265
Трихлоруксусная кислота, использование при электрофорезе 175
— — приготовление основного раствора 395
— — осаждение нуклеиновых кислот 414
Тупые концы ДНК, введение метки 129, 134
— — — лигирование 352

— — — создание непосредственно перед определенным кодоном 370, 374

Ультразвуковая обработка экстракта из индуцированных клеток 251
Упаковка in vitro рекомбинантных геномов в частицы фага λ 282, 286
УФ-излучение, использование при фотографировании агарозных гелей 167
— чувствительность к нему бактерий, несущих *recA*-мутации 248

Фаголизаты на чашках 81
Фаг P2 и *spi*-фенотип 35
Фенол, очистка нуклеиновых кислот 402, 403
— приготовление и хранение 388
Фенол/хлороформ, очистка нуклеиновых кислот 403
— — удаление следов эфиром, насыщенным водой 404
Ферменты рестрикции 110—114. *См. также* Рестриктаза
— — изошизомеры 108
— — инактивация диэтилпирокарбонатом 358
— — — нагреванием 358
— — картирование расщепляемых участков 337
— — — с помощью одиночного или множественного расщепления 339
— — места расщепления 110—112
— — обработка больших количеств ДНК 117
— — образование комплементарных липких концов в молекулах ДНК 108, 110—112
— — одновременное расщепление двумя или тремя ферментами 117, 339
— — распределение сайтов в эукариотической ДНК 258, 259
— — расщепление ДНК 115, 116
— — создание сайтов рестрикции лигированием ДНК с тупыми концами 356
— — стабильность 117
— — температура инкубации 110—112
— — типа I, II, III, определение 107
— — узнаваемые последовательности 110—112
— — хранение 117
— — частичный гидролиз эукариотической ДНК 266, 341
Фикол в буферах для нанесения проб 163, 174
— содержание в растворе *Денхардта* 305, 396
Фильтры ДЕ-81, измерение радиоактивности в нуклеиновых кислотах 415
Фильтры-реплики, получение 287
Флуоресценция бромистого этидия, механизм 166
— — — тушение полиакриламидом 179
— интенсивность, связь с распределением ДНК по массе при электрофорезе 268
Формальдегид, денатурация РНК 197
Формамид, денатурация нуклеиновых кислот 202, 302
— чистота и хранение 304, 396
Фосфатаза, использование при клонировании космид 39, 279, 280
— — — — плазмид 23
— обработка космидных векторов 279
Фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*, активность 124, 343, 353
— — — — — — — быстрое концевое включение метки в ДНК 125, 342
— — — — — — — достраивание 3′-концов двухцепочечной ДНК 123, 353
— — — — — — — синтез второй цепи кДНК 208, 209
Фузаровая кислота, отбор клонов 22

Хинальдиновая кислота, отбор клонов 22
Хлорамфеникол амплификация плазмид 99, 293, 392
— механизм действия 87
— приготовление и хранение растворов 86, 392
— скрининг небольшого числа бактериальных колоний 293
— устойчивость бактерий 87
— — генов в плазмиде pKC7 и pACYC184 19
Хлористый кальций, использование при трансформации 240
— — и хлористый рубидий, использование при трансформации 241
— натрий, приготовление основного раствора 394
— цезий, равновесное центрифугирование в градиенте плотности,

очистка ковалентно-замкнутой кольцевой ДНК 103
— — — — — — — — — РНК 193
— — — — — — — — — фага λ 93, 96, 276
Хлороформ, применение для лизиса клеток 91
Хлороформ: изоамиловый спирт, удаление белков из нуклеиновых кислот 389
Хранение замороженных препаратов бактериофага с диметилсульфоксидом 82
Хроматография колоночная в обращенной фазе 255
— на колонке с центрифугированием 409
— — Сефадексе G-50 407

Цитозин, метилирование *dmc*-метилазой 114

Частичное расщепление ДНК рестриктазами, формула числа продуктов 266, 268, 281, 341—342
Число молей концов ДНК, определение 132
— — отщепленных нуклеотидов 131

Щелочная фосфатаза бактериальная 141
— — из кишечника теленка 141, 142, 279
Щелочной гель, буфер для нанесения проб 174
— — использование 174, 230
— — приготовление 174

ЭГТА, ингибитор микрококковой нуклеазы 316
— — *Bal*31 143, 145
ЭДТА, приготовление основного раствора 394
Экзонуклеаза III, активность 149, 150, 384
— VII, активность 148, 211
— фага λ, активность 151
Экспрессия векторов 359
— — максимизация экспрессии клонированных генов 383
— эукариотических геиов 365
Электрофорез в агарозном геле 162, 163, 165, 174, 400
— — — — визуализация ДНК, окрашивание бромистым этидием 157, 166
— — — — движение одно- и двухцепочечных ДНК 182
— — — — извлечение ДНК 169
— — — — мини-гели 167
— — — — преимущества перед другими методами фракционирования ДНК 157
— — — — приспособления 160—162
— — — — разделение цепей ДНК 180
— — — — РНК 197, 199
— — — — — денатурированной глиоксалем 195
— — — — скорость миграции ДНК, зависимость от конформации 158, 335
— — — — — — — — — напряженности электрического поля 159
— — — — — — — — — размера молекулы 157
— — — — — — — — — состава оснований 159
— — — — — — — — — температуры 159
— — — — — — — и концентрация агарозы 157
— — — — фотографирование 167
— — — — шлейф ДНК 166
— — полиакриламидном геле, анализ фрагментов ДНК 175, 183
— — — — движение одно- и двухцепочечных ДНК 182
— — — — кюветы, приспособления 176, 177
— — — — разделение цепей ДНК 180
Электроэлюирование ДНК из агарозных гелей 169
Элюирование ДНК из нитроцеллюлозных фильтров после гибридизации с ДНК 308, 313
Эфир, насыщенный водой, для экстракции следов фенола 389, 404

Ядерная РНК, выделение 191

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие редакторов перевода 5
Предисловие 6

Глава 1. Системы вектор — хозяин 9

Глава 2. Размножение бактериальных штаммов и вирусов и обращение с ними 74

Выделение отдельных колоний 75
Выращивание и хранение бактериальных штаммов. Обращение с ними 77
Очистка бляшек бактериофага λ 79
Среды и антибиотики 83

Глава 3. Выделение ДНК бактериофага λ и плазмид 89

Получение бактериофага λ в больших количествах 89
Выделение больших количеств плазмидной ДНК 98

Глава 4. Ферменты, используемые в молекулярном клонировании 107

Ферменты рестрикции 107
Другие ферменты, используемые в молекулярном клонировании 118

Глава 5. Гель-электрофорез 157

Электрофорез в агарозном геле 157
Электрофорез в полиакриламидном геле 175
Электрофорез с разделением цепей 180

Глава 6. Выделение, очистка и анализ мРНК из эукариотических клеток 186

Глава 7. Синтез и клонирование кДНК 205

Синтез кДНК 205
Молекулярное клонирование двухцепочечной кДНК 209
Общие подходы к клонированию кДНК 218
Методы клонирования кДНК 224

Глава 8. Введение ДНК плазмид и бактериофага λ в клетки *E. coli* 241

Трансформация *E. coli* плазмидной ДНК 241
Упаковка ДНК бактериофага λ in vitro 244

Глава 9. Получение геномных библиотек 255

Геномные библиотеки в векторах, полученных на основе бактериофага λ 255
Получение геномных библиотек в космидных векторах 278

Глава 10. Идентификация рекомбинантных клонов 291

Гибридизация in situ бактериальных колоний или фаговых бляшек 292
Идентификация клонов кДНК гибридизационной селекцией 306
Скрининг библиотеки специфических последовательностей ДНК в бактериофаге λ методом рекомбинации у *Escherichia coli* 323

Глава 11. Анализ рекомбинантных клонов ДНК 332

Быстрое выделение ДНК плазмид или бактериофага λ 332
Картирование участков, расщепляемых рестриктирующими эндонуклеазами 337
Перенос по Саузерну 344
Субклонирование малых фрагментов ДНК в плазмидных векторах 350

Глава 12. Векторы, используемые для экспрессии клонированной ДНК в *E. coli* 359

Приложения 387

Приложение А. Биохимические методы 387
Приложение Б. Плазмида pBR322 420
Приложение В. Часто используемые бактериальные штаммы 443

Литература
Предметный указатель