

С28.07(07)  
К-616



Учебно-  
методические  
пособия  
Учебно-научного  
центра ОИЯИ  
Дубна

УНЦ-2010-44

Н. А. Колтовая

РУКОВОДСТВО К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ  
ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

2010

Объединенный институт ядерных исследований  
Учебно-научный центр

28.07 (07)  
K-616

Н. А. Колтовая

РУКОВОДСТВО  
К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ  
ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

*Учебное пособие*

Рекомендовано учебно-методическим советом  
университета «Дубна» в качестве учебного пособия для студентов,  
обучающихся по направлению «Ядерные физика и технологии»,  
и экспертной комиссией УНЦ ОИЯИ

Объединенный институт  
ядерных исследований  
Дубна 2016  
БИБЛИОТЕКА

149902

УДК 577.2.08  
ББК 28.072я73  
К17

Рецензент: доктор биологических наук,  
профессор кафедры микробиологии МГУ Ю. Д. Цыганков

Колтовая Н. А.

К17 Руководство к практическим занятиям по молекулярной биологии: Учебное пособие. — Дубна: ОИЯИ, 2010. — 112 с.

ISBN 978-5-9530-0266-0

Руководство содержит изложение основных принципов и методов работы с нуклеиновыми кислотами и белками. В качестве исходного материала традиционно используются клетки бактерий и дрожжей. Для облегчения понимания основных принципов работы помимо протоколов приводится дополнительная информация.

Пособие предназначено для студентов и аспирантов биологических специальностей.

Koltovaya N. A.

A Laboratory Manual for Molecular Biology: Textbook. — Dubna: JINR, 2010. — 112 p.

The manual contains a description of the basic methods and protocols of manipulation with nucleic acids and proteins on the basis of bacterial and yeast cells. The laboratory protocols and accompanying information given in the book have been designed to simplify and shed greater light on the principles underlying the experiments.

The book is addressed to undergraduate, postgraduate and research students specializing in biology sciences.

УДК 577.2.08  
ББК 28.072я73

© Объединенный институт  
ядерных исследований, 2010

ISBN 978-5-9530-0266-0

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение .....	5
1. Плазмиды .....	6
1.1. Бактериальные плазмиды .....	6
1.2. Дрожжевые плазмиды .....	8
2. Трансформация плазмидной ДНК .....	18
2.1. Структура клеточной стенки про- и эукариот .....	18
2.2. Трансформация бактерий <i>Escherichia coli</i> .....	20
2.2.1. Быстрый метод трансформации <i>E. coli</i> .....	26
2.3. Трансформация дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	28
2.3.1. Быстрый метод трансформации <i>S. cerevisiae</i> .....	34
3. Выделение ДНК .....	37
3.1. Выделение плазмидной ДНК из бактерий <i>E. coli</i> .....	37
3.1.1. Выделение препаративных количеств плазмидной ДНК щелочным методом из клеток бактерий <i>E. coli</i> .....	40
3.2. Выделение плазмидной ДНК из дрожжей <i>S. cerevisiae</i> .....	42
3.3. Выделение геномной ДНК из дрожжей <i>S. cerevisiae</i> .....	44
4. Рестриктивный анализ ДНК .....	46
4.1. Ферменты рестрикции .....	46
4.2. Расщепление молекул ДНК рестриктазами .....	50
5. Гель-электрофорез ДНК .....	52
5.1. Электрофорез ДНК в агарозном геле .....	53
5.2. Горизонтальный электрофорез ДНК .....	65
6. Выделение белков .....	67
6.1. Выделение белков из дрожжей .....	68
7. Разделение белков методом электрофореза .....	70
7.1. Разделение белков путем вертикального SDS-электрофореза .....	74
7.1.1. Растворы .....	74
7.1.2. Подготовка фореозного аппарата .....	76
7.1.3. Электрофорез .....	78
7.2. Окрашивание белковых гелей Кумасси .....	78
8. Работа с нуклеиновыми кислотами и белками .....	80
8.1. Очистка нуклеиновых кислот .....	80
8.1.1. Удаление РНК из препаратов .....	81
8.1.2. Удаление белков .....	81
8.1.3. Экстракция нуклеиновых кислот фенолом и хлороформом .....	82
8.1.4. Осаждение белков солями .....	84
8.1.5. Осаждение нуклеиновых кислот спиртом .....	84
8.1.6. Очистка ДНК с помощью BlueSorb .....	86

8.2. Определение количества двунитевой ДНК по флуоресценции	
бромистого этидия .....	87
Приложения .....	88
Приложение А .....	88
Приложение Б .....	100
Список литературы .....	107
Словарь терминов .....	108

## ВВЕДЕНИЕ

Руководство предназначено для проведения практических занятий по курсу «Молекулярная биология». В книге приведен примерный план практических занятий, цель которых - ознакомление студентов с основными методами выделения и работы с нуклеиновыми кислотами и белками на базе дрожжевых и бактериальных клеток. Традиционно дрожжи и бактерии используются в биотехнологии для экспрессии генов гетерологичных белков. Одноклеточные дрожжи служат в качестве модельной системы низших эукариот, и исследования, проводимые на дрожжах, вносят существенный вклад в понимание основных молекулярных механизмов клетки. В частности, почкующиеся дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* являются первым эукариотическим организмом, для которого была определена полная нуклеотидная последовательность генома, что существенно ускорило определение функции генов.

Занятия состоят из взаимосвязанных работ. На первом занятии студенты трансформируют бактериальные клетки различными рекомбинантными структурами ДНК. На следующих занятиях, проведя амплификацию плазмид, наращивают трансформированные культуры и выделяют препаративные количества плазмидной ДНК. Затем этой плазмидной ДНК трансформируют клетки дрожжей, в которых рекомбинантные структуры подвергаются мутагенной обработке. Выделение плазмидной ДНК из клеток дрожжей, рестриктивный и электрофоретический анализ структуры плазмидной ДНК завершает этот цикл. Выделению белков и их электрофоретическому анализу можно посвятить еще несколько занятий.

Предложенные методы тщательно проверены и успешно используются в различных лабораториях. Перед каждым новым методическим разделом приводится краткое введение, позволяющее студентам получить основные представления о предмете. Затем дается пропись самой методики. Отдельно приводятся рецепты растворов, необходимых для этой методики. В приложениях даётся справочный материал, а также можно ознакомиться с описанием и инструкциями по работе с некоторыми приборами. В конце книги приведен словарь терминов, который может быть полезен при проведении практикума и лекций.

# 1. ПЛАЗМИДЫ

## Литература:

1. Щелкунов С.Н. Клонирование генов. Новосибирск: Наука, 1986. С. 59—108.
2. Рыбчин В.Н. Основы генетической инженерии. Минск: Вышэйш. шк., 1986. С. 71—90.
3. Жимулёв И.Ф. Общая и молекулярная генетика. Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2003. С. 154—161.

Стабильно наследуемые внехромосомные генетические элементы — плазмиды являются обычным компонентом клеток бактерий и низших эукариот. В большинстве случаев плазмиды представляют собой суперскрученные ковалентно-замкнутые кольцевые молекулы ДНК длиной от 2 до 6 000 т.п.н. Благодаря такой структуре они не подвергаются действию нуклеаз. Существуют также линейные плазмиды, на которые нуклеазы не действуют, потому что нити на концах их ДНК защищены белками либо соединяются ковалентно. Клетки, в которые включаются плазмиды, приобретают новые признаки, то есть *трансформируются*.

## 1.1. Бактериальные плазмиды

Основным свойством плазмид является способность к автономной репликации. Молекулы ДНК приобретают ее в том случае, если в них имеется сайт начала репликации — *ori* — и набор генов, необходимых для ее осуществления. Клеточные хромосомы включают полный набор генов, кодирующих белки репликативного комплекса. Внехромосомные генетические элементы содержат не все необходимые гены, поэтому в их репликации принимают участие и клеточные ферменты. Различают плазмиды со строгим контролем репликации и с ослабленным.

Строгость контроля репликации плазмид заключается в том, что их дупликация осуществляется синхронно с удвоением бактериальной хромосомы (4 700 т.п.н. у *Escherichia coli*) и, по-видимому, одними и теми же репликативными комплексами, в которых главную роль играет ДНК-полимераза III. В бактериальной клетке насчитывается от 1 до 3 копий таких плазмид. Их минимальный размер 20—30 т.п.н., а максимальный на порядок больше.

Плазмиды с ослабленным контролем репликации вместо ДНК-полимеразы III используют ДНК-полимеразу I. В каждой бактериальной клетке содержится в среднем 40—50 копий плазмиды, в связи с чем их называют еще мультিকопийными. Они, как правило, невелики по размеру — не более 15—30 т.п.н.

Разница между строгим и ослабленным контролем репликации плазмид особенно заметна, когда клетки переходят из экспоненциальной фазы роста в стационарную. При этом плазмиды со строгим контролем и бактериальная хромосома перестают реплицироваться, в то время как плазмиды с ослабленным контролем продолжают дупликацию, и их масса в клетке может достигать массы бактериальной ДНК. Аналогичная картина наблюдается и в условиях остановки синтеза белка. Это происходит, к примеру, при добавлении в среду хлорамфеникола, прекращающего синтез белков, инициирующих репликацию бактериальной ДНК и плазмид со строгим контролем. Плазмиды же с ослабленным контролем в таких условиях способны инициировать новые раунды репликации, поэтому их число может достигать нескольких тысяч на клетку.

*Векторные системы* для молекулярного клонирования обычно создаются на основе репликонов плазмид. Хорошо известные плазмидные векторы (*pBR322* и *pUC9*) ведут свое начало от небольшой плазмиды *ColE1*, реплицирующейся в клетках *E. coli* независимо от хромосомы и существующей в числе 10—20 копий на клетку. Плазмида *pBR322* (4,36 т.п.н.) имеет гены устойчивости к антибиотикам ампициллину и тетрациклину. Ген устойчивости к ампициллину (*bla*) кодирует β-лактамазу, которая расщепляет β-лактамное кольцо ампициллина. Ампициллин нарушает биосинтез клеточной стенки в растущих клетках, подавляя активность одного или нескольких ферментов синтеза пептидогликана (пенициллинсвязывающих белков), что приводит к подавлению роста бактерий и запуску цепочки последовательных биохимических событий, результатом которых является осмотический лизис клетки. Минимальная подавляющая концентрация (МПК) для *E. coli* 2 мкг/мл. Тетрациклин нарушает биосинтез белка, связываясь с 30S рибосомной субъединицей, препятствует связыванию формилметионин-тРНК синтетазы с А-сайтом рибосомы. Ген устойчивости к тетрациклину (*tet*) кодирует фермент, который изменяет бак-

териальную мембрану и препятствует проникновению антибиотика в клетку. Обладает бактериостатическим действием, МПК = 0,5—5 мкг/мл.

Клетки *Escherichia coli* являются удобными объектами генно-инженерных экспериментов. Однако данные клетки не способны гликозилировать синтезируемые ими белки (в том числе и эукариотические). Но многие эукариотические белки активны лишь в гликозилированном состоянии.

Дрожжи обладают всеми признаками эукариот. В их геноме нет оперонов, транскрипцию у них ведут три типа РНК-полимераз, а мРНК имеют типично эукариотическое строение. Они содержат специфические эукариотические белки (гистоны, актин, тубулин, пептидные гормоны) и эукариотические органеллы (ядерная мембрана, митохондрии, 80S рибосомы, эндоплазматические мембраны, аппарат Гольджи, лизосомы). Каждая хромосома дрожжей несет по одной центромере, по две теломеры и по несколько *ori*-сайтов инициации репликации. Дрожжевые клетки могут гликозилировать синтезируемые ими белки.

Для клонирования и экспрессии обычно используют сахаромикеты — *Saccharomyces cerevisiae*. Они наиболее хорошо изучены с генетической точки зрения. У дрожжей лишь в 3 раза больше ДНК, чем у бактерий. Гаплоидный набор *S. cerevisiae* содержит 16 хорошо охарактеризованных хромосом, размер которых варьирует от 230 до 2 352 т.п.н. О расшифровке полной последовательности хромосомной ДНК дрожжей длиной 12 069 т.п.н. было сообщено в апреле 1996 г. В выполнении проекта «Геном дрожжей» принимали участие свыше 600 ученых из 96 лабораторий восьми стран. Идентифицированы 6 340 открытых рамок считывания (ОРС) длиной не менее 100 кодонов. Это позволяет относительно легко проводить скрининг клонов, содержащих рекомбинантные молекулы ДНК.

## 1.2. Дрожжевые плазмиды

У дрожжей известны три вида плазмид, которые можно использовать в качестве векторов. Это 2 мкм и 3 мкм (длина соответственно 2 и 3 мкм), а также митохондриальная (мт) ДНК (длина 25 мкм).

2-мкм плазида обнаруживается у большинства штаммов дрожжей и функционирует, по-видимому, лишь для обеспечения собственной репликации. В общем случае штаммы *cir*<sup>0</sup>, лишенные плазмиды, не отличаются

фенотипически от штаммов с плазидами *cir*<sup>+</sup>. Однако определенная хромосомная мутация *nib1* замедляет размножение штаммов *cir*<sup>+</sup> вследствие аномального увеличения числа копий плазмиды. 2-мкм плазида представляет собой кольцевую молекулу ДНК (6 318 п.н.), локализуется в ядре клетки и составляет около 3 % всей дрожжевой ДНК (50—70 копий на гаплоидный геном). В природе эта плазида не интегрируется в дрожжевые хромосомы. Лабораторные же варианты клеток, содержащих хромосомы с интегрированными в них 2-мкм ДНК, крайне нестабильны. Это объясняется несовместимостью механизма, регулирующего число копий плазмидной ДНК, с механизмом удвоения хромосом. Молекула 2-мкм ДНК содержит два инвертированных повтора — IR1 и IR2 (599 п.н.). В одном повторе находится ее *ori*-сайт. Его присутствие достаточно для автономной репликации плазмид, но в таком случае число копий невелико. Высокую копиинность 2-мкм ДНК обеспечивают плазмидные гены *REP1*, *REP2* и *REP3*.

Между инвертированными повторами 2-мкм плазмиды *in vivo* происходит внутримолекулярная рекомбинация, зависящая только от плазмидного белка, кодируемого геном *FLP*. Область рекомбинации длиной приблизительно около 60 п.н. лежит около *XbaI*-сайта. Благодаря рекомбинации 2-мкм ДНК может существовать в двух формах (А и В) в соотношении 1 : 1. Малый *EcoRI*-фрагмент В-формы (2 242 п.н.) содержит повтор IR1, *ori*-сайт, ген *FLP* и единственные сайты рестрикции (*EcoRI*, *HindIII*, *BalI*, *BclI* и *Clal*), применяемые для клонирования и экспрессии гетерологичных генов. Поэтому его используют в качестве основы при конструировании дрожжевых векторов.

Длина 3-мкм ДНК составляет около 9,5 т.п.н. Эта плазида содержит полную копию одного хромосомного повтора генов рРНК. (Всего в дрожжевых клетках ~140 копий таких повторов, состоящих из 4 разных генов рРНК; они локализованы на хромосоме XII.) Копий же плазмидной ДНК на клетку бывает не более 10. В качестве вектора данная плазида применяется редко.

Митохондриальная ДНК (мтДНК) включает ~75 т.п.н. Число молекул мтДНК на гаплоидную клетку ~50. На ней картировано несколько десятков генов (гены рибосомальных и транспортных РНК, субъединицы дыхательных ферментов). Они разделяются протяженными некодирующими после-

довательностями. Имеется около 7 канонических *ori*. В качестве вектора мтДНК пока не используется.

В дрожжевых плаزمидах селективные маркеры не обнаружены, поэтому в качестве векторов их стали применять лишь после включения в них определенных хромосомных генов дрожжей. Наиболее подходящими для таких целей оказались гены, функционально активные и в клетках *E. coli*, то есть исправляющие соответствующие бактериальные дефекты (табл. 1).

Таблица 1

Гены *S. cerevisiae*, функционально активные в клетках *E. coli*

Ген <i>S. cerevisiae</i>	Аналогичный ген <i>E. coli</i>	Фермент
<i>ARG4</i>	<i>argH</i>	Аргининосукцинатлиаза
<i>HIS3</i>	<i>hisB</i>	Имидазоглицерофосфатдегидрогеназа
<i>LEU2</i>	<i>leuB</i>	$\beta$ -изопропилмалатдегидрогеназа
<i>TRP1</i>	<i>trpAB</i>	Триптофансинтетаза
<i>TRP5</i>	<i>trpC</i>	Индолилглицерофосфатсинтетаза
<i>URA1</i>	<i>pyrD</i>	Дигидрооротатдегидрогеназа
<i>URA2</i>	<i>pyrB</i>	Аспартат-транскарбамилаза
<i>URA3</i>	<i>pyrF</i>	Оротидин-5'-фосфатдекарбоксилаза
<i>GAL1</i>	<i>galK</i>	Галактокиназа

В соответствии с разнообразием требований, которые диктуются необходимостью осуществлять делеционные или инсерционные изменения в генах, а также обеспечивать экспрессию генов в клетках дрожжей, имеются в наличии многочисленные векторы (рис. 1). Большинство плазмид, используемых в работе с дрожжами, например для трансформации, представляют собой *челночные векторы*, способные к самостоятельной репликации в дрожжах и бактериях благодаря присутствующим в них *ori*-сайтам дрожжевых и бактериальных плазмид. Это объясняется тем, что из дрожжевых клеток трудно выделить значительное количество векторных молекул. Выделение векторов и рекомбинантных ДНК из дрожжей ведут обычно в два этапа. Сначала из трансформированных дрожжей выделяют суммарную ДНК, затем с ее помощью трансформируют клетки *E. coli* и по селективным признакам отбирают клоны с челночными векторами.

Наиболее распространенные векторы дрожжей являются производными известной плазмиды *pBR322* и содержат ориджин репликации (*ori*),

обеспечивающий высокую копиюность плазмиды в клетках кишечной палочки, и селективные маркеры устойчивости к антибиотикам — ген *bla*, определяющий устойчивость к ампициллину, и иногда ген *tet* — ген резистентности к тетрациклину.

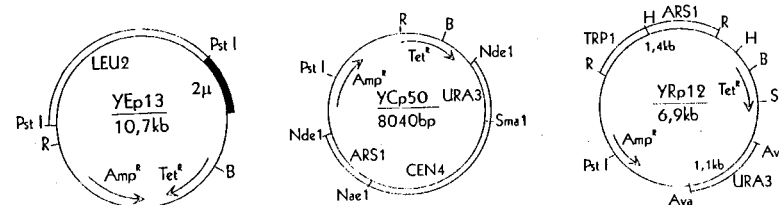


Рис. 1. Рестриктная карта плазмид YRp12, YEp13 и YCp50

В вектор также включены последовательности дрожжевой ДНК, которые обеспечивают репликацию этих плазмид в дрожжах (табл. 2 А). В зависимости от цели исследования сайт инициации репликации *ori* дрожжей можно выбрать таким образом, что вектор окажется высоко- или низкокопийным. Высококопийные векторы содержат последовательности 2-мкм плазмиды. Большинство используемых в настоящее время дрожжевых маркеров — это биосинтетические гены дикого типа, комплементирующие мутации метаболических путей. Наиболее часто в качестве таких селективных маркером используются гены *URA3*, *HIS3*, *LEU2*, *TRP1* и *LYS2*, которые комплементируют специфические мутации ауксотрофности, — соответственно *ura3-52*, *his3-Δ1*, *leu2-Δ1*, *trp1-Δ1* и *lys2-201* (табл. 2 Б). Эти мутации нарушают биохимические пути синтеза соответствующих нуклеотидов или аминокислот и выбраны для работы главным образом потому, что у них весьма низки частоты реверсий. Также часто используют мутации *his3-11,15* и *leu2-3,112*. Двойные точковые мутации снижают вероятность появления ревертантов до  $10^{-10}$ . Кроме того, гены дрожжей *URA3*, *HIS3*, *LEU2* и *TRP1* способны комплементировать специфические мутации ауксотрофности у *E. coli* и в таком случае обеспечивают дополнительный маркер для селекции и отбора в бактериальных клетках.

Гены дрожжей *URA3* и *LYS2* в качестве маркеров для векторов дрожжей обладают дополнительным преимуществом, поскольку при их использовании возможна как позитивная, так и негативная селекция, то есть отбор как клеток, содержащих плазмиду, так и клеток, утративших ее. Позитивная се-

лекция основана на комплементации ауксотрофности, определяемой, соответственно, мутациями *ura3* и *lys2*, тогда как для негативной селекции используют специфические ингибиторы — соответственно 5-фтороротовую кислоту (FOA) и  $\alpha$ -аминоадипиновую кислоту ( $\alpha$ AA), которые подавляют размножение прототрофных штаммов, но не препятствуют росту мутантов — соответственно *ura3* и *lys2*. Ген *URA3* используют более часто. Он кодирует фермент оротидин-5'-фосфат-декарбоксилазу, который необходим для биосинтеза урацила. Мутанты *ura3* можно отбирать на среде, содержащей FOA. По-видимому, под действием декарбоксилазы Ura3, имеющейся у нормальных клеток, FOA превращается в токсичный 5-фторурацил, и нормальные клетки на среде с FOA погибают, а мутанты *ura3* способны размножаться. Это обстоятельство используют для изгнания из клеток плазмид с маркером *URA3*. При работе с такими плазмидами чаще всего используют хозяйские клетки, маркированные мутацией *ura3-52*. Этот аллель содержит инсерцию мобильного элемента *Tu1* и не ревертирует.

Несмотря на разнообразие имеющихся челночных векторов для работы с дрожжами, векторы, используемые в настоящее время, можно разбить на 3 класса (табл. 2): *интегративные* векторы *YIp*; автономно реплицирующиеся многокопийные векторы *YRp* и *YEр* (их еще называют *эписомными*) и автономно реплицирующиеся векторы с низкой копийностью (*YCp*), они же кольцевые *минихромосомы*. Есть еще один специализированный вид векторов, именуемый *pYAC* и используемый для конструирования *искусственных хромосом*.

*Векторы YIp*. Интегративные векторы *YIp* (*Yeast Integrating plasmid*) являются фактически бактериальными векторами, так как дрожжевая ДНК в них представлена только одним из указанных в табл. 2 генов. Они не способны реплицироваться в дрожжевых клетках автономно, но осуществляют их трансформацию путем интеграции в хромосому через рекомбинацию дрожжевого гена с гомологичным участком и путем замены хромосомного гена на векторный с помощью двойного кроссингвера.

Рекомбинационная интеграция кольцевой плазмидной ДНК приводит к тому, что копия векторной последовательности фланкируется прямым повтором последовательности дрожжей. Сайт интеграции намечают, разрезая дрожжевой сегмент плазмиды *YIp* рестрикционной эндонуклеазой, и трансформируют дрожжевые клетки линейаризованной плазмидой.

Линейные концы рекомбиногенны и обеспечивают непосредственную интеграцию плазмиды в сайт генома, гомологичный этим концам. Вдобавок линейаризация приводит к повышению эффективности трансформации в 10—50 раз.

Таблица 2

А. Компоненты плазмидных векторов дрожжей

Элементы	Вектор			
	<i>YIp</i>	<i>YEр</i>	<i>YRp</i>	<i>YCp</i>
Гены или сегменты <i>E. coli</i> <i>ori</i> , <i>bla</i> , <i>tet</i>	+	+	+	+
Гены или сегменты дрожжей <i>URA3</i> ; <i>HIS3</i> ; <i>LEU2</i> ; <i>TRP1</i> ; <i>LYS2</i> и пр.	+	+	+	+
<i>leu2-d</i>	0	+	+	0
2 $\mu$ m; 2 $\mu$ m- <i>ori</i> <i>REP3</i>	0	+	0	0
<i>ARS1</i> ; <i>ARS2</i> ; <i>ARS3</i> и пр.	0	0	+	+
<i>CEN3</i> ; <i>CEN4</i> ; <i>CEN11</i> и пр.	0	0	0	+
Маркеры хозяйских клеток (дрожжей) <i>ura3-52</i> ; <i>his3-Δ1</i> ; <i>leu2-Δ1</i> ; <i>trp1-Δ</i> и пр.	+	+	+	+
Стабильность	++	+	±	+

Б. Природа маркерных мутаций

Мутация	Делеция	Способность к реверсии	Описание молекулярной природы
<i>ura3-52</i>	Нет	Нет	Вставка <i>Tu1</i> в положении 121
<i>his3-Δ1</i>	Частичная	Нет	187 п.н. <i>HindIII-HindIII</i> (н.ост. 305-492)
<i>leu2-Δ1</i>	Частичная	Нет	Делеции н.ост. G208 и G319
<i>trp1-Δ1</i>	Да	Нет	1,45 т.п.н. <i>EcoRI-EcoRI</i> (н.ост. -102-1352)
<i>lys2-Δ202</i>	Частичная	Нет	1,0 т.п.н. <i>XhoI-HpaI</i> (н.ост. 1813-2864)

Для векторов *YIp* обычно характерна однокопийная интеграция. С низкой частотой, однако, может происходить множественная интеграция, которая позволяет конструировать стабильные штаммы со сверхэкспрессией специфических генов. Плазмиды, имеющие два дрожжевых сегмента, например *LEU1* и *URA3*, потенциально могут интегрироваться в каждый из этих геномных локусов, тогда как векторы, содержащие повторяющиеся последовательности ДНК, например повторяющиеся элементы *Tu* или рДНК, могут интегрироваться в любой из множественных сайтов в геноме. Штаммы, сконструированные с использованием плазмид *YIp*, нужно про-



верить с помощью ПЦР или другими методами для подтверждения сайта интеграции. Эффективность трансформации клеток дрожжей такими плазмидами низка (от 0,1 до нескольких десятков колоний трансформантов на 1 мкг ДНК плазмиды). Однако если клетки *S. cerevisiae* трансформировать плазмидами, содержащими двухцепочечный разрыв внутри последовательности, гомологичной дрожжевому гену, то плазмидная трансформация происходит с гораздо большей эффективностью.

Существенной характеристикой трансформантов вообще и, в частности, трансформантов, полученных при использовании интегративных векторов, является митотическая стабильность, то есть, грубо говоря, доля клеток в культуре, сохраняющих трансформированный фенотип. Штаммы, трансформированные плазмидами *YIp*, по сравнению с трансформантами, несущими другие плазмиды, чрезвычайно стабильны даже в отсутствие селективного давления. Однако интегрированная плаزمиды все-таки может теряться с частотой приблизительно  $10^{-3}$ — $10^{-4}$  благодаря гомологичной рекомбинации между tandemными повторами ДНК; при этом происходит выпетливание векторной последовательности и одной из дублированных копий, которые ее фланкируют.

**Векторы *YEр*.** Эписомные плазмидные векторы *YEр* (*Yeast Episomal plasmid*) содержат сегмент 2-мкм плазмиды, содержащий ориджин репликации (2  $\mu$ m *ori*), и благодаря присутствию которого векторы могут автономно реплицироваться в клетках дрожжей. Векторы *YEр* могут содержать копию 2-мкм плазмиды целиком, но в большинстве случаев они содержат только область плазмиды, в которой присутствуют последовательность *ori* и ген *REP3*. Ген *REP3* является цис-активным, то есть должен быть на одной плазмиде с *ori*. Присутствие гена *REP3* на плазмиде вместе с *ori* необходимо, чтобы опосредовать действие транс-активных генов *REP1* и *REP2*. Эти гены кодируют продукты, которые способствуют распределению копий плазмиды между материнской и дочерней клетками при делении. Соответственно, гены *REP1* и *REP2* могут сами и не присутствовать в векторе *YEр*; в клетках *cir<sup>+</sup>*, содержащих множественные копии эндогенной 2-мкм плазмиды, действие генов *REP1* и *REP2*, присутствующих на этих копиях, способно обеспечить поддержание в клетках вектора *YEр*, содержащего только *ori* и *REP3*.

Эффективность трансформации клеток дрожжей плазмидами данного типа составляет  $(5-20) \cdot 10^3$  трансформантов на 1 мкг плазмидной ДНК. Число копий плазмиды *YEр* на 1 клетку (копийность) для клеток *cir<sup>+</sup>* колеблется в пределах от 10 до 40. Плазмиды распределяются между клетками не поровну, и число копий на клетку в разных популяциях сильно варьирует. По большей части плазмиды *YEр* относительно нестабильны. Темп их потери, то есть вероятность утраты плазмиды на одну генерацию, составляет от одного до нескольких процентов. При размножении в неселективных условиях митотическая стабильность таких плазмид обычно не превышает 40 %, в селективных условиях она повышается до 60—95 %.

Имеются несколько систем, обеспечивающих очень высокую копийность плазмид *YEр*. Одна из таких систем использует мутацию *leu2-d*, определяющую частичную дефектность клеток по биосинтезу лейцина. Уровень экспрессии этого аллеля, по сравнению с уровнем экспрессии нормального аллеля *LEU2<sup>+</sup>*, ниже на несколько порядков. Копийность векторов *YEр-leu2-d* составляет от 200 до 300, и после размножения в среде с дефицитом лейцина эта высокая копийность сохраняется на протяжении многих генераций уже при размножении в неселективных условиях. Векторы *YE-leu2-d* применимы при больших объемах культур, выращиваемых на полноценных средах, на которых селекция плазмид невозможна. Чаще всего векторы *YEр* используют в тех случаях, когда необходима сверхпродукция какого-либо генного продукта.

Используемые векторы *YEр*-типа являются челночными плазмидами, способными реплицироваться как в клетках *E. coli*, так и в дрожжах. Это обусловлено в первую очередь тем, что наработку гибридных ДНК и ряд других манипуляций часто проще осуществлять в бактериальных клетках. Эти челночные векторы позволяют клонировать чужеродные гены в клетках *E. coli* и затем исследовать их экспрессию в дрожжевых клетках.

**Векторы *YRp*.** Векторы типа *YRp* (*Yeast Replicating plasmid*) имеют последовательности начала репликации *ARS* (*Autonomously Replicating Sequence*), которые либо просто соответствуют природным *ori* репликации хромосом дрожжей, либо имеют с этими *ori* существенные черты сходства. Наиболее часто в векторах *YCr* используются элементы *ARS*, находящиеся у дрожжей в непосредственной близости от локусов *TRP1* и *ARG4* в хромосомах IV и VIII, обозначенные соответственно *ARS1* и *ARS2*. Последо-

вательности элементов автономной репликации эндогенной дрожжевой 2-мкм плазмиды и из клонированных сегментов дрожжевой хромосомы состоят, по крайней мере, из 60 п.н., обогащены АТ-парами и содержат каноническую последовательность АААС/ТАТААА.

Включение в плазмиду элементов автономной репликации во многих случаях позволяет довести эффективность трансформации популяции сферопластов дрожжей до 1%. Однако обычно при размножении трансформированных клеток в неселективных условиях они утрачивают плазмиды, темп их потери составляет 10% и выше. После 10 генераций плаزمида сохраняется всего примерно в 5% клеток. При размножении в селективных условиях стабильность плазмиды *YRp12* (ARS1) составляет около 30%. По-видимому, при клеточном делении плазмиды не распределяются поровну в две дочерние клетки. Таким образом, векторы *YRp* трансформируют клетки дрожжей с высокой эффективностью, например  $(0,5-2,0) \cdot 10^3$  для *YRp7*, но слишком легко утрачиваются. Соответственно, их применение в качестве векторов ограничено.

**Векторы *YCr*.** Чтобы преодолеть это затруднение, в плазмиду можно ввести фрагменты ДНК, содержащие последовательности центромера (CEN) дрожжевых хромосом. Поскольку центромера обеспечивает физическую связь хромосомы с нитями веретена во время митоза, то такие векторы проявляют стабильность при митозе и мейозе.

Центромерные плазмидные векторы *YCr* (*Yeast Centromere plasmid*) способны автономно реплицироваться, содержат автономно реплицирующиеся последовательности ARS и центромерные последовательности CEN. Центромеры обеспечивают присоединение хромосом к нитям митотического веретена, что необходимо для их точной сегрегации при делении клеток. Таким образом, плазмиды, содержащие CEN-последовательности, поддерживаются в клетках с помощью того же механизма, который обеспечивает равное распределение хромосом. При этом стабильность центромеросодержащей плазмиды *YCr50* (CEN4 ARS1) в неселективных условиях составляет уже 40—50%.

Функция центромерной последовательности CEN зависит от трех консервативных доменов, обозначаемых CDEI, CDEII и CDEIII. CDEI (14 п.н.) и CDEIII (11 п.н.) фланкируют внутренний сегмент и являются сайтами для связывания с центромерными белками. Известно несколько

центромерных белков: CENP-A, CENP-B, CENP-C, CENP-D. Центральный домен CDEII является АТ-богатым участком из 100—120 пар повторяющихся нуклеотидов, предотвращающим кроссинговер хромосом в районе центромеры. Для точной сегрегации хромосом достаточно около 100 п.н. центрального участка (кора). Для митотической стабилизации векторов *YCr* необходимы все три элемента. Наиболее употребительные и удобные для манипуляций центромерные элементы — CEN3, CEN4 и CEN11. Например, вектор *YCr50* содержит элементы CEN4 и ARS1 (см. рис. 1).

Копийность этих плазмид низка, обычно составляет от 1 до 3. Темп потери таких плазмид в неселективных условиях составляет приблизительно 1% на генерацию. В тетрадах, полученных от скрещивания трансформанта с *YCr* и нормального штамма, достаточно часто наблюдается расщепление 2:2 по наличию/отсутствию плазмиды. То есть поведением в митозе (низкая копияность) и в мейозе (регулярная сегрегация) векторы *YCr* имитируют хромосомы дрожжей. Эти векторы называют еще кольцевыми минихромосомами. Приемлемая митотическая стабильность и низкая копияность векторов *YCr* делают предпочтительным их использование в качестве векторов для клонирования, конструирования библиотек геномных ДНК, исследования функций генов.

**Искусственные хромосомы дрожжей *YAC* (*Yeast Artificial Chromosome*)** длиной 100—1 000 т.п.н. помимо ARS и CEN имеют на обоих концах линейной молекулы теломеры, селективные маркеры на каждом плече (*TRP1* и *URA3*) и клонированные фрагменты ДНК (рис. 2).

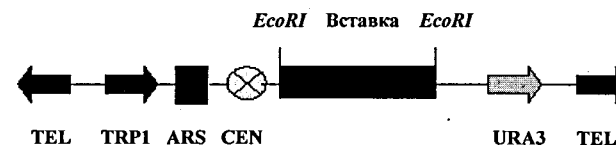


Рис. 2. Структура *YAC* (0,1—2 млн п.н.)

Отбирая трансформанты по маркерам *TRP1* и *URA3*, можно быть уверенным, что данный клон имеет и левое и правое плечо вектора. Теломеры придают стабильность и регулярность передачи вектору. Имеются рестрикционные сайты, уникальные для участков *YAC* и пригодные для инсерции ДНК. Размеры клонированных последовательностей ДНК велики: обычно несколько сот тысяч пар нуклеотидов и даже больше.

## 2. ТРАНСФОРМАЦИЯ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК

### Литература:

1. Прозоров А.А. Трансформация у бактерий. М.: Наука, 1988. С.132—147.
2. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии. М.: Мир, 1984. С. 239—244.

Трансформация — это перенос генетического материала от одного организма к другому. Плазмидные векторы вводят в реципиентные клетки методом генетической трансформации, то есть путем переноса с помощью изолированной ДНК. Встраивание чужеродной ДНК в клетки в результате обработки их изолированной ДНК называется также *трансфекцией*.

Эффективность трансформации бактерий зависит от их способности пропускать ДНК через клеточную стенку. Естественная трансформация наблюдается для некоторых видов бактерий, например *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*. Однако клетки кишечной палочки *Escherichia coli* гидролизуют линейную трансформирующую ДНК. Поэтому трансформация возможна только у мутантных штаммов *recBC sbcB*, у которых нарушена система деградации ДНК.

Бактериальные клетки, утратившие свою стенку частично (*сферопласты*) или полностью (*протопласты*), но сохранившие цитоплазматическую мембрану, также можно использовать для трансформации. Однако у грамотрицательных бактерий этот метод не получил распространения из-за сложности строения клеточной стенки.

### 2.1. Структура клеточной стенки про- и эукариот

Бактериальная клеточная стенка имеет жесткую клеточную стенку, которая выполняет защитную роль — это ее основная, но не единственная функция. В состав клеточной стенки входят пептиды, липиды, углеводы. Они образуют единообразную структурную матрицу. Такая матрица имеет сетчатую структуру и образована полисахаридными цепями, ковалентно связанными с помощью поперечных сшивок — коротких полипептидных мостиков. Из-за ковалентного связывания пептидов и углеводов такое вещество называется пептидогликаном. Клеточная стенка состоит из трех четко различимых слоев: наружного, липополисахаридного слоя, к которому прилагает двуслойная мембрана (наружная клеточная мембрана), и

пептидогликанового слоя, тесно связанного с наружной клеточной мембраной. Цитоплазматическая мембрана отделена от пептидогликанового слоя периплазматическим пространством.

Полисахаридная часть образована повторяющимися дисахаридными единицами, состоящими из N-ацетил-D-глюкозамина и N-ацетилмуравовой кислоты, соединенных  $\beta(1-4)$ -связью. Между собой повторяющиеся единицы также соединены  $\beta(1-4)$ -связями. Пептидную часть можно рассматривать как состоящую из двух оснований: 1) тетрапептида, содержащего D- и L-аминокислоты и ковалентно присоединенного к карбоксильной группе боковой цепи каждого остатка муравовой кислоты, и 2) пентаглицинового фрагмента, присоединяющегося к концевому остатку аланина тетрапептидного фрагмента соседней параллельной полисахаридной цепи.

Эукариотическая клетка окружена тонким слоем (0,0075—0,0095 мкм), состоящим из липидов и белков, так называемой плазматической мембраной или клеточной мембраной. Помимо граничных (то есть отделение одной клетки от другой) и защитных функций клеточная мембрана играет важную роль в регуляции транспорта веществ наружу и внутрь клетки. В выполнении очень многих функций мембран участвуют высокоспециализированные мембранные белки, называемые белками-рецепторами, действие которых сводится к связыванию определенных соединений на одной стороне мембраны. Наряду с клеточной мембраной эукариотические клетки растений имеют защитный слой в виде клеточной стенки, расположенной снаружи клеточной мембраны. Как и в прокариотических бактериях, стенка высших эукариотических клеток образована жесткой сетчатой структурой, сшитой ковалентными связями и состоящей в основном из полисахаридов («полиуглеводов»).

В большинстве клеток (эукариотических и прокариотических) наружная поверхность клеток (после клеточной мембраны или клеточной стенки) часто бывает покрыта слоем вязкого вещества, называемого клеточной оболочкой. Состав клеточной оболочки различен для разных клеток, однако известно, что обычно она состоит из сложных полисахаридов в сочетании с другими компонентами, например белками и липидами. Кроме того, в поверхностный слой внедряются некоторые мембранные белки.

В то время как прокариотическая клетка характеризуется отсутствием различных структур, связанных с внутриклеточными мембранами, прямо противоположное утверждение верно для эукариотических клеток. Типичная эукариотическая клетка содержит ядро, окруженное ядерной мембраной. Она отличается от большинства остальных мембран тем, что она двойная и разделена межмембранным пространством. Эта мембрана имеет мембранные поры, что обеспечивает выход в цитоплазму больших молекул РНК (информационной, транспортной, рибосомной), которые синтезируются в ядре. Ядро — это место в клетке, где генетическая информация, во-первых, хранится в виде ДНК, во-вторых, передается остальной части клетки (ДНК—РНК—белки, причем биосинтез происходит в цитоплазме), в-третьих, реплицируется, обеспечивая воспроизведение клеток (ДНК—ДНК). Также в клетке присутствуют митохондрии, эндоплазматическая сеть, аппарат Гольджи, микротельца.

## 2.2. Трансформация бактерий *Escherichia coli*

### Литература:

1. Mandel M., Higa A. Calcium depends bacteriophage DNA infection// J. Mol. Biol. V. 53. P. 159—166.
2. Cosloy S., Oishi M. The nature of the transformation process in *Escherichia coli* K12// Mol. Gen. Genet. 1973. V. 124. P. 1—10.

Физиологическое состояние клетки, в котором она способна включать нативную нуклеиновую кислоту из окружающей среды, называется *компетентностью*. Компетентность в основном связана с начальными стадиями проникновения ДНК в клетку — адсорбцией и поглощением ДНК клеткой. У *E. coli* естественная компетентность вообще отсутствует, и поглощение происходит после обработки клеток. Такую компетентность называют индуцированной. Были предприняты интенсивные исследования, направленные на поиск условий формирования индуцированной компетентности клеток *E. coli*. В генной инженерии широко используется  $\text{CaCl}_2$ -зависимый метод трансформации клеток *E. coli*, разработанный Манделем и Хига (1970 г.).

Трансформация *E. coli* посредством плазмидной и бактериальной ДНК отличается некоторыми особенностями адсорбции и поглощения

ДНК по сравнению с трансформацией у других бактерий и осуществима только в лабораторных условиях. Имеются косвенные данные, свидетельствующие о том, что трансформирующая ДНК кишечной палочки проникает в клетку в двунитевом состоянии и в дальнейшем не образует одонитевых структур. Видимо, трансформирующая ДНК при этом на начальных стадиях претерпевает гораздо меньшие изменения, чем у тех бактерий, для которых трансформация является естественным процессом; она почти не фрагментируется и не образует одонитевых молекул. Однако внутри клетки поступившая в нее линейная ДНК в значительной мере разрушается АТФ-зависимой ДНКазой. Этим, видимо, объясняется то обстоятельство, что трансформация посредством хромосомной ДНК успешно проходит лишь в клетках, лишенных этого фермента (*recBC sbcB*). Кроме того, в таких клетках отсутствует и активность экзонуклеазы I. Такое сочетание мутаций возвращает клетке способность к рекомбинации. Считается, что рекомбинация при этом идет за счет иных механизмов, чем в клетках исходного генотипа, — по так называемому пути *recF*. Используют также другой класс мутантов — *recBC sbcA*. У них также отсутствует активность АТФ-зависимой ДНКазы, но появляется активность другой экзонуклеазы — экзонуклеазы VIII. Рекомбинация у мутанта *recBC sbcA* идет по *recE*-пути.

В качестве реципиентных клеток часто используют штаммы С600 (*hsdR<sup>-</sup> hsdM*) и НВ101 (*hsdR<sup>-</sup> endA<sup>-</sup> recA<sup>-</sup>*). Мутация *hsdR*, блокируя клеточную систему рестрикции, предохраняет тем самым клонируемые фрагменты от действия рестриктазы *EcoK*. Мутации *endA<sup>-</sup>* и *RecA<sup>-</sup>* предотвращают расщепление трансформирующей ДНК клеточными нуклеазами. Применение *tonB*-мутантов, у которых изменена структура клеточной стенки, в дополнение к мутациям *recBC sbcAB* позволяет повысить частоту образования трансформантов.

Повышение частоты образования трансформантов происходит также при обработке клеток солями, например хлористым кальцием. При кальциевой методике применяется комбинация таких воздействий, как выдерживание клеток на холоде и их обработка хлористым кальцием. Хлористый кальций может быть заменен хлористым барием и хлористым рубидием. Инкубация при 37 °С обязательна для генетической трансформации.

Ионы кальция действуют лишь при 37 °С, то есть на заключительных этапах обработки клеток.

Существуют различные гипотезы о роли хлористого кальция при применении кальциевого способа получения компетентных клеток *E. coli*. Ионам кальция приписывалась определенная роль в нейтрализации отрицательных зарядов клеточной поверхности, что может способствовать адсорбции также отрицательно заряженных макромолекул ДНК. Предполагали, что хлористый кальций может денатурировать какие-то белки на поверхности клетки, что также способствует адсорбции и проникновению ДНК в клетку, или действовать на липиды клеточной стенки. Имеются предположения об активации им ферментов—фосфолипаз, влияющих на проницаемость, или гипотетических у *E. coli* ферментов, участвующих в активном транспорте ДНК. Во всяком случае, эта обработка сокращает число жизнеспособных клеток, возможно, повреждая их клеточные стенки; имеется обратная зависимость между выживаемостью клеток и частотой генетической трансформации после кальциевой обработки.

Экспериментально доказано, что в процессе  $\text{CaCl}_2$ -зависимой плазмидной трансформации *E. coli* критическую роль играет состояние липидов мембраны клеток. Ионы  $\text{Ca}^{2+}$  могут индуцировать переход липидов мембраны из обычной двухслойной в необычную гексагональную конфигурацию. Причем данный фазовый переход липидов происходит во время температурного шока (изменении температуры от 0 до 42 °С) обработанных  $\text{CaCl}_2$  клеток и сопровождается поглощением экзогенных двухцепочечных молекул ДНК. При тепловом шоке поглощение ДНК продолжается в течение лишь 20 с. Если после этого смесь клеток и ДНК с высокой температуры снова охладить до 0 °С, то в процессе индуцируемого фазового перехода липидов молекулы ДНК снова могут проникать в клетки. При этом период проникновения ДНК продолжительнее. Выявленные фазовые переходы липидов приводят к нарушению структуры внешней мембраны, но практически не затрагивают цитоплазматической мембраны клеток. Сами механизмы трансформации посредством плазмидной ДНК компетентных клеток *E. coli* изучались мало.

Культура кишечной палочки обладает различной способностью к трансформации после обработки хлористым кальцием в разные периоды роста. В самом начале и конце роста культуры трансформантов почти не

возникает. Наибольшее их число образуется, если берут клетки в середине — начале логарифмической фазы роста. Интересно, что именно на этот период падает максимальное снижение числа жизнеспособных клеток после соответствующих обработок. Тогда же наблюдается наибольшее «истечение» ферментов, расположенных в периплазматическом пространстве из клеток во внешнюю среду. Таким образом, у *E. coli* имеется стадия роста, в которую может быть сообщена компетентность при трансформации, и в этот период клетки наиболее «хрупки». Оптимальное значение рН для трансформации при кальциевой методике равно 7—8. Чтобы получить компетентные клетки, выращивают культуру *E. coli* до плотности  $2 \cdot 10^8$  кл/мл ( $OD_{650} = 0,07$ ).

Как суперскрученная, так и релаксированная плазмидная ДНК трансформировала клетки с примерно одинаковой эффективностью. ДНК более крупных плазмид обладала худшей способностью к трансформации, чем ДНК мелких плазмид. Одновременное добавление к клеткам любой другой ДНК снижало выход трансформантов независимо от происхождения конкурирующей ДНК и ее размеров. Если для трансформации брали мономерную линейную ДНК плазмиды *pBR322*, предварительно превращенную в линейную, то количество трансформантов по сравнению с суперскрученной формой в клетках штамма с ненарушенной способностью к рекомбинации падало в 100—1 000 раз. Если в качестве реципиентов были взяты мутанты *recA*, *recBC* и *recF*, то количество трансформантов посредством суперскрученной ДНК оставалось без изменения, а эффективность трансформации посредством линейной ДНК уменьшалась еще больше, чем в клетках исходного генотипа (дополнительно в 10—40 раз). Вероятно, в клетки кишечной группы бактерий, ставшие компетентными после обработки хлористым кальцием, может проникать кольцевая плазмидная ДНК, не претерпевая разрывов (в отличие от грамположительных микроорганизмов). Если же ДНК искусственно превращали в линейную, то она с достаточной низкой частотой рециркуляризовалась в клетке (как у бацилл, пневмококков и стрептококков). При этом превращение линейной формы в кольцевую происходило за счет внутримолекулярной рекомбинации между прямыми повторами. Этот процесс нуждался в рекомбинационных системах клетки (в частности в наличии АТФ-зависимой ДНКазы, образова-

ние которой у кишечной палочки детерминируется генами *recBC*) и был облегчен у димерных форм плазмид.

Количество ДНК, которое адсорбируется на одной компетентной клетке *E. coli* и поглощается ею, точно не установлено. В одной из работ (Cosloy, Oshi, 1973) приводятся подсчеты, судя по которым на одну клетку в популяции приходится в среднем 70 МДа необратимо связанной ДНК.

После проникновения ДНК (инфекционной фаговой или плазмидной) в клетку нет последующего включения этой ДНК в хромосому. Имеются косвенные данные, свидетельствующие о том, что трансформирующая ДНК проникает в клетку в двуниговом состоянии.

В отличие от других бактериальных видов у кишечной палочки оптимальная величина фрагментов трансформирующей ДНК ограничена не только нижними, но и верхними пределами. Больше всего трансформантов образуется, если использовать ДНК с молекулярным весом 10—30 МДа.

Насыщающие концентрации ДНК при трансформации кишечной палочки несколько выше, чем у большинства микроорганизмов, — около 10 мкг/мл. Зависимость количества трансформантов от концентрации ДНК при ненасыщающих концентрациях близка к линейной. Судя по частоте появления трансформантов, число компетентных клеток в культуре при кальциевой методике составляет лишь незначительную часть популяции.

Выход трансформантов в большинстве случаев составляет  $10^5$ — $10^7$  на 1 мкг интактной ДНК бактерии. Модификациями основного метода пытались увеличить эффективность трансформации у разных штаммов бактерий. Можно подобрать условия, в которых штаммы бактерий воспроизводимо дают  $10^7$ — $10^8$  трансформантов на 1 мкг интактной ДНК. Следует учитывать, что компетентна, то есть способна поглощать плазмидную ДНК, только небольшая фракция клеток (в трансформации участвует лишь 1 из 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.

Механизмы проникновения ДНК сильно различаются в зависимости от применения той или иной из методик и мало изучены.

Трансформация посредством плазмидной ДНК может осуществляться и с помощью метода замораживания / оттаивания клеток. Эффектив-

ность трансформации была не ниже, чем при употреблении кальциевого метода. Методика сводится к непродолжительному замораживанию бактериальных клеток совместно с ДНК при  $-70^\circ\text{C}$  и последующему оттаиванию при  $37^\circ\text{C}$ . Поглощение ДНК происходит очень быстро. В момент оттаивания, менее чем за минуту, обработка ДНКазой оттаявшей суспензии уже не препятствует трансформации. Судя по скорости поглощения ДНК, в случае возникновения компетентности при замораживании — оттаивании клеток *E. coli* ДНК поглощают не протопласты, а интактные клетки, у которых из-за соответствующей обработки резко меняется проницаемость для макромолекул. Сам молекулярный механизм такого поглощения неизвестен.

Бактерии способны 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 сут. Компетентные клетки можно приготовить в больших количествах, проверить и хранить замороженными.

Отметим факторы, мешающие трансформации:

1) вещества, связывающие ионы  $\text{Mg}^{2+}$  (ЭДТА, цитрат натрия) и применяемые для инактивации дезоксирибонуклеаз, подавляют поглощение ДНК компетентными клетками;

2) додецилсульфат;

3) лизоцим, который может сам лизировать компетентные клетки.

Уровень эффективности трансформации может достигать  $10^8$  колоний/мкг ДНК. Реальный рабочий уровень не ниже  $5 \cdot 10^7$  колоний/мкг ДНК. Кальциевый метод дает эффективность трансформации  $10^5$ — $10^8$  колоний/мкг ДНК.

В целом можно констатировать, что пока сделаны лишь первые шаги в понимании  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцируемой компетентности клеток *E. coli*. Тем не менее, вследствие своей простоты и надежности данный метод заслужил всеобщее признание и используется практически во всех генно-инженерных экспериментах на клетках *E. coli*.

## 2.2.1. Быстрый метод трансформации *E. coli*

### Литература:

1. Inoue H., Nojima H., Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids// *Gene*. 1990. V. 96. P. 23—28.

### Штамм *Escherichia coli*

Для трансформации применялся штамм *Escherichia coli* TG1 с генотипом  $F' traD36 LacI^q \Delta(lacZ) M15 proA^+ B^+ / supE \Delta(hsdSM-mrcB) (r_k^- m_k^+ McrB^-) thi-1 \Delta(lac-proAB)$ , дающий высокую частоту трансформации.

Мутации:  $F'$  — отсутствует эписома F; *traD36* — мутация в гене фактора передачи, предотвращает передачу эписомы F; *hsdR* — предупреждает рестрикцию проникающей в клетку ДНК, блокируя клеточную систему рестрикции, предохраняя тем самым клонируемые фрагменты от действия рестриктазы *EcoK*; *lacZ* — неспособность синтезировать галактозидазу и невозможность использования лактозы в качестве источника углерода; *lacZAM15* — частичная делеция гена  $\beta$ -D-галактозидазы, позволяет осуществлять селекцию белый/голубой для рекомбинантных клонов при высеве на X-gal; *pro* — потребность в пролине; *thi* — потребность в тиамине; *supE* — супрессор amber-мутаций.

### Векторы

*pLL12* (2  $\mu$ m-ori *LYS2 LEU2*) длиной 15,2 т.п.н.; *YEp13* (2  $\mu$ m-ori *LEU2*) длиной 10,7 т.п.н.; *YRp12* (*ARS1 TRP1*) длиной 6,9 т.п.н.; *YCp50* (*ARS1 CEN4 URA3*) длиной 8,04 т.п.н.; *YCpL2* (*ARS1 CEN3 TRP1 LEU2 CAN1 CYH2 URA3*) длиной 13,8 т.п.н.

### Среда LB (*Luria-Bertani*):

	на 100 мл:
1 % триптона	1 г триптона
0,5 % дрожжевого экстракта	0,5 г дрожжевого экстракта
1 % NaCl	1 г NaCl
Довести pH до 7,5 раствором 2 М NaOH.	

### Антибиотики

**Ампициллин (Amp).** Концентрированный раствор: 25 мг/мл натриевой соли ампициллина растворить в стерильной воде. Хранить при -20 °С. Рабочая концентрация 25—50 мкг/мл.

**Тетрациклин (Tet).** Концентрированный раствор — 12,5 мг/мл. Тетрациклин гидрохлорид растворить в смеси этанол—вода (50 % по объему). Хранить при -20 °С. Рабочая концентрация 12,5—12,0 мкг/мл. Ионы магния являются антагонистами тетрациклина; для селекции бактерий, устойчивых к тетрациклину, используйте среду без солей магния (например LB).

### 1×TE-буфер, pH 7,4:

0,01 М Трис-HCl, pH 7,4  
0,001 М ЭДТА, pH 8,0

### Раствор SS:

50 мМ MgCl<sub>2</sub>  
100 мМ KCl  
10 % ПЭГ3000  
5 % DMSO

### Протокол:

1. Приготовьте 3 мл ночной культуры (LB, 37 °С).
2. Внесите 30 мкл ночной культуры в 3 мл среды LB. Выращивайте клетки при 37 °С при интенсивном перемешивании до концентрации  $5 \cdot 10^7$  кл/мл. Обычно это занимает 1,5—2 часа. Чаще всего концентрацию клеток определяют с помощью спектрофотометра, отбирая пробы и измеряя оптическую плотность (*OD*) при длине волны 600 или 550 нм. ( $OD_{600} = 1$  соответствует примерно  $8 \cdot 10^8$  клеток/мл.) Так как точное соотношение между оптической плотностью и числом бактерий для *E. coli* несколько варьирует от штамма к штамму, для точных определений желательнее построить калибровочную кривую зависимости числа жизнеспособных бактерий от  $OD_{550}$  для каждой культуры. Для штамма

TG1 нужная концентрация соответствует коэффициенту  $OD_{550} = 0,6$  для XL1 —  $OD_{550} = 0,4$ .

3. Осадите клетки центрифугированием (4 000 об/мин., 1 мин.).
4. Ресуспендируйте клетки в 300 мкл буфера SST.
5. Добавьте к 100 мкл компетентной культуры 10 мкл раствора ДНК (20 мкг/мкл). В контрольную пробирку такое же количество ТЕ-буфера. (Три раза пипетировать.)
6. Выдержите во льду 3—5 мин.
7. Перенесите пробы в микротермостат (42 °С, 40 с).
8. Посейте по 50 мкл культуры на селективные чашки (LB + Amp (100 мкг/мл)).
9. Инкубируйте сутки при 37 °С, затем чашки перенесите в холодильник. Так как секретируемая устойчивыми трансформированными клетками β-лактомаза разрушает ампициллин, то при длительном инкубировании вокруг колоний трансформантов вырастают чувствительные сателлитные колонии.
10. Подсчитайте количество выросших колоний на чашке, рассчитайте эффективность трансформации (количество трансформантов в расчете на 1 мкг добавленной плазмидной ДНК).
11. Постройте график зависимости эффективности трансформации от размера плазмиды, используемой для трансформации.

### 2.3. Трансформация дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

#### Литература:

1. Ito H., Fukuda Y., Murata K., Kimura A. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations// *J. Bacteriol.* 1983. V. 153. P. 163—168.
2. Schiestle R.H., Gietz R.D. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier// *Current Genet.* 1989. V. 16. P. 339—346.
3. Gietz R.D., Schiestl R.H. Applications of high efficiency lithium acetate transformation of intact yeast cells using single-strand nucleic acids as carrier// *Yeast.* 1991. V. 7.—P. 253—263.
4. Woods R.A., Gietz R.D. Yeast transformation// P.A. Norton, L.F. Steel (Eds), *Gene Transfer Methods: Introducing DNA into Living Cells and Organisms.* MA: Eaton Pub., Natick, 2000.

5. Gietz R.D., Woods R.A. Genetic transformation of yeast// *BioTechniques.* 2001. V. 30. P. 816—831.
6. Gietz R.D., Woods R.A. Yeast transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG method// *Methods Mol. Biol.* 2006. V. 313. P. 107—120.
7. Уотсон Дж., Туз Дж., Курц Д. *Рекомбинантные ДНК.* М.: Мир, 1986.

Под трансформацией понимают введение в клетки ДНК, добавленной извне, и ее последующие наследование и экспрессию. Наиболее существенные достижения в определении молекулярных характеристик и в контролируемой модификации генов дрожжей основаны на использовании челночных векторов, которые могут быть использованы для трансформации как дрожжей, так и клеток бактерий *E. coli*. Самое крупное преимущество использования дрожжей состоит в легкости, с которой гены можно извлекать, делетировать, встраивать и модифицировать контролируемым образом. Эти методы используют сочетание технологий рекомбинантных ДНК, трансформации и процедур классической генетики.

Существует три основных метода трансформации дрожжей: а) метод, использующий сферопласты; б) метод, использующий обработку клеток солями лития, и в) метод, основанный на использовании электропорации.

Известно, что клеточная стенка дрожжей препятствует проникновению экзогенной ДНК в клетку. Для введения ДНК в клетки дрожжей целлюлозную клеточную стенку частично удаляют и получают так называемые *сферопласты*. Сферопласты для трансформации получают в результате действия гидролитических комплексов ферментов, в состав которых входят *глюканазы*, *протеазы* и др., частично удаляющих клеточную стенку, в присутствии осмотических стабилизаторов, типичным примером которых может служить 1 М *сорбит*. При этом используют ферментные препараты, выделенные из самых различных источников. Например, клеточную стенку разрушают либо экстрактом из пищеварительных органов улиток *Helix pomatia* (коммерческий фермент *глюзулаза*), либо *зимолиазой*, ферментом бактерий *Arthrobacter luteus*. После обработки ферментами клеточная стенка эффективно регенерирует в 2 %-м агаре.

Трансформирующую ДНК добавляют к сферопластам и проводят соосаждение смеси раствором полимерного спирта (например полиэтиленгликолем), содержащим ионы  $Ca^{2+}$ . *Полиэтиленгликоль* (ПЭГ) делает



мембрану проницаемой и создает тем самым возможность для проникновения ДНК в клетки. Вслед за этим клетки ресуспенсируют в растворе сорбита, смешивают с еще не застывшим агаром и затем выливают на поверхность чашки с селективной средой, содержащей сорбит, где они восстанавливают клеточную стенку. Это, в общем, довольно трудоемкий протокол, и при его использовании эффективность трансформации может варьировать в диапазоне четырех порядков величины, в зависимости от штамма. Все же для некоторых штаммов можно получить довольно высокую эффективность трансформации, достигающую величины  $10^4$  трансформантов на 1 мкг ДНК. В настоящее время трансформацию сферопластов используют для трансформации дрожжевых клеток YACами.

Однако плазмидную трансформацию клеток дрожжей можно осуществить и без удаления клеточной стенки. Для этого клетки обрабатывали полиэтиленгликолем в присутствии солей лития, цезия или кальция. Компетентность клеток дрожжей индуцирует в основном полиэтиленгликоль, а перечисленные катионы лишь повышают эффективность плазмидной трансформации. Большинство исследователей используют для трансформации клетки, обработанные солями лития. После обработки клеток ацетатом лития (LiAc), который увеличивает проницаемость клеточной стенки, добавляют ДНК и клетки соосаждают ПЭГ, ответственным за адсорбцию ДНК клеточными стенками. Клетки подвергают непродолжительному тепловому шоку, отмывают от ПЭГ и ацетата лития и распределяют по поверхности обычной селективной среды. Эффективность трансформации может быть увеличена при использовании специально приготовленной одноклеточной ДНК-носителя и некоторых органических растворителей. Уровень трансформации компетентных клеток дрожжей несколько ниже, чем при введении плазмид в сферопласты клеток, но «солевые» методики плазмидной трансформации *S. cerevisiae* значительно проще по сравнению с системой сферопластов. Поэтому они получили широкое распространение. Трансформация с помощью ацетата лития впервые была предложена в 1983 г. (Ito et al., 1983), в последующие годы в результате модификаций было уменьшено время процедуры и увеличена эффективность более чем в 20 раз (Schiestl, Gietz, 1989). Используемая методика проста и дает до  $2,2 \cdot 10^7$  трансформантов/мкг плазмидной ДНК/ $10^9$  клеток и до 1,5% трансформированных клеток.

Наблюдается почти линейное увеличение числа трансформантов в области от 1 нг до 5 мкг плазмидной ДНК в реакционной смеси.

Хотя литиевая методика трансформации широко используется, очень мало известно о механизме трансформации. Известно, что трансформация стимулируется агентами, изменяющими пористость клеточной стенки, например  $Li^+$ , протеазами и  $\beta$ -меркаптоэтанолом. Показано, что из них наиболее эффективным агентом является LiAc. Для высокой эффективности трансформации существенным является присутствие в реакции молекул одноклеточной ДНК-носителя, которые, возможно, защищают плазмидную ДНК от действия нуклеаз. Хотя выход трансформантов пропорционален среднему размеру фрагментов ДНК-носителя, используют УЗ-обработку для уменьшения длины до достаточной для предотвращения образования геля денатурированным носителем при замораживании ДНК.

Таблица 3

Влияние способа обработки ДНК-носителя на эффективность трансформации

Носитель	Условия обработки	Число трансформантов/ мкг плазмидной ДНК	Увеличение эффективности трансформации
Сперма лосося	-	37	1×
Сперма лосося	Ультразвук	739	20×
Сперма лосося	Ультразвук, кипячение	67 000	1 810×
Тимус телянка	Ультразвук	7 900	213×
Тимус телянка	Ультразвук, кипячение	37 000	1 000×

В качестве ДНК-носителя используют ДНК из спермы лосося или тимуса телянка. Как видно из табл. 3, добавление нативной ДНК из спермы лосося дает 20-кратное увеличение, а из тимуса телянка — 200-кратное увеличение. Фрагментация ультразвуком молекул ДНК-носителя повышает эффективность трансформации. Кипячение и последующее замораживание еще больше повышают эффективность трансформации. Необработанная УЗ ДНК из спермы лосося дает эффективность трансформации  $4,6 \cdot 10^4$  на 1 мкг плазмидной ДНК. Анализ фрагментов ДНК в агарозном геле показал, что эффективность трансформации достигает пика,  $5,5 \cdot 10^4$  на 1 мкг плазмидной ДНК, если при ультразвуковой обработке получают фрагменты в области от 15 до 2 т.п.н., средняя длина фрагмента около 7 т.п.н. Дальнейшее уменьшение размера фрагментов ДНК до 500 п.н. сни-

снижает эффективность трансформации до  $1,9 \cdot 10^4$  трансформантов на мкг плазмидной ДНК.

Процедуру трансформации можно оптимизировать, изменяя количество ДНК-носителя, длительность теплового шока и количество трансформирующего вектора. В табл. 4 показано влияние количества носителя на частоту трансформантов. Пик эффективности трансформации наблюдается при добавлении 200 мкг одноклеточных молекул ДНК-носителя.

Таблица 4

Влияние различного количества ДНК-носителя, обработанного кипячением, на эффективность трансформации

Количество ДНК-носителя (сперма лосося), мкг	Число трансформантов/мкг плазмидной ДНК	Кратность увеличения
0	37	1×
10	720	20×
50	29 700	803×
100	37 000	1 000×
200	42 500	1 149×
500	28 000	757×

Таким образом, оптимальная реакционная смесь

**200 мкл** суспензии клеток ( $1 \cdot 10^8$  клеток) +  
**20 мкл** ДНК (5 мкг плДНК + 100 мкг ДНК-носителя)

Добавление ПЭГ к смеси клеток, носителя и плазмидной ДНК абсолютно необходимо для прохождения трансформации. ПЭГ концентрирует молекулы ДНК-носителя и плазмид на поверхности клетки. Показано, что важен молекулярный вес ПЭГ: ПЭГ2000 и ПЭГ3350 наиболее эффективны, критична концентрация ПЭГ в трансформационной смеси.

Тепловой шок при 42 °С в течение 15—20 мин. сильно увеличивает уровень трансформации для большинства штаммов дрожжей. Показано, что при завершении всей процедуры жизнеспособность клеток (*plating efficiency*) составляет более 50 %. Эксперименты показали, что продолжительность инкубации при 42 °С перед посевом на чашки с селективной средой влияет на число трансформантов. Применение теплового шока увеличивает эффективность трансформации в 8 раз, пик наблюдается при 15 мин. выдерживания (табл. 5).

Таблица 5

Влияние времени инкубации при 42 °С (тепловой шок) на эффективность трансформации

Время инкубации при 42 °С, мин	Число трансформантов/мкг плазмидной ДНК	Кратность увеличения
0	12 900	1×
5	56 900	4,4×
10	94 400	7,3×
15	107 000	8,3×
20	100 000	7,8×

Метод литиевой трансформации, или LiAc/ss carrier DNA/PEG-метод, как его еще называют, в последнее время был модифицирован, оптимизирован и сокращен (Gietz, Woods, 2006). В результате снижено время обработки LiAc, удален TE-буфер из трансформационного раствора (клетки ресуспендируют в воде, а не в TE-буфере), оптимизирована концентрация клеток и ДНК-носителя, ДНК-носитель не обрабатывают УЗ, а только нагревают.

Трансформирующая ДНК может сохраняться в дрожжевых клетках либо путем интеграции с хромосомой, либо путем автономной репликации в виде эписомы.

Наиболее эффективна трансформация растущих культур, однако можно трансформировать стационарные культуры и 4-недельные. Трансформация замороженных компетентных клеток происходит с эффективностью  $0,2—1,0 \cdot 10^5$  трансформантов/мкг ДНК.

В настоящее время широко используется также метод трансформации различных видов клеток, основанный на индукции проницаемости клеток для ДНК под действием электрических полей. Предполагается, что электрический импульс индуцирует образование пор в клеточной мембране, через которые проникают в клетки макромолекулы. Свежевыращенные культуры дрожжей отмывают, суспендируют в растворе осмотического протектора, например сорбита, добавляют ДНК, и суспензии клеток сообщают импульс с помощью прибора для *электропорации*. Затем клетки распределяют по поверхности селективной среды. Для повышения эффективности электропорационной трансформации используют ПЭГ, одноклеточную ДНК-носитель и клетки, находящиеся в поздней логарифмической фазе роста. Несмотря на простоту метода, оборудование, требуемое для его реализации, недешево.

### 2.3.1. Быстрый метод трансформации *S. cerevisiae*

#### Литература:

1. Woods R.A., Gietz R.D. *Gene Transfer Methods*// MA: Eaton Pub., Natick, 2000.

#### Штамм дрожжей

В работе использовали ауксотрофный по аденину, триптофану и урацилу штамм дрожжей *S. cerevisiae* 3D (МАТа *ade2 trp1 ura3-160,188*). Мутации, влияющие на биосинтез аденина, триптофана и урацила, обозначаются *ade*, *trp* и *ura*. Цифра указывает индивидуальную мутацию.

#### Векторы

*YCp50* (ARS1 CEN4 *URA3*) длиной 8,04 т.п.н., *YCpL2* (ARS1 CEN3 *TRP1 LEU2 CAN1 CYH2 URA3*) длиной 13,8 т.п.н.

#### Питательная среда YPAD:

2 % пептона  
1 % дрожжевого экстракта  
2 % глюкозы  
30 мг/л аденина  
Довести рН среды до 6,0 раствором NaOH.

#### Селективная среда YNB-ura:

0,6 % YNB (Yeast Nitrogen Base «Difco», USA)  
2 % глюкозы  
20 мг/л триптофана  
20 мг/л аденина  
0,6 % YNB готовится 20× и стерилизуется фильтрованием.

#### Раствор 1M Li-Ac:

растворите 10,2 г ацетата лития ( $C_2H_3O_2Li \cdot 2H_2O$ ) в 100 мл воды. Проверьте рН, который должен быть 8,4—8,9. Простерилизуйте раствор автоклавированием. Перелейте в стерильную колбу с притертой крышкой и храните при комнатной температуре.

#### Раствор 50 % ПЭГ 3500 (w/v):

растворите 50 г ПЭГ3500 в воде. Доведите водой объем до 100 мл, простерилизуйте автоклавированием и храните при комнатной температуре.

#### Трансформационный раствор:

240 мкл 50 % ПЭГ3500  
36 мкл 1,0 M Li-Ac  
50 мкл 2,0 мг/мл однострессовой ДНК-носителя  
0,1—10 мкг плазмидной ДНК  
34 мкл воды

#### Протокол:

1. Ночную культуру клеток, выращенных в 2×YPAD, или примерно 50 мкл клеток, собранных с чашки YPAD, ресуспендируйте в 1,5 мл-микроцентрифужной пробирке в 1 мл стерильной воды. Суспензия должна содержать  $5 \cdot 10^8$  клеток.
2. Определите концентрацию клеток с помощью спектрофотометра, измеряя *OD* на длине волны 600 нм (суспензия с концентрацией  $1 \cdot 10^6$  клеток/мл имеет *OD* = 0,1). Для этого добавьте в кювету с 900 мкл воды 100 мкл суспензии, хорошо перемешайте и проведите измерение. В качестве контроля используйте кювету с водой. При определении титра не забудьте умножить на фактор разведения.
3. Клетки отцентрифугируйте при высокой скорости на микроцентрифуге (30 с) и удалите супернатант.
4. Осевшие клетки ресуспендируйте в 360 мкл трансформационного раствора и хорошо перемешайте на Vortex.
5. Клетки в трансформационном растворе инкубируйте в микротермостате при 42 °С в течение 20—180 мин. Осадите клетки в микроцентрифуге при высокой скорости (30 с) и удалите трансформационный раствор микропипеткой.
6. Осторожно ресуспендируйте осажденные клетки в 1,0 мл стерильной воды, перемешайте наконечником микропипетки и расseyте по 250 мкл суспензии на чашки с селективной средой YNB-ura.

7. Инкубируйте чашки при 30 °С в течение 3—4 сут.
8. Подсчитайте количество выросших колоний на чашке и определите эффективность трансформации (количество трансформантов в расчете на 1 мкг добавленной плазмидной ДНК на 10<sup>8</sup> клеток).

### 3. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК

#### 3.1. Выделение плазмидной ДНК из бактерий *E. coli*

##### *Литература:*

1. Birnboim H.C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA// *Nucleic Acids Res.* 1979. V. 7. P. 1513—1523.
2. Godson G.N., Vapnek D. A simple method of preparing large amounts of  $\phi$ X174 RFI supercoiled DNA// *Biochem. Biophys. Acta.* 1973. V. 29. P. 516—520.
3. Holmes D.S., Quigley M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids// *Anal. Biochem.* 1981. V. 114 P. 193—197.

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

*Амплификация в богатой среде.* Амплификацию плазмид производят при выращивании бактерии-хозяина в богатой среде в присутствии антибиотика хлорамфеникола. Ночную культуру (10 мл LB с добавлением антибиотика Amp) пересевают в свежую среду LB (0,2 мл н. к. в 25 мл LB с антибиотиком Amp) и инкубируют, пока культура не достигнет поздней логарифмической фазы ( $OD_{600} = 0,6$ ). Затем переносят культуру в свежую среду LB с антибиотиком Amp (500 мл), инкубируют 2,5 ч (при этом титр удваивается), добавляют хлорамфеникол (Clf) до концентрации 170 мкг/мл и инкубируют еще 12—16 ч.

*Лизис клеток.* Разрушения бактерий для последующего выделения биологически активной ДНК можно добиться разными способами.

— *Механические.* При этом происходят многочисленные разрывы ДНК.

— Добавление анионного детергента *додецилсульфата натрия* (SDS или *лаурилсульфата*) вызывает лизис у многих бактерий. В частности, так можно разрушить бактерии кишечной группы, пневмококки и гемофильные бактерии. Додецилсульфат не только разрушает клетки, но и денатурирует некоторые белки. SDS ( $CH_3-(CH_2)_{10}-CH_2-OSO_3^- Na^+$ )-ионное соединение с поверхностно-активными свойствами (гидрофобная часть молекулы отрицательно заряжена). SDS сорбируется на полипептидной цепи, что приводит к денатурации молекулы белка. SDS разрушает ионные ассоциаты и ассоциаты неполярных частиц. Однако затем он должен быть полностью удален из лизата (что и достигается при последующих обработках),

так как его примесь в трансформирующей ДНК мешает самому процессу трансформации.

— Некоторые грамположительные бактерии нельзя разрушить только додецилсульфатом или другими поверхностно-активными веществами. Вначале нужно удалить клеточную стенку и затем применить тот или иной детергент. Для разрушения клеточной стенки чаще всего применяют *лизозим*. При концентрациях, которые чаще всего применяются для разрушения бактериальных клеток (50—500 мкг/мл), функции лизоцима сводятся к разрушению клеточной стенки, в результате чего образуются хрупкие протопласты, легко разрушаемые детергентами. При больших концентрациях лизоцим может, видимо, влиять на связь ДНК с цитоплазматической мембраной и даже связываться с ДНК, осаждая ее. Кроме лизоцима, для той же цели употребляют *проназу*. Проназа способствует более полному гидролизу белка и поэтому лучшей последующей депротенизации ДНК.

При разрушении бактерий в лизате в числе прочих ферментов появляются *дезоксирибонуклеазы*. Если действие их чем-либо не блокировано, они могут тут же разрушить ДНК. Обычно от них защищаются, добавляя вещества (ЭДТА — этилендиамидтетрауксусная натриевая соль  $C_{10}H_{14}N_2O_8 \cdot Na_2 \cdot 2H_2O$ ), которые связывают ионы магния, требующиеся для работы большинства ДНКаз. Эти вещества (додецилсульфат, дезоксихолат) подавляют поглощение ДНК компетентными клетками. Лизоцим и проназа, остающиеся в лизате, сами могут лизировать компетентные клетки. В ряде случаев от нежелательных примесей, мешающих трансформации, можно избавиться за счет разведения лизата.

ЭДТА	— разрыхляет наружную мембрану, ингибирует нуклеазы
Лизоцим	— разрушает клеточную стенку
SDS	— разрушает цитоплазматическую мембрану, денатурирует белки, ингибирует нуклеазы

Для депротенизации лизата при выделении ДНК используют обработку фенолом, который осаждает додецилсульфат и инактивирует все белки, в том числе и дезоксирибонуклеазы.

Существуют и другие методики лизиса. *Лизис кипячением* (Holmes, Quigley, 1981) и *лизис щелочью* (Birnboim, Doly, 1979) отличаются высокой эффективностью и в случае малых плазмид ( $\leq 10$  т.п.н.) дают выход

2 — 3 мг/л. Лизис под действием SDS (Godson, Varnek, 1973) сравнительно более мягкий, и им следует пользоваться в случае больших плазмид ( $\geq 10$  т.п.н.).

**Очистка ДНК.** В методах очистки так или иначе используют два основных различия между ДНК *E. coli* и плазмидной ДНК:

— хромосома *E. coli* по размеру много больше ДНК плазмид, обычно используемых в качестве векторов;

— основная масса ДНК *E. coli* выделяется из клеток в виде фрагментированных линейных молекул, тогда как большая часть 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 обломки 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 при равновесном центрифугировании в градиенте хлористого цезия, содержащем какой-нибудь интеркалирующий краситель в насыщающей концентрации, например бромистый этидий или дейодистый пропидий. Ковалентно-замкнутые кольцевые молекулы ДНК связывают меньше такого красителя, чем линейная ДНК, и поэтому в градиентах хлористого цезия, содержащих интеркалирующий агент, оказываются в зонах с более высокой плотностью. Эту методику используют, если необходима высокая степень очистки плазмидной ДНК. Однако по мере развития методов работы с рекомбинантной 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 мало-очищенные препараты плазмидной ДНК, полученные из небольших объемов культуры.

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

### 3.1.1. Выделение препаративных количеств плазмидной ДНК щелочным методом из клеток бактерий *E. coli*

#### Лизирующий раствор I:

	на 5 мл:
50 мМ глюкозы	112,6 мкл 40 % глюкозы
25 мМ Трис-НСl, рН 8,0	125 мкл 1 М Трис-НСl, рН 8,0
10 мМ ЭДТА	100 мкл 0,5 М ЭДТА
2 мг/мл лизоцима	10 мг лизоцима
	4,66 мл H <sub>2</sub> O

#### Щелочной раствор II:

	на 10 мл:
0,2 н NaOH	200 мкл 40 % NaOH
1 % SDS	1 мл 10 % SDS
	8,8 мл H <sub>2</sub> O

#### Раствор III:

3 М Na-Ас (рН 4,8)

#### Раствор хлорамфеникола:

концентрированный раствор — 34 мг/мл растворите в 100 %-м этаноле. Храните при -20 °С. Рабочая концентрация — для амплификации плазмид 170 мкг/мл, для селекции устойчивых бактерий 30 мкг/мл.

#### Протокол:

1. Вырастите ночную культуру бактерий в 10 мл LB + Amp (100 мкг/мл).
2. Перенесите 0,2 мл ночной культуры в 25 мл свежей среды LB + Amp и растите до поздней логарифмической фазы ( $OD = 0,6$ ).
3. Перенесите 25 мл культуры в 500 мл свежей среды LB + Amp и дайте концентрации клеток удвоиться (примерно 2,5 ч).
4. Добавьте 2,5 мл раствора хлорамфеникола (Clf) до концентрации 170 мкг/мл и растите в течение 12—16 ч или вырастите ночную культуру бактерий, содержащих плазмиду, в 150 мл среды LB + Amp при 37 °С (20—24 ч).
5. Перенесите культуру в центрифужные пробирки и осадите клетки центрифугированием в течение 15 мин при 4 000 об/мин.
6. Отбросьте супернатант и ресуспендируйте осадок в 2,4 мл раствора I, содержащего 2 мг/мл лизоцима (лизоцим не работает, если рН < 8,0).
7. Поместите пробирку в лед на 15 мин.
8. Добавьте 4,8 мл свежеприготовленного раствора II. Пробирку закройте парафилмом и осторожно (!) переверните несколько раз.
9. Выдержите пробирку 5—10 мин в ледяной бане.
10. Добавьте 7,2 мл охлажденного раствора III. Резко переверните пробирку, заклеенную парафилмом.
11. Выдержите пробирку 30—60 мин в ледяной бане.
12. Отцентрифугируйте 20 мин в центрифуге при 6 000 об/мин. при комнатной температуре.
13. К супернатанту добавьте 2 V этанола и оставьте на 1 ч в морозильнике (-20 °С).
14. Отцентрифугируйте 30 мин. при 6 000 об/мин. при 4 °С.
15. Ресуспендируйте осадок в 1 мл ТЕ-буфера.
16. Храните раствор ДНК при 4 °С до использования.

### 3.2. Выделение плазмидной ДНК из дрожжей *S. cerevisiae*

#### Литература:

1. Toh-e A., Tada S., Oshima Y. 2  $\mu$ m DNA-like plasmids in the osmophilic haploid yeast *Saccharomyces rouxii*// *J. Bacteriol.* 1982. V. 151. P. 1380—1390.
2. Cameron J.R., Philippsen P., Davis R.W. Analysis of chromosomal integration and deletions of yeast plasmids// *Nucleic Acids Res.* 1977. V. 4. P. 1429—1448.
3. Livingston D.M., Klein H.L. Deoxyribonucleic acid sequence organization of a yeast plasmid// *J. Bacteriol.* 1977. V. 129. P. 472—481.
4. Struhl K., Stinchcomb D.T., Scherer S., Davis R.W. High-frequency transformation of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979. V. 76. P. 1035—1039.

#### YPAD

	на 1 л:
2 % пептона	20 г пептона
1 % дрожжевого экстракта	10 г дрожжевого экстракта
2 % глюкозы	20 г глюкозы
30 мг/л аденина	400 мг аденина
Довести pH среды до 6,0 раствором NaOH.	

#### Раствор А:

	на 50 мл:
1,2 М сорбитол	25 мл 2,4 М сорбита
14 мМ 2-м-этанол	50 мкл 14,4 М $\beta$ -меркаптоэтанола
50 мМ $K_2HPO_4$ -буфер	2,5 мл 1М $K_2HPO_4$
	22,5 мл $H_2O$
	на 1 мл раствора «А» $\rightarrow$ 0,2 мг зимолиазы 6000
<i>Zimolyase 6000</i>	раствор зимолиазы готовить <u>отдельно!</u>

#### Раствор В:

	на 50 мл:
0,25 М ЭДТА	25 мл 0,5 М ЭДТА
2,5 % SDS	1,25 г SDS
в 0,5 М Tris-base	25 мл 1 М Трис

#### Раствор 5 М К-Ас:

к 60 мл 5 М К-Ас (49,1 г/100 мл) добавьте 11,5 мл ледяной уксусной кислоты и 28,5 мл воды. Концентрация калия такого раствора составляет 3 М, а концентрация ацетата — 5 М.

#### Раствор DEPC:

диэтилпирикарбонат  $O(COOC_2H_5)_2$  FW = 162,14 («Sigma», cat. no. D5758)

#### Раствор С:

либо TE-, либо ЭФ-буфер

#### Протокол:

1. Нарастите ночную культуру дрожжей в 5 мл богатой среды YPAD при 30 °С.
2. Перенесите культуру в центрифужную пробирку и осадите клетки центрифугированием в течение 5 мин. и 1 раз отмойте в 3 мл стерильной воды.
3. Отбросьте супернатант и ресуспендируйте осадок в 0,4 мл раствора А, перенесите в микроцентрифужную пробирку (Эппендорф) и инкубируйте в микротермостате при 30 °С в течение 30 мин.
4. Добавьте сначала 80 мкл раствора В, а затем 2 мкл раствора DEPC. Быстро перемешайте, переворачивая несколько раз.
5. Инкубируйте суспензию при 65 °С в течение 30 мин. с открытой крышкой (выпариваем DEPC до исчезновения запаха).
6. Добавьте 100 мкл раствора 5 М К-Ас и перенесите в лед на 60 мин.
7. Отцентрифугируйте при 12 000 об/мин. в течение 5 мин.
8. Перенесите супернатант в новый Эппендорф и добавьте 2 V этанола, оставьте на 10 мин. при комнатной температуре.
9. Отцентрифугируйте 5 мин. при 5 000 об/мин. Отбросьте супернатант и высушите осадок под продувкой ламинара в течение 10 мин. Ресуспендируйте осадок в 50 мкл раствора С, встряхивая на Votrex.
10. Храните раствор ДНК при 4 °С до использования.

### 3.3. Выделение геномной ДНК из дрожжей *S. cerevisiae*

#### Литература:

1. Hohmann S. A region in the genome which favours multiple integration of DNA via homologous recombination// *Current Genet.* 1987. V. 12. P. 519—526.
2. Green E.D., Olson M.V. Systematic screening of yeast artificial-chromosome libraries by use of the polymerase chain reaction// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. V. 87. P. 1213—1217.
3. Huibregtse J.M., Evans C.F., Engelke D.R. Comparison of tRNA gene transcription complexes formed in vitro and in nuclei// *Mol. Cell. Biol.* 1987. V. 7. P. 3212—3220.

#### Питательная среда YPAD:

2 % пептона

1 % дрожжевого экстракта

2 % глюкозы

30 мг/л аденина

Довести pH среды до 6,0 раствором NaOH.

#### Раствор А:

1 М сорбитола

60 мМ ЭДТА-Na<sub>2</sub>, pH 7,5

100 мМ цитрат-Na<sub>3</sub>, pH 7,0

4 мкл/мл β-меркаптоэтанола

0,1 мг/мл Zymolyase 100Т (или 0,25 мг/мл Zymolyase 20Т)

#### Раствор В:

500 мМ Трис-HCl, pH 7,4

200 мМ ЭДТА-Na<sub>2</sub>, pH 8,0

2 % SDS

#### Раствор 5 М NaCl:

растворите 29,2 г NaCl в 80 мл H<sub>2</sub>O. Доведите объем до 100 мл и простерилизуйте автоклавированием.

#### Протокол:

1. Нарастите 5 мл культуры в YPD до стационарной фазы.
2. Осадите клетки (2 000 об/мин., 10 мин.) и один раз отмойте водой.
3. Ресуспендируйте осадок в 400 мкл раствора А.
4. Инкубируйте при 37 °С в течение 1—2 ч для разрушения клеточной стенки.
5. Сферопласты осадите центрифугированием.
6. Лизируйте клетки, ресуспензируя в 400 мкл раствора В и инкубируя в течение 10 мин.
7. Добавьте 100 мкл 5 М NaCl и осадите хромосомную ДНК, выдерживая в течение 2 ч при 4 °С.
8. Отцентрифугируйте и растворите осадок в 400 мкл ТЕ-буфера.
9. Экстрагируйте равным объемом фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (50 : 50 : 1 v/v).
10. Осадите два раза этанолом.
11. Очищенную ДНК промойте 70 %-м этанолом и растворите в ТЕ-буфере.

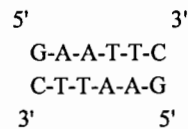


## 4. РЕСТРИКТНЫЙ АНАЛИЗ ДНК

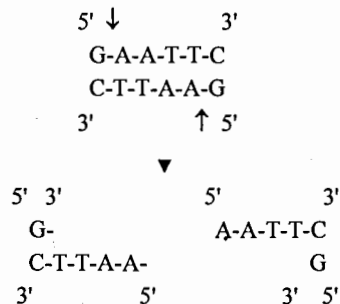
### 4.1. Ферменты рестрикции

Ферменты рестрикции (или *рестриктазы*) — это эндонуклеазы, которые расщепляют фосфодиэфирные связи двухцепочечной ДНК по специфическим сайтам (*сайты рестрикции*). Их выделяют преимущественно из прокариотических клеток и обозначают по специальной номенклатуре. Известно до 600 рестриктаз. Рестриктазы можно разделить на три группы. Ферменты *типа I* и *типа III* обладают модифицирующей (метилирующей) активностью и АТФ-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, многие из которых используются в молекулярном клонировании. Эти ферменты разрезают ДНК внутри или около своих сайтов узнавания, которые обычно имеют 4—6 нуклеотидов и обладают осью симметрии 2-го порядка. Например, фермент *EcoRI* узнает последовательность гексануклеотидов:



Подобно многим другим ферментам рестрикции, *EcoRI* вносит разрыв не точно по оси симметрии 2-го порядка, а в точках двух цепей ДНК, отстоящих друг от друга на 4 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 ДНК*.

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

Фермент *HaeIII* узнает последовательность из 4 нуклеотидов 5'-GGCC-3' / 3'-CCGG-5' и расщепляет между G и C, образуя тупые концы:



Обычно активность ферментов выражается в относительных единицах, где за *1 ед. фермента* принято количество фермента, необходимое для полного расщепления 1 мкг ДНК фага  $\lambda$  в течение 1 ч при 37 °С в объеме 20 мкл. Поскольку размер ДНК фага  $\lambda$  известен, можно, зная количество сайтов рестрикции для той или иной рестриктазы, выразить активность фермента в молях сайтов за час и, исходя из этой величины, рассчитать количество фермента, необходимое для гидролиза какой-либо иной ДНК, отличной от ДНК фага.

Пример: *BamHI*

ДНК $\lambda$	48,5 т.п.н.	5 сайтов
ДНК <i>pBR322</i>	4,3 т.п.н.	1 сайт

Количество фермента, необходимое для гидролиза 1 мкг плазмиды *pBR322* в течение часа при 37 °С =  $48,5 \times 1 / 4,3 \times 5 = 2,3$  ед.

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.

Ферменты требуют определенного значения pH (от 6,5 до 8,6) и наличия ионов  $Mg^{2+}$ . 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 средние значения ионной силы; ферменты, функционирующие предпочтительно в буферах с низкой ионной силой. В соответствии с таким делением необходимо готовить только три исходных буфера.

Таблица 6

Буферы, используемые при расщеплении ДНК рестриктирующими эндонуклеазами

Ионная сила буфера	NaCl, mM	Трис-HCl pH 7,5, mM	MgCl <sub>2</sub> , mM	Дитиотрей- тол, mM
Низкая (Буфер В – Blue)	0	10	10	1
Средняя (Буфер G – Green)	50	10	10	1
Высокая (Буфер O – Orange)	100	50	10	1
Буфер R (Red)	100	10 (pH 8,5)	10	1
Буфер Y (Yellow)	100 (KCl)	33 (Трис-ацетат, pH 7,9)	10 (Mg-ацетат)	1

Обычно все буферные растворы, приведенные в табл. 6, готовят в виде исходных растворов 10-кратной концентрации, которые можно хранить при 4 °C в течение 1—2 недель или при –20 °C неопределенно долгое время.

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

Для многих рестриктаз (табл. 7) в реакционную смесь для повышения эффективности работы фермента необходимо добавлять 0,1 мг/мл альбумина (BSA — Bovin Serum Albumin), дитиотрейтол (DDT), свежеприготовленный раствор которого добавляется непосредственно в реакционную смесь, или 0,02 %-й Тритон X-100 (Triton X-100).

Таблица 7  
Гидролиз ДНК рестриктазами

Рестриктаза	Сайт рестрикции	Тип буфера	Температура	
			Оптимальная	Инактивирующая (65 °C)
<i>AluI</i>	AG↓CT	Y+BSA	37	+
<i>AvaII (Eco88I)</i>	G↓G(A/T)CC	R	37	+
<i>BamHI</i>	G↓GATCC	BamHI+BSA	37	-
<i>BclI</i>	T↓GATCC	G+BSA	50	-
<i>BglI</i>	GCCN>NNN↓NGGC	R	37	+
<i>BglII</i>	A↓GATCT	O	37	-
<i>BsuRI</i>	GG↓CC	R+BSA	37	-
<i>ClaI (Bsu15I)</i>	AT↓CGAT	Y+BSA	37	+
<i>DraI</i>	TTT↓AAA	B+BSA	37	+
<i>EcoRI</i>	G↓AATTC	O+DTT	37	+
<i>EcoRII (MvaI)</i>	↓CC(A/T)GG	R+BSA	37	-
<i>EcoRV (Eco32I)</i>	GAT↓ATC	R	37	+
<i>HaeII (Bsp143II)</i>	PuGCGC↓Py	Y+BSA+TX-100	37	+
<i>HincII</i>	GTPy↓PuAC	Y+BSA	37	+
<i>HindIII</i>	A↓AGCTT	R+BSA	36-55	+
<i>HinfI</i>	G↓ANTC	R+BSA	37	+
<i>KpnI</i>	GGTAC↓C	B+BSA+TX-100	37	-
<i>MspI</i>	C↓CGG	Y+BSA	37	+
<i>PstI</i>	CTGCA↓G	R+BSA	21-37	-
<i>PvuI</i>	CGAT↓CG	R+DDT+TX-100	37	+
<i>PvuII</i>	CAG↓CTG	G+BSA	37	-
<i>RsaI (Csp6I)</i>	GT↓AC	B	37	+
<i>SacI (Ecl136II)</i>	GAGCT↓C	Y+BSA	37	+
<i>SalI</i>	G↓TCGAC	O	37	+
<i>Sau3A</i>	↓GATC	Y+BSA	37	+
<i>SmaI</i>	CCC↓GGG	Y+BSA	37	+
<i>SphI (PaeI)</i>	GCATG↓C	B+BSA+TX-100	37	+
<i>TaqI</i>	T↓CGA	R+BSA	65	-

Pu = A или G, Py = C или T; N = G, A, T или C.

Некоторые рестриктазы, например *BamHI*, нуждаются в специальных буферах. Для остановки реакции часто используют нагревание, а за-

тем быстро охлаждают во льду. Инкубация при 65 °С в течение 20 мин инактивирует большую часть рестриктаз.

Рестриктазы быстро инактивируются при комнатной температуре. Хранятся ферменты в морозильной камере. Рестриктазы стабильны при хранении при -20 °С в буфере, содержащем 50 % глицерина.

#### 4.2. Расщепление молекул ДНК рестриктазами

Реакцию рестрикции обычно проводят в пластиковых пробирках объемом 0,5 или 1,5 мл. Большое количество реакций удобно проводить в титровальных платах, однако в этом случае надо по возможности свести к минимуму испарение воды из реакционных смесей.

Проведите реакции рестрикции пЛДНК. Общий объем смеси 20 мкл. Инкубация — 1 ч при 37 °С. В качестве примера приведена пропись для рестрикции λ ДНК рестриктазами *EcoRI*, *BamHI*, *Sall* и *PstI* (табл. 8).

Таблица 8  
Рестрикционная смесь

Компоненты	Рестриктазы			
	<i>EcoRI</i>	<i>BamHI</i>	<i>Sall</i>	<i>PstI</i>
10(х) буфер	2	2	2	2
λ ДНК 0,5 мкг/мкл	1,5	1,5	1,5	1,5
ДТТ 100мМ	-	-	1	-
Бидистилл. вода	14,5	14,5	13,5	14,5
Фермент	2	2	2	2

#### Протокол:

1. В стерильную микропробирку типа Эппендорф с ДНК добавьте стерильной воды или ТЕ-буфера.
2. Добавьте 2 мкл соответствующего буфера рестрикции 10-кратной концентрации и перемешайте, слегка постукивая по пробирке пальцем.
3. Добавьте необходимое количество рестриктазы и быстро перемешайте, слегка постукивая по пробирке пальцем.
4. Поместите пробирку в термостат и инкубируйте смесь при подходящей температуре в течение необходимого времени.
5. Остановите реакцию добавлением 0,4 мкл 0,5 М ЭДТА (рН 7,5) до конечной концентрации 10 мМ.

6. Если ДНК анализируют сразу в геле, добавьте 6 мкл красителя в буфере для нанесения I, перемешайте смесь встряхиванием и нанесите расщепленную ДНК на 0,8 %-й гель.

7. Если обработанная рестриктазой ДНК нуждается в очистке, экстрагируйте ее один раз смесью фенол/хлороформ, один раз хлороформом и осадите этанолом.

#### Комментарии:

п. 1. 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.

п. 3. При проведении расщепления ДНК рестриктазами приготовьте реакционную смесь, содержащую все компоненты, кроме фермента. Достаньте из морозильника фермент и сразу же поместите его в лед. Отбирать фермент необходимо новым или, в крайнем случае, автоклавированным носиком. Работайте как можно быстрее, чтобы фермент находился вне морозильника минимальное время. Сразу же после использования поместите фермент обратно в морозильник.

п. 3. Чтобы отобрать небольшое количество фермента из упаковки с концентрированным раствором рестриктазы, быстро коснитесь кончиком стеклянной микропипетки разового пользования (на 5 мкл) поверхности раствора фермента. Таким способом можно отобрать всего 0,1 мкл раствора фермента.

п. 3. 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.

## 5. ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗ ДНК

### Литература:

1. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии. М.: Мир, 1984.
2. Aaij C., Borst P. The gel electrophoresis of DNA// *Biochim. Biophys. Acta*. 1972. V. 269. P. 192—200.
3. Fisher M.P., Dingman C.W. Role of molecular conformation in determining the electrophoresis of polynucleotids in agaroseacrylamide composite gels// *Biochemistry*. 1971. V. 10. P. 1895—1899.
4. Helling R.B., Goodman H.M., Boyer H.W. Analysis of R.EcoRI fragments of DNA from lambda bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis// *J. Virol.* 1974. V. 14. P. 1235—1244.
5. Thorne H.V. Electrophoretic separation of polyoma DNA from host cell DNA// *Virology*. 1966. V. 29. P. 234—239.
6. Thorne H.V. Electrophoretic characterization and fractionation of polyoma virus DNA// *J. Mol. Biol.* 1967. V. 24. P. 203—211.
7. Johnson P.H., Grossman L.I. Electrophoresis of DNA in agarose gels. Optimizing separations of conformational isomers of double and single stranded DNAs// *Biochemistry*. 1977. V. 16. P. 4217—4225.
8. Thomas M., Davis R.W. Studies on the cleavage of bacteriophage lambda DNA with EcoRI restriction endonuclease// *J. Mol. Biol.* 1975. V. 91. P. 315—328.

Электрофоретические методы являются эффективным инструментом исследования биополимеров различной природы. Принцип электрофореза основан на зависимости подвижности заряженных частиц, мигрирующих под действием внешнего электрического поля, от массы и заряда этих частиц. Подвижность крупных молекул может существенно зависеть также от их конформации, что особенно проявляется при проведении процесса в специальных поддерживающих средах — гелях, гидрофильная сетка которых удерживает буферный раствор от вытекания и препятствует его конвекции. В качестве таких сред наиболее часто используют полиакриламидный (ПААГ) и агарозный гель (АГ).

В начале 1970-х гг. было показано, что с помощью *гель-электрофореза* (разделение заряженных молекул в геле, помещенном в электрическое поле) можно определить длину и чистоту молекул ДНК. Этот метод прост, так как каждый нуклеотид в молекуле нуклеиновой кислоты обладает отрицательным зарядом, который заставляет молекулы

двигаться к положительному электроду. Были разработаны специальные полиакриламидные гели, с помощью которых удается разделить фрагменты ДНК длиной до 500 нуклеотидов, отличающиеся даже на один нуклеотид. Поскольку поры в полиакриламидном геле для больших молекул ДНК слишком малы, для их разделения по размеру были разработаны специальные гели на основе *агарозы* (полисахарид, выделяемый из морских водорослей). Оба эти метода разделения ДНК широко используются для аналитических и препаративных целей.

В 1980-х гг. была предложена модификация гель-электрофореза в агарозном геле, названная электрофорезом в пульсирующем электрическом поле или *пульс-электрофорез*. С ее помощью удается разделять очень большие молекулы ДНК. Обычный гель-электрофорез не позволяет разделить такие молекулы ввиду постоянства электрического поля, которое придает молекулам змеевидную конфигурацию. Обладающие такой конфигурацией молекулы движутся в гелях с постоянной скоростью вне зависимости от длины молекул. Если же направление электрического поля будет часто меняться, скорость движения молекул будет определяться их способностью переориентироваться согласно этому изменению. Такой процесс у больших молекул занимает значительно больше времени, вследствие чего они будут отставать. На гелях после пульс-электрофореза целые хромосомы дрожжей выявляются в виде отдельных полос, и поэтому можно легко определить хромосомные перестройки. Более того, используя гибридизацию молекул клонированной ДНК данного геля для поиска комплементарных последовательностей в геле, удалось картировать множество генов у дрожжей.

### 5.1. Электрофорез ДНК 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 низкой концентрации. Просматривая прокрашенный гель в ультрафиолетовом свете, можно заметить 1 нг ДНК.

Благодаря своей высокой чувствительности, технической простоте и доступности электрофоретические методы получили очень широкое распространение. Однако, несмотря на повсеместное использование электрофореза и огромное количество методических работ, теоретические представления о движении макромолекул в геле разработаны недостаточно.

Классический электрофорез, проводимый при постоянной напряженности электрического поля, имеет ряд весьма существенных ограничений. Показано, что при концентрации АГ более 0,4 % и напряженности поля порядка 1 В/см логарифм молекулярной массы и пройденное молекулой расстояние связаны линейной зависимостью только в том случае, если масса молекулы не превышает  $10^7$  Да. При увеличении молекулярной массы свыше этого значения отклонение от линейной зависимости быстро нарастает. 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 ( $M_w$ ), обозначаемому как относительная масса (relative  $M_r$ ) (Helling et al., 1974) (см. табл. 9 и рис. 3, 4).

Таблица 9  
Сравнение молекулярной массы и скорости миграции

Молекулярная масса, Да	$\log$ (мол. масса)	$1/\log$ (мол. масса) = $M_r$
100 000	5,0	0,20
50 000	4,7	0,21
10 000	4,0	0,25
5 000	3,7	0,27
1 000	3,0	0,33

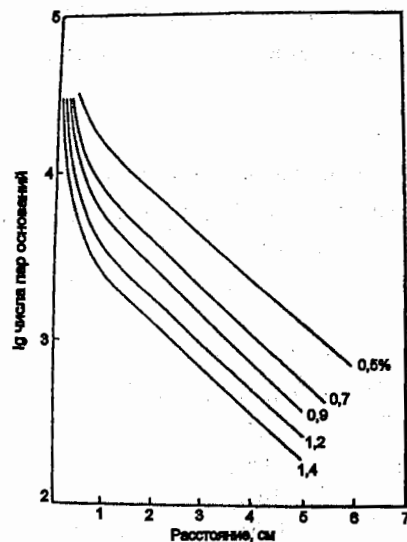


Рис. 3. Зависимость скорости движения фрагментов ДНК от их размеров при электрофорезе в геле

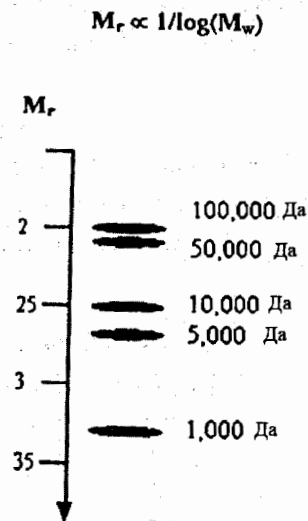


Рис. 4. Зависимость положения фрагмента от массы фрагмента ДНК

**Концентрация агарозы.** Фрагменты ДНК данного размера перемещаются в геле, содержащем разные концентрации агарозы, с разными скоростями (рис. 5).

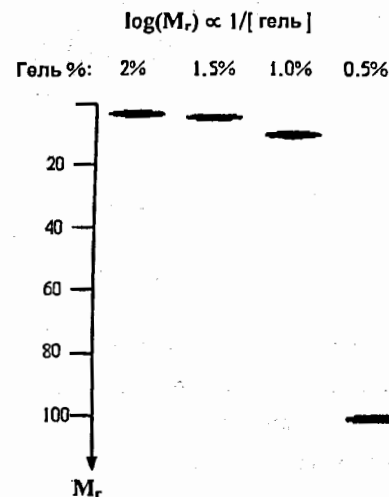


Рис. 5. Зависимость подвижности фрагмента от концентрации геля

Между логарифмом электрофоретической подвижности ДНК  $\mu$  и концентрацией геля  $\tau$  существует прямая зависимость, описанная уравнением

$$\log \mu = \log \mu_0 - K_r \tau,$$

где  $\mu_0$  — свободная электрофоретическая подвижность, а константа  $K_r$  называется коэффициентом замедления и зависит от свойств геля, а также от величины и формы движущихся молекул (табл. 10):

Таблица 10  
Сравнение концентрации геля и подвижности ДНК

Гель ( $\tau$ ), %	1/гель (1/ $\tau$ ), %	Инв. $\log(1/\text{гель}, \%) (M_r)$
2,0	0,50	3,2
1,5	0,67	4,6
1,0	1,00	10,0
0,5	2,00	100,0

Таким образом, применяя гели разных концентраций, можно разделить большой набор фрагментов ДНК, различающихся по размеру (табл. 11).

Таблица 11  
Область эффективного разделения молекул ДНК  
в зависимости от концентрации агарозы

Количество агарозы в геле, %	Область эффективного разделения линейных молекул ДНК, т.п.н.
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 одноцепочечным 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 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.

Чаще всего линейная форма (форма III) мигрирует медленнее всех. Суперспирализованная ДНК (форма I) обычно мигрирует наиболее быстро (рис. 6).

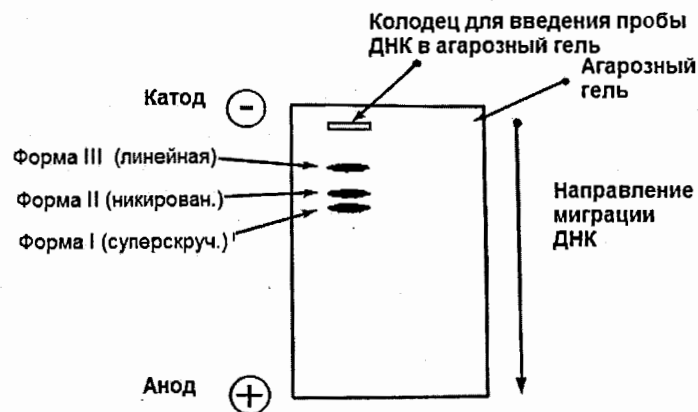


Рис. 6. Подвижность фрагмента ДНК в зависимости от конформации

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 релаксированной формы II и линейной 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. Обычно используют напряженность от 0,5 до 5 В/см (табл. 12). При небольшой напряженности получается более высокое разрешение, особенно для высокомолекулярных ДНК (70 т.п.н.). При электрофорезе небольших молекул ДНК (2 т.п.н.), чтобы увеличить их подвижность и тем самым снизить диффузность полос, используют большую напряженность. Чаще всего электрофорез проводят в 0,8 %-й агарозе при 1 В/см в Трис-боратном буфере в течение ~10—12 ч.

Таблица 12  
Оптимальный режим работы

Длина дуплекса, п.н.	Концентрация агарозы, %	Градиент напряженности, В/см
150—1 000	1,8	2—3
300—2 500	1,4	2—3
500—4 000	1,0	1—2
700—6 000	0,7	0,5—1
1 000—9 000	0,5	0,5—1

**Состав оснований и температура.** Электрофоретическое поведение ДНК в агарозных гелях 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 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.

**Маркеры ДНК.** Для определения размера фрагментов ДНК используют маркеры с известным размером, как правило, это либо ДНК фага  $\lambda$ ,

порезанная различными рестриктазами, либо «лестница» ДНК с шагом 100 п.н. или 1 000 п.н. Например, на рис. 7 приводится схема электрофореза фрагментов ДНК фага  $\lambda$ , порезанной рестриктазой *HindIII*.

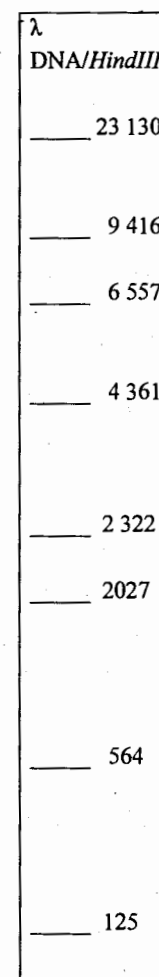


Рис. 7. Положение фрагментов ДНК фага  $\lambda$ , порезанной рестриктазой *HindIII*

**Буферы.** Биологические буферы — это смесь растворов, сопряженных кислоты и основания, которая способна противодействовать большим изменениям pH, когда добавляется небольшое количество другой кислоты

или основания. Главное требование — близость значения рКа тому рН, который должен поддерживать буфер, а также нетоксичность, устойчивость, растворимость в воде.

Для электрофореза обычно применяют буферы, содержащие трис-ацетат, трис-борат или трис-фосфат в концентрации 50 мМ и имеющие рН 7,5—7,8. рН буфера может варьировать от 7,5 до 8,5, что практически не сказывается на качестве разделения. Чаще всего их готовят в виде концентрированных растворов и хранят при комнатной температуре (табл. 13).

Таблица 13.  
Электрофорезные буферные системы

Буфер	Кратность	Состав концентрированного буфера
ТАЕ	50×	242 г Трис-НСI 57,1 мл ледяная уксусная кислота 18,6 г ЭДТА
ТВЕ	10×	108 г Трис-НСI 55 г борная кислота 9,3 г ЭДТА

**ТРИС-БОРАТНЫЙ БУФЕР (ТВЕ).** Обладает высокой буферной емкостью. При его использовании, по-видимому, получают наиболее узкие полосы. Основной раствор 5х не зарастает, но при длительном хранении в нем образуется осадок, который растворим в щелочи.

**ТРИС-АЦЕТАТНЫЙ БУФЕР (ТАЕ).** Обладает относительно низкой буферной емкостью, и при длительном электрофорезе может возникнуть необходимость в рециркуляции буфера в аппарате. Использование при электрофорезе высоких напряжений не вызывает нагрева. Исходные растворы могут зарастать.

Подвижность молекул ДНК зависит от напряженности электрического поля и буфера. ТАЕ рекомендуется для растворения молекул ДНК  $\geq 1,5$  т.п.н. (суперскрученная ДНК); ТВЕ — для фрагментов ДНК  $\leq 1,5$  т.п.н. Рекомендуются следующие условия для электрофореза:

5—10 В/см в ТАЕ или ТВЕ — для небольших $\leq 1$ т.п.н. молекул ДНК
4—10 В/см в ТАЕ или ТВЕ — для небольших 1—12 т.п.н. молекул ДНК
1—3 В/см только в ТАЕ — для больших $\geq 12$ т.п.н. молекул ДНК

По-видимому, проще всего работать с системой, когда гель полностью покрыт слоем буфера для электрофореза толщиной около 1 мм. Сопротивление агарозы ненамного превышает сопротивление буфера, так что значительная часть тока течет через агарозу. В процессе электрофореза буфер у анода защелачивается, а у катода закисляется. Поэтому обычно пользуются буферной системой с высокой емкостью. Буферы не содержат ионов  $\text{Cl}^-$ , так как последние не обладают буферной емкостью и их присутствие может привести к тому, что ДНК в геле утратит биологическую активность.

**Агароза.** Агароза — это очищенный линейный содержащий галактозу аэрогель-ксерогелевый коллоид, выделяемый или из агара, или непосредственно из содержащих агар морских водорослей. Агароза характеризуется хорошей гелеобразующей способностью; она относительно биологически инертна и поэтому удобна в качестве матрицы. Агар и агароза — не синонимы, а различные агарозные препараты, которые могут отличаться друг от друга по своим физико-химическим свойствам. Агар состоит из двух фракций: высокозаряженной агаро-пектиновой фракции и «нейтральной» агарозной фракции. Нейтральная агарозная фракция построена из повторяющихся агаробиозных звеньев, состоящих из чередующихся 1,3-связанных  $\beta$ -D-галактопиранозильных и 2,4-связанных 3,6-ангидро- $\alpha$ -L-галактопиранозильных остатков. Однако дальнейшие исследования показали, что такое представление о структуре агарозы слишком упрощено; на самом деле агарозная фракция неоднородна и содержит как высокозаряженные, так и нейтральные молекулы агарозы.

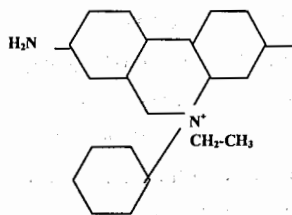
Агаробиозная матрица может содержать сульфатные, метоксильные, карбоксильные группы, хотя не всегда одновременно. Содержание сульфата в агарозе часто используется как показатель ее чистоты; чем ниже этот показатель, тем лучше качество, поскольку многие нежелательные свойства агара приписываются наличию в нем ионных групп, главным образом, вероятно, сульфата. Вторичная структура агарозы характеризуется наличием линейных полисахаридных цепей без ковалентной поперечной сшивки.

Структурная целостность, жесткость и пористость агарозного геля определяется его вторичной структурой, характеризуется наличием нековалентных взаимодействий (водородных связей) между различными агарозными цепями. Агароза обладает достаточно большими порами. Препара-



раты агарозы значительно различаются по твердости, по разрешающей способности при разделении фрагментов ДНК, электрофоретической подвижности ДНК, легкости плавления, прозрачности и наличию вредных примесей. Наиболее вредной примесью являются сульфонируемые агарозы, подавляющие активность многих ферментов, работающих на нуклеиновых кислотах. Существует много различных марок агарозы. Даже в пределах одной марки из разных упаковок агароза может сильно различаться. Наиболее подходящей для общих целей считается агароза типа II — низкоосмотическая агароза. 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, выделенные из таких гелей, необходимо хорошо очистить, прежде чем использовать их в качестве матриц или субстратов для этих ферментов. Используя различные концентрации агарозы (0,4—5%), можно разделить фрагменты длиной 10—50 000 п.н. Электрофорез в агарозном геле проводят в горизонтальном направлении, так как при этом: 1) гель с низкой концентрацией лучше держится; 2) получается меньшее перекашивание (коллапс) в процессе электрофореза.

*Окраска ДНК в агарозных гелях.* Наиболее удобный метод визуализации ДНК в агарозных гелях — окрашивание ее флуоресцирующим красителем *бромистым этидием*:



Молекула этого вещества содержит плоскую группу, которая интеркалирует между соседними основаниями ДНК. В результате 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 302 и 366 нм), испускается затем в красно-оранжевой области видимого спектра (590 нм).

Бромистый этидий можно использовать для обнаружения как двух-, так и одноцепочечных молекул нуклеиновых кислот (ДНК и РНК). Однако сродство красителя к одноцепочечной ДНК гораздо меньше, чем к двухцепочечной ДНК, поэтому флуоресценция в первом случае оказывается более слабой.

Обычно бромистый этидий (0,5 мкг/мл) добавляют и в гель, и в электрофоретический 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 разделения. В последнем случае гель помещается в электрофорезный буфер или воду, содержащие бромистый этидий, на 45 мин. при комнатной температуре. Обесцвечивания обычно не требуется, но при определении малых количеств ДНК (< 10 нг) лучше снизить фоновую флуоресценцию, обусловленную несвязанным бромистым этидием, выдержав окрашенный гель в 1 мМ MgSO<sub>4</sub> в течение 1 ч при комнатной температуре.

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

*Буфер для внесения проб.* Буферы для внесения 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. Обычно буфер для нанесения проб готовят в виде раствора 6—10-кратной концентрации (табл. 14).

Краситель в буфере нужен лишь для того, чтобы образец был легко заметен в лунке и в геле. Обычно приводимые в методиках концентрации ~0,025% для бромфенолового синего и ксиленианола (в 1х буфере) завышены, так что можно использовать меньшие концентрации.

Таблица 14  
Буферы для нанесения проб

Тип буфера	Буфер (6×)	Температура хранения
I	0,25 % бромфенолового синего, 0,25 % ксиленцианола, 40 % (вес/объем) сахарозы в H <sub>2</sub> O	4 °C
II	0,25 % бромфенолового синего, 0,25 % ксилолцианола, 15 % фикола (тип 400) в H <sub>2</sub> O	Комнатная
III	0,25 % бромфенолового синего, 0,25 % ксилолцианола, 30 % глицерина в H <sub>2</sub> O	4 °C
IV	0,25 % бромфенолового синего, 40 % (объем/вес) сахарозы в H <sub>2</sub> O	4 °C

#### Выбор красителя

• Бромфенол синий и ксиленцианол — (стоковые растворы 1 % в H<sub>2</sub>O; рабочая концентрация в 1× буфере ~0,005—0,02 %) могут заметно мешать наблюдению фрагментов под УФ. Элюция фрагмента в ПЭГ вместе с любым из этих красителей не оказывает заметного влияния на меченье, легирование и трансформацию.

• Крезоловый красный (Cresol red) — (стоковый раствор 50 мМ в H<sub>2</sub>O; рабочая концентрация в 1× буфере ~0,1 мМ) совместим с ферментативными реакциями, практически не мешает наблюдению под УФ.

• Оранжевый Ж (Orange G) — (стоковый раствор 1 % в формамиде; рабочая концентрация в 1× буфере ~0,01—0,05 %) наиболее подвижный краситель, практически всегда находится вне «рабочей зоны» (табл. 15). Замечен под УФ.

Таблица 15

Подвижность красителя в гелях с различной концентрацией агарозы

Агароза, %	Подвижность красителя			
	Ксиленцианол	Крезоловый кр.	Бромфенол синий	Оранжевый Ж
0,7	~10,5 (9—15)	~3,8 (3,2—4,5)	~0,8 (0,7—1,2)	~0,15 (0,1—0,2)
0,8	~8 (7—9)	~2,9 (2,7—3,2)	~0,5 (0,4—0,6)	< 0,25
1,0	~6 (4,8—7)	~2,2 (2—2,5)	~0,5 (0,4—0,6)	< 0,25
1,5	~2,2 (1,8—2,6)	~1,0 (0,9—1,3)	~0,25	<< 0,25
2,0	~0,75 (0,6—0,9)	~0,35 (0,3—0,4)	< 0,25	<< 0,25

**Фотографирование.** Фотографии гелей можно сделать в проходящем или отраженном УФ-свете, используя оранжевый фильтр. Фотографируют гели с помощью цифровой фотокамеры (например Canon PowerShot A610).

## 5.2. Горизонтальный электрофорез ДНК

### Протокол:

1. Добавьте рассчитанное количество порошка агарозы в отмеренный объем концентрированного электрофорезного буфера и воды.
2. Агарозу растворяют в буфере для электрофореза, нагревая до кипения. Необходимо убедиться, что раствор стал гомогенным и в нем не осталось твердых частиц агарозы. Нагрейте взвесь в бане с кипящей водой или в микроволновой печи до тех пор, пока агароза не растворится. Агарозу довести до кипения, кипятить 30—60 с (вынимать из микроволновой печи осторожно: может резко вскипеть).
3. Остудите раствор до 50—60 °C и добавьте бромистый этидий (из водного раствора, содержащего 10 мг/мл и хранящегося при 4 °C в светонепроницаемом сосуде) до конечной концентрации 0,5 мкг/мл. В этом случае не надо окрашивать гель после проведения электрофореза.
4. Лунки для образцов делают с помощью погруженной в расплавленный гель гребенки из оргстекла или тефлона. Гребенку устанавливают до заливки геля таким образом, чтобы кончики зубьев находились примерно в 0,5 мм от основания геля.
5. После того как гель полностью затвердеет (через 30—45 мин. при комнатной температуре), осторожно удалите гребенку и поместите гель в камеру для электрофореза.
6. Залейте в камеру электрофорезный буфер так, чтобы слой буфера над гелем был около 1 мм. В буфер можно добавить бромистый этидий до концентрации 0,5 мкг/мл.
7. Используйте специальный буфер для нанесения проб, благодаря которому можно проследить за ходом электрофореза. Его смешивают с пробой в отношении 1 : 10, а затем осторожно вливают в лунку с помощью автоматической микропипетки.

8. Подсоедините электроды к источнику напряжения. ДНК движется от отрицательно заряженного (катод) к положительно заряженному (анод) электроду. Напряженность электрического поля при разделении в агарозных гелях составляет 1—8 В/см. Маркерный краситель движется с той же скоростью, что и фрагменты ДНК, содержащие указанное в табл. 11 число пар оснований.
9. По окончании разделения выньте пластинку с гелем из кюветы и поместите гель вместе с пластинкой в красящий раствор (1 мкг/мл бромистого этидия). Будьте осторожны! Гель хрупок и легко соскальзывает с пластинки. После 15 мин. прокрашивания выньте пластину вместе с гелем и промойте в воде в течение 20 мин.
10. Жидкость с пластинки удалите с помощью фильтровальной бумаги и переложите пластинку на стекло трансиллюминатора, пропускающее УФ-свет.
11. Сфотографируйте гель.

**Предостережение.** Работая с УФ-излучением, необходимо предохранять глаза и кожу от ожогов. Надевайте очки!

## 6. ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ

### Литература:

1. Скоупс Р. Методы очистки белков. М.: Мир, 1985.
2. Коницев А.С., Севастьянова Г.А. Молекулярная биология. М.: Издательский центр «Академия», 2005. С. 20—72.

Белки — самый распространенный в природе класс биополимеров, составленных из аминокислотных остатков, соединенных пептидными связями. Белки составляют большую часть сухого вещества клетки (~50—80 %) и обладают наибольшим разнообразием структуры и функций. Именно белки определяют в конечном счете фенотип любого организма. И хотя их строение запрограммировано нуклеотидной последовательностью соответствующих генов, в структурном и функциональном отношении белки более разнообразны, чем ДНК. Число постоянно встречающихся аминокислот (20 канонических аминокислот) в четыре раза больше, чем число канонических нуклеотидов (А, Т, Г, Ц, У).

Выделение и очистка белков во многом представляют собой самостоятельную область биохимии и молекулярной биологии. Широко применяемым способом разделения белков является осаждение части белковой смеси за счет изменения свойств растворителя. Белки можно классифицировать в зависимости от их растворимости. Для выделения, например из клеток бактерий *E. coli*, нерастворимых или растворимых белков, находящихся в цитоплазме, необходимо разрушить клеточную стенку и цитоплазматическую мембрану. При выделении белков, секретируемых в периплазму, требуется большая избирательность; в этом случае используются методы, при которых целиком или частично удаляется клеточная стенка, но не разрушается цитоплазматическая мембрана. Клетки могут быть лизированы ферментами, такими как лизоцим (бактерии) или зимолиаза (дрожжи), в сочетании с детергентами. Можно использовать также методы механического разрушения клеток или разрушение ультразвуком. Методы очистки дрожжевых белков не отличаются от тех, которые используются для *E. coli*.

Содержание белка в образце может быть установлено разными способами. Метод Брэдфорда чувствительней на 2 порядка, чем метод Лоури или BSA—Assay, и является самым чувствительным количественным колориметрическим тестом. Пользоваться им легко и быстро. Главное его

преимущество состоит в том, что он совместим с целым рядом восстанавливающих агентов (например ДТТ, меркаптоэтанол), которые мешают при методе Лоури или BSA. Впрочем, метод Брэдфорда тоже чувствителен к детергентам.

### 6.1. Выделения белков из клеток дрожжей

#### Литература:

1. Hlinkova E., Obert B., Fillipp D. Phenotypes of tobacco plants expressing genes for the synthesis of growth regulators// *Biologia Plantarum*. 1998. V. 41. P. 25—37.
2. Hlinkova E., Ondrej M. Characteristics of transgenic tobacco carrying phytohormone synthesis T-DNA genes// *Biologia (Bratislava)*. 1996. V. 51. P. 43—48.

#### Экстракционный раствор А:

на 40 мл:  
10 мкл 10 г/л MgSO<sub>4</sub>  
200 мкл 50 % глицерина  
50 мкл 5 М NaCl  
25 мкл 0,5 М ЭДТА

Довести до 40 мл 0,1 М Na-фосфатным буфером, pH 7,0.

#### Раствор 4 М Na-фосфатный буфер:

Раствор А: 8,16 г Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O в 50 мл стерильной H<sub>2</sub>O  
Раствор В: 3,12 г NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O в 50 мл стерильной H<sub>2</sub>O  
К 50 мл раствора А добавляем раствор В до pH 7,0 (А : В ≈ 1 : 3).

#### Раствор Брэдфорда:

100 мг Кумасси (Coomassie G-250)  
50 мл 96 % этанола  
10 мл 85 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

Довести до 1 л дистиллированной водой.

#### Раствор бычьего сывороточного альбумина (BSA):

1 мг/мл BSA в воде. Хранить при - 20 °С.

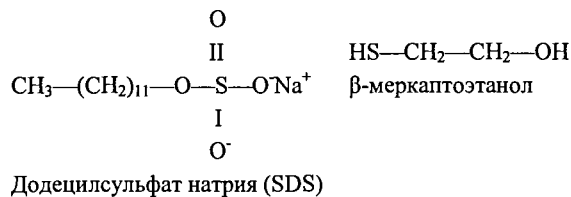
#### Протокол:

1. Соберите клетки дрожжей с чашки в микроцентрифужную пробирку (Эппендорф). Объем клеток должен составлять ~100 мкл (~10<sup>9</sup> клеток).
2. Для разрушения клеточной стенки биомассу дрожжей ресуспендируйте в экстракционном растворе А, доведя объем до 500 мкл.
3. Выдержите при 4 °С в течение 1 ч (лучше 24 ч).
4. Обработайте суспензию 2—3 мин ультразвуком.
5. Белковую фракцию отделите от грубых клеточных компонентов (мембран, ДНК, нерастворимых белков) центрифугированием при 12 000 об/мин. в течение 5—7 мин. В супернатанте остается фракция растворимых белков.
6. Концентрацию белков определите с помощью калибровочной кривой. Для построения калибровочной кривой зависимости *OD* от концентрации белка используйте альбумин заданной концентрации в растворе Брэдфорда. Разведите раствор Брэдфорда в 3 раза и разлейте по 2 мл в 6 пробирок. Добавьте в 5 пробирок альбумин в количестве 2, 4, 6, 8 и 12 мкг/мл. Постройте калибровочную кривую при λ = 595 нм. В шестую пробирку с раствором Брэдфорда внесите 50 мкл изучаемого раствора белков, измерьте коэффициент поглощения и определите по калибровочной кривой концентрацию белков.
7. Проведите разделение белков путем SDS-электрофореза в 12,5 % ПААГ.
8. Окрасьте белки краской Кумасси.
9. Определите размеры выделенных белков, используя маркерные белки.

## 7. РАЗДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Разделение и идентификацию выделенных белков осуществляют с помощью различных методов, в частности электрофоретическими методами. В основе этих методов лежит способность белков, обладающих определенным суммарным положительным или отрицательным зарядом, перемещаться в электрическом поле в соответствии с величиной заряда, размером и формой молекул. Электрофорез проводится, как правило, в каком-либо пористом (полимерном) носителе: крахмальном, агарозном или полиакриламидном геле, на целлюлозных или нитроцеллюлозных пластинах и т. д. В настоящее время наиболее часто для разделения белков используют метод *электрофореза в полиакриламидном геле* (ПААГ), который представляет собой инертный матрикс с высоким и контролируемым числом поперечных сшивок. Варьируя размеры гелевых пор, можно фракционировать белки, существенно отличающиеся по молекулярной массе (от нескольких десятков тысяч до сотен тысяч дальтон). Он позволяет осуществлять тонкое фракционирование смесей белков, отличающихся по заряду и молекулярной массе.

Модификацией этого метода является электрофорез в ПААГ с добавлением *додecilсульфата натрия* (SDS):



Додecilсульфат натрия представляет собой мощный ионный детергент, который вызывает разворачивание белковых молекул в вытянутые цепи и сообщает им избыточный отрицательный заряд. Потерявшие нативную форму белки в таком денатурирующем геле перемещаются к положительно заряженному электроду (аноду) со скоростью, которая детерминируется только размером (массой) их полипептидных цепей. При этом гель, выступая в роли молекулярного сита, легче пропускает некрупные полипептиды и в большей мере тормозит продвижение более крупных мо-

лекул, тем самым, разделяя белки в соответствии с их молекулярными массами. Применяя гели различной концентрации, можно разделить большой набор белков, различающихся по размеру (табл. 16).

Таблица 16

Рекомендуемая концентрация акриламида для разделения белков в геле

ПААГ, %	Размер белка, кДа
5,0	57—212
7,5	36—94
10,0	16—68
15,0	12—43

При электрофорезе с SDS обычно используют также обработку белков *β-меркаптоэтанолом*, разрывающим дисульфидные связи между субъединицами белков, что позволяет определить число и массу субъединиц в белках-мультимерах. После электрофореза белки выявляются либо красителем Кумасси (рис. 8), либо серебрением (минорные белки), что позволяет выявить на электрофореграммах ничтожные количества белка (около 10 нг и 1 нг соответственно).

Размер белка оценивают по подвижности маркерных белков, молекулярная масса которых известна (табл. 17).

Для разделения белков используют также метод *изоэлектрофокусирования*. В отличие от метода электрофореза, в процессе которого белки фракционируются при значении pH, задаваемом буферным раствором, при изоэлектрофокусировании белки разделяются в градиенте pH, создаваемом с помощью специальных реагентов (*амфолитов*). При низких значениях pH белки заряжены положительно, при высоких значениях pH — отрицательно. В электрическом поле молекулы белков мигрируют к противоположно заряженным полюсам в строгом соответствии только с зарядом молекул и останавливаются (фокусируются) в тех точках градиента pH, которые соответствуют их изоэлектрическим точкам (*pI*), то есть там, где молекулы становятся электронейтральными. Изоэлектрофокусирование позволяет тонко разделить белки по заряду; разделяются белки, различающиеся по *pI* всего на 0,005 единиц pH.

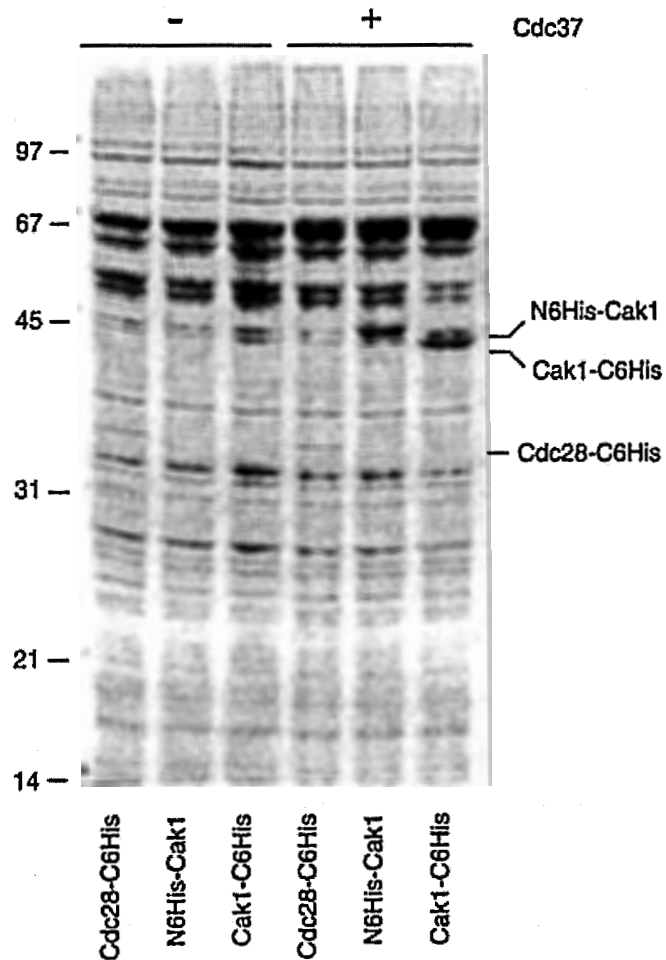


Рис. 8. Электрофореграмма, полученная в результате фракционирования растворимых белков дрожжей методом электрофореза в полиакриламидном геле с SDS и окрашивания их Кумасси (из статьи *Farell A., Morgan D. Mol. Cell Biol. 2000. 20(3):749-754*). Полосы 1—6 — различные виды экспрессируемых генов; размеры белков указаны в кДа

Таблица 17

Молекулярные массы полипептидов, используемых в качестве маркеров

Полипептид	Молекулярная масса, кДа
Тяжелая цепь миозина из мышц кролика	212
$\beta'$ -субъединица РНК-полимеразы <i>E. coli</i>	165
$\beta$ -субъединица РНК-полимеразы <i>E. coli</i>	155
$\beta$ -галактозидаза <i>E. coli</i>	130
Фосфорилаза <i>a</i> из мышц кролика	92,5
Бычий сывороточный альбумин	68
Каталаза из печени быка	57,5
Пируваткиназа из мышц кролика	57,2
Глутаматдегидрогеназа из печени быка	53
Фумараза из печени свиньи	48,5
Овальбумин	43
Енолаза из мышц кролика	42
Алкогольдегидрогеназа из печени лошади	41
Альдолаза из мышц кролика	40
$\alpha$ -субъединица РНК-полимеразы <i>E. coli</i>	39
Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа из мышц кролика	36
Лактатдегидрогеназа из сердца свиньи	36
Карбоангидраза	29
Химотрипсиноген <i>A</i>	25,7
Ингибитор трипсина из сои	20,1
Миоглобин из сердца лошади	16,95
$\alpha$ -лактальбумин из коровьего молока	14,4
Лизоцим яичного белка	14,3
Цитохром <i>c</i>	11,7

Если эффективность экспрессии белка достаточно высока, соответствующую полосу в геле можно визуализировать Кумасси голубым или путем окрашивания серебром. При низком уровне экспрессии используют вестерн-блот-анализ с антителами к данному белку.

Метод *двумерного электрофореза* (2D-SDS-PAGE) сочетает метод изоэлектрофокусирования и электрофореза в ПААГ с SDS (1D-SDS-PAGE/EF) и имеет большую разрешающую способность.

В этой процедуре белки вначале обрабатывают  $\beta$ -меркаптоэтанолом и мочевиной, что приводит к их полному растворению, денатурации и дис-

социации полипептидных цепей без изменения заряда. Далее проводят изоэлектрофокусирование в ПААГ, разделяя белки по заряду, а затем (в перпендикулярном направлении) ведут их электрофорез в блоке ПААГ с SDS, при котором белки разделяются по молекулярной массе. Таким образом, сочетая тонкое разделение вначале по заряду, а затем по размеру (массе), удастся за один раз разделить до 2 000 полипептидных цепей, то есть проанализировать большую часть белков бактериальной клетки.

## 7.1. Разделение белков путем вертикального SDS-электрофореза

### 7.1.1. Растворы

#### Раствор ТГБ

Трис-глициновый буфер (1×, pH 8,3) (хранить рабочий сток при комнатной температуре)

Tris-base	3,05 г
глицин	14,4 г
SDS	1 г
H <sub>2</sub> O	1 000 мл

При разделении нативных белков SDS в раствор не включать.

#### Разрешающий (нижний) гель

(готовить непосредственно перед применением, пробирка стоит во льду)

на 21 мл:	10 %	12,5 %	15 %
30 % ПАА/BIS	7,25 мл	8,4 мл	10,0 мл
H <sub>2</sub> O, mQ	9,78 мл	7,3 мл	10,0 мл
1,5 М Трис-НCl, pH 8,8	5,43 мл	5,3 мл	5 мл
10 % SDS	100 мкл	100 мкл	100 мкл
10 % PSA	140 мкл	140 мкл	140 мкл
TEMED	20 мкл	20 мкл	20 мкл

#### Концентрирующий (верхний) гель

(готовить непосредственно перед применением)

	Конц.	Сток	4 мл
H <sub>2</sub> O		mQ	2,5 мл
30 % ПАА/BIS	5 %	30 %	0,5 мл
0,5 М Трис-НCl, pH 6,8	0,13 М	1 М	0,8 мл
10 % SDS	0,1 %	10 %	30 мкл
10 % PSA	0,1 %	10 %	40 мкл
TEMED	1 мкл/мл		10 мкл

#### 30 % ПАА/BIS

(стоковый раствор: ПАА : BIS = 29:1 (можно хранить несколько месяцев при + 4 °C))

	Конц.	Сток	50 мл	100 мл	150 мл	200 мл
ПАА	29 % (w/v)	тв.	14,5 г	29 г	43,5 г	58,0 г
BIS	1 % (w/v)	тв.	0,5 г	1 г	1,5 г	2,0 г
H <sub>2</sub> O		mQ				

#### Трис/SDS (pH 6,8)

на 50 мл

Трис	3,02 г
SDS	0,2 г

Растворяем навески в 40 мл воды, доводим соляной кислотой pH до 6,8 и объем раствора — водой до 50 мл.

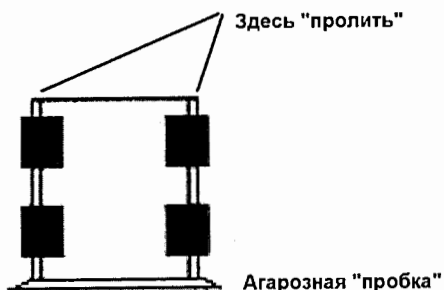
#### Трис/SDS (pH 8,8)

на 50 мл

Трис	0,1 г
SDS	0,2 г

Растворяем навески в 40 мл воды, доводим соляной кислотой pH до 8,8 и объем раствора — водой до 50 мл.

### 7.1.2. Подготовка форезного аппарата



1. Вымыть камеры детергентом, хорошо сполоснуть дистиллированной водой.
2. Вымыть стекла детергентом. Чтобы гель легко снимался со стекол, следует

силиконизировать (достаточно 1 раз на ~10 прогонов); высушить; промыть 70 %-м этанолом; высушить.

3. Уложить спейсеры и прокладки.
4. Пролить щели 6 %-й агарозой.
5. Оценить объем геля:

Гель	Камера		
	Мини	Миди	Макси
Концентрирующий	~2 мл	~4 мл	~4 мл
Разрешающий	~10 мл	~15 мл	~20 мл

6. Приготовить нижний/разрешающий гель; дегазировать медицинским шприцом ~10 мин.



7. Собрать форезный прибор, отметить фломастером уровень концентрирующего геля (длина зубчиков гребенки +1 см).

8. ~5—10 мл расплавленной 1,5 %-й агарозы (в ТГБ-буфере) налить на ровную горизонтальную поверхность. Сразу же установить прибор со стеклами (агароза подни-

мется между стеклами на ~2—10 мм).

9. «Пролить» агарозой внешние края спейсеров.
10. Залить концентрирующий гель до отметки.
11. Наслоить сверху изопропанол (~3—10 мм).
12. После завершения полимеризации отсосать изопропиловый спирт фильтровальной бумагой.
13. Вставить (не полностью) гребенку между стеклами.
14. Залить концентрирующий гель, вставить полностью гребенку.
15. После полимеризации установить верхнюю камеру в нижнюю, залить буфер, вытащить гребенку.
16. Немедленно промыть лунки шприцом, поправить изогнувшиеся перегородки между карманами (либо плоским «типом», либо иглой шприца).

#### Комментарии:

##### Общие

- Готовый гель можно оставить на ночь при +4 °С, не вынимая гребенку и замотав верх и низ SaranWrap, чтобы не подсыхал.
- Бромфеноловый синий идет с фронтом фореза. Ниже него белков нет.
- Опасно наносить на форез белок в растворе с высокой концентрацией соли: 1) K<sup>+</sup> (и некоторые другие катионы) способны выпадать в осадок с белком и SDS; 2) высокая концентрация соли не позволяет белкам войти в гель. Однако часто концентрирующий гель способен обеспечить хорошую картинку, даже если вначале в ячейке выпал осадок.
- В случае бактериальной культуры средней плотности на одну лунку ПААГ 0,75x2,5 мм<sup>2</sup> нужно брать материал из ~15 мкл бактериальной культуры.

##### По пунктам

7. Кислород — ингибитор полимеризации. Без дегазации гель, конечно, заполимеризуется, но за большее время (в этом случае стоит увеличить раза в полтора количество PSA и TEMED).
11. Удобно отлить из остатков гелевого раствора ~0,5—1,0 мл в 1,7 мл-пробирку и использовать ее как индикатор полимеризации.
13. Можно промокнуть сложенной фильтровальной бумагой.
14. Вставлять гребенку после заливки геля — ненужная суета во время полимеризации; кроме того, она выдавит в камеру значительный объем геля.



### 7.1.3. Электрофорез

#### Протокол:

1. Готовим образцы (1 дорожка — ~10—12 мкг белка). Материал + буфер для нанесения смешать, перед форе́зом прокипятить 15 мин.
2. Перед нанесением промыть водой лунки с помощью шприца.
3. Проводить электрофорез при напряжении (для мини- и миди-камеры) ~10 В/см в концентрирующем геле, ~180 В — в разрешающем.

### 7.2 Окрашивание белковых гелей Кумасси

#### Раствор для фиксации:

	Конц.	Сток	20 мл
уксусная кислота	60 %	100 %	12 мл
этанол	44 %	100 %	8,8 мл
хлороформ	0,025 %	100 %	50 мкл

#### Краска:

	Конц.	Сток	500 мл
Кумасси G-250	0,25 %	тв.	1,25 г
этанол	25 %	100 %	125 мл
уксусная кислота	25 %	100 %	125 мл
H <sub>2</sub> O	50 %	mQ	250 мл

#### Отмывка:

	Конц.	Сток	1000 мл
уксусная кислота	10 %	100 %	100 мл
этанол	30—40 %	100 %	300—400 мл
H <sub>2</sub> O	60—50 %	mQ	600—500 мл

#### Протокол:

1. Гель поместить в стеклянную чашку Петри и залить раствором для фиксации.
2. Закрыть чашку пленкой и при комнатной температуре выдержать 1—48 ч, после фиксации раствор слить, промыть гель водой и залить краску.
3. Осторожно качать на качалке 10—60 мин.
4. Слить краску, сполоснуть гель водой, налить отмывку I.
5. Качать на качалке 10 мин.
6. Слить отмывку I, сполоснуть гель водой, налить отмывку II.
7. Качать на качалке 10 мин.
8. Слить отмывку II, сполоснуть гель водой.
9. Гель можно сфотографировать, отсканировать или высушить на гель-драере.

#### Комментарии:

##### Общие

- Быстрый и простой метод для окраски белковых гелей. Вся процедура занимает максимум 30 мин. Можно несколько сократить время окрашивания и отмывок и получить результат еще быстрее.

##### По пунктам

- п. 4, 6. Можно использовать отмывку I по несколько раз, отмывку II — свежую. Когда отмывка I становится слишком синей, ее следует вылить, а использованная и сохраненная отмывка II становится отмывкой I.
- п. 9. Если гели сушить на фильтровальной бумаге, то их потом не очень удобно переводить в цифровое изображение. Фильтровальная бумага не идеально белая, и на сером фоне скрадываются плохо видимые полосы. Поэтому можно фотографировать гели цифровой камерой (например, Nikon Coolpix 4500 или Canon PowerShot A610) в проходящем белом свете (на вайт-боксе) для хорошей электронной копии, а для вклеивания в журнал сушить на гель-драере. Если есть приличный сканер (с нормальным значением OD), то можно положить гель прямо на стекло сканера, отсканировать, а затем протереть стекло.

## 8. РАБОТА С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ И БЕЛКАМИ

### Литература:

1. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии. М.: Мир, 1984. С. 402—407.

### 8.1. Очистка нуклеиновых кислот

Одной из самых важных процедур в молекулярном клонировании является очистка ДНК от РНК и белков (табл. 18).

Таблица 18

Содержание вещества в расчете на клетку

Вещество	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i> (1 п)
ДНК	17 фг	0,017 пг
РНК	100 фг	1,2 пг
Белок	0,16 пг	6 пг

Содержание РНК в любых клетках в 5—10 раз превышает содержание ДНК. Около 80—85 % массы клеточных РНК составляют три (прокариоты) или четыре (эукариоты) вида рРНК, около 10 % — почти 100 видов тРНК. Размеры одонитевых молекул РНК приведены в табл. 19.

Таблица 19

Основные виды РНК

Вид РНК	Размер, нуклеотиды
<i>Прокариоты:</i>	
тРНК	75—90
5S	120
16S	1 541
23S	2 904
мРНК	1 900
<i>Эукариоты:</i>	
тРНК	75—90
5S	120
5,8S	158
18S	1 900
28S	5 000
мРНК	4 000

- Для разрушения клеточной стенки используют лизоцим (образуются хрупкие протопласты, легко разрушаемые детергентами). Также используют проназу: она способствует более полному гидролизу белка и поэтому лучшей последующей депротеинизации ДНК.

- У многих бактерий лизис наступает после добавления анионного детергента додецилсульфата. Он не только разрушает клетки, но денатурирует некоторые белки. Однако он должен быть удален при последующих работах, так как его примесь мешает трансформации.

- Денатурирование ДНК в экстрактах клеток щелочью, а затем восстановление нейтральной рН приводит к тому, что две цепи плазмидной ковалентно-замкнутой ДНК остаются после денатурации соединенными в виде зацепленных колец. Их ренатурация происходит с гораздо большей эффективностью, чем ренатурация хромосомной ДНК, у которой комплементарные цепи после денатурации расходятся.

#### 8.1.1. Удаление РНК из препаратов

РНК удаляют из препаратов плазмиды различными способами. Наиболее распространенным является использование фермента панкреатической РНКазы (РНКазы А). Раствор РНКазы готовится в концентрации 10 мг/мл в 10 мМ Трис-НСl, рН 7,5 и 15 мМ NaCl.

#### Протокол:

1. Добавьте к препарату РНКазу, свободную от ДНКазы, в концентрации не ниже 100 мкг/мл.
2. Проинкубируйте препарат при комнатной температуре в течение 1 ч.

#### 8.1.2. Удаление белков

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 работы, прежде чем перейти к следующему. Если же нуклеиновые кислоты выделяют из сложных смесей молекул, таких как клеточные лизаты, то необходимо прилагать дополнительные усилия. В таких случаях прежде чем проводить экстракцию органиче-

скими растворителями, чаще всего удаляют большинство белков гидролизом их протеолитическими ферментами, такими как проназа или протеиназа К (табл. 20), которые активны в отношении широкого спектра нативных белков.

Таблица 20

Условия работы протеолитических ферментов

Фермент	Основной раствор (в H <sub>2</sub> O), мг/мл	Температура хранения, °С	Концентрация в реакции, мг/мл	Буфер для реакции	Температура, °С	Предварительная обработка
Проназа	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

*Протокол:*

1. Добавьте к препарату проназу в концентрации 1 мг/мл или протеиназу К (0,5 мг/мл).
2. Проинкубируйте при 37 °С в течение 1 ч.

### 8.1.3. Экстракция нуклеиновых кислот 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. 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 полиА. Обе эти проблемы решаются при использовании смеси фенола и хлороформа (1 : 1). В результате последней экстракции хлороформом из препарата нуклеиновой кислоты удаляются остатки фенола.

Под «фенолом» подразумевают фенол, уравновешенный буфером и содержащий 0,1 % оксихинолина и 0,2 % β-меркаптоэтанола, а под «хло-

роформом» — смесь хлороформа и изоамилового спирта (24 : 1, по объему). Хлороформ денатурирует белки, а изоамиловый спирт уменьшает пенообразование во время экстракции, в результате чего происходит более четкое разделение водной и органической фаз. 8-оксихинолин, желтое соединение, является антиоксидантом; оно частично ингибирует РНКазу и слабо связывает ионы металлов. Кроме того, желтая окраска позволяет легко определить фенольную фазу.

*Протокол:*

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.
3. Центрифугируйте 3 мин при 1600 g или 15 с в микроцентрифуге при комнатной температуре. Если органическая и водная фазы разделились недостаточно хорошо, отцентрифугируйте еще раз более продолжительное время или при большей скорости.
4. Перенесите пипеткой верхнюю водную фазу в новую полипропиленовую пробирку. Для небольших объемов (≤200 мкл) используйте автоматическую пипетку с подходящим наконечником. Промежуточную фазу и нижнюю органическую фазу отбросьте.
5. Добавьте равный объем смеси фенола и хлороформа (1 : 1). Повторите пп. 2—4.
6. Добавьте равный объем хлороформа и повторите пп. 2—4.
7. Осадите ДНК этанолом.

*Комментарии:*

Органическую и водную фазы можно смешивать встряхиванием при выделении небольших ДНК (≤ 10 т.п.н.) или слабым покачиванием при выделении ДНК среднего размера (10—30 т.п.н.).

#### 8.1.4. Осаждение белков солями

##### Протокол:

1. Добавьте к 1 V препарата ДНК 1 V 9 M LiCl (конечная концентрация LiCl 4,5 M) и хорошо перемешайте.
2. Оставьте в холодильнике (- 20 °C) на 20 мин. до выпадения осадка в виде хлопьев.
3. Отцентрифугируйте в течение 10 мин. при 12 000 об/мин.
4. Осадите ДНК изопропанолом и растворите в воде (лучше режутся рестриктазами). ДНК пригодна для трансформации, рестрикции, клонирования.

#### 8.1.5. Осаждение нуклеиновых кислот спиртом

Наиболее часто используемый метод концентрирования ДНК — осаждение её этанолом. Осадок ДНК, образующийся при низкой температуре (- 20 °C 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 нанограммах.

##### Протокол:

1. Определите объем раствора ДНК.
2. Доведите до необходимой концентрацию моновалентных катионов либо путем разведения буфером TE, рН 8,0, если в растворе ДНК имеется высокая концентрация солей, либо путем добавления одного из солевых растворов.
3. Хорошо размешайте. Добавьте точно 2 V охлажденного во льду этанола и снова хорошо размешайте. Охладите до - 20 °C. Оставьте при низкой температуре, чтобы ДНК выпала в осадок. Обычно для этого требуется 30—60 мин при - 20 °C, но когда размер ДНК мал (< 1 т.п.н.) или когда она присутствует в небольших количествах (< 0,1 мкг/мл), нужно увеличить время выдерживания или понизить температуру до - 70 °C.

4. Центрифугируйте при 0 °C. 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).
5. Удалите надосадочную жидкость. Оставьте пробирку в перевернутом положении на листе фильтровальной бумаги, чтобы как следует стекла вся жидкость. Фильтровальной бумагой удалите все капли со стенок пробирки.
6. Растворите осадок ДНК в соответствующем объеме буфера. Хорошо ополосните буфером стенки пробирки, чтобы собрать всю ДНК. Для ускорения растворения осадка можно прогреть пробу при 37 °C в течение 5 мин.

##### Комментарии:

- 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 °C. В общем, если не требуется сводить к минимуму объем жидкости, осаждение предпочтительнее проводить этанолом.
- Для удаления примесей, захватываемых осадком, можно промыть осадок ДНК раствором 70 %-го этанола. Чтобы при промывании не потерять часть ДНК, заполняйте пробирку 70 %-м этанолом не более чем на 2/3. Встряхивайте непродолжительное время и центрифугируйте так, как описано выше. Осадок, остающийся после промывания 70 %-м этанолом, не очень прочно связан со стенками пробирки, поэтому будьте очень осторожны при удалении надосадочной жидкости.
- Очень короткие молекулы ДНК (<200 п.н.) плохо осаждаются этанолом. Однако эффективность их осаждения значительно увеличивается, если предварительно к раствору ДНК добавить MgCl<sub>2</sub> до концентрации 0,01 M.
- Как правило, ДНК, осажденная этанолом, легко вновь растворяется в буферах с низкой ионной силой, таких как буфер TE.

### 8.1.6. Очистка ДНК с помощью BlueSorb

(разработано и производится фирмой Clonogene, С.-Петербург)

BlueSorb (BS) предназначен для очистки ДНК путем быстрого связывания и удаления белков из реакционной смеси, что позволяет избежать фенольной экстракции и пересадки ДНК спиртом. Для удаления ферментов рестрикции, полимераз, лигаз достаточно двух циклов экстракции; при работе с ферментами, обладающими нуклеазной активностью, рекомендуется три цикла.

*Протокол:*

1. Тщательно ресуспендируйте BS.
2. Добавьте в реакционную смесь необходимое количество суспензии BS из расчета: добавляемый объем сорбента равен квадратному корню объема реакционной смеси. Например, для объемов реакционной смеси 100/50/25 мкл добавляемые объемы BS составляют 10/7/5 мкл соответственно.
3. Интенсивно встряхивайте смесь в течение 30 с, после чего осадите BS кратким центрифугированием.
4. Осторожно отберите и перенесите содержащий ДНК супернатант в чистую пробирку, после чего повторите экстракцию (пп. 1—3).

BlueSorb заменяет экстракцию смесью фенол/хлороформ в процессе выделения плазмидной ДНК методами щелочного лизиса и кипячения.

Начинаете работать с 1,5 мл ночной культуры *E. coli* по стандартной методике и доходите до стадии осаждения грубого осадка ДНК спиртом. После растворения осадка в TE и его обработки РНКазой А, депротеинизируйте плазмидную ДНК с помощью BS, как описано выше в пп. 1—4.

*Комментарии:*

- BS может храниться при комнатной температуре в течение месяцев, но предпочтительнее хранение при +4 °С;
- не используйте избытки сорбента большие, чем рекомендованные в п. 2;
- не работайте при концентрации солей выше чем 0,3 М;
- не работайте при значениях pH ниже 6,0 и выше 8,0;
- не работайте в присутствии SDS, Triton, Tween.

### 8.2. Определение количества двунитевой 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 мини-геля*

Электрофорез в мини-геле 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.

*Протокол:*

1. Смешайте 2 мкл пробы ДНК с 0,4 мкл буфера для нанесения IV (см. табл. 10) (краситель — только бромфеноловый синий) и нанесите эту смесь на 0,8 %-й 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.
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<sub>2</sub>.
5. Сравните интенсивности флуоресценции неизвестной и стандартных ДНК в коротковолновом УФ-свете и определите количество ДНК в пробе.

*Комментарии:*

п. 1. Стандартный раствор ДНК должен содержать ДНК приблизительно такого же размера, какой имеет неизвестная ДНК.

## ПРИЛОЖЕНИЯ

### Приложение А

#### 1. Греческий алфавит

Α α	альфа	Ν ν	ню
Β β	бета	Ξ ξ	кси
Γ γ	гамма	Ο ο	омикрон
Δ δ	дельта	Π π	пи
Ε ε	эпсилон	Ρ ρ	ро
Ζ ζ	дзета	Σ σς	сигма
Η η	эта	Τ τ	тау
Θ θ	тета	Υ υ	ипсилон
Ι ι	йота	Φ φ	фи
Κ κ	каппа	Χ χ	хи
Λ λ	лямбда	Ψ ψ	пси
Μ μ	мю	Ω ω	омега

#### 2. Латинские и греческие названия числительных

##### Метрические приставки

Цифры	Числительные количественные	
	Лат.	Греч.
1	уни-	моно-
2	ду-; би-	ди-
3	три-	три-
4	квадр-	тетра-
5	квинкв-	пента-
6	секс-	гекса-
7	септ-	гепта-
8	окто-	окта-
9	нона-	эна-(нона-)
10	деци-	деци-
11	ундеци-	гендека-
12	дуодеци-	додека-
20	вигинти-	икоса-
100	центи-	гекато-
1000	мили-	хилио-

##### Десятичные приставки

обозначают изменение в соответствующее число раз ( $10^n$ ) основной единицы измерения и образуют названия десятичных кратных и дольных основных единиц измерения.

Обозначения		Произношение	Числовые значения
Русские	Междунар.		
Т	Т	тера	$10^{12}$
Г	G	гига	$10^9$
М	M	мега	$10^6$
к	k	кило	$10^3$
г	h	гекто	$10^2$
да	da	дека	10
д	d	деци	$10^{-1}$
с	c	санти	$10^{-2}$
м	m	милли	$10^{-3}$
мк	μ	микро	$10^{-6}$
н	n	нано	$10^{-9}$
ммк	m μ	миллимикро	$10^{-9}$
мкмк	μ μ	микромикро	$10^{-12}$
п	p	пико	$10^{-12}$
ф	f	фемто	$10^{-15}$
а	a	атто	$10^{-18}$
ц	z	центи	$10^{-21}$

#### 3. Символы и сокращения

bp, п.н. — пары оснований

Da — дальтон, единица молекулярной массы; kDa = 1 000 Da

ds — двуцепочечная ДНК

ss — одноцепочечная ДНК

kb, т.п.н. — килобаза: 1 000 оснований или 1 000 пар оснований

M — молярность, моль растворенного вещества на 1 л растворителя

Mb — мегабазы: 1 000 000 bp

MM — молекулярная масса

моль — абсолютное количество вещества

λ — длина волны

#### 4. Единицы измерения и факторы пересчета

1 дальтон (Да) равен массе одного атома водорода

$$1 \text{ Да} = 1,67 \cdot 10^{-24} \text{ г}$$

$$1 \text{ мкг} = 1 \gamma = 10^{-6} \text{ г}$$

$$1 \text{ нг} = 10^{-9} \text{ г}$$

$$1 \text{ н} = 10 \text{ \AA}$$

$$1 \text{ мкм} = 10^3 \text{ нм}$$

$$1 \text{ нм} = 10^{-9} \text{ м}$$

$$1 \text{ kb ds ДНК} = 6,6 \cdot 10^5 \text{ Да}$$

$$1 \text{ kb ss ДНК} = 3,3 \cdot 10^5 \text{ Да}$$

$$1 \text{ kb ss РНК} = 3,4 \cdot 10^5 \text{ Да}$$

$$1 \text{ МДа ds ДНК} = 1,52 \text{ kb}$$

$$1 \text{ kb} \approx 333 \text{ АК}$$

$$\text{Белок с MW } 10\,000 = 270 \text{ бр ДНК}$$

Средняя молекулярная масса дезоксирибонуклеотидов = 324,5 Да

Средняя масса пары дезоксирибонуклеотидов = 649 Да

Средняя молекулярная масса рибонуклеотидов = 340,5 Да

$$1 \text{ виток спирали ДНК} = 3,4 \text{ нм} = 10 \text{ bp}$$

$$1 \text{ \AA} = 1,05 \text{ основания}$$

$$1 \text{ OD}_{260} \text{ двухцепочечной ДНК} = 50 \text{ мкг}$$

$$1 \text{ OD}_{260} \text{ одноцепочечной ДНК} = 37 \text{ мкг}$$

$$1 \text{ К} = ^\circ\text{C} + 273,15$$

1 S — 1 сведберг — единица Сведберга — коэффициент седиментации

$$1 \text{ S} = 1 \times 10^{-13} \text{ с}$$

#### 5. Содержание ДНК в различных организмах

Организм	Содержание ДНК (п.н.) (1n — гаплоидный геном)
<i>Escherichia coli</i>	$4,2 \cdot 10^6$
<i>Arabidopsis thaliana</i>	$4,7 \cdot 10^6$
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$1,4 \cdot 10^7$
<i>Drosophila melanogaster</i>	$1,4 \cdot 10^8$
<i>Homo sapiens</i>	$3,3 \cdot 10^9$
<i>Triticum aestivum</i> (гексаплоидная пшеница)	$1,7 \cdot 10^{10}$

#### 6. ДНК-маркер

*FastRuler™* ДНК-маркер (500—10 000 п.н.) дает 13 полос. Размеры фрагментов: 10 000, 9 000, 8 000, 7 000, 6 000, 5 000, 4 000, 3 000, 2 500, 2 000, 1 500, 1 000, 500 п.н.

#### 7. Бактериофаг лямбда

ДНК фага  $\lambda$  бактерии *E. coli* — линейная молекула с 5'-выступающими липкими концами длиной 12 н. После проникновения в клетку ДНК фага  $\lambda$  замыкается в кольцо благодаря комплементарному взаимодействию липких концов. Кольцевая молекула состоит из 48 502 п.н. Отсчет нуклеотидной последовательности начинается с первого основания левого конца GGGCGGCGACCT... и продолжается вдоль L-цепи в направлении от поздних генов к ранним.

*Координаты сайтов рестрикции на ДНК  $\lambda$*

Уникальные сайты рестрикции: *Apa I* (1086), *Nae I* (20040), *Nar I* (45679), *Nhe I* (34679), *Sba I* (12188), *Xba I* (24508), *Xho I* (33498).

2 сайта: *Kpn I* (17053, 18556)

*Sac I* (24772, 25877)

*Sal GI* (32745, 33244)

3 сайта: *Pvu I* (11933, 26254, 35787)

*Sma I* (19397, 31617, 39888)

5 сайтов: *Bam HI* (5505, 2346, 27972, 34499, 41732)

*Eco RI* (21226, 26104, 31747, 39168, 44972)

6 сайтов: *Bgl II* (415, 22425, 35711, 38103, 38754, 38814)

7 сайтов: *Hind III* (23130, 25157, 2779, 36895, 37459, 37584, 44141)

Размеры фрагментов рестрикции бактериофага λ

<i>Bam</i> HI		<i>Eco</i> RI		<i>Pst</i> I	
16841	1	21226	1	11501	1
7233	2	7421	2	5077	2
6770	3	5804	3	4749	3
6527	4	5643	4	4507	4
5626	5	4878	5	2838	5
5505	6	3530	6	2556	6
				2459	7
				2443	8
<i>Cla</i> I		<i>Hind</i> III		2140	9
11381	1	23130	1	1986	10
10496	2	9416	2	1700	11
4998	3	6682	3	1159	12
4198	4	4361	4	1093	13
3673	5	2322	5	805	14
2614	6	2027	6	514	15
2064	7	564	7	468	16
1915	8	125	8	447	17
1804	9			339	18
1701	10	<i>Kpn</i> I		264	19
1112	11	19947	1	247	20
973	12	17053	2	216	21
621	13	1503	3	211	22
537	14			200	23
354	15	<i>Sal</i> I		164	24
		32745	1	150	25
		15258	2	97	26
		499	3	94	27
				72	28

8. Таблица генетического кода

		2-я позиция кодона				
		U	C	A	G	
1-я позиция кодона	U	UUU <i>Phe</i>	UCU	UAU <i>Try</i>	UGU <i>Cys</i>	U
		UUC	UCC <i>Ser</i>	UAC	UGC	C
		UUA <i>Leu</i>	UCA	UAA <i>ochre</i>	UGA <i>opal</i>	A
		UUG	UCG	UAG <i>amber</i>	UGG <i>Trp</i>	G
	C	CUU	CCU	CAU <i>His</i>	CGU	U
		CUC <i>Leu</i>	CCC <i>Pro</i>	CAC	CGC <i>Arg</i>	C
		CUA	CCA	CAA <i>Gln</i>	CGA	A
		CUG	CCG	CAG	CGG	G
	A	AUU	ACU	AAU <i>Asn</i>	AGU <i>Ser</i>	U
		AUC <i>Ile</i>	ACC <i>Thr</i>	AAC	AGC	C
		AUA	ACA			A
		AUG <i>Met</i>	ACG	AAA <i>Lys</i>	AGA <i>Arg</i>	G
G	GUU	GCU	GAU <i>Asp</i>	GGU	U	
	GUC <i>Val</i>	GCC <i>Ala</i>	GAC	GGC <i>Gly</i>	C	
	GUA	GCA	GAA <i>Glu</i>	GGA	A	
	GUG	GCG	GAG	GGG	G	

В митохондриях дрожжей кодоны AUG и UGA для *Met* и *Trp* используют не для всех *Ile* и стоп-кодонов.

9. Порядковый номер и атомный вес элементов

Элемент	Символ	Порядковый номер	Атомный вес
Активный	Ac	89	227,03
Алюминий	Al	13	26,98
Америций	Am	95	243,06
Сурьма	Sb	51	121,75
Аргон	Ar	18	39,95
Мышьяк	As	33	74,92
Астат	At	85	210,99
Барий	Ba	56	137,34
Берклий	Bk	97	247,07
Бериллий	Be	4	9,01
Свинец	Pb	82	207,2

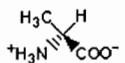
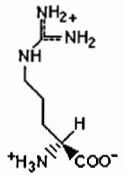
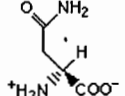
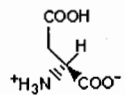
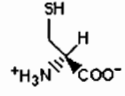
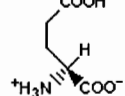


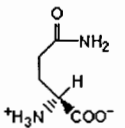
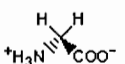
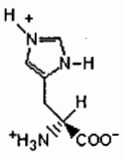
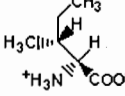
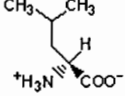
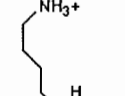
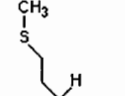
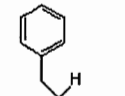
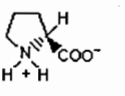
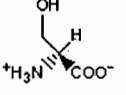
Бор	B	5	10,81
Бром	Br	35	79,9
Кадмий	Cd	48	112,4
Цезий	Cs	55	132,91
Кальций	Ca	20	40,08
Калифорний	Cf	98	249,07
Церий	Ce	58	140,12
Хлор	Cl	17	35,45
Хром	Cr	24	52
Кюрий	Cm	96	245,07
Диспрозий	Dy	66	162,5
Эйнштейний	Es	99	254,09
Железо	Fe	26	55,58
Эрбий	Er	68	167,26
Европий	Eu	63	151,96
Фермий	Fm	100	252,08
Фтор	F	9	18,99
Франций	Fr	87	223,02
Гадолиний	Gd	64	157,25
Галлий	Ga	31	69,72
Германий	Ge	32	72,59
Золото	Au	79	196,97
Гафний	Hf	72	178,49
Гелий	He	2	4
Гольмий	Ho	67	164,93
Индий	In	49	114,82
Иридий	Ir	77	192,22
Йод	I	53	126,9
Калий	K	19	39,1
Резерфордий	Rf	104	260
Кобальт	Co	27	58,93
Углерод	C	6	12,01
Криптон	Kr	36	83,8
Медь	Cu	29	63,55
Лантан	La	57	138,91
Лоуренсий	Lr	103	262
Литий	Li	3	6,94
Лютеций	Lu	71	174,97
Магний	Mg	12	24,31
Марганец	Mn	25	54,94
Менделевий	Md	101	258

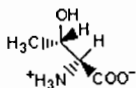
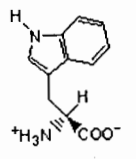
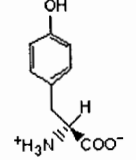
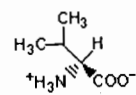
Молибден	Mo	42	95,94
Натрий	Na	11	22,99
Неон	Ne	10	20,18
Нептуний	Np	93	237,05
Никель	Ni	28	58,71
Ниобий	Nb	41	92,91
Нобелий	No	102	259
Осмий	Os	76	190,2
Палладий	Pd	46	106,4
Фосфор	P	15	30,97
Платина	Pt	78	195,09
Плутоний	Pu	94	244
Полоний	Po	84	208,98
Празеодим	Pr	59	140,91
Прометий	Pm	61	145
Протактиний	Pa	91	231,04
Ртуть	Hg	80	200,59
Радий	Ra	88	226,03
Радон	Rn	86	222,02
Рений	Re	75	186,2
Родий	Rh	45	102,91
Рубидий	Rb	37	85,47
Рутений	Ru	44	101,07
Самарий	Sm	62	150,4
Кислород	O	8	16
Скандий	Sc	21	44,96
Сера	S	16	32,06
Селен	Se	34	78,96
Серебро	Ag	47	107,87
Кремний	Si	14	28,09
Азот	N	7	14,01
Стронций	Sr	38	87,62
Тантал	Ta	73	180,95
Технеций	Tc	43	98,91
Теллур	Te	52	127,6
Тербий	Tb	65	158,93
Талий	Tl	81	204,37
Торий	Th	90	232,04
Тулий	Tm	69	168,93
Титан	Ti	22	47,9
Уран	U	92	238,03

Ванадий	V	23	50,94
Водород	H	1	1,01
Висмут	Bi	83	208,98
Вольфрам	W	74	183,85
Ксенон	Xe	54	131,3
Иттербий	Yb	70	173,04
Иттрий	Y	39	88,91
Цинк	Zn	30	65,37
Олово	Sn	50	118,69
Цирконий	Zr	40	91,22

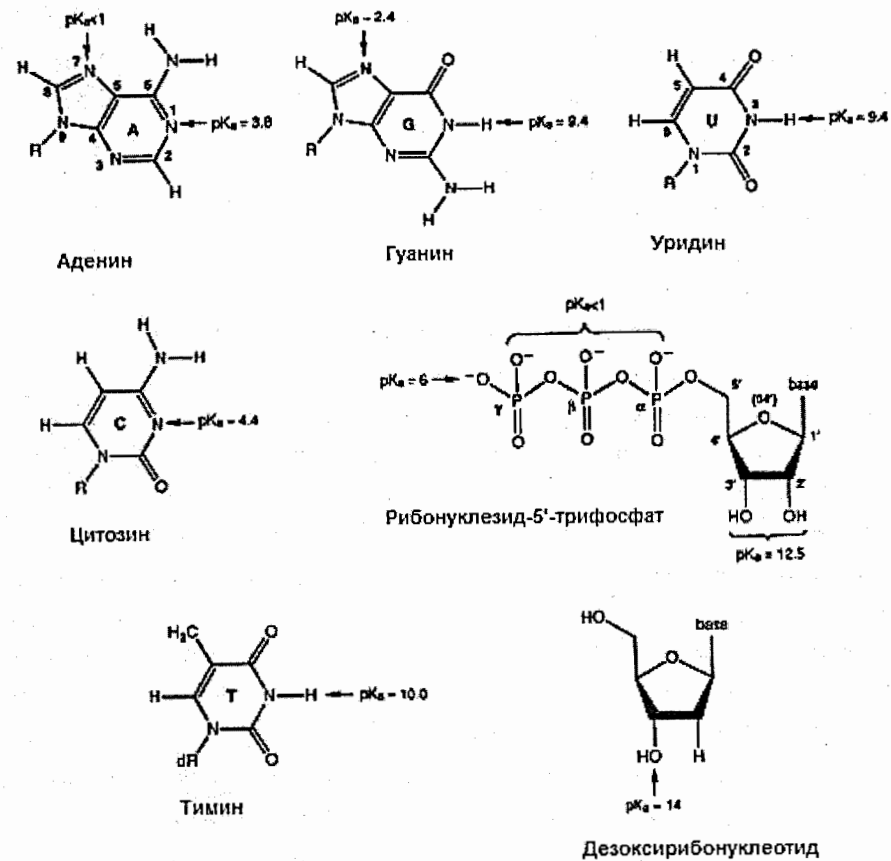
### 10. Свойства аминокислот

Аминокислота	Букв. обозн.	Структура	Формула	Хим. гр.; рКа боковой цепи	Mw	Заряд pH6-7
Alanine Alanine	Ala A		C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	Aliphatic	89,1	0
Arginine ARginine	Arg R		C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	Basic ~11,5-12,5 (12)	174,2	(+)
Asparagine AsparagiNe	Asn N		C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Amide	132,1	0
Aspartic acid AsparDic	Asp D		C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub>	Acidic 3,9-4,5 (4)	133,1	(-)
Asparagine or Aspartic acid	Asx B					
Cysteine Cysteine	Cys C		C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> S	Sulfur 8,3-9,5 (9)	121,2	0
Glutamic acid GluEtamic	Glu E		C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	Acidic 4,3-4,5 (4,5)	147,1	(-)

Glutamine	Gln		C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Amide	146,1	0
Q-tamine	Q					
Glutamine or Glutamic acid	Glx Z					
Glycine	Gly		C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	Aliphatic	75,1	0
Glycine	G					
Histidine	His		C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	Basic 6,0-7,0 (6,3)	155,2	(+)
Histidine	H					
Isoleucine	Ile		C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	Aliphatic	131,2	0
Isoleucine	I					
Leucine	Leu		C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	Aliphatic	131,2	0
Leucine	L					
Lysine	Lys		C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Basic 10,4-11,1 (10,4)	146,2	(+)
Lysine	K					
Methionine	Met		C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> S	Sulfur	149,2	0
Methionine	M					
Phenylalanine	Phe		C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	Aromatic	165,2	0
Fenylalanine	F					
Proline	Pro		C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	Imino	115,1	0
Proline	P					
Serine	Ser		C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	Hydroxyl	105,1	0
Serine	S					

Threonine	Thr		C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	Hydroxyl	119,1	0
Threonine	T					
Tryptophan	Trp		C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Aromatic	204,2	0
TWypthophan	W					
Tyrosine	Tyr		C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	Aromatic	9,7-10,1	181,2
TYrosine	Y			(10,0)		0
Valine	Val		C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	Aliphatic	117,1	0
Valine	V					
a-amino				Basic	6,8-8,2 (8,0)	(+)
a-carboxyl						

## 11. Химическая структура нуклеотидов



## Приложение Б

### 1. Автоматическая пипетка

Априори, объем, выставленный на пипетке, равен объему жидкости в типе (носик, наконечник) только в том случае, если эта жидкость – вода при комнатной температуре. Особое внимание (контролировать объем в типе визуально) требуется обращать при отборе:

— вязких жидкостей типа глицерина (практически всегда в таких случаях лучше пользоваться весами);

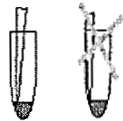
— жидкостей с низким поверхностным натяжением, особенно при повторных заборах (детергенты, растворы белков); холодных и горячих растворов, так как воздух в типе меняет температуру и, следовательно, объем (растворы ферментов на  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , горячие буфера для гибридизации, верхний агар).

• Автоматические пипетки используют либо совсем неградуированные, либо слабо градуированные типы. С заметной частотой случается, что отбирается неправильный объем (некачественный тип, тип неплотно одет, тип не сразу коснулся жидкости, тип закупорился каким-нибудь сгустком). Поэтому нужно контролировать работу пипетки «на глаз».

• Разницу в 25—30 % нужно уметь заметить (не говоря уже о том, что случается, когда начинающие путают 200 мкл и 20 мкл пипетки).

• Тип имеет не только внутренний объем, но и поверхность:  
— не надо глубоко погружать тип в отбираемую жидкость (особенно в случае вязких жидкостей);  
— следует обращать внимание, чтобы тип не касался ничего лишнего своей внешней поверхностью.

• Априори, материал пипетки выдерживает только пары воды. В остальных случаях устойчивость не гарантируется. Особое внимание следует обращать на летучие жидкости. Лучше вообще не использовать автоматическую пипетку при работе с органическими растворителями и кислотами.



### Правила работы:

1. Перед отбором сбросить жидкость на дно Эппендорфа.
2. Боковыми стенками типа не касаться боковых стенок пробирки.
3. Отжать пипетку до первого упора.
4. Жидкость отбирать прямо с поверхности, тип глубоко не опускать.
5. Выдавливать жидкость, отжав пипетку до второго упора (по возможности на стенку пробирки или на поверхность жидкости лучше не капать и не погружать тип глубоко).
6. Для того чтобы жидкость не попала внутрь автоматической пипетки, отжимать поршень вверх обязательно плавно.
7. Не класть на стол пипетку с надетым типчиком.
8. Не сбрасывать типчик, в котором есть жидкость.

### Комментарии:

п. 2. По двум причинам: 1) часто тип укрепляют на пипетке руками, так что внешняя поверхность у него грязная; 2) на внешнюю поверхность может налипнуть жидкость со стенок пробирки.

п. 7. По двум причинам: 1) тип может загрязниться (особое внимание при «чистой» работе (стерильные среды, RNA, PCR) или работе с «опасными» растворами (бактериальные суспензии, радиоактивность, бромистый этидий); 2) если в типе осталась жидкость, то она может затечь внутрь пипетки (если осталось больше 50 мкл в желтом типе или больше 200 мкл в синем). НО!!! Растворы с низким поверхностным натяжением (растворы белков, детергентов, фенол, хлороформ, спирт) способны затечь в горизонтально лежащую пипетку, даже если их в типчике очень мало.

### 2. Колориметр фотоэлектрический однолучевой (КФО)

Колориметр фотоэлектрический однолучевой предназначен для измерения коэффициентов пропускания прозрачных сред в видимой области спектра.

Пределы измерения коэффициентов пропускания — 5—100 %.

Основная абсолютная погрешность (а.п.) измерений —  $\pm 1,5\%$ .

Дополнительная погрешность при изменении  $t^{\circ}$  — не более  $\frac{1}{2}$  а.п.

Дополнительная погрешность при изменении напряжения — не более  $\frac{1}{3}$  а.п.

Спектральный диапазон работы прибора — 380—720 нм.

Принцип работы заключается в измерении отношения двух световых потоков, полного и прошедшего через измеряемую среду, методом пропорциональных отклонений. На фотоприемник поочередно направляются световые потоки — полный  $\Phi_0$  и пропущенный через среду  $\Phi$ . Коэффициент пропускания  $\tau$  измеряемой среды, представляющий собой отношение этих потоков, определяется в виде отношения соответствующих фототоков непосредственно по шкале микроамперметра, то есть

$$\tau = I / I_0 \times 100 \%,$$

где  $I_0$  — фотопоток, соответствующий полному световому потоку  $\Phi_0$ ;  $I$  — фотопоток, соответствующий световому потоку  $\Phi$ , прошедшему через измеряемую среду. Связь между коэффициентом пропускания  $\tau$  и оптической плотностью  $OD$  определяется по формуле

$$OD = - \lg \tau.$$

Правила работы:

1. Введите необходимый светофильтр.
2. Включите прибор в сеть.
3. Измерения на приборе начинайте через 15 мин. после включения прибора в сеть. В течение этого времени наступает стабильный режим работы источника излучения и блока питания.
4. Установите нуль при закрытой шторке (открытой крышке кюветного отделения) рукояткой «Установка «0»» по шкале микроамперметра.
5. Закройте крышку кюветного отделения и с помощью ручки «Установка «100»» выставьте отсчет 100 по шкале измерительного прибора кюветой с контрольным раствором.
6. Установите в кюветное отделение измеряемый образец.
7. Закройте крышку прибора и снимите показания прибора.



### 3. Вортекс

Вортекс применяется для быстрого перемешивания жидкостей в емкостях малого объема. «Миксер НГ-1» обеспечивает вихревое перемешивание для одиночных пробирок диаметром до 22 мм, регулируемая скорость вращения гнезда до 3 400 об/мин.



### 4. Термостат суховоздушный

Инкубация дрожжей проводится в термостатах при 28—30 °С, а бактерий — при 37 °С. Термостат предназначен для получения и поддержания внутри рабочей камеры стабильной температуры. Термостат обеспечивает непрерывное измерение температуры в рабочей камере и ее визуальную индикацию. Максимальный температурный диапазон термостатирования от  $T_{\text{окр. среды}}$  до +60 °С. Максимальные отклонения температуры от заданной  $\pm 1$  °С. Максимальные отклонения температуры в любой точке рабочей камеры от средней  $\pm 0,4$  °С.



### 5. Термостат для микропробирок

Микротермостаты предназначены для инкубирования биопроб в пробирках типа Эппендорф объемом 0,5—2,0 мл «сухим» способом (пробирки помещаются в гнезда твердотельного нагревающего блока). Термостат обеспечивает нагревание до 100 °С, число мест — 24. Точность поддержания температуры  $\pm 0,2$  °С.



### Правила работы:

1. Включите прибор в сеть 220 В. На правой боковой панели прибора расположен сетевой выключатель.
2. Установите нужную температуру с помощью кнопки «°С».
3. Установите время на таймере с помощью кнопки «Таймер».
4. Для выключения прибора переведите сетевой выключатель в положение «0».

## 6. Центрифуги

Настольная микроцентрифуга специально предназначена для центрифугирования микропробирок объемом 0,5 или 2,0 мл. Имеется таймер. Угловой ротор на 16 мест создает скорость вращения до 12 000 об./мин. (11 000 g). Крышка открывается только после полной остановки центрифуги.

Ускорение ( $rcf$ ) можно вычислить по формуле

$$rcf(g) = 1118 \cdot 10^{-8} \cdot r(\text{cm}) \cdot n^2(\text{rpm}),$$

где  $r$  — радиус от центра ротора до точки, в которой необходимо вычислить ускорение;  $n$  (об./мин.) — скорость вращения ротора.



Настольная центрифуга T23D  
(8 000 об./мин. Таймер.)



Центрифуга K23D  
(8 000 об./мин. Охлаждение. Таймер.)

### Правила работы:

1. Включить центрифугу в сеть.
2. Включить охлаждение (если требуется).
3. Уравновесить центрифужные стаканы с центрифужными пробирками. Не забудьте проверить наличие резинового вкладыша.
4. Вставить центрифужные стаканы в гнезда центрифуги.
5. Установить время центрифугирования.
6. Закрыть крышку.
7. Медленно набрать требуемую скорость вращения, поворачивая ручку по часовой стрелке.
8. Дождитесь полной остановки центрифуги, откройте крышку и достаньте центрифужные стаканы.

## 7. Электрофоретическое оборудование

для одномерного электрофореза включает электрофоретическую камеру, источник питания, камеру для окраски геля флуоресцентным красителем бромистым этидием, трансиллюминатор, цифровую камеру для фиксации электрофореграмм, программное обеспечение, расходные материалы.

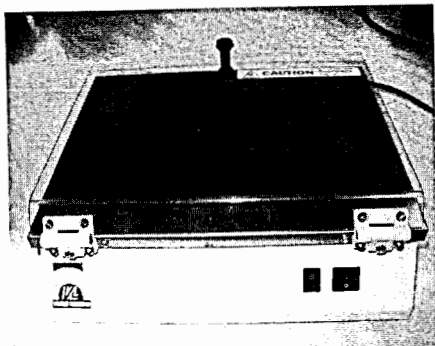
### Камера для горизонтального электрофореза

Горизонтальные камеры «Хеликон» (модель SE-2) предназначены для электрофореза нуклеиновых кислот в агарозных гелях. Размер геля 11,8x17,0 см, без охлаждающей рубашки. В комплект входят электрофорезная камера, гелевая рамка, заливочный столик, набор гребенок. Конструкция гелевой рамки позволяет установить от 1 до 4 гребенок в гель.



### Трансиллюминатор

Высокочастотные трансиллюминаторы «Vilber Lourmat» (France, серия TSP-20.M) предназначены для просмотра гелей в видимом и УФ-диапазоне. Особым образом обработанные УФ-фильтр и специальные рефлекторные мембраны внутри трансиллюминатора позволяют создать в области просмотрочного экрана равномерное интенсивное излучение с заданной



длинной волны. Защитный пластиковый экран предохраняет пользователей от УФ-излучения. Поверхность трансиллюминатора выполнена из нержавеющей стали, устойчивой к химическим и механическим воздействиям.

Размер фильтра 20×20 см, 6 ламп по 8 Вт, длина волны 312 нм.

#### УФ-защитный экран:

- полная защита пользователя от УФ-лучей;
- регулируемый угол.

#### Фильтр:

- долгое время «жизни»;
- высокое качество передачи УФ;
- высокая емкость поглощения видимого света;
- яркий флуоресцентный выход.

#### Правила работы:

1. Поместите трансиллюминатор на ровную рабочую поверхность.
2. Включите вилку в розетку с заземлением.
3. Включите тумблер «In/Off» в положение «On» (загорится контрольный светодиод).
4. После работы поверните тумблер «On/Off» в положение «Off».

#### Предупреждения:

- включать только в стенную розетку с заземлением.
- выньте вилку из розетки, если продолжительное время не собираетесь его использовать.
- глаза и кожу необходимо защищать от воздействия излучения. Рекомендуется пользователю надевать УФ-защитные (LP-70) очки или маску (для полной защиты лица MP-80 или для полной защиты лица и ушей MP800).

#### Комментарии:

- не кладите гели непосредственно на фильтр. Это позволит сберечь пропускное качество фильтра. Используйте пластины для геля GSP-10 (150×115 мм) или GSP-40 (235×420 мм) (только для трансиллюминаторов на 312 или 365 нм);
- для чистки поверхности фильтра используйте среднее моющее средство или теплую воду, протрите сухой тряпкой;
- фильтр имеет поры, поэтому старайтесь держать его сухим.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии. М.: Мир, 1984.
2. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. (v.1-3). NY: Cold Spring Harbor Lab., 1989.
3. Molecular genetics of yeast: a practical approach / Ed. J.R. Johnston. Oxford, England: IRL Press, Oxford Univ. Press, 1994.
4. Cell biology: a laboratory handbook. 2nd ed. / Ed. J.E. Celis. San Diego, CA: Academic Press, Inc., 1997.
5. Methods in molecular biology. Yeast protocols. 2nd ed. / Ed. Wei Xiao. Totowa, New Jersey: Human Press, 2006.
6. Жимулёв И.Ф. Общая и молекулярная генетика. Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2003.
7. Щелкунов С.Н. Конструирование гибридных молекул ДНК. Новосибирск: Наука, 1987.
8. Щелкунов С.Н. Клонирование генов. Новосибирск: Наука, 1986.
9. Клонирование ДНК. Методы / Под ред. Д. Гловера. М.: Мир, 1988.
10. Новое в клонировании ДНК / Под ред. Д. Гловера. М.: Мир, 1989.
11. Льюин Б. Гены. М.: Мир, 1986.
12. Уотсон Дж., Туз Дж., Курц Д. Рекомбинантные ДНК. М.: Мир, 1986.
13. Девис Р., Ботстайн Д., Рот Дж. Генетика бактерий. М.: Мир, 1984.
14. Плазмиды. Методы / Под ред. К. Харди. М.: Мир, 1990.
15. Зенгбуш П. Молекулярная и клеточная биология. М.: Мир, 1982.
16. Рыбчин В.Н. Основы генетической инженерии. Минск: Вышэйш. шк., 1986.
17. Методы молекулярной генетики и геномной инженерии / Под ред. Р. И. Салганика. Новосибирск: Наука, 1990.
18. Практическая молекулярная биология. <http://molbiol.edu.ru>
19. <http://www.fhcr.org/labs/gottschling>
20. [http://www.fhcr.org/labs/breeder/Methods\\_BreederLab.html](http://www.fhcr.org/labs/breeder/Methods_BreederLab.html)

## СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

**Аллель** — различные формы одного и того же гена, расположенные в одинаковых участках, или локусах, гомологичных (парных) хромосом.

**Амплификация** — увеличение количества ДНК, числа копий гена.

**Ауксотрофы** — мутантные организмы (чаще всего микроорганизмы), которые в результате мутации утратили способность синтезировать тот или иной тип органических молекул, необходимых для их роста, и вследствие этого не могут расти на минимальной среде. Рост таких организмов происходит только при поступлении требуемого соединения вместе с питательными веществами.

**Вектор** — молекула ДНК, способная к автономной репликации и включению чужеродной ДНК, является инструментом генной инженерии, обеспечивающим доставку генетической информации в клетку и ее клонирование.

**Веретено** — состоящий из нитей или микротрубочек компонент клетки, функционирующий как организатор определенных сил, под действием которых осуществляется движение хромосом в митозе и мейозе.

**Ген** — структурная, функционально неделимая единица наследственной информации, представляющая собой участок молекулы ДНК (реже РНК), кодирующий синтез одной макромолекулы (полипептидов, тРНК либо рРНК). Большинство генов имеют фиксированную локализацию на хромосоме, однако известны и перемещающиеся (мигрирующие, мобильные) гены.

**Генетическая карта** — схема расположения на хромосоме индивидуальных генов, составленных на основе экспериментов по генетической рекомбинации и комплементации мутантных сайтов.

**Геном** — полный гаплоидный набор генов или хромосом клетки или организма.

**Генотип** — совокупность имеющих фенотипическое проявление генов, локализованных в хромосомах либо в ауторепродуцирующихся цитоплазматических структурах клетки; понятие генотип используется также для обозначения различия между индивидуумами по одной или нескольким парам аллельных генов; гены, образующие генотип, обнаруживаются с помощью генетического анализа.

**Гены внехромосомные** — у прокариот гены, входящие в состав автономно реплицирующихся в цитоплазме молекул ДНК, плазмид; у эукариот — гены, входящие в состав митохондрий и контролирующие цитоплазматическую наследственность.

**Гликозилирование белка** — перенос углеводной (олигосахаридной) группы от полипренольного липида мембраны на амидную группу аспарагинового (N-гликозилирование) остатка растущего пептида. Также может идти по остаткам серина, треонина и называется O-гликозилирование.

**Делеция** — отсутствие части генетического материала, находящегося в хромосоме или цитоплазме; размер делеции может варьировать от одного нуклеотида до сегмента, включающего группу генов (например целую хромосому).

**Денатурация белка** — переход из физиологической конформации в другую (неактивную) конформацию.

**Денатурация ДНК и РНК** — переход молекул из двухцепочечной формы в одноцепочечную, разделение цепей наиболее часто достигается нагреванием.

**Инсерция** — вставка фрагмента ДНК в молекулу ДНК.

**Интеграция** — внедрение вирусной или иной последовательности ДНК в геном клетки-хозяина, приводящее к ковалентному соединению с хозяйской последовательностью.

**Интеркаляция** — встраивание небольших молекул, так называемых интеркалирующих агентов, между основаниями ДНК.

**Интроны** — некодирующие последовательности в структурных генах эукариот, в зрелой иРНК не представлены.

**Клон** — группа генетически идентичных клеток, образующихся в результате вегетативного размножения одного общего предка.

**Клонирование молекулярное** — метод обнаружения молекул рекомбинантных ДНК (например гибридных плазмид, несущих в составе вектора фрагмент чужеродной ДНК) путем посева и выращивания на питательном агаре клеток, в которые такая ДНК была введена путем трансформации. В случае бактерий каждая такая клетка образует колонию, представляющую собой клон; все клетки содержат идентичные молекулы рекомбинантной ДНК.

**Кодирующая цепь** — цепь ДНК, последовательность которой идентична иРНК.

**Компетентная клетка** — клетка, находящаяся в таком физиологическом состоянии, когда она может воспринимать экзогенные молекулы ДНК — быть реципиентом ДНК при трансформации.

**Компетентность** — физиологическое состояние клеток, определяющее способность воспринимать трансформирующую ДНК.

**Комплементарность** — свойство нуклеотидов образовывать парные комплексы при взаимодействии цепей нуклеиновых кислот; в соответствии с правилами комплементарности оснований при формировании таких комплексов образуется двойная спираль — стереорегулярная структура с постоянным диаметром вдоль оси.

**Легирование** — соединение концов ДНК посредством фосфодиэфирных связей, осуществляемое с участием фермента лигазы.

**Лизис** — разрушение бактериальных клеток.



**Локус** — место на хромосоме, занимаемое геном. Термин «локус» используется так же, как синоним термина «сайт» для обозначения места на карте группы сцепления, в котором картируется та или иная мутация.

**Мутаген** — физический или химический агент, увеличивающий частоту возникновения мутаций.

**Мутант** — организм, у которого мутации (генные, хромосомные или геномные) проявляются фенотипически в виде какого-либо признака или свойства.

**Мутация** — изменение типа, числа или порядка расположения нуклеотидов в генетическом материале.

**Нуклеаза** — фермент, расщепляющий нуклеиновые кислоты и продукты их распада. Катализирует гидролиз фосфодиэфирных связей в молекулах нуклеиновых кислот, что ведет к разрыву этих связей и образованию моно- и олигонуклеотидов.

**Однонаправленная репликация** — единственная репликационная вилка движется от определенной точки, называемой местом начала репликации.

**Ориджин (ori)** — локус, в котором начинается репликация ДНК или ее перенос.

**Плазмиды** — кольцевые или линейные (редко) молекулы нуклеиновых кислот (как правило, ДНК), реплицирующиеся в клетке автономно от хромосомы. В составе плазмид могут находиться гены, кодирующие различные соматические функции клеток-хозяев.

**Прокариоты** — простейшие одноклеточные организмы (бактерии и сине-зеленые водоросли), не имеющие ядерной мембраны и окруженные элементарными мембранами органелл; генетический материал прокариот расположен в нуклеоиде — примитивном эквиваленте ядра эукариот.

**Промотор** — регуляторный участок оперона, к которому присоединяется фермент транскрипции ДНК-зависимая РНК-полимераза и с которого инициируется транскрипция.

**Протопласт** — растительная или микробная клетка, лишенная клеточной стенки.

**Прототрофы** — штаммы бактерий или грибов, которые способны к полному синтезу, то есть могут расти на минимальной питательной среде.

**Рекомбинация** — обмен генетическим материалом между двумя исходными (родительскими) молекулами ДНК, приводящий к появлению в потомстве новых комбинаций признаков, отличающихся от тех, что имеются у родителей. Результатом рекомбинации на молекулярном уровне является образование рекомбинантных (гибридных) ДНК.

**Репликация ДНК** — синтез дочерних цепей ДНК на исходной (матричной) молекуле ДНК, приводящий к увеличению числа копий генетического материала.

**Репликон** — единица репликации: участок ДНК, имеющий регуляторные элементы, необходимые для независимой репликации.

**Рестриктазы** — ферменты рестрикции, разрезающие ДНК по определенным нуклеотидным последовательностям, называемым сайтами рестрикции. Кодируются бактериями, плазмидами и бактериофагами.

**Рестрикционный анализ** — исследование структуры ДНК с помощью рестриктаз, или рестрикционных эндонуклеаз, — ферментов, расщепляющих ДНК в участках, содержащих специфические последовательности обычно из 4—7 п.н.

**Сайт** — участок нуклеотидной последовательности, молекулы белка и т. п.

**Секвенирование** — определение последовательности оснований в ДНК или РНК или аминокислот в белке.

**Селекция** — создание условий, при которых выживает только определенный тип клеток.

**Супернатант** — часть отцентрифугированного раствора, который не может быть осажден при данных условиях центрифугирования и остается над осадком.

**Суперспираль** — пространственная, или четвертичная, структура ковалентно замкнутой двухцепочечной молекулы ДНК, образующая спираль, закрученную так, что пересекает собственную ось дуплекса.

**Сфероласт** — бактериальная или дрожжевая клетка, лишенная или почти лишенная клеточной стенки.

**Теломеры** — концевые участки хромосом.

**Транскрипция** — синтез РНК на ДНК-матрице.

**Трансформант** — организм, генотип и фенотип которого изменены в результате трансформации.

**Трансформация** — способ переноса генетической информации, при которой ДНК, изолированная из одной клетки, проникает в другую и встраивается в ее геном.

**Фенотип** — совокупность признаков, определяемых данным генотипом. Иногда этот же термин используется по отношению только к одному признаку.

**Хроматин** — комплекс ДНК с белками, представляющий собой декомпактизованные в интерфазном ядре хромосомы.

**Хромосомы** — нуклеопротеиновые нитевидные структуры клеточного ядра, имеющие сродство к основным красителям. Наблюдаются и идентифицируются во время митоза и мейоза. Основной осевой компонент хромосом — гигантская непрерывная молекула ДНК, которая в линейном порядке содержит гены и генетические регуляторные последовательности.

**Центрифугирование** — использование сил, создаваемых центрифугой, для разделения молекул в жидкой среде.

80=

**Центромера, или первичная перетяжка** — участок хромосомы эукариот, к которому прикрепляются нити веретена во время митоза.

**Экзонуклеаза** — фермент, вызывающий деградацию (расщепление) молекул ДНК или РНК на 3', 5' или обоих концах молекулы.

**Экспрессия гена** — реализация генетической информации, закодированной в ДНК, путем ее транскрипции и трансляции иРНК.

**Электрофорез** — метод разделения заряженных биологических макромолекул (белков, нуклеиновых кислот и т.д.) в электрическом поле, базирующийся на их различии по электрическому заряду, форме и размеру. Электрофорез открыт Ф. Ф. Рейсом в 1807 г. В биологии электрофорез начал использовать А. Тизелиус, сконструировавший первый прибор для электрофоретического разделения белков в 30-ые гг. XX в.

**Эндонуклеаза** — фермент, катализирующий разрыв внутренних фосфодиэфирных связей (гидролиз) в одно- или двунитевой молекуле ДНК или РНК.

**Эписома** — плазида, способная интегрировать в хромосомную ДНК бактерий, а также существовать в них автономно.

**Эукариоты** — организмы, клетки которых имеют четко выраженное деление на ядро и цитоплазму. Эукариоты могут быть как одноклеточными (дрожжи), так и многоклеточными, к ним относятся высшие растения и животные.

Учебное издание

Колтовая Наталья Алексеевна

**Руководство к практическим занятиям  
по молекулярной биологии**

УНЦ-2010-44

Редактор *А. И. Петровская*

Получено 8.06.2010. Подписано в печать 12.08.2010.  
Формат 60 × 90/16. Усл. печ. л. 7,12. Уч.-изд. л. 7,84. Тираж 100. Заказ № 57062.

Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований  
141980, г. Дубна, Московская обл., ул. Жолио-Кюри, 6  
E-mail: [publish@jinr.ru](mailto:publish@jinr.ru)  
[www.jinr.ru/publish/](http://www.jinr.ru/publish/)

