

ПРАКТИКУМ
ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

Составила Н. А. Колтовая

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	3
Трансформация бактерий <i>E. coli</i> плазмидной ДНК	4
Трансформация дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i> плазмидной ДНК	8
Выделение плазмидной ДНК из <i>E. coli</i>	13
Выделение плазмидной ДНК из дрожжей	18
Выделение геномной ДНК из дрожжей	19
Очистка нуклеиновых кислот	20
Осаждение нуклеиновых кислот этанолом или изопропанолом	20
Определение количества двунитевой ДНК по флуоресценции БЭ	21
Рестриктный анализ ДНК	23
Гель-электрофорез	26

В Практическом пособии по молекулярной биологии описаны методы, разработанные и испытанные в различных лабораториях мира. Эти методы тщательно проверены и успешно используются в различных лабораториях. В тексте мы старались по возможности указать, кто именно разработал ту или иную методику. 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. Большинство методик состоит из множества отдельных этапов, чтобы справиться со всеми трудностями, нужно хорошо понимать те принципы, которые лежат в основе каждой методики. Мы приводим необходимую для этого информацию и ссылки, которые могут оказаться полезными в случае затруднений.

Мы использовали материалы из следующих Сборников методик по молекулярной биологии:

Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. **Молекулярное клонирование** (Методы генетической инженерии). Москва. «Мир».1984

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2nd ed. (v.1-3), Cold Spring harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Johnston J.R., Ed., **Molecular genetics of yeast: a practical approach**. IRL Press , Oxford Univ. Press, Oxford, England, 1994.

Celis J.E., Ed., **Cell biology: a laboratory handbook**, 2nd ed., Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1997.

«Практическая Молекулярная Биология» <http://molbiol.edu.ru>

<http://www.fhcrc.org/labs/gottschling>

http://www.fhcrc.org/labs/breeden/Methods_BreedenLab.html

ТРАНСФОРМАЦИЯ БАКТЕРИЙ *E. coli* ПЛАЗМИДНОЙ ДНК

Литература:

Прозоров А.А. Трансформация у бактерий. Москва. «Наука». 1988

Плазмидные вектора вводят в реципиентные клетки методом генетической трансформации, т.е. путем переноса с помощью изолированной ДНК. Эффективность трансформации бактерий зависит от их способности пропускать ДНК через клеточную стенку. Для некоторых видов бактерий, например *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, трансформация естественна. Такие клетки, как клетки *E. coli*, гидролизуют линейную трансформирующую ДНК. Поэтому их трансформация происходит только у штаммов *recBC sbcB*, поскольку у них 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.

Бактериальные клетки, способные к трансформации и трансфекции, называются компетентными. Культуру, содержащую такие клетки, называют культурой в стадии компетентности. Хотя успешное завершение трансформации и трансфекции зависит от осуществления многих стадий, компетентность в большинстве работ принято связывать с начальными этапами – адсорбцией и поглощением ДНК клеткой.

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. 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 – так называемой экзонуклеазы VIII. Конкретные молекулярные механизмы рекомбинации здесь опять-таки не выяснены; путь, по которому у мутанта *recBC sbcA* идет рекомбинация, называется путем *recE*.

В качестве реципиентных клеток в большинстве случаев используют штаммы *S600* *hsdR⁻ hsdM⁻* и *HB101* *hsdR⁻ endA⁻ recA⁻*. Мутация *hsdR⁻*, блокируя клеточную систему рестрикции, предохраняет тем самым клонируемые фрагменты от действия рестриктазы *EcoK*. Мутации *endA⁻* и *RecA⁻* предотвращают расщепление трансформирующей ДНК клеточными нуклеазами.

После проникновения ДНК (инфекционной фаговой или плазмидной) в клетку нет последующего включения этой ДНК в хромосому.

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 100-1000 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 ДНК-азы, образование которой у кишечной палочки детерминируется генами *recBC*) и был облегчен у димерных форм плазмид.

Применение так называемых *tonB*-мутантов, у которых изменена структура клеточной стенки, в дополнение к мутациям *recBC* *sbcAB* позволяет повысить частоту образования трансформантов.

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 pH для трансформации при кальциевой методике равно 7-8.

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 составляют лишь незначительную часть популяции.

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 мегадальтон.

Имеются косвенные данные, свидетельствующие о том, что трансформирующая ДНК кишечной палочки проникает в клетку в двунитевом состоянии и в дальнейшем не образует однострунчатых структур.

Трансформация посредством плазмидной ДНК может осуществляться и с помощью метода замораживания-оттаивания клеток. Эффективность трансформации была не ниже, чем при употреблении кальциевого метода. Методика сводится к непродолжительному замораживанию бактериальных клеток совместно с ДНК при –

70°C и последующему оттаиванию при 37°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 здесь происходит поглощение ДНК не протопластоподобными структурами, а интактными клетками.

При кальциевой методике применяется комбинация таких воздействий как выдерживание клеток на холоду и их обработка хлористым кальцием. Хлористый кальций может быть заменен хлористым барием и хлористым рубидием. Инкубация при 37°C обязательна для генетической трансформации. Ионы кальция действуют лишь при 37°C, т.е. на заключительных этапах обработки клеток.

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

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.

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.

Главный этап в молекулярном клонировании - введение рекомбинантной ДНК в бактериальные клетки. В основе большинства методов бактериальной трансформации лежит наблюдение, согласно которому обработка бактерий хлористым кальцием увеличивает эффективность поглощения ими молекул ДНК. Выход трансформантов в большинстве случаев составляет 10^5 - 10^7 на 1 мкг интактной ДНК бактерий. 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, т.е. способна поглощать плазмидную ДНК, только небольшая фракция клеток (в трансформации участвует лишь 1 из 10000 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 антибиотикам.

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 дней. Компетентные клетки можно приготовить в больших количествах, проверить и хранить замороженными.

Главный этап в молекулярном клонировании - введение рекомбинантной ДНК в бактериальные клетки. В основе большинства методов бактериальной трансформации лежит наблюдение, согласно которому обработка бактерий хлористым кальцием увеличивает эффективность поглощения ими молекул ДНК. 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, т.е. способна поглощать плазмидную ДНК, только небольшая фракция клеток (в трансформации участвует лишь 1 из 10000 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.

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 дней. Компетентные клетки можно приготовить в больших количествах, проверить и хранить замороженными.

Быстрый метод трансформации бактерий *E. coli*

Среда LB:

1 % триптона
0.5 % дрожжевого экстракта
1 % NaCl

на 100 мл:

1 г триптона
0.5 г дрож. экстракта
1 г NaCl

Раствор SST :

MgCl₂ 50 mM
KCl 100 mM
PEG3000 10%
DMSO 5%

1. Приготовьте 3 мл ночной культуры (LB, 37°C).
2. Внесите 30 мкл ночной культуры в 3 мл среды LB. Выращивайте клетки при 37°C при интенсивном перемешивании до концентрации 5×10^7 кл/мл. Обычно это занимает 1.5-2 часа. Для штамма TG1 нужна концентрация соответствует коэффициенту $OD_{550}=0.6$ для XL1 - $OD_{550}=0.4$.
3. Осадите клетки центрифугированием (4000 об/мин, 1 мин).
4. Ресуспендируйте клетки в 300 мкл буфера SST.
5. Добавьте к 100 мкл компетентной культуры 10 мкл раствора ДНК. (Три раза пипетировать.)
6. Выдержите на льду 3-5 мин.
7. Перенесите пробы в термостат (42°C, 40 сек).
8. Посейте по 50 мкл культуры на селективные чашки (LB+Amp (100 мкг/мл)).
9. Инкубируйте сутки при 37°C.

ТРАНСФОРМАЦИЯ ДРОЖЖЕЙ *Saccharomyces cerevisiae* ПЛАЗМИДНОЙ ДНК

Литература:

1. Ito H., Fukuda Y., Murata K., Kimura A. (1983) *J. Bacteriol.* 153:163.
2. Gietz R.D., St Jean A., Woods R.A. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:1425.
3. Gietz R.D., Weinberg O., Woods R.A. (1992) *Yeast.* 8:S259.
4. Schiestle R.H., Gietz R.D. (1989) *Current Genet.* 16:339-346
5. Gietz R.D., Schiestl R.H. (1991) *Yeast.* 7: 253.
6. Gietz R.D., Woods R.A.
7. Уотсон Дж., Туз Дж., Курц Д. (1986) *Рекомбинантные ДНК. Москва. Мир.*

ДНК очень легко ввести в клетки дрожжей. Для этого ферментативным способом удаляют целлюлозную клеточную стенку и получают так называемые «сферопласты». Сферопласты затем инкубируют с ДНК, CaCl₂ и полимерным спиртом (например, полиэтиленгликолем), который делает мембрану проницаемой и создает тем самым возможность для проникновения ДНК в клетки. После этого сферопласты инкубируют в среде, содержащей агар, где они восстанавливают клеточную стенку. Эффективность трансформации при этом составляет $2 \times 10^5/\mu\text{g}$.

Трансформация с помощью ацетата лития (LiAc) впервые была предложена в 1983 году (Ito et al., 1983), в последующие годы в результате модификаций было уменьшено время процедуры и увеличена эффективность более чем в 20 раз (Gietz et al., 1992; 1992). Используемая методика проста и дает до 2.2×10^7 трансформантов/ μg плазмидной ДНК и до 1.5% трансформированных клеток. 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 β-меркаптоэтанолом. Показано, что из них наиболее эффективным агентом является LiAc. Для высокой эффективности трансформации существенным является присутствие в реакции молекул односторонней ДНК-носителя. 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. Добавление PEG к смеси клеток, носителя и плазмидной ДНК абсолютно необходимо для прохождения трансформации. PEG концентрирует молекулы ДНК носителя и плазмид на поверхности клетки. Показано, что важен молекулярный вес PEG: PEG 2000 и PEG 3350 наиболее эффективны, критична концентрация PEG в трансформационной смеси. Тепловой шок при 42°C в течение 15-20 минут сильно увеличивает уровень трансформации для большинства штаммов дрожжей. Показано, что при завершении всей процедуры жизнеспособность клеток (plating efficiency) составляет более 50%.

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

В качестве ДНК-носителя используют ДНК из спермы лосося (*Salmon sperm*) или тимуса теленка (*Calf thymus*). Добавление нативной ДНК из спермы лосося дает 20-кратное увеличение, а из тимуса теленка – 200-кратное увеличение (Табл. 1).

Таблица 1. Влияние способа обработки ДНК-носителя на эффективность трансформации.

Носитель	Условия обработки	Число трансформантов/ μg пл ДНК	Увеличение эффективности трансформации
-	-	37	1x
Salm. sp.	ультразвук	739	20x
Salm.sp.	ультразвук, кипячение	67 000	1 810x
Calf thymus	ультразвук	7900	213x
Calf thymus	ультразвук, кипячение	37 000	1 000x

Фрагментация ультразвуком молекул ДНК-носителя повышает эффективность трансформации. Кипячение и последующее замораживание еще повышают эффективность трансформации. Не обработанная УЗ ДНК из спермы лосося дает эффективность трансформации 4.6×10^4 на μg плазмидной ДНК. Анализ фрагментов ДНК в агарозном геле показал, что эффективность трансформации достигает пика, 5.5×10^4 на μg плазмидной ДНК, если при ультразвуковой обработке получают фрагменты в области от 15 до 2 kb, средняя длина фрагмента около 7 kb. Дальнейшее уменьшение размера фрагментов ДНК до 500 bp снижает эффективность трансформации до 1.9×10^4 трансформантов на μg плазмидной ДНК.

Процедуру трансформации можно оптимизировать изменяя количество ДНК-носителя, длительности теплового шока и количества трансформирующего вектора. В Табл. 2 показано влияние количества носителя на частоту трансформантов.

Таблица 2. Влияние различного количества ДНК-носителя, обработанной кипячением, на эффективность трансформации.

Количество ДНК-носителя (Salmon sperm)	Число трансформантов/ μg плазмидной ДНК	Кратность увеличения
0	37	1x
10 μg	720	20x
50 μg	29 700	803x
100 μg	37 000	1 000x
200 μg	42 500	1 149x
500 μg	28 000	757x

Пик эффективности трансформации наблюдается при добавлении 200 μg одноклеточных молекул ДНК-носителя.

Эксперименты показали, что продолжительности инкубации при 42°C 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 выдерживании (Табл. 3).

Таблица 3. Влияние времени инкубации при 42°C (тепловой шок) на эффективность трансформации.

Время инкубации при 42°C	Число трансформантов/ μg плазмидной ДНК	Кратность увеличения
0	12 900	1x
2.5 мин	31 600	2.5x
5 мин	56 900	4.4x
10 мин	94 400	7.3x
15 мин	107 000	8.3x
20 мин	100 000	7.8x
10 мин/10 лед	78 000	6.1x

Таким образом, оптимальная реакционная смесь

200 μl суспензии клеток (1×10^8 клеток) + **20 μl** ДНК (5 μg плДНК + 100 μg ДНК-носителя)

Трансформирующая ДНК может сохраняться в дрожжевых клетках либо путем интеграции с хромосомой, либо путем автономной репликации в виде эписомы. Судьба введенной в клетки ДНК определяется присутствием или отсутствием в ней элементов автономной репликации (ЭАР). Высокоэффективная эписомная трансформация достигается включением в кольцевую плазмиду сегмента ДНК, содержащего точку начала репликации, что обуславливает независимую репликацию эписомы в дрожжевых клетках. Включение в плазмиду ЭАР во многих случаях позволяет довести эффективность трансформации популяции сферопластов дрожжей до 1%.

Последовательности ЭАР были выделены из эндогенной дрожжевой плазмиды (2μ-кольца) и из клонированных сегментов дрожжевой хромосомы. Они состоят, по крайней мере, из 60 нуклеотидных пар, обогащены АТ парами и содержат каноническую последовательность АААС/ТАТААА. Интересно, что в качестве ЭАР в дрожжевых плаزمиде функционируют также определенные клонированные сегменты ДНК кукурузы, дрозофилы и других организмов. Во всех случаях последовательности служат сигналом для экстрахромосомной репликации ДНК, введенной в дрожжевые клетки, однако пока нет четких доказательств того, что они инициируют репликацию хромосомной ДНК у дрожжей или других организмов. Поэтому присутствие таких последовательностей в хромосомах множества разнообразных видов организмов может быть и чистой случайностью.

Для трансформации дрожжей часто используют челночные векторы, т.е. плазмиды, содержащие как бактериальные сигнальные последовательности, запускающие репликацию ДНК в клетках *E. coli*, так и последовательности, необходимые для инициации репликации в дрожжевых клетках. Селекцию осуществляют с помощью комплементации мутаций в дрожжевых клетках.

Когда в рекомбинантные бактериальные плазмиды, например pBR322, содержащие в виде вставки ЭАР и чужеродные гены, вводят в дрожжевые клетки, происходит высокоэффективная трансформация. Однако обычно при размножении трансформированных клеток в неселективных условиях они утрачивают плазмиды. После 10 генераций плазида сохраняется всего примерно в 5% клеток. При размножении в селективных условиях стабильность плазмиды YRp12 (ARS1) составляет около 34%. По-видимому, при клеточном делении плазмиды не

распределяются поровну в две дочерние клетки. Чтобы преодолеть это затруднение, в плазмиду можно ввести фрагменты ДНК, содержащие последовательности центромер (CEN) дрожжевых хромосом. Они 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 центромерсодержащей плазмиды YCr50 (CEN4 ARS1) в неселективных условиях составляет уже 40-50%.

Процедура быстрой трансформации дрожжевых клеток

Питательная среда YPD:

2% пептона
1% дрожжевого экстракта
2% глюкозы
ade-сульфат (30 мг/л)
Довести pH среды до 6.0 раствором NaOH.

10xTE-буфер, pH 7,4:

0.1 М трис-HCl, pH 7,4
0.01 М ЭДТА, pH 8,0

10xLiCl:

1 М LiCl, pH 7,5

- хлорид лития (Sigma cat.no.L-4408) LiCl (FW 42.39)
- * 0.22 μ m-фильтр для стерилизации

Растворить 42.39 г хлорида лития в 100 мл воды и простерилизовать фильтрованием.

1M Li Ac:

Для приготовления матричного 1M раствора LiAc предъявляются следующие требования:

- ацетат лития (Sigma cat.no.L-4158) $C_2H_3O_2Li \cdot 2H_2O$ (FW 102.0)
- * 0.22 μ m-фильтр для стерилизации

Растворить 10.2 г ацетата лития в 100 мл воды. Проверить pH, который должен быть 8.4-8.9 и простерилизовать раствор фильтрованием. Перелить в стерильную матричную с колбу с притертой крышкой и хранить при комнатной температуре.

40% ПЭГ 4000:

в 1xTE, 1xLiCl. Свежий раствор готовят из стерильных матричных растворов 50% ПЭГ, 10xTE и 10xLiCl.

1. Зацепить с чашки примерно 50 μ l клеток и суспендировать их в 1.5 мл микроцентрифужной пробирке в 1 мл стерильной воды.
2. Центрифугируя на микроцентрифуге клетки отмыть по разу в 1 мл стерильной воды и 0.5 мл 100 mM растворе LiAc.
3. Оценить объем осевших клеток и ресуспендировать в равном объеме 100 mM раствора LiAc.

4. Добавить 5 μ l ДНК-носителя (50 μ g) и 5 μ g плазмидной ДНК к 50 μ l суспензии клеток и хорошо перемешиваем (Vortex).
5. Добавить 300 μ l PEG/LiAc и перемешать (Vortex).
6. Тепловой шок (42°C, 20 мин).
7. Центрифугировать при максимальной скорости 10 сек, микропипеткой удалить PEG.
8. Ресуспендировать клетки в 1.0 мл стерильной воды и рассеять по 250 μ l суспензии на 4 чашки с селективной средой.
9. Инкубировать чашки при 30°C в течение 3-4 дней.

ВЫДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК ИЗ БАКТЕРИЙ *E. coli*

Литература:

1. Birnboim H.C., Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513.
2. Godson G.N., Vapnek D. 1973. A simple method of preparing large amounts of ϕ X174 RFI supercoiled DNA. *Biochem. Biophys. Acta.* 299:516.
3. Holmes D.S., Quigley M. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114:193.

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

Амплификация в богатой среде

Амплификацию плазмид производят при выращивании бактерии-хозяина в богатой среде в присутствии хлорамфеникола. Ночную культуру (10 мл LB с добавлением антибиотика) пересевают в свежую среду LB (0.2 мл н.к. в 25 мл LB с антибиотиком) и инкубируют пока культура не достигнет поздней логарифмической фазы ($D_{600}=0,6$). Переносят культуру в свежую среду LB с антибиотиком (500 мл), инкубируют 2,5 часа (при этом титр удваивается), добавляют антибиотик 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.
- У многих бактерий наступает лизис после добавления анионного детергента додецилсульфата (или лаурилсульфата). В частности, так можно разрушить бактерии кишечной группы, пневмококки и гемофильные бактерии. Додецилсульфат не только разрушает клетки, но и денатурирует некоторые белки. 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 лизоцим. 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 депротеинизации ДНК.

При разрушении бактерий в лизате в числе прочих ферментов появляются дезоксирибонуклеазы. Они, если действие их чем-либо не блокировано, могут тут же разрушить ДНК. Обычно от них защищаются, добавляя вещества, которые связывают ионы магния, требующиеся для работы большинства ДНКаз.

Вещества, связывающие ионы магния (ЭДТА, цитрат), которые добавляют при лизисе клеток для инактивации дезоксирибонуклеаз и предохранения выделяющейся ДНК, подавляют поглощение ДНК компетентными клетками. Додецилсульфат и дезоксихолат также подавляют трансформацию. Лизоцим и проназа, остающиеся в лизате, сами могут лизировать компетентные клетки. В ряде случаев от нежелательных примесей, мешающих трансформации, можно избавиться за счет его разведения.

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

ЭДТА – разрыхляет наружную мембрану, ингибирует нуклеазы лизоцим – разрушает клеточную стенку SDS- разрушает цитоплазматическую мембрану, денатурирует белки, ингибирует нуклеазы

Существуют различные методики лизиса. Лизис кипячением (Holmes, Quigley, 1981) и лизис щелочью (Birnboim, Doly, 1979), отличаются высокой эффективностью и в случае малых плазмид (≤ 10 kb) дают выход 2-3 мг/л. Лизис под действием SDS

(Godson, Varnek, 1973) сравнительно более мягкий, и им следует пользоваться в случае больших плазмид (≥ 10 kb).

Очистка ДНК

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

Поэтому большинство методов очистки включают осаждения, при которых из препарата удаляются преимущественно длинные цепи ДНК *E. coli*, случайно захваченные 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 и при равновесном центрифугировании в градиенте хлористого цезия, содержащих какой-нибудь интеркалирующий краситель в насыщающей концентрации, например бромистый этидий или дейодистый пропидий. Ковалентно замкнутые кольцевые 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 малоочищенные препараты плазмидной ДНК, полученные из небольших объемов культуры (около 10 мл). Плазмидную ДНК выделяют из больших объемов культуры лишь в тех случаях, когда нужны значительные ее препараты (например, в

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

Описанные ниже методики можно успешно использовать для выделения разнообразных плазмид из различных штаммов бактерий. Вообще говоря, чем меньше 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 kb, сильно затрудняется и выход оказывается невысоким. Однако все плазмиды, обычно используемые при клонировании, относительно невелики и приведенные ниже методы дают хорошие результаты.

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

Используемые растворы.

Лизирующий раствор I:

	на 5 мл:
50 mM глюкозы	112.6 мкл 40% глюкозы
25 mM Tris-HCl, pH 8.0	125 мкл 1M Трис, pH 8.0
10 mM ЭДТА	100 мкл 0.5 M ЭДТА
2 мг/мл лизоцима	10 мг лизоцима
	4.66 мл H ₂ 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 ₂ O

Раствор III:

3 M Na-Ac (pH 4.8)

1. Нарращиваем культуру в 150 мл среды LB+Amp при 37°C (20-24 часа).
2. Осаждаем клетки (4000 об/мин, 15 мин).
3. Ресуспендируем клетки в 2.4 мл раствора I, содержащего 2 мг/мл лизоцима (лизоцим не работает, если pH <8.0).
4. Выдерживаем 15 мин во льду.

5. Добавляем 4.8 мл свежеприготовленного раствора II. Пробирку закрываем парафилмом и переворачиваем несколько раз осторожно!
6. Выдерживаем 5-10 мин в ледяной бане.
7. Добавляем 7.2 мл охлажденного раствора III. Резко переворачиваем пробирку, заклеенную парафилмом.
8. Выдерживаем 30-60 мин в ледяной бане.
9. Центрифугируем 20 мин при 6000 об/мин при 4°C.
10. К супернатанту добавляем 2V этанола и выдерживаем 1 час в морозильнике (-20°C).
11. Центрифугируем 30 мин при 6000 об/мин при 4°C.
12. Осадок растворяем в 1 мл ТЕ-буфера.

ВЫДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК ИЗ ДРОЖЖЕЙ

Saccharomyces cerevisiae

(*Oshima Lab.- Toh-e,Tada. J.Bacteriol.1982.151.3:1380-1390*)

Используемые растворы:

раствор «А»:

	на 50 мл:
1.2 М сорбитол	25 мл 2,4 М сорбит
14 mM 2-м-этанол	2,5 мл 1М K ₂ HPO ₄
0.2 мг Zimoliase 6000	50 мкл β-меркаптоэтанола
50 mM K ₂ HPO ₄ -буфер	22.5 мл H ₂ O
	Zimoliase <u>отделько!</u>
	на 1 мл р-ра «А» →0.2 мг зимолтазы

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 Tris

р-р 5 М Ка-Ас

раствор «С»:

либо ТЕ, либо ЭФ-буфер

1. Инокулят дрожжевых клеток в 5 мл богатой среды YEPD инкубируют ночь при 30°C.
2. Центрифугируют 5 мин и 1 раз отмывают H₂O_{стер} (3 мл).
3. Суспендируем в 0.4 мл р-ра «А», переносим в эппендорф и инкубируем при 30°C в течение 30 мин.
4. Добавляем 80 мкл р-ра «В», затем 2 мкл DEPC. Смешиваем, переворачивая несколько раз.
5. Инкубируем суспензию при 65°C в течение 30 мин с открытой крышкой (выпариваем DEPC до исчезновения запаха).
6. Добавляем 100 мкл 5 М Ка-Ас и переносим в лед на 60 мин.

7. Центрифугируем при 12 000 об/мин в течение 5 мин.
8. Переносим супер в новый эппендорф и добавляем 2V этанола, держим при комнатной температуре в течение 10 мин.
9. Центрифугируем (5000 об/мин, 5 мин). Сливаем супер и сушим осадок под продувкой ламинара в течение 10 мин. Растворяем осадок в 50 мкл р-ра «С» и встряхиваем на вортексе.

ВЫДЕЛЕНИЕ ГЕНОМНОЙ ДНК

1. выращиваем **5 мл** ночной культуры при 30°C
2. центрифугируем, отмываем один раз в **1 мл воды**.
3. Ресуспендируем в **500 µl лизирующего буфера**.
4. Добавить стеклянные бусинки, промытые в кислоте, до объема 1.25 мл.
5. Встряхиваем 2 мин.
6. Recover liquid phase with blue tip or punch whole into the bottom of the tube and centrifuge into another tube
7. Добавляем 275 µl 7M ацетат аммония pH 7.0

ОЧИСТКА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Одной из самых важных процедур в молекулярном клонировании является очистка нуклеиновых кислот. Ключевой этап – удаление белков – часто проводят с помощью экстракции водных растворов нуклеиновых кислот фенолом и (или) хлороформом. Такую экстракцию используют там, где нужно инактивировать и удалить ферменты, применяемые на одном из этапов клонирования, прежде чем перейти к следующему. Если же нуклеиновые кислоты выделяют из сложных смесей молекул, таких как клеточные лизаты, то необходимо прилагать дополнительные усилия. В таких случаях прежде чем проводить экстракцию органическими растворителями, чаще всего удаляют большинство белков гидролизом их протеолитическими ферментами, такими, как проназа или протеинкиназа К (табл.), которые активны в отношении широкого спектра нативных белков.

Таблица.

	Основной раствор (в H ₂ O), мг/мл	Температура хранения, °С	Концентрация в ре-акции, 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, pH7,8 0,005 М ЭДТА 0,5% SDS	37	Не требуется

ОСАЖДЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ЭТАНОЛОМ ИЛИ ИЗОПРОПАНОЛОМ

Наиболее часто используемый метод концентрирования ДНК – осаждение ее этанолом. Осадок ДНК, образующийся при низкой температуре (-20°С или ниже) в присутствии умеренной концентрации моновалентных катионов, собирают центрифугированием и вновь растворяют в соответствующем буфере, доводя до желаемой концентрации. Эта процедура является быстрой и количественной, даже если ДНК присутствует в нанограммах.

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

5. Центрифугируйте при 0°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 в роторе Beckman SW50.1).
6. 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.
7. 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.
Примечания. а) Вместо двух объемов этанола для осаждения ДНК можно взять 1 объем изопропанола. Преимущество такой замены состоит в меньшем объеме центрифугируемой жидкости. Но изопропанол менее летуч, чем этанол, поэтому его следы труднее удалить из раствора; кроме того, некоторые растворенные соединения, такие как сахароза или NaCl, легче осаждаются вместе с ДНК при использовании изопропанола, особенно при -70°C. В общем, если не требуется сводить к минимуму объем жидкости, осаждение предпочтительнее проводить этанолом.
б) Для удаления примесей, захватываемых осадком, можно промыть осадок ДНК раствором 70%-ного этанола. Чтобы при промывании не потерять часть ДНК, заполняйте пробирку 70%-ным этанолом не более чем на 2/3. Встряхивайте непродолжительное время и центрифугируйте так, как описано выше. Осадок, остающийся после промывания 70%-ным этанолом, не очень прочно связан со стенками пробирки, поэтому будьте очень осторожны при удалении надосадочной жидкости.
в) Очень короткие молекулы ДНК (<200 пар оснований) плохо осаждаются этанолом. Однако эффективность их осаждения значительно увеличивается, если, предварительно к раствору ДНК добавить MgCl₂ до концентрации 0,01 М.
г) Как правило, ДНК, осажденная этанолом, легко вновь растворяется в буферах с низкой ионной силой, таких, как буфер TE.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ДВУХЦЕПОЧЕЧНОЙ ДНК ПО ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ БРОМИСТОГО ЭТИДИЯ

Иногда ДНК присутствует в количестве (<250 нг/мл), недостаточном для спектрофотометрического определения, или ее раствор содержит примеси других УФ-поглощающих веществ, мешающих точному анализу. Быстрый способ оценки количества ДНК в таких пробах заключается в измерении флуоресценции бромистого этидия, интеркалированного в молекулу ДНК. Поскольку величина флуоресценции пропорциональна общей массе ДНК, количество ДНК в пробе можно определить, сравнивая выход флуоресценции пробы и серии стандартов. Этим методом можно определить до 1-5 нг ДНК.

Метод 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.

1. Смешайте 2 мкл пробы ДНК с 0,4 мкл буфера для нанесения IV (красител – только бромфеноловый синий) и нанесите эту смесь на 0,8%-ный агарозный мини-гель, содержащий 0,5 мкг/мл бромистого этидия.

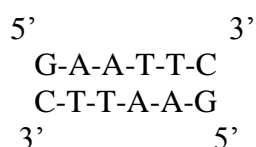
2. Смешайте 2 мкл каждого из серии стандартных растворов ДНК (0,5-50 мкг/мл) с 0,4 мкл буфера для нанесения. Нанесите пробы на гель.
Примечание. Стандартный раствор ДНК должен содержать ДНК приблизительно такого же размера, какой имеет неизвестная ДНК.
3. Проводите электрофорез до тех пор, пока бромфеноловый синий не продвинется приблизительно на 1-2 см.
4. Удалите краситель из геля, погрузив последний на 5 мин в электрофорезный буфер, содержащий 0,01 М $MgCl_2$.
5. Сфотографируйте гель в коротковолновом УФ-свете. Сравните интенсивности флуоресценции неизвестной и стандартных ДНК и определите количество ДНК в пробе.

РЕСТРИКТНЫЙ АНАЛИЗ ДНК

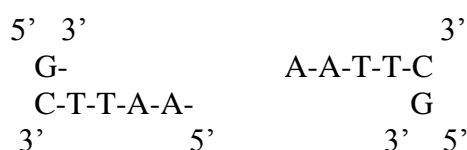
ФЕРМЕНТЫ РЕСТРИКЦИИ

Рестриктирующие эндонуклеазы (или рестриктазы) – это ферменты, «узнающие» определенные последовательности (сайты рестрикции) в двухцепочечной ДНК и расщепляющие молекулу ДНК в этих сайтах. Их выделяют преимущественно из прокариотических клеток. Рестриктазы можно разделить на три группы. Ферменты типа I и типа III обладают модифицирующей (метилирующей) активностью и 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 льдельных 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, 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.

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, *BalI*) разрезают ДНК по оси симметрии с образованием фрагментов с тупыми концами.

РАСЩЕПЛЕНИЕ ДНК РЕСТРИКТИРУЮЩИМИ ЭНДОНУКЛЕАЗАМИ

Для каждого фермента рестрикции существуют оптимальные условия реакции, которые приводятся в описании, прилагаемом фирмой-изготовителем. Основные

переменные параметры – это температура инкубации и состав буфера. К температурному режиму предъявляются достаточно жесткие требования, тогда как различия между буферами чаще всего лишь незначительны. Чтобы не готовить отдельный буфер для каждого фермента, удобно разделить ферменты на три группы: ферменты, лучше всего функционирующие при высокой ионной силе; ферменты, для которых желательны ее средние значения; ферменты, функционирующие предпочтительно в буферах с низкой ионной силой.

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

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

Ионная сила буфера	NaCl	Трис-НСl, рН 7,5	MgCl ₂	Дитиотрейтол
Низкая	0	10	10	1
Средняя	50	10	10	1
Высокая	100	50	10	1

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

Проведение расщепления ДНК рестриктазами

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

1. Добавьте воду к раствору ДНК в стерильной пробирке фирмы Эппендорф до объема 18 мкл и перемешайте.
2. Добавьте 2 мкл соответствующего буфера 10-кратной концентрации и перемешайте, слегка постукивая по пробирке пальцем.
3. Добавьте 1 ед. рестриктазы и перемешайте, слегка постукивая по пробирке пальцем. (1 уд. Фермента – это количество фермента, необходимое для полного расщепления 1 мкг ДНК за 1 ч в определенном буфере и при определенной температуре в объеме 20 мкл. Как правило, расщепление рестриктазами, проводимое в течение более длительных периодов времени или при избытке фермента, не приводит к осложнениям, если в препарате фермента отсутствуют примеси ДНКазы или экзонуклеазы. В имеющихся в продаже препаратах рестриктаз такие примеси обнаруживаются редко.)
4. Инкубируйте смесь при подходящей температуре в течение необходимого времени.
5. Остановите реакцию добавлением 0,5 М ЭДТА, рН 7,5, до конечной концентрации 10 мМ.

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

Если обработанная рестриктазой ДНК нуждается в очистке, экстрагируйте ее один раз смесью фенол-хлороформ, один раз элороформом и осадите этанолом.

Примечания

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

А. 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.

Б. рестриктазы стабильны при хранении при -20°C в буфере, содержащем 50% глицерин. При проведении расщепления ДНК рестриктазами приготовьте реакционную смесь, содержащую все компоненты, кроме фермента. Достаньте из морозильника фермент и сразу же поместите его в лед. Работайте как можно быстрее, чтобы фермент находился вне морозильника минимальное время. Сразу же после использования поместите фермент обратно в морозильник.

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

Г. 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.

ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

В начале 70-ых годов было показано, что с помощью гелеэлектрофореза 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 80-ых годах была предложена модификация гелеэлектрофореза в агарозном геле, названная электрофорезом в пульсирующем электрическом поле или пульс-электрофорез. С ее помощью удастся разделять очень большие молекулы ДНК. Обычный гелеэлектрофорез 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.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ

Литература:

- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование (Методы генетической инженерии). Москва. «Мир».1984*
- Aaij C., Borst P.1972. The gel electrophoresis of DNA. Biochim. Biophys. Acta.269:192.*
- Fisher M.P., Dingman C.W. 1971. Role of molecular conformation in determining the electrophoreticities of polynucleotids in agaroseacrylamide composite gels. Biochemistry.10:895.*
- Helling R.B., Goodman H.M., Boyer H.W. 1974. Analysis of R.EcoRI fragments of DNA from lambda bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. J. Virol.14:1235.*
- Thorne H.V.1966. Electrophoretic separation of polyoma DNA from host cell DNA. Virology.29:234.*
- Thorne H.V.1967. Electrophoretic characterization and fractionation of polyoma virus DNA. J. Mol. Biol. 24:203.*
- Johnson P.H., Grossman L.I. 1977. Electrophoresis of DNA in agarose gels. Optimizing separations of conformational isomers of double and singlestranded DNAs. Biochemistry.16:4217.*
- Thomas M., Davis R.M. 1975. Studies on the cleavage of bacteriophage lambda DNA with EcoRI restriction endonuclease. J. Mol. Biol. 91:315.*

Электрофорез в агарозном геле – стандартный метод, используемый для разделения, идентификации и очистки фрагментов ДНК. С помощью этой простой техники можно быстро разделить такие смеси фрагментов ДНК, которые не могут быть

разделены другими способами, например центрифугированием в градиенте плотности. Кроме того, при разделении в геле прямо следят за положением ДНК, так как полосы ДНК в геле можно окрашивать флуоресцирующим и интеркалирующим в ДНК красителем – бромистым этидием в низкой концентрации. Просматривая покрашенный гель в ультрафиолетовом свете, можно заметить даже 1 нг ДНК.

Скорость миграции ДНК через агарозный гель при электрофорезе определяется пятью главными параметрами, рассмотренными ниже.

Размер молекул ДНК. Молекулы линейной двухцепочечной ДНК перемещаются в геле предположительно одним концом вперед (Fisher, Dingman, 1971; Aaij, Borst, 1972) со скоростями, обратно пропорциональными десятичному логарифму их молекулярных масс (Helling et al., 1974) (рис.).

$$M_r \propto 1/\log(M_w)$$

Таблица. Сравнение молекулярной массы и скорости миграции.

Молекулярная масса (Da)	log (мол. масса)	1/Log (мол.масса), т.е. relative 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

Концентрация агарозы. Фрагменты ДНК данного размера перемещаются в геле, содержащем разные концентрации агарозы, с разными скоростями. Между логарифмом электрофоретической подвижности ДНК μ и концентрацией геля τ существует прямая зависимость, описанная уравнением: $\log \mu = \log \mu_0 - K_r \tau$, где μ_0 – свободная электрофоретическая подвижность, а константа K_r называется коэффициентом замедления и зависит от свойств геля, а также от величины и формы движущихся молекул. Таким образом, применяя гели разных концентраций, можно разделить большой набор фрагментов ДНК, различающихся по размеру.

$$\log(M_r) \propto 1/[\text{gel}]$$

Гель, %	1/гель %	Инв. log(1/гель%) (т.е. relative 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

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

Конформация ДНК. ДНК, имеющие одинаковую молекулярную массу, но разные конформации, например кольцевая неповрежденная (форма I), кольцевая с 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 и от таких факторов, как сила тока, ионная сила буфера или плотность сверхспиральных витков в форме I (Johnson, Grossman, 1977). В одних условиях форма I перемещается быстрее, а в других – медленнее, чем форма III. *Чаще всего линейная форма (форма III) мигрирует медленнее всех. Суперспирализованная ДНК (форма I) обычно мигрирует наиболее быстро.* 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. Подвижность формы II и формы III в описанных условиях снижаются, хотя и по-разному, вследствие нейтрализации зарядов и увеличения жесткости молекул ДНК под влиянием бромистого этидия. Для большинства препаратов ДНК, находящейся в форме I, критическая концентрация бромистого этидия находится в области 0,1-0,5 мкг/мл.

Напряженность электрического поля. При низких напряженностях скорость перемещения фрагментов линейной ДНК пропорциональна приложенному напряжению. Однако с увеличением напряженности электрического поля подвижность фрагментов ДНК с высокой молекулярной массой дифференциально возрастает. Следовательно, с увеличением напряженности область эффективного разделения ДНК в агарозном геле снижается. Максимальное разделение фрагментов происходит при напряженности, и не превышающей 5 В/см.

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°C 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°C – в этих условиях они становятся более плотными.

Буферы

Для электрофореза обычно применяют буферы, содержащие трис-ацетат, трис-борат или трис-фосфат в концентрации 50 мМ и имеющие рН 7,5-7,8. Чаще всего их готовят в виде концентрированных растворов и хранят при комнатной температуре.

Агароза

Существует много различных марок агарозы. Даже в пределах одной марки из разных упаковок могут сильно различаться. Наиболее подходящей для общих целей считается агароза типа II – низкоэндоосмотическая 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, элюированные из таких гелей, необходимо

хорошо очистить, прежде чем использовать их в качестве матриц или субстратов для этих ферментов.

Окрашка ДНК в агарозных гелях

Наиболее удобный метод визуализации ДНК в агарозных гелях – окрашивание ее флуоресцирующим красителем бромистым этидием. Молекула этого вещества содержит плоскую группу (рис.), 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 нуклеиновых кислот (ДНК и РНК). Однако сродство красителя к одноцепочечной ДНК гораздо меньше, чем к двуцепочечной 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 двуцепочечной 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, содержание 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 MgSO₄ 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.

Таблица. Буферы для нанесения проб.

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

Краситель в буфере нужен лишь для того, чтобы образец был легко заметен в лунке и в геле. Обычно приводимые в методиках ~0.025% для бромфенолового синего и ксиленцианола (в 1хбуфере) по нашему мнению слишком большое количество.

Таблица. Подвижность красителя в гелях с различной концентрацией агарозы.

%	Подвижность красителя			
	КЦ	Крезоловый кр.	Бромфенол. синий	OrangeG
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

Выбор красителя:

- Бромфеноловый синий и ксиленцианол – (стоковые растворы 1% в H₂O; рабочая концентрация в 1хбуфере ~0.005-0.02%) могут заметно мешать наблюдению фрагментов под УФ. По нашему опыту, элюция фрагмента в РЕГ вместе с любым из этих красителей не оказывает заметного влияния на меченье, лигирование и трансформацию.

- Cresol red - (стоковый раствор 50 mM в H₂O; рабочая концентрация в 1хбуфере ~0.1 mM) совместим с ферментативными реакциями, практически не мешает наблюдению под УФ.

- OrangeG – (стоковый раствор 1% в формамиде; рабочая концентрация в 1хбуфере 0.01-0.05%) наиболее подвижный краситель, практически всегда находится вне «рабочей зоны». Заметен под УФ.

Фотографирование

Фотографии гелей можно сделать в проходящем или отраженном УФ-свете.

Наибольшей чувствительностью обладает пленка Polaroid Type 57 или 667 (3000 ед. ASA). При наличии мощного источника УФ-излучения (более 2500 мкВт/см²) и хороших линз для получения изображения полос, содержащих всего лишь 10 нг ДНК, достаточно экспозиции пленки в течение нескольких секунд. При длительной экспозиции и мощном источнике УФ-излучения можно обнаружить даже 1 нг ДНК.

Приготовление агарозных гелей и электрофорез.

1. Добавьте рассчитанное количество порошка агарозы в отмеренный объем электрофорезного буфера.
2. 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'' (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.
4. Установите гребенку в плоску для агарозы. Необходимо, чтобы между дном лунки и основанием геля оставался слой агарозы толщиной 0,5-1,0 мм, т.е. чтобы дном лунки служил агарозный гель (рис.).

5. После того как гель полностью затвердеет (через 30-45 мин при комнатной температуре), осторожно удалите гребенку и поместите гель в электрофорезную кювету.
6. Добавьте достаточное количество электрофорезного буфера (при необходимости содержащего 0,5 мкг/мл бромистого этидия), так чтобы гель был закрыт слоем буфера толщиной 1 мм.
7. Смешайте пробы с буфером для нанесения пробы, содержащим 5-10% глицерина, 7% сахарозы или 2,5% фикола и краситель (0,025% бромфенолового синего или ксилолцианола) и внесите их в лунки геля под электрофорезный буфер. Обычно буфер для нанесения проб готовят в виде раствора 6-10-кратной концентрации. Его смешивают с пробой, а затем осторожно вливают в лунку с помощью автоматической микропипетки.
8. Подсоедините электроды к источнику напряжения. Напряженность при проведении разделения в агарозных гелях составляет 1-8 В/см. Маркерный краситель движется с той же скоростью, что и фрагменты ДНК, содержащие указанные в табл. 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 ультрафиолет.
Предостережение. Работая с УФ-излучением необходимо предохранять глаза и кожу от ожогов. Одевайте очки!