

ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ՓԱՆՈՍՅԱՆ Հ. Հ., ՄԱՐԳԱՐՅԱՆ Ա. Ա.,
ԲԱԶՈՒԿՅԱՆ Ի. Լ., ԹՈՂՈՒՆՅԱՆ Ա. Հ.

ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ՄԱՆՐԷԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ
ԼԱԲՈՐԱՏՈՐ ԱՇԽԱՏԱՆՔՆԵՐ

(ՈՒՍՈՒՄՆԱՄԵԹՈՂԱԿԱՆ ՁԵՌՆԱՐԿ)

ԵՐԵՎԱՆ
ԵՊՀ ՀՐԱՏԱՐԱԿԶՈՒԹՅՈՒՆ
2020

ՀՏԴ 577.2(07)
ԳՄԴ 28.070g7
Մ 860

*Հրատարակության է երաշխավորել
ԵՊՀ կենսաբանության ֆակուլտետի
գիտական խորհուրդը:*

Գրախոսներ՝

Նիլս-Կորե Բիրկելանդ

Բերգենի համալսարանի (Նորվեգիա) կենսաբանական գիտություն-
ների ամբիոնի պրոֆեսոր, դոկտոր

Թոշունյան Կ.Ա.

ԵՊՀ կենսաքիմիայի, մանրէաբանության և կենսատեխնոլոգիայի
ամբիոնի դոցենտ, կենսաբանական գիտությունների դոկտոր

Մ 860 Մոլեկուլային մանրէաբանության: Լաբորատոր աշխատանքներ: Ուսումնամեթո-
դական ձեռնարկ/ Հ. Հ. Փանոսյան, Ա. Ա. Մարգարյան, Ի. Լ. Բագուկյան, Ա. Հ.
Թոշունյան.- Եր: ԵՊՀ հրատ., 2020, 120 էջ:

Ուսումնամեթոդական ձեռնարկն ընդգրկում է հողային և ջրային նմուշներից
հանրագումարային նուկլեինաթթուների (ԴՆԹ-ի և ՌՆԹ-ի), բակտերիաների մաքուր
կուլտուրաներից ընդհանուր ՌՆԹ-ի և գենոմային ու պլազմիդային ԴՆԹ-ի անջատման,
նուկլեինաթթուների որակական և քանակական որոշման, ֆիլոգենետիկական մարկե-
րային գեների ՊՇՌ եղանակով ամպլիֆիկացման, մոլեկուլային կլոնավորման, հաջոր-
դականությունների սեքվենավորման և ստացված հաջորդականությունների կենսաին-
ֆորմատիկական վերլուծության մեթոդներ: Ձեռնարկը ներառում է նաև արծարծվող թե-
ման լուսաբանող համառոտ տեսական տեղեկություն, ինքնուրույն լաբորատոր աշխա-
տանքներ և դրանց կատարման առաջադրանքներ:

Հայերեն լեզվով մոլեկուլային մանրէաբանության լաբորատոր աշխատանքների
այս եզակի ձեռնարկը նախատեսված է բուհերի կենսաբանական մասնագիտություննե-
րով մասնագիտացող ավարտական կուրսերի ուսանողների, մագիստրոսների և ասպի-
րանտների համար:

ՀՏԴ 577.2(07)
ԳՄԴ 28.070g7

ISBN 978-5-8084-2462-3

© ԵՊՀ հրատ., 2020
© Հեղ խումբ, 2020

ՆԱԽԱԲԱՆ

Մոլեկուլային մանրէաբանության լաբորատոր աշխատանքների ուսումնամեթոդական ձեռնարկն ընդգրկում է մոլեկուլային մանրէաբանության մեթոդների մասին համապարփակ տեղեկատվություն: Ձեռնարկում շարադրված են հողային և ջրային նմուշներից հանրագումարային նուկլեինաթթուների (ԴՆԹ-ի և ՌՆԹ-ի), բակտերիաների մաքուր կուլտուրաներից ընդհանուր ՌՆԹ-ի և գենոմային ու պլազմիդային ԴՆԹ-ի անջատման, ինչպես նաև նուկլեինաթթուների որակական և քանակական որոշման մեթոդները: Ձեռնարկի առանձին բաժիններ նվիրված են նաև ֆիլոգենետիկական մարկերային գեների ՊՇՌ եղանակով ամպլիֆիկացման, մոլեկուլային կլոնավորման, հաջորդականությունների սեքվենավորման և ստացված հաջորդականությունների կենսաինֆորմատիկական վերլուծության մեթոդներին:

Ձեռնարկը ներառում է արժարժվող թեման լուսաբանող համառոտ տեսական տեղեկություն, ինքնուրույն լաբորատոր աշխատանքներ և դրանց կատարման առաջադրանքներ: Առանձին հավելվածներով ներկայացված են առաջադրանքները կատարելու համար անհրաժեշտ լուծույթների, բուֆերների և ռեակտիվների բաղադրատոմսերը, որոշ ռեստրիկտազների և չափանմուշային ԴՆԹ-ի բնութագրերը, ինչպես նաև սեքվենավորման արդյունքում ստացված նուկլեոտիդային հաջորդականությունների կենսաինֆորմատիկական վերլուծության վերաբերյալ ուղեցույցները:

Ուսումնամեթոդական այս ձեռնարկը կազմվել է Բարձրագույն կրթության ոլորտում միջազգային համագործակցության և որակի ապահովման (DIKU) նորվեգական կենտրոնի կողմից տրամադրվող եվրասիական ծրագրերի (Ընդհանուր և կիրառական մանրէաբանության բնագավառում գիտահեն բարձրագույն կրթության կատարելագործման եվրասիական ցանց, CPEA-LT-2016/10095 և Մանրէների կենսատեխնոլոգիայի բնագավառում գիտահեն բարձրագույն կրթության կրթական ցանց, CPEA-LT-2017/10061) շրջանակներում:

Մայրենի լեզվով մոլեկուլային մանրէաբանության լաբորատոր աշխատանքների այս եզակի ձեռնարկը նախատեսված է բուհերի կենսաբանական մասնագիտություններով մասնագիտացող ավարտական կուրսերի ուսանողների, մագիստրոսների և ասպիրանտների համար:

ՀԱՊԱՎՈՒՄՆԵՐ

Մ - մոյար

մՄ - միլիմոյար

մկՄ - միկրոմոյար

պՄ - պիկոմոյար

մլ - միլիլիտր

մկլ - միկրոլիտր

գ - գրամ

մգ - միլիգրամ

մկգ - միկրոգրամ

նգ - նանոգրամ

մկմ - միկրոմետր

նգ - նուկլեոտիդային զույգ

կնգ - 1000x նգ

ՕԽ - օպտիկական խտություն

ՈԻՄ ճառագայթներ - ուլտրամանուշակագույն ճառագայթներ

Վ - վոլտ

ԱՊՄ - ամոնիումի պերսուլֆատ

ՆԴՄ - նատրիումի դոդեցիլսուլֆատ

ԵՄԷԵԱ - եռմեթիլէթիլէներկամին

ԷԵՔՔ - էթիլէներկամինքառքացախաթթվային

ՏԳԷ - տրիս-գլյուկոզ-ԷԵՔՔ

ՏԷ - տրիս և ԷԵՔՔ

ՏՔԷ - տրիս քացախաթթու և ԷԵՔՔ

ՑԵԱԲ - ցետիլեռմեթիլամոնիումային բրոմիդ

ԵԷՊԿ - երկէթիլպիրոկարբոնաթթու

ՊՇՌ - պոլիմերազային շղթայական ռեակցիա

դՆԵՖ - դեզօքսիտիբոնուկլեոզիդէոֆոսֆատ

դԱԵՖ - դեզօքսիադենոզիդէոֆոսֆատ

դԹԵՖ - դեզօքսիթիմիդինէոֆոսֆատ

դԳԵՖ - դեզօքսիգուանոզիդէոֆոսֆատ

դՑԵՖ - դեզօքսիցիտոզիդինէոֆոսֆատ

եղՆԵՖ - երկդեզօքսինուկլեոզիդեռաֆոսֆատ
 եղԱԵՖ - երկդեզօքսիադենոզինի եռֆոսֆատ
 եղԹԵՖ - երկդեզօքսիթիմիդինեռաֆոսֆատ
 եղԳԵՖ - երկդեզօքսիզուանոզինեռաֆոսֆատ
 եղՑԵՖ - երկդեզօքսիցիտոզինեռաֆոսֆատ
 ԴՆԹ - դեզօքսիռիբոնուկլեինաթթու
 ԼԴՆԹ – լրացչական ԴՆԹ
 ՌՆԹ - ռիբոնուկլեինաթթու
 ռՌՆԹ - ռիբոսոմային ՌՆԹ
 Ի-ՌՆԹ - ինֆորմացիոն (տեղեկատվական) ՌՆԹ
 ԱԵՖ - ադենոզինեռաֆոսֆատ
 ԱՄՖ - ադենոզինմիաֆոսֆատ
 ՆԱԱԵ - նիկոտինամիդադենիներկնուկլեոտիդ
 ՌՆազ - ռիբոնուկլեազ
 ԴՆազ - դեզօքսիռիբոնուկլեազ
 ՋԳԺԷ - ջերմաստիճանային գրադիենտային ժել էլեկտրաֆորեզ
 ԲԳԺԷ - բնափոփող գրադիենտային ժել էլեկտրաֆորեզ

ԹԵՄԱ 1
ԲԱԿՏԵՐԻԱԿԱՆ ԲՋԻՋՆԵՐԻՑ ՆՈՒԿԼԵԻՆԱԹԹՈՒՆԵՐԻ
ԱՆՋԱՏՈՒՄԸ

Նուկլեինաթթուների անջատումը և մաքրումը մանրէների մոլեկուլային կենսաբանության, գենետիկայի, մանրէաբանության և կենսաքիմիայի հիմնական գործընթացներից են: Առանցքային փուլն ապապրոտեինացումն է (սպիտակուցի հեռացումը և ապաակտիվացումը), որը հիմնականում իրականացնում են ֆենոլով կամ քլորոֆորմի և իզոամիլային սպիրտի խառնուրդով ջրային լուծույթներում նուկլեինաթթուների լուծամզման միջոցով: Ֆենոլային լուծամզման դեպքում նուկլեինաթթուները մնում են ջրային շերտում, այն դեպքում, երբ սպիտակուցները հայտնվում են ֆենոլի և ջրի շերտերի միջև:

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 1.1. ՔՐՈՄՈՍՈՄԱՅԻՆ ԴՆԹ-Ի ԱՆՋԱՏՈՒՄԸ

Ներկայումս մանրէների բջիջներից քրոմոսոմային ԴՆԹ-ի անջատման համար կիրառվում են տարբեր ընկերությունների (Roche Diagnostics, Invitrogen, Sigma, Quiagen և այլն) արտադրության առևտրային հավաքածուներ (DNA isolation kit) (նկար 1): Առևտրային հավաքածուների կիրառման դեպքում ԴՆԹ-ի ելքը կախված է էլային կենսազանգվածի քանակից, նմուշում ԴՆԹ-ի կոնցենտրացիայից, օգտագործվող բուֆերային լուծույթներից: Հայտնի են նաև առևտրային հավաքածուներ, որոնք նախատեսված են թիրախային խմբի մանրէներից (օրինակ՝ արքեաներից, գրամդրական կամ գրամբացասական բակտերիաներից, ցիանաբակտերիաներից) քրոմոսոմային ԴՆԹ-ի անջատման համար*:

* Ավելի մանրամասն տեղեկատվություն կարելի է ստանալ տվյալ առևտրային հավաքածուների կից արձանագրություններից:



Նկար 1. Մանրէների բջիջներից քրոմոսոմային ԴՆԹ-ի անջատման համար նախատեսված առևտրային հավաքածուներ:

Բջիջներից ԴՆԹ-ի անջատման ընթացքում բարձր ելք ստանալու համար անհրաժեշտ է՝

- էնդոգեն նուկլեազներով ԴՆԹ-ի մոլեկուլների քայքայումը կանխելու համար օգտագործել թարմ կամ հեղուկ ազոտում սառեցված և -80°C ջերմաստիճանում պահպանված կենսազանգված,
- խուսափել քրոմոսոմային ԴՆԹ պարունակող նմուշները ուժգին թափահարելուց, ԴՆԹ պարունակող լուծույթները խառնել սրվակները շրջելով,
- քրոմոսոմային ԴՆԹ-ի նմուշների հետ աշխատելիս օգտագործել ավտոմատ պիպետների համար նախատեսված լայն անցքերով ծայրակալներ, քանի որ նեղ անցքերով ծայրակալներ օգտագործելիս երկար մոլեկուլները կարող են վնասվել,
- նախընտրելի է քրոմոսոմային ԴՆԹ-ն պահպանել 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում, քանի որ նմուշների սառեցումը -20°C ջերմաստիճանային պայմաններում և հաջորդող հալեցումը նույնպես կարող են հանգեցնել մոլեկուլների վնասման,
- ԴՆԹ-ի նմուշները փորձարարական աշխատնքի ամբողջ ընթացքում պահել սառույցի վրա:

Առաջադրանք 1.1.1. Բակտերիաներից քրոմոսոմային ԴՆԹ-ի անջատումն ըստ Մարմուրի (Marmur) մեթոդի

Այս մեթոդը կիրառվում է հիմնականում մանրէային փոքր ծավալով կախույթներից (5-10 մլ) քրոմոսոմային ԴՆԹ-ի անջատման համար: Գոյություն ունեն այս մեթոդի զանազան տարբերակներ, որոնք տարբերվում են ԴՆԹ-ի մաքրման վերջնական փուլով:

Նուկլեինաթթուների լուծույթից սպիտակուցները հեռացվում են ֆենոլով կամ ֆենոլի և քլորոֆորմի (1:1) խառնուրդով, այնուհետև քլորոֆորմի և իզոամիլային սպիրտի (24:1) խառնուրդով միանգամյա լուծամզմամբ: Նուկլեինաթթուները այս դեպքում մնում են ջրային շերտում: Փորձարարական նմուշի ապապրոտեինացումն առավելագույն արդյունավետությամբ է ընթանում երկու օրգանական լուծիչների օգտագործմամբ: Քլորոֆորմը բնափոխում է սպիտակուցը, իսկ իզոամիլային սպիրտը՝ կանխում փրփրագոյացումը լուծամզման ժամանակ և ապահովում ջրային ու օրգանական շերտերի հստակ տարանջատումը: Ֆենոլը նաև բնափոխում է սպիտակուցները, սակայն ամբողջությամբ չի արգելակում ռիբոնուկլեազի (ՌՆԱզ) ակտիվությունը: Բացի այդ, ֆենոլում լուծվում են ադենինից կազմված երկար հաջորդականություններ պարունակող ՌՆԹ-ի մոլեկուլները: Քլորոֆորմն ապակտիվացնում է ՌՆԱզը, իսկ քլորոֆորմի և իզոամիլային սպիրտի խառնուրդը վերջնական լուծամզման դեպքում հեռացնում է ԴՆԹ-ի պատրաստուկից ֆենոլի մնացորդները: ԴՆԹ-ի լվացումը և նստեցումը էթանոլով իր հերթին նպաստում է քլորոֆորմի հեռացմանը:

Էթանոլով նստեցումը ԴՆԹ-ի խտացման և ցածրամոլեկուլային մնացորդներից մաքրման ամենահաճախ կիրառվող արագ և արդյունավետ մեթոդներից է: Էթանոլում ԴՆԹ-ի ագրեգատներն առաջանում են միավալենտ կատիոնների միջին կոնցենտրացիաների պայմաններում (հիմնականում -20 -ից մինչև -80°C ջերմաստիճանային պայմաններում): Այդ իսկ պատճառով ԴՆԹ-ի լուծույթին հաճախ ավելացնում են նատրիումի քացախաթթվի ($0.25-0.3 \text{ M}$), նատրիումի քլորիդի ($0.1-0.2 \text{ M}$), լիթիումի քլորիդի (0.8 M) կամ ամոնիումի քացախաթթվի ($1.6-2.5 \text{ M}$) լուծույթներ: LiCl -ի լուծույթը օգտագործում են էթանոլի հետ, քանի որ էթանոլի բացակայության պայմաններում այն ընտրողաբար նստեցնում է ՌՆԹ-ի մոլեկուլները (հետագա աշխատանքների համար պետք է նկատի ունենալ, որ Li^{+} -ի իոնները արգելակում են հետադարձ տրանսկրիպցիան): NaCl -ի լուծույթը օգտագործում են հիմնականում նատրիումի դոդեցիլսուլֆատ (SDS) պարունակող լուծույթներից ԴՆԹ-ի նստեցման համար: Դրա համար հաճախ օգտագործում են նաև նատրիումի քացախաթթու ($\text{pH } 5.2$): ԴՆԹ-ի նստեցումն ավելի լավ է ընթանում, երբ լուծույթին ավելացվում է մինչև 10

մՄ $MgCl_2$ -ի լուծույթ կամ օժանդակ նյութեր, օրինակ՝ գլիկոլեն (50 մկգ/մլ): Այնուհետև լուծույթը կենտրոնախուսում են և նստվածքը կրկին լուծում համապատասխան բուֆերում մինչև պահանջվող խտություն (եթե աղերի կոնցենտրացիան $\Gamma\text{L}\theta$ -ի լուծույթում բարձր է, հաճախ օգտագործում են ցածր իոնային ուժով բուֆերային լուծույթ, pH 7.8-8.0): $\Gamma\text{L}\theta$ -ի անցանկալի մնացորդներից ազատվելու համար նմուշը մշակում են բարձր մենահատկությամբ ΓL ազով:

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ մանրէների կուլտուրա, լուծույթներ, սարքեր և պարագաներ՝

- 12-14 ժամ նախապես աճեցված *Escherichia coli* M17 շտամի կախույթ,
- Էթիլեներկամինքառքացախաթթվային (ԷԵՔՔ) նատրումի լուծույթ հետևյալ բաղադրությամբ՝ 0.15 Մ $NaCl$, 0.01 Մ Na_2 -ԷԵՔՔ (pH 8.0),
- ՏԷ բուֆերային լուծույթ (պատրաստումը տե՛ս հավելված 1-ում),
- ՆԴՄ-ի լուծույթ (10%, զանգված/ծավալ),
- $NaClO_4$ -ի լուծույթ (5 Մ),
- Տրիս և ԷԵՔՔ (ՏԷ) բուֆերային լուծույթով (pH 8.0) հավասարակշռված ֆենոլ (պատրաստումը տե՛ս հավելված 1-ում),
- Քլորոֆորմի և իզոամիլ սպիրտի 24:1 (ծավալ/ծավալ) խառնուրդ,
- 96% սառեցված էթանոլ,
- ΓL ազի լուծույթ (10 մգ/մլ),
- 1.5-2 մլ տարողությամբ կենտրոնախուսման սրվակներ (Էպենդորֆ), ավտոմատ պիպետների հավաքածու համապատասխան ծայրակալներով,
- Սառցախցիկով կենտրոնախուսակ, սառնարան, ջերմապահարան, լամինար բոքս, թափահարիչ, խառնիչ (vortex), քարշիչ պահարան, լատեքսային կամ նիտրիլային ձեռնոցներ:

Փորձի ընթացքը

1. 12-14 ժամ հեղուկ սննդամիջավայրում նախապես աճեցված մանրէների կուլտուրայի 1.5-3 մլ կախույթը կենտրոնախուսել 10000

պտույտ/րոպե արագությամբ 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում 20 րոպե տևողությամբ և հեռացնել վերնստվածքը:

2. Բակտերիական նստվածքը լուծել 0.95 մլ աղային ԷԵՔՔ-ում, ավելացնել 100 մկլ 10% ՆԴՍ, խառնել սրվակը՝ շրջելով: Բջջիների ամբողջական լիզիսի համար խորհուրդ է տրվում ստացված կախույթը պարբերաբար խառնելով ինկուբացնել 60°C ջերմաստիճանային պայմաններում (մինչև 30 րոպե), ապա սառեցնել մինչև սենյակային ջերմաստիճան:

Ծանոթագրություն: *Լուծամզման ընթացքում ԴՆԹ-ի երկպարույր երկար մոլեկուլների մեխանիկական վնասվածքներից խուսափելու համար բոլոր խառնուրդները պետք է թափահարել առավելագույն զգուշությամբ: Ստորին և վերին շերտերը կարելի է խառնել թափահարմամբ միայն ոչ մեծ չափերի (10000 նգ-ից փոքր) ԴՆԹ-ի անջատման դեպքում:*

3. Ավելացնել 250 մկլ 5 Մ նատրիումի պերքլորատ (վերջնական կոնցենտրացիան 1 Մ): Ինկուբացնել սառույցի վրա 60 րոպե (խորհուրդ է տրվում, բայց պարտադիր չէ):

4. Ավելացնել 600 մկլ քլորոֆորմի և իզոամիլ սպիրտի խառնուրդ, խառնել այն՝ սրվակը դանդաղ ճոճելով 30 րոպե թափահարիչի վրա, մինչև նմուշի ապապրոտեինացումը, այսինքն՝ մինչև կիթի (եմուլսիայի) առաջացումը:

5. Կենտրոնախուսել 10000 պտույտ/րոպե արագությամբ 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում, 10 րոպե տևողությամբ, այնուհետև վերին հեղուկ շերտը տեղափոխել նոր սրվակների մեջ:

6. ԴՆԹ-ն նստեցնել 2 ծավալ 96% նախապես սառեցված էթանոլով, դանդաղ խառնել՝ սրվակը շրջելով 3-5 անգամ, ապա ինկուբացնել -20°C ջերմաստիճանային պայմաններում 30-60 րոպե (կամ 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում 8-12 ժամ): Նմուշը կենտրոնախուսել 15000 պտույտ/րոպե արագությամբ 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում 5-10 րոպե տևողությամբ: Զգուշությամբ հեռացնել վերնստվածքը, սրվակի հատակից և պատերից հեռացնել էթանոլի հետքերը, շրջել սրվակը և չորացնել ԴՆԹ-ի նստվածքը օդում:

7. ՌՆԹ-ից մասնակի մաքրված ԴՆԹ-ի պատրաստուկը լուծել 0.4 մլ ՏԷ բուֆերային լուծույթում (pH 8.0): Այս մաքրությամբ ԴՆԹ-ն կարելի է օգտագործել որպես կաղապար պոլիմերազային շղթայական ռեակցիայի

(ՊՇՌ) համար: ԴՆԹ-ի պատրաստուկը պահպանել 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում:

Օանդթագրություն: Ամբողջ ԴՆԹ-ն լուծելու նպատակով ՏԷ բուֆերային լուծույթով զգուշությամբ լվանալ սրվակի պատերը: ԴՆԹ-ի նստվածքի արդյունավետ լուծման համար նմուշը տաքացնել 37°C ջերմաստիճանային պայմաններում 5 րոպե:

8. Ավելացնել 20 մկլ ՌՆԱԳի լուծույթ, ապա նմուշը ինկուբացնել 37°C ջերմաստիճանային պայմաններում 30-60 րոպե: Խորհուրդ է տրվում նմուշին ՌՆԱԳի լուծույթը ավելացնելուց առաջ այն տաքացնել 10 րոպե եռացող ջրային բաղնիքում ԴՆԱԳի հետքային քանակության ապակտիվացման համար:

9. ԴՆԹ-ն ՌՆԹ-ի մնացորդներից տարանջատելու համար նմուշին ավելացնել ՏԷ բուֆերային լուծույթով հավասարակշռված 0.5 մլ ֆենոլ: Ավելացնել 0.5 մլ քլորոֆորմի և իզոամիլ սպիրտի խառնուրդ և սրվակը զգուշությամբ թափահարել մինչև կիթի առաջացումը:

Օանդթագրություն: Ֆենոլը բավական թունավոր միացություն է, որն առաջացնում է նյարդային համակարգի խանգարումներ: Դրա գոլորշիները և լուծույթը գրգռում են լորձաթաղանթները և մաշկը: Ֆենոլի հետ աշխատելիս անհրաժեշտ է դիմակ և ձեռնոցներ կրել, իսկ աշխատանքը կատարել քարշիչ պահարանում: Օգտագործված լուծույթները, որոնք ֆենոլ են պարունակում, անհրաժեշտ է լցնել թափոնների համար նախատեսված հերմետիկ փակվող հատուկ անոթների մեջ:

ՌՆԱԳով մշակելուց հետո ԴՆԹ-ի նստեցման համար երբեմն օգտագործվում է 5-13% պոլիէթիլենգլիկոլի լուծույթ (ինկուբացնել 20°C ջերմաստիճանային պայմաններում 10 րոպե, այնուհետև կենտրոնախուսել և նստվածքը լուծել 70% էթանոլի մեջ):

10. Նմուշը 3-5 րոպե կենտրոնախուսել 15000 պտույտ/րոպե արագությամբ սենյակային ջերմաստիճանի պայմաններում, և ավտոմատ պիպետով վերին՝ ԴՆԹ պարունակող հեղուկ շերտը զգուշությամբ տեղափոխել նոր սրվակի մեջ: Եթե ստորին ֆենոլային, միջանկյալ սպիտակուցային և վերին ԴՆԹ պարունակող հեղուկ շերտերը լավ չեն տարանջատվում, անհրաժեշտ է նմուշը կրկին կենտրոնախուսել 5 րոպե տևողությամբ:

11. ԴՆԹ-ն կրկին լուծանգել՝ ավելացնելով ԴՆԹ-ի նմուշի ծավալին համարժեք ծավալով քլորոֆորմի և իզոամիլ սպիրտի խառնուրդ, ապա կենտրոնախուսել 10000 պտույտ/րոպե 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում 10 րոպե տևողությամբ և վերին հեղուկ շերտը (≈ 0.4 մլ) տեղափոխել նոր սրվակի մեջ:

12. ԴՆԹ-ն նստեցնել՝ զգուշությամբ խառնելով 2 ծավալ 96% նախապես սառեցված էթանոլին: Ինկուբացնել -20°C ջերմաստիճանային պայմաններում 30-60 րոպե, մինչև նստվածքի առաջացումը:

13. Նմուշը կենտրոնախուսել 15000 պտույտ/րոպե արագությամբ 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում 5-10 րոպե տևողությամբ:

14. Զգուշությամբ հեռացնել վերնստվածքը, սրվակի հատակից և պատերից հեռացնել վերնստվածքի հետքերը ու, շրջելով բաց սրվակը, ԴՆԹ-ի նստվածքը չորացնել օդում 5-10 րոպեի ընթացքում:

Ծանոթագրություն: *Էթանոլի հետքերը հեռացնելու համար ստացված քրոմոսոմային ԴՆԹ-ի չորացնելը կարևոր փուլ է, քանի որ մնացորդային էթանոլն արգելակում է ԴՆԹ-ի հետ հետագա աշխատանքներում (օրինակ՝ ՊՇՌ-ի ընթացքում) օգտագործվող ֆերմենտները: Մյուս կողմից՝ պետք է խուսափել ԴՆԹ-ի նստվածքի գերչորացումից, ջրում կամ ՏԷ բուֆերում դրա դժվար լուծման պատճառով:*

15. Զգուշությամբ շրջելով սրվակը՝ ԴՆԹ-ի ստացված նստվածքը լուծել 100 մկլ ՏԷ բուֆերային լուծույթում (pH 8.0) կամ H₂O-ում: ԴՆԱզնեքի ապակտիվացման համար թույլատրվում է նմուշն ինկուբացնել 65°C ջերմաստիճանային պայմաններում 10 րոպե տևողությամբ: ԴՆԹ-ի պատրաստուկը պահպանել 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում:

Անջատված քրոմոսոմային ԴՆԹ-ի խտությունը պետք է չափել սպեկտրալուսաչափման մեթոդով (տե՛ս Առաջադրանք 3.1.1) և ստուգել այն 0.8% ազարոզային ժելում էլեկտրաֆորեզի եղանակով (տե՛ս Առաջադրանք 5.1.1):

Առաջադրանք 1.1.2. Բակտերիաներից քրոմոսոմային ԴՆԹ-ի անջատումը ցետիլեռմեթիլամոնիումային բրոմիդի (ՑԵԱԲ) կիրառմամբ

Գրամդրական բակտերիաների քրոմոսոմային ԴՆԹ-ի անջատման համար հարմար է կիրառել ՑԵԱԲ: ՑԵԱԲ-ը ցածր մոլյարությամբ աղային լուծույթում, կապվելով ԴՆԹ-ի հետ, առաջացնում է անլուծելի համալիրներ: Այս պայմաններում բազմաշաքարները, ֆենոլային միացությունները և այլ հավելանյութեր մնում են վերնստվածքում, մինչդեռ ԴՆԹ-ի համալիրները կենտրոնախուսելիս նստում են: ՑԵԱԲ/ԴՆԹ համալիրները կարելի է լուծել բարձրացնելով աղի խտությունը: ԴՆԹ-ի մաքրման և նստեցման մնացած բոլոր քայլերն էապես չեն տարբերվում վերը նշված Մառմուրի մեթոդից:

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ մանրէների կուլտուրա, լուծույթներ, սարքեր և պարագաներ՝

- 12-14 ժամ նախապես աճեցված *Bacillus subtilis* A1 շտամի կախույթ,
- Տէ բուֆերային լուծույթ,
- Լիզոցիմի լուծույթ (100 մգ/մլ),
- ՌՆազի լուծույթ (10 մգ/մլ),
- Պրոտեինազ-K-ի լուծույթ (20 մգ/մլ)
- ՆԴՄ 10% (զանգված/ծավալ) լուծույթ,
- NaCl-ի լուծույթ (5 Մ),
- ՑԵԱԲ/NaCl խառնուրդ (պատրաստումը տե՛ս հավելված 1-ում),
- Քլորոֆորմի և իզոամիլ սպիրտի (24:1) խառնուրդ,
- Իզոպրոպանոլ,
- 70% էթանոլ,
- 1.5-2 մլ տարողությամբ կենտրոնախուսման սրվակներ (Էպենդորֆ), ավտոմատ պիպետների հավաքածու համապատասխան ծայրակալներով,
- Մառցախցիկով կենտրոնախուսակ, սառնարան, ջերմապահարան, լամինար բոքս, քարշիչ պահարան, թափահարիչ, խառնիչ, լատեքսային կամ նիտրիլային ձեռնոցներ:

Փորձի ընթացքը

1. 12-14 ժամ հեղուկ սննդամիջավայրում նախապես աճեցված մանրէների կուլտուրայի 1.5-3 մլ կախույթը կենտրոնախուսել 10000 պտույտ/րոպե արագությամբ 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում 5 րոպե տևողությամբ և հեռացնել վերնստվածքը:

2. Նստվածքը վերակախութացնել 500 մլլ ՏԷ բուֆերում, ավելացնել 100 մլլ լիզոցիմի լուծույթ, ինկուբացնել 30 րոպե սենյակային ջերմաստիճանում:

3. Ավելացնել 1 մլլ ՌՆագ, 20 մլլ պրոտեինագ-K, 100 մլլ ՆԴՍ և ինկուբացնել 1 ժամ 55°C ջերմաստիճանային պայմաններում:

4. Ավելացնել 100 մլլ 5 Մ NaCl-ի լուծույթ և լավ խառնել:

5. Ավելացնել 80 մլլ ՑԵԱԲ/NaCl խառնուրդ, ինկուբացնել 20 րոպե 65°C ջերմաստիճանային պայմաններում:

Ծանոթագրություն: ՑԵԱԲ/NaCl խառնուրդը օգտագործելուց առաջ տաքացնել 65°C ջերմաստիճանային պայմաններում 20 րոպե:

6. Ավելացնել 785 մլլ քլորոֆորմ-իզոամիլ սպիրտի (24:1) խառնուրդ, կենտրոնախուսել 5 րոպե 15000 պտույտ/րոպե արագությամբ:

7. Տեղափոխել վերնստվածքը մաքուր սրվակի մեջ (տեղափոխվող լուծույթը չպետք է մածուցիկ լինի):

8. Ավելացնել -20°C ջերմաստիճանային պայմաններում նախապես սառեցված 1 ծավալ իզոպրոպանոլ, ինկուբացնել սառույցի վրա 15-30 րոպե կամ սառնարանում (4°C) 1 ժամ տևողությամբ, կենտրոնախուսել 15 րոպե 15000 պտույտ/րոպե արագությամբ:

Ծանոթագրություն: Երկարատև ինկուբացիան սառը պայմաններում նպաստում է ԴՆԹ-ի ավելի արդյունավետ նստեցմանը:

9. Վերնստվածքը հեռացնել, նստվածքը լվանալ 1 մլ 70% էթանոլով, կենտրոնախուսել 15 րոպե 15000 պտույտ/րոպե արագությամբ:

10. Վերնստվածքը հեռացնել և չորացնել 5-10 րոպե 37°C ջերմաստիճանային պայմաններում:

11. ԴՆԹ-ն լուծել 20 մլլ ՏԷ բուֆերում:

12. Անջատված քրոմոսոմային ԴՆԹ-ի խտությունը պետք է չափել սպեկտրալուսաչափման մեթոդով (տե՛ս Առաջադրանք 3.1.1) և ստուգել այն 0.8% ազարոզային ժելում էլեկտրաֆորեզի եղանակով (տե՛ս Առաջադրանք 5.1.1):

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 1.2. ՊԼԱՋՄԻԴԱՅԻՆ ԴՆԹ-Ի ԱՆՋԱՏՈՒՄԸ

Պլազմիդային ԴՆԹ-ի անջատման համար կիրառվում են արագ և համապարփակ մի շարք մեթոդներ, որոնք բոլորն էլ ընթանում են երեք հիմնական փուլերով՝ բակտերիաների աճ և պլազմիդի ամպլիֆիկացում բջջում, բակտերիական կենսազանգվածի ստացում և բջիջների լիզիս, պլազմիդային ԴՆԹ-ի մաքրում: Պլազմիդային ԴՆԹ-ի մաքրումը հիմնված է քրոմոսոմային և պլազմիդային ԴՆԹ-ների միջև եղած երկու հիմնական տարբերությունների վրա՝

1. բակտերիաների քրոմոսոմային ԴՆԹ-ն չափերով բազմակի անգամ գերազանցում է պլազմիդային ԴՆԹ-ին,

2. քրոմոսոմային ԴՆԹ-ի հիմնական զանգվածն անջատվում է գծային մոլեկուլների տեսքով այն դեպքում, երբ պլազմիդային ԴՆԹ-ն մաքրման ընթացքում անջատվում է կովալենտ փակված օղակաձև մոլեկուլի տեսքով:

Պլազմիդային ԴՆԹ-ի անջատման և մաքրման մեթոդները ներառում են նստեցման փուլ, որի ընթացքում պատրաստուկից հեռացվում են քրոմոսոմային ԴՆԹ-ի երկար շղթաները: Այդ ընթացքում տեղի է ունենում քրոմոսոմային ԴՆԹ-ի մոլեկուլների ջրածնային կապերի խզում (տաքացնելիս կամ հիմնային միջավայրում ($\text{pH } 12.5$) մշակելիս), այն դեպքում, երբ պլազմիդային ԴՆԹ-ի կովալենտ կապերով փակված օղակաձև մոլեկուլները մնում են անվնաս: Սառեցման կամ pH -ի չեզոքացման պայմաններում պլազմիդային ԴՆԹ-ն վերականգնում է իրեն բնորոշ օղակաձև տեսքը (ռենատուրացվում է), իսկ քրոմոսոմային ԴՆԹ-ի մոլեկուլները անդարձելի բնափոխվում են: Բարձր խտությամբ աղերի (օրինակ՝ ամոնիումի քացախաթթու) ավելացման պայմաններում ռիբոսոմային ՌՆԹ-ի միաշղթա մոլեկուլները առաջացնում են չլուծվող համալիրներ: Ներմոլեկուլային երկպարույր հատվածների առաջացման հաշվին փՌՆԹ-ն մնում է լուծված: Դրանից ազատվելու համար պլազմիդային ԴՆԹ-ի պատրաստուկը պետք է լրացուցիչ մշակել ՌՆԱզով:

Առաջադրանք 1.2.1. Պլազմիդային ԴՆԹ-ի անջատումը հիմնային լիզիսի մեթոդով

Տվյալ մեթոդը ներառում է հիմքով կամ ՆԴՄ-ով բակտերիական բջիջների լիզիսը: Սա մոլեկուլային կենսաբանության փորձերում օգտագործվող պլազմիդային ԴՆԹ-ի անջատման ամենատարածված մեթոդն է:

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ մանրէների կուլտուրա, լուծույթներ, սարքեր և պարագաներ՝

- *E. coli* DH5α-pUC18 ամպիցիլին կայուն շտամ,
- Ամպիցիլին պարունակող Լուրիա Բերտանի (ԼԲ) մանրէազերծված սննդամիջավայր (պատրաստումը տես հավելված 1-ում),
- Լիզոցիմի լուծույթ (2-5 մգ/մլ),
- Լուծույթ I՝ տրիսպլուկոզ-ԷԵՔՔ (ՏԳԷ) բուֆերային լուծույթ (պատրաստումը տես հավելված 1-ում)
- Լուծույթ II՝ ՆԴՄ 1% լուծույթ 0.2 Մ NaOH-ում,
- Լուծույթ III՝ 3 Մ կալիումի քացախաթթու,
- ՏԷ բուֆերային լուծույթ,
- Ֆենոլ,
- Քլորոֆորմ,
- 96% և 70% էթանոլ,
- 1.5-2 մլ տարողությամբ կենտրոնախուսման սրվակներ (Էպենդորֆ), ավտոմատ պիպետների հավաքածու համապատասխան ծայրակալներով,
- Սառցախցիկով կենտրոնախուսակ, սառնարան, ջերմապահարան, լամինար բոքս, քարշիչ պահարան, խառնիչ, լատեքսային կամ նիտրիլային ձեռնոցներ:

Փորձի ընթացքը

1. *E. coli* DH5α-pUC18 շտամն աճեցնել ակտիվ թափահարմամբ (200-300 պտույտ/րոպե) 37°C ջերմաստիճանային պայմաններում 8-16 ժամվա ընթացքում ամպիցիլին պարունակող ԼԲ սննդամիջավայրում:

Ծանոթագրություն: *Խորհուրդ է տրվում E. coli-ի կուլտուրան, որից նախատեսվում է անջատել պլազմիդային ԴՆԹ, աճեցնել մինչև աճի ուշ լոգարիթմական փուլ (ՕԽ 600≈0.6), քանի որ բջիջների խտության բարձրացմանը զուգընթաց՝ պլազմիդի կրկնապատկման արագությունը ընկնում է:*

2. 1.5 մլ մանրէային կախույթը տեղափոխել կենտրոնախուսման համար նախատեսված սրվակի մեջ և կենտրոնախուսել 10000 պտույտ/րոպե արագությամբ 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում 5 րոպե տևողությամբ, ապա զգուշությամբ հեռացնել վերնստվածքը:

3. Բջիջների նստվածքը լուծել լիզոցիմ պարունակող 100 մկլ SԳԷ սառեցված բուֆերային լուծույթում (լուծույթ I), թափահարել, ապա ինկուբացնել սենյակային ջերմաստիճանում 5-10 րոպե:

4. Ավելացնել 200 մկլ թարմ պատրաստված լուծույթ II (ջերմաստիճանը սենյակային), անմիջապես առանց թափահարելու, խառնել պարունակությունը՝ սրվակը զգուշությամբ շրջելով 3-5 անգամ: Սրվակը տեղադրել սառույցի մեջ 5 րոպե (կամ մինչև մածուցիկ և թափանցիկ լուծամզվածքի առաջացումը):

Ծանոթագրություն: *Լուծույթը պետք է պատրաստել անմիջապես փորձից առաջ, բայց այն կարելի է պահպանել սենյակային ջերմաստիճանում (նստվածքի առաջացման դեպքում լուծույթը տաքացնել 50°C պայմաններում) ամուր փակված սրվակում:*

5. Ավելացնել 150 մկլ սառեցված լուծույթ III, խառնել՝ սրվակը շրջելով և զգուշությամբ թափահարել՝ մինչև մածուցիկության անհետացումը և նստվածքի սպիտակ փաթիլների (քրոմոսոմային ԴՆԹ – սպիտակուցներ - ՆԴՄ համալիրների) առաջացումը: Սրվակը տեղադրել սառույցի վրա 10-15 րոպե (3 րոպե պարբերությամբ խառնել լուծույթը՝ շրջելով սրվակը):

6. Կենտրոնախուսել 15000 պտույտ/րոպե արագությամբ 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում 10-15 րոպե տևողությամբ:

7. Պլազմիդային ԴՆԹ պարունակող կիսաթափանց վերնստվածքը (≈450 մկլ) տեղափոխել նոր սրվակի մեջ:

8. Ավելացնել 1 ծավալ (450 մլ) ֆենոլի և քլորոֆորմի (1:1 pH 7.8-8.0) խառնուրդ, սրվակը զգուշությամբ շրջելով խառնել լուծույթը՝ մինչև կիթի

առաջացումը: Կենտրոնախուսել 15000 պտույտ/րոպե արագությամբ 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում 10 րոպե տևողությամբ: Վերին հեղուկ շերտը (նուկլեինաթթու պարունակող) տեղափոխել նոր կենտրոնախուսման սրվակի մեջ՝ խուսափելով սահմանային կամ ֆենոլային շերտերից այլ նյութերի տեղափոխումից:

9. Ավելացնել հավասար ծավալով (450 մլ) քլորոֆորմ, կենտրոնախուսել 15000 պտույտ/րոպե արագությամբ 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում 10 րոպե տևողությամբ: Ստացված վերնստվածքը տեղափոխել նոր սրվակի մեջ:

10. Պլազմիդային ԴՆԹ-ի նստեցման համար ավելացնել սառեցված 2 ծավալ (900 մլ) 96%-ոց էթանոլ, թափահարելով լավ խառնել և խառնուրդը ինկուբացնել -20°C ջերմաստիճանային պայմաններում մինչև 1 ժամ:

11. Կենտրոնախուսել 15000 պտույտ/րոպե արագությամբ 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում 10 րոպե տևողությամբ: Զգուշությամբ հեռացնել վերնստվածքը:

12. Նստվածքը լվանալ 1մլ 70%-ոց էթանոլով, թափահարել և կենտրոնախուսել 15000 պտույտ/րոպե արագությամբ 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում 10 րոպե տևողությամբ:

Ծանոթագրություն: *Խորհուրդ է տրվում ֆենոլի և քլորոֆորմի հետքերից ձերբազատվելու համար պլազմիդային ԴՆԹ-ի նստվածքը եռակի լվանալ 70%-ոց էթանոլով:*

13. Հեռացնել վերնստվածքը, իսկ նստվածքը չորացնել օդում 20 րոպե:

14. Նստվածքը լուծել 50 մլլ ՏԷ բուֆերային լուծույթում կամ ջրում և պահպանել 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում:

15. Անջատված պլազմիդային ԴՆԹ-ի խտությունը պետք է չափել սպեկտրալուսաչափման մեթոդով (տես Առաջադրանք 3.1.1) և ստուգել այն 0.8% ագարոզային ժելում էլեկտրաֆորեզի եղանակով (տես՝ Առաջադրանք 5.1.1):

Առաջադրանք 1.2.2. Պլազմիդային ԴՆԹ-ի անջատումը ՆԴՄ-ի կիրառմամբ

Պլազմիդային ԴՆԹ-ի անջատման այս մեթոդը կիրառվում է մեծ չափերով (>10000 նգ) պլազմիդների անջատման դեպքում:

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ մանրէների կուլտուրա, լուծույթներ, սարքեր և պարագաներ՝

- *E. coli* DH5 α -pUC18 ամպլիցիլին կայուն շտամ,
- Ամպլիցիլին պարունակող ԼԲ մանրէազերծված սննդամիջավայր (պատրաստումը տես հավելված 1-ում),
- Տրիս-սախարոզային բուֆերային լուծույթ հետևյալ բաղադրությամբ՝ 10% սախարոզ, 50 մՄ տրիս-HCl (pH 8.0),
- Լիզոցիմի լուծույթ (10 մգ/մլ՝ 250 մՄ տրիս-HCl-ում, pH 8.0): Լուծույթը պատրաստել անմիջապես փորձից առաջ,
- 0.25 Մ ԷԵՔՔ,
- ՆԴՄ-ի 10% լուծույթ,
- 5 Մ NaCl-ի լուծույթ,
- Ֆենոլի, քլորոֆորմի և իզոամիլ սպիրտի (25:24:1) խառնուրդ,
- Քլորոֆորմ,
- 96% և 70% էթանոլ,
- ՏԷ բուֆերային լուծույթ (pH 8.0) (պատրաստումը տես հավելված 1-ում),
- 1.5-2 մլ տարողությամբ կենտրոնախուսման սրվակներ (Էպենդորֆ), ավտոմատ պիպետների հավաքածու համապատասխան ծայրակալներով,
- Սառցախցիկով կենտրոնախուսակ, սառնարան, ջերմապահարան, լամինար բոքս, քարշիչ պահարան, թափահարիչ, խառնիչ, լատեքսային կամ նիտրիլային ձեռնոցներ:

Փորձի ընթացքը

1. *E. coli* DH5 α -pUC18 շտամն աճեցնել ակտիվ թափահարմամբ (200-300 պտույտ/րոպե) 37°C ջերմաստիճանային պայմաններում 8-16 ժամվա ընթացքում ամպիցիլին պարունակող ԼԲ սննդամիջավայրում:

2. 1.5 մլ մանրէային կախույթը տեղափոխել կենտրոնախուսման համար նախատեսված սրվակի մեջ և կենտրոնախուսել 10000 պտույտ/-րոպե արագությամբ 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում 5 րոպե տևողությամբ, ապա զգուշությամբ հեռացնել վերնաստվածքը:

3. Բջջիջների նստվածքը լուծել 200 մկլ սառեցված տրիս-սախարոզային բուֆերային լուծույթում և ավելացնել 40 մկլ թարմ պատրաստված լիզոցիմին լուծույթ:

4. Ավելացնել 160 մկլ 0.25 Մ ԷԵՔՔ, խառնել լուծույթը՝ սրվակը մի քանի անգամ շրջելով և ինկուբացնել սառույցի վրա 10 րոպե:

5. Ավելացնել 80 մկլ 10% ՆԴՄ և զգուշությամբ խառնել կախույթը:

6. Ավելացնել 120 մկլ 5 Մ NaCl, ապա զգուշությամբ խառնել՝ ինկուբացնելով սառույցի վրա 1-1.5 ժամ:

7. Կենտրոնախուսել 15000 պտույտ/րոպե արագությամբ 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում 20-30 րոպե:

8. Վերնաստվածքը կրկնակի լուծամզել ֆենոլի, քլորոֆորմի և իզոամիլ սպիրտի խառնուրդով, ապա մեկ անգամ՝ քլորոֆորմով կենտրոնախուսել 15000 պտույտ/րոպե արագությամբ 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում, 5-10 րոպե: Յուրաքանչյուր լուծամզումից հետո վերին հեղուկ շերտը զգուշությամբ տեղափոխել նոր սրվակի մեջ:

9. Հեղուկ շերտին ($\approx$ 600 մկլ) ավելացնել 2 ծավալ (1.2 մլ) 96% էթանոլ: Ստացված լուծույթը լավ խառնել՝ շրջելով սրվակը, և թողնել 1.5-2 ժամ -20°C ջերմաստիճանային պայմաններում:

10. Կենտրոնախուսել 15000 պտույտ/րոպե արագությամբ 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում 10-15 րոպե տևողությամբ:

11. Զգուշությամբ հեռացնել վերնաստվածքը, իսկ նստվածքը լվանալ 70% էթանոլով՝ սենյակային ջերմաստիճանում: Կրկին կենտրոնախուսել, հեռացնել էթանոլը և նստվածքը չորացնել օդում 10 րոպե:

12. Նստվածքը լուծել 50-100 մկլ SE բուֆերային լուծույթում (pH 8.0): Պահպանել սառույցի վրա կամ -20°C-ում:

13. Անջատված պլազմիդային ԴՆԹ-ի խտությունը պետք է չափել սպեկտրալուսաչափման մեթոդով (տես Առաջադրանք 3.1.1) և ստուգել այն 0.8% ազարոզային ժելում էլեկտրաֆորեզի եղանակով (տե՛ս Առաջադրանք 5.1.1):

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 1.3. ԲԱԿՏԵՐԻԱԿԱՆ ԲՁՁԻՑ ՀԱՆՐԱԳՈՒՄԱՐԱՅԻՆ ՌՆԹ-Ի ԱՆՋԱՏՈՒՄԸ

ՌՆԹ-ի անջատումն անհրաժեշտ գործընթաց է, մասնավորապես, գեների արտահայտման (էքսպրեսիայի) ուսումնասիրություններում: Լայն տարածված մեթոդները, ինչպիսիք են՝ հետադարձ տրանսկրիպցիայով ՊՇՌ-ն, հիբրիդացումը, *in vitro* տրանսլյացիան, պահանջում են ուսումնասիրվող մանրէային բջիջներից բնականոն ՌՆԹ-ի նախնական ստացում: ՌՆԹ-ն տարանջատում են ԴՆԹ-ից՝ շնորհիվ սպիրտային լուծույթներում դրանց տարբեր լուծելիության: ՌՆԹ-ի մոլեկուլները քիմիապես անկայուն են և միջավայրում առկա ՌՆԱզներով հեշտությամբ քայքայվում են: Այդ պատճառով ՌՆԹ-ի անջատման համար անհրաժեշտ է օգտագործել կրկնակի մանրէազերծված աշխատանքային լուծույթներ, իսկ ՌՆԹ-ի պատրաստուկները պետք է լուծել նախապես մանրէազերծված 0.1% երկէթիլպիրոկարբոնաթթու (ԵԷՊԿ) պարունակող ջրում:

Առաջադրանք 1.3.1. Հանրագումարային ՌՆԹ-ի անջատումը թթու ֆենոլով

Մեթոդը հիմնված է թույլ թթվային pH-ի (5.5) պայմաններում ֆենոլով ԴՆԹ-ի լուծամզման վրա: Թթու ֆենոլով նուկլեինաթթուների լուծամզման ընթացքում առաջանում է համասեռ լուծույթ, ապա սպիրտակուցը տարանջատվում է քլորոֆորմի ավելացմամբ: Հարկ է նշել, որ լուծույթից ՌՆԹ-ի նստեցման համար պահանջվում է ավելի խիտ էթանոլ, քան ԴՆԹ-ի նստեցման համար:

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ մանրէների կուլտուրա, լուծույթներ, սարքեր և պարագաներ՝

- 12-14 ժամ աճեցված *E. coli* M17 շտամի կուլտուրա,
- ՏԷ-աղային բուֆերային լուծույթ (պատրաստումը տե՛ս հավելված 1-ում),
- Լիզիսի համար նախատեսված բուֆերային լուծույթ՝ 20-30 մՄ նատրիումի քացախաթթու (pH 5.5), 2-10 մՄ Na₂ԷԵՔՔ, 0.5-1.5% ՆԴՍ (զանգված/ծավալ): Պահպանել 4°C-ում,
- Թթու ֆենոլ (պատրաստումը տե՛ս հավելված 1-ում),
- Չեզոք ֆենոլ (պատրաստումը տե՛ս հավելված 1-ում),
- Քլորոֆորմի և իզոամիլ սպիրտի (24:1) խառնուրդ,
- 96% և 70% էթանոլ,
- Նատրիումի քացախաթթվի 3 Մ լուծույթ (pH 5.2),
- ԵԷՊԿ-ով մշակված մանրէազերծ կրկնակի թորած ջուր (պատրաստումը տես հավելված 1-ում),
- 1.5-2 մլ տարողությամբ կենտրոնախուսման սրվակներ (Էպենդորֆ), ավտոմատ պիպետների հավաքածու համապատասխան ծայրակալներով,
- Սառցախցիկով կենտրոնախուսակ, սառնարան, ջերմապահարան, խառնիչ, լամինար բոքս, քարշիչ պահարան, լատեքսային կամ նիտրիլային ձեռնոցներ:

Փորձի ընթացքը

1. Մինչև էքսպոնենցիալ միջին փուլ աճեցված 1-3 մլ մանրէային կախույթը կենտրոնախուսել 10000 պտույտ/րոպե արագությամբ 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում 5-10 րոպե տևողությամբ: Կենտրոնախուսման սրվակները նախապես սառեցնել սառույցի վրա:

2. Բջջային նստվածքը լուծել սառեցված 500 մկլ ՏԷ-աղային բուֆերային լուծույթում:

3. Կենտրոնախուսել 15000 պտույտ/րոպե արագությամբ 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում 5 րոպե:

4. Բջջային նստվածքը լուծել 250 մկլ լիզիտի համար նախատեսված բուֆերային լուծույթում, ապա ավելացնել 250 մկլ թթու ֆենոլ (ՆԴՄ-ը և ֆենոլը արգելակում են ՌՆԱզները):

5. Լուծույթը զգուշությամբ խառնել՝ սրվակը 5 անգամ շրջելով, և բջիջների քայքայման համար անմիջապես ինկուբացնել 60-65°C պայմաններում 5-15 րոպե:

6. Կենտրոնախուսել 15000 պտույտ/րոպե արագությամբ 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում 15 րոպե:

7. Վերին հեղուկ շերտը (≈ 650 մկլ) զգուշությամբ տեղափոխել նոր սրվակի մեջ և ավելացնել չեզոք ֆենոլի 500 մկլ:

8. Զգուշությամբ խառնել և կենտրոնախուսել 15000 պտույտ/րոպե արագությամբ 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում 10 րոպե:

9. Վերին հեղուկ շերտը (≈ 550 մկլ) տեղափոխել նոր սրվակի մեջ և ավելացնել 500 մկլ քլորոֆորմի և իզոամիլ սպիրտի (24:1) խառնուրդ:

10. Զգուշությամբ խառնել և կենտրոնախուսել 15000 պտույտ/րոպե արագությամբ 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում 5 րոպե:

11. Վերին հեղուկ շերտը (≈ 450 մկլ) տեղափոխել նոր սրվակի մեջ: ՌՆԹ-ի նստեցման և օրգանական լուծիչների մնացորդներից մաքրման նպատակով ավելացնել 1 մլ (2 ծավալ) 96% էթանոլ և 50 մկլ (1/10 ծավալ) 3 Մ նատրիումի քացախաթթու (pH 5.2): Լավ խառնել խառնիչով:

12. ՌՆԹ-ի նստեցումը էթանոլով իրականացնել -20°C պայմաններում 24 ժամ կամ -80°C ջերմաստիճանային պայմաններում 30-60 րոպե:

13. Կենտրոնախուսել 15000 պտույտ/րոպե արագությամբ 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում 15 րոպե:

14. Վերնստվածքը հեռացնել, իսկ ՌՆԹ պարունակող նստվածքը աղերից լվանալ 1 մլ 70% էթանոլով սենյակային ջերմաստիճանում:

15. Կենտրոնախուսել 15000 պտույտ/րոպե արագությամբ 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում 5 րոպե տևողությամբ:

16. Կրկին կենտրոնախուսել (1 րոպե) և հեռացնել էթանոլի հետքերը:

17. Նստվածքը չորացնել օդում կամ վակուումային պահարանում-10 րոպե:

18. ՌՆԹ-ի նստվածքը լուծել 100 մկլ ԵԷՊԿ-ով մշակված մանրէազերծ կրկնակի թորած ջրում: Պահպանել -80°C ջերմաստիճանային պայ-

մաններում: Անջատված ՌՆԹ-ի խտությունը պետք է չափել սպեկտրալուսաչափման մեթոդով (տե՛ս Առաջադրանք 3.1.1) և ստուգել այն 0.8% ազարոզային ժելում էլեկտրաֆորեզի եղանակով (տե՛ս Առաջադրանք 5.1.1):

ԹԵՄԱ 2
ՆՈՒԿԼԵԻՆԱԹԹՈՒՆԵՐԻ ԱՆՋԱՏՈՒՄԸ ԲՆԱԿԱՆ
ՆՄՈՒՇՆԵՐԻՑ

Վերջին տասնամյակներում մոլեկուլային կենսաբանության մեթոդները լայնորեն կիրառվում են բնական նմուշներում մանրէների հայտնաբերման համար: Բնական նմուշներից նուկլեինաթթուների անջատումը և վերլուծությունը թույլ են տալիս վերծանել տարբեր էկոհամակարգերում մանրէների, այդ թվում դեռևս չկուլտիվացված տեսակների բազմազանությունը:

Բնական նմուշներից հանրագումարային ԴՆԹ-ի (կամ ՌՆԹ-ի) վերլուծությամբ կարելի է ուսումնասիրել մանրէային համակեցության առանձին թիրախային գեների առկայությունը, ֆիզիկաքիմիական գործոնների կամ սննդանյութերի ազդեցությունը համակեցության մանրէային կազմի վրա, ինչպես նաև մանրէների բազմազանությունը՝ 16S/18S կամ 23S/28S ռՌՆԹ-ների գեների հաջորդականությունների վերլուծությամբ:

Մշակվել են մի քանի պարզ և ճեպընթաց մեթոդներ նստվածքների, հողերի և ջրային նմուշներից հանրագումարային ԴՆԹ-ի (կամ ՌՆԹ-ի) անջատման համար, որոնք ապահովում են նուկլեինաթթուների բարձր ելք նմուշի փոքր ծավալից: Հանրագումարային ԴՆԹ-ի (կամ ՌՆԹ-ի) անջատման համար մեթոդի, ինչպես նաև դրա իրականացման փուլերի ընտրությունը կախված է բնական նմուշի տեսակից և կազմից: Հաճախ մեթոդը ձևափոփովում կամ բարելավվում է որոշակի նմուշներից հանրագումարային նուկլեինաթթուների անջատման համար:

Բնական նմուշներից նուկլեինաթթուների անջատման գործընթացում խոչընդոտ է նմուշներում որոշակի նույթերի առկայությունը, օրինակ՝ հողում հումինային միացությունների պարունակությունը, որոնք ֆերմենտային արգելակիչներ են: Բացի այդ, բնական նմուշներում մանրէային բջիջների փոքր քանակությունը (հետևաբար հանրագումարային ԴՆԹ-ի կամ ՌՆԹ-ի քիչ քանակությունը) ևս կարող է խոչընդոտել նուկլեինաթթուների անջատմանը:

Բնական նմուշներից նուկլեինաթթուների անջատումը իրականացվում է երկու հիմնական մեթոդներով՝ 1. բնական նմուշներից մանրէային

բջիջների տարանջատման և խտացման, հետագայում դրանց լիզիսով նուկլեինաթթուների անջատման և մաքրման մեթոդ, 2. անմիջապես բնական նմուշներից նուկլեինաթթուների անջատման և հաջորդիվ խառնուրդներից դրանց մաքրման մեթոդ:

Առաջինը՝ բնական նմուշներից մանրէների բջիջների տարանջատմամբ և ապա նուկլեինաթթուների անջատման մեթոդը, ավելի երկարատև և աշխատատար է, քան դրանց անմիջական անջատումը նմուշից, չնայած այդ դեպքում բացառվում է հոդային կոլոիդների մակակլանված ազատ նուկլեինաթթուների առկայությունը պատրաստուկում: Անմիջապես բնական նմուշներից անջատված նուկլեինաթթվային պատրաստուկները պարունակում են մեծ քանակությամբ կոդմնակի նյութեր և պահանջում են հետագա մաքրում: Բացի այդ, պատրաստուկում չի բացառվում էուկարիոտային (նախակենդանիների, սնկերի և ջիրիմուռների) ԴՆԹ-ի կամ ՌՆԹ-ի առկայությունը:

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 2.1. ՀԱՆՐԱԳՈՒՄԱՐՍՅԻՆ ԴՆԹ-Ի ԱՆՋԱՏՈՒՄԸ ԲՆԱԿԱՆ ՆՍՈՒՇՆԵՐԻՑ

Առաջադրանք 2.1.1. Հոդային նմուշից գումարային ԴՆԹ-ի անջատումը ՑԵԱԲ-ի կիրառմամբ

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ լուծույթներ, սարքեր և պարագաներ՝

- Հոդային նմուշ,
- Լիզիսի համար նախատեսված բուֆերային լուծույթ (400 մՄ NaCl, 750 մՄ սախարոզ, 20 մՄ ԷԵՔՔ, 50 մՄ Տրիս-HCl (pH 9)),
- Լիզոցիմի լուծույթ (100 մգ/մլ),
- ՌՆազի լուծույթ (10 մգ/մլ),
- Պրոտեինազ-K-ի լուծույթ (20 մգ/մլ),
- 10% ՆԴՄ-ի լուծույթ,
- NaCl-ի լուծույթ (5 Մ),
- ՑԵԱԲ/NaCl խառնուրդ (պատրաստումը տես հավելված 1-ում),

- Քլորոֆորմի և իզոամիլ սպիրտի (24:1) խառնուրդ,
- Իզոպրոպանոլ,
- 70% էթանոլ,
- Տէ բուֆերային լուծույթ (pH 8.0) (պատրաստումը տե՛ս հավելված 1-ում),
- 15 մլ տարողությամբ սրվակներ, 1.5-2 մլ տարողությամբ կենտրոնախուսման սրվակներ (Էպենդորֆ), ավտոմատ պիպետների հավաքածու համապատասխան ծայրակալներով,
- Սառցախցիկով կենտրոնախուսակ, սառնարան, ջերմապահարան, խառնիչ, լամինար բոքս, քարշիչ պահարան, լատեքսային կամ նիտրիլային ձեռնոցներ:

Փորձի ընթացքը

1. 0.5 գ հողային նմուշին ավելացնել 3 մլ լիզիսի համար նախատեսված բուֆերային լուծույթ և ինկուբացնել սենյակային ջերմաստիճանում 3 ժամվա ընթացքում: Այնուհետև նմուշը սառեցնել -80°C ջերմաստիճանային պայմաններում, 8 ժամ:

2. Սառեցված նմուշը տեղափոխել ջերմապահարան՝ 55°C ջերմաստիճանային պայմաններում 30 րոպե:

3. Ստացված հողային կախույթից 600 մկլ տեղափոխել 2 մլ տարողությամբ կենտրոնախուսման սրվակներ, ավելացնել 100 մկլ լիզոցիմի լուծույթ և ինկուբացնել 30 րոպե 37°C ջերմաստիճանային պայմաններում՝ անընդմեջ թափահարմամբ:

4. Փորձի ընթացքը շարունակել այնպես, ինչպես նկարագրված է Աշխատանք 1.1, առաջադրանք 1.1.2.-ում (3-րդ փուլից սկսած):

Առաջադրանք 2.1.2. Ջրային նմուշից գումարային ԴՆԹ-ի անջատումը ՑԵԱԲ-ի կիրառմամբ

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ լուծույթներ, սարքեր և պարագաներ՝

- 1 լ բաց ջրամբարի ջրային նմուշ,
- 0.22 մկմ տրամագծով թաղանթային ֆիլտրեր,
- Ջեյտցի ֆիլտր՝ կցված վակուումային պոմպին,
- Լիզիսի համար նախատեսված բուֆերային լուծույթ ((400 մՄ NaCl, 750 մՄ սախարոզ, 20 մՄ էԵՔՔ, 50 մՄ Տրիս HCl (pH 9)),
- Լիզոցիմի լուծույթ (100 մգ/մլ),
- ՌՆազի լուծույթ (10 մգ/մլ),
- Պրոտեինազ-K-ի լուծույթ (20 մգ/մլ),
- 10% ՆԴՄ-ի լուծույթ,
- NaCl-ի լուծույթ (5 Մ),
- ՑԵԱԲ/NaCl խառնուրդ (պատրաստումը տե՛ս հավելված 1-ում),
- Քլորոֆորմի և իզոամիլ սպիրտի (24:1) խառնուրդ,
- Իզոպրոպանոլ,
- 70% էթանոլ,
- ՏԷ բուֆերային լուծույթ (pH 8.0) (պատրաստումը տե՛ս հավելված 1-ում),
- 15 մլ տարողությամբ սրվակներ, 1.5-2 մլ տարողությամբ կենտրոնախուսման սրվակներ (Էպենդորֆ), ավտոմատ պիպետների հավաքածու՝ համապատասխան ծայրակալներով, ունելի,
- Սառցախցիկով կենտրոնախուսակ, սառնարան, ջերմապահարան, խառնիչ, լամինար բոքս, քարշիչ պահարան, լատեքսային կամ նիտրիլային ձեռնոցներ:

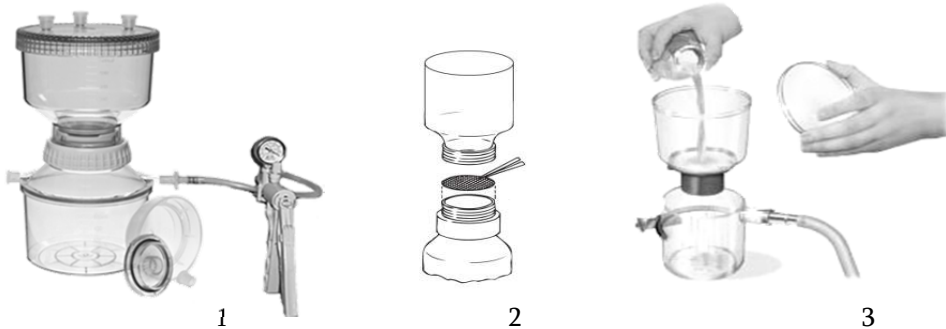
Փորձի ընթացքը

1. Մանրէագերծ թաղանթային ֆիլտրերն ընկղմել ՏԷ բուֆերային լուծույթի մեջ և թողնուլ 15 րոպե, որից հետո հավաքել Ջեյտցի ֆիլտրման համակարգը (տե՛ս նկար 2):

2. 1լ բաց ջրամբարի ջրային նմուշը ֆիլտրել, այնուհետև կենսազանգվածով թաղանթային ֆիլտրը տեղափոխել մանրէազերծ սրվակի մեջ, ավելացնել 1 մլ լիզիսի համար նախատեսված բուֆերային լուծույթ և ուժգին թափահարել խառնիչով:

3. Ստացված կախույթից 500 մլլ տեղափոխել 2 մլ տարողությամբ կենտրոնախուսման սրվակներ, ավելացնել 100 մլլ լիզոցիմի լուծույթ և ինկուբացնել 30 րոպե 37°C ջերմաստիճանային պայմաններում՝ անընդմեջ թափահարմամբ:

4. Փորձի ընթացքը շարունակել այնպես, ինչպես նկարագրված է Աշխատանք 1.1, առաջադրանք 1.1.2-ում (3-րդ փուլից սկսած):



Նկար 2. Զեյտցի ֆիլտրման ամբողջական համակարգ (1) և ֆիլտրման ընթացքի առանձին փուլերը (2-3):

1. Զեյտցի ֆիլտրման համակարգը՝ միացված վակուումային պոմպին, 2. Մանրէազերծ թաղանթային ֆիլտրի տեղադրումը, 3. Նմուշի նախապատրաստումը ֆիլտրման:

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 2.2. ԲՆԱԿԱՆ ՆՄՈՒՇՈՑ ՀԱՆՐԱԳՈՒՄԱՐԱՑԻՆ ՌՆԹ-Ի ԱՆՋԱՏՈՒՄԸ

Բնական նմուշներից ՌՆԹ-ի անջատման փուլերը նման են ԴՆԹ-ի անջատման փուլերին այն տարբերությամբ միայն, որ ՌՆԱԳԻ փոխարեն պատրաստուկը մշակվում է ԴՆԱԳՈՎ:

Առաջադրանք 2.2.1. Հողային նմուշից հանրագումարային ՌՆԹ-ի անջատումը

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ լուծույթներ, սարքեր և պարագաներ՝

- Հողային նմուշ,
- Լիզիսի համար նախատեսված բուֆերային լուծույթ (0.2 Մ Na_3PO_4 , 0.1 Մ ԷԵՔՔ, pH 8.0),
- Լիզոցիմի լուծույթ (100 մգ/մլ),
- 10% ՆԴՄ-ի լուծույթ,
- 0.5% Սարկոզիլ, 25 մՄ Na-ցիտրատ (pH 7.0) և 0.1 Մ 2-մերկապտոնեթանոլ պարունակող 4 Մ գուանիդինի թիոցիանատի լուծույթ,
- 2Մ Na-ցիտրատ (pH 4.0),
- Չեզոք ֆենոլ (պատրաստումը տե՛ս հավելված 1-ում),
- Քլորոֆորմի և իզոամիլ սպիրտի (24:1) խառնուրդ,
- 96% և 70% էթանոլ,
- ՏԷ բուֆերային լուծույթ (pH 8.0) (պատրաստումը տե՛ս հավելված 1-ում),
- ԵԷՊԿ պարունակող մանրեագերծված ջուր,
- 50 մլ տարողությամբ սրվակներ, 1.5-2 մլ տարողությամբ կենտրոնախուսման սրվակներ (Էպենդորֆ), ավտոմատ պիպետների հավաքածու՝ համապատասխան ծայրակալներով,
- Սառցախցիկով կենտրոնախուսակ, ջրային բաղնիք, սառնարան, ջերմապահարան, թափահարիչ, լամինար բոքս, քարշիչ պահարան, թափահարիչ, խառնիչ, լատեքսային կամ նիտրիլային ձեռնոցներ:

Փորձի ընթացքը

1. 2-5 գ հողային նմուշը տեղադրել 50 մլ տարողությամբ սրվակում, ավելացնել 8 մլ լիզիտի բուֆերային լուծույթ, ապա 1.5 մլ ՆԴՄ-ի 10% լուծույթ:

Ծանոթագրություն: Հողային կամ տիղմային նմուշներից բջիջների առավել լավ տարանջատման համար կարելի է օգտագործել ապակյա գնդիկներով հոմոգենիզատոր, իսկ նմուշը լուծել ԵԷՊԿ պարունակող ջրով պատրաստված լիզիտի համար նախատեսված բուֆերային լուծույթում:

2. Սրվակը տեղադրել եռացող ջրային բաղնիքում 5 րոպե:

3. Հովացնել և սառեցնել -80°C պայմաններում 30 րոպե, ապա ինկուբացնել 65°C պայմաններում 15 րոպե:

4. Կախույթը կենտրոնախուսել 10000 պտույտ/րոպե արագությամբ 10°C ջերմաստիճանային պայմաններում 15 րոպե:

5. Վերնստվածքը տեղափոխել նոր սրվակի մեջ, իսկ նստվածքը լուծել 5 մլ լիզիտի համար նախատեսված բուֆերային լուծույթով,

6. Սրվակը տեղադրել եռացող ջրային բաղնիքում 5 րոպե, ապա կենտրոնախուսել 10000 պտույտ/րոպե արագությամբ 10°C ջերմաստիճանային պայմաններում 15 րոպե:

7. Վերնստվածքը խառնել 5-րդ կետում ստացված վերնստվածքին և ավելացնել 11.2 մլ 4 Մ գուանիդինի թիոցիանատի լուծույթ, ապա 1 մլ 2 Մ Na-ցիտրատ ($\text{pH } 4.0$) և 11.2 մլ չեզոք ֆենոլ և 6.4 մլ քլորոֆորմի և իզոամիլ սալիրտի խառնուրդ,

8. Ստացված խառնուրդը լավ խառնել թափահարմամբ 10 վայրկյան, ապա սառեցնել սառցի վրա 15 րոպե:

9. Կենտրոնախուսել 10000 պտույտ/րոպե արագությամբ 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում 10 րոպե:

10. Վերին կախույթը տեղափոխել նոր սրվակ, ավելացնել 2 ծավալ 96% էթանոլ և լուծույթը խառնել շրջելով սրվակը:

11. Ինկուբացնել -80°C ջերմաստիճանային պայմաններում 2-10 րոպե ՌՆԹ-ի նստեցման համար, ապա կենտրոնախուսել 15000 պտույտ/րոպե արագությամբ 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում 15 րոպե:

12. Զգուշությամբ ամբողջությամբ հեռացնել վերնաստվածքը, իսկ նստվածքը չորացնել օդում կամ վակուումային պահարանում 10 րոպե:

14. ՌՆԹ-ն լուծել 50-100 մկլ ՏԷ բուֆերային լուծույթում (рН 8.0): Պահպանել սառույցի վրա կամ -20°C ջերմաստիճանային պայմաններում:

15. Անջատված ՌՆԹ-ի խտությունը չափել սպեկտրալուսաչափման մեթոդով (տե՛ս Առաջադրանք 3.1.1) և ստուգել այն 1% ազարոգային ժելում էլեկտրաֆորեզի եղանակով (տե՛ս Առաջադրանք 5.1.2):

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 2.3. ՌՆԹ-Ի ՊԱՏՐԱՍՏՈՒԿԻ ՄԱՔՐՈՒՄԸ ԴՆԹ-ԻՑ

ՌՆԹ-ի պատրաստուկների դեգոքսիտիբոնուկլեազ I-ով (ԴՆազ I) մշակման նպատակը ԴՆԹ-ի միևնույն խառնուրդներից ազատված, բարձր աստիճանի մաքրությամբ ՌՆԹ-ի ստացումն է: ԴՆազ I-ն էնդոնուկլեազային ֆերմենտ է, որը հիդրոլիզում է ԴՆԹ-ի միաշղթա և երկշղթա մոլեկուլները: Mg^{2+} իոնների առկայությամբ ԴՆազ I-ը ԴՆԹ-ի շղթաներից յուրաքանչյուրը կտրում է անկախ մեկը մյուսից պատահական տեղում, իսկ Mn^{2+} իոնների առկայությամբ՝ ԴՆԹ-ի երկու շղթաներն էլ գրեթե նույն տեղում:

Առաջադրանք 2.3.1. ՌՆԹ-ի պատրաստուկի մաքրումը դեգոքսիտիբոնուկլեազ I-ով մշակմամբ

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ լուծույթներ, սարքեր և պարագաներ՝

- ՌՆԹ-ի պատրաստուկ,
- ԴՆազ I-ի համար նախատեսված 10 անգամ խիտ բուֆերային լուծույթ՝ հետևյալ կազմով՝ 1 Մ նատրիումի քացախաթթու (рН 5.0), 50 մՄ MgCl_2 և ԴԵՊԿ-ով մշակված ջուր,
- ՌՆազի խառնուրդներից գուրկ ԴՆազ I-ի լուծույթ (10 միավոր/մկլ)
- Չեզոք ֆենոլ,
- Քլորոֆորմի և իզոամիլ սպիրտի (24:1) խառնուրդ,

- 96% էթանոլ,
- 3 Մ նատրիումի քացախաթթու (pH 5.2),
- 1.5-2 մլ տարողությամբ կենտրոնախուսման սրվակներ (Էպենդորֆ), ավտոմատ պիպետների հավաքածու՝ համապատասխան ծայրակալներով,
- Սառցախցիկով կենտրոնախուսակ, ջրային բաղնիք, սառնարան, ջերմապահարան, թափահարիչ, լամինար բոքս, քարշիչ պահարան, լատեքսային կամ նիտրիլային ձեռնոցներ:

Փորձի ընթացքը

1. 88 մլլ ՌՆԹ-ի պատրաստուկին ավելացնել ԴՆԱզ I-ի համար նախատեսված 10 մլլ բուֆերային լուծույթ և 2 մլլ ԴՆԱզ I և ինկուբացնել 30 րոպե 37°C ջերմաստիճանային պայմաններում:

2. Ավելացնել 100 մլլ ԵԷՊԿ-ով մշակված կրկնակի թորած ջուր:

3. Ավելացնել 100 մլլ չեզոք ֆենոլ և 100 մլլ քլորոֆորմի և իզոամիլ սպիրտի (24:1) խառնուրդ:

4. Ուժգին թափահարել 10 վայրկյան և կենտրոնախուսել 15000 պտույտ/րոպե արագությամբ 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում 5 րոպե տևողությամբ:

5. Վերին հեղուկ շերտը տեղափոխել նոր սրվակի մեջ և ավելացնել 100 մլլ քլորոֆորմ-իզոամիլ սպիրտ խառնուրդ, ուժգին թափահարել 10 վայրկյան և կենտրոնախուսել 15000 պտույտ/րոպե արագությամբ 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում 5 րոպե:

6. Վերին հեղուկ շերտը տեղափոխել նոր սրվակ ավելացնել 2 ծավալ 96% էթանոլ և 1/10 ծավալ 3 Մ նատրիումի քացախաթթու (pH 5.2):

7. ՌՆԹ-ն նստեցնելու համար թողնել -20°C ջերմաստիճանային պայմաններում 12 ժամ կամ -80°C ջերմաստիճանային պայմաններում 30 րոպե:

8. Կենտրոնախուսել 15000 պտույտ/րոպե արագությամբ 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում 15 րոպե:

9. Վերնստվածքը հեռացնել, իսկ նստվածքը լուծել 1 մլ 70% էթանոլով:

10. Կենտրոնախուսել 15000 պտույտ/րոպե արագությամբ 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում 5 րոպե տևողությամբ:

11. Վերնստվածքը հեռացնել և կրկին կենտրոնախուսել նույն պայմաններով:

12. Նստվածքը չորացնել օդում կամ վակուումային պահարանում 10 րոպե:

13. Նստվածքը լուծել 100 մկլ մանրէազերծ ԵԷՊԿ պարունակող կրկնակի թորած ջրում:

14. Անջատված ՌՆԹ-ի խտությունը չափել սպեկտրալուսաչափման մեթոդով (տե՛ս Առաջադրանք 3.1.1) և ստուգել այն 1% ազարոզային ժելում էլեկտրաֆորեզի եղանակով (տե՛ս Առաջադրանք 5.1.2):

ԹԵՄԱ 3
ՆՈՒՎԼԵԻՆԱԹԹՈՒՆԵՐԻ ՔԱՆԱԿԱԿԱՆ ՎԵՐԼՈՒԾՈՒԹՅԱՆ
ՄԵԹՈԴՆԵՐ

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 3.1. ՆՈՒՎԼԵԻՆԱԹԹՈՒՆԵՐԻ ԿՈՆՑԵՆՏՐԱՑԻԱՆԵՐԻ
ՈՐՈՇՈՒՄԸ ՍՊԵԿՏՐԱԼՈՒՍԱԶԱՓԱԿԱՆ ԵՂԱՆԱԿՈՎ

Նմուշում ԴՆԹ-ի կամ ՌՆԹ-ի քանակական վերլուծությունն իրականացվում է սպեկտրալուսաչափական եղանակով՝ հիմնված նուկլեինաթթուների 260 կամ 280 նմ երկարությամբ ուլտրամանուշակագույն (ՈւՄ) ալիքների կլանման ունակության վրա: ԴՆԹ-ի կամ ՌՆԹ-ի կոնցենտրացիան և մաքրության աստիճանը որոշվում են՝ պատրաստուկի կլանման արժեքը համեմատելով ստուգիչի կլանման արժեքի հետ: Ջրում կամ ՏԷ բուֆերային լուծույթում (рН 8.0) լուծված ԴՆԹ-ի կամ ՌՆԹ-ի օպտիկական խտության (ՕԽ) 1 արժեքը համապատասխանում է երկշղթա ԴՆԹ-ի 50 մկգ/մլ, կամ միաշղթա ԴՆԹ կամ ՌՆԹ-ի 40 մկգ/մլ, կամ 33 մկգ/մլ միաշղթա օլիգոնուկլեոտիդների կոնցենտրացիաներին: Տվյալ մեթոդով ԴՆԹ-ի կոնցենտրացիայի չափման սխալի սահմանը 0.1 մկգ/մլ է: Նուկլեինաթթուների ՈւՄ ալիքների կլանման սպեկտրը գործնականում կախված չէ նուկլեոտիդների հաջորդականությունից: Չափումները նախընտրելի է իրականացնել 100 մկլ տարողությամբ կվարցային կյուվետներով:

ՌՆԹ-ի քանակության չափման ընթացքում սխալները բացառելու համար ՌՆԹ-ի պատրաստուկը հարկավոր է պարբերաբար նոսրացնել ցածր աղային խտությամբ բուֆերով կամ հիմնային ջրով (1 մՄ Na_2HPO_4 , рН 7.5-8.0), քանի որ ՌՆԹ-ի լուծման և պահպանման համար օգտագործված ապաիոնիզացված ջրի ցածր рН-ը ազդում է ուլտրամանուշակագույն սպեկտրում ՌՆԹ-ի մոլեկուլների կլանման վրա:

Նուկլեինաթթուների մաքրության մասին կարելի է դատել ՕԽ₂₆₀ և ՕԽ₂₈₀ հարաբերության արժեքից: Այսպես, մաքուր ԴՆԹ-ի և ՌՆԹ-ի պատրաստուկների համար ՕԽ₂₆₀/ՕԽ₂₈₀ հարաբերության արժեքը պետք է լինի համապատասխանաբար 1.8 և 2.0: Եթե պատրաստուկը աղտոտված է սպիտակուցներով կամ ֆենոլով ապա ՕԽ₂₆₀/ՕԽ₂₈₀ արժեքը փոքր է վերը նշված արժեքներից: ԴՆԹ-ի պատրաստուկի ՕԽ₂₆₀/ՕԽ₂₈₀>2.0 արժեքները

վկայում են պատրաստուկի ԴՆԹ-ի մոլեկուլներով աղտոտվածության մասին:

Նուկլեինաթթուների քանակական որոշման համար հաճախ կիրառվում է փոքր ծավալների լուծույթների (<1 մկլ) սպեկտրալուսաչափման համար նախատեսված սպեկտրալուսաչափիչներ, ինչպիսիք են, օրինակ՝ նանոդրոփը (NanoDrop) և քյուբիտը (Qubit) (նկար 3): Այս սարքերից օգտվելիս հարկավոր է հետևել սարքին կցված համապատասխան պայմանականագրերին:



Նկար 3. Փոքր ծավալներով լուծույթների լուսաչափման համար նախատեսված սպեկտրալուսաչափիչներ.

Ա. Նանոդրոփ, Բ. Քյուբիտ անհրաժեշտ ռեակտիվներով:

Առաջադրանք 3.1.1. ԴՆԹ-ի քանակական վերլուծությունը սպեկտրալուսաչափական եղանակով

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ լուծույթներ, սարքեր և պարագաներ՝

- ԴՆԹ-ի նմուշ,
- Մանրէազերծված երկակի թորած ջուր,
- 0.5, 2.5, 5, 10, 25, 50, 75 և 100 նգ/մկլ λ ֆազի ԴՆԹ-ի լուծույթներ,
- Ավտոմատ պիպետների հավաքածու համապատասխան ծայրակալներով, լատեքսային կամ նիտրիլային ձեռնոցներ, սպեկտրալուսաչափ, 1սմ օպտիկական ուղի ունեցող կվարցե կյուվետներ:

Փորձի ընթացքը

1. ԴՆԹ-ի նմուշը նոսրացնել 10 անգամ մանրէազերծված կրկնակի թորած ջրով և ստացված ԴՆԹ-ի լուծույթը լցնել կվարցե կյուվետի մեջ:
2. Զուգահեռաբար պատրաստել նաև λ ֆագի ԴՆԹ-ի վերը նշված կոնցենտրացիաներով լուծույթներ և լցնել կվարցե կյուվետի մեջ:
3. Սպեկտրալուսաչափով չափել նմուշի և λ ֆագի ԴՆԹ-ի տարբեր կոնցենտրացիաներով լուծույթների ՕԽ ($\lambda=260$ նմ): Որպես ստուգիչ օգտագործել մանրէազերծված երկակի թորված ջուրը:
4. Կառուցել տրամաչափական կոր՝ օգտագործելով λ ֆագի ԴՆԹ-ի տարբեր կոնցենտրացիաների և համապատասխան լուծույթների ՕԽ արժեքները: Նմուշում ԴՆԹ-ի կոնցենտրացիան որոշել՝ համեմատելով նմուշի լուծույթի ՕԽ արժեքը տրամաչափման կորի համապատասխան ՕԽ արժեքի հետ:
5. Սպեկտրալուսաչափմամբ որոշել ԴՆԹ-ի լուծույթի ՕԽ ($\lambda=280$ նմ):
6. ԴՆԹ-ի նմուշի որակական վերլուծության համար հաշվարկել $\text{ՕԽ}_{260}/\text{ՕԽ}_{280}$ արժեքը:

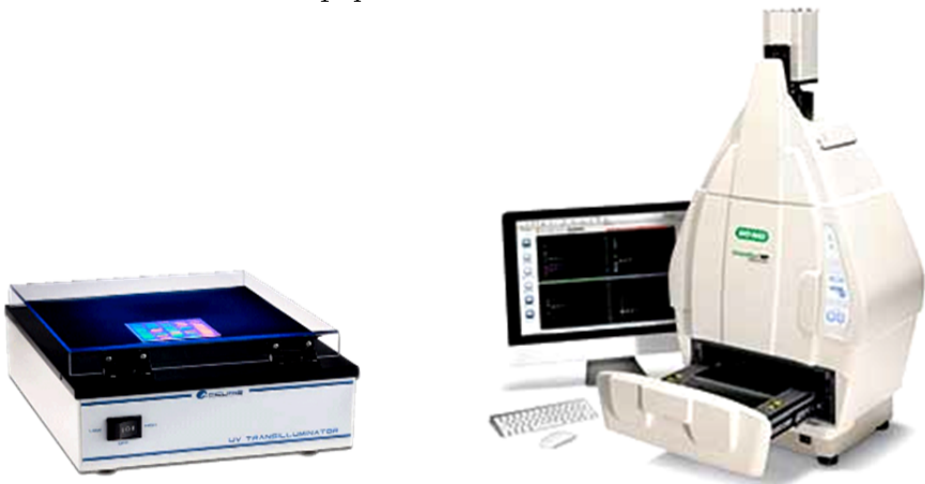
ԱՇԽԱՏԱՆՔ 3.2. ԴՆԹ-Ի ԿՈՆՑԵՆՏՐԱՑԻԱՅԻ ՈՐՈՇՈՒՄԸ ԷԹԻԴԻՈՒՄԻ ԲՐՈՍԻԴԻ ԼՈՒՍԱՐԶԱԿՄԱՄԲ

Եթե ԴՆԹ-ի կոնցենտրացիան փոքր է (<0.5 նգ/մլ) կամ նմուշը աղ-տոտված է ՈԻՄ ճառագայթներ կլանող այլ միացություններով, ապա քանակական վերլուծության համար կիրառվում է ԴՆԹ-ին կապվող էթիդիումի բրոմիդի լուսարձակման չափման եղանակը: ԴՆԹ-ի քանակությունը որոշվում է էթիդիումի բրոմիդով մշակված նմուշի լուսարձակման ուժգնությամբ՝ համադրելով այն որպես ստուգիչ տարբեր կոնցենտրացիաներով ԴՆԹ-ի լուծույթների լուսարձակման ուժգնությունների հետ:

Առաջադրանք 3.2.1. ԴՆԹ-ի կոնցենտրացիայի որոշումը էթիդիումի բրոմիդի լուսարձակմամբ

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ լուծույթներ, սարքեր և պարագաներ՝

- ԴՆԹ-ի նմուշ,
- 0.5, 2.5, 5, 10, 25, 50, 75 և 100 նգ/մլ λ ֆազի ԴՆԹ-ի լուծույթներ,
- 2 մկգ/մլ էթիդիումի բրոմիդ պարունակող SE (pH 7.6) բուֆերային լուծույթներ,
- ՈւՄ ճառագայթների համար թափանցելի պլաստիկ թաղանթ, ՈւՄ ճառագայթներից պաշտպանիչ ակնոցներ, ավտոմատ պիպետների հավաքածու՝ համապատասխան ծայրակալներով, լատեքսային կամ նիտրիլային ձեռնոցներ, անդրլուսանցույց (UV transiluminator) (նկար 4):



Նկար 4. ՈւՄ անդրլուսանցույց (UV transiluminator):

Փորձի ընթացքը

1. ՈւՄ անդրլուսանցույցի ապակին ծածկել թափանցիկ պլաստիկ թաղանթով, որի վրա ավելացնել 1 մլլ ԴՆԹ-ի պատրաստուկ:

2. ԴՆԹ-ի պատրաստուկին զուգահեռ՝ որոշակի հերթականությամբ ավելացնել λ ֆազի ԴՆԹ-ի տարբեր կոնցենտրացիաներով (0.5-100 նգ/մլլ) լուծույթներ (1 մլլ):

3. Նմուշի և ստուգիչների յուրաքանչյուր կաթիլին ավելացնել 1 մլլ էթիլիումի բրոմիդի ՏԷ բուֆերային լուծույթ (pH 7.6) և պիպետով լավ խառնել:

4. Նմուշում ԴՆԹ-ի կոնցենտրացիան որոշվում է ՈւՄ ճառագայթների ներքո ակնադիտմամբ՝ համադրելով նմուշի լուսարձակման ուժգնությունը ստուգիչների լուսարձակման ուժգնությունների հետ:

Ծանոթագրություն: *Էթիլիումի բրոմիդը ուժեղ մուտագեն է, և անհրաժեշտ է աշխատել ձեռնոցներով: ՈւՄ ճառագայթների բաց աղբյուրի հետ աշխատելիս անպայման պետք է կրել պաշտպանիչ ակնոցներ կամ ուլտրամանուշակագույն ճառագայթներից պաշտպանող սաղավարտ (նկար 5):*



Նկար 5. ՈւՄ ճառագայթներից պաշտպանող ակնոց և սաղավարտներ:

ԹԵՄԱ 4

ՊՈԼԻՄԵՐԱԶԱՅԻՆ ՇՂԹԱՑԱԿԱ Ն ՌԵԱԿՑԻԱ (ՊՇՌ)

ՊՇՌ-ն թույլ է տալիս *in vitro* ամպլիֆիկացնել գենոմի ընտրված հատվածի նուկլեոտիդային հաջորդականությունը ավելի քան միլիոն անգամ: ԴՆԹ-ի այն հատվածները, որոնք կողահարում են (flanking) ամպլիֆիկացման համար ընտրված հաջորդականությանը, ծառայում են որպես նախատիպ երկու օլիգոնուկլեոտիդային հաջորդականությունների ուղիղ 5'-3' և հակադարձ 3'-5' մերանների (փրայմերների) քիմիական սինթեզի համար:

ՊՇՌ-ն լայնորեն կիրառվում է մոլեկուլային կլոնավորման, ԴՆԹ-ի և գեների հատվածների սինթեզի, գենադարանների ստեղծման, քրոմոսոմների քարտեզավորման, գեներում մուտացիաների հայտնաբերման, *in vitro* յուրահատուկ մուտացիաների ստացման աշխատանքներում:

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 4.1. *Tag* ԴՆԹ-ՊՈԼԻՄԵՐԱԶԻ ԿԻՐԱՌՄԱՄԲ ՊՇՌ

ՊՇՌ իրականացման համար անհրաժեշտ են հետևյալ բաղադրանյութերը. 1) երկու օլիգոնուկլեոտիդային մերաններ (18-30 նգ); 2) կադապար թիրախային ԴՆԹ (0.1 մինչև 40000 նգ); 3) ջերմակայուն ԴՆԹ-պոլիմերազ; 4) 4-դեզօքսիդիֆոնուկլեոզիդեռֆոսֆատներ (դՆԵՖ):

ՊՇՌ յուրաքանչյուր ցիկլում անհրաժեշտ է սկզբում իրականացնել ԴՆԹ-կադապարի դարձելի բնափոխում՝ կրկնակի պարույրի 2 շղթաների տարանջատում կարճատև ջերմամշակմամբ ($\approx 94-96^{\circ}\text{C}$): Դրան հետևում է ԴՆԹ-ի դանդաղ սառեցումը մինչև $54-68^{\circ}\text{C}$, որի ընթացքում ուղիղ և հակադարձ մերանները ԴՆԹ շղթաների լրացչական հաջորդականությունների հետ հիփրիդացմամբ առաջացնում են դուպլիքսներ: Մերանների միակցումից հետո ռեակցիոն խառնուրդը ինկուբացնում են ջերմակայուն ԴՆԹ-պոլիմերազով և չորս դՆԵՖ-ներով $68-75^{\circ}\text{C}$, որի արդյունքում սինթեզվում են 2 ԴՆԹ շղթաների այն հատվածները, որոնք տեղակայվում են յուրաքանչյուր մերանից 5'-3' ուղղությամբ: ԴՆԹ-ի թիրախային հատվածի արդյունավետ ամպլիֆիկացման համար անհրաժեշտ է ռեակցիայի

25-30 ցիկլեր (յուրաքանչյուրը 3-5 րոպե տևողությամբ): Յուրաքանչյուր հաջորդող ցիկլում ԴՆԹ-ի հատվածի պատճենների քանակությունը կրկնապատկվում է: ՊՇՌ-ն իրականացնում են ավտոմատ կարգավորվող սարքերում միկրոսրվակների կիրառմամբ (նկար 6):



Նկար 6. ՊՇՌ իրականացման ավտոմատ ջերմակարգավորվող սարքերի՝ ՊՇՌ ամպլիֆիկատորի օրինակներ (Ա), ՊՇՌ իրականացման համար նախատեսված միկրոսրվակներ (Բ):

ՊՇՌ առաջին ցիկլում նոր սինթեզված շղթաներից յուրաքանչյուրը (այսպես կոչված «երկար կաղապարը») ունի ավելի մեծ երկարություն, քան համապատասխան մերանների 3'-OH խմբից մինչև հաջորդականության վերջին նուկլեոտիդների միջև եղած հեռավորությունը, որն էլ լրացական է երկու փրայմերներին: Այս շղթաները կաղապար են ծառայում ՊՇՌ-ի II ցիկլում, երբ երկշղթա ԴՆԹ-ն (կազմված ելային և նոր սինթեզված շղթաներից) նորից ենթարկվում են բնափոխման, իսկ ապա փրայմերներով միակցման: Նորից իրականանում է «երկար կաղապարների» սինթեզ ելային շղթաների հիման վրա, բայց ռեակցիոն միջավայրում առաջանում են որոշ քանակությամբ «կարճ կաղապարներ», որոնք սինթեզվում են «երկար կաղապարների» հիման վրա: Վերջին ցիկլում արդեն «կարճ կաղապարների» քանակությունը (սինթեզված «երկար» և «կարճ կաղապարների» հիման վրա) մինչև 10^6 անգամ գերազանցում է ելային շղթաների և «երկար կաղապարների» քանակությանը: ԴՆԹ-ի այսպիսի քանակությունը բավարար է ՊՇՌ տվյալների էլեկտրաֆորեզային եղանակով ազարոզային ժելում երևակման համար:

Ավելի հաճախ ՊՇՌ-ի համար օգտագործվում են *Thermus aquaticus*-ից (*Taq* ԴՆԹ-պոլիմերազ), *Pyrococcus furiosus*-ից (*Pfu* ԴՆԹ-պոլիմերազ) և

Thermus thermophilus-ից (*Tth* ԴՆԹ-պոլիմերազ) ջերմակայուն ԴՆԹ-պոլիմերազները, որոնք չեն բնափոխվում 95°C ջերմաստիճանում: *Taq* ԴՆԹ-պոլիմերազի հիմնական թերություններից է կրկնապատկման ցածր ճշգրտությունը 3'-5'-էկզոնուկլեազային ակտիվության բացակայության պատճառով և ճշգրտման մեխանիզմի բացակայությունը: *Pfu* ԴՆԹ-պոլիմերազն առավել ջերմակայուն է, օժտված է բարձր կրկնապատկման ճշգրտությամբ և ճշգրտման մեխանիզմով: *T. thermophilus*-ից անջատված ԴՆԹ-պոլիմերազը Mn^{2+} -ի առկայության պայմաններում ունակ է հակադարձ տրանսկրիպցիայի:

Մոլեկուլային կլոնավորման փորձերում ՊՇՌ ամպլիկոնների անհրաժեշտ ելքի, ինչպես նաև 30 նգ երկարությամբ ԴՆԹ-ի հատվածների ամպլիֆիկացման համար հաճախ օգտագործվում են *Pfu* և *Taq* ԴՆԹ-պոլիմերազների խառնուրդներ, ինչն ապահովում է սխալների ցածր հաճախություն ու ամպլիֆիկացման մեծ արագություն:

Որպես կանոն, մերանները սինթեզվում են *in vitro* ԴՆԹ-ի ավտոմատ սինթեզատորների միջոցով: Մերանների կառուցման հիմնական սկզբունքները քննարկենք ստորև:

Յուրաքանչյուր մերանի առավել արդյունավետ չափը (5'-3' ուղիղ և 3'-5' հակադարձ) 18-30 նուկլեոտիդ է (հաճախ նաև օգտագործվում է 35-45 նուկլեոտիդային մերաններ):

Մերանների հալման ջերմաստիճանը (T_m) պետք է լինի 52-58 °C միջակայքում: Հալման ջերմաստիճանը այն ջերմաստիճանն է, որի դեպքում ԴՆԹ դուպլեքսը դիսոցվում է միաշղթա մոլեկուլների: Այն ցույց է տալիս մերան-կադապարային ԴՆԹ դուպլեքսի կայունությունը: Հաշվի առնելով մերանների երկարությունը, GC պարունակությունը, հալման ջերմաստիճանը, լրացականությունը, որոշ ծրագրեր, ինչպիսիք են, օրինակ՝ Vector NT1 Advance 10 («Invitrogen» ԱՄՆ) կամ Visual Cloning 2000 («Redasoft», Կանադա), կլոնավորման և ամպլիֆիկացման ծրագրերի փաթեթը, թույլ են տալիս նախագծել արդյունավետ օլիգոնուկլեոտիդային մերաններ: Մերանների հատկությունների վերլուծությունը կարելի է կատարել նաև առցանց հասանելի Oligo Analyzer («Integrated DNA Technologies», ԱՄՆ) ծրագրերի միջոցով:

GC-ի պարունակությունը մերանի հաջորդականություններում պետք է կազմի 40-60%:

Մերանում երկնուկլեոտիդների հաջորդական կրկնությունների առավելագույն հնարավոր թիվը պետք է լինի <4-ից (օր. AATATATAT): Մեծ թվով այդպիսի հաջորդականությունների առկայությունը կարող է հանգեցնել ամպլիֆիկացման ընթացքում մեծ թվով սխալների առաջացմանը: Պետք է հաշվի առնել նաև միկնույն նուկլեոտիդի կրկնողությունների քանակը (օր. AGCGGGG): Այսպիսի կրկնողությունների առավելագույն թույլատրելի քանակը կա 4-ն է:

Պետք է ռեակցիայի ընթացքում կանխել կադապարային ԴՆԹ-ի երկրորդային կառուցվածքների առաջացումը: Նուկլեինաթթվի միաշղթա մոլեկուլը բավականին անկայուն է և առաջացնում է երկրորդային կառուցվածքներ: Մերաններն այն պարագայում անկարող կլինեն կապվելու կադապարային ԴՆԹ-ի հետ, հատկապես, եթե դրանք նախագծված են այնպես, որ նույնիսկ միակցման ջերմաստիճանից բարձր ջերմաստիճաններում դրանց լրացչական կադապարային ԴՆԹ-ի հատվածները ունակ լինեն առաջացնելու երկրորդային կառույցներ: Մերանների նախագծման համար օգտագործվում են հատուկ ծրագրային փաթեթներ և ալգորիթմեր (օրինակ՝ Mfold ալգորիթմը), որոնցով հաշվարկվում է երկրորդային կառուցվածքների առաջացման հավանականությունը:

Խորհուրդ է տրվում 20 մկլ ռեակցիոն խառնուրդին ավելացնել 10 պմոլ յուրաքանչյուր մերանից: Օգտագործվող մերանների կոնցենտրացիան (պմոլ/մկլ) հաշվարկվում է $10^8/N \times O\% / \text{մկլ}$ բանաձևով, որտեղ N՝ դա մերանի նուկլեոտիդային հիմքերի քանակն է, իսկ O%-ն՝ մերանի օպտիկական խտությունը ($\lambda=260$ նմ): Մերանների ավելի բարձր խտությունները կարող են հանգեցնել ՊՇՌ ոչ մենահատուկ ամպլիկոնների առաջացմանը, իսկ քիչ խտությունները կարող են սպառվել մինչ ռեակցիայի բոլոր փուլերի ավարտը՝ բացասաբար ազդելով ՊՇՌ-ի ելքի վրա:

ՊՇՌ-ն զգայուն մեթոդ է, և հետևաբար, նույնիսկ օտարածին ԴՆԹ-ի չնչին քանակությունները, ընկնելով ռեակցիոն խառնուրդի մեջ, կարող են հանգեցնել ոչ մենահատուկ ամպլիկոնների առաջացմանը: Լաբորատորիայում որպես ադտոտման աղբյուր կարող են հանդիսանալ նախորդ փորձերի ԴՆԹ-ն, պլազմիդային ԴՆԹ-ն, նախորդ ՊՇՌ վերջնանյութերը և

այլն: Եվ քանի որ ՊՇՌ վերջնանյութերը բավականին կայուն են, ապա դրանցով ռեակցիոն խառնուրդի ադտոտման դեպքում հնարավոր է ամպլիֆիկացման կեղծ-դրական արդյունքի ստացում, ինչը հատկապես վտանգավոր է կլինիկական հետազոտություններում ՊՇՌ մեթոդով ախտորոշման դեպքում:

ԴՆԹ-պոլիմերազի համար բուֆերային լուծույթը (10x խիտ) սովորաբար պարունակում է 0.1-0.7 Մ տրիս-HCl (pH 8.6-9.0), 15 մՄ $MgCl_2$ և 0.1-0.5 Մ KCl: pH-ի բարձր արժեքն անհրաժեշտ է, քանի որ տրիս-բուֆերային խառնուրդի pH-ն նվազում է ռեակցիայի ընթացքում ջերմաստիճանի բարձրացմանը զուգընթաց և 72°C ջերմաստիճանում կազմում 7.5: Հարկ է նշել, որ տրիս պարունակող բուֆերային լուծույթը կանխում է ԴՆԹ-ի մոլեկուլների արագ քայքայումը ՊՇՌ բարձր ջերմաստիճանային պայմաններում: Բուֆերում չափավոր քանակությամբ KCl պարունակությունը բարձրացնում է *Taq*-պոլիմերազի ակտիվությունը 40-60% ով: Երբեմն ՊՇՌ խառնուրդների կազմի մեջ ավելացնում են $MgSO_4$ (20 մՄ), Triton X-100 (1%) և ցլի սիժուկային ալբումին (1մգ/մլ): $MgCl_2$ ունենում է զգալի ազդեցություն մերանների միակցման ունակության, երկշղթա ԴՆԹ-ի հալման ջերմաստիճանի և ԴՆԹ-պոլիմերազի ակտիվության վրա: Mg^{2+} իոնները լուծելի համալիրներ են առաջացնում դՆԵՖ և կադապարային ԴՆԹ-ի միջև: Mg^{2+} -ի ավելցուկը ռեակցիոն խառնուրդում նպաստում է ԴՆԹ-ի հալման ջերմաստիճանի բարձրացմանը և ՊՇՌ ոչ մենհատուկ վերջնանյութերի առաջացմանը:

Կադապարային ԴՆԹ-ի մաքրության աստիճանը բավականին մեծ ազդեցություն է ունենում ՊՇՌ ելքի վրա: Մասնավորապես՝ ԴՆԹ մոլեկուլների ադտոտումը ՌՆԹ-ով կարող է հանգեցնել Mg^{2+} -ի հետ խելատային համալիրների առաջացմանը և նվազեցնել անհրաժեշտ վերջնանյութի ելքը: Կադապարային ԴՆԹ-ի քանակությունը ևս ռեակցիոն խառնուրդում մեծ ազդեցություն է ունենում ՊՇՌ վերջնանյութի ելքի վրա. որքան քիչ ԴՆԹ է ներմուծվում ռեակցիոն խառնուրդ, այնքան ավելի շատ ՊՇՌ ցիկլեր են հարկավոր անհրաժեշտ քանակությամբ ամպլիկոններ ստանալու համար, և այնքան ավելի է մեծանում ամպլիֆիկացման ընթացքում սխալների հավանականությունը: Կադապարային ԴՆԹ-ի քանակությունը, որը խորհուրդ է տրվում օգտագործել ՊՇՌ ամպլիֆիկաց-

ման համար, պետք է լինի 1-10 նգ քրոմոսոմային ԴՆԹ-ի և 0.1-500 նգ պլազմիդային ԴՆԹ-ի համար: Կադապարային ԴՆԹ-ի լուծելը ՏԵ բուֆերային լուծույթում նպատակահարմար չէ, քանի որ ԷԵՔՔ-ն խելատացնում է ռեակցիոն խառնուրդում առկա Mg^{2+} : Ավելի նպատակահարմար է օգտագործել 5-10 մՄ տրիսի (pH 7-8) լուծույթը:

Օգտագործվում են հավասար խտություններով չորս դՆԵՖ-ներ (դԱԵՖ, դԹԵՖ, դԳԵՖ, դՅԵՖ): Յուրաքանչյուր դՆԵՖ-ի վերջնական կոնցենտրացիան ռեակցիոն խառնուրդում պետք է կազմի 40-500 մկՄ (սովորաբար 200 մկՄ), որքան քիչ է դՆԵՖ-ի խտությունը, այնքան ավելի բարձր է սինթեզի ճշգրտությունը: դՆԵՖ-ների ավելցուկը կարող է հանգեցնել ԴՆԹ-ի կեղծ շղթանների սինթեզին՝ Mg^{2+} կապման և ԴՆԹ-պոլիմերազի ակտիվության վրա բացասաբար ազդելու հետևանքով:

Ջերմակայուն ԴՆԹ-պոլիմերազի (կամ պոլիմերազների խառնուրդի) օպտիմալ (լավագույն) խտություն է համարվում 0.5-2.5 միավորը 50 մկլ ռեակցիոն խառնուրդի համար: *Taq* ԴՆԹ-պոլիմերազի շատ ցածր խտությունների օգտագործումը հանգեցնում է ռեակցիայի վերջնանյութի ելքի նվազման (հատկապես եթե վերջնանյութը մեծ չափսերի է): Ավելի մեծ խտությունները կարող են հանգեցնել ՊՇՌ մենահատկության նվազման: Պետք է նկատի ունենալ, որ *Pfu* ԴՆԹ-պոլիմերազի օպտիմում խտությունը զգալիորեն ցածր է, քան *Taq* ԴՆԹ-պոլիմերազինը, այդ իսկ պատճառով հաճախ օգտագործվում է դրանց խառնուրդը 100:1 հարաբերությամբ (*Taq*: *Pfu*, ըստ ակտիվության միավորների): *Taq* ԴՆԹ-պոլիմերազի ճշգրտությունը զգալիորեն կախված է Mg^{2+} և դՆԵՖ խտություններից, ինչպես նաև ռեակցիոն խառնուրդի pH-ից:

Առաջադրանք 4.1.1. Բակտերիական 16S ռՌՆԹ գենի ամպլիֆիկացումը ՊՇՌ եղանակով

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ լուծույթներ, սարքեր և պարագաներ՝

- 20-100 նգ ԴՆԹ-ի պատրաստուկ (բնական նմուշից անջատված հանրագումարային ԴՆԹ կամ բակտերիական բջջից անջատված քրոմոսոմային ԴՆԹ),
- Բակտերիական 16S ռՌՆԹ գեների ամպլիֆիկացման համար մենահատուկ մերանների զույգ (10 մկՄ)՝ 27 F (5' GAGTTTGATCCTGGCTCA 3') և 1492 R (3' GAAAGGAGGAGATCCAGCC 5'),
- One *Taq* ԴՆԹ-պոլիմերազ (5000 միավոր/մլ; BioLab, New England),
- 5× խիտ One *Taq* ստանդարտ բուֆեր (BioLab, New England),
- 10 մՄ դՆԵՖ,
- Մանրէազերծված կրկնակի թորած ջուր,
- 0.2 և 1.5 մլ տարողությամբ կենտրոնախուսման սրվակներ (Էպենդորֆ), ավտոմատ պիպետների հավաքածու՝ համապատասխան ծայրակալներով, լատեքսային կամ նիտրիլային ձեռնոցներ, ՊՇՌ ամպլիֆիկատոր (Thermo Scientific™ Arktik™ Thermal Cycler):

Փորձի ընթացքը

1. Պատրաստել 50 մկլ վերջնական ծավալով ռեակցիոն խառնուրդ հետևյալ բաղադրությամբ՝ 1 մկլ ԴՆԹ, 10 մկլ 5× ՊՇՌ բուֆեր, 1 մկլ դՆԵՖ, 1 մկլ յուրաքանչյուր մերաններից, 0.25 մկլ *Taq* ԴՆԹ-պոլիմերազ և 35.75 մկլ թորած ջուր:

2. ՊՇՌ-ն իրականացնել հետևյալ փուլերով. բնափոխում՝ 95°C ջերմաստիճանային պայմաններում, 5 րոպե, որին հաջորդում է 30 կրկնվող ցիկլերով՝ բնափոխում՝ 95°C ջերմաստիճանային պայմաններում, 1 րոպե, միակցում՝ 54°C ջերմաստիճանային պայմաններում, 40 վայրկյան, սինթեզ՝ 68°C ջերմաստիճանային պայմաններում, 1 րոպե: Ռեակցիան

ավարտվում է սինթեզի փուլով՝ 68°C ջերմաստիճանային պայմաններում, 10 րոպե, և սառեցմամբ՝ 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում:

3. 16S ռՌՆԹ գեների ամպլիկոնները (≈ 1500 նգ) երևակել 1% ազա-րոգային ժել էլեկտրաֆորեզի եղանակով (տե՛ս Առաջադրանք 5.1.1):

Առաջադրանք 4.1.2. Արքեային 16S ռՌՆԹ գենի ամպլիֆիկացումը ՊՇՌ եղանակով

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ լուծույթներ, սարքեր և պարագաներ՝

- 20-100 նգ ԴՆԹ-ի ապատրաստուկ (բնական նմուշից անջատված հանրագումարային ԴՆԹ կամ արքեային բջջից անջատված քրոմոսոմային ԴՆԹ),
- Արքեային 16S ռՌՆԹ գեների ամպլիֆիկացման համար մենա-հատուկ մերանների զույգ (10 մկՄ)՝ 21 F (5' TTCCGGTTGATCCYGCCGGA 3') և 958 R (3' YCCGGCGTTGAMTCCAATT 5'),
- One *Taq* ԴՆԹ-պոլիմերազ (5000 միավոր/մլ; BioLab, New England),
- 5× խիտ One *Taq* ստանդարտ բուֆեր (BioLab, New England),
- 10 մՄ դՆԵՖ,
- Մանրեզերծված երկակի թորած ջուր,
- 0.2 և 1.5 մլ տարողությամբ կենտրոնախուսման սրվակներ (Է-պենդորֆ), ավտոմատ պիպետների հավաքածու՝ համապատասխան ծայրակալներով, լատեքսային կամ նիտրիլային ձեռնոցներ, ՊՇՌ ամպլիֆիկատոր (Thermo Scientific™ Arktik™ Thermal Cycler):

Փորձի ընթացքը

1. Պատրաստել 50 մկլ վերջնական ծավալով ռեակցիոն խառնուրդ հետևյալ բաղադրությամբ՝ 1 մկլ ԴՆԹ, 10 մկլ 5× ՊՇՌ բուֆեր, 1 մկլ դՆԵՖ, 1 մկլ յուրաքանչյուր մերանից, 0.25 մկլ *Taq* ԴՆԹ-պոլիմերազ և 35.75 մկլ թորած ջուր:

2. ՊՇՌ-ն իրականացնել հետևյալ փուլերով. բնափոխում՝ 94°C ջերմաստիճանային պայմաններում, 3 րոպե, որին հաջորդում է 30 կրկնվող ցիկլերով՝ բնափոխում՝ 94°C ջերմաստիճանային պայմաններում, 15 վարկյան, միակցում՝ 55°C ջերմաստիճանային պայմաններում, 20 վայրկյան, սինթեզ՝ 68°C ջերմաստիճանային պայմաններում, 45 վայրկյան: Ռեակցիան ավարտվում է սինթեզի փուլով՝ 68°C ջերմաստիճանային պայմաններում, 30 վայրկյան, և սառեցմամբ՝ 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում:

3. 16S ռՌՆԹ գեների ամպլիկոնները (≈ 930 նգ) երևակել 1% ազարոզային ժել-էլեկտրաֆորեզային եղանակով (տե՛ս Առաջադրանք 5.1.1):

Առաջադրանք 4.1.3. Բակտերիական 16S ռՌՆԹ գենի կարճ հատվածների ՊՇՌ ամպլիֆիկացումը GC հաջորդականություններով հարուստ մերաններով

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ լուծույթներ, սարքեր և պարագաներ՝

- 20-100 նգ ԴՆԹ-ի նմուշ, կամ ՊՇՌ ամպլիֆիկացված 16S ռՌՆԹ գեներ,
- Բակտերիական 16S ռՌՆԹ գեների կարճ հատվածների ամպլիֆիկացման համար մենահատուկ GC հաջորդականություններով հարուստ մերանների զույգ (10 մկՄ)՝ L340GC F (5' GCGCCCGCCGCGCGCGGGCGG GCGGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCA 3') և K517 R (3' ATTACCGCGGCTGCTGG 5'),
- One *Taq* ԴՆԹ-պոլիմերազ (5000 միավոր/մլ; BioLab, New England),
- 5× խիտ One *Taq* ստանդարտ բուֆեր,
- 10 մՄ դՆԵՖ,
- Մանրէազերծված կրկնակի թորած ջուր,
- 0.2 և 1.5 մլ տարողությամբ կենտրոնախուսման սրվակներ (Էպենդորֆ), ավտոմատ պիպետների հավաքածու՝ համապատասխան ծայրակալներով, լատեքսային կամ նիտրիլային ձեռ-

նոսր, ՊՇՌ ամպլիֆիկատոր (Thermo Scientific™ Arktik™ Thermal Cycler):

Փորձի ընթացքը

1. Պատրաստել 25 մկլ վերջնական ծավալով ռեակցիոն խառնուրդ՝ հետևյալ բաղադրությամբ՝ 0.5 մկլ ԴՆԹ կամ 16 ռԲՆԹ գեներ, 5 մկլ 5×ՊՇՌ բուֆեր, 0.5 մկլ դՆԵՖ, 0.5 մկլ յուրաքանչյուր մերանից, 0.125 մկլ *Taq* ԴՆԹ-պոլիմերազ և 17.875 մկլ թորած ջուր:

2. ՊՇՌ-ն իրականացնել հետևյալ փուլերով. բնափոխում, 95°C ջերմաստիճանային պայմաններում, 3 րոպե, որին հաջորդում են 30 ցիկլեր՝ բնափոխում՝ 95°C ջերմաստիճանային պայմաններում, 1 րոպե, միացում՝ 55°C ջերմաստիճանային պայմաններում, 30 վայրկյան, սինթեզ՝ 68°C ջերմաստիճանային պայմաններում, 1 րոպե: Ռեակցիան ավարտվում է սինթեզի փուլով՝ 68°C ջերմաստիճանային պայմաններում, 10 րոպե, և սառեցմամբ՝ 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում:

3. 16S ռԲՆԹ գեների կարճ հատվածների (≈200 նգ) ամպլիկոնները դիտարկել 1% ագարոզային ժել-էլեկտրաֆորեզի եղանակով (տե՛ս Առաջադրանք 5.1.1):

Առաջադրանք 4.1.4. Արքեային 16S ռԲՆԹ գենի կարճ հատվածների ՊՇՌ ամպլիֆիկացումը GC հաջորդականություններով հարուստ մերաններով

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ լուծույթներ, սարքեր և պարագաներ՝

- 20-100 նգ ԴՆԹ-ի նմուշ, կամ ՊՇՌ ամպլիֆիկացված 16S ռԲՆԹ գեներ,
- Արքեային 16S ռԲՆԹ գեների կարճ հատվածների ամպլիֆիկացման համար մենահատուկ GC հաջորդականություններով հարուստ մերանների զույգ (10 մկլՄ)՝ PARC340GC F (5' CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGC- GGGGCGGGGGCACGGGGGGCCCTACGGGCGYGCASCAG 3') և PARC3519R (3' TTACCGCGGCKGCTG 5'),
- One *Taq* ԴՆԹ-պոլիմերազ (5000 միավոր/մլ; BioLab, New England),

- 5× խիտ One *Taq* ստանդարտ բուֆեր (BioLab, New England),
- 10 մՄ դՆԵՖ,
- Մանրէազերծված կրկնակի թորած ջուր,
- 0.2 և 1.5 մլ տարողությամբ կենտրոնախուսման սրվակներ (Էպենդորֆ), ավտոմատ պիպետների հավաքածու՝ համապատասխան ծայրակալներով, լատեքսային կամ նիտրիլային ձեռնոցներ, ՊՇՌ ամպլիֆիկատոր (Thermo Scientific™ Arktik™ Thermal Cycler):

Փորձի ընթացքը

1. Պատրաստել 25 մլլ վերջնական ծավալով ռեակցիոն խառնուրդ հետևյալ բաղադրությամբ՝ 0.5 մլլ ԴՆԹ կամ 16 ռԲՆԹ գեներ, 5 մլլ 5×ՊՇՌ բուֆեր, 0.5 մլլ դՆԵՖ, 0.5 մլլ յուրաքանչյուր մերանից, 0.125 մլլ *Taq* ԴՆԹ-պոլիմերազ և 17.875 մլլ թորած ջուր:

2. ՊՇՌ-ն իրականացնել հետևյալ փուլերով. բնափոխում, 94°C ջերմաստիճանային պայմաններում, 30 վայրկյան, որին հաջորդում են 4 կրկնվող ցիկլեր՝ բնափոխում՝ 95°C ջերմաստիճանային պայմաններում, 5 վայրկյան, միակցում՝ 52°C ջերմաստիճանային պայմաններում, 1 րոպե, սինթեզ՝ 68°C ջերմաստիճանային պայմաններում, 22 վայրկյան: Այս փուլին հաջորդում են 35 կրկնվող ցիկլեր՝ բնափոխում՝ 95°C ջերմաստիճանային պայմաններում, 5 վայրկյան, միակցում՝ 52°C ջերմաստիճանային պայմաններում, 15 վայրկյան, սինթեզ՝ 68°C ջերմաստիճանային պայմաններում, 22 վայրկյան: Ռեակցիան ավարտվում է սինթեզի փուլով՝ 68°C ջերմաստիճանային պայմաններում, 30 վայրկյան, և սառեցմամբ՝ 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում:

3. 16S ռԲՆԹ գեների կարճ հատվածների (≈ 200 նգ) ամպլիկոնները դիտարկել 1% ագարոզային ժել-էլեկտրաֆորեզի եղանակով (տե՛ս Առաջադրանք 5.1.1):

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 4.2. ՀԱԿԱԴԱՐՁ ՏՐԱՆՍԿՐԻՊՏԱԶՈՎ ՊՇՈՒ (ՀՏ-ՊՇՈՒ)

ՀՏ-ՊՇՈՒ-ն ՌՆԹ մենահատուկ հատվածի ամպլիֆիկացում է: Հակադարձ տրանսկրիպտազի (ռետրովիրուսային ՌՆԹ-կախյալ ԴՆԹ-պոլիմերազի) օգնությամբ կարելի է ստանալ անհրաժեշտ երկշղթա ԴՆԹ-ն *in vitro* պայմաններում՝ որպես կադապար օգտագործելով բջիջներից անջատված ի-ՌՆԹ:

Քանի որ ՌՆԹ-ն ինքնին չի կարող օգտագործվել որպես կադապար, նախ սինթեզվում է լրացչական ԴՆԹ-ն (լԴՆԹ) կադապարային ՌՆԹ-հիմքով, ապա իրականացվում է ՊՇՈՒ: Համապատասխանաբար օգտագործվում են ՌՆԹ- և ԴՆԹ-կախյալ ԴՆԹ-պոլիմերազները առանձին («երկու ֆերմենտ/երկու սրվակ») կամ միասին («երկու ֆերմենտ/մեկ սրվակ») ռեակցիաներում:

AMV («Avian myeloblastosis virus» անվանումից) հակադարձ տրանսկրիպտազի օգտագործումը թույլ է տալիս խուսափել ՌՆԹ երկրորդային կառուցվածքի առաջացման հետ կապված մի շարք խնդիրներից՝ ի տարբերություն MMLV («Moloney murine leukaemia virus» անվանումից) հակադարձ տրանսկրիպտազի, որն օժտված է թույլ արտահայտված ՌՆԱզային ակտիվությամբ:

Հակադարձ տրանսկրիպտազով սինթեզվող լԴՆԹ-ի քանակությունը պետք է ճշգրտորեն համապատասխանի ռեակցիոն միջավայր ներմուծվող կադապարային ՌՆԹ-ի քանակությանը: Ֆերմենտի բարձր որակը և մենահատկությունը որոշիչ են ՀՏ-ՊՇՈՒ ում: Հակադարձ տրանսկրիպտազը սովորաբար կազմված է 2 պոլիպեպտիդներից, որոնցից մեկն օժտված է 5'-3' ԴՆԹ-պոլիմերազային ակտիվությամբ, ինչպես նաև լԴՆԹ-ՌՆԹ հիֆրիդների նկատմամբ 5'-3' ռիբոէնդոնուկլեազային ակտիվությամբ, որը բերում է միաշղթա լԴՆԹ-ի և օլիգոռիբոնուկլեոտիդների առաջացման: Ջերմակայուն հակադարձ տրանսկրիպտազի (55-70°C) օգտագործումը թույլ է տալիս ստանալ իՌՆԹ-ի ճշգրիտ պատճեններ (քանի որ բարձր ջերմաստիճանը բարձրացնում է ռեակցիայի մենահատկությունը), հատկապես, երբ կադապարային ՌՆԹ-ն ունի GC բարձր պարունակություն:

1000 նգ մեծությամբ ԼԴՆԹ-ի սինթեզի համար հաճախ օգտագործում են *Tth* ԴՆԹ-պոլիմերազ Mn^{2+} իոնների առկայությամբ, մինչդեռ ավելի մեծ չափսերի ԼԴՆԹ-ի (մինչև 4000 նգ) ճշգրիտ սինթեզի համար անհրաժեշտ է օգտագործել *Clostridium thermocellum*-ի պոլիմերազը: Նշված ֆերմենտներն օժտված չեն ՌՆԱզ-ային ակտիվությամբ: Հարկ է նշել, որ *Tth* պոլիմերազը օգտագործվում է նաև հետագա ՊՇՌ ռեակցիայի ժամանակ (այսպես կոչված «մեկ ֆերմենտ/մեկ սրվակ» մեթոդի դեպքում), իսկ *C. thermocellum*-ի պոլիմերազը ապասկտիվանում է 95°C ջերմաստիճանային պայմաններում, ուստի հակադարձ տրանսկրիպցիայից հետո անհրաժեշտ է ներմուծել երկրորդ ֆերմենտը, օրինակ՝ *Taq* ԴՆԹ-պոլիմերազը:

«Invitrogen» ընկերության կողմից արտադրվում է «SuperScript™ VILO™ MasterMix» անվանմամբ SuperScript™ III հակադարձ տրանսկրիպտազ, ռեկոմբինանտ ռիբոնուկլեազների արգելակիչ (RNaseOUT™), օժանդակող սպիտակուցներ, դՆԵՖ, մենահատուկ մերաններ և $MgCl_2$ պարունակող բուֆերային լուծույթ, որը թույլ է տալիս իրականացնել շատ փոքր կոնցենտրացիայով ՌՆԹ-ից (<25 նգ) ԼԴՆԹ-ի սինթեզ: SuperScript™ III հակադարձ տրանսկրիպտազը ձևափոխված MMLV հակադարձ տրանսկրիպտազ է, որն օժտված է ավելի ցածր ՌՆԱզ-ային ակտիվությամբ և բարձր ջերմակայունությամբ (օպտիմալ ջերմաստիճանը 42-55°C):

Առաջադրանք 4.2.1. Լրացչական ԴՆԹ-ի ՊՇՌ սինթեզը հակադարձ տրանսկրիպտազի կիսումամբ

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ լուծույթներ, սարքեր և պարագաներ՝

- ≈25 նգ ՌՆԹ-ի նմուշ,
- SuperScript™ VILO™ MasterMix (Invitrogen, USA),
- Մանրէազերձ ԵԷՊԿ-ով մշակված և կրկնակի թորած ջուր,
- 0.2 մլ տարողությամբ կենտրոնախուսման սրվակներ (Էպենդորֆ), ավտոմատ պիպետների հավաքածու համապատասխան

ծայրակալներով, լատեքսային կամ նիտրիլային ձեռնոցներ, ՊՇՌ ամպլիֆիկատոր (Thermo Scientific™ Arktik™ Thermal Cycler):

Փորձի ընթացքը

1. Պատրաստել 20 մկլ վերջնական ծավալով ռեակցիոն խառնուրդ հետևյալ բաղադրությամբ՝ 2 մկլ ՌՆԹ, 4 մկլ SuperScript™ VILO™ MasterMix խառնուրդ և 14 մկլ մանրէազերծ ԵԷՊԿ-ով մշակված և կրկնակի թորած ջուր:

2. ՊՇՌ-ն իրականացնել հետևյալ փուլերով. 25°C, 10 րոպե, լԴՆԹ-ի սինթեզ՝ 42°C, 60 րոպե, ռեակցիայի արգելակում՝ 85°C, 5 րոպե և սառեցում՝ 4°C:

3. Սինթեզված լԴՆԹ-ն երևակել 0.8% ագարոզային ժելում էլեկտրաֆորեզի եղանակով (տե՛ս Առաջադրանք 5.1.1):

ԹԵՄԱ 5

ՆՈՒԿԼԵԻՆԱԹԹՈՒՆԵՐԻ ԺԵԼ-ԷԼԵԿՏՐԱՖՈՐԵԶ

Նուկլեինաթթուների ժել-էլեկտրաֆորեզը լայնորեն կիրառվում է նուկլեինաթթվային պատրաստուկի մաքրության աստիճանի, կոնցենտրացիայի և չափերի վերլուծության համար:

Էլեկտրաֆորեզի հիմնական սկզբունքն էլեկտրաշարժիչ ուժի ազդեցությամբ նուկլեինաթթուների (կամ սպիտակուցների) մոլեկուլների տեղափոխումն է ժելի մատրիքում: Մանրածակոտկեն պոլիակրիլամիդային ժելերը հաճախ օգտագործվում են 10-500 նգ հիմք պարունակող ԴՆԹ-ի հատվածների (նույնիսկ, եթե դրանք տարբերվում են նուկլեոտիդների մեկ հիմքով) տարաբաժանման համար: Ազարոզային ժելերը հիմնականում օգտագործվում են 100-20000 նգ հիմքեր պարունակող երկշղթա ԴՆԹ-ի մոլեկուլների տարաբաժանման համար:

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 5.1. ՆՈՒԿԼԵԻՆԱԹԹՈՒՆԵՐԻ ԱԳԱՐՈԶԱՅԻՆ ԺԵԼ ԷԼԵԿՏՐԱՖՈՐԵԶ

Էլեկտրաֆորեզի ժամանակ նուկլեինաթթուների մոլեկուլները տեղաշարժվում են բացասական էլեկտրոդից դրականի ուղղությամբ, որը պայմանավորված է մոլեկուլում բացասական լիցքավորված շաքար-ֆոսֆատային հիմքերի առկայությամբ: Ժելում երկշղթա ԴՆԹ-ի մոլեկուլների տեղաշարժման արագությունը կախված է ԴՆԹ-ի չափերից, իսկ ՌՆԹ-ի և միաշղթա ԴՆԹ-ի տեղաշարժումը կարող է բարդանալ դրանց երրորդային կառուցվածքների առաջացման հետևանքով: Սովորաբար էլեկտրաֆորեզը իրականացնում են 0.7-2% ազարոզային ժելում:

Էլեկտրաֆորեզի արդյունքում առաջացած ԴՆԹ-ի տարաբաժանված բծերը կարելի է երևակել՝ ազարոզային ժելը մշակելով էթիդիումի բրոմիդի լուծույթով: Վերջինս ներկառուցվում է ԴՆԹ-ի մոլեկուլներում և անդրլուսանցույցում ՈւՄ ճառագայթների նեքո լուսարձակում է (նկար 4): Այս մեթոդը թույլ է տալիս ժելում հայտնաբերել առնվազն 1-2 նգ ԴՆԹ-ի մոլեկուլուներ, իսկ ըստ բծի լուսարձակման ուժգնության՝ դատել

նմուշում ԴՆԹ-ի կոնցենտրացիայի մասին:

Պետք է նշել, որ Էթիդիումի բրոմիդի խնամակցությունը միաշղթա ՌՆԹ-ի նկատմամբ ավելի ցածր է, քան երկշղթա ԴՆԹ-ի, այդ պատճառով լուսարձակումը ՌՆԹ-ի դեպքում ավելի թույլ է:

Էլեկտրաֆորեզի ժամանակ ազարոզային ժելում ԴՆԹ-ի մոլեկուլներին շարժման արագությունը որոշվում է հինգ հիմնական չափանիշներով: Նախ՝ կարևոր նշանակություն ունի գծային երկշղթա ԴՆԹ-ի մոլեկուլի չափը, քանի որ Էլեկտրաֆորեզային շարժունակությունը հակադարձ համեմատական է մոլեկուլային զանգվածի տասնորդական հիմքով լոգարիթմին (այսինքն՝ ինչքան մոլեկուլների չափերը փոքր են, այնքան արագ են շարժվում): Նույն չափերով և լիցքով մոլեկուլները Էլեկտրական դաշտում միանման են շարժվում:

Երկրորդ կարևոր չափանիշը ազարոզի խտությունն է: Տարբեր խտությամբ ազարոզային ժելերը թույլ են տալիս արդյունավետորեն տարաբաժանել տարբեր չափերով ԴՆԹ-ի հատվածներ, քանի որ ԴՆԹ-ի Էլեկտրաֆորեզային շարժունակության և ազարոզային ժելի խտության միջև գոյություն ունի ուղիղ համեմատական կապ: Ազարոզը 1,4 կապերով կապված β -D-գալակտոպիրանոզի և 3,6-անհիդրիդ- α -1-գալակտոպիրանոզի մնացորդների հաջորդականություններից կազմված գծային բազմաշաքար է: Ժելի ձևավորման (պինդ վիճակի անցման) ջերմաստիճանային կետը 45°C-ն է:

Երրորդ չափանիշը ԴՆԹ-ի կոնֆորմացիան է: Միանման մոլեկուլային զանգված, սակայն տարբեր կոնֆորմացիաներ (երկշղթա օղակաձև, օղակաձև՝ միաշղթա խզվածքով, գերպարուրված, գծային) ունեցող ԴՆԹ-ի մոլեկուլներն ազարոզային ժելում տարբեր արագություններով են տեղաշարժվում: ԴՆԹ-ի տարբեր կոնֆորմացիոն ձևերի հարաբերական շարժունակությունը կախված է ազարոզի կոնցենտրացիայից, հոսանքի ուժից, Էլեկտրաֆորեզի համար նախատեսված բուֆերային լուծույթի իոնային ուժից և այլն:

Չորրորդ չափանիշը Էլեկտրական դաշտի լարումն է: Էլեկտրական դաշտի ոչ բարձր լարվածության պայմաններում գծային ԴՆԹ-ի տեղաշարժման արագությունը համեմատական է կիրառված լարմանը, սակայն լարվածության մեծացմանը զուգընթաց՝ ազարոզային ժելում ԴՆԹ-ի մո-

լեկուլների տարաբաժանման արդյունավետությունն ընկնում է, քանի որ ԴՆԹ-ի բարձրամոլեկուլային հատվածների շարժունակությունը մեծանում է: ԴՆԹ-ի հատվածների առավել արդյունավետ տարաբաժանումը տեղի է ունենում $\approx 5-8$ Վ/սմ լարվածության պայմաններում: Լարվածության արժեքը հաշվարկելու համար պետք է չափել անոդի և կատոդի միջև հեռավորությունը, ապա ստացված արժեքը բազմապատկվում է 5-ով՝ լարվածության միջին, կամ 8-ով՝ առավելագույն արժեքները որոշելու համար:

Ագարոզային ժելով ԴՆԹ-ի մոլեկուլների տեղաշարժման արագության վրա ամենաաննշան ազդեցությունը թողնում է ջերմաստիճանը: Սովորաբար 0.7-1% ագարոզային ժելում էլեկտրաֆորեզն իրականացնում են սենյակային ջերմաստիճանի պայմաններում, իսկ 0.3-0.5% փխրուն ժելերի հետ աշխատում են 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում:

Ագարոզային ժելում նուկլեինաթթուների հորիզոնական էլեկտրաֆորեզի իրականացման համար օգտագործվում են տարբեր ծավալներով պլաստմասսե խցիկներ, պլաստմասե տակդիրներ, ժելում գրպանիկներ ստանալու համար պլաստմասե սանրիկեր, ինչպես նաև հոսանքի ուժը կարգավորվող սարք (նկար 7):

Ժելի գրպանիկների մեջ ներմուծվող նուկլեինաթթվային յուրաքանչյուր պատրաստուկին նախապես խառնում են գլիցերին և գունանյութ (լիցքավորված ցածրամոլեկուլային միացություն) պարունակող բուֆերային լուծույթի հետ: Դա թույլ է տալիս էլեկտրաֆորեզի ընթացքում անգեն աչքով հետևել նմուշի տեղաշարժմանը (սովորաբար հետևում են, որպեսզի գունանյութը անցնի ժելի երկու երրորդը):

Էլեկտրաֆորեզում տարանջատված նուկլեինաթթուների բծերի չափերը կարելի է որոշել՝ օգտագործելով ԴՆԹ-ի չափանմուշներ (մարկերային ԴՆԹ կամ ԴՆԹ-սանդուղք): Վերջիններս ժելում նույն արագությամբ են տեղաշարժվում, ինչ համապատասխան չափերի նուկլեինաթթուների մոլեկուլները: Խորհուրդ է տրվում օգտագործել օրինակ՝ 1200-10000 նգ ԴՆԹ-ի ցածրամոլեկուլային հատվածներ: Նմուշում նուկլեինաթթվի կոնցենտրացիան որոշվում է համապատասխան հատվածների լուսարձակման ուժգնության համեմատությամբ:



Ա



Բ

Նկար 7. Ագարոզային ժել-էլեկտրաֆորեզի համար անհրաժեշտ պարագաներն ու սարքավորումները. Ա. Հոսանքի ուժը կարգավորող սարք, Բ. Էլեկտրաֆորեզային խցիկ, պլաստմասե տակդիր և սանրիկներ:

Առաջադրանք 5.1.1. Ագարոզային ժելում ԴՆԹ-ի հորիզոնական ժել էլեկտրաֆորեզ

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ լուծույթներ, սարքեր և պարագաներ՝

- Քրոմոսոմային ԴՆԹ-ի կամ ՊՇՌ ամպլիֆիկացված 16S ռԲՆԹ գենի պատրաստուկ,
- 1 կնգ ԴՆԹ-չափանմուշ (Invitrogen, USA) (տե՛ս հավելված 3),
- Տրիս-քացախաթթու-էԵՔՔ-ի (ՏՔԷ) բուֆերային լուծույթ (պատրաստումը տե՛ս հավելված 1-ում),
- Ագարոզ,
- Էթիդիումի բրոմիդի ջրային լուծույթ (10 մգ/մլ),
- Գլիցերին և գունանյութ պարունակող բուֆերային լուծույթ (պատրաստումը տես հավելված 1-ում),
- Էլեկտրական սալիկ կամ միկրոալիքային վառարան, կշեռք, էլեկտրական հոսանքի ուժը կարգավորող սարք, պլաստմասսայե խցիկ՝ պլատինե էլեկտրոդներով, պլաստմասսայե տակդիրներ, պլաստմասսայե սանրիկ, անդրլուսանցույց, ուլտրամանուշակագույն ճառագայթներից պաշտպանող սաղավարտ,
- Ավտոմատ պիպետներ՝ համապատասխան ծայրակալներով, լա-

տեքսային կամ նիտրիլային ձեռնոցներ, պարաֆիլմ:

Փորձի ընթացքը

1. Պատրաստել 0.8% կամ 1% ազարոզային ժել ՏՔԷ բուֆերային լուծույթում: Ազարոզը լիարժեք լուծելու համար դրա ջրային լուծույթը պետք է տաքացնել միկրոալիքային վառարանում կամ էլեկտրական սալիկի վրա 1-2 րոպե, մինչև դրա եռալը (զգուշությամբ՝ խուսափելու համար եռացող լուծույթի թափվելուց), ապա սառեցնել այն մինչև 45-60°C:

Ծանոթագրություն: *Եռալիս ազարոզի լուծույթը գոլորշիանում է, ուստի փոփոխվում է վերջինիս կոնցենտրացիան: Դրանից խուսափելու համար պաղեցված լուծույթին ավելացնել թորած ջուր պահանջված ծավալը ստանալու համար:*

2. Դեռևս հեղուկ բայց պաղեցված ազարոզային լուծույթին ավելացնել 1% էթիլդիումի բրոմիդի ջրային լուծույթը (1 մկլ 10 մլ ազարոզային լուծույթի հաշվարկով):

3. Ազարոզային լուծույթը զգուշությամբ լցնել խիստ հորիզոնական մակերեսի վրա տեղադրված պլաստմասսայե տակդիրի մեջ: Ժելում գրպանների ձևավորման համար անմիջապես, դեռևս չպոլիմերիզացված ժելի մեջ տեղադրել ատամնավոր սանրիկը (նկար 8): Եթե տակդիրի երկարությունը թույլ է տալիս, ապա միաժամանակ կարելի է տեղադրել պլաստմասսայե մի քանի սանրիկներ: Սանրիկը տեղադրելու ընթացքում անհրաժեշտ է ստուգել սանրիկի ատամիկի և տակդիրի հատակի միջև ձևավորված տարածության չափը: Այն պետք է կազմի 1-2 մմ: Ժելն ամբողջությամբ պնդանում է սենյակային ջերմաստիճանում 30-45 րոպեի ընթացքում:

4. Պոլիմերիզացումից հետո տակդիրով ժելը տեղափոխել էլեկտրաֆորեզային խցիկի մեջ և զգուշությամբ ավելացնել ՏՔԷ բուֆերային լուծույթն այնպես, որ ժելն ամբողջությամբ ծածկված լինի բարակ շերտով (2-3 մմ), և ժելի տակ չլինեն օդի պղպջակներ:

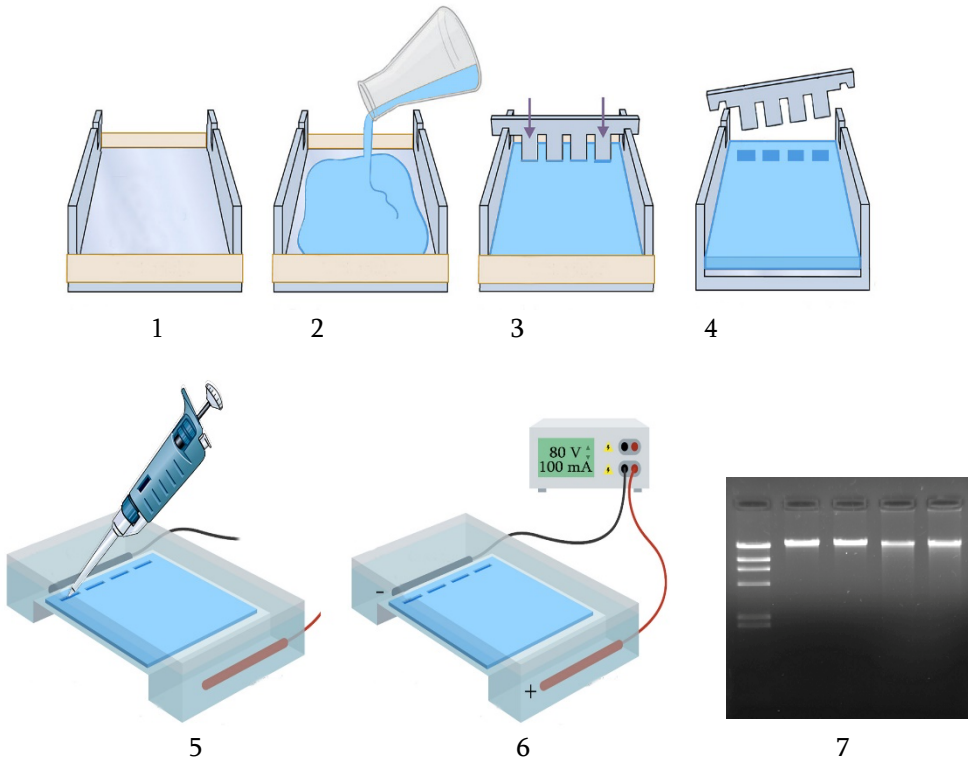
5. Սանրիկը զգուշությամբ հեռացնել ժելից: Հեռացնել նաև օդի պղպջակները, եթե դրանք կան:

6. Ուսումնասիրվող ԴՆԹ-ի 5 մկլ ծավալով լուծույթը խառնել գլիցերին և գունանյութ պարունակող բուֆերային լուծույթի հետ:

7. Ստացված խառնուրդը ծայրակալներով միկրոպիպետի միջոցով

զգուշությամբ լցնել էլեկտրաֆորեզային խցիկում տեղադրված ագարոզային ժելի գրպանիկների մեջ:

8. Էլեկտրաֆորեզային խցիկը փակել կափարիչով, էլեկտրոդները միացնել հոսանքի ուժը կարգավորող սարքի համապատասխան բևեռներին: Էլեկտրաֆորեզն իրականացնել 80-100 Վ լարվածության պայմաններում 40 րոպե:



Նկար 8. Ագարոզային ժել էլեկտրաֆորեզի իրականացման համար անհրաժեշտ պարագաները և փորձի արդյունքում ստացվող էլեկտրաֆորեզի օրինակը:

1. Ագարոզային ժելի պատրաստման համար պլաստմասսայե տակդիր, 2. Էթիդիումի բրոմիդ պարունակող հալեցված ագարոզային ժելի տեղափոխումը պլաստմասսայե տակդիրի մեջ, 3. սանրիկի տեղադրումը, 4. Գրպանիկները, որոնք առաջանում են ժելի պնդացումից հետո՝ սանրիկը հեռացնելիս, 5. ԴՆԹ, գլիցերին և գունանյութ պարունակող բուֆերային լուծույթի տեղափոխումն արդեն էլեկտրաֆորեզային խցիկում տեղադրված ագարոզային ժելի գրպանիկների մեջ, 6. էլեկտրաֆորեզային խցիկը՝ միացված հոսանքի ուժը կարգավորող սարքին, 7. Չափանմուշային և հետազոտվող գենոմային ԴՆԹ-ի ագարոզային ժելում անդրլուսանցույցով երևակելիս ստացվող էլեկտրաֆորեզի օրինակը:

9. Էլեկտրաֆորեզից հետո սարքն անջատել հոսանքի սնուցման սարքից, ագարոզային ժելը զգուշությամբ տեղափոխել անդրլուսանցույցի վրա երևակելու համար:

10. Լուսանկարել երևակված ժելը և վերլուծել ստացված էլեկտրաֆորեզիրը:

Առաջադրանք 5.1.2. Ագարոզային ժելում ՌՆԹ-ի հորիզոնական ժել էլեկտրաֆորեզ

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ լուծույթներ, սարքեր և պարագաներ՝

- ՌՆԹ-ի նմուշ,
- 1 կն պլազմիդային ստանդարտ մարկեր,
- ԵԷՊԿ պարունակող թորած ջրով պատրաստված ՏՔԷ բուֆերային լուծույթ (պատրաստումը տես հավելված 1-ում),
- Ագարոզ,
- Էթիդիումի բրոմիդի ջրային լուծույթ (10 մգ/մլ),
- Գլիցերին և գունանյութ պարունակող բուֆերային լուծույթ (պատրաստումը տես հավելված 1-ում),
- Էլեկտրական սալիկ կամ միկրոալիքային վառարան, կշեռք, էլեկտրական հոսանքի ուժը կարգավորող սարք, պլաստմասսայե խցիկ՝ պլատինե էլեկտրոդներով, պլաստմասսայե տակդիրներ, պլաստմասսայե սանրիկ, անդրլուսանցույց, ՈԻՄ ճառագայթներից պաշտպանող սաղավարտ,
- Ավտոմատ պիպետներ՝ համապատասխան ծայրակալներով, լատեքսային կամ նիտրիլային ձեռնոցներ, պարաֆիլմ:

Փորձի ընթացքը

Փորձի ընթացքը իրականացնել, ինչպես նկարագրված է առաջադրանք 5.1.1-ում:

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 5.2. ՆՈՒԿԼԵԻՆԱԹԹՈՒՆԵՐԻ ԲՆԱՓՈԽՈՂ ԳՐԱԴԻԵՆՏԱՅԻՆ ԺԵԼ ԷԼԵԿՏՐԱՖՈՐԵԶ

Գրադիենտային ժել էլեկտրաֆորեզն իր հերթին լինում է ջերմաստիճանային (ՋԳԺԷ՝ TGGE - Temperature gradient gel electrophoresis) կամ բնափոխող (ԲԳԺԷ՝ DGGE - Denaturing gradient gel electrophoresis): Սա համեմատաբար նոր մեթոդ է և ենթադրում է էլեկտրաֆորեզի եղանակով ՊՇՌ ամպլիկոնների (100-500 նգ ԴՆԹ-ի հատվածների) տարաբաժանումը բնափոխիչ գրադիենտ պարունակող պոլիակրիլամիդային ժելում: Ժելում բնափոփող գրադիենտը ստեղծվում է կա՛մ ջերմաստիճանային տարբերությամբ (ՋԳԺԷ), կա՛մ բնափոխիչ (դենատուրացնող) նյութերի՝ միզանյութի կամ ֆորմիատի ավելացմամբ (ԲԳԺԷ): Ժելում ՊՇՌ ամպլիկոնների տարաշարժը կախված է դրանց առաջնային կառուցվածքից և նուկլեոտիդային կազմից: Ջերմաստիճանի և բնափոխիչ նյութերի գրադիենտի շնորհիվ տարաշարժվող ԴՆԹ-ների երկշղթա մոլեկուլները (հալման/բնափոխման ենթարկվող դոմենները), պոլիակրիլամիդային ժելի գծային աճող գրադիենտում, կախված առաջնային կառուցվածքից և նուկլեոտիդային կազմից, որոշակի հատվածների հասնելով,՝ մասնակի ապապարուրվում են և կորցնում էլեկտրաֆորեզային շարժունակությունը: Արդյունքում ժելում առաջանում են ընդհատ բծեր, որոնցից յուրաքանչյուրը համապատասխանում է միևնույն հալման ջերմաստիճանով բնութագրվող որևէ հաջորդականության: Տեսականորեն մեթոդը թույլ է տալիս տարաբաժանել մինչև 500 նուկլեոտիդային զույգ պարունակող ամպլիկոններ, որոնք տարբերվում են նուկլեոտիդների նույնիսկ մեկ զույգով: Կարելի է մեթոդի զգայունությունը հասցնել մինչև 100%-ի, եթե տարանջատվող ԴՆԹ-հատվածներին նախօրոք միակցվեն այսպես կոչված սեղմակներ (clamp)՝ GC հիմքերի բարձր պարունակությամբ (մինչև 40-ի հասնող) նուկլեոտիդային հաջորդականություններ, որոնք կիրառվում են որպես հալման բարձր ջերմաստիճանային դոմեններ: Այդ հաջորդականությունների կցումն իրականացվում է կա՛մ կլոնացման, կա՛մ ՊՇՌ-ի ընթացքում:

Ի տարբերություն մոլեկուլային կլոնացման բարդ տեխնոլոգիայի՝ այս եղանակը թույլ է տալիս արագ գնահատել համակեցության բազմա-

զանությունը՝ հիմնված էլեկտրաֆորեզի ստացման վրա, որտեղ յուրաքանչյուր բիծ համապատասխանում է համակեցության որևէ անդամին: Այս եղանակը կարելի է համարել իդեալական բնական համակեցության կազմի փոփոխության դինամիկայի ուսումնասիրության համար:

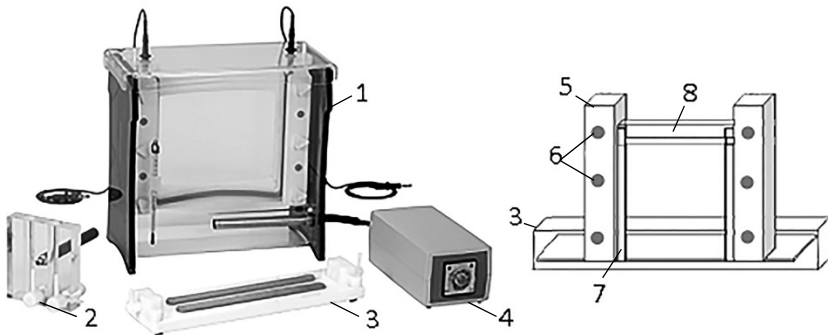
Դրա հետ մեկտեղ այս մեթոդը ունի որոշակի սահմանափակումներ: Օրինակ՝ դրա կիրառմամբ կարելի է տարաբաժանել գեներ միայն համեմատաբար ոչ մեծ թվով անդամներ (մի քանի տասնյակ տեսակ) պարունակող համակեցություններից: Բացի այդ, իրենց շատ փոքր պարունակության հետևանքով ՊՇՌ ամպլիկոնների որոշ բծեր այլ բծերի ֆոնի վրա կարող են լինել դժվար տեսանելի: Մյուս կողմից, ազգակցականորեն մոտ օրգանիզմների ամպլիկոնների բարձր պարունակության պարագայում էլեկտրաֆորեզում դրանք կարող են երևակվել մեկ հոծ բծի տեսքով: Այս ուղղելի և լուծելի խնդիրներից զատ՝ առկա են նաև առավել բարդ խնդիրներ, օրինակ՝ ՊՇՌ-ի ժամանակ քիմերային ամպլիկոնների ինքնաբերական սինթեզը, որոնք կարող են սխալմամբ դիտարկվել որպես նմուշում առկա նոր, չնույնականացված կամ չկուլտիվացվող օրգանիզմների ֆիլոտիպեր:

Առաջադրանք 5.2.1. GC հաջորդականություններով հարուստ մերաններով ՊՇՌ ամպլիֆիկացված բակտերիական 16S rDNA-ի գենի կարճ հատվածների տարանջատումը ԲԳԺԷ եղանակով

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ լուծույթներ, սարքեր և պարագաներ՝

- GC հաջորդականություններով հարուստ մերաններով կրկնապատկված բակտերիական 16S rDNA-ի նմուշ,
- 0.5x նոսր ՏՔԷ բուֆեր,
- 8% պոլիակրիլամիդային լուծույթ (պատրաստումը տե՛ս հավելված 1-ում),
- 7U մրջնաթթու և 40% ապաիոնացված ֆորմամիդ պարունակող 8% պոլիակրիլամիդային լուծույթ (պատրաստումը տե՛ս հավելված 1-ում),
- 10% ամոնիումի պերսուլֆատ (ԱՊՍ),

- Եռմեթիլէթիլէներկամին (ԵՄԷԵԱ),
- Գլիցերին և գունանյութ պարունակող բուֆեր (Loading dye),
- Ժելում նուկլէինաթթուների երևակման համար նախատեսված SYBR GOLD-ի ՏԷ լուծույթ,
- 96% էթանոլ,
- Մանրէազերծված թորած ջուր,
- Էլէկտրաֆորէզային խցիկ, ապակյա հարթակներ, ապակյա հարթակների կրիչ՝ իրենց բռնակներով, տակդիր, պլաստմասսայե սանրեր, տաքացուցիչ, գրադիէնտային խառնիչ (նկար 9), ռետինե խողովակ, հոսանքի ուժը կարգավորող սարքավորում, մագնիսական խառնիչ, պոմպ,
- 1.5 մլ տարողությամբ կենտրոնախուսման սրվակներ, ավտոմատ պիպետների հավաքածու՝ համապատասխան ծայրակալներով, լատեքսային կամ նիտրիլային ձեռնոցներ, ՈւՄ անդրլուսանցույց, պլաստիկ թափանցիկ թաղանթ:



Նկար 9. ԲԳԺԷ իրականացման համար նախատեսված սարքավորումներ և պարագաներ:

1. Էլէկտրաֆորէզային խցիկ, 2. Գրադիէնտային խառնիչ, 3. Տակդիր, 4. Տաքացուցիչ, 5. Ապակյա հարթակների կրիչ, 6. Բռնակներ 7. Միջադիրներ, 8. Ապակյա հարթակներ:

Փորձի ընթացքը

1. Բնափոփոխ գրադիենտային ժելի պատրաստման համար նախատեսված ապակյա հարթակները մաքրել 96% էթանոլով և տեղադրել խցիկում՝ օգտագործելով դրա համար նախատեսված միջադիրները, բռնակները և տակդիրը այն հերթականությամբ, ինչպես պատկերված է նկար 10-ում:

2. Պատրաստել 30% և 70% միզանյութ և ապախոնացված ֆորմամիդ պարունակող լուծույթներ (պատրաստումը տե՛ս հավելված 1-ում) և լցնել բնափոփոխ գրադիենտային ժելի պատրաստման համար նախատեսված երկխցիկ տարայի համապատասխան խցիկի մեջ,

3. Երկխցիկ տարան տեղադրել մագնիսական խառնիչի վրա, իսկ ծորանից դուրս եկող խողովակը տեղադրել ապակյա հարթակների միջև: Ինչպես երկխցիկ տարայից դուրս եկող կարճ խողովակի ծորանի, այնպես էլ խցիկներն իրար հաղորդակցող միջխցիկային խողովակի ծորանի փականները պետք է լինեն փակված (նկար 11):

4. Նախ գգուշությամբ պետք է բացել երկխցիկ տարայից դուրս եկող կարճ խողովակի ծորանի փականը, որի հետևանքով խիտ (70% միզանյութ և ֆորմամիդ պարունակող) լուծույթը երկխցիկ տարայից կհոսի ռետինե խողովակով և կլցնի երկու ապակյա հարթակների միջև տարածությունը մինչև 0.5 սմ բարձրությամբ: Այնուհետև պետք է բացել երկխցիկ տարայի միջխցիկային խողովակի ծորանի փականը, որպեսզի խիտ և նոսր լուծույթները միախառնվելով լցնեն երկու ապակյա հարթակների միջև ամբողջ տարածությունը (նկար 11):

5. Տեղադրել պլաստմասսայե սանրիկը և սպասել 30-40 րոպե, մինչև ժելի պոլիմերացումը: Ցանկալի պոլիմերացումն իրականացնել սառնարանային պայմաններում 2-3 ժամվա ընթացքում:

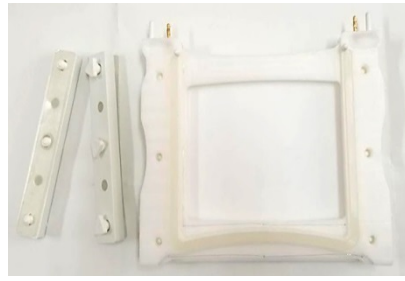
6. Էլեկտրաֆորեզային խցիկի մեջ ավելացնել ՏՔԷ բուֆերային լուծույթ ($\times 0.5$ նոսր), տեղադրել մագնիսական խառնիչի վրա և տաքացնել մինչև 60°C խցիկին կից տաքացուցիչով:



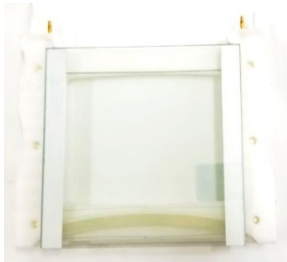
1



2



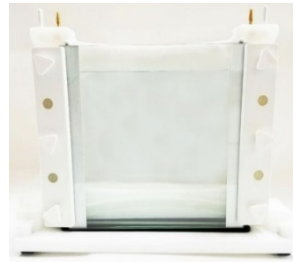
3



4

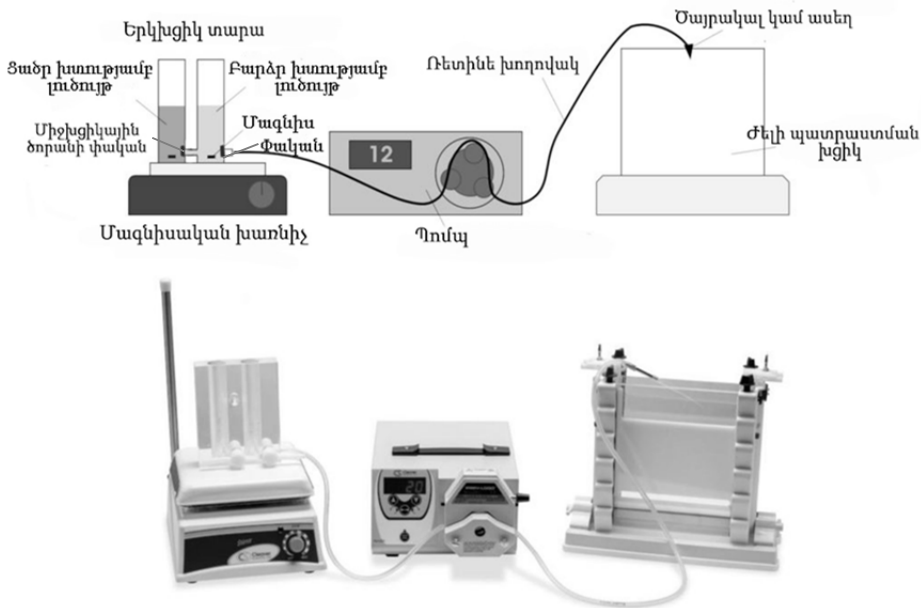


5



6

Նկար 10. Բնափոփոխ գրադիենտային ժելի պատրաստման համար ապակյա հարթակները, միջադիրները, բռնակները, տակդիրները և խցիկը:
1-2. 96% էթանոլով նախապես մաքրված ապակյա հարթակները միջադիրներով (ապակյա հարթակներից մեկը՝ հետին հարթակը, ելունդավոր է և նախատեսված է սանրի տեղադրման համար), 3-5. միջադիրներով ապակյա հարթակների տեղադրումը ապակիների կրիչի վրա և ամրացումը բռնակներով: Ապակյա հարթակները տեղադրվում են այնպես, որ ելունդավոր ապակյա հարթակը գտնվի խցիկի ներսի կողմում (կրիչին հպված): 6. Ապակյա հարթակներով, միջադիրներով և կրիչով համալիրի ամրացումը տակդիրին:



Նկար 11. Բնափոխող գրադիենտային ժելի պատրաստումը:

7. Պոլիմերացումից հետո տակդիրով գրադիենտային ժել պարունակող ապակյա հարթակներով խցիկն առանձնացնել տակդիրից և տեղադրել էլեկտրաֆորեզային խցիկի մեջ:

8. Զգուշությամբ ավելացնել ՏՔԷ բուֆերային լուծույթ ($\times 0.5$ նոսր), այնպես, որ այն ամբողջովին ծածկի ժելը: Սպասել մինչև բուֆերային լուծույթը կրկին կտաքանա մինչև 60°C :

9. Մանրիկը զգուշությամբ հեռացնել ժելից: Գրպանիկներից հեռացնել օդի պղպջակները:

10. 15 մկլ ԴՆԹ-ի լուծույթը խառնել գլիցերին և գունանյութ պարունակող բուֆերային լուծույթի հետ և լցնել ժելում սանրների հեռացումից առաջացած գրպանիկների մեջ:

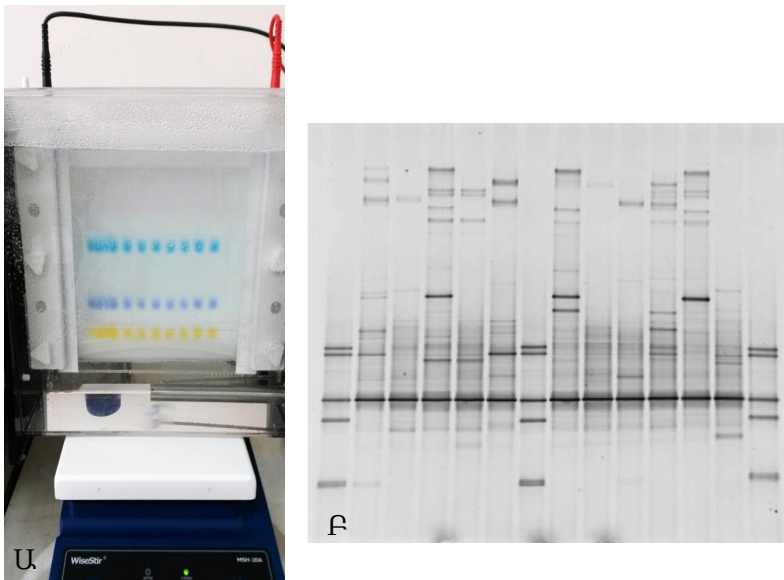
11. Էլեկտրաֆորեզային խցիկը փակել կափարիչով, էլեկտրոդները միացնել հոսանքի ուժը կարգավորող սարքավորմանը: Էլեկտրաֆորեզն իրականացնել 200 Վ լարվածության պայմաններում 4 ժամվա ընթացքում (նկար 12 Ա):

12. Էլեկտրաֆորեզի ավարտից հետո պոլիակրիլամիդային ժելը

ապակյա հարթակներով հանդերձ զգուշությամբ հեռացնել խցիկից, առանձնացնել բռնակները և ապակյա հարթակները տեղադրել հորիզոնական դիրքով, ապա հեռացնել վերին ապակյա հարթակը:

13. Պատրաստել SYBR GOLD բուֆերային լուծույթ հետևյալ բաղադրությամբ՝ 10 մլ 10x խիտ SՔԷ բուֆերային լուծույթ, 1 մլլ SYBR GOLD:

14. SYBR GOLD բուֆերային լուծույթը ամբողջությամբ լցնել պոլիակրիլամիդային ժելի մակերեսին, այնպես որ ժելն ամբողջությամբ ծածկված լինի, և տեղադրել մթության մեջ 1 ժամ:



Նկար 12. ԲԳԺԷ-ի ավարտը և ժելում գունանյութերի բաշխումը (Ա), 16S ռՌՆԹ գեների կարճ հատվածների բնափոխող գրադիենտային ժելի երևակումից ստացված էլեկտրաֆորեզիրը (Բ):

15. Պոլիակրիլամիդային ժելը ապակյա հարթակից զգուշությամբ տեղափոփել թափանցիկ պլաստիկ թաղանթի վրա, ապա երևակել ՈւՄ անդրլուսանցույցով (նկար 12 Բ):

16. Անհրաժեշտության դեպքում ժելում առաջացած բծերը զգուշությամբ կտրատել ծածկապակու միջոցով և տեղափոխել 1.5 մլ տարողությամբ կենտրոնախուսման սրվակներ: Ավելացնել 50 մլլ մանրէազերծված թորած ջուր և տեղադրել 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում ԴՆԹ-ի հետլուծման (էլյուցիայի) համար:

ԹԵՄԱ 6

ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՑԻՆ ԿԼՈՆԱՎՈՐՈՒՄ

Մոլեկուլային կլոնավորումը կամ ԴՆԹ-ի ռեկոմբինանտ մոլեկուլների ստացումը կարևոր է ինչպես հիմնարար գիտական հետազոտությունների, այնպես էլ կենսատեխնոլոգիական կիրառական նպատակների տեսանկյունից: Մոլեկուլային կլոնավորման շնորհիվ ստեղծվել են նախապես հայտնի հատկություններով գենաճարտարագիտական շտամներ, ուսումնասիրվել են առանձին գեների ամպլիֆիկացման ազդեցությունը բջջային նյութափոխանակության վրա, վերծանվել են որոշակի ֆենոտիպի համար պատասխանատու գեները, բացահայտվել են գեներում նուկլեոտիդային հաջորդականությունները:

Մոլեկուլային կլոնավորման էությունը օտարածին ԴՆԹ-ի որոշակի հատվածների ներկառուցումն է, այսպես կոչված, վեկտորային մոլեկուլների (այսուհետ՝ ուղղակի վեկտորներ) մեջ: Վեկտորներն ինքնավար կրկնապատկվելու ունակ պլազմիդային կամ վիրուսային ԴՆԹ-ի մոլեկուլներ են: Ռեկոմբինանտ ԴՆԹ-ի կառուցման համար նախ վեկտորի նուկլեոտիդային հաջորդականությունները ճեղքվում են էնդոնուկլեազային ֆերմենտներով՝ ռեստրիկտազներով, ապա ԴՆԹ-լիզազ ֆերմենտներով *in vitro* միացվում օտարածին ԴՆԹ-ին: Ստացված վերախմբավորված (ռեկոմբինանտ) ԴՆԹ-ն տրանսֆորմացվում է բակտերիական կոմպետենտ ընդունող կամ ռեցիպիենտ բջիջներում: Մանրէային գաղութներից (կլոններից) առանձնացվում են ռեկոմբինանտ ԴՆԹ պարունակող բջիջները: Անհրաժեշտության դեպքում կարելի է մակածել կլոնավորված գենի արտահայտումը տրանսֆորմացված բջիջներում:

Մոլեկուլային կլոնավորման գործընթացում առաջնահերթ խնդիր է ռեկոմբինանտ պլազմիդային ԴՆԹ պարունակող բակտերիական կլոնները դատարկ պլազմիդային վեկտորներով բակտերիական կլոններից: Ռեկոմբինանտ ԴՆԹ պարունակող բջիջների ընտրությունն իրականացվում է ինչպես նշակիրային հատկանիշների շնորհիվ, որոնցով օժտված է հենց վեկտորը, այնպես էլ շտամի ֆենոտիպի՝ ԴՆԹ-ի կլոնավորված հատվածի առաջացրած փոփոխություններով: Որպես ընտրողական հատկանիշ՝ սովորաբար կիրառվում է կա՛մ հակաբիոտիկի նկատմամբ

կայունությունը, որով մինչ տրանսֆորմացումը բջիջներն օժտված չէին, կա՛մ ինչ-որ ֆերմենտ սինթեզելու ունակությունը, որով օժտված չէր ռեցիպիենտ բջիջը նախկինում: Եթե վերոնշյալ մեթոդներով հնարավոր չի լինում իրականացնել ընտրությունը, կիրառվում է ՊՇՌ վերլուծություն, ԴՆԹ-ԴՆԹ հիբրիդացման կամ ԴՆԹ-ի ռեկոմբինանտ մոլեկուլներ պարունակող բջիջների հայտնաբերման իմունաբանական մեթոդներ:

ԴՆԹ-ի հատվածների կամ գեների կլոնավորումը պլազմիդային վեկտորներում իրականացում է 3 փուլերով.

1. վեկտորի կտրում էնդոնուկլեազների (ռեստրիկտազների) կիրառմամբ համապատասխան կետում (ռեստրիկցիայի սայթ կամ տեղամաս),
2. վեկտորի և ԴՆԹ-ի հատվածի կամ գենի կարում ԴՆԹ-լիգազների կիրառմամբ,
3. ռեկոմբինանտ վեկտորի տրանսֆորմացում բակտերիական բջիջ և կլոնավորված գենը կրող ռեկոմբինանտ բակտերիաների ընտրություն:

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 6.1. ՎԵԿՏՈՐԻ ԿՏՐՈՒՄԸ ԷՆԴՈՆՈՒԿԼԵԱԶՆԵՐԻ ԿԻՐԱՌՄԱՄԲ

Էնդոնուկլեազները ճեղքում են արտաքին միջավայրից ներթափանցած օտարածին ԴՆԹ մոլեկուլները: Ռեստրիկտազները, ճանաչելով ԴՆԹ-ի 4-8 նուկլեոտիդներից բաղկացած ռեստրիկցիայի սայթը կամ ճանաչման տեղամասը, իրականացնում են ԴՆԹ-ի երկշղթա պարույրի տրոհում այդ խիստ որոշակի տեղամասում: Ճեղքվում է կապը մեկ նուկլեոտիդի շաքարային մնացորդի 3՛ - ածխածնի դիրքում թթվածնի և հարևան նուկլեոտիդի շաքարային մնացորդի 5՛ - ածխածնի դիրքում ֆոսֆատային խմբի միջև եղած ֆոսֆոէրկթերային կապը: Ռեստրիկտազների ստացման աղբյուր ծառայում են տարբեր բակտերիաներ. այսպես *EcoRI* ռեստրիկտազն անջատվել է *E. coli*-ից, իսկ *HindIII*-ը՝ *Haemphilus influenza*-ից:

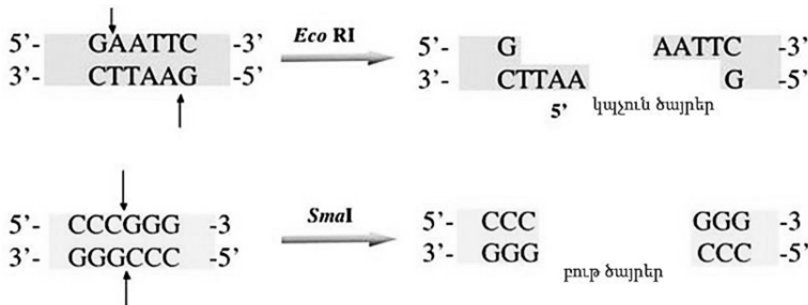
Ռեստրիկտազների մեծամասնությունը ունակ է ճանաչելու նուկլեոտիդների միայն մեկ որոշակի հատված, սակայն կան ռեստրիկազներ,

որոնք ունեն մեկից ավելի ռեստրիկցիայի սայթեր: Գոյություն ունեն նաև ռեստրիկտազներ, որոնք ունակ են ճանաչելու միևնույն տեղամասը և տրոհելու ԴՆԹ-ի նույն հատվածը: Այդպիսի ռեստրիկտազներն անվանվում են **իզոշիզոմերներ**, օրինակ՝ *SphI* (CGTAC[^]G) և *BbuI* (CGTAC[^]G) ռեստրիկտազները: Այն ռեստրիկտազները, որնք ունակ են ճանաչելու միևնույն ռեստրիկցիայի սայթը, սակայն ԴՆԹ-ի նույն հատվածը տրոհում են տարբեր եղանակով, անվանվում են **հետերոշիզոմերներ**, օրինակ՝ *SmaI* (GGG[^]CCC) և *XmaI* (G[^]GGCCC) ռեստրիկտազները: Իսկ այն ռեստրիկտազները, որոնք ճանաչում են ԴՆԹ-ի տարբեր հատվածներ, բայց ԴՆԹ-ի տրոհման արդյունքում առաջացնում են միանման ծայրեր, անվանվում են **իզոկատուոմերներ**, օրինակ՝ *MboI* (N[^]GATN) և *BamHI* (G[^]GATC) ռեստրիկտազները: Մի շարք ռեստրիկտազների բնութագրերը տե՛ս հավելված 2-ում:

Հայտնի են 3 տիպի ռեստրիկտազներ: I և III տիպերին պատկանող ռեստրիկտազները ունեն ինչպես մեթիլացնող, այնպես էլ ԱԵՖ կախյալ տրոհող ակտիվություն: Վերջիններս տարբերվում են միայն ԴՆԹ-ի մոլեկուլում ռեստրիկցիայի սայթից տրոհվող տեղամասի տեղադրությամբ: Այսպես. I տիպի ռեստրիկտազները ԴՆԹ-ի մոլեկուլում առաջացնում են պատահական տրոհումներ ճանաչման սայթից մեծ հեռավորությունների վրա (ոչ պակաս, քան 1000 նգ), իսկ III տիպի ռեստրիկտազները իրականացնում են ԴՆԹ-ի տրոհում ռեստրիկցիայի սայթին մոտ:

II տիպի ռեստրիկտազները ներառում են երկու տարբեր ֆերմենտներ՝ էնդոնուկլեազներ և մեթիլազներ, որոնք ճանաչում են ԴՆԹ-ի միևնույն հատվածը: Այս դեպքում ռեստրիկցիայի սայթը 4-8 նգ կազմված երկշղթա ԴՆԹ-ի հատվածն է, որը բնորոշվում է 2-րդ կարգի հայելանման համաչափությամբ (պալինդրոմ՝ նուկլեոտիդների հաջորդականությունները երկու ուղղություններում կարդացվում են միանման): Եթե ռեստրիկցիայի սայթը մեթիլացված չէ, ապա II տիպի ռեստրիկտազն առաջացնում է ԴՆԹ-ի երկու շղթաների տրոհում: Դա տեղի չի ունենում, երբ ԴՆԹ-ի նույնիսկ մեկ շղթան մեթիլացված է: II տիպի ռեստրիկտազները պահպանում են բակտերիական բջիին օտարածին ԴՆԹ-ի ներթափանցումից: Մոլեկուլային կլոնավորման աշխատանքներում մեծամասամբ կիրառվում են II տիպի ռեստրիկտազները:

II տիպի ռեստրիկտազները երկշղթա ԴՆԹ-ն տրոհում են երկու եղանակով՝ ռեստրիկցիայի սայթի համաչափության առանցքին ուղղահայաց և երկու շղթաների ռեստրիկցիայի սայթի մի քանի նուկլեոտիդային հենավորության վրա գտնվող տարբեր կետերում: Առաջին դեպքում (օրինակ՝ *SmaI*, *PvuII*) առաջանում են ԴՆԹ-ի բուրժայրերով հատվածներ, իսկ երկրորդ դեպքում (օրինակ՝ *EcoRI*, *HindIII*)՝ կաշուն ծայրերով հատվածներ (նկար 13):



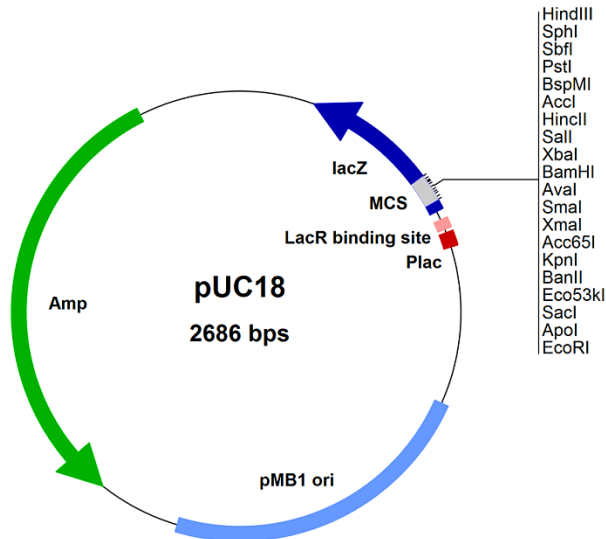
Նկար 13. *EcoRI* և *SmaI* ռեստրիկտազների երկշղթա ԴՆԹ-ում ռեստրիկցիայի սայթերը և ԴՆԹ-ի ձեղքման արդյունքում առաջացած ծայրերը:

Կաշուն ծայրերը կարելի է վերածել բութ ծայրերի *E. coli*-ի ԴՆԹ-պոլիմերազ I-ի ձեղքումից առաջացած Կլենովի բեկորի կիրառմամբ, որը սինթեզում է 3'→5' շղթային լրացչական 5'→3' շղթայում բացակայող նուկլեոտիդները: Յուրաքանչյուն կաշուն ծայրերով միաշղթա ԴՆԹ-ն հեշտությամբ կարող է միանալ իրեն լրացչական ցանկացած շղթայի: Ուստի նույն ռեստրիկցիայի սայթ պարունակող տարբեր ԴՆԹ-ի հատվածները կարող են միաձուլվել լրացչական սկզբունքով՝ առաջացնելով ռեկոմբինանտ ԴՆԹ: Դա կանխելու համար ռեստրիկցիայի արդյունքում առաջացած ԴՆԹ-ի կաշուն ծայրերը անհրաժեշտ է վերափոխել բութ ծայրերի:

Առաջադրանք 6.1.1. pUC18 վեկտորի կտրումը *HindIII* ռեստրիկտազի կիրառմամբ

pUC18 վեկտորը փոքր մոլեկուլային զանգվածով, *E. coli*-ի բջիջներում ամպլիֆիկացման բարձր ունակությամբ պլազմիդային ԴՆԹ-ի մոլեկուլ է:

Այն պարունակում է ամպիցիլինի հանդեպ կայունության գեն, ինչպես նաև *E. coli*-ի լակտոզային օպերոնի գեններ (նկար 14):



Նկար 14. pUC18 պլազմիդային վեկտորի գենետիկական քարտեզը:

Amp ■ - ամպիցիլինի հանդեպ կայունությունը ապահովող գեն, pMB1 ori ■ - *E. coli*-ի բջիջներում վեկտորի վերարտադրականությունը ապահովող գեն, Plac ■ - *lac* օպերոնի պրոմոտոր, LacR ■ - *lac* օպերոնի ռեպրեսորի միակցման հատված, MCS (Multiple cloning site) ■ - ռեստրիկցիային սայթեր, ■ - *lacZ* գեն:

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ ֆերմենտները, լուծույթներ, սարքեր և պարագաներ՝

- pUC18 պլազմիդային վեկտոր,
- *Hind*III ռեստրիկտազ (BioLabs, New England),
- NEB 2.1 բուֆեր (BioLabs, New England),
- Մանրէազերծ կրկնակի թորած ջուր,
- 96% էթանոլ,
- ԴՆԹ-ի ռեստրիկցիան արգելակող լուծույթ (պատրաստումը տե՛ս հավելված 1-ում),

- 1.5-2 մլ տարողությամբ կենտրոնախուսման սրվակներ (Էպենդորֆ), ավտոմատ պիպետների հավաքածու՝ համապատասխան ծայրակալներով,
- Ջերմապահարան, սառցախցիկով կենտրոնախուսակ, սառցե խցիկ, լամինար բոքս, լատեքսային կամ նիտրիլային ձեռնոցներ, սառնարան:

Փորձի ընթացքը

1. 1 մլլ pUC18 պլազմիդային վեկտորի բուֆերային լուծույթը (50 մկգ/մլ) ավելացնել 13 մլլ մանրէազերծ կրկնակի թորած ջուր, 1 մլլ (1 Մի-ավոր/մլլ) *Hind*III ռեստրիկտազ ֆերմենտ և 5 մլլ 10x խիտ NEB 2.1 բուֆերային լուծույթ պարունակող խառնուրդին (խառնուրդի վերջնական ծավալը պետք է լինի 50 մլլ):

2. Ինկուբացնել 37°C ջերմաստիճանային պայմաններում 1 ժամ:

3. Ռեակցիոն խառնուրդից 1մլլ առանձնացնել և ստուգել ռեակցիայի արդյունավետությունն էլեկտրաֆորեզի եղանակով (տե՛ս Առաջադրանք 5.1.1.): Եթե ռեակցիան ընթացել է ոչ արդյունավետ (ամբողջությամբ չեն առաջացել գծային ԴՆԹ-ի մոլեկուլներ) ապա էլեկտրաֆորեզում 1 բծի փոխարեն կստացվեն 2 բծեր:

Ծանոթագրություն: Հաճախ վեկտորի կտրումը արդյունավետ իրականացնելու համար օգտագործվում են ԴՆԹ-ի նույն հատվածը կտրող 1-ից ավելի ռեստրիկտազներ: Այս դեպքում հարկավոր է հաշվի առնել տվյալ ֆերմենտի ակտիվության համար կիրառվող բուֆերային լուծույթի կազմը: Եթե վերջինս տարբերվում է, ապա տարբեր ռեստրիկտազներով կտրումը իրականացվում է հաջորդաբար՝ յուրաքանչյուր գործընթացից հետո իրականացնելով վեկտորային ԴՆԹ-ի մաքրում:

4. Եթե ռեակցիան 1 ժամվա ընթացքում արդյունավետ չի ընթացել, ապա այն ինկուբացնել 37°C ջերմաստիճանային պայմաններում ևս 2-3 ժամ:

5. Ռեակցիան արգելակել 10 մլլ արգելակող լուծույթի ավելացմամբ կամ 80°C ջերմաստիճանային պայմաններում 20 րոպե ջերմամշակմամբ:

6. Ստացված գծային վեկտորային ԴՆԹ-ն նստեցնել՝ ավելացնելով 50 մլլ 96% նախապես սառեցված էթանոլ: Ինկուբացնել -20°C ջերմաստիճանային պայմաններում 30-60 րոպե, մինչև նստվածքի առաջացումը:

7. Նմուշը կենտրոնախուսել 15000 պտույտ/րոպե արագությամբ 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում 5-10 րոպե տևողությամբ:

8. Զգուշությամբ հեռացնել վերնստվածքը, սրվակի հատակից և պատերից հեռացնել վերնստվածքի հետքերը: Շրջելով բաց սրվակը՝ ԴՆԹ-ի նստվածքը չորացնել օդում 5-10 րոպեի ընթացքում:

9. ԴՆԹ լուծել 20 մկլ մանրէազերծ կրկնակի թորած ջրում:

10. Պատրաստուկը պահպանել -20°C ջերմաստիճանային պայմաններում մինչ կիրառումը:

Առաջադրանք 6.1.2. Կտրված գծային ԴՆԹ-ի կաչուն ծայրերի ապաֆոսֆորիլացումը

Գծային ԴՆԹ-ի օդակավորումը կանխելու համար իրականացվում է վեկտորային ԴՆԹ-ի կտրման արդյունքում առաջացած կաչուն ծայրերի ապաֆոսֆորիլացում: Ապաֆոսֆորիլացման համար հիմնականում օգտագործվում է բակտերիաներից (BAC), մանրածովախեցգետնից (SAP) և հորթի աղիներից (CIAP) անջատված հիմնային ֆոսֆատազներ: Առավել հաճախ կիրառվում են SAP և CIAP ֆոսֆատազները, որոնք, ի տարբերություն BAC ֆոսֆատազների, քիչ ջերմակայուն են և ռեակցիայի ավարտից հետո հեշտությամբ կարող են արգելակվել 15 րոպե ջերմամշակելով 68°C ջերմաստիճանային պայմաններում:

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ ֆերմենտները, լուծույթներ, սարքեր և պարագաներ՝

- Գծային վեկտորային ԴՆԹ-ի պատրաստուկ,
- CIAP ֆոսֆատազ իր բուֆերային լուծույթով (Invitrogen, USA),
- 5 մՄ ԷԵՔՔ (pH 8.0),
- Ֆենոլի, քլորոֆորմի և իզոամիլաին սպիրտի (25:24:1) լուծույթ,
- 3Մ Na-քացախաթթու,
- 96% էթանոլ,
- մանրէազերծ կրկնակի թորած ջուր,

- 1.5-2 մլ տարողությամբ կենտրոնախուսման սրվակներ (Էպենդորֆ), ավտոմատ պիպետների հավաքածու՝ համապատասխան ծայրակալներով,
- Ջերմապահարան, սառցե խցիկ, լամինար բոքս, լատեքսային կամ նիտրիլային ձեռնոցներ, սառնարան:

Փորձի ընթացքը

1. 20 մլլ (0.2-1 պՄ) գծային վեկտորային ԴՆԹ-ն ավելացնել 6 մլլ 10x խիտ ապաֆոսֆորիլացման բուֆերային լուծույթ, 2 մլլ CIAP ֆոսֆատազ և 32 մլլ մանրէազերծ երկակի թորած ջուր պարունակող խառնուրդին (խառնուրդի վերջնական ծավալը պետք է լինի 60 մլլ):

2. Ինկուբացնել 37°C ջերմաստիճանային պայմաններում 20 րոպե (բուրժ ծայրերով գծային վեկտորային ԴՆԹ-ի ապաֆոսֆորիլացումն իրականացնել 50°C ջերմաստիճանային պայմաններում 20 րոպե):

3. Ռեակցիան արգելակել՝ ավելացնելով 0.3 մՄ ԷԵՔՔ և 65°C ջերմաստիճանային պայմաններում 15 րոպե ջերմամշակելով:

4. Ապաֆոսֆորիլացված գծային վեկտորային ԴՆԹ-ի մաքրման համար խառնուրդին ավելացնել համարժեք ծավալով ֆենոլի, քլորոֆորմի և իզոամիլային սպիրտի (25:24:1) խառնուրդ, լավ խառնել և կենտրոնախուսել 15000 պտույտ/րոպե արագությամբ սենյակային ջերմաստիճանային պայմաններում 5 րոպե:

5. Զգուշությամբ հեռացնել վերին ջրային շերտը և տեղափոխել նոր սրվակների մեջ:

6. Ավելացնել 0.1 ծավալ 3Մ Na-քացախաթթու և խառնել:

7. Ավելացնել 2.5 ծավալ նախապես սառեցված 96%-ոց էթանոլ, զգուշությամբ խառնել և կենտրոնախուսել 15000 պտույտ/րոպե արագությամբ սենյակային ջերմաստիճանային պայմաններում 5 րոպե:

8. Զգուշությամբ հեռացնել վերնստվածքը, սրվակի հատակից և պատերից հեռացնել վերնստվածքի հետքերը ու, շրջելով բաց սրվակը, ԴՆԹ-ի նստվածքը չորացնել օդում 5-10 րոպեի ընթացքում:

9. ԴՆԹ-ն լուծել 20 մլլ մանրէազերծ կրկնակի թորած ջրում:

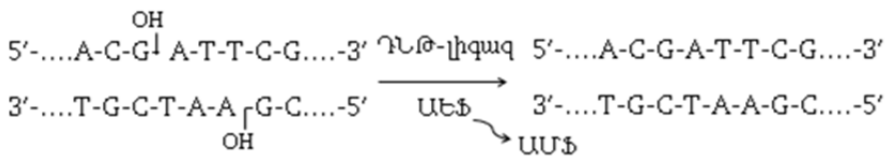
10. Պատրաստուկը պահպանել -20°C ջերմաստիճանային պայմաններում մինչ կիրառումը:

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 6.2. ԴՆԹ ՀԱՏՎԱԾԻ ԿԱՄ ԳԵՆԻ ԿԱՐՈՒՄԸ ՎԵԿՏՈՐԱՅԻՆ ԴՆԹ-ԻՆ ԴՆԹ-ԼԻԳԱԶԻ ԿԻՐԱՌՄԱՄԲ

Շրջակա միջավայրի գործոնների (մուտագենների), ինչպես նաև բջջում տեղի ունեցող տարբեր գենետիկական (ռեպլիկացում, ռեկոմբինացում, ռեպարացում) գործընթացների արդյունքում երկշղթա ԴՆԹ-ի մոլեկուլում կարող են առաջանալ միաշղթա հատվածներ: Այսպիսի վնասվածքները վերականգնելու համար բջիջը սինթեզում է հատուկ ֆերմենտներ՝ ԴՆԹ-լիզազներ, որոնք «կարում» են բջջում երկշղթա ԴՆԹ-ի մոլեկուլում առաջացած միաշղթա հատվածները՝ հարևան նուկլեոտիդներում ֆոսֆոերկթերային կապերի վերականգնումով:

Առավել լավ ուսումնասիրված են *E. coli*-ի և T4 բակտերիաֆագի ԴՆԹ-լիզազները: Կովալենտ կապերի առաջացման համար *E. coli*-ի ԴՆԹ-լիզազները պահանջում են ՆԱԱԵ⁺, իսկ T4 բակտերիաֆագի ԴՆԹ-լիզազները՝ ԱԵՖ: Երկու դեպքում էլ ֆերմենտները ադենիլացնում, ապա ԱՄՖ տեղափոխում են ԴՆԹ-ի վնասված հատվածի 5' ծայրին, որը ուղեկցվում է միկրոերգիկ պիրոֆոսֆատային կապի առաջացմամբ (նկար 15):

Հարկ է նշել, որ T4 բակտերիաֆագի ԴՆԹ-լիզազները ունակ են վերականգնելու ինչպես կաչուն, այնպես էլ բուրծ ծայրեր պարունակող վնասված ԴՆԹ-ի շղթան: Ուստի հատկապես T4 բակտերիաֆագի ԴՆԹ-լիզազներն օգտագործվում են ԴՆԹ-ի կլոնավորման գործընթացներում:



Նկար 15. ԴՆԹ-ի մոլեկուլում միաշղթա հատվածների կարումը ԴՆԹ-լիզազով:

Առաջադրանք 6.2.1. 16S ռՌՆԹ գենի կարումը վեկտորային ԴՆԹ-ին T4 րակտերիաֆագի ԴՆԹ-լիզազի կիրառմամբ

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ ֆերմենտները, լուծույթներ, սարքեր և պարագաներ՝

- Գծային վեկտորային ԴՆԹ-ի պատրաստուկ,
- 16S ռՌՆԹ գեն,
- T4 ԴՆԹ-լիզազ իր համապատասխանա բուֆերային լուծույթով (BioLabs, New England),
- Նուկլեազներից գերծ, մանրէազերծ կրկնակի թորած ջուր,
- 1.5-2 մլ տարողությամբ կենտրոնախուսման սրվակներ (Էպենդորֆ), ավտոմատ պիպետների հավաքածու՝ համապատասխան ծայրակալներով,
- Ջերմապահարան, սառցե խցիկ, լամինար բոքս, լատեքսային կամ նիտրիլային ձեռնոցներ, սառնարան:

Փորձի ընթացքը

1. Պատրաստել ռեակցիոն խառնուրդը 20 մլլ վերջնական ծավալով հետևյալ բաղադրությամբ՝ 14 մլլ նուկլեազներից գերծ, մանրէազերծ կրկնակի թորած ջուր, 2մլլ 10x խիտ T4 ԴՆԹ-լիզազի բուֆերային լուծույթ, 1 մլլ վեկտորային ԴՆԹ (0.02 պՄ), 2 մլլ 16S ռՌՆԹ գեն (0.06 պՄ), 1մլլ T4 ԴՆԹ-լիզազ:

Ծանոթագրություն: ԴՆԹ-ի ցանկացած հատվածի կամ գենի կարումը վեկտորին ԴՆԹ-լիզազների կիրառմամբ իրականացնելիս հարկավոր է պահպանել վեկտորի և վեկտոր ներմուծվող ԴՆԹ-ի մոլեկուլային զանգվածների 1:3 հարաբերությունը: Լիզացիայի խառնուրդ պատրաստելիս վեկտորի և վեկտոր ներմուծվող ԴՆԹ-ի ճիշտ չափաբաժինները կարելի է որոշել՝ օգտագործելով հետևյալ կայքում առցանց հասանելի հաշվիչը. <http://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>:

2. Խառնուրդը զգուշությամբ խառնել պիպետի միջոցով, ապա ինկուբացնել 16°C ջերմաստիճանային պայմաններում 12 ժամ կամ սենյակային ջերմաստիճանային պայմաններում 10 րոպե (բուրծ ծայրերով գծային վեկտորային ԴՆԹ-ում գենի կարելու համար ինկուբացվել 16°C

ջերմաստիճանային պայմաններում 12 ժամ կամ սենյակային ջերմաստիճանային պայմաններում 2 ժամ):

3. Ռեակցիան արգելակել 65°C ջերմաստիճանային պայմաններում 10 րոպե ջերմամշակմամբ:

4. Ռեակցիոն խառնուրդը տեղափոխել սառցե խցիկ և պահպանել մինչ տրանսֆորմացումը (երկարաժամկետ պահպանումը ցանկալի չէ):

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 6.3. ԿՈՄՊԵՏԵՆՏ ԲՋԻՋՆԵՐԻ ՍՏԱՑՈՒՄԸ ԵՎ ՏՐԱՆՍՖՈՐՄԱՑՈՒՄԸ

Կոմպետենտ են համարվում այն բակտերիական բջիջները, որոնք ունեն փոփոխված բջջապատ, և որի միջոցով հեշտությամբ կարող են բջիջ թափանցել օտար ԴՆԹ-ի մոլեկուլներ: Բջիջները կոմպետենտ կարելի է դարձնել՝ դրանք ենթարկելով քիմիական կամ էլեկտրական հատուկ մշակման:

Կոմպետենտ բակտերիական բջիջներ կարելի է ստանալ կալցիումի կամ ռուբիդիումի իոններով մշակմամբ, որի արդյունքում բակտերիական բջջապատում առաջանում են ծակոտիներ, իսկ արտաքին միջավայրից ԴՆԹ-ն հեշտությամբ թափանցում է բջիջ ջերմամշակելիս:

Սովորաբար կոմպետենտ բջիջների ստացման համար կիրառվում են *E. coli*-ի պլազմիդներ չպարունակող շտամները, ինչպես, օրինակ՝ *E. coli* Top10, DH5 α , Stb13, TG1, JM109, XL10-Gold և այլ շտամներ:

Առաջադրանք 6.3.1. Քեմոկոմպետենտ բջիջների ստացում CaCl_2 -ի մշակմամբ

Բակտերիական բջիջների մշակումը CaCl_2 -ով հեշտացնում է արտաքին միջավայրից ԴՆԹ-ի ներթափանցումը բակտերիական բջիջ: Այդ գործընթացում Ca -ի իոնների դերը դեռ լիովին պարզաբանված չէ, սակայն ենթադրվում է, որ Ca -ի իոնները, միանալով բջջապատի բացասական լիցքավորված ֆոսֆորիլացված լիպոպոլիսախարիդային շերտին, առաջացնում են կատիոնային կամուրջ, որին ամրանում է բացասական լիցքավորված ԴՆԹ: Սառեցված CaCl_2 -ի լուծույթը հեշտացնում է ԴՆԹ-ի ամ-

րացումը բակտերիական բջժի բջջապատին, իսկ կարճատև ջերմամշակելիս ԴՆԹ թափանցում է բջիջ:

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ մանրէների կուլտուրա, լուծույթներ, սարքեր և պարագաներ՝

- *E. coli* Top10-ի կուլտուրա,
- ԼԲ սննդամիջավայր,
- 0.1 Մ CaCl_2 -ի լուծույթ,
- 15% գլիցերին պարունակող 0.1 Մ CaCl_2 -ի լուծույթ,
- 1.5-2 մլ տարողությամբ կենտրոնախուսման սրվակներ (Էպենդորֆ), ավտոմատ պիպետների հավաքածու՝ համապատասխան ծայրակալներով,
- Մառցախցիկով կենտրոնախուսակ, սառույց, սառնարան, ջերմապահարան, ջերմակարգավորմամբ թափահարիչ, լամինար բոքս, լատեքսային կամ նիտրիլային ձեռնոցներ:

Փորձի ընթացքը

1. Նախապես աճեցված բակտերիական բջիջների կախույթից 1 մլ ավելացնել 99 մլ ԼԲ սննդամիջավայրին և ինկուբացնել 225 պտույտ/րոպե թափահարման և 37°C ջերմաստիճանային պայմաններում: 15-20 րոպե պարբերականությամբ չափել բակտերիական կախույթի օպտիկական խտությունը՝ 600 նմ ալիքի երկարությամբ սպեկտրալուսաչափական եղանակով:

2. ՕԽ₆₀₀ 0.35-0.4 արժեքի դեպքում բակտերիական կախույթով փորձանոթը տեղափոխել սառցե խցիկ և ինկուբացնել 20-30 րոպե:

3. Բակտերիական կախույթը կենտրոնախուսել նախապես սառեցված կենտրոնախուսման սրվակներում 4000 պտույտ/րոպե արագությամբ 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում 10 րոպե:

4. Բջջային նստվածքը զգուշությամբ լուծել 20 մլ սառեցված 0.1 Մ CaCl_2 -ի լուծույթում:

5. Բջիջները ինկուբացնել սառցի վրա 30 րոպե, այնուհետև տեղափոխել նախապես սառեցված կենտրոնախուսման սրվակներ:

6. Կենտրոնախուսել 4000 պտույտ/րոպե արագությամբ 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում 10 րոպե տևողությամբ:

7. Վերնստվածքը զգուշությամբ հեռացնել, իսկ բջջային նստվածքը լուծել 5 մլ սառեցված 15% գլիցերին պարունակող 0.1 Մ CaCl₂-ի լուծույթում:

8. Կոմպլետենտ բջիջները պահպանել -80°C ջերմաստիճանային պայմաններում:

Առաջադրանք 6.3.2. Ուլտրաքեմոկոմպլետենտ բջիջների ստացում RbCl-ի մշակմամբ

E. coli-ի բջջապատի մշակումը RbCl-ի հիպոտոնիկ լուծույթով հանգեցնում է թաղանթային սպիտակուցների վնասման, որը հեշտացնում է արտաքին միջավայրից բացասական լիցքավորված ԴՆԹ-ի ներթափանցումը բջիջ:

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ մանրէների կուլտուրա, լուծույթներ, սարքեր և պարագաներ՝

- *E. coli* Top10-ի կուլտուրա,
- ԼԲ սննդամիջավայր,
- 20 մՄ MgSO₄ պարունակող 250 մլ ԼԲ սննդամիջավայր,
- TFB1 լուծույթ (pH 5.8) (պատրաստումը տե՛ս հավելված 1-ում),
- TFB2 լուծույթ (pH 6.5) (պատրաստումը տե՛ս հավելված 1-ում),
- 1.5-2 մլ տարողությամբ կենտրոնախուսման սրվակներ (Էպենդորֆ), ավտոմատ պիպետների հավաքածու՝ համապատասխան ծայրակալներով,
- Սառցախցիկով կենտրոնախուսակ, սառույց, սառնարան, ջերմապահարան, ջերմակարգավորմամբ թափահարիչ, լամինար բոքս, լատեքսային կամ նիտրիլային ձեռնոցներ:

Փորձի ընթացքը

1. Նախապես աճեցված բակտերիական բջիջների կախույթից 0.25 մլ ավելացնել 20 մՄ MgSO₄ պարունակող 25 մլ ԼԲ սննդամիջավայրին (1լ

ծավալով փորձանոթում) և ինկուբացնել 225 պտույտ/րոպե թափահարման և 37°C ջերմաստիճանային պայմաններում մինչև կիսանի ՕԽ₆₀₀ 0.4-0.6 (սովորաբար 2-3 ժամ):

2. Աճեցված 25 մլ մանրէային կախույթը կենտրոնախուսել 9000 պտույտ/րոպե արագությամբ 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում, 5-10 րոպե:

3. Բջջային նստվածքը զգուշությամբ լուծել 10 մլ սառեցված TFB1 լուծույթում: Գործողությունը իրականացնել սառույցի վրա, իսկ օգտագործվող պիպետները և սրվակները նախապես սառեցնել:

Ծանոթագրություն: Բակտերիական բջիջները դժվարությամբ են լուծվում TFB1 լուծույթում, հետևաբար գործընթացը պահանջում է երկար ժամանակ:

4. Բակտերիային կախույթը պահել սառցի վրա 5 րոպե:

5. Կենտրոնախուսել 9000 պտույտ/րոպե արագությամբ 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում 5 րոպե:

6. Բջջային նստվածքը լուծել 1 մլ սառեցված TFB2 լուծույթում:

Ծանոթագրություն: Կոմպլետենտ բակտերիական բջիջները շատ զգայուն են ջերմաստիճանային տատանումների նկատմամբ, ուստի պետք է աշխատել զգուշությամբ:

7. Բջիջները ինկուբացնել սառույցի վրա 15-60 րոպե, այնուհետև տեղափոխել նախապես սառեցված կենտրոնախուսման սրվակներ:

8. Ստացված կոմպլետենտ բջիջները պահպանել -80°C ջերմաստիճանային պայմաններում:

Առաջադրանք 6.3.3. 16S ռԲՆԹ պարունակող վեկտորի տրանսֆորմացումը *E. coli* Top10 բջիջներում

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ մանրէների կուլտուրա, լուծույթներ, սարքեր և պարագաներ՝

- Կոմպլետենտ *E. coli* Top10-ի կուլտուրա,
- 16S ռԲՆԹ պարունակող վեկտորի՝ լիզացման խառնուրդ,
- ԼԲ սննդամիջավայր,
- 50-100 մկգ ամպիցիլին պարունակող ագարացված ԼԲ,

- 1.5-2 մլ տարողությամբ կենտրոնախուսման սրվակներ (Էպենդորֆ), մանրէազերծ սրվակներ, ավտոմատ պիպետների հավաքածու՝ համապատասխան ծայրակալներով,
- Սառույց, ջրային բաղնիք, ջերմակարգավորմամբ թափահարիչ, ջերմապահարան, լատեքսային կամ նիտրիլային ձեռնոցներ:

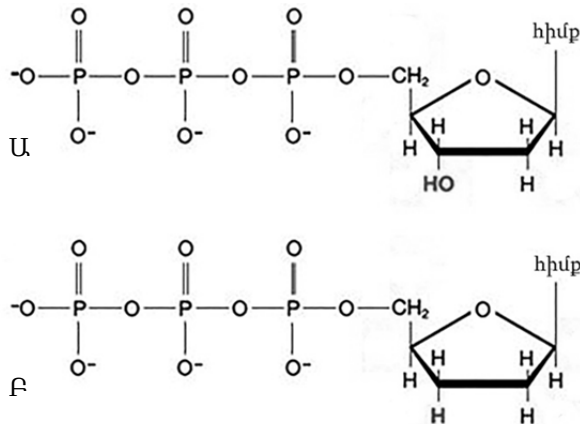
Փորձի ընթացքը

1. 3-5 մլլ լիզացման խառնուրդը ավելացնել 50 մլլ կոմպետենտ *E. coli* Top10-ի կուլտուրային և ինկուբացնել սառույցի վրա 30 րոպե:
2. Սրվակները հանել սառցե խցիկից և արագ տեղափոխել 42°C ջերմաստիճանային պայմաններով ջրային բաղնիք 45 վարկյան:
3. Սրվակները կրկին տեղափոխել սառույցի վրա և ինկուբացնել 5 րոպե:
4. Ավելացնել 0.3 մլ ԼԲ սննդամիջավայր, խառնուրդը տեղափոխել մանրէազերծ սրվակներ և ինկուբացնել 37°C ջերմաստիճանային պայմաններում 1 ժամ 150 պտույտ/րոպե թափահարմամբ:
5. Խառնուրդը աճեցնել 50-100 մլգ ամպիցիլին պարունակող ագարացված ԼԲ սննդամիջավայրի մակերեսին 37°C ջերմաստիճանային պայմաններում 12 ժամ:
6. Ընտրել գաղութները և յուրաքանչյուր գաղութ աճեցնել 50-100 մլգ ամպիցիլին պարունակող ԼԲ սննդամիջավայրում, 37°C ջերմաստիճանային պայմաններում 12 ժամ:
7. Անջատել պլազմիդները (տե՛ս Առաջադրանք 1.2.2.), այնուհետև իրականացնել 16S ռՌՆԹ գենի ՊՇՌ ամպլիֆիկացում (տե՛ս Առաջադրանք 4.1.2.):

ԹԵՄԱ 7

ԴՆԹ-Ի ՆՈՒԿԼԵՈՏԻԴԱՅԻՆ ՀԱՋՈՐԴԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՄԵՔՎԵՆԱՎՈՐՈՒՄ ԵՎ ՎԵՐԼՈՒԾՈՒԹՅՈՒՆ

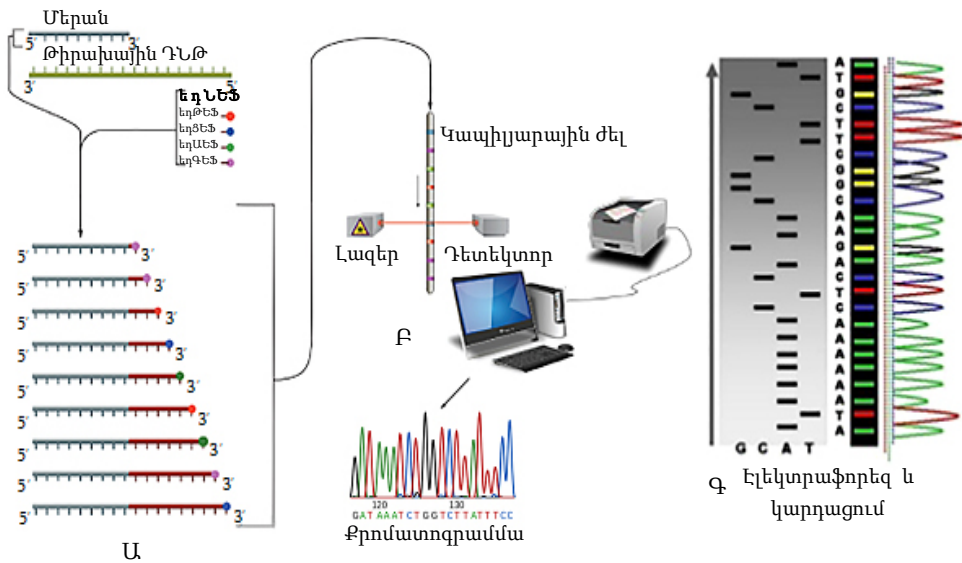
Ներկայումս լայնորեն կիրառվում է սեքվենավորման Սանգերի (F. Sanger) առաջարկած շղթայի կենսաքիմիական սինթեզի ընդհատման մեթոդը: Մշակվել են այս մեթոդի բազմաթիվ տարբերակներ: Դրանցից մեկում ռեակցիոն խառնուրդը, որը պարունակում է միաշղթա թիրախային ԴՆԹ, մերաններ, բուֆերային լուծույթ և չորս տեսակի դՆԵՖ, բաժանվում է չորս մասի, և յուրաքանչյուրին ավելացվում է չորս տեսակի երկդեզօքսինուկլեոզիդեոֆոսֆատներից (եդՆԵՖ) մեկը՝ եդԱԵՖ, եդԹԵՖ, եդԳԵՖ կամ եդՅԵՖ: Երկդեզօքսինուկլեոտիդները ստացվում են քիմիական սինթեզի ճանապարհով և դեզօքսինուկլեոտիդներից տարբերվում են շաքարային օղակում ածխածնային 3' դիրքում հիդրօքսիլ խմբի բացակայությամբ (նկար 16):



Նկար 16. Դեզօքսիռիբոնուկլեոզիդեոֆոսֆատ (դՆԵՖ) (Ս) և երկդեզօքսիռիբոնուկլեոզիդեոֆոսֆատ (եդՆԵՖ) (Բ) կառուցվածքային առանձնահատկությունները:

ԴՆԹ-ի շղթայի *in vitro* սինթեզի ժամանակ, եթե հերթական նուկլեոտիդի հետ միանում է եդՆԵՖ, ապա հաջորդ նուկլեոտիդի հետ ֆոսֆոդիֆերային կապ չի առաջանում, և շղթայի սինթեզն ընդհատվում է (այստեղից էլ անվանումը): Արդյունքում յուրաքանչյուր սրվակում առաջանում է

տարբեր երկարությամբ օլիգոնուկլոտիդների յուրահատուկ հավաք, որոնք ենթարկվում են էլեկտրաֆորեզի առանձին-առանձին: ԴՆԹ-ում նուկլեոտիդային հաջորդականությունները որոշվում են օլիգոնուկլեոտիդների երկարությունների համեմատմամբ՝ հաշվի առնելով, որ ամենակարճ հաջորդականությունը էլեկտրաֆորեզում համապատասխանում է այն բժին, որն ամենաառաջն է տեղաշարժվում և հետևաբար տեղակայվում է ամենաստորին հատվածում: Երկդեզօքսինուկլեոտիդների տեղակայումը որոշվում են ռադիոավտոգրաֆիայի մեթոդով: Նուկլեոտիդային հաջորդականությունը ռադիոավտոգրից կարդացվում է ներքևից վերև (նկար 17 Գ):



Նկար 17. ԴՆԹ-ի հաջորդականության սեքվենավորումը ըստ Սանգերի:

Ա. ԴՆԹ-ի հաջորդականության կրկնապատկումը ֆլուորոքրոմներով նշակիր երկդեզօքսինուկլեոտիդներով, Բ. Սինթեզված օլիգոնուկլեոտիդների խառնուրդի էլեկտրաֆորեզիր, Գ. Սինթեզված օլիգոնուկլեոտիդների խառնուրդի էլեկտրաֆորեզ և կարդացում:

Ժամանակակից համակարգչային տեխնիկայի կիրառմամբ հաջորդականությունների վերարտադրությունը կարելի է ավտոմատացնել: Այդ դեպքում կիրառվում են տարբեր ֆլուորոքրոմներով նշակիր երկդեզօքսինուկլեոտիդներ, իսկ ստացված օլիգոնուկլեոտիդների խառնուրդն էլեկտ-

րաֆորեզի են ենթարկվում միասին: Քանի որ յուրաքանչյուր եդՆԵՖ նշակիր է որոշակի գույն ունեցող ֆլուորեսցենտային գունանյութով, հատուկ դեդեկտորը սքանավորում է ժելը և ըստ բծերում գույների հերթագայության արագ որոշում հաջորդականությունները (նկար 17 Ա, Բ):

Դիցուք՝ եթե էլեկտրոֆորեզում ստորին բծին համապատասխանում է եդԱԵՖ, որին հաջորդում են եդԳԵՖ, եդՅԵՖ, եդԹԵՖ, եդԳԵՖ և այլն, ապա ԴՆԹ-ում նուկլեոտիդների հաջորդականությունները կկարդացվեն AGCTG, իսկ դրան լրացչական հաջորդականությունները՝ TCGAC: Այսպիսով, սինթեզված օլիգոնուկլեոտիդային հատվածների չափերով կարելի է որոշել դիդեգոքինուկլեոտիդների տեղադրությունը և ըստ այդմ՝ դրանց գեներում համապատասխան նուկլեոտիդների հերթադրությունը:

Սանգերի առաջարկած սեքվենավորման մեթոդը պարզ և հուսալի եղանակ է և թույլ է տալիս վերարտադրել արդյունքները 800-1000 նուկլեոտիդներ պարունակող հաջորդականությունների դեպքում: Համաշխարհային տվյալների բանկում ԴՆԹ-ի հաջորդականությունների վերաբերյալ պահպանվող տեղեկատվության 95%-ը ստացվել է այս մեթոդով: Վերջին տարիներին ԴՆԹ-ի սեքվենավորման մեթոդները կատարելագործվել են: Այժմ առկա են տարբեր տեխնոլոգիաներ, օրինակ՝ GS FLX Titanum, ABI Prism 3130, Illumina HiSeq, NextSeq, MiSeq, պիրոսեքվենավորում և այլն, որոնց հիմքում այնուամենայնիվ ընկած է ավանդական Սանգերի մեթոդը: Այս մեթոդների տարբերությունը պայմանավորված է միայն կարդացվող հաջորդականության երկարությամբ, ուսումնասիրվող նմուշների թվաքանակով, լուսաձորման գրանցման, նուկլեոտիդների ձևափոխման, հատվածների ծայրերի դրոշման շման և այլ տեխնոլոգիաներով:

Վերջին տարիներին մշակվել է սեքվենավորման բացարձակ նոր մեթոդ, որն անվանվում է նանոանցուղային սեքվենավորում: Այս մեթոդի հիմքում ընկած է բնական կամ արհեստական սինթեզված անցուղային սպիտակուցով նյութերի տեղափոխման ընթացքում թաղանթի էլեկտրական պոտենցիալի փոփոխման ունակությունը: Տարբեր նուկլեոտիդներն անցուղիով անցնելիս յուրահատուկ ձևով են փոխում թաղանթի պոտենցիալը, ինչը թույլ է տալիս վերծանել ԴՆԹ-ի նուկլեոտիդային հաջորդականությունը:

**ԱՇԽԱՏԱՆՔ 7.1. ԲԱԿՏԵՐԻԱԿԱՆ 16S ռՌՆԹ ԳԵՆԻ
ՀԱՋՈՐԴԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՆԱԽԱՊԱՏՐԱՍՏՈՒՄԸ
ՍԵՔՎԵՆԱՎՈՐՄԱՆ**

ԴՆԹ-ի հաջորդականությունների սեքվենավորումը ըստ Սանգերի առաջարկած մեթոդի իրականացման համար անհրաժեշտ է թիրախային ԴՆԹ-ն նշադրել երկդեզօքսինուկլեոզիդեոֆոսֆատներով: Այդ նպատակով իրականացվում է թիրախային ԴՆԹ-ի ՊՇՌ ամպլիֆիկացում եղևեհ-ի կիրառմամբ հատուկ պոլիմերազի՝ BigDye-ի օգտագործմամբ:

**Առաջադրանք 7.1.1. Բակտերիական 16S ռՌՆԹ գենի
հաջորդականությունների եղևեհ-ով նշադրմամբ ամպլիֆիկացումը
BigDye-ի կիրառմամբ**

Աշխատանքի ընթացքի համար անհրաժեշտ լուծույթներ, սարքեր և պարագաներ՝

- BigDye (version 3.1),
- Սեքվենավորման բուֆեր,
- 16S ռԴՆԹ (200 նգ),
- Ուղիղ կամ հակադարձ մերաններ (3.2 պՄ),
- Մանրէազերծ կրկնակի թորած ջուր,
- 0.2 մլ տարողությամբ կենտրոնախուսման սրվակներ (Էպենդորֆ), ավտոմատ պիպետների հավաքածու՝ համապատասխան ծայրակալներով, լատեքսային կամ նիտրիլային ձեռնոցներ, ՊՇՌ ամպլիֆիկատոր (Thermo Scientific™ Arktik™ Thermal Cycler):

Փորձի ընթացքը

1. Պատրաստել 10 մկլ վերջնական ծավալով ռեակցիոն խառնուրդ հետևյալ բաղադրությամբ՝ 1 մկլ 16 ռԴՆԹ, 1 մկլ բուֆեր, 1 մկլ BigDye, 1 մկլ ուղիղ (կամ հակադարձ) մերան և 6 մկլ մանրէազերծ կրկնակի թորած ջուր:

2. ՊՇՌ-ն իրականացնել հետևյալ փուլերով. բնափոխում, 96°C պայմաններում 5 րոպե, որին հաջորդում են 66 ցիկլեր՝ բնափոխում՝ 96°C,

10 վայրկյան, միակցում՝ 50°C, 5 վայրկյան, սինթեզ՝ 60°C, 4 րոպե: Ռեակցիան ավարտվում է սառեցմամբ՝ 4°C:

3. ՊՇՌ ավարտից հետո ռեակցիոն խառնուրդին ավելացնել 10 մկլ մանրէագերծ կրկնակի թորած ջուր:

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 7.2. ԲԱԿՏԵՐԻԱԿԱՆ 16S ՌՌՆԹ ԳԵՆԻ ՀԱԶՈՐԴԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԿԵՆՍԱԻՆՖՈՐՄԱՏԻԿԱԿԱՆ ՎԵՐԼՈՒԾՈՒԹՅՈՒՆԸ

Սեքվենավորման արդյունքում թիրախային գենի ԴՆԹ-ի հաջորդականությունները գրանցվում են ab1, txt, fasta և pdf ֆորմատներով, որոնց կարդացումը և հետագա մշակումն իրականացվում են հատուկ համակարգչային և առցանց կենսաինֆորմատիկական ալգորիթմների կիրառմամբ: Դրանցից են. Chromas Life 2.1.1, BioEdit 7.2.5, FINCH, GENESIS, UGENE, NCBI-BLASTn և այլն: Ուսումնասիրվող բակտերիայի ֆիլոգենետիկորեն ազգակից տեսակների բացահայտման համար 16S ՌՌՆԹ գենի մշակված և ամբողջական հաջորդականությունը մուտքագրվում է NCBI-BLASTn (National Centre for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) առցանց հասանելի որոնման համակարգ և համապատասխան գործիքների կիրառմամբ համադրվում է GenBank տվյալների բազայում առկա նմանատիպ հաջորդականությունների հետ:

Առաջադրանք 7.2.1. Բակտերիական 16S ՌՌՆԹ գենի հաջորդականությունների շտկում

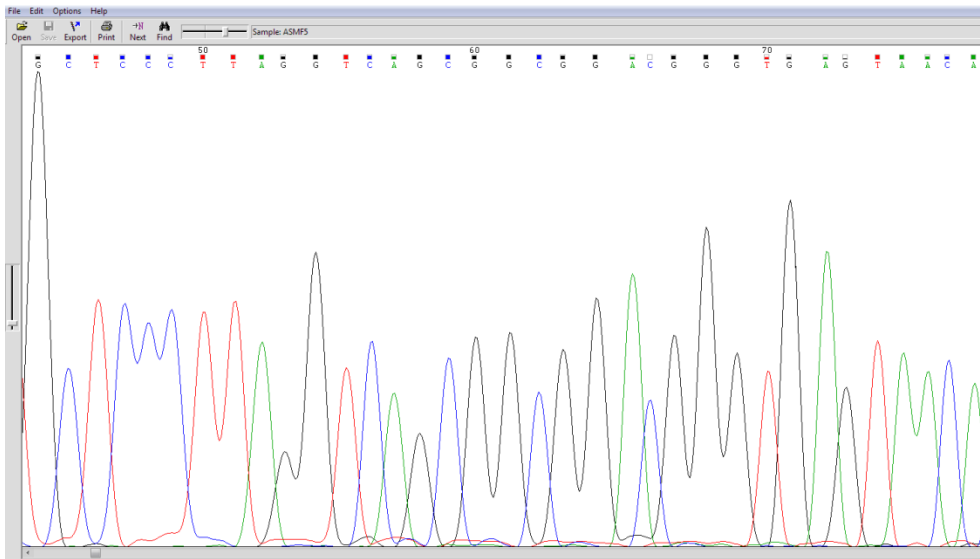
Աշխատանքի ընթացքի համար անհրաժեշտ ծրագրերը և սարքավորումները՝

- Համակարգիչ,
- 16S ՌՌՆԹ գենների (ուղիղ և հակադարձ) հաջորդականություններ՝ պահպանված ab1 կամ fasta ֆայլերում,

- Chromas Life 2.1.1 (<http://technelysium.com.au/wp/chromas/>), BioEdit 7.2.5 (<https://bioedit.software.informer.com/7.2/>) համակարգչային ծրագրեր:

Աշխատանքի ընթացքը

1. 16S ռՌՆԹ գեների (ուղիղ և հակադարձ) հաջորդականությունների ֆայլերը բացել Chromas Life 2.1.1 ծրագրի միջոցով (նկար 18): Տվյալ ծրագիրը թույլ է տալիս տեսանելի դարձնել ԴՆԹ-ի նուկլեինաթթվային հաջորդականությունների քրոմատագրերը և սխալների դեպքում իրականացնել շտկումներ: Երբեմն երկու նուկլեոտիդային հաջորդականությունների պիկերը վերածածկվում են և ծրագրերը ԴՆԹ-ի հաջորդականությունում նուկլեոտիդի անվան առաջին տառի փոխարեն նշում են N տառը: N տառով նշված նուկլեոտիդը պետք է փոխարինել պիկին առավելագույնս համապատասխանող նուկլեոտիդով (ադենին-A, թիմին-T, գուանին-G, ցիտոզին-C):



Նկար 18. 16S ռՌՆԹ գեների (ուղիղ կամ հակադարձ) սեքվենավորման արդյունքում ստացված հաջորդականության քրոմատագրի պատկերը Chromas Life 2.1.1 ծրագրում:

2. 16S ռՌՆԹ գեների ուղիղ և հակադարձ շտկված հաջորդականությունները բացել BioEdit 7.2.5 ծրագրի միջոցով այսպես. BioEdit ծրագրում File -> Open հրահանգի միջոցով ներմուծել 16S ռՌՆԹ գենի ուղիղ հաջորդականությունը, ապա File -> Import -> Sequence Alignment File հրահանգի միջոցով ներմուծել 16S ռՌՆԹ գենի հակադարձ հաջորդականությունը:

3. Նշել 16S ռՌՆԹ գենի հակադարձ հաջորդականությունը և Sequence -> Nucleic Acid -> Reverse Complement (Shift+Ctrl+R) հրահանգի միջոցով ուղղել հակադարձ հաջորդականության ուղղությունը 5' - 3':

4. Նշել ուղիղ և հակադարձ հաջորդականությունները, այնուհետև հավասարեցնել Sequence -> Pairwise alignment -> Align two sequences (allow end to slide) հրահանգներով: Դիտարկել հավասարեցված հաջորդականությունները:

5. Ուղիղ և հակադարձ հաջորդականությունների հիման վրա սինթեզել 16S ռՌՆԹ գենի ամբողջական շղթան՝ օգտագործելով Alignment -> Create Consensus Alignment հրահանգը:

6. 16S ռՌՆԹ-ի ամբողջական հաջորդականությունը պատճենել և պահպանել NotePad ֆայլով՝ նշելով անվանումը հետևյալ կերպ. >Seq1:

Աշխատանքի հաջորդական քայլերը տե՛ս Հավելված 4, նկար Հ1-ում:

Առաջադրանք 7.2.2. Բակտերիական 16S ռՌՆԹ գենի BLAST վերլուծությունը

Աշխատանքի ընթացքի համար անհրաժեշտ ծրագրերը և սարքավորումները՝

- Ինտերնետային ցանցին միացված համակարգիչ,
- 16S ռՌՆԹ գեների մշակված ամբողջական հաջորդականություն NotePad ֆայլում,
- NCBI-BLASTn առցանց ծրագիր:

Աշխատանքի ընթացքը

1. Բացել NotePad ֆայլում 16S ռԲՆԹ ամբողջական հաջորդականությունը:

2. Բացել NCBI-BLASTn (National Centre for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) առցանց որոնման համակարգը և մուտքագրել 16S ռԲՆԹ ամբողջական հաջորդականությունը:

3. Բացված պատուհանի Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) դաշտում մուտքագրել 16S ռԲՆԹ գենի հաջորդականությունը:

4. Choose Search Set դաշտում ընտրել Nucleotide collection (nr/nt), Program Selection դաշտում՝ Highly similar sequences (megablast) տարբերակը, ընտրել նաև Show results in a new window տարբերակը և սեղմել BLAST կոճակը:

5. Նոր բացված պատուհանում կպատկերվեն արդյունքները, այդ թվում GenBank-ում առկա ներմուծված 16S ռԲՆԹ գենի ամենամոտ հաջորդականությունները (Descriptions), դրանց միջև նմանության գրաֆիկական պատկերումը (Graphic Summery), հավասարեցման արդյունքները (Alignments) և դասակարգումը (Taxonomy):

6. Սեղմել Descriptions դաշտում բերված ամենամոտ հաջորդականության ավանդադրման համարին (Accession): Բացված պատուհանում արտացոլվում է ամենամոտ նմանակի մասին տեղեկատվությունը (ավանդադրված 16S ռԲՆԹ գենի երկարությունը, նույնականացված մանրէի դասակարգումը, հեղինակները, հրատարակումը, մեկուսացման վայրը և հաջորդականությունը):

7. Սեղմելով FASTA կոճակը կարելի է պատճենել տվյալ մանրէի 16S ռԲՆԹ գենի հաջորդականությունը:

8. Արդյունքները գրանցել գրանցամատյանում աղյուսակ 1 ձևով:

Աշխատանքի հաջորդական քայլերը տե՛ս Հավելված 4, նկար Հ2-ում:

Աղյուսակ 1. Ուսումնասիրվող կուլտուրաների ամենամոտ ծագումնաբանական հաջորդականությունները NCBI գենադարանում:

Կուլտուրա	16S rԴՆԹ հաջորդականության երկարությունը (նգ)	Ամենամոտ ծագումնաբանական նմանակը Ավանդադրման համարը	Նմանությունը (%)
Seq1			
Seq2			
....			

ՀԱՎԵԼՎԱԾ 1

ՏԷ բուֆերային լուծույթ (10 մՄ Տրիս-HCl, 1մՄ ԷԵՔՔ)

Նախապես մանրեազերծված 494 մլ թորած ջրին ավելացնել մանրեազերծ 5 մլ 1Մ Տրիս-HCl (pH 8.0), 1 մլ 0.5Մ ԷԵՔՔ (pH 8.0): Պահպանել 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում:

ՏԷ-աղային բուֆերային լուծույթ (10 մՄ Տրիս-HCl, 1մՄ ԷԵՔՔ, 100 մՄ NaCl)

Նախապես մանրեազերծված 484 մլ-ի թորած ջրին ավելացնել մանրեազերծ 5 մլ 1Մ Տրիս-HCl (pH 8.0), 1 մլ 0.5Մ ԷԵՔՔ (pH 8.0) և 10մլ 1Մ NaCl: Պահպանել 4°C- ջերմաստիճանային պայմաններում:

Լիզիսի համար նախատեսված բուֆերային լուծույթ (400 մՄ NaCl, 750 մՄ սախարոզ, 20 մՄ ԷԵՔՔ, 50 մՄ Տրիս HCl)

Նախապես մանրեազերծված 5Մ NaCl 4 մլ, 1.5Մ սախարոզ 25 մլ, 0.5 Մ ԷԵՔՔ (pH 8.0) 2 մլ, 1 Մ Տրիս-HCl (pH 9.0) 2.5 մլ, ծավալը հասցնել 100 մլ մանրեազերծ թորած ջրով: Պահպանել 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում:

ՏԷ բուֆերային լուծույթով (pH 8.0) հավասարակշռված ֆենոլ

10 մլ ֆենոլի լուծույթին ավելացնել 0.01գ 8-օքսիլիսիտլին և հավասար ծավալով ՏԷ բուֆերային լուծույթ (սկզբում 1.0 Մ, ապա 0.1 տրիս-HCl (pH 8.0) պարունակող ՏԷ բուֆերային լուծույթ): Այնուհետև ավելացնել 0.2% β -մերկապտոթեանոլ այնքան ժամանակ մինչ ֆենոլի ջրային շերտի pH կազմի 7.6: Ջրային շերտը զգուշությամբ հեռացնել, իսկ ստացված ֆոնոլի լուծույթը պահպանել մուգ տարայում, 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում ոչ ավելին, քան 1 ամիս:

Թթու ֆենոլ

10 մլ ֆենոլի լուծույթին ավելացնել 20 մՄ նատրիումի քացախաթթու (pH 5.5), մինչ ֆենոլի ջրային շերտի pH կկազմի 5.5: Ջրային շերտի զգուշությամբ հեռացնել, իսկ ստացված թթու ֆոնոլի լուծույթը պահպանել մուգ ապակյա տարայում, 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում ոչ ավելին, քան 1 ամիս:

Չեզոք ֆենոլ

10 մլ ֆենոլի լուծույթին ավելացնել 20 մՄ տրիս-HCl-ով (pH 7.4), մինչև ֆենոլի ջրային շերտի pH կազմի 7.4-7.6: Ջրային շերտը զգուշությամբ հեռացնել, իսկ ստացված հիմային ֆոնոլի լուծույթը պահպանել մուգ ապակյա տարրայում, 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում ոչ ավելին, քան 1 ամիս:

Ցետիլեռմեթիլամոնիումային բրոմիդ (ՑԵԱԲ)/NaCl խառնուրդ

NaCl 4.1 գ լուծել 80 մլ մանրէագերծ թորած ջրում և ավելացվել ՑԵԱԲ 10 գ: Ստացված խառնուրդը տաքացնել $\approx 65^{\circ}\text{C}$, մինչև ՑԵԱԲ-ի ամբողջությամբ լուծվելը (այն կարող է տևել 3 ժամ): Ծավալը հասցնել 100 մլ մանրէագերծ թորած ջրով:

Ամպիցիլին պարունակող ԼԲ (Լուրիա Բերտանի) սննդամիջավայր

Տրիպտոն 10 գ, շաքարասնկային լուծամզվածք 5 գ, NaCl 5 գ, թորած ջուր 1000 մլ: Մանրէագերծումը իրականացնել ավտոկլավում 1.0 ամձ պայմաններում 15 րոպե: Մանրէագերծված սննդամիջավայրին ավելացնել ամպիցիլին՝ 100 մկգ/մլ հաշվարկով:

Տրիսգլյուկոզ-ԷԵՔՔ (ՏԳԷ) բուֆերային լուծույթ (25մՄ Տրիս HCl, 50 մՄ գլյուկոզ, 10 մՄ ԷԵՔՔ)

Նախապես մանրէագերծված 93 մլ թորած ջրին ավելացնել մանրէագերծ 2.5 մլ 1Մ Տրիս HCl (pH 8.0), 2.5 մլ 2Մ գլյուկոզ, 2.0 մլ 0.5Մ ԷԵՔՔ (pH 8.0):

50x խիտ Տրիս-Քացախաթթու-ԷԵՔՔ-ի (ՏՔԷ) բուֆերային լուծույթ

Տրիս 242 գ, սառցե քացախաթթու 57.1 մլ, ԷԵՔՔ 18.61 գ, ծավալը թորած ջրով հասցնել 1000 մլ:

Տրիս-Քացախաթթու-ԷԵՔՔ-ի (ՏՔԷ) բուֆերային լուծույթ

50x խիտ Տրիս-Քացախաթթու-ԷԵՔՔ-ի (ՏՔԷ) բուֆերային լուծույթ 20 մլ, թորած ջուր 980 մլ:

ԴՆԹ-ի ռեստրիկցիան արգելակող լուծույթ

2.5% Ֆիկոլ-400, 10մՄ ԷԵՔՔ, 3.3 մՄ Տրիս-HCl, 0.08% ՆԴՄ, 0.02% Dye 1, 0.001% Dye 2, pH 8.0:

TFB1 լուծույթ (pH 5.8)

100 մՄ RbCl, 50 մՄ MnCl₂, 30 մՄ K-ի քացախաթթու, 10 մՄ CaCl₂, 15% գլիցերին, մանրէազերծումը իրականացնել ֆիլտրմամբ, լուծույթի pH 5.8:

TFB2 լուծույթ (pH 6.5)

10 մՄ MOPS, 10 մՄ RbCl, 75 մՄ CaCl₂, 15% գլիցերին, մանրէազերծումը իրականացնել ֆիլտրմամբ՝ 0.2 մկմ ծակոտկոնությամբ ֆիլտրների կիրառմամբ: Լուծույթի pH կարգավորել 6.5՝ 1Մ KOH-ի կիրառմամբ:

Գլիցերին և գունանյութ պարունակող բուֆերային լուծույթ (6x)

գլիցերին 3մլ, բրոմֆենոլ կապույտ 25 մգ, ծավալը թորած ջրով հասցնել 10 մլ: Լուծույթը պահպանել 4°C-ում:

0.1% Երկէթիլպիրոկարբոնատով (ԵԷՊԿ) մշակված ջուր

ԵԷՊԿ 1մլ, 1000 մլ թորած ջուր: Լավ խառնել և թողնել սենյակային ջերմաստիճանում 1 ժամ, որից հետո մանրէազերծել ավտոկլավում 1.0 ամձ պայմաններում 15 րոպե:

40% Ակրիլամիդի և Բիսակրիլամիդի (37.5:1) խառնուրդ

Ակրիլամիդ 100 գ, բիսակրիլամիդ 2.67 գ: Ծավալը թորած ջրով հասցնել 250 մլ:

Բնափոխող ելային լուծույթ Ա (ԲԵԼ Ա) (8% պոլիակրիլամիդ, 0.5 x ՏՔԷ)

40% Ակրիլամիդ/բիսակրիլամիդ 50 մլ, 50x խիտ ՏՔԷ բուֆերային լուծույթ 2.5 մլ: Ծավալը թորած ջրով հասցնել 250 մլ:

Բնափոխող ելային լուծույթ Բ (ԲԵԼ Բ) (8% պոլիակրիլամիդ, 0.5 x ՏՔԷ, 7 Ս միզանյութ, 100% ապաիոնացված ֆորմամիդ պարունակող լուծույթ)

40% Ակրիլամիդ/բիսակրիլամիդ 50 մլ, 50x խիտ ՏՔԷ բուֆերային լուծույթ 2.5 մլ, միզանյութ 105 գ, ապաիոնիզացված ֆորմամիդ 100 մլ: Ծավալը թորած ջրով հասցնել 250 մլ:

ԲԵԼԱ և ԲԵԼԲ լուծույթներին ավելացնել 150 մկլ 10% ամոնիումի-պերսուլֆատ (ԱՊՍ), 7.5 մլ տետրամեթիլէթիլենդիամին (ՏԵՄԵԴ):

Նշում. 30% և 70% միզանյութի և դեփոնիզացված ֆորմամիդ պարունակող լուծույթները պատրաստել ըստ ստորև բերված աղյուսակի.

Բնափո- խող լու- ծույթի (%)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
ԲԵԼԱ (մլ)	15	13.5	12.0	10.5	9.0	7.5	6.0	4.5	3.0	1.5	0
ԲԵԼԲ (մլ)	0	1.5	3.0	4.5	6.0	7.5	9.0	10.5	12.0	13.5	15

ՀԱՎԵԼՎԱԾ 2
Որոշ ռեստրիկտազներ և դրանց բնութագրերը

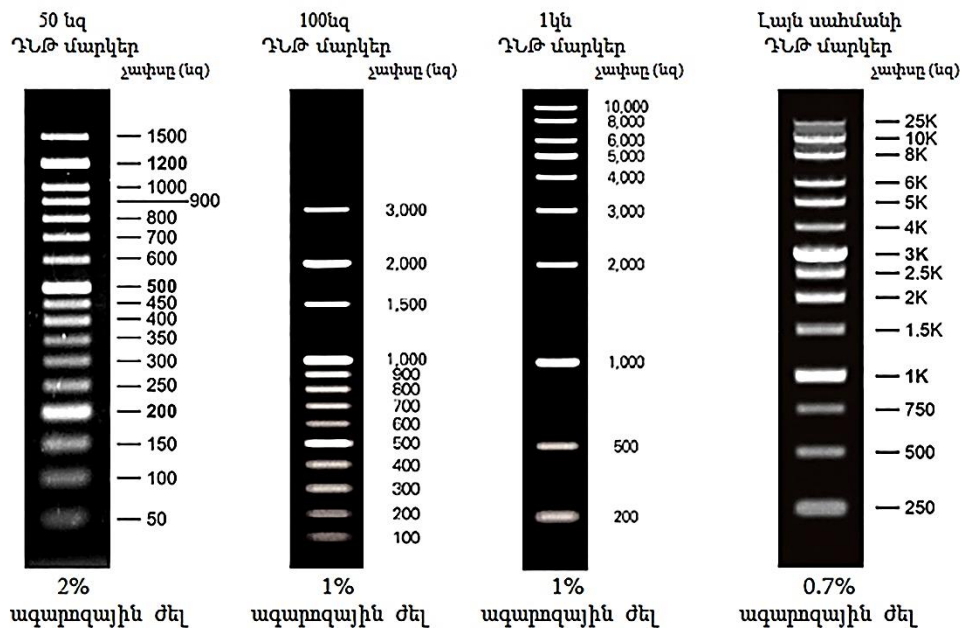
Ֆերմենտ	Աղբյուրը	Ճանաչման հաջորդականությունը	Տրոհման հատված
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>	5'GAATTC 3'CTTAAG	5'---G [^] AATTC---3' 3'---CTTAA [^] G---5'
<i>EcoRII</i>	<i>Escherichia coli</i>	5'CCWGG 3'GGWCC	5'--- [^] CCWGG---3' 3'---GGWCC [^] ---5'
<i>EcoRV</i>	<i>Escherichia coli</i>	5'GATATC 3'CTATAG	5'---GAT [^] ATC ---3' 3'---CTA [^] TAG ---5'
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amylobacter</i>	5'GGATCC 3'CCTAGG	5'---G [^] GATCC---3' 3'---CCTAG [^] G---5'
<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	5'AAGCTT 3'TTCGAA	5'---A [^] AGCTT---3' 3'---TTCGA [^] A---5'
<i>HinFI</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	5'GANTC 3'CTNAG	5'---G [^] ANTC---3' 3'---CTNA [^] G---5'
<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>	5'GGCC 3'CCGG	5'---CC [^] GG ---3' 3'---GG [^] CC ---5'
<i>HgaI</i>	<i>Haemophilus gallinarum</i>	5'GACGC(N) ₅ 3'CTGCG(N) ₁₀	5'---NNN [^] NNN ---3' 3'---NNN [^] NNN ---5'
<i>TaqI</i>	<i>Thermus aquaticus</i>	5'TCGA 3'ACGT	5'---T [^] CGA---3' 3'---ACG [^] T---5'
<i>Sau3AI</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	5'GATC 3'CTAG	5'--- [^] GATC---3' 3'---CTAG [^] ---5'
<i>PvuII</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	5'CAGCTG 3'GTCGAC	5'---CAG [^] CTG ---3' 3'---GTC [^] GAC ---5'
<i>SmaI</i>	<i>Serratia marcescens</i>	5'CCCGGG 3'GGGCCC	5'---CCC [^] GGG ---3' 3'---GGG [^] CCC ---5'
<i>AluI</i>	<i>Arthrobacter luteus</i>	5'AGCT 3'TCGA	5'---AG [^] CT ---3' 3'---TC [^] GA ---5'
<i>KpnI</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5'GGTACC 3'CCATGG	5'---GGTAC [^] C ---3' 3'---C [^] CATGG ---5'
<i>SacI</i>	<i>Streptomyces achromogenes</i>	5'GAGCTC 3'CTCGAG	5'---GAGCT [^] C---3' 3'---C [^] TCGAG---5'

Ֆերմենտ	Աղբյուրը	Ճանաչման հաջորդականությունը	Տրոհման հատված
<i>SaI</i>	<i>Streptomyces albus</i>	5'GTCGAC 3'CTCGAG	5'---G [^] TCGAC---3' 3'---CAGCT [^] G---5
<i>SphI</i>	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>	5'GCATGC 3'CGTACG	5'---GCATG [^] C---3' 3'---C [^] GTACG---5
<i>NoI</i>	<i>Nocardia otitidis</i>	5'GCGGCCGC 3'CGCCGGCG	5'---GC [^] GGCCGC---3' 3'---CGCCGG [^] CG---5
<i>XbaI</i>	<i>Xanthomonas badrii</i>	5'TCTAGA 3'AGATCT	5'---T [^] CTAGA---3' 3'---AGATC [^] T---5

N = C կամ G կամ T կամ A; W = A կամ T

ՀԱՎԵԼՎԱԾ 3

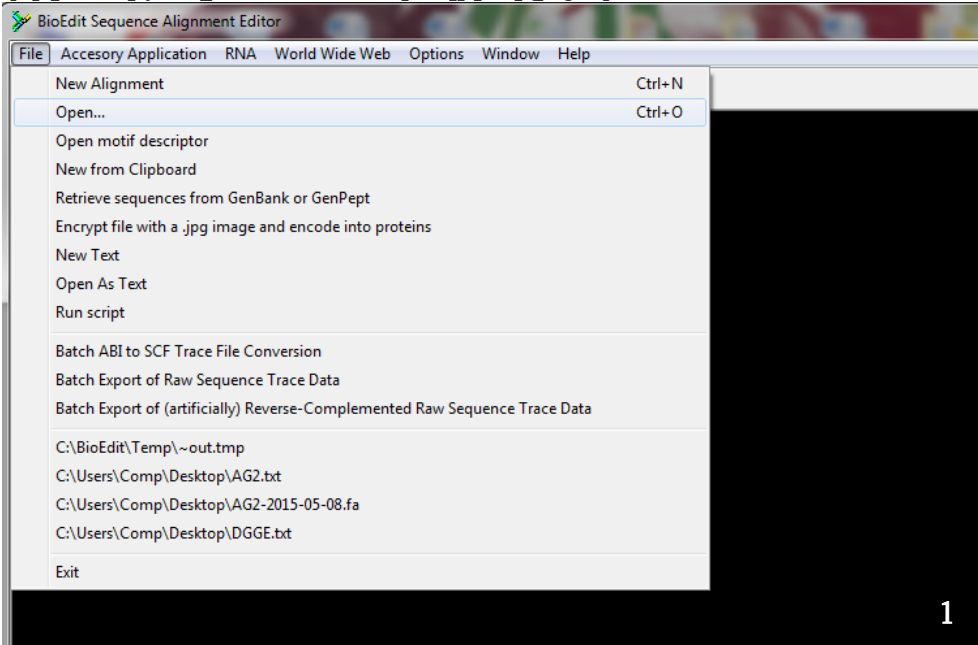
Տարբեր մեծությամբ ԴՆԹ մարկերների պատկերումը ագարոզային ժելում



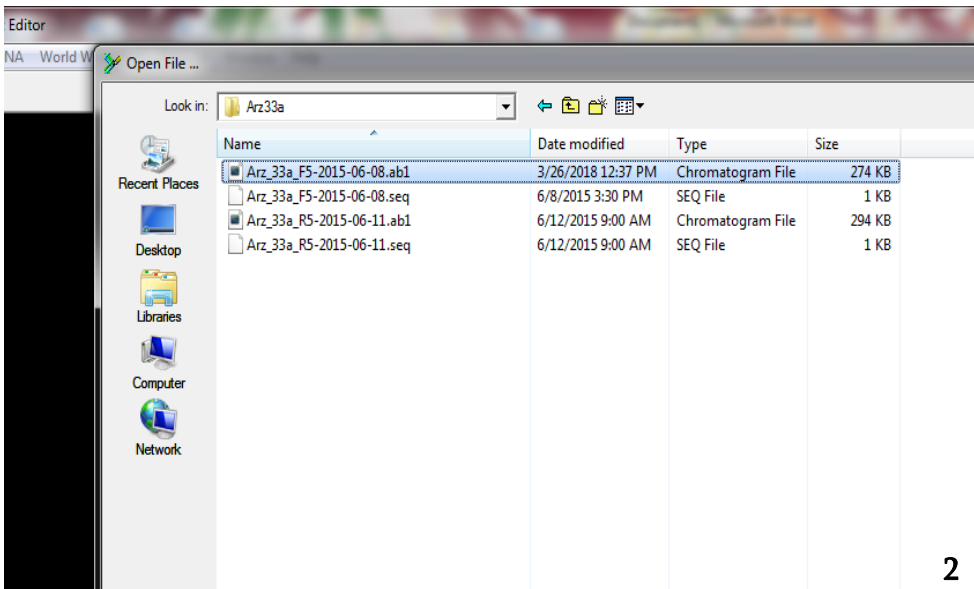
ՀԱՎԵԼՎԱԾ 4

Նկար Հ1. 16S ռԻՆԹ գենների ուղիղ և հակադարձ շտկված հաջորդակա-
նությունների

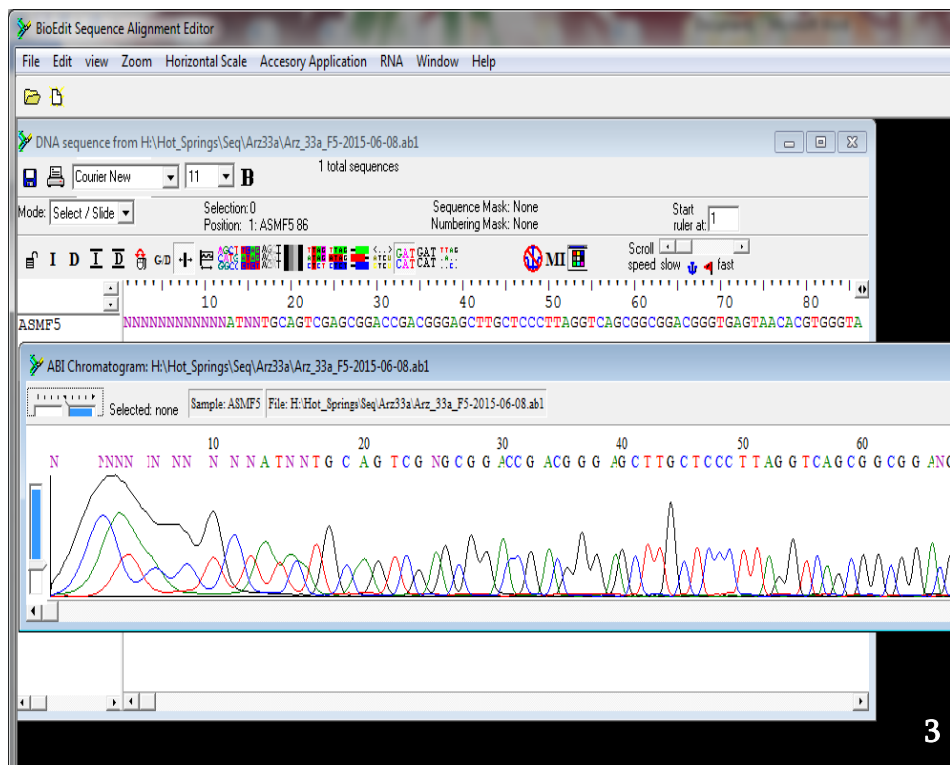
վերլուծությունը BioEdit 7.2.5 ծրագրի միջոցով (1-14):



1

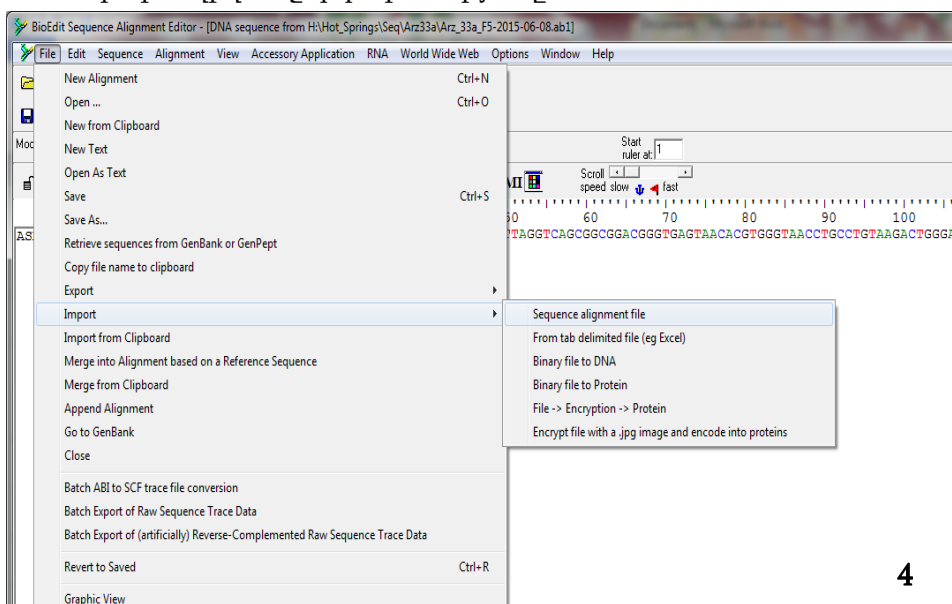


2



3

1-3 BioEdit ծրագրում File -> Open հրահանգի միջոցով ներմուծել 16S ռՌՆԹ գենի ուղիղ հաջորդականությունը:

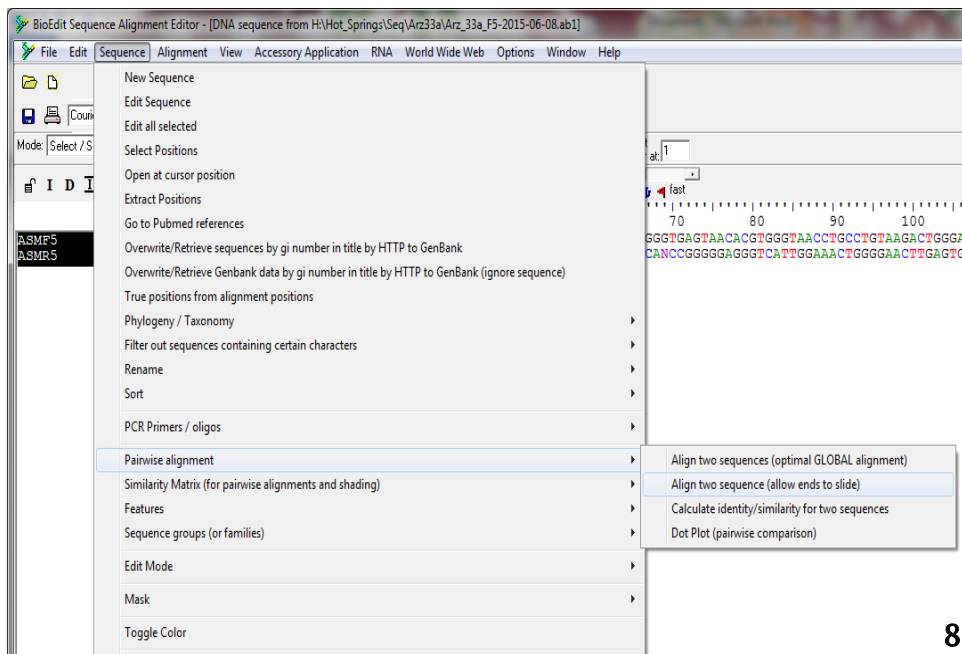


4

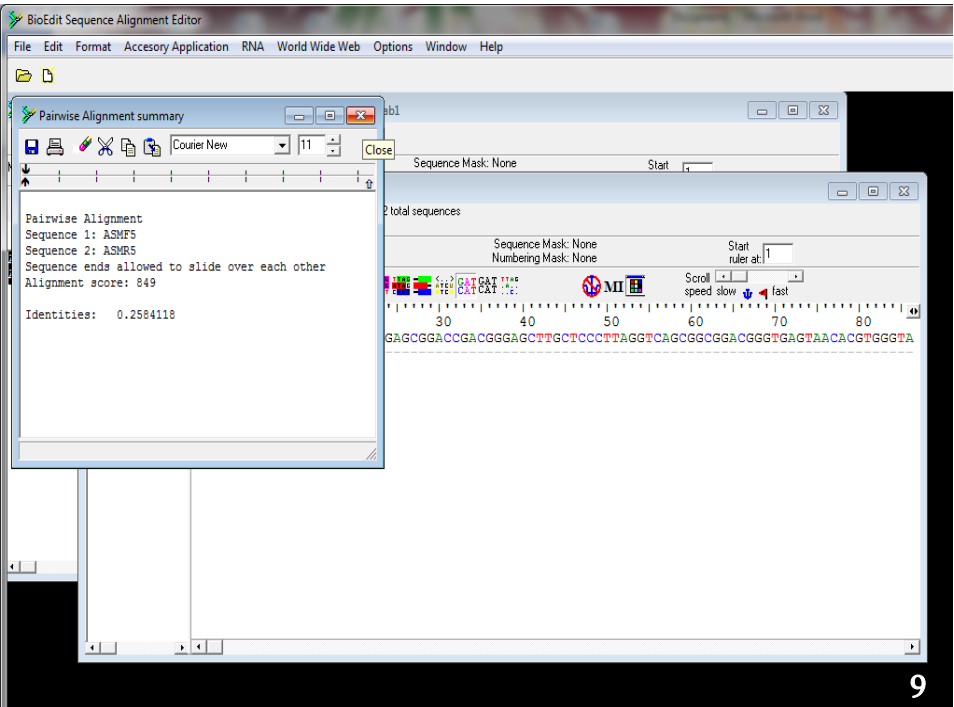


7

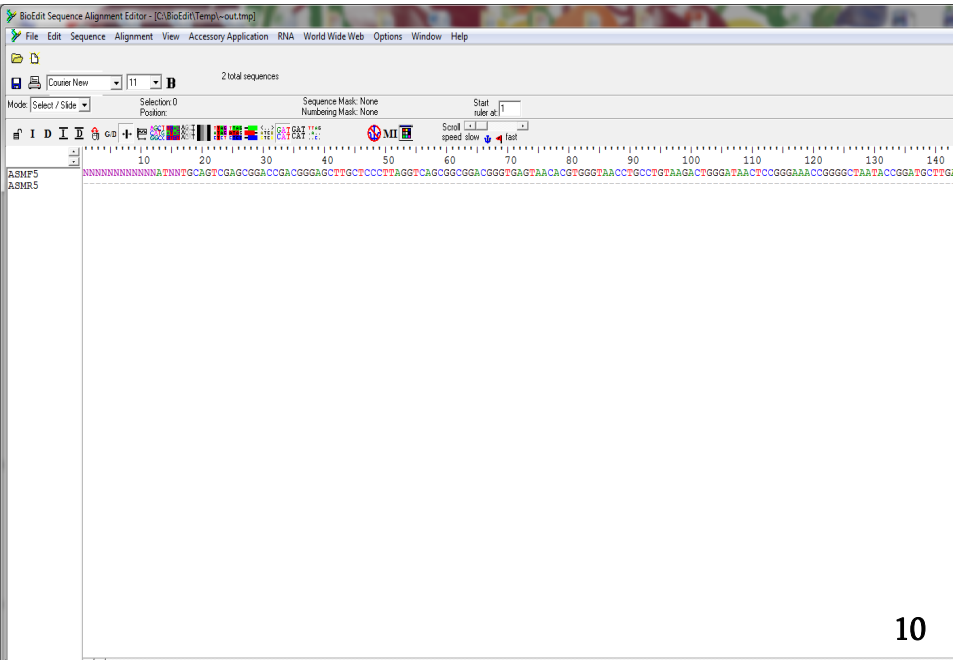
6-7 Նշել 16S ռՌՆԹ գենի հակադարձ հաջորդականությունը և Sequence → Nucleic Acid → Reverse Complement (Shift+Ctrl+R) հրահանգի միջոցով ուղղել հակադարձ հաջորդականության ուղղությունը 5' - 3':



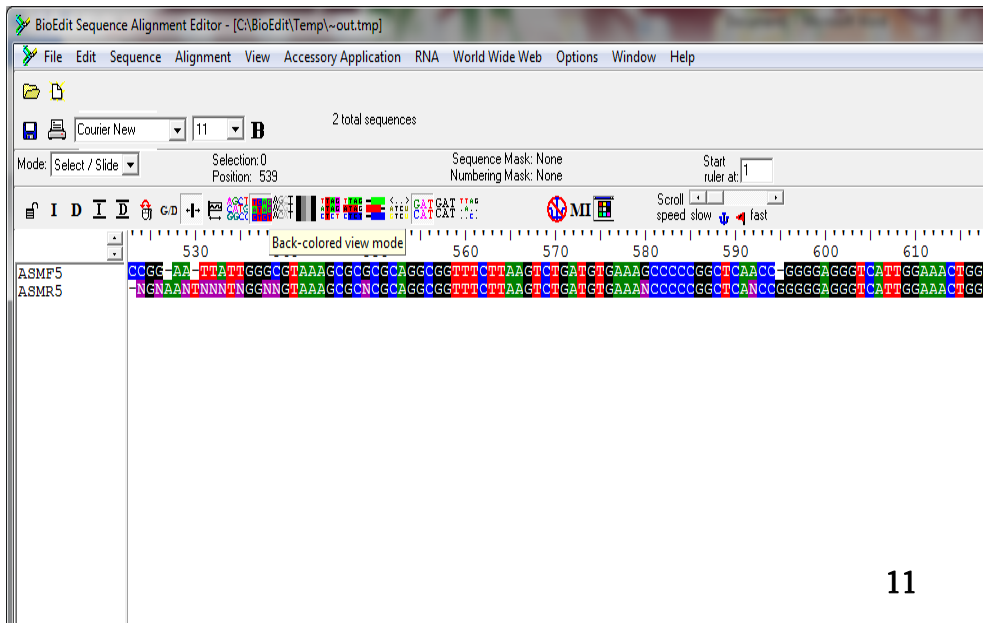
8



9

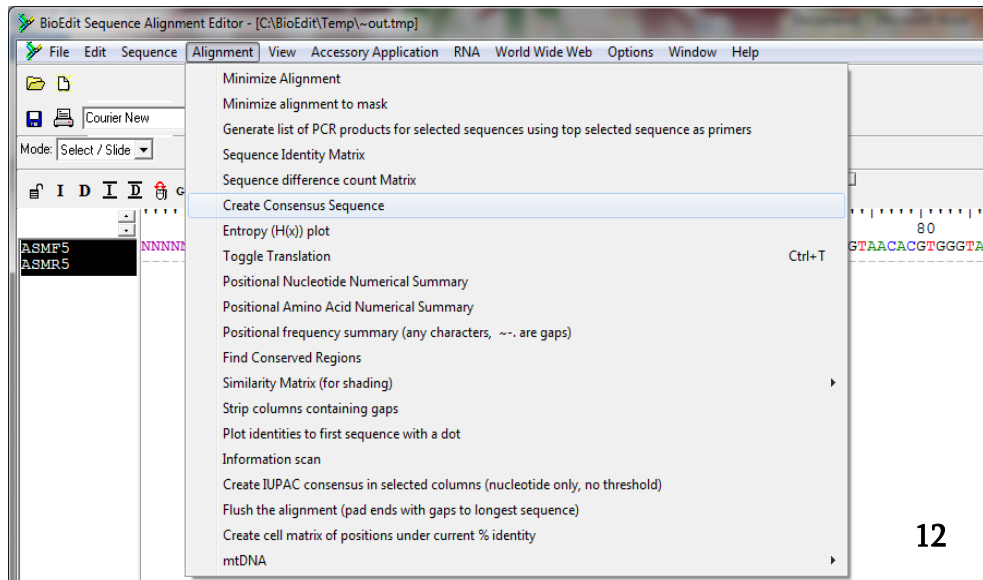


10



11

8-11 Նշել ուղիղ և հակադարձ հաջորդականությունները, այնուհետև հավասարեցնել Sequence → Pairwise alignment → Align two sequences (allow end to slide) հրահանգով: Դիտարկել հավասարեցված հաջորդականությունները:



12

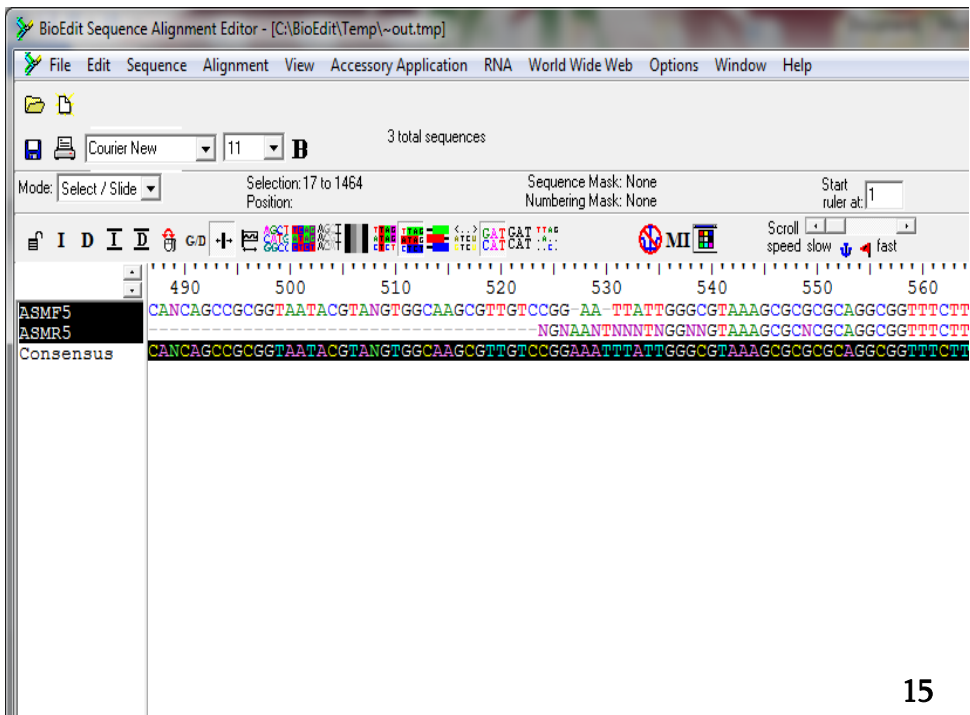


13

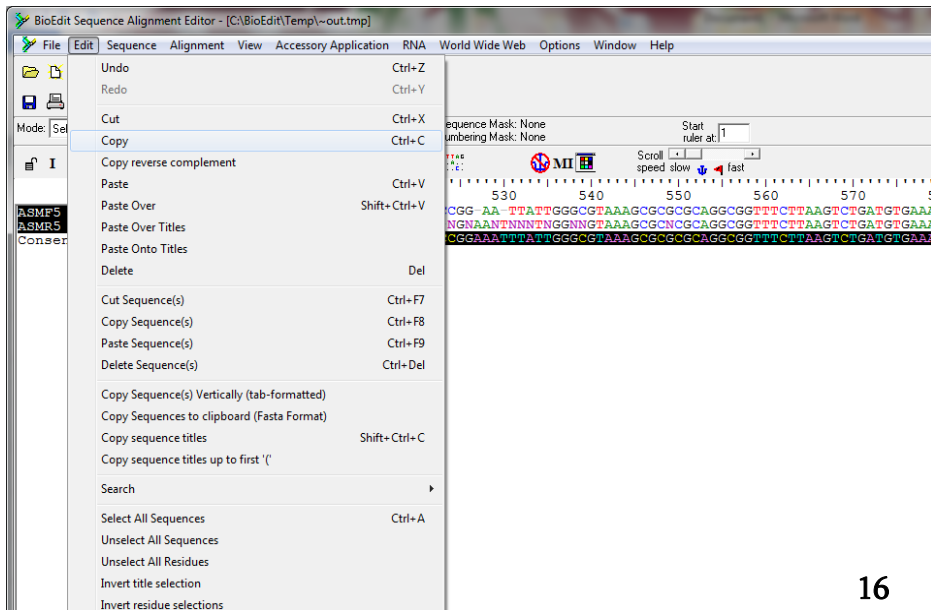
12-14 Ուղիղ և հակադարձ հաջորդականությունների հիման վրա սինթեզել 16S ռՌՆԹ գենի ամբողջական շղթան օգտագործելով Alignment → Create Consensus Alignment հրահանգը:



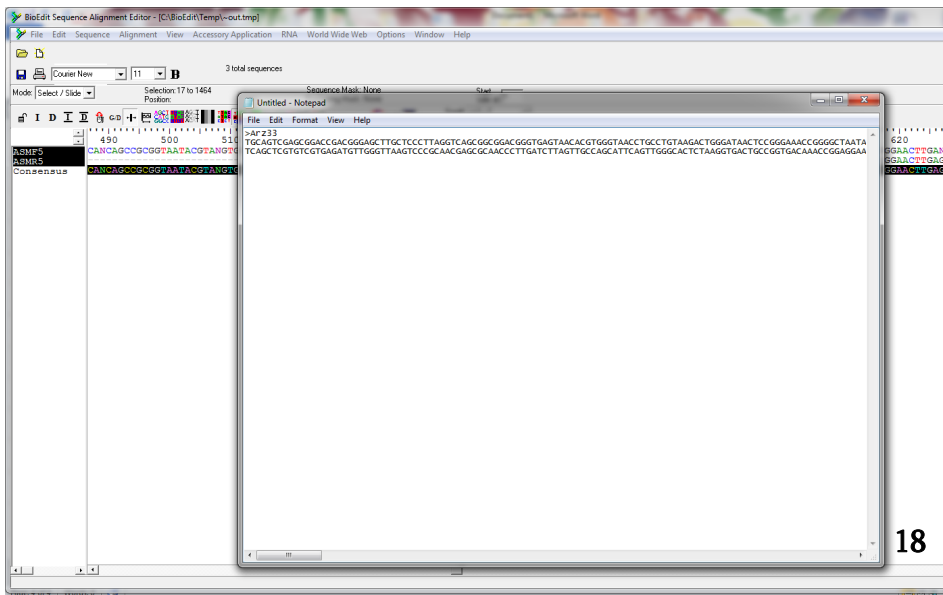
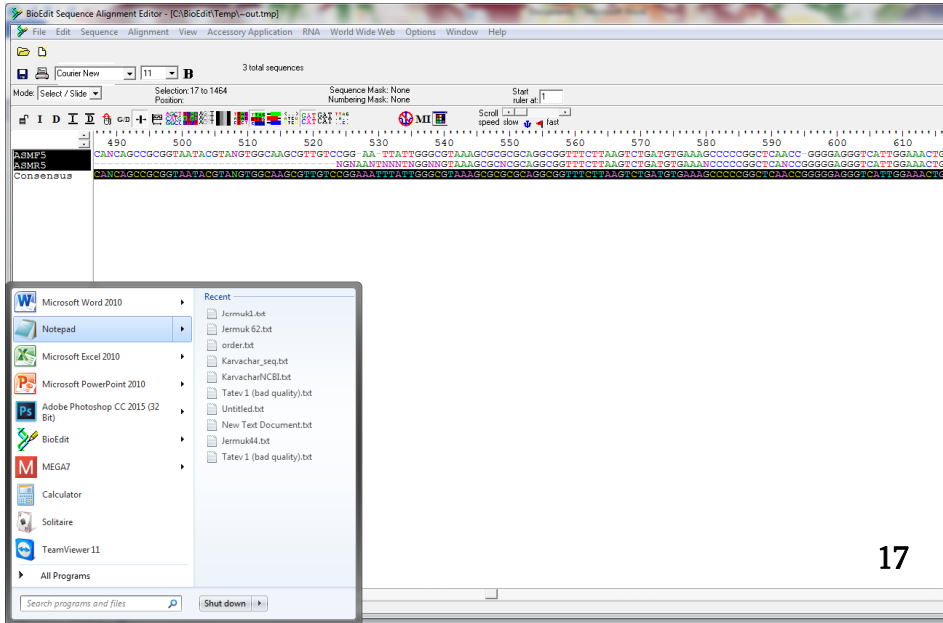
14



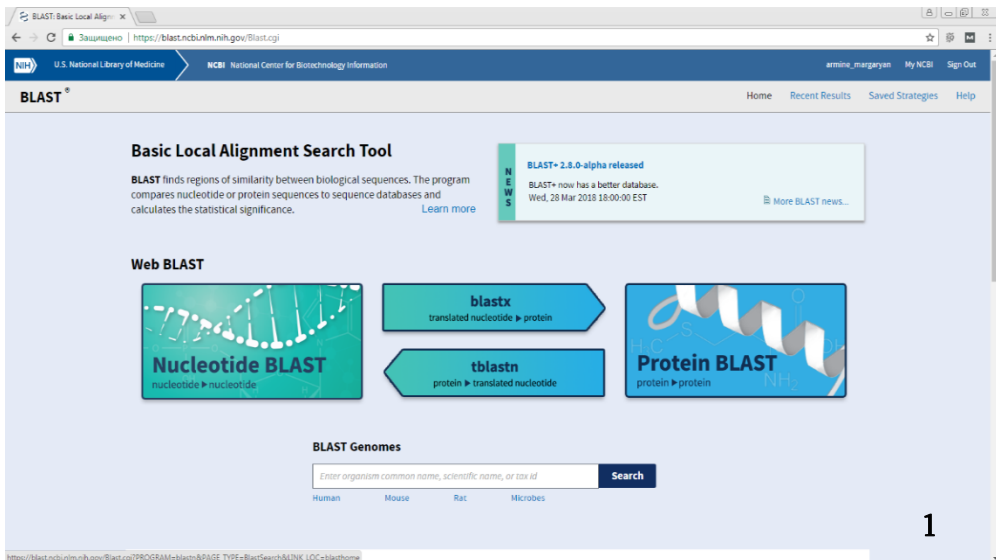
15



16

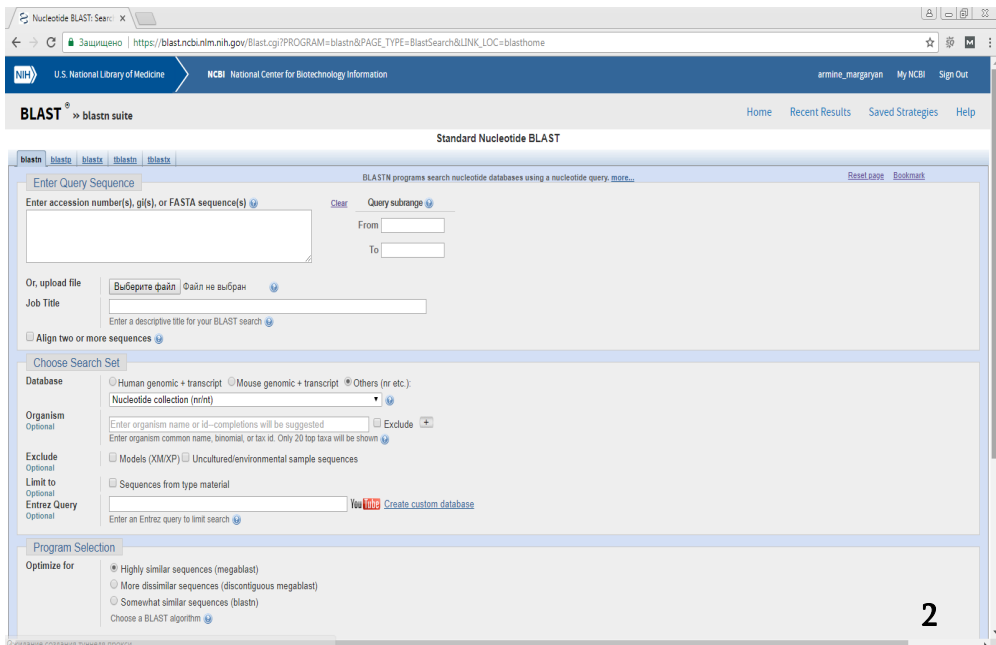


15-18 Պատճենել ստացված 16S ռԻՆԹ գենի ամբողջական շղթան նոր text կամ notepad ֆայլում՝ անվանումից առաջ տեղադրելով > նշանը:



1

Նկար 22. 16S ռԻՆԹ գենի BLAST վերլուծությունը (1-12):



2

1. Մուտք գործել <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> կայքը և սեղմել Nucleotide BLAST կոճակը:

Nucleotide BLAST Search

Enter a descriptive title for your BLAST search

☐ Align two or more sequences

Choose Search Set

Database
☐ Human genomic + transcript ☐ Mouse genomic + transcript ☒ Others (nr etc.)
 Nucleotide collection (nr/nt)

Organism
 Optional
 Enter organism name or id... completions will be suggested
 Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top taxa will be shown

Exclude
 Optional
☐ Models (XM/XP) ☐ Uncultured/environmental sample sequences

Limit to
 Optional
 Enter an Entrez query to limit search

Program Selection
 Optimize for
☒ Highly similar sequences (megablast)
☐ More dissimilar sequences (discontiguous megablast)
☐ Somewhat similar sequences (blastn)
 Choose a BLAST algorithm

BLAST Search database Nucleotide collection (nr/nt) using Megablast (Optimize for highly similar sequences)
☒ Show results in a new window

Algorithm parameters

BLAST is a registered trademark of the National Library of Medicine

NCBI
 National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine
 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA
 Policies and Guidelines | Contact

Support center Mailing list

NIH NLM TSA.gov

5

4-5. Choose Search Set դաշտում ընտրել Nucleotide collection (nr/nt), Program Selection դաշտում՝ Highly similar sequences (megablast) տարբերակը, ընտրել նաև Show results in a new window տարբերակը և սեղմել BLAST կոճակը:

U.S. National Library of Medicine
 National Center for Biotechnology Information

BLAST® » blastn suite » results for RID-WJW6MSB01R

Home Recent Results Saved Strategies Help

[Edit Search](#) [Save Search](#) [Search Summary](#)

Job Title Nucleotide Sequence

RID WJW6MSB01R Search expires on 11-12 21:31 pm [Download All](#)

Program BLASTN [Citation](#)

Database nt [See details](#)

Query ID Icl|Query_32215

Description None

Molecule type dna

Query Length 154

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results

Organism only top 20 will appear ☐ exclude
 Type common name, binomial, taxid or group name
[Add organism](#)

Percent Identity to **E value** to **Query Coverage** to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions [Graphic Summary](#) [Alignments](#) [Taxonomy](#)

Sequences producing significant alignments [Download](#) [Manage Columns](#) [Show](#) 100

☒ select all 100 sequences selected

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
☒ Geobacillus caldosylosylticus strain ES_26f 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	267	267	99%	1e-67	98.05%	EU934089.1

6

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

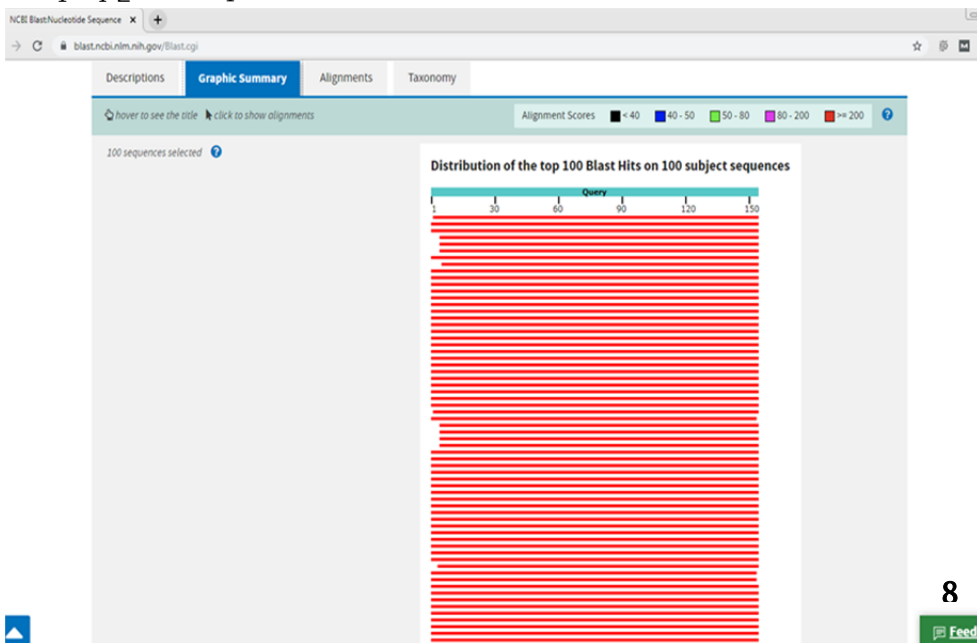
Sequences producing significant alignments

Download Manage Columns Show 100

☒ select all 100 sequences selected

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
☒ Geobacillus caldoolysylicus strain ES_261 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	267	267	99%	1e-67	98.05%	EU934089.1
☒ Uncultured compost bacterium partial 16S rRNA gene, clone FS1625	265	265	100%	5e-67	97.44%	FN667153.1
☒ Uncultured bacteria clone F1-13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	265	265	100%	5e-67	97.44%	AY096145.1
☒ Parageobacillus caldoolysylicus strain SURF-051A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	261	261	97%	6e-66	98.00%	MF965175.1
☒ Parageobacillus caldoolysylicus strain SURF-043A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	261	261	97%	6e-66	98.00%	MF965164.1
☒ Geobacillus sp. GWFE1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	261	261	97%	6e-66	98.00%	FJ598658.1
☒ Parageobacillus caldoolysylicus strain Jermuk 6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	259	259	100%	2e-65	96.79%	MK410557.1
☒ Parageobacillus caldoolysylicus strain SURF-052B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	259	259	96%	2e-65	97.99%	MF965179.1
☒ Parageobacillus caldoolysylicus strain SURF-044B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	259	259	100%	2e-65	96.79%	MF965052.1
☒ Geobacillus caldoolysylicus strain UTM6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	259	259	100%	2e-65	96.79%	KRB67680.1
☒ Geobacillus sp. DC1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	259	259	100%	2e-65	96.79%	KC822365.1
☒ Geobacillus sp. FFT1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	259	259	100%	2e-65	96.79%	JN087516.1
☒ Geobacillus caldoolysylicus strain S35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	259	259	100%	2e-65	96.79%	FJ823099.2
☒ Bacillus sp. NBY16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	259	259	100%	2e-65	96.79%	HQ851060.1
☒ Uncultured bacterium clone ncd1765d08c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	259	259	100%	2e-65	96.79%	JF153472.1
☒ Geobacillus caldoolysylicus strain J16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	259	259	100%	2e-65	96.79%	HM067871.1
☒ Uncultured Firmicutes bacterium clone Aerocomp_NA02 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	259	259	100%	2e-65	96.79%	FJ754668.1
☒ Geobacillus caldoolysylicus strain S40 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	259	259	100%	2e-65	96.79%	FJ823101.1
☒ Geobacillus sp. JAM-FM0501 gene for 16S rRNA, partial sequence	259	259	100%	2e-65	96.79%	AB362270.1
☒ Bacillus sp. BGSC W9A58 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	259	259	100%	2e-65	96.79%	AY608954.1
☒ Bacillus sp. BGSC W9A59 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	259	259	100%	2e-65	96.79%	AY608952.1
☒ Geobacillus caldoolysylicus strain BGSC W9A36 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	259	259	100%	2e-65	96.79%	AY608951.1

6-7. GenBank-ում աղկա ներմուծված 16S ռՌՆԹ զեխի ամենամոտ նմանակները (Descriptions):



8. GenBank-ում առկա ներմուծված 16S ռՌՆԹ գենի ամենամոտ նմանակների միջև նմանության գրաֆիկական պատկերումը (Graphic Summery):

Descriptions

Graphic Summary

Alignments

Taxonomy

Alignment viewPairwiseCDS featureDownload

100 sequences selected

DownloadGenBankGraphics

NextPreviousDescriptions

Geobacillus caldxylosilyticus strain ES_26f 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: EU934089.1Length: 792Number of Matches: 1

Range 1: 4 to 157GenBankGraphics

Next MatchPrevious Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
267 bits(144)	1e-67	151/154(98%)	1/154(0%)	Plus/Plus
Query 2	TAC-TGCAGTCGAGCGGACCGAACGAGAGCTTGCTCTTGTCGGTTAGCGCGGACCGTT	60		
Sbjct 4	TACATGAGTCGAGCGGACCGAACGAGAGCTTGCTCTTGTCGGTTAGCGCGGACCGGT	63		
Query 61	GAGTAACACGTGGGTAACTACCCGTAAGACCGGATAAATCCGGGAACCGGAGCTAAAT	120		
Sbjct 64	GAGTAACACGTGGGTAACTACCCGTAAGACCGGATAAATCCGGGAACCGGAGCTAAAT	123		
Query 121	ACCGGATAACACCGAAGACCGCATGGCTTTTGGT	154		
Sbjct 124	ACCGGATAACACCGAAGACCGCATGGCTTTTGGT	157		

DownloadGenBankGraphics

NextPreviousDescriptions

Uncultured compost bacterium partial 16S rRNA gene, clone FS1625

Sequence ID: FN667153.1Length: 1489Number of Matches: 1

Range 1: 3 to 158GenBankGraphics

Next MatchPrevious Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
265 bits(143)	5e-67	152/156(97%)	2/156(1%)	Plus/Plus
Query 1	ATAC-TGC-AGTCGAGCGGACCGAACGAGAGCTTGCTCTTGTCGGTTAGCGCGGACCG	58		
Sbjct 3	ATACATGCAAGCTTGAGCGGACCGAACGAGAGCTTGCTCTTGTCGGTTAGCGCGGACCG	62		

9

Descriptions

Graphic Summary

Alignments

Taxonomy

ReportsLineageOrganismTaxonomy

100 sequences selected

Organism	Blast Name	Score	Number of Hits	Description
Bacteria	bacteria		107	
. Firmicutes	firmicutes		70	
. . Bacillaceae	firmicutes		68	
. . . Parageobacillus	firmicutes		41	
. . . . Parageobacillus caldxylosilyticus	firmicutes	267	31	Parageobacillus caldxylosilyticus hits
. . . . Parageobacillus thermantarcticus	firmicutes	248	10	Parageobacillus thermantarcticus hits
. . . . Geobacillus sp. GWE1	firmicutes	261	1	Geobacillus sp. GWE1 hits
. . . . Geobacillus sp. DC1	firmicutes	259	1	Geobacillus sp. DC1 hits
. . . . Geobacillus sp. EFT1	firmicutes	259	1	Geobacillus sp. EFT1 hits
. . . . Bacillus sp. NBY16	firmicutes	259	1	Bacillus sp. NBY16 hits
. . . . Geobacillus sp. JAM-FM0501	firmicutes	259	1	Geobacillus sp. JAM-FM0501 hits
. . . . Geobacillus sp. FL204	firmicutes	255	1	Geobacillus sp. FL204 hits
. . . . Geobacillus sp. IP_60A2	firmicutes	255	1	Geobacillus sp. IP_60A2 hits
. . . . Geobacillus sp. HEO1	firmicutes	254	1	Geobacillus sp. HEO1 hits
. . . . Geobacillus kaustophilus	firmicutes	254	1	Geobacillus kaustophilus hits
. . . . Bacillus sp. GJ4-B	firmicutes	254	1	Bacillus sp. GJ4-B hits
. . . . Bacillus sp. GJ2-1	firmicutes	254	1	Bacillus sp. GJ2-1 hits
. . . . Geobacillus sp. BGSC W9A7	firmicutes	254	1	Geobacillus sp. BGSC W9A7 hits
. . . . Geobacillus stearothermophilus	firmicutes	254	2	Geobacillus stearothermophilus hits
. . . . Geobacillus sp. R-7653	firmicutes	254	1	Geobacillus sp. R-7653 hits
. . . . Bacillus sp. C1(BN)	firmicutes	254	1	Bacillus sp. C1(BN) hits
. . . . Bacillus sp. S1b-3	firmicutes	254	1	Bacillus sp. S1b-3 hits
. . . . Bacillus sp. GJ1-2	firmicutes	252	1	Bacillus sp. GJ1-2 hits
. . . . Geobacillus sp. D-0-55-4	firmicutes	252	1	Geobacillus sp. D-0-55-4 hits
. . . . Geobacillus sp. D-31-55-2	firmicutes	250	1	Geobacillus sp. D-31-55-2 hits

10

NCBI Resources How To Help

Nucleotide Nucleotide Search

Advanced

GenBank Send to:

Geobacillus caldoxylosilyticus strain ES_26f 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: EU934089.1

[FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)

[Go to:](#)

LOCUS	EU934089	792 bp	DNA	linear	BCT 09-SEP-2008
DEFINITION	Geobacillus caldoxylosilyticus strain ES_26f 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.				
ACCESSION	EU934089				
VERSION	EU934089.1				
KEYWORDS	.				
SOURCE	Parageobacillus caldoxylosilyticus				
ORGANISM	Parageobacillus caldoxylosilyticus Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Parageobacillus.				
REFERENCE	1 (bases 1 to 792)				
AUTHORS	Hoissi-Eichinger,C. and Stieglmeier,H.				
TITLE	Microbial diversity of spacecraft associated clean rooms				
JOURNAL	Unpublished				
REFERENCE	2 (bases 1 to 792)				
AUTHORS	Hoissi-Eichinger,C. and Stieglmeier,H.				
TITLE	Direct Submission				
JOURNAL	Submitted (24-JUL-2008) Institute for Microbiology and Archae Center, University Regensburg, Universitaetsstrasse 31, Regensburg 93055, Germany				
FEATURES	Location/Qualifiers				
source	1..792 /organism="Parageobacillus caldoxylosilyticus" /mol_type="genomic DNA" /strain="ES_26f" /isolation_source="ESTEC clean room" /db_xref="taxon:81488" /country="Netherlands: Noordwijk" <1..792 /product="16S ribosomal RNA"				

rRNA

[illegible]

113

ՕԳՏԱԳՈՐԾՎԱԾ ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅԱՆ ՑԱՆԿ

1. Ազարյան Ն. Հ., Մոլեկուլային գենետիկայի գործնական աշխատանքներ, Ուսումնամեթոդական ձեռնարկ, ԵՊՀ հրատարակչություն, Երևան, 2006, 41 էջ:
2. Փանոսյան Հ., Մոլեկուլային գենետիկական մեթոդների կիրառությունը մանրէների համակեցությունների ուսումնասիրության մեջ, Ուսումնամեթոդական ձեռնարկ, Երևան, ԵՊՀ հրատարակչություն, 2010, 48 էջ:
3. Թոչունյան Ա. Հ., Փանոսյան Հ. Հ., Բազուկյան Ի. Լ., Մարգարյան Ա.Ա., Պոպով Յու. Գ., Մանրէաբանության լաբորատոր աշխատանքներ, Ուսումնամեթոդական ձեռնարկ, ԵՊՀ հրատարակչություն, 2014, 316 էջ:
4. Брюханов А. Л., Рыбак К.В., Нетрусов А.И. Молекулярная микробиология: Учебник для вузов, Издательство Московского университета, Москва, 2012, 480 с.
5. Коничев А. С., Севастьянова Г.А. Молекулярная биология, 2-е изд., Академия, Москва, 2005, 400 с.
6. Методы общей бактериологии. В 3-х томах. Под ред. Ф. Герхарда и др., Москва, Мир, 1983.
7. Alexander S. K., Strete D., Niles M.J. Laboratory Exercises in Organismal and Molecular Microbiology. New York, The McGraw-Hill Companies, 2003, 384 p.
8. Bernard R. Glick, Jack J. Pasternak, Cheryl L. Patten Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA, 4th Edition, ASM Press, 2009, 1020 p.
9. Brown T. A. Gene cloning and DNA analysis. An Introduction, 17th ed., John Wiley and Sons Ltd, 2016, 354 p.
10. Chang A., Chau V, Landas J., Pang Y. Preparation of calcium competent *Escherichia coli* and heat-shock transformation, JEMI methods, Vol. 1, 2017, pp. 22-25.
11. David H. Persing, Fred C. Tenover, Randall T. Hayden, Greet Ieven, Melissa B. Miller, Frederick S. Nolte, Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice, ASM Press, 2016, 852 p.

12. Green M. R., Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, In Three Volumes, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 4th edition, 2012, 2028 p.
13. Handbook of Molecular Microbial Ecology I: Metagenomics and Complementary Approaches, Editor(s): Frans J. de Bruijn, Wiley-Blackwell, 2011, 761p.
14. Protocols and Applications Guide (3rd ed.), Promega, 2009, p. 45-46.
15. Steve K. A. Dennis S. Mary J.N. Laboratory Exercises in Organismal and Molecular Microbiology. Spiral Bound/Comb. 2004, 384 p.

ԲՈՎԱՆԴԱԿՈՒԹՅՈՒՆ

ՀԱՊԱՎՈՒՄՆԵՐ	4
ԹԵՄԱ 1. ԲԱԿՏԵՐԻԱԿԱՆ ԲԶԻՋՆԵՐԻՑ ՆՈՒԿԼԵԻՆԱԹԹՈՒՆԵՐԻ ԱՆՋԱՏՈՒՄԸ.....	6
ԱՇԽԱՏԱՆՔ 1.1. ՔՐՈՍՈՍՈՄԱՅԻՆ ԴՆԹ-Ի ԱՆՋԱՏՈՒՄԸ.....	6
Առաջադրանք 1.1.1. Բակտերիաներից քրոմոսոմային ԴՆԹ-ի անջատումն ըստ Մարմուրի (Marmur) մեթոդի.....	7
Առաջադրանք 1.1.2. Բակտերիաներից քրոմոսոմային ԴՆԹ-ի անջատումը ցետիլեռմեթիլամոնիումային բրոմիդի (ՑԵԱԲ) կիրառմամբ	13
ԱՇԽԱՏԱՆՔ 1.2. ՊԼԱՋՄԻԴԱՅԻՆ ԴՆԹ-Ի ԱՆՋԱՏՈՒՄԸ	15
Առաջադրանք 1.2.1. Պլազմիդային ԴՆԹ-ի անջատումը հիմնային լիզիսի մեթոդով.....	16
Առաջադրանք 1.2.2. Պլազմիդային ԴՆԹ-ի անջատումը ՆԴՄ-ի կիրառմամբ	19
ԱՇԽԱՏԱՆՔ 1.3. ԲԱԿՏԵՐԻԱԿԱՆ ԲԶԶԻՑ ՀԱՆՐԱԳՈՒՄԱՐԱՅԻՆ ՌՆԹ-Ի ԱՆՋԱՏՈՒՄԸ	21
Առաջադրանք 1.3.1. Հանրագումարային ՌՆԹ-ի անջատումը թթու ֆենոլով	21
ԹԵՄԱ 2. ՆՈՒԿԼԵԻՆԱԹԹՈՒՆԵՐԻ ԱՆՋԱՏՈՒՄԸ ԲՆԱԿԱՆ ՆՄՈՒՇՆԵՐԻՑ.....	25
ԱՇԽԱՏԱՆՔ 2.1. ՀԱՆՐԱԳՈՒՄԱՐԱՅԻՆ ԴՆԹ-Ի ԱՆՋԱՏՈՒՄԸ ԲՆԱԿԱՆ ՆՄՈՒՇՆԵՐԻՑ.....	26
Առաջադրանք 2.1.1. Հողային նմուշից գումարային ԴՆԹ-ի անջատումը ՑԵԱԲ-ի կիրառմամբ	26
Առաջադրանք 2.1.2. Ջրային նմուշից գումարային ԴՆԹ-ի անջատումը ՑԵԱԲ-ի կիրառմամբ	28
ԱՇԽԱՏԱՆՔ 2.2. ԲՆԱԿԱՆ ՆՄՈՒՇԻՑ ՀԱՆՐԱԳՈՒՄԱՐԱՅԻՆ ՌՆԹ-Ի ԱՆՋԱՏՈՒՄԸ.....	30
Առաջադրանք 2.2.1. Հողային նմուշից հանրագումարային ՌՆԹ-ի անջատումը.....	30
ԱՇԽԱՏԱՆՔ 2.3. ՌՆԹ-Ի ՊԱՏՐԱՍՏՈՒԿԻ ՄԱՔՐՈՒՄԸ ԴՆԹ-ԻՑ.....	32

Առաջադրանք 2.3.1. Ռեժ-ի պատրաստուկի մաքրումը դեզօքսիդիզացիայի I-ով մշակմամբ.....	32
ԹԵՄԱ 3. ՆՈՒԿԼԵԻՆԱԹԹՈՒՆԵՐԻ ՔԱՆԱԿԱԿԱՆ ՎԵՐԼՈՒԾՈՒԹՅԱՆ ՄԵԹՈԴՆԵՐ.....	35
ԱՇԽԱՏԱՆՔ 3.1. ՆՈՒԿԼԵԻՆԱԹԹՈՒՆԵՐԻ ԿՈՆՑԵՆՏՐԱՑԻԱՆԵՐԻ ՈՐՈՇՈՒՄԸ ՍՊԵԿՏՐԱԼՈՒՍԱԶՈՒՄԱԿԱՆ ԵՂԱՆԱԿՈՎ.....	35
Առաջադրանք 3.1.1. ԴՆԹ-ի քանակական վերլուծությունը սպեկտրալուսաչափական եղանակով.....	36
ԱՇԽԱՏԱՆՔ 3.2. ԴՆԹ-ի ԿՈՆՑԵՆՏՐԱՑԻԱՅԻ ՈՐՈՇՈՒՄԸ ԷԹԻԴԻՈՒՄԻ ԲՐՈՄԻԴԻ ԼՈՒՍԱՐԶԱԿՄԱՄԲ.....	37
Առաջադրանք 3.2.1. ԴՆԹ-ի կոնցենտրացիայի որոշումը էթիդիումի բրոմիդի լուսարձակմամբ.....	38
ԹԵՄԱ 4. ՊՈԼԻՄԵՐԱԶԱՅԻՆ ՇՂԹԱՅԱԿԱՆ ՌԵԱԿՑԻԱ (ՊՇՌ).....	40
ԱՇԽԱՏԱՆՔ 4.1. <i>Taq</i> ԴՆԹ-ՊՈԼԻՄԵՐԱԶԻ ԿԻՐԱՌՄԱՄԲ ՊՇՌ.....	40
Առաջադրանք 4.1.1. Բակտերիական 16S ռՌՆԹ գենի ամպլիֆիկացումը ՊՇՌ եղանակով.....	46
Առաջադրանք 4.1.2. Արքեային 16S ռՌՆԹ գենի ամպլիֆիկացումը ՊՇՌ եղանակով.....	47
Առաջադրանք 4.1.3. Բակտերիական 16S ռՌՆԹ գենի կարճ հատվածների ՊՇՌ ամպլիֆիկացումը GC հաջորդականություններով հարուստ մերաններով.....	48
Առաջադրանք 4.1.4. Արքեային 16S ռՌՆԹ գենի կարճ հատվածների ՊՇՌ ամպլիֆիկացումը GC հաջորդականություններով հարուստ մերաններով.....	49
ԱՇԽԱՏԱՆՔ 4.2. ՀԱԿԱԴԱՐՁ ՏՐԱՆՍԿՐԻՊՏԱԶՈՎ ՊՇՌ (ՀՏ-ՊՇՌ).....	51
Առաջադրանք 4.2.1. Լրացչական ԴՆԹ-ի ՊՇՌ սինթեզը հակադարձ տրանսկրիպտազի կիսմամբ.....	52
ԹԵՄԱ 5. ՆՈՒԿԼԵԻՆԱԹԹՈՒՆԵՐԻ ԺԵԼ-ԷԼԵԿՏՐԱՖՈՐԵԶ.....	54
ԱՇԽԱՏԱՆՔ 5.1. ՆՈՒԿԼԵԻՆԱԹԹՈՒՆԵՐԻ ԱԳԱՐՈՋԱՅԻՆ ԺԵԼ ԷԼԵԿՏՐԱՖՈՐԵԶ.....	54
Առաջադրանք 5.1.1. Ագարոզային ժելում ԴՆԹ-ի հորիզոնական ժել էլեկտրաֆորեզ.....	57

Առաջադրանք 5.1.2. Ագարոզային ժելում ՌՆԹ-ի հորիզոնական ժել էլեկտրաֆորեզ.....	60
ԱՇԽԱՏԱՆՔ 5.2. ՆՈՒԿԼԵԻՆԱԹԹՈՒՆԵՐԻ ԲՆԱՓՈԽՈՂ ԳՐԱԴԻԵՆՏԱՅԻՆ ԺԵԼ ԷԼԵԿՏՐԱՖՈՐԵԶ.....	61
Առաջադրանք 5.2.1. GC հաջորդականություններով հարուստ մերաններով ՊՇՌ ամպլիֆիկացված բակտերիական 16S ռՌՆԹ գենի կարճ հատվածների տարանջատումը ԲԳԺԷ եղանակով	62
ԹԵՄԱ 6. ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ԿԼՈՆԱՎՈՐՈՒՄ	68
ԱՇԽԱՏԱՆՔ 6.1. ՎԵԿՏՈՐԻ ԿՏՐՈՒՄԸ ԷՆԴՈՆՈՒԿԼԵԱԶՆԵՐԻ ԿԻՐԱՌՄԱՄԲ	69
Առաջադրանք 6.1.1. pUC18 վեկտորի կտրումը <i>Hind</i> III ռեստրիկտազի կիրառմամբ	71
Առաջադրանք 6.1.2. Կտրված գծային ԴՆԹ-ի կաշուն ծայրերի ապաֆոսֆորիլացումը	74
ԱՇԽԱՏԱՆՔ 6.2. ԴՆԹ ՀԱՏՎԱԾԻ ԿԱՄ ԳԵՆԻ ԿԱՐՈՒՄԸ ՎԵԿՏՈՐԱՅԻՆ ԴՆԹ-ԻՆ ԴՆԹ-ԼԻԳԱԶԻ ԿԻՐԱՌՄԱՄԲ.....	76
Առաջադրանք 6.2.1. 16S ռՌՆԹ գենի կտրումը վեկտորային ԴՆԹ-ին T4 բակտերիաֆագի ԴՆԹ-լիզազի կիրառմամբ.....	77
ԱՇԽԱՏԱՆՔ 6.3. ԿՈՄՊԵՏԵՆՏ ԲԶԻԶՆԵՐԻ ՍՏԱՑՈՒՄԸ ԵՎ ՏՐԱՆՍՖՈՐՄԱՑՈՒՄԸ.....	78
Առաջադրանք 6.3.1. Քեմոկոմպետենտ բջիջների ստացում CaCl_2 -ի մշակմամբ.....	78
Առաջադրանք 6.3.2. Ուլտրաքեմոկոմպետենտ բջիջների ստացում RbCl -ի մշակմամբ	80
Առաջադրանք 6.3.3. 16S ռՌՆԹ պարունակող վեկտորի տրանսֆորմացումը <i>E. coli</i> Top10 բջիջներում	81
ԹԵՄԱ 7. ԴՆԹ-Ի ՆՈՒԿԼԵՈՏԻԴԱՅԻՆ ՀԱԶՈՐԴԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՍԵՔՎԵՆԱՎՈՐՈՒՄ ԵՎ ՎԵՐԼՈՒԾՈՒԹՅՈՒՆ	83
ԱՇԽԱՏԱՆՔ 7.1. ԲԱԿՏԵՐԻԱԿԱՆ 16S ռՌՆԹ ԳԵՆԻ ՀԱԶՈՐԴԱԿԱՆ ՆՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՆԱԽԱՊԱՏՐԱՍՏՈՒՄԸ ՍԵՔՎԵՆԱՎՈՐՄԱՆ	86
Առաջադրանք 7.1.1. Բակտերիական 16S ռՌՆԹ գենի հաջորդականությունների եղևեՖ-ով նշադրմամբ ամպլիֆիկացումը BigDye-ի կիրառմամբ.....	86

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 7.2. ԲԱԿՏԵՐԻԱԿԱՆ 16S ռՌՆԹ ԳԵՆԻ ՀԱԶՈՐԴԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԿԵՆՍԱԻՆՖՈՐՄԱՏԻԿԱԿԱՆ ՎԵՐԼՈՒԾՈՒԹՅՈՒՆԸ	87
Առաջադրանք 7.2.1. Բակտերիական 16S ռՌՆԹ գենի հաջորդականությունների շտկում	87
Առաջադրանք 7.2.2. Բակտերիական 16S ռՌՆԹ գենի BLAST վերլուծությունը	89
ՀԱՎԵԼՎԱԾ 1	92
ՀԱՎԵԼՎԱԾ 2	96
ՀԱՎԵԼՎԱԾ 3	97
ՀԱՎԵԼՎԱԾ 4	99
ՕԳՏԱԳՈՐԾՎԱԾ ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅԱՆ ՑԱՆԿ	114

ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

**ՓԱՆՈՍՅԱՆ Հ. Հ., ՄԱՐԳԱՐՅԱՆ Ա. Ա.,
ԲԱԶՈՒԿՅԱՆ Ի. Լ., ԹՈՉՈՒՆՅԱՆ Ա. Հ.**

**ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ՄԱՆՐԷԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ
ԼԱԲՈՐԱՏՈՐ ԱՇԽԱՏԱՆՔՆԵՐ**

(ՈՒՍՈՒՄՆԱՄԵԹՈԴԱԿԱՆ ՁԵՌՆԱՐԿ)

Համակարգչային ձևավորումը՝ Կ. Չալաբյանի
Կազմի ձևավորումը՝ Ա. Պատվականյանի
Հրատ. սրբագրումը՝ Ս. Դավթյանի

Տպագրված է «ՎԱՌՄ» ՍՊԸ-ում:
Ք. Երևան, Տիգրան Մեծի 48, բն. 43

Ստորագրված է տպագրության՝ 05.08.2020:
Չափսը՝ 60x84 ¹/₁₆: Տպ. մամուլը՝ 7.5:
Տպաքանակը՝ 100:

ԵՊՀ հրատարակչություն
Ք. Երևան, 0025, Ալեք Մանուկյան 1
www.publishing.am