

УДК 577.2;579
ББК 28.070;28.4
К71

Рецензенты:

доктор биологических наук, член-корреспондент РАН *Янковский Н.К.* (Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН); доктор биологических наук, профессор *Цыганков Ю.Д.* (ФГУП «ГосНИИгенетика» Минобрнауки РФ)

Брюханов А.Л., Рыбак К.В., Нетрусов А.И.

Б87 Молекулярная микробиология: Учебник для вузов. — М.: Издательство Московского университета, 2012. — 480 с.

ISBN 978-5-211-05486-8

В учебнике обобщены основные современные приемы и методы работы с носителями генетической информации микроорганизмов — молекулами ДНК и РНК, выделяемыми из экспериментальных образцов при биохимических, молекулярно-биологических, генно-инженерных и экологических исследованиях в микробиологии. Впервые широко представлены обобщенные материалы по молекулярным методам работы со смешанными культурами микроорганизмов и приемам анализа микробных сообществ.

Учебник предназначен для студентов, обучающихся по биологическим специальностям, аспирантов, преподавателей и научных работников, интересующихся методами молекулярной биологии и генной инженерии и их применением в изучении физиологии и экологии микроорганизмов.

Ключевые слова: молекулярная микробиология, молекулярно-биологические методы, генетика микроорганизмов.

A. Bryukhanov, K. Rybak, A. Netrusov

Molecular Microbiology: Textbook for universities. — M.: Moscow University Press, 2012. — 480 p.

ISBN 978-5-211-05486-8

Basic contemporary methods of work with the genetic information carriers of microorganisms — DNA and RNA molecules, isolated from the experimental samples for biochemical, molecular-biological, genetic engineering and ecological research in microbiology, are described in the textbook. Integrated materials on molecular-biological research work methods with mixed cultures of microorganisms and analyses of microbial communities are widely described for the first time.

The textbook will be of interest for students of Biology, Bachelors, Masters and post-graduates, lecturers and researchers interested in methods of molecular biology and gene engineering and their application for the research in physiology and ecology of microorganisms.

Key words: molecular microbiology, molecular-biological methods, genetics of microorganisms.

УДК 577.2;579

ББК 28.070;28.4

ISBN 978-5-211-05486-8

© Брюханов А.Л., Рыбак К.В., Нетрусов А.И., 2012
© Издательство Московского университета, 2012

<i>Предисловие</i>	8

Раздел I

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ПРИ РАБОТЕ С ЧИСТЫМИ (АКСЕНИЧЕСКИМИ) КУЛЬТУРАМИ МИКРООРГАНИЗМОВ

<i>Глава 1. Выделение нуклеиновых кислот из клеток микроорганизмов (А.Л. Брюханов)</i>	10
1.1. Выделение хромосомной ДНК	10
1.2. Выделение плазмидной ДНК	23
1.3. Выделение тотальной РНК	36
1.4. Количественное определение нуклеиновых кислот	48
<i>Глава 2. Полимеразная цепная реакция (А.Л. Брюханов)</i>	53
2.1. Амплификация фрагментов ДНК с помощью ПЦР	53
2.2. ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)	72
2.3. Полимеразная цепная реакция в реальном времени.	79
<i>Глава 3. Гель-электрофорез нуклеиновых кислот (А.Л. Брюханов).</i>	103
3.1. Электрофорез ДНК и РНК в агарозном геле	103
3.2. Выделение нуклеиновых кислот из агарозного геля	116
3.3. Электрофорез ДНК в полиакриламидном геле	123
<i>Глава 4. Трансформация клеток микроорганизмов плазмидной ДНК (А.Л. Брюханов).</i>	131
4.1. Получение химически-компетентных клеток и трансформация. ...	145
4.2. Получение электрокомпетентных клеток и электропорация.	162
<i>Глава 5. Перенос генетической информации у бактерий с помощью фаговой трансдукции и конъюгации (К.В. Рыбак, А.Л. Брюханов)</i>	170
5.1. Генетический перенос с помощью фаговой трансдукции	171
5.2. Генетический перенос посредством конъюгации	185
<i>Глава 6. Трансфекция клеток микроорганизмов фаговой ДНК (К.В. Рыбак)</i>	192
<i>Глава 7. Молекулярное клонирование (К.В. Рыбак, А.Л. Брюханов)</i>	204
7.1. Клонирование фрагмента ДНК в составе плазмидных векторов ...	205
7.2. Создание геномных библиотек	235
7.3. Гетерологичная экспрессия генов в клетках <i>E. coli</i>	248
7.4. Электрофоретическое разделение белков в денатурирующем ДСН-полиакриламидном геле	259

Глава 8. Мутагенез (К.В. Рыбак, А.Л. Брюханов)	270
8.1. Мутагенез с помощью химических агентов	272
8.2. Получение серийных делеций	276
8.3. Сайт-направленный мутагенез	280
8.4. Модификация бактериальных хромосом с помощью фаговых систем рекомбинации	290
Глава 9. Мечение нуклеиновых кислот (А.Л. Брюханов, К.В. Рыбак)	305
9.1. Радиоактивное мечение нуклеиновых кислот	305
9.2. Нерадиоактивное мечение нуклеиновых кислот	315
Глава 10. Гибридизация нуклеиновых кислот (А.Л. Брюханов, К.В. Рыбак)	321
10.1. ДНК–ДНК гибридизация	324
10.2. РНК–ДНК гибридизация	343
Глава 11. Секвенирование ДНК (А.Л. Брюханов)	355

Раздел II

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ПРИ РАБОТЕ СО СМЕШАННЫМИ КУЛЬТУРАМИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Глава 12. Экстракция нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) из природных образцов (А.И. Непрусов)	373
12.1. Прямая экстракция ДНК	376
12.2. Прямая экстракция РНК	382
Глава 13. T/DGGE-методы для анализа микробных сообществ (А.И. Непрусов)	385
13.1. Принципы разделения молекул на примере денатурирующего градиентного гель-электрофореза (ДГГЭ)	388
13.2. Метод проведения термального градиентного гель-электрофореза (ТГГЭ)	394
13.3. Проведение электроблоттинга денатурирующих градиентных гелей и гибридизационный анализ профилей ДГГЭ с олигонуклеотидными зондами	399
13.4. Экстракция ДНК из денатурирующих градиентных гелей	403
Глава 14. Метод T-RFLP для анализа динамики сложных микробных сообществ (А.И. Непрусов)	406
Глава 15. Флуоресцентная гибридизация <i>in situ</i> как метод обнаружения и идентификации микробных клеток (А.И. Непрусов, А.Л. Брюханов)	420
15.1. Выполнение процедуры стандартной флуоресцентной гибридизации <i>in situ</i>	429
15.2. Флуоресцентная гибридизация <i>in situ</i> с использованием тирамидной амплификации сигнала (CARD-FISH)	437

Приложения

<i>Приложение 1. Приготовление питательных сред и растворов (А.Л. Брюханов, К.В. Рыбак)</i>	444
<i>Приложение 2. Некоторые штаммы <i>Escherichia coli</i>, наиболее часто применяемые в молекулярно-биологических исследованиях (А.Л. Брюханов)</i>	456
<i>Приложение 3. Молекулярно-биологические базы данных и другие интернет-ресурсы (А.Л. Брюханов)</i>	462
<i>Приложение 4. Некоторые компании — поставщики химических реактивов, препаратов и оборудования (А.Л. Брюханов)</i>	466
<i>Предметный указатель</i>	468

В течение долгого времени не удавалось точно определить сложные структуры сообществ микроорганизмов в различных природных пробах, что крайне затрудняло работу микробных экологов. Классические методы выделения микроорганизмов, опирающиеся на получение накопительных и чистых культур, которые поддаются культивированию на известных питательных средах, дают возможность выделить и идентифицировать большое количество микроорганизмов в природных образцах. Тем не менее общепринятым сейчас является мнение, что такому культивированию поддаются менее 0,1% от всего разнообразия прокариот, существующих на Земле в настоящий период. Применение молекулярных методов и приемов, основанных, прежде всего, на изучении последовательностей ДНК, в значительной степени расширило возможности изучения микробного разнообразия, позволяя преодолеть ограничения, связанные с наличием некультивируемых микроорганизмов. В первую очередь к таким методам относится экстракция тотальной ДНК из природных образцов, ее очистка и амплификация участков, кодирующих ген 16S рРНК. Амплифицированные участки затем подвергают анализу с помощью методов T/DGGE или TRFLP, что позволяет идентифицировать наличие в образцах представителей отдельных родов и даже видов микроорганизмов без выделения их в чистые культуры и, при определенных навыках и приемах, провести их количественную оценку. Таким образом, впервые за многие годы экология микроорганизмов обогатилась такими качественными и количественными методами исследований, которые позволяют исследователям точно идентифицировать объекты их изучения в сложных природных экосистемах.

Цель настоящего учебника — познакомить начинающих микробных экологов, только лишь пришедших в эту замечательную и крайне интересную область общей микробиологии, с методическими приемами молекулярной биологии и геной инженерии, помогающими работать как с чистыми культурами культивируемых микроорганизмов (в подавляющем большинстве это прокариоты), так и со сложными образцами, содержащими помимо микроорганизмов частицы косного природного вещества — глину, минералы, гумусные соединения, являющиеся основным препятствием для количественной экстракции и очистки нуклеиновых кислот из природных образцов.

Книга построена по логике «от простого — к сложному» применительно к исследованию микроорганизмов в микробных сообществах. В первый

раздел вошли главы, описывающие методы выделения ДНК и РНК из чистых культур прокариот. Затем следуют главы, рассказывающие о принципах проведения полимеразной цепной реакции (включая ПЦР в реальном времени), электрофореза, различных методах мечения нуклеиновых кислот и гибридизации, а также секвенирования. В первый раздел включены также главы с описанием современных методологических приемов молекулярного клонирования и получения генно-инженерных штаммов микроорганизмов.

Второй раздел описывает молекулярно-биологические методы и приемы работы со сложными природными образцами, содержащими микробные сообщества, их анализ, количественную и качественную оценки.

Предлагаемый вниманию читателя учебник является первым в отечественной литературе практическим руководством, где собраны классические, а также основанные на новых разработках в этой области методы работы с нуклеиновыми кислотами прокариот, в том числе выделенными из природных образцов. Данное пособие поможет студентам в их практической и теоретической работе при прохождении учебных занятий; аспирантам — в их первых научных исследованиях при изучении отдельных разделов микробной биохимии, генетики и экологии; научным сотрудникам — при изучении микроорганизмов и сложных микробных сообществ с использованием молекулярно-биологических методов исследования и в планировании перспективных научных разработок; преподавателям — в их повседневной работе по подготовке новых поколений современных микробиологов.

А.И. Непрысов

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ПРИ РАБОТЕ С ЧИСТЫМИ (АКСЕНИЧЕСКИМИ) КУЛЬТУРАМИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Глава 1

ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ИЗ КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ

Выделение и очистка нуклеиновых кислот представляет собой одну из основополагающих процедур в биохимии, генетике и молекулярной биологии микроорганизмов. Ключевым этапом является депротеинизация (удаление и инактивация белков), которую проводят в подавляющем большинстве случаев при помощи экстракции нуклеиновых кислот в водных растворах фенолом и/или смесью хлороформа и изоамилового спирта. При фенольной экстракции нуклеиновые кислоты остаются в водной фазе, тогда как белки осаждаются в интерфазе между слоями фенола и воды. При исходном выделении нуклеиновых кислот из экстрактов клеток часто применяют первоначальный гидролиз нативных белков протеолитическими ферментами, такими, как протеиназа К (50 мкг/мл) при 37°C, и только затем проводят экстракцию нуклеиновых кислот органическими растворителями. Литр культуры *E. coli* (10^9 клеток/мл) содержит примерно 17 мг хромосомной ДНК и 100 мг РНК, размер ДНК *E. coli* составляет $4,7 \times 10^6$ пар оснований.

1.1.

ВЫДЕЛЕНИЕ ХРОМОСОМНОЙ ДНК

Хорошие результаты по выделению из клеток микроорганизмов хромосомной ДНК, пригодной для дальнейшего использования в ПЦР, рестрикционном анализе, гибридизации по Саузерну и клонировании, достигаются с использованием наборов производства

компании «Roche Diagnostics» (Швейцария): **DNA Isolation Kit for Cells and Tissues** (выход ДНК ~15–27 мкг на 10^9 клеток) или **High Pure PCR Template Preparation Kit** (выход ДНК ~1–3 мкг на 10^9 клеток). Также для выделения хромосомной ДНК из клеток *E. coli* и дрожжей часто применяют набор производства компании «Invitrogen» (США) — **Easy-DNA Kit** (выход ДНК ~30–40 мкг на 10^9 клеток). Выход ДНК с применением коммерческих наборов зависит от многих факторов, таких, как количество исходной биомассы, концентрация ДНК в образце, используемые буферные растворы.

В данной подглаве мы рассмотрим классические методы выделения хромосомной ДНК, используемой в дальнейшем для основных молекулярно-биологических исследований (ПЦР, гибридизация по Саузерну и т.д.). Для достижения высокого выхода ДНК в ходе выделения из клеток необходимо соблюдать определенные правила:

- использовать свежую биомассу или замороженную под жидким азотом и хранившуюся при -70°C для предотвращения деградации молекул ДНК эндогенными нуклеазами;

- избегать интенсивного перемешивания проб, содержащих хромосомную ДНК — растворы надо перемешивать путем переворачивания пробирки;

- применять для работы с пробами хромосомной ДНК накопечники для автоматических пипеток с широкими выходными отверстиями, поскольку использование узких носиков может привести к разрывам длинных молекул;

- хранить хромосомную ДНК лучше при 4°C , поскольку замораживание и последующее оттаивание проб при -20°C может также привести к ее разрывам;

- всегда держать пробу ДНК во льду во время экспериментальной работы.

МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ ХРОМОСОМНОЙ ДНК ПО МАРМУРУ (MARMUR) ИЗ НЕБОЛЬШОГО ОБЪЕМА КУЛЬТУРЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

Этот метод является одним из наиболее эффективных и распространенных протоколов выделения хромосомной ДНК из клеток микроорганизмов. Существует достаточно большое количество модификаций метода выделения хромосомной ДНК по Мармуру, различающихся, в основном, конечной степенью очистки ДНК.

Удаление белков из растворов нуклеиновых кислот осуществляют путем однократной экстракции фенолом (сильным органическим

растворителем) или смесью фенол : хлороформ (1 : 1), а затем смесью хлороформ : изоамиловый спирт (24 : 1). Нуклеиновые кислоты при этом остаются в водной фазе. При использовании двух органических растворителей депротенинизация экспериментальной пробы протекает с максимальной эффективностью. Хлороформ денатурирует белки, а изоамиловый спирт уменьшает вспенивание во время экстракции и обеспечивает четкое разделение водной и органической фаз. Надо отметить, что фенол хорошо денатурирует белки, но не полностью ингибирует активность РНКазы, кроме того, в нем растворяются молекулы РНК, содержащие длинные последовательности poly(A). Хлороформ инактивирует РНКазу, а при использовании смеси хлороформ : изоамиловый спирт (24 : 1) в ходе последней экстракции остатки фенола удаляются из препарата нуклеиновой кислоты. Следы хлороформа удаляют, в свою очередь, осаждением и промывкой препарата ДНК этанолом.

Осаждение этанолом представляет собой наиболее часто используемый, количественный, быстрый и эффективный метод концентрирования ДНК и отделения нуклеиновых кислот от низкомолекулярных клеточных соединений. Агрегаты ДНК образуются в этаноле (лучше при пониженных температурах от -20°C до -70°C) в присутствии средней концентрации моновалентных катионов. Для этого в раствор ДНК часто добавляют растворы ацетата натрия, хлорида натрия, хлорида лития или ацетата аммония (конечные концентрации 0,25–0,3 М; 0,1–0,2 М; 0,8 М и 1,6–2,5 М соответственно). LiCl применяют в комбинации с высокими концентрациями этанола, в отсутствие этанола он селективно осаждает молекулы РНК (для дальнейшей работы надо учитывать, что присутствие ионов Li^+ ингибирует обратную транскрипцию). NaCl используется в основном для осаждения ДНК из растворов, содержащих додецилсульфат натрия (ДСН, SDS). Для стандартной преципитации ДНК наиболее часто применяют ацетат натрия (рН 5,2). Осаждение ДНК улучшается, если добавить в раствор MgCl_2 до 10 мМ или соосадители (тРНК — 5–10 мкг/мл, линейный полиакриламид — 10–20 мкл/мл, гликоген — 50 мкг/мл). Затем осадок ДНК собирают центрифугированием и вновь растворяют в соответствующем буферном растворе до требуемой концентрации (обычно применяют буферный раствор TE, рН 7,8–8,0 с низкой ионной силой, если концентрация солей в растворе ДНК высока). Для освобождения от нежелательной примеси РНК пробу обрабатывают высокоспецифичной РНКазой.

Приведенная ниже процедура описывает выделение и очистку ДНК из небольшого объема культуры (5–10 мл) для аналитических

целей с применением настольной центрифуги. Данный метод выделения хромосомной ДНК дает очень хорошие результаты и при использовании большего количества биомассы (до 100–150 мл культуры) с *обязательным* сохранением объемных соотношений между используемыми растворами.

Необходимые реактивы и растворы:

- раствор солевой ЭДТА следующего состава: 0,15 М NaCl; 0,01 М Na₂ЭДТА; pH 8,0;
- 10%-ный раствор додецилсульфата натрия (ДСН, вес/объем);
- 5 М раствор перхлората натрия;
- буферный раствор ТЕ (см. приложение 1);
- фенол, уравновешенный буферным раствором ТЕ (pH 8,0) и содержащий 0,1% 8-оксихинолина и 0,2% β-меркаптоэтанола. Хранить в темной бутылки при 4°C не больше месяца (см. приложение 1);
- смесь хлороформ : изоамиловый спирт в соотношении 24 : 1 (объем/объем). Можно хранить при комнатной температуре в герметично закрытом сосуде неограниченно долго;
- 96%-ный ледяной этанол — хранить в плотно закрытой посуде;
- раствор РНКазы (10 мг/мл).

Методика

1. Собрать **5–10 мл** ночной (12–14 ч) клеточной культуры центрифугированием на настольной центрифуге при 8000 g в течение 20 мин при 4°C и удалить надосадочную жидкость (супернатант).

2. Ресуспендировать бактериальный осадок в **0,95 мл** солевой ЭДТА, добавить **100 мкл** 10%-ного додецилсульфата натрия (ДСН) и немедленно перемешать путем переворачивания пробирки. Для полного лизиса клеток рекомендуется дополнительная инкубация при 60°C (не более 30 мин) с периодическим перемешиванием. Охладить суспензию до комнатной температуры.

3. Добавить **250 мкл** 5 М перхлората натрия (конечная концентрация — 1 М). Инкубировать во льду в течение 60 мин (рекомендуется, но не обязательно).

4. Добавить **600 мкл** смеси хлороформ : изоамиловый спирт (24 : 1), перемешивать при медленном покачивании в течение 30 мин до формирования эмульсии после депотеинизации пробы.

5. Центрифугировать пробу на настольной центрифуге при 8000 g в течение 10 мин при 4°C и затем перенести верхнюю водную фазу в новую пробирку.

6. Осадить ДНК с использованием *точно 2 объемов* ледяного 96%-ного этанола (**2,5 мл**) при медленном перемешивании (перевернуть пробирку 3–5 раз), инкубировать при -20°C в течение 30–60 мин (или при 4°C в течение ночи) до выпадения осадка ДНК. Центрифугировать пробу при 16 500 g в течение 5–10 мин при 4°C . Аккуратно слить супернатант, удалить следы этанола со дна и стенок пробирки микропипеткой и, перевернув открытую пробирку, высушить осадок ДНК на воздухе в течение 5–10 мин.

7. Растворить частично очищенный от РНК препарат ДНК в **0,4 мл** буферного раствора TE (pH 8,0). ДНК с данной степенью очистки уже можно использовать как матрицу в обычной полимеразной цепной реакции (ПЦР). Хранить препарат ДНК при 4°C .

8. Добавить **20 мкл** раствора РНКазы (освобожденного от ДНКаз!) до конечной концентрации 50–100 мкг/мл и инкубировать пробу в течение 30–60 мин при 37°C для прохождения реакции. Рекомендуется перед внесением в пробу прогреть раствор РНКазы на кипящей водяной бане в течение 10 мин (для инактивации следовых количеств ДНКаз).

9. Добавить к пробе ДНК **0,5 мл** фенола, уравновешенного с буферным раствором TE, для разделения оставшихся фрагментов РНК от хромосомной ДНК. Добавить **0,5 мл** смеси хлороформ : изоамиловый спирт и перемешать путем переворачивания пробирки до формирования эмульсии.

Примечание. Фенол является очень токсичным соединением, вызывающим нарушения функций нервной системы. Его пары и раствор раздражают слизистые оболочки и кожу. Работать с фенолом необходимо в перчатках и маске (!). Использованные растворы, содержащие фенол, необходимо сливать после работы в специальную емкость для отходов с плотно закрывающейся крышкой.

10. Центрифугировать пробу на настольной центрифуге при 15 700 g в течение 3–5 мин при комнатной температуре и осторожно отобрать микропипеткой верхнюю водную фазу (содержащую ДНК) в новую пробирку для дальнейшей работы. Если нижняя органическая, промежуточная (содержащая белки) и верхняя водная фазы разделились недостаточно хорошо, повторить центрифугирование в течение 5 мин.

11. Провести экстракцию ДНК смесью хлороформ : изоамиловый спирт (добавить **объем, равный объему пробы ДНК**) еще раз и отобрать водную фазу ($\sim 0,4$ мл).

12. Осадить ДНК с использованием *точно 2 объемов* ледяного 96%-ного этанола при медленном, но тщательном перемешивании.

Инкубировать при -20°C в течение 30–60 мин до выпадения осадка.

13. Центрифугировать пробу на настольной центрифуге при 15 700 *g* в течение 5–10 мин при 4°C .

14. Аккуратно слить супернатант, удалить следы надосадочной жидкости со дна и стенок пробирки микропипеткой и, перевернув открытую пробирку, высушить собранный после преципитации этанолом осадок ДНК на воздухе в течение 5–10 мин (необходимо избегать пересушивания осадка ДНК!).

15. Растворить полученный осадок ДНК в 100 мкл буферного раствора TE (pH 8,0) или H_2O , аккуратно переворачивая пробирку. Допускается инкубация пробы при 65°C в течение 10 мин для инактивации ДНКаз. Хранить препарат ДНК при 4°C . Провести измерение концентрации выделенной хромосомной ДНК спектрофотометрическим методом (см. подглаву 1.4), отобрать 10 мкл препарата и проверить его с помощью электрофореза в 0,8%-ном агарозном геле (см. подглаву 3.1).

Дополнения к методике

К п. 2 и последующим. Все перемешивания необходимо производить максимально аккуратно (путем слабого покачивания пробирки со скоростью ~ 20 об/мин) во избежание механического повреждения длинных двухцепочечных молекул ДНК (размером больше 30 тпо) в ходе экстракции. Органическую и водную фазы можно перемешивать встряхиванием только при выделении ДНК небольшого размера (менее 10 тпо), а интенсивным покачиванием — при выделении молекул ДНК размером в 10–30 тпо.

Весьма эффективным раствором для лизиса клеток *E. coli* является раствор следующего состава (на 10 мл): 9,5 мл 0,25 М ЭДТА; 0,5 мл 10%-ного N-лауроилсаркозината натрия (Саркозила) и 1 мг сериновой протеиназы *Bacillus thuringiensis*. Ресуспендировать осадок клеток из 5–10 мл культуры в 0,1 мл буферного раствора TE и добавить 1 мл лизирующего раствора при перемешивании. Инкубировать при 50°C в течение 1 ч с периодическим перемешиванием, затем охладить до комнатной температуры.

В качестве лизирующего раствора при работе с клетками метаногенных архей рекомендуется использовать раствор АЕ следующего состава: 30 мМ ацетат натрия (pH 5,5); 10 мМ $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ и 1,5% (вес/объем) додецилсульфата натрия. Ресуспендировать биомассу, полученную из 5–10 мл культуры, в 1 мл раствора и инкубировать при 60°C в течение 5–30 мин.

При работе с клетками кlostридий часто применяют буферный раствор следующего состава: 50 мМ трис-НСl (рН 8,0); 1 мМ ЭДТА и 6,7% (вес/объем) сахарозы. Ресуспендировать биомассу, полученную из 10 мл культуры, в 1 мл раствора и инкубировать при 37°C в течение 15 мин. Затем добавить 60 мкл раствора лизоцима (20 мг/мл) и инкубировать при 37°C в течение 10 мин для лизиса клеток. Для эффективного ингибирования ДНКаз из клеток кlostридий и более полного лизиса клеток к пробе обычно добавляют 30 мкл 0,5 М раствора ЭДТА (рН 8,0) и 20 мкл раствора следующего состава: 50 мМ трис-НСl (рН 8,0); 20 мМ ЭДТА и 20% (вес/объем) додецилсульфата натрия. Инкубировать при 37°C в течение 10 мин, затем внести 5 мкл раствора протеиназы К (2,5 мг/мл, хранить при -20°C) в 10 мМ трис-НСl (рН 8,0) с 1 мМ ЭДТА и инкубировать при 37°C в течение 3 ч при периодическом перемешивании (или при 50°C в течение 1 ч). После этого перейти к пункту 3 метода выделения хромосомной ДНК по Мармуру.

К п. 6 и 12. Если концентрация ДНК в растворе не превышает 20 нг/мл, то для выпадения осадка ДНК пробу необходимо выдерживать с 96%-ным этанолом в течение нескольких часов либо использовать температуру -70°C (1-2 ч). При высоких концентрациях ДНК преципитация будет происходить и при инкубации во льду в течение 15-30 мин.

Если используется раствор с низкой концентрацией ДНК, то ее можно сконцентрировать при помощи **экстракции бутиловым спиртом** (добавить равный объем 2-бутанола к пробе, хорошо перемешать). В ходе такой экстракции часть молекул воды (но не нуклеиновые кислоты и растворенные соли) переходит в верхнюю фазу и объем разведенного раствора значительно уменьшается, что облегчает последующее осаждение ДНК этанолом. Для удаления бутилового спирта из пробы необходимо дважды провести экстракцию водонасыщенным эфиром, который, в свою очередь, удаляется выпариванием.

При планируемом использовании выделяемой хромосомной ДНК для создания геномной библиотеки и выделении крупных (размером более 30 тпо) молекул ДНК нельзя применять осаждение этанолом, так как оно приводит к уменьшению размеров ДНК. Вместо этого нужно удалить следы хлороформа путем длительного диализа раствора ДНК против больших объемов холодного буфера ТЕ (рН 7,8-8,0) с 0,1 М NaCl либо **экстракцией этиловым эфиром, насыщенным дистиллированной водой**. Эфир насыщают водой (используют равные объемы) для предотвращения потери воды из раствора во время экстракции и подавления образования свободных ради-

калов при хранении эфира, повреждающих молекулы ДНК. Для экстракции к пробе ДНК добавляют равный объем водонасыщенного эфира, перемешивают и выдерживают 3–5 мин при комнатной температуре для разделения органической и водной фаз. Отбирают верхний слой и повторяют экстракцию с нижним слоем, содержащим ДНК. Следы эфира удаляют нагреванием раствора ДНК при 68°C в течение 5–10 мин с перемешиванием, затем проводят диализ против буферного раствора ТЕ, содержащего 0,1 М NaCl, при 4°C. *При работе с эфиром следует соблюдать максимальную осторожность, так как эфир чрезвычайно летуч и легко воспламеняется. Эфир необходимо хранить в вытяжном шкафу.*

К п. 7 и 15. Аккуратно ополоснуть буферным раствором ТЕ стенки пробирки с помощью пипетирования, чтобы собрать всю ДНК. Для ускорения растворения осадка ДНК (иногда невидимого) в буферном растворе можно прогреть пробу при 37°C в течение 5 мин. Хранение выделенной хромосомной ДНК в буферном растворе ТЕ при –20°C не рекомендуется, так как это может вызвать разрывы и укорачивание двухцепочечных высокомолекулярных молекул ДНК при замораживании и оттаивании. С другой стороны, длительное хранение хромосомной ДНК при 4°C может привести к ее контаминации микроорганизмами.

К п. 9. Для переосаждения ДНК после обработки РНКазой иногда применяют 5–13%-ный полиэтиленгликоль (инкубация при 20°C в течение 10 мин, затем центрифугирование и отмывка осадка 70%-ным этанолом).

К п. 10. Для увеличения выхода ДНК можно вновь экстрагировать нижнюю органическую и промежуточную фазы путем добавления к ним равного объема буферного раствора ТЕ (рН 8,0) после отбора верхней водной фазы. Хорошо перемешать и разделить фазы центрифугированием, объединить первую и вторую водные фазы. Для более полного ингибирования остаточной РНКазной активности к пробе можно добавить равный объем смеси фенол : хлороформ (1 : 1) и повторить экстракцию (п. 9, 10).

К п. 13. Если концентрация ДНК в растворе мала (< 20 нг/мл) или если раствор содержит мелкие фрагменты нуклеиновых кислот, необходимо более длительное и интенсивное центрифугирование (до 60 000 g в течение 30–60 мин при 4°C).

К п. 14. Высушивание полученного препарата хромосомной ДНК для удаления следов этанола является достаточно важным этапом, поскольку этанол способен ингибировать многие ферменты, используемые при последующей работе с ДНК. С другой стороны,

пересушивать осадок ДНК нельзя, поскольку тогда он будет очень плохо растворяться в буферном растворе ТЕ или воде.

МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ ХРОМОСОМНОЙ ДНК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ 2-БУТАНОЛА И ИЗОПРОПАНОЛА ПО МАКУ (МАК)

Этот метод выделения хромосомной ДНК из клеток микроорганизмов схож с приведенным выше методом выделения по Мармуну. Он часто применяется в лабораторной практике в тех случаях, когда не требуется получения препарата ДНК с высокой степенью очистки, например при использовании частично очищенной ДНК микроорганизма в качестве матрицы для стандартной полимеразной цепной реакции. Как уже упоминалось выше, осаждение ДНК этанолом является основным способом концентрирования ДНК. Осадок ДНК образуется в присутствии умеренной концентрации моновалентных катионов (чаще всего используют NH_4^+), процесс идет наиболее эффективно при -20°C и ниже, затем осадок собирают центрифугированием. Использование изопропанола для осаждения ДНК выгодно тем, что требуется его меньший объем по сравнению с этанолом. Но следы изопропанола (который менее летуч, чем этанол) труднее удаляются из раствора ДНК. Белки не осаждаются изопропанолом в присутствии 1–2 М ацетата аммония. Кроме того, следует иметь в виду, что при осаждении ДНК изопропанолом при -70°C также осаждаются некоторые другие растворенные соединения, например сахароза или NaCl . Для удаления следов изопропанола и остаточных примесей, захватываемых ДНК при осаждении, осадок обязательно промывают 70%-ным этанолом.

Необходимые реактивы и растворы:

- 1%-ный раствор додецилсульфата натрия (ДСН) в водонасыщенном 2-бутаноле (вода деионизованная). Для работы необходимо использовать свежий раствор, приготовленный из 10%-ного водного раствора ДСН;
- 7,5 М раствор ацетата аммония;
- 70%-ный ледяной этанол;
- смесь фенол : хлороформ (1 : 1) — хранить в плотно закрытой посуде;
- 100%-ный изопропанол — хранить в плотно закрытой посуде.

Методика

1. К 7,5 мл выращенной на среде LB или бульоне Хоттингера культуры добавить 15 мл 1%-ного раствора ДСН в водонасыщенном

2-бутаноле. Добавить **3,5 мл** 7,5 М ацетата аммония, аккуратно перемешать покачиванием и оставить при комнатной температуре на 15 мин.

2. Аккуратно перемешать снова и затем центрифугировать пробу при 6500 g в течение 5 мин при комнатной температуре.

3. Аккуратно отобрать *нижнюю* водную фазу в новую пробирку. Добавить **10 мл** смеси фенол : хлороформ для депротеинизации пробы и хорошо перемешать.

4. Центрифугировать пробу при 12000 g в течение 15 мин при комнатной температуре.

5. Отобрать *верхнюю* водную фазу в новую пробирку. Добавить **1 объем** изопропанола и аккуратно перемешивать до исчезновения белого осадка. Инкубировать пробу при комнатной температуре не менее 15 мин.

6. Собрать ДНК путем центрифугирования пробы при 12 000 g в течение 30 мин при комнатной температуре.

7. Трижды промыть осадок ДНК от следов изопропанола и избытка солей **1 мл** ледяного 70%-ного этанола (центрифугировать каждый раз на настольной центрифуге при 15 700 g в течение 10 мин). Высушить осадок на воздухе в течение 10 мин для удаления следов этанола и суспендировать препарат ДНК в **500 мкл** буферного раствора ТЕ.

Дополнения к методике

К п. 7. Чтобы при промывании 70%-ным этанолом не снизить выход ДНК, необходимо аккуратно добавлять этанол в пробирку и аккуратно перемешивать смесь встряхиванием. Осадок ДНК (иногда практически невидимый) после промывки 70%-ным этанолом не прочно связан со стенками пробирки, поэтому супернатант следует удалять очень осторожно. ДНК, осажденная этанолом, легко растворяется в буферных растворах с низкой ионной силой, таких как буферный раствор ТЕ.

МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ ХРОМОСОМНОЙ ДНК ИЗ КЛЕТОК МЕТАНОГЕННЫХ АРХЕЙ ПО ДЖАРРЕЛЛУ (JARRELL)

Этот метод выделения хромосомной ДНК принципиально весьма схож с методами, приведенными выше, но содержит больше стадий экстрагирования ДНК. Мы приводим протокол для иллюстрации получения высокоочищенного препарата тотальной хромосомной ДНК, пригодного для любых молекулярно-генетических исследований.

Необходимые реактивы и растворы:

- ТЕ-сахароза следующего состава: 20 мМ трис-НСl (рН 8,0); 5 мМ ЭДТА; 10% сахарозы;
- раствор протеиназы К (20 мг/мл, 20 ед./мг);
- 10%-ный раствор додецилсульфата натрия (ДСН);
- 5 М раствор NaCl;
- 100%-ный изопропанол;
- 96%-ный этанол, 70%-ный этанол;
- буферный раствор ТЕ (рН 8,0) — см. приложение 1;
- свежеперегнанный Roti-фенол («Carl Roth», Германия), уравновешенный буферным раствором ТЕ (рН 7,5–8,0);
- смесь фенол : хлороформ : изоамиловый спирт (25 : 24 : 1);
- 3 М раствор ацетата натрия (рН 5,2);
- раствор РНКазы (10 мг/мл).

Методика

1. Для разрушения клеток архей, обладающих иным строением клеточных стенок и мембран по сравнению с бактериями, перед выделением хромосомной ДНК рекомендуется предварительное тщательное растирание пестиком собранной центрифугированием (12 000 g, 20 мин, 4°C) биомассы в стерильной фарфоровой ступке под жидким азотом.

2. Перенести порошок в пластиковую 50-мл пробирку и добавить раствор ТЕ-сахарозы (**10 мл** на 1 г собранной сырой биомассы), перемешать пипетированием.

3. Добавить к пробе раствор протеиназы К (400 ед./мл) из расчета **100 мкл** раствора на 1 г сырой биомассы для гидролиза пептидных связей клеточных белков и инкубировать при 37°C в течение 1 ч.

4. Добавить 10%-ный раствор додецилсульфата натрия (**2,5 мл** на 1 г сырой биомассы) при осторожном перемешивании и инкубировать при 60°C в течение 1 ч до полного лизиса клеток.

5. Добавить **2,5 мл** 5 М NaCl и инкубировать во льду в течение 1 ч.

6. Центрифугировать пробу при 3000 g в течение 15 мин при 4°C.

7. Перенести супернатант в новую пластиковую пробирку и добавить **равный объем** 100%-ного изопропанола при медленном перемешивании для осаждения нуклеиновых кислот.

8. Центрифугировать пробу при 12 000 g в течение 15 мин при 4°C.

9. Полученный осадок кратковременно (в течение 1–2 мин) трижды промыть холодным 70%-ным этанолом, высушить осадок на воздухе в течение 10 мин.

10. Частично очищенную ДНК растворить в **0,75 мл** буферного раствора ТЕ и инкубировать в течение ночи при 4°C.

11. Добавить **3,75 мкл** раствора протеиназы К (400 ед./мл) для полного гидролиза остаточных белков и инкубировать в течение 1 ч при 37°C.

12. Добавить **0,75 мл** свежеперегнанного Roti-фенола, уравновешенного с буферным раствором ТЕ, для разделения молекул ДНК и РНК. Перемешать.

13. Центрифугировать пробу на настольной центрифуге при 3000 g в течение 15 мин при 4°C.

14. Верхнюю водную фазу, содержащую ДНК, аккуратно перенести в новую пластиковую пробирку, добавить **0,75 мл** смеси фенол : хлороформ : изоамиловый спирт и перемешивать при медленном покачивании в течение 30 мин.

15. Центрифугировать пробу на настольной центрифуге при 3000 g в течение 15 мин при 4°C.

16. Верхнюю водную фазу аккуратно перенести в новую пластиковую пробирку и дважды повторить экстракцию смесью фенол : хлороформ : изоамиловый спирт.

17. Верхнюю водную фазу (~0,6 мл) после центрифугирования перенести в новую пластиковую пробирку, добавить 1/10 объема (**60 мкл**) 3 М ацетата натрия (рН 5,2) и медленно перемешать.

18. Добавить 2 объема (**1,2 мл**) ледяного 96%-ного этанола для осаждения ДНК при -20°C, перемешать, инкубировать 8–12 ч (или 0,5–1 ч при -80°C), центрифугировать при 3000 g в течение 20 мин при 4°C.

19. Полученный осадок ДНК дважды промыть 70%-ным этанолом, отцентрифугировать при 15 700 g в течение 5 мин при 4°C. Провести дополнительное центрифугирование в течение 1 мин для удаления следов этанола. Высушить осадок на воздухе или под вакуумом в течение 10 мин.

20. Очищенный препарат ДНК аккуратно растворить в **200 мкл** буферного раствора ТЕ и хранить при 4°C.

21. Для дополнительной очистки от молекул РНК добавить к пробе раствор РНКазы до конечной концентрации 20–50 мкг/мл и инкубировать в течение 30 мин при 37°C для гидролиза остаточной РНК.

22. Добавить 1/10 объема (**20 мкл**) 3 М ацетата натрия (рН 5,2) и 2 объема (**400 мкл**) ледяного 96%-ного этанола, перемешать, осадить ДНК при -20°C, осторожно перемешать и центрифугировать при 3000 g в течение 20 мин при 4°C (см. п. 17, 18).

23. Полученный осадок ДНК дважды промыть 70%-ным этанолом и высушить на воздухе в течение 10 мин.

24. Высокоочищенный препарат тотальной хромосомной ДНК растворить в **100 мкл** буферного раствора TE и хранить при 4°C (хранение при –20°C некоторыми протоколами не рекомендуется, поскольку при размораживании длинные молекулы хромосомной ДНК могут порваться).

МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ ХРОМОСОМНОЙ ДНК ИЗ ЦИАНОБАКТЕРИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ NaI

Клетки цианобактерий обладают прочными клеточными стенками, поэтому для их разрушения применяют, в частности, обработку NaI и лизоцимом. Стандартные протоколы для выделения хромосомной ДНК из бактериальных клеток по этой причине дают низкий выход или не работают совсем.

Необходимые реактивы и растворы:

- водонасыщенный раствор NaI (20 г NaI на 10 мл воды). Готовить свежим перед опытом;
- буферный раствор TNE следующего состава: 50 мМ трис-HCl (pH 8,0); 50 мМ NaCl; 5 мМ Na₂ЭДТА (pH 8,0). Готовить свежим перед опытом;
- раствор лизоцима (50 мг/мл);
- раствор РНКазы (10 мг/мл);
- 10%-ный раствор N-лауроилсаркозината натрия или додецилсульфата натрия (ДСН);
- раствор протеиназы К (20 мг/мл, 20 ед./мг);
- 100%-ный изопропанол;
- буферный раствор TE (pH 8,0) — см. приложение 1;
- смесь фенол : хлороформ (1 : 1).

Методика

1. Вырастить **300 мл** цианобактериальной культуры до ОП₆₀₀ = 1,5–2,0.
2. Собрать биомассу центрифугированием при 1200 g в течение 10 мин при 4°C.
3. Полученный осадок биомассы суспендировать в **5 мл** водонасыщенного раствора NaI, хорошо перемешать.
4. Инкубировать при 37°C в течение 20 мин.
5. Довести деионизованной стерильной водой до конечного объема **50 мл** и центрифугировать при 1200 g в течение 10 мин при 4°C.

6. Полученный осадок ресуспендировать в 12 мл буферного раствора TNE и добавить 1,8 мл раствора лизоцима. Желательно также внести 15 мкл раствора РНКазы.

7. Инкубировать при 37°C в течение 45–60 мин.

8. Добавить 1,2 мл 10%-ного раствора N-лауроилсаркозината или додецилсульфата натрия, а также протеиназу К (конечная концентрация 0,1 мг/мл).

9. Инкубировать при 37°C в течение 20–40 мин (до получения вязкого лизата).

10. Экстрагировать хромосомную ДНК смесью фенол : хлороформ с использованием центрифугирования при 3000 g в течение 10 мин при 20°C. Повторить экстракцию 2 раза.

11. Осадить ДНК при помощи изопропанола (добавить 0,8–1 объем) при –20°C в течение 10 мин.

12. Центрифугировать при 16 000 g в течение 10 мин при 4°C.

13. Промыть полученный осадок ДНК 70%-ным этанолом и растворить в буферном растворе TE.

1.2.

ВЫДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК

Для быстрого выделения плазмидной ДНК применяется целый ряд хорошо воспроизводимых, быстрых и универсальных методов, все они состоят из трех основных этапов: рост бактерий и амплификация плазмиды в клетках, сбор биомассы бактерий и лизис клеток, очистка плазмидной ДНК. В процессе очистки используется два основных различия между хромосомной ДНК *E. coli* и плазмидной ДНК: 1) хромосомная ДНК бактерий многократно превышает по размеру плазмидные ДНК, используемые в качестве векторов переноса генетической информации и 2) основная масса хромосомной ДНК выделяется в виде фрагментов линейных молекул, тогда как большинство плазмидных ДНК экстрагируется в ходе очистки в виде ковалентно замкнутых кольцевых молекул.

Большинство методов выделения и очистки плазмидной ДНК включает в себя этапы осаждения, когда из препарата удаляются длинные цепи хромосомной ДНК, захваченные фрагментами лизированных клеток. В ходе выделения плазмидной ДНК происходит также разрыв большинства водородных связей в молекулах хромосомной ДНК (при нагревании или при выдерживании в щелочных растворах с pH до 12,5), тогда как комплементарные цепи плазмидной ДНК, ковалентно замкнутые в кольцо, остаются интактными.

В ходе охлаждения или восстановления нейтрального pH замкнутые кольцевые молекулы плазмидной ДНК вновь принимают нативную конформацию (ренатурируют), а хромосомная ДНК *E. coli* остается необратимо денатурированной. Одноцепочечные молекулы рибосомной РНК образуют нерастворимые ассоциаты при добавлении высоких концентраций солей (например, ацетата аммония), но для освобождения от тРНК, которая растворяется в этих условиях за счет образования внутримолекулярных двухцепочечных участков, лучше дополнительно проводить обработку препарата плазмидной ДНК РНКазой А.

Надо отметить, что мы не приводим в данной главе протоколы получения очень высокоочищенных препаратов плазмидной ДНК (например, метод равновесного центрифугирования в градиенте хлористого цезия с интеркалирующим красителем), поскольку расщепление рестрицирующими эндонуклеазами, лигирование, трансформацию, гибридизацию, гель-электрофорез и даже определение нуклеотидной последовательности можно проводить с использованием препаратов плазмидной ДНК средней степени очистки. Приводимые ниже методики выделения плазмидной ДНК из небольшого объема культуры (1–10 мл) можно эффективно использовать для работы с различными плазмидами (однако плазмиды с размером более 25 тпо дают намного меньший выход, чем плазмиды небольшого размера) и разнообразными штаммами *E. coli*. Из больших объемов культуры выделять плазмидную ДНК имеет смысл только при постановке сложных опытов по трансформации клеток исходной и модифицированными плазмидами, а также в опытах по гибридизации для отбора специфических мРНК.

Для качественного и количественного анализа выделенной плазмидной ДНК необходимо обработать 1–5 мкл раствора полученной плазмиды соответствующей рестрицирующей эндонуклеазой (см. подглаву 7.1) и осуществить электрофорез в агарозном геле (см. подглаву 3.1) для визуального определения размера и количества выделенной плазмидной ДНК при сравнении с маркерными фрагментами ДНК.

МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК ИЗ НЕБОЛЬШОГО ОБЪЕМА КУЛЬТУРЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЩЕЛОЧНОГО ЛИЗИСА (NaOH MINIPREP)

Данный метод включает в себя лизис бактериальных клеток щелочью и додецилсульфатом натрия (ДСН, SDS). Он является одним из наиболее широко распространенных методов выделения плазмидной ДНК из разных штаммов *E. coli*, обеспечивая высокий выход

плазмид, пригодных для большинства молекулярно-биологических экспериментов.

Необходимые реактивы и растворы:

- стерильная среда LB (Luria-Bertani) с соответствующим антибиотиком — см. приложение 1;
- раствор TGE (раствор I) следующего состава (на 100 мл): 25 мМ трис-НСl, pH 8,0 (2,5 мл 1 М трис-НСl, pH 8,0); 50 мМ глюкоза (2,5 мл 2 М глюкозы); 10 мМ ЭДТА, pH 8,0 (2,0 мл 0,5 М ЭДТА, pH 8,0); довести стерильной деионизованной водой до 100 мл. Хранить раствор при 4°C. Для наиболее эффективного лизиса клеток микроорганизмов необходимо растворить сухой лизоцим (2–5 мг/мл) в требуемом объеме раствора TGE непосредственно перед экспериментом. *Надо иметь в виду, что действие лизоцима снижается при pH ниже 8,0.*
- раствор II следующего состава: 0,2 М NaOH (приготовленный из 2 М или 10 М раствора NaOH); 1% додецилсульфата натрия (разведенный из 10%-ного раствора ДСН, вес/объем). Лизирующий раствор лучше готовить свежим перед опытом, но его можно хранить при комнатной температуре (нагреть до 50°C в случае образования осадка) в плотно закрытой пластиковой посуде;
- раствор III (3 М калий/5 М ацетат) — см. приложение 1;
- 96%-ный этанол, 70%-ный этанол;
- буферный раствор TE — см. приложение 1.

Методика

1. Перенести отдельную выросшую колонию микроорганизма, из которого необходимо выделить плазмидную ДНК, зубочисткой или стерильным наконечником для автоматической пипетки в закрывающуюся стеклянную пробирку с 5 мл среды LB и соответствующим антибиотиком (ген устойчивости к которому несет выделяемая плазида). Культивировать при 37°C в течение 8–16 ч с энергичным перемешиванием (200–300 об/мин) для амплификации плазмиды.

2. Отобрать 1,5 мл культуры в микроцентрифужную пробирку. Хранить оставшийся объем культуры при 4°C.

3. Собрать биомассу центрифугированием на настольной центрифуге при 15 700 g в течение 1–3 мин при 4°C. Удалить культуральную жидкость при помощи микропипетки как можно тщательнее. Выделение плазмид осуществляют нестерильно.

4. Суспендировать осадок клеток в **100 мкл** ледяного буферного раствора TGE (раствор I) с добавленным непосредственно перед экспериментом лизоцимом путем энергичного перемешивания или пипетирования. Инкубировать при комнатной температуре в течение 5–10 мин.

5. Быстро добавить **200 мкл** свежеприготовленного лизирующего раствора II (не охлажденного), немедленно перемешать содержимое осторожным переворачиванием пробирки 3–5 раз без встряхивания (чтобы не раздробить хромосомную ДНК). Поместить пробирку в лед на 5 мин (или до образования вязкого и прозрачного лизата клеток).

6. Добавить **150 мкл** ледяного нейтрализующего раствора III, перемешивать путем переворачивания и осторожного встряхивания пробирки до уменьшения вязкости раствора и образования белых хлопьев преципитата (сформировавшихся комплексов хромосомная ДНК–белки–ДСН). Поместить пробирку в лед на 10–15 мин (перемешивая каждые 3 мин переворачиванием пробирки, один-два раза встряхнуть для раздробления больших фрагментов осадка).

7. Центрифугировать на настольной центрифуге при 15 700 g в течение 10–15 мин при 4°C. Большая часть хромосомной ДНК, белки–ДСН и фрагменты клеток образуют на дне пробирки плотный осадок.

8. Перенести полупрозрачный супернатант (~450 мкл), содержащий плазмидную ДНК, декантацией в новую микроцентрифужную пробирку, предварительно тщательно удалив неосевшие фрагменты с помощью зубочистки или фильтрованием через маленькую колонку с ватой.

9. Добавить 1 объем (**450 мкл**) смеси фенол : хлороформ (1 : 1; рН 7,8–8,0), аккуратно перемешать переворачиванием пробирки до формирования эмульсии. Центрифугировать на настольной центрифуге при 15 700 g в течение 5–10 мин при комнатной температуре. Осторожно перенести верхнюю водную фазу (содержащую нуклеиновые кислоты) с помощью микропипетки в новую микроцентрифужную пробирку, избегая попадания туда следов материала с границы фаз или слоя фенола. Повторно экстрагировать водную фазу при помощи равного объема хлороформа (**450 мкл**) и перенести водную фазу в новую микроцентрифужную пробирку. *П. 9 можно опустить, если высокой степени очистки плазмидной ДНК не требуется.*

10. Добавить 2 объема (**900 мкл**) 96%-ного этанола для осаждения плазмидной ДНК, тщательно перемешать встряхиванием и инкубировать смесь при комнатной температуре в течение 2–5 мин. Луч-

ший выход достигается применением 96%-ного ледяного этанола и инкубированием при -20°C в течение часа.

11. Центрифугировать на настольной центрифуге при 15 700 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Осторожно и тщательно удалить супернатант с помощью микропипетки.

12. Промыть осадок 1 мл 70%-ного этанола, встряхнуть и отцентрифугировать при 15 700 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Рекомендуется промыть осадок плазмидной ДНК от следов фенола и хлороформа 70%-ным этанолом трижды.

13. Удалить супернатант как можно тщательнее при помощи микропипетки (рекомендуется провести после этого дополнительное центрифугирование в течение 30 с для удаления следов этанола). Высушить осадок плазмидной ДНК на воздухе или в вакуумном испарителе в течение 5–10 мин.

14. Растворить плазмидную ДНК встряхиванием в 50 мкл буферного раствора TE (pH 8,0) или в воде. В буферный раствор можно добавить свободную от ДНКаз РНКазу (20 мкг/мл). Для максимальной очистки плазмидной ДНК от белков и нуклеиновых кислот можно провести равновесное центрифугирование в градиенте плотности хлористого цезия с бромистым этидием.

Хранить препарат выделенной плазмидной ДНК, очищенной от белков, можно при -20°C . Однако плазмиды, предназначенные для последующей трансформации, многие протоколы рекомендуют хранить при 4°C во избежание возможных одонитевых разрывов в молекулах ДНК (так называемых «ников») в ходе замораживания–оттаивания препарата.

Дополнения к методике

Приведенный протокол применим для выделения плазмид как малого, так и большого размера (до 200 тпо) из различных грамотрицательных бактерий, а также для выделения космид. Выход плазмидной/космидной ДНК выше при ее выделении из активно растущей культуры. При использовании плазмид со строгим контролем (низкокопийных, таких, как pBR322) выход значительно снижается. Для выделения космидной ДНК используйте двойные объемы растворов I–III.

Можно применять метод выделения плазмидной ДНК с использованием NaOH из культур объемом 50–500 мл (50 мл свежей ночной культуры *E. coli* соответствует примерно $5-10 \times 10^{10}$ клеток), базируясь на протоколе для 1,5 мл культуры с некоторыми моди-

фикациями в объемном соотношении используемых растворов — так называемый, **NaOH midiprep** или **NaOH maxiprep**.

- Центрифугировать **50 мл** ночной (12–14 ч) культуры при 2000 g в течение 10 мин при 4°C. Удалить культуральную жидкость при помощи пипетки и оставить открытый центрифужный стакан в перевернутом состоянии на 2 мин для высушивания осадка клеток (п. 3).

- Суспендировать осадок биомассы в **2 мл** ледяного раствора I с помощью пипетки и добавить еще **6 мл** ледяного раствора I (п. 4).

- Провести лизис клеток добавлением **16 мл** раствора II (п. 5).

- Осадить фрагменты клеток центрифугированием после внесения **12 мл** ледяного раствора III (п. 6).

- Осадить ДНК из полученного супернатанта **12 мл** (0,6 объема) изопропанола, инкубировать при комнатной температуре в течение 10 мин и центрифугировать при 15 700 g в течение 10–15 мин при комнатной температуре. Отбросить супернатант и подсушить осадок, поставив перевернутую пробирку на фильтровальную бумагу, в течение 5 мин.

Далее для обеспечения высокой степени очистки плазмидной ДНК в ходе NaOH midiprep/maxiprep рекомендуется следующий протокол:

- Растворить осадок ДНК в **800 мкл** буферного раствора TE с РНКазой, перенести в микроцентрифужную пробирку и инкубировать при 37°C в течение 30 мин.

- Добавить **80 мкл** 3 М ацетата натрия (0,1 объема).

- Добавить **800 мкл** смеси фенол : хлороформ : изоамиловый спирт (24 : 24 : 1; pH 8,0), аккуратно перемешать переворачиванием пробирки в течение 2–3 мин до формирования эмульсии и центрифугировать при 15 700 g в течение 10 мин. Перенести верхнюю водную фазу с помощью пипетки в новую пробирку (аккуратно, избегая забора материала с границы фаз и из органической фазы).

- Добавить **800 мкл** смеси фенол : изоамиловый спирт (24 : 1) и перемешать переворачиванием пробирки. Центрифугировать при 15 700 g в течение 10 мин и перенести водную фазу в новую пробирку.

- Добавить **600 мкл** (0,8 объема) изопропанола, аккуратно перемешать переворачиванием пробирки. Инкубировать при комнатной температуре в течение 5 мин. Если будут заметны нитевидные частицы (остатки хромосомной ДНК), их можно удалить с помощью стерильной зубочистки. Центрифугировать при 15 700 g в течение 10 мин и отбросить супернатант (остатки супернатанта отобрать микропипеткой).

— Пункт 12 основной методики и далее.

К п. 1. Рекомендуется выращивать культуру *E. coli*, из которой предполагается выделение плазмидной ДНК, до поздней логарифмической фазы роста ($ОП_{600} \approx 0,6$), поскольку при дальнейшем увеличении концентрации клеток эффективность амплификации плазмиды снижается.

К п. 5. Превышение времени щелочной денатурации ДНК может привести к необратимой денатурации плазмидной ДНК, на которую не будут действовать эндонуклеазы рестрикции и которая показывает аномальную подвижность при электрофорезе.

К п. 6. Вместо раствора III возможно использовать 3 М раствор ацетата калия или натрия (pH 4,8–5,0) комнатной температуры.

К п. 9. Многие протоколы рекомендуют иную методику — добавить к супернатанту 0,6 объема (270 мкл) изопропанола, хорошо перемешать и инкубировать при комнатной температуре в течение 10–30 мин. Центрифугировать на настольной центрифуге при 15 700 g в течение 10–15 мин при комнатной температуре (возможно выпадение осадка солей, если проводить центрифугирование при 4°C). Высушить осадок плазмидной ДНК на воздухе в течение 5 мин, перевернув пробирку, и растворить осадок в 50 мкл буферного раствора TE. Добавить равный объем (50 мкл) 7 М ацетата аммония. Инкубировать при –20°C в течение 1 ч. Центрифугировать для удаления осадка и добавить к супернатанту 3 объема (300 мкл) 96%-ного этанола (см. п. 10).

В случае работы с низкокопийными плазмидами лучше использовать стандартную фенольную очистку, нежели очистку изопропанолом, иначе выход плазмидной ДНК будет невысоким.

К п. 10. Если концентрация плазмидной ДНК в растворе низка (< 0,1 мкг/мл) или размер ДНК очень мал (< 1 тпо), то для осаждения ДНК пробу необходимо выдержать с 96%-ным этанолом в течение нескольких часов либо использовать температуру –70°C.

К п. 11. Центрифугирование при 4°C может привести к выпадению соли в осадок. При работе с раствором ДНК низкой концентрации или содержащим мелкие фрагменты ДНК рекомендуется центрифугирование при высоких оборотах (до 60 000 g) в течение 30 мин.

К п. 12. Будьте очень внимательны при удалении супернатанта после промывки осадка 70%-ным этанолом, так как осадок плазмидной ДНК иногда не очень хорошо заметен и непрочен связан со стенками пробирки. Эффективность осаждения молекул ДНК небольшого размера, плохо осаждающихся этанолом, можно существенно увеличить добавлением к раствору ДНК $MgCl_2$ до концентрации 0,01 М.

К п. 13. Осадок плазмидной ДНК нельзя пересушивать, иначе он будет плохо растворяться в буферном растворе ТЕ или воде.

К п. 14. Если требуется препарат с высокой степенью очистки от РНК, рекомендуется растворить осадок плазмидной ДНК в 75 мкл буферного раствора ТЕ, содержащего свободную от ДНКаз РНКазу А (20–50 мкг/мл, хранить при -20°C). Инкубировать при 37°C в течение 15–30 мин, затем снова провести осаждение плазмидной ДНК (например, добавив 25 мкл 10 М ацетата аммония и 100 мкл изопропанола) и растворить осадок после центрифугирования в буферном растворе ТЕ или H_2O .

Иногда применяют осаждение примесей РНК из препарата, растворенного в воде, посредством 2,5 М LiCl (инкубация при -70°C в течение 10 мин или при 4°C в течение нескольких часов). После центрифугирования отбрасывают осадок и осаждают плазмидную ДНК из супернатанта двойным объемом этанола.

Препарат плазмидной ДНК, загрязненной солями в ходе выделения, может плохо порезаться эндонуклеазами рестрикции (см. главу 7.1) в ходе клонирования. Соли также влияют на подвижность плазмиды в агарозном геле. Примесь РНК часто мешает увидеть полученные при рестрикции фрагменты плазмидной ДНК.

Для наиболее полного удаления примесей низкомолекулярной РНК из препарата плазмидной ДНК (что необходимо, например, при использовании экзонуклеазы *Bal31* или при мечении 5'-концов рестриционных фрагментов плазмиды с помощью полинуклеотидкиназы) можно применить метод центрифугирования в 1 М NaCl. Препарат плазмидной ДНК в концентрации не ниже 100 мкг/мл растворить в буферном растворе ТЕ (рН 8,0) с добавлением РНКазы (20–50 мкг/мл) и проинкубировать в течение 1–1,5 ч при комнатной температуре. Добавить обработанную РНКазой пробу плазмидной ДНК (50 мкл) к 200 мкл 1 М NaCl в буферном растворе ТЕ, довести до 500 мкл буферным раствором ТЕ. Центрифугировать при 110 000 g в течение 6 ч при 20°C . Плазмидная ДНК оседает на дно пробирки, а рибонуклеотиды остаются в надосадочной жидкости. Удалив супернатант, растворить осадок плазмидной ДНК в 50 мкл буферного раствора ТЕ.

МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК ИЗ НЕБОЛЬШОГО ОБЪЕМА КУЛЬТУРЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КИПЯЧЕНИЯ

Данный метод выделения плазмидной ДНК включает в себя лизис клеток кипячением и, так же как и метод с использованием щелочного лизиса, отличается высокой воспроизводимостью и эф-

фективностью, обеспечивая выход ~2–3 мкг плазмидной ДНК на 1–1,5 мл культуры многих штаммов *E. coli*. Наиболее эффективен данный метод в случае небольших плазмид (размером < 10 тпо).

Необходимые реактивы и растворы:

- стерильная среда LB с соответствующим антибиотиком — см. приложение 1;
- буферный раствор STET — см. приложение 1;
- раствор лизоцима (10 мг/мл в 10 мМ трис-HCl, pH 8,0);
- 3 М раствор ацетата натрия (pH 5,2);
- 100%-ный изопропанол;
- буферный раствор TE (pH 8,0) — см. приложение 1;
- 70%-ный раствор этанола в буфере TE.

Методика

1. Перенести отдельную выросшую колонию микроорганизма, из которого необходимо выделить плазмидную ДНК, в закрывающуюся стеклянную пробирку с 5 мл среды LB, содержащей соответствующий антибиотик (ген устойчивости к которому содержит выделяемая плазида). Культивировать при 37°C в течение ночи с интенсивным перемешиванием (не менее 120 об/мин).

2. Осадить бактериальные клетки из 1 мл ночной культуры на настольной центрифуге при 15 700 g в течение 1 мин. Как можно тщательнее удалить супернатант микропипеткой. Остальную часть культуры сохранять при 4°C.

3. Суспендировать осадок клеток в 350 мкл буферного раствора STET.

4. Добавить 25 мкл свежеприготовленного раствора лизоцима и перемешать смесь встряхиванием в течение 3 с. Инкубировать при комнатной температуре в течение 2–5 мин.

5. Поместить микроцентрифужную пробирку с препаратом в кипящую водяную баню на 40–42 с.

6. Центрифугировать немедленно на настольной центрифуге при 15 700 g в течение 10 мин при 4°C. Фрагменты клеток, денатурированные белки и денатурированная хромосомная ДНК должны образовать на дне пробирки рыхлый осадок желтоватого цвета.

7. Удалить осадок с помощью стерильной зубочистки (осадок легко прилипает к ней).

8. Добавить к супернатанту 32 мкл 3 М раствора ацетата натрия (pH 5,2) и 420 мкл изопропанола. Перемешать встряхиванием и инкубировать при комнатной температуре в течение 5 мин. Происходит

преципитация ДНК, неденатурировавшие белки остаются в растворе.

9. Центрифугировать на настольной центрифуге при 15 700 g в течение 15 мин при 4°C.

10. Слить супернатант (беловатый осадок нуклеиновых кислот крепко прилипает к стенке пробирки) и высушить осадок на воздухе в течение 5–10 мин.

11. Добавить 1 мл охлажденного 70%-ного этанола в буферном растворе ТЕ (рН 8,0) для промывки осадка, быстро перемешать и центрифугировать на настольной центрифуге при 15 700 g в течение 5–10 мин при 4°C.

12. Аккуратно отобрать супернатант и оставить открытую микроцентрифужную пробирку в перевернутом состоянии на воздухе до полного высыхания осадка (5–10 мин).

13. Растворить осадок плазмидной ДНК в 50 мкл буферного раствора ТЕ, содержащего свободную от ДНКаз РНКазу (20–50 мкг/мл). Это необходимо для удаления РНК, которая маскирует плазмидную ДНК небольшого размера при электрофорезе в агарозном геле. Инкубировать при 37°C в течение 10 мин. Хранить препарат плазмидной ДНК во льду или при –20°C.

14. Отобрать 2–5 мкл раствора и осуществить аналитическую проверку выделенной плазмидной ДНК расщеплением соответствующими эндонуклеазами рестрикции с последующим электрофорезом фрагментов ДНК в агарозном геле.

Дополнения к методике

Приведенный метод дает хорошие результаты в случае использования *E. coli* штамм DH5 α , но его не рекомендуется применять при работе со штаммами TG1 или HB101 из-за наличия внутриклеточных эндонуклеаз, **которые** инактивируются в недостаточной степени. Плазмидная ДНК, выделенная при помощи данного метода, полностью пригодна для секвенирования двухцепочечной ДНК без ее дополнительной очистки равновесным центрифугированием в градиенте хлористого цезия с бромистым этидием.

К п. 4. Действие лизоцима неэффективно при рН раствора ниже 8,0.

К п. 6. Перед центрифугированием желательно охладить пробирку с пробой во льду в течение 5 мин, если используются большие объемы растворов (при выделении плазмидной ДНК из 10–500 мл культуры).

К п. 8. Некоторые методики рекомендуют инкубировать пробу в бане с сухим льдом и этанолом (–55°C) в течение 15 мин.

МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК ИЗ НЕБОЛЬШОГО ОБЪЕМА КУЛЬТУРЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТА НАТРИЯ

Этот способ выделения плазмидной ДНК является сравнительно мягким методом по сравнению с методами, описанными выше. Лизис бактериальных клеток под воздействием додецилсульфата натрия (ДСН, SDS) рекомендуется использовать при выделении плазмид большого размера (> 10 тпо).

Необходимые реактивы и растворы:

- стерильная среда LB с соответствующим антибиотиком — см. приложение 1;
- трис-сахарозный буферный раствор следующего состава: 10% сахарозы; 50 мМ трис-НСl (рН 8,0);
- раствор лизоцима (10 мг/мл в 250 мМ трис-НСl, рН 8,0). Готовить раствор непосредственно перед опытом;
- 0,25 М ЭДТА;
- 10%-ный раствор ДСН (SDS) — см. приложение 1;
- 5 М раствор NaCl;
- смесь фенол : хлороформ : изоамиловый спирт (25 : 24 : 1), хлороформ;
- 96%-ный этанол, 70%-ный этанол;
- буферный раствор ТЕ (рН 8,0) — см. приложение 1.

Методика

1. Собрать бактериальные клетки из **10 мл** ночной (12–14 ч) культуры, выросшей на среде LB с соответствующим антибиотиком, центрифугированием на настольной центрифуге при 15 700 g в течение 5 мин. Тщательно удалить супернатант.

2. Суспендировать осадок клеток в **200 мкл** холодного трис-сахарозного буферного раствора.

3. Добавить **40 мкл** свежеприготовленного раствора лизоцима.

4. Добавить **160 мкл** 0,25 М ЭДТА. Перемешать несколько раз путем переворачивания пробирки. Инкубировать при 0°C в течение 10 мин.

5. Добавить **80 мкл** 10%-ного ДСН. Немедленно и осторожно перемешать суспензию.

6. Немедленно добавить **120 мкл** 5 М NaCl. Тщательно и осторожно перемешать. Инкубировать при 0°C в течение 1–1,5 ч.

7. Центрифугировать для удаления высокомолекулярной хромосомной ДНК и фрагментов клеток на настольной центрифуге

при 15 700 g в течение 20–30 мин при 4°C (до образования плотного твердого осадка).

8. Провести две экстракции полученного супернатанта смесью фенол : хлороформ : изоамиловый спирт и одну экстракцию хлороформом. Водную фазу, получаемую в ходе каждой экстракции, аккуратно переносить в чистую микроцентрифужную пробирку.

9. Добавить к водной фазе (~600 мкл) два объема (1,2 мл) 96%-ного этанола. Хорошо перемешать и оставить на 1,5–2 ч при –20°C или на 15–30 мин при –70°C.

10. Центрифугировать на настольной центрифуге при 15 700 g в течение 10–15 мин при 4°C для осаждения плазмидной ДНК.

11. Аккуратно удалить супернатант и промыть осадок нуклеиновых кислот 70%-ным этанолом при комнатной температуре. Отцентрифугировать на настольной центрифуге, тщательно отобрать микропипеткой этанол и высушить осадок на воздухе или под вакуумом в течение 10 мин.

12. Растворить плазмидную ДНК в 50–100 мкл буферного раствора TE (pH 8,0). Хранить во льду или при –20°C.

ВЫДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК С ПОМОЩЬЮ КОММЕРЧЕСКИХ НАБОРОВ

Для выделения и очистки высококопийной плазмидной ДНК из небольшого объема культуры микроорганизмов рекомендуется использовать, например, набор **QIAprep Spin Miniprep Kit** производства компании «Qiagen» (Нидерланды), позволяющий быстро и с высоким выходом выделить плазмидную ДНК из 250 экспериментальных образцов. Этот набор содержит специальные буферные растворы (с добавлением РНКазы А для ресуспендирования клеток, для лизирования клеток, для нейтрализации лизирующего раствора, для удаления остаточной нуклеазной активности клеток при использовании *endA*⁺ штаммов (HB101 и др.) и штаммов дикого типа с высоким уровнем нуклеазной активности, для промывки, для элюции плазмидной ДНК), а также микроколонок с фильтрами (QIAprep Spin Columns), связывающими плазмидную ДНК, под микроцентрифужные пробирки.

Элюцию с микроколонок в ходе выделения плазмидной ДНК проводят с помощью настольной центрифуги или вакуумного насоса (рис. 1.1). Полученный препарат плазмидной ДНК рекомендуется хранить при –20°C в 50 мкл буферного раствора для элюции (содержащего 10 mM трис-HCl, pH 8,5) или в деионизованной стерильной воде (что предпочтительнее в случае последующего секвенирования ДНК).

Рис. 1.1. Микроколонок с фильтрами для выделения плазмидной ДНК (набор QIAprep Spin Miniprep Kit производства компании «Qiagen», Нидерланды). Элюцию с микроколонок проводят с помощью настольной центрифуги или вакуумного насоса с насадкой QIAvac 24



Также широкое применение нашел набор **QIAprep 96 Turbo BioRobot Kit** («Qiagen», Нидерланды), предназначенный для быстрого автоматического выделения высокоочищенной плазмидной или космидной ДНК (до 20 мкг на 1-мл лунку 96-луночной плашки) с высоким (до 85–95%)

выходом из клеток *E. coli* и *Bacillus subtilis*. Лизат бактериальных клеток очищается при помощи вакуумного фильтрования через плащечный модуль TurboFilter 96 plates и попадает в лунки плашки (QIAprep 96 plates), которые содержат силикагелевые мембраны, обратимо связывающие плазмидную ДНК в присутствии высоких концентраций хаотропных солей (гидрохлорида гуанидина). Примеси вымываются буферным раствором, содержащим хаотропную соль. ЭДТА, также входящая в состав используемых буферов, необходима для отмывки препарата от РНК и одноцепочечных фрагментов хромосомной ДНК.

Элюция плазмидной ДНК после отмывки препарата от хаотропной соли (этанолом высокой концентрации в присутствии трис) осуществляется небольшим объемом низкосолевого буферного раствора или воды (рН 7,0–8,5) также с использованием вакуумного насоса. Данная технология (связывание—промывка—элюция) позволяет значительно ускорить процедуру выделения плазмидной ДНК по сравнению с классическими методами экстракции с помощью фенола/хлороформа и преципитации этанолом, а также избежать проблем, связанных с использованием смол и сорбентов. Полученные препараты плазмидной ДНК не требуют последующей преципитации, концентрирования или обессоливания и могут использоваться непосредственно в молекулярно-биологических исследованиях, включая обработку эндонуклеазами рестрикции, лигирование, секвенирование, гибридизацию, ПЦР и клонирование.



Хорошие результаты по выделению плазмидной ДНК из *E. coli*, пригодной для практически всех молекулярно-биологических экспериментов, достигаются также и при использовании набора **High Pure Plasmid Isolation Kit** («Roche Diagnostics», Швейцария). Средний выход ДНК плазмиды pUC19 на 2 мл культуры ($ОП_{600} = 1,5-5,0$) составляет 12 мкг для *E. coli* XL1 Blue или 3,5 мкг для *E. coli* DH5 α .

Для выделения плазмидной ДНК из больших объемов культуры (25–250 мл) применяют, например, наборы **QIAfilter Midi/Maxi Kits** («Qiagen», Нидерланды).

1.3.

ВЫДЕЛЕНИЕ ТОТАЛЬНОЙ РНК

Выделение РНК является необходимой процедурой, например, при исследовании экспрессии генов. Широко используемые методы, такие как ПЦР с обратной транскрипцией, гибридизация по Нозерну, трансляция *in vitro*, анализ методом удлинения праймера, требуют предварительного получения интактной РНК из клеток исследуемых микроорганизмов. РНК отделяют от ДНК, пользуясь их различной растворимостью в спиртовых растворах.

Примечание. Чрезвычайно важно отметить, что молекулы РНК являются химически нестабильными и легко расщепляются присутствующими в окружающей среде рибонуклеазами (РНКазами), устойчивыми даже к длительному нагреванию. *Поэтому все манипуляции с РНК необходимо проводить на специально отведенном для этого рабочем месте, обязательно использовать в течение всего эксперимента стерильные перчатки, свободные от РНКаз одноразовые стерильные наконечники для автоматических пипеток и микроцентрифужные пробирки, а также дважды проавтоклавированные рабочие растворы и воду для растворения препаратов РНК.*

Поверхность рабочего стола, предназначенного для работы с РНК, перед работой нужно протирать 96%-ным этанолом. *Всю стеклянную посуду и шпатели, тщательно отмытые детергентом, для инактивации РНКаз необходимо прокалить в сушильном шкафу при 180–200°C в течение 4 ч и после обработать 0,1%-ным раствором диэтилпирокарбоната (DEPC) при 37°C в течение 12 ч.* Для последующего удаления следов DEPC рекомендуется кратковременное (10–15 мин) нагревание до 100°C. Если лабораторный пластик планируется по каким-либо причинам использовать для работы с РНК повторно, его необходимо вымочить в 0,1 М NaOH с 1 мМ ЭДТА (или в абсолютном этаноле с 1%-ным ДСН) при 37°C в течение 2 ч, затем промыть DEPC-Н₂O и

прогреть при 100°C в течение 15 мин. При использовании рН-электродов их следует выдержать с 70%-ным этанолом в течение 30 с, затем с 1 М NaOH в течение 5 мин и промыть DEPC-H₂O.

Все растворы для работы с РНК во избежание ее деградации в ходе выделения необходимо готовить на DEPC-воде и использовать для их приготовления коммерческие реактивы, свободные от РНКаз. Протокол приготовления воды, обработанной DEPC, см. в приложении 1.

Диэтилпирокарибонат является сильным ингибитором РНКаз, но надо иметь в виду, что он также частично инактивирует РНК в результате карбоксиметилирования. Кроме того, DEPC разлагается до C₂H₅OH и CO₂ в присутствии буферных растворов, содержащих трис. Для ингибирования РНКаз применяют также натуральный белок из плаценты человека («Roche Diagnostics», Швейцария), нековалентно связывающийся с ними, Macaloid и ванадил-рибонуклеозидные комплексы.

Операции по выделению РНК из биологического материала необходимо осуществлять во льду (лучше в смеси льда и воды) и как можно быстрее во избежание ее деградации. Экспериментальные пробы (осадок биомассы, лизат клеток) должны быть свежими или храниться при –70°C после быстрой заморозки жидким азотом (для снижения вероятности деградации тотальной РНК эндогенными РНКазами). Наибольший выход РНК достигается при использовании активно растущих культур микроорганизмов из середины экспоненциальной фазы роста.

МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ РНК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТИОЦИАНАТА ГУАНИДИНА И СМЕСИ ФЕНОЛ : ХЛОРОФОРМ

Эта разновидность метода фенольной депротеинизации достаточно эффективна для выделения РНК из культур микроорганизмов, обеспечивая выход 100–400 мкг тотальной РНК (2–6 мкг мРНК) на 1 × 10⁷ клеток в зависимости от используемого штамма и физиологического состояния клеток микроорганизма.

Необходимые реактивы и растворы:

- гуанидин-тиоцианатный (лизирующий) буферный раствор следующего состава: 293 мл деионизованной (Milli-Q) воды; 17,6 мл 0,75 М раствора цитрата натрия (рН 7,0; хранить при 4°C); 26,4 мл 10%-ного (вес/объем) N-лауроилсаркозината натрия (Саркозила); 250 г тиоцианата гуанидина. Перемешивать при 60–65°C до полного растворения. Раствор можно

хранить до трех месяцев при комнатной температуре, но рекомендуется хранить при -20°C в аликвотах по 50 мл. Перед использованием добавить 0,35 мл 2-меркаптоэтанола на 50 мл раствора (такой рабочий раствор можно хранить до одного месяца при комнатной температуре). Конечная концентрация компонентов гуанидин-тиоцианатного буфера — 4 М тиоцианата гуанидина; 25 мМ цитрата натрия; 0,5% Саркозила и 0,1 М 2-меркаптоэтанола;

- 2 М раствор ацетата натрия (рН 4,0). Растворить 16,42 г безводного ацетата натрия в 40 мл деионизованной воды и 35 мл ледяной уксусной кислоты. Довести рН до 4,0 с помощью ледяной уксусной кислоты, довести водой до конечного объема 100 мл. Хранить при комнатной температуре до года;
- смесь фенол : хлороформ : изоамиловый спирт в соотношении 25 : 24 : 1;
- 100%-ный изопропанол;
- 75%-ный этанол;
- свободная от РНКаз вода (коммерческий продукт или стерильная вода, обработанная диэтилпирокарбонатом в концентрации 2 мл/л).

Методика

1. Отделить биомассу от питательной среды из **250 мл** культуры ($\text{ОП}_{600} = 1,0$ или 5×10^6 клеток/мл) центрифугированием при 2000–5000 g в течение 20 мин при 4°C . Некоторые протоколы рекомендуют дополнительно промыть биомассу от остатков питательной среды при помощи $1 \times \text{PBS}$ (см. приложение 1). Суспендировать осадок клеток в 1 мл DEPC-воды.

2. Тщательно разрушить клетки дезинтеграцией в жидком азоте с помощью стерильных керамических ступки и пестика в течение 15–20 мин. Жидкий азот необходимо подливать в ступку аккуратно, чтобы порошок клеток не разлетелся.

3. Добавить к оттаявшему осадку клеток **500 мкл** лизирующего раствора (гуанидин-тиоцианатный буфер). Осторожно перемешать пипетированием 7–10 раз.

4. Добавить к лизату **500 мкл** 2 М ацетата натрия (рН 4,0) и тщательно перемешать, переворачивая пробирку.

5. Добавить **500 мкл** смеси фенол : хлороформ : изоамиловый спирт, тщательно перемешивать в течение 3–4 мин (или 10 с на вортексе). Инкубировать суспензию при температуре $0-4^{\circ}\text{C}$ в течение 15 мин.

6. Центрифугировать при 10 000 g в течение 15 мин при 4°C. Перенести верхнюю водную фазу в новую микроцентрифужную пробирку (эта фаза содержит РНК, тогда как ДНК и белки находятся в нижней органической фазе или между фазами).

7. Осадить РНК добавлением **1 объема** 100%-ного изопропанола, аккуратно перемешать и инкубировать пробу при –20°C в течение 30–45 мин (лучше в течение нескольких часов).

8. Центрифугировать при 10 000 g в течение 15–20 мин при 4°C, отбросить супернатант (*осторожно, токсичен!*).

9. Растворить осадок РНК в **200–300 мкл** лизирующего (денатурирующего) раствора и перенести в новую стерильную микроцентрифужную пробирку.

10. Осадить РНК добавлением **300–400 мкл** (1 объем) 100%-ного изопропанола, инкубировать пробу при –20°C в течение 45–60 мин (лучше в течение нескольких часов).

11. Центрифугировать при 15 000 g в течение 15–20 мин при 4°C, отбросить супернатант.

12. Добавить к осадку РНК **500 мкл** 75%-ного этанола для промывки, перемешать на вортексе и инкубировать при 20°C в течение 10–15 мин для растворения остаточного количества гуанидина, загрязняющего осадок РНК.

13. Центрифугировать при 10 000 g в течение 15 мин при 4°C для освобождения от этанола, отбросить супернатант. Отцентрифугировать снова в течение 1 мин и аккуратно отобрать последние следы этанола микропипеткой. Высушить осадок РНК на воздухе при комнатной температуре в течение 10–15 мин (или при 50°C в течение 2–5 мин).

14. Растворить осадок РНК пипетированием в 100–200 мкл стерильной свободной от РНКаз воды (например, обработанной диэтилпиракарбонатом) или свежего деионизованного формамида (растворимость > 4 мг/мл). Инкубировать при 55–60°C в течение 10–15 мин. Аккуратно перемешать и поместить в лед.

15. Препараты очищенной РНК необходимо хранить при температуре не выше –70°C (если РНК растворена в воде или этаноле) или при температуре не выше –20°C (если РНК растворена в формамиде). Полученную РНК необходимо проверить с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле (см. подглаву 3.1) и измерить ее концентрацию спектрофотометрическим способом (см. подглаву 1.4). Отсутствие в полученном препарате загрязнений в виде молекул ДНК желательно проверить с помощью ПЦР, в процессе которой не должно

образовываться продуктов амплификации (матрица для ПЦР — 0,5 мкл препарата РНК).

Дополнения к методике

Для выделения РНК лучше использовать активную культуру микроорганизма из середины экспоненциальной фазы роста.

К п. 3. Тиоцианат гуанидина быстро проникает в клетки микроорганизмов при оттаивании и инактивирует РНКазы. Необходимо добиться максимально полного лизиса клеток для получения высокого выхода РНК. Лизат клеток можно хранить при -70°C .

Часто для экстракции РНК с помощью тиоцианата гуанидина, фенола и хлороформа используют коммерческий реагент TRIzol («Invitrogen», США), в котором суспендируют осадок клеток, разрушают их в жидком азоте, а затем полученный лизат смешивают с хлороформом в соотношении 5 : 1. После центрифугирования (12 000 g, 15 мин) отбирают водную фазу, содержащую РНК, и смешивают ее с изопропанолом в соотношении 1 : 1. Далее по пунктам. TRIzol, содержащий тиоцианат гуанидина и фенол, надо хранить при 4°C в темноте. Следует также отметить, что TRIzol эффективно удаляет из лизата клеток додецилсульфат натрия, который входит в состав большинства лизирующих буферных растворов.

К п. 4. Добавление ацетата натрия необходимо для снижения pH буферного раствора, поскольку только при низких pH экстракция нуклеиновых кислот фенолом переводит ДНК из водной фазы в органическую. Если раствор после лизиса клеток получился вязким, необходимо пропустить его несколько раз через иглу ($\varnothing$ 1 мм), используя стерильный шприц. Данная процедура позволяет уменьшить размер молекул ДНК в растворе до ~ 50 тпо, что препятствует захвату молекул РНК молекулами ДНК в вязком растворе при последующей экстракции фенолом. Молекулы РНК, размер которых обычно не превышает 20 тыс. нуклеотидов, при этом не повреждаются.

К п. 5. Смесь фенола, хлороформа и изоамилового спирта является токсичной и требует осторожности в работе! Для получения более качественного разделения нуклеиновых кислот рекомендуется повторить п. 5–6 трижды.

К п. 9–11. Эти пункты являются необязательными, но их выполнение рекомендуется для получения высокоочищенного препарата РНК.

К п. 12. Для промывки осадка РНК иногда применяют смесь 96%-ного этанола и 10 мМ трис-НСl + 1 мМ ЭДТА (pH 8,0) в объемном соотношении 7 : 3.

К п. 13. Не допускайте полного высыхания осадка РНК после преципитации этанолом, поскольку это значительно снижает ее растворимость. С другой стороны, освобождение осадка РНК от следов этанола путем центрифугирования и сушки чрезвычайно важно, так как этанол может ингибировать ферментативные реакции с использованием выделенного препарата РНК.

К п. 15. Хранение РНК в формамиде является предпочтительным по ряду причин: формамид эффективно инактивирует рибонуклеазы (например, РНКазы А в концентрации 50 мкг/мл за 30 мин не приводит к деградации РНК, растворенной в формамиде), возможно хранение проб при -20°C и нанесение в агарозную лунку большего количества материала при постановке электрофореза.

МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ РНК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КИСЛОГО ФЕНОЛА (pH 5,5) ИЗ НЕБОЛЬШОГО ОБЪЕМА КУЛЬТУРЫ

Этот достаточно недорогой метод основан на экстракции ДНК фенолом при низком pH. В ходе экстракции нуклеиновых кислот кислым фенолом получается однофазный раствор, а разделение фаз происходит после добавления хлороформа. Надо отметить, что для осаждения РНК из раствора требуются немного более высокие концентрации этанола (2,5 объема), чем для осаждения ДНК.

Необходимые реактивы и растворы:

- буферный раствор TES следующего состава: 10 mM трис-HCl (pH 8,0); 1 mM ЭДТА; 100 mM NaCl. Хранить при 4°C ;
- лизирующий буферный раствор II следующего состава: 20–30 mM ацетат натрия (pH 5,5); 2–10 mM $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$; 0,5–1,5% додецилсульфата натрия (ДСН, вес/объем). Хранить при 4°C ;
- кислый фенол, полученный трехкратной экстракцией фенола посредством 20 mM ацетата натрия (pH 5,5);
- нейтральный фенол, полученный трехкратной экстракцией фенола посредством 20 mM трис-HCl (pH 7,4);
- смесь хлороформ : изоамиловый спирт в соотношении 24 : 1;
- 96%-ный этанол, 70%-ный этанол;
- 3 M раствор ацетата натрия (pH 5,2);
- стерильная бидистиллированная вода, обработанная диэтилпирокарбонатом (DEPC) — см. приложение 1.

Методика

1. Центрифугировать 1–3 мл культуры микроорганизма из середины экспоненциальной фазы роста на настольной центрифуге

при 5000—8000 g в течение 5—10 мин при 4°C. Предварительно охладить микроцентрифужные пробирки во льду!

2. Суспендировать осадок клеток, тщательно освобожденный от остатков питательной среды, в **500 мкл** ледяного буферного раствора TES. Аккуратно перемешать с помощью микропипетки.

3. Центрифугировать при 16 000—17 000 g в течение 5 мин при 4°C.

4. Суспендировать осадок клеток в **250 мкл** лизирующего буферного раствора II, добавить **250 мкл** кислого фенола.

5. Осторожно перемешать 5 раз путем переворачивания пробирки и немедленно инкубировать при 60—65°C в течение 5—15 мин для лизиса клеток. Молекулы ДНК уходят из водной фазы.

6. Центрифугировать при 16 000—17 000 g в течение 15 мин при 4°C.

7. Аккуратно отобрать верхнюю водную фазу (~650 мкл) в новую микроцентрифужную пробирку и добавить **500 мкл** нейтрального фенола.

8. Осторожно перемешать и центрифугировать при 16 000—17 000 g в течение 10 мин при 4°C.

9. Перенести верхнюю водную фазу (~550 мкл) для экстрагирования в микроцентрифужную пробирку, содержащую **500 мкл** смеси хлороформ : изоамиловый спирт (24 : 1).

10. Тщательно перемешать и центрифугировать при 16 000—17 000 g в течение 5 мин при 4°C.

11. Перенести верхнюю водную фазу (~450 мкл) в новую микроцентрифужную пробирку, добавить **1 мл** (2 объема) 96%-ного этанола и **50 мкл** (1/10 объема) 3 М ацетата натрия (pH 5,2) для осаждения РНК и очистки ее от остатков органических растворителей. Тщательно перемешать.

12. Провести преципитацию РНК этанолом в течение ночи при -20°C или в течение 30—60 мин при -70°C.

13. Собрать осадок центрифугированием при 16 000—17 000 g в течение 15 мин при 4°C. Удалить супернатант.

14. Промыть осадок РНК **1 мл** 70%-ного ледяного этанола при комнатной температуре для освобождения препарата от солей.

15. Центрифугировать при 16000—17000 g в течение 5 мин при 4°C. Удалить супернатант.

16. Центрифугировать еще раз в течение 1 мин и полностью удалить следы этанола со дна и стенок пробирки с помощью микропипетки.

17. Высушить осадок на воздухе или под вакуумом в течение 10 мин.

18. Растворить осадок РНК в **100 мкл** стерильной бидистиллированной (Milli-Q) воды, обработанной диэтилпирокарбонатом (DEPC). Хранить в аликвотах при -70°C . Провести измерение концентрации РНК (при необходимости развести отобранную аликвоту РНК водой, обработанной DEPC) на спектрофотометре. Проверить степень интактности выделенной РНК посредством электрофореза 15–20 мкг пробы в 1%-ном агарозном геле.

Дополнения к методике

К п. 2. Неполное удаление супернатанта после центрифугирования приводит к ингибированию гидролиза клеточной стенки микроорганизмов и значительно снижает эффективность лизиса клеток.

К п. 4. ДСН и фенол быстро проникают внутрь клеток и инактивируют РНКазы.

К п. 18. Для хранения препаратов РНК при -20°C добавить к пробе **10 мкл** 1 М ацетата натрия (рН 5,2) и **250 мкл** 96%-ного этанола (в этих условиях препарат осажденной РНК достаточно стабилен).

ВЫДЕЛЕНИЕ ТОТАЛЬНОЙ РНК С ПОМОЩЬЮ КОММЕРЧЕСКИХ НАБОРОВ

Очень хорошие результаты по получению высокоочищенного препарата totalной РНК из клеток микроорганизмов (бактерий, архей, дрожжевых клеток) достигаются с использованием набора **High Pure RNA Isolation Kit** производства компании «Roche Diagnostics» (Швейцария). Данный набор позволяет быстро выделить РНК из 50 экспериментальных проб (выход 35–50 мкг РНК на 1×10^9 бактериальных клеток) без использования экстракции и осаждения РНК токсичными органическими растворителями. Полученный препарат РНК можно использовать для ПЦР с обратной транскрипцией, гибридизации по Нозерну и других молекулярно-биологических экспериментов.

Принцип выделения РНК с использованием данного набора заключается в лизировании клеток (предварительно суспендированных в DEPC- H_2O или в свободном от РНКаз 10 мМ трис- HCl + 1 мМ ЭДТА, рН 8,0) с помощью лизоцима (1 мг/мл) и лизирующего буфера, содержащего 4,5 М гидрохлорид гуанидина и 30% Triton X-100 (вес/объем) в 50 мМ трис- HCl (рН 6,6). На данном этапе инактивируются также РНКазы. В присутствии хаотропной соли нуклеиновые кислоты в течение секунд специфически связываются с поверхностью стеклянных волокон поставляемых в наборе колонок с фильтром (High Pure Filter Tubes), причем условия связывания оптимизированы для молекул РНК. Пластиковые колонки с фильтрами

соединяются с коллекторными пробирками. Остатки молекул геномной ДНК, загрязняющих препарат, подвергаются гидролизу после внесения ДНКазы I (инкубация при 15–25°C в течение 60 мин) в буферном растворе для ДНКазы (1 М NaCl; 20 мМ трис-HCl (pH 7,0) и 10 мМ MnCl₂), также поставляемом в наборе. Связанные со стеклянными волокнами молекулы РНК очищаются от солей, белков и других клеточных примесей в процессе промывки фильтров двумя различными промывными буферными растворами I и II, содержащими этанол (I — 5 М гидрохлорид гуанидина; 20 мМ трис-HCl, pH 6,6; II — 20 мМ NaCl; 2 мМ трис-HCl, pH 7,5). РНК элюируется с фильтра в чистую микроцентрифужную пробирку в ходе очередного центрифугирования на настольной центрифуге (8000 g в течение 3 мин) при помощи стерильной бидистиллированной воды, освобожденной от РНКаз, или низкосолевого элюирующего буфера (50–100 мкл).

Внимание: гидрохлорид гуанидина, входящий в состав буферных растворов из набора, является вредным веществом!

Для выделения тотальной РНК из микроорганизмов широко используется также принципиально схожий с описанным выше набор **RNeasy Mini/Midi Kit** производства компании «Qiagen» (Нидерланды). Надо отметить, что для оптимального выхода и максимальной чистоты препарата РНК, выделяемой с применением коммерческих наборов, необходимо использовать в работе строго рекомендованное количество биомассы. Два параметра лимитируют использование максимального количества бактериальных клеток: способность колонки с фильтром связывать молекулы РНК (100 мкг РНК в случае RNeasy Mini Kit) и объем лизирующего буфера, необходимого для полного лизиса клеток.

Так, в ходе применения RNeasy Mini Kit рекомендуется использовать не более 5×10^8 — 1×10^9 клеток микроорганизма, а для культур с высоким содержанием РНК необходимо брать меньшее количество биомассы, чтобы не превысить РНК-связывающую способность колонки RNeasy. В случае использования культур с низким уровнем РНК следует работать с максимально рекомендованным количеством клеток, но даже если количество выделяемой из них РНК недостаточно, не следует превышать значение 1×10^9 клеток для обеспечения полного лизиса клеток лизирующим буферным раствором. В качестве примера приведем культуру *E. coli*, содержащую 1×10^9 бактерий на мл — оптическая плотность такой культуры при измерении на спектрофотометре ($\lambda = 600$ нм) равняется примерно 0,75–1,0 (рекомендуется делать разведение культуры, чтобы спектрофо-

тометрические измерения находились в диапазоне максимальной точности 0,05–0,3). Количество выделяемой из клеток микроорганизмов РНК очень сильно зависит от используемого штамма и от стадии роста культуры (для максимально возможного выхода РНК необходимо использовать клетки из середины экспоненциальной фазы роста), в целом из 1×10^9 бактерий с помощью RNeasy Mini Kit можно выделить 20–160 мкг тотальной РНК. Для получения более высокой конечной концентрации тотальной РНК рекомендуется дважды элюировать РНК водой с RNeasy колонки в ходе центрифугирования (последний пункт протокола выделения РНК с использованием набора).

Согласно протоколу, описывающему процедуру выделения РНК с помощью набора RNeasy Mini Kit, возможно хранить собранную биомассу клеток или лизаты клеток при -70°C в течение нескольких месяцев для последующего использования, но, на наш взгляд, крайне желательно выделять тотальную РНК из клеток сразу же после сбора биомассы при 4°C . Особенно важен данный этап при изучении экспрессии генов во избежание возможной деградации части молекул РНК в процессе хранения и оттаивания биомассы. Для лизиса клеток применяют буферный раствор TE (pH 8,0) с добавлением лизоцима (400 мкг/мл в случае грамотрицательных бактерий и 3 мг/мл в случае грамположительных бактерий) и буферный раствор, содержащий β -меркаптоэтанол (10 мкл/мл) и соль гуанидина. *Последний раствор токсичен. При работе с ним необходимо использовать защитные перчатки!*

Полный лизис клеток микроорганизмов чрезвычайно важен для максимального выхода РНК в процессе выделения. Поэтому в некоторых случаях, например при работе с археями, рекомендуется использовать наиболее эффективный для данного конкретного микроорганизма метод лизиса клеточных стенок (допустим, инкубация при 60°C в лизирующем буферном растворе в сочетании с TRIzol), а потом уже использовать коммерческий набор для выделения тотальной РНК. При использовании большого количества клеток желательно применять гомогенизатор или шприц с тонкой иглой для гомогенизации клеточного материала в ходе лизиса.

После промывки колонок RNeasy со связанной РНК промывными буферами, содержащими этанол, необходимо подсушить мембрану колонок с помощью дополнительного центрифугирования при максимальной скорости на настольной центрифуге в течение 1 мин. Это важно, поскольку следы этанола могут ингибировать реакции в последующих молекулярно-биологических экспериментах. Элюция РНК

с колонки осуществляется 30–50 мкл воды, освобожденной от РНКаз, в ходе центрифугирования при $\geq 8000\text{ g}$ в течение 1 мин.

Препарат РНК, выделенный с помощью набора RNeasy Mini Kit, в достаточной степени освобожден от молекул ДНК за счет эффективной кварцевой мембраны колонок RNeasy и не требует дополнительной обработки ДНКазой I. Тем не менее при дальнейшем использовании полученного препарата РНК для TaqMan полимеразной цепной реакции в реальном времени или в других методиках, чувствительных к очень низкому содержанию ДНК, необходима последующая очистка препарата от остаточного количества ДНК.

ОБРАБОТКА ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕАЗОЙ I ПРЕПАРАТА ВЫДЕЛЕННОЙ РНК

Обработка дезоксирибонуклеазой I (ДНКазой I) проводится для получения высокоочищенного препарата РНК, освобожденного от минорных примесей ДНК. Фермент представляет собой эндонуклеазу, гидролизующую одноцепочечные и двухцепочечные молекулы ДНК с образованием смеси нуклеотидов (от моно- до олиго-) с 5'-фосфатными концами. В присутствии ионов Mg^{2+} ДНКазы I воздействует на каждую из цепей ДНК независимо, с образованием случайных разрывов, а в присутствии ионов Mn^{2+} ДНКазы I расщепляет обе цепи ДНК практически в одном и том же месте.

Необходимые реактивы и растворы:

- сконцентрированный в 10 раз (10×) буферный раствор для ДНКазы I следующего состава: 1 М ацетат натрия (рН 5,0); 50 мМ MgCl_2 и обработанная диэтилпирокарбонатом деионизованная вода;
- раствор панкреатической ДНКазы I (10 ед./мкл), свободной от примесей РНКаз. Хранить при -20°C ;
- нейтральный фенол, смесь хлороформ : изоамиловый спирт (24 : 1);
- 96%-ный этанол, 3 М ацетат натрия (рН 5,2).

Методика

1. Смешать в микроцентрифужной пробирке **88 мкл** раствора выделенной РНК, **10 мкл** 10× буферного раствора для ДНКазы I и **2 мкл** ДНКазы I (20 ед.). Для предотвращения деградации высокомолекулярной РНК примесями рибонуклеаз необходимо использовать только хроматографически чистые реактивы и коммерческий препарат ДНКазы I, свободный от РНКаз.

2. Инкубировать при 37°C в течение 30 мин, добавить **100 мкл** деионизованной воды, обработанной диэтилпиروкарбонатом.

3. Добавить **100 мкл** нейтрального фенола и **100 мкл** смеси хлороформ : изоамиловый спирт (24 : 1) для очистки препарата РНК от ДНКазы I.

4. Перемешать встряхиванием на вортексе в течение 10 с и центрифугировать на настольной центрифуге при 15 700 g в течение 5 мин. Отобрать водную фазу для дальнейшей работы.

5. Добавить **100 мкл** смеси хлороформ : изоамиловый спирт, перемешать встряхиванием на вортексе в течение 10 с и центрифугировать при 15 700 g в течение 5 мин.

6. Отобрать водную фазу, добавить к ней **2 объема** 96%-ного этанола и **1/10 объема** 3 М ацетата натрия (рН 5,2) для осаждения РНК.

7. Провести осаждение РНК в течение ночи при –20°C или в течение 30 мин при –70°C.

8. Центрифугировать при 22 000 g в течение 15 мин при 4°C, отбросить супернатант.

9. Промыть полученный осадок РНК **1 мл** 70%-ного этанола.

10. Центрифугировать при 22 000 g в течение 5 мин при 4°C, отбросить супернатант.

11. Центрифугировать еще раз в течение 1 мин и полностью удалить следы этанола со дна и стенок пробирки с помощью микропипетки.

12. Высушить осадок РНК на воздухе или под вакуумом в течение 10 мин.

13. Растворить осадок РНК в **100 мкл** стерильной бидистиллированной воды, обработанной диэтилпирокарбонатом, и измерить концентрацию РНК на спектрофотометре.

Примечание. Для ускоренной обработки ДНКазой I препарата тотальной РНК (≤ 10 мкг в пробе) можно применить следующий упрощенный метод.

— Смешать 0,1 мкл ингибитора РНКаз (20 ед./мкл); 1,2 мкл концентрированного (10×) буферного раствора для ДНКазы I; 1,0 мкл ДНКазы I (1 ед./мкл) и препарат тотальной РНК (конечный объем реакционной смеси — 12 мкл). Инкубировать при комнатной температуре в течение 30 мин (или при 37°C в течение 15 мин) для прохождения реакции гидролиза ДНК, охладить во льду, а затем инкубировать при 70°C в течение 10 мин для инактивации ДНКазы I и остановки реакции. Рекомендуется также перед инкубацией при 70°C добавить в пробу 1 мкл ингибитора ДНКаз. Полученный препарат тотальной РНК, освобожденный от остаточных молекул ДНК, ис-

пользовать в дальнейшей работе, например в ПЦР с обратной транскрипцией.

1.4.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ДНК И РНК

Определение количества ДНК в пробе, не загрязненной РНК, белками, свободными нуклеотидами, фенолом или агарозой, проводят в основном простым спектрофотометрическим методом, измеряя величину поглощения ультрафиолета основаниями ДНК при $\lambda = 260$ нм с использованием кварцевых кювет (длина оптического пути — 1 см). Сравнение спектральных характеристик полученного препарата нуклеиновой кислоты со стандартными характеристиками позволяет определить ее концентрацию и степень чистоты. Спектр УФ поглощения нуклеиновых кислот практически не зависит от последовательности нуклеотидов (однако зависит от нуклеотидного состава в случае коротких олигонуклеотидов). **$ОП_{260} = 1$ примерно соответствует содержанию 50 мкг двухцепочечной ДНК или 33 мкг одноцепочечной ДНК в 1 мл воды или буферного раствора ТЕ (рН 8,0),** относительно которых и проводят измерение поглощения. Предел измерения концентрации ДНК данным методом составляет примерно 0,1 мкг/мл. Во избежание ошибок измеряемая оптическая плотность раствора нуклеиновой кислоты должна располагаться в диапазоне 0,1–1,0 (максимальная точность спектрофотометрических измерений в данном случае лежит в диапазоне 0,3–0,7). При измерениях лучше пользоваться кюветой с микрорячейкой на 100 мкл.

Количественное определение чистой РНК также проводят спектрофотометрически, измеряя поглощение пробы при $\lambda = 260$ и 280 нм с использованием кварцевых кювет, свободных от РНКаз. **$ОП_{260} = 1$ примерно соответствует содержанию 40 мкг РНК в 1 мл воды.** Препарат РНК предварительно разводят низкосолевым буфером или щелочной водой (рН = 7,5–8,0) для исключения ошибок в измерениях концентрации, поскольку низкий рН деионизованной воды, используемой для растворения и хранения очищенной РНК, влияет на УФ спектр абсорбции молекул РНК и значительно снижает соотношение $ОП_{260}/ОП_{280}$. Щелочную воду рекомендуется по-

лучать добавлением к воде концентрированного раствора Na_2HPO_4 до конечной концентрации 1 мМ. Соотношение $\text{ОП}_{260}/\text{ОП}_{280}$ для высокоочищенного препарата РНК должно составлять значение большее либо равное 2,0 (или 1,8–2,1 в 10 мМ трис), а для препарата ДНК высокой степени очистки равняться 1,8–1,9 ($\text{ОП}_{260}/\text{ОП}_{280} > 2,0$ свидетельствует о возможном загрязнении препарата молекулами РНК). Для получения достоверных результатов концентрация РНК в пробе не должна быть ниже 100 нг/мкл.

Если препарат нуклеиновой кислоты содержит примесь белков или ароматических соединений (фенола), то соотношение $\text{ОП}_{260}/\text{ОП}_{280}$ меньше указанных выше значений и точное измерение концентрации нуклеиновой кислоты спектрофотометрическим методом в данном случае не представляется возможным, для дальнейшей работы ее необходимо снова очистить. Для поправки на вклад примесей рекомендуется измерять $\text{ОП}_{260} - \text{ОП}_{320}$, поскольку для препаратов чистых нуклеиновых кислот $\text{ОП}_{320} = 0$. Также необходимо учитывать (особенно при измерениях относительно воды) наличие в растворе нуклеиновой кислоты таких компонентов, которые способны к поглощению УФ, например NaI (после выделения ДНК из агарозного геля), различных детергентов, ЭДТА.

Величина поглощения нуклеиновых кислот характеризуется молярным коэффициентом экстинкции (ϵ) — величиной поглощения 1 М раствора (расчет в данном случае проводится на нуклеотиды) в максимуме поглощения с использованием кюветы с оптическим путем 1 см. Для препаратов двухцепочечной ДНК ϵ_{260} составляет примерно 6500, а для препаратов РНК — примерно 8000.

Перевод мкг в пмоль осуществляется по следующим формулам:

— **пмоль двухцепочечной ДНК** = $\text{мкг ДНК} \times 10^6 \text{ пг/1 мкг} \times 1 \text{ пмоль/660 пг} \times 1/N_{\text{bp}} = (\text{мкг ДНК} \times 1515) / N_{\text{bp}}$, где N_{bp} — количество пар оснований ДНК, а 660 пг соответствует средней молекулярной массе пары оснований ДНК (660 Да);

— **пмоль одноцепочечной ДНК** = $\text{мкг ДНК} \times 10^6 \text{ пг/1 мкг} \times 1 \text{ пмоль/330 пг} \times 1/N_{\text{b}} = (\text{мкг ДНК} \times 3030) / N_{\text{b}}$, где N_{b} — количество оснований ДНК, а 330 пг соответствует средней молекулярной массе дезоксирибонуклеотида (330 Да);

— **пмоль РНК** = $\text{мкг РНК} \times 10^6 \text{ пг/1 мкг} \times 1 \text{ пмоль/340 пг} \times 1/N_{\text{b}} = (\text{мкг РНК} \times 2941) / N_{\text{b}}$, где N_{b} — количество оснований РНК, а 340 пг соответствует средней молекулярной массе рибонуклеотида (340 Да).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ДНК ПО ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ БРОМИСТОГО ЭТИДИЯ

Если количество нуклеиновой кислоты в пробе очень мало для точного спектрофотометрического определения (< 500 нг/мл) или проба загрязнена примесями УФ поглощающих соединений, то применяют измерение количества ДНК по флуоресценции бромистого этидия, интеркалированного в молекулу ДНК (подробнее см. гл. 3). Сравнивая величины флуоресценции препарата и нескольких стандартов, которые прямо пропорциональны концентрации ДНК, можно определить до 1 нг нуклеиновой кислоты в пробе.

Один из способов определения концентрации ДНК этим методом заключается в следующем. На УФ проницаемое стекло трансиллюминатора для анализа гелей накладывают полимерную пленку, на которую наносят 1–5 мкл препарата ДНК. Рядом наносят равные объемы (например, по 3 мкл) стандартных растворов, содержащих возрастающие концентрации ДНК фага λ (от 0,5 до 100 нг/мкл). К каждой капле (пробы и стандартов) добавляют равный объем буферного раствора ТЕ (рН 7,6) с бромистым этидием (0,5–2 мкг/мл) и тщательно перемешивают микропипеткой. Концентрацию ДНК в препарате определяют визуально под коротковолновым УФ светом путем сравнения интенсивности флуоресценции пробы со стандартами ДНК.

Если есть опасения, что проба ДНК содержит примеси, влияющие на интенсивность флуоресценции, то рекомендуется наносить пробу и стандарты на поверхность 1%-ного агарозного геля, содержащего бромистый этидий. Оставьте гель при комнатной температуре на 2–3 часа для диффузии молекул примесей в агарозу, а затем поместите его на стекло трансиллюминатора и сфотографируйте под УФ. При наличии РНК в экспериментальной пробе измерять количество ДНК лучше с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле — см. подглаву 3.1.

Для точного количественного анализа содержания РНК в пробе (например, перед постановкой реакции с обратной транскрипцией) используют также RiboGreen («Invitrogen», США) — краситель, усиливающий свою флуоресценцию при присоединении к молекулам нуклеиновых кислот. Измерение проводят с помощью спектрофлуорометра, точность метода — до 5 нг РНК/мл.

Примечание. Бромистый этидий является сильным мутагеном, работать с ним необходимо в перчатках! В случае работы с открытым источником УФ излучения (трансиллюминатором) обязательно нужно использовать защитные очки!

Литература

1. Attal J., Puissant C., Houdebine L.M. An improvement of a rapid method using Qiagen columns to purify plasmids // *Biotechniques*. 1990. V. 8. P. 269–271.
2. Beld M., Sol C., Goudsmit J., Boom R. Fractionation of nucleic acids into single-stranded and double-stranded forms // *Nucleic Acids Res.* 1996. V. 24. P. 2618–2619.
3. Birnboim H.C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // *Nucleic Acids Res.* 1979. V. 7. P. 1513–1523.
4. Borodina T.A., Lehrach T., Soldatov A.V. DNA purification on homemade silica spin-columns // *Anal. Biochem.* 2003. V. 321. P. 135–137.
5. Chakrabarti A., Sitaric S., Ohi S. A procedure for large-scale plasmid isolation without using ultracentrifugation // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1992. V. 16. P. 211–215.
6. Cheng L., Li T.Y., Zhang Y. Rapid preparation of total nucleic acids from *E. coli* for multi-purpose applications // *J. Biochem. Mol. Biol.* 2004. V. 37. P. 351–355.
7. Chomczynski P., Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on // *Nat. Protoc.* 2006. V. 1. P. 581–585.
8. Cryer D.R., Eccleshall R., Marmur J. Isolation of yeast DNA // *Methods Cell Biol.* 1975. V. 12. P. 39–44.
9. Ehrt S., Schnappinger D. Isolation of plasmids from *E. coli* by boiling lysis // *Methods Mol. Biol.* 2003. V. 235. P. 79–82.
10. Engebrecht J., Brent R., Kaderbhai M.A. Minipreps of plasmid DNA // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2001. Ch. 1, unit 1.6.
11. Feliciello I., Chinali G. A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from *Escherichia coli* // *Anal. Biochem.* 1993. V. 212. P. 394–401.
12. Fiore M.F., Moon D.H., Tsai S.M., Lee H., Trevors J.T. Miniprep DNA isolation from unicellular and filamentous cyanobacteria // *J. Microbiol. Methods*. 2000. V. 39. P. 159–169.
13. Gallagher S. Quantitation of nucleic acids with absorption spectroscopy // *Curr. Protoc. Protein. Sci.* 2001. V. 5: appendix 4K.
14. Holmes D.S., Quigley M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids // *Anal. Biochem.* 1981. V. 114. P. 193–197.
15. Huang Y.H., Leblanc P., Apostolou V., Stewart B., Moreland R.B. Comparison of Milli-Q PF plus water with DEPC-treated water in the preparation and analysis of RNA // *Nucleic Acids Symp. Ser.* 1995. V. 33. P. 129–133.
16. Jarrell K.F., Faguy D., Hebert A.M., Kalmokoff M.L. A general method of isolating high molecular weight DNA from methanogenic archaea (archaeobacteria) // *Can. J. Microbiol.* 1992. V. 38. P. 65–68.
17. Lee S.Y., Rasheed S. A simple procedure for maximum yield of high-quality plasmid DNA // *Biotechniques*. 1990. V. 9. P. 676–679.
18. Lev Z. A procedure for large-scale isolation of RNA-free plasmid and phage DNA without the use of RNase // *Anal. Biochem.* 1987. V. 160. P. 332–336.
19. Liou J.T., Shieh B.H., Chen S.W., Li C. An improved alkaline lysis method for minipreparation of plasmid DNA // *Prep. Biochem. Biotechnol.* 1999. V. 29. P. 49–54.
20. Mak Y.M., Ho K.K. An improved method for the isolation of chromosomal DNA from various bacteria and cyanobacteria // *Nucleic Acids Res.* 1992. V. 20. P. 4101–4102.
21. Nuyts S., van Mellaert L., Lambin P., Anne J. Efficient isolation of total RNA from *Clostridium* without DNA contamination // *J. Microbiol. Methods*. 2001. V. 44. P. 235–238.

22. *Ortlepp S.A.* An improved boiling method for the preparation of bacterial plasmid and phage DNA // *Gene Anal. Tech.* 1989. V. 6. P. 93–96.

23. *Phongsisay V., Perera V.N., Fry B.N.* Evaluation of eight RNA isolation methods for transcriptional analysis in *Campylobacter jejuni* // *J. Microbiol. Methods.* 2007. V. 68. P. 427–429.

24. *Sparks R.B., Elder J.H.* A simple and rapid procedure for the purification of plasmid DNA using reverse-phase C18 silica beads // *Anal. Biochem.* 1983. V. 135. P. 345–348.

25. *Wilfinger W.W., Mackey K., Chomczynski P.* Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity // *Biotechniques.* 1997. V. 22. P. 474–481.

26. *Wilson K.* Preparation of genomic DNA from bacteria // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2001. Ch. 2, unit 2.4.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) произвела настоящую революцию в молекулярной биологии. Данный метод позволяет быстро амплифицировать *in vitro* нужную последовательность ДНК из какого-нибудь выбранного участка генома более чем в миллион раз при условии, что хотя бы часть этой нуклеотидной последовательности известна. Участки данной последовательности, фланкирующие выбранную для амплификации область (обычно размером в 50–2000 нуклеотидов), используют для создания двух химически синтезированных олигонуклеотидов (прямой 5'–3' и обратный 3'–5' праймеры), каждый из которых комплементарен участкам ДНК из противоположных цепей, фланкирующих последовательность-мишень. Эти праймеры служат специфическими затравками при синтезе ДНК, осуществляемом ДНК-полимеразой (копирует ДНК между соответствующими нуклеотидными последовательностями), и определяют концы получаемого в ходе ПЦР фрагмента ДНК. За разработку метода ПЦР в 1983 г. американский ученый К. Мюллис (Mullis) получил Нобелевскую премию.

Метод ПЦР обладает чрезвычайно высокой чувствительностью, позволяющей обнаружить в пробе всего одну молекулу ДНК. ПЦР очень широко применяется в молекулярном клонировании фрагментов ДНК и синтезе генов, для скрининга геномных библиотек и картирования хромосом, для выявления мутаций в генах и внесения специфических мутаций *in vitro*, а также при анализе следовых количеств РНК, которую переводят в последовательность ДНК с помощью фермента обратной транскриптазы. Быстрая и автоматизированная амплификация фрагментов ДНК методом ПЦР практически вытеснила ДНК–ДНК гибридизацию (гибридизацию по Саузерну) в таких практических областях применения, как пренатальная диагностика наследственных болезней, судебная медицина, выявление вирусных и бактериальных инфекций.

2.1.

АМПЛИФИКАЦИЯ ФРАГМЕНТОВ ДНК С ПОМОЩЬЮ ПЦР

Для проведения полимеразной цепной реакции необходимы следующие компоненты: 1) два синтетических олигонуклеотидных

праймера (длиной около 20 нуклеотидов), комплементарных участкам из противоположных цепей, которые фланкируют нужную последовательность-мишень; их 3'-гидроксильные концы после отжига с ДНК должны быть ориентированы навстречу друг другу; 2) ДНК мишень (длиной от 0,1 до ~40 тыс. пар оснований, тпо); 3) термостабильная ДНК-полимераза; 4) четыре дезоксирибонуклеозидтрифосфата (дНТФ).

В каждом цикле ПЦР необходимо сначала непродолжительное нагревание ДНК-матрицы для разделения двух цепей двойной спирали (1-й этап ПЦР — тепловая денатурация при ~95°C). Затем следует медленное охлаждение ДНК до ~54–68°C в присутствии значительного избытка двух синтетических олигонуклеотидов (прямого и обратного праймеров), что приводит к специфической гибридизации этих олигонуклеотидных затравок с комплементарными последовательностями цепей ДНК с образованием дуплексов (2-й этап ПЦР — ренатурация или отжиг). После так называемого отжига с праймерами реакционную смесь инкубируют с термостабильной ДНК-полимеразой и четырьмя дезоксирибонуклеозидтрифосфатами при ~72–75°C (оптимальная температура для *Taq* ДНК-полимеразы), в результате 3-го этапа синтезируются те участки обеих цепей ДНК, которые располагаются в 5'–3' направлении от каждого праймера-затравки. Для эффективной амплификации нужного фрагмента ДНК, расположенного между затравками, необходимо около 25–30 циклов реакции (каждый занимает 3–5 мин), в каждом последующем цикле количество копий фрагмента ДНК удваивается (рис. 2.1). ПЦР проводят в микропробирках или стрипах (ряд из 12 лунок, закрывающихся общей крышкой) в программируемых аппаратах-амплификаторах, где смена температурных режимов и их поддержание с высокой точностью осуществляется автоматически с помощью элементов Пельтье.

В первом цикле ПЦР каждая из новосинтезированных цепей (так называемые «длинные матрицы») имеет гораздо большую длину, чем расстояние от 3'-ОН группы соответствующего праймера до последнего нуклеотида последовательности, комплементарной второму праймеру. Эти цепи служат матрицами во втором цикле ПЦР, когда двухцепочечную ДНК (состоящую из исходной и новосинтезированной цепей) опять подвергают денатурации, а затем отжигают с праймерами. Снова происходит синтез «длинных матриц» на исходных цепях, но в реакционной смеси также образуется и некоторое количество «коротких матриц» (с праймерной последовательностью на одном конце и с комплементарной второму

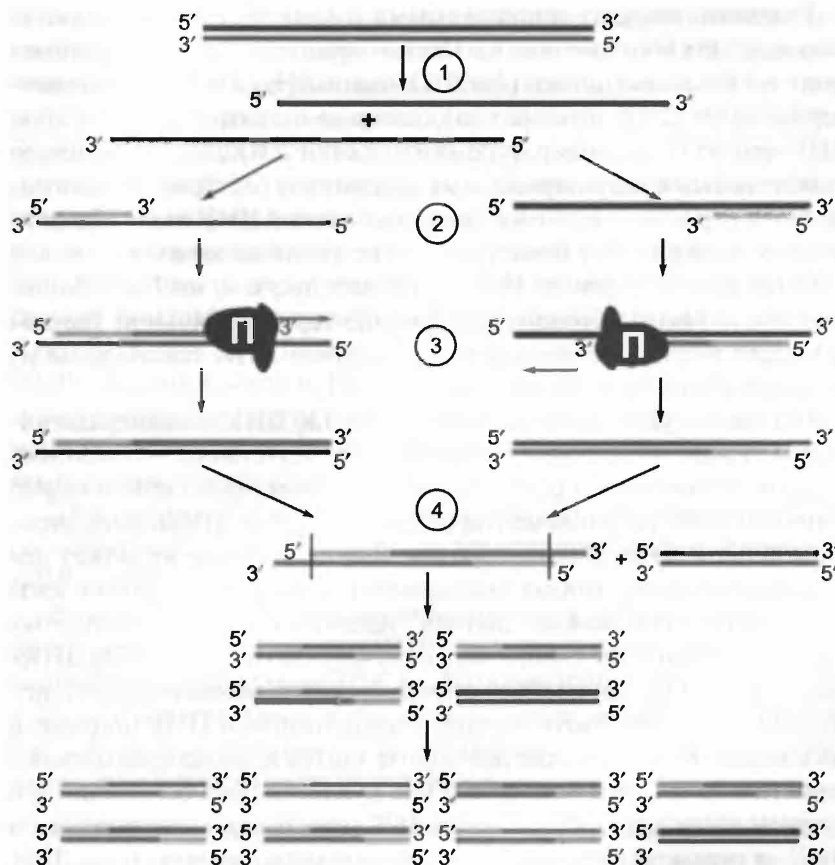


Рис. 2.1. Схема полимеразной цепной реакции (ПЦР): 1 — разделение комплементарных цепей ДНК (денатурация) при 94–96°C; 2 — отжиг при специфической для соответствующих праймеров (олигонуклеотидных затравок) температуре; 3 — синтез ДНК (элонгация) при 72°C (П — полимеразы); 4 — завершение первого цикла ПЦР. Две синтезированные цепи ДНК являются матрицей для второго цикла ПЦР, что приводит к удвоению количества ДНК в каждом последующем цикле (количество цепей, начинающихся с одного праймера и заканчивающихся последовательностью, комплементарной второму праймеру, возрастает)

праймеру последовательностью на другом), синтезированных на «длинных матрицах». К последнему циклу число «коротких матриц» (синтезированных на «длинных» и «коротких матрицах») в 10^6 раз превышает число исходных цепей и «длинных матриц». Такое количество ДНК достаточно для визуальной регистрации результатов ПЦР после электрофоретического разделения продуктов реакции в агарозном геле.

Наиболее широко используемыми в ПЦР являются термостабильные ДНК-полимеразы из *Thermus aquaticus* (*Taq* ДНК-полимераза), из *Pyrococcus furiosus* (*Pfu* ДНК-полимераза) и из *Thermus thermophilus* (*Tth* ДНК-полимераза), которые не разрушаются в ходе ПЦР при 95°C — температуре денатурации ДНК. *Taq* полимераза из обитающей в гидротермальных источниках бактерии *T. aquaticus* является первой выделенной термостабильной ДНК-полимеразой, которая выдерживает денатурирующие условия, характерные для ПЦР (фермент сохраняет 50% активности после 40 мин инкубации при 95°C). Таким образом, применение термостабильной *Taq* полимеразы быстро вытеснило использование ДНК-полимеразы из *E. coli* в генетических исследованиях.

Одним из существенных недостатков *Taq* ДНК-полимеразы является низкая точность репликации из-за отсутствия 3'—5'-экзонуклеазной активности и соответственно механизма замены неверно встроившихся некомплементарных нуклеотидов в новосинтезированной цепи ДНК. Таким образом, *Taq* полимераза не может использоваться в некоторых экспериментах по молекулярному клонированию, где важна полная идентичность нуклеотидных последовательностей (например, в случае использования *Taq* ДНК-полимеразы для правильного определения последовательности необходимо секвенировать не один клонированный ПЦР продукт, а несколько). Коммерческие препараты *Taq* ДНК-полимеразы имеют вероятность ошибки 1 на 10 000 пар нуклеотидных оснований и в среднем приводят к образованию 16% мутантных 1-тпо продуктов ПЦР на реакцию. Фермент способен амплифицировать цепь ДНК со скоростью 30—70 оснований в секунду при 72°C. Использование *Taq* ДНК-полимеразы приводит к накоплению фрагментов с избытком аденина, что является особенно важным в случае «Т—А клонирования», при котором используемый вектор для клонирования имеет участок, обогащенный тимином и комплементарный продукту ПЦР с избытком аденина, — это увеличивает эффективность последующего лигирования. Наиболее эффективно *Taq* ДНК-полимераза добавляет дезоксиаденозин, если 3'-концевой нуклеозид — дезоксиситидин.

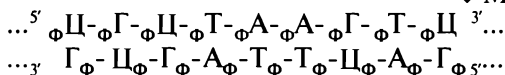
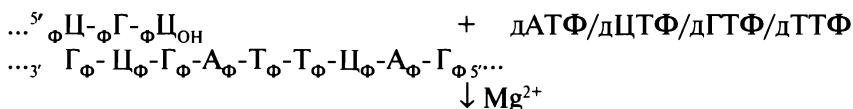
Pfu ДНК-полимераза из гипертермофильного архея *P. furiosus*, являющаяся более термостабильной и имеющая низкую вероятность ошибки при амплификации, часто используется в ПЦР вместо «классической» *Taq* полимеразы начиная с 1990-х гг. *Pfu* полимераза обладает 3'—5'-экзонуклеазной активностью (*proofreading*) в отличие от *Taq* полимеразы, т. е. способна к коррекции ошибок при присо-

единении нуклеотидных остатков, деградируя двухцепочечную или одноцепочечную ДНК, начиная со свободного 3'-ОН конца, и синтезируя фрагменты ДНК с гораздо меньшим числом ошибок. С другой стороны, 3'-5'-экзонуклеазная активность может приводить к быстрой деградации длинных праймеров с 3'-конца. Коммерческие препараты *Pfu* ДНК-полимеразы (например, производства «Stratagene», США) имеют вероятность ошибки 1 на 1 300 000 пар нуклеотидов и образуют около 2,6% мутантных продуктов в ходе ПЦР амплификации 1-тпо фрагмента ДНК. Из недостатков *Pfu* полимеразы необходимо отметить ее низкую скорость (для амплификации 1 тпо ДНК при 72°C требуется 1–2 мин) и образование продуктов ПЦР с тупыми концами. Кроме того, K_m (ДНК) для *Pfu* полимеразы может отличаться почти на два порядка от K_m (ДНК) для *Taq* полимеразы, что оказывает непосредственное влияние на эффективную температуру отжига праймеров.

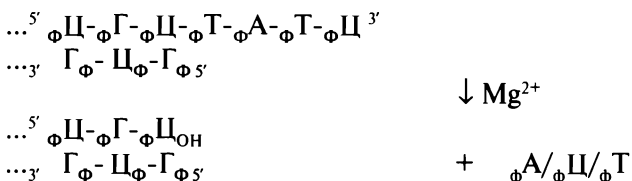
ДНК-полимераза из *T. thermophilus* в присутствии ионов марганца способна осуществлять обратную транскрипцию, т. е. проводить ПЦР на РНК матрице.

В экспериментах по молекулярному клонированию для оптимизации выхода необходимого ПЦР продукта, а также при амплификации длинных участков ДНК до 30 тпо часто применяют смесь *Pfu* и *Taq* ДНК-полимераз, что обеспечивает более низкую частоту ошибок и более высокую скорость амплификации, чем при использовании этих ферментов по отдельности.

5–3' ДНК-полимеразная активность с использованием матрицы-затравки с 3'-ОН концом: ДНК_{ОН} + пдНТФ → ДНК (φН)_n + пФФ_i



3–5'-экзонуклеазная активность, деградирующая двухцепочечную (активность блокируется 5–3'-полимеразной активностью) или одноцепочечную ДНК, начиная со свободного 3'-ОН конца: ДНК → 5' Н_{ОН}



Методика

А. Принципы конструирования праймеров для ПЦР

Использование правильно сконструированных олигонуклеотидных праймеров, комплементарных 3'-концам обеих цепей копируемой ДНК-матрицы, является необходимым и важнейшим условием для проведения ПЦР с высоким выходом нужного продукта. Как правило, праймеры синтезируются *in vitro* при помощи автоматических синтезаторов ДНК. Базовыми принципами конструирования праймеров являются следующие:

1. Оптимальный размер каждого праймера (5'–3' прямого и 3'–5' обратного) составляет около 18–30 нуклеотидов (хотя достаточно часто используют и 35–45-нуклеотидные праймеры). Этой длины вполне достаточно для проведения специфической амплификации фрагмента ДНК, а с другой стороны, не слишком длинные праймеры легко гибридизуются с ДНК-матрицей при отжиге.

Участок гена, который необходимо амплифицировать:

5' ТГА ГАЦ ТЦГ ААГ АЦГ ТГГ ТГ..ЦТ ЦТТ ТГА ГЦА ЦТТ ЦТГ ГГА 3'.

Праймеры:

5' ТГА ГАЦ ТЦГ ААГ АЦГ ТГГ ТГ 3' (прямой),

5' ТЦЦ ЦАГ ААГ ТГЦ ТЦА ААГ АГ 3' (обратный).

2. Температура плавления (T_m) — это температура, при которой половина ДНК-дуплекса будет диссоциировать с образованием одноцепочечных молекул, она показывает стабильность дуплекса праймер–матричная ДНК. В основном наилучшие результаты достигаются при $T_m = 52–58^\circ\text{C}$. Праймеры с температурой плавления выше 65°C имеют тенденцию к вторичному отжигу.

Примерную температуру плавления праймеров (длиной 14–25 нуклеотидов) можно вычислить исходя из содержания Г/Ц в соответствующей нуклеотидной последовательности по формуле Уоллеса: $T_m = (\text{Г} + \text{Ц}) \times 4^\circ\text{C} + (\text{А} + \text{Т}) \times 2^\circ\text{C} + 4^\circ\text{C}$. Существуют более сложные формулы, учитывающие энтальпию и энтропию, по которым рассчитывается точная температура плавления праймеров. Оба праймера (прямой и обратный) должны иметь близкие сбалансированные температуры плавления (отличающиеся не более чем на $2–4^\circ\text{C}$) для максимального выхода продукта реакции. Амплификации может не произойти, если разница в температурах плавления праймеров превышает 5°C . Хорошие компьютерные программы, рассчитывающие T_m , требуют задания еще двух параметров помимо нуклеотидной последовательности — концентраций праймеров и соли в реакционной смеси. Эффективно конструировать олигонук-

леотидные праймеры с учетом их длины, содержания Г/Ц, температуры плавления, статистической комплементарности и т.д. позволяет, например, пакет программ для клонирования и амплификации Vector NTI Advance 10 («Invitrogen», США) или программа Visual Cloning 2000 («Redasoft», Канада). Анализ характеристик праймеров можно провести и с помощью онлайн-программы Oligo Analyzer («Integrated DNA Technologies», США).

3. Содержание Г/Ц в нуклеотидной последовательности праймера должно находиться в пределах 40–60% от общего количества нуклеотидов. Желателен баланс в распределении участков, обогащенных Г/Ц и А/Т. Если точная последовательность ДНК неизвестна, можно использовать *вырожденные праймеры*.

4. Температура отжига праймера (T_a) определяется температурой его плавления. Слишком высокая температура отжига приводит к недостаточной гибридизации между праймером и комплементарным участком ДНК-матрицы и соответственно к низкому выходу нужного продукта амплификации (уменьшению специфичности реакции). Слишком низкая температура отжига может иметь результатом образование неспецифических продуктов амплификации из-за большого количества ошибочных взаимодействий между азотистыми основаниями. Температура отжига праймера рассчитывается по формуле $T_a = 0,3 \times T_m \text{ праймера} + 0,7 \times T_m \text{ продукта} - 14,9$. Оптимальная температура отжига праймера определяется экспериментально и часто находится примерно на 5–10°C ниже, чем температура его плавления. Рекомендуется конструировать праймеры таким образом, чтобы T_a находилась в диапазоне 55–65°C, для максимальной специфичности желательна T_a , равная 62–72°C. Температуру отжига праймеров необходимо подбирать в том же буферном растворе для ПЦР, в котором будет проходить реакция, поскольку дополнительные компоненты могут приводить к изменению T_a .

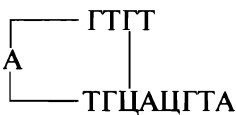
5. Наличие Г или Ц среди последних пяти нуклеотидов на 3'-конце праймера способствует лучшему специфическому связыванию в районе 3'-конца, но не следует конструировать праймеры с более чем тремя гуанинами или цитозинами на 3'-конце праймера. Стабильность 3'-конца определяется максимальным значением ΔG пяти концевых нуклеотидов. В случае использования *Taq* ДНК-полимеразы лучше, чтобы праймеры не начинались на Ц или на Т, а начинались на Г.

6. Максимально возможное число последовательных повторов динуклеотидов в праймере равно четырем (например, АТАТАТАТ), по-

сколько наличие большого числа таких повторов может приводить к ошибкам в ходе амплификации. Следует иметь в виду и количество повторов одного и того же нуклеотида (например, АГЦГГГГ) — максимально возможное число таких повторов также равняется четырем.

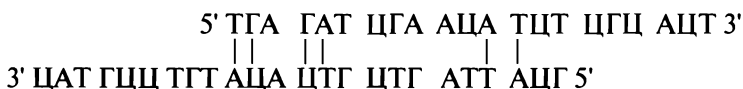
7. Вторичные структуры праймеров, образуемые благодаря внутри- или межмолекулярным взаимодействиям, могут весьма значительно снижать или даже прекращать выход продукта амплификации из-за изменения температуры отжига и снижения доступности праймеров для полимеразной цепной реакции. Существуют следующие вторичные структуры, имеющие негативное значение для процесса амплификации:

а) *Шпильки*, образуемые за счет внутримолекулярных взаимодействий в праймере. Стабильность шпильки определяется ее значением ΔG , т. е. энергией, необходимой для разрыва вторичной структуры. Большие отрицательные значения ΔG свидетельствуют о стабильной структуре шпильки. Образование таких шпилек на 3'-конце влияет на ПЦР наиболее негативно. В принципе наличие 3'-концевых шпилек с $\Delta G = -2$ ккал/моль и внутренних шпилек с $\Delta G = -3$ ккал/моль является допустимым.



б) *Самодимеры*, формирующиеся за счет межмолекулярных взаимодействий между двумя праймерами одной направленности (двумя прямыми или двумя обратными) в местах гомологии праймеров друг с другом. Поскольку в ПЦР используется достаточно большая концентрация праймеров по сравнению с количеством амплифицируемого гена-мишени, образование таких димеров может происходить легче, чем гибридизация праймеров с матричной ДНК. Это значительно снижает выход продукта амплификации. Тем не менее наличие 3'-концевых самодимеров с $\Delta G = -5$ ккал/моль и внутренних самодимеров с $\Delta G = -6$ ккал/моль допустимо.

в) *Перекрестные димеры*, образуемые за счет межмолекулярных взаимодействий между прямым и обратным праймерами в местах их гомологии. В принципе наличие 3'-концевых перекрестных димеров с $\Delta G = -5$ ккал/моль и внутренних перекрестных димеров с $\Delta G = -6$ ккал/моль допустимо.



8. Следует избегать образования вторичных структур матричной ДНК. Одноцепочечная молекула нуклеиновой кислоты весьма нестабильна и образует конформации (вторичные структуры). Стабильность таких конформационных состояний определяется преимущественно их свободной энергией и температурой плавления (T_m). При создании праймеров необходимо учитывать возможность образования вторичных структур матричной ДНК, особенно в случае проведения количественной ПЦР. Если праймеры сконструированы таким образом, что комплементарные им участки матричной ДНК образуют вторичные структуры, стабильные даже при температурах выше температуры отжига, праймеры не смогут связаться с матричной ДНК. Необходимо конструировать праймеры так, чтобы они были комплементарны тем участкам матричной ДНК, которые не образуют стабильные вторичные структуры в ходе ПЦР. Существуют специальные программы и алгоритмы, учитывающие образование таких вторичных структур (например, алгоритм Mfold) при конструировании праймеров.

9. Крайне важно избегать участков со значительной перекрестной гомологией, которая существенно снижает специфичность праймеров. ПЦР не должна приводить к амплификации каких-либо иных генов, кроме заданного фрагмента ДНК. Для оценки специфичности праймеров к определенному участку матричной ДНК используется, например, база данных BLAST.

10. Примерная концентрация используемых праймеров (в пмоль/мкл) вычисляется по формуле $108/N \times \text{ОП/мл}$, где N — количество нуклеотидных оснований (размер) праймера, а ОП — его оптическое поглощение при 260 нм. Рекомендуются вносить около 10 пмоль каждого праймера на 20 мкл реакционной смеси для ПЦР (0,1 — 1 мкМ как оптимальная конечная концентрация праймеров, которые должны присутствовать в избытке). Более высокие концентрации могут привести к накоплению неспецифических продуктов ПЦР, тогда как праймеры в низкой концентрации могут истощиться раньше, чем завершатся все циклы реакции, и выход ожидаемого продукта ПЦР будет мал.

$\text{ОП}_{260} = 1$ примерно соответствует содержанию 20–30 мкг олигонуклеотидного праймера в 1 мл H_2O .

Кол-во пмоль олигонуклеотида = (кол-во мкг олигонуклеотида $\times$ 3030) / кол-во оснований.

Кол-во мкг олигонуклеотида = (кол-во пмоль олигонуклеотида $\times$ кол-во оснований) / 3030.

Разведения лиофилизированных праймеров (обычно до концентрации 100 пмоль/мкл) необходимо делать в стерильной дис-

тиллированной (или свежей Milli-Q) воде либо в небольшом объеме 5 мМ трис (рН 7,5); хранить их рекомендуется при -20°C . Перед растворением лиофилизированного праймера его надо отцентрифугировать на настольной центрифуге при 10 000 g в течение 1–3 мин, затем добавить воду до желаемой конечной концентрации праймера, тщательно растворить лиофилизат при перемешивании и измерить концентрацию олигонуклеотида. После растворения желательно провести центрифугирование на настольной центрифуге при максимальных оборотах в течение 1 мин. Рабочие растворы праймеров (во избежание многократных замораживаний и оттаиваний, что может впоследствии привести к низкому выходу ПЦР) надо хранить при -20°C в аликвотах.

11. Размер продукта амплификации обычно не превышает 100 по в случае количественной ПЦР и 500–800 по в случае стандартной ПЦР. При тщательной оптимизации условий ПЦР возможно амплифицировать фрагмент ДНК размером до 10 тпо и более. Если позиция каждого праймера по отношению к матричной ДНК точно известна, то размер амплифицируемого фрагмента ДНК можно вычислить по формуле: *размер продукта = (позиция обратного праймера — позиция прямого праймера) + 1*. Праймер может иметь гомологию с 5'- или 3'-концом нужного фрагмента на матричной ДНК или гомологию с любым участком внутри фрагмента в зависимости от экспериментальных задач.

Б. Приготовление стандартной реакционной смеси для проведения ПЦР

Поскольку ПЦР является высокочувствительным методом, то даже ничтожное количество чужеродной ДНК, попавшей в реакционную смесь, может привести к неверным результатам. Источником загрязнения в лаборатории может быть хромосомная ДНК из предыдущих экспериментов, плазмидная ДНК, очищенные фрагменты ДНК после рестрикции, продукты предыдущих ПЦР и т.д. Поскольку продукты ПЦР весьма стабильны, при загрязнении ими новой реакционной смеси возможна ложно-положительная амплификация, что особенно опасно в случае проведения клинической ПЦР-диагностики.

Принимая во внимание вышесказанное, при постановке ПЦР чрезвычайно важно работать в одноразовых перчатках и использовать растворы на стерильной деионизованной воде (используемые только для ПЦР и хранящиеся в небольших аликвотах!), а также применять стерильную посуду и одноразовые наконечники для микропипеток. Одним из наиболее распространенных способов борьбы с загрязне-

ниями в ПЦР-лабораториях является УФ облучение, разрушающее ДНК. Поверхность лабораторных столов желательно обрабатывать гипохлоридом натрия. *Рекомендуется иметь отдельные рабочие места (а лучше ламинарные боксы с УФ лампой), используемые для выделения ДНК, подготовки реакционных смесей для ПЦР и анализа ПЦР продуктов с помощью электрофореза.*

Необходимо обязательно ставить негативный контроль (реакционная смесь включает все компоненты за исключением ДНК-матрицы) и позитивный контроль (ПЦР, успешно прошедшая в аналогичных предыдущих экспериментах) в случае использования новых компонентов реакционной смеси, например других ДНК-матрицы, ДНК-полимеразы или праймеров.

Буферный раствор для ДНК-полимеразы (10×) обычно содержит 0,1–0,7 М трис-НСl (рН 8,6–9,0); 100–160 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и 0,1–0,5 М КСl. Высокое значение рН необходимо потому, что рН трис буферного раствора снижается с увеличением температуры и при 72°C его рН равняется 7,5. Надо отметить, что трис буферные растворы предотвращают быстрое разрушение молекул ДНК при нагревании в ходе ПЦР денатурации. Присутствие в буфере КСl в умеренных концентрациях стимулирует активность *Taq* ДНК-полимеразы на 40–60%. Иногда в состав ПЦР буферных растворов входит также MgSO_4 (20 мМ), Triton X-100 (1%) и БСА (1 мг/мл).

MgCl_2 . Концентрация магния оказывает значительное влияние на специфичность отжига праймеров, температуру плавления двухцепочечной ДНК и активность ДНК-полимеразы, определяя эффективность ПЦР. Ионы Mg^{2+} образуют растворимые комплексы с дезоксирибонуклеозидтрифосфатами (дНТФ) и матричной ДНК, которые и являются субстратом для ДНК-полимеразы. Концентрация свободных ионов Mg^{2+} в реакционной смеси зависит от концентрации таких ее отрицательно заряженных компонентов, как дНТФ, свободные пиродифосфаты и ЭДТА (при использовании буферного раствора ТЕ), связывающихся с Mg^{2+} . Поэтому концентрация Mg^{2+} должна быть выше концентрации указанных компонентов и составлять примерно 1–5 мМ (оптимальная концентрация подбирается экспериментально и зависит от нуклеотидных последовательностей используемых матрицы и праймеров); 10 мМ ингибирует ДНК-полимеразу почти на 50%. Наиболее часто используют 1,5 мМ MgCl_2 . Избыток Mg^{2+} в реакционной смеси вызывает повышение температуры плавления ДНК и может привести к накоплению неспецифических продуктов ПЦР, тогда как низкие концентрации магния снижают выход целевого продукта.

ДНК-матрица. Степень очистки используемой ДНК в достаточно сильной степени влияет на эффективность ПЦР. Так, загрязнение препарата ДНК молекулами РНК может привести к образованию хелатных комплексов с Mg^{2+} и уменьшить выход нужного продукта реакции. Поэтому при выделении ДНК рекомендуется использовать такие протоколы или наборы, которые предназначены для очистки ДНК специально с учетом последующего использования в ПЦР. Например, в ходе переосаждения молекул ДНК спиртом нежелательно использовать ацетат натрия, поскольку он ингибирует ПЦР (надо применять ацетат аммония). Тем не менее, если в составе матрицы присутствует целевая последовательность, она, так или иначе, будет амплифицирована. Поскольку ДНК — достаточно стабильная молекула, а рутинная ПЦР предполагает амплификацию фрагментов небольшого размера (обычно 200–1500 по), то можно пренебречь частичной деградацией ДНК в ходе ее выделения из клеток микроорганизмов. Для оценки размера и целостности ДНК-матрицы рекомендуется провести ее электрофорез в агарозном геле перед постановкой ПЦР (см. подглаву 3.1).

Количество ДНК-матрицы в реакционной смеси оказывает значительное влияние на выход ПЦР продукта: чем меньше матрицы внесено в реакционную смесь, тем большее количество циклов ПЦР потребуется и тем выше вероятность ошибок амплификации ДНК. Рекомендуемое количество ДНК-матрицы для одной стандартной ПЦР составляет 1–10 нг бактериальной ДНК или 0,1–500 нг плазмидной ДНК. Если используется ДНК фага λ , то достаточно внести 1 мкл из 200 мкл элюата одиночной фаговой бляшки (хлороформ не оказывает влияния на ПЦР). Что касается плазмидной ДНК, то многие протоколы рекомендуют вносить большое количество (50–500 нг) из-за того, что плазида представляет собой кольцевую молекулу, ренатурирующую при пониженной температуре и не позволяющую праймерам связываться с ней. Поэтому перед проведением ПЦР желательно провести *щелочную денатурацию плазмидной ДНК* (4 мкл ДНК в буферном растворе ТЕ смешать с 1 мкл 1 М NaOH, инкубировать при 70°C в течение 5 мин, охладить во льду и добавить 1 мкл 1 М HCl).

Растворение ДНК-матрицы в буферном растворе ТЕ нежелательно, поскольку ЭДТА хелатирует Mg^{2+} ; лучше использовать раствор ДНК в 5–10 мМ трис (рН 7–8).

Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (дНТФ). Для снижения процента ошибок ПЦР до минимума необходимо использовать сбалансированное соотношение всех четырех дНТФ (дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ). Конечная концентрация каждого дНТФ в реакционной смеси

должна составлять 40–500 мкМ (обычно 200 мкМ), чем меньше концентрация дНТФ — тем выше точность синтеза. Значительный избыток дезоксирибонуклеотидов может привести к ложному затравлению синтеза ДНК из-за уменьшения концентрации свободного Mg^{2+} и негативного влияния на активность ДНК-полимеразы. Однако концентрация дНТФ должна быть значительно выше, чем K_m ДНК-полимеразы.

Для предотвращения возможной контаминации реакционной смеси продуктами предыдущих ПЦР дТТФ иногда заменяют на дУТФ и до амплификации добавляют фермент N-урацил-ДНК-гликозилазу (расщепляет молекулы ДНК со встроенными основаниями урацила, апириимидиновые сайты разрушаются при нагревании). Для эффективной амплификации концентрация дУТФ должна превышать концентрацию каждого из остальных дНТФ в три раза (т.е. используют 600 мкМ дУТФ).

Растворы дНТФ следует хранить при $-20^{\circ}C$. Для достижения оптимальных результатов амплификации рекомендуется использовать нуклеотиды высокой степени очистки (например, special PCR grade nucleotides производства «Roche Diagnostics», Швейцария). Поскольку дНТФ обладают значительной буферной емкостью, их растворы должны иметь нейтральный pH.

ДНК-полимераза. В большинстве случаев оптимальной концентрацией термостабильной ДНК-полимеразы (или смеси полимераз) является 0,5–2,5 ед. на 50 мкл реакционной смеси. Использование слишком низких концентраций *Taq* ДНК-полимеразы приводит к снижению выхода продукта реакции (в особенности, если продукт большого размера). Более высокие концентрации могут привести к уменьшению специфичности ПЦР. Надо иметь в виду, что оптимум концентраций для высокоточной *Pfu* ДНК-полимеразы гораздо уже, чем для *Taq* ДНК-полимеразы, поэтому обычно используют их смесь в соотношении 100 : 1 (*Taq* : *Pfu*, по единицам активности). Точность *Taq* ДНК-полимеразы существенно зависит от концентраций Mg^{2+} и дНТФ, а также от pH реакционной смеси.

Для стандартной ПЦР при амплификации фрагмента ДНК размером до 3000 по используют в основном *Taq* ДНК-полимеразу, тогда как для высокоточного синтеза более длинных фрагментов (до 5000 по) с высоким выходом рекомендуется использовать Expand High Fidelity Enzyme Mix («Roche Diagnostics», Швейцария). За одну единицу активности ДНК-полимеразы принимается такое количество фермента, которое включает 10 нмоль всех четырех дНТФ в кислотонерастворимую фракцию за 30 мин при $72^{\circ}C$.

Дополнительные компоненты. В некоторых случаях внесение в реакционную смесь следующих компонентов может улучшить специфичность и эффективность ПЦР: бетаин Na (0,5–2,0 М); бычий сывороточный альбумин, БСА (100 нг/50 мкл реакционной смеси); диметилсульфоксид, ДМСО (2–10%, объем/объем); глицерин (1–10%, объем/объем); пирофосфатаза (0,001–0,1 ед. на реакцию); сахараза (12%, вес/объем); Tween 20 (0,1–0,5%, объем/объем); хлорид тетраметиламмония, ТМА хлорид (0,01–0,1 мМ).

Добавление в буферный раствор сахарозы, неионного детергента Tween 20, глицерина или БСА улучшает результаты ПЦР за счет стабилизации ДНК-полимеразы. Внесение бетаина уменьшает разницу в температурах плавления различных ДНК-матриц, богатых А/Т и Г/Ц, а также стабилизирует ДНК-полимеразу и позволяет наносить ПЦР-смесь в лунки агарозного геля при электрофорезе без добавления буфера для внесения; однако бетаин также сильно снижает максимальную температуру отжига праймеров. ДМСО повышает растворимость компонентов реакционной смеси. ТМА хлорид улучшает специфичность ПЦР без изменения оптимальной температуры отжига. Термостабильная пирофосфатаза устраняет пирофосфаты, которые могут приводить к обратимости реакции. Вязкое минеральное масло, часто вносимое (~20 мкл) в ПЦР-пробирки на поверхность реакционной смеси для предотвращения ее выкипания, может устранять ингибирующий эффект некоторых загрязнений.

рН. Стандартный буферный раствор, поставляемый для соответствующей ДНК-полимеразы, имеет рН 8,3–9,0. В некоторых случаях повышение рН способствует стабилизации ДНК-матрицы и улучшает выход ПЦР.

1. Стандартную реакционную смесь для полимеразной цепной реакции (конечным объемом 1200 мкл) готовят в охлажденных 1,5-мл микроцентрифужных пробирках во льду. Во избежание загрязнения молекулами чужеродной ДНК необходимо использовать отдельные автоматические пипетки для ПЦР, стерильные носики для пипеток и стерильные микроцентрифужные пробирки. Смесь дНТФ и ДНК-полимеразу необходимо размораживать во льду (хранить их нужно при –20°С, так же как и буферный раствор для ДНК-полимеразы).

10× буферный раствор с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

для <i>Taq</i> или <i>Pfu</i> ДНК-полимеразы	75 мкл	150 мкл	250 мкл
MgCl_2 (25 мМ)	48 мкл	96 мкл	160 мкл
дНТФ (по 25 мМ каждого, смесь)	6 мкл	12 мкл	20 мкл

<i>Taq</i> или <i>Pfu</i> ДНК-полимераза (5 ед./мкл)	3,75 мкл	7,5 мкл	12,5 мкл
Бидистиллированная (или Milli-Q)			
стерильная вода	467,25 мкл	934,5 мкл	1557,5 мкл
	600 мкл	1200 мкл	2000 мкл

2. Внести по **40 мкл** стандартной реакционной смеси в 0,5-мл ПЦР-пробирки во льду, добавить 1 каплю минерального масла SIGMA поверх, заморозить и хранить при -20°C . Или внести по **20 мкл** реакционной смеси в 0,2-мл ПЦР-пробирки во льду (масло можно не добавлять), заморозить и хранить при -20°C .

3. Приготовить во льду смесь ДНК следующего состава:

- олигонуклеотидные праймеры (по 100 нг/мкл каждого) 1 + 1 мкл;
- ДНК в качестве матрицы ($\sim 1-50$ нг/мкл) 1 мкл;
- бидистиллированная (или Milli-Q) стерильная вода 7 мкл.

4. Подогреть ПЦР-пробирки со стандартной реакционной смесью для ПЦР (см. п. 1, по **40 мкл**) при 80°C в течение 1 мин.

5. Добавить **10 мкл** соответствующей смеси ДНК в каждую ПЦР-пробирку со стандартной реакционной смесью для ПЦР, аккуратно перемешать и отцентрифугировать на настольной центрифуге при максимальных оборотах в течение 1 мин. Необходимо отметить, что для аналитических целей можно использовать меньшие объемы для экономии реактивов (например, 20 мкл стандартной реакционной смеси и 5 мкл смеси ДНК на каждую пробу).

Наиболее часто реакционная смесь, целиком содержащая все необходимые компоненты для ПЦР, готовится во льду непосредственно перед опытом и разливается в необходимое количество ПЦР-пробирок (стандартный состав на 25 мкл реакционной смеси):

- $10\times$ буферный раствор для *Pfu* (*Taq*) ДНК-полимеразы с 15 мМ MgCl_2 — 2,5 мкл;
- дНТФ (2,5 мМ каждого) — 1–4 мкл [конечная концентрация — 100–400 мкМ];
- выделенная из клеток ДНК — 0,5–1 мкл [максимальная конечная концентрация — 0,1–0,25 мкг в реакционной смеси];
- прямой и обратный праймеры (10–12,5 мкМ) — 1 + 1 мкл [конечная концентрация — 0,4–0,5 мкМ];
- *Pfu* (*Taq*) ДНК-полимераза (2,5–5 ед./мкл) — 0,5 мкл [конечная концентрация — 0,05–0,1 ед./мкл], вносится в реакционную смесь в последнюю очередь;
- стерильная дистиллированная (или Milli-Q) H_2O — довести объем смеси до 25 мкл.

Если в дальнейшем предполагается выделять амплифицированные фрагменты ДНК из агарозного геля после электрофореза (пре-

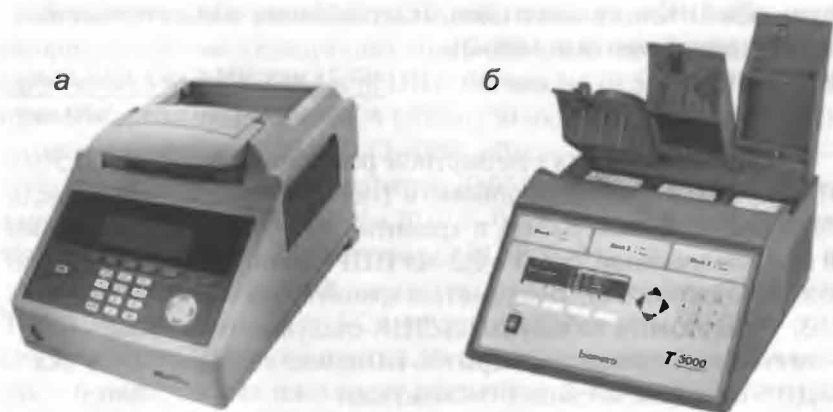


Рис. 2.2. Амплификаторы: а) GeneAmp® PCR System 9700 на 96 проб производства «Applied Biosystems» (США); б) T3000 Thermocycler 48 с тремя независимыми ПЦР-блоками на 48 проб каждый производства «Biotetra» (Германия)

паративная ПЦР), то рекомендуется использовать четыре ПЦР-пробирки (40 мкл стандартной реакционной смеси и 10 мкл смеси ДНК в каждой) на каждую пробу, объединив их содержимое перед постановкой электрофореза. Перед проведением препаративной ПЦР необходимо поставить аналитическую ПЦР (в гораздо меньшем объеме реакционной смеси) для того, чтобы убедиться в правильности сконструированных праймеров и выбранного режима ПЦР, а также в хорошем качестве ДНК-матрицы.

6. Начать процесс ПЦР, используя необходимый температурный режим, в приборе-амплификаторе (рис. 2.2). Ячейки амплификатора должны быть чистыми (протирать ватой, смоченной в 50%-ной смеси изопропанол : вода). В качестве негативного контроля использовать ПЦР-пробирку с реакционной смесью без добавления ДНК-матрицы. После окончания ПЦР оценить наличие фрагмента ДНК нужного размера и его концентрацию с помощью электрофореза в агарозном геле (см. подглаву 3.1).

Иногда применяют мечение продукта ПЦР флуоресцентными красителями, присоединенными к 5'-концу каждого праймера (например, флуоресцеином и родамином, испускающими зеленый и красный цвет соответственно), — после ПЦР-амплификации фрагмента ДНК проводят хроматографическое разделение меченых праймеров и продукта реакции и регистрируют включение метки колориметрическим способом. Такой метод часто применяют в генотипировании для различения мутантной ДНК и ДНК дикого типа.

В. Режим циклов при проведении ПЦР

Очень важно предварительно полностью денатурировать матричную ДНК нагреванием реакционной смеси. Обычно нагрев до 95–98°C в течение 2–5 мин достаточен для *начальной денатурации* любой геномной двухцепочечной ДНК, даже с высоким содержанием Г/Ц и имеющей сложную вторичную структуру. Неполная денатурация ДНК-матрицы может привести к «раскручиванию» ее молекул и соответственно к неэффективному отжигу праймеров или к образованию самодимеров праймеров. В результате такой амплификации могут иметь место ложно-положительные сигналы.

Денатурация (плавление ДНК) в ходе циклов ПЦР обычно длится 20–30 с при 92–98°C, однако для максимально оптимизированного режима желательно учитывать модель используемого амплификатора и тип ПЦР-пробирок (для тонкостенных 0,2-мл пробирок достаточно 10–15 с при 94°C). Если ДНК-матрица имеет повышенное содержание Г/Ц, то необходимо использовать рекомендованную повышенную температуру либо увеличенное время денатурации. Однако надо иметь в виду, что длительное время денатурации и высокая температура постепенно уменьшают активность даже термостабильных ДНК-полимераз и могут привести к повреждению матрицы (поскольку ДНК разрушается при нагревании). При низкой же температуре денатурации неполностью расплавленная ДНК будет мешать эффективному отжигу праймеров и удлинению цепи.

Для достижения высокой специфичности ПЦР крайне важно рассчитать оптимальную *температуру отжига* для используемых праймеров (применяемый диапазон — 54–68°C). Отжига не произойдет, если температура будет слишком высока, хотя незначительное повышение T_a увеличивает специфичность ПЦР. С другой стороны, использование низкой температуры приведет к резкому увеличению неспецифического отжига.

Этап удлинения цепи (основной синтез ДНК, элонгация) обычно осуществляют при $T_c = 72^\circ\text{C}$ (если продукт ПЦР имеет размер больший, чем 3000 по, то при 68°C). Тем не менее показано, что при 65°C процесс амплификации зависит от характера ДНК-матрицы в меньшей степени, а матрицы с очень высоким содержанием А/Т (до 90%) эффективно амплифицируются только при 60°C. При 72°C *Taq* ДНК-полимераза добавляет примерно 60 нуклеотидов в секунду и имеет практически максимальную активность. Времени 45 с достаточно для удлинения фрагмента цепи ДНК размером до 0,75–1 килобазы (обычно такую величину и дают в протоколах — 45 с/1000 нуклеотидов). Из-за накопления амплифицируемых матриц и од-

современного снижения количества активной ДНК-полимеразы в ходе ПЦР для увеличения выхода продукта рекомендуется использовать одно и то же время удлинения цепи для первых 10 циклов (например, 45 с), а затем увеличивать время на 2–5 с для каждого последующего цикла.

Рекомендованное количество циклов для визуализации продуктов ПЦР — 25–35, при большем количестве циклов возможно накопление неспецифических продуктов (например, длинных фрагментов ДНК за счет использования нужного продукта реакции в качестве праймера или одноцепочечных и коротких фрагментов из-за ограничения по нуклеотидам). При оптимальных условиях даже менее чем 10 молекул ДНК-матрицы за ≤ 40 циклов ПЦР образуют продукт амплификации, детектируемый при помощи электрофореза в агарозном геле.

Надо также учитывать, что разные модели амплификаторов имеют разную скорость изменения температуры, а точная температура в ПЦР-пробирке зависит от объема внесенной реакционной смеси и от типа ПЦР-пробирки (0,2-мл или 0,5-мл). Поэтому объем реакционной смеси в мкл обычно вводится в программу амплификатора перед проведением реакции, объем в 100 мкл на одну пробирку лучше не превышать.

После прохождения последнего цикла ПЦР реакционную смесь инкубируют при 72°C в течение 5–15 мин (*финальное удлинение*) для завершения амплификации частично удлиненных продуктов реакции и отжига одноцепочечных комплементарных продуктов.

По завершении ПЦР необходимо немедленно поместить образцы в лед или на 4°C для последующего контрольного электрофореза в 0,8–1%-ном агарозном геле (использовать 5-мкл аликвоту) или хранить их при –20°C (после оттаивания желательно отцентрифугировать пробу в течение 1–3 мин).

Стандартный режим для амплификации фрагментов ДНК с помощью ПЦР представлен в табл. 2.1.

Дополнения к методике

1. Разведения дНТФ, олигонуклеотидных праймеров и хромосомной ДНК необходимо делать на стерильной бидистиллированной воде (или стандарта Milli-Q). После растворения праймеров в воде до требуемой концентрации рекомендуется отцентрифугировать их при 10 000 g в течение 1 мин.

2. При тестировании большого количества генно-инженерных штаммов, выросших на агаризованной среде, с помощью ПЦР в

Таблица 2.1

Стандартный режим ПЦР

	Температура	Время	Количество циклов
Исходная денатурация	94–95°C	2–5 мин	1
Денатурация	94–95°C	15–30 с	25–35
Отжиг	$T_m - 5$	30–60 с	
Удлинение цепи	72°C	45 с–3 мин	
Финальное удлинение	72°C	5–7 мин	1
Охлаждение пробы	4°C	пауза	

ряде случаев можно не выделять из клеток тотальную ДНК как матрицу для ПЦР, а использовать непосредственно биомассу микроорганизмов. Для этого надо приготовить разбавленную суспензию клеток (внести немного биомассы на кончике носика для автоматической пипетки в 20–100 мкл стерильной воды), инкубировать ее при 90°C в течение 5 мин и добавить 1 мкл суспензии в соответствующую реакционную смесь. Возможно также внесение *минимального* количества биомассы на кончике зубочистки непосредственно в реакционную смесь для ПЦР.

При использовании препарата плазмидной или хромосомной ДНК в качестве матрицы для ПЦР ее обычно предварительно разводят стерильной бидистиллированной водой примерно в 1000 раз.

3. При низкой эффективности амплификации фрагмента ДНК можно попробовать поварьировать концентрацию $MgCl_2$ в реакционной смеси, изменить продолжительность этапа отжига или удлинения цепи, увеличить концентрацию праймеров и температуру отжига праймеров. Иногда для улучшения специфичности реакции применяют «горячий старт», когда ДНК-полимеразу вносят в реакционную смесь при 72°C. Простым способом контроля прохождения ПЦР является внесение в реакционную смесь (до реакции) бромистого этидия в концентрации до 0,1 мкг/мл с последующим освещением ПЦР пробирок после реакции УФ светом.

4. Для концентрирования продукта ПЦР можно использовать следующую методику (расчет на объем пробы, равный 100 мкл):

- добавить к пробе 10 мкл 3 М ацетата натрия (рН 5,2) и 250 мкл 96%-ного этанола;

- инкубировать при –80°C в течение 10 мин и отцентрифугировать на настольной центрифуге при максимальных оборотах;

- добавить к осадку ДНК 100 мкл 70%-ного этанола и отцентрифугировать на настольной центрифуге при максимальных оборотах;

— растворить осадок в 20 мкл буферного раствора ТЕ или дистиллированной воды.

5. **Для очистки продукта ПЦР** от праймеров, нуклеотидов, минерального масла, ферментов, солей и т.д. рекомендуется использовать набор **QIAquick PCR Purification Kit** («Qiagen», Нидерланды). Данный набор позволяет очистить за три шага до 10 мкг продукта размером от 0,1 до 10 тпо с выходом до 95%. В состав набора входят кварцевые мембраны для микроцентрифужных пробирок, эффективно адсорбирующие фрагменты ДНК при $\text{pH} < 7,0$ после внесения в пробы специального буферного раствора с высоким содержанием хаотропной соли (изотиоцианата гуанидина). Отмывка продуктов ПЦР от примесей обеспечивается буферными растворами, содержащими ЭДТА (удаление праймеров и одноцепочечных фрагментов ДНК) и 80%-ный этанол (отмывка от хаотропной соли). Элюция фрагментов ДНК (с помощью настольной центрифуги или вакуумного насоса) с кварцевой мембраны осуществляется небольшим объемом низко-солевого буферного раствора или воды при $\text{pH} 7,0\text{--}8,5$. Очищенный продукт ПЦР можно непосредственно использовать для секвенирования, обработки эндонуклеазами рестрикции, лигирования и трансформации, мечения, транскрипции *in vitro* и т.д.

2.2.

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ С ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИЕЙ (ОТ-ПЦР, RT-PCR)

ОТ-ПЦР представляет собой метод амплификации специфического фрагмента РНК. С помощью обратной транскриптазы (РНК-зависимой ДНК-полимеразы, синтезируемой ретровирусами) можно получить необходимую двухцепочечную ДНК *in vitro*, используя в качестве матрицы выделенную из клеток одноцепочечную информационную РНК (иРНК, мРНК). Обратная транскриптаза также используется для синтеза на РНК или одноцепочечной ДНК зондов, применяемых в различных опытах по гибридизации и скринингу геномных библиотек. Затравками в этом случае служит набор случайно выбранных олигодезоксирибонуклеотидов, часть из которых окажется комплементарна нуклеотидной последовательности матричной нуклеиновой кислоты и после гибридизации с ней будет представлять собой затравки для обратной транскриптазы.

В настоящее время метод ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР, RT-PCR) является одним из наиболее распространенных и чувствительных методов изучения экспрессии генов, анализа струк-

туры РНК и мутаций, диагностики генетических заболеваний, а также сравнения уровней мРНК в различных экспериментальных образцах. Поскольку все компоненты реакционной смеси для ОТ-ПЦР взаимозависимы, необходимо уделять повышенное внимание оптимизации специфичности, чувствительности, воспроизводимости и точности реакции.

Поскольку РНК не может непосредственно применяться как матрица для ПЦР, первым шагом является обратная транскрипция РНК-матрицы в комплементарную ДНК (кДНК), которая амплифицируется в ходе ПЦР. Соответственно используют РНК- и ДНК-зависимые ДНК-полимеразы в отдельных («два фермента/две пробирки») или в одной («два фермента/одна пробирка») реакциях. Разделение обратной транскрипции и ПЦР позволяет создать пул стабильных молекул кДНК, пригодных, в отличие от РНК, для длительного хранения, тогда как применение единственного фермента (функционирующего как РНК- и ДНК-зависимая ДНК-полимераза) в реакции «один фермент/одна пробирка» существенно уменьшает время проведения эксперимента и снижает риск загрязнения пробы.

В качестве матрицы для стандартной ОТ-ПЦР по возможности лучше использовать очищенную мРНК, чем тотальную РНК (поскольку доля мРНК в препарате тотальной РНК достаточна мала). *Качество препарата РНК очень важно для проведения количественной ОТ-ПЦР!* Тщательное определение концентрации тотальной РНК особенно необходимо в случае абсолютного количественного анализа уровней мРНК, когда число копий мРНК нормализуется относительно количества тотальной РНК и любое загрязнение ДНК может привести к неверным результатам. Поэтому пробы РНК желательно предварительно обработать ДНКазой, свободной от РНКаз, или очистить на колонках соответствующих наборов (производства «Qiagen», «Stratagene»). Впоследствии ДНКазы обязательно должны быть удалены из препарата перед постановкой ОТ-ПЦР (например, американской компанией «Applied Biosystems» выпускается специальный реагент, связывающийся с ДНКазой и удаляющий их из раствора в ходе центрифугирования). Желательно не использовать в качестве матрицы для реакции обратной транскрипции мРНК с высоким содержанием Г/Ц или вторичных структур, поскольку это может привести к остановке обратной транскриптазы, ее диссоциации от РНК-матрицы или пропуску соответствующих областей РНК.

Существует три типа праймеров, применяемых в реакции обратной транскрипции: олиго(дТ)₁₂₋₁₈ (связываются с поли-(A⁺) хвостом на

3'-конце эукариотических мРНК, служат для синтеза полноразмерной кДНК), набор случайных гексануклеотидов (связываются с мРНК в различных комплементарных сайтах, служат для синтеза коротких кДНК) и специфичные к определенной последовательности мРНК олигонуклеотидные праймеры (очень эффективны для диагностических целей). Применение случайных гексануклеотидов (гексамеров) позволяет избежать проблем с транскрипцией протяженных вторичных структур матрицы, кроме того, гексануклеотиды эффективно транскрибируют 5'-участки мРНК. Однако, по сравнению с использованием специфичных обратных праймеров, случайные гексануклеотиды могут привести к завышенной оценке числа копий мРНК.

Надо отметить, что с помощью ПЦР и обратной транскриптазы можно синтезировать кДНК, отвечающие 3'- или 5'-концевым областям мРНК, и использовать кДНК в качестве зонда для скрининга геномных библиотек. Данный метод носит название RACE (от «rapid amplification of cDNA ends»). Для проведения амплификации необходимо знать последовательность нуклеотидов кодирующей области мРНК-мишени, чтобы сконструировать комплементарный геноспецифичный праймер (ГСП). В случае 3' RACE праймером для синтеза первой цепи кДНК служит олиго(дТ) с присоединенным вторым праймером. Олиго(дТ) спаривается с поли-(А) концом мРНК, после чего обратная транскриптаза синтезирует комплементарную цепь. Вторая цепь кДНК синтезируется на первой как на матрице с использованием праймера ГСП и *Taq* ДНК-полимеразы. По окончании нескольких раундов ПЦР в реакционную смесь вносят вторую пару праймеров (внутренние праймеры), которые связываются рядом с первыми и позволяют синтезировать в итоге полноразмерную кДНК, соответствующую 3'-концу данной мРНК. При 5' RACE праймером для синтеза первой цепи кДНК, осуществляемого обратной транскриптазой, служит ГСП. Затем к 3'-концу синтезированной цепи присоединяют поли-(А) хвост с помощью концевой дезоксирибонуклеотидилтрансферазы в присутствии дАТФ. С ним спаривается праймер олиго(дТ) и происходит синтез второй цепи. После нескольких раундов ПЦР также добавляют внутренние праймеры и амплифицируют кДНК, соответствующую 5'-концу мРНК.

Кроме того, обратная транскриптаза используется в методе удлинения праймера (primer extension), который используется при определении сайта инициации транскрипции РНК для известной последовательности гена. Реакционная смесь содержит РНК (~6 мг); 5х буферный раствор (100 мМ трис-НСl; 150 мМ КCl; рН 8,3); радио-

активно-меченый праймер (~2 пмоль), который комплементарен области около 3'-конца гена; раствор дНТФ и обратную транскриптазу AMV (~15 ед.). Праймер отжигается с РНК, а обратная транскриптаза синтезирует кДНК на РНК до достижения 5'-конца РНК. Осуществив анализ продукта реакции с помощью электрофореза в полиакриламидном геле или секвенирования, можно определить место начала транскрипции.

Применение обратной транскриптазы AMV (от «avian myeloblastosis virus») позволяет избежать ряда проблем, связанных с вторичной структурой РНК, однако использование обратной транскриптазы MMLV (от «Moloney murine leukaemia virus») с существенно уменьшенной активностью РНКазы Н более предпочтительно в случае амплификации полноразмерных молекул кДНК.

Количество кДНК, синтезируемой с помощью обратной транскриптазы, должно точно соответствовать количеству вносимой в реакционную смесь РНК-матрицы. Соответственно высокое качество и специфичность фермента являются определяющими для успешного проведения ОТ-ПЦР. Обратная транскриптаза обычно состоит из двух полипептидов, один из которых обладает 5'–3' ДНК-полимеразной активностью, а также специфической по отношению к кДНК–РНК гибридам двусторонней 5'–3' рибозекзонуклеазной активностью, приводящей к образованию одноцепочечной кДНК и олигорибонуклеотидов. Надо отметить, что для достижения высокого выхода транскриптов необходимо использовать высокоочищенную обратную транскриптазу без примесей РНКаз, часто имеющую 30–60-кратное концентрационное превышение над используемой матрицей мРНК, а также оптимальную для активности обратной транскриптазы концентрацию двухвалентных катионов (6–10 мМ Mg^{2+} или Mn^{2+}) и высокую концентрацию дНТФ (200–250 мкМ). Использование термоактивной обратной транскриптазы для проведения реакции при 55–70°C позволяет получить точные копии мРНК (поскольку высокая температура улучшает специфичность реакции), в особенности если РНК-матрица имеет высокое содержание Г/Ц. Однако при повышенных температурах следует применять специфичные праймеры, а не случайные гексануклеотиды.

Для синтеза кДНК размером до 1000 оснований часто применяют *Tth* ДНК-полимеразу в присутствии ионов Mn^{2+} , тогда как для высокоточного синтеза продукта большего размера (до 4000 оснований) на РНК-матрице с высоким содержанием Г/Ц лучше использовать *C. therm.* полимеразу; оба фермента не обладают активностью РНКазы Н. Важно отметить, что *Tth* ДНК-полимераза используется

и в последующей ПЦР (так называемый метод «один фермент/одна пробирка»), а в случае *S. therm.* полимеразы (инактивирующейся при 95°C) после обратной транскрипции в реакционную смесь для ПЦР надо вносить второй фермент, как правило *Taq* ДНК-полимеразу.

Компанией «Qiagen» (Нидерланды) выпускается фермент под торговой маркой «Sensiscript», который позволяет проводить ОТ-ПЦР с низкой концентрацией РНК-матрицы (< 25 нг) благодаря высокому сродству к молекулам РНК. Данный фермент обладает активностью РНКазы Н, специфичной исключительно к гибридам РНК/ДНК. Тем не менее надо иметь в виду, что при сравнительно низких температурах проведения ОТ-ПЦР (обычно 40–50°C) может иметь место неспецифичность реакции, что является особенной проблемой при использовании очень низких концентраций матрицы. Обратная транскриптаза «Thermoscript» («Invitrogen», США) сохраняет свою активность вплоть до 70°C, что обеспечивает повышенную специфичность и эффективность реакции, с другой стороны, этот фермент менее устойчив к действию различных ингибиторов, присутствующих в пробах РНК.

Методика

A1. Реакция обратной транскрипции со случайными гексануклеотидами

1. Приготовить свежую реакционную смесь следующего состава (объем 10 мкл):

- 3,85 мкл раствора очищенной матричной РНК в деионизованной воде, свободной от РНКаз (не более 200–500 нг РНК, часто рекомендуется до 50 нг);

- 1 мкл 10× буферного раствора для обратной транскриптазы;

- 2,2 мкл 25 мМ MgCl₂;

- 2 мкл смеси дНТФ (с дТТФ; 2,5 мМ каждого);

- 0,5 мкл случайных гексамеров (50 мкМ) — например, производства «Invitrogen» (США);

- 0,2 мкл ингибитора РНКаз (20 ед./мкл) — например, RiboLock («Fermentas», Литва);

- 0,25 мкл обратной транскриптазы (50 ед./мкл) — MultiScribe («Applied Biosystems», США), Superscript II («Invitrogen», США) или ImProm-II («Promega», США).

2. Начать процесс обратной транскрипции в приборе-амплификаторе, используя следующий режим:

25°C в течение 5–10 мин (отжиг);

48°C в течение 30 мин или 37–42°C в течение 60 мин (обратная транскрипция);

95°C в течение 5 мин или 70°C в течение 15 мин (инактивация обратной транскриптазы).

Инкубация при 25°C необходима при использовании случайных гексамеров или олиго(дТ) в качестве праймеров для синтеза одноцепочечной кДНК, поскольку этот этап максимально усиливает связывание праймера с РНК-матрицей.

3. Очистить кДНК, например с использованием центрифужных микроколонок с фильтром Microcon YM-30 («Millipore», США). Хранить при –20°C.

Примечание. Некоторые протоколы рекомендуют инкубировать смесь матричной РНК и случайных гексануклеотидов при 70°C в течение 3–5 мин, затем быстро охладить во льду в течение 1–5 мин и добавить к холодной смеси остальные компоненты реакции (перемешать на вортексе).

A2. Реакция обратной транскрипции с олигонуклеотидными праймерами

1. Приготовить свежую реакционную смесь следующего состава (объем 20 мкл):

- 2 мкл 10× буферного раствора для *Tth* ДНК-полимеразы (поставляется вместе с ферментом);
- 2 мкл 9 мМ $MnCl_2$;
- 0,2 мкл смеси дНТФ (25 мМ каждого);
- 1 мкл прямого праймера (100 нг/мкл, часто рекомендуется 20 пмоль);
- 1 мкл обратного праймера (100 нг/мкл), если после реакции с обратной транскриптазой сразу планируется осуществлять полимеразную цепную реакцию (п. Б1);
- 3 мкл очищенной матричной РНК (0,1–10 нг/мкл);
- 0,8 мкл *Tth* ДНК-полимеразы (~4 ед. на реакцию);
- 10 мкл бидистиллированной воды, обработанной диэтилпи-рокарбонатом (DEPC), для инактивации РНКаз.

2. Добавить 1 каплю минерального масла SIGMA поверх реакционной смеси.

3. Начать процесс обратной транскрипции в приборе-амплификаторе, используя следующий режим:

65°C в течение 1 мин;

60–70°C в течение 20–30 мин.

Б1. Последующая полимеразная цепная реакция с использованием *Tth* ДНК-полимеразы

1. Во время обратной транскрипции приготовить реакционную смесь следующего состава (объем 80 мкл):

- 8 мкл 10× буферного раствора для *Tth* ДНК-полимеразы;
- 10 мкл 7,5 мМ ЭДТА;
- 62 мкл бидистиллированной воды.

2. Внести эту реакционную смесь в пробирку с пробой синтезированной кДНК после реакции обратной транскрипции (п. А2), осторожно перемешать на вортексе и кратковременно отцентрифугировать на настольной центрифуге.

3. Немедленно начать процесс полимеразной цепной реакции в приборе-амплификаторе, используя следующий режим:

85°C 10 с (во избежание перегрева реакционной смеси);

95°C 3 мин → исходная денатурация;

62°C 1 мин;

72°C 1 мин;

85°C 10 с;

95°C 1 мин → денатурация, отжиг, элонгация (40 циклов);

62°C* 1 мин;

72°C 1 мин**;

72°C 6 мин → финальная элонгация.

Примечание. *Точная температура отжига зависит от температуры плавления используемых праймеров, **время элонгации зависит от размера ожидаемого продукта ПЦР и от используемой ДНК-полимеразы (в среднем ~45–60 с на каждую тысячу оснований).

Б2. Отдельная полимеразная цепная реакция с использованием Taq ДНК-полимеразы

1. Приготовить реакционную смесь следующего состава (объем 10 мкл):

— 1 мкл пробы после реакции обратной транскрипции и очистки (п. А1);

— 1 мкл прямого праймера (100 нг/мкл);

— 1 мкл обратного праймера (100 нг/мкл);

— 0,5 мкл 7,5 мМ ЭДТА;

— 6,5 мкл бидистиллированной воды.

2. Дальнейшая процедура аналогична стандартной методике проведения амплификации ДНК (см. подглаву 2.1).

Двухстадийный процесс (обратная транскрипция, а затем ПЦР — метод «два фермента/одна пробирка» или «два фермента/две пробирки»), описанный выше, обеспечивает оптимальные условия для обеих реакций, что повышает эффективность и точность амплифи-

кации. С использованием правильно подобранных комбинаций обратной транскриптазы и ДНК-полимеразы двухстадийная ОТ-ПЦР позволяет амплифицировать последовательность РНК размером до 14 000 оснований. Кроме того, синтезированную в реакции обратной транскрипции кДНК можно использовать для нескольких ПЦР и соответственно для анализа множественных транскриптов.

С другой стороны, некоторые протоколы рекомендуют проводить одностадийную ОТ-ПЦР, используя для обеих реакций одни и те же специфичные праймеры и буферный раствор (метод «один фермент/одна пробирка»), — это позволяет ускорить и упростить процедуру, использовать РНК-матрицу с протяженной вторичной структурой, увеличить выход продукта и уменьшить риск контаминации при работе. Однако чувствительность ПЦР при использовании *Tth* полимеразы будет существенно ниже по сравнению с *Taq* полимеразой, кроме того, присутствие в реакционной смеси ионов Mn^{2+} уменьшает точность включения нуклеотидов.

2.3

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ (REAL-TIME PCR)

ПЦР в реальном времени представляет собой количественную ПЦР, позволяющую одновременно детектировать и определять выход продукта реакции после каждого цикла амплификации, строить по полученным данным кинетическую кривую и рассчитывать относительную концентрацию субстрата на основании анализа этой стандартной кривой. Этот чувствительный, быстрый и воспроизводимый метод в комбинации с ОТ-ПЦР значительно упростил и ускорил процесс достоверной оценки количества копий мРНК в образце и соответственно изучение экспрессии генов в клетках.

Для детекции продукта ПЦР используются различные флуоресцентные красители, обеспечивающие уровень флуоресценции, прямо пропорциональный количеству амплифицированной ДНК, — так называемую *репортерную флуоресценцию*. Механизмы генерации репортерной флуоресценции различаются в зависимости от типа используемой ПЦР в реальном времени.

Разработка протоколов количественной или стандартизированной ОТ-ПЦР (StaRT) с применением стандартизованного праймера и конкурентной матрицы для каждого гена-мишени позволила достоверно сравнивать результаты экспериментов и избежать проблем с вариациями начальных количеств матрицы. Уровни мРНК гена-

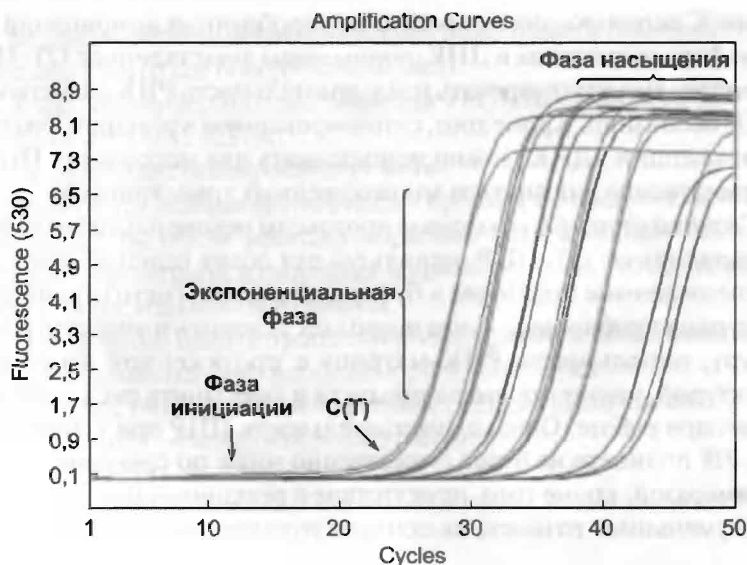


Рис. 2.3. Стандартные кинетические кривые, полученные в ходе ПЦР в реальном времени

мишени нормализуются по отношению к калибровочным генам для контроля количества кДНК, вносимого в реакционную смесь. Соответственно измерение экспрессии каждого гена выражается численной величиной, что делает возможным прямое сравнение результатов различных экспериментов.

Кинетическая кривая ПЦР строится в координатах «уровень репортерной флуоресценции» и «количество циклов амплификации». Кривая имеет сигмоидную форму и в ней различают три фазы (рис. 2.3): 1) *фазу инициации* (ПЦР-продукты пока не детектируются по флуоресцентной метке), 2) *экспоненциальную фазу* (наблюдается экспоненциальная зависимость уровня флуоресценции от цикла ПЦР) и 3) *фазу насыщения* (плато).

Экспоненциальная фаза ПЦР в реальном времени описывается следующим уравнением: $P_n = P_0 \times E^n$, где P_n — величина репортерной флуоресценции (т.е. количество молекул продукта) к циклу n , P_0 — исходное количество молекул, содержащих амплифицируемый фрагмент (матрица) и E — эффективность амплификации. В идеальных условиях $E = 2$, т.е. в каждом цикле ПЦР количество продукта удваивается. Пороговый цикл $C(T)$ представляет собой такой цикл n , на котором достигается определенный заданный уровень репортерной флуоресценции ($P_{C(T)} = \text{const}$). Для $n = C(T)$ уравнение принимает вид: $C(T) = - (1 / \log E) \times \log P_0 + \log P_{C(T)} / \log E$. Как видно из этого

основного уравнения ПЦР в реальном времени, значение $C(T)$ прямо пропорционально логарифму количества субстрата (чем выше $C(T)$, тем ниже концентрация). Таким образом, чем больше субстрата (матрицы) присутствует в начале реакции, тем меньшее число циклов необходимо для достижения точки (порогового цикла), где флуоресцентный сигнал детектируется как статистически превосходящий фоновое значение.

Следовательно, ПЦР в реальном времени позволяет сравнивать количества субстрата при обязательном условии, что эффективность и заданный уровень пороговой флуоресценции одинаковы для каждой из сравниваемых реакций. Метод ПЦР в реальном времени очень удобен для изучения экспрессии генов в молекулярно-биологических экспериментах и для применения в клинической диагностике. Однако надо учитывать, что экспоненциальный характер ПЦР амплификации и малое количество молекул-мишеней приводят к тому, что даже незначительные вариации в составе реакционной смеси и режиме ПЦР могут значительно повлиять на выход продукта амплификации и на достоверность полученных результатов. Соответственно требуется обязательная стандартизация в процессе подготовки и осуществления ПЦР в реальном времени.

А. Типы ПЦР в реальном времени

Детекция продукта амплификации в ходе ПЦР в реальном времени различается по способам генерации репортерной флуоресценции. Существует два основных подхода: применение *интеркалирующих флуоресцентных красителей*, флуоресценция которых существенно возрастает при их специфическом связывании с молекулами двухцепочечной ДНК (наиболее простой метод), и использование *флуоресцентно-меченых олигонуклеотидных проб*, комплементарных соответствующему участку продукта ПЦР. В качестве интеркалирующего красителя наиболее часто применяют SYBR Green. В технологиях TaqMan, Molecular Beacons и LightCycler используют олигонуклеотидные пробы, меченные флуоресцентными агентами. В любом случае увеличение флуоресценции пробы будет прямо пропорционально количеству синтезированного продукта ПЦР.

1) Краситель **SYBR Green I** флуоресцирует при связывании с двухцепочечной молекулой ДНК. В ходе денатурации ДНК краситель освобождается и его уровень флуоресценции в растворе резко снижается до базового уровня. Во время этапа удлинения цепи праймеры отжигаются на матрице, и происходит синтез двухцепочечного ПЦР-продукта, с которым связываются молекулы SYBR Green I, вызывая увеличение флуоресценции (рис. 2.4). Таким образом, из-

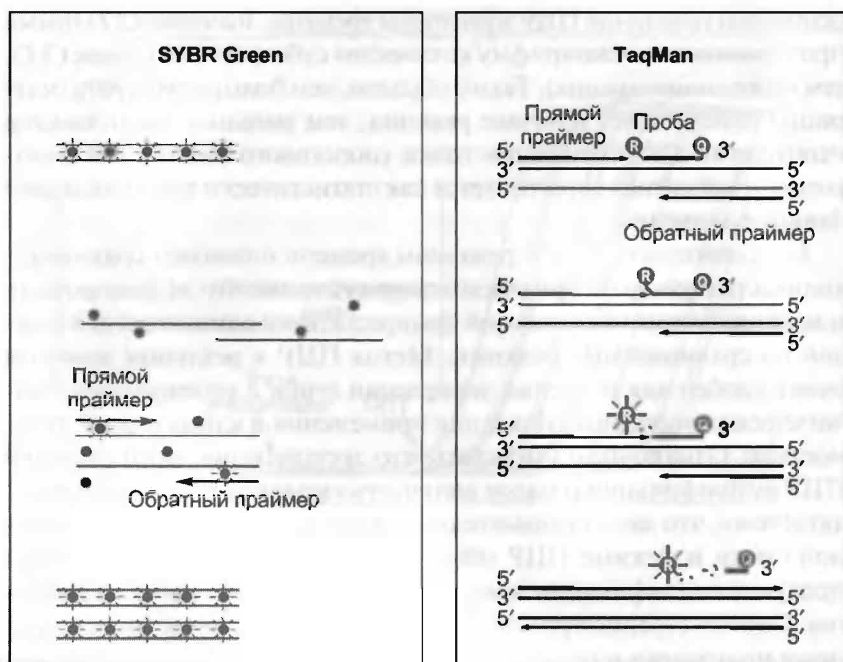


Рис. 2.4. Принцип ПЦР в реальном времени с использованием SYBR Green и TaqMan (R — флуоресцентный краситель-репортер, Q — гаситель флуоресценции)

мерение флуоресценции в конце этапа удлинения цепи каждого цикла ПЦР позволяет оценить увеличение количества амплифицированной ДНК.

Использование SYBR Green весьма дешево и не требует применения комплементарных ампликону флуоресцентных проб. Однако данный метод не позволяет осуществлять больше чем одну ПЦР в каждой реакционной смеси. Кроме того, SYBR Green предъявляет высокие требования к специфичности реакции, поскольку любая двухцепочечная ДНК (в том числе димеры праймеров) будет генерировать репортерную флуоресценцию; точность данного метода при малых количествах субстрата не очень высока. SYBR Green дает хорошую эффективность до $C(T) = 35-37$, затем точность снижается.

Для улучшения достоверности результатов кривую плавления ампликона строят по величине флуоресценции как функции температуры — для этого увеличивают температуру немного выше T_m ампликона и измеряют флуоресценцию. Поскольку T_m ампликона зависит от его нуклеотидного состава, возможно идентифицировать

сигнал, исходящий от нужного продукта амплификации. Кроме того, необходимо иметь в виду, что интенсивность сигнала флуоресценции при использовании ДНК-связывающих красителей зависит от массы молекул двухцепочечной ДНК, образуемых в ходе ПЦР, т. е. амплификация длинного продукта генерирует более сильный сигнал, чем амплификация короткого.

2) ПЦР с использованием **TaqMan** основана на 5'-экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы (обычно используют *Taq* или *Tth* полимеразу). В реакционную смесь вносят олигонуклеотидную пробу, меченную на 5'-конце флуоресцентным красителем (репортером), а на 3'-конце содержащую фосфатную группу и другой флуоресцентный краситель (гаситель флуоресценции). Проба комплементарна соответствующему участку амплифицируемой области. Гаситель поглощает и рассеивает излучение, испускаемое репортером, а фосфатная группа в 3'-положении блокирует ДНК-полимеразу.

При отжиге праймеров меченая проба количественно связывается с комплементарным участком ДНК. ДНК-полимераза синтезирует комплементарную цепь ДНК во время стадии элонгации и, дойдя до участка, гибридного с пробой, начинает ее расщеплять за счет 5'-экзонуклеазной активности, специфичной к двухцепочечным молекулам ДНК. Соответственно флуоресцентная метка (репортер) отделяется от гасителя флуоресценции в ходе каждого цикла ПЦР и характерная флуоресценция репортера детектируется с высокой точностью. Этот сигнал прямо пропорционален количеству молекул ампликона, присутствующих в конце предыдущего или в начале данного цикла ПЦР (рис. 2.4). Несвязавшаяся проба остается интактной и репортерная флуоресценция не детектируется. Таким образом, после осуществления обратной транскрипции для успешного количественного анализа с применением TaqMan требуется отжиг трех олигонуклеотидов с кДНК-матрицей — двух специфичных праймеров, определяющих концы ампликона, и флуоресцентно-меченой пробы.

Поскольку полимеразы гидролизуют пробу только в случае ее гибридизации с комплементарным участком ДНК, для обеспечения связывания пробы необходимо подобрать температурные условия. Большинство проб имеют T_m около 70°C, поэтому для этапа отжига и полимеризации используется температура 60–62°C, что обеспечивает связывание пробы с мишенью во время этапа удлинения цепи. В случае длинных ампликонов может потребоваться более продолжительный этап отжига — полимеризации и/или увеличение концентрации Mn^{2+} или Mg^{2+} для стабилизации связывания пробы.

По сравнению с SYBR Green применение технологии TaqMan лишено недостатков в плане проведения нескольких количественных реакций в одной реакционной смеси, точности детектирования при малых количествах субстрата и требований к специфичности реакции (поскольку репортерная флуоресценция будет иметь место только при гибридизации пробы со специфическим продуктом ПЦР). Если необходима детекция продукта в области $C(T) > 35-37$, то лучше использовать TaqMan.

Однако флуоресцентные пробы для TaqMan являются достаточно дорогими, кроме того, использование TaqMan предоставляет гораздо меньше возможностей для оптимизации условий проведения ПЦР с различными количественными комбинациями пробы и праймеров. Технология TaqMan нашла широкое применение для количественной оценки уровней транскрипции в отдельных клетках, в диагностике генетических и онкологических болезней, при детекции мутаций (в этом случае используют две пробы, меченные различными флуоресцентными репортерами), а также при обнаружении вирусных и бактериальных патогенов.

3) Технология **Molecular Beacons** («молекулярные маяки») отличается от TaqMan тем, что 5'- и 3'-концы пробы (на которых находятся флуорофор и гаситель флуоресценции соответственно) являются комплементарными друг другу. При температуре отжига праймеров они образуют специфическую структуру (так называемую «шпильку»), где участок комплементарности пробы к последовательности в середине ампликона находится в петле. Проба в такой конформации не обладает флуоресценцией. При гибридизации пробы с мишенью (ампликоном) вторичная структура пробы изменяется, что приводит к расхождению флуоресцентной метки и гасителя флуоресценции (нефлуоресцентного хромофора), в этом случае испускаемое свечение метки может быть детектировано. Когда температура реакционной смеси повышается для осуществления этапа удлинения цепи, «молекулярные маяки» диссоциируют от мишени и флуоресценция снова гасится. Новая гибридизация происходит в течение этапа отжига каждого цикла ПЦР и интенсивность итоговой флуоресценции характеризует количество накопленного продукта амплификации в конце предыдущего цикла.

Разновидность метода — технология **Scorpions** (рис. 2.5), основанная на объединении флуоресцентно-меченой пробы и праймера, является более быстрой и чувствительной, поскольку в данном случае генерация флуоресцентного сигнала не зависит от межмолекулярных взаимодействий между пробой и ампликоном. Блокатор

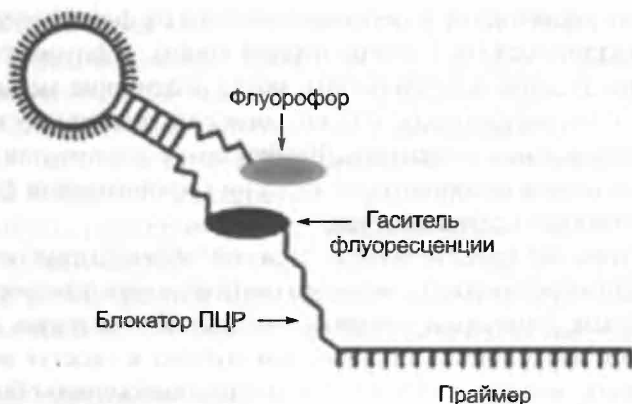


Рис. 2.5. Структура петли «шпильки» флуоресцентно-меченой пробы, присоединенной к специфическому праймеру (технология Scorpions)

ПЦР, соединяющий петлю «шпильки» с 5'-концом праймера, служит для предотвращения чтения петли. В данном случае ПЦР идет при оптимальной температуре для ДНК-полимеразы, в отличие от TaqMan, требующей пониженной температуры для обеспечения 5'-экзонуклеазной активности.

Разработана также новая модификация Scorpions с усиленной интенсивностью сигнала и более простая в плане конструирования пробы, так называемый «дуплексный скорпион», где специфичный праймер, блокатор ПЦР, проба и флуорофор составляют один олигонуклеотид, тогда как гаситель флуоресценции присоединен к 3'-концу другого олигонуклеотида, полностью комплементарного последовательности пробы.

В целом технология «молекулярных маяков» является несколько более точной по сравнению с TaqMan и используется для обнаружения молекул РНК из одной-единственной клетки или детекции различий в последовательности вплоть до одного нуклеотида, а также в различных научно-исследовательских и диагностических методах. Главной трудностью при использовании этой технологии является конструирование соответствующей пробы с правильной конформацией «шпильки», поскольку флуорофор должен находиться в непосредственной близости от гасителя флуоресценции. В противном случае возможны различные альтернативные конформации пробы, при которых гашение флуоресценции не будет происходить в должной мере, что приведет к сильному фоновому сигналу.

4) При использовании технологии **LightCycler** (метод гибридных проб) применяют две флуоресцентно-меченые пробы,

а принцип заключается в переносе энергии от флуоресцеина-донора, находящегося на 3'-конце первой пробы, к флуорофору-акцептору на 5'-конце второй пробы, когда расстояние между ними составляет 1–3 нуклеотида. Спектр эмиссии донора перекрывает спектр возбуждения акцептора. Возбуждение донора приводит к переносу энергии на акцептор и эмиссии красного света флуоресценции, которая и детектируется.

В растворе оба красителя находятся обособленно друг от друга и имеет место эмиссия только зеленого света фоновой флуоресценции донора. После этапа денатурации обе пробы гибридизуются с последовательностью мишени в положении «голова к хвосту» во время этапа отжига, что приводит к близкому расположению обоих красителей и передаче энергии флуоресцеина на флуорофор с высокой эффективностью. При температуре полимеризации обе пробы высвобождаются обратно в раствор. Увеличение уровня измеряемой флуоресценции пропорционально количеству ДНК, синтезируемой во время ПЦР. Сигнал флуоресценции детектируется только в результате гибридизации двух независимых проб с соответствующей комплементарной последовательностью мишени, что увеличивает специфичность реакции и позволяет иметь некоторую гибкость в плане конструирования проб по сравнению с технологией «молекулярных маяков». Поскольку, в отличие от TaqMan, пробы не гидролизуются, то флуоресценция является обратимым процессом и это позволяет генерировать кривые плавления.

Технология LightCycler также нашла широкое применение в молекулярной биологии, в особенности при детекции мутаций и в молекулярной диагностике онкогенных и инфекционных заболеваний.

Необходимо отметить, что несколько более специфичные и точные технологии Molecular Beacons и LightCycler применяются в основном для высокоспецифичной детекции лишь одного из синтезирующихся продуктов ПЦР, а в обычных исследованиях используют более дешевые технологии SYBR Green и TaqMan. Стандартные эксперименты, в которых требуется определить количество одного продукта ПЦР, лучше вначале проводить с SYBR Green. Переходить к технологии TaqMan рекомендуется в тех случаях, когда реакцию не удастся оптимизировать с несколькими парами заказанных праймеров или когда количества субстрата недостаточно для проведения достоверного анализа.

TaqMan используют также в поточных экспериментах с применением двух- и четырехканальных амплификаторов, когда требуется одновременно проконтролировать образование нескольких продук-

тов реакции в одной ПЦР-пробирке или в лунке ПЦР-плашки (как с одной пары праймеров, так и с нескольких). Однако такой подход *мультиплексной ПЦР* требует достаточно сложной оптимизации условий для сохранения приемлемого уровня чувствительности реакции, в частности по подбору подходящих флуоресцентных репортеров с хорошим спектральным разрешением и соответствующего набора праймеров. В этом смысле хорошие перспективы есть у технологии *Molecular Beacons*, поскольку она использует универсальный нефлуоресцентный гаситель и соответственно требует единственный флуорофор для каждой пробы, а не пару флуорофоров.

Б. Конструирование праймеров и проб, выбор гасителя флуоресценции

I. Как уже отмечалось выше, применение *SYBR Green* предъявляет очень высокие требования к специфичности ПЦР, что необходимо иметь в виду при конструировании праймеров. Параметры праймеров в данном случае рекомендуются следующие: размер ПЦР продукта 50–200 по, длина каждого праймера 15–25 оснований, температура плавления (T_m) 56–65°C, содержание Г/Ц 40–60% с минимумом Г/Ц на 3'-конце праймеров (1–2 из пяти последних нуклеотидов для минимизации неспецифичной гибридизации). Что касается размера ПЦР продукта, то чем он меньше, тем точнее уровень репортерной флуоресценции отражает количество амплифицированной ДНК. Желательно заказывать две-три пары праймеров и затем выбрать из них лучшие.

Примечание. Необходимо использовать такие пары праймеров, для которых программы по конструированию праймеров не выявляют димеров и других вторичных структур. Хорошие результаты по подбору праймеров с $T_m = 58–60^\circ\text{C}$ дает программа *Primer Express* («Applied Biosystems», США). Однако необходимо учитывать сложность конструирования нужных праймеров с помощью этой программы, поскольку она задает очень высокие критерии поиска. Еще одной неплохой программой для дизайна праймеров является известный *Vector NTI* («Invitrogen», США). Однако в этом случае лучше заказывать те из них, которым программа присваивает максимальный рейтинг. Существует также несколько других программ для термодинамического вычисления T_m , например *OLIGO* («Molecular Biology Insights», США).

II. При использовании технологии *TaqMan* параметры флуоресцентно-меченого зонда (*TaqMan* пробы) рекомендуются следующие: длина пробы 20–30 оснований, температура плавления (T_m) 65–

70°C, содержание Г/Ц 20–80% (оптимально — около 50%), не более четырех одинаковых нуклеотидов подряд, на 5'-конце не должно быть гуанозина (иначе репортерная флуоресценция может гаситься даже после гидролиза). Поскольку в ходе ПЦР происходит удлинение праймеров после их присоединения к ДНК-мишени, комплементарная последовательность пробы к мишени быстро маскируется новосинтезированной ДНК. Следовательно, для гибридизации пробы раньше праймеров ее T_m должна превышать (примерно на 10°C) T_m праймеров. Проба не должна перекрываться или иметь комплементарные последовательности с используемыми в реакции праймерами.

В качестве флуоресцентной метки на 5'-конце пробы предпочтительнее использовать FAM или VIC (*не забудьте перед постановкой ПЦР выбрать в программном меню прибора детектор на соответствующую метку!*). Самыми распространенными гасителями флуоресценции на 3'-конце являются DABCYL или TAMRA (тетраметилродамин), но существует и новое семейство гасителей — BHQ (от «Black Hole Quencher») производства компании «Bioreserach Technologies», США. Использование TAMRA имеет определенный недостаток (автофлуоресценцию), что приводит к относительно низкому соотношению сигнал—шум, тем не менее воспроизводимость результатов и чувствительность метода при применении TAMRA достаточно высоки. DABCYL обладает низким перекрыванием спектров со стандартными флуоресцентными красителями (флуорохромами). Гасители флуоресценции семейства BHQ не обладают автофлуоресценцией и способны тушить флуоресценцию во всем видимом, а также в инфракрасном спектре, т. е. их можно использовать с широко распространенными флуорохромами FAM (максимум абсорбции 518 нм), TET (538 нм) и Cy5 (667 нм). Еще одним достоинством отсутствия автофлуоресценции гасителя является возможность применения нескольких пар флуорохром/гаситель и постановки нескольких реакций амплификации в одной пробирке.

Параметры праймеров: оптимальный размер ПЦР продукта около 50–80 по (короткие фрагменты ДНК амплифицируются более эффективно и специфично из-за полной денатурации), длина каждого праймера 15–25 оснований, температура плавления (T_m) 58–60°C, содержание Г/Ц 20–70% с минимумом Г/Ц на 3'-конце праймеров (1–2 из пяти последних нуклеотидов). Димеры и другие вторичные структуры нежелательны.

Примечание. Оптимизацию ПЦР в реальном времени следует начинать с подбора TaqMan пробы, ее T_m должна быть примерно на

10°C выше температуры плавления праймеров. При использовании двух проб оптимальными являются FAM/BNQ1 и VIC/BNQ1. Следует помнить, что флуоресцентные красители чувствительны к свету и должны храниться в темноте до момента их внесения в реакционную смесь. Кроме того, желательно использовать свежие TaqMan пробы, поскольку при долгом (шесть и более месяцев) хранении они могут давать ошибочное значение $C(T)$ и соответственно неверное расчетное число копий мРНК.

III. Технологии «молекулярных маяков» и гибридизационных проб позволяют использовать праймеры с широким диапазоном температур плавления, но значения T_m каждой пары праймеров должны быть, разумеется, близки. Флуоресценция с использованием технологий «молекулярных маяков» и гибридизационных проб гасится более эффективно, чем флуоресценция TaqMan проб, поэтому фоновая флуоресценция в первых двух случаях существенно ниже. Гибридизационные пробы, применяемые для количественного анализа, должны иметь одинаковые T_m , тогда как для исследования мутаций T_m сенсорной пробы, комплементарной сайту мутации, должна быть ниже, чем у более длинной якорной пробы, генерирующей сигнал флуоресценции.

В. Параметры амплификации

Рекомендуется использовать реакционную смесь, содержащую по 300 нМ каждого праймера, 250 нМ флуоресцентно-меченой пробы для TaqMan и $MgCl_2$ (5 нМ в случае SYBR Green и 3,5 нМ при использовании технологии TaqMan). Тем не менее настоятельно рекомендуется подбирать оптимальные концентрации прямого и обратного праймеров, TaqMan-пробы и ДНК-матрицы для каждой серии соответствующих экспериментов (см. ниже).

I. Состав реакционной смеси для SYBR Green (по 25 мкл на лунку ПЦР-плашки): 12,5 мкл SYBR Green PCR Master Mix («Applied Biosystems», США); 1 мкл раствора матричной ДНК (20 нг ДНК в реакционной смеси); по 1 мкл раствора прямого и обратного праймера (по 300 нМ в смеси) и 9,5 мкл свежей стерильной деионизованной воды. SYBR Green PCR Master Mix содержит краситель SYBR Green I, ДНК-полимеразу AmpliTaq Gold, смесь дНТФ (с дУТФ), пассивный стандарт I и оптимизированный для реакции буферный раствор.

II. Состав реакционной смеси для TaqMan (по 25 мкл на лунку ПЦР-плашки): 12,5 мкл TaqMan Universal PCR Master Mix («Applied Biosystems», США); 1 мкл раствора матричной ДНК (20–50 нг ДНК в реакционной смеси); по 1 мкл раствора прямого и обратного праймера (по 300 нМ в смеси) и 9,5 мкл TaqMan пробы (100–250 нМ).

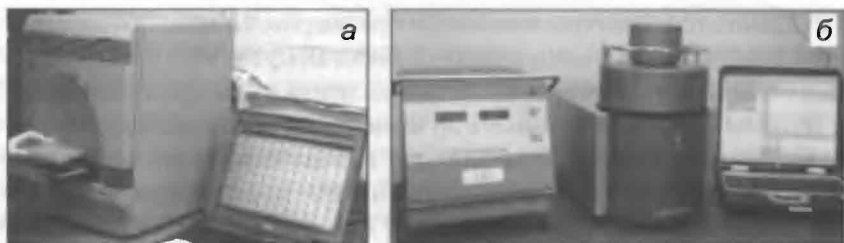


Рис. 2.6. Системы для проведения ПЦР в реальном времени: а) детектирующий планшетный амплификатор 2-го поколения ABI Prism 7500 производства «Applied Biosystems» (США); б) детектирующий капиллярный амплификатор LightCycler производства «Roche Diagnostics» (Швейцария)

TaqMan Universal PCR Master Mix содержит урацил-N-гликозилазу AmpErase, ДНК-полимеразу AmpliTaq Gold, смесь дНТФ (с дУТФ), пассивный стандарт 1 и оптимизированный для реакции буферный раствор.

Реакционная смесь во льду по 20–30 мкл вносится в лунки ПЦР-плашки (часто используются 96-луночные плашки), которая заклеивается сверху специальной пленкой для предотвращения испарения смеси. Перемешать реакционную смесь в лунках аккуратным постукиванием по дну лунок. После этого ПЦР-плашку с реакционной смесью желательно отцентрифугировать с использованием ротора для плашек (до 1000 g в течение 2–5 мин при 4°С) и убедиться, чтобы на стенках лунок не оставалось капель жидкости, а на дне — пузырьков воздуха, мешающих реакции.

Амплификация осуществляется в специальном детектирующем приборе-амплификаторе для проведения ПЦР в реальном времени (рис. 2.6), подключенном к компьютеру, на монитор которого выводятся кинетические кривые ПЦР. Перед стартом реакции надо открыть на компьютере соответствующую программу, выбрать вид количественного анализа, тип ПЦР-плашки и объем реакционной смеси в лунке, а также выбрать необходимый детектор эмиссии флуоресценции, соответствующий флуоресцентной метке, и отметить в программе лунки плашки, заполненные реакционной смесью. Поместить ПЦР-плашку, накрытую сверху специальной защитной прокладкой с отверстиями под лунки, в термоблок амплификатора и начать реакцию. После проведения ПЦР сохранить на компьютере полученные данные, аккуратно вынуть из амплификатора плашку и выключить прибор.

Надо отметить, что широкое применение находят не только планшетные, но и капиллярные приборы-амплификаторы для проведе-

ния ПЦР в реальном времени, например LightCycler® Real-Time PCR System («Roche Diagnostics», Швейцария). Процесс ПЦР в реальном времени в плашках занимает, как правило, 1,5–2 ч, а проведение реакции в тонкостенных стеклянных капиллярах (объемом по 5–20 мкл) позволяет уменьшить время каждого цикла амплификации и сократить общее время прохождения ПЦР до 20–30 мин.

Амплификаторы с одним излучающим лазером (например, ABI Prism 7700 и ABI Prism 7900HT производства «Applied Biosystems», США) менее универсальны, поскольку область излучения лазера (488–514 нм) является слишком узкой для эффективного возбуждения некоторых флуорофоров и осуществления мультиплексных реакций, хотя эти приборы и позволяют детектировать флуоресценцию в диапазоне 500–660 нм.

В этом смысле применение амплификаторов с вольфрамовой галогенной лампой (например, iCycler производства «Bio-Rad», США или ABI Prism 7000 производства «Applied Biosystems», США), несмотря на более низкую интенсивность излучения при максимальной длине волны по сравнению с лазером, обеспечивает равномерное излучение в широком диапазоне длин волн (400–700 нм с использованием фильтров). Это особенно важно при постановке мультиплексных реакций с несколькими флуорофорами для уменьшения возможности перекрывания их спектров флуоресценции (например, новейшие приборы производства компании «Bio-Rad» способны возбуждать и детектировать излучение одновременно у широкого круга флуорофоров). Однако лазеры обеспечивают более высокий уровень яркости спектра и чувствительность для флуорофоров в среднем значении соответствующих длин волн.

Детекция флуоресценции в приборах-амплификаторах осуществляется посредством спектрографа со светофильтрами для разных длин волн и ПЗС-камерой. Чем большее количество копий кДНК матрицы присутствует в реакционной смеси, тем быстрее будет наблюдаться увеличение уровня флуоресценции.

I. При использовании SYBR Green обычно применяют следующий режим ПЦР:

- 1) 94°C 8 мин;
- 2) 94°C 30 с;
- 3) 60–65°C 20 с;
- 4) 72°C 1 мин ;
- 5) детекция флуоресценции в пробах ПЦР плашки;
- 6) примерно 39 циклов начиная с шага 2;

7) точки кривой плавления (melting curve) в диапазоне от 60°C до 94°C измеряются через каждые 0,2°C в течение 1 с (перед детекцией флуоресценции);

8) 10°C пауза.

Примечания. 1. Для предотвращения образования праймерных димеров стадия отжига праймеров должна быть как можно короче (как правило, не более 15–20 с). В случае образования димеров детекцию флуоресценции рекомендуется проводить не при 72°C, а при температурах выше температуры плавления димеров праймеров.

2. Около 40 циклов амплификации является оптимальным значением, поскольку применение SYBR Green дает достоверные результаты при $C(T)$ не выше 35–38.

3. При работе с SYBR Green кривую плавления двухцепочечной ДНК необходимо строить для определения специфичности реакции. Кроме того, при оптимизации реакции рекомендуется проанализировать ПЦР продукты с помощью электрофореза в агарозном геле.

II. При использовании TaqMan стандартный режим ПЦР выглядит так:

1) 94°C 10 мин;

2) 94°C 15 с;

3) 60°C 1 мин;

4) детекция флуоресценции в пробах ПЦР плашки;

5) примерно 39–45 циклов начиная с шага 2;

6) 10°C пауза.

Примечания. 1. Поскольку стандартный буферный раствор от «Applied Biosystems» (США) содержит урацил-N-гликозилазу (вместо дТТФ добавлены дУТФ) для защиты от загрязнений продуктами ПЦР, для активации фермента необходима предварительная инкубация при 50°C в течение 2 мин.

2. В данном случае построение кривой плавления после ПЦР не обязательно (это будет кривая плавления не ПЦР продуктов, а дуплекса флуоресцентно-меченой пробы с продуктом амплификации). Однако такой шаг может оказаться полезным для анализа полиморфизмов, поскольку температура плавления дуплексов может различаться в зависимости от степени комплементарности пробы и ампликона.

Г. Оптимизация эксперимента, оценка качества реакции и некоторые проблемы при проведении ПЦР в реальном времени

Оптимизацию ПЦР в реальном времени следует начинать с серии последовательных разведений хромосомной ДНК-матрицы (от 0,125 нг до 32 нг в реакционной смеси). Максимальная концентрация

должна обеспечивать пороговый цикл $C(T)$ в диапазоне 18–20, а минимальная — немного больший, чем у экспериментальных образцов. Необходимо учитывать, что воспроизводимость результатов снижается с уменьшением концентрации ДНК, поэтому при $C(T) = 30–35$ надо усреднять результаты двух-трех реакций для достижения приемлемой достоверности. Важно также откалибровать прибор-амплификатор и придерживаться единого способа пипетирования при раскапывании образцов для минимизации погрешностей независимых экспериментов. Для оптимизации концентрации праймеров и TaqMan пробы в качестве ДНК-матрицы обычно используют раствор плазмидного вектора с соответствующей вставкой фрагмента гена (концентрация плазмидной ДНК — 0,02–1 пг/мкл реакционной смеси).

Буферные растворы для ПЦР в реальном времени часто содержат стандартный краситель ROX для нормализации по уровню пассивной флуоресценции, поэтому в качестве *контролей* рекомендуется использовать не только реакционные смеси без матричной ДНК, но и реакционные смеси, не содержащие ни праймеров, ни ДНК (до конечного объема доводить стерильной деионизованной водой). Если в качестве матричной ДНК для ПЦР в реальном времени используется комплементарная ДНК (кДНК) после реакции с обратной транскрипцией, то также ставят контроли с исходной тотальной РНК, обработанной ДНКазой I. Для оценки эффективности и калибровки ПЦР в реальном времени используют ряд разведений кДНК в DEPC- H_2O (конечная концентрация в реакционной смеси — от 2 до 50 нг).

Что касается оптимизации концентраций прямого и обратного праймеров, то их растворы обычно разводят стерильной деионизованной водой до концентраций 22,5; 7,5 и 1,25 мкМ и вносят по 1 мкл соответствующего разведения на 25 мкл стандартной реакционной смеси (т.е. конечная концентрация каждого праймера составляет 900, 300 или 50 нМ соответственно). После прохождения ПЦР (с SYBR Green) выбирают лучший вариант кинетической кривой из этих 9 комбинаций концентраций обоих праймеров. Часто применяют концентрации 50–200 нМ, поскольку более высокое содержание праймеров в реакционной смеси может приводить к ошибкам при гибридизации и к накоплению неспецифического продукта.

Оптимизация концентрации TaqMan пробы иногда проводится после найденной оптимальной концентрации праймеров (в реакции с SYBR Green). Для этого TaqMan пробу разводят стерильной деионизованной водой до концентрации 1,25 мкМ и вносят соответ-

ствующий объем раствора в реакционные смеси, чтобы получить конечные концентрации TaqMan пробы 50, 100, 150, 200 и 250 нМ. Оптимальная концентрация пробы зависит от фоновой флуоресценции и концентрации праймеров и обычно находится в пределах 100 нМ.

По окончании ПЦР необходимо выбрать способ определения базового уровня флуоресценции (baseline level) и выбрать уровень пороговой флуоресценции (threshold level).

Базовый уровень флуоресценции — уровень флуоресценции, наблюдающийся в реакционной смеси до появления репортерного сигнала. Программы, предназначенные для анализа результатов ПЦР в реальном времени, позволяют задать базовый уровень флуоресценции тремя разными способами, учитывая: среднее значение в диапазоне циклов, минимальное значение в диапазоне циклов и тотальный минимум. В каждом конкретном случае необходимо использовать такой способ, при котором обеспечивается минимальный уровень флуоресценции до появления репортерного сигнала и начало экспоненциальной фазы реакции детектируется с наибольшей точностью. Базовую линию выбирают как среднее значение флуоресценции в широком диапазоне циклов до появления репортерной флуоресценции (до начала детекции экспоненциальной фазы); также при выборе диапазона желательно избегать циклов вне экспоненциальной фазы, в которых наблюдаются скачки флуоресценции.

Характерными признаками того, что базовый уровень выбран неправильно, являются уход кривой флуоресценции ниже нуля и положительное значение флуоресценции в начале экспоненциальной фазы реакции (последний эффект часто является следствием расчета по минимальным значениям). Обычно эти ошибки исправляются правильной коррекцией диапазона циклов.

Для SYBR Green в большинстве случаев оптимальным является расчет базового уровня по среднему значению в диапазоне циклов с 3 по 7 (первые 2 цикла исключают из диапазона, поскольку в это время может наблюдаться значительная флуоресценция из-за недостаточно стабилизировавшейся реакции).

При использовании технологии TaqMan расчет базового уровня флуоресценции необходимо проводить более тщательно, поскольку к началу ПЦР в реакционной смеси может наблюдаться достаточно высокий уровень флуоресценции от проб, в которых произошла диссоциация репортера от гасителя. При малом количестве таких проб подобная флуоресценция достигает минимума к 3–7 циклу,

который и принимают за начальный цикл диапазона. Если флуоресценция от диссоциировавших проб наблюдается также и на поздних стадиях реакции, это создает значительные трудности при выборе базового уровня флуоресценции. В таком случае надо готовить реакционную смесь заранее и проинкубировать ее при 4°С в темноте в течение 1–3 ч до добавления ДНК-матрицы.

Уровень пороговой (репортерной) флуоресценции P_{CT} должен быть одинаков для всех сравниваемых экспериментальных образцов. Его выбирают в самом начале экспоненциальной фазы, пока вклад различных стохастических процессов в кинетику реакции еще незначителен. Существует три основных способа выбора уровня пороговой флуоресценции: 1) по минимальному значению уровня флуоресценции, соответствующему началу экспоненциальной фазы во всех реакциях, проведенных с данной парой праймеров; 2) по превышению над стандартным отклонением кинетической кривой (превышение порогового уровня над базовым уровнем должно быть мало, но статистически достоверно) и 3) по абсолютному максимуму второй производной кинетической кривой (за пороговый уровень выбирается наиболее резкий скачок уровня флуоресценции).

При использовании первого способа оптимальным является пороговый уровень в районе 0,05–0,1 единиц флуоресценции при условии одновременного проведения измерений и одинакового базового уровня флуоресценции — для сравнения данных в лунках одной плашки при оптимизации реакции это весьма корректный способ. Способ с учетом второй производной кинетической кривой лишен основного недостатка второго способа (усредненности стандартного отклонения по всей кинетической кривой) и он наименее чувствителен к способу выбора базового уровня флуоресценции, а также к различиям в условиях реакции. Поэтому при наличии соответствующего программного обеспечения лучше всегда использовать выбор уровня пороговой флуоресценции именно по второй производной кинетической кривой.

Оценку качества ПЦР в реальном времени проводят по ряду параметров: форме кинетической кривой, специфичности амплификации исходя из анализа кривой плавления (при использовании SYBR Green), достоверности количественного анализа и эффективности реакции.

Форма кинетической кривой в координатах «уровень флуоресценции — количество циклов амплификации» должна быть сигмовидной (рис. 2.3). Если это не так, то возможными причинами являются следующие: 1) возрастание уровня флуоресценции до начала экспо-

ненциальной фазы (тогда надо изменить способ выбора базового уровня флуоресценции или ввести контроль на реакционную смесь без праймеров для вычитания его уровня флуоресценции); 2) отсутствие фазы насыщения (что свидетельствует о низкой эффективности ПЦР, особенно если используется достаточная концентрация субстрата); 3) непараллельность кинетических кривых, полученных с разными разведениями субстрата, в экспоненциальной фазе (тогда увеличивают объем реакционной смеси, чтобы снизить возможные концентрационные ошибки); 4) изломы на протяжении экспоненциальной фазы (что свидетельствует о недопустимом образовании нескольких продуктов реакции или праймерных димеров).

Если стадия насыщения при больших концентрациях ДНК-матрицы наступает рано, то это свидетельствует о наступившем дефиците пробы или праймеров. При пересечениях кинетических кривых с разными разведениями матрицы в самом начале экспоненциальной фазы необходимо выбрать значения базовой линии выше пересечений. Пересечения на всем протяжении экспоненциальной фазы свидетельствуют о плохой калибровке ПЦР оборудования. Если уровень флуоресценции для контрольного варианта без добавления ДНК-матрицы превышает базовый, то при использовании технологии TaqMan это свидетельствует о загрязнении препарата, а для SYBR Green, скорее всего, означает образование праймерных димеров (что выявляется анализом кривой плавления).

Многие программы строят кинетическую кривую в осях « ΔR_n — количество циклов амплификации». R_n (нормализованный репортер) — это интенсивность флуоресцентной эмиссии репортерного красителя, деленная на интенсивность флуоресцентной эмиссии пассивного стандартного красителя; $\Delta R_n = R_n^+ - R_n^-$, где R_n^+ — величина R_n для реакционной смеси, содержащей все необходимые компоненты, включая ДНК-матрицу, R_n^- — величина R_n для контрольной реакционной смеси. Величина R_n^- определяется на первых циклах амплификации (предшествующих детектируемому возрастанию флуоресценции) либо в реакционной смеси, не содержащей ДНК-матрицу. Таким образом, ΔR_n — это магнитуа сигнала, генерируемого при данных конкретных условиях ПЦР. Термин порог (threshold), таким образом, соответствует среднему значению среднеквадратического отклонения R_n для ранних циклов ПЦР, умноженному на переменный фактор. Порог должен быть установлен в области экспоненциальной фазы кинетической кривой.

Кривая плавления при использовании SYBR Green строится в температурном диапазоне от температуры отжига до температуры пол-

ной денатурации. Анализ кривой плавления удобно проводить в координатах «скорость изменения интенсивности флуоресценции — температура» при базовом уровне, равном минимуму во всем диапазоне. В идеале в реакциях с ДНК-матрицей должен наблюдаться один пик (плавление специфического продукта), а контроль с праймерами без добавления ДНК должен показывать слабые затухающие колебания во всем диапазоне температур. Возможны следующие случаи, при которых форма кривой плавления может отличаться от стандартной: образование праймерных димеров (в контрольном варианте наблюдается широкий пик в районе 80°C) или образование больше одного продукта реакции (в варианте с ДНК-матрицей присутствуют несколько пиков, не наблюдающихся в контроле).

Достоверность количественного анализа зависит от концентрации субстрата для ПЦР и от поставленных экспериментальных задач. На достоверность результатов оказывают влияние также размер ампликона и эффективность амплификации. Линейный регрессионный анализ выполняется соответствующей программой, обслуживающей прибор-амплификатор. При $C(T) = 20\text{--}30$ желательно, чтобы величина достоверности линейной аппроксимации (R^2) зависимости «средние значения $C(T) - \log P_0$ » была больше 0,99. Для очень низких концентраций субстрата, когда отладочный эксперимент обязательно проводят в нескольких повторностях, допускаются значения R^2 не ниже 0,975. Коэффициент вариации для $C(T)$ составляет менее 2% для TaqMan и 0,4% для LightCycler, т. е. он очень мал.

Эффективность амплификации (E) при ПЦР в реальном времени определяют по углу наклона прямой в координатах « $C(T) - \log P_0$ ». $E = 10^{-1/k}$, где k берется из уравнения прямой $C(T) = k \times \log P_0 + b$, полученного с помощью линейной аппроксимации экспериментальных данных. Максимальное теоретически возможное значение эффективности равно 2. Рекомендуется подбирать условия ПЦР таким образом, чтобы эффективность амплификации не была меньше 1,7–1,8. Необходимо отметить, что эффективность амплификации можно рассчитать и без использования серийных разведений, по анализу кинетической кривой.

Если при использовании SYBR Green образуются димеры праймеров, то существует несколько вариантов решения данной проблемы. При образовании димеров в случае очень низких концентраций субстрата или когда можно отличить пик плавления праймерных димеров от более высокого пика плавления специфического продукта, рекомендуется провести дополнительный этап

ПЦР перед детекцией флуоресценции (используя промежуточную температуру плавления, 1–2 с). В противном случае подбирают другую пару праймеров либо уменьшают концентрацию используемых праймеров, также можно сократить продолжительность стадии отжига до минимума или поднять температуру отжига.

При низкой эффективности амплификации с использованием TaqMan желательно проверить при помощи электрофореза в агарозном геле интенсивность образования димеров праймеров. Для всех технологий ПЦР в реальном времени для увеличения эффективности реакции имеет смысл увеличить объем реакционной смеси и оптимизировать стандартные параметры (температуру отжига, концентрации праймеров и/или флуоресцентно-меченой пробы, концентрацию $MgCl_2$).

Д. Обработка данных при ПЦР в реальном времени, нормализация

Репортерный сигнал нормализуется по отношению к флуоресценции внутреннего красителя (TaqMan) или между тремя красителями (LightCycler), что позволяет корректировать флуктуации флуоресценции, вызванные изменениями концентрации или объема. Величина $C(T)$ предоставляется для каждого экспериментального образца и переводится в количественный результат путем построения калибровочной кривой.

Для коррекции возможных ошибок, связанных с вариациями в количестве исходного материала между различными экспериментальными образцами, одновременно с амплификацией мишени проводят амплификацию клеточной РНК, служащей внутренним стандартом для нормализации. Идеальный стандарт (так называемый house-keeping gene, ген «домашнего хозяйства») должен экспрессироваться на постоянном уровне вне зависимости от стадии роста культуры и быть неподверженным влиянию экспериментальных условий, также экспрессия такого гена должна происходить примерно на таком же уровне, что и у исследуемой РНК.

Единого универсального стандарта, в полной мере удовлетворяющего всем этим условиям, не существует, но чаще всего для нормализации экспрессии генов используют мРНК, соответствующие генам глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (GAPDH), β -актина или рибосомальных РНК (рРНК). Нормализацию результатов по возможности лучше проводить по усредненным данным амплификации двух-трех house-keeping генов. Считается, что рРНК, составляющая до 85–90% от тотальной РНК в клетке, является оптимальным внутренним контролем для нормализации (ген 16S рРНК как house-keeping ген), поскольку уровни экспрессии рРНК

не подвержены значительному влиянию условий, затрагивающих экспрессию мРНК. Тем не менее существуют некоторые различия в уровнях экспрессии рРНК, а также транскрипция разными РНК-полимеразами и возможная диспропорция во фракциях рРНК и мРНК между различными экспериментальными образцами.

Количественный анализ транскрипции мРНК в ходе обработки полученных данных при ПЦР в реальном времени может быть относительным и абсолютным. Относительный количественный анализ (метод калибровочного графика) определяет изменения в транскрипции гена и является достаточно достоверным. В качестве стандарта (калибровщика) для получения серийных разведений можно использовать любую нуклеиновую кислоту, если известна ее концентрация и длина ампликона. Абсолютный количественный анализ транскрипции (метод прямого сравнения данных) требует точного определения числа копий мРНК на клетку и концентрации тотальной РНК. Для получения достоверного профиля реакций обратной транскрипции и амплификации необходимо строить абсолютные калибровочные кривые для каждого индивидуального ампликона.

Калибровочный график строят в координатах « $C(T) - \log P_0$ », базируясь на серийных разведениях кДНК-стандарта, и по графику определяют концентрацию субстрата (P_0) в экспериментальных образцах (рис. 2.7). Число копий РНК (кДНК) рассчитывают, исходя из линейной регрессии калибровочного графика. Точность этого метода зависит от того, насколько эффективность амплификации в реакциях со стандартами близка к эффективности амплификации в реакциях с экспериментальными образцами. Соответственно содержание примесей, а также доли амплифицируемого фрагмента в реакционных смесях стандартных и экспериментальных образцов должны быть близки, кроме того, для максимальной достоверности серия разведений кДНК-стандарта должна охватывать весь возможный диапазон концентраций субстрата.

Для построения калибровочного графика рекомендуется делать три независимых серийных разведения стандарта и ставить опыт с каждым разведением в двух повторностях. Если условия ПЦР достаточно сильно различаются, желательно ставить серию стандартных разведений для каждого из экспериментальных образцов и сравнивать эффективности амплификации. Однако необходимо учитывать, что низкие концентрации субстрата, недостаточные для достоверных результатов при большой степени разведения, а также наличие примесей в препарате (снижающих эффективность при

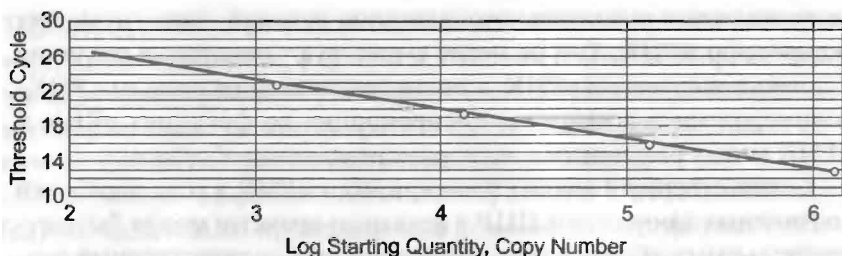


Рис. 2.7. Калибровочный график в осях «пороговый цикл — логарифм числа копий» для ПЦР в реальном времени

малых разведениях) могут привести к низкой достоверности линейной аппроксимации данных ПЦР. Поэтому применяют концентрирование препарата или проведение реакции в большем объеме соответственно.

Для определения количества ДНК-матрицы применяют следующие стандарты: очищенный ПЦР продукт, рекомбинантную ДНК, рекомбинантную РНК с последующей обратной транскрипцией и синтетический олигонуклеотид, содержащий амплифицируемую последовательность. При использовании очищенных ПЦР продуктов в реакцию необходимо добавлять неспецифические нуклеиновые кислоты (обратные транскрипты РНК, тРНК, рРНК) для приближения условий к экспериментальным.

Прямое сравнение данных. При равной эффективности реакции (E) в образцах 1 и 2 относительная концентрация субстрата равна

$$R = P1/P2 = E^{-(C(T)1-C(T)2)} = E^{-\Delta C(T)}.$$

Нормализация этих результатов по данным амплификации с контрольной последовательностью REF (соответствующей house-keeping гену, например гену *16S* рРНК) дает следующее. Пусть реакция REF в обоих образцах протекает с эффективностью E_{ref} . Тогда

$$R = E^{-\Delta C(T)} / E_{ref}^{-\Delta C(T)_{ref}}.$$

Многие программы обработки данных для ПЦР в реальном времени выполняют расчеты именно по этой формуле, учитывая средние значения $C(T)$.

При сходной эффективности амплификации контрольной и экспериментальной реакций $R = E^{-\Delta C(T)} / E^{-\Delta C(T)_{ref}} = E^{\Delta C(T)_{ref} - \Delta C(T)}$, а если допустить, что эффективность близка к максимально возможному значению 2, то формула приобретает вид

$$R = E^{\Delta C(T)_{ref} - \Delta C(T)} \sim 2^{\Delta C(T)_{ref} - \Delta C(T)} = 2^{-\Delta \Delta C(T)}.$$

Надо отметить, что выбор правильного контроля для нормализации данных является наиболее сложной проблемой. Многие исследователи полагают, что нормализация по отношению к тотальной клеточной РНК является наиболее достоверным методом, но этот подход требует тщательного количественного определения РНК в пробе (см. подглаву 1.4). Необходимо иметь в виду, что в случае использования тотальной РНК для нормализации отсутствует внутренний контроль на возможные ингибиторы реакции обратной транскрипции и ПЦР, поскольку допускается, что РНК-матрица обратно транскрибируется, а затем амплифицируется с одинаковой эффективностью. Поэтому для точной нормализации необходимо применение универсальных внутренних стандартов, вносимых в пробы РНК для оценки эффективности реакции обратной транскрипции и последующей ПЦР.

Литература

1. *Bustin S.A.* Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays // *J. Mol. Endocrinol.* 2000. V. 25. P. 169–193.
2. *Bustin S.A.* Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems // *J. Mol. Endocrinol.* 2002. V. 29. P. 23–39.
3. *Di Donato A., de Nigris M., Russo N., Di Biase S., D'Alessio G.* A method for synthesizing genes and cDNAs by the polymerase chain reaction // *Anal. Biochem.* 1993. V. 212. P. 291–293.
4. *Dieffenbach C.W., Dvksler G.S.* PCR Primer: a Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995.
5. *Erlich H.A., Gelfand D., Sninsky J.J.* Recent advances in the polymerase chain reaction // *Science.* 1991. V. 252. P. 1643–1651.
6. *Frey B., Suppmann B.* Demonstration of the Expand™ PCR's systems greater fidelity and higher yields with a *lacI*-based PCR fidelity assay // *Biochemica.* 1995. V. 2. P. 8–9.
7. *Goerke C., Bayer M.G., Wolz C.* Quantification of bacterial transcripts during infection using competitive reverse transcription-PCR (RT-PCR) and LightCycler RT-PCR // *Clin. Diagnost. Lab. Immunol.* 2001. V. 8. P. 279–282.
8. *Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J.* PCR Protocols: a guide to Methods and Applications. New York: Academic Press, 1990.
9. *Kovarova M., Draber P.* New specificity and yield enhancer of polymerase chain reaction // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28. E70.
10. *Linz U., Dellung U., Rubsamenwaigmann H.* Systematic studies on parameters influencing the performance of the polymerase chain reaction // *J. Clin. Chem. a Clin. Biochem.* 1990. V. 28. P. 5–13.
11. *Longo M.C., Berninger M.S., Hartley J.L.* Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions // *Gene.* 1990. V. 93. P. 125–128.
12. *Lowe T., Sharefkin J., Yang S.Q., Dieffenbach C.W.* A computer program for selection of oligonucleotide primers for polymerase chain reactions // *Nucleic Acids Res.* 1990. V. 18. P. 1757–1761.

13. *Mullis K.B., Ferré F., Gibbs R.A.* The Polymerase Chain Reaction. Birkhäuser Boston, 1994.
14. *Nolan T., Hands R.E., Bustin S.A.* Quantification of mRNA using real-time RT-PCR // *Nat. Protoc.* 2006. V. 1. P. 1559–1582.
15. PCR Application Manual. Roche Molecular Biochemicals, 1999.
16. *Pfaffl M.W., Horgan G.W., Dempfle L.* Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR // *Nucleic Acids Res.* 2002. V. 30. E36.
17. *Rolfs A. et al.* PCR Clinical Diagnostics and Research. New York: Springer Verlag, 1992.
18. *Rychlik W., Spencer W.J., Rhoads R.E.* Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro* // *Nucleic Acids Res.* 1990. V. 18. P. 6409–6412.
19. *Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase // *Science.* 1988. V. 239. P. 487–491.
20. *SantaLucia J.* A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. P. 1460–1465.
21. *Schuster D.M., Buchman G.W., Rashtchian A.* A simple and efficient method for amplification of cDNA ends using 5' RACE // *Focus.* 1992. V. 14. P. 46–52.
22. *Scotto-Lavino E., Du G., Frohman M.A.* 5' end cDNA amplification using classic RACE // *Nat. Protoc.* 2006. V. 1. P. 2555–2562.
23. *Tichopad A., Dilger M., Schwarz G., Pfaffl M.W.* Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up // *Nucleic Acids Res.* 2003. V. 31. E122.
24. *Tichopad A., Dzidic A., Pfaffl M.W.* Improving quantitative real-time RT-PCR reproducibility by boosting primer-linked amplification efficiency // *Biotechnol. Lett.* 2002. V. 24. P. 2053–2056.
25. *Vandesompele J., de Preter K., Pattyn F., Poppe B., van Roy N., de Paepe A., Speleman F.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes // *Genome Biol.* 2002. V. 3. RESEARCH0034.
26. *VanGuilder H.D., Vrana K.E., Freeman W.M.* Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis // *Biotechniques.* 2008. V. 44. P. 619–626.
27. *Weiss J.B.* DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections // *Clin. Microbiol. Rev.* 1995. V. 8. P. 113–130.
28. *White T.J., Madej R., Persing D.H.* The polymerase chain reaction: clinical applications // *Adv. Clin. Chem.* 1992. V. 29. P. 161–196.
29. *Williams J.F.* Optimization strategies for the polymerase chain reaction // *Biotechniques.* 1989. V. 7. P. 762–776.
30. Сайт <http://www.molbiol.ru>.

Методы электрофореза в геле широко используются для аналитических и препаративных целей, позволяя определить размер, концентрацию и чистоту полученного образца нуклеиновых кислот. Основным принципом электрофореза является действие электродвижущей силы, перемещающей молекулы нуклеиновых кислот или белков в толще матрикса геля. Мелкопористые полиакриламидные гели часто применяют для фракционирования отдельных цепей ДНК (так, в диапазоне размеров от 10 до 500 оснований можно разделить фрагменты ДНК, отличающиеся всего лишь одним нуклеотидом). Агарозные гели в основном используются для разделения двухцепочечных молекул ДНК, обычно размером от 100 до 20 000 пар оснований.

3.1.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ ДНК И РНК В АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ

Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле является одним из самых распространенных и универсальных методов в молекулярной биологии. Наиболее важное применение он нашел в аналитических целях, например при анализе фрагментов ДНК после ПЦР или обработки эндонуклеазами рестрикции. При электрофорезе молекулы нуклеиновых кислот мигрируют по направлению от отрицательного электрода к положительному, что обусловлено наличием в них отрицательно заряженного сахара-фосфатного остова. Скорость перемещения двухцепочечных молекул ДНК в агарозном геле зависит в основном от их размера, тогда как миграция РНК или одноцепочечной ДНК представляет собой более сложный процесс из-за возможного формирования третичной структуры.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ ДНК В АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ

Электрофорез в 0,7–2%-ном агарозном геле представляет собой стандартный метод, используемый для идентификации, разделения и очистки фрагментов нуклеиновых кислот среднего размера. Этим простым методом можно быстро и эффективно разделить такие

смеси фрагментов ДНК, которые не могут быть фракционированы другими способами, например центрифугированием в градиенте плотности. При разделении фрагментов ДНК посредством электрофореза можно непосредственно наблюдать за положением полос ДНК после их окраски флуоресцирующим красителем (бромистым этидием), который встраивается в молекулу ДНК. Предел чувствительности метода при количественном анализе окрашенного бромистым этидием геля в ультрафиолетовом свете 1–2 нг ДНК. По интенсивности флуоресценции полос судят о концентрации соответствующих фрагментов ДНК в пробе.

Существует также модификация электрофореза в агарозном геле (пульс-электрофорез), суть которого заключается в использовании пульсирующего электрического поля. С его помощью можно разделять очень большие молекулы ДНК и целые хромосомы микроорганизмов. В постоянном электрическом поле такие молекулы приобретают змеевидную конфигурацию и движутся в агарозном геле с постоянной скоростью вне зависимости от их длины. При частом же изменении направления электрического поля скорость движения больших молекул ДНК будет определяться их способностью переориентироваться в пространстве.

Надо отметить, что скорость миграции молекул ДНК через агарозный гель при электрофорезе определяется пятью основными параметрами. *Размер молекул линейной двухцепочечной ДНК* играет важную роль, поскольку электрофоретическая подвижность (R_f) обратно пропорциональна десятичному логарифму молекулярной массы (т.е. чем меньше размер молекул, тем быстрее они движутся). Молекулы одинакового размера и заряда движутся в электрическом поле единым фронтом.

Применяя гели с разными *концентрациями агарозы* (0,3–2%) можно эффективно разделять фрагменты ДНК различных размеров (от 80 по до 60 тпо), поскольку между логарифмом электрофоретической подвижности ДНК и концентрацией агарозного геля существует прямая зависимость. Важно иметь в виду, что низкопроцентные (0,3–0,5%) агарозные гели, предназначенные для разделения больших (1–60 тпо) фрагментов ДНК, очень хрупкие и все манипуляции с ними надо проводить, используя 2%-ную агарозную «подложку». Агароза представляет собой особо чистую фракцию линейного полисахарида агара, состоящую из чередующихся остатков β -D-галактопиранозы и 3,6-ангидридо- α -1-галактопиранозы, объединённых 1→4 связью. Точка образования геля за счет формирования водородных связей между пучками нитей — около 45°C. Для

электрофореза можно рекомендовать агарозу Multi Purpose («Roche Diagnostics», Швейцария), позволяющую готовить прочные гели различных концентраций. Стандартная концентрация агарозного геля (0,7–1%) позволяет разделить линейные молекулы ДНК размером от 0,2 до 12 тпо.

ДНК, имеющие одинаковую молекулярную массу, но разные *конформации* (кольцевая неповрежденная, кольцевая с одноцепочечным разрывом, суперспирализованная, линейная), движутся в агарозном геле с разными скоростями. Относительная подвижность конформационных форм ДНК зависит в данном случае от концентрации агарозы, силы тока, ионной силы буферного раствора для электрофореза и т.д.

Для точного определения конформации ДНК и увеличения разрешения суперскрученной ДНК необходимо провести электрофорез в присутствии возрастающих концентраций бромистого этидия при повышенной ионной силе буферного раствора, поскольку с увеличением концентрации красителя число его молекул, связавшихся с ДНК, растет. При этом отрицательные сверхспиральные витки в кольцевых неповрежденных молекулах исчезают и скорость движения ДНК в геле уменьшается. Последующее добавление новых порций бромистого этидия приводит к образованию положительных сверхспиральных витков, и подвижность кольцевой неповрежденной формы ДНК возрастает. Подвижности кольцевых молекул с одноцепочечным разрывом и линейных форм в данных условиях снижаются из-за нейтрализации зарядов и увеличения жесткости молекул под влиянием бромистого этидия. Для кольцевой неповрежденной ДНК критическая концентрация последнего 0,1–0,5 мкг/мл. Что касается молекул одноцепочечной ДНК, то при равном размере с двухцепочечными они перемещаются в агарозном геле примерно на 10% быстрее и в 4–5 раз хуже окрашиваются бромистым этидием.

При невысоких *напряженностях электрического поля* скорость перемещения фрагментов линейной ДНК пропорциональна приложенному напряжению, но с увеличением напряженности эффективное разделение молекул ДНК в агарозном геле снижается, поскольку возрастает подвижность высокомолекулярных фрагментов ДНК. Таким образом, проведение электрофореза при высоком напряжении эквивалентно уменьшению длины геля. Наиболее эффективное разделение фрагментов ДНК происходит при напряженности ~5 В/см (для высокоточных препаративных электрофорезов лучше использовать 2 В/см).

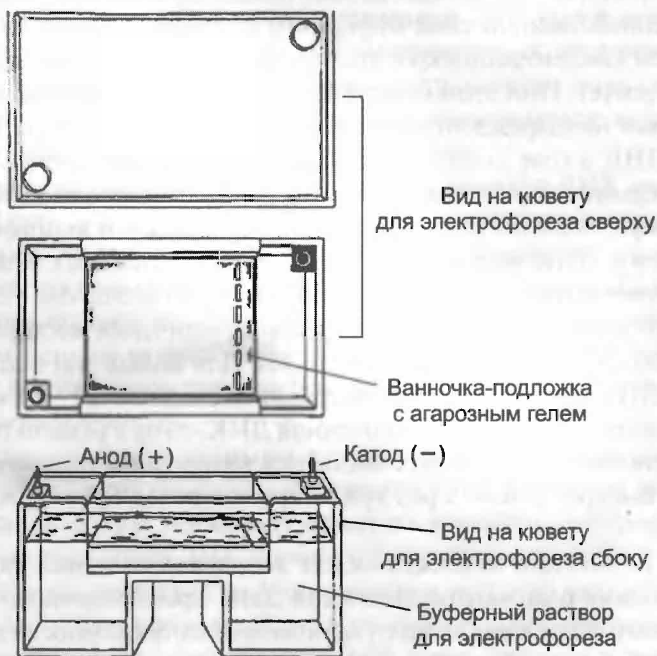
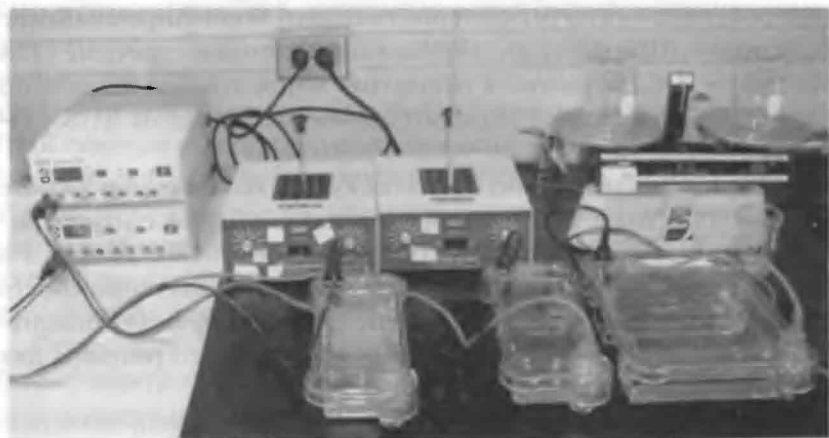


Рис. 3.1. Прибор для горизонтального электрофореза в агарозном геле производства «Bio-Rad Laboratories» (США) с набором кювет различного размера и схема кюветы

Наименьшее влияние на скорость миграции молекул ДНК через агарозный гель оказывает *температура*. Обычно электрофорез в 0,7–1%-ном агарозном геле осуществляют при комнатной температуре, а с мягкими 0,3–0,5%-ными гелями работают при 4°C.

Для проведения горизонтального электрофореза нуклеиновых кислот в агарозном геле используют электрофорезные аппараты с пластиковыми кюветами (камерами) различного объема и ванночками-подложками под гель из проницаемой для ультрафиолета пластмассы (рис. 3.1), позволяющими легко готовить и хранить агарозные гели в виде пластинок разнообразных размеров. Пластиковые гребенки, с помощью которых в геле делают лунки для внесения проб нуклеиновых кислот, различаются количеством и размером зубцов. Каждую пробу нуклеиновой кислоты смешивают с буфером для внесения проб в лунки геля, который представляет собой раствор высокой плотности и содержит специальный краситель (заряженное низкомолекулярное вещество), позволяющий визуальное наблюдать за перемещением пробы в ходе электрофореза (обычно дожидаются, когда краситель пройдет две трети дорожки в геле).

Как уже упоминалось выше, наибольшее применение в визуализации фрагментов ДНК после электрофореза нашел очень эффективный метод окраски флуоресцирующим красителем бромистым этидием. Плоская группа молекулы этого вещества интеркалирует между соседними основаниями ДНК и краситель связывается с ДНК, что сопровождается увеличением интенсивности флуоресценции. УФ излучение, поглощаемое ДНК (260 нм) или бромистым этидием (300 и 360 нм), испускается затем в красно-оранжевой области видимого спектра при 590 нм. Иногда применяют еще более чувствительный радиоавтографический метод, основанный на включении радиоизотопа ^{32}P в фосфатные группы молекул ДНК перед электрофорезом.

Необходимые реактивы и растворы:

- 50× ТАЕ (трис-ацетатный) буферный раствор для электрофореза (см. прил. 1). Надо отметить, что буферная емкость трис-ацетатного буферного раствора довольно низка и при продолжительных электрофорезах он истощается, поэтому достаточно широкое применение нашли также трис-фосфатный (ТРЕ состава 80 мМ трис-фосфат; 8 мМ ЭДТА; pH 8,0) и трис-боратный (ТВЕ состава 89 мМ трис-борат; 2 мМ ЭДТА; pH 8,0) буферные растворы для электрофореза, которые имеют более высокую буферную емкость и также обеспечивают хорошее разделение фрагментов ДНК. Кроме того, агарозные гели, приготовленные на ТРЕ, хорошо растворимы в хаотропных агентах (перхлорате натрия или иодиде калия), что лежит в основе одного из методов выделения фрагментов ДНК из агарозных гелей; однако

фосфаты изменяют характеристики плавления агарозы. TBE (0,5×) применяют в основном для разделения небольших (< 200 по) фрагментов ДНК;

- 1%-ный агарозный гель следующего состава: агароза — 0,5 г; 0,5–1× TAE буферный раствор для электрофореза — довести объем до 50 мл. Для приготовления гелей лучше использовать низкоэндоосмотическую легкоплавкую агарозу известных фирм-производителей. Если агароза содержит примеси сульфатированных полисахаридов, ингибирующих рестриктазы, лигазы и полимеразы, то выделенные из таких агарозных гелей фрагменты ДНК необходимо дополнительно очищать перед использованием в экспериментах по клонированию;
- водный раствор бромистого этидия (10 мг/мл) (см. прил. 1).

Примечание. Бромистый этидий является сильным канцерогеном (!), при работе с ним необходимо использовать перчатки.

- 6× буферный раствор для внесения проб (см. прил. 1). В настоящее время очень широкое применение нашел 6× буферный раствор с красителем Mass Loading Dye производства компании «Fermentas», Литва.

Методика

1. Навеску агарозы полностью растворить в 0,5× TAE буферном растворе нагреванием до кипения (*аккуратно, чтобы не обжечься и не пролить вскипевшую агарозу!*) в СВЧ печи или на электроплитке в течение 1–2 мин, остудить до 45–60°C при легком покачивании. Осторожно залить теплым агарозным гелем герметичную ванночку-подложку, лежащую на строго горизонтальной поверхности. Немедленно вставить в незаполимеризовавшийся гель зубчатый шаблон (гребенку) для формирования лунок. Если позволяет длина подложки, то в ней можно одновременно заливать несколько гелей, разделяя их пластиковыми гребенками. Необходимо, чтобы между дном лунки и основанием геля оставался слой агарозы толщиной 1–2 мм (рис. 3.2). Гель полностью затвердевает при комнатной температуре в течение 30–45 мин.

Агарозные гели, завернутые от высыхания в полимерную пленку, можно хранить при 4°C в течение нескольких недель (гребенки из геля вынимают непосредственно перед опытом), но перед постановкой электрофореза их желательно выдержать 1 ч при комнатной температуре.

2. После завершения полимеризации поместить гель на подложке в кювету для электрофореза и аккуратно налить в кювету

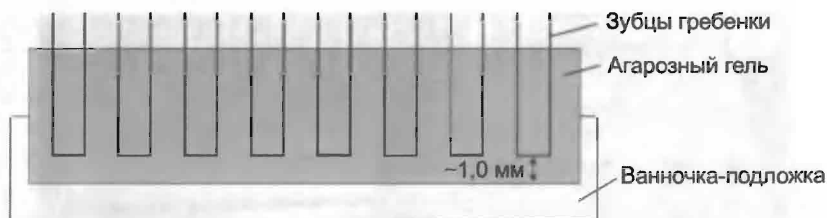


Рис. 3.2. Гребенка, вставленная в агарозный гель

0,5–1× TAE буферный раствор так, чтобы гель был покрыт его тонким слоем (2–3 мм) и под гелем не было пузырей воздуха. Излишки буфера можно удалить с помощью шприца на 50 мл. Гель на ванночке-подложке должен находиться под самой поверхностью налитого в кювету буферного раствора для электрофореза, а поскольку сопротивление агарозного геля электрическому току мало отличается от сопротивления буферного раствора, то значительная доля тока будет проходить через гель.

3. Аккуратно вынуть из геля гребенку. Промыть лунки агарозного геля буферным раствором TAE с помощью пастеровской пипетки, чтобы удалить возможные пузырьки воздуха. В каждую лунку под электрофорезным буферным раствором аккуратно внести микропипеткой по 10–25 мкл проб ДНК, предварительно смешанных с 2–5 мкл 6× буферного раствора для внесения проб, содержащего краситель (как правило, бромфеноловый синий, иногда еще дополнительно добавляют ксиленцианол и оранжевый G) (рис. 3.3). Максимальное количество ДНК, которое можно внести в лунку, зависит от концентрации и размеров фрагментов ДНК в пробе. Желательно не переполнять лунки, поскольку при содержании более 500 нг ДНК в лунке шириной 0,5 см при окрашивании будет наблюдаться расплывчатая полоса со шлейфом, особенно выраженная при наличии крупных фрагментов ДНК в пробе. Концентрация ДНК должна составлять 20–500 нг для 0,5-см лунки, оптимально — 100–200 нг.

Красители, содержащиеся в буферном растворе для внесения проб, значительно облегчают точное нанесение ДНК в лунку агарозного геля и позволяют визуально наблюдать перемещение пробы в ходе электрофореза, а также оптимизировать время его прохождения. Однако эти красители иногда могут мешать наблюдению фрагментов ДНК в геле под ультрафиолетовым светом.

В качестве стандартных маркеров, движущихся в геле с той же скоростью, что и фрагменты ДНК соответствующих размеров, рекомендуется использовать, например, 10 kb MassRuler™ DNA Ladder

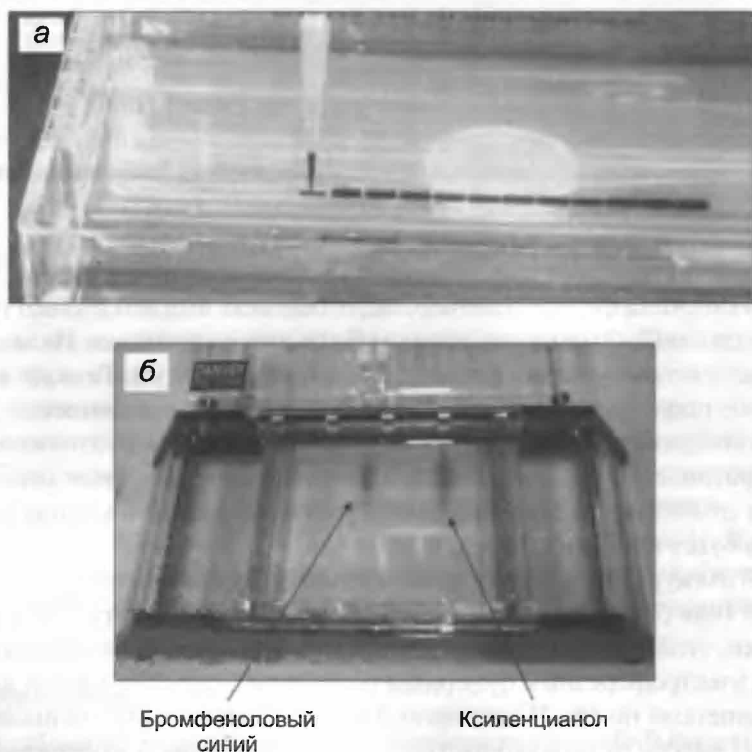


Рис. 3.3. Электрофорез в агарозном геле: а) нанесение проб ДНК в лунки геля; б) распределение полос красителей (бромфеноловый синий и ксиленицианол), содержащихся в стандартном буферном растворе для внесения проб

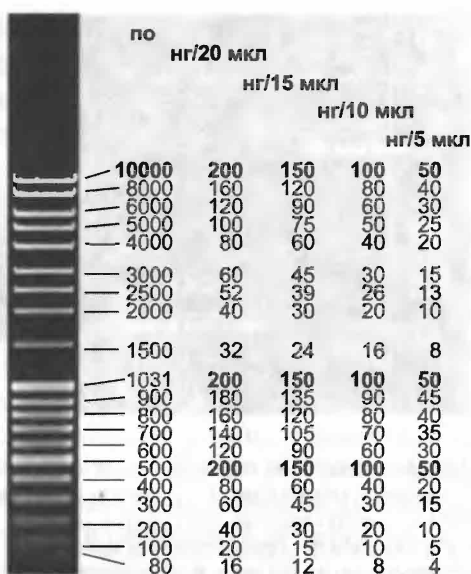
(«Fermentas», Литва) или 200–10 000 bp SmartLadder («Eurogentec», Бельгия). Маркеры вносят по 1–5 мкл (~0,1 мкг/мкл) в крайние лунки геля для оценки качественного и количественного состава низкомолекулярных фрагментов ДНК. Так, маркер MassRuler™ DNA Ladder позволяет оценить размер фрагмента ДНК (относительную молекулярную массу) от 80 до 10 000 по и концентрацию ДНК в пробе, определяемую путем сравнения интенсивности флуоресценции соответствующих фрагментов ДНК, от 16 до 200 нг/20 мкл (рис. 3.4).

Маркером, состоящим из линейных фрагментов ДНК, нельзя пользоваться для оценки размера кольцевых молекул. ДНК маркеры необходимо хранить при -20°C и разводить, если требуется, стерильной деионизованной водой перед нанесением в лунку геля.

4. Закрывать кювету для электрофореза крышкой, подключить электроды в правильной полярности, включить блок питания (соблюдая технику безопасности при работе с электроприборами!) и осу-

Рис. 3.4. Маркер MassRuler™ DNA Ladder Mix (80–10000 по) для оценки размера и концентрации фрагментов ДНК в 1%-ном агарозном геле (согласно изображению из каталога компании «Fermentas», Литва)

шестить электрофорез в 0,5–1× TAE буферном растворе при напряжении 60–120 В (стандартная напряженность около 15 В/см); при более высокой напряженности полосы ДНК могут изогнуться. Молекулы ДНК перемещаются от «–» (катод) к «+» (анод). Продолжительность электрофореза составляет приблизительно 1–2 ч в зависимости от на-



пряжения, за это время краситель бромфеноловый синий, входящий в состав буферного раствора для внесения проб, проходит почти всю длину геля (примерно до отметки, соответствующей расположению фрагмента ДНК размером 500 по).

5. После электрофореза отключить прибор от сети, аккуратно извлечь агарозный гель и поместить его в ванночку с водным раствором флуоресцирующего красителя бромистого этидия (конечная концентрация 0,5–1 мкг/мл) на 15–30 мин для окрашивания ДНК, а затем отмыть в течение 5–10 мин в ванночке с водой.

Внимание: работать с бромистым этидием, являющимся сильным мутагеном, необходимо обязательно в перчатках!

После электрофореза промыть кювету, ванночку-подложку, а также гребенки для формирования лунок несколько раз дистиллированной водой.

При определении очень малых количеств ДНК (< 10 нг) рекомендуется выдержать агарозный гель в 1 мМ MgSO₄ в течение 1 ч для снижения фоновой флуоресценции из-за несвязавшегося красителя. Проанализировать и сфотографировать гель под проходящим длинноволновым ультрафиолетовым светом (рис. 3.5). Источником УФ излучения служит трансиллюминатор для анализа гелей (рис. 3.6).

Внимание: УФ излучение опасно для глаз и кожных покровов, поэтому проводить анализ агарозных гелей необходимо в специальных очках или пользуясь защитным экраном трансиллюминатора.



Рис. 3.5. Агарозный гель (1%) после электрофореза обработанных рестрицирующими эндонуклеазами фрагментов ДНК. Гель окрашен флуоресцирующим красителем бромистым этидием. В крайние лунки внесен маркер (pUC18—HaeIII)



Рис. 3.6. Трансillюминатор для просмотра гелей в ультрафиолетовом свете производства «BioSystematica» (Великобритания)

Дополнения к методике

К п. 1. Если требуется приготовить щелочной гель, то в расплавленную и остуженную до 60°C агарозу добавляют NaOH (до конечной концентрации 50 мМ) и ЭДТА (до конечной концентрации 1 мМ). NaOH—ЭДТА буферный раствор для щелочного электрофореза необходимо готовить свежим перед экспериментом.

К п. 3. Слишком большое количество ДНК, внесенное в лунку, может привести к изменению подвижности полосы в агарозном геле (идет быстрее) и к заниженной оценке количества ДНК в пробе при визуальном сравнении с маркером после окрашивания бромистым этидием.

Если отдельные лунки в агарозном геле плохо видны, то можно добавить немного буферного раствора для внесения ДНК с красителем поверх зоны лунок с помощью микропипетки, а через 1 мин промыть лунки посредством пастеровской пипетки. Краситель диффундирует в гель и лунки становятся ясно видимыми. Можно также аккуратно подложить под гель кусочек старой фотопленки для лучшей визуализации лунок.

Электрофорез в 0,8–1%-ном агарозном геле можно применять в качестве быстрого способа определения количества двухцепочечной ДНК в пробе, особенно если она содержит значительные количества РНК. Для этого смешивают 10 мкл пробы ДНК, а также по 10 мкл

стандартных растворов ДНК (0,5–20 мкг/мл) с 2 мкл 6х раствора для внесения проб (не содержащего ксиленианол) и вносят каждую смесь в соответствующую лунку агарозного геля с бромистым этидием (0,5 мкг/мл). Разумеется, во избежание погрешностей при оценке количества ДНК в экспериментальной пробе необходимо использовать стандартные растворы, содержащие ДНК аналогичного размера. Провести электрофорез в течение непродолжительного периода времени (фронт красителя должен продвинуться максимум на 2 см), затем отмыть гель от красителя погружением его в 1х ТАЕ буферный раствор с 0,01 М $MgCl_2$ на 5–10 мин. Определить концентрацию ДНК путем сравнения интенсивности флуоресценции между экспериментальной и стандартными пробами.

Кп. 5. Для более полного окрашивания возможно внесение бромистого этидия непосредственно в остуженный до ~50°C агарозный гель перед заливкой в ванночку-подложку до конечной концентрации 0,5 мкг/мл, а также в буферный раствор для электрофореза. В этом случае гель можно анализировать под ультрафиолетовым светом непосредственно после окончания электрофореза. Отметим, что в присутствии бромистого этидия электрофоретическая подвижность линейной двухцепочечной ДНК снижается примерно на 15%.

ЭКСПРЕСС-МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК ИЗ КОЛОНИИ *E. coli* ДЛЯ АНАЛИЗА С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ

Для определения наличия вставки чужеродной ДНК в плазмиде иногда можно не выделять плазмидную ДНК из трансформантов с последующим ее расщеплением рестрицирующими эндонуклеазами или не использовать ПЦР с соответствующими праймерами. В некоторых случаях можно ограничиться непосредственным определением размера ДНК с помощью электрофореза в агарозном геле, используя описанную ниже методику в качестве экспресс-метода анализа большого числа трансформантов.

Необходимые реактивы и растворы:

- лизирующий буферный раствор следующего состава: 50 мМ NaOH; 0,5% ДСН; 5 мМ ЭДТА и 0,025% бромкрезолового зеленого;
- 25%-ный фикол (Ficoll).

Методика

1. Получить колонии трансформантов большого размера (около 3 мм), выросших на агаризованной среде LB с соответствующим антибиотиком.

2. Перенести колонию с помощью стерильной зубочистки в микроцентрифужную пробирку с **25 мкл** лизирующего буферного раствора. Суспендировать колонию путем осторожного перемешивания.

3. Инкубировать закрытую пробирку при 68°C в течение 45–60 мин до полного лизиса клеток.

4. Добавить к пробе **2,5 мкл** 25%-ного фикола, перемешать и нанести смесь в лунку 0,7%-ного агарозного геля без добавления бромистого этидия.

5. Провести электрофорез и окрасить гель водным раствором бромистого этидия (0,5 мкг/мл) в течение 45 мин. Надо отметить, что в ходе электрофореза в агарозном геле скорость перемещения сверхспиральной ДНК точнее отражает ее молекулярную массу в отсутствие бромистого этидия (который дает 15–20%-ную погрешность).

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ РНК В АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ

Идентификация и разделение молекул РНК различных размеров посредством электрофореза в 0,8–1,5%-ном горизонтальном агарозном геле в целом идентичны электрофорезу ДНК за исключением тщательного освобождения растворов и соприкасающегося с гелем электрофорезного оборудования от РНКаз. Электрофорез можно использовать и для оценки качества мРНК, используемой для ПЦР с обратной транскрипцией — большинство мРНК видны в агарозном геле в виде пятна размером 1500–2000 оснований.

При постановке электрофореза РНК необходимо применять *свободные от РНКаз* пробирки и наконечники для автоматических пипеток, а также обязательно работать в одноразовых перчатках. ТАЕ буферный раствор следует готовить на водном растворе *диэтилпи-рокарбоната* (DEPC, 2 мл/л) для инактивации РНКаз. Допускается применение ТАЕ буферного раствора (в том числе и для приготовления агарозного геля) без добавления диэтилпи-рокарбоната, если готовить его на дважды проавтоклавированной свежей деионизованной воде. Агарозный гель также необходимо предварительно *автоклавировать* либо использовать агарозу, свободную от РНКаз (например, Agarose Multi Purpose производства компании «Roche Diagnostics», Швейцария).

Электрофорезные кюветы, подложки под гель и гребенки обрабатывают 1%-ным ДСН, затем несколько раз промывают стериль-

ной водой и 100%-ным этанолом, замачивают в 3%-ной перекиси водорода в течение 10 мин. Непосредственно перед использованием кюветы промывают DEPC-H₂O. Также применяется способ обработки электрофорезного оборудования стерильным 1 М раствором NaOH в течение 3 ч, а затем стерильной деионизованной водой (*только в этом случае надо использовать оборудование из устойчивого к щелочам пластика!*). Часто электрофорезные кюветы обрабатывают специальным раствором для инактивации РНКаз на поверхности оборудования, например RNaseZAP («Invitrogen», США), в таком случае обработки диэтилпирокарбонатом и другими соединениями не требуется.

Надо отметить, что сродство красителя бромистого этидия к одноцепочечной РНК гораздо меньше, чем к двухцепочечной ДНК, и флуоресценция в случае РНК будет более слабой.

Методика

1. В каждую лунку агарозного геля нанести 1–20 мкл образца РНК, смешанного с 5 мкл водного раствора DEPC (2 мл/л) для ингибирования РНКаз и с 1–2 мкл буферного раствора для внесения проб РНК (например, RNA Gel Buffer производства компании «Fermentas», Литва). Состав буферного раствора для внесения проб РНК см. в прил. 1. Существует достаточно большое количество маркеров молекулярной массы, применяемых для определения размеров фрагментов РНК при электрофорезе; в качестве таких маркеров можно использовать также бактериальную 23S (2900 оснований) и рибосомальную 16S (1550 оснований) РНК.

Примечание. Вместо водного раствора диэтилпирокарбоната образец РНК можно смешать (в соотношении 1 : 2) с буферным раствором следующего состава: деионизованный формамид — 10 мл; 37%-ный формальдегид — 3,5 мл и MOPS 5× — 2 мл. Такой раствор хранится в 500-мкл аликвотах при –20°С до 6 мес. *При приготовлении раствора необходимо соблюдать правила техники безопасности, поскольку формамид и формальдегид являются канцерогенами!*

2. Провести электрофорез в стерильном 0,5–1× TAE буферном растворе при напряжении 60–100 В. Отрицательно заряженные молекулы РНК перемещаются от «–» к «+». Продолжительность электрофореза составляет приблизительно 1–1,5 ч. Бромистый этидий (0,5 мкг/мл) лучше добавить непосредственно в TAE буферный раствор, а также в агарозный гель во избежание возможной деградации РНК при окраске геля после электрофореза и его промывке водой.

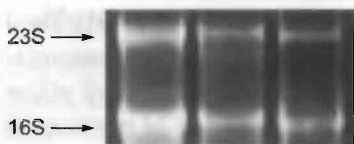


Рис. 3.7. Электрофорез тотальной РНК в 1%-ном агарозном геле

3. Сфотографировать гель под ультрафиолетовым светом, полосы 16S и 23S рРНК должны быть ясно видны (фотография классического электрофореза тотальной РНК приведена на рис. 3.7).

3.2.

ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ИЗ АГАРОЗНОГО ГЕЛЯ

Известно много способов извлечения нужного фрагмента ДНК из агарозного геля, но большинство из них сталкивается с двумя основными проблемами: а) загрязнением большинства сортов агарозы сульфатированными полисахаридами, которые экстрагируются из геля вместе с ДНК и сильно ингибируют многие ферменты (рестрицирующие эндонуклеазы, лигазы, полимеразы, киназы), часто используемые в ходе последующих этапов эксперимента, и б) зависимостью эффективности экстракции фрагментов ДНК от их молекулярных масс. Фрагменты величиной менее 1 тпо могут быть выделены из агарозного геля с очень высоким выходом (более 95%), но извлечение фрагментов крупнее 20 тпо редко происходит с выходом выше 15–20%. Для быстрого и эффективного выделения ДНК из агарозного геля широко применяются наборы DNA Extraction Kit («Fermentas», Литва); JETSORB DNA Extraction Kit («Genomed GmbH», Германия); MinElute Gel Extraction Kit («Qiagen», Нидерланды); GeneClean Kit («MP Biomedicals», США).

Существуют также специальные сорта агарозы, в молекулы которой введены гидроксильные группы, что обеспечивает температуру плавления около 65°C и застывание геля при 30°C. В этом случае нуклеиновые кислоты выделяют из геля простым нагревом при 65–68°C в пяти объемах (относительно веса вырезанного фрагмента геля) 0,5х буферного раствора ТЕ и проводят стандартную экстракцию нуклеиновых кислот водонасыщенным фенолом.

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ АГАРОЗНОГО ГЕЛЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ DNA EXTRACTION KIT ПРОИЗВОДСТВА «FERMENTAS» (ЛИТВА)

Данный метод представляет собой очень быстрый и удобный способ выделения двухцепочечной и одноцепочечной ДНК разме-

ром 0,2–12 т(п)о. Метод основан на растворении легкоплавкой агарозы с помощью раствора NaI и связывании молекул ДНК кварцевым порошком (SiO_2), поставляемым в наборе. Элюция ДНК осуществляется низкосолевым буферным раствором или водой (рН 7,0–8,5). Эффективность выделения ДНК не ниже 80%. Полученный препарат ДНК является достаточно чистым для проведения стандартных молекулярно-биологических процедур. Однако необходимо иметь в виду, что очистка ДНК с использованием кварцевых частиц может привести к ее частичной денатурации, поэтому использование такого препарата для последующей обработки эндонуклеазами рестрикции не очень желательно.

Методика

1. Провести разделение фрагментов ДНК посредством электрофореза в агарозном геле и установить местоположение полосы с нужным фрагментом ДНК под ультрафиолетовым светом (предварительно протерев спиртом стекло трансиллюминатора для обеспечения стерильности). *Надо иметь в виду, что коротковолновое УФ излучение (254 нм) приводит к повреждению молекул ДНК и резко снижает эффективность последующего клонирования, поэтому работать с гелем необходимо очень быстро либо использовать длинноволновый (365 нм) УФ.*

2. С помощью стерильного острого скальпеля или бритвенного лезвия вырезать полосу агарозного геля, содержащую необходимый фрагмент ДНК. Перенести полосу геля в предварительно взвешенную стерильную микроцентрифужную пробирку с помощью пинцета. При вырезании геля под ультрафиолетовым светом *необходимо* использовать специальные очки или защитный экран для предохранения глаз и кожных покровов. Вырезанную полосу геля можно хранить при -20°C в течение нескольких дней.

3. Добавить **3 объема** (1 г геля принимается равным 1 мл) раствора NaI из набора (раствор хранить при 4°C в темноте). Инкубировать при 55°C в течение 5 мин или до полного растворения агарозы при перемешивании. Цвет раствора, содержащего индикатор крезол красный, должен быть желтым; если он приобрел красную окраску, надо добавить 1–5 мкл 3 М ацетата натрия (рН 5,0). Адсорбция ДНК (в особенности небольших фрагментов размером меньше 500 по) частицами кварцевого порошка резко уменьшается при $\text{pH} > 7,5$.

4. Добавить **10 мкл** суспендированного в воде (*перемешать перед экспериментом!*) кварцевого порошка для связывания молекул ДНК. Очень аккуратно перемешать смесь и инкубировать при 55°C в тече-

ние 5 мин для улучшения адсорбции ДНК. Емкость кварцевого порошка составляет > 2 мкг линейной двухцепочечной ДНК (размером 3 тпо) на 1 мкл суспензии.

5. Центрифугировать на настольной центрифуге при 15 700 g в течение 5 с. Тщательно отобрать супернатант микропипеткой и хранить его при -20°C на случай низкого выхода ДНК для возможности повторного выделения. Осадок представляет собой комплекс кварцевого порошка с ДНК.

6. Трижды промыть осадок от примесей с помощью **500 мкл** холодного промывного буфера с добавлением 95%-ного этанола (1 : 1), перемешивать пипетированием (или на вортексе, если размер фрагментов ДНК не превышает 5 тпо). Центрифугировать на настольной центрифуге при 15 700 g в течение 5 с. Тщательно и аккуратно удалить надосадочную жидкость микропипеткой, подсушить осадок на воздухе или под вакуумом в течение 5–7 мин. Если фрагмент ДНК предназначен для последующей электропорации, дополнительно промыть осадок один раз 80%-ным этанолом.

7. Добавить к осадку **10 мкл** деионизованной воды или буферного раствора TE (pH 8,0), перемешать на вортексе и инкубировать при 55°C в течение 5 мин (перемешав во время инкубации один раз постукиванием по пробирке). Центрифугировать на настольной центрифуге при 15 700 g в течение 5 с и перенести надосадочную жидкость в новую микроцентрифужную пробирку. Повторить элюцию ДНК с кварцевого порошка новой **10-мкл** порцией воды или буферного раствора TE. Центрифугировать и объединить полученные надосадочные жидкости, тщательно избегая захвата осадка кварцевого порошка. Повторная элюция увеличивает выход ДНК на 10–20%.

8. Центрифугировать на настольной центрифуге при 15 700 g в течение 30 с для удаления следов кварцевого порошка, перенести готовый к использованию в молекулярно-биологических экспериментах препарат ДНК (**20 мкл**) в новую микроцентрифужную пробирку и хранить при -20°C . Отобрать аликвоту (1–2 мкл) и определить концентрацию фрагмента ДНК в препарате с помощью электрофореза в агарозном геле.

Дополнения к методике

К п. 3. Большие полосы геля (весом свыше 300 мг) могут потребовать несколько большего времени для полного растворения агарозы. После этого рекомендуется дополнительная инкубация в течение 5 мин. С помощью данного набора можно также очищать ДНК

из растворов, добавив 2,5–3 объема раствора NaI и инкубировав в течение 30–45 мин во льду (далее по пунктам).

К п. 6. Для качественного выделения ДНК очень важно полностью (количественно) удалить остатки промывного буфера, включая мелкие капли на стенке микроцентрифужной пробирки. Перед тем как осуществлять элюцию ДНК, осадок должен быть освобожден от следов этанола, который может ингибировать последующие реакции при молекулярном клонировании. Полностью высушенный осадок имеет снежно-белый цвет, однако пересушивание осадка также недопустимо, так как это может привести к низкому выходу ДНК. При использовании мощных вакуумных насосов время сушки должно составлять 1–2 мин, оптимальным способом является высушивание осадка в открытой микроцентрифужной пробирке при 50°C в течение 10 мин.

К п. 7. Выход фрагментов ДНК большого размера можно увеличить, используя инкубацию при 60°C в течение 10–15 мин.

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ АГАРОЗНОГО ГЕЛЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ JETSORB DNA EXTRACTION KIT ПРОИЗВОДСТВА «GENOMED GmbH» (ГЕРМАНИЯ)

Достаточно схожий принцип выделения ДНК из агарозного геля положен в основу применения набора JETSORB производства компании «Genomed GmbH» (Германия), позволяющего быстро выделять ДНК (кроме суперскрученных плазмидных ДНК) из агарозных гелей с очень высокой степенью очистки и выходом (более 80%), зависящим от размера и количества ДНК. Методика также включает в себя вырезание и растворение в специальном буферном растворе полосы агарозного геля, содержащей нужный фрагмент ДНК; связывание молекул ДНК суспензией JETSORB (7,5 мкг ДНК/10 мкл суспензии) при 50°C; промывку комплекса ДНК–JETSORB промывными буферными растворами с высоким и низким содержанием солей (последний содержит этанол) и элюцию ДНК при помощи буферного раствора TE или воды (инкубация при 50°C в течение 5 мин).

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ АГАРОЗНОГО ГЕЛЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ MINELUTE GEL EXTRACTION KIT ПРОИЗВОДСТВА «QIAGEN» (НИДЕРЛАНДЫ)

Набор предназначен для быстрого выделения из геля до 5 мкг фрагментов ДНК (размером от 70 до 4000 по) с высоким выходом в небольших элюирующих объемах. Он позволяет также проводить очистку одноцепочечных молекул ДНК.

Принцип выделения фрагментов ДНК основан на использовании микроколонок с кварцевыми мембранами под микроцентрифужные пробирки (MinElute Spin Columns), которые специфически адсорбируют фрагменты ДНК в условиях применения высокосолевого буферного раствора (содержит хаотропную соль — 5 М изотиоцианата гуанидина). Использование мембран позволяет избежать неудобств, связанных с освобождением проб от кварцевого порошка.

Агарозный гель растворяют при 50°C в высокосолеовом буферном растворе, содержащем рН-индикатор крезол красный для визуального определения оптимального рН для адсорбции ДНК мембраной (при $\text{pH} \leq 7,5$). Затем смесь после добавления изопропанола вносят в микроколону с кварцевой мембраной. В ходе центрифужной промывки буферными растворами, содержащими соответственно изотиоцианат гуанидина и 80%-ный этанол, происходит очистка препарата от остатков агарозы, праймеров, нуклеотидов, ферментов, солей, бромистого этидия и т.д. Промывной буфер для отмывки мембран от хаотропных солей должен содержать трис, поскольку незабуференный 80%-ный этанол денатурирует двухцепочечную ДНК.

Элюция ДНК с мембран в ходе центрифугирования при 17 900 g в течение 1 мин производится буферным раствором с низкой ионной силой (10 мМ трис-НСI; pH 8,5) или водой (pH 7,0–8,5). В последнем случае препарат выделенной ДНК необходимо хранить при –20°C во избежание ее деградации. Выделенные фрагменты ДНК можно непосредственно использовать для секвенирования, лигирования, обработки эндонуклеазами рестрикции, ПЦР, мечения при проведении гибридизации и т.д.

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ АГАРОЗНОГО ГЕЛЯ ПРИ ПОМОЩИ КОЛОНКИ ELUTIP-d

Колонки Elutip-d («Whatman»/«GE Healthcare», Великобритания) предназначены для высокоэффективного удаления невключившихся нуклеотидов и других примесей при радиоактивном мечении нуклеиновых кислот, но такие колонки нашли также широкое применение для выделения фрагментов ДНК из легкоплавких агарозных гелей. Матрикс стандартной колонки Elutip-d связывает нуклеиновые кислоты (до 100 мкг) в условиях низкого содержания солей в растворе, примеси вымываются через колонку, а ДНК затем элюируют при помощи высокосолевого буферного раствора. Полученный высокоочищенный препарат ДНК пригоден для большинства молекулярно-биологических исследований.

Необходимые реактивы и растворы:

- высокосолевого буферный раствор следующего состава: 1 М NaCl; 20 mM трис-HCl (pH 7,5); 1 mM ЭДТА; бидистиллированная вода. Приготовить 50 мл;
- низкосолевого буферный раствор следующего состава: 0,2 М NaCl; 20 mM трис-HCl (pH 7,5); 1 mM ЭДТА; бидистиллированная вода. Приготовить 100 мл;
- 3 М ацетат натрия, 96%-ный этанол, буферный раствор TE.

Методика

А. Вырезание ДНК из агарозного геля

1. Вырезать нужную полосу ДНК из агарозного геля и поместить ее в 5-мл шприц. Продавить гель через иглу в закрывающуюся пробирку объемом 15 мл.

2. Промыть шприц однократно **10 мл** низкосолевого раствора, собрать элюат в закрывающуюся пробирку и инкубировать при 37°C на водяной бане с перемешиванием в течение ночи.

Б. Подготовка колонки

1. Отрезать колонку Elutip-d как можно ближе к белому диску, снять верхнюю защитную крышку и присоединить колонку к открытому 2-мл шприцу.

2. Наполнить шприц **2 мл** высокосолевого раствора и аккуратно продавить его в колонку для промывки наполнителя колонки, избегая противодействующего давления.

3. Наполнить 10-мл шприц **5 мл** низкосолевого раствора, присоединить шприц к колонке и залить ее раствором.

В. Связывание ДНК

1. Отсоединить колонку от шприца. Открыть шприц и присоединить к нему 0,45-мкм целлюлозоацетатный фильтр. Присоединить фильтр к колонке для удаления частичек геля, которые могут засорить колонку.

2. Наполнить шприц раствором ДНК и продавить его очень медленно и аккуратно через фильтр и колонку. Скорость потока пробы через колонку должна равняться 1–2 мл/мин.

3. Отсоединить колонку и фильтр от шприца. Открыть шприц, повторно соединить его с фильтром и наполнить его **2–3 мл** низкосолевого раствора. Промыть шприц и фильтр.

4. Отсоединить фильтр от шприца, присоединить открытый 2-мл шприц к колонке без фильтра между ними и наполнить шприц **0,4 мл** высокосолевого раствора.

5. Элюировать ДНК с колонки в 1,5-мл микроцентрифужную пробирку путем медленного и аккуратного продавливания через нее высокосолевого раствора.

6. Добавить к препарату **1/10 объема** 3 М ацетата натрия и **2 объема** 96%-ного этанола. Инкубировать при -70°C в течение 1 ч или при -20°C в течение ночи.

7. Осадить ДНК, промыть осадок один раз 70%-ным этанолом и растворить его в **12 мкл** буферного раствора ТЕ. Проверить 2 мкл препарата электрофорезом в 0,8–1%-ном агарозном геле.

ЭЛЕКТРОЭЛЮИРОВАНИЕ ДНК С ПОСЛЕДУЮЩЕЙ ОЧИСТКОЙ НА DEAE-СЕФАЦЕЛЕ

Фрагмент двухцепочечной ДНК можно полностью элюировать из горизонтального агарозного геля в вырезанную в геле ванночку (метод Хогнесса). Затем отрицательно заряженные молекулы ДНК адсорбируются положительно заряженным DEAE (ДЭАЭ, диэтил-аминоэтил целлюлоза) ионообменником в низкосолевым буферном растворе. Элюция ДНК с DEAE-колонки осуществляется высокосолевым буфером. Этот дешевый метод дает очень хороший выход даже для относительно крупных (до 15 тпо) фрагментов ДНК, но он требует много времени и постоянного контроля. Наиболее эффективно выделяются фрагменты ДНК размером до 5 тпо. Перед использованием в ферментативных реакциях собранную ДНК необходимо очистить от DEAE-Сефацеля.

Необходимые реактивы и растворы:

- буферный раствор I следующего состава: 10 мМ трис- HCl (pH 7,6); 1 мМ ЭДТА и 60 мМ NaCl . Хранить при 4°C ;
- буферный раствор ТЕ (pH 7,6) (см. прил. 1); буферный раствор ТЕ, содержащий 0,6 М NaCl ; буферный раствор ТЕ, содержащий 0,3 М NaCl ; буферный раствор ТЕ, содержащий 0,1 М NaCl ;
- фенол, хлороформ, этанол.

Методика

А. Электроэлюирование ДНК

1. Провести разделение фрагментов ДНК посредством электрофореза в агарозном геле с бромистым этидием (0,5 мкг/мл), установить под длинноволновым ультрафиолетовым светом местоположение необходимой полосы.

2. Стерильным скальпелем аккуратно вырезать ванночку перед

передним краем полосы, причем длина и ширина ванночки должны быть примерно на 2 мм больше соответствующих размеров полосы.

3. Заполнить ванночку буферным раствором для электрофореза и еще раз провести электрофорез. Необходимо каждые 2–3 мин отбирать микропипеткой жидкость из ванночки и заполнять ее свежим буферным раствором до тех пор, пока вся ДНК из полосы не выйдет из агарозного геля в жидкость.

4. Очистить собранную ДНК хроматографией на DEAE-Сефацеле.

Б. Очистка ДНК на DEAE-Сефацеле

1. Добавить к DEAE-Сефацелю низкосолевого буферный раствор I и поместить 0,6 мл суспензии DEAE-Сефацеля (этого количества достаточно для связывания 20 мкг ДНК) в небольшую колонку.

2. Промыть колонку последовательно 3 мл буферного раствора TE (pH 7,6) с 0,6 М NaCl, 3 мл буферного раствора TE и 3 мл буферного раствора TE с 0,1 М NaCl.

3. Нанести на колонку ДНК в буферном растворе для электрофореза. Собрать раствор, прошедший через колонку, и пропустить его через колонку еще раз для более полного связывания ДНК с DEAE-Сефацелем.

4. Промыть колонку дважды 1,5 мл буферного раствора TE с 0,3 М NaCl.

5. Элюировать ДНК с помощью 0,5 мл буферного раствора TE с 0,6 М NaCl. Повторить элюцию с колонки еще два раза. Элюат можно хранить при 4°C в течение нескольких дней или при –70°C неограниченное время.

6. Экстрагировать собранный элюат фенолом, смесью фенол : хлороформ и хлороформом, осадить ДНК 96%-ным этанолом.

7. Промыть осадок ДНК 70%-ным этанолом, высушить осадок и растворить его в 15–20 мкл буферного раствора TE или в деионизованной воде.

3.3.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ ДНК В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

Вертикальный электрофорез ДНК в полиакриламидных гелях (ПААГ) в основном используют для идентификации и выделения линейных фрагментов ДНК, имеющих длину существенно меньше 1 тпо. Гели могут содержать разные концентрации полиакриламида (от 2,5 до 20%) в зависимости от размера анализируемых фрагментов. Например, 12%-ный ТАЕ-полиакриламидный гель применяется для эффективного разделения фрагментов ДНК величиной 40–200 нуклеотидов. В 20%-ном полиакриламидном геле можно разделить фраг-

менты, состоящие всего из 6 оснований и различающиеся по одному нуклеотиду.

При использовании данного метода фрагменты ДНК перемещаются в полиакриламидном геле, который представляет собой инертный матрикс с высоким содержанием поперечных сшивок. ПААГ образуется при сополимеризации акриламида и *бис*-акриламида, использующегося для сшивания линейных полимеров акриламида. Как правило, гель готовят путем полимеризации мономеров непосредственно перед экспериментом. Размер ячеек в полиакриламидной «сетке» определяется концентрацией акриламида и соотношением между акриламидом и *бис*-акриламидом в геле. Полиакриламидные гели заливают между двумя стеклянными пластинами, разделенными прокладками, и ведут разделение фрагментов ДНК в вертикальном положении геля.

Необходимые реактивы и растворы:

- 12%-ный ТАЕ-полиакриламидный гель следующего состава (расчет на приготовление двух гелей, объемом по 6 мл): 40%-ный акриламид (растворить 38,7 г акриламида и 1,3 г N,N'-метилен-*бис*-акриламида в 60 мл воды при 37°C, довести до 100 мл водой стандарта Milli-Q) — 3,6 мл; 10× ТАЕ буферный раствор — 1,2 мл; 10%-ный раствор персульфата аммония (ПСА) в 1× ТАЕ — 0,1 мл; TEMED (N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин) — 20 мкл; довести водой до 12 мл. Инициаторы полимеризации TEMED и персульфат аммония добавляют непосредственно перед заливкой геля.

Примечание. Акриламид является высокотоксичным соединением (нейротоксином) и быстро проникает через кожные покровы. При работе с ним необходимо обязательно использовать перчатки и защитную маску! Раствор акриламида можно хранить в темноте при 4°C (стабилен в течение нескольких месяцев). Водный раствор персульфата аммония нестабилен и может храниться при 4°C не дольше двух недель. TEMED обладает неприятным запахом.

Таблица 3.1

Состав полиакриламидных гелей

Компоненты	Полиакриламидный гель, %				
	3,5%	5,0%	8,0%	12,0%	20,0%
1	2	3	4	5	6
40%-ный акриламид, мл	4,40	6,25	10,00	15,00	25,00
Деионизованная H ₂ O, мл	40,18	38,33	34,58	29,58	19,58

1	2	3	4	5	6
10× TAE буферный раствор, мл	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
10%-ный персульфат аммония, мл	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42
Общий объем, мл	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00
Диапазон эффективного разделения линейных фрагментов ДНК, по	90–1000	80–500	60–400	40–200	5–100

Методика

1. Приготовить стеклянные пластины (наружные и внутренние) для заливки геля. Пластины необходимо предварительно тщательно вымыть в растворе теплого детергента (например, ДСН), а затем ополоснуть дистиллированной водой и этанолом, держа стеклянные пластины в перчатках. Электрофорезную кювету, зажимы и тефлоновую гребенку для формирования лунок также необходимо хорошо вымыть и высушить при комнатной температуре.

После добавления TEMED к раствору акриламида немедленно перемешать гель и аккуратно залить его в пространство между стеклянными пластинами и боковыми разделительными полосками («спейсерами»). Вставить сверху гребенку, тщательно избегая попадания в гель пузырьков воздуха (для этого гребенку надо вставлять под углом) и утечки геля. Основания зубцов гребенки должны располагаться немного выше верха стеклянной пластины. Акриламид полимеризуется при комнатной температуре примерно за 45–60 мин. Аккуратно удалить гребенку и сполоснуть сформировавшиеся в геле лунки водой. Пластины с ПААГ, завернутые в полимерную пленку, можно хранить при 4°C в течение нескольких недель.

2. После полимеризации геля прикрепить стеклянные пластины к электрофорезной кювете зажимами и заполнить камеру буферным раствором для электрофореза (1× TAE), аккуратно удалив микропипеткой пузырьки воздуха, скопившиеся под гелем. Резиновую прокладку-уплотнитель для обеспечения герметичности системы предварительно слегка смазать силиконовой смазкой.

3. Осторожно внести в лунки буферный раствор для электрофореза, чтобы полосы ДНК получились четкими и ровными. Нанести в каждую лунку под слой буфера по 25 мкл пробы ДНК, смешанной с 2,5 мкл красителя, содержащего глицерин («Fermentas», Литва). В качестве стандартного маркера рекомендуется использовать, например, 50 bp DNA Ladder (0,1 мг/мл, производства литовской компании «Fermentas»), вносимого в количестве 5 мкл на лунку. Емкость полиакриламидного геля достаточно велика и это позволяет нано-



Рис. 3.8. Аппарат для вертикального электрофореза в полиакриламидном геле BioRad Mini-PROTEAN 3 Cell производства «Bio-Rad» (США) и кюветы для геля с зажимами для стекол и гребенкой производства «АТТО» (Япония)

силь до 1 мкг ДНК на полосу в лунку размером $0,5 \times 0,2$ см (при анализе олигонуклеотидов часто вносят от 0,5 до 5 мкг препарата на лунку).

4. Осуществить электрофорез в $1 \times$ TAE буферном растворе при напряжении $\sim 140\text{--}200$ В (стандартная напряженность $1\text{--}8$ В/см, иногда до 30 В/см), используя прибор для электрофореза в полиакриламидных гелях — например, BioRad Power Pac 300 или BioRad Mini-PROTEAN 3 Cell («Bio-Rad», США), изображенный на рис. 3.8. Анодный электрод (+) должен быть подключен ко дну электрофорезной камеры. В 12%-ном неденатурирующем ПААГ краситель ксиленианол мигрирует до отметки, соответствующей 60–70 по, а бромфеноловый синий — до отметки 20–25 по.

5. После электрофореза осторожно извлечь стеклянные пластины с гелем из кюветы и аккуратно поместить гель вместе с нижней стеклянной пластиной в раствор бромистого этидия (0,5 мкг/мл) в $1 \times$ TAE буферном растворе на 10–45 мин для окрашивания (можно при медленном покачивании), а затем отмыть в течение 5–7 мин в воде.

6. Провести анализ геля после окрашивания бромистым этидием под ультрафиолетовым светом (250–270 нм), сфотографировать гель. Надо отметить, что полиакриламид гасит флуоресценцию бромистого этидия, поэтому пределом разрешения при электрофорезе в полиакриламидных гелях является 10 нг ДНК на полосу.

Дополнения к методике

К п. 1.

1. Для освобождения полиакриламидного геля от кислорода, который подавляет полимеризацию, рекомендуется перед внесением TEMED дегазировать раствор акриламида в колбе, подсоединенной к вакуумному насосу, в течение 5 мин. Иногда концентрацию растворенного кислорода в растворе акриламида уменьшают путем барботирования аргоном через длинную иглу. Реакцию полимеризации ПААГ можно также ускорить, если поместить гель в термостат на 37–50°C.

2. Чтобы кювета со стеклянными пластинами для электрофореза исключала утечку ПААГ, перед заливкой геля ее устанавливают в ванночку с расплавленной 2%-ной агарозой для герметизации нижнего шва. Расплавленную агарозу рекомендуется нанести также и сбоку, вдоль «спейсеров».

3. Для электрофореза нуклеиновых кислот в полиакриламидном геле часто используют трис-боратный (ТБЕ) буферный раствор, поскольку он имеет более высокую буферную емкость, чем ТАЕ буферный раствор.

К п. 3. Некоторые протоколы рекомендуют использовать для внесения проб в лунки ПААГ (особенно при электрофорезе олигонуклеотидов) раствор, представляющий собой 50–100%-ный формамид с несколькими красителями в концентрации 0,01–0,05%. Для наблюдения полос олигонуклеотидов лучше использовать краситель OrangeG, поскольку его фронт идет очень низко и не мешает визуализации фрагментов малого размера в ПААГ под ультрафиолетовым светом.

К п. 5. Олигонуклеотиды малого размера (до 20 оснований) окрашивают с помощью SYBR Green (максимальная чувствительность 1 нг) или метиленового синего.

Дополнение. Очень хорошей альтернативой полиакриламидным гелям являются гели **Spreadex®** («Elchrom Scientific AG», Швейцария), основанные на мономере N-акрилоил-трис(гидроксиметил)-аминаметане (NAT). Гели Spreadex, применяемые для точного анализа фрагментов ДНК в диапазоне от 20 до 100 по, имеют разрешающую способность в 3 раза выше, чем полиакриламидные гели. Гели Poly(NAT) того же производителя обеспечивают высокое разрешение в более широком диапазоне размеров фрагментов ДНК (до 2000 по), тогда как гели Clearose® предназначены в основном для электрофореза РНК.

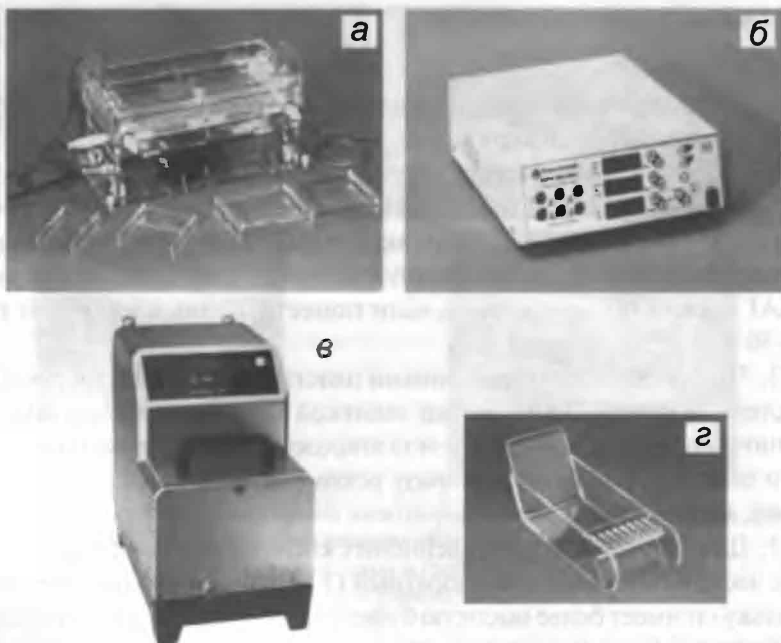


Рис. 3.9. Система Elchrom для гель-электрофореза («Elchrom Scientific AG», Швейцария), состоящая из электрофорезного аппарата SEA 2000 (а), блока питания (б), термостатированной водяной бани с циркуляционным насосом (в) и лотка для окрашивания гелей (г)

Компания «Elchrom Scientific AG» (Швейцария) выпускает специальные аппараты для электрофореза SEA 2000 (рис. 3.9), оснащенные системой подогрева/охлаждения и циркуляции буферного раствора, а также электродами, размещенными в плоскости геля, что обеспечивает постоянное электрическое поле. Электрофорез проходит в $1\times$ TAE буферном растворе при напряженности 10 В/см. Окрашивание геля производится посредством красителя SybrGold в темноте (5 мкл SybrGold/50 мл воды, чувствительность 0,4–4 нг ДНК в пробе).

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ ПОЛИАКРИЛАМИДНОГО ГЕЛЯ ПО МЕТОДУ МАКСАМА–ГИЛБЕРТА (MAXAM–GILBERT)

Необходимые реактивы и растворы:

- буферный раствор для элюции следующего состава: 0,5 М ацетат аммония; 1 мМ ЭДТА; pH 8,0;

- 96%-ный и 70%-ный этанол;
- 3 М ацетат натрия (pH 5,2);
- буферный раствор TE (pH 8,0) — см. приложение 1.

Методика

1. Провести электрофорез в полиакриламидном геле, окрасить гель бромистым этидием и найти нужную полосу ДНК под ультрафиолетовым светом.

2. Быстро вырезать полосу при помощи стерильного скальпеля или бритвенного лезвия. Перенести вырезанный кусок геля на стерильное (обработанное спиртом) стекло и разрезать гель на мелкие кусочки. Поместить их стерильным пинцетом в микроцентрифужную пробирку и добавить **1 объем** буферного раствора для элюции.

3. Проинкубировать при 37°C в течение 12 ч с вращением или покачиванием.

4. Центрифугировать пробу при 10 000 g в течение 20 мин при 20°C. Аккуратно собрать надосадочную жидкость микропипеткой, избегая захвата полиакриламидного геля.

5. Добавить к осадку **0,5 объема** буферного раствора для элюции, встряхнуть и отцентрифугировать снова. Объединить надосадочные жидкости после обоих центрифугирований.

6. Удалить оставшиеся фрагменты полиакриламидного геля путем фильтрования раствора, осадить ДНК 96%-ным этанолом.

7. Растворить ДНК в **200 мкл** буферного раствора для элюции, добавить **25 мкл** 3 М ацетата натрия и снова осадить ДНК 96%-ным этанолом.

8. Промыть осадок 70%-ным этанолом, высушить под вакуумом или на воздухе в течение 10–15 мин и растворить в небольшом объеме (15–50 мкл) буферного раствора TE (pH 8,0). Определить концентрацию ДНК на спектрофотометре и хранить препарат при –20°C.

Литература

1. *Auger L.T., Saunders G.F.* A simplified procedure for eluting mRNA from agarose gels // *Anal. Biochem.* 1977. V. 79. P. 338–348.
2. *Barnes W.M.* Plasmid detection and sizing in single colony lysates // *Science.* 1977. V. 195. P. 393–394.
3. *Brody J.R., Kern S.E.* History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis // *Anal. Biochem.* 2004. V. 333. P. 1–13.
4. *Garfin D.E.* Electrophoretic methods // *Introduction to Biophysical Methods for Protein and Nucleic Acid Research* / Eds. J.A. Glasel, M.P. Deutscher. San Diego: Academic Press, 1995. P. 53–109.

5. *Maniatis T., Fritsch E.E., Sambrook J.* Molecular Cloning — a Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982. P. 157–185.

6. *Maniatis T., Jeffrey A., van deSande H.* Chain length determination of small double- and single-stranded DNA molecules by polyacrylamide gel electrophoresis // *Biochemistry*. 1975. V. 14. P. 3787–3794.

7. *Sharp P.A., Sugden B., Sambrook J.* Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis // *Biochemistry*. 1973. V. 12. P. 3055–3063.

8. *Southern E.M.* Gel electrophoresis of restriction fragments // *Methods Enzymol.* 1979. V. 68. P. 152–176.

9. *Vogelstein B., Gillespie D.* Preparative and analytical purification of DNA from agarose // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979. V. 76. P. 615–619.

ТРАНСФОРМАЦИЯ КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК

Трансформация бактерий молекулами плазмидной ДНК представляет собой один из важнейших этапов в современной молекулярной биологии и генной инженерии микроорганизмов, а именно — клонирование и амплификацию малых и средних фрагментов рекомбинантной (чужеродной) ДНК в клетках.

Начало работам по трансформации было положено в 1970-х гг. с обнаружением значительного позитивного эффекта, оказываемого на поглощение ДНК и образование эписомных репликонов или интегративных рекомбинантов в ходе обработки клеток *E. coli* и *Salmonella typhimurium* растворами двухвалентных катионов (особенно, хлоридом кальция) при 0°C. Последующие исследования привели к более детальному изучению механизмов получения компетентных клеток, а также к нахождению условий и факторов для проведения высокоэффективной трансформации.

Плазмиды представляют собой небольшие внехромосомные генетические элементы — замкнутые кольцевые молекулы двухцепочечной ДНК с размером от 1 до 500 тпо, которые способны к автономной репликации в клетках микроорганизмов, даже если они ковалентно соединены с фрагментом чужеродной ДНК. На плазмиде находится сайт начала репликации *ori*, без которого репликация в бактериальной клетке невозможна. Плазмиды содержат гены, кодирующие ферменты, полезные для клеток микроорганизма-хозяина при определенных условиях. Однако существуют плазмиды, в которых не обнаружены гены с определенными функциями — так называемые криптические плазмиды (от «cryptic» — скрытый, латентный). Плазмиды очень широко применяются для создания новых конструкций ДНК, анализа экспрессии чужеродных генов, а также для секвенирования, создания библиотек кДНК и субклонирования библиотек геномных ДНК, созданных на основе бактериофага λ или космид (векторы, объединяющие в себе свойства плазмид и векторов на основе фага λ).

Основными фенотипическими признаками, сообщаемыми различными плазмидами, являются следующие: устойчивость к антибиотикам (R-плазмиды), способность к синтезу антибиотиков, об-

разование энтеротоксинов и колицинов, расщепление сложных органических соединений, использование сахаров, устойчивость к тяжелым металлам, образование ферментов рестрикции и модификации. В естественных условиях многие плазмиды передаются реципиентным бактериальным клеткам посредством конъюгации и схожих с ней процессов. F-плазмиды содержат информацию, обеспечивающую их собственный перенос из клетки-донора в клетку-реципиент. Обычно на долю плазмидной ДНК приходится от 0,1% до 5% суммарной ДНК клетки.

Различают также высококопийные плазмиды (представленные в клетке 10–100 копиями) и низкокопийные (1–4 копии в клетке). Кроме того, есть плазмиды с узким спектром хозяев (несут специфичный сайт инициации репликации), тогда как плазмиды с широким спектром хозяев способны реплицироваться в микроорганизмах, относящихся к разным видам. Существуют группы несовместимости плазмид — плазмиды, не способные к сосуществованию в одной и той же клетке, относятся к одной группе несовместимости; плазмиды разных групп несовместимости могут присутствовать в клетке независимо от выполняемых ими функций и числа копий.

Необходимо отметить, что сконструированные с помощью генно-инженерных методов плазмиды представляют собой высокоэффективные векторы для переноса фрагментов чужеродной ДНК в клетки. Такие плазмиды обладают небольшим размером (поскольку эффективность переноса экзогенной ДНК в *E. coli* резко снижается при величине плазмиды больше 15 тпо), содержат уникальные сайты рестрикции, по которым можно осуществить вставку фрагмента чужеродной ДНК (см. подглаву 7.1), а также селективные генетические маркеры, позволяющие идентифицировать клетки-трансформанты с нужной рекомбинантной ДНК.

Стандартное обозначение плазмидного вектора обычно начинается со строчной буквы р (от «plasmid»), а далее идут несколько букв, имеющих отношение к характеристикам вектора или к истории его создания.

Трансформацией называется процесс введения в бактериальную клетку-реципиент генетической информации при помощи чужеродной изолированной ДНК. Клетки обрабатывают особым химическим или физическим (электропорация) способом, чтобы они стали временно проницаемы для небольших молекул ДНК. Классические химические способы подразумевают инкубацию клеток микроорганизмов в растворе би- или мультивалентных катионов (одним из наиболее эффективных является хлорид кальция) при температурах около 0°C, что делает клетки гораздо более восприимчивыми (**ком-**

петентными) для проникновения ДНК через клеточную оболочку. Состояние естественной компетентности у микроорганизмов может возникать только в определенной фазе роста культуры либо присутствовать всегда, а у некоторых бактерий (например, у *E. coli*) естественная компетентность отсутствует и ее можно только индуцировать в ходе специальной обработки. В состоянии компетентности многие бактерии вырабатывают особый фактор компетентности (низкомолекулярный белок), активирующий синтез аутолизина, эндонуклеазы I и ДНК-связывающего белка.

Для высокоэффективного получения химически-компетентных клеток и повышения частоты трансформации некоторых штаммов *E. coli*, различающихся по строению молекул липополисахаридов клеточной стенки, вместо простой обработки клеток двухвалентными катионами при определенном pH часто используют оптимизированные комплексные методы (табл. 4.1) с использованием трансформационных буферов, содержащих одновалентные катионы (хлорид калия), соли марганца (II), бария (II) или гексаминокобальта (III). Также состояние компетентности клеток большинства штаммов *E. coli* улучшается после добавления диметилсульфоксида (ДМСО) и дитиотреитола (ДТТ), которые облегчают взаимодействие молекул ДНК с каналами клеточной стенки (так называемыми зонами адгезии). Типичная клетка *E. coli* содержит примерно 400 зон адгезии, представляющих собой каналы для транспортировки макромолекул через наружную мембрану, ригидную клеточную стенку и внутреннюю мембрану. Долю компетентных клеток можно также повысить, используя особые условия культивирования или специальные питательные среды (например, с повышенным содержанием магния).

Таблица 4.1

Условия проведения высокоэффективной трансформации плазмидной ДНК с использованием химически-компетентных клеток

Простые условия	Комплексные условия
1	2
Хлорид кальция (II) Хлорид марганца (II) Хлорид магния (II)	Хлорид кальция (II) Хлорид марганца (II) Хлорид калия Хлористый гексаминокобальт (III)
Ацетат калия (pH 7,0)	MES буфер (pH 6,0) — 2-(N-морфолино) этансульфоновая кислота
Инкубация при 0°C	Инкубация при 0°C Добавление диметилсульфоксида (ДМСО) и дитиотреитола (ДТТ)

1	2
Инкубация с ДНК при 0°C	Инкубация с ДНК при 0°C
Тепловой шок (в течение примерно 90 с): 0°C — 42°C — 0°C	Тепловой шок (в течение примерно 90 с): 0°C — 42°C — 0°C

Последующее резкое изменение температуры (тепловой шок при 40–50°C в течение 30–120 с и быстрое возвращение суспензии компетентных клеток с плазмидной ДНК в лед) также приводит к увеличению частоты трансформации на последнем этапе процесса химической трансформации. Температура сильно влияет на подвижность («текучесть») мембраны клеток, а кратковременное восстановление квазикристаллического состояния мембраны при 0°C способствует поглощению длинных молекул ДНК.

Поскольку грамотрицательные клетки *E. coli* представляют собой палочки длиной около 1 мкм и диаметром 0,2 мкм, а размер используемых плазмид варьирует в основном от 2 до 20 мкм, то плазмиды, проникшие внутрь клетки, должны организовываться в очень компактные минихромосомы и представлять собой репликон. Процесс проникновения ДНК в клетку, скорее всего, не осуществляется за счет пассивной диффузии, принимая во внимание средний объем, занимаемый молекулой ДНК.

К настоящему времени подобрано большое количество соединений и условий для значительного увеличения эффективности химической трансформации у разных штаммов *E. coli* и *S. typhimurium*, включая циклы замораживания—оттаивания, обработку клеток органическими растворителями и сульфгидрильными соединениями. Подобные методы оказывают позитивное влияние на ассоциацию ДНК и ее перенос через клеточную оболочку внутрь клетки в случае химической трансформации.

Несколько позже химической трансформации был разработан весьма эффективный альтернативный метод получения компетентных клеток и трансформации, основанный на иных принципах и оптимальных физиологических условиях для трансформируемых клеток, — **электропорация** (электрошоковая трансформация). В этом случае трансформационная смесь подвергается импульсному воздействию высоковольтного электрического поля, индуцирующего проникновение молекул ДНК в клетки в условиях очень низкой ионной силы, в отличие от химической трансформации, где применяются двухвалентные или мультивалентные катионы. Разряд электрического тока через смесь клеток и молекул ДНК, суспенди-

рованных между двумя электродами, деполяризует клеточные мембраны на короткий промежуток времени и индуцирует образование временных каналов в клеточной стенке.

Длительность импульсного разряда зависит от емкости конденсатора и сопротивления электрической цепи, частью которой является трансформационная смесь клеток и молекул ДНК. Время импульса тока («электрошока») описывается постоянной времени спада τ , которая соответствует периоду времени, за который разность потенциалов понижается до $\sim 37\%$ от исходного значения. Оптимальной напряженностью поля для электропорации клеток *E. coli* является величина 12,5–16,7 кВ/см.

Известно, что штаммы, у которых в мембранных липополисахаридах отсутствуют длинные боковые цепи О-полисахаридов, обладают повышенной трансформационной эффективностью при использовании как электропорации, так и методов химической трансформации. Надо отметить, что с точки зрения электростатики ассоциация молекул ДНК и бактериальных клеток является весьма невыгодным процессом, поскольку и те и другие являются полианионами — молекулы ДНК обогащены фосфатными группами, а клетки *E. coli* имеют наружную мембрану, содержащую фосфолипидный бислой и богатое фосфатами липополисахаридное ядро. Условия достижения высокоэффективной компетентности зависят в случае электрошоковой и химической трансформации от генотипа используемого штамма *E. coli*.

Поскольку плазида сообщает реципиентам новый фенотипический признак, это дает возможность проводить отбор успешно трансформируемых бактерий (чаще всего применяется отбор трансформантов по устойчивости к какому-нибудь антибиотику). После проникновения в клетку происходит репликация плазмидной ДНК и начинается экспрессия маркеров устойчивости к соответствующим антибиотикам. Необходимо отметить, что плазмидный рекомбинантный вектор желательно подбирать для каждого конкретного случая, чтобы максимально упростить выявление и характеристику трансформантов.

Одной из наиболее широко используемых в молекулярном клонировании плазмид является плазида pBR322 с ослабленной регуляцией репликации, содержащая гены устойчивости к ампициллину (фенотип Amp^r), тетрациклину (фенотип Tet^r) и несколько сайтов рестрикции, а также ее многокопийный вариант pAT153. Классическим вектором для получения увеличенной дозы гена и соответственно очень большого выхода кодируемого белка является плаз-

мида рAS2. В данном векторе клонируют фрагмент ДНК, содержащий *lac*-промотор и экспрессируемый ген. Соответствующий штамм, трансформируемый рAS2, выращивают при 42°C в течение нескольких часов, за которые число копий плазмиды увеличивается более чем 1000 на клетку, а затем *lac*-репрессор инактивируют добавлением ИПТГ (изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид).

Очень часто репликацию плазмидной ДНК осуществляют те же ферменты, что участвуют в дупликации бактериальной хромосомы. Некоторые плазмиды находятся под строгим контролем, т. е. их репликация сопряжена с репликацией ДНК клетки-хозяина — это малокопийные плазмиды. Число копий плазмид под ослабленным контролем может составлять от 10 до 200 на клетку, а если синтез белков хозяина подавлен, что приводит к остановке репликации хромосомной и малокопийной плазмидной ДНК, — то до нескольких тысяч.

Очевидно, что плазида, пригодная для использования в качестве вектора, должна быть небольшого размера, находиться под ослабленным контролем репликации, нести один или несколько фенотипических маркеров для отбора нужных трансформируемых клеток и содержать необходимые уникальные сайты для ферментов рестрикции в несущественной для репликации плазмиды области. Предпочтительно, если сайты рестрикции, куда можно вставить чужеродный фрагмент ДНК, находятся внутри генов, кодирующих фенотипические маркеры. Тогда вставка фрагмента чужеродной ДНК в плазмидный вектор приведет к инактивации таких генов.

Соотношение количества нужных трансформантов, содержащих рекомбинантные плазмиды, и трансформантов с повторно замкнутым в кольцо исходным плазмидным вектором сильно зависит от размера встраиваемого в плазмиду фрагмента чужеродной ДНК. Чем больше размер такого фрагмента, тем ниже эффективность трансформации. Так, частота трансформации для рекомбинантных плазмид, содержащих вставки ДНК размером больше 10 тпо, является весьма невысокой.

Бактерия способна поглощать плазмидную ДНК в течение короткого периода времени, но благодаря повышающим эффективность трансформации агентам многие штаммы приобретают способность сохранять состояние компетентности в течение 1–2 суток и более, а также храниться в замороженном состоянии в течение длительного времени. Но надо иметь в виду, что компетентность приобретает только небольшая доля клеток в культуре, а в трансформации участвует лишь примерно 0,01% молекул плазмидной

ДНК. В случае использования методов высокоэффективной химической трансформации удается достичь 10%-ного выхода компетентных клеток и 1% молекул плазмидной ДНК, проникающих в трансформируемые клетки (обычно максимальная частота трансформации при химическом способе составляет около 10^{-3} , т.е. на каждую 1000 клеток приходится одна трансформированная). При электропорации до 95% клеток являются компетентными для трансформации и 10% молекул плазмидной ДНК способны участвовать в этом процессе.

Эффективность трансформации часто выражается в числе трансформируемых колоний (клеток), которые образуются из расчета на микрограмм внесенной плазмидной ДНК. К примеру, плаزمида рВR322 часто используется в качестве стандарта для расчета эффективности трансформации. Характеристическими значениями для химически-компетентных клеток являются от 1×10^6 до 2×10^9 трансформантов на 1 мкг суперскрученной ДНК рВR322, что означает вероятность трансформации клетки молекулой плазмидной ДНК до 1%, т.е. в 1 мкг содержится примерно 2×10^{11} молекул рВR322. Эффективность при электрошоковой трансформации (электропорации) возрастает до 2×10^{11} трансформантов на 1 мкг плазмидной ДНК. Вероятность (эффективность) трансформации есть взаимодействие между одной молекулой ДНК и одной клеткой, и оно является оценкой того, насколько эффективно молекула ДНК может проникнуть в клетку и может представлять стабильный агент трансформации. Увеличение количества ДНК с определенного момента не приводит к увеличению эффективности трансформации (обычно используют 10–100 нг ДНК на пробу).

Другим не менее важным критерием оценки эффективности трансформации является способность индивидуальных клеток к трансформации. Данный параметр оценивается в условиях значительного превышения количества молекул плазмидной ДНК над количеством клеток, чтобы все клетки, способные к трансформации, имели контакт с молекулами ДНК. Как уже отмечалось выше, для химической трансформации доля компетентных клеток составляет до 10–12% от всех жизнеспособных клеток в популяции, что зависит от генетической характеристики штамма и метода получения компетентных клеток. В случае проведения электропорации с такими штаммами *E. coli*, как, например, DH10B, до 90% жизнеспособных клеток способны к трансформации в условиях избытка молекул ДНК. При использовании значительного количества плазмидной ДНК в процессе трансформации практически все компетентные

клетки успешно трансформируются, когда соотношение плазмиды: клетка достигает величины около 200 : 1.

Для характеристики процесса трансформации необходимо также отметить, что все протестированные ДНК обнаруживали способность к трансформации, сходной с плазмидной: эти молекулы ДНК включали различные плазмиды, ДНК *E. coli* и человека. Тот факт, что все ДНК достаточно схожи в данном случае, свидетельствует о том, что, вероятно, взаимодействие молекулы ДНК с клеткой не зависит от специфической последовательности нуклеотидов.

Однако влияние размера плазмиды на эффективность трансформации свидетельствует о важности наличия пор или каналов в клеточной оболочке, через которые могут проникнуть молекулы ДНК. Размер стандартных плазмид варьирует от 2 до 66 тпо и вероятность того, что молекула плазмиды трансформирует клетку, линейно уменьшается с увеличением размера плазмидной ДНК (например, если принять эффективность трансформации 2–7 тпо плазмиды за 100%, то для плазмиды размером 13 тпо она будет составлять около 25%). Большинство методов с использованием химически-компетентных клеток *E. coli* оптимальны для трансформации плазмидной ДНК размером 2–4 тпо и обеспечивают относительно эффективный перенос молекул ДНК размером до 13–15 тпо.

Более того, не обнаружено значительных различий в процессе трансформации между различными конформационными формами плазмид. Поглощение нуклеиновых кислот включает в себя организацию их молекул в особое хроматинподобное состояние, так что ДНК способна проникнуть в клетку через пору любого диаметра. Сходная обратная корреляция между увеличением размера плазмид и эффективностью трансформации наблюдается и в случае электропорации. Однако, по всей видимости, существует определенный порог размера плазмиды для эффективной трансформации, поскольку было показано, что вероятность трансформации 85-тпо плазмидой примерно в восемь раз ниже, чем при использовании плазмидной ДНК размером в 65 тпо. Тем не менее нет строгого ограничения по размеру ДНК в ходе трансформации, поскольку некоторые библиотеки искусственных бактериальных хромосом в низкокопийных плазмидных векторах содержат последовательности ДНК человека размером 130–300 тпо и данные вектора успешно трансформируются в *E. coli* DH10В с использованием метода электропорации. Широко используемые в молекулярном клонировании штаммы *E. coli* DH5α можно трансформировать большими плазмидами (размером до 50–60 тпо). Однако для подобных целей

лучше использовать векторы на основе бактериофага λ или космид.

Что касается используемых для получения компетентных клеток и трансформации штаммов *E. coli*, то при их выборе нужно учитывать ряд генетических характеристик: системы рестрикции и модификации (гены *hsdM*, *hsdP*, *hsdS*); репарации и рекомбинации (гены *recA*, *recB*, *recC*, *recE*, *recF*, *recK*, *sbsB*, *uvrA*, *uvrB*, *uvrC*, *uvrE*, *dam*), наличие супрессирующих мутаций, маркерных генов, других плазмид и т.д. Например, необходимо, чтобы клетка-хозяин имела фенотип RecA^- , т.е. была не способна к общей рекомбинации (чтобы экзогенная рекомбинантная ДНК не смогла модифицироваться в клетке в результате гомологичной рекомбинации). В клетках Rec^+ вообще очень трудно клонировать повторяющиеся и палиндромные последовательности. Обычно используют штаммы, дефектные по системе рестрикции, чтобы не допустить разрушения проникнувшей в клетку чужеродной ДНК.

Надо отметить, что, помимо широко используемой в молекулярном клонировании *E. coli*, в качестве клеток-хозяев используют и другие бактерии, например *Bacillus subtilis* и *Agrobacterium tumefaciens*. Часто в векторы, предназначенные для трансформации клеток *E. coli*, встраивают второй сайт инициации репликации (эти так называемые челночные векторы позволяют провести клонирование нужного фрагмента ДНК в *E. coli*, а затем перенести готовую генетическую конструкцию в клетки других микроорганизмов).

Три этапа процесса трансформации

Статистический анализ химической и электрошоковой трансформации свидетельствует о том, что процесс трансформации плазмидной ДНК может быть разбит на три этапа: 1) связывание (ассоциация) ДНК с клеткой, 2) проникновение ДНК в клетку и 3) формирование стабильной эписомы (рис. 4.1).

При использовании эквимолярных соотношений плазмид pBR322 и pACYC184 примерно 70–90% клеток, трансформируемых одной из этих плазмид, содержали обе плазмиды. Этот результат свидетельствует о том, что химически-компетентные клетки способны поглощать множественные молекулы ДНК. Схожие результаты по часто встречающейся ко-трансформации были получены и при электропорации. При эквимолярном соотношении в условиях высокоэффективной химической трансформации 1% плазмид трансформируют клетки и 1% всех клеток являются трансформантами. Увеличение количества плазмид в 100 раз приводит к 10-кратному увеличению количества трансформированных клеток, что сви-

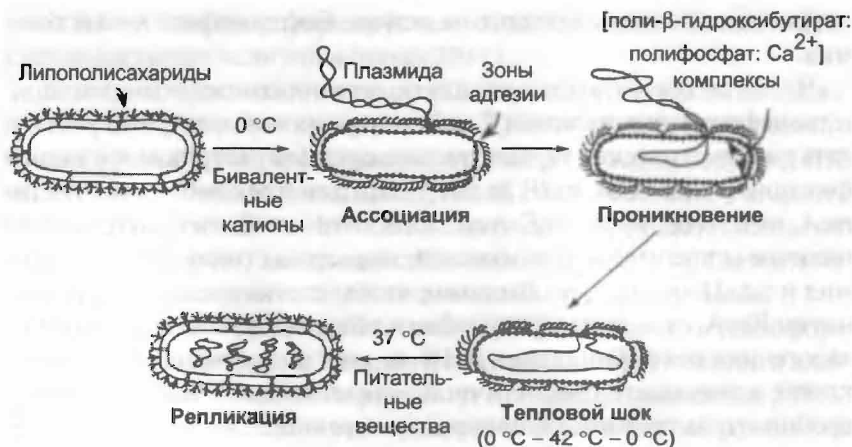


Рис. 4.1. Стадии плазмидной трансформации химически-компетентных клеток *E. coli*, полученных с помощью CaCl_2 (по Hanahan, Bloom, 1996). Обработка клеток раствором двухвалентных катионов (Ca^{2+}) при 0°C вызывает реорганизацию липополисахаридного слоя и кристаллизацию внутренней и наружной мембран, что приводит к формированию зон адгезии (макромолекулярных транспортных каналов). В данных условиях формируются также [поли-β-гидроксибутират : полифосфат : Ca^{2+}] комплексы (предполагаемые переносчики молекул ДНК), локализованные на внутренней мембране. Тепловой шок вызывает временное повышение лабильности мембран клетки, способствующее окончательному поглощению плазмидной ДНК. Плазмида реплицируется и организуется в эписому (минихромосому) в ходе инкубации клеток при 37°C в богатой питательной среде

детельствует об улучшении условий формирования стабильных эписом при увеличении количества плазмид. При использовании электрошоковой трансформации и эквимольного соотношения плазмид и клеток 10% плазмид вызывают трансформацию и 10% всех клеток трансформируются. Увеличение соотношения плазмиды: клетка в 100 раз имеет результатом 90% трансформантов от общего количества всех клеток. В принципе оба способа трансформации являются весьма эффективными для проникновения множественных плазмид в клетку. В каждом случае существует фаза формирования трансформанта с вероятностью 0,1, которую можно увеличить, вводя большее количество молекул плазмидной ДНК на каждую клетку.

Ассоциация ДНК. Многочисленные наблюдения свидетельствуют о том, что все молекулы ДНК независимо от происхождения, сложности строения и конформации (линейная, замкнутая или суперскрученная) способны эффективно участвовать в процессе трансформации при условии примерно 100-кратного количественного избытка над клетками. ДНК ассоциирует с клетками *E. coli* неспе-

цифически в районе основных клеточных каналов для транспорта макромолекул. Оба способа трансформации (электропорация и химическая трансформация) требуют температуры 0°C, что предполагает кристаллизацию мембран (и, возможно, липополисахаридного слоя) для эффективной ассоциации ДНК с клеткой. Предполагается, что первичная ассоциация ДНК происходит около пор в липополисахаридном каркасе, которые стабилизируются в условиях низких температур, что обеспечивает доступ макромолекул ДНК к каналам в наружной мембране.

Проникновение ДНК в клетку. В случае химической трансформации температура 0°C и мультивалентные катионы необходимы для индукции состояния компетентности клеток и последующей трансформации. Низкая температура в сочетании с миллимолярными концентрациями двухвалентных катионов приводит к кристаллизации мембран, делая подвижную структуру клеточной оболочки относительно жесткой и более благоприятной для ассоциации молекул ДНК с клеткой. Низкие температуры «фиксируют» фосфолипиды, белки и липополисахариды на поверхности клетки, благодаря чему катионы экранируют фосфаты на клеточной поверхности и на молекулах ДНК, создавая оптимальные условия для проникновения ДНК через клеточную оболочку. Диметилсульфоксид (ДМСО), вероятно, действует как стабилизатор зарядов на гидрофобной/гидрофильной границе, создаваемой фосфолипидами.

Некоторые эксперименты показали, что ДНК проникает в клетку через большие каналы, формирующие зоны адгезии. Интересно, что кобаламин (витамин B₁₂) и некоторые его аналоги ассоциируют с зонами адгезии и транспортируются в клетку посредством связывания со специфическим трансмембранным рецептором. Добавление значительных количеств кобаламина вместе с молекулами ДНК в трансформационную смесь приводит к ингибированию процесса трансформации. Более того, было показано, что препараты клеточных мембран и выделенные белки внешней мембраны конкурируют с молекулами ДНК в процессе трансформации.

Наиболее очевидным объяснением данных наблюдений является стерическое исключение молекул ДНК из-за связывания конкурирующих молекул с транспортными каналами. Экспериментальными исследованиями было выявлено, что существуют специальные каналы для проникновения ДНК в клетку, которые состоят из поли-β-гидроксibuтирата, полифосфата и Ca²⁺. Компетентные клетки *E. coli* обладают повышенным уровнем поли-β-гидроксibuтирата в цитоплазматической мембране. Синтез поли-β-гидроксibuтирата

индуцируется переносом клеток из экспоненциально растущей аэробной культуры в условия пониженных (0°C) температур и инкубацией клеток в трансформационном буферном растворе для формирования комплексов [поли- β -гидроксibuтират : полифосфат : Ca^{2+}]. Таким образом, синтез поли- β -гидроксibuтирата в высшей степени коррелирует со способностью клеток к поглощению молекул ДНК. Инкубация клеток *E. coli* при 0°C в присутствии различных двухвалентных катионов усиливает состояние компетентности и увеличивает уровень образования комплексов. Миллимолярные концентрации моно- или мультивалентных катионов и низкие температуры индуцируют синтез поли- β -гидроксibuтирата и формирование его комплексов, присутствие двухвалентных катионов необходимо для индукции эффективного состояния компетентности.

Исследования полифосфатного компонента предполагаемых каналов, через которые молекулы ДНК проникают в клетку, показали, что специфическая низкомолекулярная форма полифосфата синтезируется при инкубации клеток в сложном трансформационном буфере при 0°C . Эта форма состоит из 60—70 фосфатных остатков в отличие от высокомолекулярной формы (500—1000 фосфатных остатков), обнаруженной в цитозоле. Так же как и в случае с поли- β -гидроксibuтиратом, содержание короткоцепочечных полифосфатов в клетке коррелирует с уровнем компетентности для трансформации ДНК. Крайне интересен тот факт, что инкубация клеток *E. coli* при 0°C в присутствии миллимолярных концентраций катионов индуцирует синтез двух новых молекул полифосфатов и их встраивание в мембранно-связанный комплекс с Ca^{2+} .

Молекулярное моделирование показало, что комплекс [поли- β -гидроксibuтират : полифосфат : Ca^{2+}] формирует трансмембранный канал, в котором поли- β -гидроксibuтират образует цилиндрическую пору с липофильной поверхностью и гидрофильной внутренней частью, взаимодействующей с ионами Ca^{2+} . Полифосфаты образуют центральную часть канала. Была предложена модель поглощения ДНК, в которой ДНК перемещается в периплазматическое пространство в процессе, происходящем с участием двухвалентных катионов (Mn^{2+} , Ca^{2+} и Mg^{2+}). ДНК ассоциирует с поли- β -гидроксibuтиратным цилиндром, проникая в клетку путем замещения полифосфатов центра канала. Как поли- β -гидроксibuтират, так и полифосфаты присутствуют в растущей при 37°C культуре на очень низком уровне, и их синтез значительно усиливается в ответ на инкубацию клеток при 0°C .

Генетический фактор, участвующий в регуляции процесса проникновения молекул ДНК в компетентные клетки, был обнаружен с помощью мутационной инактивации белка-репрессора транскрипции, кодирующегося геном *deoR*, который первоначально рассматривался в качестве регулятора катаболизма нуклеозидов. Инактивация *deoR* значительно усиливала эффективность плазмидной трансформации для штамма *E. coli* K-12. Мутант *E. coli* DH1 по *deoR*, обозначенный как штамм DH5, обладал примерно в 3–4 раза большей компетентностью, чем исходный штамм DH1, что было показано с использованием тест-плазмид pBR322, pUC8 и pUC9. Более того, штамм DH5 был в 30 раз более эффективен по сравнению с DH1 при проведении трансформации с большими плазмидами (размером в 66 тпо). Позитивный эффект мутации по *deoR* на плазмидную трансформацию наиболее выражен при использовании методов получения химически-компетентных клеток с применением сложных трансформационных буферных растворов. Это свидетельствует о том, что ген, в норме репрессируемый *deoR*, участвует в процессе проникновения молекул ДНК, вероятно, посредством воздействия на состояние клеточной оболочки.

Способность *E. coli* поглощать молекулы ДНК с длиной, превосходящей размеры клеток, свидетельствует в некотором смысле об активном транспорте. Тем не менее многие исследователи приводят доводы против предположения о роли активного транспорта в трансформации, несмотря на имеющиеся данные, что мембранный потенциал является необходимым условием для прохождения трансформации.

Предполагается также, что тепловой шок приводит к временному ослаблению кристаллического состояния мембраны и, таким образом, возникающие конформационные изменения способствуют продолжению процесса поглощения молекул ДНК. Однако тепловой шок увеличивает эффективность трансформации только в 10 раз, что свидетельствует о возможности завершения проникновения ДНК в клетку и без температурного воздействия. Финальным этапом всех видов трансформации является добавление питательной среды и инкубация клеток при 37°C, что также приводит к некоторому ослаблению структуры мембран и способствует завершению переноса молекул ДНК в клетки, хотя оказывает менее эффективное воздействие по сравнению с кратковременным тепловым шоком.

Существуют доказательства наличия сходных этапов процесса ассоциации и проникновения молекул ДНК в ходе осуществления трансформации плазмидой при помощи электропорации. Электри-

ческий импульс приводит к изменению формы клеток и перераспределению поверхностного заряда липополисахаридов. Плазмидная ДНК, добавленная в трансформационную смесь до (но не после) электрического импульса, успешно проникает в клетки. Если клеточную суспензию немедленно разводят питательной средой и инкубируют после электрошока при 37°C, частота трансформации увеличивается в 10 раз по сравнению с методом инкубирования клеток во льду в течение 10 мин. Таким образом, этап теплового шока облегчает завершение процесса поглощения молекул ДНК, инициированного электрическим импульсом. Данные заключения согласуются с гипотезой, что электрический импульс разрушает или реорганизует структуру клеточной оболочки, усиливая ассоциацию молекул ДНК с клеткой и индуцируя избирательное проникновение плазмидной ДНК.

Формирование трансформантов. Изучение процессов химической и электрошоковой трансформации *E. coli* и *S. typhimurium* свидетельствует об изменении клеточной оболочки при использовании обоих методов, что позволяет молекулам ДНК взаимодействовать и проникать в клетки микроорганизмов. Наличие многочисленных независимых каналов для поглощения ДНК (что было показано в экспериментах по ко-трансформации) доказывает, что процесс трансформации не является простым вероятностным событием. Если бы формирование трансформантов представляло собой, к примеру, вероятность завершения процесса поглощения ДНК через 1 из 200 независимых каналов, то эффективность трансформации зависела бы от количества молекул ДНК, связавшихся с этими каналами. Однако необходимо обеспечить 100-кратный избыток молекул плазмидной ДНК для увеличения вероятности успешной трансформации (химической или электрошоковой) в 10 раз. Это подтверждает наличие стадии формирования трансформантов, имеющей место после проникновения молекул ДНК в клетки.

Представляется очевидным, что плазмиды не существуют в клетке в качестве простой молекулы ДНК, но должны быть организованы в хроматинподобные структуры, сходные с хромосомой. Важную роль в процессе формирования трансформантов играет клеточный цикл, вероятно, в форме белков-инициаторов репликации в низкой концентрации и с коротким периодом существования, так что множественные репликоны увеличивают вероятность формирования функционального репликативного комплекса.

4.1.

ПОЛУЧЕНИЕ ХИМИЧЕСКИ-КОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК И ТРАНСФОРМАЦИЯ

МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ ХИМИЧЕСКИ-КОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК *E. coli* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ CaCl_2 , ТРАНСФОРМАЦИЯ

Известно, что обработка клеток микроорганизмов хлористым кальцием значительно увеличивает эффективность поглощения ими плазмидной ДНК и ДНК бактериофага λ . В настоящее время существует много разновидностей этого наиболее широко распространенного способа получения химически-компетентных клеток, разработанного для увеличения эффективности трансформации у разных штаммов *E. coli*. В среднем выход трансформантов составляет 10^5 – 10^7 на 1 мкг интактной плазмидной ДНК в зависимости от используемых плазмид и штаммов. Необходимо отметить, что применение богатых питательных сред (например, LB), содержащих казеин и/или дрожжевой экстракт и обеспечивающих быстрое деление клеток, имеет большое значение для осуществления эффективной трансформации, поскольку использование минимальных сред приводит к значительному (около 100 раз) снижению компетентности клеток.

Необходимые реактивы и растворы:

- стерильная среда LB (среда Лурия—Бертани) — см. прил. 1;
- растворы соответствующих антибиотиков для среды LB (конечная концентрация в среде для ампициллина составляет 50–100 мкг/мл, для хлорамфеникола 10–30 мкг/мл, для канамицина 25–50 мкг/мл, для стрептомицина 25–100 мкг/мл, для тетрациклина 10–20 мкг/мл). Антибиотики необходимо добавить в охлажденную до 55°C расплавленную агаризованную среду LB во избежание их инактивации при высоких температурах, тщательно перемешать и немедленно разлить среду по чашкам Петри (30 мл среды на чашку с $\varnothing = 85$ мм) — см. прил. 1;
- раствор CaCl_2 следующего состава: 60 мМ CaCl_2 ; 15%-ный глицерин; 10 мМ PIPES (pH 7,0). Способ приготовления раствора: растворить 0,60 г PIPES [пиперазин-N,N'-бис-(2-этансульфоновая кислота)] в 90 мл бидистиллированной воды; добавить NaOH на кончике шпателя; довести pH до 7,0; до-

бавить $1,76 \text{ г CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, добавить 30 г глицерина и довести объем раствора до 200 мл бидистиллированной водой. Стерилизовать фильтрованием и хранить при 4°C . Реже применяют раствор $50 \text{ mM CaCl}_2 + 10 \text{ mM трис-HCl}$ (pH 8,0).

Методика

А. Приготовление компетентных клеток

1. Посеять одну свежую колонию *E. coli* штамм DH5 α (или штаммы TG1, LE392 и др.) в стерильную пробирку с 5 мл среды LB, выращивать в течение ночи (12–14 ч) при 37°C на качалке при интенсивном перемешивании (250–300 об/мин).

2. Засеять 4 мл выросшей ночной культуры *E. coli* в стерильную двухлитровую колбу с 400 мл среды LB. Выращивать при 37°C на качалке при интенсивном перемешивании (250–300 об/мин) до достижения середины логарифмической фазы роста ($\text{ОП}_{600} \sim 0,375$), обычно это занимает 3–4 ч. Отметим, что $\text{ОП}_{600} = 1$ примерно соответствует $1\text{--}8 \times 10^8$ клеток/мл. Разумеется, соотношение между оптической плотностью и числом жизнеспособных клеток в 1 мл культуры варьирует в зависимости от используемого штамма, поэтому калибровочную кривую необходимо строить для каждого нового штамма *E. coli*, использующегося в работе.

Дальнейшие манипуляции проводить на холоде, соблюдая стерильность при работе с клетками!

3. Разделить выросшую культуру на восемь аликвот по 50 мл в стерильные, предварительно охлажденные центрифужные пробирки Falcon. Охладить пробирки с культурой во льду в течение 5–10 мин, центрифугировать суспензии клеток при 1600 g в течение 10–15 мин при 4°C .

4. Аккуратно слить супернатант, тщательно удалить его остатки микропипеткой и суспендировать каждый осадок в 10 мл ледяного стерильного раствора CaCl_2 .

5. Центрифугировать клетки при 1600 g в течение 5 мин при 4°C . Отбросить супернатант и суспендировать каждый осадок в 10 мл ледяного стерильного раствора CaCl_2 . Инкубировать во льду в течение 30 мин.

6. Центрифугировать при 1600 g в течение 10–15 мин при 4°C . Отбросить супернатант и суспендировать каждый осадок в 2 мл ледяного стерильного раствора CaCl_2 .

7. Разлить суспензии компетентных клеток по аликвотам в стерильные, предварительно охлажденные 1,5-мл пластиковые микроцентрифужные пробирки (по 100–300 мкл в каждую пробирку). Не-

медленно заморозить (лучше в жидком азоте, что значительно повышает компетентность) и хранить при -70°C . При 4°C компетентные клетки можно хранить не более 12–16 ч.

Б. Процесс трансформации

1. Добавить ~4–10 мкл холодной плазмидной ДНК (10 нг–1 мкг) в растворе для лигирования или в буферном растворе TE в предварительно охлажденную стерильную микроцентрифужную пробирку. Необходимо подготовить также две контрольные микроцентрифужные пробирки для каждого эксперимента по трансформации: одна пробирка должна содержать компетентные клетки, трансформируемые известным количеством стандартного препарата соответствующей суперскрученной плазмидной ДНК — контрольная трансформация; а вторая пробирка должна содержать компетентные клетки без добавления плазмидной ДНК.

2. *Быстро* разморозить суспензию химически-компетентных клеток (*E. coli* DH5 α , *E. coli* One Shot TOP10, *E. coli* JM109 и др.) нагреванием пробирки между ладонями, перемешать при помощи микропипетки, поместить в лед и *немедленно* добавить 100 мкл суспензии в каждую пробирку, содержащую плазмидную ДНК. Осторожно перемешать смесь пипетированием или покачиванием пробирки.

3. Инкубировать трансформационную смесь *во льду* в течение 20–30 мин.

4. Индуцировать тепловой шок в клетках путем инкубации при 42°C на водяной бане в течение 45–120 с без перемешивания. *Немедленно* перенести микроцентрифужные пробирки с трансформационной смесью в лед и охладить клетки в течение 1,5–2 мин.

5. Добавить 1 мл предварительно подогретой до 37°C стерильной среды LB в каждую микроцентрифужную пробирку. Культивировать при 37°C на качалке (~120 об/мин) в течение 1–1,5 ч, поместив плотно закрытые пробирки в горизонтальное положение для лучшего плавного перемешивания. За это время в клетках произойдет экспрессия полученных с плазмидой генов устойчивости к антибиотикам и клетки приобретут соответствующий новый фенотип.

6. После инкубации поместить микроцентрифужные пробирки с трансформантами в лед и высеять аликвоты клеточной суспензии по 10, 50 и 100 мкл на чашки Петри с агаризованной (1,5% агара) средой LB, содержащей соответствующий антибиотик. Тщательно и равномерно распределить культуру трансформантов по поверхности агаризованной среды при помощи стерильного шпателя Дригальского или стерильных стеклянных шариков.

Во многих случаях на агаризованную среду вносят растворы (по 25 мкл на чашку, концентрация 40 мг/мл) дополнительных селективирующих агентов (X-gal и ИПТГ), позволяющих оценить эффективность трансформации при использовании плазмид, которые содержат фрагмент лактозного оперона *E. coli* (см. подглаву 7.1).

Инкубировать чашки при 37°C до появления колоний (обычно колонии появляются через 12–48 ч в зависимости от штамма).

7. Компетентные клетки, используемые в качестве контроля, не должны расти на среде LB с антибиотиком, поскольку они не содержат плазмиду с соответствующим маркерным геном устойчивости к антибиотику. Для анализа полученных трансформантов необходимо отобрать стерильными зубочистками ~10–20 отдельно выросших колоний (их число зависит от количества введенной в клетки плазмидной ДНК и эффективности процесса трансформации), инокулировать каждую колонию в 2–5 мл среды LB с нужным антибиотиком и культивировать при 37°C на качалке (120 об/мин) в течение 5–12 ч.

Затем надо выделить плазмидную ДНК из каждого варианта (см. подглаву 1.2) и провести ее рестрикционный анализ (как с помощью одной, так и нескольких эндонуклеаз рестрикции; см. подглаву 7.1) с последующим электрофорезом в 1%-ном агарозном геле. Во многих случаях при клонировании фрагментов ДНК проводят секвенирование вставки для подтверждения ее корректного встраивания в плазмидный вектор и отсутствия нуклеотидных замен. Для экономии рестриктаз можно провести предварительную оценку наличия вставки в выделенных плазидах с помощью электрофореза в агарозном геле, используя в качестве контроля исходную плазмиду (плазида со вставкой движется в агарозе медленнее, чем контроль). Затем проверить выбранные клоны с помощью рестрикции или ПЦР на наличие нужной вставки.

8. Несколько колоний полученных трансформантов пересевают штрихом на агаризованную среду LB с соответствующим антибиотиком для кратковременного хранения при 4°C, для долгосрочного хранения при –80°C замораживают 1 мл культуры в 15%-ном глицерине (830 мкл культуры тщательно смешать со 170 мкл 87%-ного глицерина).

Дополнения к методике

К п. А2. Для максимальной эффективности трансформации крайне важно, чтобы культура находилась в экспоненциальной фазе роста и оптическая плотность суспензии клеток во время обработки

хлористым кальцием была низкой. Некоторые методики рекомендуют культивировать *E. coli* при пониженных температурах (не 37°C, а 25–30°C) перед сбором биомассы для получения химически-компетентных клеток, поскольку такие клетки имеют большую долю ненасыщенных мембранных фосфолипидов, что увеличивает подвижность мембран и восприимчивость клеток к трансформации.

К п. А3. Центрифугу необходимо останавливать плавно во избежание взмучивания осадка клеток.

К п. А5. Суспензия клеток может храниться во льду в течение нескольких суток. Для многих штаммов *E. coli* (включая DH5 α) эффективность получения компетентных клеток возрастает с увеличением времени инкубации на холоде — максимальная эффективность трансформации достигает 4–6-кратного максимума после 12–24-часовой инкубации при 4°C.

К п. А7. Рекомендуется хранить компетентные клетки при –70°C в 15%-ном глицерине.

К п. Б1. Надо иметь в виду, что увеличение количества вносимой ДНК больше 40 нг на пробу может привести к снижению эффективности трансформации.

К п. Б2. Для увеличения эффективности трансформации можно добавить к смеси 2 мкл 5 М NaCl. При трансформации необходимо использовать пластиковые, а не стеклянные пробирки из-за адсорбции ДНК на стекле и значительного снижения эффективности трансформации.

К п. Б5. Многие протоколы рекомендуют инкубацию в течение 30 мин при тетрациклиновой селекции трансформантов и в течение 1 ч при ампициллиновой или канамициновой селекции.

К п. Б6. Перед посевом на чашки Петри с агаризованной средой LB и антибиотиком рекомендуется собрать биомассу центрифугированием на настольной центрифуге, суспендировать в минимально необходимом объеме жидкой среды LB и затем высеять соответствующие аликвоты (10–100 мкл) на чашку Петри.

Если селекцию трансформантов ведут на устойчивость к тетрациклину, то трансформационную смесь можно целиком высеять на одну чашку Петри. При селекции на устойчивость к ампициллину на чашку необходимо высевать только часть культуры, поскольку число выросших колоний трансформантов не пропорционально высеваемому объему из-за накопления в агаризованной среде токсичных веществ. Кроме того, надо учитывать, что ампициллин разрушается β -лактамазой, выделяемой устойчивыми трансформантами, поэтому для предотвращения роста чувствительных к антибиотику

сателлитных колоний плотность высеваемой суспензии должна быть низкой, а чашки необходимо перенести через 16–24 ч из термостата в холодильник на 4°C (для отбора только быстрорастущих колоний).

К пункту Б7. В качестве экспресс-метода анализа выросших трансформантов без выделения плазмидной ДНК рекомендуется следующий способ. Суспендировать колонию в 50 мкл стерильной дистиллированной воды, перемешать и инкубировать при 99°C в течение 5 мин. Удалить фрагменты клеток центрифугированием на настольной центрифуге при 2000 g в течение 1 мин и перенести супернатант в чистую микроцентрифужную пробирку. Провести анализ наличия нужного фрагмента ДНК в плазмиде путем проведения ПЦР с соответствующими праймерами и 5 мкл полученного супернатанта в качестве матрицы.

МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ ХИМИЧЕСКИ-КОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК *E. coli* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ $MgCl_2$ И $CaCl_2$

Предварительная инкубация клеток в условиях достаточно высокой концентрации ионов магния (20–100 мМ) повышает эффективность получения компетентных клеток химическим способом с использованием $CaCl_2$ и пониженной температуры. Присутствие магния в питательной среде изменяет поверхностную фосфолипидную структуру клеточной оболочки, уменьшает количество белок-липополисахаридных связей и приводит к замене ковалентных связей ионными (за счет двухвалентных катионов), что увеличивает подвижность липополисахаридного ядра наружного мембранного слоя и доступность каналов клеточной стенки. Это делает процесс индукции состояния компетентности клеток с использованием двухвалентных катионов и низких температур более эффективным.

Необходимые реактивы и растворы:

- стерильная среда LB и раствор необходимого антибиотика (см. прил. 1);
- стерильный 100 мМ раствор $MgCl_2$;
- стерильный 100 мМ раствор $CaCl_2$;
- стерильный глицерин.

Методика

1. Высевать клетки *E. coli* DH5 α (или другого штамма) из хранящейся в замороженном состоянии под глицерином культуры штрихом на поверхность чашки Петри с агаризованной средой LB. Выращивать в течение ночи при 37°C.

2. Перенести одну выросшую колонию в закрывающуюся пробирку с 5 мл среды LB, выращивать в течение ночи при 37°C на качалке (200–300 об/мин).

3. Засеять 0,5 мл ночной культуры *E. coli* в 50 мл среды LB. Выращивать при 37°C до достижения ОП₆₀₀ ~ 0,67, что соответствует 5×10^8 клеток/мл (рост занимает примерно 2 ч).

4. Охладить клетки во льду в течение 15 мин.

5. Перенести культуру в стерильную, предварительно охлажденную центрифужную пробирку на 50 мл, центрифугировать при 1100 g в течение 10 мин при 4°C. Слить супернатант и тщательно удалить остатки жидкости микропипеткой.

6. Суспендировать осадок в 25 мл ледяного 100 mM раствора MgCl₂, осторожно перемешать пипетированием. Центрифугировать при 1100 g при 4°C в течение 10 мин, слить супернатант.

7. Суспендировать осадок в 25 мл ледяного 100 mM раствора CaCl₂, инкубировать во льду в течение 20 мин. Центрифугировать при 1100 g при 4°C в течение 10 мин, слить супернатант.

8. Суспендировать осадок клеток в 2,5 мл ледяного 100 mM раствора CaCl₂.

9. Добавить 380 мкл ледяного глицерина (конечная концентрация глицерина равна 15%), осторожно перемешать и хранить компетентные клетки в аликвотах по 200 мкл при –70°C.

10. Трансформация проводится аналогично процессу, описанному выше в методе получения компетентных клеток *E. coli* с использованием CaCl₂.

МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ ХИМИЧЕСКИ-КОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК *E. coli* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ RbCl И CaCl₂, ТРАНСФОРМАЦИЯ, ТРАНСФОРМАЦИЯ В УСЛОВИЯХ ИНТЕГРАЦИИ

Данный метод получения химически-компетентных клеток различных штаммов *E. coli* с применением ионов Rb⁺ более эффективен, чем классический метод с использованием только CaCl₂. При обработке клеток гипотоническим раствором, содержащим RbCl, изменяется расположение мембранных белков, что позволяет отрицательно заряженным молекулам ДНК связываться с поверхностью клеток.

Необходимые реактивы и растворы:

- стерильная среда LB и раствор необходимого антибиотика (см. прил. 1);

- буферный раствор I следующего состава (на 100 мл): 10 мМ RbCl (1 мл 1 М RbCl); 10 мМ MOPS, 3-морфолинопропансульфоная кислота (2 мл 0,5 М MOPS); pH 6,5–6,7. Стерилизовать автоклавированием при 0,5 ати;
- буферный раствор II следующего состава (на 100 мл): 50 мМ CaCl₂ (5 мл 1 М CaCl₂); 10 мМ RbCl (1 мл 1 М RbCl); 100 мМ MOPS (20 мл 0,5 М MOPS); pH 6,5–6,7. Стерилизовать автоклавированием при 0,5 ати;
- стерильный физиологический раствор (0,9% NaCl), 15%-ный раствор глицерина.

Методика

А. Подготовка компетентных клеток

1. Засеять **0,2–0,5 мл** ночной культуры *E. coli* (или свежую биомассу с агаризованной среды LB) в 250-мл колбу с **50 мл** среды LB. Выращивать при 37°C и интенсивном перемешивании (250 об/мин) до достижения ОП₆₀₀ ~ 0,3–0,4. Для одной трансформационной пробы требуется 2 мл культуры с плотностью ~ 0,5–0,8 × 10⁸ клеток/мл.

2. Собрать биомассу центрифугированием при 1100 g в течение 10 мин при 4°C (в работе использовать стерильные центрифужные стаканы). Удалить надосадочную жидкость и осторожно суспендировать осадок клеток в **25 мл** (1/2 исходного объема культуры) *ледяного* стерильного буферного раствора I. Инкубировать суспензию во льду в течение 20–30 мин.

3. Собрать биомассу центрифугированием при 1100 g в течение 10 мин при 4°C. Осторожно суспендировать осадок клеток в **20 мл** *ледяного* стерильного буферного раствора II. Инкубировать суспензию во льду в течение 20–30 мин.

4. Осадить клетки центрифугированием при 1100 g в течение 10 мин при 4°C. Как можно более тщательно удалить надосадочную жидкость микропипеткой. Осторожно суспендировать осадок клеток в **5 мл** (1/10 исходного объема культуры) *ледяного* стерильного буферного раствора II и использовать для трансформации. Смешать суспензию клеток и 80%-ный глицерин в соотношении 4,3 : 1, хранить аликвоты суспензии компетентных клеток в 15%-ном глицерине по 200 мкл при –70°C.

Б. Процесс трансформации

1. Смешать на холоде **200 мкл** полученной суспензии компетентных клеток и **1–10 мкл** плазмидной ДНК (1–200 нг ДНК) в буферном растворе TE (pH 8,0). В случае использования для трансформации реакционной смеси после лигирования объем ДНК

может составлять до **30 мкл**. В последнем случае лигированную смесь *необходимо* перед трансформацией прогреть при 65°C в течение 10 мин для инактивации ДНК-лигазы. В качестве контроля использовать компетентные клетки без добавления плазмидной ДНК и компетентные клетки, трансформируемые исходной плазмидной ДНК, лигированной на себя.

2. Инкубировать трансформационную смесь во льду в течение 30 мин.

3. Индуцировать тепловой шок в клетках путем инкубации при 42°C на водяной бане в течение ровно 45 с без перемешивания. *Немедленно* перенести пробирки с трансформационной смесью в лед и охладить клетки в течение 1,5–2 мин.

4. Добавить 1 мл предварительно подогретой до 30–37°C среды LB. Культивировать при 30–37°C (в зависимости от штамма) с умеренным перемешиванием при 100–120 об/мин в течение 1–1,5 ч.

5. Сконцентрировать биомассу центрифугированием на настольной центрифуге при 4°C в течение 5 мин, суспендировать осадок клеток в **50 мкл** стерильного физиологического раствора и высеять на чашку Петри с агаризованной средой LB и соответствующим антибиотиком, ген устойчивости к которому находится на плазмиде.

6. Культивировать при 30–37°C в течение 12–48 ч. Контрольный вариант, содержащий только компетентные клетки без добавления плазмидной ДНК, не должен расти на среде LB с антибиотиком. Отобрать петлей или стерильными зубочистками отдельные, хорошо изолированные колонии (чистые культуры трансформантов), выросшие на поверхности агаризованной среды LB с антибиотиком, для посева и последующего анализа.

В. Трансформация в условиях интеграции чужеродной ДНК в хромосому

Наличие в клетке плазмиды требует затраты части энергетических ресурсов на ее репликацию, транскрипцию и синтез кодируемых белков; многокопийные плазмиды требуют больших энергетических затрат клетки. Соответственно в процессе развития культуры часть популяции клеток очень часто утрачивает плазмиды и в конечном счете такие быстрорастущие клетки оказываются преобладающими. Через несколько клеточных генераций это существенным образом отражается на количестве синтезируемого белка, который кодируется клонированным геном на плазмиде.

Самым простым подходом для сохранения плазмид в клетках является культивирование микроорганизма в присутствии антибиотика, ген устойчивости к которому находится на соответствующей

плазмиде. Однако внесение антибиотиков в большие объемы культур при промышленном производстве приводит к значительному удорожанию биотехнологического продукта, кроме того, это решение не идеально с точки зрения экологической безопасности и медицинских показателей. Включение клонированного фрагмента ДНК непосредственно в хромосому клетки-хозяина делает возможным повысить уровень активности продукта соответствующего клонированного гена, обойтись без плазмидных штаммов (которые используют в биотехнологии в основном как тестовые системы) и избежать утраты клонированных генов.

При встраивании чужеродного гена в хромосомную ДНК клетки необходимо учитывать два основных момента: 1) сайт интеграции в хозяйской ДНК должен находиться внутри незначительной для функционирования клетки области и 2) для обеспечения эффективной экспрессии гена его помещают под контроль регулируемого промотора. Соответственно нужный ген вместе с регулируемым промотором встраивают в клонированный хромосомный сайт интеграции или вблизи него и полученной генетической конструкцией в составе нереплицирующейся плазмиды трансформируют клетки. Наследование клонированного гена будет возможным только в случае его интеграции в хромосому клетки-хозяина. После трансформации клетки плазмидой, содержащей клонированный ген в середине клонированного фрагмента с сайтом интеграции, возможно спаривание между гомологичными нуклеотидными последовательностями плазмиды и хромосомной ДНК, далее происходит интеграция клонированного гена в хромосому в результате двойного кроссинговера (рис. 4.2). Второй вариант — интеграция всей плазмидной ДНК в хромосому в результате одиночного кроссинговера, если клонированный ген был встроен рядом с клонированным хромосомным сайтом интеграции.

Мы рассмотрим простую методику трансформации клеток в условиях интеграции гена в хромосому с использованием транспозазы. Транспозаза (ЕС 2.7.7) — это фермент, который узнает концы соответствующей ДНК (транспозирующего элемента), режет ее по этим концам и присоединяет их к последовательностям геномной ДНК.

1. Провести трансформацию компетентных клеток плазмидой, содержащей ген транспозазы (например, хелперной плазмидой рМН-Тс, несущей ген устойчивости к тетрациклину), по стандартной методике. Получить компетентные клетки, содержащие такую плазмиду.

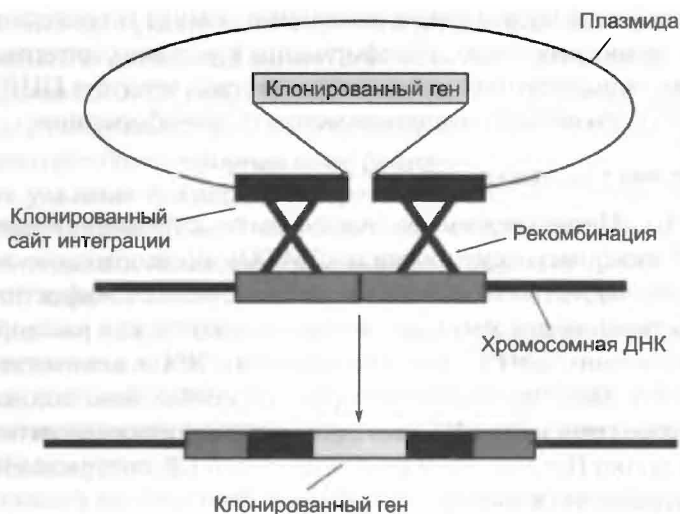


Рис. 4.2. Интеграция клонированного в плазмидном векторе гена в хромосомную ДНК

2. Смешать 600 мкл суспензии компетентных клеток, содержащих транспозазную плазмиду, с 3–10 мкл плазмидной ДНК (~0,5 мкг ДНК) с необходимым геном для интеграции в хромосому.

3. Инкубировать трансформационную смесь во льду в течение 30 мин.

4. Индуцировать тепловой шок в клетках путем инкубации при 42°C на водяной бане в течение ровно 45 с без перемешивания. Немедленно перенести пробирки с трансформационной смесью в лед и охладить клетки в течение 1,5–2 мин.

5. Смешать трансформационную смесь с 4 мл предварительно подогретой среды LB в пробирке и инкубировать на водяной бане при 44°C в течение 25 мин при перемешивании.

6. Инкубировать при 37°C с перемешиванием (250 об/мин) в течение 40 мин.

7. Собрать биомассу центрифугированием на настольной центрифуге (4°C, 5 мин), суспендировать осадок в 50 мкл стерильного физиологического раствора и высеять растиранием шпателем на чашку Петри с агаризованной средой LB, содержащей соответствующий антибиотик. Культивировать при 30–37°C в течение 1–2 дней.

8. Пересеять колонии выросших трансформантов на среду LB с соответствующим антибиотиком. Проверку интеграции гена с плазмидной ДНК в хромосому провести с помощью ПЦР, используя один праймер к последовательности данного гена, а второй праймер к att-

сайту, находящемуся на интегративной плазмиде и также встроенному в хромосому после трансформации в условиях интеграции. В качестве отрицательного контроля (отсутствие продукта ПЦР) взять ДНК базового штамма, используемого для трансформации.

Дополнения к методике

К п. Б1. Иногда рекомендуется добавлять к трансформационной смеси 3 мкл диметилсульфоксида (ДМСО), но необходимо иметь в виду, что продукты его окисления сильно снижают эффективность трансформации, поэтому надо вносить только свежий раствор спектрально чистого ДМСО, хранящегося при -70°C в аликвотах.

К п. Б5. Полученные трансформанты необходимо заложить на длительное хранение в 15%-ном глицерине, а также пересеять штрихом на чашки Петри с агаризованной средой LB, содержащей соответствующий антибиотик.

Для длительного хранения отдельную бактериальную колонию предварительно инокулируют в 5–10 мл жидкой среды LB, подращивают в течение 12–16 ч и переносят 0,85 мл выросшей культуры в микроцентрифужную пробирку с 0,15 мл стерильного глицерина (*хорошо перемешать!*). Такая суспензия клеток может храниться в течение нескольких лет при низких температурах (от -20°C до -70°C) без изменения фенотипических свойств и существенного снижения жизнеспособности. Замораживать следует по несколько пробирок каждого полученного штамма, а извлекать клетки можно с помощью стерильной бактериологической петли с поверхности замороженной клеточной суспензии.

Колонии большинства штаммов *E. coli* могут храниться на поверхности агаризованной среды в течение нескольких недель при 4°C , если чашки Петри плотно заклеить пленкой Parafilm. Надо отметить, что при молекулярном клонировании лучше избегать последовательных пересевов штаммов на агаризованные среды в течение длительного времени во избежание утраты или появления новых генетических маркеров, а работать необходимо с культурами из проверенных источников (штаммы, заложенные на длительное хранение при низких температурах).

К п. В1. Крайне *не рекомендуется* замораживать компетентные клетки с транспозазной плазмидой для хранения, их необходимо немедленно использовать для трансформации в условиях интеграции гена в хромосому. Для выделения плазмиды рМН-Тс лучше всего использовать *E. coli* штамм С600.

К п. В7. Для увеличения дозы интегрируемого гена (количества его копий) в хромосоме можно провести дополнительную трансформацию компетентных клеток-интегрантов плазмидой рМН-Тс, несущей ген транспозазы, в стандартных условиях трансформации (так называемая «повторная интеграция»).

Для **удаления плазмиды** (содержащей термочувствительный репрессор) из клеток *E. coli* после проведения трансформации в условиях интеграции гена в хромосому проводят культивирование полученного штамма в 1 мл среды LB без добавления соответствующего антибиотика при 42°С в течение 3 дней. Затем делают рассев петлей по поверхности агаризованной среды LB для получения изолированных колоний и последующей **проверки их «методом отпечатков» на чувствительность к антибиотику**, ген устойчивости к которому находился на плазмиде.

Проверку осуществляют отбором по меньшей мере 25 колоний. Каждую колонию суспендируют при помощи стерильной зубочистки в 200 мкл стерильного физиологического раствора, внесенного в соответствующую лунку металлической плашки, инкубируют при комнатной температуре в течение 1,5 ч и делают «отпечатки» суспензий металлическим пробоотборником на чашки Петри с агаризованной средой LB и необходимыми антибиотиками. Например, одна чашка Петри содержит среду LB с добавлением тетрациклина для оценки удаления транспозазной плазмиды рМН-Тс, а другая чашка — среду LB с добавлением антибиотика, ген устойчивости к которому находился на плазмиде с интегрируемым в хромосому геном. Чашку Петри со средой LB без антибиотиков используют для выявления чувствительного к антибиотикам нужного клона, освобожденного от обеих плазмид, который пересевают и проверяют интеграцию необходимого гена в хромосому посредством ПЦР. Если штамм все еще содержит плазмиду, то необходимо повторить его культивирование в жидкой среде LB, не содержащей соответствующих антибиотиков, при 42°С.

МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ ХИМИЧЕСКИ-КОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК *E. coli* ПО ХАНАХАНУ (HANAHAN), ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ

Данный метод с применением комплексных условий для получения компетентных клеток воспроизводимо дает до 10^7 – 10^8 трансформантов на 1 мкг интактной плазмидной ДНК в зависимости от штамма компетентных клеток и типа плазмидной ДНК. Трансформационный буфер содержит одно-, двух- и трехвалентные катионы

(K^+ , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{3+}), а диметилсульфоксид (ДМСО) и дитиотреитол (ДТТ) добавляют для облегчения взаимодействия молекул плазмидной ДНК с каналами клеточной стенки бактерий. Различные модификации этого, одного из наиболее эффективных способов химической трансформации применяются для работы со многими штаммами *E. coli*, такими как $\chi 1776$ (для которого метод и был разработан), С600, DH1 и др. Частота трансформации постоянна до ~ 10 нг плазмидной ДНК на 100 мкл компетентных клеток, далее с увеличением концентрации ДНК эффективность снижается.

Необходимые реактивы и растворы:

- буферный раствор TFB (для стандартной трансформации) следующего состава: 45 мМ $MnCl_2 \times 4H_2O$, 10 мМ $CaCl_2 \times 2H_2O$, 100 мМ KCl; 3 мМ хлористый гексаминокобальт; 10 мМ MES (4-морфолиноэтансульфоновая кислота, pH 6,3).

Способ приготовления буферного раствора TFB: 1) растворить 19,52 г MES в 80 мл деионизованной воды, довести pH до 6,3 с помощью 5 М КОН и довести объем деионизованной водой до 100 мл; стерилизовать фильтрованием через фильтр с диаметром пор 0,2–0,45 мкм; разлить полученный 1 М раствор на аликвоты по 10 мл и хранить при $-20^\circ C$; 2) растворить 8,91 г $MnCl_2 \times 4H_2O$, 1,47 г $CaCl_2 \times 2H_2O$, 7,46 г KCl и 0,8 г хлористого гексаминокобальта в 500 мл деионизованной воды; добавить 10 мл 1 М MES (pH 6,3) и довести объем деионизованной водой до 1 л; стерилизовать фильтрованием через фильтр с диаметром пор 0,2–0,45 мкм; разлить полученный раствор на аликвоты по 40 мл и хранить при $4^\circ C$;

- буферный раствор FSB (для хранения замороженных компетентных клеток) следующего состава: 10 мМ ацетат калия (pH 7,5); 45 мМ $MnCl_2 \times 4H_2O$, 10 мМ $CaCl_2 \times 2H_2O$, 100 мМ KCl; 3 мМ хлористый гексаминокобальт; 10% (объем/объем) глицерина.

Способ приготовления буферного раствора FSB: 1) растворить 9,82 г ацетата калия в 90 мл деионизованной воды; довести pH до 7,5 с помощью 2 М уксусной кислоты и довести объем деионизованной водой до 100 мл; стерилизовать фильтрованием через фильтр с диаметром пор 0,2–0,45 мкм; разлить полученный 1 М раствор на аликвоты по 10 мл и хранить при $-20^\circ C$; 2) растворить 8,91 г $MnCl_2 \times 4H_2O$, 1,47 г $CaCl_2 \times 2H_2O$, 7,46 г KCl и 0,8 г хлористого гексаминокобальта в 500 мл деионизованной воды; добавить 10 мл 1 М ацетата калия (pH 7,5) и 100 мл глицерина; довести pH до 6,4 с помощью 0,1 М HCl и довести объем деионизованной водой до 1 л; стерилизовать

фильтрованием через фильтр с диаметром пор 0,2–0,45 мкм; разлить полученный раствор на аликвоты по 40 мл и хранить при 4°C.

Стандартный буферный раствор для трансформации (буфер TFB) используется в процессе приготовления химически-компетентных клеток для немедленного использования. Буферный раствор для хранения клеток в замороженном состоянии (буфер FSB) используется для приготовления химически-компетентных клеток с последующим их хранением при –70°C;

- диметилсульфоксид (ДМСО) высокой степени очистки (HPLC или выше). Разлить на аликвоты по 1 мл в стерильные, хорошо закрывающиеся пробирки и хранить при –20°C;
- раствор DnD следующего состава (на 10 мл): 1,53 г дитиотреитола (ДТТ); 9 мл ДМСО; 100 мкл 1 М ацетата калия (pH 7,5); деионизованная вода. Стерилизовать только фильтрованием через мембраны Millex SR («Millipore», США), устойчивые к органическим растворителям. Разлить полученный раствор на аликвоты по 160 мкл в стерильные микроцентрифужные пробирки, плотно закрыть и хранить при –20°C;
- стерильные среды SOB и SOC — см. приложение 1.

Методика

А. Подготовка компетентных клеток

1. Высеять необходимый штамм *E. coli* непосредственно из хранящейся при –70°C культуры на поверхность чашки Петри с агаризованной средой SOB. Инкубировать при 37°C в течение 16 ч.

2. Перенести 4–5 изолированных колоний в 1 мл среды SOB, содержащей 20 мМ MgSO₄. Перемешать клеточную суспензию умеренным встряхиванием на вортексе и развести ее 30–100 мл среды SOB с 20 мМ MgSO₄ в 500-мл колбе.

3. Выращивать культуру при 37°C на качалке с интенсивным перемешиванием (200–300 об/мин) в течение 2–4 ч, наблюдая за ростом (до плотности 0,5–1 × 10⁸ клеток/мл).

4. Перенести культуру в стерильную, предварительно охлажденную 50-мл центрифужную пробирку. Охладить клетки инкубацией во льду в течение 10 мин.

5. Собрать биомассу центрифугированием при 2700 g в течение 10 мин при 4°C. Слить надосадочную жидкость, тщательно освободить осадок клеток от остатков жидкости с помощью пипетки и перемешиванием пробирки на 1 мин.

6. Осторожно суспендировать (перемешиванием или аккуратным встряхиванием на вортексе) осадок клеток в 20 мл ледяного

трансформационного буферного раствора TFB или FSB. Инкубировать клеточную суспензию во льду в течение 10 мин.

7. Собрать биомассу центрифугированием при 2700 g в течение 10 мин при 4°C. Слить буферный раствор и тщательно освободить осадок биомассы от остатков жидкости с помощью пипетки и переворачиванием пробирки на 1 мин.

8. Осторожно суспендировать (перемешиванием или аккуратным встряхиванием на вортексе) осадок клеток в **4 мл ледяного** трансформационного буферного раствора TFB или FSB. Перейти к п. 9, если компетентные клетки предполагается использовать немедленно, или к п. 10, если компетентные клетки предполагается хранить при –70°C и использовать позже.

9. Приготовление свежих компетентных клеток

9.1. Добавить **140 мкл** раствора DnD в центр пробирки с клеточной суспензией. Немедленно и осторожно перемешать вращательным движением и инкубировать суспензию во льду в течение 15 мин.

9.2. Добавить в пробирку **140 мкл** раствора DnD дополнительно. Осторожно перемешать вращательным движением и инкубировать суспензию клеток во льду снова в течение 15 мин.

9.3. Разлить аликвоты клеточной суспензии по 0,2 мл в стерильные, предварительно охлажденные микроцентрифужные пробирки и держать их во льду до начала процесса трансформации.

10. Приготовление компетентных клеток для последующего хранения при –70°C (остаются компетентными в большинстве случаев в течение 6 мес. и более)

10.1. Добавить **140 мкл** спектрально чистого ДМСО на 4 мл клеточной суспензии. Осторожно перемешать вращательным движением и инкубировать суспензию во льду в течение 15 мин.

10.2. Добавить в пробирку еще **140 мкл** ДМСО. Осторожно перемешать вращательным движением и поставить пробирку с клетками в лед.

10.3. Быстро разлить 0,2-мл аликвоты клеточной суспензии в стерильные, предварительно охлажденные микроцентрифужные пробирки. Немедленно заморозить компетентные клетки путем кратковременного погружения плотно закрытых пробирок в жидкий азот или в смесь сухой лед : этанол (–55°C). Хранить суспензии компетентных клеток при –70°C.

10.4. Перед процессом трансформации быстро разморозить клетки, хранившиеся при –70°C, нагревом между ладонями и поместить аликвоты клеточной суспензии в лед *сразу* после того, как они начнут размораживаться (либо разморозить при 0–4°C в течение

30 мин). Держать пробирки с суспензией компетентных клеток во льду до начала эксперимента.

Б. Процесс трансформации

1. Добавить к холодной суспензии компетентных клеток необходимую плазмидную ДНК (желательно не больше **5 нг** ДНК в буферном растворе ТЕ или в растворе для лигирования на **50 мкл** суспензии клеток) в объеме, не превышающем 5% от объема клеточной суспензии. Аккуратно перемешать содержимое пробирок переворачиванием несколько раз. Инкубировать пробы во льду в течение 30 мин.

2. Перенести пробирки с суспензией компетентных клеток и плазмидной ДНК в водяную баню, нагретую предварительно до **42°C**. Инкубировать ровно **90 с**. Не перемешивать содержимое пробирок во время инкубации.

3. Немедленно перенести пробирки с клетками в лед и охладить их в течение 1–2 мин.

4. Добавить **800 мкл** среды SOC в каждую пробирку. Нагреть культуры до 37°C на водяной бане и затем перенести пробирки в термостат на 37°C. Инкубировать в течение 45–60 мин при слабом перемешивании для восстановления жизнеспособности клеток и экспрессии гена антибиотической устойчивости, находящегося на плазмиде. В случае тетрациклиновой селекции рекомендуется инкубировать клетки в течение 30 мин.

5. Высеять необходимый объем (до 200 мкл на чашку Петри с $\varnothing = 85$ мм) клеточных суспензий трансформантов на чашки Петри с агаризованной средой SOB, содержащей 20 мМ MgSO_4 и соответствующий антибиотик. Выдержать при комнатной температуре до впитывания суспензии в агаризованную среду. Инкубировать чашки при 37°C до появления колоний трансформантов (обычно это происходит через 12–16 ч).

Дополнения к методике

К п. А3. Культивирование при 18°C повышает эффективность компетентности, но время роста культуры в этом случае будет составлять несколько суток. При 18°C высокая степень компетентности достигается в широком интервале $\text{ОП}_{600} = 0,35\text{--}0,70$; тогда как при 37°C зависимость эффективности компетентности от плотности клеточной культуры гораздо более строгая (максимум компетентности наблюдается при $\text{ОП}_{600} = \sim 0,45$ для штамма DH5 α).

К п. А10. Как уже отмечалось выше, продукты окисления диметилсульфоксида (ДМСО) сильно подавляют процесс трансформации. Поэтому рекомендуется хранить свежий раствор спектрально

чистого ДМСО при -70°C в аликвотах, которые используются только один раз.

К п. Б1. Несмотря на то что эффективность трансформации снижается при большой концентрации плазмидной ДНК в смеси (свыше 10–40 нг ДНК на 100-мкл пробу), некоторые протоколы рекомендуют вносить до 150 нг и больше плазмидной ДНК на 100 мкл суспензии компетентных клеток. Мы, в свою очередь, не использовали больше 50 нг плазмидной ДНК на 100 мкл клеточной суспензии.

К п. Б2. Для увеличения эффективности трансформации в случае использования *E. coli* штамм $\chi 1776$ рекомендуется перед проведением теплового шока (42°C) предварительно быстро заморозить трансформационную смесь, поместив ее в баню с сухим льдом и этанолом на 30–60 с, и после этого немедленно разморозить ее в водяной бане при комнатной температуре.

К п. Б5. Если в ходе генно-инженерной работы необходимо получить несколько индивидуальных колоний, то можно высеять 100–200 мкл суспензии *неравномерно*. Для получения как можно большего числа колоний, например при создании геномной библиотеки, — равномерно высеять 10–50 мкл суспензии для определения титра.

4.2.

ПОЛУЧЕНИЕ ЭЛЕКТРОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК И ЭЛЕКТРОПОРАЦИЯ

Воздействие на суспензию клеток импульсов электрического поля с максимальной напряженностью до нескольких тысяч вольт на см и длительностью до десятков миллисекунд способно вызвать резкий рост проводимости бислойных липидных мембран за счет локальной перестройки их структуры и создания пор. Благодаря этому в клетку может быть осуществлен даже перенос макромолекул, размер которых превышает диаметр пор (которые способны к обратимому расширению). После электрического импульса проницаемость клеток снижается до базовых значений в течение короткого (1–2 мин и менее) периода времени.

Методы получения компетентных клеток и сам процесс электропорации проще и удобнее, чем химическая трансформация. Электропорация позволяет получить высокую максимальную эффективность трансформации (до 10^9 – 10^{10} трансформантов на 1 мкг интактной плазмидной ДНК размером до 3 тпо) при использовании даже минимального количества ДНК. В случае использования больших плазмид (размером до 120–140 тпо) эффективность электропорации составляет около 10^6 .

Однако в отличие от химической трансформации рекомбинантная плазмидная ДНК для использования при электропорации должна быть очищена, так как не очищенная от солей лигазная смесь может вызвать искровой разряд в кювете электропоратора при подаче электрического импульса, что резко снижает эффективность трансформации. Кроме того, в ходе такой электропорации в клетки *E. coli* может попасть ДНК-лигаза. Также надо отметить, что из-за высокой эффективности электропорации крайне важно применять стерильные растворы, одноразовые микроцентрифужные пробирки и носики для автоматических пипеток, чтобы максимально снизить вероятность трансформации клеток посторонними плазмидами; полученные клоны необходимо обязательно проверять.

Как уже было отмечено, электропорация (электрошоковая трансформация) представляет собой наиболее эффективный метод трансформации в случае *E. coli* и обеспечивает частоту получения компетентных клеток, близкую к теоретическому максимуму. Оптимальные условия электропорации уже разработаны и для многих других видов бактерий, где химическая трансформация дает низкую эффективность или не отработана вовсе. Одним из наиболее важных требований к электротрансформационной смеси (клетки + ДНК) является ее очень низкая ионная сила, в отличие от использования двухвалентных/мультивалентных катионов для получения химически-компетентных клеток. Наилучшие результаты по получению электрокомпетентных клеток и электропорации обнаруживаются при использовании *E. coli* штамм MC1061 и его производного DH10B, выращиваемых на питательной среде без добавления Mg^{2+} .

Электрокомпетентные клетки хранятся при $-70^{\circ}C$ в суспензиях с добавлением высокоочищенных криопротекторов — глицерина (препятствует формированию кристаллов льда внутри клетки за счет образования водородных связей с молекулами воды) и/или сахарозы (непроникающий криопротектор, защищает клетки от осмотических перепадов и снижает скорость образования кристаллов льда).

МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ ЭЛЕКТРОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК *E. coli* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЛИЦЕРИНА, ЭЛЕКТРОПОРАЦИЯ

Необходимые реактивы и растворы:

- стерильные ледяная деионизованная вода и ледяной 10%-ный водный раствор глицерина (высокой степени очистки);
- стерильные среды LB и SOC — см. приложение 1.

Методика

А. Приготовление электрокомпетентных клеток

1. Засеять **1 мл** свежей ночной культуры *E. coli* в **100 мл** среды LB (или SOB) в литровой колбе. Культивировать при 30–37°C с энергичным перемешиванием (не менее 120 об/мин) до достижения середины экспоненциальной фазы роста культуры (соответствует $OP_{600} \sim 0,5$ или около 4–6 ч культивирования).

Все дальнейшие операции проводить во льду!

2. Охладить колбу с культурой во льду в течение 15–30 мин, собрать клеточную биомассу центрифугированием при 2700 g в течение 15 мин при 4°C. Слить супернатант, тщательно удалить остатки питательной среды микропипеткой.

3. Аккуратно промыть клетки равным объемом (**100 мл**) ледяной деионизованной воды. Центрифугировать при 2700 g в течение 15 мин при 4°C. Слить супернатант.

4. Суспендировать осадок в 0,5 объемах ледяной деионизованной воды (**50 мл**). Центрифугировать при 2700 g в течение 15 мин при 4°C. Слить супернатант.

5. Суспендировать осадок в **5 мл** ледяного 10%-ного раствора глицерина. Концентрация клеток должна составлять примерно $1-3 \times 10^{10}$ клеток/мл.

6. Суспензию электрокомпетентных клеток разлить по 45-мкл аликвотам во льду, немедленно заморозить (лучше в жидком азоте) и хранить при –70°C. Качество электрокомпетентных клеток сохраняется при таком условии хранения в глицерине в течение 6 мес.

Б. Процесс электротрансформации (электропорации)

1. Осторожно оттаять пробирки с электрокомпетентными клетками при комнатной температуре и *немедленно* поместить их в лед. Охладить во льду стерильные кюветы для электропорации.

2. Настроить прибор для электропорации (наиболее часто применяются приборы типа «Gene Pulser» производства компании «Bio-Rad», США, рис. 4.3) в следующем режиме: электрическая емкость конденсатора 25 мкФ, электрическое сопротивление 200 Ом (Ω). Установить электрическое напряжение 1,7 кВ в случае использования 0,2-см кювет для электропорации.

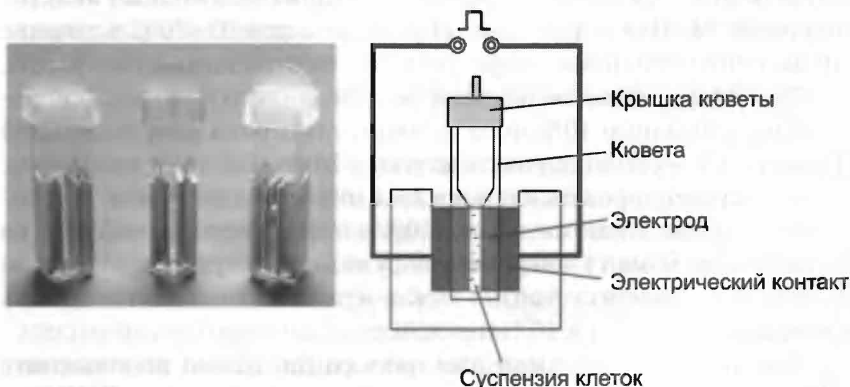
3. Добавить к **45 мкл** холодной суспензии электрокомпетентных клеток **5 мкл** раствора плазмидной ДНК. Аккуратно перемешать и инкубировать во льду в течение **5–10 мин**.

4. Перенести электротрансформационную смесь на дно охлажденной 0,2-см кюветы для электропорации (рис. 4.4). Правильно поместить закрытую кювету в ячейку прибора для электропорации,

Рис. 4.3. Прибор для электропорации «Gene Pulser II» производства «Bio-Rad» (США)



Рис. 4.4. Кюветы для электропорации «Gene Pulser» с электродами из алюминия («Bio-Rad», США) и схема электропоратора со вставленной кюветой



предварительно тщательно вытерев электроды на наружных стенках кюветы от следов воды (это *важно* во избежание пробоя электричества, что может привести к нарушению процесса трансформации). Провести электропорацию импульсным разрядом тока (время импульса от 3,9 до 4,6 мс).

5. Вынуть кювету из прибора для электропорации и *немедленно* добавить в кювету 1 мл среды SOC. Быстро перемешать суспензию клеток пипетированием.

6. Перенести суспензию в стерильную 15-мл полипропиленовую пробирку и инкубировать при 30–37°C (в зависимости от используемых штамма и плазмиды) в течение 1–2 ч при умеренном перемешивании (50–120 об/мин).

7. Высеять аликвоты клеточной суспензии по 10 и 100 мкл на чашки Петри с агаризованной (1,5% агара) средой LB, содержащей соответствующий антибиотик. Инкубировать при 37°C до появления колоний трансформантов (обычно в течение 12–24 ч).

Дополнения к методике

К разделу А. Необходимо работать с электрокомпетентными клетками в процессе их приготовления при 0°C (использовать баню с ледяной водой).

К п. А3. Клетки необходимо отмывать в большом объеме ледяной воды для удаления всех солевых примесей питательной среды.

К разделу Б. При использовании в качестве ДНК смеси после лигирования (см. подглаву 7.1) необходимо предварительно освободить препарат от солей. Для этого можно переосадить лигазную смесь этанолом и растворить ее в деионизованной воде, провести диализ против 0,1х буферного раствора ТАЕ в течение 1 ч при 4°C (самый эффективный способ) или использовать 10-кратное разведение водой. Кроме того, после лигирования необходимо инактивировать T4 ДНК-лигазу инкубированием при 65–70°C в течение 10 мин (что увеличивает эффективность электропорации в ~ 10 раз).

Существует несколько модификаций данного метода с использованием ледяного 10%-ного раствора глицерина вместо ледяной воды: п. А3 — суспендировать клетки в 20 мл 10%-ного глицерина, п. А4 — суспендировать клетки в 2 мл 10%-ного глицерина, п. А5 — суспендировать клетки в 1 мл 10%-ного глицерина, разлить на аликвоты по 50 мкл в микроцентрифужные пробирки и хранить при –70°C. Полученная суспензия электрокомпетентных клеток должна содержать 5×10^{10} – 1×10^{11} клеток/мл.

К п. Б3. Для успешной электропорации важно использовать 50 мкл смеси суспензии электрокомпетентных клеток и ДНК при применении 0,2-см кювет.

К п. Б7. Поскольку количество трансформантов в суспензии клеток после электропорации значительно больше, чем в случае химической трансформации, высевать всю пробу на агаризованную среду не стоит из-за возможного появления сателлитных колоний и снижения уровня компетентности.

МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ ЭЛЕКТРОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК *Pseudomonas* sp. С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ САХАРОЗЫ, ЭЛЕКТРОПОРАЦИЯ

Необходимые реактивы и растворы:

- стерильная среда NB следующего состава (вес/объем, %): глюкоза — 0,5; мясной экстракт — 0,5; NaCl — 0,5 и пептон — 0,5. Питательный бульон готовится на деионизованной воде, pH 7,5;
- стерильный ледяной 300 мМ водный раствор сахарозы.

Методика

А. Подготовка электрокомпетентных клеток

1. Выращивать 100 мл культуры *Pseudomonas* sp. в питательном бульоне при 30°C до достижения ранней экспоненциальной фазы роста (соответствует $ОП_{600} = 0,3-0,5$).

2. Охладить колбу с культурой во льду в течение 30 мин и перенести клетки в 50-мл охлажденные центрифужные пробирки. Собрать биомассу центрифугированием при 2700 g в течение 10 мин при 4°C.

3. Суспендировать осадок клеток в **40 мл** *ледяного* 300 мМ раствора сахарозы. Центрифугировать при 2700 g в течение 10 мин при 4°C. Повторить настоящий пункт.

4. Суспендировать осадок клеток в **20 мл** *ледяного* 300 мМ раствора сахарозы. Центрифугировать при 2700 g в течение 10 мин при 4°C. Повторить настоящий пункт.

5. Суспендировать осадок клеток в **500 мкл** *ледяного* 300 мМ раствора сахарозы.

6. Инкубировать суспензию электрокомпетентных клеток во льду в течение 30 мин перед электропорацией.

Б. Процесс электротрансформации (электропорации)

1. Настроить прибор для электропорации (типа «Gene Pulser») в следующем режиме: электрическая емкость конденсатора 25 мкФ, электрическое сопротивление 200 Ом (Ω). Установить электрическое напряжение 1,5–2,5 кВ в случае использования 0,2-см кювет для электропорации.

2. Перенести **45 мкл** суспензии электрокомпетентных клеток в охлажденную микроцентрифужную пробирку и добавить **5 мкл** раствора ДНК (до 1 мкг). Перемешать и инкубировать во льду в течение **1 мин**.

3. Перенести электротрансформационную смесь на дно охлажденной 0,2-см кюветы для электропорации. Правильно поместить закрытую кювету в прибор для электропорации, предварительно тщательно освободив электроды на наружных стенках кюветы от следов воды (это *важно* во избежание пробоя электричества!). Провести электропорацию импульсным разрядом тока.

4. Вынуть кювету из прибора для электропорации и *немедленно* добавить в нее 3 мл питательного бульона. Быстро перемешать суспензию клеток пипетированием.

5. Перенести клеточную суспензию в стерильную полипропиленовую пробирку и инкубировать при 30°C в течение 2–16 ч при сильном перемешивании (200 об/мин).

6. Высеять аликвоты клеточной суспензии по 100 мкл после 2-часового и 16-часового культивирования на чашки Петри с агаризованной средой, содержащей соответствующий антибиотик. Инкубировать при 30°C до появления колоний трансформантов. Для *Pseudomonas* sp. штамм P51 необходимо использовать среду NB, для *Pseudomonas putida* — среду LB или NB.

Литература

1. Bergmans H.E.N., van Die I.M., Hoekstra W.P.M. Transformation in *Escherichia coli*: stages in the process // J. Bacteriol. 1981. V. 146. P. 564–570.
2. Bolivar F., Backman K. Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors // Methods Enzymol. 1979. V. 68. P. 245–267.
3. Bukau B., Brass J.M., Boos W. Ca²⁺-induced permeabilization of the *Escherichia coli* outer membrane: comparison of transformation and reconstitution of binding-protein dependent transport // J. Bacteriol. 1985. V. 163. P. 61–68.
4. Calvin W., Hanawalt P.C. High efficiency transformation of bacterial cells by electroporation // J. Bacteriol. 1988. V. 170. P. 2796–2801.
5. Chen I., Dubnau D. DNA uptake during bacterial transformation // Nat. Rev. Microbiol. 2004. V. 2. P. 241–249.
6. Chung C.T., Niemela S.L., Miller R.H. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 2172–2175.
7. Dreiseikelmann B. Translocation of DNA across bacterial membranes // Microbiol. Rev. 1994. V. 58. P. 293–316.
8. Farinha M.A., Kropinski A.M. High efficiency electroporation of *Pseudomonas aeruginosa* using frozen cell suspensions // FEMS Microbiol. Lett. 1990. V. 58. P. 251–255.
9. Hanahan D. Studies on transformation of *E. coli* with plasmids // J. Mol. Biol. 1983. V. 166. P. 557–580.
10. Hanahan D., Bloom F.R. Mechanisms of DNA transformation // *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. 2nd ed. / Eds. F.C. Neidhardt et al. Washington, D.C.: ASM Press, 1996. P. 2449–2459.
11. Hanahan D., Jessee J., Bloom F.R. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria // Methods Enzymol. 1991. V. 204. P. 63–113.
12. Hengen P.N. Methods and reagents. Preparing ultra-competent *Escherichia coli* // Trends Biochem. Sci. 1996. V. 21. P. 75–76.
13. Huang R., Reusch R.N. Genetic competence in *Escherichia coli* requires poly- β -hydroxybutyrate/calcium polyphosphate membrane complexes and certain divalent cations // J. Bacteriol. 1995. V. 177. P. 486–490.
14. Huff J.P., Grant B.J., Penning C.A., Sullivan K.F. Optimization of routine transformation of *Escherichia coli* with plasmid DNA // Biotechniques. 1990. V. 9. P. 570–577.
15. Inoue H., Nojima H., Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids // Gene. 1990. V. 96. P. 23–28.
16. Kiel J.A., ten Berge A.M., Borger P., Venema G. A general method for the consecutive integration of single copies of a heterologous gene at multiple locations in the *Bacillus subtilis* chromosome by replacement recombination // Appl. Environ. Microbiol. 1995. V. 61. P. 4244–4250.

17. *Kushner S.R.* An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1-derived plasmids // Genetic Engineering / Eds. H.B. Boyer, S. Nicosia Amsterdam: Elsevier/North-Holland, 1978. P. 17–23.

18. *Mandel M., Higa A.* Calcium dependent bacteriophage DNA infection // J. Mol. Biol. 1970. V. 53. P. 159–162.

19. *Sato Y., Kumazawa N., Yoshikawa K., Kurusu Y.* Transformation of *Escherichia coli* mediated by natural phospholipids // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2005. V. 69. P. 235–237.

20. *Sukharev S.I., Klenchin V.A., Serov S.M., Chernomordik L.V., Chizmadzhev Y.A.* Electroporation and electrophoretic DNA transfer into cells — the effect of DNA interaction with electropores // Biophys. J. 1992. V. 63. P. 1320–1327.

21. *Swords W.E.* Chemical transformation of *E. coli* // Methods Mol. Biol. 2003. V. 235. P. 49–53.

22. *Weaver J.C.* Electroporation — a general phenomenon for manipulating cells and tissues // J. Cell Biochem. 1993. V. 51. P. 426–435.

23. *Weaver J.C., Chizmadzhev Y.* Theory of electroporation: a review // Bioelectroch. Bioener. 1996. V. 41. P. 135–160.

24. *Wirth R., Friesenegger A., Fiedler S.* Transformation of various species of gram-negative bacteria belonging to 11 different genera by electroporation // Mol. Gen. Genet. 1989. V. 216. P. 175–177.

**ПЕРЕНОС ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ
У БАКТЕРИЙ С ПОМОЩЬЮ
ФАГОВОЙ ТРАНСДУКЦИИ И КОНЬЮГАЦИИ**

У бактерий известны три способа передачи генетических признаков: трансформация, трансдукция и конъюгация (рис. 5.1). В процессе *трансформации* ДНК одной бактерии — донора — переходит в другую бактерию — реципиент. Способность или неспособность к трансформации любого бактериального штамма зависит от его компетентности, под которой понимают способность реципиентного штамма включать ДНК из внешней среды внутрь клетки. Второй способ передачи генетических признаков — *трансдукция* — это процесс генного переноса, при котором бактериальный вирус, размножающийся в клетках штамма-донора, включает в себя часть генетической информации бактерии и после инфицирования другого, реципиентного, штамма вызывает наследуемые изменения у последнего. Реципиентная клетка, которая таким путем приобретает признаки донора, называется трансдуктантом. И, наконец, третий тип генетического переноса — *конъюгация* — это процесс, при котором клетки бактерии-донора вступают в непосредственный физический контакт с клетками реципиентного штамма и передают ему генетический материал. Общим свойством всех указанных процессов является однонаправленность переноса генетического материала, от клетки-донора к клетке-реципиенту. Реципрокного (взаимного) обмена генетической информацией у бактерий не происходит.

Генетический перенос играет важную роль в появлении новых штаммов бактерий, поскольку он наряду с мутационными процессами обуславливает генетическую изменчивость микроорганизмов, позволяя им наиболее благоприятно адаптироваться к определенным условиям внешней среды.

Способность осуществлять перенос генетических признаков от одной бактерии к другой широко применяется при генетических исследованиях микроорганизмов. Благодаря этим процессам создаются новые генно-инженерные штаммы, изучение которых позволяет устанавливать способ организации генов на бактериальной хромосоме, основные принципы их функционирования, а также возможные схемы регуляции выражения генов.

а трансформация



б трансдукция



в конъюгация

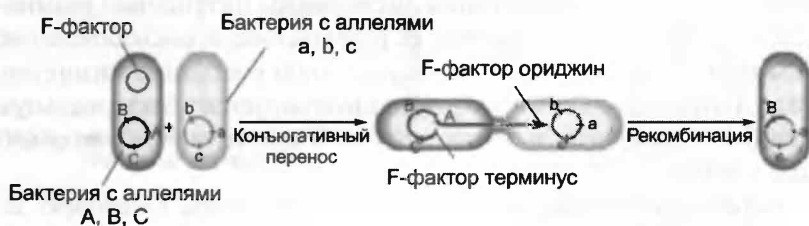


Рис. 5.1. Способы генетического обмена у бактерий

5.1.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПЕРЕНОС С ПОМОЩЬЮ ФАГОВОЙ ТРАНСДУКЦИИ

Известны два типа трансдукции — специфическая и общая. При *специфической трансдукции* могут передаваться лишь генетические маркеры донора, прилежащие к интегрированному профагу. Фаги, осуществляющие специфическую трансдукцию, содержат участки генетического материала донора, заменившие участки фагового генома. Примером специфической трансдукции является перенос *gal⁺*

признака фагом λ *E. coli*. Под *общей трансдукцией* понимают передачу любого признака донора независимо от того, расположены ли его детерминанты в хромосоме, плазмиде или профаге. В этом случае образование фагов, участвующих в общей трансдукции, сопровождается случайной упаковкой донорного генетического материала вместо фагового. Поэтому большинство фаговых частиц, способных трансдуцировать ДНК донора, полностью дефектны. Реципиентная клетка, инфицированная такой частицей, в отсутствие одновременной множественной инфекции нормальными фаговыми частицами приобретает только генетический материал донора, но не фага. Проникнув в реципиентную клетку, генетическая информация донора либо заменяет генетическую информацию реципиента путем рекомбинации (если она хромосомного происхождения), либо существует автономно (в случае трансдукции внехромосомной ДНК).

Широкое применение нашли клонирующие фаговые векторы на основе бактериофага λ , размер ДНК которого составляет 48,5 тпо. При этом часть ДНК (примерно 20 тпо) необходима для встраивания фага в хозяйскую ДНК, но несущественна для его размножения (таким образом, эту часть можно заменить фрагментом чужеродной ДНК, который предполагается клонировать). После проникновения фага в клетку *E. coli* возможны два пути развития событий — литический цикл (когда *вирулентный бактериофаг* интенсивно размножается в клетке, что приводит к ее разрушению и высвобождению примерно 100 новых фаговых частиц) либо состояние лизогении (когда ДНК *умеренного бактериофага* интегрируется в бактериальную хромосому как профаг и реплицируется в клетке вместе с ее обычными генами).

Инфекционная фаговая частица имеет головку, в которую заключена плотно упакованная ДНК, и отросток с отходящими от него фибриллами (белковыми нитями). ДНК бактериофага λ представляет собой линейную двухцепочечную молекулу с одноцепочечными взаимно комплементарными 5'-концами из 12 нуклеотидов (так называемые *cos*-концы). После прохождения фаговой ДНК через отросток и проникновения ее в *E. coli* *cos*-концы спариваются друг с другом с образованием кольцевой молекулы. В результате ее репликации образуется линейная молекула, которая состоит из нескольких повторяющихся сегментов по 50 тпо, разделенных *cos*-сайтами (по которым разрезается молекула при заполнении очередными сегментами головок бактериофагов).

Классическим примером бактериофага λ для клонирования яв-

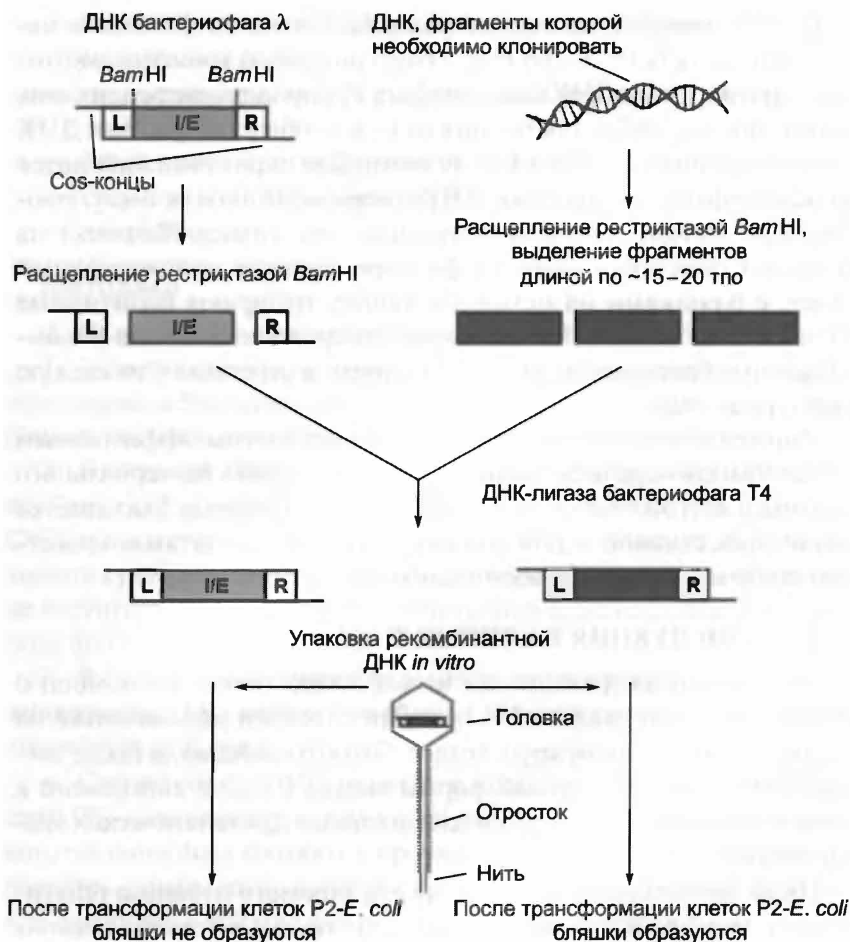


Рис. 5.2. Клонирование с помощью системы на основе бактериофага λ

ляется вектор с двумя *Bam*HI-сайтами (рис. 5.2), фланкирующими участок размером 20 тпо, который ответствен за процессы интеграции и исключения (I/E-сегмент). Слева от него находится область L (содержит информацию о головке и отростке фага), а справа — область R (содержит информацию, необходимую для репликации ДНК и лизиса). Клонированную и фаговую ДНК расщепляют с помощью рестриктазы *Bam*HI, препараты фрагментов клонируемой ДНК (размером 15–20 тпо) смешивают с рестрицированной фаговой ДНК, смесь обрабатывают ДНК-лигазой фага T4 и упаковывают рекомбинантные молекулы в пустые головки бактериофага λ *in vitro* с добавлением собранных отростков.

В инфицированных такими рекомбинантными фаговыми частцами клетках P2-*E. coli* (т.е. в бактериальную хромосому которых интегрирована ДНК бактериофага P2) происходит репликация только молекул ДНК, состоящих из R- и L-областей фаговой ДНК и клонированной вставки между ними. Для скрининга библиотек на основе фага λ используют ДНК-гибридизацию или иммунологические методы после перенесения зон лизиса (бляшек) на фильтр. Сопоставив пятна на фильтре, дающие положительный ответ, с бляшками на исходной чашке, отбирают позитивные бляшки и проводят субкультивирование; для сохранения рекомбинантных бактериофагов их периодически пересевают на свежую культуру *E. coli*.

Применение общей трансдукции является очень эффективным средством для переноса генных мутаций из одного бактериального штамма в другой. Часто использование этого подхода оказывается самой эффективной мерой при создании сложных штаммов, несущих сразу несколько хромосомных модификаций.

P1-ТРАНСДУКЦИЯ В КЛЕТКАХ *E. coli*

У *E. coli* общая трансдукция может осуществляться с помощью умеренного бактериофага P1, который способен размножаться на чрезвычайно широком круге хозяев. Это его свойство, а также легкость получения мутантной формы вируса P1_{vir}, не способного к лизогении, делает P1 очень привлекательным для генетических экспериментов.

Ниже приведена методика трансдукционного переноса генетического маркера из одного (донорного) штамма в другой (реципиентный) штамм *E. coli*. Она заключается в размножении P1_{vir} на донорном штамме с последующим получением его фаголизата. После этого проводится инфицирование реципиентного штамма полученным P1-лизатом и отбор трансдуктанов (бактерий, получивших селективный маркер) на соответствующей питательной среде и при определенных условиях.

Необходимые реактивы и растворы:

- стерильная среда LB — см. приложение 1;
- «верхний» агар следующего состава: в предварительно прогретой до 50°C микробиологической пробирке смешать 10 мл жидкой среды LB и 5 мл агаризованной среды LB (1,2% агара), прокипятить, добавить 40 мкл 1 М CaCl₂;

- селективная среда в агаризованном виде (например, минимальная среда М9);
- стерильный раствор МС следующего состава: 0,1 М MgSO_4 и 5 мМ CaCl_2 ;
- стерильный 0,9%-ный раствор NaCl ;
- стерильный 1 М раствор цитрата натрия;
- хлороформ.

Методика

А. Получение P1-лизата на донорном штамме

1. Засеять одиночную колонию штамма, используемого в качестве донора, в 5 мл жидкой среды LB. Поместить пробирку на качалку (240 об/мин) и выращивать при 37°C в течение ночи (12–14 ч).

2. Перенести 200 мкл ночной культуры в микробиологическую пробирку с 2 мл жидкой среды LB, добавить 80 мкл 1 М раствора CaCl_2 и поместить пробирку на качалку (37°C, 240 об/мин). Подрачивать культуру в течение нескольких часов до тех пор, пока клетки не достигнут плотности, соответствующей середине логарифмической фазы роста.

3. В 5 стерильных микробиологических пробирок налить по 1 мл жидкой среды LB, добавить по 40 мкл 1 М раствора CaCl_2 и по 100 мкл подросшей культуры.

4. Суспензию фага P1_{vir} развести в микроцентрифужных пробирках 0,9%-ным раствором NaCl в 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 раз (100 мкл исходного раствора фага добавить к пробирке с 900 мкл физиологического раствора, перемешать, отобрать 100 мкл смеси и перенести ее в новую пробирку с 900 мкл физиологического раствора и т.д.).

5. Отобрать по 100 мкл из каждого серийного разведения фага P1_{vir} и внести в пробирки с культурой, аккуратно перемешать. В последнюю пробирку фаг не добавлять, она будет служить контролем на чистоту используемой культуры от фага.

6. Поместить пробирки в водяной термостат (37°C) и инкубировать в течение 20 мин для адсорбции фага на клетках бактерий.

7. Приготовить соответствующее количество чашек Петри с агаризованной средой LB в качестве нижнего слоя и 1–2 микробиологические пробирки с 15 мл расплавленного «верхнего» агара.

8. Чашки с «нижним» слоем можно подсушить при 37°C для удаления конденсата и предотвращения преждевременного застывания «верхнего» агара, а пробирки с «верхним» агаром необходимо поместить в водяной термостат (42–45°C).

9. В пробирки с инфицированной фагом культурой добавить по **2 мл** «верхнего» агара, перемешать и сразу же вылить на чашки Петри с «нижним» агаром на строго горизонтальной поверхности (иначе плотность посева будет неравномерной).

10. Инкубировать чашки в термостате при 37°C в течение 8–12 ч крышками вверх.

11. Осмотреть чашки. Выбрать из них вариант с таким разведением суспензии фага, на котором фаговые бляшки почти полностью покрыли газон бактерий (так называемую фаговую сетку). Титр фага определяется по числу фаговых бляшек.

12. Осторожно собрать верхний слой агара с помощью стерильного шпателя в несколько микроцентрифужных пробирок (обычно в две). Объем суспензии в каждой из них не должен превышать **500 мкл**. Добавить в пробирки по **400 мкл** 0,9%-ного раствора NaCl и **100 мкл** хлороформа, интенсивно перемешать на вортексе в течение 30–60 с и инкубировать в течение 20 мин при комнатной температуре.

13. Центрифугировать пробирки при 12 000 g в течение 15 мин.

14. Осторожно отобрать по **500 мкл** верхней фазы и перенести в новые микроцентрифужные пробирки. Добавить в них по **50 мкл** хлороформа, перемешать и повторить центрифугирование.

15. Отобрать по **400 мкл** верхней фазы и объединить пробы в одной микроцентрифужной пробирке. Добавить в нее несколько капель хлороформа для предотвращения бактериального застарения и хранить как фаговый лизат данного штамма при 4°C . Для длительного хранения лучше добавить в фаговый лизат ДМСО до конечной концентрации 7% и хранить при -70°C .

Б. Трансдукция с использованием P1-лизата

1. Засеять одиночную колонию реципиентного штамма в микробиологическую пробирку с **5 мл** жидкой среды LB. Поместить пробирку на качалку и инкубировать при 37°C в течение ночи (12–14 ч).

2. Перенести **2 мл** ночной культуры в стерильную микроцентрифужную пробирку и осадить клетки центрифугированием (при 5000 g в течение 5 мин при комнатной температуре).

3. Слить надосадочную жидкость и ресуспендировать клетки в **2 мл** стерильного раствора MC.

4. Инкубировать клеточную суспензию при 37°C в течение 15–20 мин с перемешиванием.

5. Внести по **100 мкл** клеточной суспензии в шесть микроцентрифужных пробирок. Добавить в пять пробирок по **100 мкл** соот-

ветствующего разведения Р1-лизата (1 : 1, 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000 и 1 : 10000), полученного на донорном штамме. В шестую пробирку фаголизат вносить не нужно, она служит контролем на чистоту реципиентного штамма от фага.

6. Поместить пробирки в термостат (37°C) и инкубировать в течение 20 мин без перемешивания для адсорбции фага Р1 на бактериальных клетках.

7. Осадить клетки центрифугированием при 5000 g в течение 5 мин при комнатной температуре.

8. Слить надосадочную жидкость и ресуспендировать клетки в 1 мл физиологического раствора.

9. Осадить клетки центрифугированием при 5000 g в течение 5 мин при комнатной температуре.

10. Слить надосадочную жидкость, ресуспендировать клетки в 50–100 мкл физиологического раствора и высеять суспензию клеток на селективные агаризованные среды.

11. Поместить чашки в термостат и инкубировать при 37°C до появления отдельных колоний.

12. Для очистки бактерий от остатков фага Р1 с помощью микробиологической петли рассеять несколько трансдуктантов до отдельных колоний на чашки с селективной средой, дополнительно содержащей цитрат натрия (100 мкл 1 М раствора цитрата натрия на 25 мл среды), который препятствует реадсорбции фага. Повторить процедуру 1–2 раза.

Дополнения к методике

К п. А3 и всей методике в целом. Для адсорбции и развития бактериофага Р1 в клетках *E. coli* необходимо присутствие в питательной среде ионов кальция и магния. При несоблюдении этого условия эффективность фагового инфицирования и трансдукции заметно падает.

К п. А4 и Б5. При использовании фага Р1_{vir} необходимо предотвратить чрезмерную гибель клеток реципиентного штамма. Этого можно достичь благодаря оптимально низкой множественности инфицирования культуры. Использование последовательного ряда разведений Р1-лизата позволяет подобрать такое условие.

Стоит заметить, что эту проблему можно решить и иным способом. Известно, что добавление цитрата натрия (до 50 мМ) удаляет из среды ионы Ca²⁺, что в значительной степени предотвращает повторную адсорбцию фага. В этом случае для проведения эффектив-

ной трансдукции может быть использована множественность инфицирования около 1.

Кп. А6 и Б6. При инфицировании фагом Р1 клеток *E. coli* нужно учитывать тот факт, что адсорбция данного фага протекает не очень быстро. Поэтому важно выждать определенное время перед высевом инфицированной культуры в питательную среду. Как правило, для этого процесса достаточно 20 мин (известно, что за это время при 37°C к клеткам прикрепляется 30–50% от общего количества фага). Кроме того, необходимо иметь в виду, что инкубация фага и клеток в высоких концентрациях гарантирует хорошую адсорбцию. Некоторые протоколы рекомендуют для синхронизации инфицирования инкубировать смесь фаг + клетки при 0°C в течение 20–25 мин (адсорбция фага), а затем при 37°C в течение 5 мин (проникновение фага в клетки).

Кп. А10. При инкубации чашек крышками вверх образующийся конденсат капает на клеточный газон, что помогает получению сплошного лизиса культуры.

Кп. А11. Количество фага и клеток, высеваемых на чашку, зависит от размера блюшек. Наиболее высокие титры препаратов получаются тогда, когда блюшки на чашке соприкасаются, давая сплошной лизис. Если блюшки сильно перекрываются, то клетки газона лизируются слишком рано (чашки выглядят прозрачными), а выход фага будет низким. В том случае, когда блюшки не перекрываются (видны отдельные блюшки на клеточном газоне), заражено слишком мало клеток, что приводит к низкой концентрации фага в конечном препарате.

Кп. Б5. Применение метода разведений для подбора оптимальной множественности инфицирования значительно упрощает процедуру трансдукции, поскольку в этом случае сделать это быстрее и проще, чем отдельно титровать фаголизат.

Кп. Б11 и Б12. В некоторых случаях было показано, что переносимый посредством фаговой трансдукции фрагмент ДНК не вступает в рекомбинацию с хромосомой реципиента, а остается вне хромосомы. Тогда клетка становится гетерозиготной по перенесенным генам. Показано, что гены, находящиеся на такой внехромосомной ДНК, выражаются, но сам фрагмент не реплицируется. Это приводит к тому, что при клеточном делении этот фрагмент ДНК переходит только в одну из дочерних клеток (так называемая *абортивная трансдукция*). Если реципиентный штамм ауксотрофный, а переносимый фрагмент ДНК исправляет соответствующий дефект, то

при высеве на агаризованную селективную среду способны расти только те клетки, которые унаследовали этот фрагмент. При абортивной трансдукции бактерии на такой среде могут образовывать колонии мельчайшего размера, которые можно ошибочно принять за нормальных трансдуктантов.

T4-ТРАНСДУКЦИЯ В КЛЕТКАХ *E. coli*

Для осуществления общей трансдукции также пользуются мутантной формой литического бактериофага T4 (рис. 5.3) — T4GT7. Преимуществом данного подхода является больший размер ДНК, который может быть упакован в фаговые частицы данного фага (до 120 тпо), что позволяет осуществлять одновременный перенос далеко отстоящих друг от друга генетических маркеров. Кроме того, частота трансдукции некоторых генов с использованием бактериофага T4 выше, чем с использованием бактериофага P1. Стоит заметить, что фаг T4GT7, как и P1, способен размножаться на широком круге хозяев, и это свойство активно используется в генетических экспериментах.

Ниже приведена методика трансдукционного переноса генетического маркера из штамма-донора в штамм-реципиент *E. coli* с помощью фага T4GT7. Поскольку протокол достаточно схож с вышеприведенной методикой для P1-трансдукции, мы не будем подробно описывать все этапы процедуры, а приведем лишь ключевые моменты.

Необходимые реактивы и растворы:

- стерильные среды LB и Хоттингера — см. приложение 1;
- селективная среда в агаризованном виде (например, минимальная среда M9);
- стерильный раствор MC следующего состава: 0,1 М MgSO_4 и 5 мМ CaCl_2 ;
- стерильный 0,9%-ный раствор NaCl;
- стерильный 1 М раствор цитрата натрия;
- хлороформ.

Методика

А. Получение T4-лизата на донорном штамме

1. Вырастить культуру донорного штамма в 5 мл жидкой среды LB. Инкубировать на качалке (240 об/мин) при 37°C в течение 12–14 ч.
2. Перенести 200 мкл ночной культуры в микробиологическую пробирку с 2 мл жидкой среды LB, поместить пробирку на качалку

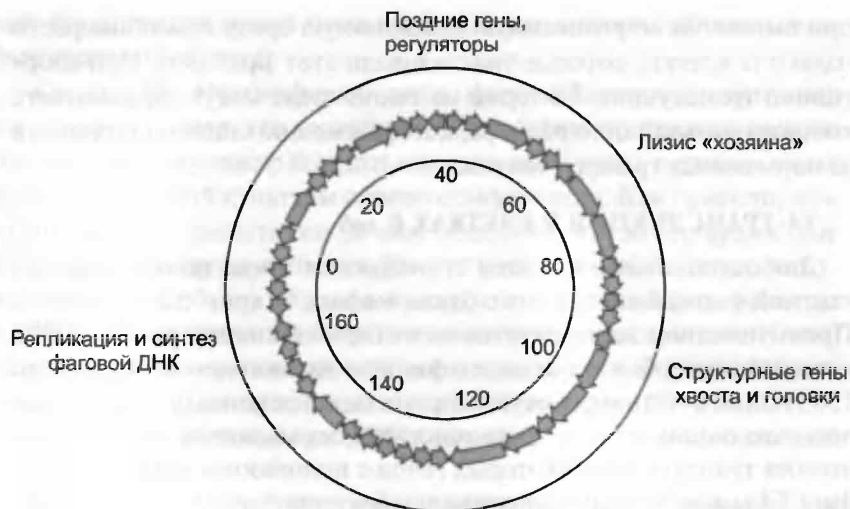


Рис. 5.3. Схематическая генетическая карта бактериофага Т4.
Цифрами обозначены координаты генов (в тыс. по)

(240 об/мин) и подрастить культуру при 29°C до плотности, соответствующей середине логарифмической фазы роста.

3. В 6 стерильных микробиологических пробирок налить по 200 мкл жидкой среды LB, добавить по 20 мкл подросшей культуры.

4. Суспензию фага Т4GT7 развести в микроцентрифужных пробирках 0,9%-ным раствором NaCl в 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 раз. Добавить по 100 мкл из каждого разведения фага в пробирки с культурой (в последнюю пробирку фаг не вносить, это контроль) и инкубировать при комнатной температуре в течение 20 мин для адсорбции фага на клетках бактерий.

5. Приготовить: чашки Петри с агаризованной средой Хоттингера в качестве нижнего слоя и 1–2 микробиологические пробирки с 15 мл расплавленного «верхнего» агара. «Верхний» агар готовится следующим образом: в предварительно прогретой до 50–60°C стерильной микробиологической пробирке смешать 10 мл бульона Хоттингера и 5 мл агаризованной (1,2%) среды Хоттингера.

6. В пробирки с инфицированной культурой добавить по 2 мл «верхнего» агара (лучше в водяной бане на 45°C), перемешать и сразу же вылить на чашки Петри с агаризованной средой.

7. Инкубировать чашки в термостате при 30–37°C в течение 8–12 ч крышками вверх.

8. Осмотреть чашки. Выбрать из них вариант с таким разведением суспензии фага, на котором фаговые бляшки почти полностью покрыли газон бактерий (фаговую сетку, рис. 5.4).

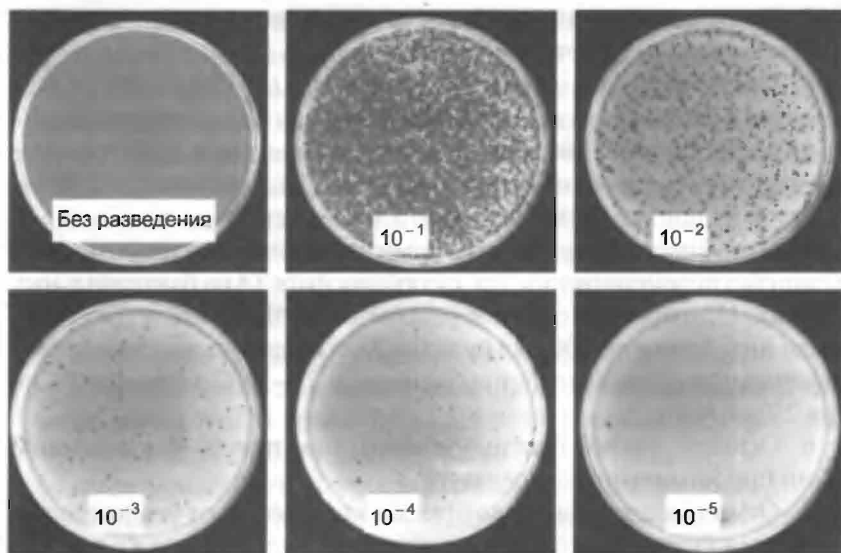


Рис. 5.4. Типичный вид бляшек бактериофага Т4 при серийных разведениях

9. Осторожно собрать верхний слой агара с помощью стерильного шпателя в две микроцентрифужные пробирки. Объем суспензии в каждой из них не должен превышать **500 мкл**. Добавить в пробирки по **400 мкл** 0,9%-ного раствора NaCl и **100 мкл** хлороформа, интенсивно перемешать на вортексе в течение 30–60 с и инкубировать в течение 20 мин при комнатной температуре.

10. Центрифугировать пробирки при 12 000 g в течение 15 мин.

11. Осторожно отобрать по **500 мкл** верхней фазы и перенести в новые микроцентрифужные пробирки. Добавить в них по **50 мкл** хлороформа, перемешать и повторить центрифугирование.

12. Отобрать по **400 мкл** верхней фазы и объединить пробы в одной микроцентрифужной пробирке. Добавить в нее несколько капель хлороформа для предотвращения бактериального застарения и хранить как Т4-лизат данного штамма при 4°C.

Б. Трансдукция с использованием Т4-лизата

1. Вырастить культуру реципиентного штамма в **5 мл** жидкой среды LB. Инкубировать на качалке (240 об/мин) при 37°C в течение 12–14 ч.

2. Перенести **2 мл** ночной культуры в стерильную микроцентрифужную пробирку и осадить клетки центрифугированием (5000 g в течение 5 мин при комнатной температуре).

3. Слить надосадочную жидкость и ресуспендировать клетки в 0,6 мл стерильного раствора МС.

4. Приготовить два разведения фаголизата (1 : 10 и 1 : 100) в 0,9%-ном растворе NaCl. Внести по 10 мкл фаголизата в микроцентрифужные пробирки с 200 мкл клеточной суспензии и триптофаном (50 мкл раствора с концентрацией 1 мг/мл). Адсорбция фага Т4 зависит от наличия триптофана в питательной среде.

5. Инкубировать пробы при комнатной температуре в течение 30 мин без перемешивания для адсорбции фага Т4 на бактериальных клетках. Некоторые методики рекомендуют добавить в пробирки после инкубации по 500 мкл бульона Хоттингера, перенести пробы на качалку и продолжить инкубацию при 29–30°C в течение 2–3 ч при 250 об/мин.

6. Осадить клетки центрифугированием при 5000 g в течение 5 мин при комнатной температуре.

7. Отмыть клетки физиологическим раствором от неадсорбированного фага, как это было описано для фага Р1.

8. Высеять суспензию клеток на селективные агаризованные среды. Поместить чашки в термостат и инкубировать при 37°C до появления отдельных колоний.

ТРАНСДУКЦИЯ У БАКТЕРИЙ РОДА *Bacillus*

Фаговая трансдукция играет главенствующую роль при исследовании генетического сцепления маркеров у *Bacillus*. Практически у всех представителей этого рода обнаружены фаги, способные инфицировать клетку и трансдуцировать фрагменты ДНК. Изучение некоторых видов бацилл, например *Bacillus thuringiensis*, возможно только посредством трансдукционных скрещиваний по причине отсутствия у них природной компетентности или низкой эффективности трансформации протопластов. С помощью некоторых фагов, в частности CP-51 и CP-54, возможно осуществлять генетический перенос между различными видами *Bacillus*.

Для *Bacillus subtilis* наиболее используемым для трансдукционных экспериментов является бактериофаг PBS1. Его частицы способны упаковывать в свою головку порядка 6–9% хромосомы. Такая большая емкость этого фага сделала трансдукцию PBS1 основным методом анализа удаленных друг от друга генетических маркеров у этой бактерии. Трансдуцирующие лизаты PBS1 готовятся сравнительно легко и хранятся годами. Единственным ограничением для применения этого фага является то, что он адсорбируется и инфицирует только подвижные клетки и поэтому не может быть пригоден для исследования малоподвижных мутантов.

Помимо PBS1 для *B. subtilis* описано множество бактериофагов. Некоторые из них, например SP-15 или SPPI, обладают трансдуцирующими свойствами, хотя и редко используются для работы с *B. subtilis*. Однако эти фаги могут применяться для переноса плазмидной ДНК посредством трансдукции.

Представленная ниже методика описывает процедуру осуществления генетического переноса в бактериях рода *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. cereus*) посредством бактериофага CP-51.

Необходимые реактивы и растворы:

- стерильная среда РА — см. приложение 1;
- агаровые среды для чашек: нижний слой — 15 г Бакто-агара («Difco») на 1 л среды РА (1,5% агара); верхний слой — 5 г Бакто-агара («Difco») на 1 л среды РА (0,5% агара);
- стерильный 1%-ный раствор пептона («Difco») в воде;
- стерильный фаговый буферный раствор следующего состава: 0,1 М NaCl; 0,01 М $MgCl_2$; 0,05 М трис-HCl; pH 7,5;
- стерильный 0,9%-ный раствор NaCl;
- хлороформ.

Методика

А. Получение фаголизата на штамме-доноре

1. Вырастить ночную культуру штамма-донора в 5 мл жидкой среды РА.

2. Перелить 0,5 мл ночной культуры в микробиологическую пробирку с 10 мл жидкой среды РА. Поместить пробирку на качалку (240 об/мин) и подрачивать в течение 5–6 ч при 37°C.

3. Залить 6 чашек Петри расплавленным «нижним» агаром.

4. В заранее прогретую до 50°C микробиологическую пробирку налить 20 мл расплавленного «верхнего» агара. Поместить пробирку в водяную баню (42–45°C).

5. Приготовить несколько разведений фагового стока (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) в фаговом буферном растворе (см. предыдущую методику).

6. В 5 стерильных микробиологических пробирках смешать 0,2 мл бактериальной культуры и 0,1 мл из каждого разведения фага. Шестая (контрольная) пробирка должна содержать только культуру штамма-донора.

7. Налить в пробирки 3–4 мл «верхнего» агара, интенсивно перемешать и вылить в чашки Петри на поверхность «нижнего» агара. После застывания верхнего слоя поместить чашки в термостат и, не переворачивая, инкубировать в течение ночи при 30°C.

8. Осмотреть чашки. Убедиться в отсутствии фаговых бляшек в контроле. С помощью шпателя осторожно собрать верхний слой агара с тех чашек, на которых фаговые бляшки почти полностью покрыли газон чувствительных клеток. Перенести суспензию в микробиологические пробирки с 5 мл фагового буферного раствора.

9. Добавить к суспензии хлороформ до конечной концентрации 2%, перемешать и инкубировать при комнатной температуре в течение 3–6 ч.

10. Перенести клеточный лизат в стерильные центрифужные пробирки и центрифугировать при 5000 g в течение 30 мин при 4°C.

11. Отобрать надосадочную жидкость и профильтровать ее через нитроцеллюлозный фильтр с размером пор 0,45 мкм («Millipore», США).

12. Повторить процедуру инфицирования, описанную выше, используя полученный препарат фага. Рассчитать титр фага в растворе исходя из числа фаговых бляшек на чашках и соответствующего разведения.

Б. Трансдукция с помощью фага.

1. Засеять культуру штамма-реципиента в микробиологическую пробирку с 5 мл жидкой среды РА. Поместить пробирку на качалку и инкубировать при 37°C в течение ночи.

2. Добавить 0,5 мл ночной культуры в микробиологическую пробирку с 10 мл жидкой среды РА. Поместить пробирку на качалку (240 об/мин) и подрашивать в течение 5–6 ч при 37°C.

3. Обработать 1 мл фаголизата, полученного на донорном штамме, ультрафиолетом. Для этого следует заранее подобрать условия облучения, при которых число фаговых бляшек, образуемых на газоне чувствительных клеток, сокращается на 95–99%.

4. В стерильной микробиологической пробирке смешать 1 мл подросшей культуры штамма-реципиента (приблизительно 10^9 клеток) с препаратом фага, полученным на донорном штамме. При этом надо исходить из расчета, чтобы множественность инфицирования находилась в интервале от 1 до 4. Во вторую (контрольную) пробирку добавить только культуру реципиентного штамма.

5. Поместить пробирки в водяную баню и инкубировать при 37°C в течение 30–40 мин для адсорбции фага на клетках штамма-реципиента.

6. Высевать суспензии клеток на чашки Петри, содержащие селективную среду для последующего отбора трансдуктантов. Инкубировать чашки в термостате при соответствующей температуре до появления отдельных бактериальных колоний на тех чашках, в ко-

торые были посеяны пробы с фагом. Контрольные чашки должны быть чистыми.

7. Подтвердить генный перенос у выросших бактерий с помощью ПЦР или иным способом (генетическим, биохимическим и т.п.).

Дополнения к методике

Кп. А3. Чашки готовить непосредственно перед экспериментом и не сушить. Образовавшийся конденсат на чашках можно осторожно удалить с помощью фильтровальной бумаги.

Кп. А10. Длительное хранение фага в растворе без существенной потери титра значительно сокращает время работы при серии опытов (не нужно готовить каждый раз свежий препарат фага). В отличие от фагов *E. coli* (P1 или лямбда), фаги, размножающиеся на бактериях рода *Bacillus*, часто бывают нестабильны. Поэтому для каждого определенного бактериофага приходится подбирать оптимальные условия хранения. Так, для фага SP-10 — это замораживание в фаговом буферном растворе, содержащем глицерин в концентрации 15%. Бактериофаг CP-51, способный размножиться в клетках *B. cereus*, *B. thuringiensis* и *B. anthracis*, стабильно поддерживает титр только при хранении в разведенной (1 : 5) питательной среде NBY при температуре 15°C.

5.2.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПЕРЕНОС ПОСРЕДСТВОМ КОНЪЮГАЦИИ

Конъюгация — это тип опосредуемого клеткой переноса генов, требующий наличия у клетки-донора специальной *конъюгативной плазмиды*, которая может реплицироваться автономно от бактериальной хромосомы либо находиться в ней в интегрированном состоянии. Особенностью конъюгативных плазмид является то, что они содержат гены *tra*, определяющие и/или контролирующие образование на поверхности клеток половых ворсинок-пилей, необходимых для осуществления донорной клеткой физического контакта с реципиентной клеткой, а также точку начала переноса в молекуле конъюгативной плазмиды.

Конъюгативные плазмиды свойственны главным образом грамотрицательным бактериям. Они, как правило, имеют довольно ограниченный круг клеток-хозяев, в которые могут переносить и реплицировать свою ДНК. Однако существуют и исключения. Например, плаزمида RP4, выделенная из бактерий рода *Pseudomonas*,

переносится и стабильно поддерживается в граммотрицательных клетках *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Rhizobium*, *Salmonella*, *Shigella*. Непосредственно перенос ДНК в реципиентную клетку обеспечивается мобилизационными свойствами конъюгативной плазмиды.

Из плазмид, способных к конъюгационному переносу, наиболее хорошо изученным является фактор фертильности (F-фактор) *E. coli*. Эта низкокопийная конъюгативная плазида IncF1-группы несовместимости может существовать как автономно в цитоплазме F⁺-донора (свободная эписома F⁺), так в интегрированном состоянии (штамм Hfr, от «*high frequency of recombination*»). При определенных условиях доноры Hfr способны последовательно и ориентированно переносить в реципиент хромосому с постоянной скоростью, начиная с генетически фиксированной точки, зависящей от места интеграции фактора F в бактериальную хромосому и ее ориентации. До определения полного генома *E. coli* это свойство широко использовалось при картировании генетических локусов кишечной палочки.

Реципиентные клетки, в которых происходит экспрессия генетического материала донора, называются *трансконъюгантами*. Но надо иметь в виду, что перенос генетического материала от донора к реципиенту является частичным, поскольку во время передачи хромосомы происходят ее спонтанные разрывы.

Стоит заметить, что наряду с осуществлением собственного переноса из клеток-доноров в клетки-реципиенты конъюгативные мобилизуемые плазмиды способны участвовать также в специфическом процессе переноса от одной бактерии к другой некоторых неконъюгативных плазмид (а большинство плазмид, использующихся в работе с рекомбинантными ДНК, не обладают конъюгативными свойствами). Характерной особенностью таких плазмид является наличие так называемого *oriT*-локуса, обеспечивающего передачу их ДНК через систему переноса конъюгативной плазмиды (*oriT* — это определенная точка на конъюгативной плазмиде, с которой начинается перенос плазмиды и хромосомы донора в случае Hfr-штаммов).

В качестве примера таких плазмид можно привести неконъюгативный вектор RSF1010 из IncQ-группы несовместимости, который может быть мобилизован в широкий круг бактерий. Перенос неконъюгативных плазмид в клетки-реципиенты может осуществляться также вместе с конъюгативными, т.е. в этом случае они составляют единую молекулу ДНК, объединяющую несколько репликонов (например, так передаются вектора группы pBR). Таким образом, с использованием *мобилизации неконъюгативной плазмиды*

можно трансформировать плазмидой клетки-реципиенты, с трудом поддающиеся трансформации другими способами.

Часто для мобилизации неконъюгативных плазмид используют не двухродительское, а трехродительское скрещивание (мобилизуемая и конъюгативная плазмиды находятся в разных штаммах-донорах), что позволяет преодолеть возможный барьер несовместимости плазмид и упрощает конструирование донорных штаммов. Культуры, используемые в скрещиваниях, должны быть активно растущими, а концентрация реципиентов должна превышать концентрацию доноров, по крайней мере, на порядок.

Конъюгацию можно ставить в жидкой среде, на поверхности агаризованной среды или на мембранных фильтрах с диаметром пор 0,22–0,45 мкм, помещенных на поверхность агаризованной среды. Последние два метода обеспечивают гораздо более тесный контакт между клетками и являются предпочтительными, если используемые плазмиды детерминируют образование коротких пилей (например, плазмиды R-группы несовместимости).

Конъюгация широко применяется для генетического анализа, например для определения частот рекомбинации между генетическими маркерами при анализе тесно сцепленных генов и внутригенном картировании, для определения последовательности генов на хромосоме по градиенту их передачи и в картировании методом прерывания конъюгации.

Предлагаемая ниже методика может использоваться для изучения конъюгационного переноса фенотипических признаков при внутривидовом, межвидовом и межродовом скрещивании. Эксперимент представляет собой смешивание клеток донора и реципиента в благоприятствующих конъюгации условиях, остановку этого процесса через определенное время и последующее выделение трансконъюгантов, обладающих признаками как донора, так и реципиента. В качестве примера рассматривается генетическая передача способности донорного штамма расти на средах, содержащих антибиотик хлорамфеникол, клеткам реципиента, устойчивого к налидиксовой кислоте. Заметим, что применение налидиксовой кислоты в качестве селективного агента имеет дополнительное преимущество, поскольку данное соединение устойчиво ингибирует конъюгационный перенос ДНК.

Необходимые реактивы и растворы:

- стерильная среда LB в жидком и агаризованном (1,2%) виде — см. приложение 1;

- «верхний» агар следующего состава: в предварительно прогретой до 50°C микробиологической пробирке смешать 10 мл жидкой среды LB и 5 мл агаризованной (1,2% агара) среды LB;
- стерильный 0,9%-ный раствор NaCl;
- хлорамфеникол (рабочая концентрация 30 мг/мл);
- налидиксовая кислота (рабочая концентрация 50 мг/мл).

Методика

1. Вырастить ночные культуры реципиентного и донорного штаммов.

2. Добавить **100 мкл** каждой из культур в соответствующие микробиологические пробирки, содержащие по **10 мл** жидкой среды LB. Поместить пробирки на качалку (240 об/мин, 37°C) и подрачивать до тех пор, пока культуры не достигнут плотности, соответствующей середине логарифмической фазы роста.

3. Высеять небольшие аликвоты культур (50–100 мкл) на чашки с селективной средой, чтобы убедиться в том, что родительские штаммы чувствительны к используемым концентрациям селективных агентов (в предложенном примере это налидиксовая кислота и хлорамфеникол) и не способны к образованию колоний на селективной среде. Для определения максимально возможного числа конъюгативных пар оценивают число жизнеспособных клеток штамма-донора (клетки штамма-реципиента берутся заведомо в избытке), высевая десятичные разведения суспензии донора на чашки Петри со средой LB.

4. Поместить 250-мл колбу Эрленмейера в водяную баню так, чтобы уровень воды в бане был немного ниже пробки колбы. Прогрейте баню до 37°C.

5. Внести в колбу **9 мл** культуры реципиента. Выдержать 5–7 мин, чтобы она приняла температуру бани, после чего добавить **1 мл** культуры донора. Легким вращательным движением смешать клетки донора и реципиента.

6. Инкубировать колбу в течение 1 ч. За это время периодически (обычно через 5-, 10- или 15-минутные интервалы) отбирать пробы из смеси донорных и реципиентных клеток, которые затем разводятся и высеваются по 100–150 мкл на чашки, содержащие селективную среду. При длительности конъюгации до 30 мин делать конечные разведения 10^{-2} – 10^{-3} , при более продолжительном процессе — до 10^{-3} – 10^{-4} для определения частоты образования рекомбинантов в процентах от числа живых клеток штамма-донора.

7. Инкубировать чашки в термостате при 37°C до появления отдельных колоний (трансконъюгантов) на поверхности агара.

8. Убедиться в наличии обоих фенотипических родительских признаков у полученных трансконъюгантов (рекомбинантов), проверив их способность расти на среде, содержащей оба селективных агента (хлорамфеникол и налидиксовую кислоту).

Дополнения к методике

К п. 1. При выборе реципиентного штамма не стоит забывать о системах рестрикции—модификации бактерий. Иногда именно работой этой системы объясняется невозможность обнаружения конъюгативных плазмид при внутривидовых, межвидовых и межродовых скрещиваниях. Поэтому в качестве реципиента целесообразно брать мутантов, лишенных таких систем. Это *hsdR* или *hsdS* мутанты *E. coli* или *S. typhimurium*. Если же подобрать такой штамм в качестве реципиентного не представляется возможным, то проблема может быть отчасти решена прогреванием клеток реципиента перед конъюгацией в течение 15–20 мин при 45°C или предварительным выращиванием их при 42°C в течение 5–7 генераций.

К п. 4–6. Строгое поддержание постоянной температуры в течение процесса (в данной методике это 37°C) необходимо для обеспечения передачи ДНК с постоянной скоростью при конъюгативном спаривании. Это обстоятельство особенно важно при конъюгационном картировании генетического локуса, ответственного за определенный фенотип донора (в данном примере это устойчивость к хлорамфениколу). Благодаря этому становится возможным поставить соответствие между временем, прошедшим от начала процесса конъюгации до передачи данного маркера реципиентному штамму, и расположением маркера на хромосоме донорного штамма по отношению к точке начала переноса.

Стоит заметить, что приведенная в методике температура, при которой осуществляется конъюгативное спаривание (37°C), не всегда является оптимальной. Многие конъюгативные плазмиды энтеробактерий, например из группы несовместимости IncH, переносятся с наибольшей частотой, когда процесс спаривания проводится при более низких температурах.

К п. 5. Общий объем находящейся в колбе Эрленмейера жидкости (10 мл) имеет высоту слоя не более 2–3 мм. В этих условиях можно не проводить аэрацию культуры встряхиванием, поскольку обеспечивается достаточная диффузия кислорода к конъюгирующим клеткам. Рост бактериальной культуры без активного переме-

шивания необходим для оптимальной экспрессии фенотипа донорного штамма, так как эти условия благоприятствуют образованию максимального числа половых ворсинок наибольшей длины.

Ко всей методике в целом. Некоторые конъюгативные плазмиды плохо стимулируют перенос ДНК в условиях контакта клеток в жидкой среде. В этих случаях процесс конъюгационного переноса может протекать более эффективно, если спаривание клеток донора и реципиента происходит на агаризованной среде. Для этого необходимо смешать соответствующие количества клеток реципиента и донора в стерильной микроцентрифужной пробирке и профильтровать через стерильный мембранный фильтр (например, нитроцеллюлозный фильтр «Millipore» с размером пор 0,22 мкм). Далее фильтр осторожно помещают на поверхность чашек Петри с агаризованной средой LB. Иногда ~ 20 мкл суспензии клеток донора и реципиента просто наносят поверх фильтра, лежащего на агаризованной среде. Чашки инкубируют в термостате в неперевернутом виде в течение необходимого для протекания процесса конъюгации периода времени. После этого надо поместить фильтр в пробирку с физиологическим раствором и смыть с него клетки энергичным встряхиванием. Соответствующие разведения образовавшейся клеточной суспензии высевать на чашки Петри, содержащие селективную среду. Поместить чашки в термостат и инкубировать до появления колоний трансконъюгантов.

Литература

1. Ackermann H.W., Krisch H.M. A catalogue of T4-type bacteriophages // Arch. Virol. 1997. V. 142. P. 2329–2345.
2. Dul J.L., Drexler H. Transcription stimulates recombination. Generalized transduction of *Escherichia coli* by phages T1 and T4 // Virology. 1988. V. 162. P. 471–477.
3. Firth N., Ippen-Ihler K., Skurray R. Structure and function of the F factor and mechanism of conjugation // *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. 2nd ed. / Eds. F.C. Neidhardt et al. Washington, D.C.: ASM Press, 1996. P. 2377–2401.
4. Goldberg R., Bender R., Streicher S. Direct selection for P1-sensitive mutants of enteric bacteria // J. Bacteriol. 1974. V. 118. P. 810–814.
5. Gormley E., Davies J. Transfer of plasmid RSF1010 by conjugation from *Escherichia coli* to *Streptomyces lividans* and *Mycobacterium smegmatis* // J. Bacteriol. 1991. V. 173. P. 6705–6708.
6. Ippen K., Shapiro J., Beckwith J. Transposition of the *lac* region to the *gal* region of the *Escherichia coli* chromosome: isolation of lambda-lac transducing bacteriophages // J. Bacteriol. 1971. V. 108. P. 5–9.
7. Kutter E., Guttman B., Carlson K. The transition from host to phage metabolism after T4 infection // Molecular Biology of Bacteriophage T4 / Eds. J.D. Karam et al. Washington, D.C.: ASM Press, 1994. P. 343–346.

8. Miller E.S., Kutter E., Mosig G., Arisaka F., Kunisawa T., Ruger W. Bacteriophage T4 genome // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2003. V. 67. P. 86–156.
9. Plakidou S., Moffat K.G., Salmond G.P.C., Mackinnon G. Convenient transduction of *recA* with bacteriophage T4GT7 // J. Bacteriol. 1984. V. 159. P. 1072–1073.
10. Rao V.B., Thaker V., Black L.W. A phage T4 *in vitro* packaging system for cloning long DNA molecules // Gene. 1992. V. 113. P. 25–33.
11. Samuels A., Lanka E., Davies J. Conjugative junctions in RP4-mediated mating of *Escherichia coli* // J. Bacteriol. 2000. V. 182. P. 2709–2715.
12. Thorne C. Transduction in *Bacillus thuringiensis* // Appl. Environ. Microbiol. 1978. V. 35. P. 1109–1115.
13. van Alstyne D., Simon M. Division mutants of *Bacillus subtilis*: isolation and PBS1 transduction of division-specific markers // J. Bacteriol. 1971. V. 108. P. 1366–1379.
14. Wall J., Harriman P. Phage P1 mutants with altered transducing abilities for *Escherichia coli* // Virology. 1974. V. 59. P. 532–544.
15. Wilson G.G., Young K.K.Y., Edlin G.J., Konigsberg W. High-frequency generalised transduction by bacteriophage T4 // Nature. 1979. V. 280. P. 80–82.
16. Young K.K., Edlin G.J. Physical and genetical analysis of bacteriophage T4 generalized transduction // Mol. Gen. Genet. 1983. V. 192. P. 241–246.

ТРАНСФЕКЦИЯ КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ ФАГОВОЙ ДНК

Под генетической трансфекцией понимается процесс поглощения фаговой ДНК компетентными клетками бактерии с последующим развитием фага в клетке и выходом из нее зрелых фаговых частиц. Впервые данное явление было продемонстрировано Ромигом в 1962 г. в его работах с клетками *Bacillus subtilis*. В дальнейшем возможность протекания этого процесса была доказана и для других бактерий.

Подобно явлению трансформации, процесс трансфекции может осуществляться бактериями, находящимися в особом состоянии — состоянии компетентности. У большинства бактерий компетентность возникает лишь на определенном этапе роста культуры. Например, для стрептококков это этап раннего логарифмического роста, а для сенной палочки и пневмококков — более поздние этапы развития культуры. Примечательно, что ряд бактерий вообще не обладают «естественной» компетентностью. Так, *E. coli* способна поглощать фаговую ДНК только после определенной обработки клеток.

При трансфекции процесс адсорбции и поглощения фаговой ДНК протекает, по-видимому, так же как и при генетической трансформации бактерий (см. гл. 4 и 5). Далее ДНК зрелого фага подвергается частичной фрагментации за счет действия клеточных нуклеаз. После этого наступает стадия так называемой первичной рекомбинации, когда фрагменты фаговой ДНК воссоединяются, дополняя друг друга. Это кооперативный процесс, для которого нужно присутствие в клетке нескольких молекул ДНК, дублирующих друг друга, так как некоторые участки одной молекулы ДНК могут быть повреждены при фрагментации. Этими процессами объясняется зависимость эффективности трансфекции от размера фаговой ДНК.

Чем крупнее фаг, тем сильнее фрагментация и тем больше нативных молекул фаговой ДНК должна поглотить клетка. Показано, что в случае фага H1, *B. subtilis* необходимо 4–5 молекул фаговой ДНК для формирования одной фаговой бляшки. Дальнейшие стадии развития фаговых частиц при трансфекции подобны соответствующим этапам развития фага после «обычного» заражения

клетки. Отличается лишь временной интервал между попаданием фаговой ДНК в бактерию и выходом зрелых частиц. Выход фаговых частиц из клетки в случае трансфекции заметно задержан. Так, при трансфекции посредством ДНК фага $\phi 25$ клеток *B. subtilis* фаговые частицы появляются через 80–85 мин, в то время как в случае фаговой инфекции — через 45 мин. Данное различие объясняется явлением фрагментации при трансфекции, поскольку показано отсутствие этого процесса в случае обычного заражения клетки.

Обычно опыты с трансфекцией ставят на штаммах бактерий, чувствительных к инфицированию фагом, из которого выделяется трансформирующая ДНК. Однако показана возможность осуществления трансфекции посредством ДНК одного и того же фага у разных подвидов микроорганизмов, а также у близкородственных и неродственных видов. Оказалось, что в тех случаях, где бактериальная клетка была способна поглощать ДНК (находиться в состоянии компетентности), трансфекция могла осуществляться, хотя и с низкой частотой, вне видовых границ.

Например, к трансфекции *B. subtilis* и *Bacillus licheniformis* способна ДНК фага GA-1, хотя между обоими микроорганизмами трансформация не идет. Трансфекция посредством фага $\phi X174$ из *E. coli* может происходить на сферопластах *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens* и *Pseudomonas aeruginosa*. Вместе с этим не удалось получить образования фаговых частиц после заражения компетентных клеток *B. subtilis* посредством ДНК фагов кишечной палочки. Точно так же в гемофильных бактериях, поглотивших ДНК фага λ , не образовывалось частиц этого фага, хотя сама ДНК фага существовала в течение часа без существенных повреждений. Видимо, после проникновения ДНК в компетентную клетку в действие вступают внутриклеточные механизмы, по тем или иным причинам препятствующие развитию фагов в несвойственном им хозяине.

ТРАНСФЕКЦИЯ КЛЕТОК *E. coli* ДНК БАКТЕРИОФАГА M13

Нитевидный фаг M13 бактерии *E. coli* широко применяется для молекулярного клонирования, определения последовательности нуклеотидов клонированных участков ДНК, выделения комплементарной РНК, фагового дисплея, а также для сайт-направленного мутагенеза.

В составе зрелых вирионов геном бактериофага M13 представляет собой замкнутую одноцепочечную нить ДНК длиной в 6407 нук-

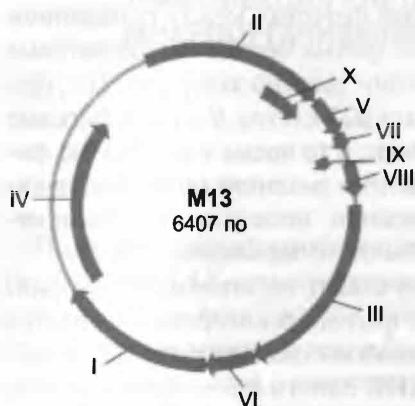


Рис. 6.1. Генетическая карта бактериофага М13. Римскими цифрами обозначены гены бактериофага

леотидов (рис. 6.1). При размножении фага в инфицированной бактериальной клетке происходит достройка второй фаговой цепи ДНК. Образовавшаяся двухцепочечная кольцевая молекула ДНК, называемая репликативной формой, реплицируется, достигая 200–300 копий на клетку. Клетки, инфицированные фагом М13, не подвергаются лизису и в них непрерывно синтезируются новые одноцепочечные молекулы ДНК М13, которые проходят через клеточную стенку, одеваются белковой оболочкой

и выходят в окружающую среду.

Таким образом, геном бактериофага М13 может находиться как в виде одноцепочечной ДНК, так и в виде большого числа копий двухцепочечной кольцевой плазмиды. Данное обстоятельство с успехом используется для генно-инженерных экспериментов. На рисунке 6.2 представлена рекомбинантная молекула бактериофага (М13mp18), в состав которой внесены дополнительные генетические элементы (промотор P_{lac} -UV5, *lacZ'* — альфа-пептид β -галактозидазы из *E. coli*, MCS — последовательность уникальных сайтов рестрикции) взамен несущественных участков фаговой ДНК; при этом инфекционность рекомбинантных вирусных частиц сохраняется. Наличие таких модификаций значительно облегчает работу при молекулярном клонировании и селекции гибридных молекул бактериофага.

После трансформации компетентных клеток *E. coli* рекомбинантной вирусной ДНК со вставкой их высевают на чашки со средой, содержащей субстрат X-gal, при гидролизе которого β -галактозидазой образуется продукт синего цвета. Соответственно клетки, инфицированные М13 со вставкой (размером до 500 нуклеотидов), нарушившей рамку считывания гена *lacZ'*, дают бесцветные колонии, из которых выделяют одноцепочечную фаговую ДНК со вставкой для ее последующего секвенирования.

Ниже представлена методика выделения репликативной формы ДНК фага М13mp18 и последующего осуществления трансфекции клеток *E. coli* с помощью ДНК этого бактериофага.

- насыщенный раствор ацетата аммония. Хранить раствор при 4°C;
- изопропиловый спирт;
- этиловый спирт: чистый (96%) и 70%-ный раствор в воде;
- буферный раствор ТЕ — см. прил. 1.

Методика

A. Выделение репликативной формы ДНК из фага M13mp18

1. Засеять одиночную колонию инфицируемого бактериального штамма (например, *E. coli* TG1) в микробиологическую пробирку с 5 мл жидкой среды LB. Поместить пробирку на качалку (240 об/мин) и инкубировать при 37°C в течение ночи.

2. Пастеровской пипеткой отобрать свежую одиночную фаговую бляшку, перенести ее в микробиологическую пробирку с 5 мл жидкой среды LB. Добавить в пробирку 50 мкл ночной культуры, поместить на качалку и инкубировать при 37°C в течение 3,5–4 ч.

3. Осадить клетки центрифугированием (при 5000 g в течение 5 мин при комнатной температуре). Осторожно отобрать надосадочную жидкость и поместить ее в стерильную полипропиленовую пробирку.

4. В микробиологическую пробирку с 5 мл жидкой среды LB внести 100 мкл ночной культуры, поместить пробирку на качалку и инкубировать при 37°C до достижения культурой середины логарифмической фазы роста.

5. В пробирку с подросшей культурой добавить 1 мл надосадочной жидкости (см. п. 3), поместить пробирку на качалку и инкубировать при 37°C в течение 40 мин.

6. Перелить клеточную суспензию в пробирки для центрифуги и центрифугировать при 12 000 g в течение 5 мин при комнатной температуре. Слить надосадочную жидкость.

7. Промыть клетки 2 мл раствора GT. Центрифугировать при 5000 g в течение 5 мин при комнатной температуре.

8. Клетки ресуспендировать в 800 мкл раствора I. Добавить 200 мкл раствора лизоцима, тщательно перемешать суспензию. Выдержать в течение 25 мин при комнатной температуре, после чего перенести в лед.

9. Добавить 2 мл раствора II и осторожно перемешать до просветления раствора. Инкубировать в течение 5 мин.

10. Добавить 1,5 мл охлажденного раствора III. Осторожно перемешать содержимое пробирки и инкубировать во льду в течение 30 мин.

11. Центрифугировать пробирку с лизатом бактерий при 12 000 g в течение 15 мин при 4°C. Перелить надосадочную жидкость в стерильную пробирку.

12. К содержимому пробирки добавить 1,5 мл 40%-ного раствора ПЭГ 6000 для преципитации фага, инкубировать во льду в течение часа.

13. Центрифугировать при 12 000 g в течение 15 мин при 4°C. Тщательно удалить надосадочную жидкость, ресуспендировать осадок в 600 мкл стерильной воды.

14. Добавить 300 мкл 3 М раствора ацетата натрия (рН 6,0), перемешать содержимое пробирки.

15. Центрифугировать при 12 000 g в течение 5 мин при 4°C. Перенести надосадочную жидкость в стерильную пробирку.

16. Добавить 300 мкл 40%-ного раствора ПЭГ 6000, перемешать и инкубировать во льду в течение часа.

17. Центрифугировать при 12 000 g в течение 15 мин при 4°C. Тщательно удалить надосадочную жидкость, ресуспендировать осадок в 300 мкл стерильной воды.

18. Добавить 600 мкл насыщенного раствора ацетата аммония, перемешать и инкубировать во льду в течение 15 мин.

19. Центрифугировать при 12000 g в течение 15 мин при 4°C. Перенести надосадочную жидкость в стерильную пробирку.

20. Добавить 600 мкл изопропилового спирта, инкубировать при комнатной температуре 15 мин.

21. Центрифугировать при 12 000 g в течение 3–5 мин при комнатной температуре. Тщательно удалить надосадочную жидкость. Осадок промыть 1 мл 70%-ного этилового спирта и подсушить в вакуумном испарителе в течение 5 мин. Растворить осадок в 200 мкл буферного раствора TE (рН 8,0).

22. Определить концентрацию ДНК в растворе, измерив его оптическую плотность при $\lambda=260$ нм.

Б. Трансфекция *E. coli* с помощью ДНК фага M13mp18

1. Получить химически-компетентные клетки *E. coli* любым из методов, предложенных в гл. 4.

2. Залить две чашки Петри агаризованной средой LB и слегка подсушить в ламинарном боксе для удаления конденсата.

3. Поместить две стерильные пробирки для микроцентрифуги в лед. В одной из них (проба А) смешать фаговую ДНК (10–50 нг) и компетентную культуру (приблизительно 10^8 клеток), в другую добавить только компетентную культуру (проба Б). Инкубировать при 4°C в течение 30 мин.

4. Быстро перенести пробирки на 42°C, инкубировать 1–2 мин. Перенести пробы обратно в лед.

5. В заранее охлажденную до 42–45°C стерильную стеклянную пробирку с 5 мл расплавленного верхнего слоя добавить 50 мкл ночной культуры (которая использовалась при приготовлении компетентных клеток) и содержимое пробирки А. Интенсивно перемешать и вылить на чашку с агаризованной средой LB. Повторить операцию с пробой Б.

6. Дождаться пока застынет верхний слой, поместить чашки Петри в термостат на 37°C в перевернутом положении и инкубировать в течение 12–16 ч. Фаговые бляшки должны присутствовать только на чашке с пробой А, на второй чашке обязан быть только чистый клеточный газон.

Дополнения к методике

К п. А2–А5. На этих этапах происходит размножение фага в клетках *E. coli*. Поскольку M13 является умеренным бактериофагом, то образующиеся фаговые частицы постоянно секретируются из бактериальных клеток без лизиса последних. Полученная на данном этапе культуральная жидкость используется для массовой инфекции незараженных клеток свежей культуры для увеличения выхода ДНК фага в репликативной форме.

К п. А7. Отмывка клеток раствором GT позволяет избежать загрязнения препарата однокитевой формой фаговой ДНК.

К п. Б6. Скорость роста клеток *E. coli*, зараженных нитевидным фагом (таким, как M13), на 25–50% ниже, чем неинфицированных. При титровании на твердой агаризованной среде зараженные фагом бактерии образуют на сплошном бактериальном газоне мутные бляшки. Однако при долгой инкубации культуры в термостате данное различие может нивелироваться, что может затруднить и даже сделать невозможным определение инфицированных бактерий.

ТРАНСФЕКЦИЯ КЛЕТОК *B. subtilis* ДНК БАКТЕРИОФАГА SPO1

На сегодняшний день известно несколько десятков бактериофагов *B. subtilis*, способных инфицировать и размножаться в клетках этой бактерии. Большинство из них используется в опытах с трансфекцией. Последовательность операций, совершаемых для осуществления данного процесса в клетках *B. subtilis*, не отличается от той схемы, которая уже была представлена для *E. coli*. Это получение компетентной культуры реципиентного штамма, к которой добав-

ляется фаговая ДНК, и, после непродолжительной инкубации, высевают смеси вместе с чувствительной к данному фагу культурой в верхний слой агара на чашки Петри. Чашки инкубируют в термостате до появления фаговых бляшек, хорошо видимых на фоне газона индикаторного штамма.

При работе с *B. subtilis* следует знать, что самым критическим этапом при проведении экспериментов по трансфекции и при трансформации является получение компетентной культуры. Штаммы *B. subtilis* более «капризны» в этом отношении, чем, например, кишечная палочка. Число компетентных клеток иногда может сильно колебаться от опыта к опыту, поскольку оно сильно зависит от многих факторов, начиная от состава питательных сред и заканчивая чистотой лабораторной посуды. Поэтому для получения стабильных результатов важно строго придерживаться методических рекомендаций и максимально стандартизировать условия проведения эксперимента по трансфекции в клетках *B. subtilis*.

Ниже представлена методика введения ДНК бациллярного фага SPO1 в клетки *B. subtilis* штамм 168 посредством трансфекции.

Необходимые реактивы и растворы:

- стерильная среда Spizizen (10× концентрат), см. прил. 1;
- стерильная среда SP I следующего состава (на 100 мл): среда Spizizen (10×); 10 мл; 40%-ный р-р глюкозы — 2 мл; 2%-ный р-р казаминовых кислот («Difco») — 2 мл; 5%-ный р-р дрожжевого экстракта («Difco») — 2 мл; 20%-ный р-р $MgSO_4$ — 0,1 мл; раствор L-триптофанана (5 мг/мл) — 1 мл. Все растворы стерилизуются отдельно, а потом смешиваются в стерильных условиях;
- стерильная среда SP II следующего состава (на 100 мл): среда Spizizen (10×); 10 мл; 40%-ный р-р глюкозы — 2 мл; 2%-ный р-р казаминовых кислот («Difco») — 1 мл; 20%-ный р-р $MgSO_4$ — 0,8 мл; раствор L-триптофанана (5 мг/мл) — 0,1 мл. Все растворы стерилизуются отдельно, а потом смешиваются в стерильных условиях. Раствор $MgSO_4$ добавляют последним, непосредственно перед опытом.
- верхний слой: 0,9%-ный р-р NaCl, содержащий 0,5% агара («Difco») жидкий при 45–50°C;
- стерильный 0,1 М трис-HCl (pH 7,2), содержащий 0,15 М раствор NaCl;
- раствор ДНКазы (1 мг/мл) в 0,05 М растворе $MgCl_2$;

- раствор ДНКазы (200 мкг/мл) в 0,1 М растворе NaCl, содержащем 0,01 М р-р ацетата натрия (pH 5,2);
- стерильный 0,9%-ный р-р NaCl;
- раствор 80% фенола, уравновешенный с буферным раствором ТЕ (pH 8,0);
- чистый (96%) этиловый спирт;
- буферный раствор ТЕ, см. прил. 1.

Методика

А. Получение фаголизата SPO1

1. Вырастить ночную культуру инфицируемого штамма *B. subtilis* 168 в 5 мл жидкой среды SP I.
2. Внести 0,5 мл ночной культуры в микробиологическую пробирку с 5 мл жидкой среды SP I и выращивать на качалке (37°C, 240 об/мин) в течение 4–5 ч.
3. Инфицировать выросшую культуру фагом SPO1 (с множественностью инфекции около 1). Продолжить инкубировать пробирку с культурой на качалке в тех же условиях в течение 2 ч.
4. Поместить пробирку с инфицированной культурой в термостат на 37°C и инкубировать в течение ночи.
5. К полученному клеточному лизату добавить 200 мкл хлороформа, осторожно перемешать содержимое пробирки и инкубировать при комнатной температуре в течение 2–3 ч.
6. Осадить клеточные обломки центрифугированием при 5000 g в течение 20 мин при 4°C.
7. Перелить надосадочную жидкость в стерильные пробирки для высокоскоростной центрифуги и центрифугировать при 20 000 g в течение 1 ч при 4°C для концентрирования фаговых частиц.
8. Ресуспендировать осадок в 50–100 мкл буферного раствора, содержащего 0,1 М трис-HCl (pH 7,2) и 0,15 М NaCl. Хранить суспензию фага при 4–6°C.

Б. Выделение ДНК фага SPO1

1. Полученный на предыдущем этапе клеточный лизат обработать ДНКазой. Для этого в пробирку с фаговой суспензией внести 5 мкл раствора ДНКазы (конечная концентрация фермента в пробе равна 100 мкг/мл). Инкубировать при 37°C в течение 30 мин.
2. Добавить к смеси 5 мкл раствора РНКазы (конечная концентрация фермента в пробе равна 20 мкг/мл). Инкубировать при 37°C в течение 30 мин.
3. Центрифугировать смесь при 20 000 g в течение 1 ч при 4°C.

4. Полученный осадок ресуспендировать в **500 мкл** буферного раствора, содержащего 0,1 М трис-НСl (рН 7,2) и 0,15 М NaCl, после чего добавить равный объем 80%-ного фенола.

5. Перемешать смесь встряхиванием в течение 10 мин. Центрифугировать при 2000 g в течение 10 мин при 4°C для разделения фаз.

6. Осторожно отобрать верхний слой (приблизительно 400–450 мкл) и поместить его в стерильную микроцентрифужную пробирку.

7. Повторить обработку фенолом.

8. Фаговую ДНК осадить двойным объемом холодного 96%-ного этилового спирта. Полученную смесь инкубировать при –20°C в течение 30 мин.

9. Центрифугировать при 12 000 g в течение 15 мин при 4°C. Осадок растворить в **50–100 мкл** буферного раствора TE.

В. Трансфекция клеток *B. subtilis* с помощью ДНК фага SPO1

1. Засеять культуру инфицируемого штамма (например, *B. subtilis* 168) в микробиологическую пробирку с **5 мл** жидкой среды SP I. Поместить пробирку на качалку (240 об/мин) и инкубировать при 37°C в течение ночи.

2. Внести **0,5 мл** ночной культуры в микробиологическую пробирку с **5 мл** жидкой среды SP I и выращивать на качалке (37°C, 240 об/мин) в течение 4–5 ч.

3. Перенести **1,5 мл** подросшей культуры в пробирку с **10 мл** жидкой среды SP II и выращивать в тех же условиях в течение 90 мин. Пробирку с оставшейся культурой убрать в холодильник (данная культура будет использована в дальнейшем).

4. Внести по **1 мл** полученной компетентной культуры в две стерильные микроцентрифужные пробирки. В одну из них (проба А) добавить **50–100 нг** ДНК фага SPO1, во вторую (проба Б) ничего добавлять не надо.

5. Инкубировать пробы в термостате при 37°C в течение 1 ч.

6. Залить две чашки Петри агаризованной средой LB. Слегка подсушить их в ламинарном боксе для удаления конденсата.

7. В две стерильные микробиологические пробирки налить по **3 мл** расплавленного «верхнего» агара и поместить их в водный термостат (40–42°C).

8. Добавить в каждую из пробирок по **100 мкл** культуры *B. subtilis*, полученной на этапе В3.

9. Внести в эти пробирки содержимое проб А и Б, интенсивно перемешать и вылить на чашки с агаризованной средой LB.

10. После застывания верхнего слоя поместить чашки в термостат и инкубировать при 37°C в течение 18–20 ч. По истечении этого времени на чашке с пробой А должны присутствовать фаговые бляшки, хорошо заметные на клеточном газоне. Газон клеток на чашке с пробой Б должен быть чистым.

Дополнения к методике

К п. Б1. Обработку ДНКазой и РНКазой проводят для разрушения нуклеиновых кислот, находящихся вне фаговых частиц.

К п. Б8. Для удаления следов фенола из смеси рекомендуется проводить двухкратную обработку равным объемом охлажденного эфира. Для освобождения от эфира следует аккуратно продуть воздух через водную фракцию в течение нескольких минут.

К п. В1. За день до получения компетентных клеток нужный штамм следует отсеять на чашку с питательной агаризованной средой (например, средой LB). Утром следующего дня с этой свежей чашки засевают бактерии в пробирку с жидкой средой Спицайзена (SP I) для получения ночной культуры штамма.

К п. В2 и В3. Среды перед посевом обязательно должны быть прогреты до 37°C. Для этого микробиологические пробирки со средами SP I и SP II необходимо заранее поместить в водяную баню или термостат и проинкубировать при данной температуре в течение 10–15 мин.

К п. В3. Компетентные клетки можно готовить впрок, замораживая их. Это полезно делать не только по соображениям экономии времени в последующих опытах, но и по следующей причине. После первого опыта в течение нескольких дней приблизительно известна степень компетентности культуры, а также и другие характеристики данной партии клеток.

Замораживание клеток проводят следующим образом. К культуре после 90-мин инкубации на среде SP II добавляют стерильный раствор глицерина до концентрации 12% (считая на объем). Глицерин препятствует разрушению клеток при замораживании—оттаивании. Затем культуру разливают по 2–3 мл в пластиковые пробирки с завинчивающейся крышкой и помещают на –70°C. Клетки можно использовать в течение недели.

К п. В4. В опытах с трансфекцией очень важен контроль на стерильность самой фаговой ДНК, так как в ней могут оставаться фаговые частицы. Их присутствие может имитировать трансфекцию. Во избежание этого дополнительно следует высевать пробу, содержащую лишь фаговую ДНК в соответствующем разведении, в «верхний» агар

с индикаторной культурой. Компетентные клетки к этой пробе не добавляются. Наличие бляшек на чашках, в которые высевалась данная проба, говорит о загрязнении ДНК фаговыми частицами.

Литература

1. Лурия С., Даррелл Дж., Балтимор Д., Кэмпбелл Э. Общая вирусология. М.: Мир, 1981.
2. Проzerов А.А. Генетическая трансформация и трансфекция. М.: Наука, 1980.
3. Arwert F., Venema G. Transfection of *Bacillus subtilis* with bacteriophage H1 DNA: fate of transfecting DNA and transfection enhancement in *B. subtilis uur⁺* and *uur⁻* strains // Mol. Gen. Genet. 1974. V. 128. P. 55–72.
4. Arwert F., Venema G. Protease-sensitive transfection of *Bacillus subtilis* with bacteriophage GA-1 DNA: a probable case of heterologous transfection // J. Virol. 1974. V. 13. P. 584–589.
5. Benzinger R. Transfection of *Enterobacteriaceae* and its applications // Microbiol. Rev. 1978. V. 42. P. 194–236.
6. Liljemark W., Anderson D. Morphology and physiology of the intracellular development of *Bacillus subtilis* bacteriophage phi25 // J. Virol. 1970. V. 6. P. 114–124.
7. Newman C., Stuy J. Fate of bacteriophage lambda DNA after adsorption by *Haemophilus influenzae* // J. Gen. Microbiol. 1971. V. 65. P. 153–159.
8. Romig W. Infection of *Bacillus subtilis* with phenol-extracted bacteriophages // Virology. 1962. V. 16. P. 452–459.
9. Taketo A. Studies on the infectious DNA from bacterial virus phiX174 and from the virus-infected cells // J. Biochem. (Tokyo). 1963. V. 54. P. 520–529.
10. Tomley F.M. Transfection of *E. coli* with M13 DNA // Methods Mol. Biol. 1993. V. 23. P. 31–36.

Молекулярное клонирование, или конструирование рекомбинантных молекул ДНК, является исключительно важным и эффективным инструментом как для фундаментальных научных исследований, так и для прикладных медицинских и биотехнологических целей. Благодаря этому подходу создают генно-инженерные штаммы с заранее заданными свойствами, изучают влияние амплификации отдельных генов на клеточный метаболизм, осуществляют поиск ответственных за определенный фенотип генов, получают достаточное количество специфических фрагментов для определения нуклеотидной последовательности и белкового продукта гена для его дальнейших исследований и т.п.

Суть молекулярного клонирования заключается во встраивании определенных фрагментов чужеродной ДНК в так называемые векторные молекулы (в дальнейшем просто векторы) — плазмидные или вирусные ДНК, которые впоследствии могут быть перенесены в бактериальные клетки, где векторы обладают способностью автономно реплицироваться.

Для конструирования рекомбинантной ДНК нуклеотидная последовательность вектора расщепляется ферментом эндонуклеазой рестрикции и соединяется с чужеродной (клонированной) ДНК *in vitro*. Для осуществления этого процесса используется фермент ДНК-лигаза. Полученными гибридными плазмидами («клонированный вектор—встроенная ДНК») трансформируют компетентные клетки бактерий и выделяют нужные рекомбинантные ДНК из полученных и идентифицированных колоний (клонов). При необходимости можно индуцировать экспрессию клонированного гена в клетках-хозяевах (трансформированных клетках) и получить соответствующий кодируемый данным геном белок. Стоит заметить, что при молекулярном клонировании, помимо упомянутых выше ферментов, используют и другие действующие на ДНК белки (фосфатазы, киназы, трансферазы и т.п.), а также синтетические олигонуклеотиды (праймеры, линкеры, адаптеры и зонды). С помощью этого набора «инструментов» объединяют, синтезируют, идентифицируют и анализируют гены.

Помимо клонирования *in vitro* существуют методы создания рекомбинантных молекул ДНК *in vivo*. Для этого используются специальные комбинированные вектора, сочетающие в себе свойства плазмид и бактериальных вирусов. В определенных условиях они способны интегрироваться в хромосому клетки-хозяина и исключаться из нее, захватывая прилежащие к месту интеграции области хромосомы. Данное свойство широко используется при создании геномных библиотек — смеси рекомбинантных плазмид, содержащих в своем составе полный геном исследуемого организма.

Основная трудность обоих подходов заключается в том, как отличить бактерии, которые несут плазмиды с клонированным фрагментом ДНК, от бактерий с «пустыми» векторами, т.е. такими, которые замкнулись в кольцо, не захватив нужной нуклеотидной последовательности. Отбор клеток, содержащих рекомбинантные ДНК, производится благодаря набору маркерных признаков, которыми обладает сам вектор, а также и по тем изменениям в фенотипе штамма, которые вносит клонированный фрагмент ДНК. В качестве селективных признаков обычно используют устойчивость к антибиотику, которой до трансформации клетки не обладали, или образование фермента, синтез которого в клетках-реципиентах не проходил. Стоит заметить, что иногда не удается подобрать такой маркер. В таких случаях приходится прибегать к методам, основанным на ПЦР-анализе, ДНК—ДНК гибридизации или иммунологическом способе выявления клеток, содержащих рекомбинантные молекулы ДНК.

7.1.

КЛОНИРОВАНИЕ ФРАГМЕНТА ДНК В СОСТАВЕ ПЛАЗМИДНЫХ ВЕКТОРОВ

Методика клонирования в плазмидных векторах состоит из трех этапов: 1) расщепления ДНК плазмидного вектора и нужного ДНК-фрагмента (нуклеотидной вставки) соответствующими эндонуклеазами рестрикции, 2) их объединения с помощью ДНК-лигазы и 3) трансформации бактерий рекомбинантными кольцевыми молекулами с последующим отбором рекомбинантных клонов, которые воспроизводят вставку чужеродной ДНК. Рассмотрим каждый из этих этапов более подробно.

РАСЩЕПЛЕНИЕ ДНК ЭНДОНУКЛЕАЗАМИ РЕСТРИКЦИИ

Рестрицирующие эндонуклеазы (в дальнейшем просто рестриктазы) являются компонентами систем рестрикции и модификации

бактерий, которые используются для защиты собственного генома микроорганизма от проникновения чужеродной ДНК. Первые данные о существовании ферментов рестрикции ДНК были получены Арбером (Arber) в 1962 г. Широкое использование рестриктаз при проведении генно-инженерных работ связано с их уникальной способностью распознавать специфическую последовательность из 4—8 нуклеотидов в молекуле ДНК (*сайт рестрикции* или *участок узнавания*) и вносить двухцепочечный разрыв в этом строго определенном месте. Расщепляется фосфодиэфирная связь между атомом кислорода при 3'-атоме углерода сахарного остатка одного нуклеотида и фосфатной группой при 5'-атоме углерода сахарного остатка соседнего нуклеотида. Большинство рестриктаз узнает только одну специфическую последовательность нуклеотидов, но существуют рестриктазы, имеющие несколько сайтов рестрикции.

Рестриктазы выделяют из различных бактерий, например *EcoRI* из *E. coli*, а *HindIII* — из *Haemophilus influenzae*. В настоящее время многими биотехнологическими компаниями производится несколько сотен наименований рестриктаз, большинство из которых распознает специфические нуклеотидные последовательности (см. приложение 1). Обозначение рестриктазам дается по следующему принципу — род микроорганизма, из которого выделяют фермент, обозначается прописной буквой, а видовое название — двумя строчными, римской цифрой обозначают порядковый номер рестриктаз, выделенных из данного микроорганизма.

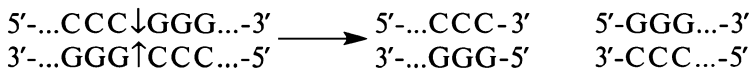
Согласно существующей классификации, различают системы рестрикции и модификации I, II и III типа. Ферменты, относящиеся к типам I и III, обладают как модифицирующей (метилирующей), так и АТФ-зависимой рестрицирующей активностью (внесение разрывов), которые проявляются одним и тем же белком. Различие заключается в расположении места, по которому расщепляется молекула ДНК, по отношению к сайту узнавания. Рестриктазы I типа вносят случайные разрывы на огромном расстоянии от сайта связывания — не менее 1000 нуклеотидных пар, в то время как ферменты III типа расщепляют ДНК на небольшом фиксированном расстоянии от него.

В качестве примера можно привести рестриктазы *EcoB* и *EcoK*, обнаруженные у штаммов *E. coli* B и K соответственно. Эти рестриктазы относятся к системам рестрикции I типа и представляют собой ферментный комплекс, состоящий из трех отдельных субъединиц, кодируемых у *E. coli* генами *hsdM*, *hsdS* и *hsdR*. Субъединица HsdS отвечает за узнавание сайта рестрикции, по которому HsdR вносит

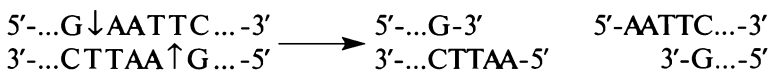
разрыв. Последовательность сайта рестрикции для *EcoB* выглядит следующим образом: 5'-TGA*N₈TGCT-3' или 5'-AGCA*[N₈]TCA-3'. Если оба отмеченных звездочкой аденина этой последовательности метилированы, то рестриктаза ничего с последовательностью не делает. Если метилирован только один аденин (например, после репликации или репарации), то HsdM субъединица комплекса метилирует второй, используя S-аденозилметионин в качестве донора метильной группы. В том случае, если сайт полностью не метилирован, то ДНК, в составе которой он находится, распознается как чужеродная и за дело принимается субъединица HsdR. Штаммы, содержащие мутантные неактивные HsdR и HsdS, описаны и широко используются в генетической инженерии. В такие штаммы (г⁻ и м⁻-фенотипы) можно вводить протяженную чужеродную, т.е. не модифицированную ДНК, которая при этом не подвергается рестрикции. В качестве примера можно привести такой штамм, как *E. coli* TG1.

Системы рестрикции II типа обнаружены у очень многих бактерий. Эти системы состоят из двух отдельных ферментов, рестрицирующей эндонуклеазы и модифицирующей метилазы, узнающих одну и ту же последовательность ДНК — сайт рестрикции. Данный сайт представляет собой последовательность двухцепочечной ДНК длиной в 4–8 пар нуклеотидов, обладающую осью симметрии 2-го порядка (палиндром, т.е. последовательности нуклеотидов в обоих направлениях читаются одинаково). От длины сайта рестрикции зависит частота его распространения в молекуле ДНК: 1 сайт на 4ⁿ оснований ДНК, где n — размер сайта рестрикции в нуклеотидах. Наибольшее применение нашли рестриктазы, распознающие 4 или 6 нуклеотидов. Некоторые рестриктазы, например *HincII*, допускают возможность нуклеотидных замен в сайте рестрикции (в этом случае пурины обозначают буквой R, а пиримидины — буквой Y). Если сайт рестрикции не метилирован, то рестриктаза типа II вносит в него двухцепочечный разрыв. Такого не происходит, если хотя бы одна из цепей ДНК метилирована (собственная ДНК). Таким образом, системы рестрикции II типа служат бактерии для защиты от проникновения в клетку чужеродной ДНК. Именно система рестрикции–модификации II типа преимущественно используется в молекулярном клонировании.

По геометрии вносимых разрывов рестриктазы II типа разделяют на несколько групп. Если разрыв вносится точно перпендикулярно по оси симметрии сайта (например, рестриктазой *SmaI*), то в результате образуются фрагменты ДНК с «тупыми» концами.



В том случае, когда расщепление связи происходит в точках двух цепей ДНК, отстоящих друг от друга на несколько нуклеотидов (например, рестриктазой *EcoRI*), получают фрагменты с выступающими одноцепочечными 5'-концами («липкие» концы). В данном случае каждый одноцепочечный конец заканчивается 5'-фосфатной группой, а 3'-гидроксильная группа у противоположной цепи как бы «утоплена».



Превратить «липкие» концы в «тупые» можно с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I (он достраивает «утопленный» 3'-конец комплементарными нуклеотидами) или нуклеазы золотистой фасоли (удаляет выступающие 5'- или 3'-концы).

Существуют ферменты (например, *PstI*), в результате действия которых образуются фрагменты с короткими выступающими 3'-«липкими» концами (с 3'-гидроксильной группой).

Каждый одноцепочечный «липкий» конец может взаимодействовать с любым другим концом, комплементарным ему. Таким образом, фрагменты ДНК, содержащие определенные сайты рестрикции, можно соединять путем комплементарного спаривания оснований с другими рестрицированными тем же ферментом молекулами ДНК (например, плазмидной) и в результате получать рекомбинантные молекулы, что делает рестриктазы очень удобным инструментом для клонирования генов и вырезания клонированной последовательности из вектора. Фрагменты ДНК с «тупыми» концами, полученными при помощи ПЦР, можно клонировать с высокой эффективностью в плазмидном векторе pCR-Blunt, используя набор для клонирования **Zero Blunt PCR Cloning Kit** («Invitrogen», США).

Как правило, разные ферменты рестрикции распознают различные последовательности ДНК. Однако имеются примеры, когда выделенные из разных источников рестриктазы имеют одинаковые сайты рестрикции. Такие ферменты называют изошизомерами. В качестве примера можно привести рестриктазы *SacI* и *EclI* 36II, узнающие одинаковую последовательность ДНК, но по-разному ее расщепляющие (рестриктаза *EclI* 36II вносит разрыв точно по оси симметрии второго порядка сайта рестрикции 5'-GAG↓CTC-3', а рестриктаза *SacI* расщепляет последовательность на некотором удалении от оси симметрии — 5'-G↓AGCTC-3').

Часто наличие изошизомера позволяет преодолеть трудности, связанные, например, с ограничением использования ряда рестриктаз из-за метилирования их сайта родными метилазами клетки-хозяина. Действительно, изошизомеры *MboI* и *Sau3A* узнают одинаковую последовательность (5'-GATC-3'), которая также является мишенью для Dam-метилазы *E. coli*. Этот фермент метилирует атом N⁶ аденина, в результате чего расщепление ДНК рестриктазой *MboI* становится невозможным. Выходом из этого положения может являться применение рестриктазы *Sau3A*, функционирование которой не зависит от метилирования, осуществляемого метилазой Dam.

Сравнение размеров рестрикционных фрагментов ДНК, полученных после гидролиза заданного участка генома набором определенных рестриктаз в различных сочетаниях (как по отдельности, так и в смеси), с помощью гель-электрофореза позволяет построить рестрикционную карту данного участка ДНК с указанием расположения каждого сайта рестрикции относительно других вдоль молекулы ДНК. На таких рестрикционно-генетических картах также обязательно указываются расстояния (в парах оснований) между сайтами рестрикции для соответствующих рестриктаз.

Таким образом можно проводить приближенное сравнение гомологии различных генов без непосредственного определения их нуклеотидной последовательности, а также локализовать определенный ген на данном рестрикционном фрагменте. Импортировать нуклеотидные последовательности, строить и анализировать (по частоте рестрикции определенными рестриктазами, размеру и положению сайтов рестрикции, типу образующихся концов) линейные и кольцевые рестрикционно-генетические карты профессионального качества можно с помощью таких программ, как **Vector NTI Advance 10** («Invitrogen», США) или **Visual Cloning 2000** («Redasoft», Канада).

При проведении расщепления ДНК *in vitro* следует знать, что для каждого фермента существуют оптимальные условия реакции, которые приводятся в описании, прилагаемом компанией-изготовителем. Основные переменные параметры — это температура инкубации и состав буферного раствора рестрикционной реакционной смеси. К температурному режиму предъявляются достаточно жесткие требования, тогда как различия между составом буферных растворов чаще незначительны. Все крупные производители ферментов стремятся максимально унифицировать условия проведения реакции рестрикции, разделяя рестриктазы всего на несколько групп. Как правило, это ферменты, требующие высокой, низкой и некоторой промежуточной ионной силы раствора (см. приложение 1).

Обычно все буферные растворы для рестриктаз поставляются в виде исходных растворов 10-кратной концентрации, которые следует хранить при -20°C . Процедура обработки ДНК определенной рестриктазой заключается в разведении буферного раствора с добавленным препаратом ДНК водой, внесении соответствующего фермента-рестриктазы в реакционную смесь и инкубации при рекомендуемой температуре. При обработке ДНК двумя и более рестриктазами реакцию можно проводить одновременно, если для обоих ферментов подходит соответствующий буферный раствор; в противном случае первой следует использовать рестриктазу, функционирующую в растворе с более низкой ионной силой.

Надо учитывать, что рестриктазы поставляются в буферных растворах, содержащих 50% глицерина, для хранения при -20°C . Поскольку избыток глицерина может ингибировать реакцию рестрикции, объем вносимой рестриктазы не должен превышать $1/10$ от объема всей реакционной смеси.

Необходимо также иметь в виду такое явление, как снижение специфичности рестриктаз (так называемая *star activity* — «активность со звездочкой»), то есть их способность в неоптимизированных условиях расщеплять ДНК по сайтам, которые являются схожими, но не идентичными уникальным сайтам рестрикции для соответствующих рестриктаз. В большей степени это характерно для таких рестриктаз, как *Bam*HI, *Bss*III, *Dde*I, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Hin*fI, *Kpn*I, *Mam*I, *Pvu*II, *Sal*I, *Sau*3AI, *Sgr*AI и *Taq*I, хотя есть предположения, что снижение специфичности возможно для любой рестриктазы. Для предотвращения «активности со звездочкой» надо соблюдать ряд необходимых условий: 1) не допускать избытка рестриктазы в реакционной смеси, а также глицерина (не более 5% по объему), 2) применять рестрикционный буфер с такой оптимальной ионной силой, pH и концентрацией двухвалентных катионов, которые рекомендуются компанией-производителем для данной конкретной рестриктазы и 3) использовать пробы ДНК, освобожденные от органических растворителей, которые использовались в ходе ее выделения.

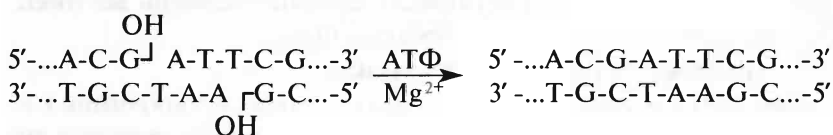
За одну единицу активности рестрицирующей эндонуклеазы принимают такое количество фермента, которое необходимо для полного расщепления 1 мкг ДНК по одному сайту рестрикции за 60 мин при соответствующих рекомендованных условиях реакции.

Подробная последовательность действий при проведении рестрикции приводится ниже, в разделе, посвященном клонированию фрагмента ДНК на плазмидных векторах в клетках *E. coli*.

КОВАЛЕНТНОЕ СОЕДИНЕНИЕ ДНК С ПОМОЩЬЮ ФЕРМЕНТА ДНК-ЛИГАЗЫ

Процесс жизнедеятельности клетки сопровождается появлением в составе двухнитевых молекул ДНК одонитевых разрывов. Эти явления могут быть обусловлены как внешними факторами (действиями различных мутагенов), так и разнообразными генетическими процессами (репликацией, рекомбинацией, репарацией). В таких молекулах концы разорванных полинуклеотидных цепей удерживаются вместе за счет водородных связей с комплементарной цепью. Для репарации подобных повреждений клетка обладает специальными ферментами, позволяющими восстанавливать («сшивать») одонитевые разрывы. Фермент, объединяющий такие цепи путем восстановления фосфодиэфирных связей между соседними нуклеотидами, называется ДНК-лигазой. Он был открыт Геллертом (Gellert) в 1967 г.

Наиболее подробно изучены ДНК-лигазы *E. coli* и бактериального фага Т4. Для образования ковалентных связей эти ферменты используют энергию кофакторов — НАД⁺ (ДНК-лигаза *E. coli*) или АТФ (ДНК-лигаза бактериофага Т4). В обоих случаях ферменты аденилируются, а затем переносят АМФ на 5'-концы полинуклеотидных цепей в местах разрывов, что сопровождается образованием макроэргических пирофосфатных связей. Запасенная таким образом энергия тратится на восстановление двойной цепи ДНК и высвобождение АМФ.



Таким образом, ДНК-лигаза катализирует образование фосфодиэфирной связи между концами полинуклеотидных цепей ДНК (между 3'-гидроксильными и 5'-фосфатными концевыми группами в месте разрыва), уже удерживающихся вместе за счет недостаточно прочных водородных связей благодаря спариванию «липких» концов. ДНК-лигаза также закрывает одноцепочечные разрывы в двухцепочечной молекуле ДНК.

Необходимо заметить, что ДНК-лигаза бактериофага Т4 (а также бактериальная лигаза с крайне низкой эффективностью) способна осуществлять и воссоединение двухцепочечных фрагментов ДНК, содержащих «тупые» концы, образуя фосфодиэфирные связи в обеих цепях. Очищенные препараты ДНК-лигаз (особенно фермент из бактериофага Т4) широко используются в генной инженерии для

создания рекомбинантных молекул. Подробная методика лигирования приводится ниже, в разделе, посвященном клонированию фрагмента ДНК на плазмидных векторах в клетках *E. coli*.

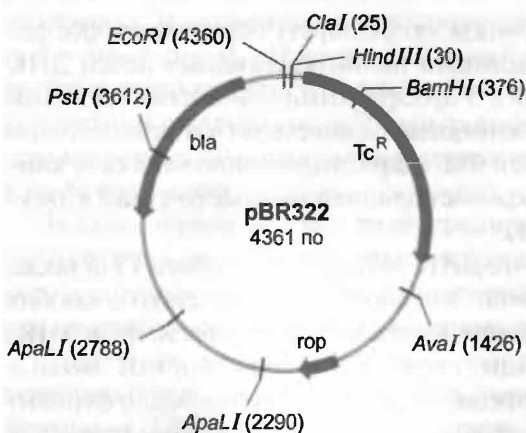
ОТБОР РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК ПРИ КЛОНИРОВАНИИ

Часто присутствие фрагмента чужеродной ДНК на векторной молекуле не приводит к определенному фенотипу, позволяющему вести селективный отбор таких бактерий. Поэтому основной задачей, решаемой при молекулярном клонировании, является выбор простого и эффективного способа, позволяющего различать те плазмиды, которые содержат последовательность чужеродной ДНК, от молекул векторной ДНК, которые замкнулись в кольцо, не захватив клонируемую последовательность.

Для этого были разработаны специальные методы, благодаря которым удастся отличать клетки, содержащие рекомбинантные плазмиды, от клеток, несущих «пустые» интактные векторные молекулы. Для отбора трансформированных бактерий, содержащих рекомбинантные плазмиды, чаще всего проводят тестирование на резистентность к определенным антибиотикам, а затем подтверждают наличие нужной вставки в векторе с помощью ПЦР или гибридизации. Иногда используют иммунологические тесты или выявление белка, являющегося продуктом клонированного гена. Кроме того, применение определенных генно-инженерных методик позволяет значительно снизить эффективность самокопирования векторов. Некоторые из этих подходов приведены ниже.

А. Инактивация в результате вставки

Этот метод может быть использован в случае клонирования на



плаزمиды, которые содержат два или более маркеров устойчивости к антибиотикам. Примером такого вектора служит одна из самых универсальных плазмид — многокопийный плазмидный вектор pBR322 (рис. 7.1). В своем составе он содержит два гена, вы-

Рис. 7.1. Рестрикционно-генетическая карта плазмидного вектора pBR322

ражение которых определяет устойчивость бактерии, содержащей данную плазмиду, к антибиотикам ампициллину (Ap^R или bla) и тетрациклину (Tc^R). Кроме того, плазида pBR322 несет уникальные сайты рестрикции для рестриктаз *Bam*HI, *Hind*III и *Sal*I в гене Tc^R , сайт рестрикции для *Pst*I в гене Ap^R , сайт рестрикции для *Eco*RI вне генов устойчивости к антибиотикам и участок, ответственный за репликацию плазмиды в клетках *E. coli*.

При осуществлении клонирования в структурную часть любого из этих двух генов устойчивости к антибиотикам бактерии вместе с рекомбинантными плазмидами получают фенотипический признак — чувствительность к данному антибиотику. На рис. 7.2 пред-

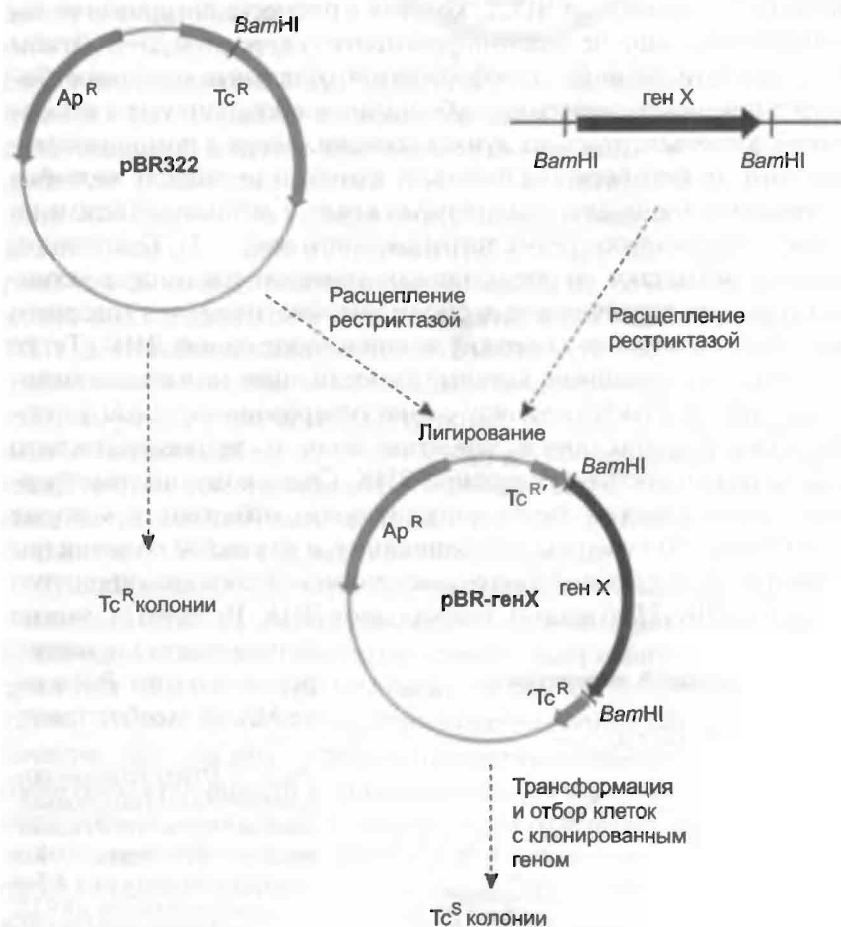


Рис. 7.2. Схема клонирования фрагмента ДНК в структурную часть гена Tc^R на плазмидном векторе pBR322

ставлена схема клонирования фрагмента ДНК в уникальные (т.е. присутствующий на данной молекуле ДНК в единственном числе) сайт *Bam*HI на плазмиде pBR322. Как видно из схемы, при такой постановке эксперимента клонирование приводит к нарушению кодирующей последовательности гена *Tc^R*, в то время как ген *Ap^R*, отвечающий за устойчивость к ампициллину, остается неповрежденным.

При трансформации чувствительного к ампициллину штамма *E. coli* (например, TG1) отбор бактерий с плазмидами ведется по устойчивости к данному антибиотику. Много колоний, выросших на питательной среде в присутствии ампициллина, будут содержать рекомбинантные плазмиды; другие же будут содержать только ДНК интактной плазмиды pBR322, которая в процессе лигирования замкнулась в кольцо, не захватив фрагмента чужеродной ДНК. Чтобы различить эти два вида трансформантов, отдельные колонии отбирают с помощью стерильных зубочисток и суспендируют в физрастворе в соответствующих лунках плашки. Затем с помощью плащечного пробоотборника биомассу колоний переносят **методом отпечатков** на чашку, содержащую среду с ампициллином и на чашку, содержащую среду с тетрациклином (рис. 7.3). Те колонии, которые вырастают на обеих чашках, содержат плазмиду с активными генами устойчивости к обоим антибиотикам, что говорит о том, что плазида не содержит вставки чужеродной ДНК. Те же бактериальные колонии, которые выросли лишь на чашке с ампициллином, содержат плазмиду с инактивированным геном устойчивости к тетрациклину и, вероятнее всего, со встроенной в него последовательностью чужеродной ДНК. Среди колоний трансформантов, выросших на среде с ампициллином, отбирают те, которые оказались чувствительны к тетрациклину, и из каждой колонии получают индивидуальные клеточные клоны, содержащие гибридную плазмиду pBR322 со вставкой чужеродной ДНК. Разумеется, можно

использовать для клонирования и сайт *Pst*I в гене *bla*, тогда отбор транс-



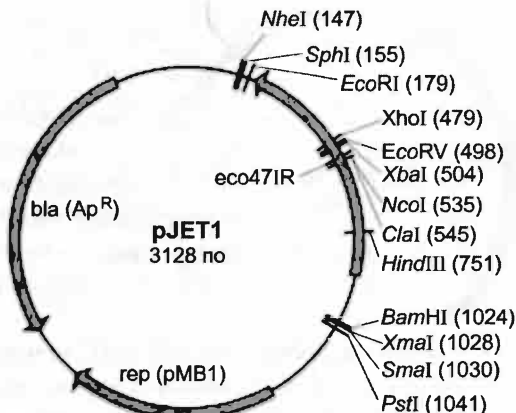
Рис. 7.3. Отбор тетрациклин-чувствительных трансформантов в эксперименте по клонированию фрагмента ДНК в структурную часть гена *Tc^R* на плазмидном векторе pBR322 (метод инактивации гена в результате вставки фрагмента ДНК)

Рис. 7.4. Рестрикционно-генетическая карта плазмидного вектора pJET1

формантов проводится по аналогичной схеме, но в другом порядке — сначала клетки высевают на агаризованную среду с тетрациклином, а потом — с ампициллином.

Кроме вышеприведенного достаточно долгого двухстадийного отбора рекомбинантов были разработаны альтернативные методы, позволяющие напрямую отбирать бактерии, содержащие плазмиды со вставками. В качестве примера можно привести плазмиду pJET1 (рис. 7.4). В своем составе она несет ген устойчивости к ампициллину *bla* (Ap^R) и ген *eco47IR*, кодирующий рестрицирующую эндонуклеазу *E. coli*. Поскольку данный фермент расщепляет любую неметилированную в соответствующем положении ДНК, то вектор pJET1 не может поддерживаться в подобных штаммах *E. coli* (например, в TG1). Для удобства клонирования в состав гена *eco47IR* на плазмиде искусственно внесены нуклеотидные замены, приводящие к появлению уникальных сайтов рестрикции. Вставка чужеродной ДНК в любой из этих сайтов приводит к нарушению функционирования гена. Поэтому при трансформации штамма TG1 лигированной смесью практически все выросшие на чашках с ампициллином трансформанты содержат рекомбинантные плазмиды.

Традиционно большой популярностью пользуется способ отбора рекомбинантов по изменению характерного окрашивания бактериальных колоний на питательных средах, содержащих специальные красители. Данное изменение также связано с инактивацией определенного гена при клонировании чужеродного фрагмента ДНК. В качестве примера можно привести плазмиду pUC18 (рис. 7.5). Помимо гена устойчивости к ампициллину, этот вектор содержит фрагмент лактозного оперона *E. coli*, который ответственен за утилизацию лактозы. Это укороченный ген β -галактозидазы кишечной палочки (*lacZ'*), кодирующий так называемый α -пептид (N-концевой пептид, первые 146 аминокислот) данного фермента. Для удобства клонирования в состав этого гена внесен *полилинкер* — короткий участок ДНК, содержащий уникальные участки узнавания для мно-



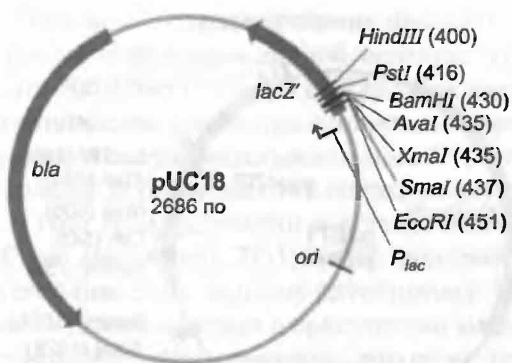


Рис. 7.5. Рестрикционно-генетическая карта плазмидного вектора pUC18

гих рестриктаз (*EcoRI*, *SacI*, *KpnI*, *SmaI*, *BamHI*, *XbaI*, *SalI*, *HincII*, *PstI*, *HindIII*). Присутствие полилинкера для клонирования существенно не сказывается на активности α -пептида в клетках *E. coli*, поскольку рамка

считывания гена β -галактозидазы сохраняется.

Выражение гена *lacZ'* осуществляется с лактозного промотора P_{lac} -UV5, нечувствительного к катаболитной репрессии, и оно может быть индуцировано добавлением в среду искусственного индуктора ИПТГ (изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид). В отсутствие ИПТГ белок-репрессор (кодируемый геном *lacI*, который транскрибируется с промотора P_i) блокирует транскрипцию гена *lacZ'*, связываясь с его операторной областью, перекрывающейся с промоторной. Если же репрессор связывается с индуктором, то транскрипции *lac*-оперона (и, следовательно, гена β -галактозидазы) ничто не препятствует. В современной генной инженерии используют мутантный ген *lacI* — *lacI^q*, который увеличивает синтез репрессора в 10 раз. Ген *lacI* (*lacI^q*) может находиться в той же плазмиде, что и ген *lacZ'*, либо в эписоме — F-факторе или в отдельной плазмиде (например, Rep4).

Синтез α -пептида обеспечивает образование активного гибридного фермента β -галактозидазы в клетках-реципиентах *E. coli*, дефектных по данному ферменту (так называемая α -комплементация). Встраивание клонируемого фрагмента в полилинкер приводит к прерыванию кодирующей последовательности гена *lacZ'* и соответственно к отсутствию α -комплементации в клетках-хозяевах после трансформации. Данное обстоятельство позволяет вести отбор клеток *E. coli*, несущих рекомбинантную плазмиду, по утрате характерного синего окрашивания колоний на среде, содержащей хромогенный субстрат X-gal (5-бromo-4-хлоро-3-индолил- β -D-галактозид), который гидролизруется под действием активной β -галактозидазы с образованием продукта ярко-синего цвета (5-бromo-4-хлоро-индиго). Само же присутствие рекомбинантного вектора в клетках фиксируется по их устойчивости к антибиотику ампициллину. Такая

система сине-белой селекции трансформантов носит название *blue-script*, она используется в целом ряде плазмид — типы pGEM, pUC, pTZ, KS, Bin19 и др.

Далее проводят скрининг белых (положительных) колоний и последующую ПЦР-идентификацию тех из них, которые содержат нужную последовательность ДНК. На основе селекционной системы *lacZ* и F-плазмиды (фактора фертильности) *E. coli* был создан также вектор для клонирования очень крупных (до 300 тпо) фрагментов ДНК — так называемая *бактериальная искусственная хромосома (BAC)*.

Б. Клонирование фрагментов ДНК в определенной ориентации

Большинство векторных плазмид содержит по одному уникальному сайту рестрикции для двух или более рестриктаз. Например, плазида pACYC184 содержит по одному сайту для *HindIII* и *BamHI* (рис. 7.6). Обработка этими рестриктазами приводит к образованию двух фрагментов ДНК: большого и малого. Большой фрагмент содержит все генетические элементы, необходимые для репликации в клетках *E. coli*, а также ген устойчивости к хлорамфениколу (*cat*).

С помощью электрофореза в агарозном геле можно выделить этот фрагмент ДНК и лигировать его с участком чужеродной ДНК, «липкие» концы которого совместимы с соответствующими концами фрагмента плазмиды, образующегося при расщеплении рестриктазами *BamHI* и *HindIII* (рис. 7.7). Полученную в результате этого кольцевую рекомбинантную молекулу используют затем для трансформации чувствительных к хлорамфениколу клеток *E. coli*. Так как одноцепочечные концы разрывов, вызванных обработкой рестриктазами *BamHI* и *HindIII*, не комплементарны друг другу, то не может происходить эффективного замыкания в кольцо большого фрагмента вектора, не содержащего вставку чужеродной ДНК, и такой фрагмент трансформирует клетки *E. coli* очень слабо. Эффективность же трансформации кольцевой ДНК гораздо выше, чем линейной плазмидной

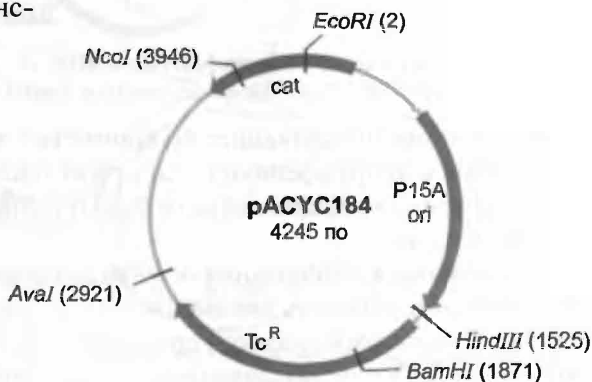


Рис. 7.6. Рестрикционно-генетическая карта плазмидного вектора pACYC184

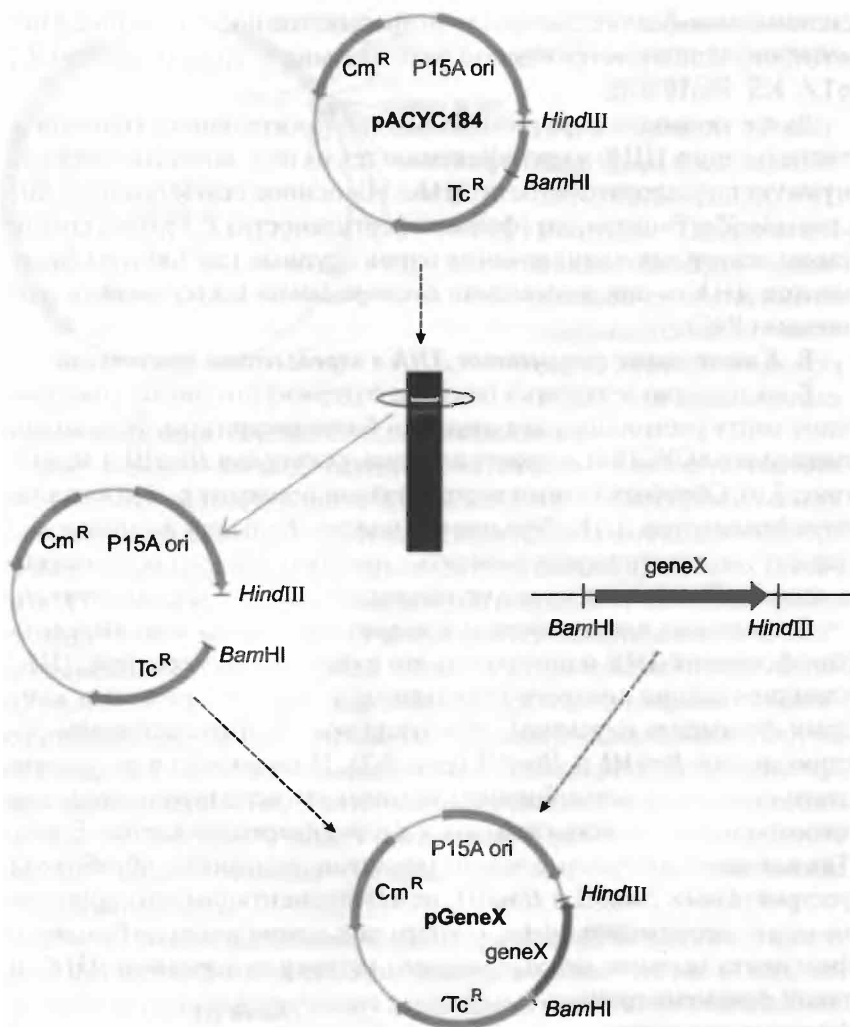


Рис. 7.7. Схема клонирования фрагмента ДНК на плазмидном векторе pACYC184 по сайтам рестрикции *Bam*HI и *Hind*III

ДНК. Поэтому подавляющее большинство выросших колоний, устойчивых к хлорамфениколу, содержит плазмиду с встроенным между рестрикционными сайтами *Bam*HI и *Hind*III фрагментом чужеродной ДНК.

Применение клонирования по двум различным сайтам рестрикции позволяет получать рекомбинантные плазмиды, содержащие вставку в строго определенной ориентации, в то время как при клонировании ДНК с использованием только одного сайта рестрикции

(см. раздел А) из-за его палиндромной структуры возможны две ориентации клонируемого фрагмента и, как следствие, два типа рекомбинантных плазмид.

Клонирование с использованием двух различных рестриктаз используется, например, при конструировании экспрессионных систем на базе специальных векторов: рЕТ-система («Merck», Германия), рBAD-система («Invitrogen», США), рGEX-система («GE Healthcare», Великобритания) и другие. В этом случае важно расположить клонируемый ген строго в определенном направлении для обеспечения его эффективного выражения с промотора, находящегося в составе этих экспрессионных векторов. Другим примером использования подобного подхода может служить задача по клонированию чужеродного гена, чья экспрессия заведомо токсична для кишечной палочки. Тогда точное знание ориентации клони-

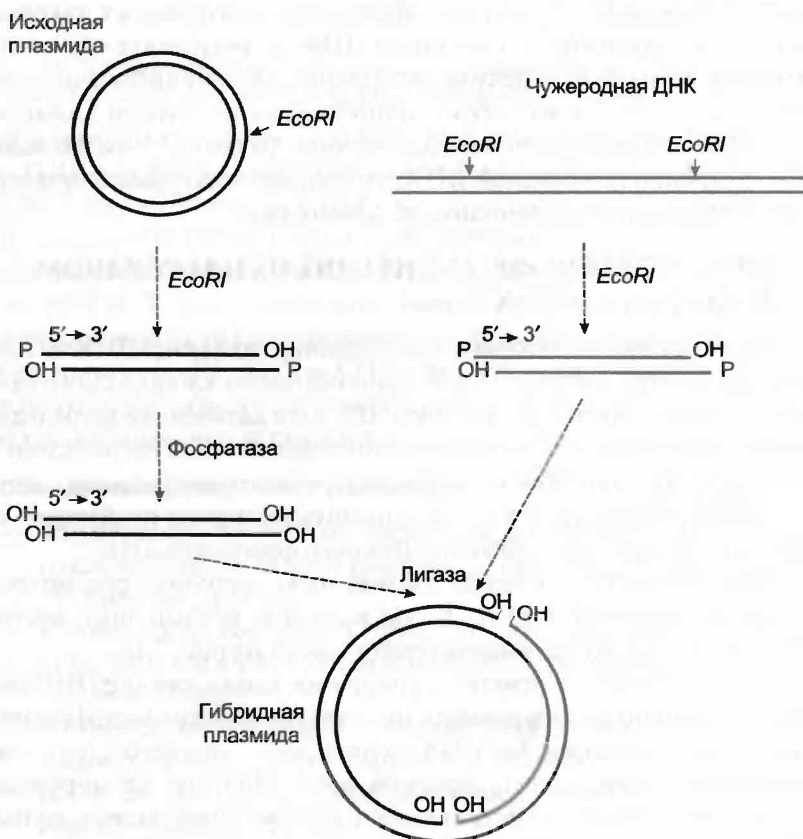


Рис. 7.8. Схема клонирования фрагмента ДНК на плазмидном векторе, обработанном щелочной фосфатазой

руемого фрагмента позволяет сконструировать рекомбинантную плазмиду таким образом, чтобы исключить случайную экспрессию с промоторов генов, входящих в состав векторной плазмиды.

В. Обработка фосфатазой линейной ДНК плазмиды-вектора

В процессе лигирования ДНК-лигаза катализирует образование фосфодиэфирной связи между соседними нуклеотидами лишь тогда, когда один из них содержит 5'-фосфатную группу, а другой — 3'-гидроксильную группу. Поэтому повторное замыкание в кольцо плазмидной ДНК можно свести к минимуму, если удалить 5'-фосфаты на обоих концах линейной ДНК плазмиды. Это достигается обработкой плазмидной ДНК бактериальной щелочной фосфатазой или фосфатазой из поджелудочной железы крупного рогатого скота. В результате ни одна из цепей дуплекса не способна образовать фосфодиэфирной связи и в то же время сохранивший 5'-фосфаты фрагмент чужеродной ДНК может эффективно лигировать с такой дефосфорилированной плазмидной ДНК. В результате образуется открытая кольцевая молекула, содержащая два одноцепочечных разрыва (рис. 7.8). Так как эффективность трансформации кольцевой ДНК (даже содержащей одноцепочечные разрывы) гораздо выше, чем линейной плазмидной ДНК, то большинство трансформантов будет содержать рекомбинантные плазмиды.

КЛОНИРОВАНИЕ ФРАГМЕНТА ДНК НА ПЛАЗМИДНОМ ВЕКТОРЕ В КЛЕТКАХ *E. coli*

Ниже приведена методика клонирования фрагмента ДНК на плазмидном векторе в клетках *E. coli*. Амплификация клонируемого фрагмента осуществляется с помощью ПЦР, а его дальнейшее встраивание в состав вектора ведется в определенной ориентации по уникальным сайтам рестрикции. Нуклеотидная последовательность данных сайтов искусственно вводится в состав олигонуклеотидных праймеров, используемых при амплификации нужного фрагмента ДНК.

Для наглядности в предлагаемой ниже методике рассмотрено клонирование гена *thrA* из *E. coli* в составе плазмидного вектора pUC18. Схема эксперимента представлена на рис. 7.10.

Примечание. Надо отметить, что прямое клонирование ПЦР-продукта с помощью лигирования по «тупым» концам неэффективно из-за присоединения *Taq* ДНК-полимеразой лишнего адениннуклеотида к 3'-концу синтезируемой цепи. Поэтому клонирующий вектор обрабатывают рестриктазой с образованием новых «тупых» концов и присоединяют к обоим 3'-концам фрагментов тиминнуклеотид для комплементарности с ПЦР-продуктом. В качестве при-

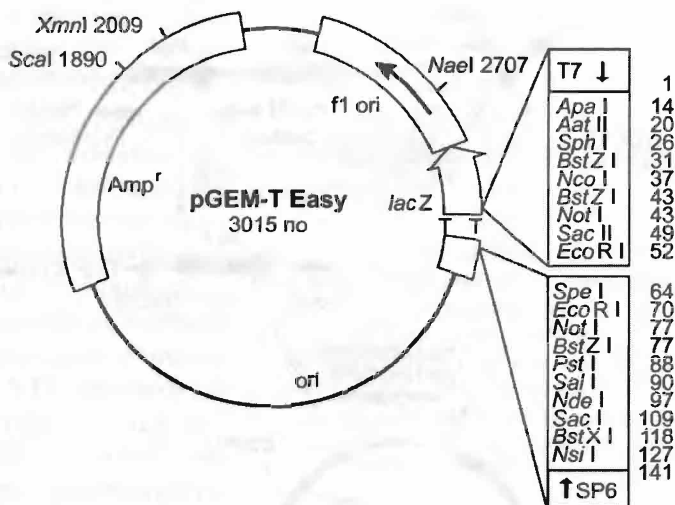


Рис. 7.9. Рестрикционно-генетическая карта плазмидного вектора pGEM-T Easy (согласно изображению из каталога компании «Promega», США)

мера плазмидных векторов, широко используемых для клонирования ПЦР-продуктов, можно привести высококопийный вектор pGEM-T Easy («Promega», США), который содержит 3'-терминальный тимидин на обоих концах в инсерционном сайте, что значительно улучшает эффективность лигирования продуктов ПЦР. Плазмида pGEM-T Easy содержит также многочисленные сайты рестрикции в области клонирования (включая фланкирующие сайты для рестриктаз *EcoRI*, *BstZI* и *NotI*) и ген *lacZ*, кодирующий α-пептид β-галактозидазы, что обеспечивает классическую сине-белую селекцию рекомбинантных штаммов (рис. 7.9).

Необходимые реактивы и растворы:

- коммерчески доступные препараты рестрицирующих эндонуклеаз *EcoRI* и *HindIII* (например, производства компании «Fermentas», Литва);
- коммерчески доступный препарат щелочной фосфатазы из кишечника телят (например, производства компании «Fermentas», Литва);
- коммерчески доступный препарат ДНК лигазы фага T4 (например, производства компании «Fermentas», Литва);
- набор для проведения ПЦР (например, производства компании «Fermentas», Литва);
- 10%-ный водный раствор додецилсульфата натрия;
- 0,5 М раствор ЭДТА (pH 7,5);

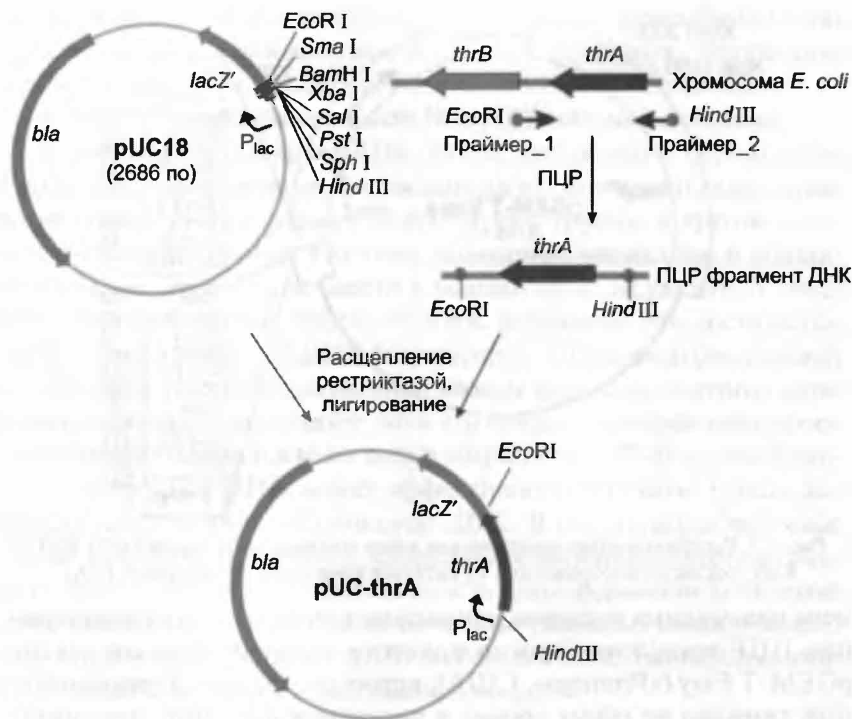


Рис. 7.10. Схема клонирования фрагмента хромосомы *E. coli* с геном *thrA* на плазмидном векторе pUC18

- стерильная среда LB в жидком и агаризованном (1,2%) виде — см. приложение 1;
- раствор ампициллина — см. приложение 1;
- стерильный раствор X-gal — см. приложение 1;
- стерильный раствор ИПТГ — см. приложение 1;
- стерильный 0,1 М раствор $CaCl_2$;
- 80%-ный фенол, уравновешенный с буферным раствором ТЕ (pH 8,0);
- хлороформ;
- 3 М раствор ацетата натрия (pH 4,8);
- чистый (96%-ный) этанол и 70%-ный водный раствор этанола;
- стерильная деионизованная вода.

Методика

А. Приготовление фрагмента ДНК к клонированию

1. Сконструировать и синтезировать фланкирующие клонируемый ген прямой и обратный олигонуклеотидные праймеры (прай-

мер_1 и праймер_2, рис. 7.10), содержащие на своих 5'-концах нуклеотидные последовательности участков узнавания рестриктаз, по которым будет осуществляться дальнейшее клонирование. Необходимо проверить с помощью компьютерной программы (например, Vector NTI производства «Invitrogen», США или DNAMAN производства «Lynnon Corporation», Канада), что нуклеотидная последовательность клонируемого фрагмента ДНК не содержит участков узнавания для планируемых к использованию рестриктаз.

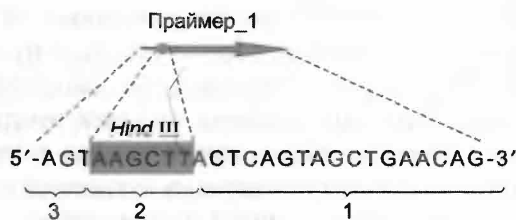


Рис. 7.11. Структура олигонуклеотидного праймера, используемого для амплификации фрагмента ДНК для последующего клонирования: 1 — участок, гомологичный последовательности хромосомы; 2 — последовательность уникального сайта рестрикции (может входить в состав участка 1); 3 — дополнительная часть праймера, необходимая для увеличения эффективности узнавания сайта рестрикции соответствующим ферментом

2. Подготовить препарат ДНК, который будет использоваться в качестве матрицы при амплификации клонируемого фрагмента. Для этого выделите хромосомную или плазмидную ДНК, содержащую в своем составе интересующий участок, с помощью методов, рекомендованных в гл. 1.

3. Амплифицировать клонируемый фрагмент ДНК с помощью ПЦР. Процедуру осуществлять в соответствии с рекомендациями, изложенными в гл. 2.

4. Очистить полученный препарат от ДНК-матрицы, выделив соответствующую полосу из агарозного геля, как это описано в гл. 3.

5. Осадить ДНК этанолом и растворить осадок в 50 мкл стерильной деионизованной H_2O . Определить концентрацию амплифицированного фрагмента ДНК спектрофотометрически или осуществить сравнительный анализ в агарозном геле со стандартными концентрациями ДНК (маркерами).

Дополнения к методике

К и. 1. Пример олигонуклеотидного праймера, используемого при клонировании, представлен на рисунке 7.11. Как видно, праймер состоит из двух частей: основной и дополнительной. Основная часть гомологична матричной ДНК и служит для гибридизации с ней на начальных этапах ПЦР. Дополнительная часть праймера содержит участок (или участки) узнавания рестриктаз, по которым

будет осуществляться клонирование. Помимо этого на 5'-конец праймера следует добавить несколько нуклеотидов (например, три А), присутствие которых необходимо для увеличения эффективности связывания соответствующей рестриктазы с нуклеотидной последовательностью данного сайта рестрикции. Информацию о числе таких дополнительных нуклеотидов можно найти в каталогах компаний-производителей ферментов.

Кп. 3. При ПЦР амплификации в нуклеотидную последовательность клонируемого фрагмента могут быть внесены замены (так называемые ошибки ПЦР). Для снижения вероятности данных событий используйте термостабильные ДНК-полимеразы с 3'-корректирующей экзонуклеазной активностью (например, *Pfu* полимеразу производства компании «Fermentas», Литва).

Б. Расщепление ДНК вектора и клонируемого фрагмента с помощью эндонуклеаз рестрикции

Осуществить расщепление ДНК клонируемого фрагмента и вектора по сайтам рестрикции, по которым осуществляется клонирование, согласно описанной ниже процедуре.

1. В микроцентрифужную пробирку внести необходимое количество ДНК (как правило, это не более чем **0,2–1,0 мкг**), после чего стерильной деионизованной водой довести объем раствора до **17 мкл**.

2. В полученный раствор добавить **2 мкл** буферного раствора 10-кратной концентрации (10×), соответствующего выбранной рестриктазе (выбор осуществляйте в соответствии с рекомендациями компании — производителя фермента, см. также приложение 1). Перемешать содержимое, слегка постукивая по пробирке пальцем.

3. В стерильной деионизованной воде развести раствор необходимой рестриктазы до концентрации **1 ед./мкл**. *Приготовление раствора рестриктазы осуществлять во льду.*

4. Добавить **1 мкл** полученного раствора рестриктазы к реакционной смеси и осторожно перемешать.

5. Инкубировать реакционную смесь в водяной бане при подходящей температуре (согласно рекомендациям компании-производителя фермента) и в течение необходимого времени (1–3 ч). Например, для препарата рестриктазы *HindIII* («Fermentas», Литва) оптимальными условиями являются буферный раствор «Red» и инкубация при 37°C в течение 40–60 мин.

6. По истечении времени реакции отобрать из реакционной смеси небольшую аликвоту (обычно, 1–2 мкл) для оценки эффективности расщепления ДНК. Анализ осуществлять с помощью электрофоретического разделения ДНК в 1%-ном агарозном геле, как

это рекомендовано в п. 3.1. Если реакция прошла не полностью (в геле наблюдается полоса, отвечающая нерасщепленному вектору), то надо продолжить инкубацию смеси. Дополнительно можно также добавить 1–2 мкл «свежей» рестриктазы. Обычно для полного расщепления фрагмента ДНК в большинстве случаев достаточно 2–3 ч инкубации при 37°C с соответствующей рестриктазой (конечная концентрация 0,05–0,5 ед./мкл смеси, 1–5 ед./мкг ДНК).

7. Остановить реакцию добавлением 0,5 М раствора ЭДТА (рН 8,0) до конечной концентрации **10 мМ**.

8. Осадить ДНК этанолом и растворить в **17 мкл** стерильной деионизированной H_2O .

9. Подобным образом обработайте препараты ДНК плазмиды и клонируемого фрагмента второй рестриктазой (в рассматриваемом примере это рестриктаза *EcoRI*). Допускается обработка препарата сразу двумя рестриктазами при условии, что используемый буферный раствор оптимален для обоих ферментов в соответствии с рекомендациями компании-производителя и соответствующие сайты рестрикции на плазмидной ДНК достаточно удалены друг от друга.

10. Растворите каждый препарат рестрицированной ДНК в **20 мкл** стерильной деионизированной H_2O и храните при $-20^{\circ}C$.

Дополнения к методике

К п. 2. Рестриктазы довольно стабильны в случае хранения при $-20^{\circ}C$ в соответствующем буферном растворе, содержащем 50% глицерина. Как и большинство ферментов, рестриктазы чувствительны к повышенной температуре, поэтому работать с ними во избежание потери удельной активности необходимо во льду и как можно быстрее, чтобы фермент находился вне морозильника минимальное время. Сразу после использования поместите фермент обратно на $-20^{\circ}C$. Иногда в реакционную смесь (на 20 мкл) рекомендуется дополнительно вносить **2 мкл** 0,1%-ного БСА для активации реакции.

К п. 3. Разведение раствора рестриктазы до оптимальной концентрации позволяет решить сразу несколько проблем. Это ингибирование активности фермента глицерином (что может происходить при концентрации глицерина в смеси выше 5%) и так называемая «активность со звездочкой» (*star activity*) рестриктазы. Этот термин описывает ситуации, когда фермент способен расщеплять ДНК по сайтам рестрикции, отличным от своего участка узнавания. Это может происходить, когда в реакционной смеси при-

сутствует чрезмерное количество фермента или ее солевой состав сильно отличается от оптимального.

К п. 7. Для функционирования рестриктаз II типа, которые обычно используются при клонировании, необходимо присутствие в реакционной смеси ионов Mg^{2+} . Внесение в смесь ЭДТА (pH 8,0) до конечной концентрации 10 мМ полностью подавляет активность фермента. Некоторые рестриктазы могут быть инактивированы нагреванием при 65°C в течение 5–15 мин. В случае необходимости полного удаления эндонуклеаз рестрикции из реакционной смеси можно использовать экстракцию образца фенолом/хлороформом с дополнительной экстракцией хлороформом и последующей преципитацией ДНК этанолом или изопропанолом, либо, например, применять набор **High Pure PCR Product Purification Kit** («Roche Diagnostics», Швейцария).

В. Дефосфорилирование линейаризованной векторной ДНК

Для снижения эффективности самокольцевания рестрицированную ДНК плазмидного вектора можно обработать щелочной фосфатазой. Этот фермент отщепляет от линейаризованной молекулы ДНК 5'-концевые фосфатные группы, делая невозможным образование фосфодиэфирной связи между цепями с помощью ДНК-лигазы. В то же время клонируемый рестрицированный фрагмент ДНК можно эффективно лигировать с такой дефосфорилированной плазмидной ДНК, поскольку он содержит необходимые для реакции 5'-концевые фосфаты; два оставшихся одноцепочечных разрыва в рекомбинантной молекуле ДНК устранятся системой лигирования клетки-хозяина после репликации.

Для дефосфорилирования цепей ДНК обычно пользуются бактериальной щелочной фосфатазой (*bacterial alkaline phosphatase*, BAC), щелочной фосфатазой креветки (*shrimp alkaline phosphatase*, SAP) или щелочной фосфатазой, выделенной из кишечника теленка (*calf intestinal alkaline phosphatase*, CIAP). Значительное преимущество последних двух ферментов заключается в том, что они могут быть полностью и необратимо инактивированы инкубацией при 68°C в течение 15 мин (CIAP — в буфере с додецилсульфатом натрия), тогда как BAC является термостабильным ферментом.

1. В стерильной микроцентрифужной пробирке смешать: раствор очищенной рестрицированной ДНК (**0,2–1 пмоль** в зависимости от характера 5'-концов), **5 мкл** 10× буферного раствора для CIAP, щелочную фосфатазу (расчет количества см. в дополнениях к методике). Довести объем раствора до **50 мкл**, добавив необходимое количество стерильной деионизованной воды.

2. Поместить пробирку в термостат на 37°C и инкубировать в течение 10–60 мин (60 мин рекомендуется использовать в случае «тупых» концов или при количестве ДНК ~1 пмоль).

3. К содержимому пробирки добавить **40 мкл** стерильной деионизованной воды, **10 мкл** 10× буферного раствора STE (или 10 мкл 50 mM ЭДТА) и **5 мкл** 10%-ного раствора додецилсульфата натрия. Для как можно более полного освобождения от щелочной фосфатазы внести в смесь протеиназу К до конечной концентрации **100 мкг/мл**. Хорошо перемешать, поместить пробирку в термостат на 68°C и инкубировать в течение 15 мин (или при 56°C в течение 30 мин).

4. Добавить к раствору, охлажденному до комнатной температуры, **равный объем** фенола. Тщательно перемешать и центрифугировать до разделения фаз при 5000 g в течение 5 мин.

5. Осторожно отобрать верхнюю фазу и перенести ее в стерильную микроцентрифужную пробирку. Добавить к раствору **равный объем** хлороформа и тщательно перемешать. Центрифугировать до разделения фаз при 5000 g в течение 5 мин.

6. Осторожно отобрать верхнюю фазу и перенести ее в стерильную микроцентрифужную пробирку.

7. Добавить к смеси **0,1 объема** 3 M ацетата натрия (pH 4,8–5,2), хорошо перемешать и добавить **2,5 объема** охлажденного этанола для очистки препарата от щелочной фосфатазы. Инкубировать смесь при –20°C (–70°C) в течение 30 мин.

8. Центрифугировать при 12 000 g в течение 10 мин при 4°C. Слить надосадочную жидкость, промыть осадок ДНК охлажденным 70%-ным этиловым спиртом. Осадок подсушить и растворить в **20 мкл** стерильной деионизованной H₂O или в буферном растворе TE. Проверить ДНК на самолигирование и эффективность трансформации.

Дополнения к методике

Ко всему разделу. Использование дефосфорилированной векторной ДНК заметно снижает общее число трансформантов, так как в этом случае лигированная смесь содержит кольцевые молекулы ДНК с одноцепочечными разрывами. Вместе с этим доля гибридных молекул (плазмид со вставкой) в такой реакционной смеси увеличена. Обработку фосфатазой следует проводить в тех случаях, когда нет возможности вести прямой селективный отбор бактерий, содержащих рекомбинантные плазмиды (клонлируемый фрагмент не придает клеткам определенного фенотипа).

К п. 1. Для проведения эффективного лигирования дефосфорилированного вектора с клонируемым фрагментом ДНК необходимо

полностью очистить реакционную смесь от остатков фосфатазы. В связи с этим при проведении дефосфорилирования векторной ДНК следует пользоваться минимально необходимым количеством фермента. При расчетах нужно учитывать, что для удаления концевых остатков из 1 пмоль 5'-концов ДНК требуется 0,01 ед. СІАР (1 пмоль 5'-концов линейной ДНК размером 4 тпо равен ~1,6 мкг). Для 3'- и «тупых» концов желательно брать 0,1 ед. СІАР/пмоль.

Тем не менее некоторые протоколы рекомендуют использовать 1 ед. щелочной фосфатазы на 1 пмоль ДНК в случае выступающих 5'-концов (инкубация при 37°C в течение 30 мин) и 1 ед. щелочной фосфатазы на 2 пмоль ДНК в случае «липких» концов (инкубация при 37°C в течение 15 мин, затем внесение новой аликвоты фермента и инкубация при 55°C в течение 45 мин). Для щелочной фосфатазы креветки (SAP) оптимальными с точки зрения эффективности дефосфорилирования являются следующие концентрации (для 2,5 мкг ДНК): 5'-выступающий конец — 0,1 ед., «тупой» конец — 0,2 ед., 5'-утопленный конец — 0,5 ед.

К п. 3 и последующим. Для полной инактивации СІАР часто применяют инкубацию препарата при 80°C в течение 30 мин. Для быстрой и эффективной очистки препаратов ДНК от рестриктаз, а также от праймеров, нуклеотидов, ДНК-полимеразы, щелочной фосфатазы и других использовавшихся в ходе работы ферментов можно использовать набор **MinElute Reaction Cleanup Kit** («Qiagen», Нидерланды). В состав набора входят кварцевые мембраны для микроцентрифужных пробирок, селективно связывающие ДНК при обработке проб специальными буферными растворами с высоким содержанием солей. Элюция ДНК (с помощью настольной центрифуги или вакуумного насоса) с мембраны после отмывки проб от примесей осуществляется низкосолевым буферным раствором или водой.

Г. Ковалентное соединение ДНК вектора и клонируемого фрагмента (вставки) с помощью фермента ДНК-лигазы — лигирование

Использование активной ДНК-лигазы является залогом успешного проведения реакции. Поэтому перед постановкой опыта рекомендуется проверить используемый препарат фермента на эффективность лигирования. Это легко можно осуществить с помощью следующего простого теста.

1. В микроцентрифужной пробирке смешать: **0,1–1 мкг ДНК** фага лямбда, расщепленной, например, рестриктазой *Xba*I; **2 мкл** 10× буферного раствора для проведения лигазной реакции (см. приложение 1) и **2 ед.** ДНК-лигазы фага Т4. Довести деионизованной

водой объем реакционной смеси до **20 мкл**. *Работать с ДНК-лигазой необходимо во льду и надо стараться не держать фермент вне морозильной камеры дольше необходимого времени.*

Широкое применение нашел также буферный раствор для лигирования производства американской компании «Promega» (2× Rapid Ligation Buffer). *Буферные растворы для лигирования после разморозки должны находиться в ходе эксперимента во льду, поскольку они содержат АТФ.*

2. Инкубировать смесь при 22°C, отбирая аликвоты (**2–3 мкл**) через 0, 15, 30, 60 и 120 мин. Каждый образец смешать с краской для электрофореза и прогреть 15 мин при 65°C.

3. Проанализировать пробы в агарозном геле. Как правило, для полного осуществления реакции лигирования (на фореze видна только одна полоса, отвечающая полноразмерной длине ДНК бактериофага) достаточно 30–60 мин. Если данное условие выполнено, то можно переходить к постановке реакции лигирования вектора с клонируемым фрагментом (вставкой).

4. В стерильной микроцентрифужной пробирке (проба А) смешайте **~25–100 нг** ДНК вектора и клонируемого фрагмента (вставки), обработанные рестриктазами, в эквимольном соотношении (см. дополнения к методике). В другую пробирку (проба Б) внесите такое же количество линейаризованной плазмидной ДНК. Эта проба будет служить контролем на частоту самокольцевания вектора. Довести объем реакционных смесей до **17 мкл**, добавив соответствующее количество стерильной деионизованной воды.

5. В реакционные смеси внести по **2 мкл** буферного раствора (10×) для реакции лигирования и **1 мкл** препарата ДНК-лигазы фага Т4 (1–5 ед.), перемешать.

6. Инкубировать реакционные смеси при 22°C в течение 1–2 ч или при более низкой температуре в течение ночи (см. дополнения к методике).

7. Инактивировать ДНК-лигазу, прогрев пробирки с лигированными смесями в термостате при 65–70°C в течение 10 мин. Проводить температурную инактивацию ДНК-лигазы рекомендуется тогда, когда лигированные смеси будут использоваться в дальнейшем для трансформации клеток, поскольку в противном случае возможно значительное снижение количества трансформантов.

8. Проверить наличие клонируемого фрагмента в векторе с помощью обработки лигированной смеси соответствующими рестриктазами и последующего электрофореза в агарозном геле. Лигированные смеси можно хранить при –20°C.

Дополнения к методике

Ко всему разделу. Для быстрого (5 мин) и достаточно эффективного проведения лигирования «липких» и «тупых» концов при комнатной температуре можно рекомендовать набор **Rapid DNA Ligation Kit** («Roche Diagnostics», Швейцария), включающий все необходимые для реакции компоненты в оптимальных концентрациях. Однако в этом случае продукт лигирования не может быть использован (без дополнительной очистки) в ходе электропорации бактериальных клеток, поскольку буферный раствор для лигирования содержит полиэтиленгликоль (ПЭГ). Все вышеприведенные этапы клонирования (рестрикцию, дефосфорилирование, инактивацию фосфатазы и лигирование) можно провести в одной пробирке, используя набор **Shrimp Alkaline Phosphatase and Rapid DNA Ligation Kit** («Roche Diagnostics», Швейцария).

При клонировании ПЦР-продукта (вставки) в вектор с «тупыми» концами удаление лишних оснований на 3'-конце вставки и фосфорилирование 5'-конца является необходимым условием последующего успешного лигирования. Данную процедуру можно очень быстро и эффективно осуществить в единственной реакции (37°C, 10 мин) с помощью набора **Blunting Kination Ligation (BKL) Reagent Set** («Takara Bio Inc.», Япония). Используемые в реакционной смеси ферменты (Blunting Kination Enzyme Mix) легко удаляются из препарата, предназначенного для лигирования, при помощи центрифугирования при 14 000 g в течение 30 с с применением микроцентрифужных пробирок со специальными фильтрами Micropure-EZ («Millipore», США).

К п. 4. Эквимольярное соотношение линеаризованный вектор : фрагмент при постановке реакции лигирования позволяет увеличить выход гибридных молекул. Однако данное правило не всегда справедливо. В ряде случаев бывает полезно увеличить долю клонированного фрагмента (в 2–4 раза) в реакционной смеси. Это связано со снижением эффективности работы некоторых рестриктаз на концах линейной ДНК. Часто рекомендуется использовать молярное соотношение вектор : вставка, равное 1 : 10. Например, если размер клонированного фрагмента ДНК составляет 2400 по, а размер вектора — 6000 по (в 2,5 раза больше), то при концентрации препарата фрагмента ДНК (вставки) 5 нг/мкл надо использовать концентрацию вектора, равную 5 нг/мкл : $(10 : 2,5) = 1,25$ нг/мкл.

Некоторые протоколы рекомендуют использовать при лигировании «липких» концов молярное соотношение вектор : вставка, равное 1 : 3 (если векторная ДНК и встраиваемый фрагмент ДНК имеют

примерно одинаковый размер) или 1 : 2 (если их размеры различны). При лигировании «тупых» концов рекомендуется молярное соотношение 1 : 5. В целом надо иметь в виду, что использование слишком низких концентраций вектора и вставки (<1 нг/мкл) приводит преимущественно к самолигированию вектора, а слишком высоких (>7 нг/мкл) — к образованию конкатамеров.

При осуществлении реакции лигирования следует также учитывать, что максимальная концентрация ДНК в реакционной смеси не должна превышать 10 нг/мкл. В этом случае снижается вероятность образования мультимеров (плазмидных молекул, содержащих более одного репликаона). Заметим, что данное ограничение существенно при трансформации клеток *E. coli*. Для некоторых других бактерий (например, *B. subtilis*) мультимеризация, наоборот, существенно повышает эффективность трансформации.

Кп. 5. Добавление полиэтиленгликоля (ПЭГ) в лигазную смесь до концентрации 5–10% (вес/объем) увеличивает скорость лигирования в несколько раз за счет возрастания аффинности ДНК-лигазы к субстрату.

При использовании плазмидного вектора pGEM-T Easy надо применять ДНК-лигазу T4 без экзонуклеазной активности во избежание удаления терминальных дезокситимидинов вектора.

Кп. 6. Пониженная температура реакции лигирования (4–16°C) необходима для удержания «липких» концов ДНК в совместном комплексе, поскольку при оптимальной для ДНК-лигазы температуре (37°C) энергии водородных связей между «липкими» концами для этой цели недостаточно (T_m для «липких» концов в 4 нуклеотида примерно равна 5°C). Стоит заметить, что скорость лигирования при низких температурах сильно снижена из-за малой активности ДНК-лигазы. Компромиссным решением этой проблемы является либо использование промежуточной температуры (20–22°C), либо удлинение времени реакции (до 8–12 ч). Часто рекомендуется инкубировать лигируемые пробы при 16°C в течение 3–16 ч или при 4°C в течение 12 ч с избытком ДНК-лигазы (эффективность лигирования «липких» концов в этом случае может быть выше 95% в зависимости от качества используемой эндонуклеазы рестрикции).

При лигировании «тупых» концов применяют инкубацию при 14–25°C в течение 12 ч (эффективность — выше 80%). Надо отметить, что для достижения высокой эффективности реакции лигирования «тупых» концов требует на порядок большего времени инкубации по сравнению с лигированием «липких» концов. Лигирование

по «тупым» концам проходит лучше при использовании достаточно высоких концентраций ДНК.

Эффективность лигирования зависит также от структуры объединяемых концов, даже если они оба «липкие» или «тупые». Например, скорость сшивания «липких» концов у фрагментов ДНК плазмиды pBR322 (рис. 7.1), образованных под действием различных рестриктаз, снижается в последовательности: *Hind*III > *Pst*I > *Eco*RI > *Bam*HI > *Sa*I, причем *Hind*III-концы лигируются в 10–40 раз быстрее, чем *Sa*I-концы.

Д. Трансформация штамма *E. coli* TG1 лигированной смесью и отбор рекомбинантных плазмид

1. Трансформировать штамм *E. coli* TG1 лигированными смесями из пробирок А и Б. Для этой цели воспользуйтесь методиками, предложенными в гл. 4.

2. Высейте трансформированные клетки на чашки с агаризованной средой LB, содержащей антибиотик ампициллин (конечная концентрация 100 мкг/мл), а также ИПТГ и X-gal в концентрации 40 мг/мл. Инкубируйте чашки в термостате при 37°C до появления отдельных колоний (обычно 8–12 ч).

Ap^R-колонии, выросшие на чашках, могут быть окрашены как в синий, так и в белый цвет. Бактерии в колониях синего цвета содержат нативный вектор pUC18, в то время как белый цвет колоний говорит о том, что бактерии могут содержать рекомбинантную плазмиду со вставкой (таких колоний должно быть подавляющее большинство, если частота самокольцевания вектора мала). Для максимально четкой сине-белой селекции желательно выдержать чашки при 4°C в течение 2–6 ч (продукт β-галактозидазной реакции сам по себе бесцветен и окрашивается при окислении кислородом воздуха).

Дополнения к методике

К п. 1. При проведении генетической трансформации обязательно проверяйте трансформируемую культуру (в данном примере, *E. coli* TG1) на устойчивость к используемой концентрации антибиотика. Для этого высейте такое же количество культуры, что было использовано для трансформации, на чашку с соответствующим антибиотиком. После инкубации в термостате на этой контрольной чашке не должно присутствовать ни одной устойчивой колонии.

К п. 3. Ампициллин является разлагаемым β-лактамым антибиотиком и длительная инкубация чашек в термостате может привести к подросту культуры вокруг устойчивых колоний, выделяющих

β -лактамазу. Данное обстоятельство вносит определенную сложность при идентификации и отборе колоний белого цвета, поэтому плотность высеваемой суспензии должна быть низкой, а чашки после появления колоний трансформантов нужно перенести из термостата в холодильник на 4°C.

Е. Подтверждение клонирования с помощью рестрикционного картирования или экспресс-метода скрининга посредством ПЦР

1. Выделить плазмидную ДНК из 6–24 колоний, окрашенных в белый цвет, согласно любой методике, представленной в подглаве 1.2.

2. Обработать выделенную плазмидную ДНК соответствующими рестриктазами, по результатам действия которых (расположение фрагментов ДНК при электрофоретическом разделении в агарозном геле) можно судить об успешности клонирования. Для анализа нуклеотидных последовательностей рекомендуется пользоваться специальными программами, позволяющими не только подбирать удобные рестриктазы для клонирования, но и строить рестрикционно-генетические карты конструируемых плазмид. В качестве примера такого программного обеспечения для клонирования и амплификации, позволяющего рассчитывать рестрикционные фрагменты, можно привести набор прикладных программ Vector NTI, разработанный компанией «Invitrogen» (США).

Анализ нуклеотидной последовательности сконструированной плазмиды с помощью Vector NTI показывает, что для подтверждения клонирования гена *thrA* из *E. coli* в составе плазмидного вектора pUC18 можно воспользоваться рестриктазами *ClaI*, *PvuI* или *PvuII* (номенклатура фирмы «Fermentas», Литва). Так, после обработки рестриктазой *PvuII* и при последующем разделении полученных фрагментов ДНК в агарозном геле в ходе электрофореза плазмиды со вставкой образуют три полосы размером 2579, 2364 и 91 по соответственно. В то время как при обработке плазмиды без вставки рестриктазой *PvuII* образуются только два фрагмента размером 2364 и 322 по. Данное различие позволяет сделать вывод о том, что ген *thrA* клонирован в составе вектора pUC18.

При рестрикции двумя рестриктазами с единственными сайтами рестрикции на плазмидном векторе, фланкирующими клонируемый фрагмент, после электрофореза должны быть видны две полосы соответствующего размера (линеаризованный плазмидный вектор и клонируемый фрагмент-вставка); рестрикция с использованием одной из таких рестриктаз должна давать одну полосу размером вектор + вставка.

Альтернативой этому способу является экспресс-метод подтверждения наличия и размера нужной вставки с помощью ПЦР. Для осуществления полимеразной реакции используются два праймера, один из которых способен гибридизоваться только с плазмидной ДНК, — в случае нашего примера это коммерчески доступный олигонуклеотид M13 universal primer («Fermentas», Литва). В качестве второго праймера можно взять один из тех олигонуклеотидов, которые использовались при амплификации клонируемого фрагмента. Такой олигонуклеотид соответственно не должен гибридизоваться с плазмидной ДНК. В качестве матрицы для ПЦР контроля на отсутствие вставки можно использовать исходный вектор или ДНК исходного штамма *E. coli* TG1. Протокол методики приведен ниже.

3. Пронумеровать проверяемые бактериальные колонии на чашке.

4. Осторожно отобрать часть проверяемой колонии с помощью микробиологической петли или стерильной зубочистки. Ресуспендировать биомассу в микроцентрифужной пробирке, содержащей **10–15 мкл** стерильной воды. Инкубировать в кипящей водяной бане в течение 5 мин (или 10 мин при 95°C), центрифугировать при 8000 g в течение 1 мин для удаления фрагментов клеток.

5. В тонкостенные пробирки для ПЦР внести по **1 мкл** полученного супернатанта.

6. В стерильной микроцентрифужной пробирке смешать необходимые для осуществления ПЦР реактивы: олигонуклеотиды (M13-праймер и праймер_1), буферный раствор для соответствующей ДНК-полимеразы, смесь четырех дНТФ и собственно сам фермент (подробно постановка ПЦР рассмотрена в гл. 2). Объем реакционной смеси рассчитывается по формуле $V = 10 \times X - X$, где X — количество проверяемых колоний.

7. Добавить по **9 мкл** реакционной смеси в пробирки с клеточным лизатом (см. п. 5) и провести ПЦР.

8. Нанести образцы на агарозный гель и провести их электрофоретическое разделение. Определите те пробы, где наблюдается продукт ПЦР расчетного размера.

9. Выделить плазмидную ДНК из нужных колоний, окрашенных в белый цвет, согласно любой методике, представленной в п. 1.2. Заложить культуры, выращенные из отобранных колоний, на хранение при –20°C в физиологическом растворе, содержащем 15%-ный глицерин.

10. Поскольку при амплификации клонируемого фрагмента использовалась ПЦР, убедитесь в отсутствии замен в его нуклеотидной

последовательности с помощью секвенирования ДНК или, если это возможно, по определенному фенотипу, придаваемому клеткам *E. coli* клонированным фрагментом ДНК.

Дополнения к методике

К п. 2. Эффективность работы некоторых рестриктаз может зависеть от нуклеотидного окружения их сайтов рестрикции. Например, *EcoRI* сайт, расположенный на правом конце фага лямбда, расщепляется в 10 раз медленнее, чем остальные сайты для этой рестриктазы. Данное обстоятельство может приводить к ошибкам при определении числа сайтов рестрикции в таком фрагменте ДНК.

7.2.

СОЗДАНИЕ ГЕНОМНЫХ БИБЛИОТЕК

Конструирование представительных геномных библиотек и поиски в них индивидуальных генов являются начальными этапами многих современных молекулярно-генетических и биотехнологических исследований. Применение данного подхода подчас представляет единственно возможный способ для идентификации гена, ответственного за тот или иной признак.

Наиболее универсальным методом, используемым при создании геномных клонотек, является метод «шотгана» — клонирование фрагментов ДНК в составе плазмидных или фаговых векторов. Альтернативой этому подходу являются методы клонирования *in vivo*, основанные на способности ряда фагов захватывать участки геномной хромосомы при упаковке в фаговые частицы. Для поиска специфических клеточных линий (клонов), несущих искомые последовательности ДНК, используют Саузерн-гибридизацию с меченым ДНК-зондом (см. главу 10), иммунологический скрининг или скрининг по активности белка, кодируемого геном-мишенью. В последнем случае идентификацию проводят по изменению окраски колоний, утилизирующих специфический хромогенный субстрат, добавленный в питательную среду, или методом трансформации мутантных клеток, не способных расти на минимальной среде без продукта искомого гена.

Иммунологический скрининг геномной библиотеки осуществляется следующим образом (рис. 7.12): а) все клоны библиотеки высевает на чашки с агаризованной питательной средой, обеспечивающей рост только трансформированных (трансдуцированных) клеток; б) выросшие колонии переносят на нитроцеллюлозный или



Рис. 7.12. Иммунологическое тестирование геномной библиотеки

нейлоновый фильтр, клетки лизируют и белки фиксируют на фильтре; в) наносят на фильтр первые антитела, специфически связывающиеся с искомым белком, удаляют несвязавшиеся антитела и наносят на фильтр вторые антитела, специфичные к первым антителам (очень часто используют конъюгаты вторых антител с щелочной фосфатазой); г) промывают фильтр от несвязавшихся вторых антител и добавляют хромогенный субстрат, при ферментативном гидролизе которого образуется окрашенный продукт; д) отбирают колонии на чашке, которые соответствуют окрашенным пятнам на фильтре, культивируют соответствующие клоны и затем определяют, какие из них содержат полноразмерный ген (с помощью гель-электрофореза и картирования, дополнительного клонирования или секвенирования).

Ниже представлены две методики — клонирование фрагментированной случайным образом хромосомной ДНК в составе фагового вектора EMBL3 и создание геномной библиотеки с помощью мини-Mu элемента Mud5005.

МЕТОД «ШОТГАНА»

При использовании метода «шотгана» (англ. *shotgun* — дробовик) проводят расщепление исследуемого генома с помощью рестриктаз. Полученные многочисленные фрагменты ДНК клонируются на векторах большой емкости (как правило, это производные бакте-

риофага *E. coli* лямбда) путем замещения балластного фагового фрагмента на фрагмент геномной ДНК. Далее проводится упаковка ДНК в фаговые частицы *in vitro* и последующая амплификация библиотеки. Для создания библиотек ДНК часто используются клонирующий вектор (фаг) λ ZAP Express и одноцепочечный фаг-помощник ExAssist («Stratagene», США). Смысл в том, что у фага λ ZAP сайт инициации репликации и сайт терминации синтеза ДНК клонированы отдельно и содержат последовательность pSK(-). Фаг-помощник осуществляет выщепление pSK(-) из фага λ ZAP, ее упаковку и секрецию в среду.

Представленный ниже метод описывает процесс создания геномной библиотеки в клетках *E. coli*. Данный подход основан на неполном гидролизе геномной ДНК с помощью рестриктазы *Sau3A*, узнающей тетрануклеотиды и вносящей один разрыв примерно на 256 по, для получения полного набора фрагментов (т.е. содержащего все гены). Неполный гидролиз ДНК (степень которого контролируют изменением времени реакции или количества фермента) проводят для того, чтобы образовались фрагменты различных размеров; такая процедура позволяет клонировать целые гены. Дальнейшее клонирование каждого из получившихся фрагментов осуществляется, например, в вектор EMBL3 по сайту рестрикции *Bam*HI (рис. 7.13). Лигированная смесь упаковывается *in vitro* с помощью набора Packagene («Promega», США) и амплифицируется в клетках *E. coli*.

А. Определение оптимальных условий для неполного расщепления хромосомы рестриктазой *Sau3A*

1. Выделить хромосомную ДНК с помощью одной из методик, описанных в подглаве 1.1. Определить концентрацию полученного препарата ДНК, измерив оптическую плотность раствора при 260 нм. Качество выделенной ДНК проверить путем электрофореза в 0,3%-ном агарозном геле при 4°C (ДНК должна давать компактную полосу размером больше 100 тпо).

2. В стерильную микроцентрифужную пробирку поместить приблизительно 7,5 мкг ДНК, после чего добавить 16,5 мкл 10× буфер-

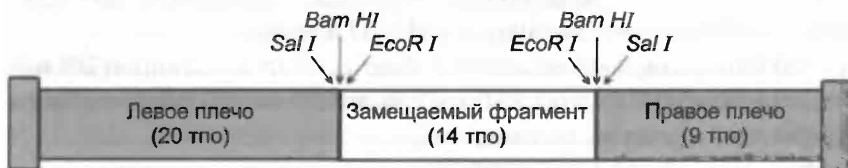


Рис. 7.13. Структурная карта фагового вектора EMBL3

ного раствора для рестриктазы *Sau3A*. Стерильной деионизованной водой довести объем раствора до **165 мкл**.

3. Поместить 10 микроцентрифужных пробирок в лед (4°C). В одну из них налить **30 мкл** смеси, в остальные — по **15 мкл**.

4. Развести препарат рестриктазы *Sau3A* до концентрации **0,5 ед./мкл** в 1× буферном растворе.

5. В пробу с **30 мкл** раствора ДНК (проба №1) добавить **4 мкл** рестриктазы *Sau3A* (2 ед.). Осторожно, но тщательно перемешать пипетированием, отобрать $\frac{1}{2}$ объема и перенести в пробирку № 2. Повторить процедуру двукратного разведения фермента еще 7 раз (*пробирки держать во льду, для каждого шага разведения применять новый наконечник для микропипетки*). Пробирка №10 будет служить контролем на отсутствие рестриктазной активности.

6. Перенести пробирки в термостат на 37°C и инкубировать в течение 60 мин (с перемешиванием каждые 10 мин).

7. Остановить реакцию добавлением 0,5 М раствора ЭДТА (рН 7,5) до конечной концентрации **10 мМ**.

8. Проанализировать результаты аналитического расщепления хромосомы, проведя электрофорез в агарозном геле (см. п. 3.1). Рассчитать концентрацию фермента, при которой максимальное количество фрагментов ДНК имеет длину 10–20 тпо.

Б. Неполное расщепления хромосомы рестриктазой *Sau3A*, фракционирование ДНК

1. В три стерильные микроцентрифужные пробирки внести по **100 мкг** хромосомной ДНК.

2. Обработать хромосому рестриктазой *Sau3A* при следующих условиях: пробирка № 1 — оптимальная концентрация фермента (см. раздел А); в пробирки № 2 и № 3 внесена $\frac{1}{3}$ - и 3-кратная оптимальная концентрация рестриктазы соответственно.

3. Отобрать из каждой пробирки аликвоты и проанализировать, осуществив электрофорез в агарозном геле. Выбрать наиболее удачный вариант (см. п. А8).

4. В пробирке ротора Beckman SW40 с помощью мешалки и перистальтического насоса приготовить градиент раствора NaCl (25–5%, вес/объем), содержащего 3 мМ ЭДТА (рН 8,0).

5. Осторожно наслоить ДНК в объеме, не превышающем **200 мкл** (количество ДНК не должно быть больше 150 мкг). Уравновешивать пробирки 1× рестрикционным буфером.

6. Центрифугировать пробу при 37 000 об/мин в течение 5–6 ч при комнатной температуре. При этом набор скорости необходимо

осуществлять при низком ускорении, а останавливать центрифугу следует в режиме без торможения.

7. Осторожно отобрать фракции по **250 мкл** и поместить их в микроцентрифужные пробирки с **1,25 мл** 96%-ного этанола.

8. Поместить пробы в морозильник (-20°C) и инкубировать в течение 1 ч.

9. Пробы центрифугировать на максимальной скорости в течение 15 мин при комнатной температуре.

10. Слить надосадочную жидкость, промыть осадок охлажденным 70%-ным этанолом, подсушить и растворить в **20 мкл** стерильной воды.

11. Внести по **2 мкл** из каждой пробы в агарозный гель (0,3%-ная агароза) и проанализировать образцы с помощью электрофореза. Выбрать пробирки, содержащие нужный диапазон размеров фрагментов хромосомной ДНК. Объединить содержимое таких пробирок, определить концентрацию ДНК, хранить при -70°C .

В. Подготовка вектора к клонированию

1. Обработать векторную ДНК рестриктазой *Bam*HI, как это предложено в подглаве 7.1.

2. Отделить концевые фрагменты от центральной вставки вектора EMBL3, выделив соответствующие им полосы из агарозного геля (см. подглаву 3.2).

3. Осадить ДНК концевых фрагментов этанолом и определить концентрацию раствора ДНК, измерив его оптическую плотность при 260 нм с помощью спектрофотометра.

Г. Создание библиотеки клонов, подбор условий для оптимальной реакции лигирования

1. Для пробной реакции лигирования удобно использовать следующие молярные соотношения концевых фрагментов к вставке — 4 : 1; 2 : 1 и 0,5 : 1. Для осуществления реакции смешать в трех микроцентрифужных пробирках ДНК вектора и препарата хромосомы, полученных на предыдущих этапах, в указанных соотношениях. Четвертая пробирка должна содержать только ДНК вектора для оценки фонового образования частиц фага из-за загрязнения препарата ДНК или интактной ДНК фага. Каждая проба должна содержать **1–2 мкг** ДНК в конечном объеме **10 мкл**.

2. Отобрать по аликвоте (**1–2 мкл**) из каждой пробирки для последующего анализа на эффективность лигирования. Внести аликвоты в пробирки с **10 мкл** буфера TE (pH 7,9) и заморозить.

3. Для проведения реакции лигирования поместить пробирки (см. п. 1) в лед. Добавить к их содержимому по **5 ед.** ДНК-лигазы фага T4 и по **1 мкл** 10× буферного раствора для данного фермента

(например, производства компании «Fermentas», Литва). Довести объем реакционной смеси до **10 мкл**.

4. Инкубировать смесь при 12°C в течение 12–16 ч.

5. Отобрать по аликвоте (**1–2 мкл**) из каждой пробирки. Внести их в пробирки с **10 мкл** буфера TE (pH 7,9). Прогреть эти аликвоты вместе с аликвотами, отобранными на стадии 2, при 68°C в течение 5 мин для денатурации любых «липких» концов ДНК фага лямбда.

6. Проанализировать все аликвоты после электрофореза в 0,3%-ном агарозном геле. Если реакция лигирования прошла успешно, то почти вся ДНК в пробе должна иметь размер не меньший, чем интактная ДНК фага. Определить пробу, которая в наибольшей степени отвечает данному условию.

Д. Создание библиотеки клонов, упаковка и трансфекция *E. coli* лигированной смесью

1. Засеять одиночную колонию штамма *E. coli* LE392 в микробиологическую пробирку с **5 мл** жидкой среды LB, содержащей 0,2% мальтозы и 10 mM MgSO₄. Поместить пробирку на качалку (240 об/мин) и инкубировать при 37°C в течение ночи.

2. Развести ночную культуру в **100 раз** жидкой средой LB, содержащей 0,2% мальтозы и 10 mM MgSO₄. Поместить пробирку на качалку и инкубировать при 37°C и 240 об/мин до достижения культурой середины логарифмической фазы роста (*не допускать перехода культуры в стационарную фазу!*). После этого клетки могут храниться при 4°C в течение суток.

3. Осуществить реакцию лигирования в соответствии с оптимальными условиями, определенными на предыдущем этапе. В результате получить две пробирки: одну, содержащую лигированную смесь, и вторую — контрольную (самолигирование вектора).

4. Разморозить три пробирки из набора **Packagene Extract** («Promega», США) во льду. Осторожно отцентрифугировать их при низких оборотах на настольной центрифуге с охлаждением в течение нескольких секунд, чтобы собрать содержимое на дне пробирок.

5. Содержимое одной из них внести в пробирку с лигированной смесью, другой — в контрольную пробирку, третий экстракт добавить в пробирку с 0,5 мкг Packagene Control DNA. Все операции проводить во льду, для работы с фагами желательно применять наконечники для автоматических пипеток с внутренними фильтрами.

6. Инкубировать пробы при 22°C в течение 3 ч.

7. К содержимому каждой пробирки добавить **445 мкл** фагового буфера и **25 мкл** хлороформа. Осторожно перемешать пробирку в руках, переворачивая вверх-вниз. Инкубировать при 25°C в течение

1 ч, изредка перемешивая. Смесь хранится в течение 7 дней при 4°C без существенного падения титра фага.

8. Сделать несколько разведений полученных в предыдущем пункте препаратов фага (от 10^{-2} до 10^{-7}). Обычно наиболее подходящее разведение находится в интервале от 1 : 1000 до 1 : 10 000. Некоторые протоколы рекомендуют делать разведения препаратов фагов в буферном растворе SM состава: 1 М NaCl; 81 мМ $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,5 М трис (pH 7,5); 0,1% желатина.

9. Подготовить три чашки Петри с агаризованной средой LB. Подсушить их в ламинаре для удаления конденсата.

10. В трех стерильных микроцентрифужных пробирках смешать **100 мкл** из каждого разведения фага и **100 мкл** культуры штамма LE392 (см. п. 2). Осторожно перемешать и инкубировать при 37°C в течение 30 мин для адсорбции фага.

11. В охлажденную до 40–45°C стеклянную пробирку с расплавленным «верхним» агаром (~3,5 мл для чашки с $\varnothing = 85$ мм) добавить содержимое одной из проб смеси фаг + клетки. Быстро перемешать и вылить на чашку Петри с агаризованной средой LB. Повторить процедуру высева для оставшихся проб. «Верхний» агар (0,66%) имеет состав (на 500 мл): триптон — 5 г; NaCl — 4 г; агароза — 3,3 г.

12. Дождаться застывания верхнего слоя агара, поместить чашки в термостат и инкубировать при 37°C в течение ночи.

13. Утром посчитать количество фаговых бляшек (pfu — *plaque forming unit*) и рассчитать титр фага в каждой из проб (pfu/мкл препарата фага). На основании этих данных оценить представительность фаговой библиотеки (суммарный размер клонированной ДНК в составе фаговых частиц).

Дополнения к методике

К п. А3. В этом разделе определяется количество рестриктазы *Sau3A*, которое за 1 ч при 37°C дает максимальное количество фрагментов в диапазоне 10–20 тпо. Смеси готовят во льду для обеспечения согласованного начала реакции расщепления во всех пробирках при их одновременном переносе на 37°C.

К п. А5. При приготовлении двухкратных разведений фермента необходимо осторожно и вместе с тем тщательно перемешивать содержимое пробирок. Геномная ДНК — вязкая субстанция и хорошо перемешать фермент сложно. В то же время, если смешивать слишком интенсивно, можно раздробить молекулы ДНК.

К п. А7. При остановке реакции рестрикции не следует использовать буферный раствор для электрофореза, содержащий ксилен-

цианол. В противном случае его полоса, находясь в пределах 14–20 тпо, будет мешать анализу после проведения электрофореза в агарозном геле.

К п. Б1. Известно, что сайты рестрикции для *Sau3A* располагаются в среднем через каждые 250 пар оснований. Однако надо иметь в виду, что в молекуле ДНК существуют области, где *Sau3A*-сайтов может быть гораздо меньше или больше. Для клонирования таких областей применяют рестрикцию с пониженной или соответственно с повышенной концентрацией рестриктазы.

К п. Д1. Магний вносится в среду для стабилизации оболочки фага λ . Мальтоза необходима для экспрессии мальтозного оперона в клетках *E. coli* (фаг λ проникает в клетку, связываясь с мальтозным рецептором).

К п. Д13. Вероятность обнаружения определенной последовательности ДНК, представленной в геномной библиотеке, может быть рассчитана по формуле $N = \ln(1-p) / \ln(1-f)$, где N — количество рекомбинантов (фаговых бляшек), которое нужно проанализировать, чтобы обнаружить нужную последовательность с вероятностью p . Величина f соответствует доле геномной ДНК в одном рекомбинантном фаге (т.е. соотношению между размером клонируемого фрагмента (C) и размером генома (G); $f = C / G$). Таким образом, чтобы с вероятностью, близкой к 1 ($p = 0,99$), клонировать уникальный фрагмент ДНК длиной 10 тпо из генома *E. coli* ($\sim 5 \times 10^6$ по), «репрезентативная» геномная библиотека должна содержать $N = \ln(1-0,99) / \ln(1-10^4 / 5 \times 10^6) = 2,3 \times 10^3$ рекомбинантных фагов.

МИНИ-MU КЛОНИРОВАНИЕ

Способность многих бактериальных вирусов упаковывать вместе с фаговой ДНК небольшой участок бактериальной хромосомы давно используется как для молекулярного клонирования (фазмиды, космиды и т.п.), так и для переноса генетической информации от штамма к штамму (трансдукция). Исследования бактериофага *Mu* показали отсутствие предпочтительных мест при интеграции фаговой ДНК в бактериальную хромосому. Эта его особенность оказалось исключительно полезна, в частности, для создания геномных библиотек на фазмидных векторах, содержащих компоненты фага *Mu*.

Бактериофаг типа *Mu* является умеренным бактериофагом, способным как к литическому, так и к лизогенному поведению. Установление и поддержание лизогенного состояния клетки определяется наличием активного белка, кодируемого фаговым геном *c*. Поиск фагов-мутантов, чувствительных к температуре, позволил обнару-

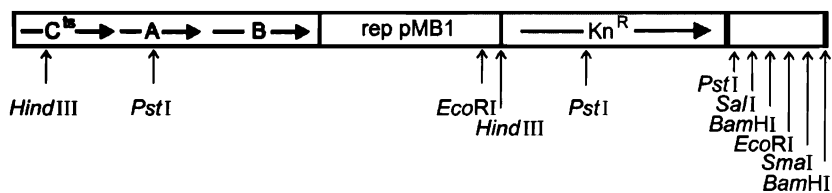


Рис. 7.14. Рестрикционно-генетическая карта мини-Му элемента Mud5005

жить мутанта *Muc-ts62*. Присутствие данной мутации в гене-репрессоре *c* позволяет индуцировать литическое развитие этого мутантного профага.

Размер генома бактериофага Му около 37,5 тпо. При литическом развитии в фаговые частицы упаковывается ДНК длиной приблизительно в 39 тпо начиная от *c*-конца фага. Таким образом, при упаковке фаговой ДНК около 1500 по бактериальной хромосомы могут включаться в фаговые частицы. Данный объем может быть увеличен путем создания мини-Му элементов, полученных за счет делеции несущественных для литического пути развития фага генов. Примером такого мини-Му элемента является фазмида Mud5005, сочетающая в себе свойства фага и плазмиды (рис. 7.14). В зависимости от температурных условий (30°C или 42°C), этот элемент может находиться в лизогенном состоянии (в присутствии фага-помощника с мутантным репрессором *c-ts62*), а также автономно в виде мультикопийной плазмиды. Данная особенность фазмиды позволяет осуществлять упаковку бактериальной ДНК размером до 31 тпо, а способность фага Му встраиваться в практически произвольную точку на бактериальной хромосоме гарантирует клонирование любого участка генома.

Схема эксперимента по клонированию *in vivo* в клетках *E. coli* выглядит следующим образом (рис. 7.15). Бактериальный штамм-донор инфицируется фаголизатом, содержащим смесь Mud5005 и фага-помощника *Muc-ts62*, и создаются условия для литического развития фага (инкубация при 37°C). После лизиса клеток донора клеточный лизат собирается и используется для инфекции штамма-реципиента. После инфицирования штамм культивируется в температурных условиях, не допускающих литического развития фага (инкубация при 30°C). Отбор рекомбинантов проводится по устойчивости бактерий к канамицину.

Необходимые реактивы и растворы:

- стерильная среда LB в жидком и агаризованном (1,2%) виде — см. приложение 1;

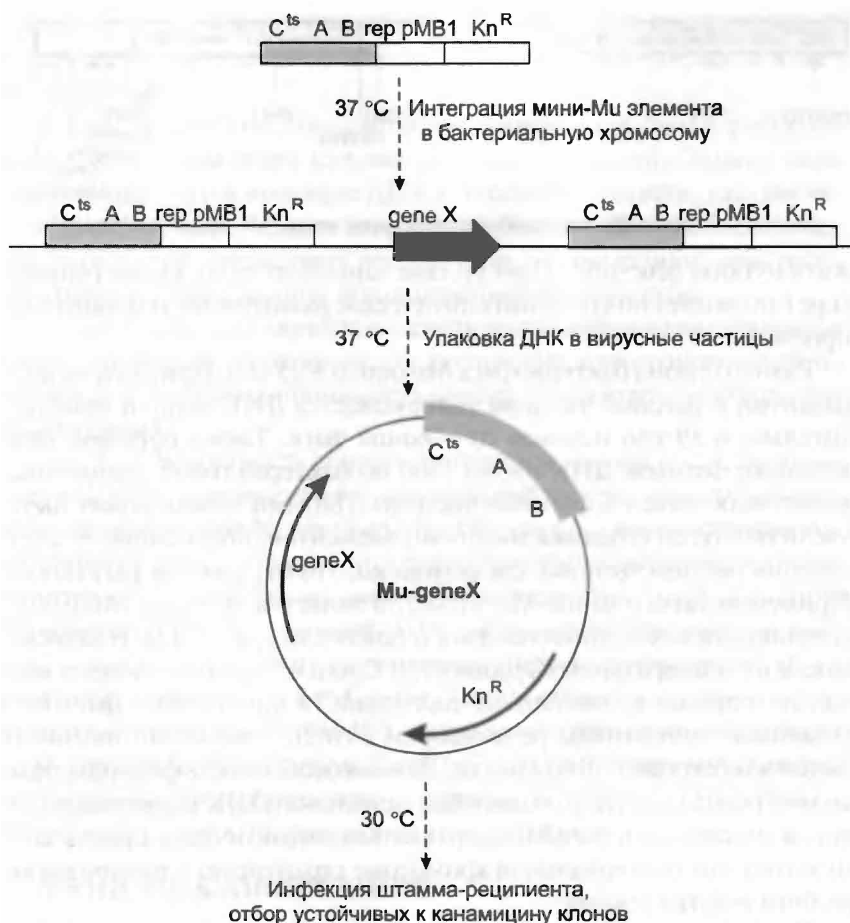


Рис. 7.15. Схема клонирования фрагмента хромосомы *E. coli* с помощью мини-Му элемента Mud5005

- раствор канамицина (конечная концентрация в среде — 30 мкг/мл);
- стерильный раствор $MgSO_4$ (конечная концентрация в среде — 2 мМ);
- стерильный раствор $CaCl_2$ (конечная концентрация в среде — 0,2 мМ);
- стерильный 0,9%-ный раствор NaCl;
- хлороформ.

А. Получение Му-лизата на штамме *E. coli* MC1040-2

1. Засеять одиночную колонию штамма MC1040-2 в микробиологическую пробирку с 5 мл жидкой среды LB. Поместить пробирку на качалку и выращивать при $30^\circ C$ и 240 об/мин в течение ночи.

2. Отобрать **150 мкл** выросшей культуры и поместить в колбу Эрленмейера на 125 мл, содержащую **15 мл** жидкой среды LB. Выращивать культуру при тех же условиях до оптической плотности, соответствующей середине логарифмической фазы роста (обычно это занимает 2–3 ч).

3. Осуществить термоиндукцию литического развития фага. Для этого в предварительно нагретую до 42°C водяную баню поместить колбу с культурой.

4. Инкубировать колбу в бане в течение 10–15 мин, после чего перенести колбу обратно на качалку (37°C, 240 об/мин), где она должна находиться до заметного просветления культуры из-за лизиса клеток или в течение 2,5 ч.

5. К содержимому колбы добавить хлороформ (до концентрации **1%**), а также растворы MgSO_4 и CaCl_2 до конечной концентрации **2** и **0,2 мМ** соответственно. Хорошо перемешать и перелить в стерильные стаканы для центрифугирования.

6. Центрифугировать суспензию при 12 000 g в течение 10 мин при 4°C.

7. Перенести надосадочную жидкость в стерильную полипропиленовую пробирку. Хранить фаголизат можно при 4–8°C в течение одной недели (см. дополнения к методике).

Б. Получение Ми-лизата на донорном штамме

1. Засеять одиночную колонию штамма-донора в микробиологическую пробирку с **5 мл** жидкой среды LB. Поместить пробирку на качалку (240 об/мин) и инкубировать при 37°C в течение ночи.

2. Перенести **200 мкл** клеточной суспензии ночной культуры в микробиологическую пробирку с **2 мл** жидкой среды LB, добавить растворы MgSO_4 и CaCl_2 до конечной концентрации **2** и **0,2 мМ** соответственно. Поместить пробирку на качалку (37°C, 240 об/мин). Подрашивать культуру до тех пор, пока она не достигнет оптической плотности, соответствующей середине логарифмической фазы роста.

3. В 5 стерильных микробиологических пробирок налить по **1 мл** жидкой среды LB, добавить растворы MgSO_4 и CaCl_2 до конечной концентрации **2** и **0,2 мМ** соответственно. Внести в пробирки по **100 мкл** подросшей культуры штамма-донора.

4. Исходный раствор Ми-лизата развести в микроцентрифужных пробирках 0,9%-ным раствором NaCl в 10^2 , 10^3 , 10^4 и 10^5 раз.

5. Отобрать по **100 мкл** из каждого разведения фага и внести в 4 пробирки с культурой. В пятую пробирку фаг не добавлять, она будет служить контролем на чистоту используемой культуры от фага.

6. Поместить пробирки в водяной термостат на 37°C и инкубировать в течение 30 мин для адсорбции фага на клетках бактерий.

7. Приготовить 5 чашек Петри с агаризованной средой LB в качестве нижнего слоя и микробиологическую пробирку с 15 мл расплавленного «верхнего» агара. «Верхний» агар готовится следующим образом: в предварительно прогретой до 45–50°C стерильной микробиологической пробирке смешать 10 мл жидкой среды LB и 5 мл агаризованной (1,2%) среды LB, добавить растворы $MgSO_4$ и $CaCl_2$ до конечной концентрации 2 и 0,2 мМ соответственно.

8. Чашки с нижним слоем можно слегка подсушить для удаления конденсата, а пробирки с «верхним» агаром поместить в водяной термостат (42–45°C).

9. В пробирки с инфицированной культурой добавить по 2 мл «верхнего» агара, перемешать и сразу же вылить на чашки Петри с агаризованной средой LB.

10. Инкубировать чашки в термостате при 37°C в течение 8–12 ч в неперевернутом положении.

11. Осмотреть чашки. Выбрать из них ту, на которой фаговые бляшки почти полностью покрыли газон бактерий (так называемую фаговую сетку).

12. Осторожно собрать верхний слой с помощью стерильного шпателя в несколько микроцентрифужных пробирок (обычно в две). Объем суспензии в каждой из них не должен превышать 500 мкл. Добавить в пробирки по 400 мкл 0,9%-ного раствора NaCl и 100 мкл хлороформа, интенсивно перемешать в течение 30–60 с и инкубировать в течение 10 мин при комнатной температуре.

13. Центрифугировать пробирки при 12 000 g в течение 10 мин.

14. Осторожно отобрать по 500 мкл верхней фазы и перенести в новые пробирки для микроцентрифуги. Добавить в них по 50 мкл хлороформа, перемешать и повторить центрифугирование.

15. Отобрать по 400 мкл верхней фазы и объединить пробы в одной микроцентрифужной пробирке. Полученный Ми-лизат штамма-донора следует использовать в течение недели (см. дополнения к методике).

В. Инфекция реципиентного штамма Ми-лизатом донорного штамма и отбор клонов, содержащих рекомбинантные плазмиды

1. Засеять одиночную колонию штамма-реципиента в микробиологическую пробирку с 5 мл жидкой среды LB. Поместить пробирку на качалку (240 об/мин) и инкубировать при 37°C в течение ночи.

2. В две стерильные 1,5-мл микроцентрифужные пробирки внести по 100 мкл ночной культуры реципиентного штамма, после

чего в одну из них (проба А) добавить **100 мкл** Ми-лизата донорного штамма. Вторая пробирка (проба Б) служит контролем на чувствительность штамма к селективному агенту (канамицину).

3. Поместить обе пробирки в термостат на 30°C и инкубировать в течение 30 мин.

4. Осадить клетки центрифугированием при 5000 g в течение 2 мин при комнатной температуре.

5. Осторожно слить надосадочную жидкость. Промыть биомассу от неадсорбировавшегося фага **1 мл** физиологического раствора (0,9%-ный раствор NaCl), отцентрифугировать.

6. Ресуспендировать клетки в **100 мкл** физиологического раствора и перенести каждую клеточную суспензию (пробы А и Б) в микробиологические пробирки с **2 мл** жидкой среды LB.

7. Инкубировать пробирки на качалке (30°C , 240 об/мин) в течение 75–90 мин.

8. Перенести содержимое пробирок в стерильные 2-мл микроцентрифужные пробирки. Центрифугировать в течение 1 мин при 4°C .

9. Ресуспендировать клетки в **100–200 мкл** физиологического раствора. Высеять клеточную суспензию на чашки Петри с агаризованной средой LB, содержащей канамицин в концентрации 40 мкг/мл.

10. Поместить чашки в термостат и инкубировать при 30°C до появления отдельных колоний на чашках, содержащих пробу А. Контрольные чашки (проба Б) должны быть чистыми.

Дополнения к методике

К п. А1–А3. Штамм *E. coli* MC1040–2 содержит фаг Muc-ts62 в интегрированном в хромосому состоянии. Кроме того, клетки этого штамма содержат мини-Ми элемент (Mud5005) в виде плазмиды. Литическое развитие фага Ми осуществляется посредством термоиндукции. Для получения хорошего титра фага в конечном клеточном лизате изменение температуры культуры (температурный скачок) должно происходить как можно быстрее. В этом случае выход фага может составлять 10^9 – 10^{10} частиц на мл.

К п. А7 и Б15. Каждый раз при постановке опыта фаголизат должен быть свежим. При хранении препарата больше недели титр фага значительно падает и проведение эксперимента становится невозможным.

К п. В2. Предложенное в методике количественное соотношение клеток и фаголизата является варьируемой величиной. Для получения максимального выхода рекомбинантных молекул часто приходится подбирать такие оптимальные количества экспериментально.

7.3.

ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ *E. coli*

При решении ряда научных и биотехнологических задач часто требуется осуществить экспрессию гетерологичных генов в клетках бактерий. Поскольку системы регуляции экспрессии генов значительно отличаются у различных микроорганизмов, для осуществления этого процесса необходимо преодолеть множество проблем, начиная от воссоздания условий для выражения чужеродного гена в данном микроорганизме и заканчивая защитой синтезируемого белка от деградации протеазами клетки-хозяина.

Для проведения эффективной экспрессии гетерологичных генов в клетках бактерий необходимо поместить структурную часть гена под контроль прокариотической регуляторной области (так называемой экспрессионной кассеты). В ее составе должны присутствовать промотор, участок связывания рибосом и терминатор транскрипции. Как правило, все эти необходимые элементы, включая еще и участок ДНК, содержащий несколько уникальных рестрикционных сайтов, размещаются на плазмидных векторах, способных автономно реплицироваться в клетках бактерий. Правильный выбор экспрессионной кассеты и реципиентного штамма часто является определяющим фактором для удачного осуществления гетерологичной экспрессии.

При конструировании экспрессионных векторов часто используют сильные и хорошо регулируемые бактериальные или фаговые промоторы. Необходимость тщательного контроля над экспрессией гетерологичных генов объясняется потенциальной токсичностью их белковых продуктов. Для экспрессии генов в штаммах *E. coli* часто используется промотор лактозного оперона P_{lac} -UV5, а также созданные на его основе гибридные промоторы P_{tac} и P_{trc} . Это высокоэффективные промоторы, индукция которых может осуществляться добавлением в среду ИПТГ. Из фаговых промоторов наибольшей популярностью пользуются ранние промоторы бактериофага λ — P_L и P_R , выражение с которых можно контролировать при помощи мутантного репрессора CI857, а также кассеты, сконструированные на базе систем транскрипции фагов T3, T7 и SP6.

Для обеспечения эффективной инициации трансляции мРНК гетерологичного гена необходимо присутствие перед его иницирующим кодоном специфической последовательности RBS (от англ. *ribosome binding site*), комплементарной определенным участ-

кам прокариотической 16S рРНК. Как правило, для этой цели используются фаговые (например, RBS гена *g10-L* из фага T7) или бактериальные (например, RBS гена *lacZ*) участки связывания рибосом.

Включение в состав экспрессионной кассеты терминатора транскрипции, расположенного в 3'-нетранслируемой области гетерологичного гена, призвано не допустить негативных эффектов, связанных, например, с нетерминированной транскрипцией, что может приводить к значительным снижениям копийности рекомбинантных плазмид и даже к их полной потере. Заметим также, что присутствие стабильной Г/Ц-богатой шпильки на 5'-конце мРНК способствует увеличению стабильности данной структуры.

Надо отметить, что использование подходящей экспрессионной кассеты не гарантирует синтеза достаточных количеств биологически активного гетерологичного полипептида в клетках бактерий. При проведении этого процесса важную роль играет сам бактериальный штамм, в клетках которого осуществляется биосинтез, а также аминокислотный состав синтезируемого полипептида. Присутствие большого числа редко встречающихся в данном микроорганизме аминокислотных кодонов может приводить к нарушению динамики синтеза гетерологичного полипептида и, по меньшей мере, к неправильному сворачиванию белковой молекулы. В результате на выходе можно получить биохимически неактивный белок. Решением этой проблемы является использование бактериальных штаммов, содержащих гены соответствующей изоакцепторной тРНК, или *in vitro* замена таких кодонов в экспрессируемом гене на подходящие синонимические кодоны.

Для повышения выхода биологически активного гетерологичного полипептида необходимо предотвратить (или значительно снизить) его деградацию бактериальными протеолитическими системами. Общим подходом для решения этой задачи является использование в качестве реципиентов штаммов, дефектных по системе деградации белков (так называемых *deg-* или *lon-*мутантов). Существуют и иные способы защиты гетерологичного белка от протеолиза, основанные, например, на создании необходимых условий для его агрегации в клетке в виде «телец включения». Однако в этом случае возникают дополнительные сложности на этапе очистки синтезированного белка, связанные с необходимостью его перевода из денатурированного в биологически активное состояние.

Таким образом, проведение гетерологичной экспрессии в клетках бактерий является непростой задачей. Для осуществления этого

процесса приходится преодолевать много сложностей, связанных с различными сторонами молекулярной биологии. Для решения этих задач разработаны высокоэффективные методы, позволяющие получить высокий уровень продукции гетерологичных полипептидов, который может достигать десятков процентов от суммарных клеточных белков. Вместе с этим стоит заметить, что даже при удачном осуществлении гетерологичной экспрессии остается открытым вопрос об идентичности структурно-функциональных характеристик полученного рекомбинантного белка с его природным аналогом. В исходном организме данный белок может подвергаться сложным посттрансляционным модификациям, которые отсутствуют в условиях гетерологичной экспрессии. Кроме того, всегда есть шанс получить биологически неактивный рекомбинантный аналог из-за неправильного сворачивания белка или его агрегации в клетке.

В данной методике предлагается использовать коммерчески доступный вектор pET-22b(+) («Merck», Германия) для осуществления гетерологичной экспрессии в клетках *E. coli* штамм BL21(DE3). Рестрикционно-генетическая карта плазмиды pET-22b(+) представлена на рисунке 7.16. Для обеспечения эффективного синтеза гетерологичных белков в клетках *E. coli* вектор pET-22b(+) содержит экспрессионную кассету, состоящую из промотора фага T7, консенсусной последовательности участка связывания рибосом и терминатора транскрипции из фага T7. Помимо этих основных элементов в ее состав входят: операторный участок лактозного репрессора *E. coli*, His-tag последовательность для последующей очистки белка на Ni²⁺-колонках, а также PelB-лидерный пептид, необходимый для осуществления транслокации синтезируемого полипептида в периплазматическое пространство клетки. Для удобства клонирования плазида несет полилинкер с сайтами узнавания для десяти уникальных рестрицирующих эндонуклеаз.

Штамм *E. coli* BL21(DE3) содержит хромосомную копию РНК-полимеразы фага T7 под контролем P_{lac}-UV5 промотора. Благодаря этому можно индуцировать выражение фаговой РНК-полимеразы с лактозного промотора с помощью ИПТГ. Затем синтезированная полимеразы с высокой эффективностью и специфичностью осуществляет транскрипцию гетерологичного гена. Дополнительным достоинством штамма BL21(DE3) является наличие мутаций в генах, кодирующих протеазы OmpT и Lon, что существенно понижает клеточный протеолиз. Данное обстоятельство позволяет значительно увеличить выход синтезируемого полипептида.

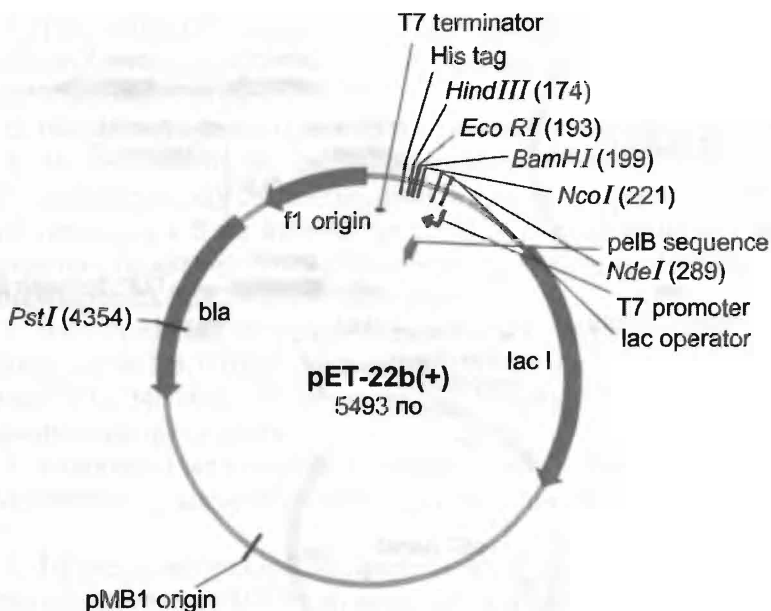


Рис. 7.16. Рестрикционно-генетическая карта плазмидного вектора pET-22b(+)

Общая схема эксперимента по проведению гетерологичной экспрессии в клетках *E. coli* выглядит следующим образом. Структурная часть исследуемого гена амплифицируется с помощью ПЦР, после чего осуществляется клонирование синтезируемого фрагмента ДНК на векторе pET-22b(+) (рис. 7.17). Полученной гибридной плазмидой трансформируется штамм *E. coli* BL21(DE3). Отбор трансформантов проводится по приобретению устойчивости к антибиотику ампициллину. Экспрессия гетерологичного гена в данном штамме осуществляется РНК-полимеразой фага Т7, индукцию которой проводят с помощью ИПТГ. Уровень продукции синтезируемого полипептида оценивается посредством электрофореза в ДСН-полиакриламидном геле.

Необходимые реактивы и растворы:

- буферный раствор для электрофореза: 100 мМ трис-НСl (рН 6,8); 4% ДСН; 0,2% красителя бромфенолового синего; 20% глицерина; 200 мМ дитиотреитола или β -меркаптоэтанола;
- раствор Кумасси — растворить Кумасси Brilliant Blue R-250 в растворе, содержащем 90 мл смеси метанол : H_2O (1 : 1, объем/объем) и 10 мл ледяной уксусной кислоты, до конечной концентрации 0,25%;

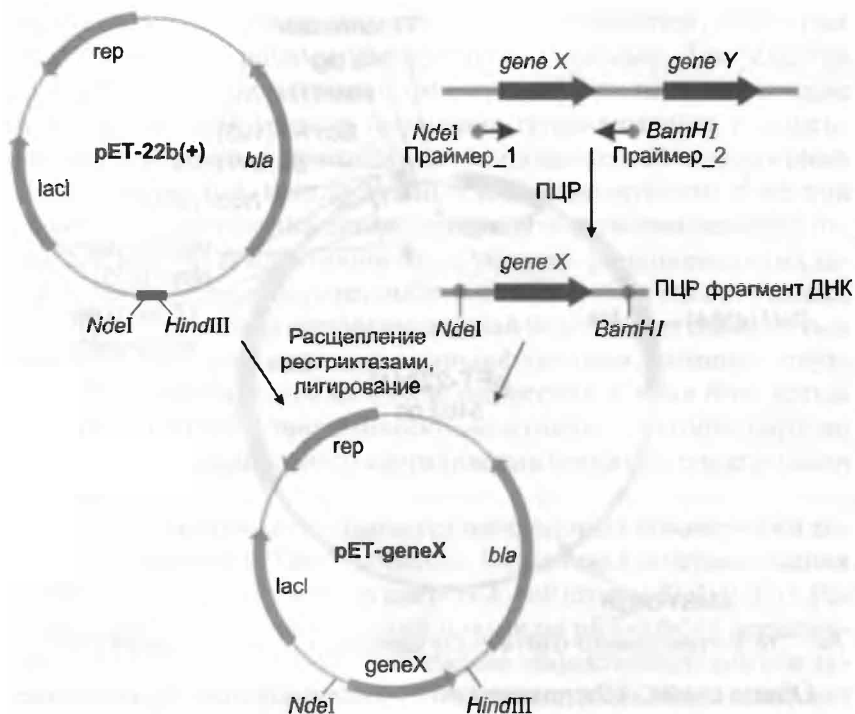


Рис. 7.17. Схема клонирования чужеродной ДНК в составе плазмидного вектора pET-22b(+)

- раствор лизоцима (10 мг/мл);
- Ni^{2+} сорбент (Ni^{2+} -NTA агароза);
- буферный раствор «А»: 20 мМ Na_3PO_4 ; 500 мМ NaCl; pH 7,8;
- буферный раствор «В»: 20 мМ Na_3PO_4 ; 500 мМ NaCl; pH 6,0;
- буферный раствор «С»: 20 мМ Na_3PO_4 ; 500 мМ NaCl; имидазол в соответствующей концентрации (pH 6,0). Раствор имидазола обладает значительной буферной емкостью, поэтому его pH необходимо доводить заранее.

Методика

А. Клонирование исследуемого гена в составе плазмиды pET-22b(+)

1. Осуществить клонирование фрагмента ДНК с исследуемым геном в составе вектора pET-22b(+). При выполнении работы руководствоваться правилами и рекомендациями, представленными в п. 7.1. Примерная схема клонирования показана на рисунке 7.17.

2. Выделить ДНК полученной гибридной плазмиды (pET-geneX) согласно одной из методик, описанных в подглаве 1.2.

3. Трансформировать штамм *E. coli* BL21(DE3) плазмидной ДНК с клонированным геном. Отбор трансформантов вести по устойчивости к ампициллину.

Б. Подбор оптимальных условий для синтеза гетерологичного белка

1. Засеять одиночную колонию штамма *E. coli* BL21(DE3), содержащего плазмиду с клонированным геном, в микробиологическую пробирку с 5 мл жидкой среды LB с ампициллином в концентрации 100 мкг/мл. Поместить пробирку на качалку (240 об/мин) и инкубировать при 37°C в течение ночи.

2. Внести 500 мкл ночной культуры в колбу Эрленмейера с 50 мл жидкой среды LB, содержащей ампициллин, и инкубировать на качалке (37°C, 240 об/мин) до достижения культурой середины логарифмической фазы роста.

3. Отобрать 1 мл культуры (нулевая точка) в микроцентрифужную пробирку, с которой осуществить операции, описанные в п. 7–10.

4. Провести индукцию экспрессии исследуемого гена, добавив к основной культуре ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ.

5. Инкубировать культуру на качалке (37°C, 240 об/мин) в течение 3 ч.

6. Отобрать аликвоты культуры в микроцентрифужные пробирки (по 1 мл) после 0,5; 1; 2 и 3 ч инкубации. Определить оптическую плотность культуры на момент отбора каждой пробы при длине волны 540 нм.

7. Осадить клетки из каждой пробы центрифугированием при 5000 g в течение 2 мин при комнатной температуре.

8. Удалить надосадочную жидкость и ресуспендировать клетки в 100 мкл буферного раствора для электрофореза белков.

9. Прогреть пробирки при 100°C в течение 3 мин и центрифугировать на максимальной скорости в течение 15 мин при комнатной температуре.

10. Осторожно перелить надосадочную жидкость в отдельные микроцентрифужные пробирки, поместить их в лед и хранить до тех пор, пока не будут собраны все образцы для дальнейшего анализа.

В. Анализ образцов с помощью электрофореза в ДСН-полиакриламидном геле

1. Нагреть образцы, отобранные на предыдущем этапе, до комнатной температуры и нанести в лунки 10%-ного ДСН-полиакриламидного геля (SDS-PAAG) такое их количество, которое эквивалентно 0,15 относительных единиц оптической плотности исходной культуры при 540 нм.

2. Провести электрофоретическое разделение белков при напряженности электрического поля 8–15 В/см до тех пор, пока краситель бромфеноловый синий не достигнет нижней границы геля.

3. Окрасить гель (например, с помощью Кумасси голубого или серебра) и оценить количество синтезированного белка в каждой пробе. На основании этих данных определить оптимальные условия для проведения гетерологичной экспрессии.

Г. Проведение гетерологичной экспрессии

1. Вырастить 5–10 мл ночной культуры штамма *E. coli* BL21(DE3), содержащего плазмиду с исследуемым геном, в жидкой среде LB с ампициллином.

2. Внести 5 мл данной культуры в 2-литровую стерильную колбу с 500 мл жидкой среды LB с ампициллином.

3. Поместить колбу на качалку и инкубировать (37°C, 220–240 об/мин) до достижения культурой середины логарифмической фазы роста.

4. Осуществить индукцию экспрессии гетерологичного гена в условиях, определенных в разделе Б.

5. Перелить клеточную суспензию в стерильные стаканы для центрифугирования и осадить клетки на центрифуге (5000 g в течение 5 мин при 4°C).

6. Слить надосадочную жидкость и перейти к процедуре очистки синтезированного полипептида.

Д. Очистка His-tag содержащих белков с помощью Ni^{2+} хроматографии

Предложенная система экспрессии позволяет добиваться высокого уровня продукции гетерологичных полипептидов, который может достигать десятков процентов от общего количества клеточных белков. Однако в большинстве случаев (для точных измерений основных кинетических параметров фермента, определения его аминокислотной последовательности и т.д.) важно получить хроматографически чистый препарат белка. Очистка рекомбинантного полипептида от остальных клеточных белков осуществляется посредством аффинной хроматографии на колонке с сорбентом, содержащим иммобилизованные на твердом носителе двухвалентные катионы (Ni^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} или Zn^{2+}). Такие сорбенты способны при определенных условиях избирательно связывать белки, содержащие гистидиновые (а также цистеиновые, аспарагиновые и глутаминовые) аминокислотные остатки.

Среди таких сорбентов наибольшей популярностью пользуется коммерчески доступная Ni^{2+} -NTA агароза (*nickel-nitrilotriacetic acid*

matrix). Ионы Ni^{2+} удерживаются на поверхности за счет образования четырех координационных связей с нитрилотриуксусной кислотой. Оставшиеся незаполненными две координационные связи позволяют осуществлять аффинную очистку белков. Устойчивость координационной связи ионов Ni^{2+} делает возможным проводить выделение рекомбинантных белков при различных условиях, в том числе и в присутствии денатурирующих агентов и детергентов. Дополнительной привлекательной особенностью данного сорбента является возможность его регенерации для повторного использования.

В предлагаемой постановке эксперимента клонирование гетерологичного гена с использованием вектора pET-22b(+) осуществляется таким образом, что в состав кодируемого им белка искусственно вводится последовательность из шести гистидиновых остатков, так называемый His-tag (рис. 7.16). Как правило, присутствие такого участка на N- или C-конце полипептида существенно не сказывается на его ферментативных свойствах. Благодаря тому, что имидазольное кольцо гистидина содержит электроно-донорные группы, образующие координационные связи с иммобилизованными ионами металлов, белки с His-tag последовательно прочно удерживаются на аффинном сорбенте (например, на никель-нитрилотриуксусной агарозе). Элюция белков с носителя осуществляется за счет добавления в буферный раствор имидазола.

Используя данный подход, можно с высокой степенью чистоты отделить гетерологичный полипептид от остальной массы клеточных белков. После очистки происходит многократное обогащение рекомбинантного белка, при этом содержание данного полипептида в препарате может достигать 95–99%. Для достижения такой высокой степени очистки разработаны также коммерчески доступные специальные системы (например, BioLogic DuoFlow™ System производства компании «Bio-Rad», США), состоящие из готовых колонок, растворов и специальных приборов для очистки белков (рис. 7.18). Ниже приведена методика очистки His-tag полипептида, демонстрирующая общие этапы процедуры.

Д1. Подготовка Ni^{2+} -NTA колонок к опыту

1. Небольшую стеклянную или полипропиленовую пипетку равномерно заполнить 2 мл Ni^{2+} -NTA агарозы, аккуратно перемешивая для удаления пузырей. Дать агарозе осесть в течение часа.

2. Закрепить колонку на штативе и промыть ее 2–3 объемами стерильной деионизованной H_2O .

3. Уравновесить колонку, пропустив через нее 3–4 объема буферного раствора «А».

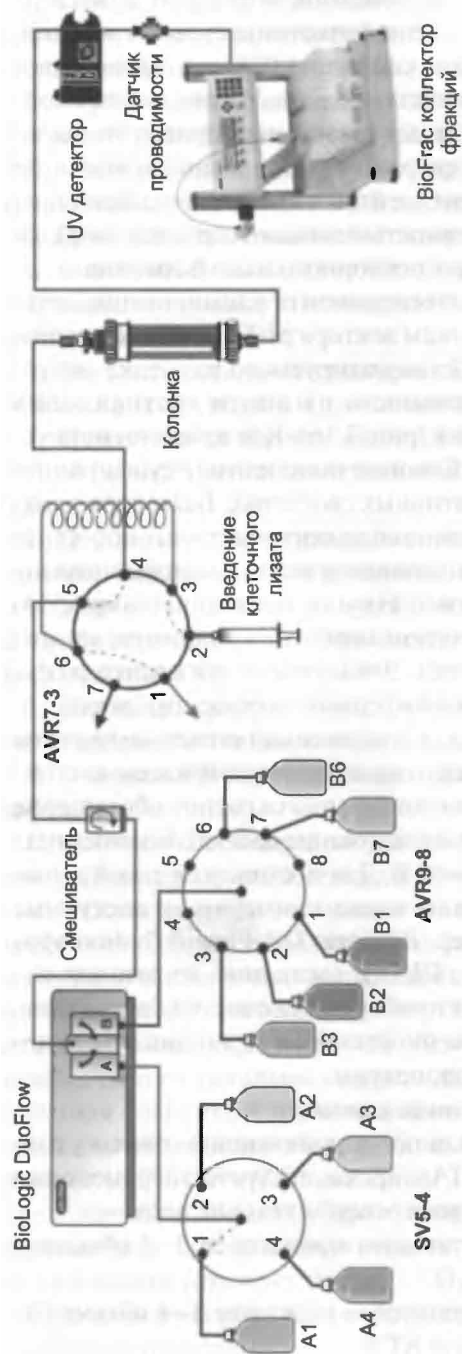


Рис. 7.18. Схематичное изображение рабочей станции BioLogic DuoFlow™ («Bio-Rad», США).
 Краткие обозначения: SV5-4 и AVR9-8 — порты сбора образцов,
 AVR7-3 — устройство для автоматического введения образцов
 (использовано изображение из каталога компании «Bio-Rad»)

Д2. Подготовка экстракта клеток к нанесению на колонку.

1. Ресуспендировать клеточную суспензию в буферном растворе «А» из расчета **100 мл** культуры на **4 мл** буфера.

2. Добавить лизоцим к полученной суспензии клеток до конечной концентрации **1 мг/мл** и инкубировать в течение 30 мин при 4°C.

3. Перенести суспензию на качающуюся платформу шейкера (необходимо постоянное аккуратное перемешивание) и инкубировать 10 мин при 4°C.

4. Внести в смесь Triton X-100 до конечной концентрации **1%**, а также ДНКазу и РНКазу до конечных концентраций **5 мкг/мл**.

5. Продолжать инкубировать суспензию с перемешиванием на платформе в течение 10 мин.

6. Отцентрифугировать суспензию при 3000 g в течение 30 мин при 4°C, после чего осторожно отобрать надосадочную жидкость (клеточный лизат) и поместить ее в стерильную полипропиленовую пробирку.

Д3. Очистка белка на колонке

1. Нанести на заранее уравновешенную колонку **1 мл** буферного раствора «А». Позволить раствору немного стечь, чтобы верхняя часть колонки слегка подсохла.

2. Нанести клеточный лизат сверху на колонку. Сразу после этого налить буферный раствор «А» и создать его проток через колонку со скоростью приблизительно 10 объемов колонки в час.

3. Пропустить через колонку **6–7 объемов** буферного раствора «А».

4. Промыть колонку **4–5 объемами** отмывочного буферного раствора «В». Следите за тем, чтобы ОП₂₈₀ прошедшего буферного раствора стала меньше 0,01.

5. Смыть связанный с колонкой белок при помощи элюирующего буферного раствора «С», который содержит 10 мМ имидазола. Для этого пропустить через колонку **6 мл** данного раствора, отбирая пробы по **1 мл** на выходе колонки.

6. Повторить предыдущий пункт, используя буферный раствор «С» с увеличенной концентрацией имидазола (например, 50 мМ, 75 мМ, 100 мМ, 250 мМ и т.д.).

7. Провести оценку индукции и степени очистки His-tag белка в каждой пробе с помощью электрофореза в ДСН-полиакриламидном геле. Для этих целей достаточно небольшой аликвоты (10–20 мкл) из каждой пробы. При окрашивании гелей с His-tag белками очень хорошие результаты дает часовая инкубация со специальным раствором **InVision His-tag In-gel Stain** («Invitrogen», США) с последующей 10-мин отмывкой геля 20 мМ фосфатным буферным раствором (pH 7,8).

Дополнения к методике

К п. А3. При клонировании исследуемого гена в составе вектора рЕТ–22b(+) можно использовать любые другие штаммы *E. coli*, имеющиеся в наличии, а не только BL21(DE3). Однако для снижения вероятности генетических перестроек мы рекомендуем применять *recA*⁻ штаммы *E. coli* (например, DH5α или XL1-Blue).

Для обнаружения среди выросших на селективной среде трансформантов тех, которые содержат плазмиду с клонированным геном, удобно использовать экспресс-метод, основанный на ПЦР (более подробно см. подглаву 7.1). Для этой цели, например, можно использовать олигонуклеотидные праймеры, с которых нарабатывался фрагмент ДНК для клонирования (если они не способны гибридизоваться с хромосомой *E. coli*), или поставляемый с рЕТ-22b(+) набор Т7-праймеров (#69337-3 и #69348-3, «Merck», Германия). По появлению специфического ПЦР продукта или изменению его размера можно судить об осуществлении клонирования.

К п. Б. Условия, влияющие на эффективность выражения гетерологического гена, зависят от многих факторов, таких как плотность культуры перед внесением индуктора, время роста культуры до и после индукции, а также температура и степень аэрации. Поэтому для обеспечения наибольшей эффективности экспрессии необходимо подобрать условия, отвечающие оптимуму.

К п. Д2. При очистке белка на Ni²⁺-NTA колонках необходимо помнить, что присутствие в клеточном лизате ЭДТА или другого хелатирующего агента может привести к удалению двухвалентных катионов из аффинной смолы и невозможности связывания белка с His-tag последовательностью. Также перед нанесением на колонку клеточный лизат можно профильтровать через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Эта процедура облегчит прохождение лизата через колонку.

К п. Д3. Количество гетерологического белка, получаемого после проведения экспрессии, сильно зависит как от структуры самого белка, так и от подбора условий проведения гетерологической экспрессии. Однако в большинстве случаев оно лежит в интервале 1–10 мг белка в 100 мл клеточной культуры. Поскольку известно, что 1 мл Ni²⁺-сорбента способен связать приблизительно 8–12 мг белка, мы рекомендуем наносить на одну колонку такое количество клеточного лизата, которое эквивалентно 100–150 мл клеточной культуры.

Повысить эффективность элюции связанного с колонкой белка можно с помощью градиентного раствора элюирующего буферного

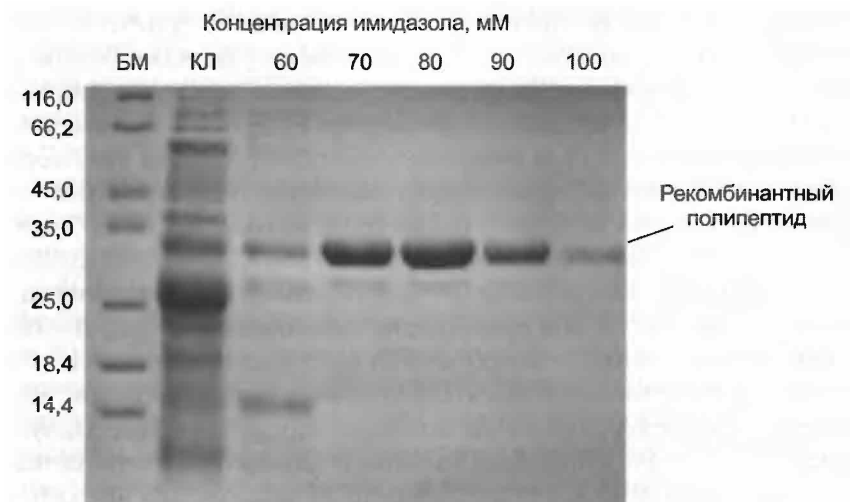


Рис. 7.19. Фракции рекомбинантного полипептида при элюции с Ni^{2+} -NTA колонки. В позиции БМ нанесен стандартный белковый маркер, позиция КЛ — клеточный лизат штамма до очистки на колонке, остальные позиции — фракции белкового препарата, элюированные с колонки буферным раствором с различной концентрацией имидазола

раствора «С» с имидазолом. Известно, что большинство полипептидов, содержащих His-tag, хорошо смываются с колонки в интервале концентраций 50–100 мМ имидазола (рис. 7.19).

Для взаимодействия аффинного носителя с полигистидиновым участком не требуется наличия специфической конформации полипептида, поэтому очистку белков можно проводить и в денатурирующих условиях. Данное обстоятельство позволяет осуществлять очистку белков, склонных к агрегации в тельца включения. Такие белки могут быть выделены в присутствии денатурирующих агентов — 6 М хлорида гуанидина или 8 М мочевины. Использование в качестве элюента содержащих имидазол буферных растворов позволяет получать биологически активные белки в конечном препарате.

7.4.

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ В ДЕНАТУРИРУЮЩЕМ ДСН-ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

При использовании метода электрофореза белков в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (электрофорез в ДСН-ПААГ) белковые молекулы находятся в буферном растворе,

содержащем мощный анионный детергент — додецилсульфат натрия (ДСН, SDS). Он связывается с гидрофобными участками белков и вызывает развертывание (диссоциацию) белковых молекул в длинные цепи. При этом отдельные белковые молекулы освобождаются из комплексов с белками или липидами и солюбилизируются в растворе детергента. Поскольку общий заряд связавшихся отрицательно заряженных молекул детергента превосходит суммарный заряд белка, то белковые молекулы двигаются при электрофорезе в направлении положительного электрода. Белки одного размера связывают одинаковое количество ДСН и приобретают одинаковый отрицательный заряд, белки с большой молекулярной массой замедляются в порах полиакриламидного геля значительно сильнее — таким образом, метод электрофореза в ДСН-ПААГ позволяет определить молекулярную массу полипептида и примерно изучить субъединичный состав белка.

При электрофорезе в присутствии ДСН заряд белков не оказывает существенной роли на подвижность макромолекул, а логарифм молекулярной массы белка обратно пропорционален расстоянию, пройденному им в ходе электрофореза. В качестве восстанавливающего агента, приводящего к разрушению в белках S-S связей и позволяющего проводить анализ мультисубъединичных белковых комплексов, часто добавляют β -меркаптоэтанол. Для повышения напряженности электрического поля, чтобы увеличить скорости миграции белков при приближении к конечным положениям, часто используют буферные растворы низкой концентрации (30–50 мМ).

При ступенчатом электрофорезе используют два полиакриламидных геля, наносимых между двумя стеклянными пластинами один поверх другого — мелкопористый разделяющий (6–15%-ный) и крупнопористый концентрирующий (5%-ный), различающиеся также по молярности и рН буферных растворов для полимеризации. Например, 10%-ный разделяющий гель оптимален для работы с белками, имеющими молекулярную массу от 20 до 70 кДа (диапазон разрешения — от 14 до 205 кДа).

Окрасив полиакриламидный гель после электрофореза красителем Кумасси голубым (Coomassie Brilliant Blue R-250), выявляют основные фракции полипептидов, расположенных в геле в соответствии с их молекулярной массой. Для фиксации белковых полос окрашивание надо проводить в кислой среде (для этого краситель растворяют в растворе этанол : уксусная кислота : вода). Минорные белки идентифицируют более чувствительной (но и более дорогой) окраской серебром ($\text{NaOH} + \text{NH}_4 + \text{AgNO}_3$) или 0,2 М имидазолом с 0,3 М ZnCl_2 . Отдельные белки проявляются в виде узких окра-

шенных полос; полосы увеличиваются в размере, если в лунке геля присутствует слишком много белка. С помощью полиакриламидных гелей можно идентифицировать специфические белки, если предварительно пометить их антителами, связанными с ферментами, флуоресцирующими красителями или радиоактивными изотопами. Аналитический метод иммунологической идентификации белков с использованием их переноса из полиакриламидного геля на нитроцеллюлозную мембрану называется *вестерн-блоттингом*.

ДСН-ПААГ электрофорез белков представляет собой очень эффективный метод фракционирования белковых молекул (размером от 20 до 200 кДа) в зависимости только от одного их параметра — молекулярной массы, а зависимость от конформационного состояния и плотности упаковки полипептидной цепи исключена. Данный подход может быть использован для выявления любых полипептидов, независимо от степени их растворимости в воде.

В качестве недостатка ступенчатого электрофореза в полиакриламидном геле можно указать на плохое разделение низкомолекулярных полипептидов в гелях с невысоким (до 10%) содержанием полиакриламида. В подобных случаях для увеличения разрешающей способности лучше использовать электрофорез в градиенте концентрации полиакриламидного геля (например, от 8 до 20%), когда средний размер пор геля уменьшается по мере возрастания концентрации акриламида.

Необходимые реактивы и растворы:

- разделяющий гель (конечная концентрация раствора акриламида 10%), на 5 мл:
деионизованная H_2O — 1,90 мл;
30%-ный раствор акриламида (акриламид : метилен-бис-акриламид, 29 : 1, вес/объем) — 1,70 мл;
1,5 М трис-HCl (pH 8,8) — 1,30 мл;
10%-ный раствор ДСН — 50 мкл;
10%-ный раствор персульфата аммония (добавлять перед полимеризацией) — 50 мкл;
TEMED — N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (добавлять перед полимеризацией) — 2 мкл;
- концентрирующий гель (конечная концентрация раствора акриламида 5%), на 2 мл:
деионизованная H_2O — 1,40 мл;
30%-ный раствор акриламида (акриламид : метилен-бис-акриламид, 29 : 1, вес/объем) — 330 мкл;

- 1,5 М трис-НСl (рН 6,8) — 250 мл;
10%-ный раствор ДСН — 20 мл;
10%-ный раствор персульфата аммония (добавлять перед полимеризацией) — 20 мл;
TEMED (добавлять перед полимеризацией) — 2 мл;
- 10× трис-глициновый буферный раствор для электрофореза — см. приложение 1;
 - 2× буферный раствор для нанесения проб белка (диссоциирующий буфер): 1,5 М трис-НСl (рН 6,8) — 1 мл; 20%-ный раствор ДСН — 600 мл; 0,2%-ный раствор бромфенолового синего — 100 мл; глицерин — 3 мл; β-меркаптоэтанол — 1,5 мл; довести объем деионизованной водой до 10 мл. Хранить при –20°С (рабочий раствор можно хранить при +4°С в течение месяца);
 - раствор для фиксации: 96%-ный этанол — 225 мл; уксусная кислота — 50 мл; деионизованная Н₂О — 225 мл; ТХУ до конечной концентрации 12,5%. Хранить при комнатной температуре в плотно закрытой посуде;
 - раствор для окрашивания: Coomassie Brilliant Blue R-250 («Sigma-Aldrich», США) — 2,5 г; 96%-ный этанол (или метанол) — 450 мл; ледяная уксусная кислота — 100 мл (добавлять медленно при перемешивании); деионизованная Н₂О — 400 мл. Довести объем до 1 л водой. После растворения красителя при перемешивании раствор необходимо отфильтровать и хранить в плотно закрытой посуде при комнатной температуре. Раствор можно использовать несколько раз. Иногда используют раствор состава 25% изопропанола, 10% уксусной кислоты и 0,25% Coomassie Brilliant Blue.

Методика

А. Подготовка геля

1. Собрать прибор для вертикального электрофореза (рис. 7.20), например Mini-PROTEAN II Electrophoretic Cell («Bio-Rad», США). Стекла, камера для приготовления геля, зажимы и гребенка должны быть тщательно отмыты детергентом (ДСН) и дистиллированной водой, сушить их необходимо при комнатной температуре. На расстоянии приблизительно 1 см от зубчиков гребенки нужно отметить с помощью фломастера уровень концентрирующего геля. Стекланные пластины, между которыми заливают растворы полиакриламидного геля, разделяются друг от друга с помощью специальных прокладок (спейсеров) толщиной 1 мм. Вставлять эти пластины в

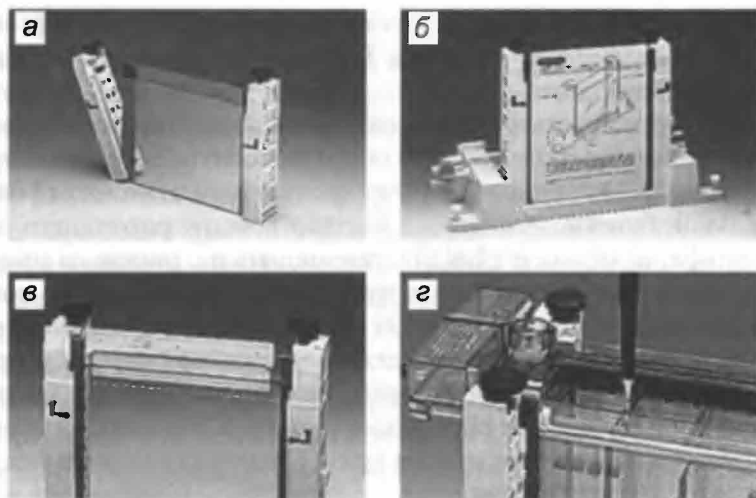


Рис. 7.20. Электрофоретическое разделение белков в ДСН-полиакриламидном геле в аппарате для вертикального электрофореза («Bio-Rad», США): а) сборка аппарата; б) заливка полиакриламидных гелей (разделяющего и концентрирующего); в) установка гребенки в полиакриламидный гель; г) нанесение проб в гель и электрофорез.

Использовано изображение из каталога компании «Bio-Rad»

аппарат надо аккуратно. Резиновую прокладку, обеспечивающую герметичность системы, смазывают небольшим количеством силиконовой смазки.

2. Залить нижнюю «пробку» геля. Для этого на дно чистой ровной ванночки налить немного расплавленного 1,5%-ного раствора агарозы (в буферном растворе ТВЕ), на который следует поместить собранный прибор со стеклами. Дождаться полимеризации агарозы, которая поднимется между стеклами на несколько миллиметров. Также нанести жидкую агарозу на внешние края спейсеров для герметизации стекол.

3. Приготовить разделяющий мелкопористый (нижний) гель (без персульфата аммония и TEMED), хорошо перемешав компоненты. Дегазировать раствор в течение 10 мин, поскольку кислород ингибирует процесс полимеризации (без дегазации гели полимеризуются долго). Добавить в раствор персульфат аммония и TEMED. Аккуратно залить гелевый раствор шприцом между стеклами камеры до поставленной отметки (стандартный размер геля $6 \times 8 \times 0,75$ мм). Для получения ровной верхней границы разделяющего геля надо аккуратно наслоить сверху насыщенный водой изобутанол или воду (на 0,5–1 см). Осуществить полимеризацию при комнатной температуре в течение 30–60 мин.

4. Приготовить концентрирующий крупнопористый (верхний) гель (без персульфата аммония и TEMED). Дегазировать раствор в течение 10 мин.

5. Осторожно удалить изобутанол или воду с границы заполимеризовавшегося разделяющего геля. Сполоснуть 2–3 раза дистиллированной водой и удалить воду микропипеткой и кусочком фильтровальной бумаги. Добавить в раствор концентрирующего геля персульфат аммония и TEMED, перемешать и с помощью микробиологической пипетки залить гель между стекол аппарата почти до верха. Вставить гребенку между стекол для формирования лунок для нанесения белковых проб (*аккуратно, избегая появления пузырей!*). Осуществить полимеризацию при комнатной температуре. Для рутинных анализов гель можно хранить в полимерной пленке для предотвращения высыхания при 4°C в течение нескольких недель, но это нежелательно.

6. Вынуть гребенку из аппарата после окончания полимеризации концентрирующего геля. Аккуратно промыть образовавшиеся лунки 1× трис-глициновым буферным раствором с помощью шприца и залить 1× трис-глициновый буферный раствор в камеры аппарата для электрофореза в полиакриламидных гелях (см. также рис. 3.8). Прижать стеклянные пластины с гелем между ними специальными зажимами к передней части катодного отсека аппарата для электрофореза так, чтобы меньшая пластина была на уровне выреза в передней стенке прибора, а большая пластина была выше этого выреза. Опустить пластины в буферный раствор для электрофореза.

7. К анализируемым пробам белка добавить буферный раствор для нанесения в соотношении 1 : 2 (буферный раствор : проба) и поместить пробирки в кипящую водяную баню. Инкубировать в течение 3–5 мин для диссоциации, перемешать, отцентрифугировать на настольной центрифуге в течение 15 с.

Б. Электрофорез

8. Нанести прогретые пробы (и белковый маркер) в лунки геля под слой буферного раствора (примерно по 20–25 мкл на лунку, 1–30 мкг белка в пробе). В качестве стандартного маркера можно использовать, например, Low Molecular Weight (LMW) Calibration Kit («GE Healthcare», Великобритания) с диапазоном молекулярных масс 6,5–75 кДа.

Подключить аппарат к источнику постоянного тока, например Bio-Rad PowerPac 300 (нижний электрод должен быть присоединен к положительному полюсу). Осуществить электрофорез в следующих условиях: концентрирующий гель — 10 В/см, разделяющий гель —

170–180 В/см. Рекомендованная сила тока — 35–50 мА в течение первых 30 мин (белковые пробы входят в гель) и 80 мА до конца электрофореза. Бромфеноловый синий, содержащийся в буферном растворе для нанесения, перемещается вместе с фронтом электрофореза.

9. После окончания электрофореза (процесс занимает 1–3 ч), когда маркерный краситель бромфеноловый синий дойдет до конца гелевой пластины, вынуть стекла из камеры прибора. Аккуратно извлечь спейсеры и с помощью скальпеля осторожно разделить стеклянные пластины.

В. Окрашивание

10. Поместить стекло с гелем в ванночку с кислым раствором для фиксации и прокипятить в течение 1–3 мин (либо инкубировать при комнатной температуре в течение 10–15 мин с легким покачиванием). Слить раствор для фиксации и дважды промыть гель в деионизованной воде. Фиксация особенно необходима, если разделяют белки небольшого размера, которые легко вымываются из геля. Иногда вместо фиксации применяют простую отмывку от ДСН в воде (трижды по 10 мин).

11. Перенести стекло с гелем в ванночку с раствором для окрашивания Coomassie Brilliant Blue R-250, довести раствор до кипения и кипятить в течение 3–5 мин (можно также прогреть гель 20–60 с в микроволновой печи, а затем окрашивать в течение 30–40 мин при медленном покачивании). Краситель диффундирует внутрь геля и прочно связывается с белками. Без кипячения гель окрашивается при комнатной температуре в течение 3–4 ч, при 65°C — в течение 50–60 мин. *Внимание — пары метанола весьма ядовиты, горячее окрашивание необходимо проводить под тягой!* Чувствительность стандартного метода окраски 100–1000 нг белка/полосу.

12. Перенести стекло с гелем в ванночку с 10%-ным раствором уксусной кислоты, довести раствор до кипения и кипятить в течение нескольких минут для отмывки геля от несвязавшегося красителя. При необходимости повторить процедуру в свежем растворе несколько раз (аккуратно, чтобы не удалить окраску белковых полос). Отмывка, как и окрашивание, идет существенно быстрее при повышенной температуре (40–65°C), но можно отмывать и при комнатной температуре с медленным покачиванием в течение 30–60 мин. Промыть гель в деионизованной воде.

13. Для кратковременного хранения при 4°C гель запаивают в полиэтиленовый пакетик с водой, для длительного — высу-

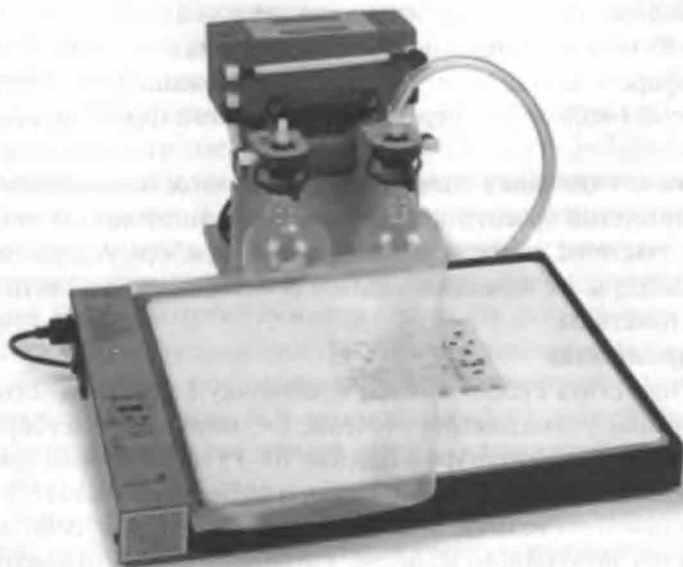


Рис. 7.21. Прибор для сушки полиакриламидных гелей GD 2000 («Hoefer», США)

шивают под вакуумом. Для этого помещают гель на подложку аппарата для сушки гелей (рис. 7.21), накрывают лавсановой или целлофановой пленкой и сушат при режиме, рекомендованном производителем аппарата. Затем необходимо сфотографировать или отсканировать гель.

Дополнения к методике

К п. 3—4. Кислород — сильный ингибитор полимеризации. Дегазировать растворы можно как под вакуумом, так и с помощью продувки азотом или инертными газами (например, гелием). Без дегазации растворов полимеризация протекает значительно медленнее. В этом случае рекомендуется увеличить в полтора раза добавляемое количество персульфата аммония и TEMED.

К п. 3—5. Для контроля степени полимеризации геля рекомендуется налить 0,5—1,0 мл гелевого раствора в микроцентрифужную пробирку и использовать ее в качестве индикатора.

К п. 8. Пробы нужно наносить на гель асимметрично относительно белкового маркера (например, 3 пробы слева и 1 — справа). Это позволит в дальнейшем не перепутать расположение проб в геле.

К п. 11. Окрашивание белковых гелей с помощью раствора Ку-масси является менее чувствительным методом по сравнению с окра-

шиванием серебром или имидазолом/ Zn . Чувствительность метода — 0,1–1,0 мкг белка на электрофоретическую лунку. Однако в отличие от окрашивания имидазолом/ Zn гель можно высушить и сохранить.

Фон при окрашивании возникает из-за присутствия ДСН и следов буферного раствора, поэтому для отмывки геля перед окрашиванием можно использовать воду или 5 мМ HCl (инкубировать 2 ч с покачиванием).

К п. 12. Некоторые протоколы рекомендуют использовать обесцвечивающий раствор следующего состава: метанол — 450 мл, уксусная кислота — 100 мл и вода — 450 мл. Раствор хранится при комнатной температуре. Используют также раствор состава: этанол — 100 мл, уксусная кислота — 100 мл и вода — 800 мл. Достаточно часто применяют эффективный двухфазный обесцвечивающий раствор, состоящий из бутанола и раствора 5%-ной уксусной кислоты (20% : 80%), его можно использовать несколько раз.

К п. 13. Для предотвращения возможного растрескивания геля при сушке иногда рекомендуется инкубировать гель перед сушкой в 20%-ном глицерине или в ацетоне в течение 30 мин.

Полиакриламидный гель можно легко высушить и без использования аппарата для сушки. Для этого тщательно промытый водой гель инкубируют с покачиванием в небольшом объеме ацетона в течение 30–45 мин для обезвоживания, затем помешают на целлофановую пленку и кладут на стопку фильтровальной бумаги. Прижав грузом стеклянную пластинку, уложенную на гель, сушат его в течение 12–16 ч.

Литература

1. *Au T., Agrawal P., Harshey R.* Chromosomal integration mechanism of infecting Mu virion DNA // *J. Bacteriol.* 2006. V. 188. P. 1829–1834.
2. *Bernard H., Helinski D.* Use of the lambda phage promoter P_L to promote gene expression in hybrid plasmid cloning vehicles // *Methods Enzymol.* 1979. V. 68. P. 482–492.
3. *Bornhorst J., Falke J.* Purification of proteins using polyhistidine affinity tags // *Methods Enzymol.* 2000. V. 326. P. 245–254.
4. *Bullard D., Bowater R.* Direct comparison of nick-joining activity of the nucleic acid ligases from bacteriophage T4 // *Biochem. J.* 2006. V. 398. P. 135–144.
5. *Crowe J., Masone B.S., Ribbe J.* One-step purification of recombinant proteins with the 6 $\times$ His-tag and Ni-NTA resin // *Mol. Biotechnol.* 1995. V. 4. P. 247–258.
6. *de Vos W., Venema G., Canosi U., Trautner T.* Plasmid transformation in *Bacillus subtilis*: fate of plasmid DNA // *Mol. Gen. Genet.* 1981. V. 181. P. 424–433.
7. *Gill R., Valdes J., Bentley W.* A comparative study of global stress gene regulation in response to overexpression of recombinant proteins in *Escherichia coli* // *Metab. Eng.* 2000. V. 2. P. 178–189.

8. Gombert A., Kilikian B. Recombinant gene expression in *Escherichia coli* cultivation using lactose as inducer // J. Biotech. 1998. V. 60. P. 47–54.
9. Grossmann E., Casadaban M. Mini-Mu bacteriophage with plasmid replicons for *in vivo* cloning and *lac* gene fusing // J. Bacteriol. 1986. V. 168. P. 357–364.
10. Handa N., Kobayashi I. Type III restriction is alleviated by bacteriophage (RecE) homologous recombination function but enhanced by bacterial (RecBCD) function // J. Bacteriol. 2005. V. 187. P. 7362–7373.
11. Higgins N., Cozzarelli N. DNA-joining enzymes: a review // Methods Enzymol. 1979. V. 68. P. 50–71.
12. Hochuli E., Bannwath W., Döbeli H., Gentz R., Stüber D. Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent // Biotechnology. 1988. V. 6. P. 1321–1325.
13. Ish-Horowicz D., Burke J.F. Rapid and efficient cosmid cloning // Nucleic Acids Res. 1981. V. 9. P. 2989–2998.
14. Jiang L., Yang Y., Chatterjee S., Seidel B., Wolf G., Yang S. The expression of *proUK* in *Escherichia coli*: the *vgb* promoter replaces IPTG and coexpression of *argU* compensates for rare codons in a hypoxic induction model // Biosci. Biotechnol. Biochem. 1999. V. 63. P. 2097–2101.
15. Kessler C., Manta V. Specificity of restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases // Gene. 1990. V. 92. P. 1–248.
16. Kobayashi I. Behavior of restriction-modification systems as selfish mobile elements and their impact on genome evolution // Nucleic Acids Res. 2001. V. 29. P. 3742–3756.
17. Kozłowski M., van Brunschot A., Nash N., Davies R.W. A novel vector allowing the expression of genes in a wide range of gram-negative bacteria // Gene. 1988. V. 70. P. 199–204.
18. Lee J., Choi S., Ahn T. A transcription terminator in the *groE* gene of symbiotic bacteria expressed in *Escherichia coli* // Mol. Cell. 2002. V. 13. P. 35–42.
19. Lobner-Olesen A., Skovgaard O., Marinus M. Dam methylation: coordinating cellular processes // Curr. Opin. Microbiol. 2005. V. 8. P. 154–160.
20. Murray N. Type I restriction systems: sophisticated molecular machines // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2000. V. 64. P. 412–434.
21. Reisner A.H., Nemes P., Bucholtz C. The use of Coomassie Brilliant Blue G-250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels // Anal. Biochem. 1975. V. 64. P. 509–516.
22. Sakamoto K., Ishimaru S., Kobayashi T., Walker J., Yokoyama S. The *Escherichia coli* *argU10*(Ts) phenotype is caused by a reduction in the cellular level of the *argU* tRNA for the rare codons AGA and AGG // J. Bacteriol. 2004. V. 186. P. 5899–5905.
23. Schmitt J., Hess H., Stunnenberg H. Affinity purification of histidine-tagged proteins // Mol. Biol. Rep. 1993. V. 18. P. 223–230.
24. Shima S., Weiss D.S., Thauer R.K. Formylmethanofuran: tetrahydromethanopterin formyltransferase (Ftr) from the hyperthermophilic *Methanopyrus kandleri*: cloning, sequencing and functional expression of the *ftr* gene and one step purification of the enzyme overproduced in *Escherichia coli* // Eur. J. Biochem. 1995. V. 230. P. 906–913.
25. Smith H.O. Nucleotide sequence specificity of restriction endonucleases // Science. 1979. V. 205. P. 455–462.

26. Stankevicius K., Povilionis P., Lubys A., Menkevicius S., Janulaitis A. Cloning and characterization of the unusual restriction-modification system comprising two restriction endonucleases and one methyltransferase // *Gene*. 1995. V. 157. P. 49–53.
27. Studier F., Rosenberg A., Dunn J., Dubendorff J. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes // *Methods Enzymol*. 1990. V. 185. P. 60–89.
28. Taylor W.M., Hagerman P.J. A general method for cloning DNA fragments in multiple copies // *Gene*. 1987. V. 53. P. 139–144.
29. Velterop J., Dijkhuizen M., Postma P. A versatile vector for controlled expression of genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* // *Gene*. 1995. V. 153. P. 63–65.
30. Vieitra J., Messing J. New pUC-derived cloning vectors with different selectable markers and DNA replication origins // *Gene*. 1991. V. 100. P. 189–194.
31. Wanner B., Kodaira R., Neidhart F. Physiological regulation of a decontrolled *lac* operon // *J. Bacteriol*. 1977. V. 130. P. 212–222.
32. Wu X., Jornvall H., Berndt K., Oppermann U. Codon optimization reveals critical factors for high level expression of two rare codon genes in *Escherichia coli*: RNA stability and secondary structure but not tRNA abundance // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2004. V. 313. P. 89–96.

ГЛАВА 8

МУТАГЕНЕЗ

Мутации, т.е. наследуемые изменения в генетическом материале, представляют собой важное биологическое явление, поскольку обуславливают, наряду с механизмами переноса генов, генетическую изменчивость живых организмов. Изучение мутантных штаммов бактерий значительно облегчает исследование процессов, протекающих в клетке на молекулярном уровне. Современные методы картирования мутаций позволяют локализовать ген или даже группу генов, ответственных за определенный фенотип. Кроме того, наличие достаточного набора мутаций облегчает определение ферментативных стадий в биохимическом пути, дает возможность выявить и охарактеризовать новые биосинтетические и регуляторные системы. Изучение белков, измененных в результате мутаций, позволяет точнее предсказывать их пространственную структуру, определять участки на белковой молекуле, ответственные, например, за связывание субстрата или эффекторной молекулы. Мутации являются основой для селекции микроорганизмов с полезными свойствами, таких, как штаммов-продуцентов антибиотиков, аминокислот или витаминов.

В популяции микроорганизмов мутанты могут возникать спонтанно за счет нормальных клеточных процессов (рекомбинации, репликации и репарации), а также в результате воздействия факторов внешней среды. Однако частота возникновения какого-нибудь определенного мутанта в результате *спонтанных мутаций* довольно низка, например у *E. coli* частота такого процесса обычно не превышает 10^{-5} . В тех случаях, когда приобретаемая мутация приводит к определенному фенотипу, позволяющему отбирать мутантные клетки из популяции, обнаружить такие редкие события не представляет сложности. К сожалению, не всегда существует возможность для проведения подобного отбора. Решением этой задачи является увеличение доли мутантов в популяции микроорганизмов посредством *индуцирования* мутаций, что достигается обработкой клеток специальными химическими, физическими или биологическими агентами.

Примерами химических мутагенов являются нитрозогуанидин, гидроксилламин, 5-бромурацил и 2-аминопурин, которые вызывают мутации замены одного пуринового/пиримидинового основания

на другое в составе кодона (транзиции), а также акридиновые соединения, приводящие к мутациям сдвига рамки считывания и делециям (утрате сегмента ДНК размером от нуклеотида до гена). Облучение бактерий ионизирующим излучением (вызывает разрывы хромосомы) или ультрафиолетом (димеризует пиримидиновые основания) приводит соответственно к делециям и инверсиям (поворот сегмента ДНК на 180°) или к делециям, транзициям и трансверсиям (замене в одном из кодонов пуринового основания на пиримидиновое или наоборот). В качестве биологических мутагенов часто выступают транспозирующие фаги, такие, как бактериофаг *Mu*, который встраивается в ДНК, и гены-мутаторы (нарушают процессы репликации и репарации ДНК).

Поскольку разные мутагены обладают различными механизмами действия и эффективностью, их выбор определяется типом мутации, которую необходимо получить. Разные виды и даже штаммы микроорганизмов требуют определенных концентраций мутагенов и специфических условий для осуществления эффективного индуцированного мутагенеза. Поэтому перед экспериментом необходимо строить кривые выживаемости клеток в зависимости от концентрации (дозы) мутагенного фактора и времени экспозиции.

Для проявления мутаций необходимо, чтобы произошла репликация и мутационное изменение закрепилось в новосинтезированной молекуле ДНК. Фенотипически мутация проявляется через определенное время (сегрегационный лаг-период), за которое проходят процессы транскрипции и трансляции. Для появления нового признака должно произойти несколько делений клеток в популяции (так называемый фенотипический лаг-период), для этого суспензию клеток, обработанных мутагеном, подращивают в течение некоторого времени.

Что касается **отбора мутантов**, то в микробиологии применяют несколько классических методов. Широко используется прямой отбор по фенотипу высевом на селективные среды, метод непрямой селекции с использованием индикаторных сред (с индикатором на использование субстрата или с хромогенным субстратом, например X-gal) и метод непрямой селекции с отпечатыванием колоний, выросших на полноценной агаризованной среде, на чашки с селективными средами. Для повышения доли ауксотрофных мутантных клеток в популяции часто используют пенициллиновый метод обогащения мутантов, который элиминирует значительное количество активно растущих прототрофных клеток дикого типа в ходе подращивания обработанной мутагеном культуры на минимальной среде

с добавлением пенициллина (антибиотик подавляет синтез пептидогликана клеточной стенки).

Развитие методов генетической инженерии позволило использовать ее инструментарий для направленного изменения генетического материала в строго определенных сайтах нуклеотидной последовательности и соответственно получать белки, содержащие нужные аминокислоты в заданных позициях. Данный подход получил название *сайт-направленного мутагенеза*. Например, исследуемый ген встраивают в двухцепочечную форму вектора на основе бактериофага M13 и копируют одноцепочечную форму фаговой ДНК с использованием специального праймера, с помощью которого в ген-мишень вносят точечную мутацию. После трансформации клеток *E. coli* двухцепочечными ДНК фага M13 идентифицируют фаговые частицы, несущие ген с нужной мутацией, встраивают мутантный ген в экспрессирующий вектор, синтезируют белок и измеряют его активность. Также можно вносить изменения в гены с помощью плазмид или ПЦР. Возможность внесения заранее запланированных изменений в нуклеотидную последовательность позволяет детально изучать принципы функционирования клеточных ферментов, создавая и исследуя их мутантные формы. Сайт-направленный мутагенез также незаменим при изучении сложной системы регуляции экспрессии генов, помогая устанавливать роль того или иного участка хромосомы в этом процессе.

8.1.

МУТАГЕНЕЗ С ПОМОЩЬЮ ХИМИЧЕСКИХ АГЕНТОВ

В генетике микроорганизмов нашел широкое применение целый ряд химических агентов, используемых для индукции мутаций. К таким соединениям относятся нитрозогуанидин, этилметансульфонат (вызывает алкилирование гуанидина), гидроксилламин (приводит к дезаминированию цитозина), 2-аминопурин и 5-бромурацил (аналоги оснований, вызывают ошибки при репликации ДНК), акридиновые красители (интеркалируют между основаниями во время репликации ДНК). Мы приводим протокол получения мутаций с помощью нитрозогуанидина.

Мутагенный эффект химических соединений связан в основном с возникновением точечных мутаций. Большое значение имеют условия обработки клеточной суспензии химическим мутагеном — его концентрация, продолжительность экспозиции, pH среды и т.д.

При работе с химическими мутагенами, многие из которых обладают

сильным канцерогенным и токсическим действием, необходимо соблюдать технику безопасности — надо работать в вытяжном шкафу в резиновых перчатках и утилизировать растворы мутагенов как опасные отходы.

ИНДУКЦИЯ МУТАЦИЙ В КЛЕТКАХ *E. coli* НИТРОЗОГУАНИДИНОМ

N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин (НГ) является мощным химическим мутагеном, широко применяемым в генетике бактерий, так как он с высокой частотой индуцирует мутации при таких дозах, которые не приводят к гибели клеток. При обработке культуры клеток НГ можно получить до 20% ауксотрофных мутантов (т.е. таких, которые утратили способность к синтезу необходимых для роста соединений). Растворы нитрозогуанидина в 50–100 мМ цитратном буфере (рН 5,5) необходимо готовить непосредственно перед экспериментом. Как правило, клетки из экспоненциальной фазы роста культуры обрабатывают НГ в конечной концентрации 20–100 мкг/мл в течение 30 мин.

Этот мутаген вызывает в основном замены оснований за счет их алкилирования в репликационной вилке, хотя имеются данные, что НГ индуцирует также образование небольших делеций. Исследование распределения мутаций, вызванных НГ, показали, что область репликации ДНК значительно более чувствительна к действию этого мутагена, чем остальная хромосома. Эта особенность НГ часто приводит к образованию двойных замен, что является существенным недостатком данного метода. Однако в каждом эксперименте можно контролировать уровень возникновения таких мутаций. Действие мутагена обычно останавливают внесением 50–100 мМ фосфатного буферного раствора с рН 7,0.

Необходимые реактивы и растворы:

- стерильная среда LB — см. приложение 1;
- цитратный буферный раствор следующего состава (на 0,5 л): 10,5 г лимонной кислоты; 4,4 г NaOH; довести до рН 5,5 с помощью 2 М NaOH;
- фосфатный буферный раствор следующего состава (на 0,5 л): 6,8 г KH_2PO_4 ; 1,16 г NaOH; довести 2 М NaOH до рН 7,0;
- раствор НГ (концентрация нитрозогуанидина — 1 мг/мл в цитратном буферном растворе). *Внимание!* НГ является опасным канцерогенным веществом, работать с ним необходимо в перчатках;
- стерильный 0,9%-ный раствор NaCl.

Методика

А. Подбор оптимальных условий при действии НГ, построение кривых выживаемости.

1. Засеять одну колонию бактериального штамма, подвергаемого мутагенезу, в микробиологическую стеклянную пробирку с **5 мл** среды LB. Поместить пробирку на качалку и культивировать при 37°C и 240 об/мин в течение ночи (12–14 ч).

2. Добавить **4 мл** ночной культуры в колбу Эрленмейера с **40 мл** жидкой среды LB. Выращивать культуру до середины логарифмической фазы роста при 37°C и 240 об/мин.

3. Осадить клетки центрифугированием при 5000 g в течение 5 мин при комнатной температуре (*стерильно!*). Слить надосадочную жидкость.

4. Промыть клетки стерильным цитратным буферным раствором. Для этого ресуспендировать осадок клеток в **40 мл** цитратного буферного раствора. Центрифугировать при 5000 g в течение 5 мин при комнатной температуре. Слить надосадочную жидкость.

5. Ресуспендировать клетки в **40 мл** цитратного буферного раствора. Перенести по **5 мл** суспензии в 8 стерильных микробиологических пробирок. Поместить их в водяную баню при 37°C .

6. Внести в каждую из пробирок по **200 мкл** раствора НГ. Засечь время.

7. Через определенный промежуток времени достать одну пробирку из бани. Осадить клетки на центрифуге при 12 000 g в течение 1–2 мин, промыть **одним объемом** фосфатного буферного раствора и ресуспендировать в **5 мл** фосфатного буферного раствора. Пробы отбирать через 0, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90 мин.

8. Высевать разведения суспензии клеток из каждой пробирки на чашки Петри с агаризованной средой LB. Из проб, отобранных в течение первых 30 мин, высевается по 100 мкл из разведений 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} и 10^{-5} . Остальные пробы высеваются по 100 мкл из разведений 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} и 10^{-4} .

9. Поместить чашки в термостат и инкубировать при 37°C в течение ночи.

10. Пересчитать число бактериальных колоний, выросших на чашках. Исходя из использованного разведения, определить количество жизнеспособных клеток для каждого периода времени обработки НГ.

11. Построить кривую выживаемости культуры в зависимости от времени обработки НГ. Определить временной интервал (Т-50), при котором выживаемость составляет 50%.

Б. Индукция мутаций под действием НГ

1. Засеять одну колонию бактериального штамма, подвергаемого мутагенезу, в микробиологическую стеклянную пробирку с **5 мл** среды LB. Поместить пробирку на качалку и культивировать при 37°C и 240 об/мин в течение ночи (12–14 ч).

2. Добавить **1 мл** ночной культуры в микробиологическую пробирку с **10 мл** жидкой среды LB. Поместить пробирку на качалку и инкубировать при 37°C и 240 об/мин до достижения культурой середины логарифмической фазы роста ($\sim 2 \times 10^9$ клеток/мл).

3. Осадить клетки центрифугированием при 5000 g в течение 5 мин при комнатной температуре (*стерильно!*). Слить надосадочную жидкость.

4. Промыть клетки цитратным буферным раствором. Для этого ресуспендировать осадок клеток в **10 мл** цитратного буферного раствора. Осадить клетки центрифугированием при 5000 g в течение 5 мин при комнатной температуре. Слить надосадочную жидкость.

5. Ресуспендировать клетки в **10 мл** цитратного буферного раствора. Перенести по **5 мл** клеточной суспензии в две стерильные микробиологические пробирки.

6. В одну пробирку добавить **200 мкл** раствора НГ, во вторую (контрольную) НГ добавлять не нужно. Поместить пробирки в водяную баню (37°C) и инкубировать в течение временного интервала Т-50, определенного на предыдущем этапе.

7. Перенести содержимое каждой пробирки в стерильный стакан для центрифугирования. Осадить клетки центрифугированием при 5000 g в течение 5 мин. Слить надосадочную жидкость.

8. Отмыть клетки от НГ. Для этого дважды промыть их **равным объемом** фосфатного буферного раствора, собрать осадок клеток центрифугированием.

9. Ресуспендировать клетки из каждого варианта в **10 мл** жидкой среды LB и инкубировать в течение ночи при 37°C и 240 об/мин.

10. Осадить клетки центрифугированием при 5000 g в течение 5 мин. Промыть клетки **равным объемом** физиологического раствора.

11. Ресуспендировать клетки в **500 мкл** физиологического раствора и высеять суспензии на чашки Петри с селективной агаризованной средой.

12. Инкубировать чашки в термостате при 37°C до появления отдельных колоний (через 12–24 ч) в варианте с культурой клеток, обработанных НГ. Чашки с культурой, не подвергнутой действию мутагена, должны быть чистыми.

Дополнения к методике

Ко всем разделам методики. Нитрозогуанидин очень опасен в обращении, поскольку является мощным канцерогенным веществом. При работе с раствором НГ обязательно нужно использовать защитные перчатки.

К п. А. Подбор оптимальной дозы НГ определяет эффективность мутагенеза. Высокие дозы НГ вызывают образование множественных мутаций, резко снижая выживаемость клеток (ауксотрофность, летальные мутации). Наоборот, при недостаточной обработке мутагеном сложно отобрать бактерии с определенным фенотипом из-за малого числа мутаций. Экспериментально установлено, что доза НГ, приводящая к гибели приблизительно 50% клеток бактериальной популяции, в большинстве случаев является оптимальной. Поскольку известно, что разные штаммы в различной степени чувствительны к токсическому действию нитрозогуанидина, то для определения такой дозы для каждого нового штамма целесообразно строить кривую выживаемости, т.е. снижение выживаемости при увеличении дозы мутагена.

К п. А6 и А7. Для построения кривых выживаемости клетки обрабатывают либо одной и той же дозой НГ, но при разной длительности воздействия, либо разными концентрациями НГ в течение одного и того же временного интервала. Если индукция мутаций прошла недостаточно сильно, то надо провести обработку культуры более высокими концентрациями мутагена (100 мкг/мл) или же увеличить длительность его воздействия.

К п. Б7. Для увеличения числа мутантов с желаемым фенотипом клетки можно перенести в жидкую среду LB и подрастить в течение ночи. Затем выросшие культуры высеваются на селективные (индикаторные) чашки.

8.2.

ПОЛУЧЕНИЕ СЕРИЙНЫХ ДЕЛЕЦИЙ

Приведем описание метода получения серийных делеций с помощью ДНКазы I и вставки гена устойчивости к антибиотику. Принцип заключается в том, что в присутствии ионов Mn^{2+} ДНКазы I вносит случайные, преимущественно двухцепочечные разрывы в молекулу плазмидной ДНК, которые достраиваются до «тупых» концов с помощью ДНК-полимеразы Т4 (рис. 8.1). Размер делеции обычно находится в диапазоне от 10 до 80 по. По «тупым» концам в разрыв встраивают ген устойчивости к антибиотику (например, к канамицину) и плазмиды со вставкой отбираются на ага-

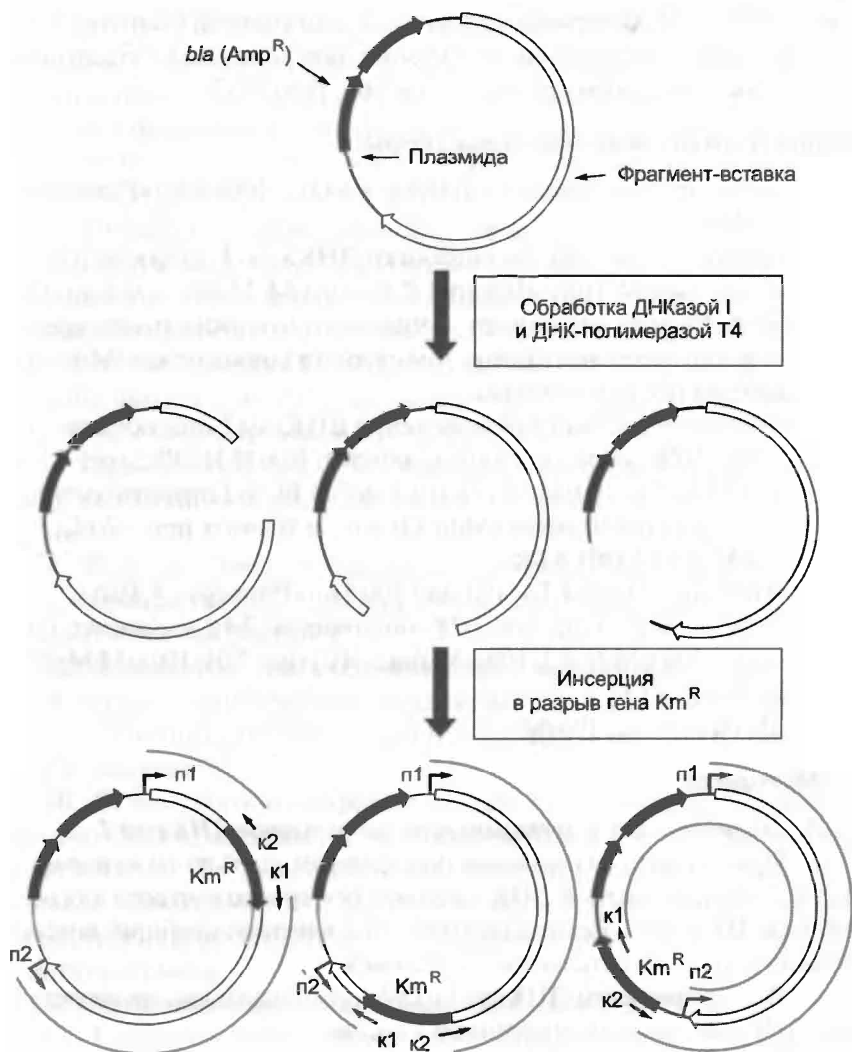


Рис. 8.1. Принцип метода получения серийных делеций с помощью ДНКазы I и вставки гена устойчивости к антибиотику (канамицину)

ризованной среде, содержащей соответствующий антибиотик. Затем проводят анализ локализации инсерций (поскольку часть клонов содержит вставку за границей секвенируемого участка).

Данный метод имеет некоторые преимущества перед классическим методом получения серийных делеций с помощью рестриктазы *ExoIII* и нуклеазы из золотистой фасоли — нет нужды в линейаризации плазмидной ДНК при помощи рестриктазы, ниже требования

к качеству ДНК. Описываемый метод в достаточной степени схож с более дорогими способами получения инсерционных мутантов *in vitro* с использованием транспозонов Mu, Tn5 и Tn7.

Необходимые реактивы и растворы:

- дезоксирибонуклеаза I (ДНКазы I RQ1), 1000 ед. («Promega», США);
- буферный раствор для обработки ДНКазой I следующего состава: 10 мМ трис-НСl (рН 7,8); 10 мМ $MnCl_2$ и 0,1 мг/мл БСА. Раствор нестабилен, лучше всего его готовить непосредственно перед экспериментом на дистиллированной (Milli-Q) воде из 10× компонентов;
- буферный раствор для разведения ДНКазы I следующего состава: 50% глицерина (объем/объем); 10 мМ HEPES (рН 7,5); 10 мМ $CaCl_2$; 10 мМ $MnCl_2$ и 0,1 мг/мл БСА. Готовить раствор на дистиллированной (Milli-Q) воде и хранить при $-20^{\circ}C$;
- 0,5 М ЭДТА (рН 8,0);
- ДНК-полимераза Т4, 100 или 500 ед. («Promega», США);
- буферный раствор для ДНК-полимеразы Т4 следующего состава: 500 мМ NaCl; 100 мМ трис-НСl (рН 7,9); 100 мМ $MgCl_2$ и 10 мМ ДТТ;
- дНТФ (смесь, 10 мМ).

Методика

A. Аналитическое и препаративное расщепление ДНКазой I

1. Приготовить 10 пробирок под номерами от 1 до 10 из расчета 0,2–0,5 мкг плазмидной ДНК на 20 мкл буферного раствора для обработки ДНКазой I. Разлить по аликвотам: в первую пробирку внести **40 мкл** раствора, в остальные — по **20 мкл**.

2. Во льду развести ДНКазу I в буферном растворе для разведения ДНКазы I до концентрации **0,1 ед./мл**.

3. Внести в первую пробирку **1 мкл** разведенной ДНКазы I, перемешать пипетированием и перенести половину объема во вторую пробирку, перемешать и т.д. (каждое разведение делать новым носиком для автоматической пипетки). Десятая пробирка служит контролем, не обработанным ДНКазой I.

4. Инкубировать при $37^{\circ}C$ в течение 1 ч для расщепления ДНК. Остановить реакцию инкубированием при $65^{\circ}C$ в течение 10 мин в присутствии 20 мМ ЭДТА (рН 8,0).

5. Оценить эффективность реакции при помощи электрофореза в агарозном геле (см. подглаву 3.1). Выбрать такую концентрацию

ДНКазы I, при которой обнаруживается наибольшее количество линейной плазмидной ДНК или где наблюдается наиболее равномерный переход полосы суперскрученной ДНК в полосу линейной ДНК (на фореже может быть видно три полосы: релаксированная ДНК и чуть пониже — линейная форма, самая нижняя полоса соответствует суперскрученной ДНК).

6. Провести препаративное расщепление плазмидной ДНК подобранной концентрацией ДНКазы I в одной пробирке. После инкубации при 37°C в течение 55 мин добавить к реакционной смеси 2,3 мкл 10× буферного раствора для ДНК-полимеразы Т4, 0,5 мкл смеси дНТФ (10 мМ) и 1 ед. ДНК-полимеразы Т4. Т.е. «затупление» концов фрагментов ДНК осуществляется без замены буферного раствора и промежуточной очистки ДНК.

7. Инкубировать при 37°C в течение 5 мин для достройки «тупых» концов. Остановить реакцию инкубированием при 65°C в течение 10 мин.

8. Выделить линейный фрагмент плазмидной ДНК из агарозного геля, обращая особое внимание на то, чтобы не захватить ДНК, не расщепленную ДНКазой I.

Б. Лигирование с геном устойчивости к антибиотику

9. Провести лигирование плазмидной ДНК с геном устойчивости к канамицину при 14°C в течение 10–12 ч по методике, описанной в подглаве 7.1.

10. Осуществить трансформацию (см. гл. 4) и последующую селекцию клонов, содержащих плазмиды со вставкой гена устойчивости к канамицину Km^R , на селективной агаризованной среде с добавлением антибиотиков. Количество отбираемых клонов зависит от размера секвенируемого фрагмента и от длины участка, считываемого с одного праймера.

В. Определение положения вставок при помощи ПЦР

11. Поставить ПЦР в объеме реакционной смеси по 15 мкл с добавлением 50 мМ красителя крезолового красного; 1,5 М бетаина и 0,5 мг/мл бромистого этидия. Нужные колонии отобрать стерильной зубочисткой и ресуспендировать в реакционной смеси. Использовать праймеры, соответствующие концам гена, отвечающего за фенотип Km^R , и полилинкеру плазмиды (рис. 8.1). Поскольку ориентация встроившегося гена Km^R заранее неизвестна, то для амплификации участков, на которые он разбивает секвенируемый фрагмент, надо ставить 4 ПЦР для каждого клона (продукт амплификации соответственно образуется в тех двух реакционных смесях, которые светятся под УФ).

12. Провести анализ размера и положения места вставок с помощью электрофореза в агарозном геле (каждой инсерции соответствуют два ПЦР фрагмента). Исходя из результатов, выбрать клоны с инсерциями, которые равномерно распределены по секвенируемому фрагменту. Осуществить секвенирование с использованием праймеров, располагающихся на концах гена *Km^R* (секвенировать можно как с праймеров, используемых для ПЦР, так и с внутренних праймеров).

8.3.

САЙТ-НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ

Сайт-направленный мутагенез представляет собой ценный инструмент при генетических и биохимических исследованиях. Благодаря этому методу становится возможным не только получить представление о взаимосвязи структурной организации белка, кодируемого изучаемым геном, с его ферментативной активностью, но и установить, какое место занимает исследуемый ген в сложной цепи биохимических процессов клетки. Кроме того, применение данного подхода позволяет получать ферменты с измененными свойствами, что широко используется, например, в биотехнологии.

Благодаря сайт-направленному мутагенезу можно осуществлять любые заранее запланированные изменения в нуклеотидной последовательности — единичные или множественные замены, делеции или вставки практически любого размера. Число общепринятых методик для внесения подобных изменений достаточно велико. Все они имеют как сильные, так и слабые стороны. Поэтому выбор метода обуславливается исключительно поставленной задачей и предпочтениями исследователя.

Ниже предлагаются методики двух часто цитируемых в научной литературе подходов при проведении сайт-направленного мутагенеза: 1) классического метода введения нуклеотидной замены по Кункелю и 2) так называемого олигонуклеотид-направленного мутагенеза с помощью ПЦР, а вернее, одной из его разновидностей — метода перекрывающихся ПЦР-продуктов (overlap PCR).

МЕТОД КУНКЕЛЯ (САЙТ-НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДНК ФАГА М13)

Схема эксперимента представлена на рис. 8.2. Для проведения мутагенеза фрагмент ДНК клонируют в векторе, полученном на основе нитевидного бактериофага М13. Затем с одноцепочечной ДНК

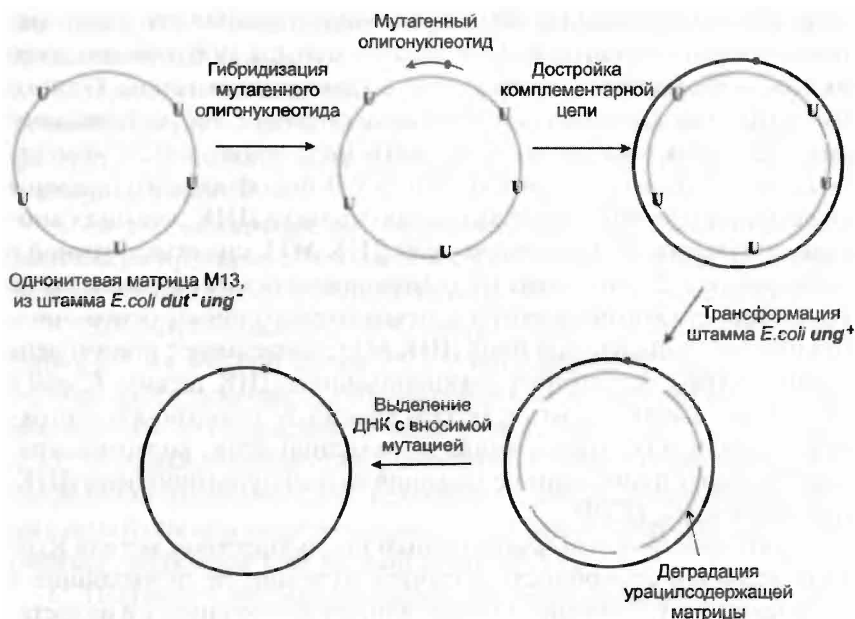


Рис. 8.2. Схема сайт-направленного мутагенеза по методу Кункеля

(плюс-цепь M13) рекомбинантного фага гибридизуют синтетический мутагенный олигонуклеотид. Он комплементарен участку последовательности гена-мишени мутагенеза за исключением одной или нескольких позиций, несущих мутации. Неспаривающийся нуклеотид соответствует такому нуклеотиду кодона мРНК, который необходимо изменить. Этот синтетический олигонуклеотид используется в качестве праймера для синтеза на однострессовой кольцевой ДНК-матрице полноразмерной комплементарной цепи *in vitro*. Репликация осуществляется с помощью ДНК-полимеразы фага T4 (часто используют также фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*) в присутствии четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, присоединение же последнего нуклеотида синтезированной цепи к 5'-концу затравки происходит за счет действия ДНК-лигазы фага T4. После замыкания достраиваемой цепи в кольцо образуется двухцепочечная кольцевая ДНК, комплементарная по всей длине, за исключением области мутации. Полученный гетеродуплекс вводят в клетки *E. coli*, где он реплицируется по полуконсервативному механизму, давая потомство двух типов: исходного и мутантного.

Фаговые частицы, содержащие мутантный ген, идентифицируют при помощи секвенирования или ДНК-гибридизации, используя в

качестве зонда исходный олигонуклеотид. В реальности число фаговых частиц с мутантной ДНК гораздо меньше 50%, обычно всего около 1–5% бляшек содержат фаг с измененным геном. Однако благодаря использованию специального штамма *E. coli*, содержащего два дефектных гена метаболизма ДНК (*ung*, кодирующего урацил-*N*-гликозилазу, и *dut*, кодирующего дУТФ-пирофосфатазу), удается значительно (до 90%) увеличить долю молекул ДНК, несущих вносимую мутацию. В одноцепочечной ДНК М13, синтезированной в таких клетках *E. coli*, около 1% тимидиновых остатков заменены на уридиновые. Олигонуклеотид с некомплементарным основанием отжигают с урацилсодержащей ДНК М13, синтезируют вторую цепь *in vitro* и трансформируют двухцепочечной ДНК штамм *E. coli* с функциональным геном *ung* (чтобы урацил-*N*-гликозилаза клеток-хозяев удалила остатки урацила из исходной цепи, которая деградирует). Далее происходит репликация только мутантной цепи ДНК, не содержащей дУТФ.

Стоит заметить, что несомненным преимуществом метода Кункеля является способность получать мутации, не приводящие к определенному фенотипу. Однако данный подход имеет и недостаток — большое количество процедур в ходе эксперимента. Поэтому широко используются и альтернативные методы, основанные, например, на методе ПЦР.

Необходимые реактивы и растворы:

- стерильная среда 2× YT (см. приложение 1);
- раствор I состава: 10 мМ трис-*HCl* (pH 7,6); 1 мМ ЭДТА; 300 мМ *NaCl*;
- буферный раствор «А» состава (10-кратная концентрация): 50 мМ дитиотреитол; 10 мМ спермидин; 100 мМ *MgCl*₂; 700 мМ трис-*HCl* (pH 7,6);
- буферный раствор «В» состава (10-кратная концентрация): 500 мМ *NaCl*; 20 мМ *MgCl*₂; 200 мМ трис-*HCl* (pH 7,4). Хранить при –20°C;
- буферный раствор «С» состава (10-кратная концентрация): 5 мМ дАТФ; 5 мМ дТТФ; 5 мМ дЦТФ; 5 мМ дГТФ; 10 мМ АТФ; 20 мМ дитиотреитол; 50 мМ *MgCl*₂; 100 мМ трис-*HCl* (pH 7,4). Хранить при –20°C.

Методика

А. Приготовление однонитевой матрицы

1. Осуществить клонирование небольшого фрагмента ДНК, содержащего мутагенизируемую область, в составе вектора на основе

бактериофага M13 (например, M13mp18) согласно рекомендациям, предложенным в гл. 7.

2. Провести трансфекцию штамма *E. coli* CJ236 с помощью ДНК рекомбинантного фага. Для этого используйте такое количество фага, чтобы получить чашки с отдельными фаговыми бляшками на клеточном газоне.

3. Засеять одиночную колонию штамма *E. coli* CJ236 в микробиологическую пробирку с 5 мл жидкой среды 2× YT. Поместить пробирку на качалку (240 об/мин) и инкубировать при 37°C в течение ночи.

4. Добавить 50 мкл ночной культуры в микробиологическую пробирку с 5 мл жидкой среды 2× YT. Инкубировать при 37°C и 240 об/мин до достижения культурой середины логарифмической фазы роста. Поместить пробирку в холодильник (4–6°C).

5. С чашки, содержащей рекомбинантный фаг (см. пункт A2), стерильной пастеровской пипеткой аккуратно отобрать одиночную фаговую бляшку и ресуспендировать ее в микроцентрифужной пробирке, содержащей 1 мл жидкой среды 2× YT.

6. Поместить пробирку в термостат и инкубировать при 60°C в течение 5 мин.

7. Интенсивно перемешать суспензию и центрифугировать при 5000 g в течение 2 мин при 4°C.

8. Отобрать 50 мкл надосадочной жидкости и внести в колбу, содержащую 50 мл среды 2× YT с раствором уридина (конечная концентрация 0,25 мкг/мл). К содержимому колбы добавить 5 мл культуры *E. coli* CJ236, полученной на этапе A4, и инкубировать колбу на качалке (300 об/мин) при 37°C в течение 6 ч.

9. Осадить клетки центрифугированием при 5000 g в течение 10 мин при 4°C. Осторожно перелить надосадочную жидкость в стерильную центрифужную пробирку и измерить объем конечного раствора.

10. Добавить 0,25 объема 2,5 М раствора NaCl, содержащего 15% (вес/объем) ПЭГ 8000 (раствор хранить при 4°C). Хорошо перемешать и выдержать смесь во льду в течение 1 ч для осаждения бактериофага.

11. Центрифугировать при 12 000 g в течение 20 мин при 4°C. Тщательно удалить надосадочную жидкость и ресуспендировать осадок в 5 мл буферного раствора «А». Инкубировать суспензию во льду в течение 1 ч.

12. Центрифугировать при 5000 g в течение 20 мин при 4°C. Осторожно перенести надосадочную жидкость в стерильную полипропиленовую пробирку. Измерить объем раствора.

13. Экстрагировать смесь дважды **равным объемом** фенола (рН 8,0) и один раз **равным объемом** смеси фенол : хлороформ (50 : 50). Для разделения фаз использовать центрифугирование при 4000 g в течение 5 мин при комнатной температуре. Данный этап необходим для очистки фаговой ДНК от компонентов белковой оболочки.

14. Перенести верхнюю фазу в отдельную полипропиленовую пробирку. Измерить объем раствора.

15. Добавить **0,1 объема** 3 М ацетата натрия (рН 5,2) и **два объема** 96%-ного этилового спирта. Поместить смесь в лед (либо на -20°C) и инкубировать в течение 30 мин.

16. Центрифугировать суспензию при 5000 g в течение 20 мин при 4°C . Надосадочную жидкость слить, осадок промыть 70%-ным этанолом и подсушить.

17. Растворить осадок в **200 мкл** стерильной деионизованной воды. Определить концентрацию ДНК в растворе, измерив его оптическую плотность при 260 нм на спектрофотометре.

Примечание. Для амплификации фага и его последующего хранения применяют следующую методику. Инкубируют смесь (состава: 2х УТ — 5 мл, ночная культура клеток — 20 мкл, стоковый раствор фага — 5 мкл) на качалке (200–300 об/мин) при 37°C в течение ночи, разливают по 1,2-мл аликвотам и инкубируют при 65°C в течение 15 мин для убивки бактерий. Затем центрифугируют суспензию при 5000 g в течение 5 мин для осаждения клеток, супернатант (1-мл аликвоты) переносят в микроцентрифужные пробирки с 70 мкл ДМСО, перемешивают и хранят при -70°C (или при 4°C — не более 1,5 мес.).

Б. Фосфорилирование мутагенного олигонуклеотида

1. Составьте и синтезируйте мутагенный олигонуклеотид.

2. Для проведения реакции фосфорилирования в стерильной микроцентрифужной пробирке смешать: 2,5 мкг ДНК мутагенного олигонуклеотида, 5 мкл 10х буферного раствора для полинуклеотидкиназы, 5 мкл 10 мМ раствора АТФ и 5 ед. фермента Т4 полинуклеотидкиназы. Довести объем раствора до 50 мкл, добавив соответствующее количество стерильной деионизованной воды. Все операции проводить во льду.

3. Инкубировать смесь при 37°C в течение 15–30 мин, после чего поместить пробирку в лед. Полинуклеотидкиназа инактивируется прогреванием смеси при 70°C в течение 10 мин. Мутагенный олигонуклеотид необходимо хранить при -20°C .

В. Гибридизация мутагенного олигонуклеотида с однонитевой матрицей и синтез комплементарной цепи бактериофага

1. В микроцентрифужной пробирке смешать **50 нг** ДНК фосфорилированного мутагенного олигонуклеотида и **100 нг** ДНК однонитевой матрицы. К смеси добавить **1 мкл** буферного раствора «В» (буфер для отжига). Довести объем раствора до **10 мкл**, добавив соответствующее количество стерильной деионизованной воды.

2. Поместить пробирку с реакционной смесью в стакан с нагретой до 70°C водой. Инкубировать до тех пор, пока вода, находящаяся в стакане, не остынет до комнатной температуры. Пониженная температура и высокая ионная сила необходимы для эффективной гибридизации олигонуклеотида с комплементарным участком клонированного гена.

3. К содержимому пробирки добавить **2 мкл** буферного раствора «С» (буфер для синтеза), **1–2 ед.** препарата ДНК-лигазы фага Т4 и **3–6 ед.** препарата ДНК-полимеразы фага Т4. Довести объем стерильной деионизованной водой до **20 мкл**. Инкубировать смесь при 18°C в течение 6–8 ч (или при 37°C в течение 1,5 ч).

Г. Отбор мутантов

1. Получить химически компетентные клетки штамма *E. coli* TG1 любым методом, предложенным в гл. 4.

2. Залить три чашки Петри агаризованной средой LB и слегка подсушить в ламинаре для удаления конденсата.

3. Поместить три стерильные микроцентрифужные пробирки в лед. В одну из них (проба А) внести $\frac{1}{2}$ объема смеси, полученной на предыдущем этапе, в другую пробирку (проба Б) добавить **50 нг** ДНК однонитевой матрицы, использованной для мутагенеза. В третью пробирку (проба В) ничего добавлять не нужно.

4. Внести в пробирки компетентную культуру штамма *E. coli* TG1 (приблизительно 10^8 клеток) и инкубировать в течение 30 мин.

5. Быстро перенести пробирки в термостат на 42°C и инкубировать в течение 1 мин. Поместить пробы обратно в лед.

6. В заранее охлажденную до $42\text{--}45^{\circ}\text{C}$ стерильную стеклянную пробирку с **5 мл** расплавленного верхнего слоя среды добавить **50 мкл** ночной культуры (которая использовалась при приготовлении компетентных клеток) и содержимое пробирки А. Интенсивно перемешать и вылить на чашку Петри с агаризованной средой LB. Повторить операцию с пробами Б и В.

7. Дождаться, пока застынет верхний слой, поместить чашки в термостат на 37°C и инкубировать в течение 12–16 ч (не переворачивая).

8. Осмотреть чашки. Фаговые бляшки должны присутствовать на чашках с пробами А и Б, причем на последней их число должно

быть существенно ниже. Чашка с пробой В должна содержать только чистый клеточный газон.

9. С помощью стерильной пипетки отобрать одиночные фаговые бляшки с чашки, содержащей пробу А. Выделить фаговую ДНК из этих колоний.

10. Для подтверждения наличия мутации провести секвенирование клонированного участка ДНК у этих клонов (см. гл. 11).

Дополнения к методике

К п. А1. При необходимости совместить на одном векторе мутагенез и экспрессию мутантного гена можно воспользоваться фазмидными векторами (например, серии pTZ или pEMBL), содержащими наряду с плазмидным репликоном репликон нитевидного фага. При определенных условиях (в присутствии фага-помощника) одна из цепей такого вектора может упаковываться в фаговые капсиды.

К п. Б1. При конструировании мутагенного олигонуклеотида необходимо учитывать, что адресность мутации обеспечивается комплементарностью конструируемого олигонуклеотида к заранее выбранному участку ДНК (мишени мутагенеза). Как правило, при введении одиночной замены достаточно использовать олигонуклеотид длиной 15–25 оснований. Мутагенные позиции следует по возможности располагать в центре, а комплементарные плечи должны быть длиной минимум в 6 нуклеотидов. Это важно для эффективной инициации элонгации, а также для успешного лигирования, так как локально нестабильные концы дуплекса являются плохими субстратами для ДНК-полимеразы и лигазы. По этой причине желательно, чтобы плечи были обогащены Г/Ц.

К разделу Г. Селекция мутантной цепи гетеродуплекса в данном методе происходит из-за того, что матричная ДНК, выделенная из штамма *E. coli* CJ236 с мутантными генами *ung* и *dut*, несет до нескольких процентов остатков дезоксиуридина вместо дезокситимидина. При введении гетеродуплекса на основе такой матрицы в клетки штамма TG1 (*ung*⁺ *dut*⁺) избирательно репарируется матричная цепь, при этом гидролизуются и теряют инфекционность одонитевая матричная ДНК и продукты неполной элонгации и лигирования (рис. 8.2).

МЕТОД ПЕРЕКРЫВАЮЩИХСЯ ПЦР-ПРОДУКТОВ (OVERLAP PCR)

В данном методе сайт-направленного мутагенеза используются две пары синтетических олигонуклеотидов для амплификации с по-

мощью ПЦР двух линейных фрагментов ДНК, имеющих общую область перекрытия, в которой располагают нуклеотидные замены (рис. 8.3). Праймеры FM и RM содержат нуклеотидную замену и комплементарны разным цепям плазмидной ДНК, праймеры F2 и R2 полностью комплементарны соответствующим участкам разных цепей. На следующем этапе эти два фрагмента ДНК смешивают после очистки и создают условия для их денатурации и формирования гетеродуплекса. После чего проводится достройка выступающих одонитевых концов молекул ДНК, спаренных в области гена-мишени, и последующая ПЦР-амплификация фрагмента с праймеров, отжигаемых на выступающих 3'-концах. Полученный фрагмент ДНК используется для субклонирования по уникальным сайтам рестрикции взамен нативного участка гена.

Надо отметить, что сайт-направленный мутагенез с использованием ПЦР-амплификации является более простой и быстрой альтернативой методу с применением фага M13 — при помощи перекрывающихся ПЦР-продуктов можно вносить точечные мутации в клонированный ген без необходимости встраивания гена в ДНК M13, использования мутантных по *dut ung* штаммов *E. coli* и переноса мутантного гена из фага M13 в экспрессирующий вектор. Мутагенез с использованием «вырожденных» олигонуклеотидных праймеров (т.е. таких, в одном из сайтов которых находятся разные нуклеотиды) позволяет получить гены со случайными мутациями, что бывает важно при отсутствии информации о том, какую конкретную роль играет в функционировании белка тот или иной аминокислотный остаток.

Необходимые реактивы и растворы:

- набор для проведения ПЦР;
- набор для выделения ДНК из агарозных гелей;
- чистый (96%-ный) этиловый спирт и 70%-ный раствор этанола в воде;
- стерильный буферный раствор TE — см. приложение 1.

Методика

1. Выделить ДНК плазмиды, содержащей мутагенизируемый фрагмент ДНК.

2. Составить и синтезировать две пары праймеров: FM и RM, F2 и R2. Схема их расположения на мутагенизируемой области представлена на рис. 8.3.

3. С помощью ПЦР амплифицировать два перекрывающихся фрагмента ДНК (фрагмент А и фрагмент Б), содержащих в своем

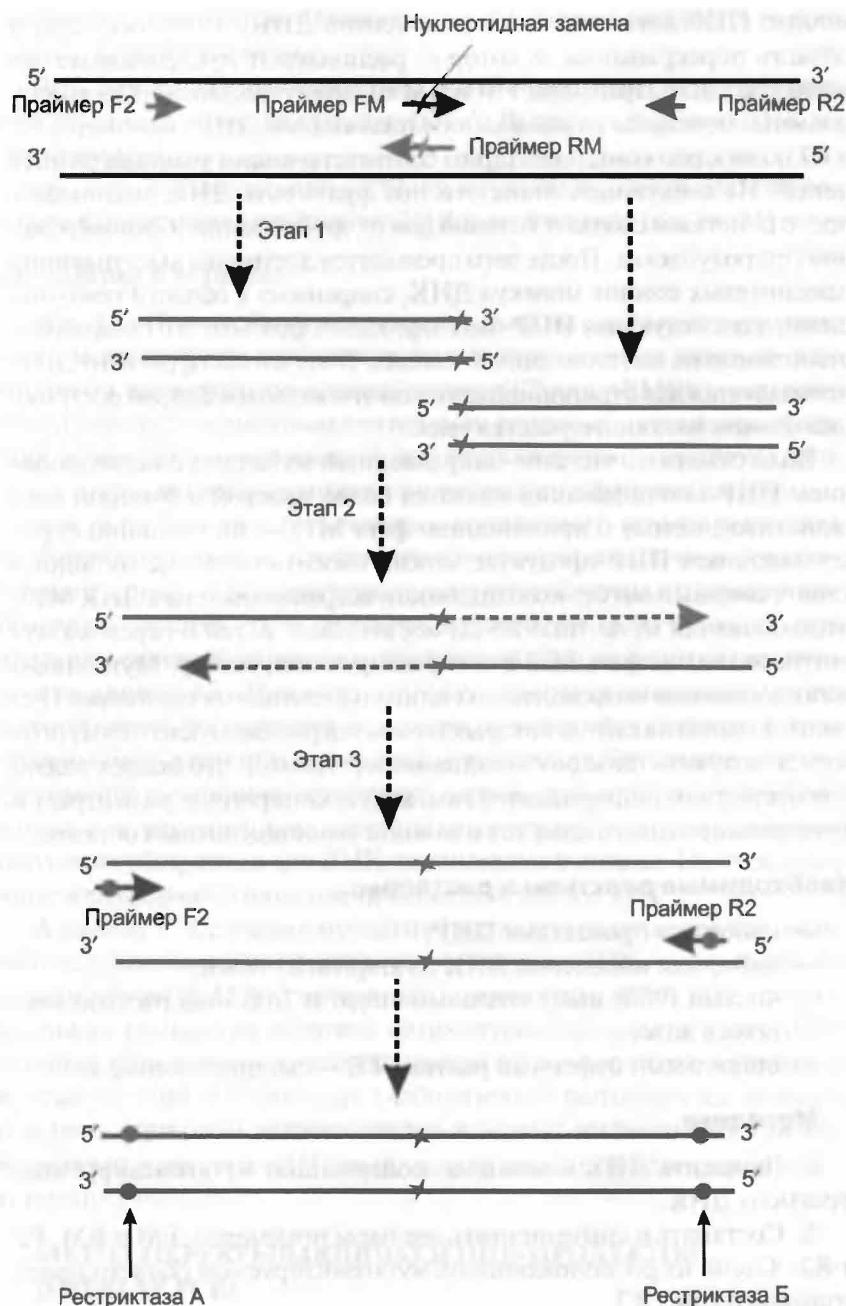


Рис. 8.3. Схема осуществления олигонуклеотид-направленного мутагенеза методом «overlap PCR»

составе вносимую мутацию. Соответственно в одном случае используют праймеры FM и R2, в другом — RM и F2.

4. Получить свободные от ДНК-матрицы препараты фрагментов А и Б, выделив соответствующие их размерам полосы из агарозного геля, как это рекомендовано в подглаве 3.2.

5. Определить концентрацию синтезированных фрагментов ДНК, проведя их сравнительный анализ в агарозном геле со стандартными концентрациями ДНК (маркерами) или измерив оптическую плотность растворов при 260 нм с помощью спектрофотометра.

6. В тонкостенной пробирке для ПЦР смешать следующие компоненты: ДНК фрагментов А и Б (приблизительно по 50 нг каждого), буфер для ПЦР (10×) — 10 мкл, термостабильная ДНК-полимераза — 1 ед. Довести объем реакционной смеси до 100 мкл и поместить пробирку в прибор-амплификатор. Провести реакцию объединения и достройки фрагментов ДНК согласно следующей программе: 95°C — 3 мин, T_m — 3 мин, 95°C — 3 мин; всего 7–10 циклов (T_m — расчетная температура «отжига» перекрывающегося участка).

7. Для амплификации «сшитых» фрагментов ДНК внести в реакционную смесь праймеры F2 и R2 (30 пмоль каждого олигонуклеотида) и провести ПЦР согласно рекомендациям, предложенным в гл. 2.

8. Для очистки полученного препарата ДНК выделить из агарозного геля полосу, отвечающую размерам ПЦР продукта, полученного с использованием праймеров F2 и R2.

9. Осуществить субклонирование полученного мутантного фрагмента ДНК взамен нативного на плазмидном векторе по уникальным выбранным сайтам рестрикции. Процедуру выполнить согласно рекомендациям, описанным в гл. 7.

10. Подтвердить присутствие вносимой мутации, проведя секвенирование мутантной области с использованием праймеров F2 и R2 (см. гл. 11).

Дополнения к методике

Кп. 2. При конструировании олигонуклеотидных праймеров для амплификации фрагментов необходимо руководствоваться следующими рекомендациями. Для проведения эффективного мутагенеза обычно достаточно олигонуклеотидов длиной в 30–40 оснований, подобранных таким образом, чтобы вероятность образования стабильных вторичных структур была минимальной. Нуклеотидные последовательности мутагенных праймеров FM и RM должны пе-

рекрываться как минимум на 15 нуклеотидов, а вводимая мутация располагаться в середине этих нуклеотидов. На 5'-концах праймеров F2 и R2 можно добавить уникальные сайты узнавания рестриктаз для последующего субклонирования мутантного фрагмента взамен нативного. Другим подходом может быть внесение на 5'-концы этих праймеров последовательностей, достаточных для осуществления интеграции фрагмента в состав бактериальной хромосомы, например с помощью Red-зависимой рекомбинации (см. подглаву 8.4).

8.4.

МОДИФИКАЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ХРОМОСОМ С ПОМОЩЬЮ ФАГОВЫХ СИСТЕМ РЕКОМБИНАЦИИ

Мощным инструментом в исследовании возможных функций генов является направленная модификация бактериальных хромосом (делеция генов, внесение точечных мутаций, изменение регуляторных областей и пр.). Получение этих генетических изменений основывается на способности бактерий к гомологичной рекомбинации, т. е. к комплементарному спариванию между цепями ДНК, принадлежащими разным рекомбинирующим дуплексам.

Обычно для получения хромосомных перестроек пользуются специальными штаммами с так называемым «гиперрекомбинационным» фенотипом. В качестве примера такого штамма можно привести штамм *E. coli* JC7623, содержащий *recB*, *recC*, *sbcB* мутации. Однако данный подход обладает одним существенным недостатком. Как известно, для гомологичной рекомбинации необходимо наличие довольно протяженных участков гомологии. Поэтому получение требуемой модификации занимает существенное время из-за большого количества *in vitro* процедур. Кроме того, использование строго определенных штаммов накладывает ограничения на применение этого метода.

Другим подходом для получения хромосомных модификаций является использование фаговых систем рекомбинации. Эффективность применения таких систем, по меньшей мере, в 50 раз выше по сравнению с предыдущим подходом. Для осуществления рекомбинационного события в данном случае достаточно коротких участков гомологии длиной всего в 35–40 нуклеотидов. Современная технология позволяет включать эти последовательности в состав олигонуклеотидных праймеров для ПЦР и тем самым упрощает процедуру. Еще одним достоинством этого метода является возможность его применения для довольно широкого круга микроорганизмов.

ПОЛУЧЕНИЕ МАРКИРОВАННЫХ ДЕЛЕЦИЙ НА ХРОМОСОМЕ *E. coli*

Предлагаемый метод основывается на способности Red-системы бактериофага лямбда осуществлять высокоэффективную рекомбинацию линейных фрагментов ДНК в клетках *E. coli*. Red-система фага λ состоит из трех белковых компонентов, кодируемых генами *exo* (*red α*), *bet* (*red β*) и *gam* (*red γ*). Гены *exo*, *bet* и *gam* являются ранними фаговыми генами, организованными в оперон, выражение которого осуществляется с P_L промотора. Белок Exo — высокопроцессивная экзонуклеаза, расщепляющая одну цепь из двухцепочечной ДНК в направлении $5' \rightarrow 3'$. Белок Bet обладает способностью связываться с одноцепочечной ДНК и предотвращать ее деградацию клеточными нуклеазами. Кроме того, этот белок обеспечивает комплементарное спаривание между гомологичными участками ДНК, а также катализирует ограниченный тип замещения одной цепи в двухцепочечной молекуле. Третий компонент Gam определяет эффективность функционирования Red-системы. Показано, что этот белок способен связываться с RecB субъединицей нуклеазы RecBCD и ингибировать ее активность.

Ниже приведена методика для получения хромосомной модификации *E. coli* (делеции гена) с помощью Red-системы фага лямбда (рис. 8.4). В основе данного подхода лежит замещение практически любого участка хромосомы *E. coli* (не приводящее к летальной мутации) на нуклеотидную последовательность, содержащую генетический маркер (например, ген антибиотической устойчивости), который позволяет вести селективный отбор трансформантов. Как уже упоминалось, для осуществления Red-зависимой рекомбинации достаточно коротких, длиной всего 35–40 нуклеотидов, участков гомологии. Данные последовательности легко могут быть добавлены в состав олигонуклеотидных праймеров, используемых для ПЦР-амплификации линейного фрагмента ДНК с маркером селекции. Далее этим фрагментом ДНК трансформируются клетки *E. coli* с индуцированными генами Red-системы фага лямбда.

Отбор трансформантов ведется по фенотипу, придаваемому клеткам генетическим маркером селекции (в приведенном примере — по устойчивости к хлорамфениколу). Присутствие хромосомной модификации (если замена не приводит к отчетливому фенотипу) в полученных трансформантах подтверждается с помощью ПЦР, проводимой с использованием олигонуклеотидных праймеров, находящихся по обеим сторонам от делеции (рис. 8.4). Расположение проверочных праймеров выбирается таким образом, чтобы можно было

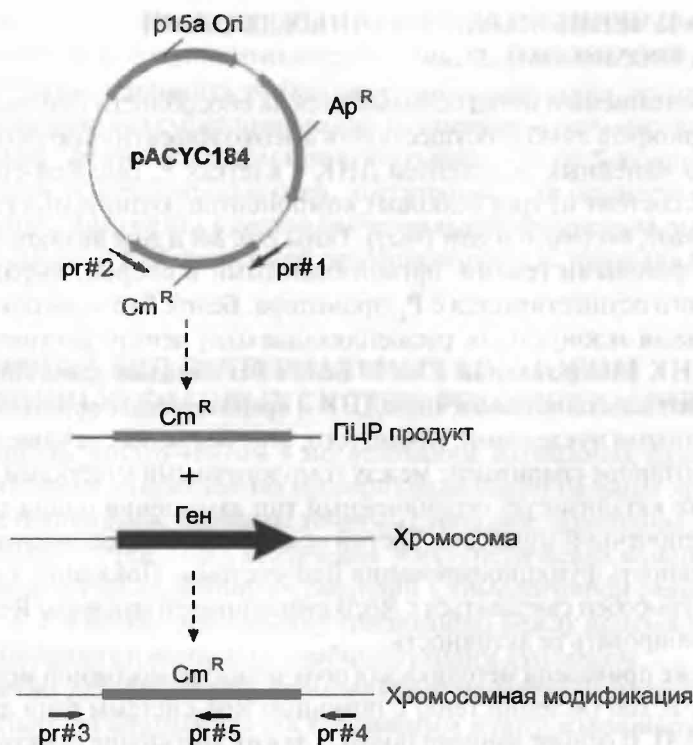


Рис. 8.4. Схема эксперимента по встраиванию гена *cat* в хромосому *E. coli*, приводящему к делеции гена *thrA*, с помощью метода Red-зависимой рекомбинации

судить о произошедшей замене по изменению размера амплифицируемого с них фрагмента ДНК. В качестве отрицательного контроля на наличие делеции используется ДНК из исходного штамма.

Стоит заметить, что применение данного метода ограничено небольшим числом бактерий, для которых продемонстрирована возможность осуществления Red-зависимой рекомбинации при экспрессии соответствующих генов. Помимо *E. coli*, это *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, а также *Pantoea ananatis*. Однако увеличивающийся объем публикаций показывает интерес исследователей к данному подходу, что внушает надежду о скором использовании метода Red-зависимой рекомбинации на более широком круге микроорганизмов.

Необходимые реактивы и растворы:

- стерильная среда LB в жидком и агаризованном (1,2%) виде — см. приложение I;

- стерильные среды SOB и SOC — см. приложение 1;
- стерильный раствор арабинозы (150 мг/мл, 1 М);
- стерильная дистиллированная вода с высоким значением омического сопротивления (стандарта Milli-Q);
- растворы ампициллина и хлорамфеникола — см. приложение 1.

Методика

А. Приготовление линейного фрагмента ДНК

1. Сконструировать и синтезировать олигонуклеотидные праймеры (праймер_1 и праймер_2), содержащие в своем составе участки, которые гомологичны последовательности генетического маркера и последовательности хромосомы, куда вносится модификация. Таким образом, эти олигонуклеотиды состоят из двух частей. В своей 5'-области они представляют собой участок ДНК, гомологичный последовательности инактивируемого гена (обычно длиной в 35–40 оснований), а на 3'-конце содержат область, гомологичную последовательности генетического маркера, выбранного для селекции рекомбинантных бактерий (обычно 24–28 оснований). На рис. 8.5 приведен пример составления олигонуклеотидных праймеров. В данном примере ген *cat* плазмиды pACYC184 («Fermentas», Литва) используется в качестве матрицы для ПЦР. Полученный в этой реакции фрагмент ДНК служит для делетирования гена *thrA* на хромосоме *E. coli*.

2. Используя синтезированные праймер_1 и праймер_2, амплифицировать фрагмент ДНК, содержащий генетический маркер, по которому будет вестись дальнейшая селекция (*thrA'*-*cat*-*'thrA*). Для этой цели рекомендуется использовать следующую программу амплификации с помощью ПЦР: а) денатурация ДНК: 95°C — 5 мин; б) первичная амплификация фрагмента: 95°C — 30 с; 50°C — 30 с; 72°C — 1 мин (10 циклов); в) вторичная амплификация фрагмента: 95°C — 30 с; 68°C — 1 мин (30 циклов); г) достройка: 72°C — 10 мин.

3. Освободить полученный раствор ДНК от плазмидной ДНК. Для этого необходимо очистить препарат фрагмента ДНК, выделив соответствующую полосу из агарозного геля после электрофореза (см. гл. 3), либо обработать полученный препарат рестрицирующей эндонуклеазой *DpnI* (см. подглаву 7.1).

4. Переосадить ДНК этанолом и растворить в 20–50 мкл стерильной воды с высоким значением омического сопротивления.

5. Определить концентрацию ДНК в растворе спектрофотометрическим способом (см. подглаву 1.4). Конечная концентрация линейного фрагмента ДНК должна составлять 50–100 нг/мкл.

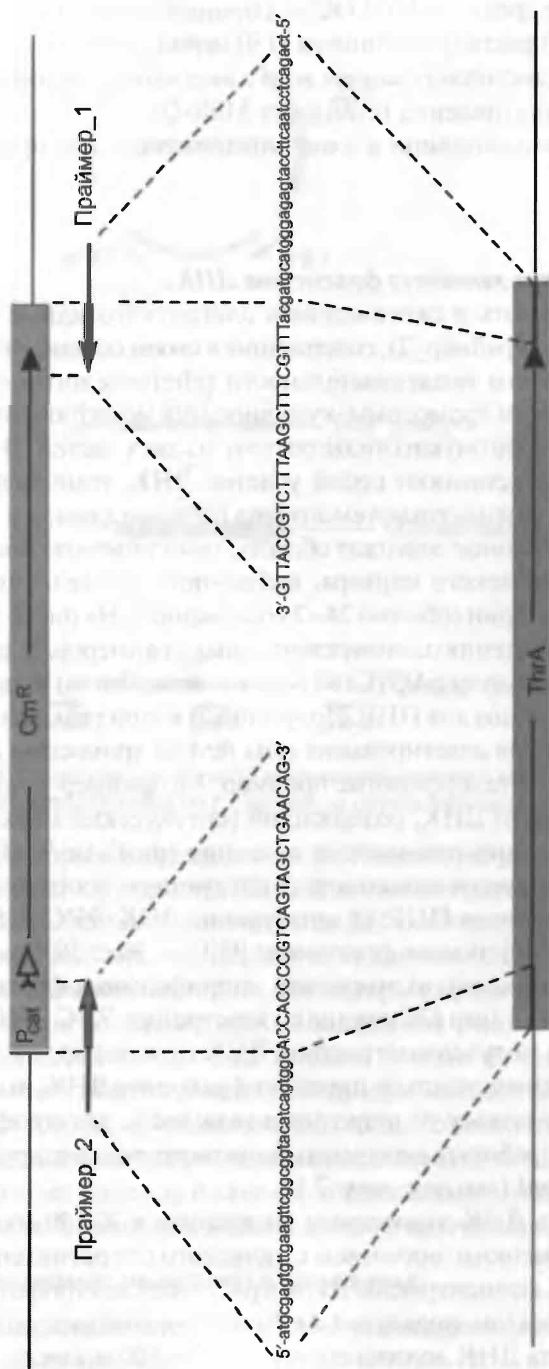


Рис. 8.5. Структура олигонуклеотидных праймеров, используемых при амплификации гена устойчивости к хлорамфениколу, для последующего делектирования гена *thrA* с помощью метода Red-зависимой рекомбинации

Б. Получение компетентных клеток *E. coli*, трансформированных плазмидой *pKD46*

1. Трансформировать культуру штамма, в хромосому которого вносится делеция, плазмидой *pKD46* (рис. 8.6). Данная плазмида содержит все три гена *Red*-системы фага лямбда под контролем промотора P_{araB} , индуцируемого арабинозой. Селекцию трансформантов проводить по устойчивости к ампициллину. Заметим, что *pKD46* содержит *repA101ts* репликон, поэтому отбор устойчивых к ампициллину трансформантов необходимо проводить при 30°C.

2. Засеять одиночную колонию полученного на предыдущем этапе штамма *E. coli* в микробиологическую пробирку с 5 мл жидкой среды LB, содержащей ампициллин. Поместить пробирку на качалку (240 об/мин) и инкубировать при 30°C в течение 12–14 ч.

3. В две микробиологические пробирки, содержащие по 10 мл жидкой среды SOB с ампициллином, добавить по 100 мкл клеточной суспензии из пробирки с ночной культурой. Для индукции экспрессии генов *Red*-системы внести в эти пробирки по 100 мкл раствора L-арабинозы (конечная концентрация в среде — 10 мМ).

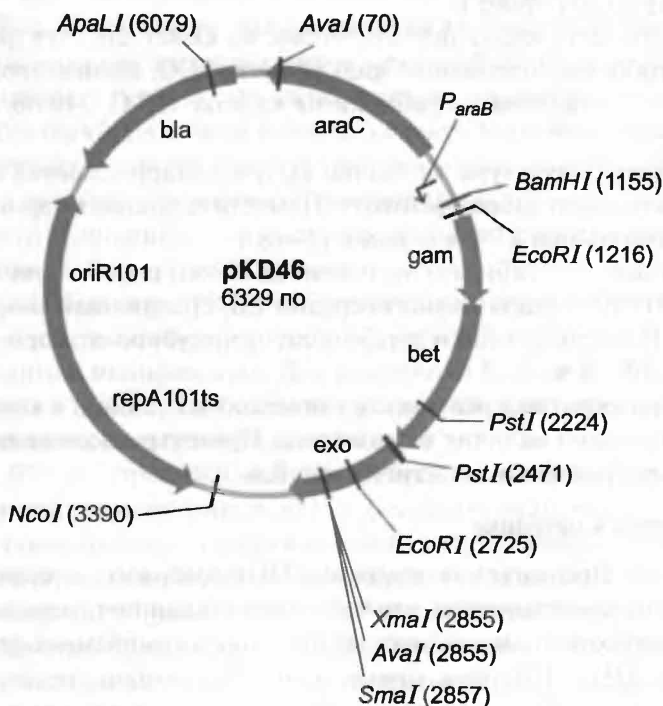


Рис. 8.6. Рестрикционно-генетическая карта плазмидного вектора *pKD46*

4. Инкубировать пробирки на качалке при 30°C и 240 об/мин до достижения относительной оптической плотности культуры при 540 нм около 0,6–0,8 (обычно это занимает 3–5 ч).

5. Осадить клетки на центрифуге (5000 g, 1–2 мин). Трижды промыть биомассу **равным объемом** ледяной (4°C) стерильной воды с высоким значением омического сопротивления. После этого ресуспендировать осадок клеток в **200 мкл** такой воды. Поместить клеточную суспензию в лед.

В. Электропорация клеток *E. coli*, содержащих плазмиду *pKD46*, линейным фрагментом ДНК и отбор устойчивых трансформантов

1. Поместить две стерильные микроцентрифужные пробирки в лед. В одну из них добавить **10 мкл** полученного ранее фрагмента ДНК (см. п. А).

2. Внести в пробирки **по 100 мкл** культуры компетентных клеток, тщательно перемешать и поместить смеси в заранее охлажденные кюветы для проведения электропорации.

3. Осуществить электропорацию клеток согласно методике, представленной в подглаве 4.2, и рекомендациям производителя используемого прибора.

4. Перенести клеточную суспензию из кювет для электропорации в пробирки, содержащие жидкую среду SOC, заранее прогретую до 37°C. Инкубировать пробирки на качалке (37°C, 240 об/мин) в течение 2 ч.

5. Высеять культуры на чашки Петри с агаризованной средой LB, содержащей хлорамфеникол. Поместить чашки в термостат и инкубировать при 37°C в течение 12–18 ч.

6. Рассеять антибиотикоустойчивые клоны штрихом на свежие чашки Петри с агаризованной средой LB, содержащей хлорамфеникол. Поместить чашки в термостат и инкубировать при 37°C в течение 12–18 ч.

7. Провести экспресс-анализ отобранных клонов с помощью ПЦР на предмет наличия делеции гена. Пример расположения проверочных праймеров показан на рис. 8.4.

Дополнения к методике

К п. А2. Предлагаемая программа ПЦР содержит две серии циклов. Вначале учитывается, что на ранней стадии полимеразной реакции только часть используемых праймеров комплементарна матричной ДНК. Поэтому отжиг олигонуклеотидов ведется при пониженной (50°C) температуре. Как известно, далее амплифицируются уже синтезированные на предыдущем этапе фрагменты ДНК,

с которыми используемые праймеры гомологичны по всей длине. Исходя из этих соображений температура отжига олигонуклеотидов поднята до 68°C. Поскольку эффективность функционирования *Taq*-полимеразы при такой температуре заметно не снижена, то стадии отжига олигонуклеотидов и элонгации цепи объединены на данном этапе ПЦР-программы.

К п. А3. Если не удалить из амплифицированной смеси плазмидную ДНК, то при дальнейшем отборе хлорамфеникол-устойчивых трансформантов абсолютное большинство из них будет содержать плазмиду, поскольку эффективность трансформации значительно превышает частоту рекомбинации. Поэтому важно очистить полученный препарат от ДНК-матрицы. Это можно осуществить либо выделив амплифицированный фрагмент ДНК из агарозного геля, либо деградировав плазмидную ДНК обработкой рестриктазой *DpnI* («Fermentas», Литва), поскольку известно, что данная эндонуклеаза рестрикции специфична только к метилированной ДНК.

К п. Б и всей методике. Согласно исследованиям, экспрессия генов Red-системы фага лямбда токсична для бактерий. При долгом культивировании штамма с *red*-генами эффективность рекомбинации падает. Возможным объяснением данного факта является отбор бактерий, в которых выражение генов Red-системы снижено или отсутствует. В связи с этим рекомендуется хранить стоковый раствор культуры в замороженном состоянии (при –70°C в растворе 25%-ного глицерина) и пользоваться только свежевыращенным штаммом.

К п. Б1. Плаزمида pKD46 обладает температурочувствительным репликоном, что позволяет легко избавиться от нее после получения необходимой модификации. Для выражения Red-оперона в клетках *E. coli* можно также воспользоваться штаммом с интегрированными в состав хромосомы генами *gam*, *bet* и *exo*.

К п. В7. Для проверки наличия требуемой модификации у трансформантов, выросших на среде с хлорамфениколом, можно использовать также праймер, гомологичный нуклеотидной последовательности генетического маркера, выбранного для селекции (ген *cat*). В качестве второго праймера для ПЦР используется олигонуклеотид, гомологичный близлежащему району хромосомной ДНК (рис. 8.4). В данном случае амплифицируемый фрагмент ДНК обнаруживается только у тех $Ст^R$ -трансформантов, которые содержат сконструированную модификацию.

САЙТ-НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ С ПОМОЩЬЮ RED-СИСТЕМЫ ФАГА ЛЯМБДА

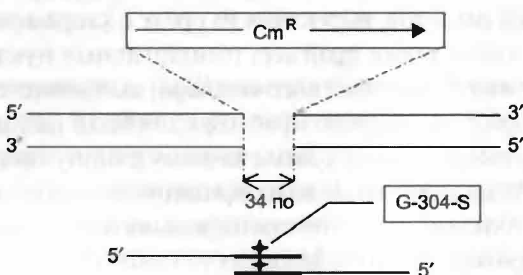
Предлагаемая методика является модифицированным вариантом изложенного в предыдущем разделе метода, который основан на использовании Red-зависимой рекомбинации. Схема эксперимента представлена на рис. 8.7.

Как видно из схемы, замена нуклеотидов в определенном положении осуществляется в два этапа. На первом этапе в район модифицируемой позиции вносится небольшая (30–40 нуклеотидов) маркированная делеция с помощью вышеописанного метода Red-зависимой рекомбинации. Отбор бактерий с такой хромосомной модификацией ведется по устойчивости к антибиотику (в приведенном примере — к хлорамфениколу). На следующем этапе полученный штамм вновь трансформируется плазмидой pKD46 (либо наличие этой плазмиды постоянно поддерживается ампициллином, а все операции осуществляются при 30°С).

Дальше используется способность белков Red-системы способствовать рекомбинации между гомологичными участками хромосомы и одноцепочечными перекрывающимися фрагментами ДНК. В результате данного процесса встроенный в хромосому на предыдущем этапе антибиотический маркер удаляется, а рамка считывания гена восстанавливается. Отбор таких бактерий ведется по появляющемуся после такой реорганизации фенотипу, в приведенном примере — по способности бактерии использовать ксилозу в качестве единственного источника углерода. Как видно из рис. 8.8, любые точечные мутации могут вноситься в состав олигонуклеотидов в районе их перекрывания.

Предлагаемый метод имеет неоспоримое преимущество перед теми подходами, которые представлены в подглаву 8.3, поскольку он не требует клонирования участка ДНК, подвергаемого мутагенезу; все операции осуществляются непосредственно на бактериальной хромосоме. Кроме того, ПЦР непосредственно не используется для создания мутации, что полностью исключает возможность внесения дополнительной случай-

Рис. 8.7. Схема эксперимента по внесению нуклеотидной замены в хромосому *E. coli* с помощью метода Red-зависимой рекомбинации



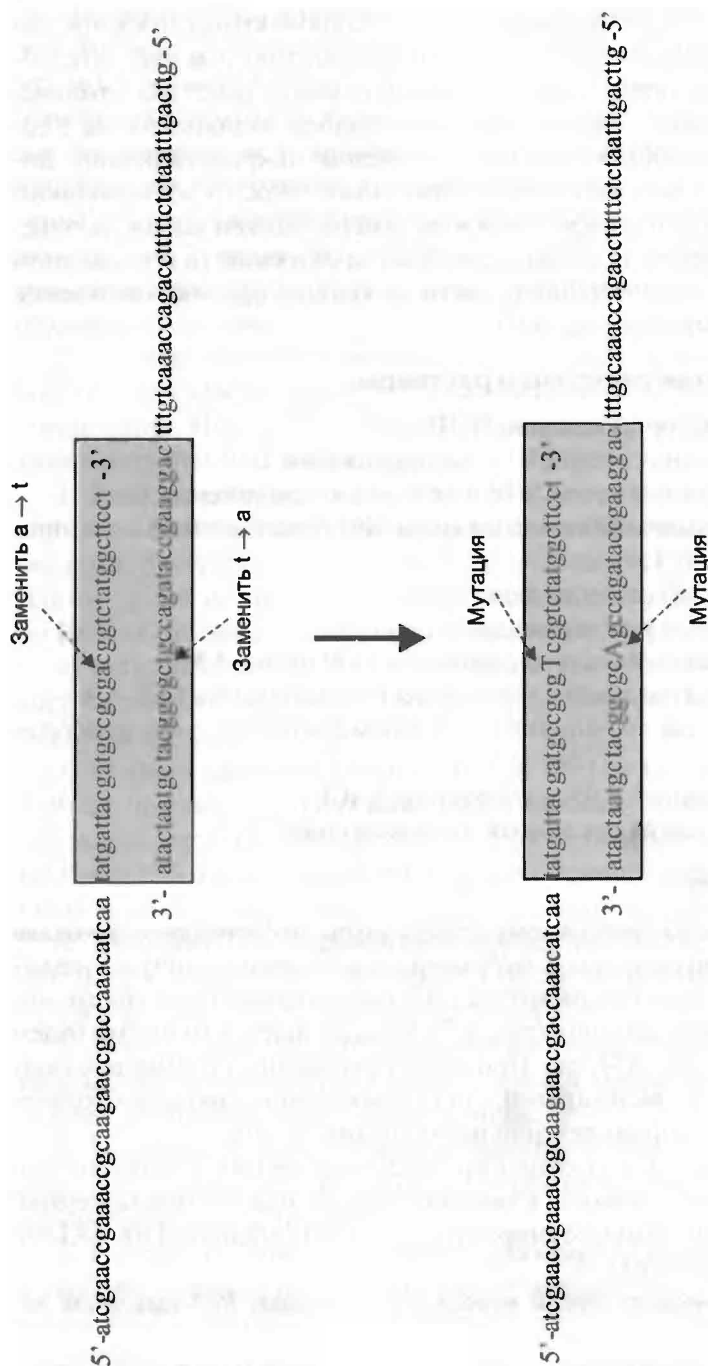


Рис. 8.8. Структура перекрывающихся олигонуклеотидных праймеров для внесения точечной мутации в ген *xylA* на хромосоме *E. coli*

ной замены при амплификации ДНК. В данном подходе нуклеотидная замена осуществляется на этапе химического синтеза олигонуклеотидов. Однако применение предлагаемого метода имеет ряд ограничений. Во-первых, как это уже упоминалось, использование Red-системы ограничено небольшим числом микроорганизмов. Во-вторых, не во все участки хромосомы можно вносить мутации таким способом: ген, в который вносится замена, должен выражать определенный фенотип, позволяющий вести селекцию (в приведенном примере — это способность расти на ксилوزه при восстановлении рамки считывания гена *hxlA*).

Необходимые реактивы и растворы:

- набор для проведения ПЦР;
- стерильная среда LB — см. приложение 1;
- стерильные среды SOB и SOC — см. приложение 1;
- стерильная минимальная среда M9 (агаризованная) — см. приложение 1;
- 40%-ный раствор глюкозы;
- 40%-ный раствор ксилозы;
- стерильный раствор арабинозы (150 мг/мл, 1 М);
- стерильная дистиллированная вода (стандарта Milli-Q);
- растворы ампициллина и хлорамфеникола — см. приложение 1;
- стерильный 0,9%-ный раствор NaCl;
- 96%-ный охлажденный этиловый спирт.

Методика

A. Внесение маркированной делеции вокруг модифицируемой позиции

1. Получить штамм *E. coli*, содержащий маркированную хлорамфениколом делецию размером в 34 нуклеотидные пары вокруг модифицируемой позиции (рис. 8.7). В дальнейшем этот штамм будем называть *E. coli* Δ34::cat. При конструировании штамма руководствоваться рекомендациями, описанными выше в разделе «Получение маркированных делеций на хромосоме *E. coli*».

2. Убедиться в сохранении плазмиды pKD46 у полученного штамма (по устойчивости к ампициллину). Если же плазида утеряна, то необходимо трансформировать штамм плазмидной ДНК pKD46, как это описано в гл. 4.

Б. Сайт-направленный мутагенез с помощью Red-зависимой комбинации

1. Сконструировать и синтезировать олигонуклеотидные прай-

меры (праймер_mp1 и праймер_mp2), организованные таким образом, чтобы их 3'-концевые участки перекрывались. Структура праймеров представлена на рис. 8.8. Размер их перекрываемой части составляет 34 нуклеотида, кроме того, их последовательность должна точно совпадать с делетированным участком на хромосоме *E. coli*, за исключением тех позиций, куда вносится нуклеотидная замена (мутация). Размер выступающих 5'-концевых участков праймеров — не меньше, чем 35 нуклеотидов длиной. Эти участки должны быть гомологичны нуклеотидной последовательности хромосомы по обеим сторонам от делеции.

2. Засеять одну колонию штамма *E. coli* $\Delta 34::cat$ (pKD46) в микробиологическую пробирку с 5 мл жидкой среды LB, содержащей ампициллин. Поместить пробирку на качалку (240 об/мин) и культивировать при 30°C в течение ночи (12–14 ч).

3. В две микробиологические пробирки, содержащие по 10 мл жидкой среды SOB с ампициллином, добавить по 100 мкл клеточной суспензии из пробирки с ночной культурой (разведение культуры 1 : 100). Для индукции экспрессии генов Red-системы внести в эти пробирки по 100 мкл раствора L-арабинозы (концентрация в среде — 10 мМ).

4. Инкубировать пробирки на качалке при 30°C и 240 об/мин до достижения относительной оптической плотности культуры при 540 нм около 0,6–0,8.

5. Осадить клетки на центрифуге при 5000 g в течение 1–2 мин. Трижды промыть культуры **равным объемом** ледяной (4°C) стерильной воды с высоким значением омического сопротивления (Milli-Q H₂O) или 10%-ным глицерином. Ресуспендировать клетки в 200 мкл такой воды или глицерина. Поместить клеточную суспензию в лед.

6. Поместить две стерильные микроцентрифужные пробирки в лед. В одну из них (проба А) добавить по 50 пмоль ДНК праймеров mp1 и mp2. Во вторую (проба Б) ничего добавлять не нужно.

7. Внести в эти пробирки по 100 мкл компетентной культуры, тщательно перемешать и поместить смеси в заранее охлажденные кюветы для проведения электропорации.

8. Немедленно провести электропорацию клеток согласно методике, представленной в подглаве 4.2, и рекомендациям производителя используемого прибора.

9. Перенести клеточную суспензию из кювет для электропорации в пробирки, содержащие по 1 мл жидкой среды SOC, заранее подогретой до 37°C. Инкубировать пробирки на качалке (37°C, 240 об/мин) в течение 2 ч.

10. Осадить клетки на центрифуге при 5000 g в течение 1–2 мин. Промыть биомассу **равным объемом** стерильного 0,9%-ного раствора NaCl. Ресуспендировать клетки в **500 мкл** этого же раствора.

11. Высеять клеточные суспензии на чашки Петри с селективной средой (в предлагаемом примере это чашки с агаризованной минимальной средой M9, содержащей ксилозу в концентрации 0,4%). Поместить чашки в термостат и инкубировать при 37°C до появления на чашках с культурой А отдельных бактериальных колоний. Чашки с пробой Б должны быть чистыми (это контроль на неспособность штамма *E. coli* Δ34::cat расти на данной среде).

12. Убедиться в неспособности выросших на селективной среде бактерий расти в присутствии антибиотика (хлорамфеникола), к которому устойчив штамм *E. coli* Δ34::cat. Подтвердить наличие внесенной мутации с помощью сиквенса.

Дополнения к методике

К п. А2 и всей методике. Как уже упоминалось в дополнениях к методу внесения маркированных делеций с помощью генов Red-системы фага лямбда, при продолжительном культивировании штамма, содержащего данные гены, эффективность рекомбинации падает. Поэтому на данном этапе рекомендуется элиминировать «старую» плазмиду rKD46, инкубируя полученный штамм на среде без ампициллина при 42°C и отобрав чувствительные к этому антибиотику колонии. Далее следует трансформировать данный штамм «свежей» плазмидой rKD46 и работать впоследствии именно с ним.

К п. Б11 и всей методике. Существенным ограничением в применении данного метода является необходимость вести отбор бактерий после второго раунда интеграции (удаления кассеты с антибиотическим маркером посредством рекомбинации с перекрывающимися олигонуклеотидами). Выходом из данного положения является использование интегративной кассеты, содержащей как маркер селекции (для внесения делеции), так и маркер контрселекции, позволяющий напрямую отбирать бактерии, утратившие вставку с кассетой. В качестве примера можно привести ген *sacB* из *B. subtilis*, выражение которого в клетках *E. coli* приводит к ингибированию роста бактерий на средах, содержащих сахарозу. Однако применение этого гена в качестве маркера контрселекции не всегда позволяет отбирать утерявшие кассету бактерии, поскольку показано, что при использовании такого подхода часто образуются устойчивые к сахарозе мутанты с инактивированным геном *sacB*, но сохранившие вставку в хромосому.

Литература

1. *Bratucci M., Nagarajan V.* Direct selection of cloned DNA in *Bacillus subtilis* based on sucrose-induced lethality // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. P. 3948–3953.
2. *Cerda-Olmedo E., Hanawalt P., Guerola N.* Mutagenesis of the replication point by nitrosoguanidine: map and pattern of replication of the *Escherichia coli* chromosome // J. Mol. Biol. 1968. V. 33. P. 705–719.
3. *Court D., Sawitzke J., Thomason L.* Genetic engineering using homologous recombination // Annu. Rev. Genet. 2002. V. 36. P. 361–388.
4. *Datsenko K., Wanner B.* One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products // Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000. V. 97. P. 6640–6645.
5. *Deng W.P., Nickoloff J.A.* Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site // Anal. Biochem. 1992. V. 200. P. 81–88.
6. *Geisselsoder J., Witney F., Yuckenberg P.* Efficient site-directed *in vitro* mutagenesis // Biotechniques. 1987. V. 5. P. 786–791.
7. *Glickman B.* 2-Aminopurine mutagenesis in *Escherichia coli* // Basic Life Sci. 1985. V. 31. P. 353–379.
8. *Hayashi K., Nakazawa M., Ishizaki Y., Hiraoka N., Obayashi A.* Regulation of inter- and intramolecular ligation with T4 DNA ligase in the presence of polyethylene glycol // Nucleic Acids Res. 1986. V. 14. P. 7617–7631.
9. *Herlitze S., Koenen M.* A general and rapid mutagenesis method using polymerase chain reaction // Gene. 1990. V. 91. P. 143–147.
10. *Ho S., Hunt H., Horton R., Pullen J., Pease L.* Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction // Gene. 1989. V. 77. P. 51–59.
11. *Hutchinson F., Stein J.* Mutagenesis of lambda phage: 5-bromouracil and hydroxylamine // Mol. Gen. Genet. 1977. V. 152. P. 29–36.
12. *Karlinsky J.E.* λ -Red genetic engineering in *Salmonella enterica* serovar typhimurium // Methods Enzymol. 2007. V. 421. P. 199–209.
13. *Kirchhoff F., Desrosiers R.C.* Random mutagenesis of short target DNA sequences via PCR with degenerate oligonucleotides // Methods Mol. Biol. 1995. V. 57. P. 323–333.
14. *Kunkel T.A.* Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection // Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1985. V. 82. P. 488–492.
15. *Kunkel T.A., Bebenek K., McClary J.* Efficient site-directed mutagenesis using uracil-containing DNA // Methods Enzymol. 1991. V. 204. P. 125–139.
16. *Lamberg A., Nieminen S., Qiao M., Savilahti H.* Efficient insertion mutagenesis strategy for bacterial genomes involving electroporation of *in vitro*-assembled DNA transposition complexes of bacteriophage Mu // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. P. 705–712.
17. *Landt O., Grunert H.-P., Hahn U.* A general method for rapid site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction // Gene. 1990. V. 96. P. 125–128.
18. *Lawrence C., Gibbs P., Borden A., Horsfall M., Kilbey B.* Mutagenesis induced by single UV photoproducts in *E. coli* and yeast // Mutat. Res. 1993. V. 299. P. 157–163.
19. *Lesic B., Rahme L.G.* Use of the lambda Red recombinase system to rapidly generate mutants in *Pseudomonas aeruginosa* // BMC Mol. Biol. 2008. V. 4. P. 9–20.
20. *Muniyappa K., Radding C.* The homologous recombination system of phage lambda Pairing activities of beta protein // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. P. 7472–7478.

21. *Murphy K.C.* Use of bacteriophage lambda recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* 1998. V. 180. P. 2063–2071.
22. *Murphy K.C., Campellone K.G.* Lambda Red-mediated recombinogenic engineering of enterohemorrhagic and enteropathogenic *E. coli* // *BMC Mol. Biol.* 2003. V. 13. P. 4–11.
23. *Nabirochkina E.N., Georgieva S.G., Krasnov A.N., Soldatov A.V.* Rapid construction of sequencing templates by random insertion of antibiotic resistance genes // *Biotechniques.* 2002. V. 32. P. 300–304.
24. *Piechocki M.P., Hines R.N.* Oligonucleotide design and optimized protocol for site-directed mutagenesis // *Biotechniques.* 1994. V. 16. P. 702–707.
25. *Poteete A.R.* What makes the bacteriophage lambda Red system useful for genetic engineering: molecular mechanism and biological function // *FEMS Microbiol. Lett.* 2001. V. 201. P. 9–14.
26. *Smith M.* In vitro mutagenesis // *Annu. Rev. Genet.* 1985. V. 19. P. 423–462.
27. *Yu D., Sawitzke J., Ellis H., Court D.* Recombineering with overlapping single-stranded DNA oligonucleotides: testing a recombination intermediate // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. P. 7207–7212.
28. *Zoller M.J., Smith M.* Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any fragment of DNA // *Nucleic Acids Res.* 1982. V. 10. P. 6487–6500.

Радиоактивное мечение ДНК часто осуществляют с использованием случайной олигонуклеотидной затравки (*random primer*). Синтез комплементарной цепи проводят на денатурированной матричной ДНК, начиная с 3'-конца олигонуклеотидной затравки, при помощи ДНК-полимеразы в присутствии меченых дНТФ. Также используют 5'-концевое мечение синтетических олигонуклеотидов и дефосфорилированных концов ДНК с помощью Т4 полинуклеотидкиназы, катализирующей перенос γ -фосфата от АТФ на 5'-ОН конец ДНК (реакция кинирования).

Нерадиоактивное мечение осуществляют путем добавления меченого биотином или флуоресцеином мононуклеотида (например, биотин-11-дУТФ или флуоресцеин-12-дУТФ) к концевой 3'-ОН группе ДНК. Включение нерадиоактивной метки в ДНК возможно двумя основными способами (с использованием ПЦР и с использованием случайных олигонуклеотидов). Применение нерадиоактивного мечения имеет свои недостатки и преимущества. Основным минусом использования нерадиоактивных проб является их более низкая чувствительность в некоторых методиках по сравнению с радиоактивно мечеными пробами. Однако биотинилированные пробы гораздо более безопасны в работе, кроме того, их можно хранить долгое время при низких температурах.

9.1.

РАДИОАКТИВНОЕ МЕЧЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Выбор нужного метода радиоактивного мечения ДНК зависит от ряда условий: планируемого эксперимента (для использования меченой ДНК в гибридизации по Саузерну/Нозерну, дот-блоттинге, в гибридизации колоний/бляшек или гибридизации *in situ*), вида ДНК-матрицы (клонированная вставка, олигонуклеотид и т.д.) и необходимой чувствительности (например, если требуется обнаружить единственную копию гена).

Обычно применяют метод случайной затравки, мечение при помощи ПЦР, внесение метки на 5'- или 3'-конец ДНК. Первые два

метода являются наиболее чувствительными для Саузерн- и Нозерн-гибридизаций, для дот-блоттинга и гибридизации колоний все упомянутые подходы дают достаточно хорошие результаты. В случае гибридизации *in situ* в основном применяют мечение при помощи ПЦР, внесение метки на 5'- или 3'-конец ДНК и ник-трансляцию. В качестве радиоактивных меток нуклеотидов используют [^{32}P], [^{35}S] и [^3H]. Для получения радиоактивных проб обычно используют элюированные из геля рестрикционные фрагменты ДНК рекомбинантных плазмид, продукты ПЦР, синтетические олигонуклеотиды, РНК-транскрипты. Мы рассмотрим подробно радиоактивное мечение ДНК при помощи стандартных методов — случайной затравки (для фрагментов ДНК) и внесения метки на 5'-конец ДНК (для олигонуклеотидов).

МЕТОД СЛУЧАЙНОЙ ЗАТРАВКИ

Предлагаемый метод основан на способности фрагмента Кленова (большой фрагмент ДНК-полимеразы I *E. coli*) удлинять *in vitro* гомологичную олигонуклеотидную затравку (праймер) по одноцепочной матрице ДНК в 5' → 3' направлении в соответствующем буферном растворе, содержащем необходимые концентрации ионов магния и четырех дезоксирибонуклеотидов. Помимо ДНК-полимеразной активности фрагмент Кленова обладает 3'–5' экзонуклеазной активностью, но он лишен 5'–3' экзонуклеазной активности нативной ДНК-полимеразы I (которая могла бы расщепить новосинтезированные молекулы ДНК).

Если в этом процессе хотя бы один из используемых дезоксирибонуклеотидов содержит радиоактивный атом, например α - ^{32}P , то синтезируемый фрагмент цепи ДНК (обычно размером от 0,2 до 50 тпо) будет содержать радиоактивную метку, практически равномерно распределенную по всей длине молекулы. В дальнейшем эту меченую ДНК можно использовать в качестве радиоактивного зонда в экспериментах по ДНК-ДНК гибридизации (метод переноса по Саузерну, см. подглаву 10.1).

Способ получения радиоактивного зонда методом случайной, или «рассеянной», затравки (*random primer*) заключается в способности коротких (длиной 6–10 оснований) синтетических олигонуклеотидов, составленных в случайной последовательности, служить в качестве универсальных праймеров (затравок) для достройки комплементарной цепи на однострессовой ДНК-матрице. Схема эксперимента представлена на рис. 9.1.

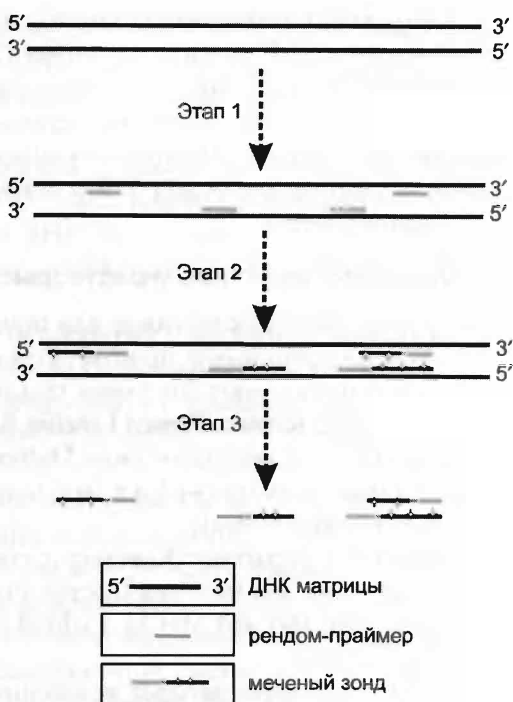
На первом этапе эксперимента двухнитевая исходная ДНК де-

Рис. 9.1. Схема эксперимента по радиоактивному мечению фрагмента ДНК методом случайной затравки

натурируется нагреванием, после чего создаются температурные условия для отжига смеси всех возможных дека- или гексануклеотидов на полученной одонитевой матрице. Затем после случайной гибридизации некоторых олигонуклеотидных праймеров с ДНК-матрицей в реакционную смесь вносят четыре дезоксирибонуклеозидтрифосфата (один из которых радиоактивно меченый), которые используются для синтеза комплементарной

цепи ДНК в присутствии фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I в направлении от 3'-ОН конца праймеров (этап 2). Очистка меченой ДНК от несвязанной радиоактивной метки проводится путем гель-фильтрации на колонке с сефадексом (G-50), а оценка эффективности включения метки в ДНК — на счетчике радиоактивности. После денатурации синтезированной ДНК получается смесь меченых фрагментов (ДНК-зондов), которые вместе составляют полноразмерную исходную ДНК-матрицу (этап 3).

Надо отметить, что концентрация рендом-праймера практически не влияет на размер образующихся продуктов, однако необходимо использовать избыточную по отношению к ДНК-матрице концентрацию праймера, чтобы обеспечить равномерное мечение ДНК. Для достижения высокого удельного включения метки в синтезированную цепь ДНК желательно использовать такое количество ДНК-матрицы, чтобы израсходовать радиоактивно меченый дезоксирибонуклеозидтрифосфат. Иногда ДНК-матрицу метят фотобиотином для ее отделения от новосинтезированной ДНК после прохождения реакции, чтобы избежать конкуренции при последующей гибридизации.



Обнаружение гибридизационного сигнала после гибридизации радиоактивного ДНК-зонда с препаратом ДНК (см. подглаву 10.1) осуществляют с помощью радиоавтографии. На исследуемый образец в темноте накладывают рентгеновскую пленку, в которой под воздействием радиоактивного излучения из бромида серебра образуется металлическое серебро, что детектируется визуально после проявления пленки.

Необходимые реактивы и растворы:

- набор олигонуклеотидов для проведения реакции рендом-мечения (например, производства «Fermentas», Литва). Также часто используют 10× смесь гексануклеотидов (62,5 о.е./мл) из набора **Random Primed Labeling Kit** производства «Roche Diagnostics» (Швейцария) или **Multiprime DNA Labeling System** с декапраймерами (44,1 о.е./мл) производства «GE Healthcare» (Великобритания);
- фермент «фрагмент Кленова» с соответствующим буферным раствором для мечения (состав 10× буфера: 500 мМ трис (pH 7,2–7,5); 100 мМ $MgCl_2$; 1 мМ ДТТ; 2 мг/мл БСА). Хранить при $-20^{\circ}C$;
- 1 мМ растворы четырех дезоксинуклеотидов (дАТФ, дТТФ, дЦТФ, дГТФ). Хранить при $-20^{\circ}C$;
- раствор радиоактивно меченого дезоксинуклеотида (например, $[\alpha\text{-}^{32}P]$ дАТФ) с удельной активностью 3000 Ки/ммоль. Хранить при $-20^{\circ}C$ не дольше двух недель;
- Сефадекс G-50;
- стерильный буферный раствор ТЕ (pH 8,0) — см. приложение 1;
- чистый 96%-ный этанол и 70%-ный раствор этанола в воде;
- стерильный 0,5 М раствор ЭДТА (pH 8,0).

Методика

А. Радиоактивное мечение зонда

1. В микроцентрифужной пробирке смешать равные объемы трех растворов дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (дТТФ, дЦТФ и дГТФ), за исключением меченого $[\alpha\text{-}^{32}P]$ дАТФ. Поместить полученную смесь (смесь А) в лед.

2. В микроцентрифужной пробирке смешать равные объемы всех четырех растворов дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (дАТФ, дТТФ, дЦТФ и дГТФ). Поместить полученную смесь (смесь Б) в лед.

3. В микроцентрифужной пробирке смешать 10–200 нг линей-

ной ДНК-матрицы, на основе которой будет синтезироваться радиоактивный зонд, и **100–150 нг** препарата рендом-прайма. Довести объем реакционной смеси бидистиллированной водой до **30 мкл**.

4. Пробирку плотно закрыть крышкой и поместить в водяную баню с заранее нагретой до **95–100°C** водой. Инкубировать в течение **5–10 мин** для денатурации ДНК. В качестве альтернативы можно проинкубировать пробирку с ДНК при **95,5°C** в течение **3 мин** в приборе-амплификаторе.

5. Немедленно перенести пробирку в лед и инкубировать в течение **1–2 мин** для отжига олигонуклеотидных затравок на ДНК.

6. Сбросить капельки конденсата с крышки пробирки путем центрифугирования (при **5000 g** в течение **5–10 с** при **4°C**) и снова поместить пробирку в лед.

7. В эту микроцентрифужную пробирку внести следующие компоненты: **3 мкл** смеси А (конечная концентрация каждого немеченого дНТФ в реакционной смеси — **20 мкМ**), **5 мкл** буферного раствора (**10×**) для проведения реакции рендом-мечения, а также **5 мкл** из раствора радиоактивно меченого нуклеотида ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ дАТФ (конечная концентрация в реакционной смеси — до **50 мкКи** или **1,85 МБк**). В полученную смесь добавить **5 ед.** фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*. Стерильной бидистиллированной водой довести объем реакционной смеси до **50 мкл**. Добавление в реакционную смесь белка БСА (**0,4 мкг/мл**) позволяет увеличить выход меченого продукта.

Все операции с радиоактивной меткой необходимо проводить в специально оборудованной изотопной лаборатории за защитным экраном и в одноразовых перчатках!

8. Осторожно перемешать смесь, поместить пробирку в термостат на **37°C** и инкубировать в течение **15–20 мин**.

9. Добавить в реакционную смесь **4 мкл** смеси Б и продолжить инкубацию в тех же условиях в течение **10–15 мин**. Скорость включения **>55%** метки ($\pm 1,6 \times 10^9$ распадов/мин на мкг) наблюдается после **30 мин** инкубации.

10. Остановить реакцию, добавив в реакционную смесь **1–2 мкл** **0,5 М** раствора ЭДТА (рН **8,0**) или проинкубировав реакционную смесь при **65°C** в течение **10 мин**. Иногда применяют STOP-буферный раствор следующего состава (**10×**): **50 мМ** трис-НСl (рН **7,5**); **50 мМ** NaCl; **5 мМ** ЭДТА; **0,5%** ДСН (для непосредственной остановки реакции); **50 мкг/мл** ДНК спермы лосося (для предотвращения ДНК-специфической сорбции на G-50 колонке).

11. Полученную меченую ДНК можно использовать сразу или хранить при -20°C . Процент включения метки можно определить с помощью 10%-ной трихлоруксусной кислоты (ТХУ), которая преципитирует длинные молекулы ДНК на стеклянном фильтре (дНТФ остаются в растворе).

Б. Очистка радиоактивного зонда от несвязавшейся метки

Для очистки меченой пробы от несвязавшейся нуклеотидной метки используют несколько различных методов, таких как использование набора **High Pure PCR Product Purification Kit** («Roche Diagnostics», Швейцария), преципитация ДНК этанолом (для очистки фрагментов ДНК), этанольная преципитация с гликогеном или очистка на колонках с Сефадексом (для отделения невключившейся метки от олигонуклеотидов). Очистка радиоактивного зонда необходима для уменьшения фона в экспериментах по гибридизации и для точной количественной оценки несвязавшейся метки.

1. Очистку зонда от невключившейся дНТФ-метки провести на колонке с Сефадексом G-50. Для этого можно воспользоваться уже готовыми колонками «Microspin» (например, производства компании «GE Healthcare», Великобритания) для настольной центрифуги или же приготовить колонку самостоятельно, как это описано ниже.

2. В 500-мл стакан или колбу налить **250 мл** буфера TE (pH 8,0). Осторожно перемешивая, медленно добавить **30 г** Сефадекса G-50. Убедиться в однородности получившейся суспензии (для набухания G-50 требуется некоторое время).

3. Инкубировать суспензию в течение ночи при комнатной температуре. Также можно прогреть ее при 65°C в течение 1–2 ч, после чего охладить до комнатной температуры.

4. Удалить надосадочную жидкость и добавить к осадку такой же объем буфера TE (pH 8,0). Готовый Сефадекс можно хранить в сосуде с плотно закрытой крышкой при 4°C .

5. Аккуратно перемешать раствор Сефадекса G-50 перед использованием (не допуская образования пузырей) и заполнить им стеклянную пипетку объемом 5 мл, плотно заткнутую с одного конца стеклянной ватой. Промыть колонку несколькими объемами буферного раствора TE (pH 8,0). Колонку, концы которой завернуты в полимерную пленку, можно хранить при 4°C .

6. Нанести по центру на колонку с Сефадексом G-50 раствор радиоактивного зонда, полученный на этапе А. Сразу после этого налить буферный раствор TE (pH 8,0) и обеспечить его проток через колонку со скоростью приблизительно 0,5 мл/мин.

7. Через равные промежутки времени собирать пробы (10–15 фракций по 500 мкл), после чего проанализировать распределение радиоактивности на счетчике. Отобрать те фракции, которые составляют первый пик радиоактивности, что соответствует меченому ДНК-зонду. В среднем эффективность мечения ДНК-зондов составляет около 3×10^9 расп./мин на мкг. Набор Random Primed Labeling Kit («Roche Diagnostics», Швейцария) обеспечивает примерно 60%-ное включение метки.

8. Объединить эти фракции в одной микроцентрифужной пробирке. Для этого, при необходимости, осадить ДНК с помощью 96%-ного этанола, промыть 70%-ным этанолом и растворить осадок в небольшом (20–50 мкл) объеме воды. Препарат меченого ДНК-зонда можно хранить при -20°C . Перед гибридизацией меченую ДНК обычно денатурируют инкубацией в 0,2 М NaOH в течение 5 мин.

Дополнения к методике

Чем выше степень очистки препарата ДНК-матрицы, тем выше эффективность мечения. Крайне важно, чтобы ДНК-матрица, используемая при мечении, была предварительно линеаризована и полностью денатурирована при нагревании. Нежелательно растворять препарат ДНК-матрицы в буферных растворах, содержащих ЭДТА, поскольку ЭДТА ингибирует реакцию с использованием случайной затравки.

Для увеличения доли включенной метки в зонд можно использовать 1–2 дополнительных цикла денатурация–отжиг–реакция. Для улучшения включения метки можно также увеличить время реакции мечения, оставляя смесь для инкубации при комнатной температуре на ночь. Реакция достройки «холодными» нуклеотидами (п. А9) необходима для того, чтобы избежать образования коротких, не до конца синтезированных фрагментов ДНК.

При закладке препарата меченого ДНК-зонда на хранение на пробирке необходимо указать дату, общую активность пробы и тип использованной радиоактивной метки. Это позволит рассчитать активность образца к моменту последующего использования.

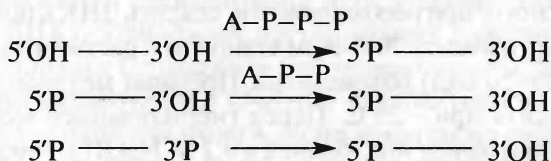
При высокой степени включения метки в зонд (см. формулы для расчетов ниже) очистка меченого препарата от несвязанной метки на Сефадексе G-50 может не проводиться. Однако при постановке гибридизации следует учесть возможное увеличение фона.

Вместо пипетки в качестве колонки можно использовать 2-мл шприц, дно которого забито стекловатой. В этом случае элюцию

проводят с помощью центрифугирования (1500 об/мин, 2 мин), каждый раз нанося на колонку порции буферного раствора ТЕ.

ВНЕСЕНИЕ МЕТКИ НА 5'-КОНЕЦ ДНК

Метод основан на способности полинуклеотидкиназы бактериофага катализировать перенос γ -фосфата от АТФ на 5'-ОН конец ДНК или РНК (*реакция кинирования*). Полинуклеотидкиназа фага Т4 обеспечивает также обмен терминальных 5'-фосфатных групп нуклеиновых кислот и удаляет фосфатные группы с 3'-конца.



Благодаря данному способу можно осуществлять реакцию $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -мечения синтетических олигонуклеотидов, использующихся в качестве специфической пробы при гибридизации, и дефосфорилированных концов ДНК. Ограничением метода является невозможность прямого внесения метки во фрагменты ДНК, полученные после обработки рестриктазой. Для того чтобы это стало возможным, необходима обработка таких фрагментов фосфатазой, поскольку для реакции кинирования требуется, чтобы 5'-конец был предварительно фосфорилирован.

Необходимые реактивы и растворы:

- фермент Т4 полинуклеотидкиназа с буферным раствором для фосфорилирования (например, производства «Fermentas», Литва или «Roche Diagnostics», Швейцария). Состав буфера (10 $\times$): 500 мМ трис; 100 мМ MgCl_2 ; 1 мМ ЭДТА; 50 мМ дитиотреитол; 1 мМ спермидин; pH 8,2;
- водный раствор $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ АТФ с удельной активностью 3000 Ки/моль;
- 0,5 М раствор ЭДТА (pH 8,0);
- Сефалекс G-50;
- буферный раствор ТЕ (pH 8,0) — см. приложение 1;
- 96%-ный ледяной этанол.

Методика

Радиоактивное мечение зонда

1. В микроцентрифужной пробирке во льду последовательно

смешать следующие компоненты: **10–200 пмоль ДНК** (10 пмоль приблизительно соответствуют 1,6 мкг линейаризованной ДНК плазмиды рBR322), **10 мкКи** [γ - ^{32}P] АТФ, **5 мкл** буферного раствора для фосфорилирования (10 $\times$), **5–10 ед.** Т4 полинуклеотидкиназы. Объем реакционной смеси довести до **50 мкл** стерильной бидистиллированной водой.

2. Инкубировать смесь при 37°C в течение 10 мин. При указанных условиях более чем 30% [^{32}P] из [γ - ^{32}P] АТФ включается в ДНК. Время инкубации можно увеличить до 30–60 мин.

3. Остановить реакцию фосфорилирования добавлением **2 мкл** 0,5 М раствора ЭДТА или поместив пробу в лед.

4. Провести очистку радиоактивного зонда от несвязавшейся нуклеотидной метки хроматографией на колонке с Сефадексом G-50, как это описано в предыдущей методике.

Дополнение к методике

Ионы аммония являются сильными ингибиторами Т4 полинуклеотидкиназы. Поэтому при подготовке ДНК для реакции кинирования не используют растворы, содержащие соли аммония.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕЧЕНИЯ И РАСЧЕТ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ДНК-ЗОНДА

1. Развести 1 мкл ДНК-зонда в 100 раз водой или 0,2 М раствором ЭДТА. Нанести по **5 мкл** полученной смеси на два фильтра Whatman DE-81.

2. Фильтры высушить и подписать. Один из них (фильтр №2) трижды промыть **10 мл** 7,5%-ного раствора Na_2HPO_4 для удаления несвязанной метки и высушить.

3. Измерить радиоактивность обоих фильтров на счетчике радиоактивности, после чего рассчитать относительную эффективность включения (v) метки в ДНК по следующей формуле:

$$v = (A_{\text{фильтра №2}} / A_{\text{фильтра №1}}) \times 100\%,$$

где A — радиоактивность соответствующего фильтра.

4. Для расчета специфической активности зонда необходимо сначала рассчитать теоретически максимальный выход меченой ДНК (Y_t), т.е. случай, когда ДНК содержит только меченые нуклеотиды.

Для этого можно воспользоваться формулой:

$$Y_t = (A_{\text{дНТФ}} \times 4 \times 330) / sA_{\text{дНТФ}},$$

где $A_{\text{дНТФ}}$ — суммарная радиоактивность (мкКи), $sA_{\text{дНТФ}}$ — удельная радиоактивность (Ки/ммоль) нуклеотидов, использованных в реакции.

5. Рассчитать количество синтезируемой ДНК (Y) исходя из данных по эффективности включения метки. Расчет ведется по формуле $Y = 0,01 \times v \times Y_r$.

6. Специфическая радиоактивность пробы ($A_{\text{пробы}}$) рассчитывается по формуле $A_{\text{пробы}} = (A_{\text{фильтра №2}} \times V_{\text{пробы}} \times 20) / (Y + C_r)$, где $V_{\text{пробы}}$ — объем пробы ДНК радиоактивного зонда, C_r — суммарное количество ДНК, использованной в качестве матрицы для реакции мечения, и ДНК рендом-праймеров.

ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ МЕЧЕНИЯ РНК

Для гибридизации по Нозерну и дот-блоттинга используют разнообразные методы мечения РНК: с помощью транскрипции *in vitro*, внесение метки на 5'- или 3'-конец. Наиболее чувствительным является метод мечения РНК с помощью транскрипции *in vitro* при использовании ДНК-зависимых РНК-полимераз фагов Т3, Т7 или SP6, специфичных к соответствующему промотору на ДНК-матрице. Промоторные последовательности этих фагов присутствуют на многих плазмидных и космидных векторах. Поэтому в реакционную смесь добавляют рекомбинантную плазмиду, содержащую Т3- или Т7-промотор, с которой будет осуществляться синтез меченой РНК. Продуктами реакции являются гомогенно меченые одноцепочечные молекулы РНК, используемые в дальнейших опытах по гибридизации.

Короткие меченые РНК-транскрипты, соответствующие участкам исследуемых фрагментов ДНК, часто называют *рибозондами*. В качестве включаемой в молекулы метки используют радиоактивные (^{32}P , ^{35}S) нуклеотиды или нерадиоактивные соединения (дигоксигенин, биотин, флуорохромы).

При мечении РНК необходимо принимать во внимание правила работы с РНК как с нестабильными молекулами из-за присутствия в окружающей среде рибонуклеаз (см. подглаву 1.3). Поэтому следует ставить опыт в максимально стерильных условиях и обязательно добавлять в реакционную смесь ингибитор РНКаз. По той же причине в экспериментах по гибридизации желательнее использовать только что полученные рибозонды.

Методика

1. Приготовить в микроцентрифужной пробирке во льду реакционную смесь следующего состава (радиоактивное/нерадиоактивное мечение):

— матричная ДНК — 0,5мкг/1,0 мкг;

— нуклеотиды (конечная концентрация) — АТФ, ГТФ, УТФ (по 0,5 мМ) / АТФ, ГТФ, ЦТФ (по 1 мМ), УТФ (0,65 мМ);

— меченый нуклеотид (конечная концентрация) — $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ ЦТФ (400 Ки/ммоль, 50 мКи — 1,85 МБк/ммоль) / дигоксигенин-, биотин- или флуорохром-УТФ (0,35 мМ);

— транскрипционный буферный раствор (10 $\times$) — 2 мкл. Состав транскрипционного буферного раствора (10 $\times$): 400 мМ трис (рН 8,0); 60 мМ MgCl_2 ; 100 мМ ДТТ; 20 мМ спермидин. Хранить (без добавления нуклеотидов) в аликвотах при -20°C . Дитиотреитол нужен для повышения эффективности реакции;

— РНК-полимераза Т3 или Т7 — 20 ед./40 ед.;

— ингибитор РНКаз — 20 ед.;

— стерильная бидистиллированная вода — довести объем реакционной смеси до 20 мкл.

2. Инкубировать при 37°C в течение 20 мин в случае радиоактивного мечения РНК или в течение 2 ч в случае нерадиоактивного мечения. В данных условиях >50% метки включается в синтезированную молекулу РНК. Для инактивации РНК-полимеразы добавить 2 мкл 0,2 М ЭДТА и проинкубировать реакционную смесь при 65°C в течение 10 мин.

Для мечения выделенной тотальной РНК часто применяют метод с использованием олиго(дТ)-праймера. Реакционная смесь (15 мкл) в этом случае состоит из: олиго(дТ)-праймера (100 мкМ) — 0,5 мкл; РНК — до 15 мкг и стерильной воды. Инкубировать смесь при 70°C в течение 3 мин и затем перенести в лед на 2 мин. Добавить 5 $\times$ буферный раствор FSB (*first strand buffer*) — 8 мкл; ДТТ (0,1 М) — 4 мкл; 20 $\times$ А $^-$ смесь дНТФ (20 мМ каждого) — 1 мкл; ингибитор РНКаз — 0,5 мкл; $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ дАТФ (10 мКи/мкл) — 10 мкл и после перемешивания смеси внести SuperScript RT (200 ед./мкл) — 2 мкл. Инкубировать при 42°C в течение 1 ч и затем перенести в лед. Процент включения радиоактивной метки определяют по преципитации с 10%-ной ТХУ.

9.2.

НЕРАДИОАКТИВНОЕ МЕЧЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Нерадиоактивные зонды с использованием хромогенной, хемилюминесцентной или флуоресцентной детекции (метка с биотином, дигоксигенином, флуоресцеином и т.д.) намного безопаснее в экспериментальной работе по сравнению с радиоактивными зондами.

Кроме того, нерадиоактивно меченые пробы достаточно долго хранятся (по крайней мере в течение года при -20°C) без существенной потери сигнала.

Включение нерадиоактивной метки в ДНК осуществляют в основном двумя способами — с использованием ПЦР и с использованием случайных олигонуклеотидных затравок (*random primers*). Также используют внесение метки (например, биотин-16-ддУТФ или дигоксигенин-11-ддУТФ) на 3'-конец олигонуклеотидов при помощи терминальной трансферазы.

Нерадиоактивно меченые нуклеиновые кислоты находят широкое применение в гибридизациях/блоттингах по Саузерну и Нозерну, скрининге геномных библиотек, гибридизациях *in situ*.

После проведения блоттингов или гибридизаций в растворе ДНК, меченную флуоресцеином, выявляют по флуоресценции (длина волны возбуждения для флуоресцеин-12-дУТФ равна 495 нм, длина волны излучения — 525 нм) или в ходе непрямой реакции с использованием антител к флуоресцеину и образованием окрашенного продукта. Биотинилированную ДНК можно обнаружить путем непрямой реакции с образованием окрашенного продукта (например, методом связывания биотина конъюгатом стрептавидин—щелочная фосфатаза с последующей реакцией с 5-бромо-4-хлоро-3-индолил фосфатом [BCIP] и нитроголубым хлоридом тетразолия [NBT], которая катализируется щелочной фосфатазой и дает синий нерастворимый осадок). Зонды, меченные дигоксигенином, детектируют преимущественно при помощи Fab-фрагментов из антидигоксигенин антител, конъюгированных со щелочной фосфатазой.

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ С НЕРАДИОАКТИВНОЙ МЕТКОЙ

Получение меченых проб для гибридизации с помощью ПЦР является быстрым, эффективным и хорошо воспроизводимым методом. В качестве исходной матрицы используют минимальные количества плазмидной или геномной ДНК. Надо отметить, что ДНК-матрица в этом случае может быть низкой степени очистки, тогда как при мечении с использованием случайных затравок чистота препарата имеет большое значение.

Модифицированное основание (например, биотин-11-дУТФ или флуоресцеин-12-дУТФ) не оказывает существенного влияния на действие ДНК-полимераз в плане выхода конечного продукта по сравнению с обычной ПЦР, однако для синтеза пробы с высоким удельным включением необходимо, чтобы количество модифицированного ос-

нования в смеси с остальными дНТФ было максимальным. Надо иметь в виду, что *Pfu* ДНК-полимераза включает биотин-11-дУТФ намного более эффективно, чем *Taq*- и *Tth*-полимеразы.

Методика

1. Приготовить в ПЦР пробирке во льду реакционную смесь следующего состава (конечный объем смеси — 20 мкл):

- матричная ДНК (10–200 нг/20 мкл смеси);
- смесь биотин-11-дУТФ или флуоресцеин-12-дУТФ (по 150 мкМ дАТФ, дЦТФ, дГТФ; 100 мкМ дТТФ и 50 мкМ модифицированного основания) — 3,2 мкл;
- 10× буферный раствор для ДНК-полимеразы — 2 мкл;
- прямой и обратный праймеры (конечная концентрация 0,1–1 мкМ) — по 1 мкл;
- ДНК-полимераза (конечная концентрация 0,5–2 ед./20 мкл смеси);
- довести стерильной деионизованной водой до 20 мкл.

2. Осуществить ПЦР в приборе-амплификаторе, используя следующий режим;

- 94–95°C в течение 10–15 с;
- (T_m –5) в течение 10–15 с;
- 72°C в течение 10–60 с (в зависимости от размера амплифицированного продукта).

Провести 35–40 циклов, затем инкубировать при 72°C в течение 3 мин.

3. Отобрать из реакционной смеси аликвоту в 2–3 мкл и провести анализ с помощью электрофореза в агарозном геле на предмет наличия единственной полосы (см. подглаву 3.1). Надо иметь в виду, что меченый продукт обладает меньшей электрофоретической подвижностью по сравнению с аналогичным немеченым продуктом.

МЕТОД СЛУЧАЙНОЙ ЗАТРАВКИ

I. Мечение фрагментов ДНК с применением набора **Random Primed DNA Labeling Kit** («Roche Diagnostics», Швейцария).

Синтез комплементарной цепи ДНК проводят на денатурированной матрице, начиная с 3'-конца олигонуклеотидной затравки, при помощи ДНК-полимеразы (фрагмента Кленова). В одной стандартной реакции можно пометить от 10 нг до 3 мкг предварительно очищенной ДНК, но для максимально высокого удельного выхода меченого продукта рекомендуется использовать 25–100 нг ДНК-

матрицы. Эффективность мечения зависит также от степени очистки препарата ДНК, ее размера (не менее 200 по) и конформации (используют линейную форму). В качестве нерадиоактивной метки, включающейся в новосинтезированную цепь ДНК, в данном случае используют в основном биотин-16-ДУТФ.

Методика

1. Внести **25–100 нг** линейной матричной ДНК в **12,4 мкл** стерильной деионизованной воды. Денатурировать ДНК нагреванием при **95°C** в течение **10 мин**. Быстро охладить пробу во льду.

2. Приготовить в ПЦР пробирке во льду реакционную смесь следующего состава (конечный объем смеси — 20 мкл):

- денатурированная ДНК — 12,4 мкл;
- смесь дАТФ, дЦТФ и дГТФ 1 : 1 : 1 (1 мМ) — 3 мкл;
- смесь дТТФ и биотин-16-ДУТФ (0,65 и 0,35 мМ) — 1,6 мкл;
- 10× реакционная смесь гексапраймеров — 2 мкл;
- фрагмент Кленова — 1 мкл.

3. Перемешать и инкубировать при **37°C** в течение **1–2 ч**.

4. Остановить реакцию добавлением **2 мкл 0,2 М ЭДТА (pH 8,0)** и/или нагреванием при **65°C** в течение **10 мин**. При использовании меченой ДНК в экспериментах по гибридизации удаления не включившихся нуклеотидов не требуется. Меченую ДНК необходимо хранить при **–20°C**.

Дополнения к методике

К п. 1. Для эффективного мечения очень большое значение имеет полнота денатурации ДНК-матрицы.

К п. 3. Для повышения эффективности включения модифицированного основания рекомендуется инкубировать реакционную смесь при **37°C** в течение **12–20 ч**. Инкубация при комнатной температуре в этом случае является даже более предпочтительной, поскольку фрагмент Кленова лучше сохраняет свою активность.

II. Мечение фрагментов ДНК с применением реакционной смеси Biotin-High Prime («Roche Diagnostics», Швейцария), которая содержит случайные олигонуклеотиды, фрагмент Кленова, биотин-16-ДУТФ, дНТФ и оптимизированный буферный раствор для реакции.

Данный протокол обеспечивает выход **0,8 мкг** меченой ДНК после **1 ч** инкубации при **37°C** и **2 мкг** — после **20 ч** инкубации. Размер биотин-меченых фрагментов ДНК составляет от **200 до 1000 по**, что зависит от размера исходной ДНК-матрицы.

Методика

1. Внести **1 мкг** матричной ДНК (линейной или суперскрученной) в **16 мкл** стерильной деионизованной воды. Денатурировать ДНК нагреванием при 95°C в течение 10 мин и затем охладить во льду (в смеси с NaCl или этанолом).

2. Добавить **4 мкл** 5× реакционной смеси Biotin-High Prime. Перемешать и инкубировать при 37°C в течение 1–20 ч.

3. Остановить реакцию добавлением **2 мкл** 0,2 М ЭДТА (pH 8,0) и/или нагреванием при 65°C в течение 10 мин. Поскольку свободный биотин-дУТФ не создает фона в ходе проведения гибридизаций, удаление невключившихся нуклеотидов необязательно.

ТРАНСКРИПЦИЯ *in vitro* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДИГОКСИГЕНИН-11-УТФ ИЛИ БИОТИН-16-УТФ

Данный протокол приводится в качестве иллюстрации метода нерадиоактивного мечения РНК, когда в ходе транскрипции *in vitro* УТФ заменяют на модифицированный УТФ.

Методика

1. К **10 мкл** очищенной матричной ДНК (~0,5–1 мкг, после обработки эндонуклеазами рестрикции и протеиназой К) добавить **2 мкл** 10× транскрипционного буфера («Roche Diagnostics», Швейцария), **2 мкл** 10× смеси для дигоксигенин-мечения РНК (DIG RNA Labeling Mix, «Roche Diagnostics», Швейцария) и **2 мкл** РНК-полимеразы Т3, Т7 или SP6 (20 ед./мкл). Довести объем бидистиллированной (деионизованной) водой, свободной от РНКаз, до **20 мкл**.

2. Инкубировать при 37°C в течение 2 ч.

3. Инактивировать РНК-полимеразу инкубацией при 65°C в течение 5 мин.

4. Осадить РНК добавлением **2,5 мкл** 4 М LiCl и **75 мкл** 96%-ного этанола (инкубация при -80°C в течение 30 мин или при -20°C в течение 8–12 ч), центрифугировать при 15 600 g в течение 15 мин при 4°C .

5. Промыть осадок **200 мкл** 70%-ного этанола в буферном растворе TE, центрифугировать при 15 600 g в течение 5 мин при 4°C . Высушить осадок на воздухе или под вакуумом в течение 10 мин.

6. Растворить осадок РНК в **100 мкл** воды, свободной от РНКаз.

7. Разлить по **10-мкл** аликвотам, в которые добавить по **1 мкл** 3 М ацетата натрия (pH 5,3) и по **22 мкл** 96%-ного этанола.

8. Хранить такой препарат меченой РНК можно при -20°C . Осадить перед использованием и растворить в **50 мкл** бидистиллированной воды, свободной от РНКаз.

При мечении РНК биотином к 10 мкл очищенной матричной ДНК (~0,5–1 мкг, после обработки эндонуклеазами рестрикции и протеиназой К) добавить 2 мкл 10× транскрипционного буфера, 2 мкл смеси НТФ для мечения (1,43 мкл АТФ; 1,43 мкл ЦТФ; 1,43 мкл ГТФ; 0,9 мкл УТФ; 5 мкл биотин-16-УТФ; 4 мкл деионизованной воды), 2 мкл РНК-полимеразы (40 ед.) и 4 мкл деионизованной воды. Далее следовать п. 2–8 предыдущей методики.

Литература

1. *Feinberg A.P., Vogelstein B.* A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity // *Anal. Biochem.* 1983. V. 132. P. 6–13.
2. *Feinberg A.P., Vogelstein B.* A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Addendum // *Anal. Biochem.* 1984. V. 137. P. 266–267.
3. *Gillam I.C.* Non-radioactive probes for specific DNA sequences // *Trends Biotechnol.* 1987. V. 5. P. 332–334.
4. *Höltke J.L., Ankenbauer W., Mühlegger K., Rein R., Sagner G., Seibl R., Walter T.* The digoxigenin (DIG) system for non-radioactive labelling and detection of nucleic acids — an overview // *Cell. Mol. Biol.* 1995. V. 41. P. 883–905.
5. *Klevan L., Gebeyehu G.* Biotinylated nucleotides for labeling and detecting DNA // *Methods Enzymol.* 1990. V. 184. P. 561–577.
6. *Kruchen B., Rueger B.* The DIG system — nonradioactive and highly sensitive detection of nucleic acids // *Biochemica* 2003. V. 3. P. 13–15.
7. *Reisch U., Rüger R., Kessler C.* Nonradioactive labeling and high-sensitive detection of PCR products // *Mol. Biotechnol.* 1994. V. 1. P. 229–240.

Гибридизация нуклеиновых кислот, основанная на их способности связываться с комплементарными последовательностями РНК или ДНК, позволяет быстро выявлять специфические нуклеотидные последовательности с высокой чувствительностью и точностью. Суть гибридизации заключается в том, что при инкубации любых одинарных цепей нуклеиновых кислот (ДНК–ДНК, РНК–РНК, ДНК–РНК), содержащих комплементарные последовательности нуклеотидов, при температурах не выше 65°C они ренатурируют (реассоциируют, отжигаются), восстанавливая структуру двойной спирали, т. е. гетерогенные одноцепочечные молекулы нуклеиновых кислот при отжиге комплементарных последовательностей друг на друга образуют гетеродуплексные, гибридные молекулы.

Скорость процессов денатурации и ренатурации нуклеиновых кислот зависит от температуры, pH и времени. Так, при нагревании ДНК до 90–95°C энергии водородных связей между комплементарными парами азотистых оснований (А/Т и Г/Ц), а также гидрофобных и стэкинг-взаимодействий становится недостаточно для сохранения структуры двойной спирали. Денатурация ДНК при увеличении pH раствора до 10 происходит потому, что в этих условиях резко возрастает электростатическое отталкивание отрицательно заряженного фосфорного остова молекулы. Поскольку для разрыва двух водородных связей А/Т пары требуется меньше энергии, чем для разрыва трех водородных связей Г/Ц пары, то точные значения температуры и pH, необходимые для высокой степени денатурации, зависят от нуклеотидного состава ДНК. Чем выше содержание Г/Ц, тем выше температура плавления ДНК (T_m) или pH плавления ДНК (pH_m).

Ренатурация цепей с восстановлением исходных пар оснований происходит при плавном понижении температуры или pH. Резкое же понижение может привести к спариванию локально комплементарных участков даже в пределах одной цепи. Небольшие фаговые ДНК (10–50 тпо) ренатурируют с высокой скоростью. Бактериальная ДНК, состоящая из нескольких сотен отдельных фрагментов после выделения, ренатурирует на 50% примерно за 1–1,5 ч. Для снижения вероятности неспецифического связывания ренатурацию

желательно осуществлять при повышенной температуре и низкой ионной силе (высоком pH).

Скорость ренатурации (гибридизации) зависит, таким образом, от вероятности столкновения двух комплементарных нуклеотидных последовательностей, что определяется их концентрацией в реакционной смеси. Соответственно скорость гибридизации можно использовать для определения концентрации любых последовательностей нуклеиновых кислот в растворе (т.е. для оценки количества копий определенного гена в анализируемом образце ДНК). В качестве индикатора применяют меченый одноцепочечный фрагмент ДНК (так называемый *ДНК-зонд* размером 20–1000 нуклеотидов), комплементарный к нужной последовательности в образце нуклеиновой кислоты, и оценивают включение ДНК-зонда в состав дуплексов в ходе гибридизации. В раствор часто добавляют специфические нуклеазы для расщепления всех незагибризовавшихся одноцепочечных молекул.

Процедура ДНК–ДНК гибридизации состоит из четырех основных этапов: 1) фиксация денатурированной одноцепочечной ДНК-мишени на нитроцеллюлозном или нейлоновом мембранном фильтре при высокой температуре; 2) инкубация фильтра в буферном растворе с меченым одноцепочечным ДНК-зондом, который гибридируется с ДНК-мишенью при определенных условиях (температуре, ионной силе); 3) отмывка фильтра после прохождения гибридизации для удаления избытка несвязавшегося ДНК-зонда; 4) детекция меченых двухцепочечных гибридных молекул. Система детекции гибридизационного сигнала должна обеспечивать высокую чувствительность и специфичность.

При постановке эксперимента одну из одноцепочечных нитей ДНК (*single strand DNA, ssDNA*) фиксируют на мембране — такая мембрана с фиксированной ssDNA называется *блотом* (*Саузерн-блотом*, в честь американского ученого Э. Саузерна, разработавшего эту методику). Вторая цепь (*зонд* или *проба*) метится радиоактивной или флуоресцентной меткой для выявления нужной комплементарной последовательности в одноцепочечной ДНК на блоте. Если исследуют образование гетеродуплексов между РНК и одноцепочечной ДНК, то блот с фиксированной на нем РНК называют *Нозерн-блотом*.

ДНК(РНК)-зонды должны гибридоваться только с нужной нуклеотидной последовательностью, без получения ложноположительного или ложноотрицательного сигналов. В зависимости от экспериментальных задач гибридизационные зонды могут быть длин-

ными (более 100 нуклеотидов) или короткими (менее 50 нуклеотидов) и представлять собой клонированные интактные гены, их фрагменты или химически синтезированные молекулы. Обычно для образования стабильного гибридизационного комплекса между ДНК-мишенью и зондом необходимо, чтобы на участке размером в 50 нуклеотидов комплементарными являлись не менее 80% из них.

Чаще всего в лабораторной практике используют зонды, меченные радиоактивным изотопом ^{32}P (см. главу 9), — такие зонды обладают высокой удельной радиоактивностью, обеспечивают низкий фоновый шум, а гибридизационный сигнал можно легко детектировать с помощью радиоавтографии. Однако при работе с короткоживущим изотопом ^{32}P необходимо неукоснительно соблюдать правила техники безопасности при работе с радиоактивными веществами, включая правильную утилизацию отходов.

Намного более безопасными в работе являются нерадиоактивные гибридизационные зонды с хромогенной, хемилюминесцентной или флуоресцентной системами регистрации (биотин, дигоксигенин, флуорохромы и т.д.). Кроме того, нерадиоактивно меченые пробы достаточно долго хранятся без существенной потери сигнала, а гибридизационные растворы можно использовать несколько раз повторно.

Наибольшее применение нашли ДНК-зонды, меченные биотином. Для усиления гибридизационного сигнала применяется ферментативное превращение хромогенного или хемилюминесцентного субстрата. Стандартная процедура гибридизации в этом случае состоит из следующих этапов: 1) меченый биотином зонд гибридизуют с ДНК-мишенью, фиксированной на фильтре; 2) промывают фильтр для удаления избытка незагибризовавшегося зонда и добавляют стрептавидин, связывающийся с биотином; 3) добавляют биотинилированный фермент (щелочную фосфатазу или пероксидазу хрена), также связывающийся со стрептавидином; 4) вносят хромогенный или хемилюминесцентный субстрат и детектируют изменение окраски или люминесценцию в ходе превращения субстрата в продукт под действием соответствующего фермента. Часто после гибридизации ДНК с биотинилированным зондом в раствор вносят комплекс (конъюгат) стрептавидин — щелочная фосфатаза, имеющий сайт связывания с биотином.

Одним из современных методов нерадиоактивной детекции гибридизационного сигнала является применение так называемого «молекулярного маяка» (*molecular beacon*) — зонда, средняя часть которого комплементарна ДНК-мишени, а концевые нуклеотиды комплементарны между собой и образуют «шпильку» (к 5'-концу

зонда присоединен флуорофор, а к 3'-концу — нефлуоресцентный хромофор-тушитель). В растворе при температурах, близких к комнатной, флуорофор и тушитель находятся в контакте и флуоресценция флуорофора тушится. При гибридизации зонда с соответствующей комплементарной последовательностью ДНК-мишени происходит разъединение флуорофора и тушителя в пространстве, соответственно зонд начинает испускать свет.

Важно отметить, что реакция гибридизации с использованием ДНК-зондов чрезвычайно чувствительна и избирательна, что позволяет идентифицировать нуклеотидные последовательности даже в концентрации одна молекула на клетку. С помощью данного метода можно определить количество копий последовательности ДНК, комплементарной ДНК-зонду, в геноме. Гибридизация нуклеиновых кислот применяется в диагностических исследованиях для поиска не только идентичных, но и родственных генов. Но особенно широкое применение метод гибридизации нашел в изучении уровня экспрессии генов в клетках (гибридизация меченого ДНК-зонда, содержащего часть последовательности изучаемого гена, с интактной немеченой РНК, выделенной из клеток), включая точное определение местоположения РНК-транскриптов.

10.1.

ДНК–ДНК ГИБРИДИЗАЦИЯ

Метод ДНК–ДНК гибридизации используется для поиска и локализации специфических нуклеотидных последовательностей в составе протяженных участков ДНК, клонированных, например, в составе плазмидных векторов. Данный подход применим (с небольшими модификациями) и для геномных исследований. Так, с помощью ДНК–ДНК (Саузерн) гибридизации возможна идентификация определенных последовательностей, а также определение числа их копий не только на хромосоме прокариот, но и в гидролизатах суммарной эукариотической ДНК. Саузерн-гибридизация нашла широкое применение в медицинских исследованиях для идентификации изменений генотипа, а также при разработке методов идентификации микроорганизмов в окружающей среде (в том числе и патогенов в клиническом материале).

ГИБРИДИЗАЦИЯ ПО САУЗЕРНУ (САУЗЕРН-БЛОТТИНГ)

Для поиска определенных участков ДНК в составе исследуемой нуклеотидной последовательности обычно пользуются методом пе-



Рис. 10.1. Принцип гибридизации по Саузерну

реноса, предложенным Эдвином Саузерном в 1975 г. Общая схема подхода заключается в следующем (рис. 10.1). Изучаемая изолированная последовательность ДНК расщепляется на более мелкие фрагменты (например, обработкой рестрицирующими нуклеазами), после чего проводится их разделение по размеру в агарозном геле с помощью электрофореза. Положение фрагментов ДНК в геле документируется.

Далее гель с фракционированными фрагментами помещают на фильтровальную бумагу, находящуюся в контакте с буферным раствором. Сверху гель накрывают специальным мембранным фильтром (нейлоновым или нитроцеллюлозным), на который накладывают несколько слоев фильтровальной бумаги, легко адсорбирующей влагу (рис. 10.2). Для переноса фрагментов ДНК с сохранением их взаимного расположения на нитроцеллюлозные, а также на нейтральные и отрицательно заряженные нейлоновые мембраны используют буферный раствор с высокой ионной силой (фиксация проводится после переноса). Бумага служит своеобразным капиллярным насосом, способствуя вымыванию фрагментов ДНК током буферного раствора из геля и их переносу (блоттингу) на мембранный фильтр, где ДНК впоследствии денатурируется щелочью и осуществляется ее иммобилизация (фиксация). Это делает молекулы ДНК, содержащиеся в геле, более доступными для гибридизации с ДНК-зондом. Фиксацию ДНК на нейтральных или отрицательно заряженных

нейлоновых мембранных фильтрах проводят чаще всего, поместив сухой фильтр между двумя листами фильтровальной бумаги и прогревая его при 80°C в течение 2 ч. Для гибридизации на положительно заряженных нейлоновых мембранах (например, Hybond N⁺ производства компании «GE Healthcare», Великобритания) применяют щелочной перенос в 0,4 М NaOH — в этом случае фиксация ДНК на мембране происходит одновременно с переносом.

Иногда для переноса фрагментов нуклеиновых кислот из агарозного геля на мембрану для создания градиента тока жидкости используют не капиллярные силы, а электрический ток или вакуум. Преимущество электрического и вакуумного методов переноса по сравнению с более дешевым и простым капиллярным методом заключается в более быстром переносе нуклеиновых кислот на мембранный фильтр (обычно это занимает 3–6 ч вместо 12–24 ч).

Затем мембрану (Саузерн-блот) инкубируют в растворе с меченым ДНК-зондом (см. гл. 9) в течение определенного времени и в условиях (температура, pH), оптимальных для образования водородных связей между зондом и комплементарным ему фрагментом ДНК. Гибридизацию проводят достаточно долго — в течение 12–24 ч.

На следующем этапе проводится тщательная отмывка мембраны от неспецифически связавшейся метки в подогретом буферном растворе с низкой ионной силой. После этого выявляют результат гибридизации с помощью радиоавтографии (если в качестве зонда использовалась радиоактивно меченая ДНК) или иным способом (например, непосредственная визуализация в случае применения биотинилированной метки). Чувствительность метода позволяет выявить нужные фрагменты ДНК, количество которых измеряется пикограммами.

Локализация фрагментов ДНК с комплементарной ДНК-зонду последовательностью легко устанавливается, поскольку при переносе ДНК из геля на фильтр относительное положение полос с фрагментами не изменяется. Повторяя эту процедуру с использованием различных рестрицирующих нуклеаз для обработки исследуемой последовательности ДНК, можно получить детальную рестрикционную карту генома в участке соответствующего гена. Также можно проводить последовательные гибридизации с несколькими мечеными зондами, каждый из которых комплементарен определенной последовательности ДНК, предварительно полностью удаляя предыдущий зонд с мембраны перед гибридизацией с последующим. Таким образом можно детектировать полосы, отвечающие продуктам гибридизации соответствующего зонда с рестрициро-

ванной ДНК, и построить «лестницу фрагментов» для выделенной ДНК, что находит применение, например, в судебной экспертизе для идентификации биологических образцов (так называемая генная дактилоскопия).

Необходимые реактивы и растворы:

- буферный раствор SSC (pH 7,7) — см. приложение 1;
- 0,25 М HCl (готовить перед экспериментом);
- денатурирующий раствор ДР. Состав: 0,5 М NaOH; 1,5 М NaCl. Хранить при комнатной температуре;
- нейтрализующий раствор НР. Состав: 0,5 М трис-HCl (pH 7,2); 1,5 М NaCl; 0,81 М HCl; 1 мМ ЭДТА. Хранить при комнатной температуре;
- раствор РП для переноса. Состав: 250 мМ NaOH; 1,5 М NaCl;
- раствор РПГ для предгибридизации. Состав: 5× SSC; 5× раствор Денхардта (см. приложение 1); 0,1% додецилсульфата натрия; раствор ДНК из спермы лосося (конечная концентрация — 100 мкг/мл);
- раствор «А»: 2× SSC; 0,1% додецилсульфата натрия;
- раствор «В»: 1× SSC; 0,1% додецилсульфата натрия;
- раствор «С»: 0,1× SSC; 0,1% додецилсульфата натрия;
- чистый 96%-ный этанол и 70%-ный раствор этанола в воде;
- стерильная дистиллированная (деионизованная) вода.

Методика

А. Подготовка пробы к переносу на нейлоновый фильтр

1. Выделить хромосомную (плазмидную) ДНК из тестируемого штамма бактерии согласно рекомендациям, предложенным в гл. 1.

2. Определить концентрацию ДНК в полученном препарате, измерив его оптическую плотность на спектрофотометре при 260 нм.

3. Обработать препарат ДНК соответствующей рестриктазой (см. дополнения к методике). При работе с плазмидной ДНК достаточно использовать 1–3 мкг ДНК, в случае постановки гибридизации с хромосомной ДНК рекомендуется увеличить концентрацию до 5–10 мкг.

4. Осуществить электрофоретическое разделение фрагментов ДНК пробы, проведя электрофорез при напряжении 20–40 В в 0,9%-ном агарозном геле в течение 12–16 ч. Для этих целей лучше всего использовать трис-ацетатный буферный раствор, поскольку он слабо нагревается при длительном электрофорезе. Желательно использовать тонкие (толщиной до 0,7 мм) гели. Одновременно с экс-

периментальными образцами в гель необходимо внести пробу, содержащую фрагменты ДНК известных размеров (ДНК-маркер).

5. Зафиксировать расположение фрагментов ДНК на геле, сфотографировав его или отсканировав с помощью системы для гель-документирования электрофоретических образцов (например, на установке Bio-Print производства компании «Vilber Lourmat», Франция).

6. Погрузить гель в 0,25 М HCl на 10 мин (*не дольше!*), после изменения цвета красителя бромфенолового синего на желтый промыть водой. Этот этап не обязателен, но такая обработка HCl при медленном перемешивании приводит к депуринизации ДНК и дроблению ДНК на фрагменты умеренной длины (фрагменты больше 5 тпо плохо проходят через агарозу при переносе).

7. Немедленно поместить гель в ванночку с раствором ДР и инкубировать в течение 30–40 мин при постоянном легком покачивании для денатурации ДНК (бромфеноловый меняет цвет обратно на синий при инкубации в денатурирующем буфере примерно через 20 мин). Процедуру проводить при комнатной температуре.

8. Ополоснуть гель деионизованной водой и поместить его в ванночку, заполненную раствором НР. Инкубировать при комнатной температуре в течение 30–40 мин при постоянном легком покачивании ванночки (бромфеноловый синий меняет цвет при инкубации в нейтрализующем буфере примерно через 20 мин).

9. Ополоснуть гель деионизованной водой и поместить его в раствор РП. Инкубировать при комнатной температуре в течение 30–40 мин при постоянном легком покачивании ванночки.

Б. Перенос фрагментов ДНК на мембранный фильтр

1. Вырезать из листа нейлонового мембранного фильтра Nubond N («GE Healthcare», Великобритания) кусок прямоугольной формы по размеру геля (с дополнительными полями по 2–5 мм с каждой стороны). Подготовить также 6–7 листов Whatman 3ММ прямоугольной формы. Один из них должен совпадать с размерами поля на вакуум-аппарате для осуществления переноса (или с размерами контейнера для переноса), остальные вырезаются в соответствии с размерами геля.

2. За 20 мин до начала процедуры переноса поместить нейлоновый и бумажные фильтры в ванночку с буферным раствором 20× SSC.

3. На предварительно смоченную деионизованной водой поверхность вакуум-аппарата для осуществления переноса (например, производства компании «Bio-Rad», США) положить мокрый кусок ватмана, совпадающий размерами с полем прибора. Далее сверху поместить нейлоновый фильтр, на поверхность которого необхо-

димо равномерно налить 1–2 мл буферного раствора 20× SSC, после чего точно по границам фильтра осторожно положить гель (*гель кладется один раз, после этого его нельзя поднимать!*). Сверху на него поместить один на другой 5–6 смоченных раствором 20× SSC листов Whatman 3ММ.

Укладывать такой «сэндвич», состоящий из геля, нейлонового и бумажных фильтров, необходимо очень аккуратно, не допуская образования пузырьков воздуха (можно аккуратно прокатывать пипеткой, чтобы выгнать пузыри, если они все же появились). Перенос ДНК не произойдет в тех местах между фильтрами и гелем, где будут находиться пузырьки воздуха.

4. Подключить аппарат к водоструйному насосу и осуществить вакуумный перенос в течение 2–3 ч при очень слабом напоре воды (~12 мм рт.ст.).

5. Отключить вакуум-аппарат от водоструйного насоса. Снять покрывающие нейлоновый фильтр листы ватмана и перенести его (с отмеченными карандашом границами геля) с помощью пинцета в ванночку с 200 мл 2× SSC. Инкубировать в течение 5 мин при легком покачивании ванночки. Пластины вакуум-аппарата промыть деионизованной водой и высушить.

6. Вынуть нейлоновый фильтр из раствора с помощью пинцета и положить его для просушки на сухой лист Whatman 3ММ лицевой стороной наружу. Сушить при комнатной температуре в течение 3–4 ч.

7. Поместить высушенный нейлоновый фильтр в сушильный шкаф на 80°C и выдержать в течение 2 ч для фиксации фрагментов ДНК (либо нагревать при 120°C в течение 30 мин). После этой процедуры фильтр готов к гибридизации. Можно также провести быструю фиксацию ДНК на мембранном фильтре под ультрафиолетом (~120 мДж/см²) с применением прибора UV Stratalinker производства компании «Stratagene», США (рис. 10.3). Завернув фильтр в полимерную пленку, его можно хранить при температурах от –20 до 4°C.

В. Гибридизация

1. Поместить мембранный фильтр в бокс для гибридизации (гибридайзер) лицевой стороной наружу. Налить в бокс раствор для предгибридизации РПГ так, чтобы жидкость полностью покрывала фильтр. Во избежание высыхания раствора фильтр (который в ходе гибридизации должен быть всегда влажным) необходимо прикрыть лавсановой пленкой, плотно закрыть бокс крышкой и поместить его в термостат. Инкубировать при 42°C в течение 2 ч (или при 62°C в течение 15 мин) со слабым покачиванием на шейкере.

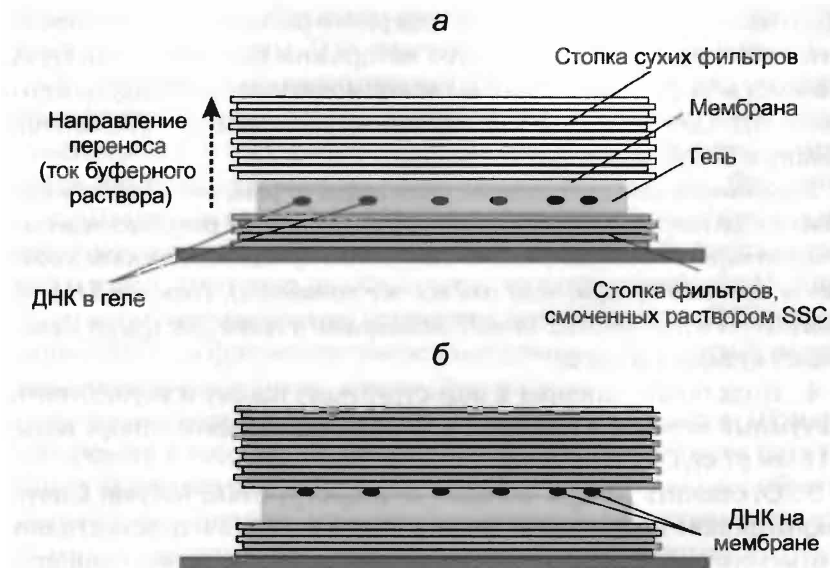


Рис. 10.2. Схема установки (вид сбоку) для осуществления переноса ДНК из агарозного геля на нейлоновую мембрану в ходе Саузерн-блоттинга: а) перед началом переноса (ДНК — в геле); б) после переноса (ДНК — на мембране)

2. Внести радиоактивно меченый зонд (~ 2 мкл/мл) в стеклянную микробиологическую пробирку, содержащую 2–3 мл раствора РПГ. Раствор осторожно перемешать, после чего инкубировать в кипящей водяной бане в течение 5 мин для денатурации.

3. Пробирку быстро охладить во льду и перелить ее содержимое в гибридизационный бокс с нейлоновым фильтром (предварительно удалив лавсановую пленку с поверхности фильтра пинцетом).

4. Фильтр накрыть лавсаном и закрыть бокс крышкой. Поместить его в термостат на 42–62°C и инкубировать в течение 12–16 ч с постоянным слабым покачиванием на шейкере.

Примечание Температура инкубации фильтров зависит от типа используемого меченого ДНК-зонда. Для элюированных из геля рестрикционных фрагментов ДНК она составляет 65–68°C. При гибридизации с олигонуклеотидными пробами обычно используют температуру на 5°C ниже соответствующей T_m — в пределах 42–60°C. В случае использования вырожденных олигонуклеотидов (содержащих инозин или имеющих смешанный нуклеотидный состав) оптимальную температуру гибридизации подбирают экспериментально.

Г. Отмывка мембранного фильтра от несвязанной метки

1. Вынуть пинцетом нейлоновый мембранный фильтр из бокса. Позволить стечь каплям смеси и поместить фильтр в ванночку с

раствором «А». Инкубировать при комнатной температуре, постоянно покачивая, в течение 10–15 мин. Отмывку желательно повторить 2–3 раза в свежем растворе А. **Внимание!** Радиоактивный раствор после гибридизации аккуратно слить в стакан и утилизировать, соблюдая правила техники безопасности.

2. Перенести фильтр в ванночку с предварительно подогретым до 55–65°C раствором «В». Инкубировать в течение 15–30 мин при 55–65°C с постоянным покачиванием.

3. Перенести фильтр в ванночку с предварительно подогретым до 55–65°C раствором «С». Инкубировать в течение 10 мин при 55–65°C, постоянно покачивая ванночку.

4. Вынуть нейлоновый фильтр из раствора пинцетом. Положить его лицевой стороной наружу на сухой лист Whatman 3ММ и высушить при комнатной температуре (3–4 ч).

Примечание. Для мягкой отмывки достаточно выполнить только первый пункт либо использовать более низкие температуры в п. 2 и 3 (если фоновый уровень радиоактивности фильтра низок, в противном случае осуществить полную промывку). Надо иметь в виду, что при высушивании фильтра удалить остатки неспецифически связавшегося с ним меченого зонда уже практически невозможно, поэтому некоторые протоколы не рекомендуют высушивать фильтр.

Д. Получение радиоавтографа

1. Запаять фильтр в лавсановую пленку и поместить его на рентгеновскую пленку (например, производства компании «Eastman Kodak», США), находящуюся в светонепроницаемой кассете, для получения радиоавтографа. Операцию проводить в темноте (в фотографической комнате или с использованием специального оборудования).

2. Выдержать кассету в закрытом состоянии некоторое время (обычно экспонирование занимает от 2–3 ч до нескольких суток) при –70°C.

3. Вынуть радиоавтограф из кассеты и проявить изображение в специальном проявителе для рентгеновских пленок в соответствии с рекомендациями производителя пленки.

4. Отсканировать изображение. Сопоставить данные по гибридизации с расположением полос на геле, полученным на этапе А.

Дополнения к методике

К п. А3. При выборе рестриктазы, используемой для гидролиза исследуемой ДНК, следует учитывать, что искомая последовательность не должна содержать участков, которые узнаются этим фер-

ментом. Если вы не обладаете подобной информацией, то применяйте в работе сразу несколько рестриктаз. Соответственно, в этом случае количество проб возрастет на число использованных ферментов.

К п. А6 и А7. Красители, входящие в состав раствора для внесения проб в агарозный гель, могут служить в качестве цветowych индикаторов при подготовке геля к переносу. При обработке соляной кислотой синяя окраска красителя бромфенолового синего должна измениться на желтый цвет и снова стать синей в присутствии щелочи (раствор ДР).

К п. Б1 и последующим пунктам раздела. Все манипуляции с нейлоновым фильтром следует проводить только пинцетом, не касаясь фильтра руками! Кроме того, следует учесть, что нейлоновый фильтр плохо намокает в высокосолевых растворах (20× SSC), поэтому его следует заранее выдержать в ванночке с деионизованной водой.

К п. Б3. При отсутствии специального аппарата для осуществления переноса процедуру можно проводить в обыкновенном пластиковом боксе. Для этого на дно коробки необходимо положить два листа фильтровальной бумаги, хорошо смоченных буферным раствором 20× SSC. Сверху на них аккуратно положить гель, к которому плотно прижать мокрый нейлоновый фильтр (*необходимо следить, чтобы между гелем и фильтром ДНК-зонда не образовалось пузырей!*). Накрыть фильтр двумя листами фильтровальной бумаги, обильно смоченными 20× SSC. Сверху поместить стопку бумажных полотенец и закрыть бокс крышкой, которую следует плотно прижать с помощью груза (~300 г для 10 × 10 см геля). При такой постановке опыта перенос ДНК в растворе осуществляется за счет капиллярных сил в течение 2—16 ч.

К п. В1. Перед первой гибридизацией рекомендуется обработать фильтры следующим образом: отмыть 2 раза по 10 мин в 1× SSC с добавлением 0,1% ДСН, затем трижды инкубировать в 0,1× SSC с добавлением 0,1% ДСН при 80°C в течение 20 мин. Это нужно для того, чтобы ДНК не смывалась с фильтра в гибридизационный раствор во время гибридизации. Подсушенные фильтры хранятся между листами Whatman 3ММ.

К п. Г1 и последующим пунктам раздела. При отмывке нейлонового фильтра от несвязанной метки следует обязательно следить, чтобы он всегда оставался влажным.

К п. Д3. Стандартный раствор для проявки экспонированной пленки в течение 5—7 мин при комнатной температуре имеет состав (на 1 л деионизованной воды): метол — 2,2 г; гидрохинон — 8,8 г; сульфит натрия безводный — 72 г; натрий углекислый — 48 г; калий

бромистый — 4 г. После промывки проявленной пленки водой ее фиксируют в течение 20 мин в растворе следующего состава (на 1 л деионизованной воды): гипосульфит натрия — 260 г; аммоний хлористый — 50 г; метабисульфит натрия — 17 г. Пленку промывают деионизованной водой и сушат на воздухе.

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ДЛЯ БИОТИН-МЕЧЕННЫХ ПРОБ

Метод (рис. 10.4) основан на очень высоком сродстве биотина к стрептавидину (бактериальному белку — аналогу белка куриного яйца авидина), константа диссоциации $K_d = 10^{-15}$. Каждая из молекул стрептавидина может одновременно связывать четыре молекулы биотина (т.е. биотинилированных зонда и фермента — щелочной фосфатазы), таким образом, биотин-меченые пробы соединяются поперечными сшивками с образованием трехмерной сети.

Для детекции гибридизационного сигнала с помощью хромогенного субстрата в качестве маркера часто используют стрептавидин, связанный со щелочной фосфатазой, которая катализирует превращение неокрашенного субстрата в легко регистрируемый нерастворимый окрашенный продукт. Использование хемилюминесцентного субстрата для регистрации сигнала гибридизации является практически таким же высокочувствительным методом, как и регистрация радиоактивного сигнала (радиоавтография). Ферментативное дефосфорилирование хемилюминесцентного субстрата CSPD под действием щелочной фосфатазы ведет к световой эмиссии при 477 нм, которая улавливается специальным детектором или рентгеновской пленкой.

Подобная нерадиоактивная система детекции для Саузерн- и Нозерн-гибридизаций имеет ряд неоспоримых преимуществ перед использованием радиоактивно меченых зондов: она не требует повышенных мер безопасности при работе с радиоактивными веществами, биотинилированный ДНК-зонд можно хранить при комнатной температуре длитель-



Рис. 10.3. Прибор UV Stratalinker 2400 («Stratagene», США) для фиксации нуклеиновых кислот на нейлоновых или нитроцеллюлозных мембранных фильтрах

ное время (по крайней мере в течение года), детекция испускаемого света или регистрация изменения цвета в пробе (в случае использования хромогенного субстрата) занимает мало времени.

А. Гибридизация

Необходимые реактивы и растворы:

- ДСН/БСА гибридизационный буферный раствор следующего состава (на 500 мл, вода деионизованная): 1 М Na-фосфатный буфер (33,5 г Na_2HPO_4 ; 1 мл 85%-ной H_3PO_4 ; pH 7,2) — 250 мл; 0,5 М ЭДТА (pH 8,0) — 1 мл; БСА (высокой степени очистки, растворить полностью при перемешивании) — 5 г; 14%-ный ДСН (перемешать после внесения) — 250 мл; разлить на аликвоты по 50 мл и хранить при -20°C . Перед экспериментом оттаять раствор на водяной бане при 60°C ;
- буферный раствор SSC — см. приложение 1;
- 10%-ный раствор ДСН: 30 г додецилсульфата натрия на 300 мл деионизованной воды;
- $2\times$ SSC + 0,1%-ный ДСН (на 200 мл): $20\times$ SSC — 20,0 мл; 10%-ный ДСН — 2,0 мл;
- $0,2\times$ SSC + 0,1%-ный ДСН (на 200 мл): $20\times$ SSC — 2,0 мл; 10%-ный ДСН — 2,0 мл.

Методика

1. Осуществить предгибридизацию мембранного фильтра с фрагментами нуклеиновых кислот при $62-68^\circ\text{C}$ в течение 1 ч с использованием **1,5 мл** гибридизационного раствора ДСН/БСА **на 10 см^2** мембраны. Минимальное количество раствора не должно быть меньше 15 мл при использовании стандартных гибридизационных стаканов. Некоторые протоколы рекомендуют применять гибридизационный раствор без добавления БСА.

2. Внести денатурированный ДНК-зонд, меченный биотином. Продолжить гибридизацию в том же самом гибридизационном растворе при $62-68^\circ\text{C}$ в течение 16 ч.

3. Промыть мембрану дважды в **50 мл** $2\times$ SSC + 0,1%-ный ДСН в течение 3 мин при комнатной температуре.

4. Промыть мембрану дважды в **50 мл** $0,2\times$ SSC + 0,1%-ный ДСН при 68°C в течение 30 мин. Предварительно необходимо подогреть промывной раствор до соответствующей температуры.

5. Промыть мембрану дважды в **50 мл** $1\times$ SSC при комнатной температуре в течение 5–10 мин.

Дополнение к методике

Очень важно осуществлять все промывки и инкубации мембран в гибридизационных стаканах с вращением в термостате-гибридайзере (рис. 10.5) в течение максимально возможного рекомендуемого времени. Это способствует избавлению от сильного фона при детекции и значительно повышает воспроизводимость экспериментов. Положительно заряженные нейлоновые мембраны Qiabgene («Qiabgene», Нидерланды) очень подходят для этой цели. Необходимо отметить, что гибридизация по Нозерну дает несколько более высокий фон, чем Саузерн-блоттинг.

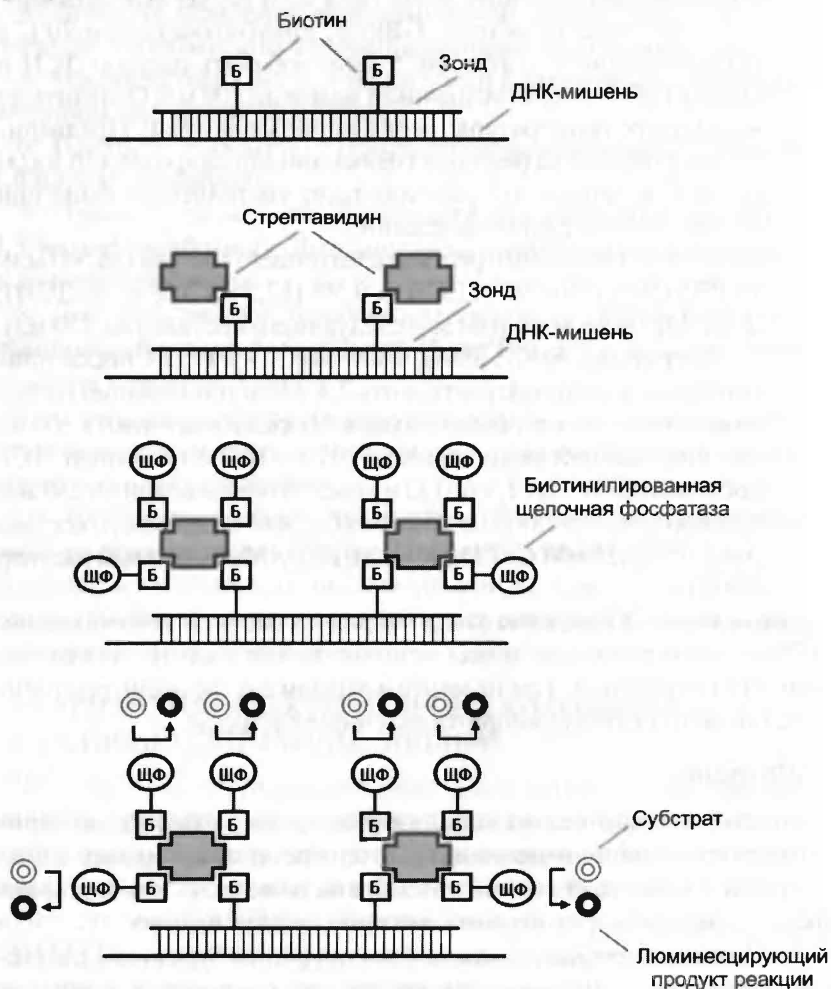


Рис. 10.4. Хемилуминесцентный метод детекции гибридизационного сигнала

Б. Окраска и детекция

Необходимые реактивы и растворы:

- 10× PBS буферный раствор — см. приложение 1;
- конъюгат Avidx-AP (щелочная фосфатаза—стрептавидин) производства «Applied Biosystems» (США);
- блокирующий буферный раствор следующего состава (на 300 мл): реагент I-Block («Applied Biosystems», США) — 0,2% (0,6 г); 1× PBS (30 мл 10× PBS); ДСН — 0,5% (7,5 мл 20%-ного раствора ДСН). Способ приготовления блокирующего буферного раствора: добавить 30 мл 10× PBS в 200 мл деионизованной воды, внести реагент I-Block, инкубировать при 70°C с перемешиванием в течение 5 мин, добавить раствор ДСН и довести объем деионизованной водой до 300 мл. Охладить до комнатной температуры перед использованием. Предварительная обработка реагента I-Block авидин-агарозой (10 мл/л) при 4°C в течение 16 ч способствует уменьшению фона при ультрачувствительной детекции;
- промывной буферный раствор следующего состава (на 500 мл): 1× PBS (50 мл 10× PBS); ДСН — 0,5% (12,5 мл 20%-ного ДСН);
- ДЭА-Mg буферный раствор следующего состава (на 250 мл): 0,1 М диэтаноламин (ДЭА); 1 мМ $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$. Способ приготовления раствора: растворить 2,4 мл диэтанолamina (*осторожно, так как это раздражающее для кожи вещество*) в 200 мл деионизованной воды, довести pH до 10,0 с помощью HCl, добавить 0,05 г $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ и довести объем водой до 250 мл;
- раствор хемилюминесцентного субстрата следующего состава (на 5 мл): 0,25 мМ CSPD (50 мкл); ДЭА-Mg буферный раствор (5 мл).

Примечание. Добавление азида натрия в конечной концентрации 0,02% ко всем растворам может использоваться в случае их кратковременного хранения. Тем не менее в данном случае очень рекомендуется использовать свежеприготовленные растворы.

Методика

Исключительно важно использовать на всех стадиях эксперимента гибридизационные стаканы и термостат-гибридаizer с вращающейся мешалкой для них. Мембрана не должна высыхать, поэтому смену растворов необходимо производить быстро.

1. Промыть мембрану дважды блокирующим буферным раствором (0,5 мл/см² мембраны) при комнатной температуре в течение 5 мин.

2. Инкубировать мембрану в блокирующем буферном растворе (**1,0 мл/см²** мембраны) при комнатной температуре в течение 30 мин для предотвращения неспецифического связывания.

3. Развести конъюгат Avidx-AP (щелочная фосфатаза—стрептавидин) в блокирующем буферном растворе (1 : 5000). Использовать **2,0 мкл** конъюгата Avidx-AP («Applied Biosystems», США) в **10 мл** блокирующего буферного раствора на **100 см²** мембраны (0,1 мл/см²). Возможно также применять разведение 1 : 10000, поскольку в этом случае фон будет меньше, но тогда потребуется более длительное время экспозиции.

4. Вращать мембрану при комнатной температуре в течение 20 мин для постоянного перемешивания раствора конъюгата.

5. Промыть один раз в течение 5 мин блокирующим буферным раствором (**0,5 мл/см²** мембраны).

6. Промыть трижды по 5 мин промывным буферным раствором (**1,0 мл/см²** мембраны).

7. Промыть дважды по 5 мин ДЭА-Mg буферным раствором (**0,5 мл/см²** мембраны). Диэтаноламин необходим для активации щелочной фосфатазы.

8. Добавить раствор хемилюминесцентного субстрата в гибридизационный стакан с мембраной (**5 мл/100 см²**) и медленно перемешивать в течение 5 мин.

9. Слить излишки раствора хемилюминесцентного субстрата (его можно использовать повторно, хранить при 4°C), но не допускать высыхания мембраны.

10. Положить мембрану на пластиковую подложку и экспонировать на рентгеновской пленке. Проявить пленку через 1—4 ч либо продолжить экспозицию (но обычно это ведет к появлению сильного фона). Мембрану можно хранить сутки при 4°C и экспонировать снова на следующий день.

ГИБРИДИЗАЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КОЛОНИЙ С РАДИОАКТИВНЫМ ДНК-ЗОНДОМ

Часто при конструировании рекомбинантных ДНК клонирование ДНК-фрагмента не приводит к появлению определенного фенотипа, позволяющего легко отобрать нужные клоны микроорганизма. Более того, не всегда имеются возможности для проверки клонов с помощью ПЦР-скрининга или отбором на средах с X-gal и ИПТГ. Применение эффективного метода идентификации нужных клонов с помощью прямой гибридизации бактериальных колоний со специфическим радиоактивным ДНК-зондом (олигонук-

леотид размером около 20 оснований) позволяет решить эту непростую задачу. Данный подход также незаменим, когда существует необходимость проверить очень большое количество клонов на наличие нужной вставки в рекомбинантной плазмиде. Это имеет место при скрининге геномных библиотек или в других случаях (например, при низкой эффективности клонирования или при одновременном клонировании большого количества фрагментов).

Общая схема эксперимента при гибридизации колоний такова: а) трансформированные клетки высевают на чашки с агаризованной селективной питательной средой и переносят выросшие колонии с агара на нитроцеллюлозный или нейлоновый фильтр; б) осуществляют лизис клеток прямо на фильтре, проводят депротеинизацию и денатурацию ДНК, фиксируют ДНК на фильтре; в) инкубируют фильтр с меченым ДНК-зондом в оптимальных условиях для ренатурации комплементарных цепей ДНК, отмывают фильтр от несвязавшегося зонда и визуализируют положительные сигналы на фильтре при помощи радиоавтографии. Затем колонии, содержащие искомую ДНК, выделяют для дальнейшего культивирования.

В настоящее время разработаны специальные роботы-аррейеры, распечатывающие геномные и хромосомные клонотеки непосредственно на нитроцеллюлозных фильтрах. Это позволяет проводить скрининг десятков тысяч отдельных колоний для обнаружения нужного клона, содержащего конкретный ген.

Необходимые реактивы и растворы:

- стерильная среда LB в агаризованном виде (1,2%) — см. приложение 1;
- 0,5 М раствор NaOH;
- раствор 2× SSC;
- раствор HP следующего состава: 1,5 М NaCl; 1 М трис-HCl (pH 7,5);
- раствор Денхардта — см. приложение 1.

Методика

1. Вырезать нитроцеллюлозный фильтр по шаблону (рис. 10.6). Отметить карандашом положение будущих колоний. Пометить правый верхний угол. Для этого фильтра подготовить стерильную чашку Петри (чашка А).

2. С внутренней стороны другой чашки Петри (чашка Б) отметить маркером по этому же шаблону положение будущих колоний. Отметить правый верхний угол.

Рис. 10.5. Термостат-гибридаizer с вращающимся блоком и стаканы для проведения гибридизаций производства «GE Healthcare» (Великобритания)

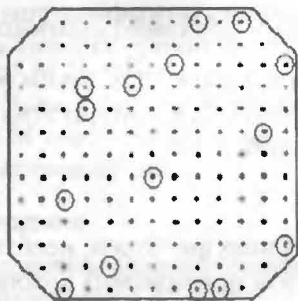


3. Залить три чашки Петри (чашки А, Б и еще одну чашку) агаризованной средой LB, содержащей соответствующий антибиотик, и подсушить в ламинаре. Последняя чашка Петри необходима для остужения платиновой петли при дальнейшем перекалывании бактериальных колоний.

4. На чашку А положить влажный нитроцеллюлозный фильтр. Для этого фильтр необходимо предварительно смочить в деионизованной воде и промокнуть фильтровальной бумагой. Затем, оперируя двумя пинцетами, осторожно наложить фильтр на чашку. Операцию проводить аккуратно, стараться избегать образования пузырей.

5. Каждую анализируемую колонию переколоть в одну и ту же позицию на чашки А и Б. Для этого лучше придерживаться следующей последовательности: раскалить докрасна платиновую петлю в пламени горелки, после чего охладить петлю в агаре вспомога-

а



б

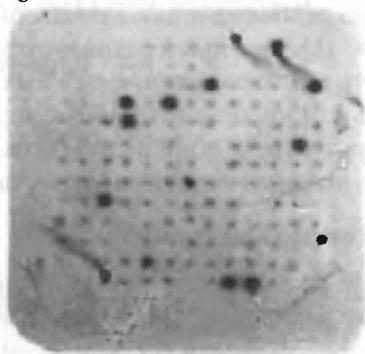


Рис. 10.6. Схема расположения колоний на нитроцеллюлозном фильтре в эксперименте по гибридизации бактериальных колоний с радиоактивным ДНК-зондом (а) и типичный радиоавтограф после проведения гибридизации *in situ* (б). Яркие сигналы — это гибридизующиеся колонии (на схеме расположение колоний обведено кругами), слабые сигналы — это фоновая гибридизация

тельной чашки (см. п. 3), коснуться петлей колонии, перенести бактерии сначала на фильтр, а затем на чашку Б.

6. Поместить чашки в термостат и инкубировать при 37°C в течение 12–16 ч.

7. В стерильную стеклянную чашку Петри налить 1–2 мл 0,5 М раствора NaOH (для лизиса клеток бактерий и денатурации ДНК). С чашки А осторожно снять пинцетом фильтр и поместить его на поверхность денатурирующего раствора колониями вверх. Следить за тем, чтобы этот раствор не попал на верхнюю поверхность фильтра с колониями. Инкубировать в течение 5–10 мин (*не дольше!*). Чашку Б убрать в холодильник на 4°C.

8. Осторожно поднять фильтр с помощью пинцетов и положить его на фильтровальную бумагу стороной с колониями вверх. Далее аналогичным способом поместить фильтр на поверхность нейтрализующего раствора НР. Инкубировать в течение 5 мин.

9. Осторожно поднять фильтр с помощью пинцетов и положить его на фильтровальную бумагу стороной с колониями вверх. Обработать фильтр таким же образом раствором 2× SSC.

10. Высушить фильтр под лампой накаливания. Фильтр можно хранить при комнатной температуре.

11. Провести гибридизацию проб на фильтре с радиоактивно меченым по 5'-концу ДНК-зондом (который содержит часть нуклеотидной последовательности искомого гена), как это описано в предыдущей методике гибридизации по Саузерну.

12. Поместить фильтр в кассету с рентгеновской пленкой и инкубировать при –70°C в течение ночи. Проявить радиоавтограф согласно рекомендациям производителя пленки.

13. Проявленный радиоавтограф совместить с фильтром и определить местоположение нужных клонов, обнаруживших способность к гибридизации с ДНК-зондом и содержащих, таким образом, требуемую рекомбинантную молекулу ДНК. Культуры этих клонов взять для дальнейшей работы с чашки Б.

Дополнения к методике

К п. 1. Количество нитроцеллюлозных фильтров, необходимых для эксперимента, определяется числом проверяемых колоний. Оптимально на одном фильтре можно провести гибридизацию с 120–150 бактериальными колониями при условии, что они не располагаются слишком близко друг к другу. Для удобства последующей идентификации рекомендуется располагать колонии рядами, например, как это показано на рис. 10.6.

К п. 3. Для чашки А имеет смысл использовать увеличенное количество антибиотика. Например, при выращивании бактерий на среде, содержащей ампициллин, концентрация антибиотика для чашек А и Б составляет 100 и 50 мкг/мл соответственно.

К п. 6. Важно, чтобы колонии не перерастали. Оптимальный размер колоний — точечный, диаметром около 1 мм. Если колонии имеют размер больше 2 мм в диаметре, то это может привести к увеличению фона при гибридизации. Также желательно перекалывать на фильтр колонии со свежей чашки. Такие колонии растут равномерно и дают наилучшее соотношение сигнал / фон.

К п. 7. Блестящий цвет колоний является отличительным признаком, по которому легко установить, что денатурация прошла успешно.

К п. 11. В качестве зонда обычно используется клонируемый фрагмент ДНК. Внесение метки в его последовательность можно осуществлять любым способом, предложенным в п. 9.1. Принципы гибридизации и стадии процесса аналогичны тем, что изложены в описании метода гибридизации по Саузерну.

К п. 12. Перед закладкой фильтра с рентгеновской пленкой на экспозицию их следует скрепить скотчем в нескольких местах. Для облегчения трактовки радиоавтографа проколите шилом фильтр и пленку в трех местах. Совместив эти проколы после проявки пленки, легко сопоставить наблюдаемые пятна с расположением колоний на чашке Петри. Стоит отметить еще тот факт, что негибридизующиеся колонии дают небольшой фон и это существенно облегчает определение координат положительного сигнала (рис. 10.6).

МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДА — БЛОТТИНГ КОЛОНИЙ

Необходимые реактивы и растворы:

- 0,5 М NaOH;
- 1%-ный раствор додецилсульфата натрия;
- 1 М трис-HCl (pH 8,0);
- раствор 4× SSC.

Методика

А. Блоттинг колоний (снятие реплик)

1. Выращивать *E. coli* на чашках Петри с агаризованной средой при 37°С в течение 8–12 ч до формирования видимых очень маленьких колоний.

2. Поместить чашки Петри в холодильник на 30–60 мин для отверждения агара и предотвращения его прилипания к мембранному фильтру.

3. Отметить карандашом дату и номер соответствующего образца на мембранных фильтрах (диаметр 82 мм; размер пор 0,2 мкм; тип Pall, Qiabrane или Colonyscreen).

4. С помощью двух пинцетов осторожно поместить мембранный фильтр на поверхность бактериальных колоний в чашке Петри. Изогнуть диск фильтра таким образом, чтобы его середина первой коснулась поверхности чашки, затем аккуратно положить диск на чашку. *Не передвигать и не приподнимать диски после того, как они соприкоснулись с агаризованной средой!* Подписанная сторона фильтра должна быть обращена к агару.

5. Через 2–5 мин проколоть мембрану, лежащую на агаризованной среде, с помощью стерильной иглы в двух местах (например, по аналогии с циферблатом часов в «четверть первого»). Либо сделать примерно пять проколов асимметрично по площади чашки. Проколы делаются для того, чтобы потом соотнести радиоавтографический сигнал с местоположением колоний на чашке.

6. Снять мембранный фильтр с чашки Петри, приподнимая его края пинцетом и осторожно отслаивая с агаризованной среды.

7. Поместить мембранный фильтр с отпечатками бактериальных колоний, обращенными вверх, на кусок фильтровальной бумаги и подсушить в течение 10 мин.

8. Вернуть чашки Петри с агаризованной средой в термостат на 37°C для подрачивания колоний по необходимости. Если изначально колонии выращивали в течение 8 ч, то может понадобиться дополнительная инкубация в течение ночи.

Б. Лизис биомассы колоний и денатурация ДНК

1. Аккуратно налить 0,75 мл 0,5 М NaOH на кусок фольги или пленки Saran Wrap, поместить в NaOH мембранный фильтр (*отпечатки бактериальных колоний обращены вверх!*) и осторожно притопить фильтр до тех пор, пока вся его нижняя сторона не покроется раствором щелочи. Выдержать 2–5 мин, аккуратно снять мембрану и удалить излишки жидкости.

2. Повторить ту же самую процедуру еще раз с 0,5 М NaOH и дважды с 1 М трис-HCl, pH 7,5 (нейтрализующий раствор).

3. Поместить мембраны на фильтровальную бумагу и высушить на воздухе стороной с бактериальными колониями («блоттинг-сторона»), обращенной вверх.

4. Зафиксировать ДНК (дополнительная фиксация за счет формирования поперечных сшивок) путем облучения мембранных фильтров в УФ-трансиллюминаторе (например, UV Stratalinker 1800 производства компании «Stratagene», США) в течение 2 мин. «Блот-

тинг-сторона» должна располагаться книзу от источника УФ-излучения.

5. Прополоскать мембранный фильтр в $4\times$ SSC в течение 5–10 мин, высушить. Мембраны готовы к использованию для гибридизации, их можно хранить при комнатной температуре. Чашки с колониями можно хранить до одного-двух месяцев при 4°C .

Дополнения к методике

К п. Б1. При работе с иными бактериями, чем *E. coli*, они могут лизироваться с меньшей эффективностью при использовании только NaOH. Очень хороший лизис клеток почвенных микроорганизмов достигается погружением мембранного фильтра в 0,75 мл 1%-ного раствора ДСН (SDS) в течение 2 мин перед стадией обработки 0,5 М NaOH.

Примечание к методике. Иногда проводят не снятие реплик («перепечатку колоний»), а дот-блоттинг под вакуумом с использованием дот-блот коллектора (например, производства компании «Gibco-BRL Life Technologies», США). Для этого вырезают мембранный фильтр по размеру дот-блот ячейки коллектора, смачивают фильтр бидистиллированной водой и кладут его на резиновую подложку дот-блот ячейки. Осторожно наносят по 20 мкл экспериментальных проб (сuspензии клеток из соответствующей колонии) в отверстия верхней части дот-блот ячейки, стараясь не повредить мембранный фильтр наконечниками от автоматических пипеток. Создают оптимальное вакуумное разрежение, в течение которого жидкость из нанесенных проб элюируется сквозь мембрану (необходимо включать вакуум после нанесения проб в каждый ряд отверстий дот-блот ячейки для гарантированного получения компактных пятен). Затем осуществляют лизис клеток и денатурацию ДНК на фильтре так, как это описано выше.

10.2.

РНК–ДНК ГИБРИДИЗАЦИЯ

Методика переноса электрофоретически разделенных фрагментов РНК из геля на нитроцеллюлозный или нейлоновый фильтр называется Нозерн-блоттингом. Принципы переноса молекул РНК на мембрану и детекции сигнала после гибридизации с комплементарным ДНК-зондом весьма схожи с ДНК–ДНК гибридизацией (Саузерн-блоттингом), описанной выше. Нозерн-блоттинг является стандартным методом определения размера мРНК и изучения уровня экспрессии конкретного гена на разных этапах развития организма или при различных стрессовых воздействиях.

ФОРМАЛЬДЕГИДНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ РНК, НОЗЕРН-БЛОТТИНГ

Обычно образцы РНК разделяют в агарозном геле, содержащем формальдегид в качестве денатурирующего агента, чтобы снизить образование вторичных структур РНК. Для гибридизации с изучаемой РНК применяют различные зонды (ДНК, РНК или олигонуклеотиды, содержащие не менее 25 комплементарных РНК-мишени оснований). Часто с помощью меченых праймеров синтезируют кДНК, используемую в качестве зонда для гибридизации с РНК. Зонды метят либо с помощью радиоактивных изотопов (^{32}P), либо с использованием хемилюминесцентной или хромогенной системы детекции.

Необходимые реактивы и растворы:

- агароза;
- 36,6%-ный раствор формальдегида (pH 4,0);
- 50× буферный раствор FGRB (от *formaldehyde gel-running buffer*) — см. приложение 1;
- 4× буферный раствор для внесения РНК в лунки геля при формальдегидном электрофорезе. Состав: 50× FGRB; раствор красителя (50% глицерина; 1 мМ ЭДТА и 0,25% бромфенолового синего) и 36,5%-ный формальдегид в объемном соотношении компонентов 1 : 2,5 : 9, соответственно. Хранить при -20°C ;
- 20× буферный раствор SSC — см. приложение 1;
- гибридизационный буферный раствор HSB (от *high SDS hybridization buffer*) — см. приложение 1;
- 10%-ный раствор додецилсульфата натрия;
- раствор для проявки рентгеновской пленки (см. ниже).

Методика

А. Электрофорез

1. Для Нозерн-гибридизации проводят фракционирование totalной РНК в 1–1,5%-ном агарозном геле с формальдегидом в концентрации 2,2 М. Гель готовят следующим образом: растворить 1–1,5 г агарозы в стерильной дистиллированной (деионизованной) воде, добавить 2 мл 50× буферного раствора FGRB и 16,6 мл 36,5%-ного формальдегида (*под тягой, поскольку пары формальдегида токсичны!*). Перемешать и довести объем водой до 100 мл. Залить охлажденный до $45\text{--}60^{\circ}\text{C}$ гель в ванночку-подложку под тягой. Необходимо иметь отдельную чистую электрофорезную камеру, используемую только для этой цели.

2. Пробу РНК смешать с 4× буферным раствором для внесения

(3 : 1), прогреть смесь 15 мин при 65°C (для денатурации возможных двухцепочечных структур РНК и химической реакции формальдегида с РНК) и охладить во льду в течение 2–5 мин. Обычно в лунку геля наносят **10–30 мкг РНК** в конечном объеме **10–20 мкл** (для разведений лучше использовать 100%-ный формамид, чем воду).

3. Осуществить электрофорез в буферном растворе 1× FGRB так, чтобы он не покрывал верхнюю поверхность геля (гель от подсыхания накрыть пленкой Saran Wrap). В противном случае формальдегид будет диффундировать из геля и возникнет концентрационная неоднородность формальдегида в толще геля, что приведет к изгибу полос РНК в ходе электрофореза. Электрофорез проводят при напряжении 3–10 В/см до тех пор, пока краситель бромфеноловый синий не пройдет ~80% геля (краситель идет в районе фрагмента РНК размером 100 оснований). Если в буферный раствор добавлять бромистый этидий, то его концентрация не должна превышать 0,1 мкг/мл, чтобы избежать неравномерного фона при детекции результатов последующей гибридизации.

Примечание. Для более точного определения размеров молекул РНК в сочетании с Нозерн-блоттингом широкое применение находит агарозный электрофорез с использованием глиоксаля и диметилсульфоксида (ДМСО). Пробу РНК готовят следующим образом (на 30 мкл): РНК (до 10 мкг) — 6 мкл; 0,2 М Na_2HPO_4 (рН 7,0) — 1,5 мкл; ДМСО — 15 мкл; 6 М деионизованного глиоксаля — 4,5 мкл и инкубируют для денатурации при 50°C в течение 1 ч. Затем к пробе во льду добавляют 3 мкл 10× буфера для внесения и вносят в лунки 1%-ного агарозного геля, приготовленного на 10 мМ Na_2HPO_4 (рН 7,0, DEPC-вода). Электрофорез проводят при 4 В/см с рециркуляцией буферного раствора от анода к катоду для предотвращения диссоциации глиоксаля. В качестве стандартов можно использовать RNA Molecular Weight Markers, 10–20 нг/мкл («Roche Diagnostics», Швейцария).

Б. Перенос РНК на мембранный фильтр

1. Гель частично отмыть от формальдегида в 300 мл воды в течение 30–45 мин.

2. Промыть гель в 300 мл 20× буферного раствора SSC в течение 30–45 мин.

3. Перенос РНК с геля на нейлоновую мембрану Hybond N или Hybond N⁺ («GE Healthcare», Великобритания) с помощью капиллярного метода можно осуществить за 18–24 ч. Для этого используют буферный раствор 20× SSC, положив небольшой грузик (~500 г) на «сэндвич» из листов ватмана, геля, мембраны и бумажных фильтров (по аналогии с гибридизацией по Саузерну, см. рис. 10.2).

4. Для иммобилизации РНК мембрану кратковременно (2 мин) облучить УФ (например, с использованием прибора UV Stratalinker производства компании «Stratagene», США) либо проинкубировать при 80°C в течение 2 ч. Такую мембрану можно хранить между листами ватмана при –20°C.

В. Гибридизация РНК с ДНК-зондом

1. Мембранный фильтр с пробами РНК смочить в 2× SSC и поместить в гибридизационный стакан, содержащий 12–25 мл гибридизационного буферного раствора HSB. Осуществить предгибридизацию при 42–68°C (в зависимости от нуклеотидного состава олигонуклеотидного зонда) в течение 30–60 мин (иногда — до нескольких часов) с постоянным вращательным перемешиванием.

2. Внести в раствор радиоактивно меченый ДНК-зонд (0,1–1,0 мкг) и продолжать гибридизацию в течение 12–24 ч.

Г. Отмывка мембранного фильтра от несвязанной метки

1. Промыть мембранный фильтр дважды в 50 мл 1× SSC с 0,1% ДСН при комнатной температуре в течение 10–15 мин.

2. Промыть мембрану дважды в 50 мл 0,1× SSC с 0,1% ДСН при 65–68°C в течение 20–30 мин. Раствор должен быть заранее подогрет до температуры горячей отмывки. Некоторые протоколы не рекомендуют для Нозерн-блотов горячую отмывку от несвязавшегося зонда.

Д. Радиоавтография и проявка

1. Влажную мембрану запаять в полимерную пленку и провести регистрацию радиоактивных сигналов с помощью радиоавтографии (например, с использованием пленки Kodak X-Omat, «Eastman Kodak», США). Длительность радиоавтографии определяется в зависимости от общего фона радиоактивности по формулам: $T_{\text{exp}} = [600 \times 100] / \text{срм}$ и $T_{\text{exp}^*} = [600 \times 100] / [\text{срм} \times 4]$, где T_{exp} — время экспозиции (в часах) фильтра и рентгеновской пленки в кассете для радиоавтографии при комнатной температуре; T_{exp^*} — время экспозиции (в часах) фильтра и рентгеновской пленки в кассете для радиоавтографии при –70°C. Лучше проводить экспозицию при –70°C, чтобы избежать возможного подсыхания мембраны.

2. Проявить пленку в течение 3–4 мин с использованием проявителя. Например, раствор для проявки РТ-2 состоит из равных объемов растворов I и II,готавливаемых на деионизованной воде (хранить в темноте). Раствор I содержит (на 1 л) 28 г метола и 28 г гидрохинона. Состав раствора II (на 1 л): 106 г Na₂SO₃; 20 г NaOH; 20 г KBr и 100 мл этанола.

3. Фиксировать пленку в течение 15–20 мин с помощью раствора,

содержащего (на 1 л деионизованной воды) 250 г гипосульфита натрия и 10 г борной кислоты. Промыть пленку водопроводной водой в течение 15 мин, ополоснуть деионизованной водой и высушить.

4. Денситометрию радиоавтографических изображений (рис. 10.7) проводят с помощью различных компьютерных программ, например Un-Scan-It («Silk Scientific, Inc.», США).

Дополнения к методике

К п. Д1. Некоторые протоколы рекомендуют после экспозиции ошпарить мембрану в кипящем 0,5%-ном ДСН (*аккуратно, чтобы не обжечься!*) в течение 1 мин и затем инкубировать при комнатной температуре в течение 20–30 мин.

РНК–ДНК ДОТ-БЛОТТИНГ

Дот-блоттинг представляет собой широко используемый метод детектирования макромолекул по аналогии с Нозерн-, Саузерн-или Вестерн-блоттингом. При дот-блоттинге нуклеиновые кислоты или белки, которые необходимо обнаружить, не разделяют предварительно с помощью гель-электрофореза или хроматографии. Вместо этого смесь, содержащую экспериментальный материал, сразу непосредственно наносят на мембрану в виде пятнышка (*dot*). Затем проводят гибридизацию и детектирование при помощи меченой олигонуклеотидной пробы (в случае нуклеиновых кислот) или антитела (в случае белков).

При дот-блоттинге необходимо соблюдать стандартные правила работы с нуклеиновыми кислотами: использовать стерильные растворы и специально отведенное рабочее место, работать в перчатках, поднимать мембраны только за край чистым пинцетом и т.д.

Данный метод помогает существенно сэкономить время эксперимента, поскольку не требуется проводить гель-электрофорез и осуществлять процедуру переноса фракционированных молекул из геля на мембранный фильтр. Однако дот-блоттинг не позволяет получить информацию о размере макромолекулы — если две молекулы различного размера обнаруживаются в ходе проведения дот-блоттинга, они представляют собой единственное пятно. Таким образом, дот-блоттинг может только подтвердить наличие или отсутствие, к примеру, определенных молекул РНК в экспериментальном материале, которые детектируются после гибридизации с соответствующей нуклеотидной пробой (зондом). Дот-блот гибридизация получила особенное распространение в связи с появлением *биочипов*. Биочип — это специальная подложка, на которую нанесены фраг-

менты ДНК, принадлежащие разным генам, или олигонуклеотиды с определенными последовательностями. На таких чипах можно проводить тестирование на наличие конкретных мутаций, проводить идентификацию микроорганизмов в клиническом материале, секвенировать ДНК и т.д.

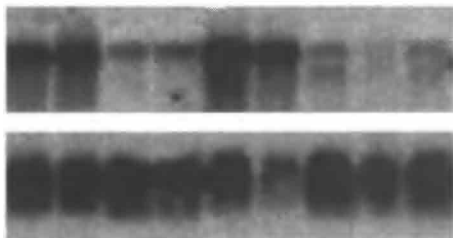
Зонд, меченный радиоактивной, хемилюминесцентной или хромогенной меткой, при гибридизации позволяет оценить различия в количестве соответствующих макромолекул-мишеней. Равные количества ДНК-зонда при гибридизации вносятся в избытке по сравнению с их гибридизационной мишенью в образце (например, 10 мкг для плазмиды или 1 мкг для ПЦР-продукта). В случае использования дот-блот коллектора образцы РНК наносят количественно в отверстия верхней части дот-блот ячейки, где при оптимальном вакуумном разрежении жидкость из нанесенных проб элюируется через нейлоновый или нитроцеллюлозный мембранный фильтр (часто рекомендуется провести дополнительную элюцию с помощью равного объема $1 \times \text{SSC}$). Затем мембрану высушивают на воздухе и проводят фиксацию путем облучения фильтра в УФ транс-иллюминаторе в течение 2 мин. После этого мембранный фильтр готов к использованию для дот-блот гибридизации.

РНК–ДНК ДОТ-БЛОТТИНГ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФРАГМЕНТОВ ДНК, МЕЧЕННЫХ ДИГОКСИГЕНИН-дУТФ, В КАЧЕСТВЕ ЗОНДА

Дигоксигенин (ДИГ, DIG) — низкомолекулярный стероидный гаптен, использующийся в качестве метки ДНК-зондов для всех типов гибридизации на фильтрах и последующей хромогенной или хемилюминесцентной детекции с помощью ферментативной иммунологической пробы.

Вся процедура состоит из трех этапов: 1) мечение проб ДНК по методу рассеянной затравки с использованием щелоченеустойчивого дигоксигенин-дУТФ, например с применением набора **DTG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit** («Roche Diagnostics», Швейцария); 2) гибридизация (ДИГ-меченые пробы используются для гибридизации с пятнами нуклеиновых кислот на мембране согласно стандартному протоколу, применение щелоченеустойчивой формы ДИГ-11-дУТФ позволяет легко и эффективно использовать блоттинг для регибридизации со второй ДИГ-меченой пробой); 3) иммунологическая детекция — гибридизованные пробы обнаруживают с применением антител к дигоксигенину (поликлональные анти-дигоксигенин Fab-фрагменты), связанных со щелочной фосфатазой.

Рис. 10.7. Пример фотографии
Нозерн-блоттинга



После промывки для удаления несвязавшегося конъюгата детекция проб осуществляется с помощью хемилюминесцентного субстрата CSPD

или хромогенной смеси NBT/BCIP (нитросиний тетразолий в качестве хромогена и 5-бром-4-хлор-3-индолил-фосфат как субстрат), реагирующих со щелочной фосфатазой. Окрашивание или люминесценция (в зависимости от используемого субстрата) свидетельствует о связывании антитела к дигоксигенину с пробой ДНК, меченной дигоксигенином.

ДИГ-меченые ДНК-зонды могут использоваться для обнаружения даже одной копии гена в тотальной геномной ДНК. В качестве зондов применяют фрагменты ДНК размером от 100 по, линейные молекулы плазмид и космид, суперскрученную ДНК. Упомянутый набор от «Roche Diagnostics» предназначен для быстрого и высокоэффективного проведения 12 реакций ДИГ-мечения ДНК (до 3 мкг ДНК-зонда) и детекции 24 блоттингов размером 10 × 10 см.

Методика

А. ДИГ-мечение ДНК-зонда

ДНК метят методом рассеянной затравки (см. гл. 9) с использованием смеси случайных гексамеров, смеси дНТФ с щелоченеустойчивым дигоксигенин-11-дУТФ, фрагмента Кленова и оптимизированного буферного раствора.

Проба ДНК должна быть высокоочищенной с применением дополнительной экстракции фенолом и хлороформом для удаления остаточных белков. Для получения оптимальных результатов гибридизации ДНК-зонд должен иметь линейную конфигурацию и размер не менее 100 по, молекулы величиной свыше 5000 по необходимо обработать перед мечением эндонуклеазой рестрикции (с тетрануклеотидным сайтом узнавания, например *HaeIII*). Протокол оптимизирован для мечения от 10 нг до 3 мкг ДНК, но для детекции гена в единственной копии необходимо провести мечение по крайней мере 300 нг ДНК-зонда.

1. Внести в микроцентрифужную пробирку 1 мкг ДНК (линейной или суперскрученной) и довести конечный объем до 16 мкл с помощью стерильной бидистиллированной воды.

2. Провести денатурацию ДНК нагреванием в кипящей водяной бане в течение **10 мин** и быстро охладить пробу во льду. Полная денатурация необходима для эффективного мечения.

3. Тщательно перемешать DIG-High Prime из набора и добавить **4 мкл** к денатурированной ДНК, перемешать и отцентрифугировать на настольной центрифуге в течение 10–15 с. Инкубировать при 37°C в течение 8–12 ч. Длительная инкубация (до 20 ч) может увеличить выход ДИГ-меченой ДНК.

4. Остановить реакцию путем добавления **2 мкл 0,2 М ЭДТА (pH 8,0)** и/или нагреванием на водяной бане при 65°C в течение 10 мин. Длина фрагментов, меченных по ДИГ, варьирует от 200 до 1000 и более оснований, что зависит от длины используемой матричной ДНК.

В стандартных условиях примерно 15% нуклеотидов включаются в 0,8 мкг новосинтезированной ДИГ-меченой ДНК в течение 1 ч и примерно 38% нуклеотидов — в 2 мкг ДНК за 20 ч.

Примечание: для мечения олигонуклеотидов с помощью дигоксигенин-ДУТФ по 3'-концу часто используют также набор **DIG Oligonucleotide Tailing Kit** («Roche Diagnostics», Швейцария). Необходимый олигонуклеотид растворяют в воде стандарта Milli-Q до концентрации 100 мкМ. Реакционную смесь готовят при 0°C. Состав реакционной смеси (на 20 мкл): 5× реакционный буфер (1 М какодилат калия; 0,125 М трис-HCl; 1,25 мг/мл БСА; pH 6,6) — 4 мкл; 25 мМ CoCl₂ — 4 мкл; 1 мМ водный раствор ДИГ-11-ДУТФ — 1 мкл; 100 мкМ раствор олигонуклеотида — 1 мкл; 10 мМ раствор ДАТФ в трис-буфере (pH 7,5) — 1 мкл; раствор терминальной трансферазы (50 ед./мкл) в 0,2 М какодилате калия и 50%-ном глицерине (с добавлением 1 мМ ЭДТА; 200 мМ KCl и 0,2 мг/мл БСА; pH 6,5) — 1 мкл; стерильная деионизованная вода — 8 мкл.

Мечение олигонуклеотида осуществляют следующим образом: инкубируют реакционную смесь при 37°C в течение 15 мин и добавляют к ней 1 мкл водного раствора гликогена (20 мг/мл) и 1 мкл ЭДТА (200 мМ, pH 8,0), а затем 2,5 мкл LiCl (4 М) и 75 мкл 96%-ного этанола. Выдерживают при –80°C в течение 30 мин, центрифугируют (13 000 g, 15 мин, 4°C) и промывают осадок 50 мкл 70%-ного этанола. Снова центрифугируют пробу, добавляют к осадку 20 мкл стерильной деионизованной воды и хранят меченый олигонуклеотид при –20°C.

Б. Перенос и фиксация РНК

При непосредственном нанесении проб РНК на положительно заряженную нейлоновую мембрану Hybond N⁺ («GE Healthcare», Великобритания) или Pall Biotrade A («Pall Corporation», США) же-

лательно, чтобы минимальное расстояние между пятнами составляло примерно 1 см. Необходимо наносить не более 1–2,5 мкл пробы (~10 мкг), стараясь получить пятна одинакового размера и избегая касания мембраны наконечником автоматической пипетки. Содержание РНК во всех пробах должно быть одинаковым. Для этого спектрофотометрически измеряют концентрацию растворов РНК перед нанесением или окрашивают контрольные образцы на мембране 0,02%-ным метиленовым синим в 0,3 М ацетате калия (рН 5,5) в течение 3 мин. Переносить пробы на влажные мембраны нужно особенно аккуратно, поскольку в этом случае пятна получаются большего размера, чем при переносе на сухие мембраны; кроме того, влажная мембрана может высохнуть неравномерно.

1. Для фиксации молекул нуклеиновых кислот на нейлоновом мембранном фильтре с помощью УФ сшивки поместить мембрану на лист Whatman 3ММ, смоченный буферным раствором 10× SSC.

2. Провести УФ сшивку влажной мембраны без предварительной отмывки в течение 2 мин — например, с помощью прибора UV Stratalinker («Stratagene», США).

3. Быстро промыть мембрану в бидистиллированной воде и высушить на воздухе. Мембрана с фиксированными пробами нуклеиновых кислот может храниться при 2–8°C в течение, по меньшей мере, 3 мес. (завернутая в полимерную пленку) либо при –20°C более длительное время.

В. Гибридизация

Соответствующая температура для гибридизации может быть рассчитана согласно известному содержанию Г/Ц и проценту гомологии меченого зонда и экспериментального образца по формуле: $T_m = 49,82 + 0,41 (\%Г/Ц) - (600/l)$, где l — длина продукта гибридизации в по; $T_{opt} = T_m - 20-25^\circ\text{C}$. Оптимальная температура может рассматриваться в качестве точной температуры для гибридизации, обеспечивающей не более 18% несоответствий между меченой пробой и экспериментальным образцом. В случае гомологии меньшей, чем 80%, необходимо снижать оптимальную температуру (примерно на 1,4°C на каждый процент несоответствий) и оптимизировать процедуру отмывки (увеличивать концентрацию буферного раствора SSC и снижать температуру при отмывке).

1. Предварительно подогреть необходимый объем суспензии гранул DIG Easy Hyb из набора (10 мл/100 см² мембраны) до соответствующей температуры гибридизации (37–55°C). Осуществить предгибридизацию мембраны в этой суспензии в течение 30 мин в закрывающемся гибридизационном стакане при медленном переме-

шивании во вращающемся термостате-гибридайзере (рис. 10.5). Для этого аккуратно по стенке положить мембрану в гибридизационный стакан (мембрана должна перемещаться свободно, особенно если несколько мембран используются с одинаковым предгибризационным раствором). *Не допускайте попадания пузырей воздуха под мембрану, в противном случае в этих местах гибридизация пройдет хуже.*

2. Денатурировать ДИГ-меченый ДНК-зонд (рекомендуемая концентрация — 25 нг/мл гибридизационного раствора) кипячением в течение 5 мин, затем быстро охладить его во льду. Поскольку ДИГ-11-дУТФ является щелоченеустойчивым соединением, пробы ДНК не могут быть денатурированы с помощью NaOH.

3. Добавить денатурированный ДНК-зонд, меченный дигоксигенином, к предварительно подогретой суспензии гранул DIG Easy Hyb (3,5 мл/100 см² мембраны) и тщательно перемешать, избегая вспенивания (пузырьки могут привести к значительному фону).

4. Слить предгибризационный раствор и добавить зонд/гибридизационную смесь к мембране. Инкубировать при соответствующей температуре гибридизации в течение 4–16 ч при медленном перемешивании на вращающемся термостате-гибридайзере. Суспензию DIG Easy Hyb, содержащую ДИГ-меченый зонд, можно хранить при –20°C и использовать несколько раз (с предварительной денатурацией ДНК-зонда при 68°C в течение 10 мин перед экспериментом.).

Г. Отмывка мембранного фильтра от несвязанной метки

1. Промыть мембрану дважды по 5 мин в 2× SSC с добавлением 0,1% ДСН при комнатной температуре (15–25°C) и постоянном перемешивании.

2. Промыть мембрану дважды по 15 мин в 0,5× SSC с добавлением 0,1% ДСН при 60–68°C и постоянном перемешивании. Раствор SSC необходимо заранее подогреть до температуры горячей отмывки.

Примечание. Пробы (зонды) размером >150 оснований и с высоким содержанием Г/Ц необходимо отмывать при 68°C, для проб размером меньше 100 оснований применяют более низкую температуру отмывки.

Д. Иммунологическая детекция

Данный протокол описывает проведение иммунологической детекции результатов прошедшей гибридизации для мембранного фильтра площадью 100 см². Все инкубации следует проводить при рекомендованных температурах (25–50°C) с медленным перемешиванием во вращающемся термостате-гибридайзере. Если необходимо использовать мембрану повторно, то она всегда должна находиться во влажном состоянии.

1. Инкубировать мембрану после гибридизации и отмывки в промывном буферном растворе в течение 1–5 мин.

Промывной буферный раствор имеет следующий состав: 0,1 М малеиновая кислота; 0,15 М NaCl; 0,3% (объем/объем) Tween 20; pH 7,5 (раствор стерилизовать автоклавированием, хранить при комнатной температуре).

2. Инкубировать в течение 30 мин в **100 мл** свежеприготовленного 1%-ного раствора блокирующего реагента (*blocking solution*), полученного разведением соответствующего концентрированного раствора из набора от «Roche Diagnostics» с помощью промывного буфера (не содержащего Tween 20). Эта процедура необходима для блокировки неспецифических связывающих сайтов.

3. Инкубировать в течение 30 мин в **20 мл** раствора Fab-фрагментов из поликлональных антидигоксинин овечьих антител, конъюгированных со щелочной фосфатазой, которые связываются с ДИГ-мечеными пробами. Предварительно необходимо отцентрифугировать Fab-фрагменты на настольной центрифуге при максимальной скорости в течение 5 мин и развести супернатант до ферментативной концентрации 0,15 ед./мкл в растворе блокирующего реагента.

4. Промыть мембрану дважды в течение 5–15 мин в **100 мл** промывного буферного раствора.

5. Инкубировать в течение 2–5 мин в **20 мл** буферного раствора для детекции (буфер для щелочной фосфатазы).

Буферный раствор для детекции имеет следующий состав: 0,1 М трис-HCl; 0,1 М NaCl; 0,05 М MgCl₂; pH 9,5.

6. Вынуть мембрану, поместить ее (гибридизационной пробой вверх) на пленку и нанести **1 мл** раствора хемилюминесцентного субстрата CSPD (25 мМ исходный раствор, разведенный 1 : 100 в буферном растворе для детекции). Немедленно закрыть мембрану полимерной пленкой и аккуратно распределить CSPD по мембране, избегая образования пузырьков. Инкубировать в темноте при комнатной температуре в течение 5 мин, а затем — в темноте при 37°C в течение 15 мин для прохождения реакции.

Примечание. При использовании раствора субстрата для хромогенной детекции — инкубировать мембрану в **10 мл** свежеприготовленного раствора в темноте (без перемешивания) в течение 1–16 ч. Раствор готовится добавлением 200 мкл смеси NBT/BCIP из набора от «Roche Diagnostics» в 10 мл буферного раствора для детекции. Остановить реакцию после достижения необходимой интенсивности окраски пятна путем промывки мембраны в течение 5 мин в 50 мл буферного раствора TE или стерильной бидистиллированной воды.

7. Отобрать излишки жидкости и запаять края пленки с мембраной внутри. Необходимо отметить, что высыхание мембраны во время экспозиции может привести к темному фону.

8. Инкубировать влажную мембрану при 37°C в течение 10 мин для усиления реакции люминесценции.

9. Осуществить экспозицию на фото(рентгеновской) пленке (например, производства «Fujifilm», Япония или «Eastman Kodak», США) при комнатной температуре в течение 5–30 мин в светонепроницаемом контейнере. Люминесценция продолжается примерно 48 ч. Сигнал усиливается в течение первых часов, пока не достигнет стабильного состояния во время последующих 24–48 ч.

10. В случае последующего использования мембранных фильтров их необходимо тщательно промыть в следующих растворах: 2× SSC с 50 мМ ЭДТА (pH 8,0) — 2 раза по 15 мин при 85°C; 2× SSC с 0,1%-ным ДСН — 2 раза по 15 мин при 20°C; 0,2 М NaOH с 0,1%-ным ДСН — 2 раза по 15 мин при 37°C и постоянном перемешивании (для удаления ДИГ-меченой пробы). Отмыть мембраны с помощью 2× SSC. Подсушить их на листе Whatman 3MM и хранить между такими листами при –20°C (либо при 4°C в 2× SSC).

Литература

1. *Alwine J.C., Kemp D.J., Stark G.R.* A method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzomethyl-paper and hybridization with DNA probes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977. V. 74. P. 5350–5354.
2. *Carlson D.P., Superko C., Mackey J., Gaskill M.E., Hansen P.* Chemiluminescent detection of nucleic acid hybridization // *Focus.* 1990. V. 12. P. 9–12.
3. *Grunstein M., Hogness D.S.* Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1975. V. 72. P. 3961–3965.
4. *Khandijan E.W.* Optimized hybridization of DNA blotted and fixed to nitrocellulose and nylon membranes // *Biotechnology.* 1987. V. 5. P. 165–167.
5. *Meinkoth J., Wahl G.* Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports // *Anal. Biochem.* 1984. V. 138. P. 267–284.
6. *Pollard-Knight D., Simmonds A.C., Schaap A.P., Akhavan H., Brady M.A.* Non-radioactive DNA detection on Southern blots by enzymatically triggered chemiluminescence // *Anal. Biochem.* 1990. V. 185. P. 353–358.
7. *Sayler G.S., Layton A.C.* Environmental application of nucleic acid hybridization // *Annu. Rev. Microbiol.* 1990. V. 44. P. 625–648.
8. *Southern E.* Southern blotting // *Nat. Protoc.* 2006. V. 1. P. 518–525.
9. *Southern E.* Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis // *J. Mol. Biol.* 1975. V. 98. P. 503–517.
10. *Tyagi S., Kramer F.R.* Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization // *Nat. Biotechnol.* 1996. V. 14. P. 303–308.
11. *Wetmer J.G.* Hybridization and renaturation kinetics of nucleic acids // *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 1976. V. 5. P. 337–361.

Определение полной нуклеотидной последовательности (секвенирование) очищенного фрагмента ДНК позволяет точно определить границы генов, а также аминокислотные последовательности, кодируемые ими, на основании генетического кода. Данные о составе нуклеотидной последовательности необходимы для проведения молекулярного клонирования, идентификации мутационных изменений в гене и часто для установления функции исследуемого гена и изучения контроля его экспрессии. В настоящее время используются два метода быстрого и точного секвенирования ДНК — химический (разработан А. Максамом и В. Гилбертом в 1976 г.) и, в особенности, ферментативный (разработан Ф. Сэнгером в 1977 г.).

При **химическом методе секвенирования ДНК** (*метод сайт-специфического химического расщепления цепи*, или *метод химической дегградации*) получают меченые по 5'-концу с помощью Т4-полинуклеотидкиназы радиоактивные фрагменты цепи ДНК (см. гл. 9), рестрицируемой по определенному нуклеотиду. Эту цепь ДНК, образованную при денатурации двухцепочечной молекулы ДНК, подвергают мягкой химической обработке, при которой из цепи удаляется небольшое количество одного из четырех нуклеотидов. При радиоавтографии геля регистрируются только фрагменты, содержащие [γ - ^{32}P]-фосфатную группу на 5'-конце.

Данная процедура выполняется одновременно для четырех одинаковых проб ДНК с использованием специфических соединений, расщепляющих молекулу ДНК в первом случае по Т, во втором по Ц, в третьем по Г и в четвертом по А. Например, пуриновые основания модифицируются с помощью диметилсульфата (происходит метилирование адениновых остатков по азоту в третьем положении, а гуаниновых — по азоту в седьмом положении), обработка ДНК соляной кислотой на холоде приводит к выщеплению метиладенина, а пиперидин расщепляет ДНК на фрагменты по остаткам метилгуанина. Пиримидиновые основания модифицируют с помощью гидразина (в присутствии 2 М NaCl модифицируется только цитозин).

Чаще всего в четырех отдельных пробах меченый полинуклеотид подвергают следующей химической обработке для получения мо-

дификаций: диэтилпирокарбонатом — по аденину, диметилсульфатом — по гуанину, оксидом осмия (IV) — по тимину и гидразинном — по цитозину. Концентрацию модифицирующих реагентов и время реакции подбирают так, чтобы одна молекула реагента взаимодействовала с основанием одного полинуклеотида. Результатом является набор молекул ДНК с модифицированными основаниями во всех положениях цепи. Затем его обрабатывают пиперидином для разрыва цепей в положении модифицированного основания, соответственно образуются полинуклеотиды разных размеров.

Полученный полный набор фрагментов разделяют строго по размерам при помощи электрофореза на четырех параллельных дорожках (соответственно по сайтам расщепления Т, Ц, Г и А) одного полиакриламидного геля. Полную последовательность ДНК определяют из анализа результатов электрофореза посредством радиоавтографии, оценивая вертикальное и горизонтальное (по дорожкам) распределение полос в геле. Первая снизу полоса соответствует расположенному на 5'-конце нуклеотиду и т.д. (рис. 11.1).

Метод химической деградации (метод Максама—Гилберта) позволяет эффективно секвенировать фрагменты размером от 3—5 до нескольких сотен нуклеотидов, а также двухцепочечный полинуклеотид (если у него помечена только одна цепь). Этот метод применяется в настоящее время для секвенирования областей с очень высоким содержанием Г/Ц и участков, образующих тугоплавкие вторичные структуры. Также данный подход позволяет секвенировать РНК (тогда метка вводится на 3'-конец, а набор модифицированных нуклеиновых кислот обрабатывают анилином вместо пиперидина).

Ферментативный (дидезоксинуклеотидный) метод секвенирования ДНК основан на энзиматическом введении нуклеотида, терминирующего цепь молекулы ДНК и останавливающего ее синтез. В результате реакции, как и в случае метода Максама—Гилберта, образуется статистический набор фрагментов ДНК различной длины.

Применение этого быстрого, технологичного и точного метода (называемого также *методом терминирующих аналогов трифосфатов*) произвело настоящую революцию в разработке молекулярных подходов к диагностике многих болезней. В настоящее время дидезоксинуклеотидный метод в модифицированном виде продолжает широко использоваться при секвенировании фрагментов ДНК. В этом случае применяют полученные искусственным путем 2'-3'-дидезоксирибонуклеозидтрифосфаты, в которых по сравнению с нормальными нуклеотидами (дезоксирибонуклеозидтрифосфатами) от-

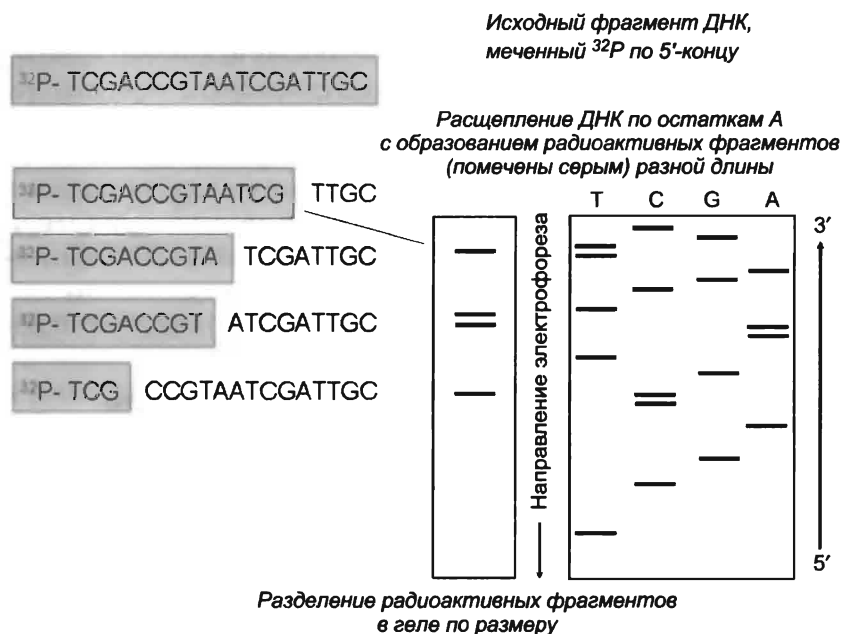


Рис. 11.1. Принцип химического метода секвенирования ДНК

существует 3'-гидроксильная группа при углеродном атоме сахарного кольца. Такой модифицированный нуклеотид, включаясь в цепь ДНК при репликации, блокирует присоединение к концу растущей цепи следующего дезоксирибонуклеотида ввиду отсутствия 3'-ОН группы и соответственно невозможности образования фосфодиэфирной связи.

При синтезе молекулы ДНК *in vitro* в присутствии праймера (синтетического олигонуклеотида, поставляющего 3'-ОН группу для инициации синтеза второй цепи на денатурированной ДНК-матрице), ДНК-полимеразы, четырех дезоксирибонуклеотидов (дАТФ, дЦТФ, дГТФ и дТТФ, один из них — радиоактивно- или, чаще, флуоресцентно-меченый) и экспериментально подобранного небольшого количества соответствующего дидезоксирибонуклеотида (терминатора) образуется смесь флуоресцирующих фрагментов ДНК различного размера, оканчивающихся на данный 3'-дидезоксинуклеотид. Для проведения реакции секвенирования необходимо порядка 0,1–1 мкг матричной ДНК, достаточно хорошо очищенной во избежание высокого фона или ложных сигналов. Концентрации нуклеотидов подбирают с учетом субстратной специфичности ДНК-полимеразы (для дНТФ — 2–20 мкМ, для ддНТФ — 1–600 мкМ).

При таком методе определения последовательности нуклеотидов ДНК проводят четыре реакции синтеза, каждая из которых использует различные дидезоксирибонуклеозидтрифосфаты-терминаторы (ддАТФ, ддЦТФ, ддГТФ или ддТТФ), прекращающие удлинение цепи ДНК. Концентрацию каждого дидезоксирибонуклеотида подбирают так, чтобы он оказался включенным по всем позициям в смеси растущих цепей ДНК. Таким образом, продуктом каждой из четырех реакций синтеза является уникальный набор олигонуклеотидов разной длины, включающих нуклеотидную последовательность праймера (при этом образуется и некоторое число полноразмерных молекул ДНК).

Затем в пробы добавляют формамид для расхождения цепей и разделяют продукты реакций с помощью электрофореза в полиакриламидном геле на четырех параллельных дорожках (по числу реакций). Таким образом можно разделить одноцепочечные фрагменты, различающиеся по длине всего на один нуклеотид. При детекции будет обнаружен набор полос, отвечающих меченым фрагментам ДНК, и по сопоставлению их расположения определяют нуклеотидную последовательность секвенируемого участка ДНК. Меченый фрагмент в самом низу геля соответствует самому короткому фрагменту.

В более современной модификации метода применяют четыре набора фрагментов (оканчивающихся каждым из дидезоксирибонуклеотидов А, Т, Ц или Г соответственно), которые автоматически определяются детектором по флуоресценции соответствующих различно меченых затравок в процессе движения по одной дорожке геля (рис. 11.2).

С помощью дидезокси-метода можно секвенировать также очень длинные фрагменты ДНК (5000 по и более) при использовании так называемой «праймер-опосредованной прогулки». Для этого идентифицируют первые 250–350 нуклеотидов изучаемой последовательности ДНК; затем подбирают второй олигонуклеотидный праймер, комплементарный концевому участку уже секвенированной последовательности, который отстоит примерно на 300 нуклеотидов от места связывания первого праймера; секвенируют следующие 250–350 нуклеотидов и так далее, до полного секвенирования всей вставки. Так секвенируют фрагменты ДНК, клонированные в бактериофаге λ (20 тпо) или в космидах (40 тпо).

Автоматизация дидезоксинуклеотидного метода с использованием праймеров или терминаторов, меченных различными флуоресцентными красителями с разной длиной волны флуоресценции,



Рис. 11.2. Принцип ферментативного метода секвенирования ДНК

и лазерного сканирования электрофоретической дорожки позволяет проводить быстрое рутинное секвенирование фрагментов ДНК размером в несколько десятков п.н. Весь процесс секвенирования, так же как и в классическом методе, состоит из двух основных этапов: постановка терминирующих реакций и электрофоретическое разделение меченых продуктов реакций в ПААГ с получением спектра эмиссии меток-флуорофоров. Обычно автоматизируется только вторая стадия.

Что касается **флуоресцентной метки**, то ее включают или в праймер, или в ддНТФ-терминатор по одному из следующих вариантов: 1) меченый четырьмя различными красителями праймер и немеченые терминаторы (проводят четыре реакции с каждым из термина-

торов), 2) меченый одним красителем праймер и немеченые терминаторы (разделение продуктов реакции проводят на четырех дорожках геля), 3) меченые каждый соответствующим красителем терминаторы и немеченый праймер (данный подход позволяет совместить четыре реакции в одной пробирке и разделить полученные продукты в одной лунке геля).

В настоящее время существует большое разнообразие флуоресцентных красителей, которые удовлетворяют ряду требований: иметь высокую интенсивность флуоресценции, оказывать минимальное влияние на электрофоретическую подвижность меченого фрагмента ДНК в полиакриламидном геле и иметь минимальное перекрытие спектров эмиссии. Спектр абсорбции и спектр эмиссии флуорофора зависят не только от его химической структуры, но и от окружающих условий (pH, температуры). Автоматические секвенаторы работают с флуорофорами, у которых абсорбция и испускание происходят в видимой области спектра при длине волн 450–650 нм либо в ближней инфракрасной области спектра при длине волн 650–825 нм.

Для видимой области спектра применяют флуоресцеиновые (FAM, JOE), родаминовые (R110, R6G, TAMRA, ROX) и d-родаминовые, а также трехкомпонентные красители семейств BigDye™ («Applied Biosystems», США) и DYEnamic™ ET («GE Healthcare», Великобритания). Трехкомпонентные красители, использующие принцип безизлучательного переноса энергии возбужденного состояния от донора к акцептору, отличаются повышенным квантовым выходом, что увеличивает чувствительность метода. Донором во флуоресцентных красителях BigDye™ является 4'-аминометил-5(6)-карбоксифлуоресцеин (5CF или 6CF), который связан с акцептором (d-родаминовым красителем) через остаток 4-аминометилбензойной кислоты. В автоматических секвенаторах с детекторами флуоресценции в инфракрасной области спектра (например, производства компании «LI-COR Biotechnology», США) используют цианиновые красители (семейства IRDye и Cy5).

При автоматическом секвенировании используют рекомбинантные ДНК-полимеразы, у которых отсутствуют 3'- и 5'-экзонуклеазные активности и которые одинаково эффективно включают в растущую цепь ДНК как обычные, так и меченые ддНТФ. Обычно применяют два подхода — 1) синтез при 37°C при помощи высокоэффективных термолабильных полимераз (например, T7 ДНК-полимеразы-секвенса производства «GE Healthcare», Великобритания); либо 2) циклический процесс, включающий денатурацию, отжиг и элонгацию,

с использованием термостабильных ДНК-полимераз (например, Thermo Sequenase™ производства «GE Healthcare», Великобритания; AmpliTaq™ производства «Applied Biosystems», США). Секвенаса представляет собой клонированный фрагмент Кленова, с гораздо большей эффективностью связывающий дидезоксирибонуклеозидтрифосфаты. Циклический процесс позволяет осуществить секвенирование очень малых (фемтомолярных) количеств образца.

Флуоресцентно-меченые продукты реакции секвенирования (одноцепочечные фрагменты ДНК) разделяют в денатурирующих условиях при помощи **электрофореза в 5–8%-ном полиакриламидном геле**. Условия электрофореза позволяют проводить эффективное разделение фрагментов, отличающихся по длине всего на один нуклеотид, в широком диапазоне размеров. Как правило, полиакриламидные гели содержат 7 М мочевины, а электрофорез осуществляют в трис-боратном буферном растворе (pH 8,0–8,5) при напряжении около 40 В на 1 см геля. Очень важным требованием является также обеспечение одинаковой оптимальной для проведения электрофореза температуры вдоль всей длины геля, поскольку неравномерный нагрев кассеты для геля способен исказить результаты секвенирования из-за разной скорости движения фрагментов ДНК по фронту геля. Поэтому в автоматических секвенаторах применяют тонкие (0,2–0,4 мм толщиной) гели и подогрев стекол кассеты для геля (например, с помощью термопластины с водяной системой).

В настоящее время большую популярность получили автоматические капиллярные секвенаторы, осуществляющие электрофорез в капиллярах, залитых линейным полиакриламидным гелем. Капилляры секвенатора представляют собой трубки длиной 30–100 см и диаметром 50–100 мкм, и их применение позволяет осуществлять электрофорез быстрее и гораздо эффективнее (за счет отсутствия горизонтальной диффузии и малого диаметра капиллярной трубки). Капиллярные секвенаторы обладают высоким уровнем автоматизации — начиная от заливки геля в капилляры и кончая загрузкой образцов.

Типы автоматических секвенаторов. Современные секвенаторы делятся по типу проведения электрофореза в ПААГ на *пластинчатые* (детектируют один, два или четыре флуоресцентных красителя) и *капиллярные* (детектируют четыре флуоресцентных красителя).

Пластинчатые секвенаторы различаются по способу заливки геля и его размеру (что определяет количество и длину разгона анализируемых образцов). Одним из наиболее популярных секвенаторов, осуществляющих электрофорез в пластинах геля, является ABI 373,

производство которого было начато в начале 1990-х гг. компанией «Applied Biosystems» (США). Эта модель может одновременно детектировать четыре флуоресцеиновых (FAM, JOE) и родаминовых (TAMRA, ROX) красителя, возбуждаемых непрерывным излучением аргонового лазера в диапазоне длин волн 488–514 нм при прохождении меченым фрагментом ДНК зоны сканирования и детекции вдоль всего геля. Для уменьшения перекрывания спектров эмиссии флуоресценции сигнал от метки пропускается через диск с четырьмя последовательно заменяемыми светофильтрами (так называемая *оптическая фильтрация флуоресценции красителей*). Прибор ABI 373 позволяет проводить секвенирование 16–24 образцов за прогон, определяя до 450 нуклеотидов за 9 ч.

Последующая модель ABI Prism 377 разлагает пучок света флуоресцентной эмиссии на составляющие во всем спектральном диапазоне с помощью дифракционной решетки и фиксирует кванты света камерой на основе устройства с зарядовой связью. Секвенатор позволяет провести автоматический анализ до 96 образцов и осуществить определение последовательности в 900 нуклеотидов за 9-часовой прогон (~100 нуклеотидов/ч).

В качестве примера секвенатора, детектирующего один флуоресцентный краситель, можно привести модель MicroGene Blaster («Visible Genetics», Канада). Этот секвенатор позволяет проводить одновременный анализ четырех образцов, меченных цианиновым красителем Cy5.5, на 16 дорожках геля в специальных одноразовых кассетах с гелем. В зависимости от размера используемой кассеты можно провести быстрый (30–120 мин) сиквенс фрагмента размером от 300 до 700 нуклеотидов. Для возбуждения эмиссии флуорофора MicroGene Blaster оборудован гелий-неоновым лазером с длиной волны 633 нм, причем луч лазера направлен поперек геля.

Также с одним флуоресцентным красителем работают секвенаторы широко известного модельного ряда ALFexpress (рис. 11.3, а), выпущенные компанией «Amersham Pharmacia Biotech» (Швеция), а затем — «GE Healthcare» (Великобритания). Например, ALFexpress II использует красный гелий-неоновый лазер (633 нм) для возбуждения флуоресценции красителей семейства Cy5 и 40 фотодетекторов (по одному на каждую дорожку геля) для автоматического измерения флуоресцентной эмиссии меченых фрагментов ДНК в ходе вертикального электрофореза. Прибор позволяет провести определение последовательности в 600 нуклеотидов за 6 ч.

На двух флуоресцентных красителях работает, например, секвенатор IR2 («LI-COR Biotechnology», США) с двумя твердофазными



Рис. 11.3. Секвенаторы: а) ALFexpress II, осуществляющий электрофорез в пластинах геля («GE Healthcare», Великобритания); б) 4-х капиллярный секвенатор ABI Prism 3130 («Applied Biosystems», США)

полупроводниковыми лазерами — в качестве флуорофоров для мечення ДНК используются производные IRDye700 и IRDye800 (цианиновые красители инфракрасной области спектра). Возбуждение и детекция эмиссии красителей происходит последовательно, детекция осуществляется специальным фотодиодом для каждого красителя. Применение подобной технологии позволяет разнести спектры эмиссии и проводить одновременное двухнаправленное секвенирование с использованием пары меченых праймеров. Применяемые пластины геля обеспечивают прогон образцов на 32–96 дорожках в зависимости от размера геля, позволяя определять после-

довательность до 2000 нуклеотидов (при двухнаправленном секвенировании).

Первым капиллярным секвенатором стал прибор ABI Prism 310 («Applied Biosystems», США), имеющий один капилляр и аргоновый лазер, который позволяет провести автоматический анализ до 96 образцов. Полный цикл для каждого образца, занимающий 90 мин, состоит из электрокинетического введения пробы в капилляр, капиллярного электрофореза, этапа возбуждения и детекции флуоресцентной эмиссии и смену полимера в капилляре перед введением следующей пробы. Размер определяемой за цикл последовательности образца составляет примерно 450 нуклеотидов.

В настоящее время очень широкое распространение получили мультикапиллярные секвенаторы для одновременного анализа большого количества образцов за прогон (4–96-капиллярные), выпускаемые такими известными компаниями, как «Applied Biosystems» (США), «Beckman Coulter» (США), «GE Healthcare» (Великобритания). Например, 4-капиллярный секвенатор ABI Prism 3130 производства компании «Applied Biosystems» с аргоновым лазером (длина волны 488–514 нм), работающий с d-родаминовыми или трехкомпонентными (BigDye™) красителями, позволяет определить 500 нуклеотидов за 35 мин с использованием 36-см капилляров или 950 нуклеотидов за 170 мин с использованием 80-см капилляров при проведении капиллярного электрофореза в полимере POP7 (рис. 11.3, б).

Ниже приведены протоколы постановки стандартной реакции секвенирования с флуоресцентной меткой, используемой в диде-зокси-нуклеотидном методе, и разделения фрагментов ДНК в пластине геля при помощи автоматического секвенатора.

ПОСТАНОВКА РЕАКЦИИ СЕКВЕНИРОВАНИЯ

I. При использовании набора ABI PRISM BigDye™ Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit производства компании «Applied Biosystems», США.

1. Приготовить во льду исходную смесь следующего состава:

— готовая реакционная смесь (*Terminator Ready Reaction Mix*) — 8 мкл. Смесь состоит из А(Ц, Г, Т)-BigDye™ терминаторов, четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, AmpliTaq® ДНК-полимеразы, MgCl₂ и трис-НСl буферного раствора (рН 9,0);

— матричная ДНК — 50–100 нг одноцепочечной или 200–500 нг двухцепочечной ДНК; для подбора концентрации продукта ПЦР можно воспользоваться формулой $x = n / 50$, где x — количество

фрагмента ДНК в нг, n — его размер в парах оснований. Максимальный объем составляет 8 мкл;

— олигонуклеотидный праймер — 3–5 пмоль. Максимальный объем 4 мкл;

— довести деионизованной водой до конечного объема 20 мкл.

2. Поставить в амплификаторе реакцию со следующим температурным режимом:

96°C — 1 мин (первичная денатурация);

25–28 циклов:

96°C — 10 с (денатурация),

50–60°C — 10 с (отжиг, T_a зависит от используемого праймера),

60°C — 4 мин (удлинение).

Примечание. а) Температура гибридизации (отжига) не должна быть меньше 50°C; б) если температура плавления сконструированного праймера превышает 60°C, то исключите из реакции этап отжига; в) количество циклов можно увеличить в случае слабого накопления продукта реакции или низкой концентрации ДНК-матрицы; г) при использовании ДНК-матриц большого размера (например, космидной ДНК или бактериальной хромосомы) лучше применять для первичной денатурации 5 мин, для денатурации — 30 с и проводить 50 циклов; д) некоторые протоколы для повышения эффективности сиквенса рекомендуют вносить в реакционную смесь до 10% ДМСО или 10% формамида на этапе отжига.

3. После прохождения реакции отцентрифугировать пробы на настольной центрифуге при максимальных оборотах в течение 1 мин и очистить продукт реакции от невключившихся ддНТФ с помощью преципитации с этанолом/ацетатом натрия по следующему протоколу:

— добавить в стерильную микроцентрифужную пробирку 3 мкл 3 М ацетата натрия (рН 4,6); 62,5 мкл ледяного 96%-ного этанола и 14,5 мкл деионизованной воды;

— внести в эту пробирку реакционную смесь из п. 2 (~20 мкл) после центрифугирования, тщательно перемешать;

— инкубировать при –80°C в течение 20 мин (или при –20°C в течение 30 мин) для преципитации продуктов реакции;

— центрифугировать на настольной центрифуге при 15 000 g в течение 15 мин;

— полностью отобрать с помощью микропипетки и отбросить супернатант (в нем растворены невключившиеся ддНТФ);

— промыть осадок 250 мкл 70%-ного этанола, перемешать;

— центрифугировать на настольной центрифуге при 15 000 g в течение 5–10 мин;

— полностью отобрать с помощью микропипетки и отбросить супернатант;

— высушить осадок на воздухе или под вакуумом в течение 10 мин. Для сиквенсового электрофореза ресуспендировать осадок в 10 мкл формамида, инкубировать при 95°C в течение 2–3 мин для денатурации и немедленно поместить в лед.

II. Широкое применение нашел набор для постановки реакций секвенирования **Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit** («USB Corporation», США) с использованием флуоресцентно-меченых (IRDye800) терминирующих смесей. Стандартная реакционная смесь готовится во льду для четырех реакций. Сперва в 0,5-мл ПЦР пробирки вносят терминирующую смесь д/ддНТФ из набора (А, Ц, Г или Т) по 1 мкл. Затем в пробирки добавляют по 3 мкл смеси ДНК и праймера следующего состава: немеченый праймер (1 пмоль/мкл) — 1,5 мкл; матричная ДНК (0,3 пмоль); буферный раствор для реакции — 0,75 мкл; термосеквеназа (4 ед./мкл) — 1 мкл и бидистиллированная вода (довести конечный объем до 13,5 мкл). Сверху вносят по 50 мкл минерального масла.

Ставят реакцию секвенирования в приборе-амплификаторе со следующим температурным режимом: 95°C, 2 мин (1 цикл); 95°C, 30 с — T_m -5°C, 30 с — 72°C, 45 с (30 циклов) и 72°C, 3 мин — 30°C, 1 мин (1 цикл). После окончания реакции очистить образцы с помощью преципитации с этанолом/ацетатом натрия.

III. Иногда применяют набор для постановки реакций секвенирования с использованием флуоресцентно-меченого праймера **Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing Kit with 7-deaza-dGTP** («GE Healthcare», Великобритания). Он содержит А(Ц, Г, Т)-реагенты (состава: трис-НCl, pH 9,5; MgCl₂; Tween 20; NonidetTM P-40; 2-меркаптоэтанол; дАТФ; дЦТФ; 7-деаза-дГТФ; дТТФ; ддА(Ц, Г, Т)ТФ; термостабильная пирофосфатаза; Thermo Sequenase ДНК-полимераза) и раствор с формамидом + красителем для нанесения в гель (раствор добавляют после реакции удлинения цепи ДНК). Стандартная реакционная смесь готовится во льду для четырех реакций. Вначале в охлажденные 0,5-мл ПЦР пробирки вносят терминирующую смесь д/ддНТФ из набора (А, Ц, Г или Т) по 1 мкл. Затем в каждую пробирку добавляют по 3 мкл смеси ДНК и праймера следующего состава: флуоресцентно-меченый олигонуклеотидный праймер (1–5 пмоль); матричная ДНК (~0,1 пмоль); ДМСО — 0,5 мкл и бидистиллированная вода (довести конечный объем до 13 мкл). Сверху вносят по 50 мкл парафинового или минерального масла.

Ставят реакцию секвенирования в приборе-амплификаторе со следующим температурным режимом: 95°C, 4 мин (1 цикл); 95°C, 45 с — T_m –5°C, 45 с — 72°C, 1 мин (30 циклов) и 95°C, 3 мин — 72°C, 1 мин (1 цикл). После прохождения реакции удаляют масло с поверхности смеси с помощью микропипетки и вносят по 3 мкл 2× раствора с красителем для остановки реакции (состав раствора: 95%-ный формамид; 20 мМ ЭДТА; 0,05% кислого фуксина). Отцентрифугировать на настольной центрифуге при максимальных оборотах в течение 1 мин. Образцы готовы для нанесения в полиакриламидный гель для сиквенса (по 1–2 мкл) без предварительной денатурации, их можно хранить при –20°C.

Иногда рекомендованная реакция секвенирования имеет вид: 95°C, 4 мин (1 цикл); 94°C, 30 с — T_m –5°C, 30 с (28–30 циклов). Тогда после внесения раствора для остановки реакции (*formamide loading dye fluorescent sample*) пробы прогревают при 80°C в течение 4 мин для денатурации. Чтобы подтвердить результаты секвенирования фрагмента ДНК рекомендуется провести также повторное секвенирование с обратным праймером (и/или с праймерами, позволяющими получить перекрывающиеся последовательности) и сравнить полученные результаты.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ГЕЛЯ ДЛЯ СИКВЕНСА

Приведем пример использования пластинчатого секвенатора, поскольку современные капиллярные секвенаторы полностью автоматизированы.

А. Сборка кассеты для геля

1. Тщательно промыть щелочным раствором низкой концентрации (например, Extean MA 01AI производства «Merck», Германия или 50 мМ NaOH), теплой деионизованной водой и 70%-ным этанолом стекла кассеты для геля (с двух сторон), гребенку, а также очень аккуратно — стеклянные спейсеры-разделители. Можно мыть стекла мягкой нейлоновой щеткой и нефлуоресцирующими детергентами (*мыло применять нельзя!*). Недостаточно отмытые или поцарапанные стекла могут явиться причиной плохой полимеризации полиакриламидного геля, нечеткого разделения полос при электрофорезе и соответственно получения недостоверных результатов секвенирования. *Работать со стеклами всегда необходимо в перчатках!* После каждой промывки вытирать стекла и спейсеры насухо при помощи бумажных безворсовых салфеток.

Для предотвращения прилипания геля рекомендуется распределить по поверхности верхнего стекла 0,5–1 мл диметил-дихлорси-

лана (*repel silane*), подсушить 3 мин, отполировать безворсовой салфеткой, сполоснуть этанолом для удаления частичек пыли и подсушить. Верхние 1,5 см второго стекла можно обработать так называемым *bind silane* (свежеприготовленная смесь состава абсолютный этанол : 10%-ная уксусная кислота : *bind silane*, 1 мл : 250 мкл : 3 мкл) для обеспечения ковалентного связывания геля со стеклом в том месте, куда вставляется гребенка для формирования лунок; его же наносят на нижний край стекла для герметичности. *Bind silane* представляет собой γ -метакрилоксипропилтриметоксисилан. Иногда им обрабатывают всю поверхность второго стекла.

Внимание! Repel silane и bind silane являются токсичными летучими веществами, при работе с ними необходимо использовать перчатки и вытяжной шкаф.

2. Собрать кассету для геля (состоящую, как правило, из нижнего и верхнего стекла, спейсеров-разделителей стекол, нескольких пар зажимов и термопластины для поддержания заданной температуры при электрофорезе), следуя рекомендациям производителя прибора.

Б. Заливка геля

1. Использовать коммерческий полиакриламидный гель (например, ReproGel™ производства «GE Healthcare», Великобритания), который состоит из раствора «А» (21%-ный акриламид : бис-акриламид) и раствора «Б» (ТВЕ, денатурирующий агент и УФ инициатор), хранящихся при комнатной температуре в темноте. Эти растворы необходимо объединить в одной большой пластиковой бутылки и аккуратно перемешать путем переворачивания бутылки с надетым носиком для нанесения геля непосредственно перед его заливкой

Внимание! Незаполимеризовавшийся акриламид является нейротоксичным веществом, работать с ним необходимо в перчатках!

Существует два типа данного раствора геля: *ReproGel™ High Resolution* (для секвенирования коротких фрагментов ДНК размером до 450 оснований) и *ReproGel™ Long Read* (для секвенирования длинных фрагментов ДНК).

2. Аккуратно и медленно залить полиакриламидный гель через нижний край между скрепленными зажимами стеклами кассеты со вставленными спейсерами на специальном заливочном столике (*не допускать образования даже мельчайших пузырей в ходе заливки геля!*), вставить в гель гребенку и оставить полимеризоваться в течение 10 мин под УФ светом на установке ReproSet™ (рис. 11.4). Конечная концентрация мономеров акриламида и бис-акриламида в ReproGel™ Long Read составляет 7% (вес/объем) в 1,5× ТВЕ, а в ReproGel™ High Resolution — 8% (вес/объем) в 1× ТВЕ. Желательно использовать гель

Рис. 11.4. Оборудование для заливки и полимеризации раствора полиакриламидного геля ReproGel™ для постановки секвенирования («GE Healthcare», Великобритания)



для секвенирования в течение часа после окончания полимеризации. При необходимости можно протереть стекла кассеты для геля в районе прохождения лазерного луча ДНК-секвенатора перед тем, как поместить ее в прибор.

Примечание. Приведем состав 5%-ного акриламидного геля с формамидом, если гель нужно готовить самим в лабораторных условиях. На 100 мл геля: 42 г мочевины (7 М); 4,75 г акриламида; 0,25 г бисакриламида; 35 мл формамида; 24,6 мл воды. Добавить 5 мл 20× буферного раствора GTGB (*Glycerol Tolerant Gel Buffer*) состава: 1,78 М трис; 0,56 М таурина ($C_2H_7NO_3S$); 10,7 мМ $Na_2EDTA \times 2 H_2O$. Полностью растворить мочевины при перемешивании, дегазировать 15–20 мин, отфильтровать через 0,2-мкм фильтр, непосредственно перед заливкой геля добавить 500–700 мкл 10%-ного персульфата аммония и 50–100 мкл TEMED.

Часто гели для секвенса готовят также на 1–1,2× буферном растворе TBE, в который вносят ДМСО (1 мл/100 мл геля). Заливку геля между стеклянными пластинами осуществляют с помощью большого шприца, медленно выдавливая гель при движении шприца от одного края стекла к другому (фронт геля должен быть прямым). Акриламидные гели (3,75–8%) полимеризуются в течение 1,5–2 ч.

Гели с формамидом (в сочетании с 7-деаза-дГТФ) используются преимущественно для секвенирования сложных участков, в стандартных экспериментах лучше использовать гели без добавления формамида.

СЕКВЕНИРОВАНИЕ

В качестве примера приведем пластинчатый ДНК-секвенатор ALFexpress II производства компании «GE Healthcare» (Великобритания), использующий красный гелий-неоновый лазер (633 нм) для возбуждения флуоресценции и 40 фотодетекторов (по одному на каждую дорожку геля) для автоматического измерения флуоресцентной эмиссии меченых фрагментов ДНК в ходе вертикального электрофореза при дидезоксинуклеотидном секвенировании (рис.

11.3, а). Таким образом, ALFexpress II позволяет анализировать за один прогон 10 образцов (по 4 дорожки, соответствующие азотистым основаниям, на каждый). Для мечения дНТФ или праймера используется метка DyeAmidite⁶⁶⁷. При постановке реакции секвенирования применяют наборы **ALFexpress AutoRead Sequencing Kit** или **ALFexpress dATP Labelling Mix**. Сигналы с фотодетектора секвенатора посылаются на компьютер для хранения и обработки. Во время электрофореза данные выводятся в виде хроматограммы в реальном времени на экране компьютера (каждому из четырех азотистых оснований присвоен свой цвет, поэтому каждый пик на кривой секвенирования соответствует отдельному нуклеотиду в последовательности), см. рис. 11.5.

1. Включить прибор с присоединенным компьютером и выставить оптимальные параметры секвенирования для *ReproGel Long Read* в соответствующей программе: напряжение 1500 В, сила тока 60 мА, мощность 25 Вт, температура геля 55°C, интервал между образцами — 2 с, время прогона — 750–1000 мин.

Внимание! В ходе работы с секвенатором необходимо соблюдать правила техники безопасности при использовании высоковольтных электрических приборов и приборов с лазерным излучением!

2. Правильно установить в соответствии с рекомендациями компании-производителя нижний резервуар для буферного раствора и кассету для геля. Налить буферный раствор до метки в нижний и верхний резервуары, подсоединить водяную систему к термопластине и закрыть крышку прибора. По достижении требуемой температуры удалить гребенку из геля и аккуратно промыть лунки буферным раствором с помощью шприца. В качестве буферного раствора при секвенировании рекомендуется использовать буферный раствор TBE состава (0,5×): трис — 0,05 М; борная кислота — 41,5 мМ; ЭДТА — 0,5 мМ; pH 8,3. Убедиться в отсутствии протечек буферного раствора.

3. Денатурированные пробы аккуратно внести микропипеткой в лунки геля по 4–10 мкл, слева направо в рекомендуемом порядке — А, Ц, Г, Т.

4. Подсоединить электроды к соответствующим клеммам на секвенаторе. Убедиться, что стекло перед фотодетекторами является абсолютно чистым и его положение отрегулировано. Откалибровать (сфокусировать) лазер, пользуясь соответствующим программным обеспечением, а также отрегулировать фоновый сигнал. Начать процесс автоматического секвенирования.

5. После окончания прогона выключить прибор, открыть его крышку, отсоединить электроды и водяную систему термоконтроля,

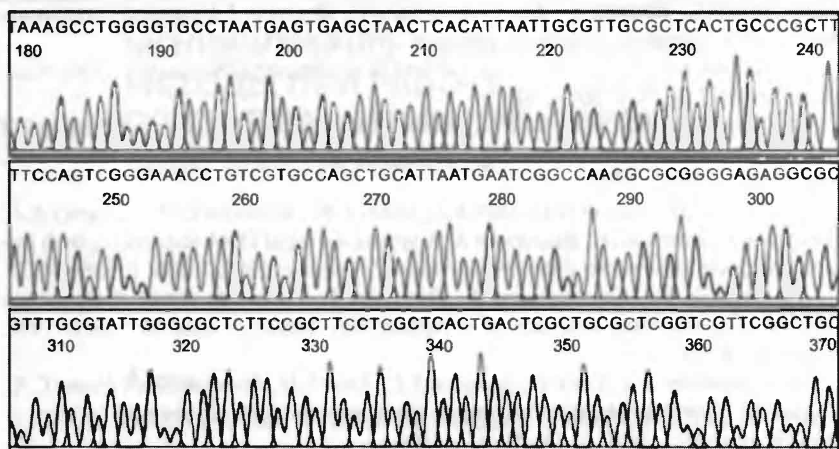


Рис. 11.5. Типичный вид кривых секвенирования

после охлаждения до комнатной температуры извлечь кассету с гелем и вылить буферный раствор из резервуаров. Протереть фотодетекторы на секвенаторе мягкой безворсовой салфеткой, смоченной деионизованной водой. Аккуратно разъединить стекла кассеты, не допуская их повреждения, удалить с них гель с помощью специального скребка из мягкого пластика. Протереть и вымыть компоненты кассеты теплой деионизованной водой, высушить их на воздухе.

6. Для обработки и анализа результатов секвенирования можно использовать программу Alfin Sequence Analyzer 2.0 («GE Healthcare», Великобритания), а также DNASIS («Hitachi Software Engineering Co.», Япония), пакет программ EditSeq, SeqMan II, MapDraw, Megalign («DNAStar», Великобритания) и интернет-базы данных BLAST2 (NCBI), EMBL.

Литература

1. Chen E.Y., Seeburg P.H. Supercoil sequencing: a fast and simple method for sequencing plasmid DNA // DNA 1985. V. 4. P. 165–170.
2. Gilbert W. DNA sequencing and gene structure // Science. 1981. V. 214. P. 1305–1312.
3. Hall N. Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology // J. Exp. Biol. 2007. V. 210. P. 1518–1525.
4. Ju J., Ruan C., Fuller C.W., Glazer A.N., Mathies R.A. Fluorescence energy transfer dye-labeled primers for DNA sequencing and analysis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995. V. 92. P. 4347–4351.
5. Lee L.G., Spurgeon S.L., Heiner C.R., Benson S.C., Rosenblum B.B., Menden S.M., Graham R.J., Constantinescu A., Upadhyya K.G., Cassel J.M. New energy transfer dyes for DNA sequencing // Nucleic Acids Res. 1997. V. 25. P. 2816–2822.

6. *Martin C., Bresnick L., Juo R.-R., Voyta J.C., Bronstein I.* Improved chemiluminescent DNA sequencing // *BioTechniques*. 1991. V. 11. P. 110–114.
7. *Maxam A.M., Gilbert W.* A new method of sequencing DNA // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1977. V. 74. P. 560–564.
8. *Nunnally B.K., He H., Li L.C., Tucker S.A., McGown L.B.* Characterization of visible dyes for four-decay fluorescence detection in DNA sequencing // *Anal. Chem.* 1997. V. 69. P. 2392–2397.
9. *Prober J.M., Trainor G.L., Dam R.J., Hobbs F.W., Robertson C.W., Zagursky R.J., Cocuzza A.J., Jensen M.A., Baumeister K.* A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain terminating dideoxynucleotides // *Science*. 1987. V. 238. P. 336–341.
10. *Ronaghi M., Karamohamed S., Pettersson B., Uhlen M., Nyren P.* Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release // *Anal. Biochem.* 1996. V. 242. P. 84–89.
11. *Rosenblum B.B., Lee L.G., Spurgeon S.L., Khan S.H., Menchen S.M., Heiner C.R., Chen S.M.* New dye-labeled terminators for improved DNA sequencing patterns // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. P. 4500–4504.
12. *Sanger F., Coulson A.R.* A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase // *J. Mol. Biol.* 1980. V. 143. P. 161–178.
13. *Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.* DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1977. V. 74. P. 5463–5467.
14. *Smith L.M., Sanders J.Z., Kaiser R.J., Hughes P., Dodd C., Connell C.R., Heiner C., Kent S.B., Hood L.E.* Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis // *Nature*. 1986. V. 321. P. 674–679.
15. *Tu O., Knott T., Marsh M., Bechtol K., Harris D., Barker D., Bashkin J.* The influence of fluorescent dye structure on the electrophoretic mobility of end-labeled DNA // *Nucleic Acids Res.* 1998. V. 26. P. 2797–2802.

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ПРИ РАБОТЕ СО СМЕШАННЫМИ КУЛЬТУРАМИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Глава 12

ЭКСТРАКЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ (ДНК И РНК) ИЗ ПРИРОДНЫХ ОБРАЗЦОВ

Применение техники молекулярно-биологических исследований для обнаружения и изучения микроорганизмов в природных образцах бурно развивается в последние 20 лет. Это привело ко все большему пониманию микробных процессов и выявлению богатого микробного разнообразия в природных экосистемах. Обнаружение и идентификация НК — полезный инструмент для характеристики микроорганизмов в их природных эконикшах, так как только очень небольшое количество (менее 0,1%) этих видов может быть выделено и выращено в лаборатории. Поэтому многие исследователи используют преимущества чувствительности, специфичности и скорости молекулярной техники для обнаружения разных типов микроорганизмов в природных образцах. Экстракция ДНК и РНК из природных образцов — первый шаг к применению многочисленных молекулярных методов исследований, однако в силу разных причин эти методы получили меньшее внимание методистов. Существует огромное количество литературы по оптимизации ПЦР, разработке и сравнению праймеров, велик коммерческий интерес к поиску новых, более эффективных ферментов (термостабильных полимераз), однако все эти приемы могут быть использованы лишь после экстракции НК. Метод, прекрасно показавший себя с одним типом природных образцов в одной лаборатории, может не работать с другими образцами или в других руках (в другой лаборатории). Поэтому многие исследователи адаптируют имеющиеся методы под свои потребности или разрабатывают новые модификации этих методов.

Для экстракции НК из природных образцов не существует одного универсального метода, который подходил бы для всех разнообразных проб. Поэтому опубликовано множество протоколов, по которым проводили экстракцию НК и их очистку для последующих молекулярно-биологических анализов. Можно, однако, привести сводную методику экстракции ДНК и РНК из природных проб и объектов, которая для каждого конкретного случая исследований (вода, почва, осадки рек, озер, морей, болот, части растений, активный ил) может быть модифицирована для достижения наилучшего результата.

Проблема, с которой сталкиваются многие исследователи при применении энзиматических методов к экстрактам НК из природных образцов, состоит в том, что вместе с НК из почвы экстрагируется большое количество гуминовых материалов, которые являются ингибиторами ПЦР и других ферментативных реакций. Добавляет трудностей и невысокая концентрация экстрагируемой ДНК. Идеальный метод экстракции должен давать относительно интактную ДНК и РНК с наименьшими потерями материала из широкого набора природных образцов, с минимумом ко-экстракции гуминовых кислот или других ингибиторов ферментативных реакций. Вдобавок к этому метод должен быть быстрым и не включать применение токсичных органических веществ. Конечно, этот идеал еще не достигнут (а может быть, не будет достигнут никогда), однако эта глава описывает некоторые приемы, которые могут быть универсальными и применимыми при обработке целого ряда различных природных образцов.

Методы экстракции. При экстракции НК из природных образцов используют два основных подхода: отделение и концентрацию микробных клеток из природного образца с последующим их лизисом и очисткой из них НК и прямую экстракцию НК из природных образцов с последующей очисткой от примесей.

Отделение клеток — более длительная и трудоемкая процедура по сравнению с прямой экстракцией, исключающая введение в анализ свободных молекул НК, сорбированных на почвенных коллоидах. НК, экстрагируемые непосредственно из природных образцов, содержат значительное количество загрязнителей и требуют дальнейшей очистки. В дополнение к этому экстрактивный материал содержит не только ДНК и РНК, но также и НК из эукариот: простейших, грибов и водорослей. Оба метода, однако, включают общие процедуры: 1) лизис клеток; 2) высвобождение НК из клеточных компонентов; 3) осаждение НК; 4) очистку НК.

Отделение клеток от природных образцов. Для отделения клеток бактерий от клеток эукариот и от почвенных частиц применяют технику дифференциального центрифугирования. Эффективность фракционирования может быть улучшена при применении химических десорбирующих веществ. Для снятия электростатических сил притяжения между клетками и коллоидными частицами используют детергенты.

Для диспергирования почвенных частиц при встряхивании и последующей обработке пробы УЗ облучением рекомендуют использование комбинации анионного детергента и катионного ионообменника. Добавление ДСН и понижение рН экстрагирующей смеси приводит к увеличению выхода ДНК из осадков и почв. Добавление поливинилпирролидона (ПВП) приводит к удалению гуминовых веществ до процесса гомогенизирования с выходом более чистой суспензии бактерий, хотя ПВП несколько снижает эффективность экстракции. В одном эксперименте показано, что дистиллированная вода, использованная для гомогенизирования образцов и выделения бактерий из почвы, дала лучшие результаты по сравнению со смесью солей Виноградского или Na-PO_4 -буфером (рН 7,5) при отделении бактерий от органических и песчаных почв. Суспензии бактерий могут быть затем очищены в процессе изопикнического градиентного центрифугирования или с помощью зонального центрифугирования в градиентах плотности, в зависимости от количества органического материала, присутствующего в почве.

Выход бактерий из образца может быть оценен в процентах при прямом подсчете клеток с помощью эпифлуоресцентного микроскопа, сравнивая пробы объединенных экстрактов с содержанием клеток в разбавленном образце почвы. При различных методах извлечения клеток из почв величины выхода составляют от 28 до 80% для различных почв.

Поскольку клеточные суспензии фракционируют перед разрушением и промывают растворами пирофосфата или гексаметафосфата, свободные НК и эукариотические клетки не попадают в суспензию прокариот. Большинство гуминовых веществ почвы удаляется при экстракции клеток. При разрушении суспензии прокариот рекомендуют использовать ферменты и детергенты для лучшей экстракции ДНК из клеток, подвергнутых обработке встряхиванием со стеклянными бусами (0,2–0,5 мм в диаметре) в приборах-гомогенизаторах. При разрушении очищенной суспен-

зии клеток получают относительно чистую и нефрагментированную ДНК по сравнению с методом прямой экстракции ДНК из почвы. Однако вследствие трудоемкости метода и стремления анализировать ДНК всего сообщества, а не только прокариотического, предпочтительным является метод прямой экстракции природных ДНК.

12.1.

ПРЯМАЯ ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

При анализе тотальной ДНК природных образцов можно изучать множество закономерностей. Например, изучать предпочтительное доминирование отдельных генов микробного сообщества и изучать действие физико-химических факторов и наличия питательных веществ на распространение микробов. Разнообразие микробного сообщества можно анализировать, сравнивая 16S/18S или 23S/28S-фрагменты рибосомных РНК. Экстракция тотальной ДНК позволяет также анализировать ЖНК-формы бактерий (жизнеспособные, но некультивируемые) и генетическую стабильность в природных экосистемах.

Разработано несколько быстрых и простых методов для экстракции тотальной ДНК из проб осадков, почв и воды, и все они дают высокий выход экстрагированной ДНК из малого объема пробы. При сравнении трех методов выделения ДНК из осадков было установлено, что метод прямой экстракции дает больший выход НК по сравнению с методом выделения клеток, и они более пригодны для блоттинга по Саузерну. Методы прямой экстракции ДНК используют более часто, чем методы выделения клеток, поскольку они лучше отражают микробное разнообразие в природных образцах. Замораживание/оттаивание и разрушение со стеклянными шариками — два наиболее распространенных метода для физического разрушения и лизиса бактериальных клеток в природных образцах, однако установлено, что второй метод дает более высокий выход ДНК. Недостатком второго метода является большая концентрация гуминовых веществ в экстракте по сравнению с методом замораживания/оттаивания. Методы с применением УЗ обработки и растирание в ступке дают похожие результаты. Самый большой недостаток метода прямой экстракции ДНК заключается в высоком содержании ко-экстрагируемых гуминовых веществ в экстрактах ДНК, которые подавляют энзиматические реакции ПЦР и рестрикционного анализа.

Методика — экстракция, очистка и осаждение ДНК из природных образцов

Подготовка водных проб

1. Простерилизуйте автоклавированием в течение 30 мин поликарбонатные мембраны (0,22 мкм, 47 мм в диаметре), обработанные ПВП («Poretic, Inc.»).

2. Погрузите мембраны в стерильный буферный раствор ТЭБ (10 мМ трис-НСl; 1 мМ ЭДТА; рН 7,5) на 15 мин перед фильтрованием.

3. Промойте фильтродержатель несколько раз стерильным ТЭБ, поместите фильтр и профильтруйте через него ~100 мл стерильного ТЭБ.

4. Отфильтруйте пробу воды (**100–1000 мл**, в зависимости от плотности), промойте держатель и мембрану стерильным ТЭБ и снимите фильтр.

5. С помощью стерильного пинцета поместите мембрану в стерильную пробирку на 2 мл.

6. Добавьте **300 мкл** стерильного буферного раствора НТЭ (50 мМ трис-НСl; 20 мМ Na₂ЭДТА; рН 7,5) и убедитесь, что мембрана погружена полностью и нет пузырей воздуха.

Для почвенных, осадочных и фекальных проб суспендируйте **0,5–1,0 г** материала в **1 мл** НТЭ буфера в 20-мл пробирке и затем следуйте экстракционной процедуре.

7. Добавьте **18 мкл** раствора протеиназы К (18 мг/мл) и **2 мкл** 10%-ного (вес/объем) ДСН, перемешайте и инкубируйте при 37°C в течение 30 мин.

8. Добавьте **200 мкл** 2%-ного (вес/объем) Саркозила, перемешайте и инкубируйте при 37°C в течение 15 мин.

9. Добавьте **175 мкл** 5 М NaCl, перемешайте, затем проведите 3 цикла заморозки (–70°C, 10 мин) и оттаивания (65°C, 5 мин).

10. Добавьте **170 мкл** СТАВ в 0,7 М NaCl, перемешайте 1 мин и проинкубируйте при 65°C в течение 30 мин.

11. Добавьте **865 мкл** смеси фенол (рН 8,0) : хлороформ : изоамиловый спирт (25 : 24 : 1).

12. Интенсивно перемешайте и отцентрифугируйте на микроцентрифуге при 12 000 g в течение 10–15 мин при 4°C (в случае водных проб встряхивать до полного растворения мембраны).

13. Перенесите **750 мкл** супернатанта в 1,5-мл пробирку Эппендорф.

14. Добавьте **750 мкл** смеси хлороформ : изоамиловый спирт (24 : 1), интенсивно перемешайте на вортексе и осадите, как в п. 12



Рис. 12.1. Простое приспособление для сбора образцов природных осадков с целью последующего извлечения из них нуклеиновых кислот

15. Перенесите **700 мкл** супернатанта в 1,5-мл пробирку Эппендорф (рис. 12.1).

16. Добавьте **1 мкл** гликогена («Roche Diagnostics»), перемешайте переворачиванием, оставьте отстаиваться на 5 мин при комнатной температуре (гликоген

можно не добавлять к пробам с большой биомассой).

17. Добавьте **420 мкл** изопропанола, перемешайте осторожным переворачиванием, оставьте на ночь при -20°C .

18. Отцентрифугируйте при $12\,000\text{ g}$ в охлаждаемой центрифуге в течение 15 мин при 4°C .

19. Осторожно слейте супернатант и промойте осадок **500 мкл** ледяного 70%-ного этанола особой чистоты.

20. Отцентрифугируйте при $12\,000\text{ g}$ в охлаждаемой центрифуге в течение 5 мин при 4°C .

21. Повторите п. 19 и 20.

22. Осторожно слейте супернатант и высушите осадок (в вакуумном эксикаторе или на SpeedVac'e) в течение 10 мин.

23. Растворите осадок в **100 мкл** стерильной H_2O (высшей очистки) и оставьте для растворения на 30 мин при комнатной температуре. Отберите 10 мкл и проверьте качество препарата ДНК электрофорезом в 0,8%-ном агарозном геле. Храните при 4°C до использования.

Примечания к методике

В добавление к физическому разрушению прокариотических клеток обычно используют литические ферменты, такие, как лизоцим, протеиназа К и проназа для ферментативного разрушения структур клеточной стенки. Для химического ускорения процесса лизиса добавляют детергенты, такие, как додецилсульфат натрия (ДСН, SDS), лаурилсульфат натрия (ЛСН, SLS) и Саркозил (рис. 12.2). Добавление ЭДТА к литическому буферу уменьшает или вовсе снимает активность нуклеаз. В качестве альтернативы ферментативной обработке можно посоветовать добавить сильный хаотропный агант, тиоцианат гуанидина (или изотиоцианат гуанидина,

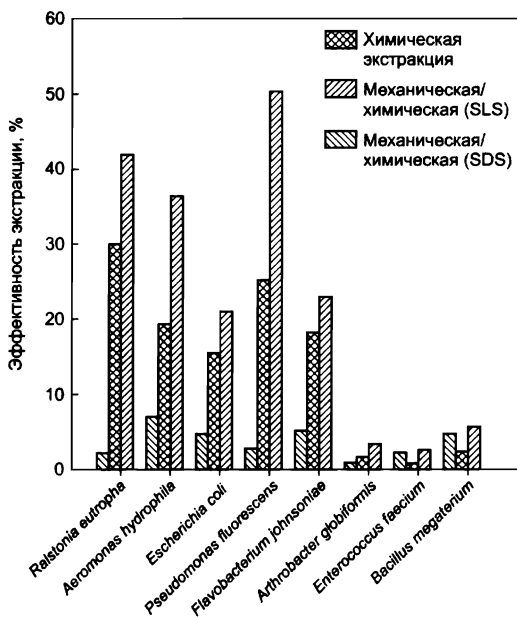
Рис. 12.2. Сравнение эффективности экстракции нуклеиновых кислот из различных бактерий в зависимости от выбранного метода разрушения клеток

ИТЦГ) для лизиса клеток бактерий и предохранения выделенных ДНК и РНК. Катионообменник Chelax-100 применяют для диспергирования почвенных частиц и связывания некоторых ингибирующих веществ, что повышает выход ДНК. Однако было также обнаружено, что предобработка лизоцимом и ИТЦГ снижает выход ДНК, а

Chelax-100 увеличивает выход ко-экстрагируемых гуминовых веществ. Смесь фенола и хлороформа обычно включают в методики по экстракции для удаления белков и липидов из лизатов клеток, что повышает выход ДНК. Однако вследствие токсичности этих соединений были разработаны другие методы экстракции, без применения этих соединений. ProCipitate («CPG, Inc.») — синтетическое, нерастворимое, связывающее белки вещество, которое является нетоксичной альтернативой фенолу при экстракции НК, хотя его пока не очень широко применяют при экстракции НК из природных проб.

Методика описывает прямую процедуру экстракции ДНК из различных проб (водных, почвенных, осадочных, биохимических фильтров из активированного угля и фекалий животных). Это выделение ДНК в малых объемах, но оно может быть легко масштабировано. ДНК проб с высоким первоначальным содержанием гуминовых веществ должна быть подвергнута очистке с использованием хроматографии на колонках.

Недавно появились коммерческие препараты для прямой экстракции ДНК из проб фирм «Bio 101» (**Fast DNA SPIN Kit**) и «MO-BIO» (**UltraCleanSoil/Water DNA Isolation Kits**). Эти наборы основаны на разрушении клеток стеклянными и керамическими шариками различного размера при сильном встряхивании в пробирках Эп-



пендорфа на 2 мл и могут быть использованы для 0,5 г почвы. Несмотря на небольшой размер экстрагируемого материала, ДНК получается высокого качества и может быть непосредственно использована для ПЦР. Процедура выделения занимает 1 ч. Набор от «МОВЮ» содержит специальный раствор, снимающий действие ингибиторов, который используют для ДНК, служащей матрицей для ПЦР. Эти наборы подходят также для экстракции ДНК из осадков и фекалий.

ОЧИСТКА ДНК

Спектрофотометрический метод определения чистоты и количества ДНК в экстрактах является наиболее часто используемым при рутинных выделениях НК. При $\lambda = 260$ нм поглощение раствора в 1 ед. ОП в кювете с длиной оптического пути 10 мм соответствует содержанию ~50 мкг двухспиральной ДНК/мл. Однако при этой длине волны очень сильно поглощают гуминовые кислоты, так что такая процедура пригодна лишь для определения концентрации чистых и бесцветных препаратов ДНК, свободных от гуминовых кислот. Чистая ДНК имеет также соотношение $ОП_{260}/ОП_{280}$ выше, чем 1,5, а соотношение $ОП_{260}/ОП_{230}$ выше, чем 1,9. Органические и глинистые компоненты почвы и осадков значительно снижают выход и чистоту экстрагируемой ДНК, а гуминовые вещества и частички глины могут присутствовать в препаратах ДНК даже после интенсивной очистки. Не существует единого метода, который удалял бы все примеси из препаратов ДНК, выделенных из почвенных и осадочных образцов. Гуминовые вещества являются основными ингибиторами ПЦР. Они мешают действию литических ферментов, связывают ДНК и белки и препятствуют связыванию ДНК-полимеразы с ДНК. Гуминовые кислоты подавляют действие эндонуклеаз рестрикции, снимают чувствительность при ДНК–ДНК блот-гибридизации и подавляют эффективность трансформации компетентных клеток плазмидной ДНК.

Методика — очистка ДНК гель-фильтрацией на колонке при центрифугировании

1. Поместите комочек стерильной стеклянной ваты в кончик стерильного 3-мл шприца без поршня.

2. Наполните шприц 2,5 мл Сефадекса G-75, набухшего в течение ночи в дистиллированной воде.

3. Проймите колонку 3 раза добавлением 300 мкл стерильной воды с центрифугированием при 1400 g в течение 5 мин. Поместите

для этого шприц в 15-мл центрифужную пластиковую пробирку с микропробиркой (1,5 мл) на кончике шприца для сбора фильтрата.

4. Добавьте **100–300 мкл** экстракта НК.

5. Отцентрифугируйте препарат, как в п. 3. Соберите очищенную ДНК в чистую центрифужную микропробирку (1,5 мл), укрепленную на кончике шприца.

ПВП или его водорастворимый аналог добавляют в процессе или после экстракции ДНК, что приводит к снижению концентрации гуминовых кислот. Цетилметиламмоний бромид (СТАВ) используют для снижения концентрации полисахаридов в экстрагируемой ДНК. Даже после добавления ПВП, неоднократных промывок и осаждения этанолом препарат ДНК часто содержит окрашенные соединения. Наилучшей стратегией будет добиться получения препарата с легким соломенным цветом, который будет пригоден для амплификации. Препараты темно-коричневые и почти черные не подходят для дальнейших анализов. Снизить концентрации гуминовых веществ можно простым разбавлением. Хотя это не убирает ингибиторы полностью, однако может снизить их концентрацию до субингибиторных. Это, однако, приводит и к снижению чувствительности определения. Соответственно было разработано множество методов для очистки экстрагированной ДНК, которые включают:

А) гель-фильтрацию на колонках с Сефадексами при центрифугировании;

Б) комбинацию гель-фильтрации (Сефадекс G-50–G-200) и катионообменника (Chelex-100) в предупакованных колонках;

В) гель-электрофорез и электроэлюцию;

Г) комбинацию гель-электрофореза и ионного обмена или ультрафильтрации;

Д) диффузию из агарозного блока;

Е) обработку ацетатом аммония для удаления белков с последующим центрифугированием и этанольным осаждением с промывкой;

Ж) осаждение на иммуно-магнитных частицах;

З) коммерческие препараты для очистки ДНК: колонки SpinBind («FMC Bio Products»), Wizard DNA Clean-up columns («Promega, Inc.»), Centricon-100-микроконцентраторы («Amicon, Inc.»), Quia-gen-Tip («Quiagen, Inc.») и GeneClean («Bio101, Inc.»).

Было установлено, что очистка на колонках с Сефадексом G-200 дает наивысший выход и убирает большинство загрязнителей, включая гуминовые вещества, по сравнению с кремниевыми колонками SpinBind, гель-электрофорезом и осаждением ацетатом аммония. Недавно обнаружено, что центрифужные колонки с Сефарозой

4В являются хорошим заменителем колонок с Сефадексом G-200, давая больший выход и чистоту препаратов ДНК. Также показано, что Сефадекс G-50 не убирает гуминовые загрязнители вовсе. Многие компании предлагают готовые к употреблению колонки для гель-фильтрации, однако они могут быть легко приготовлены и в лаборатории (см. методику выше). Гель-фильтрация разделяет молекулы по их размеру: гуминовые кислоты имеют размеры от ≤ 1000 до 300 000 и удерживаются в колонке, входя в поры геля, тогда как большие молекулы НК проходят через колонку. Размер пор может быть оптимизирован (Сефадексы G-50—G-200) для каждого случая с целью максимального удаления загрязнений и минимальной потере НК. Колонки могут быть использованы для очистки ДНК и РНК с тщательной подготовкой условий, препятствующих действию РНКаз.

12.2.

ПРЯМАЯ ЭКСТРАКЦИЯ РНК

При работе с РНК необходимо соблюдать дополнительные меры предосторожности для удаления РНК-расщепляющих ферментов. Такие меры включают прожарку лабораторного стекла при 180°C в течение 8 ч, обработку поверхностей и лабораторных приборов растворами RNase ZAP («Ambion, Inc.»), RNase-OFF («CPG, Inc.»), ELIMINase («Decon Labs»), использование сертифицированной пластиковой посуды без РНКаз, обработку растворов (за исключением содержащих трис) 0,1%-ным раствором диэтилпирокарбоната (DEPC), экстракцию сильными денатурирующими агентами (такими, как GTC) и включение ингибиторов РНКаз в экстракции и последующие анализы. Необходимо работать в перчатках и держать образцы во льду.

Техника экстракции напоминает таковую для ДНК и для очистки РНК применяют такие же типы колонок. Одно важное добавление — включение пункта расщепления ДНКазой для удаления ДНК из финального экстракта РНК. Даже следы ДНК могут привести к ложно-положительным результатам, особенно если определение РНК служит критерием жизнеспособности.

Методика — экстракция РНК из природных образцов

1. Поместить 2–5 г осадка (или почвы) в 50-мл полипропиленовую или тефлоновую пробирку с завинчивающейся крышкой.

2. Добавить 8 мл экстрагирующего буфера (0,2 М Na-PO₄; 0,1 М ЭДТА; pH 8,0).

3. Добавить **1,5 мл** 10%-ного ДСН.
4. Поместить пробирку на 5 мин на кипящую водяную баню.
5. После охлаждения пробирку поместить на 30 мин в холодильник на -80°C , затем инкубировать 15 мин на водяной бане при 65°C .
6. Отцентрифугировать при 12 000 g в течение 15 мин при 10°C .
7. Перенести супернатант в свежую пробирку и ресуспендировать осадок в **5 мл** экстрагирующего буфера.
8. Прокипятить содержимое пробирки на водяной бане в течение 5 мин.
9. Отцентрифугировать при 12 000 g в течение 15 мин при 10°C и объединить оба супернатанта (после п. 7 и 9).
10. Добавить **11,2 мл** 4 М тиоцианата гуанидина, содержащего 0,5% Саркозила, 25 мМ цитрата Na (pH 7,0) и 0,1 М 2-меркаптоэтанол.
11. Добавить **1 мл** 2 М ацетата Na (pH 4,0); 11,2 мл трис-забуференного фенола (pH 8,0) и 6,4 мл смеси хлороформ : изоамиловый спирт (24 : 1).
12. Интенсивно перемешать содержимое пробирки на вортексе в течение 10 с и оставить на льду на 15 мин.
13. Отцентрифугировать при 6000 g в течение 10 мин при 4°C .
14. Перенести верхнюю водную фазу в чистую пробирку и добавить **два объема** 96%-ного этанола, перемешать переворачиванием пробирки.
15. Инкубировать при -80°C в течение 2–10 ч для преципитации РНК и отцентрифугировать при 12 000 g в течение 15 мин при 4°C .
16. Супернатант слить, высушить осадок РНК и ресуспендировать его в 10 мМ трис-НСl буфере (pH 7,5), содержащем 1 мМ ЭДТА и 1 ед. ингибитора РНКаз.

Примечание. При использовании клеточного гомогенизатора со стеклянными бусами для разрушения клеток осадок или почву суспендируют в двойном объеме свежеприготовленного на DEPC-воде гомогенизирующего буфера следующего состава: 200 мМ трис-НСl (pH 8,5); 1,5% ДСН; 10 мМ ЭДТА (pH 8,0); 1% дезоксихолата натрия; 1% Nonidet-P40; 5 мМ мочевины и 10 мМ дитиотреитола (ДТТ).

Приведенная методика — относительно длительная процедура, однако она позволяет выделить высококачественную РНК (рис. 12.3) из почв и осадков, которая пригодна для проведения ОТ-ПЦР. Все растворы для выделения РНК должны быть обработаны DEPC (0,1%, 12 ч, автоклавировать 15 мин). Трис-буфер должен быть приготовлен на обработанной DEPC воде, однако не должен подвергаться прямому

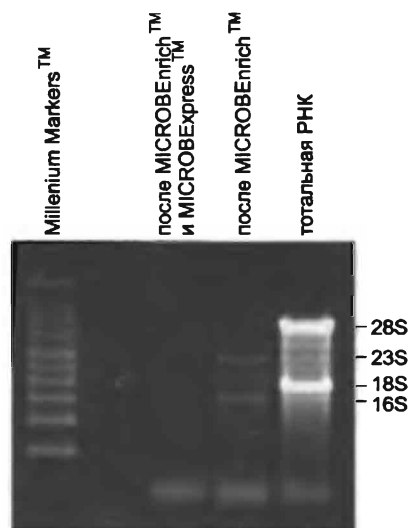


Рис. 12.3. Оценка чистоты экстрагированной из проб почвы тотальной РНК путем электрофореза в агарозном геле

действию DEPC. Даже самая эффективная процедура экстракции РНК приводит к появлению небольших количеств ДНК в конечном препарате. Соответственно, если наличие ДНК может привести к ложно-положительным ответам (например, тест на жизнеспособность с проведением ОТ-ПЦР), раствор РНК должен быть обработан свободной от РНКазы ДНКазой I до проведения дальнейших анализов.

Литература

1. Holben W.E., Jansson J.K., Chelm B.K., Tiedje J.M. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community // Appl. Environ. Microbiol. 1988. V. 54. P. 703–711.
2. Jackson C.R., Harper J.R., Willoughby D., Roden E.E., Churchill P.F. A simple, efficient method for the separation of humic substances and DNA from environmental samples // Appl. Environ. Microbiol. 1997. V. 63. P. 4993–4995.
3. Leff L.G., Dana J.R., McArthur J.V., Shimkets L.J. Comparison of methods of DNA extraction from stream sediments // Appl. Environ. Microbiol. 1995. V. 61. P. 1141–1143.
4. Malik M., Kain J., Pettigrew C., Ogram A. Purification and molecular analysis of microbial DNA from compost // J. Microb. Meth. 1994. V. 20. P. 183–196.
5. Moran M.A., Torsvik V.L., Torsvik T., Hodson R.E. Direct extraction and purification of rRNA for ecological studies // Appl. Environ. Microbiol. 1993. V. 59. P. 915–918.

Методы Т/ДГГЭ были первоначально разработаны и использованы в медицинских и диагностических целях для обнаружения точечных мутаций. Продукты ПЦР одинаковой длины, но разные по последовательностям, могут быть разделены в денатурирующем гель-электрофорезе, согласно различиям в их точках плавления. Поэтому эта техника идеальна для анализа ПЦР-продуктов амплификации отдельных участков гена, кодирующего синтез 16S рРНК, поскольку эти продукты содержат как консервативные, так и изменяемые участки. Когда фрагменты ДНК подвергают электрофорезу в линейно увеличивающихся градиентах (химических или температурных), они остаются двухцепочечными до тех пор, пока не достигают области градиента, в которой цепочки расходятся благодаря достижению точки плавления именно этого фрагмента, и движение его практически останавливается. Поскольку из множества матриц ДНК, представляющих набор геномов, соответствующий определенному микробному сообществу, получается набор различных амплифицированных участков ДНК с заведомо разными последовательностями, их точки плавления также будут различными, и полосы на электрофорезе от различных фрагментов ДНК окажутся на разном расстоянии от старта.

При изучении микробных сообществ неизменно встает вопрос об их составе, структуре и стабильности, о функциях и активности отдельных членов сообществ. Традиционные методы микробиологии и обычная световая микроскопия не могут дать ответы на такие вопросы. Большинство бактерий в природных образцах не обнаруживаются обычной световой микроскопией, поскольку они прикреплены к частицам почвы или осадков и поэтому остаются невидимыми. Флуоресцентные красители, такие, как ДАФИ или акридин оранжевый, улучшают визуальное разрешение, однако не дают информации о видовой принадлежности объектов. Накопительные культуры, поставленные в определенных условиях, не отражают условия существования определенного микроорганизма в природных условиях, дают преимущественное развитие лишь отдельной физиологической группе. Применение техники молеку-

лярно-биологических методов для исследования природных микробных популяций в их динамике и развитии открывает новые перспективы для анализа микробных сообществ.

Для анализа микробных сообществ применяли различные техники молекулярного клонирования фрагментов ДНК гена, кодирующего синтез 16S рРНК, такие как «shotgun»-клонирование в бактериофаге λ или клонирование кДНК-фрагментов, полученных обратной транскрипцией 16S рРНК, а также клонирование сегментов ДНК, амплифицированных с генов 16S рРНК, выделенных из осадков, почв, горячих источников, морской воды, гидротермальных источников. Используя эти подходы, были идентифицированы многие бактерии, до этого неизвестные. Из полученных результатов было сделано заключение, что существующая техника культивирования неадекватна природному биоразнообразию видов микроорганизмов и филогенетическое разнообразие гораздо более обширно, чем предполагали.

Как альтернатива длительным и трудоемким экспериментам по клонированию возникла стратегия изучения микробных сообществ, основанная на генетическом фингерпринтинге низкомолекулярных РНК (5S рРНК и тРНК) в полиакриламидных гелях высокого разрешения, и метод Т/ДГГЭ-анализа амплифицированных участков гена, кодирующего синтез 16S рРНК. Такие методы объединяют в себе прямую визуализацию микробного разнообразия и позволяют идентифицировать членов сообществ в последующих анализах последовательностей **или** в экспериментах по гибридизации соответствующих фрагментов с таксон-специфичными олигонуклеотидными пробам.

В настоящей главе приведено описание метода Т/ДГГЭ-анализа ПЦР-амплифицированных фрагментов ДНК, его применение к различным экологическим задачам, рассмотрены ограничения метода и перспективы его использования для изучения природных микробных сообществ в их развитии.

Применение метода Т/ДГГЭ в микробной экологии

Метод Т/ДГГЭ первоначально применяли в микробной экологии для определения генетического разнообразия сложных смесей бактериальных популяций. В настоящее время эту технику используют для различных целей. К ним относятся изучение сложных микробных сообществ; прослеживание изменений в популяциях; анализ накопительных культур и выделение из них чистых культур; определение различий в последовательностях гена, кодирующего синтез 16S рРНК; сравнение методов экстракции ДНК; поиск и сравнение

геномных библиотек, а также определение ошибок при ПЦР и клонировании фрагментов ДНК.

Ограничения при использовании метода T/ДГГЭ

Для синтеза фрагментов ДНК, анализируемых при помощи T/ДГГЭ, используют метод ПЦР. Большим преимуществом ПЦР является ее способность амплифицировать небольшие количества ДНК. Метод этот, однако, имеет и свои недостатки, среди которых ошибки вставок отдельных оснований в продукты ПЦР, образование химерных и гетеродуплексных молекул, преимущественная амплификация отдельных молекул перед другими.

Одно из ограничений метода T/ДГГЭ — разделение относительно небольших фрагментов ДНК, до 500 по. К тому же иногда бывает невозможно разделить фрагменты несмотря на их разницу в последовательностях. В геномах некоторых бактерий можно наблюдать наличие нескольких копий гена 16S рРНК, что также приводит к возникновению различий в последовательностях. Этот феномен не только усложняет интерпретацию результатов разделения полос при T/ДГГЭ, но и вносит сложности в применение подходов, основанных на изучении рРНК в микробной экологии в целом. Результаты T/ДГГЭ анализов проб из местообитаний, содержащих большие популяции бактерий, таких как почва, могут представлять сплошные смазанные полосы.

Для уменьшения сложностей, связанных с анализом профилей T/ДГГЭ, можно анализировать содержание только отдельных групп микроорганизмов. Фрагменты ДНК, разделенные с помощью T/ДГГЭ, можно затем гибридизовать с таксон-специфическими радиоактивными или дигоксигенин-мечеными олигонуклеотидами. Можно также использовать праймеры, которые характерны лишь для отдельных групп микроорганизмов, таких как цианобактерии, или праймеры, сконструированные для определенного функционального гена, как, например, для гена [NiFe]-гидрогеназы.

Перспективы применения T/ДГГЭ в микробной экологии

В самом ближайшем будущем можно будет использовать флуоресцирующие ПЦР-продукты для визуализации профилей T/ДГГЭ без их окрашивания и применять внутренние стандарты, позволяющие лучше сравнивать гели между собой и делающие возможным анализы образцов. Для анализа микробных сообществ разрабатывают также другие методы, основанные на фингерпринтинге, например с применением капиллярного электрофореза. Новым и привлека-

тельным направлением в микробной экологии является применение Т/ДГГЭ анализа для изучения экспрессии генов отдельными популяциями бактерий в природных местообитаниях.

13.1.

ПРИНЦИПЫ РАЗДЕЛЕНИЯ МОЛЕКУЛ НА ПРИМЕРЕ ДЕНАТУРИРУЮЩЕГО ГРАДИЕНТНОГО ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА (ДГГЭ)

При ДГГЭ разделяются фрагменты ДНК одинаковой длины, но с различными внутренними последовательностями. Разделение фрагментов основано на резком замедлении электрофоретической подвижности частично расплавленной ДНК в полиакриламидных гелях, содержащих линейно увеличивающиеся градиенты веществ, приводящих к денатурации ДНК (смесь мочевины и формамида). Плавление ДНК происходит в различных так называемых «доменах плавления», где одновременно происходит расхождение пар оснований ДНК с идентичной температурой плавления. Как только домен плавления достигнет участка в денатурирующем градиенте геля, соответствующем концентрации или температуре его плавления, происходит расхождение пар оснований этого участка, что приводит к частичному переходу молекулы от состояния двойной спирали к денатурированному, и это ведет к практически полной остановке миграции молекулы в электрическом поле. Различия в последовательностях молекул, подвергнутых электрофорезу, приводят к разному положению остановленных молекул в геле и появлению в нем разных полос разделенных фрагментов ДНК.

При использовании этого метода до 50% вариантов различных последовательностей могут быть отделены друг от друга, если длина фрагментов не превышает 500 п. Этот процент может быть поднят практически до 100%, если к фрагментам ДНК при разработке праймеров будут добавлены Г/Ц-богатые участки («скобки», «шпильки»), которые действуют в молекуле как высокотемпературные домены плавления. Прикрепление таких участков может быть осуществлено путем клонирования или, если для наработки фрагментов ДНК была использована ПЦР, при добавлении Г/Ц-богатых участков в 40–50 оснований к 5'-концу одного из ПЦР-праймеров.

Существуют два разных типа денатурирующих гелей — перпендикулярный и параллельный. Перпендикулярные гели имеют увеличивающийся градиент денатурирующего агента перпендикулярно направлению электрофореза. Пробу наслаивают по всей ширине

геля и электрофорез ведут около 3 ч. После прокрашивания геля с помощью бромистого этидия и просмотра в УФ лучах миграция молекул ДНК напоминает сигмоидную кривую. Молекулы ДНК на левой стороне геля, где концентрация денатурантов низка, мигрируют, как двухцепочечные. С другой стороны геля, где концентрация денатурантов максимальна, молекулы плавятся сразу после вхождения в гель и более по нему не движутся. Резкое изменение скорости миграции молекул наблюдается при концентрации денатурирующих агентов, соответствующей домену с самой низкой температурой плавления. Перпендикулярные гели используют для определения точки плавления фрагмента ДНК. К тому же из экспериментов с такими гелями можно определить оптимальную концентрацию денатурантов для проведения анализов в многодорожечных гелях при параллельном ДГГЭ. Параллельные градиенты в гелях формируют с увеличением градиента денатурирующего агента сверху вниз, параллельно направлению электрофореза. Такие гели используют при анализе множества проб в одном геле. До анализа пробы на параллельном геле величина времени прогона должна быть определена заранее для достижения максимума разделения полос. Для этой цели смесь двух фрагментов ДНК после ПЦР вносят в разные ячейки геля, выдерживая постоянный интервал времени между ячейками, так называемый «эксперимент, определяющий время путешествия».

Методика

А. Амплификация с помощью ПЦР

Фрагменты для Т/ДГГЭ получают с помощью различных, сконструированных для этого метода праймеров к консервативным участкам гена, направленных на амплификацию фрагментов гена 16S рРНК: 345F+GC, 518R, 907R, 1055R, 1392R+GC, 968F+GC, 1330R, 1385R (все цифры соответствуют гену *E. coli*). Разработано также несколько Г/Ц-богатых последовательностей в 40–50 оснований для прикрепления к 5'-концам праймеров. Для снижения неспецифического прикрепления праймеров к матричной ДНК *Taq*-полимеразу добавляют к реакционной смеси ПЦР после периода денатурации при 80°C (техника «горячего старта»). В дополнение к ней применяют также искусственное завышение температуры прикрепления праймеров на 10°C выше рассчитанной и постепенно понижают ее на 1°C с каждым вторым циклом до рассчитанной, при которой затем проводят дополнительные 9 циклов. Эта процедура, называемая «посадкой» ПЦР, снижает образование нежелательных побочных продуктов при амплификации.

Необходимые реактивы и растворы:

- 10× ПЦР-буфер;
- 100 мМ трис-НСl буферный раствор (рН 9,0);
- 15 мМ $MgCl_2$;
- 500 мМ KCl;
- 0,1%-ная (вес/объем) желатина;
- 1%-ный (объем/объем) Triton X-100;
- 2,5 мМ дНТФ-смесь («Roche Diagnostics», Швейцария);
- SUPER Taq ДНК-полимераза — 0,5 ед. («HT Biotechnology Ltd.»).

Протокол

1. В стерильную пробирку на 0,5 мл внесите: 10× ПЦР-буфер с $MgCl_2$ — 10 мкл; смесь дНТФ — 10 мкл; 25 пмоль прямого праймера — 1 мкл; 25 пмоль обратного праймера — 1 мкл; ДНК-матрицу — 1 мкл; стерильную деионизованную воду — 76 мкл.

2. Смешайте реагенты интенсивно на вортексе и осадите на микроцентрифуге при 8000 g в течение 5 с. Наслоите на поверхность раствора 2 капли минерального масла (М-5904, «Sigma-Aldrich», США).

3. Для использования праймеров 341F+GC/907R разработана следующая программа проведения ПЦР: 1 цикл — 94°C — 5 мин, 80°C — 1 мин (после добавить 1 мкл Taq-полимеразы — «горячий старт»), 65°C — 1 мин, 72°C — 3 мин; 19 циклов — 94°C — 1 мин, 64°C — 1 мин (с уменьшением температуры на 1°C на каждом втором цикле — «посадка» ПЦР), 72°C — 3 мин; 9 циклов — 94°C — 1 мин, 55°C — 1 мин (рассчитанная температура связывания праймера), 72°C — 3 мин; 1 цикл — 94°C — 1 мин, 55°C — 1 мин, 72°C — 10 мин, 15°C — постоянно.

4. Проанализируйте 5 мкл амплифицированного продукта с помощью агарозного электрофореза. Используйте стандарты молекулярных масс ДНК (например, AmpliSize производства «Bio-Rad») для определения размера ПЦР-продукта.

Дополнения к методике

1. Бычий сывороточный альбумин («Sigma-Aldrich», США) может быть добавлен к смеси для ПЦР до конечной концентрации 3 мкг/мкл для преодоления ингибирующего действия гуминовых кислот.

2. Растворители ДМСО или глицерин могут быть использованы для усиления амплификации.

3. Можно использовать стерильную воду (деионизованную), которую разливают аликвотами по 1,5 мл и хранят при -20°C.

4. «Предпочтительная» амплификация может иметь место при проведении процедуры «посадки» ПЦР.

Б. Метод проведения ОТ-ПЦР

До начала амплификации с помощью ПЦР выделенные тотальные препараты РНК должны быть транскрибированы в кДНК с использованием фермента обратной транскриптазы (ОТ). При этом используют гексануклеотидную смесь (метод случайных праймеров) для синтеза первой цепи кДНК. Это открывает возможность по использованию различных наборов праймеров для последующей ПЦР-амплификации, так как все последовательности РНК (рРНК и мРНК) будут транскрибированы в кДНК.

Необходимые реактивы и растворы:

- 10× гексануклеотидная смесь («Roche Diagnostics», Швейцария), разбавленная 1 : 50 в стерильной воде;
- 5× буферный раствор для ОТ: 250 мМ трис-НCl буфер (рН 8,3); 375 мМ KCl; 15 мМ MgCl₂;
- 50 мМ дитиотреитол;
- 2,5 мМ дНТФ-смесь;
- М-MLV обратная транскриптаза — 200 ед./мл («Promega», США).

Протокол

1. Добавьте 1 мкл смеси гексануклеотидов (10 пмоль) к 10 мкл РНК (0,5–1 мкг).
2. Денатурируйте при 70°C в течение 10 мин, затем поместите в лед.
3. Быстро отцентрифугируйте смесь и добавьте 4 мкл 5× буферного раствора для ОТ и 4 мкл 2,5 мМ дНТФ-смеси. Проинкубируйте при 37 °C в течение 2 мин.
4. Добавьте 1 мкл обратной транскриптазы и инкубируйте при 37°C в течение 1 ч.
5. Прогрейте пробу при 95°C в течение 5 мин, затем поместите в лед.
6. Используйте 1–5 мкл ОТ реакционной смеси для ПЦР (как описано в предыдущем п. А).

Дополнения к методике

1. Вместо буферного раствора для ОТ можно использовать стандартный ПЦР-буфер для синтеза кДНК и для ПЦР, если используемая *Taq*-полимераза имеет рН-оптимум около 8,3. В таком случае добавьте дитиотреитол к ОТ-реакционной смеси до конечной концентрации 10 мМ.

2. Хорошие результаты при обратной транскрипции получаются с применением М-MLV фермента от «Promega» или фермента Superscript RT от «Invitrogen».

3. ОТ-реакционную смесь можно хранить при -20°C .

4. 10 мкл буферного раствора для ОТ подавляет ПЦР-систему. Однако если для синтеза кДНК использовать стандартный ПЦР-буфер, весь объем реакционной смеси (20 мкл) может быть использован для проведения ПЦР. В этом случае дальнейшее добавление дНТФ для последующей ПЦР не является необходимым.

5. Для того чтобы удостовериться, что продукты ПЦР получены после амплификации кДНК, синтезированной в результате реакции обратной транскрипции с РНК, а не от контаминирующей ДНК пробы, необходимо проведение следующего негативного ПЦР-контроля: 0,5–1 мкг тотальной РНК или 5 мкл ОТ-реакционной смеси без добавленной обратной транскриптазы используют для проведения ПЦР.

В. Метод проведения ДГГЭ (денатурирующий градиентный гель-электрофорез)

Оборудование для проведения ДГГЭ может быть приобретено у нескольких компаний: «CBS Scientific Co.» (США) или «Bio-Rad» (США). Эти системы полные, удовлетворяют требованиям техники безопасности и поставляются с хорошими описаниями процедуры, включая методики преодоления трудностей. Для подготовки и заливки градиентного геля необходим градиентный миксер и магнитная мешалка. Для получения воспроизводимых гелей рекомендуют применять перистальтический насос.

Необходимые реактивы и растворы:

- 50× ТАЕ буферный раствор (рН 8,3) — см. приложение 1;
- формамид, деионизованный на AG501-X8 mixed bed resin («Bio-Rad», США);
- 0% МФ 6% АА: 40% акриламид/бис 37,5 : 1 (=АА) — 15 мл; 50× ТАЕ-буфер — 2 мл. Доведите раствор до 100 мл деионизованной водой. Отфильтруйте через фильтр Whatman №1 и дегазируйте 15 мин. Храните в коричневой бутылки при 4°C максимум 1 месяц;
- 100% МФ 6% АА: 40% акриламид/бис 37,5 : 1 (=АА) — 15 мл; 50× ТАЕ-буфер — 2 мл; мочевины (М) — 42 г; формамид (Ф) — 40 мл. Доведите раствор до 100 мл деионизованной водой. Отфильтруйте через фильтр Whatman №1 и дегазируйте 15 мин. Храните в коричневой бутылки при 4°C максимум 1 месяц;
- буфер для нанесения проб состава: 0,05% (вес/объем) бромфенолового голубого; 40% сахарозы; 0,1 М ЭДТА (рН 8,0); 0,5% (вес/объем) лаурилсульфата натрия;

- 10%-ный (вес/объем) раствор персульфата аммония (АПС).
Храните при -20°C в аликвотах по 250 мкл;
- TEMED (N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин).

Протокол

1. Вымойте стекла, спейсеры (длиной 160 мм, толщиной 1 мм) и гребень с мылом, а затем ополосните этанолом. Соберите «сэндвич» для геля и укрепите выходную трубку от перистальтического насоса между стеклами для геля.

2. Наполните емкость для буфера 1× TAE-буфером и включите нагрев. Поставьте температуру на 60°C .

3. Добавьте в 50-мл пробирку следующие реагенты:

раствор «А»: 0% МФ 6% AA — 6 мл; TEMED — 10 мкл; АПС — 50 мкл.

раствор «Б»: 100% МФ 6% AA — 11 мл; TEMED — 10 мкл; АПС — 50 мкл.

4. Налейте раствор «Б» в выходную емкость градиентного миксера, а раствор «А» — в другую емкость.

5. Поместите магнит в выходную емкость миксера и включите магнитную мешалку.

6. Откройте перепускной кран миксера, затем выходной кран и включите перистальтический насос. Выключите перистальтику, когда гель будет сформирован.

7. Добавьте в 15-мл пробирку следующие реагенты: 0% МФ 6% AA — 10 мл; TEMED — 10 мкл; АПС — 25 мкл.

8. Закройте перепускной кран миксера. Налейте смесь (из п. 7) в выходную емкость миксера, вставьте гребенку и включите перистальтику.

9. Оставьте гель для полимеризации по крайней мере на 2 ч. Удалите гребенку, промойте ячейки геля 1× TAE-буфером для удаления незаполимеризовавшегося акриламида. Прикрепите «сэндвич» геля к центральной части аппарата для фореа и погрузите эту часть в прогретую емкость для буфера. Прикрепите трубку для рециркуляции буфера к верхнему резервуару аппарата для фореа.

10. Смешайте пробы для фореа с буфером для нанесения проб (4 : 1) и нанесите пробы на гель.

11. Проведите фореа при постоянном напряжении 100 В в течение 18 ч.

12. Прокрасьте гель ДГГЭ бромистым этидием, серебром или SYBR Green I.

Дополнения к методике

1. При пониженных температурах проведения электрофореза (55°C) разрешение может быть более четкое.

2. Процент акриламида зависит от размера фрагментов, которые необходимо разделить. Приведенный пример — для фрагментов около 500 по.

3. Следующую формулу применяют для подсчета объемов раствора акриламида, необходимых для других процентов денатурирующих градиентов:

$$(100 - X) \times V/100 + X \times V/100 = V_{0\% \text{ МФ}} + V_{100\% \text{ МФ}} = V_{X\% \text{ МФ}},$$

где X — желаемый % МФ, V — $1/2$ общего объема геля в мл, $V_{0\% \text{ МФ}}$ — мл 0% раствора МФ, $V_{100\% \text{ МФ}}$ — мл 100% раствора МФ, $V_{X\% \text{ МФ}}$ — мл $X\%$ раствора МФ ($=V$).

4. Мочевина и формамид могут подавлять хорошую полимеризацию ячеек для нанесения проб, поэтому рекомендуют применять раствор 0% МФ 6% АА для геля под гребенкой.

5. Денатурирующий гель может быть залит в день накануне электрофореза.

6. Для дорожек с ожидаемыми многочисленными полосами фрагментов ДНК необходимо нанесение большего количества материала, так как интенсивность прокраски не соответствует агарозному гелю.

7. Различия в объемах проб при нанесении менее критичны, чем при использовании другой электрофоретической техники, так как полосы при ДГГЭ имеют тенденцию к фокусированию (концентрации).

8. Гели можно хранить завернутыми во влажную фильтровальную бумагу при 4°C в течение ночи для блоттинга на следующий день.

13.2.

МЕТОД ПРОВЕДЕНИЯ ТЕРМАЛЬНОГО ГРАДИЕНТНОГО ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА (ТГГЭ)

Для проведения анализов с ТГГЭ используют систему DIAGEN TGGE («Diagen GmbH», Германия) или аналогичную, недавно разработанную компанией «Biometra» (Германия).

А. Приготовление геля

До сборки все части гелевой подложки (стеклянные пластины, спейсеры, гребенки) тщательно моют и протирают этанолом. Для удобства при дальнейшей работе с гелем используют пленку-поддержку («FMC BioProducts», Дания) или аналогичную от «Serva Elec-

trophoresis» (Германия). Пленка фиксируется на стекле при расправлении ее на плоской поверхности гидрофобной стороной, направленной к стеклу.

Для приготовления геля растворите 21,64 г мочевины в 9 мл деионизированной воды; добавьте 9 мл акриламида/N,N'-бис-акриламида (30%–0,8% смесь); 9 мл формамида (деионизованного на AG501-X8 mixed bed resin, «Bio-Rad»); 1,06 мл 85%-ного глицерина и 0,9 мл 50× TAE-буфера (или 50× MOPS, pH 8,0); доведите pH при помощи NaOH. Никогда не используйте хлориды из-за возможного образования осадка при окраске геля. Перемешайте смесь и осторожно нагрейте (максимум до 40°C). Раствор фильтруют и доводят до 45 мл деионизированной водой. После добавления 77 мкл TEMED (N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамина), 135 мкл 10%-ного персульфата аммония и перемешивания раствор немедленно заливают между двумя стеклами прибора с помощью шприца. Полимеризацию проводят в течение минимум 2 ч.

Б. Нанесение образцов на гель и проведение электрофореза

Один литр 1× TAE-буфера (электрофорез в течение ночи) или 1× MOPS-буфера (короткое время электрофореза) заливают в каждую емкость аппарата. Приблизительно 3 мл парафинового масла наносят на температурную подложку ТГГЭ-прибора и на нее помещают сформированный гель (пленкой к подложке; *будьте осторожны, чтобы не было пузырей!*). Гель покрывают пластиковой пленкой на расстоянии 1 см от ячеек и до конца. Концы электродов кипятят в дистиллированной воде в течение 5 мин до помещения их на гель в качестве буферных мостиков. Смешивают до нанесения на гель 1 мкл загрузочного буфера (табл. 13.1) и 5 мкл ПЦР-продукта (ПЦР-продукты, образованные из штаммов или клонов, необходимо разводить в 5 или 10 раз).

Таблица 13.1

Композиции загрузочных буферов

Реагент	6× MOPS (pH 8,0)	6× TAE (pH 8,0)
Глицерин	85%	60%
MOPS	200 мМ	—
TAE	—	6×
ЭДТА	10 мМ	—
Бромфеноловый голубой	0,05%	0,5%
Ксиленцианол	0,05%	0,5%

На поверхность геля помещают стекло для лучшего контакта электродов с гелем и все покрывают пластиковой пленкой. Ночной

форез ведут в 1× ТАЕ-буфере в течение 16 ч при 100 В. Более короткие форезы (5 ч, 300 В) проводят с использованием 1× MOPS-буфера. При разделении фрагментов, соответствующих 16S рРНК, используют температурный градиент от 38 до 52°С.

В. Прокраска гелей Т/ДГГЭ

Для визуализации ДНК в полиакриламидных гелях можно использовать различные методы окрашивания, которые требуют разного оборудования и отличаются по нижнему уровню определения (табл. 13.2).

Таблица 13.2

Оборудование, необходимое для прокраски гелей разными способами, и уровни определения количества ДНК в полосе

Краска	Источник света	Фотографический фильтр	Нижний предел обнаружения ДНК в полосе, пг
Бромистый этидий	302 нм	Polaroid #15	1000
SYBR Green I	254/302 нм	FMC No. 505030	20/60
Серебро	белый	Polaroid #58	5

Окраска бромистым этидием

Эта флуоресцентная краска — наиболее используемая при обнаружении нуклеиновых кислот в электрофорезных гелях. Краситель связывается с молекулами ДНК и РНК, интеркалируя между основаниями. Комплекс ДНК/бромистый этидий имеет два пика возбуждения — при 302 и 366 нм, испуская пик флуоресценции при 590 нм, повышая эмиссию флуоресценции в связанном виде по сравнению со свободной краской. Большинство выпускаемых трансиллюминаторов имеют максимум волны испускаемого света при 302 нм, использование для возбуждения длины волны 254 нм немного увеличит флуоресценцию краски, однако количество обнаруживаемой при этом ДНК будет намного меньше, чем при 302 нм.

Необходимые реактивы и растворы:

- 0,5 мкг/мл бромистого этидия в 1× ТАЕ-буфере (рН 8,3), приготовленного из коммерческого бромистого этидия (исходный раствор 1 мг/мл в воде, «Bio-Rad»).

Протокол

1. Погрузите гель в раствор бромистого этидия и инкубируйте при слабом покачивании в течение 30 мин.
2. Промойте гель в воде в течение 10 мин.
3. Просмотрите гель в трансиллюминаторе под ультрафиолетом (302 нм) и сфотографируйте на пленку Polaroid 667.

Окраска с SYBR Green I

Краска SYBR Green I была недавно разработана для обнаружения нуклеиновых кислот. Она более чувствительна по сравнению с бромистым этидием (табл. 13.2) и подобно ему связывается с ДНК и РНК, увеличивая при этом эмиссию флуоресценции. Возбуждение краски максимально при 254 и 497 нм, а максимум флуоресценции приходится на 520 нм. По свидетельству производителя краски («FMC Co.», Дания), использование стандартного трансиллюминатора с длиной волны 302 нм понижает чувствительность обнаружения ДНК в три раза. По свидетельству экспериментаторов, использование краски SYBR Green I для прокрашивания гелей ДГГЭ снижает фоновую флуоресценцию по сравнению с применением бромистого этидия.

Необходимые реактивы и растворы:

- исходный раствор SYBR Green I («FMC Co.», Дания, № 50512 или 50513) в ДМСО;
- 1× ТАЕ-буфер — см. приложение 1.

Протокол

1. Добавьте 1 мкл исходного раствора SYBR Green I в 10 мл 1× ТАЕ-буфера (рН 8,3).
2. Поместите гель на подложку трансиллюминатора и равномерно залейте раствором.
3. Проинкубуйте в течение 30 мин в темноте.
4. Просмотрите гель в трансиллюминаторе под УФ (302 нм) и сфотографируйте на пленку Polaroid 667.

Дополнения к протоколу окраски с SYBR Green I

1. Рабочий раствор SYBR Green I должен быть свежеприготовлен. Растворы на буферном растворе с рН между 7 и 8,5 более стабильны, чем приготовленные на воде.
2. Гели после прокрашивания краской SYBR Green I не надо отмывать в воде.
3. Используйте источник света в трансиллюминаторе с длиной волны 254 нм для большей чувствительности.

Окраска серебром

Первоначально окраска серебром предназначалась для прокрашивания гелей с белковыми форезами, затем она была применена и для окраски гелей с нуклеиновыми кислотами. Нитрат серебра реагирует с биополимерами в кислых условиях, и затем ионы серебра селективно восстанавливаются в металлическое серебро в реакции

с формальдегидом в щелочных условиях (аналогично реакции серебряного зеркала). Нитрат серебра обнаруживает нуклеиновые кислоты в полиакриламидных гелях с очень большой чувствительностью, и поэтому для детекции в Т/ДГГЭ гелях необходимы небольшие количества продуктов ПЦР (рис. 13.1).

Эта техника, однако, имеет и некоторые недостатки. Поскольку белки также прокрашиваются, большие количества БСА в реакционной смеси для ПЦР вызывают появление темных фоновых следовых полос, если ПЦР-продукты наносят на гели без предварительной очистки. По некоторым данным, после окрашивания Т/ДГГЭ гелей с помощью серебра невозможны дальнейшие блоттинг и гибридизация. Также снижается эффективность элюции полос ДНК из гелей и ее последующая амплификация для секвенирования. Коммерческие наборы для окраски серебром можно приобретать у различных производителей (например, «Bio-Rad», США).

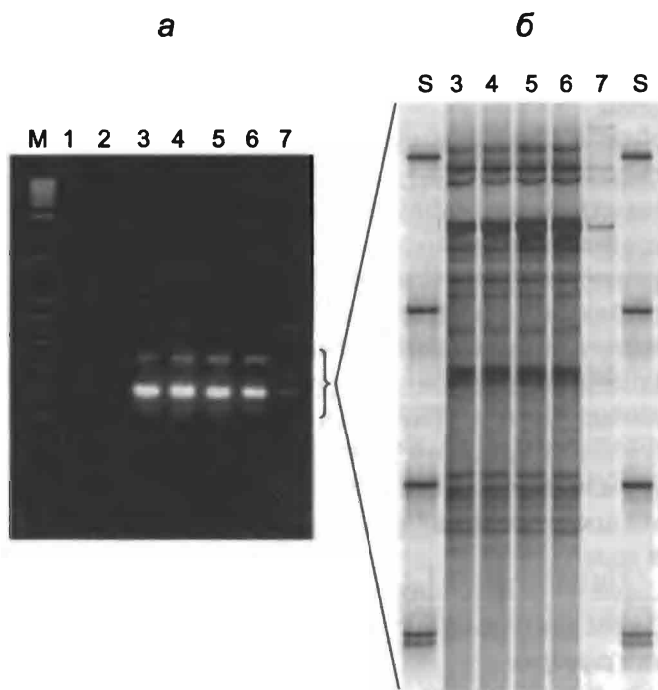


Рис. 13.1. Пример электрофореза в ПААГ амплифицированных фрагментов 16S рРНК/ДНК почвенных проб: *а)* окраска гелей бромистым этидием; *б)* повторный электрофорез отобранных полос в денатурирующем геле после их амплификации, окраска серебром. Обозначения: М — маркеры молекулярных масс; S — стандарты; 1–7 — фрагменты ДНК, выделенной из различных проб почвы

Необходимые реактивы и растворы:

- раствор этанол/уксусная кислота — 10% (объем/объем) этанола; 0,5% (объем/объем) уксуса;
- 0,1%-ный (вес/объем) раствор нитрата серебра в воде (*свежеприготовленный!*);
- проявляющий раствор (*свежеприготовленный!*) — 1,5% (вес/объем) NaOH; 0,01% (вес/объем) NaBH₄;
- фиксирующий раствор — 0,75% (вес/объем) Na₂CO₃.

Протокол

1. Проинкубируйте гель дважды по 3 мин в растворе этанол/уксусная кислота.
2. Выдержите гель в течение 20 мин в растворе нитрата серебра.
3. Хорошо отмойте гель в воде.
4. Погрузите гель в проявляющий раствор на 30 мин.
5. Погрузите гель в фиксирующий раствор на 10 мин.
6. Просмотрите гель в белом свете и сфотографируйте.

Примечание

Все инкубации проводите при осторожном покачивании. Растворы удаляют с подложки, на которой расположен гель, отсасывая их вакуумным насосом.

13.3.

ПРОВЕДЕНИЕ ЭЛЕКТРОБЛОТТИНГА ДЕНАТУРИРУЮЩИХ ГРАДИЕНТНЫХ ГЕЛЕЙ И ГИБРИДИЗАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ПРОФИЛЕЙ ДГГЭ С ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫМИ ЗОНДАМИ

Процедура блоттинга основана на электрофоретическом переносе ДНК с акриламидных гелей на нейлоновую мембрану в полувлажных условиях. Блоттинг осуществляют с помощью плоских горизонтальных электродов. Гель и мембрана для переноса располагаются по принципу «сэндвича» между слоями фильтровальной бумаги, смоченной буферным раствором, который служит резервуаром ионов (рис. 13.2). Плоские электроды позволяют создать плотное электрическое поле через гель и осуществлять очень эффективный и быстрый перенос молекул. В этом протоколе применяли устройство для блоттинга производства компании «Bio-Rad» (США).

Гибридизацию с олигонуклеотидными зондами необходимо проводить после выбора условий гибридизации, соответствующих длине зондов и их последовательностям. Температуру плавления определяют по формуле: $T_m = 4^{\circ}\text{C} \times (\Gamma + \Pi) + 2^{\circ}\text{C} \times (\text{A} + \text{T})$. Гибридизацию

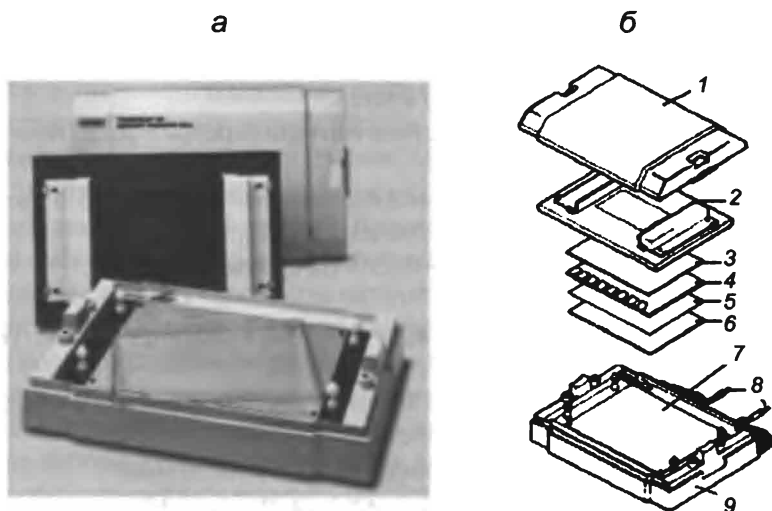


Рис. 13.2. Принцип метода переноса ДНК с геля на нейлоновую мембрану при помощи электроблоттинга: а) общий вид прибора для влажного переноса нуклеиновых кислот с геля на мембрану («Bio-Rad», США); б) схема совмещения геля и мембраны в приборе (1 — крышка прибора; 2 — катодный плоский серебряный электрод; 3 — слои фильтровальной бумаги; 4 — гель; 5 — мембрана; 6 — слои фильтровальной бумаги; 7 — анод с четырьмя направляющими стержнями; 8 — провода для подключения к источнику постоянного тока; 9 — основание прибора)

обычно ведут при температурах на 5–10°C ниже рассчитанной температуры плавления. Однако это только совет — оптимальную температуру гибридизации подбирают эмпирически, имея в виду рассчитанную в качестве стартовой. После гибридизации с целевой ДНК ДИГ-меченые олигонуклеотидные зонды определяют в иммунной реакции с конъюгатом анти-дигоксинин-Fab-щелочная фосфатаза (рис. 13.3). Последующая ферментативная реакция с применением хемилюминесцентного реактива CSPD («Tropix, Inc.», США) позволяет идентифицировать гибриды на рентгеновской пленке. Сигналы затем можно будет удалить с мембраны для проведения гибридизации с другими зондами. Приведенный протокол гибридизации рекомендован компанией «Roche Diagnostics» (Швейцария). Объемы растворов рассчитаны для мембраны на 250 см².

Необходимые реактивы и растворы:

- 10× буферный раствор TBE — см. приложение 1;
- денатурирующий раствор — 0,4 М NaOH; 0,6 М NaCl;
- 20× буферный раствор SSC — см. приложение 1;
- буферный раствор 1: 0,1 М малеиновая кислота; 0,15 М NaCl; pH 7,5. Подвести pH твердым NaOH и автоклавировать;

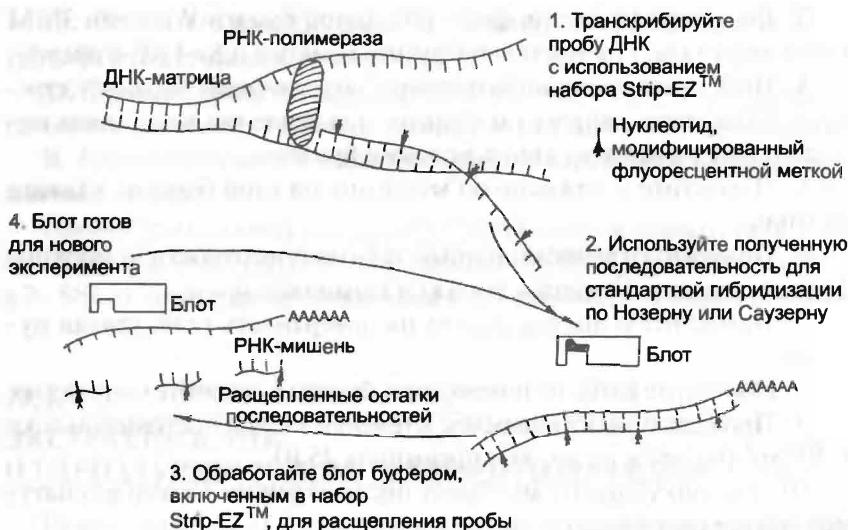


Рис. 13.3. Повторяющиеся циклы гибридизации/отмывки олигонуклеотидных зондов с целевой (сигнальной) ДНК на гибридизационных мембранах

- буферный раствор 2: блокирующий раствор, разведенный 1 : 10 в буфере 1;
- буферный раствор 3: 0,1 М трис-НCl; 0,1 М NaCl; 50 мМ MgCl₂; pH 9,5;
- блокирующий раствор — 10% (вес/объем) блокирующего реагента («Roche Diagnostics», Швейцария) в буфере 1. Автоклавировать и хранить при 4°C;
- гибридизационный буферный раствор: 5× SSC; 2% (вес/объем) блокирующего реагента; 0,1% (вес/объем) N-лаурилсаркозина; 0,02% (вес/объем) ДСН;
- промывной буферный раствор: 0,3% (объем/объем) Tween 20 в буфере 1;
- раствор CSPD («Tropix, Inc.», No. CD005): 0,25 мМ CSPD в буфере 3. Хранить при 4°C в темной бутылки. Раствор можно использовать многократно.

Методика

А. Процедура переноса гелей

1. Уравновесьте гель после ДГГЭ в течение 30 мин в 0,5× TBE-буфере.

2. Вырежьте нейлоновую мембрану (Hybond N⁺, «GE Healthcare») по размеру геля. Смочите мембрану вначале в воде, затем — в 0,5× TBE-буфере.

3. Вырежьте 12 листов фильтровальной бумаги Whatman 3ММ по размеру геля. Полностью погрузите бумагу в 0,5× TBE-буфер.

4. Поместите смоченный фильтр на платиновый анодный электрод. Прокатите пипетку по фильтру для удаления воздушных пузырей. Повторите этот этап с 5 слоями бумаги.

5. Поместите увлажненную мембрану на слои бумаги. Удалите пузыри.

6. Поместите уравновешенный гель на поверхность мембраны. Удалите пузыри. Пометьте дорожки карандашом.

7. Поместите 6 листов бумаги на поверхность геля, удаляя пузыри.

8. Поместите катод на поверхность бумаги и закройте устройство.

9. Проведите электроперенос в течение 1 ч при постоянном токе в 400 мА (вольтаж не должен превышать 25 В).

10. Проинкубируйте мембрану после переноса 15 мин в денатурирующем растворе.

11. Отмойте мембрану дважды по 10 мин в 2,5× SSC-буфере.

12. Удалите избыток влаги с мембраны фильтровальной бумагой. Экспонируйте мембрану в течение 45 с под УФ (302 нм) для пришивки фрагментов ДНК к мембране. Мембрана готова для гибридизации или для хранения между слоями фильтровальной бумаги при –20°C.

Б. Проведение гибридизации

1. Промойте мембрану дважды 2× SSC-буфером и предгибризируйте при гибридизационной температуре в течение 4 ч в **25 мл** гибридизационного раствора.

2. Гибридизуйте мембрану при гибридизационной температуре в течение ночи в **6 мл** гибридизационного раствора, содержащего 100 пмоль ДИГ-меченого олигонуклеотидного зонда.

3. Отмойте дважды при температуре гибридизации по 15 мин в **50 мл** 2× SSC-буфера, содержащего 0,1% (вес/объем) ДСН, и дальше дважды в **50 мл** 0,1× SSC-буфера с 0,1% (вес/объем) ДСН.

4. Быстро промойте мембрану в промывном буфере при покачивании.

5. Инкубируйте в течение 30 мин в **200 мл** буфера 2.

6. Инкубируйте в течение 30 мин в **40 мл** буфера 2, содержащего **4 мкл** конъюгата анти-дигоксигенин-Fab-щелочная фосфатаза.

7. Промойте дважды по 15 мин в **150 мл** промывного буфера.

8. Уравновесьте в течение 5 мин с **50 мл** буфера 3.

9. Инкубируйте мембрану в течение 5 мин в **30 мл** раствора CSPD.

10. Позвольте избытку жидкости скапать с мембраны и запечатайте ее в пластиковый пакет.

11. Прединкубируйте мембрану 5 мин и экспонируйте ее на рентгеновской пленке в течение предварительно подобранного времени.

В. Повторная гибридизация мембраны со следующим олигонуклеотидным зондом

Промойте мембрану стерильной водой и затем дважды при 37°C по 15 мин в 200 мМ NaOH с 0,1% (вес/объем) ДСН. Промойте быстро в 2× SSC и продолжайте процедуры с п. 1 предыдущего протокола.

13.4.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

ИЗ ДЕНАТУРИРУЮЩИХ ГРАДИЕНТНЫХ ГЕЛЕЙ

Разделенные в ДГГЭ продукты могут быть отсекарованы. Для этих целей фрагменты ДНК экстрагируют из геля, реамплифицируют, очищают от праймеров и секвенируют (вручную или автоматически). Экстракцию небольших (до 250 по) фрагментов из денатурирующих градиентных гелей проводят при инкубации в элюиционном буфере при 37°C в течение ночи. Однако полосы, содержащие более тяжелые фрагменты (500 по), нельзя экстрагировать таким путем. Для выделения таких полос приводятся два протокола — с использованием растворимого полиакриламида или при разрушении бусами Баллатини.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАСТВОРИМЫХ ГЕЛЕЙ

Для приготовления растворимых полиакриламидных гелей используют N,N'-бис-акрилил-цистамин, БАЦ («Bio-Rad», США). БАЦ — аналог бис-акриламида, содержащий дисульфидные мостики. После полимеризации и проведения электрофореза гели можно растворить 2-меркаптоэтанолом или дитиотреитолом с высвобождением фрагментов ДНК.

Проведение экстракции

1. Вырежьте окрашенную флуоресцентными красителями полосу денатурирующего геля.

2. Перенесите кусочек геля в стерильную пробирку Эппендорф и ополосните стерильной водой.

3. Удалите воду, добавьте 100 мкл 2-меркаптоэтанола и проинкубируйте при 37°C в течение ночи.

4. Добавьте **100 мкл** стерильной воды, **1/10 объема** 5 М NaCl и **2,5 объема** ледяного этанола. Поставьте на -80°C на 2 ч или на -20°C на ночь. Осадите на микроцентрифуге при 10 000 g в течение 20 мин.

5. Осторожно удалите этанол и добавьте **250 мкл** 70%-ного (объем/объем) ледяного этанола. Осадите на микроцентрифуге при 10 000 g в течение 20 мин.

6. Осторожно удалите этанол, быстро высушите под вакуумом и растворите осадок в **100 мкл** стерильной воды.

7. Используйте 1–10 мкл раствора ДНК для реамплификации как описано выше.

8. Проанализируйте реамплифицированный продукт с помощью ДГГЭ для проверки его гомогенности по последовательностям и с целью подтверждения его правильной позиции на геле при сравнении с оригинальным ПЦР-продуктом.

Дополнения к методике

1. Экспонируйте гель под УФ максимально короткое время, так как УФ свет разрушает ДНК.

2. Кусочек геля полностью не растворяется.

3. Оставьте остатки геля в пробирке.

4. Может быть видим солевой осадок.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ПРИ РАЗРУШЕНИИ ГЕЛЕЙ СТЕКЛЯННЫМИ БУСАМИ

Необходимые реактивы и растворы:

— стерильная вода («Sigma-Aldrich», № W-4501);

— стеклянные бусы Баллатини диаметром 1 мм.

Проведение экстракции

1. Вырежьте окрашенную флуоресцентными красителями полосу денатурирующего геля.

2. Перенесите кусочек геля в стерильную 1,5-мл пробирку Эппендорф, добавьте **0,5 мл** стерильной воды и **равный объем** стеклянных бус.

3. Разрушите гель бусами в бус-битере/гомогенизаторе клеток Mikro-Dismembrator U («B.Braun Biotech International GmbH», Германия) 3 раза по 1 мин при наивысшей скорости для выхода ДНК.

4. Проинкубируйте в течение ночи при 4°C .

5. Осадите фрагменты акриламида при низких оборотах и используйте супернатант как матрицу ДНК для реамплификации с теми же праймерами, как прежде.

6. Проанализируйте реамплифицированный продукт с помощью ДГГЭ для проверки его гомогенности по последовательностям и с целью подтверждения его правильной позиции на геле при сравнении с оригинальным ПЦР-продуктом.

Примечание. Иногда невозможно получить чистый продукт ПЦР при реамплификации.

Литература

1. Felske A., Akkermans A.D., de Vos W.M. Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive RT-PCR in TGGE fingerprints // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. P. 4581–4587.
2. May L.A., Smiley B., Schmidt M.G. Comparative denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities associated with whole plant corn silage // Can. J. Microbiol. 2001. V. 47. P. 829–841.
3. Schabereiter-Gurtner C., Pinar G., Lubitz W., Rolleke S. Analysis of fungal communities on historical church window glass by denaturing gradient gel electrophoresis and phylogenetic 18S rRNA sequence analysis // J. Microbiol. Meth. 2001. V. 47. P. 345–354.
4. van Elsas J.D., Duarte G.F., Keijzer-Wolters A., Smit E. Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis // J. Microbiol. Meth. 2000. V. 43. P. 133–151.

МЕТОД T-RFLP ДЛЯ АНАЛИЗА ДИНАМИКИ СЛОЖНЫХ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ

T-RFLP — основанный на изучении ДНК молекулярный метод анализа, позволяющий идентифицировать и даже в некоторых случаях количественно определить состав микробного сообщества и его динамику, не выделяя в чистые культуры представителей такого сообщества. Метод применим для анализа микробных сообществ почв, активированного ила, анаэробных осадков из пресных и морских обитаний, содержимого кишечника различных животных. В этом методе геномная ДНК, экстрагированная из природного образца, является матрицей для ПЦР-амплификации, в которой, по крайней мере, один праймер помечен флуоресцентной краской. Амплифицированные продукты подвергают рестрикции с помощью одной или нескольких рестриктаз и определяют размеры рестрикционных фрагментов, которые помечены флуоресцентной меткой, с помощью электрофореза. Таким образом, электрофореграмма дает информацию о длине различных флуоресцирующих фрагментов ДНК, различающихся по интенсивности свечения.

Чрезвычайно важным является выбор метода анализа сложных микробных сообществ при применении T-RFLP. Наиболее простым подходом является визуальное сравнение электрофореграмм, полученных из различных образцов, на предмет обнаружения или отсутствия одинаковых пиков флуоресценции (по молекулярной массе рестрикционных фрагментов). Такой подход приемлем, однако он не позволяет количественно оценить образцы. Количественные (и качественные автоматические) анализы возможны, однако они также пока не унифицированы, и для анализа и сравнения результатов работы различных лабораторий необходимо пользоваться одними и теми же программными продуктами, позволяющими автоматически сканировать гели и подвергать флуоресцентные пики на них качественному и количественному анализу.

ПРОВЕДЕНИЕ T-RFLP

Для сравнительного анализа динамики микробных сообществ с применением метода T-RFLP необходимо строго соблюдать все параметры эксперимента. Наиболее важными из них являются: 1) ме-

тод экстракции ДНК; 2) биохимия проведения ПЦР, включая относительные количества всех компонентов реакции; 3) последовательности праймеров; 4) биохимия реакций рестрикции; 5) количество флуоресцирующего материала, нанесенного на дорожку геля или капилляр; 6) элаймент (выравнивание) профилей рестрикционных фрагментов и статистический анализ базы данных экспериментов.

Выделение тотальной ДНК сообщества

После проведения выделения и очистки ДНК (см. гл. 12) препараты сохраняют в качестве архивного материала для повторения экспериментов в дальнейшем. Некоторые исследователи, однако, отмечали расщепление или «исчезновение» ДНК при хранении образцов при -20°C в разбавленных водных растворах. Полагают, что ДНК может адгезироваться на стенках пробирки, однако такому предположению нет экспериментального подтверждения. До некоторой степени эту проблему можно решить, храня ДНК в виде осадка под этанолом. Для взятия аликвоты в таком случае образец взбалтывают для суспендирования осадка и быстро отбирают необходимое количество ДНК. Эту пробу затем центрифугируют и осадок растворяют в небольшом количестве стерильной воды для проведения дальнейших анализов. В некоторых случаях помогает добавление неионного детергента Nonidet P40 (0,05%) для отбора ДНК из хранящейся пробы.

Выбор праймеров

Для любого анализа с применением ПЦР выбор праймеров является критическим. Для большинства исследований с использованием метода T-RFLP применяют праймеры, основанные на известных последовательностях гена, кодирующего синтез 16S рРНК, хотя для некоторых экспериментов используют и праймеры, подобранные для функциональных генов. Праймер между 42-й и 63-й парами нуклеотидов в гене 16S рРНК является высококонсервативным и, по общему мнению, считается «универсальным прямым праймером» (отсчет по последовательности для *E. coli*). В литературе можно найти и множество других праймеров, которые являются пригодными для проведения амплификации нужных участков ДНК для T-RFLP анализов.

Выбранные праймеры могут быть помечены с 5'-конца такими концентрациями флуоресцентного красителя, что на дорожки геля или в капилляры для электрофореза могут быть нанесены двойные или тройные их концентрации. Одна из красок и соответствующая спектральная линия должна быть зарезервирована для флуоресцентно меченых метчиков молекулярных масс.

ПЦР-амплификация

Данная процедура проходит в соответствии с протоколом, описанным в гл. 2. Для первоначальной амплификации обычно не применяют флуоресцентно меченые праймеры для того, чтобы убедиться в правильности выбранной стратегии и провести анализ более экономично. Первоначальную пилотную амплификацию проводят, чтобы убедиться в том, что результатом реакции будет один единственный продукт (одна полоса на 1%-ном агарозном геле). Любые проявляющиеся контаминирующие полосы должны быть убраны изменением условий проведения ПЦР. В большинстве случаев этого добиваются, увеличивая «строгость» специфичности реакции при добавлении 3–5% ацетамида, повышая температуру отжига праймеров или подбирая концентрацию магния. ПЦР с «горячим стартом» или метод «посадки» ПЦР улучшает специфичность и снижает вероятность появления нежелательных продуктов.

После получения удовлетворительного результата ПЦР (одиночной полосы на геле) в реакцию можно добавлять флуоресцентно меченые праймеры. Стандартный протокол рекомендует провести 2–3 реакции в объеме 100 мкл с мечеными праймерами для каждой анализируемой пробы ДНК. При существенной амплификации в ходе ПЦР этого количества ДНК должно хватить для проведения 5–10 рестрикционных анализов. ПЦР продукты объединяют перед очисткой (см. ниже).

При проведении реакций мечения праймеров и при всех дополнительных процедурах и манипуляциях с флуоресцентным материалом следует соблюдать осторожность и не подвергать образцы прямому воздействию света, поскольку это приводит к выцветанию краски и уменьшению чувствительности в дальнейшем. Для снижения артефактов при проведении ПЦР количество циклов следует планировать как можно меньше, не более 25–30.

Очистка ПЦР продукта

Некоторые компоненты ПЦР могут мешать проведению дальнейших анализов. Поэтому продукт ПЦР должен быть очищен от белков и олигонуклеотидов с помощью коммерческих наборов для очистки ПЦР продуктов.

Выбор рестрицирующих эндонуклеаз и проведение расщепления ДНК

Обычно ПЦР продукт размером более чем 1000 по является мишенью действия рестриктаз, узнающих последовательности из 4–5 оснований, которые наиболее часто используют при проведении T-RFLP анализов. Вероятности присутствия сайтов рестрикции и их распространение по выбранной последовательности — важное об-

стоятельство при проведении рестрикционного анализа. Одной из целей T-RFLP анализа является определение возможно большего числа филотипов на одном филогенетическом маркере, каким является ген 16S рНК. Таким образом, для определения разнообразия необходимо выбирать такую комбинацию праймер–фермент, которая приводит к появлению в результате рестрикции наибольшего количества уникальных рестрикционных фрагментов. Количество таких фрагментов, определенное из анализа более 27 000 известных последовательностей гена, помещенных в рибосомальную базу данных, может колебаться для разных рестриктаз от 296 до 917. Сайты рестрикции, которые являются высококонсервативными и не варьируют среди представителей различных филогенетических рангов, мало помогают в анализе сообществ. Поэтому экспериментатор должен проводить анализ и делать выбор между конструкцией праймеров и рестриктазой для получения наиболее приемлемых результатов анализа микробных сообществ.

Другим аспектом распределения сайтов рестрикции на продуктах ПЦР является то, что некоторые филогенетические группы содержат их первый сайт рестрикции слишком далеко от меченого конца (праймера). Размер фрагментов более 700 по (для гелей) или 900 по (для капилляров) выходит за рамки точного определения длины с помощью используемых в настоящее время маркеров. Поэтому для определения всех потенциальных филогенетических групп в сообществе рекомендуют метить флуоресцентно оба — и прямой, и обратный праймеры.

Рестрикционное расщепление ДНК

Хотя рестрикционные анализы являются рутинными методами для многих лабораторий, необходимо соблюдать осторожность при применении этого метода для T-RFLP анализа, убеждаясь в том, что рестрикционная реакция прошла до конца. Рестрикцию необходимо проводить, строго следуя рекомендациям производителя, и ни при каких условиях рестрикция не должна продолжаться целую ночь или при нерекомендуемой ионной силе рестрикционной смеси. Такие ограничения в результате проведенной реакции позволят появиться только нужным продуктам. Дополнительные предосторожности должны быть приняты, если в результате проведенной реакции в контролях появляются продукты псевдорестрикции. После истечения времени, рекомендованного для проведения реакции, ферменты должны быть инактивированы прогреванием, и затем пробы помещают на -20°C до проведения электрофореза. Если его проводят сразу, то рестрикционную смесь можно наносить в гель непосредственно, добавляя денатурирующий агент и метчики. При проведе-

нии капиллярного электрофореза продукты рестрикции могут требовать дополнительного обессоливания перед нанесением в гель.

Разделение рестрикционных фрагментов

Терминальные фрагменты разделяют в денатурирующем геле или в капиллярах. Специфические параметры для электрофореза варьируют от системы к системе и обычно они требуют эмпирической оптимизации.

Определение размера фрагментов

В автоматических системах для гелей или капилляров маркеры стандартного размера могут быть включены в каждую дорожку и поэтому определение длины рестрикционных фрагментов бывает очень точным. Обычно предлагаемые производителем автоматических секвенаторов снабжены компьютерной программой автоматического подсчета длины фрагментов, основанной на определении электрофоретической подвижности фрагментов каждой пробы относительно заложенных в пробу стандартов длины. Стандарты длины поставляют компании—производители приборов для электрофореза (GeneScan — «ABI»; GeneFlo DNA Ladder — «Chimerx»; MegaBACE ET Size Standards — «GE Healthcare»).

Сравнительный анализ микробных сообществ

После проведения электрофореза его параметры хранятся в файлах, содержащих табулированные данные сканирования геля и его графический имидж (электрофореграмму). Детали дальнейшей обработки данных в значительной степени зависят от компании—производителя машины. В случае ABI-системы применяют компьютерные программы GeneScan или Genotyper для перевода данных анализа в графическую или табличную формы. Программа Genotyper особенно удобна, поскольку позволяет одновременно анализировать несколько гелевых профилей и вводить уровень контроля, отсекающий нижний уровень детекции флуоресценции и предел толерантности при определении размера фрагментов. При тщательном анализе данных определения размера терминальных рестрикционных фрагментов в ходе работы с микробными сообществами исследователь должен обнаружить замечательное разнообразие присутствующих видов!

Гелевые профили подвергают сравнению и унификации (похожую процедуру элаймента проводят при сравнительном анализе результатов секвенирования гена 16S рРНК). После унификации профилей их подвергают анализу с помощью статистических программ, например программы Arlequin. Это набор статистических программ, разработанных для оценки и анализа данных популяций на молекулярном уровне, а также традиционных данных популяционного анализа (мультилокусный анализ). Программа доступна на сайте:

<http://lgb.unige.ch/arlequin/>. Для осуществления гидролиза последовательностей генов 16S рРНК *in silico* были разработаны такие программы, как TAP-TRFLP (<http://rdp.cme.msu.edu>), torast (<http://www.torast.de>) и MiCA (<http://micaibest.uidaho.edu/>). TRF-CUT программа, созданная как дополнение к бесплатному программному обеспечению ARB (www.arb-home.de), позволяет прогнозировать *in silico* терминальные рестрикционные фрагменты (Т-RF) гена, кодирующего рРНК малой субъединицы, или функционально активных генов, используя любую эндонуклеазу рестрикции с определенным рестрикционным сайтом. Программа TRF-CUT применима для выбора ферментов с высоким филогенетическим разрешением и для сравнения терминальных рестрикционных фрагментов из экспериментальных T-RFLP данных с потенциально соответствующими последовательностями, взятыми из баз данных.

ДЕТАЛЬНЫЙ ПРОТОКОЛ ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

После получения качественной пробы тотальной ДНК микробного сообщества следуют следующие процедуры.

А. ПЦР-амплификация

Для ПЦР-амплификации последовательностей гена 16S рРНК из почвенных образцов вначале проводят предварительную реакцию в небольших объемах (25–50 мкл) с немечеными праймерами. Реакция проверяется электрофорезом в агарозном геле, и все удачные реакции масштабируются до объема 100 мкл (2–3 реакции на пробу) с мечеными праймерами.

1. Приготовьте исходную смесь реагентов для предварительно определенного числа реакций в объеме 50 мкл в чистой области лаборатории для уменьшения возможности загрязнения. Коммерческие рабочие станции, такие как CleanSpot («Coy Lab», США), оборудованные стерилизующей УФ лампой, подходят для этих целей. Каждая смесь должна содержать (в объеме 50 мкл для проведения реакции):

Стерильная деионизованная вода	30,5 мкл
10× буфер для ПЦР	5 мкл
Смесь дНТФ (2 мМ каждого)	5 мкл
MgCl ₂ (50 мМ)	1,5 мкл
БСА (10 мг/мл)	0,5 мкл
27F-праймер (10 мкМ)	1 мкл
1492R- или 1392R-праймер (10 мкМ)	1 мкл
Taq ДНК-полимераза (10 ед./мкл)	0,5 мкл
ДНК-матрица	5 мкл

2. ПЦР проводят в программируемом термоциклере. Следующие условия должны быть соблюдены для проведения реакции амплификации последовательности гена, кодирующего 16S рРНК, с праймерами, специфичными для доменов:

94°C — 5 мин, 25–30 следующих циклов: 94°C — 40 с для денатурации; 55–57°C — 40 с для связывания праймеров; 72°C — 1,5 мин для амплификации. Затем следует: 72°C — 10 мин (конечное удлинение) и 4°C — до выемки проб из прибора.

3. Проанализируйте ПЦР-продукт в 1%-ном агарозном геле.

4. Повторите ПЦР-амплификацию с мечеными праймерами (5-гексахлорофлуоресцеин или 6-карбоксифлуоресцеин) в двух-трех 100-мкл ПЦР-реакциях для каждой пробы и проанализируйте продукты в агарозном геле.

Б. Очистка продукта

5. ПЦР продукт после масштабированной амплификации (3 × 100 мкл) для каждой из проб объединяют, очищают с использованием QIAquick PCR Purification Kit («Qiagen», Нидерланды) и спектрофотометрически измеряют концентрацию ДНК, элюированной в конечном объеме 50 или 100 мкл.

В. Рестрикция

6. Расщепление ДНК с помощью рестриктаз проводят в объеме 15 мкл. В каждую пробирку добавляют следующие компоненты: 200–400 нг меченой ДНК; 1,5 мкл 10× буфера для рестрикции; 10 ед. рестриктазы, деионизованной воды — до 15 мкл. Смешайте и инкубируйте смесь при оптимальном времени и температуре для применяемой рестриктазы. Используйте инкубационный период, рекомендованный производителем, для полного прохождения рестрикции. Остановите реакцию прогреванием при 72°C в течение 20 мин.

Г. Электрофорез

7. Рестрикционные фрагменты можно непосредственно вносить в разделяющие денатурирующие полиакриламидные гели с соответствующими стандартами длины (например, ABI TaqMan 2500) на каждую дорожку. Типичный электрофорез проводят на модели ABI 373A в течение 14–16 ч при 2500 В и 40 мА в 6%-ном денатурирующем полиакриламидном геле.

8. Капиллярный электрофорез может потребовать обессоливания пробы для эффективного нанесения. Обессоливание проводят с помощью колонок Microcon («Amicon»), QIAquick Nucleotide Removal Kit («Qiagen») или при обычном переосаждении ДНК этанолом. В некоторых лабораториях перевары разбавляют стерильной деионизованной водой до 500 мкл и наносят на колонки Microcon для кон-

центрирования и обессоливания. После обессоливания необходима проверка концентрации ДНК, так как эта процедура может приводить к неодинаковому выходу продукта от пробы к пробе. Денатурированные пробы, содержащие стандартные маркеры (например, MM1000, «BioVentures», США), наносят на 36-см капилляры (с полимером POP4) и проводят электрофорез в системе ABI 3100 для капиллярного электрофореза при 50 кВ в течение 2 ч. Количество рестрикционных фрагментов, наносимых в капилляр, контролируется исследователем по времени нанесения смеси (10–60 с в зависимости от концентрации ДНК и содержания соли в образце).

ПРИМЕР ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ДИНАМИКИ АНАЭРОБНОГО МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА T-RFLP

Метаногенные археи — высокоспециализированная группа прокариот, которая в качестве единственного продукта энергетического метаболизма образует метан. Метан является вторым после CO₂ важнейшим парниковым газом. Основными средами обитания метаногенных архей являются заболоченные территории, включая почвы рисовых полей, которые являются источником около 25% глобальной эмиссии метана и поэтому оказывают значительное влияние на изменение климата нашей планеты. Кроме того, почвы рисовых полей являются удобной моделью для изучения фундаментальных аспектов микробной экологии, таких, как разнообразие, структура и динамика микробных сообществ, а также структурно-функциональные отношения между группами микроорганизмов.

В анаэробных почвах рисовых полей образование метана является следствием взаимодействия различных групп сложного микробного сообщества, в которое наряду с метаногенами входят гидролитики, бродильщики, синтрофы, гомоацетогены. Метан преимущественно образуется из ацетата или водорода и CO₂. Более длинноцепочечные органические кислоты, например пропионат, должны быть предварительно преобразованы в субстраты метаногенеза с помощью синтрофов в присутствии водород- и формиат-потребляющих метаногенов. При этом метаногены поддерживают концентрацию водорода и формиата на экстремально низком уровне, тем самым делая анаэробное окисление пропионата энергетически благоприятным.

Существенная часть (от 20 до 45%) метана, выделяющегося из почвы рисовых полей, образуется гидрогенотрофными метаногенами, входящими в состав семейств *Methanobacteriaceae*, *Methanomicrobiaceae*, *Methanosarcinaceae*, и новой филогенетической группой в пре-

делах *Euryarchaeota* — rice cluster I (RCI). До настоящего времени ни один из представителей RCI не был выделен в чистую культуру, однако установлено, что эта группа метаногенов имеет гидрогенотрофный фенотип. Имеется немного сведений о физиологических особенностях, которые давали бы преимущества в развитии одного гидрогенотрофного метаногена перед другими. Известно, что представители *Methanomicrobiaceae*, *Methanobacteriaceae*, *Methanosarcinaceae* и RCI используют в качестве субстрата H_2/CO_2 , в то время как метаногены рода *Methanosarcinaceae* могут также использовать ацетат.

Показано, что в различных местах обитания доминирует определенная группа гидрогенотрофных метаногенов. Причиной такого специфического доминирования могут служить особые физико-химические условия, сложившиеся в данном месте обитания, а именно концентрации H_2 , CO_2 , формиата и ацетата, а также температура и pH среды. Существует несколько способов доказательства возможного селективного влияния того или иного фактора на преимущественное развитие определенной группы H_2 -использующих метаногенов. Наиболее общепринятым способом является инкубация почвенной суспензии в определенных условиях. Этот подход легко применим для контроля влияния такого фактора, как температура, с помощью термостата. Однако контролирование концентраций таких веществ, как H_2 , CO_2 , ацетат в гетерогенной среде, которую представляет собой почвенная суспензия, где одновременно происходит их образование и потребление, представляется проблематичным. Поэтому более простой и удобной моделью является получение накопительной культуры и проверка влияния факторов среды на преимущественное развитие определенных групп гидрогенотрофных метаногенов.

Удобным методом мониторинга динамики структуры микробного сообщества является метод T-RFLP. Метод основан на амплификации функционального гена (например, 16S рРНК) с определенным набором праймеров, один из которых мечен флуоресцентной меткой, и рестрикции полученного продукта с помощью частощепящих рестриктаз(ы), с последующим определением относительного количества терминальных рестрикционных фрагментов (рис. 14.1). Ниже представлены результаты изучения динамики структуры гидрогенотрофного метаногенного сообщества почв рисовых полей в условиях высокого и низкого содержания водорода.

А. Выделение ДНК из почвы и накопительных культур

Геномную ДНК выделяли из 0,5 г исходной почвы (в трех повторностях) и из 10 мл накопительной культуры для каждого временного интервала, используя набор FastDNA® Spin Kit для почв

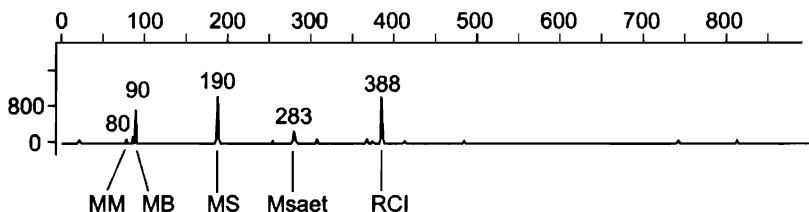


Рис. 14.1. Типичная T-RFLP электрофореграмма ампликонов генов 16S рРНК архей из почвы рисовых полей Италии (контроль). Ось x — длины фрагментов, выраженные в количестве пар оснований (по). Ось y — относительная интенсивность флуоресценции

MM — *Methanomicrobiaceae* (80 по); MB — *Methanobacteriaceae* (90 по); MS — *Methanosarcinaceae* (190 по); Msaet — *Methanosetaeaceae* (283 по); RCI — rice cluster I (388 по)

(«Qbiogene», Германия) согласно рекомендации изготовителя. Для удаления гуминовых кислот была выполнена дополнительная стадия очистки с помощью 5,5 М раствора тиоцианата гуанидина.

Б. ПЦР-амплификация генов 16S рРНК архей

Гены 16S рРНК архей из каждого образца ДНК были ПЦР-амплифицированы с использованием специфичных для архей праймеров, которые позволяют амплифицировать фрагмент гена 16S рРНК с позиции 109 по 934 (нумерация указана для гена 16S рРНК *E. coli*). 5'-концевой праймер был флуоресцентно мечен 5-карбоксифлуоресцеином. Для проведения амплификации использовали реактивы компании «Invitrogen» (США). Амплификация была выполнена на приборе GeneAmp PCR System 9700 («Applied Biosystems», США).

В. T-RFLP анализ анаэробного микробного сообщества

Флуоресцентно меченые ампликоны гена 16S рРНК были очищены с помощью набора для очистки ПЦР продуктов («Sigma-Aldrich», США), следуя рекомендациям изготовителя. Концентрация очищенных фрагментов гена 16S рРНК была определена с помощью стандартной УФ фотометрии при 260 нм на спектрофотометре Bio-photometer («Eppendorf», Германия).

Рестрикцию 30–50 нг ампликонов гена 16S рРНК рестриктазой *TaqI* проводили, следуя рекомендации изготовителя («Promega», США), в течение 3 ч при 65°C. Продукты рестрикции очищали на колонках AutoSeq™ G-50 («GE Healthcare», Великобритания). Затем 2 мкл очищенных рестрикционных фрагментов смешивали с 0,2 мкл одноцепочечной флуоресцентно меченой маркерной ДНК Map-Marker® 1000 («BioVentures», США) и 12 мкл формамида Hi-Di™ («Applied Biosystems», Германия), нагревали в течение 5 мин при 95°C и анализировали с помощью ABI PRISM® 310 Genetic Analyser («Applied Biosystems», США).

Относительную частоту встречаемости индивидуальных концевых рестрикционных фрагментов в тотальном сообществе архей определяли по относительной высоте пика поглощения каждого фрагмента. Принадлежность метаногенов к определенной филогенетической группе определяли по длине соответствующих концевых рестрикционных фрагментов, полученных из генов 16S рРНК, клонированных из почв рисовых полей Италии.

Г. Результаты анализа анаэробного микробного сообщества с помощью T-RFLP

В образцах рестрикционных фрагментов ампликонов, полученных из исходной почвы, доминировали фрагменты, длины которых соответствовали RCI (*Euryarchaeota*, 388 по) и *Methanosarcinaceae* (190 по), относительное количество которых составило 38 и 34% от общего количества архей соответственно (рис. 14.1 и 14.2, 0 сут.). Фрагменты других обнаруженных групп присутствовали в меньших количествах и соответствовали представителям *Methanobacteriaceae* (90 по) и *Methanosaetacea* (283 по). В низких пропорциях (менее 5% в целом) были обнаружены рестрикционные фрагменты, принадлежащие *Methanomicrobiaceae*, RCII и RCV (*Euryarchaeota*), RCIV и RCVI (*Crenarchaeota*), а также те, которые не могут быть приписаны ни к одной из известных филогенетических линий. Все они были исключены из анализов в процессе процедуры нормализации. Результаты анализа рестрикционных фрагментов, полученные при инкубации почвы рисовых полей при высокой и низкой концентрации водорода, представлены на рис. 14.2.

По результатам T-RFLP анализа можно сделать вывод о том, что состав сообщества водородиспользующих метаногенов менялся в процессе инкубации как при высокой, так и при низкой концентрациях водорода (рис. 14.2). В накопительной культуре, инкубируемой при высоких концентрациях водорода (рис. 14.2, а), относительное количество фрагментов, соответствующих представителям *Methanobacteriaceae*, *Methanosarcinaceae* и RCI, существенно не менялось вплоть до 8-го дня инкубации, тогда как фрагментов, соответствующих представителям семейства *Methanosaetaceae*, не было зафиксировано уже через 24 ч. Затем, в течение второй недели инкубации, относительное количество фрагментов, соответствующих *Methanobacteriaceae* и RCI, уменьшилось, в то время как количество *Methanosarcinaceae* увеличилось. К концу инкубации в культуре было отмечено присутствие только представителей *Methanobacteriaceae* и *Methanosarcinaceae*. Важно отметить, что к концу инкубации относительное количество *Methanosarcinaceae* составило приблизительно 90%.

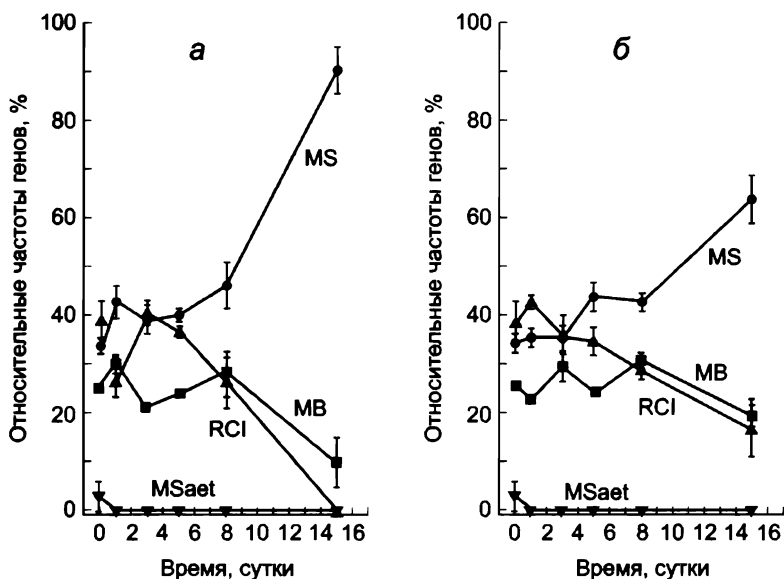


Рис. 14.2. T-RFLP анализ изменения популяций метаногенов в анаэробных накопительных культурах из почв рисовых полей при высоких а) и низких б) концентрациях водорода

MB — *Methanobacteriaceae*; MS — *Methanosarcinaceae*; Msaet — *Methanosaetaceae*; RCI — rice cluster I

В накопительных культурах, инкубируемых при низких концентрациях водорода (рис. 14.2, б), относительное количество фрагментов, соответствующих *Methanobacteriaceae*, увеличивалось незначительно вплоть до 8-го дня инкубации (с 25 до 30%), затем в течение следующей недели уменьшалось (с 30 до 19%). В течение всего времени инкубации относительное количество фрагментов, соответствующих RCI, значительно уменьшилось (с 43 до 16%), а *Methanosarcinaceae* — увеличилось, но в меньшей степени (с 33 до 62%) по сравнению с накопительной культурой, инкубируемой при высоких концентрациях водорода. Представители семейства *Methanosaetaceae* не были обнаружены уже после 24 ч инкубации (как и при высокой концентрации водорода). После двух недель инкубации сообщество метаногенов в накопительных культурах, инкубируемых при низких концентрациях водорода, было значительно разнообразнее, чем при его высоких концентрациях.

Заключая, необходимо отметить, что T-RFLP анализ накопительных культур является удобным методом изучения влияния различных физико-химических факторов на изменения структуры метаногенного сообщества. Мы показали, что структура гидрогенотрофного

метаногенного сообщества изменяется в процессе инкубации и зависит от концентрации водорода в среде. Высокие концентрации водорода дают преимущество в развитии представителям *Methanosarcina*, в то время как при низких его концентрациях метаногенное сообщество со временем становится более разнообразным.

ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

Техническим преимуществом метода T-RFLP является его способность обнаруживать разницу в длине рестрикционных фрагментов экономично и в большом количестве образцов. Это позволяет исследователю проследить достаточно детальные изменения филогенетического или физиологического разнообразия в зависимости от экологически значимых градиентов. В процессе такого изучения экспериментатор способен идентифицировать популяции, чье присутствие или активность коррелируют с изменениями в окружающей среде. Поскольку в описанном методе имеются технические сложности, необходимо ставить повторные эксперименты.

Каждая ниша или проба должны быть проверены многократно, начиная от процедуры экстракции ДНК до разделения продуктов терминальной рестрикции. Экспериментальные контроли должны проверять полноценность проведения рестрикции и наличие необычных продуктов ПЦР. Первое может быть проверено в реакции амплификации изолята или клона с известной целевой последовательностью одновременно с природным образцом. Если этот контроль будет амплифицирован с меченым праймером, который будет отличаться от праймера для остального сообщества, ПЦР продукты могут быть затем смешаны и рестрицированы в одной пробирке, давая недвусмысленное подтверждение полноты проведения рестрикции ПЦР продуктов, амплифицированных из пробы сообщества. Необычные продукты ПЦР обнаруживают при проведении электрофореза негидролизованной пробы. Поскольку чувствительность обнаружения флуоресцентного сигнала достаточно высока, полосы, обнаруживаемые при автоматическом электрофорезе, могут быть не видны в стандартном геле, что обуславливает необходимость этого контроля. После окончания электрофореза необходимо убедиться в том, что количество флуоресцентной метки на одной дорожке приблизительно равно таковому на соседних.

Объективно понятно, что разница в количестве метки может привести к серьезному различию в интерпретации результатов. Различия больше чем в два раза могут привести к различиям в профилях рестрикции, которые относительно неинформативны по отноше-

нию к анализу всего сообщества. Обработка данных на стадии сравнения профилей может существенно снизить влияние различной флуоресцентной нагрузки на разные дорожки геля, однако исследователь должен быть уверен, что при этом не будут потеряны важные данные. Экспериментатор должен хорошо себе представлять, что никто не способен провести филогенетический анализ с размером только одного терминального фрагмента рестрикции. T-RFLP анализ последовательностей гена, кодирующего синтез 16S рРНК, имеет преимущества в возможности использования большой базы данных, собранных по последовательностям этого гена от разных представителей культивируемых и некультивируемых форм микроорганизмов. Такие базы данных дают исследователям возможность прогнозировать новые эксперименты и проверять новые гипотезы по присутствию (или отсутствию) различных филогенетических групп в различных экологических нишах.

Таким образом, T-RFLP анализ последовательностей гена, кодирующего синтез 16S рРНК, позволяет экономично проводить исследования структуры и функции микробных сообществ и их изменений под влиянием различных факторов. Кто-то может возразить, что метод T-RFLP анализа еще до конца не разработан. Однако при разработке новых наборов праймеров для широких и узких филогенетических групп, для функциональных генов, определяющих ключевые физиологические активности, тысячи фрагментов могут быть отобраны для анализа из одной природной пробы. Это дает возможность широкого и глубокого сравнительного изучения сообществ в их развитии и изменении.

Литература

1. *Лейба А.И., Нетрусов А.И., Конрад Р.* Накопительные культуры и анализ полиморфизма длин концевых рестрикционных фрагментов (T-RFLP-анализ) ампликонов генов 16S рРНК как модель исследования влияния концентрации водорода на структуру сообщества гидрогенотрофных метаногенов // *Микробиология*. 2006. Т. 75. С. 786–791.
2. *Chin K.J., Lukow T., Conrad R.* Effect of temperature on structure and function of the methanogenic archaeal community in an anoxic rice field soil // *Appl. Environ. Microbiol.* 1999. V. 65. P. 2341–2349.
3. *Dunbar J., Ticknor L.O., Kuske C.R.* Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. V. 69. P. 190–197.
4. *Viaud M.A., Pasquier A., Brygoo Y.* Diversity of soil fungi studied by PCR-RFLP of ITS // *Mycol. Res.* 2000. V. 104. P. 1027–1032.

ФЛЮОРЕСЦЕНТНАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ *IN SITU* КАК МЕТОД ОБНАРУЖЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРОБНЫХ КЛЕТОК

FISH (*fluorescence in situ hybridization*) используют для различных целей во многих областях биологии и микробиологии (рис. 15.1). FISH позволяет обнаруживать, подсчитывать и идентифицировать не только культивируемые, но и некультивируемые микроорганизмы, поэтому именно этот подход может помочь в расшифровке принципов функционирования микробных сообществ. Метод помогает обнаружению патогенных микроорганизмов в тканях человека (микобактерии туберкулеза), патогенов растений, его применяют при анализе микробных сообществ, развивающихся в ротовой полости, кишечной микробиоты, инфекций дыхательного тракта. Применяют FISH и при изучении анаэробных осадков, в изучении симбиозов, при выявлении вирулентных видов и штаммов в ветеринарии, во многих областях экологической микробиологии, а

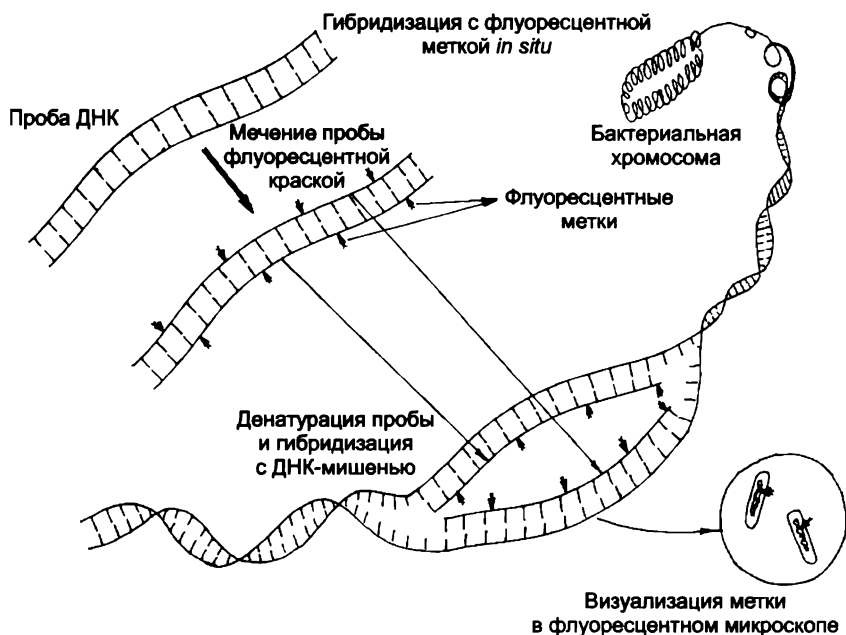


Рис. 15.1. Общая схема проведения процедуры FISH

также для локализации определенной последовательности нуклеотидов на хромосоме.

Целью микробиологической диагностики является быстрое и точное определение микроорганизмов в их природных местообитаниях. Методы, основанные на культивировании, занимают много времени и часто не позволяют выделить необходимые микроорганизмы, — это особенно относится к патогенным и некультивируемым видам. Поэтому данный подход полностью не отражает состав сложных микробных сообществ и невозможен для изучения многих микробных патогенов и некультивируемых форм.

Флуоресцентная гибридизация *in situ*, напротив, сочетает в себе точность молекулярно-генетических методов с получением визуальной информации (как в случае использования классических микроскопических методов), что позволяет выявлять и идентифицировать отдельные клетки микроорганизмов в их естественных местообитаниях или внутри зараженных ими тканей.

Гибридизация *in situ* (ISH) была независимо разработана двумя группами исследователей. ДНК с радиометкой или 28S рРНК гибридизовали с цитологическим препаратом ооцитов *Xenopus* и определяли результаты гибридизации радиографически. После этого ISH модифицировали для изучения эволюции хромосом, анализа хромосом опухолей и лейкозиев, цитогенетического изучения большого круга видов. Этот метод утвердился в микробиологии с 1988 г., когда впервые использовали олигонуклеотидные радиоактивно меченые пробы, специфичные к рРНК, для обнаружения бактерий. С разработкой флуоресцентных меток радиоактивные метки начали постепенно заменять на неизотопные красители. В 1989 г. E. DeLong первым использовал флуоресцентно меченые олигонуклеотиды для обнаружения отдельных бактериальных клеток. В отличие от радиоактивных зондов флуоресцентные зонды безопаснее, дают большее разрешение и не требуют дополнительных этапов определения. Более того, флуоресцентная метка может быть нанесена с красителями, обладающими разными длинами волн эмиссии, что делает возможным обнаружение нескольких последовательностей за один раз. Только за последние 10 лет чувствительность и быстрота FISH-метода сделали его незаменимым для филогенетиков, микробных экологов и врачей-диагностов.

FISH выявляет последовательности нуклеиновых кислот с помощью флуоресцентно меченых проб (зондов), которые проникают в метаболически активные интактные клетки и специфично гибридизуются там с комплементарными последовательностями молекул-мишеней. Эта процедура включает следующие последовательные

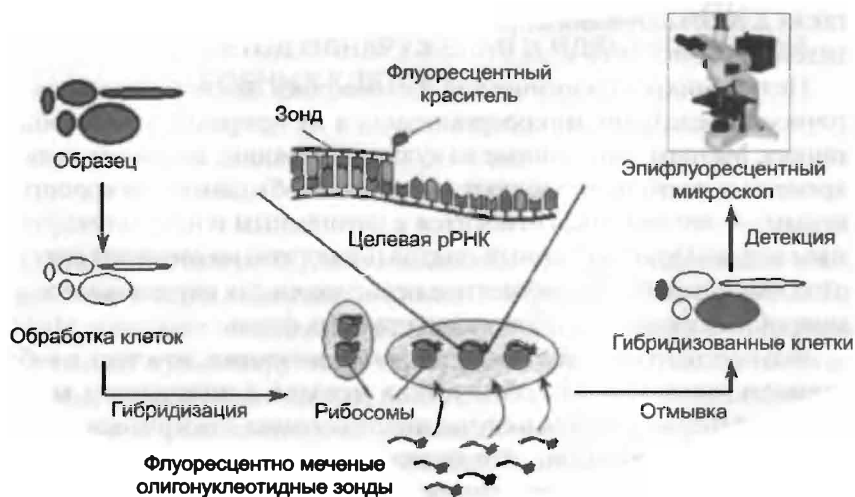


Рис. 15.2. Принципиальная схема гибридизации флуоресцентно меченого олигонуклеотидного зонда с целевой рРНК

шаги: 1) фиксация образца с клетками; 2) конструирование и подготовка меченого олигонуклеотидного зонда; 3) гибридизация с соответствующим меченым зондом для определения наличия в клетках образца искоемых нуклеотидных последовательностей; 4) отмывка для удаления непрореагировавших зондов (несвязанной метки); 5) визуализация с помощью флуоресцентного микроскопа меченых молекул, ассоциированных с комплементарными участками на хромосомах, подсчет и документирование результатов (рис. 15.2).

FISH-ЗОНДЫ И МЕЧЕНИЕ

Флуоресцентно меченые, 16S рРНК-специфичные олигонуклеотидные зонды используются для выявления различных представителей микробных сообществ. Специфичность зондов варьируется от рода до царства, в зависимости от области, выбранной на рРНК в качестве мишени. Такие зонды могут быть сконструированы и протестированы для определения наличия некультивируемых микроорганизмов в природных образцах, но интенсивность сигнала клеток, гибридизованных с олигонуклеотидным зондом, напрямую связана с количеством рРНК в клетке.

При выборе зонда для FISH необходимо учитывать его специфичность, чувствительность и легкость проникновения в клетку. Обычно олигонуклеотидные зонды длиной в 15–30 нуклеотидов создаются в автоматическом синтезаторе. Короткие зонды легче достигают своих мишеней, но они менее специфичны.

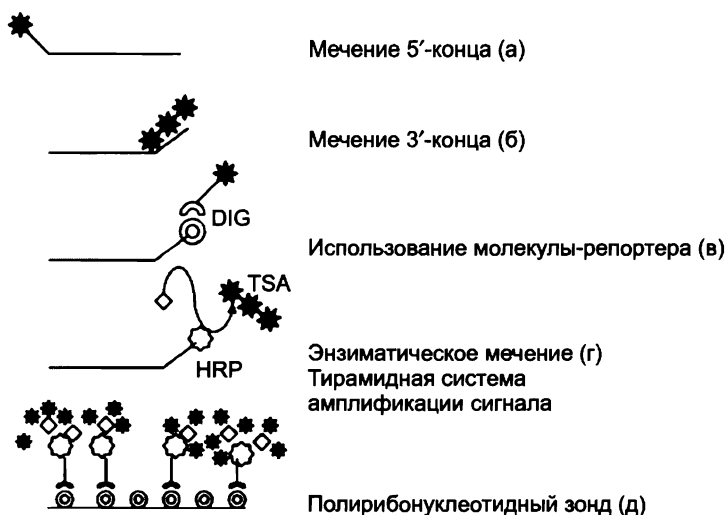


Рис. 15.3. Основные типы мечения FISH-зондов (по Bottari et al., 2006)

Существуют разные пути мечения (рис. 15.3). Прямое флуоресцентное мечение — самый широко применяемый метод, который к тому же является самым быстрым, дешевым и простым и не требует дополнительных операций после гибридизации. Одну или несколько молекул флуоресцентного красителя строго направленно прикрепляют к олигонуклеотиду химически во время синтеза с 5'-конца зонда или энзиматически с использованием терминальных трансфераз для прикрепления флуоресцентно меченых нуклеотидов с 3'-конца. Присоединение флуоресцеинизотиоцианата (FITC) к олигонуклеотиду через вставку C-18 может увеличить интенсивность сигнала по сравнению с непосредственной конъюгацией метки и олигонуклеотида. Флуоресценция сигнала может быть увеличена при мечении зондов с обоих концов: одной флуоресцирующей молекулой с 3'-конца и четырьмя — с 5'-конца через вставочные сегменты, предотвращающие тушение флуоресценции. Флуоресцентно меченые олигонуклеотидные зонды синтезируются различными фирмами. Зонды можно хранить при -20°C в темноте в течение нескольких месяцев. В некоторых случаях лучше использовать опосредованное мечение (табл. 15.1).

Для мечения олигонуклеотидного зонда флуоресцентным красителем карбоцианином 3 (рис. 15.4, а) обычно применяют следующую методику:

1. Высушить **50 мг** (или **30 нмоль**) олигонуклеотида, соединенного с линкером, под вакуумом.

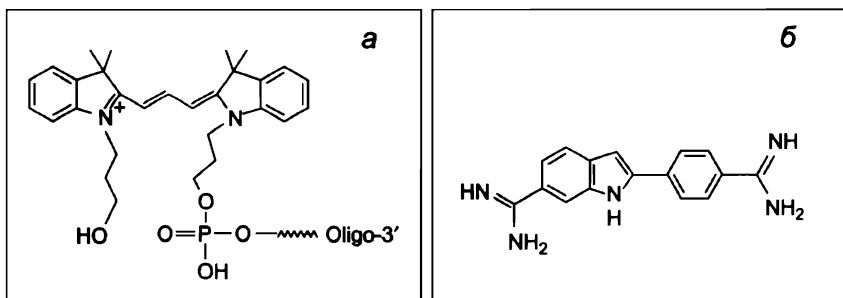


Рис. 15.4. Структурные формулы карбоцианина 3 (а) и ДАФИ (б)

2. Растворить в **100 мкл** 80%-ной уксусной кислоты и высушить под вакуумом.

3. Перерастворить в **50 мкл** дистиллированной воды и дважды высушить.

4. Растворить содержимое одной ампулы с Cu_3Z в **500 мкл** 0,1 М Na_2CO_3 (рН 9,0).

5. Растворить **50 мг** высушенного олигонуклеотида в **100 мкл** раствора Cu_3Z .

6. Инкубировать при комнатной температуре в течение 12 ч.

Очистку меченых олигонуклеотидов проводят с помощью гель-хроматографии на колонках с Сефадексом G-25 (идентификация осуществляется по абсорбционному спектру), посредством гель-электрофореза в 50%-ном акриламидном геле и на колонках с NEN-сорбентом.

Показано, что чувствительность FISH-анализов можно увеличить, если флуоресцентная метка будет прикреплена к молекуле-переносчику (например, к ДИГ — дигоксигенину), которая соединяется с олигонуклеотидом по принципу антиген—антитело. Чувствительность FISH-метода может быть увеличена еще больше, если использовать энзиматическую амплификацию сигнала. Этот метод был разработан для цитогенетических исследований и позже адаптирован для определения бактерий. ДИГ-меченый олигонуклеотид определяется с помощью анти-ДИГ антитела, прикрепленного к щелочной фосфатазе. Этот фермент превращает субстрат в сочетании с красителем Fast Red (Fast Red TR/нафтол AS-MX фосфат или 4-хлоро-2-метилбензолдиазоний/3-гидрокси-2-нафтойная кислота 2,4-диметиланилид фосфат) в его дефосфорилированную форму, которая флуоресцирует светло-красным светом. Интенсивность флуоресценции при таком подходе превышает флуоресценцию олигонуклеотида с единичной меткой в 8 раз. Данный

подход (энзиматическая амплификация сигнала) был в дальнейшем улучшен с помощью тирамидной амплификации сигнала (ТАС, TSA). Олигонуклеотиды при этом метили при помощи пероксидазы из хрена, субстратом которой является флуоресцеин-тирамид. Система приводит к увеличению интенсивности сигнала в 10–20 раз. Тем не менее число клеток, в которых прошла гибридизация с такими метками, меньше, чем в случае с единично мечеными зондами. Это может быть вызвано затруднениями при проникновении высокомолекулярных соединений в бактериальную клетку.

Несмотря на это, проницаемость клеток может быть увеличена при помощи лизоцима. Данный подход, однако, нельзя применять в случае грамположительных бактерий и, следовательно, он не применим для анализа сложных бактериальных популяций. Чувствительность метода FISH была значительно увеличена при использовании полирибонуклеотидных зондов, меченных несколькими молекулами флуорохрома. Возможно, самый чувствительный метод должен сочетать использование полирибонуклеотидных зондов, не терминально меченых ДИГ, и системы ТАС. Этот метод был успешно применен для определения и визуализации фактора вирулентности у *Listeria*.

Таблица 15.1

Флуоресцентные красители, используемые в методе FISH для мечения олигонуклеотидных зондов (по Bottari et al., 2006)

Флуорохром	Цвет	Максимум возбуждения, λ (нм)	Максимум эмиссии, λ (нм)
Alexa488	Зеленый	493	517
AMCA	Голубой	399	446
Cy3	Красный	552	565
Cy5	Красный	649	670
Cy7	Фиолетовый	743	767
ДАФИ	Голубой	350	456
Флуоресцеин	Зеленый	494	523
Родамин	Красный	555	580
TAMRA	Красный	543	575
Texas Red	Красный	590	615
TRITC	Красно-оранжевый	550	580

Доступность выбранной мишени для олигонуклеотидного зонда может быть повышена за счет добавления немеченых олигонук-

леотидных зондов, которые связываются с прилежащими к мишени сайтами. Целью является разворачивание нуклеиновой кислоты и, таким образом, облегчение ее гибридизации с зондом. Эти так называемые зонды-помощники (хелперы) должны конструироваться очень тщательно из-за их высокой специфичности к соответствующим нуклеотидным последовательностям и они должны иметь T_m по крайней мере такую же, как и T_m меченого зонда, для предотвращения диссоциации хелпера в строгих гибридизационных условиях.

РИБОСОМАЛЬНАЯ РНК КАК МИШЕНЬ ДЛЯ FISH

В микробиологии наиболее часто используемой мишенью для FISH является 16S рРНК, потому что именно она является наиболее эволюционно консервативной, обладает доменной структурой с консервативными и вариабельными участками и в клетке содержится большое число ее копий. Именно для последовательностей 16S рРНК конструируют олигонуклеотидные зонды, специфичные для бактерий или архей, либо узкоспецифичные зонды для определения микроорганизма до вида. С увеличением числа известных последовательностей они заносятся в публичные или коммерческие базы данных, по генам 16S рРНК можно проще и точнее всего идентифицировать большинство микроорганизмов. Это особенно важно, когда речь идет об изучении состава сложных микробных сообществ и некультивируемых микроорганизмов. Высокое число копий 16S рРНК в любой метаболически- и репликативно-активной клетке обычно позволяет визуализировать отдельные клетки при использовании одиночно меченых олигонуклеотидов в FISH. Выбор участка гибридизации мишени и конструирование зонда должны быть выполнены с высокой степенью точности. С меньшим успехом для идентификации используют 23S, 18S рРНК и мРНК.

Необходимо отметить, что возможна неспецифическая гибридизация нуклеотидных последовательностей РНК, которые частично, но не полностью гомологичны последовательности используемого зонда, и это может приводить к завышению результатов при подсчете численности микроорганизмов. Такие гибриды менее стабильны, чем полностью комплементарные, и могут быть отделены за счет выполнения строгой отмывки. На эффективность отмывки проб от несвязавшегося зонда существенное влияние оказывает концентрация дестабилизирующих молекул, таких как формамид, нековалентные катионы, а также рН и температура.

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ПРОВЕДЕНИЯ FISH

Гибридизация должна выполняться при условии строгого соответствия зонда с последовательностью-мишенью. Для этого критического этапа в FISH предварительно нагретый гибридизационный буфер наносят на образец, содержащий флуоресцентно меченый зонд, предположительно комплементарный РНК-мишени. Точность гибридизации регулируется изменением концентрации формамида и/или температуры. Формамид снижает температуру плавления ДНК за счет ослабления водородных связей, таким образом становится возможным использование более низких температур без ухудшения результатов процесса.

Гибридизация проходит в темной влажной камере, обычно при температурах 37–58°C (в зависимости от используемого зонда). Время гибридизации варьирует от 30 мин до нескольких часов. Затем слайды быстро прополаскивают, чтобы отмыть несвязавшиеся зонды, высушивают и обсчитывают.

Приготовление зонда

При проведении FISH используют обычно три типа зондов: двухнитевые пробы ДНК, пробы однонитевых РНК или ДНК и олигонуклеотидные пробы. Такие пробы метят флуорохромом, диоксигенином или биотином для дальнейшей визуализации гибридных молекул. Олигонуклеотидные пробы могут быть напрямую связаны и с пероксидазой хрена. *При работе с флуоресцентными пробами необходимо пользоваться перчатками без талька, так как тальк может вызывать избыточную флуоресценцию фона.*

Проверка качества зонда

Обычно пробы поставляют в лиофилизированном виде. Для определения точной концентрации проба должна быть растворена в 50 мкл стерильной деионизованной воды. Поглощение разведенной 1 : 100 пробы измеряют при $\lambda = 260$ нм. Так как конъюгированная пероксидаза дает свой вклад в поглощение, в этом случае его значение надо умножить на фактор 0,276.

После этой коррекции 1 ед. ОП₂₆₀ эквивалентна приблизительно 20 нг/мкл одноцепочечного олигонуклеотида. Концентрация метки на олигонуклеотиде также должна быть проверена. Например, поглощение пероксидазы измеряют при 404 нм. При оптимальной концентрации метки на олигонуклеотиде отношение поглощений (ОП₂₆₀/ОП₄₀₄) должно быть около 3.

Рабочие растворы готовят в концентрации 50 нг/мкл и хранят небольшими аликвотами (50–100 мкл) в темноте при –20°C. После размораживания меченые пробы с пероксидазой нельзя снова за-

мораживать, так как повторное замораживание разрушает фермент. При 4°C рабочие растворы проб стабильны обычно в течение 6 мес.

Приготовление образца

Состав клеточных стенок бактерий и архей может сильно варьировать в отношении проницаемости зондов. Поэтому для клеток из разных местообитаний стратегия пермеабилзации и фиксации клеток может отличаться. Ниже будет приведен протокол для работы с морскими планктонными археями и бактериями, с образцами морского бентоса и с пресноводными пробами с преобладанием актинобактерий.

Для предупреждения больших потерь клеток при процедуре пермеабилзации их клеточные стенки должны быть крепко прикреплены к поликарбонатным фильтрам, например с помощью 0,2%-ной легкоплавкой агарозы. Хотя по описанным методикам клетки при процедурах пермеабилзации и фиксации не терялись, рекомендуется проверять число клеток на фильтрах до и после приводимых обработок.

Ошибочные положительные результаты

Самофлуоресценция. Метод FISH имеет ограничения, если объектом исследования является самофлуоресцирующий материал. Самофлуоресценция микроорганизмов — самая обычная проблема при FISH. Огромное число видов плесеней и дрожжей обладает собственной флуоресценцией. Среди бактерий самофлуоресценция обнаружена у представителей родов *Pseudomonas*, *Legionella*, у *Rhodospirillum centenum* и цианобактерий. Метаногенные археи обладают сильной собственной флуоресценцией, что осложняет проведение FISH с микроорганизмами данной группы.

Самофлуоресцировать может и неживой материал, окружающий бактерии в их природных местообитаниях (почва, растения, водные растворы, неорганические субстраты). Некоторые животные ткани, содержащие эластин и коллаген, или элементы крови, такие, как эритроциты и эозинофилы, обычно осуществляют слабую самофлуоресценцию.

Иногда фоновая самофлуоресценция может оказаться полезной при изучении ориентации клеток микроорганизмов в тканях, хотя при этом возрастают шумы, маскирующие специфический флуоресцентный сигнал. В цитогенетических и иммунологических исследованиях самофлуоресцентные шумы тканей убираются при цифровой обработке изображения. Использование узкополосных фильтров и системы сигнальной амплификации позволяет преодолеть трудности, связанные с самофлуоресценцией. Для *Candida albicans* была показана штаммоспецифичность длины волны са-

мофлуоресценции. Именно по причине самофлуоресценции некоторых микроорганизмов при изучении новых видов и штаммов необходимо выяснять до проведения FISH, обладают ли их клетки самофлуоресценцией.

Факторы, занижающие результаты FISH

К таким факторам относятся затрудненное проникновение зондов, сложная структура мишеней и зондов, низкое содержание рРНК в клетках, светоотражение, сложности в работе с некоторыми зондами.

Светоотражение. После возбуждения светом многие флуорохромы быстро выцветают. Время экспозиции составляет от нескольких секунд до нескольких минут, и это оказывает критическое действие на качество микроэлектронной фотографии. Для решения этой проблемы принято использовать узкополосные световые фильтры, фотостабильные цианиновые красители и специальные не выцветающие закрепляющие растворы.

15.1.

ВЫПОЛНЕНИЕ ПРОЦЕДУРЫ СТАНДАРТНОЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ *in situ*

Необходимые реактивы и растворы:

- 37%-ный раствор формальдегида. Состав: формальдегид — 3,7 г; 1 М NaOH — 140 мкл; довести деионизованной водой до 10 мл и растворить на кипящей водяной бане в течение 1–3 мин. Хранить в пробирке с закручивающейся крышкой;
- 1× PBS буферный раствор — см. приложение 1;
- легкоплавкая агароза;
- 96%-ный этанол;
- 0,05%-ный раствор лизоцима следующего состава (*готовить свежим перед опытом на стерильной деионизованной воде*): 0,5 мг лизоцима (76 200 ед./мг) производства «Sigma-Aldrich» (США) растворить в 1 мл 0,1 М трис-HCl (pH 7,2–7,5) с добавлением 5 мМ ЭДТА (pH 8,0). Хранить при 4°C;
- гибридизационный буферный раствор следующего состава (на 1 мл): 0,9 М NaCl (180 мкл 5 М NaCl); 0,01% додецилсульфата натрия (1 мкл 10%-ного ДСН); 20 мМ трис-HCl (pH 7,5); 0,2% блокирующего реагента («Roche Diagnostics», Швейцария); деионизованный формамид в рекомендованной для соответствующего зонда концентрации (5–60%). Блокирующий реагент растворяется только в буферном растворе с высокой

ионной силой при нагревании — для этого готовят 1 М трис-НCl (рН 7,5) с 10% блокирующего реагента и вносят 20 мкл этого раствора на 1 мл гибридизационного буфера. Гибридизационный буфер необходимо готовить на стерильной деионизованной воде непосредственно перед опытом, хотя ряд протоколов отмечает возможность его хранения в течение 3 мес. при -20°C без видимого негативного эффекта на детекцию сигнала при FISH. **Внимание:** с формамидом необходимо работать в перчатках, так как это едкое и тератогенное вещество;

- промывной буферный раствор следующего состава (на 50 мл): 20 мМ трис-НCl (1 мл 1 М трис-НCl, рН 7,5); 5 мМ ЭДТА (0,5 мл 0,5 М ЭДТА, рН 8,0); 0,01% додецилсульфата натрия (50 мкл 10%-ного ДСН); от 4 до 890 мМ NaCl — в зависимости от концентрации формамида в гибридизационном буферном растворе, см. табл. 15.2. Готовить на стерильной деионизованной воде. Хранить при $4-20^{\circ}\text{C}$;

Таблица 15.2

Необходимые объемы 5 М NaCl на 50 мл промывного буферного раствора в соответствии с используемыми концентрациями формамида в гибридизационном буферном растворе

% Формамида в гибридизационном буфере	Объем вносимого 5 М NaCl (в мкл) на 50 мл промывного буфера	
	Отмывка при 37°C	Отмывка при 48°C
0	—	8900
5	—	6260
10	—	4400
15	—	3080
20	1350	2150
25	950	1490
30	640	1020
35	420	700
40	270	460
45	160	300
50	90	180
55	30	100
60	0	40
65	0	—
70	0	—

- водный раствор 4',6-диамидино-2-фенилиндола (ДАФИ) в концентрации 0,5 нг/мкл. Готовится из стокового раствора ДАФИ (1 мкг/мкл), хранящегося при -20°C в темноте. Рабочий раствор ДАФИ хранить при 4°C в темноте. **Внимание:** с ДАФИ, являющимся канцерогенным веществом, необходимо работать в перчатках.

Методика

А. Фиксация и фильтрация образцов

Фиксация образцов необходима для проникновения зонда в клетки и защиты клеточной РНК от разрушения эндогенными РНКазами. Поскольку метод FISH идентифицирует только метаболически активные клетки, образцы необходимо фиксировать сразу после отбора проб либо хранить их в холодильнике при 4°C не дольше нескольких дней. Образцы либо осаждают на мембранных фильтрах и обрабатывают фиксирующим агентом (спирт, формальдегид), либо смешивают с фиксирующим агентом, инкубируют, осаждают центрифугированием, ресуспендируют, переносят на стеклянное предметное стекло со специальными лунками и высушивают. Для лучшего прикрепления образцов к стеклу некоторые протоколы предлагают сначала обрабатывать стекло такими веществами, как желатин, поли-L-лизин или силановые агенты. При работе с клеточными суспензиями микроорганизмы фиксируют в суспензии, помещают на стекло с лунками, высушивают на воздухе и дегидратируют в серии спиртов возрастающей концентрации.

1. Добавьте фильтрованный раствор формальдегида (конечная концентрация 1–3,7%) к экспериментальной пробе и зафиксируйте ее при 4°C в темноте в течение 12–24 ч. Эта фиксация хорошо работает для морских планктонных и бентосных образцов. Для пресноводных актинобактерий и многих почвенных бактерий рекомендуют фиксацию в 96%-ном этаноле (объем/объем) до конечной концентрации 50% при 4°C в течение 24 ч. Хранить фиксированные образцы в холодильнике.

2. Сконцентрируйте клетки из зафиксированных проб при низком вакууме (не более 50 кПа) на черных поликарбонатных мембранных фильтрах типа GTBP 2500 («Millipore», США) диаметром 25 мм с размером пор 0,2 мкм. При фильтрации эти фильтры помещают на белые нитроцеллюлозные поддерживающие фильтры с размером пор 0,45 мкм.

3. Промойте каждый фильтр дважды 5–10 мл смеси PBS : этанол (1 : 1), инкубируйте при комнатной температуре в течение 1 мин.

Удалите PBS : этанол под вакуумом и высушите фильтры на воздухе. Фильтры в таком виде могут храниться при -20°C в течение нескольких недель без существенной потери сигнала.

Примечание. Для фиксации клеток из активных илов рекомендуется применять свежеприготовленный фиксирующий буферный раствор следующего состава (на 50 мл стерильной деионизованной воды): формальдегид — 2 г; 1 М NaOH — 150 мкл; 10× PBS — 5 мл; pH 7,2. Формальдегид вначале растворить в 40 мл воды, нагретой до 60°C . Такой раствор можно использовать и для фиксации клеточных суспензий. Фиксировать клетки следующим образом: смешать 1 г ила с 5 мл фиксирующего буферного раствора и инкубировать при $0-4^{\circ}\text{C}$ в течение 3–16 ч, затем дважды промыть 10 мл 1× PBS с осаждением клеток центрифугированием (4000 g, 5 мин), ресуспендировать клетки в 500 мкл 1× PBS, добавить 500 мкл 96%-ного этанола (постфиксация), перемешать и хранить при -20°C .

Б. Подготовка фильтров к FISH

1. Нарезьте фильтры на секции (например, фильтр диаметром 25 мм легко режется на 8–10 секторов), используя стерильные (обработанные спиртом) пинцет и ножницы. Пометьте сектора свинцовым карандашом, другие маркеры могут содержать флуоресцентные краски.

2. Многие протоколы рекомендуют смочить поверхности фильтров в легкоплавкой агарозе, тем не менее данный этап не является обязательным. Приготовьте 0,2%-ную (вес/объем) легкоплавкую агарозу (прочность геля должна быть на уровне 1000 г/см^2) на деионизованной воде. Перед применением прокипятите раствор агарозы в микроволновой печи. Залейте агарозу в чашки Петри и остудите до $35-40^{\circ}\text{C}$. Смочите обе стороны фильтров в агарозе и положите фильтры поверхностью с клетками вверх на чистые предметные стекла. Высушите фильтры на воздухе при $20-40^{\circ}\text{C}$ в течение 10–30 мин.

3. Для дегидратации фильтров смочите их 80–96% этанолом (инкубация при комнатной температуре в течение 1 мин) и осторожно снимите фильтры с поверхности стекол. Промойте стерильной деионизованной водой. Высушите фильтры на воздухе. Препараты могут храниться при -20°C в течение нескольких недель без существенной потери сигнала.

Примечание. При проведении гибридизации не на фильтрах, а в лунках специальных предметных стекол, в которые наносят по 1–20 мкл зафиксированных формальдегидом проб (полученных, например, из донных осадков или почв), стекла необходимо погрузить перед внесением проб в водный раствор желатина состава: 0,1% же-

латина; 0,01% $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2$. Высушить на воздухе. После нанесения проб в лунки стекол их подсушивают при 45°C в течение 20 мин и проводят дегидратацию (постфиксацию), опуская предметные стекла в растворы этанола с возрастающей концентрацией (50%, 70%, 96%) на 3 мин.

В. Инактивация эндогенных пероксидаз (в случае использования HRP-меченых зондов)

Некоторые микроорганизмы, особенно из анаэробных морских осадков, могут содержать пероксидазы или белки с псевдопероксидазной активностью. Это можно проверить при инкубации секции фильтра в амплификационном буфере, содержащем пероксид водорода и флуоресцентно меченые тирамиды. Клетки, обладающие пероксидазной активностью, будут ярко флуоресцировать. Такие ферменты должны быть инактивированы обработкой соляной кислотой. Для этого проинкубируйте сектор фильтра в 50 мл 0,01 М HCl в течение 10 мин при комнатной температуре. Промойте фильтры в 50 мл фосфатного солевого буфера (состав: 137 мМ NaCl ; 2,7 мМ KCl ; 10 мМ Na_2HPO_4 ; 2 мМ KH_2PO_4 ; pH 7,6), затем в 50 мл деионизованной воды. Фильтры высушить на воздухе и хранить в холодильнике при -20°C.

Г. Способы нарушения ригидности микробных клеточных оболочек
Пермеабиллизация с лизоцимом

1. Добавьте по 10 мкл свежеприготовленного 0,05%-ного раствора лизоцима на каждую секцию фильтра. Проинкубируйте при 37°C в течение 30–60 мин.

2. Дважды промойте фильтры стерильной деионизованной водой, затем промойте один раз 96%-ным этанолом в течение 1 мин и высушите их на воздухе. Препараты могут храниться при -20°C в течение нескольких недель без существенной потери сигнала.

Пермеабиллизация с ахромопептидазой

Для проведения FISH с водными пробами, содержащими актинобактерии, клетки нуждаются в предобработке лизоцимом с последующей обработкой ахромопептидазой (КФ 3.4.21.50). Приготовьте свежий раствор ахромопептидазы следующего состава: 0,01 М NaCl ; 0,01 М трис- HCl (pH 8,0); ахромопептидаза — 60 ед./мл. Инкубируйте фильтры в растворе ахромопептидазы при 37°C в течение 30 мин. Отмойте фильтры так, как это описано для пермеабиллизации с лизоцимом.

Такая обработка может понадобиться для проб, богатых грамположительными микроорганизмами. Как альтернатива ферментативной обработке клеточные стенки можно подвергнуть воздей-

ствию разбавленной кислоты или детергентов. Эта стратегия может оказаться полезной и при обработке клеточных стенок архей.

Пермеабиллизация с соляной кислотой

Инкубируйте фильтры в **50 мл 0,1 М HCl** в течение 30 с. Перенесите фильтры в **50 мл фосфатного солевого буфера (pH 7,6)**. Отмойте фильтры, как это описано выше.

Пермеабиллизация с додецилсульфатом натрия (ДСН)

Проинкубируйте фильтры в **50 мл фосфатного солевого буфера (pH 7,6)**, содержащего **0,5% (вес/объем) ДСН**, в течение 10–15 мин. Отмойте фильтры, как это описано выше.

Обработка диэтилпирокарбонатом (DEPC)

Для планктонных морских проб используют обработку с DEPC для пермеабиллизации клеток и инактивации эндогенных РНКаз и пероксидаз. Смешайте **50 мкл DEPC** с **50 мл фосфатного солевого буфера (pH 7,6)** и перемешайте на вортексе. Добавьте смесь к фильтрам и инкубируйте при комнатной температуре в течение 12 мин. Отмойте фильтры, как это описано выше.

Д. Проведение гибридизации

1. Нанесите по **9 мкл** гибридизационного буферного раствора на каждую секцию фильтра, лежащую поверхностью с клетками вверх на чистом обезжиренном предметном стекле (предварительно тщательно протертом 96%-ным этанолом и высушенном на воздухе).

2. Добавьте по **1 мкл** раствора соответствующего СуЗ-меченого олигонуклеотида (зонда) в концентрации 20–50 нг/мкл, очень аккуратно перемешайте наконечником микропипетки. Можно поместить секции фильтра в микроцентрифужные пробирки с гибридизационным буферным раствором, содержащим соответствующий зонд, но для экономии дорогостоящего зонда его обычно наносят непосредственно на фильтр, как это описано выше.

3. Осуществить гибридизацию во влажной камере (закрывающаяся коробочка для предметных стекол, которые должны быть размещены строго горизонтально, с фильтровальной бумагой на дне, смоченной гибридизационным буферным раствором) в термостате при 37–58°C в течение 2 ч. Температурный режим, как и концентрация формамида в гибридизационном буферном растворе, крайне важны для специфичности гибридизации и их выбор зависит от используемого зонда. Влажная камера нужна для предотвращения испарения раствора с поверхности фильтров, в противном случае возможно неспецифическое связывание зонда.

Е. Проведение отмывки в темноте

1. После гибридизации аккуратно промойте секции фильтров стерильной деионизованной водой в чашке Петри и поместите их в

чистые микроцентрифужные пробирки с промывным буферным раствором, предварительно нагретым до рекомендуемой температуры отмывки.

2. Инкубируйте в промывном буферном растворе в течение 10–15 мин при 37–58°C (температура отмывки соответствует температуре гибридизации).

3. Отмойте секции фильтров от солей и ДСН стерильной деионизованной водой в чашке Петри, положите их на чистое предметное стекло поверхностью с клетками вверх и высушите на воздухе (*но не допускайте длительное нахождение фильтров в высушенном состоянии*).

Ж. Окраска 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (ДАФИ), микроскопирование

Для оценки общего количества микроорганизмов в образце обычно проводят окрашивание с использованием ДАФИ (рис. 15.4, б). ДАФИ (4',6-диамидино-2-фенилиндол) представляет собой ДНК-специфичный краситель, связывающийся с А/Т богатыми районами ДНК и образующий флуоресцентный комплекс. ДАФИ широко применяется во флуоресцентной микроскопии. Так как ДАФИ способен проникать сквозь интактную клеточную мембрану, этот краситель может быть использован для окрашивания как живых, так и фиксированных клеток. Флуоресценция ДАФИ возбуждается ближним ультрафиолетовым светом.

1. Нанесите **10 мкл** водного раствора ДАФИ (0,5 нг/мкл) на каждую секцию фильтра и инкубируйте в течение 10–15 мин при комнатной температуре в темноте.

2. Промойте секции фильтра в стерильной деионизованной воде и высушите на воздухе в темноте.

3. Положите секции фильтра поверхностью с клетками вверх на чистое обезжиренное предметное стекло, нанесите несколько маленьких капель смеси от выцветания Citifluor AF1 («Citifluor Ltd.», Великобритания) : Vectashield («Vector Laboratories», Канада) в соотношении 4 : 1 рядом с секциями фильтра и аккуратно накройте препарат длинным покровным стеклом, избегая образования пузырей. Препараты можно хранить при –20°C в темноте в течение нескольких месяцев без существенной потери сигнала.

4. Провести микроскопический анализ при увеличении около $\times 1000$ с масляной иммерсией под эпифлуоресцентным микроскопом с соответствующими световыми фильтрами, оборудованным цифровой камерой (рис. 15.5). Длины волн: ДАФИ (синий) — возбуждение 350 нм и эмиссия 456 нм; карбоцианин 3 (красный) — воз-

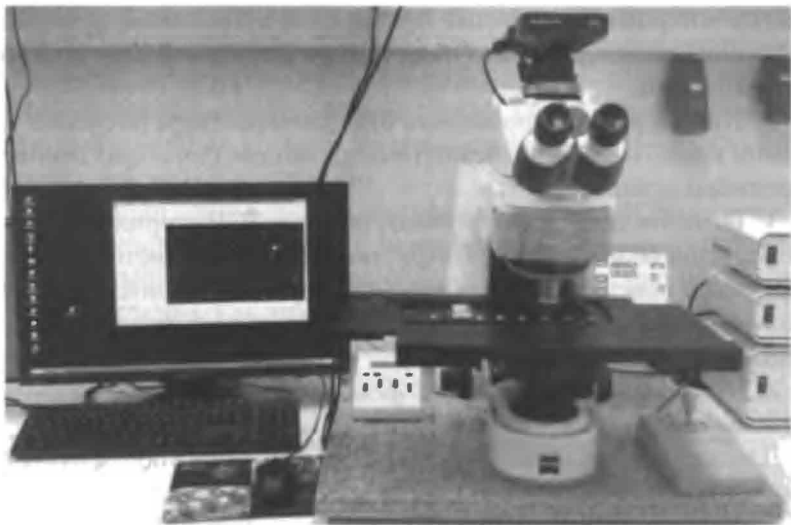


Рис. 15.5. Эпифлуоресцентный микроскоп Zeiss AxioPlan II («Carl Zeiss», Германия), оборудованный светофильтрами и цифровой камерой AxioCam с компьютерным программным обеспечением для распознавания и анализа изображений

буждение 552 нм и эмиссия 565 нм. Подсчет клеток ведут обычно в 30–40 полях зрения цифровой камеры на каждую секцию фильтра для статистической достоверности. Количество клеток (N) в мл пробы вычисляют по формуле $N = n \times (S_{\text{фильтра}} / S_{\text{поля зрения}}) / V$, где n — среднее количество клеток в поле зрения, V — объем отфильтрованной пробы в мл. Примеры цифровых фотографий, иллюстрирующих метод FISH, приведены на рисунках 15.6–15.8.

Примечание. Для дифференцировки живых/мертвых клеток используют окрашивание препарата йодидом пропидия (интеркалирующий флуоресцирующий краситель на ДНК, который не проникает через мембраны живых клеток) и SYBR Green (цианиновый краситель на двухцепочечную ДНК). Обычно смешивают 50 мкл клеточной суспензии в 1× PBS (pH 8,0) с 50 мкл раствора йодида пропидия (0,1 мг в 1 мл 1× PBS) и 1 мкл раствора SYBR Green (коммерческий препарат, разведенный



Рис. 15.6. Визуализация клеток *Borrelia* sp. в мазке крови с применением метода FISH (использован универсальный бактериальный олигонуклеотидный зонд EUB338, меченный карбоцианином 3)

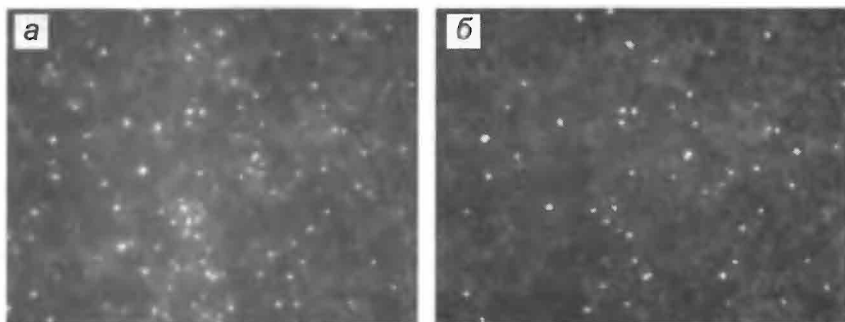


Рис. 15.7. Визуализация клеток *Desulfovibrio* sp. в водной пробе из Черного моря с применением метода FISH: а) окраска клеток ДАФИ (для общего подсчета микроорганизмов в пробе); б) гибридизация клеток с олигонуклеотидным зондом DSV698, меченным карбоцианином 3 (для обнаружения представителей рода *Desulfovibrio* в пробе)

1 : 100 в ДМСО). Инкубируют смесь при 0°C в темноте в течение 15 мин и микроскопируют 1–2 мкл пробы на эпифлуоресцентном микроскопе (йодид пропидия на красном светофильтре Cu_2 , SYBR Green на зеленом светофильтре FITC или EGFP). Надо иметь в виду, что красная флуоресценция гораздо более яркая, а зеленая флуоресценция быстрее исчезает, поэтому вначале делают цифровые фотографии поля зрения для SYBR Green с использованием зеленого светофильтра, а потом переключают на красный светофильтр для йодида пропидия, фотографируя то же самое поле зрения.

15.2.

ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ *in situ* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТИРАМИДНОЙ АМПЛИФИКАЦИИ СИГНАЛА (CARD-FISH)

Метод амплификации сигнала с помощью тирамида (TSA — *tyramid signal amplification*), также известный как CARD (*catalyzed reporter deposition* — катализируемое репортерное осаждение), был предложен для усиления чувствительности FISH. Он основывается на осаждении большого числа молекул гаптенизированного тирамида под действием пероксидазной активности. Тирамид представляет собой фенольное соединение и пероксидаза хрена (HRP) может катализировать димеризацию таких соединений, когда они представлены в высоких концентрациях, вероятно, за счет образования свободных радикалов. В случае данного метода амплификации сигнала используются более низкие концентрации тирамида, что снижает вероятность димеризации, в то же время становится предпочтительным связывание вы-

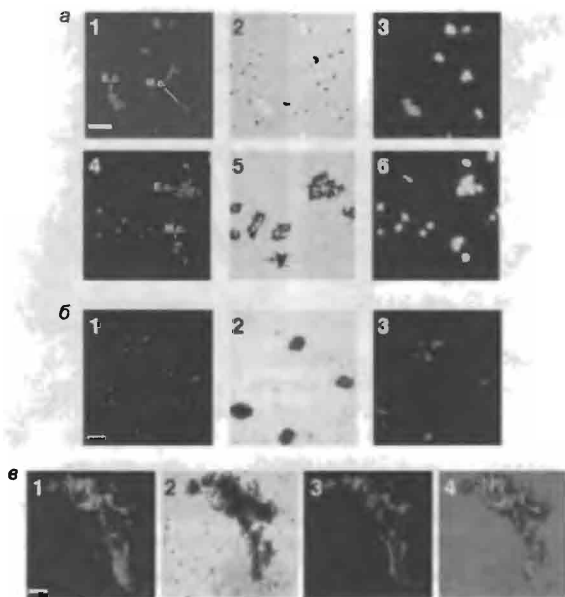


Рис. 15.8. Тройное мечение клеток *in situ* (по Ouverney, Fuhrman, 2004).

(a1–6). Простое микробное сообщество, представленное двумя культивируемыми видами — *E. coli* (Е.с.) и *Moraxella catarrhalis* (М.с.). Штамм *E. coli* может поглощать D-глюкозу, в то время как клетки *M. catarrhalis* не способны к этому процессу. Клетки обоих штаммов были инактивированы 10%-ным формалином (a1–3) или оставались живыми (a4–6) в мини-среде М9 с внесенной D-[^3H]-глюкозой (10 нМ). Клетки окрашивали ДАФИ (a1 и a4) и гибридовали с СуЗ-меченым зондом EUB338 на *Bacteria* (a3 и a6). Такой зонд метит как клетки *E. coli*, так и *M. catarrhalis* (a3 и a6), доказывая, что клетки обоих видов были метаболически активны до действия формалина. Однако только клетки *E. coli* помечены радиоактивной глюкозой (a5), что показывают расположенные вокруг клеток темные зерна серебра. Клетки *M. catarrhalis* не помечены серебряными зернами в «живой» пробе (a5), что подтверждает их неспособность поглощать глюкозу. Эпифлуоресцентный микроскоп ($\times 1000$, линейка шкалы — 10 мкм); (b1–3). Пробы, отобранные с 200-м глубины залива Вилелфранше-сур-мер Средиземного моря и демонстрирующие клетки архей, которые поглощают смесь 15 различных ^3H -меченых аминокислот *in situ*. Общее микробное число оценивалось с помощью окраски ДАФИ (b1); клетки, поглощающие меченые аминокислоты, выявлены с помощью окружающих их темных зерен серебра (b2); клетки архей выявлены с помощью СуЗ-меченого олигонуклеотидного зонда ARCH915 на *Archaea* (b3). Обозначения — как на панели А вверху. Линейка шкалы — 10 мкм;

в (1–4). Биопленка, образованная прокариотическими клетками в поддесенной области зубной расщелины полости рта человека, была подвергнута тройному окрашиванию и обработке различными маркерами: неспецифическим красителем на ДНК YO-PRO-1 (в1); смесью 15 различных аминокислот, меченных по ^3H , в течение 1 ч при 37°C (в2) и СуЗ-меченым универсальным бактериальным зондом EUB338 (в3). Все фото с трех панелей в объединены для наглядности на панели в4. Фотографии сделаны при помощи конфокального микроскопа Nikon Eclipse TE300 («Nikon», Япония), оборудованного компьютерной программой распознавания изображений NRC-1024 («Bio-Rad», США), при увеличении $\times 1000$. Линейка шкалы — 10 мкм

сокореакционноспособных интермедиатов с электронно-богатыми молекулами, такими, как тирозин, в сайте связывания пероксидазы или около него. Таким образом, множество флуоресцентно меченых молекул тирамида могут быть внедрены в сайт гибридизации *in situ*. Это приводит к резкому возрастанию чувствительности FISH по сравнению с использованием проб, меченных единственным флуорохромом. Критическим этапом данного подхода является диффузия больших молекул, таких, как пероксидаза, в интактные клетки, поэтому при CARD-FISH необходимо обязательно проводить процедуру пермеабилзации

Визуализация осажденного тирамида может быть выполнена либо непосредственно после CARD реакций (при использовании тирамида, меченного флуорохромом) с помощью флуоресцентного микроскопа, либо непрямым методом с использованием флуоресцентной микроскопии или микроскопии в светлом поле при выборе в качестве гаптенов биотина, дигоксигенина или ди(три)нитрофенила, которые могут впоследствии служить сайтами связывания антигаптеновых антител или (стрепт)авидиновых конъюгатов (в случае биотинилированного тирамида). Кроме того, в качестве гаптенов могут быть использованы флуоресцеин и родамин, поскольку специфические антитела к этим веществам в настоящее время доступны для приобретения у некоторых компаний.

Необходимые реактивы и растворы:

- гибридизационный буферный раствор для CARD-FISH. Содержит в дополнение к стандартным компонентам (см. подглаву 15.1) 10% декстрансульфата (вес/объем, 0,1 г/мл); 0,5 мг/мл денатурированной ДНК спермы лосося; 0,5 мг/мл тРНК *E. coli*. Для полного растворения декстрансульфата подогрейте гибридизационный раствор, содержащий 0,9 М NaCl и 0,01–0,02% ДСН, до 60°C при перемешивании, затем добавьте формамид, блокирующий реагент, ДНК спермы лосося и тРНК *E. coli*;
- буферный раствор TNT следующего состава: 0,1 М трис-HCl (pH 7,5); 0,15 М NaCl; 0,05% Tween 20;
- флуоресцентно меченый тирамид (1 мг/мл). Рабочий раствор флуоресцентно меченого тирамида получают 20-кратным разведением исходного раствора меченого тирамида в амплифицирующем буферном растворе, которые входят в набор TSA-Cy3 Fluorescence Systems («NEN Life Science Products», США).

Методика (обработка раствором тирамида)

Все предыдущие стадии (подготовка фильтров, пермеабилзация с лизоцимом, гибридизация, отмывка) аналогичны приведенной методике для стандартной FISH, см. подглаву 15.1. Единственное исключение, помимо использования HRP-меченых олигонуклеотидных зондов для проведения цитохимической реакции тирамида с пероксидазой, это состав гибридизационного буферного раствора для CARD-FISH (см. выше). Также во многих случаях при CARD-FISH предпочтительнее осуществлять гибридизацию и отмывку при 37°C.

1. Инкубируйте секции фильтров в буферном растворе TNT в течение 15 мин при комнатной температуре.

2. Аккуратно удалите избыток жидкости с помощью фильтровальной бумаги. Не допускайте полного высыхания фильтров, так как это приводит к уменьшению активности пероксидазы в случае CARD-FISH.

3. Нанесите по **10 мкл** свежеприготовленного раствора тирамида, меченного флуорохромом, на каждую секцию фильтра и инкубируйте в течение 5 мин в темноте при комнатной температуре. Некоторые протоколы рекомендуют проводить инкубацию при 37°C, поскольку сигнал несколько усиливается с повышением температуры.

4. Промойте секции фильтров буферным раствором TNT.

5. Поместите секции фильтров в микроцентрифужные пробирки с буферным раствором TNT и инкубируйте в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре.

6. Промойте секции в стерильной деионизованной воде в течение 1 мин и высушите их на воздухе (*в темноте!*). Препараты можно хранить при –20°C в темноте в течение нескольких месяцев без существенной потери сигнала. Секции фильтров можно теперь прокрасить (например, универсальным красителем на ДНК ДАФИ для подсчета общего числа клеток) и микроскопировать под эпифлуоресцентным микроскопом, оснащенным соответствующими светофильтрами (рис. 15.5).

Усиление тирамидного сигнала при FISH может быть достигнуто при добавлении некоторых солей. Осаждение тирамидов, меченных карбоцианином 3, флуоресцеином и другими красителями, усиливается в присутствии NaCl. Предпочтительно использование концентраций NaCl в амплифицирующем буфере от 2 М до насыщенных. Пара-иодоборная кислота (20 мг кислоты на 1 мг тирамида) также усиливает сигнал FISH.

ПРИЧИНЫ ВОЗМОЖНЫХ ПРОБЛЕМ И СПОСОБЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Высокая фоновая флуоресценция

1. Высокая фоновая флуоресценция может возникать вследствие избыточной концентрации тирамида. В этом случае уменьшите концентрацию тирамида или увеличьте концентрацию блокирующего реагента.

2. Слишком высокая концентрация зонда. Если при микроскопировании фон покрыт маленькими флуоресцирующими пятнами, проверьте концентрацию зонда.

3. Слишком короткое время отмывки препарата. Увеличьте время отмывки в деионизованной воде. Несколько отмывок в воде может помочь устранить проблему.

Слишком низкий уровень сигнала

Это может быть следствием нескольких возможных причин.

1. Низкое содержание рибосом в объекте исследования. Увеличьте концентрацию тирамида или температуру при тирамидной амплификации сигнала. Увеличение продолжительности времени гибридизации до 15 ч также может помочь в решении проблемы.

2. Слишком низкая концентрация тирамида. Увеличьте его концентрацию.

3. Зонд с пероксидазой имеет низкую или нулевую активность. Проверьте ее. Аликвота HRP-меченого зонда должна быть разморожена лишь один раз и не должна храниться в холодильнике дольше 6 месяцев. Проверьте pH буферного раствора TNT — он должен быть около 7,5.

4. Пероксидаза не конъюгирована с зондом.

5. Конъюгированная с зондом пероксидаза не может проникнуть через клеточную стенку. Протокол пермеабилзации не оптимизирован для эксперимента с данными микроорганизмами.

МНОГОЦВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ FISH

Иногда бывает необходимо локализовать несколько объектов методом FISH на одном фильтре, например для прояснения картины распределения микроорганизмов в плотном сообществе (био-пленки, симбиозы). Для многоцветной реакции FISH с олигонуклеотидными зондами, непосредственно связанными с пероксидазой, гибридизации и цитологические выявления сигналов могут быть проведены последовательно. После первой гибридизации и обнаружения соответствующего сигнала проба с пероксидазой может быть инактивирована (обработкой кислотой или H_2O_2 , нагрева-

нием). Затем осуществляют повторную гибридизацию с другим зондом и другим флуорохромом. Для этого подходят, например, тирамиды, меченные Alexa350, Alexa488 и Alexa546, которые дают хорошие результаты при проведении CARD-FISH.

Процедура повторной гибридизации

1. Инактивируйте пробу с пероксидазой после первой гибридизации, инкубируя секторы фильтров в 0,01 М HCl в течение 10 мин при комнатной температуре.

2. Промойте секторы дважды в 50 мл стерильной деионизованной воды.

3. Фильтры готовы для проведения повторной гибридизации с использованием второго зонда с пероксидазой и другим флуоресцентно меченым тирамидом по протоколу, описанному выше.

Литература

1. Amann R.I., Binder B.J., Olsen R.J., Chisholm S.W., Devereux R., Stahl D.A. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations // Appl. Environ. Microbiol. 1990. V. 56. P. 1919–1925.
2. Amann R.I., Fuchs B.M., Behrens S. The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridisation // Curr. Opin. Biotech. 2001. V. 12. P. 231–236.
3. Amann R.I., Krumholz L., Stahl D.A. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology // J. Bacteriol. 1990. V. 172. P. 762–770.
4. Amann R.I., Zarda B., Stahl D.A., Schleifer K.H. Identification of individual prokaryotic cells by using enzyme-labeled, ribosomal-RNA-targeted oligonucleotide probes // Appl. Environ. Microbiol. 1992. V. 58. P. 3007–3011.
5. Bottari B., Ercolini D., Gatti M., Neviani E. Application of FISH technology for microbiological analysis: current state and prospects // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. V. 73. P. 485–494.
6. DeLong E.F., Wickham G.S., Pace N.R. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identifications of single cells // Science. 1989. V. 243. P. 1360–1363.
7. Eller G., Stubner S., Frenzel P. Group-specific 16S rRNA targeted probes for the detection of type I and type II methanotrophs by fluorescent *in situ* hybridization // FEMS Microbiol. Lett. 2001. V. 198. P. 91–97.
8. Fuchs B.M., Glockner F.O., Wulf J., Amann R. Unlabeled helper oligonucleotides increase the *in situ* accessibility to 16S rRNA of fluorescently labelled oligonucleotide probes // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. P. 3603–3607.
9. Glockner F.O., Amann R., Alfreider A., Pernthaler J., Psenner R., Trebesius K., Schleifer K.H. An *in situ* hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria // Syst. Appl. Microbiol. 1996. V. 19. P. 403–406.
10. Hahn D., Amann R.I., Ludwig W., Akkermans A.D., Schleifer K.H. Detection of microorganisms in soil after *in situ* hybridization with rRNA-targeted, fluorescently labelled oligonucleotides // J. Gen. Microbiol. 1992. V. 138. P. 879–887.
11. Lee N., Nielsen P.H., Andreasen K.H., Juretschko S., Nielsen J.L., Schleifer K.H., Wagner M. Combination of fluorescent *in situ* hybridization and microautoradiogra-

phy — a new tool for structure-function analyses in microbial ecology // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. P. 1289–1297.

12. *Levsky J.M., Singer R.H.* Fluorescence *in situ* hybridization: past, present and future // J. Cell. Sci. 2003. V. 116. P. 2833–2838.

13. *Ouverney C.C., Fuhrman J.A.* Correlating single-cell count with function in mixed natural microbial communities through STARFISH // Molecular Microbial Ecology Manual, 2nd ed. / Eds. G.A. Kowalchuk, F.J. De Bruijn, I.M. Head, A.D.L. Akkermans, J.D. van Elsas. Dordrecht (The Netherlands): Kluwer Academic Publishers, 2004. Chapter 8.08. P. 1689–1710.

14. *Pernthaler J., Glockner F.O., Schonhuber W., Amann R.I.* Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes // Methods In Microbiology / Ed. J.H. Paul. 30. San Diego: Academic Press, 2001. P. 207–226.

15. *Pernthaler A., Pernthaler J., Amann R.I.* Fluorescence *in situ* hybridization and catalyzed reporter deposition (CARD) for the identification of marine bacteria // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V.68. P. 3094–3101.

16. *Rabus R., Fukui M., Wilkes H., Widdel F.* Degradative capacities and 16S rRNA targeted whole-cell hybridization of sulfate-reducing bacteria in an anaerobic enrichment culture utilizing alkylbenzenes from crude oil. // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. P. 3605–3613.

17. *Sekar R., Pernthaler A., Pernthaler J., Warnecke F., Posch T., Amann R.I.* An improved protocol for the quantification of freshwater *Actinobacteria* by fluorescence *in situ* hybridization // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. P. 2928–2935.

18. *Speel E.J., Hopman A.H., Komminoth P.* Amplification methods to increase the sensitivity of *in situ* hybridization: play card(s) // J. Histochem. Cytochem. 1999. V. 47. P. 281–288.

19. *van Gijlsvijk R.P., van de Corput M.P.C., Bezrookove V., Wiegant J., Tanke H.J., Raap A.K.* Synthesis and purification of horseradish peroxidase labeled oligonucleotides for tyramide-based fluorescence *in situ* hybridization // Histochem. Cell. Biol. 2000. V. 113. P. 175–180.

Приложение 1.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД И РАСТВОРОВ

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

Hottinger's broth состава (г/л): гидролизат по Хоттингеру — 24 (отвар говяжьего мяса, обработанный панкреатином и хлороформом); NaCl — 5; вода деионизованная; pH 7,8–8,0. Стерилизовать автоклавированием при 1 ати в течение 15 мин, хранить при температуре 4–20 °С до 1 года (перед использованием отфильтровать).

LB (Luria–Bertani) состава (г/л): триптон — 10,0; дрожжевой экстракт — 5,0; NaCl — 5,0; вода деионизованная; pH 7,0–7,5 (довести 10 М NaOH, 165–200 мкл). Стерилизовать автоклавированием при 1 ати в течение 15 мин, хранить при комнатной температуре. Некоторые протоколы рекомендуют готовить среду LB в 5-кратной концентрации, а затем разводить ее необходимым объемом стерильной деионизованной воды перед экспериментом.

M9 минимальная состава (г/л): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ — 12,8; KH_2PO_4 — 3,0; NaCl — 0,5; NH_4Cl — 1,0; вода деионизованная; pH 7,4 (довести 10 М NaOH, ~100 мкл). Стерилизовать автоклавированием при 1 ати в течение 15 мин, охладить до 20–50 °С и добавить на 1 л среды: 2 мл 1 М $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$; 0,1 мл 1 М CaCl_2 и 10 мл 20%-ного раствора глюкозы (простерилизованные отдельно). Часто рекомендуется готовить среду M9 в 5-кратной концентрации, а перед экспериментом разводить ее стерильной деионизованной водой и вносить требуемые добавки. Хранить при 8–20 °С до 6 мес.

При культивировании штаммов *E. coli*, несущих хромосомную делецию в опероне биосинтеза пролина [$\Delta(\text{lac-proAB})$] и гены *proAB* на F'-плазмиде, минимальная среда M9 должна содержать следующие добавки: 0,4% (вес/объем) глюкозы, 5 мМ $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ и 0,01% тиамина.

РА состава (г/л): обезжиренный питательный бульон «Difco» — 8,0; NaCl — 5,0; $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ — 0,2; $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ — 0,05; $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ — 0,15; вода деионизованная; pH 6,0–7,4 (довести с помощью NaOH). Стерилизовать автоклавированием при 1 ати в течение 15 мин, хранить при 2–8 °С до 6 мес. Возможно приготовление и хранение среды РА в 10-кратной концентрации и

разведение ее необходимым объемом стерильной деионизованной воды перед экспериментом.

SOB состава (г/л): триптон — 20,0; дрожжевой экстракт — 5,0; NaCl — 0,5; KCl — 2,5 мл 1 М раствора (7,45 г KCl на 100 мл воды); вода деионизованная; pH 7,0–7,5 (довести 10 М NaOH, ~100 мкл). Стерилизовать автоклавированием при 1 ати в течение 15 мин, хранить при 2–8°C до 6 мес. (или долговременно в аликвотах при –20°C). Непосредственно перед экспериментом добавить (на 1 л среды) 5 мл стерильного 2 М раствора $MgCl_2$ (19,04 г $MgCl_2$ на 100 мл воды).

SOC — состав аналогичен среде SOB. Дополнительно содержит 20 мМ глюкозы (добавить 20 мл 1 М раствора глюкозы на 1 л стерильной и охлажденной до 50–60°C среды SOB).

Spizizen's (10 $\times$) состава (г/л): $K_2HPO_4 \times 3 H_2O$ — 183,4; KH_2PO_4 — 60,0; $(NH_4)_2SO_4$ — 20,0; $Na_3C_6H_5O_7 \times 5,5 H_2O$ (цитрат натрия) — 12,0; вода деионизованная; pH 7,0. Стерилизовать автоклавированием при 1 ати в течение 15 мин, хранить в аликвотах по 10–15 мл при 8–20°C.

YT (2 $\times$) состава (г/л): триптон — 16,0; дрожжевой экстракт — 10,0; NaCl — 5,0; вода деионизованная; pH 7,0–7,5 (довести 10 М NaOH, ~200 мкл). Стерилизовать автоклавированием при 1 ати в течение 15 мин, хранить при 2–8°C до 6 мес. Возможно приготовление и хранение среды YT в 10-кратной концентрации и разведение ее необходимым объемом стерильной деионизованной воды перед экспериментом.

Агаризованные среды готовятся из расчета 15 г агара на 1 л жидкой среды (1,5% агара). Одного литра агаризованной среды хватает для заливки примерно 40 чашек Петри ($\varnothing = 85$ мм) по 25 мл на чашку. Перед использованием желательно выдержать открытые чашки Петри с застывшей агаризованной средой в стерильном ламинарном боксе при 37°C в течение 1 ч в перевернутом положении для удаления конденсата. Для приготовления агаризованных сред, используемых в качестве «верхнего» агара, необходимо вносить 4–7 г агара на 1 л жидкой среды (0,4–0,7% агара).

Индикаторные чашки с X-gal/ИПТГ — перед разливом агаризованной среды по чашкам Петри добавить (на 1 л теплой среды) 2 мл 0,1 М раствора ИПТГ (конечная концентрация — 0,2 мМ) и 2 мл раствора X-gal (20 мг/мл, конечная концентрация — 40 мкг/мл). Приготовление растворов: **ИПТГ (0,1 М)** — растворить 1,19 г изопропил- β -D-1-тиогаляктопиранозид (ИПТГ) в 40 мл деионизованной воды, довести до 50 мл водой, стерилизовать фильтрованием и хранить в аликвотах по 1–2 мл при –20°C (раствор стабилен в течение 2–4 мес.); **X-gal (20 мг/мл, 2%)** — растворить 400 мг 5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D-галактозид (X-gal) в 20 мл N, N'-диметилформамида, разлить по 1–2-мл аликвотам и хранить в темноте при –20°C (раствор стабилен в течение 2–4 мес., его можно не стерилизовать).

Дополнение. Измерение β -галактозидазной активности

1. Собрать биомассу из 2 мл культуры центрифугированием при 13 000 g в течение 5–10 мин.

2. Суспендировать осадок клеток в 1 мл буферного раствора Z (0,06 М $Na_2HPO_4 \times 7 H_2O$; 0,04 М $NaH_2PO_4 \times H_2O$; 0,01 М KCl; 0,001 М $MgSO_4 \times 7 H_2O$; 0,05 М β -меркаптоэтанол; pH 7,0; хранить при 4°C). Измерить оптическую плотность суспензии при $\lambda = 600$ нм.

3. Отобрать 0,1 мл и 0,5 мл суспензии, развести буферным раствором Z до 1 мл.
4. Добавить 2 капли хлороформа и 1 каплю 0,1%-ного ДСН. Перемешать на вортексе в течение 10 мин для пермеабиллизации клеток.
5. Инкубировать в водяной бане при 30°C в течение 10 мин.
6. Добавить 200 мкл раствора ОНПГ (о-нитрофенил-β-D-галактопиранозид — субстрат для реакции; раствор — 4 мг/мл в 50 мМ фосфатном буферном растворе; рН 7,0). Перемешать на вортексе в течение 3 с.
7. Инкубировать в водяной бане при 30°C до появления желтой окраски (обусловлена присутствием о-нитрофенола — продукта гидролиза ОНПГ β-галактозидазой).
8. Остановить реакцию добавлением 0,5 мл 1 М Na₂CO₃.
9. Отцентрифугировать при 13 000 g в течение 5 мин.
10. Измерить оптическую плотность супернатанта при λ = 420 нм и рассчитать активность β-галактозидазы в единицах Миллера по формуле $(1000 \times \text{ОП}_{420}) / (t \times v \times \text{ОП}_{600})$, где *t* — время реакции в минутах от момента внесения ОНПГ до остановки реакции; *v* — объем культуры, взятой для анализа, в мл; ОП₆₀₀ — оптическая плотность ресуспендированных в буферном растворе Z клеток (ОП₆₀₀ = 1,4 примерно соответствует 10⁹ клеток/мл).

АНТИБИОТИКИ

Растворы антибиотиков во избежание их термической инактивации следует вносить в расплавленные стерильные агаризованные среды, охлажденные до ~50°C. Водные растворы антибиотиков хранят при –20°C в небольших аликвотах, поскольку их нельзя замораживать повторно из-за потери активности.

Ампициллин (Amp, Ap). Спиртовой раствор натриевой соли ампициллина (100 мг/мл в 50%-ном этаноле) хранить в аликвотах при –20°C, вносить 0,5–1 мкл раствора на 1 мл питательной среды (конечная концентрация 50–100 мкг/мл). Можно готовить также водный раствор ампициллина, стерилизовать фильтрованием и хранить в аликвотах при –20°C. *Чашки Петри с агаризованной средой, содержащей ампициллин, можно хранить при 4°C не более двух недель.* Ампициллин блокирует терминальную реакцию синтеза пептидогликана клеточной стенки бактерий. Ген устойчивости (*bla*) к антибиотику кодирует периплазматическую β-лактамазу, расщепляющую β-лактамовое кольцо ампициллина.

Канамицин (Kan, Km). Водный раствор канамицин(ди)сульфата (50 мг/мл) стерилизовать фильтрованием и хранить в аликвотах при –20°C, вносить 0,5–1 мкл раствора на 1 мл питательной среды (конечная концентрация 25–50 мкг/мл). Канамицин приводит к ошибкам при считывании мРНК путем связывания с 30S субъединицами рибосом. Ген устойчивости (*kan*) к канамицину кодирует аминогликозид-3'-фосфотрансферазу, фосфорилирующую антибиотик.

Стрептомицин (Str, Sm). Водный раствор стрептомицинсульфата (100 мг/мл) стерилизовать фильтрованием и хранить в аликвотах при –20°C, вносить 0,5–1 мкл раствора на 1 мл питательной среды (конечная концентрация 50–100 мкг/мл). Стрептомицин ингибирует стадию элонгации в период трансляции мРНК, связываясь с белком S-12 30S субъединицы рибосом прокариот. Ген устойчивости (*str*) к антибиотику кодирует аминогликозидфосфотрансферазу,

которая модифицирует молекулу стрептомицина, препятствуя его связыванию с рибосомой.

Тетрациклин (Tet, Tc). Спиртовой раствор тетрациклингидрохлорида (10 мг/мл в 50%-ном этаноле) хранить в аликвотах при -20°C в темноте, вносить 1–2 мкл раствора на 1 мл питательной среды (конечная концентрация 10–20 мкг/мл). *Чашки Петри с агаризованной средой, содержащей тетрациклин, необходимо хранить при 4°C в темноте, так как данный антибиотик разрушается на свету.* Необходимо также иметь в виду, что Mg^{2+} в питательной среде является ингибитором тетрациклина. Тетрациклин блокирует синтез белка у бактерий путем связывания с 30S субъединицами рибосом (препятствует связыванию аминоацил-тРНК с сайтом А на рибосоме). Ген устойчивости (*tet*) к антибиотику кодирует белок, модифицирующий клеточную мембрану, что препятствует проникновению молекул тетрациклина в клетки.

Хлорамфеникол (Cam, Cm). Спиртовой раствор хлорамфеникола (34 мг/мл в 96%-ном этаноле) хранить в аликвотах при -20°C , вносить 1,0–3,0 мкл раствора на 1 мл питательной среды (конечная концентрация 34–102 мкг/мл). *Чашки с агаризованной средой, содержащей хлорамфеникол, можно хранить при 4°C не более 5 сут.* Хлорамфеникол блокирует синтез белка у бактерий путем связывания с 50S субъединицами рибосом и препятствует формированию пептидной связи. Ген устойчивости (*cat*) к хлорамфениколу кодирует ацетилтрансферазу, которая ацетирует молекулу антибиотика, инактивируя его.

ОБРАБОТКА ВОДЫ ДИЭТИЛПИРОКАРБОНАТОМ (DEPC)

Развести диэтилпирокарбонат до концентрации 2% (объем/объем) в 50%-ной смеси этанол : вода, смешать стерильную деионизованную воду с этим раствором DEPC в соотношении 1 : 10 (конечная концентрация диэтилпирокарбоната — 0,2%). Тщательно перемешать и инкубировать в течение нескольких часов при комнатной температуре. Стерилизовать DEPC-воду автоклавированием при 1 ати (для инактивации остатков DEPC). Хранить при комнатной температуре.

Внимание! С диэтилпирокарбонатом, являющимся токсичным веществом, необходимо работать в перчатках в вытяжном шкафу. Растворы, содержащие химические вещества с аминогруппами (трис, MOPS, ЭДТА), а также дитиотреитол, нельзя обрабатывать DEPC напрямую; такие растворы следует готовить на DEPC-воде.

ФЕНОЛ ДЛЯ ЭКСТРАКЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Большинство марок водонасыщенного фенола не требует перегонки перед использованием. Однако кристаллический фенол ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$), а также фенол с желтоватым или красноватым оттенком необходимо перегнать при 160°C для удаления примесей, способных вызвать повреждения в молекулах РНК и ДНК. Перегнанный и водонасыщенный фенол хранят в аликвотах при -20°C , часто под газообразным азотом.

Внимание! Фенол является едким и ядовитым веществом — он вызывает тяжелые ожоги при попадании на кожные покровы и приводит к нарушениям функций нервной системы. При работе с фенолом надо всегда использовать вытяжной

шкаф, надевать защитные очки и перчатки, желательна пользоваться защитной маской во избежание вдыхания паров фенола. Попавший на кожу фенол необходимо незамедлительно смыть большим объемом воды с мылом.

Перед экспериментом фенол выдерживают при комнатной температуре и плавят при 68°C, затем рекомендуется добавить 8-гидроксихинолин до конечной концентрации 0,1%. Гидроксихинолин является антиоксидантом, частично связывает ионы металлов и ингибирует РНКазу, а также позволяет легко заметить фенольную фазу по желтой окраске. Растворить 500 г расплавленного фенола в 500 мл 1 М трис-НСl (рН 8,0) при перемешивании в течение 30 мин. Дождаться разделения фаз и удалить верхнюю водную фазу. Снова добавить 500 мл 1 М трис-НСl (рН 8,0), перемешать для образования эмульсии и дождаться разделения фаз. Повторить процедуру, используя буферный раствор ТЕ (рекомендуется добавить в него β-меркаптоэтанол до концентрации 0,2%), до тех пор, пока рН верхней водной фазы не будет меньше 7,2. Насыщенный раствор нейтрального фенола можно хранить в темноте при 4°C до месяца (*красная или коричневая окраска раствора свидетельствует о его непригодности для дальнейшей работы!*).

Кислый фенол для экстракции РНК готовится следующим образом: растворить 500 г фенола в 500 мл 50 мМ ацетата натрия (рН 4,0); удалить верхнюю водную фазу; снова добавить 500 мл 50 мМ ацетата натрия (рН 4,0) и перемешать для образования эмульсии; дождаться разделения фаз. Повторять процедуру до тех пор, пока рН верхней водной фазы не будет меньше 4,1. Хранить кислый фенол в герметично закрытой емкости в темноте при 4°C.

ДЕИОНИЗОВАННЫЙ ФОРМАМИД

Свежий раствор формамида высокой степени очистки не требует деионизации, однако при пожелтении раствора его необходимо очистить. Для этого к 50 мл формамида добавить 5 г катионо-анионообменной смолы (например, сорбент AG 501-X8 производства компании «Bio-Rad», США). Перемешивать в темноте (завернув емкость в алюминиевую фольгу) при комнатной температуре в течение 30–60 мин. Дважды профильтровать через фильтровальную бумагу Ватман № 1. Разлить аликвоты по 1–1,5 мл и хранить в темноте при –20°C.

Внимание! Формамид — едкое и тератогенное химическое вещество, работать с ним необходимо в перчатках и защитных очках.

СОЛЕВЫЕ РАСТВОРЫ, КИСЛОТЫ И НЕКОТОРЫЕ ДРУГИЕ РАСТВОРЫ

Для приготовления всех солевых и буферных растворов для молекулярно-биологических исследований необходимо использовать реактивы максимальной степени очистки и свежую деионизованную (Milli-Q или бидистиллированную) воду, полученную на установках с коэффициентом сопротивления 18 Ом/см. Рекомендуемый режим стерилизации автоклавированием для солевых и буферных растворов: 0,5 л — 15 мин при 1 атм (121°C); 1,0 л — 20 мин при 1 атм. Растворы, содержащие ацетат аммония, сахара, ДСН, ДТТ, β-меркаптоэтанол, следует стерилизовать фильтрованием через фильтры с диаметром пор 0,22 мкм.

Аммония ацетат (5 М). Растворить 385,4 г $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ в 800 мл деионизованной воды, довести объем водой до 1 л. Стерилизовать фильтрованием, хра-

нить в плотно закрытой емкости при комнатной температуре (ацетат аммония разлагается в горячей воде и является гигроскопичным веществом).

Аммония персульфат (10%). Растворить 1 г персульфата аммония (АПС, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$) в 8 мл деионизованной воды. Довести объем водой до 10 мл. Раствор стабилен при 4°C в течение двух недель (поскольку АПС разлагается со временем). Персульфат аммония применяется как катализатор кополимеризации акриламида : бис-акриламида. Полимеризация полиакриламидного геля обусловлена действием свободных радикалов, генерирующихся в окислительно-восстановительной реакции, в которой диамин (например, TEMED) исполняет роль вспомогательного катализатора.

Глюкоза (2 М). Растворить 90,08 г $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ в 150 мл деионизованной воды, довести объем водой до 250 мл. Стерилизовать автоклавированием при 0,5 ати (лучше — фильтрованием), хранить при 4°C.

Денхардта раствор (50x). Растворить в 800 мл стерильной деионизованной воды следующие компоненты: Ficoll 400 — 10 г; поливинилпирролидон — 10 г; бычий сывороточный альбумин (БСА) — 10 г. Профильтровать через бумажный фильтр и довести объем водой до 1 л. Хранить в аликвотах по 25 мл при -20°C.

Дитиотреитол (1 М). Растворить 3,085 г 1,4-дителио-DL-треитола (ДТТ, $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$) в 20 мл 10 мМ ацетата натрия (рН 5,2). Стерилизовать фильтрованием, хранить при -20°C в аликвотах (ДТТ — относительно нестабильное вещество из-за его окисления кислородом воздуха).

Имидазол (2 М). Растворить 13,62 г $\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2$ в 70 мл деионизованной воды, довести объем до 100 мл. Стерилизовать фильтрованием, хранить при 4°C.

Калия ацетат (3 М калий/5 М ацетат). К 60 мл 5 М ацетата калия (49,075 г KCH_3COO на 100 мл деионизованной воды) добавить 11,5 мл 100%-ной ледяной уксусной кислоты и довести стерильной водой до 100 мл; рН 4,8–5,0. Хранить раствор при 4–20°C.

Калия гидроксид (5 М). Растворить 56,11 г КОН в 150 мл деионизованной воды, довести объем водой до 200 мл. Хранить при комнатной температуре (лучше в плотно закрытой щелочеустойчивой пластиковой химической посуде, поскольку щелочь немного растворяет стекло). **Внимание!** При работе со щелочами, являющимися едкими и коррозионно-активными веществами, необходимо соблюдать правила техники безопасности (работать в перчатках и в защитных очках); при попадании на кожу — смыть водой или слабым раствором уксусной кислоты.

Калия хлорид (1 М). Растворить 74,55 г KCl в 800 мл деионизованной воды, довести объем водой до 1 л. Стерилизовать автоклавированием, хранить в аликвотах при комнатной температуре.

Кальция хлорид (1 М). Растворить 219,08 г $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ в 800 мл деионизованной воды, довести объем водой до 1 л. Стерилизовать можно автоклавированием при 0,5 ати (но лучше — фильтрованием), хранить при 4°C.

Магния ацетат (1 М). Растворить 214,46 г $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ в 800 мл деионизованной воды, довести объем водой до 1 л. Стерилизовать фильтрованием, хранить при комнатной температуре.

Магния сульфат (1 М). Растворить 246,47 г $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ в 800 мл деионизованной воды, довести объем водой до 1 л. Стерилизовать автоклавированием, хранить при комнатной температуре.

Магния хлорид (1 М). Растворить 203,31 г свежего (гигроскопичен) $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ в 800 мл деионизованной воды, довести объем водой до 1 л. Стерилизовать

автоклавированием (лучше аликвоты по 100 мл), хранить при комнатной температуре.

Марганца хлорид (1 М). Растворить 197,9 г $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ в 800 мл деионизованной воды, довести объем водой до 1 л. Стерилизовать автоклавированием, хранить при комнатной температуре.

Натрия ацетат (3 М; pH 5,2). Растворить 408,24 г $\text{NaCH}_3\text{COO} \times 3 \text{H}_2\text{O}$ в 800 мл деионизованной воды. Довести pH до 5,2 ледяной уксусной кислотой, довести объем водой до 1 л. Стерилизовать автоклавированием, хранить при комнатной температуре.

Натрия гидроксид (10 М). Растворить 80 г NaOH в 150 мл деионизованной воды, довести объем водой до 200 мл. Хранить при комнатной температуре (лучше в плотно закрытой щелочеустойчивой пластиковой химической посуде, поскольку щелочь немного растворяет стекло). **Внимание!** При работе со щелочами, являющимися едкими и коррозионно-активными веществами, необходимо соблюдать правила техники безопасности (работать в перчатках и в защитных очках); при попадании на кожу — смыть водой или слабым раствором уксусной кислоты.

Натрия додецилсульфат (ДСН или SDS; 10%). Растворить 100 г электрофoretически чистого $\text{Na}[\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{SO}_4]$ в 900 мл деионизованной воды, для полного растворения нагреть раствор до 68°C. Довести pH до 7,2 с помощью концентрированной HCl (~50 мкл), довести объем водой до 1 л. Раствор можно не стерилизовать (ДСН не выдерживает автоклавирования). Хранить в аликвотах при комнатной температуре. В случае преципитации кристаллов ДСН (при температуре менее 20°C) растворить их заново нагреванием раствора до 37°C. **Внимание!** При взвешивании ДСН, который является поверхностно-активным веществом, раздражающим кожные покровы, необходимо использовать защитную маску и работать в вытяжном шкафу. При доведении pH в растворах, содержащих ДСН, желательно не использовать pH-электрод, поскольку ДСН оседает на электроде и снижает точность измерений.

Натрия иодид (6 М). Растворить 89,94 г NaI в 60 мл деионизованной воды, довести объем водой до 100 мл. Желательно готовить раствор непосредственно перед опытом.

Натрия перхлорат (5 М). Растворить 153 г NaClO_4 в 150 мл деионизованной воды, довести объем водой до 250 мл. Стерилизовать автоклавированием, хранить при комнатной температуре.

Натрия хлорид (5 М). Растворить 292,2 г NaCl в 800 мл деионизованной воды, довести объем водой до 1 л. Стерилизовать автоклавированием, хранить при комнатной температуре.

Натрия цитрат (1 М). Растворить 29,41 г $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ в 70 мл деионизованной воды, довести объем водой до 100 мл. Стерилизовать автоклавированием, хранить при 4–20°C.

Полиэтиленгликоль (40%). Растворить 80 г PEG 6000 в 100 мл деионизованной воды, довести объем водой до 200 мл. Хранить при 4°C.

Рубидия хлорид (1 М). Растворить 120,92 г RbCl в 800 мл деионизованной воды, довести объем водой до 1 л. Стерилизовать автоклавированием, хранить при комнатной температуре.

Сахароза (1 М). Растворить 85,58 г $C_{12}H_{22}O_{11}$ в 150 мл деионизованной воды, довести объем до 250 мл. Стерилизовать фильтрованием, хранить при комнатной температуре.

Соляная кислота (0,25 М). Внести 10,3 мл 37%-ной HCl в 489,7 мл деионизованной воды. *Внимание! Работать с концентрированной соляной кислотой, которая является едким веществом и при попадании на кожу вызывает ожоги, надо в перчатках в вытяжном шкафу (пары хлороводорода раздражают слизистые оболочки).*

Трихлоруксусная кислота (100%, вес/объем). Добавить 500 г ТХУ (CCl_3CO_2H) в 227 мл деионизованной воды (конечный объем — 500 мл). Хранить при комнатной температуре под тягой в темноте в плотно закрытой химической посуде. *Внимание! ТХУ является токсичным веществом, работать с ней необходимо в перчатках в вытяжном шкафу.*

Уксусная кислота (0,2 М). Добавить 11,55 мл ледяной уксусной кислоты в 500 мл деионизованной воды, перемешать, довести объем водой до 1 л. Хранить при комнатной температуре под тягой в плотно закрытой химической посуде. *Внимание! Работать с ледяной уксусной кислотой, способной вызывать ожоги и пары которой раздражают слизистые оболочки, необходимо в перчатках в вытяжном шкафу.*

ЭДТА (0,5 М; pH 8,0). Добавить 46,55 г $Na_2EDTA \times 2 H_2O$ к 200 мл деионизованной воды. Энергично перемешивая раствор на магнитной мешалке, довести pH до 8,0 с помощью NaOH (~5 г) для полного растворения этилендиаминтетраацетата натрия. Довести объем водой до 250 мл. Стерилизовать автоклавированием, хранить при 4–20°C.

Этидия бромид (10 мг/мл). Полностью растворить 1 г бромистого этидия ($C_{21}H_{20}N_3Br$) в 100 мл деионизованной воды при перемешивании на магнитной мешалке (в течение нескольких часов). Хранить раствор в светонепроницаемом сосуде (емкости из темного стекла или во флаконе, завернутом в алюминиевую фольгу) при 4–20°C. *Внимание! Работать с бромистым этидием, являющимся мутагенным веществом, всегда необходимо в перчатках, а взвешивать его — в защитной маске.* Добавить 50–100 мкл раствора бромистого этидия на 1 л агарозного раствора перед заливкой геля или 50–200 мкл — на 1 л раствора для окраски агарозных гелей после электрофореза (конечная концентрация — 0,5–2 мкг/мл, для уменьшения фоновой окраски геля можно уменьшить концентрацию бромистого этидия до 0,1 мкг/мл).

БУФЕРНЫЕ РАСТВОРЫ

FGRB (50×). Буферный раствор для электрофореза РНК в агарозном геле с добавлением формальдегида (*formaldehyde gel-running buffer*). Состав (на 1 л): 1 М MOPS, pH 7,0 (209,27 г); 0,5 М $CH_3COONa \times 3 H_2O$ (68,04 г); 50 мМ ЭДТА $\times 2 H_2O$ (18,62 г); довести объем до 1 л деионизованной водой. Подводить pH до 7,0 надо с помощью 10 М NaOH. Отфильтровать раствор через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм и хранить при 4°C.

HSB. Буферный раствор для гибридизации с высоким содержанием ДСН (*high SDS hybridization buffer*). Состав: 7% ДСН; 50% формамида; 5× SSC; 50 мМ натрий-фосфатного буфера (pH 7,0); 2% блокирующего реагента («Roche Diagnostics», Швейцария) и 0,1% N-лауроилсаркозината Na. Хранить при комнатной

температуре. Иногда в буфер добавляют денатурированную ДНК из спермы лососа (50 мкг/мл), а вместо 2% блокирующего реагента используют 10× раствор Денхардта.

MOPS (10×). Внести 41,85 г 4-морфолинпропансульфоновой кислоты (MOPS) и 6,80 г ацетата натрия ($\text{NaOAc} \times 3 \text{ H}_2\text{O}$) в 800 мл деионизованной воды, обработанной диэтилпиокарбонатом (DEPC). Перемешивать до полного растворения. Добавить 20 мл 0,5 М $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ (раствор готовить на воде, обработанной DEPC) и довести pH до 7,0 с помощью 10 М NaOH. Довести объем до 1 л DEPC-водой. Хранить в аликвотах по 200 мл при 4°C в темноте (если раствор приобрел желтую окраску, то нужно использовать новую аликвоту).

Na-фосфатный (0,1 М) буферный раствор. Приготовить 0,2 М раствор $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (27,6 г на 1 л воды) и 0,2 М раствор $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ (53,62 г на 1 л воды). Для получения pH 7,0 смешать 39 мл первого и 61 мл второго раствора, добавить 100 мл деионизованной воды. Стерилизовать автоклавированием, хранить при 4–20°C.

PBS (10×). Растворить 80 г NaCl; 2 г KCl; 26,8 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ и 2,4 г KH_2PO_4 в 800 мл H_2O . Довести pH до 6,8 с помощью HCl (pH однократного раствора должен равняться 7,4). Довести объем до 1 л деионизованной водой, разлить на аликвоты и стерилизовать автоклавированием. Хранить при комнатной температуре.

Многие протоколы дают следующий состав 10× PBS: 1,3 М NaCl; 70 мМ Na_2HPO_4 и 30 мМ NaH_2PO_4 ; pH 7,2.

SSC (20×). Буферный раствор для опытов по гибридизации. Растворить 175,3 г NaCl и 88,2 г цитрата натрия $\times 2 \text{ H}_2\text{O}$ в 800 мл деионизованной воды. Довести pH до 7,0 с помощью HCl, довести объем до 1 л водой. Таким образом, 20× SSC имеет состав 3 М NaCl и 0,3 М цитрат натрия. Разлить на аликвоты и стерилизовать автоклавированием. Хранить при комнатной температуре.

SSPE (20×). Буферный раствор для опытов по гибридизации. Растворить 175,3 г NaCl; 27,6 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ и 7,4 г $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ в 800 мл деионизованной воды. Довести pH до 7,4 с помощью 10 М NaOH (~6,5 мл). Объем раствора довести до 1 л водой. Таким образом, 20× SSPE имеет состав 3 М NaCl; 0,214 М $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ и 20 мМ $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$. Разлить на аликвоты и стерилизовать автоклавированием. Хранить при комнатной температуре.

STET имеет следующий состав (на 100 мл): 0,1 М NaCl (2 мл 5 М NaCl); 10 мМ трис-HCl (1 мл 1 М трис-HCl, pH 8,0); 1 мМ ЭДТА (200 мкл 0,5 М ЭДТА, pH 8,0); 5% (вес/объем) Triton X-100 (5 г). Буферный раствор, не содержащий Triton X-100, носит название **STE (TNE)**. Стерилизовать автоклавированием, хранить при 4°C.

Иногда вместо STET применяют раствор несколько иного состава, содержащий 8% сахарозы; 10–50 мМ трис-HCl (pH 8,0); 50 мМ $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ (pH 8,0); 0,5–5% Triton X-100.

Трис-HCl (1 М). Растворить 121,14 г трис-(гидрооксиметил)-аминометана в 800 мл деионизованной воды. Добавить концентрированную HCl для доведения pH до необходимого значения (~70 мл HCl до pH 7,4; ~60 мл до pH 7,6; ~42 мл до pH 8,0). Перед окончательным доведением pH необходимо охладить раствор до комнатной температуры (поскольку pH буферных растворов на основе трис

уменьшается на 0,028 ед. при увеличении температуры на 1°C), затем довести объем до 1 л водой. Стерилизовать автоклавированием. Хранить при 4°C.

ТАЕ (трис-ацетатный, 50×) буферный раствор для электрофореза ДНК. Состав на 1 л деионизованной воды: трис (основной) — 242 г; 0,5 М Na₂ЭДТА (рН 8,0) — 100 мл; ледяная уксусная кислота — 57,1 мл; рН 7,6. Таким образом, 1× ТАЕ буферный раствор содержит 40 мМ трис-ацетата и 1 мМ ЭДТА. Стерилизовать автоклавированием, хранить при 4–20°C.

ТВЕ (трис-боратный, 10×) буферный раствор для электрофореза ДНК. Состав на 1 л деионизованной воды: трис (основной) — 107,8 г; борная кислота — 55,03 г; 0,5 М Na₂ЭДТА (рН 8,0) — 40 мл; рН 8,3. Таким образом, 1× ТВЕ буферный раствор содержит 89 мМ трис-бората и 2 мМ ЭДТА. Хранить при комнатной температуре (предварительно отфильтровать через фильтр с диаметром пор 0,4 мкм).

ТГВ (трис-глициновый, 10×) буферный раствор для электрофореза белков в ДСН-ПААГ. Состав на 1 л деионизованной воды: трис (основной) — 30,3 г; глицин — 188 г; ДСН — 10 г; рН 8,3. Таким образом, 1× ТГВ буферный раствор содержит 25 мМ триса; 250 мМ глицина и 0,1% ДСН. Хранить при 4–20°C.

ТРЕ (трис-фосфатный, 10×) буферный раствор для электрофореза ДНК. Состав на 1 л деионизованной воды: трис (основной) — 107,8 г; 85%-ная фосфорная кислота (1,679 г/мл) — 15,5 мл; 0,5 М Na₂ЭДТА (рН 8,0) — 40 мл. Таким образом, 1× ТРЕ буферный раствор содержит 89 мМ трис-фосфата и 2 мМ ЭДТА. Хранить при комнатной температуре.

ТЕ имеет следующий состав (на 100 мл): 10 мМ трис-НСl, рН 7,4–8,0 (1 мл 1 М трис-НСl соответствующего рН) и 1 мМ ЭДТА, рН 8,0 (200 мкл 0,5 М Na₂ЭДТА). Стерилизовать автоклавированием, хранить при 4°C. В буферный раствор для хранения препаратов ДНК, которые планируется использовать в ПЦР или иных ферментативных реакциях, рекомендуется добавлять 20 мкл 0,5 М Na₂ЭДТА вместо 200 мкл (0,1 мМ ЭДТА). Кроме того, раствор ТЕ, используемый для хранения ДНК, должен содержать свободную от ДНКаз РНКазу (20 мкг/мл).

Буферный раствор (6×) для внесения проб ДНК в лунки агарозного геля при электрофорезе. Растворить 250 мг бромфенолового синего и 250 мг ксиленила в 33 мл 150 мМ трис-НСl (рН 7,6). Добавить 60 мл глицерина (иногда используют 40 г сахарозы или 15 мл Ficoll 400). Довести до 100 мл деионизованной водой. Раствор лучше хранить при 4°C (в случае применения фикола — при комнатной температуре). Часто 6× буферные растворы для внесения проб ДНК в лунки агарозного геля содержат также 0,5% ДСН и 0,1 мМ ЭДТА (рН 8,0).

Раствор для внесения проб РНК в лунки агарозного геля при электрофорезе. Состав: 50%-ный глицерин; 1 мМ Na₂ЭДТА (или 0,01 М NaH₂PO₄) и 0,4%-ный бромфеноловый синий. Для приготовления раствора необходимо использовать воду, обработанную диэтилпиракарбонатом (DEPC), и глицерин высшего качества во избежание контаминации рибонуклеазами (иногда приготовленный буферный раствор смешивают также с 37%-ным формальдегидом в соотношении 1 : 3). Разлить по 500-мкл аликвотам и хранить при –20 °C.

Достаточно часто применяют раствор, содержащий 50% сахарозы в 30%-ном глицерине и 15 мг/мл бромфенолового синего. Смешивают 3 мкл раствора с 10 мкл пробы РНК и наносят в лунку агарозного геля.

Буферный раствор для хранения ДНКазы. Состав: 20 мМ трис-НCl (pH 7,0); 50 мМ NaCl; 1 мМ ДТТ; 50% глицерина. Разводить деионизованной водой, хранить при -20°C .

Буферный раствор для хранения РНКазы. Состав: 10 мМ трис-НCl (pH 7,6); 50% глицерина. Разводить деионизованной водой, хранить при -20°C .

Буферный раствор (10×) для ДНК-лигазы T4. Состав: 660 мМ трис-НCl (pH 7,5); 50 мМ MgCl_2 ; 50 мМ ДТТ; 10 мМ АТФ. Хранить в аликвотах при -20°C . Необходимо иметь в виду, что АТФ является нестабильным соединением, а уменьшение его концентрации в растворе сильно влияет на эффективность лигирования — поэтому рекомендуется хранить АТФ отдельно в аликвотах при -20°C и добавлять в буферный раствор непосредственно перед экспериментом.

Буферный раствор (10×) для щелочной фосфатазы креветки. Состав: 0,5 М трис; 50 мМ MgCl_2 ; pH 8,5. Хранить при -20°C .

Рестрикционные буферные растворы. Готовить на бидистиллированной воде, стерилизовать фильтрованием и хранить в аликвотах при -20°C .

Компоненты	Конечная концентрация в растворе (мМ)				
	А	В	Л	М	Н
Трис-ацетат	33				
Трис-НCl		10	10	10	50
Магния ацетат	10				
MgCl_2		5	10	10	10
Калия ацетат	66				
NaCl		100		50	100
1,4-Дитиозеритритол			1	1	1
1,4-Дитиотреитол	0,5				
2-Меркаптоэтанол		1			
pH при 37°C	7,9	8,0	7,5	7,5	7,5

НЕКОТОРЫЕ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ РЕСТРИКЦИИ

Рестриктаза	Сайт рестрикции	% активности фермента в рестрикционном буфере					$T^{\circ}\text{C}$ инкубации смеси	Инактивация рестриктазы нагреванием
		А	В	Л	М	Н		
1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>AluI</i>	AG↓CT	100	50–75	25–50	25–50	0–10	37	+
<i>AvaII</i>	G↓G(A,T)CC	100	50–75	75–100	100	10–25	37	+
<i>BamHI</i>	G↓GATCC	100	100	75–100	100	25–50	37	–
<i>BclI</i>	T↓GATCA	100	100	25–50	100	100	50	–

1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Bgl</i> II	A↓GATCT	100	100	25–50	100	100	37	–
<i>Dra</i> I	TTT↓AAA	100	75–100	100	100	50–75	37	+
<i>Eco</i> RI	G↓AATTC	100	100	25–50	50–75	100	37	–
<i>Hae</i> III	GG↓CC	50–75	50–75	75–100	100	25–50	37	–
<i>Hind</i> III	A↓AGCTT	50–75	100	25–50	100	50–75	37	+
<i>Hpa</i> I	GTT↓AAC	100	25–50	25–50	50–75	25–50	37	–
<i>Kpn</i> I*	GGTAC↓C	75–100	10–25	100	25–50	0–10	37	–
<i>Msp</i> I	C↓CGG	100	100	100	100	50–75	37	+
<i>Nco</i> I	C↓CATGG	50–75	50–75	50–75	50–75	100	37	+
<i>Nor</i> I	GC↓GGCCGC	10–25	50–75	0–10	25–50	100	37	+
<i>Pst</i> I	CTGCA↓G	25–50	25–50	10–25	25–50	100	37	–
<i>Pvu</i> II	CAG↓CTG	25–50	25–50	25–50	100	25–50	37	–
<i>Sac</i> I	GAGCT↓C	100	0–10	100	50–75	0–10	37	+
<i>Sal</i> I	G↓TCGAC	0–10	25–50	0–10	10–25	100	37	+
<i>Sau</i> 3A1	↓GATC	100	25–50	25–50	75–100	0–10	37	–
<i>Sca</i> I	AGT↓ACT	0–10	100	0–10	75–100	100	37	–
<i>Sma</i> I	CCC↓GGG	100	0–10	0–10	0–10	0–10	25	+
<i>Sph</i> I	GCATG↓C	50–75	75–100	25–50	100	75–100	37	+
<i>Ssp</i> I	AAT↓ATT	75–100	75–100	10–25	75–100	100	37	+
<i>Swa</i> I	ATTT↓AAAT	0–10	10–25	0–10	0–10	100	25	–
<i>Xba</i> I	T↓CTAGA	100	75–100	75–100	75–100	100	37	–
<i>Xho</i> I	C↓TCGAG	25–50	75–100	10–25	25–50	100	37	–

* Требуется добавления БСА (100 мкг/мл).

Литература

1. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. М.: Мир, 1991.
2. Brown T.A. Bacteria and bacteriophages // Molecular Biology LabFax. 2nd ed. V. 1 (Recombinant DNA). San Diego: Academic Press, 1998. P. 33–36.
3. Elbing K., Brent R. Media preparation and bacteriological tools // Curr. Protoc. Mol. Biol. 2002. V. 59. Unit 1.1.
4. Good N.E., Izawa S. Hydrogen ion buffers // Meth. Enzymol. 1972. V. 24. P. 53–68.
5. Sambrook K., Fritsch E.J., Maniatis T. Preparation of reagents and buffers used in molecular cloning. Media // Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. A1.1, A2.1.
6. http://www.dsmz.de/microorganisms/media_list.php — состав основных микробиологических сред от немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ).

Приложение 2

НЕКОТОРЫЕ ШТАММЫ *Escherichia coli*, НАИБОЛЕЕ ЧАСТО ПРИМЕНЯЕМЫЕ В МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

E. coli — один из наиболее хорошо изученных в генетическом, биохимическом и физиологическом плане микроорганизмов. Клетки *E. coli* представляют собой грамотрицательные подвижные палочки длиной около 1 мкм и диаметром 0,2 мкм. Они способны размножаться простым делением на несложных синтетических средах, содержащих ионы K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , NH_4^+ , Cl^- , SO_4^{2-} и HPO_4^{2-} , а также микроэлементы и источник углерода (например, глюкозу). Время генерации многих штаммов в логарифмической фазе роста при культивировании на богатых жидких питательных средах в аэробных условиях и температуре 37°C составляет всего около 22 мин.

Свежие культуры *E. coli* из экспоненциальной фазы роста можно хранить в течение нескольких лет в 0,6-мл аликвотах при -70°C (предварительно заморозив в жидком азоте) в 7,5–15%-ном стерильном глицерине или 7%-ном диметилсульфоксиде (ДМСО), которые предотвращают образование кристаллов льда, разрушающих клетки при размораживании. Для долговременного хранения при -70°C рекомендуется также суспендировать клетки в стерильном растворе следующего состава: 20% глицерина, 50 мМ $MgSO_4$ и 10 мМ HEPES; pH 6,5.

Штаммы, посеянные глубинным способом в столбики агаризованной среды, выдерживают хранение в пробирках с плотно завинчивающимися крышками при 4–20°C в течение нескольких месяцев.

В качестве литературного источника, описывающего генотипы и фенотипы наиболее широко применяемых в молекулярном клонировании штаммов *E. coli*, можно порекомендовать книгу *Brown T.A. Molecular Biology LabFax. 2nd ed. V. 1 (Recombinant DNA)*. San Diego: Academic Press, 1998. P. 1–29.

BL21(DE3) — $F^- ompT gal dcm lon hsdS_B(r_g^- m_g^-) \lambda(DE3 [lacI lacUV5-T7 \text{ gene } 1 ind1 sam7 nin5])$. Штамм *E. coli* В лизогенен по λ DE3, который содержит ген T7 РНК-полимеразы под контролем P_{lac} -UV5 промотора (индукторы — ИПТГ и галактоза; репрессор — глюкоза). Обычный штамм для экспрессии белков в системе T7, часто с использованием плазмидных векторов pREST6a. Отсутствие *lon* и *ompT* предотвращает протеолитическое расщепление рекомбинантного белка.

C600 — $F^- tonA21 thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 glnV44 rfbC1 fhuA1 \lambda^-$. Штамм общего назначения.

CJ236 — $F^+ \lambda^- ung-1 relA1 dut-1 spoT1 thi-1$ pCJ105. Штамм *E. coli* K-12 применяется для создания урацил-содержащих конструкций в экспериментах по мутагенезу. Высеивается на среду LB с хлорамфениколом (F-фактор pCJ105 несет маркер устойчивости к этому антибиотику).

DH5 α — $F^- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG \phi 80dlacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF) U169 hsdR17(r_g^- m_g^+) \lambda^-$. Штамм общего назначения, устойчив к налидиксовой кислоте.

DH10B — $F^- mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \phi80dlacZ\Delta M15 \Delta lacX74 deoR recA1 endA1 araD139 \Delta(ara-leu)7697 galU galK rpsL nupG \lambda^-$. Штамм для повседневного клонирования с полностью нефункциональной системой рестрикции. Работает X-gal/ИПТГ селекция, можно использовать для клонирования метилированной ДНК. Нельзя применять для одноцепочечных бактериофагов, так как штамм не содержит F' -фактор.

HB101 — $F^- ara14 galK2 hsdS20(r_B^- m_B^-) lacY1 leuB6 mtl-1 proA2 recA13 rpsL20(Str^r) supE44,9,14 thi-1 xyl-5 \Delta(mcrC-mrr)$. Гибрид штаммов *E. coli* K-12 и *E. coli* B (по локусам *hsd*, *mcrB*, *mrr*), используемый для выращивания плазмид. Нельзя использовать для одноцепочечных бактериофагов fl. X-gal/ИПТГ селекция не работает.

JM109 — $endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB^+ \Delta(lac-proAB) e14^- [F^+ traD36 proAB^+ lacI^q\Delta M15] hsdR17(r_K^- m_K^+)$. Обычный штамм для выращивания плазмид и одноцепочечных бактериофагов fl. Клетки JM109 лишены эндонуклеазы EndA, что существенным образом повышает качество выделяемой из них ДНК, а дефицит по *recA* (рекомбинация) улучшает стабильность вставок. Мутация в *hsdR* предотвращает расщепление клонируемой ДНК эндонуклеазной системой EcoK. Клетки JM109 содержат ген $lacI^q\Delta M15$ на F' -эписоме, что позволяет осуществлять X-gal/ИПТГ скрининг рекомбинантных плазмид. Штамм высевается на минимальную среду M9 с добавлением 1 mM тиамина.

LE392 — $hsdR514(r_K^- m_K^+) supE44 supF58 (lacY1 \text{ or } \Delta lacIZY) galK2 galT22 merB1 trpR55$. Основной штамм для работы с бактериофагом λ , используется для клонирования геномной и кДНК. Отсутствует система рестрикции *E. coli* K. Нет селекции против фагов без вставки и не работает X-gal/ИПТГ селекция.

MG1655 — $F^- \lambda^- ilvG- rfb-50 rph-1$. Это штамм *E. coli* K-12 дикого типа, геном которого был секвенирован. Рекомендуются при работе с амплифицированными генами соответствующего генома.

S17-1 — $F^- recA hsdR RP4-2(Tc::Mu)(Km::Tn7)$. Штамм применяется в экспериментах по конъюгации.

SURE — $endA1 glnV44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 uvrC e14^- \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 [F^+ proAB^+ lacI^q\Delta M15 Tn10]$. Штамм производства компании «Stratagene» (США) применяется в основном для клонирования последовательностей, содержащих прямые или инвертированные повторы. Его можно использовать как обычный штамм для выращивания плазмид и одноцепочечных бактериофагов fl. Устранена система репарации УФ-повреждений, наличие *recB recJ* способствует снижению гомологичной рекомбинации до уровня *recA*. Работает X-gal/ИПТГ селекция. Для образования бляшек фага λ необходима инкубация при 39°C. Штамм высевается на среду LB с канамицином и тетрациклином.

TG1 — $supE thi-1 \Delta(lac-proAB) \Delta(mcrB-hsdSM)5(r_K^- m_K^-) [F^+ traD36 proAB lacI^q\Delta M15]$. Стандартный штамм для выращивания плазмид и одноцепочечных бактериофагов fl. Рекомендуются для получения высококачественных электрокомпетентных клеток. Работает X-gal/ИПТГ селекция.

TOP10 — $F^- mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \phi80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 recA1 ara\Delta139 \Delta(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^r) endA1 nupG$. Химически компетентные клетки для эффективной трансформации, клонирования и стабильной репликации высококопийных плазмид производства компании «Invitrogen» (США). Генотип

очень сходен со штаммом DH10B (*hsdR* обеспечивает трансформацию неметилованной ДНК, полученной при помощи ПЦР; *mcrA* способствует трансформации метилированной ДНК из геномных препаратов; *lacZΔM15* служит для сине-белой селекции колоний рекомбинантных клонов; *endA1* подавляет неспецифический гидролиз молекул ДНК эндонуклеазой I; *recA1* необходим для снижения вероятности неспецифической рекомбинации в клонированной ДНК).

TOP10F⁺ — F'*lacI^q* Tn10 (Tet^r)} *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ф80*lacZΔM15* Δ*lacX74 deoR recA1 araD139* Δ(*ara, leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str^r) *endA1 nupG*. Стандартный штамм производства компании «Invitrogen» (США) для выращивания плазмид (отсутствие эндонуклеаз улучшает качество) и одноцепочечных бактериофагов. Генотип очень сходен со штаммом DH10B с F'-плазмидой, содержащей *lacI^q* и Tn10. Работает X-gal/ИПТГ селекция. Штамм высевается на среду LB с тетрациклином и стрептомицином.

XL1-Blue MRF⁺ — (*mcrA*)183 Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* [F' *proAB lacI^qΔM15* Tn10 (Tet^r)]. Штамм XL1-Blue («Stratagene», США) широко применяется в молекулярном клонировании для выделения плазмид, при инфицировании фагом λ, в опытах по амплификации и экспрессии генов. MR обозначает *minus restriction* (делеция всех систем рестрикции *E. coli* K-12) для клонирования метилированной ДНК. Работает X-gal/ИПТГ селекция. Штамм высевается на среду LB с тетрациклином.

XL0LR — Δ(*mcrA*)183 Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* [F' *proAB lacI^qΔM15* Tn10 (Tet^r)] λ'. Штамм часто применяется при работе с фагом-помощником ExAssist («Stratagene», США).

Культуры упомянутых штаммов, хранящиеся в глицерине, поставляются на рынок такими компаниями, как «Stratagene» (США), «Promega» (США), «Invitrogen» (США), «Life Technologies» (США), Coli Genetics Stock Center (CGSC, США — <http://cgsc2.biology.yale.edu/index.php>), «Takara Bio Inc.» (Япония) и др.

НОМЕНКЛАТУРА ГЕНОТИПОВ И ФЕНОТИПОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

Названия генов описываются тремя курсивными латинскими буквами (как правило, это аббревиатура функциональной роли соответствующего гена). Если одна и та же функция определяется несколькими генами, их названия различаются по заглавной букве. Делеции обозначаются греческой буквой Δ, за которой в скобках даются названия deletированных генов. Специфические мутации обозначаются арабскими цифрами. Фенотипические обозначения пишутся прямым шрифтом с заглавной буквы, далее следует знак + или — (либо *r* — *resistant* или *s* — *sensitive*).

Amp^r (Ap^R) — устойчивость к ампициллину;

ara — неспособность использовать арабинозу;

argF — неспособность использовать аргинин (мутация орнитин-карбамоил-трансферазы);

Str^r — устойчивость к хлорамфениколу;

dam — мутация аденинметилазы. Такие штаммы имеют повышенную частоту рекомбинации и конститутивно экспрессируют гены, отвечающие за ре-

парацию ДНК. Ген *dam* важен при направленном мутагенезе в векторах, основанных на фаге M13;

dcm — мутация цитозинметилазы. Штаммы *dam* и *dcm*, у которых отсутствует эндогенное метилирование аденина в последовательности GATC (*dam*) или метилирование цитозина в последовательности CCWGG (*dcm*), используют для того, чтобы приготовить ДНК для расщепления некоторыми эндонуклеазами рестрикции, чувствительными к метилированию (например, *Ava*II или *Bcl*I). Из-за проблем с репликацией модифицированные по *dam* и *dcm* плазмидные векторы плохо трансформируют некоторые бактериальные штаммы;

deoR — мутация, обеспечивающая постоянную экспрессию генов для синтеза дезоксирибозы. Такие штаммы хорошо трансформируются плазмидами большого размера;

dut — мутация дУТФазы. В комбинации с мутацией *ung* позволяет включать урацил в ДНК в экспериментах по мутагенезу;

e14 — профаг-подобный элемент, способный вырезаться из генома;

endA — мутация эндонуклеазы I. Данная мутация удаляет неспецифичную эндонуклеазную активность, что улучшает выход и качество плазмид в ходе их выделения;

F' — низкокопийная самопередающаяся плаزمид (F'-эписома), определяющая мужской тип штамма *E. coli*. Применяется при работе с бактериофагом M13 для накопления одноцепочечной ДНК. F'-плазмид иногда содержит в своем составе маркер устойчивости к антибиотику для обеспечения ее поддержания, а также часто несет генотипы *lac*I и *lac*Z Δ M15;

galK — мутация галактокиназы;

galT — мутация галактозо-1-фосфат уридилтрансферазы;

galU — мутация глюкозо-1-фосфат уридилтрансферазы. Мутации *galK*, *galT* и *galU* приводят к неспособности штаммов использовать галактозу;

gyrA96 — мутация ДНК-гиразы, обеспечивающая устойчивость к налидиксовой кислоте;

hflA — мутация, приводящая к повышенной частоте лизогении при инфекции фага λ ;

hsdM — мутация *Eco*KI метилазы;

hsdR — мутация *Eco*KI рестриктазы;

hsdR17(r, m⁺) — не функционирует система рестрикции, но работает система модификации. В таких штаммах можно клонировать неметилированную ДНК;

hsdS20(r, m⁻) — не функционируют системы рестрикции и модификации, распознающие чужеродную ДНК. В таких штаммах можно клонировать неметилированную ДНК. Генотип *hsd* позволяет проводить эффективную трансформацию с использованием ПЦР-фрагментов ДНК;

Kan^r — устойчивость к канамицину;

lacI^q — мутация, приводящая к сверхэкспрессии LacI (белка-репрессора *lac* оперона) и ингибированию транскрипции с *lac* промотора. ИПТГ связывается с *lac* репрессором и дерепрессирует промотор, такая конструкция используется в X-gal/ИПТГ (сине-белой) селекции и для контроля экспрессии рекомбинантных генов;

lacY — мутация галактозидпермеазы, приводящая к неспособности штамма использовать лактозу;

lacZ — мутация β -D-галактозидазы, приводящая к неспособности штамма использовать лактозу. Клетки с такой мутацией образуют белые колонии в присутствии X-gal, а клетки дикого типа — синие;

$\Delta(lacZ)M15$ — частичная N-концевая делеция β -D-галактозидазы, нарушающая ее α -комплементацию с фрагментом, кодируемым плазмидами с синей-белой селекцией. Элемент *lacZ*M15 часто входит в состав F'-плазмиды или профага $\phi 80$;

$\lambda(DE3)$ — в геноме интегрирован бактериофаг λ , несущий ген T7 РНК-полимеразы;

leuB — мутация β -изопропил-малатдегидрогеназы. Для роста на минимальной среде необходим лейцин;

$\Delta(lon)$ — делеция АТФ-зависимой протеазы Lon, ответственной за деградацию рекомбинантных белков. В таких штаммах уменьшается протеолиз экспрессируемых эукариотических белков;

malA — мутация в мальтозном регулоне, приводящая к неспособности использовать мальтозу;

mcrA — мутация, прекращающая разрезание ДНК, метилированной по последовательности 5'-G(^mC)GC-3'. Надо отметить, что *mcr* и *mrr* локусы дикого типа понижают эффективность клонирования метилированных последовательностей ДНК из некоторых эукариот и бактерий;

metB — мутация цистатинин- γ -синтазы. Для роста на минимальной среде необходим метионин;

mrr — в мутантном штамме прекращается разрезание ДНК, метилированной по последовательностям 5'-G(^mA)C или 5'-C(^mA)G. Поскольку мутации *mcrA*, *mcrBC* или *mrr* позволяют метилированной ДНК не распознаваться в качестве чужеродной, то такой генотип важен для клонирования геномной ДНК или метилированной кДНК;

Mu — Mu профаг, Mud — дефектный профаг;

mutS — мутация, нарушающая систему мисматч-репарации (предотвращается репарация новой неметилированной ДНК);

nupG — мутация в транспортной системе нуклеозидов;

ompT — мутация мембранной протеазы OmpT, что приводит к снижению деградации экспрессируемых рекомбинантных белков;

P1 — штаммы, содержащие систему рестрикции профага P1;

P2 — штаммы, содержащие лизоген фага P2;

$\phi 80$ — клетки содержат профаг $\phi 80$;

proAB — для роста на минимальной среде необходим пролин;

recA — мутация по центральному гену систем общей рекомбинации и репарации ДНК. Такие штаммы широко применяются для клонирования генов с прямыми повторами. Надо иметь в виду, что клетки с *recA* мутацией более чувствительны к УФ облучению;

recB, *recC* — мутация экзонуклеазы V, нарушающая экзонуклеазную и рекомбиназную активности;

recD — мутация экзонуклеазы V, устраняющая экзонуклеазную активность, но стимулирующая рекомбиназную активность;

recF — мутация, нарушающая межплазмидную рекомбинацию;

relA — мутация, при которой синтез РНК идет в отсутствие синтеза белка из-за нарушения взаимосвязи между процессами транскрипции и трансляции.

Приложение 2. Штаммы *Escherichia coli*

У штаммов дикого типа недостаток аминокислот приводит к остановке синтеза РНК (так называемый строгий контроль или *stringent response*, регулируемый гуанозинтетра(пента)фосфатом — (p)ppGpp), pppGpp-синтетаза кодируется геном *relA*;

rpsL (strA) — мутация одного из белков малой субъединицы рибосомы, обеспечивающая устойчивость к стрептомицину;

rpoH — отсутствие транскрипционного фактора теплового шока, что предотвращает экспрессию некоторых стресс-индуцированных протеаз;

sbcBC — мутация экзонуклеазы I. Допускает общую рекомбинацию у *recBC* мутантов;

Sm^r — устойчивость к стрептомицину;

Spⁱ — обозначение *red⁺ gam⁻* мутантных производных фага λ , которые способны расти на P2 лизогенах *E. coli*;

supB, *supC*, *supG*, *supL*, *supM*, *supN*, *supO* — супрессоры охра- (UAA) и амбер- (UAG) мутаций; *supB* — кодирует тРНК глутаминовой кислоты, а *supC (tyrT)* — тирозина;

supD, *supE*, *supF* — супрессоры амбер-мутации (UAG); *supD* — кодирует тРНК серина, *supE (glnV)* — глутамина, а *supF (tyrT)* — тирозина;

Tet^r (Tc^R) — устойчивость к тетрациклину;

thi-1 — для роста на минимальной среде необходим витамин B1 (тиамин);

thr — для роста на минимальной среде необходим треонин;

Tn10 — транспозон, который обычно содержит ген устойчивости к тетрациклину (*Tet^r*);

Tn5 — транспозон, который обычно содержит ген устойчивости к канамицину (*Kan^r*);

tonA — мутация внешнего мембранного белка, обеспечивающая устойчивость к литическим бактериофагам T1, T5 и f80;

traD — мутация, предотвращающая самоперенос F'-эписомы;

trpR — для роста на минимальной среде необходим триптофан;

tsp — делеция, устраняющая периплазматическую протеазу, которая деградирует секретлируемые белки;

tsx — мутация, обеспечивающая устойчивость к бактериофагу T6 и колицину K;

umuC — мутация гена, участвующего в SOS репарации; уменьшает перестройки обратных повторов;

ung — мутация урацил-N-гликозилазы. В комбинации с мутацией *dut* позволяет включать урацил в ДНК в ходе экспериментов по мутагенезу;

uvrC — мутация гена, участвующего в УФ-репарации; уменьшает перестройки обратных повторов;

xyl5 — мутация, блокирующая катаболизм ксилоты.

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ БАЗЫ ДАННЫХ И ДРУГИЕ ИНТЕРНЕТ-РЕСУРСЫ

Внимание. Интернет-адреса могут устаревать, меняться и быть в настоящее время недоступными. Приведены работающие ссылки на лето 2010 г.

<http://www.genome.ad.jp/kegg/kegg.html> — KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*): энциклопедия генов и геномов центра биоинформатики университета Киото (Япония), содержит также карты метаболических путей и ферментических реакций для различных микроорганизмов.

<http://www.labome.org> — базы данных по публикациям, методам, интернет-страничкам биомедицинской направленности.

<http://lcweb.loc.gov/z3950/gateway.html> — доступ к электронным библиотекам Северной Америки.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> — NCBI (*National Center for Biotechnology Information*): обширная поисковая система по молекулярно-биологическим ресурсам.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez> — NCBI (*National Center for Biotechnology Information*): каталог биомедицинской литературы (PubMed), базы данных по аминокислотным и нуклеотидным последовательностям и много других молекулярно-биологических ресурсов.

ИНТЕРНЕТ-РЕСУРСЫ ПО МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИМ МЕТОДАМ

<http://www3.appliedbiosystems.com/sup/gl/search.htm> — база данных экспериментальных протоколов и другой справочной литературы от компании «Applied Biosystems» (США).

<http://bioinformatics.weizmann.ac.il/mb/bioguide/pcr/contents.html> — основы полимеразной цепной реакции (ПЦР).

<http://www.cellbio.com/protocols.html> — список интернет-ресурсов по молекулярно-биологическим лабораторным протоколам.

<http://gac.edu/cgi-bin/user/~cellab/phpl?index-1.html> — практические методы в клеточной биологии.

<http://www.gene-quantification.info> — один из лучших сайтов, посвященных техническим аспектам ПЦР в реальном времени.

<http://info.med.yale.edu/genetics/ward/tavi/PCR.html> — методология стандартной ПЦР и мультиплекс-ПЦР.

<http://www.molbiol.ru> — наиболее известный русскоязычный интернет-ресурс по молекулярно-биологическим методам.

<http://www.protocol-online.org/> — базы данных по экспериментальным протоколам (молекулярная биология, микробиология, биохимия, иммунология и т.д.).

БАЗЫ ДАННЫХ ПО АНАЛИЗУ НУКЛЕОТИДНЫХ И АМИНОКИСЛОТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<http://www.addgene.org/> — AddGene: база данных нуклеотидных последовательностей и рестрикционно-генетических карт плазмидных векторов.

<http://www.bioinf.manchester.ac.uk/cgi-bin/dbbrowser/cgina2aafrm.pl> — перевод нуклеотидных последовательностей в аминокислотные.

<http://www.bioinformatics.org/JaMBW/> — JaMBW (*Java Based Molecular Biologist's Workbench*): пакет программ для анализа нуклеотидных последовательностей и конструирования праймеров.

http://www.biophp.org/minitools/restriction_digest/demo.php — поиск сайтов рестрикции в нуклеотидных последовательностях.

<http://www.biotech.iastate.edu/publications/Facilities/DSSF/ABRF> — анализ последовательностей ДНК.

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> — BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*): эвристический программный алгоритм для поиска гомологии между аминокислотными и нуклеотидными последовательностями.

<http://www.broadinstitute.org/science/software> — пакеты программ для анализа нуклеотидных последовательностей, экспрессии генов, конструирования праймеров и т.д. («Broad Institute», США).

<http://cmr.jcvi.org/tigr-scripts/CMR/CmrHomePage.cgi> — CMR (*Comprehensive Microbial Resource*): информация по опубликованным полным прокариотическим геномам.

<http://www.ddbj.nig.ac.jp> — DDBJ (*DNA Data Bank of Japan*): японская база данных анонсированных нуклеотидных последовательностей.

<http://www.ebi.ac.uk/embl> — EMBL (*The European Molecular Biology Laboratory*): европейская база данных анонсированных нуклеотидных последовательностей.

<http://www.ebi.ac.uk/Radar> — Radar (*Rapid Automatic Detection and Alignment of Repeats*): анализ повторяющихся последовательностей в белковых молекулах от Европейского института биоинформатики.

<http://www.expasy.ch/sprot> — ExPASy (*Expert Protein Analysis System*), Swiss-Prot: одна из лучших баз данных и пакетов программ от Швейцарского института биоинформатики по аминокислотным последовательностям с описанием классификации белков, анализом их функций, физических, биохимических и молекулярных свойств, доменной структуры и посттрансляционных модификаций.

<http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html> — Webcutter: поиск сайтов рестрикции в нуклеотидных последовательностях.

http://www.humgen.nl/primer_design.html — база интернет-ресурсов и программ по конструированию олигонуклеотидных праймеров.

http://www.isrec.isb-sib.ch/software/SAPS_form.html — SAPS (*Statistical Analysis of Protein Sequences*): анализ аминокислотных последовательностей.

<http://www.jcbi.ru/baza/index.shtml> — ссылки на основные молекулярно-биологические базы данных.

<http://medgen.ugent.be/rtpimerdb> — RTPimerDB: база данных праймеров и флуоресцентных проб, используемых при ПЦР в реальном времени.

<http://www.microbial-ecology.net/probebase> — probeBase: база олигонуклеотидных проб для pPHK.

<http://molbiol-tools.ca> — анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей онлайн.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank> — NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) GenBank: американская база данных по анонсированным нуклеотидным последовательностям.

<http://www.oligo.net/> — *OLIGO Primer Analysis Software*: пакет программ для конструирования и анализа праймеров, а также иных нуклеотидных последовательностей.

http://www.operon.com/technical/pcr_primer_design.aspx — конструирование праймеров для стандартной ПЦР, ПЦР в реальном времени, секвенирования ДНК и т.д. («Eurofins MWG Operon», Германия).

<http://pedant.gsf.de> — PEDANT (*Protein Extraction, Description and Analysis Tool*): анализ полных и частично секвенированных геномных последовательностей.

<http://www.pitt.edu/~rsup/OligoCalc.html> — Oligo Calculator: расчет T_m , процентного содержания Г/Ц, молекулярной массы олигонуклеотидных праймеров.

<http://www.predictprotein.org> — PredictProtein: анализ последовательностей, структуры и функций белковых молекул.

<http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html> — REBASE: информация по рестрицирующим эндонуклеазам и метилазам.

<http://www.redasoft.com/rsn/vectorsearch.htm> — *Plasmids Search Engine* от компании «Redasoft» (Канада): поисковая система для генетических векторов.

<http://www.sanger.ac.uk/Projects/Microbes/> — *Sanger Institute Database*: бактериальные геномы.

БАЗЫ ДАННЫХ ПО *Escherichia coli*

<http://cgsc.biology.yale.edu> — CGSC (*Coli Genetic Stock Center*): подробная база данных по генотипам и генетическим картам лабораторных штаммов *E. coli* K-12, поисковая система штаммов.

<http://colibase.bham.ac.uk> — *coliBASE*: база полных геномных последовательностей многих штаммов *Escherichia*, *Shigella* и *Salmonella*, а также некоторые программы для анализа и сравнения нуклеотидных последовательностей.

<http://www.ecocyc.org> — EcoCyc: база данных по геному, транскрипционной регуляции и метаболическим путям *E. coli* K-12 (штамм MG1655).

<http://ecogene.org> — EcoGene: полная информация по нуклеотидным и аминокислотным последовательностям *E. coli* K-12 (штамм MG1655), поиск по названию гена.

<http://ecoli.aist-nara.ac.jp> — японская генетическая база с анализом открытых рамок считывания для штамма W3110.

<http://genprotec.mbl.edu> — GenProtEc (*E. coli genome and proteome database*): подробная информация по нуклеотидным последовательностям *E. coli* K-12 (штамм MG1655), поиск и сравнение аминокислотных последовательностей белков, классификация белков по их молекулярной структуре и механизму катализируемой реакции.

Приложение 3. Молекулярно-биологические базы данных

http://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes — описание наиболее часто используемых штаммов *E. coli* K-12.

<http://regulondb.ccg.unam.mx/index.html> — RegulonDB: база данных по транскрипционной регуляции (регуляторные сайты, промоторы и т.д.) *E. coli* K-12.

<http://salmonella.bio.ucalgary.ca/searchmain.html> — SGSC (*Salmonella Genetic Stock Centre*): электронный каталог используемых в генетических исследованиях штаммов *Salmonella* и бактерий филогенетически близких родов.

<http://www.uni-giessen.de/~gx1052/ECDC/ecdc.htm> — ECDC (*E. coli Database Collection*): подробная информация по геному *E. coli* K-12.

Приложение 4

НЕКОТОРЫЕ КОМПАНИИ — ПОСТАВЩИКИ ХИМИЧЕСКИХ РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ И ОБОРУДОВАНИЯ

<http://www.appliedbiosystems.ru> — сайт российского представительства компании «Applied Biosystems», США (лабораторное оборудование для геномики и протеомики, сервисное обслуживание, расходные материалы и наборы для молекулярно-биологических исследований).

<http://www.biochemmack.ru> — сайт компании «БиоХимМак» (лабораторное оборудование и реагенты для клинико-диагностических лабораторий).

<http://www.biocompare.com> — интернет-ресурс с обширной информацией для покупателей лабораторного оборудования и реактивов, а также различных биологических сервисных услуг.

<http://www.bioline.ru> — сайт компании «БиоЛайн» (диагностическое оборудование и расходные материалы).

<http://www.biosan-nsk.ru> — сайт компании «Биосан» (химические реактивы, ферментные и иммунологические препараты, молекулярно-биологические реактивы).

<http://www.buyersguidechem.de> — подробная информация по химическим реактивам, лабораторным биологическим препаратам и компаниям-поставщикам.

<http://www.chemicalregister.com> — обновляемый алфавитный список реактивов и препаратов (с возможностью поиска по названию или товарному коду) с указанием адресов компаний-поставщиков по всему миру, цен и характеристик (вес, объем, степень очистки и т.д.) поставляемого товара.

<http://www.chemsuppliers.org> — большая база данных по компаниям и фирмам, производящим и поставляющим химические реактивы, ферментные и молекулярно-биологические препараты, фармацевтические средства.

<http://www.chimmed.ru> — сайт компании «Химмед» (реактивы, химическое и микробиологическое оборудование для лабораторий).

<http://www.dia-m.ru> — сайт компании «Диаэм» (лабораторные приборы и оборудование, расходные материалы и химические реактивы от российских и зарубежных производителей).

<http://www.dna-technology.ru> — сайт компании «ДНК-технология» (оборудование и реактивы для ПЦР, полная комплектация ПЦР-лабораторий).

<http://www.elite-genetix.ru> — сайт компании «Элит-Генетикс» (оборудование для генетических и биотехнологических лабораторий).

<http://www.helicon.ru> — сайт компании «Хеликон» (оснащение молекулярно-биологических лабораторий, лабораторное оборудование и реактивы производства компаний «Fermentas», «Invitrogen», «Sigma» и др.).

<http://www.interlabservice.ru> — сайт компании «ИнтерЛабСервис» (наборы реагентов для ПЦР-диагностики, лабораторный пластик и оборудование для ПЦР).

<http://www.khimexpert.ru> — сайт компании «Химэксперт» (молекулярно-биологическое лабораторное оборудование, расходные материалы и реактивы производства компаний «Applied Biosystems», «Ambion», «Invitrogen» и др.).

<http://www.labteh.com> — сайт компании «Лабтех» (универсальное и аналитическое лабораторное оборудование, лабораторная посуда и химические реактивы).

<http://www.merck.ru> — сайт российского представительства немецкой компании «Merck KGaA» (микробиологические питательные среды, химические и биохимические реактивы, наборы для молекулярно-биологических и иммунологических исследований и т.д.).

<http://www.oligos.ru> — сайт компании «ДНК-Синтез» (синтез олигонуклеотидов, в том числе модифицированных, и зондов для ПЦР в реальном времени).

<http://www.rdchemicals.com> — поисковая система химических реактивов и препаратов, а также компаний, производящих реагенты и осуществляющих различные сервисные услуги для научных исследований (например, синтез пептидов и олигонуклеотидов).

<http://www.syntol.ru> — сайт компании «Синтол» (синтез олигонуклеотидов, в том числе модифицированных, реагенты и тест-системы для ПЦР в реальном времени).

- Адсорбция фага 175, 177–178, 180, 182, 184, 241
- Акридин оранжевый 385
- Ампликоны 83–84, 415–416
- Амплификатор 54, 68, 70
- для проведения ПЦР в реальном времени 86, 90–91
- Анаэробные осадки 406, 420, 433
- Анионный детергент 259–260, 375
- Антибиотики 446–447
- ампициллин 135, 145, 149, 213–215, 232, 446
 - канамицин 149, 244, 277, 446
 - приготовление растворов 446–447
 - тетрациклин 135, 145, 149, 214–215, 447
 - хлорамфеникол 145, 188, 217, 298, 447
- Анти-дигоксигенин 348, 400–402, 424
- Ауксотроф 178, 271, 273
- Ауксотрофия 273
- Ахромопептидаза 433
- Ацетат аммония 12, 18, 30, 64, 196, 381, 448–449
- Ацетат натрия 12, 20, 28, 31, 38, 40, 64, 117, 129, 450
- Бактериофаг**
- вирулентный 172
 - умеренный 172, 174, 198, 242
 - CP-51 182, 185
 - EMBL3 236–241
 - M13 193–198, 280–286
 - Mu 242–247, 271
 - SPO1 198–203
 - P1 174–179
 - PBS1 182
 - T4GT7 179–182
 - T7 249–250,
 - λ 131, **172–174**, 237, 242, 291, 297–298
- Бетаин 66, 279
- Биотин-мечение 305, **315–320**, 323, **333–335**, 439
- Блокирующий реагент 336–337, 353, 401, 429–430, 441
- Блоттинг**
- денатурирующих градиентных гелей **399–403**
 - дот 306, 314, 343, **347–354**
 - колоний **341–343**
 - Нозерн (РНК-ДНК) 314, 335, **343–347**, 349
 - Саузерн (ДНК-ДНК) 306, 322, **324–333**, 335, 376
- Бромид цетилметиламмония (СТАВ) 381
- Бромистый этидий **50**, 71, 104–105, **107**, **111**, **113–115**, 126, 345, **396**, **451**
- Бромфеноловый синий **109–111**, 126, 251, 262, 328, 344–345, **395**, **453**
- Бусы Баллатини 403–404
- Бутанол 16, 18–19, 263, 267
- Буферный раствор 451–454**
- гибридизационный **327–330**, **334**, 346, 352, **401**, **429**, 434, **439**
 - для внесения проб НК в лунки геля **107–113**, **115**, 127, **344–345**, **453**
 - для рестрицирующих эндонуклеаз 209–210, 224–225, **454**
 - цитратный **273–275**
 - FGRB 344–345, **451**
 - FSB **158–160**, **315**
 - HSB 344–346, **451–452**
 - PBS 336, 431–432, 436, **452**
 - SSC 327–329, 332–334, 338–346, 351–354, 400–403, **452**
 - STET 31, **452**
 - TAE **107–109**, 111, 114–115, 124–126, 392–395, **453**
 - TBE **107–108**, 127, 263, **368–370**, 401–402, **453**
 - TE 17, 19–20, 45, 122, 200, **453**
 - TES 41–42
 - TFB 158–160
 - TGE 25–26
 - TNE 22–23
 - TNT 439–441

- «Верхний» агар 174–176, 180–181, 183, 188, 195, 198–199, 241, 246
- Визуализация ДНК 326, 396, 427
- «Время путешествия» 389
- Выделение нуклеиновых кислот 10–48, 373–384**
- выделение плазмидной ДНК 23–36
 - – с использованием ДСН 33–34
 - – с использованием кипячения 30–32
 - – с использованием щелочного лизиса 24–30
 - – с помощью коммерческих наборов 34–36
 - выделение тотальной РНК 36–48
 - – с использованием кислого фенола 41–43
 - – с использованием тиоцианата гуанидина и смеси фенол : хлороформ 37–41
 - – с помощью коммерческих наборов 43–46
 - выделение фаговой ДНК 196–197, 200–201
 - выделение хромосомной ДНК 10–23
 - – из цианобактерий (с использованием NaI) 22–23
 - – по Джарреллу (из метаногенных архей) 19–22
 - – по Маку (с использованием 2-бутанола и изопропанола) 18–19
 - – по Мармору 11–18
 - из агарозного геля 116–123
 - – с помощью колонки Elutip-d 120–122
 - – с помощью коммерческих наборов 116–120
 - – электроэлюирование ДНК 122–123
 - из полиакриламидного геля по методу Максама-Гилберта 128–129
- Г/Ц-богатые участки («скобки», «шпильки») 249, 388–389
- Галактозидаза 215–216, 232, 445–446, 460
- α -пептид β -галактозидазы 194, 215
- Гелевые профили 387, 399–400, 410, 418–419
- Гели Spreadex 127
- Гель-электрофорез 103–130, 259–269, 385–406
- Геномные библиотеки 138, 205, 235–247
- представительность геномных библиотек 235, 241
 - скрининг 53, 74, 174, 235, 316, 338
 - создание геномных библиотек 235–247
 - – метод «шоттана» 236–242
 - – мини-Ми клонирование 242–247
- Гетерологичная экспрессия в клетках *E. coli* 248–259
- Гибридаizer 329, 336, 339, 351–352
- Гибридизация**
- бактериальных колоний с радиоактивным ДНК-зондом 337–343
 - ДНК-ДНК (гибридизация по Саузерну) 205, 321–322, 324–333, 380
 - повторная 403, 442
 - РНК-ДНК (гибридизация по Нозерну) 343–354
 - флуоресцентная *in situ* (FISH) 420–443
 - – многоцветные реакции 441–442
 - – CARD-FISH 437–443
- Гидразин 355–356
- Гидрогенотрофные метаногены 413–414
- Градиентный миксер 392–393
- Гуминовые материалы 374–376, 379–382
- ДАФИ – см. флуоресцентные красители (4',6-диамидино-2-фенилиндол)
- Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (дНТФ) 49, 54, 57, 64–67, 76–77, 306–309, 315, 357, 390, 411
- Декстрансульфат 439
- Делеции 271, 276–280, 291–297, 300–302, 458
- Денатурация ДНК 24, 29, 54–56, 64, 69, 78, 81, 120, 309, 311, 318, 321, 328, 342, 352, 365, 388–389
- Денхардта раствор 327, 338, 449, 452
- Дестабилизирующие молекулы 426
- нековалентные катионы 426
 - формамид 426–427, 429–430, 439
- Детекция гибридизационного сигнала 315, 323, 333–337, 345, 348–349, 352–354, 435–442**
- иммунологическая 352–354
 - радиоавтографическая 308, 323, 326, 331, 333–334, 337–343, 346–347, 421
 - флуоресцентная 423–425, 435–440
 - хемилюминесцентная 333–337, 348, 353–354, 400

- хромогенная 323, 333, 348–349
- Дефосфорилирование векторной ДНК **226–228**
- Дигоксигенин-мечение (ДИГ-мечение) **314–316, 319–320, 348–354**, 400, 424
- Дидезоксирибонуклеозидтрифосфаты (ддНТФ, терминаторы) **356–361**, 365–366
- Диметил-дихлорсилан 367–368
- Диметилсульфат 355–356
- Диметилсульфоксид (ДМСО) **66**, 133, 141, **156–162**, 176, 284, 345, 365–366, 437, 456
- Динамика микробных сообществ 406, 413–414,
- Дитиотреитол (ДТТ) 133, 158–159, 251, 282, 308, 315, 383, 391, 403, **447–448, 449**, 454
- Диэтаноламин 336–337
- Диэтиламиноэтил целлюлоза (ДЭАЭ-целлюлоза) 122
- Диэтилпирокарбонат (DEPC) **36–37**, 77, **114**, 356, 382, **434, 447**, 453
- Дезоксирибонуклеаза I (ДНКазы I) **44, 46–47, 276–279**, 454
- ДНКазы 14–16, **44**, 46–47, 73, 199–200, 257, 276–279,
 - обработка дезоксирибонуклеазой I препарата РНК **46–48**
- ДНК-зонд 307, 311, **313–314, 322–326**, 330, 333–334, **337–340**, 346, **348–349**, 352
- ДНК-лигаза 153, 166, 173, 204, **211–212**, 220, **228–232**, 239, 454
- ДНК-мишень 88, 322–324
- ДНК-полимераза 53, **54–57, 63, 65–69**, 72–75, 83, 89–90, 208, 224, **306**, 357, **360–361**
 - *Pfu* **56–57**, 65, **67**, 224, 316
 - T4 **276–279**, 281, 285
 - *Taq* 54, **56–57**, 59, **65, 67**, 69, 76, 78–79, 83, 220, 389–391, 411
 - *Tth* **56, 75–79**, 83, 316
- Додецилсульфат натрия (ДСН, SDS) 13, 24–26, 33, 253, **259–262**, 309, 334, 343, 375–378, 434, **450**
- Домены плавления 388–389
- Желатин 241, 390, 431–433
- Зонды-помощники (хелперы) 426
- Извлечение клеток из почв **375–376**
- Изоакцепторная тРНК 249
- Изоамиловый спирт **10–14**, 20–21, 28, 33–34, 38, 40–42, 46–47, 377, 383
- Изопропанол **18–20**, 22–23, 28–31, 38–40, 120, 226, 262, 378
- Изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) 136, **216**, 248, 250–253, **445**, 459
- Изошизомеры 208–209
- Имидазол 252, **255–260, 449**
- Инактивация
 - ДНК-лигазы 153, 229
 - полинуклеотидкиназы 284
 - РНКаз 36–37, 40–41, 43, 115
 - РНК-полимеразы 315
 - щелочных фосфатаз 226, 228
 - эндогенных пероксидаз 433–434
 - эндонуклеаз рестрикции 226, 454–455
- Инсерции 221, 277–280,
- Интеграция **153–157**, 172–174, 186, 205, 242, 297, **298–302**
- Инфекция фаговая 172, 193, 198, 200, 243, **246–247**
- Исключение бактериофага 173, 205
- «Исчезновение» ДНК 407
- Йодид пропидия 436–437
- Кварцевый порошок для адсорбции молекул ДНК 117–118
- Кинетическая кривая ПЦР в реальном времени 79, **80**, 93, **95–96**,
- Кинирование 305, **312–313**
- Ковалентное соединение ДНК с помощью ДНК-лигазы **211–212, 228–232**
- Кодон 249, 271, 281
 - редко встречающийся 249
- Количественное определение нуклеиновых кислот
 - определение концентрации ДНК по флуоресценции бромистого этидия **50**
 - спектрофотометрическое определение концентрации ДНК и РНК **48–49**
- Количественный анализ транскрипции мРНК
 - методом калибровочного графика 99–100
 - методом прямого сравнения данных 99–101

- Компании-поставщики химических реагентов и препаратов 466–467
- Компетентные клетки **132–143**, 170, 182, 192–193, 199,
- получение химически-компетентных клеток *E. coli* **145–162**
 - – по Ханахану **157–162**
 - – с использованием CaCl_2 **145–150**
 - – с использованием MgCl_2 и CaCl_2 **150–151**
 - – с использованием RbCl и CaCl_2 **151–157**
 - получение электро-компетентных клеток **162–169**, 295–296
 - – с использованием глицерина **163–166**
 - – с использованием сахарозы (для *Pseudomonas* sp.) **166–169**
- Комплементарная ДНК (кДНК) **73–78**, 80, 83, 91, 93, 99, 344, **391–392**
- Комплементация (α) 216, 460
- Конформации ДНК 61, **105**, 140, 317
- Концентрирование продукта ПЦР **71–72**
- Конъюгация **170, 185–191**
- Конъюгированная пероксидаза 427, 439, 441
- Кривая плавления **82–83**, 86, **92**, 95, **96–97**
- Кумасси голубой **251, 260, 262, 265**
- Лактамаза 214, 232, **446**
- Лактозный оперон 194, **216**, 248, 461
- Лауроилсаркозинат натрия (Саркозил) **15, 377**
- Лигирование **220, 227–228**, 230–231, 237, 279
- Лизис клеток **13, 16, 20, 23, 24, 28, 31, 33, 45, 178, 342, 343, 338, 380**
- клостридий 16
 - метаногенных архей **15**, 20, 45
 - почвенных микроорганизмов 343, 375, **431**
 - *E. coli* **13, 24**, 31, 33, 178
- Лизогения **172, 174, 242–243**, 456, 460–461
- Лизоцим 16, 23, 25, 31, 33, 43, 196–197, 257, 425, 429, 433, 440
- «Липкие» концы **208, 217**
- Литический цикл **172, 174**
- Мальтоза 242
- Маркеры **109–112, 125, 135–136, 205, 264–266, 297–298, 302, 399, 413, 416**
- белковые 264–266,
 - ДНК **109–112**, 125, 223, 398, 412, 415
 - контр-селекции 302
 - РНК 115
 - селекции **135–136**, 187, 189, 205, 291, 297–298
- Матрица для ПЦР **54–55, 72, 74, 101**
- ДНК **54–55**, 64, 69, 311, 317–318, 411
 - мРНК **72, 74, 101**
- Мембранные фильтры 158–159, **190, 236, 338–343, 345–348, 432**
- Меркаптоэтанол 38, 251, **260, 267, 403**
- Метаногенные археи **413–414**, 428
- Метилаза **206, 208–209**
- Метилированная ДНК **206, 208–209**
- «Метод отпечатков» 214
- Метод случайных праймеров **306–308, 317**
- Мечение нуклеиновых кислот 305–320**
- нерadioактивное мечение **305, 315–316**
 - – методом случайной затравки **306–308**
 - – ПЦР с нерadioактивной меткой **316–317**
 - – транскрипция *in vitro* (мечение РНК) **319–320**
 - radioактивное мечение **306–308, 312–315**
 - – внесение метки на 5'-конец ДНК **312–313**
 - – методом случайной затравки **306–308**
 - – мечение РНК **314–315**
- Мечение олигонуклеотидных FISH-зондов 422–424
- Микробные сообщества 8, **376**, 406–407, 410, 413–416, 418
- Микроскоп эпифлуоресцентный 436
- Мини-Ми клонирование 242–247**
- Многоцветные реакции FISH 441–442
- Множественность инфицирования **178, 184**
- Мобилизация неконъюгативной плазмиды 186
- Молекулы-мишени **54, 60, 74, 79, 83–84, 322–323, 348, 423, 427–428**
- Молекулярно-биологические базы данных 462–465

Молекулярное клонирование 204–269

- клонирование фрагмента ДНК в составе плазмидных векторов 205–235
- – дефосфорилирование линейаризованной векторной ДНК 220
- – лигирование с помощью ДНК-лигазы 211–212
- – подтверждение клонирования 212–217, 233–234
- – приготовление фрагмента ДНК к клонированию 217–218
- – расщепление ДНК с помощью эндонуклеаз рестрикции 205–210
- – трансформация — см. трансформация плазмидной ДНК 131–144

Молекулярный маяк (*Molecular Beacon*) 84–87, 323

Мулярный коэффициент экстинкции (ϵ) 48

Мультилокусный анализ 410

Мультимеры 230–231

Мутагенез 193, 270–304, 406

- модификация хромосом с помощью фаговых систем рекомбинации 290–304
- – получение маркированных делеций на хромосоме *E. coli* 291–297
- – с помощью Red-системы фага λ 298–302
- получение серийных делеций 276–280
- с помощью химических агентов 272–276
- сайт-направленный мутагенез 280–290
- – метод перекрывающихся ПЦР-продуктов 286–290
- – с использованием ДНК фага M13 (метод Кункеля) 280–286

Мутагены 270–273, 276

Мутант 183, 189, 235, 243, 249, 270–271, 273, 276, 287, 302

- ауксотрофный 235, 270–271, 273, 276

Мутации 53, 86, 139, 143, 174, 270–272, 282, 286–287, 290, 298, 459–462

- индуцированные 270–271, 273, 276
- спонтанные 270, 302

Налидиксовая кислота 188

Неионный детергент 36, 66, 125

Некультивируемые микроорганизмы 8, 376, 420, 422

Нерадиоактивная метка 305, 315–317, 322–323, 333

Никель-нитрилотриуксусная агароза 255

Нитрозогуанидин 270, 272–273, 276

Номенклатура генотипов и фенотипов микроорганизмов 458–461

Нуклеотидная замена 291, 298, 300–301

Обратная транскриптаза 72–76, 392

Оптическая плотность культуры 44–45, 148

Окраска полиакриламидного геля 251, 254, 260, 394, 398–399

- раствором Кумасси 251, 254, 260

- серебром 254, 260, 266, 394, 398–399

Олиго(dT)-праймер 73–74, 76, 315

Олигонуклеотидный зонд 435–436

Оптическая фильтрация флуоресценции красителей 363

Осаждение

- ДНК 12, 19
- – изопропанолом 19
- – этанолом 12
- РНК 30, 47

Отбор мутантов 285–286

Отбор рекомбинантных ДНК при клонировании 212–220

- инаktivация в результате вставки 212–217
- клонирование фрагментов ДНК в определенной ориентации 217–220
- обработка фосфатазой линейной ДНК плазмиды-вектора 220

Отмывка

- мембранного фильтра от несвязанной метки 330–333, 346, 352, 430
- полиакриламидного геля 265

Очистка

- His-tag белков с помощью Ni^{2+} хроматографии 254–259
- препарата ДНК 116–123
- продукта ПЦР 72
- радиоактивного зонда от несвязавшейся метки 310–312

Палиндром 207

Параллельные градиенты (гели) 389

Перевод мкг НК в пмоль 49, 61

- Перенос нуклеиновых кислот на мембранный фильтр 324–326, **328–329**, 345, 350–351, 401–402
- Пермеабилзация клеток 433–434
- Пероксидаза хрена (HRP) 323, 425, 427, **437**
- Перпендикулярные градиенты (гели) 389
- Персульфат аммония 124–125, **449**
- Перхлорат натрия 13, 107, **450**
- Пилотная амплификация 408
- Пиперидин 356
- Питательная среда**
- Hottinger's broth (Хоттингера) 444
 - LB (Лурия–Бертани) 444
 - M9 444
 - NB 168
 - RA 444–445
 - SOB, SOC 445
 - YT (2x) 445
- Плазмида
- конъюгативная 186
 - типы плазмид 185–187
 - pACYC184 217
 - pAS2 136
 - pBR322 137, **212–214**
 - pET-22b(+) 251–252
 - pGEM-T Easy 221
 - pJET1 215
 - pKD46 295
 - pMN-Tc 154
 - pUC18 216
- Полиакриламидный гель (ПААГ) **259–267**
- денатурирующий **259–265**, 395
 - для сиквенса 368–370
 - концентрирующий 260–261
 - разделяющий 260–261
- Поливинилпирролидон (ПВП) 375, 449
- Полилинкер **215–216**, 250
- Полимеразная цепная реакция (ПЦР) 53–101**
- в реальном времени **79–101**
 - – нормализация 98–101
 - – оптимизация 92–98
 - – оценка качества 95–98
 - – параметры амплификации 89–92
 - – типы ПЦР в реальном времени 81–87
 - препаративная 67–68
 - с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) **72–79**
 - состав реакционной смеси для ПЦР 62–66
 - этапы ПЦР 54–55
- Полинуклеотидкиназа 284, 312
- Полиэтиленгликоль (ПЭГ) 17, 230, **450**
- Пороговый цикл $C(T)$ **80**, 92–101
- «Посадка» ПЦР 390
- Праймеры для ПЦР **53–62**, **73–75**, **87–89**, **220–224**, **286–289**
- вторичные структуры («шпильки», димеры) 60
 - для обратной транскрипции 73–75
 - принципы конструирования праймеров **58–62**, 87–89
 - – для клонирования 220–224
 - – для проведения мутагенеза 281, 286–289, 294, **299**
 - – для ПЦР в реальном времени 87–89
 - – для стандартной ПЦР 58–62
- Продукты псевдо-рестрикции 409
- Промотор 194, **248**, 250, 295, 314
- Промывка осадка ДНК этанолом **19–23**, 27, 34, 42, 47, 118, 197, 227, 239, 311
- Проназа 378
- Протеиназа К 10, 378
- Прототроф 271
- Прототрофия 270–271
- Проявка фото(рентгеновской) пленки **331**, **346**
- Прямое флуоресцентное мечение 423
- Радиоавтография **331**, **346**
- Радиоактивная метка **305–315**, 356–357
- Радиоактивность ДНК-зонда специфическая 313–315
- Разрушение клеток **20**, **38**, **379**
- дезинтеграцией в жидком азоте **20**, **38**
 - со стеклянными шариками 147, **379**
- Растворимые полиакриламидные гели 403–404
- Расщепление ДНК эндонуклеазами рестрикции 112**, **205–210**, 224–225
- Реакция секвенирования 365–368
- Реакция серебряного зеркала 399
- Реамплифицирование 405–406
- Рекомбинантные молекулы ДНК 204–205
- Ренатурация ДНК 54, 321
- Рестрикционно-генетическая карта 194–195, 221, **233**, 243, 251, 295

- Рестрикционные фрагменты 306, **410–412**, 415
- Рестрицирующие эндонуклеазы (рестриктазы) 112, 205–210, 224–225, 454–455**
- типы 206–208
 - *DpnI* 293, 297
 - *EcoB* 206–207
 - *EcoRI* 208
 - *HaeIII* 349
 - *HindIII* 206
 - *PstI* 208
 - *Sau3A* 209
 - *SmaI* 207
- Рибозонд 314
- Рибонуклеазы (РНКа́зы) **12–14**, 17, 21, 26, 30, 36–37, 41, 43–44, 75–77, 114–115, 201–202, 314, 319, 382, 454
- Рибосомальная РНК (рРНК) 98–100, 116, **385–387**, 391, 397–399, 407, 411–412, 415–416, 419, 421–422, 426
- Рибозекзонуклеазная активность **12, 75**
- РНК-полимераза 99, **314–315**
- Сайт рестрикции **206–207**, 213, 409
- Самолигирование вектора **226–227**, 240
- Самофлуоресценция микроорганизмов 428
- Светоотражение 429
- Секвенза **362**, 367
- Секвенатор **361–365, 370–371**
- капиллярный **361–362**, 365
 - пластинчатый 361–363
- Секвенирование ДНК 355–372**
- автоматизация 359–362
 - методом химической дегградации (по Максаму–Гилберту) 357
 - ферментативным (дидезоксинуклеотидным) методом 357–359
- Серебром окраска 398–399
- Сефадекс 310–313, 381–383, **424**
- Сине-белая селекция 215–216
- Скорость миграции молекул ДНК в агарозном геле 104–106
- Скрещивание **186–187**
- внутривидовое 187
 - межвидовое 187
 - межродовое 187
- Скрининг геномных библиотек 74, **235–236**, 316, 338
- Случайные олигонуклеотиды (олигомеры) 74–77, 306, 308–310, 316, 391
- Солевые растворы и кислоты 448–451
- Сравнительный анализ микробных сообществ 407–411
- Стрептавидин 316, 323, **335**
- Сушка полиакриламидного геля 265–266
- Т/ДГГЭ-анализ микробных сообществ 385–388**
- Тельца включения 259
- Температура
- оптимальная для гибридизации **330, 366**
 - отжига праймера (T_a) 59
 - плавления ДНК (T_m) 62–63, 321
- Терминатор транскрипции **248–249**
- р-независимый 249
- Термоиндукция 245
- Тетраметилэтилендиамин (TEMED) **124–126**, 261, 266, 394
- Техника «горячего старта» 389–390
- Тиоцианат гуанидина 40, 120, 379
- Тиамидная амплификация сигнала (TSA) 425, **437**
- Точечные мутации 272, 287, 290, 298
- Трансдукция 170–185**
- абортивная 178
 - общая 172
 - специфическая 171
 - у бактерий рода *Bacillus* **182–185**
 - **P1-трансдукция 174–179**
 - **T4-трансдукция 179–182**
- Трансиллюминатор 50, **112**, 116, 348, 396–397
- Транскоңьюганты **186**, 189–190
- Транспозаза 154
- Трансфекция клеток микроорганизмов фаговой ДНК 192–203, 240–241**
- трансфекция клеток *B. subtilis* ДНК бактериофага SPO1 199–203
 - трансфекция клеток *E. coli* ДНК бактериофага M13 193–199
- Трансформация клеток микроорганизмов плазмидной ДНК 131–169**
- **высокоэффективная трансформация 157–162**
 - селекция и анализ трансформантов **212–216**, 233–235, 243, 246–247, 251, 291, 295–298, 337
 - **трансформация в условиях интеграции фрагмента ДНК в хромосому 151–157**

- электрошоковая трансформация (см. электропорация) **162–168**
- этапы трансформации **139–144**
- Трихлоруксусная кислота (ТХУ) **310, 451**
- «Тупые» концы **207–208, 210, 211, 228, 230–232, 276, 279**
- Удаление примесей РНК **30**
- Удлинение праймера **70–71, 366**
- Универсальный прямой праймер **407**
- Урацил-N-гликозилаза **282**
- Уровни определения количества ДНК в полосе **396**
- Участок связывания рибосом **248–249**
- Фаговая бляшка **176, 178, 180–181, 184, 192, 196, 198, 202, 282–283**
- Фаговая сетка **176, 180–181, 246**
- Фаговые системы рекомбинации **290–292**
- Фаговый лизат **174–179, 182–184, 200–201, 243–247**
- Фазмида **243**
- Фактор фертильности (F-фактор) **186**
- Фенол **10, 12–14, 18–21, 26–29, 37–38, 40–41, 47, 49, 123, 201, 227, 284, 378, 384, 447–448**
- Физиологическое разнообразие **418**
- Фикол **113–114, 453**
- Фиксация **236, 265, 322, 325–326, 342, 350–351, 422, 431–432**
 - ДНК (РНК) на мембранных фильтрах **322, 325–326, 342, 350–351**
 - клеток **236, 422, 431–432**
- Филогенетическое разнообразие **386**
- Фильтр мембранный **190, 236, 258, 325–332, 338–343, 346–348, 352, 431–437**
- Фингерпринтинг **386–387**
- Флуоресцеин **68, 86, 305, 316, 363, 425, 427, 439–440**
- Флуоресцеинизотиоцианат (FITC) **423**
- Флуоресцентная метка **80–86, 88–89, 322–323, 360–367, 406, 414, 421–425**
- Флуоресцентно меченые зонды **81, 84–86, 429**
 - для ПЦР в реальном времени **81, 84–86**
 - для флуоресцентной гибридизации *in situ* **428**
- Флуоресцентные красители (флуорохромы) **81–83, 89, 386, 425**
 - бромистый этидий **50, 108, 115, 345, 397,**
 - 4', 6-диамидин-2-фенилиндола (ДАФИ) **385, 424–425, 431, 435, 437–438, 440**
 - йодид пропидия **437**
 - карбоцианин 3 (Cy3) **435**
 - трехкомпонентные **360**
 - BigDye **360, 364**
 - FAM **88–89, 360, 362**
 - IRDye **360, 363, 366**
 - SYBR Green I **81, 393, 396–397**
 - TAMRA **88, 360, 362, 425**
 - TET **88**
- Флуоресцентный сигнал **81, 83, 86, 419, 424, 429**
- Флуоресценции тушение **423**
- Флуоресценция **50, 79–84, 83–84, 89, 93–98, 104, 107, 110–111, 115, 126, 316, 358, 360, 362, 396–397, 406, 410, 415, 423, 427–429, 437, 441**
 - базовый уровень флуоресценции **94**
 - репортерная (пороговая) **80, 83–84, 88, 95**
 - – выбор уровня **95**
 - фоновая **89, 428, 442**
- Формальдегид **115, 343–345, 399, 432–433, 452, 453**
- Формамид **39, 41, 366–369, 388, 393–395, 415, 427–430, 434, 439, 445, 448**
- Фосфатаза щелочная **325–337, 401**
- Фосфорилирование мутагенного олигонуклеотида **284**
- Фрагмент Кленова **306, 308, 318, 361**
- Хемилюминесцентный субстрат **323, 333, 335–337, 348, 353**
- Хлорид кальция **132–133**
- Хлорид магния **133**
- Хлороформ **12–14, 16–22, 26–28, 35, 37–42, 46–47, 64, 123, 175–176, 181, 183–184, 222, 226, 240, 245–246, 284, 349, 378, 380, 384, 446**
- Хранение
 - ДНК **22, 27, 32, 34, 120, 123, 129, 239, 407**
 - клеток *E. coli* **37, 148, 150, 156, 297**
 - – компетентных клеток **136, 147–149, 160, 163–164**
 - мембранных фильтров с образцами **329, 332, 337, 340, 342, 345, 351, 354, 402, 432–433**

- олигонуклеотидных праймеров и зондов 62, 323, 334, 352, **423**
 - рестрицирующих эндонуклеаз **210**, 225
 - РНК **39–43**, 45, 48
 - фагового лизата **176**, 181, 182, 185, 245, 247, 285
- Хромосомные перестройки **290**
- Цитрат натрия **177**, 445
- «Шок» температурный **134**, 140, **143–144**, 147, 153, 155, 162
- «Шотган»-клонирование **235–236**
- Штаммы *E. coli***
- BL21(DE3) **250–251**, 253–254, 258, **456**
 - C600 **156**, 158, **456**
 - CJ236 **283**, 286, **456**
 - DH5 α **32**, 36, 138, 146–147, 149–150, 161, 258, **456**
 - JC7623 **290**
 - LE392 **146**, 207, 240–241, **457**
 - MC1040-2 **244**, 247
 - MC1061 **163**
 - TG1 **32**, 146, 196, 207, 214–215, 232, 234, 285–286, **457**
 - χ 1776 **158**
- Щелочная денатурация плазмидной ДНК**
23
- Экзонуклеазная активность **56–57**, 83, 85, 224, 231, 306, 361, 460
- Экологически значимые градиенты **418**
- Экспрессионная кассета **248–250**
- Экспрессия генов **248–251**, 297
- Экстракция**
- ДНК бутиловым спиртом **18–19**
 - ДНК из денатурирующих градиентных гелей **403**
 - – при разрушении гелей стеклянными бусами **375**, 383, 403–404, 418
 - – с использованием растворимых гелей **403–404**
 - ДНК фенолом : хлороформом : изоамиловым спиртом **20–21**, 28, 33–34, 38
 - ДНК этиловым эфиром **16–17**
 - нуклеиновых кислот из природных образцов **373–384**
 - – прямая экстракция ДНК **376–380**
 - – прямая экстракция РНК **382–384**
- Электропорация **132**, 134, 141, 162–163, 167, 296
- прибор для электропорации **165**
- Электрофорез** **103–116**, 259–267, 395–400, 343–345, 367–368, 388–390
- белков в денатурирующем ДСН-полиакриламидном геле **259–260**
 - нуклеиновых кислот **103–113**
 - – денатурирующий градиентный **389–391**
 - – капиллярный **412**
 - – пульс-электрофорез **104**
 - – термальный градиентный **394–399**
 - – электрофорез ДНК в агарозном геле **103–112**
 - – электрофорез ДНК в полиакриламидном геле **123–127**, 357, 360–361, 367–368
 - – электрофорез РНК в агарозном геле **114–116**
 - – – формальдегидный **344–345**
- Электрофорезный аппарат
- для агарозных гелей **106**
 - для полиакриламидных гелей **126**, 128, 263
- Электрофоретическая подвижность (R_f) **104**
- Энзиматическая амплификация сигнала **425**
- Этиловый эфир **16–17**, 202
- Эффективность**
- амплификации (Е) при ПЦР в реальном времени **80**, 97, 99
 - лигирования **221**, 232, 239, 454
 - мечения ДНК-зонда **311**, 317
 - мутагенеза **276**
 - трансформации **136–138**, 143–144, 149, 162–163, 220, 227, 231, 297, 380
- Термины на английском языке:
- BigDye **360**, 364
- CARD (*catalyzed reporter deposition*) **437**, 439–440, 442
- Cos-концы **172**
- CSPD **333**, 335, 349, 353, **400–402**
- DABCYL **88**

ELIMINase 383

Fab-фрагменты **348**, 353

FAM **360**, 363

FISH (*fluorescence in situ hybridization*) **420–433**, **436–437**, **439–442**

Hfr-штамм (*high frequency of recombination*) 186

His-tag proteins 250, **254–255**, 257–259

House-keeping gene **98**, 100

IRDye **360**, 363, 366

LightCycler 81, **85–86**, 90–91, 97–98

Loading Dye **108**

Molecular beacon 81, **84**, 86–87, 323

NaOH Miniprep 24

NBT/BCIP **348**, 353

ProCipitat 379

RACE (*rapid amplification of cDNA ends*) 74

Random primer 306, 316

Red-система 291

RiboGreen 50

RNAse-OFF 382

RNAse ZAP 382

Scorpions 84–85

Star activity **210**, 225

SYBR Green **81–82**, 84, 86–87, 89, 91–97, 127, 393, 396–397, 436

TAMRA **88**, 360, 362, 425

TaqMan 46, **83–85**, 92–94, 96–98

T-RFLP анализ микробных сообществ **406–419**

Triton X–100 **43**, 63, 257, 391, 453

TRIzol **40**, 45

TSA (*tyramid signal amplification*) **425**, 437

X-gal 148, 194, 216, 222, 232, 271, 337, **445**