

Документ подписан простой электронной подписью
Информация о владельце:
ФИО: Романчук Иван Сергеевич
Должность: Ректор
Дата подписания: 07.10.2022 14:31:40
Уникальный программный ключ:
6319edc2b582ffdacea443f01d5779368d0957ac34f5cd074d81181530452479

О.В. Трофимов, И.В. Пак

МЕТОДЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Практикум для обучающихся по направлению
06.04.01 Биология (магистерская программа «Биотехнология»)

Тюмень

2021

УДК: 577.21

ББК: Е04я73

Аз: П13

Трофимов О.В., Пак И.В. Методы генетической инженерии: Практикум для обучающихся по направлению 06.04.01 Биология (магистерская программа «Биотехнология»). Тюмень: Вектор Бук, 2021, 50 с.

Практикум предназначен для ознакомления обучающихся с основными методами генетической инженерии. Издание содержит описание методик, направленных на создание искусственных генетических конструкций и молекулярное клонирование, а также необходимые теоретические пояснения.

Рекомендовано к печати Учебно-методической комиссией Института биологии ТюмГУ.

РЕЦЕНЗЕНТЫ: заведующий кафедрой ботаники, биотехнологии и ландшафтной архитектуры Тюменского государственного университета, д.с.-х.н., профессор Н.А. Боме;
заместитель директора по научной работе ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной энтомологии и арахнологии», д.б.н., профессор В.Н. Домацкий.

© ФГАОУ ВО Тюменский государственный университет, 2021

© О.В. Трофимов, И.В. Пак, 2021

Введение

В настоящее время одним из наиболее значимых и широко применяемых кластеров экспериментальной генетики является **генетическая инженерия**. Генетическая инженерия представляет собой совокупность методов и приемов, позволяющих конструировать молекулы нуклеиновых кислот, а также организмы с заданными наследственными свойствами.

К основным достижениям, которые обусловили становление и успешное развитие генетической инженерии, можно отнести следующие:

- доказательство в 1944 г. О. Эйвери, К. МакЛеодом и М. МакКарти роли ДНК как носителя генетической информации и открытие явления трансформации у прокариот;
- построение в 1953 г. Дж. Уотсоном и Ф. Криком модели ДНК;
- открытие в 1956 г. М. Морзе и супругами Э. и Дж. Ледерберг явления специфической трансдукции бактериальных генов умеренными фагами;
- выяснение в 1961 г. Ф. Жакобом и Ж. Моно механизмов регуляции экспрессии отдельных генов.
- расшифровка в 1961-1966 гг. рядом ученых (Р. Холли, Х. Кораной, М. Ниренбергом и др.) генетического кода и экспериментальное подтверждение его универсальности;
- открытие в 1960-х гг. структуры элементов, контролирующих действие генов и синтез белка: промоторов, операторов, сайтов связывания рибосом, терминаторов транскрипции и трансляции и т.д.;
- обнаружение в 1962 г. В. Арбером систем рестрикции-модификации ДНК у бактерий, а также выделение в 1970 г. Х. Смитом первой

- эндонуклеазы рестрикции; открытие и выделение ряда других ДНК-связывающих ферментов: полимераз, лигаз, экзонуклеаз и пр.;
- разработка простых методов выделения высокоочищенных препаратов плазмидной и вирусной ДНК;
 - разработка эффективных методов введения в чувствительные клетки молекул плазмидной и вирусной ДНК в биологически активной форме, обеспечивающей их репликацию и экспрессию кодируемых ими генов;

Объединение в начале 1970-х гг. до того независимо разрабатываемых методов позволило создать современную **стратегию генетической инженерии**, суть которой заключается в следующем:

1. В молекулу ДНК, способную к автономной репликации в клетке (плазмиду или вирусную ДНК), ферментативно встраивают фрагмент ДНК изучаемого организма или искусственно синтезированные фрагмент ДНК.
2. Полученные таким образом молекулы (**гибридные ДНК**), вводят, в чувствительные клетки, где они реплицируются, размножая в своем составе встроенный фрагмент ДНК (**клонирование ДНК**).
3. Отбирают клоны клеток или вирусов, содержащих искомые гибридные ДНК.

Генетическая инженерия значительно расширила экспериментальные границы молекулярной генетики, позволив вводить в различные типы клеток чужеродную ДНК. Помимо возможности выявления общебиологических закономерностей организации и реализации генетической информации в различных организмах, данный подход открыл перспективы создания принципиально новых микробных продуцентов биологически активных веществ, а также животных и растений, несущих функционально активные чужеродные гены. Более того, появилась возможность

искусственно создавать гены, кодирующие химерные полипептиды, обладающие свойствами двух или более природных белков, а также полипептиды с заданной аминокислотной последовательностью. Все это произвело революцию в биологической науке и дало мощный импульс развитию биотехнологии.

1. Подготовка модельного фрагмента ДНК для клонирования в составе плазмидного вектора

Наиболее простым и популярным способом получения гибридных молекул ДНК является **рестриктазно-лигазный метод**. Первые гибридные молекулы ДНК получили этим методом С. Коэн с сотрудниками в 1973 г.

Сущность подхода заключается в следующем (рис.1):

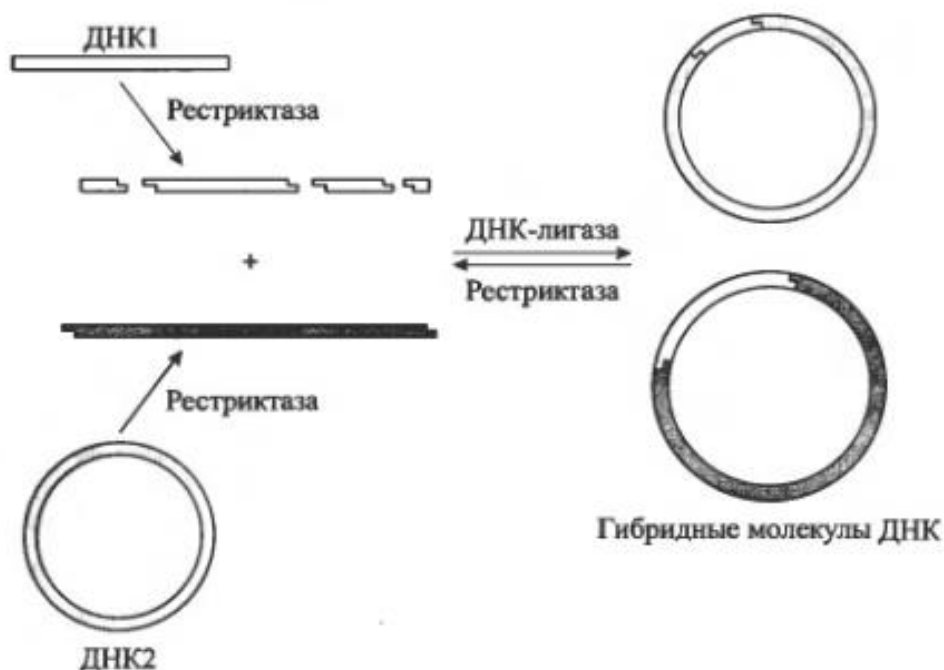


Рис. 1. Схема рестриктазно-лигазного метода получения гибридных молекул ДНК.

1. Из организма – донора генов – экстрагируют нативную ДНК (ДНК1) и подвергают ее гидролизу с помощью эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы) с образованием определенного набора ДНК-фрагментов.
2. Той же рестриктазой специфически разрезают ДНК2 (вектор); при этом образуются «липкие» (взаимокомплементарные) концы по отношению к концам фрагментов ДНК1.
3. Препараты молекул ДНК1 и ДНК2, гидролизованных одной и той же рестриктазой, смешивают.
4. С помощью ДНК-лигазы производят ковалентное связывание фрагментов ДНК.

Данный метод не ограничивается использованием в каждом конкретном случае лишь одной рестриктазы. Комбинируемые молекулы ДНК могут иметь разные концы, генерируемые двумя рестриктазами. В этом случае фрагмент объединяются с вектором в строго определенной ориентации.

В последние годы процедура получения гибридных молекул ДНК и клонирования целевых фрагментов значительно упростилась благодаря появлению метода амплификации сегментов ДНК в полимеразной цепной реакции (см. 1.2).

1.1. Выделение хромосомной ДНК из клеток эукариот (на примере *Drosophila melanogaster*)

Выделение хромосомной ДНК из биологических образцов является необходимым этапом в клонировании целевых фрагментов генома. ДНК эукариот может быть выделена из любого типа тканей и клеток, содержащих ядра. Выбор метода выделения ДНК в каждом конкретном случае зависит от природы и размеров выделяемых молекул, вида и свойств имеющегося биологического образца, а также

особенностей дальнейшего использования выделяемого материала и поставленных экспериментальных задач.

Сущность большинства методов выделения ДНК заключается в следующем. На первой стадии производят механическое разрушение и/или лизис клеток. Затем из образца удаляют фрагменты клеточных органелл и мембран. После этого препарат могут подвергать дополнительным стадиям очистки от белков и РНК. Затем, как правило, проводят спиртовое осаждение молекул ДНК и их растворение в определенном буфере. В результате, получают раствор ДНК, содержащий небольшое количество, в основном, низкомолекулярных примесей.

Приготовление растворов

4M NaCl

NaCl – 11,7 г

H₂O – до 50 мл

1M сахароза

сахароза – 17,1 г

H₂O – до 50 мл

1M трис

трис – 6,05 г

H₂O – до 50 мл

1M трис-HCl (pH=8,0)

трис – 6,05 г

H₂O – до 50 мл

pH доводить соляной кислотой

10M NaOH

NaOH – 20 г

H₂O – до 50 мл

500мМ ЭДТА (рН=8,0)

ЭДТА – 9,3 г

H₂O – до 50 мл

рН доводить 10М NaOH

10% ДСН

ДСН – 5 г

H₂O – до 50 мл

5М ацетат калия (рН=5,3)

ацетат калия – 14,7 г

H₂O – до 50 мл

рН доводить ледяной уксусной кислотой

Экстрагирующий буфер

Компонент	Исходная концентрация	Конечная концентрация	Добавляемый объем (на 50 мл)
NaCl	4М	100мМ	1,25 мл
Сахароза	1М	200мМ	10 мл
Трис	1М	100мМ	5 мл
ЭДТА (рН=8,0)	500мМ	50мМ	5 мл
ДЭПК	100%	0,5%	250 мкл
ДСН	10%	0,5%	2,5 мл
H ₂ O			26 мл

Буфер T₁₀E₁ (рН=8,0)

Компонент	Исходная концентрация	Конечная концентрация	Добавляемый объем (на 50 мл)
Трис-НСl (рН=8,0)	1М	10мМ	500 мкл
ЭДТА (рН=8,0)	500мМ	1мМ	100 мкл
H ₂ O			49,4 мл

Ход работы

Экстракция

1. Поместить образец (примерно 10 мух) в пробирку и прилить 200 мкл экстрагирующего буфера.
2. Растереть образец пестиком.

3. Инкубировать при 65°C в течение 30 минут.

Удаление дебриса

4. Добавить 300 мкл 5М ацетата калия (pH=5,3) и перемешать.

5. Инкубировать на льду в течение 30 минут и перемешать.

6. Центрифугировать в течение 10 минут при 12000 об./мин.

7. Перенести супернатант в новую пробирку.

Спиртовое осаждение ДНК

8. Добавить 500 мкл 96% этанола и перемешать.

9. Инкубировать при комнатной температуре в течение 5 минут.

10. Центрифугировать в течение 10 минут при 12000 об./мин. и удалить супернатант.

Промывка и растворение осадка

11. Добавить к осадку 500 мкл 70% этанола и перемешать.

12. Центрифугировать в течение 2 минут при 12000 об./мин. и удалить супернатант.

13. Высушить осадок и растворить в 50 мкл буфера T₁₀E₁ (pH=8,0).

1.2. Синтез фрагмента ДНК с использованием полимеразной цепной реакции

Фрагмент ДНК, который в дальнейшем необходимо клонировать в составе гибридной молекулы, удобнее всего получать с помощью **полимеразной цепной реакции (ПЦР)**.

Полимеразная цепная реакция – это эффективный метод синтеза *in vitro* большого числа копий специфической нуклеотидной последовательности. Данный подход был разработан в 1985 г. в лаборатории К. Мюллера. В состав реакционной смеси для ПЦР входят следующие компоненты:

1. Матрица. Представляет собой молекулу ДНК, содержащую последовательность, размножаемую в ходе реакции. В качестве

матрицы в ПЦР может выступать практически любая ДНК (двухцепочечная или одноцепочечная, кольцевая или линейная).

2. Термостабильная ДНК-зависимая ДНК-полимераза – фермент, осуществляющий в ходе реакции синтез дочерних цепей ДНК путем последовательного присоединения нуклеотидов, комплементарных матрице. Первоначально в ПЦР использовали фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*. Однако фермент денатурировал и терял свою активность во время нагревания, и после каждого цикла реакции необходимо было вносить в реакционную смесь его новую порцию. Поэтому со временем стали применяться термостабильные ДНК-полимеразы, выделенные из термофильных бактерий и сохраняющие свою активность даже после многократных нагреваний реакционной смеси. Наиболее часто используются Taq-полимераза, выделенная из *Thermus aquaticus*, Tth-полимераза – из *Thermus thermophilis*, Pfu-полимераза – из *Pyrococcus furiosus* и Pwo-полимераза – из *Pyrococcus woesei*.

3. Праймеры – два синтетических олигодезоксинуклеотида (длиной порядка 15-30 нуклеотидов), каждый из которых комплементарен одному из 3'-концов противоположных цепей целевого (размножаемого) фрагмента матричной ДНК. Праймеры выступают в качестве затравок для синтеза дочерних цепей ДНК: с 3'-конца каждого из них начинается последовательное включение нуклеотидов во вновь синтезируемые ДНК-полимеразой комплементарные копии. Для эффективного использования праймеров в полимеразной цепной реакции при их подборе необходимо руководствоваться следующими требованиями:

- Праймер должен образовывать как можно меньше внутримолекулярных (приводящих к возникновению шпилек) и межмолекулярных (приводящих к возникновению димеров)

водородных связей, то есть иметь как можно меньше участков самокомплементарности.

- В паре праймеров также должны отсутствовать участки взаимокмплементарности.
- Соотношение (G+C)/(A+T) в последовательности праймера должно быть как можно ближе к 1.
- Избегать присутствия в последовательности праймера протяженных полипуриновых и полипиримидиновых участков.
- Избегать наличия поли(A)-, поли(T)-, поли(G)-, поли(C)-последовательностей.
- Избегать участков, содержащих палиндромы.
- Температуры отжига обоих праймеров должны быть близки; оптимальная температура отжига праймеров – порядка 50-70°C.

Расчет приблизительной температуры отжига (гибридизации) праймера с матрицей можно производить по формуле Уоллеса:

$$T_{\text{отж.}} = 2(A+T) + 4(G+C);$$

где $T_{\text{отж}}$ – температура отжига праймера [°C]; A, T, G, C – количество соответствующих нуклеотидов в последовательности праймера.

4. Дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфаты (dNTP's). Являются субстратами для ДНК-полимеразы. Фермент использует их для построения дочерних цепей ДНК в ходе реакции. За исключением особых случаев, добавляются четыре типа dNTP's: dATP, dTTP, dGTP, dCTP.

5. Ионы Mg^{2+} . Являются кофакторами для ДНК-полимераз. Обычно добавляются в реакционную смесь в виде хлорида магния ($MgCl_2$). ДНК-полимеразы проявляют высокую чувствительность к концентрации ионов Mg^{2+} : уменьшение концентрации снижает эффективность ПЦР, увеличение концентрации повышает эффективность, но снижает специфичность реакции.

6. Буфер. Поддерживает pH реакционной смеси на уровне, соответствующем оптимуму ферментативной активности ДНК-полимеразы. Обычно используются буферы на основе трис-HCl.

Типичная ПЦР-амплификация (рис. 2) состоит в многократном (30-40 циклов) повторении следующих трех стадий:

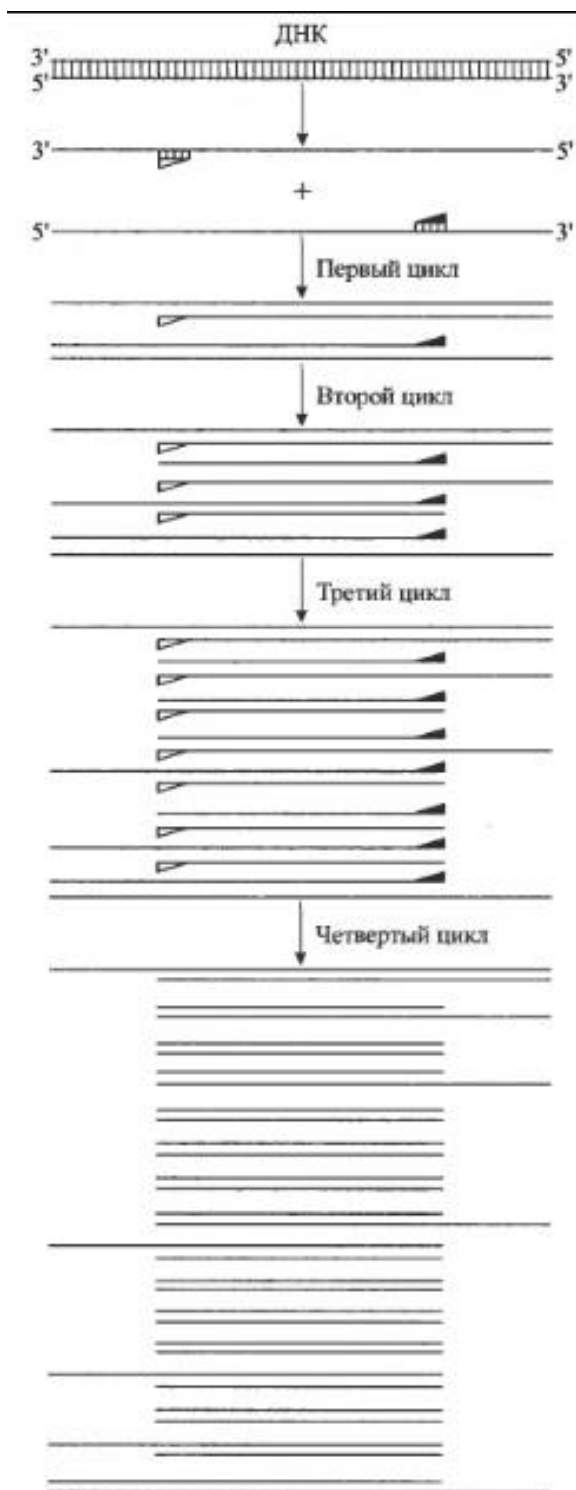


Рис. 2. Схема амплификации фрагмента ДНК с помощью ПЦР.

1. Денатурация матриц. На этой стадии ПЦР реакционную смесь нагревают до температуры 88-95°C, в результате чего происходит разрыв водородных связей между комплементарными цепями – тепловая денатурация ДНК.

2. Отжиг (гибридизация) праймеров. Температуру смеси понижают до значения, соответствующего температуре отжига праймеров, при этом происходит гибридизация (комплементарное связывание) праймеров с матрицей.

3. Элонгация цепей ДНК. Температуру реакционной смеси повышают до оптимума температурной активности фермента (например, 70-75°C для Таq-полимеразы). Благодаря этому происходит синтез комплементарных цепей ДНК, инициируемый 3'-концами праймеров.

В первом цикле ПЦР каждая из вновь синтезированных цепей оказывается удлиненной с 3'-конца, то есть имеет гораздо большую длину, чем расстояние между 5'-концами праймеров. Такие цепи называют продуктами первого цикла (или «длинными матрицами»). Во втором цикле реакции двухцепочечную ДНК, состоящую из исходной и вновь синтезированной цепей, опять подвергают денатурации, а затем отжигают с праймерами. В результате чего матрицами для синтеза комплементарных копий служат не только исходные матричные цепи, но и продукты первого цикла, причем копирование продуктов первого цикла приводит уже к образованию укороченных цепей (конечных продуктов ПЦР), длина которых равна расстоянию между праймерами. В третьем цикле эти укороченные цепи также могут служить матрицами для синтеза комплементарных копий. Таким образом, с каждым последующим циклом будет происходить синтез преимущественно коротких продуктов реакции, соответствующих размножаемой последовательности. Количество конечных продуктов

ПЦР в ходе реакции увеличивается экспоненциально, его можно рассчитать по формуле:

$$x = x_0 \cdot (2^n - n - 1);$$

где x – конечное количество цепей коротких ПЦР-продуктов; x_0 – количество исходных матричных цепей, добавленных в реакционную смесь; n – число циклов реакции.

Необходимо понимать, что реальное количество образованных в результате реакции продуктов всегда будет ниже расчетного вследствие ряда причин: неспецифического синтеза, постепенной инактивации фермента, понижения концентрации субстратов, а также повышения концентрации побочного продукта реакции (пирофосфата) и др.

Метод ПЦР получил широкое распространение и, в настоящее время, является одним из центральных методов молекулярной генетики. ПЦР используют для анализа индивидуальных вариаций нуклеотидных последовательностей в определенных локусах, выявления, а также искусственного получения мутаций, синтеза генов из отдельных олигонуклеотидов, повышения эффективности клонирования целевых последовательностей изучаемых геномов и их прямого секвенирования, для детекции патогенных микроорганизмов и т.д.

Приготовление растворов

10mM dNTP's

Компонент	Исходная концентрация	Конечная концентрация	Добавляемый объем (на 1 мл)
dATP	100mM	10mM	100 мкл
dCTP	100mM	10mM	100 мкл
dGTP	100mM	10mM	100 мкл
dTTP	100mM	10mM	100 мкл
H ₂ O			600 мкл

Ход работы

1. Приготовить общую реакционную смесь:

Компонент	Исходная концентрация	Конечная концентрация	Добавляемый объем (на 200 мкл)
ПЦР-буфер	10x	1x	20 мкл
MgCl ₂	25мМ	2,5мМ	20 мкл
dNTP's	10мМ	0,8мМ	16 мкл
Прямой праймер	25мкМ	0,5мкМ	4 мкл
Обратный праймер	25мкМ	0,5мкМ	4 мкл
Тақ-ДНК-полимераза	5 ед./мкл	0,05 ед./мкл	2 мкл
H ₂ O			124 мкл

2. Поместить в каждую пробирку по 1 мкл препарата хромосомной ДНК *Drosophila melanogaster*, в контроль – 1 мкл воды.
3. Добавить в каждую пробирку по 19 мкл общей реакционной смеси и перемешать.
4. Поместить пробирки в амплификатор.
5. Провести ПЦР в следующем температурном режиме:

94°С / 7 минут

94°С / 20 секунд
52°С / 30 секунд
72°С / 2 минуты } 40 циклов

72°С / 5 минут

1.3. Очистка фрагмента ДНК с помощью электрофореза и последующей элюции из агарозного геля

Препарат целевого фрагмента ДНК, полученный в ходе полимеразной цепной реакции, всегда содержит некоторое количество примесных молекул ДНК: продукты неспецифического синтеза, а также праймеры, неизрасходованные в ходе ПЦР. Поэтому перед

клонированием ДНК-фрагмент очищают с помощью электрофореза и последующей элюции из геля.

Электрофорез – это метод разделения биологических макромолекул под действием электрического поля. Его принцип заключается в следующем. Исследуемый препарат (раствор белка, ДНК или РНК) вносят в лунку (слот), расположенную у края **геля** – полужидкой среды с сетчатой структурой. Находящиеся в растворе макромолекулы обладают некоторым суммарным зарядом, и, при пропускании электрического тока через гель, они перемещаются в электрическом поле. Структура геля препятствует свободной миграции молекул, поэтому скорость их движения обратнопропорциональна их размерам. Молекулы одинакового размера (и одинакового заряда) движутся с равной скоростью, образуя в геле дискретные невидимые полосы. Постепенно исходный препарат, состоящий из различных макромолекул, разделяется на зоны, распределенные по длине гелевой пластины. За ходом электрофореза следят по перемещению в геле **лидирующего красителя** – заряженного низкомолекулярного вещества, которое смешивают с исследуемым препаратом перед началом электрофореза. Если образец представляет собой дискретный набор макромолекул разного размера, то после электрофореза получается набор четких полос, расположенных одна под другой. По интенсивности окраски полос можно судить о концентрации макромолекул в образце.

Для разделения молекул ДНК методом электрофореза используют два типа гелей:

1. Полиакриламидный гель. Применяют для анализа коротких фрагментов ДНК. Гель образуется при сополимеризации акриламида, формирующего линейные полимерные волокна, и метиленбисакриламида, формирующего поперечные «сшивки» между

этимися волокнами. Реакция полимеризации инициируется добавлением персульфата аммония; катализатором служит N,N,N,N-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД). Размер пор в геле и его разрешающая способность зависят от концентрации акриламида и соотношения между количеством акриламида и метиленбисакриламида (табл. 1).

2. Агарозный гель. Применяют для электрофоретического разделения более крупных фрагментов ДНК (от 400-500 п.н. до нескольких десятков тысяч п.н.). Гель образуется путем конденсации волокон агарозы – полисахарида, представляющего собой особо чистую фракцию агара. Размер пор и разрешающая способность геля зависят от концентрации агарозы (табл. 1).

Таблица 1. Зависимость длины разделяемых фрагментов ДНК от концентрации агарозы или акриламида

Концентрация агарозы, %	Длина фрагментов, п.н.	Концентрация акриламида, %	Длина фрагментов, п.н.
0,3	5000-60000	3,5	1000-2000
0,6	1000-20000	5,0	80-500
0,9	500-700	8,0	60-400
1,2	400-600	12,0	40-200
1,5	200-300	15,0	25-150
2,0	100-200	20,0	6-100

Для определения молекулярной массы (длины) разделенных фрагментов, одновременно (в одном из слотов) проводят электрофорез **маркерных фрагментов** ДНК с заведомо известными молекулярными массами. Для детекции (визуализации) фрагментов нуклеиновых кислот в геле после электрофореза используют флуоресцентные (бромистый этидий, акридиновый оранжевый и др.) и нефлуоресцентные (метиленовый синий, толуидиновый синий и др.) красители.

Приготовление растворов

1,5% агароза (легкоплавкая)

агароза – 1,5 г

H₂O – до 100 мл

10x TBE буфер

Компонент	Исходная концентрация	Конечная концентрация	Добавить (на 1 л)
Трис	сухой	890mM	107,81 г
Борная кислота	сухой	890mM	55 г
ЭДТА (pH=8,0)	500mM	20mM	40 мл
H ₂ O			до 1 л

1x TBE буфер

Компонент	Исходная концентрация	Конечная концентрация	Добавляемый объем (на 1 л)
TBE буфер	10x	1x	100 мл
H ₂ O			900 мл

0,0002% бромистый этидий

Внимание!!! Бромистый этидий обладает выраженным мутагенным и канцерогенным действием. Работать с ним необходимо в перчатках с соблюдением всех мер предосторожности, избегая попадания на кожу и слизистые оболочки!

Компонент	Исходная концентрация	Конечная концентрация	Добавляемый объем (на 1 л)
Бромистый этидий	0,1%	0,0002%	200 мкл
H ₂ O			99,8 мл

70% этанол

Компонент	Исходная концентрация	Конечная концентрация	Добавляемый объем (на 50 мл)
Этанол	96%	70%	36,5 мл
H ₂ O			13,5 мл

Ход работы

Проведение электрофореза продуктов ПЦР

1. Подготовить заливочный столик, установить гребенку.
2. Довести раствор агарозы до кипения и налить его на поверхность столика (слоем 4-5 мм).
3. После формирования геля вытащить гребенку, предварительно смочив зубцы 1х TBE буфером.
4. Залить в электрофоретическую камеру 1х TBE буфер, поместить в нее гель.
5. Приготовить образцы и внести их в слоты геля:

№ слота	Компонент				
	ДНК-маркер (500 нг/мкл)	ПЦР-продукты	ПЦР-продукты (контроль)	T ₁₀ E ₁	5х буфер для образцов
1	1 мкл	–	–	11 мкл	3 мкл
2	–	–	12 мкл	–	3 мкл
3-15	–	12 мкл	–	–	3 мкл

6. Провести электрофорез при напряженности поля 10 В/см.

Извлечение участка геля, содержащего необходимый фрагмент ДНК

7. Гель после электрофореза разрезать на две части (одна часть должна содержать дорожки 1-3, другая часть – дорожки 4-15).
8. Окрасить первую часть геля 0,0002% бромистым этидием.
9. Состыковать окрашенную и неокрашенную части, облучить ультрафиолетовым светом.
10. Оценить массу необходимого фрагмента ДНК (ПЦР-продукта).
11. Ориентируясь по окрашенной части геля, вырезать из неокрашенной участок, содержащий данный фрагмент ДНК.

Обработка фенолом и хлороформом

12. Вырезанный участок геля перенести в пробирку и инкубировать в термостате при 99°C до полного расплавления.

13. Добавить 1 объем буфера T₁₀E₁ (pH=8,0), повторно расплавить и перемешать.
14. Добавить 1 объем фенола, насыщенного T₁₀E₁ (pH=8,0).
15. Перемешивать на шейкере в течение 1 минуты.
16. Центрифугировать в течение 10 минут при 12000 об./мин.
17. Водную фазу перенести в другую пробирку, а к исходному препарату добавить еще 1 объем буфера T₁₀E₁ (pH=8,0).
18. Перемешивать на шейкере в течение 1 минуты.
19. Центрифугировать в течение 10 минут при 12000 об./мин.
20. Отобрать водную фазу и добавить к отобранной в предыдущий раз.
21. Добавить 0,6 объема фенола, насыщенного T₁₀E₁ (pH=8,0).
22. Перемешивать на шейкере в течение 1 минуты.
23. Центрифугировать в течение 10 минут при 12000 об./мин.
24. Водную фазу перенести в другую пробирку и добавить 1 объем хлороформа.
25. Перемешивать на шейкере в течение 1 минуты.
26. Центрифугировать в течение 2 минут при 12000 об./мин.
27. Водную фазу перенести в новую пробирку.

Спиртовое осаждение ДНК

28. Добавить к препарату 1/9 объема 4М NaCl (до 400мМ) и 3 объема 96% этанола.
29. Выдержать при -20°C в течение 2 часов.
30. Центрифугировать в течение 10 минут при 12000 об./мин. и удалить супернатант.
31. Промыть образец в 500 мкл 70% этанола.
32. Центрифугировать в течение 10 минут при 12000 об./мин. и удалить супернатант.
33. Высушить образец на воздухе.

34. Растворить осадок в воде до концентрации ~ 25 нг/мкл (с учетом 50% потерь при элюции).

1.4. Ферментативные модификации концов ДНК-фрагмента

Фрагменты ДНК, полученные в результате полимеразной цепной реакции с использованием Таq-полимеразы, имеют следующие особенности строения концов:

1. Выступающие 3'-концы. Большинство ДНК-полимераз, в том числе, Таq-полимераза, помимо 5'→3'-полимеризующей и 5'→3'-эксонуклеазной активности, обладают терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазной активностью. Вследствие наличия у Таq-полимеразы данной активности фермент способен нематрично присоединять нуклеотиды к 3'-концу синтезированной цепи (чаще всего присоединяется один нуклеотид – преимущественно адениловый). Из-за отсутствия у данного фермента 3'→5'-эксонуклеазной (корректирующей) активности свободный 3'-концевой нуклеотид не может быть отщеплен. Поэтому при использовании Таq-полимеразы в ПЦР все конечные продукты реакции (фрагменты ДНК) имеют выступающие на один нуклеотид 3'-концы.

2. Дефосфорилированные 5'-концы. Отсутствие фосфатных групп на 5'-концах ПЦР-продуктов связано с тем, что праймеры для ПЦР синтезируют химическим путем (в основном, фосфотриэфирным методом). Полученные этим способом олигонуклеотиды не содержат концевых фосфатных групп. В результате удлинения таких праймеров в ходе ПЦР образуются фрагменты ДНК с дефосфорилированными 5'-концами.

Для того, чтобы осуществить лигирование такого ПЦР-продукта с дефосфорилированным вектором, имеющим «тупые» концы, необходимо проведение следующих предварительных процедур:

1. Удаление выступающих 3'-концов. Для этого обычно используют ДНК-полимеразы, обладающие 3'→5'-экзонуклеазной активностью (в частности, Pfu-полимераза, Pwo-полимераза, ДНК-полимераза фага T4, фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*). За счет наличия корректирующей активности фермент способен отщеплять некоторое количество нуклеотидов с 3'-конца ДНК-фрагмента и вновь присоединять комплементарные нуклеотиды (при условии наличия их в реакционной смеси) к этому концу благодаря 5'→3'-полимеризующей активности. В результате проведения такой реакции получают ПЦР-продукт, несущий «тупые» концы.

2. Фосфорилирование 5'-концов. Фосфорилирования 5'-концов ПЦР-продукта обычно проводят с помощью полинуклеотидкиназы фага T4. Донором фосфата служит АТФ, а одним из продуктов реакции является АДФ.

1.4.1. Удаление выступающих 3'-концов фрагмента с использованием ДНК-полимеразы фага T4

Приготовление растворов

2mM dNTP's

Компонент	Исходная концентрация	Конечная концентрация	Добавляемый объем (на 10 мкл)
dNTP's	10mM	2mM	2 мкл
H ₂ O			8 мкл

Ход работы

Проведение реакции

1. Приготовить реакционную смесь:

Компонент	Исходная концентрация	Конечная концентрация	Добавляемый объем (на 20 мкл)
Буфер	5x	1x	4 мкл
dNTP's	2mM	0,1mM	1 мкл

ДНК-фрагмент	~ 25 нг/мкл	~ 12,5 нг/мкл	10 мкл (~ 250 нг)
T4-ДНК-полимераза	5 ед./мкл	0,05 ед./мкл	0,2 мкл (1 ед.)
H ₂ O			4,8 мкл

2. Инкубировать в течение 20 минут при 11°C.
3. Инкубировать в течение 5 минут при комнатной температуре.

Фенольная депротеинизация и спиртовое осаждение ДНК

4. Добавить 25 мкл буфера T₁₀E₁ (pH=8,0) и 5 мкл 4М NaCl (до 400мМ).
5. Добавить 50 мкл фенола, насыщенного T₁₀E₁ (pH=8,0).
6. Перемешивать на шейкере в течение 1 минуты.
7. Центрифугировать в течение 10 минут при 12000 об./мин.
8. Водную фазу перенести в другую пробирку и добавить 50 мкл хлороформа.
9. Перемешивать на шейкере в течение 1 минуты.
10. Центрифугировать в течение 2 минут при 12000 об./мин.
11. Водную фазу перенести в новую пробирку.
12. Добавить 3 объема 96% этанола.
13. Выдержать при -20°C в течение 2 часов.
14. Центрифугировать в течение 10 минут при 12000 об./мин. и удалить супернатант.
15. Промыть образец в 500 мкл 70% этанола.
16. Центрифугировать в течение 10 минут при 12000 об./мин. и удалить супернатант.
17. Высушить образец на воздухе.
18. Растворить осадок в 10 мкл воды (до концентрации ~ 22,5 нг/мкл с учетом 10% потерь при фенольной депротеинизации и спиртовом осаждении).

1.4.2. Фосфорилирование 5'-концов фрагмента с использованием полинуклеотидкиназы фага Т4

Приготовление растворов

10мМ АТР

Компонент	Исходная концентрация	Конечная концентрация	Добавляемый объем (на 20 мкл)
АТР	100мМ	20мМ	2 мкл
H ₂ O			18 мкл

1М ДТТ

ДТТ – 154,3 мг

H₂O – до 1 мл

80мМ ДТТ

Компонент	Исходная концентрация	Конечная концентрация	Добавляемый объем (на 1 мл)
ДТТ	1М	80мМ	80 мкл
H ₂ O			920 мкл

Ход работы

Проведение реакции

1. Приготовить реакционную смесь:

Компонент	Исходная концентрация	Конечная концентрация	Добавляемый объем (на 20 мкл)
Буфер	10x	1x	2 мкл
АТР	10мМ	1мМ	2 мкл
ДТТ	80мМ	5мМ	1,25 мкл
ДНК-фрагмент	~ 22,5 нг/мкл	~ 11,25 нг/мкл	10 мкл (~ 225 нг)
Т4-полинуклеотидкиназа	30 ед./мкл	0,5 ед./мкл	0,33 мкл (10 ед.)
H ₂ O			4,42 мкл

2. Инкубировать в течение 30 минут при 37°C.

Фенольная депротеинизация и спиртовое осаждение ДНК

3. Добавить 25 мкл буфера T₁₀E₁ (pH=8,0) и 5 мкл 4М NaCl (до 400мМ).
4. Добавить 50 мкл фенола, насыщенного T₁₀E₁ (pH=8,0).
5. Перемешивать на шейкере в течение 1 минуты.
6. Центрифугировать в течение 10 минут при 12000 об./мин.
7. Водную фазу перенести в другую пробирку и добавить 50 мкл хлороформа.
8. Перемешивать на шейкере в течение 1 минуты.
9. Центрифугировать в течение 2 минут при 12000 об./мин.
10. Водную фазу перенести в новую пробирку.
11. Добавить 3 объема 96% этанола.
12. Выдержать при -20°C в течение 2 часов.
13. Центрифугировать в течение 10 минут при 12000 об./мин. и удалить супернатант.
14. Промыть образец в 500 мкл 70% этанола.
15. Центрифугировать в течение 10 минут при 12000 об./мин. и удалить супернатант.
16. Высушить образец на воздухе.
17. Растворить осадок в 20 мкл воды (до концентрации ~ 10 нг/мкл с учетом 10% потерь при фенольной депротеинизации и спиртовом осаждении).

2. Подготовка плазмидного вектора

Вектором в генетической инженерии называют молекулу ДНК, способную включать чужеродную последовательность, переносить ее в реципиентные клетки и самостоятельно в них реплицироваться.

Вектор, автономно реплицирующийся в клетках и, тем самым, размножающий (клонированный) в своем составе экзогенную ДНК, называется **клонированным вектором**. Такой вектор должен соответствовать следующим требованиям:

- содержать ориджин репликации (*ori*) для самостоятельного размножения в клетке;
- иметь единственный участок расщепления ДНК (сайт узнавания) определенной рестриктазой;
- содержать селективный генетический маркер (или несколько маркеров), который может быть использован для отбора клонов, несущих гибридные ДНК, после введения в чувствительные клетки смеси молекул ДНК, полученных в процессе рекомбинации *in vitro*;
- должен сохранять репликативные функции при встройке экзогенного фрагмента ДНК.

Частным случаем клонирующихся векторов являются **экспрессионные векторы**. Это молекулярные векторы, которые наряду с амплификацией обеспечивают правильную и эффективную экспрессию чужеродных генов в клетках-реципиентах. В ряде случаев молекулярные векторы могут обеспечивать интеграцию чужеродной ДНК в геном реципиентной клетки. Такие молекулы ДНК называют **интегративными векторами**. Использование клонирующихся векторов позволяет получать необходимый фрагмент ДНК в индивидуальном состоянии и в препаративных количествах. Это подняло на качественно новый уровень исследования структурно-функциональной организации геномов как прокариотических, так и эукариотических организмов. Разработка и совершенствование экспрессионных векторов позволяет все с большей эффективностью создавать штаммы – суперпродуценты чужеродных белков.

В качестве векторных молекул в генетической инженерии используют широкий спектр плазмидных и вирусных ДНК. В

настоящее время, наиболее часто применяются **плазмидные векторы**.

Плазмиды – это внехромосомные автономно реплицирующиеся генетические элементы, имеющиеся практически у всех бактерий. Они представляют собой двухцепочечные кольцевые молекулы ДНК длиной от 1 т.п.н. до 500 т.п.н. и более. Как автономно реплицирующиеся генетические элементы плазмиды обладают большей частью основных свойств, которые позволяют использовать их в качестве векторов. Однако довольно часто природные (немодифицированные) плазмиды бывают лишены некоторых обязательных для вектора качеств. Поэтому плазмидные векторы приходится создавать из природных плазмид с помощью методов генетической инженерии.

Плаزمида pSC101 – первая выделенная векторная плазмида. Она была получена в 1973 г. в лаборатории С. Коэна. pSC101 детерминирует устойчивость к тетрациклину и содержит единственный сайт узнавания рестриктазы EcoRI, расположенный в несущественной для репликации области и за пределами гена устойчивости к тетрациклину (*tet*). Кроме того, pSC101 в гене *tet* имеет по одному сайту узнавания рестриктаз HindIII, BamHI и Sall. При внедрении фрагмента ДНК в EcoRI-сайт после трансформации образуются тетрациклиноустойчивые бактерии. Клетки, получившие такую гибридную ДНК, фенотипически отличаются от исходных резистентностью к тетрациклину, однако не отличаются от клеток, содержащих интактную pSC101. Фрагмент ДНК, внедренный в любой из трех других сайтов рестрикции (HindIII, BamHI и Sall) инактивирует гены, кодирующие резистентность к тетрациклину, в результате чего появляются тетрациклинчувствительные трансформанты. Они отличаются от клеток, получивших pSC101, но не отличаются от исходных клеток. Таким образом, присутствие в pSC101 только одного

селективного маркера (резистентности к тетрациклину) не позволяет осуществить прямой отбор клеток, содержащих гибридную ДНК. Из-за этого и других недостатков векторная плазмида pSC101 активно использовалась для клонирования фрагментов ДНК лишь в начальный период развития генетической инженерии, до появления векторов на основе других плазмид.

Более удобной для клонирования фрагментов ДНК в клетках *E. coli* оказалась **плазмида ColE1**. В качестве вектора ее начали использовать в лаборатории Х. Бойера в 1974 г. Плазмида ColE1 детерминирует одновременно способность клеток синтезировать колицин E1 и иммунитет этих же клеток к нему, а также содержит единственный сайт узнавания EcoRI. При интеграции в ColE1 экзогенного фрагмента ДНК по сайту EcoRI нарушается ген продукции колицина, но сохраняется ген иммунитета к нему. Таким образом, наличие двух селективных маркеров в плазмидном векторе позволяет провести отбор среди трех типов клеток: исходных, получивших интактную плазмиду и получивших гибридную плазмиду.

Однако и плазмида ColE1 не нашла широкого применения в качестве вектора, так как обладает не очень удобными селективными маркерами. Поэтому в последующие годы на ее основе были сконструированы производные векторы, содержащие высокоселективные маркеры устойчивости к антибиотикам, полученные из других плазмид.

Одним из таких векторов является **плазмида pBR322**. Она содержит гены устойчивости к тетрациклину (*tet*) и ампициллину (*bla*), которые были перенесены из плазмиды pSC101 и транспозона Tn3 соответственно. Оба этих гена позволяют проводить отбор трансформантов по их способности к росту в присутствии тетрациклина и(или) ампициллина. В pBR322 имеется несколько уникальных сайтов узнавания рестриктаз. Внедрение в плазмиду

клонированных чужеродных фрагментов ДНК по сайтам, расположенным в генах *tet* или *bla* (например, PstI или BamHI), нарушает целостность этих генов и их функциональную активность. В результате трансформанты утрачивают устойчивость к одному из антибиотиков. Исходные клетки не растут в присутствии ампициллина и тетрациклина, клетки с интактной плазмидой растут в присутствии обоих антибиотиков, а клетки с гибридной плазмидой могут расти на среде только с одним (в зависимости от локализации вставки) из антибиотиков.

Дальнейшие работы по созданию новых плазмидных векторов были направлены, в основном, на получение векторов специального назначения, а также совершенствование имеющихся селективных маркеров.

2.1. Обработка плазмиды pUC18 эндонуклеазой рестрикции SmaI (линеаризация вектора)

Эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы) – ферменты, катализирующие реакцию гидролиза ДНК. В отличие от экзонуклеаз, рестриктазы расщепляют ДНК не с конца молекулы, а в любой ее части, содержащей специфический сайт узнавания. Выделяют три основных класса рестриктаз:

1. Рестриктазы I класса узнают строго специфичную последовательность нуклеотидов и разрезают двухцепочную молекулу ДНК на большом расстоянии (до нескольких тысяч п.н.) от этой последовательности в произвольной точке.

2. Рестриктазы II класса узнают определённую последовательность и разрезают ДНК в фиксированной точке внутри этой последовательности. Сайтами узнавания для рестриктаз II класса могут являться только **палиндромы** – участки ДНК, в которых

в обеих цепях точно напротив друг друга находятся последовательности, читаемые одинаково в направлении 5'→3' (например, 5'-AGCGCT-3').

3. Рестриктазы III класса узнают непалиндромные последовательности длиной 5-6 п.н. и разрезают ДНК в фиксированной точке, отступив 24-27 п.н. от сайта узнавания.

Наиболее широкое применение в генетической инженерии нашли **рестриктазы II класса**. Их, в свою очередь, можно условно подразделить на два типа (рис. 3):

- Рестриктазы, расщепляющие ДНК строго по оси симметрии узнаваемой последовательности, что приводит к образованию фрагментов ДНК с **«тупыми» концами**, не имеющими выступающих одноцепочечных участков.
- Рестриктазы, расщепляющие ДНК с образованием одноцепочечных взаимокплементарных (5'- или 3'-выступающих) **«липких» концов**.

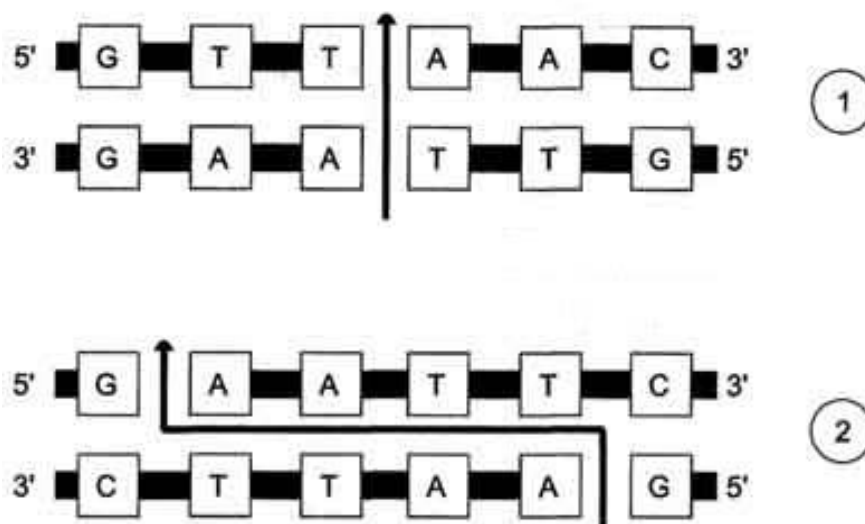


Рис. 3. Способы расщепления ДНК рестриктазами II класса.

1 – расщепление с образование «тупых» концов, 2 – расщепление с образованием «липких» концов

Размер узнаваемой рестриктазой последовательности, как правило, определяет частоту встречаемости этих участков в природных ДНК. Для случайной последовательности ДНК бесконечной длины с равным содержанием каждого из четырех нуклеотидов вероятность (P_N) наличия определенной последовательности длиной N на молекуле ДНК будет равна 4^{-N} . Средняя частота встречаемости определенного тетра-нуклеотида – $P_4 = 4^{-4} = 3,9 \cdot 10^{-3}$, октaнуклеотида — $P_8 = 1,2 \cdot 10^{-5}$. Поэтому рестриктазы, узнающие последовательность из четырех пар нуклеотидов, часто называют мелкощепящими, а рестриктазы с участком узнавания в шесть и более пар нуклеотидов — крупнощепящими.

В 1973 г. Х. Смит и Д. Натанс предложили следующие принципы номенклатуры рестриктаз:

1. Аббревиатура названия каждой рестриктазы является производной от бинарного названия микроорганизма, являющегося источником данного фермента. К первой заглавной букве названия рода добавляют две первые строчные буквы вида: *Streptomyces albus* – Sal, *Escherichia coli* – Eco.

2. В случае необходимости добавляют обозначение серотипа или штамма, например, EcoR.

3. Различные рестриктазы, кодируемые одной бактериальной клеткой, обозначают римскими цифрами: *Haemophilus influenzae* d – HindI, HindII, HindIII.

Основные принципы, заложенные в этой номенклатуре, используются и в настоящее время. Однако открытие большого количества новых рестриктаз побудило Р. Робертса в 1978 г. внести дополнения в систему обозначений ферментов: если сокращенное название совпадает для нескольких ферментов, то 2 первые буквы

аббревиатуры остаются неизменными, а третья берется из последующих букв видового названия. Например: *Haemophilus parainfluenzae* – HpaI, *Haemophilus parahaemolyticus* – HphI.

Если гидролизовать молекулы ДНК различного происхождения (вектор и клонируемый фрагмент) одной рестриктазой, то они после этого будут иметь идентичные взаимодополнительные липкие концы. Данное свойство, в первую очередь, и сделало рестриктазы II класса ферментами, наиболее часто используемыми при конструировании гибридных молекул ДНК.

В случае если клонируемый фрагмент ДНК имеет «тупые» концы (как, например, продукт полимеразной цепной реакции), плазмидный вектор также необходимо обработать рестриктазой, образующей «тупые» концы и узнающей только один сайт в последовательности вектора. В результате этого вектор линейризуется (перейдет в линейную форму), а его концы будут совместимы с концами клонируемого фрагмента. Плазида pUC18 содержит единственный сайт узнавания рестриктазы SmaI (5'-CCC↓GGG-3'), расщепляющей ДНК с образованием «тупых» концов. Поэтому целесообразно встраивать клонируемый фрагмент ДНК в данный вектор именно по сайту SmaI.

Ход работы

Проведение реакции

1. Приготовить реакционную смесь:

Компонент	Исходная концентрация	Конечная концентрация	Добавляемый объем (на 20 мкл)
Буфер	10x	1x	2 мкл
Плазида pUC18	100 нг/мкл	32,5 нг/мкл	6,5 мкл (650 нг)
Рестриктаза SmaI	10 ед./мкл	0,25 ед./мкл	0,5 мкл (5 ед.)
H ₂ O			11 мкл

2. Инкубировать в течение 2 часов при 30°C.

3. Отобрать 4,6 мкл на электрофорез.

Фенольная депротеинизация и спиртовое осаждение ДНК

4. Добавить 29,6 мкл буфера T₁₀E₁ (pH=8,0) и 5 мкл 4М NaCl (до 400мМ).
5. Добавить 50 мкл фенола, насыщенного T₁₀E₁ (pH=8,0).
6. Перемешивать на шейкере в течение 1 минуты.
7. Центрифугировать в течение 10 минут при 12000 об./мин.
8. Водную фазу перенести в другую пробирку и добавить 50 мкл хлороформа.
9. Перемешивать на шейкере в течение 1 минуты.
10. Центрифугировать в течение 2 минут при 12000 об./мин.
11. Водную фазу перенести в новую пробирку.
12. Добавить 3 объема 96% этанола.
13. Выдержать при -20°C в течение 2 часов.
14. Центрифугировать в течение 10 минут при 12000 об./мин. и удалить супернатант.
15. Промыть образец в 500 мкл 70% этанола.
16. Центрифугировать в течение 10 минут при 12000 об./мин. и удалить супернатант.
17. Высушить образец на воздухе.
18. Растворить осадок в 10 мкл воды (до концентрации ~ 45 нг/мкл с учетом 10% потерь при фенольной депротеинизации и спиртовом осаждении).

Электрофорез плазмидной ДНК (контроль линеаризации)

19. Подготовить заливочный столик, установить гребенку.
20. Довести раствор агарозы до кипения и налить его на поверхность столика (слоем 4-5 мм).
21. После формирования геля вытащить гребенку, предварительно смочив зубцы 1х TBE буфером.

22. Залить в электрофоретическую камеру 1x TBE буфер, поместить в нее гель.
23. Приготовить образцы и внести их в слоты геля следующим образом:

Компонент	№ слота		
	1	2	3
ДНК-маркер (500 нг/мкл)	1 мкл	–	–
Плазмида pUC18/SmaI (32,5 нг/мкл)	–	4,6 мкл	–
Исходная плазмида pUC18 (100 нг/мкл)	–	–	1,5 мкл
T ₁₀ E ₁	11 мкл	7,4 мкл	10,5 мкл
5x буфер для образцов	3 мкл	3 мкл	3 мкл

24. Провести электрофорез при напряженности поля 10 В/см.
25. Гель после электрофореза окрасить 0,0002% раствором бромистого этидия, облучить ультрафиолетовым светом.
26. Сравнить подвижность pUC18/SmaI с подвижностью исходной pUC18. Констатировать линейаризацию плазмиды (рис. 4).



Рис. 4. Различия в электрофоретической подвижности кольцевой и линейной форм вектора pUC18.

слева – интактная плаزمиды, справа – линейризованная плазмиды

2.2. Дефосфорилирование 5'-концов линейризованного вектора с использованием щелочной фосфатазы

Дефосфорилирование 5'-концов вектора перед его лигированием с клонируемым фрагментом ДНК необходимо для того, чтобы во ходе проведения лигазной реакции исключить возможность ковалентного связывания концов векторной молекулы друг с другом (рециркуляризацию), а также возможность образования конкатемеров, состоящих из нескольких последовательно соединенных молекул вектора. Для дефосфорилирования 5'-концов ДНК обычно используют щелочную фосфатазу (фосфомоноэстеразу).

Ход работы

Проведение реакции

1. Приготовить реакционную смесь:

Компонент	Исходная концентрация	Конечная концентрация	Добавляемый объем (на 20 мкл)
Буфер	10x	1x	2 мкл
pUC18/SmaI	~ 45 нг/мкл	22,5 нг/мкл	10 мкл (~ 450 нг)
Щелочная фосфатаза	1 ед./мкл	0,05 ед./мкл	1 мкл (1 ед.)
H ₂ O			7 мкл

2. Инкубировать в течение 10 минут при 37°C.

3. Инактивировать фермент в течение 5 минут при 75°C.

Фенольная депротеинизация и спиртовое осаждение ДНК

4. Добавить 25 мкл буфера T₁₀E₁ (pH=8,0) и 5 мкл 4M NaCl (до 400mM).

5. Добавить 50 мкл фенола, насыщенного T₁₀E₁ (pH=8,0).

6. Перемешивать на шейкере в течение 1 минуты.
7. Центрифугировать в течение 10 минут при 12000 об./мин.
8. Водную фазу перенести в другую пробирку и добавить 50 мкл хлороформа.
9. Перемешивать на шейкере в течение 1 минуты.
10. Центрифугировать в течение 2 минут при 12000 об./мин.
11. Водную фазу перенести в новую пробирку.
12. Добавить 3 объема 96% этанола.
13. Выдержать при -20°C в течение 2 часов.
14. Центрифугировать в течение 10 минут при 12000 об./мин. и удалить супернатант.
15. Промыть образец в 500 мкл 70% этанола.
16. Центрифугировать в течение 10 минут при 12000 об./мин. и удалить супернатант.
17. Высушить образец на воздухе.
18. Растворить осадок в 40 мкл воды (до концентрации ~ 10 нг/мкл с учетом 10% потерь при фенольной депротеинизации и спиртовом осаждении).

3. Введение клонируемого фрагмента в состав вектора с помощью лигазной реакции

Получение гибридных молекул ДНК включает объединение *in vitro* целевого фрагмента ДНК и вектора. Для их ковалентного соединения используют ДНК-лигазу – фермент, катализирующий образование фосфодиэфирных связей между прилегающими 5'-фосфатным и 3'-гидроксильным концами цепей ДНК. ДНК-лигаза фага Т4 способна соединять двухцепочечные молекулы не только с «липкими», но и с «тупыми» концами (хотя и с меньшей эффективностью).

Спектр продуктов лигазной реакции зависит от концентрации участвующих в ней фрагментов ДНК. При высокой концентрации преимущественно будут формироваться линейные длинные молекулы ДНК. По мере снижения концентрации фрагментов повышается вероятность образования кольцевых молекул ДНК. Получаемые при этом гибридные молекулы с наибольшей частотой будут состоять из двух фрагментов (вектора и вставки), реже из трех и более.

После каждой лигазной реакции образуется смесь разнообразных гибридных молекул ДНК, из которой целевые молекулы с заданной структурой отбирают на следующих этапах:

- Введение ДНК в клетки (отсеиваются крупные молекулы).
- Размножение трансформированных клеток (отсеиваются все линейные молекулы, а также кольцевые молекулы, не содержащие векторной последовательности, а, следовательно, и ориджина репликации).
- Селекции и/или анализ гибридных клонов на предмет искомой генетической конструкции (отсеиваются кольцевые молекулы, не содержащие клонируемого ДНК-фрагмента).

Таким образом, можно успешно отбирать гибридные молекулы ДНК, составляющие лишь малую часть полученного после лигазной реакции препарата.

Ход работы

1. Приготовить реакционную смесь:

Компонент	Исходная концентрация	Конечная концентрация	Добавляемый объем (на 20 мкл)
Буфер	10x	1x	2 мкл
АТФ	10мМ	1мМ	2 мкл
Дефосф. вектор (pUC18/SmaI)	~ 10 нг/мкл	~ 1 нг/мкл	2 мкл (~ 20 нг)
T4-ДНК-лигаза	1 ед./мкл	0,1 ед./мкл	2 мкл (2 ед.)
H ₂ O			8 мкл

2. Разделить общую реакционную смесь на 2 пробирки по 8 мкл.
3. Добавить в первую пробирку 2 мкл (~ 20 нг) клонируемого фрагмента ДНК, во вторую – 2 мкл воды (контроль качества вектора).
4. Перемешать и инкубировать не менее 12 часов при 16°C.

4. Трансформация бактериальной культуры продуктами лигазной реакции

Гибридные молекулы ДНК, полученные в результате лигазной реакции, вводят в реципиентные клетки с целью последующего их клонирования.

Процесс, в результате которого экзогенная ДНК проникает в реципиентную клетку и вызывает у нее наследуемые изменения, называют трансформацией. Генетически трансформированные клетки принято называть **трансформантами**. Эффективность трансформации обычно выражают количеством клонов (колоний), образованных в результате деления исходно единичной клетки-трансформанта, приходящихся единицу массы донорной ДНК.

Физиологическое состояние клетки, при котором она способна поглощать нуклеиновую кислоту из окружающей среды, называется **компетентностью**. Однако многие бактерии, а также дрожжи и культивируемые клетки животных и растений такой физиологической компетентностью не обладают. Поэтому восприимчивость к экзогенной ДНК у них индуцируют различными способами. Такую компетентность принято называть **индуцированной**. Наиболее просто она достигается путем определенного химического или физического воздействия на клетки. Разные типы клеток имеют свои особенности строения клеточных стенок и плазматических мембран,

поэтому они могут различаться по способам индукции у них компетентного состояния.

Первым подходом к получению компетентных для клеток бактерий является **ферментативный гидролиз клеточных стенок**, приводящий к удалению физического барьера на пути проникновения молекул ДНК в клетку. Для этой цели можно использовать различные индивидуальные ферменты (например, лизоцим) или смеси ферментов (например, пищеварительный сок виноградной улитки). При ферментативной обработке клетки необходимо помещать в изотонический раствор (имеющий осмотическое давление, характерное для цитоплазмы клетки).

Одним из наиболее часто применяемых методов введения молекул ДНК в клетки является **электропорация**. Суть данного подхода заключается в кратковременном (обычно 5-20 мс) воздействии электрического поля высокой напряженности (1-15 кВ/см) на клеточную мембрану, которое приводит к образованию в ней пор. Время существования и размеры пор достаточны для того, чтобы молекулы ДНК могли из внешней среды войти в клетку в результате действия осмотических сил.

Для трансформации *E. coli* гибридными молекулами ДНК активно применяется также метод **CaCl₂-зависимой трансформации**. Метод заключается в обработке бактерий ионами Ca²⁺, которые индуцируют компетентность клеток за счет фазового перехода мембранных липидов. Поглощение экзогенной ДНК усиливается, если подвергнуть такие клетки **тепловому шоку** (42°C) и последующему резкому охлаждению.

Приготовление растворов

100мМ CaCl₂

CaCl₂ – 1,11 г

H₂O – до 100 мл

Автоклавировать раствор в течение 1 часа при 1 атмосфере.

Ход работы

Получение компетентных клеток

1. Несколько колоний из ночной культуры *E.coli* Z-85 перенести в пробирку с 5 мл жидкой LB-среды.
2. Инкубировать при 37°C и 150 об./мин. до оптической плотности 0,2-0,4 (измерения оптической плотности проводить при длине волны 590 нм).
3. По 1 мл суспензии клеток перенести в 4 пробирки.
4. Осадить клеточную суспензию центрифугированием в течение 3 минут при 3000 об./мин. и удалить супернатант.
5. Суспендировать клетки в 1 мл охлажденного 100мМ раствора CaCl₂.
6. Вновь центрифугировать и ресуспендировать в 100 мкл 100мМ CaCl₂.
7. Инкубировать на льду в течение 20 минут.

Собственно трансформация клеток

8. Добавить в первую пробирку 10 мкл лигазной смеси, содержащей дефосфорилированный вектор pUC18/SmaI и клонируемый ДНК-фрагмент.
9. Во вторую – 10 мкл лигазной смеси содержащей только вектор (контроль качества вектора).
10. В третью – 1 мкл (10 нг) исходной плазмиды pUC18 (контроль частоты трансформации).
11. В четвертую не добавлять ничего (негативный контроль трансформации)
12. Инкубировать на льду в течение 20 минут.
13. Инкубировать в водяной бане при 42°C в течение 2 минут (тепловой шок).

14. Быстро охладить на льду.
15. Добавить в каждую пробирку по 0,5 мл теплой жидкой LB-среды и инкубировать при 37°C в течение 1,5 часов.

Посев и выращивание колоний трансформантов

16. Содержимое пробирок посеять на чашки со средой, содержащей ампициллин (100 мкг/мл), ИПТГ (40 мкг/мл), X-gal (40 мкг/мл):
 - Негативный контроль трансформации – 1 чашка (600 мкл)
 - Контроль частоты трансформации – 2 чашки (6 мкл и 60 мкл)
 - Контроль качества вектора – 1 чашка (600 мкл)
 - Клетки, трансформированные продуктами лигазной реакции вектора и фрагмента – 3 чашки (6 мкл, 60 мкл, 600 мкл)
17. Инкубировать в течение ночи при 37°C.
18. Оценить частоту трансформации во всех четырех случаях. Сравнить ее значение в опыте с аналогичными значениями в контрольных вариантах.

5. Выделение гибридных плазмид из трансформированных клеток

Предложенный метод выделения плазмидной ДНК из *E.coli* в целом напоминает описанный выше метод выделения хромосомной ДНК эукариот (см. 1.1). Основные отличия связаны с введением дополнительных стадий очистки выделяемой ДНК от бактериального нуклеоида, а также примесей РНК.

Приготовление растворов

1М трис-НСI (рН=9,0)

трис – 6,05 г

H₂O – до 50 мл

рН доводить соляной кислотой

1M MgCl₂

MgCl₂ – 2,04 г

H₂O – до 10 мл

3M ацетат натрия (pH=4,8)

ацетат натрия (трехводный) – 20,4 г

H₂O – до 50 мл

pH доводить ледяной уксусной кислотой

500мМ глюкоза

глюкоза – 4,5 г

H₂O – до 50 мл

1M цитрат натрия

цитрат натрия – 2,91 г

H₂O – до 10 мл

Раствор 1

Компонент	Исходная концентрация	Конечная концентрация	Добавляемый объем (на 5 мл)
Глюкоза	500мМ	50мМ	500 мкл
Трис-НСI (pH=8,0)	1М	25мМ	125 мкл
ЭДТА (pH=8,0)	500мМ	10мМ	100 мкл
Лизоцим	сухой	5 мг/мл	25 мг
H ₂ O			до 5 мл

Раствор 2

Компонент	Исходная концентрация	Конечная концентрация	Добавляемый объем (на 5 мл)
NaOH	10М	200мМ	100 мкл
ДСН	10%	1%	500 мкл
H ₂ O			4,4 мл

Буфер T₂₀₀E₁ (pH=9,0)

Компонент	Исходная концентрация	Конечная концентрация	Добавляемый объем (на 10 мл)
Трис-НСI (pH=9,0)	1М	200мМ	2 мл
ЭДТА (pH=8,0)	500мМ	1мМ	20 мкл

H ₂ O			7,98 мл
------------------	--	--	---------

Ход работы

Выращивание и сбор клеток

1. Посеять клетки из 10 белых колоний в 10 пробирок с 5 мл жидкой LB-среды.
2. Инкубировать при 37°C и 150 об./мин. в течение ночи.
3. Собрать клетки последовательным центрифугированием в течение 30 секунд при 12000 об./мин. в 10 пробирок на 1,5 мл. Удалить супернатант.

Разрушение клеточных стенок лизоцимом

4. Полученные осадки суспендировать в 200 мкл раствора 1.
5. Инкубировать при 37°C в течение 15 минут.

Лизис клеток, щелочная денатурация нуклеоида и удаление дебриса

6. Добавить 400 мкл раствора 2 и интенсивно перемешать.
7. Инкубировать при комнатной температуре не более 5 минут.
8. Добавить 300 мкл 3М ацетата натрия (pH=4,8) и быстро перемешать.
9. Центрифугировать в течение 10 минут при 12000 об./мин.

Осаждение нуклеиновых кислот изопропанолом

10. Перенести супернатант в пробирку с 0,6 объема (540 мкл) изопропанола и перемешать.
11. Инкубировать при комнатной температуре в течение 30 минут.
12. Центрифугировать в течение 5 минут при 12000 об./мин. и удалить супернатант.

Удаление высокомолекулярной РНК

13. Растворить осадок в 180 мкл буфера T₂₀₀E₁ (pH=9,0).
14. Добавить 20 мкл 1М MgCl₂.
15. Инкубировать в кипящей водяной бане в течение 30 секунд.
16. Охладить на льду.
17. Центрифугировать в течение 10 минут при 12000 об./мин.

18. Супернатант перенести в другую пробирку.

Деградация РНК

19. Инкубировать в кипящей водяной бане в течение 30 минут.

20. Охладить на льду.

Фенольная депротеинизация и спиртовое осаждение ДНК

21. Добавить 22 мкл 4М NaCl (до 400мМ) и 222 мкл фенола, насыщенного T₁₀E₁ (рН=8,0).

22. Перемешивать на шейкере в течение 1 минуты.

23. Центрифугировать в течение 10 минут при 12000 об./мин.

24. Водную фазу перенести в другую пробирку и добавить 222 мкл хлороформа.

25. Перемешивать на шейкере в течение 1 минуты.

26. Центрифугировать в течение 2 минут при 12000 об./мин.

27. Водную фазу перенести в новую пробирку.

28. Добавить 3 объема 96% этанола.

29. Выдержать при -20°C в течение 2 часов.

30. Центрифугировать в течение 10 минут при 12000 об./мин. и удалить супернатант.

31. Промыть образец в 500 мкл 70% этанола.

32. Центрифугировать в течение 10 минут при 12000 об./мин. и удалить супернатант.

33. Высушить осадок на воздухе.

34. Растворить в 40 мкл буфера T₁₀E₁ (рН=8,0).

6. Анализ результатов клонирования фрагмента ДНК

Анализ выделенных из клеток гибридных ДНК на наличие в их составе целевого фрагмента удобно проводить с помощью эндонуклеаз рестрикции. В этом случае плазмидные конструкции расщепляют рестриктазами по сайтам, фланкирующим

последовательность целевого фрагмента. По длине вырезаемого при этом участка ДНК судят о наличии (отсутствии) в плазмиде необходимой вставки.

Ход работы

Расщепление плазмид рестриктазами

1. Приготовить общую реакционную смесь:

Компонент	Исходная концентрация	Конечная концентрация	Добавляемый объем (на 100 мкл)
Буфер	10x	1x	10 мкл
Рестриктаза EcoRI	10 ед./мкл	0,5 ед./мкл	5 мкл (50 ед.)
Рестриктаза PstI	10 ед./мкл	0,5 ед./мкл	5 мкл (50 ед.)
H ₂ O			40 мкл

2. Добавить по 6 мкл общей смеси к 4 мкл (~ 0,5-1 мкг) каждого из 10 препаратов плазмидной ДНК.

3. Инкубировать в течение 2 часов при 37°C.

Электрофоретический анализ длины вырезаемых фрагментов ДНК

4. Подготовить заливочный столик, установить гребенку.

5. Довести раствор агарозы до кипения и налить его на поверхность столика (слоем 4-5 мм).

6. После формирования геля вытащить гребенку, предварительно смочив зубцы 1x TBE буфером.

7. Залить в электрофоретическую камеру 1x TBE буфер, поместить в нее гель.

8. Приготовить образцы и внести их в слоты геля следующим образом:

Компонент	№ слота	
	1-10	11
ДНК-маркер (500 нг/мкл)	–	1 мкл
Плазмиды, обработанные EcoRI и PstI (~ 50-100 нг/мкл)	10 мкл	–
T ₁₀ E ₁	–	9 мкл
5x буфер для образцов	2,5 мкл	2,5 мкл

9. Провести электрофорез при напряженности поля 10 В/см.
10. Гель после электрофореза окрасить 0,0002% раствором бромистого этидия, облучить ультрафиолетовым светом.
11. Определить длину участков ДНК, вырезаемых из анализируемых плазмидных конструкций. Сопоставить полученные значения с расчетными. Выбрать плазмиды, содержащие успешно клонированный целевой фрагмент ДНК.

Список литературы

1. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков. М.: Мир, 1983. 263 с.
2. Анализ генома. Методы. / Под ред. К. Дейвиса. М.: Мир, 1990. 246 с.
3. Биотехнология. Принципы и применение. / Под. ред. И. Хиггинса и др. М.: Мир, 1988. 480 с.
4. Гааль Э., Медьеши Г., Верецкеи Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М.: Мир, 1982. 448 с.
5. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. М.: Мир, 2002. 585 с.
6. Клонирование ДНК. Методы. / Под ред. Д. Гловера. М.: Мир, 1988. 538 с.
7. Льюин Б. Гены. М.: Мир, 1987. 544 с.
8. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 443 с.
9. Молекулярная клиническая диагностика. Методы. / Под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги. М.: Мир, 1999. 258с.
10. Новое в клонировании ДНК. Методы. / Под ред. Д. Гловера. М.: Мир, 1989. 368 с.
11. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). М.: Наука, 1981. 288 с.
12. Патрушев Л.И. Экспрессия генов. М.: Наука, 2000. 830 с.
13. Рыбчин В.Н. Основы генетической инженерии. С-Пб.: Изд-во СПбГТУ, 2002. 522 с.
14. Сингер М., Берг П. Гены и геномы: В 2-х т. М.: Мир, 1998. 373 с.
15. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия. Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2004. 496 с.

16. Aaij C., Borst P. The gel electrophoresis of DNA. // Biochim. Biophys. Acta. 1972. V. 269. P. 192-200.
17. Balbas P., Soberon X., Merino E., Zurita M, Lomeli H., Valle F., Flores N., Bolivar F. Plasmid vector pBR322 and its special purpose derivatives. // Gene. 1986. V. 50. P 3-40.
18. Bercovich J.R., Lehrach H., Ausubel F.M. Effect of DNA concentration of recombinant plasmid recovery after blunt-end ligation. // Biotechniques. 1992. V. 12. P 190-193.
19. Birnboim, H.C., Doly, J.A. Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. // Nucleic Acids Res. 1979. V. 7, P. 1513 – 1525.
20. Calladine C.R., Collis S.M., Drew H.R., Mott M.R. A study of electrophoretic mobility of DNA in agarose and polyacrylamide gels. // J. Mol. Biol. 1991. V. 221. P. 981-1005.
21. Dagert M., Ehrlich S.D. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. // Gene. 1979. V. 6. P 23-28.
22. Damak S., Bullock D.W. A simple two-step method for efficient blunt-end ligation of DNA fragments. // Biotechniques. 1993. V. 15. P 448-452.
23. Dower W.J., Miller J.F., Ragsdale C.W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. // Nucleic Acids Res. 1988. V. 16, P. 6127 – 6145.
24. Dugaiczyk A., Boyer H.W., Goodman H.M. Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. // J. Mol. Biol. 1975. V. 96. P. 171-184.
25. Erlich H.A. Polymerase chain reaction. // J. Clin. Immunol. 1989. V. 9. P. 437-447.

26. Hershfield V., Boyer H.W., Yanofsky C., Lovett M.A., Helinski D.R. Plasmid ColE1 as a molecular vehicle for cloning and amplification of DNA. // Proc. Natl. Acad. Sci. 1974. V. 71. P. 3455-3459.
27. Higgins N.P., Cozzarelli N.R. DNA-joining enzymes: a review. // Methods Enzymol. 1979. V. 68. P. 50-71.
28. Inoue H., Nojima H., Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. // Gene. 1990. V. 96. P 23-28.
29. Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., 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.
30. Sgaramella V., Ehrlich S.D. Use of the T4 polynucleotide ligase in the joining of flush-ended DNA segments generated by restriction endonucleases. // Eur. J. Biochem. 1978. V. 86. P. 531-537.
31. Struhl K. A rapid method for creating recombinant DNA molecules. // Biotechniques. 1985. V. 3. P 452-453.
32. Upcroft P., Healey A. Rapid and efficient method for cloning of blunt-ended DNA fragments. // Gene. 1987. V. 51. P. 69-75.

Сокращения

ДНК – 2'-дезоксирибонуклеиновая кислота

ДСН – додецил сульфат натрия

ДТТ – дитиотреитол

ДЭПК – диэтилпирокарбонат

ед. – единица активности фермента

ИПТГ – изопропилтиогалактозид

об. – оборот ротора центрифуги

п.н. – пар нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

т.п.н. – тысяч пар нуклеотидов

трис – трисоксиметиламинометан

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

A – 2'-дезоксирибоаденозин-5'-монофосфат

ATP – аденозин-5'-трифосфат

ADP – аденозин-5'-дифосфат

C – 2'-дезоксирибоцитидин-5'-монофосфат

dATP – 2'-дезоксирибоаденозин-5'-трифосфат

dCTP – 2'-дезоксирибоцитидин-5'-трифосфат

dGTP – 2'-дезоксирибогуанозин-5'-трифосфат

dNTP's – 2'-дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфаты

dTTP – 2'-дезоксириботимидин-5'-трифосфат

G – 2'-дезоксирибогуанозин-5'-монофосфат

T – 2'-дезоксириботимидин-5'-монофосфат

X-gal – 5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D-галактозид