евроген

Практикум по генной инженерии

Комплект для выполнения всех задач практикума

Номер по каталогу:
MBS02

Наборы для выполнения отдельных задач:
MB001 — Clavularia FP cloning set
BC032 — ExtractRNA
SK001 — Mint kit
PK101 — Encyclo Plus PCR kit
BC022S — Cleanup Standard
BC221S — Plasmid Miniprep 2.0

Инструкция по применению

Версия 3 от 9 апреля 2025 г.

Оглавление

1. Введение

Практикум предназначен для студентов 3–4 курса, специализирующихся в области молекулярной биологии, генетики, вирусологии и смежных специальностей, а также для повышения профессионального уровня аспирантов и начинающих исследователей.

На примере клонирования и экспрессии гена флуоресцентного белка из кораллового полипа рода *Clavularia* отрабатывается ряд методов, широко применяемых в современной генной инженерии, в том числе выделение суммарной РНК, обратная транскрипция, амплификация кДНК в полимеразной цепной реакции (ПЦР), поиск и клонирование участков интересующего гена с применением вырожденных праймеров, скрининг экспрессионной библиотеки, экспрессия белка.

Цикл практических задач построен таким образом, чтобы они моделировали реальное научное исследование. В качестве модельного объекта исследования выбраны флуоресцентные белки, окраска которых видна невооруженным глазом (при относительно высоких концентрациях).

Практикум подразумевает наличие у студентов начального опыта работы с ДНК, полимеразной цепной реакцией и клонированием.

1.1. Общие рекомендации и замечания

1. Практикум разбит на несколько задач, которые могут быть выполнены в комплексе (по очереди) или отдельно друг от друга. При недостатке времени, оборудования и т.д. некоторые задачи могут быть исключены из программы практикума. Набор Clavularia FP cloning set (кат. # MB001, Евроген) содержит все необходимые исходные материалы (контрольные образцы), позволяющие осуществить любую из задач без выполнения предыдущих.
2. Все задачи практикума можно выполнить последовательно за 13 дней. Количество полных учебных дней: 11. Продолжительность учебного дня: 7–8 часов.
3. Перед началом лабораторной работы следует проверить наличие всех необходимых для выполнения практикума реагентов и оборудования.
4. До начала практикума рекомендуется провести тестовое выполнение задач опытным сотрудником, чтобы убедиться, что реактивы не испортились в процессе транспортировки или хранения.

1.2. Основные задачи практикума

Задача 1. Выделение суммарной РНК; анализ суммарной РНК методом гель-электрофореза

Время выполнения: 1 учебный день.

В рамках задачи предлагается выделение РНК из фиксированных тканей кораллового полипа рода *Clavularia*. Однако для выделения РНК можно использовать любые другие доступные живые объекты (например: насекомое, моллюск, икра рыб или земноводных и т.д.).

Анализ суммарной РНК методом гель-электрофореза является завершающим этапом первой задачи.

Задача 2. Синтез кДНК на матрице суммарной РНК

Время выполнения: 1.5–2 учебных дня.

Задача включает приготовление амплифицированной двухцепочечной кДНК и оценку качества препарата с помощью гель-электрофореза. При проведении этой задачи студенты обучаются синтезировать первую цепь кДНК, получают сведения о постановке и оптимизации условий ПЦР, учатся анализировать качество препарата кДНК на агарозном геле.

В качестве стартового материала может быть использована РНК, полученная при выполнении задачи 1, или контрольная РНК из набора Clavularia FP cloning set (кат. # MB001, Евроген).

Задача 3. Идентификация 3'- и 5'-концевых фрагментов целевых транскриптов

Время выполнения: 2 учебных дня.

Задача включает два или три последовательных раунда быстрой амплификации 3'-концевого фрагмента кДНК флуоресцентного белка из кораллового полипа *Clavularia* (3'-RACE). В результате выполнения задачи должен быть получен гомогенный продукт ПЦР длиной около 550 п.о., соответствующий 3'-концевой последовательности мРНК.

Продукт амплификации может быть клонирован и секвенирован, если учебный центр оснащен необходимым оборудованием.

При проведении задачи учащиеся отрабатывают навыки постановки и оптимизации условий ПЦР, приобретают представление о полном цикле процедуры идентификации полноразмерных транскриптов.

В качестве стартового материала может быть использована кДНК, полученная при выполнении задачи 2, или контрольная кДНК из набора Clavularia FP cloning set (кат. # MB001, Евроген).

► *В целях экономии времени, процедура 5'-RACE вынесена за рамки лабораторной работы и рассматривается только теоретически (см. п. 3.3.4 на стр. 26).*

Задача 4. Амплификация полной кодирующей последовательности гена флуоресцентного белка и его направленное клонирование в бактериальный экспрессионный вектор

Время выполнения: 6 дней (3 полных учебных дня + интервал 2 дня + 1 полный учебный день).

Задача включает амплификацию и направленное клонирование в экспрессионный вектор полной кодирующей последовательности гена флуоресцентного белка, отбор целевых клонов и выделение плазмидной ДНК.

При проведении задачи учащиеся закрепляют навыки постановки ПЦР, учатся рассчитывать количество компонентов для реакции лигирования, проводить трансформацию бактерий, отбирать клоны со вставкой, выделять плазмидную ДНК, приобретают представление о полном цикле процедуры клонирования от стадии амплификации до получения препарата плазмидной ДНК, выделенной из отдельного клона.

В качестве стартового материала может быть использована кДНК из Clavularia, полученная при выполнении задачи 2, или контрольная кДНК из набора Clavularia FP cloning set (кат. # MB001, Евроген).

Задача 5. Экспрессия гена флуоресцентного белка в бактериях E.coli, визуализация и выделение рекомбинантного белка

Время выполнения: 2 учебных дня.

Задача включает наращивание биомассы, продуцирующей рекомбинантный белок, и визуализацию флуоресценции как доказательство функциональной активности этого белка. В процессе работы учащиеся приобретают представление об экспрессии генов в бактериальной гетерологической системе, знакомятся с процедурой экспрессочистки рекомбинантного белка из клеточного лизата.

В качестве стартового материала могут быть использованы трансформированные бактерии, полученные при выполнении задачи 4, или контрольная плазмида, вложенная в набор Clavularia FP cloning set (кат. # MB001, Евроген). В последнем случае лабораторная работа должна включать трансформацию бактерий контрольной плазмидой (см. п.п. 21–25 раздела 4.4 на странице 46).

- *В качестве дополнительной задачи рекомендуется провести анализ флуоресцентного белкового препарата на полиакриламидном геле (SDS-PAAG) и на спектрофлуориметре.*

2. Необходимое оборудование и дополнительные материалы

2.1. Материалы и оборудование для выполнения задачи 1

- Набор для практикума Clavularia FP cloning set (кат. # MB001, Евроген).
- Реагент ExtractRNA (кат. # BC032, Евроген).
- Хлороформ.
- Изопропиловый спирт (изопропанол).
- 80% этиловый спирт (разводят из 96% этилового спирта деионизированной водой).
- Реактивы и оборудование для гель-электрофореза (Приложение 1).
- Гомогенизатор Даунса на 2–3 мл (желательно).

► *Гомогенизатор можно заменить маленькой фарфоровой ступкой или пластиковым пестиком для микропробирок.*

- Настольная центрифуга (желательно с охлаждением до +4 °C).
- Настольный термостат.
- Вортекс.
- Ледяная баня.
- Автоматические дозаторы на 10, 20, 200 и 1 000 мкл.
- Микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 мл.
- Наконечники для дозаторов с фильтрами.
- Штатив для пробирок.
- Перчатки.

2.2. Материалы и оборудование для выполнения задачи 2

- Набор для практикума Clavularia FP cloning set (кат. # MB001, Евроген).
- Набор для синтеза кДНК Mint kit (кат. # SK001, Евроген).
- Минеральное масло для молекулярно-биологических работ (если амплификатор не имеет нагревающейся крышки).
- Реактивы и оборудование для гель-электрофореза (Приложение 1).
- Амплификатор.
- Мини-центрифуга.
- Вортекс.
- Ледяная баня.
- Пробирки для ПЦР (0.5 или 0.2 мл).
- Автоматические дозаторы на 10, 20, 200 и 1 000 мкл.
- Наконечники для дозаторов с фильтрами.
- Штатив для пробирок.
- Перчатки.

2.3. Материалы и оборудование для выполнения задачи 3

- Набор для практикума Clavularia FP cloning set (кат. # MB001, Евроген).
- Набор для ПЦР Encyclo Plus PCR kit (кат. # PK101, Евроген).
- Минеральное масло для молекулярно-биологических работ (если амплификатор не имеет нагревающейся крышки).
- Реактивы и оборудование для гель-электрофореза (Приложение 1).
- Амплификатор.
- Мини-центрифуга.
- Пробирки для ПЦР (0.5 или 0.2 мл).
- Автоматические дозаторы на 10, 20, 200 и 1 000 мкл.
- Наконечники для дозаторов с фильтрами.
- Штатив для пробирок.
- Перчатки.

▶ *Если планируется клонирование продукта 3'-RACE, дополнительно понадобятся:*

  – *материалы и оборудование для клонирования продукта 3'-RACE (Приложение 5);*
  – *материалы и оборудование для ПЦР-скрининга (Приложение 6);*
  – *набор для выделения плазмидной ДНК (кат. # BC221, Евроген).*

2.4. Материалы и оборудование для выполнения задачи 4

- Набор для практикума Clavularia FP cloning set (кат. # MB001, Евроген).
- Набор для ПЦР Encyclo Plus PCR kit (кат. # PK101, Евроген).
- Набор Cleanup Standard для очистки ДНК из геля и реакционных смесей (кат. # BC022S, Евроген).
- T4 ДНК-лигаза (кат. # LK101S, Евроген).
- Набор Plasmid Miniprep 2.0 для выделения плазмидной ДНК (кат. # BC221, Евроген).
- Минеральное масло для молекулярно-биологических работ (если амплификатор не имеет нагревающейся крышки).
- Компетентные клетки для химической трансформации (XL1-Blue, DH5α или другие recA(-) штаммы любого производителя, например, кат. # CC001, Евроген).
- Ферменты рестрикции BamHI и HindIII с соответствующим реакционными растворами (например, 10X буфер W (Sibenzime) или 10X буфер 2 (NEB), 10X раствор БСА 1 мг/мл).
- Среда для культивирования бактерий LB, жидкая и агаризованная на чашках Петри.
- Ампициллин.
- Реактивы и оборудование для гель-электрофореза (Приложение 1).
- Реактивы и оборудование для ПЦР-скрининга (Приложение 6).
- Шпатель микробиологический (Дригальского).
- Амплификатор.

- Вортекс.
- Мини-центрифуга.
- Водяной термостат.
- Ледяная баня.
- Холодильник (+16 °C).
- Термостат для чашек Петри (+37 °C).
- Термостатическая качалка (+37 °C).
- Спиртовая или газовая горелка.
- Трансиллюминатор, длина волны 295–365 нм.

▶ *Дополнительно желательно иметь оборудование для детекции флуоресценции: флуоресцентный бинокуляр или микроскоп с фильтром FITC.*

- Пробирки для ПЦР (0.5 или 0.2 мл).
- Стерильные культуральные пробирки (10–15 мл), стеклянные или полипропиленовые.
- Автоматические дозаторы на 10, 20, 200 и 1 000 мкл.
- Наконечники для дозаторов с фильтрами.
- Штатив для пробирок.
- Перчатки.

2.5. Материалы и оборудование для выполнения задачи 5

- Набор для практикума Clavularia FP cloning set (кат. # MB001, Евроген) (если не выполнялась задача 4).
- Среда для культивирования бактерий LB , жидкая и агаризованная на чашках Петри.
- Ампициллин.
- Буфер для озвучивания (50 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7.5–8; 300 мМ NaCl).
- Хелатный сорбент для очистки белков с His-мишенью (например, Protino Ni-IDA или Ni-ТЕД (Macherey-Nagel), NiNTA-agarose (Qiagen)).
- Раствор ЭДТА для элюции белка, 100 мМ, pH 8.0.
- Оборудование для детекции флуоресценции (трансиллюминатор (295 нм) или любая УФ-лампа).
- Вортекс (желательно).
- Термостат для чашек Петри (+37 °C)
- Мини-центрифуга.
- Ультразвуковой гомогенизатор.
- Пробирки для ПЦР (0.5 или 0.2 мл).
- Стерильные культуральные пробирки (10–15 мл), стеклянные или полипропиленовые.
- Автоматические дозаторы на 10, 20, 200 и 1 000 мкл.
- Наконечники для дозаторов с фильтрами.
- Штатив для пробирок.
- Перчатки.

3. Теоретическая часть

Настоящий практикум моделирует распространенную ситуацию, когда перед исследователем стоит задача по идентификации и исследованию гена, ответственного за определенный фенотипический признак, и доступна лишь ограниченная информация о структуре этого гена (например, имеются данные о нуклеотидной или аминокислотной последовательности фрагмента или о структуре гомологичных белков из других организмов).

Такое исследование включает следующие основные этапы:

– определение точной нуклеотидной последовательности фрагмента целевого гена (если последовательность неизвестна);
– идентификация 3'- и 5'-концевых последовательностей транскрипта;
– клонирование полной кодирующей последовательности гена;
– создание конструкции для экспрессии целевого гена в гетерологической системе;
– выделение рекомбинантного белка и исследование его активности (подтверждение связи между клонированным геном и фенотипическим признаком).

Целевые нуклеотидные последовательности могут быть клонированы из образцов геномной ДНК. Однако низкое процентное содержание кодирующих последовательностей в геноме и присутствие интронов существенно затрудняют работу. Эффективнее использовать для выявления кодирующих последовательностей гена образцы комплементарной ДНК (кДНК).

кДНК получают с помощью РНК-зависимых ДНК-полимераз на матрице зрелой РНК, лишенной интронов. Последовательность молекулы кДНК полностью комплементарна последовательности соответствующей РНК и может предоставить всю необходимую информацию о кодирующей последовательности целевого гена.

Таким образом, работу по клонированию целевых фрагментов гена обычно предваряют стадии выделения РНК и синтеза кДНК.

3.1. Выделение суммарной РНК; анализ суммарной РНК методом гель-электрофореза (задача 1)

3.1.1. Выделение суммарной РНК

Получение препарата очищенной суммарной РНК — первая и ключевая стадия любых экспериментов по анализу транскриптома. От качества полученной РНК полностью зависит успех дальнейших исследований, возможность получения достоверных данных об экспрессии генов.

Гуанидин тиоцианат-фенол-хлороформная экстракция РНК [1] — один из методов для выделения суммарной РНК из различных биологических объектов.

На его основе разработан ряд реагентов и наборов для выделения суммарной РНК, в том числе реагент ExtractRNA (кат. # BC032, Евроген). Общее время работы занимает около 2 часов.

Для выделения РНК лучше использовать свежие ткани. Однако если это невозможно, выделение РНК производится из зафиксированного материала. Для фиксации тканей используют следующие подходы: заморозка в жидком азоте с последующим хранением при –70 °C, фиксация 80% этиловым спиртом или специальными фиксаторами для РНК, например Фиксатор IntactRNA (кат. # BC031, Евроген). Хранение образцов в IntactRNA возможно при +37 °C в течение 24 часов, при комнатной температуре — до 7 дней, при +4 °C — до 30 дней, при –70 °C или –20 °C — до 12 месяцев.

Для сохранения качества необходимо как можно быстрее стабилизировать клеточную РНК после забора биологического материала. При использовании свежих тканей стабилизация РНК и ингибирование активности РНКаз достигается с помощью быстрой гомогенизации образца в лизирующем буфере.

При фиксации необходимо использовать кусочки ткани небольшого объема (толщиной 0.3–0.5 см), чтобы обеспечить моментальное замораживание или проникновение фиксатора внутрь живой ткани.

- *При фиксации большого объекта часть клеток может лопнуть, не успев зафиксироваться (заморозиться). При этом происходит высвобождение клеточных эндогенных РНКаз, что приводит к частичной деградации РНК.*

Фиксацию тканей необходимо производить немедленно после забора материала. Неправильное хранение биологического образца до фиксации приводит не только к деградация РНК под действием РНКаз, но и к изменению профиля экспрессии генов.

Эффективное разрушение клеток и гомогенизация биологического образца является обязательным этапом во всех методиках очистки РНК. Гомогенизацию проводят в лизирующем буфере, который содержит гуанидин тиоцианат, ингибирующий клеточные РНКазы.

- *Лизирующий буфер, рекомендованный для использования в практикуме, помимо гуанидин тиоцианата, содержит фенол.*

Большинство тканей легко растворяются в лизирующем буфере с помощью пипетирования. Однако для разрушения тканей, содержащих нерастворимые частицы (например, минеральный скелет или хитин), может потребоваться стеклянный гомогенизатор Даунса или полипропиленовый пестик для пробирок. Чтобы избежать деградации РНК, ткань, особенно свежую, следует гомогенизировать как можно быстрее и тщательнее.

После гомогенизации тканей к лизату клеток (который содержит буфер с гуанидином тиоцианатом и фенолом) добавляют хлороформ и центрифугируют.

Так как плотности органических растворителей отличны от плотности воды, при центрифугировании эмульсии лизата клеток происходит разделение фаз, и образуется два отдельных слоя: нижний органический, состоящий из фенола с хлороформом, и верхний, представляющий собой водный раствор. При этом белки денатурируют и образуют преципитат, который располагается узкой полосой на границе водной и органической фаз. Нуклеиновые кислоты, будучи водорастворимыми, оказываются в водной фазе.

Чтобы избавиться от солей и следов фенола, РНК переосаждают (изопропиловым или этиловым спиртом) и растворяют в воде.

- *Очищенную РНК следует растворять только в деионизированной воде, свободной от РНКаз. Использовать ТЕ-буфер или другие буферные растворы не рекомендуется. Строго не рекомендуется использовать диэтилпирокарбонат (DEPC), так как он может выступать ингибитором ферментативных реакций при дальнейших манипуляциях с образцом РНК.*
- *На этапе растворения РНК требуется избегать контакта содержимого пробирки с кожей, так как на поверхности кожи присутствуют РНКазы, которые при попадании в пробирку быстро деградируют РНК.*

Водный раствор РНК следует держать во льду и заморозить сразу после использования. Препарат РНК следует хранить при температуре –20 °С в воде или в виде осадка под спиртом (предпочтительно для длительного хранения).

3.1.2. Экспресс-анализ качества выделенной РНК

Для экспресс-анализа препарата очищенной РНК рекомендуется воспользоваться методом электрофореза в агарозном геле в неденатурирующих условиях (с ТАЕ-буфером) с окрашиванием бромистым этидием. Этот метод позволяет визуально оценить концентрацию нуклеиновых кислот в диапазоне 5–500 нг/мкл с погрешностью в 25–50% при работе с очень небольшим количеством материала.

- *Гель-электрофорез в денатурирующих условиях (в присутсвии формальдегида) [2] дает более точную информацию о состоянии РНК, но требует больше времени и сил.*
- *Проводить спектрофотометрический анализ суммарной РНК, выделенной из малых количеств биологического материала, нецелесообразно. Во-первых, снятие спектра требует довольно большого количества РНК, что не всегда выполнимо: количество РНК, выделенное из небольшого фрагмента ткани, может быть очень незначительным — 100 нг или менее. Во-вторых, спектральные данные не несут информацию о целостности РНК, а только о ее количестве. В-третьих, примесь геномной ДНК вносит существенные искажения в результаты измерения.*

Качество РНК оценивают по соотношению интенсивности полос, соответствующих 18S и 28S рРНК. При хорошем качестве выделенной РНК соотношение интенсивности полос 18S и 28S должно быть 1:1. Изменение соотношения в пользу 18S РНК свидетельствует о частичной деградации образца.

- *У ряда беспозвоночных видна только одна полоса рРНК на уровне 18S [3]. У некоторых организмов, например простейших, рРНК сегментирована — в этом случае суммарная РНК на электрофореграмме выглядит как шмер в области 2–3 т.п.о.*

Если РНК имеет длину меньше ожидаемой или выглядит деградированной по данным электрофореза, необходимо проверить чистоту и качество реагентов для выделения РНК и повторить выделение.

- *Частично деградированную РНК иногда используют для синтеза кДНК, в частности, когда нет возможности повторно провести выделение РНК. Однако следует иметь в виду, что количество полноразмерных последовательностей кДНК в таком образце снижено. Особенно это относится к протяженным молекулам.*

Препарат суммарной РНК часто содержит примесь геномной ДНК, которая на электрофореграмме выглядит как шмер высокомолекулярной фракции (в виде облака или полосы в области лунки).

Как правило, примесь геномной ДНК не влияет на качество синтеза кДНК с использованием олиго(dT)-содержащего праймера (см. раздел 3.2 Теоретической части). Но при слишком высокой ее концентрации в препарате РНК реакция синтеза кДНК может пройти менее эффективно. Избыток геномной ДНК может быть удален переосаждением образца 12M LiCl (Приложение 2) или дополнительной очисткой на колонке.

- *В некоторых протоколах рекомендуется избавляться от фракции геномной ДНК с помощью обработки ДНКазами или дополнительной экстракцией кислым фенолом, что приводит к частичной деградации ДНК, но сохраняет РНК. Однако короткие фрагменты деградированной ДНК, которые остаются в препарате, могут выступать как случайная затравка для РНК-зависимой ДНК полимеразы при синтезе первой цепи кДНК, и это снижает эффективность последующей амплификации кДНК.*

После анализа качества препарата РНК можно переходить к процедуре синтеза кДНК.

3.2. Синтез кДНК на матрице суммарной РНК (задача 2)

Суммарный препарат РНК содержит матричную РНК (мРНК, 0.5%–5% от общего содержания РНК клетки), рибосомальную РНК (рРНК, 80–85%), и транспортную РНК (тРНК, около 10%). При исследовании транскриптов интерес представляет именно матричная РНК, а остальные фракции являются балластом. Матричная мРНК эукариот обычно полиаденилирована, т.е. содержит на 3'-конце последовательность, состоящую из 100–200 остатков адениловой кислоты (поли(А) последовательность). Это позволяет провести обогащение образца РНК последовательностями мРНК, применяя методы на основе селективного взаимодействия олиго(dT) олигонуклеотида (содержащего последовательность из 20–30 остатков деокситимидиновой кислоты) с полиаденилированным участком.

Разработаны протоколы по очистке поли(А)-содержащей фракции из препаратов суммарной РНК на колонках с олиго(dT) целлюлозой. Они, однако, требуют значительных количеств суммарной РНК на старте и не применимы для образцов суммарной РНК, полученных из малых количеств биологического материала.

Другой подход состоит в использовании олиго(dT)-праймера при синтезе кДНК. Олиго(dT)-праймер комплементарно отжигается на поли(А) последовательности мРНК и выступает в качестве затравки для обратных транскриптаз (ревертаз), обладающих активностью РНК-зависимых ДНК полимераз.

► *Как правило, кроме олиго(dT) последовательности, такой праймер содержит на 5'-конце адаптерную последовательность, которую впоследствии используют для амплификации кДНК.*

Для синтеза протяженных (полноразмерных) молекул кДНК обычно используют обратную транскриптазу вируса лейкемии мышей Молони (MMLV, от murine moloney leukemia virus) и ее мутантные формы. Другие обратные транскриптазы, такие как AMV (avian moloney virus) и Tth-полимераза (*Thermus thermophilis*), менее процессивны и обладают меньшей точностью синтеза.

В рамках Практикума первую цепь кДНК синтезируют с помощью метода синтеза кДНК со сменой матрицы (template switching cDNA synthesis), реализованного в наборе реактивов Mint kit (кат. # SK001, Евроген).

Среди различных протоколов приготовления двухцепочечной дц-кДНК этот метод является наиболее эффективным и простым в использовании. Он основан на способности некоторых мутантов MMLV ревертазы (например, Mint ревертазы) по достижению конца РНК-матрицы нематрично добавлять на 3'-конец новосинтезированной цепи кДНК несколько нуклеотидных остатков, преимущественно dC [4, 5].

Синтез первой цепи кДНК начинается на РНК матрице с 3’-концевого олиго(dT)-праймера, состоящего из олиго(dT) последовательности и универсальной адаптерной последовательности. По окончании матричного синтеза обратная транскриптаза добавляет несколько нуклеотидов dC на конец первой цепи. Образованная первая цепь содержит последовательность олиго(dT)-праймера на 5’-конце и олиго(dC) последовательность на 3’-конце. Эта олиго(dC) последовательность служит местом отжига олигонуклеотидного адаптера (PlugOligo), который имеет комплементарную олиго(dG) последовательность на 3’-конце, и «внешнюю» универсальную адаптерную часть. Обратная транскриптаза воспринимает PlugOligo как продолжение РНК-матрицы и продолжает синтез первой цепи по PlugOligo-матрице.

- *3’-конец PlugOligo-адаптора химически заблокирован, что предотвращает его участие в реакции как неспецифического праймера.*

В итоге, первая цепькДНК оказывается фланкирована с обеих сторон универсальной последовательностью, которая со стороны 3’-конца была введена с помощью 3’-праймера, а со стороны 5’-конца — с помощью PlugOligo адаптера (Рисунок 1).

Полученную первую цепь кДНК амплифицируют, используя праймер M1, который отжигается на универсальную последовательность адаптеров. Для получения образцов двухцепочечной кДНК, обогащенных полноразмерными последовательностями (то есть, содержащими полную кодирующую последовательность и нетранслируемые 5’- и 3’-концевые области), используют ДНК-полимеразы и смеси полимераз, адаптированные для амплификации длинных молекул ДНК (например, Encyclo полимераза, кат. ## PK002S/L, Евроген).

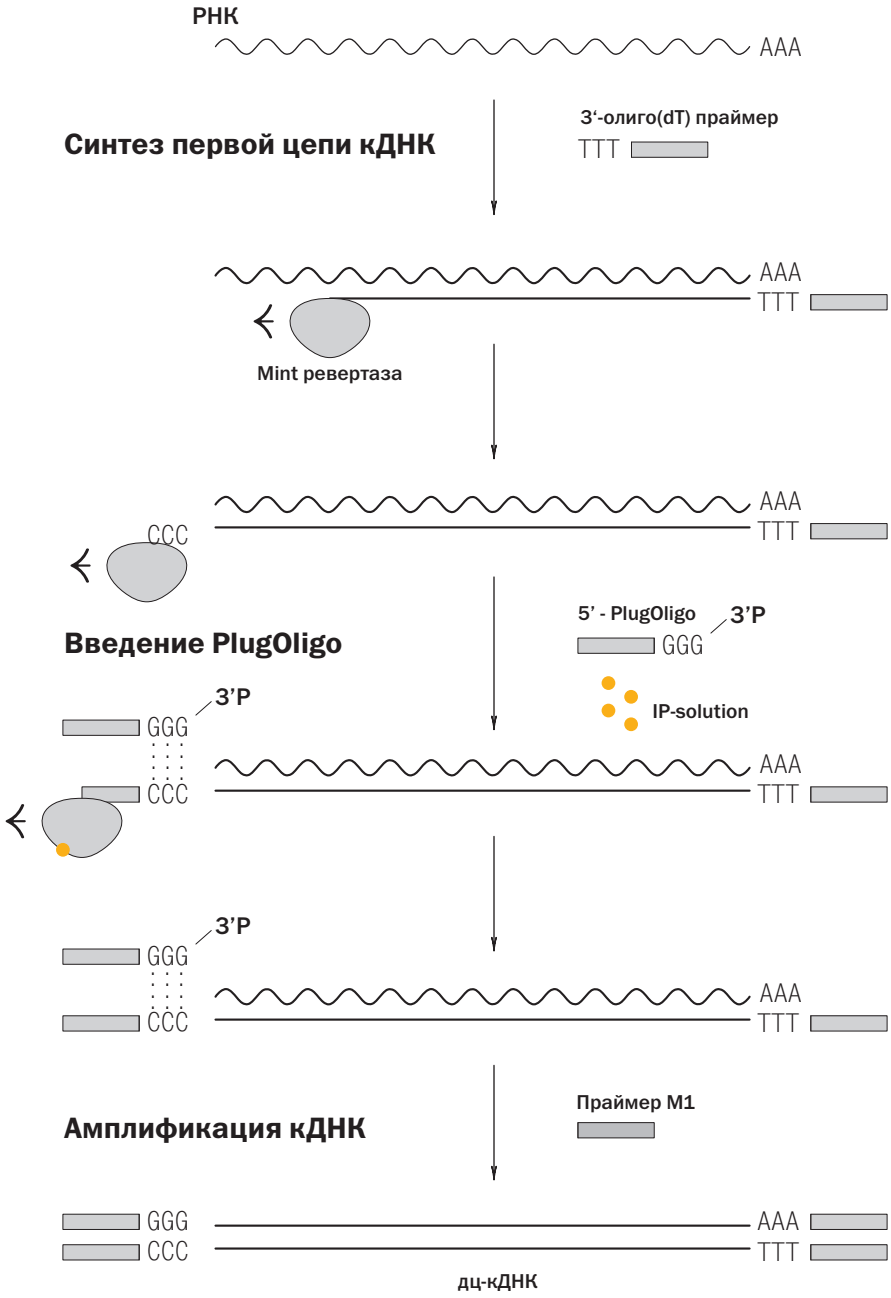

Рисунок 1 — схема синтеза дц-кДНК с использованием набора реактивов Mint kit.

3.3. Идентификация 3’- и 5’-концевых фрагментов целевых транскриптов (задача 3)

Разработан ряд технологий под общим названием Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE), которые позволяют идентифицировать 3’- и 5’-концевые фрагменты целевых транскриптов при наличии информации о фрагменте его нуклеотидной или аминокислотной последовательности.

Полученные в результате 3’- и 5’-RACE данные о последовательности концов целевой молекулы кДНК используют для дизайна встречных праймеров, которые участвуют в амплификации внутренней части молекулы кДНК.

3.3.1. Амплификация 3’-концевых фрагментов кДНК, (3’-RACE)

Большая часть методов 3’-RACE основана на использовании введенной с олиго(dT)-праймером известной последовательности адаптера, находящейся на 5’-конце первой цепи кДНК (раздел 3.2).

Для амплификации 3’-концевого фрагмента целевой кДНК осуществляют амплификацию с праймера, комплементарного этой адаптерной последовательности и встречного ген-специфического праймера, отжигающегося на известную последовательность целевого гена.

Однако в ходе такой ПЦР кроме амплификации целевого фрагмента происходит эффективная наработка неспецифических продуктов, например, с одного адаптерного праймера.

В различных технологиях RACE используют разные подходы для подавления неспецифической амплификации и селекции целевого продукта.

В рамках настоящего практикума предлагается технология ПЦР «с выходом наружу» — step-out ПЦР [5], в которой подавление нежелательной амплификации с адаптерного праймера достигается за счет введения в продукт RACE инвертированных концевых повторов (ИКП) и использования эффекта селективной супрессии ПЦР (ССП-эффект) [6].

ССП-эффект заключается в ингибировании амплификации молекул ДНК, фланкированных ИКП, в ПЦР с праймером, отжигающимся на внешнюю часть ИКП, при условии, что длина праймера значительно меньше длины ИКП (Рисунок 2). В ходе такой ПЦР во время охлаждения образца после денатурации внутримолекулярная гибридизация ИКП происходит раньше, чем отжиг праймера, так как ее температура выше температуры отжига праймера. Только небольшая часть молекул ДНК достигает температуры отжига праймера без формирования вторичной структуры, закрывающей сайт отжига праймера. Эти молекулы, на которые праймер все-таки отжигается, после синтеза второй цепи ДНК восстанавливают исходную структуру, что обеспечивает подавление их амплификации в дальнейших циклах ПЦР.

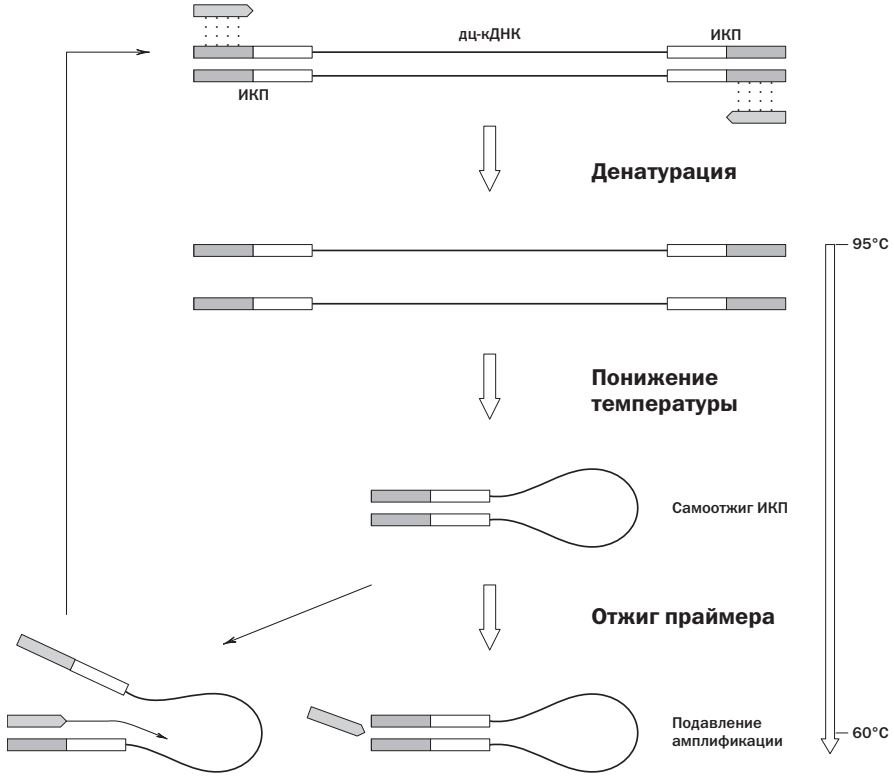

Рисунок 2 — эффект супрессии ПЦР.

Праймеры, адаптеры и комплементарные им последовательности обозначены прямоугольниками. ИКП — инвертированные концевые повторы.

Степень ингибирования амплификации зависит от многих параметров, из которых основными являются следующие:

- Различия в температурах отжига ИКП и праймера, используемого для амплификации.
  Оптимально использовать ИКП длиной 40–50 п.о. и повышенным содержанием GC-пар во внутренней (супрессионной) части и праймера, соответствующего внешней части ИКП (длиной 20–25 п.о.).
- Длина молекулы ДНК, несущей ИКП.
  Чем длиннее молекула, тем меньше вероятность внутримолекулярной гибридизации ИКП. Таким образом, супрессия не влияет (или влияет слабо) на амплификацию очень длинных молекул ДНК (пороговая длина зависит от конкретных условий и обычно составляет 6–8 т.п.о.).
- Концентрация праймера в ПЦР.
  ССП-эффект зависит от конкуренции между внутримолекулярной гибридизацией ИКП и отжигом праймера, используемого для ПЦР. Поэтому супрессия ПЦР более эффективна при низких концентрациях праймера.

3.3.2. ПЦР «с заглублением» (nested ПЦР) и ПЦР с «выходом наружу» (step-out ПЦР)

При амплификации с использованием вырожденного праймера продукт ПЦР редко оказывается гомогенным. Для выделения гомогенного целевого фрагмента проводят один или несколько дополнительных раундов амплификации в так называемой nested ПЦР (переход на «заглубленный» праймер в ходе ПЦР). В этом случае продукт первой амплификации используют в качестве матрицы для ПЦР с адаптерным праймером и новым ген-специфическим праймером, который имеет сайт отжига внутри целевой последовательности.

Если продукт nested PCR все еще не является гомогенным, проводят еще один раунд «заглубления». Одновременно с nested ПЦР для подавления неспецифической амплификации осуществляют ПЦР «с выходом наружу» — step-out ПЦР (Рисунок 3).

Каждый следующий раунд проводят с использованием новой смеси Step-out mix, где 3'-фрагмент супрессионного адаптера комплементарен последовательности фланкирующей кДНК, а 5'-конец представляет собой новую адаптерную последовательность. Короткий праймер идентичен этой новой адаптерной части длинного праймера. Таким образом, на каждом новом раунде амплификации, одновременно с «заглублением» в изучаемый ген, осуществляется переход «наружу» на новый адаптерный участок на 3'-конце молекулы кДНК.

Если после нескольких раундов амплификации получается гомогенный продукт предсказанного размера, переходят к его клонированию и секвенированию. Полученную в результате информацию о нуклеотидной последовательности целевого фрагмента используют при дизайне ген-специфических праймеров (без вырожденных позиций) для клонирования недостающих фрагментов целевого гена, например, 5'-концевого фрагмента (п. 3.3.4 на стр. 26).

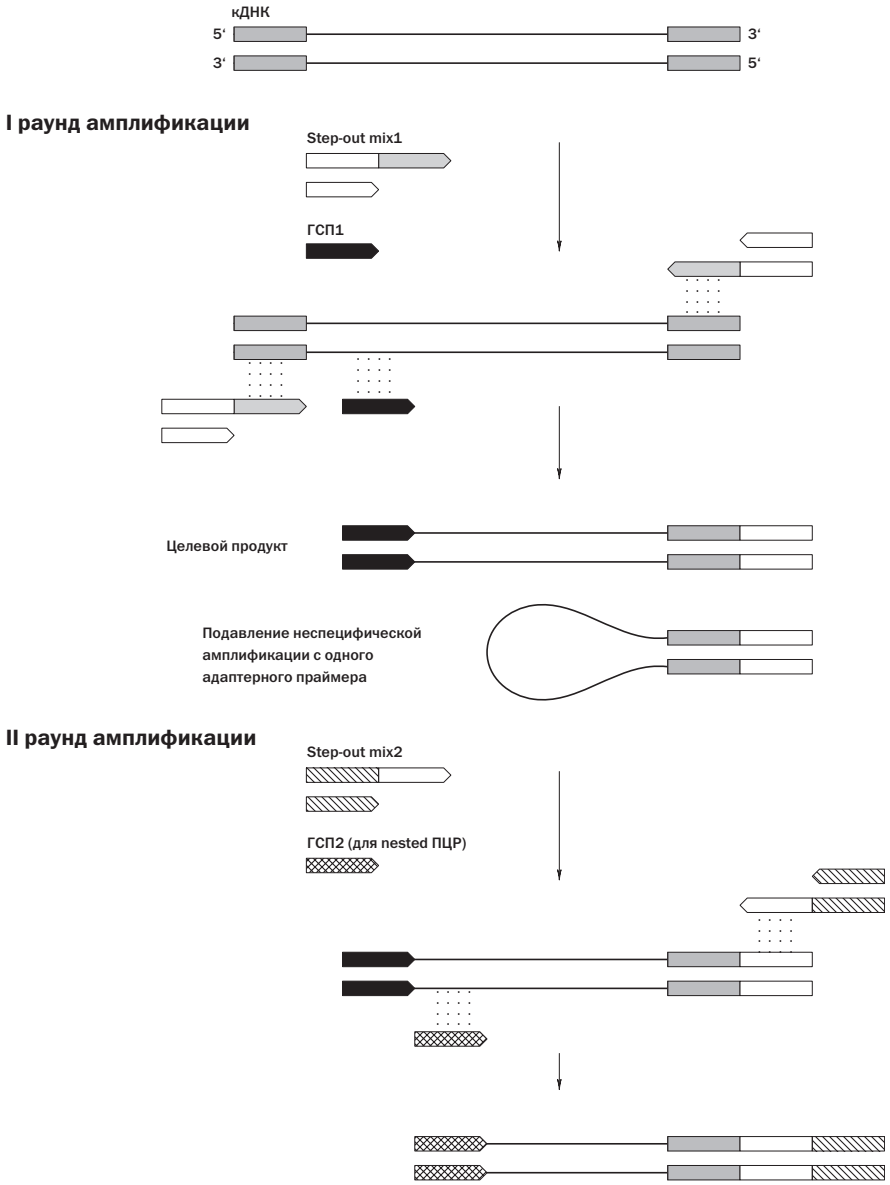

Рисунок 3 — схема быстрой амплификации 3'-концевого фрагмента целевого транскрипта в двух раундах амплификации с применением технологий nested ПЦР и step-out ПЦР.

Праймеры, адаптеры и комплементарные им последовательности обозначены прямоугольниками. ГСП — ген-специфический праймер.

3.3.3. ПЦР с вырожденными праймерами

В случаях, когда исследователь не имеет информации о нуклеотидной последовательности фрагмента целевого транскрипта и располагает данными только о частичной аминокислотной последовательности белка, амплификация фрагментов целевого гена может быть осуществлена с использованием вырожденных праймеров.

Вследствие вырожденности генетического кода, одну аминокислотную последовательность может кодировать несколько нуклеотидных (Таблица 1). Вырожденный праймер представляет собой смесь олигонуклеотидов, кодирующих одну и ту же аминокислотную последовательность и отличающихся по одной или нескольким нуклеотидным позициям. Так, например, если целевой ген кодирует аминокислотную последовательность «LFYGW», последовательность вырожденного праймера будет выглядеть следующим образом: (T/C)TN TT(T/C) TA(T/C) GGN TGG.

► *При дизайне вырожденных праймеров предпочтение следует отдать фрагментам аминокислотной последовательности с минимальной вырожденностью кода. Желательно, чтобы «вырожденные позиции» не затрагивали 3'-конец праймера.*

Таблица 1 — таблица кодонов РНК.

1-ое основание	2-ое основание			
	U (T)	C	A	G
U (T)	UUU (Phe/F) UUC (Phe/F) UUA (Leu/L) UUG (Leu/L)	UCU (Ser/S) UCC (Ser/S) UCA (Ser/S) UCG (Ser/S)	UAU (Tyr/Y) UAC (Tyr/Y) UAA (Стоп-кодон) UAG (Стоп-кодон)	UGU (Cys/C) UGC (Cys/C) UGA (Стоп-кодон) UGG (Trp/W)
C	CUU (Leu/L) CUC (Leu/L) CUA (Leu/L) CUG (Leu/L)	CCU (Pro/P) CCC (Pro/P) CCA (Pro/P) CCG (Pro/P)	CAU (His/H) CAC (His/H) CAA (Gln/Q) CAG (Gln/Q)	CGU (Arg/R) CGC (Arg/R) CGA (Arg/R) CGG (Arg/R)
A	AUU (Ile/I) AUC (Ile/I) AUA (Ile/I) AUG (Met/M)	ACU (Thr/T) ACC (Thr/T) ACA (Thr/T) ACG (Thr/T)	AAU (Asn/N) AAC (Asn/N) AAA (Lys/K) AAG (Lys/K)	AGU (Ser/S) AGC (Ser/S) AGA (Arg/R) AGG (Arg/R)
G	GUU (Val/V) GUC (Val/V) GUA (Val/V) GUG (Val/V)	GCU (Ala/A) GCC (Ala/A) GCA (Ala/A) GCG (Ala/A)	GAU (Asp/D) GAC (Asp/D) GAA (Glu/E) GAG (Glu/E)	GGU (Gly/G) GGC (Gly/G) GGA (Gly/G) GGG (Gly/G)

Если известны только структуры гомологичных белков из других организмов, для дизайна вырожденных праймеров используют высококонсервативные участки аминокислотных последовательностей, которые находят с помощью множественного выравнивания.

- *На Рисунке 4 показано множественное выравнивание последовательностей флуоресцентных белков различных коралловых полипов. Затемнением обозначены высококонсервативные позиции. Подчеркиванием обозначены консервативные участки аминокислотной последовательности, которые могут быть использованы для дизайна вырожденных праймеров. В рамках практикума рекомендуется использовать указанные участки аминокислотной последовательности для отработки навыков самостоятельного дизайна вырожденных праймеров. По окончании работы сравните полученные структуры с последовательностями вырожденных праймеров, показанных на Рисунке 5.*

Эффективность работы вырожденных праймеров намного ниже, чем у специфических, и получаемый ПЦР-продукт часто неоднороден. Чтобы обогатить образец целевыми последовательностями приходится проводить несколько последовательных раундов nested ПЦР.

```
EqRFP       ----------------------------------------MSELIKENMHMKLYM   15
ClavGFP3    MKCKFVFCLSFLVLAITNANILKRYEADLEGKTSRIPKALTTMSVIKPDMKIKLKM   56
ClavGFP2    MKCKFVFCLSFLVLAITNANMLKRYEADLEGKTSRIPKALTTMSVIKPDMKIKLKM   56
ClavGFP4    MKCKFVFCLSFLVPAITNANILKRYEADLEGKTSRIPKVLTTMSVIKPDMKIKLKM   56
ClavGFP1    MKCKFVFCLSFLVLAITNANIFLRNEADLEEKTLRIPKALTTMGVIKPDMKIKLKM   56
SarcGFP     ----------------------------------------MSVIKQEMKIKLHM   14
McGFP       ----------------------------------------MSVIKPDMKIKLRM   14
CmGFP       ----------------------------------------MNVIKPDMRIKLRM   14
DendGFP     ----------------------------------------MNLIKEDMRVKVHM   14
ZoanFP538   ---------------------------------------MAHSKHGLKEEMTMKYHM   18
consensus   ........................................m..IK..M..Kl.M

EqRFP       EGTVNNHHFKCTSEGERKPYEGTQTMKIKVVEGGPLPFAFDILATSFMYGSKTFIN   71
ClavGFP3    EGNVNGHAFVIEGEGEGKPYGGTHTLNLEVKEGAPLPFSYDILSNAFAYGNRALTK  112
ClavGFP2    EGNVNGHAFVIEGKGEGKPYDGTHTLNLEVKEGAPLPFSYDILSNAFAYGNRALTK  112
ClavGFP4    EGNVNGHAFVIEGEGEGKPYDGTHTLNLEVKEGAPLPFSYDILSNAFAYGNRALTK  112
ClavGFP1    EGNVNGHAFVIEGEGEGKPYDGTHTLNLEVKEGAPLPFSYDILSNAFQYGNRALTK  112
SarcGFP     EGNVNGHAFVIEGDGKGKPYDGTQTLNLTVKEGAPLPFSYDILTNAFQYGNRAFTK   70
McGFP       EGAVNGHNFVIEGEGKGKPFEGTQTINLTVKEGGPLPFAYDILTAAFQYGNRAFTK   70
CmGFP       EGAVNGHKFVILGDGNGKPYEGTQTIDVTVKEGGPLPFAYDILTSAFQYGNRVFTK   70
DendGFP     EGNVNGHAFVIEGEGKGKPYEGTQTLNLTVKEGAPLPFSYDILTTALHYGNRVFTK   70
ZoanFP538   EGGVNGHKFVITGEGIGYPFKGKQTINLGVIEGGPLPFSEDILSAGFKYGDRIFIE   74
consensus   EG.VNGH.FVI.G.G.GKPy.GT.T.nl.VkEG.PLPF.yDIL..aF.YGnR..Tk

EqRFP       HTQGIPDLFKQSFPEGFTWERITTYEDGGVLTATQDT--SLQNGCIIYNVKINGVN  125
ClavGFP3    YPDDIADYFKQSFPEGYSWERSMTFEDKGIVTVETDV--SMEDDCFIYKIRFDGVN  166
ClavGFP2    YPDNIADYFKQSFPEGYSWERSMTFEDKGIVTVETDV--SMEDDCFIYKIRFDGVN  166
ClavGFP4    YPDDIADYFKQSFPEGYSWERSMTFEDKGIVTVETDV--SMEDDCFIYKIRFDGVN  166
ClavGFP1    YPDDIADYFKQSFPEGYSWERTMTFEDKGIVKVKSDI--SMEEDSFIYEIRFDGMN  166
SarcGFP     YPADIPDYFKQTFPEGYSWERTMSYEDNAICNVRSEI--SMEGDCFIYKIRFDGKN  124
McGFP       YPRDIADYFKQSFPEGYSWERSMTYEDQGICIIKSDI--RMEGDCFIYEIRYDGVN  124
CmGFP       YPDDIADYFKQSFPVGYSWERSMTYEDGGICTVSSDI--KMEGNSFIYEIRFHGLN  124
DendGFP     YPEDIPDYFKQSFPEGYSWERTMTYEDKGICTIRSDI--SLEGDCFFQNVRFNGMN  124
ZoanFP538   YPQDIVDYFKNSCPAGYTWGRSFLFEDGAVCICNVDITVSVKENCIYHKSIFNGMN  130
consensus   YP.dI.DYFKQSFPeGYsWER.mt.ED.gi.....D...s.e..cfiy..rf.G.N

EqRFP       FPSNGSVMQKKTLGWEANTEMLYPA--DGGLRGHSQMALKLVGGGYLHCSFKTTYR  179
ClavGFP3    FPPNGPVMQKKTLRWEPSTEIMYVR--DGVLIGDISHALLLEGGGHYRCDFKSIYK  220
ClavGFP2    FPPNGPVMQKKTLRWEPSTEIMYVR--DGVLIGDISHALLLEGGGHYRCDFKSIYK  220
ClavGFP4    FPPNGPVMQKKTLRWEPSTEIMYVR--DGVLIGDISHALLLEGGGHYRCDFKSIYK  220
ClavGFP1    FPPNGPVMQKKTLKWEPSTEIMYVR--DGVLVGDISHSLLLEGGGHYRCDFKSIYK  220
SarcGFP     FPPNGPVMQKKTLKWEPSTEMMYVR--DGFLMGDVNMALLLEGGGHHRCDFKTSYK  178
McGFP       FPPSGPVMQKKTLKWEPSTEKMYVR--DGVLKGDVNMALLLEGGGHYRCDFRSTYK  178
CmGFP       FPSDGPVMQKKTVKWEPSTEKMYVR--DGVLKGDVNMTLLLEGGGHYRCDFKSTYK  178
DendGFP     FPPNGPVMQKKTLKWEPSTEKLHVR--DGLLVGNINMALLLEGGGHYLCDFKTTYK  178
ZoanFP538   FPADGPVMKKMTTNWEASCEKIMPVPKQGILKGDVSMYLLLKDGGRYRCQFDTVYK  186
consensus   FP..GPVMQKKTl.WEpSTE..yvr..DG.L.Gd....LLLeGGGhyrCdFk..YK

EqRFP       SKKPAKNLKMPGFHFVDHRLERIKEADKETY-VEQHEMAVAKYCD-LPSKLGHR  231
ClavGFP3    AKK---VVKLPDYHYVDHRIEILSHDKDYNK-VTLYENAVARYSL-LPSQA---  266
ClavGFP2    AKK---VVKLPDYHYVDHRIEILSHDKDYNK-VTLFENAVARYSL-LPSQA---  266
ClavGFP4    AKK---VVKLPDYHYVDHRIEILSHDKDYNK-VTLYENAVARNSL-LPSQA---  266
ClavGFP1    AKK---VVKLPDYHFVDHRIEILNHDKDYNK-VTLYENAVARYSL-LPSQA---  266
SarcGFP     AKK---VVQLPDYHYVDHRIEILSHDRDYSK-VKLYENAVARYSL-LPSQA---  224
McGFP       AKK---RVQLPDYHFVDHRIEILSHDNDYNT-VKLSENAEARYSM-LPSQAK--  225
CmGFP       AKR---AVQLPDYHYIDHRIEILSHDKDYNK-VKLCENAAARCSM-LPSQAK--  225
DendGFP     AKK---VVQLPDYHFVDHRIEILSNDSDYNK-VKLYEHGVARYSP-LPSQAW--  225
ZoanFP538   AKS--VPSKMPEWHFIQHKLLREDRSDAKNQKWQLTEHAIAFPSALA-------  231
consensus   AKk...v.lPdyH.vDHRiEil..d.dyn..V.L.E.A.Ar.S..LPSqa...
```

Рисунок 4 — множественное выравнивание аминокислотных последовательностей флуоресцентных белков различных коралловых полипов.

Eq — *Entacmaea quadricolor*; Dend — *Dendronephthya sp.*; Mc – *Montastraea cavernosa*; Cm — *Cyphastrea microphthalma*; Clav — *Clavularia sp.*; Zoan — *Zoantus sp*. Цветом выделены консервативные позиции: черный — 100% совпадений, серый — 80% совпадений.

```
Dir1-NGH 5'  -  GA(A/G)  GGN  AA(C/T)  GTN  AA(C/T)  GGN  CA
                   E      G      N      V      N      G   H

Dir2-NFP 5'  -  GT  TT(T/C)  GA(T/C)  GGN  (A/G)TN  AA(C/T)  TT(T/C)  CC
                       F        D      G     M/V       N        F      P

Dir3-WEP 5'  -  AA(A/G)  ACN  TTN  A(A/G)(A/G)  TGG  GA(A/G)  CC
                   K      T    L       K/R       W      E     P
```

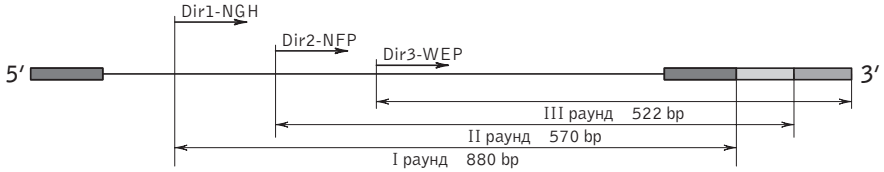

Рисунок 5 — структуры и схема расположения вырожденных праймеров для 3'-RACE гена флуоресцентного белка *Clavularia*. N — любой нуклеотид.

3.3.4. Амплификация 5'-концевого фрагмента кДНК (5'-RACE)

Первая цепь кДНК, полученная с помощью метода синтеза кДНК со меной матрицы, содержит известную последовательность адаптера на обоих концах молекулы. Это решает основную проблему, долгое время ограничивающую возможности исследователей по идентификации 5'-концевых фрагментов целевых транскриптов, — отсутствие известной последовательности для отжига праймера на 5'-концах молекул мРНК.

В ходе 5'-RACE первую цепь кДНК подвергают нескольким раундам step-out/nested ПЦР с вырожденными или ген-специфическими праймерами, направленными в сторону 5'-конца целевого гена (Рисунок 6). Первичная структура продукта 5'-RACE дает информацию о расположении стартового кодона и длине 5'-концевой нетранслируемой области.

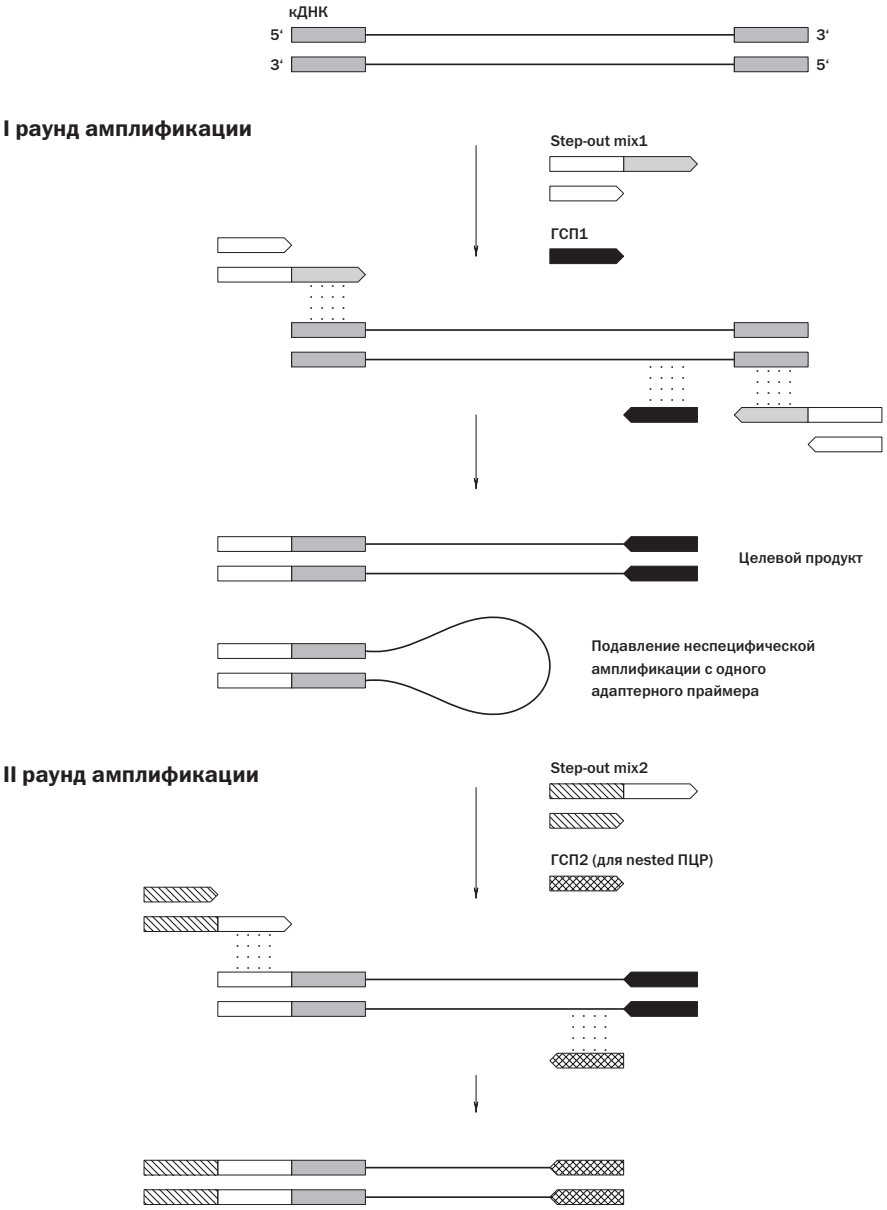

Рисунок 6 — схема быстрой амплификации 5'-концевого фрагмента целевого транскрипта в двух раундах амплификации с применением технологий nested ПЦР и step-out ПЦР.

Праймеры, адаптеры и комплементарные им последовательности обозначены прямоугольниками. ГСП — ген-специфический праймер.

3.4. Амплификация полной кодирующей последовательности гена флуоресцентного белка и его направленное клонирование в бактериальный экспрессионный вектор (задача 4)

После идентификации концевых последовательностей кДНК и определения стартового и стоп-кодонов переходят к клонированию полной кодирующей последовательности в плазмидный вектор.

Процесс клонирования включает следующие этапы:

- выбор вектора для клонирования;
- подбор структуры праймеров и амплификация целевого фрагмента ДНК;
- обработка ДНК вектора и целевого фрагмента выбранными эндонуклеазами рестрикции;
- лигирование ДНК;
- трансформация;
- отбор клонов, несущих рекомбинантные плазмиды.

3.4.1. Выбор вектора

Для клонирования продукта ПЦР с целью секвенирования часто используют универсальные векторы для быстрого клонирования, т.н. ТА-векторы: pAL2-T вектор (кат. # TA002, Евроген), pGEM-T Easy (Promega) и т.п. В ходе ПЦР амплификации Taq ДНК-полимераза нематрично присоединяет к концам синтезируемой ДНК дезоксиаденозиновые остатки. Универсальный ТА-вектор представляет собой линеаризованную плазмиду, имеющую на концах выступающие остатки «Т», что обеспечивает эффективное клонирование продукта ПЦР без использования рестрикции.

Когда предполагается клонирование гена с целью его экспрессии, выбирают вектор, содержащий регуляторные элементы, обеспечивающие экспрессию гена в выбранной системе экспрессии (дрожжи, бактерии, клетки млекопитающих или насекомых и т.д.).

► *Ген флуоресцентного белка может быть экспрессирован практически в любой гетерологической системе экспрессии, используемой в лаборатории.*

Полилинкерный участок вектора pQE-30

```
                                                Bam HI        Sac I        SmaI/XmaI      Pst I          Stops
ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCGCATGCGAGCTCGGTACCCCGGGTCGACCTGCAGCCAAGCTTAATTAGCTGAC
                  6xHis                        Sph I        Kpn I          Sal I          Hind III
```

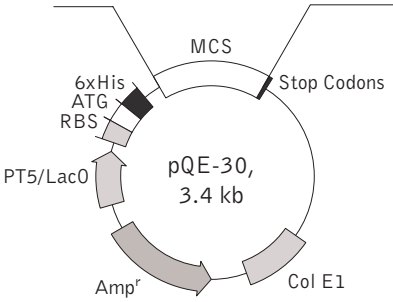

Рисунок 7 — схема вектора для клонирования pQE30.

MCS — полилинкер (от multiple cloning sites);

Stop codons — стоп-кодоны;

PT5/LacO — T5 промотор / Lac оператор;

Amp^r — ген устойчивости к ампициллину с функциональным промотором;

ColE1 — ориджин репликации;

RBS — сайт посадки рибосомы.

Для задачи практикума была выбрана бактериальная система *E. coli* и экспрессионный вектор pQE-30 (Qiagen). Вектор содержит полилинкер, селективный ген, отвечающий за устойчивость к антибиотику ампициллину, а также все регуляторные последовательности (промотор, последовательность Шайна-Дальгарно, TATA-бокс, сигнал полиаденилирования), необходимые для экспрессии белка в *E. coli* (Рисунок 7).

Выбор этого вектора определяется тем, что, во-первых, им можно трансформировать большинство распространенных штаммов *E. coli* (например, XL1-Blue).

Во-вторых, экспрессия находится под контролем T5 промотора с lac-оператором, который имеет базальный уровень экспрессии, т.е. «течет». Следовательно, синтез флуоресцентного белка в клетке будет происходить непрерывно и без индукции изопропил-D-тио-галактопиранозидом (IPTG). Это упрощает поиск целевых клонов по их фенотипу — флуоресценции в ультрафиолетовом свете.

В-третьих, целевая кодирующая ДНК после встраивания в вектор и оказывается сшита с последовательностью, кодирующей N-концевой шестигистидиновый пептид (6XHis), который позволит в дальнейшем провести одностадийную очистку рекомбинантного продукта с помощью метода металлаффинной хроматографии (IMAC).

3.4.2. Подбор структуры праймеров и амплификация ДНК для последующего клонирования

Опираясь на данные, полученные в ходе 3'- и 5'-RACE, определяют структуру праймеров для амплификации целевого фрагмента кДНК. В структуру праймеров вводят сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции (рестриктаз), по которым амплифицированный фрагмент будет клонирован в полилинкер вектора.

- *При выборе сайтов рестрикции надо убедиться, что эти сайты отсутствуют в целевой последовательности.*
- *Клонирование последовательности флуоресцентного белка в вектор рекомендовано проводить по уникальным сайтам рестрикции BamHI и HindIII. Соответствующие сайты узнавания введены в последовательности праймеров, предложенных для амплификации полной кодирующей последовательности гена флуоресцентного белка: праймер ClavFP-DirBamHI (с сайтом BamHI) отжигается на начало кодирующей последовательности (после стартового кодона ATG), праймер ClavFP-Rev-HindIII (с HindIII) на ее конец (в районе стоп-кодона).*

При дизайне праймеров для клонирования в экспрессионный вектор необходимо следить за сохранением рамки считывания, т.е. чтобы первый аминокислотный триплет вставки находился в той же рамке, что и стартовый кодон ATG вектора. Необходимо проследить, чтобы 3'-конец кодирующей последовательности содержал стоп-кодон в соответствующей рамке.

3.4.3. Рестрикция ДНК

Фрагмент ДНК, предназначенный для клонирования, очищают от реакционного буфера на колонках, а затем обрабатывают рестриктазами.

Для направленного клонирования вектор и амплифицированный фрагмент обрабатывают двумя рестриктазами. Это приводит к формированию «липких» концов, которые в процессе реакции лигирования «сшиваются» с образованием рекомбинантных кольцевых молекул.

В общем случае обработку ДНК двумя рестриктазами проводят последовательно, не менее 1 часа каждой рестриктазой с очисткой на колонке после каждой реакции для смены буферного раствора. В случаях, когда удается подобрать буфер, в котором обе рестриктазы работают с высокой эффективностью, обработку ДНК можно проводить одновременно обеими рестриктазами.

- *При подборе буфера необходимо следовать рекомендациям производителя ферментов (Таблица 2).*

После рестрикции проводят очистку вектора и фрагмента ДНК из реакционных смесей. Для очистки фрагмента ДНК (вставки) удобнее всего использовать колонки.

Очистку вектора осуществляют путем разделения реакционной смеси в препаративном агарозном геле (1.0–1.2%) и вырезания целевой полосы (линеаризованный фрагмент) под длинноволновым (мягким) ультрафиолетом — 365 нм. Затем проводят экстракцию ДНК из геля на колонке, и получают линейную форму плазмиды с выступающими «липкими» концами.

► *При слишком долгой экспозиции или при экспозиции коротковолновым «жестким» ультрафиолетом ДНК апуринизируется, что приводит к частичной деградации вектора и снижению эффективности трансформации.*

Таблица 2 — подбор буфера для одновременной обработки двумя рестриктазами определяется по данным каталогов фирм производителей.

Рестриктаза	Эффективность рестрикции в буферах производства «Сибэнзим»	Эффективность рестрикции в буферах производства «NEB»
BamHI	Buffer B 25–50% Buffer G 100% Buffer O 75–100% Buffer W 75–100% Buffer Y 25–50%	Buffer 1 75% Buffer 2 100% Buffer 3 100% Buffer 4 100%
HindIII	Buffer B 10–25% Buffer G 25–50% Buffer O 0–10% Buffer W 100% Buffer Y 0–10%	Buffer 1 50% Buffer 2 100% Buffer 3 10% Buffer 4 50%

Стадию вырезания из геля иногда опускают вследствие ее трудоемкости или отсутствия мягкого режима в трансиллюминаторе, ограничиваясь очисткой реакционной смеси на колонке. Однако в этом случае в реакцию лигирования попадают продукты неполной рестрикции вектора, что приводит к высокому фону при трансформации (образуется много колоний без вставки). Это усложняет отбор рекомбинантных клонов.

После очистки предназначенную для лигирования ДНК растворяют в 10 мМ растворе Трис-HCl, pH 8.0–8.6.

► *Для растворения фрагментов ДНК после рестрикции нельзя использовать воду, поскольку в ней может произойти частичная денатурация концов молекул ДНК.*

3.4.4. Лигирование ДНК

Подготовленные вектор и вставку лигируют с использованием ДНК-лигазы бактериофага Т4 (далее – лигаза). Комплементарные «липкие» концы молекул сшиваются лигазой с образованием кольцевых молекул.

Для повышения выхода реакции необходимо соблюсти оптимальную пропорцию молекул вектора и вставки. При направленном клонировании по «липким» концам оптимальное соотношение вектор:вставка находится в пределах 1:3 – 1:5 (по молям).

- *Вектор pQE-30 имеет длину 3 600 п.о., вставка — 800 п.о. Поскольку молекула вектора в 4.5 раз тяжелее молекулы вставки, то при их равной концентрации в реакции лигирования молярное соотношение будет в пределах 1:3 – 1:5.*

Полученную лигазную смесь используют для трансформации бактерий.

3.4.5. Трансформация

Существуют два наиболее часто применяемых способа введения плазмидной ДНК в клетки *E.coli*: электропорация и химическая трансформация (трансформация тепловым шоком).

Химический метод является самым простым и не требует специального оборудования (в случае электропорации необходимы электропоратор и комплект одноразовых кювет). Метод позволяет получить выход трансформантов от 10^5 до 10^7 в пересчете на 1 мкг плазмидной ДНК. Эффективность трансформации зависит от штамма *E.coli* и способа приготовления компетентных клеток.

Компетентные клетки трансформируют неочищенной реакционной смесью после лигирования. После трансформации бактерии высевают на чашку Петри с агаризованной селективной средой (в данном случае с ампициллином) и инкубируют в термостате при +37 °С в течение 14–16 ч.

3.4.6. Отбор клонов, несущих рекомбинантные плазмиды

Обычно для отбора целевых рекомбинантных клонов после трансформации проводят либо рестриктный анализ плазмидной ДНК, либо скрининг бактериальных колоний методом ПЦР.

Для скрининга используют пару встречных праймеров, отжигающихся на сайты, расположенные по разные стороны от полилинкера. Проводят амплификацию 8–32 случайно отобранных колоний, и по длине полученного фрагмента ДНК судят о наличии или отсутствии вставки. Для дальнейшей работы отбирают 3–4 клона со вставкой.

При работе с генами флуоресцентных белков, рекомбинантные колонии можно отобрать по их фенотипу — флуоресценции.

При отборе клонов по флуоресценции чашку с колониями следует инкубировать в течение 2–3 суток при +4 °С (в холодильнике), так как полное созревание белка (правильный фолдинг) требует длительного времени.

Флуоресценцию колоний можно детектировать с помощью флуоресцентного микроскопа или бинокуляра с фильтром FITC. Можно использовать трансиллюминатор (длина волны — 365 нм) или ультрафиолетовую (УФ) лампу.

Однако надо иметь в виду, что облученные УФ бактерии в основном гибнут и в дальнейшем крайне плохо культивируются.

В ряде случаев, благодаря тому, что при высокой концентрации флуоресцентные белки дают видимую невооруженным глазом окраску, рекомбинантные клоны можно определить визуально (они имеют зеленоватый оттенок на фоне колоний без вставки).

Отобранные клоны пересевают в жидкую среду и наращивают ночную культуру, которую используют для выделения плазмидной ДНК. Плазмиду секвенируют, чтобы убедиться в том, что полученный клон содержит целевую последовательность, и что эта последовательность не содержит ошибок, которые могли возникнуть в процессе амплификации и при клонировании.

3.5. Экспрессия гена флуоресцентного белка в бактериях *E. coli*, визуализация и выделение рекомбинантного белка (задача 5)

На практике получение бактериального штамма-продуцента, экспрессирующего гетерологичный белковый продукт, позволяет начать следующий этап исследования, связанный с изучением свойств рекомбинантного белка и доказательством его функции.

В рамках практикума в качестве завершающего этапа работы, рекомендуется провести наработку биомассы клеток, экпрессирующих флуоресцентный белок, и выделение рекомбинантного белка с помощью металлаффинной хроматогорафии (IMAC).

3.5.1. Наращивание биомассы

В зависимости от выбранного вектора экспрессия рекомбинантных генов в клетках *E.coli* может находиться под контролем конститутивного или регулируемого промотора.

Систему регуляторных элементов лактозного оперона часто используют для контроля экспрессии клонированных генов. Активация промотора происходит только после добавления индуктора, который связывается с молекулой репрессора и нарушает его взаимодействие с операторным участком ДНК. Область lac-промотора становится доступной для РНК-полимеразы, которая начинает транскрибировать гены, расположенные вслед за промотором.

При использовании индуцируемого промотора очень важно подобрать параметры индукции: оптимальную плотность жидкой культуры, при которой следует добавлять индуктор, концентрацию индуктора и время инкубации с индуктором. Эти параметры всегда подбирают индивидуально для каждой экспрессионной системы.

Обычно жидкую культуру наращивают до фазы экспоненциального роста при плотности OD 0.6–0.7 (при длине волны 600 нм) и проводят индукцию промотора путем добавления индуктора (для IPTG концентрация подбирается в диапазоне 0.1–1 мМ). Далее культивирование продолжают от 2 до 14 ч (почасовой отбор образцов биомассы позволяет установить оптимальное время культивирования).

Для вектора pQE-30, использованного в задаче для экспрессии флуоресцентного белка, индукция промотора не обязательна, так как, как уже отмечалось выше, промотор T5 обеспечивает уровень базальной экспрессии, достаточный для накопления в клетках рекомбинантного белка.

Более того, дополнительная индукция этого промотора иногда отрицательно сказывается на выходе рекомбинантного белка, поскольку флуоресцентные белки в больших концентрациях могут замедлять скорость деления бактериальных клеток.

Следует отметить, что даже без индукции скорость роста трансформированных клеток немного замедляется, а клоны со случайными рекомбинациями, приводящими к потере фенотипа, получают селективное преимущество, делятся быстро и вытесняют из жидкой культуры клетки-продуценты. Чтобы нивелировать этот эффект, при выполнении задачи практикума биомассу рекомендовано наращивать на селективной агаризованной среде в чашке Петри. При росте на агаре клетки не перемешиваются, и рост колонии ограничен только плотностью посева. Поэтому не происходит вытеснения рекомбинантных колоний колониями, утратившими фенотипический признак.

Полученную биомассу следует оставить на 2–3 суток при +4 °C, так как полное созревание белка (правильный фолдинг) требует длительного времени.

3.5.2. Визуализация рекомбинантного белка

Для визуализации флуоресценции биомассы достаточно поместить чашку Петри или пробирку с осажденными клетками под источник УФ. Зеленое свечение хорошо видно, особенно, если рядом для сравнения поместить контрольную чашку с колониями без рекомбинантного продукта.

- *При использовании трансиллюминатора нужно соблюдать осторожность, поскольку ультрафиолет может вызвать ожог роговицы глаза. Обязательно использовать защитные очки и минимизировать время наблюдения.*
- *Колонии можно также разглядеть с помощью флуоресцентного микроскопа (бинокуляра) с фильтром FITC.*

Флуоресценция биомассы является доказательством наличия функционального рекомбинантного белка. Это означает, что клонирование было произведено корректно.

- *Функциональная активность рекомбинантного продукта — большая удача для исследователя. Часто, для того, чтобы белок восстановил природную функцию, приходится долго оптимизировать условия культивирования, подбирать систему экспрессии или проводить рефолдинг неактивного продукта.*

Флуоресцентные белки обычно хорошо экспрессируются в клетках *E. coli*, при этом часть белка может формировать нерастворимые т.н. «тела включения», а часть присутствует в растворенном виде в цитоплазме.

3.5.3. Очистка рекомбинантного белка

Процесс очистки белка включает разрушение клеток (обычно для этого используют ультразвуковой гомогенизатор), отделение центрифугированием фракции нерастворимого клеточного дебриса и отбор растворимой фракции клеточного лизата.

- *При отсутствии ультразвукового гомогенизатора разрушить клетки можно, проведя 5–10 раундов замораживания-оттаивания биомассы, ресуспендированной в гипотоническом растворе, однако эффективность выделения белка при этом существенно снижается.*

Далее из лизата производят очистку белка за 6XHis участок с помощью IMAC. Этот метод позволяет получать белок со степенью очистки до 80–90%.

Принцип метода IMAC основан на специфическом взаимодействии полигистидинового домена рекомбинантного белка с ионами хелатных металлов (например, Ni^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}), иммобилизированными на инертном носителе (нитрилтрехуксусной кислоте, NTA). При нанесении пробы и дальнейшей промывке связанный белок остается на смоле, а примеси не задерживаются. Элюция белка с сорбента осуществляется имидазолом (аналог остатка гистидина, концентрационно вытесняющий рекомбинантный белок) или раствором ЭДТА (константа связывания ионов металла с EDTA выше, чем с гистидином).

Для выполнения задачи можно использовать любой коммерчески доступный хелатый сорбент. Очистку белка следует проводить согласно инструкции, сопровождающей набор для очистки.

Белковый препарат стабилен в водных растворах и хорошо хранится на +4 °C. Поэтому он может быть использован для обучения различным аналитическим методам.

Очищенный белковый препарат флуоресцентного белка рекомендуется проанализировать в зависимости от наличия инструментальной базы, например:

- Снять спектры поглощения и испускания флуоресценции на спектрофлуориметре.
- Провести разделение препарата на полакриламидном геле (SDS-PAAG). При этом флуоресцентный белок, нанесенный в неденатурирующих условиях, сохраняет флуоресценцию в ходе разделения. После окрашивания геля Кумасси видно, что денатурированный и неденатурированный белок имеют различную электрофоретическую подвижность.

4. Лабораторная работа

4.1. Рекомендации перед началом работы

4.1.1. Как избежать контаминации и деградации РНК и ДНК

Даже небольшие количества посторонней ДНК- или РНК-матрицы могут привести к образованию неспецифичного продукта в ходе синтеза кДНК. Загрязнение препаратов нуклеазами приводят к быстрой деградации ДНК и РНК. Рекомендуется:

– смешивать реагенты для синтеза кДНК в зоне, отделенной от мест выделения ДНК и РНК и анализа продуктов ПЦР;

– использовать для работы наконечники для автоматических пипеток, имеющие гидрофобный фильтр;

– для мониторинга уровня контаминации включать отрицательный контроль (в реакцию вместо ДНК или РНК-матрицы добавлять стерильную воду) в каждый эксперимент;

– осуществлять работы с РНК в стерильных условиях, перчатках, маске, халате, использовать воду деионизированную, свободную от нуклеаз.

4.1.2. Требования к рабочему месту и инструментам

► *Все нижеперечисленные меры безопасности объясняются возможностью загрязнения препаратов чужеродной ДНК и опасностью разрушения РНК рибонуклеазами из внешней среды, но не опасностью для человека при работе с РНК.*

Профессиональный подход к манипуляциям с РНК требует выделения для этих работ отдельного помещения или рабочего стола. Для работы с РНК предпочтительно использовать отдельный набор пипеток, реактивов и чистый халат.

В условиях обучения можно ограничиться выделением отдельной зоны на столе, где нужно расстелить листы чистой фильтровальной бумаги и оставить только необходимые для данной работы реактивы и оборудование. На столе, где ведется работа с РНК, желательно исключить проведение работ с использованием РНКазы (выделение плазмид) и ДНКаз (выделение белков и пр.). Возможно временное разделение работы, например, в день, когда происходят манипуляции с РНК, никакие другие работы с ДНК в учебной комнате не проводятся.

При работе следует использовать одноразовую пластиковую посуду (носики, пробирки и т.д.) и небольшие одноразовые фасовки реактивов.

Работа с РНК не требует ламинара или горелки. На основании многолетнего лабораторного опыта можно утверждать, что большая часть мифов о низкой стабильности РНК связана с плохим качеством реактивов, с недостаточной аккуратностью исследователей или с работой за одним столом с препаратами РНК и растворами РНКаз.

4.1.3. Положительный и отрицательный контроль

Положительный контроль необходим для проверки работы всех компонентов реакции. В состав наборов входят материалы, которые можно использовать в контрольном эксперименте.

Отрицательные контроли необходимы для контроля неспецифической амплификации, контаминации реагентов и экспериментальных образцов посторонними РНК и ДНК (Приложение 4).

4.1.4. Приготовление реакционных смесей

При одновременном проведении нескольких реакций рекомендуется приготовление общих реакционных смесей, содержащих общие для всех реакций компоненты. Те компоненты, которые варьируют от реакции к реакции, добавляют после разнесения аликвот реакционной смеси по пробиркам для проведения реакции.

- *Использование общей реакционной смеси позволяет уменьшить вариации в количестве различных компонентов от пробирки к пробирке. Для компенсации погрешности пипетирования реальный объем общей реакционной смеси должен примерно на 5–10% превышать расчетный.*

Перед распределением аликвот реакционной смеси по пробиркам необходимо перемешать ее содержимое, например, с помощью пипетирования. После перемешивания необходимо сбросить оставшиеся на стенках пробирки капли с помощью быстрого центрифугирования.

При смешивании малых объемов реагентов (например, при их добавлении непосредственно в пробирку для ПЦР) необходимо обратить внимание, чтобы на внешней стороне носика не оставалось дополнительных капель. После добавления реагента в пробирку следует аккуратно перемешать содержимое пипетированием.

Ферменты следует добавлять в реакционную смесь в последнюю очередь и перемешивать аккуратным пипетированием, избегая вспенивания смеси.

4.2. Задача 1. Выделение суммарной РНК. Анализ суммарной РНК методом гель-электрофореза

1. Воспользуйтесь инструкцией к набору «ExtractRNA» (кат. # BC032, Евроген).
2. В качестве биоматериала используйте небольшой фрагмент коралла.

ВНИМАНИЕ! В связи с небольшим количеством исходного биоматериала используйте 300 мкл реагента «ExtractRNA», 60 мкл хлороформа (на этапах разделения фаз и выделения РНК) и 60 мкл изопропанола (этап выделения РНК).

3. На последнем этапе выделения РНК к осадку добавьте 15–20 мкл воды, свободной от нуклеаз. Перемешайте пипетированием и с помощью вортекса, сбросьте капли центрифугированием.

► *Для улучшения растворения рекомендуется прогреть образец при 55–60 °С в течение 3–5 минут.*

Суммарная РНК может быть сразу использована для дальнейшей работы.

ВНИМАНИЕ! Все манипуляции с РНК следует проводить на льду.

Избегайте избыточных циклов замораживания-размораживания. Перед длительным хранением РНК рекомендуется распределить на аликвоты и заморозить. Очищенная РНК хранится при температуре –20 °С в течение 1 года.

4. Проверьте качество РНК методом гель-электрофореза:

– приготовьте 1.2% агарозный гель на 1X TAE-буфере (кат. ## PB022, PB122, Евроген) с бромистым этидием (0.3 мг/л) (далее, TAE-буфер).
– заполните камеру для электрофореза свежим TAE-буфером;

► *Для анализа РНК камеру следует промыть, использовать свежеприготовленный гель и чистый буфер, так как примеси РНКаз могут привести к деградации РНК во время электрофореза.*

– отберите 0.5 и 2 мкл аликвоты раствора РНК и смешайте с 2–3 объемами буфера для нанесения образцов. В соседнюю лунку добавьте 50 нг на дорожку маркер длин ДНК DNA Ladder 1 kb (кат. # NL001, Евроген);

– проведите электрофорез, используя рабочее напряжение не более 10 V/см (10 V на каждый см длины между электродами).

► *Подробно процедура гель-электрофореза описана в Приложении 1.*

5. Сравните результат электрофореза с тем, что показан на Рисунке 8. При хорошем качестве выделенной РНК соотношение интенсивности полос 18S и 28S должно быть примерно 1:1. Изменение соотношения интенсивности полос в пользу 18S и появление слабого шмера от полос рРНК в сторону фронта является первым признаком деградации РНК. Тем не менее, РНК с такой степенью деградации может быть использована для синтеза кДНК. Однако если шмер от низкомолекулярной фракции РНК столь интенсивен, что полоса рРНК не имеет выраженной нижней границы, то такая РНК не пригодна для синтеза кДНК.

► *В случае значительной примеси геномной ДНК в образце (на геле выглядит как яркое пятно высомолекулярной фракции) переосадите РНК с помощью LiCl (Приложение 2).*

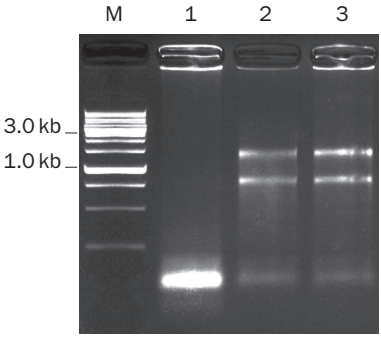

Рисунок 8 — визуализация суммарной РНК, выделенной из кораллового полипа *Clavularia*.

Дорожка 1 — деградировавшая РНК;

Дорожки 2, 3 — РНК, приемлемого качества;

M — маркер длин ДНК (DNA ladder 1 kb).

6. Поместите образцы РНК на хранение при –20 °С.

Итоги выполнения задачи 1

Получен и проанализирован препарат суммарной клеточной РНК из коралла на на гель-электрофорезе.

4.3. Задача 2. Синтез первой цепи кДНК. Амплификация двухцепочечной кДНК.

Синтез первой цепи кДНК

1. Воспользуйтесь инструкцией к набору «Mint kit» (кат. # SK001, Евроген).
2. В качестве биоматериала используйте 2 мкл РНК, полученной в задаче 1, или Контрольной РНК Clavularia (0.2 мг/мл).
3. В качестве положительного контрольного материала используйте Контрольную РНК Clavularia (0.2 мг/мл) или Control total RNA (0.5 μg/μl) из набора Mint kit (кат. # SK001, Евроген).
4. Проведите анализ результатов с помощью гель-электрофореза (1.2% агароза, TAE буфер, окраска EtBr, 4 мкл продукта ПЦР на дорожку, в качестве маркера длин используйте 50 нг DNA ladder 1kb (кат. # NL001, Евроген)).

Сравните результат гель-электрофореза с приведенным на Рисунке 9. Определите оптимальное количество циклов ПЦР для каждого экспериментального образца, исходя из следующих рекомендаций:

- ► *Избыточное число циклов ПЦР приводит к возникновению неспецифических продуктов, что крайне нежелательно для выполнения дальнейших процедур.*
- Отсутствие изменений в концентрации продукта ПЦР при добавлении циклов указывает на то, что реакция «вышла на плато». Оптимальное для амплификации образца число циклов должно быть на 1–2 цикла меньше, чем то, которое необходимо для выхода реакции на плато.
- При оптимальном количестве циклов ПЦР, продукт реакции при визуализации на агарозном геле обычно имеет следующие характеристики:

  а) Виден шмер умеренной интенсивности в области 0.25–3 т.п.о. с максимумом плотности 0.5–2 т.п.о. Интенсивность шмера (относительно интенсивности маркера) должна примерно соответствовать той, которую имеет образец кДНК, нанесенный на дорожку 2 на Рисунке 9.

- ► *Если интенсивность шмера не меняется с увеличением количества циклов ПЦР и смещена к лунке (например, как на дорожке 4 на Рисунке 9), значит, образец кДНК подвергся избыточной амплификации.*
- ► *Если интенсивность шмера существенно ниже (например, как на дорожке 1 на Рисунке 9), значит, количество циклов ПЦР было недостаточным для амплификации образца.*

  б) наличие нескольких ярких полос, соответствующих высокопредставленным транскриптам. «Размывание» таких полос свидетельствует об избыточном количестве циклов ПЦР.

5. Сохраните продукт ПЦР с оптимальным числом циклов. Продукт ПЦР можно хранить при –20 °C в течение, по меньшей мере, шести месяцев.

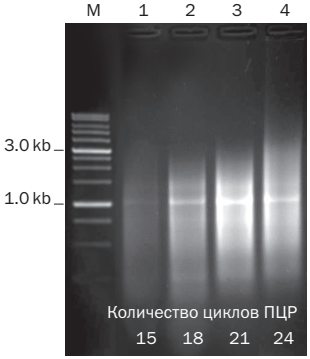

Рисунок 9 — амплифицированная кДНК кораллового полипа *Clavularia*.

Количество циклов ПЦР, которому подвергся образец кДНК, указано внизу. В данном случае оптимальному числу циклов ПЦР подвергся образец, нанесенный на дорожку 2.

Итоги выполнения задачи 2:

Методом синтеза кДНК со сменой матрицы приготовлена первая цепь опытного образца и одного или двух контрольных. Выполнена амплификация одноцепочечной кДНК для получения двухцепочечной кДНК, подобрано необходимое количество циклов для каждого образца. Образцы амплифицированной кДНК проанализированы методом гель-электрофореза.

4.4. Задача 3. Амплификация 3'-концевого участка гена флуоресцентного белка из кораллового полипа *Clavularia* (3'-RACE).

I раунд 3'-RACE

► *В первом раунде используют праймеры Dir1-NGH и Step-out mix 1.*

1. В качестве биоматериала используйте разведенную водой в 10 раз амплифицированную кДНК, полученную в задаче 2. Для этого в чистой пробирке смешайте 4 мкл образца кДНК и 36 мкл воды деионизированной, свободной от нуклеаз. Раствор перемешайте встряхиванием, сбросьте капли со стенок пробирки центрифугированием.

► *Если образец кДНК хранился перед этим при –20 °С, разморозьте его и прогрейте 2 мин при +65 °С для дезагрегации ДНК. Перемешайте содержимое пробирки перед отбором аликвоты.*

2. Подготовьте реакционную смесь для амлификации. Используйте компоненты набора «Encyclo Plus PCR kit» (кат. # PK101, Евроген):

38 мкл	Вода деионизированная, свободная от нуклеаз;
5 мкл	10X Encyclo buffer;
1 мкл	50X Смесь dNTP (10 мМ каждого);
1 мкл	Праймер для ПЦР Dir1-NGH (10 мкМ);
2 мкл	25X Смесь праймеров Step-out mix 1;
1 мкл	50X Encyclo polymerase mix.

3. Разделите реакционную смесь на две пробирки (по 24 мкл). Одну пометьте как экспериментальную, вторую как контрольную.
4. Добавьте в «экспериментальную пробирку» 1 мкл разбавленной в 10 раз амплифицированной кДНК. Разведенную кДНК сохраните при –20 °С; она потребуется при проведении задачи по амплификации полноразмерной кДНК (задача 4).
5. Добавьте в «контрольную пробирку» 1 мкл воды деионизированной, свободной от нуклеаз.

► *Контрольная амплификация без кДНК матрицы позволяет оценить уровень контаминации реактивов посторонней ДНК матрицей и избежать в дальнейшем клонирования неспецифических продуктов.*

► *В случае реального эксперимента рекомендуется также постановка дополнительных контрольных реакций для проверки специфичности праймеров. Эти реакции позволяют отличить специфический продукт ПЦР от продуктов фоновой амплификации с одного из праймеров. Описание приготовления реакционных смесей для ПЦР с постановкой всех контрольных реакций приведено в Приложении 4. Однако в рамках практикума постановка всех контрольных реакций необязательна.*

6. Если амплификатор не имеет нагревающейся крышки, добавьте каплю минерального масла в каждую пробирку. Закройте пробирки, поместите их в амплификатор.

7. Осуществите амплификацию, используя следующую программу для ПЦР:

Предварительная денатурация	1 цикл	95 °C	1 мин
Денатурация	24–26 циклов	95 °C	15 с
Отжиг		60 °C*	20 с
Элонгация		72 °C	1 мин

* Температура соответствует температуре отжига ген-специфического праймера. Для приблизительного подсчета температуры отжига праймера можно воспользоваться формулой: T=4(G+C)+2(A+T)+5.

8. По окончании амплификации проведите анализ продуктов ПЦР с помощью гель-электрофореза в 1.5% агарозе (4 мкл продукта ПЦР на дорожку параллельно с 50 нг маркера длин ДНК).

► *Подробно гель-электрофорез описан в Приложении 1.*

9. Сравните результат ПЦР с тем, что показан на Рисунке 10. Длина специфического фрагмента должна быть около 850 п.о., однако он может быть неразличим на фоне неспецифичного продукта (шмера). Если по данным электрофореза продукты ПЦР имеют низкую концентрацию в «экспериментальной пробирке», верните пробирки в амплификатор и добавьте 2–4 цикла ПЦР. При полном отсутствии продуктов реакции добавьте 6 циклов ПЦР.

10. Пробирку с продуктом ПЦР подпишите и сохраните на –20 °C.

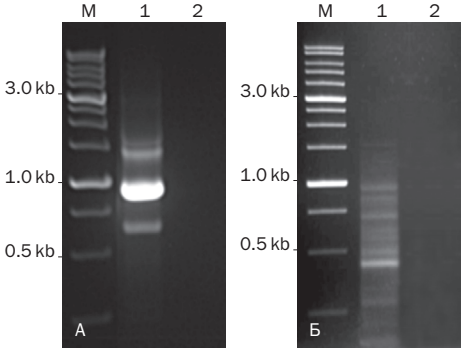

Рисунок 10 — результат первого раунда амплификации 3'-концевого фрагмента кДНК гена флуоресцентного белка из *Clavularia*.

А — результат аккуратной постановки реакции;

Б — целевой фрагмент неразличим на фоне неспецифических продуктов ПЦР;

Дорожка 1 — продукт ПЦР после 32 циклов;

Дорожка 2 — отрицательный контроль;

M — маркер длин ДНК (DNA ladder 1 kb).

II раунд 3'-RACE

▶ *Во втором раунде 3'-RACE используют праймеры Dir2-NFP и Step-out mix 2. Процедуры второго раунда полностью повторяют процедуры первого раунда, но используются другие праймеры. Это приводит к изменению условий ПЦР.*

11. Разведите в 10 раз водой аликвоту амплифицированной кДНК, полученную на предыдущей стадии (см. п. 10 выше). Как приготовить разведение описано в п. 1 данного протокола.
12. Подготовьте реакционную смесь для ПЦР:

38 мкл	Вода деионизированная, свободная от нуклеаз;
5 мкл	10X Encyclo buffer;
1 мкл	50X Смесь dNTP (10 мМ каждого);
1 мкл	Праймер для ПЦР Dir2-NFP (10 мкМ);
2 мкл	25X Смесь праймеров Step-out mix 2;
2 мкл	Амплифицированная кДНК, разбавленная в 10 раз;
1 мкл	50X Encyclo polymerase mix.

▶ *Реакционную смесь с учетом контрольных реакций можно приготовить, как описано в Приложении 4.*

13. Если амплификатор не имеет нагревающейся крышки, добавьте каплю минерального масла в пробирки и поместите их в амплификатор.
14. Осуществите амплификацию, используя следующую программу для ПЦР:

Предварительная денатурация	1 цикл	95 °C	1 мин
Денатурация	14–17 циклов	95 °C	15 с
Отжиг		60 °C	20 с
Элонгация		72 °C	1 мин

15. По окончании амплификации проведите анализ продуктов ПЦР с помощью гель-электрофореза на 1.5% агарозе (4 мкл продукта ПЦР на дорожку параллельно с 50 нг маркера длин ДНК).

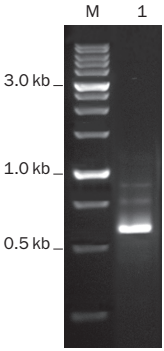

Рисунок 11 — результат второго раунда амплификации 3'-концевого фрагмента кДНК гена флуоресцентного белка из *Clavularia*.

Дорожка 1 — продукт ПЦР после 17 циклов ПЦР;
M — маркер длин ДНК (1 kb DNA ladder).

16. Сравните результат ПЦР с тем, что показан на Рисунке 11. Специфический продукт выглядит как одна или две полосы на уровне 550–570 п.о. Возможна небольшая фоновая амплификация в виде неспецифичных полос или шмера. Если продукт ПЦР имеет низкую концентрацию, верните пробирку в амплификатор и добавьте 2–4 цикла ПЦР.
Если продукт ПЦР не гомогенен (как на Рисунке 11), переходите к третьему раунду 3'-RACE. Если продукт ПЦР выглядит гомогенным, проводить третий раунд нет необходимости — переходите к выполнению п. 24 протокола.
17. Пробирку с продуктом ПЦР подпишите и сохраните на –20 °С.

III раунд 3'-RACE

► *В третьем раунде 3'-RACE используют праймеры Dir3-WEP и Step-out mix 3. Процедуры третьего раунда полностью повторяют процедуры первого раунда, но используются другие праймеры. Это приводит к изменению условий ПЦР.*

18. Разведите в 10 раз стерильной водой аликвоту амплифицированной кДНК, полученную на стадии 17. Как приготовить разведение описано в п. 1 данного протокола.
19. Подготовьте реакционную смесь для ПЦР:

38 мкл	Вода;
5 мкл	10X Буфер для ПЦР (Encyclo PCR buffer);
1 мкл	50X Смесь dNTP (10 мМ каждого);
1 мкл	Праймер для ПЦР (10 мкМ);
2 мкл	25X Смесь праймеров Step-out mix 3;
2 мкл	Амплифицированная кДНК, разбавленная в 10 раз;
1 мкл	50X Encyclo polymerase mix.

► *Реакционную смесь с учетом контрольных реакций можно приготовить, как описано в Приложении 4.*

20. Если амплификатор не имеет нагревающейся крышки, добавьте каплю минерального масла в пробирки и поместите их в амплификатор.
21. Осуществите амплификацию, используя следующую программу для ПЦР:

Предварительная денатурация	1 цикл	95 °С	1 мин
Денатурация	16–18 циклов	95 °С	15 с
Отжиг		52 °С	20 с
Элонгация		72 °С	1 мин

22. По окончании амплификации проведите анализ продуктов ПЦР с помощью гель-электрофореза на 1.5% агарозе (4 мкл продукта ПЦР на дорожку параллельно с 50 нг маркера длин ДНК).

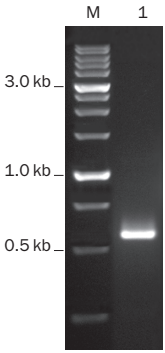

Рисунок 12 — результат третьего раунда амплификации 3'- концевого фрагмента кДНК гена флуоресцентного белка из *Clavularia*.

Дорожка 1 — продукт ПЦР после 16 циклов ПЦР;

M — маркер длин ДНК (DNA ladder 1 kb).

23. Сравните результат ПЦР с тем, что показан на Рисунке 12. Специфический продукт выглядит как полоса на уровне 530 п.о. Фоновая амплификация отсутствует.

Если по данным электрофореза продукт имеет низкую концентрацию, верните пробирку в амплификатор и добавьте 2–4 циклаПЦР.

24. Проведите сравнительный анализ на гель-электрофорезе продуктов ПЦР после первого, второго и третьего раундов 3'-RACE для оценки степени обогащения специфическим продуктом и изменением его длины в ходе nested/step-out ПЦР. Для сравнения воспользуйтесь результатом электрофореза, показанным на Рисунке 13.

25. Проведите обсуждение этапов работы, не включенных в лабораторную часть практикума: клонирование и секвенирование продуктов 3'-RACE, анализ полученных последовательностей нуклеотидов, дизайн праймеров для 5'-RACE, собственно 5'-RACE и дизайн праймеров для амплификации полной кодирующей последовательности.

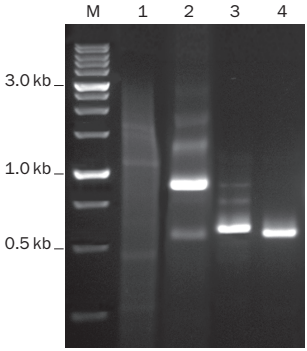

Рисунок 13 — результат трех раундов амплификации 3'-концевого фрагмента кДНК гена флуоресцентного белка *Clavularia*.

Дорожка 1 — исходная кДНК;

Дорожка 2 — I раунд 3'-RACE;

Дорожка 3 — II раунд 3'-RACE;

Дорожка 4 — III раунд 3'-RACE;

M — маркер длин ДНК (DNA ladder 1 kb).

► *Клонирование продукта 3'-RACE в TA-вектор (Приложение 5), отбор целевых клонов методом ПЦР-скрининга (Приложение 6), выделение плазмиды, содержащей продукт 3'-RACE, и секвенирование целевой вставки можно провести в качестве дополнительной задачи, если позволяют время и условия проведения практикума.*

Итоги выполнения задачи 3

В процессе двух или трех раундов 3'-RACE получен электрофоретически гомогенный продукт ПЦР, соответствующий 3'-концу мРНК. Продукты всех раундов 3'-RACE проанализированы методом гель-электрофореза.

4.5. Задача 4. Амплификация полной кодирующей последовательности гена флуоресцентного белка и его направленное клонирование в бактериальный экспрессионный вектор

► *В качестве биоматериала может быть использована кДНК из Clavularia, полученная при выполнении задачи 2, или контрольная кДНК из набора Clavularia FP cloning set.*

Амплификация

1. Разморозьте разведенную кДНК, приготовленную во время выполнения задачи 3 или разведите аликвоту контрольной кДНК из набора Clavularia FP cloning set в 10 раз водой деионизированной, свободной от нуклеаз. Процедура разведения кДНК описана в п. 1 раздела 4.4 (задача 3).
2. Подготовьте реакционную смесь для ПЦР, воспользовавшись реактивами из набора Encyclo Plus PCR kit (кат. # PK101):

38 мкл	Вода деионизированная, свободная от нуклеаз;
5 мкл	10X Encyclo buffer;
1 мкл	50X Смесь dNTP (10 мМ каждого);
1 мкл	Праймер ClavFP-DirBamHI;
1 мкл	Праймер ClavFP-Rev-HindIII;
2 мкл	кДНК, разбавленная в 10 раз;
1 мкл	50X Encyclo polymerase mix.

► *Реакционную смесь с учетом контрольных реакций можно приготовить, как описано в Приложении 4.*

3. Если амплификатор не имеет нагревающейся крышки, добавьте каплю минерального масла в пробирки и поместите их в амплификатор.

4. Осуществите амплификацию, используя следующую программу для ПЦР:

Предварительная денатурация	1 цикл	95 °C	1 мин
Денатурация		95 °C	15 с
Отжиг	25–27 циклов	60 °C	20 с
Элонгация		72 °C	1 мин

5. Проведите анализ продуктов ПЦР методом гель-электрофореза (4 мкл продукта ПЦР на дорожку параллельно с 50 нг маркера длин ДНК). Специфический продукт выглядит как полоса около 800 п.о. (Рисунок 14).

Рестрикция

6. Продукт ПЦР очистите на колонке согласно инструкции производителя. Элюируйте ДНК 40 мкл буфера для элюции (5мМ Трис-HCl, pH 8.0). Методом гель-электрофореза проанализируйте 2 мкл элюата, чтобы убедиться, что не произошло существенной потери ДНК.

7. Подготовьте реакционную смесь для рестрикции ПЦР-фрагмента, смешав реагенты в указанном порядке:

28 мкл	Очищенный ПЦР-фрагмент (15–20 нг/мкл) (ДНК со стадии 6);
4 мкл	10X буфер для рестрикции (BufferW, Сибэнзим или Buffer2, NEB);
4 мкл	10X раствор БСА (1 мг/мл), до конечной концентрации 100 мкг/мл;
2 мкл	Эндонуклеаза рестрикции BamHI (Сибэнзим или NEB, соответственно);
2 мкл	Эндонуклеаза рестрикции HindIII (Сибэнзим или NEB, соответственно).

► *Если Вы используете рестриктазы других производителей, выберите буфер для одновременной рестрикции двумя рестриктазами согласно рекомендациям производителя.*

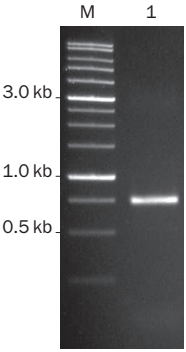

Рисунок 14 — результат амплификации фрагмента, содержащего полную кодирующую последовательность гена флуоресцентного белка *Clavularia* (дорожка 1).

M — маркер длин ДНК (DNA ladder 1 kb).

8. Подготовьте реакционную смесь для рестрикции вектора для клонирования pQE-30 (из набора Clavularia FP cloning set). Для этого смешайте реагенты в указанном порядке:

18 мкл	Вода деионизированная, свободная от нуклеаз;
10 мкл	Вектор pQE-30 (100 нг/мкл);
4 мкл	10X буфер для рестрикции (BufferW, Сибэнзим или Buffer2, NEB);
4 мкл	10X раствор БСА (1 мг/мл), до конечной концентрации 100 мкг/мл;
2 мкл	Эндонуклеаза рестрикции BamHI (Сибэнзим или NEB, соответственно);
2 мкл	Эндонуклеаза рестрикции HindIII (Сибэнзим или NEB, соответственно).

► *Если Вы используете рестриктазы других производителей, выберите буфер для одновременной рестрикции двумя рестриктазами согласно рекомендациям производителя.*

9. Инкубируйте смеси при +37 °С. Для рестрикции ПЦР-фрагмента время инкубации — 1 час. Время инкубации вектора можно увеличить до 1.5–2 часов.
10. Через 1 час инкубации очистите ПЦР-фрагмент с помощью набора Cleanup Standard (кат. # BC022S/L, Евроген). Объем элюции — 20 мкл.

► *Для элюции фрагментов ДНК после рестрикции нельзя использовать воду, так как в ней может произойти частичная денатурация концов молекул ДНК.*

11. Приготовьте 1.2% агарозный гель, желательно с широкими (7–10 мм) лунками (для нанесения проб по 10–15 мкл) для очистки вектора от продуктов неполной рестрикции.

► *Очистка вектора на геле позволяет существенно снизить количество колоний, лишенных вставки, при трансформации.*

12. Нанесите в несколько соседних лунок (в 3 или 4) весь объем реакции рестрикции вектора. Для сравнения электрофоретической подвижности линеаризованного и цельного вектора нанесите рядом 2 мкл исходной плазмиды.
13. Проведите электрофорез, используя следующие параметры: не более 8–10 объемов на каждый см расстояния между электродами, стабилизация по напряжению.
14. Поместите гель в трансиллюминатор, не снимая с подложки. Аккуратно и быстро чистым скальпелем (или тонким носиком для пипетки) отметьте под УФ-лампой фрагмент геля, содержащий наиболее интенсивно окрашенную полосу, представляющую собой линеаризованную плазмидную ДНК (Рисунок 15).

- *В трансиллюминаторе лучше использовать «мягкий» режим излучения — при 365 нм. Время экспозиции должно быть сокращено до минимума (5–10 с), так как под воздействием УФ света происходит апуринизация ДНК, что снижает эффективность клонирования.*

15. Достаньте гель из трансиллюминатора, вырежьте отмеченный фрагмент скальпелем и перенесите в чистую пробирку. Определите вес вырезанного фрагмента (взвесив пустую пробирку и пробирку с гелем).
16. После вырезания полосы рассмотрите гель под трансиллюминатором, чтобы убедиться, что большая часть линеаризованной плазмиды была вырезана.

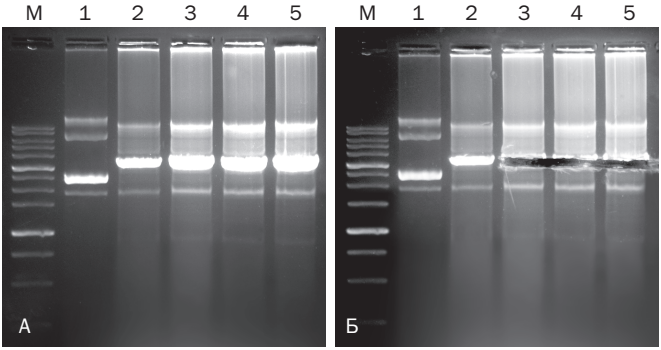

Рисунок 15 — процесс очистки вектора из рестрикционой смеси на агарозном геле.

А — результат аккуратной постановки реакции;
Б — целевой фрагмент неразличим на фоне неспецифических продуктов ПЦР;
Дорожка 1 — продукт ПЦР после 32 циклов;
Дорожка 2 — отрицательный контроль;
М — маркер длин ДНК (DNA ladder 1 kb).

17. Очистите плазмиду с помощью набора Plasmid MiniPrep 2.0 (кат. # BC221, Евроген).
18. Проанализируйте полученные препараты ДНК с помощью гель-электрофореза в 1.2% агарозе. Нанесите рядом по 1 и 2 мкл очищенной ДНК вектора и вставки. По интенсивности полос оцените их концентрацию. Для этого нанесите параллельно с опытными образцами маркер длин ДНК (25, 50 и 100 нг суммарного препарата) и визуально сравните интенсивность полос сразу после вхождения образцов в гель (разгон пробы не более 0.3–0.5 см, пока фрагменты маркера длин не успели разделиться).

Лигирование

19. Проведите ночное лигирование с помощью Т4 ДНК-лигазы (кат. # LK101S, Евроген).
Рассчитайте количество вектора и вставки, исходя из результатов оценки концентрации в п. 18. В данной задаче их количество должно составлять 15–25 нг на реакцию.

Трансформация

20. Разморозьте во льду фасовку компетентных клеток XL1-Blue (кат. # CC001, Евроген) и аккуратно перемешайте встряхиванием.
21. Приготовьте две аликвоты свежеразмороженных компетентных клеток (по 70–100 мкл) и добавьте в одну 5 мкл (1/2 объема) реакционной лигазной смеси (опытная трансформация), в другую — 1 мкл контрольной плазмиды с геном флуоресцентного белка из набора Clavularia FP cloning set (10 нг/мкл). Перемешайте содержимое пробирок осторожным встряхиванием.
22. Инкубируйте пробирки 30 мин во льду, после этого поместите их на 1 мин в водяной термостат с температурой +42 °C (тепловой шок, heat-shock).

► *Сухим термостатом для теплового шока пользоваться нельзя из-за низкой теплопроводности воздуха.*

23. Перенесите пробирки в лед на 5–10 мин.
24. Добавьте по 300 мкл теплой среды LB без антибиотика, инкубируйте 45 мин в сухом термостате при +37 °C для подращивания бактерий (с покачиванием).
25. Рассейте клетки на чашки Петри с 1.5% LB-агаром с ампициллином (100 мкг/мл). Равномерно распределите культуру по поверхности агара и тщательно разотрите микробиологическим шпателем. Открытые чашки Петри подсушите 5–10 мин рядом с пламенем горелки, после чего поставьте на 18–20 ч (на ночь) в термостат на +37 °C. В термостате чашки Петри следует размещать дном кверху, чтобы конденсат не капал на поверхность агара и не размывал колонии.

Отбор клонов

26. Для выявления рекомбинантных колоний осуществите скрининг колоний методом ПЦР, как описано в Приложении 6.
27. Поместите чашки в холодильник на +4 °C (разместив вверх дном) и оставьте на 2–3 дня.

► *Через 18–20 ч после трансформации флуоресцентный белок в рекомбинантных клонах визуально не детектируется, так как его полное созревание требует длительного времени (2–3 суток при +4 °C).*

28. Через 2–3 суток проведите отбор клонов по фенотипу. Для этого сравните флуоресценцию колоний на контрольной и опытной чашках. Найдите на опытной чашке колонии, экспрессирующие флуоресцентный белок.
Флуоресценцию можно детектировать под флуоресцентным микроскопом или бинокуляром с использованием фильтра FITC, с помощью УФ-трансиллюминатора (длина волны 295–3 675 нм) или любой УФ-лампы.

- *Если отбор клонов производится на трансиллюминаторе, то следует минимизировать время экспозиции под ультрафиолетом.*
- *Все колонии имеют желтоватую автофлуоресценцию, и только рекомбинантные клоны отличаются характерным зеленым оттенком, свойственным GFP-подобным белкам.*

29. Сравните результаты ПЦР-скрининга с результатами, полученными при отборе клонов по фенотипу. На обратной стороне чашки Петри отметьте цветным маркером 1–2 колонии, экспрессирующие флуоресцентный белок и содержащие целевую вставку.
30. Чистым носиком соскребите колонию с чашки, ресуспендируйте в 300 мкл жидкой среды LB.
31. Перенесите каплю суспензии (5–15 мкл) в пробирку с 5 мл жидкой селективной среды, инкубируйте пробирку на качалке (200–250 об/мин) при +37 °C в течение ночи для наращивания культуры.
32. Пробирку с жидкой культурой снимите с качалки, часть жидкой культуры перелейте в 1.5 или 2 мл пробирку и центрифугируйте на настольной центрифуге 5 мин при 4–5 тыс. об/мин.
33. Отбросьте супернатант. К оставшимся на дне пробирки бактериальным клеткам добавьте вторую порцию жидкой культуры и повторите центрифугирование.

- *Если запланировано выполнение задачи 5, сохраните остаток культуры и используйте его для наращивания биомассы с целью выделения рекомбинантного белка как описано в п.п. 1–3 раздела 4.6.*

34. Из полученного бактериального осадка выделите плазмиду, пользуясь набором для выделения плаздмидной ДНК и инструкцией производителя.
35. Проведите анализ препарата плазмидной ДНК с помощью гель-электрофореза (1.5% агароза, 2 мкл препарата плазмидной ДНК параллельно с 50 мкг маркера длин ДНК).

- *При решении экспериментальной задачи, для подтверждения результатов клонирования выделенную плазмидную ДНК секвенируют и проверяют правильность полученной нуклеотидной последовательности вставки. Эти этапы исключены из лабораторной работы практикума для экономии времени.*

Итоги выполнения задачи 4

Проведено направленное клонирование гена флуоресцентного белка из коралла в экспрессионный вектор. Отобраны рекомбинантные клоны. Получен и проанализирован препарат плазмидной ДНК из рекомбинантного клона.

4.6. Задача 5. Экспрессия гена флуоресцентного белка в бактериях E.coli; визуализация и выделение рекомбинантного белка.

► *Если данная задача выполняется без выполнение задачи 4, предварительно проведите трансформацию бактерий контрольной плазмидой из набора для практикума Clavularia FP cloning set как описано в п.п. 21–32 раздела 4.5 (задача 4).*

1. Пересейте остаток суспензии (п. 34 раздела 4.5) на отдельные чашки Петри. Равномерно распределите весь объем суспензии по поверхности агара и тщательно разотрите шпателем.
2. Открытые чашки Петри подсушите в течение 3–5 мин рядом с пламенем горелки, после чего поставьте вверх дном в термостат на +37 °C на ночь.
3. Через 18–20 ч перенесите чашки в холодильник на +4 °C (разместив вверх дном) и оставьте на 2–3 дня для созревания белка.
4. Достаньте чашки из холодильника. Убедитесь, что выросшая биомасса имеет флуоресценцию. Для этого поместите чашку под источник УФ на 20–30 секунд.

► *Наличие флуоресценции в биомассе является доказательством присутствия рекомбинантного белка.*

5. Соскребите бактерии с поверхности агара одноразовым пластиковым ножом или расплющенным носиком для пипетки.
6. Ресуспендируйте биомассу в 1 мл буфера для озвучивания и поместите пробирку в лед.
7. Разрушьте клетки с применением ультразвука. Подберите такой режим озвучивания, чтобы не образовывалась пена (например, 3–5 импульсов средней мощности по 20–30 секунд с перерывами по 30–40 секунд, во время озвучивания пробирку охлаждать во льду).

► *Вместо обработки ультразвуком можно провести гипотонический шок: ресуспендировать клетки в 10 мМ Трис-HCl, pH 7–8, и подвергнуть 5–10 циклам замораживания-размораживания). Эффективность выделения белка при этом существенно снижается.*

8. Клеточный дебрис осадите центрифугированием в течение 20 мин на максимальной скорости на настольной центрифуге. Аккуратно отберите надосадочную жидкость и перенесите ее в новую пробирку.

9. Проведите очистку мини-препарата рекомбинантного белка с помощью хелатного сорбента согласно инструкции производителя. Элюируйте белок 50 мкл 100 мМ раствора ЭДТА.

- *Препарат белка можно хранить при +4 °С в течение недели и при –20 °С длительное время.*

10. Поместите пробирку с белковым препаратом под УФ-трансиллюминатор или УФ-лампу для обнаружения флуоресценции.

- *В качестве дополнительных задач рекомендуется снять спектры флуоресценции белка на спектрофлуориметре и провести анализ денатурированного и неденатурированного белка с помощью гель-электрофореза в ПААГ.*

Итоги выполнения задачи 5

Продемонстрировано наличие флуоресценции в биомассе. Выделен рекомбинантный белок.

5. Приложение 1. Неденатурирующий электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле

Необходимые реактивы, расходные материалы и оборудование

- Агароза.
- 1X Трис-ацетатный буфер (TAE): 40мМ Трис-ацетат, pH 7.8–8.0, 1 мМ ЭДТА.

▶ *Используйте 50X TAE электродный буфер (кат. # PB022, Евроген) и разводите его до однократного перед использованием.*

- Концентрированный раствор бромистого этидия, 10 мг/мл (хранить при +4 °C в темной склянке).

▶ *Этидий добавляют в 1X TAE буфер перед использованием до конечной концентрации 0.3 мг/л.*

▶ *Бромистый этидий является канцерогеном! При работе с ним следует проявлять осторожность, избегая его попадания на открытые участки тела. Обязательно используйте перчатки для защиты рук.*

- Буфер для нанесения проб (Gel Loading Dye, Blue буфер (кат. # PB020, Евроген).
- Маркер молекулярных длин ДНК (кат # NL001, Евроген).
- Камера для агарозного гель-электрофореза, включая основную камеру, прозрачный для ультрафиолета лоток для геля (20 x 10 см), бортики для гелевого лотка, гребенку.
- Источник постоянного тока.
- Весы.
- Трансиллюминатор.
- Система гель-документации.
- Стеклянная колба.
- Штатив для пробирок.
- Автоматические дозаторы на 10–20, 200 и 1000 мкл.
- Микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 и 2 мл.
- Наконечники для дозаторов с фильтрами.
- Перчатки.

Протокол.

► *Электрофорез проводят в трис-ацетатном (1X TAE) электродном буфере, в который добавляют бромистый этидий до конечной концентрации 0.3 мг/л. Этот же буфер используют для приготовления геля.*

1. Установите лоток для геля строго горизонтально. Укрепите бортики для гелевого лотка. Вставьте у одного из концов геля гребенку для формирования стартовых лунок. Гребенка не должна упираться в дно лотка, на котором формируется блок геля. Зазор между дном лунки и основанием геля должен составлять 0.5–1 мм.

► *При отсутствии бортиков края лотка могут быть заклеены липкой лентой.*

2. Взвесьте необходимое количество агарозы.

► *Области эффективного разделения линейных молекул ДНК разного размера в зависимости от концентрации агарозы в геле приведены в Таблице 3.*

Таблица 3 — области эффективного разделения линейных молекул ДНК в зависимости от концентрации агарозы в геле.

Концентрация агарозы, %	Размеры фрагментов, т.п.о.
0.6	20 и более
0.8	9 – 0.7
1.0	7 – 0.5
1.5	4 – 0.2
2.0	3 – 0.1

3. Поместите навеску агарозы в стеклянную колбу, залейте свежеприготовленным 1X TAE буфером, содержащим бромистый этидий, и прогрейте колбу для растворения агарозы.

► *Во избежание пригорания агарозы нагревание лучше проводить в кипящей водяной бане или в СВЧ печи.*

4. После полного растворения агарозы остудите раствор приблизительно до +50 °С. Залейте теплый раствор агарозы в лоток так, чтобы толщина слоя агарозы составляла 4–5 мм.

5. После полного затвердения геля (20–30 мин при комнатной температуре, значительно быстрее на +4 °С) аккуратно удалите гребенку, стараясь не повредить лунки. Удалите бортики и перенесите лоток с гелем в основную камеру.

6. Залейте в камеру свежеприготовленный 1X TAE буфер, содержащий 0.3 мг/л бромистого этидия, так, чтобы гель был покрыт слоем буфера на 0.5–1.0 мм.

7. Смешайте образцы ДНК, подлежащие анализу, с 1–2 мкл буфера для нанесения проб, и внесите их в лунки геля. Наслаивание образцов проводите под буфер.

► *Обычно в лунку вносят такое количество ДНК, чтобы в индивидуальной полосе было не более 200 нг ДНК. При наличии мощного источника УФ можно увидеть полосы, содержащие 5–10 нг ДНК. При анализе продуктов ПЦР, как правило, наносят 2–4 мкл пробы.*

8. В отдельную лунку внесите 50–100 нг маркера длин ДНК, смешанного с буфером для нанесения проб.

► *Маркер длин ДНК используют для определения размера фрагментов ДНК в образце. Маркер длин ДНК, концентрация которого известна, также можно использовать для приблизительной оценки концентрации ДНК в исследуемом образце. В 2–3 лунки наносят несколько последовательно разведенных в 2 раза аликвот ДНК (или, наоборот, делают несколько разведений маркера). Через 1–2 мин после вхождения образцов в гель (пробег ДНК не далее 4–5 мм от лунок), пока фрагменты маркера не успели разделиться и выглядят как одна диффузная полоса, сравнивают интенсивности свечения исследуемых образцов и маркера длин.*

9. Подсоедините клеммы прибора к источнику питания (движение образцов ДНК идет в направлении от катода к аноду, т.е. от «–» к «+»).

10. Включите ток и установите напряжение не более 10 V/см (10 V на каждый см длины между электродами).

11. Контролируйте ход электрофореза по движению красителей.

12. По окончании электрофореза отключите прибор от сети.

13. Перенесите гель на полиэтиленовую пленку и просмотрите под трансиллюминатором.

► *При работе с источником УФ обязательно используйте защитные очки!*

14. Сфотографируйте гель с помощью системы гель-документации.

► *Фотографирование гелей проводят в проходящем или отраженном УФ-свете. Съемку проводят с использованием цифровой камеры с красным или оранжевым светофильтром.*

6. Приложение 2. Удаление избытка геномной ДНК

Необходимые реактивы, расходные материалы и оборудование

- 12M LiCl.
- 80% этиловый спирт.
- Настольная микроцентрифуга.
- Холодильник.

Протокол.

1. Добавьте к раствору РНК равный объем 12M LiCl и перемешайте встряхиванием или с помощью вортекса. Сбросьте капли со стенок пробирки центрифугированием на настольной центрифуге.
2. Инкубируйте смесь при +4°C в течение 1 ч (можно в течение ночи) или при –20 °C в течение 10 мин.

► *РНК в растворе 12M LiCl можно хранить при –20 °C.*

3. Центрифугируйте пробирку 10 мин при максимальной скорости на настольной центрифуге при комнатной температуре.
4. Аккуратно отберите и отбросьте супернатант.
5. 5) Промойте осадок 80% этиловым спиртом. Для этого аккуратно добавьте 0.3–0.5 мл спирта к осадку. Центрифугируйте на настольной центрифуге при максимальных оборотах в течение 10 мин при комнатной температуре. Отберите и отбросьте супернатант. Повторите процедуру промывки.
6. Оставьте пробирки в вертикальном положении на столе на 5–15 мин до полного высыхания осадка.
7. Растворите осадок в 15–30 мкл воды деионизированной, свободной от нуклеаз. При растворении образец рекомендуется прогреть в течение 2–3 мин при +65 °C.

7. Приложение 3. Переосаждение нуклеиновых кислот

► *Эту процедуру можно использовать для концентрирования нуклеиновых кислот и/или смены буфера в образце.*

Необходимые реактивы, расходные материалы и оборудование

- 3М ацетат натрия (pH 4.8).
- 96% этиловый спирт.
- 80% этиловый спирт.
- Настольная микроцентрифуга.
- Холодильник.

Протокол.

1. Добавьте к раствору ДНК или РНК 0.1 объем 3М ацетата натрия (pH 4.8) и 2.5–3 объема 96% этилового спирта, тщательно перемешайте встряхиванием.

► *После этой стадии нуклеиновые кислоты можно хранить при –20 °С или при –70 °С в плотно закрытой пробирке в течение длительного времени (десятки лет).*

2. Центрифугируйте образцы на настольной центрифуге при максимальных оборотах в течение 15 мин при комнатной температуре. Отберите и отбросьте супернатант.
3. Промойте осадок 80% этиловым спиртом. Для этого аккуратно добавьте 0.3–0.5 мл спирта к осадку. Центрифугируйте на настольной центрифуге при максимальных оборотах в течение 10 мин при комнатной температуре.
4. Отберите и отбросьте супернатант. Повторите процедуру промывки.
5. Осадок тщательно высушите, оставив пробирки на столе с открытой крышкой на 10–15 мин.
6. Растворите ДНК в 15–30 мкл раствора 5 мМ Трис-HCl pH 8.0 (буфер для элюции ДНК с колонок).
7. В зависимости от задачи для растворения осадка можно использовать любой другой буфер или деионизированную воду, свободную от нуклеаз.

8. Приложение 4. Контрольные реакции при постановке ПЦР

1. Контроль контаминации

Отрицательный контроль ПЦР (ОКП), в котором присутствуют все необходимые компоненты, кроме матрицы ДНК, необходим для оценки уровня контаминации. Наличие продукта амплификации в ОКП свидетельствует о загрязнении реактивов или инструментария нецелевым фрагментом ДНК, содержащим сайты отжига праймеров, используемых в ПЦР. В случае контаминации может потребоваться замена реактивов для ПЦР, замена автоматических пипеток, перенос работ по данной тематике в другое помещение.

2. Контроль специфичности праймеров

При использовании новых праймеров нужно убедиться в том, что они не имеют альтернативных сайтов отжига и не являются источником неспецифической амплификации. Для этого вместе с экспериментальной реакцией ставят две реакции контроля специфичности праймера (КСП1 и КСП2) с каждым праймером по отдельности. Отсутствие продуктов амплификации в этих реакциях означает, что праймеры можно использовать для амплификации целевого продукта. Если в одной из контрольных реакций происходит амплификация ДНК, необходимо заменить соответствующий праймер.
Появление в реакции КСП1 или КСП2 низкомолекулярного продукта (не более 40–45 п.о.) может говорить о формировании димера праймера (иногда наблюдается при превышении концентрации праймера в реакции). Как правило, это не оказывает существенного влияния на эффективность ПЦР.

3. Положительный контроль ПЦР

Отсутствие продуктов ПЦР с экспериментальной ДНК-матрицы может объясняться как отсутствием целевого фрагмента ДНК в образце, так и порчей реактивов или деградацией ДНК-матрицы. Оценить эффективность работы реактивов можно с помощью положительного контроля ПЦР (ПКП) с использованием контрольной ДНК-матрицы.

4. Подготовка реакционных смесей для ПЦР с контрольными реакциями

1. Приготовьте реакционную смесь для ПЦР, смешивая компоненты реакции в указанном порядке (объем рассчитан на 5 реакций объемом 25 мкл каждая):

97.5 мкл	Вода деионизированная, свободная от нуклеаз;
12.5 мкл	10X Encyclo buffer;
2.5 мкл	50X Смесь dNTP (10 мМ каждого);
2.5 мкл	50X Encyclo polymerase mix.

2. Аккуратно перемешайте компоненты реакционной смеси. Разделите смесь на 5 пробирок по 23 мкл и промаркируйте пробирки «Экс.» (экспериментальная), «ОКП», «КСП1», «КСП2» и «ПКП».

3. Добавьте недостающие компоненты реакции в каждую из пробирок, как указано в Таблице 4.

Таблица 4 — подготовка ПЦР-смесей с учетом контрольных реакций.

Компонент	Пробирки				
	Экс	КСП1	КСП2	ОКП	ПКП
Экспериментальная ДНК-матрица	1 мкл	1 мкл	1 мкл	—	—
Контрольная ДНК-матрица	—	—	—	—	1 мкл
Праймер 1	0.5 мкл	0.5 мкл	—	0.5 мкл	0.5 мкл
Праймер 2 (смесь Step-out mix)	0.5 мкл	—	0.5 мкл	0.5 мкл	0.5 мкл
Вода деионизированная, свободная от нуклеаз	—	0.5 мкл	0.5 мкл	1 мкл	—

9. Приложение 5. Клонирование ПЦР-фрагмента в ТА-вектор

Необходимые реактивы, расходные материалы и оборудование

- Набор Cleanup Standard для очистки ДНК из геля и реакционных смесей (кат. # BC022S, Евроген).
- Набор Plasmid Miniprep 2.0 для выделения плазмидной ДНК (кат. # BC221, Евроген).
- Набор для клонирования Quick-TA kit (кат. # TAK02, Евроген).
- Компетентные клетки для химической трансформации (XL1-Blue, DH5α или другие recA(-) штаммы любого производителя, например кат. # CC001, Евроген).
- Среда для культивирования бактерий LB, жидкая и агаризованная на чашках Петри.
- Термостат +37 °C для чашек Петри.
- Водяная баня (+42 °C).
- Шпатель микробиологический (Дригальского).

Протокол.

1. Проведите ночное лигирование с помощью набора Quick-TA kit (кат. # TAK02, Евроген). Рассчитайте количество вектора и вставки, исходя из результатов оценки концентрации методом гель-электрофореза.

2. Проведите трансформацию бактерий как описано в п.п. 20–25 раздела 4.5 на стр. 51.

10. Приложение 6. Скрининг колоний методом ПЦР

Необходимые реактивы, расходные материалы и оборудование

- Набор для практикума Clavularia FP cloning set (кат. # MB001, Евроген).
- Набор для ПЦР Encyclo Plus PCR kit (кат. # PK101, Евроген).
- Реактивы и оборудование для гель-электрофореза (Приложение 1).
- Амплификатор.
- Вортекс.
- Мини-центрифуга.
- Пробирки для ПЦР (0.5 или 0.2 мл).

► *Для скрининга удобно использовать пробирки в стрипах по 8–12 штук, 2–3 стрипа одновременно.*

- Автоматические дозаторы на 10, 20, 200 и 1 000 мкл.
- Наконечники для дозаторов с фильтами.
- Штатив для пробирок.
- Перчатки.
- Черный и цветной фломастеры-маркеры.
- Минеральное масло для молекулярно-биологических работ (если амплификатор не имеет нагревающейся крышки).

Протокол.

► *В случае скрининга колоний, несущих целевой продукт, клонированный в pQE-вектор, используйте смесь праймеров Screen-pQE из набора Clavularia FP cloning set. Температура отжига праймеров 60 °C. Ожидаемая длина продукта ПЦР 900 п.о.*

1. Приготовьте общую реакционную смесь для ПЦР, смешивая реагенты в указанном порядке (расчет на 2 стрипа по 8 пробирок):

185 мкл	Вода деионизированная, свободная от нуклеаз;
50 мкл	5X Encyclo Red buffer;
5 мкл	50X Смесь dNTP (10 мМ каждого);
5 мкл	Смесь праймеров для отбора рекомбинантных клонов (10 мкМ каждого);
5 мкл	50X Encyclo polymerase mix.

2. Аккуратно перемешайте компоненты реакционной смеси. Сбросьте капли со стенок пробирки на микроцентрифуге. Распределите по 15 мкл реакционной смеси в 16 пробирок для ПЦР, пронумеруйте пробирки.
3. На обратной стороне чашки Петри промаркируйте фломастером 16 колоний, которые будут проверены (старайтесь отмечать отдельно стоящие хорошо сформированные колонии).

4. Чистым носиком для пипетки соскребите часть колонии с чашки Петри (достаточно к ней прикоснуться кончиком носика), и затем этот же носик погрузите в пробирку с ПЦР-смесью, имеющую соответствующий номер. По окончании процедуры поместите чашку Петри в холодильник на +4 °С.
5. Если амплификатор не имеет нагревающейся крышки, добавьте в пробирки с ПЦР-смесью по капле минерального масла. Закройте пробирки и поместите их в амплификатор.
6. Осуществите ПЦР амплификацию, используя следующую программу:

Предварительная денатурация	1 цикл	95 °С	5 мин
Денатурация	24 цикла	95 °С	15 с
Отжиг		60 °С	15 с
Элонгация		72 °С	15 с

7. Проведите анализ продуктов ПЦР методом гель-электрофореза (1.5% агароза, 2 мкл продукта ПЦР на дорожку параллельно с 50 нг маркера длин ДНК).
8. На обратной стороне чашки Петри обведите цветным маркером 3–4 колонии, которые имеют вставки соответствующего размера.

11. Список литературы

[1] Chomczynski и Sacchi «Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.» (1987) Anal Biochem, 162 (1): 156–159 / pmid: 2440339.

[2] Sambrook, Fritsch и Maniatis. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.

[3] Ishikawa «Evolution of ribosomal RNA.» (1977) Comp Biochem Physiol B, 58 (1): 1–7 / pmid: 400949.

[4] Matz и др. «Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and stepout PCR.» (1999) Nucleic Acids Res, 27 (6): 1558–1560 / pmid: 10037822.

[5] Schmidt и Mueller «CapSelect: a highly sensitive method for 5' CAP-dependent enrichment of full-length cDNA in PCR-mediated analysis of mRNAs.» (1999) Nucleic Acids Res, 27 (21): e31 / pmid: 10518626.

[6] Лукьянов и др. «Селективная супрессия полимеразной цепной реакции.» (1999) Биоорганическая Химия. 25: 163–170.

Наборы и сервисы Евроген

Н ▸▸▸ – ссылка на страницу НАБОРА

С ▸▸▸ – ссылка на страницу СЕРВИСА

Выделение и очистка нуклеиновых кислот Н ▸▸▸

Реактивы для ПЦР и ПЦР-РВ Н ▸▸▸

Синтез и амплификация кДНК Н ▸▸▸

Клонирование ДНК Н ▸▸▸ С ▸▸▸

Выявление контаминации микоплазмой Н ▸▸▸

Оценка ДНК Н ▸▸▸

Нормализация кДНК Н ▸▸▸

Практикум по генной инженерии Н ▸▸▸

Генотипирование Н ▸▸▸

Синтез олигонуклеотидов и зондов С ▸▸▸

Секвенирование по Сэнгеру С ▸▸▸

Синтез генов С ▸▸▸

Сайт-направленный мутагенез С ▸▸▸

Консультация по продуктам: *support@evrogen.ru*

Подробную информацию о наших наборах и сервисах можно получить на сайте www.evrogen.ru

ЗАО Евроген
Москва 117997
ул. Миклухо-Маклая 16/10, к. 15
Тел.: +7 (495) 784-7084
order@evrogen.ru
www.evrogen.ru