

**ФГБОУ ВО НОВОСИБИРСКИЙ ГАУ
БИОЛОГО-ТЕХНИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ**

Молекулярная биология

Методические разработки по выполнению лабораторных работ

Новосибирск 2017

**УДК 557.1(075)
ББК 28.072, я73**

Кафедра ветеринарной генетики и биотехнологии

**Составитель: Короткевич О.С., д.б.н., профессор, Себежко О.И., к.б.н.,
доцент, Люханов М.П., ст. преподаватель**

Рецензент: Бокова Т.И., д.б.н., профессор, зав. кафедры химии НГАУ

**Молекулярная биология: методические разработки по выполнению
лабораторных работ / сост. Короткевич О.С., Себежко О.И., Люханов М.П.;
Новосиб. гос. аграр. ун-т. Биолого-технологический факультет.- Новосибирск,
2017. - 30 с.**

Методические разработки по выполнению лабораторных работ предназначены для бакалавров очной и заочной форм обучения Биолого-технологического факультета.

Представлены лабораторные работы по основным разделам курса «Молекулярная биология», вопросы для контроля и библиографический список.

Методические разработки по выполнению лабораторных работ утверждены и рекомендованы к изданию на заседании учебно-методического совета БТФ (протокол №2 от 1.03.2017).

© Новосибирский государственный аграрный университет, 2017

Содержание

1. Механизм полимеразной цепной реакции	3
1.1. Компоненты реакционной смеси	3
1.1.1. Основные компоненты	3
1.1.2. Дополнительные компоненты.....	5
1.2. Циклический температурный режим.....	5
1.3.«Эффект плато»	6
2. Стадии постановки ПЦР.....	6
2.1. Подготовка пробы биологического материала	6
2.1.1. Работа №1. Выделение ДНК из крови методом фенольно-протеолитической экстракции.....	8
2.1.2. Работа №2. Выделение ДНК.....	10
2.2. Способ постановки ПЦР	14
2.2.2. Работа №3. Методика постановки ПЦР (полимеразная цепная реакция).....	17
2.3. Детекция результатов ПЦР	18
2.3.1. Метод горизонтального электрофореза.....	19
2.3.1.1. Работа №4. Горизонтальный электрофорез.....	19
2.3.2. Метод вертикального электрофореза.....	21
2.3.2.1. Работа №5. Вертикальный электрофорез.....	22
2.3.2.2. Работа №6. Обработка пластиковой посуды.....	23
3. Электрофорез белков.....	24
3.1. Работа 7. Приготовление растворов и заливка ПААГ	24
3.2. Работа 8. Проведение электрофореза белков	28

1. Механизм полимеразной цепной реакции

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК/РНК) в биологическом материале (пробе).

1.1. Компоненты реакционной смеси

1.1.1. Основные компоненты

Для проведения ПЦР необходимо наличие в реакционной смеси ряда основных компонентов.

Праймеры – искусственно синтезированные олигонуклеотиды, имеющие, как правило, размер от 15 до 30 нуклеотидов, идентичные соответствующим участкам ДНК-мишени. Они играют ключевую роль в образовании продуктов реакции амплификации. Правильно подобранные праймеры обеспечивают специфичность и чувствительность тест-системы и должны отвечать ряду критериев:

- Быть специфичными. Особое внимание уделяют 3'-концам праймеров, так как именно с них Taq- полимераза начинает достраивать комплементарную цепь ДНК. Если их специфичность недостаточна, то высока вероятность, что в пробирке с реакционной смесью будут происходить процессы неспецифического связывания, и синтеза фрагментов различной длины, отличных от искомым. Часть праймеров и дНТФ расходуется на синтез неспецифической ДНК, что приводит к значительной потере чувствительности.
- Не должны образовывать димеры и петли, то есть не должно образовываться устойчивых двойных цепей в результате отжига (комплементарного присоединения) праймеров самих на себя или друг с другом.
- Область отжига праймеров должна находиться вне зон мутаций, делеций или инсерций в пределах видовой или иной специфичности, взятой в качестве критерия при выборе праймеров. При попадании на такую зону, отжиг праймеров не происходит, и, как следствие, возникает ложноотрицательный результат.

Taq-полимераза – термостабильный фермент, обеспечивающий достраивание 3'-конца второй цепи ДНК согласно принципу комплементарности.

Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) – дезоксиаденозинтрифосфата (дАТФ), дезоксигуанозинтрифосфата (дГТФ), дезоксицитозинтрифосфата (дЦТФ) и дезокситимидинтрифосфата (дТТФ) – «строительный материал», используемый Taq-полимеразой для синтеза второй цепи ДНК.

Буфер – смесь катионов и анионов в определенной концентрации, обеспечивающей оптимальные условия для реакции, а также стабильное значение pH.

Анализируемый образец – подготовленный к внесению в реакционную смесь препарат, который может содержать искомую ДНК, например, ДНК микроорганизмов, служащую мишенью для последующего многократного копирования. При отсутствии ДНК-мишени специфический продукт

амплификации не образуется.

1.1.2. Дополнительные компоненты

Для удобства детекции или контроля эффективности амплификации в состав реакционной смеси могут быть включены дополнительные компоненты.

Внутренние контроли – гетерологичный специфическому фрагмент ДНК, как правило, большего размера, ограниченный (фланкированный) специфическими праймерами. Фактически, представляет собой альтернативную матрицу ПЦР и позволяет контролировать эффективность амплификации в каждой конкретной пробирке.

ДНК-зонды – искусственно синтезированные олигонуклеотиды небольшого размера (около 30 нуклеотидов), комплементарные специфическим ампликонам (продуктам реакции). Благодаря прикрепленным к ним изотопным или флуоресцентным меткам ДНК-зонды могут использоваться для детекции продуктов реакции.

1.2. Циклический температурный режим

Если в анализируемом образце присутствует искомая ДНК, то в процессе реакции амплификации с ней происходит ряд событий, которые обеспечиваются определенными температурными циклами.

Каждый цикл амплификации состоит из трех этапов:

1. Денатурация – это переход ДНК из двухнитевой формы в однонитевую при разрыве водородных связей между комплементарными парами оснований под воздействием высоких температур (рис. 2).

2. Отжиг – это присоединение праймеров к одноцепочечной ДНК-мишени. Праймеры подбирают так, что они ограничивают искомый фрагмент и комплементарны противоположным цепям ДНК. Отжиг происходит в соответствии с правилом комплементарности Чаргаффа.

Если это условие не соблюдено, то отжига праймеров не происходит.

3. Элонгация (синтез). После отжига праймеров Таq-полимераза начинает достраивание второй цепи ДНК с 3'-конца праймера.

Температуру в реакционной смеси доводят до оптимума работы Таq-полимеразы, которая с максимальной эффективностью начинает синтез второй цепи ДНК от 3'-конца праймера, связанного с матрицей, и движется в направлении от 3' к 5' концу.

Иногда в случае близкого значения температуры отжига праймеров и температуры оптимума работы фермента, становится возможным использовать двухэтапный ПЦР, совместив отжиг и элонгацию. Температурный цикл амплификации многократно повторяется (30 и более раз). На каждом цикле количество синтезированных копий фрагмента ДНК удваивается.

Результатом циклического процесса является экспоненциальное увеличение количества специ-

фического фрагмента ДНК, которое можно описать формулой:

$$A = M \cdot (2^n - 1) \sim 2^n, \text{ где}$$

A – количество специфических (ограниченных праймерами) продуктов реакции

амплификации;

М – начальное количество ДНК-мишеней;

n – число циклов амплификации.

Реальное значение эффективности отдельных циклов амплификации составляет по некоторым данным 78-97%. Если в пробе присутствуют ингибиторы реакции это значение может быть намного меньше, поэтому фактическое количество специфических продуктов амплификации лучше описывает формула:

$A = M \cdot (1 + E)^n$, где

E – значение эффективности реакции.

Следует заметить, что в процессе амплификации на исходной цепи синтезируются и длинные фрагменты, однако их накопление происходит лишь в арифметической прогрессии по формуле:

$K = M \cdot n$, где

K – количество длинных продуктов амплификации.

Таким образом, специфические фрагменты, ограниченные на концах праймерами, впервые появляются в конце второго цикла, накапливаются в геометрической прогрессии и очень скоро начинают доминировать среди продуктов амплификации.

1.3.«Эффект плато»

Следует заметить, что процесс накопления специфических продуктов амплификации по геометрической прогрессии идет лишь ограниченное время, а затем его эффективность критически падает – «эффект плато».

Термин «эффект плато» используют для описания процесса накопления продуктов ПЦР на последних циклах амплификации, когда количество ампликонов достигает 0,3–1 пмолей.

В зависимости от условий и количества циклов реакции амплификации, на момент достижения «эффекта плато» влияют:

- Утилизация субстратов (дНТФ и праймеров).
- Стабильность реагентов (дНТФ и фермента).
- Количество ингибиторов, включая пирофосфаты и ДНК-дуплексы.
- Неспецифические продукты и праймер-димеры, конкурирующие за праймеры, дНТФ и полимеразу.
- Концентрация специфического продукта за счет неполной денатурации при высокой концентрации ампликонов.

2. Стадии постановки ПЦР

ПЦР-анализ состоит из трех стадий.

2.1. Подготовка пробы биологического материала

Для подготовки пробы к постановке ПЦР используют различные методики в зависимости от поставленных задач. Их суть заключается в экстракции (извлечении) ДНК из биопрепарата и удалении или нейтрализации посторонних примесей для получения препарата ДНК с чистотой, пригодной для постановки реакции амплификации.

Иногда достаточным бывает кипячение образца в течение 5–10 минут, однако в

большинстве случаев требуются более трудоемкие методы.

Стандартной и ставшей уже классической считается методика получения чистого препарата ДНК, предложенная Marum. Она включает в себя ферментативный протеолиз клеток с последующей депротеинизацией и переосаждением ДНК спиртом. Однако это метод довольно трудоемкий и предполагает работу с такими токсичными веществами, как фенол и хлороформ.

Популярным в настоящее время является метод выделения ДНК, предложенный Boom с соавт. Он основан на использовании для лизиса клеток сильного хаотропного агента – гуанидина изотиоционата (GuSCN) высокой молярности (5М) с последующей сорбцией ДНК на носителе (стеклянные бусы, диатомовая земля, стеклянное «молоко» и т.д.). После отмывок в пробе остается ДНК, сорбированная на носителе, с которого она легко снимается с помощью элюирующего буфера. Метод удобен и технологичен для подготовки образца к амплификации. Однако возможны потери ДНК вследствие необратимой сорбции на носителе, а также в процессе многочисленных отмывок, что имеет большое значение при работе с небольшими количествами ДНК в образце. Кроме того, даже следовые количества GuSCN могут ингибировать ПЦР, поэтому при использовании этого метода важны правильный выбор сорбента и тщательное соблюдение технологии.

Следует отметить, что из-за большого количества стадий добавления и удаления растворов при работе с образцом требуется аккуратность, так как возможна перекрестная контаминация между пробами образующейся аэрозолью ДНК.

Другая группа методов пробоподготовки основана на использовании ионообменников, которые, в отличие от стекла, сорбируют не ДНК, а примеси, ингибирующие ПЦР. Как правило, эта технология включает две стадии: кипячение образца, в результате которого клеточные стенки разрушаются, а нуклеиновые кислоты выходят в раствор; и сорбция примесей на ионообменнике. Метод чрезвычайно привлекателен простотой исполнения. В большинстве случаев он пригоден для работы с клиническим материалом.

Тем не менее, встречаются образцы с такими примесями, которые невозможно удалить с помощью ионообменников. Кроме того, клеточные стенки некоторых микроорганизмов не поддаются разрушению простым кипячением. В этих случаях необходимо введение дополнительных стадий обработки образца. При массовом скрининге, когда важно получить статистические данные, допускается использование простых методов с применением детергентов или обработки биологического материала щелочами с последующей их нейтрализацией. В то же время, использование подобных методов пробоподготовки для клинической диагностики может приводить к ложноотрицательным результатам, вследствие использования в реакционной смеси некачественного препарата ДНК.

Таким образом, к выбору метода пробоподготовки следует относиться с пониманием целей проведения предполагаемых анализов.

2.1.1. Работа №1. Выделение ДНК из крови методом фенольно-протеолитической экстракции.

Для выделения ДНК из крови животных целесообразно использовать метод фенольно-протеолитической экстракции. Кровь является сложной биохимической системой, содержащей большое количество различных белков, жиров и углеводов и т.д., все эти вещества необходимо полностью удалить, т.к. даже незначительные их следы могут существенно затруднить дальнейшее использование выделенной ДНК. При выделении ДНК методом фенольно-протеолитической экстракции используются следующие реактивы:

Буфер А: 0,01M Tris-HCl при pH7.5,

10 mM NaCl,

3mM MgCl₂,

Буфер В: 0,05M Tris-HCl pH8,0,

100mM NaCl,

10mM EDTA

20% раствор SDS (додецилсульфат натрия)

20% раствор протеиназы К (40 мг протеиназы растворить в 1 мл бидистиллированной воды или 60 в мг 1,5мл)- 2 часа при 37о С.

5M NaCl

Фенол перегнанный

Смесь фенол-хлороформ (1:1)

Хлороформ (480 мл хлороформа + 20 мл изоамилового спирта)

Изопропиловый спирт

Этиловый спирт

Бидистиллированная вода

Выделение ДНК идет в 2 дня.

Первый день: кровь гомогенизируют в гомогенизаторе с добавлением небольшого количества буфера А (при необходимости), затем необходимо хорошо растереть, слить в пробирку для центрифугирования. После этого в пробирки с кровью добавляем буфер А (~ за 1,5 см до верха), закрываем крышкой, перемешиваем, центрифугируем 30 мин при 4000 об/мин. После этого сливаем надосадочную жидкость в хлорамин (осадок должен быть на дне), добавить в каждую пробирку буфера А, закрыть крышкой, перемешать, центрифугировать 30 мин при 4000 об/мин (2-3 раза). Слить надосадочную жидкость в хлорамин, добавить к осадку 1900 мкл буфера В, 50 мкл 20% SDS, 80 мкл 20% протеиназы, разбить осадок на шейкере и закрыть пробирки крышками. Лизис на ночь 46оС в термостате, либо на ночь 37оС и 2 часа при температуре 56оС.

Второй день: добавить в каждую пробирку по 400 мкл 5M NaCl, добавить по 3 мл фенола, закрыть пробирки, перемешать до однородной массы, центрифугировать 30 мин при 4000 об/мин. Слить пипеткой водную фазу в отдельную пробирку (по возможности не задевая интерфазу), фенол в слив, пробирку в раствор щелочи. В водную фазу добавить 3 мл смеси фенол-хлороформ (1:1), закрыть, перемешать до однородной массы, центрифугировать 20 мин при 4000 об/мин. Слить пипеткой водную фазу в отдельную пробирку

(по возможности не задевая интерфазу), фенол-хлороформ в слив, пробирку в раствор щелочи. В водную фазу добавить 3 мл хлороформа, закрыть, перемешать до однородной массы, центрифугировать 20 мин при 4000 об/мин. В подписанные новые пробирки добавить по 2,5 мл изопропилового спирта, затем верхнюю фазу (хлороформ- в слив), аккуратно перемешать до образования клубочка. Поставить в морозильник (-20°C) на 1 час (необязательно). Центрифугировать 20 мин при 4000 об/мин. Изопропиловый спирт в слив, промыть (2 раза) 75% этиловым спиртом (добавить по 3 мл, центрифугирование 10-15 мин при 4000 об/мин, этанол слить в раковину), затем промыть 1 раз 96 % этанолом. Слить этанол, открытую пробирку сушить (ночь) при 37°C. Растворить осадок в 600 мкл ddH₂O и оставить на сутки в холодной комнате или в холодильнике при +4°C, перемешать на шейкере и перенести в 1,5 мл пробирку. Хранить при температуре не выше -20°C.

Приготовление растворов для выделения ДНК из крови.

Одномолярный MgCl₂: навеску MgCl₂ 94 грамма растворить в 800 мл дистиллированной воды, довести до объема 1 литр.

Одномолярный Tris: навеску 121 гр. Tris растворить в 800 мл воды и довести до 1 литра (довести pH до необходимого значения добавлением концентрированной HCl).

5-и молярный NaCl: навеску 292,2 гр растворить в 800 мл воды и довести до объема 1 литр.

20% SDS: 20 гр на 80 мл воды, доводим до объема 1 литр(растворяется при нагревании).

0,5 молярный раствор ЭДТА (трилон б) при pH 8,0: 186 гр двухзамещенной соли ЭДТА добавить к 800 мл воды, размешать в магнитной мешалке, затем доводим до объема 1 литр. Довести pH до 8,0, добавляя NaOH. Разлить на порции и простерилизовать автоклавированием, пропустить через фильтр. Автоклавирование проводить в термостойких колбах, раствор наливать не более 2/3 объема. Емкость для ЭДТА после автоклавирования просушить в автоклаве и затем обработать ультрафиолетовым излучением.

Размораживание фенола.

Приготовить дезинфицирующий раствор(стиральный порошок- 1 чайная ложка, NaOH- 1 чайная ложка, растворить в воде).

Приготовить фильтровальную бумагу, вату.

Для размораживания фенола нужна вода температурой 80-85°C.

Аккуратно перелить в колбу, придерживая крышку у горлышка (вытереть бутылку насухо).

Объем фенола довести до 2/3 емкости, фенол насыщаем трисом до pH 7,5. Для экстрагирования ДНК фенолом нужны следующие растворы:

Фенол,

Фенол-хлороформ (в пропорции 1:1),

Хлороформ(в смеси с изоамиловым спиртом, соотношение 24:1).

Метод фенольно-протеолитической экстракции не является универсальным. При выделении ДНК из других органов и тканей целесообразно использовать другие методы, ориентированные на исследуемый материал.

2.1.2. Работа №2. Выделение ДНК

С помощью различных реактивов можно получить ДНК, свободную от примесей белков, жиров, углеводов, низкомолекулярных примесей. выделенная ДНК является прекрасным субстратом для ферментативных реакций, таких как гидролиз эндонуклеазами рестрикции, ПЦР, секвенирование, метилирование и др.

Цель работы: освоить методику выделения ДНК, выделить ДНК из крови крупного рогатого скота.

Материалы и оборудование: кровь крупного рогатого скота, набор для выделения днк, пробирки типа Eppendorf на 1,5 и 0,5 мл, пипетки, микроцентрифуга, микротермостат, вортекс.

Ход работы:

1. Поместить 100 мкл образца в пробирку 1,5 мл.
2. Добавить 300 мкл раствора 1 и 20 мкл суспензии сорбента.
3. Перемешать на вортексе и инкубировать при комнатной температуре 10-15 мин, перемешивая на вортексе каждые 3 минуты.
4. Пробы центрифугировать 60 сек. на микроцентрифуге при 5000 об/мин, супернатант отобрать и отбросить.
5. К осадку добавить 150 мкл раствора 2 и перемешать на вортексе.
6. Пробы центрифугировать 60 сек. на микроцентрифуге при 5000 об/мин, супернатант отобрать и отбросить.
7. К осадку добавить 0,7 мл раствора 3 и перемешать на вортексе.
8. Пробы центрифугировать 60 сек. на микроцентрифуге при 5000 об/мин, супернатант отобрать и отбросить.
9. Пробы подсушить в микротермостате 5 мин при температуре 55°C.
10. Добавить в пробирки 50 мкл стерильной воды, закрыть пробирки, перемешать на вортексе и инкубировать 5 мин в микротермостате при 55°C.
11. Пробы центрифугировать 60 сек. на микроцентрифуге при 12000 об/мин.
12. Отобрать водную фазу и перенести в пробирки 0,5 мл, осадить центрифугированием.

Приложение Б
(рекомендуемое)

Интерпретация результатов качественного определения фрагментов видоспецифичной ДНК

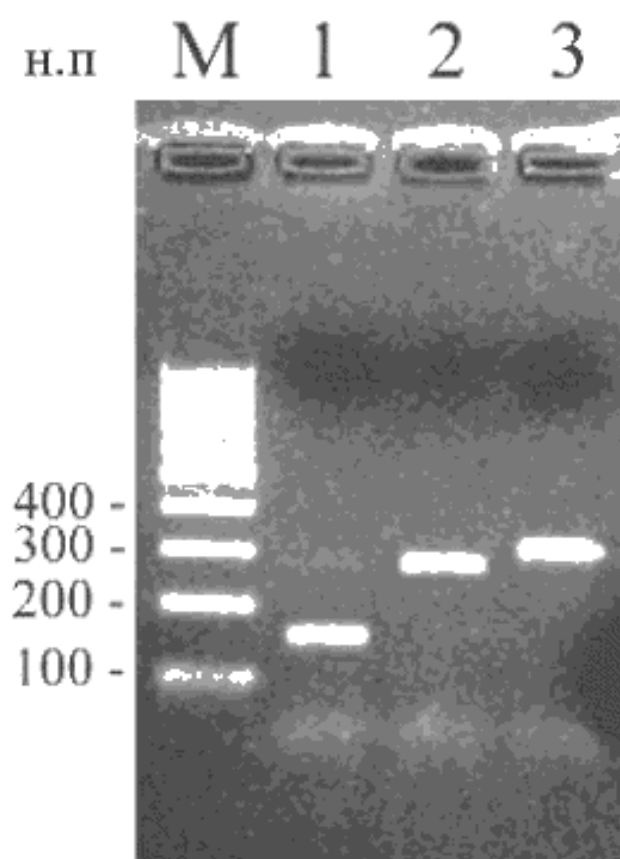
Б.1 Использование метода электрофореза для детекции продуктов амплификации

В продуктах амплификации положительного контроля наборов для определения фрагментов видоспецифичной ДНК должна присутствовать одна яркая и четкая полоса — специфический фрагмент (см. рисунки Б.1 и Б.2). Размеры специфических фрагментов указаны в таблице Б. 1.

В пробирке с К— любого из наборов для ПЦР не должны присутствовать как специфические, так и неспецифические фрагменты. Допускается присутствие неиспользованных в ходе ПЦР праймеров в виде слабо окрашенной нечеткой полосы размером менее 50 нуклеотидных пар (н.п.).

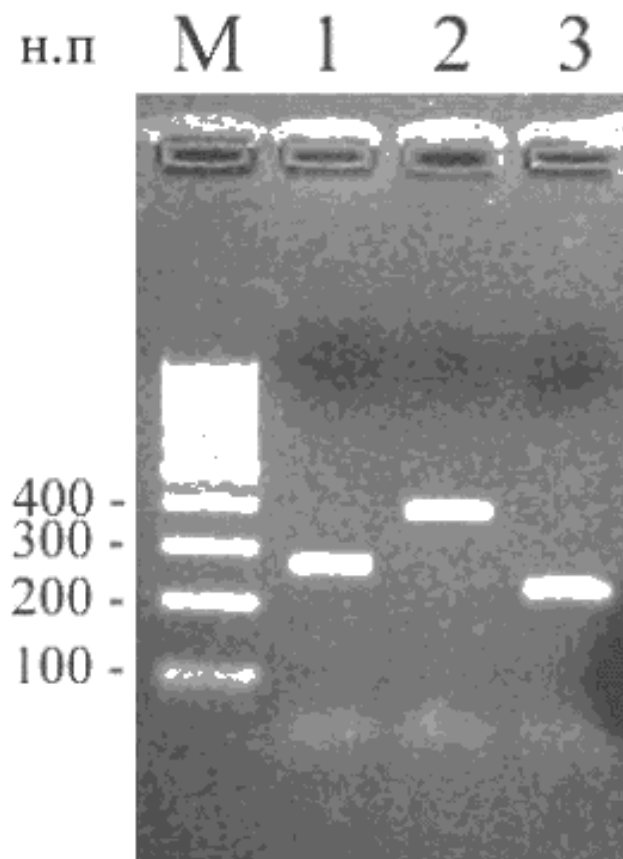
Положительными, то есть содержащими искомый фрагмент ДНК, считаются пробы, содержащие светящиеся полосы, расположенные на таком же расстоянии от точки старта, что и полоса соответствующего К+.

В случаях, когда в ходе детекции фрагмента ДНК какого-либо образца получен неоднозначный результат, для уточнения результата необходимо повторное проведение амплификации с анализируемым экстрактом ДНК. Если удовлетворительный результат не достигнут таким способом, требуется повторное выделение ДНК из новой пробы исследуемого материала и дополнительная постановка ПЦР.



М — маркер молекулярных масс; 1—3 — специфические фрагменты, являющиеся продуктами амплификации К+: 1 — «ЛЕС-ПЦР-ядро» (164 н.п.); 2 — «ZEX-ПЦР-ядро» (273 н.п.); 3 — «РАТЕХ-ПЦР-ядро» (300 н.п.)

Рисунок Б.1 — Электрофореграмма фрагментов видоспецифичной ДНК сои, кукурузы и картофеля, полученных при использовании наборов серии «ПЦР-ядро»



М — маркер молекулярных масс; 1—3 — специфические фрагменты, являющиеся продуктами амплификации К+: 1 — «ВОВ-ПЦР-ядро» (274 н.п.); 2 — «SUS-ПЦР-ядро» (398 н.п.); 3 — «GUL-ПЦР-ядро» (431 н.п.)

Рисунок Б.2 — Электрофореграмма фрагментов видоспецифичной ДНК говядины, свинины и курицы, полученных при использовании наборов серии «ПЦР-ядро»

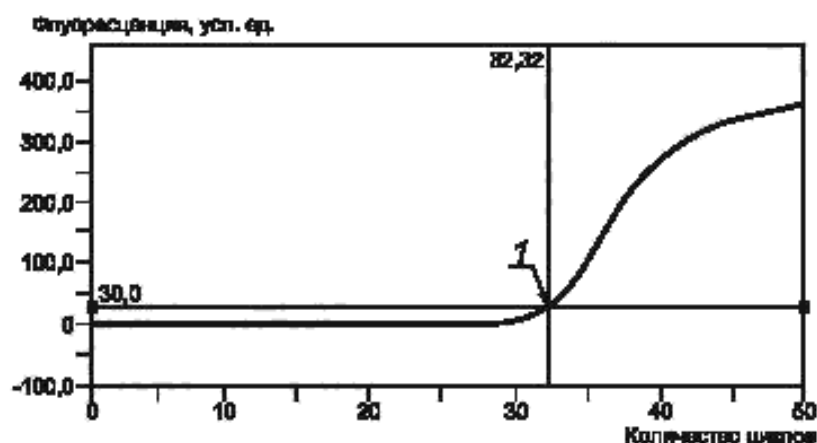
Т а б л и ц а Б.1 — Продукты амплификации К+ из наборов реагентов серии «ПЦР-ядро»

Название набора	Предназначение	Размер ампликона (н.п.)
LEC-ПЦР-ядро	Определение генома сои	164
ZEX-ПЦР-ядро	Определение генома кукурузы	273
PATEX-ПЦР-ядро	Определение генома картофеля	300
BOV-ПЦР-ядро	Определение генома крупного рогатого скота	274
SUS-ПЦР-ядро	Определение генома свиньи	398
GUL-ПЦР-ядро	Определение генома курицы	431

Б.2 Использование детекции продуктов амплификации в реальном времени

В пробирке с К+ должно наблюдаться увеличение интенсивности флуоресценции (график имеет вид S-образной кривой). Подобная картина должна наблюдаться во всех положительных образцах (рисунок Б.3).

В отрицательном контроле не должно происходить накопления продукта ПЦР, поэтому построенный прибором график должен иметь вид прямой линии. Подобная картина должна наблюдаться во всех отрицательных образцах (рисунок Б.4).



1 — точка начала эксп-фазы ПЦР и соответствующее ей количество выполненных циклов (32,32)

Рисунок Б.3 — Кривая флуоресценции накопленных продуктов ПЦР, полученная в ходе ПЦР в реальном времени

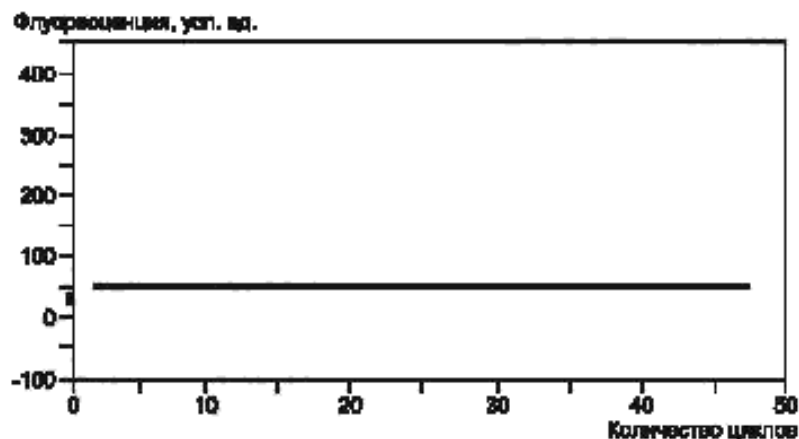
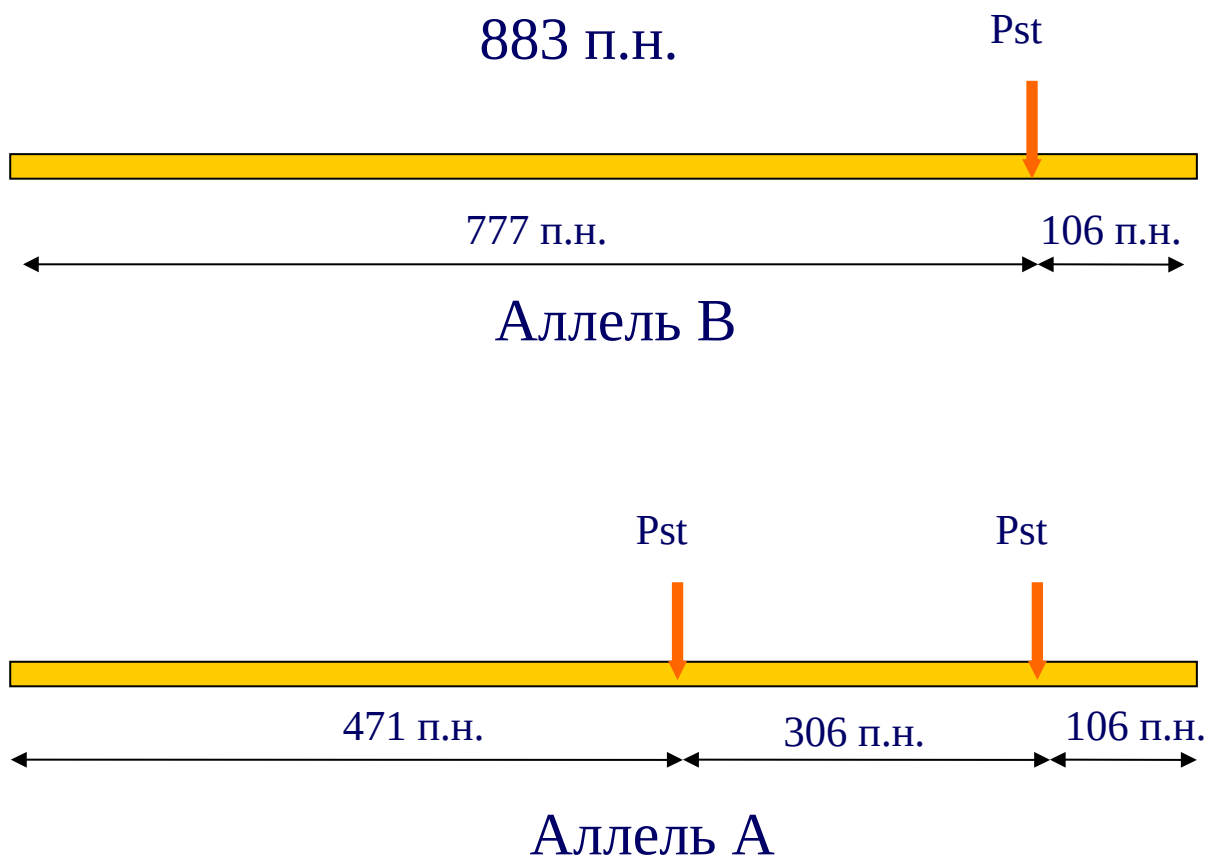


Рисунок Б.4 — Показания прибора при отсутствии накопления продуктов ПЦР (отрицательный результат анализа)

Карта рестрикции гена каппа-казеина КРС



2.2. Способ постановки ПЦР

На данный момент разработаны варианты постановки ПЦР, направленные на решение следующих задач: увеличение эффективности реакции и снижение риска образования неспецифических продуктов; реализацию возможности проведения как качественного, так и количественного анализа искомых участков молекулы ДНК/РНК.

Наиболее распространенными в клиничко-диагностических лабораториях модификациями ПЦР являются:

ПЦР с «горячим» стартом (hot-start PCR) – модификация, суть которой состоит в предотвращении возможности начала реакции до момента достижения в пробирке условий, обеспечивающих специфический отжиг праймеров. Для этого полимеразная активность фермента в момент постановки ПЦР блокируется антителами или имитирующими антитела небольшими молекулами типа Affibody до наступления первой денатурации (проводится при 95 °С в течение 10 минут). Кроме того, для предотвращения преждевременного взаимодействия фермента с компонентами реакционной смеси и, как следствие, образования неспецифических продуктов реакции до момента полного прогрева, используется легкоплавкий парафин или специальные масла,

отделяющие полимеразу от реакционной смеси.

В зависимости от ГЦ-состава и размера, праймеры имеют определенную температуру плавления T_m , при которой образование водородных связей нестабильно. Если температура системы превышает T_m , праймер не в состоянии удерживаться на цепи ДНК и денатурирует. При соблюдении оптимальных условий, то есть температуры отжига, близкой к температуре плавления, праймер образует двуцепочечную молекулу только при условии его полной комплементарности и таким образом обеспечивает специфичность реакции.

Даже если неспецифический отжиг произошел до начала температурного циклирования, в отсутствии фермента элонгации не происходит, а при нагревании комплексы праймер-ДНК денатурируют, поэтому неспецифические продукты не образуются. В дальнейшем температура в пробирке не опускается ниже температуры плавления, что обеспечивает образование специфического продукта амплификации.

Таким образом, ПЦР с «горячим» стартом позволяет минимизировать вероятность образования неспецифических продуктов ПЦР и возможность получения ложноположительных результатов анализа.

ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР, RT-PCR) – используется для амплификации, выделения или идентификации известной последовательности РНК. На первом этапе с помощью ревертазы (обратной транскриптазы), используя в качестве матрицы мРНК, проводят синтез одноцепочечной молекулы ДНК (кДНК), которая используется для последующей ПЦР. Для этого применяют обратную транскриптазу, выделенную из двух вирусов: Avian myeloblastosis virus и Moloney murine leukemia virus.

Использование ревертазы связано с некоторыми трудностями. Прежде всего, данный фермент термолабилен и поэтому может быть использован при температуре не выше 42°C. Так как при такой температуре молекулы РНК легко образуют вторичные структуры, то эффективность реакции заметно снижается и по разным оценкам приблизительно равна 5%. Этот недостаток может быть устранен при использовании в качестве обратной транскриптазы термостабильной полимеразы, проявляющей активность в присутствии ионов Mn^{2+} . Это единственный известный фермент, способный проявлять как полимеразную, так и транскриптазную активность.

Для проведения реакции обратной транскрипции в реакционной смеси так же, как и в ПЦР, в качестве затравки должны присутствовать праймеры и смесь 4-х дНТФ.

Возможность использования РНК в качестве мишени для ПЦР существенно расширяет спектр применения этого метода, например, геномы многих вирусов (гепатит С, вирусы гриппа, ВИЧ и т.д.) представлены именно РНК.

ПЦР с анализом результатов «по конечной точке» (End-point PCR) – это модификация метода ПЦР, которая позволяет учитывать результаты реакции по наличию флуоресценции после амплификации, не открывая пробирки. Таким образом, решается одна из основных проблем ПЦР – проблема контаминации ампликонами.

Одним из таких вариантов является метод «FLASH» (FLuorescent Amplification-based Specific Hybridization – специфическая гибридизации в процессе амплификации с ДНК-зондами, меченными флуорофорами).

Ключевым элементом метода «FLASH» является использование гибридизационных олигонуклеотидных зондов, меченных молекулами флуорофора и «темнового» гасителя. Зонды добавляют в реакционную смесь наряду с праймерами и остальными компонентами реакции. Поскольку в структуре зонда флуорофор и гаситель находятся в непосредственной близости друг от друга, то перед началом реакции флуоресценция отсутствует.

Во время реакции зонды гибридизуются с ДНК-мишенью, на стадии элонгации Taq-полимераза разрушает зонд благодаря 5'-экзонуклеазной активности и флуорофор оказывается свободным от гасителя. Таким образом, количество разрушенных зондов и, соответственно, уровень флуоресценции оказываются пропорциональными количеству образовавшихся ампликонов. Следует отметить, что регистрация флуоресценции происходит с помощью детектора флуоресценции после окончания реакции, поэтому метод не является количественным.

ПЦР в режиме «реального времени» (Real-Time PCR, ПЦР-РВ) – используется для одновременной амплификации и измерения количества искомой молекулы ДНК. Преимуществом данного подхода является возможность совмещения детекции и количественного определения специфической последовательности ДНК в образце в реальном времени после каждого цикла амплификации.

Для этого используют флуоресцентные красители, интеркалирующие в двуцепочечные молекулы ДНК (интеркаляция возможна в случае, если краситель имеет подходящие размеры и химическую природу и может поместиться между основаниями ДНК) или модифицированные дезоксинуклеотиды, которые флуоресцируют после гибридизации с комплементарными участками ДНК.

Часто ПЦР в реальном времени комбинируют с ОТ-ПЦР для измерения малых количеств мРНК, что позволяет получать количественную информацию о содержании искомой мРНК в клетке и судить об уровне экспрессии гена в отдельной клетке или ткани.

Отличительными чертами ПЦР-РВ являются не только возможность количественного определения ДНК/РНК в исследуемом материале, но и отсутствие стадии электрофореза, что позволяет минимизировать риск контаминации продуктами ПЦР и таким образом резко уменьшить число ложноположительных результатов. Также менее строгие требования предъявляются к организации ПЦР-лаборатории, становятся возможны автоматическая регистрация и интерпретация полученных результатов.

Мультиплексная (мультипраймерная) ПЦР – это одновременная амплификация двух и более последовательностей ДНК в одной пробирке. Преимуществом данного метода является возможность выявления ряда патогенов, генетических модификаций организмов или генотипирования множественных аллелей и т.д., поместив пробу в одну пробирку.

Кроме того, возможны и другие варианты ПЦР, получившие наибольшее распространение в научно-исследовательских лабораториях, например:

Гнездовая («вложенная», англ. nested PCR) ПЦР – применяется для уменьшения числа побочных продуктов реакции. Используют две пары праймеров и проводят две последовательные реакции.

Вторая пара праймеров амплифицирует участок ДНК внутри продукта первой реакции.

ПЦР «инвертированная» – используется в том случае, если известен лишь небольшой участок внутри нужной последовательности. Этот метод полезен, когда нужно определить соседние последовательности после вставки ДНК в геном. Для этого проводят ряд разрезов ДНК рестриктазами с последующим соединением фрагментов.

Ассиметричная ПЦР – проводится тогда, когда нужно амплифицировать преимущественно одну из цепей исходной ДНК. Используется в некоторых методиках секвенирования и гибридизационного анализа. Сама ПЦР проводится как обычно, за исключением того, что один из праймеров берется в большом избытке.

Метод молекулярных колоний – данная модификация основана на использовании акриламидного геля, который до начала ПЦР полимеризуют со всеми ее компонентами на поверхности. В процессе реакции в точках, содержащих анализируемую ДНК, происходит амплификация с образованием молекулярных колоний.

ПЦР длинных фрагментов (англ. Long-range PCR) – вариант ПЦР для амплификации протяженных участков ДНК (10 тысяч и более оснований). Для реализации данного подхода используют смесь двух полимераз, одна из которых – Taq-полимераза с высокой процессивностью (способная за один проход синтезировать длинную цепь ДНК), а вторая – ДНК-полимераза с 3'-5' экзонуклеазной активностью (Pfu-полимераза). Она необходима для корректирования ошибок, внесённых Taq-полимеразой, при этом некомплементарные нуклеотиды удаляются с помощью Pfu-полимеразы.

Групп-специфическая ПЦР (англ. group-specific PCR) – ПЦР с использованием консервативных праймеров к последовательностям ДНК для родственных групп внутри одного или между разными видами. Например, подбор универсальных праймеров к рибосомальным 18S и 26S генам для амплификации видоспецифического межгенного спейсера: последовательность генов 18S и 26S консервативна между видами, поэтому ПЦР между этими генами будет проходить для всех исследуемых видов.

ПЦР с быстрой амплификацией концов кДНК (RACE-PCR)

Иммуно-ПЦР (immuno-PCR-IPCR)

2.2.2. Работа №3. Методика постановки ПЦР (полимеразная цепная реакция).

Подготавливаем новые, чистые пробирки 0,6 мл, подписываем. Пробирки брать только простерилизованным пинцетом, во избежание контаминации. В отдельной пробирке готовим смесь для амплификации, со страховым запасом.

Первым пробирку вносится заранее подготовленный буфер для реакции. Перед внесением буфера необходимо изучить паспорта ферментов (полимераза, рестриктаза и т.д.) для коррекции оптимального подбора рабочего буфера, соответствующего всем используемым ферментам. Условия реакции также рассчитываются заранее. В реакционную смесь все рабочие реагенты вносятся в десятикратной концентрации, но в объеме, составляющем 10% от объема реакционной смеси, таким образом достигается необходимое соотношение объема реакционной смеси и концентрации растворов, необходимых для проведения данной ПЦР, недостаток объема заполняется бидистиллированной водой.

Вначале в пробирку вносится ДНК, затем последовательно остальные компоненты. Полимераза и вода вносятся последними. После внесения ДНК, а также после внесения всех компонентов содержимое пробирки встряхивается на шейкере и миницентрифуге. После внесения всех компонентов смеси и обработки на центрифуге в пробирку вносится по капле вазелинового масла (или любого другого минерального масла с высокой температурой кипения) для предотвращения высыхания реакционной смеси в процессе амплификации (если ПЦР проводится в амплификаторе не имеющем функцию подогрева крышки).

Число циклов амплификации, необходимое для получения видимой полосы продукта в геле, в значительной степени зависит от исходной концентрации целевой ДНК. Для того, чтобы амплифицировать 50 целевых молекул, рекомендуется 40 – 45 циклов, в то время как для того, чтобы амплифицировать 3×10^5 молекул до такой же концентрации, достаточно 25 – 30 циклов. Такая непропорциональность происходит из-за так называемого эффекта плато, который является затуханием экспоненциальной скорости накопления продукта на поздних стадиях ПЦР, когда продукт достигает 0.3 – 1.0 нМ. Причиной этого может быть деградация реактантов (dNTPs, ферментов), истощение реактантов (праймеров, dNTPs – в первом случае возникнет проблема коротких продуктов реакции, во втором случае – проблема длинных продуктов), а также ингибирование конечным продуктом (образование пирофосфата), конкуренция с неспецифическими продуктами за реактанты, конкуренция за связывание праймера путем ре-отжига концентрированного (10 нМ) продукта.

Если желаемый продукт не получен за 30 циклов, следует отобрать небольшую пробу (1-2 мкл) амплифицированного продукта, перемешать и реамплифицировать в течение 20 – 30 циклов в новой реакционной среде, а не продолжать последующие циклы первого прогона. В некоторых случаях, когда концентрация матрицы ограничена, такая ре-амплификация может привести к получению хорошего продукта, в то время как продолжение первого прогона до 40 циклов и более не дает такого эффекта.

2.3. Детекция результатов ПЦР

На сегодняшний день существует несколько основных способов детекции результатов ПЦР

- Электрофоретический (в агарозном или полиакриламидном геле)
 - Гибридизационно – ферментный
 - Гибридизационно – флуоресцентный:
- регистрация продукта после окончания реакции амплификации – «анализ по конечной точке»;
- детекция продукта в режиме «реального времени».

2.3.1. Метод горизонтального электрофореза

Наиболее распространенным до недавнего времени являлся метод электрофореза, основанный на разделении молекул ДНК по размеру (рис. 5). В этом случае визуализацию результатов проводят в пластине агарозного геля, который представляет собой застывшую после расплавления в электрофорезном буфере агарозу в концентрации 1,5-2,5% с добавлением специального красителя ДНК, например бромистого этидия.

Застывшая агароза образует пространственную решетку. При заливке с помощью гребенок в геле формируют лунки, в которые вносят продукты амплификации. Пластины геля помещают в аппарат для горизонтального гель-электрофореза и подключают источник постоянного напряжения.

Отрицательно заряженная ДНК начинает двигаться в геле от минуса к плюсу. При этом более короткие молекулы ДНК движутся быстрее, чем длинные. На скорость движения ДНК в геле влияют: концентрация агарозы, напряженность электрического поля, температура, состав электрофорезного буфера и, в меньшей степени, ГЦ-состав ДНК. Краситель встраивается (интеркалирует) плоскостными группами в молекулы ДНК.

Все молекулы одного размера движутся с одинаковой скоростью. После окончания электрофореза, продолжающегося от 10 мин до 1 часа, гель помещают на фильтр трансиллюминатора, который излучает свет в ультрафиолетовом диапазоне (254 – 310 нм). Энергия ультрафиолета, поглощаемая ДНК в области 260 нм, передается на краситель, заставляя его флуоресцировать в оранжево-красной области видимого спектра (590 нм).

Яркость полос продуктов амплификации может быть различной, поэтому часто в ПЦР- лабораториях принято оценивать результат по трех-, четырех- или пятибалльной системе. Однако, как уже отмечалось ранее, это нельзя связывать с начальным количеством ДНК-мишени в образце.

Часто уменьшение яркости свечения полос связано со снижением эффективности амплификации под влиянием ингибиторов или других факторов.

2.3.1.1. Работа №4. Горизонтальный электрофорез.

Электрофорез в агарозном геле является стандартным методом для разделения, идентификации и очистки интактных молекул ДНК и их фрагментов (высокомолекулярная хромосомная ДНК всегда фрагментируется при изоляции из клетки). Скорость движения ДНК (РНК) через поры агарозного геля при

электрофорезе определяется размером молекул и их конформацией. Молекулы линейной двухцепочечной ДНК перемещаются в толще геля со скоростями обратно пропорциональными десятичному логарифму их молекулярных масс. Впереди мигрируют низкомолекулярные фрагменты, крупные молекулы движутся медленнее из-за большего сопротивления. Из нативных молекул нуклеиновых кислот быстрее всего движется тРНК размером 70–90 нуклеотидов и 5S рРНК размером 120 нуклеотидов. Наиболее крупные фрагменты геномной (хромосомной, ядерной) ДНК могут достигать размеров 100000 п.н. Для определения размера фрагментов используют маркеры молекулярного веса (DNA Ladder), которые наносят в соседние лунки геля.

Агароза легко плавится при нагревании до 95°C (в электрофорезном буфере). Расплавить агарозу можно на электроплите или в микроволновой печи. При использовании микроволновой печи рекомендуется применять режим «Разморозка». При выливании расплава в форму и его застывании получают прозрачные упругие гели. Лунки (карманы) для внесения ДНК на гель-электрофорез формируются путём вставки гребёнки с зубьями в незастигший гель и её извлечением после полимеризации пластины геля.

Концентрация агарозы в геле. Скорость движения ДНК в порах геля зависит от концентрации агарозы. Зная размеры молекул ДНК в смеси, можно подбором концентрации добиться их наилучшего разделения (табл. 1).

Таблица 1. Зависимость эффективности разделения фрагментов ДНК от количества агарозы в геле

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

Окраска ДНК в агарозных гелях. Для визуализации ДНК применяют её окрашивание бромистым этидием EtBr (3,8-диамино-5-этил-6-фенил-фенантридиум бромид). Молекулы красителя интеркалируют (встраиваются) между соседними парами нуклеотидов ДНК. Этидиум бромид добавляют обычно в расплав агарозы до полимеризации гелевой пластины. Максимум поглощения EtBr наблюдается при длинах волн 300 и 360 нм, а эмиссия происходит в красно-оранжевой области видимого спектра при 590 нм.

Материалы и оборудование

Агароза, гребёнка, форма для заливки горизонтального геля (т.н. «плашка»,

можно использовать крышку от иммунологического планшета).

Растворы

- 5 электрофорезный буфер ТВЕ. На приготовление 1 л буфера: Tris–ОН (основание) – 54 г; борная кислота – 27,5 г; 0,5М ЭДТА, pH 8,0 – 20 мл. - EtBr. Раствор 10 мг/мл в воде. Хранить в темноте в холодильнике.

Методика

1. Взвесить рассчитанное количество порошка агарозы (1 г для подготовки 100 мл 1% геля) и высыпать в химический термостойкий стакан. Налить в стакан 20 мл 5 электрофорезного буфера ТВЕ и довести до 100 мл водой.
2. Нагреть смесь на электроплитке или СВЧ-печи до полного расплавления.
3. Охладить расплав до 50–60 С (стакан можно держать в руках). Добавить EtBr до конечной концентрации 0,5 мкг/мл: лаборанту следует взять 5 мкл из стокового раствора EtBr с концентрацией 10 мг/мл на 100 мл расплава.
4. Установить гребёнку \approx в 1 см от края формы. Вылить расплав, перемешав.
5. После того как гель полностью полимеризуется (30 мин) осторожно удалить гребёнку, покачивая её из стороны в сторону и потянув вверх.

Примечания

Расход геля для различных типов плашек: плашка размером 11 11 см примерно 110–140 мл, крышка от иммунологического планшета – около 30 мл.

Бромистый этидий – потенциально опасное вещество из-за возможности связывания с ДНК и стимулирования разрывов в ДНК при освещении ультрафиолетом. Строгих доказательств нет, однако некоторые продукты его окисления ферментами печени обладают небольшой, но заметной мутагенной активностью. Необходимо работать в резиновых перчатках, соблюдая меры предосторожности! Избегать контакта с кожей! EtBr разрушается на свету, поэтому гели непродолжительное время хранят в темноте при +4°C

2.3.2. Метод вертикального электрофореза

Метод вертикального электрофореза принципиально схож с горизонтальным электрофорезом.

Их отличие заключается в том, что в данном случае вместо агарозы используют полиакриламид и специальную камеру для вертикального электрофореза. Электрофорез в полиакриламидном геле имеет большую разрешающую способность по сравнению с агарозным электрофорезом и позволяет различать молекулы ДНК с точностью до одного нуклеотида. Однако приготовление полиакриламидного геля несколько сложнее агарозного, кроме того, акриламид является токсичным веществом. Поскольку необходимость определить размер продукта амплификации с точностью до 1 нуклеотида возникает редко, то в рутинной работе этот метод не используют.

Оба варианта электрофоретической детекции позволяют осуществлять только качественный анализ и сопряжены с рядом проблем:

- Большие затраты времени на стадию детекции
- Невозможность автоматизации
- Сложность и субъективность трактовки результатов
- Высокий риск контаминации и большие затраты на ее устранение:

- повышенные требования к организации лаборатории;
- максимальное удаление зоны детекции от других зон проведения ПЦР;
- выделение отдельного сотрудника на стадию детекции;
- постоянный контроль смывов;
- большое количество К- для контроля контаминации ампликонами и, как следствие, увеличение объема расходных материалов и времени для подготовки к проведению детекции.

2.3.2.1. Работа №5. Вертикальный электрофорез.

Стекла для электрофореза протирают этиловым спиртом, устанавливают между ними пластиковые ограничители, устанавливают зажимы. Затем необходимо приготовить гель для электрофореза по приведенной ниже рецептуре. Последовательно смешиваем 2 мл 40% полиакриламида, 2 мл 10х ТБЕ, в концентрации десятикратно превышающей концентрацию буфера. Добавляем 200 мкл раствора пересульфата аммония (ПСА), затем вливаем бидистиллированную воду, доводя объем смеси до 20 мл, после этого добавляем 20 мкл раствора темеда (тетраметил этилен диамид). Заливают гель через проем в «ушастом» стекле, следя чтобы в заливаемом геле не образовались пузырьки воздуха, если же они образуются, их необходимо убрать. Так же, в целях предотвращения образования пузырьков можно постукивать по поверхности стекла в процессе заливки геля. Сразу после заливки геля в проем в «ушастом» стекле необходимо вставить пластиковую пластину с заготовками для кармашков. После этого оставляем гель сохнуть в течении 20 минут. После высыхания геля необходимо вынуть пластину с заготовками для кармашков, рекомендуется делать это под слабой струей воды для предотвращения разрушения тонких перегородок между кармашками. Так же, в этих целях, следует вынимать пластину равномерно, без перемещения пластины в стороны. Устанавливаем пластину с гелем электрофорезную камеру, заливаем буфер (1% раствор ТБЕ), с помощью пипетки продуваем кармашки от воздуха. На плашку наносим по 8 мкл амплификационной смеси каждого образца, добавляем по 8 мкл краски. Смесь краски с продуктом рестрикции вносим в кармашки с помощью пипетки. Полностью собираем систему для проведения электрофореза и подключаем ее к источнику тока: сначала форе́з ведется при токе 15 мА, после перехода лидирующего красителя из концентрирующего в разделяющий гель силу тока увеличивают до 30 мА (в случае использования стабилизации по напряжению – 50 В и 120 В, соответственно), ждем 25-30 минут. Выключаем систему, после того как полоса лидирующего красителя дойдет до нижней границы геля. Следует помнить, что для амплификации и электрофореза желательно использовать разные наборы пипеток. Так же необходимо все работы с пластиковой посудой выполнять при помощи простерилизованного пинцета.

2.3.2.2. Работа №6. Обработка пластиковой посуды.

Во время проведения исследований может возникнуть необходимость вторично использовать пластиковую посуду.

Пластиковую посуду моют 10-% спиртовым раствором щелочи. В этом есть необходимость, так как при мытье пластиковой посуды другими методами можно ее не отмыть, так как ДНК, особенно в амплификационных пробирках, может адсорбироваться на стенках посуды.

Приготовление раствора.

Берем 100 грамм сухой щелочи (гидроокиси натрия или калия) растворяем ее в фарфоровом стакане в 120мл дистиллированной воды. При этом нужно соблюдать правила работы с агрессивными веществами, т.е. работать только в перчатках и защитных очках, навеску брать фарфоровой ложкой, взвешивать в стакане, работы проводить только в вытяжном шкафу, добавляя и перемешивая щелочь небольшими порциями. После получения раствора его необходимо перенести в полиэтиленовую емкость и добавить 1 литр этилового спирта.

Пошаговая инструкция.

- Пластиковую посуду рассортировать.

- 10-15 раз ополоснуть в проточной воде.

- Замочить посуду на ночь в растворе стирального порошка.

- Отполоскать посуду в проточной воде(10-15 раз).

- Загрузить посуду в спиртово-щелочной раствор, при этом, если раствор свежий, то посуду держат 10-15 минут (встряхнуть 3-4 раза) если разбавленный (старый) – 30 минут.

- Тщательно слить раствор в другую емкость.

- Отполоскать посуду в проточной воде.

- Поместить вымытую таким образом посуду в кастрюлю для кипячения и залить дистиллированной водой.

- Кипятить 3-4 раза, меняя воду после каждого кипячения.

- Вытряхнуть посуду в емкость для сушки посуды.

- Сушить в сушильном шкафу при температуре не выше 80-90°C.

- Высушенную посуду разложить по емкостям, прикрыть крышкой.

При мытье пластиковой посуды следует помнить, что пробирки эппендорф имеют защитный слой, который может разрушиться при не точном соблюдении данной инструкции. Это ведет к потере посудой своих качественных характеристик.

3. Электрофорез белков

Гель-электрофорез – один из стандартных молекулярно-биологических методов анализа. Молекулы белка в растворе обладают зарядом при любом значении pH, отличном от их изоэлектрической точки. Это обуславливает их подвижность в электрическом поле. Разделяют белки в полиакриламидных гелях (ПААГ), имеющих по сравнению с агарозными гелями меньший размер пор. Гель образуется в результате полимеризации мономерных молекул акриламида в присутствии N,N'-метилен-бис-акриламида, формирующего поперечные сшивки. Варьированием концентрации мономеров можно добиваться получения пор различного размера. ПАА-гели плотнее агарозных, устойчивы к кипячению в воде, пластичные и менее ломкие.

ПААГ состоит из зон концентрирующего и разрешающего геля.

Концентрация акриламида в разрешающем геле зависит от размеров белка – для крупных белков используют гели с низкой концентрацией, начиная от 5% и выше, менее крупные белки разделяют в мелкопористых гелях, содержащих до 20–25% акриламида. Заливка геля и электрофоретическое разделение белков в пластине геля происходит в вертикальном положении.

Разработано большое количество модификаций метода электрофореза белков в ПААГ для решения различных задач и для разных белков и пептидов. Наиболее распространённой разновидностью является электрофорез белков в денатурирующих условиях в присутствии додецилсульфата натрия (хаотропный агент, ПАВ) по Лэммли (Laemmli, 1970). Далее приведена одна из модификаций этого метода.

3.1. Работа 7. Приготовление растворов и заливка ПААГ

Подготовка к электрофорезу белков по сравнению с электрофорезом ДНК занимает больше времени. Полиакриламидный гель обычно готовят заранее, используя для этого стоковые растворы. Концентрирующий гель обычно имеет концентрацию полиакриламида от 2 до 8% и значение pH 6,8. Разделяющий гель имеет концентрацию полиакриламида от 5 до 20% и pH в районе 8,5–8,9. Выбор плотности геля зависит от молекулярных масс исследуемых белков. В качестве электродного буфера чаще всего используют Tris–глициновый или Tris–боратный буфер с водородным показателем среды pH 8–9.

Материалы и оборудование

Аппарат для вертикального электрофореза, источник постоянного тока, стеклянные пластины с вырезом и без выреза, гребёнка, спейсеры, шприц для нанесения образцов, реактивы для приготовления ПААГ и буферов.

Растворы:

1. Электродный буфер (200 мл)

Реактив	Количество
Tris–ОН (трис(гидроксиметил)аминометан)	3,03 г
Глицин	14,44 г
SDS	1,0 г
H ₂ O	(бидистиллированная, до 200 мл)

деионизированная, здесь и далее)	
----------------------------------	--

pH 8,4, p-р глицина титруют до нужного знач. pH сухим Tris;
SDS добавлять последним, после доведения pH

2.Раствор АА /бисАА

Реактив	Количество
АА (акриламид)	30,0 г
бисАА (N,N'-метилен-бис-акриламид)	0,8 г
H ₂ O	до 100 мл

3 Буфер 1 (для концентрирующего геля)

Реактив	Количество
Tris-HCl (трис-гидрохлорид)	6,06 г
SDS	0,4 г
H ₂ O	до 100 мл
pH 6,8, титровать 4–6 н HCl, перед добавлением SDS	

4 Буфер 2 (нижний буфер для разделяющего геля)

Реактив	Количество
Tris-OH (трис(гидроксиметил)аминометан)	18,17 г
SDS	0,4 г
H ₂ O	до 100
pH 8,8, титровать до нужного значения HCl, перед SDS	

Реактив	Количество
5 БФС (бромфеноловый синий)	2 мг
H ₂ O	до 4 мл

6.Краситель (0,125% кумасси R–250)

Реактив	Количество
Coomassie Brilliant Blue R–250 (у G–250 разрешение меньше)	1,25 мг
Этанол	5 мл
Уксусная к-та (10%)	1 мл
H ₂ O	до 10 мл

7. Отмывающий раствор I (50% этанол, 10% уксус. к-та)

Реактив	Количество
---------	------------

Уксусная к-та (10%)	10 мл
Этанол (50%)	50 мл
H ₂ O	до 100 мл
Перед использованием развести в 5 раз	

8 Отмывающий раствор II (5% этанол, 10% уксусная к-та)

Реактив	Количество
Уксусная к-та (10%)	35 мл
Этанол (50%)	25 мл
H ₂ O	до 100 мл
Перед использованием развести в 5 раз	

2 буфер для образцов

Реактив	Количество
Глицерин 15%	7,5 мл
β-меркаптоэтанол	2,5 мл
SDS	1,15 г
Tris-HCl (трис-гидрохлорид)	0,38 г
H ₂ O, pH 6,8	до 25 мл

- 10% ТХУ,
- 5% ПСА (персульфат аммония),
 - ТЕМЕД (N,N,N,N-тетраметилэтилендиамин).

Ход работы

Подготовка стёкол для заливки полиакриламидного геля

1. Взять стекло с вырезом и поместить по его боковым краям два спейсера.
2. Сверху положить на спейсеры стекло без выреза. Осторожно поставить собранную конструкцию в камеру вертикально так, чтобы можно было залить гель в полость между стеклами. Стекло без выреза должно быть обращено наружу, к исследователю. Закрепить конструкцию зажимами.
3. Расплавить 3% агарозу, охладить до 50–60°C и залить тонким слоем (5 мм) дно электрофорезной ячейки во избежание протекания гелевого раствора.

Заливка геля

1. Для приготовления разделяющего геля смешать компоненты^a (за исключением ТЕМЕД и ПСА) в соответствии с данными, приведёнными в табл. 2 (для разных объёмов!). Полученную смесь тщательно перемешать^b.

Таблица 2. Подготовка разделяющего геля

Компонент	3%	6%	10%	20%
Р-р АА/бисАА	1 мл	3 мл	4,95 мл	13,34 мл
Буфер 2	2,5 мл	3,75 мл	3,75 мл	5 мл
H ₂ O	6,5 мл	8,25 мл	6,3 мл	1,66 мл
ТЕМЕД	10 мкл	15 мкл	15 мкл	40 мкл
ПСА 5%	30 мкл	45 мкл	45 мкл	120 мкл
V общий	10 мл	15 мл	15 мл	20 мл

2. Добавить последовательно ТЕМЕД и ПСА и тщательно перемешать полученный раствор, при этом важно, чтобы в процессе перемешивания не образовывались пузырьки с газом.

3. Полученный раствор разделяющего геля аккуратно залить между стеклянными пластинами так, чтобы уровень не превышал 3 см от верхнего края пластин.

4. Осторожно наслоить на раствор разделяющего геля тонкий слой метанола или деионизированной воды и оставить гель застывать (до 20 мин).

5. Приготовить раствор концентрирующего геля как указано в табл. 3.

6. Удалить слой метанола (!) или воды с поверхности застывшего разделяющего геля фильтровальной бумагой.

7. Наслоить на поверхность застывшего разделяющего геля раствор концентрирующего геля, и немедленно после этого вставить гребёнку между стеклянными пластинами.

Таблица 3. Подготовка концентрирующего геля

Компонент	6%	10%
Р-р АА/бисАА	2 мл	3,3 мл
Буфер 1	2,5 мл	2,5 мл
H ₂ O	5,5 мл	4,2
ТЕМЕД	20 мкл	10 мкл
ПСА 5%	60 мкл	30 мкл
V общий	10 мл	10 мл

8. Оставить гель застывать в течение 20 мин. Удобно отлить немного из остатков гелевого раствора в 1,7 мл пробирку и использовать этот раствор как индикатор полимеризации.

Подготовка камеры к электрофорезу

1. Поставить электрофорезную камеру на ровную горизонтальную поверхность. Добавить электродный буфер в верхнюю ёмкость камеры так, чтобы уровень буфера был на 0,5 см выше уровня геля.

2. Добавить электродный буфер в нижний поддон камеры.

3. Осторожно удалить гребёнку и промыть лунки электрофорезным буфером с помощью шприца или микропипетки.

Примечания

^a Готовый стоковый раствор для геля нужной концентрации без ТЕМЕД и ПСА можно хранить в холодильнике около года. Акриламид токсичен, работать в перчатках!

^b В 15% ПАА-гелях эффективно разделяются белки с диапазоном молекулярных масс 10–45 kDa, в 10% гелях – 14–205 kDa, в 7,5% – 24–205 kDa, в 5% – 36–205 kDa.

^в Готовые гели можно хранить в холодильнике в обёрнутом виде, не вынимая гребёнки. Однако разделяющий и концентрирующий гели имеют разные буферы, поэтому лучше залитый гель использовать сразу.

3.2. Работа 8. Проведение электрофореза белков

Молекула белка в растворе имеет некий средний целочисленный заряд (положительный или отрицательный) при любом значении pH, отличающемся от изоэлектрической точки данного белка. Это обуславливает передвижение молекул в полиакриламидном геле под действием внешнего электрического поля. Кроме заряда на подвижность влияет размер белковых молекул. Электрофорез проводят обычно при нейтральных или слабощелочных значениях pH, когда большинство белков мигрирует к аноду, так же как мигрирует при электрофорезе ДНК. За прохождением электрофореза следят по движению красителя бромфенолового синего (БФС). Краситель идёт с фронтом фореза, впереди него белков нет.

Материалы и оборудование

Электрофорезная камера с гелем, источник тока, образцы белков для анализа, маркеры молекулярного веса.

Растворы

- 2 буфер для нанесения образцов (работа 7).
- Раствор БФС (работа 7).

Ход работы

1. Подготовить образцы так, чтобы общая концентрация белка была не больше 10 мг/мл. Нужно 10 мкл образца разбавить 2 буфером для нанесения образцов в два раза, добавить 4 мкл раствора БФС. Рекомендуется прокипятить образцы в течение 5 мин.
2. С помощью гамильтоновского шприца или микропипетки-дозатора с вытянутым наконечником нанести по 10 мкл образцов в лунки геля.
3. Подключить электрофорезную камеру к источнику тока, соблюдая полярность.
4. Провести электрофоретическое разделение белков при постоянном токе 20 мА, 60 В для одного геля и 60 мА, 150 В для другого геля. Повышать напряжение надо при прохождении БФС до разделяющего, нижнего геля. В этих условиях электрофорез длится 40–50 мин.
5. По достижению красителем нижнего края геля отключить ток.
6. Вынуть пластину с гелем из электрофорезной камеры.
7. Осторожно вынуть спейсеры, находящиеся между стеклами.
8. Отделить гель от стёкла, окрасить.

Примечание

^a Для придания стёклам гидрофобных свойств для лучшего отделения геля их зачастую предварительно силиконируют с использованием bind-silane и repel-silane.

Контрольные вопросы

- 1) Какие из предложенных соединений образуют в щелочном растворе биуретовый комплекс меди?
 - а) Asp; Ser; Cys; Met; Met-Thr-Phe
 - б) Ser-Cys-Ala; Gly; Val; Leu; Trp-Tyr
 - в) Ser; Ile; Glu-Met; Leu-Ala; Gly-Leu-Ala
 - г) Trp-Trp-Tyr; His; Lys; Pro-Pro; Pro
 - д) Phe-Tyr-Ala; Arg; Asn; Gln-Arg; Lys
 - е) Asp-Asn-Ala; Phe; Trp; Pro-Val; Leu
 - ж) Ser-Ile; Gly-Arg-Gly; Pro; Phe; Met
 - з) Asp-Ile-Leu; Asp; Ala-Thr; Gly, Pro
 - и) Cys; Met; Val; Trp-Ala-Thr; Gly-Met-Cys
 - к) Ser; Met-Gly-Arg; Trp; Pro; Asp
- 2) Какие из предложенных аминокислот вступают в ксантопротеиновую реакцию?
 - а) Ile; Val; Met; Phe; Trp
 - б) Lys; Pro; Phe; Gln; Tyr
 - в) Tyr; Phe; Pro; His; Arg
 - г) Thr; Ser; His; Phe; Trp
 - д) Trp; Pro; Ala; Val; Phe
- 3) Какие аминокислоты вступают в реакцию с реактивом Фоля?
 - а) Cys; Thr; Met; Val; Arg
 - б) Gly; Ala; Met; Leu; Cys
 - в) Asp; Val; Cys; Thr; Met
 - г) Glu; Met; Pro; His; Gys
 - д) Gys; Ile; Met; Ala; Gly
- 4) Какие из предложенных аминокислот вступают в реакцию с реактивом Милона:
Gly; Val; Ile; Tyr; Pro ?
- 5) Для распознавания какой аминокислоты используют в качестве реагента α - нафтол:
Glu; Asp; Ala; Met; Arg?
- 6) Для распознавания какой аминокислоты используют в качестве реагента п-диазобензолсульфокислоту:
Thr; Met; Ala; Trp; His?
- 7) Для распознавания какой аминокислоты используют в качестве реагента глиоксиловую кислоту:
Trp; Tyr; Gln; Gly; Ala?
- 8) Для распознавания какой аминокислоты используют в качестве реагента о-фталевый диальдегид:
Leu; Gly; Cys; Met; Asn?

Составители
Короткевич Ольга Сергеевна
Себежко Ольга Игоревна
Люханов Максим Павлович

Молекулярная биология

методические разработки по выполнению лабораторных работ

Формат 60x84 1/16 1.0 усл.печ.л.

В авторской редакции
Компьютерная вёрстка О.С. Короткевич