

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ

**Факультет технології виробництва і переробки продукції
тваринництва, стандартизації та біотехнології**

Кафедра біотехнології та біоінженерії

ОСНОВИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ

**методичні рекомендації для виконання лабораторних робіт
для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти**

ОПІ «Біотехнології та біоінженерія»

спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

денної форми здобуття вищої освіти

Миколаїв
2022

УДК 577.2
О75

Рекомендовано до друку рішенням науково-методичної комісії факультету технології виробництва і переробки продукції тваринництва, стандартизації та біотехнології Миколаївського національного аграрного університету від «16» листопада 2022 р., протокол № 4.

Укладач:

С. І. Луговий - д-р с.-г. наук, доцент, доцент кафедри біотехнології та біоінженерії, Миколаївський національний аграрний університет

Рецензенти:

В. М. Балацький - д-р с.-г. наук, професор, завідувач лабораторії генетики Інституту свинарства і АПВ НААН України;

І. Ю. Горбатенко - д-р біол. наук, професор, професор кафедри біотехнології та біоінженерії, Миколаївський національний аграрний університет

ЗМІСТ

Вступ.....	4
Правила техніки безпеки при роботі в лабораторії молекулярної біології.....	6
1. Виділення загальної ДНК із різних об'єктів.....	10
1.1. Виділення ДНК із бактерій.....	11
1.2. Виділення ДНК із лейкоцитів крові.....	15
1.3. Виділення ДНК із тканин рослин.....	17
1.4. Виділення плазмідної та фагової ДНК.....	20
2. Концентрування ДНК шляхом осадження спиртом.....	26
3. Спектрофотометрія препаратів ДНК, РНК і білків.....	29
3.1. Спектрофотометричне визначення концентрації ДНК.....	29
3.2. Визначення концентрації білка за власною флуоресценцією.....	31
4. Електрофорез нуклеїнових кислот.....	34
4.1. Приготування агарозного гелю.....	35
4.2. Гель-електрофорез ДНК.....	37
5. Полімеразна ланцюгова реакція.....	41
6. Рестрикція ДНК.....	46
6.1. Рестрикція плазмідної та фагової ДНК.....	47
6.2. Рестрикція геномної ДНК еукаріотів.....	50
7. Визначення концентрації білка.....	52
8. Електрофорез білків.....	56
Список використаної літератури.....	63

ВСТУП

Дисципліна «Основи молекулярної біології» спрямована на ознайомлення студентів із молекулярною організацією геномів прокариотичних і еукаріотичних мікроорганізмів, регуляцією експресії їхніх генів на рівні транскрипції, трансляції та фолдингу, ко- й посттрансляційних модифікацій білка, а також реплікацією, рекомбінацією і репарацією генетичного матеріалу, процесами рестрикції та модифікації ДНК у мікроорганізмів.

Вивчення дисципліни спрямовано на формування у студентів наступних **компетентностей**:

Інтегральна компетентність

Здатність розв'язувати складні спеціалізовані задачі та практичні проблеми, що характеризуються комплексністю та невизначеністю умов у біотехнології та біоінженерії, або у процесі навчання, що передбачає застосування теорій та методів біотехнології та біоінженерії

Загальні компетентності

K01. Здатність застосовувати знання у практичних ситуаціях;

K05. Здатність вчитися і оволодівати сучасними знаннями;

Спеціальні (фахові, предметні) компетентності

K11. Здатність використовувати ґрунтовні знання з хімії та біології в обсязі, необхідному для досягнення інших результатів освітньої програми;

K13. Здатність працювати з біологічними агентами, використовуваними у біотехнологічних процесах (мікроорганізми, гриби, рослини, тварини, віруси, окремі їхні компоненти);

K14. Здатність здійснювати експериментальні дослідження з вдосконалення біологічних агентів, у тому числі викликати зміни у структурі спадкового апарату та функціональній активності біологічних агентів;

K24. Здатність дотримуватися вимог біобезпеки, біозахисту та біоетики.

В результаті вивчення дисципліни здобувачі мають змогу досягти наступних **результатів**:

ПР02. Вміти здійснювати якісний та кількісний аналіз речовин неорганічного, органічного та біологічного походження, використовуючи відповідні методи;

ПР06. Вміти визначати та аналізувати основні фізико-хімічні властивості органічних сполук, що входять до складу біологічних агентів (білки, нуклеїнові кислоти, вуглеводи, ліпіди).

ПРАВИЛА ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ ПРИ РОБОТІ В ЛАБОРАТОРІЇ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ

Робота у лабораторії молекулярної біології пов'язана з використанням шкідливих горючих (далі ГР), пожежно-небезпечних, легкозаймистих (далі ЛЗР), токсичних речовин у газоподібному, рідкому або твердому стані. При виконанні лабораторних робіт використовуються електронагрівальні та вимірювальні прилади.

Під час роботи в лабораторії необхідно суворо дотримуватись таких загальних правил техніки безпеки:

1. Слідкувати за тим, щоб на всіх банках з реактивами були етикетки з ясным написом вмісту. Не залишати в лабораторному посуді розчинів будь якої речовини без відповідного напису спеціальним олівцем для скла. Не кидати осколків побитого посуду в раковину. Не залишати пустий посуд немитим. Не класти скляний посуд у шухляди разом з металевими предметами. Не пробувати хімічні речовини на смак. Не визначати хімічні речовини за запахом. Тримати робочий стіл чистим (все, що пролите, просипане або розбите має бути негайно прибрано). Лабораторні столи та підлоги забороняється промивати бензином та іншими рідинами, які легко займаються. Не захарашувати робочий стіл посудом, банками з реактивами та іншими речами. Не класти на робочий стіл їжу. Не розігрівати в лабораторному посуді чай. Не приймати їжу в приміщенні лабораторної кімнати.

2. Під час роботи з реактивами у витяжній шафі не вводити голову всередину шафи, не працювати в приміщенні лабораторії наодинці. Не захарашувати проходи, виходи, підходи до протипожежного інвентарю.

3. Під час переливання кислот, лугів та інших небезпечних рідин, а також при подрібненні твердих речовин вручну здійснювати роботу в захисних окулярах з оправою, яка щільно прилягає до обличчя.

4. Перед пуском в роботу того чи іншого лабораторного апарата ретельно перевіряти його технічний стан і лише після усунення всіх дефектів, що будуть виявлені, вмикати апарат. Усі електронагрівальні прилади обов'язково установлювати на листовому азбесті товщиною 8-10 мм.

5. Скляні посудини, в котрих можливо утворення пару чи газу, захищати металевими сітками або екранами для попередження

розлітання осколків при вибуху. Не вносити шпаристі порошкові тіла (пемза, активоване вугілля) в рідини, що нагріті більше 100°C, – для запобігання бурхливого закипання і викидання гарячої суміші.

6. Відпрацьовані ефіри, бромкислоти, хлористий бензол та інші речовини, що різко пахнуть, виливати у ті раковини, над котрими є витяжна шафа. Необхідні мінімальні запаси (кріпких димучих кислот), а також речовини, що легко випаровуються, пахучих (ацетон, бром, ефіри та ін.) зберігати в скляному посуді з добре притертими пробками у витяжній шафі, котра зачиняється герметично.

7. У випадку припинення дії вентиляції всі роботи, пов'язані з виділенням шкідливих речовин, газів і парів, негайно припинити.

8. Виходячи з лабораторії, не залишати ввімкнених нагрівальних приладів, пальників, що горять, відчинених газових кранів. В лабораторії, як правило, приходиться працювати з різними їдкими, отруйними для здоров'я речовинами. Невміле та недбале поводження з ними може призвести до нещасних випадків з тяжкими наслідками.

9. Речовини, які широко застосовуються в хімічних лабораторіях, наприклад, кислоти (хлористоводнева, сірчана, азотна), луги (їдкий натрій, їдкий калій та ін.) при потраплянні на шкіру можуть викликати хімічні опіки. Для попередження опіків кислотами та лугами необхідно суворо додержуватись правил техніки безпеки – працювати охайно, обережно. Найчастіше опіки виникають при переливанні кислот і луг з великих бутлів у більш дрібний посуд. Крім того переливання кислот і лугів нахиланням бутлів завжди пов'язане з небезпекою перекидання їх, розлиття речовини, тому доцільніше переливати такі рідини за допомогою сифону. Для усунення розбризкування, зливання кислот і лугів необхідно проводити за допомогою лійки. Вельми небезпечна операція – наповнення їдкими лугами піпеток; заповнювати піпетки цими рідинами треба за допомогою гумової груші. Кріпку сірчану кислоту необхідно вливати в чистий та сухий посуд, бо при наявності у посуду води відбувається сильний розігрів, подібно кипінню, і може скоїтись викидання кислоти, яке може призвести до опіків працюючих! Для розведення концентрованої сірчаної кислоти її слід вливати у воду тонким струменем, перемішуючи розчин скляною паличкою. Переливання концентрованої азотної, соляної кислот, аміаку і броду необхідно проводити лише під витяжною шафою.

10. Під час роботи з розчинами кислот і лугів необхідно застосовувати герметичні окуляри з гумовою оправою або маскою від

протигазу, фартухом з прогумованої тканини, гумовими рукавичками і нарукавниками.

11. Розколювати тверді куски їдкою калію, їдкою натрію слід, загорнувши у ганчірку або декілька шарів паперу. При цьому треба надягати захисні окуляри або гумові рукавички.

12. Відпрацьовані кислоти, луги не можна зливати в одну посудину, бо при цьому відбувається нейтралізація, яка супроводжується розігрівом і сильним випаровуванням. Для кислот, лугів треба мати окремі скляні або глиняні банки, після роботи здійснюється нейтралізація, і вміст банок виливають у спеціальні ями або каналізацію через раковину, промиваючи її потім не менш як 10-кратною кількістю води.

13. Роботу з газоподібними отруйними речовинами (бензолом, хлором тощо) треба обов'язково проводити у витяжній шафі, при цьому треба мати протигаз на випадок аварії. Роботи, пов'язані із застосуванням отруйних рідин, також треба проводити під витяжкою, при цьому працювати в гумових рукавичках, а після роботи, не знімаючи рукавичок, треба добре промити їх водою з милом і тільки після цього зняти. Знявши рукавички, треба ретельно вимити руки.

14. Слід стерегтися потрапляння токсичних рідин на одяг. У випадку пролиття отруйних рідин на одяг, його треба негайно зняти, обполоскати або попрати. Якщо рідина потрапила на тіло, то ці місця необхідно ретельно вимити спочатку без мила, а потім з милом. Уходити до дому в змоченому отруйною рідиною одязі забороняється.

15. У випадку проливання отруйної рідини на підлогу, її необхідно засипати тирсою або іншими вбираючими речовинами. Просякнуту тирсу слід обережно зібрати за допомогою двох совків та спалити. Після видалення тирси місце, де була пролита отруйна рідина, нейтралізують розчином, котрий розкладає або розчиняє речовину; якщо такого розчину немає, це місце треба ретельно промити водою.

16. Цілком неприпустимо визначати невідому отруйну хімічну речовину по запаху або смаку. По закінченні роботи з отруйними речовинами треба негайно ретельно прополоскати водою посуд, який звільнився, і тільки після цього передати його для спеціального миття.

17. Під час роботи в лабораторіях необхідно пам'ятати про можливість утворення вибухонебезпечних сумішей парів газів і пилу

з повітрям. Для безпечної роботи при застосуванні вибухонебезпечних речовин треба підтримувати такий режим, при котрому концентрації були б вище верхньої або нижче нижньої межі вибуху.

18. В приміщеннях лабораторій необхідно додержуватись протипожежних правил.

19. Для надання першої допомоги при нещасному випадку необхідно, щоб в лабораторії була в наявності аптечка з медикаментами, перев'язувальними засобами.

20. В лабораторіях не можна зберігати рідини, які легко займаються, у кількості, що перевищує добову потребу. Якщо добова потреба вище 0,5 літра, треба зберігати у залізних шафах [1].

1. ВИДІЛЕННЯ ЗАГАЛЬНОЇ ДНК ІЗ РІЗНИХ ОБ'ЄКТІВ

Процедура виділення ДНК з клітин і тканин часто є вихідним (основним) етапом дослідження живого організму на молекулярному рівні. Від ДНК безпосередньо або через білки-ферменти залежать всі біосинтези і катаболізм клітини. Клітину необхідно зруйнувати тим чи іншим способом, а хромосомну ДНК очистити від інших клітинних компонентів. Перш за все, потрібно відокремити ДНК від білків, що входять до складу нуклеопротейдних комплексів хроматину. При цьому важливо захистити ДНК від дії нуклеаз і максимально зберегти її цілісність, оскільки довгі лінійні молекули ДНК при їх ізоляції з клітини неминуче фрагментуються.

Методи виділення ДНК зазвичай включають наступні етапи:

1) лізис клітин (або руйнування фізичним, механічним способом);

2) ферментативне руйнування білків протеїназами і / або депротейнізацію клітинного лізату за допомогою фенолу і хлороформу;

3) центрифугування для видалення денатурованих білків і фрагментів клітинних органел.

4) осадження ДНК з розчину етанолом і після центрифугування розчинення осаду в буферному розчині.

Разом з ДНК частково виділяється і РНК, від якої позбавляються за допомогою ферменту РНКаз.

Для лізису клітин і денатурації білків часто використовується детергент додецилсульфат натрію і хаотропний агент¹ гуанідинізоціанат. Ряд сучасних методів передбачає сорбцію ДНК на гранулах силікагеля в присутності хаотропних речовин,

¹ Хаотропний засіб являє собою речовину, яке руйнує структуру, а також денатурує, макромолекули, такі як білки і нуклеїнові кислоти (наприклад, ДНК і РНК). Хаотропні розчинені речовини збільшують ентропію системи, перешкоджаючи міжмолекулярним взаємодіям, опосередкованим нековалентними силами, такими як водневі зв'язки, сили Ван-дер-Ваальса і гідрофобні ефекти.

Антихаотропний агент (космотропний) – це молекула в водному розчині, яка підсилює гідрофобні ефекти всередині розчину. Антихаотропні солі, такі як сульфат амонію, можна використовувати для осадження речовин з нечистої суміші. Це використовується в процесах очищення білків, щоб видалити небажані білки з розчину.

центрифугування і подальшу елюцію² ДНК з гранул у розчин. Деякі фірми продають набори реактивів для виділення ДНК з використанням магнітних частинок, покритих силікою SiO₂. Деякі комерційні набори передбачають сорбцію ДНК на мембранах або іонообмінних сорбентах. Фенол-хлороформний метод екстракції ДНК вважається стандартним.

Кількісна і якісна оцінка зразка отриманої ДНК здійснюється при подальшій стандартній процедурі електрофорезу ДНК в агарозному гелі шляхом візуального порівняння зі зразками відомої концентрації. Спектрофотометричне визначення дає більш точну характеристику препарату ДНК.

1.1. Виділення ДНК із бактерій

Виділення загальної або тотальної ДНК із клітин бактерій за використанням додецилсульфату натрію, протеїназ та фенолу (Dhaese et al., 1979) є досить поширеним підходом. Метод простий і надійний, існує в ряді модифікацій, як і багато інших методів.

Разом з хромосомною ДНК виділяється також плазмідна і фагова ДНК при їх наявності в клітині, а також РНК, від якої нескладно позбутися.

Плазматична мембрана бактеріальної клітини за використання цього методу руйнується під дією детергенту додецилсульфату натрію (SDS, sodium dodecyl sulfate) – однієї з найбільш поширених поверхнево-активних речовин, або ПАР. Цілісність пептидогліканового шару, так званого муреїнового мішка, при цьому теж порушується. Шляхом обробки бактеріального лізату фенолом, який денатурує протеїни, але не діє на нуклеїнові кислоти, видаляють усі білки, в тому числі білки нуклеоїда. Інші органічні сполуки клітини і низькомолекулярні речовини втрачаються при осаджуванні ДНК етанолом, оскільки залишаються в розчині. Отриманий у результаті центрифугування зразка осад нуклеїнових кислот, дезоксирибонуклеїнової і рибонуклеїнової, розчиняють у спеціальному буфері для зберігання ДНК – буфері TE. Хелатуючий

² Елюція, елювання (англ. elution, лат. eluo (elutum) — вимивати, видаляти) — вилучення речовини з твердого носія шляхом вимивання його відповідним розчинником (елюентом).

агент³, що входить до його складу – етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА) запобігає впливу на ДНК клітинних нуклеаз, оскільки пов'язує необхідні для їх роботи катіони Mg^{2+} .

Матеріали та обладнання

Основне обладнання для проведення молекулярно-біологічних досліджень: мікроцентрифуга, центрифуга для великих об'ємів, термостатуєма качалка-шейкер, вортекс, термостат, джерело струму, камери для електрофорезу, УФ-трансілюмінатор, термостат твердотільний для мікропробірок, рН-метр, ДНК-ампліфікатор, електропоратор, спектрофотометр, мікропіпетки-дозатори з одноразовими наконечниками.

Для проведення практичних робіт необхідно також наступне лабораторне обладнання: ламінарний бокс, витяжна шафа, сушильна шафа, холодильник, морозильник, ваги, дистильатор, електроплитка, СВЧ-піч, УФ опромінювач, лабораторний пластик і посуд.

Розчини

- *Середовище 2YT*. на 1 л: триптон – 16 г; дріжджовий екстракт – 8 г; NaCl – 5 г. Довести до 1 л дистильованою водою, рН середовища 7,0. Для отримання твердого середовища до нього додають перед автоклавуванням агар до 1,5%.
- *5% SDS*. 5%-ний розчин додецилсульфату натрію (лаурилсульфату, саркозилу, *N-laurylsarcosine*) у буфері TE.
- *Проназа*. Розчин 5 мг/мл у буфері TE.
- *Буфер TE*. 10мМ Tris-HCl, рН 8,0; 1мМ ЕДТА.
- *5M NaCl*. Розчинити 292,5 г NaCl у 800 мл води та довести об'єм до 1 л.
- *Суміш фенол-хлороформ*. Водонасичений фенол (насичений після перегонки 0,1М Tris-HCl, рН 8,0) змішують у пропорції 1:1 із заздалегідь приготовленою сумішшю хлороформ-ізоаміловий спирт.
- *Суміш хлороформ-ізоаміловий спирт*. Речовини змішують у пропорції 24:1 за об'ємом.

³ Хелатуючий агент (chelating agent) [гр. chele – клешня; лат. agens (agentis) – діючий] – хімічні сполуки клешнеподібної форми, ліганди, що володіють здатністю зв'язувати атоми металів.

Методика

1. Провести окремою колонією посів бактерій штаму *E.coli* XL1-Blue (або *A.brasilense* Sp245) в пробірку з 5 мл рідкого живильного середовища 2YT і вирощувати культуру бактеріальних клітин протягом ночі з аерацією при 37°C (або 30°C, відповідно).

2. Перенести мікропіпеткою 1,5 мл культури в мікроцентрифужну пластикову пробірку типу Eppendorf об'ємом 1,7 мл. Осадити клітини центрифугуванням протягом 5 хв при 10000 об/хв. Зауважте, що це найчастіше використовувана швидкість мікроцентрифуги, її встановлюють за замовчуванням, якщо не вказана інша швидкість.

3. Видалити супернатант (вилити живильне середовище через край: не бійтеся! осад щільний). Додати до осаду 300 мкл буфера TE і за допомогою мікропіпетки перевести клітини знову в суспензію (ресуспензувати).

4. Додати до суспензії клітин 100 мкл 5%-го розчину SDS і перемішати перевертанням пробірки 3 рази.

5. Додати 150 мкл розчину пронази (5мг/мл) і перемішати.

6. Інкубувати 1 (0,5) год. у термостаті за температури 37°C. Відбувається лізис клітин та ферментативний гідроліз білків.

7. Осадити нуклеїнові кислоти із лізату спиртом. Для цього додати в пробірку рівний об'єм ізопропанолу (550 мкл) та центрифугувати протягом 10 хвилин. (Після додавання спирту при необхідності можна перерватися; не центрифугувати пробу відразу, а прибрати її в холодильник. «Під спиртом» ДНК може зберігатися довгий час).

8. Після центрифугування відібрати мікропіпеткою залишки рідини із пробірки. Розчинити осад нуклеїнових кислот в 500 мкл буфера TE і провести депротеїнізацію зразка, тобто очищення ДНК від білків (пп. 9-12).

9. Додати до розчину рівний об'єм (500 мкл) суміші фенол-хлороформ і добре струсити до утворення стійкої емульсії.

10. Розділити водну та органічну фази шляхом центрифугування протягом 5 хв. Фенол залишається внизу, водна фаза з розчиненою ДНК – вгорі. Денатуровані фенолом білки дисоціюють з ДНК, втрачають розчинність і збираються при центрифугуванні на межі розділу фаз – в інтерфазі. Тобто відбувається екстракція ДНК із ДНП-комплексу.

11. Перенести мікропіпеткою водну фазу, що містить ДНК, в чисту 1,7 мл пробірку. При відборі важливо не засмоктувати в наконечник інтерфазу – щільний шар білого кольору між водною та органічною фазами в якій знаходяться агрегати денатурованих молекул білків⁴.

12. Провести ще одну екстракцію ДНК хлороформом і позбутися домішок фенолу. Для цього додати в пробірку зі зразком рівний обсяг суміші хлороформ-ізоаміловий спирт, перемішати і центрифугувати протягом 3 хв. Водну фазу перенести у чисту пробірку.

13. Оцінити мікропіпеткою-дозатором або за мітками на пробірці об'єм водної фази, що отримали, і додати 1/25 об'єму 5М NaCl до кінцевої концентрації солі 0,2М. Потім додати 2,5 об'єму холодного (-20°C) етанолу для осадження ДНК, точніше її натрієвої солі. Залишити на 1-2 години в морозильнику при температурі -20°C. Можна залишати ДНК під спиртом і довше, доки зразок буде потрібен.

14. Осадити нуклеїнові кислоти центрифугуванням протягом 10 хв при максимальній швидкості мікроцентрифуги. Злити супернатант та промити осад. Для цього додати до осаду 1 мл холодного 70% етанолу і центрифугувати знову протягом 3 хв⁵.

15. Злити 70% етанол, перевернути пробірки на фільтрувальний папір. Після того, як вся рідина стече, пробірку з осадом нуклеїнових кислот (ДНК і РНК⁶) трохи підсушити на повітрі до зникнення запаху спирту⁷. Розчинити осад у 50 мкл буфера TE. Для електрофорезу ДНК достатньо 5-10 мкл зразка.

⁴ Деякий об'єм водної фази при цьому неминуче втрачається, до 1/5 об'єму. Насправді краще пожертвувати цим об'ємом зараз, ніж чистотою препарату згодом. Фенол – токсична дратівлива речовина, необхідно виключити контакт зі шкірою і працювати з мікрокількістю, дотримуючись запобіжних заходів.

⁵ Допускається просто злити 70 % спирт, без центрифугування

⁶ Позбутися РНК за необхідності можна за допомогою ферменту РНКазі. Домішка РНК у препараті ДНК не впливає на рестрикцію чи ПЛР.

⁷ Пересушувати осад не можна, в повністю висушеному вигляді він практично нерозчинний у воді. Зазвичай осади сушать на свіжому повітрі не більше півгодини, під потоком нагрітого повітря чи твердотільному мікротермостаті досить 5 хв.

1.2. Виділення ДНК із лейкоцитів крові

Ізоляція загальної ДНК із тваринної клітини не становить особливої складності, оскільки плазмалема, ядерна та мітохондріальна мембрани «розчиняються» у присутності аніонного детергенту додецилсульфату натрію (SDS), а складної клітинної стінки у тварин порівняно, наприклад, з рослинами немає. Вивільнити ДНК із ДНК-білкового комплексу можна за допомогою протеїназ або хаотропних солей.

З цією ж метою можна провести, як і у випадку з бактеріями, фенольну екстракцію ДНК. Інші речовини при подальшому осадженні ДНК спиртом залишаються в розчині, і позбутися їх нескладно.

ДНК можна виділити з будь-яких тканин, клітини яких містять ядра, але кількісний вихід із різних тканин може бути різним. Досить часто для виділення ДНК використовують кров. Лейкоцити крові, на відміну зрілих еритроцитів, містять ядра. Загальної ДНК, виділеної зі 100 мкл цільної крові, достатньо для проведення декількох рестрикцій, ПЛР і секвенування. Мітохондріальна ДНК та РНК також присутні в одержуваному препараті. У наведеній нижче методиці для звільнення ДНК від білків використовується фенол. Під словом «фенол» молекулярні біологи часто мають на увазі суміш водонасиченого фенолу з хлороформом 1:1, а не кристалічну речовину. У суміші з хлороформом фенол працює ефективніше, а ізоаміловий спирт гасить піноутворення.

Матеріали та обладнання

Зразки крові, мікроцентрифуга, морозильник, термостат, мікропіпетки-дозатори з наконечниками, мікропробірки пластикові.

Розчини

- *Буфер SSC*. 3М NaCl; 0,3М цитрат натрію, рН 7,0. Для приготування концентрованого SSC 20 на 1 л потрібно взяти: NaCl – 175,3 г; цитрат натрію – 88,2 г. рН розчину доводити зазвичай не потрібно.
- *3М ацетат натрію, рН 5,2*. На 40 мл: розчинити 9,85 г ацетату натрію в 20 мл води, довести рН до 5,2 крижаної оцтової кислоти.
- *0,2М ацетат натрію, рН 5,2*. Готується розведенням 3М розчину.
- *10% розчин SDS*. Розчинити 100 мг на 10 мл дистильованої води.

- *Буфер TE* (робота 1.1).
- *Суміш фенол-хлороформ* (робота 1.1).
- *Суміш хлороформ-ізоаміловий спирт* (робота 1.1).

Методика

1. До 100 мкл цільної крові додати 2 об'єми дистильованої води до кінцевого об'єму 0,3 мл. Ретельно перемішати та залишити на 15 хвилин.

2. Пробу центрифугувати протягом 10 хв, 5000 об/хв. Супернатант (надосадову рідину) злити.

3. Осад клітин відмити подвійним об'ємом буфера SSC, додавши в пробірку 200 мкл 1-кратного SSC. Перемішування обережне.

4. Центрифугування як у п. 2. Супернатант злити.

5. До осаду додати 54 мкл 0,2М ацетату натрію⁸ і 6 мкл 10% розчину SDS. Осад клітин ретельно ресуспензувати, тобто перевести в суспензію знову за допомогою мікропіпетки або вортексу. Інкубувати при 37°C протягом 0,5-1,0 год. для проходження лізису (руйнування) клітин.

6. Додати 2 об'єми буфера TE і провести фенольну депротейнізацію зразка. Для цього внести в пробірку рівний об'єм фенол-хлороформної суміші, добре струсити і центрифугувати. Відібрати водну фазу (верхній шар) у чисту пробірку, не захоплюючи інтерфазу.

7. Повторити ту саму процедуру, що у п. 6, але із сумішшю хлороформ-ізоаміловий спирт.

8. До очищеного від білків лізату додати 1/10 об'єму 3М ацетату натрію, рН 5,2, перемішати і осадити ДНК додавши 2,5 об'єми холодного 96% етанолу і помістивши зразок на 1-2 год. в морозильну камеру при -20°C. Можна залишити ДНК під спиртом на ніч.

9. Пробу центрифугувати протягом 10 хв за максимальної швидкості мікроцентрифуги. Супернатант злити. Осад промити 70% спиртом.

⁸ Сіль потрібно додавати до зразка до фенольної депротейнізації, оскільки екстракція фенолом у низькосольовому буфері може знизити вихід ДНК через втрати

10. Висушити осад ДНК на повітрі і розчинити в 20 мкл буфера TE⁹.

1.3. Виділення ДНК із тканин рослин

При виділенні ДНК із тканин рослин важливим фактором є ефективне руйнування клітинних стінок. Багато методів, що використовуються для цього, призводять до сильної фрагментації ДНК (через гідродинамічні розриви в ланцюзі!). Часто доводиться знаходити компроміс між розміром ДНК та її кількісним виходом, адже молекули ДНК – найбільші полімерні біомакромолекули. Вивільнення високомолекулярної ДНК із клітин – це лише частина завдання, оскільки рослинні екстракти містять велику кількість білків, полісахаридів, танінів та пігментів, які у ряді випадків дуже важко відокремити від ДНК.

Тканини рослин зазвичай руйнують механічним розтиранням у присутності детергентів, які розчиняють мембрани клітин, і хелатуючих агентів, що пригнічують дію клітинних нуклеаз за рахунок зв'язування двовалентних катіонів. Від білків ДНП-комплексу позбавляються фенольною депротейнізацією зразка. Деякі методики для звільнення ДНК від білків хроматину передбачають використання протеїназ. Після депротейнізації препарат все ще дуже забруднений полісахаридами.

Якщо потрібна велика кількість чистої ДНК, то зразки очищають ультрацентрифугуванням в градієнті щільності хлористого цезію.

Поширені методи з використанням двох детергентів СТАВ (*cetyl trimethyl ammonium bromid*) та SDS (*sodium dodecyl sulfate*). Метод з використанням СТАВ (Rogers, Bendich, 1985) дозволяє отримувати препарати рослинної ДНК з чистотою, достатньою для ПЛР, рестрикційного та гібридизаційного аналізу. СТАВ добре розчиняє мембрани клітин. Крім того, його застосування дозволяє розділити ДНК і полісахариди, оскільки вони відрізняються розчинністю в присутності цієї поверхнево-активної речовини. При високих

⁹ До складу багатьох буферних розчинів входить трис-гідрохлорид (Tris-HCl), оскільки трис не допускає розвитку мікрофлори в подібному буфері, порівняно з іншими буферними системами. Стоковий (від англ. stock – запас) концентрований розчин кислої солі Tris-HCl з потрібним значенням рН отримують титруванням трис-основи (Tris-OH, трис(гідроксиметил)амінометан) соляною кислотою.

концентраціях солей нуклеїнові кислоти утворюють стабільні, але водночас розчинні комплекси зі СТАВ. При зниженні концентрації солі нижче 0,4М NaCl відбувається випадання в осад комплексів СТАВ/нуклеїнова кислота, тоді як більшість полісахаридів залишається в розчині. Осад знову розчиняють у високосольовому розчині 1М NaCl та осаджують ДНК спиртом.

Інша методика також передбачає використання детергентів, зокрема SDS, який також здійснює солюбілізацію біомембран та швидко денатурацію протеїнів (при цьому інактивуються нуклеази). Нижче наведено модифікацію одного з таких методів, спочатку розробленого Делапорта зі співавт. (Dellaporta et al., 1985). Білки та полісахариди в рослинних екстрактах при 0°C утворюють комплекси з SDS і випадують в осад, а нуклеїнові кислоти залишаються в розчині. Високомолекулярна ДНК, очищена згодом від білків фенолом, осаджена спиртом і розчинена у відповідних буферах придатна для рестрикції та ПЛР.

Матеріали та обладнання

Рослини кукурудзи, петунії, тютюну (або заморожені тканини), мікроцентрифуга, морозильник, ступка з товкачиком, оксид алюмінію, пісок.

Розчини

- *Буфер для екстракції.* 100мМ Tris-HCl, рН 8,0; 50мМ ЕДТА; 500мМ NaCl; 1,25% SDS; 8,3мМ NaOH; 0,83% Na₂S₂O₃.
- *3М ацетат калію, рН 5,0.* На 100 мл: 5М ацетат калію – 60 мл; CH₃COOH крижана – 11,5 мл; H₂O – 28,5 мл.
- *Суміш фенол-хлороформ* (робота 1.1).
- *Суміш хлороформ-ізоаміловий спирт* (робота 1.1).

Методика

1. Приготувати наважку 200 мг листя рослин, заморожених заздалегідь при -20°C в морозильнику. Або швидко заморозити наважку в рідкому азоті.

2. Зразки розтерти у попередньо охолодженій фарфоровій ступці до гомогенного стану. Якщо немає рідкого азоту, то при розтиранні до замороженого листя необхідно додати 0,1 г оксиду алюмінію або прожареного білого річкового піску в якості абразиву. У ступку при цьому потрібно додати трохи буфера для екстракції ДНК (300 мкл).

3. Додати в ступку 700 мкл буфера для екстракції, знову перемішати.

4. Перенести розтерту масу в 1,7 мл мікропробірку так, щоб об'єм становив приблизно 700 мкл (на пробірці є мітка 0,75 мл).

5. Перемішати та інкубувати гомогенат при 65°C протягом 10 хв.

6. Додати 220 мкл ацетату калію і помістити пробірку на лід на 20 хв.

7. Центрифугувати пробу протягом 3 хв при швидкості 10000 об/хв. Перенести супернатант у чисту пробірку.

8. До супернатанту додати рівний об'єм ізопропанолу, перемішати і центрифугувати 10 хв при 10000 об/хв для осадження ДНК.

9. Осад ДНК промити 70% етанолом, розчинити в 200 мкл буфера TE.

10. Провести процедуру фенольної депротеїнізації зразка. Для цього внести в пробірку з розчином ДНК рівний об'єм фенол-хлороформної суміші, добре перемішати струшуванням і центрифугувати. Відібрати водну фазу (верхній шар) у чисту пробірку, не захоплюючи інтерфазу. Повторити ту ж процедуру із сумішшю хлороформ-ізоаміловий спирт. Відібрати водну фазу з ДНК чисту пробірку.

11. Осадити ДНК¹⁰ у 2,5 об'ємах холодного 96% етанолу, попередньо приливши до зразка 1/10 об'єму 3М ацетату К (рН 5,0) або Na (рН 5,2).

12. Пробу центрифугувати протягом 10 хв на максимальній швидкості. Супернатант злити. Осад промити 70% спиртом.

13. Висушити осад ДНК на повітрі та розчинити у 50 мкл буфера TE¹¹.

¹⁰ При методі з використанням SDS виходить високомолекулярна ДНК із середнім розміром фрагментів близько 50 kb (kilo base pairs, тисячі пар нуклеотидів, т.п.н.). У препараті – хромосомна, хлоропластна та мітохондріальна ДНК, а також РНК.

¹¹ В буфері TE можна зберігати ДНК у холодильнику при +4°C терміном до кількох місяців. Для більш тривалого зберігання ДНК у замороженому вигляді її розчиняють у бідистильованій або деіонізованій воді.

1.4. Виділення плазмідної та фагової ДНК

Плазміда – позахромосомний генетичний елемент, що самовідтворюється (фактор спадковості) бактерій та деяких інших організмів, зокрема дріжджів. Усі вектори для клонування ДНК отримані на основі плазмід або вірусів. Вектори становлять основу як генетичної, так і білкової інженерії. Крім того, рекомбінантну ДНК, тобто ДНК вектора, об'єднану з необхідною досліднику ДНК, застосовують у клітинній інженерії, інженерній ензимології, генній терапії та ін.

Плазміда являє собою кільцеву (дуже рідко – лінійну) дволанцюгову молекулу ДНК, здатну до автономної реплікації в клітині організму-господаря. Векторна плазміда – переносник ДНК.

Серед методів виділення плазмідної ДНК найбільш поширені різновиди методу лужного лізису клітин бактерій, розробленого Бірнбоймом та Долі у 1979 році (Birnboim, Doly, 1979). Вони дозволяють легко відокремити плазмідну ДНК від високомолекулярної хромосомної ДНК. Пептидоглікан (муреїн) клітинної стінки руйнують лізоцимом, а мембрану клітини-господаря розчиняють детергентом SDS у лужних умовах при значенні рН близько 12,5. Хромосомна ДНК при цьому фрагментується і денатурує незворотно. Плазмідна ДНК також денатурує, але не фрагментується через її невеликий розмір і обидва ланцюги ДНК залишаються зчепленими. При зниженні рН після додавання розчину ацетату калію з рН 5,0 обидва ланцюги плазмід ренатурують один з одним. Одноланцюгові фрагменти хромосоми з різних клітин ренатурують (регібриднуються) випадковим чином і утворюють високомолекулярний сироподібний осад. Цей осад легко відокремлюється центрифугуванням від плазмід, що залишилися в розчині, яку потім осаджують етанолом. Оскільки *in vivo* ДНК не буває вільною від білків, то необхідна депротеїнізація зразка.

Реплікативна форма фагів, що існує всередині інфікованих клітин бактерій, також є молекулами дволанцюгової кільцевої ДНК і легко виділяється методом лужного лізису клітин.

Мініпрепаративне виділення плазмідної ДНК (мініпреп)

Наведений протокол є однією з модифікацій методу лужного лізису клітин бактерій. Це один із найкращих методів для отримання плазмідної ДНК високої якості. Його перевагами є простота та висока

швидкість, порівнянна лише з виділенням ДНК на мікроколонках. Кількості ДНК достатньо для кількох рестрикцій. У масштабних проектах використовують процедуру максіпреп.

Плазміда pBR322, препарат ДНК якої передбачається одержати, – один із перших векторів молекулярного клонування (Bolivar et al., 1977).

Матеріали та обладнання

Штам *E.coli* XL1-Blue (Stratagene™), трансформований плазмідом pBR322, мікроцентрифуга, шейкер.

Розчини

- *Розчин I* для виділення плазмідної ДНК: 50мМ глюкоза; 100мМ Tris-HCl, рН 8,0; 10мМ ЕДТА. Зберігати при +4°C перед використанням додати лізоцим до 5 мг/мл.
- *Розчин II* а. 0,2N NaOH; 1% SDS. Слід готувати свіжий розчин перед використанням, допускається лише нетривале зберігання при кімнатній температурі в щільно закритому пластиковому посуді.
- *Розчин III*. 3М ацетат калію, рН 5,0. На 100 мл: 5М ацетат калію – 60 мл; СН₃СООН крижана – 11,5 мл; Н₂О – 28,5 мл.
- *Суміш фенол-хлороформ* (робота 1.1)
- *Суміш хлороформ-ізоаміловий спирт* (робота 1.1).
- *Ампіцилін*. Розчин 100 мг/мл у воді.

Методика

1. Виростити культуру клітин *E.coli* з плазмідом pBR322 в 5 мл живильного середовища 2YT, що містить 100 мкг/мл антибіотика ампіциліну, протягом 16-24 годин на термостатованій роторній гойдалці-шейкері при температурі 37°C та швидкості 200-300 об/хв.

2. Осадити клітини з культурального середовища. Для цього помістити 1,5 мл «нічної культури» *E.coli* в 1,7 мл мікроцентрифужну пробірку і центрифугувати протягом 2 хв при 10000 об/хв. Видалити супернатант виливанням через край. Повторити осадження в цю пробірку ще 2 рази.

3. Центрифугувати 10 с додатково, відібрати залишки культурального середовища мікропіпеткою.

4. Ресуспензувати осад 200 мкл розчину I за допомогою мікропіпетки або вортексу. Залишити за кімнатної температури на 5 хв¹².

5. Додати 400 мкл розчину II, відразу ж різко струсити, перевернути 5 разів. Відбувається лізис бактерій та лужна денатурація ДНК. Помістити зразки на лід (0°C) на 5 хв¹³.

6. Додати 300 мкл холодного розчину III, 5 разів перевернути пробірку та залишити на льоду на 5 хв¹⁴.

7. Центрифугувати протягом 5 хв при максимальній швидкості центрифуги для осадження хромосомної ДНК.

8. Супернатант, що містить плазмідну ДНК, перенести мікропіпеткою в нову пробірку, що містить 500 мкл ізопропанолу, змішати перевертанням пробірки, залишити на 10 хв на столі.

9. Осадити плазмиду центрифугуванням протягом 10 хв при максимальній швидкості центрифуги, потім супернатант вилити через край, а залишки після короткого центрифугування відібрати мікропіпеткою.

10. Плазмідний осад розчинити у 100 мкл TE-буфера (можна 200 мкл).

11. Розчин плазмідної ДНК необхідно піддати подальшому очищенню – провести фенольну депротеїнізацію зразка. Для цього додати в пробірку рівний об'єм суміші фенол-хлороформ, добре перемішати і розділити фази центрифугуванням (10 хв, 10000 об/хв).

12. Перенести верхню водну фазу в нову пробірку, додати рівний об'єм суміші хлороформ-ізоаміловий спирт (крім денатурації

¹² Цей час необхідний для роботи лізоциму, що послаблює пептидоглікановий шар. Якщо фермент не доданий (клітини кишкової палички задовільно лізуються і без лізоциму), можна відразу переходити до наступного пункту.

¹³ Перевищення часу денатурації загрожує тим, що плазміда денатурує незворотно – одне кільце зрушить відносно іншого так далеко, що досягне локально стійкого стану. Незворотно денатуровані плазміди цілком годяться для сіквенсу, але вони не ріжуться рестриктазами і мають аномальну рухливість.

¹⁴ Відбувається нейтралізація лужного середовища. Хромосомна ДНК регібридується випадковим чином, утворюючи великі мережі, а кільцева плазмідна ДНК благополучно ренатурує «сама на себе». Важливо, щоб нейтралізація була повною, не залишалася областей з в'язким розчином. Потрібно змішувати розчин спочатку м'яко, щоб не фрагментувати геномну ДНК, але після того, як вона вже асоціює (приблизно через 1 хв) треба струснути сильніше. Розчини I, II, III для досягнення потрібного результуючого значення рН використовуються в об'ємній пропорції 1:2:1,5.

протеїнів вона видаляє залишки фенолу), добре перемішати і розділити органічну і водну фази центрифугуванням протягом 3 хв.

13. Відібрати верхню водну фазу, додати 1/10 об'єму холодного розчину 3М ацетату калію, рН 5,0 та осадити ДНК етанолом. Для цього додати в пробірку 1 мл холодного (-20°C) етанолу і помістити зразок на лід або морозильник не менше ніж на 15 хв. На цій стадії можна перерватися: під спиртом очищена ДНК може зберігатися роками. Але всі три форми плазміди, судячи з досвіду, перейдуть у лінійну форму.

14. Осадити плазмідну ДНК центрифугуванням (10 хв, 10000 об/хв).

15. Додати до осаду 1 мл 70% етанолу для промивання осаду ДНК та центрифугувати 3 хв.

16. Злити супернатант, перевернути пробірки на фільтр і підсушити осад на повітрі протягом 0,5 год. Розчинити в 50-100 мкл води. На електрофорез слід взяти 5-10 мкл зразка.

17. Провести за необхідності обробку зразка рибонуклеазою для видалення РНК. Слід додати до отриманого препарату плазміди 1/100 об'єму розчину РНКазу А (10 мг/мл у 10 мМ Tris-HCl (рН 7,4), 15 мМ NaCl) і витримати 0,5-1,0 годину при 37°C. РНКазу потім можна видалити за допомогою фенолу, якщо потрібно. На ДНК цей фермент не впливає.

Виділення реплікативної форми RF фага M13

Бактеріофаги (фаги) – віруси бактерій; розмножуються всередині клітин, що зазвичай викликає їх лізис. З хімічної точки зору являють собою нуклеопротеїдні комплекси: фаг складається з білкової оболонки (капсиду), що покриває одно- або дволанцюгову молекулу ДНК, або, рідше, РНК.

Близькоспоріднені ниткоподібні фаги M13, f1, fd та ін. з віріонами, що містять одноланцюгову ДНК відносяться до помірних – вони не лізують клітини, на яких розмножуються (паразитують). Вектори на основі ниткоподібних фагів зручні для секвенування, оскільки з фагових частинок можна виділити одноланцюгову ДНК +-ланцюгів. Інтерес до цих фагів обумовлений ще й тим, що вони становлять основу методу фагового дисплея – одного з основних афінних методів білкової інженерії для вивчення білок-білкових взаємодій поряд з двогібридними дріжджовими системами і білковими мікрочіпами. Клонування генів здійснюють у

дволанцюгову ДНК ниткоподібного фага, що існує всередині клітин інфікованої популяції бактерій як плазміда. Якщо при клонуванні «зшити» якийсь ген с фаговим геном III (або VIII), що кодує білок капсиду gp3 (gp8), то отриманий при трансляції гібридний білок буде презентовано на поверхні зрілого віріона у вигляді фьюжен-конструкту (англ. fusion – злиття, сплав). Такий фаг, а також бібліотека генів у векторі M13 називається «фаг-дисплей», оскільки це дисплей пептидів на поверхні фагових частинок (McCafferty et al., 1990).

Виділення дволанцюгової кільцевої реплікативної (RF) форми фага M13 з клітин *E.coli* може бути проведено будь-яким з методів, що використовуються при виділенні плазмід. Фаг M13 інфікує лише F+ штами кишкової палички, оскільки сорбується на F-пілях.

Наведено методику зараження (трансфекції) клітин *E.coli* фагом M13 з подальшим напрацюванням RF-форми для отримання дволанцюгової ДНК.

Матеріали та обладнання

F+ штам кишкової палички *E.coli* XL1-Blue (TG-1, JS5 або інший), фаг M13 K07 у буфері TE з титром 10^{13} частинок/мл, центрифуга, шейкер.

Розчини

- Розчин I;
- Розчин II;
- 10 М ацетат амонію. Розчинити 770 г в 800 мл води і довести до 1 л;
- Канаміцин. Розчин 100 мг/мл у воді.

Методика

1. Виростити культуру клітин F+ штаму *E.coli* у 5 мл рідкого середовища 2YT протягом ночі. Число клітин при цьому може досягти 10^{10} клітин/мл.

2. Заразити культуру фагом у співвідношенні 10:1 (на 1 бактеріальну клітину має припадати близько 10 фагових частинок). Для цього необхідно в пробірку до клітин додати 10 мкл суспензії фагових частинок.

3. Інкубувати без хитання 1 год. при 37°C. За цей час фаг M13 K07 сорбується на F-пілях, проникне в клітину і почнеться синтез його RF. Ефективність трансфекції *E.coli* вище трансформації.

4. Додати в 500 мл свіжого середовища 2YT необхідний антибіотик (500 мкл розчину канаміцину з концентрацією 100 мг/мл), перелити туди заражені фагом клітини *E.coli*.

5. Вирощувати культуру з аерацією протягом ночі при 37°C.

6. Клітини осадити центрифугуванням при 4000 об/хв протягом 10-15 хв. Злити супернатант із культуральним середовищем у чисту колбу.

7. Виділити з осаджених клітин дволанцюгову кільцеву ДНК реплікативної форми фага за протоколом мініпреп.

2. КОНЦЕНТРУВАННЯ ДНК ШЛЯХОМ ОСАДЖЕННЯ СПИРТОМ

Найбільш часто використовуваним методом концентрування ДНК є осадження етанолом. Розчинивши отриманий осад у меншому об'ємі буферного розчину, отримують більш концентрований розчин ДНК. При переосадженні ДНК спиртом відбувається її додаткове очищення.

Етиловий спирт знижує розчинність нуклеїнових кислот (їх солей) у воді¹⁵. ДНК (РНК) агрегує в 70% етанолі в присутності солі, що нейтралізує фосфатні групи. Агрегація НК краще відбувається при низькій температурі і для неї потрібен деякий час. Утворені агрегати осаджують центрифугуванням.

На осадження ДНК з розчину беруть 2,5 об'єми етанолу або 1 об'єм ізопропанолу. При значних масштабах робіт з метою економії допускається брати 0,6 об'єми ізопропанолу як мінімум. Слід пам'ятати, що 70% – це оптимум концентрації етилового спирту для преципітації нуклеїнових кислот. Якщо концентрація етанолу буде низькою, то ДНК в кристалічний стан (холестеричні рідкі кристали) не перейде, якщо високою – в осад разом з нею випадуть білки, що залишилися та інші домішки. Оптимальна іонна сила розчину для осадження ДНК становить 0,2М NaCl; при її зниженні ДНК буде преципітувати гірше.

ДНК після висаджування потрібно перевести в розчин з нейтральним або слабколужним показником рН середовища, якщо передбачається зберігання. Крім спиртів для осадження нуклеїнових кислот застосовують також поліетиленгліколь PEG, цетилтриметиламмоніум бромід СТАВ та інші хаотропні речовини. Стандартна процедура – спиртове осадження.

Матеріали та обладнання

Зразок ДНК будь-якого походження з низькою концентрацією, мікроцентрифуга, глікоген

Розчини

- 5М NaCl. Розчинити 292,5 г в воді, довівши об'єм до 1 л.

¹⁵ Будь-яка ДНК і РНК в розчині (колоїдному) це не кислота, а сіль нуклеїнової кислоти. І катіон у неї той же, що і у солі, в присутності якої вона осаджувалася.

- 3М ацетат натрію, рН 5,2 (тема 1).
- Розчин глікогену в воді 10 мг / мл.
- 96% і 70% етанол.

Методика

1. Довести концентрацію солі в препараті до 0,2М NaCl (або до 0,3М ацетату натрію), використовуючи концентровані стокові розчини цих солей. Найчастіше до розчину ДНК додають 1/25 об'єму 5М NaCl або 1/10 об'єму 3М ацетату натрію, рН 5,2, оскільки ці розчини завжди є під рукою у дослідника ДНК і білків¹⁶.

2. Якщо концентрація ДНК низька, то потрібно додати будь-який співосаджувач, наприклад глікоген, до кінцевої концентрації 50 мкг/мл¹⁷.

3. Додати до розчину ДНК 2,5 об'єми холодного 96% етанолу¹⁸, з огляду на об'єм доданого розчину солі.

4. Інкубувати при кімнатній температурі від 5 хв і до витримання протягом ночі при -20°C в залежності від концентрації ДНК¹⁹.

5. Центрифугувати при максимальній швидкості мікроцентрифуги протягом 10 хвилин. (Препарати ДНК з низькою концентрацією осаджують протягом 1-2 годин у високошвидкісній

¹⁶ Ацетати, цитрати, сульфати є космотропними солями, ціанати – хаотропні солі. Для осадження ДНК з розчинів, що містять SDS, найчастіше застосовується NaCl, оскільки інші солі висаджують SDS істотно краще.

¹⁷ Робочі концентрації інших співосаджувачів: тРНК – 5-10 мкг/мл, лінійний поліакриламід – 10-20 мкг/мл.

¹⁸ Замість етанолу можна використовувати ізопропанол. У цьому випадку додається не 2,5 об'єми, а 1 об'єм. Осадження ізопропанолом має одну перевагу перед етанольним – пробірки можуть бути меншого об'єму. Основний недолік – ізопропанол менш летючий і подальша промивка 70% етанолом є обов'язковою. Осадження спиртами ДНК, особливо низькомолекулярної і в малій концентрації, поліпшується якщо додати MgCl_2 до кінцевої концентрації 10 мМ.

¹⁹ Було показано, що збільшення часу інкубації, так само як і зниження температури, не чинить істотного впливу на ефективність осадження ДНК. Це справедливо для розчинів ДНК з концентрацією більше 20 нг/мл, проте такий підхід за традицією часто дотримується. Коли ДНК дуже мало найбільш помітний ефект дає збільшення часу центрифугування до 1 години при $+4^{\circ}\text{C}$, а не час знаходження ДНК «під спиртом» або низька температура інкубації, аж до -70°C .

центрифузі з охолодженням при швидкості 27000 об / хв і постійній температурі +4°C).

6. Промити осад ДНК холодним 70%-ним етанолом²⁰. Для цього перемішати вміст перевертанням пробірки декілька разів, злити спирт і помістити пробірку в перевернутому стані на фільтрувальний папір, щоб стекли залишки спирту. Підсушити осад.

7. Розчинити ДНК в буфері TE або H₂O.

²⁰ Пробірку слід заповнювати 70% спиртом не більше, ніж на 2/3. Добре буде перед зливанням 70% спирту центрифугувати пробу протягом 2-3 хв при максимальній швидкості центрифуги: осади хоч і щільні, але їх можна випадково вилити разом з розведеним спиртом. Таке іноді трапляється, особливо якщо ДНК погано очищена від білків, без яких вона ніколи не існує *in vivo*. У клітині ДНК – це завжди ДНП, і поза клітиною також покрита білковими молекулами (вірус, бактеріофаг). У роботі з ДНК якісні показники важливіші кількісних.

3. СПЕКТРОФОТОМЕТРІЯ ПРЕПАРАТІВ ДНК, РНК І БІЛКІВ

Досить часто кількісну і якісну оцінку препарату виділеної ДНК у першому наближенні дають при гель-електрофорезі, який проводять, як правило, відразу за процедурою виділення. Для цього візуально порівнюють на сусідніх доріжках гелю інтенсивність світіння в ультрафіолеті отриманого зразка до зразка відомої концентрації.

Визначити концентрацію ДНК, а також ступінь її чистоти, можна за допомогою спектрофотометра, що точніше і швидше. Для цього вимірюють оптичну щільність розчину ДНК при довжині хвилі 260 нм. Одна (кожна) оптична одиниця відповідає концентрації ДНК 50 мкг/мл. Спектрофотометрія (абсорбційна) – фізико-хімічний метод дослідження розчинів і твердих речовин, заснований на вивченні спектрів поглинання в ультрафіолетовій (200-400 нм), видимій (400-760 нм) та інфрачервоній (> 760 нм) ділянках спектра. Основна залежність, яка вивчається в спектрофотометрії – залежність інтенсивності поглинання падаючого світла від довжини хвилі λ . У відповідності з законом Бугера-Ламберта-Бера оптична щільність розчину прямо пропорційна концентрації поглинаючої речовини. Нуклеїнові кислоти (НК) поглинають УФ випромінювання в ділянці 240-290 нм з максимумом при 260 нм. Хромофорами є азотисті основи НК, особливо піримідинові. Піримідини поглинають УФ світло приблизно в 10-20 разів інтенсивніше, ніж хромофори білкових молекул – триптофан, тирозин і фенілаланін.

Для оцінки чистоти препарату ДНК, вільного від РНК, проводять вимірювання оптичної щільності розчину при довжинах хвиль 260, 280 і 235 нм, тобто на максимумах поглинання розчинів ДНК, білків і полісахаридів, відповідно. Значення співвідношення $A_{260/280}$ для чистої ДНК має бути більше 1,8, значення $A_{260/235}$ має бути більше, ніж 2,2. Забруднення полісахаридами характерно, головним чином, для препаратів рослинної ДНК. До складу лігніну, на відміну від інших вуглеводів, входять ароматичні угруповання атомів, і тому лігнін поглинає УФ випромінювання.

3.1. Спектрофотометричне визначення концентрації ДНК

Нижня межа концентрації ДНК, яку можна визначити спектрофотометрично, становить 0,1 мкг / мл. На визначення

завичай беруть аліквоту (лат. *aliquoties* – кілька частин, кратний) досліджуваного розчину ДНК, наприклад, 1 мкл і розбавляють в 100 і більше разів.

Потім перераховують отримане значення концентрації розчину. Важливо, щоб у розведеному зразку було більше 10 нг ДНК. Для порівняння, при гель-електрофорезі також можна візуалізувати смужку, яка містить від 10 нг ДНК. У зразку ДНК не повинно бути РНК.

Матеріали та обладнання

Геномна ДНК з бактерій, клітин крові або тканин кукурудзи з невідомою концентрацією, спектрофотометр, зразок ДНК будь-якого походження з відомою концентрацією.

Розчини

- *Розчин ДНК з невідомою концентрацією в буфері TE.*
- *Розчин ДНК фага лямбда в буфері TE з концентрацією 1 мг/мл.*

Методика

1. Взяти мікропіпеткою на аналіз 1 мкл зразка отриманої ДНК і розбавити препарат, додавши 130 мкл буфера TE, що містить 100 мМ NaCl²¹. Об'єм зразка роблять рівним 130 мкл, щоб кривизна поверхні рідини не впливала на вимірювання.

2. Помістити зразок розведеної ДНК в «маленьку» (100 мкл) комірку.

3. Виміряти поглинання A_{260} . Значення повинно знаходитися в межах 0,005-2,5²². В іншому випадку потрібно розбавляти або концентрувати ДНК²³.

4. Розрахувати концентрацію ДНК, використовуючи коефіцієнт перерахунку з табл. 1 за формулою: $C \text{ [мкг/мл]} = A_{260} \times K$

²¹ Для розчинення ДНК (РНК) можна використовувати інші низькосольові буфери, але тільки не воду. Наприклад, розчини 100мМ NaCl, 20мМ Na₃PO₄, 10-100мМ Tris-HCl (pH 7,5-9,0) або 100мМ K₂HPO₄ (pH 8,2) дають подібні результати. Вимірювання у воді призводять до суттєвих відхилень. Помилка вимірювання може становити до 14% і відношення A_{260} / A_{280} виявляється заниженим

²² Точність вимірювання знижується при занадто великих і дуже малих значеннях A_{260} через порушення закону світлопоглинання. Помилка при значенні 0,05 становить $\approx 18\%$, при значенні 0,1-1,0 $\approx 1\%$. Вимірювання при значеннях понад 2,5 недостовірні

²³ Концентрують ДНК шляхом її переосадження спиртом

Розрахунок концентрації ДНК та РНК

	К (для досліджуваного розчину), мкг/мл	К _{1:130} (для розведеного зразка), мкг/мкл
ДНК двохланцюгова	50	6,5
ДНК одноланцюгова	37 ²⁴	4,81
РНК	40	5,2

5. Виміряти поглинання A_{280} і A_{235} , щоб оцінити ступінь очищення ДНК від домішок білків і полісахаридів. Відношення 260/280, також як і 260/235 має бути більшим, ніж 1,8. Для чистої ДНК характерні значення $A_{260} / A_{280} = 1,8-1,9$ і $A_{260} / A_{235} = 2,2-2,5$. Для чистої РНК значення $A_{260} / A_{280} = 1,9-2,0$ ²⁵.

3.2. Визначення концентрації білка за власною флуоресценцією

Спектрофотометричні методи визначення білка ґрунтуються на вимірюванні поглинання або випромінювання світла в ультрафіолетовій ділянці спектру. Для абсорбційної УФ-спектрофотометрії білків існують деякі проблеми, тому набагато частіше визначають білки, що зв'язалися з певними барвниками, колориметрично у видимій області спектру, або в УФ світлі вимірюють емісію.

Розчини білка мають поглинання в інтервалах довжин хвиль 270-290 і 200-225 нм. Поглинання при 280 нм визначається присутністю в молекулі білка ароматичних амінокислот – тирозину, триптофану та меншою мірою фенілаланіну. Абсорбція при $\lambda=210$ нм, обумовлена пептидними зв'язками в білках, практично у 20 разів вища, ніж при 280 нм.

Оскільки поглинання в ультрафіолетовій ділянці при 210 нм обумовлено переважно пептидними зв'язками, то для різних білків величина поглинання відрізняється незначно. Визначення загального білка у сироватці крові за допомогою прямої фотометрії при довжині

²⁴ Для олігонуклеотидів, поглинання яких відчутно залежить від їх складу, існують спеціальні розрахунки

²⁵ Ці значення достовірні, якщо вимір проводиться в буферному розчині (наприклад, ТЕ) при нейтральному значенні рН

хвилі 210 нм забезпечує одержання результатів, порівнянних з біуретовим методом та методом К'ельдаля. Однак цей метод застосовується порівняно рідко через необхідність використання кюветів, що не поглинають при 210 нм, і монохроматора, що здорожує метод.

У порівнянні з фотометрією при $\lambda=210$ нм точність та специфічність методів визначення білків, заснованих на поглинанні при $\lambda=280$ нм, невелика, оскільки вміст тирозину та триптофану може коливатися у різних білках. Крім того, присутність у сироватці крові вільних амінокислот – триптофану та тирозину, а також сечової кислоти та білірубіну, що поглинають при 280 нм, вносить певну похибку. У зв'язку з цим метод не використовують для прямого визначення вмісту загального білка в сироватці крові. Однак для препаратів білка з тим чи іншим ступенем очищення його зручно використовувати. Домішка нуклеїнових кислот та нуклеотидів впливатиме на визначення.

Крім адсорбції в УФ світлі вимірюють також емісію. Нижче наведений метод корисний при дуже низьких концентраціях білка, наявного в малих кількостях. Головне, що він не вимагає попереднього фарбування отриманого зразка білка (незворотного), оскільки розчин білка має власну флуоресценцію.

Матеріали та обладнання

Спектрофлуориметр, кварцова кювета об'ємом 3 мл, мікропіпетка, буферний розчин, розчин білка в буферному розчині, наважка 9 мг білка бичачого сироваткового альбуміну (БСА) для калібрування.

Методика

1. Отримати спектр флуоресценції розчину білка, що досліджується, з довжиною хвилі збудження 280 нм, сканування емісії в інтервалі 310–360 нм. Режим сканування (флуоресценція, по реєстрації, корекція повна, крок 1 нм) визначається за значенням у максимумі флуоресценції при вимкненій корекції (10-90 одиниць). Якщо в ділянці 330-340 нм (при повній корекції) спостерігається пік інтенсивності флуоресценції, визначення концентрації можливе, в іншому випадку концентрація білка занадто низька, і його потрібно концентрувати.

2. Записати значення інтенсивності флуоресценції I та довжину хвилі емісії λ у максимумі кривої флуоресценції. Зняти спектр для буфера без білка з тими ж параметрами. Записати значення інтенсивності флуоресценції I_0 на знайденій довжині хвилі λ . Обчислити значення $I - I_0$.

3. Використовуючи буферний розчин, приготувати методом послідовного розведення розчини білка для калібрування з концентраціями від 3×10^0 мг/мл до 3×10^{-6} мг/мл з кроком в 1 порядок, кожен об'ємом по 2,7 мл. Для кожного розчину визначити $I - I_0$, потім, використовуючи MS Excel побудувати калібрувальний графік залежності концентрації білка від $I - I_0$.

4. За калібрувальним графіком визначити концентрацію розчину білка, що досліджується.

4. ЕЛЕКТРОФОРЕЗ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ

Електрофорез – це електрокінетичне явище переміщення частинок дисперсної фази (колоїдних розчинів) в рідкому середовищі під впливом електричного поля. Вперше це явище було відкрито професорами Московського університету П. А. Страховим і Ф. Ф. Рейссом в 1809 році.

Електрофорез в агарозному гелі є стандартним методом для розділення, ідентифікації та очищення інтактних молекул ДНК та їх фрагментів (високомолекулярна хромосомна ДНК завжди фрагментується при ізоляції з клітини). Агароза – фракція природного полісахариду агару.

ДНК – це слабка кислота, тому вона рухається до анода («+») за рахунок негативно заряджених фосфатних груп. За рухом ДНК (РНК) в пластині гелю можна стежити, оскільки смуги забарвленої флуоресцентними барвниками ДНК, що формуються молекулами одного розміру при просуванні через пори гелю, видно в УФ світлі. Для фарбування ДНК застосовують барвник бромистий етидій EtBr ($\lambda_{\max} = 590$ нм). Молекули EtBr інтеркалюють в молекули ДНК, тобто вбудовуються між сусідніми парами нуклеотидів. Інтенсивність флуоресценції зв'язаного EtBr в 20 разів вище, ніж вільного. Таке забарвлення забезпечує високу чутливість: від 10 нг ДНК можна побачити у вигляді смужки оранжевого кольору. Застосовують і інші барвники, зокрема SYBR Green ($\lambda_{\max} = 497$ нм). Довжина хвилі приладу для візуалізації ДНК УФ-трансілюмінатора – 305-320 нм.

Швидкість руху ДНК (РНК) через пори агарозного гелю при електрофорезі визначається розміром молекул і їх конформацією. Молекули лінійної двохланцюгової ДНК переміщуються в товщі гелю зі швидкостями обернено пропорційними десятковому логарифму їх молекулярних мас. Попереду мігрують низькомолекулярні фрагменти, великі молекули рухаються повільніше внаслідок більшого опору. З нативних молекул НК швидше за все рухається тРНК розміром 70-90 нуклеотидів і 5S рРНК розміром 120 нуклеотидів. Найбільш великі фрагменти геномної (хромосомної, ядерної) ДНК можуть досягати розмірів 100 000 пар основ. Для визначення розміру фрагментів використовують маркери молекулярної маси (DNA Ladder), які наносять в сусідні лунки гелю.

4.1. Приготування агарозного гелю

Заливка гелю. Агароза легко плавиться при нагріванні до 95°C (в електрофорезному буфері). При виливанні розплаву в форму і його застиганні виходять прозорі пружні гелі. Лунки (кишені) для внесення ДНК на гель-електрофорез формуються шляхом вставки гребінки з зубцями в незастиглий гель і її вилученням після полімеризації пластини гелю (рис. 1).

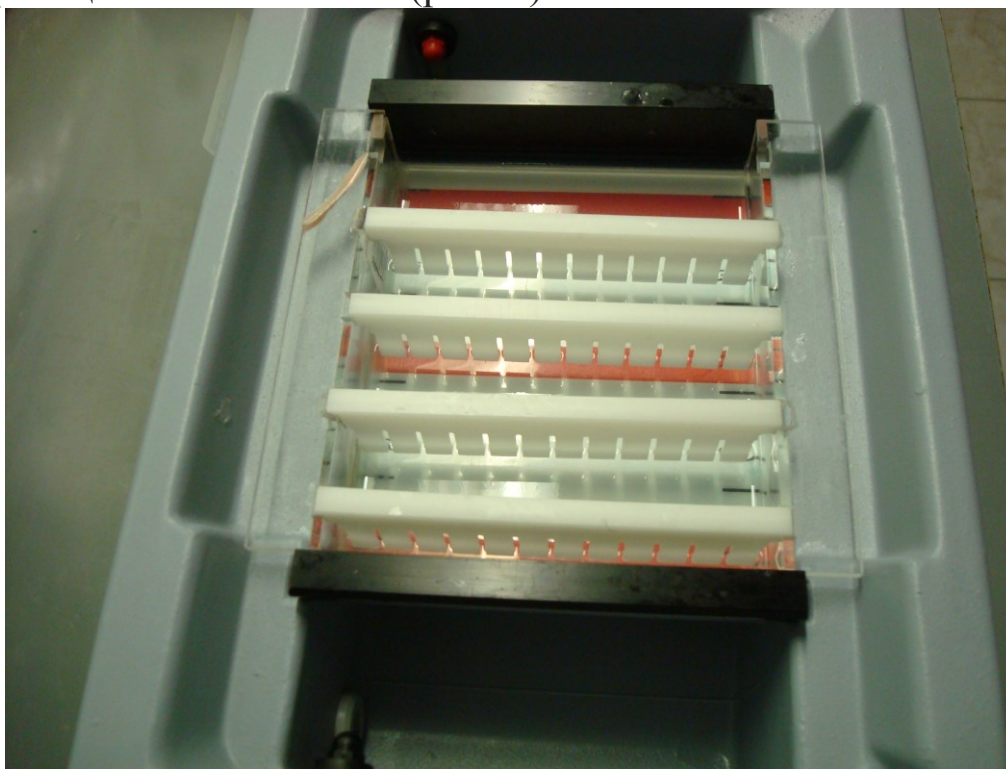


Рис. 1. Приготування агарозного гелю

Концентрація агарози в гелі. Швидкість руху ДНК в порах гелю залежить від концентрації агарози. Знаючи розміри молекул ДНК в суміші, можна підбором концентрації домогтися їх найкращого розділення (табл. 2).

Забарвлення ДНК в агарозних гелях. Для візуалізації ДНК застосовують її фарбування бромистим етидієм EtBr (3,8-діаміно-5-етил-6-феніл-фенантрідіум бромід). Молекули барвника інтеркалюють (вбудовуються) між сусідніми парами нуклеотидів ДНК. Етидіум бромід додають зазвичай в розплав агарози до полімеризації гелю пластини. Максимум поглинання EtBr спостерігається при довжинах хвиль 300 і 360 нм, а емісія відбувається в червоно-помаранчевій області видимого спектру при 590 нм.

Залежність ефективності розділення фрагментів ДНК від кількості агарози в гелі

Концентрація агарози в гелі, %	Межі ефективного розділення молекул ДНК, <i>kb</i>
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

Матеріали та обладнання:

Агароза, гребінка, форма для заливки горизонтального гелю (т.зв. «плашка», можна використовувати кришку від імунологічного планшета).

Розчини

- *5× електрофорезний буфер TBE*. На приготування 1 л буфера: Tris-ОН (основа) – 54 г; борна кислота – 27,5 г; 0,5М ЕДТА, рН 8,0 – 20 мл.
- *EtBr*. Розчин 10 мг / мл у воді. Зберігати в темряві в холодильнику.

Тріс-ацетатний буфер (ТАЕ²⁶) – буферний розчин, що містить трис, оцтову кислоту і ЕДТА (етилендіамінтетраоцтової кислоти).

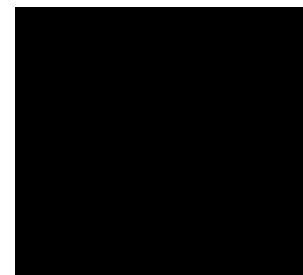
Компоненти для приготування 50-кратного ТАЕ буфера

Компонент	Кількість для приготування 100 мл розчину
Тріс (основа)	24,22 г
ЭДТА (динатрієва сіль)	1,862 г
Оцтова кислота (льодяна)	8,96 мл
H ₂ O (деіонізована)	73,3 г

²⁶ Використовується в молекулярній біології в основному для гель-електрофорезу при розділенні фрагментів нуклеїнових кислот. Має меншу буферну ємність, ніж TBE, в зв'язку з чим швидше виснажується, однак лінійні дволанцюжкові фрагменти ДНК переміщуються в ТАЕ швидше

Для отримання робочої концентрації 50-кратний буфер розводять в дистильованій воді в співвідношенні 1:49.

Тріс (англ. Tris, ТНАМ) – скорочена назва хімічної сполуки тріс (гідроксиметил) амінометана (НОСН₂)₃СNH₂. Тріс широко використовується в біохімії і молекулярній біології в якості буферного розчину, наприклад, в буферних системах ТАЕ і ТВЕ, для розчинення нуклеїнових кислот.



Методика:

1. Зважити розраховану кількість порошку агарози (1 г для підготовки 100 мл 1% гелю) і висипати в хімічний термостійкий стакан. Налити в стакан 20 мл 5× електрофорезного буфера ТВЕ і довести до 100 мл водою.

2. Нагріти суміш на електроплитці або СВЧ-печі до повного розплавлення.

3. Охолодити розплав до 50-60°C (стакан можна тримати в руках). Додати EtBr до кінцевої концентрації 0,5 мкг/мл: лаборанту слід взяти 5 мкл зі стокового розчину EtBr з концентрацією 10 мг/мл на 100 мл розплаву²⁷.

4. Встановити гребінку \approx в 1 см від краю форми. Вилити розплав, перемішавши.

5. Після того як гель повністю полімеризується (30 хв) обережно видалити гребінку, похитавши її з боку в бік і потягнувши вгору.

4.2. Гель-електрофорез ДНК

Буфер для нанесення зразків на гель. Розчин ДНК в лунки гелю вносять в буфері, що містить гліцерин або сахарозу, щоб ДНК відразу опустилася на дно лунки, а не розчинилася в електрофорезному буфері ще до вмикання струму і входження в гель. Щоб стежити за проходженням фронту фореза в буфер додають спеціальні барвники.

²⁷ Бромистий етидій – потенційно небезпечна речовина через можливість зв'язування з ДНК і стимулювання розривів в ДНК при освітленні ультрафіолетом. Строгих доказів немає, проте деякі продукти його окислення ферментами печінки мають невелику, але помітну мутагенну активність. Необхідно працювати в гумових рукавичках, дотримуючись запобіжних заходів! Уникати контакту зі шкірою! EtBr руйнується на світлі, тому гелі нетривалий час зберігають в темряві при + 4°C.

Електрофоретична рухливість бромфенолового синього (БФС) лежить в районі 100 основ. Синя пляма БФС рухається на рівні тРНК, це лідируючий барвник. Рухливість ксіленціанола (КЦ, зеленого кольору) перебуває на рівні 460 нуклеотидів (рис. 2).

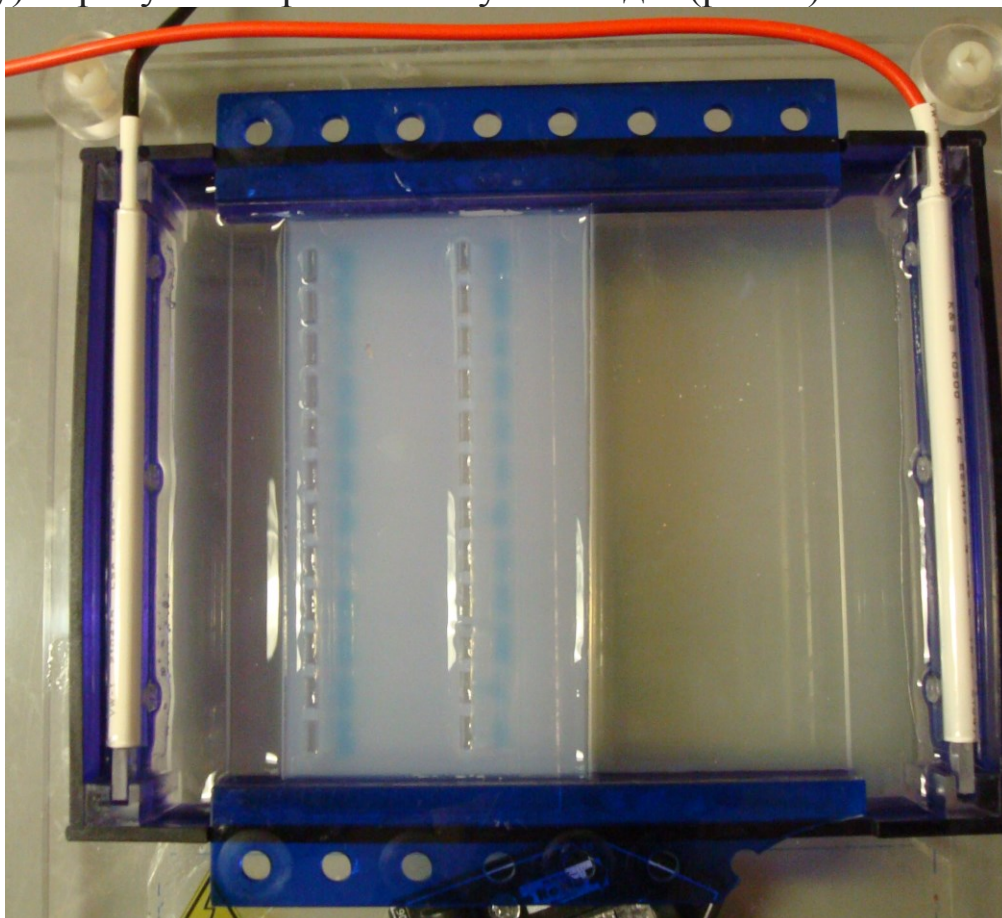
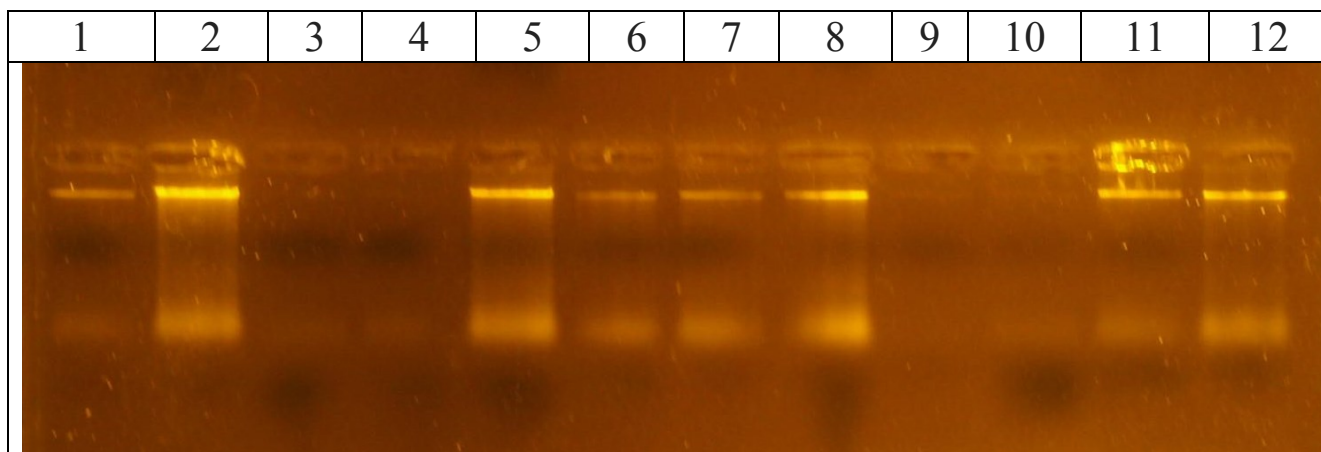


Рис. 2. Вигляд плям бромфенолового синього під час проходження електрофорезу

Кількість ДНК на доріжку гелю. Нижня межа візуалізації ДНК визначається використанням методом її детекції. Якщо застосовується фарбування EtBr, то можна побачити від 10 нг ДНК в смужці шириною 5 мм. Занадто велика кількість ДНК на доріжці гелю («перевантаження», >1 мкг) призводить до зміни рухливості смуги, яка рухається швидше, і до розмивання смуг. Кількість ДНК, яку можна внести в лунку, залежить від кількості і розміру фрагментів ДНК. Зазвичай вносять 0,2-0,5 мкг ДНК в лунку.

Геномна ДНК на відміну від плазмідної і фагової завжди дає шлейф з фрагментів різного розміру. В УФ світлі спостерігається рівномірне фарбування по всій довжині гелю, так званий «шмер» (від англ. Smear – пляма, мазок) (рис. 3).



**Рис. 3. Електрофореграма ДНК в УФ світлі
(в лунках 3, 4, 9, 10 ДНК відсутня)**

Електрофорезні буфери. Зазвичай застосовують буфери, що містять 50 мМ Tris-ацетат, Tris-борат або Tris-фосфат з рН 7,5-8,0. Найчастіше їх готують концентрованими і зберігають при кімнатній температурі. Tris-боратний і Tris-фосфатний буфери мають велику ємність і дають більш гарне розрішення, але якщо далі потрібно проводити ДНК-гібридизацію або секвенування використовується Tris-ацетатний буфер.

Напруженість поля. Ефективне розділення фрагментів ДНК відбувається при напруженості, що не перевищує 5 В/см гелю. Зі збільшенням напруженості ефективність розділення ДНК погіршується.

При підвищеній температурі молекули ДНК особливо легко втрачають барвник EtBr, що відбувається, якщо проводити електрофорез при високій напрузі. Етідіум бромід при електрофорезі рухається від «+» до «-», тобто в напрямку, протилежному руху ДНК. Щоб він не йшов з гелю, коли, наприклад, ДНК внесена в малій кількості, потрібно ввести його прямо в буфер.

Рухливість різних форм ДНК. Дволанцюжкові молекули ДНК, що мають однакову молекулярну масу, але різні конформації будуть рухатися з різною швидкістю. Так, кільцева суперспіралізована форма плазміди, кільцева з одноланцюговим розривом і лінійна форма плазміди рухаються в агарозному гелі з різними швидкостями.

В 1% агарозному гелі одноланцюгова ДНК (і РНК) рухається приблизно на 10% швидше, ніж двохланцюгова ДНК того ж розміру. Ця ДНК (РНК) забарвлюється бромистим етидієм приблизно в 4-5

разів слабкіше, що необхідно враховувати при візуальній оцінці результатів електрофорезу.

Матеріали та обладнання

Агарозний гель, розчин ДНК бактеріального, рослинного або тваринного походження, маркер молекулярної маси (комерційний препарат) або ДНК фага λ , рестриктована *HindIII*, джерело струму, камера для електрофореза, УФ-трансілюмінатор.

Розчини

- *10×* буфер для нанесення зразків: 0,025 г бромфенолового синього БФС; 4 мл гліцерину; 5 мл 0,5 М ЕДТА, рН 8,0; довести до 10 мл бідистилятом.

Методика

1. Помістити плашку з гелем в електрофорезну камеру, залити *1×* буфер ТВЕ так, щоб він повністю покрити агарозу. Шар буфера над агарозою повинен бути до 5 мм, інакше гель може «обсохнути».

2. Змішати 10 мкл розчину ДНК і 1 мкл *10×* буфера для нанесення зразків на гель в пробірці, в лунці малого імунологічного планшета або просто на поверхні тефлонової гребінки. Ретельно піпетувати.

3. Нанести зразок(и) мікропіпеткою в лунку гелю.

4. Нанести маркер молекулярної маси в сусідню лунку гелю.

5. Увімкнути джерело струму і провести електрофорез при напрузі 100 В протягом 1,5-2 год. (до виходу лідируючого барвника БФС з гелю).

6. Відключити струм, вийняти плашку і переглянути гель в УФ світлі.

7. Сфотографувати гель цифровою фотокамерою. Агарозні гелі з ДНК, на відміну від поліакриламідних з білками, слід фотографувати відразу, оскільки при зберіганні смуги ДНК (ДНК-бенд) стають розмитими внаслідок дифузії. Як показує досвід, на наступний ранок смуги нечіткі.

5. ПОЛІМЕРАЗНА ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ

ПЛР, полімеразна ланцюгова реакція – це ферментативне копіювання певного фрагмента ДНК *in vitro* за допомогою ДНК-полімерази, тобто селективна ампліфікація ДНК. Межі фрагмента задають нуклеотидними послідовностями праймерів, тому копіюванню підлягає тільки певний ген (ДНК-мішень), а не вся ДНК як при реплікації *in vivo*. Основоположником методу вважається Керрі Мулліс (Mullis, 1985).

ПЛР включає три стадії, що циклічно повторюються:

1) *денатурацію ДНК* – розплітання подвійної спіралі і розходження полінуклеотидних ланцюгів;

2) *відпал праймерів* – гібридизацію праймерів і одноланцюгової ДНК-мішені з утворенням дволанцюгових комплексів «праймер-матриця», необхідних для ініціації синтезу ДНК з мономерів – дезоксирибонуклеозидтрифосфатів;

3) *полімеризацію* – добудова (подовження, елонгацію) комплементарних ланцюгів ДНК ферментом ДНК-полімеразою в напрямку 5' → 3' починаючи від 3'-ОН-кінців приєднаних праймерів. Тобто матричний синтез ДНК (нім. *matrize*, від латинського *matrix* – матка, джерело, початок).

Багатократне (циклічне) повторення цих трьох стадій призводить до експоненціального збагачення реакційної суміші молекулами ДНК-мішені, оскільки в кожному новому циклі в якості матриці виступає не тільки вихідна ДНК, але і вся ДНК, синтезована в попередніх циклах. Тому реакція відноситься до ланцюгових. Теоретично за N циклів може вийти 2^N молекул ДНК-мішені. Перебіг ПЛР, тобто перехід від стадії до стадії і від циклу до циклу, регулюється зміною температури.

Температура денатурації ДНК. Для будь-якої високомолекулярної геномної ДНК зазвичай задають 95°C. Для продуктів ампліфікації, а тим більше комплексів «праймер-матриця» ця температура нижча.

Температура відпалу праймера – температура, при якій можливе зв'язування праймерного олігонуклеотида з одноланцюговою ДНК-матрицею при охолодженні реакційної суміші, що настає за стадією денатурації. Для кожного конкретного праймера вона розраховується окремо і перебуває в межах 50-65°C. Це варіабельна температура.

Температура елонгації залежить від типу використовуваного ферменту. Для ферментативної активності ДНК-полімерази *Taq* з термофільної бактерії *Thermus aquaticus* температурний оптимум становить 72°C.

Комерційні фірми продають набори реагентів для проведення ПЛР, де всі компоненти реакції, за винятком праймерів і матриці, вже змішані в потрібних концентраціях і розфасовані в тонкостінні пробірки. У тому числі додано і фермент, що індукується нагріванням і тому неактивний. Завдання дослідника полягає в тому, щоб додати в пробірку ДНК-матрицю і специфічні праймери в потрібній кількості, поставити пробірки в ампліфікатор і задати потрібний режим.

Підбір праймерів

Праймери – синтетичні олігонуклеотиди, що складаються з 16-30 основ. Вони комплементарні ділянкам ДНК, між якими знаходиться послідовність-мішень. Праймер (англ. *Primer*) є обов'язковим компонентом («затравка»), необхідним для роботи ДНК-полімерази: до його 3'-ОН кінця фермент приєднує нуклеотиди, комплементарні матриці.

Праймер до 5'-кінця гена називають прямим (*forward, For*), до 3'-кінця гена – зворотним або зустрічним (*reverse, Rev*). У базах даних нуклеотидних послідовностей приведено тільки один ланцюг ДНК – значущий, той, що транскрибується у вигляді мРНК. По ньому підбирають прямий праймер, тобто той праймер, від якого буде рости саме цей ланцюг. Зворотний праймер підбирають для комплементарного ланцюга, але також у напрямку 5' → 3'.

Правила підбору праймерів

- Розмір праймера має становити 16-25(30) нуклеотидів.
- CG-склад повинен бути в межах 50-60%.
- Різниця у температурі відпалу обох праймерів – не більше 6°C.
- Праймери не повинні бути само- та взаємно-комплементарними.
- Нуклеотиди 3'-кінця праймера повинні бути суворо комплементарними матриці (заміни можливі на 5'-кінці довгих праймерів²⁸).

²⁸ Олігонуклеотид будь-якого складу може бути на замовлення синтезований спеціалізованою фірмою. За бажанням замовника до його складу введуть флуоресцентну мітку. На його 5'-кінець при замовленні можна додати будь-які нуклеотиди, наприклад,

Розрахунок температури відпалу праймера

Для точного розрахунку оптимальної температури існує безліч програм та алгоритмів. Спрощений розрахунок можна провести за формулами:

$$T_a = [(A+T)2^{\circ}\text{C}] + [(G+C)4^{\circ}\text{C}] \text{ (якщо довжина } \leq 20 \text{ основ)}$$

$$T_a = 22 + 1,46 ([2(G+C)] + (A+T)) \text{ (якщо довжина } 20\text{--}30 \text{ основ)}$$

Проведення ПЛР-ампліфікації ДНК

ПЛР проводиться в об'ємі 10-50 мкл. Робоча концентрація праймерів у реакційній суміші становить 0,2-1,0 пМ/мкл. Кількість матричної ДНК, що додається до реакції, коливається в межах від 10 нг (плазмідна ДНК) до 1000 нг (геномна ДНК). Робоча концентрація Таq-полімерази становить 0,01-0,05 од/мкл. Число циклів – 30. Вважається, що швидкість добудови ДНК Таq-полімеразою при ПЛР становить 1000 нуклеотидів за хвилину.

Оптимальна концентрація праймерів часто підбирається емпірично (розрахунок див. у роб. 6.3). Не рекомендується брати більше ніж 50 пМ на пробу, інакше можливий неспецифічний відпал та утворення праймер-димерів.

Зазвичай задають наступний режим роботи ДНК-ампліфікатора:

1. $T_d = 95^{\circ}\text{C}$, від 1 хв – попередня денатурація матриці, один етап;
2. 25-30 циклів ПЛР:
 - $T_d = 95^{\circ}\text{C}$, від 10 с – денатурація (denaturation);
 - $T_a = 50\text{-}65^{\circ}\text{C}$, від 30 с – відпал праймерів (annealing);
 - $T_e = 72^{\circ}\text{C}$, від 1 хв – елонгація, полімеризація (elongation, extension);
3. $T = 72^{\circ}\text{C}$, від 1 хв – добудовування незавершених ланцюгів, один етап;
4. $T = 4^{\circ}\text{C}$ – режим зберігання.

Як приклад наведено протокол ПЛР-ампліфікації мітохондріального гена НАДН-дегідрогенази гадюки Микольського (Великов с соавт., Вестник Саратовского госагроуниверситета, 2006, №3).

Матеріали та обладнання

ПЛР-ампліфікатор, ДНК (загальна) гадюки Микільського *Vipera nikolskii* (40 нг/мкл), праймери (10 пМ/мкл), суміш нуклеотидів *dNTP-mix* (2мМ), розчин хлориду магнію (25мМ), *Taq*-полімераза (5 од/мкл), 10× ПЛР-буфер.

Розчини

- *Реакційна суміш*. Підготовка суміші в кінцевому об'ємі 20 мкл:
 1. 10× ПЛР-буфер (200 мМ Tris-HCl, рН 8,4; 500 мМ KCl; 0,01% Tween 20) – 2 мкл;
 2. 2 мМ *dNTP mix* (суміш із усіх 4-х дезоксирибонуклеозидтрифосфатів з концентрацією по 2 мМ кожного) – 2 мкл;
 3. 25 мМ розчин MgCl₂ – 2 мкл;
 4. Праймер ND2 For: 5'-GCATTTTCATGACCACCACC-3' – 2 мкл;
 5. Праймер ND2 Rev: 5'-GAGTGAGGGGTATAATAGTG-3' – 2 мкл;
 6. ДНК-мішень: загальна ДНК гадюки Микільського (40 нг/мкл) – 3 мкл;
 7. Вода деіонізована – 6,8 мкл;
 8. *Taq*-полімераза – 0,2 мкл.

Методика

1. У стерильній пластиковій тонкостінній пробірці на 0,5 (0,2) мл змішати зазначені вище компоненти, довести об'єм за допомогою деіонізованої води до 20 мкл. Фермент додавати останнім, одразу прибрати на -20°C!

2. Центрифугувати 15 с. Нанести поверх реакційної суміші трохи мінеральної олії для запобігання випаровування (≈ 30 мкл піпеткою або краплею). Якщо ДНК-ампліфікатор має кришку, що нагрівається, то олію додавати не потрібно. Помістити пробірки у ДНК-ампліфікатор.

3. Запустити наступний режим ПЛР: попередня денатурація матриці при 95°C – 5 хв, потім 30 циклів ампліфікації: 95°C – 30 с, 57°C – 30 с, 72°C – 1 хв, потім задати температуру 72°C – 5 хв (остаточна добудова ланцюгів) та вивести на +4°C – режим зберігання. Розрахункова температура відпалу обох праймерів

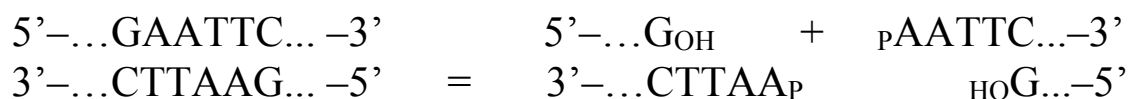
становить 60°C, реальна задана на 3°C нижче для гарантії відпалу та подальшого «подовження праймера».

4. Провести електрофорез ДНК, сфотографувати гель. При Real-Time PCR форез не проводять, за процесом стежать за флуоресценцією.

6. РЕСТРИКЦІЯ ДНК

Ендонуклеази рестрикції (рестриктази) широко використовуються в роботах з картування геномів, клонування генів, генотипування та інших молекулярно-генетичних дослідженнях як «молекулярні ножиці». Рестриктази розщеплюють молекули ДНК у певних нуклеотидних послідовностях, які називаються сайтами впізнавання. Ці сайт-специфічні ендонуклеази здатні робити розриви всередині ланцюга ДНК, на відміну від екзонуклеаз, що деградують ДНК з кінців. Перші рестриктази були виділені Смітом (Smith, 1970; Smith, Nathans, 1973), саме ж явище рестрикції-модифікації ДНК вперше було виявлено Лурія (Luria, 1952) при вивченні розмноження фагів на різних штаммах бактерій.

Рестриктази II типу впізнають паліндромні послідовності нуклеотидів – послідовності, що мають вісь симетрії другого порядку. Так, сайт впізнавання рестриктази *EcoRI* із шести нуклеотидів –GAATTC– на комплементарному ланцюзі ДНК у тому самому 5'→3' напрямку читається так само. Точка розрізання знаходиться між G та першим A, саме там відбувається розрив фосфодієфірного зв'язку. 5'-виступаючий «липкий кінець», що утворюється при рестрикції, має в довжину 4 нуклеотиди:



Ці ферменти, як правило, працюють у формі димера, причому кожна субодиниця білка гідролізує один ланцюг ДНК незалежно від іншої. Однак на одноланцюговій ДНК вони працюють значно повільніше. Залежно від відносного розташування розриву на комплементарних ланцюгах ДНК рестрикти, що виходять, володіють або 5'-виступаючими (*EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*), або 3'-виступаючими (*PstI*) липкими кінцями. Більшість рестриктаз дають 5'-виступаючі липкі кінці.

На активність ферментів та повноту гідролізу ДНК може впливати ціла низка факторів – температура інкубації, іонний склад буфера, метод виділення ДНК і відповідно ступінь її забруднення, а також рівень метилювання ДНК та специфічність метилювання. Результати рестрикції оцінюють за допомогою електрофорезу ДНК у агарозному гелі.

Невеликі за розміром молекули плазмідної або вірусної ДНК при ферментативному гідролізі за допомогою будь-якої рестриктази дають строго певну обмежену кількість рестриктів. Препарати геномної ДНК через велику кількість рестрикційних сайтів і неминучу фрагментацію ДНК при її ізоляції з клітин дають при електрофорезі шлейф із фрагментів ДНК або «шмер».

Система рестрикції-модифікації ДНК – це ферментативна система бактерій, що складається з двох білків рестриктази та метилази, специфічних до одного і того ж сайту впізнавання. Ця система руйнує чужорідну ДНК, що потрапляє в клітину. Основна її функція – захист клітини від проникнення чужорідного генетичного матеріалу, насамперед від бактеріофагів та плазмід. Захист бактеріального геному від власної рестриктази здійснюється за допомогою метилування аденіну або цитозину відповідним ферментом метилазою: метильовані сайти рестриктаза розрізати не здатна.

Для будь-якої ДНК з відомою первинною структурою можна з'ясувати число та локалізацію всіх сайтів рестрикції за допомогою спеціальних програм для рестрикційного картування, наприклад програми RestrictionMapper (<http://www.restrictionmapper.org>).

6.1. Рестрикція плазмідної та фагової ДНК

Активність та кількість ферменту. Кожен препарат ферменту має певну активність. 1 одиниця активності рестриктази повністю гідролізує 1 мкг ДНК фага λ за 1 год. при 37°C. Комерційні препарати зазвичай мають активність 10-20 од./мкл і потребують розведення. Гідроліз ДНК здійснюють 2-3-кратним надлишком ферменту, тобто на 1 мкг ДНК беруть 2-3 одиниці. Зберігають рестриктази при -20°C в 50% гліцерині.

Буфери. Абсолютно необхідним кофактором для роботи рестриктази є іони Mg^{2+} . Буферну ємність з потрібним значенням рН забезпечує Tris-HCl. β -меркаптоетанол або дитіотрейтол стабілізує фермент. Розрізняють високосольовий (100мМ NaCl), середньосольовий (50мМ NaCl) та низькосольовий (без NaCl) буфери. Фірми-постачальники разом із ферментом продають і необхідний буфер у концентрованому вигляді.

Об'єм реакційної суміші. Зручно проводити рестрикцію в об'ємі 20-50 мкл, коли розчин ДНК, 10 \times буфер і фермент змішують у

пробірці і доводять до кінцевого об'єму бідистильованою або деіонізованою водою. Для ферментативних реакцій завжди беруть високоочищену воду.

Температура та час інкубації. Більшість ферментів працюють при 37°C (крім ферментів із термофільних бактерій). При кімнатній температурі швидкість роботи значно знижується. Більш тривала, ніж 1 год. інкубація буває необхідною, якщо гідроліз з якихось причин відбувся не повністю. При неповній рестрикції на електрофореграмі видно смужки ДНК, що відповідають смужкам нерізаного контролю.

Матеріали та обладнання

Розчин ДНК плазмиди pBR322 (1 мг/мл), розчин ДНК фага λ (1 мг/мл), рестриктаза *EcoRI* (10 од./мкл), термостат, обладнання для форефу.

Розчини

- 10× буфер для рестриктази *EcoRI*: 500мМ Tris-HCl, рН 7,5; 100мМ MgCl₂; 1000мМ NaCl; 10мМ ДТТ.
- 10× буфер нанесення зразка на гель (С. 40).

Методика

1. Перед постановкою реакції (пп. 6-12) за допомогою програми рестрикційного картування RestrictionMapper можна дізнатися кількість сайтів рестрикції *EcoRI* у молекулі ДНК фага λ та їх розмір. Це потрібно для того, щоб уявляти, що можна буде побачити на електрофореграмі. Нуклеотидну послідовність фага можна отримати у базі даних GenBank так, як описано далі (пп. 2-5).

2. Відкрийте головну сторінку сайту Національного центру біотехнологічної інформації США (National Center for Biotechnology Information, US National Library of Medicine – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> або <http://www.pubmed.com>). Введіть запит «Enterobacteria phage lambda, complete genome». Виберіть вкладку Nucleotide і натисніть Enter. Скопіюйте повну нуклеотидну послідовність бактеріофага, що складається з 48502 н.п. (GenBank, NC_001416.1).

3. Відкрийте програму RestrictionMapper (<http://www.restrictionmapper.org>). Введіть у спеціальне вікно нуклеотидну послідовність фага λ .

4. Виберіть опцію «Selected individual Enzymes», виберіть фермент «*EcoRI*» і натисніть «Map Sites». Видно, що сайтів рестрикції 5, причому вказано номер позиції нуклеотиду в точці розрізання. Фрагментів вийде 6, оскільки ДНК є лінійною. Можна дізнатися розміри всіх рестриктів, натиснувши кнопку «Virtual Digest». Запишіть ці розміри.

5. Виконайте ту ж роботу з плазмідною рBR322, задавши запит «Cloning vector рBR322».

6. Приготуйте реакційну суміш об'ємом 20 мкл у 1,7 мл пластиковій пробірці: 10× буфер – 2 мкл, розчин ДНК (1 мг/мл) – 1 мкл, вода – 16,7 мкл.

7. Ретельно перемішайте суміш піпетуванням або струшуванням, осадіть краплі зі стінок пробірки коротким центрифугуванням.

8. Дістаньте фермент із морозильника, відразу поставте пробірку в лід. Наберіть мікропіпеткою потрібний об'єм розчину білка, що містить 3 одиниці активності (0,3 мкл). Додайте фермент до зразка ДНК і знову швидко заберіть рестриктазу в морозильник на -20°C . Перемішайте та зберіть рідину зі стінок пробірки коротким центрифугуванням.

9. Інкубуйте пробу 1 год²⁹. при рекомендованій температурі 37°C .

10. Зупиніть реакцію додаванням 1 мкл 200мМ ЕДТА або прогріванням реакційної суміші при 65°C протягом 5-10 хв³⁰.

11. Додайте до препарату різаної ДНК 1/10 об'єму 10× буфера для нанесення зразка на гель, перемішайте піпетуванням та внесіть ДНК у лунки гелю. У цьому буфері отримані зразки ДНК можна деякий час зберігати в холодильнику.

²⁹ Час інкубації допускається збільшувати до 2-х і більше годин для повноти гідролізу. Комерційні препарати ферментів, як правило, не містять домішок нуклеаз і тому не мають неспецифічної нуклеазної активності. Однак при занадто тривалій інкубації для деяких рестриктаз можливий прояв star-активності або активності із зіркою, тобто зниження специфічності гідролізу ДНК (для *EcoRI*-NAATTN). Це призведе до появи «шмера» замість чітких смуг у гелі.

³⁰ Крім іншого, в прогрітих препаратах йде кращий поділ рестриктів з близькою молекулярною масою, для яких іноді буває характерним «залипання». Часто такі фрагменти ДНК починають розділятися на дві окремі смужки лише ближче до кінця гелю. Таке можна побачити, наприклад, для *EcoRI*-фрагментів ДНК фага розміром 5804 та 5643 нуклеотидів.

12. Проведіть електрофорез ДНК при напрузі 100 В протягом 1,5-2,0 год. та оцініть результати, переглянувши гель в УФ світлі. Сфотографуйте гель.

6.2. Рестрикція геномної ДНК еукаріотів

Хромосомна ДНК еукаріотів у порівнянні з плазмідною, фаговою або мітохондріальною містить дуже велику кількість сайтів рестрикції. Крім того, вона завжди фрагментується випадково при виділенні, її препарати важче очистити від білків, полісахаридів та інших речовин. Крім цього, ступінь її метилювання може дуже варіювати, що чинить значний вплив на роботу ендонуклеаз.

Зазвичай беруть 3-5-кратний надлишок ферменту на 1 мкг ДНК і проводять рестрикцію протягом 2-6 год. або залишають реакцію на ніч. 10 мкг ДНК більшості вищих рослин відповідає 10^6 - 10^7 геномів. Концентрацію ДНК у розчині можна визначити шляхом порівняння з відомим стандартом при електрофорезі в агарозному гелі, або шляхом вимірювання оптичної щільності розведеної аліквоти розчину ДНК.

При обробці геномної ДНК рестриктазами, які впізнають паліндроми з шести нуклеотидів (*EcoRI*, *BamHI*, *PstI* та інші поширені рестриктази), утворюються рестрикти розміром від десятків нуклеотидів до 20-30 kb. Таким чином, при повному рестрикційному гідролізі ДНК еукаріотів виходить величезна кількість рестриктів, десятки і сотні тисяч. При електрофорезі геномна ДНК, що зазнала часткового або глибокого розщеплення, дає шлейф із фрагментів різного розміру. Візуалізувати потрібний фрагмент можна лише за допомогою блот-перенесення ДНК на нітроцелюлозний або найлоновий фільтр та гібридизації ДНК по Саузерну з радіоактивно- або флуоресцентно-міченим зондом.

Так звані «дрібнощеплячі» рестриктази, які впізнають паліндром з 4 нуклеотидів (*Sau3A* та ін), поріжуть геномну ДНК на дрібніші фрагменти і в більшій кількості. Для ефективного поділу високо- або низькомолекулярних фрагментів ДНК використовують різні гелі.

Матеріали та обладнання

Геномна ДНК із рослин тютюну (кукурудзи, петунії) з невідомою концентрацією, рестриктаза *BamHI*, зразок ДНК із відомою концентрацією, спектрофотометр, термостат, обладнання для електрофорезу.

Розчини

- $10\times$ буфер для рестриктази BamHI: 100мМ Tris-HCl, pH 8,0; 50мМ MgCl₂; 1000мМ KCl; 0,02% Triton X-100.
- $10\times$ буфер для нанесення зразка на гель (С. 40).

Методика

1. Визначте концентрацію ДНК за допомогою спектрофотометра.

2. Оцініть чистоту препарату шляхом вимірювання оптичної щільності при довжинах хвиль 260, 280 та 235 нм, тобто на максимумах поглинання ДНК, білків та полісахаридів, відповідно. Для чистої ДНК характерні значення $A_{260}/A_{235} = 2,2-2,5$ та $A_{260}/A_{280} = 1,8-1,9$.

3. Гідролізуйте 1 мкг тотальної ДНК тютюну в 50 мкл реакційної суміші протягом 6 год.³¹, відбираючи через кожну годину аліквоту 10 мкл і зупиняючи в ній реакцію, додаванням 1 мкл буфера для нанесення зразка³².

4. Проведіть електрофорез ДНК-рестриктів. Використовуйте як контроль нерізаний зразок ДНК. Сфотографуйте гель.

³¹ При тривалій інкубації деякі рестриктази можуть виявляти star-активність (зоряну, вторинну, штрихову активність), тобто гідролізувати сайти з одним чи кількома «неправильними» нуклеотидами. Це необхідно враховувати, якщо планується здійснювати молекулярне клонування (Molecular cloning).

³² Можна зупинити (тимчасово загальмувати) біохімічну реакцію поміщенням пробірки на лід. У цьому випадку за потреби (неповний гідроліз, «недорестрикція») її легко можна відновити. Якщо ж вона зупинялася за допомогою ЕДТА, яка присутня в буфері для нанесення зразка на гель, то потрібно знову додати іони магнію в еквімолярній кількості в реакційну суміш.

7. ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ БІЛКА

Основними методами для визначення концентрації білка в розчині є наступні методи:

- 1) біуретова реакція з використанням лужного розчину солі міді;
- 2) метод Лоурі із застосуванням реактиву Лоурі-Фоліна;
- 3) вимірювання оптичної щільності в УФ області спектру при 280 нм (смуга поглинання ароматичних амінокислот) або 205-220 нм (смуга поглинання пептидних груп);
- 4) зв'язування барвника кумасі діамантового блакитного *Coomassie Brilliant Blue R-250* – метод Бредфорда.

Метод Бредфорда (Bradford, 1976) та метод Лоурі (Lowry, 1951) – два найбільш відомі аналітичні методи. Стаття Лоурі зі співавт. (Lowry et al., J.Biol.Chem., 1951, V.193, P.265-275) є найцитованішою науковою статтею у світі. За надійністю обидва ці колориметричні методи однакові, використання обох може знадобитися для контролю.

Метод Бредфорда

Барвник *Coomassie Brilliant Blue R-250* при розчиненні у фосфорній кислоті має червоно-коричневе забарвлення (аніонна форма), але при зв'язуванні з аргініном та гідрофобними амінокислотними залишками білка розвивається блакитне забарвлення ($\lambda_{\max} = 595$ нм, катіонна форма). Таким чином, збільшення абсорбції розчину при довжині хвилі, що дорівнює 595 нм, пропорційне кількості білка в розчині.

Метод полягає в додаванні барвника до розчину білка та вимірювання оптичної щільності. Отримані значення порівнюють з калібрувальною кривою, побудованою по білку з відомою концентрацією, найчастіше по бичачому сироватковому альбуміну (БСА).

У порівнянні з методом Лоурі метод Бредфорда простіше, швидше і відрізняється більшою чутливістю за такої ж точності. Дає хороше значення концентрації білка в межах від 2 мкг/мл до 120 мкг/мл.

Матеріали та обладнання

Спектрофотометр, кювети, розчин БСА (10 мг/мл), розчин білка, що досліджується, барвник *Coomassie Brilliant Blue R-250*, ортофосфорна кислота.

Розчини

- *Реагент Бредфорда*. На 1 л: 100 мг *Coomassie Brilliant Blue R-250* розчинити в 50 мл спирту і додати 100 мл ортофосфорної кислоти, довести до 1 л водою та профільтрувати через паперовий фільтр. Реагент дуже чутливий до білка (1-2 мкг/мл). Все має бути абсолютно чистим, інакше розчин посиніє та зіпсується. Чистий розчин має коричневий колір.

Методика

1. Довести об'єм зразка до 0,5 мл водою.
2. Додати 0,5 мл реагенту Бредфорда.
3. Перемішати і чекати на розвиток забарвлення (від 5 с, але не більше 30 хв).
4. Виміряти A_{595} в 1 мл кюветі.
5. Розрахувати концентрацію білка за калібрувальною кривою, побудованою за БСА.

Метод Лоурі

Метод Лоурі заснований на утворенні забарвлених продуктів реакції ароматичних амінокислот з реактивом Фоліна у поєднанні з біуретовою реакцією на пептидні зв'язки.

У лужному середовищі при взаємодії сульфату міді II з пептидними групами білка $-CO-NH-$ утворюються комплексні сполуки фіолетового забарвлення, іони Cu^{2+} при цьому переходять у Cu^+ . Одновалентні іони міді реагують з реактивом Фоліна, утворюючи нестабільний продукт, що переходить у молібденову синь з максимумом поглинання при 750 нм. Збільшення абсорбції при 750 нм пропорційно до концентрації білка.

Метод дуже чутливий до наявності в розчині сторонніх відновників, що ускладнює його використання при виявленні білка в неочищених препаратах. Чутливість до білка – 10-100 мкг/мл.

Матеріали та обладнання

Спектрофотометр, кювети, ретельно вимиті та просушені, розчин БСА (10 мг/мл), розчин досліджуваного білка, реагенти.

Розчини

- *Реагенти А та В для методу Лоурі*: розчин А – 2% Na_2CO_3 ; розчин В – 5% $CuSO_4 \times 5H_2O$ в 1% цитраті Na.

- 50% трихлороцтова кислота (ТХО) розчинити в 700 мл води в круглодонній колбі на 1 л, що оснащена пришліфованим зворотним холодильником Лібіха. Додати 50 мл 50%-ної H_3PO_4 і 100 мл HCl (конц.). Помістити в колбу кілька капілярів (центрів кипіння) і кип'ятити протягом 10 год. Потім додати 150 г Li_2SO_4 , 50 мл води та кілька крапель бром. Від'єднавши зворотний холодильник, кип'ятити вміст колби під тягою 15 хв для видалення надлишків бром. Охолодити, довести водою до 1 л, перелити у склянку із темного скла.

Методика

1. Довести об'єм зразка до 0,8 мл водою.
2. Додати 0,2 мл 50% трихлороцтової кислоти (ТХО) (кінцева концентрація 10%), перемішати.
3. Зачекати 10 хв, центрифугувати 10 хв при 14000 об/хв.
4. Супернатант злити та додати до осаду 150 мкл 1М NaOH , 50 мкл 10% SDS , 0,75 мл розчину D (суміш А та В, 50:1), 50 мкл реактиву Фоліна. Перемішати та чекати розвитку забарвлення 30 хв.
5. Виміряти A_{750} в 1 мл кюветі.
6. Розрахувати концентрацію білка за калібрувальною кривою.

Концентрування білків шляхом осадження ТХО

Метод осадження білків трихлороцтовою кислотою корисний, коли концентрація білка в колоїдному розчині занадто мала для аналізу або об'єм розчину дуже великий, щоб нанести потрібну кількість білка в лунку гелю при електрофорезі. Осад розчиняють у меншому обсязі буфера, концентруючи таким чином розчин білка.

Матеріали та обладнання

ТХО, дезоксихолат натрію, розчин білка БСА, розчин білка, що досліджується, центрифуга.

Розчини

- Трихлороцтова кислота (ТХО).
- 0,15% дезоксихолат натрію. Зберігати за кімнатної температури.

Методика

1. Якщо мінімальна концентрація білка близько 5 мкг/мл, то до розчину білка додати 1/10 об'єму 100% ТХО.

2. Якщо мінімальна концентрація білка менше 1 мкг/мл, то до розчину білка додати 1/10 об'єму 0,15% дезоксихолату натрію (співосаджувач), витримати 10 хв при кімнатній температурі і додати 1/20 первісного об'єму 100% ТХО.

3. Інкубувати 30 хв на льоду або 15 хв при -20°C .

4. Центрифугувати 5-10 хв при максимальній швидкості центрифуги.

5. Відібрати супернатант піпеткою. Білок – в осаді.

6. Далі можна розчинити осад у 50-100 мкл 0,1 н NaOH і промити 1 мл суміші етанол-ефір 1:1. Для повного видалення залишків ТХО потрібно ретельно промивати кілька разів поспіль.

7. Центрифугувати на максимальній швидкості мікроцентрифуги. Супернатант відкинути. Осад білка розчинити у буфері PBS.

8. ЕЛЕКТРОФОРЕЗ БІЛКІВ

Гель-електрофорез – один із стандартних молекулярно-біологічних методів аналізу. Молекули білка в розчині мають заряд при будь-якому значенні рН, відмінному від їх ізоелектричної точки. Це зумовлює їхню рухливість в електричному полі. Розділяють білки в поліакриламідних гелях (ПААГ), що мають порівняно з агарозними гелями менший розмір пор. Гель утворюється в результаті полімеризації мономерних молекул акриламід у присутності N,N'-метилен-біс-акриламід, що формує поперечні зшивки. Варіюванням концентрації мономерів можна домагатися отримання пор різного розміру. ПАА-гелі щільніші за агарозні, стійкі до кип'ятіння у воді, пластичні і менш ламкі.

ПААГ складається з зон концентруючого та роздільного гелю. Концентрація акриламід у роздільному гелі залежить від розмірів білка – для великих білків використовують гелі з низькою концентрацією, починаючи від 5% і вище, менші білки поділяють у дрібнопористих гелях, що містять до 20-25% акриламід. Заливка гелю та електрофоретичне розділення білків у пластині гелю відбувається у вертикальному положенні.

Розроблено велику кількість модифікацій методу електрофорезу білків у ПААГ для вирішення різних завдань та для різних білків та пептидів. Найпоширенішим різновидом є електрофорез білків у умовах, що денатурують, у присутності додецилсульфату натрію (хаотропний агент, ПАР) по Леммли (Laemmli, 1970). Далі наведено одну з модифікацій цього методу.

Приготування розчинів та заливання ПААГ

Підготовка до електрофорезу білків, порівняно з електрофорезом ДНК, займає більше часу. Поліакриламідний гель зазвичай готують заздалегідь, використовуючи стокові розчини. Концентруючий гель зазвичай має концентрацію поліакриламід від 2 до 8% та значення рН 6,8. Розділюючий гель має концентрацію поліакриламід від 5 до 20% та рН у межах 8,5-8,9. Вибір густини гелю залежить від молекулярних мас досліджуваних білків. Як електродний буфер найчастіше використовують Tris-гліциновий або Tris-боратний буфер з водневим показником середовища рН 8-9.

Матеріали та обладнання

Апарат для вертикального електрофорезу, джерело постійного струму, скляні пластини з вирізом та без вирізу, гребінка, спейсери, шприц для нанесення зразків, реактиви для приготування ПААГ та буферів.

Розчини

1. Електродний буфер (200 мл)

Tris-ОН (трис(гідроксиметил)амінометан) – 3,03 г

Гліцин – 14,44 г

SDS – 1,0 г

H₂O (бідистильована, деіонізована, тут і далі) – до 200 мл

pH 8,4, р-р гліцину титрують до потрібного знач. рН сухим Tris;

SDS додавати останнім після доведення рН

2. Розчин AA /бісAA

AA (акриламід) – 30,0 г

бісAA (N,N'-метилен-біс-акриламід) – 0,8 г

H₂O – до 100 мл

3. Буфер 1 (для концентруючого геля)

Tris-HCl (трис-гідрохлорид) – 6,06 г

SDS – 0,4 г

H₂O – до 100 мл

pH 6,8, титрувати 4-6 н HCl, перед додованням SDS

4. Буфер 2 (нижній буфер для розділяючого геля)

Tris-ОН (трис(гідроксиметил)амінометан) – 18,17 г

SDS – 0,4 г

H₂O – до 100 мл

pH 8,8, титрувати до потрібного значення HCl, перед SDS

5. БФС (бромфеноловий синій) – 2 мг

H₂O – до 4 мл

6. Барвник (0,125% кумассі R-250)

Coomassie Brilliant Blue R-250 (у G-250 розділення менше) – 1,25 мг

Етанол – 5 мл

Оцтова к-та (10%) – 1 мл

H₂O – до 10 мл

7. Відмиваючий розчин I (50% етанол, 10% оцтова к-та)

Оцтова к-та (10%) – 10 мл

Етанол (50%) – 50 мл

H₂O – до 100 мл

Перед використанням розвести в 5 разів

8. *Відмиваючий розчин II (5% етанол, 10% оцтова к-та)*

Оцтова к-та (10%) – 35 мл

Етанол (50%) – 25 мл

H₂O – до 100 мл

Перед використанням розвести в 5 разів

2 × буфер для зразків

Гліцерин 15% – 7,5 мл

β-меркаптоетанол – 2,5 мл

SDS – 1,15 г

Tris–HCl (трис-гідрохлорид) – 0,38 г

H₂O, pH 6,8 – до 25 мл

10% ТХО,

- 5% ПСА (персульфат аммонію),

- ТЕМЕД (N,N,N,N-тетраметилетилендіамін).

Методика

Підготовка скелець для заливки поліакриламідного гелю

1. Взяти скло з вирізом і помістити на його бокових краях два спейсера.

2. Зверху покласти на спейсери скло без вирізу. Обережно поставити зібрану конструкцію у камеру вертикально так, щоб можна було залити гель у порожнину між склом. Скло без вирізу має бути звернене назовні, до дослідника. Закріпити конструкцію затискачами.

3. Розплавити 3% агарозу, охолодити до 50-60°C і залити тонким шаром (5 мм) дно електрофорезної комірки, щоб уникнути протікання гелевого розчину.

Заливка гелю

1. Для приготування розділяючого гелю змішати компоненти³³ (за винятком ТЕМЕД та ПСА) відповідно до даних, наведених у табл. 4 (для різних об'ємів!). Отриману суміш ретельно перемішати³⁴.

³³ Готовий стоковий розчин для гелю потрібної концентрації без ТЕМЕД та ПСА можна зберігати в холодильнику близько року. Акриламід токсичний, працювати у рукавичках!

³⁴ У 15% ПАА-гелях ефективно розділяються білки з діапазоном молекулярних мас 10-45 kDa, у 10% гелях – 14-205 kDa, у 7,5% – 24-205 kDa, у 5% – 36-205 kDa.

Таблиця 4

Підготовка розділяючого геля

Компонент	3%	6%	10%	20%
Р-н АА/бісАА	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
<i>V загальний</i>	<i>10 мл</i>	<i>15 мл</i>	<i>15 мл</i>	<i>20</i>

2. Додати послідовно ТЕМЕД та ПСА та ретельно перемішати отриманий розчин, при цьому важливо, щоб у процесі перемішування не утворювалися бульбашки з газом.

3. Отриманий розчин розділяючого гелю акуратно залити між скляними пластинами так, щоб рівень не перевищував 3 см від верхнього краю пластин.

4. Обережно нашарувати на розчин розділяючого геля тонкий шар метанолу або деіонізованої води і залишити гель застигати (до 20 хв).

5. Приготувати розчин концентруючого гелю, як зазначено в табл. 5.

Таблиця 5

Підготовка концентруючого геля

Компонент	6%	10%
Р-н АА/бісАА	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
<i>V загальний</i>	<i>10 мл</i>	<i>10 мл</i>

6. Видалити шар метанолу (!) або води з поверхні застиглого розділяючого гелю фільтрувальним папером.

7. Нашарувати на поверхню застиглого розділяючого гелю розчин концентруючого гелю, і негайно після цього вставити гребінець між скляними пластинами.

8. Залишити гель застигати протягом 20 хв³⁵. Зручно відлити трохи залишків гелевого розчину в 1,7 мл пробірку і використовувати цей розчин як індикатор полімеризації.

Підготовка камери до електрофорезу

1. Поставити електрофорезну камеру на рівну горизонтальну поверхню. Додати електродний буфер у верхню ємність камери так, щоб рівень буфера був на 0,5 см вище за рівень гелю.

2. Додати електродний буфер до нижнього піддону камери.

3. Обережно видалити гребінець та промити лунки електрофорезним буфером за допомогою шприца або мікропіпетки.

Проведення електрофорезу білків

Молекула білка в розчині має якийсь середній цілий заряд (позитивний або негативний) при будь-якому значенні рН, що відрізняється від ізоелектричної точки даного білка. Це зумовлює пересування молекул у поліакриламідному гелі під впливом зовнішнього електричного поля. Окрім заряду на рухливість впливає розмір білкових молекул.

Електрофорез проводять зазвичай при нейтральних або слаболужних значеннях рН, коли більшість білків мігрує до анода, так само як мігрує при електрофорезі ДНК. За проходженням електрофорезу стежать за рухом барвника бромфенолового синього (БФС). Барвник йде з фронтом форезу, попереду білків немає.

Матеріали та обладнання

Електрофорезна камера з гелем, джерело струму, зразки білків для аналізу, маркер молекулярної ваги.

Розчини

- 2 × буфер для нанесення зразків
- розчин БФС.

³⁵ Готові гелі можна зберігати в холодильнику в обгорнутому вигляді, не виймаючи гребінки. Однак, розділюючий і концентруючий гелі мають різні буфери, тому краще залитий гель використовувати відразу.

Методика

1. Підготувати зразки так, щоб загальна концентрація білка була не більше ніж 10 мг/мл. Потрібно 10 мкл зразка розбавити 2× буфером для нанесення зразків вдвічі, додати 4 мкл розчину БФС. Рекомендується прокип'ятити зразки протягом 5 хв.

2. За допомогою гамільтонівського шприца або мікропіпетки-дозатора з витягнутим наконечником нанести по 10 мкл зразків у лунки гелю.

3. Підключити електрофорезну камеру до джерела струму, дотримуючись полярності.

4. Провести електрофоретичне розділення білків при постійному струмі 20 мА, 60 В для одного гелю та 60 мА, 150 В для іншого гелю. Підвищувати напругу треба при проходженні БФС до розділяючого, нижнього гелю. За цих умов електрофорез триває 40-50 хв.

5. Після досягнення барвником нижнього краю гелю відключити струм.

6. Вийняти пластину з гелем із електрофорезної камери.

7. Обережно вийняти спейсери між склом.

8. Відокремити гель від скла³⁶, пофарбувати.

Фарбування білків *Coomassie R-250*

Обробка поліакриламідних гелів після електрофорезу включає фарбування і відмивання від барвника, що не зв'язався. Гель заливають трихлороцтовою кислотою, ретельно відмивають водою і поміщають у розчин барвника кумасі діамантового блакитного *Coomassie R-250*.

Молекули барвника зв'язуються з аргініном та гідрофобними амінокислотними залишками. Пов'язана форма має синє забарвлення, тому на гелі видно смуги білка з різною інтенсивністю забарвлення, що корелює з кількістю білка.

Після фарбування білкових смуг гель необхідно відмити від барвника *Coomassie R-250*, що не зв'язався. Відмивають гелі в розчинах етанолу (або метанолу – отрута!) та оцтової кислоти.

Матеріали та обладнання

Поліакриламідний гель із результатами електрофорезу білків.

³⁶ Для надання склу гідрофобних властивостей для кращого відділення гелю їх часто попередньо силіконують з використанням bind-silane і repel-silane.

Розчини

- 10% ТХО.
- Розчин кумасі R-250.
- Відмиваючий розчин I.
- Відмиваючий розчин II.

Методика

1. Відразу після електрофорезу помістити гель у ємність для відмивання, залити 10% ТХО, залишити на 30-60 хв. Можна замінити ТХО на 5мМ НСІ.

2. Додати воду, добре промити, злити воду.

3. Помістити гель у розчин кумасі для фарбування³⁷ на 1-1,5 год.

4. Злити розчин кумасі і залити відмиваючий розчин I³⁸ на 1-1,5 год.

5. Видалити відмиваючий розчин I.

6. Помістити гель у відмиваючий розчин II, і залишити на якийсь час поки з гелю не зникне фон. У процесі прояву гелю рекомендується 2-3 рази міняти відмиваючий розчин II.

³⁷ Чутливість набагато вище дає фарбування білків іонами срібла. Після обробки гелю оцтовою кислотою та етанолом у розчині I, ретельного промивання етанолом та водою гель переносять на 30 хвилин у 5 об'ємів 0,1% розчину AgNO₃. Потім після промивання водою поміщають у такий самий об'єм 0,28М карбонату натрію з додаванням до 0,02% формальдегіду. Пофарбовані смуги білка з'являються за кілька хвилин. Слід дочекатися найкращого контрасту та зупинити реакцію промиванням у 10% оцтовій кислоті.

³⁸ Як альтернатива: гель заливають холодною водою (200-300 мл), и кип'ятять ~5'.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Довгопола Л. І. Молекулярна біологія. Методичні рекомендації до лабораторних робіт для студентів біологічних спеціальностей педагогічних закладів вищої освіти. Переяслав-Хмельницький : Домбровська Я. М., 2018. 74 с.
2. Сиволоб А. В. Молекулярна біологія : підручник. Київ : Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2008. 384 с.
3. Особливості дотримання техніки безпеки при роботі в біохімічній та хімічній лабораторіях : навч. посібник для студентів та викладачів вузів / К. В. Александрова, В. М. Швець, М. В. Дячков, Д. А. Васильєв. Запоріжжя : [ЗДМУ], 2017. 76 с.
4. Celis J.E., Ed., Cell biology: a laboratory handbook, 2nd ed., Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1997.
5. Johnston J.R., Ed., Molecular genetics of yeast: a practical approach. IRL Press , Oxford Univ. Press, Oxford, England, 1994.
6. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. (v.1-3), Cold Spring harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY, 1989.

ОСНОВИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ

Методичні рекомендації для виконання лабораторних робіт
для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти
ОПП «Біотехнології та біоінженерія»
спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
денної форми здобуття вищої освіти

Укладач:
Луговий Сергій Іванович

Підписано до друку 16.11.2022 р. Формат 60×84/16. Папір офсетн.
Гарнітура Times New Roman.
Друк офс. Умовн. друк. арк. 4,0. Облік видавн. арк. 4,0
Умов. фарбовід. 0,9. Зам. № 612, тир. 20.

Надруковано у видавничому відділі
Миколаївського національного аграрного університету
54008, м. Миколаїв, вул. Георгія Гонгадзе, 9

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4490 від 20.02.2013 р.