

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

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

Кафедра генетики, годівлі тварин та біотехнології

ОСНОВИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ

**методичні рекомендації для виконання лабораторних робіт
для здобувачів вищої освіти освітнього ступеня «Молодший
бакалавр» початкового рівня (короткий цикл)
спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
денної форми навчання**

**Миколаїв
2021**

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 «23» грудня 2021 р., протокол № 5.

Укладачі:

- І. Ю. Горбатенко - д-р біол. наук, професор, професор кафедри генетики, годівлі тварин та біотехнології, Миколаївський національний аграрний університет
- С. І. Луговий - д-р с.-г. наук, доцент, доцент кафедри генетики, годівлі тварин та біотехнології, Миколаївський національний аграрний університет

Рецензенти:

- В. М. Іовенко - д-р с.-г. наук, професор, завідувач відділом генетики та біотехнології Інституту тваринництва степових районів ім. М. Ф. Іванова «Асканія-Нова» – Національного наукового селекційно-генетичного центру з вівчарства НААН України;
- В. М. Балацький - д-р с.-г. наук, професор, завідувач лабораторії генетики Інституту свинарства і АПВ НААН України.

ЗМІСТ

Вступ	4
Виділення загальної ДНК із клітин	6
Концентрування ДНК шляхом осадження спиртом	9
Спектрофотометрія препаратів ДНК, РНК і білків	12
Електрофорез нуклеїнових кислот	15
Полімеразна ланцюгова реакція	22
Визначення концентрації білка	27
Електрофорез білків	32
Список використаної літератури	40

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

К01. Здатність застосовувати знання у практичних ситуаціях;

К05. Здатність вчитися і оволодівати сучасними знаннями;

Спеціальні (фахові, предметні) компетентності

К11. Здатність використовувати ґрунтовні знання з хімії та біології в обсязі, необхідному для досягнення інших результатів освітньої програми;

К13. Здатність працювати з біологічними агентами, використовуваними у біотехнологічних процесах (мікроорганізми, гриби, рослини, тварини, віруси, окремі їхні компоненти);

К24. 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).

ВИДІЛЕННЯ ЗАГАЛЬНОЇ ДНК ІЗ КЛІТИН

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 біосинтезу 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

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.

методів передбачає сорбцію ДНК на гранулах силікагеля в присутності хаотропних речовин, 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.

Виділення ДНК із бактерій

Виділення загальної або тотальної ДНК із клітин бактерій за використання 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 ПАВ. 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,

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

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 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-трансліюмінатор, 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.

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

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 воді⁴. 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

⁴ 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.

Розчини

- 5М NaCl. Розчинити 292,5 в воді, довівши об'єм до 1 л.
- 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 білків⁵.

2. Якщо концентрація ДНК низька, то потрібно додати будь-який співосаджувач, наприклад глікоген, до кінцевої концентрації 50 мкг/мл⁶.

3. Додати до розчину ДНК 2,5 об'єми холодного 96% етанолу⁷, 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 ДНК⁸.

⁵ 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.

⁶ Робочі концентрації інших співосаджувачів: тРНК – 5-10 мкг/мл, лінійний поліакриламід – 10-20 мкг/мл.

⁷ 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 MgCl₂ до кінцевої концентрації 10 мМ.

⁸ 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

5. Центрифугувати при максимальній швидкості мікроцентрифуги протягом 10 хвилин. (Препарати ДНК з низькою концентрацією осаджують протягом 1-2 годин у високошвидкісній центрифугі з охолодженням при швидкості 27000 об / хв і постійній температурі +4°C).

6. Промити осад ДНК холодним 70%-ним етанолом⁹. 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.

при + 4°C, а не час знаходження ДНК «під спиртом» або низька температура інкубації, аж до - 70°C.

⁹ 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.

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.

Спектрофотометричне визначення концентрації ДНК

Нижня межа концентрації ДНК, яку можна визначити спектрофотометрично, становить 0,1 мкг / мл. На визначення зазвичай 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 невідомої концентрацією, спектрофотометр, зразок ДНК будь-якого походження з відомою концентрацією.

Розчини

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

Методика

1. Взяти мікропіпеткою на аналіз 1 мкл зразка отриманої ДНК і розбавити препарат, додавши 130 мкл буфера ТЕ, що містить 100мМ NaCl¹⁰. Об'єм зразка роблять рівним 130 мкл, щоб кривизна поверхні рідини не впливала на вимірювання.

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

¹⁰ Для розчинення ДНК (РНК) можна використовувати інші низькосольові буфери, але тільки не воду. Наприклад, розчини 100мМ NaCl, 20мМ Na₃PO₄, 10-100мМ Tris-HCl (рН 7,5-9,0) або 100мМ K₂HPO₄ (рН 8,2) дають подібні результати. Вимірювання у воді призводять до суттєвих відхилень. Помилка вимірювання може становити до 14% і відношення A₂₆₀ / A₂₈₀ виявляється заниженим

3. Виміряти поглинання A_{260} . Значення повинно знаходитися в межах 0,005-2,5¹¹. В іншому випадку потрібно розбавляти або концентрувати ДНК¹².

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

Таблиця 1

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 ¹³	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 $A_{260} / A_{280} = 1,9-2,0$ ¹⁴.

¹¹ 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

¹² Концентрують ДНК шляхом її переосадження спиртом

¹³ Для олігонуклеотидів, поглинання яких відчутно залежить від їх складу, існують спеціальні розрахунки

¹⁴ Ці значення достовірні, якщо вимір проводиться в буферному розчині (наприклад, TE) при нейтральному значенні рН

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 інтеркаліюють 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 100000 пар основ. Для визначення розміру фрагментів використовують маркери молекулярної ваги (DNA Ladder), які наносять в сусідні лунки гелю.

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.

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).

Таблиця 2

Залежність ефективності розділення фрагментів ДНК від кількості агарози в гелі

Концентрація агарози в гелі, %	Межі ефективного розділення молекул ДНК, kb
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-4
2,0	0,1-3

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.

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.

Трис-ацетатний буфер (ТАЕ¹⁵) – буферний розчин, що містить трис, оцтову кислоту і ЕДТА (етилендіамінтетраоцтової кислоти).

Таблиця 3

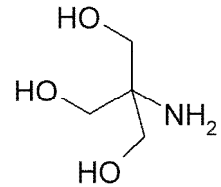
Компоненти для приготування 50-кратного ТАЕ буфера

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

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

¹⁵ 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

Тріс (англ. Tris, ТНАМ) – скорочена назва хімічної сполуки тріс (гідроксиметил) амінометана (НОСН₂)₃СН₂. 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 розплав¹⁶.

4. Встановити гребінку ≈ 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.

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 фореа в буфер

¹⁶ 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.

додають спеціальні барвники. 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.

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).

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 плазмід, кільцева з одноланцюговим розривом і лінійна форма плазмід 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 ваги (комерційний препарат) або ДНК фага λ , рестрикована *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 покрив 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 ваги 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.

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 праймерів¹⁷).

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:

¹⁷ 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, нуклеотиди сайту впізнавання певної рестриктази. Компанія прийме замовлення і на сіквенс отриманого ПЛР-продукту: праймер для його секвенування вже є.

$T_d = 95^\circ\text{C}$, 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 Микільського (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 MgCl_2 – 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 добування ланцюгів) та вивести на $+4^{\circ}\text{C}$ – 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 (розмір амплікону 911 п.н.). При Real-Time PCR форез не проводять, за процесом стежать за флуоресценцією.

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 ($\lambda_{\text{max}} = 595$ 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 $-\text{CO}-\text{NH}-$ 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% $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ в 1% цитраті Na.

- 50% трихлороцтова кислота (ТХУ). Зберігати у темряві під тягою.

- Реактив Фоліна. Приготування реактиву на 1 л: 100 г $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ та 25 г $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 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.

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 акриламідів в присутності N,N'-метилен-біс-акриламідів, 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 акриламідів в 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% акриламідів. 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 Леммлі (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 поліакриламідів від 2 до 8% та значення рН 6,8. Розділюючий гель має концентрацію поліакриламідів 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

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

SDS додавати останнім після доведення рН

2. Розчин АА /бісАА

АА (акриламід) – 30,0 г

бісАА (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

рН 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 скла 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 ячейки, щоб уникнути протікання гелевого розчину.

Заливка гелю

1. Для приготування розділяючого гелю змішати компоненти¹⁸ (за винятком ТЕМЕД та ПСА) відповідно до даних, наведених у табл. 4 (для різних об'ємів!). Отриману суміш ретельно перемішати¹⁹.

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>

¹⁸ Готовий стоковий розчин для гелю потрібної концентрації без ТЕМЕД та ПСА можна зберігати в холодильнику близько року. Акриламід токсичний, працювати у рукавичках!

¹⁹ 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.

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 хв²⁰. Зручно відлити трохи залишків гелевого розчину в 1,7 мл пробірку і використовувати цей розчин як індикатор полімеризації.

²⁰ Готові гелі можна зберігати в холодильнику в обгорнутому вигляді, не виймаючи гребінки. Однак, розділяючий і концентруючий гелі мають різні буфери, тому краще залитий гель використовувати відразу.

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.

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 скла²¹, 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.

²¹ Для надання склу гідрофобних властивостей для кращого відділення гелю їх часто попередньо силіконують з використанням bind-silane і repel-silane.

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.

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 HCl.
2. Додати воду, добре промити, злити воду.
3. Помістити гель у розчин кумасі для фарбування²² на 1-1,5 год.
4. Злити розчин кумасі і залити відмиваючий розчин I²³ 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.

²² 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.

²³ Як альтернатива: гель заливають холодною водою (200-300 мл), и кип'ятять ~5'.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Великов В. А. Молекулярная биология. Практическое руководство: Учеб. пособие для студ. биол. фак. и фак. нано- и биомед. технол., обуч-ся по напр. «Биология (020400)», «Биология-пед (050100)», «Биотехнические системы и технологии (200100)», «Медицинская физика (011200)» и по спец. «Биоинженерия и биоинформатика (020501)». Саратов : Издательство «Саратовский источник», 2013. 84 с.
2. 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.
3. Практикум по молекулярной биологии / Коничев А. С., Цветков И. Л., Попов А. П. [и др.]. Москва : КолосС, 2012. 151 с.
4. Сиволоб А. В. Молекулярна біологія : підручник. Київ : Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2008. 384 с.

Навчальне видання

ОСНОВИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ

Методичні рекомендації для виконання лабораторних робіт
для здобувачів вищої освіти освітнього ступеня «Молодший бакалавр»
початкового рівня (короткий цикл)
спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
денної форми навчання

Укладачі:

Горбатенко Ігор Юрійович
Луговий Сергій Іванович

Підписано до друку 24.12.2021 р. Формат 60×84/16. Папір офсетн.
Гарнітура Times New Roman.

Друк офс. Умовн. друк. арк. 2,5. Облік видавн. арк. 2,5
Умов. фарбовід. 0,9. Зам. № 612, тир. 20.

Надруковано у видавничому відділі
Миколаївського національного аграрного університету
54020, м. Миколаїв, вул. Георгія Гонгадзе, 9

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