

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

**ПРАКТИКУМ
ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКЕ
И БИОИНЖЕНЕРИИ**

Учебно-методическое пособие для вузов

Составители:
М.Ю. Сыромятников,
О.С. Машкина,
В.Н. Попов

Воронеж
Издательский дом ВГУ
2016

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ТЕМА 1. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК и РНК	6
1.1 Выделение ДНК.....	6
1.2 Выделение РНК	8
ТЕМА 2. РЕАКЦИЯ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ. ПРОВЕДЕНИЕ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ С ОЛИГО-D(T) ПРАЙМЕРАМИ	13
ТЕМА 3. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ ДНК и РНК.....	20
ТЕМА 4. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ МЕТОДА ПЦР. ПОСТАНОВКА ПОЛЕМЕРАЗНО-ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ.....	23
ТЕМА 5. ЭЛЛЮЦИЯ ДНК ИЗ ГЕЛЯ	28
5.1 Электроэллюция	29
5.2 Химическая эллюция	30
ТЕМА 6. ЛИГИРОВАНИЕ ВЫДЕЛЕННОГО ФРАГМЕНТА В ВЕКТОР pAL-TA	32
ТЕМА 7. ТРАНСФОРМАЦИЯ БАКТЕРИЙ <i>E. coli</i> ЛИГАЗНОЙ СМЕСЬЮ	40
ТЕМА 8. СКРИНИНГ ВЫРОСШИХ КОЛОНИЙ И ОТБОР ТРАНСФОРМАНТОВ	44
8.1 Бело-голубой скрининг трансформантов	45
8.2 Скрининг трансформантов с помощью ПЦР с колоний	46
ТЕМА 9. ВЫДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК.....	50
РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА.....	54

ТЕМА 1. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК и РНК.

1.1. Выделение ДНК

Цель занятия: Ознакомление с методикой выделения ДНК СТАВ методом.

Основные теоретические положения: ДНК может быть выделена из любого типа тканей и клеток, содержащих ядра, митохондрии и хлоропласты. Этапы выделения ДНК включают быстрый лизис клеток, удаление фрагментов клеточных органелл и мембран с помощью центрифугирования, ферментативное разрушение белков протеазами и экстрагирование ДНК из раствора с помощью органических растворителей. Затем ДНК осаждают и удаляют надосадочную жидкость и растворяют в буферном растворе. Оценку качества экстрагированной ДНК проводят на основании измерения оптической плотности раствора ДНК в области белкового и нуклеинового спектров поглощения (280-260 нм).

ДНК состоит из двух цепей, ориентированных азотистыми основаниями друг к другу. Азотистые основания одной из цепей соединены с азотистыми основаниями другой цепи водородными связями согласно принципу комплементарности: аденин соединяется только с тиминном, гуанин — только с цитозином. Эта двухцепочечная молекула спирализована.

СТАВ-буфер позволяет разделить ДНК и полисахариды, поскольку они отличаются по растворимости, в присутствии этого поверхностно-активного вещества. При высоких концентрациях солей нуклеиновые кислоты образуют стабильные, но вместе с тем растворимые комплексы со СТАВ. При снижении концентрации соли ниже 0,4 М NaCl происходит выпадение в осадок комплексов СТАВ/нуклеиновая кислота, тогда как большая часть полисахаридов остаётся в растворе. Осадок снова растворяют в высокосолевым растворе 1М NaCl и высаживают ДНК спиртом.

Оборудование: центрифуга, дозаторы.

Материалы: микроцентрифужные пробирки на 1,5 и 2 мл, наконечники для дозаторов на 10, 200 и 1000 мкл.

Реактивы: 2-3% СТАВ, хлороформ, изоамиловый спирт, изопропанол, μ Q-вода.

Ход работы:

1. Образец ткани (100-200 мг) растереть в стерильной ступке с 1 мл. подогретого до 65 °С СТАВ-буфера.
 2. Полученный гомогенат перенести в эппендорф на 2 мл, инкубировать 2-3 при 65 °С.
 3. Остудить пробирку при комнатной температуре.
 4. Добавить равный объем смеси хлороформ-изоамиловый спирт в пропорции 24:1 и перемешать (2-3 мин).
 5. Центрифугировать 5 мин при 13 000 g.
 6. Супернатант перенести в чистую пробирку на 1,5 мл
- Замечание 1. Важно не задевать среднюю и нижнюю фазы.*
7. Добавить 0,7 от объема холодного изопропанола и перемешать.
 8. Центрифугировать 5 мин. при 21 000 g.
 9. Отобрать супернатант.
 10. Осадок промыть этанолом дважды.
 11. Тщательно удалить остатки спирта, подсушить пробирку на воздухе до полного высыхания, но не пересушивая.
 12. Осадок ДНК растворить в μ Q-воде. Проверить чистоту препарата на гель-электрофорезе (рис. 1).

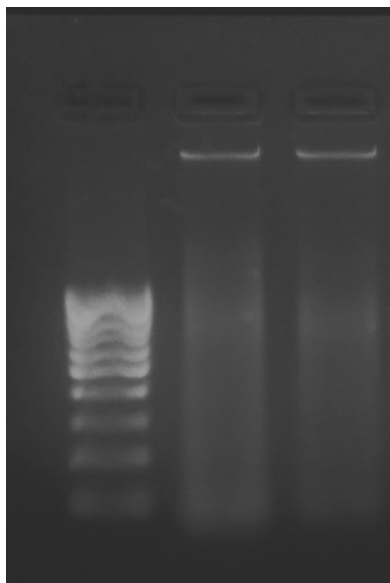


Рис. 1. Электрофорез изолированной ДНК

2.2 Выделение РНК

Цель занятия: Ознакомление с методикой выделения РНК коммерческим набором «ExtractRNA» (Евроген, Россия).

Основные теоретические положения:

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

Гуанидин тиоцианат-фенол-хлороформная экстракция РНК – один из наиболее часто используемых методов для выделения суммарной РНК из различных биологических объектов. На его основе разработан ряд реагентов и наборов для выделения суммарной РНК, в том числе реагент ExtractRNA.

Для выделения РНК лучше использовать свежие ткани. Однако если это невозможно, выделение РНК производится из зафиксированного материала. Для фиксации тканей используют следующие подходы: заморозка в жидком азоте с последующим хранением при -70°C ,

фиксация 80% этиловым спиртом или специальными фиксаторами для РНК.

Выделение тотальной РНК из биологического материала включает несколько этапов: первоначальное проведение лизиса клеток, затем удаление белковой фракции клеточного лизата и отделение фракции тотальной РНК от фракции геномной ДНК. Эффективное разрушение клеток и гомогенизация биологического образца является абсолютно необходимым этапом во всех методиках очистки РНК. Гомогенизацию проводят в лизирующем буфере, который содержит гуанидин тиоцианат, ингибирующий клеточные РНКазы.

ExtractRNA – монофазный водный раствор фенола и гуанидин-изотиоцианата, предназначенный для быстрого выделения суммарной РНК высокого качества из широкого круга объектов: животные и растительные ткани, культуры клеток млекопитающих, бактерии, дрожжи. Добавленный к образцу реагент моментально лизирует клетки, при этом целостность РНК сохраняется за счет высокоэффективного ингибирования активности РНКаз. Раствор после добавления хлороформа и центрифугирования разделяется на водную фазу, интерфазу и органическую фазу, при этом РНК, ДНК и белки оказываются в разных фазах. Общая РНК, выделенная с помощью реагента ExtractRNA, может быть использована для синтеза кДНК, ОТ-ПЦР, Нозерн блота, *in vitro* трансляции, выделения поли (А)+ фракции и других приложений.

Оборудование: центрифуга, дозаторы, центрифуга с охлаждением, настольный термостат.

Материалы: микроцентрифужные пробирки на 1,5 и 2 мл, наконечники для дозаторов на 10, 200 и 1000 мкл.

Реактивы: хлороформ, изопропиловый спирт, 80% этиловый спирт, реагент ExtractRNA, вода, свободная от РНКаз (не рекомендуется использовать диэтилпиروкарбонат (DEPC) для обработки воды и других компонентов), стерильные микроцентрифужные пробирки (1,5-2 мл).

Ход работы:

Замечание 1. При работах с РНК следует учитывать, что РНК по сравнению с ДНК гораздо более лабильна и чувствительна к действию нуклеаз. РНКазы, в отличие от ДНКаз, менее чувствительны к действию препаратов, денатурирующих белки. В связи с этим для выделения полноразмерных молекул РНК уже на первых этапах процедуры выделения тотальной РНК, одновременно с лизисом клеток, при необходимости рекомендуется осуществить инактивацию внутриклеточных РНКаз.

1. Гомогенизировать образец в растворе ExtractRNA так, чтобы объём реагента в 10 раз превышал объём образца.

Замечание 2. Реагент ExtractRNA содержит фенол (токсичное и раздражающее вещество) и гуанидин-изотиоцианат (раздражающее вещество), при попадании на кожу вызывает ожоги. Не допускайте попадания реагента на кожу или слизистые оболочки, а также вдыхания его паров! При работе с реагентом следует надевать защитные латексные или н/э перчатки, очки и халат, проводить все операции в вытяжном шкафу. При попадании на кожу рук или слизистые оболочки немедленно обработайте место слабым раствором соды и промойте большим количеством проточной воды не менее 15 минут.

2. Инкубировать лизат при комнатной температуре в течение 10-15 мин, чтобы произошла полная диссоциация нуклеопротеидных комплексов.

3. Центрифугировать лизат при 12 000 - 15 000 g в течение 10 минут для удаления нерастворенных фрагментов. Супернатант перелить в новую пробирку.

Замечание 3. На поверхности лизата богатых жиром образцов может образоваться жировая плёнка. При отборе супернатанта следует избегать попадания верхнего жирового слоя в новую пробирку.