

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Тульский государственный университет»

Естественнонаучный институт
Кафедра «Биотехнологий»

Утверждено на заседании кафедры
«Биотехнологий»
«18» января 2022г., протокол № 6

Заведующий кафедрой


О.Н. Пономарева

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
по выполнению лабораторных работ
по дисциплине (модулю)
«Генетические методы биотехнологии защиты окружающей среды»

основной профессиональной образовательной программы
высшего образования – программы магистратуры

по направлению подготовки
04.04.01 Химия

с направленностью (профилем)
Химия окружающей среды, химическая экспертиза и
экологическая безопасность

Форма обучения: *очная*

Идентификационный номер образовательной программы: 040401-01-22

Тула 2022 год

Разработчик(и) методических указаний

Акатова Е.В., доцент, к.б.н.

(ФИО, должность, ученая степень, ученое звание)



(подпись)

Содержание

ВВЕДЕНИЕ	4
ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ	5
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №1	
УСТРОЙСТВО БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ. ПРАВИЛА РАБОТЫ И ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ	6
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2	
ВЫДЕЛЕНИЕ ТОТАЛЬНОЙ ДНК ИЗ МИКРООРГАНИЗМОВ-ДЕСТРУКТОРОВ ТОКСИКАНТОВ	8
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3	
ВЫДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМИД БИОДЕГРАДАЦИИ ИЗ МИКРООРГАНИЗМОВ-ДЕСТРУКТОРОВ ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИХ АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ	9
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4	
ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ПРЕПАРАТОВ ПЛАЗМИДНОЙ И ТОТАЛЬНОЙ ДНК МИКРООРГАНИЗМОВ-ДЕСТРУКТОРОВ ПАУ. ЭЛЕКТОРОФОРЕЗ В АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ	12
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №5	
ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТЕЙ ФЕРМЕНТОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В ДЕГРАДАЦИИ НАФТАЛИНА	17
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6	
КОНЪЮГАЦИЯ БАКТЕРИЙ КАК ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ШТАММОВ ДЛЯ БИОДЕГРАДАЦИИ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ	21
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 7	
ЭЛИМИНАЦИЯ ПЛАЗМИД НА ПРИМЕРЕ ПЛАЗМИД МИКРООРГАНИЗМОВ-ДЕСТРУКТОРОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В БИОДЕГРАДАЦИИ ТОКСИКАНТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ	31
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 8	
ИНДУКЦИЯ МУТАЦИЙ ПОД ДЕЙСТВИЕМ УФ КАК МЕТОД НАПРАВЛЕННОГО МУТАГЕНЕЗА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ-ДЕСТРУКТОРОВ ТОКСИКАНТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ	36
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 9	
ИНДУКЦИЯ МУТАЦИЙ НИТРОЗОГУАНИДИНОМ КАК МЕТОД СОЗДАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ-ДЕСТРУКТОРОВ ТОКСИКАНТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ	39
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 10	
ПЕРЕНОС ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ У БАКТЕРИЙ МЕТОДОМ ТРАНСФОРМАЦИИ	43

ВВЕДЕНИЕ

Целью лабораторного практикума является закрепление на экспериментальном уровне знаний теоретического курса, приобретение практических навыков.

При подготовке к очередной лабораторной работе студенты должны:

- Изучить теоретический материал по теме работы;
- Подготовить протокол работы в лабораторном журнале, внося номер и название работы, ее цель, краткие теоретические сведения, краткое описание последовательности работы.

К защите работы предъявляется полностью оформленный лабораторный журнал, включающий, помимо выше описанного, полученные экспериментальные данные и выводы по работе.

Защита лабораторных работ проводится в форме беседы. Для защиты работы студенты должны:

- Знать теоретические основы по темам лабораторных работ;
- Представлять микробиологические и молекулярные принципы, на которых основана лабораторная работа;
- Объяснить выбор параметров процесса и их влияние на результаты опытов;

Для контроля усвоения студентами материала предусмотрено: 2 контрольные работы и доклад по изучению научных статей.

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ

Лабораторная работа № _____

- Название лабораторной работы
- Цель работы
- Оборудование и материалы
- Проведение работы
- Результаты работы
- Выводы
- Ответы на контрольные вопросы

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №1

УСТРОЙСТВО БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ. ПРАВИЛА РАБОТЫ И ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

Цель: Познакомиться с устройством биотехнологической лаборатории, основным оборудованием, правилами работы.

Основные положения.

Биологические процессы имеют свою специфику. Они осуществляются с использованием различных биологических систем, включая как живые организмы (микроорганизмы или клетки животных и растений), так и их компоненты (ферменты, их комплексы и др.). При этом биотехнологи используют, как правило, чистые культуры микроорганизмов (т.е. культуры, содержащие микроорганизмы одного вида), а принцип асептики любого биотехнологического процесса является одним из основных. В связи с требованием чистоты используемых культур и соблюдение условий стерильности в работе в значительной степени определяет специфику устройства биотехнологической лаборатории и правила работы биотехнолога.

Биотехнологическая лаборатория должна включать ряд помещений. Основная лабораторная комната должна быть просторной и светлой. Естественное освещение должно составлять не менее 110 лк. Пол и поверхность всех рабочих столов покрывают легко моющимся материалом. Стены на высоту не менее 170 см. окрашивают в светлые тона или облицовывают плиткой. Лабораторные столы должны иметь подводку электроэнергии и быть снабжены газовыми горелками. Помещение должно быть оборудовано шкафами и полками для хранения аппаратуры, посуды и реактивов. Кроме основного рабочего помещения лаборатория должна иметь стерилизационную, термостатированную комнату, холодильную комнату, моечную и др. В стерилизационной размещают автоклавы и сушильные шкафы. В термостатированной комнате выращивают микроорганизмы, а также культуры клеток растений и животных. В некоторых лабораториях из-за недостатка площадей используют термостаты различного типа для культивирования микроорганизмов и климатические камеры для культур клеток. Вместо холодной комнаты используют холодильник и морозильную камеру. Работу с микроорганизмами и культурами клеток осуществляют в боксах различных конструкций от изолированных помещений до настольных камер (ламинаров).

При работе в лаборатории микробиологии студент должен соблюдать следующие правила:

1. Каждый студент должен работать на постоянном месте.
2. Рабочее место должно быть свободно от лишних предметов (сумок, портфелей).

Во время работы с горелкой или спиртовкой рядом не должно находиться легко воспламеняющихся материалов.

3. Работа выполняется в чистом халате. Длинные волосы должны быть собраны во избежание попадания в пламя.
4. Посуда в которой производится посев и культивирование микроорганизмов должна быть подписана (дата посева, культура, группа или студент, производивший посев).
5. Предметы, которые использовались для работы с живыми культурами, должны быть обеззаражены либо обжиганием в пламени горелки, либо выдерживанием в дезинфицирующем растворе (пипетки, шпатели, микробиологические иглы и петли, покрывные и предметные стекла).
6. Все засеянные чашки Петри, пробирки помещаются в термостат или сдаются лаборанту.
7. Обработанный материал помещается в автоклав для обеззараживания.
8. В лаборатории строго запрещается прием пищи.
9. По окончании занятия студент приводит в порядок рабочее место.

Задание.

1. Познакомиться с правилами работы в биотехнологической лаборатории, отметить в журнале инструктажа по технике безопасности в лаборатории.
2. Познакомиться с устройством биотехнологической лаборатории, выделить основные зоны: рабочую зону, стерилизационную, термостатированную, холодную, моечную.
3. Познакомиться с основным оборудованием лаборатории, сделать описание в лабораторной тетради.

Контрольные вопросы

1. В чем заключается основной принцип любого микробиологического процесса?
2. Что определяет специфику устройства микробиологической лаборатории и правила работы микробиолога?
3. Какие помещения должна включать микробиологическая лаборатория?
4. Какие требования предъявляют к основной лаборатории?
5. Что размещают и для чего предназначены холодная, термостатированная и стерилизационная комнаты?
6. Что такое бокс?
7. Какой специфической посудой пользуются микробиологи?
8. Перечислите основные правила работы в лаборатории микробиологии.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2 ВЫДЕЛЕНИЕ ТОТАЛЬНОЙ ДНК ИЗ МИКРООРГАНИЗМОВ- ДЕСТРУКТОРОВ ТОКСИКАНТОВ

Цель Выделение тотальной ДНК из штаммов деструкторов нафталина и капролактама

Основные положения

Процедура выделения ДНК из клеток часто является исходным этапом в молекулярно-биологических исследованиях. Среди множества известных методов выделения ДНК на практике используют наиболее надежные и воспроизводимые. Клетку необходимо разрушить тем или иным способом, а высвободившиеся нуклеиновые кислоты очистить от других клеточных компонентов. При этом важно защитить ДНК от действия клеточных нуклеаз и попытаться максимально сохранить ее целостность.

Плазматическая мембрана клетки разрушается действием детергента додецилсульфата натрия (SDS) или лизоцима. Белки денатурируют и удаляют из бактериального лизата путем обработки фенолом. Низкомолекулярные вещества теряются при высаживании ДНК из раствора этанолом. Добавление хелатирующего реагента – этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) к полученному препарату ДНК предотвращает воздействие клеточных нуклеаз на нуклеиновые кислоты за счет связывания двухвалентных катионов Mg^{2+} .

Выделение тотальной ДНК из 1,5 мл культуры бактериальных клеток

Материалы и оборудование

Орбитальная термостатируемая качалка, микроцентрифуга, миксер, автоматические пипетки

Растворы

Растворы №1: 50мМ EDTA pH=8.0 с лизоцимом (5-10 мг/мл)

Растворы №2: фенол насыщенный 1М трисHCl pH=8.0

Растворы №3: хлороформ

TE: 10мМ трисHCl, 1мМ EDTA pH=8.0

Методика

1. Выращиваем культуру бактериальных клеток в 5 мл соответствующей среды в течение 12-16 часов.
2. В микроцентрифужной пробирке объемом 1.5 или 2 мл осаждаем 1.5 мл культуры при максимальных оборотах (12000 об/мин) на центрифуге типа «Эппендорф» в течение 1 мин.

3. В 500 мкл раствора №1 ресуспендируем пипетированием осадок клеток до равномерной плотности и ставим в термостат (37°C 10 мин).
4. Добавляем к полученной суспензии клеток 200 мкл раствора №2 и интенсивно перемешиваем на миксере.
5. Добавляем 200 мкл раствора №3 и активно перемешиваем на миксере до появления равномерной белой мути
6. Центрифугируем 5 мин при 12000 об/мин.
7. Отбираем 500 мкл супернатанта в новую пробирку
8. Добавляем 200 мкл раствора №2 и интенсивно перемешиваем на миксере до появления равномерной белой мути.
9. Добавляем 200 мкл раствора №3 и тщательно перемешиваем на вортексе до появления равномерной белой мути
10. Центрифугируем 5 мин.
11. Отбираем 400 мкл супернатанта в новую пробирку
12. Добавляем 400 мкл изопропанола, перемешиваем на миксере
13. Центрифугируем 5 мин, затем тщательно сливаем супернатант
14. Осадок ресуспендируем в 100 мкл буфера TE
15. Наносим на агарозный гель 5-10 мкл препарата с краской для нанесения

Контрольные вопросы

1. ***В чем принципиальные различия в выделении плазмидной и тотальной ДНК?***
2. ***Зачем в процессе выделения тотальной ДНК добавляют изопропанол?***
3. ***Кратко опишите другие методы выделения тотальной ДНК?***

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3 ВЫДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМИД БИОДЕГРАДАЦИИ ИЗ МИКРООРГАНИЗМОВ-ДЕСТРУКТОРОВ ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИХ АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ

Цель Выделить плазмидную ДНК из штаммов-деструкторов нафталина и капролактама.

Основные положения

Для выделения плазмидной ДНК пользуются многими методами. Все они включают три основных этапа: рост бактерий и амплификацию плазмиды; сбор бактерий и их лизис; очистку плазмидной ДНК.

В методах очистки так или иначе используют два основных различия между хромосомной ДНК и плазмидной ДНК: 1) хромосома по размеру много больше ДНК плазмид 2) основная масса хромосомной ДНК выделяется из клеток в виде фрагментированных линейных молекул, тогда

как большинство плазмидной ДНК экстрагируется в виде ковалентно замкнутых кольцевых молекул.

Большинство методов очистки включают осаждения, при которых из препарата удаляются преимущественно длинные цепи хромосомной ДНК, случайно захваченные обломками лизированных клеток. Методики основаны также на использовании свойств кольцевой замкнутой ДНК. Каждая из комплементарных цепей плазмидной ДНК представляет собой ковалентно замкнутое кольцо, поэтому цепи нельзя отделить друг от друга (не разорвав одну из них) в тех условиях, при которых происходит разрыв большинства водородных связей в хромосомной ДНК, например при нагревании или при выдерживании в умеренно щелочных растворах (до pH 12,5). При охлаждении или возвращении к нейтральному pH замкнутые кольцевые молекулы вновь принимают нативную конформацию, тогда как хромосомная ДНК остается денатурированной.

Плазмидная ДНК ведет себя отлично от хромосомной ДНК также и при равновесном центрифугировании в градиентах растворов хлористого цезия, содержащих какой-нибудь интеркалирующий (встраивающийся между нуклеотидами) краситель в насыщающей концентрации, например бромистый этидий или дейодистый пропидий. Ковалентно замкнутые кольцевые ДНК связывают меньше такого красителя, чем линейная ДНК, и потому в градиентах хлористого цезия, содержащих интеркалирующий агент, оказываются в зонах с более высокой плотностью. Эту методику используют, если необходима высокая степень очистки плазмидной ДНК. Однако по мере развития методов работы с рекомбинантными ДНК для многих целей оказалось уже необязательным проводить очистку больших количеств плазмидной ДНК до такой степени, чтобы препарат был гомогенным. Например, расщепление рестриктирующими эндонуклеазами, лигирование, трансформация и даже секвенирование ДНК можно проводить теперь, используя относительно малоочищенные препараты плазмидной ДНК, полученные из небольших объемов культуры (около 10 мл). Плазмидную ДНК выделяют из больших объемов культуры лишь в тех случаях, когда нужны значительные ее количества (например, в опытах по гибридизации для отбора специфических мРНК или когда нужно пометить 5'-концы фрагментов ДНК с помощью полинуклеотидкиназы).

Вообще говоря, чем меньше плазида, тем лучше достигаемые результаты. С увеличением молекулярной массы плазмиды ее свойства становятся все ближе к свойствам ДНК хозяина. Выделение плазмид, размер которых превышает 25 т.п.н., сильно затрудняется и выход оказывается невысоким.

Выделение малоконпийной плазмидной ДНК (размером до 250 т.п.н.)

из 50 мл труднолизиремых бактериальных культур

Материалы и оборудование

Орбитальная термостатируемая качалка, центрифуга для больших объемов, весы для уравнивания, микроцентрифуга, миксер, автоматические пипетки

РАСТВОРЫ

Отмывочный раствор: 50мМ EDTA pH8, 1М NaCl, (0.02% деоксихолат, 0.05% лаурил саркозин)

Растворы №1: 50мМ EDTA pH8 с лизоцимом (5-10 мг/мл)

Растворы №2: 1% SDS, 0.2М NaOH

Растворы №3: 3М ацетат калия pH4.8 (охлажденный в холодильнике)

Растворы №4: фенол насыщенный 1М трисHCl pH=8.0

Растворы №5: хлороформ

Растворы №6: 10мМ трисHCl, 1мМ EDTA pH=8.0 (TE)

Методика

1. Выращиваем культуру клеток в 50 мл подходящей среды в течение 12-16 часов.
2. Осаждаем 50 мл культуры в 50 мл центрифужной пробирке на центрифуге в течение 10 мин при 10 000 об/мин (угловой ротор) при температуре 4-10°C
3. (Осадок замораживаем/оттаиваем с -20°C на +37°C)
4. В оттаявший осадок добавляем 20 мл отмывочного раствора и тщательно ресуспендируем на миксере
5. Центрифугируем 10 мин 10 000 об/мин, сливаем супернатант.
6. Осадок тщательно ресуспендируем в 3 мл р-ра №1
7. Выдерживаем в термостате при 37°C 10-15 мин
8. Добавляем 3 мл р-ра №2, аккуратно (осторожно) перемешиваем и выдерживаем в термостате при 37°C 10-15 мин (до полного лизиса клеток, раствор должен стать совершенно прозрачным)
9. Добавляем 3 мл р-ра №3, аккуратно (осторожно) перемешиваем до тех пор, пока не образуется занимающий почти весь объем раствора белый комочек, состоящий из хромосомной ДНК и белков. Ставим охлаждаться на лед на 15 мин
10. Центрифугируем 20 мин 10 000 об/мин. Должен образоваться плотный белый осадок
11. Супернатант через двойную марлю сливаем в новую 50 мл пробирку.
12. Затем добавляем 5 мл хлороформа и тщательно перемешиваем на миксере
13. Центрифугируем 20 мин.
14. 8 мл верхней водной фазы (с помощью обрезанного синего носика) аккуратно (стараясь не захватить интерфазу) отбираем в новую пробирку и добавляем туда 6 мл изопропанола. Тщательно перемешиваем и ставим на лед на 5 мин.
15. Центрифугируем 20 мин.
16. Выливаем супернатант, отбираем оставшуюся водную фазу, осадок подсушиваем.

- 17.Осадок тщательно ресуспендируем в 500 мкл ТЕ, переносим в микропробирку типа «эппендорф».
- 18.Добавляем 250 мкл фенола, перемешиваем на миксере, затем добавляем 250 мкл хлороформа и тщательно перемешиваем на миксере до образования равномерной белой мути.
- 19.Центрифугируем 5 мин.
- 20.Супернатант отбираем в новую микропробирку, добавляем 50 мкл р-ра №3 и равный объём изопропанола (или двойной объём этанола).
- 21.Центрифугируем 5 мин.
- 22.Осадок промываем 70% спиртом и ресуспендируем в 50 мкл ТЕ.
- 23.Наносим на агарозный гель 5-10 мкл препарата с краской для нанесения.

Контрольные вопросы

1. *Что такое плазмиды?*
- 2 *В чем различия плазмидной ДНК и хромосомной?*
3. *Для чего используют NaCl в отмывочном растворе?*
4. *Каков принцип действия растворов №1, 2 и 3?*

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4 ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ПРЕПАРАТОВ ПЛАЗМИДНОЙ И ТОТАЛЬНОЙ ДНК МИКРООРГАНИЗМОВ-ДЕСТРУКТОРОВ ПАУ. ЭЛЕКТОРОФОРЕЗ В АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ

Цель Визуализация препаратов плазмидной и тотальной ДНК полученных в предыдущих лабораторных работах

Основные положения

Электрофорез в агарозном геле — стандартный метод, используемый для разделения, идентификации и очистки фрагментов ДНК. С помощью этой простой техники можно быстро разделить такие смеси фрагментов ДНК, которые не могут быть разделены другими способами, например центрифугированием в градиенте плотности. Кроме того, при разделении в геле прямо следят за положением ДНК, так как полосы ДНК в геле можно окрашивать флуоресцирующим и интеркалирующим в ДНК красителем — бромистым этидием в низкой концентрации. Просматривая прокрашенный гель в ультрафиолетовом свете, можно заметить даже 1 нг ДНК.

Скорость миграции ДНК через агарозный гель при электрофорезе определяется пятью главными параметрами, рассмотренными ниже.

Размер молекул ДНК. Молекулы линейной двухцепочечной ДНК перемещаются в геле предположительно одним концом вперед со скоростями, обратно пропорциональными десятичному логарифму их молекулярных масс (Рис. 1).

Концентрация агарозы. Фрагменты ДНК данного размера перемещаются в геле, содержащем разные концентрации агарозы, с разными скоростями. Между логарифмом электрофоретической подвижности ДНК μ и концентрацией геля τ существует прямая зависимость, описываемая уравнением

$$\lg \mu = \lg \mu_0 - K_T \tau,$$

где μ_0 — свободная электрофоретическая подвижность, K_T называется коэффициентом замедления и зависит от свойств геля, а также от величины и формы движущихся молекул.

Таким образом, применяя гели разных концентраций, можно разделить большой набор фрагментов ДНК, различающихся по размеру.

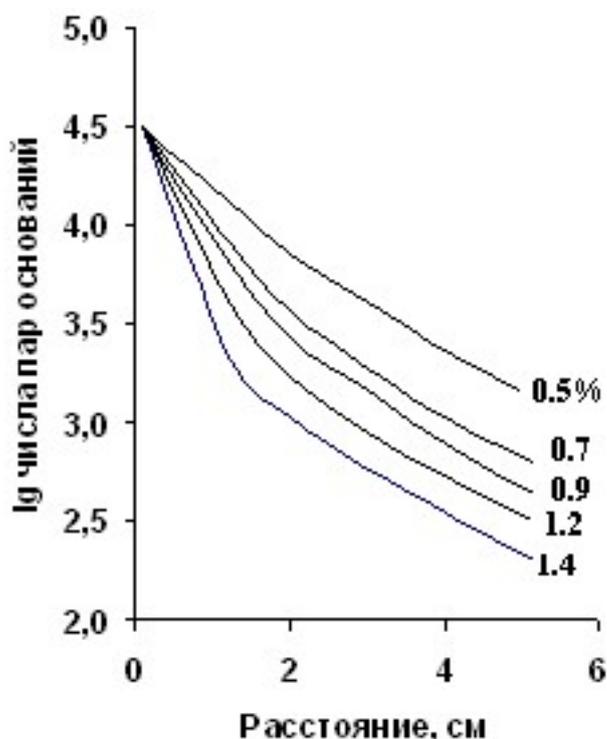


Рис.1. Зависимость скорости движения фрагментов ДНК при электрофорезе в геле от их размеров.

Таблица 1

Зависимость области эффективного разделения линейных молекул ДНК от концентрации агарозы в геле

Количество агарозы в геле, %	Область эффективного разделения линейных молекул ДНК, т.п.н.
0,3	60-5
0,6	20-1
0,7	10-0,8
0,9	7-0,5

1,2	6-0,4
1,5	4-0,2
2,0	3-0,1

Конформация ДНК. ДНК, имеющие одинаковую молекулярную массу, но разные конформации, например кольцевая неповрежденная (форма I), кольцевая с одноцепочечным разрывом (форма II) и линейная (форма III), движутся в агарозном геле с разными скоростями. Относительная подвижность трех указанных форм зависит главным образом от концентрации агарозы в геле, а также и от таких факторов, как сила тока, ионная сила буфера или плотность сверхспиральных витков в форме I. В одних условиях форма I перемещается быстрее, а в других - медленнее, чем форма III. Чтобы однозначно определить конформацию ДНК, необходимо провести ее электрофорез в присутствии возрастающих концентраций бромистого этидия. С увеличением концентрации красителя число его молекул связанных с ДНК растет. При этом отрицательные сверхспиральные витки в молекулах формы I постепенно исчезают, а скорость движения ДНК в геле уменьшается. При некоторой критической концентрации свободных молекул красителя, когда в ДНК больше не остается сверхспиральных витков, скорость движения формы I достигает минимальной величины. Последующее добавление новой порции бромистого этидия приводит к образованию положительных сверхспиральных витков, в результате чего подвижность формы I начинает быстро возрастать. Подвижности формы II и формы III в описанных условиях снижаются, хотя и по-разному, вследствие нейтрализации зарядов и увеличения жесткости молекул ДНК под влиянием бромистого этидия. Для большинства препаратов ДНК, находящейся в форме I, критическая концентрация бромистого этидия находится в области 0,1—0,5 мкг/мл.

Напряженность электрического поля. При низких напряженностях скорость перемещения фрагментов линейной ДНК пропорциональна приложенному напряжению. Однако с увеличением напряженности электрического поля подвижность фрагментов ДНК с высокой молекулярной массой дифференциально возрастает. Следовательно, с увеличением напряженности область эффективного разделения ДНК в агарозном геле снижается. Максимальное разделение фрагментов происходит при напряженности, не превышающей 5В/ см.

Состав оснований и температура. Электрофоретическое поведение ДНК в агарозных гелях (в отличие от поведения в полиакриламидных гелях) слабо зависит от состава оснований ДНК или температуры геля. В агарозных гелях в области температур от 4 до 30 °С изменения относительной электрофоретической подвижности фрагментов ДНК разного размера не наблюдается. Обычно электрофорез в агарозных гелях ведут при комнатной температуре. Однако следует отметить, что гели, содержащие менее 0,5% агарозы, очень мягкие, поэтому с ними лучше работать при 4°С — в этих условиях они становятся более плотными.

Приспособления для проведения электрофореза в геле

За годы, прошедших после изобретения электрофореза в агарозном геле, было предложено множество конструкций электрофорезных аппаратов. В настоящее время чаще всего используют гели в виде горизонтальных пластинок. Эта система имеет по крайней мере четыре преимущества: 1) можно применять низкие концентрации агарозы в связи с тем, что весь гель поддерживается снизу; 2) можно готовить гели в виде пластинок самых разных размеров; 3) хранение и разливка гелей, а также последующие манипуляции с ними достаточно просты; 4) для постановки электрофореза в гелях можно применять прочные и недорогие аппараты.

При проведении электрофореза в горизонтальном геле используются разнообразные кюветы. Большинство из них представляет собой модификации прибора, предложенного Шефнером, в котором гель размещается на отдельной стеклянной пластинке. Пластинку устанавливают на платформе таким образом, что гель находится под самой поверхностью электрофорезного буфера. Сопротивление геля проходящему электрическому току мало отличается от сопротивления буфера, поэтому по гелю проходит значительная доля тока.

Буферы

Для электрофореза обычно применяют буферы, содержащие трис-ацетат, трис-борат или трис-фосфат в концентрации 50 мМ и имеющие рН 7,5—7,8 (Табл. 2). Чаще всего их готовят в виде концентрированных растворов и хранят при комнатной температуре.

Исторически сложилось так, что чаще других используют трис-ацетат, хотя его буферная емкость довольно низка, и при продолжительных электрофорезах он истощается (анод становится щелочным, а катод — кислотным). В связи с этим обстоятельством рекомендуется предусмотреть возможность рециркуляции буфера между катодным и анодным резервуарами.

Таблица 2.

Буферы, используемые при электрофорезе

Буфер	Рабочие растворы	Концентрированные растворы (на 1л)
Трис-ацетат (ТАЕ)	0,04 М трис-ацетат 0,002 М ЭДТА	(50X): 242 г триса, 57,1 мл ледяной уксусной кислоты, 100 мл 0,5 М ЭДТА, рН 8,0
Трис-фосфат (ТРЕ)	0,08 М трис-фосфат 0,008 М ЭДТА	(10X): 108 г триса, 15,5 мл 85%-ной фосфорной кислоты (1,679 мкг/мл), 40 мл 0,5 М ЭДТА, рН

		8,0
Трис-борат (ТБЕ)	0,089 М трис-борат 0,089 М борная кислота, 0,002 М ЭДТА	(5x): 54 г триса, 27,5 г борной кислоты, 20 мл 0,5 М ЭДТА, рН 8,0

Трис-фосфатный и трис-боратный буферы обеспечивают хорошее разделение фрагментов ДНК в равной степени и имеют значительно более высокую буферную емкость, чем трис-ацетатный. Рециркуляция этих буферов необязательна. Дополнительное, хотя и не особенно важное преимущество трис-фосфата состоит в том, что гели, приготовленные на нем, растворимы в хаотропных агентах, таких, как перхлорат натрия или йодид калия. Это свойство лежит в основе метода (теперь мало используемого) выделения фрагментов ДНК из гелей.

Материалы и оборудование

Образец плазмидной ДНК, камера для электрофореза, источник постоянного тока, трансиллюминатор, автоматические пипетки, планшеты

Растворы

Концентрированный трис-боратный буфер (ТБЕ):

трис(оксиметил)аминометан – 108 г/л; борная кислота - 55 г/л; 0,5 М ЭДТА (рН 8) – 40 мл/л реактива

Агарозный гель: агароза для электрофореза – 8 г/л; концентрированный ТБЕ-буфер – 5мл/л; бромистый этидий – 1 г/л

Методика

1. Приготовить агарозный гель (0,8 %), дать ему остыть до 40-50°C, и затем залить гель в планшеты с соответствующей гребенкой.
2. После застывания геля вынуть гребенку.
3. Планшеты поместить в камеру для электрофореза.
4. Залить буфер.
5. Смешать 10 мкл раствора ДНК с 1-2 мкл красителя.
6. Нанести в лунки геля препарат ДНК с краской для нанесения.
7. Электрофорез проводить в 0.5× буфере ТБЕ при напряжении 100 В в течение 0,5 - 4 часов в зависимости от размера ДНК.
8. Вынуть плашку и просмотреть в УФ-свете при 365 нм.
9. Сфотографировать гель цифровой фотокамерой и сохранить.

Контрольные вопросы

1. **Дайте определение понятию «электрофорез», какие виды электрофоретических процессов существуют?**
2. **Как зависит выбор концентрации агарозного геля от размера ДНК?**
3. **Как подбирают условия проведения электрофореза?**

4. Какие бывают конформации ДНК и как их определяют?
5. Какие буферы используют для проведения электрофореза? Каково преимущества каждого из них?
6. Какие красители и используют при проведении электрофореза?
7. Каковы преимущества горизонтальных систем для проведения электрофореза?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №5 ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТЕЙ ФЕРМЕНТОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В ДЕГРАДАЦИИ НАФТАЛИНА

Цель: Определить активность ферментов нафталин деградирующих микроорганизмов

Материалы и оборудование

Штамм-деструктор нафталина *Pseudomonas putida* BS3701 (pBS1141), ультразвуковой дезинтегратор, спектрофотометр, центрифуга, рН-метр, компьютер

Растворы

50мМ KH_2PO_4 рН 7,0 буфер; 50мМ KH_2PO_4 рН 7,5 буфер; 1М трис-НСl рН 8,0 буфер; 20мМ раствор НАДН; 20мМ раствор салицилата натрия; 0,1М раствор катехола; 20мМ спиртовой раствор нафталина; 0,5 М ЭДТА рН 8,0

Основные положения

Определение активностей ферментов проводят в бесклеточных экстрактах. Культуры выращивают на минимальной среде Эванса с нафталином, фенантроном, салицилатом, 1-гидрокси-2-нафтоатом, протокатехатом или сукцинатом, в качестве источника углерода. Бактерии, используемые в экспериментах по изучению индукции ферментов, выращивают в минеральной среде, содержащей 1 г/л сукцината или глутамат натрия. Салицилат и 1-гидрокси-2-нафтоат (в концентрации 0.1 г/л) добавляют в начале экспоненциальной фазы роста клеток, после чего клетки выращивают еще в течение двух часов.

1. Приготовление бесклеточных экстрактов с помощью ультразвукового дезинтегратора

Бактериальные клетки выращивают до логарифмической фазы роста, осаждают центрифугированием (5000 об/мин, 0°C, 10мин), отмывают охлажденным 0,05 М фосфатным буфером рН 7,0 (дважды) и ресуспендируют в этом же буфере до плотности 0,2 ($\lambda=490$ нм, толщина кюветы 1 см). Клетки разрушают на ультразвуковом дезинтеграторе

MSE150 в течение 1,5 минут при 0°C. Обломки клеток удаляют центрифугированием (15000 об/мин, 10 мин, 0°C).

2. Определение активностей ферментов

Супернатант немедленно используют в качестве бесклеточного экстракта для определения активностей ферментов.

В реакционную смесь с конечным объемом 3 мл вносят 100 мкл экстракта. Определение активностей проводят при 30°C, начиная реакцию внесением клеточного экстракта или субстрата, на UV-160A спектрофотометре (Shimadzu, Япония) или UVIKON-спектрофотометре 810P (Kontron Instruments, Германия).

Активность фермента нафталиндиоксигеназы определяют спектрофотометрически по уменьшению экстинкции НАДН реакционной смеси, содержащей 100 мкМ НАДН и 100 мкМ нафталин (спиртовой раствор), бесклеточный экстракт и 0.05 М фосфатный буфер pH 7.5, учитывая эндогенное потребление НАДН бесклеточным экстрактом ($\lambda=340$ нм, $\epsilon=6.220 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Удельную активность фермента выражают в микромолях потребленного НАДН в минуту на мг белка, учитывая эндогенное окисление НАДН.

Активность фермента салицилатгидроксилазы определяют спектрофотометрически по уменьшению экстинкции НАДН реакционной смеси, содержащий 100 мкМ НАДН и 100 мкМ салицилат, бесклеточный экстракт и 0.05 М фосфатный буфер pH 7.5, учитывая эндогенное потребление НАДН бесклеточным экстрактом ($\lambda=340$ нм, $\epsilon=6.220 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ для салицилата). Удельную активность фермента выражают в микромолях потребленного НАДН в минуту на мг белка, учитывая эндогенное окисление НАДН.

Активность катехол-2,3-диоксигеназы определяют по скорости образования α -оксимуконного полуальдегида в реакционной смеси, содержащей 0.5 мМ катехола, бесклеточный экстракт и 0.05 М Трис-HCl буфер [pH 7.5] ($\lambda=375$ нм, $\epsilon=33.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). При высоких скоростях реакции бесклеточный экстракт разводят буфером в 10 раз. При наличии активности катехол 1,2-оксигеназы (K12O) этот фермент инактивируют нагреванием клеток или бесклеточного экстракта при 55°C в течение 10 минут. Удельную активность фермента выражают в микромолях образовавшегося α -оксимуконного полуальдегида в минуту на мг белка.

Активность катехол-1,2-диоксигеназы определяют по скорости образования *цис-цис*-муконата в реакционной смеси, содержащей 5 мМ Na ЭДТА, 1 мМ катехола, бесклеточный экстракт, 0.05 М фосфатный буфер [pH 7.0] ($\lambda=260$ нм, $\epsilon=16.9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Добавление ЭДТА необходимо для ингибирования муконлактонизирующего фермента. Предварительно клетки обрабатывают H₂O₂ (30 мМ) для инактивации катехол 2,3-оксигеназы (K23O). Удельную активность фермента выражают в микромолях превращенного в *цис-цис*-муконат катехола в минуту на мг белка.

Активность гентизат-1,2-диоксигеназы определяют по скорости образования малеил-пирувата в реакционной смеси, содержащей 100 мкМ

гентизат, 3 мкМ сульфат железа (II), бесклеточный экстракт и 0.1 М фосфатный буфер [pH 7.4] до конечного объема 3 мл ($\lambda = 334$ нм, $\epsilon = 10.8$ мМ⁻¹ см⁻¹).

Объем реактивов в кювете для измерения активности ферментов

<i>Нафталиндиоксигеназа</i>	λ 340 нм
50 мМ КН ₂ РО ₄ буфер [pH 7.5]	2900 мкл
бесклеточный экстракт	100 мкл
20 мМ раствор НАДН	15 мкл
20 мМ спиртовой раствор нафталина	15 мкл
<i>Салицилатгидроксилаза</i>	λ 340 нм
50 мМ КН ₂ РО ₄ буфер [pH 7.5]	2900 мкл
бесклеточный экстракт	100 мкл
20 мМ раствор НАДН	15 мкл
20 мМ раствор салицилата натрия	15 мкл
<i>Катехол-1,2-диоксигеназа</i>	λ 260 нм
50 мМ КН ₂ РО ₄ (pH 7,0) буфер	2900 мкл
бесклеточный экстракт	100 мкл
0.5 М ЭДТА	30 мкл
0.1 М раствор катехола	30 мкл
<i>Катехол-2,3-диоксигеназа</i>	λ 375 нм
50 мМ трис-НСl буфер [pH 7,5]*	2900 мкл
бесклеточный экстракт	100 мкл
0.1 М раствор катехола	15 мкл

Прим. * – для приготовления трис-НСl буфера трис(оксиметил)аминометан растворяют в бидистиллированной воде и доводят pH соляной кислотой

4. Определение концентрации белка в бесклеточных экстрактах по методу Бредфорда

Для получения реагента-красителя кумасси бриллиантовый синий G-250 (100 мг) растворяют в 50 мл 95% этанола. Добавляют 100 мл 85% (масса/объем) фосфорной кислоты. Доводят водой до 1 л.

Используют образец (разбавленный в случае необходимости), содержащий 10-100 мкг белка в 0.1 мл. Добавляют 5.0 мл реагента-красителя и хорошо перемешивают. Не ранее, чем через 5 мин, и не позднее, чем через 1 час, измеряют показание оптической плотности при 595 нм относительно чистого реагента. Для микроанализа используют образец, содержащий 1-10 мкг белка в 0.1 мл, добавляют 1.0 мл раствора красителя, смешивают и определяют поглощение при 595 нм, как описано выше. Концентрацию белка находят по градуировочному графику,

построенному с помощью белка (бычий сывороточный альбумин). Могут быть небольшие отклонения от линейности.

5. Определение концентрации белка спектрофотометрически

Метод не так точен, как метод Бредфорда, но очень прост и используется как прикидочный. Используя UV-160А спектрофотометр (Shimadzu, Япония) задаем параметры двух длин волн: 280 и 260 нм. В кювету с 2900 мкл фосфатного буфера вносим 100 мкл бесклеточного экстракта. Контрольная кювета - 3000 мкл фосфатного буфера. Затем по формуле рассчитываем концентрацию белка в мг.

C (мг общего белка /мл) = $(1,55 \times E_{\lambda 280} - 0,76 \times E_{\lambda 260}) \times \text{разведение}$ (30 раз)

6. Расчет активности ферментов

Удельную активность ферментов выражают в микромолях потребленного субстрата (кофактора) (или образующегося продукта (кофактора)) в минуту на 1 мг общего бактериального белка. Значения удельных активностей ферментов рассчитывают, используя компьютерную программу «Enzyme» (ИБФМ, Россия) или стандартную формулу.

Формула для определения активности фермента

$$\frac{\Delta E}{\Delta t} \times \frac{1}{\varepsilon \cdot d} \times \frac{V_1}{V_2} \times 10^3 = \frac{\text{мкМ}}{\text{мин} \cdot \text{л}}$$

ΔE – изменение оптической плотности раствора,

Δt – время измерения (1 мин)

ε – коэффициент экстинции субстрата

d – расстояние, проходимое лучем

V_1 – объем реакционной смеси (3000 мкл)

V_2 – объем клеточного экстракта (100 мкл)

Наиболее принятой единицей активности является стандартная единица (Ед). Под ней понимают то количество фермента, которое катализирует превращение 1 мкМ субстрата в минуту при оптимальных условиях для данного фермента (температура, рН). Существует также понятие *удельной активности*, которая выражается числом единиц активности фермента, приходящихся на 1 мг белка в ферментативном препарате (Ед/мг).

Методика

1. Вырастить культуру микроорганизма (250 мл) в минеральной среде, содержащей нафталин или салицилат в качестве источника углерода, до середины логарифмической фазы роста.
2. Клетки осадить центрифугированием.
3. Клетки дважды отмыть 50 мМ фосфатным буфером рН7.0 от среды.

4. К осадку добавить 1 мл 50 мМ фосфатного буфера, клетки аккуратно ресуспендировать.
5. Разрушить клетки с помощью ультразвукового дезинтегратора.
6. Отделить разрушенные клетки центрифугированием на 10000 g в течение 20 минут.
7. Супернатант (надосадочная жидкость) перенести в чистую пробирку. Поместить пробирку в лед.
8. Измерить активности ферментов на спектрофотометре, как описано выше.
9. Оценить концентрацию белка в бесклеточном экстракте, используя спектрофотометрический метод.
10. Определить концентрацию белка (метод Бредфорда)*
11. Рассчитать удельную активность ферментов.

Примечание

*Чтобы точно оценить концентрацию белка, используя метод Бредфорда, исследуемый образец должен содержать от 100 мкг до 1 мг белка в 1 мл. В случае, когда в образце по результатам спектрофотометрического метода концентрация выше указанной – делайте разведения.

Контрольные вопросы

1. Почему измерение производится при длинах волн 340нм, 375нм, 260нм, 334нм?
2. Каков физический смысл коэффициента молярной экстинкции?
3. Каков принцип действия ультразвукового дезинтегратора? Какие еще методы разрушения бактериальных клеток существуют?
4. Какими методами определяют концентрацию белка?
5. Как рассчитать активность фермента?
6. В каких единицах измеряется активность ферментов? Каков их физический смысл?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6. КОНЬЮГАЦИЯ БАКТЕРИЙ КАК ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ШТАММОВ ДЛЯ БИОДЕГРАДАЦИИ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Цель Провести перенос плазмидной ДНК из штамма-деструктора нафталина

Основные положения

Впервые конъюгационный перенос хромосомных генов был обнаружен у *E. coli* K-12 и оказался связанным с F- фактором.

Существенный вклад в изучение пола у бактерий внесли основополагающие исследования следующих пяти ученых:

- Джошуа Ледерберг вместе с Эдуардом Татумом разработал понятие о селективных методах и, применив их, открыл процессы конъюгации и рекомбинации у бактерий;
- Уильям Хэйс обнаружил однонаправленность генетической рекомбинации у бактерий, что позволило провести четкое различие между донорными «мужскими» и реципиентными «женскими» клетками. Одновременно с Кавалли-Сфорца и Ледербергами Хэйс открыл половой фактор F, главный генетический элемент, ответственный за конъюгационные свойства бактерий;
- Л. Л. Кавалли-Сфорца выделил первый штамм Hfr и участвовал в открытии фактора F;
- Эли Вольман и Франсуа Жакоб полностью разработали систему скрещивания Hfr×F⁻, играющую основную роль в генетическом картировании у *E. coli*.

Селекция и контрселекция

На практике для образования конъюгационной смеси смешивают донорный и реципиентный штамм, а затем эту смесь высевают на чашки со средой, на которой отбираются искомые рекомбинанты. Рекомбинация у бактерий была открыта только после того, как была открыта такая среда, на которой стал возможен отбор редко встречающихся рекомбинантов. Предположим, что мы проводим скрещивание *E. coli* Hfr (Leu⁺) с F⁻(Leu⁻) клетками и, высеивая конъюгационную смесь на не содержащие лейцина чашки с минимальной глюкозной средой, отбираем рекомбинанты Leu⁺. Родительские клетки F⁻ не могут расти на этой лишенной лейцина среде. Родительские клетки Hfr, однако, также являются Leu⁺. Если мы просто высеиваем клетки на такую среду, то среди выросших колоний будут как клетки рекомбинантов Leu⁺, так и клетки мужского родительского штамма. Поэтому необходимо также провести селекцию против мужского донорного штамма; эта процедура называется контрселекцией. Для контрселекции часто используют антибиотики или бактериофаг, к которому чувствителен мужской штамм.

Селекция и контрселекция – это просто разные названия одной и той же процедуры. Однако правильное использование этих терминов дает нам возможность охарактеризовать донора и реципиента при описании каждого скрещивания. Согласно договоренности, мы пишем, что селекция предпринимается против реципиентного, или женского, штамма, а контрселекция – против донорного, или мужского, штамма.

Контрселекцию против донорных клеток впервые широко применил Хэйс, которые использовали стрептомицин для подавления дальнейшего

роста донорного штамма и фаг Т6 — для удаления чувствительных клеток Hfr.

Часто при скрещиваниях Hfr с F⁻ клетками и даже при переносе F[']-факторов в реципиентные клетки F["] оказывается невозможным проводить отбор рекомбинантных колоний или контрселекцию против мужского родителя. Здесь же мы хотели бы подчеркнуть, насколько необходимо проводить контрселекцию при скрещивании бактерий, так как часто начинающие исследователи этим пренебрегают.

В таблице 3 приведены агенты, которые обычно употребляются для контрселекции, и указаны некоторые их преимущества и недостатки.

Таблица 3.

Агенты, обычно используемые для контрселекции

Агент	Преимущества	Недостатки
Стрептомицин	<ol style="list-style-type: none"> 1. Дает чистый фон даже на богатой среде при большом количестве клеток. 2. Устойчивые ревертанты возникают очень редко ($<10^{-10}$). 3. Препятствует повторному скрещиванию на чашке; наилучший агент для экспериментов по прерыванию конъюгации клеток Hfr. 4. Обладает бактерицидным действием; препятствует перекрестному питанию клеток при скрещиваниях в отпечатках. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Трудно выделить спонтанные устойчивые мутанты; в большинстве случаев для создания штаммов Str^r приходится использовать трансдукцию фагом P1. 2. Подавляет действие некоторых nonsense-супрессоров, особенно супрессоров Su2 и кодона УГА.
Налидиксовая кислота	<ol style="list-style-type: none"> 1. Быстро блокирует конъюгацию даже на чашках; рекомендуется для опытов с прерыванием конъюгации в тех случаях, когда нельзя использовать стрептомицин. 2. Устойчивые мутанты выделить довольно легко, так что этот маркер можно без труда внести в 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Если на чашки высевается много клеток, то происходит сильный рост фона. Обычно, чтобы фон не мешал, на чашку надо высевать не более 10^7 клеток. 2. Многие мутации резистентности частично супрессируются аллелем <i>recA</i>⁻. 3. Не может быть использован при

	большинство штаммов.	скрещиваниях в отпечатках, так как быстро останавливает синтез ДНК.
Спектиномицин	1. Устойчивые ревертанты возникают крайне редко. 2. Дает чистый фон.	1. Не предотвращает повторного скрещивания на чашке; не рекомендуется для использования в экспериментах с прерыванием конъюгации. 2. Бактериостатичен; допускает перекрестное питание клеток и поэтому не рекомендуется для использования при «скрещиваниях в отпечатках», если используются маркеры потребности в питательных веществах. 3. Маркер трудно вводить в штаммы, не используя трансдукции фагом P1 или скрещивания Hfr; редко возникают спонтанные устойчивые мутанты.
Валин	Легко выделить мутанты, устойчивые к валину.	Не может использоваться на богатой среде.
Чувствительность к фагу	1. Фаг T6 останавливает скрещивание. 2. Легко выделить устойчивые производные.	1. Обработка агентом требует введения дополнительного этапа — предварительной адсорбции; неудобен при большом количестве проб. 2. Использование в экспериментах с прерыванием конъюгации ограничено, так как нельзя точно определить момент прерывания скрещивания. 3. Нужно получать лизаты

		фага; нужно использовать большие избытки фага (100:1).
--	--	--

Локус *rif^R*, например, можно переносить при скрещивании из клеток Hfr в клетки F⁻ и проводить отбор на устойчивость к рифампицину. В этом случае для контрселекции должен использоваться другой маркер. Однако, многие аллели устойчивости к антибиотикам являются рецессивными и поэтому для сегрегации рекомбинантов Rif^r требуется, чтобы прошло несколько генераций. Так как удобнее высевать на чашки непосредственно конъюгационную смесь, для селекции предпочтительно использовать те маркеры, которые позволяют проводить высеив смеси прямо на чашки, например, маркеры потребности в питательных веществах.

Рост фона

На фон, который вырастает при скрещивании бактерий, сильно влияет выбор маркеров для селекции и контрселекции. Чем сильнее фоновый рост, тем труднее наблюдать колонии рекомбинантов. Фоновый рост увеличивается как в результате реверсий, так и в результате того, что блок, вызываемый мутацией, может быть неабсолютным (т. е. возможен остаточный рост немутантов, несмотря на отсутствие питательного вещества или присутствие антибиотика). Некоторые маркеры обуславливают более сильный остаточный рост, чем другие. Как правило, маркеры потребности в витаминах дают более слабый блок, чем маркеры потребности в аминокислотах или сахарах. На фоновый рост может влиять также перекрестное питание клеток. Оно происходит тогда, когда одни клетки выделяют в среду питательное вещество, а другие, которым это вещество необходимо, используют его для своего роста.

Разрешение, которое достигается при любом скрещивании, ограничено тем, что в бактериальной популяции присутствуют ревертанты по большинству маркеров. Поэтому желательно использовать такие маркеры, для которых характерна низкая частота реверсий.

Методы оптимизации частоты скрещивания

Для скрещиваний Hfr и переноса эписом (плазмидная ДНК, способная встраиваться в хромосому) в жидкой культуре рекомендуется соблюдать несколько условий.

1. Все скрещивания желательно проводить при температуре 37°C (температура зависит от штамма с которым мы будем работать). В нашем случае это культура *E. coli*, оптимальная температура для которой 37°C.
2. Культуру донора следует выращивать в богатой среде до плотности 2×10^8 — 3×10^8 кл/мл, причем культура должна находиться в экспоненциальной фазе роста. Достигшие более высокой плотности культуры скрещиваются с меньшей эффективностью. Многие исследователи считают, что эффективность скрещивания выше, если клетки F⁻ также находятся в экспоненциальной фазе роста, поэтому желательно использовать также и свежевыращенную культуру реципиента.

Для тех экспериментов, которые проводятся группой, удобнее приготовить свежие ночные культуры донора и реципиента и утром перед экспериментом культуру донора развести в свежей жидкой среде в отношении 1:40, а культуру реципиента — в отношении 1:20. Чтобы получить максимальную эффективность скрещивания клеток Hfr (что желательно для экспериментов с прерыванием конъюгации), следует использовать соотношение, по крайней мере, 10 клеток F⁻ на одну клетку Hfr. В этом случае обе культуры, и донора, и реципиента, должны находиться в экспоненциальной фазе роста и перед смешиванием иметь плотность 2×10^8 — 3×10^8 кл/мл.

3. Желательно, чтобы во время скрещивания проводилась аэрация. Для этого достаточно осторожного покачивания (энергичное встряхивание разрушает конъюгирующие пары) или просто того, чтобы отношение поверхности жидкости к ее объему было достаточно высоким. Вполне удовлетворительные результаты дают, например, следующие условия: если в колбе Эрленмейера на 100 мл находится 5 мл жидкости, или в колбе на 250 мл находится 10 мл жидкости, или, наконец, в колбе на 500 мл находится 20 мл жидкости. Если объем смеси не превышает нескольких миллилитров, то можно использовать также аналитические пробирки, которые помещаются на внешнее кольцо круговой качалки при 30—33 об/мин, термостатированной при 37 °С. Последнее наиболее приемлемо для переноса эписом.

Перенос эписом. Прямая селекция.

Скрещивая штамм CSH23 (Str^s) со штаммом CSH50 (Lac⁻Pro⁻Str^r), мы хотим перенести фактор $F'lac^+pro^+$ из штамма CSH23 в штамм CSH50. Это можно проделать двумя способами. Можно просто высеять конъюгационную смесь на чашки с глюкозной минимальной средой и стрептомицином. В этом случае все клетки CSH23 будут убиты стрептомицином. Так как клетка-реципиент не может расти в отсутствие пролина, на селективной чашке образуют колонии только те клетки CSH50, которые получили фактор $F'lac^+Pro^+$ от клеток CSH23. Таким образом проводится селекция клеток Pro⁺Str^R (Рис. 2). И, наоборот, мы можем использовать чашки с лактозной минимальной средой и стрептомицином и отбирать клетки Lac⁺Pro⁺Str^R. И в том, и в другом случае проводится прямой отбор искомым диплоидов.

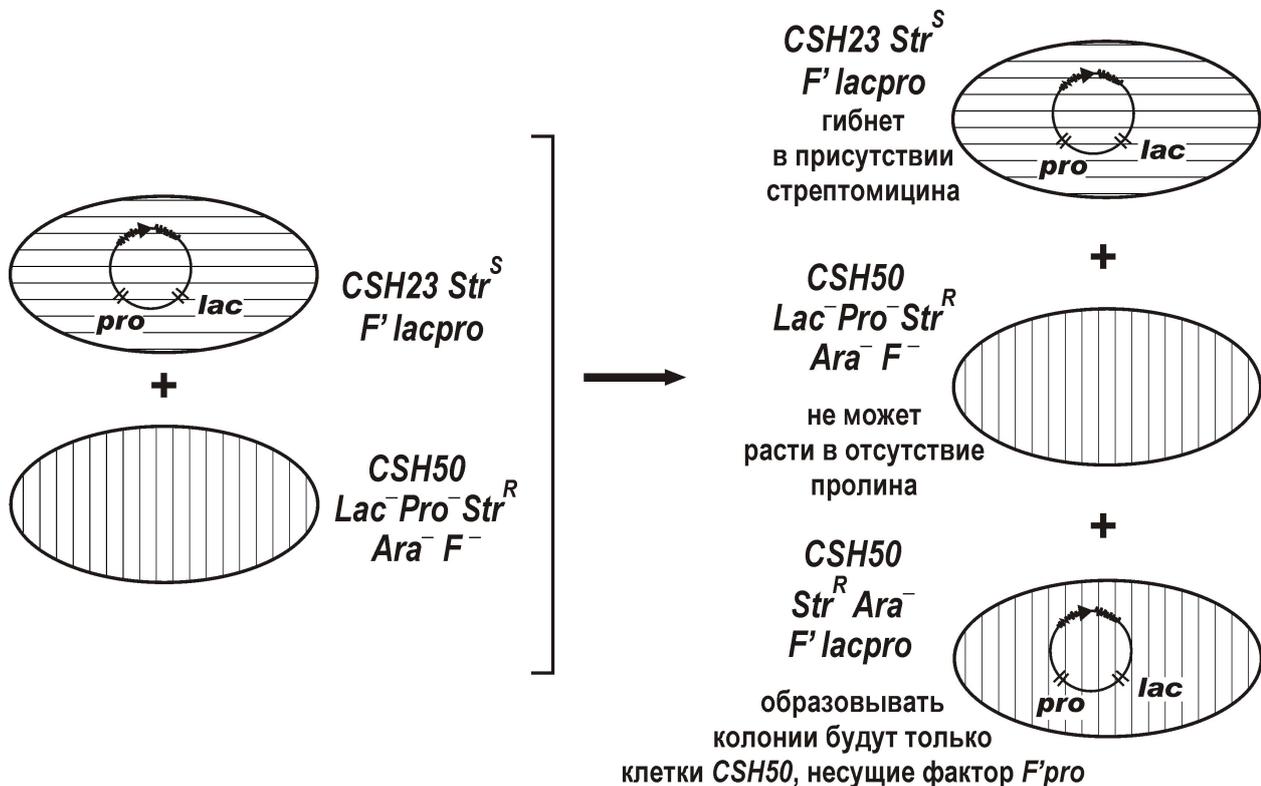


Рис. 2. Перенос фактора $F' lacpro$ из донора Str^S в реципиент $Str^R Pro^-$ (цитировано по: Миллер, 1976)

Если растут только искомые реципиентные клетки (или, соответственно, рекомбинанты), но не растет ни один из исходных родительских штаммов, то не обязательно проводить скрещивание в жидкой среде. В этом случае часто используют спот-скрещивание или «скрещивание в отпечатках».

Спот-скрещивание.

Перенос фактора F' происходит не только при скрещивании в жидком бульоне, но и на поверхности чашки с агаром. Для проведения описанных выше скрещиваний чашку с глюкозной минимальной средой и стрептомицином разделяют на три сектора. На один сектор пастеровской пипеткой наносят каплю экспоненциальной (!) культуры донора (CSH23), а на другой сектор — каплю культуры реципиента. На третий сектор наносят вместе капли культуры донора и культуры реципиента, причем каплю культуры донора наносят поверх капли культуры реципиента после того, как последняя подсохнет. Когда нанесенные капли подсохнут, чашки инкубируют при $37^\circ C$ в течение ночи. Сплошной рост должен наблюдаться только в тех местах, где нанесены вместе и донор, и реципиент.

С помощью зубочистки мы можем отобрать клетки из центра пятна и провести их очистку, рассеяв штрихом для образования отдельных колоний. Чтобы результат был более четким, чашки следует хорошо просушить. Для этого приоткрытые чашки подсушивают в течение 2 ч при $37^\circ C$. Этот метод удобен тем, что с его помощью можно получать до 8 диплоидов на чашку. Для контрселекции лучше всего использовать стрептомицин. Так как

налидиксовая кислота быстро подавляет синтез ДНК и предотвращает ее перенос, следует избегать применения этого агента для контрселекции при скрещивании на чашках. Иногда отбору рекомбинантов может мешать бульон, который попадает на чашку вместе с каплей культуры, особенно если для контрселекции используется маркер ауксотрофности (потребности в питательном веществе), а не маркер устойчивости к лекарственному препарату.

Скрещивание в отпечатках.

Эффективный метод для проведения скрещивания большого числа штаммов состоит в том, что делается отпечаток с чашки, на которую по шаблону нанесено до 50 донорных штаммов, на газон штамма F⁻. Сначала приготавливают исходную чашку с богатой средой, на которую по шаблону наносят свежевыращенные колонии и после этого инкубируют в течение 6—8 ч. Свежую ночную культуру реципиента (0,1 мл) равномерно распределяют по поверхности селективной чашки. Как только селективная чашка подсохнет, на нее делают отпечаток с исходной чашки. Преимущество этого метода заключается в том, что с его помощью можно исследовать донорные свойства сразу 50 колоний.

Опыт 1 Скрещивание *E. coli* CSH23 × CSH50

Материалы и оборудование

Культуры штаммов *E. coli* CSH23 и CSH50, круговая термостатируемая качалка, бархат и болванка для отпечатков (репликатор), пипетки

Растворы

бульон LB, минимальная агаризованная среда с глюкозой и стрептомицином, минимальная агаризованная среда с глюкозой, пролином и стрептомицином, индикаторная среда с арабинозой

Методика

<i>Штамм</i>	<i>Пол</i>	<i>Генотип</i>	<i>Важные свойства</i>
CSH23	F' <i>lac</i> * <i>proA</i> ⁺ , <i>B</i> ⁺	Δ(<i>lacpro</i>) <i>supE</i> <i>spc thi</i>	Str ^S
CSH50	F ⁻	<i>ara</i> Δ(<i>lacpro</i>) <i>strA thi</i>	Lac ⁻ Pro ⁻ Str ^r

1-й день

1. Подрастите свежие ночные культуры донора и реципиента. Для этого разведите культуру донора в отношении 1:40, а культуру реципиента — в отношении 1:20 и инкубируйте их при 37° С до тех пор, пока плотность культуры донора не достигнет 2×10⁸—3×10⁸ клетка/мл.

2. Приготовьте коньюгационную смесь, смешав в аналитической пробирке по 0.5 мл каждой из этих культур.

3. Поместите пробирку на круговую качалку при 30 об/мин и 37°C на 60 мин. 4. После инкубации высейте по 0.1 мл разведений 10^{-3} , 10^{-4} и 10^{-5} на чашки с минимальной средой, глюкозой и стрептомицином.

В качестве контролей высейте на чашки также отдельно по 0.1 мл разведений 10^{-2} донора и реципиента. Для того чтобы возможно было определить эффективность переноса, высейте также на селективную чашку с пролином 0.1 мл разведения 10^{-5} культуры реципиента.

Можно также не делать разведений, а взять петлей пробу из конъюгационной смеси и рассеять ее штрихом прямо на селективную чашку. В этом случае на каждой чашке можно провести до 8 скрещиваний.

2-й и 3-й дни

1. Обследуйте чашки и подсчитайте, какое количество диплоидов образовалось на 1 мл конъюгационной смеси, а также какой процент клеток в популяции CSH50 получили при скрещивании F'-фактор.

2. Проведя тестирование на маркер Ara, докажите, что те колонии, которые выросли на селективной чашке, действительно являются по происхождению CSH50. Для этого отберите несколько отдельных колоний и рассейте штрихом на индикаторной чашке с арабинозой (или на минимальной чашке с арабинозой). Помните, что CSH23 является Ara⁺, а штамм CSH50 — Ara⁻.

Опыт 2 Перенос плазмид биodeгадации нафталина в реципиентные штаммы в процессе конъюгации

Материалы и оборудование

Культуры штаммов *Pseudomonas putida* BS 394 (pNF142) *cys*⁻Nah⁺ и *Pseudomonas aureofaciens* BS 1393 Nah⁻, круговая термостатируемая качалка, пипетки, шпатель

Растворы

бульон LB, минимальная агаризованная среда, нафталин

Методика

1-день

1. Вырастить свежие ночные культуры донорного (*Pseudomonas putida* BS 394 (pNF142) *cys*⁻Nah⁺) и реципиентного (*Pseudomonas aureofaciens* BS 1393 Nah⁻) штаммов.

2. 1 мл культуры донора вносят в 9 мл среды LB-бульон, подрачивают в течение 3 часов.

3. По 0.1 мл культуры донора и реципиента капают на чашку Петри, содержащую агаризованную среду.

4. Чашку Петри помещают в термостат 24°C на 12 часов.

2-день

1. Смываем с чашки Петри выросшую культуру. Для этого вносим 1 мл физраствора и шпателем тщательно снимаем культуру.
2. 0.1мл культуры шпателем высеем на чашку Петри, содержащую селективную среду для отбора трансконъюгантных штаммов (минеральная среда с нафталином). Нафталин вносится на крышку чашки Петри.
3. Селективную чашку помещаем в термостат 24°C на 48 часов.

4-день

Проверяем чашки Петри на наличие колоний трансконъюгантов. Рассчитываем частоту скрещивания (количество выросших трансконъюгантов на клетку донора).

Примечание

Донорный и реципиентный штаммы не растут, так *Pseudomonas putida* BS 394 (pNF142) cys^-Nah^+ не растет в среде без аминокислоты цистеин, а *Pseudomonas aureofaciens* BS 1393 Nah^- не способен использовать нафталин в качестве источника углерода и энергии. Поэтому на чашках вырастут только колонии трансконъюгантов *Pseudomonas aureofaciens* BS1393 (pNF142).

3. Отобрать 0,5 мл среды с клетками для определения начальной концентрации клеток. Сделать серию десятикратных разведений в физрастворе. 0.1 мл из разведений 10^{-5} и 10^{-6} посеять на чашки с богатой агаризованной средой. Чашки Петри инкубировать при оптимальной температуре в течение суток. Затем подсчитать выросшие колонии.
4. Поместить среду с клетками в чашку Петри. Чашку поставить под источник УФ-излучения (расстояние 30-60 см). Время облучения культуры зависит от изучаемого микроорганизма. Через интервалы в 30 секунд отбирать пробы (30, 60, 90, 120, 150 с).
5. Сделать разведения из отобранных проб и посеять на чашки с богатой агаризованной средой разведения 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} .
6. Чашки завернуть в темную бумагу, чтобы избежать воздействия освещения. Чашки Петри инкубировать при оптимальной температуре в течение суток.
7. Подсчитать выросшие колонии.
8. Построить кривую зависимости выживаемости от длительности УФ-облучения.

Примечание

Перед использованием УФ-источник должен быть обязательно прогрет в течение по крайней мере 30 минут. Облучение проводить в отсутствии прямого освещения.

Контрольные вопросы

1. Дайте определение понятию «конъюгация».
2. В чем различие «мужских» и «женских» клеток?

3. Каков принцип отбора рекомбинантных штаммов?
4. Назовите основные агенты, которые обычно употребляются для контрелекции, и укажите их преимущества и недостатки?
5. Каковы методы оптимизации частоты скрещивания?
6. Какие методы скрещивания существуют?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 7.

ЭЛИМИНАЦИЯ ПЛАЗМИД НА ПРИМЕРЕ ПЛАЗМИД МИКРООРГАНИЗМОВ-ДЕСТРУКТОРОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В БИОДЕГРАДАЦИИ ТОКСИКАНТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Цель Освоить метод элиминации плазмид и провести элиминацию плазмид у штамма –деструктора нафталина *Pseudomonas* sp. NF142 (pNF142)

Основные положения

Плазмиды не являются обязательным компонентом генома прокариот, а следовательно, не содержат генетического материала, совершенно необходимого для бактериальной клетки, по крайней мере в определенном диапазоне нормальных ростовых условий. Так, например, жизнеспособность бактериальных клеток, не содержащих плазмиды резистентности к лекарственным соединениям, не снизится при условии, что в среде не присутствует ни одно из этих веществ. Напротив, появление в клетке плазмиды часто снижает скорость ее размножения. Хотя плазмиды реплицируются синхронно с репликацией хромосомы и клеточным делением, в процессе которого образующиеся клетки наследуют копию (копии) плазмид, однако в популяции с некоторой, обычно весьма низкой, частотой возникают клетки, не содержащие плазмиды. Частота появления таких клеток может быть значительно повышена с помощью акридиновых красителей, бромистого этидия, рифампицина, додецилсульфата натрия. Такой же эффект может оказывать тиминовое голодание. Утеря клеткой плазмиды получила название «элиминации» плазмиды или «излечения» (от плазмиды). Эффективность излечения зависит от типа плазмиды, элиминирующего агента и условий опыта. Так, например, акридиновый оранжевый элиминирует F-плазмиду, но не эффективен в отношении плазмид резистентности энтеробактерий, уступая в этом отношении бромистому этидию. Что касается плазмид биodeградации псевдомонад, то

оказалось, что единственным соединением, излечивающим клетки от данных плазмид, является митомицин С (Chakrabarty, 1972). Концентрация элиминирующего агента, как правило, должна быть субингибирующей в отношении роста культуры. Эффективность действия элиминирующего агента может зависеть от температуры. Так, пик элиминирующего действия 5-аминоакридина наблюдается при выращивании клеток *E.coli*, содержащих плазмиду F, при 42.9°C. Поскольку репликация некоторых плазмид более термочувствительна, чем репликация бактериальной хромосомы, выращивание клеток при повышенной температуре может способствовать их излечиванию от плазмиды. Некоторые мутагены, например, нитрозогуанидин, также могут элиминировать плазмиды.

Не следует забывать, что большинство элиминирующих агентов способны индуцировать мутации, однако большинство мутантных штаммов отличается от излеченных способностью к образованию ревертантов. Кроме того, поскольку многие плазмиды детерминируют несколько селективных признаков, например, резистентность к различным антибиотикам, поэтому точечная мутация или даже делеция, инактивирующая один из генов антибиотикорезистентности, часто не затрагивает гены, контролирующие устойчивость к другим антибиотикам, что позволяет отличить мутантные штаммы от излеченных.

Методика

1. Клетки выращивают до середины экспоненциальной фазы и вносят в среду LB с митомицином С до конечной плотности $10^4 - 10^5$ кл/мл. Концентрация митомицина С составляет 2, 5, 7.5, 10 мкг/мл.
2. Культуры инкубируют 48 часов при оптимальной температуре в темноте. Для дальнейшего анализа отбирают только культуры, не выросшие на первые сутки, а выросшие на вторые.
3. Для получения отдельных колоний культуры высевают на агаризованные богатые среды.

4. Клоны проверяют на способность расти на интересующих субстратах методом отпечатков и на наличие плазмидной ДНК скринингом по Экхардту.

Растворы

Митомицин С в концентрации 1 мг/мл; пробирки с богатой средой (LB) по 2 мл; чашки с богатой агаризованной средой

Материалы и оборудование

Штамм *Pseudomonas* sp. NF142 (pNF142); орбитальная термостатируемая качалка

Визуализация плазмидной ДНК по Экхардту

Основные положения

Сборка камеры и заливка геля

К стенке камеры вплотную установить стекло с вырезом. Снизу к стеклу приложить фитиль из 16 рядов фильтровальной бумаги, смоченный в 0.5× буфере ТБЕ, для того, чтобы препятствовать вытеканию агарозы в нижнюю ванну. По краям стекла поставить прокладки таким образом, чтобы они плотно прилегали к фитилю. Прижать к ним второе стекло без выреза с помощью зажимов.

Залить небольшую порцию агарозы между стеклами и дать ей остыть. Залить в камеру ≈ 70 мл агарозы. Вверху установить гребенку. После полимеризации агарозы ослабить (снять) верхние зажимы и извлечь из геля гребенку. Вновь зажать стекла. Заполнить ванну и карманы в геле 0.5× буфером ТБЕ. Перед нанесением образцов из карманов, образованных язычками гребенки в геле, убрать остатки буфера пастеровской пипеткой.

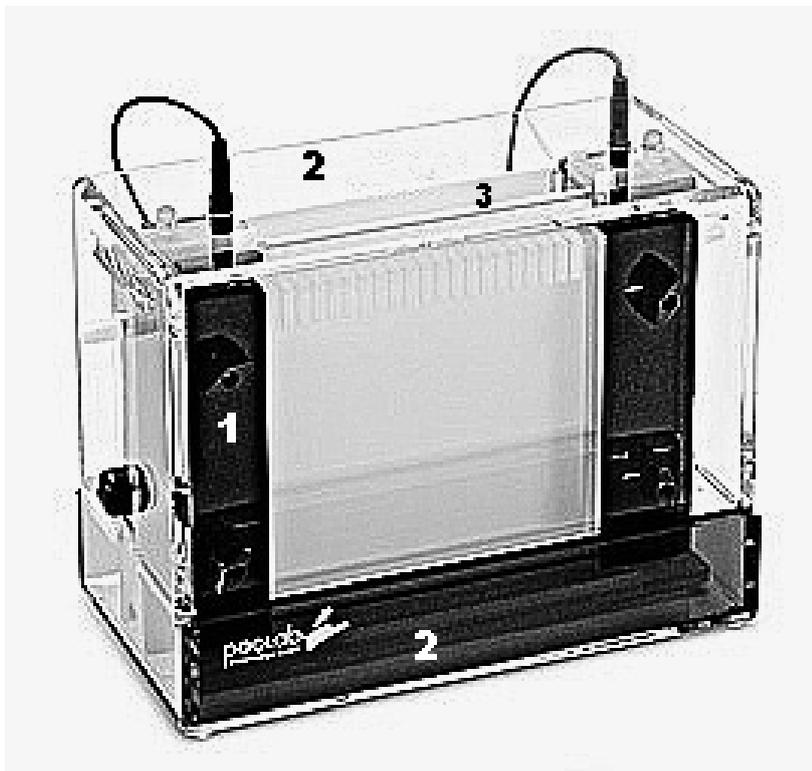


Рис 3. Камера для вертикального электрофореза:

- 1 – пластиковые прокладки с зажимами
- 2 – ванны для буфера
- 3 – гребенка

Методика

1. Вырастить ночную культуру микроорганизмов в 2 мл богатой среды LB.
2. Осадить центрифугированием клетки. Слить супернатант.
3. Добавить 1 мл 0.5× TBE к клеткам. Ресуспендировать клетки. Осадить клетки центрифугированием.
4. Ресуспендировать клетки в 20-40мкл TBE с 20% фиконом.
5. В ячейки агарозного геля внести 15 мкл лизоцимной смеси
6. Добавить в ячейки 10 мкл суспензии клеток . Оставить на 5 мин.
7. Затем сверху осторожно наслоить 30 мкл SDS-смеси и плавно перемешать зубочисткой, не достигая полного перемешивания.
8. Осторожно наслоить 100 мкл смеси верхнего слоя, не смешивая с нижними слоями.
9. Ячейки запечатать расплавленной агарозой (50-60°C)
10. Заполнить камеры аппарата для электрофореза 0.5× буфером TBE

11. Подключить прибор к блоку питания. Задать режим: $I = 2 \text{ mA}$, $U = 20 \text{ V}$ в течение 1 часа, затем $I = 40 \text{ mA}$, $U = 100 \text{ V}$ в течение 2.5 часов
12. По окончании электрофореза слить буфер, камеру разобрать.
13. Гель с нижним стеклом поместить в раствор этидиума бромиды (1%) на 3-5 мин.
14. Отмыть гель водой в течение 10-15 мин.
15. Посмотреть под УФ-светом наличие ДНК

Растворы

20% фикол: 2 г фикола растворить в $0.5 \times \text{TBE}$ буфере, объем раствора довести до 10 мл.

Лизоцимная смесь: к 25 мл $0.5 \times \text{TBE}$ добавить 125 мкл раствора РНКазы [рН 4.0] (концентрация исходного раствора РНКазы 10 мг/мл), 5 г фикола, 0.1 мл 20% красителя бромфенола синего. Перед употреблением к аликвоте этой смеси [160 мкл] добавить 40 мкл р-ра лизоцима с концентрацией 10 мг/мл (раствор лизоцима готовится отдельно и хранится небольшими порциями в замороженном виде). Конечные концентрации реактивов в смеси: лизоцим 400 мкг/мл; РНКазы 50/100 мкг/мл; бромфеноловый синий 0.05%; фикол 20%.

SDS-смесь: к 25 мл $0.5 \times$ буфера ТВЕ добавить 0.25 мл 20% SDS, приготовленном на ТВЕ и 2,5 г фикола. Конечные концентрации реактивов в смеси: SDS 0.2%; фикол 10%.

Смесь верхнего слоя: к 50 мл $0.5 \times \text{TBE}$ добавить 0.5 мл 20% SDS и 2.5 г фикола. Конечные концентрации реактивов в среде: SDS 0,2%; фикол 5%.

Агароза 1%: 100 мл ТВЕ буфера – 1 г агарозы

Исходные растворы

20% бромфеноловый синий (1 г бромфенолового синего растворить в 5 мл $0.5 \times \text{TBE}$)

р-р лизоцима (10 мг/мл деионизованной или бидистиллированной воды, замораживается аликвотами)

ТВЕ $5 \times$ - на 1 л дистиллированной воды добавить 54 г трис(оксиметил)аминометана; 27.5 г H_3BO_3 ; 25 мл 0.5 М ЭДТА (рН 8.0).

Конечные концентрации реактивов в буфере: 89 мМ трис, 89 мМ H_3BO_3 , 2.5 мМ ЭДТА.

20% SDS готовится на $0.5 \times \text{TBE}$ (1 г SDS растворить в 5 мл $0.5 \times \text{TBE}$)

Материалы и оборудование

Культуры микроорганизмов, камера для вертикального фореа, источник тока, гребенка, пипетка, термостатируемая качалка

Контрольные вопросы

1. На чем основан метод элиминация плазмид?
2. Какие свойства митомицина С позволяют использовать его в элиминации плазмид?
3. Для чего применяют селективные среды при элиминации плазмид?
4. Как проводят отбор элиминантов?
5. Какие методы применяют для выявления элиминантов?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 8. ИНДУКЦИЯ МУТАЦИЙ ПОД ДЕЙСТВИЕМ УФ КАК МЕТОД НАПРАВЛЕННОГО МУТАГЕНЕЗА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ-ДЕСТРУКТОРОВ ТОКСИКАНТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

***Цель** Провести индукцию мутаций ультрафиолетовым излучение и построить кривые выживаемости*

Основные положения

Облучение ультрафиолетом (УФ) индуцирует у бактерий широкий спектр мутаций. УФ вызывает не только замены оснований, но с высокой эффективностью вызывает также и образование делеций. В качестве источника УФ-излучения используют бактерицидные лампы низкого давления. Каждый источник УФ-излучения следует устанавливать на определенном расстоянии от бактерий и откалибровать. Поэтому, прежде чем приступить к определению оптимальных условий для мутагенеза, необходимо снять кривые выживаемости. Обычно для индукции мутаций используют такую дозу, при которой выживаемость составляет 0.1-1% (соответственно гибель клеток 99—99.9%), так как бактерии обладают

эффективными механизмами репарации УФ-повреждений, причем действие некоторых из этих механизмов стимулируется видимым светом. УФ-облучение желательно проводить в отсутствие прямого освещения. Более того, и после УФ-облучения клетки должны выращиваться в темноте или при красном свете.

Кривые выживаемости

На рисунке 7 приведены кривые выживаемости для двух разных штаммов *E. coli*, один из которых (штамм В/г) является мутантом, устойчивым к УФ-облучению. Кривые *I* и *III* получены при облучении этих штаммов прямо на твердой среде, а кривые *II* и *IV* — при облучении суспензии бактерий в жидкой среде (рис. 4). Эти результаты четко показывают, что кривые выживаемости зависят как от условий эксперимента, так и от используемого штамма. Так как при УФ-облучении сложных сред образуются токсичные соединения, клетки нужно ресуспендировать в 0, М MgSO₄. При проведении такого типа экспериментов важно, чтобы условия (плотность клеток, рост их до облучения и т. д.) были по возможности одними и теми же. Если плотность клеток в несколько раз превышает 10⁸ кл/мл, то это может привести к защите клеток от облучения и, следовательно, к искажению формы кривых выживаемости.

В приводимом ниже эксперименте строится кривая выживаемости клеток после УФ-облучения. Облучение следует проводить как на свету, так и в темноте, чтобы определить влияние на выживаемость фотореактивации. Культуры, подвергавшиеся облучению УФ-светом в темноте, подрачивают затем в течение ночи, и определяется содержание мутантов в них. Поскольку разные штаммы обладают разной чувствительностью к УФ-облучению, поэтому перед тем, как их использовать в работе, необходимо построить кривые выживаемости.

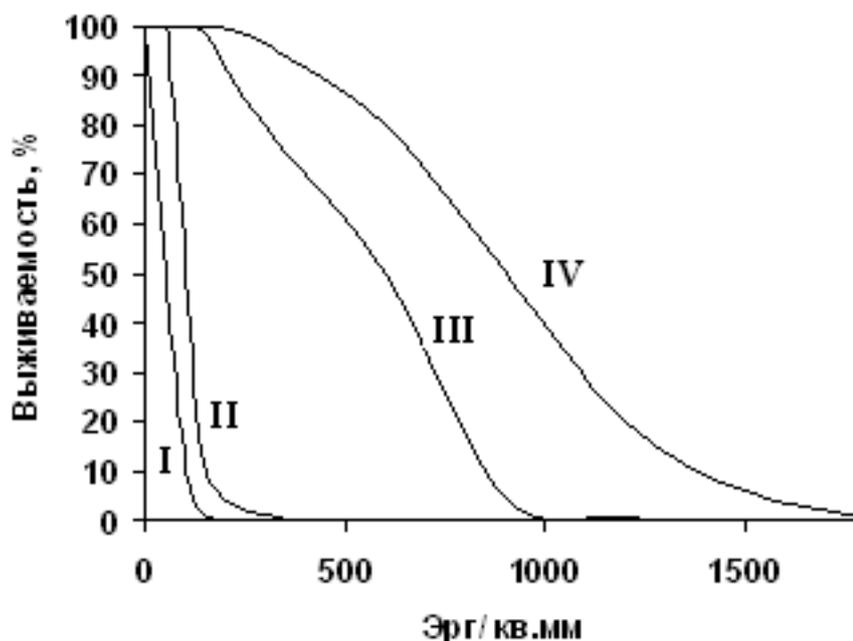


Рис. 4. Кривые выживаемости при УФ-облучении.

I — штамм В; II — штамм В; III — штамм В/г; IV — штамм В/г.

Методика

1. Вырастить изучаемую культуру до плотности $10^8 - 10^9$ кл/мл
2. Клетки осадить центрифугированием, дважды промыть 0,1 М $MgSO_4$ и ресуспендировать в 10 мл 0,1 М $MgSO_4$.
3. Отобрать 0,5 мл среды с клетками для определения начальной концентрации клеток. Сделать серию десятикратных разведений в физрастворе. 0,1 мл из разведений 10^{-5} и 10^{-6} посеять на чашки с богатой агаризованной средой. Чашки Петри инкубировать при оптимальной температуре в течение суток. Затем подсчитать выросшие колонии.
4. Поместить среду с клетками в чашку Петри. Чашку поставить под источник УФ-излучения (расстояние 30-60 см). Время облучения культуры зависит от изучаемого микроорганизма. Через интервалы в 30 секунд отбирать пробы (30, 60, 90, 120, 150 с).
5. Сделать разведения из отобранных проб и посеять на чашки с богатой агаризованной средой разведения 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} .

6. Чашки завернуть в темную бумагу, чтобы избежать воздействия освещения. Чашки Петри инкубировать при оптимальной температуре в течение суток.

7. Подсчитать выросшие колонии.

8. Построить кривую зависимости выживаемости от длительности УФ-облучения.

Примечание

Перед использованием УФ-источник должен быть обязательно прогрет в течение по крайней мере 30 минут. Облучение проводить в отсутствие прямого освещения.

Растворы

0,1 М MgSO₄, физраствор, пробирки с 5 мл богатой среды (LB), чашки с богатой агаризованной средой

Материалы и оборудование

Орбитальная термостатируемая качалка, центрифуга, УФ-лампа, секундомер, пипетки

Контрольные вопросы

- 1. Дайте определение термину «мутация». Какие виды мутаций вы знаете?***
- 2. Какова роль мутаций в популяции прокариот?***
- 3. Как образуются спонтанные мутации? Что такое частота мутаций? Как определить частоту мутаций?***
- 4. В чем заключается индуцированный мутагенез?***
- 5. Какие мутации вызывает действие ультрафиолета?***

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 9. ИНДУКЦИЯ МУТАЦИЙ НИТРОЗОГУАНИДИНОМ КАК МЕТОД СОЗДАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ-ДЕСТРУКТОРОВ ТОКСИКАНТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Цель провести мутацию бактерий нитрозогуанидином и определить выживаемость бактерий в зависимости от концентрации мутагена.

Основные положения

N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин (НГ) является мощным мутагеном (а также и канцерогеном). Он широко используется в настоящее время в генетике бактерий, так как с высокой частотой индуцирует мутации при таких дозах, при которых жизнеспособность клеток понижается незначительно. Например, если обработать клетки Lac⁺ такой дозой НГ, при которой выживаемость составляет 50%, то до 0.3% выживших бактерий оказываются по фенотипу Lac⁻. Иными словами, почти каждая трехсотая выжившая бактерия несет мутацию в *lac*-опероне. Этот мутаген вызывает в основном замены оснований, хотя имеются данные, что он индуцирует также и небольшие делеции. Мутации, индуцированные НГ, происходят главным образом в точке репликации ДНК. Поэтому вызываемые им мутации образуют кластеры. Поэтому при тех условиях, которые обычно используются при индукции мутаций с помощью НГ, в области ДНК размером в 2 мин вокруг любой индуцированной НГ мутации изменяются, кроме того, еще до 50 других оснований (Гверола и др., 1971). Такая высокая частота индукции двойных мутаций является одним из недостатков НГ. Однако в каждом эксперименте можно контролировать уровень возникновения мутаций.

Нитрозогуанидин очень опасен в обращении. При работе с растворами нитрозогуанидина нужно использовать защитные перчатки и ни в коем случае не брать пипетку ртом. Исходные растворы НГ приготавливают непосредственно перед опытом, растворяя нитрозогуанидин в соответствующем буфере до концентрации 1 мг/мл. Мы используем 0.1 М цитратный буфер [рН 5.5]. Клетки выращивают до экспоненциальной фазы, дважды промывают 5 мл цитратного буфера, суспендируют в 5 мл цитратного буфера и добавляют НГ до конечной концентрации 50 мкг/мл. Затем клетки инкубируют в течение 30 мин в водяной бане на 37°C (температура оптимальная для *E. coli*). В данном случае мы обрабатываем клетки НГ с концентрацией 50 мкг/мл в течение 30 мин, однако разные штаммы в разной степени чувствительны к токсическому действию НГ. Поэтому для каждого нового штамма целесообразно сначала построить

кривую выживаемости (т. е. снижение выживаемости при увеличении дозы). Нужно найти такую дозу, при которой выживаемость составляет 25-50%.

Через 30 мин клетки осаждают центрифугированием и промывают один раз 5 мл фосфатного буфера [рН 7.0], чтобы удалить НГ. После этого клетки можно перенести в бульон и подрастить в течение ночи. Затем выросшие культуры высевают на индикаторные чашки для того, чтобы обнаружить мутанты. Если индукция мутаций прошла недостаточно сильно, то проведите обработку более высокими концентрациями НГ (100 мкг/мл) или той же концентрацией, но в течение более длительного времени.

По другой методике используют клетки в экспоненциальной фазе роста, которые обрабатываются НГ (10—40 мкг/мл) в течение 1-4 мин. Затем НГ разбавляют. Церда-Ольмедо с соавт. (1968) разработали метод, позволяющий снизить частоту возникновения вторичных мутаций. По этой методике растущие клетки ресуспендируют в содержащем низкие концентрации НГ (1-2 мкг/мл) бульоне с плотностью $5 \cdot 10^7$ кл/мл и инкубируют в течение 4 ч при 37 °С. После этого клетки высевают на чашки для отбора мутантов.

Кривые выживаемости

Для построения кривых выживаемости клетки обрабатывают либо разными дозами НГ в течение одного и того же времени, либо одной и той же дозой при разной длительности воздействия. В приведенном ниже упражнении дается методика построения кривой выживаемости второго типа. Можно не осаждать клетки центрифугированием, а промывать их на нитроцеллюлозных фильтрах (размер пор 0.45 мкм). Было обнаружено, что если обработка ведется в условиях, благоприятных для роста клеток, то выживаемость резко снижается. Кроме того, показано, что высокие дозы НГ вызывают образование большого количества ауксотрофов. Доза, которая используется в данном эксперименте, не должна индуцировать значительные количества ауксотрофов. Тем не менее, все полученные мутанты следует проверить на способность расти на минимальном агаре с глюкозой. Содержание ауксотрофов в обработанных мутагеном культурах

может быть снижено, если после обработки клетки выращивать в течение ночи на минимальной среде.

Методика

1. Вырастить изучаемую культуру до плотности 10^8 - 10^9 кл/мл
2. Клетки осадить центрифугированием, дважды промыть цитратным буфером и ресуспендировать в 5 мл этого буфера.
3. По 1 мл суспензии клеток в цитратном буфере перенести в пробирки эппендорф. Рассчитать необходимое количество раствора НГ для внесения в эти пробирки исходя из конечных концентраций (30-100 мкг/мл). Инкубировать 30 минут при температуре оптимальной для исследуемого микроорганизма.
4. Осадить клетки центрифугированием и промыть осадок фосфатным буфером.
5. Промытые клетки ресуспендировать в 1 мл фосфатного буфера.
6. Из каждой пробы сделать серию разведений. По 0.1 мл из разведений 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} сделать высев на чашки Петри с богатой агаризованной средой. Чашки Петри инкубировать при оптимальной температуре в течение суток. Затем подсчитать выросшие колонии.
7. Построить кривую зависимости выживаемости от концентрации НГ.

Примечание

Нитрозогуанидин очень опасен в обращении. При работе с растворами НГ нужно использовать защитные перчатки и ни в коем случае не брать пипетку ртом.

Материалы и оборудование

Качалка, центрифуга, термостат, секундомер, пипетки

Растворы

100 мл цитратного буфера рН 5.5; физраствор; пробирки с 5 мл богатой среды (LB); чашки с богатой агаризованной средой; 2 мл свежеприготовленного исходного раствора НГ с концентрацией 1 мг/мл.

Контрольные вопросы

- 1. Дайте определение термину «мутация». Какие виды мутаций вы знаете?***
- 2. Какие мутагенные соединения вам известны?***
- 3. Перечислите особенности нитрозогуанидин как мутаген.***
- 4. Что такое кривые выживаемости и для чего они используются?***
- 5. Как и для чего проводят выбор дозы мутагенного соединения?***

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 10 ПЕРЕНОС ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ У БАКТЕРИЙ МЕТОДОМ ТРАНСФОРМАЦИИ

Цель Приготовить химически компетентные клетки кишечной палочки и научиться проводить трансформацию клеток *E. coli* плазмидной ДНК.

Основные положения

Существуют два наиболее часто применяемых способа введения плазмидной ДНК в клетки *E. coli* :

Кишечную палочку считают универсальным организмом для синтеза чужеродных белков. В *E. coli* исследователи вводят гены при помощи плазмидных векторов, что позволяет осуществлять биосинтез белков для промышленной ферментации. Также разработаны системы для синтеза в *E. coli* рекомбинантных белков.

Одним из первых примеров использования технологии рекомбинантных ДНК является синтез аналога инсулина человека. Модифицированные *E. coli* используют при разработке вакцин синтеза иммобилизованных ферментов и решения других задач. Для введения в клетки бактерий чужеродной ДНК необходимо наличие так называемого клонирующего вектора, т. е. автономно реплицирующегося в клетках фрагмента ДНК.

Большая часть известных векторов сконструирована на основе имеющихся в клетках бактерий внехромосомальных элементов типа плазмид или бактериофагов. При их создании и использовании придерживаются следующих критериев:

1. вектор должен быть небольшим в связи с тем, что эффективность трансформации клеток-хозяев снижается по мере увеличения размера плазмиды до 15 тысяч пар нуклеотидов (т. п. н.) и выше.
2. вектор должен быть хорошо охарактеризован относительно числа генов и их расположения, а также сайтов рестрикции и нуклеотидной последовательности.
3. вектор должен легко реплицироваться в клетке-хозяине.
4. вектор должен иметь один или несколько селективных маркеров (генов), позволяющих легко отличить клетки, несущие вектор, от нетрансформированных клеток;
5. идеальный вектор должен дополнительно содержать маркер, который может быть активирован или инактивирован путем встраивания фрагментов гетерологичной ДНК;

6. вектор должен содержать максимальное число уникальных сайтов рестрикции, в которые может быть осуществлена вставка гетерологичной ДНК.

Большая серия векторных плазмид, обозначенных символом pBR (рис. 26), создана на основе репликона природной плазмиды ColE1 путем его объединения с генами устойчивости к антибиотикам. Генетическая карта одного широко распространенного вектора этой серии, pBR322, изображена на рис. 5

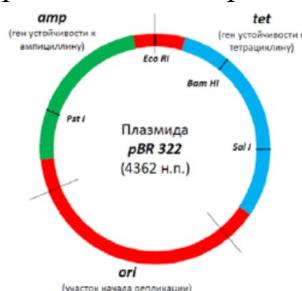


Рис. 5. Плазмидная ДНК, представляющая из себя клонирующий вектор pBR32240

Длина плазмиды pBR322 – 4361 пар нуклеотидов (п.н.). Она несет гены устойчивости к антибиотикам ампициллину (Amp^r) и тетрациклину (Tet^r) и сигнал начала репликации (ori), обеспечивающий репликацию только в клетках энтеробактерий.

В плазмиде имеются уникальные сайты рестрикции для BamHI и SalI в гене Tet^r, один PstI-сайт – в гене Amp^r. Следует иметь в виду, что встраивание в плазмиду клонируемых фрагментов ДНК по сайтам рестрикции, расположенным в генах Amp^r и Tet^r, будет нарушать их целостность. По такому признаку легко различить клетки, не содержащие плазмиды (не растут в присутствии Amp и Tet), клетки с плазмидой, не содержащей вставки (растут в присутствии обоих антибиотиков) и клетки с рекомбинантными плазмидами (в зависимости от локализации вставки растут на среде с одним из антибиотиков).

Плазмидные вектора вводят в реципиентные клетки методом генетической трансформации, т.е. путем переноса с помощью изолированной ДНК. Эффективность трансформации бактерий зависит от их способности пропускать ДНК через клеточную стенку. Для некоторых видов бактерий, например *Bacillus subtilis*, *Haemophilus influenzae*, трансформация естественна. Такие клетки, как у организма *E. coli*, гидролизуют линейную трансформирующую ДНК. Поэтому их трансформация происходит только у штаммов recBC sbcB, поскольку у них нарушена система деградации ДНК.

Бактериальные клетки, способные к трансформации и трансфекции, называются компетентными. Культуру, содержащую такие клетки, называют культурой в стадии компетентности. Компетентность в большинстве работ принято связывать с начальными этапами – адсорбцией и поглощением ДНК клеткой. Компетентные клетки кишечной палочки готовят в лаборатории путём обработки раствором хлоридом кальция (рис. 6) для приготовления аликвот химически компетентных клеток. Обработка химическим агентом делает мембрану клеток частично проницаемой для чужеродной ДНК.

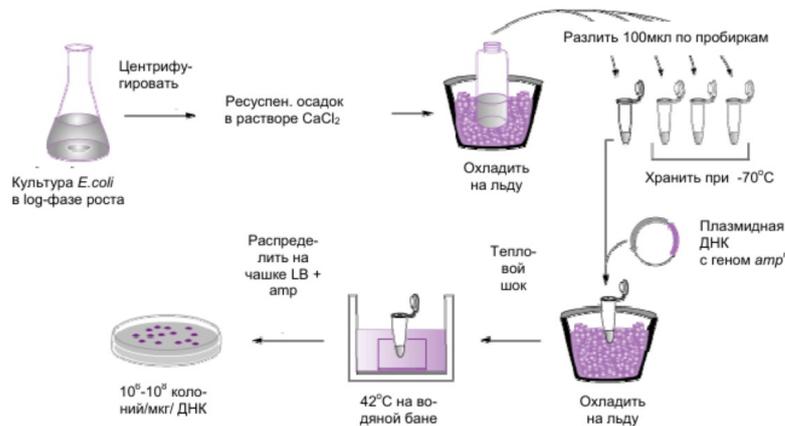


Рис. 6. Процедура приготовления химически компетентных клеток и трансформации методом теплового шока

Трансформация *E. coli* посредством плазмидной и бактериальной ДНК отличается некоторыми особенностями адсорбции и поглощения ДНК по сравнению с трансформацией у других бактерий и осуществима только в лабораторных условиях. Видимо, трансформирующая ДНК при этом на начальных стадиях претерпевает гораздо меньшие изменения, чем у тех бактерий, для которых трансформация является естественным процессом; она почти не фрагментируется и не образует одностранных молекул.

В качестве реципиентных клеток в большинстве случаев используют штаммы DH5α и Top10 (*recA1- endA1- hsdR17*). Мутация *hsdR*, блокируя клеточную систему рестрикции, предохраняет тем самым клонируемые фрагменты от действия рестриктазы EcoK. Мутации *endA* и *recA* предотвращают расщепление трансформирующей ДНК клеточными нуклеазами. После проникновения плазмидной ДНК в клетку нет последующего включения этой ДНК в хромосому.

Материалы и оборудование Следующие материалы необходимы для каждого студента или пары студентов: **Материалы** 1. 50 мл раствора 0,1М CaCl₂ 2. Глицерол 3. Среда LB 4. Ампициллин 100 мг/мл. **Оборудование** 1. Орбитальный шейкер. 2. Термостат 3. Настольная центрифуга (Эппендорф) 4. Пробирки, носики, чашки Петри

Методика приготовления Ca²⁺ компетентных клеток *E. coli*.

1. Посейте отдельную колонию в 5 мл среды LB в стерильную пластиковую пробирку на 15 или 50 мл. Выращивайте, встряхивая на качалке в течение 12 часов при 37°C.

2. Следующим утром используйте 1 мл этой культуры чтобы перенести её в 100 мл среды LB, находящейся в колбе на 250 мл.

3. Встряхивайте при 37°C в течение 1,5-3 часов. Затем отберите аликвоту этой культуры и померьте оптическую плотность при 600 нм. Культура должна иметь ОП₆₀₀ ~ 0,35-0,45.

4. Поместите клетки на холод в течение 10 минут (старайтесь с этого момента всё время держать их на холоде).

5. Соберите клетки центрифугированием в большой центрифуге в течение 3 минут при 3000 об/мин.

6. Отбросьте супернатант и аккуратно ресуспендируйте осадок в 10 мл холодного 0,1М CaCl₂ (клетки восприимчивы к механическому разрушению, поэтому пипетируйте их мягко).

7. Инкубируйте клетки на льду 15 минут 5. Центрифугируйте клетки как в 5 пункте. 6. Отбросьте снова супернатант и мягко ресуспендируйте на холоде в 5 мл раствора 0,1М CaCl₂ содержащего 15%-го глицерола. *Примечание: Если вы не собираетесь замораживать клетки, а хотите использовать их немедленно, то*

ресуспендируйте клетки только в 1-2 мл (в зависимости от нужного объёма клеток для экспериментов).

8. Распределите по пробиркам (100 мкл/на пробирку). Заморозьте при -70°C .

Трансформация Ca^{2+} компетентных клеток методом теплового шока.

1. Поместите ~ 1 мкг плазмидной ДНК или весь объём реакции лигации в пробирку. Добавьте ~ 100 мкл компетентных клеток. Сделайте вторую пробирку только с 100 мкл компетентных клеток, без ДНК для отрицательного контроля.

2. Инкубируйте в течение 10 минут на льду.

3. Поместите пробирки на водяную баню и держите при температуре 42°C в течение 90 сек. Поместите на 10 мин. обратно на лёд.

4. Добавьте 900 мкл среды LB в пробирки. Встряхивайте при 37°C в течение 1 часа.

5. Распределите 100-1000 мкл клеток по поверхности чашки с твёрдой LB + ампицилин из обеих пробирок.

6. Поместите эти чашки в термостат при 37°C и проверьте эффективность трансформации на следующее утро. У вас на чашке с ДНК, при условии правильно выполненного эксперимента, должен вырасти «газон» колоний (рис. 28), а на чашке с отрицательным контролем, не должно вырасти никаких колоний.

Чашка с колониями трансформантов хранится в холодильнике перевернутая дном вверх. Колонии могут использоваться в дальнейшем для выделения плазмидной ДНК. Далее эту ДНК возможно применять для реакции рестрикции.

Контрольные вопросы:

1. Какие клетки способны поглощать ДНК?

2. Какие клетки называют компетентными?

3. Перечислите этапы получения химически компетентных клеток

Библиографический список.

Основная

1. И.Ф. Пунтус, Л.И. Ахметов, А.Е. Флонов, И.А. Нечева, Т.В. Рогова. Генетические методы биотехнологии защиты окружающей среды. Учебно-методическое пособие. Тула: Изд-во ТулГУ, 2008, 123с.

Дополнительная

1. Т.Маниатис, Э.Фрич, Дж.Сэмбрук «Молекулярное клонирование», М.: «МИР», 1984.
2. Р.И.Салганик (отв.редактор) «Методы молекулярной генетики и геной инженерии», Новосибирск «НАУКА», 1990.
3. Л.А.Остреман «Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование», М.: «НАУКА», 1981.
4. Т.Маниатис, Э.Фрич, Дж. Сэмбрук «Молекулярное клонирование», М.: «МИР», 1984.
5. Миллер Дж. 1976. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир. С.392-398.