

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
по выполнению лабораторных работ по дисциплине
«Генная инженерия и биотехнология»

Направление подготовки	06.03.01 Биология
Направленность (профиль)	Генетика, селекция и биоинформатика

Ставрополь, 2026

Лабораторная работа №1

История возникновения, развития генной инженерии и клонирования. Объекты генной инженерии.

Цель работы: изучить историю возникновения, развития генной инженерии и клонирования.

Ход работы:

Генная инженерия появилась благодаря работам многих исследователей в разных отраслях биохимии и молекулярной генетики. На протяжении многих лет главным классом макромолекул считали белки. Существовало даже предположение, что гены имеют белковую природу. Лишь в 1944 году Эйвери, Мак Леод и Мак Карти показали, что носителем наследственной информации является ДНК. С этого времени начинается интенсивное изучение нуклеиновых кислот. Спустя десятилетие, в 1953 году Дж. Уотсон и Ф. Крик создали двуспиральную модель ДНК. Именно этот год принято считать годом рождения молекулярной биологии.

На рубеже 50 - 60-х годов были выяснены свойства генетического кода, а к концу 60-х годов его универсальность была подтверждена экспериментально. Шло интенсивное развитие молекулярной генетики, объектами которой стали ее вирусы и плазмиды. Были разработаны методы выделения высокоочищенных препаратов неповрежденных молекул ДНК, плазмид и вирусов. ДНК вирусов и плазмид вводили в клетки в биологически активной форме, обеспечивая ее репликацию и экспрессию соответствующих генов. В 70-х годах был открыт ряд ферментов, катализирующих реакции превращения ДНК. Особая роль в развитии методов генной инженерии принадлежит рестриктазам и ДНК-лигазам.

Историю развития генетической инженерии можно условно разделить на три этапа. Первый этап связан с доказательством принципиальной возможности получения рекомбинантных молекул ДНК *in vitro*. Эти работы касаются получения гибридов между различными плазмидами. Была доказана возможность создания рекомбинантных молекул с использованием исходных молекул ДНК из различных видов и штаммов бактерий, их жизнеспособность, стабильность и функционирование. Второй этап связан с началом работ по получению рекомбинантных молекул ДНК между хромосомными генами прокариот и различными плазмидами, доказательством их стабильности и жизнеспособности.

Третий этап - начало работ по включению в векторные молекулы ДНК (ДНК, используемые для переноса генов и способные встраиваться в генетический аппарат клетки-реципиента) генов эукариот, главным образом, животных. Формально датой рождения генетической инженерии следует считать 1972 год, когда в Стенфордском университете П. Берг, С. Коэн, Х. Бойер с сотрудниками создали первую рекомбинантную ДНК, содержащую фрагменты ДНК вируса SV40, бактериофага и *E. coli*.

Генетическая инженерия - конструирование *in vitro* функционально активных генетических структур (рекомбинантных ДНК), или иначе - создание искусственных генетических программ (Баев А. А.). По Э. С. Пирузян генетическая инженерия - система экспериментальных приемов, позволяющих конструировать лабораторным путем (в пробирке) искусственные генетические структуры в виде так называемых рекомбинантных или гибридных молекул ДНК [12, с.62].

Генетическая инженерия - получение новых комбинаций генетического материала путем проводимых вне клетки манипуляций с молекулами нуклеиновых кислот и переноса созданных конструкций генов в живой организм, в результате которого достигается их включение и активность в этом организме и у его потомства. Речь идет о направленном, по заранее заданной программе конструировании

молекулярных генетических систем вне организма с последующим введением их в живой организм. При этом рекомбинантные ДНК становятся составной частью генетического аппарата реципиентного организма и сообщают ему новые уникальные генетические, биохимические, а затем и физиологические свойства.

Цель прикладной генетической инженерии заключается в конструировании таких рекомбинантных молекул ДНК, которые при внедрении в генетический аппарат придавали бы организму свойства, полезные для человека. Например, получение «биологических реакторов» - микроорганизмов, растений и животных, продуцирующих фармакологически значимые для человека вещества, создание сортов растений и пород животных с определёнными ценными для человека признаками. Методы генной инженерии позволяют провести генетическую паспортизацию, диагностировать генетические заболевания, создавать ДНК-вакцины, проводить генотерапию различных заболеваний.

Технология рекомбинантных ДНК использует следующие методы:

- специфическое расщепление ДНК рестрицирующими нуклеазами, ускоряющее выделение и манипуляции с отдельными генами;
- быстрое секвенирование всех нуклеотидов очищенном фрагменте ДНК, что позволяет определить границы гена и аминокислотную последовательность, кодируемую им;
- конструирование рекомбинантной ДНК;
- гибридизация нуклеиновых кислот, позволяющая выявлять специфические последовательности РНК или ДНК с большей точностью и чувствительностью, основанную на их способности связывать комплементарные последовательности нуклеиновых кислот;
- клонирование ДНК: амплификация *in vitro* с помощью цепной полимеразной реакции или введение фрагмента ДНК в бактериальную клетку, которая после такой трансформации воспроизводит этот фрагмент в миллионах копий;
- введение рекомбинантной ДНК в клетки или организмы.

Лабораторная работа №2

Подготовка оборудования и реактивов к работе.

Цель работы: Ознакомление с оборудованием. Калибровка измерительных приборов.

Ход работы:

Перед началом выполнения задач практикума следует согласно инструкциям производителей проверить работоспособность оборудования (табл. 1), применяемого в генно-инженерных исследованиях.

Таблица 1

Оборудование, применяемое в генно-инженерных работах.

Прибор	Пример
Весы 0,1 г – 4000 г	Ohaus AV4101
Весы 0,1 мг – 200 г	Ohaus AV264
pH-метр	pH-410 Аквилон
Ламинар	Ламинарный шкаф II класса защиты БАВп-01–«Ламинар-С» 1,5

Люминометр	Immunotech, LM-01t
Шейкер-инкубатор	New Brunswick Excella E24
Термостат суховоздушный	ТС-80М-2
Пипетка автоматическая до 1 мл	Gilson
Пипетка автоматическая до 200 мкл	Ленпипет
Пипетка автоматическая до 20 мкл	HTL
Пипетка автоматическая до 2,5 мкл	Eppendorf
Холодильная установка	Двухкамерная, температура $10\pm 4^{\circ}\text{C}$ и $-18\pm 5^{\circ}\text{C}$
Мешалка	Мешалка магнитная с подогревом ПЭ-398
Центрифуга	Eppendorf 5418
Микроцентрифуга - вортекс	ТЭТА-2 Биоком
Амплификатор	МС-2+ ДНК-Технология
Твёрдотельный термостат	«Гном» ДНК-Технология
Камера для горизонтального электрофореза	SE-1 Хеликон
Камера для вертикального электрофореза	VE-10 Хеликон
Источник питания	PS-400 ДНК-Технология
СВЧ-печь	Камера объёмом 28-30 л
Трансиллюминатор	Трансиллюминатор УВТ-1
Компьютер. Монитор.	Стандартный офисный вариант

Следует откалибровать согласно инструкции производителя следующее оборудование:

1. весы;
2. рН-метр;
3. пипетки автоматические.

Приготовление рабочих растворов и сред.

При приготовлении буферов и растворов соблюдайте следующие правила: 1. Готовьте все растворы на бидистиллированной деионизованной воде.

2. По возможности стерилизуйте все растворы автоклавированием или фильтрованием через 0,22-мкм фильтр.

Для выполнения задач практикума следует приготовить необходимые растворы.

Растворы	Метод	Примечания
1М Трис-НСl, рН8,0	Растворить 121,1 г триса в 80 мл Н ₂ О, добавить 42 мл концентрированной (конц.) НСl. Остудить раствор до комнатной температуры перед окончательным доведением рН. Довести рН до 8,0 титрованием конц. НСl. Довести объём раствора до 1 литра.	1. Раствор стерилизовать автоклавированием. 2. Приблизительное количество конц. НСl для приготовления растворов 1М Трис-НСl другого рН: рН 7,4 – 70 мл рН 7,6 – 60 мл рН 8,0 – 42 мл 3. Титровать, перемешивая раствор магнитной мешалкой
0,5М ЭДТА, рН 8,0	Добавить 186,1 г двухзамещенной соли ЭДТА. 2Н ₂ О к 800 мл Н ₂ О. Интенсивно размешать на магнитной мешалке. Доведите рН до 8,0, добавляя NaOH (приблизительное количество - 20 г.)	1. Раствор стерилизовать автоклавированием. 2. Динатриевая соль ЭДТА не растворится до тех пор, пока рН раствора не будет доведен добавлением NaOH приблизительно до 8,0.
5 М NaCl	Растворить 292,2 г NaCl в 800 мл Н ₂ О. Довести объём до 1 л.	Раствор стерилизовать автоклавированием.
1 М MgCl ₂	Растворить 203,3 г MgCl ₂ · 6Н ₂ О в 800 мл Н ₂ О. Довести объём до 1 л.	MgCl ₂ чрезвычайно гигроскопичен. Хранить в плотно закрытом сосуде.
3 М ацетат натрия, рН 5,2	Растворить 408,1 г ацетата натрия. 3Н ₂ О в 800 мл Н ₂ О. Довести рН до 5,2 ледяной уксусной кислотой. Довести объём до 1 л.	1. Раствор стерилизовать автоклавированием.
2- меркаптоэтанол (BME)	Выпускается в виде 14,4 М раствора.	1. Не автоклавировать BME и растворы, содержащие BME. 2. Хранить при 4°С.
10%	Растворить 100 г SDS в	1. С SDS работать в

додецилсульфат натрия (SDS) или лаурилсульфат натрия	900 мл H ₂ O. Нагреть до 68°C для ускорения растворения. Довести pH до 7,2 добавлением нескольких капель конц. HCl. Довести объем до 1 л	вытяжном шкафу. 2. SDS стерилизовать нет необходимости.
7,5 М ацетат аммония	Растворить 577,5 г ацетата аммония. 4H ₂ O в 800 мл H ₂ O. Довести объем до 1 л	Стерилизовать фильтрованием
Бромистый этидий, 1 мг/мл	Растворить 0,1 г бромистого этидия в 100 мл H ₂ O. Размешать до полного растворения на магнитной мешалке.	Сильный мутаген. Взвешивать в перчатках и маске под тягой. Хранить в темной склянке при 4°C.

Приготовить питательные микробиологические среды и антибиотики. Жидкая микробиологическая среда LB (Luria-Bertani):

1. Добавить на 1 л:

- Бакто-триптон 10 г;
- Бакто-дрожжевой экстракт 5 г;
- NaCl 10 г.

2. Довести pH до 7,5 с помощью NaOH.

3. Тщательно перемешать.

4. Разаликвотить 0,5 л в стеклянные пробирки по 5 и 10 мл. 5. Стерилизовать автоклавированием.

Приготовить агаризованную микробиологическую среду LB (LA): в оставшиеся 0,5 л жидкой среды LB, перед автоклавированием добавить бакто-агар 1,5% (7,5 г на 0,5 л)

. Приготовить антибиотик (конц. раствор).

Ампициллин:

1 г натриевой соли ампициллина растворить в 10 мл H₂O. Рабочая концентрация 200-400 мкг/мл.

Приготовить 1% агарозный гель для электрофореза: взвесить 1 г агарозы, добавить 100 мл 1х ТАЕ, нагреть в микроволновой печи до полного расплавления агарозы. Охладить смесь до 50°C. Добавить к раствору агарозы 20 мкл бромистого этидия и осторожно перемешать, избегая появления в геле пузырьков воздуха.

Приготовить конц. буфер ТАЕ (трис, ацетат, ЭДТА) для агарозного геле-электрофореза:

на 1 л 50х ТАЕ:

трис – 242 г;

ледяная уксусная кислота – 57 мл;

0,5 М ЭДТА, pH 8,0 – 100 мл; H₂O до 1 л.

Хранить при комнатной температуре на столе (NT) в чистой посуде. Для получения рабочей концентрации 50х буфер разводят в дистиллированной воде в соотношении 1:50.

Приготовить 1х буфер ТЕ:

на 100 мл:

1 М Трис-HCl, pH 8,0 – 1 мл;

0,5 М ЭДТА, рН 8,0 – 200 мкл;
H₂O до 100 мл.

Приготовить 6х буфер для нанесения проб: 0,025 % бромфеноловый синий, 30 % глицерин. Приготовить I-й плазмидный раствор. Хранить при +4°C. Опционально: перед использованием добавить лизоцим до 5 мг/мл.

Приготовить II-й плазмидный раствор непосредственно перед использованием.

Лабораторная работа №3

Биохимическая основа методов генной инженерии-ферменты.

Цель работы: знакомиться с ферментами рестрикции и способами получения гибридной ДНК от различных организмов, освоить методы гибридизации ДНК на примере решения типовых задач.

Ход работы:

Для того чтобы искусственным путем наделить какой-либо организм новыми наследственными свойствами, нужно ввести в него новый ген или несколько генов от другого организма. Причем нужно, чтобы эти гены в чужом организме начали "работать" – производить белки.

Осуществляется эта процедура с помощью двух операций "разрезания" и "сшивания". Роль портняжных инструментов играют **ферменты рестриктазы и лигазы**.

Рестриктазы, действуя на двухцепочечную ДНК, "узнают" в ней определенную последовательность нуклеотидов. Причем, каждая рестриктаза узнает только свою последовательность ДНК, прикрепляется к ней и разрезает ее в месте прикрепления. Рестриктазам безразлично, чью ДНК разрезать – человека или растения, бактерии или вируса, лишь бы в ней были **распознаваемые участки**. Это значит, что две совершенно несхожих между собой последовательности ДНК (допустим из клеток слона и лягушки) при обработке одной и той же рестриктазой легко можно сшить (слепить) друг с другом. Обычно рестриктазы распознают в молекулах ДНК очень короткие, но строго специфичные для каждого фермента участки длиной в 4 – 6 пар нуклеотидов и разрезают обе цепи ДНК посередине этих участков или с некоторым смещением. В первом случае образуются обрывки с **ровными (тупыми) концами**, а во втором – стороны разрезаемых цепочек ДНК заходят одна за другую. Такие одноцепочечные концы называются "липкими", поскольку они могут как бы слипаться между собой в силу комплементарности.

Ярким примером рестриктазы второго типа является **EcoRI**, которая узнает фрагмент ДНК из шести нуклеотидов ГААТTC, и режет эту последовательность ДНК ассиметрично, «ступенькой» между нуклеотидами Г и А (рис. 1). В результате место разреза в одной цепи смещено по отношению к другой на 4 пары оснований. При таком разрезе образуется два выступающих конца. Эти концы притягиваются друг к другу, желая восстановить свои старые связи и скрепиться, как им и положено, водородными мостиками.

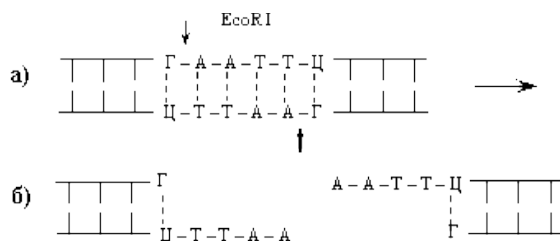


Рис. 1. а) схема действия фермента рестриктазы EcoR I на двухцепочечную молекулу ДНК, с указанием участка распознавания и места разреза; б) фрагменты ДНК с липкими концами после разрезания

Если с той же EcoRI получить фрагменты ДНК из различных организмов, то все они будут иметь одинаковые, подходящие друг к другу “липкие концы”. Скрепить выступающие липкие концы двух молекул ДНК помогает другой фермент - **ДНК-лигаза**. Он лигирует, то есть “сшивает” между собой сахарофосфатные остовы двух фрагментов с образованием полной структуры двойной спирали ДНК. Внешне она ничем не отличается от обычной ДНК. Сейчас в арсенале генных инженеров имеется более 500 различных рестриктаз, способных разрезать ДНК примерно в 120 различных местах.

С помощью этих и некоторых других ферментов многие исследователи начали конструировать и конструируют в настоящее время разнообразные по своим составным частям **гибридные (рекомбинантные) ДНК**.

Примеры решения задач

1. Имеется последовательность из 39 нуклеотидных пар двухцепочечной ДНК следующего состава:

5'-ЦЦТТАГГЦЦТГААТТААГГЦААТАГТГТГААТТЦАЦАТГ-3'
3'-ГГААТЦЦГГАЦТГААТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТТААГТГТАЦ-5'

Каким способом и на сколько частей можно разрезать эту ДНК?

Решение:

В данной последовательности ДНК имеется два участка распознавания: ГААТТЦ для рестриктазы EcoR I и ГГЦЦ для Hae III (см. таблицу 1). Поэтому искомая ДНК может быть разрезана в двух местах с образованием трёх различных фрагментов следующих последовательностей:

1) 5'-ЦЦТТАГГ - 2) - ЦЦТГААТТААГГЦААТАГТГТГ -
3'-ГГААТЦЦ - - ГГАЦТГААТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТТАА -
3) - ААТТЦАЦАТГ-3'
- ГТГТАЦ-5'

2. Рестрикционный фермент Hind III разрезает ДНК по последовательности ААГЦТТ. Насколько часто этот фермент будет разрезать двухцепочечную ДНК? (Иными словами, какова средняя длина фрагментов разрезанной ДНК?).

Решение:

Нам необходимо рассмотреть только одну цепочку ДНК, поскольку обе цепочки имеют одинаковые, симметричные последовательности, хотя и разнонаправленные. Частота встречаемости фрагмента из 6 нуклеотидных пар для Hind III составит $(1/4)^6 = 1/4096$, так как вероятность для одного нуклеотида (допустим А) занять конкретное место в цепочке ДНК составляет $1/4$, а таких мест имеется 6. Следовательно, среднее расстояние между участками разрезания рестриктазой Hind III составит около 4 тысяч нуклеотидных пар (4 тысячи баз или 4 килобазы).

Вопросы для освоения:

1. Имеется последовательность из 27 нуклеотидных пар двухцепочечной ДНК следующего состава:

5'- ЦТГААТТААГГАТЦАГГЦААТАГТГТГ -3'

3'-ГАЦТТААТЦЦТАГГТЦГТТАТЦАЦАЦ-5'

Каким способом и на сколько частей можно разрезать эту ДНК?

2. Имеется последовательность из 24 нуклеотидных пар двухцепочечной ДНК следующего состава:

5'-ТЦАГААТГЦТГГЦЦААГТАЦТТАГ-3'

3'-АГТЦТТАЦГАЦЦГГТТЦАТГААТЦ-5'

Каким способом и на сколько частей можно разрезать эту ДНК?

3. Ниже приведены две последовательности одноцепочечных молекул ДНК. Какую из них в двухцепочечной форме могут разрезать известные вам рестриктазы?

а) 5'-АЦТЦЦАГААТТЦАЦТЦЦГ-3'

б) 5'-ГЦЦТЦАТТЦГААГЦЦТГА-3'

Лабораторная работа №4

Стратегия клонирования генов прокариот и эукариот: химико-ферментативный синтез генов, ферментный синтез сложных генов.

Цель работы: выявить каким образом происходит клонирование прокариот и эукариот.

Ход работы:

Получение генетического материала

Фрагменты ДНК, предназначенные для клонирования, получают химическим или ферментативным синтезом, гидролизом рестриктазами и другими эндонуклеазами, дроблением гидродинамическим способом или ультразвуком. Изменяя условия, можно получить фрагменты разной длины, но в ряде случаев фрагменты ДНК перед клонированием **фракционируют** по размеру. Образующиеся двунитевые фрагменты ДНК обладают разными концами, что определяет выбор метода их присоединения к векторным молекулам. Если фрагменты синтезированы или получены воздействием рестриктаз, концы их могут быть тупыми или липкими. Фрагменты, полученные в результате неспецифического дробления ДНК, имеют на концах случайные однострунчатые участки. При этом разрывы распределяются по молекулам случайно, так, что среди образовавшихся фрагментов всегда содержится любой из генов в неповрежденном виде. Расщепление ДНК рестриктазами носит случайный характер. Если в клонируемом гене имеется сайт узнавания используемой рестриктазы, то ведут ограниченный гидролиз ДНК, чтобы не разрушить этот ген.

Выделение природных генов с помощью рестриктаз, которые вызывают гидролиз ДНК с образованием липких концов.

Рестриктазы действуют на ДНК любых организмов, если в ней есть распознаваемые сайты – палиндромные участки. В ГИ используется более 500 рестриктаз, способных разрезать ДНК в 120 местах.

Недостатки: не всегда можно подобрать рестриктазы, позволяющие вырезать из ДНК именно тот участок, в котором содержится нужный ген;

В составе вырезанного фрагмента ДНК могут оказаться интроны и рекДНК не смогут экспрессироваться в прокариотических клетках из-за отсутствия способности к процессингу и сплайсингу.

Химико-ферментативный синтез генов

Ему предшествует **секвенирование** – расшифровка нуклеотидной последовательности. Синтезируют короткие (8-16 пн) одноцепочечные фрагменты

ДНК, затем их соединяют с помощью лигаз и отжигают, т.е. дают возможность образоваться двухнитевым молекулам ДНК.

Ферментативный синтез генов

Выделяют мРНК и на ней, с помощью ревертазы синтезируют нить ДНК. Гены, синтезированные с помощью ревертазы, не имеют регуляторной части и промотора, т.е. не могут функционировать в клетках. При переносе в бактерию, к структурным генам присоединяют промотор оперона, и ген начинает работать.

Лабораторная работа №5. Манипуляции с ДНК in vitro.

Цель работы: приготовить смесь для ПЦР

Состав смеси ПЦР

Компонент	Конц.	Сток	100 мкл
Буфер	1х	10х	10мкл
2 mM MgCl ₂	2,5 mM	25 mM	10мкл
0,2 mM смесь дезоксинуклеозидт рифосфатов (dNTP	0,2 mM	10mM	2мкл
Праймеры №1 и №2	по 0,1 мкМ	10 мкМ	По 1мкл
Полимераза	0,05 ед./мкл	5 ед./мкл	1мкл
Матрица			1мкл
Буфер для внесения	1х	5х	20мкл
H ₂ O			До 100 мкл

При использовании амплификаторов с неподогревающейся крышкой добавить в пробирку с готовой смесью каплю минерального масла. Масло должно полностью прикрыть поверхность ПЦРсмеси.

Установить программу для ПЦР на амплификаторе:

I. Т горячего старта =95°C, 4';

II. 25-30 циклов: Тденатурации=94°C, 10"; Тотжига=(определяется праймерами), 30"; Тэлонгации=72 °C (определяется длиной амплифицируемого фрагмента);

III. Т=72°C, 45';

IV. Т хранения=4°C

Лабораторная работа №6.

Разработка схемы клонирования ДНК.

Цель работы: разобрать дизайн праймеров для ПЦР.

Ход работы:

При использовании метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) в схеме клонирования указываются праймеры и матричная последовательность с плечами по 100-200 н.п. (нуклеотидных пар). Для праймеров указывается название, температура отжига и информация о местоположении в приведённой последовательности.

Праймеры подбираются с помощью любого программного обеспечения и интернет ресурсов, позволяющих рассчитать: 1. температуру отжига; 2. наличие вторичных структур, закрывающих 3'-конец праймера; 3. неспецифическое праймирование на матрице. Температуру отжига желательно подобрать в пределах 55-65°C. Желательно избегать вторичных структур, закрывающих 3'-конец тремя и более спаренными нуклеотидами, и неспецифического праймирования.

1.

Лабораторная работа №7

Контроль результатов ПЦР методом электрофореза в агарозном геле.

Цель работы: Провести электрофорез продуктов ПЦР в агарозном теле.

Материалы и оборудование: центрифуга «vortex», камера для электрофореза, заливочный столик, источник тока, ультрафиолетовый трансиллюминатор, весы, термостат, электрическая плитка или микроволновая печь, холодильник, таймер, автоматические пипетки (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл, 1–5 мл), стерильные и нестерильные наконечники универсальные (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл, 1–5 мл), мерные цилиндры (на 10, 50 мл), колбы (на 250 мл), перчатки стоматологические текстурированные нестерильные, перчатки нитриловые, штатив для пробирок объемом 1–2 мл, штатив «рабочее место» для микропробирок на 0,5 мл 10×10 мест, лента лабораторная «Parafilm M», 6×DNA Loading Dye (краситель – 6×MassRuler™ раствор с красителями для нанесения образцов на гель), этидий бромид, Gene ruler 100 bp Plus DNA Ladder 0,5 мкг/мкл, дистиллированная вода, агароза для электрофореза, 50× TAE (или TBE) буфер, лабораторный журнал, ручка, маркеры, пищевая пленка.

Ход работы:

Электрофорез является наиболее простым методом разделения макромолекул по массе, пространственной конфигурации, заряду (под действием внешнего электрического поля). При фракционировании линейных фрагментов ДНК разделение определяется только их размером. Причинами этого являются стабильно отрицательный заряд ДНК и постоянное отношение заряда к массе.

Основными параметрами, влияющими на разделение молекул при электрофорезе, являются:

- размер пор, который зависит от вещества, образующего гель, и его концентрации;
- напряженность электрического поля.

Гели для разделения ДНК готовят из акриламида или агарозы. Для разделения фрагментов, значительно различающихся по размерам, лучше использовать гели на основе агарозы. Обычно для разделения продуктов ПЦР реакции используется 1–2%-ный агарозный гель в зависимости от длины амплифицированного фрагмента (чем больше длина, тем ниже концентрация геля). Для окрашивания ДНК после электрофореза исполь- 61 зуют бромистый этидий – краситель, несущий

положительный заряд и внедряющийся между плоскостями соседних пар оснований. Чувствительность метода достаточно высока: в агарозных гелях удастся наблюдать полосы, содержащие 10 нг двуцепочечной ДНК.

Электрофорез проводят в одном из двух буферов: ТАЕ или ТВЕ.

Для приготовления 1 л 50× ТАЕ (Трис-Ацетат-ЭДТА) потребуется:

- 242 г трис-основной (категорически не трис-НСl!!!);
- 57,1 мл ледяной уксусной кислоты;
- 100 мл 0,5 М ЭДТА; – дистиллированная вода – до 1 л, рН довести до

8,5.

Для приготовления 1 л 10× ТВЕ (Трис-борат-ЭДТА) необходимо:

- 108 г трис-основной (категорически не трис-НСl!!!); – 55 г борной кислоты;
- 9,3 г Na₄EDTA (заранее приготовленный раствор ЭДТА, титрованный и проавтоклавированный);
- дистиллированная вода – до 1 л. рН буфера равен 8,5 и доведения не требует

Порядок проведения электрофореза:

1. электрофорезную кювету залить теплым 1% агарозным гелем толщиной 0,4 см. Вертикально вставить гребенку. Дать агарозе застыть, затем осторожно удалить гребенку. Кювету с гелем поместить в электрофорезную камеру, заполненную 1х ТАЕ вровень с поверхностью агарозного геля;

2. если ПЦР-смесь не содержит красители, продукты ПЦР необходимо подготовить к электрофорезу, для этого смешать их с буфером для нанесения в соотношении 5:1;

3. осторожно внести в лунки агарозного геля исследуемую ДНК; 4. для сопоставления размера и количества образца внести в гель весовой маркер ДНК;

5. посмотреть гель в ультрафиолетовом (УФ) свете на трансиллюминаторе.

6. Сфотографировать или зарисовать результаты.

Лабораторная работа №8 Элюция фрагмента ДНК из геля.

Цель работы: провести элюцию фрагмента днк из геля.

Материалы и оборудование : гель-электрофорез.

Ход работы:

Процесс необходим для очистки амплифицированных фрагментов от других молекул ДНК и компонентов буфера. Полученные ПЦР-продукты подвергали электрофорезу в агарозном геле. После разделения фрагментов ДНК в геле 48 вырезали сегменты, содержащие нужный фрагмент, и переносили их в пробирку объемом 1 мл. Элюцию проводили с использованием DNA Extraction Kit (Fermentas) согласно рекомендациям фирмы-производителя

Для проведения элюции поставить препаративный гель-электрофорез как описано выше, но толщину геля сделать 1 см, а гребёнку взять с большими зубцами. Для гребёнки C101 (10 зубцов) в камере SE-1 (Хеликон) объём вносимого образца составляет до 20 мкл на лунку.

Продукты ПЦР соответствующего, ожидаемого размера элюировать из агарозного геля:

1. разместив гель на чистом стекле на трансиллюминаторе, вырезать перед элюируемой полосой ДНК, тонкую лунку (в полтора раза шире, чем элюируемая полоса), убрать лишние куски агарозы;
2. чтобы убрать лишние фрагменты с большим молекулярным весом вырезать лунку в геле после элюируемой полосы;
3. переместить гель в форезную камеру, расположить камеру на трансиллюминаторе;
4. наложить фитили из фильтровальной бумаги (рис. 1);
5. электрофорезную камеру и лунку, вырезанную после элюируемой полосы, заполнить 1 x TAE;
6. тонкую лунку, вырезанную перед элюируемой полосой, заполнить 5 x TAE;
7. вогнать ДНК в лунку при 35-45 В/см (2-5 мин), контролировать вхождение полосы в лунку периодически включая УФ;
8. когда ДНК войдет из геля в лунку с 5x TAE, собрать раствор ДНК из лунки;
9. концентрировать методом переосаждения ДНК этанолом.

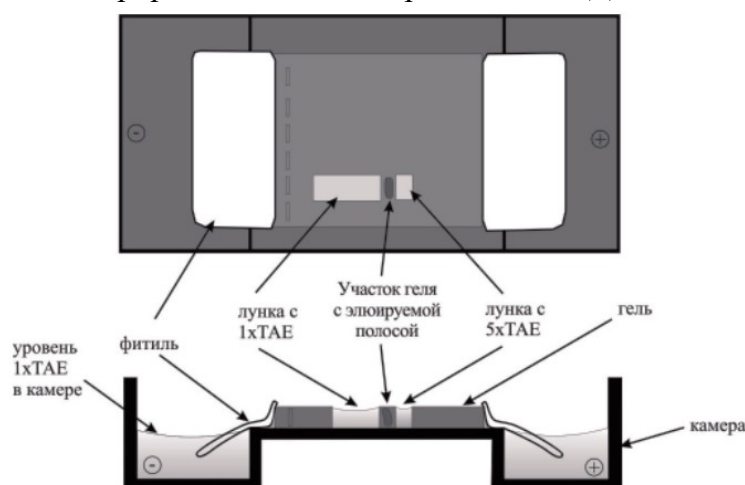


Рис.1.Схема расположения лунок и фитилей для электроэлюции.

Метод переосаждения ДНК этанолом:

1. добавить 1/10V 3M AcONa к раствору ДНК;
2. добавить 2,5 V этанола, смешать;
3. -20°C 10 минут.
4. осадить на центрифуге в течение 5 мин при максимальных оборотах (об.);
5. супернатант слить, не потеряв осадок ДНК;
6. осажённую ДНК промыть 70% этанолом;
7. осадок высушить и растворить в 25-50 мкл воды или TE.
8. хранить при -20°C;

Лабораторная работа №9

Контроль результатов элюции методом электрофореза в агарозном геле. Лигирование.

Цель работы: провести элюцию методом электрофореза в агарозном теле.

Материалы и оборудование: гель-электрофорез, трансиллюминатор.

Ход работы:

1. Подготовить элюированную и переосажденную ДНК к электрофорезу, смешать 5 мкл ДНК с 1 мкл буфера для внесения в гель;
2. для оценки концентрации образца внести в гель весовой маркер ДНК известной концентрации;

3. провести электрофорез в агарозном геле;
4. посмотреть гель на трансиллюминаторе и сфотографировать или зарисовать;
5. оценить концентрацию полученной ДНК, сопоставив интенсивности свечения исследуемого фрагмента ДНК и соответствующего по интенсивности флуоресценции фрагмента маркерной ДНК.

Лигирование элюированного и пересаженного фрагмента ДНК производится с плазмидным вектором. При клонировании ПЦР продуктов, полученных с помощью термостабильной полимеразы удобно пользоваться Т-вектором (линеаризованная плаزمид, с навешанными Т-нуклеотидами на 3'-концы).

Состав смеси:

- элюированный фрагмент – ДНК 5-500 нг;
- 5х лигазный буфер* – 2 мкл;
- вектор – 5-500 нг; Т4-ДНК-лигаза – 5 ед. (единиц активности);
- H₂O до 10 мкл.

Идеальным соотношением вектора и клонируемого фрагмента считается 1:3. Концентрация клонируемого фрагмента, должна быть примерно 0,5 пмоль на 10 мкл смеси. Если размер фрагмента ДНК составляет 500 н.п., то 0,5 пмоль этой ДНК соответствуют 100 нг.

Смесь выдержать 1 ч при NT или ночь при +4°C.

Хранить при -20°C несколько дней.

Лабораторная работа №10

Понятие вектора и его емкости. Конструирование рекомбинантной ДНК.

Цель работы: рассмотреть основные принципы технологии рекомбинантных ДНК с использованием векторных систем.

Ход работы:

Вектор - молекула ДНК или РНК, состоящая из двух компонентов: **векторной** части (носителя) и клонируемого чужеродного гена. Задача **вектора** – донести выбранную ДНК в клетку-реципиент.

Суть конструирования рекомбинантных ДНК заключается во встраивании фрагментов ДНК, среди которых находится интересующий нас участок ДНК, в так называемые векторные молекулы ДНК (или просто векторы) -плазмидные или вирусные ДНК, которые могут быть перенесены в клетки про- или эукариот и там автономно реплицироваться. На следующем этапе проводится отбор тех клеток, которые несут в себе рекомбинантные ДНК (с помощью маркерных признаков, которыми обладает сам вектор), и затем индивидуальных клонов с интересующим нас сегментом ДНК.

Механизмы конструирования рекомбинантной ДНК

- Обработка ферментами- рестриктазами (более 200 ферментов) донорной и реципиентной ДНК (гидролиз) в заданном участке
- Разрезание (линейно или ступенчато).
- Сшивание участков ДНК с помощью фермента полинуклеотид лигазы в одну рекомбинантную.
- Упаковка рекомбинантной ДНК в вектор (плазмиду, умеренный фаг, вирусы животных)
- Введение в клетку

Рестрикционно-лигазный метод.

Сшивка по одноименным «липким» концам. Этот метод является самым распространенным и популярным. Впервые этим способом гибридная ДНК была получена С. Коэном с сотрудниками в 1973 году. Некоторые рестриктазы, например Pst I, внося в цепи ДНК симметричные, расположенные наискось друг от друга разрывы на равных расстояниях от центра сайта узнавания и образующие «ступеньку» (рис. 15). Эти 47 комплементарные друг другу участки имеют тенденцию к ассоциации за счет спаривания оснований, и поэтому их называют комплементарными или липкими концами.

Спаривание оснований происходит только между комплементарными последовательностями, поэтому ААТТ-концы, образуемые Eco RI, не будут спариваться, например, с АГЦТ-концами, образуемыми Hind III. Но любые два фрагмента (независимо от их происхождения), образовавшиеся под действием одной и той же рестриктазы, могут слипаться за счет образования водородных связей между одонитиевыми участками комплементарных нуклеотидов.

Однако после такого спаривания полной целостности двойной спирали не будет, поскольку останется два разрыва в фосфодиэфирном остове. Для его восстановления, то есть сшивания, или лигирования нитей используют фермент ДНК-лигазу. Этот фермент в живой клетке выполняет ту же функцию - сшивание фрагментов ДНК, синтезирующихся при репликации.

Коннекторный метод.

Сшивка по "тупым" концам. Липкие концы не абсолютно необходимы для связывания фрагментов ДНК. Тупые концы также могут быть соединены за счет действия ДНК-лигазы, если и лигаза, и тупые концы присутствуют в реакционной смеси в высоких концентрациях. В этом случае реакция лигирования имеет свои особенности и ее эффективность ниже, чем при сшивке по липким концам. Впервые такие эксперименты были выполнены в 1972 году Полем Бергом в Стенфордском университете, США. Липкие концы также можно ферментативным путем присоединить к молекулам ДНК с тупыми концами. Для этого используют фермент - концевую трансферазу из тимуса телят, которая присоединяет нуклеотиды к 3'-концам цепей ДНК. Если к 3'-концам одного из рекомбинируемых *in vitro* фрагментов ДНК с помощью концевой дезоксинуклеотидилтрансферазы достроить одноцепочечные олиго (dA)-сегменты определенной длины, а к концам другого фрагмента — олиго (dT)-сегменты примерно такой же длины, то при смешении полученных таким образом фрагментов происходит спаривание за счет образования водородных связей между олиго (dA)- и олиго (dT) - последовательностями (рис. 17). Для ковалентного соединения двух фрагментов используется ДНК-лигаза. Эти процедуры составляют основу для второго общего метода получения рекомбинантных молекул ДНК.

Сшивка фрагментов с разноименными липкими концами. В ситуации, когда необходимо сшить фрагменты, образованные разными эндонуклеазами рестрикции, и имеющие разные, то есть некомплементарные друг другу липкие концы, применяют так называемые линкеры (или "переходники"). Линкеры - это химически синтезированные олигонуклеотиды, представляющие собой сайты рестрикции или их комбинацию. Впервые эту идею предложил Шеллер с сотрудниками в 1977 году.

Лабораторная работа №11

Стратегия клонирования прокариот и эукариот.

Лабораторная работа №12

Посев и культивирование бактерий *E. coli*.

Цель работы: выяснить как происходит посев и культивирование бактерий *E.coli*.

Ход работы:

Посев и культивирование бактерий *E. coli* можно осуществлять в жидких и агаризованных средах.

Приготовить чашки Петри со средой LA и ампициллином:

1. расплавить среду LA на водяной бане или в микроволновой печи;
2. остудить среду LA до 65°C;
3. внести по 20-25 мл среды LA в чашки Петри 90 мм;
4. добавить ампициллин конечной концентрацией 200-400 мкг/ мл, тщательно размешать;
5. дать затвердеть среде, выдержав чашки в стерильном боксе под УФ 30-60 мин.
6. Чашки Петри со средой, замотанные парафильмом, хранить при +4°C.

Пересев бактерий на чашки Петри с агаризованной средой осуществляется прокаленной, остуженной петлей (при пересеве с чаш- * Лигазный буфер поставляется производителем в комплекте с лигазой. 15 ки Петри) или простерилизованным стеклянным шпателем (при пересеве из жидкой культуры). При пересеве из жидкой культуры материал в объеме 10-50 мкл переносят на чашку стерильной пипеткой. Шпатель окунают в этанол и поджигают, для каждого посева промывка этанолом осуществляется 2-3 раза. Шпатель остужается об агаризованную среду на чашке. Затем посевная культура втирается шпателем досуха в агаризованную среду

. Посев бактерий в пробирки с жидкой средой по 5-10 мл осуществляется в ламинарном шкафу прокаленной, остуженной петлей (при пересеве с чашки Петри) или стерильной пипеткой (при пересеве из жидкой культуры). Культивирование на шейкере-инкубаторе проводить при 200 об./мин при 37°C.

Лабораторная работа №13

Трансформация *E. coli*. плазмидной ДНК.

Цель работы: понять как происходит трансформация *E. coli*. плазмидной ДНК

Ход работы:

При клонировании в векторы, позволяющие проводить сине-белую селекцию, следует использовать для трансформации штаммы типа *E. coli* TG1.

Метод кальциевой трансформации:

1. рост культуры бактериальных клеток *E. coli* до OD=0,2;
2. центрифугирование (ЦФ) 1 мин и удаление надосадка*;
3. добавление 1 мл 0,1 М CaCl₂;
4. ЦФ и удаление надосадка;
5. добавление 0,1 мл 0,1 М CaCl₂ и 5 мкл лигазной смеси;
6. 1 ч на льду;
7. 2' 42°C;
8. добавление 1 мл LB среды;
9. 30' 37°C.

Смесь высеять на чашку с ампициллином (200 мкг/мл). При клонировании в вектор, позволяющий проводить синебелую селекцию колоний, добавить в чашки 1 mM IPTG, 20 мкг/мл X-Gal.

Лабораторная работа №14

Анализ полученных конструкций.

Цель работы: сделать анализ полученных конструкций.

Ход работы:

Анализ клонов по фенотипу.

Наличие плазмиды в клетках *E. coli* определяется ростом на среде с добавлением антибиотика (ампициллин).

Наличие вставки целевого фрагмента в векторе, позволяющем проводить синевелую селекцию колоний (например, вектора серии pUC), определяется по цвету колоний: синие – нет вставки, белые – есть вставка.

Анализ клонов методом ПЦР.

Чтобы определить наличие вставки при А/Т-клонировании ПЦРфрагментов, следует поставить ПЦР с внешними универсальными праймерами (uniDir и uniRev), ожимающимися на векторе (рис. 1).

Для определения ориентации вставки (гена) по отношению к промотору следует использовать один внешний праймер и один внутренний, из тех, по которым, амплифицировался клонируемый фрагмент.

При использовании внешнего праймера uniDir и внутреннего праймера Dirin клонируемый ген будет расположен под Plac промотором (в случае векторов серии pUC, в т.ч. pTZ57R).

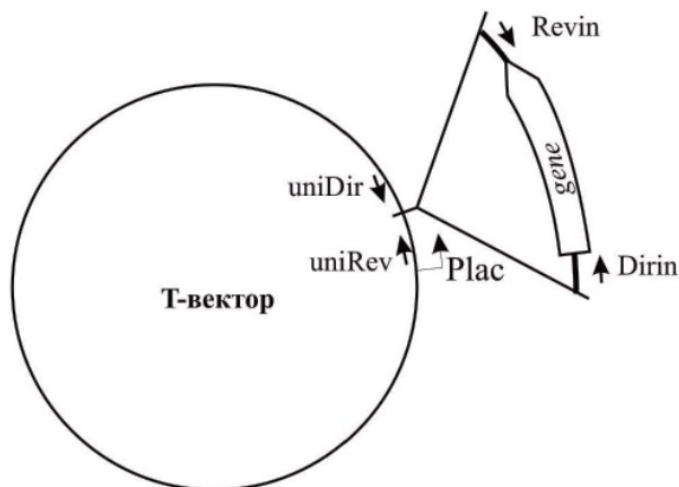


Рис. 1. Схема расположения внутренних (Dirin и Revin) и внешних (uniDir и uniRev) праймеров на Т-векторе. Plac – промотор лактозного оперона

Лабораторная работа №15

Генная дактилоскопия и полный сиквенс нуклеотидных последовательностей ДНК

Цель работы: решить генетические задачи.

Задачи для освоения:

1. Ниже приведён фрагмент ДНК, можно ли встроить его в плазмиду pSC101?

5'-АГГЦЦТГААТТААГГЦААТАГТГТГААТЦА-3' 3'-

ТЦЦГГАЦТТААТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТТАГТ-5'

2. Ниже приведены два одноцепочечных фрагмента ДНК. Какой из них в двухцепочечном варианте можно использовать для встраивания в плазмиду pSC101?

а) 5'-ГГЦЦТГААТТЦААГЦАТАГТГТГААТТЦАА-3' б) 5'-
ТЦЦГГАЦТТААТТГТТТТТТТЦАЦАЦТТАГТ-3'

3. Кольцевая плазмида pBR322 имеет участки расщепления различными рестриктазами. Какой из ниже приведённых фрагментов двухцепочечной ДНК можно встроить в данную плазмиду?

5'-ЦЦГАТТЦАГАТГТААГГЦААТАГТГТГАТТЦАЦА-3' 3'-
ГГЦТААГТЦТАЦАТТЦГТТТТТТТЦАЦАЦТААГТГТ-5' 5'-
ЦЦТТААГЦТТААГГЦТААГГЦААТАГААГЦТТТЦААТГ-3' 3'-
ГГААТТЦГААТЦЦГАТТЦЦГТТТТТЦГАААГТТАЦ-5'

4. Какой из ниже приведённых фрагментов двухцепочечной ДНК можно встроить в плазмиду pBR322?

5'-ЦЦГААТТЦАГАТГТААГГЦААТАГТГТГААТТЦАЦА-3' 3'-
ГГЦТТААГТЦТАЦАТТЦГТТТТТТТЦАЦАЦТТААГТГТ-5'
5'-ЦЦТТААГЦТТААГГЦТААГГЦААТАГААГЦТТЦАЦАТГ-3' 3'-
ГГААТТЦГААТЦЦГАТТЦЦГТТТТТЦГАААГТТАЦ-5'

5. В плазмиде pUC18 имеется полилинкерный участок, который содержит сайты рестрикции для 10 различных рестриктаз. Можно ли встроить в эту плазмиду приведённые ниже фрагменты двухцепочечной ДНК?

5'-ЦЦГААТТЦАГАТГТААГГЦААТАГТГТГААТТЦАЦА-3' 3'-
ГГЦТТААГТЦТАЦАТТЦГТТТТТТТЦАЦАЦТТААГТГТ-5'
5'-ЦЦТТААГЦТТААГГЦТААГГЦААТАГААГЦТТТЦААТГ-3' 3'-
ГГААТТЦГААТЦЦГАТТЦЦГТТТТТЦГАААГТТАЦ-5'

6. Имеется фрагмент двухцепочечной ДНК следующего состава:

5'- ТАГГАТЦЦАТТАААТАГТГГАТЦЦГТ -3' 3'-
АТЦЦТААГГТААТТТТТТТТЦАЦЦТАГГЦА-5'

Можно ли встроить данный фрагмент в плазмиду pBR322? Как подтвердить, что фрагмент чужеродной ДНК встроен в плазмиду pBR322?

7. В плазмиду pBR322 вставлен фрагмент чужеродной ДНК. Трансформированные такой плазмидой бактерии растут на питательной среде с ампициллином, но не растут на питательной среде, содержащей тетрациклин. Какой известной вам рестриктазой можно вырезать чужеродную ДНК из плазмиды?

8. Ген *Ms* находится в кольцевой плазмиде величиной 5 000 нуклеотидных пар (5 000 нп). Разрезание плазмиды рестрикционным ферментом Hind III даёт фрагменты 1, 2 и 3. Тандемная копия гена *Ms* содержится только в одном Hind III фрагменте. Если ген *Ms* кодирует регуляторный белок MSS4, состоящий из 300 аминокислот, то укажите в каком фрагменте плазмиды расположены копии гена *Ms*?

Тест 1

Ниже приведены 4 правильных ответа для 8 задач (1 – 8). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–. Полное совпадение спектров ДНК в двух образцах говорит о том, что скорее всего они были взяты у одного человека (или у однояйцевых близнецов).

–. Биологическим отцом данного ребёнка может быть только мужчина имеющий спектр ДНК №2.

–. Из семи подозреваемых преступником мог быть только человек обладающий спектром ДНК №3.

–. Нуклеотидная последовательность первых 20 нуклеотидов в рестрикционном фрагменте ДНК дрозофилы будет следующая: ТЦАЦТГЦЦЦ-ГЦТТТЦЦАГТЦ.

–. Нуклеотидная последовательность первых 20 нуклеотидов в рестрикционном фрагменте ДНК дрозофилы будет следующая: ТЦГЦТГЦЦГГ-ЦТАТЦЦАГТЦ.

Тест 2

Ниже приведены 4 правильных ответа для 8 задач (1 – 8). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–. Они могут быть только однойцевыми близнецами.

–. Предполагаемым преступником может быть только человек имеющий спектр ДНК №3.

–. Нуклеотидная последовательность рестрикционного фрагмента ДНК мыши следующая:

АЦГЦЦЦГААТАГЦЦЦАГАТТ

–. Первые 40 нуклеотидов во фрагменте ДНК дрозофилы будут иметь следующую последовательность:

ТЦАЦТГГЦЦГЦТТТЦЦАГТЦГГГАААЦТГТЦГТГЦЦАГЦ

–. Первые 40 нуклеотидов во фрагменте ДНК дрозофилы будут иметь следующую последовательность:

ТЦАЦТГГЦЦГЦТТТЦЦАГТАЦГГГАААЦТГТАЦГТГЦААГЦ

Лабораторная работа №16

Плазмида. Понятие вектор. Векторы: плазмиды, фаговые векторы, искусственные конструкции, фазмиды, челночные векторы.

Цель работы: Ознакомиться с простейшими векторами, сконструированными на основе плазмид, освоить методы введения и клонирования чужеродных ДНК с помощью плазмидных векторов на примере решения типовых задач.

Ход работы:

С помощью ферментов рестриктаз и лигаз исследователи научились конструировать разнообразные по своим составным частям гибридные (рекомбинантные) ДНК, путём сшивки фрагментов разных видов *in vitro*. Но как полученным гибридным генам попасть в клетку и начать там работать? Для доставки чужеродных генов в различные организмы учёные стали применять специальные устройства, так называемые вектора. Вектор – это молекула ДНК, способная самостоятельно реплицироваться в клетках различных организмов и обеспечивать размножение (клонирование) и работу (экспрессию) встроенного в неё искусственно какого-либо гена. В английской литературе вектор часто обозначается словом *vehicle* – повозка. Идеальными векторными молекулами, созданными самой природой, оказались плазмиды, представляющие собой небольшие кольцевые молекулы ДНК, самостоятельно живущие в цитоплазме бактерий. Плазмиды способны к автономной репликации, обладают генами устойчивости к различным антибиотикам, что позволяет легко обнаружить их присутствие в клетках, плазмиды могут внедряться в хромосому клетки хозяина, а также имеют участки ДНК (сайты рестрикции) для действия ряда рестриктаз. Это означает, что каждая такая рестриктаза может разрезать кольцо плазмидной ДНК и переводить её в линейное состояние. После чего линейную плазмиду можно легко соединить с фрагментом ДНК другого вида с подходящими липкими концами.

Первым успешным вектором-повозкой, который начали использовать в генной инженерии, стала кольцевая плазмида pSC101. Она несет только один участок расщепления (сайт рестрикции) рестриктазой *EcoR1* и превращается под действием этого фермента из кольцевой в линейную молекулу, концы которой могут «слипаться»

между собой или с любыми фрагментами другой ДНК, полученными под действием той же рестриктазы. Кроме того, она несет ген устойчивости к антибиотику тетрациклину, а значит легко обнаруживается в бактериях, если их растить на среде с этим антибиотиком. Все эти свойства pSC101 и были использованы для создания и клонирования первых гибридных (рекомбинантных) ДНК, которые были бы функционально активными, то есть могли бы стабильно существовать в клетке и наделять (трансформировать) ее новыми признаками.

По мере развития методов генной инженерии совершенствовались и плазмидные векторы. Широкое распространение получила плаزمида pBR322. У нее больше участков, разрезаемых различными рестриктазами, следовательно, с ней можно «сшивать» самые разные фрагменты ДНК. Более того, у pBR322 не один, а два маркера для селекции на бактериальных средах: помимо тетрациклина эта плазмида кодирует еще устойчивость к ампициллину. Если один из этих генов разрезать определенной рестриктазой, то при встраивании в это место фрагмента чужеродной ДНК целостность гена нарушается и определяемый им признак исчезает. Это позволяет легко отбирать гибридные плазмиды, специальным образом введенные в бактериальные клетки кишечной палочки *E. coli* при помещении их на твердую питательную среду с антибиотиками ампициллином и тетрациклином и на среду только с ампициллином. Трансформированные бактерии *E. coli*, т.е. содержащие гибридные плазмиды, растут на среде с ампициллином, но не растут на среде с двумя антибиотиками, потому что ген тетрациклиновой устойчивости в плазмиде поврежден вставкой. Селективный рост позволяет отбирать и выращивать только клетки, содержащие гибридные молекулы ДНК. Многие годы успешно применяется еще один класс плазмидных векторов, относящихся к типу pUC. У этой плазмиды величиной 2,7 кб селекционным маркером является ген резистентности к ампициллину (*amp^r*). Кроме того, имеется крайне интересный ген *lacZ*, в котором расположен полилинкер или участок множественного клонирования длиной около 200 н.п., содержащий 10 сайтов рестрикции. В результате инсерции (вставки) чужеродной ДНК в полилинкер нарушается работа гена *lacZ* в плазмиде. Колонии бактерий содержащие нормальный и поврежденный вставкой гены легко различаются если поместить клетки в чашки Петри на среду содержащую субстрат X-Gal, который расщепляется ферментом β -галак-тозидазой (продукт гена *lacZ*), с образованием нерастворимого осадка сине-голубого цвета. Если образовались колонии, окрашенные в синий цвет, значит, в этих бактериальных клетках плазмиды не содержат вставки чужеродной ДНК. В тоже время бактериальные клетки, которые содержат плазмиды со встроенной ДНК, образуют неокрашенные колонии. Следовательно, достаточно лишь взглянуть на трансформированные бактериальные клетки и можно с уверенностью сказать успешно ли прошло клонирование вставленной в плазмиду pUC18 чужеродной ДНК или нет. Поэтому гены подобные *lacZ* получили название репортерных.

Помимо плазмид в качестве векторов стали успешно использовать фаги и вирусы. Позже были созданы космиды – особый тип векторов, сочетающих свойства плазмиды и фага.

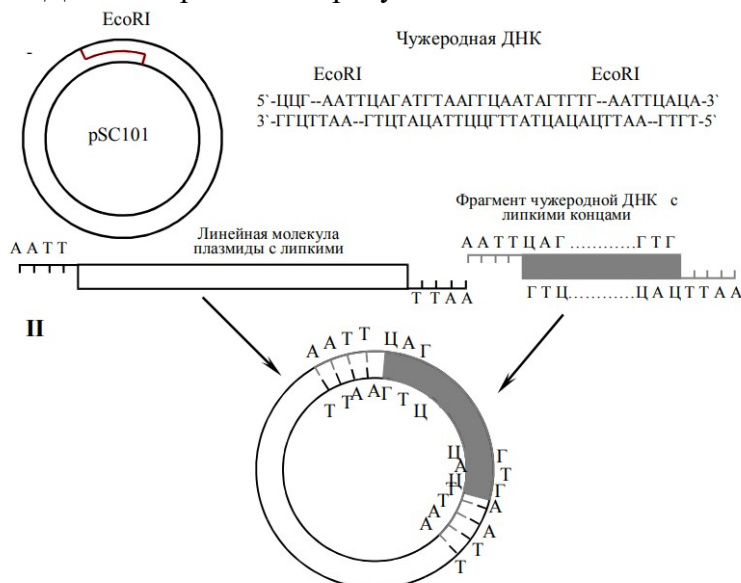
Таким образом, последовательна была создана основная триада элементов техники генной инженерии: выделение генов, «сшивание» их с вектором, доставка гибридной структуры в конкретный (реципиентный) организм, где она сможет размножаться и наследоваться в потомстве.

1. Кольцевая плазмида pSC101 несет только один участок расщепления рестриктазой EcoRI. Какой из приведённых ниже фрагментов ДНК можно встроить в данную плазмиду?

5'-ЦЦГААТТЦАГАТГТААГГЦААТАГТГТГААТТЦАЦА-3' 3'-
 ГГЦТТААГТЦТАЦАТТЦГТТТАТЦАЦАЦТТААГТГТ-5' 5'-
 ЦЦТТААГГЦТГААТТААГГЦААТАГТГТГААТЦАЦАТГ-3' 3'-
 ГГААТЦГГАЦТТААТТЦГТТТАТЦАЦАЦТТААГТГТАЦ-5'

Решение:

Поскольку плазмида pSC101 несет один участок расщепления рестриктазой EcoRI, то в неё можно встроить только тот фрагмент ДНК, который также может быть разрезан рестриктазой EcoRI. Поэтому из двух фрагментов двухцепочечной ДНК, приведённых выше, в плазмиду pSC101 можно встроить лишь первый, так как только он содержит участки разрезания для EcoRI. Схематически этапы встраивания участка чужеродной ДНК изображены на рисунке:



На первом этапе EcoR I разрезает по сайтам рестрикции плазмиду и первую молекулу ДНК с образованием фрагментов ДНК с липкими концами. На втором этапе происходит гибридизация линейной молекулы плазмиды и фрагмента чужеродной ДНК с последующим образованием кольцевой молекулы вектора со встроенным участком чужеродной ДНК и сшивание их при помощи фермента лигазы.

Задачи для освоения:

- Ниже приведён фрагмент ДНК, можно ли встроить его в плазмиду pSC101?
 5'-АГГЦЦТГААТТААГГЦААТАГТГТГААТЦА-3' 3'-
 ТЦЦГГАЦТТААТТЦГТТТАТЦАЦАЦТТААГТ-5'
- Ниже приведены два одноцепочечных фрагмента ДНК. Какой из них в двухцепочечном варианте можно использовать для встраивания в плазмиду pSC101?
 - 5'-ГГЦЦТГААТТЦААГЦАТАГТГТГААТТЦАА-3'
 - 5'-ТЦЦГГАЦТТААТТГТТТАТЦАЦАЦТТААГТ-5'
- Кольцевая плазмида pBR322 имеет участки расщепления различными рестриктазами. Какой из ниже приведённых фрагментов двухцепочечной ДНК можно встроить в данную плазмиду?
 5'-ЦЦГАТТЦАГАТГТААГГЦААТАГТГТГАТТЦАЦА-3' 3'-
 ГГЦТААГТЦТАЦАТТЦГТТТАТЦАЦАЦТААГТГТ-5'

Лабораторная работа №17.

Рекомбинантная ДНК.

Цель работы: определить суть метода рекомбинантной ДНК.

Ход работы:

Рекомбинантная ДНК

Это модифицированная молекула ДНК, которая включает гены из нескольких источников, либо с помощью лабораторных методов, либо путем генетической рекомбинации.

Технология, используемая для получения рекомбинантной ДНК, известна как **технология рекомбинантной ДНК**, которая широко известна как **генная инженерия**.

- Рекомбинантная ДНК - это фрагмент ДНК, который образуется в результате сочетания по меньшей мере двух генов из двух разных источников.

- Рекомбинантная ДНК возможна, потому что ДНК всех организмов имеет одинаковую химическую структуру, но разные нуклеотидные последовательности в общей идентичной структуре.

- Рекомбинантная ДНК также известна как химерная ДНК, поскольку эта ДНК может быть образована различными видами организмов, такими как мифические химеры.

Использование рекомбинантной ДНК

Сельское хозяйство

Рекомбинантная ДНК играет важную роль в производстве продуктов питания из-за количества продуктов, производимых растениями.

- В случае растений рекомбинантная ДНК использовалась для повышения устойчивости сельскохозяйственных культур к вирусам / вредителям.

- Рекомбинантная ДНК обладает повышенной устойчивостью к суровым условиям окружающей среды.

Животные

Рекомбинантная ДНК играет важную роль у животных. В случае животных, бычьего соматотропина (по британскому летнему времени), - это гормон, который вставляется оно в дойных коров для **повышения надоев**.

Вакцины

Рекомбинантная ДНК используется в вакцинах, которые включают прямое введение генетического материала в организм человека. Плазмида или петля ДНК из чужеродного антигена, который является мишенью иммунизации, составляет этот генетический материал. Наши клетки поглощают ДНК, как только она вводится в мышечную ткань, и начинают генерировать чужеродные белки, которые кодируются в плазмидах. Эти белки помогают иммунологическим реакциям нашего организма на целевой антиген.

ДНК-вакцины потенциально могут быть более безопасными, дешевыми и долговечными, чем современные методы вакцинации.

Лечение заболеваний

С помощью рекомбинантной ДНК можно лечить еще множество болезней и недугов.

- Пациенты с диабетом значительно выиграли от производства инсулина с использованием технологии рекомбинантной ДНК. Ученые теперь могут производить самые безопасные и чистые версии инсулина на рынке таким образом, чтобы человеческий инсулин был идентичен инсулину поджелудочной железы.

- Пациентам с бесплодием очень помогли рекомбинантный человеческий хорионический гонадотропин (r-hCG), рекомбинантный человеческий лютеинизирующий гормон (r-hLH) и рекомбинантный человеческий фолликулостимулирующий гормон (r-hFSH) - все это гормоны, которые помогают

овуляции и созреванию фолликулов работать должным образом, что необходимо для успешного оплодотворения.

Инструменты технологии рекомбинантной ДНК

Среди ферментов, которые способствуют разрезанию, синтезу и связыванию, являются ферменты рестрикции, полимеразы и лигазы.

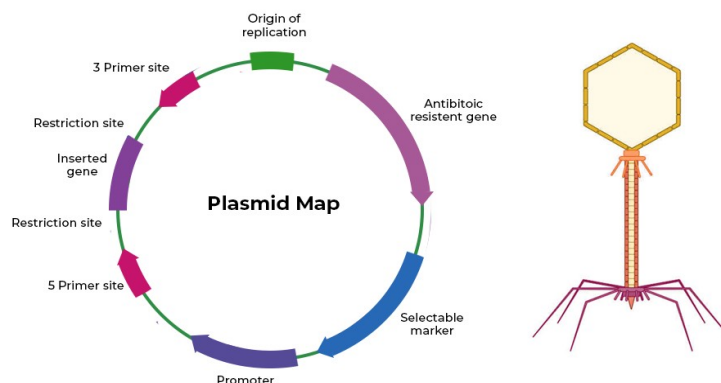
Ферменты рестрикции, используемые в технологии рекомбинантной ДНК, оказывают значительное влияние на то, где предполагаемый ген вставляется в векторный геном. Существует два типа эндонуклеаз и экзонуклеаз.

- **Экзонуклеазы** удаляют нуклеотиды с концов нитей, тогда как эндонуклеазы разрезают внутри нити ДНК.

- **Эндонуклеазы** рестрикции специфичны для последовательности и разрезают ДНК в заранее определенных местах. Эти последовательности обычно являются палиндромными последовательностями.

Они исследуют общую длину ДНК и удаляют определенную область, известную как **сайт рестрикции**. В результате у последовательности образуются липкие концы. Одни и те же ферменты рестрикции используются для вырезания как векторов, так и желаемых генов, что приводит к дополнительным замечкам.

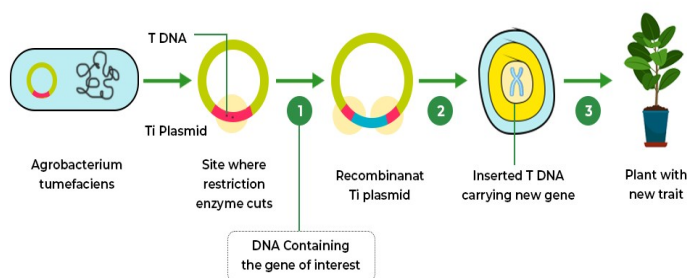
Это упрощает связывание лигазами нужного гена с **вектором**.



Желаемый ген переносится и интегрируется в векторы. Они являются основным средством, с помощью которого желаемый ген переносится в организм хозяина, что делает их важнейшим компонентом инструментов технологии рекомбинантной ДНК. Наиболее популярными векторами, используемыми в технологии рекомбинантной ДНК, являются бактериофаги и плазмиды из-за их высокого числа копий. Компонентами векторов являются источник репликации, представляющий собой последовательность нуклеотидов, с которых начинается репликация, селективный маркер, состоящий из генов, которые проявляют устойчивость к специфическим антибиотикам, таким как ампициллин, и сайты клонирования, которые представляют собой места, где вводятся желаемые ДНК, и распознаются ферментами рестрикции.

Организм используется в качестве хозяина, в который вводится рекомбинантная ДНК. Хозяин, который принимает вектор, созданный с требуемой ДНК с помощью ферментов, является основным инструментом технологии рекомбинантной ДНК. Эти рекомбинантные ДНК могут быть введены в организм хозяина несколькими способами, включая микроинъекцию, биолистику или генную пушку, попеременное охлаждение и нагревание, использование ионов кальция и т.д.

Процесс технологии рекомбинантной ДНК



Технология рекомбинантной ДНК включает в себя несколько этапов для получения желаемого результата.

Шаг 1: Выделение генетического материала

Основным этапом создания рекомбинантной ДНК является выделение желаемой ДНК в ее чистом виде. Он не содержит никаких других макромолекул.

Шаг 2: Вырезание гена в местах распознавания

Желаемый ген вставляется в векторный геном в этом месте после того, как ферменты рестрикции играют важную роль в определении местоположения.” Расщепление ферментом рестрикции.” Это название процедуры.

Шаг 3: Использование полимеразной цепной реакции для увеличения копий генов (ПЦР)

В этой процедуре одна копия ДНК умножается на сотни или миллионы, а затем правильный интересующий ген вырезается с помощью ферментов рестрикции.

Шаг 4: Лигирование молекул ДНК

С помощью фермента ДНК-лигазы фрагмент ДНК и вектор соединяются вместе на этой фазе.

Шаг 5: Рекомбинантная ДНК вводится в организм хозяина

Трансформация - это термин, используемый для описания процесса вставки рекомбинантной ДНК. Рекомбинантная ДНК вводится в клетку-хозяина с помощью этой техники. Рекомбинантная ДНК размножается после введения в клетку-хозяина и подвергается воздействию продуцируемой формы белка в оптимальных условиях. Рекомбинантный ген передается потомству измененными клетками.

Лабораторная работа №18

Клонотеки. Основы клонирования: дрожжей, растений, животных и человека.

Цель работы: понять каким образом происходит клонирование дрожжей, растений, животных и человека.

Ход работы:

Банком генов, или библиотекой генома (клонотекой), называют **совокупность клонов бактерий или фаговых частиц, в которой содержится, по меньшей мере, по одному экземпляру каждой последовательности генома исследуемого организма**. Необходимое количество клонов в клонотеке определяется отношением размера генома и размеров клонируемых фрагментов ДНК.

Процедура выделения ДНК в клетки дрожжей довольно проста. Обычно целлюлозную клеточную стенку удаляют обработкой ферментами, получая так называемые сферопласты. Их инкубируют с ДНК в присутствии CaCl_2 и полиэтиленгликоля. Мембрана при этом становится проницаемой для ДНК.

Дальнейшая инкубация сферопластов в среде с агаром восстанавливает клеточную стенку. Селекция дрожжевых клонов, трансформированных рекомбинантными плазмидами, основана на применении в качестве клеток-хозяев определенных мутантов, не способных расти на среде, в которой отсутствует тот или иной питательный компонент. Векторная плазмида содержит гены, которые при попадании в клетку-хозяина придают ей этот недостающий признак. Трансформанты легко отбираются по их способности давать колонии на обедненной среде. Применяя приемы, аналогичные использовавшимся при клонировании в бактериях, удается достичь синтеза чужеродных белков в дрожжевых клетках. Эти клетки подобно *V. subtilis* секретируют большое количество белка во внеклеточную среду, что используется также для секреции чужеродных белков, например интерферона человека.

Разработка технологии клонирования растений открывает перспективу ускоренной генетической селекции растений с заданными, нужными человеку, качествами. Клональное микроразмножение растений можно осуществлять путём регенерации растения из каллуса. Этого эффекта можно достигнуть изменением пропорционального соотношений ауксинов и цитокининов в питательной среде. Первичный каллус можно получать путём использования любых клеток и тканей растений. Это возможно благодаря тому, что клетки растений могут дифференцироваться при наличии определенного количества фитогормонов в питательной среде. Но для этой цели чаще используют клетки меристемы. Для каллусообразования в питательной среде должны присутствовать цитокинин (индуцирующий клеточное деление) и ауксин (дифференцирующий клетки). Каллус, после того, как каллусная культура получена, может быть разделён на несколько частей, каждая из которых может быть использована в целях регенерации целых растений.

Процесс клонирования животных протекает следующим образом - ядро соматической клетки пересаживают в лишённую ядра яйцеклетку и имплантируют ее в организм матери (если это животное, требующее вынашивания).

Энуклеация традиционно проводится микрохирургически или путем разрушения ядра ультрафиолетом, пересадка производится с помощью тонкой стеклянной пипетки или электрослиянием. По новой технологии, яйцеклетки разрезаются пополам, и половинки с ядрами выбрасываются. Выбирается пара оставшихся пустых половинок, которые «склеиваются» в одну яйцеклетку после добавления нового ядра.

Клонирование человека происходит следующим образом: берется клетка пациента, ядро которой пересаживается в цитоплазму (внутреннюю среду) яйцеклетки, уже лишившейся своего ядра. Эта яйцеклетка множится, развивается в ранний эмбрион пяти дней от роду. Затем в чашках Петри полученные стволовые клетки превращаются в ткани, необходимые ученым и медикам.

Лабораторная работа №19. **Введение нового гена в клетку.**

Цель работы: изучить каким образом происходит введение нового гена в клетку.

Ход работы:

Ввести рекомбинантный ген в клетку можно 2 способами: используя вектора или путем прямого введения.

Требования к векторной ДНК, ее состав

Вектор - молекула ДНК или РНК, состоящая из двух компонентов: векторной части (носителя) и клонируемого чужеродного гена. Задача вектора – донести выбранную ДНК в клетку-реципиент, встроить ее в геном, позволить идентификацию трансформированных клеток, обеспечить стабильную экспрессию введенного гена.

Таким образом, вектор должен быть небольшим, способным поддерживаться в клетке-хозяине (реплицироваться), многократно копироваться (амплифицироваться), экспрессировать соответствующий ген (содержать соответствующие регуляторные последовательности), должен иметь маркерный ген, позволяющий различать гибридные клетки для эффективной селекции их; должен быть способен передаваться в клетку соответствующего организма.

Регуляторные последовательности, отвечающие за стабильную экспрессию гена, будут рассмотрены позднее.

Можно выделить 2 группы маркерных генов, позволяющие отличить трансформированные клетки:

1. Селективные гены, отвечающие за устойчивость к антибиотикам (канамицину, тетрациклину, неомицину и др.), гербицидам (у растений). Это могут быть гены ауксотрофности по какому-либо субстрату и т.д. Основной принцип работы такого маркера – способность трансформированных клеток расти на селективной питательной среде, с добавкой определенных веществ, ингибирующих рост и деление нетрансформированных, нормальных клеток.

2. Репортерные гены, кодирующие нейтральные для клеток белки, наличие которых в тканях может быть легко тестировано.

Чаще всего в качестве репортерных используются гены β -глюкуронидазы (GUS), зеленого флюоресцентного белка (GFP), люциферазы (LUC), хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT). К настоящему времени из этого арсенала наиболее часто используют гены GUS и GFP и, в меньшей степени, LUC и CAT. Используемый в настоящее время как репортерный ген GUS является модифицированным геном из *Escherichia coli*, кодирующим β -глюкуронидазу с молекулярной массой 68 кД. GUS активен в широком диапазоне условий среды с оптимумом при pH 5-8 и 37°C. Он может гидролизовать обширный спектр природных и синтетических глюкуронидов, что позволяет подбирать соответствующие субстраты для спектрофотометрического или флюориметрического определения активности фермента, а также для гистохимического окрашивания тканей *in situ* (например, в синий цвет). Фермент достаточно стабилен: он устойчив к нагреванию (время полужизни при 55°C составляет около 2 ч) и к действию детергентов. В процессе замораживания-оттаивания потери активности GUS не происходит. В составе химерных белков, созданных генно-инженерными методами, GUS обычно сохраняет свою функциональную активность. В живых клетках белок GUS также весьма стабилен и активен от нескольких часов до нескольких суток.

GFP (green fluorescent protein - зеленый флюоресцентный белок, или белок зеленой флюоресценции) был обнаружен Shimomura с соавт. в 1962 г. у люминесцирующей медузы *Aequorea victoria*. Ген GFP был клонирован в 1992 г. Prasher и соавт., и уже через несколько лет началось активное использование этого гена как репортерного в работах с самыми разными про- и эукариотическими организмами. В настоящее время ген GFP применяется в сотнях работ во всем мире, и число их стремительно нарастает. Столь быстрый рост вызван особыми свойствами белка GFP, а именно его способностью флюоресцировать в видимой (зеленой) области спектра при облучении длинноволновым УФ. Эта флюоресценция обусловлена непосредственно белком, для ее проявления не требуется субстратов или кофакторов. Благодаря этому свойству ген GFP является очень перспективным репортерным геном, позволяющим

проводить разнообразные прижизненные (недеструктивные) исследования с трансгенными организмами.

Многочисленные производные GFP получили общее название AFR (autofluorescent proteins - автофлюоресцентные белки). Из морской анемоны *Discosoma* sp. недавно выделен еще один белок DsRed, флуоресцирующий в красном свете. Еще несколько аналогичных флюоресцирующих белков было выделено в самое последнее время учеными Российской академии наук из различных коралловых полипов порядка Anthozoa. Он может быть денатурирован очень высокой температурой, крайними значениями pH или сильными восстановителями типа Na₂SO₄. При возвращении к физиологическим условиям GFP в значительной степени восстанавливает способность к флюоресценции. В составе химерных белков, созданных генноинженерными методами, GFP обычно сохраняет свою функциональную активность. В живых клетках белок GFP также очень стабилен.

CAT – гены отвечают за синтез хлорамфениколацетилтрансферазы (выделены из *Escherichia coli*). Этот фермент катализирует реакцию переноса ацетильной группы от ацетил-КоА к хлорамфениколу. Определяется гистохимически, по изменению окраски ткани при добавлении соответствующего субстрата.

LUC – ген кодирует фермент люциферазу (клонирована из бактерий и светлячка). Она вызывает свечение трансформированных клеток. Бактериальный фермент состоит из двух субъединиц. Для определения активности ферментов необходимо специальное оборудование - флуориметр и цифровая видеокамера с амплификатором светового сигнала. Фермент теряет активность при действии детергентов и повышенной температуры. Замена селективных генов на репортерные при отборе трансгенных растений часто весьма желательна, так как возможность потенциального риска для окружающей среды и здоровья человека при использовании репортерных генов практически исключена. Однако область применения репортерных генов шире, чем просто контроль трансгеноза. Другое, и, очевидно, более важное назначение репортерных генов состоит в том, чтобы выявлять (по возможности количественно) временные и пространственные особенности экспрессии данного конкретного гена, будь то собственного или чужеродного. Присоединение репортерного гена к одной лишь промоторной области позволяет исследовать в "чистом виде" ее роль в регуляции экспрессии изучаемого гена на уровне транскрипции.

Замена белок-кодирующей области гена на репортерную при сохранении участка, кодирующего 5'-концевую не транслируемую последовательность мРНК, позволяет оценить роль этой последовательности в процессах транспорта мРНК из ядра в цитоплазму и инициации трансляции.

Одно из самых важных свойств гена - способность к экспрессии. За это свойство отвечают различные генетические элементы, которые мы должны встроить в векторную молекулу, несущую ген.

Лабораторная работа № 20

Клонирование эмбриона и стволовые клетки: свойства стволовых клеток, методы получения стволовых клеток. Трансплантация и клонирование.

Цель работы: изучить клонирование стволовых клеток, а также их свойства и методы.

Ход работы:

Ранним этапом развития эмбриона млекопитающих является бластоциста, структура, у которой наружный слой клеток трофэктодермы в будущем формирует

плаценту, а внутренняя группа клеток дает начало всему зародышу и, в конце концов, новому организму. Внутренние клетки будут, следовательно, дифференцироваться во все известные 200 (или около того) специализированные соматические клетки, найденные у взрослых организмов, и поэтому относятся к плюрипотентным клеткам. Эти плюрипотентные клетки могут быть изолированы из ранних эмбрионов и при определенных условиях культивирования могут постоянно расти *in vitro*, сохраняя способность дифференцироваться в любые специализированные клеточные типы, найденные у эмбрионов и взрослых организмов, включая спермии и яйцеклетки. Такие клетки были получены из эмбрионов человека и мыши и называются плюрипотентными эмбриональными стволовыми клетками или ES-клетками.

Плюрипотентные стволовые клетки (ES) происходят из клеток внутренней клеточной массы (ICM). Эта группа клеток возникает в развитии эмбриона на стадии морулы перед имплантацией, когда ICM клетки и слой трофэктодермы (TE) разделены и формируют бластоцисту, которая затем имплантируется в матку. Эпигенетическая регуляция экстраэмбриональных (TE) и эмбриональных (ICM) линий существенно различается. Например, общий уровень метилирования ДНК в экстраэмбриональных тканях ниже. Могут отличаться поддержание импринтинга и инактивация импринтной X хромосомы с импринтингом. ICM и TE-клетки, так же как примордиальные половые клетки (PGC) детерминируются генетической программой, включая транскрипционные факторы и плюрипотентные гены.

Эпигенетическая информация кодируется метилированием ДНК, модификацией гистонов, вариантами гистонов, негистоновыми белками хроматина и подвергается большим изменениям во время развития и дифференцировки. Главной чертой эпигенетических меток является их способность наследоваться от одного клеточного поколения к другому и регулировать экспрессию генов. Считается, что эпигенетическая информация является наиболее важной для детерминации и поддержания определенной и стабильной программы экспрессии генов, которая определяет решение клеточной судьбы во время развития. Предполагается, что в тотипотентных и плюрипотентных клетках эпигенетические метки менее стабильны и более пластичны. Однако в процессе развития клеточные потенции становятся все более и более ограниченными, а эпигенетические метки все более устойчивыми и ограничительными. Тотипотентные и плюрипотентные клетки, такие как половые клетки и эмбриональные стволовые клетки, обладают уникальной способностью репрограммировать геном и удалять эпигенетические метки. Эта способность, возможно, лежит в основе их пластичности в развитии.

Культивируемые *in vitro* клетки ES получают из мышинных эмбрионов на стадии бластоцисты, говоря конкретнее, из ICM). Они остаются недифференцированными при культивировании в сыворотке с добавкой лейкемического ингибиторного фактора. Дифференцировку *in vitro* можно включить удалением LIF из культуральной среды и пересевом клеток на чашки, изготовленные из неадгезивного пластика. В этих условиях они округляются, агрегируют и формируют эмбриоидные тела, внутри которых они дифференцируются, на протяжении всего нескольких дней, во много разных соматических клеточных типов. В недифференцированном состоянии ES-клетки XX обладают двумя активными X-хромосомами. Когда индуцируют дифференцировку этих клеток, большинство клеток эмбриоидного тела претерпевают случайную X-инактивацию. Напротив, в дифференцированных ES-клетках XY экспрессия Xist и X-инактивация не происходят. Таким образом, ES-клетки представляют собой ценную модельную систему, потому что они поддаются генетическому манипулированию с использованием "нацеливания"

на гены, и, таким образом, на них можно изучать различные этапы процесса Х-инактивации

Лабораторная работа №21

Введение генов в клетки млекопитающих.

Цель работы: определить как происходит введение генов в клетки млекопитающих.

Ход работы:

Манипуляции с клетками млекопитающих можно разделить на 2 большие группы: эксперименты с соматическими клетками и эксперименты по трансформации половых клеток. В последнем случае конечный результат – получение трансгенных организмов.

Характеристика векторов для переноса генов в животные клетки.

Одними из лучших носителей для введения чужеродной информации в животную клетку являются векторы на основе ретровирусов, например, на основе вируса лейкоза мышей. Они обеспечивают высокоэффективный перенос генов и их стабильное встраивание в хромосому клеток-мишеней. В основном трансформации животных клеток осуществляют либо с помощью ретровирусов (около 40% от всех трансформаций), либо путем упаковки ДНК в липосомы (25%), реже используют аденовирусы, так как они могут вызывать сильный иммунный ответ, кроме того, невозможно их повторное введение.

Если проблема доставки чужеродной ДНК *in vitro* практически решена, а ее доставка в клетки-мишени разных тканей *in vivo* успешно решается (главным образом путем создания конструкций, несущих рецепторные белки, в том числе и антигены, специфичные для тех или иных тканей), то другие характеристики существующих векторных систем - стабильность интеграции, регулируемая экспрессия, безопасность — все еще нуждаются в серьезных доработках.

Прежде всего это касается стабильности интеграции. До настоящего времени интеграция в геном достигалась только при использовании ретровирусных либо аденоассоциированных векторов. Повысить эффективность стабильной интеграции можно путем совершенствования генных конструкций типа рецептор-опосредованных систем, либо путем создания достаточно стабильных эписомных векторов (то есть ДНК-структур, способных к длительной персистенции внутри ядер).

В последнее время особое внимание уделяется созданию векторов на базе искусственных хромосом млекопитающих (МАС - mammalian artificial chromosomes). Благодаря наличию основных структурных элементов обычных хромосом такие мини-хромосомы длительно удерживаются в клетках и способны нести полноразмерные (геномные) гены и их естественные регуляторные элементы, которые необходимы для правильной работы гена, в нужной ткани и в должное время. Такие искусственные хромосомы уже созданы для дрожжей (YAC), так как геном дрожжей полностью картирован.

Для идентификации модифицированных клеток, необходимы маркеры. Если трансформируют соматические клетки, то применяют обычно селективные маркеры. Аксель с коллегами из колледжа терапии и хирургии Колумбийского университета исправили таким образом генетический дефект клеток мыши. Они взяли фрагмент ДНК, содержащий ген тимидинкиназы (ТК), который получен из вируса герпеса, смешали эту ДНК с несколькими миллиграммами ДНК-носителя из спермы лосося и осадили ДНК на культуру L-клеток мыши, в которых ген ТК отсутствовал (ТК-). С частотой 1 на 100000 клетки приобретали ген ТК, поэтому на селективной среде,

которая не позволяла расти ТК⁻ - клеткам, росли и нормально размножались ТК⁺ - клетки.

Другой селективный маркер - ген, кодирующий дигидрофолатредуктазу (ДГФР), можно использовать при трансформации немутантных линий клетки. Благодаря экспрессии многих копий этого гена животная клетка вместе с плазмидой приобретает устойчивость к высоким концентрациям ингибитора фермента, и таким образом трансформантов можно отбирать при высоких концентрациях ингибитора.

Разработано еще два универсальных вектора, содержащих генные маркеры, работающие в нормальных клетках. Они построены по одному и тому же принципу: прокариотические гены, определяющие фенотип трансгенных клеток, соединены с эукариотическими регуляторными сигналами.

Один из векторов состоит из прокариотического гена устойчивости к антибиотику неомицину, встроенного в раннюю область генома SV-40. Эукариотические клетки чувствительны к аналогу неомицина G 418, который инактивируется продуктом гена. Таким образом клетки, прошедшие трансфекцию приобретают способность расти на среде, содержащей G 418.

Лабораторная работа №22. Генная инженерия растений.

Цель работы: узнать, как происходит введение генов в растительную клетку.

Ход работы:

Введение генов в растительную клетку.

Ввести чужеродную ДНК в растения можно различными способами. Для двудольных растений существует естественный вектор для горизонтального переноса генов: плазмиды агробактерий. Что касается однодольных, то, хотя в последние годы достигнуты определенные успехи в их трансформации агробактериальными векторами, все же подобный путь трансформации встречает существенные затруднения. Для трансформации устойчивых («рекальцитрантных») к агробактериям растений разработаны приемы прямого физического переноса ДНК в клетку, многие из которых взяты из практики работы с клетками бактерий или животных. Эти методы достаточно разнообразны, они включают: бомбардировку микрочастицами или баллистический метод; электропорацию; обработку полиэтиленгликолем; перенос ДНК в составе липосом и др. Наиболее продуктивным и чаще всего используемым является метод бомбардировки микрочастицами. При достаточной скорости эти частицы могут непосредственно проникать в ядро, что сильно повышает эффективность трансформации. Этим же методом можно, впрочем, трансформировать и другие ДНК-содержащие клеточные органеллы - хлоропласты и митохондрии.

В последнее время был разработан и успешно применен также комбинированный метод трансформации, названный агролистическим. При этом чужеродная ДНК вводится в ткани каким-либо физическим методом, например, баллистическим. Вводимая ДНК включает как Т-ДНК вектор с целевым и маркерным геном, так и агробактериальные гены вирулентности, поставленные под эукариотический промотор. Временная экспрессия генов вирулентности в растительной клетке приводит к синтезу белков, которые 124 правильно вырезают Т-ДНК из плазмиды и встраивают ее в хозяйский геном, как и при обычной агробактериальной трансформации.

После проведения тем или иным способом трансформации растительной ткани ее помещают *in vitro* на специальную среду с фитогормонами, способствующую

размножению клеток. Среда обычно содержит селективный агент, в отношении которого трансгенные, но не контрольные клетки приобретают устойчивость. Регенерация чаще всего проходит через стадию каллуса, после чего при правильном подборе сред начинается органогенез (побегообразование). Сформированные побеги переносят на среду укоренения, часто также содержащую селективный агент для более строгого отбора трансгенных особей.

Лабораторная работа №23

Сочетание методов адаптивной системы селекции и генетической инженерии растений.

Цель работы: определить сочетание методов системы селекции и генетической инженерии растений.

Ход работы:

Генная инженерия позволяет получать новые типы растений намного быстрее, чем обычная селекция. Благодаря введению определенных генов (трансформации) происходит изменение генотипа.

С помощью генной инженерии растений решаются такие задачи:

- • повышение устойчивости к стрессовым факторам, фитопатогенам, гербицидам и пестицидам;
- • ввод генов скороспелости;
- • ввод генов симбиотической фиксации азота.

В клетках растений возможна экспрессия генов, перенесенных не только от других растений, но и от микроорганизмов и от животных. Благодаря свойству тотипотентности, из трансформированных клеток развивается целое растение с новыми свойствами.

Возможности генной инженерии растений ограничены плохой изученностью их генов. Кроме того, трудно выбрать условия регенерации растения из клеток. Пока успешно эта задача решена для картофеля, люцерны, томатов, моркови, табака и капусты. Вводить в геном растения пока удастся не более 35 кб ДНК (1 байт — это одна тройка азотистых оснований).

Большие перспективы открываются благодаря новым удачным идеям использовать при трансформации в качестве вектора искусственные бактериальные хромосомы, а также пыльцу.

Новые большие возможности заставляют более строго думать о возможных последствиях эксперимента.

Лабораторная работа №24

Тотипотентность, дифференциация, дедифференциация клеток.

Культивирование изолированных клеток и тканей на искусственных питательных средах.

Цель работы: выяснить каким образом происходит культивирование изолированных клеток и тканей на искусственных питательных средах.

Ход работы:

Условия культивирования. Для успешного культивирования изолированных клеток и тканей растений необходимо соблюдать определенные условия выращивания. Большинство каллусных тканей не нуждается в свете, так как не имеют хлоропластов и питаются гетеротрофно. Исключение составляют некоторые зеленые каллусные ткани,

такие, как каллусная ткань мандрагоры. В некоторых случаях каллусные ткани, не способные к автотрофному питанию, все же выращивают на непрерывном освещении, что является необходимым условием дальнейшего успешного морфогенеза, как у люцерны. Большинство же каллусных тканей получают в темноте или при рассеянном свете.

Детерминированные к морфогенезу ткани переносят на свет и далее 17 культивируют их при освещенности 1000-4000 лк.

Культивирование изолированных меристем и их микроразмножение также происходит на свету. Освещенность факторостатной (световой) комнаты должна составлять в зависимости от культуры 3000-10 000 лк. Необходимо учитывать фотопериод, который требуется для данного культивируемого объекта. Влажность в световой комнате должна составлять 60-70 %. Более сухой воздух способствует усыханию питательной среды в пробирках и колбах, если они закрыты ватными пробками, изменению ее концентрации и нарушению условий культивирования. Для повышения влажности в комнате можно использовать поддоны с водой.

Оптимальная температура для большинства культивируемых тканей 25- 26 °С, для культуры тканей тропических растений она может достигать 29-30 °С. В случае индукции морфогенеза температуру понижают до 18-20 °С.

Наилучшие световой и температурный режимы, а также режим оптимальной влажности можно создать при помощи климатических камер.

Лабораторная работа №25 **Культура каллусной ткани. Морфогенез.**

Цель работы: понять культуру каллусной ткани и технику его проведения

Ход работы:

Каллусная культура – это неорганизованная профилирующая (делящаяся) ткань, состоящая из дедифференцированных клеток. В дальнейшем они специализируются как каллусные, т.е. становятся таким образом дифференцированными. Каллус может образовываться как на изолированных кусочках ткани (эксплантах) *in vitro*, так и на растении при поражении.

Этапы получения каллуса:

1. Выбор экспланта

Эксплант - фрагмент ткани или органа, используемый для получения первичного каллуса. Лучшими эксплантами для получения каллуса являются: - молодая ткань; - ткань ответственная за пролиферацию (меристема).

Нежелательно использовать: - одревесневшие ткани; - старые ткани с низким уровнем метаболизма; - плохо пролиферирующие ткани (напр., мякоть плодов); - ткани, покрытые восками, суберином.

2. Стерилизация растительного материала.

На поверхности органов растений всегда находится эпифитная микрофлора. Эксплант должен быть освобожден от всех видов микроорганизмов (бактерий, грибов, микоплазм и т.д.). Поверхностная стерилизация освобождает эксплант от наружной инфекции.

ТЕХНИКА ПРОВЕДЕНИЯ СТЕРИЛИЗАЦИИ РАСТИТЕЛЬНОГО МАТЕРИАЛА:

1) Предварительная стерилизация (проводят очистку поверхности путем ее промывания проточной водой; обработки этанолом (70%-ный раствор в течение 1 мин), растворами CuSO_4 либо KMnO_4)

2) Стерилизация (в условиях ламинар-бокса предварительно простерилизованные ткани помещают в стерилизующий раствор)

3) Постстерилизация (растительный материал отмывают от стерилизующего агента 3-4 порциями стерильной дистиллированной воды)

4) Перенос стерильных эксплантов на питательную среду

5) Получение первичного каллуса – При оптимально подобранной среде первичные каллусы в количестве достаточном для пересадки образуются в течение 3-8 недель в зависимости от вида растения.

6) Субкультивирование (пассирование) – Первичный каллус разделяют на части, которые в дальнейшем культивируются отдельно. Следует обратить внимание на размеры трансплантов, переносимых на свежую питательную среду: если они слишком малы, то дальнейший рост каллуса может быть угнетен.

Основным условием превращения растений клетки в каллусную является присутствие в питательной среде фитогормонов.

Ауксины вызывают процесс дедифференцировки клетки, приготавливающие её к делению, а цитокинины – пролиферацию (деление) дедифференцированных клеток.

Если в питательную среду без гормонов поместить кусочек стебля, листа, корня (без верхушки) или любой другой эксплант, состоящий из специализированных (дифференцированных) клеток, то деление клеток не произойдет и каллусная ткань не образуется.

Это связано с неспособностью дифференцированных клеток к делению. Каждая клетка имеет три фазы роста: 1) деление; 2) растяжение; 3) дифференцировку. Характерной чертой заключительной фазы роста является утолщение вторичной клеточной оболочки и потеря клеткой способности к делению. Для того, чтобы дифференцированные клетки вновь приобрели способность к делению, необходимо, чтобы произошла их дедифференцировка, т.е. клетки как в меристематическое состояние. Размножение дедифференцированных клеток приводит к анархическому, неорганизованному росту, в результате чего образуется каллусная ткань. Таким образом, превращение специализированной ткани в каллусную связано с индукцией клеточного деления, способность к которому она потеряла в процессе дифференцировки.

Лабораторная работа № 27

Приготовление и стерилизация питательной среды Мурасиге Скуга.

Цель работы: понять, как происходит приготовление и стерилизация питательной среды Мурасиге Скуга.

Материалы и оборудование: Химические стаканы, колбы, мерные цилиндры от 5 мл до 2 л, пробирки, пипетки от 0,01 мл до 10 мл или дозаторы, весы аналитические до 500 г, весы торсионные до 100 мг, пинцеты, ножницы, шпатели, электроплитки, магнитные мешалки, химические реактивы или готовые маточные растворы макро- и микросолей, витаминов, фитогормонов.

Ход работы:

1. В химический стакан емкостью 2 л поместить 20 г сахарозы, долить дистиллированной водой до 400 мл и растворить.

2. Добавить к раствору сахарозы 50 мл маточного раствора макросолей, 1 мл микросолей, 5 мл хелата железа, 5 мл хлористого кальция.

3. Приготовить агар: навеску 7 г поместить в стакан и залить водой до 200 мл, растворить, нагревая плитке или газовой горелке, при постоянном помешивании. Готовый агар долить к раствору солей.

4. Питательную среду довести до нужного объема (1 л) дистиллированной водой. Измерить pH среды: если pH превышает 5,5-6,0 добавить несколько капель 0,1 н HCl, если ниже этого значения – 0,1 н KOH.

5. Готовую питательную среду разлить в колбы, около 25мл, закрыть их фольгой.

6. Поместить колбы в автоклав и проавтоклавировать.

7. Металлические инструменты завернуть в плотную бумагу и поместить в сушильный шкаф для стерилизации сухим жаром при t_0 170-200°C в течение 2 часов.

8. Чашки Петри, колбы с питательной средой, вату, марлю, фильтровальную бумагу, колбы с дистиллированной водой (закрытые фольгой) поместить в автоклав.

9. Автоклав привести в рабочее состояние: закрыть плотно крышку, воду залить до метки. Включить автоклав, давление пара довести до метки 1,2 атм. (в паровой камере), заполнить паром стерилизационную камеру, вытеснить конденсат в течении 10 минут, при этом давление пара в стерилизационной камере должно быть на уровне 0,1-0,2 атм. Довести давление в стерилизационной камере до 1 атм., включить автоматический режим.

10. Автоклавировать 20 минут при давлении в стерилизационной камере 1-1,2 атм.

11. Отключить автоклав, вытеснить пар из обеих камер довести давление до 0 атм.

12. Проавтоклавленные материалы перенести в комнату для пересадки тканей и поместить в шкафы или на стеллажи.

Лабораторная работа №28

Получение и культивирование каллусной ткани из корнеплодов моркови.

Цель работы: Индукция и получение каллусов, пригодных для регенерации растений.

Материалы и оборудование: корнеплоды моркови; автоклавленные листы фильтровальной бумаги; стерильные стаканы, чашки Петри, пробирки; автоклавленная среда MS; растворы фитогормонов кинетина и 2,4-D; спирт для стерилизации растительной ткани; скальпель, пинцеты; спиртовая горелка.

Ход работы:

Каллусную ткань довольно легко получить из корнеплодов моркови. Такой каллус способен расти длительное время и не терять способности к делению клеток и регенерации растений даже при большом количестве пассажей, то есть пересадок каллуса на новую питательную среду. Морковный каллус был одной из первых хорошо растущих каллусных культур (Готре, 1939 год).

Из каллусной ткани моркови можно получать суспензионную культуру клеток, в которой индуцируется образование соматических эмбриоидов, то есть клеточных образований, сходных с зиготическими зародышами. Суспензионная культура представляет собой мелкие агрегаты растительных клеток, сходных с каллусными, растущие в жидкой питательной среде при перемешивании. Каллусные и суспензионные культуры клеток используют для клеточной селекции на полезные признаки, для размножения растений путем регенерации, для производства физиологически активных веществ, накапливающихся в каллусах или культуральной жидкости, и для генетической инженерии.

Для получения каллуса:

1. Разогреть на плитке среду для культивирования каллусов, содержащую кинетин и 2,4-D в концентрации 2 мг/л, разлить ее по пробиркам.

2. Отобрать здоровые корнеплоды моркови и клубни картофеля, тщательно вымыть их щеткой с мылом, затем отмыть водопроводной водой и погрузить для стерилизации в 96% этанол на 5 минут без дальнейшей отмывки стерильной водой. Стерилизовать можно не целые клубни и корнеплоды, если они не вмещаются в стаканчик, а их сравнительно крупные фрагменты.

3. Кусочки растительной ткани обсушить между слоями стерильной фильтровальной бумаги. Поверхностные слои, обожженные спиртом, обрезать скальпелем.

4. Из внутренней части корнеплода моркови и части клубня, прилегающей непосредственно к глазкам клубней картофеля, нарезать экспланты толщиной около 1 мм и площадью 20-50 мм².

5. Экспланты поместить на питательную среду так, чтобы одна поверхность эксплантов оставалась не погруженной в среду. Причем желательно перевернуть экспланты таким образом, чтобы их апикальная сторона контактировала со средой - тогда каллус начинает расти несколько быстрее. Желательно, чтобы эксплант содержал различные ткани.

6. Каллусы растут в термостате при температуре 25-50 °С в течение 3-4 недель. Полученные каллусные ткани нужно рассмотреть, описать и зарисовать. Сравнить различные каллусы картофеля и моркови, возникшие из разного типа тканей.

Лабораторная работа №29

Технология получения оздоровленного посадочного материала картофеля. Изолирование и посадка апикальных меристем.

Цель работы: рассмотреть вопрос культуры апикальной меристемы, охарактеризовать оздоровление растений на примере методов получения безвирусного посадочного материала картофеля.

Материалы и оборудование: клубни картофеля; бинокулярная лупа; скальпели, зажатые в держателе с удлиненной рукой; препаровальные иглы; стаканы со стерильной дистиллированной водой; чашки Петри; пенициллиновые флаконы со стерильной питательной средой MS, содержащей кинетин, активированный уголь и др.

Ход работы:

Культура изолированных апикальных меристем используется для получения свободного от вирусов посадочного материала и для его микрклонального размножения. Апикальная меристема обычно совершенно свободная от вирусов представляет собой конус активно делящихся клеток высотой 0,1 мм (100 мк) и шириной 0,25 мм. Это минимальный размер меристемы, при котором морфогенетическая способность еще сохраняется. Поскольку меристему бывает трудно вычленивать без повреждений, часто ее отделяют с двумя листовыми примордиями. Для повышения эффективности оздоровления картофеля применяют сочетание метода верхушечной меристемы с термоили химиотерапией. Тепловая обработка вызывает инактивацию вирусов, химические вещества ингибируют их развитие. Выращенные из апикальных меристем безвирусные растения могут быть размножены и высажены в теплицы для получения безвирусных клубней. Для ускоренного размножения оздоровленного материала используются также клубни, образовавшиеся на безвирусных растениях в пробирках.

Порядок выполнения работы

Подготовка ростков клубней для вычленения меристем заключается в их проверке на исходную зараженность вирусами, поверхностном обеззараживании от грибных и бактериальных инфекций. Клубни картофеля хранят при температуре 4–6 °С, затем проращивают на свету до образования ростков 2–3 см длины при 20–22 °С.

1. Клубень картофеля промыть в проточной воде, отделить ростки.

2. Ростки упаковать в марлевые салфетки, опустить в раствор 0,1 %-го диацита на 3–5 мин, затем не менее трех раз промыть стерильной водой, опустить в стерильную чашку Петри, добавив туда воды для предотвращения высыхания эксплантов. Работы по вычлениению проводят в ламинар-боксе.

3. Перед вычлениением с помощью препаровальной иглы под бинокулярным микроскопом с верхушки ростка удалить покровные листочки, последовательно обнажая боковые и верхушечные меристемы с примордиальными листочками.

4. Меристему, включающую кусочек ткани размером 100–250 мк без листовых зачатков (примордиев), вычленить иглой, зажатой в цанговый держатель. Для этого можно использовать и специальную заточенную дисцизионную (разовую иглу от шприца) иглу или кусочек лезвия, зажатый в цанговый держатель. Эту операцию лучше проводить под бинокулярным микроскопом с 24-кратным увеличением с масштабной сеткой. Вычленить можно как верхушечную, так и боковые меристемы – точки роста. Каждую операцию проводят отдельным простерилизованным инструментом.

5. После вычленения меристему на острие иглы перенести на поверхность питательной среды в пробирку или пенициллиновый флакон, и закрыть ее фольгой.

6. Штативы с пробирками или поднос с флаконами поместить в световую комнату.

7. Дальнейшее культивирование проводить в световой комнате на стеллажах.

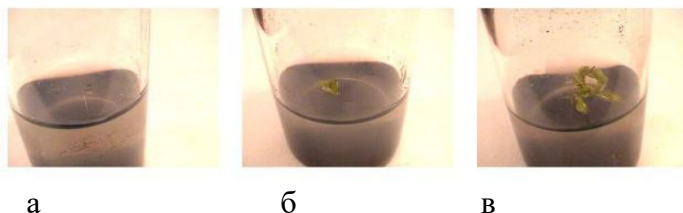


Рис. Этапы развития апикальной меристемы картофеля на питательной среде, содержащей активированный уголь: *а* – меристема после введения в культуру; *б* – начало развития адвентивных почек; *в* – формирование адвентивных побегов

Каждая проба (пробирка) должна быть зафиксирована после введения экспланта в культуру, а затем при проведении наблюдений и пассажах на свежие питательные среды должны быть отражены все изменения.

Оздоровление посадочного материала в культуре апикальных меристем происходит следующим образом:

1. Выросшие в пробирках растения картофеля с 5-6-ью листочками перенести из световой комнаты в бокс.

2. Пробирочное растение картофеля вынуть пинцетом из пробирки и поместить его в чашку Петри, разрезать на части (отрезок стебля с листом и пазушной почкой); часть стебля над листом при этом должна быть в 2 –3 раза меньше, чем часть ниже листа. Необходимо соблюдать строгую стерильность.

3. Черенки перенести на свежую питательную среду в пробирки, заглубив нижнюю часть стебля в среду.

4.Закрыть пробирки фольгой, поставить в штатив и перенести в световую комнату.

Черенкование проводят с интервалом в 14–21 день.

Лабораторная работа №30 **Искусственные ассоциации растений с микроорганизмами.**

Цель работы: понять для чего нужны искусственные ассоциации растений с микроорганизмами.

Ход работы:

Создание искусственных ассоциаций новое, сравнительно молодое направление клеточной инженерии по получению новых клеток и клеточных систем путем введения микроорганизмов в клетки или в популяции культивируемых клеток растений. Экспериментальные клеточные системы называются ассоциациями. Ассоциации могут быть как внутриклеточные (эндосимбиотического типа), так и межклеточные (экзосимбиотического типа).

При получении ассоциаций на основе изолированных протопластов с микроорганизмами предполагается, что клетки должны приобретать новые свойства, обусловленные присутствием в них клеток микроорганизмов.

Цели создания ассоциаций.

1) Экспериментальная проверка теории эндосимбиотического происхождения эукариотической клеточки.

2) Реконструирование отдельных стадий эволюционного процесса симбиогенеза.

3) Моделирование и изучение на клеточном уровне симбиотических отношений (например, клубеньковых бактерий с бобовыми растениями).

4) Повышение продуктивности клетки при выращивании в культуре.

5) Удешевление процесса культивирования растительных тканей.

Растительные клетки в культуре проводят биосинтез важных для медицины и промышленности веществ. Одним из требований рентабельности производства является возможность культивирования на простых по составу средах. Между тем, культуры растительных клеток требуют присутствия в средах витаминов, фитогормонов, аминокислот и т.д. Многим из перечисленного растительную клетку могли обеспечить микроорганизмы.

Кроме того, растительные клетки в культурах гетеротрофны или обладают ограниченной способностью к фотосинтезу. Одним из решений этой проблемы могло быть введение в эти культуры микроорганизмов, способных к фотосинтезу. Все это могло бы значительно упростить состав питательной среды.

Ассоциации протопластов с микроорганизмами внутриклеточного типа. С целью получения ассоциации внутриклеточного типа предпринимались неоднократные попытки введения микроорганизмов в клетки мезофилла злаков и других сельскохозяйственных растений.

Введение микроорганизмов в протопласты проводят при воздействии индуцирующих факторов. Микроорганизмы могут поглощаться протопластами. Так, протопласты гороха поглощали клетки *Rhizobium* непосредственно в процессе ферментативного разрушения клеточных стенок. В других случаях в качестве индуктора слияния использовали ПЭГ.

Поглощение микроорганизмов может происходить путем эндоцитоза. При действии ПЭГ микроорганизмы прилипают к плазмалеме, образуется инвагинация ее с последующим замыканием конца инвагинации. Образуется везикула.

При воздействии на протопласты розы поливинилового спирта происходило поглощение агробактерий протопластом. Причем поливиниловый спирт не оказывал токсического действия, которое наблюдалось в сравнительных опытах с использованием полиэтиленгликоля.

Характеристика продуктов слияния и поглощения. Системы, полученные путем слияния и поглощения, характеризовались ограниченной способностью к выживанию или культивированию. В протопластах кукурузы обнаружено быстрое движение цитоплазмы через 14 часов после поглощения цианобактерий, что служило признаком жизнеспособности растительных клеток. В некоторых случаях после поглощения протопласты регенерировали клеточную стенку, но как правило не делились, а спустя несколько суток разрушались.

Есть данные о сохранении интактности клеток и органелл микроорганизмов внутри протопластов. В протопластах гороха в везикулах наблюдали делящиеся клетки *Rhizobium*, однако не ясно, начали они делиться до или после поглощения. Исследование показало сходство процессов инфицирования в искусственной ассоциации и при получении корневого клубенька. Бактерии инфицировали до 10% клеток, обнаруживались в клетках хозяина в везикулах. В клетке они размножались, образовывали цепочки и проявляли нитрогеназную активность (1% от активности в клубеньках). Деления цианобактерий в протопластах табака не происходило, хотя цианобактерии сохраняли целостность. Органеллы зеленых водорослей внутри протопласта в процессе культивирования деградировали, и только хлоропласты в цитоплазме клеток моркови обнаруживались через 10 суток. Фотосинтетическая способность введенных хлоропластов составляла лишь 5% от активности в клетке хозяина. Таким образом, для успешного продолжения работ в данном направлении требуется подбор партнеров; выбор адекватного способа слияния; отработка условий культивирования.

При поглощении бактерии везикула высвобождается в цитоплазму хозяина. В случае же использования зеленых водорослей происходила интеграция протопластов и водорослей, а органеллы водорослей высвобождались в цитоплазму протопластов. Оба эти способа введения микроорганизмов имеют свои недостатки. Везикулы могут сливаться с лизосомами и существует угроза разрушения микроорганизмов. А при слиянии мембран хозяина и зеленых водорослей происходит введение не целых микроорганизмов, а интактных органелл. В качестве альтернативного пути предлагается заключить микроорганизмы в липосомную оболочку. Преимущества данного приема видятся в том, что искусственная мембрана будет сливаться с плазмалемой протопласта, а микроорганизм целиком будет попадать в клетку хозяина.

Введение микроорганизмов в популяции культивируемых клеток. Способы получения смешанных популяций растительных клеток и микроорганизмов различны: внесение клетки микроорганизма непосредственно в каллусную или суспензионную среду; высев на поверхности агарозной среды рядом, таким образом, чтобы соприкосновения клеточных колоний не происходило; разделение совместно культивируемых клеток мембранами, обеспечивающими обмен продуктами метаболизма партнеров.

Были получены ассоциации каллусной ткани сои с клубеньковыми бактериями. Проводилось совместное культивирование клеток сои и клубеньковых бактерий в жидкой питательной среде. Аналогичные ассоциации получены с небобовыми: клетками пшеницы, риса, табака и др. Существенным было то, что авторы смогли

показать, что для индукции нитрогеназной активности достаточно тканевой жидкости как бобовых, так и не бобовых хозяев. В ассоциациях с растительными клетками происходит интенсивное размножение бактериальных клеток, при отсутствии размножения в чистых культурах на тех же средах. Причем сильный рост клеток связан не с наличием живых клеток растений, а с их метаболитами.

При введении в каллус клубеньковые бактерии локализуются, как правило, на поверхности клеток хозяина.

Бактериальные клетки часто угнетали рост растительных клеток, что связывается с накоплением ауксина в супероптимальных количествах. Однако в случае с бобовыми, часто наоборот, наблюдалось стимуляция роста каллуса.

Известна оказавшаяся удачной попытка регенерации растений табака из ассоциации каллусной культуры с *Rhizobium*. К сожалению, отсутствует информация о дальнейшей судьбе растения. Удачным оказался эксперимент по введению в культуру клеток табака цианобактерий. Смесь протопластов табака и цианобактерий обрабатывали раствором с высоким содержанием Ca^{+2} . Были подобраны условия, в которых те и другие выживали, образовалась смешанная каллусная культура сине-зеленого цвета. Цианобактерии росли на поверхности каллуса или проникали вглубь по межклетникам. Кроме того, часть цианобактерий локализовалась внутриклеточно в центральных вакуолях клеток табака, что, видимо, происходило в результате обработки Ca^{+2} . Смешанные каллусные культуры стабильны до двух лет, причем подавления роста одного компонента системы другим не наблюдалось. Из смешанной культуры регенерировали растение с участками сине-зеленого цвета – местами локализации цианобактерий. Цианобактерии образовывали цепочки, что свидетельствует об их размножении в побегах. Очевидно, что такая анатомическая особенность табака, как большие межклетники является определяющей для проникновения цианобактерий в каллус и растение. Из регенерантов первого поколения получен вторичный каллус, а из него – регенеранты второго поколения. В побегах цианобактерии имеют внутритканевую локализацию.

Результаты этих опытов позволяют говорить о развитии нового прикладного направления.

Таким образом, внутривидовая и межвидовая соматическая гибридизация дополняет набор современных методов селекции. Дальнородственные гибридные клетки используются для фундаментальных исследований. Методы введения микроорганизмов в растительную клетку нуждаются в дальнейшем совершенствовании. Необходимо вводить в протопласты целые микроорганизмы, а не их органеллы, поскольку, в последнем случае, продукты гибридизации нестабильны. Отдельные удачные эксперименты по введению микроорганизмов в популяцию растительных клеток свидетельствуют о перспективности этого направления. Дальнейшие исследования должны быть направлены на подбор партнеров для симбиоза и разработку сред для их совместного культивирования.

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
по выполнению самостоятельных работ по дисциплине
«Генная инженерия и биотехнология»

Направление подготовки	06.03.01 Биология
Направленность (профиль)	Генетика, селекция и биоинформатика

Ставрополь

Вопросы для самостоятельной подготовки.

1. Что собой представляет генная инженерия?
2. Расскажите о возникновении и задачах генетической инженерии. 3. Каковы объекты исследований генной инженерии?
3. Что вы знаете об истории генной инженерии?
4. Каким образом клонирование может повлиять на восприятие ценности человеческой жизни?
5. На сколько этапов можно разделить историю развития генетической инженерии? Охарактеризуйте.
6. Когда возникла генетическая инженерия?
7. какие методы использует технология рекомбинантных ДНК?
8. В чем заключается цель прикладной генетической инженерии?
9. Сколько этапов включает в себя экспрессия генов у прокариот?
10. Опишите этапы экспрессии генов у эукариот?
11. Что указывается для праймеров?
12. Что способны рассчитать праймеры для ПЦР?
13. Для чего используется электрофорез?
14. Назовите основными параметры, влияющие на разделение молекул при электрофорезе?
15. Что потребуется для приготовления 1 л 50× ТАЕ (Трис-Ацетат-ЭДТА)?
16. Что необходимо для приготовления 1 л 10× ТВЕ (Трис-борат-ЭДТА)?
17. Назовите порядок проведения электрофореза ?
18. Где и для чего применяется метод рекомбинантной ДНК?
19. Перечислите механизмы конструирования рекомбинантной ДНК
20. Что вы знаете про рестрикционно-лигазный метод?
21. Что такое рекомбинантная ДНК?
22. Почему рекомбинантную ДНК называют химерной ДНК?
23. Как рекомбинантная ДНК используется в сельском хозяйстве?
24. Как рекомбинантная ДНК помогает в лечении заболеваний?
25. Как вы понимаете понятие “Клонотеки”?
26. Как происходит клонирование растений?
27. Как происходит клонирование дрожжей?
28. Как происходит клонирование животных?
29. Как происходит клонирование человека?
30. Каким образом происходит введение нового гена в клетку?
31. Сколько групп маркерных генов, позволяющих отличить трансформированные клетки существуют?
32. Какие способы внедрения генов в эмбриональные клетки млекопитающих, существуют?
33. Какой способ введения гена в растительную клетку считается сейчас наиболее эффективным?
34. Куда помещают растительную ткань после трансформации?
35. Какова роль генной инженерии в получении новых растений?
36. Что значит каллусная культура?
37. Какие этапы получения каллуса существуют?
38. Для чего используется эксплант?
39. Как происходит стерилизация растительного материала?
40. Что такое каллус?

41. Что такое эксплант?
42. Какие условия необходимы для индукции каллусообразования? 4. Из каких клеток состоит каллус?
43. Что такое суспензионная культура?
44. Для чего применяются суспензионные и каллусные культуры?
45. Зачем в питательную среду при культивировании картофеля добавляется активированный уголь?
46. Проанализировать полученные результаты культивирования меристем и сделать выводы.
47. Какие условия лучше использовать для проведения дальнейшего микроразмножения картофеля?
48. Сколько черенков можно получить из клубней одного растения картофеля за 3 месяца? С помощью каких процедур увеличивается эффективность оздоровления растений в культуре апикальных меристем?
49. Какие способы микроразмножения растений используют при получении безвирусного посадочного материала картофеля?
50. Каковы цели создания искусственных ассоциаций растительных клеток с микроорганизмами?
51. Что происходит с клетками микроорганизмов после их слияния с растительными протопластами?
52. Каковы результаты экспериментальной работы по введению микроорганизмов в популяцию культивируемых клеток?