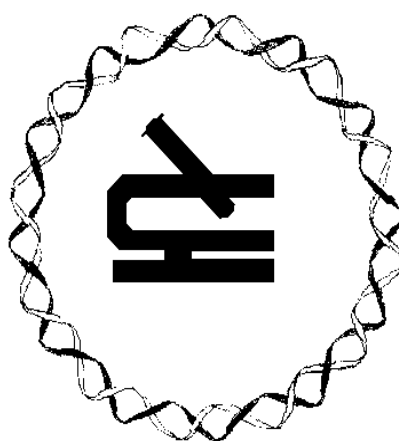


Одеський національний університет імені І.І. Мечникова
Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАНУ

Товариство мікробіологів України

Спілка біологів і біотехнологів Одеси

**МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ ДО ПРОВЕДЕННЯ
V ЛІТНЬОЇ ШКОЛИ “МОЛЕКУЛЯРНА МІКРОБІОЛОГІЯ І
БІОТЕХНОЛОГІЯ”**



ОДЕСА-2010

**МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ ДО ПРОВЕДЕННЯ У ЛІТНЬОЇ ШКОЛИ
“МОЛЕКУЛЯРНА МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ”**

Автори-укладачі:

к.б.н. Кушкіна А.І., к.б.н. Ліманська Н.В., к.б.н. Черватюк Н.В.,
к.б.н. Іваниця Т.В., к.б.н. Остапчук А. М., к.б.н. Жумінська Г.І.,
к.б.н. Сергєєва Ж.Ю., асп. Крилова К.Д., д.б.н. Товкач Ф.І.,
д.б.н. Іваниця В.О.

АВТОНОМНІ ГЕНЕТИЧНІ ЕЛЕМЕНТИ БАКТЕРІЙ: БАКТЕРІОФАГИ, ПЛАЗМІДИ І ТРАНСПОЗОНИ

Причетність таких автономних генетичних елементів (АГЕ) як плазміди, бактеріофаги і транспозони до формування нових варіантів бактерій, більш адаптованих до умов оточуючого середовища, за рахунок горизонтального перенесення генів патогенності є безперечним науковим фактом сучасної бактеріології, а також одним з аспектів загальнобіологічної проблеми, безпосередньо пов'язаної з горизонтальним потоком генів у бактеріальних популяціях і асоціаціях. Завдяки перенесенню генів між спорідненими бактеріями, які заселяють певну екологічну нішу розширюються їх адаптивні можливості, а також з'являються нові штами і формується біорізноманіття.

Відомо, що прояв патогенності у ентеробактерій має безпосереднє відношення до автономних генетичних елементів. На теперішній час найбільш ґрунтовно досліджено АГЕ інфекційно небезпечних бактерій, де їх причетність до патогенних процесів не викликає ніякого сумніву.

Тема заняття: Лізис як стратегія розвитку бактеріофага T7 Escherichia coli. Морфологія і структура ДНК фага T7

Бактеріофаг T7 є типовим представником родини фагів T7 і звичайно вважається облігатно вірулентним фагом. Генетичну карту фага T7 було побудовано у 1969 році. В цей час також було виявлено і досліджено декілька фагових ферментів, які приймають участь у реплікації і транскрипції ДНК. Завдяки цьому T7 швидко зосередив на собі увагу вчених. З бактеріофагом T7 досить легко працювати у лабораторії, він швидко росте і зараз є добре дослідженим. Усі ці переваги зробили T7 провідною модельною системою для експериментальної молекулярної еволюції і еволюційної генетики.

Бактеріофаг T7 дає великі зони лізису на газоні *E. coli*, які продовжують зростати зі збільшенням терміну інкубації. T7 не спричиняє постійної контамінації в лабораторних умовах через те, що швидко гине при висиханні.

Геном фага T7 має 39 937 п.н. і складається з 56 відомих або потенційних генів. На кінцях генома T7 існують прямі півтори розміром 160 п.н. Також встановлено, що *in vitro* після рестрикції ендонуклеазами можуть утворюватись кільцеві форми, які не були виявлені *in vivo*.

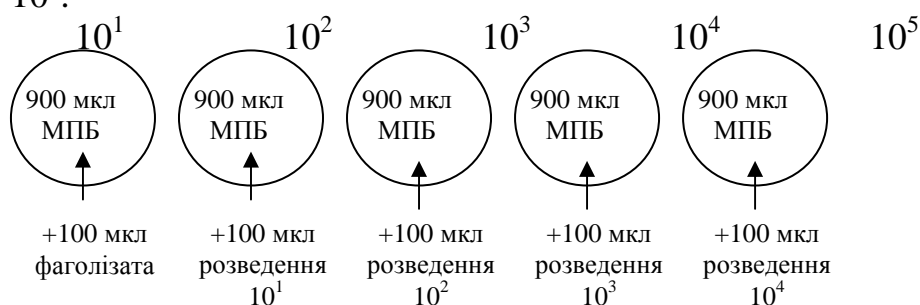
1-й день

Приготування нічної культури *E. coli* BE

Хід роботи. Бактеріальною культурою *E. coli* BE, яка виросла на твердому МПА, інокулюємо 3 мл МПБ. Інкубуємо 8 – 12 годин при 37°C.

2-й день**Титрування фага Т7**Хід роботи .

1. Нічну культуру *E. coli* ВЕ розводимо 1:50. Для цього до 3 мл МПБ додаємо 60 мкл нічної культури. Інкубуємо 2 години при 37°C до концентрації 2×10^8 кл/мл.
2. Титрування бактеріофага Т7 здійснюємо методом серійних десятикратних розведень. Для цього з вихідного штока фага Т7 відбираємо 100 мкл фаголізата і вносимо у 900 мкл стерильного МПБ. Отримуємо перше десятикратне розведення, де ступінь вмісту фагових часток складає 10^{-1} відносно вихідного фаголізата, а кратність розведення 10^1 .



Новим накінецьником відбираємо 100 мкл з отриманого першого розведення і вносимо у 900 мкл стерильного МПБ. Отримуємо друге десятикратне розведення, кратність розведення фаголізата в якому складає 10^2 відносно вихідного фаголізата і т.д. У наступні 900 мкл бульону додаємо 100 мкл попереднього розведення. Готуємо таким чином 5 розведень. Наприкінці усі розведення будуть мати об'єм по 900 мкл, а останнє - 1000 мкл. Розведення зберігаємо у холодильнику.

3. Фагові розведення висіваємо методом двошарових агарових чашок. Для цього стовпчик з м'яким МПА (вміст агара 0,5%) об'ємом 5 мл розтоплюємо на водяній бані (воду доводимо до кипіння). Охолоджуємо водяну баню зі стовпчиком до 55°C.

4. В охолоджений стовпчик з м'яким МПА додаємо 500 мкл двогодинної культури *E. coli* ВЕ і 100 мкл фагового розведення, трохи збовтуємо і акуратно виливаємо на чашку з шаром твердого МПА (вміст агара 1,5%). Даємо застигнути при кімнатній температурі.

5. Двошарові чашки інкубуємо 18 – 20 годин при 37°C.

6. Готуємо нічну культуру *E. coli* ВЕ (див. День 1)

3-й день**Титрування фага Т7(продовження)**

Титр фагових часток підраховуємо за формулою

$$T = (n/m) \times R, \text{ де}$$

T – титр фага;

n – кількість негативних колоній;

m– об'єм суспензії, що висівається на чашку, в мл – 0,005мл

R – кратність розведення.

Препаративне отримання фага T7 методом злитного лізису

Підходящим розведенням фаголізата для накопичення фагових часток у препаративних кількостях буде те розведення, яке дає злитний лізис при висіванні його на чашку з чутливою культурою. Злитний лізис утворюється тоді, коли фагові бляшки розташовуються щільно одна до одної по усій поверхні агарового шару. При цьому можуть бути помітними межі бляшок, але культура чутливої бактерії у газоні відсутня.

Хід роботи

1. Готуємо двогодинну культуру *E.coli* BE (див. День 2, п.1).
2. Після підрощування культури висіваємо на чашки розведення фага, яке дає злитний лізис методом двошарових агарових чашок (див. День 2, п. 2,3,4)
3. Готуємо нічну культуру *E.coli* BE (див. День 1)

4-й день

Концентрування часток фага T7 методом ПЕГ-преципітації (процедура Ямамото)

Хід роботи

1. Чашку Петрі зі злитним лізисом чутливої культури заливаємо 10 мл МПБ і шпателем Дригальського знімаємо шар верхнього агара у стерильну колбу.
2. До суспензії додаємо приблизно 1 мл хлороформа.
3. Агар розбиваємо на магнітній мішалці при 4 °С 1,5-2 години.
4. Отриману суспензію центрифугуємо 45 хвилин при 5000 об./хв, при +10° С.
5. Після центрифугування надосадову рідину зливаємо у стерильну колбу, а осад повторно відмиваємо половинним об'ємом МПБ. Супернатант після відмивання з'єднуємо з попереднім та зберігаємо при +4°С. Стерилізуємо хлороформом.

Процедура Ямамото

1. У стерильний пеніциліновий флакон переносимо 5 мл отриманого фаголізата.
2. До нього додаємо 10 % поліетиленгліколя (ПЕГ) 6 000 - 500мг, залишаємо у холодильнику для розчинення.
3. Після розчинення ПЕГ додаємо 292 мг NaCl. Кінцева концентрація NaCl може складати від 1 до 0,5 М. Залишаємо у холодильнику на ніч.

5-й день

Концентрування часток фага T7 методом ПЕГ-преципітації (продовження)

1. Центрифугуємо 5 мл фаголізата 15 хвилин при 5 000 об./хв.
2. Осад ресуспендуємо в 0,5 мл буфера для концентрування наступного складу: 10 мМ трис HCl, рН 7,5, 50 мМ NaCl.

3. Отриману суспензію переносимо у пробірку Епендорфа і додаємо 0,3 мл хлороформа. Струшуємо приблизно 5 хвилин.
4. Центрифугуємо 5 хвилин при 11 000 об./хв на мікроцентрифузі ELM1.
5. Супернатант переносимо у стерильну пробірку Епендорфа і додаємо 200 мкл хлороформа. Струшуємо 5 хвилин.
16. Центрифугуємо 5 хвилин при 11 000 об./хв на мікроцентрифузі ELM1.
17. Супернатант (фаголізат) відбираємо у стерильну пробірку Епендорфа і зберігаємо у холодильнику при + 4 °С.

Виділення ДНК фага T7

При роботі з ДНК обов'язковими є рукавички і маска.

Хід роботи

1. 500 мкл фаголізата переносимо у стерильну пробірку Епендорфа.
2. Додаємо у наступній послідовності:
75 мкл пронази В (1 мг/мл)
12,5 мкл 20 % SDS (кінцева концентрація 0,8 %).
3. Інкубуємо 10 хвилин в ультратермостаті при 60°C (загальний об'єм суміші 587,5 мкл).
5. Додаємо у наступній послідовності:
5 мкл Na₂ЕДТА 0,25 М (кінцева концентрація 0,002 М).
60 мкл ацетата натрія 3 М (кінцева концентрація 0,3 М).
500 мкл фенола рН 7,6
6. Акуратно змішуємо.
7. Центрифугуємо 5 хвилин при 11 000 об./хв на мікроцентрифузі.
8. Верхню водну фазу переносимо у стерильну пробірку Епендорфа. На інтерфазі має осісти денатурований білок.
9. Додаємо 2 об'єми перегнаного спирту.
10. Преципітуємо при – 20°C від 20 хвилин до 1 доби.
11. Відмиваємо 4 рази у спирті від фенола. Для цього осаджуємо преципітовану ДНК 5 хвилин при 11 000 об./хв на мікроцентрифузі. Акуратно зливаємо спирт і перевертаємо пробірку Епендорфа на фільтрувальний папір для підсушування на 2-5 хвилин.
12. Додаємо 500 мкл перегнаного спирта.
13. Осаджуємо 5 хвилин при 11 000 об./хв на мікроцентрифузі і так само ще три рази. Критерієм «відмитої» ДНК є відсутність запаху фенола з пробірки.
14. Після цього просушуємо ДНК 20 хвилин, перевернувши пробірку на фільтрувальний папір.
15. Додаємо 200 мкл стерильної дистильованої води і залишаємо пробірку в холодильнику на 15 хвилин - 3 години.
16. Для зберігання у водний розчин ДНК додаємо трис НСІ, рН 7,5 до кінцевої концентрації 10 мМ. ДНК зберігають у холодильнику.

6-й день

Рестрикційний аналіз ДНК фага T7

Загальний об'єм реакційної суміші повинен складати 20 мкл.

Хід роботи

1. У стерильні пробірки Еппендорфа або мікропланшет вносимо 16 мкл стерильної дистильованої води.
2. Додаємо 2 мкл відповідного буферу для рестриктази.
3. Додаємо 1 мкл фагової ДНК.
4. Додаємо 1 мкл рестриктази.
5. Інкубуємо 1,5-2 години при 37 °С.
6. Додаємо 4 мкл стоп-буферу.
Зразок у такому вигляді можна зберігати при – 20 °С.
7. Зразок об'ємом 10 мкл вносимо в лунку 1% агарозного геля. Електрофорез здійснюємо в трис-фосфатному буфері, рН 7,9.

Стоп-буфер для рестрикції (x5): Na₂ЕДТА – 0,1мМ; бром феноловий синій – 0,2%; фікол – 7%.

Підготування електрофоретичної камери

Готуємо 1% агарозний гель на трис-фосфатному буфері. Для цього 1 г агарози розчиняємо в 95 мл дистильованої води. Суміш нагріваємо на водяній бані, а потім доводимо до кипіння на плитці. Після повного розчинення агарози додаємо 5 мл 20-кратного трис-фосфатного буферу, рН 7,9.

Трис-фосфатний буфер x20, рН 7,9,:

0,7 М трис,
0,8 М NaH₂PO₄,
0,02 М Na₂ЕДТА.

Формуємо гель, камеру заповнюємо однократним трис-фосфатним буфером і перевіряємо наявність струму.

Вносимо зразки в лунки. U=40-60 V, довжина геля 6-10 см.

Тема заняття: Лізогенія як стратегія розвитку помірних бактеріофагів. Температурна індукція профага P1. Лізогенізація клітин штаму E. coli C600 помірним бактеріофагом P1. Виділення плазмідного профага P1

Одним із бактеріофагів *E. coli*, який використовувався для розвитку концепцій та методів молекулярної біології, є помірний бактеріофаг P1. В середині клітини фаг P1 існує у вигляді стабільної автономної плазміді розміром близько 100 т.п.н. у кількості приблизно одна копія на хромосому. В інфекційних частках ДНК фага P1 циклічно пермутована, лінійна з кінцевою надлишковістю 10-15 т.п.н. Після попадання в бактеріальну клітину вірусна ДНК замикається у кільце за рахунок рекомбінації між

надлишковими послідовностями, і переходить до літичного чи лізогенного розвитку. Профаг P1 реплікується як кільцева плазмідна з точки початку реплікації (*oriR*) та належить до групи несумісності Y. Ця плазмідна є некон'югативною, але може бути мобілізована. P1 має широке коло хазяїв серед грам-негативних бактерій. Не дивлячись на дуже малу кількість копій, плазмідна P1 виключно стабільно успадковується. Виняткова здатність P1 до генералізованої трансдукції зробила його провідним інструментом генетичного обміну між штамми.

Не дивлячись на малу кількість копій, профаг-плазмідна P1 втрачається з частотою приблизно 10^{-5} на бактеріальну генерацію. За підтримання плазмідни і збереження профагу в наступних генераціях лізогенів відповідають 4 функції: механізм розходження копій плазмідни по дочірнім клітинам, система сайт-специфічної рекомбінації і типові плазмідні функції (плазмідний реплікон, постсегрегаційне вбивство, або пригнічення росту і т.і.). Функції реплікації і розходження плазмідни зібрані всередині однієї області геному P1. Вони утворюють два оперони, що транскрибуються в одному напрямку. P1-профаг належить до великої родини плазмідних репліконів, що кодують ініціаторний білок RepA і містять значну кількість сайтів зв'язування для нього. Реплікація плазмідни P1 відбувається двоспрямовано і узгоджується з реплікацією бактеріальної хромосоми.

1-й день

Приготування нічної культури *E. coli* C600(P1ts)

Хід роботи.

Добову окрему колонію лізогена *E. coli* C600(P1ts) інокулюємо в 3 мл МПА. Інкубуємо 8-12 годин при 28 °С.

2-й день

Температурна індукція лізогена *E. coli* C600 (P1ts)

Хід роботи

1. Нічну культуру лізогена *E. coli* C600(P1ts) розводимо 1:50. Для цього до 3 мл МПБ додаємо 60 мкл нічної культури лізогена. Інкубуємо 2-3 години при 28 °С.
2. Підрощену культуру переносимо на 37 °С на ніч.
3. Готуємо нічну культуру *E. coli* C600 (див.1-й день)

3-й день

Одержання фаголізату P1. Лізогенізація чутливої культури

Хід роботи

1. Нічну культуру *E. coli* C600 розводимо 1:50. Для цього в 3 мл МПБ додаємо 60 мкл нічної культури. Інкубуємо 1,5 години при 37 °С
2. До культури лізогена *E. coli* C600(P1ts), яка знаходилась ніч при 37 °С, додаємо 50 – 100 мкл хлороформу. Струшуємо 5-10 хв при 37 °С для остаточного лізису клітин.
3. Відбираємо 1 – 1,5 мл лізату в пробірку Еппендорфа.

4. Центрифугуємо 1-2 хв в мікроцентрифузі ELMІ при 11000 об/хв для осадження клітинного детриту.
5. Відбираємо біля 1 мл супернатанту без осаду, який являє собою фаголізат P1.
6. Готуємо газон чутливої культури двошаровим методом. Для цього стовпчик з м'яким МПА (вміст агару 0,5%) об'ємом 5 мл розтоплюємо на водяній бані. Охолоджуємо до 55 °С. В охолоджений стовпчик додаємо 500 мкл 1,5-годинної культури *E.coli* С600, струшуємо і обережно наносимо на чашку з шаром твердого МПА (вміст агару 1,5%). Охолоджуємо при кімнатній температурі.
6. Фаголізат P1 наносимо на застиглий газон *E.coli* С600 краплями по 5 – 10 мкл.
7. Інкубуємо 8 – 12 часів при 28 °С. Якщо краплі не підсохли, чашку не перевертаємо.

4-й день

Одержання лізогенних клітин по фагу P1

Хід роботи

1. Знімаємо шар верхнього агару із зон лізису, які утворилися на газоні *E. coli* С600, і переносимо його в 3 мл МПБ. Інкубуємо при 28 °С дві години з інтенсивним помішуванням, або 5-7 годин без помішування.
2. Клітини, які проросли, висіваємо на МПА з хлорамфеніколом (20 мкг/мл) для одержання окремих колоній. Інкубуємо 8 – 12 год при 28 °С.
3. Готуємо нічну культуру *E. coli* С600 (див. 1-й день).

5-й день

Перевірка клонів на лізогенність

Хід роботи

1. Готуємо 1,5-годинну індикаторну культуру *E. coli* С600 (див. 3-й день, п.1) і потім - двошарову чашку з МПА з цією культурою (див. 3-й день, п.6).
2. Окремі колонії, які виростили на МПА з хлорамфеніколом, стерильними переколками переколюємо на дві наступні чашки:
 №1 – матрична чашка, МПА
 №2 – тест-чашка с газонем *E. coli* С600.
 Одну й ту ж саму колонію переколюємо на всі чашки однією переколкою.
 Порядок переколювання на чашки обов'язковий.
3. Чашку №1 (матричну) інкубуємо при 28° С, а чашку №2 (з газонем чутливої культури) – при 37 °С 8 – 12 год.

6-й день

Виділення плазмідного профага P1

- Лізогенний клон відбирається за наступними критеріями:
 - росте на МПА з хлорамфеніколом (20 мкг/мл) при 28 °С;

- утворює зону лізиса навкруги своєї колонії на газоні індикаторної культури *E. coli* С600 при 37 °С.

Джерелом біомаси лізогенних клітин для виділення плазмідного профагу слугує матрична чашка №1. Якщо відібрана колонія сягає в діаметру 4-5 мм, то вона одразу може бути використана для виділення плазмідного профага Р1. В іншому випадку, відібраний клон необхідно відсіяти додатково.

Виділення плазмідного профага здійснюється за стандартною методикою (див. нижче).

Тема заняття: Трансформація бактеріальних клітин

Бактеріальну трансформацію можна визначити як спадкову зміну властивостей бактерії завдяки отриманню клітиною ззовні молекули ДНК. При цьому бактеріальна клітина повинна бути компетентною, тобто здатною до отримання молекули ДНК. У деяких бактерій відбувається природна трансформація, і на певному етапі росту вони стають компетентними. Але бактеріальні клітини можна також зробити компетентними штучно, наприклад, якщо культивувати їх при 0 °С з CaCl_2 , що може спричинити зменшення життєздатності бактеріальних клітин, але зробить їх більш компетентними для трансформації.

Дослідження систем природної трансформації призвело до створення окремих моделей того, як відбувається трансформація у грам-негативних і грам-позитивних бактерій. Але треба зауважити, що в цих системах молекула ДНК може трансформувати реципієнтну бактерію лише за умови, що вона є гомологічною до ДНК реципієнтної бактерії і в подальшому зможе відбутися гомологічна рекомбінація.

У штучних системах трансформації як правило використовується плазмідна ДНК, яка здатна до самостійною реплікації у реципієнтній бактеріальній клітині, що не потребує процесу гомологічної рекомбінації.

1-й день

Хід роботи

Знімають окрему бактеріальну колонію реципієнтного штаму *E. coli* з чашки з LB-агаром, яка інкубувалась при 37 °С 16-24 год, і переносять в 5 мл рідкого середовища LB. Інкують ніч при 37 °С та сильній аерації (200 об/хв на круговому шейкері) .

2-й день

Одержання компетентних клітин *E. coli* з використанням хлористого кальцію та їх трансформація

Хід роботи

1. 1 мл нічної культури реципієнтного штаму розводять у 100 разів рідким середовищем LB і інкують при 37 °С та сильній аерації 2 год.

2. Культуру переносять у стерильні охолоджені центрифужні пробірки і охолоджують до 0°C на крижаній бані 10 хв.
 3. Клітини осаджують центрифугуванням при 4300 g, 5 хв при 4 °C.
 4. Зливають надосад і перевертають пробірку на 1 хв для повного зтікання.
 5. Ресуспендують клітинний осад в 1 мл крижаного 0,1 М CaCl₂ з обережним струшуванням. Інкують на крижаній бані 30 хв.
 6. Осаджують клітини центрифугуванням при 4300 g, 5 хв при 4 °C, зливають надосад і перевертають пробірку (як в пп..3, 4)
 7. Ресуспендують осад в крижаному 0,1 М CaCl₂ (з розрахунку 2 мл хлористого кальцію на 50 мл вихідного об'єма культури). До використання суспензію рекомендується залишити при 4°C на 1 год. При такій температурі її можна зберігати до 48 год, але вже після 24 год зберігання ефективність трансформації буде падати. Суспензію клітин також можна розлити на аліквоти і зберігати при – 70 °C.
 8. Охолодженою стерильною насадкою переносять 200 мкл суспензії компетентних клітин у стерильний еппендорф. Додають надспіралізовану плазмідну ДНК, але на більше 50 нг в об'ємі не більше 10 мкл. Обережно перемішують і 30 хв інкують на крижаній бані.
- Контроль – компетентні клітини, до яких не додавалась плазмідна ДНК.
9. Пробірки переносять на 90 сек на водяну баню з температурою 42 °C. Пробірки не струшують!
 10. Швидко переносять пробірки назад на крижану баню і інкують 2 хв.
 11. Додають до кожної пробірки 800 мкл LB-середовища. Для індукції експресії маркера стійкості до антибіотика, який кодується плазмідною, інкують пробірки 45 хв при 37 °C.
 12. Переносять 100 мкл трансформованих клітин на чашки з агаризованим LB-середовищем, що містить відповідний антибіотик. Рівномірно розтирають шпателем Дригальського. Дають підсохнути при кімнатній температурі.
 13. Інкують при 37 °C. Колонії трансформантів можна побачити через 12-16 год.
 14. Для виділення плазмідної ДНК використовують метод Кадо і Ліо (див. нижче).

Тема заняття: Трансдукція транспозону Tn9 бактеріофагом P1 у клітини *Erwinia carotovora*

Кільцеві позахромосомні ДНК з невідомими функціями широко розповсюджені у *Erwinia carotovora subsp. carotovora*. Ці генетичні елементи являють собою криптичні плазмиди, через те що невідома жодна фізіологічна функція, яку вони кодуєть. Дуже зручним, а іноді єдиним засобом вивчення фізіології та генетики криптичних плазмід є транспозонний мутагенез.

Штам ЕСА 48А утримує багатокопійну плазмиду рСА25 з розміром 9,8 т.п.н. Раніше було показано, що клітини ЕСА 48А чутливі до зараження

коліфагом P1. Повноцінної внутриклітинної репродукції фага не відбувається. Однак спостерігається ефективно "вбивство клітин зовні". Значна частина клітин, які виживають, стає стійкою до хлорамфеніколу. Це свідчить про P1-трансдукцію, пов'язану з лізогенізацією клітин фагом P1.

У ході вивчення плазмідних спектрів P1-трансдуктантів було виявлено клон ЕСА 48А-7/4b. Клітини клону 7/4b утримували позахромосомну ДНК збільшеного розміру. Збільшення розміру плазмиди рСА25 у клітинах клону 7/4b дійсно пов'язано зі вставкою транспозона Tn9, який несе ген хлорамфеніколацетилтрансферази. Збільшення ампліфікації плазмиди з транспозоном збільшує дозу хлорамфеніколацетилтрансферази. Транспозонмічені клони можуть бути відібрані в умовах більш суворого селективного пресу, ніж P1-трансдуктанти. Встановлено, що бактерії, які несуть плазмиду з транспозоном, здатні виживати при концентраціях хлорамфеніколу 100 мкг/мл і більше. P1-трансдуктанти при цих концентраціях антибіотика гинуть.

Таким чином, суть методу полягає в тому, що збільшення копійності плазмиди збільшує також і дозу гена хлорамфеніколацетилтрансферази і відповідно дозу самого ферменту. Це дозволяє транспозонміченим клонам виживати при високих концентраціях антибіотика.

1-й день

Приготування добової культури *E. carotovora* 48А

Хід роботи

Окрему бактеріальну колонію культури *E. carotovora* 48А (з чашки) переносимо у 3 мл МПБ. Інкубуємо 18-24 год при 28° С.

2-й день

Лізогенізація клітин *E. carotovora* 48А коліфагом P1

Хід роботи

1. Добову культуру *E. carotovora* 48А розводимо у 20 разів. Для цього до 3 мл МПБ додаємо 150 мкл добової культури. Інкубуємо 3 год до концентрації 2×10^8 кл/мл при 28°С.
2. Стівчик з МПА 0,5% (5 мл) розплавляємо на водяній бані (воду доводимо до кипіння і кип`ятим 0,5 – 1 [d]).
3. Оступаємо водяну баню зі стівчиком до 55° С.
4. У стівчик МПА 0,5% додаємо 300 – 400 мкл 3-годиної культури *E. carotovora* 48А (яка знаходиться у початковій або середній фазі росту), перемішуємо і акуратно наносимо на шар нижнього агару (МПА 1,5%).
5. Даємо застигнути при кімнатній температурі.
6. На верхній агаровий шар наносимо краплі фаголізату об`ємом по 10 мкл.
7. Після висихання п`ятен чашки Петри переносимо у термостат і інкубуємо 18 – 20 год при 28 °С.

3-й день**Перенесення лізогенів по P1 у мінімальне середовище**Хід роботи

1. Вирізаємо із лізогенної плями кубик 5*5 мм.
2. Переміщуємо кубик у флакон з 3 мл мінімального середовища для відмивання трансдуктантів на 8 і 24 год при 28 °С.

4-й день**Нанесення трансдуктантів на середовище з антибіотиком
(хлорамфенікол)**Хід роботи

1. З флакону з мінімальним середовищем на чашку з Cm капаємо по 10 мкл.
2. Інкубуємо 1-2 доби у термостаті при 28°C.

5-й день**Пересів трансдуктантів на чашки з Cm (100 мкг/мл)**Хід роботи

За допомогою мікробіологічної петлі пересіваємо трансдуктантів на середовище з Cm (100 мкг/мл) для відбору трансдуктантів з плазмідною рСА25::Tn 9.

6-й деньХід роботи

Електрофорез плазмідних ДНК у агарозному гелі.

***Тема заняття: Екстракція плазмідної ДНК за методом
Кадо і Ліо***

Плазміди являють собою самореplikативні, позахромосомні молекули ДНК, які зустрічаються у клітинах грамнегативних і грампозитивних бактерій, а також у деяких дріжджів та грибів. Більшість їх представлена у вигляді ковалентнозамкнених кільцевих дволанцюгових молекул ДНК. Молекулярний розмір плазмід може коливатися від однієї до декількох сотень т.п.н. Кількість копій плазмід є сталою характеристикою і коливається для різних плазмід від однієї до декількох сотень копій на клітину. Нещодавно у різних бактерій були також виявлені лінійні плазміди. Взагалі плазміди не є суттєво необхідними для виживання своїх хазяїв, але вони можуть нести широкий спектр генетичних детермінант, які надають їм перевагу у пристосуванні до умов оточуючого середовища та роблять їх більш конкурентноспроможними відносно інших мікроорганізмів, які займають ту ж саму екологічну нішу. Важливу роль у природі відіграють

бактеріальні плазмиди, які несуть гени стійкості до антибіотиків, а також гени специфічних факторів вірулентності. Для реплікації плазмиди за звичай використовують бактеріальні гени, не дивлячись на те, що самі вони кодують специфічні молекули необхідні для ініціації їх реплікації. Реплікація плазмід починається у сайті, який має назву *ori*, і може здійснюватись за механізмом кільця, що котиться, або за тета-типом. Деякі елементи, необхідні для реплікації плазмід, наприклад, молекули антисенсової РНК та послідовності повторів ДНК, розташовані на плазмідній ДНК поряд з сайтом *ori*, визначають такі властивості плазмиди, як копійність і несумісність.

Хід роботи

1. Біомаса клітин ресуспендується в 100 мкл буфера Е. Розмір окремої колонії повинен складати 4-6 мм.
2. До суспензії додають подвійний об'єм (200 мкл) лізуючого буферу Кадо. Суміш інкубують при 60 °С 45 хв.
3. До лізату додають подвійний об'єм суміші кислого фенолу і хлороформу (1:1). Обережно змішують та центрифугують при 11000 об/хв. 5 хв. Суміш повторно обережно струшують і повторюють центрифугування.
4. Супернатант з плазмідною ДНК відбирають у чисту пробірку, не захоплюючи осад на інтерфазі. Зберігають при +4 °С.
5. Одержані зразки аналізують за допомогою гель-електрофорезу (0,9% агарози в буфері Е), при U=40-60 V і довжині агарозного геля 6-10 см. Перед внесенням в гель, зразки забарвлюють стоп-буфером для рестрикції (див. рестрикційний аналіз ДНК фага T7).

Лізуючий буфер Кадо для виділення плазмідної ДНК:

На 100 мл дистильованої H₂O: Tris – 605 мг; SDS – 3 г; 2N NaOH – 3 мл.
Профільтрувати.

Буфер Ex1:

40 мМ Трис-Ацетат, рН 7,9

2мМ Na₂ЕДТА

Готують 20-кратний буфер, який використовують для приготування агарози, одно-кратного буфера для електрофорезу, виділення плазмід.

0,9% гель агарози:

дистильованої H₂ O - 190 мл, агароза – 1,8 г. Агарозу розчиняємо на водяній бані, додаємо

10 мл буфера Ex2 і доводимо до кипіння на плитці.

Гель формуємо з агарози, охолодженої до 55 °С. Камеру заповнюємо буфером Ex1.

Для візуалізації результатів електрофоретичного розділення агарозний гель фарбуємо розчином броміду етидію (1 мкг/мл) впродовж 20 хв. Після цього гель відмиваємо від зайвого барвника в дистильованій воді 20 хв.

ВИЯВЛЕННЯ ГЕНЕТИЧНИХ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ (ПЛР)

Тема заняття: Лабораторія полімеразної ланцюгової реакції, правила роботи у ній. Перший етап підготування зразку для виявлення фітопатогену *Rhizobium vitis* методом ПЛР

1-й день

Структура ПЛР-лабораторії

Основною умовою успішної роботи ПЛР-лабораторії є відсутність контамінації обладнання, поверхонь і реактивів молекулами ДНК. У приміщенні, де працюють з ДНК або РНК, фрагменти молекул даних кислот можуть знаходитися у повітрі у вигляді аерозолів, які утворюються при розбризкуванні, а також на поверхнях столів, приборів. Потрапляння ДНК-мішені або ампліконів у реактиви призводить до хибно-позитивних результатів ПЛР.

Через загрозу контамінації ПЛР-лабораторію поділяють на три блоки – пре-ПЛР блок, ПЛР-блок і пост-ПЛР блок. Ці три приміщення забезпечені УФ-лампами.

У пре-ПЛР блоці здійснюють пробопідготовку зразків. У даному приміщенні знаходяться ламінарні бокси для розливання реактивів і виділення ДНК. У пре-ПЛР блоці також знаходиться холодильник для збереження реактивів. Це так звана “чиста” зона ПЛР-лабораторії. У “чистій” зоні працюють у окремих халатах, які перевдягають у передбокснику, у змінному взутті, у гумових рукавичках, які не виносять у інші зони ПЛР-лабораторії. У ПЛР-блоці знаходиться ампліфікатор. Пост-ПЛР блок представляє собою приміщення для проведення електрофореза. Це так звана “забруднена зона” лабораторії. ДНК, яка ампліфікується під час ПЛР у великій кількості, знаходиться у буфері для електрофорезу, на накінечниках, на внутрішній поверхні кришечок епендорфів, на дозаторах, на одязі співробітника тощо. Необхідним перед заходженням до пост-ПЛР блоку є перевдягання халату і взуття, зміна гумових рукавичок.

Правила роботи та техніка безпеки у ПЛР-лабораторії: Усі етапи постановки ПЛР у лабораторії повинні проводитися у одному напрямку: від “чистої” зони до “забрудненої”. Ні в якому разі не можна переносити обладнання або предмети із “забрудненої” зони у “чисту”.

Таким чином, навіть якщо на різних етапах проведення ПЛР використовуються одні й тіж самі реактиви, необхідно, щоб у окремих блоках знаходилися різні упаковки, які б не виносилися за межі блоків лабораторії.

Бажано, щоб на етапах підготування зразків і на етапі електрофорезу працювали різні співробітники.

Стерильності необхідно дотримуватися лише на етапі роботи з дослідним матеріалом та з культурою мікроорганізмів. Реактиви для проведення ПЛР не є стерильними, однак під час роботи з ними слід бути дуже уважним, щоб не допустити потрапляння до пробірок з реактивами пилу, у тому числі – тальку з гумових рукавичок, зайвих речовин (кожний раз при роботі з дозатором потрібно користуватися новим накінецьником, який ще не був у використанні), ДНК та РНК мікроорганізмів. Щоб уникнути цього, епендорфи з реактивами для ПЛР відкривають на якомога менший термін у стерильному боксі. Реактиви зберігають при -18° - 20°C у холодильнику, а перед роботою залишають відтанути на льоду при кімнатній температурі. Працюють з такими реактивами якомога швидше і одразу ж після роботи поміщають до холодильника.

На етапі аналізу продуктів ПЛР важливими є правила безпеки роботи з бромистим етидієм, який використовується у якості фарбника для нуклеїнових кислот. Необхідно уникати потрапляння бромистого етидію у розчині або порошку у дихальні шляхи, на шкіру і слизові оболонки. Бромистий етидій – канцероген.

Діагностика бактеріального раку винограду методом полімеразної ланцюгової реакції

На багатьох дводольних рослинах можна спостерігати характерні пухлини, які є наслідком розростання тканин. Пухлини заважають нормальному відтоку води та метаболітів. Уражені рослини відстають у рості, врожайність в них зменшується, і зрештою хвороба може призвести до загибелі рослини. Найбільш уражуваними видами є виноград, троянди, хризантеми, персик, яблуна.

Збудником бактеріального раку винограду є *Rhizobium vitis*, раніше відомий як *Agrobacterium vitis*. Пухлини, які спричиняються цим фітопатогеном, мають усі ознаки тваринних злоякісних пухлин.

Для проведення діагностики будемо застосовувати метод так званої **біо-ПЛР**, який передбачає попереднє виділення патогена на живильні середовища і виділення ДНК вже з ізольованих штамів мікроорганізмів. Метод біо-ПЛР дозволяє уникнути впливу інгібіторів ПЛР, які можуть міститися у зразку, і збільшити кількість клітин, що аналізуються.

Для аналізу відбирають лозу з рослин, в яких є симптоми, подібні до бактеріального раку, або – з візуально здорових рослин.

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) – це реплікація певного фрагмента ДНК *in vitro*. Для кожного виду мікроорганізмів характерна наявність специфічних послідовностей генома, властивих саме цьому виду. Виявляючи наявність таких послідовностей, ми можемо визначити, до якого виду відноситься виділений штам, чи є він патогенним або ні.

Усі патогенні штами *R. vitis* несуть велику Ті-плазмиду, відповідальну за здатність штама спричиняти захворювання. У непатогенних штамів такої плазмиди не має. Для того, щоб відрізнити патогенні і непатогенні штами даного виду, достатньо за допомогою ретельно підібраних праймерів виявити специфічні ділянки Ті-плазмиди. Ми будемо виявляти за допомогою модифікованої методики Дж. Хаас (1995 рік) ділянки генів *ipt* та *virD2*, характерні для патогенних штамів *R. vitis*.

Виділення ДНК з дослідних культур ризобій

Для проведення ПЛР необхідно першим чином виділити ДНК штаму, який досліджується, і ДНК контрольних штамів. Існує багато методів виділення ДНК. У нашому випадку ми застосовуємо **метод теплового лізису** культури, оскільки якість ДНК, яка виділяється цим нескладним і швидким методом навіть без етапів очищення є достатньою для постановки ПЛР за даною методикою. Метод теплового лізису полягає у прогріванні бактеріальної суспензії при високій температурі (95°C), внаслідок чого клітини руйнуються, і ДНК виходить у розчин. Потім суспензію центрифугують, уламки клітин осідають на дно, і надосадова рідина містить ДНК, необхідну для дослідження.

Практичне завдання 1. Виділити ДНК з досліджуваних штамів збудників бактеріального раку дводольних, пересіяних на картопляний агар. Для цього:

- а) у підписані за назвою штама пластикові епандорфи внести по 225 мкл дейонізованої води;
- б) за допомогою бактпетлі перенести бактеріальну біомасу у епандорфи з водою з таким розрахунком, щоб концентрація бактеріальних клітин у отриманій суспензії склала $6 \cdot 10^8$ кл/мл (змішати суспензію у вортексі);
- в) до отриманої суспензії бактеріальних клітин додати 25 мкл розчину, який містить 10 % Тритона Х-100 і 2,5 % азида натрію; перемішати у вортексі;
- г) суспензію прогріти 10 хвилин при 95°C;
- д) прогріту суспензію центрифугувати 5 хвилин при 5700 g.

Приготування реакційної суміші для проведення ПЛР

Концентрації компонентів реакційної суміші ретельно підбираються таким чином, щоб отримати максимальну кількість ампліконів заданої

довжини і у той самий час уникнути утворення неспецифічних продуктів ампліфікації, які ускладнюють інтерпретацію результатів ПЛР. Так, недостатня кількість одиниць Taq-полімерази і мала концентрація йонів магнію може призвести до утворення недостатньої кількості продуктів ПЛР. Навпаки, підвищена кількість йонів магнію призводить до зменшення специфічності реакції: крім специфічних ампліконів на гелевій платівці можна побачити фрагменти ДНК різноманітної довжини, які утворилися внаслідок неспецифічного відпалу. Позбавитися неспецифічних ампліконів зазвичай можна, зменшуючи концентрацію йонів магнію. Специфічність реакції при цьому збільшується, але врожай ампліконів зменшується, тому треба добре підібрати оптимальну концентрацію йонів для достатньої візуалізації ампліконів.

У наведеній методиці ПЛР застосовуються наступні пари праймерів: *ipt* (5' – GAT CG(G/C) GTC CAA TG(C/T) TGT - 3' і 5' – GAT ATC CAT CGA TC(T/C) CTT - 3') або *virD₂* (5' – ATG CCC GAT CGA GCT CAA GT - 3' і 5' – TCG TCT GGC TGA CTT TCG TCA TAA - 3') Ті-плазмиди патогенних штамів *R. vitis* (Haas, 1995).

Практичне завдання 2. Приготувати реакційну суміш для проведення ПЛР:

- а) розморозити реактиви на льоду при кімнатній температурі;
- б) внести у епандорфи для проведення ПЛР на 75 мкл необхідні компоненти у таких кількостях (наведені кількості на одну реакцію у об'ємі 20 мкл):

- 5,8 мкл дейонізованої води;
- 4 мкл 5x ПЛР буфера (“АмплиСенс”, Росія);
- 2,0 мкл 2 мМ дезоксинуклеозидтрифосфатів (200мкМ);
- 1,0 мкл кожного із пари 10 мМ праймерів (0,5 мкМ);
- 0,8 мкл 50 мМ Mg⁺⁺ (2 мМ Mg⁺⁺);
- 0,4 мкл Taq-полімерази, 5 Од/мкл (2 Од).

Усі реагенти фірми “АмплиСенс”, Росія.

Компоненти перемішати 3-5 секунд на вортексі; епандорфи з реакційною сумішю підписати і у кожний внести по 5 мкл досліджуваного зразку (надосадова рідина з ДНК штаму). Перемішати накінецьником дозатора. Нашарувати готову реакційну суміш зі зразком ДНК 30 мікролітрами мінерального масла для проведення ПЛР (обережно, не змішуючи масло з іншими компонентами суміші);

Ампліфікація

Практичне завдання 3. Провести ампліфікацію фрагменту ДНК штамів.

1. Поставити епандорфи у ампліфікатор і задати відповідну програму.
2. Після закінчення ампліфікації епандорфи помістити у холодильник при - 20°C до дня проведення електрофорузу.

ДНК бактерій ампліфікують з даними праймерами шляхом чергування 1 хвилини денатурації при 94°C, 1 хвилини відпалу при 52°C, 1 хвилини елонгації при 72°C, і кількість таких циклів дорівнює 40 (у першому циклі час денатурації збільшено до 3 хвилин, а у останньому циклі час елонгації збільшено до 7 хвилин). Відповідну програму задають ампліфікаторові.

2-й день

Облік результатів ПЛР: електрофорез в агарозному гелі

1. Провести електрофорез продуктів ампліфікації:

а) приготувати 1,5 % агарозний гель;

б) після застигання гелевої платівки внести у певному порядку у лунки дослідні зразки і зразки позитивного і негативного контролів. У зошиті занотувати схему роташування зразків;

в) у окрему лунку по центру або з краю платівки внести маркер молекулярної ваги;

г) провести електрофорез при силі струму 50 мА.

2. Провести облік результатів ПЛР за наявністю або відсутністю ампліконів заданого розміру.

Облік результатів класичної ПЛР проводять за допомогою електрофорезу в агарозному гелі. Спеціальний буфер для електрофорезу – зазвичай ТБЕ (трисборатний) може містити у собі бромистий етидій, або ж бромистим етидієм фарбують гелеву платівку окремо, після завершення електрофорезу. Для електрофорезу фрагментів ДНК – ампліконів ПЛР - у нашому випадку слід приготувати 1,5 % агарозний гель.

Розмір ампліконів становить 427 п.о. у разі пари праймерів до послідовності *ipt* і 224 п.о. для пари праймерів до послідовності *virD₂*. Фрагменти ампліфікованої ДНК меншого або більшого розміру є неспецифічними ампліконами.

ДНК негативно заряджена, вона рухається у бік позитивно зарядженого електроду, тому лунки для внесення зразків слід розташовувати біля негативного електроду.

Результати ПЛР оцінюють, порівнюючи розмір ампліконів з розміром маркерів молекулярної ваги. Електрофореграму фотографують за допомогою фотоапарату або відеокамери. Результати вносять у зошит за схемою:

№ лунки									
№ зразка									
Результат ПЛР*									

* - результат ПЛР у нашому випадку, коли треба виявити факт присутності патогена у зразку, оцінюють як “+” або “-“. Це якісна реакція.

Інколи треба виявити концентрацію ДНК у ампліконі, яка вказує на первинну кількість патогена у зразку. Тоді виявляють також кількісні характеристики реакції.

ЕЛЕКТРОФОРЕЗ В ПОЛІАКРИЛАМІДНОМУ ГЕЛІ ЗА LAEMMЛI (SDS-PAGE DISCONTINUOUS ELECTROPHORESIS)

Тема заняття: Розділення білків фага Т4 та стандартних білків, які використовуються для визначення молекулярної маси

Електрофорез у поліакриламідному гелі (англ. „Polyacrylamide gel electrophoresis – PAGE”) - порівняно простий, надійний, швидкий, широкоживаний та доступний метод розділення білків у електричному полі. Метод широко застосовується при визначенні:

1. чистоти білків;
2. ізоелектричної точки;
3. розміру;
4. кількості;
5. виявлення модифікації;
6. вивчення експресованого білкового профілю з використанням комбінації ізоелектрофокусування (IEF) та SDS-PAGE (двовірний електрофорез).

Важливим вдосконаленням PAGE, яке призвело до його значного поширення, стало використання денатуруючих агентів для дисоціації нативних білків до індивідуальних ланцюгів. Основне місце серед таких сполук займає SDS (англ. „sodium dodecyl sulfate”). На сьогодні SDS-PAGE є одним із найпоширеніших методів з використанням денатуруючих акриламідних гелів.

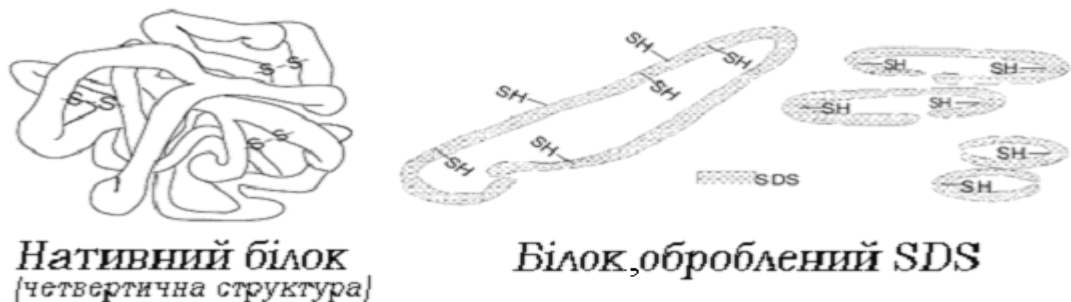


Рис.1. Вплив SDS на структуру білка.

Під час нагрівання білків у присутності SDS детергент зв'язується з ланцюгом поліпептиду та надає йому однорідний негативний заряд (рис.1). Більшість білків на 1 г своєї маси зв'язує 1,4 г SDS незалежно від

амінокислотного складу та послідовності. Пептидний ланцюг набуває форму жорсткого еліпсоїда, його мала вісь має постійну довжину, а розмір великої вісі лінійно пов'язаний з молекулярною масою білка, у результаті чого відношення заряд/маса стають постійним. Сформовані комплекси SDS-поліпептид, рухаючись в акриламідному гелі, розділяються у відповідності до їх мас - невеликі молекули рухаються швидше та мігрують на довші відстані, а більші – рухаються повільніше. Молекулярна маса невідомого білка може бути визначена з відхиленням в 10% від його реального значення шляхом порівняння з рухливістю стандартних білків.

Роздільна здатність SDS-PAGE значно удосконалена за рахунок використання концентруючого геля, який використовує принцип ізотахофореа – концентрація, порівняно великого об'єму зразка до вузьких та концентрованих смуг (або зон). В розділюючому гелі негативно-заряджений SDS-білковий комплекс мігрує крізь ситоподібний поліакриламідний матрикс, де відбувається розділення компонентів білкової суміші за молекулярними масами.

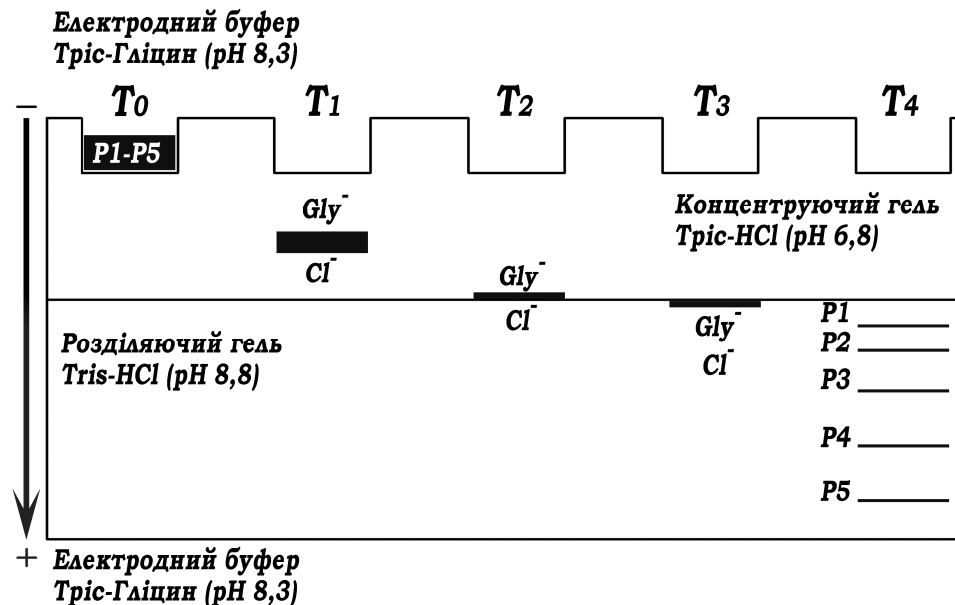


Рис. 2. Схема електрофоретичного розділення у ПААГ.

Електрофоретичне розділення гіпотетичної суміші із 5-ти білків (P1-5) крізь концентруючий гель рН 6,8 та розділюючий гель рН 8,8 в часі схематично показано на рис.2. T₀ – початок розділення, коли білкова суміш у великому об'ємі нанесена в лунку концентруючого геля з рН 6,6. Після увімкнення напруги, об'єм зразка починає зменшуватись, створюючи диск – вузьку концентровану зону між лідируючим іоном хлору розділюючого буфера та замикаючим іоном гліцину електроодного буфера з рН 8,3 (T₁), зменшуючись у розмірах в процесі руху до розділюючого геля. Після закінчення процесу концентрації (T₂), сформований диск починає проникати крізь пори розділюючого акриламідного геля зі значно меншими порами та іншим значенням рН – 8,8 (T₃), при цьому змінюється рухливість білкових

іонів. Досліджувані білки, які мають різні молекулярні маси та коефіцієнти дифузії, будуть розділені та мігруватимуть з різною рухливістю (Т4).

Поліакриламідні гелі характеризуються високою механічною стабільністю, саме тому вони є ідеальним середовищем для розділення білкових сумішей.

Поліакриламідний гель формується шляхом полімеризації молекул акриламіда та зшиваючого біфункціонального мономеру N,N-метиленабісакриламіду. Хімічна структура акриламіду, бісакриламіду та поліакриламідного геля наведена на рис. 3.

Процес полімеризації може бути індуковано:

1. хімічно - комбінація TEMED (тетраметилетилендіамін) та персульфату амонію.
2. фотохімічно - комбінація TEMED та рибофлавін-5-фосфату чи з використанням метиленового синього в якості джерела вільних радикалів.

Процес полімеризації акриламідного гелю залежить від ряду факторів. Одні можуть прискорювати чи уповільнювати його, а інші впливати на його фізичні якості – такі, як розмір пор. Розуміння, яким чином такі фактори впливають на полімеризацію, дозволяє отримати гелі з необхідними та відтворюваними характеристиками.

На швидкість полімеризації впливають:

1. Тип та концентрація ініціаторів.

За хімічної полімеризації збільшення концентрації ініціаторів прискорює полімеризацію. Фотополімеризація вимагає визначеної концентрації ініціаторів.

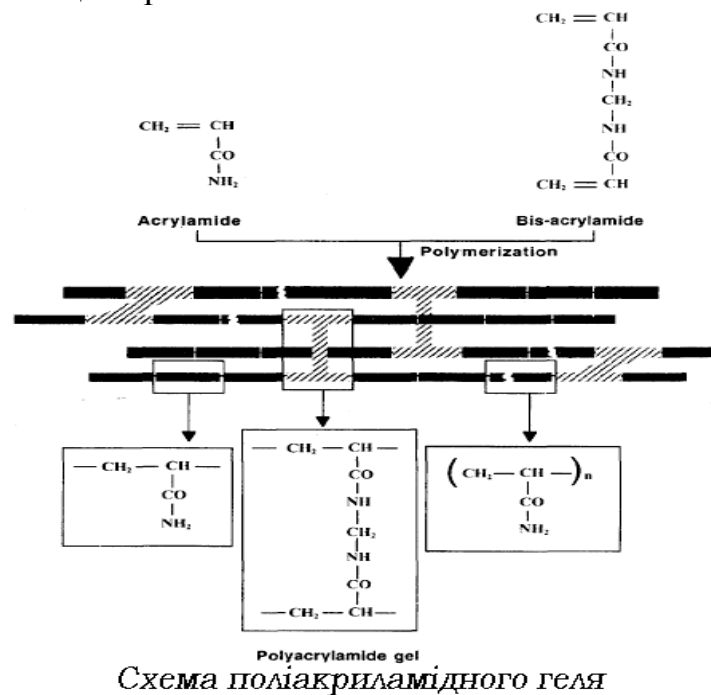


Рис. 3.

2. Чистота реагентів.

Контамінанти, присутні в акриламіді, бісакриламіді, ініціаторах, буферах, воді, SDS можуть інгібувати або прискорити полімеризацію.

3. Значення рН.

При використанні системи ініціації полімеризації на основі персульфату амонію зміна рН в кислу сторону значно знижує ефективність полімеризації; при значенні рН 4 – полімеризація не відбувається, оптимум знаходиться в межах 7-10.

4. Температура.

Низька температура зменшує швидкість полімеризації, на той час як висока – збільшує. Оптимальними є 23-25 °С.

5. Інтенсивність освітлення (при фотополімеризації).

Збільшення інтенсивності освітлення збільшує швидкість полімеризації. Надмірна інтенсивність освітлення може викликати швидке виснаження каталізатора та неповну полімеризацію акриламиду.

6. Кисень.

У результаті конкурентного захоплення вільних радикалів, кисень інгібує процес полімеризації. Для видалення кисню проводять дегазацію попередньо нагрітого до кімнатної температури розчину. Для системи ініціаторів персульфат амонію/ТЕМЕД більший час дегазації пришвидшує полімеризацію. Середній час дегазації має складати 10 хв при тискові в 125 torr.

7. Концентрація мономерів.

Збільшення концентрації мономерів призводить до прискорення швидкості полімеризації.

Фізичні параметри акриламідних гелів (розмір та кількість пор) є важливими для оптимізації розділення білків, вони визначають спектр молекулярних мас та роздільну здатність електрофоретичної системи.

Розмір пор акриламідних гелів регулюється, в основному, загальною кількістю акриламіда на одиницю об'єму (Т) та відносним відсотком бісакриламіду (С) - зшиваючого компонента .

Т – загальна концентрація у % мономерів акриламіду та бісакриламіду в грамах на 100 мл. С – вказує відсоток (за вагою) бісакриламіду (крослінкера) по відношенню до загальної кількості мономерів акриламіду (акриламід+біс).

$T = (A+B/100\text{мл}) \times 100\%$ А - маса акриламіду, В - маса бісакриламіду в грамах.

$C = (B/A+B) \times 100\%$ А - маса акриламіду, В - маса бісакриламіду в грамах.

Розмір пор прямопропорційно залежить від швидкості полімеризації. Тому всі фактори, які впливають на швидкість полімеризації, є визначальними і для розміру пор гелевої матриці. Так, наприклад, зменшення пор може бути викликане збільшенням температури полімеризації, і навпаки.

Використання сечовини індукує прискорення реакції активації мономерів акриламід у персульфатом амонію, що призводить до формування малих пор. Додавання поліетиленгліколю дозволяє отримати макропористу гелеву матрицю.

Гелі з концентрацією акриламід у менше 3% є рідкими, робота з ними вимагає включення 0,5% агарози. З іншого боку, гелі з концентрацією акриламід більше 35% занадто ламкі та крихкі, що також ускладнює роботу з ними. Для однорідних гелів концентрація акриламід знаходиться в межах 5-20%, для градієнтних – 3-30%.

Методи візуалізації білків розроблялись паралельно з методами їх розділення, вибір яких є настільки ж важливим, як і підбір умов електрофоретичного розділення.

На вибір методу візуалізації впливають:

1. Легкість використання;
2. Час, необхідний для методу детекції;
3. Рівень чутливості;
4. Сумісність з подальшими методами дослідження;
5. Рівень лінійності співвідношення між концентрацією білка та його сигналом при детекції.

На сьогодні широкого розповсюдження набули методи забарвлення органічними барвниками (Amido Black, Fast Green FCF, Coomassie blue), сріблом (запроваджений у 1979 році), флюоресцентними барвниками, методи авторадіографії, блоттингу.

Coomassie brilliant blue R250 (CBR-250) – один із найпоширеніших барвників для візуалізації білків, розділених методом SDS-PAGE. Відноситься до амінотриарилметанових барвників, які формують сильні, але нековалентні зв'язки з білками, у більшості випадків - внаслідок комбінації Ван дер Ваальсових сил та електростатичних взаємодій з NH_3^+ групами амінокислот, і тому метод сумісний з мас-спектрометричним аналізом білків. За рН=1, яке використовується під час забарвлення білків, Coomassie brilliant blue у більшості випадків знаходиться у високо протонованій рудій (червоній) формі, з незначним вмістом зеленої та синьої форм, що знаходяться у рівновазі одна з одною. Лише нейтральна (синя) форма здатна сильно зв'язуватись з білками.

Ступінь забарвлення білку прямопропорційна до його кількості відповідно до закону Ламберта-Бера. За нормальних умов Coomassie brilliant blue сильно зв'язується з аргініном, лізином, гістидином, тирозином та з меншою силою - з амінокислотами ароматичного ряду.

Кількість сайтів зв'язування залежить і варіює від білка до білка та залежить від вмісту амінокислот з основними властивостями в більшій мірі, ніж від маси білка.

Традиційний метод фарбування Кумасі здатен виявити від 100 до 30 нг білку, чутливість може бути збільшена шляхом використання модифікації з

фарбуванням при підвищених температурах, або використанням колоїдного фарбування Кумасі.

Стокові розчини

Буфер для концентруючого геля (4×) 0,5 М Tris-HCl pH 6,8

				Довести рН до 6,8 розчином 6 М HCL, залишити вистоятись до кімнатної температури, перевірити та довести рН до 6,8. Довести дейонізованою водою до кінцевого об'єму. Відфільтрувати. Зберігати при 4 °С.
Tris	60,5 г	6,05 г	3 г	
H ₂ O	850 мл	85 мл	40 мл	
Довести до	1000 мл	100 мл	50 мл	
рН	6,8			

Буфер для розділяючого геля (4×) 1,5 М Tris-HCl pH 8,8

				Довести рН до 8,8 розчином 6 М HCL, залишити вистоятись до кімнатної температури, перевірити і довести рН до 8,8 Довести дейонізованою водою до кінцевого об'єму. Відфільтрувати. Зберігати при 4 °С.
Tris	181,5 г	18,15 г	9,1 г	
H ₂ O	850 мл	85 мл	40 мл	
Довести до	1000 мл	100 мл	50 мл	
рН	8,8			

Електродний буфер (10×) Tris-Гліциновий буфер рН 8,3; 0,1% SDS

			Буфер не титрується соляною кислотою. Після приготування залишити вистоятись для врівноваження рН, повторно виміряти рН Можна зберігати при кімнатній температурі Перед використанням розвести в 10 разів, відфільтрувати.
Tris	30 г	3 г	
Гліцин	144 г	14,4 г	
SDS	10 г	1,0 г	
H ₂ O	1000 мл	100 мл	
рН	8,3		

Стоковий розчин 10% SDS

			Зберігається при кімнатній температурі. При охолодженні до 4 °С – стає твердим. Зберігати при кімнатній температурі.
SDS	10 г	1 г	
Σ об'єм	100 мл	10 мл	

Буфер для зразків (2×)

			Змішується з розчином зразку у співвідношенні 1:1. Важливо зберегти співвідношення SDS до білка 1,4 г/1 г. Концентрація білку в кінцевому розчині не повинна перевищувати 10 мкг/мкл.
(4×) конц буфер	2 мл	1 мл	
Гліцерол	1,6 мл	0,8 мл	
10 % SDS	3,2	1,6	

	мл	мл	Нагрівати 2 хв при 95 °С. Нагрівання зразку до 60 °С (і вище) та змішування ініціює процес зв'язування SDS з білком. Зберігати при 4 °С.
2-меркаптоетанол	0,8 мл	0,4 мл	
1 % бром феноловий синій	0,4 мл	0,2 мл	
Σ об'єм	8 мл	4 мл	

1% розчин агарози

			Використовується для створення агарозної пробки перед заливанням розділяючого геля. Зберігати при 4 °С
Агароза	1 г	0,5 г	
Σ об'єм	10 мл	5 мл	

Розчини ініціаторів полімеризації

Хімічна полімеризація

			Персульфат амонію є дуже гігроскопічною сполукою та негайно руйнується при розчиненні у воді. Розчин повинен готуватися безпосередньо перед проведенням полімеризації (щоразово). У нормальному стані представляє собою суху сіль, ефективність падає при накопиченні вологи. При розчиненні у воді має спостерігатись шум пухирців газу.
10% амонію персульфату	1 г	0.1 г	
H ₂ O	10 мл	1 мл	
ТЕМЕД – тетраметил-етилендіамін	Не розбавляється		Гігроскопічна сполука, легко піддається окисленню. Повинна зберігатися у темній скляній, щільно закритій тарі при 4 °С, не більше 6 місяців після відкриття. Інтенсивно жовтий колір може бути індикатором непридатності реактиву.

Розчин акриламідів та бісакриламідів. 30% Т / 2,6% С

			Розчин необхідно відфільтрувати крізь мембранний фільтр та дегазувати за допомогою вакуумного насоса та колби Бунзена (за 15-20 хв до введення ініціаторів полімеризації). Очистка та дегазація може бути проведена додаванням подрібненого активованого вугілля; відфільтрувати. Розчин необхідно готувати кожен тиждень.
Акриламід	29,22 г	14,6 г	
Бісакриламід	0,78 г	0,4 г	
H ₂ O	100 мл	50 мл	

			Зберігати при 4 °С у темному місці.
--	--	--	-------------------------------------

Фарбування гелів

Фарбування	Барвник розчиняється у спирті, а потім додається вода. Суміш відстоюється впродовж 4 годин або ночі, відфільтровується. Зберігати при 4 °С у темному місці.	
Оцтова кислота	100 мл	
Метанол	500 мл	
H ₂ O	400 мл	
Coomassie Brilliant Blue	1 г	
Σ об'єм	1000 мл	
Відмивання	При постійному перемішуванні відбувається відмивання фону. Розчин змінювати при насиченні барвником на новий.	
Оцтова кислота	70 мл	
Метанол	120 мл	
H ₂ O	810 мл	
Σ об'єм	1000 мл	

Пропис сумішей розділяючого (Т-12%) та концентруючого (Т-5%) гелів

Хід роботи

1. Підготувати скляні пластини електрофоретичної камери:
 - 1.1.Промити скляні пластинки детергентом;
 - 1.2.Промити водопровідною водою;
 - 1.3.Промити дистильованою водою;
 - 1.4.Просушити у сушильній шафі 60-120 °С, дати охолонути.
2. Зібрати електрофоретичну камеру.
3. Намітити висоту заливки гелів.

		Розділяючий		Концентруючий	
1	H ₂ O	32,9 мл	4,94 мл	56,3 мл	5,63 мл
2	1,5M Tris-HCl, pH 8,8	25 мл	3,75 мл	-	-
3	0,5M Tris-HCl, pH 6,8	-	-	25 мл	2,5 мл
4	10% SDS	1 мл	0,15 мл	1 мл	1,0 мл
5	Акрил/Біс Т30%С2,6%	40 мл	6 мл	16,6 мл	1,66 мл
6	10% персульфат амонію	1 мл	0,15 мл	1 мл	1,0 мл
7	ТЕМЕД	0,1 мл	0,015 мл	0,1 мл	0,01 мл
	Σ об'єм	100 мл	15 мл	100 мл	10 мл

4. Залити агарозну пробку.

5. Залити розділяючий гель:
 - 5.1. Приготувати суміш відповідно до пропису в необхідному об'ємі. Перемішати, але не взбовтувати. Додати полімеризатори, перемішати.
 - 5.2. Використовуючи автоматичний дозатор (5 мл), обережно внести суміш розділяючого гелю в камеру, не створюючи пухирців.
 - 5.3. Обережно нашарувати 0,3-0,5 мл води (0,1% розчин SDS, насичений розчин н-бутанолу або ізопропанолу). Із збільшенням ступеня полімеризації межа між гелем та водою ставатиме все чіткішою.
 - 5.4. Ступінь полімеризації контролювати за залишком розчину розділяючого гелю. За 7-10 хв. гель почне полімеризуватись. Залишити на 30 хв.
 - 5.5. Перед нанесенням суміші концентруючого гелю видалити воду.
6. Залити концентруючий гель:
 - 6.1. Приготувати суміш відповідно до пропису в необхідному об'ємі. Перемішати, але не збовтувати. Додати полімеризатори, перемішати.
 - 6.2. Обережно нанести суміш концентруючого гелю, поверх розділяючого до верхнього краю внутрішнього скла.
 - 6.3. Занурити тefлонову гребінку у розчин концентруючого гелю, так щоб між верхнім краєм розділяючого гелю та нижнім краєм зубців гребінки залишалось 1,0-1,5 см. Для запобігання захоплення повітря занурення гребінки необхідно проводити під кутом до електрофоретичної камери.
 - 6.4. Полімеризація займає близько двох годин. Зміна показника заломлення світла навколо зубців гребінки слугуватиме індикатором ступеня полімеризації. Для зручності маркером відмітити положення лунок.
 - 6.5. Обережно вийняти гребінки із концентруючого гелю, зібрати електрофоретичну камеру згідно інструкції виробника.
 - 6.6. Заповнити камеру електродним буфером. Видалити повітря із утворених в концентруючому гелі лунок, промити електродним буфером за допомогою автоматичного дозатора для видалення акрилової кислоти, яка утворилась внаслідок полімеризації.
7. Приготування зразків:
 - 7.1. Змішати зразок білка з буфером для зразків ($\times 2$) у співвідношенні 1:1. Ідеальними є умови, коли на 1 грам білка припадає 1,4 грам SDS. В будь-якому разі фінальна концентрація білку не повинна перевищувати 10 мкг/мкл.
 - 7.2. Нагрівати зразок на водяній бані або нагрівальному блоці до 95 °C впродовж 2-5 хв для денатурації білка та зв'язування його з SDS. Охолодити до кімнатної температури. Відцентрифугувати.
 - 7.3. Нанести зразки в лунки концентруючого геля.
8. Запустити електрофоретичне розділення:
 - 8.1. Не перевищувати характеристик напруги, сили струму та потужності для типу камери, яка використовується.

- 8.2. Катод (-) – має бути приєднаний до верхнього резервуару, а Анод (+) – до нижнього.
- 8.3. Постійна напруга в 90 В при кімнатній температурі займе 16-18 годин до моменту перетину лінії фінішу фронтом бромфенолового синього. Якщо камера обладнана системою охолодження (8 °С) – постійна напруга в 200 В забезпечить загальний час фореzu в 6-8 годин.
- 8.4. Вимкнути електрофоретичний апарат, підготувати гель для візуалізації.
9. Візуалізація гелів:
- 9.1 Помістити гель у пластиковий контейнер та залити суміш з барвником із розрахунку 100 мл на гель 8×10 см.
- 9.2 Залишити гель при постійному перемішування на ніч при кімнатній температурі.
- 9.3 Злити розчин барвника.
- 9.4 Додати необхідний об'єм розчину для відмивання. Залишити гель при постійному перемішування до достатнього знебарвлення фону.
- 9.5 Зберігати гель в 5% розчині оцтової кислоти або висушити на повітрі. Розмістити між двома натягнутими шарами целофану. Залишити для висихання. Висушені на повітрі гелі можуть зберігатися невизначений термін.

**МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ ДО ПРОВЕДЕННЯ У ЛІТНЬОЇ ШКОЛИ
“МОЛЕКУЛЯРНА МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ”**

Автори-укладачі:

к.б.н. Кушкіна А.І., к.б.н. Ліманська Н.В., к.б.н. Черватюк Н.В.,
к.б.н. Іваниця Т.В., к.б.н. Остапчук А. М., к.б.н. Жумінська Г.І.,
к.б.н. Сергєєва Ж.Ю., асп. Крилова К.Д., д.б.н. Товкач Ф.І.,
д.б.н. Іваниця В.О.

Видано в авторській редакції

Підп. до друку 30.04.2009. Формат 60x84/8.
Гарн. Таймс. Тираж 50 прим.

Редакційно-видавничий Центр
Одеського національного університету
імені І.І. Мечникова,
65082, м. Одеса, вул. Єлісаветинська, 12, Україна
Тел.: (048) 723 28 39