

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені І. І. МЕЧНИКОВА
БІОЛОГІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ
КАФЕДРА МІКРОБІОЛОГІЇ, ВІРУСОЛОГІЇ ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ

МЕТОДИ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ
МОДУЛЬ 3
ОСНОВНІ МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНІ
МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

ЕЛЕКТРОННІ МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
до лабораторних занять та самостійної роботи
для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти
денної форми навчання
спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія,
091 Біологія

ОДЕСА
ОНУ
2024

УДК 221.577
M545

Укладачі:

А. Г. Мерліч, кандидат біологічних наук, доцент кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології;

Г. І. Жумінська, кандидат біологічних наук, доцент кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології.

Рецензенти:

С. Я. Підгорна, кандидат біологічних наук, доцент кафедри зоології, гідробіології та загальної екології ОНУ імені І. І. Мечникова;

С. С. Чернадчук, кандидат біологічних наук, доцент кафедри молекулярної біології, біохімії та генетики.

*Рекомендовано вченою радою біологічного факультету
ОНУ імені І. І. Мечникова.
Протокол № 6 від 28 квітня 2023 р.*

M545 **Методи** біотехнологічних досліджень. Модуль 3. Основні молекулярно-біологічні методи досліджень [Електронний ресурс] : електрон. метод. рек. до лаб. занять та самост. роб. для здобув. першого (бакалавр.) рівня вищ. освіти денної форми навч. спец. 162 Біотехнології та біоінженерія, 091 Біологія / уклад.: А. Г. Мерліч, Г. І. Жумінська. – Одеса : Одес. нац. ун-т ім. І. І. Мечникова, 2024. – 67 с. – 1,9 МБ.

Методичні рекомендації є частиною матеріалу до курсу «Методи біотехнологічних досліджень». Вони містять теоретичну інформацію та протоколи виконання лабораторних занять, необхідних для успішного оволодіння здобувачами основними молекулярно-біологічними методами досліджень, які є необхідними для проведення біотехнологічних та біологічних експериментів. Описані методи є базовими для проведення генно-інженерних досліджень та включають електрофорез білків, виділення ДНК, класичну ПЛР та електрофорез нуклеїнових кислот. Подана методика проведення класичної ПЛР може бути використана також для надійної ідентифікації мікроорганізмів при проведенні біологічних досліджень.

Розраховано на здобувачів першого (бакалаврського) рівня навчання біологічного факультету спеціальностей 162 Біотехнології та біоінженерія, 091 Біологія.

УДК 221.577

ЗМІСТ

ЗАГАЛЬНІ ВІДОМОСТІ	4
СПИСОК СКОРОЧЕНЬ	5
ТЕМА 1. МЕТОДИ ВСТАНОВЛЕННЯ СТРУКТУРИ ТА ВЛАСТИВОСТЕЙ СПОЛУК. ЕЛЕКТРОФОРЕЗ БІЛКІВ	6
Лабораторне заняття 1 Електрофорез білків як метод визначення молекулярної маси білків. Підготовчий етап	6
Лабораторне заняття 2 Приготування гелів для електрофорезу білків	18
Лабораторне заняття 3 Проведення білкового електрофорезубактеріоцину <i>E. italicus</i> ОНУ547	24
ТЕМА 2. РОБОТА З НУКЛЕЇНОВИМИ КИСЛОТАМИ	40
Лабораторне заняття 4 Виділення ДНК детергент фенольним методом та методом теплового лізису	40
Лабораторне заняття 5 Проведення класичної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)	47
Лабораторне заняття 6 Електрофорез нуклеїнових кислот. Облік результатів класичної ПЛР	56
ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА	64

ЗАГАЛЬНІ ВІДОМОСТІ

Обов'язкова дисципліна «Методи біотехнологічних досліджень» об'ємом 180 годин (6 кредитів ECTS) викладається студентам першого рівня вищої освіти першого та другого курсів, що навчаються за ОПП 162 Біотехнології та біоінженерія, та містить три модулі. Третій модуль даної дисципліни, що носить назву «Основні молекулярно-біологічні методи досліджень» передбачає 26 годин лабораторних занять та 24 години самостійної роботи.

Лабораторні заняття та самостійна робота з даної частини курсу є необхідними для засвоєння студентами-біотехнологами базових умінь, які є необхідними для проведення генно-інженерних досліджень. Вони є корисними також для студентів-біологів для засвоєння сучасних підходів до ідентифікації мікроорганізмів. Пререквізитами є дисципліни: «Фізика», «Хімія загальна та неорганічна», «Хімія органічна», «Біологія клітини». Пореквізити: «Генетика і молекулярна біологія», «Мікробіологія і вірусологія», «Генетична інженерія мікроорганізмів». Метою дисципліни «Методи біотехнологічних досліджень» є навчання здобувачів основним методам проведення біотехнологічних досліджень, ознайомлення здобувачів з правилами підбору методів відповідно для цілей та умов біотехнологічного та біологічного експерименту.

Основні завдання, які стоять перед здобувачем у межах модулю:

1. Засвоїти знання щодо принципів молекулярно-біологічних методів досліджень, що використовуються при проведенні генно-інженерних маніпуляцій та інших видів біотехнологічних та біологічних досліджень.

2. Отримати вміння та навички використання базових методів молекулярної біології.

3. Ознайомитися з проблемами, що можуть виникнути при проведенні молекулярно-біологічних експериментів та навчитися їх вирішувати.

За результатами вивчення третього модулю дисципліни «Методи біотехнологічних досліджень» здобувач повинен знати: принципи базових молекулярно-біологічних методів досліджень.

Вміти: використовувати такі молекулярно-біологічні методи як електрофорез білків, ПЛР, електрофорез нуклеїнових кислот при проведенні генно-інженерних та інших біотехнологічних і біологічних досліджень.

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

БУО/мл – бляшко-утворюючі одиниці

В – вольти

Да – дальтони

ДСН – додецилсульфат натрію

дНТФ – дезоксинуклеозид трифосфат

GFP – green fluorescence protein (укр. зелений флуоресцентний білок)

кДа – кілодальтони

мА – міліампери

мг – міліграми (англ. mg)

мл – мілілітри (англ. mL)

мкг – мікрограми (англ. μg)

мкл – мікролітри (англ. μL)

НОР – надосадова рідина

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

п. н. – пари нуклеотидів

ТАЕ – трис-ацетатний буфер

ТЕМА 1

МЕТОДИ ВСТАНОВЛЕННЯ СТРУКТУРИ ТА ВЛАСТИВОСТЕЙ СПЛУК. ЕЛЕКТРОФОРЕЗ БІЛКІВ

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 1

Електрофорез білків як метод визначення молекулярної маси білків.

Підготовчий етап

Мета заняття – закріплення теоретичних основ електрофорезу білків та здійснення підготовки до нього.

Питання для підготовки до заняття:

1. Явище електрофорезу, що використовується у природничих науках. Фізико-хімічні основи електрофорезу.
2. Принцип електрофорезу білків.
3. Відмінність електрофорезу білків від електрофорезу нуклеїнових кислот.
4. Спектр застосування електрофорезу білків при проведенні біотехнологічних та біологічних досліджень.

Теоретичні відомості

Одним із найпоширеніших методів розділення та аналізу біологічних макромолекул, що активно використовується у біотехнологічній та біологічній лабораторії, є електрофорез. Відповідно до визначення, гель-електрофорез (англ. *Gel electrophoresis*) – це метод розділення складних сумішей біологічних молекул, як правило, нуклеїнових кислот або білків, на основі різниці в їх розмірі [Glick et al., 2010].

Саме розділення проходить в матриксі для електрофорезу. Даний матрикс називають гелем, який має напіврідку консистенцію та являє собою сітку із поліакриламідну або агарози в залежності від поставленої задачі та типу макромолекул, що в ньому розділяються. На початку експерименту заряджені біологічні макромолекули вносяться в гель та після цього на них діють електричним струмом, завдяки якому вони починають рухатися. Швидкість даного руху при постійному струмі залежить від їх розміру: чим більший розмір молекули тим повільніше їх рух і навпаки. Саме тому суміш макромолекул різного розміру з часом розділяється в гелі, формуючи окремі смуги (англ. *bands*), які видно в гелі наприкінці експерименту. Смуга

складається з фрагментів ДНК, РНК або білків однакового розміру, що мігрували в гелі з однаковою швидкістю [Glick et al., 2010].

Електрофорез білків SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) був вперше описаний Laemmli у 1970 році (Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970. V. 227, P. 680–685), який використав у якості замикаючих іонів (*trailing ions*) молекули гліцину. Її система розділення білків ще носить назву Glycine-SDS-PAGE або Laemmli-SDS-PAGE. Вона і зараз активно використовується в наукових лабораторіях для ефективного розділення білків, молекулярна маса яких перевищує 30 кДа. У випадку необхідності розділення білків меншого розміру використовується система, створена вченими Schägger and von Jagow, які замість гліцину системи Laemmli використали трицин. Систему Tricine-SDS-PAGE краще використовувати у випадку, коли розділені в гелі білки мають підлягати амінокислотному секвенуванню. Це й зрозуміло, оскільки присутність стороннього гліцину може привнести похибки в отримані результати визначення амінокислотних послідовностей. Дану систему також часто комбінують з електроблотингом та мас-спектрометрією [Schägger et al., 1987; Shägger, 2006].

Електрофорез білків дозволяє дослідникам розділяти білкові суміші, визначити молекулярну масу окремих білкових молекул та, завдяки цьому, ідентифікувати їх, перевіряти чистоту досліджуваних білків і, відповідно, ефективність застосованих методів їх очистки. Крім того, даний метод дозволяє виявити наявність білків загалом та визначити їх кількість, що особливо актуально при встановленні ефективності проведених генно-інженерних маніпуляцій з метою отримання рекомбінантних білків. Електрофорез білків часто використовується біотехнологами для дослідження бактеріоцинів та бактеріофагів і дозволяє визначити їх приблизну молекулярну масу та здійснити попередню ідентифікацію на початкових етапах дослідження [H-Kittikun et al., 2015; Merlich et al., 2019; Martínez- Hernández et al., 2020].

Для проведення електрофорезу білків приготувані гелі поміщаються у камеру для електрофорезу (рис. 1 А) та заливаються буферами. Електрофоретична камера приєднується до джерела струму, що забезпечує необхідну напругу та силу струму (рис. 1 Б).

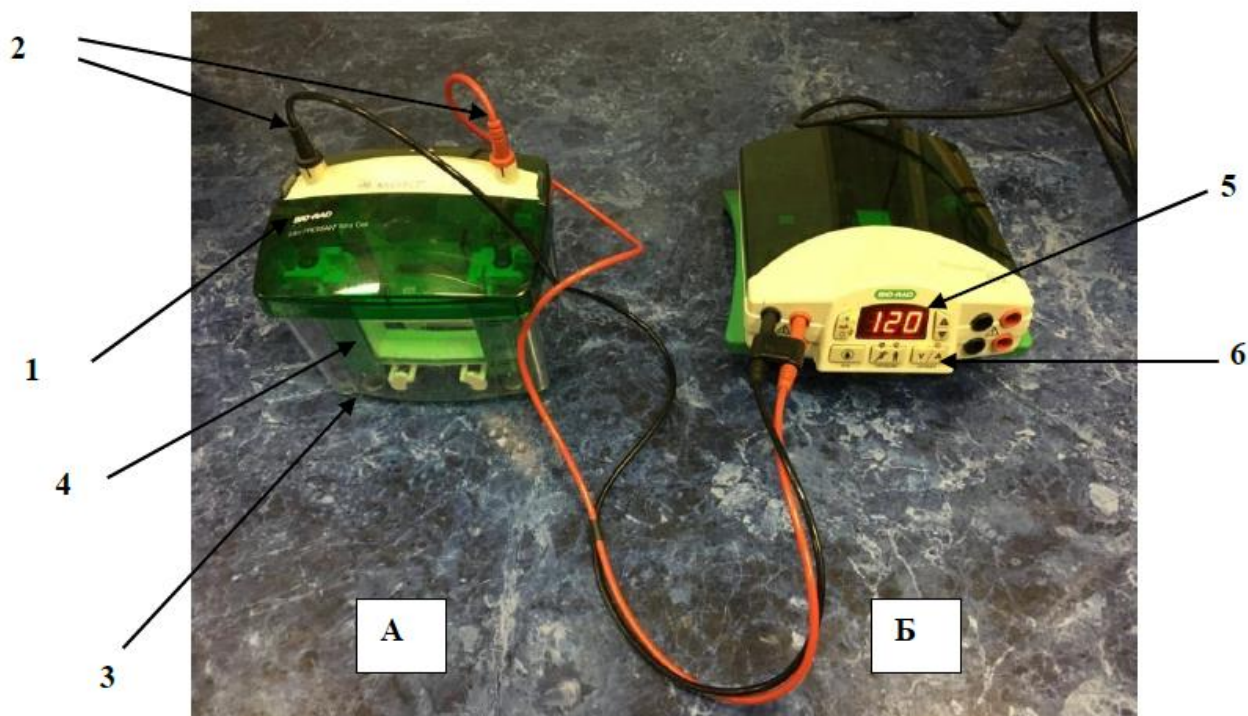


Рис. 1. Обладнання для проведення електрофорезу білків фірми Bio-Rad (США)

[авторське фото]

А – камера для електрофорезу (electrophoresis cell): 1 – кришка (lid), 2 – електроди (electrodes), 3 – камера для гелів (gel box), 4 – електрофоретичний модуль (running module) (<https://www.bio-rad.com/en-ua/applications-technologies/protein-electrophoresis-equipment?ID=LUSOZFBEB>);

Б – джерело живлення (power supply): 5 – дисплей (display), 6 – клавіатура (клавiші «stop», «run», «pause», «volts / amperes») (<https://www.bio-rad.com/en-ua/product/powerpac-basic-power-supply?ID=bea5dea1-cef0-43ad-8af5-b2c0287f6e07>)

Після внесення в гелі проб та маркеру молекулярної маси вмикають струм та починається сам процес електрофорезу. Після закінчення електрофорезу струм вимикають, гелі дістають з камери, білки в гелях фіксують та забарвлюють. Після цього йде процес знебарвлення фону гелів для виявлення смуг, що відповідають досліджуваним білкам. Гелі фотографують та аналізують.

З вищезазначеного зрозуміло, що для проведення електрофорезу білків необхідно приготувати ряд розчинів, а саме катодний та анодний буфери, розчини для приготування гелів, буфер для обробки проб, розчини для фіксації, забарвлення та знебарвлення. У розділах «Матеріали і методи» наукових публікацій, звідки дослідник бере методики для своєї роботи з посиланнями на них, у більшості випадків даються кінцеві концентрації розчинів. Кінцеві концентрації наводяться найчастіше в молях на літр (Mol/L) або у відсотках. Для успішного проведення експериментів необхідно спочатку розрахувати

масу або об'єм реактивів, необхідних для приготування суміші. У випадку використання молярних концентрацій необхідно спочатку знайти молярну масу сполуки, одиницями вимірювання яких є грами на моль (вона часто пишеться на банках з реактивами). Визначивши молярну масу, стає відомо, скільки грам реактиву необхідно для приготування 1 М розчину. Так, наприклад, молярна маса Трису-основи (англ. *Tris-base*) складає 121,14 г/Моль (121,14 грам сполуки в одному Моля/літрі). Це означає, що для приготування одного літру 1 М розчину трису необхідно зважити 121,14 г порошку даного реактиву та довести об'єм до 1 літру дейонізованою водою. У випадку одержання меншої концентрації та/або меншого об'єму здійснюються необхідні розрахунки з побудовою пропорцій.

Що стосується концентрації у відсотках, то згадайте, що 1 % означає одну частину серед ста частин. Тобто, для приготування 1 % розчину необхідно розчинити 1 мл рідини (або 1 г порошку) в 99 мл води. У випадку інших концентрацій або об'ємів робляться розрахунки шляхом побудови пропорцій.

Матеріал та обладнання

1. Електронні ваги.
2. Магнітна мішалка з магнітним якорем.
3. Дейонізатор.
4. рН-метр.
5. Дозатори та наконечники для них.
6. Трис-основа («Трис»).
7. Додецилсульфат натрію.
8. Гліцин.
9. Акриламід (2х кристалічний).
10. Бісакриламід (2х кристалічний).
11. Гліцерол.
12. Бромфеноловий синій.
13. 2-меркаптоетанол.
14. Метанол.
15. Оцтова кислота.
16. Розчин для забарвлення білків PAGE Blue (Thermofisher Scientific, США).
17. Кумасі бриліантовий блакитний R250.
18. Персульфат амонію.
19. TEMED.
20. Лабораторний посуд: колби на 1 л, мірні циліндри, градуйовані стакани, піпетки Пастера.
21. Маски, гумові рукавиці.

Завдання 1. Здійснення необхідних розрахунків

Хід роботи:

1. Розрахувати необхідну кількість компонентів для приготування катодного, анодного буферів, буферу для гелів, суміші акриламиду-бісакриламиду, а також буферу для підготовки проб (таблиці 1.1–1.5). В колонці «концентрація» наведені кінцеві концентрації реактивів в молях або відсотках, взяті із відповідних публікацій (посилання додаються). Отриманими даними заповнити відповідні таблиці. Додати зроблені розрахунки!

Таблиця 1.1

Склад катодного буферу для проведення електрофорезу

[Schägger et al., 1987]

Компонент	Концентрація	Кількість
1) Трис-основа (англ. Tris-base, Tris, порошок)	0,1 М	
2) Гліцин або трицин (порошок)	0,1 М	
3) Додецилсульфат натрію (ДСН, англ. SDS) (порошок)*	0,1 %	
4) дейонізована вода	-	
кінцевий об'єм	500 мл	

Примітка: Значення рН даного буферу має бути 8,25, не потребує доведення;

* – з ДСН працюють лише в масці!

Таблиця 1.2

Склад анодного буферу для проведення електрофорезу

[Schägger et al., 1987]

Компонент	Концентрація	Кількість
1) Трис-основа	0,2 М	
2) дейонізована вода	-	
кінцевий об'єм	700мл	

Примітка: необхідно довести рН даного буферу до 8,9, користуючись концентрованою соляною кислотою (HCl) та рН-метром. **Увага! З концентрованою соляною кислотою працюють лише в гумових рукавицях та під витяжною шафою!**

Місце для необхідних розрахунків:

Таблиця 1.3

Склад буферу для приготування гелів [Schägger et al., 1987]

Компонент	Концентрація	Кількість
1) Трис-основа	3,0 М	
2) ДСН	0,3%	
3) дейонізована вода	-	
кінцевий об'єм	100 мл	

Примітка: рН гелевого буферу необхідно довести до значення 8,45 за допомогою концентрованої НСІ, користуючись рН-метром.

Таблиця 1.4

Склад суміші акриламід-бісакриламід 49,5 % Т, 3 % С [Schägger et al., 1987]

Компонент	Концентрація	Кількість
1) акриламід (2х кристалічний, порошок)*	48%	
2) бісакриламід (2х кристалічний, порошок)	1,5%	
3) дейонізована вода	-	
кінцевий об'єм	20 мл	

***Увага!** Акриламід є нейротоксином. Працювати лише в гумових рукавицях!

Таблиця 1.5

Склад 2X класичного буферу Лемлі для підготовки проб [https://www.usbio.net/protocols/laemmli-sample-buffer-2]

Компонент	Концентрація	Кількість
1) Трис-НСІ*, рН6,8	0,125 М	
2) гліцерол (в'язка рідина)	20 %	
3) ДСН	4 %	
4) бромфеноловий синій (порошок)	0,004 %	
5) дейонізована вода	-	
кінцевий об'єм		40 мл
2-меркаптоетанол (рідина)**	10 %	

Примітка: * – у випадку відсутності Трис-НСІ можна скористуватися трисом-оснотою («Трис») приготувавши його 0,125 М розчин, а потім довести його рН до значення 6,8 концентрованою соляною кислотою;

** – 2-меркаптоетанол додається до складу буфера лише в випадку отримання відновлених проб білків та безпосередньо перед пробопідготовкою. **Легка сполука з сильним, неприємним запахом. Працювати лише під витяжною шафою!**

Завдання 2. Приготування катодного та анодного буферів, а також буферу для гелів

Хід роботи:

Зверніть увагу! Розчини для молекулярно-біологічних досліджень готуються лише на дейонізованій воді та з використанням хімічно-чистого посуду. Робота в гумових рукавицях є обов'язковою!

1. Підібрати колби під кожен розчин та підписати їх (звернути увагу на об'єми!). На етикетці зазначити назву розчину, його хімічний склад, рН, дату приготування.
2. Користуючись електронними вагами зробити необхідні наважки відповідно до зроблених розрахунків з дотриманням правил техніки безпеки (табл. 1.1–1.3).

З курсу «Методи біотехнологічних досліджень. Модуль 1» згадати правила користування електронними вагами, дейонізатором, магнітною мішалкою та рН-метром, а також принципи гравіметрії, потенціометрії, дейонізації води.

3. Набрати дейонізовану воду та виміряти її необхідні об'єми за допомогою мірних циліндрів. Звернути увагу, що об'єм необхідно **ДОВЕСТИ** до зазначеного кінцевого для отримання правильної концентрації.
4. Розчинити компоненти у воді, заливаючи її порціями та змиваючи зі стінок посуду залишки порошоків. Буфер для гелів через високий вміст Трису погано розчиняється при кімнатній температурі. Для пришвидшення процесу розчинення можна помістити даний розчин у термостат на 37 °С або на гарячу водяну баню.
5. Користуючись рН-метром виміряти значення рН анодного буферу: _____ та буферу для приготування гелів: _____. Чим, на вашу думку зумовлене їх лужне значення? _____.
6. Довести рН анодного та гелевого буферів до необхідних значень користуючись рН-метром, магнітною мішалкою, концентрованою соляною кислотою та пастерівською піпеткою.

УВАГА! З концентрованою HCl працюють лише під витяжною шафою, в рукавицях та під наглядом викладача. Значення рН необхідно довести дуже точно до вказаних у методиці. Використання індикаторного паперу є недопустимим.

7. Колби з буферами закрити та помістити в холодильник при +4 °С.

Завдання 3. Приготування буферу для обробки проб, суміші акриламід-бісакриламід, розчинів для роботи з гелями після електрофорезу

Хід роботи:

1. Приготувати буфер для обробки проб та суміш акриламід-бісакриламід згідно з правилами та з дотриманням техніки безпеки відповідно до рецептури (табл. 1.4–1.5).
2. Компоненти буферу для обробки проб додаються в послідовності, яка зазначена в таблиці 1.4. Правильний об'єм гліцеролу відбирається дозатором на 1 мл з обрізаним кінчиком, що зумовлено його високою в'язкістю.
3. Для приготування розчину можна використовувати Трис-основу замість Трис-НСІ, однак в цьому випадку після розчинення у воді довести рН суміші до значення 6,8 концентрованою соляною кислотою.
4. Колби з розчинами закрити, підписати та помістити в холодильник з +4 С.
5. Приготувати розчин для фіксації відповідно до рецептури, наведеної в таблиці 1.6. Спочатку під витяжною шафою виміряти указаний об'єм метанолу та змішати його з водою. Потім в отриману суміш додати оцтову кислоту.

Таблиця 1.6

Склад суміші для фіксації гелю після електрофорезу білків

[<https://www.interchim.fr/ft/1/115252.pdf>]

Компонент	Кількість, мл
1) дейонізована вода	40
2) метанол*	50
3) оцтова кислота	10

Примітка: * – готування суміші, та подальша фіксація гелю за допомогою неї, проводиться лише під витяжною шафою! Метанол є токсичною сполукою.

6. Колбу з сумішшю герметично закрити та підписати. Зберігати розчин потрібно під витяжною шафою.

Для забарвлення гелів рекомендується використовувати комерційний розчин PageBlue Protein Staining Solution фірми Thermofisher Scientific (США). До його складу входить кумасі G250, який є чутливішим у порівнянні з R250. Окрім того, розчин є екологічнішим та безпечнішим, оскільки він без оцтової кислоти та метанолу, може використовуватися декілька разів та швидко відмивається від матриксу гелю шляхом промивки в дейонізованій воді

[<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/24620>].

У випадку відсутності даного розчину необхідно приготувати класичні розчини для забарвлення білків та знебарвлення фону гелю (таблиці 1.7, 1.8).

- Для приготування розчину для забарвлення білків після електрофорезу відповідно до [<https://www.interchim.fr/ft/1/115252.pdf>] спочатку необхідно зробити наважку барвника кумасі бриліантового блакитного R250 та розчинити його в зазначеному об'ємі метанолу (у воді він розчиняється погано).

Таблиця 1.7

Склад суміші для забарвлення після електрофорезу білків
[<https://www.interchim.fr/ft/1/115252.pdf>]

Компонент	Кількість
метанол	90 мл
Кумасі бриліантовий блакитний R250 (Coomassie Brilliant Blue R250)	0,6 г
льодяна оцтова кислота	20 мл
дейонізована вода	90 мл

- Окремо змішати льодяну оцтову кислоту з водою (кислоту долити до води).
- Змішати два отриманих розчини та дану суміш профільтрувати через фільтрувальний папір під витяжною шафою.
- Колбу з барвником герметично закрити та підписати. Зберігати під витяжкою за кімнатної температури. Строк придатності даного розчину – 2 роки [<https://www.interchim.fr/ft/1/115252.pdf>].
- Для знебарвлення фону гелю приготувати розчин подібного складу, який не містить барвника (таблиця 1.8).

Таблиця 1.8

Склад розчину для знебарвлення фону гелю
[<https://www.interchim.fr/ft/1/115252.pdf>]

Компонент	Кількість, мл
льодяна оцтова кислота	75
дейонізована вода	875
метанол	50
кінцевий об'єм	1000

12. Колбу зі знебарвлюючим розчином герметично закрити та підписати. Зберігати під витяжкою при кімнатній температурі.

Висновки:

Завдання для самостійної роботи

Зробити висновки по проведеній лабораторній роботі.

Одним із методів дослідження протеому є двовимірний електрофорез білків (2D), який є потужнішим за одновимірний (1D). Опрацювати наведену нижче літературу та законспектувати принцип двовимірного електрофорезу (2D). Здійснити також піктографічний запис прочитаного (намалювати рисунок без слів).

Піктографічний запис

Принцип 2 D електрофорезу

Ознайомитися з принципом 3D електрофорезу. Законспектувати його принцип.

Принцип 3 D електрофорезу

Питання для перевірки знань

1. Що таке електрофорез, який використовується в науковій лабораторії? Який принцип даного методу?
2. Яке обладнання та розчини є необхідними для проведення електрофорезу білків?
3. Які бувають види електрофорезу білків?
4. Чим відрізняється електрофорез білків 1D та 2D?
5. Який принцип двовимірного електрофорезу?

6. Для яких дослідницьких задач біотехнології використовується електрофорез білків 1D та 2D?
7. Який принцип 3D електрофорезу білків? У чому полягає його подібність та відмінність від 1D та 2D?
8. Який спектр застосування електрофорезу білків 3D?

Тестові завдання для самоконтролю рівня знань

1. При здійсненні 1D електрофорезу білків біомолекули:
 - А мають позитивний заряд та рухаються від катода до анода;
 - Б мають негативний заряд та рухаються від анода до катода;
 - В мають позитивний заряд та рухаються від анода до катода;
 - Г. мають негативний заряд та рухаються від катода до анода.
2. Матрикс для проведення одновимірного та двовимірного електрофорезу білків складається з:
 - А. агар-агару;
 - Б. целюлози;
 - В. поліакриламідну;
 - Г. агарози.
3. Для аналізу складних білкових сумішей доцільним буде використання:
 - А. 1D електрофорезу білків;
 - Б. спектрофотометрії;
 - В. 2D електрофорезу білків;
 - Г. екстракції.
4. При використанні 1D електрофорезу суміші білки розділяються на основі різниці в:
 - А. лише заряді;
 - Б. розмірі та заряді;
 - В. відношенні m/z ;
 - Г. лише розмірі.
5. Для аналізу ступеня чистоти білка після етапів очистки, що передбачали використання методів хроматографії, доцільним буде використання:
 - А. спектрофотометрії;
 - Б. 1D електрофорезу білків;
 - В. екстракції;
 - Г. 2D електрофорезу білків.
6. При використанні 2D електрофорезу суміш білків розділяється на основі різниці в:
 - А. розмірі та заряді;
 - Б. лише розмірі;
 - В. відношенні m/z ;
 - Г. вірної відповіді немає.

7. При використанні 3D електрофорезу суміш білків може розділятися на основі різниці в:
- А. лише розмірі та молекулярній масі;
 - Б. лише розмірі;
 - В. лише молекулярній масі та pI;
 - Г. розмірі, молекулярній масі, pI.

Ситуаційна задача

Клітинний лізат кишкової палички являє собою складну суміш білків. Уявіть собі, що при написанні курсової роботи перед вами поставлена задача виявити в ньому фермент лактатдегідрогеназу та визначити його активність в різних умовах. Підібрати метод дослідження для успішного виконання першої задачі. Свій вибір обґрунтувати.

Рекомендована література

1. Сиволоб А. В. Молекулярна біологія: підручник. Київ: видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2008. С. 384 (356–357).
https://shron1.chtyvo.org.ua/Syvolob_Andrii/Molekuliarna_biolohiia.pdf?PHPS_ESSID=mj8107c184no93eo1qpchdvnj2
2. Ventzki R., Stegemann J. 3D-gel electrophoresis – a new development in protein analysis. *Mass spectrometry for microbial proteomics*. Chapter 10 / Eds.: Shah H. N., Gharbia S. E. John Wiley & Sons, 2010. С. 205–221 (205).
<https://doi.org/10.1002/9780470665497.ch10>

Інформаційні ресурси

1. <https://www.labtube.tv/video/MTAwNzQ1>
2. <https://www.bio-rad.com/en-ua/applications-technologies/protein-electrophoresis-equipment?ID=LUSOZFBEB>

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 2

Приготування гелів для електрофорезу білків

Мета заняття – формування практичних навичок приготування гелів для проведення електрофорезу білків.

Питання для підготовки до заняття

1. Матрикси для електрофорезу. Їх призначення, різновиди.
2. Хімічний склад гелів для проведення електрофорезу.
3. Поліакриламідні гелі для електрофорезу білків.
4. Роздільна здатність гелю.

Теоретичні відомості

З попередніх занять вам відомо, що при електрофорезі струм протікає через систему, заповнену буферами. У випадку класичного електрофорезу білків їх два – катодний та анодний. Однак, проби білків вносяться не безпосередньо в буфер, а в лунки гелю – матриксу із поліакриламідом, що нагадує молекулярну решітку. Даний полімер являє собою суміш мономерів акриламідом та бісакриламідом, що виступає у ролі крослінкеру [Glick et al., 2010].

Важливим показником гелів для електрофорезу є діаметр їх пор, що залежить від концентрації складових гелю, а у випадку поліакриламідних ще й від відношення акриламідом до крослінкеру [Glick et al., 2010]. У наукових джерелах концентрації компонентів гелю даються у %, які йдуть перед літерами Т та С, наприклад: 10% Т, 3% С. У даній формулі літера Т означає вміст обох компонентів – акриламідом та бісакриламідом, тоді як С – бісакриламідом у відношенні до загального [Schägger et al., 1987].

Гель для переривчастого (англ. *discontinuous*) електрофорезу білків в більшості випадків складається із двох частин, які відрізняються за вмістом полімеру та показниками рН. Верхня половина гелю, що слугує для укладання білків носить назву гель для концентрування (англ. «*stacking gel*», від *to stack* – “складати у стіг”), а нижня – гель для розділення (англ. «*separating gel*», або «*running gel*»). Іноді, значно рідше, між цими двома шарами ще додатково заливають спейсерний гель («*spacer gel*»). Гель для концентрування містить 4 % мономерів та його функція, як видно з назви, полягає у концентруванні, збиранні внесених білків у одну смугу («стіг») перед їх входженням у нижній шар гелю, де вони розділятимуться, що дозволяє отримати достовірніший результат. Окрім того, в гелі для концентрування під час свого руху білки позбавляються від скупчень ДСН, що є також важливою функцією верхнього

шару гелю, оскільки формування комплексів з останніми може призвести до відсутності чітких смуг досліджуваних білкових молекул [Schägger et al., 1987].

Гель для розділення слугує вже для сепарування білків на основі різниці в їх розмірі, які попередньо були зібрані в одну смугу в гелі для концентрування. Відсоток мономерів в даному шарі може бути різним, частіше це 10% та 16,5%, та його вибір залежить від наукової задачі дослідника. Спейсерний гель, який іноді заливають між гелем для концентрування та 16,5% гелем для розділення містить 10% мономерів, використовується для кращого розділення суміші білків, які мають молекулярну масу меншу ніж 5 кДа [Schägger et al., 1987].

Для заливки гелю спочатку необхідно зібрати систему, призначену для цього фірмою Bio-Rad (Рис. 2.1).

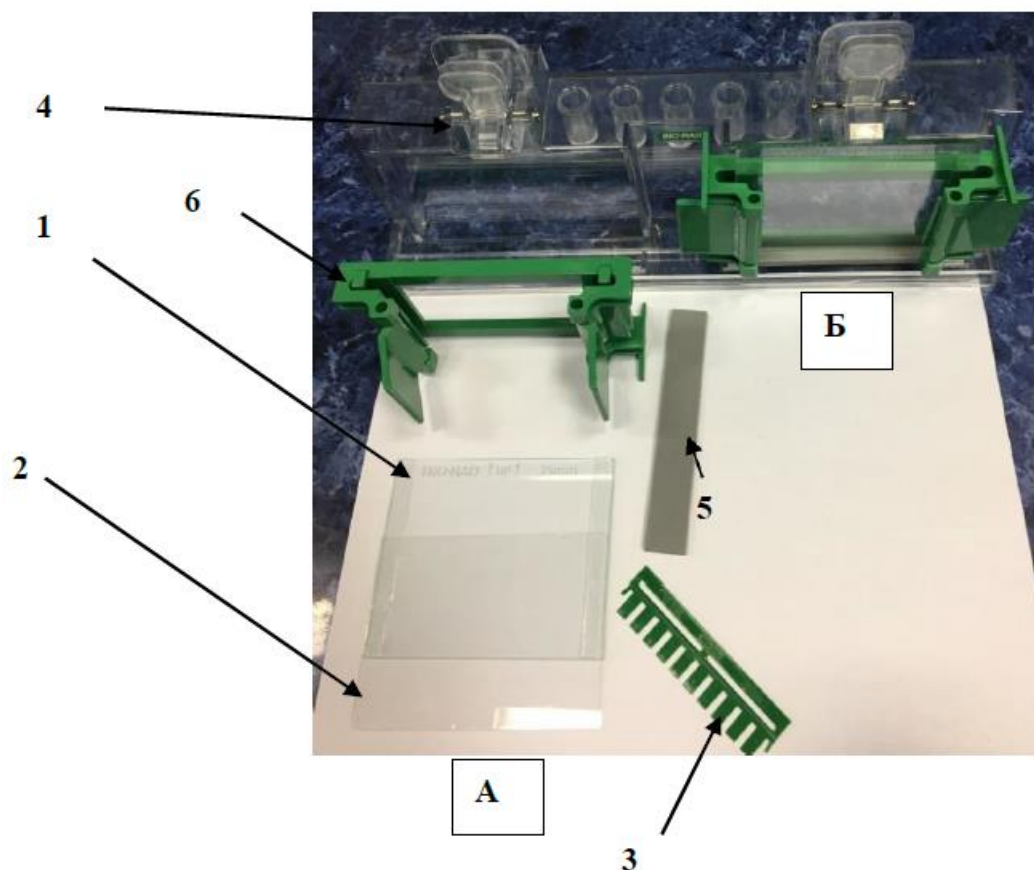


Рис 2.1. Система для заливки гелів фірми Bio-Rad (Mini-PROTEAN Tetra Handcast System) (авторське фото). Основними частинами системи є скло з розпірками та коротке скло між якими формується щілина, куди заливають суміш для утворення гелю.

Примітка: А – окремі компоненти системи: 1 – скло з розпірками (англ. spacer plate), 2 – коротке скло (англ. short plate), 3 – гребінка (англ. comb), 4 – штатив для заливки гелів (англ. casting stand), 5 – прокладка (англ. gasket), 6 – рамка (англ. frame)

[<https://www.bio-rad.com/en-ua/product/mini-protean-tetra-handcast-systems?ID=N3F2W9KG4>];

Б – система у зібраному вигляді готова до заливки гелю

Дана система складається із двох стекол – скла з розпірками, які являють собою потовщення по краям та короткого, тоненького скла. Ці два скла розміщуються один біля одного на поверхні столу і через наявність розпірок на одному із них між ними формується щілина, куди і заливають суміш для утворення гелю. Скельця вставляються у рамку, та фіксуються разом із нею на штативі, на низ якого перед цим розміщується прокладка для попередження витікання не полімеризованої суміші. Гелі заливаються шар за шаром та в кінці цього процесу в щілині розміщується гребінка, зубчики якої після полімеризації гелю сформують лунки, необхідні для внесення проб білків [<https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lsr/literature/10007296D.pdf>].

Матеріал та обладнання

1. Система для приготування гелів Mini-PROTEAN Tetra Handcast System (Bio-Rad, США).
2. Дозатори та наконечники для них.
3. Вортекс.
4. Розчин акриламід-бісакриламід 49,5 % Т, 3 % С.
5. Гелевий буфер.
6. Гліцерол.
7. Дейонізована вода.
8. Амонію персульфат.
9. ТЕМЕД.
10. Ізопропанол.
11. Фільтрувальний папір та вата.
12. Маркер.

Завдання 1. Приготування нижнього шару гелю – гелю для розділення

Дана методика базується на [Schägger et al., 1987].

Хід роботи:

1. Зібрати систему для заливки гелів Mini-PROTEAN Tetra Handcast System (Bio-Rad, США), як описано в теоретичних відомостях цього лабораторного заняття*.
- *- Примітка:** гелі готуються за день до самого електрофорезу.
2. Залити в систему між двома стеклами дейонізовану воду до верху короткого скла з метою перевірки її герметичності. У випадку відсутності протікання воду злити, а систему ретельно висушити фільтрувальним папером.
 3. За допомогою лінійки відміряти 2 см зверху від верхнього краю короткого скла та зробити відповідну позначку маркером.

4. Приготувати суміш для заливки 16,5 % гелю для розділення відповідно до таблиці 1.9. Для цього в пластикову фальконову пробірку об'ємом 50 мл додати всі компоненти у послідовності та об'ємах, зазначених у таблиці.

Зверніть увагу:

- а) акриламід є нейротоксином. Працювати лише в гумових рукавицях!;
 б) реактиви для полімеризації (амоніум персульфат та TEMED) додаються у самому кінці безпосередньо перед заливанням суміші в систему!;
 в) TEMED додається у мікрокількостях, тому важливо його об'єм внести безпосередньо у приготовану суміш та промити в ній наконечник, яким він відбирався. Це попередить можливість його залишення на стінках пробірки, що може призвести до відсутності полімеризації приготованого гелю.

Таблиця 2.1

Склад гелю для розділення (Separating gel) 16,5 %Т, 3 %С

[Schägger et al., 1987]

Компонент	Кількість на 2 гелі, мл	Кількість на 4 гелі, мл
1) розчин акриламід-бісакриламід 49,5 % Т, 3 %С	5	10
2) гелевий буфер	5	10
3) гліцерил	2	4
4) дейонізована вода	3	6
Кінцевий об'єм	15	30
каталізатори		
5) 10 % амонію персульфату	75 мкл	150 мкл
6) TEMED	7,5 мкл	15 мкл

5. Отриману суміш ретельно перемішати на вортексі та внести у щілину, сформовану між двома стеклами зібраної системи, уникаючи інтенсивного утворення бульбашок. Вносити суміш необхідно до позначки, зробленої маркером на короткому склі.
6. Після цього зразу ж залити до верху шар ізопропанолу для вирівнювання верхнього краю розділяючого гелю.
7. Зачекати 15 хвилин до повної полімеризації гелю.

Завдання 2. Приготування верхнього шару гелю – гелю для концентрування

Дана методика базується на [Schägger et al., 1987].

Хід роботи:

1. Злити ізопропанол та висушити систему за допомогою смужок фільтрувального паперу.
2. Приготувати верхній шар гелю – гелю для концентрування білків 4 % Т, 3 % С. Для цього у фальконову пробірку додати компоненти, зазначені у таблиці 2.2 у необхідних об'ємах та послідовності.

Таблиця 2.2

Склад гелю для концентрування (Stacking gel) 4 % Т, 3 % С

[Schägger et al., 1987]

Компонент	Кількість на 2 гелі,мл	Кількість на 4 гелі, мл
1) розчин акриламід-бісакриламід 49,5 % Т, 3 % С	0,5	1
2) гелевий буфер	1,55	3,1
3) дейонізована вода	4,2	8,4
Кінцевий об'єм	6,25	12,5
каталізатори		
4) 10 % амонію персульфату	50 мкл	100 мкл
5) TEMED	5 мкл	10 мкл

3. Отриману суміш перемішати на вортексі та внести в щілину до верху короткого скла уникаючи інтенсивного формування бульбашок.
4. Вставити в систему гребінку, необхідну для формування лунок в гелі. Залишки витікаючої суміші видалити фільтрувальним папером.
5. Зачекати 15 хвилин до повної полімеризації гелевого шару. Після цього, вийняти обережно рамку зі стеклами із штативу. Стекла з шаром полімеризованого гелю між ними вийняти із рамки та обернути товстим шаром вати просоченим дейонізованою водою (для підтримання необхідного рівня вологості). Закрити завернуті гелі герметично з метою запобігання висихання. Підписати та помістити у холодильник з температурою + 4 С.

Завдання для самостійної роботи

Ознайомитися з явищем дзета-потенціалу використовуючи рекомендовану літературу. Здійснити анотування прочитаного (коротко переказати основний зміст).

Питання для перевірки знань

1. Що таке матрикс для проведення електрофорезу? Який хімічний склад гелю для розділення білків?
2. Від чого залежить роздільна здатність гелю?
3. З яких частин складається гель для проведення переривчастого електрофорезу білків?
4. З яких компонентів складається система для приготування гелів? Як її правильно зібрати?
5. Що таке дзета-потенціал?
6. Які фізичні основи виникнення дзета-потенціалу?
7. Який спектр застосування дзета-потенціалу при проведенні біотехнологічних та біологічних досліджень?

Тестові завдання для самоконтролю рівня знань

1. Матрикс для проведення електрофорезу білків складається з:
 - А. акриламід;
 - Б. агарози;
 - В. акриламід та бісакриламід;
 - Г. бісакриламід.
2. При полімеризації поліакриламідних гелів у ролі крослінкеру виступає:
 - А. лише бісакриламід;
 - Б. лише акриламід;
 - В. акриламід та бісакриламід;
 - Г. правильна відповідь відсутня.
3. Верхня частина гелю (stacking gel) слугує для:
 - А. лише для розділення білків;
 - Б. лише для концентрування білків;
 - В. для розділення та концентрування білків;
 - Г. для концентрування білків та очищення від надлишків ДСН.
4. Нижня частина гелю (running gel) необхідна для:
 - А. для концентрування білків та позбавлення їх від надлишків ДСН;
 - Б. лише для розділення білків;
 - В. лише для концентрування білків;
 - Г. для розділення білків та очищення їх від надлишків ДСН.
5. Два шари гелю – для концентрування та розділення відрізняються між собою:
 - А. за вмістом акриламід;
 - Б. за діаметром пор;
 - В. за рН;
 - Г. всі відповіді вірні.
6. Дзета-потенціал – це:
 - А. міра заряду біологічної молекули;
 - Б. міра електростатичної взаємодії між зарядженими частинками;

- В. міра молекулярної маси заряджених частинок;
 - Г. міра електростатичної взаємодії між незарядженими частинками.
7. Дзета-потенціал може бути використаним для:
- А визначення молекулярної маси біологічних молекул;
 - Б. вивчення істинних розчинів;
 - В. вивчення структури білків;
 - Г. вивчення поверхонь біоматеріалів.

Рекомендована література

1. Ferraris S., Cazzola M., Peretti V., Stella B., and Spriano S. Zeta potential measurements on solid surfaces for *in vitro* biomaterials testing: surface charge, reactivity upon contact with fluids and protein absorption. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2018. V. 6, P. 1 – 7. Doi: 10.3389/fbioe.2018.00060 (P. 1–2).

Інформаційні ресурси

1. <https://www.research.colostate.edu/wp-content/uploads/2018/11/ZetaPotential-Introduction-in-30min-Malvern.pdf>
2. <https://novations.ua/dzeta-potenczial-poverhnevyj-zaryad-bilkiiv/>

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 3

Проведення білкового електрофорезу бактеріоцину *Enterococcus italicus* ОНУ547

Мета заняття – формування практичних навичок проведення електрофорезу білків, описання та аналізу його результатів.

Питання для підготовки до заняття

1. Структурна організація білків. Явище денатурації білків.
2. Принцип електрофорезу білків.
3. Передові та замикаючі іони. Їх функції.
4. Буфери для електрофорезу білків.
5. Маркери молекулярної маси та їх функція.

Теоретичні відомості

Перед внесення білків в лунки гелю для концентрування необхідно здійснити правильну пробопідготовку. Для цього використовується вже знайомий вам буфер для обробки проб за Лемлі або подібні до нього. Кожен компонент буферу Лемлі виконує певну функцію. Так, Трис-НСІ створює буферну систему для стабілізації рН на рівні 6,8, ДСН сприяє денатурації білків та він надає їм поверхневого негативного заряду (рис. 3.1), тоді як гліцерол забезпечує в'язкість пробам, що необхідно для внесення їх в лунки гелю. Інший компонент – бромфеноловий синій – є барвником, який полегшує процес внесення проби та необхідний для спостереження за перебігом електрофорезу і ні в якому разі не для забарвлення самих білків [<https://www.creative-proteomics.com/services/1d-sds-page-ief.htm>; <https://www.usbio.net/protocols/laemmli-sample-buffer-2>].

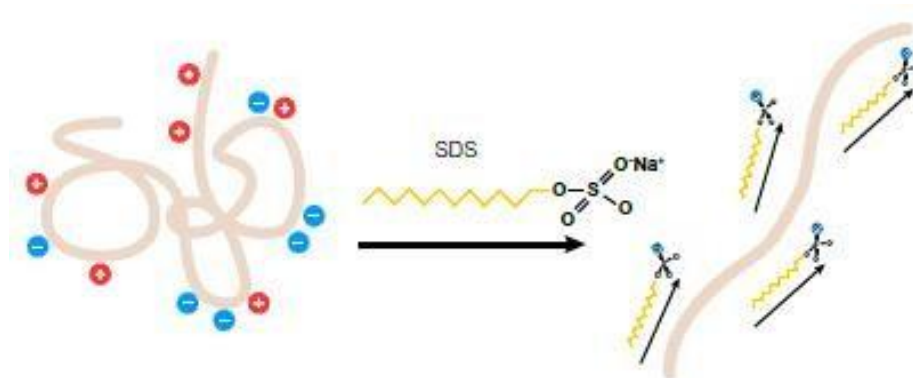


Рис. 3.1. Схематичне зображення денатурації білків під впливом ДСН (англ. SDS).

ДСН сприяє руйнуванню четвертинної, третинної та вторинної структури білків переводячи їх у випрямлену форму (англ. «rod-like conformation») та надає їм рівномірний негативний поверхневий заряд [<https://www.bio-rad.com/en-ua/applications-technologies/protein-electrophoresis-methods?ID=LUSOW4GRI>]

Меркаптоетанол не завжди додається до суміші і потрібен він лише тоді, коли досліджувані білки містять дисульфідні зв'язки. За допомогою даної сполуки здійснюється відновлення дисульфідних зв'язків, що призводить до їх зникнення, результатом чого є краща денатурація білків у результаті руйнування четвертинної та третинної структур даних біомолекул. Меркаптоетанол може використовуватись також для встановлення наявності зв'язків даного типу в структурі невивчених білків. Аналогом ДСН, який частіше входить до складу комерційних буферів для обробки проб для електрофорезу білків, є дітіотреїтол [<https://www.biocompare.com/26730-2-Mercaptoethanol-Reagents/>].

Перед здійсненням пробопідготовки, яка передуює внесенню проб білків в лунки гелю важливо визначити їх концентрацію (можна використати спектрофотометр типу Nanodrop). Необхідно пам'ятати, що в одну лунку аналітичного гелю рекомендується вносити біля 2 мкг білків для уникнення явища перевантаження лунки. При роботі з білками, молекулярна маса яких складає 1–3 кДа, потрібно збільшувати їх концентрацію до 2–5 мкг, що зумовлено ризиком їх часткової втрати при обробці гелів після електрофорезу (тривале забарвлення, промивка). У лунки препаративного гелю можна вносити 1 мг білка [Schägger et al., 1987].

Після внесення підготовлених, денатурованих білків у лунки гелів вмикається струм. Що стосується даних умов електрофорезу, то Schägger and von Jagow (1987) рекомендують починати процес при 30 Вольт та лише після входження білків до нижнього шару гелю, на що потрібно біля 1 години, можна збільшувати значення сили струму або напруги. Так, для гелів, що підходять до електрофоретичної системи Bio-Rad з концентрацією 16,5 % Т, 3 % С рекомендується 90 В або 30 мА на початку розділення та 8 мА вкінці, а для гелів з концентрацією 10 % Т, 3 % С – 150 В, 70 та 30 мА, відповідно. Зверніть увагу, що експеримент по проведенню електрофорезу білків може зайняти багато часу. Так, у першому випадку процес займає цілих 16 годин, а в другому – біля чотирьох [Schägger et al., 1987]. У публікації вчених Н-Kittikun et al. (2015), які працювали з бактеріоцинами молочнокислих бактерій, було описано ефективне використання 16,5 % поліакриламідних гелів з початковою напругою 10 мА. Після входження бактеріоцинів у гель для розділення напруга була підвищена до 20 мА [Н-Kittikun et al., 2015].

Після вмикання струму починається рух негативно заряджених білків до аноду. Важливо розуміти механізм концентрування та подальшого розділення білків в гелі. З попередніх занять згадайте, що верхня частина гелю носить назву гель для концентрування (англ. «*stacking gel*»), що має рН 6,8 та містить нижчу концентрацію мономеру – 4 %. Нижня половина гелю називається гелем для розділення (англ. «*separating gel*»), який містить більш лужне значення рН (8,8) та вищу концентрацію акриламіду та бісакриламіду (рис. 3.2) [Schägger et al., 1987; <https://www.bio-rad.com/en-ua/applications-technologies/protein-electrophoresis-methods?ID=LUSOW4GRI>]. У приготованому вами гелі 16,5 % акриламіду та бісакриламіду.

У верхній частині гелю вміст глибокої лунки (рис. 3.2 А) поступово збирається в одну тоненьку смугу (рис. 3.2 D) перед входом до нижньої частини. Це сприяє кращій роздільній здатності гелю, оскільки вся суміш білків починає розділятися одночасно. Дане концентрування стає можливим завдяки наявності в системі замикаючих іонів (*trailing ions*), в якості яких найчастіше

виступає гліцин та які йдуть позаду внесених білків, а також передових іонів (*leading ions*) представлених іонами хлору, які рухаються попереду білків. Так відбувається через різницю в електрофоретичній мобільності даних компонентів системи: при рН гелю для концентрування 6,8 найшвидше рухаються іони хлору, за ними білки і в самому кінці гліцин. Таким чином формується щось подібне до сандвіча, в якому білки збираються разом через те, що на них зверху та знизу тиснуть іони [https://www.bio-rad.com/en-ua/applications-technologies/protein-electrophoresis-methods?ID=LUSOW4GRI].



Рис. 3.2. Будова гелю та схематичне пояснення процесу, що відбувається під час електрофорезу білків: I – гелю для концентрування, рН 6,8, II – гелю для розділення, рН 8,8, Gly⁻ – аніони гліцину, Cl⁻ – аніони хлору [https://www.bio-rad.com/en-ua/applications-technologies/protein-electrophoresis-methods?ID=LUSOW4GRI].

Примітка: А – внесення проб білків з буфером до лунок гелю для концентрування;
 В – початок руху заряджених білків в електричному полі у напрямку до позитивно-зарядженого електроду – аноду. Гліцин рухається вкінці, хлор на початку;
 С – сандвіч іонів гліцину, хлору та білків;
 D – всі білки зібрані разом у одну смугу перед входом у гелю для розділення;
 E, F – менші білки рухаються швидше у розділяючому гелі, а більші – повільніше.
 Це призводить до їх сепарування на основі різниці в розмірі [https://www.bio-rad.com/en-ua/applications-technologies/protein-electrophoresis-methods?ID=LUSOW4GRI]

Після входження даного сандвічу до гелю для розділення, рН якого є вищим (8,8) відбувається наступне: більша кількість молекул гліцину при підвищенні значення рН отримують негативний заряд*. Це дозволяє збільшити швидкість їх руху в напрямку до аноду та випередити таким чином всі білки досліджуваної суміші, не заважаючи їм розділятися на основі різниці в розмірі (рис. 3.2 D – F, рис. 3.3)

* - Згадати, яким чином заряд амінокислот та відповідно білка, з яких він складається, залежить від значень рН?

З попередніх занять згадайте, що в якості замикаючих іонів можуть бути використані не лише молекули гліцину, але й трицину. При лужному рН, що має значення 6,8–8,8 більше молекул трицину отримують негативний заряд та рухаються до аноду швидше, ніж гліцин, що сприяє концентруванню білків низької молекулярної маси та успішному їх розділенню навіть при невисокій кількості акриламиду в гелі. Цим і пояснюють його ефективність при розділенні білків невеликої молекулярної маси. За допомогою системи Tricine-SDS-PAGE можна розділити білки навіть невеликої молекулярної маси (1 – 100 кДа) при використанні гелю для розділення з вмістом акриламиду 10 % [Schägger et al., 1987].

В кінці електрофорезу струм вимикають, гелі виймають із камери та звільняють від стекла. Після цього гелі фіксують, білки забарвлюють, та знебарвлюють сам фон гелю, гелі фотографують та аналізують [https://www.creative-proteomics.com/services/1d-sds-page-ief.htm].

Гелі після експерименту забарвлюють Кумасі блакитним або сріблом. Слід пам'ятати, що за допомогою забарвлення можна не лише встановлювати наявність чи відсутність певного білка, але й встановлювати його кількість аналізуючи інтенсивність забарвлення його смуги. Забарвлення Кумасі є простішим та безпечнішим для здоров'я, однак методика забарвлення сріблом є чутливішою [Schägger et al., 2006].

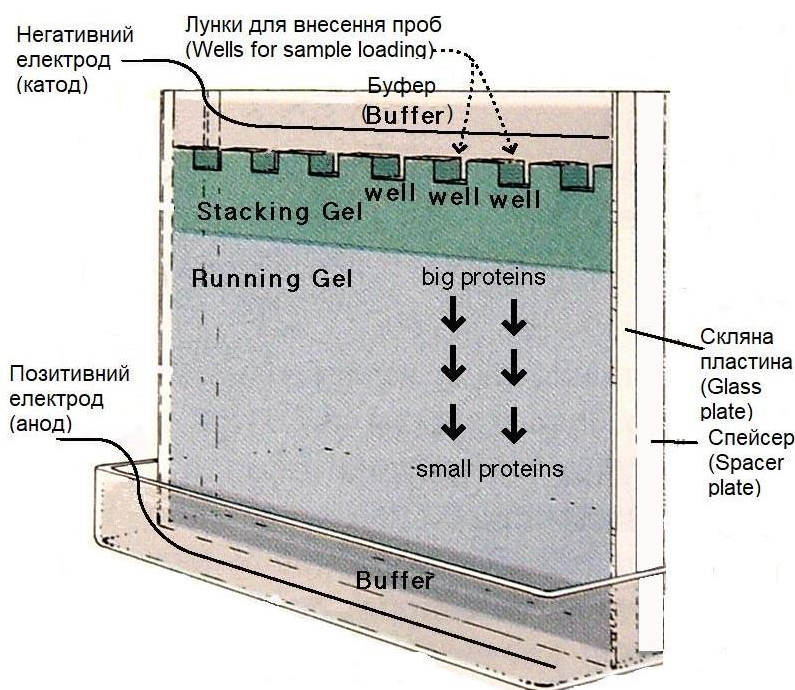


Рис. 3.3. Схематичне зображення процесу розділення білків різного розміру у системі для вертикального електрофорезу. Білки невеликого розміру рухаються швидше, більші – повільніше [https://www.creative-proteomics.com/services/1d-sds-page-ief.htm]

Так, для виявлення смуги певного білку за допомогою Кумасі блакитного у гелі має бути не менше ніж 0,2 мкг даних біомолекул. Ще одним недоліком Кумасі є те, що даний барвник погано взаємодіє з високогідрофобними білками. Методики забарвлення сріблом є чутливішими за забарвлення Кумасі у 100 разів, що означає те, що за допомогою неї можна виявити білок у набагато меншій концентрації [Schägger et al., 2006].

Електрофореграму аналізують шляхом визначення молекулярної маси білків в дальтонах, що дозволяє їх ідентифікувати. Це здійснюється за допомогою зіставлення розділених білків з білками, що спостерігаються при електрофорезі маркерів молекулярної маси, розміри яких відомі подібно до того, як визначають розміри нуклеїнових кислот в парах нуклеотидів (п. н.). Для точного визначення молекулярної маси можуть використовуватися спеціальні біоінформатичні підходи, наприклад, програма TotalLab [Nichol, 2008].

Поширеним маркером молекулярної маси, який використовується при проведенні електрофорезу білків є PageRuler prestained protein ladder фірми Thermofisher scientific (США), до складу якого входять білки з діапазоном молекулярних мас від 10 до 180 кДа (рис. 3.4). Зручність даного маркеру полягає у тому, що всі білки, які входять до його складу є забарвленими. Це дозволяє спостерігати за електрофорезом та припинити дослід коли всі білки маркеру розділяться

[[https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/26616#:~:text=Thermo%20Scientific%20PageRuler%20Prestained%20Protein,%2DPAGE\)%20and%20western%20blotting](https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/26616#:~:text=Thermo%20Scientific%20PageRuler%20Prestained%20Protein,%2DPAGE)%20and%20western%20blotting)]. Для того, щоб прочитати результати електрофореграми обов'язково треба мати «паспорт» використаного у роботі маркеру з переліком компонентів відомої молекулярної маси, на які він розділяється при подібних умовах електрофорезу (рис. 3.4).

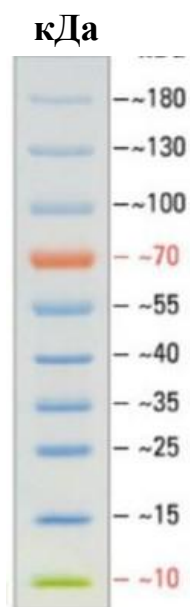


Рис. 3.4. Компоненти маркеру молекулярної маси для електрофорезу білків PageRuler prestained protein ladder розділені у гелях з відсотком акриламід-бісакриламід від 4 до 20%.

Десять різних білків входять до складу даного маркеру [https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2FMAN0011772_PgRuler_PrestainedProteinLadderUG.pdf]

Розглянемо приклад електрофореграми гліцин-ДСН-ПААГ, у якому аналізувалися фракції зеленого флуоресцентного білка (англ. *green fluorescence protein* – GFP), отримані методом аніонообмінної хроматографії. Зверніть увагу на правильне оформлення та підпис електрофореграми (рис. 3.5). У першій лунці розділено маркер молекулярної маси PageRuler prestained protein ladder. Для його підпису необхідно співставити кожну із одержаних смуг з відповідною на «паспорті» маркеру (вони йдуть у однаковій послідовності: зверху та, що відповідає найбільшому білку – 180 кДа, а знизу – найменшому – 10 кДа). На електрофореграмі помітні всі 10 білків маркеру, що свідчить про достатній час проведення досліду.

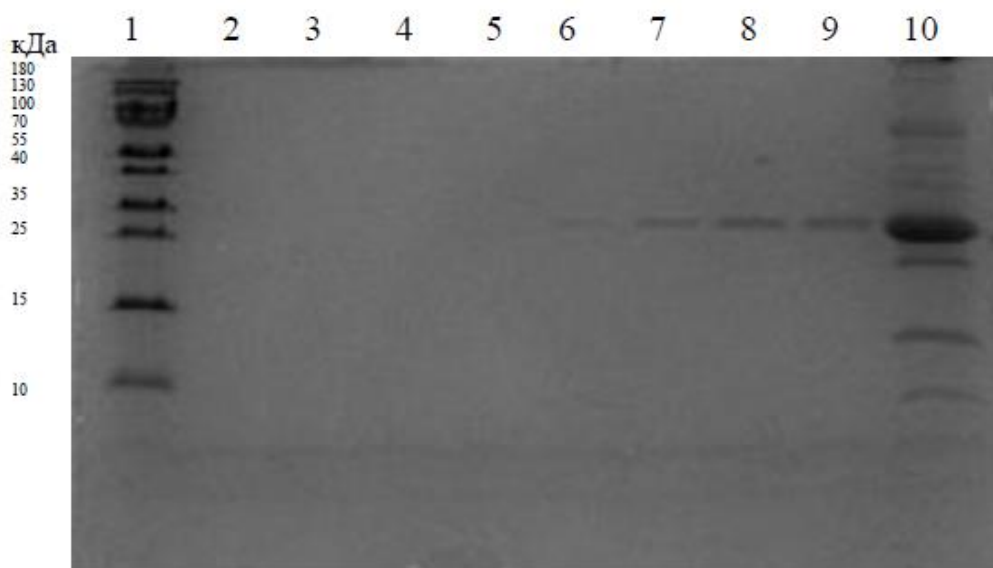


Рис. 3.5. Електрофореграма гліцин-ДСН-ПААГ електрофорезу зеленого флуоресцентного білку GFP [авторське фото]

Примітка: 1 – маркер молекулярної маси PageRuler prestained protein ladder (Thermofisher scientific, США), 2 – 5 – фракції етапів внесення проби та промивки після іонообмінної хроматографії, 6 – 9 – фракції елюції, 10 – неочищений GFP

У гелі, що відповідає 2–5 лункам, смуг не видно, що говорить про відсутність білків у фракціях, відібраних на етапах внесення проби та промивки під час іонообмінної хроматографії*.

* - Згадати принцип іонообмінної хроматографії. Чи свідчить відсутність білків на даній ділянці електрофореграми про її успішність?

На ділянці гелю, що відповідає лункам 6–9, спостерігаються поодинокі смуги. При співставленні їх з маркером видно, що вони знаходяться трішки вище ніж його компонент, розміром 25 кДа, отже їх молекулярна маса – приблизно 27 кДа. З літературних джерел відомо, що приблизна молекулярна вага досліджуваного білку (GFP) складає 27 кДа

[[https://collab.its.virginia.edu/access/content/group/f85bed6c-45d2-4b18-b868-6a2353586804/2/Ch04_Campbell_B_Green_Fluorescent_Protein_--Aequorea_victoria-_/index.html#:~:text=EGFP%20has%20a%20molecular%20weight,pI%20of%205.58%20\(2\)](https://collab.its.virginia.edu/access/content/group/f85bed6c-45d2-4b18-b868-6a2353586804/2/Ch04_Campbell_B_Green_Fluorescent_Protein_--Aequorea_victoria-_/index.html#:~:text=EGFP%20has%20a%20molecular%20weight,pI%20of%205.58%20(2))].

Таким чином, у гелі, що відповідає лункам 6–9, саме зелений флуоресцентний білок. Відсутність смуг іншого розміру свідчить про відсутність інших білків та, відповідно, про чистоту зеленого флуоресцентного білка. Особливо це видно при порівнянні з сумішшю білків проби 10, де крім GFP спостерігається велика кількість інших білків. Дана електрофореграма свідчить про ефективність використаного методу очистки.

Електрофорез білків SDS-PAGE з успіхом використовується і для розділення капсидних білків бактеріофагів, дозволяючи оцінити та ретельно проаналізувати білковий склад капсиду бактеріофагів.

На рис. 3.6 представлені електрофореграма і денситограма білкового профілю віріона фага ZF40. У його складі виявлено 13 структурних поліпептидів – p₁-p₁₃ (рис. 3.6, а-1) з молекулярними масами від 16,6 до 90,7 кДа [Панщина, 2008].

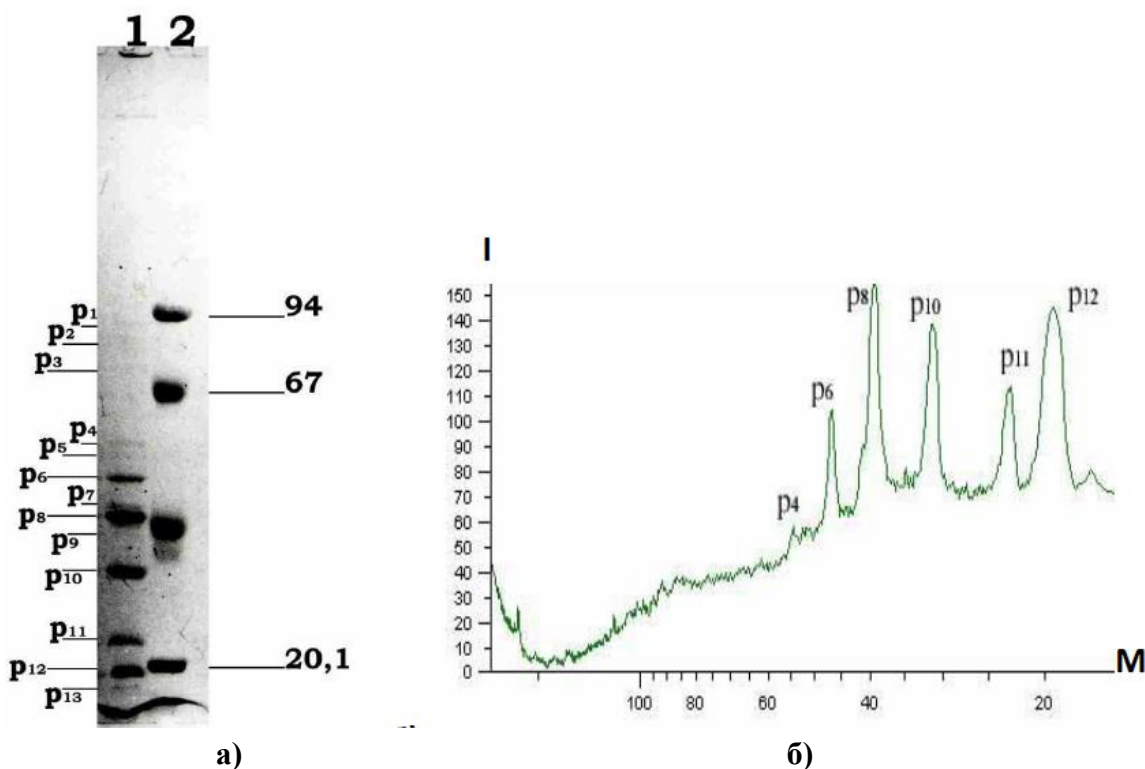


Рис. 3.6. SDS-ПААГ-електрофорез структурних поліпептидів віріона ервініофага ZF40:

а – електрофореграма: 1 – поліпептиди віріона ZF40 (p₁-p₁₃); 2 – маркерні білки (фосфорилаза, альбумін, трипсин-інгібітор; молекулярні маси наведено в кДа);

б – денситограма (відмічені деякі структурні поліпептиди).

По осі абсцис – молекулярна маса (М) в кДа, по осі ординат – інтенсивність (I) електрофоретичних смуг у пікселях [Панщина, 2008]

Їх можна розділити на 3 групи: мінорні (p₁, p₂, p₃, p₄, p₅, p₇ і p₉), проміжні (p₆, p₁₁ і p₁₃) і мажорні білки (p₈, p₁₀ і p₁₂). Мажорні структурні білки представлені трьома поліпептидами з молекулярними масами 39,2, 31,2 і 19,3 кДа. Ми спробували співвіднести знайдені білки з певними структурними частинами віріона ZF40.

Відомо, що найбільш консервативною частиною віріона бактеріофагів є стержень хвостового відростка. Як правило, він утворюється за рахунок однакових за своєю молекулярною масою поліпептидів, яка складає близько 20 кДа для фагів родини *Muoviridae*. Для фага ZF40 на білок стержня претендує p₁₂ з молекулярною масою 19,3 кДа. Структурним поліпептидом головки, скоріш за все, є p₈, який має молекулярну масу 39,2 кДа, його відносний вміст (26,6 %) приблизно дорівнює вмісту поліпептиду стержня (31,7 %). Третій поліпептид p₁₀, вірогідно, представляє собою структурний компонент футляра хвостового відростка, його кількісний вміст (13,8 %) є найменшим серед цих мажорних структурних білків віріона.

Для того, щоб підтвердити зроблені припущення було порівняно одержані результати з даними літератури, які стосуються структурних білків добре вивчених фагів P2, T4, P1 і каротоворіцина Eг (табл. 3.1). Найбільша подібність спостерігається між структурними білками стержня, різниця їх молекулярних мас складає лише близько 4 кДа, тоді як за розміром вони абсолютно однакові для фагів P2 і ZF40.

Таблиця 3.1

Молекулярні маси (кДа) структурних білків бактеріофагів родини *Muoviridae* ZF40, P2, T4, P1 і каротоворіцина Eг

Основні (мажорні) білки	Бактеріофаг				
	ZF40	P2	T4	P1	Eг
ГОЛОВКИ:					
1	39,2	36,1	43,0	44,0	-
2	-	-	40,4	-	-
3	-	-	9,1	-	-
ХВОСТОВОГО ВІДРОСТКА:					
футляра	31,2	43,2	71,3	56,9	50,0
стержня	19,3	19,1	18,5	22,3	19,0

Примітка: « - » – відповідний білок відсутній

Отже, фаг ZF40 за морфологічною будовою та білковим складом подібний до фага P2. Але на відміну від *рас*-фага ZF40, ДНК фага P2

упаковується за *cos*-механізмом. Даний факт додатково підтверджує положення про те, що геноми фагів є мозаїчними структурами [Панщина, 2008].

Ще одним прикладом розділення фагових білків за допомогою електрофорезу SDS-PAGE у вищеописаній системі є розділення білків капсиду бактеріофага AN20 досліджуваного у лабораторії ОНУ імені І. І. Мечникова (рис. 3.7).

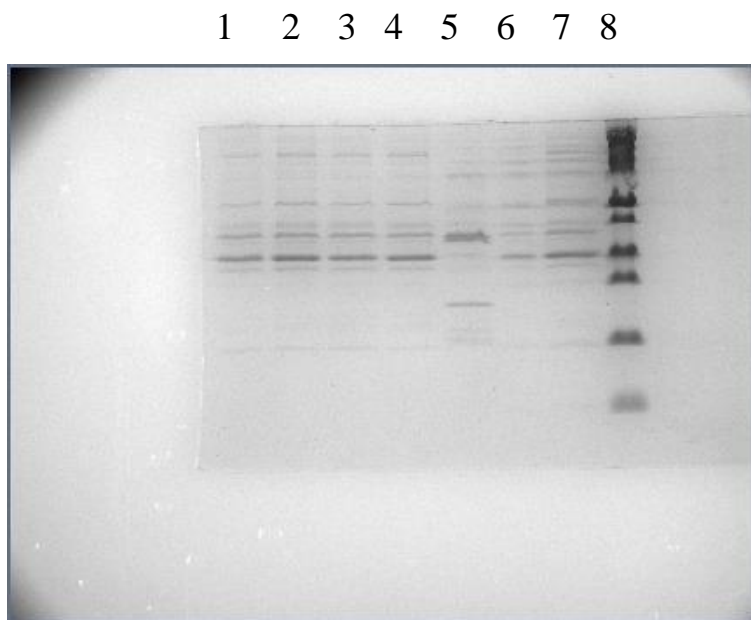


Рис. 3.7. Електрофореграма структурних поліпептидів віріонабактеріофага AN20: 1-7 – поліпептиди віріона AN20; 8 – маркерні білки [авторське фото]

Слід зауважити, що для електрофоретичного розділення фагових білків використовуються вищезазначені поліакриламідні гелі та обладнання.

Час електрофорезу для розділення фагових білків у вищезазначеній системі складає близько 4–5 годин, сила струму дорівнює 30 мА за напруги 120 В.

Матеріал та обладнання

1. Камера та джерело струму для електрофорезу білків фірми Bio-Rad (США).
2. Поліакриламідні гелі 16,5 %.
3. Класичний буфер Лемлі.
4. Очищені проби бактеріоцину *E. italicus* ОНУ547.
5. Комерційний бактеріоцин нізин.
6. Катодний та анодний буфери.
7. Маркер молекулярної маси PageRuler prestained protein ladder фірми Thermofisher scientific (США).
8. Розчин для фіксації білків.

9. Розчин для забарвлення білків PAGE Blue (ThermoFisher Scientific, США).
10. Лійка.
11. Дейонізована вода.
11. Вортекс.
12. Водяна баня.
13. Епандорфи.
14. Спектрофотометр UV5Nano (Mettler Toledo, США).
15. Дозатори та наконечники для них.

Завдання 1. Здійснення прободготовки

Хід роботи:

Дана методика базується на [Hwanhlem et al., 2013].

1. Визначити концентрацію білка у фракціях бактеріоцину *E. italicus* ОНУ547, отриманих за допомогою іонообмінної хроматографії на попередніх заняттях, за допомогою спектрофотометра UV5Nano. У випадку великої їх кількості виконати розведення для отримання концентрацій, що рекомендуються в теоретичних відомостях.
2. Для здійснення прободготовки змішати фракції бактеріоцину *E. italicus* ОНУ547 з класичним буфером Лемлі у двох повторах (з меркаптоетанолом і без) у пропорції 1:1. У якості негативного контролю використати дейонізовану воду, а позитивного – бактеріоцинізин.
3. Перемішати проби на вортексі та прокип'ятити упродовж 5 хв на водяній бані.

Завдання 2. Внесення проб та проведення електрофорезу

Дана методика базується на [Shägger et al., 1987; Hwanhlem et al., 2013;

<https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lsr/literature/10007296D.pdf>].

Хід роботи:

1. Зібрати систему Bio-Rad (США) для проведення електрофорезу використовуючи гелі, виготовлені власноруч. Для цього зафіксувати стекла з шаром гелю між ними в системі для збірки, що містить електроди (англ. «*electrode assembly*»). Зверніть увагу, що гелі необхідно розмістити так, щоб стекла з розпірками формували бокові сторони внутрішньої камери, а короткі стекла були всередині.
2. У сформовану внутрішню камеру зібраної електрофоретичної системи залити катодний буфер до самого верху та перевірити герметичність внутрішньої камери на відсутність протікання. У зовнішню камеру залити анодний буфер до мітки, що позначає об'єм, необхідний для роботи з двома гелями.

! Перед роботою обов'язково перевірити прозорість буферів, що свідчить про відсутність в них росту мікроорганізмів. У випадку потрапляння буферів на стіл необхідно протерти його насухо ганчіркою перед початком електрофорезу. Працювати на мокрих поверхнях зі струмом небезпечно.

3. Обережно вийняти гребінки з гелів та промити лунки катодним буфером з метою позбавити їх від залишків поліакриламідів, які можуть негативно вплинути на міграцію біомолекул.
4. Внести у лунки гелю по 20 мкл підготовлених та охолоджених проб білків, контролю, а також маркер молекулярної маси, користуючись спеціальними наконечниками з тонким носиком. Записати порядок внесення проб, назву маркера, діапазон молекулярних мас та фірму виробника маркера:

5. Підключити електрофоретичну камеру до джерела струму. Виставити напругу 30 В та почати електрофорез. Слідкувати за його протіканням та концентруванням проб у верхньому шарі гелю. Після входження проб в гель для розділення необхідно підвищити силу струму до 90 В.
6. Прослідкувати за процесом розділення білків, що входять до складу маркера та зняти фото і відео даного процесу. Коли з'являться всі смуги, характерні для даного маркера, електрофорез можна припинити вимкнувши струм.

Завдання 3. Фіксація та візуалізація білків

Дана методика базується на [Hwanhlem et al., 2013;

https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2FMAN0011813_PageBlue_Protein_Stain_Solution_UG.pdf].

Хід роботи:

1. Після закінчення процесу електрофорезу вимкнути струм та злити буфери (для цього зручно користуватися лійкою).
2. Розібрати внутрішню камеру. Гелі обережно вийняти, розділивши скло з розпірками та коротке скло. Для цього зняти останнє та залишити гель на першому склі.

3. Здійснити фіксацію білків. Для цього опустити скло з розпірками з гелем на ньому в розчин для фіксації, який має знаходитися під витяжкою. Після того, як гель залишиться у розчині скло вийняти*. Тримати гель у даному розчині 30 хвилин.

*- ! Працювати лише в гумових рукавицях!

4. Після фіксації здійснити промивку гелів. Для цього помістити їх в ємкість з дейонізованою водою, розмістити її на гойдалці та залишити на 10 хвилин. Після цього воду замінити та повторити процедуру ще два рази. Об'єм води кожного разу має бути біля 100-200 мл.

5. Здійснивши промивку, повністю залити гелі розчином PAGE Blue (ThermoFisher Scientific, США) для забарвлення білків та залишити на 1 годину. Гелі мають стояти на гойдалці для кращого проникнення барвнику в матрикс гелю.

? Відмітити склад комерційного розчину PAGE Blue та порівняти його зі складом класичного розчину для забарвлення:

6. Відмити барвник з фону гелю, замінивши барвник дейонізованою водою. Повторити дану процедуру ще раз.

7. Залити гель дейонізованою водою, помістити на гойдалку та залишити на 5 хвилин. Повторити дану процедуру з новими порціями води декілька разів до повного знебарвлення гелевого фону.

Завдання 4. Аналіз результатів

Хід роботи:

1. Обережно вийняти гелі з води та помістити на білу підкладку.
2. Сфотографувати гелі на камеру телефону та за допомогою відеосистеми GelDoc (Bio-Rad, США) з режимом «EPI WHITE», користуючись допомогою викладача або лаборанта.

Місце для вклеювання фотографії гелю, в який було внесено невідновлені проби

Місце для вклеювання фотографії гелю, в який було внесено відновлені проби

Місце для описання та аналізу отриманих результатів:

Висновки:

Завдання для самостійної роботи

Роздрукувати та вклеїти фотографії отриманих електрофореграм у відведені для цього місця. Правильно підписати їх. Описати та проаналізувати отримані на занятті результати та сформулювати висновки.

Ознайомитися з електрофорезом білково-нуклеїнових комплексів (shift assay) та законспектувати прочитане (коротко):

Питання для перевірки знань

1. Який склад класичного буферу для пробопідготовки для електрофорезу білків за Лемлі? Яка функція його компонентів?
2. Які параметри електрофорезу рекомендуються для розділення бактеріоцинів?

3. Який механізм концентрування білків у верхньому шарі гелю? Що таке передові та замикаючі іони?
4. Який механізм розділення білків у нижньому шарі гелю?
5. Що таке маркер молекулярної маси та яка його функція при проведенні електрофорезу?
6. Який принцип електрофорезу білково-нуклеїнових комплексів?
7. Для яких задач використовується електрофорез білково-нуклеїнових комплексів при проведенні біотехнологічних та біологічних досліджень?

Тестові завдання для самоконтролю рівня знань

1. До складу класичного буферу для обробки проб білків передпроведенням електрофорезу білків входить барвник:
 - А. бромфеноловий синій;
 - Б. феноловий червоний;
 - В. Кумасі G-250;
 - Г. генціановий фіолетовий.
2. При здійсненні пробопідготовки для денатурувального електрофорезу білків необхідно зруйнувати:
 - А. вторинну, третинну та четвертинну структури білка;
 - Б. первинну структуру білка;
 - В. вторинну та третинну структури білка;
 - Г. первинну, вторинну та третинну структури білка.
3. Верхній шар гелю для електрофорезу білків по Лемлі носить назву:
 - А. «running gel»;
 - Б. «stacking gel»;
 - В. «separating gel»;
 - Г. «denaturing gel».
4. Готові до електрофорезу білки рухаються в електричному полі в напрямку до:
 - А. аноду;
 - Б. катоду;
 - В. в обох напрямках;
 - Г. вірної відповіді немає.
5. Барвник додається до буферу для підготовки проб з метою:
 - А. лише забарвлення білків;
 - Б. лише полегшення внесення проби;
 - В. полегшення внесення проби та слідкування за ходом електрофорезу;
 - Г. забарвлення білків та полегшення внесення проби.
6. Для каталізу полімеризації поліакриламідного гелю необхідно додати:
 - А. меркаптоетанол;
 - Б. TEMED;

- В. амоніум персульфат та ТЕМЕД;
Г. ТЕМЕД та меркаптоетанол.
7. Комплекс ДНК з білками рухається у гелі:
А. швидше ніж ДНК окремо;
Б. повільніше ніж ДНК окремо;
В. однаково;
Г. правильна відповідь відсутня.
8. Швидкість руху білково-нуклеїнового комплексу може залежати від:
А. розміру білка;
Б. місця білка на молекулі ДНК;
В. довжини молекули ДНК;
Г. всі відповіді вірні.

Рекомендована література

1. Сиволоб А. В. Молекулярна біологія: підручник. Київ: видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2008. С. 384 (С. 353–354). https://shron1.chtyvo.org.ua/Syvolob_Andrii/Molekuliarna_biolohiia.pdf?PHPSESSID=mj8l07c184no93eo1qpchdvnj2
2. Hellman L. M., Fried M. G. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nature Protocols*. 2007. V. 2, P. 1849–1861 (P. 1849). <https://www.nature.com/articles/nprot.2007.249>

Інформаційні ресурси

1. <https://www.youtube.com/watch?v=KiHx7ze3h34>

ТЕМА 2

РОБОТА З НУКЛЕЇНОВИМИ КИСЛОТАМИ

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 4

Виділення ДНК детергент-фенольним методом та методом теплового лізису

Мета заняття – формування практичних навичок виділення ДНК з клітин бактеріальної культури та бактеріофагів.

Питання для підготовки до заняття

1. Виділення ДНК бактерій та бактеріофагів. Відомі методи та їх принципи.
2. Способи руйнування клітинної оболонки мікроорганізмів.
3. Методи визначення наявності виділеної ДНК та її кількості.
4. Можливі проблеми при виділенні ДНК.

Теоретичні відомості

У науковій літературі існує велика кількість методів виділення ДНК з клітин бактерій, бактеріофагів, рослин, тварин, грибів та вірусів, а сучасний ринок реагентів для проведення наукових досліджень пропонує вже готові комерційні набори реактивів з чіткою інструкцією (рис. 4.1) навіть для кожної окремої групи мікроорганізмів. Різноманіття методик для виділення ДНК пов'язано з різною будовою клітинних оболонок живих організмів, а також різними потребами у чистоті виділеної ДНК [Nichol, 2008; <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K0512>].

Так, як усім добре відомо, ДНК знаходиться усередині клітини. У зв'язку з цим для виділення даних біомолекул, незалежно від вибраного методу, необхідним є руйнування клітинних оболонок. З цією метою найчастіше використовують комбінацію ферментів та хімічних речовин, які руйнують клітинну стінку та мембрану, відповідно. Використання більш жорстких методів дезінтеграції клітин не рекомендується, оскільки це може призвести до руйнування й самої ДНК [Nichol, 2008].

Після виходу ДНК з клітин її очищають від інших біомолекул та відбирають. Найвідомішим методом очистки є екстракція ДНК сумішшю фенолу та хлороформу, однак іноді може використовуватися й хлороформ окремо. У випадку, якщо рівень чистоти ДНК має бути високим, додатково можуть використовуватися ферменти й на етапі очистки. Так, обробку

протеазами використовують для позбавлення ДНК від залишків вмісту білків, а РНК-азами видаляють із суміші РНК. Набори можуть включати також колонки для швидкої хроматографічної очистки ДНК [Nichol, 2008; <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K0512>; <https://www.omegabiotech.com/product/e-z-n-a-bacterial-dna-kit/>].

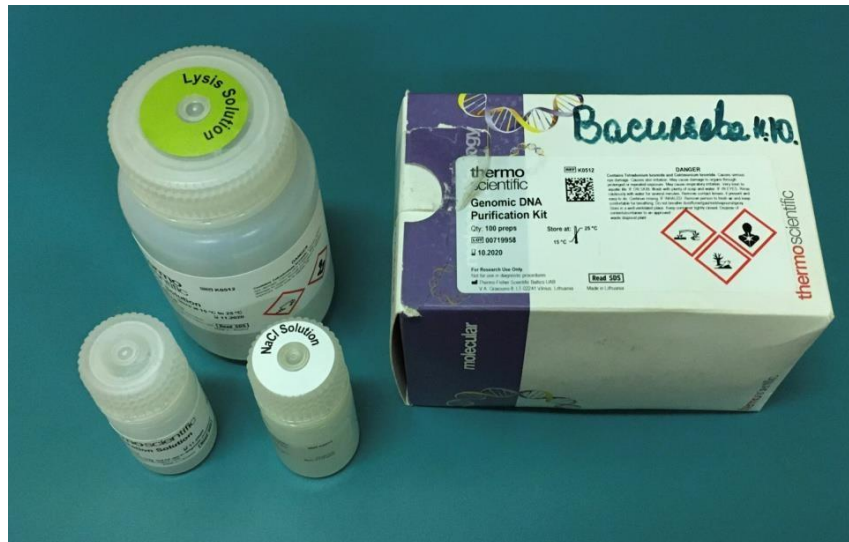


Рис. 4.1. Комерційний набір для виділення ДНК із бактеріальних клітин Genomic DNA Purification Kit фірми ThermoFisher Scientific [авторське фото]
До набору входять готові розчини до роботи та інструкція

Однак, не кожен молекулярно-біологічний експеримент вимагає такого високого рівня чистоти. У деяких випадках вчені при проведенні полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) додають безпосередньо бактеріальні клітини до реакційної суміші і отримують гарні результати [Jackson et al., 2004].

Для засвоєння під час даного лабораторного курсу пропонується два методи виділення ДНК: детергент-фенольний метод для виділення ДНК бактеріофага КЕУ [Сергєєва та ін., 2016], як приклад методу виділення ДНК бактеріофагів, і метод теплового лізису за Szegedi and Bottka (2002), як приклад методу виділення ДНК бактерій.

Детергент-фенольний метод виділення фагової ДНК є надійним методом отримання високо очищеної ДНК бактеріофагів, яку успішно можна використовувати для подальшого рестрикційного аналізу вірусної ДНК.

Матеріал та обладнання:

1. Фаголізат з титром близько 1×10^{10} БУО/мл
2. Проназа В (1 мкг/мл).
3. Розчин SDS (20 %).
4. Na_2EDTA 0,25 М.

5. Натрія ацетат 3 М.
6. Фенол рН 7,6.
7. Етиловий спирт.
8. Водний розчин Трис НСІ рН 7,5
9. Дистильована вода.
10. Термостат для епендорфів.
11. Мікроцентрифуга Eppendorf.
12. Вортекс.
13. Спектрофотометр UV5Nano (Mettler Toledo, США).
14. Дозатори та наконечники для них.
15. Бактеріальні культури.
16. Тритон X-100.
17. Азид натрію.
18. Бактеріологічні петлі.

Завдання 1. Виділення ДНК бактеріофага KEУ

Хід роботи:

Методика заснована на [Сергєєва та ін., 2016].

Звернути увагу, що при роботі з ДНК обов'язковими є використання рукавичок і маски.

При виділенні фагової ДНК за даною методикою використовується токсична речовина фенол.

1. 500 мкл фаголізата з титром близько 1×10^{10} БУО/мл перенести у стерильну пробірку епендорф.
2. До фаголізату додати наступні розчини:
75 мкл пронази В (у концентрації 1 мг/мл), 12,5 мкл 20 % SDS (кінцева концентрація повинна становити 0,8 %).
3. Інкубувати 10 хв в ультратермостаті при 60 °С (загальний об'єм суміші становить 587,5 мкл).
4. Після чого додати наступні розчини:
5 мкл Na_2EDTA 0,25 М (кінцева концентрація повинна становити 0,002 М), 60 мкл ацетата натрія, 3 М (кінцева концентрація 0,3 М), 500 мкл фенола рН 7,6
5. Акуратно змішати усі поступово додані реагенти.
6. Центрифугувати 5 хв при 11 000 об/хв на мікроцентрифузі Eppendorf.
7. Верхню водну фазу перенести у стерильну пробірку епендорф. На інтерфазі спостерігається щільний осад денатурованих білків.
8. Додати 2 об'єми перегнаного етилового спирту.
9. Преципітацію провести при -20 °С протягом від 20 хв до 1 доби.

10. Після преципітації додати 500 мкл перегнаного етилового спирту.
11. Осадити 5 хв при 11 000 об/хв на мікроцентрифузі. Процедуру осадження провести трьохкратно.
12. Провести відмивання 4 рази у етиловому спирті від фенолу. Після відмивання у етиловому спирті акуратно злити його і перевернути пробірку на фільтрувальний папір для підсушування протягом 2–5 хв. Критерієм «відмитості» ДНК є відсутність різкого фенольного запаху з пробірки з виділеною нуклеїновою кислотою.
13. Після цього просушити фагову ДНК протягом 20 хв, перевернувши пробірку на фільтрувальний папір.
14. Додати 200 мкл стерильної дистильованої води і залишити пробірку в холодильнику протягом 15 хв – 3 годин.
15. Для зберігання у водний розчин ДНК додати трис HCl, рН 7,5 до кінцевої концентрації 10 мМ. Фагову ДНК зберігати у холодильнику.

Електрофорез нативної фагової ДНК та фрагментів рестрикції даної ДНК проводити в гелях агарози з використанням Трис-фосфатного буферурН 7,9.

Підготування електрофоретичної камери

Приготувати 1 % агарозний гель на трис-фосфатному буфері. Для цього 1 г агарози розчинити в 95 мл дистильованої води. Суміш нагріти на водяній бані, а потім довести до кипіння. Після повного розчинення агарози додати 5 мл 20-кратного трис-фосфатного буферу, рН 7,9, вдруге довести до кипіння.

Трис-фосфатний буфер x20, рН 7,9,:

0,7 М трис,

0,8 М NaH₂PO₄ ,

0,02 М Na₂ЕДТА.

Сформувати гель, камеру заповнити однократним трис-фосфатним буфером і перевірити наявність струму.

Внести зразки в лунки. U=40-60 V, довжина гелю повинна бути 6–10 см.

Метод теплового лізису за Szegedi and Bottka (2002), що пропонується для засвоєння під час даного лабораторного курсу, є простим у виконанні, не потребує багато часу та коштовних реактивів. Крім того, незважаючи на невисокий рівень чистоти, виділена даним способом ДНК підходить для постановки класичної ПЛР, що неодноразово було підтверджено по досвіду автора.

Слід звернути увагу, що з метою отримання достовірних результатів ідентифікації мікроорганізмів за допомогою ПЛР, бактеріальна культура перед виділенням ДНК має бути чистою, тобто містити мікроорганізми лише одного

виду. Це ж саме правило стосується й культур інших живих організмів, з якими проводяться подібні експерименти.

Завдання 2. Отримати суспензію бактеріальної культури

Хід роботи:

Методика заснована на [Szegedi and Bottka, 2002].

1. Приготувати 10 мл лізуючого розчину, до складу якого входить 1 % Тритона X-100 та 0,25 % азиду натрію на дистильованій воді.

Увага! Азид натрію є надзвичайно токсичною сполукою. Працювати тільки в нітрилових рукавицях!

Місце для розрахунків:

2. Відібрати у пластикову мікропробірку 200 мкл отриманого лізуючого розчину та приготувати в ній суспензію мікроорганізмів, оптична щільність якої ≈ 1 . Для цього перенести 3–4 петлі біомаси бактерій з чистої культури на чашці Петрі, яку необхідно ідентифікувати, у відібраний розчин та добре провортексувати отриману суміш.

! Не забудьте про позитивний контроль (У випадку встановлення належності до роду *Enterococcus* – *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) та негативний контроль (будь-які бактерії, що не належать до роду *Enterococcus*).

Завдання 3. Виділити ДНК з бактеріальної суспензії методом теплового лізису

Методика заснована на [Szegedi and Bottka, 2002].

Хід роботи:

1. Помістити пробірки в термостат для епендорфів та прогріти їх при 95 °С впродовж 10 хв.
2. Відцентрифугувати при режимі 5700 g впродовж 5 хв.
3. Відібрати надосадову рідину (НОР), що містить виділену ДНК, в нову пробірку, не захопивши осад. Отримані проби можна зберігати при -20 °С.
4. Визначити наявність та концентрацію ДНК за допомогою спектрофотометрії, використовуючи прилад UV5Nano (Mettler Toledo, США)..Результати спектрофотометрії:

Завдання для самостійної роботи

Ознайомитися з методами мічення ДНК. Перерахувати їх та законспектувати основні принципи даних методів:

Питання для перевірки знань

1. Які методи виділення ДНК ви знаєте?
2. Які їх принципи?
3. З якою метою здійснюється виділення ДНК у біотехнологічних та біологічних лабораторіях?
4. Яких правил важливо дотримуватися для ефективного виділення ДНК і для успішного проведення молекулярно-біологічних досліджень взагалі?
5. Яких правил безпеки слід дотримуватись при виділенні ДНК, та при роботі з токсичними речовинами, які використовуються в даних методиках?
6. Якими способами можна визначити наявність ДНК та її концентрацію?
7. Що таке мічення ДНК та яке його призначення?
8. Які є методи мічення ДНК?
9. Які принципи радіоактивного та кінцевого мічення ДНК?
10. Що лежить в основі трансляції мітки (англ. «*nick translation*») та мічення за допомогою елонгації праймерів (англ. «*labelling by primer extension*»)?

Тестові завдання для самоконтролю рівня знань

1. Роль лізуючого буферу при виділенні ДНК полягає в:
А. очищенні від РНК;
Б. преципітації білків;
В. руйнуванні білків;
Г. руйнуванні клітинних оболонок.
2. Концентрація виділеної ДНК може залежати від:
А. кількості клітин бактеріальної культури;
Б. вибраної методики виділення;
В. віку бактеріальної культури;
Г. всі відповіді вірні.
3. У лабораторній практиці концентрацію виділеної ДНК визначають за допомогою методу:
А. центрифугування;
Б. спектрофотометрія;

- В. мас-спектрометрія;
Г. хроматографія.
4. У якості радіоактивних ізотопів для мічення ДНК у лабораторії використовують:
- А. ^{14}C ;
Б. ^3H ;
В. ^{32}P ;
Г. всі варіанти вірні.
5. Для здійснення мічення нерадіоактивним способом використовують:
- А. флуоресцентні барвники;
Б. нефлуоресцентні барвники;
В. ізотопи тритію;
Г. вірної відповіді немає.
6. Метод кінцевого мічення (англ. «end labeling») передбачає використання ферменту:
- А. ДНК полімерази III;
Б. ДНК полімерази I;
В. полінуклеотидкінази;
Г. фрагмент Кленова ДНК полімерази I.
7. Який фермент використовується для здійснення мічення шляхом елонгації праймерів:
- А. Таq ДНК полімераза;
Б. ДНК полімераза III;
В. фрагмент Кленова ДНК полімераза I;
Г. фермент не є потрібним.

Рекомендована література

1. Сиволоб А. В. Молекулярна біологія: підручник. Київ: видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2008. С. 384 (С. 362–363).
https://shron1.chtyvo.org.ua/Syvolob_Andrii/Molekuliarna_biolo_hiia.pdf?PHPSESSID=mj8l07c184no93eo1qpchdvnj2
2. Nichol D. S. T. An introduction to genetic engineering. Third edition. Cambridge: Cambridge University Press, 2008. С. 336 (С. 37–39).
https://www.researchgate.net/profile/Abdelrahman_Zueter2/post/What_book_for_basic_microbiology_in_human_and_what_book_genetic_engineering_for_basic/attachment/59d63056c49f478072ea076a/AS:273602769817603@1442307883122/download/An+Introduction+to+Genetic+Engineering.pdf

Інформаційні ресурси

1. <https://international.neb.com/products/dna-modifying-enzymes-and-cloning-technologies/dna-labeling/dna-labeling>
2. <https://www.perkinelmer.com/lab-products-and-services/application-support-knowledgebase/radiometric/dna-rna-labeling.html>

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 5

Проведення класичної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)

Мета заняття – формування практичних навичок проведення полімеразної ланцюгової реакції для біотехнологічних та біологічних цілей.

Питання для підготовки до заняття

1. Класична ПЛР, її принцип та спектри застосування.
2. ПЛР в реальному часі. Риси подібності та відмінності з класичною ПЛР. Сфери застосування ПЛР у реальному часі.
3. Склад реакційної суміші, функції її компонентів та правила її приготування.
4. Етапи ПЛР та процеси, які на них відбуваються.

Теоретичні відомості

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) – це молекулярно-біологічний метод, за допомогою якого досягається збільшення кількості певного фрагмента ДНК. Даний процес ще носить назву ампліфікація, вона знаходить широке використання у біотехнологічній та біологічній лабораторії, у тому числі для здійснення клонування та надійної ідентифікації живих організмів. Метод ПЛР був розроблений Кері Мюллісом наприкінці ХХ століття (Нобелівська премія по хімії) [Сиволоб, 2008; Jackson et al., 2004; Nichol, 2008].

Щоб зрозуміти механізм ПЛР, необхідно згадати, як відбувається реплікація ДНК у живій клітині. Процес, що лежить в основі методу, нагадує реплікацію ДНК, але проходить у пробірці, тому ПЛР іноді називають реплікацією *in vitro*. На відміну від реплікації *in vivo*, ПЛР передбачає роботу лише одного, найголовнішого ферменту реплікації – полімерази, але й то не звичайного, а термостійкого, що носить назву Таq ДНК-полімераза (назва походить від термофільних архебактерій, з яких отримано даний фермент – *Thermus aquaticus*). Полімераза добудовує комплементарні ланцюги виділеної ДНК, використовуючи дезоксинуклеозидтрифосфати (дНТФ) як будівельні

блоки, завдяки чому кількість ДНК збільшується. Перед цим ДНК денатурують впливом високої температури, а необхідну ділянку, яку потрібно копіювати, виділяють праймерами (штучно синтезованими олігонуклеотидами). Зрозуміло, що Таq ДНК-полімераза, як і всі інші ферменти, має працювати у спеціальному для неї буферному розчині [Сиволоб, 2008; Nichol et al., 2008].

ПЛР проходить циклами та кожен із них складається із трьох етапів:

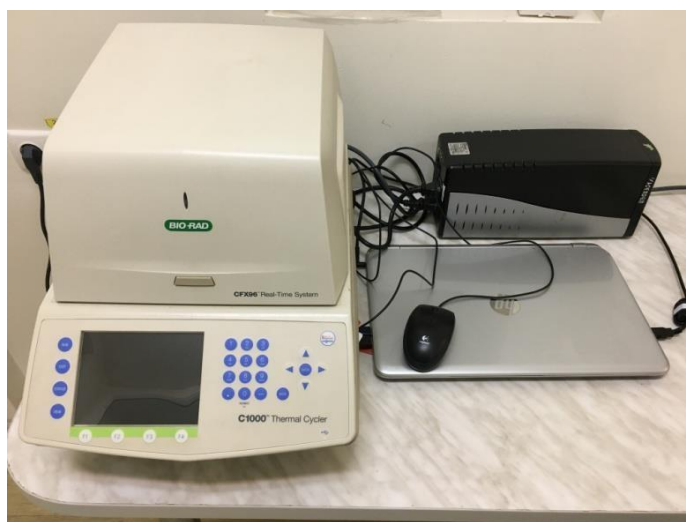
1. денатурація – формування двох одноланцюгових молекул ДНК ізоднієї дволанцюгової під впливом високих температур (як правило 95 °С);
2. відпал праймерів – відбувається приєднання праймерів до певних ділянок ДНК, які необхідно ампліфікувати за температури біля 55 °С;
3. елонгіція – добудова одноланцюгового фрагмента полімеразою за температури 72 °С по принципу комплементарності, що призводить до утворення дволанцюгових молекул із одноланцюгових [Сиволоб, 2008; Nichol et al., 2008].

У результаті, із певної ділянки однієї молекули ДНК синтезуються дві після першого циклу ампліфікації, а з цих двох утворюється чотири після другого і т. д. [Сиволоб, 2008; Nichol et al., 2008].

Процес ампліфікації проходить у спеціальних приладах, що забезпечують швидке нагрівання та охолодження реакційної суміші та які носять назву ампліфатори або термоциклери [Nichol et al., 2008] (рис. 5.1).



А



Б

Рис. 5.1. Ампліфатори фірми Bio-Rad (США) для класичної ПЛР (А) та ПЛР у реальному часі (Б) [авторське фото]

Є велика кількість різновидів ПЛР. Так, у біотехнологічній та біологічній лабораторії, окрім класичної ПЛР, часто використовується ПЛР у реальному часі (англ. Real Time PCR). Принцип його полягає у тому, що наявність ампліконів детектується за світінням, що забезпечується використанням флуоресцентних барвників. Відповідно, однією із переваг ПЛР у реальному часі над класичним методом є висока швидкість дослідження, оскільки не потрібно втрачати час на електрофорез [Сиволоб, 2008].

Результати класичної ПЛР враховуються за допомогою електрофорезу в агарозному гелі. Розглянемо приклад використання класичної ПЛР для ідентифікації бактерій. Так, було приготовано реакційну суміш для проведення ПЛР, використовуючи праймери E1/E2 з ДНК 18 ізолятів бактерій відповідно до [Jackson et al., 2004]. У результаті проведеного електрофорезу (рис. 5.2) було виявлено, що у випадку досліджуваних 4 штамів при ПЛР утворювалися продукти ампліфікації розміром приблизно 700 пар нуклеотидів (п. н.). Принцип визначення розмірів фрагментів ДНК подібний до білкового, лише розмір у даному випадку виражається у п. н.

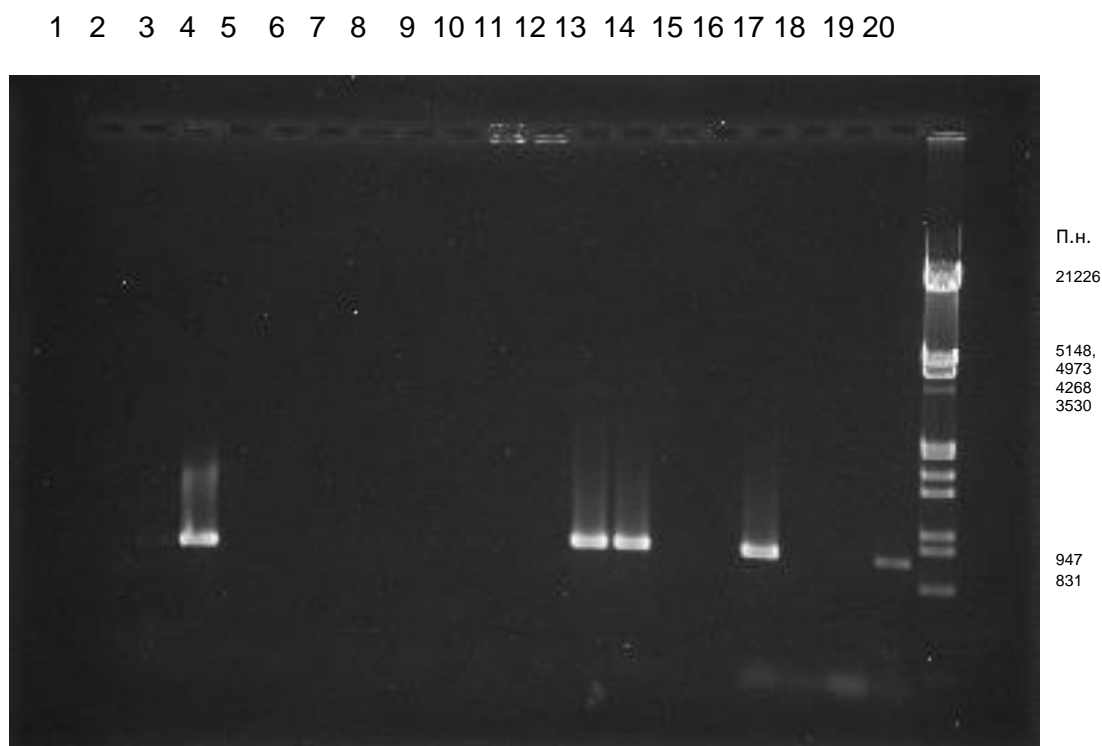


Рис. 5.2. Електрофореграма продуктів ампліфікації, отриманих шляхом класичної ПЛР з праймерами E1/E2 для ідентифікації бактерій роду *Enterococcus* [авторське фото]

Примітка: 1 – 18 – різні штами молочнокислих бактерій, 17 – негативний контроль 1, 18 – негативний контроль 2 (дейонізована вода), 19 – позитивний контроль (*E. faecalis* ATCC 29212), 20 – маркер молекулярної маси ДНК фага λ + EcoRI + HindIII (Fermentas, Литва)

Так як праймери E1/E2 є специфічними до фрагменту ДНК, який зустрічається лише у ентерококів та має відомий розмір 700 п. н. [Deasy et al., 2000; Jackson et al., 2004], то накопичення при ПЛР та виявлення у гелі ампліконів даного розміру у випадку 4 досліджуваних ізолятів бактерій вказує на їх належність до роду *Enterococcus*.

Матеріал та обладнання

1. ДНК, виділена з бактеріальних клітин на попередньому занятті.
2. MgCl₂ (25 ммоль).
3. дНТФ (10 ммоль кожного).
4. Таq-буфер + NH₄ (10X).
5. Таq-полімераза (50д/мкл).
6. Праймери E1 та E2 (16 мкмоль).
7. Стерильна дейонізована вода (без нуклеаз).
8. Нові епендорфи для ПЛР та наконечники для дозаторів (без нуклеаз).
9. Дозатори.
10. Вортекс.
11. Ампліфікатор MyCycler (BioRad, США).
12. Лід.
13. Нітрилові неопудрені рукавиці.

Завдання 1. Створити пропис реакційної суміші

В основі протоколу: [Deasy et al., 2000; Jackson et al., 2004; <https://www.biosyn.com/tew/ten-things-that-can-kill-your-pcr.aspx>].

Хід роботи:

1. Перед вами розділ з «Матеріалів і методів» експериментальної статті [Jackson et al., 2004]. Уважно прочитати його та проаналізувати. Ви можете використати наступну пару родоспецифічних праймерів: E1 (5'-TCAACCGGGGAGGGT-3') та E2 (5'-ATTACTAGCGATTCCGG-3') [Deasy et al., 2000; Jackson et al., 2004].

PCR. Template for PCR was prepared by suspending a single isolated bacterial colony in 100 μl of sterile deionized water. Seven PCR master mixes consisting of different primer sets were prepared. Group 1 was *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, and *E. malodoratus*; group 2 was *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, and *E. solitarius*; group 3 was *E. dispar*, *E. pseudoaerium*, and *E. saccharolyticus*; group 4 was *E. flavescens*, *E. mundtii*, and *E. sulfureus*; group 5 was *E. avium*, *E. columbae*, and *E. seriolicida*; group 6 was *E. cecorum*, *E. hirae*, and *E. raffinosus*; and group 7 was *E. asini*, *E. gilvus*, *E. pallens*, and *E. porcinus/villorum*. The base master mix consisted of 3 mM MgCl_2 (with Ficoll and tartrazine; Idaho Technology, Salt Lake City, Utah), 0.2 mM deoxynucleoside triphosphate mix (Roche, Indianapolis, Ind.), 16 mM (10 \times) NH_4 , 3.5 U of Expand high-fidelity PCR system (Roche), and 1.25 μl of each genus primer (16 μM). With the exception of *E. faecalis*, *E. malodoratus*, *E. gallinarum*, *E. saccharolyticus*, and *E. dispar*, 1.25 μl of each species primer (16 μM) was added to the base mix as indicated (Table 1). For primers FL1, FL2, MA1, MA2, GA1, GA2, SA1, SA2, DI1, and DI2, 2.5 μl of each primer was used. PCRs were performed in a final volume of 22.5 μl consisting of 20 μl of master mix and 2.5 μl of whole-cell template. Following an initial denaturation at 95°C for 4 min, products were amplified by 30 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 55°C (groups 1, 2, 5, and 6) or 60°C (groups 3, 4, and 7) for 1 min, and elongation at 72°C for 1 min. Amplification was followed by a final extension at 72°C for 7 min. Ten microliters of product was electrophoresed on a 2% 1 \times Tris-acetate-EDTA agarose gel containing 2 μg of ethidium bromide/ml. DNA molecular weight marker XIV (100 bp; Roche) was used as the standard. » (Jackson et al., 2004).

2. Порівняти указані в публікації концентрації компонентів реакційної суміші з загальними рекомендаціями, що наведені в таблиці 5.1.

Таблиця 5.1

Рекомендовані концентрації компонентів реакційної суміші для проведення ПЛР

[<https://www.biosyn.com/tew/ten-things-that-can-kill-your-pcr.aspx>]

Компонент реакційної суміші	Кінцева концентрація	Можливі наслідки збільшення (\uparrow) або зменшення (\downarrow) рекомендованої концентрації
MgCl_2^*	1–4 ммоль	\uparrow - зв'язуються з дНТФ
дНТФ**	40–200 мкмоль	\uparrow - реакція не йде внаслідок інгібування
Праймери	0,1–1,0 мкмоль	\uparrow - димеризація праймерів в результаті якої реакція не йде; \downarrow - реакція не йде через недостатню кількість

Тақ ДНК полімераза	0,5 мкл	↑ - відсутність чітких полос
ДНК ***	10 ⁴ копії	↑ - зв'язування праймерів реакційної суміші, в результаті якого реакція не йде

Примітка: * – рекомендується добре вортексувати; ** – рекомендується зберігати в аликвотах, оскільки можуть зіпсуватися при частому відтаюванні – заморозці; *** – розчин ДНК не має містити таких сполук, як ЕДТА, ксиленціанол, бромфеноловий синій, ДСН, фенол, хлороформ, саркозил, етиловий спирт [<https://www.biosyn.com/tew/ten-things-that-can-kills-your-pcr.aspx>].

3. На основі вищенаведеної інформації прописати власну реакційну суміш, звертаючи увагу на концентрації реактивів (початкові концентрації – C_1 з формули $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$), які надаються вам для проведення дослідження (указані в таблиці 5.2). Результати розрахунків внести в указану таблицю.

Таблиця 5.2

Склад реакційної суміші для проведення ПЛР з метою ідентифікації бактерій роду *Enterococcus*

Компонент	Кількість на одну реакцію	Кількість на _____ реакцій
25 ммоль MgCl ₂		
10 ммоль кожного дНТФ		
10X Тақ-буфер + NH ₄		
Тақ-полімераза 50д/мкл		
праймер E1 16 мкмоль		
праймер E2 16 мкмоль		
дейонізована вода		
ДНК		
кінцевий об'єм	22,5 мкл	

Завдання 2. Приготувати реакційну суміш

В основі методики: [<https://bitesizebio.com/20773/clean-up-your-act-how-to-clean-up-pcr-contamination/>; Jackson et al., 2004; Lorenz, 2012].

Хід роботи:

1. Розморозити реактиви на льоду окрім полімерази, яка має вийматися з холодильника безпосередньо перед додаванням до реакційної суміші.

УВАГА! Працювати лише в нітрилових НЕОПУДРЕНИХ рукавицях, та постійно використовуючи лід.

2. У пластиковій мікропробірці змішати всі компоненти реакційної суміші (окрім ДНК) в наступній послідовності:
 - 1) дейонізована вода;
 - 2) буфер для ПЛР;

- 3) $MgCl_2$;
 - 4) дНТФ;
 - 5) праймери;
 - 6) полімераза.
3. Легенько провортексувати суміш та розлити її по 20 мкл в пробірки для ПЛР.
- УВАГА! Запобігати утворенню бульбашок. Позбавитися від них при появі.**
4. У кожен пробірку додати 2,5 мкл ДНК та ретельно перемішати суміш без утворення бульбашок наконечниками. При появі бульбашок від них необхідно позбавитись.

Завдання 3. Записати програму ампліфікації та провести ПЛР

В основі протоколу: [Jackson et al., 2004; Lorenz, 2012].

1. Виписати параметри ампліфікації зі статті [Jackson et al., 2004]:

2. Записати програму для здійснення ампліфікації на приладі MyCycler (BioRad, США), користуючись допомогою викладача або лаборанта.
3. Вставити пробірки в лунки приладу, розмістивши їх рівномірно, закрити кришку та розпочати ампліфікацію.
4. Після закінчення ампліфікації пробірки помістити на зберігання при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Завдання для самостійної роботи

1. Сформулювати висновки по виконаному лабораторному заняттю.

Висновки:

2. Ознайомитися з методом ПЛР зі зворотною транскрипцією. Законспектувати його принцип та скласти формально-логічну модель (зобразити прочитане словесно-схематично).

Формально-логічна модель

Принцип методу (коротко)

Питання для перевірки знань

1. Що таке ПЛР? Який принцип даного методу?
2. Який спектр застосування ПЛР у біотехнологічній та біологічній лабораторії?
3. Які етапи проведення ПЛР ви знаєте?
4. Перерахуйте компоненти, які входять до складу реакційної суміші для проведення класичної ПЛР. Які їх функції?
5. Які різновиди ПЛР вам відомі?
6. Який принцип ПЛР зі зворотною транскрипцією?
7. Які риси подібності та відмінності у ПЛР зі зворотною транскрипцією з ПЛР у реальному часі?
8. Для яких задач використовується ПЛР зі зворотною транскрипцією у біотехнологічній лабораторії ?

Тестові завдання для самоконтролю рівня знань

1. У ролі коферменту Таq ДНК полімерази виступає:
А. Mg^{2+} ;
Б. $MgCl_2$;
В. Mn^{2+} ;
Г. Mo^{2+} .
2. Руйнування водневих зв'язків у молекулах ДНК при проведенні ПЛР відбувається на етапі:
А. елонгації;
Б. денатурації;
В. відпалу праймерів;
Г. фінальної елонгації.
3. До етапів ПЛР відноситься:
А. денатурація;
Б. елонгація;
В. відпал праймерів;
Г. всі відповіді вірні.

4. Проведення класичної ПЛР передбачає використання ферменту:
 - А. Таq ДНК-полімераза;
 - Б. ДНК-полімераза III;
 - В. зворотна транскриптаза;
 - Г. фермент не використовується.
5. При проведенні ПЛР з метою денатурації ДНК використовується фермент:
 - А. ДНК-гіраза;
 - Б. хеліаза;
 - В. топоізомераза;
 - Г. фермент не використовується.
6. Добудова комплементарного ланцюга полімеразою відбувається на етапі ПЛР, що носить назву:
 - А. денатурація;
 - Б. відпал праймерів ;
 - В. елонгація;
 - Г. даного не відбувається взагалі.
7. При використанні ПЛР зі зворотною транскрипцією відбувається:
 - А. синтез мРНК на матриці кДНК;
 - Б. синтез кДНК на матриці мРНК;
 - В. синтез РНК на матриці ДНК;
 - Г. вірної відповіді немає.
8. ПЛР зі зворотною транскрипцією:
 - А. використовується для вивчення експресії генів;
 - Б. використовується для вивчення вірусних захворювань;
 - В. призводить до накопичення кДНК;
 - Г. всі відповіді вірні.

Рекомендована література

1. Сиволоб А. В. Молекулярна біологія: підручник. Київ: видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2008. С. 384 (С. 341).
https://shron1.chtyvo.org.ua/Syvolob_Andrii/Molekuliarna_bioloiiia.pdf?PHPSESSID=mj8l07c184no93eo1qpchdvnj2
2. Cell and Tissue Based Molecular Pathology / Eds. : Tubbs R. R., Stoler M. H. Churchill Livingstone, 2009. Ch. 3: Overview of molecular diagnostic techniques and instrumentation. P. 19–32 (P. 19).
<https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/reverse-transcription-polymerase-chain-reaction>

Інформаційні ресурси

1. <https://www.youtube.com/watch?v=1vqNZ-H7Pq0>

2. <https://www.biocompare.com/PCR-Real-Time-PCR/6896-RT-PCR/#:~:text=RT%2DPCR%2C%20also%20known%20as,with%20the%20enzyme%20reverse%20transcriptase>

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 6

Електрофорез нуклеїнових кислот. Облік результатів класичної ПЛР

Мета заняття – формування практичних навичок проведення електрофорезу нуклеїнових кислот та обліку результатів класичної ПЛР.

Питання для підготовки до заняття

1. Електрофорез нуклеїнових кислот. Його принцип та спектрзастосувань.
2. Етапи проведення електрофорезу.
3. Склад буферу для внесення проб для проведення електрофорезу ДНК (перерахувати компоненти). Функції даних компонентів.

Теоретичні відомості

Електрофорез нуклеїнових кислот є подібним за своїм принципом до електрофорезу білків. Однак, процес проведення електрофорезу нуклеїнових кислот відрізняється від електрофорезу білків відсутністю необхідності здійснювати складну пробопідготовку. Це зумовлено тим, що нуклеїнові кислоти не потребують денатурації та спеціальної обробки передвнесенням у гель на відміну від білків через їх лінійну форму. Окрім того, вони в водному розчині при нейтральному рН мають від природи негативний заряд * [Nichol, 2008].

? З лекційного матеріалу або з попередніх курсів згадайте, які саме хімічні групи в складі нуклеїнових кислот забезпечують їм заряд.

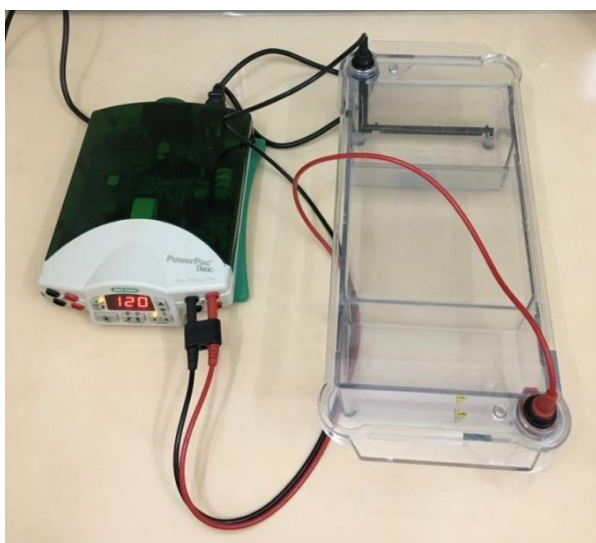
Як і у випадку електрофорезу білків, нуклеїнові кислоти завдяки негативному заряду будуть рухатися до аноду, розділяючись в гелі на основі різниці в розмірі: коротші фрагменти легше долатимуть опір матриксу та рухатимуться швидше ніж довші [Сиволоб, 2008; Nichol, 2008].

Незважаючи на відсутність складної пробопідготовки перед електрофорезом нуклеїнових кислот все ще залишається необхідність використовувати спеціальний буфер для внесення даних біомолекул у лунки гелю для полегшення даного процесу та підвищення якості електрофореграми.

Поширеним варіантом такого буферу є комерційний «DNA Gel Loading Dye», який поставляється у вигляді 6X концентрату фірмою ThermoFisher Scientific (США). До складу даного розчину входять наступні компоненти:

- 1) барвники – бромфеноловий синій та ксиленціанол FF, які допомагають слідкувати за процесом внесення проб та проходженням електрофорезу;
- 2) ЕДТА – дана сполука зменшує активність ферментів нуклеаз, які можуть бути присутніми в пробах ДНК та є небажаними в даному експерименті, через хелатування іонів металів;
- 3) гліцерол – надає в'язкості та збільшує вагу суміші нуклеїнових кислот з барвниками, що забезпечує її осідання у лунках гелю [<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R0611>].

Для проведення електрофорезу нуклеїнових кислот може використовуватись матрикс (гель) як з поліакриламідом, так і агарози. Поліакриламідні гелі мають менший діаметр пор та, відповідно, готуються, коли експеримент вимагає більшої роздільної здатності. Такі гелі дозволяють розділити фрагменти ДНК або РНК, що відрізняються навіть на один нуклеотид! Агарозні гелі готуються з метою розділення фрагментів нуклеїнових кислот, що значно відрізняються між собою за кількістю та складом нуклеотидів та використовуються частіше для виконання рутинних завдань у біотехнологічній та біологічній лабораторіях [Сиволоб, 2008; Nichol, 2008]. Агарозні гелі поміщаються у спеціальні камери для горизонтального електрофорезу (рис. 6.1 А) та заливаються буферами, в якості яких може виступати Трис-ацетатний або Трис-боратний буфер [Davis et al., 1980].



А



Б

Рис. 6.1. Система для проведення горизонтального електрофорезу нуклеїнових кислот у агарозному гелі (А) та відео система Gel Doc для якісного фотографування гелів (Б).
Фірма виробник: Bio-Rad (США). [авторське фото]

Після електрофорезу гелі забарвлюють бромистим етидієм, який є флуоресцентним барвником, або використовують радіоактивні мітки [Сиволоб, 2008].

У випадку забарвлення бромистим етидієм для отримання якісних електрофореграм використовуються відео системи, наприклад, Gel Doc фірми Bio-Rad (рис. 6.1 Б) з режимом «Trans UV» (просвічування ультрафіолетовим світлом).

Матеріал та обладнання

1. Продукти ампліфікації після ПЛР.
2. 6X DNA Gel Loading Dye (ThermoFisher Scientific, США).
3. Маркер молекулярної маси ДНК фага λ + EcoRI + HindIII (Fermentas, Литва).
4. ТАЕ буфер (50X концентрат).
5. Агароза.
6. Система для заливки горизонтальних агарозних гелів.
7. Камера для електрофорезу та джерело струму.
8. Розчин бромистого етидію (0,5 мкг/мл).
9. Дозатори та нові наконечники для них.
10. Електронні ваги.
11. Відео система Gel Doc (Bio-Rad, США).
12. Гойдалка.
13. Мікрохвильовка піч. 14. Дистильована вода. 15. Мірні циліндри.

Завдання 1. Приготувати 1XТАЕ-буфер та 1,5 % агарозний гель найого основи

В основі протоколу: [Davis et al., 1980; Layton et al., 2010].

Хід роботи:

1. Розвести 50X концентрат ТАЕ- буферу в дистильованій воді так, щоб отримати 2 л 1X буферу. Навести розрахунки:

2. На основі розведеного буферу приготувати 150 мл 1,5 % розчину агарози. Для цього зважити 2,25 г агарози на електронних вагах та розчинити наважку у 150 мл 1X ТАЕ.

3. Тричі вскип'ятити отриманий розчин в мікрохвильовій печі для повного розчинення агарози (розчин має бути повністю прозорим).
4. Зібрати систему для заливки гелю, вставивши туди гребінку як показано на рисунку 6.2. Звернути увагу, що для отримання якісного гелю однакової товщини система має стояти на рівній поверхні.

Увага! Форма має бути чистою та сухою. Наявність крапель води на її поверхнях може призвести до тріщин у гелі.

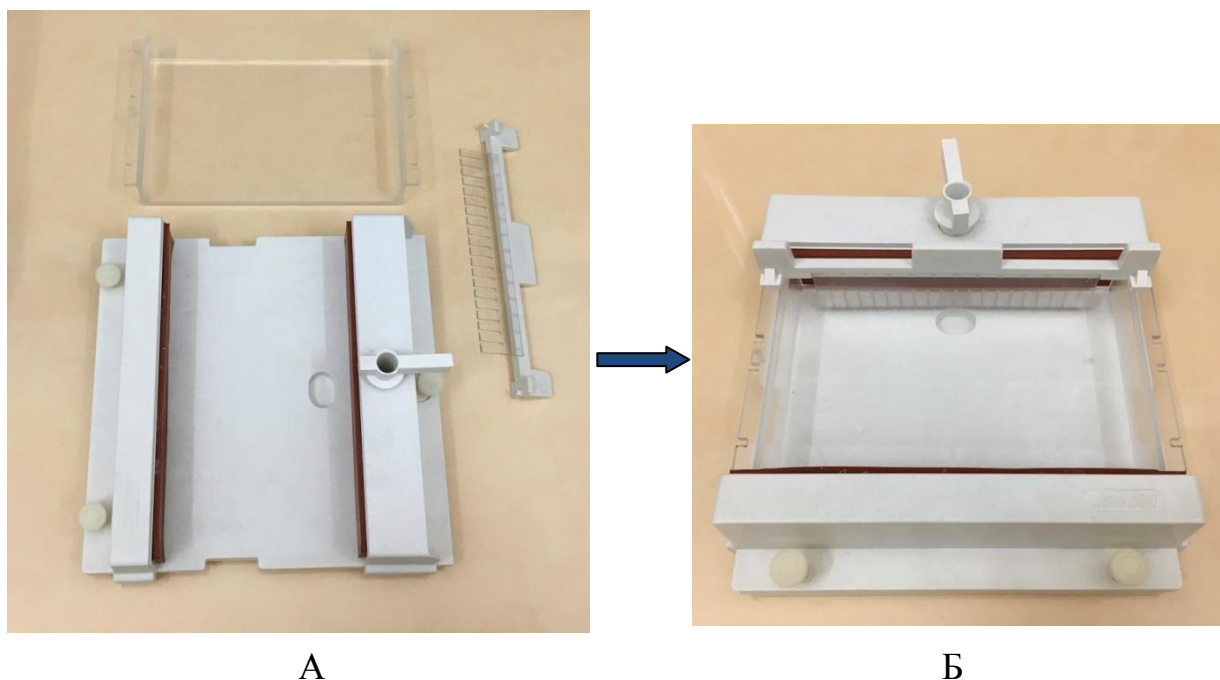


Рис. 6.2. Компоненти системи для приготування гелів (А) та правильно зібрана система, готова до заливки гелю (Б) [авторське фото]

5. Трохи охолодити розчин агарози (бажано до 50 °С) та залити його в форму для приготування гелю. Запобігати утворення бульбашок та позбавитися від них при появі.
6. Після полімеризації гелю обережно вийняти з нього гребінку для формування лунки. Краще для цього почати виймання з одного боку.
7. Вийняти обережно гель із системи разом з нижньою пластиковою підкладкою та помістити його в камеру для проведення електрофорезу. Гель має бути розміщений так, щоб лунки були біля катоду (позначений на камері як «-»).
8. Залити в камеру 1X ТАЕ-буфер так, щоб він покривав гель тонким шаром в 1 мм.
9. Промити лунки буфером від можливих залишків агарози.

Завдання 2. Підготувати проби ДНК та внести їх в гель

В основі протоколу [Davis et al., 1980;

https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2FMAN0012965_6X_DNA>Loading Dye R0611 UG.pdf].

Хід роботи:

1. Розморозити амплікони та додати до них буфер для внесення проб (6X DNA Loading Dye, ThermoFisher Scientific, США) так, щоб зменшити концентрацію буферу до 1X. Додати розрахунки:

2. Добре перемішати та внести в лунки гелю по 20 мкл проб та маркер молекулярної маси. Занотувати порядок внесення проб, назву маркера та його фірму-виробник:

Завдання 3. Провести електрофорез та роботу з гелем після нього

В основі протоколу [Davis et al., 1980;

<https://www.nationaldiagnostics.com/electrophoresis/article/ethidium-bromide-staining>]

Хід роботи:

1. Закрити електрофоретичну камеру, виставити напругу, що має дорівнювати 3 В на сантиметр гелю та почати електрофорез.
2. Після 45 хвилин електрофорезу струм вимкнути, гель обережно вийняти з камери для електрофорезу та залити розчином бромистого етидію з кінцевою концентрацією 0,5 мкг/мл*.

***-! УВАГА! ПРАЦЮВАТИ З БРОМИСТИМ ЕТИДІЕМ МОЖНА ЛИШЕ В НІТРИЛОВИХ РУКАВИЦЯХ ТА ПІД ВИТЯЖКОЮ. ЦЯ СПОЛУКА Є МУТАГЕНОМ ТА КАНЦЕРОГЕНОМ!**

3. Помістити розчин барвника з гелем на гойдалку під витяжкою та залишити на 15–30 хв з повільним перемішуванням.
4. Після забарвлення розчин бромистого етидію злити назад в колбу та помістити в темне місце (строк його придатності не більше 2 місяців!).
5. Зробити фотографію гелю за допомогою відео системи GelDoc (Bio-Rad, США) використовуючи ультрафіолетове світло з довжиною хвилі 300 нм

Завдання для самостійної роботи

1. Роздрукувати та вклеїти фотографію отриманої електрофореграми. Правильно підписати її та проаналізувати. Описати результати проведеної ПЛР. Сформулювати висновки.

Місце для вклеювання фотографії

Висновки:

2. Ознайомитися з електрофорезом ДНК у денатурувальних умовах, який використовується для оцінки результатів секвенування та інших цілей.
3. Скласти таблицю порівняння звичайного гелю для електрофорезу ДНК, що використовується для рутинних цілей у біотехнологічній лабораторії, та «секвенувального гелю».

**Порівняння звичайного гелю для електрофорезу ДНК
з «секвенувальним»**

Питання для перевірки знань

1. Що таке електрофорез нуклеїнових кислот? Які його відмінності від електрофорезу білків?
2. Який склад буферу для обробки проб для проведення електрофорезу ДНК?
3. Який принцип електрофорезу нуклеїнових кислот?
4. Який спектр застосування електрофорезу ДНК у біотехнологічних та біологічних лабораторіях?
5. Що таке денатурувальний електрофорез? Який його принцип?
6. Як використовується електрофорез нуклеїнових кислот для оцінки результатів секвенування?

Тестові завдання для самоконтролю рівня знань

1. Матрикс для проведення електрофорезу нуклеїнових кислот частіше за все складається з:
 - А. агар-агару;
 - Б. целюлози;
 - В. поліакриламідну;
 - Г. агарози.
2. Гель для проведення електрофорезу ДНК з метою оцінки результатів секвенування складаються з:
 - А. целюлози;
 - Б. поліакриламідну;
 - В. агарози;
 - Г. желатину.

3. ДНК після проведення електрофорезу забарвлюється:
 - А. бромистим етидієм;
 - Б. бромфеноловим синім;
 - В. ксилен ціанолом;
 - Г. кумасі блакитним.
4. При проведенні електрофорезу ДНК рухається до:
 - А. катода завдяки негативному заряду, зумовленому ДСН;
 - Б. анода завдяки негативному заряду, зумовленому фосфатними групами;
 - В. катода завдяки негативному заряду, зумовленому фосфатними групами;
 - Г. анода завдяки негативному заряду, зумовленому ДСН.
5. Для створення градієнту з метою проведення електрофорезу нуклеїнових кислот у денатурувальних умовах використовується:
 - А. бромистий етидій;
 - Б. бромфеноловий синій;
 - В. сечовина;
 - Г. сульфат амонію.
6. Електрофорез ДНК у денатуруючих умовах може бути використаним для:
 - А. визначення мутацій;
 - Б. оцінки результатів проведеного секвенування;
 - В. ідентифікації мікроорганізмів;
 - Г. усі відповіді вірні.

Рекомендована література

1. Сиволоб А. В. Молекулярна біологія: підручник. Київ: видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2008. С. 384 (С. 337, 341–342).
https://shron1.chtyvo.org.ua/Syvolob_Andrii/Molekuliarna_bioloiiia.pdf?PHPSESSID=mj8l07c184no93eo1qpchdvnj2
2. Nichol D. S. T. An introduction to genetic engineering. Third edition. Cambridge: Cambridge University Press, 2008. С. 336 (С. 41, 43).
https://www.researchgate.net/profile/Abdelrahman_Zueter2/post/What_book_for_basic_microbiology_in_human_and_what_book_genetic_engineering_for_basic/attachment/59d63056c49f478072ea076a/AS:273602769817603@1442307883122/download/An+Introduction+to+Genetic+Engineering.pdf

Інформаційні ресурси

1. <https://www.cleaverscientific.com/applications/denaturing-gradient-gel-electrophoresis/>
2. <https://www.youtube.com/watch?v=sRt6fS77DQQ>

ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Сиволоб А. В. Молекулярна біологія: підручник. Київ: видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2008. С. 384.
https://shron1.chtyvo.org.ua/Syvolob_Andrii/Molekuliarna_bioloiiia.pdf?PHPS_ESSID=mj8107c184no93eo1qpchdvnj2
2. Панщина Г. І. (Жумінська Г. І.) Структурна організація геному помірною бактеріофага ZF40 *Erwinia carotovora*: автореф дис. ... канд. біол. наук : спец. 03.00.06 «Вірусологія» / Г. І. Панщина. – Київ, 2008. – 20 с.
3. Лабораторний практикум з молекулярної біотехнології і біоінформатики: методичний посібник. / к.б.н. Сергєєва Ж. Ю., к.б.н. Ліманська Н. В., к.б.н. Іваниця Т.В. та ін. – Одеса: «Одеський національний університет імені І. І. Мечникова», 2016. – 62 с.
4. Deasy B. M., Rea M. C., Fitzgerald G. F., Cogan T. M., Beresford T. P. A rapid PCR based method to distinguish between *Lactococcus* and *Enterococcus*. *Systematic and Applied Microbiology*. 2000. V. 23 (4), P. 510–522.
[https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(00\)80025-9](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(00)80025-9)
5. Ferraris S., Cazzola M., Peretti V., Stella B., and Spriano S. Zeta potential measurements on solid surfaces for *in vitro* biomaterials testing: surface charge, reactivity upon contact with fluids and protein absorption. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2018. V. 6, P. 1 – 7.
Doi:10.3389/fbioe.2018.00060 (P. 1 – 2).
6. Glick B. R., Pasternak J. J., Patten Ch. L. Molecular biotechnology. Principles and applications of recombinant DNA. 4th edition. Washington: ASM Press, 2010. С. 1001.
<https://www.heavenlyfuel.com/jbframework/uploads/2017/06/Molecular-Biotechnology.pdf>
3. H-Kittikun A., Biscola V., El-Ghaish Sh., Jaffrès E., Dousset X., Pillot G., Haertlé T., Chobert J.-M., Hwanhlem N. Bacteriocin-producing *Enterococcus faecalis* KT2W2G isolated from mangrove forests in southern Thailand: Purification, characterization and safety evaluation. *Food Control*. 2015. V. 54, P. 126–134. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.037>
4. Hwanhlem N., Biscola V., El-Ghaish Sh. et al. Bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from mangrove forests in Southern Thailand as potential bio-control agents: purification and characterization of bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KT2W2L. *Probiotics and antimicrobial proteins*. 2013. V. 5, P. 264 – 278. Doi: 10.1007/s12602-013-9150-2
5. Jackson Ch. R., Fedorka-Cray P. J., and Barrett J. B. Use of a genus and species-specific multiplex PCR for identification of Enterococci. *Journal of Clinical*

- Microbiology*. 2004. V. 42(8), P. 3558–3565. doi:10.1128/JCM.42.8.3558-3565.2004
6. Layton B. A., Walters S. P., Lam L. H., and Boehm A. B. *Enterococcus* species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR. *Journal of Applied Microbiology*. 2010. V. 109, P. 539–547. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04675.x
 7. Lorenz T. C. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of Visualized Experiments*. 2012. V. 63, P. 1–15. Doi: 10.3791/3998.
 8. Martínez-Hernández S. L., Marín-Muñoz M. A., Ventura-Juárez J., Jáuregui-Rincón J. Fed-batch cultivation and operational conditions for the production of a recombinant anti-amoebic vaccine in *Pichia pastoris* system. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 2020. V. 19 (2), P. 691–705. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Bio725>
 9. Merlich A., Galkin M., Choiset Y., Limanska N., Vasylieva N., Ivanytsia V., Haertlé T. Characterization of the bacteriocin produced by *Enterococcus italicus* ONU547 isolated from Thai fermented cabbage. *Folia Microbiol.* 2019. V. 64 (4), P. 535–545. <https://doi.org/10.1007/s12223-019-00677-4>
 10. Nichol D. S. T. An introduction to genetic engineering. Third edition. Cambridge: Cambridge University Press, 2008. C. 336. https://www.researchgate.net/profile/Abdelrahman_Zueter2/post/What_book_for_basic_microbiology_in_human_and_what_book_genetic_engineering_for_basic/attachment/59d63056c49f478072ea076a/AS:273602769817603@1442307883122/download/An+Introduction+to+Genetic+Engineering.pdf
 11. Schägger H. Tricine-SDS-PAGE. *Nature protocols*. 2006. V. 1 (1), P. 16–23. doi: 10.1038/nprot.2006.4
 12. Szegedi E. and Bottka S. Detection of *Agrobacterium vitis* by polymerase chain reaction in grapevine bleeding sap after isolation on a semi selective medium. *Vitis*. 2002. V. 41 (1), P. 37–42. <https://ojs.openagrar.de/index.php/VITIS/article/view/4436/4382>
 13. Ventzki R., Stegemann J. 3D-gel electrophoresis – a new development in protein analysis. *Mass spectrometry for microbial proteomics*. Chapter 10 / Eds.: Shah H. N., Gharbia S. E. John Wiley & Sons, 2010. C. 205–221 (205). <https://doi.org/10.1002/9780470665497.ch10>
 14. <https://bitesizebio.com/20773/clean-up-your-act-how-to-clean-up-pcr-contamination/>
 15. https://collab.its.virginia.edu/access/content/group/f85bed6c-45d2-4b18-b868-6a2353586804/2/Ch04_Campbell_B_Green_Fluorescent_Protein_-_Aequorea_victoria_-

[/index.html#:~:text=EGFP%20has%20a%20molecular%20weight,pI%20of%205.58%20\(2\)](#)

16. <https://novations.ua/dzeta-potenczial-poverhnevyj-zaryad-bilkiiv/>
17. <https://www.biocompare.com/26730-2-Mercaptoethanol-Reagents/>
18. <https://www.bio-rad.com/en-ua/applications-technologies/protein-electrophoresis-equipment?ID=LUSOZFBEB>
19. <https://www.bio-rad.com/en-ua/applications-technologies/protein-electrophoresis-methods?ID=LUSOW4GRI>
20. <https://www.bio-rad.com/en-ua/product/mini-protean-tetra-handcast-systems?ID=N3F2W9KG4>
21. <https://www.bio-rad.com/en-ua/product/powerpac-basic-power-supply?ID=bea5dea1-cef0-43ad-8af5-b2c0287f6e07>
22. <https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lsr/literature/10007296D.pdf>
23. <https://www.biosyn.com/tew/ten-things-that-can-kills-your-pcr.aspx>
24. <https://www.cleaverscientific.com/applications/denaturing-gradient-gel-electrophoresis/>
25. <https://www.creative-proteomics.com/services/1d-sds-page-ief.htm>
26. <https://www.interchim.fr/ft/1/115252.pdf>
27. <https://www.nationaldiagnostics.com/electrophoresis/article/ethidium-bromide-staining>
28. <https://www.omegabiotek.com/product/e-z-n-a-bacterial-dna-kit/>
29. https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FFLSG%2Fmanuals%2FMAN0011772_PgRuler_Prestain_Protein_La_d_UG.pdf
30. https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FFLSG%2Fmanuals%2FMAN0011813_PageBlue_Protein_Stain_Solution_UG.pdf
31. https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FFLSG%2Fmanuals%2FMAN0012965_6X_DNA>Loading_Dye_R0611_UG.pdf
32. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/24620>
33. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K0512>
34. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R0611>
35. <https://www.usbio.net/protocols/laemmli-sample-buffer-2>

Навчальне видання

МЕТОДИ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ
МОДУЛЬ 3
ОСНОВНІ МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНІ
МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

ЕЛЕКТРОННІ МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
до лабораторних занять та самостійної роботи
для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти
денної форми навчання
спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія,
091 Біологія

Електронне практичне видання

Укладачі:

Мерліч Андрій Геннадійович
Жумінська Ганна Іванівна

В авторській редакції

Затвердж. авт. 08.11.2024. Шрифт Times New Roman.
Системні вимоги: операційна система сумісна з програмним забезпеченням
для читання файлів формату PDF.
Обсяг 1,9 МБ. Зам. № 2879.

Видавець і виготовлювач
Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4215 від 22.11.2011 р.
вул. Університетська, 12, м. Одеса, 65082, Україна
Тел.: (048) 723 28 39, e-mail: druk@onu.edu.ua