

ПАВЛОДАРСКИЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ ӘЛКЕЙ МАРҒҰЛАН

А.Э. Кучбоев
Б.К. Жумабекова
Б.Х. Рузиев

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЗООЛОГИЯ

Учебное пособие

Павлодар

2024

УДК 577.2(075)
ББК 28.070я73
К 95

Рекомендовано к изданию ученым советом
Павлодарского педагогического университета имени Әлкей Марғұлан
Протокол №1 от 27.09.2023 г.

Рецензенты:

А.Б. Калиева, кандидат биологических наук, профессор кафедры «Биология и экология», Торайгыров университет, Павлодар, Казахстан

Н.Е. Тарасовская, доктор биологических наук, Павлодарский педагогический университет имени Әлкей Марғұлан, Павлодар, Казахстан

Кучбоев А.Э.

К 95 **Молекулярная зоология:** учебное пособие / А.Э. Кучбоев, Б.К. Жумабекова, Б.Х. Рузиев. – Павлодар: Павлодарский педагогический университет имени Әлкей Марғұлан, 2024. – 96 с.

ISBN

Учебное пособие содержит дидактический материал по молекулярной зоологии. В пособии подробно и последовательно изложены все этапы молекулярно-генетического исследования – от требований к сбору материала, выделения нуклеиновых кислот и проведения ПЦР-амплификации до построения филогенетических деревьев, дается описание применения удобного маркера для идентификации эукариотических организмов по генам ядерной и митохондриальной ДНК. ПЦР-анализ способствует более широкому применению молекулярно-генетических данных в исследованиях систематики, таксономии и филогении животных наряду с морфологическими и физиологическими данными.

Предназначено для студентов и научных работников, заинтересованных в изучении молекулярных аспектов зоологии.

УДК 577.2(075)
ББК 28.070я73

ISBN

© Кучбоев А.Э., Жумабекова Б.К., Рузиев Б.Х., 2024.

© Павлодарский педагогический университет имени Әлкей Марғұлан, 2024.

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие (А.Э. Кучбоев)	4
Введение (Б.К. Жумабекова)	5
Модуль 1. Современные методы молекулярной зоологии	
Глава 1. Молекулярная зоология – новый подход таксономии животных (А.Э. Кучбоев)	7
Глава 2. Применение молекулярных методов в изучении биоразнообразия животного мира (А.Э. Кучбоев)	15
Глава 3. Современные разработки систематики животных (А.Э. Кучбоев)	23
Глава 4. Требования по сбору зоологического материала для молекулярно- генетического анализа. Морфологические исследования (А.Э. Кучбоев)	28
Глава 5. Выделение геномного ДНК от зоологических объектов (А.Э. Кучбоев)	32
Глава 6. Основные понятия полимеразной цепной реакции. ПЦР- амплификация (Б.Х. Рузиев)	36
Глава 7. Основные понятия метода электрофореза в агарозном геле. Очистка рибосомального ядерного ДНК (Б.Х. Рузиев)	43
Модуль 2. Клонирование. ПЦР в таксономии животных	
Глава 8. Молекулярное клонирование. Реакция лигирования (Б.Х. Рузиев)	49
Глава 9. Трансформация и приготовление компетентных клеток <i>Escherichia coli</i> (Б.Х. Рузиев)	55
Глава 10. Проведение ПЦР-скрининга бактериальных колоний (Б.Х. Рузиев)	60
Глава 11. Выделение плазмидной ДНК (Б.К. Жумабекова)	63
Глава 12. Рестрикционный анализ молекул ДНК (Б.К. Жумабекова)	67
Глава 13. Секвенирование. Определение первичной нуклеотидной последо- вательности (Б.К. Жумабекова)	70
Глава 14. Идентификация организмов на основе выяснения первичной нук- леотидной последовательности (Б.К. Жумабекова)	76
Глава 15. Построение филогенетического древа. Размещение нуклеотидных последовательностей в Генбанк (NCBI) (Б.К. Жумабекова)	84
Использованная литература	91
Приложение	94

Предисловие

В учебном пособии подробно и последовательно изложены все этапы молекулярно-генетического исследования – от требований к сбору материала, выделения нуклеиновых кислот и проведения ПЦР-амплификации до построения филогенетических деревьев, дается описание применения удобного маркера для идентификации эукариотических организмов по генам ядерной и митохондриальной ДНК. ПЦР-анализ способствует более широкому применению молекулярно-генетических данных в исследованиях систематики, таксономии и филогении животных наряду с морфологическими и физиологическими данными.

Приведены современные данные по таким понятиям как «Биоразнообразие», «Биологические виды», «Спорные виды», «Полиморфизм внутри вида», «Интерактивные каталоги», «База данных в сохранении биоразнообразия, отражена связь дисциплины «Молекулярная зоология» с другими разделами биологии. Кроме того, описано применение удобного маркера для идентификации эукариотических организмов – генов ядерной и митохондриальной ДНК. В простой и доступной форме изложены все этапы исследования – от требований к сбору материала, выделения нуклеиновых кислот и проведения ПЦР-амплификации до построения филогенетических деревьев.

Учебное пособие предназначено для студентов, магистрантов и аспирантов биологических факультетов сельскохозяйственных, ветеринарных и педагогических вузов.

Введение

В последние годы интенсивное развитие исследований в области биохимии и генетики с внедрением новых методов диагностики дало широкую возможность открытия нового направления – молекулярной систематики. С каждым годом увеличиваются научные исследования по изучению молекулярной таксономии различных систематических групп животных. В идентификации видов беспозвоночных и позвоночных животных, кроме традиционных морфологических методов, уделяется все больше внимания современным молекулярным таксономическим методам. Эти методы являются эффективными в идентификации видов животных, кроме того, они позволяют всесторонне изучать и решать некоторые проблемы систематики, эволюции и филогении животных.

Достоверная идентификация организмов стала возможной с развитием биоинформатики и современных методов молекулярной биологии – полимеразной цепной реакции, клонирования выделенных генов в бактериальных векторах и методик определения первичных нуклеотидных последовательностей (секвенирование).

Для филогенетических реконструкций на высоком таксономическом уровне используются и другие гены или участки ядерной ДНК, например, фактор элонгации (elongation factor, Ef-1a), гены белков теплового шока, миозинов, гистонов. Сравниваются также вторичные структуры ДНК и аминокислотные последовательности белков. На уровне семейств и родов используют анализ митохондриальных генов.

Систематика животных, называемая также таксономией животных, раздел зоологии, занимающийся присвоением животным научных названий, описанием их видов и распределением (классификацией) последних по естественным группам на основании родственных (эволюционных) связей. Термины «систематика» и «таксономия» часто используют как синонимы, однако полезно их все же различать.

Таксономия, в отличие от систематики, делает упор на теорию и методологию классификации. Цель ее – разделение животных на группы (таксоны) и расположение этих групп в порядке, отражающем их родственные связи и иерархию (от низших к высшим, т.е. от видов к родам, семействам и т.д.) на основе степени сходства и различий между ними. Существует несколько методов определения относительного положения группы в системе. Например, метод, известный под названием кладистического, строит схемы ветвления,

учитывающие количество общих признаков и их адаптивную роль; филогенетический метод устанавливает родственные связи по данным сравнительной анатомии и палеонтологии.

В отличие от таксономии систематика дает животным названия, а также интерпретирует и оценивает черты сходства и различия между ними, используемые при выделении таксономических групп; другими словами, задача систематики – изучение разнообразия форм живого. Таким образом, это более широкое понятие, частично или полностью включающее в себя таксономию.

В научной системе классификации каждый вид животных получает стандартное латинское название, состоящее из двух слов (биномен). Это позволяет исключить путаницу, неизбежную при использовании разнообразных традиционных, т.е. «народных», названий.

Глава 1.

Молекулярная зоология – новый подход в таксономии животных

- *Предмет, цель и задачи дисциплины «Молекулярная зоология».*
- *Значение и связи между другими дисциплинами.*
- *Понятие «Биоразнообразие».*
- *Биологические виды.*
- *Спорные виды.*
- *Полиморфизм внутри вида.*
- *Интерактивные каталоги и базы данных в сохранении биоразнообразия.*

Молекулярная зоология, или систематика животных – новое направление в зоологической науке, которое дает большие возможности для изучения эволюции. Оно вызвало целую революцию, пересмотр сделанных ранее исследований родственных связей между видами. Принимая во внимание тот факт, что все морфологические признаки закодированы в последовательности ДНК, использование для систематики генетического материала позволяет более глубоко понять процессы эволюции и на их основе сделать заключение о систематическом положении.

Молекулярная систематика использует последовательности ДНК, РНК или белков для разрешения вопросов систематики, а именно правильной классификации или таксономии с точки зрения эволюционной биологии.

Молекулярная генетика позволила углубить представления о механизмах наследования и об эволюции организмов, заложив тем самым основы филогенетики и генной систематики. По результатам сравнения генов и геномов делается заключение о генетическом родстве растений, животных и микроорганизмов. Чем больше имеется отличий в нуклеотидных последовательностях сравниваемых генов, тем дальше в генетическом родстве находятся организмы. Применение молекулярно-генетических методов в настоящее время почти повсеместно признано необходимым для изучения биоразнообразия, разделения видов и уточнения ареалов их распространения.

Несмотря на значительные усилия и большие достижения в этой области, ситуация с изучением биоразнообразия, сложившаяся к настоящему времени, остается сложной. На настоящий момент известно около 1,9 млн видов живых организмов, большая часть из которых была описана за последние 250 лет. По оценкам различных

исследователей, на настоящий момент более или менее описаны только позвоночные животные (около 90% видов) и высшие растения (около 85% видов). Членистоногих описано всего около 25% видов (в том числе 10% насекомых), около 5% грибов и диатомовых водорослей и т.д. [Шнеер, 2007].

Человеческая деятельность приводит к катастрофически быстрому сокращению видового разнообразия, таким образом, есть большая вероятность, что у нас не будет возможности не только исследовать, но даже выявить большую его часть, в случае, если будут использоваться только традиционные морфологические методы. В настоящее время во всем мире насчитывается около 15000 таксономистов-морфологов. При этом существует множество видов, которые могут быть определены лишь 1–2 специалистами во всем мире. Были произведены расчеты, согласно которым, даже если интенсифицировать усилия по выявлению новых видов в 30 раз, для описания существующего биоразнообразия понадобится 25 лет (Woodruff, 2001).

В начале 2000-ных годов возникла инициатива создания интерактивных каталогов (Catalog of Life) с целью обеспечения более широкого и полного доступа к таксономической информации (Bisby, 2000; Godfray, 2002). В это же время группа исследователей заявила, что считает более эффективным решение возникших проблем с помощью ДНК-систематики (Tautz, 2002, 2003). Такое предложение возникло в результате революционных изменений в технологии секвенирования (в данном случае имеются в виду только изменения в технологии секвенирования по Сэнгеру). Секвенирование отдельных фрагментов ДНК в среднем длиной до 1000 п.н. стало общедоступным и достаточно дешевым методом. Решение проблем описания биоразнообразия и систематики с применением только молекулярно-генетических методов стало казаться чрезвычайно заманчивым. Совершенно очевидно, однако, что использование только молекулярно-генетических методов без тесного сотрудничества с систематиками может дать лишь более точную оценку имеющемуся количеству видов, но никак не поможет с их описанием. Существующая на настоящий момент точка зрения на этот вопрос состоит в том, что изучение биоразнообразия должно базироваться как на усилиях специалистов по конкретным группам, так и на применении молекулярно-генетических методов (Шнеер, 2007). Преимущества подобного подхода очевидны, так как отдельно взятые данные о последовательностях ДНК-маркеров представителей тех или иных видов без предварительной точной идентификации

данного вида, проведенного специалистом, малоинформативны (хотя такой способ описания биоразнообразия очень распространен), а применение только морфологических методов не позволяет выявить скрытое биоразнообразие.

В 2003 году был предложен метод «ДНК-штрихкодирования», или метод молекулярного «баркодинга». В основе этого метода лежит предположение, что можно найти участок генома, небольшой по размеру, такой, что его последовательность будет одинакова у особей одного вида и разной у разных видов. Такой участок и называют ДНК-штрихкодом (barcode). Определив последовательность этого участка ДНК у объекта и сравнив его с базой данных (IBOL), в которой находятся сведения о последовательностях этого участка у всех видов, можно сразу определить вид изучаемого объекта. Если последовательность не совпадает ни с одной из имеющихся в базе, это может свидетельствовать об обнаружении нового, ранее не известного вида.

Однако у этого метода существует существенное число недостатков, на которые не без основания указывают его критики. В первую очередь естественно, возражения касаются возможности определения видовой принадлежности организма по фрагменту митохондриального генома. Так как в этом случае необходимо учитывать возможность столкновения с митохондриальной интрогрессией, существования псевдогенов и многое другое. Кроме того, изучение последовательности только митохондриальной ДНК не дает возможность оценить полиморфизм ядерной ДНК, что может быть очень важным при оценке скрытого биоразнообразия. Тем не менее этот метод по-прежнему является основным молекулярно-генетическим методом, применяемым для изучения биоразнообразия.

Применение молекулярно-биологических признаков в систематике и филогении организмов зародилось в конце 70-х годов прошлого столетия. В это время был выбран универсальный маркер для систематических построений – последовательность нуклеотидов гена рибосомной ДНК у эукариот, а усовершенствованные методы секвенирования (определение нуклеотидной последовательности нуклеиновых кислот) и обработки материала стали позволять получать данные в сравнительно короткие сроки. Рибосомальные последовательности присутствуют в геноме в виде многих копий и состоят из нескольких частей, причем одни из них, соответствующие функциональным субъединицам рибосом, оказываются в основном стабильными, эволюционно консервативными, тогда как спейсерные последовательности ITS1 и ITS2, напротив, эволюци-

онно лабильны. Консервативные участки служат для первого этапа полимеразной цепной реакции – присоединения праймеров к исследуемой ДНК-матрице, переменные участки – для идентификации видов. Степень сходства видоспецифичных переменных участков отражает эволюционное родство разных видов. Именно эта важная особенность рибосомальных генов позволяет использовать разные их части для решения таксономических проблем разного ранга (Blaxter, 1998; Nadler et al., 2000; Nguyen et al., 2001). Первая, основанная на молекулярных данных классификационная схема класса Nematoda, появилась уже пять лет назад (Blaxter et al., 1998). Она отражала полученные к тому времени данные по SSU 18S rDNA и существенно отличалась от большинства традиционных систем к ней.

Систематика и филогения получили новый мощный инструмент для своих построений в виде «рибосомальных» и «белковых» древ, а секвенирование практически стало рутинной лаборантской работой. Можно говорить, что в биологии сформировалась новая парадигма – все многообразие форм органического мира есть отображение многообразия ДНК.

Но достаточно быстро проявились несоответствия между многими предложенными филогенетическими древами. И это связано не только с техническим несовершенством секвенса – порой различаются построения, полученные в одной и той же лаборатории. Причины этого сейчас изучаются и анализируются. Все более становится очевидным, что продуктивный путь развития систематики и филогенетики – разработка синтетических схем систематики и филогении организмов, совмещающих морфологические, физиологические и молекулярные данные. Такие подходы стали активно разрабатываться уже с середины 90-х годов прошедшего столетия (Patterson, 1994; Margulis и др., 1996).

Для филогенетических реконструкций на высоком таксономическом уровне используются и другие гены или участки ядерной ДНК, например, фактор элонгации (elongation factor, Ef-1a), гены белков теплового шока, миозинов, гистонов. Сравнивают также вторичные структуры РНК и аминокислотные последовательности белков. На уровне семейств и родов используют анализ митохондриальных генов.

Таким образом, для полноценного применения «молекулярных» методов к решению вопросов таксономии любого крупного таксона требуется как изучение масштаба нуклеотидных различий в пределах входящих в него видов, родов и т. д., так и исследова-

ние факторов, определяющих эти различия, в том числе влияния взаимной удаленности изучаемых популяций («географического» фактора).

Определение понятия «биоразнообразие»

Изучение биоразнообразия является одной из основных задач биологии. Однако в первую очередь необходимо определить, что входит в понятие «биоразнообразие». Согласно современной концепции, биоразнообразие организмов определяется как все многообразие живых организмов из всех сред, включая сухопутные, морские и другие водные экосистемы и составляющие их экологические комплексы; разнообразие внутри видов, между видами и экосистемами (Конвенция о биологическом разнообразии, утвержденная на Конференции Организации Объединенных Наций по окружающей среде и развитию (Рио-де-Жанейро, 3–14 июня 1992 года https://www.un.org/ru/documents/decl_conv/conventions/biodiv.shtml).

При этом выделяют три типа биоразнообразия:

- экосистемы и ландшафты (разнообразие местообитаний);
- разнообразие видов;
- генофонд (генетическое разнообразие).

Генетическое разнообразие, или генетический полиморфизм – разнообразие популяций по признакам или маркерам генетической природы (Ramel, Claes. (1998). Biodiversity and intraspecific genetic variation. *Pure and Applied Chemistry – PURE APPL CHEM.* 70. 2079-2084. 10.1351/pac199870112079.). Генетическое разнообразие представляет собой важный компонент генетической характеристики популяции, группы популяций или вида. Генетическое разнообразие, в зависимости от выбора рассматриваемых генетических маркеров, характеризуется несколькими измеряемыми параметрами (Leffler, 2012):

1. Виртуальная гетерозиготность – π , т.е. доля различий между двумя случайно выбранными генотипами в популяции, на нефункциональный нуклеотидный сайт.

2. Число аллелей на локус.

3. Генетическое расстояние (для оценки межпопуляционного генетического разнообразия).

Нами будут рассмотрены только два вида биоразнообразия, при изучении которых могут применяться молекулярно-генетические методы: разнообразие видов и генетический полиморфизм популяций.

Разнообразие видов. Криптические виды

При изучении видового состава с использованием только морфологических критериев во многих случаях сложно или практически невозможно оказывается разделить, так называемые «криптические виды» (Bickford, 2007). В таком случае применение молекулярно-генетических методов оказывается абсолютно необходимым. Криптическими называются два и более видов, ошибочно описываемые как один вид (имеющие одно название) и, по крайней мере, внешне морфологически неразличимые. (Bicford, 2007). Впервые, впрочем, подобные виды были обнаружены задолго до возникновения молекулярно-генетических методов, более того, они были обнаружены раньше, чем была принята система классификации Линнея.

Криптические виды называют еще видами-двойниками или видами-близнецами. Впервые термин «виды-близнецы» ввел М.Н. Мейер (Мейер, 1963). Термин «криптические виды» возник позднее (Henry, 1985), но считается более правильным, так как некоторые авторы считают возможным употребление термина «виды-близнецы» только для сестринских видов, произошедших непосредственно от одного общего предка. Поскольку криптические виды действительно довольно часто являются сестринскими видами, то в этом случае термины можно считать синонимами, однако многие авторы все же предпочитают термин «криптические виды» (Knowlton, 1986). Кроме того, некоторые авторы разделяют понятия «криптические виды» и «псевдокриптические виды», так как часто обнаружение диагностических морфологических признаков следует за разделением криптических видов с помощью молекулярно-генетических методов. В этом случае виды называют псевдокриптическими» (Saez, 2003).

Внутривидовой генетический полиморфизм

Исследование внутривидового и внутривидового полиморфизма вызывает очень большое количество вопросов. Какие механизмы отвечают за поддержание генетического разнообразия в природных популяциях? Как уровень полиморфизма внутри популяции связан с ее численностью? Насколько низкий уровень генетического разнообразия лимитирует способность к адаптации в изменившихся условиях? Эти вопросы стимулировали развитие современной популяционной генетики и способствовали развитию нейтральной теории молекулярной эволюции-нуль-гипотезы для эволюционной генетики и сравнительной геномики (Kimura, 1968; Kreitman, 1996; Fay, 2003). Наиболее значительные изменения в по-

нимании этого вопроса произошли 40 лет назад на базе исследований аллозимов (Crow, 2008; Lewontin, 1974).

В настоящее время в связи с технологической революцией в секвенировании делаются попытки систематизировать информацию, касающуюся данного вопроса. Так, в работе (Leffler, 2012) сделана попытка сравнения нуклеотидной изменчивости по трем локусам, представителей различных таксонов эукариот. При этом для сравнения использовалась только изменчивость по синонимичным сайтам. Надо сказать, что изменчивость по синонимичным сайтам может тоже не быть нейтральной, существуют данные о влиянии синонимичных замен на стабильность РНК, а также на сплайсинг (Chamary, 2006).

Гипотеза полиморфизма нематод

Надсемейство Trichostrongyloidea Cram, 1927 – одно из самых обширных таксонов в классе Nematoda. Его представители паразитируют у широкого круга хозяев во всех географических зонах. Наиболее крупным в данном надсемействе является семейство Trichostrongylidae Leiper, 1912, в котором одно из первых мест по количеству видов и широте распространения занимает подсемейство Ostertagiinae Lopez-Neyra, 1947.

Для подсемейства Ostertagiinae характерно совместное паразитирование некоторых более многочисленных (major) видов в паре с менее многочисленными (minor) видами. Причем в каждой паре была отмечена существенная корреляция между интенсивностью инвазии этими видами (Drozdz, 1995). Это явление впервые было отмечено в начале 1960 годов. В 1970 годах Друдж продолжил дальнейшее изучение этого феномена и пришёл к заключению, что существует 14 таких пар в пределах пяти родов мажорных форм (*Ostertagia*, *Orloffia*, *Marshallagia*, *Teladorsagia*, *Spiculoptera*) и с четырьмя родами минорных видов (*Skjabinagia*; *Grosspiculagia*; *Rinadia*; *Apteragia*). Так, каждый «вид» *Skjabinagia* при вскрытии жвачных постоянно обнаруживается только совместно с соответствующим мажорным морфом из рода *Ostertagia*. В свою очередь, каждый «вид» *Rinadia* и *Apteragia* постоянно обнаруживается вместе с преобладающими по численности видами рода *Spiculoptera*, а «виды» *Grosspiculagia* встречаются совместно с видами из рода *Marshallagia*. При этом каждая пара имеет сходство в определённых видовых признаках, но различается по признакам рода. Доля мажорных и минорных форм в каждой популяции, как правило, остаётся постоянной для каждой пары. Накопленные данные привели к возникновению гипотезы, что эти пары являются полиморф-

ными формами одного вида, которые различаются морфологически и поэтому были помещены в разные роды (Drozdz, 1995).

Контрольные вопросы

1. *Что изучает молекулярная зоология?*
2. *Каковы место и значение молекулярной зоологии в биологической науке?*
3. *С какими науками связана молекулярная зоология?*
4. *Какие методы используются в молекулярной зоологии?*
5. *Какие преимущества предоставляет молекулярная зоология в сравнении с традиционными методами изучения животных?*
6. *Какие гены и молекулы обычно исследуются в молекулярной зоологии?*
7. *Какие механизмы эволюции можно изучать с помощью молекулярной зоологии?*
8. *Какие вопросы молекулярная зоология помогает решить в области систематики и таксономии?*
9. *Как молекулярная зоология может быть применена в охране животного мира и устойчивому развитию?*
10. *Какие вызовы и проблемы возникают при проведении молекулярных исследований в зоологии?*

Задания для самостоятельной работы

1. *Используя различные литературные источники, выпишите 5 определений понятия «Биоразнообразие». Укажите ссылки на источники.*
2. *Используя различные литературные источники, выпишите 5 определений понятия «Биологический вид». Укажите ссылки на источники.*
3. *Заполните таблицу «История развития Молекулярной зоологии»*

История развития Молекулярной зоологии

№ п\п	Этапы развития Молекулярной зоологии	Ученые, внесшие вклад в развитие Молекулярной зоологии		
		Имя ученого	Направления исследований ученого	Основные труды (год изд.)

4. *Изучите статью или научный отчет, связанный с молекулярной зоологией, и составьте краткое содержание.*
5. *Проведите обзор литературы по выбранной теме в молекулярной зоологии и подведите итоги в виде резюме.*

Глава 2.

Применение молекулярных методов в изучении биоразнообразия животного мира

- *История применения молекулярно-генетических методов для изучения биоразнообразия.*
- *Открытия дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК).*
- *Полимеразная цепная реакция.*
- *Секвенирование.*
- *ДНК-штрихкодирование.*
- *Молекулярные маркеры в зоологии, систематике и филогении.*
- *Ядерные гены.*
- *Митохондриальные гены (ДНК-баркодинг).*

История применения молекулярно-генетических методов для изучения биоразнообразия

Технология аллозимного (изоферментного) анализа начала развиваться с середины 1960-х годов и где-то в середине 1970-х годов заняла прочное место в числе методов, используемых при изучении биоразнообразия и систематики. Можно сказать, что применение молекулярных методов в классических зоологии, ботанике и в популяционной генетике началось с открытия полиморфизма изоферментов. Метод разделения изоформ белков по электрофоретической подвижности использовался для разделения криптических видов и для изучения биогеографии. Метод отличался небольшой стоимостью, скоростью проведения анализа (буквально за один день) и эффективностью. Его достоинством была также возможность проведения одновременного анализа по большому количеству независимых локусов. Основным недостатком метода было то, что негомлогичные белки могли иметь одну и ту же электрофоретическую подвижность. Иногда, в случае слабых или близких друг к другу полос, гели было сложно интерпретировать. Кроме того, было показано, что не все варианты изоформ ферментов могут быть нейтральны. Очень часто изменение электрофоретической подвижности было связано с заменами в аминокислотном составе, что не могло не отражаться на свойствах белков (Avisе, 1994; Poggiine, 1995).

До 1988 г. и начала эры применения ПЦР для амплификации целевого инструмент для молекулярного анализа использовалось крайне редко. В 1989 году вышла работа (Kocher, 1989) в которой описывалась методика быстрой амплификации трех фрагментов ДНК (cytb, 12S и контрольного региона) с использованием в каж-

дом случае своих «универсальных праймеров» с последующим секвенированием и использованием полученных последовательностей для построения филогении. Уже тогда для исследования использовалась митохондриальная ДНК. В 1994 году вышла статья Фолмера (Folmer, 1994) в которой приведены праймеры для амплификации фрагмента гена, кодирующего 1-ю субъединицу цитохромоксидазы, знаменитые теперь «фолмеровские праймеры», используемые для амплификации «фолмеровского фрагмента».

Открытие дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК)

Датой рождения молекулярной биологии принято считать апрель 1953 года, когда в английском журнале «Nature» появилась статья Джеймса Д. Уотсона и Фрэнсиса Крика с предложением пространственной модели молекулы ДНК. Основанием для построения этой модели послужили работы по рентгеноструктурному анализу, в которых участвовали также Морис Х. Ф. Уилкинсон и Розалинда Франклин. Расшифровка структуры ДНК (1953 год) стала одним из поворотных моментов в истории биологии.

За выдающийся вклад в это открытие Фрэнсису Крику, Джеймсу Уотсону и Морису Уилкинсу была присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине 1962 года.

Полимеразная цепная реакция

ПЦР – метод амплификации, т.е. получения большого числа копий нужного гена или его фрагмента в условиях *in vitro*. Реакционная смесь для получения нужной ДНК содержит: исследуемую ДНК-матрицу, субстраты реакции – 4 д. НТФ, 2 праймера, термостабильную Таq-полимеразу и реакционный буфер (кофактор – Mg²⁺). В 1983 году Кэри Мюллис с сотрудниками разработал метод клонирования последовательностей ДНК *in vitro*, который получил название полимеразной цепной реакции (ПЦР).

В 1993 году Кэри Мюллис получил за это Нобелевскую премию по химии, которую он разделил с Кэри Муллисом.

Секвенирование

Дальнейшее развитие молекулярной биологии сопровождалось как развитием её методологии, в частности, изобретением метода определения нуклеотидной последовательности, так и новыми открытиями в области исследований строения и функционирования генов. Секвенирование – метод, который используется в лабораторной практике для определения последовательности ДНК. Впервые этот метод был предложен Фредериком Сэнгером в 1977 году, за что он был удостоен Нобелевской премии по химии в 1980 году.

Молекулярные маркеры в зоологии, систематике и филогении

Молекулярные маркеры (синоним – ДНК-маркеры) – это генетические маркеры, анализируемые на уровне ДНК. Молекулярные маркеры широко используются в популяционной генетике, сравнительной генетике и геномике, в филогенетических исследованиях. Благодаря молекулярным маркерам расширяются возможности медицинской диагностики, появляются новые более точные методы паспортизации пород животных и сортов растений (Банникова, 2004; Сулимова, 2004).

Ядерные гены для молекулярного анализа

Из всего сказанного выше становится очевидным, что невозможно подобрать единый маркер, удовлетворяющий всем требованиям исследователей. Наибольшая точность в определении и разделении видов, определении степени внутривидового и внутривидового полиморфизма, а также для построения филогенетических деревьев достигается при использовании нескольких маркеров. Так, для разделения симпатрических видов необходимо доказать отсутствие скрещивания между ними, что достигается при использовании вместе ядерных и митохондриальных маркеров. Однако можно составить требования к идеальному маркеру (Cruickshank, 2002).

1. Он должен быть представлен в геноме одной копией. В случае использования многокопийных генов, копии которых могут различаться по нуклеотидным последовательностям, а хуже всего, по наличию делеций или вставок (внутренние нетранскрибируемые спейсеры генов, кодирующих рибосомальные РНК, интроны), делает необходимой процедуру клонирования в вектор ПЦР- продукта с последующим секвенированием вставки плазмид из нескольких бактериальных клонов, что делает невозможным масштабный рутинный анализ (Patwardhan, 2014).

2. Так как последовательность гена, использованного в качестве маркера для дальнейшего анализа должна пройти процедуру выравнивания с последовательностями того же гена других организмов, выравнивание должно быть легко осуществимо. Что означает, что анализируемые последовательности должны не очень значительно отличаться по длине и не содержать значительных вставок и делеций. Однако в некоторых случаях можно использовать подобные последовательности, не рассматривая участки со сложным выравниванием или использовать для сравнения получающуюся

юся в результате вторичную структуру (использование тРНК) (Kjer, 1995).

3. Число замен должно быть оптимальным для получения значимой информации. Если ген эволюционирует слишком быстро, это может привести к гомоплазиям, что существенно снизит достоверность полученных результатов. С другой стороны, сравнение близких (или недавно разошедшихся видов) по последовательностям консервативных участков (например, генов, кодирующих рРНК) не даст возможность разделить их по данным генетического анализа (Patwardhan, 2014).

4. Праймеры, используемые для амплификации фрагмента, должны соответствовать консервативному участку гена для того, чтобы можно было амплифицировать изучаемый фрагмент у достаточно далеких в систематическом отношении организмов. Однако они не должны быть слишком «универсальными», так как в противном случае их использование приведет к неспецифической амплификации других участков генома (Yli-Mattila, 2000).

Далее рассматриваются наиболее распространённые ядерные и митохондриальные маркеры:

Ядерные гены, кодирующие рибосомные РНК (рРНК).

Рибосомальные гены рассматриваются как одни из самых «хороших» маркеров, используемых для изучения филогенетических связей между относительно удаленными группами, благодаря своей универсальности и наличию высоко консервативных и переменных доменов [Patwardhan, 2014]. Во всех организмах рибосомы, как известно, состоят из двух субъединиц, малой (18S – у эукариот и 16S – у всех остальных) и большой. У бактерий и археобактерий большая субъединица содержит два варианта: 5S и 23 S рРНК). У эукариот большая субъединица содержит 5S, 5,8S и 25S/28S. Коровые структуры рРНК большой и малой субъединиц содержат, соответственно, 10 и 8 переменных участков. рРНК в среднем, эволюционируют медленнее, чем белоккодирующие гены (Schmidt, 2007).

16S рРНК – один из первых используемых универсальных маркеров. Впервые был применен задолго до эры ПЦР и секвенирования, когда в 1960-х Dubnau с соавторами применили последовательность 16SPHK для анализа видов рода *Bacillus* Cohn, 1872 (Dubnau, 1965). Однако только после классических работ Воэ (Woese, 1987) этот ген стал использоваться для бактериальной таксономии. Последовательность этого гена имеет длину около 1550 п.н. и содержит как переменные, так и консервативные участки с характерными олигонуклеотидными «подписями», уникальными

для различных групп бактерий (Clarridge, 2004). В настоящее время широко используется для метагеномных исследований с применением секвенирования нового поколения (как правило, 4-5-4 секвенирования, при котором достигается большая длина чтения).

5S рРНК – 120-нуклеотидная высоко консервативная последовательность, присутствующая в рибосомах многих организмов, не считая некоторых грибов, части животных и большинства протистов, использовалась для построения филогении растений (Troitskii, 2003). Однако из-за малых размеров надежность и точность подобных построений была очень низка.

28S рРНК – имеет длину более 1000 нуклеотидов. Ее последовательность определена у многих многоклеточных животных. Сравнение ее вторичной структуры и построение филогений на основе этого сравнения – один из основных рутинных инструментов филогенетического анализа. В некоторых случаях используется не полноразмерный ген, а его фрагменты (участок С2-С3 длиной около 400 нуклеотидов) (Schmidt, 2006).

18S рРНК – последовательность полноразмерного гена имеет длину около 1800 нуклеотидов и широко используется для филогенетических построений, а в некоторых случаях для видоидентификации и разделения видов. Впрочем, несмотря на наличие вариабельных участков, близкие виды могут не различаться по этому гену, так как в целом его последовательность достаточно консервативна. В последнее время для филогенетического анализа используются гены как 18S, так и 28S рРНК. Ген 18S рРНК часто используется для метагеномного анализа с целью определения видового состава инфузорий и других простейших.

Несмотря на то, что рибосомальные гены, безусловно, многокопийны, они представляют собой исключение из правила, предписывающего использовать в качестве маркеров только однокопийные гены. Их использование возможно вследствие их высокой консервативности: все копии данных генов одинаковы. На хромосоме гены организованы. Промежутки между генами, кодирующими рибосомальные РНК, называются внутренними транскрибируемыми спейсерами (Internal transcribed spacer, ITS).

ITS являются некодирующими последовательностями, поэтому их полиморфизм значительно выше, чем у рибосомальных и белок-кодирующих генов. Праймеры на них при этом универсальны и могут быть использованы для амплификации соответствующих фрагментов у организмов, принадлежащих почти к любой таксономической группе [Persson, 2000], например, водорослей, высших расте-

ний и беспозвоночных животных, при том, что разработаны они были для грибов, у которых они используются в качестве «молекулярного штрих-кода». Подобная универсальность праймеров связана с тем, что их последовательности соответствуют консервативным последовательностям генов, кодирующих 28S, 18S или 5,8S рНК, соответственно. К недостаткам этих маркеров относится в первую очередь сложность в выравнивании нескольких последовательностей, так как они могут заметно отличаться по длине у разных видов, кроме того, могут содержать делеции и вставки. По этой же причине их не всегда удается использовать, например, для разделения видов, так как ITS, как и гены, кодирующие рНК, многокопийны, но в отличие от рибосомальных генов, один организм может нести несколько копий ITS, отличающихся по длине и содержащих делеции или вставки (Jousson, 2001). Однако, так как это происходит не у всех организмов, во многих случаях удается использовать этот маркер для разделения близких видов. Кроме того, его очень часто используют для определения внутривидовой степени полиморфизма.

Митохондриальная ДНК (ДНК баркодинг)

Митохондриальная ДНК (мтДНК), находящаяся (в отличие от ядерной ДНК) в митохондриях, органеллах эукариотических клеток. Гены, закодированные в мтДНК, относятся к группе плазмогенов, расположенных вне ядра (вне хромосомы). Совокупность этих факторов наследственности, сосредоточенных в цитоплазме клетки, составляет плазмон данного вида организмов (в отличие от генома) (Джинкс, 1966). Последовательности мтДНК привлекают внимание людей как мишень для ДНК-баркодирования. Практически все эукариотические клетки содержат митохондрии, несущие митохондриальный геном. Исключения составляет ряд одноклеточных паразитических форм.

В 2003 году канадский ученый Paul Hebert предложил использовать для видовой идентификации живых организмов короткие стандартные последовательности цепи ДНК (ДНК-штрихкодирование, DNA barcoding). Для баркодирования локусом мтДНК является участок гена субъединицы I митохондриальной цитохром с – оксидазы (COI) длиной в 658 пар оснований (т. н. Фолмеровский участок) (Hebert et al., 2003). В результате Хеберт, которого стали именовать «отцом штрихкодирования» (Marshall, 2005), и его соавторы пришли к заключению, что пригодность ДНК-ШК для идентификации видов и выявления новых, еще не описанных видов, вполне доказана. Было предложено установить правило 10-кратных

различий (10xSST – species-screening threshold) внутривидовой и межвидовой дивергенции по CO1-фрагменту или ориентировочно использовать 2–3% различие последовательностей как пороговое для видов (Hebert, 2004b). Вторым критерием было наличие взаимной (реципрокной) монофилии, т.е. отсутствие перекрывания последовательностей.

Этот метод в настоящее время получил очень широкое распространение, а база данных International Barcode of Life (IBOL, <https://ibol.org/>) постоянно пополняется новыми последовательностями.

Контрольные вопросы

1. *Какие молекулярно-генетические методы используются для изучения биоразнообразия животного мира?*
2. *Каким образом была открыта дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК)?*
3. *Что такое полимеразная цепная реакция и как она применяется в изучении биоразнообразия?*
4. *Что такое секвенирование и как оно помогает в изучении биоразнообразия?*
5. *Что такое ДНК-штрихкодирование и как оно используется для изучения биоразнообразия?*
6. *Перечислите требования к генетическому маркеру.*
7. *Какие наиболее распространённые ядерные и митохондриальные маркеры вам известны?*

Задания для самостоятельной работы:

1. *Опишите историю применения молекулярно-генетических методов для изучения биоразнообразия.*
2. *Объясните, как была открыта дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) и почему она важна для изучения биоразнообразия.*
3. *Напишите принцип работы полимеразной цепной реакции и объясните, как она применяется в исследовании биоразнообразия.*
4. *Расскажите о принципе секвенирования и объясните, как он помогает в изучении биоразнообразия.*
5. *Опишите принцип работы ДНК-штрихкодирования и приведите примеры его применения для изучения биоразнообразия.*
6. *Заполните таблицу*

Молекулярно-генетические методы для изучения биоразнообразия

<i>Молекулярно-генетический метод</i>	<i>Содержание метода</i>
Технология аллозимного анализа	
ПЦР	

Секвенирование	
ДНК баркодинг	

7. Заполните таблицу

Термины молекулярной зоологии

Термин	Определение
ДНК-штрихкод	
	Общее название методов, которые позволяют установить последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК.
Метод молекулярного «баркодинга»	
	Разнообразие популяций по признакам или маркерам генетической природы
Криптические виды	
	Местоположение определённого гена на генетической или цитогенетической карте хромосомы
Генетический маркер	

Глава 3.

Современные разработки систематики животных

- *Наименование и описание таксонов.*
- *Современная систематика и филогенетика многоклеточных беспозвоночных.*
- *Исследование в молекулярной таксономии нематод беспозвоночных животных.*
- *Исследование молекулярной таксономии нематод в Узбекистане.*

Наименование и описание таксонов

К началу XX века в систематике оформилось семь основных таксономических категорий: царство (regnum); тип (phylum); класс (classis); отряд (ordo); семейство (familia); род (genus) и вид (species). Любое животное должно последовательно принадлежать ко всем семи категориям. Часто систематики выделяют дополнительные категории, используя для этого приставки под (sub), инфра (infra) и над (super), например: подтип, инфракласс, надкласс. Такие категории обязательными не являются, то есть при систематизации объекта их можно пропустить.

Современные разработки систематики

В настоящее время принято, чтобы классификация там, где это допустимо, следовала принципам эволюционизма.

С 1960-х развивается направление систематики, называемое «кладистика» (или филогенетическая систематика), которое занимается упорядочиванием таксонов в эволюционное дерево-кладограмму, то есть схему взаимоотношений таксонов.

Сегодня систематика принадлежит к числу бурно развивающихся биологических наук, включая всё новые и новые методы: методы математической статистики, компьютерный анализ данных, сравнительный анализ ДНК и РНК, анализ ультраструктуры клеток и многие другие.

Группы животных

Животные (лат. Animalia) – традиционно (со времён Аристотеля) выделяемая категория организмов, в настоящее время рассматриваемая в качестве биологического царства. Животные являются основным объектом изучения зоологии. Животные относятся к эукариотам (в клетках имеются ядра). Классическими признаками животных считаются: гетеротрофность (питание готовыми органическими соединениями) и способность активно передвигаться. Впрочем, существует немало животных, ведущих неподвижный об-

раз жизни, а гетеротрофность свойственна грибам и некоторым растениям-паразитам. При этом ранее к этому царству относили многих гетеротрофных протистов и делили животных на подцарства: одноклеточные Protozoa и многоклеточные Metazoa. Сейчас название «животные» в таксономическом смысле закрепилось за многоклеточными.

Первичноротые (лат. Protostomia) – таксон многоклеточных животных из группы Bilateria (рис.1). В период зародышевого развития на месте их первичного рта (бластопора) образуется рот или, при щелевидном замыкании бластопора, рот и анальное отверстие. Этим они отличаются от вторичноротых, у которых на месте бластопора образуется анальное отверстие, а ротовое возникает позже в другом месте.

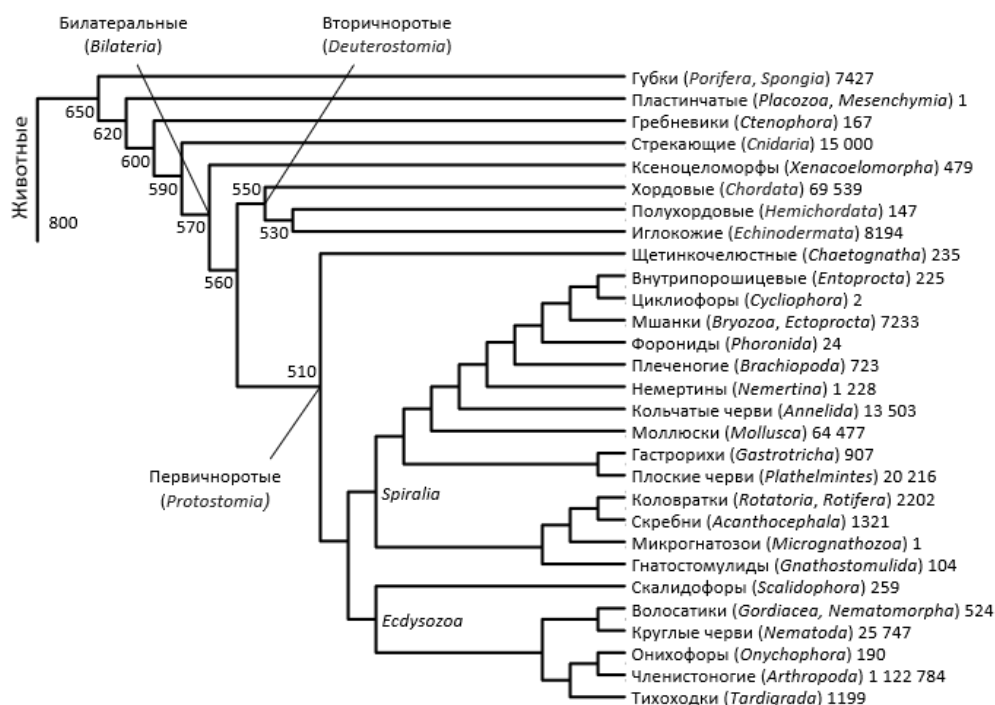


Рис.1. Филогенетическое дерево современных типов животных

Примечание: Цифры в узлах дерева показывают ориентировочное время расхождения филогенетических групп (млн лет) по данным молекулярной филогенетики. Цифры после названий типов обозначают число известных видов.

Спиральные (лат. Spiralia) – огромная группа беспозвоночных животных, включающая моллюсков и кольчатых червей. Группу Spiralia предложил в 1995 году Kenneth M. Halanych на основе молекулярных исследований. Молекулярные данные, например, эволюция маленьких субъединиц рРНК, доказывают монофилию типов этого надтипа.

Вторичноротые (лат. Deuterostomia) – группа многоклеточных животных из группы Bilateria, включает полухордовых, иглокожих и хордовых. Термин введен немецким зоологом К. Гроббеном (1908). У вторичноротых в период зародышевого развития на месте первичного рта (бластопора) образуется анальное отверстие, а собственно рот независимо появляется в передней части тела.

Основные результаты, которые легли в основу теперешней перестройки системы животных, были получены на так называемой малой субъединице рибосомного гена 18S (SSU 18S rDNA).

Исследование молекулярной таксономии нематод

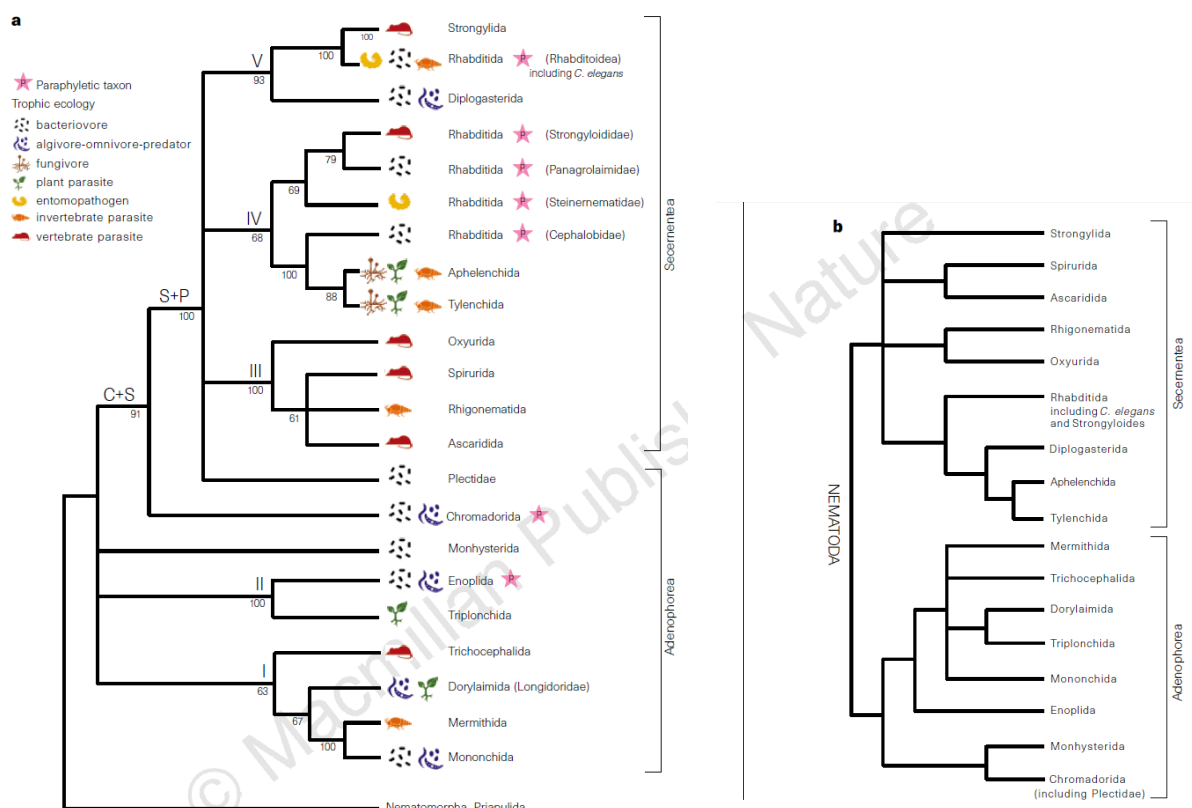
Последние годы продемонстрировали рост числа публикаций по «молекулярной таксономии» нематод. Большая часть этих работ направлена на разработку частных вопросов классификации нематод, и зачастую в них сравнивают близкие популяции или решают другие вопросы внутриродовой систематики (Joyce et al., 1994; Reid, 1994; Hominick et al., 1997; Liu et al., 1997; Reid et al., 1997; Subbotin et al., 2000, 2001). В некоторых исследованиях ставится другая задача: реконструировать эволюцию нематод, воссоздать их филогению и построить надежную классификацию группы (Blaxter et al., 1998; Aleshin, 1998).

Первая, основанная на молекулярных данных классификационная схема класса Nematoda, появилась уже 1998 году (Blaxter et al., 1998). Она отражала полученные к тому времени данные по SSU 18S rDNA и существенно отличалась от большинства традиционных систем. Содержащаяся в этой публикации филограмма отражала только взаимоотношения изученных в молекулярном отношении форм, т.е. видов, для которых были получены последовательности малой субъединицы рибосомального гена (рис.2а,б).

С тех пор число видов с установленными последовательностями SSU 18S rDNA возросло, что, по-видимому, и побудило специалистов по молекулярной таксономии нематод предложить более полную версию. Опубликованная система нематод, как мы понимаем, хотя и является развитием результатов, полученных к 1998 г., представляет все же лишь ее пробный вариант (De Ley, Blaxter, 2002).

В этой системе ранг стронгилид был понижен до надсемейства Strongyloidea Weinland, 1858 в составе отряда Rhabditida Chitwood, 1933. Выделявшиеся в составе стронгилид надсемейства были понижены до семейств, как-то: Strongylidae Baird, 1853; Trichostrongylidae Leiper, 1912; Metastrongylidae Leiper, 1908 и Ancylostomatiidae Looss, 1905. При этом в это же надсемейство этими авторами

включено и семейство Heterorhabditidae Poinar, 1975. Такие изменения ранга для стронгилид стали компромиссом между кладистическим и традиционным подходом и не затронули «внутреннюю» таксономическую структуру семейства Trichostrongylidae.



а) дендрограмма, обобщающая результаты нашего анализа максимального правдоподобия (MP) и ближайших соседей (NJ).

б) кладограмма систематики отрядов и родов класса нематод

Рис.2. Филогенетическая гипотеза класса нематод на основе нуклеотидных последовательностей SSU рДНК.

Позже Chilton et al. (2006) были проведены молекулярно-таксономические исследования нематод отряда Strongylida Railliet et Henry, 1913 на основании изучения участков 18S и 28S рибосомальной ДНК (рис. 3).

Полученные результаты показали, что Strongylida представляет собой монофилетическое сообщество, и только Metastrongylina образуют отдельную монофилетическую кладу.

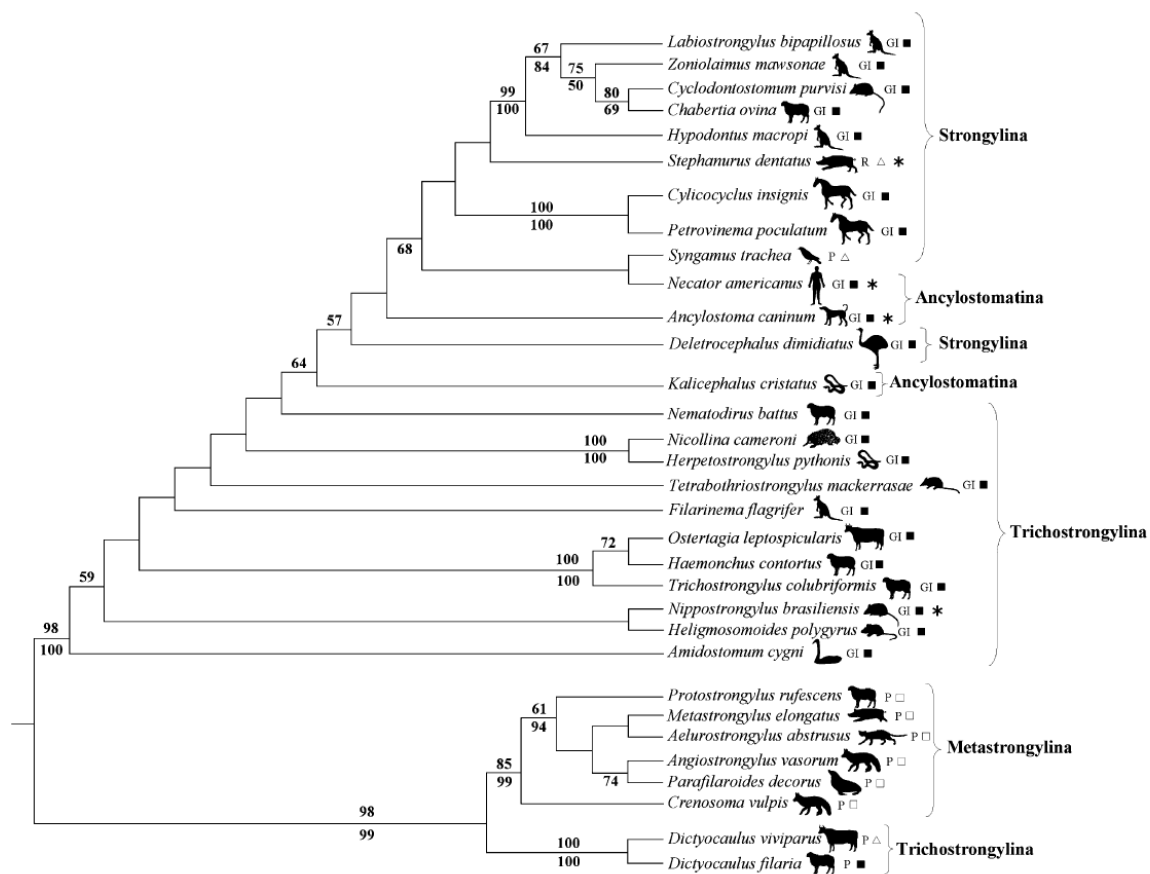


Рис. 3. Molecular phylogeny of the Strongylida modified from Chilton et al. (2006).

Контрольные вопросы:

1. Что такое таксономия?
2. Какие основные разделы входят в таксономию?
3. Какие данные используются при молекулярной таксономии?
4. Какие результаты позволяет получить исследование в молекулярной таксономии?
5. Какие животные относятся к нематодам?

Задания для самостоятельной работы:

1. Изучите информацию о выбранном таксоне и опишите его наименование и описание.
2. Сравните современную систематику и филогенетику многоклеточных беспозвоночных и объясните их связь.
3. Выберите несколько животных из разных таксонов и проведите сравнительный анализ их молекулярной таксономии. Опишите основные различия и схожести между ними.
4. Составьте таблицу, в которой укажите названия различных таксонов многоклеточных беспозвоночных животных и их описание.

Глава 4.

Требования по сбору зоологического материала для молекулярно-генетического анализа. Морфологические исследования

- *Сбор генетических (неинвазивных) проб от зоологических объектов.*
- *Требования по хранению проб в полевых и лабораторных условиях.*
- *Пригодность проб для молекулярных исследований.*
- *Проведение морфологических и таксономических исследований.*

Объекты исследования зоологии – многоклеточные животные (Animalia) и одноклеточные организмы (протисты). В зависимости от размеров исследуемого беспозвоночного животного образцами для молекулярно-генетического анализа могут послужить целые организмы (размером менее 1 см), участки тела, кусочки тканей и внутренних органов. Желательный размер образца – 5 мм × 2–3 мм, масса от 0,1 до 5 г. При сборе материала для молекулярного анализа необходимый образец может быть либо подвергнут глубокой заморозке при –70°С во избежание деструктивных изменений молекулы ДНК, либо зафиксирован в 70% растворе этанола (C₂H₅OH). В случае гибели организма после поимки фиксация образца должна быть произведена не позднее, чем через 20–30 мин. после поимки. Производится стандартное этикетирование сведений об исследуемом экземпляре животного. Фиксация образцов раствором формальдегида непригодна, так как данное вещество оказывает существенное влияние на ДНК, вызывая её деградацию и приводя в конечном итоге к полному или частичному искажению результатов анализа. Фиксированные в 70% растворе этанола образцы беспозвоночных желательно хранить в холодильнике, при его отсутствии – при комнатной температуре в недоступном для света месте. Для хранения используются пробирки (эппендорфы) объемом 1–2 мл.

Для позвоночного животного отбор проб ДНК (крови, ткани, спермы, костной ткани, рога, слюны, шерсти и др.).

Неинвазивный генетический забор

Неинвазивный генетический забор использует образцы ДНК, такие как волосы, экскременты и перья, собранные без наблюдения за животными, для мониторинга редких и уязвимых видов. Это позволяет проводить генетические исследования животных на свободном выгуле без необходимости их отлова. Этот метод введен в

1992 году для получения генетических образцов от бурых медведей в Европе.

Методология обнаружения экскрементов

Цель: получить достаточное количество образцов для оценки размера популяции.

1. Определите площадь исследования для оценки времени об- следования.

2. Разбейте территорию на блоки обследования по частям / всему ареалу.

3. Проведите трансектные обследования – длина зависит от ка- чества среды обитания, рельефа местности, количества присут- ствующих экскрементов.

4. Соберите экскременты, запишите географические координаты, отправьте в лабораторию.

Правила обработки образца

- Малое количество и низкое качество ДНК, которая извлекает- ся из образцов фекалий, чрезвычайно сложно использовать в гене- тическом анализе.

- Избегайте контаминации при заборе!
- Используйте хороший лабораторный метод.
- Проверка на соответствие и гарантия качества.
- Используйте перчатки и стерильные инструменты.
- Избегайте смешения образцов, которые могут быть от двух особей.

- Ищите свежие образцы, но старые тоже можно использовать.

Правила отбора проб в поле

- Подготовьте новую пробирку для забора пробы.
- Определите GPS локацию.
- Заполните форму с данными.
- Наденьте новые перчатки.
- Отломите (срежьте) кусочек с внешней части фекалий и по- ложите в пробирку с силикагелем.
 - Не сжимайте фекалии.
 - Простерилизуйте приборы.
 - Утилизируйте перчатки.
 - Храните пробирки в темном, сухом месте.

Работа с экскрементами

- Наибольшая концентрация генетического материала находит- ся на внешней поверхности экскрементов, которые были в прямом контакте с эпителиальными мембранами животного.

- В случае с дикими животными обычно собираются кусочки фекального материала, который фиксируют в силикагеле или в этаноле.

- Срезается внешняя часть фекального материала, чтобы максимизировать количество ДНК хозяина и свести к минимуму попадание экзогенной ДНК

- Большинство наборов для экстракции ДНК требуют максимум 0,80–1,20 г фекального материала (может быть и меньше для снежного барса!)

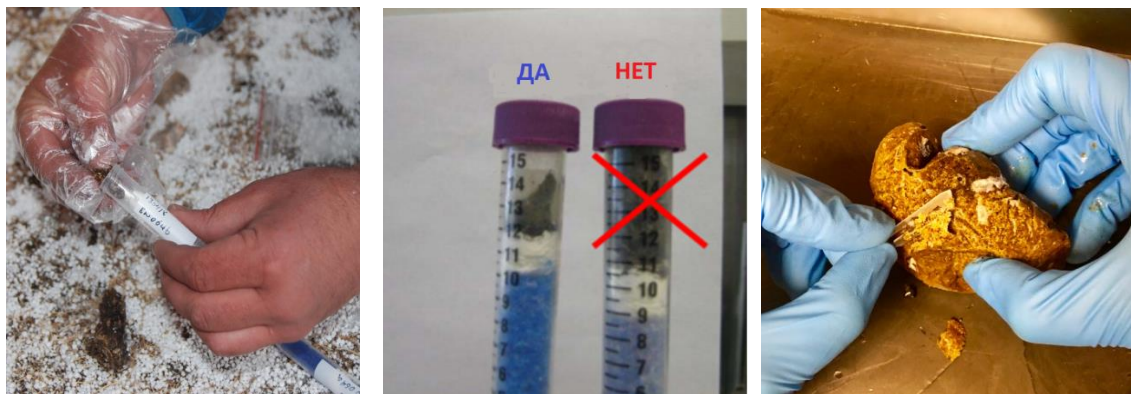


Рис. 5.

Неправильный сбор материала!



Рис.6.

Правила в лаборатории:

- *Необходимо иметь специально выделенные места для работ до- и после выделения ДНК для предотвращения контаминации.*
- *Очистка рабочего места после взятия образца на всех этапах.*
- *График лабораторных работ для предотвращения порчи продуктов.*

Контрольные вопросы

- 1. Какие методы можно использовать для сбора генетических (неинвазивных) проб от зоологических объектов?*
- 2. Какие требования должны выполняться при хранении проб в полевых условиях?*
- 3. Какие требования должны выполняться при хранении проб в лабораторных условиях?*
- 4. Почему важно, чтобы пробы были пригодными для молекулярных исследований?*
- 5. Какие методы используются для проведения морфологических и таксономических исследований зоологического материала?*
- 6. Какая роль морфологических и таксономических исследований в молекулярно-генетическом анализе зоологического материала?*

Глава 5.

Выделение геномного ДНК от зоологических объектов

- *Стандартный фенол-хлороформный метод.*
- *Метод выделения ДНК с помощью набора реагентов Diatom DNA Prep 200 (Россия).*
- *Роботизированная система для автоматического выделения ДНК.*
- *Преимущества и недостатки вышеуказанных методов.*

Выделение геномной ДНК

Процедура выделения ДНК из тканей часто является исходным (основным) этапом в исследовании живого организма на молекулярном уровне. Многие приложения, такие как амплификация, проведение обратной транскрипции, детектирование накопления продуктов амплификации методом ПЦР в реальном времени, клонирование, секвенирование, гибридизация, синтез ДНК и т.д. не могут быть выполнены непосредственно на биологических образцах без предварительной очистки нуклеиновых кислот.

Выделение (экстракция) нуклеиновых кислот эукариот сопряжено с определенными трудностями, связанными с особенностями молекулярной структуры ДНК и РНК, их функциями и внутриклеточной локализацией. Для выделения геномной ДНК клетку необходимо разрушить тем или иным способом, а ДНК очистить от других клеточных компонентов. Прежде всего, нужно отделить ДНК от белков, входящих в состав нуклеопротеидных комплексов хроматина. При этом важно защитить ДНК от действия нуклеаз и максимально сохранить ее целостность, поскольку длинные линейные молекулы ДНК при их изоляции из клетки неизбежно фрагментируются.

Фенол-хлороформный метод (ФХ-метод) – это классический метод выделения нуклеиновых кислот. Он включает лизис биологического материала детергентами в присутствии протеиназы К и экстракцию нуклеиновых кислот с помощью фенола и хлороформа. Достоинством этого метода является более высокий выход ДНК по сравнению с набором реагентов Diatom DNA Prep (Россия), к недостаткам можно отнести длительность, трудоемкость, использование агрессивных органических растворителей и недостаточную очистку ДНК как от белков, так и от РНК.

Задание 1. Выделения ДНК из образцов животного с помощью набора реагентов Diatom DNA Prep 200 (Россия).

Этот набор представляет собой один из методов экстракции нуклеиновых кислот с помощью коммерческих наборов реагентов. Этот набор позволяет выделять ДНК из различных природных материалов, а также проводить быструю очистку ДНК из клинических проб. От ФХ-метода данный способ отличается быстротой (0,5–1,5 ч. на одну пробу), отсутствием токсичных реагентов. Принцип действия основан на использовании лизирующего реагента с гуанидинтио-цианатом, который предназначен для лизиса клеток, солюбилизации клеточного дебриса, а также для денатурации клеточных нуклеаз. В присутствии лизирующего реагента ДНК активно сорбируется на поставляемом в наборе NucleoS-сорбенте, а затем легко отмывается от белков и солей спиртовым раствором. ДНК, элюированную из сорбента, можно использовать для ПЦР.

Состав набора: лизирующий реагент, солевой буфер, суспензия сорбента NucleoS, суспензия смеси ионообменников «ЭкстраГен» (рис. 7).



Рис.7. Набор Diatom DNA Prep 200

Методика экстракции ДНК из тканей нематод с помощью Diatom DNA Prep 200 состоит из следующих этапов:

1. Готовят рабочий раствор солевого буфера согласно инструкции.
2. От тела нематод отрезают кусочек ткани массой 0,05 г (желательно головной части нематод, хвостовая часть необходима для видовой идентификации) и растирают её в 800 мкл лизирующего реагента, переносят смесь в чистую пробирку, перемешивают переверачиванием 5–10 раз.
3. Термостатируют смесь в течение 5–7 мин при 65°C.
4. Центрифугируют при 5000 об/мин в течение 10 сек.

5. Супернатант переносят в чистую пробирку, добавляют к нему 20–40 мкл предварительно гомогенизированной суспензии NucleoS.

6. Перемешивают при 10–20 об/мин в течение 10 мин и центрифугируют пробирку при 5000 об/мин в течение 10 сек. и удалить супернатант.

7. К осадку добавляют 400 мкл лизирующий реагент и интенсивно перемешивают на вортексе до гомогенного состояния.

8. К смеси добавляют 1 мл рабочего раствора Солевого буфера перемешивают 5–10 раз, центрифугируют при 5000 об/мин в течение 10 сек, а затем удаляют супернатант.

9. Повторяют предыдущий пункт.

10. Подсушивают осадок при температуре 65°C в течение 4–5 мин.

11. Вносят 50–100 мкл суспензии «ЭкстарГен» и перемешивают до гомогенного состояния, затем термостатируют 5 мин при 65°C и снова перемешивают.

12. Центрифугируют при 10000 об/мин в течение 1 мин.

13. Отбирают супернатант в чистую пробирку, хранят при –20°C.

Концентрация экстрагированной ДНК составляет 0,12–0,17 мкг/мкл.

ДНК, выделенную «быстрым» ФХ-методом, зачастую необходимо очищать от оставшихся белков и углеводов. Это можно сделать суспензией NucleoS из набора реагентов Diatom, начиная работу с пункта 5 методики.

Некоторые автоматизированные приборы с использованием магнитных частиц уже применяются для подготовки образцов в лабораториях.

MagPurix 12s – это компактная настольная роботизированная система для автоматического выделения НК производства компании Zinexts (Тайвань) (рис.8). (<http://www.skygen.com/zinexts/>).

Для выделения НК при помощи системы MagPurix 12s требуется выполнить 3 простых шага:

1. Загрузить образцы, картриджи с реагентами и расходные материалы в прибор.

2. Ввести протокол при помощи сканера штрих-кодов и нажать кнопку «Start». Система автоматически выполнит выделение НК.

3. Достать из прибора пробирки с автоматически собранными растворами НК.

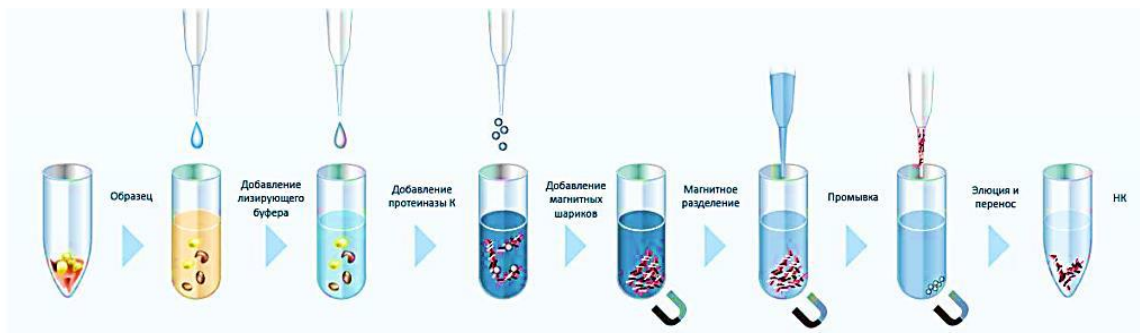


Рис. 8. Этапы автоматического выделения НК при помощи системы MagPure 12s. Выделение нуклеиновых кислот основано на методе разделения веществ при помощи магнитных шариков.

Контрольные вопросы:

1. Какая процедура является исходным этапом в исследовании живого организма на молекулярном уровне?
2. Какие приложения требуют предварительной очистки нуклеиновых кислот?
3. Почему многие приложения не могут быть выполнены непосредственно на биологических образцах?

Задания для самостоятельной работы:

1. Опишите стандартный фенол-хлороформный метод выделения геномной ДНК.
2. Перечислите преимущества и недостатки метода выделения ДНК с помощью набора реагентов Diatom DNA Prep 200.
3. Изучите роботизированную систему для автоматического выделения ДНК и опишите ее принцип работы.
4. Сравните преимущества и недостатки трех вышеперечисленных методов выделения ДНК.

Глава 6.

Основные понятия полимеразной цепной реакции.

ПЦР-амплификация

- Основные понятия ПЦР метода.
- Выбор оптимальных маркеров для ПЦР.
- Проведение ПЦР-амплификации.
- Режим ПЦР.

Основные понятия метода ПЦР-амплификации

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – метод амплификации *in vitro*, с помощью которого за короткое время можно выделить и размножить определенную последовательность ДНК в количестве, превышающем исходное в сотни тысяч раз (Mullis, Faloona, 1987). Суть метода – многократное копирование (амплификация) в пробирке определенных участков ДНК в процессе повторяющихся температурных циклов. На каждом цикле амплификации синтезированные ранее фрагменты вновь копируются ферментом ДНК-полимеразой, и происходит многократное увеличение количества специфических фрагментов ДНК (Болдырева, 2005).

Области применения ПЦР: высокоэффективное клонирование геномных последовательностей (Scharf et al., 1986), прямое секвенирование митохондриальной и геномной ДНК (Wong et al., 1987), анализ вариаций нуклеотидных последовательностей и выявление возбудителей заболеваний (Kwok et al., 1987).

Для проведения полимеразной цепной реакции необходимо наличие в реакционной смеси ряда компонентов (Саики и др., 1990):

Два праймера – искусственно синтезированные олигонуклеотиды, размером от 15 до 30 п.н., комплементарные соответствующим участкам ДНК-мишени.

Требования к нуклеотидной последовательности праймера:

1. Отсутствие внутренней вторичной структуры;
2. Сбалансированный состав нуклеотидов Г/Ц, А/Т и равномерное распределение Г/Ц, А/Т по всей последовательности;
3. Отсутствие комплементарности между 3'-концами для предотвращения образования димеров праймеров.

Оптимальная концентрация праймеров 0,1–0,5 мкМ. Более высокая концентрация праймеров может приводить к неспецифическому отжигу праймера и накоплению неспецифических продуктов ПЦР-амплификации.

Термостабильная ДНК-полимераза (Taq-полимераза). Общее свойство ДНК-полимераз – способность вести матричный синтез нуклеиновых кислот в направлении 5'→3'. Большинство ДНК-полимераз обладают также 3'→5' экзонуклеазной (корректирующей) активностью, предназначенной для удаления ошибочно присоединенных нуклеотидов. Обычно для проведения реакции достаточно 0,5-2,5 единиц термостабильной полимеразы из *Thermus aquaticus* (Taq-полимеразы). Иногда увеличение концентрации фермента приводит к уменьшению специфичности.

Смесь 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов (дНГФ – дАТФ, дГТФ, дЦТФ и дТТФ) – используются Taq-полимеразой для синтеза второй цепи ДНК. Несбалансированная смесь дНТФ (концентрация всех дОТФ не одинакова) уменьшает точность работы ДНК-полимеразы. Высокие концентрации дНГФ уменьшают концентрацию свободных ионов Mg²⁺, что сказывается на активности ДНК-полимеразы и снижению температуры отжига праймеров.

Буфер – смесь катионов и анионов в определенной концентрации, обеспечивающих оптимальные условия для реакции: стабильное значение рН и ионную силу раствора.

Анализируемый образец – подготовленный к внесению в реакционную смесь препарат, который содержит искомую ДНК, служащую мишенью для последующей ПЦР-амплификации.

Ионы Mg²⁺ – необходимы для работы Taq-полимеразы. Диапазон рабочих концентраций: 0,5-5,0 мМ (10 мМ – ингибирует ДНК-полимеразу на 40-50%). Увеличение концентрации Mg²⁺ оказывает очень сильное влияние на специфичность и эффективность полимеразной цепной реакции: увеличивается выход ПЦР-продуктов, но снижается специфичность гибридизации праймеров. Оптимальная концентрация Mg²⁺ зависит от нуклеотидной последовательности ДНК-матрицы и праймеров. Mg²⁺ образует комплексы с дНТФ – именно эти комплексы являются субстратом для Taq- полимеразы. С Mg²⁺ стехиометрически связываются дНТФ, РРi (свободный пирофосфат), ЭДТА, РО4. Повышение концентрации Mg²⁺ вызывает повышение температуры плавления ДНК, что приводит к уменьшению точности гибридизации праймеров.

Циклический температурный режим – это ряд событий, обеспечиваемых определенными температурными параметрами, в процессе реакции ПЦР-амплификации в анализируемом образце с искомой ДНК. Каждый цикл амплификации состоит из трех этапов (Рыбчин, 2002):

1. *Денатурация*. Реакционную смесь нагревают до 95°C, в результате чего двухцепочечные молекулы ДНК расплетаются (денатурируются, плавятся) с образованием двух одноцепочечных молекул.

2. *Отжиг* (присоединение, гибридизация праймеров). Праймеры присоединяются к одноцепочечной ДНК-мишени. Присоединение прямого и обратного праймеров происходит комплементарно к соответствующим последовательностям на противоположных цепях ДНК на границах целевого специфического участка. Для каждой пары праймеров существует своя температура отжига, значения которой обычно располагаются в интервале 50–65°C. Время отжига 20–60 сек.

3. *Элонгация* (синтез ДНК). Комплементарное достраивание цепей ДНК происходит от 5'-конца к 3'-концу цепи в противоположных направлениях. Праймеры служат затравками для инициации синтеза ДНК. Материалом для синтеза новых цепей ДНК служат добавляемые в раствор 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфаты. На этом этапе температуру в реакционной смеси доводят до оптимума работы Taq-полимеразы 72°C.

Время элонгации выбирают в зависимости от длины амплифицируемого фрагмента ДНК и скорости работы (эффективности) ДНК-полимеразы. Обычно расчёт времени элонгации проводят по формуле $T(\text{элонгация}) = 1 \text{ минута (т.п.н. ДНК)}$.

Температурный цикл амплификации многократно повторяется (25 и более раз). На каждом цикле количество синтезированных копий фрагмента ДНК удваивается. Результатом циклического процесса является экспоненциальное увеличение количества специфических фрагментов ДНК. Однако на практике эффективность ПЦР-амплификации ниже теоретического максимума за счёт амплификации неспецифических фрагментов ДНК и истощении компонентов реакции (Mullis, Faloona, 1987).

Завершающая достройка. Обычно после последнего цикла ПЦР-амплификации реакционную смесь инкубируют дополнительно в течении 5-15 мин при 72°C для достройки частично синтезированных продуктов ПЦР (Саики и др., 1990).

«*Горячий старт*» (от англ. «hot-start») – это подход, применяемый для уменьшения риска образования неспецифических продуктов реакции ПЦР-амплификации. Его суть состоит в предотвращении возможности начала реакции до момента достижения в пробирке условий, обеспечивающих специфический отжиг праймеров (Щелкунов, 2004).

В зависимости от ГЦ-состава и размера, праймеры имеют определенную температуру плавления, при которой образование водородных связей нестабильно. Если температура системы превышает температуру плавления, праймер не в состоянии удерживаться на цепи ДНК и денатурирует. При соблюдении оптимальных условий, то есть температуры отжига, близкой к температуре плавления, праймер образует двухцепочечную молекулу только при условии его полной комплементарности и таким образом обеспечивает специфичность реакции. Один из вариантов реализации «горячего старта» – внесение пробирок в лунки термоциклера во время этапа первичной денатурации (Саики и др., 1990).

В этом случае, даже если неспецифический отжиг произошел до начала температурного циклирования, элонгации не происходит, а при нагревании комплексы праймер-ДНК денатурируют, поэтому неспецифические продукты не образуются. В дальнейшем температура в пробирке не опускается ниже температуры плавления, что обеспечивает образование специфического продукта амплификации (Щелкунов, 2004).

Положительный контроль позволяет удостовериться, что все компоненты, входящие в состав реакционной смеси, обеспечивают нормальное прохождение реакции. Для этого используют препарат ДНК, содержащий сайты для отжига праймеров: например, ДНК искомого организма или клонированные специфические участки его генома.

Контаминация – попадание из внешней среды в реакционную смесь специфических и неспецифических молекул ДНК, способных служить мишенями в реакции амплификации и давать ложноположительные или ложноотрицательные результаты.

Отрицательные контроли проводят, чтобы удостовериться в отсутствии контаминации в каждой серии экспериментов. В качестве отрицательных контролей рекомендуется использовать бидистиллированную воду (или Milli Q H₂O) вместо анализируемого образца.

Для разрушения чужеродной ДНК в реакционной смеси пробирку с реакционной смесью (без ДНК матрицы) подвергают воздействию ультрафиолетовой радиации в течение 10 мин.

Источниками заноса в реакционную смесь посторонней матрицы могут выступать:

- Лабораторное оборудование и пипетки, на которых могут оставаться следы случайной ДНК, оставшиеся после её выделения этим оборудованием;

- Перекрестная контаминация между образцами;
- Продукты предыдущей ПЦР.

Чтобы исключить контаминацию и уменьшить число ложноположительных результатов следуйте следующим правилам, принятым в лабораториях, где проводят ПЦР:

- Разделите рабочие места, где Вы готовите матрицу для ПЦР, непосредственно проводите ПЦР и делаете анализ продуктов ПЦР.

- Смешивайте смеси для ПЦР в ламинарном шкафу или изолированном боксе, оборудованным УФ лампой. Там же держите микроцентрифугу, перчатки и другое необходимое для ПЦР оборудование, которое будет использовано только для ПЦР.

- Используйте специальные наконечники для пипеток с пористым фильтром и набор пипеток, который будет использоваться только для ПЦР.

- Используйте стерильные материалы и только новые перчатки, когда Вы готовите постановку ПЦР.

- Для подготовки ПЦР и матрицы для ПЦР используйте новые, ни разу неиспользованные, материалы (пластик, наконечники). Никогда не пользуйтесь мытыми и бывшими в употреблении материалами.

- Если реактивами для постановки ПЦР пользуются несколько человек, разделите исходные реактивы по аликвотам для каждого пользователя.

Выбор оптимальные маркеры

Из всего сказанного выше становится очевидным, что невозможно подобрать единый маркер, удовлетворяющий всем требованиям исследователей. Наибольшая точность в определении и разделении видов, определении степени внутривидового и внутривидового полиморфизма, а также для построения филогенетических деревьев достигается при использовании нескольких маркеров, которые приведены выше (урок 3).

Ядреные, т.е. рибосомные гены, также являются лучшими среди маркеров благодаря своей универсальности и высокой консервативности и вариабельности доменов и используются для изучения филогенетических взаимоотношений также относительно отдаленных групп (рис. 9). Во всех организмах рибосомы встречаются в основном в двух вариантах: малые (SSU) 16S, 18S и большие (LSU) 5S, 5,8S и 25S/28S субъединицы (Kjer, 1995).

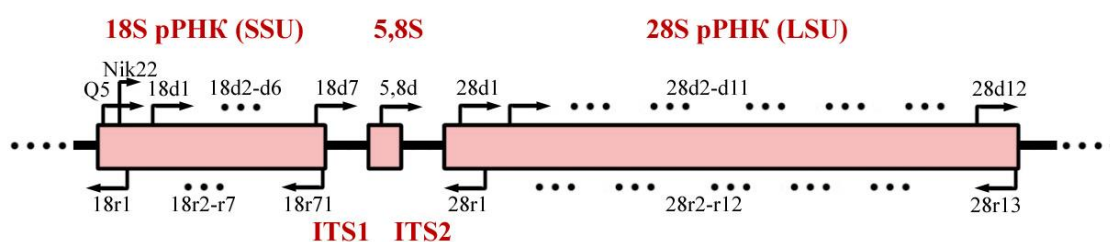


Рис.9. Универсальная схема рибосомного оперона

*Стрелками обозначены направления амплификации с приведённых праймеров;
 18S – малая субъединица рибосомной РНК;
 28S – большая субъединица рибосомной РНК;
 ITS – внутренний транскрибируемый спейсер

ПЦР-амплификация

Амплификация фрагмента гена 18S рРНК проводится с использованием универсальных эукариотических праймеров (James et al., 2006) по стандартной методике (Sambrook et. al., 2001).

Проведение ПЦР-амплификации.

1. Перед началом работы разморозьте все компоненты реакции, кроме ДНК-полимеразы (таб. 1), и поместите их на лед для временного хранения.

Таблица 1. Состав реакционной смеси для ПЦР

Компоненты реакции	Объем, мкл
10X Taq-буфер	5
2,5 mM MgCl ₂	5
0,2 мкМ 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфаты	1
20 мкМ праймер прямой*	1
20 мкМ праймер обратный*	1
Матрица ДНК	2
Taq-полимераза 5 ед/мкл	0,2
Бидистиллированная H ₂ O	34,8
Конечный объем реакции	50

*название и последовательности праймеров показаны в табл. 2. Праймеры синтезировала компания Синтол (Россия).

0,2 мл пробирку поместите на лед, добавьте 34,8 мкл бидистиллированной воды, 5 мкл 10X Таq-буфера, 5 мкл 2,5 mM MgCl₂, 1 мкл 2 мкМ 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов, по 1 мкл прямого и обратного праймеров (таб. 2), 2 мкл матрицы ДНК, 0,2 мкл Таq-полимеразы, конечный объем составит 50 мкл.

Таблица 2. Специфичные праймеры для амплификации фрагмента гена 18S рРНК

Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5'→3'
Универсальный эукариотический прямой праймер 18S (F)	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA
Универсальный эукариотический обратный праймер 18S (R)	CTGGTTGAT(CT)CTGCCAGT

2. Реакционную смесь в 0,2 мл пробирке перемешайте на вортексе и осадите капли на микроцентрифуге 15 сек при максимальных оборотах (13,3 тыс. об/мин).

3. Установите программу термоциклера (таб. 3).

Таблица 3. Режим ПЦР-амплификации фрагмента гена 18S рРНК

Реакция (Программа)	Этапы	Температура (°C), число циклов	Время
АК	Предварительная денатурация	94	5 мин
	Денатурация	95	35 циклов
	Отжиг	60	
	Элонгация	72	
	Достройка цепей	72	5 мин

4. Поместите пробирку с реакционной смесью в лунку термоциклера, плотно закройте крышку термоциклера.

5. После окончания ПЦР-амплификации, образцы можно проанализировать методом электрофореза в агарозном геле. Хранить амплифицированный образец необходимо при -20°C .

Контрольные вопросы:

1. Что такое полимеразная цепная реакция (ПЦР)?
2. Какие оптимальные маркеры выбираются для проведения ПЦР?
3. Что такое режим ПЦР и какие основные составляющие входят в него?

Задания для самостоятельной работы:

1. Опишите основное назначение и принцип работы полимеразной цепной реакции (ПЦР).
2. Поясните, как выбирают оптимальные маркеры для проведения ПЦР.
3. Проведите сравнительный анализ режимов ПЦР (например, температурный режим, время денатурации, отжига и элонгации) и объясните, как они влияют на результат амплификации ДНК.

Глава 7.

Основные понятия метода электрофореза в агарозном геле. Очистка рибосомного ядерного ДНК

- Основные понятия метода электрофореза.
- Приготовление агарозного геля.
- Проведение электрофореза ПЦР-продуктах.
- Измерение концентрации ДНК.
- Очистка и выделение ДНК с использованием наборов колонок для очистки ДНК.

Электрофорез ДНК – аналитический метод, используемый для разделения, идентификации и очистки фрагментов ДНК. Электрофорез ДНК проводится в горизонтальном направлении (Остерман, 1996).

Сахарофосфатный остов молекул ДНК заряжен отрицательно, поэтому цепи ДНК двигаются от *катода*, заряженного отрицательно, к положительному *аноду* под действием сил электрического поля. Более длинные молекулы мигрируют медленнее, так как задерживаются в геле, более короткие молекулы двигаются быстрее (Маниатис и др., 1984).

Для визуализации результата в расплавленную агарозу вносят флуоресцентный краситель бромистый этидий, который интеркалирует между азотистыми основаниями дуплекса и флюоресцирует в УФ-лучах (Dretzen et al., 1991).

Для анализа размеров полученных ДНК-фрагментов используют ДНК-маркеры – линейные фрагменты ДНК известной длины.

Большое значение имеет напряжение электрического поля, с увеличением которого понижается эффективность разделения. Для достижения максимальной эффективности разделения фрагментов ДНК напряженность не должна превышать 5 вольт на сантиметр геля (Girvitz et al., 1990).

В состав геля входят: 1X TAE (рН 8,1), агароза, бромистый этидий. В зависимости от процентности геля добавляется разное количество его компонентов. Процентность геля выбирается в зависимости от длины разгоняемых в нем фрагментов ДНК (таб. 4). Для анализа фрагментов гена 18S рРНК (длина около 600 п.н.) оптимально подходит 2% агарозный гель.

Таблица 4. Соотношение концентрации агарозы в геле и оптимального размера анализируемых фрагментов ДНК

Концентрация агарозы в геле (%)	Размер фрагментов ДНК (Кб)
0,3	50–60
0,6	1–20
0,7	0,8–10
0,9	0,5–7
1,2	0,4–6
1,5	0,2–3
2,0	0,1–2

Приготовление агарозного геля и проведение электрофореза ПЦР-продуктов

1. До заливки геля в ванне для электрофореза установите гребенки из оргстекла для создания лунок для нанесения образцов. Гребенки установите так, чтобы нижняя часть зубцов гребенки располагалась в 2 мм от основания геля общим объемом 50 мл (для геля, объемом 150 мл расстояние от основания геля до нижней части зубцов гребенки – 1 мм) (рис. 4,5).

2. Для приготовления 50 мл 2% агарозного геля добавьте 50 мл 1X ТАЕ и 1 г агарозы. 1X ТАЕ готовится из раствора ТАЕ с исходной концентрацией 50X (Трис, 0,5М ЭДТА pH 8,0, ледяная уксусная кислота).

3. Навеску агарозы растворите в 1X ТАЕ с помощью нагревания до кипения таким образом, чтобы раствор стал гомогенным, то есть не содержал нерастворенных частиц агарозы.

4. После этого раствор охладите примерно до 50°C, добавьте 0,5 мкл бромистого этидия.

5. Залейте весь объем геля в ванну для электрофореза. После того, как гель застыл (30-45 мин при комнатной температуре), осторожно удалите гребенки и залейте ванну для электрофореза буфером 1X ТАЕ до тех пор, пока гель не окажется погруженным в раствор полностью.

6. Смешайте пробы с буфером для нанесения 6X Loading Dye (состоит из: 4% оранжевого G, 0,03% бромфенолового синего, 0,03% ксилен-цианола FF, 15% Фиколла 400, 10 mM трис-HCl pH 7,5 и 50 mM ЭДТА pH 8,0) так, чтобы его итоговая концентрация в пробе для нанесения была 1X и микропипеткой внесите их в лунки агарозного геля под электрофорезный буфер.

7. Для анализа размеров полученных ДНК-фрагментов в одну из лунок добавьте 2,5 мкл ДНК-маркера *DirectLoadrM Wide Range DNA Marker*.

8. Разделение ДНК проводите при напряженности не выше 5 вольт на сантиметр геля.

9. После окончания электрофореза гель просмотрите в УФ-свете на трансиллюминаторе и сфотографируйте системой регистрации результатов электрофореза.

Внимание! Во избежание повреждения сетчатки глаз ультрафиолетовым излучением наблюдать зоны ДНК следует только через защитное стекло из комплекта трансиллюминатора или защитные (стеклянные) очки.

В качестве примера на рисунке 5 показан анализ продуктов ПЦР, который показал амплификацию ДНК фрагмента гена 18S рРНК во всех 4 образцах. Длина амплифицированной нуклеотидной последовательности фрагмента гена 18S рРНК составляет приблизительно 500 п.н.

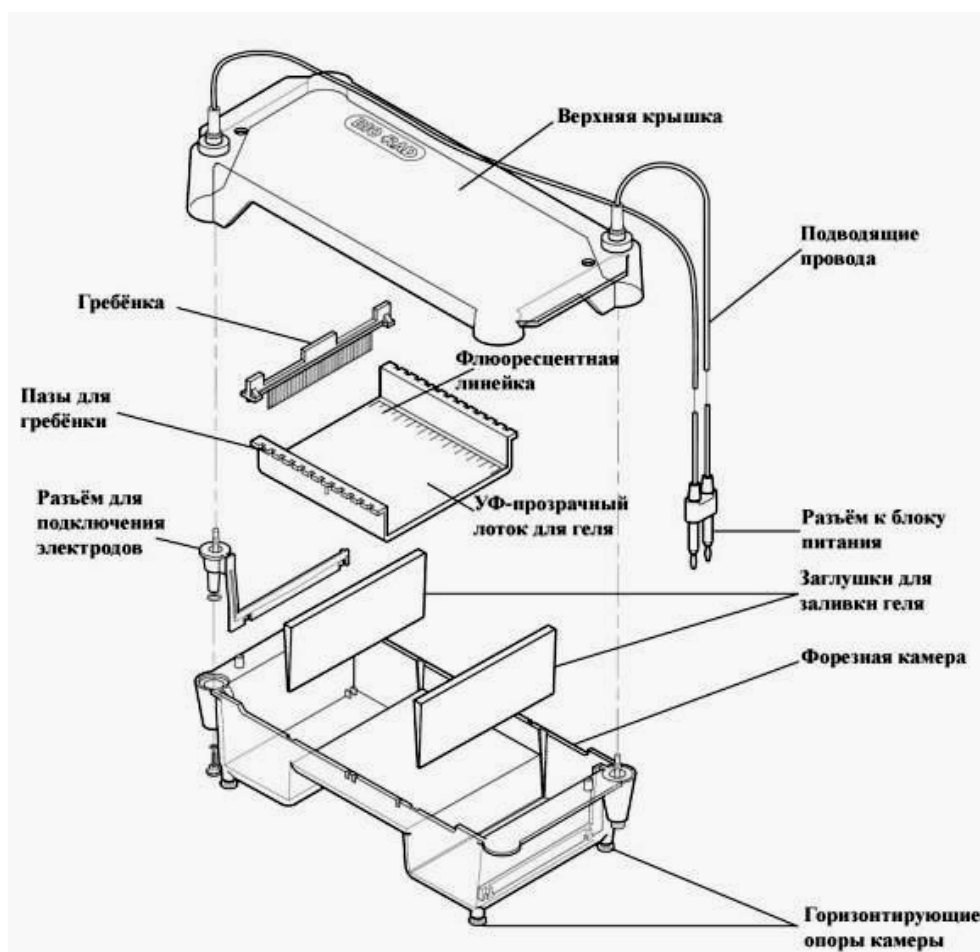


Рис. 4. Основные элементы установки для проведения горизонтального электрофореза в агарозном геле

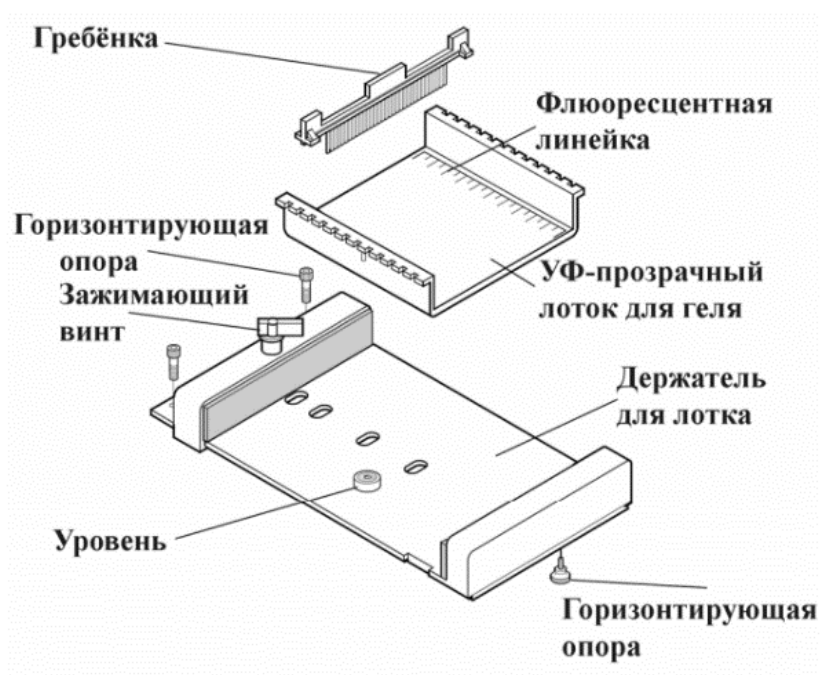


Рис.5. Лоток и подставка для заливки геля

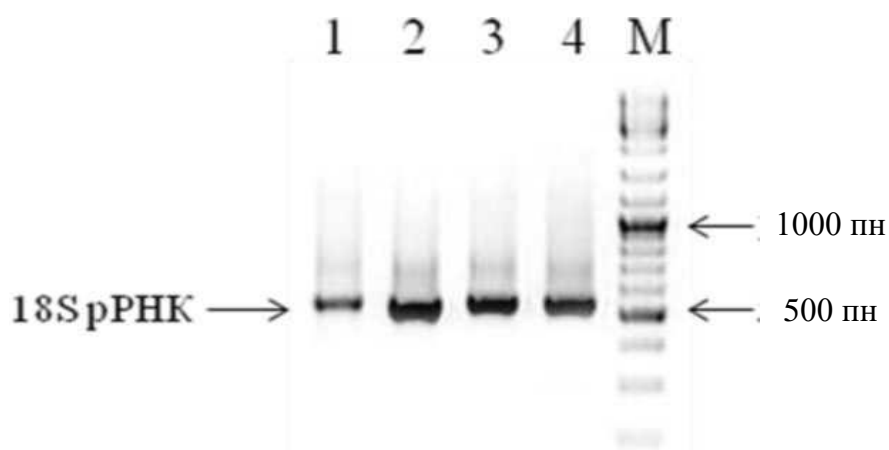


Рис. 6. Анализ ПЦР-амплификации фрагмента гена 18S рРНК при помощи электрофореза в 2% агарозном геле. 1-4 – анализируемые образцы ДНК, М – ДНК-маркер GeneRuller™ DNA Lader Mix (Sigma, США).

9. Необходимый ПЦР-фрагмент вырежьте из геля скальпелем, поместите в 1,5 мл центрифужную пробирку и взвесьте на весах. ПЦР-фрагменты можно выделить из геля с помощью различных наборов по методике, рекомендуемой производителем.

В таблице 5 указаны возможные проблемы при анализе продуктов ПЦР-амплификации и способы их решения.

Таблица 5. Возможные проблемы и способы их решения

Проблема	Возможная причина	Возможные способы решения
ДНК в геле выглядит как размазанная полоска (шмер)	Деградирует продукт	Найдите источник загрязнения нуклеазами; убедитесь, что материал не хранился долго и повторите ПЦР
	Неспецифическая амплификация	Подберите более специфические праймеры или более оптимальные условия реакции
	Избыток матрицы ДНК	Возьмите меньшие количества матрицы ДНК
Неспецифические полосы по дорожке на геле	Неспецифическая амплификация	Подберите более специфические праймеры или более оптимальные условия реакции
	Избыток матрицы ДНК	Возьмите меньшие количества матрицы ДНК
Полоса продукта ПЦР-амплификации и слабая или отсутствует	Слабо прокрашен гель	Добавьте в агарозу больше бромистого этидия
	Отсутствует матрица ДНК в пробе	Добавьте матрицу ДНК
	Деградировали праймеры	Синтезируйте новые праймеры
	Праймеры не отжигаются на матрице ДНК	Подберите более специфические праймеры
	Неправильные условия проведения ПЦР	Подберите более оптимальные условия ПЦР
	Вышел из строя амплификатор	Проведите ПЦР на другом амплификаторе

Выделение ДНК из агарозного геля набором для очистки ДНК (Цитокин)

1. *Для экстракции ДНК из агарозного геля.* Вырезанные фрагменты геля поместить в микроцентрифужную пробирку. Взвесить фрагменты геля и добавить связывающий буфер из расчета 100 мкл. связывающего буфера на 100 мг геля. Для гелей с концентрацией агарозы более 1,5% использовать двойной объем связывающего буфера.

2. Инкубировать 5–10 минут на водяной бане при температуре 60°C до полного растворения геля. Во время инкубации периодически перемешивать содержимое, переворачивая пробирку.

Для экстракции ДНК из реакционных смесей. Добавить равный объем связывающего буфера и тщательно перемешать. Инкубировать 1 минуту при комнатной температуре.

1. Поместить спин-колонку в собирательную пробирку. Перенести раствор в спин-колонку и оставить на 2 мин при комнатной температуре.

2. Центрифугировать на полной скорости (~10 000 g) 1 мин. В процессе центрифугирования жидкость из колонки перемещается в собирательную пробирку, а ДНК сорбируется на силиконовом носителе колонки.

3. Удалить жидкость из собирательной пробирки и добавить 500 мкл отмывочного буфера в спин-колонку. Центрифугировать 15 секунд. После центрифугирования убедитесь, что в спин-колонке не осталось жидкости.

4. Повторить шаг 3.

5. Удалить жидкость из собирательной пробирки и центрифугировать 1 мин для полного удаления отмывочного раствора из спин-колонки.

6. Перенести спин-колонку в новую микроцентрифужную пробирку с отрезанной крышкой.

7. Добавить 30-50 мкл. буфера для элюции. Важно поместить буфер непосредственно в центр мембраны спин-колонки. Инкубировать 2 минуты при комнатной температуре. Для лучшей элюции рекомендуется использовать подогретый до 60°C буфер. Центрифугировать 30 секунд.

8. Перенести ДНК в новую пробирку. Хранить при -20°C.

Контрольные вопросы:

1. Что такое электрофорез и какие основные понятия связаны с этим методом?

2. Как готовится агарозный гель для проведения электрофореза?

3. Как проводится электрофорез в ПЦР-продуктах и какие результаты можно получить?

4. Каким образом измеряется концентрация ДНК в пробе?

5. Какими методами можно провести очистку и выделение ДНК с использованием наборов колонок для очистки ДНК?

Задания для самостоятельной работы:

1. Опишите основные понятия, связанные с методом электрофореза.

2. Изучите и объясните шаги приготовления агарозного геля для электрофореза.

3. Проведите описание процесса электрофореза в ПЦР-продуктах и опишите возможные результаты.

4. Опишите методы измерения концентрации ДНК в пробе.

5. Изучите процесс очистки и выделения ДНК с использованием наборов колонок для очистки ДНК и составьте алгоритм действий.

Глава 8.

Молекулярное клонирование. Реакция лигирования

- Клонирование ДНК.
- Этапы клонирования ДНК.
- Разрезание и вставка ДНК.

Основные моменты:

- Клонирование ДНК – в молекулярной биологии это один из способов создания множества идентичных копий фрагмента ДНК, например, какого-то гена.

- В классическом эксперименте по клонированию целевой ген встраивается в кольцевую молекулу ДНК, которую называют плазмидой.

- Плазмида вводится в бактерии посредством процесса, называемого трансформацией. Бактерии, несущие плазмиду, отбираются с помощью антибиотиков.

- Бактерии с правильной плазмидой используются для производства большего количества плазмидной ДНК или в некоторых случаях для экспрессии гена и наработки белка.

Клонирование ДНК

Клонирование ДНК – это процесс создания нескольких идентичных копий определенного фрагмента ДНК. В типичной процедуре клонирования ДНК ген или другой интересующий нас фрагмент ДНК (например, ген какого-то гена) сначала встраивается в кольцевую молекулу ДНК, называемую плазмидой (рис. 7). Встраивание выполняется при помощи ферментов, которые «вырезают и вставляют» ДНК, в результате чего образуется молекула рекомбинантной ДНК или ДНК, собранной из фрагментов, полученных из нескольких разных источников.

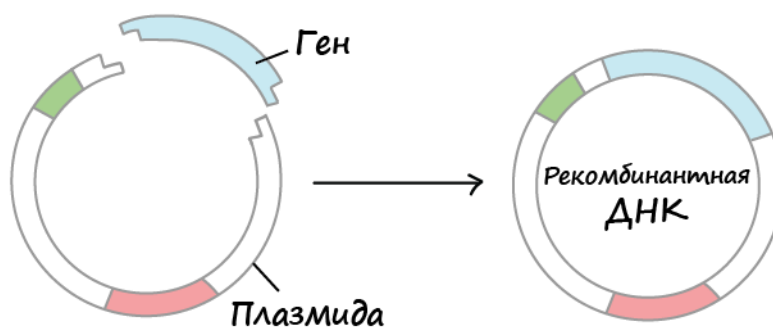


Рис.7. На схеме показано построение молекулы рекомбинантной ДНК

Круглый фрагмент плазмидной ДНК имеет выступы на концах, которые соответствуют концам фрагмента клонируемого гена. Плазида и ген соединяются вместе для получения плазмиды, содержащей нужный ген. Эта ген-содержащая плазида является примером рекомбинантной ДНК, то есть молекулы ДНК, «собранной» из нескольких различных источников.

Затем рекомбинантную плазмиду вводят в бактерии. Бактерии, несущие плазмиду, отбираются и выращиваются. В процессе работы они реплицируют плазмиду и передают ее своему потомству, таким образом, воспроизводя большое количество копий ДНК.

Этапы клонирования ДНК

Клонирование ДНК используется для многих целей. В качестве примера давайте посмотрим, как клонирование ДНК можно использовать для синтеза гена в бактериях. Основные шаги этого процесса следующие:

1. «Разрезание» плазмиды и «вставка» в нее целевого гена. Этот процесс основан на рестриктазах (которые разрезают ДНК) и ДНК-лигазе (которая сшивает ДНК).

2. Перенос плазмиды в бактерии. При помощи антибиотиков выявляются бактерии, которые содержат плазмиду.

3. Нарращивание большого количества бактерий, несущих плазмиды, и использование их в качестве «фабрик» для производства гена. Получение гена и его очистка.

Разрезание и вставка ДНК

Как можно соединить фрагменты ДНК из разных источников? Обычно используются два типа ферментов: рестриктаза и ДНК лигаза.

Рестриктаза – это фермент, разрезающий ДНК. Он распознает конкретную последовательность-мишень и разрезает ДНК в этом месте (сайте) или рядом с ним. Многие рестриктазы образуют концы с короткими одноцепочечными выступами. Если две молекулы имеют совпадающие выступы, они могут соединяться за счет комплементарных нуклеотидов. Однако они не смогут связаться, чтобы сформировать непрерывную молекулу ДНК, пока к ним не присоединится ДНК-лигаза, которая свяжет их в единую молекулу ДНК.

ДНК-лигаза – это фермент, образующий связь в ДНК после разрыва. Если два фрагмента ДНК имеют совпадающие концы, лигаза связывает их, чтобы сформировать единую, непрерывную молекулу ДНК.

Цель клонирования – вставить нужный нам ген (например, какого-то гена) в плазмиду. Используя тщательно подобранную рестриктазу, мы получим:

- плазмиду с единственным сайтом рестрикции;
- и фрагмент целевого гена, у которого есть сайты рестрикции на каждом конце.

Затем мы объединяем фрагменты с ДНК-лигазой, которая связывает их, чтобы создать рекомбинантную плазмиду, несущую нужный нам ген (рис. 8).

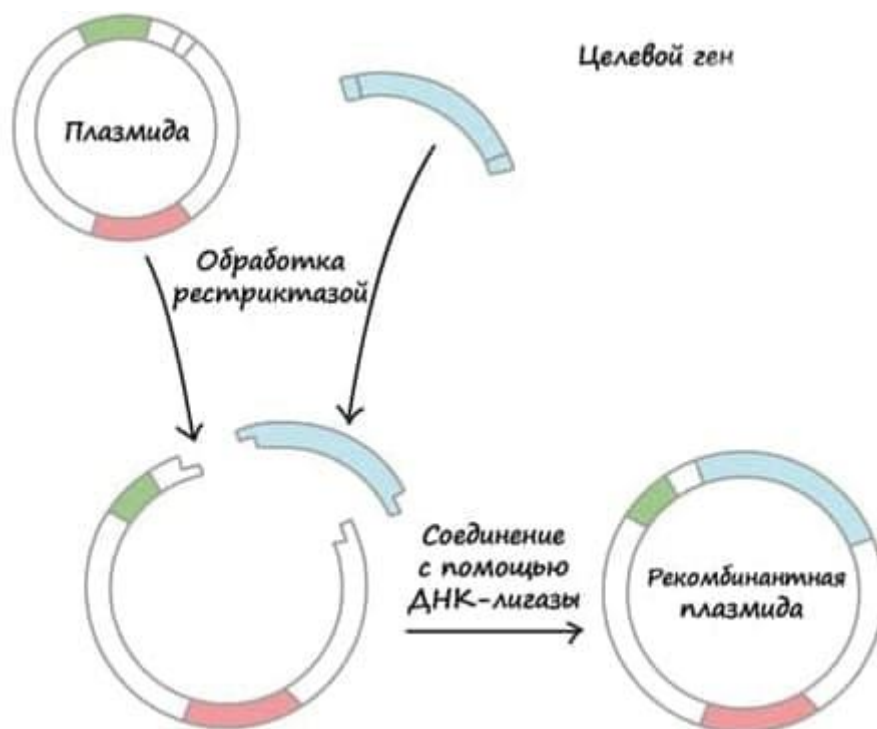


Рис. 8. На схеме изображены процессы рестрикции и лигирования в упрощенном виде.

Начнем с кольцевой бактериальной плазмиды и целевого гена. На двух концах гена-мишени находятся сайты рестрикции, то есть последовательности ДНК, распознаваемые конкретной рестриктазой. В плазмиде также есть сайт рестрикции, распознаваемый тем же ферментом, идущим после промотора, который будет управлять экспрессией гена в клетках бактерий.

И плазида, и целевой ген (по отдельности) обрабатываются рестриктазой. Получившиеся фрагменты очищаются и объединяются. У них есть совпадающие «липкие концы» – выступы одноцепочечной ДНК, поэтому они могут скрепляться.

Фермент ДНК-лигаза сшивает фрагменты по совпадающим концам, образуя единую неразрывную молекулу ДНК. Это приво-

дит к образованию рекомбинантной плазмиды, содержащей целевой ген.

Реакция лигирования

Реакция лигирования – это ковалентное соединение двух молекул ДНК. Для этой реакции необходимы следующие компоненты: фермент ДНК-лигаза T4, буфер 10X T4 ДНК-Лигазы, плазида (вектор) PTZ57R/T и выделенный из геля ПЦР-фрагмент ДНК.

Фермент ДНК-лигаза T4 – мономерный полипептид молекулярной массой 55,3 кДа. Фермент катализирует образование фосфодиэфирной связи между 5'-фосфатной и 3'-гидроксильными концевыми группами ДНК. Помимо лигирования липких концов, она способна катализировать реакцию воссоединения двухцепочечных фрагментов ДНК с тупыми концами. Выделена из штамма *Escherichia coli*, несущего рекомбинантный клонированный ген ДНК-лигазы из фага T4. Оптимальная температура действия +16°C. Температура хранения –20°C.

Буфер 10X T4 ДНК-Лигазы обеспечивает оптимальные условия для реакции лигирования. В его состав входят: 400 mM трис-HCl pH 7,8, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT (дитиотреитол), 5 mM АТФ. Буфер следует хранить (при –20°C) небольшими аликвотами, не размораживая многократно, для избежания разложения АТФ.

Плазида (вектор) PTZ57R/T (рис. 9) используется для T/A клонирования ПЦР-фрагмента и последующей трансформации в бактериальные клетки *E. coli*. Достоинства вектора pTZ57R/T:

- Представляет собой линейную молекулу двунитевой ДНК;
- Содержит дидезокситимидин (ddT) на 3'-конце обеих цепей, что предотвращает рециклизацию вектора в процессе лигирования и обеспечивает высокий выход продуктов клонирования и низкий уровень побочных продуктов;
- Позволяет использовать сине-белый тест для оценки эффективности клонирования;
- Содержит участки узнавания многих эндонуклеаз рестрикции, что дает возможность проводить дальнейшие манипуляции с клонированным фрагментом;
- Имеет в своем составе нуклеотидную последовательность, комплементарную праймеру M13/pUC, что позволяет выполнять секвенирование ДНК-фрагмента или ПЦР-анализ;
- Имеет T7 промотор, который дает возможность транскрибировать вставленный ДНК-фрагмент *in vitro*.

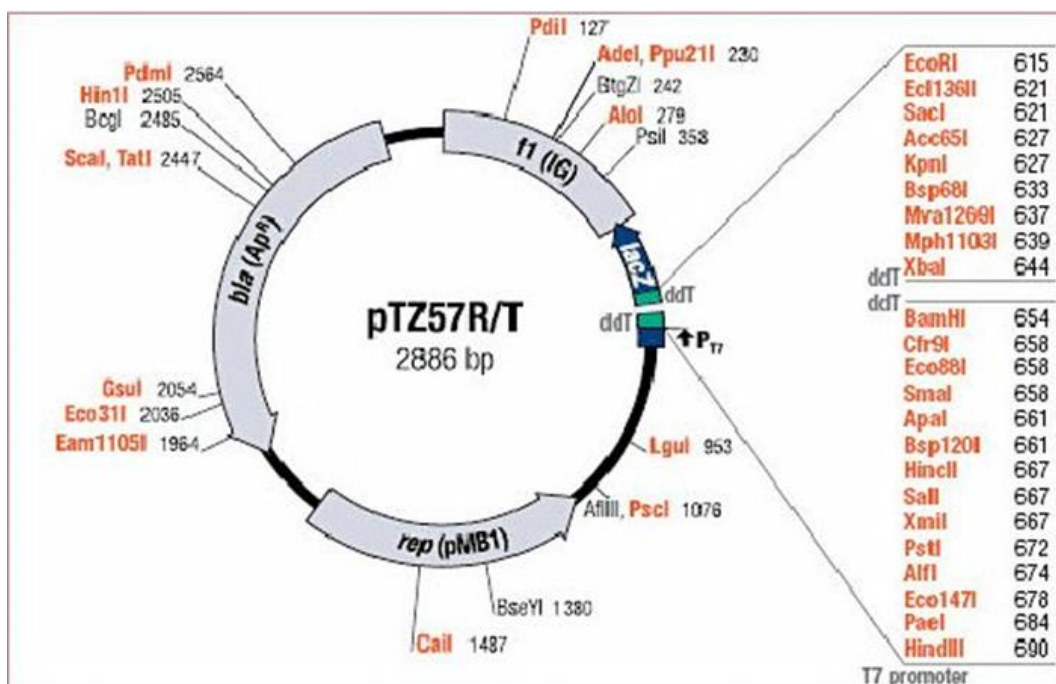


Рис. 9. Карта вектора PTZ57R/T (www.helicon.ru)

Задача 5. Постановка реакции лигирования

1. Перед началом работы разморозьте все компоненты реакции (таб. 6), кроме ДНК-лигазы T4, и поместите их на лед для временного хранения при 4°C.

2. 1,5 мл пробирку поместите на лед, добавьте 3,7 мкл очищенного из агарозного геля ПЦР-фрагмента, 0,5 мкл 10X T4 буфера ДНК-лигазы, 0,5 мкл плазмиды PTZ57R/T и 0,3 мкл T4 ДНК-лигазы, конечный объем составит 5 мкл.

3. Реакционную смесь в 1,5 мл пробирке инкубируйте в течение 1 часа при комнатной температуре.

Таблица 6. Состав реакционной смеси для реакции лигирования

Компоненты реакции	Объем, мкл
Плазмида (вектор) PTZ57R/T	0,5
Буфер ДНК-лигаза T4 10X	0,5
ПЦР-фрагмент ДНК	3,7
ДНК-лигаза T4	0,3
Конечный объем реакции	5

Культивирование клеток *Escherichia coli*

Для культивирования клеток *E. coli* штамм XL1-Blue можно использовать 2 вида питательных сред: LB (среда Лурия-Бертани) и LB агаризованная (таб. 7 и 8 соответственно).

Таблица 7. Состав среды LB (pH 7,5)

<i>Название компонента</i>	<i>Количество</i>
Триптон	10 г/л
Дрожжевой экстракт, без содержания солей, тип Д	5 г/л
Натрий хлорид NaCl 5М	10 г/л
Деионизированная вода	1 л

Таблица 8. Состав агаризованной среды LB

<i>Название компонента</i>	<i>Количество</i>
Триптон	10 г/л
Дрожжевой экстракт, без содержания солей, тип Д	5 г/л
Натрий хлорид NaCl 5М	10 г/л
Агар	5 г/л
Деионизированная вода	1 л

Контрольные вопросы

1. *Что такое клонирование ДНК?*
2. *Какие могут быть причины для клонирования ДНК?*
3. *Что такое целевой ген?*
4. *В какую молекулу ДНК встраивается целевой ген?*
5. *Что такое плаزمид?*
6. *Как происходит введение плазмиды в бактерии?*
7. *Как отбираются бактерии, несущие плазмиду?*
8. *Для чего используются бактерии с правильной плазмидой?*

Задания для самостоятельной работы:

1. *Опишите основные этапы клонирования ДНК.*
2. *Распишите подробно, как происходит введение плазмиды в бактерии.*
3. *Представьте схему эксперимента по клонированию ДНК.*
4. *Какие могут быть проблемы или ограничения при клонировании ДНК?*

Глава 9.

Трансформация и приготовление компетентных клеток *Escherichia coli*

- *Выращивание клетки Escherichia coli.*
- *Приготовление компонентных клеток Escherichia coli.*
- *Проведение генетической трансформации клетки Escherichia coli.*

Трансформация – изменение наследственных свойств клеток в результате проникновения в них чужеродной ДНК. Состояние клеток, при котором они способны к поглощению ДНК, называют состоянием компетентности. Обычно максимальное число компетентных клеток наблюдается в конце фазы логарифмического роста (экспоненциальная фаза). Эта фаза характеризуется постоянной максимальной скоростью деления клеток, величина клеток и содержание в них белка у многих бактерий тоже остаются постоянными.

В состоянии компетентности бактерии вырабатывают особый низкомолекулярный белок (фактор компетентности), активизирующий синтез аутолизина, эндонуклеазы I и ДНК-связывающего белка. Аутолизин частично разрушает клеточную стенку, что позволяет ДНК пройти через неё, а также снижает устойчивость бактерий к осмотическому шоку (Грант, 1980). В состоянии компетентности также снижается общая интенсивность метаболизма. ДНК для бактериальной трансформации должна быть двухнитевой, её длина не менее 450 пар нуклеотидов. Оптимальное рН для прохождения процесса – около 7.

Описание штамма *E.coli* XL1-Blue: Генотип: *recA1, endA1, gyrA96, thi- 1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F, proAB, lacIqZΔM15, TnlO(TetR)]*. Чашка: среда LB агаризованная с добавлением тетрациклина (концентрация 12,5 мг/мл). Жидкая культура: LB.

Штамм позволяет проводить сине-белый тест. Частично инактивирована система рестрикции. Выращивание плазмид и фагемид. F' эписома маркирована геном устойчивости к тетрациклину. Однако не стоит добавлять тетрациклин в жидкую культуру для выделения плазмиды, он вызывает проблемы с клеточной стенкой бактерий, и они слипаются при осаждении центрифугированием.

ДНК, полученная лигированием (может представлять собой смесь нужных нам плазмид, кодирующих какие-то побочные продукты, или линейных фрагментов ДНК), добавляется к бактериям (*Escherichia coli*). Бактерии подвергаются тепловому шоку, что за-

ставляет их поглощать ДНК в процессе трансформации. Однако лишь небольшое количество бактерий сможет успешно захватить плазмиду (рис.10).

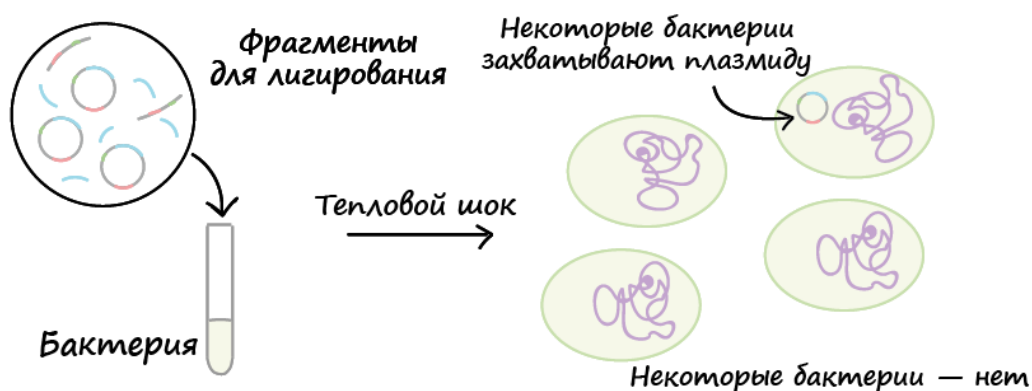


Рис. 10.

Плазмида обычно содержит ген устойчивости к антибиотикам, который позволяет бактериям выживать в питательной среде, содержащей определенный антибиотик. Таким образом, бактерии, которые захватили плазмиду, могут быть отобраны на чашках со специальной питательной средой, содержащей антибиотик. Бактерии без плазмиды погибнут из-за воздействия антибиотика, а бактерии, несущие плазмиду, будут жить и размножаться. Каждая бактерия с плазмидой образует колонию, или группу бактерий, которые содержат одну и ту же плазмиду. Типичная колония выглядит как небольшая точка белого цвета размером с булавочную головку (рис.11).

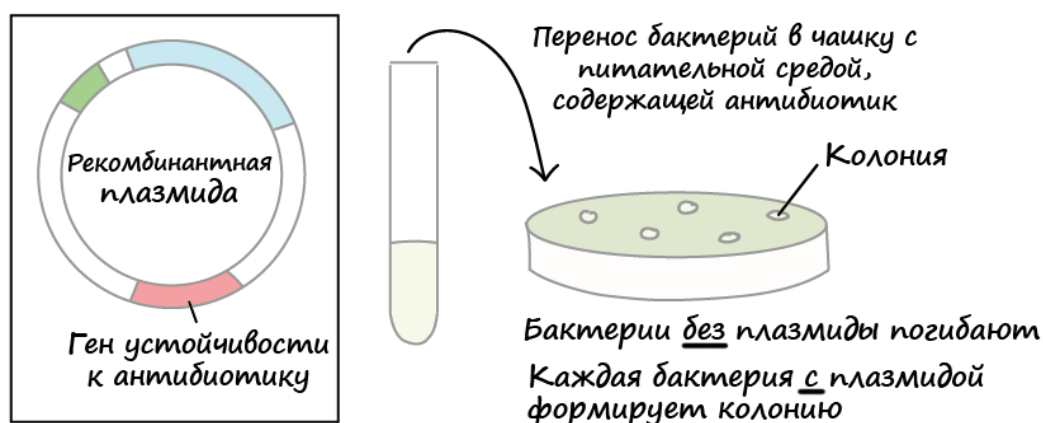


Рис. 11. Слева: схема плазмиды, которая содержит ген устойчивости к антибиотику. Справа: все бактерии после трансформации помещены в чашку с питательной средой, содержащей антибиотик.

Не все колонии будут обязательно содержать правильную плазмиду: во время лигирования фрагменты ДНК не всегда встраиваются в точности так, как мы предполагаем. Поэтому мы должны собрать ДНК из нескольких колоний и посмотреть, содержит ли каждая из них нужную нам плазмиду. Для проверки плазмид обычно используются такие методы, как рестрикционный анализ и ПЦР.

Задача 6. Приготовление компетентных клеток *E. coli* с использованием CaCl_2 метода (Cohen et al., 1972).

1. Для приготовления компетентных клеток выберете одну бактериальную колонию *E. coli* штамм XL1-Blue, диаметром 2-3 мм, из выращиваемых на чашках Петри в течение 16-20 часов при 37°C и внесите ее в колбу со средой LB.

2. Инкубируйте в термостате 3 часа при 37°C, после чего из этой колбы перенесите по 25 мл культуры в 2 стерильных охлажденных полипропиленовых тубуса и инкубируйте на льду 10 мин.

3. Далее культуру в тубусах центрифугируйте в течение 10 мин при 4°C, 6 тыс. об/мин, затем надосадочную жидкость аккуратно слейте в стакан для отходов и, не переворачивая обратно, поставьте тубус дном вверх на фильтровальную бумагу для удаления остатков надосадочной жидкости.

4. Осадок в каждом тубусе ресуспензируйте в 15 мл заранее приготовленного и охлажденного раствора, содержащего 10 mM MgCl₂ и 5 mM CaCl₂.

5. Полученную смесь центрифугируйте 10 мин при 4°C, 6 тыс. об/мин, по окончании центрифугирования удалите надосадочную жидкость, осадок в каждом тубусе ресуспензируйте в 2 мл заранее приготовленного и охлажденного раствора 0,1M CaCl₂.

Задача 7. Проведение генетической трансформации клеток *E. coli*.

1. В каждую предварительно охлажденную в течение 5 мин 1,5 мл центрифужную пробирку добавьте по 200 мкл раствора компетентных клеток из тубусов, а также по 2 мкл лигационной смеси, полученной на предыдущем этапе.

2. Раствор компетентных клеток, смешанных с продуктами реакции лигирования, выдержите на льду 30 мин, после чего проведите тепловой шок на водяной бане TW-2.03 (см. 3 с. цвет. обложки) при 42°C в течение 90 сек, по прошествии которых пробирки с трансформированными клетками незамедлительно перенесите обратно на лед.

3. Затем добавьте 800 мкл среды LB и инкубируйте в шейкере 1 час при 37°C.

4. После инкубации бактерии высеете на селективную среду, содержащую ампициллин (в концентрации 100 мг/мл), тетрациклин (в концентрации 12,5 мг/мл), 40 мкл 100 мМ IPTG и 40 мкл 1 мМ X-GAL.

5. Чашки инкубируйте в термостате в течение 14–16 часов при 37°C.

Контрольные вопросы

1. *Какие свойства имеет штамм E.coli XL1-Blue?*
2. *Чем отличается состояние компетентности клеток от остальных состояний?*
3. *В какой фазе роста клеток наблюдается максимальное число компетентных клеток?*
4. *Какие характеристики характеризуют экспоненциальную фазу роста клеток?*
5. *Что происходит с клетками при трансформации?*
6. *Что такое поглощение ДНК?*
7. *Что происходит со свойствами клеток после трансформации?*
8. *Что такое генетическая трансформация?*
9. *Какие шаги включает процесс генетической трансформации?*

Задания для практической работы

1. *Вырастить клетки Escherichia coli:*
 - *Подготовить питательную среду для выращивания клеток Escherichia coli.*
 - *По инструкции приготовить агаровые или жидкие среды.*
 - *Перенести нужное количество клеток Escherichia coli в петри-плашку или пробирку с питательной средой.*
 - *Инкубировать при заданной температуре и времени для роста клеток.*
2. *Приготовить компетентные клетки Escherichia coli:*
 - *Подготовить компетентную среду для клеток Escherichia coli.*
 - *По инструкции добавить необходимые компоненты в среды, промыть систему культуры клеток.*
 - *Следовать инструкции по подготовке компетентных клеток для конкретного протокола.*
3. *Провести генетическую трансформацию клеток Escherichia coli:*
 - *Подготовить питательную среду для трансформации клеток Escherichia coli.*
 - *По инструкции приготовить среды с нужными антибиотиками и маркерами.*
 - *Добавить чужеродную ДНК в компетентные клетки и инкубировать при заданной температуре и времени для трансформации.*

• После инкубации провести перенос клеток на селективные среды для отбора и роста трансформантов.

• Анализировать полученные клетки на наличие изменений наследственных свойств.

4. Прочитайте текст «Трансформация у бактерий» (<http://www.genetics.timacad.ru/gazeta/transform.htm>) и составьте к нему контрольные вопросы и/или тесты в объеме 5 вопросов и/или 5 тестов с 5 вариантами ответов.

Трансформация у бактерий

Трансформация – направленный перенос и встраивание в генетический аппарат клетки небольшого фрагмента чужеродной ДНК. Она происходит без участия вирусов – бактериофагов. Наблюдается лишь у немногих бактерий. Посредством генетической рекомбинации часть трансформирующей молекулы ДНК может обмениваться с частью хромосомной ДНК донора. Трансформацию используют также в экспериментах для определения порядка генов, расстояний между ними в молекулах ДНК и построения генетических карт. Известно, что бактерия *Рнеитососсис рнеитопие* имеет несколько форм. Вирулентность ее определяется наличием мукополисахаридной капсулы на поверхности клетки, которая защищает бактерию от воздействия со стороны организма – хозяина. Капсула – слой полипептидов или полисахаридов, липидов или гетерополисахаридов и до 90% воды, расположенных поверх клеточной стенки и выполняющий функции осмотического барьера, защиты от высыхания и механических повреждений. В результате размножившиеся бактерии убивают зараженное животное. Бактерии этого штамма (*S*-штамм) образуют гладкие колонии. Авирулентные формы не имеют защитной капсулы и образуют шероховатые колонии (*R*-штамм). Микробиолог Ф. Гриффитс в 1928 году инъецировал мышам культуру живого пневмококка *R*-штамма вместе с *S*-штаммом, убитым высокой температурой равной 65 градусов Цельсия.

Спустя некоторое время ему удалось выделить из зараженных мышей живые пневмококки, обладающие капсулой. Таким образом, оказалось, что свойство убитого пневмококка – способность образовывать капсулы – перешло к живой бактерии, то есть, произошла трансформация этих клеток. От этого превращения клеток и возник сам этот термин.

Глава 10.

Проведение ПЦР-скрининга бактериальных колоний

Выросшие белые колонии необходимо проверить на наличие вставки плазмиды с интересующим нас геном. Для этого проводится ПЦР-скрининг колоний. В Таблице 9 приводится список использованных для ПЦР-скрининга реагентов. Методика постановки реакции такая же, как и при ПЦР-амплификации, только вместо ДНК образца добавляется бактериальная колония (Sambrook et al., 2001).

Задание 8. Проведение ПЦР-скрининга колоний и анализа продуктов ПЦР-амплификации методом электрофореза в агарозном геле.

1. Часть колонии перенести в пробирку, содержащую ПЦР реакционную смесь, с помощью стерильной зубочистки или носика для микропипетки.

2. Далее носик (или зубочистку) опустите в пробирку с реакционной смесью и сделайте пересев колонии на новую чашку с ампициллином и тетрациклином.

3. Чашку инкубируйте 14–16 часов в термостате при 37°C.

4. Режим ПЦР-амплификации см. в таблице 3.

Таблица 9. Состав реакционной смеси для ПЦР-скрининга

<i>Компоненты реакции</i>	<i>Объем, мкл</i>
10X Taq-буфер	2
2,5 mM MgCl ₂	1
0,2 мкМ 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфаты	0,2
20 мкМ праймер прямой*	0,2
20 мкМ праймер обратный*	0,2
Taq-полимераза 5 ед/мкл	0,05
Бидистиллированная H ₂ O	6,35
Конечный объем реакции	10

*название и последовательности праймеров показаны в таблице 10. Праймеры синтезировала компания Синтол (Россия).

Таблица 10. Праймеры, используемые для ПЦР-амплификации вставочного фрагмента в плазмиде PTZ57R|T

<i>Название праймера</i>	<i>Нуклеотидная последовательность 5'→3'</i>
pUC/M13 Forward	CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC
pUC/M13 Reverse	TCACACAGGAAACAGCTATGAC

После окончания ПЦР-амплификации образцы проанализируйте методом электрофореза в 2% агарозном геле.

В качестве примера на рисунке 12 показан ПЦР-скрининг колоний одного образца.

Дальнейшая работа проводится с ПЦР позитивными колониями, содержащими рекомбинантные плазмиды с интересующей нас вставкой.

Бактерии инокулируйте в 15 мл пробирку, содержащую 5 мл среды с ампициллином (в концентрации 100 мг/мл) и инкубируйте в термостате в течение 14–16 часов при 37°C с интенсивным перемешиванием

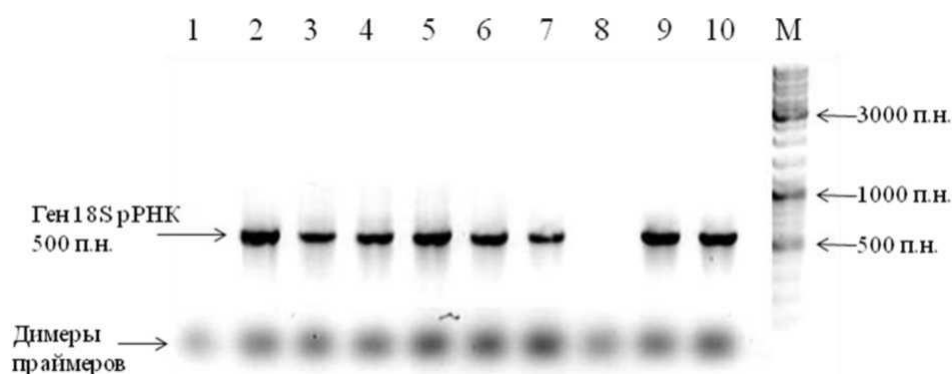


Рис. 12. Анализ результатов ПЦР-скрининга колоний *E. coli* при помощи электрофореза в 2% агарозном геле. 1 – отрицательный контроль, 2 – положительный контроль (фрагмент гена 18S рРНК, встроенный в плазмиду рTZ57R|Т), 3-10 – анализируемые колонии, где 3-7, 9,10 – позитивные колонии со вставкой, 8 – продукт ПЦР-амплификации вектора без вставки, М – ДНК-маркер GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Sigma, США)

Долговременное хранение бактериальных штаммов:

Клетки *E. coli* не рекомендуют хранить больше двух недель при температуре +4°C. Частый пересев колоний не рекомендован, так как он приводит к генетической нестабильности рекомбинантных плазмид и повышает вероятность спонтанных мутаций. Для долговременного хранения при низких температурах (от –12°C до –80°C) к клеткам добавляют криопротектор (глицерол), который не дает возможности образовываться внутри клетки кристаллам льда.

Приготовление бактериальной культуры E. coli для долговременного хранения:

Для криоконсервации образца (приготовления «стока») в чистой пробирке (объем 1,5 мл) к 0,5 мл бактериальной культуры добавьте 0,5 мл стерильного 80% глицерола. Перемешайте на вортексе. Заморозьте и храните при –80°C.

Контрольные вопросы

- 1. Что такое ПЦР-скрининг колоний?*
- 2. Какие методы используются для анализа продуктов ПЦР-амплификации?*
- 3. Какие этапы включает практическая работа по проведению ПЦР-скрининга колоний?*
- 4. Каким образом можно осуществить долговременное хранение бактериальных штаммов?*
- 5. Как проводится приготовление бактериальной культуры *E. coli* для долговременного хранения?*

Задания для самостоятельной работы

- 1. Опишите шаги, которые необходимо выполнить для проведения ПЦР-скрининга колоний.*
- 2. Какие преимущества имеет анализ продуктов ПЦР-амплификации методом электрофореза в агарозном геле?*
- 3. Подготовьте протокол по долговременному хранению бактериальных штаммов.*
- 4. Подготовьте протокол по приготовлению бактериальной культуры *E. coli* для долговременного хранения.*

Глава 11. Выделение плазмидной ДНК

- *Методы выделения плазмидной ДНК из клеток бактерий.*
- *Выделение ДНК плазмиды с набором Fermentas Gene.*

После инкубации из бактериальных клеток нужно выделить плазмидную ДНК.

Методы выделения плазмид основываются на уникальных свойствах (термостабильность, химическая устойчивость) суперспирализованных молекул ДНК. Условия подбирают таким образом, чтобы денатурировать хромосомную ДНК и РНК клеток. Для этого клеточный лизат либо кратковременно нагревают до 100°C, либо обрабатывают щелочным раствором (рН 12,5). При последующей ренатурации в результате охлаждения или нейтрализации раствора суперспирализованная плазмидная ДНК полностью восстанавливает исходную структуру, а различные участки длинных цепей хромосомной ДНК частично ренатурируют случайным образом, образуя крупный осадок в комплексе с белками и детергентом, который осаждают последующим центрифугированием. Суперспирализованная плазмидная ДНК остается в растворе; ее обычно осаждают изопропиловым или этиловым спиртом и в случае необходимости подвергают дальнейшей очистке. Успех выделения во многом зависит от правильного выращивания культуры клеток, содержащих плазмиды – если плазмид в клетках мало, даже самое тщательное выполнение методики не даст удовлетворительного результата. Для этого нужно представлять, что происходит с бактериальной плазмидсодержащей культурой в различных фазах ее роста. Как правило, содержание плазмид в клетке оказывается максимальным в самом начале стационарной фазы роста. При дальнейшем культивировании в популяции накапливаются бесплазмидные клетки, и выход плазмидной ДНК из таких культур снижается. В логарифмической фазе роста бесплазмидных клеток обычно нет, но число копий плазмиды на единицу биомассы меньше, кроме того, препараты, выделенные из логарифмических культур, содержат очень большое количество РНК и белка, поэтому плазмидную ДНК из таких культур всегда значительно сложнее качественно очистить. Ни в коем случае нельзя выращивать плазмидсодержащие клетки без селекции на поддержание плазмиды – большинство плазмид в той или иной степени нестабильны и могут легко утрачиваться при снятии селекции.

Наконец на выход плазмид существенное влияние оказывает среда культивирования. Так, например, повышение концентрации хлорида натрия в стандартном LB-бульоне с 5 до 10 г/л увеличивает выход плазмидной ДНК примерно на 30%. Еще один важный момент – выбор штамма для наработки плазмидной ДНК. Желательно выделять плазмиду из *endA* штаммов *E. coli*, дефектных по гену эндонуклеазы. Приводимая ниже методика не убирает полностью белки, в том числе и эндонуклеазы, из препарата ДНК, в результате чего ДНК, выделенная этим методом из *endA*⁺ штаммов, получается низкого качества и может быстро разрушаться при хранении. Ряд других мутаций, таких как *hcsA*, также повышают качество плазмидной ДНК. Стабильно хорошего качества ДНК выделяется из штаммов XL1-Blue и DH5a, которые также хорошо использовать и для трансформации.

Плазмидную ДНК из бактериальных клеток можно выделить с помощью различных наборов по методике, рекомендуемой производителем.

Задание 9. Выделение плазмидной ДНК набором Fermentas GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit # K050

1. 1,5 мл бактериальной культуры перенесите в 1,5 мл центрифужную пробирку, центрифугируйте при максимальных оборотах (13,3 тыс. об/мин) в течение 30 сек, супернатант удалите с помощью микропипетки.

2. К осадку добавьте 250 мкл Buffer P1 (хранится при –4°C), перемешайте на вортексе до растворения осадка.

3. Добавьте 250 мкл лизирующего буфера Buffer P2 (содержит ионный детергент SDS и NaOH; при его добавлении происходит разрушение клеточной мембраны), 6 раз переверните 1,5 мл пробирку. Не перемешивать на вортексе!

4. Добавить 350 мкл нейтрализующего буфера Buffer N3 (содержит ацетат натрия или калия), 6 раз переверните 1,5 мл пробирку.

5. Центрифугируйте в течение 5 мин при максимальных оборотах.

6. Аккуратно перенесите супернатант в колонку с сорбентом. Колонку поставьте в 2 мл центрифужную пробирку.

7. Центрифугируйте колонку в 2 мл пробирке в течение 1 мин при максимальных оборотах. Удалите центрифугат из 2 мл пробирки.

8. В колонку добавьте 500 мкл буфера для промывки Buffer PB (содержит C₂H₅OH).

9. Центрифугируйте колонку в 2 мл пробирке в течение 1 мин. при максимальных оборотах. Удалите центрифугат из 2 мл пробирки.

10. В колонку добавьте 750 мкл буфера для промывки Buffer PE.

11. Центрифугируйте колонку в 2 мл пробирке в течение 1 мин. при максимальных оборотах. Удалите центрифугат из 2 мл пробирки.

12. Снова центрифугируйте колонку в 2 мл пробирке в течение 1 мин. при максимальных оборотах для полного удаления буфера для промывки.

13. Перенести колонку в новую 1,5 мл центрифужную пробирку, добавьте в колонку 50 мкл буфера для элюции Elution Buffer. Инкубируйте в течение 1 мин при комнатной температуре.

14. Центрифугируйте колонку в 1,5 мл пробирке в течение 1 мин. при максимальных оборотах. В 1,5 мл пробирке остается плазмидная ДНК, колонку выкинуть.

15. Выделенную набором плазмидную ДНК хранить при температуре от +2°C до +4°C или от -15°C до -25°C.

Контрольные вопросы

- 1. На каких свойствах основываются методы выделения плазмид?*
- 2. Какие условия подбирают для денатурации хромосомной ДНК и РНК клеток?*
- 3. Каким образом клеточный лизат подвергается денатурации?*
- 4. Какими методами можно нагревать клеточный лизат для денатурации?*
- 5. Что происходит с клеточным лизатом в щелочном растворе с pH 12,5?*
- 6. Каким образом методы выделения плазмид помогают исследователям изучать генетическую информацию?*
- 7. Какие особенности у плазмид, которые делают их ценными в исследованиях?*
- 8. Какие еще методы выделения плазмид используются в научных исследованиях?*
- 9. Как можно использовать выделенные плазмиды в биологических экспериментах и при создании генетически модифицированных организмов?*
- 10. Какую роль играют методы выделения плазмид в молекулярной биологии и биотехнологии?*

Задания для самостоятельной работы

- 1. Изучите понятие плазмид и их роль в генетике.*
- 2. Изучите основные свойства суперспиральных молекул ДНК и их значимость для методов выделения плазмид.*
- 3. Изучите принципы денатурации хромосомной ДНК и РНК клеток с использованием клеточного лизата.*
- 4. Исследуйте метод нагревания клеточного лизата до 100°C для денатурации ДНК и РНК клеток. Изучите принцип действия и применение данного метода.*
- 5. Изучите метод обработки клеточного лизата щелочным раствором с рН 12,5 для денатурации ДНК и РНК клеток. Познакомьтесь с принципом действия и областями применения данного метода.*
- 6. Сравните преимущества и недостатки нагревания клеточного лизата и обработки щелочным раствором для выделения плазмид.*
- 7. Проведите лабораторный эксперимент, выделив плазмиды из клеточных лизатов с использованием одного из методов (нагревание или обработка щелочным раствором) и оцените его эффективность.*
- 8. Опишите полученные результаты эксперимента и сделайте выводы о применимости выбранного метода для выделения плазмид.*
- 9. Изучите другие методы выделения плазмид, используемые в генетике, и сравните их с методами, основанными на денатурации клеточного лизата.*
- 10. Составьте отчет о проделанной работе, включающий информацию о принципах методов выделения плазмид, результаты лабораторного эксперимента и обсуждение преимуществ и недостатков использованных методов.*

Глава 12.

Рестрикционный анализ молекул ДНК

- *Принципы проведения рестрикционной реакции.*
- *Постановка реакции рестрикции.*

Рестрикцией ДНК (латинское *restrictio* – ограничение) называется процесс ферментативного разделения цепочек ДНК на отдельные фрагменты, представляющие собой последовательность нуклеотидов различного размера.

Рестриктазы – это эндонуклеазы, узнающие определенные последовательности (сайты рестрикции) в двухцепочечной ДНК и гидролизующие ДНК внутри сайтов или вблизи них. Все эндогенные рестриктазы высокоспецифичны. Они четко распознают определенную цепочку нуклеотидов, но могут «разрезать» её по-разному. Как правило, узнается короткая последовательность из 4–6 оснований. Известно не менее 1 тысячи рестриктаз. Выделяют 3 типа рестриктаз:

- I тип и III тип – молекула белка, несущая на своей цепи две активности, рестриктазную и модифицирующую. Для рестрикции необходима энергия АТФ.
- II тип – 2 белка: рестриктаза и модифицирующий фермент. АТФ для рестрикции не требуется.

Изучение процессов рестрикции существенно упростило исследовательскую деятельность, так как с ее помощью стало возможным разделение единицы генетического материала на небольшие части.

С помощью физических методов (электрофорез с агарозой) фрагменты можно разделить по размеру, а затем изучить каждый в отдельности, построив рестрикционные карты.

Задание 10. Постановка реакции рестрикции

1. Перед началом работы разморозьте все компоненты реакции (таб. 11), кроме рестриктаз (таб. 12) и поместите их на лед для временного хранения при 4°C.

2. 1,5 мл пробирку поместите на лед, добавьте 8 мкл плазмидной ДНК (плазида pTZ57R/T с вставкой гена 18S рРНК), 0,5 мкл фермента EcoRI, 0,5 мкл фермента BamHI и 1 мкл буфера 10x React Buffer 0. Конечный объем реакционной смеси – 10 мкл.

3. После добавления всех компонентов реакционную смесь в 1,5 мл пробирке инкубируйте в термостате в течение 1 часа при 37°C.

Таблица 11. Состав реакционной смеси для реакции лигирования

Компоненты реакции	Объем, мкл
EcoRI	0,5
BamHI	0,5
10x React Buffer 0	1
Плазмидная ДНК	8
Конечный объем реакции	10

Таблица 12. Рестриктазы, используемые в работе

Рестрик-таза	Сайт узнавания	Источник	Буферный раствор
EcoRI	G [^] AATTCCTTAAA [^] G	Штамм <i>E. coli</i> , несущий клонированный ген <i>ecoRIR</i> из <i>E. coli</i> RY13	Buffer EcoRI или Buffer Tango
BamHI	G [^] GATCCCTTAG [^] C	Штамм <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	Buffer BamHI или Buffer Tango
Alu I	AG [^] CT	Штамм <i>Arthrobacter luteus</i>	Blue 10 ^x Buffer или Buffer Tango
HAЕ III	GG [^] CC	Штамм <i>Haemophilus aegyptius</i>	Buffer R или Buffer Tango

4. Пробы ДНК после рестрикционного анализа нанесите на 0,8% агарозный гель (см. Задание 3), добавив специальный буфер для нанесения – 6X Loading Dye так, чтобы его итоговая концентрация в пробе для нанесения была 1X.

В качестве примера на рисунке 4 показан анализ результатов рестрикционного расщепления плазмидной ДНК при помощи электрофореза в 0,8% агарозном геле.

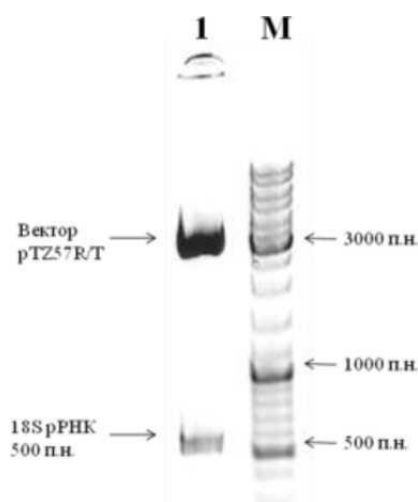


Рис. 13. Анализ результатов рестрикционного расщепления плазмидной ДНК при помощи электрофореза в 0,8% агарозном геле. 1 – анализируемый образец, М – ДНК-маркер GeneRuller™ DNA Lader Mix (Sigma, США)

Контрольные вопросы

1. *Что такое рестрикция ДНК?*
2. *Чем отличается рестриктаза от эндонуклеазы?*
3. *Какие последовательности нуклеотидов узнают эндогенные рестриктазы?*
4. *Сколько известно рестриктаз?*
5. *Какие типы рестриктаз выделяют?*
6. *Какую последовательность нуклеотидов обычно узнают рестриктазы?*
7. *Какие последовательности нуклеотидов характерны для сайтов рестрикции?*
8. *Что происходит с двухцепочечной ДНК при действии рестриктазы?*
9. *Каков размер фрагментов, образующихся при рестрикции ДНК?*
10. *Что можно сделать с полученными фрагментами?*

Задания для самостоятельной работы

1. *Дайте определение рестрикции ДНК. Как называется процесс разделения цепочек ДНК на отдельные фрагменты?*
2. *Что такое рестриктазы? Какие функции они выполняют?*
3. *Какие последовательности нуклеотидов узнают эндогенные рестриктазы?*
4. *Каким образом эндогенные рестриктазы разрезают определенную цепочку нуклеотидов?*
5. *Сколько рестриктаз известно на данный момент?*
6. *Какие типы рестриктаз выделяют?*
7. *Опишите каждый тип рестриктазы. Чем они отличаются друг от друга?*
8. *Какая последовательность нуклеотидов обычно узнается рестриктазами?*
9. *Почему все эндогенные рестриктазы высокоспецифичны?*
10. *Какие сайты рестрикции распознают рестриктазы?*

Глава 13.

Секвенирование. Определение первичной нуклеотидной последовательности

- Проведение асимметрической реакции ПЦР-амплификации с флуоресцентно мишеневыми нуклеотидами.
- Очистка асимметрических фрагментов реакции ПЦР-амплификации.
- Выравнивание с программой Blastn.

Принцип автоматического секвенирования ДНК заключается в электрофоретическом разделении флуоресцентно меченых продуктов специфически терминированных секвенирующих реакций и их детекции в режиме реального времени (Inoue et al., 1998). Детекция осуществляется в нижней части геля, где в момент прохождения фрагментов ДНК происходит возбуждение молекул красителя лазерным лучом. Разделение проводят с помощью специальных приборов – автоматических секвенаторов ДНК. Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан в 1987 г. фирмой Applied Biosystems (США).

Секвенирование по Сэнджеру (секвенирование ДНК с обрывом цепи). Данный метод секвенирования ДНК был предложен Ф. Сэнджером и Д. Коулсоном в 1975 г. (рис. 14).

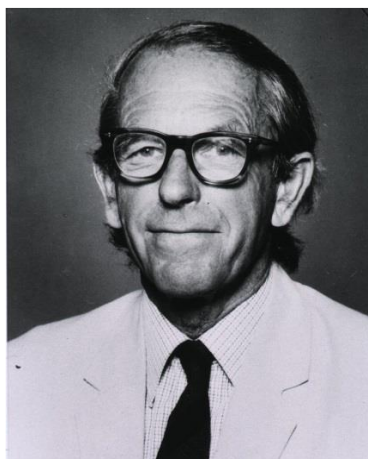


Рис 14. Фредерик Сэнджер – английский биохимик, дважды лауреат Нобелевской премии по химии: за определение аминокислотной последовательности инсулина (1955 г.) и за разработку метода секвенирования ДНК (1980 г.)

Автоматические секвенаторы ДНК управляются специально созданными компьютерными программами. Так, например, приборы фирмы Applied Biosystems комплектуются программами сбора и

анализа данных. После завершения электрофоретического разделения предварительные данные, собранные программой Data Collection, подвергаются анализу с помощью специальной программы. При этом определяется относительная высота пиков, соответствующих фрагментам ДНК, терминированным тем или иным типом нуклеотидного основания, и ликвидируются некоторые погрешности (Alphey, 1997).

В автоматическом секвенировании ДНК для разделения флуоресцентно меченых продуктов терминирующих реакций, кроме электрофореза в стандартных пластинах полиакриламидного геля, широко используется капиллярный гель-электрофорез (Sambrook et al., 2001). Для него характерны высокая чувствительность и высокая скорость разделения, являющиеся следствием крайне малого внутреннего диаметра самого капилляра. В ранних работах по секвенирующему капиллярному электрофорезу гелевым матриксом служил обычный полиакриламидный гель (Lario et al., 1997). Однако его нестабильность, формирование пузырьков воздуха, видимых при микроскопическом исследовании капилляров, заметно снижали производительность метода. Применение линейного полиакриламида позволило снять эти проблемы и способствовало развитию данного метода (Inoue et al., 1998).

Задание 11. Постановка ассиметричной реакции ПЦР-амплификации в присутствии флуоресцентно меченых терминирующих нуклеотидов (реакция секвенирования) (см. глава 2).

Компоненты реакционной смеси для ПЦР-стадии реакции секвенирования показаны в таблице 13. Режим термоциклера для ПЦР-стадии реакции секвенирования показан в таблице 14. ДНК-секвенирование проводится с использованием стандартных праймеров M13/pUC(-20) или T7 (таб. 15) на автоматическом секвенаторе ABI Prism 310 Genetic Analyzer (см. 3 с. цвет. обложки) (Watts, 2001). Праймеры синтезировала компания Синтол (Россия).

Таблица 13. Состав реакционной смеси для ПЦР-стадии реакции секвенирования

Компоненты реакции	Объем, мкл
2,5X Ready Reaction Premix	0,5
TMS Buffer 5X	3,75
3,3 мкМ Праймер	1
ДНК	1
Бидистиллированная вода	13,75
Конечный объем реакции	20

Таблица 14. Режим температурного циклирования при проведении реакции секвенирования

Этапы	Температура (°C), число циклов		Время
Предварительная денатурация	96		1 мин
Денатурация	96	35 циклов	10 сек
Отжиг	55		50 сек
Элонгация	60		50 сек
Достройка цепей	60		4 мин

Таблица 15. Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных при ДНК-секвенировании

Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5'→3'
Праймер промоторного участка T7 для секвенирования	ТААТАСГАСТСАСТАТАГГГ
M13/pUC (-20) прямой праймер для секвенирования	GTAAAACGACGGCCAGTG

В качестве буфера для ПЦР амплификации клонированных фрагментов применяют 5X TMS Buffer (400 мМ Трис рН 9,0, 10 мМ MgCl₂).

Задание 12. Очистка фрагментов асимметричной реакции ПЦР-амплификации.

1. Добавьте в пробирки с ПЦР-фрагментами по 2 мкл 125 мМ ЭДТА, 2 мкл 3М ацетата натрия и 70 мкл 95% этанола.

2. Инкубируйте смесь при комнатной температуре в течение 15 мин, затем смесь перемешайте на вортексе.

3. Инкубируйте смесь 30 мин при –20°C.

4. Центрифугируйте 20 мин при 13,3 тыс. об/мин.

5. Аккуратно отберите и отбросьте микропипеткой надосадочную жидкость.

6. К осадку добавьте 100 мкл 70% этанола и 5 мин центрифугируйте при 13,3 тыс. об/мин.

7. Отбросьте надосадочную жидкость и сушите пробирки в термостате при 37°C с открытыми крышками.

8. После испарения остатков надосадочной жидкости добавьте 20 мкл Ni-Di формамида.

9. Полученную смесь перемешайте на вортексе в течение 20 сек.

10. Смесь в пробирке загрузите в термоциклер с параметрами SeqPrep:

- Нагревание до 95°C в течение 2 мин;
- Охлаждение до 4°C для хранения.

11. Выгрузив пробирку с пробой из термоциклера, осадите капли со стенок кратковременным (20 сек) центрифугированием и перенесите пробу в специальные пробирки с септами для секвенирования.

12. Результаты секвенирования обрабатываются программным пакетом BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Для анализа секвенсных хроматограмм используется программа Chromas.

В качестве примера на Рисунке 16 показан анализ секвенсной хроматограммы одного образца с помощью программы BioEdit.

Определенная первичная нуклеотидная последовательность фрагмента гена 18S рРНК (длина 417 п.н.):

>77a

```
CGAGTGGCGTTTAGCCACACCAGATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTA
GATGTCCGGGGCCGCACGCGCTACACTGAAGGAATCAGCGTGGATGCCTCC
CTGGCCCGAAAGGGCTGGGAAACCCGTTGAATCTCCTTCGTGCTAGGGATTGG
GGCTTGTAATCTTCCCCATGAACGAGGAATCCCAGTAAGCGCGAGTCATAAG
CTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCCGCCCGTCGCTACTATCGAT
TGAGCGGTTTCAGTGAGGGCCTCGGATTGGTCTCGGTCTGGTGCGCAAGTGCCG
GCACCGCTGGCCGAGAAGAAGCTCGAACTCGATCGCTTGGAGAAAGTAAAAGT
CGTAATAAGGTTTCCGTAGGTGAATCTGCGGAAGGATCATTA
```



Рис. 16. Анализ секвенсной хроматограммы образца с помощью программы BioEdit

Контрольные вопросы

- 1. Какие известны основные методы определения первичной нуклеотидной последовательности ДНК? Какие принципы лежат в их основе?*
- 2. Какие методы определения первичной нуклеотидной последовательности чаще всего используются в научных исследованиях?*
- 3. Как работает метод секвенирования Сэнгера? Какие компоненты необходимы для его проведения?*
- 4. Что такое дидезоксинуклеотиды и как они используются в методе секвенирования Сэнгера?*
- 5. Как осуществляется детектирование в методе секвенирования Сэнгера? Какие методы используются для этого?*
- 6. Как работает метод пирометрии или пирозеквенирования? В чем его преимущества по сравнению с методом Сэнгера?*
- 7. Как работает метод секвенирования по методу Максама-Гилберта? Чем он отличается от предыдущих методов?*
- 8. Что такое метод "shotgun" или "пулеметное" секвенирование? Каким образом он используется для определения первичной нуклеотидной последовательности генома?*
- 9. Какие проблемы могут возникать при определении первичной нуклеотидной последовательности и какие методы используются для их решения?*
- 10. Какая роль методов определения первичной нуклеотидной последовательности в современной генетике и медицине?*

Задания для самостоятельной работы

- 1. Что такое первичная нуклеотидная последовательность и почему она важна для изучения генетики и молекулярной биологии.*
- 2. Составьте список методов, используемых для определения первичной нуклеотидной последовательности. Найдите информацию о каждом методе и сравните их преимущества и недостатки.*
- 3. Выберите один из методов из списка и подробно изучите его принцип работы и применение в исследованиях генетики и молекулярной биологии.*
- 4. Проанализируйте примеры исследований, в которых использовались методы определения первичной нуклеотидной последовательности. Обратите внимание на полученные результаты и их значение для расширения наших знаний о геномах различных организмов.*
- 5. Разделитесь на группы и проведите маленький исследовательский проект, используя выбранный метод определения первичной нуклеотидной последовательности. Составьте план исследования, проведите эксперименты и проанализируйте полученные результаты.*
- 6. Подготовьте презентацию или доклад о вашем исследовании, в котором представьте цель и задачи, методику, результаты и выводы исследования. Обсудите полученные результаты с другими группами и*

обменяйтесь мнениями о применимости выбранного метода в различных исследованиях.

7. Сделайте выводы о важности определения первичной нуклеотидной последовательности и ее роли в генетике и молекулярной биологии. Обсудите перспективы развития этих методов и их значимость для дальнейших исследований в этой области.

8. Рассмотрите рисунок «Особенности метода секвенирования по Сэнгеру» (<https://f-genetics.com/senger/>) и составьте инструкцию по проведению процесса секвенирования по Сэнгеру.



Глава 14.

Идентификация организмов на основе выяснения первичной нуклеотидной последовательности

- *Работа с NCBI.*
- *Анализ нуклеотидных последовательностей.*
- *Анализ белковых последовательностей.*
- *Анализ транслированных последовательностей.*
- *Принципы работы BLAST.*
- *Идентификация организмов на основе нуклеотидной последовательности.*

NCBI (National Center for Biotechnology Information) – Национальный центр биотехнологической информации США. Основан в 1988 году в Бетесда как центральный институт обработки и хранения данных молекулярной биологии. Является частью Национальной медицинской библиотеки США, подраздела Национальных институтов здоровья.

Идентификацию организмов на основании анализа первичной нуклеотидной последовательности обычно проводят в базе данных GenBank/EMBL/DDBJ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) с помощью множественного выравнивания в программе BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

BLAST (англ. Basic Local Alignment Search Tool) – алгоритм, позволяющий проводить сравнение первичных нуклеотидных и белковых последовательностей. Компьютерные программы на основе алгоритма BLAST позволяют проводить поиск гомологов белков или нуклеиновых кислот, для которых известна первичная структура (последовательность) или её фрагмент, в соответствующих базах данных (Altschul et al., 1990).

Программы серии BLAST. Существует 3 основных подхода для анализа биологических последовательностей:

Анализ нуклеотидных последовательностей. Набор алгоритмов, позволяющих работать с последовательностями нуклеотидов ДНК или РНК. Blastn («Nucleotide BLAST») позволяет сравнивать нуклеотидные последовательности с различными базами данных и осуществлять поиск гомологичных последовательностей. Анализ с помощью blastn занимает больше времени по сравнению с другими алгоритмами, но позволяет проводить сравнение последовательностей с низкой гомологией. Megablast предназначен для быстрого сравнения близкородственных нуклеотидных последовательностей с идентичностью более 95%. Программа объединяет

многочисленные нуклеотидные последовательности в единую последовательность и затем проводит поиск баз данных BLAST. Затем megablast проводит обработку полученных данных для сравнения индивидуальных последовательностей и статистической обработки. Программа discontinuous megablast позволяет игнорировать некоторые нуклеотиды в последовательности, допуская некоторые несоответствия, и предназначена для сравнения дивергировавших последовательностей, обладающих незначительным сходством, например, при межвидовом сравнении.

Анализ белковых последовательностей. Набор алгоритмов, позволяющих работать с аминокислотными последовательностями белков. Стандартный Blastp («Protein BLAST») позволяет проводить сравнение аминокислотных последовательностей с различными базами данных и осуществлять поиск гомологичных последовательностей. Как и другие программы семейства Blast, Blastp находит локальные гомологичные участки. С помощью данного алгоритма можно идентифицировать аминокислотные последовательности и находить гомологи в базах данных белковых последовательностей. Алгоритм psi-blast («Position-Specific Iterated BLAST») является наиболее чувствительным алгоритмом анализа белковых последовательностей, что делает его полезным для нахождения дальних родственных белков или новых членов семейств белков – дивергировавших последовательностей, обладающих незначительным сходством. Данный алгоритм обычно применяют, когда стандартный алгоритм Blastp не находит гомологичных последовательностей или выдаёт ссылки на гипотетические белки («hypothetical protein») или формулировки схожести с определёнными последовательностями («similar to...»). Phi-blast («Pattern-Hit Initiated BLAST») предназначен для поиска белков, которые содержат заданный пользователем шаблон (паттерн), и одновременно содержат последовательности, гомологичные запросу пользователя, в непосредственной близости от заданного шаблона. Это двойное требование призвано сократить количество хитов в базах данных, которые содержат шаблон, но, скорее всего, не имеют истинной гомологии с анализируемой последовательностью. Алгоритм cdart («Protein homology by domain architecture») исследует структуру доменов белков. Он позволяет анализировать доменную структуру всех белков в базе данных theprotein nr и проводит поиск белков, содержащих схожие консервативные домены.

Анализ транслированных последовательностей. Специальные программы позволяют транслировать нуклеотидные последо-

вательности в аминокислотные. Blastx («Translated query vs protein database») сначала проводит трансляцию нуклеотидных последовательностей в аминокислотные последовательности, а затем проводит поиск гомологичных последовательностей в базах данных белков. Blastx проводит трансляцию и анализ всех 6 рамок считывания нуклеотидной последовательности. Это позволяет эффективно проводить анализ неизвестных последовательностей или последовательностей, содержащих ошибки секвенирования, которые могли бы привести к сдвигу рамок считывания или другим ошибкам трансляции. Таким образом, алгоритм часто используют для анализа *de novo* секвенированных нуклеотидных последовательностей и для анализа EST-последовательностей («Expressed Sequence Tags»). Этот алгоритм является более чувствительным по сравнению со стандартным нуклеотидным Blast, поскольку сравнение выполняется на уровне белковых последовательностей. С другой стороны, алгоритм tblastn («Protein query vs translated database»), наоборот, позволяет проводить поиск белковых последовательностей в неаннотированных базах данных нуклеотидных последовательностей. Анализ также проводится во всех 6 рамках считывания и особенно полезен для поиска гомологичных белков в базах данных EST и HTG (Draft Genome Records – черновые варианты геномов). И, наконец, алгоритм tblastx («Translated query vs translated database») полезен для идентификации новых генов в нуклеотидных последовательностях, потенциально содержащих неточности. Алгоритм транслирует нуклеотидные последовательности во всех 6 рамках считывания и проводит сравнение с результатами трансляции по 6 рамкам считывания баз данных нуклеотидных последовательностей.

С помощью различных алгоритмов BLAST можно проводить анализ нуклеотидных последовательностей в базах данных геномов различных организмов: позвоночных (человек, мышь, макака и др.), беспозвоночных (дрозофила, *Caenorhabditis elegans* и др.), растений (арабидопсис, кукуруза и др.), бактерий (кишечная палочка, сенная палочка и др.), грибов (аспиргилл, дрожжи и др.) и вирусов.

Принципы работы BLAST. Программы серии BLAST производят локальные выравнивания, при которых сравниваются только определённые участки последовательностей. После поступления на сервер BLAST нуклеотидной или аминокислотной последовательности BLAST создаёт таблицу всех участков (в белке – это участок последовательностей, который по умолчанию состоит из трёх аминокислот, а для нуклеиновых кислот из 11 нуклеотидов) и сходных

участков. Затем в базе данных проводится их поиск и когда обнаруживается гомология, размеры участков продлеваются (до 4 и более аминокислот и 12 и более нуклеотидов) сначала без пробелов (гэпов), а затем с их использованием. После максимального продления размеров всех возможных участков изучаемой последовательности проводится парное выравнивание наиболее гомологичных последовательностей из базы данных и полученная информация фиксируется в структуре SeqAlign. Далее информация из SeqAlign представляется различными способами (традиционным, графическим, в виде таблицы) (Altschul et al., 1990, 1997).

Для определения степени и значимости сходства изучаемой последовательности с последовательностями из базы данных BLAST вычисляет такие показатели как Max ident (максимальная идентичность), Query coverage (область перекрытия запроса) и величину E (expected value, E-value ожидаемое значение) для каждой пары последовательностей. Величина E (E-value) показывает достоверность данного выравнивания (чем ниже значение E, тем достовернее выравнивание).

Задание 13. Проведение множественного выравнивания с помощью программы Blastn.

1. Зайдите на сайт программы BLAST: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>.

При открытии главной страницы BLAST вверху есть главное меню с четырьмя вкладками:

- Home – вкладка для возврата на домашнюю страницу BLAST с любой другой страницы (BLAST home page); Находящаяся под ней выделенная строка – дает переход к новостям и основным событиям дня, которые изменяются периодически.

- Recent Results – вкладка для открытия результатов поисков, которые Вы совершили в последние 36 часов;

- Saved Strategies – вкладка для перехода к сохраненным Вами поисковым запросам на вашей личной страничке «My NCBI» (надо зарегистрироваться);

- Help – вкладка для перехода в каталог с документацией по работе с программой BLAST.

2. На главной странице выберете тип программы «nucleotide Blast» в графе Basic Blast (рис. 17).

3. В окно для ввода последовательности Enter Query Sequence введите последовательность в формате FASTA (рис. 18). В качестве примера мы используем нуклеотидную последовательность фрагмента гена 18S рРНК, которая приведена выше по тексту.

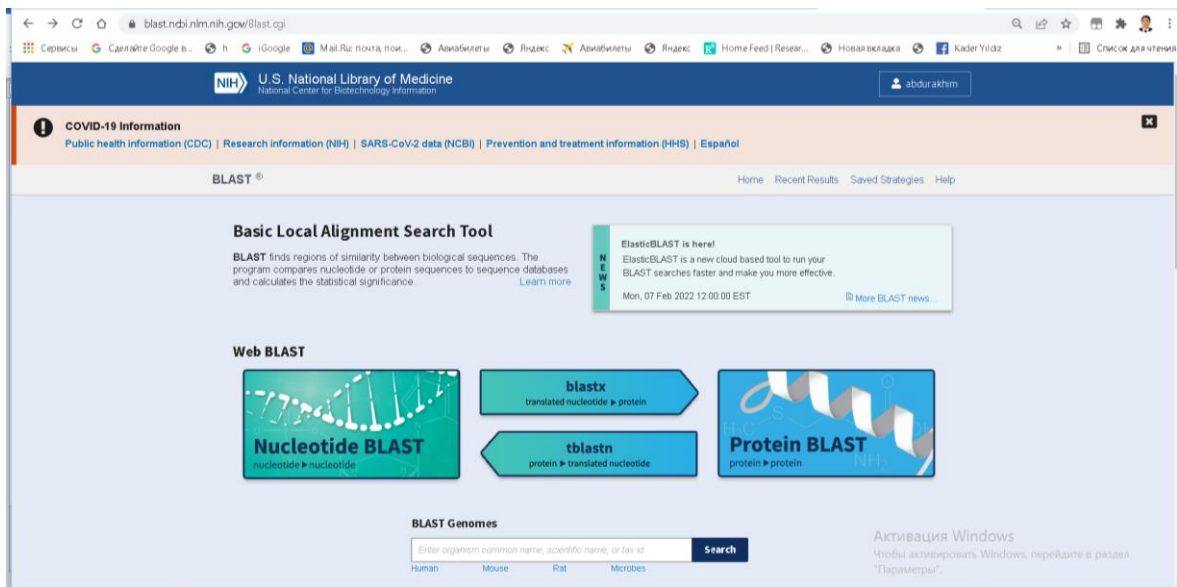


Рис. 17. Главная страница BLAST. Рамкой выделена программа blastn для поиска всех сходных нуклеотидных последовательностей

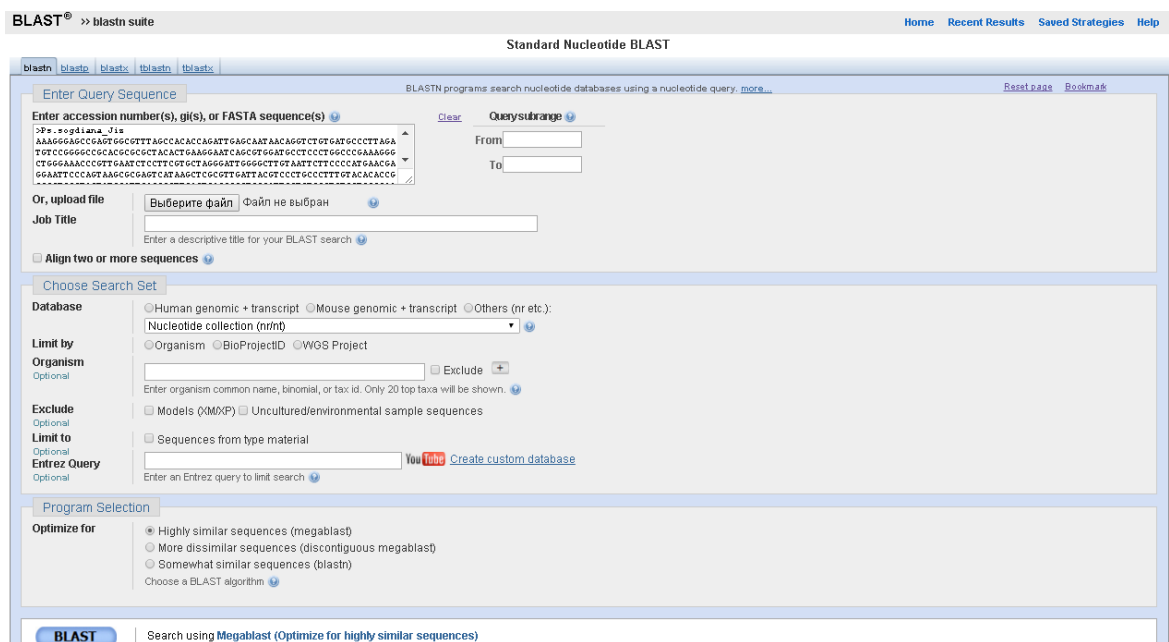


Рис. 18. Страница BLAST для ввода анализируемой нуклеотидной последовательности и выбора параметров поиска. Рамками выделены ключевые элементы страницы

4. Выберите параметры Choose Search Set -> Others -> Nucleotide collection (nr/nt)
5. Выберите в графе Program Selection алгоритм поиска Somewhat similar sequences (blastn)
6. Нажмите на кнопку BLAST внизу страницы для запуска алгоритма.

Результаты анализа представлены на рисунках 19, 20 и 21.

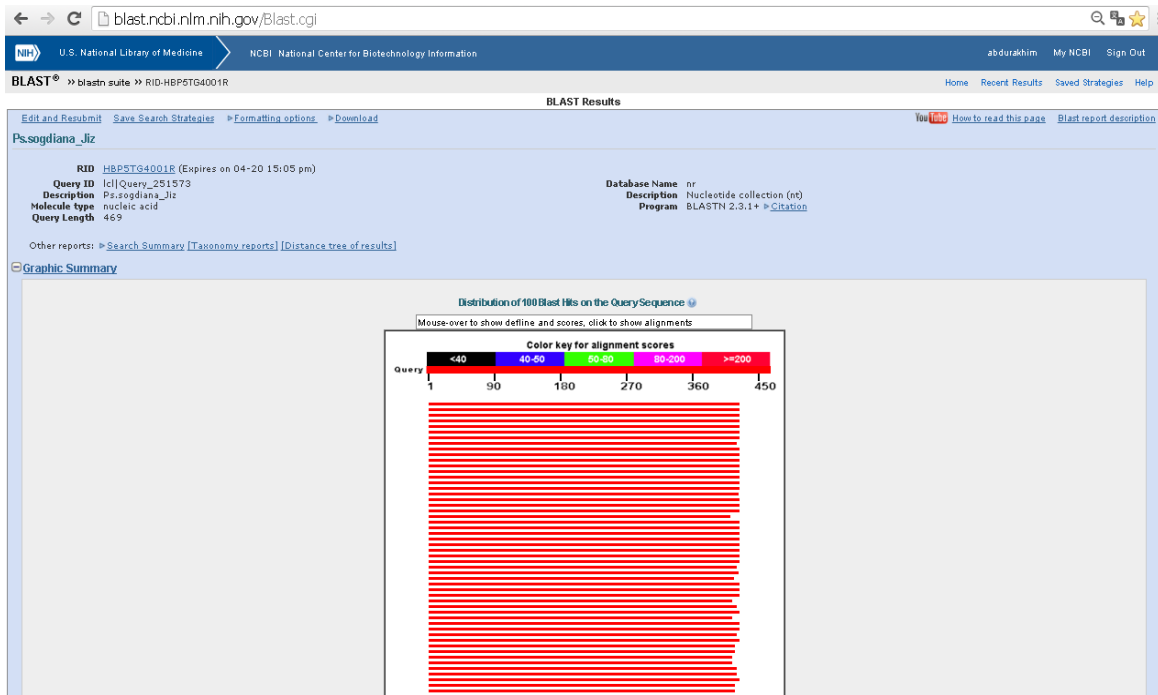


Рис. 18. Графическое представление результатов работы программы BLAST

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Auriculicella bidentata isolate PR0650 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	737	737	90%	0.0	98%	KM280971.1
Auriculicella subuta isolate PR1651 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	737	737	90%	0.0	98%	KM280970.1
Arion silvaticus 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	737	737	90%	0.0	98%	AY145385.1
Acusta despecta sieboldiana 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	737	737	90%	0.0	98%	AF190453.1
Biplicata 18S rRNA gene	737	737	90%	0.0	98%	X94276.1
Deroceras reticulatum 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	732	732	90%	0.0	98%	AY145373.1
Cylindroiulus quadrasi isolate PR2223 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	730	730	90%	0.0	98%	KM280974.1
Zospeum suarezi isolate PR1642 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	730	730	89%	0.0	98%	KM280967.1
Laemodonta bella isolate PR0652 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	726	726	90%	0.0	98%	KM280996.1
Microtrelia occidentalis isolate PR1760 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	726	726	90%	0.0	98%	KM280994.1
Myosotella myosotis isolate PR1759 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	723	723	90%	0.0	97%	KM281001.1
Pylhia scarabaeus isolate PR0626 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	721	721	90%	0.0	97%	KM281004.1
Laemodonta cubensis isolate PR1750 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	721	721	90%	0.0	97%	KM280997.1
A. sirius small subunit ribosomal RNA gene	721	721	90%	0.0	97%	X98828.1
Cespaea nemoralis 18S rRNA gene	719	719	90%	0.0	97%	AJ224921.1
Cassidula aurisfelis isolate PR1927 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	717	717	90%	0.0	97%	KM280991.1
Allochroa pfeifferi isolate PR1394 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	717	717	89%	0.0	97%	KM280989.1
Discus rotundatus voucher EED-Priv-507 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	717	717	90%	0.0	97%	FJ917212.1
Orviona sp. 18S rRNA gene	717	717	90%	0.0	97%	X94276.1
Onchidella borealis isolate PR0737 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	715	715	90%	0.0	97%	KM281006.1
Auriculicella bidentata isolate PR2057 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	715	715	87%	0.0	98%	KM280978.1
Ellobium chinense isolate PR2221 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	715	715	90%	0.0	97%	KM280975.1

Рис. 19. Текстовое представление результатов работы программы BLAST

Согласно проведённому анализу, исследуемая нуклеотидная последовательность гена 18S рРНК может быть идентифицирована как нуклеотидная последовательность *Pseudonapaesus*

sogdiana (ген 18S рРНК, KU760758) на основании 98% сходства (максимальная идентичность – 98%, область перекрытия запроса – 90%, E value – 0.0).

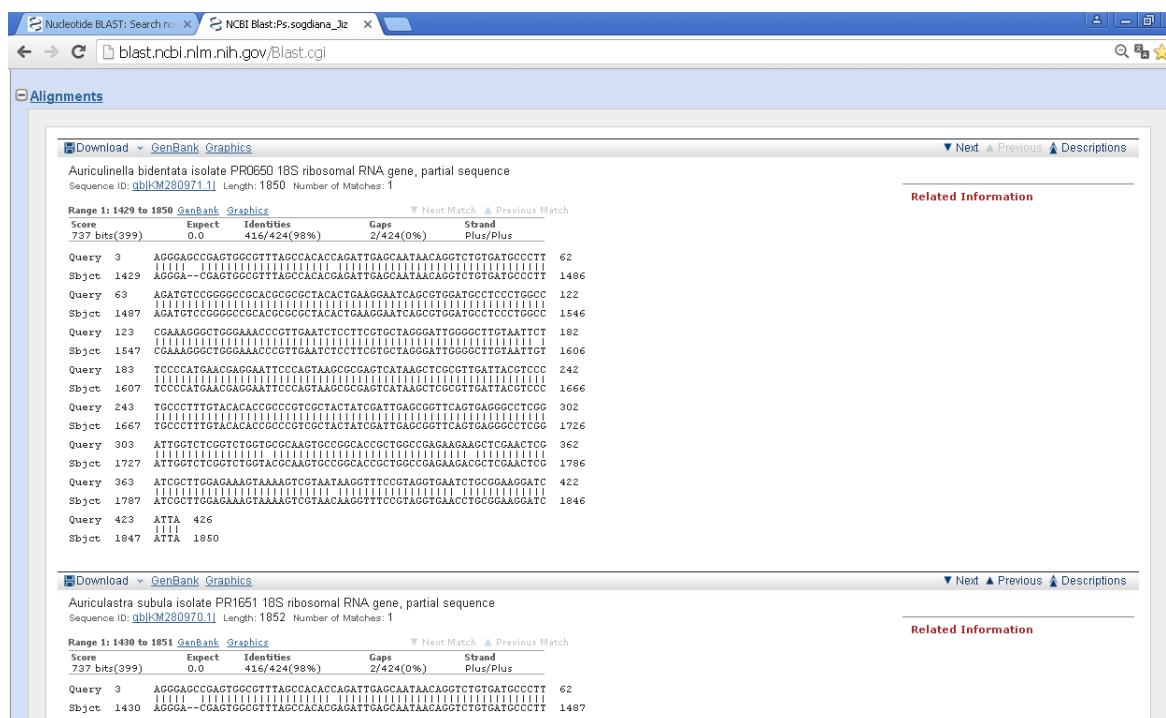


Рис. 20. Парное выравнивание изучаемой нуклеотидной последовательности и нуклеотидной последовательности из базы данных

Неполная гомология сравниваемых последовательностей может быть результатом: 1) ошибки в депонированной в GeneBank нуклеотидной последовательности (Sbjct); 2) внутривидовой изменчивостью.

Контрольные вопросы:

1. Что такое NCBI и для чего используется?
2. В чем заключается анализ нуклеотидных последовательностей?
3. Какие инструменты можно использовать для анализа белковых последовательностей?
4. Что такое транслированные последовательности и как их анализируют?
5. Что такое BLAST и какие принципы его работы?
6. Как можно провести множественное выравнивание с помощью программы Blastn?

Задания для самостоятельной работы:

1. Найдите на NCBI нуклеотидную последовательность, связанную с интересующим вас геном или генетическим расстройством, и проанализируйте ее с использованием инструментов NCBI.

2. Воспользуйтесь программой для анализа белковых последовательностей (например, BLASTp) и найдите схожие белковые последовательности с интересующим вас белком.

3. Проведите трансляцию нуклеотидной последовательности с помощью программы NCBI и проанализируйте полученные результаты.

4. Проведите поиск схожих последовательностей с помощью BLAST и проанализируйте полученные результаты.

5. Скачайте программу Blastn и проведите множественное выравнивание нескольких нуклеотидных последовательностей.

*Обратите внимание, что задания требуют использования программ и инструментов NCBI, поэтому доступ к интернету и компьютеру с установленным ПО может потребоваться для выполнения самостоятельной работы.

Глава 15.

Построение филогенетического дерева. ГенБанк (NCBI)

- *Создание последовательностей, взятых на анализ.*
- *Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей.*
- *Построение филогенетического дерева с помощью программы MEGA и проверка программами *maximal likelihood, maximal parsimony, UPGMA* и *neighbor-joining*.*
- *ГЕНБАНК (NCBI).*

Для построения филогенетического дерева необходимо сначала составить выборку анализируемых последовательностей и провести их множественное выравнивание. Далее с помощью специальных программ строится дерево, и результаты представляются в виде графической информации.

Для построения филогенетического дерева составляется выборка нуклеотидных последовательностей в формате FASTA.

При выборе последовательностей из базы данных необходимо:

- 1) придерживаться небольшой выборки (< 50 последовательностей);
- 2) избегать фрагментов, ксенологов, рекомбинантных последовательностей, tandemных повторов (многократно повторяющихся последовательностей).

Задание 14. Составление выборки анализируемых последовательностей

1. В отдельный текстовый файл (Microsoft Word) наберите нуклеотидные последовательности организмов (в формате FASTA), которые будут использованы для построения филогенетического дерева.

2. Пронумеруйте последовательности. В другой текстовый файл напишите соответствие номеров последовательностей с названиями организмов, которым принадлежат нуклеотидные последовательности (рис. 21 и 22). Например, >Номер последовательности → Перевод строки → Нуклеотидная последовательность организма (без лишних пробелов).

№	Определенная первичная нуклеотидная последовательность образца
№1	gb KF811493.1 Protostrongylus rufescens isolate AK17 L3 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, partial sequence
№2	gb KF811491.1 Protostrongylus hobmaieri isolate AK8 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, partial sequence
№3	gb KF811488.1 Spiculocaulus leuckarti isolate AK14a 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, partial sequence
№4	dbj AB478249.1 Protostrongylus shiozawai genes for ITS2, 28S rRNA, partial sequence
№5	gb EU018481.1 Cystocaulus ocreatus isolate 161 internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Рис. 21. Текстовый файл Microsoft Word с названиями организмов

>1_Pf

TCGCGACTATTTGTCAAACGGTACTCGTCGTCAGTCTAAAGACGTGATTCCCGTTTTAGTGTA
GAATAATGTGATAGCAACATGTAATGATACTTATGTATTATTACGCCAAATTC AATATGCTGGA
ATATGTCCACATGCATGCTAGTGTATCATTACTACCATCGTCGATGGATTTTCAACGAGTATC
GCTGGAAATCATATAATGTTGAAGATTCGCCGATGGACGTCGTGTGCTGTTT CAGTAATGATAG
CTGTTAACTAGACATGAAGCGAGCTGGGTGGACATAGTTTGCATATTGTTCTTGCTTATTG
TAACATGCAACCTGAACTCAGATGTGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAT

>2_Ph

CGCGTTTGAATGCGAGTATTTGTCTGAACGGTACTCGTCGTCGTCAGCCTAGTGACGTGATTC
CCGTTTTAGTGTAGAATAAATATGATAGCAACATGTAATGATACTTACGTATTATTACGCCAAA
CACAATATGCTATGTGTCCCATGCTAGTGTATCATTACTACCATCGTCGATGTTGATTTCCA
ATGGGTATCGCTGGAAATCATATAATGTTAAGGAATCGCCGATGGATGACGTGTGCTGCTCAG
TAATGATAGCTATTAACACTAGACATGAAGTGAGCTGGGTGGACATAGACTGCATAATGTGCT
TGCTTATTGTAACATGCAACCTGAACTCAGATGTGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAT

>3_Sl

GGTTGCATATATGAACGCGACTATTTGTCTGAACGGTACTTGTCTGTCGTCAGTCTATTGACGGA
CGTGGTTCCCGTTCAAGTGCAGAAGTATGTGATAGCAACATGTAATGATACTTATGTATTATTA
CACCAAATACAATATGCTATATTGTGTTTCTATGCTAGTGTATCATTACTACCATCGCCGATGT
TGATTTTCAATGGGTATCGTTGGAAATCATATAATGTTGAAGATTCGTCTGATGGACGACGTGT
GCTGTTT CAGTAATGATTGCTATTGACACAAGACATGAAGCAAATTTGGGCATAGATTGCAGCAT
AATGTGTTTATGTATTGTAACATGCAACCTGAACTCAGACGTGATTACCCGCTGAACTTAAGC
ATATCAT

>4_Psh

AGTTGCATATATGAATGCGACTATTTGTCAAACGGTACTCGTCGTCAGCTTAGTGACGTGATT
CCCGTTT CAGTATAGAATTATGTGATAGCAACATGTAATAATACTTATGTATTATTACGCCAAGT
ACAATATGCTATACGATGCCCTATGCTGGTGTATCATTACTACCATCGACGATGTTGATTTT
CAATGGGTATCGTTGGGAATCATATAATGTTGAAGATTCGTCTGATGGACGACSGTGTGCTGTT
CAGTAATGATGTCATGTTGACACTAGACATAAAGCGAGTTGGGCATACAATGCGTAATGTGTT
TGTTTCTTGTAACATGCAACCTGAACTCAGACGTGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAT

>5_Co

TTGTCGCATATATACATACTATTCATATGTATGTATTGTAAGGACGTGAATGCGGCTGTCTGTC
AAACGGTACTCGTCGTCGCCGTTGCGAAACGTCGACGTGATTCCCGTTT CAGTAAAGAATG
AAGTGATAGCAACATGTAATCGTTGCACCGAATGCAATATGGAATCGTGTGACTGTATGCTAG
TGATCACTTACCATCGTCGATTTTGAATTCTCAATGGGTATCATTGATGAAATCGCCGACA
TGAAATAGTCGTCTGATGGATGACGTGTGTTGCTCAGTAATGATGACTATGAACACTAGCATAG
TCCCAAATAGATTACATATTTGTATTTAAAATTGTACGATGCAACCTGAACTCAGACGTGATTA
CCCGCTGAACTTAAGCATATCAT

Рис. 22. Текстовый файл Microsoft Word с нумерацией оследовательностей

Задание 15. Выполнение множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей с помощью программы MEGA 7

Построение филогенетического дерева с помощью программы MEGA 5. Для построения филогенетического дерева используем программу MEGA 5 (<http://www.megasoftware.net/>). Программу можно скачать бесплатно с сайта производителя. Программа позволяет проводить бутстреп-анализ, который оценивает статистическую значимость каждого из узлов построенного дерева. Методом maximal likelihood, maximal parsimony, UPGMA и neighbor-joining выбирается дерево с минимальным количеством мутаций, необходимых для объяснения данных.

Программа MEGA 7 предназначена для множественного выравнивания последовательностей нуклеиновых кислот и белков. MEGA 7 работает через командную строку или он-лайн.

1. Для выполнения множественного выравнивания, зайдите на сайт (<http://www.megasoftware.net/>)

2. На главной странице MEGA 5 есть меню с четырьмя вкладками (рис. 25):

1. Создаем текстовый файл (с расширением .txt) и копируем в него данные с полученным множественным выравниванием пяти последовательностей (рис. 23). Файл называем, например, Example1.txt.

2. Запускаем программу MEGA 7. Появляются входные параметры программы (рис. 24): Выбираем Align → Enter → Edit Built Alignment → Gear icon → a new alignment OK → DNA → Align Explorer → Edit → Paste → Alignment by ClustalW → Data → Export Alignment → Mega format → дать имя файла → Enter (рис. 25).

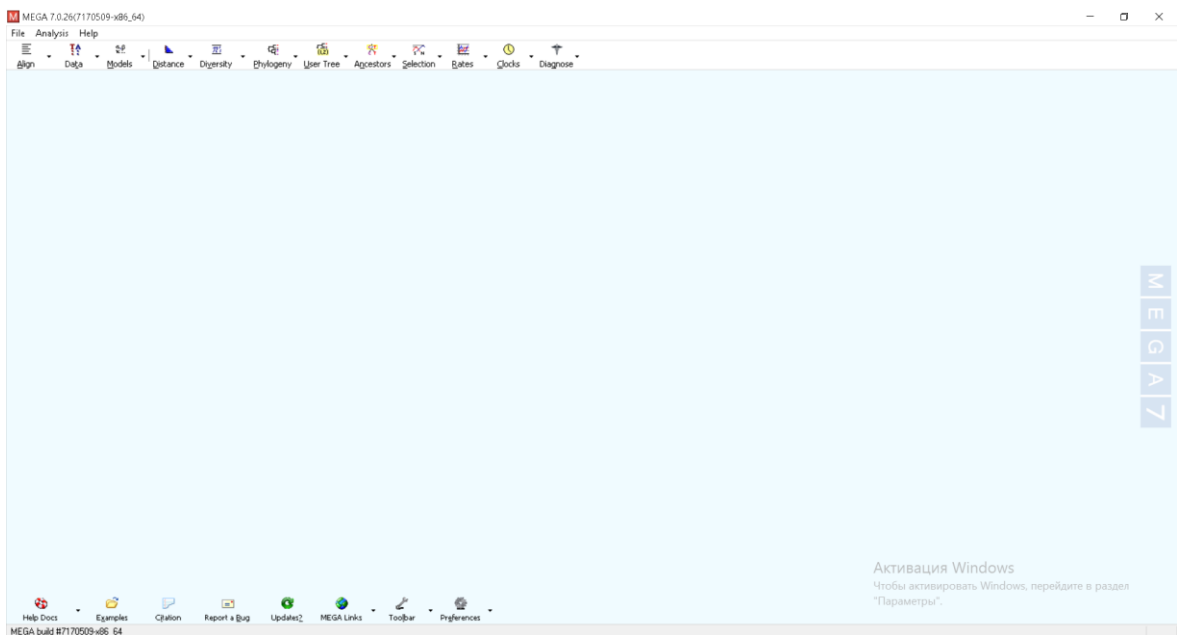


Рис. 23. Входные параметры анализа программы MEGA 5

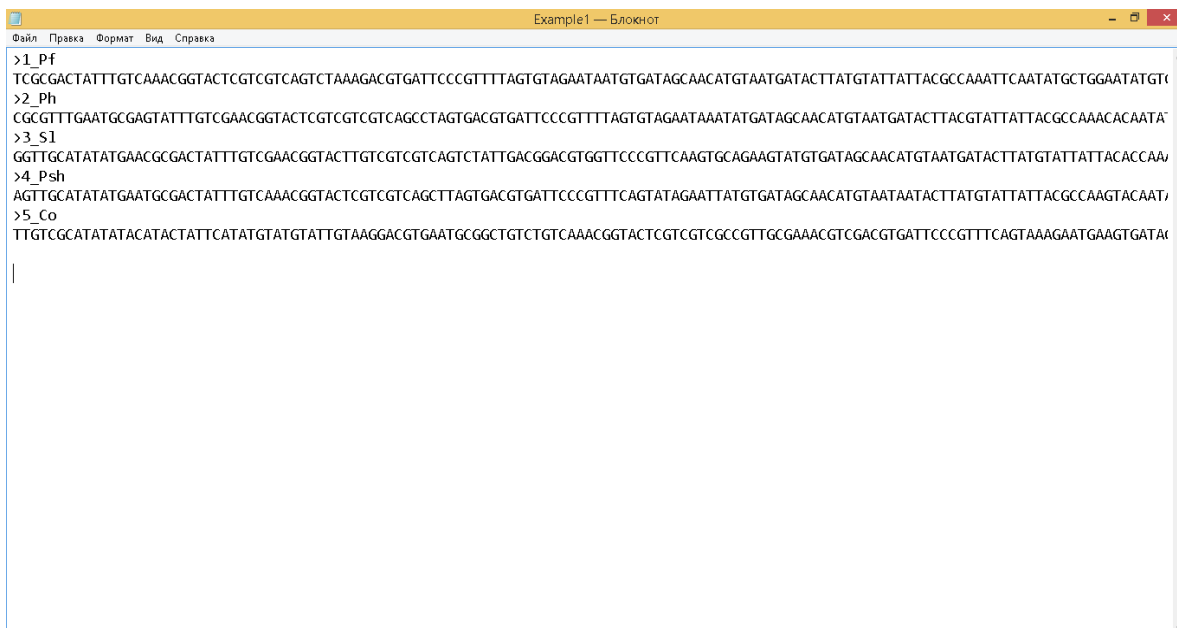


Рис. 24. Текстовый файл (txt) с множественным выравниванием последовательностей

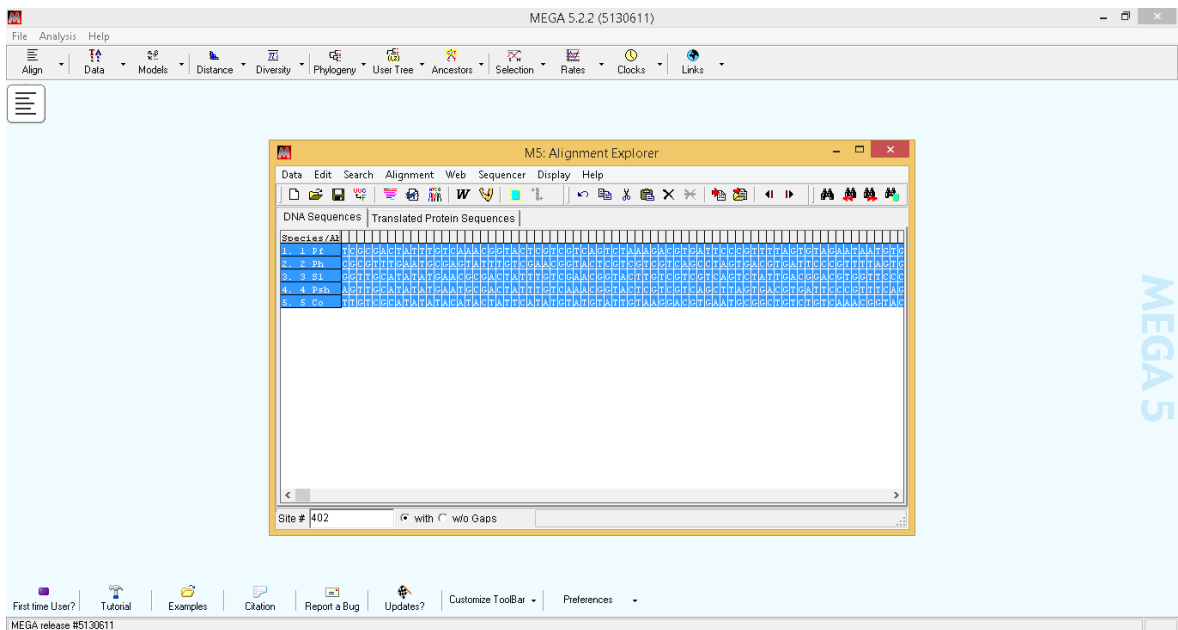


Рис. 25. Выравненные и преобразование данные на мега формат.

В результате данные сохранены в файле мега формат, который желательно переименовать, например, в Example2.

3. Запускаем программу Мега 5, которая строит древо по методу максимальной экономии, используя значения из файла Example2.

4. Вводим название файла Example2, нажимаем Enter. Появляются входные параметры анализа (рис. 26).

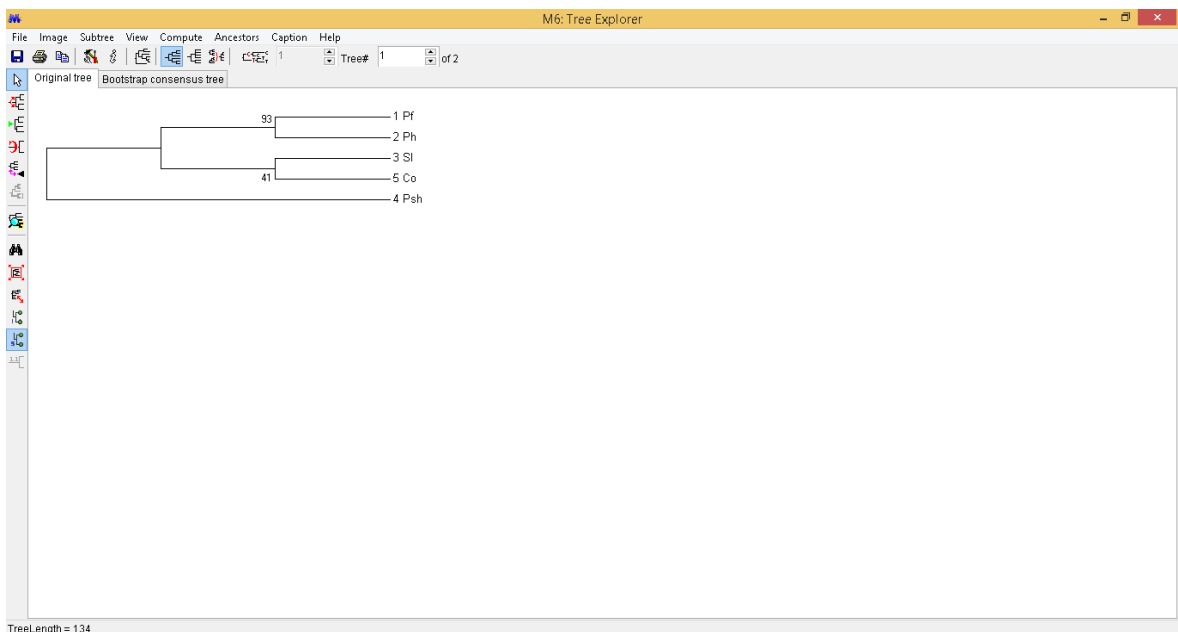


Рис. 20. Входные параметры анализа программы.

Каждому узлу на дереве приписано какое-то значение бутстреп-поддержки, например из 1000 реплик. Это число характери-

зует на скольких деревьях эта ветвь (узел) существует. Чем ближе значение к 1000, тем выше достоверность ветвления.

GenBank – Генбанк, база данных, находящаяся в открытом доступе, содержащая все аннотированные последовательности ДНК и РНК, а также последовательности закодированных в них белков.

Контрольные вопросы

- 1. Что такое филогенетическое древо?*
- 2. Какую информацию можно получить из филогенетического древа?*
- 3. Что такое ГенБанк и какую роль он играет в построении филогенетического древа?*
- 4. Почему важно учитывать генетическую информацию при построении филогенетического древа?*
- 5. Какие методы используются для построения филогенетического древа?*
- 6. Какие данные необходимы для построения филогенетического древа?*
- 7. Какие алгоритмы используются для анализа данных и построения филогенетического древа?*
- 8. Что такое биорепоzitорий и какую роль он играет в построении филогенетического древа?*
- 9. Какие преимущества и ограничения существуют при построении филогенетического древа с использованием ГенБанка?*
- 10. Какие приложения имеет построение филогенетического древа в научных и медицинских исследованиях?*

Задания для самостоятельной работы

- 1. Исследуйте понятие "филогенетическое древо" и опишите его структуру и основные принципы построения. Сделайте это с использованием литературных источников.*
- 2. Изучите роль ГенБанка (NCBI) в построении филогенетического древа. Рассмотрите основные функции ГенБанка, его значение для хранения и доступа к генетическим данным.*
- 3. Рассмотрите значение генетической информации при построении филогенетического древа. Исследуйте, какие данные используются для анализа эволюционных отношений и какая роль генетических последовательностей в этом процессе.*
- 4. Ознакомьтесь с различными методами, используемыми для построения филогенетического древа. Сравните их преимущества и недостатки, обсудите, какой метод является наиболее эффективным в различных ситуациях.*
- 5. Изучите, какие данные необходимы для построения филогенетического древа. Обратите внимание на типы данных, такие как генети-*

ческие последовательности, морфологические характеристики и геномные данные.

6. Исследуйте алгоритмы, используемые для анализа данных и построения филогенетического древа. Рассмотрите методы максимальной правдоподобности, методы на основе расстояний и байесовские методы и их применение в биоинформатике.

7. Изучите понятие "биорепоэиторий" и его значение в построении филогенетического древа. Проведите исследование о биорепоэиториях, доступных в интернете и описывающих биологические образцы, генетические последовательности и другие данные.

8. Обсудите преимущества и ограничения использования ГенБанка (NCBI) при построении филогенетического древа. Рассмотрите факторы, такие как доступ к данным, точность информации и возможности анализа данных.

9. Рассмотрите приложения и значимость построения филогенетического древа в научных и медицинских исследованиях. Обсудите, как филогенетическое древо может быть использовано для понимания эволюции и распространения инфекционных болезней, классификации видов и исследования биоразнообразия.

10. Сделайте обзор научных статей, которые использовали филогенетическое древо и ГенБанк (NCBI) для исследования эволюции и родства различных организмов. Обсудите результаты этих исследований и их вклад в науку и медицину.

Использованная литература

Основная литература

1. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук; пер. с англ. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
2. Рыбчин, В.Н. Основы генетической инженерии. 2-е изд., перераб. И доп.: учебник для вузов / В.Н. Рыбчин. – СПб.: Изд-во СПбГТУ, 2002. – 522 с.
3. Сауки, Р. Полимеразная цепная реакция / Р. Сауки, У. Гиленстен, Г. Эрлих // Анализ генома: Методы / Пер. с англ., под ред. К. Дейвиса. – М.: Мир, 1990. – С.176-190.
4. Щелкунов, С.Н. Генетическая инженерия: Учеб.-справ., пособие / С.Н. Щелкунов. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2004. – 496 с.
5. Sambrook, J. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. – Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. – 1626 p.

Дополнительная литература

6. Грант В. Эволюция организмов. – Москва: Мир, 1980. – 408 с.
7. Остерман, Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие) / Л.А. Остерман. – Москва: Наука, 1996. – 288 с.
8. Соловьева В.В. Молекулярно-генетический анализ беспозвоночных животных по нуклеотидной последовательности гена 18S рибосомной РНК: учебное пособие / В.В. Соловьева, А.Р. Мороз, А.А. Ризванов, Р.М. Сабиров. – Казань: Казан. федеральный ун-т, 2011. – 52 с.
9. Сауки, Р. Полимеразная цепная реакция / Р. Сауки, У. Гиленстен, Г. Эрлих // Анализ генома: Методы / Пер. с англ., под ред. К. Дейвиса. Москва: Мир, 1990. – С.176-190.
10. Alphey, L. DNA sequencing from experimental methods to bioinformatics / L. Alphey. – Berlin etc.: BIOS sci. publ., 1997. – 224 p.
11. Alphey, L. DNA sequencing from experimental methods to bioinformatics / L. Alphey. – Berlin etc.: BIOS sci. publ., 1997. – 224 p.
12. Altschul S.F. Basic Local Alignment Search Tool / S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman // J Mol Biol. – 1990. – V.215. – P.403-410.
13. Altschul S.F. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs / S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman // Nucleic Acids Res. – 1997. – V.25. – 3389-3402.
14. Cohen, S. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. / S. Cohen, C. Changa, L. Hsu. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. – 1972. – V.69. – P.2110-2114.

15. Dretzen, G. *A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels* / G. Dretzen, M. Bellard, P. Sassone-Corsi, P. Chambon // *Anal. Biochem.* – 1991. – V.112. – P.295-298.
16. Dretzen, G. *A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels* / G. Dretzen, M. Bellard, P. Sassone-Corsi, P. Chambon // *Anal. Biochem.* – 1991. – V.112. – P.295-298.
17. Folmer M., Black W., Hoeh R., Lutz and Vrijenhoek R. *DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates*// *Molecular marine biology and biotechnology.* – 1994. – V. 3(5). – P. 294-299.
18. Gasser R.B., Chilton N.B., Hoste H., Beveridge I. *Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of parasitic helminthes* // *Nucleic. Acids. Res.* 1993. – №21. – P. 2525-2526.
19. Girvitz, S.C. *A rapid and efficient procedure for the purification of DNA from agarose gels* / S.C. Girvitz, S. Bacchetti, A.J. Rainbow, F.L. Graham // *Anal. Biochem.* – 1990. – V.106. – P.492-496.
20. Girvitz, S.C. *A rapid and efficient procedure for the purification of DNA from agarose gels* / S.C. Girvitz, S. Bacchetti, A.J. Rainbow, F.L. Graham // *Anal. Biochem.* – 1990. – V.106. – P.492-496.
21. Hebert P. D. N., Penton E. H., Burns J. M., Janzen D. H., Hallwachs W. *Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrapes fulgerator** // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – V. 101. – P. 14812-14817.
22. Hebert P. D. N., Stoeckle M. Y., Zemplak T. S., and Francis C. M. *Identification of birds through DNA barcodes*// *PLoS Biology.* – 2004b. – V.2. – P. 1657-1663.
23. Inoue, H. *Enhanced separation of DNA sequencing products by capillary electrophoresis using a stepwise of electric field strength* / H. Inoue, M. Tsunako, Y. Baba // *Chromotogr.* – 1998. – V.802. – P.179-184.
24. Inoue, H. *Enhanced separation of DNA sequencing products by capillary electrophoresis using a stepwise of electric field strength* / H. Inoue, M. Tsunako, Y. Baba // *Chromotogr.* – 1998. – V.802. – P.179-184.
25. James, T.Y. *Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny* / T.Y. James, F. Kauff, C.L. Schoch et al. // *Nature.* – 2006. – V.443. – P.818-822.
26. Kjer K. M. *Use of rRNA secondary structure in phylogenetic studies to identify homologous positions: an example of alignment and data presentation from the frogs* // *Molecular phylogenetics and evolution.* – 1995. – V. 4. – P. 314-330.
27. Kuchboev A.E. *Amaliy molekulyar zoologiya» fanidan laboratoriya ishlari uchun uslubiy qo'llanma* // «Bayoz» nashriyoti. – Toshkent, 2023.– 62 b
28. Kwok, S. *Identification of human immunodeficiency virus sequences by using in vitro enzymatic amplification and oligomer cleavage detection* / S. Kwok, D.H. Mack, K.B. Mullis et al. // *Viol.* – 1987. – V.61, №5. – P.1690-1694.

29. Kwok, S. *Identification of human immunodeficiency virus sequences by using in vitro enzymatic amplification and oligomer cleavage detection* / S. Kwok, D.H. Mack, K.B. Mullis et al. // *Viol.* – 1987. – V.61, №5. – P.1690-1694.
30. Lario, A. *Automated laser-induced fluorescence DNA sequencing* / A. Lario, A. Gonzlez, G. Dorado // *Anal. Biochem.* – 1997. – V.247. – P.30-33.
31. Philippe, H., Brinkmann, H., Lavrov, D. V., Littlewood, D. T. J., Manuel, M., Wörheide, G., Baurain, D., David, P. «Resolving Difficult Phylogenetic Questions: Why More Sequences Are Not Enough». *PLoS Biology*, 2011. 9 (3): e1000602. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000602>
32. Sambrook, J. *Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed* / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. – Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. – 1626 p.
33. Scharf, S.J. *Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences* / S.J. Scharf, G.T. Horn, H.A. Erlich // *Science.* – 1986. – V.233, № 4768. – P.1076-1078.
34. Wong, C. *Characterization of beta-thalassaemia mutations using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA* / C. Wong, C.E. Downing, R.K. Saiki et al. // *Nature.* – 1987. – V.330, № 6146. – P.384-386.

Приложение

Оборудование, используемое для проведения ПЦР

 <p>Центрифуга (Centrifuge)</p>	 <p>Автоматический секвинатор</p>	 <p>Трансляминатор (Transilluminator)</p>
 <p>Водяная баня (Water Bath)</p>	 <p>pH метр (Basic pH Meter)</p>	 <p>Вортекс (Vortex Genue)</p>
 <p>Система электрофореза (Electrophoresis system)</p>	 <p>Смеситель (Corning Scholar)</p>	 <p>Весы (Scale)</p>

Список используемых реагентов

Реагент	Производитель
10X <i>Taq</i> -буфер	Силекс, Россия www.sileks.com
25 мМ MgCl ₂	
10 мкМ 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфаты	
<i>Taq</i> -полимераза 5 ед/мкл	
20 мкМ Универсальный прокариотический прямой праймер 16S-8F (прямой)	Синтол, Россия www.syntol.ru
20 мкМ Универсальный прокариотический обратный праймер 16S-1492R (обратный)	
20 мкМ Вектор-специфичный прямой праймер pUC/M13 Forward	
20 мкМ Вектор-специфичный обратный праймер pUC/M13 Reverse	
ДНК-маркер <i>DirectLoad™ Wide Range DNA Marker</i>	SIGMA, США www.sigmaaldrich.com
Агароза	
ЭДТА	
Набор для выделения ДНК из агарозного геля <i>DNA Extraction Kit #KOS13</i>	Fermentas International Inc., Канада www.fermentas.com
Фермент ДНК-лигаза T4	
Буфер 10X T4 ДНК-Лигазы	
Плаزمид (вектор) PTZ57R T	
Набор для выделения плазмидной ДНК <i>Fermentas Gene JET™ Plasmid Miniprep Kit # K0502</i>	
Набор для выделения ДНК из агарозного геля <i>EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit</i>	BioBasic Inc., Китай www.biobasic.com
Набор для выделения плазмидной ДНК <i>Roche High Pure Plasmid Isolation Kit</i>	Roche Applied Science, Германия
	www.roche-applied-science.com
Фермент EcoRI	Invitrogen, США www.invitrogen.com
Фермент BamHI	
Буфер 10x React Buffer 0	
Триптон	Amresco, США www.amresco-inc.com
Дрожжевой экстракт, без содержания солей, тип Д	
Ni-Di формамид	Applied Biosystems, США www.appliedbiosystems.com
2,5X Ready Reaction Premix	
Ацетат натрия	Helicon, Россия www.helicon.ru
Хлорид магния MgCl ₂	
Глицерол	
Ампициллин	
Тетрациклин	

Реагент	Производитель
Хлорид кальция CaCl ₂	
Tris (Hydroxymethyl) Aminomethane	
Уксусная кислота	
Бромистый этидий <i>Ethidium Bromide</i>	
Натрий хлорид NaCl	
Агар	
pGEM®-T Easy	
IPTG	Anatrace, США www.affymetrix.com
X-GAL	USBiological, США www.usbio.net
Парафильм <i>Parafilm® M</i>	Alcan Packaging, США www.alcanpackaging.com
ДНК-экспресс	Литех, Россия www.lytech.ru

А.Э. Кучбоев, Б.К. Жумабекова, Б.Х. Рузиев

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЗООЛОГИЯ
Учебное пособие

Подписано в печать 04.05.2024.
Формат 29,7 × 42½. Бумага офсетная.
Гарнитура Times New Roman.
Объем 6,2 усл. печ. л. Тираж 500 экз.
Заказ № 1492.

Редакционно-издательский отдел
Павлодарского педагогического университета имени Әлкей Марғұлан
140002, г. Павлодар, ул. Олжабай батыр, 60