

Биолого-почвенный факультет

Соловьева В.В., Мороз А.Р., Ризванов А.А., Сабиров Р.М.

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
БЕСПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ ПО НУКЛЕОТИДНОЙ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНА
18S РИБОСОМНОЙ РНК**

Учебное пособие



КАЗАНСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
2011

УДК 592/599: 577.21.06

ББК 28.69: 28.04

С 59

*Печатается по рекомендации Редакционно-издательского
совета биолого-почвенного факультета КФУ*

Научный редактор-

доктор биологических наук, профессор КИББ КНЦ РАН **В.М.Чернов**

Рецензент -

доктор биологических наук, с.н.с. ЛИН СО РАН **О.А.Тимошкин**

Соловьева В.В.

С 59 Молекулярно-генетический анализ беспозвоночных животных по нуклеотидной последовательности гена 18S рибосомной РНК: учебное пособие / Соловьева В.В., Моров А.Р., Ризванов А.А., Сабилов Р.М.- Казань: Казан. федеральный ун-т, 2011. – 52 с.

В пособии к учебным курсам «Молекулярная систематика и филогенетика беспозвоночных», «Проблемы мегасистемы Животного Царства», «Частная зоология беспозвоночных» описано применение удобного маркера для идентификации эукариотических организмов – гена, кодирующего 18S рибосомную РНК. В простой и доступной форме изложены все этапы исследования – от требований к сбору материала, выделения НК и проведения ПЦР-амплификации до построения филогенетических древ.

Предназначено для студентов, магистрантов и аспирантов биологических факультетов университетов, а также сельскохозяйственных, ветеринарных и педагогических ВУЗов.

УДК 592/599: 577.21.06

ББК 28.69: 28.04

© Соловьева В.В., Моров А.Р.,

Ризванов А.А., Сабилов Р.М.

**© Казанский федеральный
университет, 2011**

СОДЕРЖАНИЕ

	ВВЕДЕНИЕ	5
	ТРЕБОВАНИЯ К СБОРУ ЗООЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА	6
	ВЫДЕЛЕНИЕ ГЕНОМНОЙ ДНК	7
<u>Задание 1.</u>	<i>Выделение геномной ДНК из образца беспозвоночного животного при помощи реактива «ДНК-ЭКСПРЕСС»</i>	7
	ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ МЕТОДА ПЦР- АМПЛИФИКАЦИИ	7
	ПЦР-АМПЛИФИКАЦИЯ	12
<u>Задание 2.</u>	<i>Проведение ПЦР-амплификации</i>	12
	ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ МЕТОДА ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ	14
<u>Задание 3.</u>	<i>Приготовление агарозного геля и проведение электрофореза ПЦР-продуктов</i>	15
<u>Задание 4.</u>	<i>Выделение ДНК из агарозного геля с использованием колонок набором EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit</i>	17
	РЕАКЦИЯ ЛИГИРОВАНИЯ И НЕОБХОДИМЫЕ КОМПОНЕНТЫ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ РЕАКЦИИ	18
<u>Задание 5.</u>	<i>Постановка реакции лигирования</i>	20
	КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК <i>ESCHERICHIA COLI</i>	20
	ТРАНСФОРМАЦИЯ И ПРИГОТОВЛЕНИЕ КОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК <i>E. COLI</i>	21
<u>Задание 6.</u>	<i>Приготовление компетентных клеток <i>E. coli</i> с использованием $CaCl_2$ метода (Cohen et al., 1972)</i>	22
<u>Задание 7.</u>	<i>Проведение генетической трансформации клеток <i>E. coli</i></i>	22
	ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-СКРИНИНГА БАКТЕРИАЛЬНЫХ КОЛОНИЙ	23
<u>Задание 8.</u>	<i>Проведение ПЦР-скрининга колоний и анализ продуктов ПЦР-амплификации методом электрофореза</i>	23

	ВЫДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК	25
<u>Задание 9.</u>	<i>Выделение плазмидной ДНК набором Fermentas Gene JET™ Plasmid Miniprep Kit # K0502</i>	26
	РЕСТРИКЦИОННЫЙ АНАЛИЗ	27
<u>Задание 10.</u>	<i>Постановка реакции рестрикции</i>	27
	ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРВИЧНОЙ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДНК – СЕКВЕНИРОВАНИЕ	28
<u>Задание 11.</u>	<i>Постановка асимметричной реакции ПЦР-амплификации в присутствии флуоресцентно меченых терминирующих нуклеотидов (реакция секвенирования) (см. Задание 2)</i>	29
<u>Задание 12.</u>	<i>Очистка фрагментов асимметричной реакции ПЦР-амплификации</i>	31
	ИДЕНТИФИКАЦИЯ ОРГАНИЗМА НА ОСНОВАНИИ АНАЛИЗА ПЕРВИЧНОЙ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ	32
<u>Задание 13.</u>	<i>Проведение множественного выравнивания с помощью программы Blastn</i>	35
	ПОСТРОЕНИЕ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОГО ДРЕВА	39
<u>Задание 14.</u>	<i>Составление выборки анализируемых последовательностей.</i>	40
<u>Задание 15.</u>	<i>Выполнение множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей с помощью программы ClustalW</i>	41
<u>Задание 16.</u>	<i>Построение филогенетического древа с помощью программы DNAPARS из пакета Phylip методом максимальной экономии</i>	43
	ПРИЛОЖЕНИЕ. Список используемых реагентов	49
	ОСНОВНАЯ ЛИТЕРАТУРА	51
	ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА	51

ВВЕДЕНИЕ

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 18S рРНК у эукариот, а усовершенствованные методы секвенирования (определение нуклеотидной последовательности нуклеиновых кислот) и обработки материала стали позволять получать данные в сравнительно короткие сроки. 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 деревьями. 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).

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). Ген, кодирующий 18S рибосомную РНК, есть в геноме всех известных эукариот и является удобным маркером для их идентификации; он отсутствует у вирусов, бактерий и архей. Ген 18S рРНК содержит как консервативные участки, одинаковые у всех прокариот, так и переменные. 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.

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.

В данном пособии в простой и доступной форме описано применение удобного маркера для идентификации эукариотических организмов по гену, кодирующему 18S рибосомную РНК. Подробно и последовательно изложены все этапы исследования – от требований к сбору материала, выделения НК и проведения ПЦР-амплификации до построения филогенетических древ. Пособие предназначено для учебных курсов «Молекулярная систематика и филогенетика беспозвоночных», «Проблемы мегасистемы Животного Царства», «Частная зоология беспозвоночных», должно способствовать более широкому применению молекулярно-генетических данных в исследованиях систематики, таксономии и филогении животных наряду с морфологическими и физиологическими данными.

ТРЕБОВАНИЯ К СБОРУ ЗООЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

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 x 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°C во избежание деструктивных изменений молекулы ДНК, либо зафиксирован в 70% растворе этанола ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$). 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.

ВЫДЕЛЕНИЕ ГЕНОМНОЙ ДНК

Задание 1. Выделение геномной ДНК из образца беспозвоночного животного при помощи реактива «ДНК-ЭКСПРЕСС».

1. Высушите на фильтровальной бумаге образец для молекулярно-генетического анализа, затем измельчите его скальпелем (особенно рекомендуется для плотных тканей).

2. В 1,5 мл пробирку, содержащую 100 мкл реактива «ДНК-ЭКСПРЕСС», поместите измельченный образец и перемешайте на вортексе (см. 2 с. цвет. обложки) в течение 10 сек.

3. Пробирку с перемешанным содержимым поместите в предварительно прогретый до 98° С термоблок (см. 2 с. цвет. обложки) и инкубируйте при 98° С в течение 10 мин. Пробирки должны как можно более плотно прилегать к нагреваемым ячейкам термоблока для обеспечения хорошего прогрева. Рекомендовано применение специальных микропробирок с защелкивающимися крышками или заклеивание крышек пробирок Парафильмом Parafilm® M.

4. После прогрева пробирки перенесите в микроцентрифугу (см. 2 с. цвет. обложки) и центрифугируйте при 13,3 тыс. об/мин (17000 g) при комнатной температуре в течение 15 сек.

5. Полученный в результате центрифугирования супернатант используйте в качестве исследуемого образца ДНК (матрицы) для постановки ПЦР-амплификации.

6. Обработанные таким образом пробы можно хранить при температуре 2–8° С в течение одной недели или при температуре -20° С в течение 6 месяцев.

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 (дНТФ – дАТФ, дГТФ, дЦТФ и дТТФ) – используются Taq-полимеразой для синтеза второй цепи ДНК. Несбалансированная смесь дНТФ (концентрация всех дНТФ не одинакова) уменьшает точность работы ДНК-полимеразы. Высокие концентрации дНТФ уменьшают концентрацию свободных ионов Mg^{2+} , 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 pH и ионную силу раствора.

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

Ионы Mg^{2+} – необходимы для работы *Taq*-полимеразы. Диапазон рабочих концентраций: 0,5–5,0 мМ (10 мМ – ингибирует ДНК-полимеразу на 40-50%). Увеличение концентрации Mg^{2+} оказывает очень сильное влияние на специфичность и эффективность полимеразной цепной реакции: увеличивается выход ПЦР-продуктов, но снижается специфичность гибридизации праймеров. Оптимальная концентрация Mg^{2+} зависит от нуклеотидной последовательности ДНК-матрицы и праймеров. Mg^{2+} образует комплексы с дНТФ – именно эти комплексы являются субстратом для *Taq*-полимеразы. С Mg^{2+} стехиометрически связываются дНТФ, РРi (свободный пирофосфат), ЭДТА, PO_4 . Повышение концентрации Mg^{2+} 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° С, 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° С. 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° С.

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

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° С 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, оборудованном 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.

ПЦР-АМПЛИФИКАЦИЯ

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

Задание 2. Проведение ПЦР-амплификации.

1. Перед началом работы разморозьте все компоненты реакции, кроме ДНК-полимеразы (таб. 1), и поместите их на лед для временного хранения.
2. 0,2 мл пробирку поместите на лед, добавьте 34,8 мкл бидистиллированной воды, 5 мкл 10X *Taq*-буфера, 5 мкл 2,5 mM MgCl₂, 1 мкл 0,2 мкМ 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов, по 1 мкл прямого и обратного праймеров, 2 мкл матрицы ДНК, 0,2 мкл *Taq*-полимеразы, конечный объем составит 50 мкл.
3. Реакционную смесь в 0,2 мл пробирке перемешайте на вортексе (см. 2 с. цвет. обложки), и осадите капли на микроцентрифуге (см. 2 с. цвет. обложки) 15 сек при максимальных оборотах (13,3 тыс. об/мин).
4. Установите программу термоциклера (таб. 3).
5. Поместите пробирку с реакционной смесью в лунку термоциклера (см. 2 с. цвет. обложки), плотно закройте крышку термоциклера.
6. После окончания ПЦР-амплификации, образцы можно проанализировать методом электрофореза в агарозном геле. Хранить амплифицированный образец необходимо при -20°C.

Таблица 1.

Состав реакционной смеси для ПЦР

Компоненты реакции	Объем, мкл
10X <i>Taq</i> -буфер	5
2,5 мМ MgCl ₂	5
0,2 мкМ 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфаты	1
20 мкМ праймер прямой*	1
20 мкМ праймер обратный*	1
Матрица ДНК	2
<i>Taq</i> -полимераза 5 ед/мкл	0,2
Бидистиллированная Н ₂ О	34,8
Конечный объем реакции	50

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

Таблица 2.

Специфичные праймеры для амплификации фрагмента гена 18S рРНК

Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5'→3'
Универсальный эукариотический прямой праймер 18S-SR1R(1F)	TACCTGGTTGATQCTGCCAGT
Универсальный эукариотический обратный праймер 18S- SR1(578R)	ATTACCGCGGCTGCT

Таблица 3.

Режим ПЦР-амплификации фрагмента гена 18S рРНК

Температура	Время	Описание этапа
95° С	5 мин	предварительный нагрев
95° С	30 сек	денатурация
60° С	30 сек	отжиг
72° С	1,5 мин	синтез
72° С	2 мин	окончательный синтез
10° С		хранение

} 35 циклов

ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ МЕТОДА ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ

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 флуоресцирует 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 (pH 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

Концентрация агарозы в геле (%)	Размер фрагментов ДНК (Кб)
1,2	0,4–6
1,5	0,2–3
2,0	0,1–2

Задание 3. 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).

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

3. Навеску агарозы растворите в 1X TAE 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 (см. 2 с. цвет. обложки). После того, как гель застыл (30–45 мин при комнатной температуре), осторожно удалите гребенки и залейте ванну для электрофореза буфером 1X TAE до тех пор, пока гель не окажется погруженным в раствор полностью.

6. Смешайте пробы с буфером для нанесения 6X Loading Dye (состоит из: 0,4% оранжевого G, 0,03% бромфенолового синего, 0,03% ксиленицианола 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 *DirectLoad™ 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 (см. 3 с. цвет. обложки) и сфотографируйте системой регистрации результатов электрофореза (см. 3 с. цвет. обложки).

В качестве примера на рисунке 1 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.

10. 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.

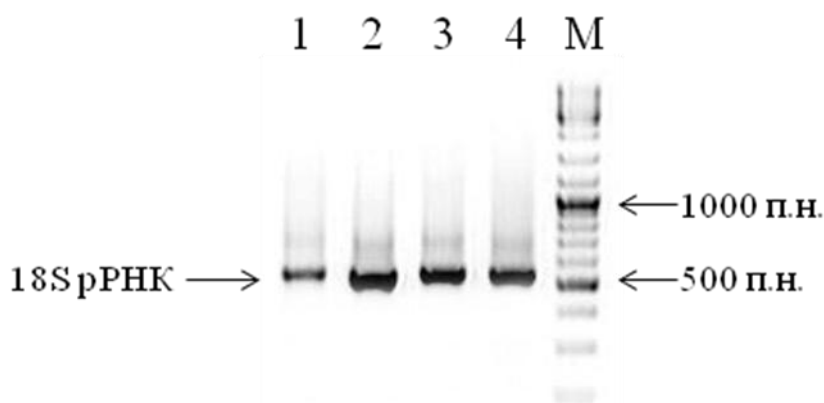


Рис. 1. Анализ ПЦР-амплификации фрагмента гена 18S рРНК при помощи электрофореза в 2% агарозном геле. 1–4 — анализируемые образцы ДНК, М – ДНК-маркер GeneRuller™ DNA Lader Mix (Sigma, США)

Таблица 5.

Возможные проблемы и способы их решения

Проблема	Возможная причина	Возможные способы решения
ДНК в геле выглядит как размазанная полоска	Деградирует продукт	Найдите источник загрязнения нуклеазами; убедитесь, что материал не хранился долго и повторите ПЦР

Проблема	Возможная причина	Возможные способы решения
(шмер)	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 покрашен 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

Задание 4. Выделение ДНК из агарозного геля набором EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit.

1. Добавьте в 1,5 мл пробирку с вырезанным из геля участком Binding Buffer II (связывающий буфер; хранится при +4° С) в пропорции: 3 объема буфера к 1 массе вырезанного из геля участка.

2. Инкубируйте смесь в 1,5 мл пробирке в течение 10 мин при 55° С в термоблоке до растворения геля.

3. Перелейте содержимое пробирки в колонку с сорбентом, вставьте колонку в чистую 2 мл центрифужную пробирку. Инкубируйте смесь в колонке в течение 2 мин при комнатной температуре.

4. Центрифугируйте колонку в 2 мл пробирке в течение 1 мин при 5 тыс. об/мин. Удалите из 2 мл пробирки центрифугат (осажденную

жидкость).

5. Добавьте в колонку 500 мкл Wash Solution (буфер для промывки).
6. Центрифугируйте колонку в 2 мл пробирке в течение 1 мин при 8 тыс. об/мин. Удалите из 2 мл пробирки центрифугат.
7. Повторите пункты 5 и 6 еще один раз.
8. Центрифугируйте колонку в 2 мл пробирке в течение 30 сек при 10 тыс. об/мин.
9. Перенесите колонку в новую 1,5 мл центрифужную пробирку.
10. Добавьте в колонку 20 мкл Elution Buffer (буфер для элюции) в центр мембраны, инкубируйте в течение 2 мин при комнатной температуре.
11. Центрифугируйте колонку в 1,5 мл пробирке в течение 1 мин при 10 тыс. об/мин.
12. Повторите пункты 10 и 11 еще один раз.
13. В 1,5 мл пробирке остается элюированная ДНК (очищенный ПЦР-продукт).
14. Очищенные набором ПЦР-фрагменты хранить при температуре от +2° С до +4° С или от -15° С до -25° С.

РЕАКЦИЯ ЛИГИРОВАНИЯ

Реакция лигирования – это ковалентное соединение двух молекул ДНК. Для этой реакции необходимы следующие компоненты: фермент ДНК-лигаза Т4, буфер 10X Т4 ДНК-Лигазы, плаزمид (вектор) PTZ57R/Т и выделенный из геля ПЦР-фрагмент ДНК.

Фермент ДНК-лигаза Т4 – 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 Т4. Оптимальная температура действия +16° С. Температура хранения -20° С.

Буфер 10X Т4 ДНК-Лигазы обеспечивает оптимальные условия для реакции лигирования. В его состав входят: 400 mM трис-НСl pH 7,8, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT (дитиотреитол), 5 mM АТФ. Буфер следует хранить (при -20° С) небольшими aliquотами, не размораживая

множественно, для избежания разложения АТФ.

Плазмида (вектор) PTZ57R/T (рис. 2) используется для Т/А 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*.

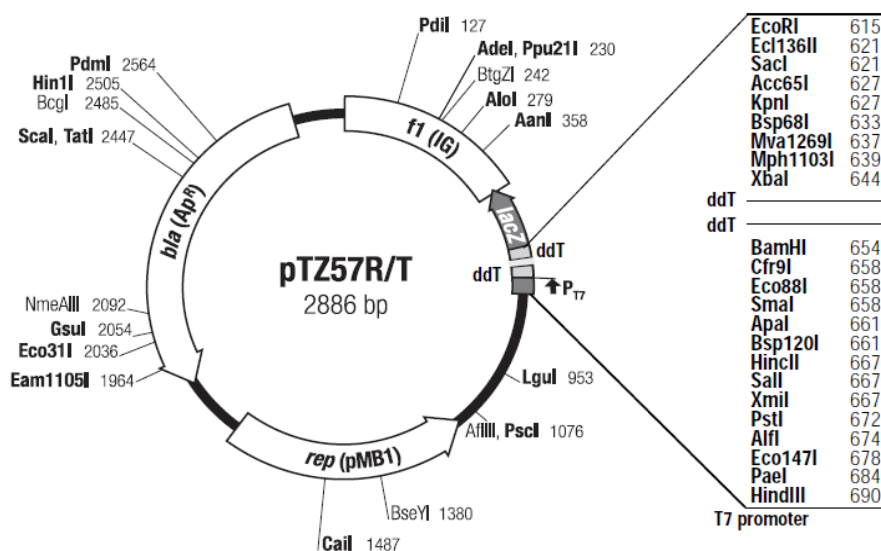


Рис. 2. Карта вектора PTZ57R/T (www.helicon.ru)

Задание 5. Постановка реакции лигирования.

1. Перед началом работы разморозьте все компоненты реакции (таб. 6), кроме ДНК-лигазы Т4, и поместите их на лед для временного хранения при 4° С.

2. 1,5 мл пробирку поместите на лед, добавьте 3,7 мкл очищенного из агарозного геля ПЦР-фрагмента, 0,5 мкл 10X Т4 буфера ДНК-лигазы, 0,5 мкл плазмиды PTZ57R/Т и 0,3 мкл Т4 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
Плазида (вектор) PTZ57R/Т	0,5
Буфер ДНК-лигаза Т4 10X	0,5
ПЦР-фрагмент ДНК	3,7
ДНК-лигаза Т4	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 (рН 7,5)

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

Таблица 8.

Состав агаризованной среды LB

Название компонента	Количество
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

ТРАНСФОРМАЦИЯ И ПРИГОТОВЛЕНИЕ КОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК *E. 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, lacI^qZΔM15, Tn10(Tet^R)]. 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.

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

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

2. Инкубируйте в термостате 3 часа при 37° С, 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° С, 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 ресуспендируйте в 15 мл заранее приготовленного и охлажденного раствора, содержащего 10 mM MgCl_2 и 5 mM CaCl_2 .

5. Полученную смесь центрифугируйте 10 мин при 4° С, 6 тыс. об/мин, по окончании центрифугирования удалите надосадочную жидкость, осадок в каждом тубусе ресуспендируйте в 2 мл заранее приготовленного и охлажденного раствора 0,1M CaCl_2 .

Задание 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° С 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° С.

4. После инкубации бактерии высейте 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° С.

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

Таблица 9.

Состав реакционной смеси для ПЦР-скрининга

Компоненты реакции	Объем, мкл
10X <i>Taq</i> -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
<i>Taq</i> -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

Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5'→3'
pUC/M13 Forward	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC
pUC/M13 Reverse	TCACACAGGAAACAGCTATGAC

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

В качестве примера на рисунке 3 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° С с интенсивным перемешиванием

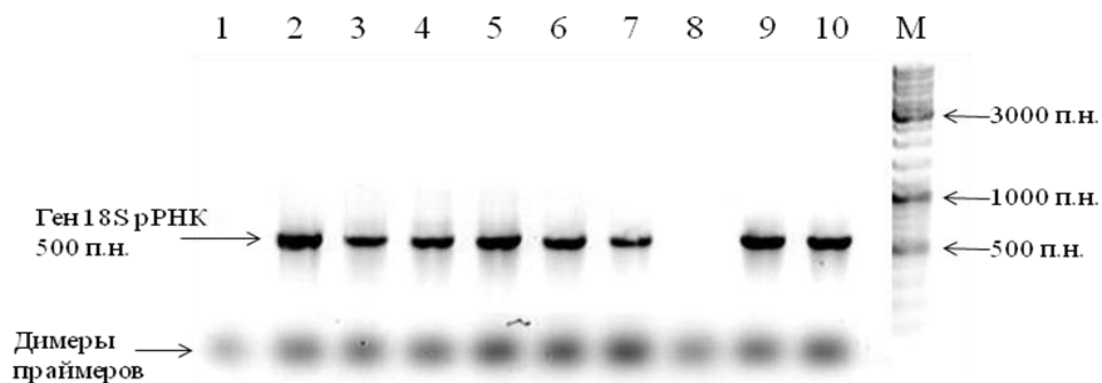


Рис. 3. Анализ результатов ПЦР-скрининга колоний *E. coli* при помощи электрофореза в 2% агарозном геле. 1 – отрицательный контроль, 2 – положительный контроль (фрагмент гена 18S рРНК, встроенный в плазмиду рTZ57R|T), 3–10 – анализируемые колонии, где 3–7, 9,10 – позитивные колонии со вставкой, 8 – продукт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

Долговременное хранение бактериальных штаммов:

Клетки *E. coli* не рекомендуют хранить больше двух недель при температуре +4° С. 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° С до -80° С) 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° С.

ВЫДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК

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

Задание 9. Выделение плазмидной ДНК набором Fermentas Gene JET™ 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.

РЕСТРИКЦИОННЫЙ АНАЛИЗ

Рестриктазы – это эндонуклеазы, узнающие определенные последовательности (сайты рестрикции) в двухцепочечной ДНК и гидролизующие ДНК внутри сайтов или вблизи них. 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.

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° С.

2. 1,5 мл пробирку поместите на лед, добавьте 8 мкл плазмидной ДНК (плазида рTZ57R/Т 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° С.

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.

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

Рестриктаза	Сайт узнавания	Источник	Буферный раствор
EcoR1	G [^] AATT C C TTAA [^] G	Штамм <i>E. coli</i> , несущий клонированный ген <i>ecoR1R</i> из <i>E. coli</i> RY13	Buffer EcoR1 или Buffer Tango
BamH1	G [^] GATC C C CTAG [^] C	Штамм <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	Buffer BamH1 или Buffer Tango

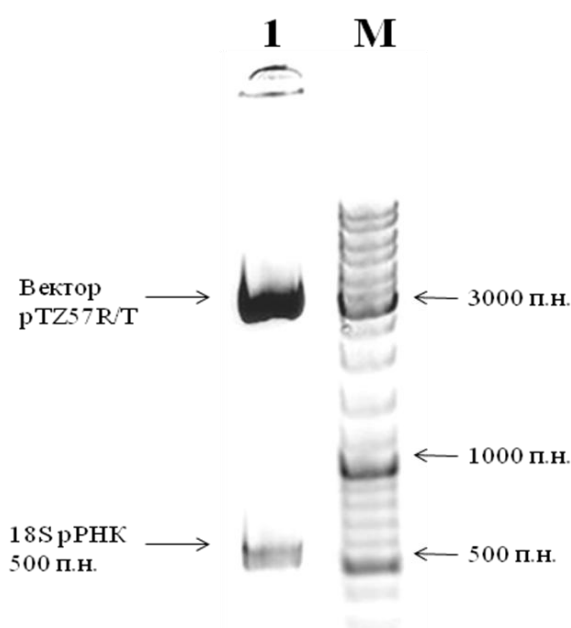


Рис. 4. Анализ результатов рестрикционного расщепления плазмидной ДНК при помощи электрофореза в 0,8% агарозном геле. 1 – анализируемый образец, М – ДНК-маркер GeneRuller™ DNA Lader Mix (Sigma, США)

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРВИЧНОЙ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДНК – СЕКВЕНИРОВАНИЕ

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).

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. Задание 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
Плазмидная ДНК	1
Бидистиллированная вода	13,75
Конечный объем реакции	20

Таблица 14.

Режим температурного циклирования при проведении реакции секвенирования

Температура	Время	Описание этапа	} 35 циклов
96° C	1 мин	предварительный нагрев	
96° C	10 сек	денатурация	
55° C	50 сек	отжиг	
60° C	4 мин	синтез	
10° C		хранение	

Таблица 15.

Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных при ДНК-секвенировании

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

В качестве буфера для ПЦР амплификации клонированных фрагментов применяют 5X TMS Buffer (400 мМ Трис pH 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° С.
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° С с открытыми крышками.
8. После испарения остатков надосадочной жидкости добавьте 20 мкл Hi-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° С в течение 2 мин;
 - Охлаждение до 4° С 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.

Результаты секвенирования обрабатываются программным пакетом Lasergene 5.03 (DNA STAR, Inc., США). Для анализа секвенсных хроматограмм используется программа SeqMan.

В качестве примера на рисунке 5 показан анализ секвенсной хроматограммы одного образца с помощью программы SeqMan.

Определенная первичная нуклеотидная последовательность фрагмента гена 18S рРНК (длина 486 п.н.):

```
ttcagcttagccatgcagtgtaagttcacgccacgcattagaacgggcgaaaccgcgaatggctcaggaa  
ccggacctaatacctcgggaccgtattcctcctcggaggcgatggataactgtggcaattctagagctaatacatgt  
gacacaggccgcgatcggtcggcgcgcggtgtcgtcgctcgcttcttgcgcgctggcatccacgtcggccgtt  
ccgggtcgcggcgctacatattagactgagaccgatgcgcgctattccgtcctcctgtcgtcgctggtggctcgag  
tggcttacgcttctctgtttgcgtcgggtggcggggctcacagggcgacgcgctccgctttggtgactctggataact
```

cactggtcgatcgcacgggctccaatgctcggcgacgggtctctcgagggtccgccctatcaactgtcgacggtc
ggttaagtgcctaccgtggttactacgggtaacgggg

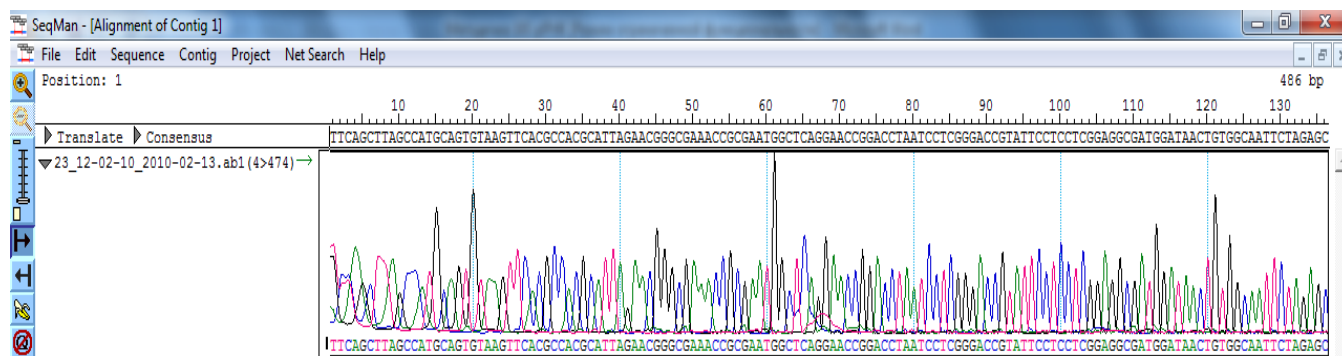


Рис. 5. Анализ секвенсной хроматограммы образца с помощью программы SeqMan

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ОРГАНИЗМА НА ОСНОВании АНАЛИЗА ПЕРВИЧНОЙ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

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 **discontiguous 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 последовательности 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 чувствительный 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) 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. 6).

3. В окно для ввода последовательности Enter Query Sequence введите последовательность в формате FASTA (рис. 7). В качестве примера мы используем нуклеотидную последовательность фрагмента гена 18S рРНК, которая приведена выше по тексту.

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.

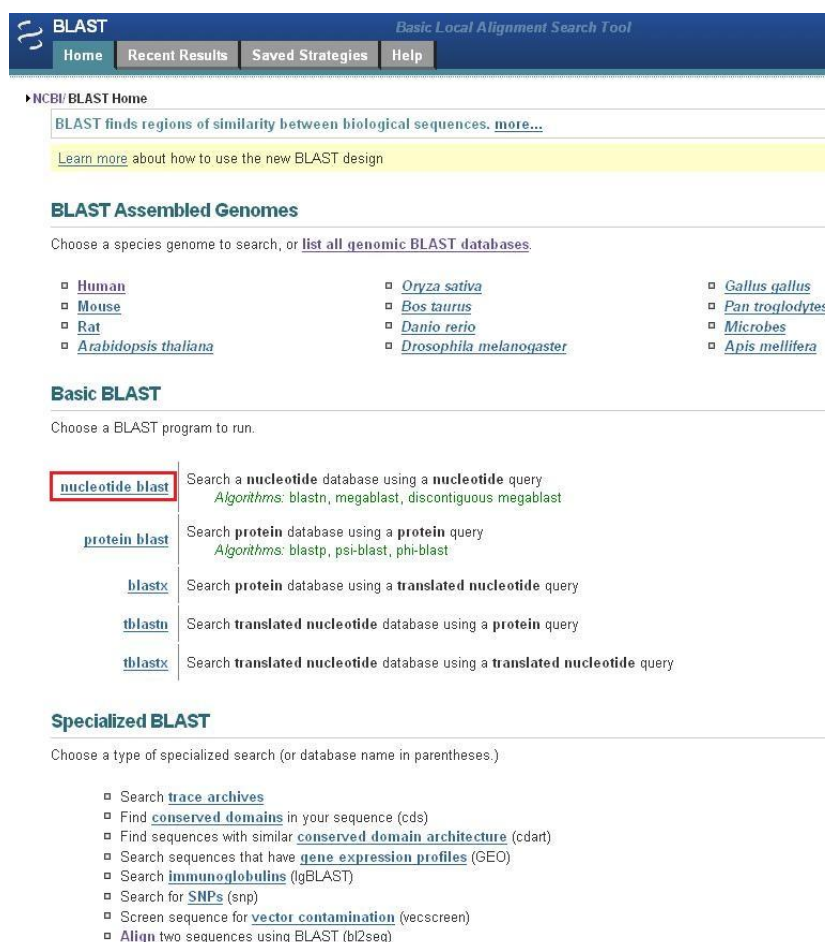


Рис. 6. Главная страница BLAST. Рамкой выделена программа blastn для поиска всех сходных нуклеотидных последовательностей

BLAST Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help

My NCBI Sign In Register

NCBI BLAST/ blastn suite

blastn blastp blastx tblastn tblastx

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)

Clear Query subrange

From To

Or, upload file

Job Title

Align two or more sequences

Choose Search Set

Database

Human genomic + transcript Mouse genomic + transcript Others (nr etc.):

Nucleotide collection (nr/nt)

Organism

Optional

Exclude

Optional

Entrez Query

Optional

Program Selection

Optimize for

Highly similar sequences (megablast)

More dissimilar sequences (discontiguous megablast)

Somewhat similar sequences (blastn)

BLAST

Search database Nucleotide collection (nr/nt) using Blastn (Optimize for somewhat similar sequences)

Algorithm parameters

Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow and marked with + sign

Copyright | Disclaimer | Privacy | Accessibility | Contact | Send feedback

NCBI | NLM | NIH | DHHS

Рис. 7. Страница BLAST для ввода анализируемой нуклеотидной последовательности и выбора параметров поиска. Рамками выделены ключевые элементы страницы

Результаты анализа представлены на рисунках 8, 9 и 10.

Согласно проведённому анализу, исследуемая нуклеотидная последовательность гена 18S рРНК может быть идентифицирована как нуклеотидная последовательность *Rossia palpebrosa* (ген 18S рРНК, AY557473.1) на основании 99% сходства (максимальная идентичность – 99%, область перекрытия запроса – 99%, E value – 0.0).

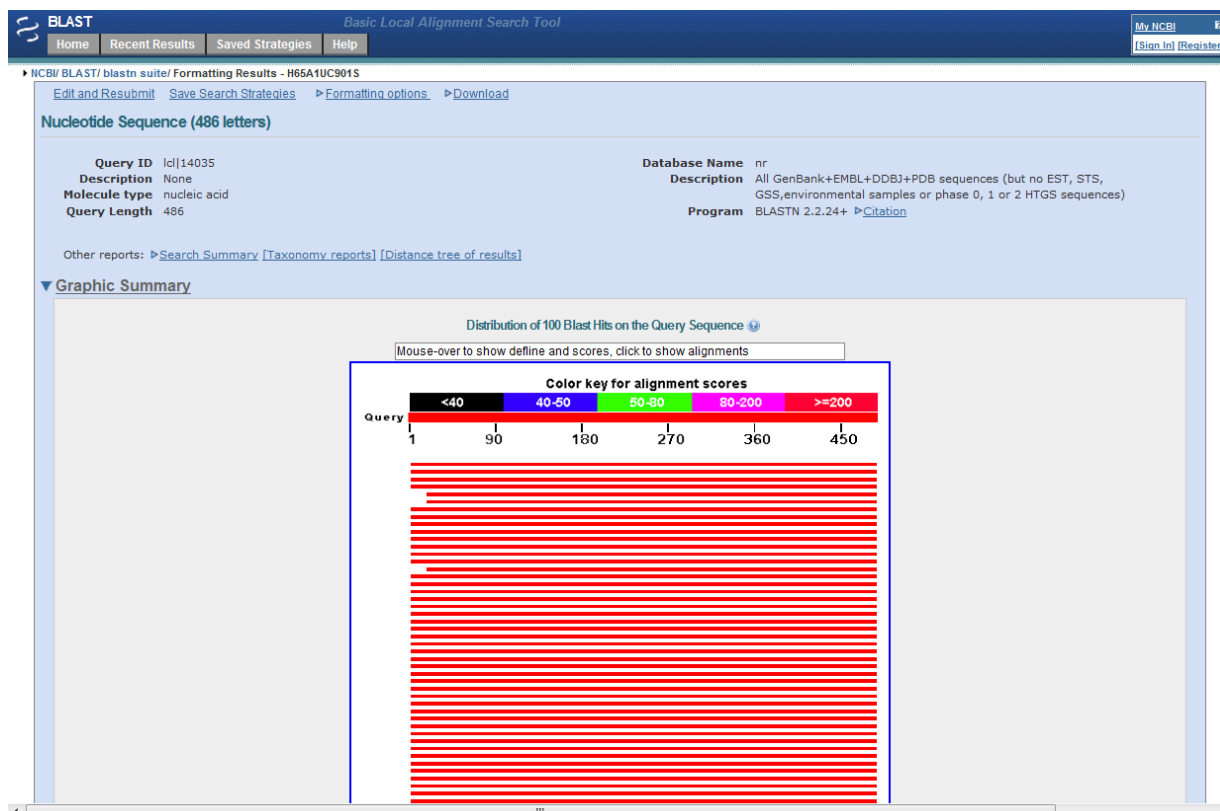


Рис. 8. Графическое представление результатов работы программы BLAST

Descriptions

Legend for links to other resources: UniGene GEO Gene Structure Map Viewer PubChem BioAssay

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AY557473.1	Rossia palpebrosa 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	850	850	99%	0.0	99%	
AY557475.1	Stoloteuthis leucoptera 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	704	704	99%	0.0	93%	
AY557474.1	Sepiella affinis 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	688	688	99%	0.0	91%	
AY557472.1	Heteroteuthis hawaiiensis 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	686	686	99%	0.0	92%	
AJ606937.1	Sepietta sp. France-WK partial 18S rRNA gene	677	677	96%	0.0	91%	
AJ606940.1	Heteroteuthis sp. Spain-WK partial 18S rRNA gene	670	670	96%	0.0	92%	
AY557470.1	Sepiella inermis 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	659	659	99%	0.0	90%	
AY557483.1	Bathyteuthis abyssicola 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	636	636	99%	5e-179	90%	
EU735272.1	Bathyteuthis sp. A ARL-2008 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	628	628	99%	8e-177	89%	
AY557471.1	Sepia officinalis 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	628	628	99%	8e-177	89%	
EU735271.1	Chtenopteryx sp. ARL-2008 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	623	623	99%	3e-175	88%	
EU735270.1	Chtenopteryx sicula 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	623	623	99%	3e-175	88%	
EU735301.1	Thysanoteuthis rhombus 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	618	618	99%	1e-173	89%	
EU735302.1	Magnapinna sp. ARL-2008 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	612	612	99%	6e-172	88%	
AJ606935.1	Sepia officinalis partial 18S rRNA gene	612	612	96%	6e-172	89%	
EU735284.1	Chiroteuthis veranyi 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	609	609	99%	7e-171	88%	
EU735283.1	Chiroteuthis calyx 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	609	609	99%	7e-171	88%	
AY557486.1	Chiroteuthis veranyi 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	609	609	99%	7e-171	88%	
EU735292.1	Octopoteuthis megaptera 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	605	605	99%	9e-170	88%	
EU735274.1	Brachioteuthis sp. 3 ARL-2008 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	605	605	99%	9e-170	88%	
AY557499.1	Histioteuthis corona 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	605	605	99%	9e-170	88%	
AY557485.1	Brachioteuthis sp. ARL-2004 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	605	605	99%	9e-170	88%	
EU735313.1	Octopoteuthis danae 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	601	601	99%	1e-168	88%	
EU735281.1	Planctoteuthis levimana 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	601	601	99%	1e-168	89%	
EU735273.1	Brachioteuthis sp. 2 ARL-2008 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	601	601	99%	1e-168	88%	
AY557506.1	Neoteuthis thielei 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	601	601	99%	1e-168	88%	
AY557503.1	Lepidoteuthis grimaldii 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	601	601	99%	1e-168	88%	
EU735290.1	Histioteuthis miranda 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	600	600	99%	4e-168	87%	
EU735289.1	Histioteuthis bonellii 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	600	600	99%	4e-168	87%	
AY557507.1	Octopoteuthis nielsenii 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	600	600	99%	4e-168	88%	
AY145378.1	Histioteuthis sp. YJP-2002 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	600	600	99%	4e-168	88%	
EU735305.1	Pholidoteuthis adami 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	598	598	99%	1e-167	87%	
EU735269.1	Architeuthis sp. ARL-2008 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	596	596	99%	4e-167	87%	
AY557500.1	Histioteuthis hoylei 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	596	596	99%	4e-167	87%	
AY557482.1	Architeuthis dux 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	596	596	99%	4e-167	87%	
AY377661.1	Architeuthis dux 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	596	596	99%	4e-167	87%	

Рис. 9. Текстовое представление результатов работы программы BLAST



Рис. 10. Парное выравнивание изучаемой нуклеотидной последовательности и нуклеотидной последовательности из базы данных

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

ПОСТРОЕНИЕ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОГО ДРЕВА

Для построения филогенетического дерева необходимо сначала составить выборку анализируемых последовательностей и провести их множественное выравнивание. Далее с помощью специальных программ строится древо, 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. 11 и 12). Например, >Номер последовательности → Перевод строки → Нуклеотидная последовательность организма (без лишних пробелов).



№1	Определенная первичная нуклеотидная последовательность образца
№2	gi 49482078 gb AY557473.1 <i>Rossia palpebrosa</i> 18S rRNA gene
№3	gi 49482080 gb AY557475.1 <i>Stoloteuthis leucoptera</i> 18S rRNA gene
№4	gi 49482079 gb AY557474.1 <i>Sepiola affinis</i> 18S rRNA gene
№5	gi 49482077 gb AY557472.1 <i>Heteroteuthis hawaiiensis</i> 18S rRNA gene

Рис. 11. Текстовый файл Microsoft Word с названиями организмов

Задание 15. Выполнение множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей с помощью программы ClustalW.

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

1. Для выполнения множественного выравнивания, зайдите на сайт ClustalW: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>.
2. На главной страницы ClustalW есть меню с четырьмя вкладками (рис. 13):



Рис. 12. Текстовый файл Microsoft Word с нумерацией последовательностей

- Step 1 (Шаг 1) – вкладка содержит окно для ввода анализируемых нуклеотидных последовательностей, в которое вставляются последовательности в формате FASTA из файла Microsoft Word. В графе Enter or paste выбираем DNA;

- Step 2 (Шаг 2) – вкладка содержит опции парного выравнивания (Pairwise Alignment Options): медленное (Slow) или быстрое (Fast). Параметры по умолчанию (Slow) не меняем;

- Step 3 (Шаг 3) – вкладка содержит опции множественного выравнивания последовательностей (Multiple Sequence Alignment Options): формат ввода устанавливаем PHYLIP;

- Step 4 (Шаг 4) – вкладка для отправки результатов на электронную почту (указать свой электронный адрес в графе EMAIL).

3. Нажмите на кнопку SUBMIT внизу страницы для запуска выравнивания. Результаты выравнивания присылают на почту в течение нескольких минут (рис. 14).

EMBL-EBI EBI Search All Databases Enter Text Here Go Reset Advanced Search Give us feedback

Databases Tools EBI Groups Training Industry About Us Help Site Index

Help
FAQ
Jalview
Download

Related Applications
Multiple Sequence Alignment
Phylogeny

Clustal related literature
Search for Clustal related literature in Medline... more

ClustalW2 - Multiple Sequence Alignment

ClustalW2 is a general purpose multiple sequence alignment program for DNA or proteins.

Use this tool

STEP 1 - Enter your input sequences

Enter or paste a set of **DNA** sequences in any supported format:

>1
CAGCTTAGCCATGCAAGTGTAAAGTTCACGCCACGCATTAGAACGGGCGAAACCGCAATGGCTCAGGAACCGG
ACCTAATCCTCGGACCGTATTCCTCTCGGAGGCGATGGATAACTGTGGCAATCTAGAGCTAATACATGTG
ACACAGGCGCGATCGGTGCGGCGCGTTGTCGTCGCTCGCTTCTTGGCGCGCTGGCATCCACGTCGCGGT
TCCGGTTCGCGGCGCTACA

>2
AGCTTAAGCCATGCAAGTGTAAAGTTCACGCCACGCATTAGAACGGGCGAAACCGCAATGGCTCAGGAACCGG

Or, upload a file:

STEP 2 - Set your Pairwise Alignment Options

Alignment Type: ☒ Slow ☐ Fast

Slow Pairwise Alignment Options

DNA Weight Matrix: **IUB** GAP OPEN: **10** GAP EXTENSION: **0.1**

STEP 3 - Set your Multiple Sequence Alignment Options

DNA Weight Matrix: **IUB** GAP OPEN: **10** GAP EXTENSION: **0.20** GAP DISTANCES: **5** NO END GAPS: **no**

ITERATION: **none** NUMITER: **1** CLUSTERING: **NJ**

OUTPUT Options

FORMAT: **PHYLIP** ORDER: **aligned**

STEP 4 - Submit your job

☒ Be notified by email (Tick this box if you want to be notified by email when the results are available)

EMAIL:

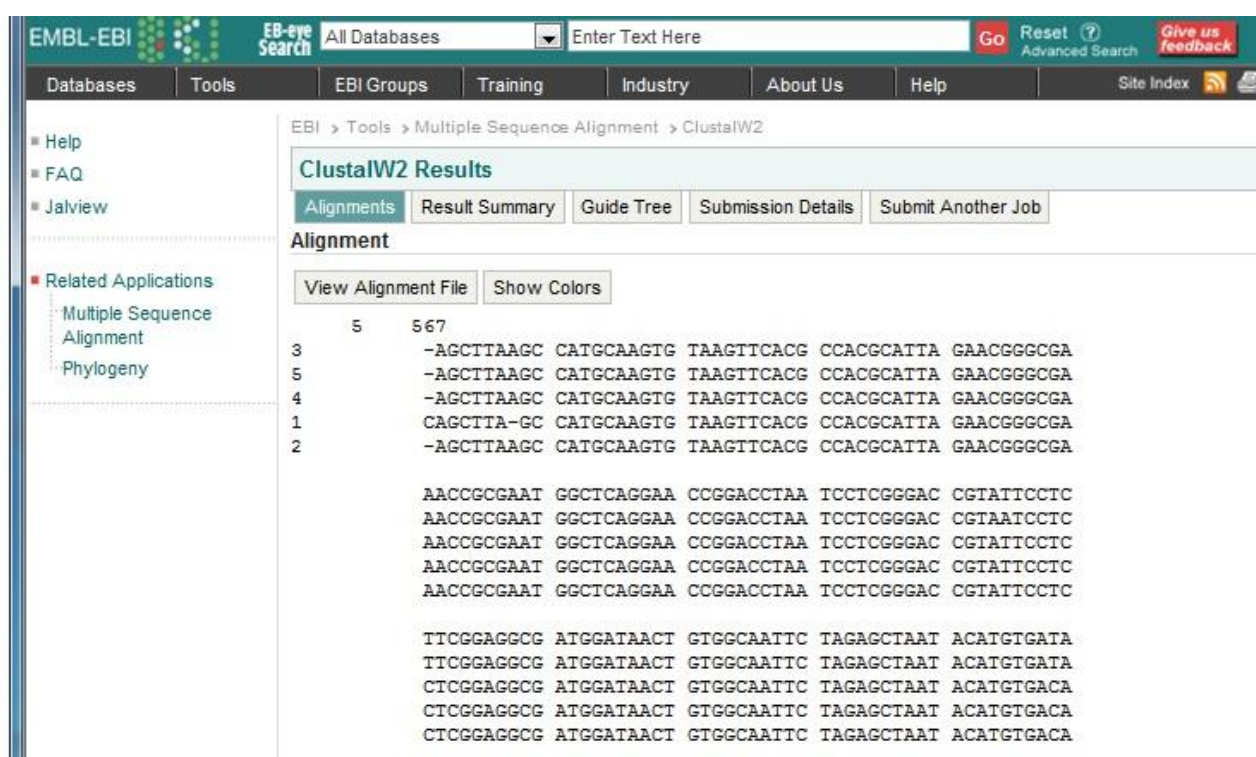
TITLE:

If available, the title will be included in the subject of the notification email and can be used as a way to identify your analysis

Рис. 13. Страница ClustalW для ввода анализируемой нуклеотидной последовательности и выбора параметров выравнивания. Рамками выделены ключевые элементы страницы

Задание 16. Построение филогенетического дерева с помощью программы DNAPARS из пакета Phylip методом максимальной экономии.

Для построения филогенетического дерева используем программу DNAPARS из пакета Phylip (<http://evolution.gs.washington.edu/phylip>). Программу можно скачать бесплатно с сайта производителя. Программа позволяет проводить бутстреп-анализ, который оценивает статистическую значимость каждого из узлов построенного дерева. Методом максимальной экономии (maximal parsimony) выбирается дерево с минимальным количеством мутаций, необходимых для объяснения данных.



	5	567
3	-AGCTTAAGC	CATGCAAGTG TAAGTTCACG CCACGCATTA GAACGGGCGA
5	-AGCTTAAGC	CATGCAAGTG TAAGTTCACG CCACGCATTA GAACGGGCGA
4	-AGCTTAAGC	CATGCAAGTG TAAGTTCACG CCACGCATTA GAACGGGCGA
1	CAGCTTA-GC	CATGCAAGTG TAAGTTCACG CCACGCATTA GAACGGGCGA
2	-AGCTTAAGC	CATGCAAGTG TAAGTTCACG CCACGCATTA GAACGGGCGA
		AACCGCGAAT GGCTCAGGAA CCGGACCTAA TCCTCGGGAC CGTATTCCTC
		AACCGCGAAT GGCTCAGGAA CCGGACCTAA TCCTCGGGAC CGTATTCCTC
		AACCGCGAAT GGCTCAGGAA CCGGACCTAA TCCTCGGGAC CGTATTCCTC
		AACCGCGAAT GGCTCAGGAA CCGGACCTAA TCCTCGGGAC CGTATTCCTC
		AACCGCGAAT GGCTCAGGAA CCGGACCTAA TCCTCGGGAC CGTATTCCTC
		TTCGGAGGCG ATGGATAACT GTGGCAATTC TAGAGCTAAT ACATGTGATA
		TTCGGAGGCG ATGGATAACT GTGGCAATTC TAGAGCTAAT ACATGTGATA
		CTCGGAGGCG ATGGATAACT GTGGCAATTC TAGAGCTAAT ACATGTGACA
		CTCGGAGGCG ATGGATAACT GTGGCAATTC TAGAGCTAAT ACATGTGACA
		CTCGGAGGCG ATGGATAACT GTGGCAATTC TAGAGCTAAT ACATGTGACA

Рис. 14. Результаты выравнивания программой ClustalW

1. Создаем текстовый файл (с расширением .txt) и копируем в него данные с полученным множественным выравниванием пяти последовательностей (рис. 15). Файл называем, например, Example1.txt.

2. Запускаем программу **seqboot.exe** из пакета Phylip. Программа формирует файл с указанным числом повторений (реplik). Для запуска работы программы файл должен находиться в той же папке. После открытия программы вводим название файла Example1.txt, нажимаем

Enter. Появляются входные параметры анализа (рис. 16): R → Enter → How many replacement? (изменение количества реплик) → 1000 → Enter → Y to accept these or type the letter for one to change → Y → Random number seed (must be odd)? → 7 → Enter.

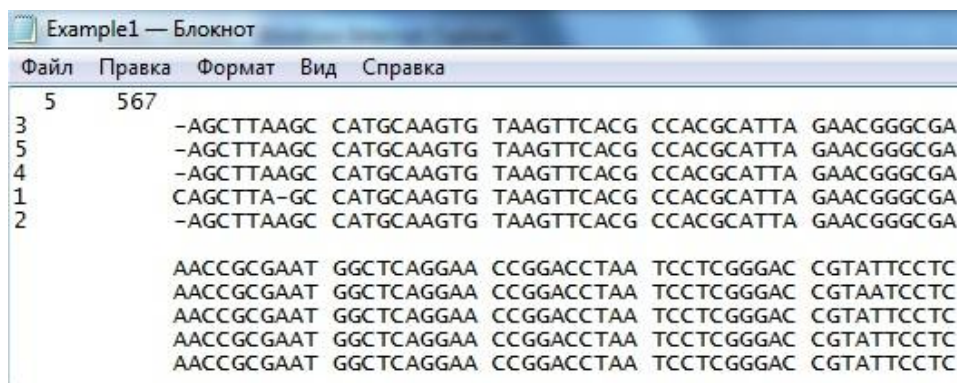


Рис. 15. Текстовый файл (txt) с множественным выравниванием последовательностей

Результаты автоматически сохраняются в файле outfile, который желательно переименовать, например, в Example2, чтобы предотвратить случайное переписывание файла с результатами при проведении следующего анализа.

3. Запускаем программу **dnapars.exe**, которая строит древо по методу максимальной экономии, используя значения из файла Example2.

4. Вводим название файла Example2, нажимаем Enter. Появляются входные параметры анализа (рис. 17): M → Analyze multiple data sets? (type D or W) → D → Enter → How many data sets? → 1000 → Random number seed (must be odd)? → 5 → Number of times to jumble? → 6 → Y to accept these or type the letter for one to change → Y. Процесс работы программы показан на рисунке 18.

```

seqboot.exe: can't find input file "infile"
Please enter a new file name> Example1.txt

Bootstrapping algorithm, version 3.6a3

Settings for this run:
D      Sequence, Morph, Rest., Gene Freqs?      Molecular sequences
J      Bootstrap, Jackknife, Permute, Rewrite?   Bootstrap
B      Block size for block-bootstrapping?       1 (regular bootstrap)
R      How many replicates?                      100
W      Read weights of characters?               No
C      Read categories of sites?                 No
F      Write out data sets or just weights?       Data sets
I      Input sequences interleaved?              Yes
@      Terminal type (IBM PC, ANSI, none)?       (none)
1      Print out the data at start of run         No
2      Print indications of progress of run      Yes

Y to accept these or type the letter for one to change

```

Рис. 16. Входные параметры анализа программы seqboot.exe

Результаты автоматически сохраняются в файлы outfile и outtree. Файл outtree желательно переименовать, например, в Example3.tre. Файл outfile желательно переименовать, например, в Example3. Файл Example3.tre содержит древо без бутстреп-поддержки (рис. 19). Его можно открыть с помощью программы TreeView (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>), которая показывает графические изображения построенных древ.

```

DNA parsimony algorithm, version 3.6a3

Setting for this run:
U      Search for best tree?                     Yes
S      Search option?                           More thorough search
U      Number of trees to save?                  100000
J      Randomize input order of sequences?       No. Use input order
O      Outgroup root?                           No, use as outgroup species 1
T      Use Threshold parsimony?                 No, use ordinary parsimony
N      Use Transversion parsimony?              No, count all steps
W      Sites weighted?                          No
M      Analyze multiple data sets?              No
I      Input sequences interleaved?              Yes
@      Terminal type (IBM PC, ANSI, none)?       (none)
1      Print out the data at start of run         No
2      Print indications of progress of run      Yes
3      Print out tree                            Yes
4      Print out steps in each site              No
5      Print sequences at all nodes of tree      No
6      Write out trees onto tree file?           Yes

Y to accept these or type the letter for one to change

```

Рис. 17. Входные параметры анализа программы dnapars.exe

```

Data set # 25:
Adding species:
  1. 2
  2. 5
  3. 1
  4. 4
  5. 3

Doing global rearrangements on all trees tied for best
?-----?
.....

Adding species:
  1. 2
  2. 5
  3. 1
  4. 3
  5. 4

Doing global rearrangements on all trees tied for best
?-----?
.....

```

Рис. 18. Процесс работы программы dnarpars.exe

5. Запускаем программу **consense.exe**, которая позволяет вывести значения бутстреп-поддержки на древе, работает на основе файла, полученного предыдущей программой, Example3.tre. После открытия программы вводим название файла Example3.tre, нажимаем Enter. Появляются входные параметры анализа (рис. 20): Are these settings correct? → Y.

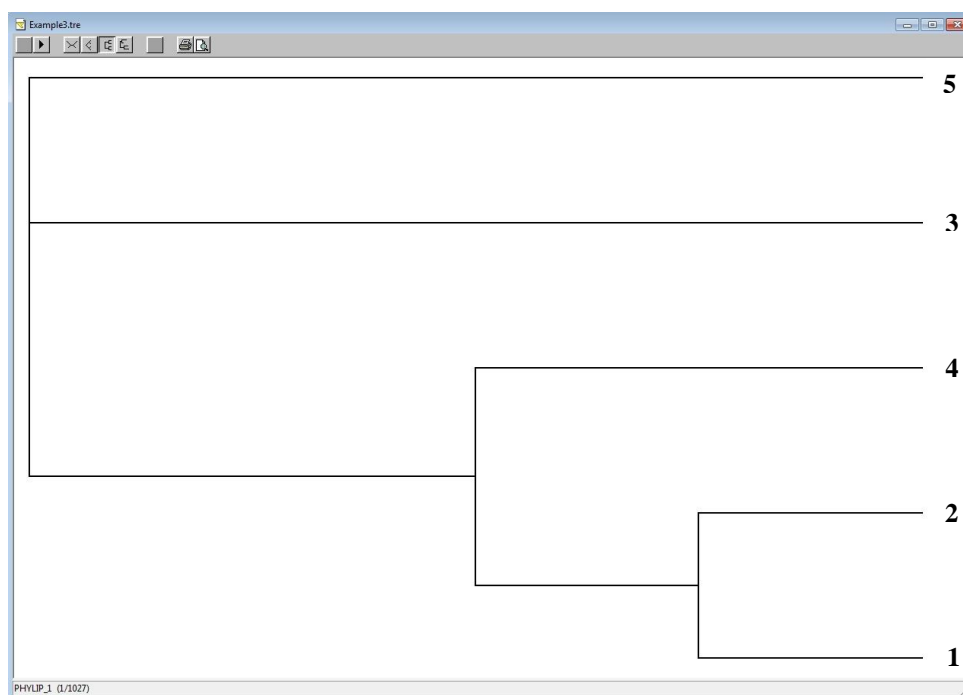


Рис. 19. Древо без бутстреп-поддержки

Результаты автоматически сохраняются в файлах outfile и outtree. Файл outtree желательно переименовать, например, в Example4.tre, который содержит древо со значениями бутстреп-поддержки, например, 1000 реплик (рис. 21).

```
consense.exe: can't find input tree file "intree"
Please enter a new file name> Example3.tre

Consensus tree program, version 3.6a3
Settings for this run:
C      Consensus type (MRe, strict, MR, ML): Majority rule (extended)
0      Outgroup root: No, use as outgroup species 1

R      Trees to be treated as Rooted: No
T      Terminal type (IBM PC, ANSI, none): (none)
1      Print out the sets of species: Yes
2      Print indications of progress of run: Yes
3      Print out tree: Yes
4      Write out trees onto tree file: Yes

Are these settings correct? (type Y or the letter for one to change)
```

Рис. 20. Входные параметры анализа программы consense.exe

Каждому узлу на дереве приписано какое-то значение бутстреп-поддержки, например из 1000 реплик. Это число характеризует на скольких деревьях эта ветвь (узел) существует. Чем ближе значение к 1000, тем выше достоверность ветвления.

Открываем файл с помощью программы **TreeView**, для вывода бутстреп-поддержки в меню Tree выбираем Show internal edge labels. Копируем рисунок в графический редактор, например, Paint и номера заменяем соответствующими названиями организмов (рис. 22).

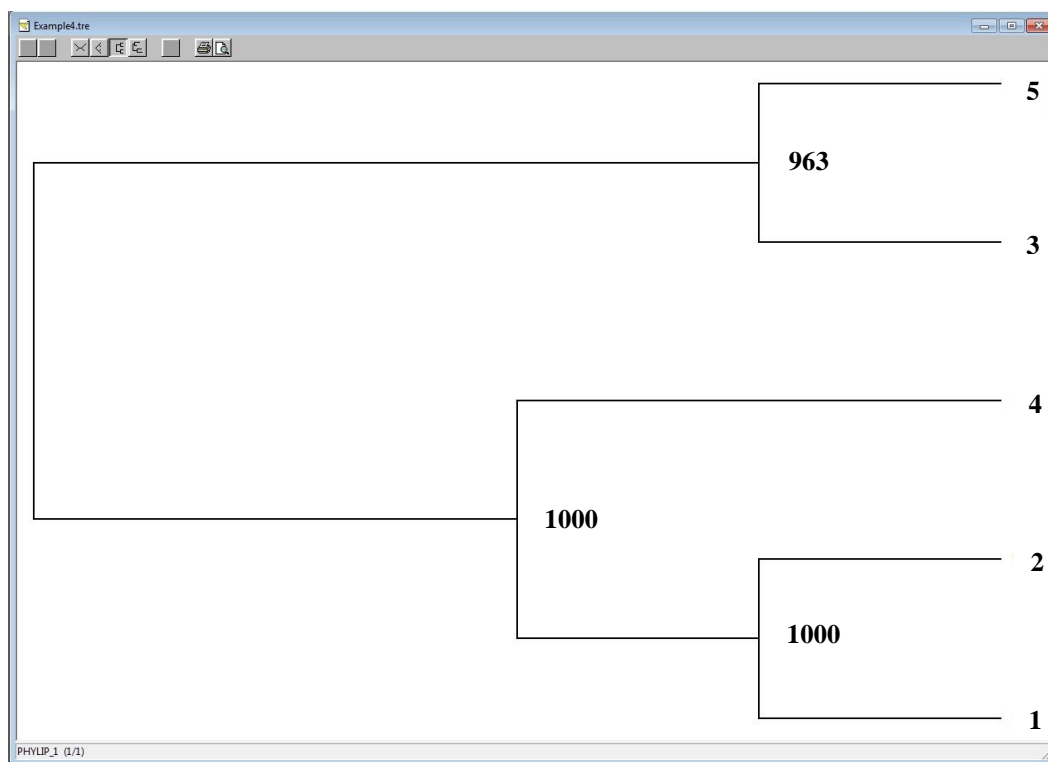


Рис. 21. Древо с бутстреп-поддержкой

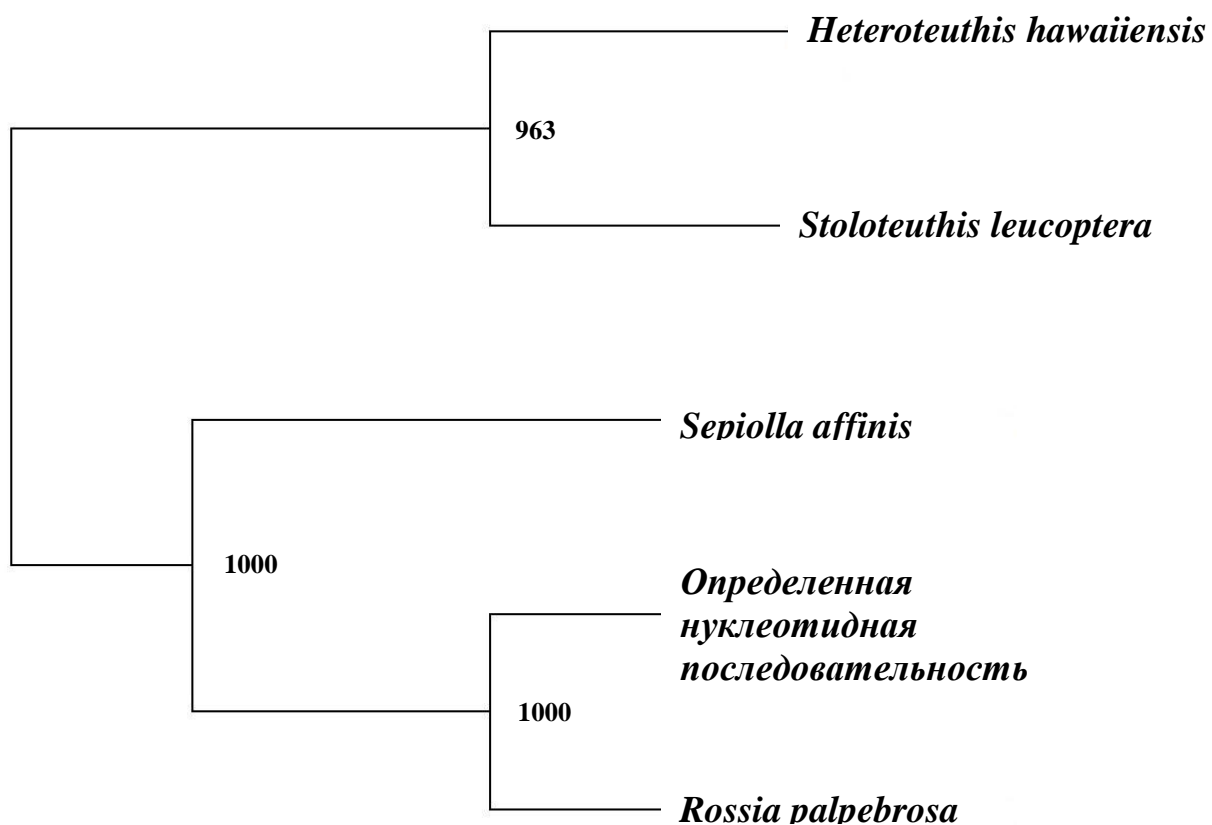


Рис. 22. Итоговое древо

ПРИЛОЖЕНИЕ

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>DirectLoadTM 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	
Плазмида (вектор) PTZ57R T	
Набор для выделения плазмидной ДНК <i>Fermentas Gene JETTM Plasmid Miniprep Kit # K0502</i>	BioBasic Inc., Китай www.biobasic.com
Набор для выделения ДНК из агарозного геля <i>EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit</i>	
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	
Hi-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	
Хлорид кальция CaCl ₂	
Tris (Hydroxymethyl) Aminomethane	
Уксусная кислота	
Бромистый этидий <i>Ethidium Bromide</i>	
Натрий хлорид NaCl	
Агар	
pGEM [®] -T Easy	Promega Corporation, СШФ www.promega.com
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

ОСНОВНАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. 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.
2. Саики, Р. Полимеразная цепная реакция / Р. Саики, У. Гиленстен, Г. Эрлих // Анализ генома: Методы / Пер. с англ., под ред. К. Дейвиса. М.: Мир, 1990. – С.176-190.
3. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук; пер. с англ. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
4. 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.
5. Щелкунов, С.Н. Генетическая инженерия: Учеб.-справ., пособие / С.Н. Щелкунов. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2004. – 496 с.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Alphey, L. DNA sequencing from experimental methods to bioinformatics / L. Alphey. – Berlin etc.: BIOS sci. publ., 1997. – 224 p.
2. 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.
3. 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.
4. Cohen, S. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. / S. Cohen, C. Chang, L. Hsu. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. – 1972. – V.69. – P.2110-2114.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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. // Virol. – 1987. – V.61, №5. – P.1690-1694.
9. 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.

10. Lario, A. Automated laser-induced fluorescence DNA sequencing / A. Lario, A. Gonzplez, G. Dorado // *Anal. Biochem.* – 1997. – V.247. – P.30-33.

11. Mullis, K.B. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase chain reaction / K.B. Mullis, F.A. Faloona // *Meth. Enzymol.* – 1987. – V.155. – P.335-350.

12. 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.

13. Watts, D. Automated fluorescent DNA sequencing on the ABI PRISM 310 Genetic Analyzer / D. Watts, J.R. MacBeath // *Methods Mol. Biol.* – 2001. – V.167. – P.153-170.

14. Wong, C. Characterization of beta-thalassaemia mutations using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA / C. Wong, C.E. Dowling, R.K. Saiki et al. // *Nature.* – 1987. – V.330, №6146. – P.384-386.

15. Болдырева, М.Н. Генодиагностика заболеваний: качественный и количественный подходы / М.Н. Болдырева // *Цитокины и воспаление.* – 2005. – №3. – С.40-41.

16. Грант, В. Эволюция организмов / В. Грант. – М.: Мир, 1980. – 408 с.

17. Остерман, Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие) / Л.А. Остерман. – М.: Наука, 1996. – 288 с.

**Соловьева Валерия Владимировна,
Моров Арсений Романович,
Ризванов Альберт Анатольевич,
Сабиров Рушан Мирзович**

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
БЕСПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ ПО
НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
ГЕНА 18S РИБОСОМНОЙ РНК**

Учебное пособие