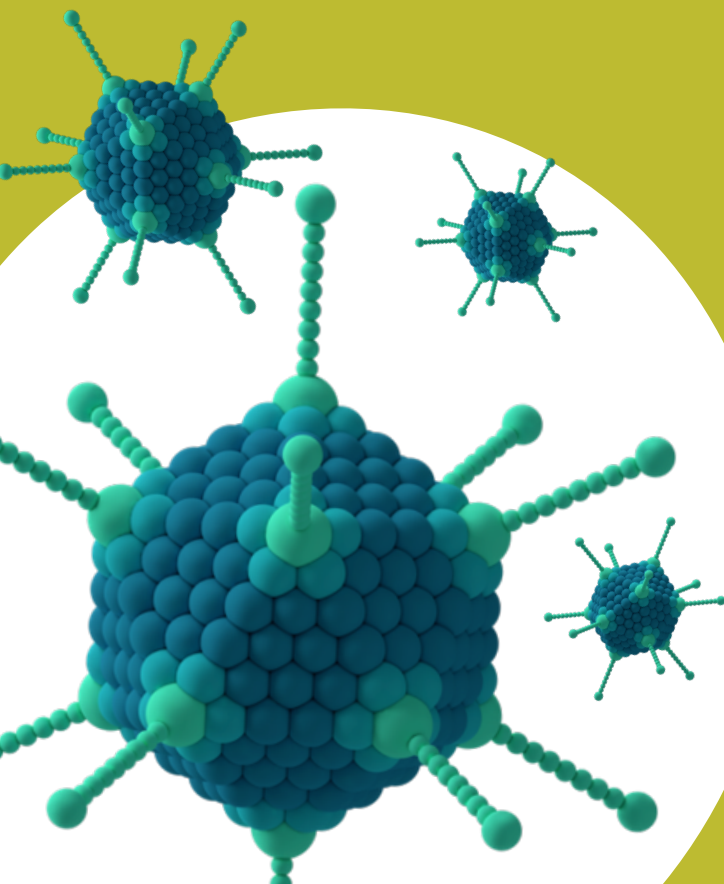




НИКОЛАЙ ПЕТРОВ

Молекулярни методи във вирусологията

Ръководство за практически занятия



НОВ
БЪЛГАРСКИ
УНИВЕРСИТЕТ

МОЛЕКУЛЯРНИ МЕТОДИ ВЪВ ВИРУСОЛОГИЯТА

Ръководство за
практически занятия



Молекулярни методи във вирусологията.
Ръководство за практически занятия

© доц. д-р Николай Петров, автор

доц. д-р Галина Сачанска, научен рецензент
доц. д-р Мария Стоянова, научен редактор

Ваня Петкова, коректор

© Жанет Цанова, дизайн и предпечат

© Нов български университет, 2025
ул. „Монтевидео“ 21, 1618 София
www.nbu.bg
bookshop.nbu.bg

Всички права са запазени. Не е разрешено публикуването на части от книгата под каквато и да е форма – електронна, механична, фотокопирна, презапис или по друг начин – без писменото разрешение на носителя на авторските права.

ISBN 978-619-233-386-7

НИКОЛАЙ ПЕТРОВ

МОЛЕКУЛЯРНИ МЕТОДИ ВЪВ ВИРУСОЛОГИЯТА

Ръководство за
практически занятия



НОВ
БЪЛГАРСКИ
УНИВЕРСИТЕТ

СЪДЪРЖАНИЕ

1. Увод	7
2. Оборудване на лаборатория по вирусология	9
3. Стерилизация на стъклени и пластмасови лабораторни съдове	16
4. Техника за безопасност и изисквания за работа във вирусологична лаборатория	20
5. Изолране на ДНК	22
5.1. Изолране на геномна ДНК от растителни клетки	33
6. Изолране на РНК	45
7. Изолране на РНК със силициеви частици	51
8. Електрофоретични техники	55
9. Рестрикционен анализ	66
10. Полимеразна верижна реакция – PCR	75
10.1. RT-PCR анализ	84
10.2. Touchdown RT-PCR	92
11. Използвана литература	97

1. УВОД

Вирусите са открити за първи път и признати като отделен клас микроби в края на XIX век. Те са били изследвани, тъй като е установено, че са причинители на някои от най-важните болести по растенията и животните, но поради техния субмикроскопичен размер и изискването да се възпроизвеждат в живите клетки едва през 50-те години на миналия век вирусологията се установява твърдо като клон на науката сама по себе си. По това време са разработени методи за клетъчни култури и пречистяване на вируси, а въвеждането на оцветяване позволява на електронните микроскописти да визуализират структурите на вирусите за първи път. Създаването на системи за клетъчни култури дава възможност за изследвания на репликацията на вирусите и разработването на атенюирани живи ваксини срещу важни човешки патогени като морбили, рубеола и полиомиелит. Концепциите, произтичащи директно от изследването на репликацията на вирусите, включват полиаденилиране на информационни РНК, интрони в клетъчната ДНК и снаждане на РНК транскрипти, интерферони, обра-

тна транскрипция, клетъчни онкогени и вътреклетъчна обработка и представяне на антигени на клетъчната повърхност. Познанията ни за структурата и репликацията на вируса се усложняват, както и техниките, необходими за откриване, характеризиране и диагностика на вирусите. Способността да се секвенират вирусни нуклеинови киселини, независимо дали ДНК или РНК, чрез сравнително прости технологии, включващи полимеразна верижна реакция, довежда до нашата способност да проследяваме движението на вируса в човешки или животински популации с голяма прецизност. Откри се нова област на молекулярната епидемиология, която осигурява основата за кампании на Световната здравна организация (СЗО) за изкореняване на полиомиелита и морбили през следващите пет години. В допълнение тази информация за генетичната последователност се използва като основа за рационалното проектиране на нови антивирусни лекарства, както и на ваксини.

Ръководството е предвидено за обучение по вирусология на студентите в професионално направление 4.3. Биологически науки в НБУ от БП „Биология – обща и приложна“, БП „Клетъчна биология и вирусология“, МП „Микробиология“, както сходни специалности в други висши училища. В ръководството се разглеждат основните съвременни методи за изолване на нуклеинови киселини, техники за амплифициране на генетичен материал, полиморфизъм в дължината на рестрикционните фрагменти, количествено определяне на генна експресия, молекулярна диагностика и идентификация на вируси. Акцентира се върху награвждането на общата биологична, вирусологична и молекулярно-биологична подготовка на студентите, като се подчертава връзката между класическата и молекулярната генетика и значението ѝ като теоретична база в обучението на студентите.

2. ОБОРУДВАНЕ НА ЛАБОРАТОРИЯ ПО ВИРУСОЛОГИЯ

Оборудването на лабораторията по тъканни култури се състои от:

- ✓ Ламинарен бокс клас II
- ✓ Автоклав
- ✓ Везни – технически и аналитични
- ✓ рН метър
- ✓ Магнитни бъркалки
- ✓ Дестилатор
- ✓ Апарат за ултрачиста вода
- ✓ Центрофуга с охлаждане
- ✓ Вортекс
- ✓ Микроскоп с камера – светлинен инвертен
- ✓ Хладилник (4°C)
- ✓ Фризер (-20°C)
- ✓ Ултра фризер (-80°C)
- ✓ Инкубатор за клетъчни култури
- ✓ Апарат за Real Time PCR
- ✓ Гел-документираща система
- ✓ Дестилатор
- ✓ Овоскоп
- ✓ Инкубатор за кокоши ембриони

СПЕЦИАЛИЗИРАНА ЛАБОРАТОРНА АПАРАТУРА



Фиг. 1
Ламинарен бокс
биобезопасност
тип II на Heraeus



Фиг. 2
Дюарови съдове

Специализирана лабораторна апаратура



Фиг. 3
CO2 инкубатор –
Mettmert



Фиг. 4
Инвертен микроскоп Модел Zeiss Axio Vert. A1 с
камера за снимки и 3D визуализация



Фиг. 5
LuMatic CLIA Microplate Reader
Model 4401



Фиг. 5
ChroMate



Фиг. 6
Лабораторна мини bench
центрифуга Eppendorf



Фиг. 7
Лабораторна
центрифуга с
охлаждане Eppendorf



Фиг. 8

DeNovix Showcases First
All-in-One Spectrophotometer/
Fluorometer System



Фиг. 9

Real Time PCR Step one plus,
Biosystems



Фиг. 10

Термоблок



Фиг. 11

Гел документираща система
Syngene™ NuGenius



Фиг. 12
Ултрафризер (-80°C)



Фиг. 13
Лабораторен ледогенератор –
инокс



Фиг. 14
Ротационен вакуум
изпарител Heidolph
HEI-VAP Core G3



Фиг. 15
Дейонизатор за ултрачиста
вода – Ultramatic Plus GRUF



Фиг. 16
Инкубатор за пилешки
ембриони

3. СТЕРИЛИЗАЦИЯ НА СЪГЛЕНИ И ПЛАСТМАСОВИ ЛАБОРАТОРНИ СЪДОВЕ

Използват се различни методи за стерилизация в зависимост от термичната стабилност на материала на съдовете – пластмасови или стъклени.

Суша стерилизация – за тази цел съдовете (епруветки, мерителни колби, мерителни цилиндри, пипети и др.) се поставят в сух стерилизатор, предварително загрят до 160°C. Стерилизацията протича в продължение на най-малко 2 часа.

Автоклавиране – извършва се при въздействие на водна пара с висока температура и налягане. Хранителните среди за инвитро култивиране се стерилизират при 121°C, 1.1-1.2 атмосфери налягане. Продължителността на автоклавирането зависи от обема на съдовете и количеството хранителна среда, но не по-малко от 20 минути. Пластмасовите лабораторни съдове (центрифужни епруветки, крайници за автоматични пипети и др.) се поставят в автоклав с налягане в камерата 1.2 атмосфери. Стерилизацията трае около 45 минути.

Студена стерилизация – разтвори на термолабилни съставки като антибиотици, ензими, някои растежни регулатори и витамини се стерилизират чрез филтриране през микрофилтри с диаметър 0.22 μm или 0.45 μm .

Стерилизация – пълното унищожаване на патогенни и непатогенни микроорганизми и техните спори, които

се намират върху определен предмет или в даден материал.

1. Физични средства (топлина, ултравиолетови лъчи, йонизиращи лъчи и гр.)

- Стерилизацията чрез топлина се извършва по различни методи:
 - **Опламеняването** като метод има ограничено приложение. То се използва само за стерилизация на огнеупорни материали, които при многократно нагряване не биха се повредили – пинцети, скалпели и гр.
 - **Сух горещ въздух** – използват се сухи стерилизатори. По този начин се стерилизират колби, епруветки, петрича, пинети и други съклени и порцеланови съдове. Те трябва да бъдат добре измити, подсушени и опаковани по начин, непозволяващ замърсяването им с микроби след стерилизацията.
 - **Течащи водни пари** – по този начин се стерилизират хранителни среди.
 - **Автоклавиране** – най-сигурният начин за пълно унищожаване на спори и вегетативни форми. То се извършва с пари под налягане, като се основава на покачване на точката на кипене на водата при повишаване на налягането на водните пари. Стерилизираният ефект се дължи на повишената температура на прегретите пари.
 - Йонизиращи лъчи – много надеждно средство за стерилизация.
 - Ултравиолетови лъчи – използват се при стерилизиране на въздуха в помещения. Това става в отсъствие на хора, тъй като УВ лъчите гразнят очите и кожата при продължително въздействие

Дезинфекция – унищожаване на патогенни микроорганизми във външната среда. За разлика от стерилизацията при дезинфекция се унищожават вегетативните форми, но не и спорите.

Дезинфекционните средства се прилагат под формата на разтвори, течни препарати, сапуни, пудри, аерозоли и гр. Основното изискване към дезинфекционните средства е да унищожават микроорганизмите, без да увреждат материала, който се дезинфектира.

Дезинфекцията може да се извърши по няколко начина – чрез влажно затърсване, оросяване или заливане с дезинфектант, чрез обработка с формалинови пари и гр.

Изисквания по отношение на дезинфекциите и стерилизациите

1. При зацапване на работното облекло с инфекциозен или друг биологичен материал то се сваля незабавно, накисва се в дезинфекционен разтвор и се изпира, след което се автоклавира.
2. Преди изхвърляне отпадъчните материали се обеззаразяват чрез накисване в дезинфекционен разтвор, автоклавиране или изгаряне. Не се допуска изхвърлянето на инфекциозен материал в канализацията или на сметищата за твърди отпадъци без предварително обеззаразяване.
3. Използваният инструментариум се дезинфектира чрез накисване в дезинфекционен разтвор, след което се почиства и стерилизира в автоклав или сух стерилизатор.
4. След завършване на работа работните места и помещения се почистват и дезинфекцират, като се работи с ръкавици.
5. При разкъсване или срязване на ръкавиците те се свалят веднага и ръцете се измиват с вода и сапун.

Носенето на специални облекла и аксесоари, наречени лични предпазни средства, е включено в стандартния протокол за безопасност на работниците във вирусологичната лаборатория. Работниците с дълга коса трябва да вържат косата си и тя да бъде максимално прибрана към главата. Използват се лабораторни престилки за еднократна употреба, специални ръкавици, затворени обувки, защитни очила. Целта на тези елементи е да предпазят служителите от заразяване, докато боравят с потенциално опасни материали, и да се предотврати евентуално замърсяване по време на процедурите.

4. ТЕХНИКА ЗА БЕЗОПАСНОСТ И ИЗИСКВАНИЯ ЗА РАБОТА ВЪВ ВИРУСОЛОГИЧНА ЛАБОРАТОРИЯ

ПРАКТИЧЕСКО ЗАНЯТИЕ 1

Във вирусологичната практика от особено значение са мерките за безопасност, за да не се допуска нараняване и разпространение на инфекциозни и възможно опасни вещества. Специалното облекло, етикетуването и оборудването са част от стандартните предпазни мерки за безопасност. Другите предпазни мерки са квалифицираните служители и проверките от Министерството на здравеопазването.

Поради опасност за здравето на персонала и населението и поради възможността за епидемично разпространение на инфекциите всички изследвания с инфекциозни агенти могат да се извършват само в лаборатории при спазване на разпоредбите на този стандарт.

Лично предпазно облекло

Има четири основни части на личното предпазно облекло, които следва да се спазват с цел предпазване от респираторни заболявания:

- лицева маска;
- очила, шлем на лицето или защитни очила;
- ръкавици (не е нужно да са стерилни);
- гълга предпазна престилка или гащеризон (найлонова престилка, ако се предвижда излагане на напръскване).

ИЗИСКВАНИЯ ЗА БИОБЕЗОПАСНОСТ

Терминът „биологична безопасност“ на лаборатории се използва за ниво на защита от патогени и токсини – предотвратяване на нежелано излагане и случайното им изпускане.

Микроорганизмите се разделят в 4 групи в зависимост от риска, който те представляват за персонала и обществото.

1. Група 1 – биологични агенти, които вероятно няма да причинят заболяване у хората (напр. агеноасоциирани вируси тип 1-4);

2. Група 2 – биологични агенти, които могат да причинят заболяване у хората и да представляват опасност за работещите, но не е вероятно да се разпространят в обществото и обикновено има ефективна профилактика или средства за лечение (херпесни вируси, агеновируси);

3. Група 3 – биологични агенти, които могат да причинят тежко заболяване у хората и да представляват сериозна опасност за работещите, възможен е риск за разпространяване на заболяването в обществото, но обикновено има ефективна профилактика или средства за лечение (HIV, хепатит Б, хантавируси, вирус на японския енцефалит, бяс, жълта треска и др.);

4. Група 4 – биологични агенти, които причиняват тежки заболявания у хората и представляват сериозна опасност за работещите, съществува висок риск за разпространяване на заболяването в обществото и обикновено няма ефективна профилактика или средства за лечение (Ебола, треска Ласа, Кримско-хеморагична треска, едра шарка и др.);

5. ИЗОЛИРАНЕ НА ДНК

ПРАКТИЧЕСКО ЗАНЯТИЕ 2

Лабораторно оборудване, консумативи и материали

Центрофуза, водна баня или сух термоблок, апарат за електрофореза, гребени, микровълнова печка, термометър, рН метър, микропипети, накрайници за микропипети, центрофужни епруветки – 1.5 mL; 0.5 mL; 0.2 mL, изолирана ДНК, агароза, разтвори за гела и електрофорезата – 1(0.5)хТАЕ или 1(0.5)хTBE, етидиев бромид, буфер за нанасяне (пробен буфер), ДНК маркер (различни концентрации на λ ДНК).

Методология на изолиране на нуклеинови киселини

Изолирането и пречистването на нуклеинови киселини от различни биологични обекти е първи етап в техниките на молекулярната биология и биотехнология, използвани и прилагани за идентифициране и изолиране на гени в генното инженерство, изучаване на структурата и експресията на различни геноми, генната организация и генна експресия на молекулно ниво. Получаването на високомолекулна пречистена ДНК е необходимо за конструирането на геномни библиотеки, за секвенционен и маркерен анализ, приложим в маркерната селекция, молекулярна идентификация и молекулярна диагностика на патогени.

Съобразно обекта на изследване и целта на експеримента се изолират различни типове ДНК:

- ✓ Ядрена ДНК
- ✓ Митохондриална ДНК
- ✓ Хлоропластна ДНК

- ✓ Бактериална ДНК
- ✓ Плазмидна ДНК
- ✓ Вирусна ДНК

Основни техники

А. Изолране на ДНК в зависимост от биологичния обект

В зависимост от изходния материал и типа ДНК (ядрена, плазмидна, вирусна или друга) се използват различни подходи за изолране. Растителните клетки съдържат клетъчна стена (изградена от полимер целулоза, а тя – от мономера глюкоза, до 3000 остатъка), която трябва да се отстрани, за да се екстрахира ДНК. Обикновено това се извършва чрез стриване на растителната тъкан в течен азот (ниската температура разрушава клетъчната стена и едновременно с това предпазва ДНК от нуклеазно разграждане). Грам-отрицателните бактерии (напр. *E. coli*) и Грам-положителните (напр. *Staphylococcus aureus*) също притежават клетъчна стена, която се разрушава специфично от лизозим. Клетъчната стена при грождите се разрушава с използването на ензима зимолаза. За изолрането на ДНК от животински клетки не е необходимо извършване на подобни процедури поради отсъствие на клетъчна стена.

Разрушаването на плазмената мембрана при всички типове клетки се извършва с екстракционни буфери. Загължителни компоненти на буферите са:

- ✓ натриев дodeцилсулфат (SDS) – анионен детергент, който разрушава връзките на белтъците с нуклеиновите киселини в нуклеопротеиновите комплекси и същевременно денатурира белтъците;
- ✓ поливинилпиролidon – антиоксидант, намаляващ вероятността от разрушаване на фосфодиестерните връзки в нуклеиновите киселини при окисление, водещо до получаване на нискомолекулярни ДНК фрагменти;

- ✓ етилендиаминтетраоцетна киселина (ЕДТА) – изпълнява ролята на хелатен агент, елиминиращ действието на нуклеазите.

Б. Пречистване на нуклеиновите киселини

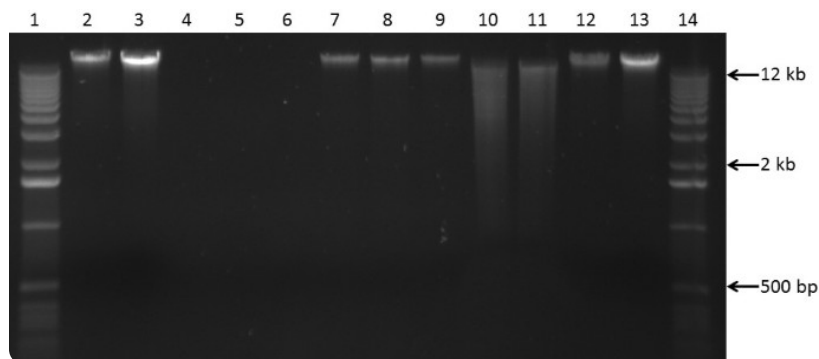
За отстраняване на белтъчните примеси от препаратите на нуклеиновите киселини се процедурира по следните начини:

1. Разтворите се третираат с протеолитичен ензим, напр. проназа или протеиназа К.
2. Пречистване на специална колонка, съдържаща Celit.
3. Ултрацентрифузиране в плътностен градиент на CsCl/етилов бромид.
4. Фенолна екстракция за денатурация на белтъците.

В. Концентриране на нуклеиновите киселини

След депротеинизацията се извършва концентриране на ДНК чрез утаяване с изопропанол или етанол. Всеки рутинен протокол за утаяване на ДНК включва следните стъпки:

1. Нужната концентрация на моновалентни катиони в пробата се постига с прибавяне на 1/10 обема 3М CH_3COONa (натриев ацетат).
2. Прибавят се два обема етанол и се смесва внимателно.
3. Центрофузира се пробата и утайката от ДНК се промива със 70% етанол за отстраняване на остатъците от сол.
4. Остатъците от етанол се отстраняват чрез изпаряване на стайна температура (докато изчезне миризмата от етанола), след което ДНК се разтваря в буфер по желание или ddH_2O до необходимата концентрация.



Фиг. 17

Изолирана геномна ДНК

ПРАКТИЧЕСКО ЗАНЯТИЕ 3

Определяне на концентрацията на нуклеинови киселини и чистотата на пробите

1. Спектрофотометрично определяне

Фотометричният количествен анализ на нуклеинови киселини е един от най-често използваните методи в молекулярната биология и биохимичните изследвания. Измерването на абсорбцията се извършва в ултравиолетовата област на светлинния спектър. Спектрофотометричното определяне на количеството на нуклеиновите киселини – ДНК, РНК, олигонуклеотиди или мононуклеотиди се състои в измерване на абсорбцията при 260 nm дължина на вълната. Една абсорбционна единица при 260 nm е равна на 50 $\mu\text{g/mL}$ двойноверижна ДНК. Вземат се 5 μL от пробата ДНК и се разреждат до 100 μL вода (фактор на разреждане =20). Отчита се абсорбцията при дължина на вълната 260 nm.

За двойноверижна ДНК:

Една абсорбционна единица $1A_{260} = 50 \text{ ng}/\mu\text{L}$

За еднoверижна ДНК (олигонуклеотиди):

Една абсорбционна единица $1A_{260} = 37 \text{ ng}/\mu\text{L}$

За РНК:

Една абсорбционна единица $1A_{260} = 40 \text{ ng}/\mu\text{L}$

Чистотата на ДНК пробата се определя чрез съотношенията A_{260}/A_{280} и A_{260}/A_{230} . Нуклеиновите киселини поглъщат светлина при 260 nm, белтъците – при 280 nm, а полизахаридите – при 230 nm.

Когато съотношението $A_{260/280}$ е между 1.65 и 2.0, ДНК пробата се счита за достатъчно чиста по отношение на замърсяване с белтъци. По-малкото съотношение показва наличие на белтъци в ДНК пробата. Тя трябва да се пречисти допълнително чрез утаяване или с колонка (афинитетна хроматография). При съотношение $A_{260/230} > 2.0$ ДНК пробата се счита за достатъчно чиста по отношение на замърсяване със захари. По-малкото съотношение е указание за наличие на захари в ДНК пробата, които се пречистват допълнително чрез утаяване. Получените резултати се отразяват в таблица.

Табл. 1

Чистота на ДНК пробата

Проба	Абсорбция 260 nm	Абсорбция 280 nm	Отношение 260/280	ДНК концентрация ng/ μL
1	0.017	0.009	1.878	17.11
2	0.009	0.002	2.198	12.85

2. Чрез свързване с етидиев бромид

Количеството на ДНК в разтвор е пропорционално на светлинния сигнал, излъчван от свързания към нея етидиев бромид. Определянето на концентрацията се извършва, като различни разреждания на ДНК с непозната

концентрация в присъствие на $2\mu\text{g/mL}$ етидиев бромид се сравняват с разреждания на стандарти от ДНК с известна концентрация, поставен в петри или след електрофореза в агарозен гел.

3. Чрез агарозна електрофореза

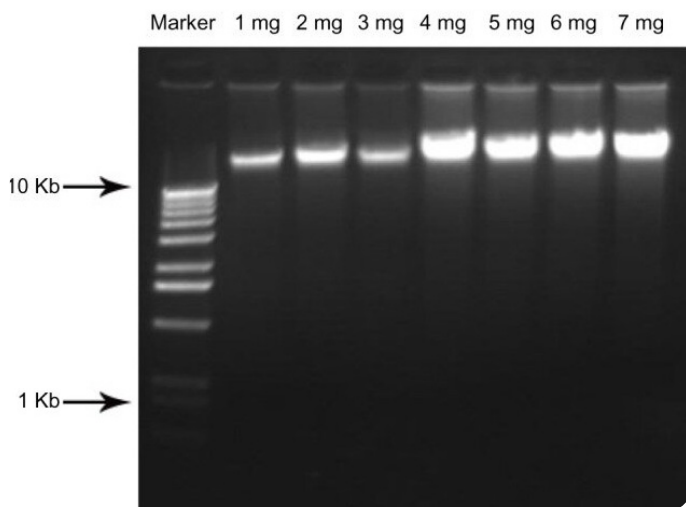
Ориентирано количеството и чистотата на ДНК пробата могат да се определят чрез електрофореза в агарозен гел (0.7%–1%). Интактната и чиста геномна ДНК трябва да остане високо на старта като плътна ивица без други по-нискомолекулни ивици по дължината на старта. Количеството ДНК се определя при сравнение с маркер, който съдържа известни количества геномна ДНК.

За целта $2\mu\text{L}$ от разтворената ДНК се смесват с $2\mu\text{L}$ буфер за нанасяне (пробен буфер) и се нанасят в 1% агарозен гел, съдържащ $0.5\mu\text{g/mL}$ етидиев бромид. Електрофорезата се провежда с 1xTAE или 1xTBEбуфер при напрежение 90–150 V. След приключване на електрофорезата ДНК се визуализира под UVсветлина. Според интензитета на ивиците може да се съди за количеството ДНК в гела, но при не по-малко от 15–20 ng в старт. За определяне концентрацията на ДНК в агарозния гел се нанасят ДНК проби с известна концентрация (обикновено ДНК от фаз λ). Буферът за електрофорезата и гелът трябва да бъдат един и същ – TAE или TBE. Оцветяването на гела става по време на приготвянето му или след провеждането на електрофорезата.

За да се избегне токсичността на етидиевия бромид, в съвременните технологии се използват нови поколения флуоресцентни багрила за нуклеинови киселини – Vis-traGreen, SYBRGreen, GreenSave, GelRed и др.

Протокол за определяне на количеството и качеството на ДНК на агарозен гел

Протоколът описва използването на мини гел-електрофореза за оценка на ДНК деградацията (разграждането) чрез сравняване на флуоресценцията на пробата със серия от стандарти (концентрации на λ ДНК).



Фиг. 18

Агарозна ЕФ на геномна ДНК

ПРАКТИЧЕСКО ЗАНЯТИЕ 4

Приготвяне на разтвори за изолиране на ДНК

0.5 М ЕДТА (рН 8.0)

Използва се динатриева сол на етилендиаминтетраоцетната киселина. За приготвяне на 0.5 М разтвор в 100 mL се претеглят 18.61 g 2NaEDTA и се разтварят в

по-малко от 80 mL ddH₂O. Привежда се рН на разтвора до рН 8.0 с 5% разтвор на NaOH. Разбърква се с магнитна бъркалка и след пълно разтваряне се долива до 100 mL. Автоклавира се и се съхранява в тъмна реактивна банка.

TAE

За 1 L 50x TAE (2M Трис-ацетат, 0.05 M EDTA):

- ✓ 242 g Трис база
- ✓ 57.1 mL легена оцетна киселина
- ✓ 100 mL 0.5 M EDTA (pH 8.0)
- ✓ доливане до 1 L с ddH₂O

TBE

За 1 L 10x TBE (0.9 M Трис-фосфат, 0.02 M EDTA)

- ✓ 108 g Трис база
- ✓ 55.0 g борна киселина
- ✓ 55 mL 0.5 M EDTA (pH 8.0)
- ✓ доливане до 1 L с ddH₂O

Буфер 1 за ДНК проба

- ✓ бромфенолблу – в гела се движи като около 300 бг гвДНК
- ✓ 50% Глицерол
- ✓ 60 mM EDTA, pH 8.0
- ✓ ddH₂O

Буфер 2 за ДНК проба

- ✓ бромфенолблу – в гела се движи като около 300 бг гвДНК
- ✓ 0.25% ксилен цианол (XyleneCyanolFF)
- ✓ фикола (Ficoll)
- ✓ ddH₂O

Табл. 2

SDS екстракционен буфер

Реактив	Концентрация на стоковия разтвор	Крайна концентрация в буфера	Обем от стоковия разтвор
Tris-HCl pH 7.5	1 M	50 mM	5 mL
NaCl	5 M	100 mM	2 mL
EDTA	0.5 M	25 mM	5 mL
SDS	10 %	0.25 %	2.5 mL
ddH ₂ O			go100 mL

Табл. 3

5 M NaCl

NaCl	58.4	292.0 g
ddH ₂ O		go1000 mL

Табл. 4

10 % SDS

SDS	10 g
ddH ₂ O	go100 mL

Процедура:

Приготвяне на мини агарозен гел.

1. Приготвяне на 1% агарозен гел, като се добавят 0.6 g към 60 mL 1xTAE за 60 mL обем на ваната.
2. Загряване в микровълнова печка и охлаждане до 60°C.
3. Прибавяне на етидиев бромид в концентрация 0.5 µg/mL. (Тъй като етидиевият бромид е генетична отрова, с него се работи само под камина и с ръкавици.)

4. Гелът се излива внимателно, като се отстраняват мехурчетата с микропипета.
5. Постава се гребенът за оформяне на стартовете. (Гребенът да бъде на разстояние 1–2 mm над гъното на ваничката.)
6. След изстиване гелът се прехвърля в електрофорезната ваничка.
7. Излива се 1xTAE в електрофорезната ваничка в количество, което да покрива около 2 mm.
8. Изважда се внимателно гребенът.
Зарежда се гелът с ДНК проби. Към разтвора, който съдържа целевата ДНК, се прибавя пробен буфер 1 или 2. Пробният буфер дава възможност за проследяване на движението на ДНК пробите в гела, тъй като е оцветен, увеличава плътността на пробите, като зарежда ДНК на гъното в ямичките.
9. Внимателно се зарежда също егин старт с ДНК маркер.
10. Свързват се електродите с електрофорезната ваничка и се подава напрежение от 60–90 V.
11. Изключва се апаратът, когато цветната ивица е на около 2 cm от положителния му край.
12. Визуализира се гелът на UV трансилюминатор и се фотografiра с камера.

ПРАКТИЧЕСКО ЗАНЯТИЕ 5

Протокол за използване на флуоресцентното багрило за детекция на нуклеинови киселини:

- ✓ Приготвя се 100 mL разтвор на агарозен гел (концентрация от 0.8–3.0%) и се загрява, докато разтворът стане напълно прозрачен и няма никакви видими малки плаващи частици.

- ✓ Добавя се 2.5 μL GreenSafe към разтвора на гела и се разбърква леко.
- ✓ Гелът се охлажда до 50–60°C и се поставя в електрофорезната ваничка.
- ✓ Когато гелът се втвърди, пробите се зареждат и електрофорезата се стартира.
- ✓ Ивиците се детектират при UV осветяване.

Протокол за оцветяване на гела:

- ✓ Разтворът за оцветяване на гела може да се използва 2–3 пъти. За да се използва отново, разтворът за оцветяване е нужно да се съхранява на стайна температура на тъмно.
- ✓ За агарозни гелове с дебелина <0.5 cm трябва да се използват 10–15 μL от багрилото на 100 mL буфер.
- ✓ Оптимално време за оцветяване (5–60 min). Количеството багрило може да зависи от дебелината на гела и процента на агарозата.



Фиг. 19

Агарозна ЕФ на геномна ДНК с
флуоресцентното багрило

5.1. ИЗОЛИРАНЕ НА ГЕНОМНА ДНК ОТ РАСТИТЕЛНИ КЛЕТКИ

ПРАКТИЧЕСКО ЗАНЯТИЕ 6

Лабораторно оборудване, консумативи и материали: центрофуга, спектрофотометър, апарат за електрофореза, гребени, микровълнова фурна, рН метър, термометър, хапан и пестик, дюаров съд с течен азот, водна баня (60°C), микропипети, накрайници за микропипети, епруветки епендорф – 1.5 mL, 0.5 mL, 0.2 mL, агароза, разтвори и буфери за гела и електрофорезата – 1xTAE (или 1xTBE) или 0.5xTAE (0.5xTAE), етидиев бромид, буфер за нанасяне (пробен буфер), ДНК маркер (λ ДНК), СТАВ буфер, бета-меркаптоетанол, изопропанол, RNase A, свеж растителен или листен материал.

За да бъде изследван растителният геном, е необходимо да се изолира геномната ДНК на изследвания обект. Методът на изолиране е принципно същият, както при изолиране на бактериална ДНК, но с модификации, засягащи главно етапа, в който се разрушават клетъчните стени. Лизозимът например няма ефект върху растителните клетки. Ето защо при растенията се използват физични методи като стриване на замразен материал в течен азот.

Растителните клетки са различни от животинските поради наличие на твърда клетъчна стена и органели като хлоропластите. Те също така съдържат протеини и ензими, които играят роля във фотосинтезата. Някои растителни клетки са полиплоидни, което означава, че имат повече от едно копие от всяка хромозома във всяка клетка. При клетъчните процеси, протичащи в растенията, като например фотосинтезата, се произвеждат вторични метаболити, които при екстракцията могат да взаимодействат с геномната ДНК и съществува опас-

ност от замърсяване на ДНК пробата по време на процеса на утаяване. Поради тези причини изолирането на растителна геномна ДНК е по-трудно. Разликите между растителната и животинската ДНК се дължат на различия в последователността на базите в секвенциите. В много случаи геномната растителна ДНК е по-дълга от животинската ДНК.

Ефективното разрушаване на растителната клетъчна стена е критичен фактор при изолирането на растителна ДНК. Много от техниките за разрушаване на клетъчната стена накъсват ДНК и поради тази причина е необходимо да се направи компромис между дължината на изолираната ДНК и добива. Растителните клетки съдържат много въглехидрати, танини и пигменти, които не могат да се отстранят с фенолна екстракция. Те пречат на спектрофотометричното определяне на количеството на ДНК и причиняват аномална хибридизация. Също така те водят до инхибиране на активността на модифициращи ДНК ензими, включително и рестриктазите, което причинява затруднения при анализа на ДНК чрез Southern blotting и геномно клониране. Затова допълнително се използват детергенти – например цетилтриметиламониев бромид (СТАВ). Прибавен към растителния извлек, СТАВ образува неразтворим комплекс с нуклеиновите киселини, като по този начин те се отделят от въглехидратите, белтъците и другите примеси като утайка. Получените нуклеинови киселини могат да бъдат концентрирани чрез етанолна преципитация, а РНК да се разгради с добавянето на рибонуклеаза.

Растителните клетки се замразяват, например в течен азот, веднага след тяхното събиране, като по този начин може да се съхраняват повече от година. Растителните клетки се разрушават във водни разтвори в присъствие на хелатни агенти с цел инхибиране на нуклеазното действие и детергенти, разтварящи мембрания материал. Белтъците се денатурират и утаяват от екстракта с използване на фенол/хлороформ.

Процедурите за изолитране на общата ДНК (от ядра, митохондри и хлоропласти) от растителни клетки могат да бъдат разделени на четири етапа:

1. Разрушаване на клетъчните стени и отстраняване от клетките.
2. Разрушаване на клетките и освобождаване на клетъчното съдържимо.
3. Отстраняване на цялото клетъчно съдържимо, с изключение на ДНК молекулите.
4. Промиване, утаяване и концентриране на получения ДНК разтвор.

Изолитрането на ДНК може да се извърши по класически методи – соли, фенолна екстракция, СТАВ метод или с търговско произведени китове, съдържащи всички необходими компоненти за екстракция.

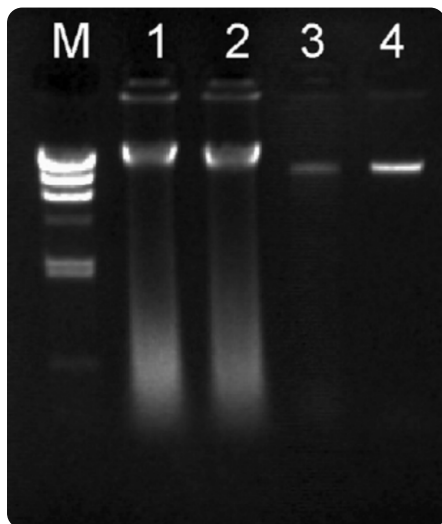
Фенолна екстракция

- ✓ Приготвят се растителни проби с тегло около 100 mg (листа или клубени) със скалпел. Пробите се гържат върху лег.
- ✓ Растителните проби се стриват с течен азот, а при липса – с кварцов пясък.
- ✓ В центрофужна епруветка от 1.5 mL се поставя растителният материал, 3 микролжички кварцов пясък, 1 стъклена перла с диаметър 3 mm и 600 μ L SDS екстракционен буфер.
- ✓ Съдържанието на епруветката се стрива с вортекс два пъти по 20 s.
- ✓ Центрофузира се за 1 min при 14 000 rpm и 4°C за намаляване на пияната.
- ✓ Прехвърля се 500 μ L от супернатантата в чиста 1.5 mL.
- ✓ В епруветката се добавят 500 μ L от сместа фенол:хлороформ:изоамилов алкохол (25:24:1) или:
- ✓ Хлороформ:изоамилов алкохол (24:1) (при екстракция без фенол).

- ✓ Епруветката се разклаща силно.
- ✓ Центрофузира се за 1 min при 14 000 rpm и 4°C.
- ✓ Прехвърля се 350 μ L от супернатантата в чиста 1.5 mL епруветка.
- ✓ Прибавят се 350 μ L изопропанол, охладен на -20°C.
- ✓ Остава се 2–3 min на стайна температура и леко се размесва.
- ✓ Центрофузира се за 10–15 min при 14 000 rpm и 4°C.
- ✓ Супернатантата се изхвърля.
- ✓ Утайката се измива с етанол.
- ✓ Утайката от ДНК се изсушава при 37°C за 5–10 min в термомиксер (до отстраняване на миризмата на етанол).
- ✓ Прибавят се 50–100 μ L ddH₂O (или TE) (в зависимост от обема на утайката).

* Остатъчният фенол пречи на последващия анализ.

Фенолът е токсичен! Добавя се в камина.



Фиг. 20

ЕФ на фенолна екстракция на растителна ДНК

ПРАКТИЧЕСКО ЗАНЯТИЕ 7

СТАВ (Cetrimonium bromide) протокол за изолуране на високомолекуларна геномна ДНК (50 000 нг (нуклеотидни двойки) и повече) от растителни обекти

Този протокол е подходящ за изолуране на високомолекуларна ДНК от листна или друга растителна тъкан. Чрез стриването на растителния материал с течен азот в хапан с пестик се цели разрушаването на клетъчните стени на растителните клетки. Последващата екстракция на ДНК с буфер, съдържащ детергента цетилтриметиламониев бромид (СТАВ), осигурява освобождаването на ДНК от клетъчното ядро чрез свързването ѝ със СТАВ, а ЕДТА (етилендиаминтетраоцетната киселина) предпазва ДНК от действието на ендогенни нуклеази. Разделянето на ДНК от протеините се осъществява чрез хлороформна екстракция и с последващо преципитиране чрез изопропанол.

*Необходими разтвори***Табл. 5**

Състав на 2.0% СТАВ (1000 mL)

СТАВ	20.0 g
1 M Tris (pH 8.0)	75 mL
0.5 M Na ₂ EDTA	30 mL
NaCl	61.43 g
ddH ₂ O	go 1000 mL

β-меркаптоетанол

Хлороформ:Изоамилов алкохол (24:1)

RNase A (10 mg/mL)

Намриев ацетат (3 M)

Етанол (96%, 70%)

TE (10 mM TrisHCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)

Екстракция на ДНК

1. Предварително се приготвя 2% СТАВ. Изчислява се какъв обем (колко mL) от този разтвор е необходим за изолирането на ДНК. Например за една проба от 300–400 mg са необходими 1000 μ L СТАВ, който предварително е загрят на водна баня на 60°C. Непосредствено преди добавянето на СТАВ се добавя β -меркаптоетанол, изчислен спрямо количеството на първия (β -меркаптоетанолът се разтваря в концентрация от 10 mM). Сместа се хомогенизира внимателно. Добавя се малко (на върха на ножа) поливинил пиролигон (PVP).
2. Растителният материал се стрива с течен азот до получаване на фина зелена пудра, която се прехвърля в центрофужна епруветка от 1.5 mL, без да се остави да се затопли.
3. Прибавя се загрятият на 60°C СТАВ.
4. Хомогенизира се добре с вортекс.
5. Сместа се инкубира на водна баня или термомиксер при 60°C с леко разклащане за около 20 min.
6. След екстракцията със СТАВ пробите се охлаждат до стайна температура и в тях се добавя по един обем от сместа хлороформ:изоамилов алкохол.
7. Пробите се разклащат 20 min внимателно на лег.
8. Следва центрофугиране на 3000 xg при 10°C за 25 min.
9. В нова 1.5 mL епруветка (предварително надписана с номера на пробата) се отделя горната фаза (настоящата течност).
10. Отделя се горната фаза и се преципитира с $\frac{2}{3}$ обема изопропанол.
11. Престоява в хладилник най-малко 1 час на 4°C. Ако престоят се проведе в продължение на една нощ, добивът от ДНК се увеличава.

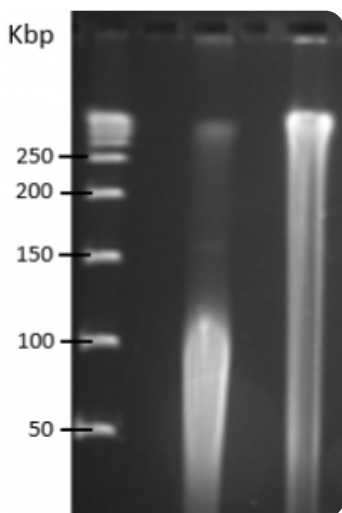
12. Центрофузира се на 3000 xg на студено (4°C) за 25 min.
13. Супернатантата се изхвърля.
14. Утайката от ДНК се ресуспендира в 150 μ L изстуден ТЕ.
15. Прибавя се РНКазаА и се инкубира при 65°C за един час или докато се отстрани цялото количество на РНК.
16. ДНК се преципитира отново, като се прибавят 0.1 обема 3М натриев ацетат и 0.7 обема изопропанол (на 4°C за една нощ) или 2.5 обема 96% етанол (на -20°C за една нощ). Натриевият ацетат допълнително пречиства екстрахираната ДНК и се използва при необходимост.
17. Пробите се центрофузират на максимална скорост в микроцентрофуга при охлаждане (4°C).
* Ако РНК не пречи на последващия анализ, стъпки 18, 19 и 20 може да се пропуснат.
18. Утайката се промива двукратно със 70% етанол на стайна температура.
19. ДНК се суши на въздух до напълно изпаряване на етанола.
20. ДНК се ресуспендира в 20 μ L ТЕ или двукратно дестилурана вода стерилна (ddH_2O) (или повече – в 50 μ L, в зависимост от очаквания добив).

ДНК се съхранява на -20 °C.

* Вместо на стъпка 18, 19 и 20 при необходимост РНКазаА може да се добави след стъпка 23 или по-късно на стъпка 24 (след провеждането на целия протокол за изолване на ДНК), като отново трябва да се повтори преципитирането на ДНК с изопропанол и измиването с етанол, изсушаването на въздух и ресуспендирането на ДНК с ddH_2O или ТЕ.

* Пробата не се пресушава.

Количеството на ДНК се определя, като се използва ДНК на плазмида Lambda (например Fermentas № SD0011) в различни концентрации, приготвени според очаквания добив на протокола и необходимата концентрация за последващия анализ: например – 15, 30, 60, 90, 180, 260, 520 ng/ μ L, или 5, 10, 20 и 50 ng/ μ L.



Фиг. 21

ЕФ на високомолекулна растителна ДНК

ПРАКТИЧЕСКО ЗАНЯТИЕ 8

ДНК екстракция с NucleonPhytoPureKit (AmershamBiosciences)

ДНК се изолира от 100 mg свеж растителен материал или 0.33 mg лиофилизиран материал чрез кит за изолиране на ДНК. Освен химикалите, включени в кита, протоколът изисква използването на изстуден изопропанол (на 4°C), 70% етанол (на 4°C) и хлороформ (на -20°C). Най-успешно се използват първите същински листа.

Разкъсване на клетъчните стени

1. В предварително изстуден хапан и пестик се прибавят 3 обема течен азот (или сух лед) към 0.1 g свеж растителен материал, предварително замразен на -20°C или веднага след откъсването на листата.

* Течният азот се прибавя постепенно, за да не се разпръсне растителната материя.

* Представените в протокола обеми са за свеж растителен материал. Ако се използва изсушен материал, теглото на материала се редуцира. Ако се налага изолиране на по-голямо количество ДНК, обемите в протокола могат да бъдат преизчислени пропорционално на увеличеното количество на пробата.

2. Тъканта се стрива с течен азот или със сух лед до получаването на хомогенна пудра.
3. Пудрата се прехвърля с помощта на изстудена шпатула в 1.5 mL (2 mL), а остатъкът от стрити листа – в подходящи по обем полипропиленови центрофужни епруветки за съхранение във фризер.

Клетъчен лизис

4. Прибавя се 100 μL от реагент 1 така, че всички съставки да бъдат напълно разтворени.
 - a. При тази стъпка може да се прибави и β -меркаптоетанол, разтворен в реагент 1 в концентрация от 10 mM.
 - b. Може да се добави RVP в количество „на върха на ножа“ за отстраняване на полифенолни съединения.
 - c. Екстрахираната ДНК може да съдържа малки количества от РНК. Ако се изисква РНКаз, когато РНК пречи на последващия анализ на ДНК, тя се добавя в концентрация 20 $\mu\text{g} / \text{mL}$ на тази стъпка – след прибавянето на реагент 1. Инкубира се при 37°C за 30 min или на друга температура в зависимост от изискването за активността на рибонуклеазата.
 5. Миксира се внимателно с шпатула.
 6. Добавят се 200 μL от реагент 2.
 7. Разклаща се няколко пъти, докато се получи хомогенна смес.
 8. Инкубира се при 65°C на водна баня с клатачка или термомиксер за 10 min. Достатъчно е и редовното обръщане на пробите с ръка по време на инкубирането.
 9. Пробите се поставят на лед за 20 min.
- * При наличие на големи количества протеини тази стъпка се повтаря два пъти.

Изолиране на ДНК

10. Пробите се отстраняват от леда и се прибавя 500 μL хлороформ, охладен на -20°C. Хлороформът е най-ефективен за отстраняването на комплексите протеини/полизахариди.
11. Добавят се по 100 μL от резината. Резината трябва да е добре суспендирана, като преди употреба се

разклаща енергично (Вортекс). Важно е тубичката с резината да съдържа равни пропорции резина и буфер. Ако е необходимо, се добавя стерилен ТЕ буфер, след като се утаи резината.

* Резината трябва да бъде преизчислена според обема на центрофужната епруветка:

- ✓ за 1.5 mL епруветка → 100 μ L резина;
- ✓ за 5 mL епруветка → 200 μ L резина;
- ✓ за 10 mL епруветка → 300 μ L резина.

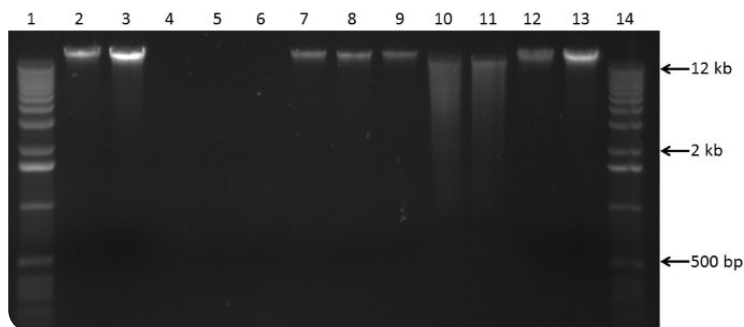
12. Пробите се поставят на клатачка за 10 min при стайна температура.

* Достатъчно е пробите да се разклащат на ръка през определено време.

13. Пробите се центрофузират при 1300xg за 10 min.

14. С помощта на пипета внимателно се отделя горният слой, без да се отнема (отпипетира) от долния, и се прехвърля в чиста епруветка.

* Горната фаза съдържа ДНК и може да изглежда зеленикава или мътна, но това не променя качеството на ДНК. Може да се приложи допълнително центрофузиране на повече от 1300 xg за проявяване на отделения горен слой.



Фиг. 22

ЕФ на растителна ДНК, изолирана с NucleonPhytoPureKit (AmershamBiosciences)

ПРАКТИЧЕСКО ЗАНЯТИЕ 9

Преципитиране на ДНК

15. Прибавя се изстуден изопропанол в равно количество на отделената нагстояща течност.
16. Внимателно се хомогенизира сместа, за да преципитира ДНК (с обръщане на епруветката или при наличие с орбитална клатачка).
17. Центрофузира се при минимум 4000 x g за 5 min, за да се утаи ДНК (да се залепи на дъното на епруветката).
18. Утайката се измива със 70% етанол.
19. Отново се центрофузира при същите условия, за да се утаи ДНК.
20. Утайката се измива за втори път със 70% етанол.
21. Отново се центрофузира при същите условия, за да се утаи ДНК.
22. Супернатантата се изхвърля.
23. ДНК се изсушава напълно на въздух за 10 min, като трябва да се премахнат всички останали капчици етанол по епруветката.
 - * Отстраняването на етанола (следи се по миризмата) може да стане по-ефективно на клатачка с отворена капачка на епруветката, на струя въздух в ламинар-бокс и др.
24. ДНК се ресуспендира в ТЕ буфер или в стерилна вода (PCR вода, дейонизирана, бидестелирана вода или ТЕ буфер).
 - * Ако е необходимо пречистване с РНКаза, то може да се извърши на тази стъпка вместо на стъпка 4.

**Фиг. 23**

Преципитирана
с етанол ДНК

6. ИЗОЛИРАНЕ НА РНК

ПРАКТИЧЕСКО ЗАНЯТИЕ 10

Лабораторно оборудване, консумативи и материали

Автоклав, рНметър, везни, микропипети (2–20 μL , 10–100 μL , 100–1000 μL), микроцентрифуга, водна баня, вортекс, спектрофотометър, термостат, 1.5 mL епендорф епруветки, Trizol, изопропилов алкохол, етанол, натриев додецилсулфат (SDS), растителна тъкан.

ИЗОЛИРАНЕ НА РНК

Получаване на високо качество на РНК е първата и често най-критична стъпка при изпълнението на много молекулярни техники като обратна транскрипция, PCR в реално време (RT-qPCR), транскриптомен анализ чрез използване на следващо поколение секвениране (next-generation sequencing), ДНК чипове, PCR и изграждане на cДНК библиотека.

Трудностите при изолирането на РНК се дължат на наличие на големи количества полизахариди, високи нива на RNase, различни феноли, включително танини, ниски концентрации на нуклеинови киселини, високо съдържание на вода и др.

Традиционните процедури за изолиране на РНК се извършва в присъствието на РНКаза инхибиторни средства (обикновено силно денатуриращи като гуанидинови соли, натриев додецилсулфат (SDS) или фенолни съе-

гинения, които са предназначени за намаляване на риска от деградация на РНК в пробата).

Намирането на най-подходящия метод за клетъчно или тъканно разграждане от изходния материал е важно за увеличаване на добива и качеството на екстракция на РНК.

Методите за изолиране на РНК могат да бъдат класифицирани в четири основни техники:

- ✓ органични методи за екстракция;
- ✓ метод на колонките;
- ✓ метод на магнитните частици;
- ✓ директни методи за лизиране.

Органичните методи за екстракция се считат за златен стандарт за екстракция на РНК. По време на този процес пробата се хомогенизира във фенол-съдържащ разтвор и след това се центрофугира. По време на центрофугиране пробата се разделя на три фази: органична фаза, средна фаза, която съдържа денатурирани протеини и ДНК, и горна водна фаза, която съдържа РНК. Горната водна фаза се отделя и РНК се събира чрез утаяване и алкохолрехидратация.

Основните предимства на органичната екстракция са следните:

- ✓ бързо денатуриране на нуклеазите и стабилизиране на РНК;
- ✓ екстракция на голям брой проби.

Недостатъците на органичната екстракция са свързани с използването на хлорирани органични реагенти. Процесът е труден за автоматизиране. Изолирането на РНК по този начин е трудоемка и интензивна ръчна обработка.

Метод на колонките

При този метод се използват мембрани (обикновено от стъклени влакна, силициев диоксид или йонообменни

мембрани), които са поставени в колонка. Пробите се лизират в буфер, който съдържа инхибитори на РНКазата (обикновено гуанидинови соли) и нуклеиновите киселини се свързват към мембраната чрез преминаване на лизата посредством центрофугиране. Разтворите за промиване впоследствие преминават през мембраната и се отстраняват. Използва се подходящ разтвор за елуиране и пробата се събира в центрофужна епруветка.

Предимства

- ✓ Възможност за обработка на единична проба и обработка на 96 проби;
- ✓ Възможност за автоматизиране;
- ✓ Възможност за производство на мембрани с различни размери.

Недостатъци

- ✓ склонност да се задръсти с частици от материал;
- ✓ Възможно задръжане на ДНК.

Метод на магнитните частици

При този метод се използват малки (0.5–1 μm) частици, които съдържат парамагнитно ядро и обвивка, свързващи се с различни молекули. Парамагнитните частици мигрират, когато са изложени на магнитно поле, но запазват минимална магнитна памет при загубването му. Това позволява частиците да взаимодействат с молекулите въз основа на техните повърхностни модификации и да се събират бързо с помощта на външно магнитно поле, след което се ресуспендират лесно след отстраняването му. Пробите са разтворени в разтвор, съдържащ инхибитори на РНКазата, и могат да се свързват към магнитните частици. Магнитните частици се събират чрез прилагане на магнитно поле.

Предимства

- ✓ няма риск от запушване на филтъра;
- ✓ магнитният формат дава възможност за бързото събиране/концентрация на пробата;
- ✓ възможност за автоматизиране.

Недостатъци

- ✓ потенциални възможности за пренасяне на магнитните частици в елуираните проби;
- ✓ бавна миграция на магнитните частици във вискозни разтвори;
- ✓ улавянето/освобождаването на частиците е трудоемко, когато се извършва ръчно.

Директни методи за лизиране

При директните методи за лизиране се използват буфери за лизиране, които разграждат клетките и стабилизират нуклеиновите киселини. Обикновено пробата се смесва с лизиращ агент и се инкубира за определен период от време при определени условия и след това се използва директно.

Предимства

- ✓ изключително бързо и лесно;
- ✓ най-голям потенциал за точно определяне на РНК;
- ✓ може да работи и с много малки проби;
- ✓ възможност за автоматизация.

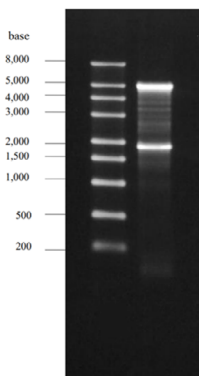
Недостатъци

- ✓ невъзможно спектрофотометрично измерване на добива;
- ✓ възможно е получаването на остатъчна RNase активност.

ПРАКТИЧЕСКО ЗАНЯТИЕ 11

Протокол за екстракция на РНК от *Arabidopsis thaliana*

1. Смила се около 0.1 g растителна тъкан в течен азот.
2. Добавя се 1 mL Trizol. Прехвърля се в епруветки епендорф.
3. Центрофузира се при 12 000 xg за 5 min при 2 до 8°C.
4. Отдекантира се нагутайката и се прехвърля в центрофужна епруветка.
5. Добавя се 200 µL хлороформ и се разклаща в продължение на около 15 s.
6. Престоява на стайна температура (~ 20–25 °C) в продължение на 3 min.
7. Центрофузира се при 12 000 xg за 15 min при 2 до 8°C.
8. Прехвърля се внимателно горната водна фаза в нова епруветка.
9. Прибавят се 0.5 mL изопропилов алкохол. Смесва се.
10. Престоява на стайна температура за 10 min.
11. Центрофузира се при 12 000 xg в продължение на 10 min при температура от 2 до 8°C.
12. Внимателно се изхвърля супернатанта. Утайката може да бъде леко прозрачна.
13. Добавя се 1 mL 75% етанол.
14. Вортексура се кратко и се центрофузира при 12 000 xg в продължение на 5 min при температура от 2 до 8°C.
15. Изхвърля се повърхностният слой, както в стъпка 13.
16. Разтваря се утайката в 20 µL дейонизирана вода.
17. Определя се концентрацията на РНК.

**Фиг. 24**

ЕФ на екстрахирана РНК
от *Arabidopsis thaliana*

7. ИЗОЛИРАНЕ НА РНК СЪС СИЛИЦИЕВИ ЧАСТИЦИ

ПРАКТИЧЕСКО ЗАНЯТИЕ 12

Лабораторно оборудване

Центрофуза с охлаждане, автоматични микропипети, лабораторна аналитична везна, рН метър, автоклава, хомогенизатор, температурен инкубатор (20–90°C), ле-догенератор.

Необходими реактиви за извършване на анализа: силициеви частици, епруветки, накрайници.

Табл. 6

Необходими буфери

Буфер	4.0 M	Guanadine thiocyanate
	0.2 M	Na-Acetate, pH 5.2
	25 mM	EDTA
	1.0 M	K-Acetate
	2.5 % (w/v)	PVP 40
	store at 4°C	
Буфер за промиване	10 mM	Tris-HCl, pH 7.5
	0.5 mM	EDTA
	5 mM	NaCl
	50 % (v/v)	Ethanol
	store at 4°C	
NaI	0.15 M	Na ₂ SO ₃
	6 M	NaI
	Съхранение при 4°C на тъмно	

Получаването на РНК с високо качество и количество е важна предпоставка за много молекулярно-биологични методи като конструирането на копи ДНК (кДНК) библиотеки, RT-PCR, бързо амплифициране на кДНК краища (RACE). Повечето методи за изолиране на РНК са неподходящи за устойчивите на въздействие растителни тъкани, съдържащи голямо количество протеини и вторични метаболити. Чрез този метод се осигурява свързването на РНК със силициеви частици при висока концентрация на NaCl в присъствието на етанол и натриев ацетат. Методът е сравнително евтин и силно възпроизводим. Създаден е за изолиране на висококачествена РНК от различни тъкани, устойчиви на въздействие в гуанидин тиоцианат.

Предимства на метода

Екстракцията на РНК със силициеви частици дава по-висок добив в сравнение с екстракцията с кит. Екстрахира РНК от проби, съдържащи голямо количество протеини и вторични метаболити. По-евтин е от кита за екстракция.

Недостатъци на метода

Чистотата на екстрахираната РНК е по-ниска от тази, получена с кит. Недостатък е използването на течен азот за стриване на пробите.

Приложения на метода

Изолиране на висококачествена РНК от всякакви по произход проби, основно от такива с голямо съдържание на белтъци и вторични метаболити.

За определяне на щамове и рекомбинанти на бързо еволюиращи организми (някои вируси).

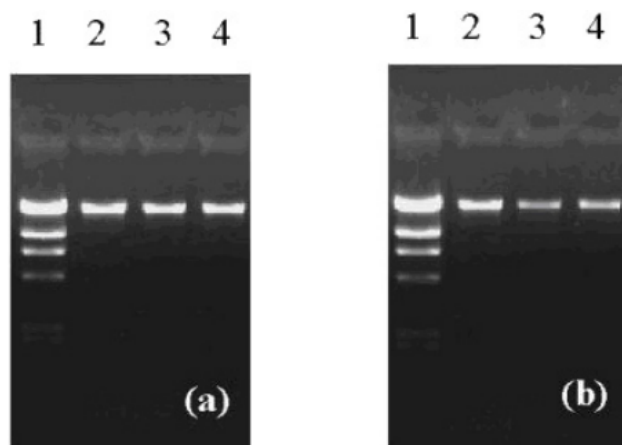
Протокол за изолиране на РНК със силициеви частици:

- ✓ Смесват се 60 g силициеви частици (SigmaS5631) с 500 mL ултрачиста бидестилирана вода и престой 24 h.

- ✓ Отстранява се супернатантата от 470 mL и се смесват силициеви частици с нови 500 mL ултрачиста вода. Престояват 5 h.
- ✓ Отстранява се супернатантата от 440 mL и оставащите 60 mL слизеста утайка се довеждат до pH 2,0 с HCl.
- ✓ Приготвят се количества от по 200 μ L, автоклавират се при 121°C за 20 min и се съхраняват при 4°C.

Екстракция на тотална РНК

- ✓ Хомогенизирам се 300 mg листа в торбичку (Bioreba, Reinach, Switzerland) с 300 mL GB.
- ✓ Инкубирам се 500 μ L със 100 μ L 10% (w/v) разтвор на N-Laurilsarcosyl при 70°C за 10 min на клатачка.
- ✓ Инкубира се 5 min на лег.
- ✓ Центрофугира се при 13 000 xg за 10 min на стайна температура.
- ✓ Смесват се 300 μ L от супернатантата със 150 μ L етанол, 300 μ L 6 M NaI и 25 μ L силициеви частици.
- ✓ Инкубира се сместа на стайна температура за 10 min на клатачка.
- ✓ Центрофугира се при 6000 xg за 1 min.
- ✓ Отстранява се супернатантата и се ресуспендира силициевата утайка в 500 μ L WB.
- ✓ Центрофугира се при 6000 xg за 1 min.
- ✓ Отстранява се супернатантата и се ресуспендира силициевата утайка в 500 μ L WB.
- ✓ Суши се утайката на стайна температура.
- ✓ Ресуспендира се утайката в 150 μ L ултрачиста вода.
- ✓ Инкубиране при 70°C за 4 min.
- ✓ Центрофугира се на 13 000 xg за 3 min при стайна температура.
- ✓ Прехвърлям се 130 μ L от супернатантата в нова епруветка.
- ✓ Съхранява се на -20°C.



Фиг. 25

ЕФ на екстрахирана РНК със
силициеви частици

8. ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНИ ТЕХНИКИ

ПРАКТИЧЕСКО ЗАНЯТИЕ 13

Лабораторно оборудване, консумативи и материали

Автоклав, рН-метър, Везни, микровълнова печка, апарат за електрофореза, микропипети (2–20 μL , 10–100 μL , 100–1000 μL), 1.5 mL епендорф епруветки, ТАЕ, ТВЕ, Трис, оцетна киселина, ЕДТА, буфер за нанасяне, ДНК стандарт (DNALadder), агароза, флуоресцентно багрило за оцветяване.

Явлението, при което под въздействие на електрично поле заредените колоидни частици се придвижват към катода или анода в зависимост от електричния си заряд, се нарича електрофореза. Електрофорезата е широко използван метод за разделяне на заредени молекули или по-големи частици въз основа главно на различия в сумарния заряд. Посоката на придвижване към един от полюсите на външно електрично поле се определя от знака на сумарния заряд на молекулите. Електрофоретичните методи се прилагат успешно както за разделяне на смеси от аминокиселини, така и на смеси от пептиди, белтъци и нуклеинови киселини.

Съществуват 3 основни типа електрофоретични системи:

- ✓ електрофореза с подвижна граница;
- ✓ зонална електрофореза;
- ✓ стационарна електрофореза.

Първият тип се характеризира с рязка граница между разтвора на макромолекулите и буфера. Скоростта на миграция на макромолекулите се наблюдава чрез преместване на тази граница.

При зоналната електрофореза се използва пореста среда носител, наречена гел, като нишесте, акриламид, агар, агароза и др.

Към електрофорезата от третия тип се отнасят изоелектрическото фокусиране и изотахофорезата.

Развитието на биохимичната генетика на белтъците и изоензимите е свързано с усъвършенстване на методите и лабораторната техника за електрофоретичното им разделяне.

Методите на електрофореза на различни носещи среди гатират отговора. За изследване на генетичния полиморфизъм на белтъците и изоензимите значителна роля изиграва въвеждането на зоналната електрофореза на скорбелен (нишестен) гел от канадския учен Смитис, на агарова и агарозна, на полиакриламидната електрофореза.

Принципи на електрофоретичното разделяне на белтъци

Биологичните макромолекули – белтъци, нуклеинови киселини и въглехидрати, се намират в разтворите във вид на частици, които по своите размери съответстват на колоидни частици. Те имат определен електричен заряд (товар), който се определя от група, поддаваща се на електролитна дисоциация (разграждане). Това са аминокиселинни остатъци с натоварени групи – основни групи на аргинин, лизин и хистидин и киселинни групи на глутаминовата и аспарагиновата киселина. Повечето от киселинните и основни групи са относително слаби и поради това белтъкът е силно зависим от рН на средата.

Измененията в белтъчната молекула в резултат на точкова мутация са причина за промени в първичната структура на белтъка. Това е свързано със замяна на една аминокиселина с друга в полипептидната верига, което води до промяна на изоелектричната точка на белтъчната фракция и нейния електричен заряд. Това

от своя страна изменя скоростта и посоката на придвижването им в електрично поле. Такова изменение на сумарния заряд на белтъка се използва за откриване на алелните варианти на определен ген чрез съответните маркерни белтъчни фракции.

Когато е в електрично поле, върху протеиновата молекула действа силата F . Тя зависи от силата на полето и товара на протеина.

Миграцията на белтъка на единица електрично поле се нарича електрофоретична подвижност и изисква определени условия (температура, буфер, състав на гела, рН). Тя се отразява върху свойствата на всеки един белтък.

Високата сила на тока генерира топлина, което оказва ефект върху скоростта на миграция. Тя се определя от съотношението заряд/молекулна маса. Освен това разделянето зависи и от интензитета на полето и формата на молекулите в сместа, както и от структурата на носещия гел (агаров, агарозен, целулозно-ацетатен, полиакриламиден гел и др.). Скоростта на движение зависи и от относителната маса на съответната белтъчна молекула. Колкото по-ниска е относителната молекулна маса, толкова по-напред в електричното поле ще мигрират фракциите на разделения белтък. Например най-бързо мигриращите в електрическото поле са преалбумините и албумините.

Най-общо разделянето на белтъците в съответната среда носител (нишесте, агароза, акриламид) зависи от следните фактори:

- ✓ свойства на белтъците – електричен заряд, форма и големина, степен на дисоциация;
- ✓ свойства на средата – носител – проводимост, топлина и вискозитет;
- ✓ качества на електричното поле – интензивност, хомогенност, джаулова топлина и промени в рН;

- ✓ обратнопропорционалната зависимост между йонната сила на използваните буфери и електрофоретичната подвижност.

Принципи на гел-електрофореза на ДНК

Гел-електрофорезата на ДНК е метод, при който се разделят (въз основа на размера, електрически заряд и други физични свойства) макромолекулите на нуклеиновите киселини. За електрофоретично разделяне на различните полинуклеотиди се използва ефектът на молекулярното сито, характерно за различни видове гелове. Отрицателно заредените молекули на ДНК се движат към положителния полюс и се разделят въз основа на различните си размери (гължина на веригата). По-късите молекули се движат по-бързо през порите на гела, отколкото по-дългите. Чрез агарозни гелове става по-грубо разделяне на фрагменти, които се различават значително по гължина. Чрез полиакриламидни гелове методът е много по-чувствителен – установяват се разлики в гължината дори с един нуклеотид. Това позволява определяне на последователността (секвенцията) на ДНК.

ДНК-ивиците в гела се визуализират с помощта на багрила – например етидиевият бромид позволява визуализацията на всички ивици под ултравиолетова светлина. Посредством метода на електрофореза може да се определят:

- ✓ молекулната маса на полинуклеотидите;
- ✓ тяхната природа, т.е. рибонуклеотиди или дезоксирибонуклеотиди;
- ✓ от броя вериги, съставлящи дадената молекула – една или две;
- ✓ формата на молекулата – линейна или пръстеновидна.

За разделяне на нуклеиновите киселини се използват агарови, агарозни и полиакриламидни гелове. Най-голяма

разрешаваща способност и поради това най-често използвани са агарозните и полиакриламидните гелове.

Скоростта, с която се движи дадена макромолекула, се определя от нейната електрофоретична подвижност. Това е коефициент, аналогичен на коефициента на седиментация при центрофугирането и зависи от заряда и масата на молекулата. Колкото е по-голям зарядът, толкова по-голяма е електрофоретичната подвижност. Зависимостта на подвижността от молекулната маса обаче е обратна: колкото по-голяма е молекулата, толкова по-голямо съпротивление среща при движението си през гела и по-назад в носителя се намират молекулите, а най-леките най-бързо достигат края на гела.

Агаровите и агарозните гелове имат свойства на молекулярни сита, което позволява да се използват за разделяне на високомолекулярни нуклеинови киселини. Най-използваният гел за електрофореза на нуклеинови киселини е агарозният. Агарозата се разтваря във водни разтвори при нагряване в кипяща водна баня и при изстигане желира.

Аналитична електрофореза в агарозен гел

Изходният разтвор на агарозата се разтопява на кипяща водна баня, докато стане прозрачен. Приготвя се гел с концентрация на агарозата, съответна на големината на фрагментите, които ще се анализират. Между концентрацията на гела и големината на фрагментите, разделени на гела, има обратнопропорционална зависимост (табл.1).

След изстигане на гела той се пренася на апарата за електрофореза. Използваната апаратура за електрофореза се състои от източник на постоянен ток (стабилизиран токоизправител), пластмасови или стъклени вани, снабдени с електроди за поставяне на електролитния буфер.

Табл.7

Големина на ДНК фрагментите, разделени
в гел с различна концентрация

Агароза (%)	Размер на ДНК фрагментите
0.5	700 бг (базови двойки) до 25 кб (килобази, 1000 бази)
0.8	500 бг до 15 кб
1.0	250 бг до 12 кб
1.2	150 бг до 6 кб
1.5	80 бг до 4 кб

За електрофорезата се приготвят следните буфери:
TAE – Tris-Acetate(Трис-ацетат)и ЕДТА, pH= 8.0
TBE – Tris-Borate(Трис-борат)и ЕДТА, pH=8.0

Електрофоретичните буфери се приготвят и съхраняват на стайна температура. Обикновено се използват 1x TAE или 0.5x TBE, като концентрацията му в гела и електрофорезата трябва да бъде една и съща (табл. 2).

Табл. 8

Съдържание на концентрирани и работни
разтвори на буфери за електрофореза

Буфер	Работен разтвор	Концентриран разтвор/ литър
TAE	1x 40 mM Трис-ацетат 1 mM ЕДТА	50x 242 g Трис 57.1 mL оцетна киселина 100 mL 0.5M ЕДТА (pH 8.0)
TBE	0.5x 45 mM Трис-борат 1 mM ЕДТА	5x 54 g Трис 27.5 g борна киселина 20 mL от 0.5M ЕДТА (pH 8.0)

Багрилото за нанасяне се смесва с пробите преди залагането им в гела.

Използват се 2 ДНК стандартa (DNALadder):

- ✓ с ниско молекулно тегло – 100 до 1000 бг;
- ✓ с високо молекулно тегло 1–20 килобази (кб).

Концентрираният разтвор на ДНК стандартa за големина се разрежда с буфера за електрофореза.

За детекция на ДНК се използват два метода:

- ✓ оцветяване на гела с етидиев бромид;
- ✓ оцветяване на гела със SYBRGold.

Ваните се запълват с електролитен разтвор. Всяка проба се поставя в отделна ямка (старт) в началото на гела. Обикновено на един старт се нанасят и маркери за молекулна маса, т.е. смес от фрагменти ДНК с известна дължина (молекулен стандарт). Гелната плака с нанесените проби се поставя хоризонтално върху електродните ваните.

Най-подходящият и широко използван метод за визуализиране на ДНК в агарозен гел е оцветяване с флуоресцентната боя – етидиев бромид, съдържаща трициклическа група, която интеркалира между базите на ДНК и се образуват етидиев бромид – ДНК комплекси, видими под UV светлина.

Етидиевият бромид се приготвя като концентриран разтвор (10 mg/mL вода). Оцветяването на гела се извършва по два възможни начина:

1. Нанасяне директно в гела преди електрофорезата с концентрация 0.5 μ L/mL, след което се визуализира на UV трансилюминатора.
2. Оцветяване на гела след приключване на електрофорезата, като етидиевият бромид се разтваря в буфера за електрофореза (0.5 μ L/mL) за 30–45 min на стайна температура.

ПРАКТИЧЕСКО ЗАНЯТИЕ 14

Агарозна електрофореза на серумни белтъци

Плазмените белтъци имат йоногенни групи, които определят сумарния заряд на дадена белтъчна молекула. При разделяне на тези белтъци чрез електрофореза върху агарозен гел обикновено се използва буфер с $pH =$ или > 8.6 . Изоелектричните точки на плазмените белтъци са между 5 и 7. При $pH \geq 8.6$ и над него те са заредени отрицателно и движейки се към анода с различна скорост, изминават различно разстояние и се разделят на следните фракции: албумин, α , β и γ глобулини, фибриноген. При сканиране на електрофорезграмата се получава т.нар. генситограма, в която на всяка фракция съответства пик с определена ширина и височина. От площта на всеки пик може количествено да се определи даден белтък.

Акриламидна електрофореза

За среда носител се използва полиакриламиден гел. Акриламидната среда носител се използва по 2 основни начина:

- ✓ чрез акриламидни гелни плаки, разположени хоризонтално и вертикално;
- ✓ чрез т.нар. гискова електрофореза с вертикално разположени колонки, съдържащи акриламиден гел.

Акриламидният гел се приготвя чрез полимеризация на акриламиден мономер, разтворен в буферен разтвор, при добавяне на кръстосано свързващ агент NN метилен-бис-акриламид. Гелът желира след 10–30 min при лабораторна температура. Акриламидният гел се приготвя в 3 до 30% акриламидна концентрация. Нискоконцентрираните гелове са с по-широки пори и се използват за разделяне на белтъчни молекули с по-голяма молекулна маса. Геловете, които съдържат над 10% акриламид, са

по-твърди и по-чупливи. Те имат по-малки размери на порите и се използват за разделяне на белтъчни молекули с по-малка относителна маса.

При акриламидната електрофореза за разделяне на генетично детерминирани зони на белтъци и нуклеинови киселини се използват 2 вида плаки – обикновени, които съдържат гел с една и съща концентрация, и градиентни, когато процентът на акриламидната смес е различен.

Капилярната електрофореза е една от най-често прилаганите техники през последните години. При този метод се провежда свободна електрофореза (за кратко време) в капилярни тръбички с диаметър 0.05–0.3 mm, като се използват много малки количества от изходния материал. Около отрицателно заредените стени на капилярите се движи поток от катиони към катода, увеличавайки със себе си разделяните молекули независимо от техния заряд. Положително заредените молекули се движат с този поток най-бързо, последвани от неутралните и отрицателно заредените молекули.

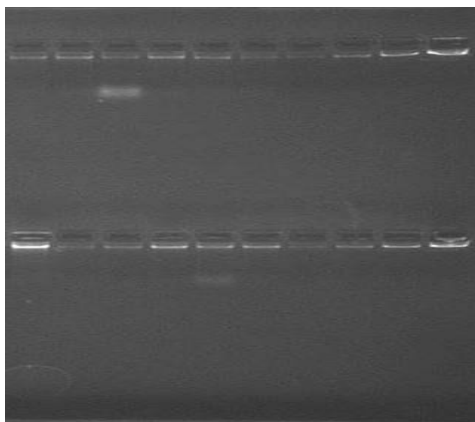
Приложение на електрофорезата

- ✓ идентификация на генотипове при земеделски култури. Служи за разделяне на протеини, включително резервни белтъци;
- ✓ маркерна селекция в растениевъдството – наличието или отсъствието на определени алели се свързва с добри технологични качества, висок добив, толерантност към абиотични фактори, устойчивост към биотични фактори;
- ✓ тестване за чистота на семената (изоензимно и др.);
- ✓ при всички PCR базирани методи за молекулярно-генетични маркери – RFLP, AFLP, RAPD, SSR, SNP;
- ✓ оценка на генетично разнообразие и филогенетични анализи при животни;

- ✓ тест за бащинство;
- ✓ гетекция на генетични заболявания;
- ✓ изследване на рекомбинантни ДНК.

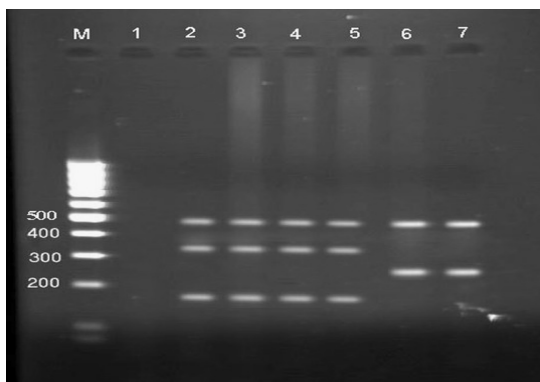
Протокол за провеждане на електрофореза в агарозни гелове

1. Постава се гребенът за оформяне на стартовете на разстояние 1–2 mm над гъното на ваничката.
2. Приготвя се работният буфер – разтваря се 20 mL 50xTAEбуфер до 1 LddH₂O.
3. Приготвя се агарозата – в 250 mL бехерова чаша/ колба се претегля 0.64 gагароза. Добавя се 80 mL 1xTAEбуфер, загрява се до 95°C на микровълнова фурна за ~1 min до пълно разтваряне на агарозата.
4. Охлаждане до 50–60 °C.
5. Добавяне на етидиев бромид в концентрация 0.5 µg /µL.
6. Гелът се излива във формата за отливане.
7. След около 30 min гелът е готов за работа и гребенът се отстранява внимателно.
8. Пробите се приготвят и зареждат в гела. Към разтвора, който съдържа целевата (матричната) ДНК, се прибавя пробен буфер – 0.25% бромфенол-блу, 0.25% ксиленцианол, 30% глицерол.
9. В апарата се налива електрофорезен буфер до по-тапянето на гела.
10. Провежда се гел-електрофорезата. Електрофорезата приключва до достигане на багрилото (багрилата) до края на гела. При проверка на ДНК времето на протичане на електрофорезата е 15 min за преодоляване на стартовете от пробите при големина на тока 70 Vu 110 min до края на електрофорезата при 50 V. След 15 и 110 min резултатът от придвижените ДНК молекули се фотодокументира (2 пъти).
11. Визуализация на гела.

**Фиг. 26**

Проверка на изолираната ДНК на агарозен гел

Стартове 1–6 – проби от изолирана ДНК, стартове 7–10 – стандартни концентрации на ДНК за сравнение с пробите: старт 7 – 15 ngλ ДНК, старт 8 – 30 ngλ ДНК, старт 9 – 60 ngλ ДНК, старт 10–150 ngλ ДНК.

**Фиг. 27**

Визуализиран резултат от PCR на агарозен гел

Старт М – ДНК маркер, стартове 1–7 – амплификационни продукти от проведен PCR анализ.

9. РЕСТРИКЦИОНЕН АНАЛИЗ

ПРАКТИЧЕСКО ЗАНЯТИЕ 15

Лабораторно оборудване, консумативи и материали

Автоклав, рНметър, везни, апарат за електрофореза, апарат за PCR, микропипети (2–20 μL , 10–100 μL , 100–1000 μL), микроцентрифуга, водна баня, Вортекс, спектрофотометър, термостат, 1.5 mL центрофужни епруветки, рестрикционни ензими, ТАЕ, ТБЕ, Трис, оцетна киселина, ЕДТА, буфер за нанасяне, ДНК стандарт (DNA ladder) с ниско и високо молекулно тегло, агароза, флуоресцентно багрило за оцветяване.

Според ензимната номенклатура рестрикционните ендонуклеази са хидролази, действащи върху естерните връзки от вътрешността на полинуклеотидната верига на дезоксирибонуклеиновата киселина и образуващи 5'-фосфомоноестерни фрагменти. Рестрикционните ендонуклеази (рестриктази) режат двойноверижните ДНК молекули на специфично място, наречено рестрикционен сайт, при което се получават два или повече полинуклеотидни фрагмента.

Известни са около 3500 рестрикционни ензими, разпознаващи над 250 различни ДНК секвенции. Рестриктазите са характерни за бактериалната клетка, но са изолирани също така и от вируси и еукариотни организми. Около 25% от всички бактерии съдържат поне един вид рестрикционна ендонуклеаза, а при някои бактериални щамове броят в отделната клетка може да достигне седем и повече.

Основните рестрикционни ензими са означени като място(сайт)-специфични ендезоксирибонуклеази от тип I, II и III, с идентификационни номера съответно

3.1.21.3, 3.1.21.4 и 3.1.21.5. Рестрикционните ензими от тип I разпознават определена специфична нуклеотидна последователност и режат двойноверижната ДНК молекула около нея, без да имат специфичност по отношение на нуклеотидите, между които се осъществява срязването. Ендонуклеазите от тип II разпознават специфичната последователност и режат двойната верига в определено място на тази секвенция. Ензимите от тип III разпознават специфичната последователност и срязват двойноверижната ДНК в място, намиращо се на няколко нуклеотида встрани от нея.

Названията на рестрикционните ендонуклеази показват биологичния вид, от който е изолиран съответният ензим, и евентуално типа на щам. Това е трибуквено съкращение, чиято първа буква означава родово име, а втората и третата буква представляват съкратен запис на видовото име на микроорганизма (или и на подвидовото). С арабски цифри и латински букви, изписани след трибуквения код, се отбелязват щамовете. С римска цифра се отбелязва съответна рестриктаза, в случай че от конкретния организъм могат да бъдат изолирани няколко ензима (табл. 1).

Табл. 9

Рестрикционни ензими и разпознавателни секвенции

Рестрикционен ензим	Организъм, от който произлиза рестриктазата	Целева секвенция (срязване в *)5' → 3'
<i>Ava</i> I	<i>Anabaena variabilis</i>	C* C/T C G A/G G
<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	G* G A T C C
<i>Bgl</i> II	<i>Bacillus globigii</i>	A* G A T C T
<i>Eco</i> RI	<i>Escherichia coli</i> RY 13	G* A A T T C
<i>Eco</i> RII	<i>Escherichia coli</i> R245	* C C A/T G G

Рестрикционен ензим	Организъм, от който произлиза рестриктазата	Целева секвенция (срязване в *)5' → 3'
<i>Hae</i> III	<i>Haemophilus aegyptius</i>	G G * C C
<i>Hha</i> I	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	G C G * C
<i>Hind</i> III	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	A * A G C T T
<i>Hpa</i> I	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	G T T * A A C
<i>Kpn</i> I	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	G G T A C * C
<i>Mbo</i> I	<i>Moraxella bovis</i>	* G A T C
<i>Pst</i> I	<i>Providencia stuartii</i>	C T G C A * G
<i>Sma</i> I	<i>Serratia marcescens</i>	C C C * G G G
<i>Sst</i> I	<i>Streptomyces stanford</i>	G A G C T * C
<i>Sal</i> I	<i>Streptomyces albus</i> G	G * T C G A C
<i>Taq</i> I	<i>Thermophilus aquaticus</i>	T * C G A
<i>Xma</i> I	<i>Xanthamonas malvacearum</i>	C * C C G G G

Рестрикционните ендонуклеази разпознават определена къса ДНК секвенция, (**разпознавателна секвенция**), състояща се от 4–6 нуклеотида, прикрепват се към ДНК молекулата и разкъсват фосфодиестерните връзки, които свързват нуклеотидите в полинуклеотидна верига. По този начин ДНК молекулата се нарязва на различни по брой и дължина ДНК фрагменти в зависимост от броя на рестрикционните места и разпределението им в съответния геном. Рестрикционният ензим винаги реже ДНК в своята разпознавателна секвенция, независимо от произхода на ДНК молекулата – вирусна, бактериална, растителна, животинска или човешка.

Рестрикционната ендонуклеаза *Hae*III, изолирана от *Haemophilus aegyptius*, има следната разпознавателна секвенция:

GG↓CC

CC↑GG

Това срязване води до получаване на следните симетрични ДНК фрагменти:

....GG CC.....

....CC GG.....

Рестриктазата *Hpa* II има следната разпознавателна секвенция:

C↓CGG

GGC↑C

При рязане с нея се получават несиметрични ДНК фрагменти:

C CGG

GGC C

Видове разпознавателни секвенции

1. Палиндромни

Повечето рестрикционни ендонуклеази разпознават участъци от ДНК, означавани като палиндромни или частично палиндромни. Палиндромът е полинуклеотидна секвенция, която се повтаря и в двете вериги на ДНК, носейки една и съща информация при четене в една посока (5'→3') по дължината на веригата (т.е. всяка последователност, която има симетрия от втори ред) – т.нар. *напълно симетрични обратни повтори*. Като пример за палиндромни участъци могат да бъдат посочени следните прицелни последователности, съответно при *E.coli* и *Proteus vulgaris*:

5' - Г А А Т Т Ц - 3' *Eco*RI (*E.coli*)

3' - Ц Т Т А А Г - 5'

5' - Ц А Г Ц Т Г - 3' *Pvu*II (*P. vulgaris*)

3' - Г Т Ц Г А Ц - 5'

2. Частично палиндромни

Участък, в който има неспецифични нуклеотиди, нарушаващи симетрията от втори ред, се нарича частично палиндромен.

5' – ЦЦ Т А ГГ – 3' (палиндром)

3' – ГГ А Т ЦЦ – 5'

5' – ЦЦА А ГГ – 3' частичен палиндром

5' – ЦЦТ Т ГГ – 3'

3' – ГГТ Т ЦЦ – 3' частичен палиндром

5' – ГГА А ЦЦ – 3'

3. Прекъснат палиндром

Представлява участък от ДНК молекулата с нарушена симетрия от втори ред поради наличието на вмъкнати, несъществени нуклеотиди, които най-общо се означават с латинската буква N. Броят на тези вмъкнати нуклеотиди може да бъде от 1 до 9.

Например:

5' – Ц А Ц N N N Г Т Г – 3' *AdeI (Alcaligenes denitrificans Ss 3-028)*

3' – Г Т Г N N N Ц А Ц – 5'

4. Двустранни разпознавателни секвенции

Те представляват прекъснати последователности без палиндромна симетрия в специфичните нуклеотиди. Такава секвенция е позната при *Bacillus coagulans*:

5' – (N)₁₀ ЦГ А (N)₆ Т ГЦ (N)₁₂ – 3' *BcgI (Bacillus coagulans)*

3' – (N)₁₂ ГЦ Т (N)₆ А ЦГ (N)₁₀ – 5'

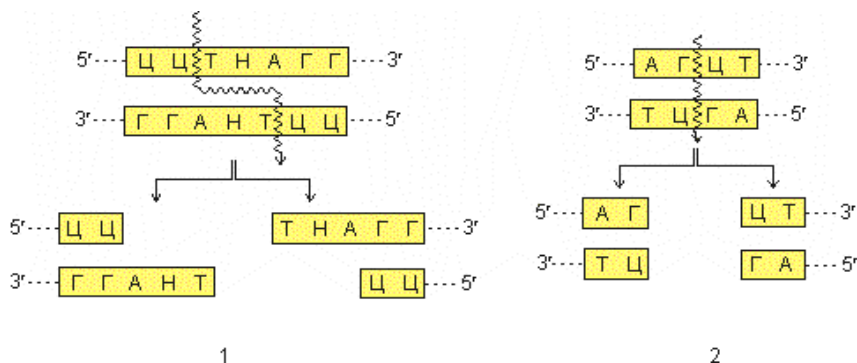
5. Непалиндромни

При този вид разпознавателна секвенция не се наблюдава симетрия от втори ред, но се характеризира със специфични нуклеотиди:

5' – Ц Т Г Г А Г – 3' *Bco35I (Bacillus coagulans RFL35)*

3' – Г А Ц Ц Т Ц – 5'

При срязването с рестриктаза може да се получат както едноверижни стърчащи (наричани още лепливи), така и двойноверижни нестърчащи (тъпи) краища.



Фиг. 28 А

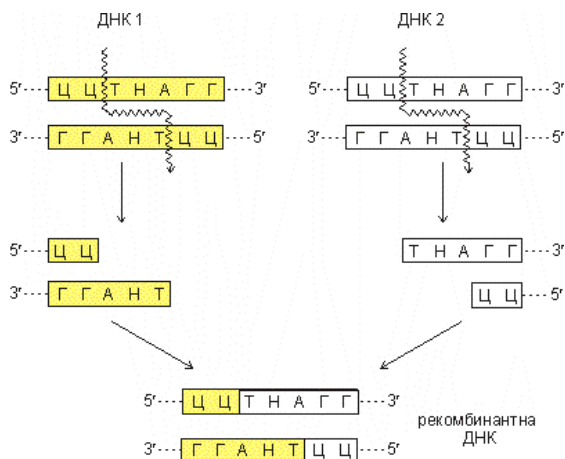
Рестриктаза *MstII* – лепливи краища

Фиг. 28 В

Рестриктаза *AluI* – тъпи краища

Действие на рестрикционните ензими върху палиндромни последователности: 1 – под действие на рестриктазата *MstII* се получава стърчащи краища; 2 – под действие на рестриктазата *AluI* се получава тъпи краища. „Н“ означава, че на това място в секвенцията може да се намира всеки един от четирите нуклеотида.

Получените ДНК-фрагменти се наричат рестрикционни фрагменти. Те могат да се свързват едни с други, ако имат стърчащи комплементарни краища. Така фрагменти от различни ДНК молекули могат да се свържат един с друг, ако молекулите са срязани с един и същи рестрикционен ензим. След комплементарното свързване на краищата чрез водородни връзки краищата могат да се съединят ковалентно чрез ДНК лигаза. В резултат на това се получава рекомбинантна ДНК.



Фиг. 29

Получаване на рекомбинантна ДНК с рестриктазата MstII и ДНК-лигаза

Рестрикционен анализ

Рестрикционният анализ е техника за анализ на различни по дължина ДНК фрагменти, получени в резултат на третиране на двойноверижна ДНК с определен рестрикционен ензим.

Рестрикционният анализ се основава на способността на рестрикционната ендонуклеаза да разпознава специфична нуклеотидна последователност (рестрикционно място) и да срязва ДНК молекулата на всички места, където се среща тази последователност. Нуклеотидните замени, водещи до изчезване или създаване на ново рестрикционно място за определен ензим, довеждат до промяна в дължината и броя на рестрикционните фрагменти. Наличието на такива промени се означава като полиморфизъм по дължината на рестрикционните фрагменти (Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP). Полиморфизмите по дължината на рестрикционните фрагменти (RFLP) имат дуалелна характеристика, тъй като всеки индивид носи по два алела за определен генен

локус с максимална хетерозиготност – 50%. Например при алели (+) и (-) са възможни три генотипа – (+/+); (+/-); (-/-).

Стъпки в рестрикционния анализ

1. Подбор на подходящ рестрикционен ензим. В зависимост от целите на рестрикционния анализ се подбира такава ендонуклеаза, на която рестрикционното място да съвпада с мястото на нуклеотидната замяна, която може да има характеристиката на полиморфизъм или мутация.
2. Изолитране на ДНК.
3. Амплификация (PCR) на получената ДНК.
4. Рестрикция – инкубиране на PCR продукта с определен рестрикционен ензим при специфичната за неговото действие температура.
5. Електрофоретично разделяне на рестрикционните фрагменти в агарозен или полиакриламиден гел.
6. Визуализация и интерпретация на резултатите от RFLP анализа.

Предимства на метода

- ✓ Бърз и лесно изпълним метод.

Недостатъци на метода

- ✓ Необходимост от голямо количество висококачествена ДНК;
- ✓ Непълна пенетрантност на алелите, контролиращи признаците на продуктивността;
- ✓ Трудности при локализацията на алелите на структурните гени;
- ✓ Детекция на полиморфизми – RFLP анализ;
- ✓ Диагностика на различни генетични заболявания (муковисцидоза, β -таласемия, мускулна дистрофия и др.);
- ✓ Популационни проучвания – произход и еволюция на растителния, животинския и човешкия геном;
- ✓ Получаване на рекомбинантна ДНК.

Протокол за рестрикционен анализ

В стерилна микроцентрифужна епруветка се поставя разтвор на ДНК в концентрация 2 μg ДНК и обемът се довежда до 36 μL с ddH₂O.

Прибавят се 2 μL от подходящ за съответната рестриктазна реакция буфер (10x).

Прибавят се 3–4 единици рестрикционен ензим. Инкубиране на реакционната смес при специфичната за използвания ензим температура.

Реакцията се приключва чрез добавяне на 0.5 ЕДТА (pH 8.0) до крайна концентрация 10 mM или замразяване при -20°C.

Електрофореза на получените рестрикционни фрагменти. Визуализация на получените резултати с фотодокументираща система.

10. ПОЛИМЕРАЗНА ВЕРИЖНА РЕАКЦИЯ – PCR

ПРАКТИЧЕСКО ЗАНЯТИЕ 16

Лабораторно оборудване, консумативи и материали

PCR апарат, лабораторни пипети (2–20 μL , 10–100 μL , 100–1000 μL), 1.5 mL центрофужни епруветки, праймери, матрица ДНК, ДНК полимераза, буфер за PCR, дезокси-нуклеозид-трифосфати (dNTP) – dATP, dTTP, dCTP, dGTP, магнезиев хлорид, вода.

Полимеразната верижна реакция (PCR) е основен молекулярно-биологичен метод за целево намножаване (амплифициране) на участък от ДНК в *in vitro* условия, намиращ приложение за различни цели. Създаден е през 1983 г. от американския биолог Кери Мюлис. Принципът на метода се състои в експоненциално намножаване (амплификация) на специфичен фрагмент ДНК с използването на къси, изкуствено синтезирани олигонуклеотиди (10–30 нг), които се наричат праймери. Те се свързват специфично с определен участък от целевата ДНК, което е необходимо условие за *Taq*-полимеразата за започване на синтеза на новата ДНК-верига. След начален етап на денатурация (термично разделяне на двете вериги от изследваната нативна ДНК) следва етап на хибридизация на праймерите и синтез на новата ДНК-верига. В следващия цикъл от реакцията този новосинтезиран ДНК фрагмент ще послужи като матрица за синтез на нова верига ДНК. Процесът продължава 25–50 цикъла, което има като резултат генерирането на милиони молекули

ДНК, идентични на целевата молекула. В резултат на амплификацията се добиват микрограмови количества от прицелния участък на ДНК.

Компоненти на PCR реакцията:

- ✓ Прав и обратен праймер;
- ✓ ДНК полимераза (*Taq* полимераза);
- ✓ Буфер за PCR;
- ✓ Четирите дезокси-нуклеотид-трифосфати (dNTP) – dATP, dTTP, dCTP, dGTP;
- ✓ Магнезиев хлорид;
- ✓ Вода;
- ✓ ДНК матрица (шаблон, модел за амплификация).

Компонентите се смесват в разтвор, наречен PCR смес (мастър микс), към който се добавя изследваната ДНК. Пробата се денатурира при 94–96°C. Праймерите са дъва синтетични къси олигонуклеотида (15–30 нг). Олигонуклеотидите са комплементарни на къс участък от едната и съответно от другата верига на ДНК – прав – forward (F) и обратен – reverse (R). Олигонуклеотидите се свързват специфично към комплементарния им участък от ДНК и служат като начало за свързване на ДНК полимеразата и синтез на нова ДНК верига. Четирите dНТФ (dNTPs) са градивните единици за синтеза на новата верига. Процесът на денатурация, прикачване на праймерите и синтез на ДНК се повтаря най-често 30–35 пъти, в резултат на което се амплифицира изследваната ДНК. ДНК полимеразата утължава веригите в двете направления (5' и 3') и синтезира дъве вериги, комплементарни на изходните. Цикълът се повтаря много пъти и резултатът е многократно увеличено количество ДНК с определена дължина и секвенция. За 20 цикъла количеството на изходната ДНК може да се увеличи 10^6 пъти, а за 30 цикъла 10^9 пъти.

Основни компоненти на PCR

- ✓ ДНК матрица (прицелна ДНК, таргетна ДНК) – молекулата, в която участва търсената последователност. Върху нея се синтезират новите копия на интересувания ни участък. PCR пробата може да бъде едно- или двуверижна ДНК, което се определя от специфичността на експеримента. За стартиране на реакцията е необходимо малко количество ДНК. Обикновено за стандартна реакция се използва 50–100 ng матрична ДНК.
- ✓ Праймери – това са олигонуклеотиди, които хибридузират с комплементарни участъци от двете вериги на ДНК молекулата. По този начин се осигурява двововерижен участък, необходим за свързване с полимеразата. Праймерите са инициатори на реакцията, указващи мястото, от което тя трябва да започне. Те имат дължина 15–30 бази и ограничават областта на амплифициране в двете вериги на прицелната ДНК. Идеалната им дължина е около 18 нуклеотида. Изборът на праймери е най-критичният момент за процеса на амплификация. Правилният им подбор осигурява получаване на продукти с високо тегло, супресия на неспецифични продукти и улеснява по-нататъшния анализ на PCR продуктите. От голямо значение е и тяхната концентрация, защото при по-големи количества се увеличава количеството на неспецифичните продукти.

При избора на секвенциите (конструиране, дизайн) на двата праймера е необходимо да се спазват следните правила:

- да не съдържат комплементарни бази помежду си и с прицелната ДНК;
- да се избягва комплементарността на 3'-края, която води до получаване на артефакт т.нар.

- „праймерен димер“ (между двата праймера) или „праймерен олигомер“ (вътре в единия праймер);
- препоръчаното G+C съдържание е 40 до 60%;
 - да не са от областта на матричната ДНК, която има по-висока температура на топене от тази на праймерите;
 - към праймера може да се добавят нематрични 5'-краища, необходими за постамплификационни манипулации – промоторни секвенции, рестрикционни сайтове и др.;
 - дължината на комплементарния на матрицата праймер да е с дължина 15–20 нуклеотида. Разликата между двата праймера в двойката да не превишава 3 бг;
 - температурата на топене между двата праймера не трябва да се различава с повече от 5°C.

Оптималните температури на анилинг (хибридизация) и праймерната концентрация се определят емпирично. В стандартните реакции се използва концентрация на праймерите 0.1–0.5 μmol от всеки праймер, което е достатъчно за 30 цикъла на амплификация на 1 kb от ДНК. По-големите количества на праймера са причина за неспецифична хибридизация и получаване на неспецифични продукти.

Оптималната температура на хибридизация на праймерите (annealing) и тяхната концентрация се определя емпирично. ДНК полимеразата е активна в границите 25–72°C.

Стандартният PCR съдържа еквимоларни количества gATФ, gTTФ, gЦТФ, gГТФ. Препоръчителната концентрация на всяко gНТФ в полимеразната реакция е 200–250 μmol . Стандартно буферите за PCR амплификация съдържат натриев или калиев хлорид и са с рН 8.0–8.3. В 50 μL реакция това количество води до синтез на 6–6.5 μg ДНК, което е достатъчно и за мултиплексните

реакции, в които участват 8 или повече двойки праймери едновременно. Високата концентрация на gHTФ (>4 mM) инхибира полимеразната реакция. По-ниската концентрация от 20 μM – 0.5–1.0 mM е достатъчна за амплификация на фрагмент с дължина 1 kb.

Изчисляване на молекулното тегло на олигонуклеотидите

$$M_r = (C \times 289) + (A \times 313) + (G \times 304) + (T \times 329)$$

където: C е брой на C базите, A – брой на A базите, T – брой на T базите, а G – брой на G базите.

Например молекулното тегло на нуклеотид с 20-базисе бѐде ~6000 далтона.

Използва се и разтвор на 25 μM $MgCl_2$ за оптимизиране на титруването.

✓ Магнезиеви йони

Всички термостабилни ДНК полимерази изискват свободни дивалентни катиони – обикновено Mg^{2+} .

Рутинно се използва концентрация от 1.5 μM Mg^{2+} . В присъствие на 0.8 μM gHTФ оптимално избраната концентрация на $MgCl_2$ (от 1 до 4 μM) подобрява продукцията на PCR продукти с високо тегло. Ниската концентрация на магнезиеви йони води до ниски количества или отсъствие на PCR продукти, а високите количества на свободни магнезиеви йони – 4.5–6 μM – до получаване на неспецифични продукти или грешно включване на бази. Оптималната концентрация на магнезиеви йони се определя емпирично за всяка комбинация от праймери.

✓ Термостабилна ДНК полимераза.

Taq ДНК полимеразата е първият изолиран ензим от термофилни бактерии и е най-често използваният за амплификация на фрагменти ДНК с дължина до 5000 бази. Изборът на полимеразата се определя от целта на експеримента. Възможно е да се смесят две и повече полимерази, което подобрява амплификацията на дълги фрагменти. Например смес от Taq и Pfu полимеразите води до получаване на фрагменти до 35 kb.

“Hotstart” *Taq* полимеразите са в неактивна форма при ниски температури и изискват активиране при 94–95°C.

Например за PCR реакция с обем 50 µL се използват 1.25 единици (U) “hotstart” ДНК полимераза. Ензимът се добавя към мастер микса на стайна температура.

- ✓ PCR температурен профил

Дизайн на полимеразната верижна реакция

PCR е повтарящ се процес, който се състои от 3 елемента: денатурация на матричната ДНК чрез нагряване, хибризация (анйлинг) на олигонуклеотидните праймери с едноверижната прицелна секвенция (матричната ДНК), удължаване (синтез) на хибридуираните праймери с ДНК полимераза.

ДНК денатурацията е критична стъпка в PCR процеса. Температурата на денатурация е 94–96°C. Температурата на хибризация се базира на T_m (температура на топене) и е в границите 37–55°C. Тя може да бъде увеличена до температурата на удължаване (extension). Високата температура на хибризация увеличава специфичността.

- ✓ Денатурация

След смесването на ДНК, праймерите, дезоксинуклеотидите, ДНК полимеразата, буфера и Mg^{2+} йони, реакционната смес се нагрява до 94°C за около 30–90 сек. Двойноверижните ДНК молекули се денатурират, при което двете полинуклеотидни вериги се разделят. Това позволява на праймерите да се свържат с матрицата, ако са комплементарни на участък от нея. Двойноверижната ДНК се денатурира на температура, зависеща от G+C съдържанието. По-високото съдържание на гуанин и цитозин изисква по-висока температура на денатурация на веригите на ДНК. Ако температурата на денатурация е ниска и времето – кратко, ще се денатурират само богатите на АТ участъци. За линейни молекули ДНК със съдържание G+C (55%) или по-малко е достатъчна де-

натурация за 45 s на 94–95°C. По-висока температура се изисква за богатите на G+C райони (>55%).

✓ Хибридузация (annealing, присъединяване)

- ✓ Протича при специфична за използваните праймери температура, най-често в интервала 55°C – 60°C за около 1 минута. Брауновото движение на праймерите ги среща с комплементарни участъци от ДНК. Между тях непрекъснато се образуват и разрушават водородни връзки. Най-стабилни са връзките между праймери и участъци от ДНК с най-голяма комплементарност.

Обикновено температурата на хибридузация на праймерите е по-ниска с 3–4°C от изчислената температура на топене (T_m)(Melting temperature T_m).

За праймери с дължина 15–20 нуклеотида най-често използваната формула за изчисляване на T_m на хибрида, образуващ се между всеки олигонуклеотиден праймер и комплементарната му секвенция от матричната верига, е уравнението на Уолъс:

$$T_m (\text{в градуси}) = 2(A+T) + 4(G+C)$$

Където:

A+T – броят на базите аденин и тимин в олигонуклеотида

G+C – броят на базите гуанин и цитозин в олигонуклеотида

- ✓ Синтез на нова верига ДНК (елонгация)

Реакцията протича при 72°C в продължение на 1–2 min в зависимост от дължината на търсения участък. Температурата зависи от температурата на ензима, катализиращ синтеза на ДНК. В случай че се използва *Taq* ДНК полимеразата, тази температура ще бъде в границите 72–78°C. Ензимът, свързал се с двойноверижния участък, започва да „пълзи“ по матрицата в посока на 5' края и да синтезира новата верига. Скоростта на полимеризация на *Taq* ДНК полимеразата е ~2000 нуклеотида за минута и като практическо правило удължа-

Ването се задава за 1 min на всеки 1000 бг от продукта. Често се задава 1 min и 30 s (с резерв от време) за синтезиране на 1 000 бг.

✓ Брой на циклите

Броят на циклите се определя в зависимост от броя копия на матричната ДНК в началото на реакцията и ефикасността на утължаването и амплификацията. За 30 цикъла на амплификация се образуват 105 копия от прицелната ДНК. След приключване на полимеразната верижна реакция трябва да се провери дали се е формирал PCR продукт, тъй като не всеки опит е успешен. Възможно е количеството на ДНК да е недостатъчно или твърде много или праймерите да не съответстват. Може да се получи продукт със съвсем друга дължина или няколко с различни дължини. Тези резултати се получават, когато праймерите са хибридузирали със съвсем друга секвенция. Паралелно се пуска „празна проба“ – без ДНК матрица, за да се провери наличие на замърсяване сред реактивите на PCR сместа. Най-лесният метод, чрез който може да се провери дали в пробата присъства търсеният PCR продукт, е електрофорезата. Успоредно с пробата се пуска и контрола, съдържаща молекулни маркери с точно определена, известна дължина, които указват къде би трябвало да се появи намноженият участък.

✓ Инхибитори

Основните инхибитори са: протеиназа К, фенол, ЕДТА, хепарин, хемоглобин, багрила като бромфенолблу и ксилен цианол.

Трудностите при провеждане на полимеразната верижна реакция водят до получаване на неспецифични продукти, липса на продукти, получаване на малко количество PCR продукти и други, описани в табл. 1.

Како всеки метод иPCR има ограничения:

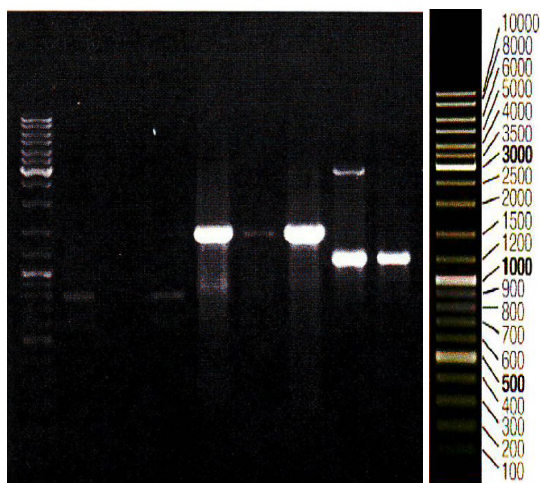
- ✓ Могат да се амплифицират само къси последователности – до около 5000 нг, най-добре до 2000 нг, а това невинаги е достатъчно.

- ✓ Специфични праймери обикновено са достъпни само за последователности, които вече са добре изучени. Затова PCR рядко се използва за разучаване на неизвестни ДНК региони.

PCR методът е подходящ за стандартизирани изследвания:

- ✓ идентификация;
- ✓ диагностика на инфекциозни болести;
- ✓ диагностика на генетично обусловени болести;
- ✓ предразположение към заболяване;
- ✓ ранна диагностика на туморни заболявания;
- ✓ контрол на хранителни продукти (ГМО, патогени);
- ✓ състав на хранителни продукти (растителни, животински, обработени);
- ✓ контрол на земеделска продукция;
- ✓ екологичен контрол (патогени в почва и вода).

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9.



Фиг. 30

ЕФ на PCR фрагменти от вирусен геном HSV
(Herpes Simplex Virus)

10.1. RT-PCR АНАЛИЗ

ПРАКТИЧЕСКО ЗАНЯТИЕ 17

1. Изолуране на РНК

За източник на РНК се използват пресни биологични материали: кръв, костен мозък, тъканни биопсии и гр. РНК е доста неустойчива и лесно се разгражда от ендогенните РНКази. При изолуране на РНК трябва да бъдат спазвани следните условия:

- ✓ Цялата процедура трябва да протича максимално бързо при съответен температурен режим.
- ✓ Използва се гейонизирана вода без РНКази.
- ✓ При изолуране на РНК от тъкани първо се получава клетъчен хомогенат.

2. Количествена и качествена оценка на получената РНК

- Определяне на абсорбцията при 260 nm и 280 nm.
- ✓ В спектрофотометрична кювета се смесват 2 μL от разтвора на изолураната РНК и 1000 μL свободна от РНКази вода.
- ✓ Определя се оптичната плътност на разтвора при 260 nm (A_{260}) и при 280 nm (A_{280}).
- Определяне на коефициента К на чистота на РНК в пробата:

$$K = A_{260} / A_{280}$$

При задоволителна чистота коефициентът трябва да бъде в границите от 1.7 до 2.0.

- Определяне на концентрацията C на РНК в пробата по формулата:

$$C = (A_{280} \times 40 \mu\text{g/mL}) \times 1/2$$

В зависимост от вида на тъканите добивът на РНК е в границите от 4 до 7 μg на 1 mg тъкан.

- Съхраняване на изолирана РНК.

След преципитация с етанол РНК се съхранява:

- ✓ В специален буфер на -80°C (SDS-TE buffer, pH 7,6);
- ✓ В абсолютен етанол на -20°C .

3. Обратна транскрипция

Получаването на егноверижна кДНК от иРНК става с помощта на специфични или неспецифични праймери и РНК-зависими ДНК полимерази (обратни транскриптази).

Получаването на егноверижни кДНК е в зависимост от използвания праймер:

- ✓ Използване на олиго-дТ в качеството на праймер.
- ✓ Всяка иРНК има полиагенилова (поли-А) опашка. Олиго-дТ представлява синтетичен политимилов олигонуклеотид, комплементарен на поли-А опашката на иРНК. С помощта на този универсален праймер могат да бъдат получени кДНК от всички видове иРНК.
- ✓ Използване на случайни хексамери в качеството на праймери.
- ✓ Случайни хексануклеотиди се използват в тези случаи, когато иРНК е много гълга или съдържа много вторични структури. Използването на олиго-дТ при такова положение би било неефективно.
- ✓ Използване на ген-специфични праймери (GSP).

4. Амплификация на егноверижната кДНК

В качество на GSP могат да бъдат използвани анти-сенс олигонуклеотиди. Следва се описаният по-горе протокол за PCR.

5. Детекция на получените PCR продукти

За визуализация на получените PCR продукти се използва РААGE или агарозна гел-електрофореза и оцветяване с етидиев бромид. Заедно с пробата на електрофореза се пускат:

- ✓ набор от ДНК фрагменти с фиксирана дължина – (DNA Ladder);
- ✓ отрицателна контрола, съдържаща микс за PCR без кДНК;
- ✓ положителна контрола, съдържаща специфична кДНК, аналогична на тази, която трябва да се идентифицира.

Предимства на метода RT-PCR

- ✓ Бърз и чувствителен метод за доказване на експресията на даден ген чрез наличие/отсъствие на транскрипт.
- ✓ Амплификацията на специфични ДНК копия на иРНК е особено полезна при изследване на големи гени, съдържащи дълги некодиращи сегменти.

Табл.10

Трудности при провеждане на PCR

Проблем	Вероятна причина	Препоръки за отстраняването
Липсва PCR продукт	Няма оптимална концентрация на Mg. Количеството на матричната ДНК не е оптимално. Присъства ензимен инхибитор в реакцията. Висока или ниска температура на анилинг. Деградирали праймери или недостатъчно количество. Незавършена денатурация на матричната ДНК. Висока концентрация на NaCl – над 50 mM. Висока концентрация на KCl – над 50 mM.	Да се оптимизира с различна концентрация на Mg (0.5–5 mM)! Да се използват различни концентрации на ДНК (100–750 ng човешка ДНК)! Да се регулира или отстрани инхибиторът! Оптимизиране на температурата! Проверка на дизайна на праймерите! Повишаване на температурата на денатурация! Намаляване на концентрацията!

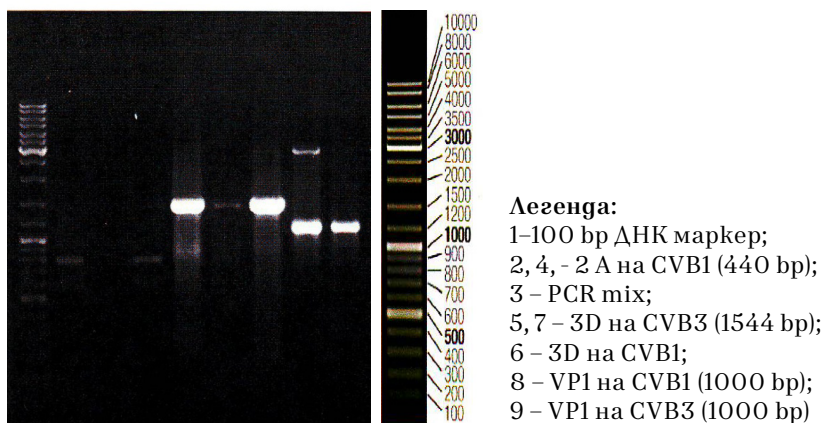
Проблем	Вероятна причина	Препоръки за отстраняването
Няма специфични фрагменти	Неоптимална концентрация на Mg. Концентрацията на нуклеотиди е висока или небалансирана. ДНК контаминиране. Температурата на анилинг е ниска. Праймерите са деградирани или не са в оптимално количество. Концентрацията на праймерите е много висока. Неточно съотношение между количеството на матричната ДНК и ензима.	Да се проведе PCR без матричната ДНК! Да се прецизира концентрацията на праймерите (0.1–1.0 μmol от всеки праймер е оптимално)! Да се използва оптимално количество на матричната ДНК!
Неясни фрагменти	Неоптимална концентрация на Mg. Концентрацията на нуклеотиди е висока или небалансирана. ДНК контаминиране. Температурата на анилинг е ниска. ДНЗна активност. Наличие на екстрахираща мазнина.	Използване на нов свеж концентриран разтвор (изходен)! Центрофузиране, за да се отдели мазнината.
Малко количество PCR продукт	Висока температура на анилинг. Деградирала или замърсена матрична ДНК. Наличие на инхибитор в реакцията. Количеството на матричната ДНК не е достатъчно. Температурата на удължаване е висока. Голям брой на циклите. Хидролизирани нуклеотиди. Концентрацията на нуклеотидите е висока или небалансирана.	Пречистване на ДНК или използване на техниката „горещ старт“. Оптимизиране на температурата (72°C, 1 min). Съхраняването на нуклеотидите в концентриран разтвор в концентрация най-малко 10 mM, а 100 mM е препоръчителната.

Създаване на PCR програмата.

- ✓ Т °C на начална денатурация гв ДНК – 95 °C, 2 min;
- ✓ 35 цикъла:
 - Т °C на денатурация в циклите – 94 °C, 30 s;
 - Т °C на анилиране (хибридизация на праймерите за матрицата) – 38 °C, 1 min;
 - Т °C на синтезиране на нови вериги – 72 °C, 2 min;
- ✓ Т °C крайно утвърждаване на новосинтезираните вериги – 4 °C.
- ✓ Т °C крайна поддържаща до изваждане на PCR пробите – 4 °C.

1. Приготвяне на реакционната смес и матричната ДНК.
2. Нанасяне и затваряне на капачките на епруветките.
3. Кратък вортекс на реакционната смес с ДНК.
4. Старт на PCR програмата.
5. Зареждане на 5 до 10 μ L от PCR пробите в агарозен гел (1.4 % концентрация на агароза).
6. Подава се напрежение 90 V.
7. Фотодокументиране.

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9.



Фиг. 31

ЕФ на RT PCR фрагменти от вирусен геном CVB1 (Coxsackievirus B1) и CVB3 (Coxsackievirus B3)

ПРАКТИЧЕСКО ЗАНЯТИЕ 18

PCR протокол със специфични праймери

За PCR сместа:

1. Разтворите се приготвят преди извършването на PCR реакцията!
2. Температурата на анилинг се определя емпирично и е зависима от T_m (T_m) на праймерите.

Правило на палеца или правило на Уолъс позволява приблизителното ѝ изчисляване:

$$T_m = 2C(A+T) + 4C(C+G)$$

Температурата на анилинг (T_a) е с няколко градуса ($\sim 4^\circ\text{C}$) по-ниска от температурата на топене (T_m).

3. Да се направи преценка на качеството и количеството на изолираната ДНК! (Леко деградирана – по-точна преценка на количеството.) При добро качество да се изчисли количеството, в което се съдържа 50–100 ng ДНК матрица. Концентрацията на ДНК да се приведе така, че обемите да са удобни за точно пипетиране.
4. Ако не е пречистена добре, се прилага допълнително пречистване:
 - ✓ Пречистване с 1 V разтвор от: 1 обем хлороформ: 1 обем изоамилов алкохол;
 - ✓ Разклащане;
 - ✓ Центрофузиране;
 - ✓ Отделяне на супернатанта в нова епруветка;
 - ✓ Добавяне на NH_4Ac (7.5 M);
 - ✓ Добавяне на 3 обема етанол за преципитиране на ДНК;

- ✓ Центрофузиране;
- ✓ Изхвърляне на супернатанта;
- ✓ Промиване на утайката с етанол 70%;
- ✓ Изсушаване на утайката;
- ✓ Разтваряне в 20 μL TE / ddH₂O.

Табл. 11

Типична PCR реакционна смес (мастър микс):

Изходни разтвори	μL	Крайна работна концентрация
10xPCR buffer (15 mM MgCl ₂)	5.0	1xPCR buffer (1.5 mM MgCl ₂)
Праймер 1 (100 pmol/ μL)	0.5	1 pmol
Праймер 2 (100 pmol/ μL)	0.5	1 pmol
dNTP mix (10 mM)	1	0.2 mM
DNA template (100 ng/ μL)	1	100 ng
Taq DNA Polymerase (5 U/ μL)	0.5	2.5 U
ddH ₂ O	41.5	

Краен обем на мастър микса 50 μL за една реакция.

Мастър миксът съдържа всички реагенти без матрична ДНК, когато в пробите участва различна ДНК матрица за амплифициране с еднаква двойка праймери.

Мастър миксът може да съдържа всички реагенти без двойката праймери, когато в пробите участва еднаква ДНК матрица за амплифициране с различни праймери.

- ✓ Умножават се всички изчислени обеми, осигуряващи концентрациите в мастър микса, по броя на пробите и се добавя допълнително резервно количество за 1–2 проби в зависимост от броя на пробите. Това се налага поради оставащи количества от PCR микса по епруветката, в която той се съдържа, и по крайниците.

- ✓ Смесват се.
- ✓ Добавя се обем от разтворената ДНК, изчислен да съдържа 50–100 ng във всяка епруветка.
- ✓ Прибавя се равно количество от PCR сместа.
- ✓ Задава се по-висока температура на капака на PCR машината, например 110 °C, за да не се изпарява и губи PCR миксът. При по-старите модели термосайклери се налага покриване с минерално масло на PCR сместа.
- ✓ Поставят се в PCR машината.
- ✓ Пробите да не престояват на стайна температура!

10.2. TOUCHDOWN RT-PCR

ПРАКТИЧЕСКО ЗАНЯТИЕ 19

Лабораторно оборудване, консумативи и материали

Лабораторно оборудване: микроцентрифуга, автоматични микропипети, ледогенератор, PCR апарат.

Необходими реактиви за извършване на анализа:

PCR апарат, лабораторни пипети (2–20 μL , 10–100 μL , 100–1000 μL), 1.5 mL центрофужни епруветки, праймери, матрица ДНК, ДНК полимераза, буфер за PCR, дезокси-нуклеотид-трифосфати (dNTP) – dATP, dTTP, dCTP, dGTP, магнезиев хлорид, вода.

Реактиви за обратната транскрипция на Touch-Down-PCR:

Приготвяне на 15 μL мастър микс

5 μL	5 $\times$ MMLV-buffer
2 μL	dNTPs (2mM)
0.5 μL	M-MuLV Reverse transcriptase (200 U/ μL)
7.5 μL	ddH ₂ O

Реактиви за Touch-Down PCR:

Приготвя се мастър микс с краен обем 25 μL за една реакция.

Табл. 12

Мастър микс

1 μL	cDNA
2.75 μL	10 $\times$ PCR buffer
2.2 μL	MgCl ₂ (25 mM)
2.2 μL	dNTPs (2 mM)
$\times 1$ μL	Праймери (1–5; 11–17)
1 μL	<i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/ μL)
12.85 μL	ddH ₂ O

Чрез този метод се избягва амплифицирането на неспецифични фрагменти от търсения вирусен генетичен регион поради по-голямата концентрация на растителна РНК в пробата, която се конкурира с по-ниската концентрация на вирусна РНК. Чувствителността на реакцията се увеличава при ниско ниво на екстрахирана вирусна РНК.

Температурата на топене на праймерите определя горната граница на температурата на хибридизация на праймерите за матрицата, при която се получават най-специфичните PCR фрагменти. С намаляване на температурата специфичността на хибридизация на праймерите намалява. Неспецифичните хибридизации на праймерите, получени в първите етапи на амплификацията, маскират крайния PCR резултат, тъй като поради експоненциалната природа на реакцията те са повече на брой от амплифицираните в крайните етапи специфични фрагменти. По този начин ивицата от неспецифични фрагменти е по-ясно изразена във визуализирания с УВ агарозен гел. За да се избегне това нежелано намаляване на неспецифични фрагменти, първата серия от цикли е с най-високи температури на хибридизация на праймерите, близки до точката им на топене (62°C),

като постепенно и плавно намалява с 2°C в следващите серии от температурни цикли до 55°C в последната серия, като първите две серии са с по-малко на брой цикли (5), а последните 2 серии са с по 10 цикъла. Използването на серия от цикли с различна температура на хибридизация е необходимо за „улавянето“ на търсения специфичен фрагмент. Ако се използва само една серия от цикли с висока температура на хибридизация, е възможно да се пропусне точната температура на хибридизация на праймерите, както и да липсва PCR продукт.

Праймерите хибридизират с търсения генетичен фрагмент при най-високата възможна температура и първата амплифицирана секвенция ще бъде с най-голяма специфичност. Този фрагмент се размножава след това в последващите серии от цикли, които са с по-голям брой и по-ниска температура на хибридизация, и конкурира възможните размножени неспецифични фрагменти.

Предимства на метода

Методът е много по-специфичен и чувствителен в сравнение с класическия RT-PCR. Избягва се амплифицирането на неспецифични фрагменти от търсения генетичен регион.

Недостатъци на метода

При неоптимизиран метод е възможно изпускането на търсения специфичен фрагмент.

Приложения на метода

- ✓ Анализ на гени от проби с ниско ниво на екстрахирана РНК;
- ✓ При трудно амплифициращи се гени в РНК;
- ✓ При липса на PCR продукт при анализ на дадена генетична секвенция;
- ✓ При неоптимизирана PCR реакция.

Въпроси и протоколи:

1. Какво представлява методът Touchdown RT-PCR?
2. Какво се идентифицира с този метод?
3. Какви компоненти изисква приложението на метода?
4. На какъв принцип се основава методът?
5. Опишете приложението на метода!
6. Какви са предимствата и недостатъците на метода, сравнен с останалите методи на RT-PCR?

Протокол за провеждане на Touch down RT-PCR**Синтеза на сору ДНК:**

- ✓ Денатуриране на тоталната РНК (0.05–0.5 μg) при 95°C за 5 min с 2 μL Poly dT праймер и вода в краен обем 10 μL .
- ✓ Изстудяване на лед (за избягване на ренатурация).
- ✓ Добавяне на 15 μL мастер микс.
- ✓ Инкубиране при 42°C за 60 min.

PCR:

Приготвя се мастер микс с краен обем 25 μL :

Табл. 13

Програма за Touch-Down RT-PCR

Начална денатурация	3 min	95°C	
Денатурация	30 s	92°C	5 цикъла
Анилинг	30 s	62°C	
Елонгация	90 s	72°C	
Денатурация	30 s	92°C	5 цикъла
Анилинг	30 s	60°C	
Елонгация	90 s	72°C	

Денатурация	30 s	92°C	10 цикъла
Хибридикация	30 s	58°C	
Елонгация	90 s	72°C	
Денатурация	30 s	92°C	10 цикъла
Хибридикация	30 s	55°C	
Елонгация	90 s	72°C	
Крайна елонгация	10 min	72°C	

PCR продуктите се визуализират чрез агарозна гел-електрофореза.

Фиг. 32

ЕФ на Touchdown RT-PCR на избрани генетични региони на CVB1 и CVB3



Легенда:

- 1, 9, 12, 13 – VP1 на CVB1 (1000 bp);
- 3 5, 6, 8 – VP1 на CVB3 (1000 bp);
- 2, 7, 14, 15 – 3D на CVB3 (3848 bp);
- 10 – 3D на CVB1 (3848 bp);
- 11 – 2A на CVB3 (440 bp);
- 4 – PCR mix;
- 16–100 bp ДНК маркер

11. ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

- Зарков, И., Н. Сангев, И. Бочев, Н. Русенова, 2007. *Ръководство за упражнения по ветеринарна вирусология*. Стара Загора: Тракийски университет.
- Протоколи за практическите занятия на студентите по вирусология в НБУ.
- Cann, A. J., 2016. *Principles of Molecular Virology*, 6th ed. London: Elsevier.
- Fields, B. N., P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, et al., 2001. *Fields Virology*, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins Publishers.
- Kudesia, G., T. Wreghitt, 2009. *Clinical and Diagnostic Virology*. Cambridge University Press.
- Mahy, B. W. J., H. O. Kangro, 1996. *Virology Methods Manual*. Academic Press Harcourt Brace & Company Publishers.



ISBN 978-619-233-386-7