

ЛАБОРАТОРИЯ №. 1 (525)

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ (50 баллов)

ОСНОВНЫЕ ИНСТРУКЦИИ

- Если вы готовы пойти в зону электрофореза, поднимите зеленую карту.
- Если вы столкнулись с трудностью, для решения которой вам необходима помощь, поднимите красную карточку.
- Если вы хотите сходить в туалет, возьмите синюю карту, в этом случае вас будет сопровождать лаборант.
- Вы будете выполнять работу разделившись на 2 группы, участники с номерами 1-7 представляют первую группу, участники с номерами 8-14 представляют группу №2. Схема организации работы в лаборатории представлена в таблице ниже:

Интервал времени	Группа	Действие
0-5 мин.	1+2	Общий инструктаж, проверка наличия указанных материалов.
6-30 мин.	1	Работа над 2 частью.
6-30 мин.	2	Работа над 1 частью
31-55 мин.	1	Работа над 1 частью.
31-55 мин.	2	Работа над 2 частью
55-60 мин.	1+2	Завершение работы, подготовка к переходу в следующую лабораторию.

РУКОВОДСТВО ПО ЭКСПЛУАТАЦИИ ДОЗИРУЮЩЕЙ ПИПЕТКИ

- ✓ **Регулировка объема.** Чтобы отрегулировать нужный объем, поверните диск регулировки объема, расположенный в верхней части микропипетки. Его можно повернуть вправо или влево, чтобы уменьшить или увеличить громкость.
- ✓ **Измерение объема жидкости.** Прежде чем измерять жидкость и переливать ее, убедитесь, что вы правильно установили объем и прикрепили наконечник. Удерживая пипетку вертикально, нажмите верхний поршень до первого упора. Погрузите кончик микропипетки в раствор на глубину примерно 3 мм в жидкость. Медленно ослабьте давление на поршень и дайте ему вернуться в исходное положение. Жидкость начнет подниматься вверх. Не отпускайте поршень слишком быстро, так как это может привести к образованию пузырьков в растворе, а также к выплескиванию раствора на нестерильный стержень. Выньте наконечник из раствора. Жидкость теперь будет на кончике микропипетки.
- ✓ **Примечание.** Наиболее серьезной и распространенной ошибкой является перемещение поршня до второго упора перед заполнением микропипетки. Избегайте этой ошибки.
- ✓ **Перенос объема жидкости** – Загрузите наконечник жидкостью, затем вертикально вставьте наконечник в контейнер, в который необходимо перелить жидкость. Не допускайте попадания жидкости в воздух. Аккуратно нажмите на поршень до первого упора, затем сделайте паузу и затем продолжайте нажимать на поршень до второго упора. Большая часть содержимого высвобождается при первой остановке, вторая остановка обеспечивает высвобождение последней капли жидкости. Вертикально держа пипетку вытащите наконечник из емкости и верните поршень в исходное положение. Снимите и выбросьте насадку в контейнер для отходов с помощью выталкивателя насадки.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧИСТОТЫ И КОНЦЕНТРАЦИЯ ДНК

Прежде чем использовать выделенную и очищенную ДНК в различных молекулярных манипуляциях, необходимо убедиться в ее чистоте и целостности. Проверка чистоты ДНК обычно проводится спектрофотометрически с учетом следующих соображений:

1. Молекулы ДНК (как двухцепочечные, так и одноцепочечные) демонстрируют максимальное поглощение при длинах волн от 257 до 260 нм;
2. максимальное поглощение белков, возможно остающихся в экстракте, приходится на $\lambda=280$ нм;
3. существуют также белки, поглощающие световое излучение с $\lambda=260$ нм, но их вклад в общее поглощение экстракта ДНК при $\lambda=260$ нм эквивалентен вкладу поглощения при $\lambda=300$ нм.
4. некоторые полисахариды поглощают световое излучение с $\lambda = 230$ нм.
5. оптическая плотность при 220 нм определяется олигонуклеотидами, которые обычно представляют собой молекулы ДНК, искусственно фрагментированные в ходе методов экстракции и очистки;
6. В зависимости от значений A_{260} и A_{280} степень загрязнения белками можно установить следующим образом:
 - ✓ оптимальное соотношение A_{260}/A_{280} составляет 1,8-2,0.
 - ✓ если это соотношение меньше 1,7, то белковая контаминация экстракта ДНК значительна.
7. о степени загрязнения РНК свидетельствуют значения отношения A_{260}/A_{280} более 2,0;
8. степень загрязненности полисахаридами определяется по значению отношения A_{260}/A_{230} , которое должно быть больше 2. Если получены значения ниже 2, это свидетельствует о наличии полисахаридов в экстракте ДНК. .

Таким образом, можно видеть, что для того, чтобы оценить степень чистоты экстракта ДНК, необходимо спектрофотометрическое считывание значений оптической плотности на нескольких длинах волн. Параллельно, если технические характеристики спектрофотометра это позволяют, рекомендуется также определить весь спектр поглощения образца в диапазоне $\lambda = 200 - 350$ нм, чтобы выделить возможные примеси.

Определение концентрации ДНК:

Самый простой метод определения концентрации ДНК в экстракте основан на считывании оптической плотности при $\lambda = 260$ нм. Таким образом, можно использовать следующие формулы:

$$A_{260} = 1 \text{ соответствует } 50 \text{ мкг ДНК д.ц. / мл}$$

$$A_{260} = 1 \text{ соответствует } 33 \text{ мкг ДНК о.ц. / мл}$$

$$A_{260} = 1 \text{ соответствует } 40 \text{ мкг РНК о.ц. / мл}$$

$$A_{260} = 1 \text{ соответствует } 20 \text{ мкг олигонуклеотидов/мл.}$$

Примечание! Учитывая тот факт, что в подавляющем большинстве случаев величина концентрации ДНК важна для последующих манипуляций с ней, совершенно необходимо, чтобы перед определением концентрации была оценена степень чистоты экстракта, а соответственно, и точное определение A_{260} .

ОЦЕНКА ЧИСТОТЫ И КОНЦЕНТРАЦИИ ДНК МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Целесообразно также определение концентрации ДНК по А260 коррелировать с появлением ДНК в электрофорезном геле. Также, это важно когда весь объем образца очень мал и не позволяет проводить спектрофотометрические измерения даже в кюветах небольшого объема, 50-100 мкл,

Электрофорез в агарозном геле — это метод, который позволяет разделить смешанную популяцию макромолекул, таких как ДНК или белки, в агарозной матрице, одном из двух основных компонентов агара. Полосы визуализируются благодаря использованию интеркалирующих флуоресцентных соединений (бромид этидия или SYBR Green) при облучении УФ-светом.

Когда необходимо оценить концентрацию и качество ДНК с помощью электрофореза, используют агарозный гель. В гель загружается небольшой объем образца, а рядом с ним загружается маркер молекулярной длины (например, можно использовать продаваемые разведения стандартного образца ДНК с известной концентрацией). Затем концентрацию образца оценивают по сравнению с интенсивностью флуоресцентных пятен, испускаемых растворами известных концентрации (используют окраску бромидом этидия). Этот метод позволяет обнаружить чрезвычайно малые количества ДНК (1-5 нг).

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ИНСТРУМЕНТЫ:

- ✓ ДНК, выделенная из бактерий (**пробирка с маркировкой от 1 до 13**)
- ✓ Краситель 6X, Loading Dye для загрузки образца (**присутствует на рабочей станции в химическом шкафу**)
- ✓ Штатив для пробирок
- ✓ Этикетки самоклеящиеся, 2 шт.
- ✓ Маркер, 1 ед.
- ✓ Парафильм
- ✓ Пипетка-дозатор (**присутствует на рабочей станции в химическом шкафу**)
- ✓ Наконечники для дозирующей пипетки (**присутствует на рабочей станции**)
- ✓ Электрофоретическая камера с агарозным гелем,

ХОД РАБОТЫ:

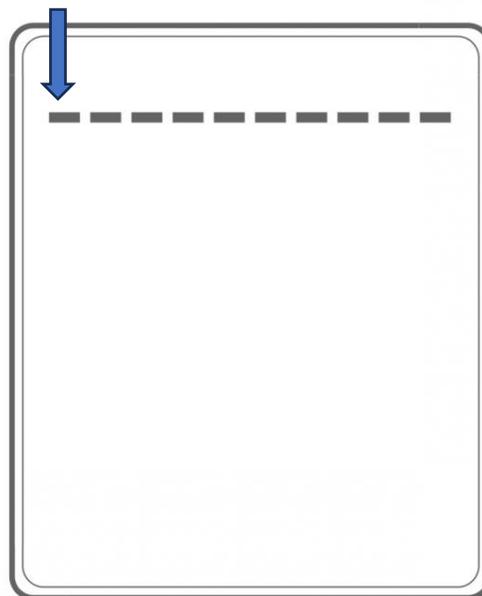
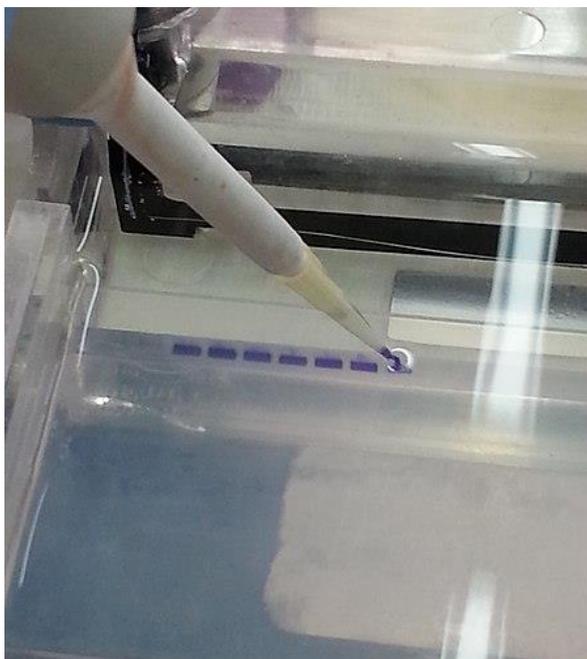
ЧАСТЬ I. Спектрофотометрическое определение чистоты и концентрации ДНК

1. Для спектрофотометрического исследования образца ДНК, выделенной из бактерий, обычно берут и разводят небольшое количество общего объема ДНК.
2. Выполните задания **1.1 – 1.4** на **ЛИСТЕ ОТВЕТОВ**.

ЧАСТЬ II. Оценка чистоты и концентрации ДНК методом электрофореза

3. Электрофоретическая камера была собрана лаборантами. Для электрофореза будет использоваться 1% агарозный гель. Используемым буферным раствором является TAE 1X (трис-ацетат-ЭДТА, 40 мМ трис-основания, 20 мМ уксусной кислоты, 1 мМ ЭДТА). Лунки, в которые вы собираетесь загрузить раствор ДНК, окрашенный красителем, **представляют собой свободные места в агарозном геле**. В одной из них уже загружен маркер длины, Ladder, либо на геле уже будут размещены образцы, исследованные другими участниками.

4. Если вы хотите загрузить образец в гель, возьмите соответствующую карточку и обратитесь за помощью к ассистенту. Вы можете сделать это только в сроки, указанные для вашей группы.
5. Чтобы загрузить образец в гель, выполните следующие действия:
 - ✓ В сопровождении ассистента вы подходите к рабочему месту, имея при себе образец для анализа, помещенный в подставку, вощеную бумагу (парафильм) с надписью номера стола, за которым вы работаете, и **ЛИСТЫ ОТВЕТОВ**.
 - ✓ Попросите ассистента указать, в какую лунку загрузить образец.
 - ✓ Установите пипетку на 1 мкл. Наденьте чистый наконечник.
 - ✓ Нанесите 2 капли красителя Loading Dye на вощеную бумагу.
 - ✓ Выбросьте наконечник в контейнер для отходов.
 - ✓ Установите пипетку на 5 мкл. Наденьте чистый наконечник.
 - ✓ В одну из капель красителя добавьте 5 мкл раствора ДНК.
 - ✓ Не меняя наконечник, установите пипетку на 6 мкл. Соберите в наконечник всю смесь красителя + раствор ДНК.
 - ✓ Загрузите образцы в гель, как показано на рисунке ниже. Держите пипетку вертикально. Вставьте наконечник на 2 мм в лунку и нажмите на поршень до первого упора. Удерживая поршень, извлеките наконечник из лунки и из жидкости. Расслабьте поршень. Выбросьте наконечник.



6. По окончании попросите лаборанта подписать п. 1.5 в **ЛИСТЕ ОТВЕТОВ**.
7. Вернитесь на свое рабочее место и выполните задания **ЛИСТА ДЛЯ ОТВЕТОВ**.