

Учреждение образования
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Кафедра лесных культур и почвоведения

Основы генетической инженерии древесных видов

**Методические указания к выполнению лабораторных работ
по одноименной дисциплине для студентов очной формы обучения
специальности 1-75 01 01 «Лесное хозяйство» специализации
1-75 01 01 06 «Лесовосстановление и питомническое хозяйство»**

Минск 2013

УДК 602.6 : 635.054(073)

ББК 43я73

О34

Рассмотрены и рекомендованы к изданию редакционно-издательским советом университета

Составители:

С. В. Ребко, Л. Ф. Поплавская

Рецензент

кандидат биологических наук,
заведующий кафедрой ландшафтного проектирования и садово-паркового строительства УО «Белорусский государственный технологический университет»

Т. М. Бурганская

В методических указаниях рассмотрены вопросы клонального микроразмножения древесных видов и культивирования протопластов растений, изложены методики выделения, размножения, проведения спектрофотометрического, рестрикционного и электрофоретического анализа ДНК растений.

По тематическому плану изданий учебно-методической литературы университета на 2013 год. Поз. 14.

Для студентов очной формы обучения специальности 1-75 01 01 «Лесное хозяйство» специализации 1-75 01 01 06 «Лесовосстановление и питомническое хозяйство».

© УО «Белорусский государственный технологический университет», 2013

ВВЕДЕНИЕ

Изучение дисциплины «Основы генетической инженерии древесных видов» ставит своей целью обратить внимание студентов на наиболее важные вопросы конструирования рекомбинантных молекул ДНК методами *in vivo* или *in vitro*, что позволит создавать новые растительные организмы с заданными свойствами. Знание теоретических законов генетической инженерии и овладение ее современными методами обеспечат создание теоретической базы для дальнейшей самостоятельной и плодотворной работы выпускников высших учебных заведений в различных отраслях народного хозяйства, в том числе и лесохозяйственного профиля.

Учебная дисциплина «Основы генетической инженерии древесных видов» занимает достойное место в современной биологии как самый эффективный метод исследования генетических процессов на молекулярном уровне. Использование генетической инженерии в различных областях народного хозяйства, в том числе лесного, позволит значительно повысить продуктивность и устойчивость лесов.

Возрастающая роль генетической инженерии в ускорении научно-технического прогресса требует, чтобы основами данной дисциплины овладели специалисты в разных областях биологии, сельского и лесного хозяйства, медицины и биотехнологии. Поскольку применение селекционно-генетических методов позволяет наиболее эффективно решать вопросы повышения продуктивности и жизнестойкости, в том числе и лесных насаждений, то знание теоретических основ и методов получения рекомбинантных ДНК и получение на их основе новых растительных организмов позволят будущим специалистам применять их на практике для повышения продуктивности и биологической устойчивости искусственно создаваемых насаждений.

ТЕМА 1. МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ

Традиционным способом получения клонов у древесных видов растений является черенкование с последующим укоренением черенков или прививкой. Клональное микроразмножение является принципиально новым способом получения клонов, основанным на методе культуры органов и клеток *in vitro*. С помощью этого способа за довольно короткий срок можно получить большое количество однородного посадочного материала. Клональным микроразмножением называют массовое бесполое размножение растений в культуре тканей и клеток, при котором возникшие формы растений генетически идентичны исходному экземпляру.

Клональное микроразмножение значительно ускоряет селекционный процесс, при размножении растений в культуре тканей происходит оздоровление посадочного материала, освобождение его от патогенных микроорганизмов и вирусов [1, 2]. Методом культуры тканей удастся размножить растения, которые размножаются с трудом или совсем не размножаются вегетативно [3, 4].

Работы по культивированию клеток и тканей растений проводят в стерильных условиях [5]. Получение растений с помощью клонального микроразмножения включает в себя следующие этапы технологического процесса: 1) приготовление питательных сред; 2) получение асептической культуры; 3) культивирование эксплантов; 4) укоренение побегов; 5) адаптация клональных растений к почвенным условиям; 6) длительное хранение клонированных растений. Обобщенная схема получения растений с помощью клонального микроразмножения представлена на рис. 1.

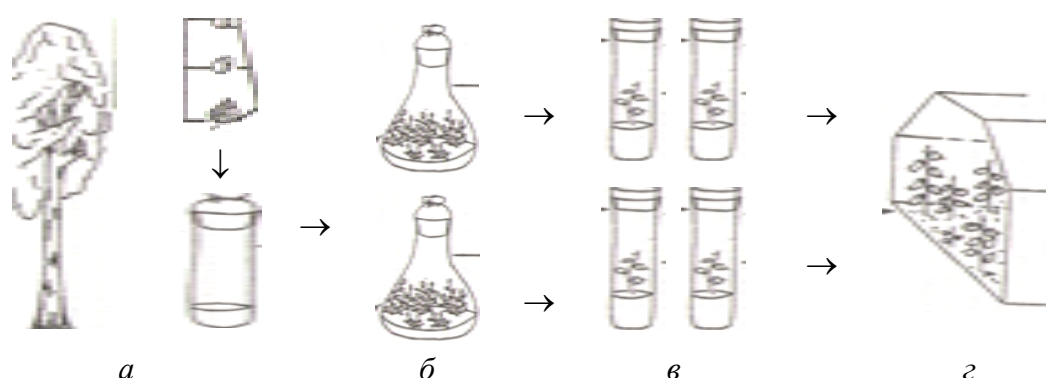


Рис. 1. Схема этапов клонального микроразмножения:
а – отбор эксплантов и введение в культуру; б – мультипликация побегов;
в – ризогенез; г – адаптация к нестерильным условиям среды

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1.
ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ
ДЛЯ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО
РАЗМНОЖЕНИЯ ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ

Эффективность микроразмножения в значительной степени зависит от правильного выбора питательной среды [6, 7]. Для культивирования органов и тканей чаще применяют твердую агаросодержащую среду. Любая питательная среда включает следующие группы веществ: макро- и микроэлементы, углеводы, витамины, аминокислоты, регуляторы роста гормональной природы [8–10]. При клональном микроразмножении растений наиболее часто используют специально разработанную питательную среду Мурасиге-Скуга (табл. 1). Также широкое применение на практике получили питательные среды для культивирования тканей растений WPM, АСМ, Гамборга, Уайта, Нича, Као и др. [2]. Состав этих сред представлен в приложении.

Таблица 1

Питательная среда Мурасиге-Скуга

№ п/п	Компонент питательной среды	Содержание вещества, мг/л
1	KNO_3	1900
2	NH_4NO_3	1650
3	KH_2PO_4	170
4	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370
5	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	690
6	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25
7	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025
8	H_3BO_3	6,2
9	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22,3
10	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8,6
11	KJ	0,83
12	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,025
13	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27,85
14	$Na_2 \cdot \text{ЭДТА}$ (трилон Б)	37,35
15	Тиамин HCl	0,1
16	Пиридоксин HCl	0,5
17	Глицин	0,5
18	Никотиновая кислота	0,5
19	Инозитол	100

№ п/п	Компонент питательной среды	Содержание вещества, мг/л
20	ИУК	2,0
21	6-БАП	0,2
22	Сахароза	30 000
23	Агар	7000

Обязательным условием является присутствие в питательной среде кроме элементов питания гормональных факторов, которые способствуют дифференциации каллусных клеток.

Для приготовления питательной среды Мурасиге-Скуга изначально готовят маточные (концентрированные) растворы макросолей, микросолей и витаминов (табл. 2), которые впоследствии используют многократно. Маточные растворы фитогормонов готовят непосредственно перед использованием питательной среды [2].

Таблица 2

Состав маточных растворов по Мурасиге-Скуга

№ п/п	Компонент питательной среды	Количество вещества
Маточный раствор макросолей № 1 (г на 1 л маточного раствора)		
1	KNO ₃	38
2	NH ₄ NO ₃ (или CaCl ₂ безводный)	33 (8,8)
3	KH ₂ PO ₄	3,4
4	MgSO ₄ · 7H ₂ O (или MgSO ₄ безводный)	7,4 (3,6)
5	CaCl ₂ · 2H ₂ O	13,8
Маточный раствор микросолей № 2 (мг на 100 мл маточного раствора)		
1	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	25
2	CuSO ₄ · 5H ₂ O	2,5
3	H ₃ BO ₃	620
4	MnSO ₄ · 4H ₂ O	2230
5	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	860
6	KJ	83
7	CoCl ₂ · 6H ₂ O	2,5
Маточный раствор хелата железа № 3 (мг на 100 мл маточного раствора)		
1	FeSO ₄ · 7H ₂ O	557
2	Na ₂ · ЭДТА (трилон Б)	745
Маточный раствор витаминов № 4 (мг на 10 мл маточного раствора)		
1	Тиамин HCl	1
2	Пиридоксин HCl	5
3	Глицин	5
4	Никотиновая кислота	5
5	Инозитол	1000

Цель работы – ознакомить студентов с составом питательных сред для культивирования древесных растений и развить практические навыки по их приготовлению.

Материалы и оборудование. Электроплитка, весы аналитические до 500 г, весы торсионные до 100 мг, магнитные мешалки, дозатор, рН-метр, пинцеты, ножницы, химические стаканы, колбы, мерные цилиндры объемом от 5 мл до 1 л, пробирки объемом от 1 до 10 мл, макро- и микросоли, фитогормоны (ИУК и 6-БАП), витамины.

Ход работы

1. Подготовка посуды для приготовления маточных растворов. Используемую для приготовления маточных растворов посуду нужно тщательно отмыть в растворе-детергенте – стиральном порошке, затем промыть 8–10 раз проточной водой, затем дважды промыть дистиллированной водой. Чистую посуду поместить в сушильный шкаф на 1 ч при температуре 120°C. Сухую посуду для хранения закрыть ватными пробками, фольгой, целлофаном.

2. Приготовление и хранение маточных растворов.

2.1. Приготовление маточного раствора макросолей. Каждую соль из состава маточного раствора макросоли (KNO_3 , NH_4NO_3 , KH_2PO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ и $CaCl_2 \cdot 2H_2O$) по прописи Мурасиге-Скуга растворить в отдельном стаканчике при нагревании, затем слить в стеклянную колбу и добавить дистиллированную воду до необходимого объема (для предотвращения выпадения осадка в охлажденную смесь маточного раствора макросоли последним компонентом добавляют раствор солей магния). Для приготовления 1 л питательной среды Мурасиге-Скуга необходимо взять 50 мл маточного раствора макросоли.

2.2. Приготовление маточного раствора микросолей. Каждую соль из состава маточного раствора микросоли ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, H_3BO_3 , $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, KJ и $CoCl_2 \cdot 6H_2O$) по прописи Мурасиге-Скуга (табл. 2) растворить в отдельном стаканчике при нагревании, затем слить в стеклянную колбу и добавить дистиллированную воду до необходимого объема (для предотвращения выпадения осадка в охлажденную смесь маточного раствора микросоли последним компонентом добавляют раствор солей молибдена). Для приготовления 1 л питательной среды Мурасиге-Скуга необходимо взять 1 мл маточного раствора микросоли.

2.3. Приготовление маточного раствора хелата железа. Для приготовления хелата железа необходимо растворить отдельно $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ и $Na_2 \cdot ЭДТА$ в 450 мл дистиллированной воды, подогреть и постоянно

помешивая раствор, затем их смешать, установить кислотность среды на уровне $pH = 5,5$ и добавить дистиллированной воды до объема 1 л. Для приготовления 1 л питательной среды Мурасиге-Скуга необходимо взять отдельно по 5 мл маточных растворов $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ и $Na_2 \cdot ЭДТА$.

2.4. Приготовление маточных растворов витаминов. Взять десятикратные навески каждого витамина по прописи Мурасиге-Скуга (тиамин, пиридоксин, глицин, инозитол и никотиновая кислота) и растворить отдельно в 10 мл дистиллированной воды. В 1 мл каждого из приготовленных растворов будет содержаться порция витамина, необходимая для приготовления 1 л питательной среды Мурасиге-Скуга.

2.5. Приготовление маточного раствора фитогормона ауксина ИУК (индолилуксусной кислоты). Взвесить 100 мг ИУК и растворить в небольшом количестве спирта (1,0–2,0 мл). Затем полученную смесь подогреть до полного растворения и довести до объема 100 мл (1 мл раствора содержит 1 мг ИУК).

2.6. Приготовление маточного раствора фитогормона цитокинина 6-БАП (6-бензиламинопурин). Взвесить 100 мг гормона 6-БАП и растворить в небольшом количестве 1 н. раствора HCl (1,0–2,0 мл). Затем полученную смесь подогреть до полного растворения и довести до объема 100 мл (1 мл раствора содержит 1 мг 6-БАП).

2.7. Приготовленные маточные растворы макросоли, микросоли и хелата железа хранят в холодильнике в сосудах с притертыми пробками при температуре $0-4^{\circ}C$, маточные растворы витаминов хранят в холодильнике при температуре $t = -20^{\circ}C$ в небольших (5–10 мл) сосудах с пробками, приготовленные растворы ИУК и 6-БАП не хранят, а используют непосредственно перед приготовлением среды Мурасиге-Скуга.

3. Приготовление питательной среды Мурасиге-Скуга.

3.1. В химический стакан емкостью 2 л поместить 30 г сахарозы, долить дистиллированной водой до объема 400 мл и растворить.

3.2. Добавить к раствору сахарозы 50 мл маточного раствора макросоли, 1 мл микросоли, 5 мл хелата железа, 5 мл хлористого кальция, 1 мл каждого в отдельности витамина.

3.3. Для приготовления агара нужно навеску массой 7 г поместить в стакан и залить водой до 200 мл, растворить, нагревая на плитке при постоянном помешивании.

3.4. Приготовленный агар (концентрация агара – 0,7%) долить к раствору солей и питательную среду довести дистиллированной водой до объема 1 л.

3.5. Установить кислотность среды на уровне рН = 5,5–6,0. Регулирование величины рН осуществляется добавлением 2–3 капель 0,1 н. раствора HCl (снижение рН) или 2–3 капель 0,1 н. раствора KOH (повышение рН).

3.6. Питательную среду разлить в пробирки на 1/3 объема, закрыть их ватными пробками и поместить в металлические штативы.

3.7. Штативы с пробирками завернуть в целлофановую бумагу, поместить в автоклав и проавтоклавировать в течение 20 мин. при давлении 1,0 атм.

3.8. Приготовленную питательную среду Мурасиге-Скуга охладить при комнатной температуре и хранить в холодильнике при 4°C.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2. ПОЛУЧЕНИЕ АСЕПТИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЫ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ЭКСПЛАНТОВ

Исходным материалом для получения культур тканей растений могут служить любые органы растений, растущих в полевых условиях [11–14]. Для микроразмножения древесных растений используют два вида исходного материала: 1) семена и их отдельные части, а также части проростков; 2) молодые ткани взрослых растений (почки, хвоя, ткани листа, побеги).

Перед введением в культуру эксплант стерилизуют. В качестве растворов для стерилизации используют хлорамин, хлорную известь и другие вещества, содержащие активный хлор, или же ртутьсодержащие растворы. Перед посадкой на питательную среду материал ополаскивают в стерильной воде. Далее экспланты помещают на питательную среду.

Цель работы – ознакомить студентов с различными видами эксплантов и дать практические навыки по их стерилизации и посадке на питательную среду.

Материалы и оборудование. Ламинар-бокс, пробирки с питательной средой Мурасиге-Скуга, стерильные препарировальные иглы, пинцеты, скальпели, флакон с 96%-м спиртом, спиртовка, вата, 1–6%-й раствор хлорамина, 2–3%-й раствор перекиси водорода, 5–7%-й раствор хлорной извести, 0,1%-й раствор сулемы, колбы с автоклавированной дистиллированной водой, чашки Петри, вегетативные почки тополя.

Для культивирования стерильных эксплантов необходимо использовать ламинар-бокс, с помощью которого обеспечивается их посадка на питательную среду Мурасиге-Скуга без заражения микроорганизмами.

Ход работы

1. Посуду, халаты, вату, бумагу, дистиллированную воду необходимо стерилизовать в автоклаве под давлением пара 1 атм и температурой 120°C в течение 30 мин. (перед автоклавированием колбы, вату, бумагу, халаты заворачивают в целлофановую бумагу).

2. Металлические инструменты (препарировальные иглы, пинцеты, скальпели) следует стерилизовать в сушильном шкафу при температуре 170°C в течение 1 ч.

3. Для стерилизации почек в качестве эксплантов нужно предварительно удалить из них кроющие чешуи и поместить экспланты по 5 шт. в чашки Петри со следующими стерилизующими растворами:

- спирт, 96%-й раствор (время 5 с);
- хлорамин, 1–6%-й раствор (время 1–3 мин.);
- перекись водорода, 13–18%-й раствор (время 3–5 мин.);
- хлорная известь, 5–7%-й раствор (время 5–8 мин.);
- сулема, 0,1%-й раствор (время 8–10 мин.).

4. Поверхности ламинар-бокса обработать 96%-м раствором спирта.

5. После стерилизации эксплантов нужно отмыть их от стерилизующих растворов дистиллированной автоклавированной водой.

6. Простерилизованные инструменты и пробирки с питательной средой поместить на стол ламинар-бокса и включить ультрафиолетовое излучение на время 20 мин.

7. Почки поместить на простерилизованный стол ламинар-бокса.

8. Для работы в ламинар-боксе необходимо надеть стерильный халат и шапочку, руки обработать 96%-м раствором спирта.

9. Пинцеты, скальпели и препарировальные иглы поместить в стакан с 96%-м раствором спирта. Перед каждой манипуляцией инструменты обжечь спиртовкой.

10. Взять из штатива пробирку с питательной средой Мурасиге-Скуга, обжечь горлышко над спиртовкой, снять пробку.

11. Препарировальной иглой перенести почки на поверхность питательной среды Мурасиге-Скуга без заглабления, далее пробирку и ее горлышко обжечь на пламени спиртовки и закрыть.

12. Зарисовать образовавшийся из почек каллус через 1–2 недели.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3.
СУБКУЛЬТИВИРОВАНИЕ ПЕРВИЧНОГО КАЛЛУСА.
УКОРЕНЕНИЕ ПОБЕГОВ И АДАПТАЦИЯ РАСТЕНИЙ
К ПОЧВЕННЫМ УСЛОВИЯМ

Ростовой цикл каллусных клеток начинается с посадки экспланта на питательную среду Мурасиге-Скуга (начало культивирования) и завершается в момент прекращения митоза (стационарная фаза). Общая продолжительность периода роста каллуса составляет 21–28 дней, далее вследствие истощения питательной среды элементами питания клетки стареют и умирают. Для недопущения отмирания клеток в процессе культивирования каллус пассируют (пересаживают на свежую питательную среду) каждые 4–6 недель. Масса каллусной ткани, которую пассируют на свежую питательную среду, должна составлять 60–100 мг на 20–40 мл среды [15].

После четырех недель культивирования формируются многочисленные адвентивные побеги. Адвентивные побеги длиной 0,3–0,5 см отделяют от экспланта и пересаживают на свежую среду. Первые корешки появляются через 10 дней.

Цель работы – научить студентов проводить пересадку первичного каллуса и адвентивных побегов на свежую питательную среду, готовить субстрат для выращивания микроклональных растений в нестерильных условиях.

Материалы и оборудование. Пробирки с каллусами, пробирки с питательной средой Мурасиге-Скуга для культивирования каллусов, чашки Петри, пинцеты, препарировальные иглы, 96%-й раствор спирта, ламинар-бокс, спиртовка, верховой торф, песок, агаровая среда.

Ход работы

1. Создать асептические условия в ламинар-боксе для успешного пассирования каллусных тканей (столик ламинар-бокса следует обработать 96%-м раствором спирта и включить ультрафиолетовое излучение).

2. В асептических условиях следует извлечь каллусы тополя из пробирок и поместить их на стерильную поверхность ламинар-бокса.

3. Стерильной препарировальной иглой выделить зоны меристематической активности (белые мелкие клетки).

4. Выделенные транспланты тополя величиной 2–3 мм следует поместить на поверхность питательной среды Мурасиге-Скуга с добавлением гормонов ИУК (концентрация 2 мг/л) и 6-БАП (концентрация 1 мг/л).

5. Результаты пассирования каллусных тканей тополя зарисовать через 2–4 недели. По результатам взвешиваний через 1–2–3–4 недели построить график роста каллуса.

6. Извлечь пучки побегов из культуральных сосудов, отобрать 1–2-почечные сегменты, длиной 1 см и базальным концом поместить в чашки Петри с агаровой средой.

7. Приготовить субстрат, состоящий из двух частей верхового торфа и одной части песка, и прокалить его в сушильном шкафу при температуре $t = 200^{\circ}\text{C}$ в течение 30 мин.

8. Растения высотой не менее 4 см с длиной корней не менее 10 см пересадить в подготовленный субстрат.

9. Наблюдения за культивируемыми растениями проводить ежедневно и фиксировать фазы развития и сроки их наступления.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4. ПОЛУЧЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ПРОТОПЛАСТОВ РАСТЕНИЙ

Изолированные протопласты представляют собой клетки, лишенные оболочки. Оболочка растительных клеток состоит из целлюлозы, гемицеллюлозы и пектиновых веществ. Для ее разрушения применяют ферментативные смеси на основе целлюлаз, гемицеллюлаз и пектиназ. Растительные протопласты способны восстанавливать клеточную оболочку, в результате деления образовывать каллус и вследствие регенерации формировать растения. Исходным материалом для выделения протопластов могут быть различные части растений – листья, корни, семядоли, гипокотили, пыльцевые зерна, каллусные и суспензионные культуры [2].

Оптимальные условия для выделения протопластов индивидуальны для различных растений и типов тканей. Главными факторами являются состав ферментов, рН среды, выбор осмотического раствора, физиологическое состояние, возраст и условия выращивания исходного растения. Ферментные растворы лучше готовить непосредственно перед опытом или за сутки до опыта. Вероятность получения жизнеспособных протопластов увеличивается, если растения находятся в состоянии активного роста [1].

Стерилизацию ферментов раствора производят через бактериальные фильтры. Важным фактором для выделения жизнеспособных протопластов является подбор осмотического стабилизатора, в

качестве которого обычно используют сахара (глюкоза, сахароза, ксилоза, сорбит, маннит), а также ионные осмотики (растворы солей CaCl_2 , Na_2HPO_4 , KCl). Среда должна быть гипертоничной, чтобы протопласты находились в слегка плазмолизированном состоянии [2].

Чтобы получить протопласты из суспензионной культуры, ее предварительно осаждают центрифугированием или фильтрованием, затем переносят в ферментный раствор. Каллусные ткани, растущие на агаре, переносят в чашку с ферментным раствором с помощью скальпеля. В случае использования для получения протопластов каллуса и суспензионной культуры отпадает необходимость в стерилизации исходного материала. При использовании каллуса и суспензионной культуры лучшей является поздняя стадия логарифмического роста (клеточные стенки легче разрушаются ферментами, протопласты наиболее жизнеспособны).

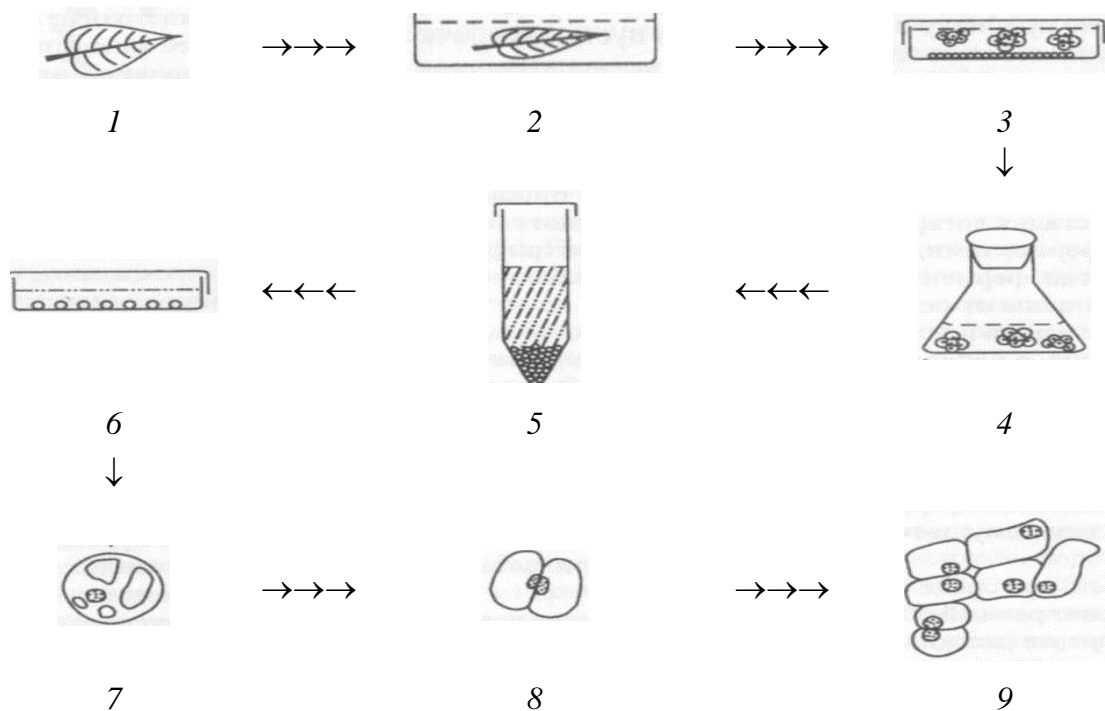


Рис. 2. Схема получения и культивирования протопластов из клеток растений:

- 1 – лист растения; 2 – стерилизация листа; 3 – культура клеток растений;
 4 – выделение протопластов; 5 – фильтрация протопластов и отмывание фермента;
 6 – инкубирование протопластов; 7 – регенерация клеточной стенки;
 8 – первое деление клетки; 9 – колонии клеток

Для культивирования протопластов обычно используют питательные среды Мурасиге-Скуга. Оптимальные условия культивирова-

ния протопластов видо- и сортоспецифичны. Для инициации деления протопластов света не требуется, однако некоторые из них обладают чувствительностью к свету. Температура, в зависимости от культуры, колеблется от 22 до 30°C. Клеточная стенка у протопластов образуется сразу после удаления раствора фермента. Первые деления протопластов начинаются через 24–36 ч, в результате чего образуются колонии клеток. При перенесении колонии клеток на агаризованную среду образуется каллус с последующим формированием растений (рис. 2). Регенерация целых растений происходит при наличии в составе питательной среды гормонов роста – цитокининов и ауксинов.

Цель работы – научить студентов выделять и культивировать протопласты растений на питательной среде.

Материалы и оборудование. Автоклав, центрифуга, рН-метр, трансиллюминатор, камера Фукса-Розенталя, центрифужные пробирки, воронка, нейлоновый фильтр, колбы, пипетки, чашки Петри, лезвия, листья растений, питательная среда Мурасиге-Скуга, индолилуксусная кислота, 6-БАП, сахароза, этанол, хлорамин, перекись водорода, хлорная известь, сулема, агар, целлулизин, мацераза, дриселаза, сахароза, CaCl₂, флуоресцеиндиацетат, парафилм, дистиллированная автоклавированная вода.

Ход работы

1. Для стерилизации листьев в качестве эксплантов их нужно поместить в чашки Петри со следующими стерилизующими растворами:

- спирт, 96%-й раствор (время 5 с);
- хлорамин, 1–6%-й раствор (время 1–3 мин.);
- перекись водорода, 13–18%-й раствор (время 3–5 мин.);
- хлорная известь, 5–7%-й раствор (время 5–8 мин.);
- сулема, 0,1%-й раствор (время 8–10 мин.).

2. После стерилизации эксплантов их нужно отмыть от стерилизующих растворов дистиллированной и автоклавированной водой.

3. Приготовить ферментный раствор для ферментации листьев (1%-й раствор целлулизина, 0,5%-й раствор мацеразы и 0,2%-й раствор дриселазы).

4. Приготовленные ферментные смеси растворить в растворе, содержащем 0,5 М раствор сахарозы и 50 мМ CaCl₂.

5. Установить кислотность раствора на уровне рН = 5,5–5,6.

6. Для получения протопластов листья нарезать узкими полосами, после чего поместить их на поверхность ферментного раствора в чашки Петри (1 г листовой ткани на 10 мл ферментного раствора).

7. Ферментацию листьев проводят на протяжении 15–18 ч при температуре $t = 28\text{--}30^\circ\text{C}$.

8. После обработки ферментным раствором и изоляции протопласты следует очистить от остатков ткани и отмыть от ферментов (для этого содержимое чашки после инкубации в ферментном растворе нужно отфильтровать в пустую колбочку через воронку с нейлоновым фильтром).

9. Затем полученную суспензию изолированных протопластов перенести в центрифужную пробирку и центрифугировать.

10. Далее протопласты отобрать пипеткой и перенести на питательную среду Мурасиге-Скуга, содержащую осмотик CaCl_2 .

11. В питательной среде протопласты нужно центрифугировать (дважды произвести отмывку от ферментного раствора).

12. Осуществить культивирование протопластов в агаре. Перед пересадкой протопласты нужно промыть, суспендировать в определенном объеме питательной среды и подсчитать количество клеток в образце с использованием камеры Фукса-Розенталя.

13. Определить жизнеспособность протопластов путем их окрашивания флуоресцеиндиацетатом (жизнеспособные протопласты имеют зеленое свечение в ультрафиолетовом свете).

14. В чашку Петри перенести небольшой объем суспензии протопластов, добавить равный объем той же питательной среды, содержащей 1%-й раствор агар-агара (температура не должна превышать 45°C).

15. Протопласты тщательно перемешать и оставить на 30 мин. для застывания агара (плотность протопластов – $10^4\text{--}10^5$ шт. на 1 мл).

16. При культивировании в висячей (либо сидячей) капле протопласты с помощью пипетки распределить по каплям (20–40 мкл) на крышке или на дне чашки Петри.

17. Чашку Петри запечатать парафилмом и хранить при высокой влажности.

ТЕМА 2. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК РАСТЕНИЙ

Для всех существующих методов анализа ДНК растений первоначальным этапом является получение препаратов нуклеиновых кислот. При выделении ДНК из различных частей растений необходимо учитывать их физиологические и биохимические особенности.

Первый этап выделения ДНК из растений связан с разрушением клеточных структур. Лизис цитоплазматической и ядерной мембран клеток проводят с применением поверхностно-активных веществ в экстрагирующем буфере. Также дополнительно используется механическое воздействие путем растирания ткани в специальных гомогенизаторах или вручную с помощью пестика. Хорошие результаты дает растирание ткани в жидком азоте.

При выборе разрушающего агента и метода разрушения клеточных структур необходимо учитывать возможность повреждения молекул ДНК самими агентами или условиями выделения. Молодые ткани растений имеют тонкие клеточные оболочки, поэтому выделению ДНК из таких тканей отдается предпочтение.

На следующем этапе выделения ДНК из растений проводится ее очистка от разрушенных клеточных структур, высоко- и низкомолекулярных соединений. Удаление белков проводится путем их денатурации с помощью фенола, хлороформа, ацетона и некоторых солей.

Значительные примеси в препаратах ДНК могут быть представлены полисахаридами, танинами и полифенолами. Физико-химические свойства веществ данной группы в определенной степени совпадают со свойствами нуклеиновых кислот, что затрудняет их полное отделение от ДНК. Эти вторичные компоненты могут обуславливать низкое качество препаратов, что делает непригодным их дальнейшее использование.

Важным этапом при выделении ДНК является ее осаждение. Наиболее часто используемый метод концентрирования ДНК – осаждение ее этанолом. Выпавшую в осадок нуклеиновую кислоту промывают 65–70%-м раствором спирта этанола, затем просушивают и растворяют в дистиллированной воде для дальнейшего хранения.

Существуют методы с применением сорбентов, связывающих нуклеиновые кислоты из растворов. Дальнейшая промывка коллоидных частиц с адсорбированными молекулами нуклеиновых кислот позволяет избавиться от низкомолекулярных примесей и получить чистые препараты ДНК. Иногда требуется очистка препаратов от содержания РНК. Это достигается применением фермента РНКазы [16].

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5. ВЫДЕЛЕНИЕ СУММАРНОЙ ДНК РАСТЕНИЙ УПРОЩЕННЫМ СТАВ-МЕТОДОМ

Детергент СТАВ (цетилтриэтиламмоний бромид) хорошо растворяет мембраны клеток растений. Использование данного детергента позволяет разделить ДНК и полисахариды, так как они различаются по растворимости в присутствии СТАВ. При высоких концентрациях солей (0,7 М NaCl) нуклеиновые кислоты образуют стабильные, но вместе с этим растворимые комплексы со СТАВ. При снижении концентрации соли ниже 0,4 М NaCl происходит выпадение в осадок комплексов СТАВ – нуклеиновая кислота, тогда как большая часть полисахаридов остается в растворе [16].

Применение СТАВ позволяет получать препараты растительной ДНК, пригодные для рестрикционного и электрофоретического анализов, полимеразной цепной реакции и ряда других ферментативных реакций.

Цель работы – научить студентов выделять ДНК из растений упрощенным СТАВ-методом.

Материалы и оборудование. Вихревой смеситель, встряхивающая ванна, центрифуга, центрифужные пробирки типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл, дозатор, рН-метр, штатив, прокаленные стеклянные пестики, соляная кислота, хлороформ, изопропанол, этанол, растворы СТАВ, трис, хлорида натрия, трилона Б, лаурилсульфата натрия, ацетата натрия, бидистиллированная и деионизированная вода.

Ход работы

1. Гомогенизация и экстракция.

1.1. Навеску тканей образца массой 40–50 мг поместить в центрифужную пробирку типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл, содержащую 400 мкл экстрагирующего буфера ($t = 60^{\circ}\text{C}$) следующего состава: 2%-й раствор бромида цетилтриметиламмония (СТАВ), 0,1 М раствор трис, 1,4 М раствор хлорида натрия, 20 мМ раствор трилона Б.

1.2. Установить с помощью НСI кислотность буфера $\text{pH} = 8,0$.

1.3. Используя прокаленные стеклянные пестики, произвести гомогенизацию материала при комнатной температуре в течение 30–40 с.

1.4. Далее пробирку с растертыми тканями закрыть и перемешать на вихревом смесителе (400–600 об./мин.) в течение 5 с.

1.5. Далее пробирку поместить на водяную баню и инкубировать в течение 60 мин. при температуре $t = 60^{\circ}\text{C}$.

2. Очистка гомогенатов.

2.1. После экстракции пробирку охладить до комнатной температуры и к образцу добавить 400 мкл хлороформа.

2.2. Содержимое пробирки перемешать на вихревом смесителе (200 об./мин.) в течение 2 мин. при комнатной температуре.

2.3. Затем произвести центрифугирование содержимого пробирки при 13 000 об./мин. при температуре $t = 18\text{--}20^{\circ}\text{C}$ в течение 10 мин.

3. Осаждение ДНК.

3.1. По окончании центрифугирования дозатором отобрать 350 мкл супернатанта и перенести в другую центрифужную пробирку «Eppendorf» объемом 1,5 мл, после чего добавить 350 мкл охлажденного изопропанола и оставить на 20 мин.

3.2. Далее центрифугировать содержимое пробирки при 13 000 об./мин. при температуре $t = 4^{\circ}\text{C}$ в течение 20 мин.

3.3. Полученный осадок ДНК двукратно промыть 500 мкл 65%-го раствора этанола, охлажденного до температуры $t = -10^{\circ}\text{C}$.

3.4. После промывания содержимое пробирки центрифугировать при 15 000 об./мин. при температуре $t = 4^{\circ}\text{C}$ в течение 10 мин.

4. Лиофилизация препарата ДНК. После промывки этанолом пробирки разместить в горизонтальном штативе и, открыв крышки, просушить осадок ДНК в течение 30–40 мин. при температуре $t = 45^{\circ}\text{C}$ до полного испарения этанола.

5. Растворение препарата ДНК. Высушенный осадок растворить в 100 мкл бидистиллированной и деионизированной воды во встряхивающей ванне (200 об./мин.) при температуре $t = 40^{\circ}\text{C}$ в течение 30 мин. Растворенную ДНК хранить при температуре $t = 4^{\circ}\text{C}$.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6. ВЫДЕЛЕНИЕ СУММАРНОЙ ДНК РАСТЕНИЙ ФЕРМЕНТНЫМ МЕТОДОМ

Ферментный метод предусматривает получение очищенных от РНК препаратов ДНК в результате применения фермента РНКазы [16]. Очищенная ДНК используется при проведении спектрофотометрического, рестрикционного и электрофоретического анализов ДНК.

Цель работы – научить студентов выделять ДНК из растений ферментным методом.

Материалы и оборудование. Вихревой смеситель, дозатор, рН-метр, электроплитка, штатив, прокаленные стеклянные пестики, центрифужные пробирки «Eppendorf» объемом 1,5 мл, растворы трис, трилона Б, лаурил саркозила, фермент РНКазы А, протеиназа К, соляная кислота HCl, бидистиллированная и деионизированная вода.

Ход работы

1. Гомогенизация и экстракция. Навеску образца массой 20–30 мг поместить в центрифужную пробирку типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл, содержащую 100 мкл экстрагирующего буфера следующего состава: 10 mM раствор трис; 0,45 M раствор трилона Б; 1%-й раствор лаурил саркозила; 1 мг/мл протеиназы К. Кислотность буфера довести соляной кислотой HCl до pH = 8,0.

2. Используя прокаленные стеклянные пестики, произвести гомогенизацию материала при комнатной температуре в течение 30–40 с.

3. Пробирки с растертыми тканями закрыть и перемешать на вихревом смесителе (400–600 об./мин.) в течение 5 с.

4. Пробирки с содержимым поместить на водяную баню и инкубировать в течение 60 мин. при температуре $t = 50^{\circ}\text{C}$.

5. Далее к содержимому пробирки добавить 150 мкл бидистиллированной и деионизированной воды и перемешать в течение 5 с.

6. Дозатором взять 20 мкл экстракта, перенести в другую центрифужную пробирку типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл и добавить 80 мкл бидистиллированной и деионизированной воды, содержащей 10 мг РНКазы А.

7. Произвести кипячение содержимого пробирки в течение 5 мин.

8. Содержимое пробирки охладить до комнатной температуры.

9. Дозатором отобрать 10 мкл раствора, перенести в другую центрифужную пробирку типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл и добавить 240 мкл бидистиллированной и деионизированной воды.

10. Выделенные препараты ДНК хранить при температуре $t = -20^{\circ}\text{C}$ для последующего анализа.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 7. ВЫДЕЛЕНИЕ СУММАРНОЙ ДНК РАСТЕНИЙ ЩЕЛОЧНЫМ МЕТОДОМ

Щелочный метод выделения суммарной ДНК растений по эффективности не уступает ферментному и упрощенному СТАВ-методу и

предусматривает применение в качестве лизирующего раствора гидроксида натрия [16]. Выделенную данным методом ДНК растений используют в дальнейшем для молекулярно-генетического анализа (рестрикционный и электрофоретический анализ ДНК, различные ферментативные реакции).

Цель работы – научить студентов выделять ДНК из растений щелочным методом.

Материалы и оборудование. Вихревой смеситель, дозатор, рН-метр, электроплитка, штатив, прокаленные стеклянные пестики, центрифужные пробирки «Eppendorf» объемом 1,5 мл, растворы трис, трилона Б, лаурил саркозила, фермент РНКазы А, протеиназа К, соляная кислота HCl, бидистиллированная и деионизированная вода.

Ход работы

1. Гомогенизация и экстракция.

1.1. В центрифужную пробирку типа «Eppendorf» добавить свежеприготовленный лизирующий 0,5 М раствор гидроксида натрия.

1.2. Далее добавить в данную пробирку навеску тканей образца растения массой 40–50 мг.

1.3. Используя прокаленные стеклянные пестики, произвести гомогенизацию материала при комнатной температуре в течение 30–40 с.

1.4. Пробирку с растертыми тканями закрыть и перемешать на вихревом смесителе (400–600 об./мин.) в течение 5 с.

1.5. Далее пробирку поместить на ледяную баню (температура $t = 0^{\circ}\text{C}$) и инкубировать в течение 5 мин.

2. Очистка гомогенатов. Произвести центрифугирование пробирки при 13 000 об./мин. при температуре $t = 4^{\circ}\text{C}$ в течение 2 мин.

3. Нейтрализация.

3.1. В другую центрифужную пробирку типа «Eppendorf» добавить для нейтрализации в качестве буфера 95 мкл 100 мМ раствора трис.

3.2. Кислотность буфера довести до $\text{pH} = 8,0$ с помощью HCl.

3.3. Дозатором отобрать 5 мкл супернатанта и перенести в данную центрифужную пробирку типа «Eppendorf».

4. Хранение препарата ДНК. Полученные препараты ДНК разлить на аликвоты и хранить при температуре $t = -20^{\circ}\text{C}$ для последующего анализа.

ТЕМА 3. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДНК РАСТЕНИЙ

Основными факторами, оказывающими существенное влияние на результаты молекулярно-генетического анализа выделенной ДНК растений, являются количество и чистота препарата ДНК [16]. Численные значения этих показателей устанавливают с помощью спектрофотометра. Количество ДНК определяют путем измерения оптической плотности раствора (D) в областях спектра с длинами волн 260 и 280 нм (рис. 3).

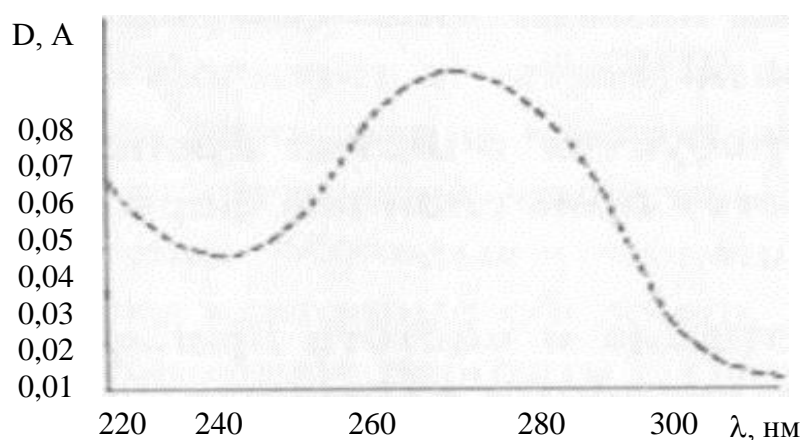


Рис. 3. Спектрофотометрический анализ препарата суммарной ДНК дуба черешчатого

Измеренные показатели оптической плотности препаратов ДНК с заданной длиной волны $\lambda = 260$ нм позволяют рассчитать количество ДНК в пробе. Оптическая плотность $D = 1$ А соответствует приблизительно 50 мкг/мл двухцепочной ДНК.

Соотношение показателей оптической плотности при длине волн 260 и 280 нм позволяет судить о чистоте ДНК. Чистые препараты ДНК имеют соотношение не менее 1,67.

Если препарат содержит определенное количество примеси белка, то значение соотношения показателей оптической плотности при длинах волн 260 и 280 нм ниже указанного. В этом случае необходимо провести дополнительную очистку ДНК.

После дополнительной очистки препарата ДНК необходимо провести измерение оптической плотности при длине волны $\lambda = 320$ нм.

В чистых препаратах ДНК значение оптической плотности D_{320} должно стремиться к нулю.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ И ЧИСТОТЫ ПРЕПАРАТОВ ДНК РАСТЕНИЙ

Спектрофотометрический анализ ДНК растений проводят на специальном приборе – спектрофотометре – для измерения количества (концентрации) и чистоты ДНК растений в пробе.

Цель работы – научить студентов проводить спектрофотометрический анализ препаратов выделенной ДНК растений.

Материалы и оборудование. Спектрофотометр, препараты ДНК, кюветы, дистиллированная вода.

Ход работы

1. Установить прибор в рабочее положение: включить в сеть и прогреть его 5 мин.

2. Установить длину волны $\lambda = 220$ нм.

3. Включить измерение оптической плотности (кнопка «D»).

4. Залить в кювету дистиллированную воду, поместить кювету в прибор и измерить оптическую плотность при заданной длине волны $\lambda = 220$ нм (включить режим «градуировка», нажав кнопку «#»).

5. Залить во вторую кювету образцы препарата ДНК, поместить кювету в прибор и измерить оптическую плотность при длине волны $\lambda = 220$ нм.

6. Поместить кювету с дистиллированной водой в прибор и измерить оптическую плотность при заданной длине волны $\lambda = 240$ нм (включить режим «градуировка», нажав кнопку «#»).

7. Поместить кювету с образцами препарата ДНК в прибор и измерить оптическую плотность при длине волны $\lambda = 240$ нм.

8. Поместить кювету с дистиллированной водой в прибор и измерить оптическую плотность при заданной длине волны $\lambda = 260$ нм (включить режим «градуировка», нажав кнопку «#»).

9. Поместить кювету с образцами препарата ДНК в прибор и измерить оптическую плотность при длине волны $\lambda = 260$ нм.

10. Поместить кювету с дистиллированной водой в прибор и измерить оптическую плотность при заданной длине волны $\lambda = 280$ нм (включить режим «градуировка», нажав кнопку «#»).

11. Поместить кювету с образцами препарата ДНК в прибор и измерить оптическую плотность при длине волны $\lambda = 280$ нм.

12. Поместить кювету с дистиллированной водой в прибор и измерить оптическую плотность при заданной длине волны $\lambda = 300$ нм (включить режим «градуировка», нажав кнопку «#»).

13. Поместить кювету с образцами препарата ДНК в прибор и измерить оптическую плотность при длине волны $\lambda = 300$ нм.

14. Рассчитать количество ДНК растений в препарате (показатель оптической плотности препарата ДНК $D = 1$ А при $\lambda = 260$ нм соответствует 50 мкг/мл двухцепочной ДНК).

15. Рассчитать чистоту ДНК растений в препарате (соотношение значений показателя оптической плотности препарата ДНК при длинах волн $\lambda = 260$ и 280 нм). Для чистых препаратов ДНК растений данное соотношение не ниже 1,67. Если выделенная ДНК содержит примеси, то соотношение значений оптической плотности при длине волны $\lambda = 260$ и 280 нм ниже 1,67 и необходимо провести дополнительную очистку препарата ДНК.

16. В случае необходимости проведения дополнительной очистки ДНК измерить оптическую плотность дистиллированной воды при заданной длине волны $\lambda = 320$ нм (включить режим «градуировка», нажав кнопку «#»).

17. После дополнительной очистки препарата ДНК от примесей необходимо поместить кювету с образцами ДНК в прибор и измерить оптическую плотность при длине волны $\lambda = 320$ нм (для чистых препаратов ДНК растений значение оптической плотности при длине волны $\lambda = 320$ нм должно стремиться к нулю).

18. По полученным значениям оптической плотности препарата ДНК растений с учетом использования значений различных длин волн (от 220 до 320 нм) построить график изменения концентрации ДНК.

ТЕМА 4. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ РАЗМНОЖЕНИЯ ФРАГМЕНТОВ ДНК РАСТЕНИЙ

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – процесс амплификации (размножения) *in vitro*, при котором фрагмент ДНК может быть размножен до 10^8 раз, т. е. ПЦР способна увеличить количество копий исходной пробы ДНК в миллионы раз в течение нескольких часов. В ходе каждого цикла реакции из исходной молекулы образуются две копии. Каждая из синтезированных копий ДНК может служить матрицей для синтеза новых копий ДНК в следующем цикле. Многократное повторение циклов приводит к возрастанию количества копий в геометрической прогрессии. При наличии уже 30 циклов число копий исходной молекулы ДНК составит более 1 млрд [17].

Каждый цикл ПЦР состоит из следующих этапов (рис. 4).

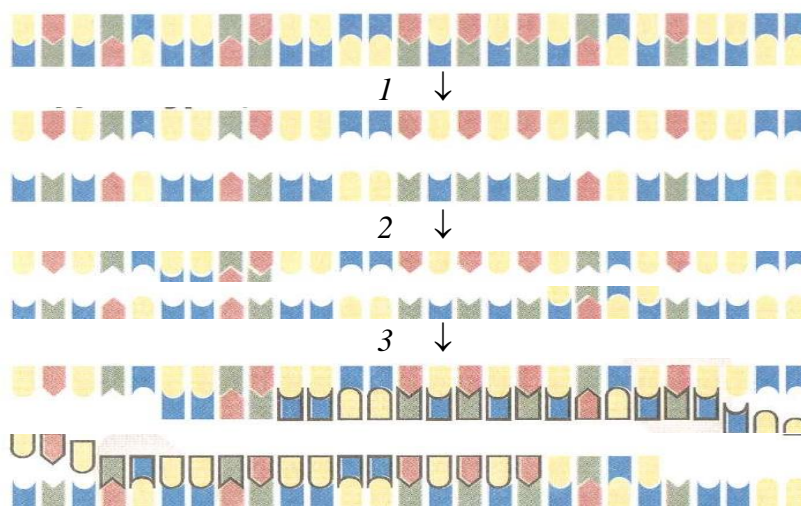


Рис. 4. Этапы полимеразной цепной реакции:
1 – денатурация; 2 – отжиг; 3 – элонгация

1. Денатурация: повышение температуры вызывает раскручивание и расщепление двухцепочной молекулы ДНК на две одноцепочные. Температурные параметры денатурации находятся в области 90–95°C, но в случае ДНК-образца с большим содержанием гуанина и цитозина температура должна быть увеличена до 98°C.

Температура денатурации должна быть достаточной для полной денатурации – расщепления нитей ДНК и избежания внезапного

охлаждения или быстрого отжига. Подбор оптимальных температурных параметров денатурации для соотношения праймер/образец ДНК является важным условием амплификации.

Если температура денатурации на первом этапе выше 95°C, рекомендуется добавлять ДНК-полимеразу в реакционную смесь после первичной денатурации. Продолжительность данной стадии первого этапа в ходе ПЦР должна быть достаточной для полной денатурации ДНК, но не оказывать влияния на активность ДНК-полимеразы.

2. Отжиг: снижение температуры позволяет праймерам присоединиться к комплементарным участкам молекулы ДНК. Температура отжига (T_a) является одним из важнейших параметров ПЦР, для каждого конкретного праймера подбирается индивидуально и зависит от его длины и нуклеотидного состава. Обычно она ниже на 2–4°C значения температуры плавления праймера (T_m).

Если температура отжига системы ниже оптимальной, то число неспецифических амплифицированных фрагментов возрастает, а более высокая температура уменьшает количество амплифицированных продуктов. При этом концентрация специфических ампликонов может резко снижаться, вплоть до ингибирования ПЦР. Увеличение времени отжига приводит к увеличению количества неспецифических ампликонов.

3. Элонгация: фермент ДНК-полимеразы производит достраивание комплементарной цепи. Обычно каждый вид термостабильной ДНК-полимеразы имеет индивидуальный температурный оптимум активности. Скорость синтеза ферментом комплементарной нити ДНК также является специфической величиной для каждой полимеразы (30–60 нуклеотидов/с.), поэтому время элонгации подбирается в зависимости от типа ДНК-полимеразы и длины амплифицируемого региона.

Общий вид программы ПЦР следующий:

1 этап – первичная длительная денатурация препарата ДНК – 1 цикл;

2 этап – быстрая денатурация препарата ДНК; отжиг праймеров; элонгация – 30–45 циклов;

3 этап – длительная элонгация; охлаждение реакционной смеси – 1 цикл.

Денатурация, отжиг и элонгация имеют индивидуальные температурные и временные характеристики. Параметры температуры и времени протекания каждого элемента подбирают эмпирически, в со-

ответствии с качественными и количественными показателями продуктов амплификации.

Для амплификации избранного фрагмента используют два олигонуклеотидных праймера (затравки), фланкирующих определенный участок ДНК. Праймеры ориентированы 3'-концами навстречу друг другу и в сторону той последовательности, которую необходимо амплифицировать. ДНК-полимераза осуществляет достройку взаимно комплементарных цепей ДНК, начиная с праймеров. При синтезе ДНК праймеры физически встраиваются в цепь синтезирующихся молекул ДНК. Каждая цепь молекулы ДНК, образуемая с помощью одного из праймеров, может служить матрицей для синтеза комплементарной цепи ДНК с помощью другого праймера.

Основными компонентами реакционной смеси являются: Трис-НСl, КСl, MgCl₂, смесь нуклеотидтрифосфатов (АТФ, ГТФ, ЦТФ, ТТФ), праймеры (олигонуклеотиды), препарат анализируемой ДНК, термостабильная ДНК-полимераза. Каждый из компонентов реакционной смеси непосредственно участвует в ПЦР, а концентрация реагентов напрямую влияет на ход амплификации.

Трис-НСl. Определяет рН реакционной смеси, создает буферную емкость. Активность ДНК-полимеразы зависит от рН среды, поэтому значение водородного показателя напрямую влияет на ход полимеразной цепной реакции. Обычно значение рН = 8–9,5. Высокое значение рН берется из-за того, что при повышении температуры рН Трис-НСl буфера падает (температурный коэффициент равен 0,031 на 1°С) и при 72°С составляет рН = 7,5.

КСl. Концентрация хлорида калия до 50 мМ влияет на протекание процессов денатурации и отжига, концентрация свыше 50 мМ ингибирует ДНК-полимеразу.

MgCl₂. Поскольку ДНК-полимераза является Mg²⁺-зависимым ферментом, то концентрация ионов магния влияет на активность фермента (Mg²⁺ образует комплексы с НТФ – именно эти комплексы являются субстратом для полимеразы). Высокая концентрация приводит к увеличению неспецифической амплификации, а низкая ведет к ингибированию реакции, оптимум (для различных полимераз) находится в области 0,5–5 мМ.

Кроме того, концентрация солей магния влияет на протекание процессов денатурации и отжига – повышение концентрации Mg²⁺ вызывает повышение температуры плавления ДНК (т. е. температуры, при которой 50% двухцепочечных нитей ДНК разъединяются на одноцепочечные).

НТФ. Нуклеотидтрифосфаты являются непосредственными мономерами нуклеиновых кислот. Для предотвращения цепной терминации рекомендуется равноколичественное соотношение всех четырех нуклеотидтрифосфатов. Низкая концентрация данных компонентов в реакционной смеси (10–20 мМ) увеличивает вероятность ошибки при построении комплементарной цепи ДНК. Диапазон концентраций – 50–500 мМ.

Праймеры. Используемый диапазон концентраций: 0,1–0,6 мМ. Наиболее оптимальным является использование праймеров с разницей температур плавления (T_m) не более 2–4°C. Иногда при длительном хранении при +4°C или после большого количества замораживаний-оттаиваний праймеры образуют вторичные структуры – димеры, снижая эффективность протекания ПЦР. Устранение данной проблемы сводится к инкубации на водяной бане ($T = 95^\circ\text{C}$) в течение 3 мин. и резкому охлаждению до 0°C.

Препараты ДНК. Количество и качество препарата ДНК (матрицы) непосредственно влияет на ход и параметры полимеразной цепной реакции. Избыточное количество образца ДНК ингибирует ПЦР. Диапазон используемых концентраций ДНК-матрицы следующий: геномная ДНК млекопитающих – 10–500 нг; ДНК растений – 10–300 нг; ДНК бактерий – 1–10 нг; плазмидная, митохондриальная, хлоропластная ДНК – 0,2–5 нг.

Примеси различных веществ (ацетат и хлорид натрия, трилон Б, изопропанол, этанол, гепарин, фенол, мочевины, гемоглобин), находящихся в препарате ДНК, также могут уменьшать эффективность протекания ПЦР.

ДНК-полимераза. При использовании малого количества ДНК-полимеразы наблюдается уменьшение синтеза конечного продукта прямо пропорционально размеру фрагментов. Избыток полимеразы в 2–4 раза приводит к появлению диффузных спектров, а в 4–16 раз – к появлению низкомолекулярных неспецифических спектров. Диапазон используемых концентраций – 0,5–1,5 единиц активности в пересчете на 25 мкл ПЦР смеси. Примесь в рекомбинантных полимеразах ДНК бактерий вызывает появление неспецифических ампликонов. Точность синтеза зависит от концентрации Mg^{2+} , НТФ, рН. В среднем частота ошибок *Tag*-полимеразы ниже одной замены на 100–300 п. н.

Кроме основных компонентов смеси, используют дополнительные вещества, улучшающие качественные и количественные показатели ПЦР: ацетамид (5%) – увеличение растворимости основных компонентов; бетаин (0,8–1,6 М) – стабилизация ДНК-полимеразы,

понижение температуры плавления ДНК; альбумин бычий (10–100 мкг/мл) – стабилизация ДНК-полимеразы; диметилсульфоксид (1–10%) – повышение растворимости основных компонентов; формамид (2–10%) – увеличение специфичности отжига в GC-насыщенных регионах; глицерин (15–20%) – увеличение термостабильности фермента, понижение температуры денатурации образца ДНК; сульфат аммония (15–30 мМ) – снижение температуры денатурации и отжига.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 9. РАЗМНОЖЕНИЕ ФРАГМЕНТОВ ДНК РАСТЕНИЙ С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводят в специальных тонкостенных полипропиленовых пробирках, совместимых по размеру с используемым амплификатором – прибором, который контролирует температурные и временные характеристики этапов ПЦР [16].

Цель работы – научить студентов осуществлять размножение фрагментов ДНК растений с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием специального прибора – амплификатора.

Материалы и оборудование. Амплификатор, дозатор, рН-метр, центрифужные пробирки типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл, ПЦР-буфер (растворы трис-НСl, КСl, MgCl₂), смесь нуклеотидтрифосфатов (дНТФ), вода (MilliQ), праймеры № 1 и № 2, фермент *Tag*-полимераза, образец ДНК.

Ход работы

1. Приготовление состава реакционной стандартной ПЦР-смеси. Изначально необходимо приготовить 10-кратный ПЦР-буфер.

1.1. Для этого нужно приготовить 100 мМ раствор трис-НСl (установить кислотность рН = 9,0), далее 500 мМ раствор КСl и 25 мМ раствор MgCl₂.

1.2. Смешать приготовленные компоненты буфера и перенести с помощью дозатора 2,5 мкл в центрифужную пробирку типа «Eppendorf» объемом 1,5 мкл.

2. Добавить дозатором в пробирку 18,8 мкл воды (MilliQ).

3. Затем добавить в пробирку «Eppendorf» с помощью дозатора 0,5 мкл 10 мМ раствор каждого из нуклеотидтрифосфата (дНТФ).

4. После этого добавить дозатором в пробирку «Eppendorf» 1 мкл 10мМ раствора праймера № 1 и 1 мкл 10 мМ раствора праймера № 2.

5. Далее добавить в пробирку «Eppendorf» 0,2 мкл ДНК-полимеразы (фермент *Taq*-полимераза, 5 ед./мкл).

6. Последним компонентом в пробирку «Eppendorf» добавить 1 мкл образца ДНК растения (20 нг/мкл).

7. Установить на амплификаторе программу временной и температурной характеристик протекания полимеразной цепной реакции для выявления зон до 3000 п. н.:

7.1. 1-й этап – денатурация (1 цикл), время протекания реакции 3 мин., температура $t = 94^{\circ}\text{C}$.

7.2. 2-й этап – денатурация, отжиг и элонгация (35 циклов):

– денатурация, время реакции 1 мин., температура $t = 94^{\circ}\text{C}$;

– отжиг, время протекания реакции 45 с., температура отжига ниже на 2°C температуры плавления праймера ($T_a = T_m - 2^{\circ}\text{C}$);

– элонгация, время реакции 2 мин., температура $t = 72^{\circ}\text{C}$.

7.3. 3-й этап – элонгация (1 цикл), время протекания реакции 7 мин., температура $t = 72^{\circ}\text{C}$.

7.4. Охлаждение реакционной смеси, необходимое время 5 мин., температура $t = 4^{\circ}\text{C}$.

ТЕМА 5. РЕСТРИКЦИОННЫЙ И ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДНК РАСТЕНИЙ

Рестрикционные эндонуклеазы (или рестриктазы) – это ферменты, «узнающие» определенные последовательности (сайты узнавания) в двухцепочечной ДНК и расщепляющие молекулу ДНК в этих местах (сайты рестрикции).

В настоящее время выделено огромное количество ферментов рестрикции, которые разрезают ДНК внутри или около своих сайтов (4–6 нуклеотидов), обладающих осью симметрии 2-го порядка (рис. 5). Например, фермент *EcoR* I узнает последовательность гексануклеотидов ГААТTC и вносит разрыв не точно по оси симметрии 2-го порядка, а в точках цепей ДНК, отстоящих друг от друга на 4 нуклеотида. В результате такого разрыва образуются фрагменты ДНК с выступающими (липкими) концами.

Есть ряд ферментов рестрикции, например, *Hpa* I, которые разрезают цепочку ДНК по оси симметрии с образованием фрагментов с тупыми концами [17].

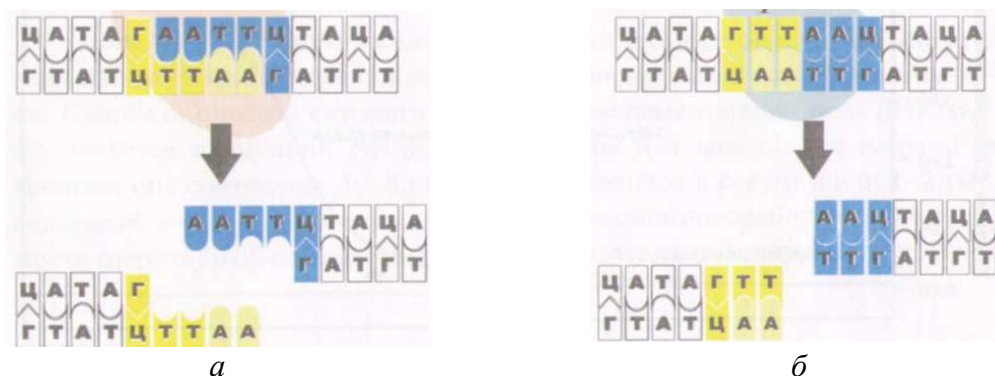


Рис. 5. Типы разрывов, вносимых различными рестрикционными эндонуклеазами:
а – рестриктаза *EcoR* I; б – рестриктаза *Hpa* I

Размер и количество фрагментов рестрикции после обработки молекулы ДНК зависит от нуклеотидной последовательности, длины молекулы ДНК и типа используемой рестриктазы. Наиболее простые рестрикционные спектры характерны для вирусов и плазмид и представляют небольшое число фракций.

Спектры эукариотических организмов на электрофореграммах

имеют вид сплошного шлейфа, состоящего из множества отдельных, ранжированных по размеру фракций рестрикетов – от наиболее крупных до самых мелких (рис. 6).

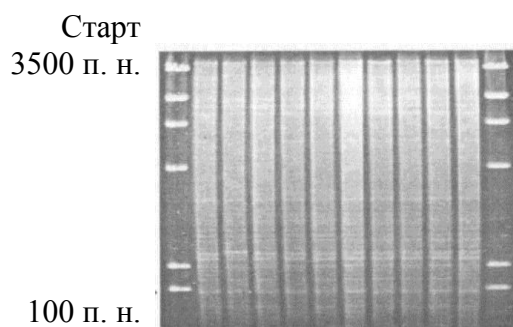
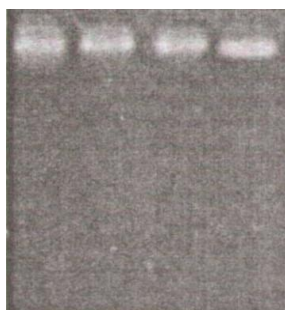


Рис. 6. Рестрикционный спектр образцов суммарной ДНК березы повислой при использовании рестрикционной эндонуклеазы *Hind* III

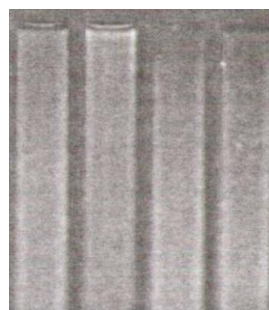
Количество нуклеотидов, входящих в сайт рестрикции, также определяет частоту вносимых разрывов в молекуле ДНК. Средняя вероятность выявления 4-нуклеотидной последовательности выше по сравнению с 6-нуклеотидной и составляет 1 сайт через каждые 256 оснований.

Для 6-нуклеотидного сайта рестрикции эта величина составляет 4096 нуклеотидов. Для каждого фермента рестрикции существуют оптимальные условия реакции, которые приводятся в описании, прилагаемом фирмой-изготовителем. Основные переменные параметры – это температура инкубации и состав буфера. К температурному режиму предъявляются достаточно жесткие требования, в то время как различия между буферами незначительны.

Следует отметить, что спектрофотометрический анализ позволяет измерить количество ДНК в пробе и оценить чистоту полученных препаратов, а выявить степень деградации молекул можно лишь при электрофоретическом анализе ДНК растений (рис. 7).



а



б

Рис. 7. Электрофоретический спектр недеградированных (а) и деградированных (б) препаратов ДНК каштана конского

Электрофоретическое разделение ДНК проводят в вертикальных или горизонтальных электрофоретических камерах (рис. 8). Для агарозных гелей чаще применяются горизонтальные камеры, для полиакриламидных гелей – горизонтальные и вертикальные типы камер.

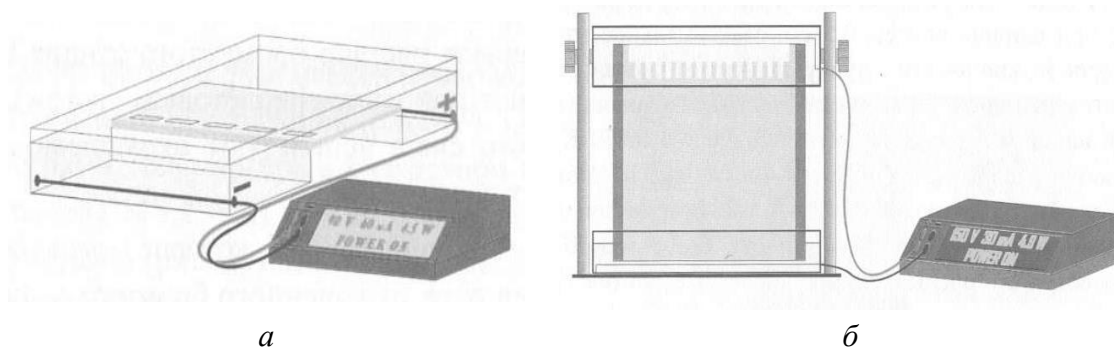


Рис. 8. Горизонтальная (а) и вертикальная (б) электрофоретическая камера

Разделение нуклеиновых кислот при электрофоретическом анализе ДНК растений основано на том, что смесь ДНК под действием электрического поля начинает перемещаться в пористом, похожем на мармелад геле [18].

Скорость продвижения фрагментов ДНК в геле зависит от их длины. Короткие фрагменты движутся быстрее, чем длинные, что позволяет цепочкам ДНК разной длины отделиться друг от друга. При этом фрагменты ДНК не повреждаются и их можно выделить из геля без разрывов и потери биологических свойств.

Скорость миграции ДНК через гель при электрофорезе определяется следующими параметрами:

1. Размер молекул ДНК – молекулы линейной двухцепочной ДНК перемещаются в геле одним концом вперед со скоростями, обратно пропорциональными десятичному логарифму их молекулярных масс.

2. Концентрация геля – фрагменты ДНК определенного размера перемещаются в геле с разными концентрациями носителей (агарозы и полиакриламида), с разными скоростями. Существует зависимость между логарифмом электрофоретической подвижности ДНК и концентрацией геля.

3. Конформация ДНК – молекулы ДНК, имеющие одинаковую молекулярную массу, но разные конформации (кольцевая или линейная), движутся с разными скоростями.

4. Напряженность электрического поля – при низких напряженно-

стях скорость перемещения фрагментов линейной ДНК пропорциональна приложенному напряжению. С увеличением напряженности электрического поля подвижность фрагментов ДНК с высокой молекулярной массой дифференциально возрастает. С увеличением напряженности область эффективного разделения ДНК в геле снижается. Максимальное разделение фрагментов происходит при напряженности, не превышающей 5 В/см.

5. Состав оснований и температура – электрофоретическое поведение ДНК в гелях, в отличие от полиакриламидных гелей, слабо зависит от состава оснований ДНК или температуры геля. В агарозных гелях в области температур от 4 до 30°C изменения относительной электрофоретической подвижности фрагментов ДНК разного размера не наблюдается.

После электрофоретического фракционирования ДНК агарозный гель окрашивают специальным красителем этидиум бромидом, связывающимся с ДНК. После окраски гель помещают под ультрафиолетовый свет и рассматривают хорошо видимые, окрашенные в красный цвет и расположенные на различном расстоянии друг от друга светящиеся фракции ДНК. Для анализа в спектре видимого света используют окрашивающую смесь, содержащую нитрат серебра. Окрашивание геля производится в кювете. Каждая такая фракция соответствует одному фрагменту ДНК.

Электрофорез в агарозном геле позволяет разделить, а затем легко извлечь любые фрагменты ДНК для последующего использования. Минимальное количество ДНК, которое можно обнаружить при фотографировании геля, окрашенного бромистым этидием, составляет 2 нг при ширине полосы 0,5 см.

Максимальное количество ДНК, которое можно внести в лунку, зависит от числа фрагментов в пробе и их размеров. Если лунка будет переполнена (в полосе указанной ширины будет содержаться более 200 нг ДНК), то полоса окажется расплывчатой и будет иметь шлейф. Этот дефект особенно выражен при разделении крупных фрагментов.

При анализе простого набора молекул ДНК вносят 0,2–0,5 мкг ДНК. Если же пробы содержат очень большое число фрагментов ДНК разных размеров, то можно наносить по 5–10 мкг в лунку, не опасаясь существенного снижения разрешающей способности электрофореза. После окраски проводят фотодокументирование гелей для сохранения результатов, а также их последующей интерпретации.

Заключительным этапом электрофоретического анализа является описание выявленных спектров – определение количества зон и их обозначение. Для типировки каждой фракции используется числовая

величина размера (в парах нуклеотидов) фрагментов ДНК, находящихся в данной электрофоретической фракции.

Вычисление размера молекул ДНК каждой зоны спектра производится на основании сравнения электрофоретической подвижности данной зоны относительно молекул ДНК с известным размером (электрофоретическим маркером).

Маркер представляет собой смесь однотипных или различающихся по размерам молекул ДНК. Для каждой фракции маркера известен размер молекул ДНК, которые их составляют. В качестве маркера могут быть использованы рестрикционные фрагменты бактериофагов, искусственно синтезированные цепочки ДНК и др.

Анализ и расчет размера фрагментов проводят с помощью специального программного обеспечения. При отсутствии таких программ для маркера в агарозном геле можно самостоятельно составить калибровочную кривую и вычислить размер фракций для других образцов.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 10. РЕСТРИКЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ДНК РАСТЕНИЙ

Рестрикционный анализ ДНК растений проводят в специальной реакционной смеси при оптимальных условиях реакции (температура инкубации и состав буфера) с использованием фермента рестрикции.

Цель работы – научить студентов проводить рестрикционный анализ препаратов выделенной ДНК растений.

Материалы и оборудование. Электроплитка, штатив, колбы на 100 мл, центрифужные пробирки типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл, препараты ДНК растений, рестриктаза *EcoR I*, специальный состав буфера, вода.

Ход работы

1. В центрифужную пробирку типа «Eppendorf» перенести 50 мкл препарата ДНК растений и добавить 50 мкл рестриктазы *EcoR I*.

2. Затем добавить специальный состава буфера (для каждого фермента рестрикции существуют строго определенные условия протекания реакции: температура инкубации и буфера, которые приводятся в описании, прилагаемом фирмой-изготовителем).

3. Пробирку «Eppendorf» поместить в колбу на 100 мл и нагреть на плитке до температуры, указанной в описании к рестриктазе *EcoR I*.

4. После нагревания пробирку поместить в штатив и охладить до комнатной температуры (около 30 мин.).

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 11.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ БУФЕРНОЙ СИСТЕМЫ И ГЕЛЯ ДЛЯ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОГО ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ ДНК РАСТЕНИЙ

Электрофоретическое разделение ДНК проводят в электрофоретических камерах. Для агарозных гелей чаще всего применяют горизонтальные камеры, для полиакриламидных гелей – горизонтальные и вертикальные типы камер.

Цель работы – научить студентов проводить электрофоретическое разделение ДНК растений в горизонтальной электрофоретической камере, готовить буферные системы и агарозный гель для электрофоретического фракционирования ДНК растений.

Материалы и оборудование. Горизонтальная электрофоретическая камера, источник питания, электроплитка, рН-метр, кювета, пластмассовая шаблон-расческа, колбы на 2 л, пипетка, трис, борная кислота, уксусная кислота, сульфобензойная кислота, нитрат серебра, карбонат натрия, формальдегид, тиосульфат натрия, ацетат натрия, глицерин, дистиллированная вода.

Ход работы

1. Приготовление электрофоретического Трис-ЭДТА-Боратного буфера.

1.1. Навески 12,1 г трис, 5,1 г борной кислоты и 0,37 г ЭДТА растворить в 1 л дистиллированной воды.

1.2. Установить кислотность буфера на уровне рН = 8,3.

2. Приготовление агарозного геля.

2.1. Навеску агарозы массой 0,8 г растворить в 100 мл электрофоретического Трис-ЭДТА-Боратного буфера путем нагревания смеси на электроплитке.

2.2. Горячий раствор залить в специальную кювету.

2.3. После полимеризации гель поместить в камеру.

2.4. С помощью пластмассовой расчески выдавить в геле лунки.

2.5. Отсеки электрофоретической камеры наполнить электрофоретическим Трис-ЭДТА-Боратным буфером, чтобы его слой оказался выше агарозного геля на 5–7 мм.

2.6. В лунки агарозного геля с помощью пипетки ввести образцы,

смешанные с буфером, и плотно закрыть горизонтальную электрофоретическую камеру.

2.7. Подсоединить электроды и подключить электрофоретическую камеру к источнику питания (напряжение, силу тока и время электрофореза подобрать эмпирически).

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 12. ОКРАШИВАНИЕ АГАРОЗНОГО ГЕЛЯ ЭТИДИУМ БРОМИДОМ И НИТРАТОМ СЕРЕБРА ПОСЛЕ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОГО РАЗДЕЛЕНИЯ ФРАГМЕНТОВ ДНК РАСТЕНИЙ

После электрофоретического фракционирования ДНК растений производится процедура окраски агарозного геля специальным красителем этидиум бромидом, связывающимся с ДНК. После окраски гель помещают под ультрафиолетовый свет с последующим рассмотрением хорошо видимых, окрашенных в красный цвет и расположенных на различном расстоянии друг от друга светящихся фракций ДНК. Для анализа в спектре видимого света используют окрашивающую смесь, содержащую нитрат серебра. Окрашивание геля производится в кювете. Каждая такая фракция соответствует одному фрагменту ДНК [18].

Цель работы – научить студентов проводить окрашивание геля красителями этидиум бромидом и нитратом серебра после электрофоретического разделения ДНК с последующим фотодокументированием результатов.

Материалы и оборудование. Трансиллюминатор, кювета, этидиум бромид, нитрат серебра, борная кислота, уксусная кислота, сульфобензойная кислота, карбонат натрия, формальдегид, тиосульфат натрия, ацетат натрия, глицерин, дистиллированная вода.

Ход работы

1. После электрофоретического фракционирования агарозный гель необходимо положить в кювету и произвести окрашивание.

2. Окраска агарозного геля этидиум бромидом. В кювету с гелем залить раствор этидиум бромида в концентрации 1 мг/л и инкубировать 15 мин. при комнатной температуре.

3. Промывка геля. Окрашивающий раствор слить и промыть трижды дистиллированной водой для удаления остатков этидиум бромида.

4. Результаты окраски просмотреть в ультрафиолетовом свете с по-

мощью трансиллюминатора при длине волн 260–360 нм (окрашенные фрагменты ДНК представлены в виде светлых полос на темном фоне).

5. Окрашивание геля нитратом серебра.

5.1. Фиксация геля. В кювету с гелем залить фиксирующий раствор (24%-й раствор спирта этанола и 0,7%-й раствор сульфобензойной кислоты) и инкубировать на протяжении 10 мин. при $t = 50^{\circ}\text{C}$ (или на протяжении 30 мин. при $t = 27^{\circ}\text{C}$).

5.2. Окраска геля. Фиксирующий раствор слить, затем добавить окрашивающую смесь (0,2%-й раствор нитрата серебра и 0,07%-й раствор сульфобензойной кислоты) и инкубировать на протяжении 20 мин. при $t = 50^{\circ}\text{C}$ (или на протяжении 30 мин. при $t = 27^{\circ}\text{C}$).

5.3. Промывка геля. Окрашивающий раствор слить и промыть дважды дистиллированной водой.

5.4. Проявление. Добавить раствор для проявления (2,5%-й раствор карбоната натрия, 0,037%-й раствор формальдегида и 0,002%-й раствор тиосульфата натрия) и инкубировать до появления четких фракций (около 6–8 мин.).

5.5. Остановка окраски. Раствор для проявления удалить, гель промыть дистиллированной воды. К гелю добавить останавливающий раствор (1%-й раствор уксусной кислоты, 5%-й раствор ацетата натрия и 10%-й раствор глицерина) и инкубировать на протяжении 8 мин. при $t = 50^{\circ}\text{C}$ (или на протяжении 60 мин. при $t = 27^{\circ}\text{C}$).

ПРИЛОЖЕНИЕ

**Состав различных питательных сред,
применяемых при культивировании тканей растений**

Компонент среды	Концентрация веществ (мг/л) в различных питательных средах						
	WPM	АСМ	Гамборга	Уайта	Нича	Као	N ₆
KNO ₃	–	–	3000	80	950	1900	2830
NH ₄ NO ₃	400	400	–	–	720	600	–
Ca(NO ₃) ₂	–	–	–	2085	–	–	–
CaNO ₃ · 4H ₂ O	556	556	–	–	–	–	–
K ₂ SO ₄	990	990	–	–	–	–	–
(NH ₄) ₂ SO ₄	–	–	134	–	–	–	463
CaCl ₂ · H ₂ O	–	–	–	–	166	–	166
CaCl ₂ · 2H ₂ O	96	96	150	–	–	–	–
KCl	–	–	–	65	–	300	–
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	370	250	360	185	300	185
KH ₂ PO ₄	170	170	–	12	68	170	400
Na ₂ PO ₄	–	–	–	200	–	–	–
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	–	–	169,6	18,7	–	–	–
Na ₂ · ЭДТА · 2H ₂ O	37,3	–	37,3	–	37,3	37,3	37,3
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,8	–	27,8	–	27,8	27,8	27,8
MnSO ₄ · H ₂ O	–	–	10	–	–	10	–
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22,3	22,3	13,2	7	25	–	4,4
ZnSO ₄ · 4H ₂ O	–	–	–	–	–	2	–
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8,6	8,6	2	3	10	–	1,5
H ₃ BO ₃	6,2	6,2	3	1,5	10	3,6	1,5
KJ	–	0,83	0,75	0,75	–	0,75	0,8
Na ₂ MoO ₄ · 4H ₂ O	0,25	0,25	0,25	0,0025	0,25	0,25	–
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,25	0,025	0,025	0,001	0,025	0,025	–
CoCl ₂ · 6H ₂ O	–	0,025	0,025	–	–	0,25	–
Fe(SO ₄) ₃	–	–	–	2,5	–	2,46	–
Sodium Ferric EDTA	–	30,0	–	–	–	–	–
Тиамин HCl	0,1	0,1	10	0,1	3	0,005	3
Пиридоксин HCl	0,5	0,5	1	0,5	1	0,005	1
Глицин	0,5	–	–	3	–	–	–
Лизин	–	100	–	–	–	–	–
Мезоинозит	100	100	100	–	200	100	200
Аскорбиновая кислота	–	–	–	–	3	–	3
Никотиновая кислота	0,5	0,5	1	0,5	–	–	–
Сахароза	30 000	30 000	20 000	20 000	60 000	125	60 000

ЛИТЕРАТУРА

1. Царев, А. П. Селекция и репродукция лесных древесных пород / А. П. Царев, С. П. Погиба, В. В. Тренин. – М.: Логос, 2003. – 520 с.
2. Картель, Н. А. Биотехнология в растениеводстве / Н. А. Картель, А. В. Кильчевский. – Минск: Технология, 2005. – 310 с.
3. Гузь, Н. М. Размножение гинкго двухлопастного (*Ginkgo biloba* L.) культурой тканей / Н. М. Гузь, Р. М. Гречаник, А. А. Остудимов // Устойчивое управление лесами и рациональное лесопользование: материалы Междунар. науч.-практ. конф., Минск, 18–21 мая 2010 г.: в 2 кн. / БГТУ; редкол.: Л. Н. Рожков, О. А. Атрощенко, Н. П. Вырко. – Минск, 2010. – С. 165–168.
4. Кириллов, В. Ю. Размножение туи западной *in vitro* / В. И. Кириллов, А. В. Данчева // Современное состояние, проблемы и перспективы лесовосстановления и лесоразведения на генетико-селекционной основе: материалы Междунар. науч.-практ. конф., Гомель, 8–10 сент. 2009 г. / Ин-т леса НАН Беларуси; редкол.: А. И. Ковалевич [и др.]. – Гомель, 2009. – С. 63–66.
5. Центральный ботанический сад НАН Беларуси: сохранение, изучение и использование биоразнообразия мировой флоры / [В. В. Титок [и др.]; под ред. В. В. Титка и В. Н. Решетникова]. – Минск: Беларус. навука, 2012. – 345 с.
6. Концевая, И. И. Оптимизация питательной среды для массового размножения березы / И. И. Концевая // Рациональное использование и воспроизводство лесных ресурсов в системе устойчивого развития: материалы Междунар. науч.-практ. конф., Гомель, 5–7 окт. 2007 г. / Ин-т леса НАН Беларуси; редкол.: А. И. Ковалевич [и др.]. – Гомель, 2007. – С. 269–272.
7. Кулагин, Д. В. Влияние различных условий культивирования на индукцию каллусообразования на листовых эксплантах дуба черешчатого / Д. В. Кулагин, Е. Н. Химченко // Труды БГТУ. Сер. I, Лесное хозяйство. – 2010. – Вып. XVIII. – С. 247–250.
8. Влияние ауксинов и питательных сред на корнеобразование у регенерантов селекционных гибридов / Е. Н. Кутас [и др.] // Регуляция роста, развития и продуктивности растений: тезисы докладов VII Междунар. науч. конф., Минск, 26–28 окт. 2011 г. / НАН Беларуси, ИЭБ им. В. Ф. Купревича; редкол.: А. Ф. Судник, Ж. Н. Калацкая, П. А. Родионов. – Минск, 2011. – С. 127.

9. Концевая, И. И. Влияние цитокининов на морфогенез в культуре листовых эксплантов березы / И. И. Концевая // Сб. науч. тр. / Ин-т леса НАН Беларуси. – Гомель, 2008. – Вып. 68: Проблемы лесоведения и лесоводства. – С. 205–213.

10. Медведев, С. С. Ауксин и его роль в регуляции морфогенеза растений / С. С. Медведев // Регуляция роста, развития и продуктивности растений: тезисы докладов VII Междунар. науч. конф., Минск, 26–28 окт. 2011 г. / НАН Беларуси, ИЭБ им. В. Ф. Купревича; редкол.: А. Ф. Судник, Ж. Н. Калацкая, П. А. Родионов. – Минск, 2011. – С. 5.

11. Регенерация селекционных гибридов непосредственно из ткани листа / Е. Н. Кутас [и др.] // Регуляция роста, развития и продуктивности растений: тезисы докладов VII Междунар. науч. конф., Минск, 26–28 окт. 2011 г. / НАН Беларуси, ИЭБ им. В. Ф. Купревича; редкол.: А. Ф. Судник, Ж. Н. Калацкая, П. А. Родионов. – Минск, 2011. – С. 128.

12. Шестибратов, К. А. Регенерация адвентивных побегов из листовых эксплантов *B. pendula* и *B. pubescens* / К. А. Шестибратов, Т. Е. Шадрина // Сб. науч. тр. / Ин-т леса НАН Беларуси. – Гомель, 2008. – Вып. 68: Проблемы лесоведения и лесоводства. – С. 298–304.

13. Богинская, Л. А. Возможности введения в культуру *in vitro* каштана конского (*Aesculus hippocastanum* L.) с использованием одностеблевых узловых эксплантов / Л. А. Богинская // Сб. науч. тр. / Ин-т леса НАН Беларуси. – Гомель, 2010. – Вып. 70: Проблемы лесоведения и лесоводства. – С. 189–193.

14. Кулагин, Д. В. Получение культуры *in vitro* дуба черешчатого с использованием зародышевых осей в качестве эксплантов / Д. В. Кулагин // Труды БГТУ. Сер. I, Лесное хоз-во. – 2010. – Вып. XVIII. – С. 232–234.

15. Оптимизация условий адвентивного корнеобразования и адаптации *ex vitro* древесно-кустарниковых видов рода *Vaccinium* / В. Л. Филипня [и др.] // Регуляция роста, развития и продуктивности растений: тезисы докладов VII Междунар. науч. конф., Минск, 26–28 окт. 2011 г. / НАН Беларуси, ИЭБ им. В. Ф. Купревича; редкол.: А. Ф. Судник, Ж. Н. Калацкая, П. А. Родионов. – Минск, 2011. – С. 210.

16. Падутов, В. Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В. Е. Падутов, О. Ю. Баранов, Е. В. Воропаев. – Минск: Юнипол, 2007. – 176 с.

17. Гончаренко, Г. Г. Основы генетической инженерии / Г. Г. Гончаренко. – Минск: Вышэйшая школа, 2005. – 183 с.

18. Гончаренко, Г. Г. Руководство по исследованию хвойных видов методом электрофоретического анализа изоферментов / Г. Г. Гончаренко, В. Е. Падутов, В. В. Потенко. – Гомель: Урожай, 1989. – 219 с.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	3
Тема 1. Микрклональное размножение древесных растений	4
Лабораторная работа № 1. Приготовление питательной среды для микрклонального размножения древесных растений	5
Лабораторная работа № 2. Получение асептической культуры и культивирование эксплантов	9
Лабораторная работа № 3. Субкультивирование первичного каллуса. Укоренение побегов и адаптация растений к почвенным условиям	11
Лабораторная работа № 4. Получение и культивирование протопластов растений	12
Тема 2. Выделение ДНК растений	16
Лабораторная работа № 5. Выделение суммарной ДНК растений упрощенным СТАВ-методом	17
Лабораторная работа № 6. Выделение суммарной ДНК растений ферментным методом	18
Лабораторная работа № 7. Выделение суммарной ДНК растений щелочным методом	19
Тема 3. Спектрофотометрический анализ ДНК растений	21
Лабораторная работа № 8. Определение концентрации и чистоты препаратов ДНК растений	22
Тема 4. Использование полимеразной цепной реакции для размножения фрагментов ДНК растений	24
Лабораторная работа № 9. Размножение фрагментов ДНК растений с помощью полимеразной цепной реакции	28
Тема 5. Рестрикционный и электрофоретический анализ ДНК растений	30
Лабораторная работа № 10. Рестрикционный анализ ДНК растений	34
Лабораторная работа № 11. Приготовление буферной системы и геля для электрофоретического фракционирования ДНК растений	35
Лабораторная работа № 12. Окрашивание агарозного геля этидиум бромидом и нитратом серебра после электрофоретического разделения фрагментов ДНК растений	36
Приложение. Состав различных питательных сред, применяемых при культивировании клеток и тканей растений	38
Литература	39

Составители: **Рибко** Сергей Владимирович
Поплавская Лилия Францевна

ОСНОВЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ ДРЕВЕСНЫХ ВИДОВ

Редактор *Е. К. Лабоха*
Компьютерная верстка *Я. Ч. Болбот*
Корректор *Е. К. Лабоха*

Издатель:
УО «Белорусский государственный технологический университет»
ЛИ № 02330/0549423 от 08.04.2009.
Ул. Свердлова, 13а, 220006, г. Минск