

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

*Львівський національний університет ветеринарної медицини та
біотехнологій імені С. З. Гжицького*

Кафедра біотехнології та радіології

ГЕНЕТИЧНА ІНЖЕНЕРІЯ

**Методичні вказівки до лабораторних робіт для здобувачів
першого (бакалаврського) рівня вищої освіти
спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія
ОП «Біотехнології та біоінженерія»**



Львів – 2024

Генетична інженерія: методичні вказівки до лабораторних робіт для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія ОП «Біотехнології та біоінженерія» / [уклад. Малишева Х. В.] Львів: Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, 2024. 88 с.

Рецензент – Назар Манько, молодший науковий співробітник відділу регуляції проліферації клітин і апоптозу, Інституту біології клітини НАН України, к.б.н.

Рекомендовано навчально-методичною радою факультету харчових технологій та біотехнології, протокол № 4 від 30.09.2024 р.

ЗМІСТ

ВСТУП	6
ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ У ЛАБОРАТОРІЇ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ.....	7
Загальні правила роботи у лабораторії	7
НАДАННЯ ПЕРШОЇ ДОМЕДИЧНОЇ ДОПОМОГИ.....	8
ВИМОГИ ДО ОФОРМЛЕННЯ ТА ЗАХИСТУ ЛАБОРАТОРНОЇ РОБОТИ....	9
ЛАБОРАТОРНИЙ ПРАКТИКУМ	10
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №1. Особливості організації, проведення робіт і техніка безпеки у біолабораторії. Поняття про технологію рекомбінантних ДНК.....	10
Теоретичні відомості	10
Практична частина.....	11
Контрольні питання	12
ЧАСТИНА 1. КЛОНУВАННЯ ГЕНІВ	13
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №2. Гідроліз плазмідної ДНК ендонуклеазами рестрикції.	13
Теоретичні відомості	14
Практична частина.....	16
Контрольні питання	18
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №3. Аналіз результатів гідролізу плазмідної ДНК за допомогою гель-електрофорезу.	19
Теоретичні відомості	19
Практична частина.....	23
Контрольні питання	24
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №4. Дефосфорилювання вектора.	25
Теоретичні відомості	25
Практична частина.....	27
Контрольні питання	27
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №5. Лігування ДНК.	28
Теоретичні відомості	28
Практична частина.....	30
Контрольні питання	30
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №6. Виділення плазмідної ДНК.	31
Теоретичні відомості	31
Практична частина.....	32
Контрольні питання	33
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №7. Приготування компетентних клітин.	33
Теоретичні відомості	33
Практична частина.....	35
Контрольні питання	36
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №8. Трансформація клітин.....	36
Теоретичні відомості	36
Практична частина.....	38
Контрольні питання	39
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №9. Нарощування нічних бактерійних культур для аналізу трансформантів.	39

Теоретичні відомості	39
Практична частина.....	41
Контрольні питання	41
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №10. Скринінг клонів.	42
Теоретичні відомості	42
Практична частина.....	43
Контрольні питання	44
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №11. Довготривале зберігання бактерійних штамів.....	45
Теоретичні відомості	45
Практична частина.....	47
Контрольні питання	47
ЧАСТИНА 2. ЕКСПРЕСІЯ ЧУЖОРІДНИХ ГЕНІВ В БАКТЕРІЙНИХ КЛІТИНАХ.....	48
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №12. Клонування гена рекомбінантного білка. .	48
Теоретичні відомості	48
Практична частина.....	50
Контрольні питання	50
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №13. Індукція генної експресії.	51
Теоретичні відомості	51
Теоретична частина	53
Контрольні питання	54
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №14. Виділення та очищення рекомбінантного білка.	55
Теоретичні відомості	55
Практична частина.....	57
Контрольні питання	58
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №15. Кількісний і якісний аналіз рекомбінантного білка.	59
Теоретичні відомості	59
Практична частина.....	61
Контрольні питання	62
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №16. Перевірка функціональної активності рекомбінантного білка.	63
Теоретичні відомості	63
Практична частина.....	65
Контрольні питання	66
ЧАСТИНА 3. ЕКСПРЕСІЯ ЧУЖОРІДНИХ ГЕНІВ В ЕУКАРІОТИЧНИХ КЛІТИНАХ.....	66
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №17. Підготовка культури еукаріотичних клітин для трансфекції.....	67
Теоретичні відомості	67
Практична частина.....	71
Контрольні питання	72
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №18. Трансфекція клітин.	73
Теоретичні відомості	73

Практична частина	78
Контрольні питання	79
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №19. Оцінка ефективності трансфекції.	80
Теоретичні відомості	80
Практична частина.....	84
Контрольні питання	85
РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА.....	87
ІНФОРМАЦІЙНІ РЕСУРСИ.....	88

ВСТУП

Навчальна дисципліна «Генетична інженерія» є важливою складовою підготовки майбутніх біотехнологів і біоінженерів, надаючи їм необхідні теоретичні знання та практичні навички для роботи з генетичним матеріалом, зокрема з технологіями рекомбінантних ДНК. Генетична інженерія дозволяє здійснювати маніпуляції з генами різних організмів, створюючи генетично модифіковані організми (ГМО) для потреб медицини, сільського господарства та промисловості. Досягнення у цій галузі включають виробництво рекомбінантних білків, таких як інсулін, розробку генетичних вакцин та створення стійких до хвороб сільськогосподарських культур.

Метою навчальної дисципліни «Генетична інженерія» є надання здобувачам вищої освіти фундаментальних знань та формування практичних навичок щодо використання методів генної інженерії для маніпуляцій генетичним матеріалом. Зокрема, здобувачі повинні ознайомитися з етапами генетичних маніпуляцій, такими як клонування генів, трансформація клітин і аналіз експресії рекомбінантних білків. Особливу увагу приділяється сучасним підходам у дослідженні та створенні біотехнологічних продуктів для медицини, сільського господарства та промисловості.

Завдання дисципліни полягають у формуванні глибокого розуміння принципів генетичної інженерії, засвоєнні основних методів аналізу та модифікації генетичного матеріалу, а також розвитку навичок роботи з рекомбінантними ДНК та білками. У результаті вивчення дисципліни здобувачі вищої освіти мають оволодіти техніками роботи з генами, векторами, ферментами для рестрикції і лігування, а також методами аналізу продуктів генної інженерії. Це забезпечить здобувачам можливість проводити наукові дослідження у сфері генетичної інженерії та біотехнології, розробляти нові технології для медичних та аграрних потреб, а також пропонувати інноваційні рішення для біотехнологічної галузі.

Ці методичні рекомендації покликані допомогти здобувачам у проведенні лабораторних робіт, що дозволять закріпити теоретичні знання на практиці. Лабораторні завдання охоплюють проведення генно-інженерних маніпуляцій, таких як клонування генів, проведення трансформації та аналіз результатів експресії генів у модельних системах.

ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ У ЛАБОРАТОРІЇ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

Загальні правила роботи у лабораторії

Сучасна лабораторія генетичної інженерії – це високотехнологічний комплекс, обладнаний спеціалізованими приладами та устаткуванням для проведення складних маніпуляцій із генетичним матеріалом. Незважаючи на доступ до передових технологій, людський фактор залишається однією з основних причин помилок у лабораторних експериментах, що може вплинути на результати. Крім того, умови роботи в лабораторіях різного типу можуть відрізнятися, що може призвести до варіативності в результатах експериментів навіть при дотриманні стандартних протоколів.

Особливістю роботи в лабораторії генетичної інженерії є частий контакт із рекомбінантними молекулами ДНК, бактеріальними або еукаріотичними клітинами, різними хімічними реактивами, що використовуються для проведення генно-інженерних експериментів. Такі маніпуляції вимагають високої точності, стерильності та безпеки для уникнення контамінації зразків та забезпечення надійних результатів експериментів. Тому всі працівники лабораторії повинні суворо дотримуватись правил роботи з біологічними матеріалами та хімічними речовинами, дотримуватись правил безпеки під час використання обладнання та забезпечувати правильну утилізацію біологічних і хімічних відходів.

ЗАБОРОНЕНО

- ✓ Перебувати у верхньому одязі (необхідний спеціальний одяг – халат).
- ✓ Відкривати вікна (можна тільки з дозволу викладача).
- ✓ Приносити та вживати напої і продукти.
- ✓ Палити.
- ✓ Приносити сторонні речі.
- ✓ Виходити за межі лабораторії в халатах або одягати верхній одяг на халат.
- ✓ Користуватися відкритим вогнем.
- ✓ Вмикати та вимикати тумблери на електрощиті (можна тільки з дозволу викладача).

Необхідно дотримуватись заходів безпеки, керуючись наступними правилами:

- ✓ Двері лабораторії повинні бути постійно зачиненими.
- ✓ Забороняється самостійно ремонтувати несправне обладнання та оптичні прилади (про це необхідно повідомити викладача).
- ✓ Перш, ніж розпочати роботу, необхідно переконатися в цілковитій справності електронагрівних приладів, пальників, а також у наявності засобів пожежогасіння.
- ✓ Працювати з отруйними і легкозаймистими хімічними речовинами дозволяється тільки у витяжній шафі.
- ✓ Набирання реактиву і переливання його з однієї посудини в іншу допускається лише піпеткою з гумовою грушею.

✓ Працювання з небезпечними реактивами необхідно в медичинських рукавичках.

✓ По закінченні роботи непотрібний біологічний матеріал та культури мікроорганізмів повинні бути знищені. Інструменти, які використовувалися в роботі, та поверхню робочого столу необхідно дезінфікувати.

✓ Після закінчення роботи обов'язково прибрати своє робоче місце, почистити інструменти і прилади, зокрема, протерти лінзу об'єктива мікроскопа, відключити всі електроприлади. Протерти робочий стіл дезінфікуючим розчином. Вимити руки з милом.

✓ Лише упевнившись в абсолютній чистоті робочого місця і цілковитій пожежній безпеці приладів, можна покинути лабораторію.

НАДАННЯ ПЕРШОЇ ДОМЕДИЧНОЇ ДОПОМОГИ

✓ При виникненні пожежі у лабораторії необхідно негайно виключити газ та нагрівальні прилади, прибрати легкозаймисті рідини, вогонь засипати піском або накрити вовняною ковдрою, шматком азбесту, рушником або залити тетрахлорометаном. Великий вогонь гасять за допомогою вогнегасника. Не можна задувати палаючу рідину або заливати її водою. Якщо на людині палає одяг, її треба швидко закутати в ковдру, халат або покласти на підлогу і перекочуючи збивати полум'я. Якщо загорілися дерев'яні предмети, полум'я гасять водою або вогнегасником.

✓ Під час роботи у хімічній лабораторії найбільш можливими є порізи склом, опіки термічні та хімічні, а також інгаляційне ураження парами токсичних речовин.

✓ У всіх лабораторіях у доступному постійному місці має бути аптечка з набором необхідних матеріалів і медикаментів. Всі працівники у лабораторії повинні бути обізнані з правилами надання першої медичної допомоги. В аптечці лабораторії необхідно мати стерильні бинти та вату, 5%-ий спиртовий розчин йоду, 2%-ий розчин гідрокарбонату натрію, мазь від опіків, лейкопластир, 2%-ий розчин калій манганату (VII) KMnO_4 , 2%-ий розчин оцтової кислоти, 2%-ий розчин борної кислоти, етанол, піпетки для очей, скляні палички та ножиці.

✓ При теплових опіках роблять примочку з розчином 2%-го калій манганату (VII) KMnO_4 або етанолу $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, а потім наносять мазь від опіків.

✓ При хімічних опіках шкіри необхідно насамперед видалити речовину, що викликала опік, відповідним розчинником, а потім уражену ділянку обробити етиловим спиртом і змазати маззю від опіків.

✓ При опіках кислотами ушкоджене місце обмивають водою з крану, а потім 3%-им розчином натрій гідрогенкарбонату (питної соди); при опіках їдкими лугами – водою, а потім 2%-им розчином оцтової або борної кислоти і знову водою.

✓ При опіках очей кислотою необхідно промити їх великою кількістю води, потім обробити тампоном, змоченим у розчині питної соди (3%-му), і знову змити водою; при опіках очей лугом – промити їх великою кількістю води, потім обробити тампоном, змоченим у 2%-му розчині борної кислоти, і знову промити водою. Після цього необхідно звернутись до лікаря.

✓ При опіках бромом ушкоджене місце необхідно швидко промити спиртом та змастити маззю від опіків.

✓ У випадку опіку фенолом ушкоджене місце розтирають гліцеролом до відновлення природного кольору шкіри, потім промивають водою і накладають пов'язку з марлі, що змочена у розчині гліцеролу.

✓ При порізах склом у першу чергу необхідно пінцетом, попередньо промитим спиртом, видалити з рани видимі шматочки скла, рану промити дистильованою водою або протерти тампоном, змоченим в етиловому спирті, а далі змастити 5%-им розчином йоду та забинтувати. Невеликі порізи можна заклеїти антисептичним пластиром.

✓ При ураженні електрострумом насамперед необхідно відключити електроенергію, а потім, якщо необхідно, зробити штучне дихання та викликати швидку допомогу.

✓ При вдиханні галогенів, галогеноводнів та оксидів Нітрогену потрібно вдихнути спирт або понюхати 5%-ий розчин амоніаку, а потім вийти на свіже повітря.

✓ При інгаляційних ураженнях потрібно негайно вийти на свіже повітря.

У всіх випадках опіків, поранень та отруєнь після надання першої допомоги необхідно звернутися до лікаря!

ВИМОГИ ДО ОФОРМЛЕННЯ ТА ЗАХИСТУ ЛАБОРАТОРНОЇ РОБОТИ

Всі лабораторні роботи практикуму оформлюються в окремому робочому зошиті. Зошит здається на перевірку викладачу після кожного заняття.

При підготовці до лабораторної роботи з відповідної теми необхідно вивчити теоретичну частину, що стосується даної роботи.

Перед початком лабораторної роботи при співбесіді з викладачем здобувач зобов'язаний:

✓ представити для обговорення план роботи, який детально з виділенням окремих етапів складений у відповідності з методикою роботи і зафіксовано в робочому журналі;

✓ обґрунтувати всі розрахунки і відповідні перерахунки з урахуванням кількостей речовин і об'ємів розчинів, необхідних для напрацювання продукту, щоб можна було використовувати його в подальших методиках;

✓ пояснити хімізм процесів і написати реакції, що лежать в основі цих процесів.

У звіті з лабораторної роботи фіксуються всі записи, що стосуються проміжних і кінцевих результатів аналізу.

При захисті лабораторної роботи здобувач викладає не тільки суть даного методу аналізу і констатує кінцевий результат експерименту, але також дає вичерпні відповіді на поставлені питання.

ЛАБОРАТОРНИЙ ПРАКТИКУМ

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №1. Особливості організації, проведення робіт і техніка безпеки у біолабораторії. Поняття про технологію рекомбінантних ДНК.

Мета: ознайомлення з основними правилами техніки безпеки у лабораторії генетичної інженерії; набуття навичок організації робочого місця та засвоєння принципів роботи з лабораторним обладнанням, що використовується для проведення генно-інженерних експериментів.

Теоретичні відомості

Роль генетичної інженерії у розвитку біотехнологій

Генетична інженерія є ключовою складовою сучасної біотехнології, що дозволяє вченим і дослідникам здійснювати точні генетичні маніпуляції для створення організмів з новими або поліпшеними властивостями. Ця технологія базується на методах, що дозволяють змінювати генетичну інформацію шляхом вставки, видалення або модифікації певних генів. Основою генетичної інженерії є технології рекомбінантних ДНК, які дозволяють комбінувати фрагменти ДНК з різних організмів для отримання нових біологічних функцій або поліпшення існуючих.

Застосування генетичної інженерії має широкий спектр, від створення ГМО, що використовуються в сільському господарстві, до розробки біотехнологічних продуктів у медицині та фармацевтиці. Наприклад, виробництво рекомбінантного інсуліну, яке стало можливим завдяки генно-інженерним технологіям, суттєво покращило якість лікування пацієнтів із діабетом. Крім того, технології рекомбінантних ДНК використовуються для створення генетичних вакцин, що відкриває нові перспективи в імунoproфілактиці хвороб, зокрема таких як COVID-19.

Послідовність етапів типового генно-інженерного експерименту

- **Виділення ДНК.** На першому етапі зразок ДНК ізолюється з живого організму. Цей процес включає механічне або хімічне руйнування клітинної мембрани для вивільнення ДНК, яку потім очищують і концентрують. Виділена ДНК використовується для подальших маніпуляцій.
- **Клонування гена.** Клонування гена полягає у вирізанні потрібного фрагменту ДНК за допомогою рестрикційних ферментів і вставці цього фрагмента в плазмідний вектор. Плазміди – це невеликі кільцеві молекули ДНК, які можуть автономно реплікуватися в бактеріальних клітинах і використовуються як транспортні засоби для введення чужорідної ДНК у клітину-хазяїна.
- **Трансформація клітин.** На цьому етапі плазмідний вектор, що містить цільовий ген, вводять у клітину-хазяїна (найчастіше бактерії, наприклад, *Escherichia coli*). Для цього можуть використовуватися методи хімічної трансформації або електропорації, які забезпечують проникність клітинної мембрани для введення плазмідної ДНК.

- **Відбір трансформантів.** Після трансформації проводять селекцію клітин, що успішно інтегрували рекомбінантну ДНК. Це здійснюється за допомогою селективних маркерів, таких як антибіотикорезистентні гени. Трансформовані клітини вирощуються на селективних середовищах, що містять відповідний антибіотик, і тільки ті клітини, які містять плазмідний вектор, виживають.

- **Аналіз та експресія гена.** Після відбору трансформантів здійснюється перевірка експресії цільового гена. Якщо експеримент передбачає експресію білка, перевіряється його наявність та функціональна активність. Цей етап включає використання таких методів, як полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) для перевірки наявності гена або західний блот для підтвердження синтезу білка.

- **Перевірка результатів.** На завершальному етапі проводять глибокий аналіз отриманих результатів. Це може включати вивчення активності білка, перевірку його біохімічних властивостей або вивчення клітинної поведінки після введення нового гена. Якщо метою було клонування генетичної вставки, досліджується коректність вставки та її подальша експресія у клітині-хазяїні.

Ці етапи складають основу більшості генетичних маніпуляцій і забезпечують ефективне дослідження та створення нових генетичних конструкцій для наукових і практичних цілей.

Практична частина

Матеріали і реактиви: лабораторні халати, захисні окуляри, рукавички, засоби для дезінфекції (спирт, дезінфекційні розчини), контейнери для відходів: окремо для біологічних, хімічних, та загальних відходів, хімічні розчини, буфери.

Обладнання: витяжна шафа, автоматичні піпетки різного об'єму, автоклав, центрифуги, система для гель-електрофорезу, УФ-трансілюмінатор, термоциклер.

Хід роботи

1. Засвоєння правил роботи у лабораторії та техніки безпеки.

- Перед початком будь-якої роботи в біолабораторії необхідно ретельно ознайомитися з правилами безпеки, які мають першорядне значення для попередження аварійних ситуацій та захисту здоров'я дослідників (див. вище).

2. Поводження з хімічними речовинами.

- **Вивчення властивостей хімічних речовин:** перед роботою необхідно ознайомитися з властивостями кожного реактиву. Токсичні, леткі або їдкі речовини вимагають особливої уваги та використання витяжних шаф.

- **Техніка роботи з рідинами:** забороняється піпетування рідин ротом – використовуються спеціальні автоматичні піпетки.

3. Утилізація відходів.

- **Хімічні відходи:** утилізуються в спеціальні контейнери, призначені для різних типів речовин (кислоти, луги, органічні розчинники).

- **Біологічні матеріали:** усі залишки живих культур або генетичного матеріалу знищуються в спеціальних біовідходах або автоклавуються перед утилізацією.

4. Ознайомлення з основними методами та принципами використання лабораторного обладнання.

- **Мікропіпетки**

Призначення: використовуються для точного дозування малих об'ємів рідини (мікролітри). Це незамінний інструмент для роботи з ДНК, ферментами, буферами та іншими рідинами.

Правила використання: важливо правильно вибирати об'єм піпетки для роботи з певними зразками. Під час дозування слід дотримуватися точної техніки піпетування, уникаючи бульбашок повітря та перекручування наконечників.

- **Центрифуга**

Призначення: використовується для осадження або розділення компонентів суміші на основі їхньої щільності шляхом високошвидкісного обертання.

Правила роботи: обов'язково потрібно збалансувати пробірки в роторі для уникнення механічних пошкоджень обладнання. Пробірки з однаковим об'ємом рідини повинні бути розміщені навпроти одна одної для рівноваги.

- **Система для гель-електрофорезу**

Призначення: використовується для розділення фрагментів ДНК, РНК або білків за їхнім розміром і зарядом у полі електричного струму.

Правила використання: при підготовці гелю необхідно обережно працювати з гарячим агарозним розчином. Під час завантаження зразків важливо не пошкодити гель, щоб уникнути змішування зразків.

- **Термоциклер (ПЛР-машина)**

Призначення: цей прилад використовується для проведення ПЛР – методу ампліфікації ДНК. Процес включає цикли нагрівання і охолодження, необхідні для денатурації ДНК, відпалу праймерів та елонгації.

Правила використання: точна налаштування параметрів циклів є критично важливою для успішної ампліфікації ДНК. Потрібно стежити за температурними режимами, часом кожного циклу та правильним приготуванням реакційної суміші.

Ці методи та обладнання є основними інструментами для проведення досліджень у галузі генетичної інженерії, тому вміння правильно з ними працювати є важливим для досягнення надійних результатів у лабораторних дослідженнях.

Очікувані результати

Після виконання лабораторної роботи студенти мають засвоїти правила техніки безпеки в лабораторії, ознайомитися з основним лабораторним обладнанням та навчитись його використовувати під час проведення експериментів у сфері генетичної інженерії.

Контрольні питання

1. Що таке генетична інженерія?

2. Яка роль технології рекомбінантної ДНК у генетичній інженерії?
3. Які основні застосування генетичної інженерії у біотехнологіях?
4. Наведіть приклади використання генетичної інженерії у сільському господарстві, медицині та фармацевтиці.
5. Що таке ГМО?
6. Як відбувається процес створення ГМО та які організми використовуються для цього?
7. Як генетична інженерія вплинула на виробництво медичних продуктів, наприклад, рекомбінантного інсуліну?
8. Який внесок генетичної інженерії у медицину, зокрема у виробництво рекомбінантних білків?
9. Які етапи включає типовий генно-інженерний експеримент?
10. Опишіть основні етапи проведення експерименту з генетичного клонування, від виділення ДНК до аналізу результатів.
11. Які методи використовуються для введення рекомбінантної ДНК у клітини?
12. Які методи трансформації клітин застосовуються у генно-інженерних експериментах, і коли їх використовують?
13. Як здійснюється відбір трансформантів у процесі генно-інженерного експерименту?
14. Які селективні маркери використовують для відбору клітин, що інтегрували рекомбінантну ДНК?
15. Яка мета аналізу експресії гена після його клонування?
16. Як проводиться перевірка експресії гена та якими методами можна підтвердити синтез білка?
17. Які можуть виникнути помилки у процесі генно-інженерного експерименту, і як їх можна уникнути?
18. Які фактори можуть призвести до помилок на етапах трансформації або експресії гена, і які є шляхи їх корекції?

ЧАСТИНА 1. КЛОНУВАННЯ ГЕНІВ.

Клонування генів є однією з основних технологій генетичної інженерії, яка дозволяє ізолювати та багаторазово копіювати окремі фрагменти ДНК для подальшого дослідження чи використання у біотехнологічних процесах. Ця технологія відкрила нові можливості для вивчення функцій генів, створення генетично модифікованих організмів, виробництва рекомбінантних білків і навіть лікування генетичних захворювань. Процес клонування включає кілька ключових етапів: виділення цільової ДНК, її вставка у вектор, трансформація в клітину-хазяїна та відбір позитивних клонів, що дозволяє створити копії генетичного матеріалу для подальшого використання.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №2. Гідроліз плазмідної ДНК ендонуклеазами рестрикції.

***Мета:** провести гідроліз плазмідної ДНК за допомогою ендонуклеази рестрикції типу II; провести очищення зразка за допомогою*

фенол:хлороформної екстракції та переосадження ДНК для отримання чистого зразка, придатного для подальшого аналізу або використання.

Теоретичні відомості

Плазмідні вектори як інструменти для доставки і клонування чужорідних генів

Плазміди – це невеликі кільцеві молекули ДНК, які можуть реплікуватися незалежно від хромосомної ДНК у клітинах бактерій. Завдяки своїм унікальним властивостям, плазміди використовуються як вектори для доставки чужорідних генів у клітини-господарі. Плазмідні вектори є важливим інструментом у генетичній інженерії та біотехнології для клонування генів, трансформації клітин і експресії білків.

Плазмідні вектори зазвичай мають декілька важливих елементів:

- **Полілінкер (множинне місце клонування)** – це коротка ділянка ДНК, що містить численні сайти для рестрикції, куди можуть бути вставлені чужорідні гени.
- **Маркери селекції** – гени, що забезпечують стійкість до антибіотиків (наприклад, гени стійкості до ампіциліну або канаміцину), які дозволяють відбирати клітини, що отримали плазмиду.
- **Реплікаційне начало (ori)** – ділянка, необхідна для ініціації реплікації плазміди в клітині-господарі.
- **Промотори** – ділянки, що контролюють експресію вставлених генів, та інші регуляторні елементи.

Таким чином, плазміди забезпечують ефективне клонування та експресію чужорідних генів, що є критичним у створенні генетичних модифікацій для дослідження білків або отримання цінних біопродуктів.

Механізм дії ендонуклеаз рестрикції типу II

Ендонуклеази рестрикції – це ферменти, які розпізнають специфічні послідовності нуклеотидів у молекулі ДНК та розрізають фосфодіестерний зв'язок між нуклеотидами. Ендонуклеази типу II є найбільш використовуваними в молекулярній біології завдяки своїй здатності розрізати ДНК в межах або поблизу розпізнавальних послідовностей.

Основні характеристики ендонуклеаз рестрикції типу II:

- **Визнання специфічних паліндромних послідовностей.** Ці ферменти розпізнають певні послідовності, зазвичай 4-8 пар основ, які є паліндромами, тобто мають однаковий порядок нуклеотидів з обох сторін у зворотному напрямку (наприклад, розпізнавальна послідовність для EcoRI — 5'-GAATTC-3').
- **Гідроліз ДНК.** Фермент розрізає фосфодіестерний зв'язок між нуклеотидами, створюючи специфічні фрагменти ДНК.
- **Необхідність іонів магнію (Mg^{2+}).** Для ефективного роботи ферменту необхідні іони магнію, які допомагають активувати активний центр ферменту.

Ендонуклеази типу II використовуються для маніпуляцій з ДНК у процесах клонування, оскільки вони дозволяють отримати фрагменти ДНК з точними та передбачуваними розрізами.

Типи розрізів: липкі і тупі кінці

При розщепленні ДНК ендонуклеазами рестрикції утворюються два типи кінців – липкі та тупі кінці:

- **Липкі кінці** (англ. cohesive ends) – це одониткові виступи ДНК, які утворюються при асиметричному розрізі. Такі кінці легко комплементарно з'єднуються з іншими фрагментами ДНК, що мають відповідні липкі кінці. Наприклад, фермент EcoRI утворює липкі кінці при розрізі послідовності 5'-GAATTC-3', залишаючи виступи 5'-AATT-3'. Липкі кінці є зручними для зшивання фрагментів ДНК за допомогою лігази.

- **Тупі кінці** (англ. blunt ends) – це кінці ДНК, які утворюються при симетричному розрізі, без одониткових виступів. Такі кінці менш гнучкі для з'єднання, проте їх також можна використовувати для клонування. Прикладом ферменту, що утворює тупі кінці, є SmaI, який розрізає послідовність 5'-CCCGGG-3'.

Вибір між липкими та тупими кінцями залежить від задачі експерименту. Липкі кінці зручніші для клонування, оскільки їх комплементарність полегшує з'єднання фрагментів ДНК.

Рестрикційний аналіз ДНК як основний етап клонування

Рестрикційний аналіз – це метод, що використовує ендонуклеази рестрикції для розрізання ДНК на фрагменти з метою їх аналізу. Цей процес є одним з ключових етапів клонування генів. Після гідролізу ДНК ендонуклеазами фрагменти можуть бути проаналізовані за допомогою гелевого електрофорезу для визначення розмірів фрагментів і перевірки наявності специфічних розрізів або вставок.

Як правило, продукти розщеплення ДНК аналізують за допомогою гелевого електрофорезу в агарозному чи поліакриламідному гелі, а отримана таким чином картина розділення фрагментів ДНК у вигляді певного, відмінного для різних ферментів, набору смуг і є результатом рестрикційного аналізу тої чи іншої ДНК.

Основні кроки рестрикційного аналізу:

- *Підготовка ДНК*: очищення плазмідної або геномної ДНК для подальшого гідролізу.

- *Гідроліз ДНК*: використання ендонуклеаз рестрикції для розрізання ДНК на фрагменти.

- *Аналіз фрагментів*: проведення гелевого електрофорезу для визначення розмірів фрагментів і перевірки результатів рестрикції.

- *Інтерпретація результатів*: порівняння отриманих фрагментів з маркерами або з очікуваними результатами для визначення правильності клонування.

Рестрикційний аналіз дозволяє ідентифікувати правильність побудови плазмідного конструкта після вставки чужорідного гена та є основним методом перевірки успішності генетичних маніпуляцій.

Велике розмаїття існуючих ендонуклеаз рестрикції дозволяє здійснювати розщеплення ДНК за більше ніж 150 сайтам упізнавання. Рестрикційний аналіз

проводиться для найрізноманітніших ДНК, починаючи з невеликих фрагментів завдовжки декілька десятків нуклеотидних пар, і закінчуючи цілими геномами еукаріотів розмірами більше 1 млрд. пар нуклеотидів. Одним з важливих елементів рестрикційного аналізу є отримання теоретично розрахованої картини розділення фрагментів ДНК, яка визначається на основі відомої первинної структури даної ДНК.

Для теоретичного прогнозування довжини фрагментів ДНК, які можна отримати під час рестрикції нуклеїнової кислоти з відомою послідовністю, можна користуватися он-лайн програмою NEBcutter V2.0 (<https://nc2.neb.com/NEBcutter2/>).

Загальні рекомендації

- Для отримання повного гідролізу плазмідної ДНК (особливо її суперскрученої форми) ендонуклеазами рестрикції в переважній більшості випадків потрібно в 2-10 разів більше одиниць ферменту порівняно з гідролізом ДНК фага λ або ДНК фага T7. Особливо це стосується ферментів, які мають на плазміді один сайт упізнання.

- Багато ендонуклеаз рестрикції є чутливими до домішок в препараті плазмідної ДНК, наприклад, до присутності залишків сорбенту, який використовується під час виділення плазмід. Слід також пам'ятати, що сліди фенолу, які можуть залишитися у випадку використання фенольного способу очистки плазмідної ДНК, інгібує активність рестриктаз.

- Обираючи ендонуклеазу рестрикції, якою потрібно гідролізувати плазмідну ДНК, слід урахувати, що деякі штами *E. coli*, в яких наростає плазміда, можуть містити системи метилювання ДНК. Наприклад, деметилаза модифікує залишок цитозину в положенні C5 у послідовності CCA/TGG. Відповідно ці модифікації можуть перешкодити гідролізу плазмідної ДНК деякими ендонуклеазами рестрикції у випадку перекривання їхніх сайтів упізнання з даними послідовностями.

Отже, гідроліз плазмідної ДНК ендонуклеазами рестрикції є важливим етапом у процесі клонування генів. Плазмідні вектори забезпечують ефективну доставку генетичного матеріалу, а ендонуклеази рестрикції дозволяють точно розрізати ДНК для подальшої роботи з нею. Рестрикційний аналіз є невід'ємною частиною контролю за клонуванням та допомагає забезпечити успішність генетичних маніпуляцій.

Практична частина

Матеріали і реактиви: плазмідна ДНК pBR322 (<https://www.neb.com/en/products/n3033-pbr322-vector>), буфер для рестрикції 10x (рекомендований для ферменту *EcoRI*), ендонуклеаза *EcoRI* (<https://www.neb.com/en/products/r0101-ecori>), стерильна бідистильована або деіонізована вода, фенол:хлороформ (за потреби), 96% і 70% етанол (за потреби), 3 М ацетат натрію (pH 5,2), буфер TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8,0).

Обладнання: стерильні мікропробірки (0,5 або 1,5 мл), автоматичні піпетки (0,1–10 мкл, 10–100 мкл), стерильні наконечники, водяна баня або

термостат (37°C для інкубації, 65°C для інактивування ферменту), мікроцентрифуга, рукавички.

Хід роботи

1. Підготовка реакційної суміші:

- у стерильну мікропробірку додати
 - ✓ 2 мкг плазмідної ДНК pBR322
 - ✓ 2 мкл 10x буфера для рестрикції (рекомендованого для ферменту EcoRI)
 - ✓ 1 мкл ендонуклеази EcoRI (10 од. активності, що відповідає 5 од. на 1 мкг ДНК)
 - ✓ дистильовану воду до загального об'єму 20 мкл,
- добре змішати компоненти, обережно струшуючи пробірку або піпетуючи.

2. Інкубація:

- інкубувати реакційну суміш при температурі 37°C (оптимальна температура для EcoRI) протягом 1 години.

3. Інактивування ферменту (якщо потрібно):

- після інкубації інактивувати фермент нагріванням пробірки при 65°C протягом 20 хвилин,
- за необхідності провести очищення зразка фенол:хлороформною екстракцією з подальшим переосадженням ДНК етанолом.

4. Фенол:хлороформна екстракція:

- використовуйте розчин фенол:хлороформу у співвідношенні 1:1 (об'єм/об'єм). Зберігайте розчин у темному місці або в холодильнику, щоб уникнути окислення фенолу,
- до реакційної суміші додайте об'єм розчину фенол:хлороформу, рівний об'єму суміші (наприклад, якщо об'єм реакційної суміші становить 20 мкл, додайте 20 мкл фенол:хлороформу),
- закрийте пробірку щільно та ретельно перемішайте її, перевертаючи пробірку кілька разів або струшуючи, не створюючи бульбашок. Це сприяє утворенню емульсії, яка дозволяє фенолу витягати білки,
- центрифугуйте пробірку при 12,000-14,000 об/хв протягом 5 хвилин при кімнатній температурі,
- після центрифугування в пробірці утворюється три шари:
 - ✓ верхній шар – водна фаза, що містить ДНК
 - ✓ проміжний шар – білки та інші забруднення
 - ✓ нижній шар – органічна фаза (фенол:хлороформ).
- акуратно перенесіть водну фазу (верхній прозорий шар) у нову стерильну мікропробірку за допомогою піпетки, не зачіпаючи проміжного шару, щоб уникнути контамінації.

5. Переосадження ДНК:

- додайте 1/10 об'єму 3 М розчину ацетату натрію (рН 5.2) до зібраної водної фази. Це необхідно для підтримки оптимального рН для осадження ДНК,

- додайте 2-2.5 об'єми холодного 96% етанолу (наприклад, якщо водна фаза становить 20 мкл, додайте 40-50 мкл етанолу). Використовуйте охолоджений етанол (-20°C) для ефективного осадження ДНК,
- помістіть пробірку на лід або в морозильник (-20°C) на 15-30 хвилин, щоб осадити ДНК,
- центрифугуйте пробірку при 12,000-14,000 об/хв протягом 10 хвилин при 4°C. Після цього на дні пробірки утвориться білий або прозорий осад – це осаджена ДНК,
- обережно видаліть супернатант (рідина, що залишилася зверху), не зачіпаючи осад. Промийте осад 70% етанолом, додаючи об'єм, рівний об'єму водної фази (наприклад, 20 мкл). Це допомагає видалити залишки солей і фенолу,
- повторно центрифугуйте при 12,000-14,000 об/хв протягом 5 хвилин при кімнатній температурі. Видаліть залишок етанолу, залишивши осад,
- просушіть осад, залишивши пробірку відкритою при кімнатній температурі на 5-10 хвилин, поки залишки етанолу повністю не випаруються. Важливо не пересушити осад, щоб зберегти розчинність ДНК,
- додайте стерильну дистильовану воду або буфер TE для розчинення осадженої ДНК. Об'єм залежить від концентрації, яку ви бажаєте отримати (наприклад, 20-30 мкл),
- акуратно змішайте розчин піпетуванням, уникаючи бульбашок.

Примітки

- Слід урахувати, що препарати ендонуклеаз рестрикції постачаються в буфері для зберігання, який містить 50% гліцеролу. А концентрація гліцеролу у реакційній суміші під час гідролізу ДНК ендонуклеазами рестрикції не повинна перевищувати 5% (тобто об'єм доданого препарату ферменту не повинен перевищувати 1/10 частини об'єму рестрикційної суміші). Тому, коли для повного гідролізу ДНК потрібно додати велику кількість ферменту, слід збільшити об'єм реакційної суміші до 30-50 мкл, або збільшити час інкубації до 2-4 год.
- При потребі гідролізувати препаративну кількість плазмідної ДНК (10-20 мкг) рекомендується збільшити об'єм реакційної суміші, а також потрібно брати ендонуклеазу у кількості не менше 5 од. активності на 1 мкг ДНК.

Очікувані результати

Після гідролізу та очищення очікується отримати чистий зразок плазмідної ДНК з правильними фрагментами, що відповідають результатам гідролізу. ДНК буде очищена від білкових забруднень, готова до подальших молекулярних досліджень або маніпуляцій.

Контрольні питання

1. Що таке плазміда?
2. Яка роль плазмід у генетичній інженерії та біотехнології?
3. Які елементи зазвичай містять плазмідні вектори?
4. Що таке полілінкер, і для чого він використовується?
5. Яке значення мають маркери селекції в плазмідних векторах?
6. Для чого необхідне реплікаційне начало (ori) в плазміді?

7. Яка роль промоторів у складі плазмідного вектора?
8. Як плазмідні вектори використовуються для клонування чужорідних генів?
9. Чому плазмідні вектори є ефективними для експресії чужорідних генів у клітинах-господарях?
10. Які приклади плазмідних векторів найчастіше використовуються у молекулярній біології?
11. Як маркери стійкості до антибіотиків допомагають у процесі селекції трансформованих клітин?
12. Чому важливо мати специфічні сайти рестрикції в плазмідних векторах?
13. Які переваги мають плазмідні вектори порівняно з іншими методами доставки генетичного матеріалу в клітини?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №3. Аналіз результатів гідролізу плазмідної ДНК за допомогою гель-електрофорезу.

Мета: провести аналіз гідролізу плазмідної ДНК за допомогою методу гель-електрофорезу; порівняти отримані фрагменти ДНК з маркером молекулярної маси, та інтерпретувати результати для оцінки правильності рестрикційного аналізу.

Теоретичні відомості

Принцип методу гель-електрофорезу

Гель-електрофорез – це метод, який дозволяє розділяти молекули ДНК, РНК або білків за їх розміром та зарядом під впливом електричного поля. ДНК має негативний заряд завдяки фосфатним групам у своїй структурі, тому під час електрофорезу молекули ДНК мігрують у напрямку позитивного електрода (анода). Розділення молекул відбувається на основі їхнього розміру: чим більша молекула ДНК, тим повільніше вона проходить через пори агарозного гелю, тоді як менші молекули переміщуються швидше. Таким чином, гель-електрофорез дозволяє розділяти фрагменти ДНК за розмірами.

Для електрофорезного розділення нуклеїнових кислот середнього розміру зазвичай використовують агарозні гелі. Агароза – це чиста фракція, як одержують з агару або безпосередньо з агароутворюючих морських водоростів. В 1,0% агарозному гелі можна розділити молекули розміром від 600 до 20000 п.н. Для фракціонування більших молекул ДНК (мільйони пар основ), денатурованої ДНК і РНК використовують спеціальні системи електрофорезу.

Деколи для вирішення спеціальних завдань для розділення ДНК використовують поліакриламідні гелі. В 20% поліакриламідному гелі можна розділити фрагменти ДНК, які складаються всього з шести основ і які відрізняються лише одним нуклеотидом.

Більшість агарозних гелів готуються з концентрацією від 0,7% (для розділення фрагментів ДНК розміром 5-10 т.п.н.) до 2% (для розділення фрагментів ДНК розміром 0,2-1 т.п.н.) агарози в електрофоретичному буфері. Підвищення концентрації до 3% забезпечує розділення дуже маленьких

фрагментів, проте вертикальний поліакриламідний гель є більш придатним у даному випадку.

Низькопроцентні гелі є дуже м'якими і можуть порватися при роботі з ними. Високопроцентні гелі часто є крихкими і не завжди з рівними поверхнями. Тому найбільш оптимальною концентрацією агарози для приготування гелю є 1%

Для агарозних електрофорезів використовують кілька буферів. Найбільш широковживані:

- *трис/ацетат/ЕДТА (ТАЕ),*
- *трис/борат/ЕДТА (ТВЕ),*
- *літію борат.*

ТАЕ має низьку буферну ємність і забезпечує найкраще розділення великих фрагментів ДНК. Це означає, що напруга повинна бути низькою (1-5 В/см), а тривалість електрофорезу довшою. Наприклад, розділення фрагментів розміром 50-150 п.н. проводять в 2% агарозному гелі за напруги 90-100 В протягом 30 хв. Електрофорез геномної ДНК проводять в 0,7-0,8% агарозному гелі за напруги 25- 30 В протягом кількох годин. Продукт розміром 1,4 т.п.н. слід розганяти в 1-1,5% гелі за напруги 70-90 В протягом 30-40 хв.

Літію борат відносно недавно почали використовувати, проте він є малоефективним при розділенні фрагментів розміром більш 5 т.п.н. Низька електропровідність цього буферу дає можливість підвищувати вольтаж (до 35 В/см), що скорочує час аналізу під час виконання рутинних електрофорезів. Щоб побачити різницю в одну пару нуклеотидів у розмірі фрагментів готують 3% агарозні гелі на 1 мМ бораті літію (з надзвичайно низькою електрорівдністю).

Відмінність у розмірах молекул ДНК можна аналізувати як в нативних суперскручених формах, так і в лінеаризованих, оброблених рестриктазами. Концентрацію виділеної плазмідної ДНК після проведення електрофорезу можна визначити шляхом порівняння з препаратами ДНК відомої концентрації.

Етапи проведення електрофорезу ДНК в агарозному гелі



Рис. 1. Заливання агарозного гелю.

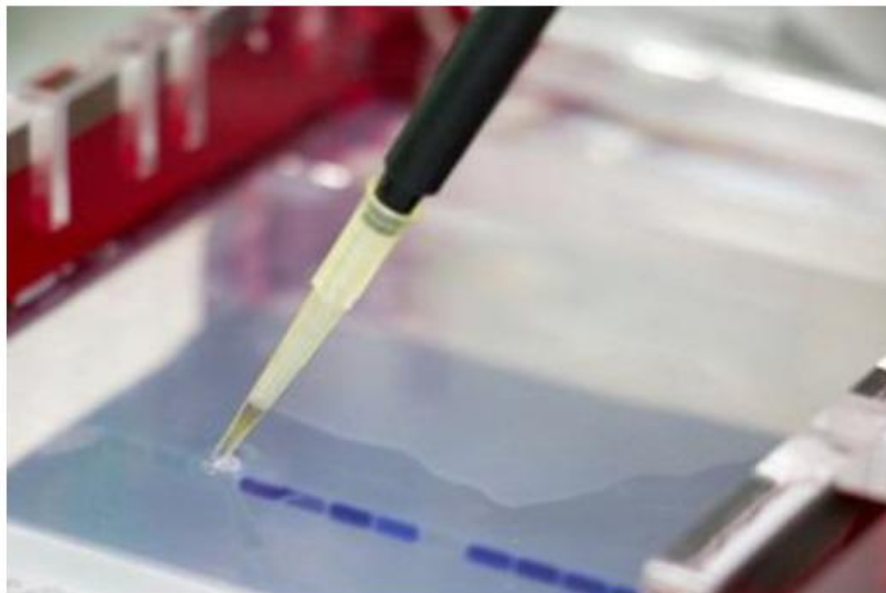


Рис. 2. Внесення проб ДНК у лунки агарозного гелю.

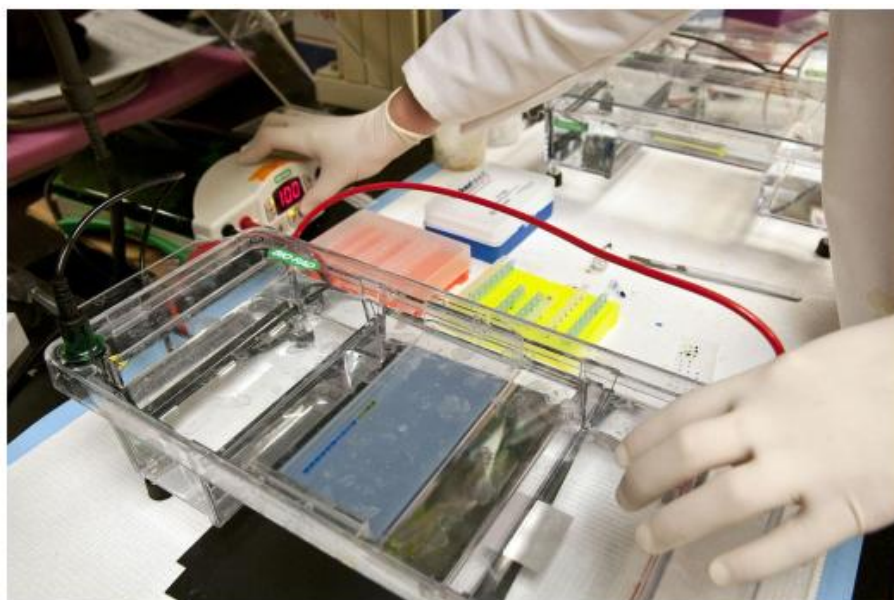


Рис. 3. Підключення камери, в якій знаходиться агарозний гель, до блок живлення.

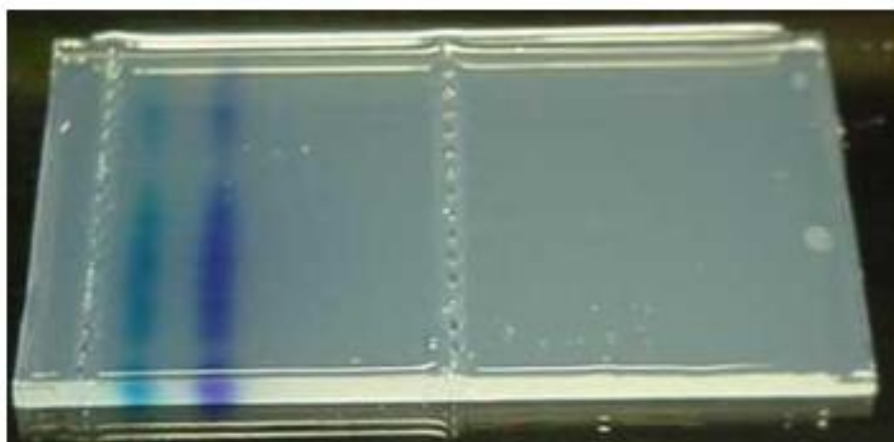


Рис. 4. 1% агарозний гель на поверхні вимкненого УФ-трансілюмінатора.

Видно лише фарбу буфера для нанесення проб. Для детекції фрагментів ДНК в агарозному гелі використовують флюорисціюючий барвник, **етидію бромід**, який інтеркалює у молекули нуклеїнових кислот і під час експозиції в ультрафіолетовому світлі генерує оранжеве світіння смуг зв'язаної з ним ДНК.

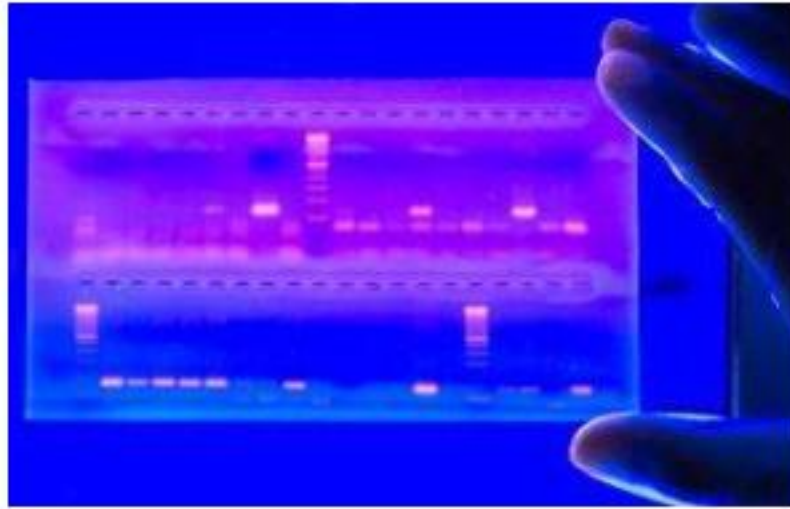


Рис. 5. 1% агарозний гель на поверхні увімкненого УФ-трансліюмінатора. Зв'язана з етидієм бромідом ДНК світиться оранжевим.

Застосування гель-електрофорезу в генетичній інженерії

Гель-електрофорез є універсальним інструментом у генетичній інженерії для:

- **Аналізу рестрикційних фрагментів ДНК:** після розрізу ДНК рестрикційними ферментами, гель-електрофорез дозволяє візуально підтвердити наявність певних фрагментів, перевірити, чи було виконано розрізання плазмід або інших молекул ДНК.
- **Підтвердження успішного клонування:** після вставки нового гена у плазмиду гель-електрофорез допомагає перевірити, чи дійсно вставка була інтегрована у вектор.
- **Контроль якості плазмід:** перевіряється, чи немає зайвих фрагментів, неочікуваних продуктів або лінійованих векторів.
- **Підготовка до подальших експериментів:** очищення ДНК перед клонуванням або секвенуванням.

Інтерпретація результатів рестрикційного аналізу

Після гідролізу ДНК рестрикційними ендонуклеазами, фрагменти ДНК, що утворилися, завантажуються на гель. Для аналізу результатів використовується маркер молекулярної маси ДНК (англ. DNA ladder), який містить фрагменти ДНК відомого розміру. Це дає можливість визначити розміри фрагментів ДНК, отриманих після гідролізу.

Основні етапи інтерпретації

- **Порівняння смуг ДНК із смугами маркера.** Якщо плазмід розрізана на два або більше фрагментів, смуги ДНК розділяються за розмірами, і їх можна порівняти з маркером молекулярної маси.

- *Виявлення очікуваних фрагментів.* Якщо гідроліз пройшов успішно, на гелі будуть присутні очікувані фрагменти розміром, що відповідають результатам аналізу.
- *Визначення розміру вставки.* Вставка ДНК може бути підтверджена за допомогою порівняння з очікуваними результатами, наприклад, додатковим фрагментом або збільшенням розміру плазміди.

Визначення розміру фрагментів ДНК

Розмір фрагментів ДНК визначають шляхом вимірювання відстані, на яку фрагмент мігрував у гелі, і порівняння цього значення з відстанню, на яку мігрували фрагменти молекулярного маркера. Молекулярний маркер (англ. DNA ladder) містить фрагменти ДНК відомих розмірів, що дозволяє визначити розмір невідомих фрагментів за принципом прямої кореляції між відстанню міграції та розміром молекули.

Виявлення можливих помилок у процесі рестрикційного аналізу та їх корекція

Помилки у процесі гідролізу або під час проведення гель-електрофорезу можуть призвести до неспецифічних результатів. Основні причини помилок є наступними.

- **Неповний гідроліз плазмідної ДНК:** якщо фермент не повністю розрізає ДНК, то на гелі можуть бути присутні як лінійовані, так і неповністю розрізані молекули.
- **Неправильна підготовка буфера:** буфер для електрофорезу (ТАЕ або ТВЕ) має бути правильно приготованим для забезпечення оптимальних умов міграції ДНК.
- **Недостатня кількість ферменту:** при недостатній концентрації ферменту або короткому часі реакції, гідроліз може бути неповним, що також призводить до хибних результатів.

Шляхи корекції

- *Оптимізація концентрації ДНК:* перевірити кількість ДНК у реакції.
- *Збільшення кількості ферменту:* збільшення концентрації рестриктази може сприяти кращому гідролізу.
- *Корекція часу інкубації:* продовження часу реакції дозволить досягти повного гідролізу.

Практична частина

Матеріали і реактиви: агароза, 1X буфер ТАЕ, 6X буфер для завантаження зразків, маркер молекулярної маси ДНК, зразки ДНК після гідролізу, стерильна бідистильована вода, етидіум бромід або інший барвник для візуалізації ДНК, стерильні пробірки (1,5 мл).

Обладнання: центрифуга, автоматичні піпетки (0,1–10 мкл, 10–100 мкл), стерильні наконечники, холодильник (4°C), морозильник (-20°C), система для гель-електрофорезу, аналітичні ваги, мірні циліндри, водяна баня або мікрохвильова піч, УФ-трансілюмінатор.

Хід роботи

1. Підготовка агарозного гелю:

- розплавте 1 г агарози в 100 мл 1X буфера TAE,
- після охолодження до $\sim 50^{\circ}\text{C}$, залийте гель у форму для електрофорезу,
- вставте гребінець для створення лунок і дайте гелю застигнути (приблизно 20-30 хвилин).

2. Підготовка зразків для завантаження:

- додайте до кожного зразка (отриманого після гідролізу) 1 мкл 6X буфера (англ. loading dye),
- підготуйте зразок маркера молекулярної маси.

3. Завантаження зразків у гель:

- занурте гель у електрофорезну камеру, заповнену 1X буфером TAE,
- завантажте 5-10 мкл кожного зразка у лунки,
- в окрему лунку завантажте маркер молекулярної маси.

4. Проведення електрофорезу:

- запустіть електрофорез, встановивши напругу 100-120 В,
- електрофорез триває приблизно 45-60 хвилин, або доки барвник не мігрує на дві третини гелю.

5. Візуалізація ДНК:

- після завершення електрофорезу перенесіть гель на УФ-трансліюмінатор,
- спостерігайте фрагменти ДНК та порівняйте їх з маркером молекулярної маси.

6. Аналіз результатів.

• *Порівняння фрагментів:* порівняйте міграцію фрагментів ДНК із маркером молекулярної маси для визначення розміру фрагментів, отриманих після гідролізу.

• *Інтерпретація:* якщо гідроліз пройшов успішно, ви отримаєте очікувані фрагменти. Якщо виникли помилки (наприклад, додаткові або відсутні фрагменти), це може вказувати на неповний або неспецифічний гідроліз.

• *Корекція:* у разі відхилень необхідно оптимізувати умови гідролізу, кількість ферменту або концентрацію ДНК.

Очікувані результати

Після проведення електрофорезу візуалізація гелю повинна показати фрагменти ДНК, які чітко розділені за розміром. Порівняння цих фрагментів із маркером молекулярної маси дозволить визначити розміри фрагментів, отриманих після гідролізу.

Контрольні питання

1. Що таке гель-електрофорез і для чого він використовується?
2. Який принцип лежить в основі розділення молекул ДНК у процесі гель-електрофорезу?
3. Чому ДНК мігрує до позитивного електрода під час електрофорезу?

4. Як впливає розмір фрагментів ДНК на швидкість їхньої міграції через гель?
5. Яку роль відіграють барвники, такі як етидій бромід, у процесі візуалізації ДНК після електрофорезу?
6. Як гель-електрофорез застосовується в процесі клонування генів?
7. Яким чином можна інтерпретувати результати рестрикційного аналізу після проведення гель-електрофорезу?
8. Що таке маркер молекулярної маси ДНК і для чого він використовується?
9. Як визначають розміри фрагментів ДНК за результатами гель-електрофорезу?
10. Які можливі помилки можуть виникнути під час проведення гідролізу та гель-електрофорезу?
11. Якими способами можна коригувати помилки, що виникають під час гідролізу ДНК або гель-електрофорезу?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №4. Дефосфорилювання вектора.

***Мета:** ознайомитися з методами дефосфорилювання ДНК-векторів з використанням лужної фосфатази для запобігання самолігування під час клонування; провести реакцію дефосфорилювання на прикладі плазмідного вектора після розрізання рестрикційними ферментами.*

Теоретичні відомості

Поняття самолігування вектора та його негативний вплив на ефективність клонування

У процесі клонування генів вектори, такі як плазмідні, часто піддаються дії рестрикційних ферментів, які розрізають їх у певних ділянках, створюючи відкриті кінці для вбудовування вставки (наприклад, гена). Проте після цього кінці вектора можуть знову з'єднуватися (самолігування) без включення вставки, що значно знижує ефективність процесу. Самолігування виникає через те, що обидва кінці вектора, які залишилися після розрізу, можуть з'єднуватися за допомогою лігази, створюючи замкнене кільце без включення вставки.

Негативний вплив самолігування на ефективність клонування полягає в тому, що:

- **збільшується кількість хибнопозитивних результатів** – більшість клонів, отриманих після трансформації, можуть не містити вставки, а бути лише векторами, які самолігувалися. Це призводить до зниження кількості колоній, які фактично містять цільовий генетичний матеріал;
- **ускладнюється процес скринінгу** – оскільки кількість клітин, що містять тільки плазмиду без вставки, збільшується, потрібно більше часу та ресурсів для відбору трансформантів із правильною вставкою.
- **знижується ефективність трансформації** – ресурси та робочий час витрачаються на аналіз неефективних трансформацій, що ускладнює отримання бажаних результатів.

Принципи і механізми реакції дефосфорилювання

Дефосфорилювання є ключовим підходом для запобігання самолігуванню вектора. Це процес, під час якого фермент фосфатаза видаляє 5'-фосфатні групи з кінців лінійованої ДНК (вектора). Для того, щоб лігаза могла з'єднати два кінці ДНК, необхідно, щоб один із кінців мав 5'-фосфатну групу. Видалення цієї групи запобігає формуванню фосфодіестерного зв'язку між кінцями, що робить самолігацію неможливою.

Основні етапи дефосфорилювання

- **Ферментативне видалення 5'-фосфатних груп.** Лужна фосфатаза каталізує видалення фосфатних груп з кінців ДНК, залишаючи 5'-гідроксильну групу, що робить лігування кінців неможливим.
- **Запобігання самолігуванню.** Оскільки дефосфорилювані кінці не можуть лігуватися, лігування може відбутися лише тоді, коли вставка зберігає свої 5'-фосфатні групи, що дозволяє інтеграцію фрагменту ДНК у вектор.

Вибір ферменту залежно від типу вектора та умов клонування

Для ефективного дефосфорилювання використовуються різні типи лужних фосфатаз, кожна з яких має свої переваги та обмеження, залежно від умов експерименту.

- **CIAP** (англ. Calf Intestinal Alkaline Phosphatase). Це фосфатаза з кишківника теляти, яка є ефективним ферментом для видалення 5'-фосфатів. Вона широко використовується, але має один важливий недолік – важко деактивується після реакції, що може призвести до залишкової активності ферменту в наступних стадіях експерименту. Тому після використання CIAP необхідно проводити додаткові етапи очищення для повного видалення ферменту.

Застосування: підходить для різних типів векторів, але особливо корисна для роботи з великими плазмідами.

- **rSAP** (англ. Recombinant Shrimp Alkaline Phosphatase). Це рекомбінантна фосфатаза з креветок, яка має перевагу в тому, що легко деактивується нагріванням. Після 5-10 хвилин при 65°C фермент повністю інактивується, що спрощує подальший процес лігування.

Застосування: rSAP є зручним ферментом для стандартних реакцій клонування і часто використовується в лабораторіях завдяки своїй простоті у використанні.

- **AnP** (англ. Archaeal Alkaline Phosphatase). Це фосфатаза з архей, яка вирізняється високою стабільністю і здатністю працювати за екстремальних умов, таких як висока температура. Цей фермент є стабільним навіть при високих температурах і може використовуватися в умовах, де інші фосфатази втрачають активність.

Застосування: підходить для роботи в умовах з екстремальними температурами або для експериментів, де необхідна підвищена стійкість ферменту.

Реакція дефосфорилювання є важливим етапом у підвищенні ефективності клонування. Вибір правильного ферменту залежить від умов

експерименту, типу вектора та специфіки роботи. Правильне дефосфорилювання запобігає самолігації векторів, підвищуючи ймовірність успішного включення цільової вставки та значно полегшуючи подальший процес відбору трансформантів.

Практична частина

Матеріали і реактиви: лінеаризований плазмідний вектор (наприклад, pUC19), 10X буфер для фосфатази (відповідний для використаного ферменту, наприклад, для rSAP), рекомбінантної лужної фосфатази (rSAP), стерильна бідистильована вода, буфер для елюції або TE-буфер, етанол, стерильні пробірки (1,5 мл).

Обладнання: термостат (37°C і 65°C), центрифуга, автоматичні піпетки (0,1–10 мкл, 10–100 мкл), стерильні наконечники, холодильник (4°C), морозильник (-20°C), колонки для очищення ДНК (опціонально).

Хід роботи

1. Підготовка реакційної суміші:

- до стерильної пробірки додайте
 - ✓ 500 нг лінеаризованого плазмідного вектора,
 - ✓ 1 мкл 10X буфера для фосфатази,
 - ✓ 1 мкл rSAP,
 - ✓ бідистильовану воду до загального об'єму 10 мкл.

2. Інкубація:

- інкубуйте суміш при 37°C протягом 30 хвилин.

3. Деактивація ферменту:

- після завершення реакції деактивуйте фермент шляхом нагрівання при 65°C протягом 10 хвилин.

4. Очищення вектора (опціонально):

- якщо потрібно, очистіть вектор після дефосфорилювання за допомогою методу очищення (наприклад, колонкового очищення або осадження етанолом).

5. Подальші кроки:

- після дефосфорилювання вектор готовий для лігування з цільовою вставкою.

Очікувані результати

В результаті дефосфорилювання з використанням лужної фосфатази rSAP, самолігування вектора буде попереджено.

Контрольні питання

1. Що таке самолігування вектора і як воно відбувається?
2. Чому самолігування векторів знижує ефективність клонування?
3. Як самолігування впливає на кількість хибнопозитивних результатів у процесі клонування?
4. Які проблеми виникають при відборі трансформантів у випадку самолігування вектора?
5. Що таке дефосфорилювання і як цей процес допомагає уникнути самолігування вектора?

6. Які ферменти використовуються для дефосфорилювання векторів, і чим вони відрізняються між собою?
7. Який механізм дії лужної фосфатази під час дефосфорилювання вектора?
8. Як вибір фосфатази залежить від типу вектора та умов експерименту?
9. Які переваги та недоліки має СІАР як фермент для дефосфорилювання?
10. Чому rSAP є зручнішою для використання в лабораторних умовах?
11. У яких випадках варто використовувати АпР для дефосфорилювання векторів?
12. Як дефосфорилювання впливає на загальну ефективність процесу клонування та відбір трансформантів?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №5. Лігування ДНК.

Мета: ознайомитися з процесом лігування ДНК та його значенням у генетичній інженерії; провести реакцію лігування фрагментів ДНК (вектора і вставки) з використанням ДНК-лігази фага Т4.

Теоретичні відомості

Лігування ДНК та його значення у генетичній інженерії

Лігування ДНК – це процес з'єднання фрагментів ДНК, який є критично важливим у генетичній інженерії та молекулярній біології. Це ключовий етап у клонуванні генів, оскільки дозволяє інтегрувати фрагменти ДНК, такі як гени або інші регуляторні послідовності, у векторні молекули (наприклад, плазміди), що забезпечує їх подальшу реплікацію, експресію або внесення змін у геном організму. Основне завдання лігування – створити рекомбінантні ДНК, що можуть використовуватися для досліджень, виробництва рекомбінантних білків або генетичних модифікацій організмів. У процесі клонування генів ДНК-фрагменти (вставки) лігуються з плазмідними векторами, які виступають в ролі «транспортного засобу» для перенесення генетичної інформації у клітини.

Механізм дії ДНК-лігаз

ДНК-лігази – це ферменти, що відповідають за з'єднання двох молекул ДНК через утворення фосфодіестерного зв'язку між 5'-фосфатною і 3'-гідроксильною групами на кінцях ДНК. Цей процес відбувається на ділянках розривів у ДНК і необхідний для зшивання фрагментів після реплікації, репарації або рекомбінації ДНК.

ДНК-лігаза фага Т4, яка є однією з найпоширеніших у молекулярній біології, має здатність працювати як з липкими (кохезивними), так і з тупими кінцями ДНК, що робить її універсальним інструментом для клонування. Механізм дії Т4 ДНК-лігази включає активацію 5'-фосфатної групи АТФ, що є обов'язковою умовою для ефективного лігування. Після цього фермент з'єднує 5'-фосфатний і 3'-гідроксильний кінці дволанцюгової ДНК.

Розрахунок молярного співвідношення вектора і вставки

Для успішного лігування важливо підібрати правильне співвідношення між вектором (плазмідною) та вставкою (ДНК-фрагментом). Найбільш часто

використовується молярне співвідношення 1:3 (вектор:вставка), яке максимізує шанси на утворення рекомбінантної молекули. Це співвідношення може бути скориговане в залежності від специфіки експерименту, оскільки оптимальне співвідношення може змінюватися в залежності від розміру вектора та вставки.

Формула для розрахунку кількості вставки:

$$\text{Вставка (нг)} = \frac{\text{Маса вектора (нг)} * \text{Розмір вставки (п. н.)}}{\text{Розмір вектора (п. н.)}} * 3$$

де:

Маса вектора – кількість вектора, яка використовується в реакції (зазвичай 50 нг),

Розмір вставки – довжина вставки ДНК у парах нуклеотидів (п.н.),

Розмір вектора – довжина векторної ДНК у парах нуклеотидів (п.н.).

Ця формула допомагає визначити, скільки вставки потрібно додати до реакції лігування для забезпечення оптимального співвідношення 1:3.

Фактори, що впливають на ефективність лігування

Лігування ДНК залежить від багатьох факторів, які необхідно оптимізувати для досягнення максимальних результатів.

- **Концентрація ДНК.** Низькі концентрації ДНК знижують ймовірність взаємодії молекул вектора і вставки, що може призвести до неефективного лігування. Занадто висока концентрація може викликати утворення небажаних продуктів, таких як димери або мультимери плазміди. Оптимальна концентрація вектора зазвичай становить 50-100 нг на реакцію.

- **Тип кінців ДНК.** Ліпкі кінці, які утворюються при розрізі ДНК рестриктазами, здатні комплементарно зв'язуватися між собою, що значно спрощує лігування і підвищує його ефективність. Лігування тупих кінців є менш ефективним і вимагає більш тривалих інкубаційних часів і/або вищих концентрацій ДНК.

- **Температура.** Ліпкі кінці найкраще лігуються при 16°C, оскільки це забезпечує стабільність комплексів між кінцями ДНК і ДНК-лігазою. Тупі кінці вимагають вищих температур, і часто інкубація проводиться при кімнатній температурі (22-25°C).

- **Буфер для лігування.** Лігази фага Т4 потребують присутності магнію (Mg^{2+}) і АТФ у буфері для здійснення каталітичної реакції. Концентрація АТФ і правильне рН буфера також критично впливають на активність ферменту і кінцеву ефективність реакції.

Таким чином, ефективність лігування ДНК залежить від оптимізації концентрації ДНК, типу кінців, температури реакції та наявності необхідних компонентів у буфері для лігування.

Практична частина

Матеріали і реактиви: векторна ДНК, вставка ДНК (цільовий ген), 10X лігазний буфер (з АТФ), ДНК-лігаза фага Т4, стерильна бідистильована вода, стерильні пробірки (1,5 мл).

Обладнання: термостат (16°C), центрифуга, автоматичні піпетки (0,1–10 мкл, 10–100 мкл), стерильні наконечники, холодильник (4°C), морозильник (-20°C).

Хід роботи

1. Підготовка реакційної суміші:

- у стерильну пробірку додайте:
 - ✓ 50 нг векторної ДНК,
 - ✓ вставку ДНК у співвідношенні 3:1 (вектор:вставка),
 - ✓ 1 мкл 10X лігазного буфера,
 - ✓ 0,5-1 мкл ДНК-лігази фага Т4 (залежно від активності ферменту),
 - ✓ додайте дистильовану воду до загального об'єму 10 мкл.

2. Інкубація:

- для липких кінців: інкубуйте 1 годину при 16°C або 4°C протягом ночі,
- для тупих кінців: інкубуйте 4-6 годин при кімнатній температурі.

3. Закінчення реакції:

- після завершення інкубації реакційну суміш можна використовувати для подальших етапів, таких як трансформація в компетентні клітини для перевірки успішності клонування,
- зберігайте реакційну суміш при -20°C для подальшого використання.

Очікувані результати

У разі успішного лігування буде отримано рекомбінантну молекулу ДНК, готову для подальшої трансформації в клітини.

Контрольні питання

1. Що таке лігування ДНК, і яке його значення в генетичній інженерії?
2. Як використовують лігування ДНК у процесі клонування генів?
3. Яка роль векторних молекул, таких як плазміди, у процесі лігування ДНК?
4. Який механізм дії ДНК-лігаз і які хімічні зв'язки вони утворюють між молекулами ДНК?
5. Які умови необхідні для активності ДНК-лігази фага Т4 під час лігування ДНК?
6. Яке співвідношення між вектором і вставкою найчастіше використовується під час лігування, і як його розрахувати?
7. Які фактори впливають на ефективність лігування ДНК і як їх можна оптимізувати?
8. Чому липкі кінці ДНК легше лігуються, ніж тупі кінці, і як це впливає на тривалість реакції лігування?

9. Яке значення має температура для лігування липких і тупих кінців ДНК?

10. Які компоненти мають бути присутні в буфері для лігування ДНК, щоб забезпечити активність лігази?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №6. Виділення плазмідної ДНК.

Мета: навчитися виділяти плазмідну ДНК з бактерійних клітин методом лужного лізису, визначати концентрацію та оцінювати якість отриманої ДНК для подальшого використання в молекулярно-біологічних експериментах.

Теоретичні відомості

Виділення плазмідної ДНК в аналітичних та препаративних кількостях

Плазмідна ДНК – це невеликі кільцеві молекули ДНК, які автономно реплікуються в бактеріальних клітинах незалежно від геномної ДНК. Плазміди широко використовуються у молекулярній біології та генетичній інженерії як вектори для клонування генів або експресії білків. Виділення плазмідної ДНК є необхідним кроком для подальшої її маніпуляції, включаючи трансформацію, секвенування або модифікацію. В залежності від цілей експерименту, виділення плазмідної ДНК може бути проведене в аналітичних кількостях, що підходять для полімеразної ланцюгової реакції або рестрикційного аналізу, або в препаративних кількостях, які потрібні для великих експериментів, таких як трансфекція еукаріотичних клітин або очищення білків.

Основні етапи виділення плазмідної ДНК

Процес виділення плазмідної ДНК передбачає кілька важливих етапів.

- **Лізис клітин.** Метою цього етапу є розрив клітинної стінки бактерій для вивільнення плазмідної ДНК. Це досягається шляхом використання лужних або детергентних буферів, які руйнують мембрану клітин і денатурують білки.

- **Осадження білків та геномної ДНК.** Після лізису геномна ДНК і білки осаджуються за допомогою нейтралізації лужного буфера, зазвичай із застосуванням ацетату калію. Цей процес дозволяє зберегти плазмідну ДНК у розчиненій формі, тоді як великі молекули осаджуються і видаляються.

- **Очищення плазмідної ДНК.** На цьому етапі плазмідна ДНК очищується від домішок, таких як залишкові білки або солі, шляхом центрифугування або використання органічних розчинників. Також можуть застосовуватися колонки, що селективно зв'язують плазмідну ДНК, для її очищення.

- **Концентрування ДНК.** Після очищення ДНК осаджується за допомогою етанолу або ізопропанолу, що дозволяє зібрати її в концентрованій формі для подальшого використання.

Методи виділення плазмідної ДНК

- **Лужний лізис.** Цей метод є одним із найпоширеніших для виділення плазмідної ДНК. Він базується на використанні лужного буфера, що денатурує геномну ДНК і білки, а також руйнує клітинні мембрани. Після додавання лужного буфера та ресуспендування клітин, додається нейтралізуючий буфер, що спричиняє утворення осаду геномної ДНК та білків. Плазмідна ДНК залишається у розчиненій формі, що дозволяє її легко відокремити.

- **Комерційні набори.** Для зручності і швидкості багато лабораторій використовують комерційні набори, які включають спеціальні колонки для селективного зв'язування плазмідної ДНК. Ці набори спрощують процес виділення за рахунок використання фільтраційних мембран, на яких плазмідна ДНК зв'язується під дією певних буферів, а потім елюється в чистій формі для подальших маніпуляцій.

Виділена плазмідна ДНК використовується в багатьох генетичних і біотехнологічних експериментах, тому важливо дотримуватися точності на всіх етапах для отримання чистого і якісного зразка ДНК.

Практична частина

Матеріали і реактиви: культура *E. coli*, що містить плазмиду, буфер для ресуспендування клітин (50 мМ Tris-HCl, рН 8,0; 10 мМ ЕДТА; 100 мг/мл РНКази А (зберігати при 4°C)), лужний буфер для лізису (0,2 М гідроксид натрію, 1% додецилсульфат натрію), нейтралізуючий буфер (3 М ацетат калію, рН 5,5), ізопропанол або 96% етанол, 70% етанол, ТЕ-буфер або бідистильована вода.

Обладнання: центрифуга, автоматичні піпетки (0,1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1000 мкл), стерильні наконечники, стерильні центрифужні пробірки (1,5 мл), холодильник (4°C), морозильник (-20°C), льодяна баня, спектрофотометр.

Хід роботи

1. Підготовка бактеріальної культури:

- нічна култура *E. coli*, що містять плазмиду, в 2-3 мл середовища LB з антибіотиком (наприклад, ампіциліном).

2. Лізис клітин методом лужного лізису:

- центрифугуйте 2-3 мл бактеріальної культури при 5000 об/хв протягом 5 хвилин. Видаліть супернатант,
- додайте 250 мкл буфера для ресуспендування клітин,
- ресуспендуйте осад бактеріальних клітин шляхом інтенсивного перемішування,
- додайте 250 мкл лужного буфера,
- обережно перемішуйте протягом 5 хвилин на льодяній бані,
- додайте 350 мкл нейтралізуючого буфера та перемішуйте для нейтралізації лужного розчину. Після цього спостерігатиметься утворення осаду геномної ДНК і білків.

3. Очищення плазмідної ДНК:

- центрифугуйте зразки протягом 10 хвилин при 13 000 об/хв,
- зберіть супернатант, що містить плазмідну ДНК,

- додайте 0,7 об'єму ізопропанолу або 2 об'єми 96% етанолу для осадження ДНК,
- інкубуйте при -20°C протягом 15 хвилин,
- центрифугуйте осад ДНК протягом 10 хвилин при 13 000 об/хв,
- видаліть супернатант і промийте осад 70% етанолом,
- після центрифугування видаліть етанол та висушіть осад,
- розчиніть отриману ДНК у ТЕ-буфері або бідистильованій воді.

4. Визначення концентрації ДНК:

- визначте концентрацію ДНК за допомогою фотометра при довжині хвилі 260 нм,
- визначіть чистоту зразка за співвідношенням абсорбції при $\text{OD}_{260/280}$.

Очікувані результати

Отримання чистого препарату плазмідної ДНК із концентрацією, придатною для подальших молекулярно-біологічних експериментів.

Контрольні питання

1. Що таке плазмідна ДНК і яке її значення в молекулярній біології та генетичній інженерії?
2. У чому полягає різниця між аналітичними та препаративними кількостями плазмідної ДНК?
3. Які основні етапи включає процес виділення плазмідної ДНК?
4. Які методи використовуються для лізису клітин з метою виділення плазмідної ДНК?
5. Яка роль нейтралізуючого буфера у процесі осадження білків та геномної ДНК?
6. Чому плазмідна ДНК залишається у супернатанті після осадження великих молекул і білків?
7. Як здійснюється очищення плазмідної ДНК від домішок? Які методи для цього використовуються?
8. Чому для осадження плазмідної ДНК використовуються етанол або ізопропанол?
9. У чому полягає принцип методу лужного лізису для виділення плазмідної ДНК?
10. Які переваги мають комерційні набори для виділення плазмідної ДНК порівняно з традиційними методами?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №7. Приготування компетентних клітин.

Мета: приготувати хімічно компетентні клітини *E. coli* з використанням розчину CaCl_2 .

Теоретичні відомості

Поняття про компетентність

Компетентність – це здатність клітин поглинати позаклітинну ДНК, що є основою для генетичних маніпуляцій, оскільки дозволяє ввести нову генетичну інформацію до клітин. У природних умовах компетентність виникає

внаслідок природних процесів горизонтального переносу генів, що є важливим механізмом адаптації бактерій до нових умов середовища, наприклад, набуття стійкості до антибіотиків. Однак, більшість бактерій не є природно компетентними, тому для їх трансформації використовується штучна компетентність, яку отримують хімічною або фізичною обробкою клітин.

Природна та штучна компетентність

Природна компетентність є властивістю деяких видів бактерій, таких як *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Neisseria gonorrhoeae*, які за певних умов можуть поглинати ДНК з навколишнього середовища без необхідності в додатковій обробці. Цей процес регулюється генетично і запускається у відповідь на специфічні умови середовища.

Штучна компетентність досягається шляхом хімічної або фізичної обробки клітин. Штучно компетентні клітини можуть поглинати ДНК після впливу певних хімічних агентів, таких як CaCl_2 , або через вплив коротких електричних імпульсів, що тимчасово відкривають пори в клітинній мембрані. Штучна компетентність є основою лабораторних методів трансформації і клонування.

Методи отримання компетентних клітин

- **Хімічна компетентність.** Найбільш поширеним методом отримання компетентних клітин є обробка холодним розчином CaCl_2 . Цей метод ґрунтується на здатності кальцію нейтралізувати негативний заряд фосфатів на мембрані клітин і ДНК, що полегшує проникнення цієї ДНК через мембрану. Після обробки клітини стають більш проникними для молекул ДНК.

Переваги: простий у виконанні та відносно дешевий.

Недоліки: порівняно низька ефективність трансформації, особливо для великих плазмід або лінійних фрагментів ДНК.

- **Електропорація.** Інший метод полягає в обробці клітин короткими імпульсами високої напруги, що тимчасово відкриває пори в клітинній мембрані, через які може проходити ДНК. Цей метод має високу ефективність і широко використовується для трансформації клітин великими або складними плазмідними конструкціями.

Переваги: висока ефективність трансформації, особливо для складних генетичних конструкцій.

Недоліки: потребує спеціального обладнання (електропоратора) і витратних матеріалів, клітини чутливі до умов електропорації.

Контроль якості та перевірка компетентних клітин

Для перевірки якості компетентних клітин використовують контрольну трансформацію з плазмідною, концентрація якої відома (наприклад, pUC19). Ефективність трансформації вимірюють кількістю колоній, що утворилися після трансформації, і виражають у кількості колоній на мкг введеної ДНК. Це дозволяє оцінити, наскільки компетентні клітини здатні до поглинання ДНК і наскільки висока ефективність трансформації.

Проблеми при отриманні компетентних клітин та їх вирішення

Під час підготовки компетентних клітин можуть виникати різні проблеми, які впливають на ефективність трансформації.

- **Низька ефективність трансформації.** Це може бути спричинено неправильним зберіганням або обробкою клітин. Щоб уникнути цього, слід дотримуватися суворих умов стерильності, температурного режиму і використовувати свіжоприготовлені або правильно збережені реагенти.

- **Висока смертність клітин.** Це може статися через неправильну обробку клітин або їх перегрівання під час обробки або зберігання. Для мінімізації ризику слід проводити всі маніпуляції при низьких температурах і уникати перегрівання клітин.

- **Недостатня концентрація ДНК.** Низькі концентрації ДНК під час трансформації можуть призводити до поганих результатів. Для покращення трансформації можна збільшити кількість ДНК або використовувати більш ефективні методи, такі як електропорація.

Практична частина

Матеріали і реактиви: культура клітин *E. coli*, 0,1 М CaCl_2 , 15% гліцерин.

Обладнання: центрифуга (з можливістю роботи при 4°C), автоматичні піпетки (0,1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1000 мкл), стерильні наконечники, стерильні центрифужні пробірки (0,5 або 1,5 мл), холодильник (4°C), морозильник (-20°C), льодяна баня, спектрофотометр, сухий лід або рідкий азот.

Хід роботи

1. Вирощування клітин:

- засійте 5 мл свіжого середовища LB з антибіотиком колонією *E. coli* і інкубуйте при 37°C до досягнення оптичної густини OD600 0.4–0.6.

2. Збір клітин:

- центрифугуйте культуру при 4000 об/хв протягом 10 хвилин при 4°C,
- видаліть супернатант і ретельно ресуспендуйте осад у 10 мл холодного 0,1 М CaCl_2 ,
- інкубуйте клітини на льоду протягом 20–30 хвилин.

3. Другий етап обробки CaCl_2 :

- знову центрифугуйте клітини при 4000 об/хв протягом 10 хвилин при 4°C,
- видаліть супернатант і ресуспендуйте клітини в 5 мл холодного 0,1 М CaCl_2 з додаванням 15% гліцерину,
- інкубуйте клітини на льоду ще 20 хвилин.

4. Зберігання компетентних клітин:

- розділіть суспензію клітин у стерильні епендорфи по 100 мкл.
- заморозьте пробірки з клітинами у рідкому азоті або на сухому льоду,
- зберігайте при -80°C до моменту використання.

Очікувані результати

Компетентні клітини, отримані в результаті хімічної обробки CaCl_2 , повинні мати достатню трансформаційну ефективність, яка перевіряється шляхом тестової трансформації плазмід.

Контрольні питання

1. Що таке компетентність клітин і яку роль вона відіграє в генетичній інженерії?
2. Чим відрізняється природна компетентність від штучної компетентності?
3. Які бактерії є природно компетентними і за яких умов вони можуть поглинати ДНК?
4. Що таке штучна компетентність і які методи використовуються для її отримання?
5. Як CaCl_2 допомагає клітинам стати компетентними для трансформації?
6. У чому полягають основні переваги та недоліки хімічної індукції компетентності?
7. Як електропорація дозволяє ДНК проникати в клітини?
8. Які переваги електропорації порівняно з хімічною індукцією компетентності?
9. Як перевіряється ефективність отриманих компетентних клітин?
10. Які проблеми можуть бути при отриманні компетентних клітин і як їх можна вирішити?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №8. Трансформація клітин.

Мета: ознайомитися з процесом трансформації клітин *E. coli* за допомогою методу теплового шоку; вивчити поняття трансформації, механізм, фактори, що впливають на ефективність, та засвоїти практичні навички проведення трансформації.

Теоретичні відомості

Поняття про трансформацію, трансфекцію і трансдукцію

Трансформація – це процес, за допомогою якого клітини, здебільшого бактерії, здатні поглинати позаклітинну ДНК з навколишнього середовища і включати її в свій геном або зберігати у вигляді плазмід. У природних умовах це є одним із механізмів горизонтального переносу генетичної інформації, що сприяє еволюції та адаптації, наприклад, до антибіотиків. У лабораторних умовах трансформацію проводять для введення плазмідної ДНК у бактерії, що є важливим етапом у клонуванні генів.

Трансфекція – це аналогічний процес, що відбувається у еукаріотичних клітинах. Він передбачає введення чужорідної ДНК у клітину за допомогою різних методів: хімічних (наприклад, ліпофекція), фізичних (електропорація) або за допомогою вірусів. Трансфекція часто використовується для експресії рекомбінантних білків у культурах еукаріотичних клітин.

Трансдукція – це процес, за якого генетична інформація переноситься в бактеріальну клітину за допомогою бактеріофагів — вірусів, які інфікують

бактерії. Бактеріофаги, що випадково захоплюють бактеріальну ДНК, можуть переносити її до іншої клітини під час наступної інфекції.

Механізм трансформації

Під час трансформації клітини поглинають позаклітинну ДНК після тимчасового підвищення проникності їх клітинної мембрани. Це може бути досягнуто шляхом хімічної обробки (наприклад, CaCl_2) або фізичної (електропорація). Після проникнення ДНК вона може інтегруватися в геном клітини або залишитися у вигляді плазміди, яка самостійно реплікується.

Різновиди методів трансформації

- **Хімічна трансформація** (метод теплового шоку) – полягає у використанні хлориду кальцію (CaCl_2) для зміни проникності клітинної мембрани бактерій. Після інкубації клітин із ДНК проводять короткочасний тепловий шок, що дозволяє ДНК проникнути через мембрану.

Переваги: простота, низька вартість, можливість проведення без спеціального обладнання.

Недоліки: нижча ефективність трансформації порівняно з електропорацією, особливо для великих плазмід або складних конструкцій.

- **Електропорація** – застосування коротких електричних імпульсів високої напруги для тимчасового створення пор у клітинній мембрані, через які проходить ДНК.

Переваги: висока ефективність трансформації, особливо для великих фрагментів ДНК.

Недоліки: потребує дорогого обладнання та більш ретельної підготовки клітин.

- **Термопорація** – поєднує хімічну обробку із короткочасним нагріванням, що сприяє підвищенню проникності мембран. Використовується переважно у дослідженнях із бактеріями.

Процедура трансформації

Процес хімічної трансформації включає такі кроки:

- Охолодження компетентних клітин у розчині CaCl_2 .
- Додавання плазмідної ДНК до суспензії клітин.
- Інкубація на льоду для формування комплексів ДНК з клітинними мембранами.
- Проведення теплового шоку (42°C протягом 45 секунд) для тимчасового підвищення проникності мембрани і проникнення ДНК.
- Відновлення клітин у рідкому середовищі LB для синтезу антибіотикорезистентних білків (якщо плазміда містить ген антибіотикорезистентності).
- Висів клітин на агаризоване середовище LB із відповідним антибіотиком для селективного вирощування трансформованих клітин.

Фактори, що впливають на ефективність трансформації

- **Концентрація ДНК.** Якщо кількість ДНК надто мала або надмірна, це може впливати на ефективність трансформації. Оптимальна концентрація – кілька десятків нанограм на трансформацію.
- **Стан клітин.** Клітини повинні перебувати в активній фазі росту ($OD_{600} \sim 0.4-0.6$), щоб ефективно приймати ДНК.
- **Температурні умови.** Точна температура і тривалість теплового шоку можуть значно впливати на результат трансформації.

Визначення ефективності трансформації

Ефективність трансформації визначається шляхом підрахунку колоній, що вирости на селективних середовищах. Результат виражається як кількість колоній на мікрограм введеної ДНК (колонієутворюючі одиниці – англ. colony-forming unit, CFU).

Проблеми та їх вирішення при трансформації клітин

- **Низька ефективність трансформації.** Можливо через неправильні умови (температура або концентрація ДНК) або невідповідну обробку клітин.
- **Мала кількість колоній.** Може бути результатом недостатнього часу відновлення клітин або проблем зі складом середовища.
- **Неправильний ріст клітин.** Це може бути наслідком забруднення середовища або недостатньої селекції.

Таким чином, трансформація є ключовим етапом у молекулярній біології та генетичній інженерії, що дозволяє вносити чужорідні гени до клітин для подальших маніпуляцій.

Практична частина

Матеріали і реактиви: компетентні клітин *E. coli*, плазмідна ДНК (наприклад, pUC19), середовище LB (рідке), агаризоване середовище LB з ампіциліном.

Обладнання: центрифуга (з можливістю роботи при 4°C), автоматичні піпетки (0,1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1000 мкл), стерильні наконечники, стерильні центрифужні пробірки (0,5 або 1,5 мл), холодильник (4°C), морозильник (-20°C), льодяна баня, водяна баня або термостат (42°C), інкубатор (37°C).

Хід роботи

1. Підготовка компетентних клітин:

- охолодіть компетентні клітини *E. coli* на льоду протягом 10 хвилин,
- додайте 50 нг плазмідної ДНК до 100 мкл компетентних клітин.

2. Інкубація:

- інкубуйте клітини з ДНК на льоду протягом 30 хвилин.

3. Тепловий шок:

- піддайте клітини тепловому шоку при 42°C протягом 45 секунд,
- швидко поверніть клітини на лід і інкубуйте протягом 2 хвилин.

4. Відновлення клітин:

- додайте 900 мкл рідкого середовища LB до клітин та інкубуйте їх при 37°C протягом 45-60 хвилин для відновлення.

5. Висів на селективне середовище:

- висійте 100 мкл суспензії клітин на агаризоване середовище LB з ампіциліном,
- інкубуйте при 37°C протягом ночі.

Очікувані результати

Після трансформації очікується ріст колоній *E. coli* на селективному середовищі, що вказує на успішну трансформацію клітин з плазмідною, яка містить ген стійкості до антибіотика.

Контрольні питання

1. Що таке трансформація і які клітини здатні до цього процесу в природних умовах?
2. Яка роль трансформації у природних умовах для бактерій?
3. Чим відрізняється трансфекція від трансформації?
4. Що таке трансдукція і як вона відбувається?
5. Які основні етапи механізму трансформації клітин?
6. У чому полягає суть хімічної трансформації клітин?
7. Які переваги і недоліки має метод хімічної трансформації порівняно з електропорацією?
8. Що таке електропорація і які її переваги при введенні ДНК у клітини?
9. Як відбувається процедура хімічної трансформації клітин *E. coli* методом теплового шоку?
10. Які фактори впливають на ефективність трансформації клітин?
11. Як визначають ефективність трансформації клітин?
12. Які основні проблеми можуть виникати під час трансформації і як їх вирішити?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №9. Нарощування нічних бактерійних культур для аналізу трансформантів.

Мета: висів бактерійних культур після трансформації на селективне середовище для отримання окремих колоній трансформантів та створення оптимальних умов для їхнього культивування з подальшим аналізом успішності трансформації.

Теоретичні відомості

Підбір оптимальних умов культивування залежно від штаму

Для успішного вирощування бактерій після трансформації важливо правильно підібрати умови культивування, що залежать від специфіки штаму бактерій. Основні фактори включають наступні.

Температура

- Штами *E. coli*, які найчастіше використовуються для клонування, зазвичай культивуються при температурі 37°C, що відповідає оптимальним умовам для їх швидкого росту.

- Для штамів із температурно-чутливими мутаціями (наприклад, mutant ts), може бути необхідна нижча температура, зазвичай 28-30°C, оскільки при 37°C ці штами можуть демонструвати знижену життєздатність.

Тривалість інкубації

- Нічне вирощування зазвичай триває 12-16 годин, що дозволяє отримати насичену бактеріальну культуру для подальшого аналізу. У випадку швидкоростучих штамів або індукованих культур, час може бути скоригований.

Аерація:

- Бактеріям необхідний постійний доступ до кисню для активного метаболізму, тому культури вирощують у рідкому середовищі з постійним струшуванням у шейкері зі швидкістю 180-250 обертів на хвилину. Це забезпечує максимальний контакт клітин з киснем і сприяє швидкому росту.

Різновиди селективних маркерів для відбору позитивних клонів

Селективні маркери використовуються для того, щоб з-поміж великої кількості бактерій відібрати лише ті, що були успішно трансформовані. Основні типи селективних маркерів:

Гени резистентності до антибіотиків

- Найчастіше для відбору трансформованих бактерій використовуються гени, що забезпечують стійкість до антибіотиків. Наприклад:

- ✓ *amp* (ген, що кодує β-лактамазу, забезпечує стійкість до ампіциліну),

- ✓ *kan* (ген стійкості до канаміцину),

- ✓ *cat* (ген стійкості до хлорамфеніколу).

- Бактерії, що несуть плазмиду з таким геном, можуть рости на середовищі, що містить відповідний антибіотик.

Маркерні гени

- Важливими є також візуальні маркери, такі як ген *lacZ*, який кодує фермент β-галактозидазу. Використання такого гена дозволяє проводити синьо-білий скринінг на середовищах із субстратом X-gal. Бактерії, що не були трансформовані, утворюють блакитні колонії, а трансформанти – білі.

Важливість позитивних та негативних контролів

Проведення трансформації завжди має супроводжуватися включенням контрольних груп для точної оцінки результатів.

Позитивний контроль

- Для підтвердження того, що процедура трансформації була проведена правильно, використовується позитивний контроль – бактерії, трансформовані плазмідною, яка вже раніше показала позитивний результат (наприклад, плазміда з геном резистентності до антибіотиків). Наявність колоній у позитивному контролі підтверджує, що умови трансформації були коректними.

Негативний контроль

- Негативний контроль включає бактерії, до яких не додавалася плазмідна ДНК. Відсутність росту на селективному середовищі підтверджує, що немає сторонніх факторів, які могли б призвести до помилкових позитивних результатів (наприклад, забруднення або спонтанна резистентність).

Правильний підбір умов культивування, використання селективних маркерів та проведення контрольних експериментів дозволяє надійно оцінити успішність трансформації та відбір трансформантів для подальшого аналізу.

Практична частина

Матеріали і реактиви: трансформовані клітин *E. coli*, середовище LB з ампіциліном (рідке), агаризоване середовище LB з ампіциліном, стерильні пробірки для інокуляції (2-3 мл середовища LB на пробірку), бактеріологічні петлі, шпатель для розподілу суспензії.

Обладнання: ламінарний бокс або спиртівка, автоматичні піпетки (0,1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1000 мкл), стерильні наконечники, холодильник (4°C), морозильник (-20°C), інкубатор (37°C), шейкер-інкубатор (37°C).

Хід роботи

1. Підготовка культури:

- за допомогою стерильної бактеріологічної петлі перенесіть трансформовані бактерії на селективне середовище (наприклад, LB з ампіциліном) для отримання окремих колоній,
- розподіліть суспензію рівномірно по поверхні чашки Петрі за допомогою шпателя.

2. Інкубація:

- помістіть чашки Петрі з висівами у термостат та інкубуйте при температурі 37°C на 12-16 годин до появи колоній.

3. Перенесення окремих колоній у рідке середовище:

- виберіть декілька окремих колоній за допомогою стерильної петлі і перенесіть їх у пробірки з 2-3 мл рідкого середовища LB (з відповідним антибіотиком).

4. Нічне вирощування культури:

- вирощуйте культури при температурі 37°C зі струшуванням на шейкері при 180-250 об/хв протягом ночі (12-16 годин).

5. Контрольні групи:

- підготуйте позитивний контроль, використовуючи бактерії з плазмідною ДНК, що вже підтверджена як успішна. Також підготуйте негативний контроль, інокулювавши клітини без плазмідної ДНК.

Очікувані результати

Через 12-16 годин інкубації ви отримаєте насичену культуру бактерій, що трансформовані плазмідною ДНК, на основі якої можна буде провести подальший аналіз (підтвердження трансформації або експресії гена).

Контрольні питання

1. Яка оптимальна температура культивування штамів *E. coli* і чому?
2. Чому для штамів з температурно-чутливими мутаціями рекомендується використовувати нижчу температуру, наприклад, 28-30°C?
3. Скільки зазвичай триває нічне вирощування бактеріальних культур і як цей час може змінюватися для різних штамів?

4. Чому забезпечення постійної аерації важливе для успішного культивування бактерій, і яку швидкість струшування зазвичай використовують у шейкері?

5. Які основні типи селективних маркерів використовуються для відбору трансформованих клітин?

6. Наведіть приклади генів резистентності до антибіотиків і поясніть, як вони використовуються для селекції трансформованих клітин.

7. Що таке синьо-білий скринінг і для чого використовують ген *lacZ*?

8. Яка роль позитивного контролю під час проведення трансформації клітин?

9. Чому важливо використовувати негативний контроль при трансформації і які результати можна очікувати від цього контролю?

10. Які фактори потрібно враховувати для успішного культивування бактерій після трансформації?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №10. Скринінг клонів.

Мета: аналіз трансформантів з рекомбінантною плазмідною, що містить вставку, методом ПЛР.

Теоретичні відомості

Поняття скринінгу

Скринінг – це процес ідентифікації та відбору клонів, які містять бажаний генетичний матеріал після трансформації. Після введення рекомбінантної плазмиди у бактерії лише деякі клітини успішно трансформуються та містять потрібну вставку. Завдяки скринінгу можна відокремити такі клітини від тих, що не містять вставки або взагалі не були трансформовані.

Типи і методи скринінгу

Колірний скринінг (синьо-білий скринінг)

- Цей метод використовує плазмиди з геном *lacZ*, який кодує фермент β -галактозидазу. У присутності субстрату X-gal β -галактозидаза гідролізує X-gal, внаслідок чого з'являється синій колір. Якщо в плазміді вставлено чужорідну ДНК, це перериває ген *lacZ*, і трансформанти, які містять вставку, утворюють білі колонії. Таким чином, сині колонії вказують на відсутність вставки, а білі – на наявність вставки.

Антибіотикорезистентний скринінг

- Використовує плазмиди, що містять гени резистентності до певних антибіотиків (наприклад, ампіциліну або канаміцину). Тільки ті клітини, які містять плазмиду, здатні рости на середовищі з відповідним антибіотиком. Це дозволяє відбирати клітини, які успішно трансформовані плазмідною, оскільки неклітинні бактерії не можуть вижити на такому середовищі.

Метод ПЛР

- ПЛР дозволяє точніше підтвердити наявність вставки в плазміді. Після вирощування колоній їхній ДНК-матеріал можна використовувати як матрицю для ПЛР. Специфічні праймери, що фланкують ділянку вставки, дозволяють

ампліфікувати фрагмент ДНК, що містить цільову вставку. ПЛР є високочутливим методом і дозволяє ідентифікувати навіть дуже малі кількості цільової ДНК.

Вибір методу скринінгу залежно від цілей експерименту

Метод скринінгу залежить від потреб експерименту. Якщо необхідний швидкий попередній скринінг, колірний або антибіотикорезистентний підходи є найкращими. Проте для підтвердження наявності вставки або її правильності використовується ПЛР-скринінг, який дає точні результати і може виявити навіть невеликі мутації або неправильну вставку.

Проблеми та їх вирішення при проведенні скринінгу клонів

Хибнопозитивні результати

- Деякі клітини можуть містити плазмиду без вставки або з неповною інсерцією гена. Це можна вирішити за допомогою ПЛР-скринінгу або секвенування, що дозволяє точно перевірити наявність і правильність вставки в плазмиду.

Низька ефективність скринінгу

- Може бути пов'язана з неправильною підготовкою компетентних клітин або неякісною плазмідною ДНК. Для підвищення ефективності трансформації слід оптимізувати умови культивування та забезпечити належну концентрацію ДНК і правильні температурні режими під час трансформації.

Скринінг є важливим етапом у клонуванні генів, що дозволяє ідентифікувати та відібрати бажані трансформанти для подальших експериментів і аналізів.

Практична частина

Матеріали і реактиви: трансформовані колонії бактерій (*E. coli* з рекомбінантною плазмідною), стерильна бідистильована вода, праймери (специфічні до ділянок, що фланкують вставку), ПЛР-мікс (готовий для використання, містить ДНК-полімеразу, дНТФ, буфер для полімерази, $MgCl_2$), 1% агарозний гель, барвник для візуалізації ДНК (наприклад, етидій бромід або альтернативи), ДНК-маркер, 1X буфер ТАЕ, пробірки для ПЛР (0,2 мл), стерильні пробірки (1,5 мл).

Обладнання: автоматичні піпетки (0,1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1000 мкл), стерильні наконечники, холодильник (4°C), морозильник (-20°C), термоциклер для проведення ПЛР, водяна баня або термоблок для лізису клітин (нагрівання до 95°C), система для гель-електрофорезу, транслюмінатор.

Хід роботи

1. Підготовка колоній для ПЛР:

- виберіть 3-5 окремих колоній трансформованих бактерій і перенесіть їх у пробірки з 10 мкл стерильної бідистильованої води,
- нагрійте пробірки при 95°C протягом 5 хвилин для лізису клітин і вивільнення ДНК.

2. Налаштування параметрів ПЛР:

- Підготуйте реакційну суміш для ПЛР:
 - ✓ 1 мкл матричної ДНК (лізис бактеріальних колоній)
 - ✓ 1 мкл кожного праймера (специфічні до ділянок, що фланкують вставку)
 - ✓ 12,5 мкл ПЛР-міксу (містить ДНК-полімеразу, дНТФ, буфер для полімерази)
 - ✓ 9,5 мкл стерильної бідистильованої води.
- Завантажте суміш у термоциклер і проведіть ампліфікацію згідно з наступною програмою (30 циклів):
 - ✓ денатурація: 95°C, 30 сек
 - ✓ відпал праймерів: 55°C, 30 сек
 - ✓ Елонгація: 72°C, 1 хв

3. Аналіз результатів ПЛР:

- проведіть електрофорез з використанням 1% агарозного гелі для перевірки наявності ампліконів,
- візуалізуйте результати за допомогою УФ-освітлення після фарбування гелю барвником.

Очікувані результати

Очікується, що у позитивних клонів буде спостерігатися смуга на гелі, яка відповідає розміру цільової вставки. Негативні клони не матимуть ампліфікаційного продукту.

Контрольні питання

1. Що таке скринінг у контексті клонування генів?
2. Для чого використовується процес скринінгу після трансформації бактерій?
3. Як визначити, чи містить бактеріальна колонія бажану вставку ДНК після трансформації?
4. У чому полягає принцип колірного скринінгу (синьо-білий скринінг) та як він використовується для ідентифікації трансформантів?
5. Які гени використовуються для антибіотикорезистентного скринінгу, і як цей метод дозволяє відбирати успішно трансформовані клітини?
6. Як ПЛР допомагає підтвердити наявність вставки в плазміді після трансформації?
7. У яких випадках доцільніше використовувати ПЛР-скринінг порівняно з іншими методами?
8. Які можуть бути проблеми під час проведення скринінгу клонів, і як їх можна вирішити?
9. Як хибнопозитивні результати можуть вплинути на точність скринінгу і як їх уникнути?
10. Чому важливо оптимізувати умови культивування та концентрацію ДНК для підвищення ефективності скринінгу?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №11. Довготривале зберігання бактерійних штамів.

Мета: ознайомитися з методами довготривалого зберігання бактерійних штамів, зокрема кріоконсервацією штамів *E. coli* з використанням гліцеролу, а також навчитися правильно проводити підготовку бактерій до заморожування.

Теоретичні відомості

Роль бактерійних штамів у клонуванні генів

Бактерійні штами, зокрема штами *E. coli*, є незамінними інструментами в молекулярній біології та генетичній інженерії. Вони виконують кілька важливих функцій у процесі клонування генів.

- **Експресія рекомбінантних білків.** Після введення плазмідної ДНК із чужорідними генами в бактерійні клітини, бактерії можуть експресувати білки, кодувані цими генами. Це є основою виробництва рекомбінантних білків для біотехнологічних, медичних та наукових потреб.

- **Зберігання плазмідної ДНК.** Штами *E. coli* можуть зберігати та реплікувати плазмиди – кільцеві молекули ДНК, що використовуються як вектори для переносу генетичного матеріалу. Це дозволяє зберігати бажаний генетичний матеріал і забезпечувати його стабільність під час численних поділів клітин.

- **Створення генетичних бібліотек.** Плазмиди з фрагментами геномної або кДНК можуть бути використані для створення генетичних бібліотек, які представляють собою колекції клонів з різними фрагментами ДНК. Це дозволяє дослідникам вивчати геноми організмів або знайти конкретний ген серед тисяч інших.

Методи консервації бактерійних штамів

Забезпечення довготривалого зберігання бактерійних штамів є важливим для збереження їхньої функціональності та генетичної стабільності. Основні методи консервації включають наступні.

- **Кріоконсервація.** Це найпоширеніший метод зберігання бактерій, при якому клітини заморожують при дуже низьких температурах (-80°C або нижче) з використанням кріопротекторів, таких як гліцерол. Гліцерол допомагає запобігти пошкодженню клітинних мембран, яке може виникнути через утворення льодових кристалів.

- **Ліофілізація (сублімаційне сушіння).** Бактерії спочатку заморожують, а потім висушують у вакуумі, що дозволяє зберігати їх у сухому вигляді при кімнатній температурі. Цей метод є ефективним для зберігання штамів на тривалий період без необхідності заморожування.

- **Зберігання на агаризованому середовищі.** Це метод короткотривалого зберігання, при якому бактерії підтримуються на живильному середовищі при 4°C протягом кількох тижнів. Цей метод не підходить для довготривалого зберігання, але є зручним для швидкого доступу до штамів.

Процедура підготовки бактерій для довготривалого зберігання

Процес підготовки бактерій для довготривалого зберігання включає кілька ключових етапів.

- **Вирощування культури.** Бактерії вирощують у рідкому середовищі (наприклад, LB) з відповідним антибіотиком до досягнення експоненційної фази росту ($OD_{600}=0.6-0.8$), що гарантує їх активний метаболізм і життєздатність.

- **Додавання кріопротекторів.** До вирощеної культури додають стерильний гліцерол у концентрації 15-20%, який допомагає зберегти цілісність клітин під час заморожування.

- **Заморожування.** Підготовлені зразки охолоджують і швидко заморожують у рідкому азоті або на сухому льоду. Після цього вони зберігаються при температурі -80°C .

Контроль якості штамів після тривалого зберігання

Після тривалого зберігання важливо перевірити життєздатність і стабільність збережених штамів, щоб переконатися, що вони не втратили своїх властивостей.

- **Розморожування та висів.** Розморожують невелику кількість зразка на льоду, після чого висівають на агаризоване середовище з антибіотиком. Це дозволяє перевірити, чи зберегли клітини свою життєздатність і генетичні властивості.

- **Аналіз плазмідної ДНК.** Відбирають колонії і проводять ПЛР або інші методи молекулярного аналізу для підтвердження наявності та цілісності плазміди.

Приклади штамів E. coli, які використовуються в генетичній інженерії

У генетичній інженерії використовують спеціальні штами *E. coli*, адаптовані для різних цілей:

- **DH5α:** один із найпоширеніших штамів, що використовується для клонування генів. Цей штам має високу ефективність трансформації та підтримує стабільну реплікацію плазмід.

- **BL21 (DE3):** штам, спеціально призначений для експресії рекомбінантних білків. Він містить T7 РНК-полімеразу, що активується ПТГ і дозволяє експресувати білки з промотором T7.

- **XL1-Blue:** штам, який широко застосовується для підвищення ефективності клонування, особливо для фрагментів ДНК, що важко клонуються.

- **JM109:** штам, який використовується для блакитно-білого скринінгу та високоефективної трансформації.

- **Top10:** штам, що забезпечує високий рівень трансформації та ідеально підходить для клонування складних плазмід і бібліотек ДНК.

Кожен із цих штамів має специфічні генетичні мутації, які роблять його придатним для певних експериментальних завдань у генетичній інженерії.

Практична частина

Матеріали і реактиви: культура *E. coli*, середовище LB (рідке), агаризоване середовище LB, стерильні пробірки (1,5 мл), стерильний 30% гліцерол, стерильна бідистильована вода, стерильні бактеріологічні шпателі.

Обладнання: ламінарний бокс або спиртівка, автоматичні піпетки (0,1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1000 мкл), стерильні наконечники, холодильник (4°C), морозильник (-20°C і -80°C), інкубатор (37°C), шейкер-інкубатор (37°C), центрифуга, лід або сухий лід для охолодження пробірок, рідкий азот.

Хід роботи

1. Вирощування бактеріальної культури:

- засійте бактерії *E. coli* у 5 мл рідкого середовища LB,
- інкубуйте культуру на шейкері при 37°C протягом 12–16 годин.

2. Підготовка для кріоконсервації:

- після нічного вирощування додайте 500 мкл вирощеної культури до стерильної пробірки,
- додайте 500 мкл 30% стерильного гліцеролу для отримання кінцевої концентрації 15%,
- ретельно перемішайте вміст пробірки.

3. Заморожування:

- охолодіть зразки на льоду або сухому льоду,
- швидко заморозьте пробірки у рідкому азоті або сухому льоду,
- зберігайте заморожені зразки при -80°C.

4. Контроль якості після заморожування:

- через певний час розморозьте зразок на льоду,
- висійте 100 мкл розмороженої суспензії на агаризоване середовище LB та інкубуйте при 37°C для перевірки росту колоній.

Очікувані результати

Отримання життєздатних бактерій після розморожування з подальшим ростом колоній на селективному середовищі.

Контрольні питання

1. Яку роль відіграють штами *E. coli*, у процесі клонування генів?
2. Як саме штами *E. coli* використовуються для експресії рекомбінантних білків?
3. Чому бактерійні штами є важливими для зберігання плазмідної ДНК?
4. Яке значення мають штами бактерій у створенні генетичних бібліотек?
5. Які методи консервації бактерійних штамів використовуються для довготривалого зберігання?
6. Яка функція гліцеролу під час кріоконсервації бактерій?
7. У чому полягає основна відмінність між кріоконсервацією та ліофілізацією як методами зберігання бактерій?
8. Як відбувається підготовка бактерій для довготривалого зберігання? Які етапи включає цей процес?
9. Яким чином контролюється якість бактерійних штамів після тривалого зберігання?

10. Як проводиться аналіз життєздатності бактерій після їх розморожування?

11. Які методи використовуються для перевірки стабільності плазмідної ДНК після тривалого зберігання?

ЧАСТИНА 2. ЕКСПРЕСІЯ ЧУЖОРІДНИХ ГЕНІВ В БАКТЕРІЙНИХ КЛІТИНАХ.

Експресія чужорідних генів у бактеріальних клітинах є ключовим процесом у молекулярній біології та біотехнології, що дозволяє отримувати рекомбінантні білки для досліджень, медицини та промислових застосувань. Бактерії, такі як *E. coli*, використовуються як платформа для експресії через їхню здатність швидко рости і продукувати великі кількості білків. Для цього чужорідний ген вбудовується у вектор, зазвичай плазмиду, яка потім трансформується у бактеріальні клітини. Після індукції експресії бактерії починають синтезувати потрібний білок, який можна ізолювати і використовувати в наукових або виробничих цілях.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №12. Клонування гена рекомбінантного білка.

Мета: ознайомитися з методами клонування генів для отримання рекомбінантних білків бактеріальними клітинами; провести трансформацію компетентних клітин *E. coli* плазмідною, що містить ген *Taq*-полімерази, та підтвердити успішність трансформації за допомогою рестрикційного аналізу.

Теоретичні відомості

Рекомбінантні білки – це білки, отримані шляхом введення штучно створених або модифікованих генів у клітини-організми, які зазвичай не синтезують ці білки. Процес отримання рекомбінантних білків полягає у використанні генетичних технологій для внесення гена, що кодує певний білок, у клітинну систему, яка згодом експресує цей білок у великих кількостях. Такі білки мають широкий спектр застосувань у науці, медицині та промисловості. Наприклад, рекомбінантний інсулін використовується для лікування діабету, фактори згортання крові допомагають у лікуванні гемофілії, а вакцини, такі як проти вірусу гепатиту В, створені на основі рекомбінантних білків.

Основні етапи отримання рекомбінантного білка

Клонування гена.

- На першому етапі ген, що кодує білок, ізолюється або синтезується хімічно. Цей ген вбудовується у вектор, зазвичай плазмиду – кільцеву молекулу ДНК, яка здатна автономно реплікуватися в клітині. Плазмиди використовуються як транспортний засіб для введення генетичного матеріалу в клітини.

- Вектори часто містять регуляторні елементи, такі як промотор, що керує експресією гена, та маркери для відбору трансформованих клітин.

Трансформація.

- Вектор із вставленим геном вводять у клітини бактерій, таких як *E. coli*. Процес введення ДНК у бактерії називається трансформацією. Для цього використовуються спеціально підготовлені клітини, які називаються компетентними. Вони мають здатність поглинати чужорідну ДНК із зовнішнього середовища.

- Після трансформації клітини починають розмножуватися, копіюючи вектор разом із внесеним геном.

Індукція експресії.

- Щоб почати синтез рекомбінантного білка, потрібен спеціальний індуктор. Наприклад, для білків, експресія яких регулюється промотором *lac*, використовується ізопропіл- β -D-тіогалактопіранозид (ІПТГ). Індуктори активують промотор, що запускає процес транскрипції гена в РНК і подальший синтез білка на рибосомах клітини.

- Експресія білка відбувається в контрольованих умовах, щоб максимізувати вихід білка і мінімізувати вплив на життєдіяльність клітин.

Очищення.

- Після індукції експресії рекомбінантний білок треба відокремити від інших білків клітини. Для цього використовують різні методи очищення, включаючи хроматографію. Одним з найбільш поширених підходів є використання афінних міток, таких як His-тег (гексагістидиновий тег), який приєднується до білка. Після цього білок можна очистити за допомогою метал-афінної хроматографії.

- Існують також інші методи, такі як іонообмінна хроматографія, гель-фільтрація або центрифугування, залежно від характеру білка та умов експерименту.

Аналіз.

- Після очищення рекомбінантний білок аналізується, для перевірки його чистоти, молекулярної маси та функціональності. Один із найбільш поширених методів – електрофорез у поліакриламідному гелі з додаванням лаурилсульфату натрію (англ. SDS-PAGE), який дозволяє візуально оцінити розмір білка.

- Інші методи, такі як Вестерн-блот (англ. Western blot), дозволяють виявити наявність білка за допомогою специфічних антитіл. Це дозволяє підтвердити, що отриманий білок є саме тим, який був запланований до експресії.

Значення рекомбінантних білків

Рекомбінантні білки відіграють важливу роль у різних галузях, таких як:

- **Біотехнологія:** ферменти, що використовуються у молекулярній біології, наприклад, Таq-полімераза для ПЛР.

- **Медицина:** рекомбінантний інсулін, фактори згортання крові, інтерферони, моноклональні антитіла.

- **Фармацевтика:** вакцини, виготовлені на основі рекомбінантних технологій, мають важливе значення для боротьби з різними інфекційними хворобами.

Практична частина

Матеріали і реактиви: компетентні клітини *E. coli*, плазміда з геном Таq-полімерази, середовище LB, рестрикційні ферменти для підтвердження наявності гена Таq-полімерази, буфер для проведення рестрикційного аналізу, агарозний гель, 1X буфер ТАЕ, буфер для нанесення зразків (на основі бромфенолового синього або інший), етидій бромід або інший барвник для візуалізації ДНК у гелі, ДНК-маркер, стерильна дистильована і бідистильована вода, чашки Петрі з агаризован середовищем LB та ампіциліном (100 мкг/мл).

Обладнання: ламінарний бокс, термостат (37°C), водяна баня або термостат (42°C), шейкер-інкубатор (37°C), центрифуга, автоматичні піпетки (0,1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1000 мкл), стерильні наконечники, система для гель-електрофорезу, транслюмінатор, таймер.

Хід роботи

1. Трансформація компетентних клітин плазмідною:

- змішати 100 мкл компетентних клітин з 1 мкл плазмід, що містить ген Таq-полімерази,
- інкубувати суміш на льоду протягом 30 хвилин,
- провести термошок при 42°C протягом 45 секунд для того, щоб ДНК проникла в клітини,
- швидко охолодити суміш на льоду,
- додати 900 мкл середовища LB та інкубувати клітини при 37°C протягом 1 години на шейкері для відновлення клітин.

2. Відбір трансформантів:

- висіяти клітини на агарові чашки з ампіциліном та інкубувати їх при 37°C протягом 16-18 годин,
- після інкубації перевірити наявність колоній, що вирости на селективному середовищі.

3. Підтвердження успішності трансформації:

- вибрати кілька колоній для подальшого аналізу,
- виділити плазмідну ДНК з трансформованих клітин та провести рестрикційний аналіз за допомогою ферментів, щоб підтвердити наявність гена Таq-полімерази у плазміді,
- результати рестрикційного аналізу перевірити за допомогою агарозного гель-електрофорезу.

Очікувані результати

Після трансформації на агарових чашках з ампіциліном повинні з'явитися колонії, що вирости завдяки наявності гена стійкості до антибіотика, який міститься у плазміді. Підтвердження успішності трансформації буде проведено за допомогою рестрикційного аналізу.

Контрольні питання

1. Що таке рекомбінантні білки та як їх отримують?
2. Яке значення мають рекомбінантні білки у сучасній біотехнології та медицині? Наведіть приклади.

3. Опишіть процес клонування гена для отримання рекомбінантного білка. Яку роль відіграють плазміди у цьому процесі?
4. Що таке індукція експресії рекомбінантного білка і які індуктори для цього використовуються?
5. Які фактори впливають на процес індукції експресії рекомбінантного білка?
6. Чому необхідно очищувати рекомбінантний білок після його експресії? Які методи очищення використовуються?
7. Що таке His-тег і як він допомагає в очищенні рекомбінантних білків?
8. Які методи використовуються для перевірки чистоти та якості отриманого рекомбінантного білка?
9. Які переваги має використання рекомбінантних білків у медицині? Наведіть приклади таких білків.
10. Які рекомбінантні білки використовуються у діагностиці та лікуванні захворювань?
11. Яку роль відіграють рекомбінантні білки у розробці вакцин? Наведіть приклади.
12. Чому важливо мати контроль над процесом експресії рекомбінантного білка в клітинах?
13. Як ферменти, отримані з рекомбінантних білків, використовуються у молекулярній біології?
14. Які інші галузі, окрім медицини та фармацевтики, використовують рекомбінантні білки?
15. Як розвиток технологій рекомбінантних білків вплинув на сучасну біотехнологію та фармацевтику?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №13. Індукція генної експресії.

Мета: ознайомитися з методами індукції генної експресії в бактеріальних клітинах, зокрема за допомогою ізопропіл- β -D-тіогалактопіранозиду; провести індукцію експресії гена Таq-полімерази у клітинах *E. coli* та зібрати проби для подальшого аналізу білка.

Теоретичні відомості

Оптимізація умов культивування трансформованих клітин

Після трансформації бактерій, таких як *E. coli*, важливо створити оптимальні умови для вирощування та індукції експресії рекомбінантного білка. Це забезпечує високу ефективність синтезу білка та зменшує ризик утворення неправильно згорнутих або неактивних білків. Основними факторами, що впливають на цей процес, є температура культивування, поживні середовища та індукційні агенти.

1. Температура. Бактерії *E. coli* зазвичай культивують при температурі 37°C, що сприяє швидкому росту клітин. Однак для синтезу рекомбінантних білків з метою мінімізації утворення неправильно згорнутих білкових структур часто використовують нижчі температури (18-30°C).

- *Температура 37°C* забезпечує швидкий ріст клітин і часто використовується на етапі накопичення біомаси до моменту індукції.

- *Знижена температура (18-30°C)* під час індукції експресії сприяє правильному згортанню білків та зменшує ризик утворення нерозчинних включень (тілець включень). Це особливо важливо для синтезу складних або великих білків.

2. Середовище. Поживне середовище для вирощування бактерій також відіграє ключову роль у забезпеченні ефективної експресії білка. Найчастіше використовуються такі середовища:

- *Лури-Бертані (LB) середовище:* стандартне середовище для культивування *E. coli*, що містить всі необхідні поживні речовини для росту клітин.

- *спеціальні середовища з підвищеним вмістом поживних речовин:* для максимізації експресії рекомбінантних білків використовують середовища, збагачені амінокислотами або іншими необхідними компонентами для активного синтезу білків.

Ці середовища допомагають збільшити вихід білка та підтримують активний метаболізм клітин.

3. Щільність бактерійної суспензії. Індукція експресії рекомбінантного білка зазвичай проводиться тоді, коли клітини досягають експоненційної фази росту – це відбувається при оптичній густині культури $OD_{600} \sim 0,6-0,8$.

- $OD_{600} \sim 0,6-0,8$ відповідає активній фазі росту клітин, коли бактерії здатні максимально ефективно виробляти білки після індукції.

- Використання цієї фази дозволяє зберегти здоровий ріст клітин і мінімізувати стресові умови, які могли б вплинути на зниження продуктивності білка.

Індукція експресії генів за допомогою ІПТГ

Ізонпропіл-β-D-тіогалакто-піранозид (ІПТГ) – це хімічний індуктор, що використовується для активації промоторів *lac*, зокрема промотора T7, який часто застосовується для експресії рекомбінантних білків. ІПТГ є структурним аналогом лактози, але він не метаболізується клітинами, що робить його стійким індуктором тривалої дії.

1. Механізм дії ІПТГ. ІПТГ зв'язується з білком-репресором *lac*, блокуючи його дію, і дозволяє активувати промотор. Це дозволяє розпочати транскрипцію гена та синтез рекомбінантного білка. Після зв'язування ІПТГ з репресором, промотор стає активним і запускає процес синтезу мРНК, що кодує рекомбінантний білок.

2. Концентрація ІПТГ. Концентрація ІПТГ для індукції варіюється залежно від системи експресії та бажаного рівня білка.

- $0,1-1$ мМ ІПТГ зазвичай використовується для активації системи експресії.

- Вибір концентрації залежить від експериментальних умов: нижчі концентрації можуть використовуватися для зменшення рівня токсичності або уникнення надмірної експресії білка, тоді як вищі концентрації забезпечують швидку індукцію.

Контроль експресії та збір проб

Контроль умов індукції є важливим для визначення оптимальних параметрів експресії та подальшого аналізу білка.

1. Час індукції. Тривалість індукції варіюється від 2 до 6 годин або навіть більше, залежно від характеру білка та експериментальних цілей. Час індукції впливає на кількість синтезованого білка. Довша індукція може призвести до накопичення білка, але також збільшує ризик утворення тілець включень.

2. Збір проб. Зразки клітинної суспензії збираються перед індукцією (як контроль) і через певні часові проміжки після початку індукції (наприклад, через 2, 4 та 6 годин). Це дозволяє оцінити динаміку експресії білка та виявити оптимальний час для його збору.

3. Аналіз білка. Після індукції білок аналізується для оцінки рівня його експресії та якості. Один із найбільш поширених методів аналізу – електрофорез у поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію (англ. SDS-PAGE), який дозволяє візуалізувати розмір та рівень експресії білка.

- **SDS-PAGE** дає можливість перевірити, чи було синтезовано білок належного розміру та в достатній кількості.

- **Вестерн-блот** може використовуватися для специфічного виявлення білка за допомогою антитіл, що підтверджує його наявність та правильність експресії.

Оптимізація умов культивування та індукції рекомбінантного білка є критичним кроком для досягнення високої ефективності синтезу функціональних білків. Контроль температури, складу поживного середовища, часу індукції та концентрації ІПТГ дозволяє регулювати процес експресії, що знижує ризик утворення нефункціональних білків і підвищує якість отриманого продукту.

Теоретична частина

Матеріали і реактиви: трансформовані клітини *E. coli* з плазмідною, що містить ген Таq-полімерази, середовище LB з ампіциліном (100 мкг/мл), розчин ІПТГ (кінцева концентрація 0,5 мМ), центрифужні пробірки (1,5 мл або 2 мл).

Обладнання: ламінарний бокс, шейкер-інкубатор (30°C або 37°C), центрифуга, автоматичні піпетки (0,1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1000 мкл), стерильні наконечники, таймер, спектрофотометр, морозильник (-20°C).

Хід роботи

1. Підготовка клітин:

- виростити трансформовані клітини *E. coli* у 100 мл середовища LB з ампіциліном при температурі 37°C,
- коли оптична густина культури досягне OD₆₀₀ ~0,6-0,8, додати ІПТГ до кінцевої концентрації 0,5 мМ для індукції експресії гена Таq-полімерази.

2. Індукція експресії:

- після додавання ІПТГ продовжити інкубацію культури при 30°C або 37°C протягом 4 годин або довше, залежно від необхідного рівня експресії.

3. Збір проб для подальшого аналізу:

- перед індукцією (контроль) відібрати 1 мл культури,

- після індукції ППТГ відбирати 1 мл культури через 1, 2, 3 і 4 години.
- центрифугувати проби при 8000 об/хв протягом 5 хвилин для осадження клітин. Осад зберігати при -20°C або лізувати для подальшого аналізу білка.

Контрольні питання

1. Яким чином температура впливає на ріст клітин *E. coli* і експресію рекомбінантних білків?
2. Які температурні режими використовуються для культивування бактерій та індукції білків, і чому можуть бути корисними нижчі температури (18-30°C) для індукції?
3. Яке середовище найчастіше використовується для вирощування *E. coli* при експресії білків? Які його переваги?
4. Чому використання спеціальних середовищ з підвищеним вмістом поживних речовин може бути важливим для експресії рекомбінантних білків?
5. Що таке OD₆₀₀ і чому важливо проводити індукцію експресії білка при OD₆₀₀ ~0,6-0,8?
6. Чому важливо проводити індукцію білка в експоненційній фазі росту клітин?
7. Як ППТГ використовується для індукції експресії рекомбінантних білків? Опишіть механізм його дії.
8. Чим ППТГ відрізняється від лактози, і чому ППТГ використовується як індуктор для промоторів *lac* і T7?
9. Які концентрації ППТГ зазвичай використовуються для індукції і як вибір концентрації впливає на експресію білка?
10. Чому важливо збирати проби на різних етапах індукції? Як це допомагає визначити оптимальний час для збору білка?
11. Який метод найчастіше використовується для аналізу білка після індукції? Яку інформацію надає метод SDS-PAGE?
12. Чому важливо використовувати Вестерн-блот для підтвердження наявності рекомбінантного білка?
13. Які фактори слід контролювати для досягнення високої ефективності синтезу функціональних рекомбінантних білків?
14. Яку роль відіграє контроль температури, складу середовища, часу індукції та концентрації ППТГ в оптимізації експресії білка?
15. Як можна знизити ризик утворення нефункціональних білків під час експресії рекомбінантних білків?
16. Чому довший час індукції не завжди є оптимальним для експресії білків?
17. Як різні методи аналізу допомагають оцінити якість та кількість отриманого рекомбінантного білка після індукції?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №14. Виділення та очищення рекомбінантного білка.

Мета: ознайомитися з методами виділення та очищення рекомбінантних білків із бактеріальних клітин; провести виділення та очищення рекомбінантної Taq-полімерази з клітинного лізату методом теплового осадження та афінної хроматографії.

Теоретичні відомості

Методи лізису бактерійних клітин

Для виділення рекомбінантних білків із бактерійних клітин необхідно розірвати клітинну стінку, забезпечуючи доступ до внутрішньоклітинного вмісту, включаючи цільові білки. Існують різні методи лізису, які використовуються в залежності від типу клітин, природи білка та доступного обладнання. Лізис можна провести за допомогою фізичних або хімічних методів.

1. Фізичні методи лізису. Фізичні методи лізису клітин забезпечують механічне руйнування клітинної стінки, що дозволяє ефективно вивільняти рекомбінантні білки.

- **Ультразвукова дезінтеграція (сонікація).** Ультразвукові хвилі високої частоти застосовуються для руйнування клітинної стінки бактерій шляхом створення механічних коливань у рідкому середовищі. Це один із найпоширеніших методів, який використовується в лабораторіях для лізису бактеріальних клітин.

Переваги: швидкість процесу, висока ефективність лізису, особливо при роботі з великими об'ємами.

Недоліки: може призводити до локального перегрівання, що може пошкоджувати білки, тому важливо використовувати охолодження під час процедури.

- **Французький прес.** Цей метод передбачає пропускання клітинної суспензії через вузький отвір під високим тиском (приблизно 20 000 psi). Це викликає різке зниження тиску та руйнування клітинних стінок.

Переваги: ефективність для великих об'ємів і високий рівень лізису.

Недоліки: необхідне спеціалізоване обладнання, метод трудомісткий для малих зразків.

- **Заморожування/відтавання.** Послідовне заморожування клітин при низьких температурах (часто при -80°C) і їх відтавання при кімнатній температурі руйнує клітинну стінку через утворення кристалів льоду, що розривають мембрани.

Переваги: простота та відсутність потреби у спеціалізованому обладнанні.

Недоліки: не завжди ефективний для повного лізису клітин, потребує кількох циклів заморожування/відтавання.

2. Хімічні методи лізису. Хімічні методи передбачають використання речовин, що безпосередньо впливають на клітинну стінку або мембрану, руйнуючи їх і вивільняючи білки.

- **Лізоцим.** Лізоцим – це фермент, який гідролізує пептидоглікан клітинної стінки бактерій, руйнуючи її структуру. Він використовується для лізису грам-позитивних і грам-негативних бактерій.

Переваги: специфічний і м'який метод, який мінімізує пошкодження білків.

Недоліки: може бути недостатнім для лізису без додаткових методів (наприклад, осмотичного шоку або ультразвукової дезінтеграції).

- **Детергенти (додecilсульфат натрію, Triton X-100).** Детергенти руйнують ліпідний бішар клітинної мембрани, роблячи її проникною для водорозчинних білків.

Переваги: ефективність у руйнуванні клітинних мембран.

Недоліки: можуть денатурувати білки, що робить цей метод менш підходящим для отримання активних білків.

Методи очищення рекомбінантного білка

Після лізису клітин отриманий лізат містить суміш білків, нуклеїнових кислот та інших клітинних компонентів. Для виділення рекомбінантного білка застосовують різні методи очищення. Основні з них – це хроматографічні методи, що дозволяють ефективно відділити цільовий білок від інших білкових та небілкових компонентів.

1. Афінна хроматографія. В основі методу лежить специфічна взаємодія між білком і лігандом, що зв'язаний із сорбентом на колонці. Наприклад, такий сорбент як Ni-NTA (нікель-нітрилотриоцтова кислота) використовується для очищення рекомбінантних білків з гістидиновими мітками (His-тег). Він містить іони Ni^{2+} , які зв'язуються з білками, що містять полігістидинову послідовність (6xHis), забезпечуючи швидку та ефективну очистку.

Переваги: висока специфічність і ефективність, можливість швидкого очищення великих кількостей білка.

Недоліки: метод залежить від правильного розташування тегу та може потребувати додаткових кроків для видалення тегу з білка після очищення.

2. Іонообмінна хроматографія. Цей метод розділяє білки на основі їх заряду. У випадку позитивно заряджених білків вони зв'язуються з аніонною смолою, а негативно заряджені білки – з катіонною. Для елюювання білків використовують зміну концентрації солі в буфері.

Переваги: висока роздільна здатність, можливість очищення навіть без спеціальних афінних тегів.

Недоліки: потребує оптимізації для кожного білка, залежить від рН буфера та концентрації солей.

3. Гель-фільтраційна хроматографія. Цей метод розділяє білки на основі їх молекулярної маси. Білки проходять через пористий матеріал, де більші молекули виходять з колонки швидше, ніж малі, оскільки не проникають у пори.

Переваги: ефективний для розділення білків різних розмірів і для видалення низькомолекулярних домішок.

Недоліки: метод менш ефективний для складних сумішей білків, тривалий у виконанні.

4. Осадження білків. Осадження білків може бути досягнуто за допомогою сульфату амонію, що знижує розчинність білків, або теплового осадження, що викликає випадіння білків при підвищеній температурі.

Переваги: простота і низька вартість, придатність для концентрації білків.

Недоліки: низька специфічність, потреба в додаткових кроках очищення.

Лізис бактерійних клітин та очищення рекомбінантного білка є важливим етапами в біотехнологічних процесах. Вибір методів лізису залежить від типу клітин і чутливості білка до різних фізичних та хімічних впливів. Очищення білків за допомогою хроматографічних методів дозволяє отримати цільовий білок високої чистоти, що є критично важливим для подальшого використання в наукових або промислових цілях.

Практична частина

Матеріали і реактиви: трансформовані клітини *E. coli* з плазмідною, що містить ген *Taq*-полімерази, лізоцим (0,5 мг/мл), буфер для лізису (наприклад, 50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, pH 8.0), буфер з низькою концентрацією імідозолу (20 mM), буфер з високою концентрацією імідозолу (250 mM), буфер для афінної хроматографії (Ni-NTA) для зв'язування His-тегрованої *Taq*-полімерази, стерильна бідистильована вода, центрифужні пробірки (1,5 мл або 2 мл), сорбент Ni-NTA.

Обладнання: центрифуга, термостат або водяна баня (70°C), ультразвуковий дезінтегратор (сонікатор), апарат для афінної хроматографії, льодяна баня, автоматичні піпетки (0,1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1000 мкл), стерильні наконечники, таймер, морозильник (-20°C).

Хід роботи

1. Лізис клітин:

- після індукції ІПТГ (як описано у попередній лабораторній роботі), відібрати клітини та центрифугувати їх при 8000 об/хв протягом 10 хвилин,
- ресуспендувати осад клітин у буфері для лізису та додати лізоцим (0,5 мг/мл),
- лізувати клітини за допомогою ультразвукової дезінтеграції (10 циклів по 10 секунд з охолодженням на льоду між циклами).

2. Теплове осадження:

- нагріти лізат до 70°C протягом 10-15 хвилин для осадження більшості бактеріальних білків, оскільки *Taq*-полімераза термостабільна і залишиться в розчині,
- центрифугувати лізат при 12000 об/хв протягом 20 хвилин для видалення осаду.

3. Афінне очищення з використанням Ni-NTA:

- пропустити термооброблений лізат через Ni-NTA колонку, яка специфічно зв'язується з His-тегрованою *Taq*-полімеразою,
- промити колонку буфером з низькою концентрацією імідозолу (20 mM) для видалення неспецифічно зв'язаних білків,
- елюювати білок з колонки буфером з високою концентрацією імідозолу (250 mM).

- зібрати фракції з очищеним білком для подальшого аналізу.

Очікувані результати

Очікується, що після теплового осадження більшість бактеріальних білків осадиться, тоді як Таq-полімераза залишиться в розчині. Афінна хроматографія повинна дозволити отримати високочистий рекомбінантний білок, що підтвердиться після проведення SDS-PAGE.

Контрольні питання

1. Які основні фізичні методи лізису бактерійних клітин використовуються у лабораторіях?
2. Як працює ультразвукова дезінтеграція (сонікація) і які її переваги та недоліки?
3. Що таке французький прес і як він використовується для лізису бактерійних клітин?
4. Чому метод заморожування/відтавання може бути ефективним для руйнування клітинних стінок бактерій? Які його переваги та недоліки?
5. Чим відрізняються фізичні методи лізису клітин від хімічних?
6. Як лізоцим сприяє лізису клітин і які переваги має використання лізоциму для лізису бактерій?
7. Які хімічні речовини використовуються для лізису клітин за допомогою детергентів? Як вони впливають на клітинну мембрану?
8. Чому детергенти можуть бути небажаними для виділення активних білків?
9. Які фактори необхідно враховувати при виборі методу лізису бактерійних клітин?
10. Що таке афінна хроматографія і як вона використовується для очищення рекомбінантних білків?
11. Які особливості має His-тег і як він полегшує очищення білків за допомогою афінної хроматографії?
12. Чим відрізняється іонообмінна хроматографія від афінної? Коли варто використовувати іонообмінну хроматографію?
13. Як працює гель-фільтраційна хроматографія і чому вона ефективна для розділення білків за розміром?
14. Які переваги та недоліки має осадження білків, наприклад, за допомогою сульфату амонію?
15. Як методи очищення білків впливають на кінцеву чистоту та активність рекомбінантного білка?
16. Які етапи очищення рекомбінантного білка можна використовувати після лізису клітин для досягнення високої чистоти білка?
17. Чому важливо ретельно вибирати метод очищення білків після лізису бактерійних клітин?
18. Як вибір методу лізису може вплинути на якість і кількість виділеного рекомбінантного білка?
19. Які недоліки можуть виникнути при використанні хімічних методів лізису для виділення чутливих до денатурації білків?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №15. Кількісний і якісний аналіз рекомбінантного білка.

Мета: ознайомитися з методами кількісного та якісного аналізу рекомбінантних білків; провести визначення концентрації рекомбінантної Taq-полімерази методом Бредфорда та оцінити її чистоту за допомогою електрофорезу в ПААГ.

Теоретичні відомості

Оцінка чистоти білка

Оцінка чистоти білка є важливим етапом після його виділення та очищення. Для цього використовуються різні методи, що дозволяють аналізувати склад білкових сумішей, ідентифікувати цільовий білок та оцінити рівень домішок.

1. Електрофорез у поліакриламідному гелі (ПААГ) з додецилсульфатом натрію (SDS-PAGE). SDS-PAGE – це один із найпоширеніших методів для оцінки чистоти білка та його молекулярної маси. Цей метод базується на тому, що в умовах денатурації (в присутності детергенту додецилсульфату натрію або SDS) білки набувають негативного заряду і розділяються в гелі відповідно до їх молекулярної маси під дією електричного поля.

Принцип методу

SDS зв'язується з білками, надаючи їм негативний заряд пропорційно їх молекулярній масі. Білки, мігруючи через поліакриламідний гель, розділяються залежно від їхнього розміру: менші молекули переміщуються швидше, а більші – повільніше.

Фарбування білків

Після завершення електрофорезу білки фарбуються барвниками (наприклад, Кумасі діамантовий блакитний), що дозволяє візуалізувати смуги білків на гелі. Якщо на гелі спостерігається лише одна смуга, це вказує на високу чистоту білка. Якщо є кілька смуг, це може свідчити про наявність домішок або інших білкових компонентів.

Переваги: метод дозволяє одночасно оцінити молекулярну масу та чистоту білка; відносно простий у виконанні та не потребує складного обладнання.

Недоліки: метод не завжди дозволяє точно оцінити дуже низькі рівні забруднень; може бути чутливим до умов гелевої системи, таких як концентрація поліакриламідну.

2. Вестерн-блот (англ. Western blot). Вестерн-блот є додатковим методом до SDS-PAGE і використовується для специфічного виявлення білків за допомогою антитіл. Після розділення білків за допомогою електрофорезу вони переносяться з гелю на мембрану (зазвичай нітроцелюлозну або PVDF). Далі на мембрану наносяться антитіла, специфічні до цільового білка, що дозволяє виявити і підтвердити його присутність.

Принцип методу

Після переносу білків на мембрану відбувається інкубація з первинними антитілами, що специфічно зв'язуються з цільовим білком. Далі застосовують вторинні антитіла, які взаємодіють з первинними і несуть фермент або флуоресцентний міток, який дає сигнал, видимий на мембрані після додавання субстрату.

Переваги: висока специфічність: дозволяє виявити конкретний білок серед складної білкової суміші; можливість кількісного аналізу шляхом вимірювання інтенсивності сигналу.

Недоліки: вимагає більше часу і є складнішим у виконанні порівняно з SDS-PAGE; потребує спеціальних антитіл, що може збільшувати вартість експерименту.

Визначення концентрації білка

Після виділення білка необхідно оцінити його концентрацію. Існують різні методи для кількісної оцінки білків, що використовуються залежно від чутливості, точності та наявності реагентів.

1. Метод Бредфорда. Це колориметричний метод, що ґрунтується на взаємодії барвника Кумасі діамантовий блакитний з білками. При зв'язуванні з білком барвник змінює свій колір, і інтенсивність забарвлення прямо пропорційна концентрації білка.

Принцип методу

Барвник Кумасі взаємодіє з основними амінокислотами білків, змінюючи свій спектр поглинання. Інтенсивність забарвлення вимірюється за допомогою спектрофотометра при довжині хвилі 595 нм.

Переваги: швидкий і простий метод, який не потребує складних процедур; чутливий до широкого діапазону концентрацій білка.

Недоліки: чутливість методу залежить від складу білка; він може давати неточні результати для білків із низьким вмістом аргініну, лізину або гістидину.

2. Метод Лоурі. Метод Лоурі базується на взаємодії білків із купрум-іонами та реактивом Фоліна, що дає кольорову реакцію, яку можна виміряти на спектрофотометрі.

Принцип методу

Білки відновлюють іони міді (Cu^{2+} до Cu^{+}) у лужному середовищі, а реактив Фоліна далі реагує з купрум-іонами, утворюючи синій комплекс. Інтенсивність забарвлення пропорційна кількості білка і вимірюється при 750 нм.

Переваги: висока точність і чутливість до малих кількостей білка.

Недоліки: метод складніший і триваліший, вимагає більше реагентів; чутливий до наявності домішок, таких як детергенти чи буфери, які можуть впливати на реакцію.

3. Спектрофотометрія. Пряме вимірювання абсорбції білків при довжині хвилі 280 нм є швидким методом оцінки їх концентрації. Цей метод засновано на поглинанні світла ароматичними амінокислотами – триптофаном і тирозином.

Принцип методу

Ароматичні амінокислоти в білках (триптофан, тирозин, фенілаланін) поглинають ультрафіолетове світло при довжині хвилі 280 нм. Чим більше цих амінокислот у складі білка, тим вища абсорбція.

Переваги: простота й швидкість: метод не потребує додаткових реагентів.

Недоліки: метод менш точний для білків з низьким вмістом ароматичних амінокислот; може бути складно виміряти концентрацію білка у зразках із домішками, що також поглинають світло при 280 нм.

Оцінка чистоти білка та його концентрації є критично важливими етапами у біохімічних дослідженнях і виробничих процесах. Методи, такі як SDS-PAGE і Вестерн-блот, дозволяють візуально оцінити чистоту та наявність цільового білка, тоді як методи Бредфорда, Лоурі та спектрофотометрія забезпечують кількісне визначення концентрації білка. Кожен метод має свої переваги і недоліки, що впливає на вибір методу залежно від експериментальних умов і вимог.

Практична частина

Матеріали і реактиви: зразки рекомбінантної Taq-полімерази, стандарти білка (альбумін) для побудови калібрувальної кривої (0,1–1 мг/мл), Laemmli буфер (SDS, гліцерин, Tris-HCl, β -меркаптоетанол, бромфеноловий синій), поліакриламідний гель (наприклад, 12% ПААГ), електрофоретичний буфер (Tris-гліцин-SDS), барвник для візуалізації білків (наприклад, Кумасі діамантовий блакитний), розчин для фіксації білків у гелі (ацетон або етанол), розчин Кумасі діамантовий блакитний для методу Бредфорда, 1X PBS, бідистильована вода, білковий маркер (маркер молекулярної маси).

Обладнання: система для гель-електрофорезу (SDS-PAGE), гель-документатор для візуалізації білкових смуг після електрофорезу, спектрофотометр, автоматичні піпетки (0,1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1000 мкл), стерильні наконечники, центрифуга, шейкер-інкубатор, термостат або водяна баня, морозильник (-20°C), холодильник (4°C).

Хід роботи

1. Підготовка зразків для SDS-PAGE:

- розвести зразки білка та білкові стандарти в електрофоретичному буфері,
- завантажити зразки у поліакриламідний гель і провести електрофорез при 150 В протягом 1-2 годин,
- після завершення електрофорезу вийняти гель і провести його фарбування, щоб візуалізувати білкові смуги.

2. Проведення кількісного аналізу методом Бредфорда:

- приготувати серію стандартних розчинів білка альбуміну для калібрувальної кривої (0,1–1 мг/мл),
- до кожного зразка (стандартів і зразка Taq-полімерази) додати робочий розчин барвника Бредфорда,
- інкубувати суміші при кімнатній температурі протягом 5-10 хвилин,
- виміряти оптичну густину кожного зразка при 595 нм на спектрофотометрі,

- за допомогою калібрувальної кривої визначити концентрацію білка у зразку Таq-полімерази.

3. Побудова калібрувальної кривої (програмне забезпечення MS Excel):

- побудувати графік залежності оптичної густини від концентрації стандартного білка.
- використати рівняння калібрувальної кривої для визначення концентрації білка в невідомих зразках.

Очікувані результати

На гелі SDS-PAGE має бути видно одну або кілька смуг, що відповідають білку Таq-полімерази, і свідчить про успішне очищення білка. Метод Бредфорда повинен надати кількісну оцінку концентрації білка у зразках Таq-полімерази, яка буде визначена за допомогою калібрувальної кривої.

Контрольні питання

1. Що таке SDS-PAGE і як він використовується для оцінки чистоти білка?
2. Яким чином додецилсульфат натрію (SDS) допомагає розділити білки за молекулярною масою?
3. Як молекулярна маса білка впливає на його міграцію в поліакриламідному гелі під час SDS-PAGE?
4. Чому після електрофорезу білки фарбують барвниками? Які барвники найчастіше використовуються для фарбування білків у гелі?
5. Що означає наявність однієї чіткої смуги на гелі після SDS-PAGE?
6. Які обмеження має метод SDS-PAGE щодо оцінки чистоти білка?
7. Що таке Вестерн-блот і як він відрізняється від SDS-PAGE?
8. Який принцип роботи Вестерн-блоту і як він дозволяє ідентифікувати специфічні білки у зразку?
9. Які антитіла використовуються у Вестерн-блоті і для чого застосовують вторинні антитіла?
10. Які переваги та недоліки Вестерн-блоту порівняно з SDS-PAGE?
11. Що таке метод Бредфорда і як він використовується для визначення концентрації білка?
12. Чому барвник Кумасі змінює колір при взаємодії з білками і як це дозволяє оцінювати концентрацію білка?
13. Які переваги та недоліки методу Бредфорда для визначення концентрації білка?
14. У чому полягає метод Лоурі для оцінки концентрації білків і які хімічні реакції використовуються в цьому методі?
15. Чому метод Лоурі є більш чутливим, ніж метод Бредфорда, і які його обмеження?
16. Як вимірюють концентрацію білка за допомогою спектрофотометрії при довжині хвилі 280 нм?
17. Чому триптофан і тирозин поглинають світло при довжині хвилі 280 нм і як це використовується для оцінки концентрації білка?

18. Які білки можуть не давати точних результатів при використанні спектрофотометрії при 280 нм?

19. Які фактори можуть впливати на точність спектрофотометрії при оцінці концентрації білка у зразках?

20. Як вибір методу для оцінки концентрації або чистоти білка залежить від конкретних експериментальних умов?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №16. Перевірка функціональної активності рекомбінантного білка.

Мета: ознайомитися з методами перевірки функціональної активності рекомбінантних білків; провести оцінку функціональної активності Taq-полімерази за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції.

Теоретичні відомості

Методи перевірки функціональної активності рекомбінантного білка

Функціональна активність рекомбінантного білка визначається його здатністю виконувати специфічну біологічну функцію, таку як каталіз хімічних реакцій, зв'язування лігандів або взаємодія з іншими молекулами. Оцінка функціональної активності є ключовим етапом після отримання та очищення білка, щоб переконатися, що він не тільки експресується, але й зберігає свою активність. Існує кілька основних методів для перевірки функціональної активності рекомбінантного білка.

1. Ензиматичний аналіз. Ензиматичний аналіз використовується для оцінки активності ферментів шляхом вимірювання швидкості каталізованих реакцій. Цей метод особливо важливий для ферментів, таких як Taq-полімераза, які широко застосовуються в молекулярній біології.

Принцип методу

Оцінюється здатність ферменту каталізувати певну реакцію, зазвичай з використанням специфічного субстрату. Швидкість реакції або кількість продукту визначають за допомогою спектрофотометричних або інших методів.

Для Taq-полімерази: Функціональна активність цього ферменту перевіряється в контексті полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Фермент повинен мати здатність копіювати ДНК, тому основний показник активності — це ефективність ампліфікації цільової послідовності ДНК у ПЛР.

Методи оцінки активності

- Оцінюють кількість синтезованої ДНК після кількох циклів ПЛР.
- Перевіряють якість копій ДНК через гель-електрофорез.

Переваги: метод забезпечує точну оцінку активності ферменту і дозволяє визначити, наскільки добре білок виконує свою функцію.

2. Зв'язування лігандів та афінний аналіз. Цей метод використовується для оцінки здатності білка зв'язуватися зі своїми специфічними лігандами або субстратами. Він є надзвичайно корисним для білків, що зв'язуються з ДНК, РНК або іншими молекулами, оскільки дозволяє визначити специфічність і силу взаємодії білка з цими молекулами.

Принцип методу

Зв'язування білка з лігандом може бути досліджено за допомогою різних технік, таких як афінна хроматографія, поверхнево-плазмонний резонанс (англ. Surface Plasmon Resonance, SPR), або гель-фільтрація. У цих аналізах оцінюється, як добре білок зв'язується з лігандом або субстратом, і з якою афінністю (сила зв'язку).

Для білків, що зв'язуються з ДНК або РНК: афінний аналіз використовується для визначення специфічності взаємодії білка з нуклеїновими кислотами. Наприклад, аналіз взаємодії білка зі специфічною послідовністю ДНК може бути проведений за допомогою аналізу зміщення електрофоретичної рухливості (англ. Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA).

Переваги: метод дозволяє оцінити не тільки факт взаємодії, але й інтенсивність і стабільність цього зв'язку.

3. Аналіз фізико-хімічних властивостей. Цей метод спрямований на дослідження стабільності білка при різних умовах, таких як зміна температури або рН середовища. Для деяких білків, особливо ферментів, дуже важливо знати їх стійкість до впливу цих факторів, оскільки це може впливати на їх активність.

Принцип методу

Досліджують фізико-хімічні властивості білка, такі як:

- *Термостабільність:* для термостабільних ферментів, таких як Таq-полімераза, проводять тестування їх здатності залишатися активними при високих температурах. Наприклад, Таq-полімераза повинна зберігати свою активність при температурах понад 70°C, оскільки вона використовується у ПЛР, що вимагає таких температурних умов.

- *Стійкість до рН:* досліджують, чи зберігає білок свою активність при різних значеннях рН.

- *Стійкість до детергентів або хімічних агентів:* білок перевіряють на стійкість до реагентів, що використовуються у дослідженнях або виробництві.

Переваги: оцінка стабільності білка дозволяє визначити його придатність для різних застосувань, включаючи промислові процеси або тривале зберігання.

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)

ПЛР – це метод, що використовується для ампліфікації специфічних фрагментів ДНК, і є одним із основних способів перевірки функціональної активності ферментів, таких як Таq-полімераза. Ефективність цього ферменту може бути оцінена через здатність ампліфікувати цільову ДНК під час циклів ПЛР, які включають денатурацію, відпал праймерів і подовження ДНК.

Принцип методу

ПЛР складається з багаторазових циклів нагрівання та охолодження, де:

- *денатурація:* ДНК розплітається при високій температурі,
- *відпал праймерів:* після зниження температури до праймерів приєднуються до специфічних послідовностей на ДНК,
- *елонгація ланцюгів ДНК:* Таq-полімераза синтезує нові ланцюги ДНК, подовжуючи їх від праймерів.

Оцінка активності Таq-полімерази

Після завершення ПЛР аналізують отримані продукти на гелі, щоб перевірити якість ампліфікації. Ефективність ферменту оцінюється за кількістю і розміром ампліфікованих фрагментів ДНК.

Переваги: метод дає змогу перевірити функціональну активність Taq-полімерази в реальних умовах ПЛР і визначити її придатність для молекулярних досліджень.

Методи перевірки функціональної активності рекомбінантного білка включають ензиматичні аналізи, дослідження зв'язування лігандів, аналіз фізико-хімічних властивостей і специфічні методи, такі як ПЛР. Вони дозволяють оцінити, наскільки білок здатен виконувати свою природну функцію, і визначити умови, при яких він зберігає свою активність. Вибір методу залежить від типу білка та специфіки його функціонування.

Практична частина

Матеріали і реактиви: матрична ДНК (1 мкл, концентрація залежить від експерименту), праймери (концентрація 10 мкМ кожного), дНТФ (кінцева концентрація 200 мкМ), хлорид магнію (кінцева концентрація 1,5 мМ), 1X ПЛР-буфер для Taq-полімерази, зразки Taq-полімерази, бідистильована вода, 1-2% агарозний гель, буфер для нанесення зразків (на основі бромфенолового синього або інший), етидій бромід або інший барвник для візуалізації ДНК у гелі 1X буфер ТАЕ.

Обладнання: термоциклер, система для проведення гель-електрофорезу, транслюмінатор, автоматичні піпетки (0,1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1000 мкл), стерильні наконечники, центрифуга для мікропробірок.

Хід роботи

1. Підготовка ПЛР-реакції:

- Підготувати реакційну суміш для ПЛР (в 50 мкл):
 - ✓ 1 мкл матричної ДНК (концентрація залежить від експерименту),
 - ✓ 1 мкл кожного праймера (концентрація 10 мкМ),
 - ✓ 200 мкМ кожного дНТФ,
 - ✓ 1,5 мМ $MgCl_2$,
 - ✓ 1X ПЛР-буфер,
 - ✓ 1 одиниця Taq-полімерази,
 - ✓ додати бідистильовану воду до 50 мкл.

2. Запуск ПЛР:

- провести ПЛР у термоциклері за такими параметрами:
 - ✓ денатурація: 94°C протягом 30 секунд.
 - ✓ відпал праймерів: 55-65°C (залежно від праймерів) протягом 30 секунд.
 - ✓ елонгація: 72°C протягом 1 хвилини на кожні 1 тпн ДНК.
- повторити ці цикли 25-35 разів,
- завершальна стадія елонгації при 72°C протягом 5 хвилин.

3. Аналіз продуктів ПЛР:

- після завершення ПЛР, відокремити продукти реакції за допомогою гель-електрофорезу на 1-2% агарозному гелі.

- пофарбувати гель етидієм бромідом або GelRed для візуалізації ДНК,
- візуалізувати ампліфіковані фрагменти під ультрафіолетом та порівняти їх із ДНК-маркером для оцінки розміру продуктів ПЛР.

Очікувані результати

Успішна ампліфікація ДНК буде свідчити про функціональну активність рекомбінантної Таq-полімерази. На агарозному гелі мають бути чітко видимі ампліфіковані фрагменти ДНК, що відповідають очікуваному розміру.

Контрольні питання

1. Що таке функціональна активність рекомбінантного білка і чому її важливо оцінювати після отримання білка?
2. Що таке ензиматичний аналіз і як він використовується для оцінки активності ферментів?
3. Які параметри оцінюються під час ензиматичного аналізу для визначення активності білка?
4. Як перевіряють активність Таq-полімерази в контексті ПЛР? Які показники визначають її ефективність?
5. Що таке гель-електрофорез і як його використовують для аналізу продуктів ПЛР?
6. Яким чином зв'язування лігандів використовується для оцінки функціональної активності білка?
7. Що таке афінний аналіз і які методи використовуються для дослідження взаємодії білка з лігандами?
8. Що таке EMSA і як він використовується для оцінки зв'язування білків з нуклеїновими кислотами?
9. Які фізико-хімічні властивості білка досліджують для оцінки його стабільності?
10. Як визначають термостабільність ферментів, таких як Таq-полімераза?
11. Чому важливо знати стійкість білка до змін рН або хімічних агентів?
12. Як оцінюють ефективність Таq-полімерази після проведення ПЛР? Які показники свідчать про її функціональну активність?
13. Які переваги і недоліки ензиматичних аналізів порівняно з іншими методами перевірки активності білка?
14. Як вибір методу перевірки функціональної активності рекомбінантного білка залежить від його природи і застосування?

ЧАСТИНА 3. ЕКСПРЕСІЯ ЧУЖОРІДНИХ ГЕНІВ В ЕУКАРІОТИЧНИХ КЛІТИНАХ.

Експресія чужорідних генів в еукаріотичних клітинах є ключовим інструментом сучасної біотехнології та молекулярної біології, який дозволяє вивчати функції генів, отримувати рекомбінантні білки та моделювати різні біологічні процеси. Цей підхід використовується для впровадження нового генетичного матеріалу у клітини з метою досягнення тимчасової або стабільної експресії чужорідного гена. Успішна експресія в еукаріотичних клітинах

важлива для фундаментальних досліджень, розробки нових терапевтичних засобів та створення модельних систем для вивчення захворювань.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №17. Підготовка культури еукаріотичних клітин для трансфекції.

Мета: ознайомитися з методами підготовки еукаріотичних клітин для трансфекції з метою експресії чужорідних генів; навчитися проводити підрахунок кількості клітин за допомогою гемоцитометричної камери, визначати їх концентрацію та життєздатність; провести посів клітин у культуральні планшети для подальшої трансфекції.

Теоретичні відомості

Вибір клітинної лінії для експресії рекомбінантних білків

Експресія чужорідних генів в еукаріотичних клітинах є важливим інструментом біотехнології, що дозволяє отримувати рекомбінантні білки для досліджень та медичних застосувань. Клітинна лінія повинна забезпечувати оптимальні умови для експресії білків, включаючи високу трансфекційну ефективність, здатність до посттрансляційної модифікації білків, а також швидкий ріст і сумісність з різними системами експресії. Декілька поширених клітинних ліній використовуються для цих цілей, кожна з яких має свої переваги.

Критерії вибору клітинної лінії для експресії рекомбінантних білків

1. *Походження клітин.* Клітинні лінії можуть походити від різних організмів (комахи, ссавці), і вибір залежить від необхідності в посттрансляційних модифікаціях, рівня експресії та інших чинників.

2. *Ефективність трансфекції.* Важливо, щоб клітини мали високу здатність поглинати та експресувати чужорідну ДНК, що забезпечує максимальний рівень продукції білка.

3. *Швидкість росту.* Швидкість росту клітинної лінії впливає на масштабність і швидкість отримання рекомбінантного білка, що є важливим для виробництва великих обсягів білка.

4. *Посттрансляційні модифікації.* Якщо білок потребує специфічних модифікацій, таких як глікозилування або фосфорилування, слід вибирати клітинну лінію, яка здатна здійснювати ці модифікації.

Популярні клітинні лінії для експресії рекомбінантних білків

1. Клітини лінії HEK293 (англ. Human Embryonic Kidney 293) (рис. 6).

Походження: клітини людської ембріональної нирки.

Переваги:

- висока трансфекційна ефективність,
- сумісність із багатьма системами експресії (вектори на основі аденовірусів та лентівірусів, плазмід),
- швидкий ріст і просте культивування *in vitro*,
- можливість посттрансляційних модифікацій, таких як глікозилування.

Використання: клітини лінії НЕК293 підходять для тимчасової експресії білків, а також для стабільної трансфекції. Ця лінія широко використовується в біотехнології для виробництва рекомбінантних білків, досліджень вірусоподібних часток і вакцин.

ATCC Number: **CRL-1573**
Designation: **293**

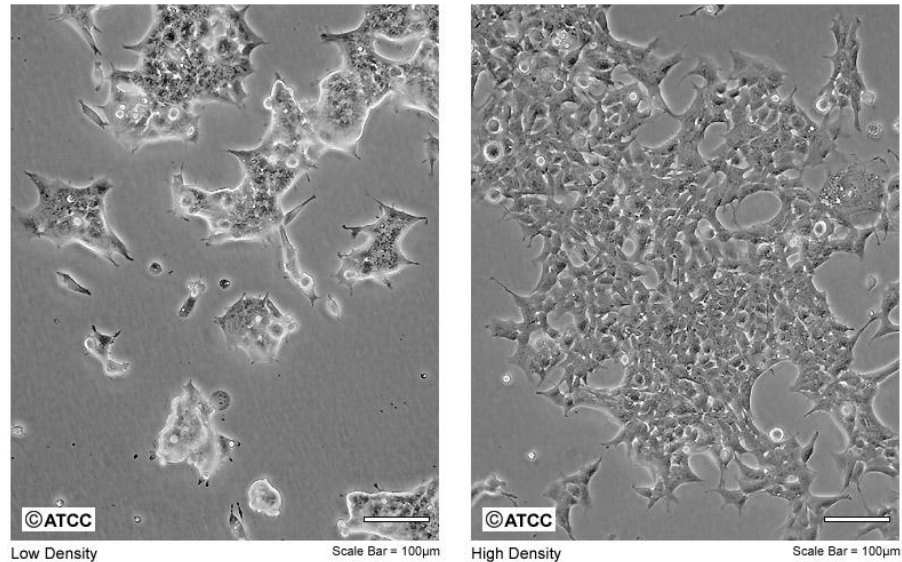


Рис. 6. Клітини лінії НЕК293 (джерело: ATCC® URL: <https://www.atcc.org/products/crl-1573>)

2. Клітини лінії СНО (англ. Chinese Hamster Ovary).

Походження: оваріальні клітини китайського хом'яка.

Переваги:

- високий рівень стабільної експресії,
- здатність до глікозилювання та інших важливих посттрансляційних модифікацій,
- використовуються у великих біореакторах для промислового виробництва терапевтичних білків.

Використання: клітини лінії СНО є одними з найпоширеніших для промислової експресії рекомбінантних білків, включаючи антитіла, гормони та фактори згортання крові. Вони мають тривалу історію застосування у фармацевтичній індустрії.

3. Клітини лінії Sf9 (<https://www.atcc.org/products/crl-1711>).

Походження: клітини оваріальної тканини лялечки метелика *Spodoptera frugiperda*.

Переваги:

- використовуються у системах на основі бакуловірусів для експресії білків,
- забезпечують високу експресію білків, зокрема тих, що мають складну посттрансляційну модифікацію.

Використання: клітини лінії Sf9 підходять для виробництва великих обсягів білка, включаючи вірусні частинки та вакцини. Також використовуються для експресії мембранних білків.

4. Клітини лінії NS0.

Походження: мієломні клітини миші.

Переваги:

- висока здатність до посттрансляційної модифікації, включаючи глікозилування,

- широко використовується для виробництва моноклональних антитіл.

Використання: ця клітинна лінія використовується для виробництва терапевтичних антитіл, а також для інших білків, що потребують складної посттрансляційної модифікації.

5. Клітини лінії ВНК-21 (англ. Baby Hamster Kidney 21) (<https://www.atcc.org/products/ccl-10>).

Походження: клітини нирки новонародженого хом'яка.

Переваги:

- підходить для тимчасової експресії білків та вірусних частинок,

- використовується для виробництва рекомбінантних вірусів і вакцин.

Використання: клітини лінії ВНК-21 використовується для виробництва вакцин і вірусних векторів. Вони мають високу здатність до трансфекції та забезпечують продукцію великих обсягів вірусних білків.

Вимоги до підготовки еукаріотичних клітин для трансфекції

Ефективна трансфекція клітинної лінії НЕК293 та подальша експресія рекомбінантних білків залежать від дотримання кількох важливих умов. Це включає підтримання оптимальних умов росту, досягнення необхідної конфлюентності культури та забезпечення здорового стану клітин.

1. Оптимальні умови росту. Для клітин лінії НЕК293 важливо забезпечити правильні умови культивування, оскільки це безпосередньо впливає на здатність клітин до трансфекції та продуктивність під час експресії білків.

Основні параметри

- *Температура.* Оптимальною температурою для росту клітин ссавців, включаючи НЕК293, є 37°C. Підтримання стабільної температури критично важливо для підтримки фізіологічних процесів у клітинах, зокрема для синтезу білків.

- *Вологість.* Висока вологість, а саме 95%, необхідна для підтримання оптимальної гідратації клітин і середовища, запобігання випаровуванню рідини та дегідратації клітинної культури.

- *Концентрація вуглекислого газу (CO₂).* Концентрація CO₂ в атмосфері інкубатора повинна підтримуватися на рівні 5%, що забезпечує підтримку стабільного рівня рН в культуральному середовищі за рахунок балансу між CO₂ і бікарбонатною буферною системою в середовищі.

- *Культуральне середовище.* Культуральне середовище DMEM (англ. Dulbecco's Modified Eagle Medium) з 10%-им вмістом фетальної бичачої сироватки (англ. Fetal Bovine Serum, FBS) забезпечує клітини необхідними поживними речовинами та факторами росту. Фетальна бичача сироватка містить білки, гормони та фактори росту, які сприяють клітинному

розмноженню. Додатково до культурального середовища додаються антибіотики для запобігання бактеріальному або грибковому забрудненню.

Важливі моменти

- Зміна середовища має проводитися регулярно (зазвичай кожні 2-3 дні), щоб запобігти накопиченню метаболітів, які можуть негативно вплинути на стан клітин.

- Вибір середовища і компонентів залежить від конкретних потреб експерименту, однак культуральне середовище DMEM з 10%-им вмістом FBS – це стандарт для багатьох досліджень з клітинами лінії НЕК293.

2. Конфлюентність культури. *Конфлюентність* – це ступінь, до якого клітини покривають поверхню культурального посуду. Конфлюентність має великий вплив на ефективність трансфекції, оскільки вона відображає стан росту клітин і їх готовність до поглинання чужорідної ДНК.

Рекомендації для трансфекції

- **70-90% конфлюентність** є оптимальною для трансфекції клітин лінії НЕК293. Якщо конфлюентність занадто низька (<70%), клітини можуть бути недостатньо активними для ефективного поглинання ДНК, а при занадто високій конфлюентності (>90%) клітини можуть бути перенаселені і перебувати у стані контактувального інгібування, що також знижує трансфекційну ефективність.

- **Чому важлива правильна конфлюентність?** У фазі 70-90% клітини перебувають у активній логарифмічній фазі росту, що забезпечує максимальну готовність клітин до поглинання ДНК і подальшої експресії білка.

Контроль конфлюентності

- Візуально конфлюентність визначають за допомогою мікроскопії: при 70-90% конфлюентності клітини утворюють щільний, але неповний шар на дні посудини.

- Важливо своєчасно проводити підрахунок клітин і їх пересівання, щоб уникнути перевищення необхідної конфлюентності до моменту трансфекції.

3. Здоровий стан культури. Ефективність трансфекції значно залежить від стану клітин на момент експерименту. Клітини лінії НЕК293 мають бути у фазі активного поділу і перебувати в оптимальних умовах.

Основні фактори

- **Логарифмічна фаза росту:** для найкращих результатів клітини мають перебувати в активній фазі росту (логарифмічній фазі), коли вони інтенсивно діляться і знаходяться в оптимальному стані для поглинання чужорідної ДНК.

- **Здоровий вигляд клітин:** клітини мають бути здоровими, мати чітко виражену морфологію та не демонструвати ознак старіння або стресу. У випадках, коли клітини мають неправильну морфологію, ознаки стресу або старіння (наприклад, після занадто довгого перебування в культурі або у випадку недостатньої зміни середовища), трансфекційна ефективність значно знижується.

- **Уникнення стресових факторів:** стресові фактори, такі як зміни температури, механічні пошкодження або тривала відсутність зміни середовища, можуть призвести до зниження життєздатності клітин і ефективності трансфекції.

Ознаки здорових клітин

- Клітини лінії НЕК293 мають чітку епітеліальну морфологію з великими ядрами.
- Відсутність детриту або інших ознак некрозу в середовищі.
- Високий рівень мітотичної активності, що свідчить про активний поділ клітин.

Ключові моменти для забезпечення здорового стану клітин

- **Своєчасне пересівання:** клітини лінії НЕК293 слід пересівати кожні 2-3 дні, щоб запобігти перенаселенню та переходу в стаціонарну фазу.
- **Перевірка клітин перед трансфекцією:** перед проведенням трансфекції важливо перевірити клітини на наявність ознак стресу або деградації і використовувати лише ті, що перебувають у найкращому стані.

Практична частина

Матеріали і реактиви: клітини лінії НЕК293, культуральне середовище DMEM, фетальна бичача сироватка (FBS), антибіотики (пеніцилін-стрептоміцин), трипсин-EDTA (0,25%), 1X фосфатно-сольовий буфер (PBS), культуральні планшети (6- або 24-лункові), стерильні центрифужні пробірки (1,5 мл або 15 мл), стерильні наконечники для автоматичних піпеток, автоматичні піпетки (0,1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1000 мкл), 0,4% трипановий синій.

Обладнання: CO₂-інкубатор (37°C, 5% CO₂), інвертований мікроскоп, центрифуга, водяна баня, ламінарний бокс, гемоцитометрична камера, таймер, стерильні піпетки Пастера або вакуумна система, холодильник/морозильник.

Хід роботи

1. Підготовка клітин до підрахунку:

- вилучити культуру клітин лінії НЕК293 з CO₂-інкубатора.
- видалити культуральне середовище та обережно промити клітини 1 мл 1X PBS для видалення залишків середовища;
- додати 0,5 мл 0,25% розчину трипсину-ЕДТА та інкубувати клітини при 37°C протягом 2-3 хвилин, поки клітини не відщепляться від поверхні культурального посуду;
- додати 1 мл культурального середовища DMEM, що містить 10% FBS, для нейтралізації дії трипсину;
- перенести суспензію клітин у центрифужну пробірку і центрифугувати при 1000 об/хв протягом 5 хвилин для осадження клітин;
- видалити надосадову рідину після центрифугування і ресуспендувати клітинний осад у 1 мл 1X PBS.

2. Фарбування клітин трипановим синім для визначення життєздатності:

- взяти 10 мкл клітинної суспензії та змішати її з 10 мкл 0,4% розчину трипанового синього;
- інкубувати клітини з трипановим синім протягом 1-2 хвилин;
- перенести 10 мкл цієї суміші на гемоцитометричну камеру.

3. Підрахунок клітин за допомогою гемоцитометричної камери:

- під мікроскопом підрахувати кількість живих (не зафарбованих) і мертвих (зафарбованих) клітин у центральній сітці камери;
- підрахувати клітини у кількох великих квадратах для отримання середнього значення,
- визначити концентрацію клітин у суспензії за формулою:

$$C = \frac{N * 10^4}{V}$$

де:

C – концентрація клітин (клітини/мл),

N – середня кількість клітин у великому квадраті,

V – об'єм, взятий для підрахунку (мкл).

- визначити відсоток життєздатних клітин за формулою:

$$\% \text{ життєздатності} = \frac{\text{кількість живих клітин}}{\text{загальна кількість клітин}} * 100$$

4. Посів клітин для трансфекції:

- підготувати культуральні планшети;
- відповідно до розрахованої концентрації, внести необхідну кількість клітин у кожну лунку планшета, щоб досягти 70-90% конфлюентності через 24 години;
- додати 1-2 мл DMEM у кожну лунку;
- інкубувати клітини в умовах 37°C з 5% вмістом CO₂ в атмосфері інкубатора протягом 24 годин для адаптації перед трансфекцією.

Очікувані результати

Після підрахунку життєздатних клітин і посіву в культуральні планшети через 24 години повинна бути досягнута оптимальна конфлюентність для трансфекції – 70-90%. Клітини повинні бути в активній фазі росту та мати високий відсоток життєздатності, що забезпечить ефективну трансфекцію.

Контрольні питання

1. Які фактори слід враховувати при виборі клітинної лінії для експресії рекомбінантних білків?
2. Які клітинні лінії найчастіше використовуються для експресії рекомбінантних білків і чому?
3. Які переваги має клітинна лінія НЕК293 для експресії рекомбінантних білків?
4. У чому полягає особливість клітинної лінії CHO і для чого вона використовується?
5. Для яких цілей використовують клітини лінії Sf9?

6. Які ключові характеристики клітин лінії NS0 і для чого вони використовуються?
7. Які умови росту необхідно забезпечити клітинам лінії HEK293 для успішної трансфекції?
8. Який відсоток конфлюентності вважається оптимальним для трансфекції клітин HEK293 і чому?
9. Які ознаки свідчать про здоровий стан клітин перед трансфекцією?
10. Як впливають стресові фактори на ефективність трансфекції клітин?
11. Чому важливо пересівати клітини лінії HEK293 кожні 2-3 дні?
12. Які фактори можуть вплинути на ефективність трансфекції еукаріотичних клітин?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №18. Трансфекція клітин.

Мета: ознайомитися з методами трансфекції еукаріотичних клітин, етапами трансфекції та оптимізацією параметрів для різних клітинних ліній; провести трансфекцію клітин лінії HEK293 експресійним вектором, що містить ген зеленого флуоресцентного білка, для вивчення експресії чужорідного білка.

Теоретичні відомості

Методи трансфекції еукаріотичних клітин

Трансфекція еукаріотичних клітин – це процес введення чужорідної ДНК або РНК з метою зміни генетичного матеріалу клітин або експресії рекомбінантних білків. Цей процес є ключовим у багатьох біотехнологічних і молекулярно-біологічних дослідженнях, таких як вивчення функцій генів, створення моделей захворювань, виробництво рекомбінантних білків та розробка терапевтичних методів. Розглянемо основні методи трансфекції у більш детально.

1. Хімічні методи.

Використання фосфату кальцію. Це один із найстаріших методів трансфекції. Кальцій використовується для утворення осаду з ДНК, який може адсорбуватися на поверхні клітин. Процедура включає змішування ДНК із розчином фосфату кальцію, що утворює дрібнодисперсні частинки. Ці частинки зв'язуються з клітинною мембраною, і, згодом, клітини захоплюють їх шляхом ендоцитозу.

Переваги: простий і недорогий метод.

Недоліки: низька ефективність у випадку застосування до деяких типів клітин і можливий цитотоксичний ефект.

Ліпосомна трансфекція. Ліпосоми – це сферичні везикули, що утворюються з фосфоліпідів. Для трансфекції ліпосоми інкапсулюють ДНК або РНК, після чого легко зливаються з клітинною мембраною і доставляють генетичний матеріал до цитоплазми або ядра. Препарати ліпосом часто мають позитивний заряд, що сприяє їх взаємодії з негативно зарядженою ДНК та мембранами клітин.

Переваги: висока ефективність, мінімальна токсичність для клітин.

Недоліки: вартість реагентів, деякі клітинні лінії можуть бути стійкими до ліпосом.

Використання поліетиленіміну (ПЕІ). Поліетиленімін – це позитивно заряджений полімер, який утворює стабільні комплекси з негативно зарядженими молекулами ДНК. Ці комплекси проникають в клітину через механізм ендоцитозу. ПЕІ є популярним реагентом завдяки простоті використання і високій ефективності для багатьох клітинних ліній.

Переваги: висока ефективність трансфекції для багатьох типів клітин.

Недоліки: можлива цитотоксичність при високих концентраціях.

2. Фізичні методи.

Електропорація. Цей метод полягає в застосуванні коротких електричних імпульсів до клітин, що створює тимчасові пори в їх мембрані. Через ці пори ДНК або РНК можуть проникнути всередину клітини. Після імпульсу мембрана відновлюється

Переваги: висока ефективність для багатьох типів клітин, включаючи клітини, важкі для трансфекції іншими методами.

Недоліки: високий ризик пошкодження клітин і потрібне спеціалізоване обладнання.

Мікроін'єкція. Мікроін'єкція включає пряме введення ДНК або РНК в клітину за допомогою тонкої мікроскопічної голки. Це один із найточніших методів, оскільки дозволяє доставляти матеріал прямо в ядро або цитоплазму однієї клітини.

Переваги: висока точність, можливість роботи з окремими клітинами.

Недоліки: вимагає високого рівня технічної майстерності та спеціального обладнання.

Балістична трансфекція (генна гармата). Цей метод полягає у використанні мікроскопічних частинок (зазвичай золота або вольфраму), покритих ДНК, які "вистрілюються" у клітини під дією високого тиску. Частинки проникають у клітини, доставляючи ДНК до ядра.

Переваги: підходить для важкодоступних типів клітин і організмів, включаючи рослини та тканини.

Недоліки: вимагає спеціального обладнання і може пошкоджувати клітини.

3. Вірусна трансдукція.

Вірусні вектори (наприклад, аденовіруси, ретровіруси, лентівіруси) використовуються для стабільного введення чужорідного генетичного матеріалу в клітини. Цей метод ґрунтується на природній здатності вірусів проникати в клітини і вбудовувати свій геном у клітинний геном.

Переваги: висока ефективність, стабільна експресія генів.

Недоліки: потребує значної підготовки векторів, може викликати імунну відповідь або мати потенційні ризики для безпеки.

4. Трансфекція за допомогою наноматеріалів.

Сучасний підхід до трансфекції, що використовує різні типи наночастинок (наприклад, вуглецеві нанотрубки, металеві або полімерні наночастинок), які можуть бути кон'юговані з ДНК або РНК. Наночастинок

можуть легко проникати через клітинні мембрани і доставляти генетичний матеріал до всередини клітини.

Переваги: можливість спрямованої доставки, висока ефективність, низька цитотоксичність.

Недоліки: технологія ще знаходиться на етапі розвитку, і для багатьох наноматеріалів досі вивчаються можливі довгострокові наслідки для клітин.

Ці методи трансфекції варіюються залежно від типу клітин, цілей експерименту та необхідної тривалості експресії генетичного матеріалу (тимчасова або стабільна трансфекція).

Етапи проведення трансфекції

Трансфекція з використанням ПЕІ є одним із найпоширеніших і ефективних методів хімічної трансфекції. ПЕІ формує катіонні комплекси з ДНК або РНК, завдяки чому може бути поглинутий клітиною шляхом ендоцитозу. Нижче детально розглянуто кожен етап трансфекції з використанням ПЕІ.

1. Підготовка клітин.

Перед проведенням трансфекції важливо підготувати клітинну культуру до оптимальних умов. Це забезпечує високу ефективність трансфекції та мінімальну токсичність.

- ***Конфлюентність.*** Клітини повинні досягти 70-90% конфлюентності. Це означає, що вони повинні покривати певний відсоток поверхні культуральної пластини (або чашки Петрі). Якщо клітини занадто щільно розташовані (понад 90% конфлюентності), трансфекція може бути менш ефективною через недостатній обмін речовин та погане поглинання комплексу ПЕІ-ДНК. Якщо ж клітини занадто розріджені (менше 70%), це може призвести до стресу і поганого зростання після трансфекції.

- ***Стан клітин.*** Важливо, щоб клітини були у здоровому стані, без ознак стресу або контамінації. Під час підготовки клітин до трансфекції їх культивують у стандартних умовах (37°C, 5% CO₂) у відповідному середовищі з необхідними факторами росту.

2. Підготовка трансфекційної суміші.

Цей етап включає змішування генетичного матеріалу (ДНК або РНК) з ПЕІ для формування стабільного трансфекційного комплексу. Поліетиленімін має здатність з'єднуватися з негативно зарядженою ДНК через позитивно заряджені аміногрупи, утворюючи наноконспекти, які поглинаються клітинами через ендоцитоз.

- ***Підбір пропорцій ПЕІ та ДНК.*** Важливим аспектом є вибір оптимального співвідношення між ПЕІ та ДНК. Зазвичай використовують співвідношення 1:1 або 2:1 за молекулярною масою ПЕІ до ДНК, хоча точне співвідношення варіюється залежно від типу клітин. Визначення цього співвідношення є ключовим для ефективності трансфекції та зменшення цитотоксичності.

- ***Приготування розчинів.*** ПЕІ зазвичай використовується у вигляді водного розчину при рН 7.0-7.4. Спочатку ДНК розчиняють у буфері (часто використовують PBS), після чого додають ПЕІ. Суміш інкубується протягом

15-30 хвилин при кімнатній температурі, щоб забезпечити утворення стабільних комплексів ПЕІ-ДНК.

- **Параметри інкубації.** Утворення комплексів між ДНК та ПЕІ відбувається протягом інкубації при кімнатній температурі або в холодному середовищі, що дозволяє зменшити їх розмір до наночастинок. Молекули ПЕІ забезпечують захист ДНК від деградації і полегшують її транспортування через клітинну мембрану.

3. Інкубація клітин з трансфекційною сумішшю.

Після приготування трансфекційної суміші її додають до попередньо підготовленої клітинної культури. Цей етап важливий для забезпечення максимальної поглинальної здатності клітин та ефективної трансфекції.

- **Додавання трансфекційної суміші.** Комплекси ПЕІ-ДНК обережно додаються до середовища культивування клітин. Зазвичай рекомендується не змінювати культуральне середовище протягом кількох годин після додавання трансфекційного комплексу, щоб забезпечити адекватне поглинання ДНК клітинами.

- **Оптимальні умови інкубації.** Після додавання трансфекційного комплексу клітини інкубуються при 37°C у вологій атмосфері з 5% CO₂. Інкубація триває зазвичай 4-6 годин або до 24 годин, залежно від типу клітин та методу трансфекції.

- **Заміна середовища.** Через певний час інкубації, щоб зменшити потенційну цитотоксичність ПЕІ, середовище може бути замінене на свіже. Це допомагає уникнути стресу для клітин і покращує їх виживаність.

4. Аналіз результатів трансфекції.

Через 24-72 години після трансфекції проводять аналіз на наявність експресії чужорідного гена. У даному випадку використовується ген, що кодує зелений флуоресцентний білок (англ. Green Fluorescent Protein, GFP), який дозволяє візуально оцінити ефективність трансфекції за допомогою флуоресцентної мікроскопії.

- **Флуоресцентна мікроскопія.** Для оцінки ефективності трансфекції використовують флуоресцентний мікроскоп, який дозволяє візуалізувати GFP у клітинах. Експресія GFP забезпечує світіння клітин під впливом певної довжини хвилі світла, що дозволяє кількісно оцінити кількість трансфікованих клітин.

- **Кількісний аналіз.** Для більш точної оцінки ефективності трансфекції можуть використовуватися методи флуориметрії, коли кількість світла, яке виділяється клітинами, що експресують GFP, вимірюється у спеціальному апараті.

- **Аналіз результатів.** Після збору даних аналізується ефективність трансфекції (відсоток трансфікованих клітин) та загальний рівень експресії гена. Цей етап важливий для оцінки успіху трансфекції та подальшої оптимізації протоколу для конкретної клітинної лінії.

Висока ефективність та відносна простота методу ПЕІ роблять його популярним вибором для проведення трансфекцій у багатьох лабораторіях. Однак важливо враховувати можливу токсичність поліетиленіміну при надмірній концентрації або тривалій інкубації з клітинами.

Оптимізація параметрів трансфекції

Оптимізація параметрів трансфекції є критично важливим етапом для досягнення високої ефективності введення генетичного матеріалу в еукаріотичні клітини. Оскільки кожна клітинна лінія має свої особливості, оптимальні умови трансфекції можуть значно варіювати. Основні параметри, які впливають на ефективність трансфекції наведені нижче.

- ***Концентрація ДНК.*** Концентрація ДНК у трансфекційній суміші має бути точно підібрана. Якщо концентрація занадто низька, клітини можуть отримати недостатню кількість генетичного матеріалу, що знижує ефективність трансфекції. З іншого боку, надмірно висока концентрація ДНК може викликати цитотоксичність та інші негативні ефекти.

- ***Співвідношення ДНК до трансфекційного реагенту.*** Співвідношення між кількістю ДНК і кількістю трансфекційного реагенту (наприклад, ПЕІ) є важливим фактором, який безпосередньо впливає на утворення комплексів, їх розмір, стабільність та поглинання клітинами.

- ***Тривалість інкубації з трансфекційним комплексом.*** Тривалість інкубації визначає, скільки часу комплекси ДНК-ПЕІ або інші комплекси залишаються у контакті з клітинами до заміни середовища. Занадто короткий період може не дозволити клітинам поглинути достатню кількість комплексу, тоді як занадто довгий період може призвести до стресу для клітин і зниження їхньої життєздатності.

- ***Умови росту клітин.*** Для успішної трансфекції важливо підтримувати оптимальні умови росту клітин. Це включає підтримання постійної температури (зазвичай 37°C для більшості ссавців клітин), рівня CO₂ (зазвичай 5%) та використання високоякісного культурального середовища, яке забезпечує належні фактори росту і буферні системи.

Проблеми та їх вирішення при проведенні трансфекції

1. Низька ефективність трансфекції. Низька ефективність трансфекції може виникнути через кілька причин, серед яких:

- неправильний вибір методу трансфекції для певної клітинної лінії,
- неправильне співвідношення ДНК до трансфекційного реагенту,
- неправильно підібрана концентрація ДНК.

Можливі рішення

- ***Оптимізація методу.*** Якщо використовуваний метод дає низьку ефективність, варто спробувати інший метод (наприклад, замінити ліпофекцію на електропорацію чи вірусну трансдукцію).

- ***Оптимізація параметрів.*** Переглянути співвідношення ДНК до трансфекційного реагенту, концентрацію ДНК, тривалість інкубації з трансфекційною сумішшю.

- ***Покращення умов культивування.*** Перевірити стан клітин перед трансфекцією і переконатися, що вони не знаходяться в фазі сповільненого росту чи стресу.

2. Цитотоксичність. Деякі трансфекційні агенти, включаючи ПЕІ, можуть бути токсичними для клітин, що може призвести до зниження

життєздатності клітин після трансфекції. Це часто виникає при використанні надмірних концентрацій трансфекційного реагенту або при надто тривалій інкубації.

Можливі рішення

- *Зниження концентрації ДНК або реагенту.* Зниження концентрації трансфекційного реагенту або ДНК може допомогти зменшити цитотоксичність. Однак потрібно стежити за тим, щоб це не призвело до зниження ефективності трансфекції.

- *Зменшення тривалості інкубації.* Якщо трансфекційна суміш знаходиться в середовищі надто довго, це може бути шкідливим для клітин. Зменшення часу експозиції і заміна середовища після 4-6 годин може допомогти знизити токсичність.

- *Використання альтернативних реагентів.* Деякі трансфекційні агенти менш токсичні, ніж ПЕІ, наприклад, ліпосомні комплекси можуть бути безпечнішими для клітин.

3. Відсутність експресії чужорідного гена. Якщо після трансфекції не спостерігається експресії чужорідного гена (наприклад, GFP), це може свідчити про проблеми з підготовкою ДНК або неповне поглинання трансфекційної суміші клітинами.

Можливі рішення

- *Перевірка якості ДНК.* ДНК повинна бути високої чистоти, без контамінантів. Використання високоякісної плазмідної ДНК з низькою концентрацією ендотоксинів може покращити результат.

- *Продовження тривалості інкубації.* Можливо, клітинам потрібно більше часу для експресії гена, тому збільшення періоду інкубації до 48-72 годин може підвищити рівень експресії.

- *Перевірка конструкції вектора.* Якщо конструкція вектора некоректна або містить мутації, це може призвести до відсутності експресії. Важливо переконатися, що використовуваний вектор правильно сконструйований і містить відповідні елементи для експресії в клітині.

Практична частина

Матеріали і реактиви: клітини лінії HEK293, культуральне середовище DMEM, фетальна бичача сироватка (FBS), антибіотики (пеніцилін-стрептоміцин), 1X фосфатно-сольовий буфер (PBS), розчин ПЕІ з молекулярною масою 25 кДа, плазмідна ДНК, що містить ген GFP, стерильні центрифужні пробірки (1,5 мл), стерильні наконечники для автоматичних піпеток, автоматичні піпетки (0,1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1000 мкл).

Обладнання: CO₂-інкубатор (37°C, 5% CO₂), інвертований мікроскоп, центрифуга, водяна баня, ламінарний бокс, таймер, стерильні піпетки Пастера або вакуумна система, холодильник/морозильник.

Хід роботи

1. Підготовка клітин (попереднє лабораторне заняття):

- виростити клітини лінії HEK293 до 70-90% конфлюентності в DMEM з 10%-им вмістом FBS.

2. Підготовка трансфекційної суміші:

- у стерильних умовах у ламінарному боксі готують дві пробірки (з розрахунку на одну лунку культурального планшету):

- ✓ **пробірка 1:** у 100 мкл безсироваткового DMEM розчиняють 2 мкг плазмідної ДНК, що містить ген GFP

- ✓ **пробірка 2:** у 100 мкл DMEM додають 6 мкл розчину PEI з молекулярною масою 25 кДа,

- обережно додають розчин PEI до пробірки з ДНК і перемішують,
- інкубують отриману суміш при кімнатній температурі протягом 15-30 хвилин для формування стабільних наноконкомплексів PEI-ДНК, які можуть проникати через клітинну мембрану.

3. Трансфекція клітин:

- після інкубації суміш PEI-ДНК обережно додають до кожної лунки з клітинами у 6-лунковому планшеті. Важливо рівномірно розподілити суміш для забезпечення рівного контакту з клітинами,

- після додавання трансфекційної суміші клітини інкубують при температурі 37°C і 5% CO₂ протягом 4-6 годин. Це забезпечує проникнення комплексу PEI-ДНК через мембрану клітин за допомогою ендоцитозу,

4. Зміна середовища:

- після 4-6 годин інкубації середовище, що містить трансфекційну суміш, замінюють на свіже DMEM з 10%-им вмістом FBS. Це зменшує цитотоксичний вплив PEI на клітини і забезпечує їх подальший нормальний ріст.

Очікувані результати

Ефективна трансфекція клітин лінії HEK293 призведе до експресії GFP, що можна буде спостерігати під флуоресцентним мікроскопом. Експресія білка буде виявлятися як зелене світіння в трансфікованих клітинах.

Контрольні питання

1. Які основні методи хімічної трансфекції існують? Поясніть, як працює кожен із них.

2. Які переваги та недоліки методу трансфекції з використанням фосфату кальцію?

3. Як ліпосомна трансфекція забезпечує доставку ДНК або РНК у клітину? Які її переваги та недоліки?

4. Що таке PEI і чому він є ефективним реагентом для трансфекції? Які його переваги та недоліки?

5. Які основні фізичні методи трансфекції ви знаєте? Опишіть принцип дії електропорації та її основні переваги й недоліки.

6. Що таке мікроін'єкція і в яких випадках її доцільно використовувати? Які її основні переваги та недоліки?

7. Як працює балістична трансфекція (генна гармата) і для яких типів клітин вона найбільш підходить?

8. Які особливості вірусної трансдукції як методу трансфекції? В чому її переваги та можливі ризики?

9. Що таке трансфекція за допомогою наноматеріалів? Як наночастинки використовуються для введення генетичного матеріалу в клітину?

10. Які ключові етапи трансфекції за допомогою PEI? Поясніть кожен етап.

11. Яким чином підготовка клітин перед трансфекцією впливає на ефективність процесу? Яка конфлюентність клітин є оптимальною для трансфекції?

12. Чому важливо підбирати оптимальне співвідношення між ДНК і PEI у трансфекційній суміші? Як це співвідношення впливає на цитотоксичність?

13. Чому важливо дотримуватися певних умов інкубації клітин під час трансфекції? Які умови вважаються оптимальними?

14. Які проблеми можуть виникнути під час трансфекції? Як можна покращити ефективність трансфекції?

15. Що таке цитотоксичність у контексті трансфекції? Як можна зменшити токсичний вплив PEI на клітини?

16. Які можливі причини відсутності експресії чужорідного гена після трансфекції? Як можна вирішити цю проблему?

17. Як оптимізуються параметри трансфекції для підвищення її ефективності? Які параметри потребують корекції?

18. Чому важливо підтримувати оптимальні умови росту клітин під час трансфекції і після неї? Які фактори впливають на життєздатність клітин?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №19. Оцінка ефективності трансфекції.

Мета: ознайомитися з методами оцінки ефективності трансфекції еукаріотичних клітин; провести аналіз ефективності трансфекції клітин лінії HEK293 за допомогою флуоресцентної мікроскопії, визначивши відсоток GFP-позитивних клітин від загальної кількості клітин.

Теоретичні відомості

Методи оцінки ефективності трансфекції

Оцінка ефективності трансфекції є важливим кроком у дослідженнях, пов'язаних з експресією чужорідних генів, оскільки вона дозволяє визначити, наскільки успішно було введено генетичний матеріал у клітини та чи відбувається експресія цільового гена. Для цього використовують різні методи, кожен з яких має свої особливості, залежно від цілей експерименту та наявних ресурсів.

1. Використання репортерних генів. Репортерні гени – це спеціальні гени, які допомагають відстежувати експресію іншого гена або генетичного конструкта, оскільки їх продукт легко виявляється за допомогою флуоресцентних або ферментативних методів.

- **GFP:** один із найпопулярніших репортерів. Клітини, що експресують GFP, світяться зеленим кольором при опроміненні світлом певної довжини хвилі. Це дозволяє візуально оцінювати кількість трансфікованих клітин.

- ***β-галактозидаза***: фермент, який розщеплює субстрати на кольорові продукти реакції. Її активність можна виміряти за зміною кольору в реакційній суміші, що дає змогу оцінити ефективність трансфекції.

- ***Люцифераза***: фермент, який каталізує хемілюмінесцентну реакцію, що виробляє світло. Інтенсивність світіння прямо пропорційна кількості експресованого ферменту і дозволяє кількісно оцінити ефективність трансфекції.

Переваги:

- **простота візуалізації**: репортерні гени, такі як GFP, дозволяють легко оцінити результат за допомогою флуоресцентної мікроскопії,

- **кількісний аналіз**: люциферазний тест дозволяє точно виміряти рівень експресії, надаючи кількісні дані.

Недоліки:

- **залежність від стабільності експресії**: в деяких випадках експресія репортерних генів може змінюватися залежно від типу клітин або умов трансфекції,

- **не всі репортери працюють однаково у різних клітинах**: деякі типи клітин можуть не проявляти ефективної експресії певних репортерів.

2. Флуоресцентна мікроскопія. Це один із найпоширеніших і простих методів оцінки ефективності трансфекції, особливо при використанні флуоресцентних репортерних білків, таких як GFP. Флуоресцентна мікроскопія дозволяє візуально спостерігати клітини, що експресують GFP, і підраховувати кількість трансфікованих клітин.

Процедура:

- клітини, що були піддані трансфекції, фіксують або одразу оглядають під флуоресцентним мікроскопом,

- трансфіковані клітини світяться зеленим світлом (при використанні GFP), і кількість цих клітин можна підрахувати та порівняти із загальною кількістю клітин.

Переваги:

- **прямий візуальний аналіз**: дослідник може одразу побачити клітини, які були успішно трансфіковані,

- **швидкість**: не вимагає додаткових ферментативних реакцій або інших складних аналізів.

Недоліки:

- **суб'єктивність**: кількість трансфікованих клітин залежить від точності підрахунку під мікроскопом,

- **кількісна неточність**: складно точно виміряти рівень експресії гена, оскільки флуоресценція може варіюватися залежно від рівня експресії білка в різних клітинах.

3. Флуориметрія. Флуориметрія є кількісним методом для вимірювання інтенсивності флуоресценції. Вона використовується для оцінки кількості флуоресцентного білка (наприклад, GFP) у зразку. На відміну від флуоресцентної мікроскопії, флуориметрія дозволяє отримати точні кількісні дані.

Процедура:

- після трансфекції клітини збирають і лізують, щоб отримати внутрішньоклітинний вміст,
- лізат клітин аналізують у флуориметрі, який вимірює інтенсивність флуоресценції. Ці дані можуть бути використані для кількісної оцінки рівня експресії флуоресцентного білка.

Переваги:

- **точний кількісний аналіз:** флуориметрія дозволяє точно виміряти кількість білка на основі інтенсивності сигналу,
- **широкий діапазон застосування:** метод може використовуватися для оцінки як трансфекцій у популяції клітин, так і індивідуальних клітинних зразків.

Недоліки:

- **не дає візуальних даних:** на відміну від флуоресцентної мікроскопії, цей метод не дозволяє побачити клітини, а лише кількісно оцінити загальну експресію білка в зразку,
- **вимагає додаткового обладнання:** для аналізу необхідний флуориметр.

4. Люциферазний аналіз. Люцифераза – це фермент, який каталізує хемілюмінесцентну реакцію, що генерує світло. Інтенсивність світла, що випромінюється під час реакції, прямо пропорційна кількості експресованого ферменту. Люциферазний аналіз є високочутливим і дозволяє кількісно оцінити рівень експресії гена.

Процедура:

- клітини трансфікують плазмідною, що містить ген люцифери, а не люцифери, як в оригіналі,
- після певного часу для експресії ферменту додають субстрати, які взаємодіють з люциферазою, викликаючи хемілюмінесцентну реакцію,
- інтенсивність світла вимірюється за допомогою люмінометра, що дозволяє кількісно оцінити рівень експресії гена.

Переваги:

- **висока чутливість:** цей метод дозволяє детектувати навіть дуже низькі рівні експресії,
- **кількісний аналіз:** можна отримати точні дані про рівень експресії генів на основі інтенсивності світла.

Недоліки:

- **не дає візуальних даних:** як і у випадку флуориметрії, цей метод не дає змоги спостерігати клітини, а лише кількісно оцінювати експресію.
- **необхідність використання специфічних субстратів:** реакція залежить від доступності й правильного вибору субстрату для люцифери.

Вибір методу оцінки залежить від цілей дослідження: флуоресцентна мікроскопія дозволяє візуально спостерігати процес трансфекції, тоді як флуориметрія і люциферазний аналіз забезпечують кількісні дані для детального аналізу ефективності.

Аналіз та інтерпретація результатів

При трансфекції з використанням GFP, важливо правильно оцінити ефективність процесу шляхом кількісного та якісного аналізу результатів. Для цього використовуються кілька критеріїв, таких як відсоток трансфікованих клітин, інтенсивність флуоресценції та життєздатність клітин.

1. Відсоток трансфікованих клітин. Цей показник є основним критерієм оцінки успішності трансфекції і визначається як відсоткове співвідношення кількості клітин, що експресують GFP (світяться під флуоресцентним мікроскопом), до загальної кількості клітин у зразку.

Процедура підрахунку

- *Флуоресцентна мікроскопія:* після завершення трансфекції клітини оглядають під флуоресцентним мікроскопом. Клітини, які успішно трансфіковані, будуть світитися зеленим флуоресцентним сигналом.

- *ImageJ:* для точного підрахунку кількості клітин можна використовувати програму ImageJ, яка дозволяє автоматизувати процес підрахунку клітин, що флуоресценціюють.

Важливі моменти

- кількість трансфікованих клітин залежить від типу клітинної лінії, методу трансфекції та обраних умов експерименту.
- програма ImageJ значно спрощує процес підрахунку і робить його більш точним, зменшуючи суб'єктивність підрахунку під мікроскопом.

2. Інтенсивність флуоресценції. Інтенсивність флуоресцентного сигналу є показником рівня експресії гена в клітинах. Чим більше GFP експресується в клітинах, тим сильніший флуоресцентний сигнал. Це дозволяє оцінити, не тільки скільки клітин трансфіковано, але й наскільки активно експресується чужорідний ген.

Процедура вимірювання

- Для вимірювання інтенсивності флуоресценції також можна використовувати ImageJ. У програмі можна обрати окремі клітини або групи клітин і визначити середню інтенсивність флуоресцентного сигналу в кожній із них.

Алгоритм використання ImageJ для вимірювання інтенсивності флуоресценції:

1. Відкрийте зображення з трансфікованими клітинами в ImageJ.
2. Використовуйте інструмент *ROI Manager* (Region of Interest) для виділення окремих клітин або певної ділянки зображення.
3. Використовуйте команду *Measure* (*Analyze > Measure*), яка дозволить виміряти інтенсивність флуоресценції у вибраних областях.
4. Порівняйте інтенсивність флуоресценції між різними зразками або типами клітин для оцінки рівня експресії.

Важливі моменти

- Інтенсивність флуоресценції може варіювати між клітинами навіть у межах одного експерименту, тому важливо проводити кілька вимірювань на різних клітинах і брати середнє значення.

- Інтенсивність сигналу також може залежати від параметрів флуоресцентної мікроскопії, таких як експозиція та налаштування фільтрів.

3. Життєздатність клітин. Життєздатність клітин є важливим фактором для оцінки впливу трансфекції на клітини. Навіть при високій ефективності трансфекції надмірна цитотоксичність трансфекційних реагентів може призвести до зниження життєздатності клітин, що негативно впливає на результати експерименту.

Методи оцінки життєздатності

- **Мікроскопічне спостереження:** візуальна оцінка морфології клітин після трансфекції. Здорові клітини мають правильну форму, чіткі контури та активне поділення.

- **Фармакологічні тести:** наприклад, використання фарбування трипаном синім, де мертві клітини фарбуються синім, а живі залишаються безбарвними.

- **Флуоресцентні маркери:** використання барвників для визначення клітин, які знаходяться в стані апоптозу або некрозу. Наприклад, пропідій йодид або Annexin V для виявлення мертвих клітин.

Важливі моменти

- Життєздатність клітин після трансфекції залежить від багатьох факторів, включаючи концентрацію трансфекційного реагенту, час інкубації з ним і тип клітин.

- Висока цитотоксичність може свідчити про необхідність оптимізації умов трансфекції (наприклад, зменшення кількості ПЕІ або ліпофектаміну, зменшення часу інкубації).

Практична частина

Матеріали і реактиви: клітини лінії HEK293 після трансфекції, 1X PBS, стерильні центрифужні пробірки (1,5 мл), стерильні наконечники для автоматичних піпеток, автоматичні піпетки (0,1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1000 мкл), 0,4% розчин трипанового синього, розчин DAPI.

Обладнання: флуоресцентний мікроскоп, центрифуга, водяна баня, ламінарний бокс, таймер, стерильні піпетки Пастера або вакуумна система, холодильник/морозильник, гемоцитометрична камера, комп'ютер із встановленим програмним забезпеченням ImageJ.

Хід роботи

1. Підготовка зразків для аналізу:

- через 24-48 годин після трансфекції обережно промийте клітини PBS, щоб видалити залишки середовища,

- якщо потрібно оцінити життєздатність клітин, обробіть клітини 0,4% розчином трипанового синього. Після обробки підрахуйте кількість життєздатних (нефарбованих) та нежиттєздатних (забарвлених) клітин.

2. Флуоресцентна мікроскопія:

- спостерігайте зразки клітин під флуоресцентним мікроскопом. Виберіть декілька полів зору для аналізу. Фотографуйте кожне поле зору, зберігаючи зображення для подальшого аналізу у програмі ImageJ,

- відзначте клітини, що світяться зеленим (GFP-позитивні) для подальшого підрахунку.

3. Підрахунок кількості клітин за допомогою ImageJ:

- відкрийте збережені зображення у програмі ImageJ,
- використовуйте команду *Process > Filters > Gaussian Blur*, щоб згладити шум у зображенні,
- налаштуйте рівень порогового значення флуоресценції за допомогою *Image > Adjust > Threshold*. Це дозволить виділити GFP-позитивні клітини,
- використовуйте команду *Analyze > Analyze Particles*, щоб автоматично підрахувати кількість GFP-позитивних клітин у кожному полі зору,
- для визначення загальної кількості клітин використовуйте DAPI-фарбування або ядерні маркери. Знову застосуйте *Analyze > Analyze Particles* для підрахунку загальної кількості клітин.

3. Визначення ефективності трансфекції:

- визначити ефективність трансфекції як відсоток GFP-позитивних клітин від загальної кількості клітин можна за формулою нижче

$$\% \text{ трансфікованих клітин} = \frac{\text{кількість трансфікованих клітин (GFP+)}}{\text{загальна кількість клітин}} * 100$$

4. Запис та аналіз результатів:

- записати кількість GFP-позитивних і загальних клітин у кількох полях зору,
- розрахувати середній відсоток трансфікованих клітин для кожного зразка.

Очікувані результати

Ефективна трансфекція клітин лінії HEK293 повинна призвести до експресії GFP, що можна візуалізувати за допомогою флуоресцентної мікроскопії. Очікується, що відсоток GFP-позитивних клітин становитиме від 50% до 80%, що свідчить про високу ефективність трансфекції.

Контрольні питання

1. Які основні методи оцінки ефективності трансфекції використовуються у дослідженнях?
2. Що таке репортерні гени і як вони допомагають оцінювати успішність трансфекції?
3. Які особливості використання GFP для оцінки трансфекції? Які переваги цього репортера?
4. Яка різниця між репортерними генами GFP, β-галактозидазою та люциферазою? Які їхні переваги та недоліки?
5. Як проводиться підрахунок кількості трансфікованих клітин за допомогою флуоресцентної мікроскопії?
6. Які переваги та недоліки флуоресцентної мікроскопії для оцінки ефективності трансфекції?
7. Чим відрізняється флуориметрія від флуоресцентної мікроскопії? В яких випадках флуориметрія більш ефективна?

8. Які основні переваги флуориметрії як кількісного методу оцінки трансфекції?

9. Як працює люциферазний аналіз і чому він є чутливим методом для оцінки рівня експресії гена?

10. Які переваги та недоліки люциферазного аналізу у порівнянні з іншими методами оцінки трансфекції?

11. Як визначається відсоток трансфікованих клітин? Опишіть основні кроки процедури підрахунку за допомогою флуоресцентної мікроскопії та програми ImageJ.

12. Яку роль відіграє інтенсивність флуоресценції при аналізі трансфекції? Як її можна виміряти за допомогою ImageJ?

13. Які фактори можуть вплинути на інтенсивність флуоресценції під час аналізу трансфекції?

14. Як оцінюється життєздатність клітин після трансфекції? Які методи для цього використовуються?

15. Чому важливо враховувати цитотоксичність трансфекційних реагентів при оцінці ефективності трансфекції?

16. Які фактори можуть вплинути на життєздатність клітин після трансфекції і як їх можна контролювати?

17. Як оптимізувати умови трансфекції для зменшення цитотоксичності і підвищення життєздатності клітин?

18. Чому для аналізу результатів трансфекції важливо використовувати кілька методів оцінки (наприклад, флуоресцентна мікроскопія, флуориметрія, люциферазний аналіз)?

19. Як використовуються фарбування трипаном синім і флуоресцентні маркери для оцінки життєздатності клітин після трансфекції?

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

Гиль М. І., Сметана О. Ю., Юлевич О. І., Баркарь Є. В., Горбатенко І. Ю., Нежлукченко Т. І., Барановський Д. І., Повод М. Г. *Молекулярна генетика та технології дослідження генома: навчальний посібник*. Херсон: Олді, 2019. 320 с.

Півень О. О., Скоробогатова З. М. *Сучасні інструменти редагування геному з основами молекулярної генетики: навчальний посібник*. Київ: Біокомполіт, 2021. 178 с.

Столяр О. Б. *Молекулярна біологія: навчальний посібник*. Київ: ЦНЛ, 2019. 224 с.

Alberts, B., Heald, R., Johnson, A. et al. *Molecular Biology of the Cell*. 7th ed. New York, NY: W. W. Norton & Company, 2022. 1552 p.

Bhat, T. A., Al-Khayri, J. M. *Genetic Engineering*. 1st ed. Palm Bay, FL, USA; Burlington, ON, Canada: Apple Academic Press; CRC Press, 2023. 328 p.

Brown, T. A. *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction*. 8th ed. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, John Wiley & Sons, 2021. 432 p.

Cannon, T. *Genetics and Genetic Engineering*. United Kingdom: EDTECH, 2018. 382 p.

Chandran, S., George, K. W. *DNA Cloning and Assembly: Methods and Protocols*. Springer US; Humana, 2020. 334 p.

Clark, D. P., Pazdernik, N. J. *Biotechnology*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier/Academic Cell Press, 2016. 825 p.

Craig, N. L., Chandler, M., Gellert, M., Lambowitz, A., Rice, P. A., Sandmeyer, S. *Mobile DNA III*. Washington, DC: ASM Press, 2015. 1350 p.

Dincer, S., Takci, H. A. M., Ozdenefe, M. S. *Molecular Cloning*. London: IntechOpen, 2022. 108 p.

Edgell, D. R. *Homing Endonucleases: Methods and Protocols*. New York: Humana Press, 2014. 294 p.

Glick, B. R., Patten, C. L., John Wiley & Sons Ltd. *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*. 6th ed. Washington, DC; Hoboken, NJ: American Society for Microbiology: AMS Press; John Wiley & Sons, 2022. 896 p.

Glieder, A., Kubicek, C. P., Mattanovich, D., Wiltschi, B., Sauer, M. *Synthetic Biology*. Cham: Springer, 2015. 368 p.

Hartl, D. L. *Essential Genetics and Genomics*. 7th ed. Burlington, MA: Jones & Bartlett Learning, 2020. 632 p.

Kühn, R., Wurst, W., Wefers, B. *TALENs: Methods and Protocols*. New York: Humana Press, 2016. 273 p.

Lundgren, M., Charpentier, E., Fineran, P. C. *CRISPR: Methods and Protocols*. New York, NY: Humana Press, 2015. 380 p.

Manfredsson, F. P., Benskey, M. J. *Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols*. New York: Humana Press, Springer, 2019. 342 p.

Mapelli, V., Bettiga, M. *Yeast Metabolic Engineering: Methods and Protocols*. 2nd ed. New York, NY: Humana Press, 2022. 295 p.

Nicholl, D. S. T. *An Introduction to Genetic Engineering*. United Kingdom: Cambridge University Press, 2023. 466 p.

Pierre, E. *Molecular Cloning*. New York: Callisto Reference, 2015. 340 p.

ІНФОРМАЦІЙНІ РЕСУРСИ

Львівська національна наукова бібліотека України імені В. Стефаника.
URL: <https://www.lsl.lviv.ua/index.php/uk/golovna2/>

Львівська обласна універсальна наукова бібліотека.
URL: <http://www.lounb.org.ua/>

Національна бібліотека України ім. В. І. Вернадського.
URL: <http://www.nbuv.gov.ua/>

Genetic Science Learning Center.
URL: <https://learn.genetics.utah.edu/content/basics/>

The National Center for Biotechnology Information.
URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

WorldCat. The world's largest library catalog. URL: <https://www.worldcat.org/>

Wiley. Online Library. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/>

Genome Biology. URL: <https://genomebiology.biomedcentral.com/>

GenScript. URL: https://www.genscript.com/gene_news.html

Recombineering. URL: <https://redrecombineering.ncifcrf.gov/background-info/>

Frontiers in Genome Editing. URL: <https://www.frontiersin.org/journals/genome-editing>

Gene and Genome Editing. URL: <https://www.sciencedirect.com/journal/gene-and-genome-editing>

Nature Biotechnology. URL: <https://www.nature.com/nbt/>

CRISPR Journal. URL: <https://home.liebertpub.com/publications/the-crispr-journal/642>

Gene Therapy. URL: <https://www.nature.com/gt/>

Ensembl Genome Browser. URL: <https://www.ensembl.org/index.html>

Addgene. URL: <https://www.addgene.org/>

Benchling. URL: <https://www.benchling.com/>

Khan Academy. Biotechnology. URL: <https://www.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology>

Coursera. URL: <https://www.coursera.org/>

EdX. Principles of Synthetic Biology. URL: <https://www.edx.org/learn/synthetic-biology/massachusetts-institute-of-technology-principles-of-synthetic-biology>

Labster. URL: <https://www.labster.com/>

PhET Interactive Simulations. URL: <https://phet.colorado.edu/>

Genetic Engineering & Biotechnology News (GEN). URL: <https://www.genengnews.com/>

ResearchGate. URL: <https://www.researchgate.net/>