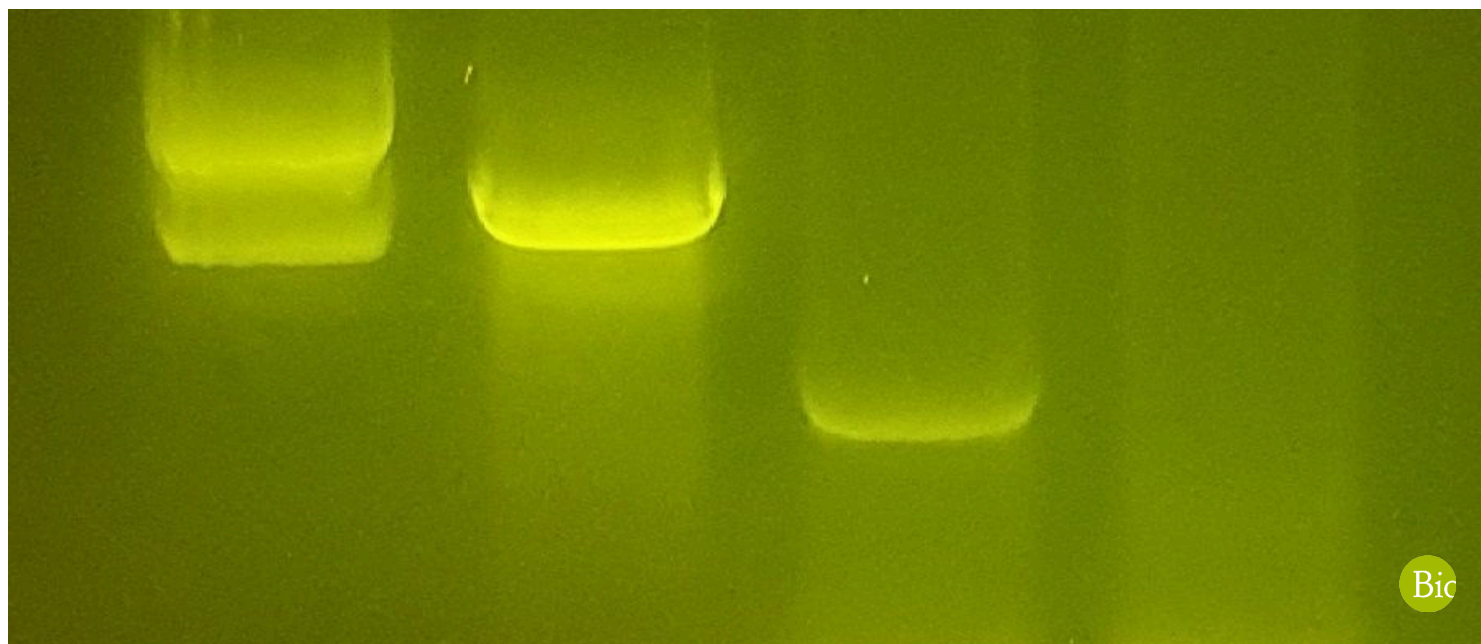


Электрофорез плазмидной ДНК



Химия → Общая химия → Смеси и разделение вещества

Химия → Органическая химия → Биохимия

Биология → Микробиология и генетика → Молекулярная генетика

Биология → Биохимия

Прикладные науки → Медицина → Биохимия



Уровень сложности

средний



Размер группы

2



Время подготовки

20 Минут



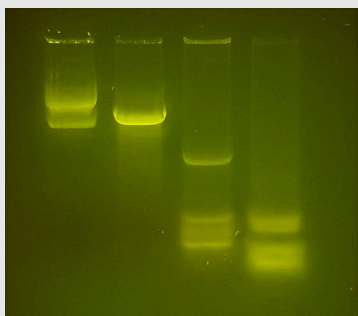
Время выполнения

20 Минут



Информация для учителей

Описание (1/3)



Гель-электрофорез
плазмидной ДНК

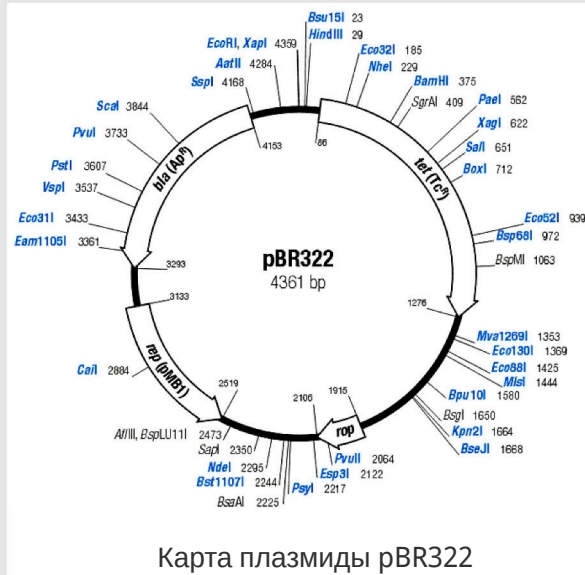
Плазмиды идеально подходят для изучения того, как работает гель-электрофорез. В эксперименте тестируют 4 образца ДНК плазмиды pBR322. В одном образце плаزمида присутствует в неразрезанной форме: в форме кзк - ковалентно замкнутое суперскрученное кольцо и в форме ок - открытое кольцо. В образцах плазмиды была переварена различными ферментами рестрикции:

- EcoRI (хозяин - кишечная палочка (*Escherichia coli*), производит "липкие концы" на 5'-G AATTC-3' - разрезы на одном участке, создавая открытую кольцевую форму плазмиды);
- HinfI (хозяин - палочка инфлюэнцы (*Haemophilus influenzae*), производит "липкие концы" на 5'-G ANTC-3');
- HaeIII (хозяин - гемофильная палочка (*Haemophilus egyptius*), производит гладкие концы при 5'-GG CC-3').

В результате получается разное количество фрагментов разной длины, которые можно визуализировать с помощью гель-электрофореза.

Описание (2/3)

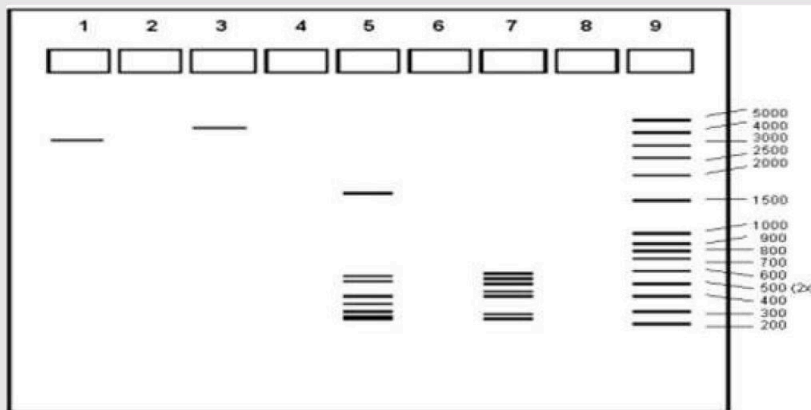
PHYWE
excellence in science



pBR322 - одна из первых искусственно созданных плазмид. Чтобы иметь возможность анализировать фрагменты ДНК и РНК, их обычно разделяют по размеру и делают видимыми путем окрашивания. Для этого используется гель-электрофорез. Нуклеиновые кислоты заряжены отрицательно и поэтому движутся в электрическом поле в направлении положительного полюса (анода).

Описание (3/3)

PHYWE
excellence in science



Ориентировочное представление подготовленного геля

Чтобы иметь возможность анализировать фрагменты ДНК и РНК, их обычно разделяют по размеру и делают видимыми путем окрашивания. Для этого используется гель-электрофорез. Нуклеиновые кислоты заряжены отрицательно и поэтому движутся в электрическом поле в направлении положительного полюса (анода).

Электрофоретическое разделение ДНК от плазмиды pBR322 приводит к следующим образцам полос: полоса 1: pBR322, непереваренная (кубическая форма); полоса 3: pBR 322 EcoR1; полоса 5: pBR 322 HinfI; полоса 7: pBR322 HaeIII; полоса 9: необязательный маркер длины (не входит в комплект) (все значения в парах оснований (bp)).

Дополнительная информация для учителей (1/4)

PHYWE
excellence in science

Предыдущие знания



Студенты уже должны знать молекулярную структуру и свойства ДНК. Кроме того, они также должны иметь базовое представление о бактериях, знать, как работают ферменты рестрикции и поведение заряженных молекул в электрическом поле.

Принцип



Плазмиды и фрагменты плазмид разделяют по размеру в агарозном геле. При использовании таблеток агарозы GelGreen® 3-в-1 флуоресцентный краситель SYBR-Green, содержащийся в таблетках, интеркалируется с ДНК. Краситель освещается специальным светом электрофорезной камеры и, таким образом, заставляет ДНК светиться.

Дополнительная информация для учителей (2/4)

PHYWE
excellence in science

Цель



В ходе этого эксперимента студенты должны узнать и понять, как работает гель-электрофорезная камера. С помощью этого метода ДНК разделяется по размеру и становится видимой.

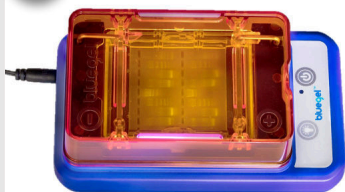
Задачи



Студенты готовят агарозный гель заданной концентрации и применяют различные образцы ДНК. Разделение можно наблюдать в реальном времени, самостоятельно задокументировав его с помощью смартфона или планшета и передав эти данные на компьютер.

Дополнительная информация для учителей (3/4)

PHYWE
excellence in science



Введение в систему

Инструкции по подготовке и выполнению работы

- Краситель SYBR-Green, используемый в таблетках GelGreen, является безопасной альтернативой обычному бромиду этидия. Он не проникает через кожу, но может проникать в ткани через открытые раны. Поэтому рекомендуется использовать нитриловые перчатки.
- При использовании таблеток GelGreen обратите внимание, что таблетка уже содержит TBE соль. Добавлять соль больше нельзя. В таблетку необходимо добавить только то количество деионизированной воды, которое указано на вкладыше упаковки.
- Рабочий буфер также должен быть буфером TBE и иметь концентрацию 1x.

Дополнительная информация для учителей (4/4)

PHYWE
excellence in science

Экспериментальные варианты и примечания



- Для кипячения геля рекомендуется использовать микроволновую печь (или электроплитку).
- Эксперимент также можно проводить на гелях, состоящих из отдельных компонентов (агароза, TBE или TAE), и полосах ДНК, окрашенных раствором метиленового синего. Однако здесь невозможно наблюдать разделение в реальном времени.
- Поскольку пипетирование - непростая задача, рекомендуется заранее отработать эту процедуру со студентами с помощью специальных карт, входящих в состав набора.

Инструкции по технике безопасности

PHYWE
excellence in science

- К этому эксперименту применяются общие инструкции по безопасному проведению экспериментов при преподавании естественных наук.
- Правила работы с опасными веществами приведены в соответствующих паспортах безопасности.
- SYBR-Green, используемый в таблетках GelGreen, является безопасной альтернативой обычному бромиду этидия. Он не проникает через кожу, но может проникать в ткани через открытые раны. Поэтому рекомендуется использовать перчатки.
- Агарозный гель, изготовленный из GelGreen таблетки может быть утилизирован с обычным бытовым мусором.

Инструкции по хранению и подготовке

PHYWE
excellence in science

Хранение

Благодаря тому, что образцы ДНК лиофилизированы, они очень стабильны и могут храниться при комнатной температуре в течение нескольких дней. То же самое относится и к другим компонентам комплекта. Тем не менее, рекомендуется хранить содержимое комплекта в холодильнике, за исключением агарозы и буфера TAE.

Подготовка

ДНК растворяются в буфере загрузки геля настолько стерильно, насколько это возможно:

- рBR322 ДНК, без надрезов + добавление 110 мкл буфера для загрузки геля.
- рBR322 ДНК, разрез Eco RI + добавление 130 мкл буфера для загрузки геля.
- рBR322 ДНК, разрез Hinf I+ добавление 110 мкл буфера для загрузки геля.
- рBR322 ДНК, разрез Hae III + добавление 110 мкл буфера для загрузки геля.

Примечания по подготовке

PHYWE
excellence in science

Процесс растворения занимает прибл. 15 минут, время от времени энергично перемешивайте емкости с помощью магнитной мешалки или энергично встряхивайте рукой. В конце процесса растворения постучите трубкой по столу, чтобы вся жидкость снова собралась на дне трубки. ДНК также можно растворить на ночь в холодильнике, чтобы растворенная ДНК была доступна сразу на следующий день. Подготовленные для электрофореза образцы можно хранить в холодильнике несколько дней на случай, если электрофорез будет проведен позже. Для более длительного хранения образцы следует заморозить при -20°C .

Буфер для загрузки геля используется для "взвешивания" молекул ДНК, чтобы они лучше погружались в подготовленный гель. Краситель в буфере для загрузки геля облегчает пипетирование в подготовленный гель, а также используется для контроля за ходом электрофореза. Лиофилизованная ДНК прозрачна и поэтому почти не видна в сосудах (прозрачная пленка). Окрашивание следует проводить сразу же после гель-электрофореза, иначе полосы ДНК диффундируют в геле и становятся размытыми.

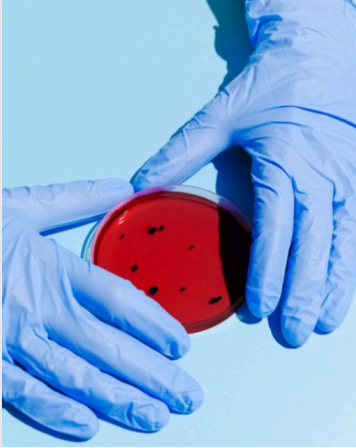
Прилагаемую неразрезанную ДНК также можно использовать для собственных экспериментов. Необходимые ферменты рестрикции можно приобрести в специализированных магазинах.

PHYWE
excellence in science

Информация для студентов

Мотивация (1/3)

PHYWE
excellence in science



Устойчивые бактерии

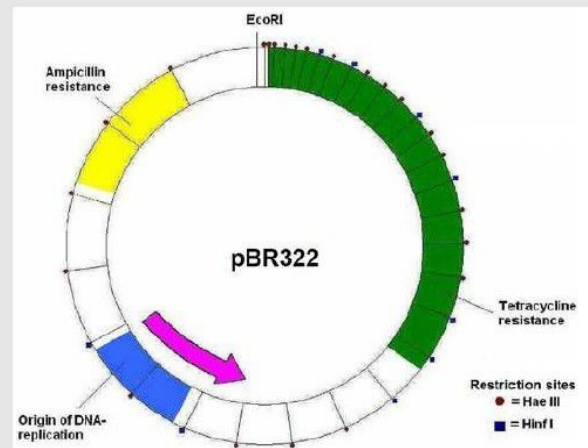
Практически во все времена нашей жизни мы окружены бактериями и даже живем в симбиозе с некоторыми из них. Чтобы быстро адаптироваться к окружающей среде, у бактерий есть плазмиды. Это кольцеобразные молекулы ДНК, которые естественным образом встречаются в бактериях и археях; редко встречаются в эукариотах (на хлебопекарных дрожжах). Плазмиды имеют размер от 1000 до 1 000 000 пар оснований, содержат последовательности ДНК, что позволяет использовать транскрипционные комплексы клеток-хозяев и реплицировать их самостоятельно. Клетка может содержать несколько разных плазмид, а также несколько копий одной и той же плазмиды. В этом контексте плазмиды могут содержать несколько генов и реплицироваться автономно. Генетическая информация о плаزمиде дает хозяевам эволюционные преимущества, такие как устойчивость к антибиотикам или создание новых источников пищи. Клетки-хозяева имеют эволюционные преимущества перед другими бактериями и поэтому могут лучше размножаться. Бактерии и плазмиды живут в симбиозе. Если плаزمида имеет недостатки, это может привести к гибели клетки-хозяина.

Мотивация (2/3)

PHYWE
excellence in science

Благодаря своим свойствам, плазмиды также используются в биотехнологиях и исследованиях. Чтобы получить определенную плазмиду, должны быть вырезаны необходимые гены (последовательности ДНК) и собраны вместе, чтобы сформировать плазмиду в соответствии с планом. Здесь помогают ферменты рестрикции, то есть белки, которые могут разрезать ДНК.

Ферменты рестрикции существуют во всех живых организмах. Подходящие для этого процесса ферменты выбираются таким образом, чтобы ДНК была разрезана точно в нужном месте. Некоторые ферменты в одной точке гладко разрезают обе нити ДНК, а некоторые слегка смещены, создавая "липкие концы", которые способствуют сборке плазмиды.



Схематическое изображение плазмиды pBR322

Мотивация (3/3)

PHYWE
excellence in science

Некоторые лекарства синтезируются с помощью генной инженерии

Молекулы ДНК, введенные плазмидами, заставляют бактерии вырабатывать вещества, необходимые человеку. При этом плазида может оставаться в клетке-хозяине в качестве плазмиды - а еще лучше: быть включена в ее геном с помощью определенных встроенных последовательностей ДНК. В то время как перенос плазмиды в дочерние клетки не определен, а перенос с бактериальной ДНК не вызывает сомнений. Таким образом, в настоящее время можно получить около 140 различных препаратов, таких как инсулин (против диабета), гормоны (лечение нарушений роста) или ферменты (против муковисцидоза).

Задачи

PHYWE
excellence in science

1. Приготовьте 1,5 % агарозный гель: обратите внимание, что таблетка агарозы уже содержит агарозу, флуоресцентный краситель и соль TBE, поэтому нужно добавлять только деионизированную воду. Используйте инструкции по применению таблеток.
2. Загрузите образцы ДНК в подготовленный гель и начните электрофорез.
3. Сравните рисунок полос разрезанной плазмиды с аналогичным рисунком полос неразрезанной плазмиды.

Материал

Позиция	Материал	Пункт No.	Количество
1	blueGel Камера для гель-электрофореза с источником питания	35016-99	1
2	GelGreen® Agarose Tabs™, 3-in-1 agarose tablets	35018-61	1
3	Микролитровая пипетка 2-20 мкл, автоклавируемая	47141-10	1
4	Бактериальная плазмидная ДНК	KLA-530-100	1
5	Наконечники для микролитровых пипеток, 2-200 мкл, желт., 1000 шт.	47148-01	1
6	Шпатель, с никелевым покрытием, 180 мм	33392-00	1
7	Защитные очки, прозрачные	39316-00	1
8	Колба Эрленмейера, широкогорлая, 100 мл	46151-00	1
9	Мерный цилиндр, 100 мл	36629-00	1
10	Вода, дистиллирован., 5 л	31246-81	1
11	Резиновые перчатки, размер 8	39323-00	1
12	Бутылка с резьбовой крышкой, 250 мл, GL 45, стекло	34155-00	1
13	Мерный цилиндр, 250 мл,	36630-00	1
14	Трис-боратный буфер (ТВЕ) для электрофореза	KLA-530-223	1
15	Градуированная пипетка, 25 мл	36602-00	1
16	Шаровая пипетка	36592-00	1

Подготовка (1/2)

PHYWE
excellence in science



Видео 1: Заливка геля

- Разбавьте 10-кратный концентрированный концентрат буфера TBE до 1x деионизированной водой (на один гель требуется около 30 мл буфера).
 - Приготовьте 1,5% агарозный гель (см. также видео 1). **Внимание: одной таблетки достаточно для двух 1% гелей.**
1. Выньте из упаковки таблетку с агарозой GelGreen и поместите ее в колбу Эрленмейера.
 2. Добавьте в таблетку 40 мл деионизированной воды и вскипятите (в микроволновой печи или на электроплитке).
 3. Поместите стеклянную емкость для геля в платформу для заливки, а гребень - в емкость для геля (гребень находится под платформой для заливки). Используйте сторону гребня с большими зубцами.

Подготовка (2/2)

PHYWE
excellence in science



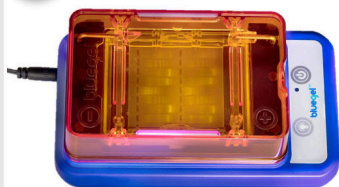
Готовый гель, готовый к загрузке

Теперь налейте в чашу 20 мл жидкого геля и дайте ему застыть (около 10 минут).

- После остывания геля осторожно вертикально вытащите гребень из геля.
- Теперь поместите емкость с гелем в буферную камеру базового блока.
- Заполните буферную камеру 1x TBE, чтобы гель заполнил поверхность камеры.

Выполнение работы (1/2)

PHYWE
excellence in science



Загрузка и запуск геля

Загрузка и запуск геля (см. также видео 2):

- Возьмите пипетку объемом 2 мкл–20 мкл на 7 мкл и наденьте на нее желтый наконечник.
- Загрузите четыре образца ДНК в гель в следующем порядке:
 1. pBR322 ДНК, без надрезов
 2. pBR322 ДНК, разрез Eco RI
 3. pBR322 ДНК, разрез Hinf I
 4. pBR322 ДНК, разрез Xэ III
- Теперь аспирируйте (наберите) 7 мкл в наконечник с помощью пипетки и осторожно переносите содержимое в ячейку.

Выполнение работы (2/2)

PHYWE
excellence in science



Гель-камера с "черной камерой" и смартфоном

- Повторите процесс и меняйте после каждого образца наконечник, чтобы не допустить загрязнения образцов друг другом.

Запуск геля

- Закройте базовый блок крышкой и включите его , нажав кнопку "Вкл / Выкл".
- Разверните "черную камеру" и аккуратно наденьте ее на крышку (см. также фото слева).
- Нажав кнопку "Свет", активируете синий свет и следите за разделением образцов. С помощью смартфона или планшета задокументируйте разделение на пленке или сделайте фотографии и видео.
- Разделение завершается примерно через 20 минут.



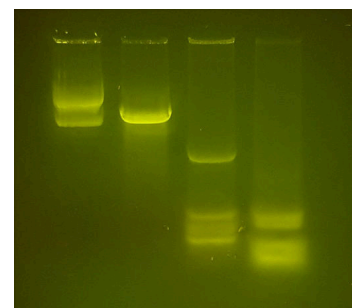
Протокол

Задача 1

Сравните свои результаты с таблицей и показанной фотографией

Размеры фрагментов с оптимальным окрашиванием и разделением (задаются в парах оснований, bp)

ρBR322-ДНК ЭкоRI	ρBR322-ДНК HinfI	ρBR322-ДНК ХэIII
4.361	1.632	587
	517	540
	504	502
	396	458
	344	434
	298	267
	221	234
	220	212



Разделение ДНК плазмиды

Задача 2

Что происходит во время гель-электрофореза?

- Чем выше концентрация агарозы, тем хуже поток проходит через камеру.
- Разделение фрагментов ДНК в соответствии с их зарядом.
- Разделение фрагментов ДНК в соответствии с их размерами.
- Фрагменты лямбда-ДНК становятся видимыми без красителя.



Задача 3

Заполните пробелы в тексте

ДНК заряжена отрицательно и мигрирует к аноду в электрическом поле. ДНК представляет собой двойную спираль. и тимин, а также цитозин и связаны водородными связями.

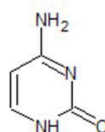
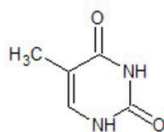
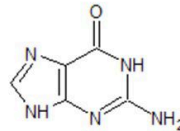
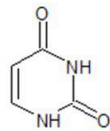
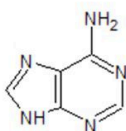
Плазмиды - это молекулы ДНК, размеры которых варьируются от 1 000 до 1 000 000 пар оснований, которые дают хозяину эволюционное .

EcoRI - это , который распознает определенную ДНК и разрезает ее.

Проверить

Задача 4

Напишите названия оснований



Гуанин

Аденин

Цитозин

Урацил

Тимин

 Проверить

Задача 5

Какими характеристиками должна обладать ДНК, чтобы ее можно было распознать и разрезать с помощью определенного фермента рестрикции?

- Последовательность ДНК не имеет значения, ферменты рестрикции обрезают только определенные длины фрагментов ДНК.
- Ферменты рестрикции распознают и разрезают последовательности ДНК, присутствующие в виде палиндрома.
- Ферменты рестрикции всегда гладко разрезают нити ДНК.

 Проверить

Слайд	Оценка/Всего
Слайд 24: Принцип гель-электрофореза	0/1
Слайд 25: Свойства ДНК	0/6
Слайд 26: Назначьте базам их имена	1/1
Слайд 27: Ферменты ограничения	0/1

Всего  1/9 Решения Повторить