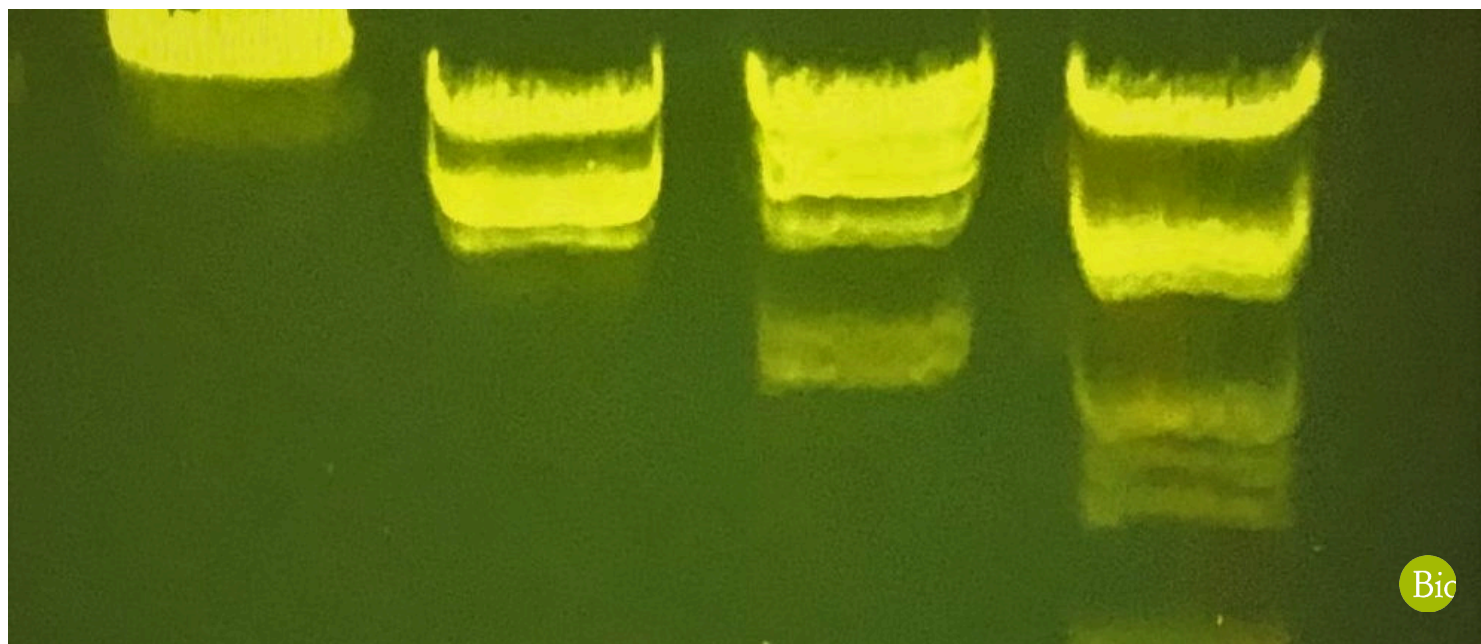


Электрофорез лямбда-ДНК



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

10 Минут



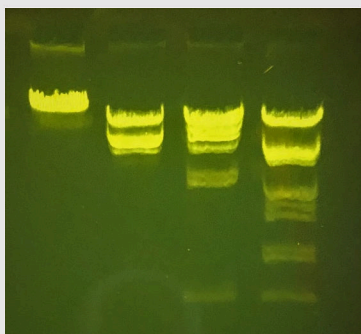
Время выполнения

30 Минут



Информация для учителей

Описание



Гель-электрофорез
лямбда-ДНК с системой
blueGel

Для того, 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 к положительному полюсу (аноду).

Здесь анализируется генетический состав вируса Лямбда. Этот вирус был открыт и исследован еще в 1950 году и является одним из наиболее изученных вирусов. Его "хозяином" является бактерия *Escherichia Coli* (Кишечная палочка), и поэтому он также классифицируется как бактериофаг.

Генетический состав вирусов сравнительно невелик (48 502 пары оснований) и может быть легко отображен с помощью гель-электрофореза. Нуклеотидная последовательность полностью известна с 1982 года, что позволяет при переваривании рестрикционными ферментами генерировать фрагменты определенных размеров.

Дополнительная информация для учителей (1/4)

PHYWE
excellence in science

предварительные знания



Студенты уже должны знать состав и свойства ДНК. Они также должны знать, как работают ферменты рестрикции и поведение заряженных молекул в электрическом поле. Студенты также должны иметь базовое представление о вирусах.

Принцип



Генетический материал фаг лямбда разрезают и наносят неразрезанным на агарозный гель, а затем разделяют в соответствии с размером.

При использовании таблеток агарозы GelGreen® 3-в-1 флуоресцентный краситель SYBR-Green, содержащийся в таблетках, интеркалируется с ДНК. Краситель освещается специальным светом гелевой камеры blueGel™ 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 BlueGel

Инструкции по подготовке и выполнению работы

- На видео слева показаны производство геля, сборка системы и пример разделения ДНК.
- 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.
- Для кипячения геля рекомендуется использовать микроволновую печь (или электроплитку).

Дополнительная информация для учителей (4/4)

PHYWE
excellence in science

Варианты эксперимента и примечания



- 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.
- Фрагменты ДНК могут прилипнуть друг к другу, и во время гель-электрофореза могут возникать артефакты: цепочки, прилипающие друг к другу, или кольцевые структуры, которые спонтанно образуются из фрагментов. Их можно очень просто разделить, нагревая все образцы ДНК до 68 °C в течение 5 минут. Немедленное охлаждение льдом предотвращает повторное формирование этих структур.

Инструкции по технике безопасности

PHYWE
excellence in science

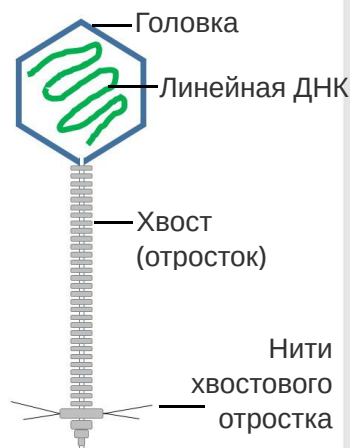
- К этому эксперименту применяются общие инструкции по безопасному проведению экспериментов при преподавании естественных наук.
- Правила работы с опасными веществами приведены в соответствующих паспортах безопасности.
- SYBR-Green, используемый в таблетках GelGreen, является безопасной альтернативой обычному бромистому этидию. 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.

PHYWE
excellence in science

Информация для студентов

Мотивация (1/2)

PHYWE
excellence in science



Схематическое изображение фага лямбды

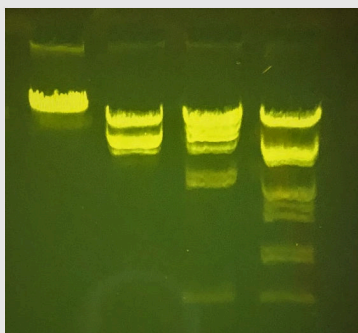
Вирусы - это захватывающие и особые структуры. Хотя все они содержат генетический материал, необходимый для размножения, они не могут этого сделать без "хозяина". У них также нет собственного метаболизма. По этой причине они не считаются живыми существами, а считаются "близкими к жизни".

По оценкам, во всем мире существует от 200 000 до 600 000 вирусов, которые можно классифицировать примерно на 3000 типов вирусов. Многие вирусы обладают характеристиками "хозяина", которые могут расширяться или изменяться в процессе эволюции.

Анализируемый здесь бактериофаг Лямбда специализируется на бактерии *Escherichia Coli* (Кишечная палочка), поэтому не представляет опасности для человека. Этот вирус был открыт еще в 1950 году и с тех пор интенсивно исследуется.

Мотивация (2/2)

PHYWE
excellence in science



Полосы ДНК в агарозном геле

Гель-электрофорез позволяет разделить ДНК и РНК и сделать их видимыми. Он использует отрицательный заряд нуклеиновых кислот, которые мигрируют в электрическом поле к положительному полюсу (аноду). Агарозный гель, служит в качестве стационарной (неподвижной) фазы: чем выше концентрация агарозы в геле, тем плотнее сетка. Маленьким фрагментам ДНК легче, чем большим, перемещаться через эту сеть к аноду и, следовательно, со временем мигрировать дальше в геле.

Сами по себе нуклеиновые кислоты в геле не видны. Их можно либо окрашивать раствором метиленового синего после окончания цикла, либо использовать вещества, которые интеркалируются между основаниями генетического материала (накапливаются там). В этом эксперименте используется флуоресцентный краситель, который интеркалирует с фрагментами лямбда ДНК. Синий свет камеры для электрофореза заставляет краситель светиться, и таким образом ДНК становится видимой (зелено-желтые полосы, как на фото слева).

Задачи

PHYWE
excellence in science

1. Приготовьте 1% агарозный гель: обратите внимание, что таблетка агарозы уже содержит агарозу, флуоресцентный краситель и соль TBE, поэтому нужно добавлять только деионизированную воду.
2. Загрузите образцы ДНК в подготовленный гель и начните электрофорез.
3. Сравните неразрезанную фаговую ДНК с расщепленными фрагментами.

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	Электрофорез Лямбда-ДНК	KLA-530-110	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 10x концентрированный концентрат буфера TBE до 1x деионизированной водой (на один гель требуется около 30 мл буфера).
 - Приготовьте 1% агарозный гель (см. также видео 1). **Внимание: одной таблетки достаточно для приготовления 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 разливки, а гребень - в емкость для геля (гребень находится под платформой для разливки). Используйте сторону гребня с большими зубцами.

Подготовка (2/2)

PHYWE
excellence in science



Гель, готовый к загрузке

4. Теперь налейте в чашу 20 мл жидкого геля и дайте гелю застыть (около 10 минут).
 - После остывания геля осторожно вытащите гребень из геля вертикально.
 - 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. Лямбда-ДНК, нативная
 2. Лямбда-ДНК, разрез EcoRI
 3. Лямбда-ДНК, разрез HindIII
 4. Лямбда-ДНК, разрез EcoRI / HindIII
- 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.

PHYWE
excellence in science



Протокол

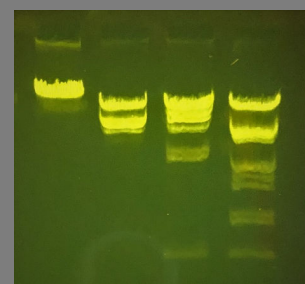
Задача 1

PHYWE
excellence in science

Сравните свои результаты с таблицей и показанной фотографией

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

Лямбда-ДНК Нативная	Лямбда-ДНК EcoRI	Лямбда-ДНК HindIII	Лямбда-ДНК EcoRI / HindIII
48.502	21.226	23.130	21.226
	7.421	9.416	5.148
	5.804	6.557	4.973
	5.643	4.361	4.268
	4.878	2.322	3.530
	3.530	2.027	2.027
		564	1.904



Разделение лямбда-ДНК

Задача 2

PHYWE
excellence in science

Что происходит во время гель-электрофореза?

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

✓ Проверить



Задача 3

PHYWE
excellence in science

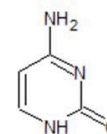
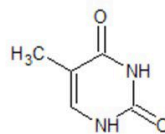
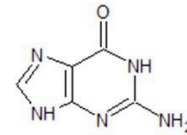
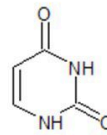
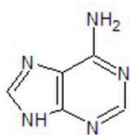
Как лямбда-ДНК ведет себя при гель-электрофорезе?

ДНК заряжена и мигрирует в электрическом поле к . Агарозный гель действует как стационарная (неподвижная) фаза и позволяет разделять фрагменты ДНК в соответствии с их . фрагменты разделяются медленнее, чем .

✓ Проверить

Задача 4

Напишите названия оснований



Гуанин

Аденин

Цитозин

Урацил

Тимин

✓ Проверить

Слайд	Оценка/Всего
Слайд 19: Принцип гель-электрофореза	0/1
Слайд 20: ДНК лямбды при гель-электрофорезе	0/5
Слайд 21: Базовое имя	1/1

Общая сумма  1/7

👁 Решения

🔄 Повторить