НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного

Методичні рекомендації щодо практичних занять з дисциплін «Віруси бактерій» «Вірусоподібні частки та їх значення для сучасної медицини»

Київ 2023

Рекомендовано Вченою радою Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України (протокол № 9 від 24.10.2023 р.)

Укладачі:
Товкач Ф.І., доктор біологічних наук, старший науковий співробітник, завідувач відділу молекулярної генетики бактеріофагів
Кушкіна А.І., кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник відділу молекулярної генетики бактеріофагів
Златогурська М.А., кандидат біологічних наук, науковий співробітник відділу молекулярної генетики бактеріофагів

У методичних рекомендаціях до навчальних дисциплін «Віруси бактерій» та «Вірусоподібні частки та їх значення для сучасної медицини» подано зміст практичних занять з вивчення автономних генетичних елементів та виявлення генетичних послідовностей методом полімеразної ланцюгової реакції. У методичних рекомендаціях наведено методики і прописи необхідних буферів та розчинів.

© Колектив авторів, 2023
Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України

Автономні генетичні елементи бактерій: бактеріофаги, плазміди і транспозони

Тема: Лізис як стратегія розвитку бактеріофага Т7 Escherichia coli. Морфологія і структура ДНК фага Т7

1-й день

Приготування нічної культури *E. coli* BE

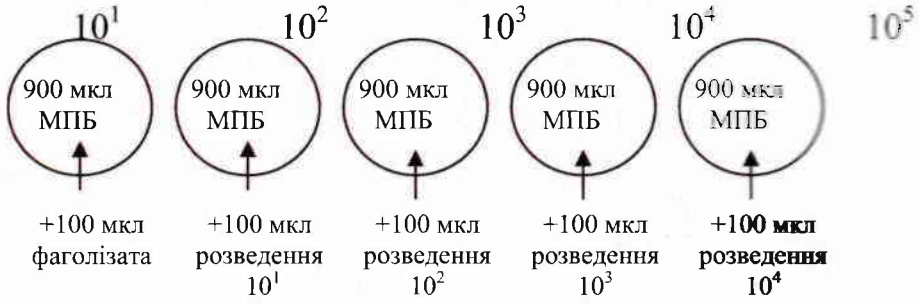
Хід роботи. Бактеріальною культурою *E. coli* BE, яка виросла на твердому МПА, інокулюємо 3 мл МПБ. Інкубуємо 8 – 12 годин при 37°С.

2-й день

Титрування фага Т7

Хід роботи .

1. Нічну культуру *E. coli* BE розводимо 1:50. Для цього до 3 мл МПБ додаємо 60 мкл нічної культури. Інкубуємо 2 години при 37°С до концентрації $2x10^8$ кл/мл.
2. Титрування бактеріофага Т7 здійснюємо методом серійних десятикратних розведень. Для цього з вихідного штока фага Т7 відбираємо 100 мкл фаголізата і вносимо у 900 мкл стерильного МПБ. Отримуємо перше десятикратне розведення, де ступінь вмісту фагових часток складає 10^{-1} відносно вихідного фаголізата, а кратність розведення 10^1.



Новим накінечником відбираємо 100 мкл з отриманого першого розведення і вносимо у 900 мкл стерильного МПБ. Отримуємо друге десятикратне розведення, кратність розведення фаголізата в якому складає 10^2 відносно вихідного фаголізата і т.д. У наступні 900 мкл бульону додаємо 100 мкл попереднього розведення. Готуємо таким чином 5 розведень. Наприкінці усі розведення будуть мати об´єм по 900 мкл, а останнє - 1000 мкл. Розведення зберігаємо у холодильнику.

3. Фагові розведення висіваємо методом двошарових агарових чашок. Для цього стовпчик з м´яким МПА (вміст агара 0,5%) об´ємом 5 мл

розтоплюємо на водяній бані (воду доводимо до кипіння). Охолоджуємо водяну баню зі стовпчиком до 55°С.

4. В охолоджений стовпчик з м´яким МПА додаємо 500 мкл двогодинної культури *E.coli* BE і 100 мкл фагового розведення, трохи збовтуємо і акуратно виливаємо на чашку з шаром твердого МПА (вміст агара 1,5%). Даємо застигнути при кімнатній температурі.
5. Двошарові чашки інкубуємо 18 – 20 годин при 37°С.
6. Готуємо нічну культуру *E.coli* BE (див. День 1)

3-й день

Титрування фага Т7(продовження)

Титр фагових часток підраховуємо за формулою

T= (n/m) x R, де

T – титр фага;
n – кількість негативних колоній;
m– об´єм суспензії, що висівається на чашку, в мл – 0,005мл
R – кратність розведення.

Препаративне отримання фага Т7 методом злитного лізису

Підходящим розведенням фаголізата для накопичення фагових часток у препаративних кількостях будет те розведення, яке дає злитний лізис при висіванні його на чашку з чутливою культурою. Злитний лізис утворюється тоді, коли фагові бляшки розташовуються щільно одна до одної по усій поверхні агарового шару. При цьому можуть бути помітними межі бляшок, але культура чутливої бактерії у газоні відсутня.

Хід роботи

1. Готуємо двогодинну культуру *E.coli* BE (див. День 2, п.1).
2. Після підрощування культури висіваємо на чашки розведення фага, яке дає злитний лізис методом двошарових агарових чашок (див. День 2, п. 2,3,4)
3. Готуємо нічну культуру *E.coli* BE (див. День 1)

4-й день

Концентрування часток фага Т7 методом ПЕГ-преципітації (процедура Ямамото)

Хід роботи

1. Чашку Петрі зі злитним лізисом чутливої культури заливаємо 10 мл МПБ і шпателем Дригальского знімаємо шар верхнього агара у стерильну колбу.
2. До суспензії додаємо приблизно 1 мл хлороформа.
3. Агар розбиваємо на магнітній мішалці при 4 °С 1,5-2 години.
4. Отриману суспензію центрифугуємо 45 хвилин при 5000 об./хв, при +10° С.
5. Після центрифугування надосадову рідину зливаємо у стерильну колбу, а осад повторно відмиваємо половинним об´ємом МПБ. Супернатант після

відмивання з'єднуємо з попереднім та зберігаємо при +4°С. Стерилізуємо хлороформом.

Процедура Ямамото

1. У стерильний пеніциліновий флакон переносимо 5 мл отриманого фаголизата.
2. До нього додаємо 10 % поліетиленгліколя (ПЕГ) 6 000 - 500мг, залишаємо у холодильнику для розчинення.
3. Після розчинення ПЕГ додаємо 292 мг NaCl. Кінцева концентрація NaCl може складати від 1 до 0,5 М. Залишаємо у холодильнику на ніч.

5-й день

Концентрування часток фага Т7 методом ПЕГ-преципітації (продовження)

1. Центрифугуємо 5 мл фаголізата 15 хвилин при 5 000 об./хв.
2. Осад ресуспендуємо в 0,5 мл буфера для концентрування наступного складу: 10 мМ трис HCl, pH 7,5, 50 мМ NaCl.
3. Отриману суспензію переносимо у пробірку Епендорфа і додаємо 0,3 мл хлороформа. Струшуємо приблизно 5 хвилин.
4. Центрифугуємо 5 хвилин при 11 000 об./хв на мікроцентрифузі ELMI.
5. Супернатант переносимо у стерильну пробірку Епендорфа і додаємо 200 мкл хлороформа. Струшуємо 5 хвилин.
16. Центрифугуємо 5 хвилин при 11 000 об./хв на мікроцентрифузі ELMI.
17. Супернатант (фаголізат) відбираємо у стерильну пробірку Епендорфа і зберігаємо у холодильнику при + 4 °С.

Виділення ДНК фага Т7

При роботі з ДНК обов'язковими є рукавички і маска.

Хід роботи

1.500 мкл фаголізата переносимо у стерильну пробірку Епендорфа.
2. Додаємо у наступній послідовності:
75 мкл пронази В (1 мг/мл)
12,5 мкл 20 % SDS (кінцева концентрація 0,8 %).
3. Інкубуємо 10 хвилин в ультратермостаті при 60°С (загальний об'єм суміші 587,5 мкл).
5. Додаємо у наступній послідовності:
5 мкл Na_2ЕДТА 0,25 М (кінцева концентрація 0,002 М).
60 мкл ацетата натрія 3 М (кінцева концентрація 0,3 М).
500 мкл фенола pH 7,6
6. Акуратно змішуємо.
7. Центрифугуємо 5 хвилин при 11 000 об./хв на мікроцентрифузі.
8. Верхню водну фазу переносимо у стерильну пробірку Епендорфа. На інтерфазі має осісти денатурований білок.
9. Додаємо 2 об'єми перегнаного спирту.
10. Преципітуємо при – 20°С від 20 хвилин до 1 доби.

11. Відмиваємо 4 рази у спирті від фенола. Для цього осаджуємо преципітовану ДНК 5 хвилин при 11 000 об./хв на мікроцентрифузі. Акуратно зливаємо спирт і перевертаємо пробірку Епендорфа на фільтрувальний папір для підсушування на 2-5 хвилин.
12. Додаємо 500 мкл перегнаного спирта.
13. Осаджуємо 5 хвилин при 11 000 об./хв на мікроцентрифузі і так само ще три рази. Критерієм «відмитої» ДНК є відсутність запаха фенола з пробірки.
14. Після цього просушуємо ДНК 20 хвилин, перевернувши пробірку на фільтрувальний папір.
15. Додаємо 200 мкл стерильної дистильованої води і залишаємо пробірку в холодильнику на 15 хвилин - 3 години.
16. Для зберігання у водний розчин ДНК додаємо трис HCl, pH 7,5 до кінцевої концентрації 10 мМ. ДНК зберігають у холодильнику.

6-й день

Рестрикційний аналіз ДНК фага Т7

Загальний об`єм реакційної суміші повинен складати 20 мкл.

Хід роботи

1. У стерильні пробірки Еппендорфа або мікропланшет вносимо 16 мкл стерильної дистильованої води.
2. Додаємо 2 мкл відповідного буферу для рестриктази.
3. Додаємо 1 мкл фагової ДНК.
4. Додаємо 1 мкл рестриктази.
5. Інкубуємо 1,5-2 години при 37 °С.
6. Додаємо 4 мкл стоп-буферу.
   Зразок у такому вигляді можна зберігати при – 20 °С.
7. Зразок об`ємом 10 мкл вносимо в лунку 1% агарозного геля. Електрофорез здійснюємо в трис-фосфатному буфері, pH 7,9.

Підготування електрофоретичної камери

Готуємо 1% агарозний гель на трис-фосфатному буфері. Для цього 1 г агарози розчиняємо в 95 мл дистильованої води. Суміш нагріваємо на водяній бані, а потім доводимо до кипіння на плитці. Після повного розчинення агарози додаємо 5 мл 20-кратного трис-фосфатного буферу, pH 7,9.

Трис-фосфатний буфер х20, *pH 7,9,*:
0,7 М трис,
0,8 М NaH_2PO_4,
0,02 М Na_2ЕДТА.

Формуємо гель, камеру заповнюємо однократним трис-фосфатним буфером і перевіряємо наявність струму.

Вносимо зразки в лунки. U=40-60 V, довжина геля 6-10 см.

Тема: Лізогенія як стратегія розвитку помірних бактеріофагів. Температурна індукція профага P1. Лізогенізація клітин штаму E. coli C600 помірним бактеріофагом P1. Виділення плазмідного профага P1

1-й день

Приготування нічної культури *E. coli C600(P1ts)*

Хід роботи.

Добову окрему колонію лізогена *E. coli* C600(P1ts) інокулюємо в 3 мл МПА. Інкубуємо 8-12 годин при 28 °С.

2-й день

Температурна індукція лізогена *E. coli* C600(P1ts)

Хід роботи

1. Нічну культуру лізогена *E. coli* C600(P1ts) розводимо 1:50. Для цього до 3 мл МПБ додаємо 60 мкл нічної культури лізогена. Інкубуємо 2-3 години при 28 °С.
2. Підрощену культуру переносимо на 37 °С на ніч.
3. Готуємо нічную культуру *E. coli* C600 (див.1-й день)

3-й день

Одержання фаголізату P1. Лізогенізація чутливої культури

Хід роботи

1. Нічну культуру *E. coli* C600 розводимо 1:50. Для цього в 3 мл МПБ додаємо 60 мкл нічної культури. Інкубуємо 1,5 години при 37 °С
2. До культури лізогена *E. coli* C600(P1ts), яка знаходилась ніч при 37 °С, додаємо 50 – 100 мкл хлороформу. Струшуємо 5-10 хв при при 37 °С для остаточного лізису клітин.
3. Відбираємо 1 – 1,5 мл лізату в пробірку Еппендорфа.
4. Центрифугуємо 1-2 хв в мікроцентрифузі ELMI при 11000 об/хв для осадження клітинного детриту.
5. Відбираємо біля 1 мл супернатанту без осаду, який являє собою фаголізат P1.
6. Готуємо газон чутливої культури двошаровим методом. Для цього стовпчик з м`яким МПА (вміст агару 0,5%) об`ємом 5 мл розтоплюємо на водяній бані. Охолоджуємо до 55 °С. В охолоджений стовпчик додаємо 500 мкл 1,5-годинної культури *E.coli* C600, струшуємо і обережно наносимо на чашку з шаром твердого МПА (вміст агару 1,5%). Охолоджуємо при кімнатній температурі.

6. Фаголізат Р1 наносимо на застиглий газон *E.coli* С600 краплями по 5 – 10 мкл.
7. Інкубуємо 8 – 12 часов при 28 °С. Якщо краплі не підсохли, чашку не перевертаємо.

4-й день

Одержання лізогенних клітин по фагу Р1

Хід роботи

1. Знімаємо шар верхнього агару із зон лізису, які утворилися на газоні *E. coli* С600, і переносимо його в 3 мл МПБ. Інкубуємо при 28 °С дві години з інтенсивним помішуванням, або 5-7 годин без помішування.
2. Клітини, які проросли, висіваємо на МПА з хлорамфеніколом (20 мкг/мл) для одержання окремих колоній. Інкубуємо 8 – 12 год при 28 °С.
3. Готуємо нічну культуру *E. coli* С600 (див. 1-й день).

5-й день

Перевірка клонів на лізогенність

Хід роботи

1. Готуємо 1,5-годинну індикаторну культуру *E. coli* С600 (див. 3-й день, п.1) і потім - двошарову чашку з МПА з цією культурою (див. 3-й день, п.6).
2. Окремі колонії, які виросли на МПА з хлорамфеніколом, стерильними переколками переколюємо на дві наступні чашки:

№1 – матрична чашка, МПА

№2 – тест-чашка с газоном *E. coli* С600.

Одну й ту ж саму колонію переколюємо на всі чашки однією переколкою. Порядок переколювання на чашки обов`язковий.

3. Чашку №1 (матричну) інкубуємо при 28° С, а чашку №2 (з газоном чутливої культури) – при 37 °С 8 – 12 год.

6-й день

Виділення плазмідного профага Р1

Лізогенний клон відбирається за наступними критеріями:

- росте на МПА з хлорамфеніколом (20 мкг/мл) при 28 °С;
- утворює зону лізиса навкруги своєї колонії на газоні індикаторної культури *E. coli* С600 при 37 °С.

Джерелом біомаси лізогенних клітин для виділення плазмідного профагу слугує

матрична чашка №1. Якщо відібрана колонія сягає в діаметру 4-5 мм, то вона одразу може бути використана для виділення плазмідного профага Р1. В іншому випадку, відібраний клон необхідно відсіяти додатково.

Виділення плазмідного профага здійснюється за стандартною методикою (див. нижче).

Тема: Трансформація бактеріальних клітин

1-й день

Хід роботи

Знімають окрему бактеріальну колонію реципієнтного штаму *E. coli* з чашки з LB-агаром, яка інкубувалась при 37 °С 16-24 год, і переносять в 5 мл рідкого середовища LB. Інкубують ніч при 37 °С та сильній аерації (200 об/хв на круговому шейкері) .

2-й день. Одержання компетентних клітин E. coli з використанням хлористого кальцію та їх трансформація

Хід роботи

1. 1 мл нічної культури реципієнтного штаму розводять у 100 разів рідким середовищем LB і інкубують при 37 °С та сильній аерації 2 год.
2. Культуру переносять у стерильні охолоджені центрифужні пробірки охолоджують до 0°С на крижаній бані 10 хв.
3. Клітини осаджують центрифугуванням при 4300 g, 5 хв при 4 °С.
4. Зливають надосад і перевертають пробірку на 1 хв для повного зтікання.
5. Ресуспендують клітинний осад в 1 мл крижаного 0,1 М $CaCl_2$ обережним струшуванням. Інкубують на крижаній бані 30 хв.
6. Осаджують клітини центрифугуванням при 4300 g, 5 хв при 4 °С зливають надосад і перевертають пробірку (як в пп..3, 4)
7. Ресуспендують осад в крижаному 0,1 М $CaCl_2$ (з розрахунку 2 мл хлористого кальцію на 50 мл вихідного об`єма культури). До використання суспензію рекомендується залишити при 4°С на 1 год. При такій температурі її можна зберігати до 48 год, але вже після 24 год зберігання ефективність трансформації буде падати. Суспензію клітин також можна розлити аліквоти і зберігати при – 70 °С.
8. Охолодженою стерильною насадкою переносять 200 мкл суспензії компетентних клітин у стерильний еппендорф. Додають надспіралізовану плазмідну ДНК, але на більше 50 нг в об`ємі не більше 10 мкл. Обережно перемішують і 30 хв інкубують на крижаній бані.

Контроль – компетентні клітини, до яких не додавалась плазмідна ДНК.

9. Пробірки переносять на 90 сек на водяну баню з температурою 42 °С. Пробірки не струшують!
10. Швидко переносять пробірки назад на крижану баню і інкубують 2 хв.
11. Додають до кожної пробірки 800 мкл LB-середовища. Для індукції експресії маркера стійкості до антибіотика, який кодується плазмідою, інкубують пробірки 45 хв при 37 °С.

12. Переносять 100 мкл трансформованих клітин на чашки з агаризованим LB-середовищем, що містить відповідний антибіотик. Рівномірно розтирають шпателем Дригальського. Дають підсохнути при кімнатній температурі.
13. Інкубують при 37 °С. Колонії трансформантів можна побачити через 12-16 год.
14. Для виділення плазмідної ДНК використовують метод Кадо і Ліо (див. нижче).

Тема: Екстракція плазмідної ДНК за методом Кадо і Ліо

Хід роботи

1. Біомаса клітин ресуспендується в 100 мкл буфера Е. Розмір окремої колонії повинен складати 4-6 мм.
2. До суспензії додають подвійний об`єм (200 мкл) лізуючого буферу Кадо. Суміш інкубують при 60 °С 45 хв.
3. До лізату додають подвійний об`єм суміші кислого фенолу і хлороформу (1:1). Обережно змішують та центрифугують при 11000 об/хв. 5 хв. Суміш повторно обережно струшують і повторюють центрифугування.
4. Супернатант з плазмідною ДНК відбирають у чисту пробірку, не захоплюючи осад на інтерфазі. Зберігають при +4 °С.
5. Одержані зразки аналізують за допомогою гель-електрофорезу (0,9% агарози в буфері Е), при U=40-60 V і довжині агарозного геля 6-10 см. Перед внесенням в гель, зразки забарвлюють стоп-буфером для рестрикції (див. рестрикційний аналіз ДНК фага Т7).

Лізуючий буфер Кадо для виділення плазмідної ДНК:

На 100 мл дистильованої H_2O: Tris – 605 мг; SDS – 3 г; 2N NaOH – 3 мл. Профільтрувати.

Буфер Ex1:

40 мМ Трис-Ацетат, pH 7,9

2мМ Na_2ЕДТА

Готують 20-кратний буфер, який використовують для приготування агарози, одно-

кратного буфера для електрофорезу, виділення плазмід.

0,9% гель агарози:

дистильованої H_2O - 190 мл, агароза – 1,8 г. Агарозу розчиняємо на водяній бані, додаємо

10 мл буфера Ex2 і доводимо до кипіння на плитці.

Гель формуємо з агарози, охолодженої до 55 °С. Камеру заповнюємо буфером Ex1.

Для візуалізації результатів електрофоретичного розділення агарозний гель фарбуємо розчином броміду етидію (1 мкг/мл) впродовж 20 хв. Після цього гель відмиваємо від зайвого барвника в дистильованій воді 20 хв.

Виявлення генетичних послідовностей методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)

Тема: Лабораторія полімеразної ланцюгової реакції, правила роботи у ній.
Перший етап підготування зразку для виявлення фітопатогену Rhizobium vitis методом ПЛР

1-й день

Структура ПЛР-лабораторії

Основною умовою успішної роботи ПЛР-лабораторії є відсутність контамінації обладнання, поверхонь і реактивів молекулами ДНК. У приміщенні, де працюють з ДНК або РНК, фрагменти молекул даних кислот можуть знаходитися у повітрі у вигляді аерозолів, які утворюються при розбризкуванні, а також на поверхнях столів, приборів. Потрапляння ДНК мішені або ампліконів у реактиви призводить до хибно-позитивних результатів ПЛР.

Через загрозу контамінації ПЛР-лабораторію поділяють на три блоки – пре-ПЛР блок, ПЛР-блок і пост-ПЛР блок. Ці три помещення забезпечен УФ-лампами.

У пре-ПЛР блоці здійснюють пробопідготовку зразків. У даному приміщенні знаходяться ламінарні бокси для розливання реактивів виділення ДНК. У пре-ПЛР блоці також знаходиться холодильник дл збереження реактивів. Це так звана "чиста" зона ПЛР-лабораторії. У "чистій зоні працюють у окремих халатах, які перевдягають у передбокснику, змінному взутті, у гумових рукавичках, які не виносять у інші зони ПЛР лабораторії. У ПЛР-блоці знаходиться ампліфікатор. Пост-ПЛР бло представляє собою приміщення для проведення електрофореза. Це так зван "забруднена зона" лабораторії. ДНК, яка ампліфікується під час ПЛР великій кількості, знаходиться у буфері для електрофорезу, на накінечника на внутрішній поверхні кришечок епендорфів, на дозаторах, на одеж співробітника тощо. Необхідним перед заходженням до пост-ПЛР блоку перевдягання халату і взуття, зміна гумових рукавичок.

Правила роботи та техніка безпеки у ПЛР-лабораторії: Усі етаі постановки ПЛР у лабораторії повинні проводитися у одному напрямку: в "чистої" зони до "забрудненої". Ні в якому разі не можна переноси обладнання або предмети із "забрудненої" зони у "чисту".

Таким чином, навіть якщо на різних етапах проведення П використовуються одні й тіж самі реактиви, необхідно, щоб у окрем блоках знаходилися різні упаковки, які б не виносилися за межі бло лабораторії.

Бажано, щоб на етапах підготування зразків і на етапі електрофорезу працювали різні співробітники.

Стерильності необхідно дотримуватися лише на етапі роботи з дослідним матеріалом та з культурою мікроорганізмів. Реактиви для проведення ПЛР не є стерильними, однак під час роботи з ними слід бути дуже уважним, щоб не допустити потрапляння до пробірок з реактивами пилу, у тому числі – тальку з гумових рукавичок, зайвих речовин (кожний раз при роботі з дозатором потрібно користуватися новим накінечником, який ще не був у використанні), ДНК та РНК мікроорганізмів. Щоб уникнути цього, епендорфи з реактивами для ПЛР відкривають на якомога менший термін у стерильному боксі. Реактиви зберігають при – 18 ° - 20°С у холодильнику, а перед роботою залишають відтанути на льоду при кімнатній температурі. Працюють з такими реактивами якомога швидше і одразу ж після роботи поміщають до холодильника.

На етапі аналізу продуктів ПЛР важливими є правила безпеки роботи з бромистим етидієм, який використовується у якості фарбника для нуклеїнових кислот. Необхідно уникати потрапляння бромистого етидію у розчині або порошку у дихальні шляхи, на шкіру і слизові оболонки. Бромистий етидій – канцероген.

Діагностика бактеріального раку винограду методом полімеразної ланцюгової реакції

На багатьох дводольних рослинах можна спостерігати характерні пухлини, які є наслідком розростання тканин. Пухлини заважають нормальному відтоку води та метаболітів. Уражені рослини відстають у рості, врожайність в них зменшується, і зрештою хвороба може призвести до загибелі рослини. Найбільш уражуємими видами є виноград, троянди, хризантеми, персик, яблуня.

Збудником бактеріального раку винограду є *Rhizobium vitis,* раніше відомий як *Agrobacterium vitis.* Пухлини, які спричиняються цим фітопатогеном, мають усі ознаки тваринних злоякісних пухлин.

Для проведення діагностики будемо застосовувати метод так званої **біо-ПЛР,** який передбачає попереднє виділення патогена на живильні середовища і виділення ДНК вже з ізольованих штамів мікроорганізмів. Метод біо-ПЛР дозволяє уникнути впливу інгібіторів ПЛР, які можуть міститися у зразку, і збільшити кількість клітин, що аналізуються.

Для аналізу відбирають лозу з рослин, в яких є симптоми, подібні добактеріального раку, або – з візуально здорових рослин.

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) – це реплікація **певного** фрагмента ДНК *in vitro.* Для кожного виду мікроорганізмів характерна наявність специфічних послідовностей генома, властивих саме цьому виду.

Виявляючи наявність таких послідовностей, ми можемо визначити, до якого виду відноситься виділений штам, чи є він патогенним або ні.

Усі патогенні штами *R. vitis* несуть велику Ті-плазміду, відповідальну за здатність штама спричиняти захворювання. У непатогенних штамів такої плазміди не має. Для того, щоб відрізнити патогенні і непатогенні штами даного виду, достатньо за допомогою ретельно підібраних праймерів виявити специфічні ділянки Ті-плазміди. Ми будемо виявляти за допомогою модифікованої методики Дж. Хаас (1995 рік) ділянки генів *ipt* та *virD2*, характерні для патогенних штамів *R. vitis*.

Виділення ДНК з дослідних культур різобій

Для проведення ПЛР необхідно першим чином виділити ДНК штаму, який досліджується, і ДНК контрольних штамів. Існує багато методів виділення ДНК. У нашому випадку ми застосовуємо **метод теплового лізису** культури, оскільки якість ДНК, яка виділяється цим нескладним і швидким методом навіть без етапів очищення є достатньою для постановки ПЛР за даною методикою. Метод теплового лізису полягає у прогріванні бактеріальної суспензії при високій температурі (95°С), внаслідок чого клітини руйнуються, і ДНК виходить у розчин. Потім суспензію центрифугують, уламки клітин осідають на дно, і надосадова рідина містить ДНК, необхідну для дослідження.

Практичне завдання 1. Виділити ДНК з досліджуваних штамів збудників бактеріального раку дводольних, пересіяних на картопляний агар. Для цього:

а) у підписані за назвою штама пластикові епендорфи внести по 225 мкл дейонізованої води;

б) за допомогою бактпетлі перенести бактеріальну біомасу у епендорфи з водою з таким розрахунком, щоб концентрація бактеріальних клітин у отриманій суспензії склала б 10^8 кл/мл (змішати суспензію у вортексі);

в) до отриманої суспензії бактеріальних клітин додати 25 мкл розчину, який містить 10 % Тритона Х-100 і 2,5 % азида натрію; перемішати у вортексі;

г) суспензію прогріти 10 хвилин при 95°С;

д) прогріту суспензію центрифугувати 5 хвилин при 5700 g.

Приготування реакційної суміші для проведення ПЛР

Концентрації компонентів реакційної суміші ретельно підбираються таким чином, щоб отримати максимальну кількість ампліконів заданої довжини і у той самий час уникнути утворення неспецифічних продуктів ампліфікації, які ускладнюють інтерпретацію результатів ПЛР. Так, недостатня кількість одиниць Taq-полімерази і мала концентрація йонів магнію може призвести до утворення недостатньої кількості продуктів

ПЛР. Навпаки, підвищена кількість йонів магнію призводить до зменшення специфічності реакції: крім специфічних ампліконів на гелевій платівці можна побачити фрагменти ДНК різноманітної довжини, які утворилися внаслідок неспецифічного відпалу. Позбавитися неспецифічних ампліконів зазвичай можна, зменшуючи концентрацію йонів магнію. Специфічність реакції при цьому збільшується, але врожай ампліконів зменшується, тому треба добре підібрати оптимальну концентрацію йонів для достатньої візуалізації ампліконів.

У наведеній методиці ПЛР застосовуються наступні пари праймерів: *ipt* (5'– GAT CG(G/C) GTC CAA TG(C/T) TGT - 3' і 5' – GAT ATC CAT CGA TC(T/C) CTT - 3') або *virD*$_2$ (5' – ATG CCC GAT CGA GCT CAA GT - 3' і 5' – TCG TCT GGC TGA CTT TCG TCA TAA - 3') Ті-плазміди патогенних штамів *R. vitis* (Haas, 1995).

Практичне завдання 2. Приготувати реакційну суміш для проведення ПЛР:

а) розморозити реактиви на льоду при кімнатній температурі;

б) внести у епендорфи для проведення ПЛР на 75 мкл необхідні компоненти у таких кількостях (наведені кількості на одну реакцію у об'ємі 20 мкл):

- 5,8 мкл дейонізованої води;
- 4 мкл 5х ПЛР буфера ("АмплиСенс", Росія);
- 2,0 мкл 2 мМ дезоксинуклеозидтрифосфатів (200мкМ);
- 1,0 мкл кожного із пари 10 мМ праймерів (0,5 мкМ);
- 0,8 мкл 50 мМ Mg^{++} (2 мМ Mg^{++});
- 0,4 мкл Taq-полімерази, 5 Од/мкл (2 Од).

Усі реагенти фірми "АмплиСенс", Росія.

Компоненти перемішати 3-5 секунд на вортексі;

Епендорфи з реакційною сумішю підписати і у кожний внести по 5 мкл досліджуваного зразку (надосадова рідина з ДНК штаму). Перемішати накінечником дозатора;

Нашарувати готову реакційну суміш зі зразком ДНК 30 мікролітрами мінерального масла для проведення ПЛР (обережно, не змішуючи масло з іншими компонентами суміші);

Ампліфікація

Практичне завдання 3. Провести ампліфікацію фрагменту ДНК штамів

1. Поставити епендорфи у ампліфікатор і задати відповідну програму.
2. Після закінчення ампліфікації епендорфи помістити у холодильник пр - 20°С до дня проведення електрофорезу.

ДНК бактерій ампліфікують з даними праймерами шляхом чергуванн 1 хвилини денатурації при 94°С, 1 хвилини відпалу при 52°С, 1 хвилин елонгації при 72°С, і кількість таких циклів дорівнює 40 (у першому цикл час денатурації збільшено до 3 хвилин, а у останньому циклі час елонгаці збільшено до 7 хвилин). Відповідну програму задають ампліфікаторові.

2-й день

Облік результатів ПЛР: електрофорез в агарозному гелі

1. Провести електрофорез продуктів ампліфікації:

а) приготувати 1,5 % агарозний гель;

б) після застигання гелевої платівки внести у певному порядку у лунки дослідні зразки і зразки позитивного і негативного контролів. У зошиті занотувати схему роташування зразків;

в) у окрему лунку по центру або зкраю платівки внести маркер молекулярної ваги;

г) провести електрофорез при силі струму 50 мА.

2. Провести облік результатів ПЛР за наявністю або відсутністю ампліконів заданого розміру.

Облік результатів класичної ПЛР проводять за допомогою електрофорезу в агарозному гелі. Спеціальний буфер для електрофорезу – зазвичай ТБЕ (трисборатний) може містити у собі бромистий етидій, або ж бромистим етидієм фарбують гелеву платівку окремо, після завершення електрофорезу. Для електрофорезу фрагментів ДНК – ампліконів ПЛР - у нашому випадку слід приготувати 1,5 % агарозний гель.

Розмір ампліконів становить 427 п.о. у разі пари праймерів до послідовності *ipt* і 224 п.о. для пари праймерів до послідовності *virD*$_2$. Фрагменти ампліфікованої ДНК меншого або більшого розміру є неспецифічними ампліконами.

ДНК негативно заряджена, вона рухається у бік позитивно зарядженого електроду, тому лунки для внесення зразків слід розташовувати біля негативного електроду.

Результати ПЛР оцінюють, порівнюючи розмір ампліконів з розміром маркерів молекулярної ваги. Електрофореграму фотографують за допомогою фотоапарату або відеокамери. Результати вносять у зошит за схемою:

№ лунки									
№ зразка									
Результат ПЛР*									

* - результат ПЛР у нашому випадку, коли треба виявити факт присутності патогена у зразку, оцінюють як "+" або "-". Це якісна реакція. Інколи треба виявити концентрацію ДНК у ампліконі, яка вказує на первинну кількість патогена у зразку. Тоді виявляють також кількісні характеристики реакції.