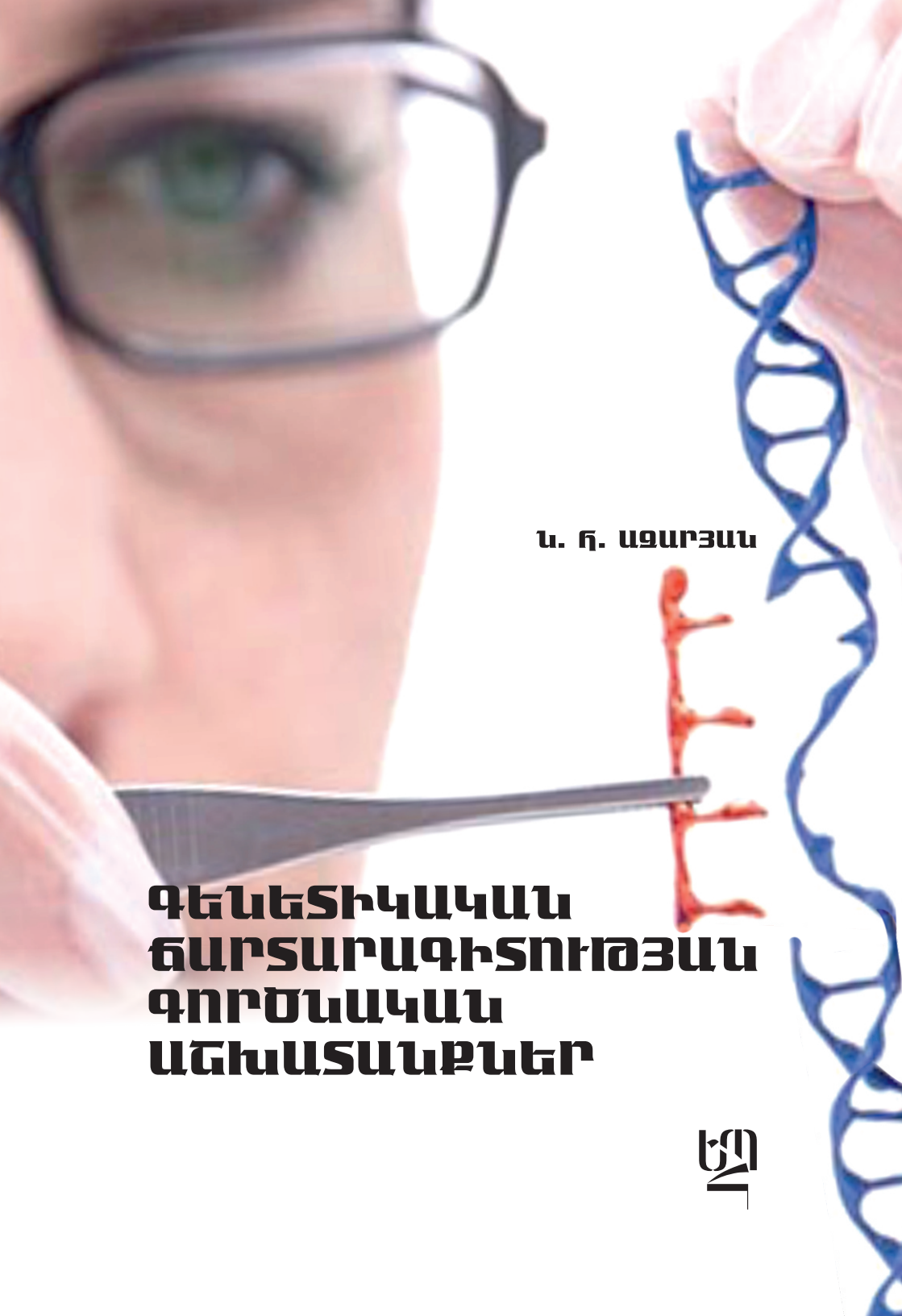


A close-up photograph of a person's face, wearing black-rimmed glasses, looking down. Their hands are holding a blue plastic DNA double helix model. In the lower center, a pair of metal tweezers is holding a red, branched protein structure. The background is plain white.

Ն. Դ. ԱՋԱՐՅԱՆ

**ԳԵՆԵՏԻԿԱԿԱՆ
ՃԱՐՏԱՐԱԳԻՏՈՒԹՅԱՆ
ԳՈՐԾՆԱԿԱՆ
ԱՇԽԱՏԱՆՔՆԵՐ**

ԵԳ

ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՍՏԱԼՍԱՐԱՆ

Ն. Դ. ԱԶԱՐՅԱՆ



**ԳԵՆԵՏԻԿԱԿԱՆ
ՃԱՐՏԱՐԱԳԻՏՈՒԹՅԱՆ
ԳՈՐԾՆԱԿԱՆ ԱԾԽԱՏԱՆՔՆԵՐ**

**ՈՒՍՈՒՄՆԱԿԱՆ
ՋԵՌՆԱՐԿ**

ԵՐԵՎԱՆ
ԵՊՀ ՀՐԱՏԱՐԱԿՉՈՒԹՅՈՒՆ
2015

ՀՏԴ 602.6(07)
ԳՄԴ 28.04 ց7
Ա. 227

*Հրատարակության է երաշխավորվել
ԵՊՀ կենսաբանության ֆակուլտետի
գիրխորհրդի կողմից*

Ազարյան Ն. Հ.

Ա. 227 Գենետիկական ճարտարագիտության գործնական աշխատանք-
ներ/Ուսումնական ձեռնարկ: -Եր., ԵՊՀ հրատ., 2015, 60 էջ:

Տվյալ ուսումնական ձեռնարկում ներկայացված են գենետիկական ճարտարագիտություն առարկայի տեսական ծրագրին համապատասխանեցված փորձարարական խնդիրներ, որոնք կխրթանեն ուսանողների կողմից աշխատանքների ինքնուրույն կատարման գործնական հմտությունների զարգացումը: ԵՊՀ կենսաբանության ֆակուլտետի գենետիկայի և բջջաբանության ամբիոնի մոլեկուլային գենետիկայի լաբորատորիան ապահովված է առաջադրված փորձերի համար անհրաժեշտ բոլոր սարքերով և ռեակտիվներով: Ներկայացված փորձարարական աշխատանքները կարող են իրականացվել նաև այլ բուհերի համապատասխան ամբիոններում:

Հայերենով մնան ձեռնարկների բացակայությունը թելադրեց տվյալ աշխատանքի նախաձեռնումը:

ՀՏԴ 602.6(07)
ԳՄԴ 28.04 ց7

ISBN 978-5-8084-1984-1

© ԵՊՀ հրատ., 2015
© Ազարյան Ն., 2015

ՆԵՐԱԾՈՒԹՅՈՒՆ

70-ականների սկզբում ռեկոմբինանտ ԴՆԹ-ների ստացման, նրանց կլոնավորման, սելեկցիայի և մեթոդների մշակումը մոլեկուլային գենետիկայի նվաճումների և մեթոդների հետազոտությունների տրամաբանական և բնական շարունակությունն էր: Տվյալ ձեռնարկն ուսանողներին ծանոթացնում է գենետիկական ճարտարագիտության լավ մշակված և առավել կիրառվող մեթոդներին՝ մոլեկուլային գենետիկայի դասական մեթոդների կիրառմամբ: Ներկայացված բոլոր գործնական խնդիրներից առաջ տրվում են տեսական դրույթներ՝ առաջադրված խնդրի կատարման համար անհրաժեշտ ծավալով, ինչպես նաև գործնական խորհուրդներ՝ փորձերի իրականացման ընթացքը դյուրացնելու համար:

Տվյալների մշակման և ավելի խոր վերլուծության համար առաջադրվում է «Գրական աղբյուրներ» բաժինը:

«Հավելված» բաժնում տրված են կիրառվող մանրէների և ֆագերի շտամերի, պլազմիդների աճեցման, նուսրացման և պահպանման միջավայրերը և պայմանները: Նույն բաժնում ներկայացված է տարբեր փորձարարական աշխատանքներում կիրառվող լուծույթների և բուֆերների մանրամասն բաղադրությունը:

Աշխատանքի ընթացքի մասին առավել ճշգրիտ պատկերացում կազմելու համար ուսանողներին առաջադրվում է «Աշխատանքի ընթացք» բաժինը՝ փորձի հաջորդական քայլերի մանրամասն նկարագրությամբ, որին հաջորդում են այս կամ այն փուլի անհրաժեշտությունը լուսաբանող «Մեկնաբանումները»:

Մանրէների հետ աշխատելիս մշտապես օգտագործվող սարքերը թվարկված չեն:

Փորձերում կիրառվող մանրէների և ֆագերի շտամերի, ինչպես նաև պլազմիդների գենետիկական բնութագրերը բերված են «Աղյուսակ 1-ում և 2-ում:»

Աղյուսակ 1.

Բակտերիալ և ֆագային շտամերի բնութագիրը:

Բակտերիալ և ֆագային շտամեր	Գենոտիպ
<i>E. coli</i> K12	wt F ⁺
<i>E. coli</i> W3350	gal ton iva84 metE metB bla tet
<i>E. coli</i> J53	met pro nal-r
<i>E. coli</i> HB101	leu thr thi ₁ tonE r ⁻ m ⁻
C600	leu thr thi ₁
λ	wt

Աղյուսակ 2.

Օգտագործվող պլազմիդի բնութագիրը:

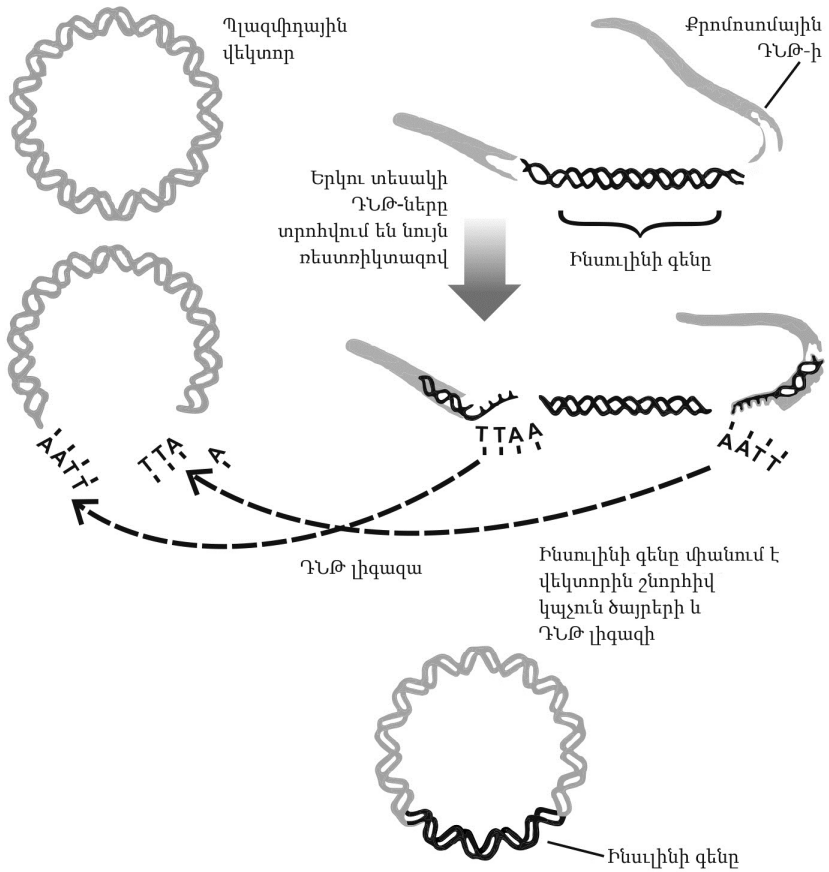
Պլազմիդ	Գենոտիպ
RP4	bla tet kan
pBR322	bla tet
pNA8	bla sul str
pTK16	tet kan
RSF1010	sul str

ՆԱԽԱԲԱՆ

Ռեկոմբինանտ ԴՆԹ-ների մեթոդաբանության համար ուղի են հարթել մոլեկուլային գենետիկայի զանազան բացահայտումները: Նրանցից մեկն է տրանսդուկցիայի երևույթը, որի ընթացքում քրոմոսոմային հատվածները մեկ բջջից տեղափոխվում է մյուս բջջին ֆագային մասնիկի՝ փոխադրող-վեկտորի օգնությամբ: Նույն ֆագային մասնիկն ապահովում է քրոմոսոմային հատվածի կրկնապատկումը (բազմացումը) նոր բջջում՝ սեփական գենոմի կազմում: Ֆագերի, նրանց զարգացման ուսումնասիրման հետ է կապված նաև ռեստրիկցիայի և մոդիֆիկացիայի երևույթների հայտնագործումը: Այդ գործընթացների համար պատասխանատու ֆերմենտների անջատումը և ուսումնասիրումը մեծ փուլանիշ դարձավ նոր կենսաբանական ուղղության՝ գենետիկական ճարտարագիտության կայացման ճանարարիին: Միշտ նույն հաջորդականությունների սահմաններում՝ սայթերում ռեստրիկցիոն էնդոնուկլեազների՝ ԴՆԹ-ները հատելու և կաշուն (կոմպլեմենտար) միաթել ծայրերի առաջացման հատկության հայտնաբերումը հնարավորություն ընձեռեց նույնատիպ կաշուն ծայրերով իրար միացնելու տարբեր ծագում ունեցող ԴՆԹ-ների հատվածները *«in vitro»*:

Հետևաբար, ռեկոմբինանտ ԴՆԹ-ների (տարբեր ծագման, նույնիսկ ֆիլոգենետիկորեն իրարից շատ հեռու գտնվող ԴՆԹ-ների հատվածների միավորում) կառուցման համար անհրաժեշտ են համապատասխան մանրէների շտամերի բջիջներում (*տեղ բջիջ*) ինքնակրկնապատկվող ԴՆԹ-ի մոլեկուլներ՝ *վեկտորներ*, ունակ իրենց կազմում փոխադրել և կրկնապատկել «օտարամարմին» ԴՆԹ-ների հատվածներ (*ներդիրներ*):

Վեկտորների և Գերդիրները միավորումը իրականացվում է «*in vitro*» պայմաններում:



Նկար 1. Մոլեկուլային կլոնավորման սխեմա

Ստացված ռեկոմբինանտ ԴՆԹ-ները ներմուծվում են տեր բջիջների մեջ տրանսֆորմացիայի միջոցով, որտեղ էլ նրանք բազմանում են:

Գենետիկական ճարտարագիտության մեջ կիրառվող վեկտորները կառուցված են տարբեր պլազմիդների, ֆագերի հիման վրա: Ստեղծված են նաև պլազմիդային և ֆագային հատկությունները միավորող արհեստական մոլեկուլներ և զանազան արհեստական քրոմոսոմներ:

Առաջին վեկտորներն էին մանրէային պլազմիդները՝ արտաքրոմոսոմային գենետիկ տարրեր, որոնք իրենցից ներկայացնում են կրկնապատկման սկզբնակետ պարունակող օղակաձև ԴՆԹ-ի մոլեկուլներ: Պլազմիդների չափսը կախված է տարբեր հատկությունների բնորոշող գեների քանակից՝ վոլխանցելիությունն ապահովող գեներ, տոքսինների, տարբեր ֆերմենտների սինթեզն ապահովող գեներ, որոշ դեղամիջոցների, մետաղների հանդեպ կայունություն ապահովող գեներ, արմատիկ միացությունների տրոհումն ապահովող ֆերմենտների գեներ, և այլն:

Այսպիսով, ռեկոմբինանտ ԴՆԹ-ների կառուցման համար անհրաժեշտ է ունենալ.

- վեկտորային մոլեկուլների ԴՆԹ-ներ,
- ներդիրների ԴՆԹ-ներ,
- գործիք-ֆերմենտներ՝ ԴՆԹ-ների մոլեկուլների հատման և կցակարման համար:

1. ՎԵԿՏՈՐԱՅԻՆ ՄՈԼԵԿՈՒԼՆԵՐԻ ԴՆԹ-Ի ԱՆՋԱՏՈՒՄ

1.1. ՊԼԱՋՄԻԴԱՅԻՆ ՎԵԿՏՈՐՆԵՐ ԵՎ ՊԼԱՋՄԻԴԱՅԻՆ ԴՆԹ-Ի ԱՆՋԱՏՈՒՄ

Պլազմիդային ԴՆԹ-ի անջատման համար գոյություն ունեն բազմազան մեթոդներ, որոնք ընդգրկում են երեք հիմնական փուլ.

- պլազմիդ պարունակող մանրէների աճեցում և բիոզանգվածի ստացում,
- բիոզանգվածի քայքայում,
- պլազմիդային ԴՆԹ-ի գտում:

Անջատման բոլոր մեթոդները հիմնված են տեր բջջի և պլազմիդային ԴՆԹ-ների միջև եղած երկու հիմնական տարբերությունների վրա.

1) բջջի քրոմոսոմի չափսը զգալիորեն գերազանցում է պլազմիդային ԴՆԹ-ի չափսը,

2) քրոմոսոմային ԴՆԹ-ների հիմնական մասն անջատվում է բջջիցներից գծային հատվածների տեսքով, մինչդեռ պլազմիդային ԴՆԹ-ների մեծ մասն անջատվում է որպես օղակաձև կովալենտ փակ մոլեկուլներ:

Այդ իսկ պատճառով անջատման մեթոդների զգալի մասը ներառում է նստվածք ստանալու փուլը, որի ընթացքում պատրաստուկից հեռացվում են առավելապես մանրէային քրոմոսոմի ԴՆԹ-ի երկար շղթաները, որոնք պատահաբար զավթվել են քայքայված բջջիցների ջարդոններով: Օղակաձև պլազմիդային ԴՆԹ-ի կոմպլեմենտար շղթաներից յուրաքանչյուրն իրենից ներկայացնում է կովալենտ փակ օղակ, ինչն ապահովում է նրանց ամբողջականությունն բարձր ջերմային, չափավոր հիմնային միջնա pH 12.5 պայմաններում, երբ քայքայվում են նշված երկու շղթաները միացնող ջրածնային կապերը: Սառեցման կամ չեզոք pH-ին վերադառնալու դեպքում օղակաձև

փակ մոլեկուլները նորից ընդունում են սկզբնական տեսք, մինչդեռ բակտերիալ ԴՆԹ-ն մնում է բնավորական (դենատուրացված):

Պլազմիդային ԴՆԹ-ի գոման բարձր աստիճանն ապահովվում է ցեզիումի քլորիդի խտության գրադիենտում հավասարակշիռ ցենտրիֆուգմամբ: Ցեզիումի քլորիդի լուծույթում պարտադիր է հազեցնող խտությամբ ներկանյութը (էտիդիումի բրոմիդ), որը կապվում է ԴՆԹ-ի հետ, ներմուծվելով նրա ակոսների մեջ:

Սակայն ռեկոմբինանտ ԴՆԹ-ների հետ աշխատանքների մեթոդների զարգացման ընթացքում պարզվեց, որ շատ դեպքերում անհրաժեշտ չէ մեծ քանակությամբ պլազմիդային ԴՆԹ-ի միատարրության աստիճանի գտում:

Ռեստրիկցիոն էնդոնուկլեազներով տրոհումը, ԴՆԹ լիգազով կցակարումը, տրանսֆորմացիան և նույնիսկ նուկլեոտիդային հաջորդականության որոշումը ներկայումս կարելի է իրականացնել, կիրառելով մանրէային կուլտուրայի փոքր ծավալներից ստացված համեմատաբար սակավ գտվածության պլազմիդային ԴՆԹ-ների պատրաստուկներ:

Ստորև ներկայացված ԴՆԹ-ի անջատման մեթոդները հաջողությամբ և լայնորեն կիրառվում են գենետիկական ճարտարագիտության ոլորտում:

ԽՆԴԻՐ I. Պլազմիդային ԴՆԹ-ի անջատում հիմնային պայմաններում քայքայման մեթոդով

Աշխատանքի ընթացք.

1. 10 մլ L միջավայրը վարակել *E. coli* J 53 (pBR322) շտամի առանձին գաղութով և աճեցնել մեկ գիշեր (18 ժամից ոչ պակաս) 37°C պայմաններում:

2. Աճեցված կուլտուրայի 1.5 մլ-ից ստանալ նստվածք ցենտրիֆուգելով միկրոցենտրիֆուգում (5 րոպե, 15.000 պտ./րոպե, 4°C): Վերնստվածքային հեղուկը հեռացնել:

3. Նստվածքին ավելացնել 100 մկլ սառույցի մեջ սառեցված Ա լուծույթ՝ հետևյալ բաղադրությամբ.

50 մՄ գլյուկոզ

10 մՄ էԴ-SU

25 մՄ տրիս-HCl pH 8,0

4 մկգ/մլ լիզոցին:

Լիզոցինը փոշու տեսքով ավելացնել վերջում:

4. Պահել 5 րոպե սենյակային ջերմաստիտաճանում: Փորձանոթը կարելի է չփակել:

5. Ավելացնել 200 մկլ թարմ, սառույցի մեջ սառեցված Բ լուծույթ՝ հետևյալ բաղադրությամբ .

0,2Ն NaOH

1% SDS (նատրիումի դոդեցիլսուլֆատ):

Փորձանոթը փակել կափարիչով, պարունակությունը խառնել առանց թափահարելու, 2-3 անգամ զգուշորեն շրջելով անոթը:

6. Փորձանոթը պահել սառույցի մեջ 5 րոպե:

7. Ավելացնել 150 մկլ սառույցի մեջ սառեցված Գ լուծույթ

3Մ CH₃COOK կամ CH₃COONa pH4,8 (5 Մ ացետատի 60 մլ-ին ավելացնել 11.5 մլ սառցային քացախաթթու և 28.5 մլ H₂O: Ստացված լուծույթում կալիումի կամ նատրիումի խտությունը կկազմի 3Մ, իսկ քացախաթթվի մնացորդի խտությունը՝ 5 Մ):

8. Փորձանոթը փակել, 10 վայրկյանի ընթացքում զգուշությամբ մի քանի անգամ շրջել, պահել սառույցի մեջ 5 րոպե:

9. Զենտրիֆուգել 5 րոպե, 15.000 պտ./րոպե, 4°C:

10. Վերնստվածքային հեղուկը տեղափոխել նոր անոթի մեջ:

11. Ավելացնել 2 ծավալ սենյակային ջերմաստիճանի էթանոլ և թողնել սառույցի մեջ մեկ գիշերվա ընթացքում (կամ 2 ժամ - 20°C):

12. Ցենտրիֆուգել, թափել վերնատվածքը, նստվածքը չորացնել, շրջելով փորձանոթը քամիչ թղթի վրա: Այնուհետև նստվածքը լուծել 50 մկլ TE բուֆերում հետևյալ բաղադրությամբ.

10 մՄ տրիս-HCl

1մՄ ԷԴ-SU (pH 8,0).

Արդյունքները վերահսկվում են ագարոզային գել-էլեկտրաֆորեզի միջոցով (տե՛ս ներքևում):

ԽՆԴԻՐ II. Պլազմիդային ԴՆԹ-ի անջատում եռացման մեթոդով

Աշխատանքի ընթացք.

1. Աճեցնել E.coli C600 (pTK16) շտամի գիշերային կուլտուրան 5 մլ համապատասխան հակաբիոտիկ պարունակող L ագարակում:

2. 1,5 մլ գիշերային կուլտուրան տեղափոխել միկրոֆուգի փորձանոթ և ցենտրիֆուգել 5 րոպե (15.000 պտույտ/րոպե):

3. Վերնատվածքային հեղուկը թափել, նստվածքը չորացնել թղթե սրբիչի կամ քամիչ թղթի վրա:

4. Նստվածքին ավելացնել 350 մկլ Ա լուծույթ, հետևյալ բաղադրությամբ.

8% սախարոզ,

0,5 % Տրիտոն X-100,

50 մՄ ԷԴ-SU (pH 8,0),

10 մՄ տրիս-HCl (pH 8,0):

5. Ավելացնել 25 մկլ լիզոցիմի թարմ լուծույթ (10 մկգ/մլ 10 մՄ տրիս-HCl, pH 8,0) և թափահարելով խառնել երեք վայրկյան:

6. Փորձանոթը 40 վայրկյանով տեղադրել եռման ջրով բաղնիսի մեջ:

7. Անմիջապես ցենտրիֆուգել 10 րոպե սենյակային ջերմաստիճանի պայմաններում:

8. Վերնստվածքային լուծույթը տեղափոխել նոր փորձանոթի մեջ և ավելացնել 40 մկլ 2,5 Մ նատրիումի ացետատ և 420 մկլ իզոպրոպանոլ: Խառնել թափահարելով և պահել 15 րոպե չոր սառույցի մեջ:

9. Ցնտրիֆուգել 15 րոպե 4°C պայմաններում:

10. Վերնստվածքային հեղուկը թափել, չորացրած նստվածքը լուծել 50 մկգ/մլ Ռ-ՆԹազա պարունակող 50 մկլ TE բուֆերում (pH 8,0):

10 մՄ տրիս-HCl

1 մՄ ԷԴ-SU (pH 8,0)

ԽՆԴԻՐ III. Մանրէային գաղութներից պլազմիդային ԴՆԹ-ի անջատման արագ մեթոդ

Աշխատանքի ընթացք.

Վեկտորային մոլեկուլում ներդիրի առկայությունն ստուգելու համար հաճախ բավական է որոշել ԴՆԹ-ի ռեկոմբինացիայի մոլեկուլի չափսը: Ստորև առաջարկվող մեթոդը թույլ է տալիս ստանալ ազարոզային գելի մեկ փոսիկի համար բավարար քանակով ԴՆԹ:

1. Համապատասխան հակաբիոտիկ պարունակող L միջավայրում աճեցնել ռեկոմբինացիայի ԴՆԹ պարունակող մինչև 2-3 մմ տրամագծով բակտերիալ գաղութներ:

2. Գաղութի մի փոքր մաս մանրագերծված փայտիկով տեղափոխել ստուգիչ թասի մեջ, մնացորդը տեղափոխել միկրոֆուգի փորձանոթի, կամ միկրոտիտրավորման թասի փոսիկի մեջ, ավելացնելով 25 մկլ Ա լուծույթ՝ հետևյալ բաղադրությամբ.

50 մՄ NaOH

0,5% նատրիումի դոդեցիլ սուլֆատ (SDS)

5 մՄ ԷԴ-SU pH 8,0

0,025% բրոմֆենոլային կապույտ:

3. Գաղութը մանրացնել զգուշորեն խառնելով կախույթահեղուկը:

4. Փորձանոթը կափարիչով փակել (փոսիկի դեպքում՝ մեկուսիչ ժապավենով) և ինկուբացնել 45-60 րոպե 68°C պայմաններում:

5. 20 մկլ խառնուրդ տեղադրել 0,7% ազարոզային գելում պատրաստաց փոսիկի մեջ: Էլեկտրաֆորեզի ավարտից հետո գելը ներկել Էտիդիումի բրոմիդի լուծույթում (0,5 մկգ/մլ) 45 րոպեի ընթացքում:

Ստացված արդյունքները համեմատել ստուգիչ ԴՆԹ-ների չափսերի հետ:

Ստուգիչ ԴՆԹ-ների նմուշները տեղադրել նույն ազարոզային գելի ուրիշ փոսիկներում:

ԽՆԴԻՐ IV. Մանրէային կուլտուրայից պլազմիդային ԴՆԹ-ի անջատման արագ մեթոդ

Աշխատանքի ընթացք.

1. Համապատասխան բջիջներն աճեցնել 0,4% գլյուկոզ պարունակող 10 մլ L ազարակի մեջ հազեցվածությամբ աստիճանի:

2. Բջիջները ցենտրիֆուգել, նստվածքը լուծել 1,4 մլ 10 մՄ տրիս-HCl-ում (pH 8,5):

3. 1,5 մլ կախության հեղուկը տեղափոխել միկրոֆուգի անոթի մեջ և ցենտրիֆուգել 30 վայրկյան:

4. Նստվածքին ավելացնել 400 մկլ Ա լուծույթ.

15% սախարոզ

50 մՄ տրիս-HCl

50 մՄ Na₂ E-ԴՏԱ (pH 8,5)

Լավ խառնել:

5. Փորձանոթը դնել սառույցի մեջ և ավելացնել 100 մկլ վերոնը-ված բուֆերում պատրաստված լիզոցիմի թարմ լուծույթ (5 մգ/մլ):

6. 10 րոպեի ընթացքում փորձանոթները պահել սառույցի մեջ, պարբերաբար զգուշորեն շրջելով:

7. Ավելացնել 300 մկլ Բ լուծույթ (0° C).

0,1% X-100 տրիտոն

500 մՄ տրիս-HCl

50 մՄ Na₂ E-Դ-SU (pH 8,5)

8. Կրկնել 6-րդ կետը:

9. Սառը պայմաններում ցենտրիֆուգել 2 րոպե:

10. Վերնստվածքային հեղուկը լցնել միկրոֆուգի նոր անոթի մեջ:

11. Ավելացնել 2 մկլ դիէթիլօքսիդիֆորմատ և թափահարել սրվակը:

12. 70° C պայմաններում սրվակը տաքացնել 15 րոպե, տեղափոխել սառույցի մեջ, պահել 15 րոպե, ցենտրիֆուգել 2 րոպե:

13. Վերնստվածքային հեղուկը լցնել նոր փորձանոթի մեջ, սպիրտով լրացնել ծավալը սենյակային ջերմաստիճանի պայմաններում:

14. Ցենտրիֆուգել 5 րոպե միկրոֆուգի մեջ:

15. Վերնստվածքային հեղուկը թափել, փորձանոթը շրջել թղթե սրբիչի վրա, սպասել մինչև նստվածքի չորանալը: Զգուշանալ գերչորացումից:

16. Նստվածքը լուծել 50 մկլ Գ լուծույթի մեջ

10 մՄ տրիս-HCl (pH 7,5)

1 մՄ Na₂ E-Դ-SU

10 մկգ/մլ ՌՆԹազա A:

Այսպիսով՝ անջատված ԴՆԹ-ն տրոհվում է ռեստրիկցիոն էնդոնուկլեազների մեծամասնությամբ:

ՄԵԿԼԱԲԱՆՈՒՄ

1. Բջջիջների նստվածքի ստանալն անհրաժեշտ է աճեցման միջավայրից լվանալու և մեջը պարունակվող զանազան խոններից և աղերից ազատվելու նպատակով, որպեսզի կանխվեն նրանց միջամտությունը հետագա փուլերում:

2. Ա լուծույթում նստվածքը, լուծելը նպաստում են Ca^{++} հեռացմանը բջջապատից: Արդյունքում վերջինս դառնում է ավելի զգայուն լիզոցիմի հանդեպ: Լիզոցիմը հիմնային պայմաններում բավականին անկայուն է, որի պատճառով խորհուրդ է տրվում օգտագործել թարմ լուծույթ: PH 4-5-ի, 5°C պայմաններում լիզոցիմը կայուն է մի քանի շաբաթվա ընթացքում, մինչդեռ սենյակային ջերմաստիճանի պայմաններում՝ մի քանի օր: Այդ ֆերմենտը պետք է լուծել սառը թորած ջրում:

3. SDS-ը քայքայում է լիզոցիմով մշակված բջիջները և բնափոխում (դեմատուրացնում) սպիտակուցները, իսկ բջջային ԴՆԹ-ի հիմնական մասը մնում է բջիջների ջարդոցների հետ կապված: Ցենտրիֆուգման արդյունքում այն հայտնվում է նստվածքում:

4. Նատրիումի կամ կալիումի ացետատն օգտագործվում է SDS-ի, ինչպես նաև SDS- սպիտակուցներ կցույթների նստվածք ստանալու համար: SDS-ի լիարժեք նստվածք ստանալու համար բավական է փորձանոթները սառեցնել և պահել սառը տեղում 30 րոպե:

1.2. ՖԱԳԱՅԻՆ ՎԵԿՏՈՐՆԵՐ ԵՎ ՖԱԳԱՅԻՆ ԴՆԹ-Ի ԱՆՋԱՏՈՒՄ

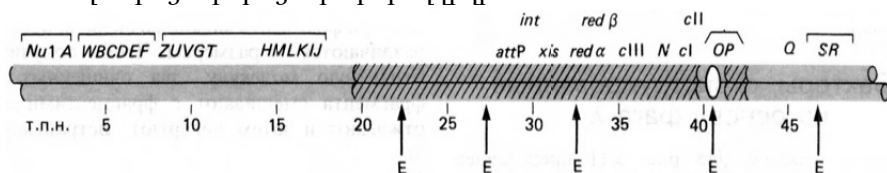
Ֆագերը նուկլեոպրոտեինային մասնիկներ են, որոնք բազմանում են կենդանի բջիջներում, սեփական գենոմի վերարտադրման և նոր հասուն ֆագային մասնիկների ձևավորման համար օգտագործելով տեր բջջի պաշարները: Ինքնավերարտադրման ունակության շնորհիվ ֆագերը հարմար են մոլեկուլային վեկտորներ կառուցելու համար: Լայն կիրառում ունեն λ բակտերիոֆագի հիման վրա ստեղծված մոլեկուլային վեկտորները, քանի որ նրանց կազմում հնարավոր է կլոնավորել ԴՆԹ-ի ներդիրային շատ ավելի մեծ հատվածներ, քան պլազմիդային վեկտորներում: Դա հնարավոր դարձավ λ ֆագի գենոմի գենետիկական կառուցվածքի շնորհիվ: λ -ն չափավոր ֆագ է, որը զարգանում է լիտիկ և լիզոգեն ուղիներով:

λ ֆագի ԴՆԹ-ն իրենից ներկայացնում է գծային երկշղթա մոլեկուլ միաթել $\cos$ (կոհեզիվ, կաշուն) ծայրերով, 12 նուկլեոտիդ երկարությամբ (Նկ. 2).

գլխիկի պոչիկի

տերմի- սպիտա- սպիտա- ԴՆԴ-ի

նազա կուցներ կուցներ սինթեզ լիզիս



Նկ. 2. λ ֆագի գծային գենոմը:

Ստվարագծված են այն գեները, որոնք անհրաժեշտ չեն լիտիկ զարգացման համար: E – EcoRI-սայտեր:

Այդ հատվածները միմյանց կոմպլեմենտար են: Ֆագային ԴՆԹ-ի աջ և ձախ ուսերում տեղակայված են լիտիկ զարգացման համար

անհրաժեշտ բոլոր գեները: Ուսերի միջև կոմպակտ տեղադրված են լիզոգեն զարգացման համար պատասխանատու գեները: Գենոմից վերջին գեները հեռացնելիս ստացվում են լիտիկ ուղիով բազմանալու ընդունակ մասնիկներ: λ ֆագի հասուն մասնիկում տեղավորվում են մոտ 50 հազար գույգ նուկլեոտիդ (հզն), որոնցից մոտ 30 հզն տեղակայվում են աջ և ձախ ուսերին: Մնացյալը կարող է գրեթե լիովին փոխարինվել 22-ից 24 հզն ներդիրով: Այն ֆագային մասնիկները, որոնցում տեղավորվել է առանց ներդիրի ֆագային ԴՆԹ-ն, կամ ֆագի գենոմի չափսերը գերազանցող ներդիրով ԴՆԹ-ն, չեն վարակում տեր բջիջը և չեն զարգանում: Հետևաբար այն ֆագային գաղութները, որոնք գոյացել են տեր բջիջներից բաղկացած մարզում, պարունակում են ֆագի գենոմի չափսերի 87%-ից ոչ պակաս և 107% ոչ ավել ռեկոմբինանտ ԴՆԹ:

ԽՆԴԻՐ V. λ բակտերիոֆագի ԴՆԹ-ի անջատում

Աշխարհանքի ընթացք.

1. Ագարոզով թասերի վրա ցանել λ ֆագի և նրա տեր բջիջների խառնուրդը, ինկուբացնել 24 ժամ 37°C պայմաններում:

2. Թասերի մեջ լցնել 5-ական մլ Ֆագերը նոսրացնելու սառը բուֆեր, թասերը թողնել 4°C պայմաններում 3 ժամից ոչ պակաս:

3. Պարզեցված ֆագոլիզատի 0,4 մլ տեղափոխել 1,5 մլ-անոց ցենտրիֆուգային անոթի մեջ:

4. Ավելացնել 1 մլլ դիէթիլօքսիդիֆորմատ կամ 0,25 ԷԴ-SU սենյակային ջերմաստիճանի պայմաններում, ավելացնել 10 մլլ SDS-ի 10%-անոց լուծույթ, փորձանոթը շրջել, թափահարելով խառնել պարունակությունը:

5. Ավելացնել 50 մլլ լուծույթ Ա.

2 Մ տրիս,

0,2 Մ Na_2EDTA (pH 8,5),

խառնել:

6. Կափարիչով փակել, ինկուբացնել 5 թույն 70°C պայմաններում:
7. Ավելացնել 50 մկլ կալիումի կամ նատրիումի ացետատի 5 Մ-անոց լուծույթ:
8. Անոթները դնել սառույցի մեջ 30 թույնից ոչ պակաս ժամանակով:
9. Ցենտրիֆուգել 15 թույն (15 000 պտույտ/թույն):
10. Վերնստվածքային հեղուկը լցնել նոր փորձանոթի մեջ, ծավալը լրացնել էթանոլով, սենյակային ջերմաստիճանի պայմաններում:
11. Ցենտրիֆուգել միկրոֆուգում 5 թույն:
12. Վերնստվածքային հեղուկը թափել, շրջել թղթե սրբիչի վրա, որպեսզի հեղուկն ամբողջովին դատարկվի: Զգուշանալ գերչորացումից:
13. Նստվածքը լուծել 50 մկլ լուծույթ Բ-ում.
 - 10 մՄ տրիս ($\text{pH } 7,5$),
 - 1 մՄ $\text{Na}_2 \text{ E-}\Gamma\text{-SU}$,
 - 10 մկգ/մլ Ռ-ՆԹազա A:

ՄԵԿՆԱԲԱՆՈՒՄ

1. Թասերի սառեցումը հանգեցնում է ագարոզի պնդեցմանը, ինչը կանխում է նրա ներթափանցումը ֆագոլիզատի մեջ: Նվազում է նաև ֆագոլիզատում ԴՆԹ-ի դեգրադացման աստիճանը:
2. Նուկլեազների ակտիվությունը ճնշելու նպատակով ավելացվում է դիէթիլթրսիդիֆորմատ կամ $\text{Na}_2 \text{ E-}\Gamma\text{-SU}$:
3. SDS-ը դեմատուրացնում է սպիտակուցները, հանգեցնելով ֆազային մասնիկներից ԴՆԹ-ի անջատման:
4. Տրիս ավելացվում լուծույթում բուֆերային համակարգի հավասարակշռությունն ապահովելու համար:
5. Լուծույթը տաքացվում է սպիտակուցների լիակատար բնափոխման նպատակով:

6. Կալիումի կամ մատրիումի աղետատի ավելացումը հանգեցնում է դողեցիլտուլֆատով բնավոխված սպիտակուցների մատեցմանը:

7. Սառեցումն ապահովում է մսովածքի լիակատար ձևավորումը:

8. Եթե մսովածքի որոշ մասը հատակին չի մստել, ապա փորձանոթն անհրաժեշտ է կտրուկ թափ տալ, որպեսզի հեռացվի զավթված օդը: Կրկին ցեմտրիֆուգել:

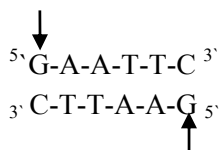
9. Եթե վերնսովածքային հեղուկը պղտոր է, անհրաժեշտ է կրկին ցեմտրիֆուգել:

10. Ստացված պատրաստուկում էթանոլի ներկայությունը դյուրացնում է ֆազի բարձրամոլեկուլային ԴՆԹ-ի մսովածքի ձևավորումը:

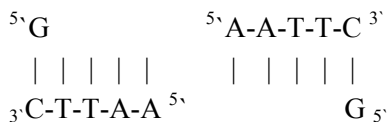
11. ՌՆԹազա A-ն ավելացվում է, որպեսզի հեռացվեն պատրաստուկում առկա ՌՆԹ-ի մոլեկուլները, որոնք հետագա փորձերում կարող են ճնշել զանազան ֆերմենտների ակտիվությունը:

2. ՌԵՍՏՐԻԿՑԻՈՆ ԷՆԴՈՆՈՒԿԼԵԱԶՆԵՐ

4-6 մուկլեոտիդներից բաղկացած հաջորդականություններ (*ռեստրիկցիոն սայթեր*) ճանաչող և այդ սայթերում ԴՆԹ-ն հատող ֆերմենտները համդիսանում են II տիպի ռեստրիկցիոն էնդոնուկլեազներ (*ռեստրիկտրազներ*): Այդ հաջորդականություններն բնութագրվում են երկրորդ կարգի հայելանման սիմետրիայով: Ռեստրիկտազները, ճանաչելով ռեստրիկցիոն սայթերը, տրոհում են երկշղթա ԴՆԹ-ի մոլեկուլն այդ հաջորդականությունների սահմաններում կամ նրանց կից՝ միմյանցից չորս մուկլեոտիդի հեռավորության վրա գտնվող երկու շղթաների կեսերում: Օրինակ, EcoRI ռեստրիկտազը ճանաչում է 6 մուկլեոտիդից բաղկացած հետևյալ հաջորդականությունը

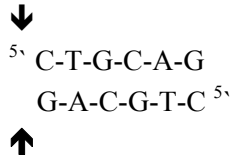


և տրոհում է հաջորդականությունը երկու շղթաներում գտնվող (G) և ադենինի (A) միջև: Գոյանում են ցից կաչում 5' ծայրերով հատվածներ:

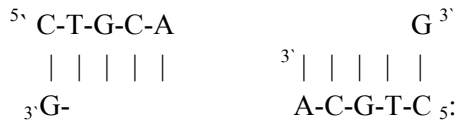


Կան ռեստրիկտազներ, որոնք ճանաչելով 6 մուկլեոտիդից բաղկացած հաջորդականությունը, տրոհում են ԴՆԹ-ն՝ առաջացնելով 3' կաչում ծայրեր: Օրինակ՝ Pst I.

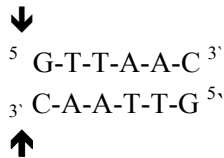
ռեստրիկտազը ճանաչում է հետևյալ հաջորդականությունը



և տրոհում է ԴՆԹ-ն երկու շղթաներում գտանիմի (G) և ադենինի (A) միջև: Գոյանում են ցից կաչուն 3՝ ծայրերով հատվածներ



Հայտնաբերված են նաև ռեստրիկտազներ, որոնք հատում են ռեստրիկցիոն սայթը առանցքով, օրինակ՝ HpaI ռեստրիկտազը ճանաչում է հետևյալ հաջորդականությունը



և տրոհում այն առանցքով:

Կաչուն ծայրերը կարող են փոխազդել ցանկացած այլ կոմպլեմենտար միաշղթա ծայրերի հետ, ինչի արդյունքում գոյանում են ԴՆԹ-ի ռեկոմբինանտ (տարբեր ծագում ունեցող հատվածներից բաղկացած) մոլեկուլներ:

Կան 3՝ կաչուն ծայրեր առաջացնող ռեստրիկտազներ, օրինակ Pst I, ինչպես նաև ռեստրիկտազներ, որոնք սրոհում են ԴՆԹ-ն սիմետրիայի առանցքով, առաջացնելով բութ ծայրեր:

Յուրաքանչյուր ռեստրիկտազի համար գոյություն ունեն ռեսկցիայի որոշակի պայմաններ: Հիմնական փոփոխական պարամետրերն են ինկուբացման ջերմաստիճանը և բուֆերի կազմը: Ջերմաս-

տիճանային ռեժիմին բավականին խիստ պահանջներ են ներկայացվում, մինչդեռ բուֆերների միջև տարբերությունները հաճախ աննշան են: Ըստ բուֆերային պայմանների, ֆերմենտները բաժանվում են երեք խմբի. ա) բարձր իոնային ուժի ներքո ակտիվ գործող ֆերմենտներ, բ) ֆերմենտներ, որոնց համար ցանկալի են իոնային ուժի միջին թվեր, գ) ցածր իոնային ուժի ներքո գործող ֆերմենտներ: Բուֆերների բաղադրությունները տե՛ս Հավելվածում:

ԽՆԴԻՐ VI. ԴՆԹ-ի տրոհում ռեստրիկտազներով

Աշխարհանքի ընթացք.

Ռեակցիայի խառնուրդի ծավալը հավասար է 20 մկլ և պարունակում է 0,2-1 մկգ ԴՆԹ:

1. 1,5 մլ փորձանոթի մեջ լցնել 1 մկգ խտությամբ 1 մկլ ԴՆԹ-ի լուծույթ, ավելացնել 17 մկլ մանրագերծված H_2O , խառնել, մատով թեթևակի խփելով անոթի ծայրին:

2. Ավելացնել 2 մկլ 10 x բուֆեր՝ տվյալ ռեստրիկտազին համապատասխան իոնային ուժով, նորից խառնել:

3. Ավելացնել 1 միավոր ֆերմենտ, խառնել (1 միավորը ֆերմենտի այն քանակն է, որն անհրաժեշտ է 1 մկգ ԴՆԹ-ն 1 ժամում, անհրաժեշտ բուֆերում և ջերմային պայմաններում, 20 մկլ ծավալում լիովին տրոհելու համար):

4. Խառնուրդն ինկուբացնել անհրաժեշտ ժամանակի ընթացքում (ֆերմենտի ակտիվությունը և օպտիմալ ներգործման պայմանները նշված են փաթեթի վրա):

5. Ռեակցիան կանգնեցնել, ավելացնելով 0,4 մկլ ԷԴՏԱ-ի (0,5 Մ, pH 7,5): Վերջնական խտությունը կկազմի 10 մՄ:

Տրոհման արդյունքները հսկվում են ազարոզային գել-էլեկտրաֆորեզով: (Տե՛ս ներքևում):

ՄԵԿՆԱԲԱՆՈՒՄ

Ռեստորիկագները թանկարժեք ֆերմենտներ են: Ստորև բերված խորհուրդները կօգնեն նվազագույնի հասցնել կորուստները:

1. 50% գլիցերին պարունակող բուֆերում -20°C պայմաններում պահվելու դեպքում ռեստորիկագները կայուն են:

2. Ռեկոմբինանտ ԴՆԹ ստանալու համար միևնույն ռեստորիկ-տազով տրոհել վեկտորային ԴՆԹ-ն և այն ԴՆԹ-ն, որից անջատվում է անհրաժեշտ գենը: Նշված ԴՆԹ-ների տրոհումը կարելի է կատարել առանձին-առանձին, կամ նույն փորձանոթի մեջ: Վերջին դեպքում, ռեակցիայի խառնուրդը կազմելու ժամանակ հաշվի է առնվում ԴՆԹ-ի գումարային քանակը, որպեսզի ճիշտ հաշվարկվի ռեակցիայի մյուս բաղադրիչների քանակային հարաբերակցությունը: Եթե ռեակցիայի խառնուրդի ընդհանուր ծավալը կազմում է 20 մկլ, ապա բաղադրիչներն ավելացվում են հետևյալ քանակներով.

1 մկլ վեկտորային ԴՆԹ (1մկգ),

1 մկլ ներդիրի ԴՆԹ (1մկգ),

2 մկլ 10x բուֆեր,

1 մկլ ֆերմենտ (1 միավոր),

15 մկլ H_2O :

3. ՌԵԿՈՄԵՆԴԱՆՏ ԴՆԹ-Ի ՆԵՐՄՈՒԾՈՒՄ ԲԶԻԶՆԵՐԻ ՄԵԶ

Մոլեկուլային կլոնավորման կարևոր փուլ է հանդիսանում «*in vitro*» կառուցված ռեկոմբինանտ ԴՆԹ-ի ներմուծումը բակտերիալ բջիջների մեջ: Այդ նպատակով կիրառվում են պլազմիդային ԴՆԹ-ով *E.coli* բջիջների գենետիկական տրանսֆորմացիայի արդյունավետ և վերադասարկվող մեթոդներ:

Բակտերիաների գենետիկական տրանսֆորմացիան գենետիկական փոխանակման միջոց է, որի հետևանքով, քրոմոսոմային կամ պլազմիդային մեկուսացված ԴՆԹ-ի մոլեկուլի ներմուծման արդյունքում, փոփոխվում է բջջի գենոտիպը: Տրանսֆորմացիայի ընթացքը բաղկացած է մի քանի փուլից. ա) ԴՆԹ-ի ադսորբցիա բջջի մակերեսի վրա, բ) ԴՆԹ-ի ներմուծում բջջի մեջ, գ) քրոմոսոմային դոնորային ԴՆԹ-ի ինտեգրում ռեցիպիենտի քրոմոսոմի մեջ՝ քրոսինգովերների գույգ քանակի շնորհիվ ԴՆԹ-ի հումուլոգ հատվածների ռեկոմբինացիոն փոխանակման արդյունքում: Ի տարբերություն քրոմոսոմայինի՝ պլազմիդային ԴՆԹ-ն չի ինտեգրվում ռեցիպիենտ բջջի քրոմոսոմի մեջ:

Քրոմոսոմային դոնորային ԴՆԹ-ի մվազագույն երկարությունը 500 գույգ նուկլեոտիդ է, սակայն ռեկոմբինացիայում սովորաբար մասնակցում են 200 հազար գույգ նուկլեոտիդ երկարությամբ ԴՆԹ-ի հատվածներ: Եթե դոնորային ԴՆԹ-ն պլազմիդային է, ապա գոյացած տրանսֆորմանտները ձեռք են բերում տվյալ ԴՆԹ-ով պայմանավորված հատկություններ: Էկզոգենային ԴՆԹ-ն ներթափանցում է միայն այն բջիջների մեջ, որոնք գտնվում են այսպես կոչված կոմպետենտ վիճակում: Կոմպետենտ վիճակը բակտերիաներին բնորոշ է աճեցման որոշակի փուլում: Գրամ-դրական բակտերիաները կոմպետենտ են աճեցման բավականին երկար ժամանակահատվածում, այդ իսկ պատճառով նշված բակտերիաներում տրանսֆորմացիան կատարվում է բնական պայմաններում: Գրամ-բացասական բակ-

տերիաների կոմպետենտ վիճակը կարճաժամկետ է, ուստի և նրանց տրանսֆորմացիայի համար անհրաժեշտ կոմպետենտ բջիջներն ստացվում են արհեստականորեն, մշակելով՝ նրանց CaCl_2 լուծույթով: Տրանսֆորմացիայի հաճախականության վրա ազդում է ոչ միայն ռեցիպիենտ բջիջների վիճակը, այլև ԴՆԹ-ի պատրաստուկի հատկությունները (գալարման աստիճանը, չափսերը), նրա խտությունը և բակտերիաների տեսակը: ԴՆԹ-ի տրանսֆորմացիոն ակտիվության մակարդակը նրա կառուցվածքային ամբողջականության ցուցանիշ է հանդիսանում:

Կոմպետենտ բջիջներ ստանալու համար գրամ-բացասական բակտերիալ բջիջները մշակվում են CaCl -ով: Տրանսֆորմանտների ելքի հաճախականությունը կազմում է $10^5 - 10^7$ pBR 322 պլազմիդի ԴՆԹ-Ի յուրաքանչյուր 1 մկգ-ին: CaCl -ով մշակված բակտերիալ բջիջները պահպանում են կոմպետենտ վիճակը երկու օրվա ընթացքում: *E.coli* որոշ շտամերի կոմպետենտ բջիջները կարելի է պատրաստել մեծ քանակներով և պահել սառեցրած վիճակում:

ԽՆԴԻՐ VII. Պլազմիդային ԴՆԹ-ով *E.coli* բջիջների գենետիկական տրանսֆորմացիա

Աշխատանքի ընթացք.

1. *E.coli* HB101 շտամի գիշերային կուլտուրան 20-ապատիկ նուրացնել գոլ L ագարակով, ինկուբացնել թափահարելով 1,5 ժամ 37°C պայմաններում, մինչև 2×10^7 բջիջ/մլ տիտրի:

2. Թարմացրած կուլտուրայի 1,5 մլ տեղադրել միկրոֆուգի փորձանոթի մեջ, 5 րոպե ցենտրիֆուգել ($10\,000$ պտույտ/րոպե, 0°C):

3. Նստվածքին ավելացնել 200 մկլ CaCl_2 0,1 M լուծույթ, թողնել 25 րոպե 0°C պայմաններում:

4. Ցենտրիֆուգել, նստվածքին ավելացնել 10 մկլ CaCl_2 0,1 M լուծույթ:

5. Այդ նստվածքին ավելացնել 1-5 մկգ/մլ պլազմիդային ԴՆԹ-ի լուծույթ, ինկուբացնել 15 րոպե 0°C պայմաններում:

6. Անոթը 5 րոպեով դնել ջրային բաղնիսի մեջ 37°C պայմաններում:

7. Անոթի մեջ լցնել 1 մլ L ագարակ, ինկուբացնել 1 ժամից ոչ պակաս 37°C պայմաններում:

8. Բոլոր մմուշներից 0,1-ական մլ ցանել սելեկտիվ միջավայրեր պարունակող Պետրիի թասերի վրա: Նույնատիպ միջավայրերում ցանել 0,1-ական մլ ռեցիպիենտ բջիջ՝ սելեկտիվ գործոնի հանդեպ նրանց զգայունությունը հաստատելու նպատակով:

9. Թասերն ինկուբացնել տերմոստատի մեջ (37°C) 24 ժամվա ընթացքում:

10. Հաջորդ օրը սելեկտիվ միջավայրերի վրա աճած բակտերիալ գաղութները արտատպվում են երկու տարբեր հակաբիոտիկներ պարունակող միջավայրերի վրա: Այդ հակաբիոտիկների հանդեպ կայունություն ապահովող գեները գտնվում են վեկտորային մոլեկուլում և նրանցիմ մեկը ինակտիվացած է ներդիրով: Հետևաբար, այն գաղութները, որոնք չեն աճում այն թասերի վրա, որոնք միջավայրում պարունակում են այն հակաբիոտիկը, որի հանդեպ կայունությունը կոդավորող գենն ինակտիվացած է, հանդիսանում են ռեկոմբինանտ տրանսֆորմանտներ:

ՄԵԿՆԱԲԱՆՈՒՄ

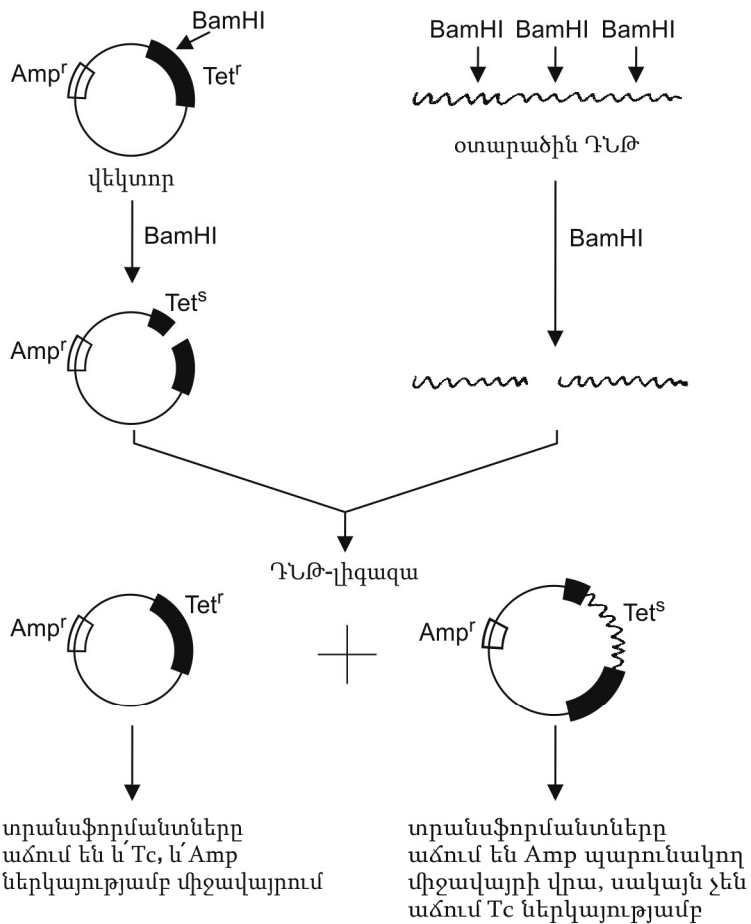
1. Տրանսֆորմացիայի արդյունավետությունը կախված է ռեցիպիենտ բջիջների աճեցման պայմաններից և խտությունից: Վերջինս չպետք է գերազանցի $T=1-2 \times 10^7$ բջիջ/մլ: Կարևոր նշանակություն է տրվում լավ աէրացիային, որի համար նպատակահարմար է կուլտուրան աճեցնել մեծ անոթում:

2. Տրանսֆորմացիայի բարձր արդյունավետություն ապահովելու համար կարևոր է, որպեսզի ջերմաստիճանը չտատանվի 0° -ից նույնիսկ ամենակարճ ժամանակով:

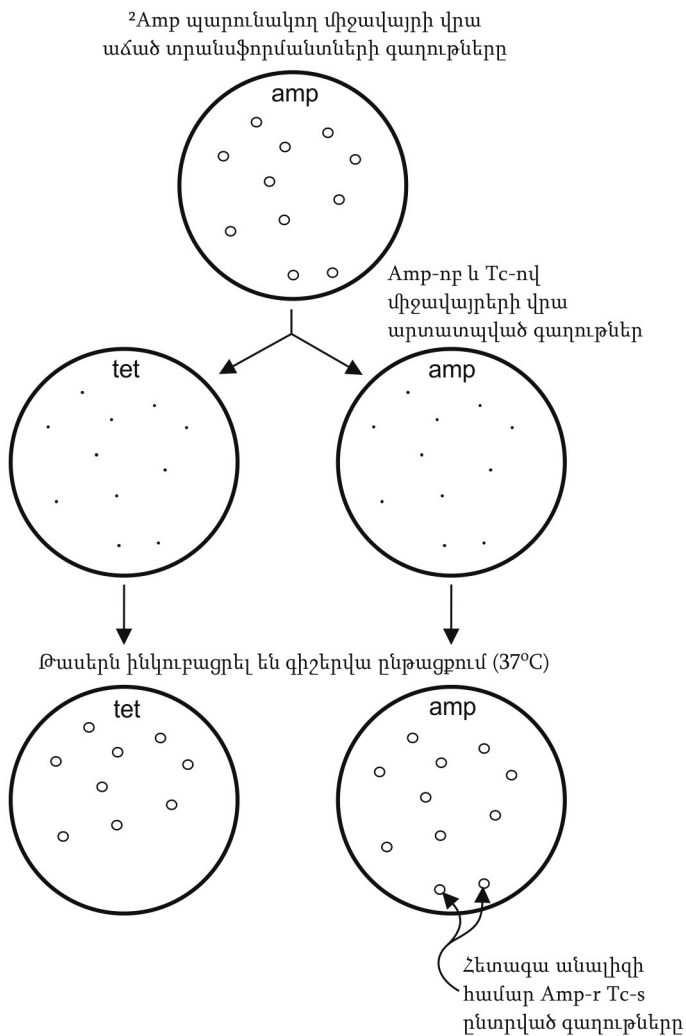
3. Սառեցված կոմպեսենտ բջիջները կարելի է բարձր արդյունավետությամբ օգտագործել 10-11 ամսվա ընթացքում:

4. ՌԵԿՈՄԵՆԴԱՆՏ ԿԼՈՆԵՐԻ ՃԱՆԱԶՈՒՄ ԵՎ ԸՆՏՐՈՒՄ

Պլագմիդային վեկտորների հիման վրա ստացված ռեկոմբինանտ ԴՆԹ պարունակող կլոնների ճանաչումը և ընտրումը կատարվում է հատուկ սելեկտիվ միջավայրերի վրա: Վերջիններս պարունակում են վեկտորային մոլեկուլով պայմանավորված հակաբիոտիկներից մեկը, որի հանդեպ կայունությունը պահպանվել է: Մյուս հակաբիոտիկի հանդեպ կայունությունն ապահովող գենն ապասկտիվացված է ներդիրով, ինչն օգնում է ռեկոմբինանտ ԴՆԹ պարունակող կլոնների հեշտությամբ հայտնաբերելուն:



Նկար 3. Ներդիրն ինակտիվացնում է Tc հանդեպ կայունությունը



Նկար 4. Ռեկոմբինանտ ԴՆԹ (վեկտոր + ներդիր) պարունակող գաղութների հայտնաբերումը համապատասխան սեղեկտիվ միջավայրեր օգտագործելով

Սակայն, երբ կայունության գեները վնասված չեն ներդիրով, ռե-կոմբինացիոն կլոնների հայտնաբերման համար (ֆագային վեկտորների դեպքում՝ գրեթե միշտ) կիրառում են մոլեկուլային հիբրիդացման մեթոդը: Այն հիմնված է երկու միաթել մոլեկուլային թթուների կամ նրանց հատվածների կոմպլեմենտար փոխազդեցության վրա:

Դեմատուրացման պայմաններում (բարձր ջերմաստիճան կամ հիմնային միջավայր) մոլեկուլային թթուների երկթելանի մոլեկուլների շղթաները բաժանվում են ջրածնային կապերի թուլացման պատճառով և դառնում միաշղթա: Ռեմատուրացման ժամանակ նրանք նորից միանում են կոմպլեմենտարության սկզբունքով: Եթե լուծույթի մեջ կա ԴՆԹ-ի տարբեր ծագում ունեցող մի քանի մոլեկուլ, ապա ռեմատուրացման ժամանակ որոշ դեպքերում կարող են գոյանալ տարբեր ծագման միաթել մոլեկուլների հիբրիդներ:

Հիբրիդացման փորձերում կարևորվում են երեք բաղադրիչներ.

- զոնդ՝ մոլեկուլային թթվի՝ միաթել հայտնի հաջորդականությամբ նիշակիր մոլեկուլ,
- թիրախ ԴՆԹ՝ ԴՆԹ-ի մոլեկուլ, որում հետազոտվում է զոնդին կոմպլեմենտար հաջորդականության առկայությունը կամ բացակայությունը,
- հիբրիդացման ազդանշանի հայտնաբերման համակարգ, որը պետք է լինի հնարավորինս զգայուն:

ԽՆԴԻՐ VIII. Ձոնդային ԴՆԹ-ի նիշավորումը nick-տրանսլյացիայի մեթոդով

Մեթոդը հիմնված է ԴՆԹ պոլիմերազ 1 ֆերմենտի՝ ռեպարատիվ տիպի սինթեզ իրականացնելու ունակության վրա այն ԴՆԹ-ներում, որոնցում կան միաթել կտրվածքներ: Ֆերմենտն օժտված է երեք ակտիվություններով՝ պոլիմերազային և երկու էկզոնուկլեազային. $3' \rightarrow 5'$ և $5' \rightarrow 3'$:

Պոլիմերազային ակտիվությունը ապահովում է նուկլեոտիդների միացում ԴՆԹ-ի 3'-OH ծայրին, որը գոյացնում է շղթաներից մեկի կտրվածքի՝ nick-ի ժամանակ: Իսկ էկզոնուկլեազային 5'→3' ակտիվությունը՝ նուկլեոտիդներ է հեռացնում ԴՆԹ-ի 5'-P ծայրից: Այդ երկու ակտիվությունների միաժամանակ արտահայտումը հանգեցնում է ԴՆԹ-ի շղթայով nick-ի տեղաշարժին (nick-տրանսլյացիա): Եթե ռեակցիայի խառնուրդում կան միշակիր դեզոքսինուկլեոտիդեռաֆոսֆատներ, ապա շղթայի ձևավորման ժամանակ նրանք կմիանան աճող շղթային, որի արդյունքում կստացվի ԴՆԹ-ի միշակիր մոլեկուլ:

Սովորաբար միշավորվում են զոնդերը: Նիշը կարող է լինել ռադիոակտիվ և ոչ-իզոտոպային: Որպես ռադիոակտիվ միշ օգտագործվում են ^{32}P , ^{35}S և ^3H իզոտոպները: Ոչ-իզոտոպային (բիոտին, դիզոքսիգենին, դինիտրոֆենոլ, ագետիլամինոֆլորեն, ևն) միշավորման մեթոդների ստեղծումը լուծեց աշխատանքների անվտանգության խնդիրը: Բիոտինով նշված զոնդերը հայտնաբերվում են ոչ միայն կոլորիմետրով, այլև լյումինեսցենտ մանրադիտակով, ֆլուորոքրոմների կամ միշերի հանդեպ հակամարմինների օգնությամբ:

Աշխատանքի ընթացք.

1. Nick-տրանսլյացիայի ռեակցիան իրականացնում են 25 մկլ հետևյալ խառնուրդի մեջ.

2,5 մկլ nick-տրանսլյացիայի բուֆեր (10x)

2,5 մկլ 0,2 մՄ բոլոր dNTP-ներից, բացառությամբ միշակիրի

1 մկլ ԴՆԹ լուծույթ (1 մկգ)

0,5 մկլ նոսրացրած ԴՆԹազ

0,4 մկլ 0,2 մՄ միշակիր dNTP պարունակող լուծույթ

0,1 մկլ ԴՆԹ պոլիմերազ I-ի լուծույթ (2 մկգ/մկլ)

18 մկլ H_2O :

2. Խառնուրդն ինկուբացնել 60 րոպե 14°C պայմաններում:

3. Ռեակցիան կանգնեցնել, ավելացնելով 2 մկլ 0,5 Մ ԷԴԹԱ:

4. Անջատել նիշակիր ԴՆԹ-ն չմիացված նիշից՝ սեֆադեքս G-50 միկրոաշտարակի վրա:

ՄԵԿՆԱԲԱՆՈՒՄ

1. Nick-տրանսլյացիայի ժամանակ օգտագործվող ֆերմենտները զգայուն են ազարոզի նկատմամբ: Այդ պատճառով nick-տրանսլյացիայից առաջ ազարոզային գելից անջատված ԴՆԹ-ն անհրաժեշտ է մանրակրկիտ մաքրել:

2. ԴՆԹ-ի հետագոտվող մոլեկուլը, որի վրա պետք է որոշվի հատուկ հաջորդականության առկայությունը կամ բացակայությունը, կարող է գտնվել ինչպես լուծույթում, այնպես էլ պինդ կրիչի վրա:

3. Սովորաբար զոնդի և դեմատուրացված թիրախ ԴՆԹ-ի փոխազդեցությունը զգալիորեն ավելի արդյունավետ է, երբ թիրախ ԴՆԹ-ն անշարժեցված է միկրոցելյուլոզային կամ նեյլոնային ֆիլտրի վրա:

4. Վերոհիշյալ կրիչների վրա կարելի է տեղափոխել ինչպես ԴՆԹ-ն, այնպես էլ բակտերիալ կամ ֆագային գաղութները, որոնք այնուհետև քայքայվում են ֆիլտրերի վրա: Այժմ ԴՆԹ-ն պատրաստ է հիբրիդացմանը:

ԽՆԴԻՐ IX. 1. Բակտերիալ գաղութների տեղափոխում միկրոցելյուլոզային ֆիլտրի վրա

Աշխատանքի ընթացք.

1. Սելեկտիվ միջավայրերով Պետրիի թասերում աճեցնել ռեկոմբինանտ ԴՆԹ պարունակող տրանսֆորմանտների գաղութներ:

2. Մանրագերծված թավշով գաղութները վերատպել Պետրիի թասի չափով կտրված ֆիլտրի վրա, որը գտնվում է նույն սելեկտիվ մի-

ջավայրով Պետրիի թասի մեջ: Այդպիսով կարելի է ստանալ մի քանի դրոշմ:

3. Սկզբնական թասը պարաֆիլմով փակել և պահել 4°C պայմաններում:

4. Դրոշմով թասերն ինկուբացնել մեկ գիշեր 37°C պայմաններում:

5. Թասի և ֆիլտրի վրա նույն կետերում փափուկ մատիտով նշում կատարելուց հետո աճեցված գաղութներով ֆիլտրը զգուշորեն հանել:

6. 3MM վատման թուղթը կտրատել ֆիլտրից մի փոքր մեծ չափսերի, մեկ թերթիկը թրջել 10% SDS լուծույթում: Հեղուկի ավելցուկը թափել:

7. Ֆիլտրը 3-10 բոպեով դնել 3MM թղթի 2 թերթի վրա, թրջված 30 մլ դենատուրացնող լուծույթում (0,5 Մ NaOH, 1,5Մ NaCl): Ֆիլտրի այն երեսը, որտեղ գտնվում են աճացված գաղութները, պետք է ուղղված լինի դեպի վեր:

8. Հեղուկի ավելցուկը հեռացնելու համար ֆիլտրը տեղափոխել 3MM թղթի թերթի վրա, աճեցված գաղութներով երեսը դեպի վեր:

9. Ֆիլտրը 3-10 բոպեով դնել 3MM թղթի 2 թերթի վրա, թրջված 30 մլ չեզոքացնող լուծույթում (0,5 Մ տրիս pH 7,5, 1,5Մ NaCl):

10. Ֆիլտրը տեղափոխել քամիչ թղթի դիզակի վրա:

11. Ֆիլտրը երկու անգամ լվանալ 25 մլ 90% էթանոլով և լավ չորացնել:

12. Ֆիլտրը դնել քամիչ թղթի թերթերի արանքում և պահել վակուումի մեջ 1,5-2 ժամ 80°C պայմաններում՝ թրծելու նպատակով: (Նկար 4)

13. Ֆիլտրը պատրաստ է հիբրիդացման (տե՛ս ստորև):

ՄԵԿՆԱԲԱՆՈՒՄ

1. 7-րդ կետում, հիմքի և բարձր NaCl խտության ազդեցության տակ տեղի է ունենում բակտերիալ գաղութների քայքայում, իսկ անջատված ԴՆԹ-ն դեմատուրացվում է:

2. Ֆիլտրերի տեղափոխումը 0,5 Մ տրիսի մեջ չեզոքացնում է հիմքի ներգործությունը, և միաթել ԴՆԹ-ն ամրանում է ֆիլտրի վրա:

ԽՆԴԻՐ IX.2. Ֆիլտրերի վրա ամրացված նուկլեինային թթուների հիբրիդացում նիշակիր զոնդերի հետ

Աշխատանքի ընթացք.

1. Տաքացրած ֆիլտրերը դնել տաշտակի մեջի SSC (6x) լուծույթի մակերեսին: Ֆիլտրերը թրջվելուն պես, ընկղմել լուծույթի մեջ:

2. Ֆիլտրերը տեղափոխել մեկ այլ ապակյա կամ պլաստմասե պնակի մեջ, վրան լցնել 100 մլ լվացող հեղուկ, որը ֆիլտրերից կհեռացնի աճեցման միջավայրը, ագարոզայի և բակտերիալ բջիջների մնացորդները:

3. Լվացող հեղուկը թափել, ֆիլտրերն ինկուբացնել 4-6 ժամ 42⁰C պայմաններում, 60 մլ նախահիբրիդացման լուծույթի մեջ: Ֆիլտրերը պետք է ամբողջությամբ թաղվեն լուծույթում: Նախահիբրիդացման ընթացքում, միկրոցելյուլոզային ֆիլտրի այն հատվածները, որտեղ տեղի է ունեցել մեկ- կամ երկթելանի ԴՆԹ-ի ոչ-սպեցիֆիկ միացում, հազեցնում են սաղմոնի սերմի ոչ-նիշակիր ԴՆԹ-ներով, SDS-ով, կամ Դենհարդտի լուծույթի բաղադրիչներով:

4. Չոնդի ԴՆԹ-ն տաքացնելով դեմատուրացնել (5 րոպե, 100⁰C), լցնել ֆիլտրերը ծածկող նախահիբրիդացման հեղուկով տաշտակի մեջ: Ինկուբացնել 1-2 ժամ 42⁰ C պայմաններում: Հիբրիդացման ռեակցիայի ժամանակ պնակները պետք է կիպ փակված լինեն՝ գոլորշիացումը կանխելու նպատակով:

5. Ռեակցիան ավարտելուց հետո թափել հիբրիդացման լուծույթը և ֆիլտրերը երեք-չորս անգամ 5-10 բուլե տևողությամբ լվանալ SSC (2x) և 1% SDS բուֆերի մեծ ծավալների մեջ (300-500 մլ) սենյակային ջերմաստիճանի պայմաններում: Լվանալու ոչ մի փուլում նիտրոցելյուլոզային ֆիլտրերը չպետք է չորանան:

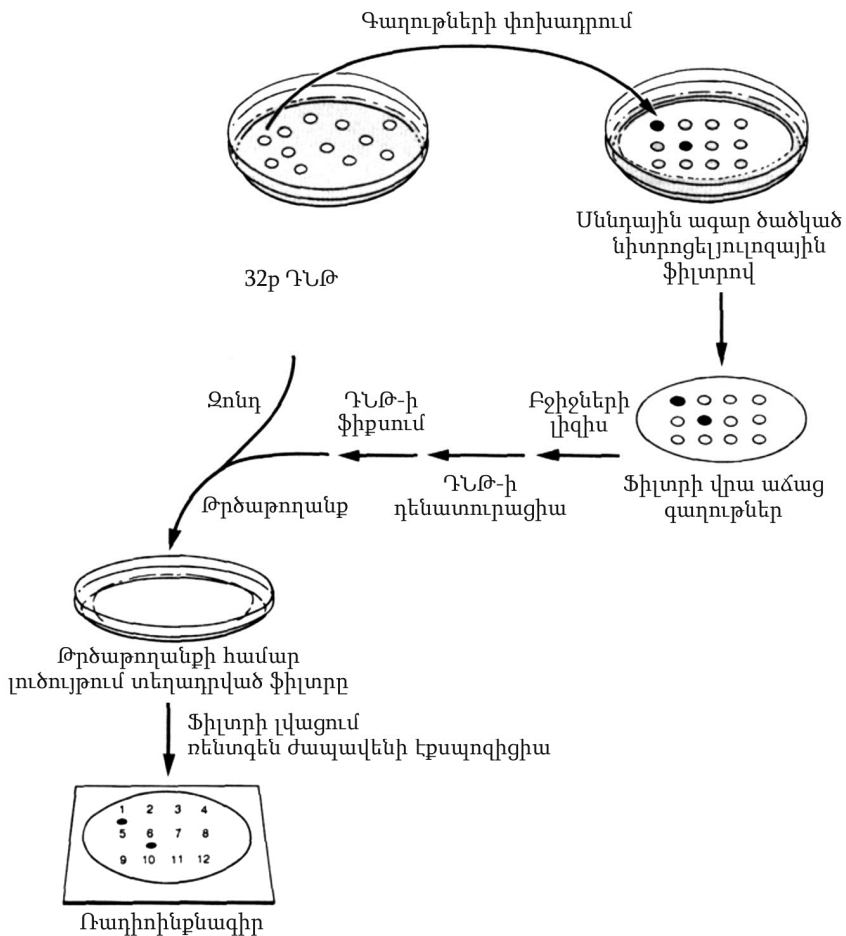
6. Ֆիլտրերը երկու անգամ լվանալ 300 մլ SSC (2x) և 1% SDS բուֆերի մեջ 68 °C պայմաններում:

7. Ֆիլտրերը կաշուն ժապավենով ամրացնել 3MM վատման թղթի վրա, օդային հոսանքով չորացնել սենյակային ջերմաստիճանի պայմաններում:

8. Ֆիլտրերով 3MM վատման թուղթը փաթաթել Saran Wrap թաղանթով, կիպ տեղադրել համապատասխան չափսի ռենտգենյան ժապավենի վրա, լուսակայել մութ սենյակում հատուկ տուփի մեջ մի քանի ժամից մինչև մի քանի օր՝ 70° C պայմաններում:

9. Լուսակայումից հետո ժապավենը համապատասխանեցնել ֆիլտրի հետ և վերլուծել ստացված պատկերը: Ֆիլտրի վրա կատարել նշումներ:

10. Նշված ֆիլտրերը համեմատել սկզբնական թասերի հետ, ընդգծելով ռեկոմբինանտ ԴՆԹ մոլեկուլներ պարունակող գաղութները, վերացանել նոր թասերի վրա և պահել որպես աշխատանքային նյութ:



5. ԴՆԹ-Ի ՀՈՄՈԼՈԳԻԱԿԱՆ ՀԱՋՈՐԴԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԲԱՅԱՀԱՅՏՈՒՄ ՍԱՌԻՉԵՐՆ-ԲԼՈԹԻՆԳԻ ՄԵԹՈԴՈՎ

Առանձին որոշակի հաջորդականությունների հայտնաբերումը և տեղակայումը թիրախ ԴՆԹ-ի մոլեկուլի վրա կատարվում է Սաու-զերն-Բլոթինգի առաջարկաց մեթոդով (Southern, 1975), երկու փուլով.

ա) Ռեստրիկտացնելով տրոհված ԴՆԹ-ի հատվածները տա-րանջատվում են ազարոզային գել-էլեկտրաֆորեզի միջոցով՝ ըստ նրանց մոլեկուլային կշիռների, դենատուրացվում են, տեղափոխվում են միտրոցելյուլոզային ֆիլտրի վրա և ամրացվում: Ֆիլտրի վրա տե-ղափոխելիս պահպանվում են գելում ռեստրիկցիոն հատվածների դիրքերը:

բ) Ֆիլտրի հետ կապված ԴՆԹ-ի հատվածները հիբրիդացվում են ^{32}P նիշակիր զոնդով, ռենտգեն ժապավենի վրա ստացված պատկե-րում հայտնաբերվում են տվյալ զոնդին կոմպլեմենտար ԴՆԹ-ի բո-լոր հատվածները:

ԽՆԴԻՐ X.I. ԴՆԹ-ի տեղափոխում ազարոզային գելից միտրոցելյուլոզային ֆիլտրի վրա

Աշխատանքի ընթացք.

1. Տրոհված ԴՆԹ-ն ենթարկել էլեկտրաֆորեզի՝ օգտագործելով 0,7% ազարոզա և 0,5 մկգ/մլ էտիդիումի բրոմիդ պարունակող տրիս-ացետատային բուֆեր: Էլեկտրաֆորեզի ավարտից հետո գելը լու-սանկարել, լուսավորելով կարճալիք ուլտրամանուշակագույն լույ-սով:

2. Գելը դնել պնակի մեջ, դենատուրացնել, ավելացնելով 250 մլ՝ 0,25 Մ HCl սենյակային ջերմաստիճանի պայմաններում: Պարբե-րաբար ճոճել 15 րոպե: Նկարագրվածը կրկնել երկու անգամ:

3. Գելն արագորեն ողողել ջրով:

4. Գելը տեղափոխել 250 մլ՝ 0,25 Մ NaOH և 1,5 Մ NaCl լուծույթով պնակի մեջ: Ճոճել 15 րոպե: Նկարագրվածը կրկնել ևս մեկ անգամ:

5. Գելը չեզոքացնել 500 մլ՝ 0, 5 Մ տրիս-HCl (pH 7,5) և 1,5 Մ NaCl լուծույթում: (Տրիս-HCl տվյալ լուծույթը ստանալու համար 60 գ տրիս հիմքին ավելացնել 30 մլ խտացված HCl, H₂O-ով հասցնել 1 լ: 1,5 Մ NaCl տվյալ լուծույթը ստանալու համար 1 լ H₂O-ին ավելացնել 90 գ NaCl:) Գելը պահել սենյակային ջերմաստիճանի պայմաններում, զգուշորեն ճոճելով 30 րոպեի ընթացքում:

6. Գելը տեղափոխել 250 մլ՝ 1 Մ նատրիումի ացետատի (pH 4,0) լուծույթի մեջ, պահել 30 րոպե: Կրկնել նատրիումի ացետատի քարմ լուծույթի մեջ:

7. Գելը լվանալ 0,1 Մ նատրիումի ացետատի (pH 4,0) մեջ, պահել 30 րոպե՝ NaCl-ի բարձր խտությունը հեռացնելու նպատակով:

8. Պլաստմասե մեծ քիթեղի վրա դնել վատմանի 3 MM թղթի թերթ, տեղադրել խորը մեծ էքսիկատորի մեջ, ավելացնել SSC բուֆեր, ապակե ձողիկով հեռացնել 3 MM թղթի թերթի վրա գոյացած օղի պղպջակները:

9. Գելը տեղափոխել վատման 3 MM թղթի թերթի վրա՝ հակառակ կողմը դեպի վեր: Թղթի և գելի միջև եղած օղի բոլոր պղպջակները հեռացնել:

10. Նխորոցելյուոզային ֆիլտրից կտրել գելի չափսը 1-2 մմ գերազանցող մի կտոր: (Նխորոցելյուոզային ֆիլտրերի հետ աշխատել նրբումեղիով /պինցետով/ և կրել ձեռնոցներ:)

11. Ֆիլտրի թերթը դնել SSC (2x) լուծույթի մակերեսին, պահել մինչև ներքևի երեսի ամբողջովին թրջվելը, ընկղմել լուծույթի մեջ 2-3 րոպեով:

12. Թաց ֆիլտրը դնել գելի վրա, օղի պղպջակները հեռացնել:

13. Կտրել վատման 3 MM թղթից գելի չափսով 2 թերթ, թրջել H₂O-ով կամ SSC (2x)-ով և տեղադրել ֆիլտրի վրա, օղի պղպջակները հեռացնել:

14. Կտրել քամիչ թղթի կամ թղթե սրբիչի 5-8 սմ բարձրությամբ մի դիզակ՝ վատման 3 MM թերթից աննշան փոքր չափսի, տեղադրել վերջինիս վրա: Այս ամենի վրա դնել 500 մգ ծանրություն: (Նկար 5)՝ Սաուզերն բլոտինգի սխեմա: Այս գործողություններն անհրաժեշտ են՝ էքսիկատորից հեղուկի շարժը գելի և ֆիլտրի միջով ապահովելու համար: Այդպիսով ԴՆԹ-ի հատվածները գելից անցնում են նիտրոցելյուլոզային ֆիլտրի վրա և ամրանում:

15. ԴՆԹ-ի տեղափոխումը տևում է 12-24 ժամ: Քամիչ թղթի կամ թղթե սրբիչի թրջված դիզակը պարբերաբար փոխարինել չորով: ԴՆԹ-ի մանր հատվածներն անցնում են ֆիլտրին 1-2 ժամում, իսկ 15 հզն և ավել չափսերի հատվածների տեղափոխումը տևում է ավելի քան 15 ժամ:

16. Հեռացնել քամիչ թղթի կամ թղթե սրբիչի դիզակը, ջրազրկված գելը և ֆիլտրը շրջված վիճակում տեղափոխել չոր 3 MM թղթի վրա: Շատ փափուկ մատիտով ֆիլտրի վրա նշել գելի փոսիկները և եզրերը:

17. Գելը հեռացնել, ֆիլտրը ներծծել SSC (6x) լուծույթով սենյակային ջերմաստիճանի պայմաններում 5 րոպե:

18. Ֆիլտրը չորացնել վատման 3 MM թղթի վրա:

19. Չոր ֆիլտրը դնել 3 MM թղթի երկու թերթի արանքում, տաքացնել 80°C վակուումային վառարանում 2 ժամվա ընթացքում:

20. Ֆիլտրը պատրաստ է հիբրիդացմանը: Պահել 3 MM թղթի երկու թերթի արանքում, սենյակային ջերմաստիճանի պայմաններում, վակուումում:

ԽՆԴԻՐ X.2. Հիբրիդացում ֆիլտրերի վրա՝ Սաուզերն-բլոթինգի մեթոդով

Աշխատանքի ընթացք.

1. Տաքացրած ֆիլտրը դնել դնել SSC (6x) լուծույթի մակերեսին, պահել մինչև ներքևի երեսի ամբողջովին թրջվելը, ընկղմել լուծույթի մեջ 2-3 րոպեով:

2. Թաց ֆիլտրը դնել պոլիէթիլենի տոպրակի մեջ, ավելացնել մինչև 68⁰C տաքացրած նախահիբրիդացման լուծույթ (տե՛ս Հավելվածը): Լուծույթի քանակը կախված է ֆիլտրի չափսերից (0,2 մլ 1 սմ²):

3. Օդը տոպրակից լիովին հեռացնել, տաքացնելով փակել բաց եզրը: Ջրի բաղնիսում ինկուբացնել 2-4 ժամ 68⁰C պայմաններում:

4. Տոպրակը բաղնիսից հանել, մի անկյունը կտրել, նախահիբրիդացման լուծույթը լիովին հեռացնել:

5. Տոպրակի մեջ լցնել հիբրիդացման լուծույթ՝ 50 մլ/ 1 սմ²: Օդը խնամքով հեռացնել, տաքացնելով փակել:

6. Տոպրակը դնել ջրային բաղնիսի մեջ՝ 68⁰C պայմաններում, հիբրիդացման ամբողջ ժամանակի ընթացքում (12-24 ժամ):

7. Տոպրակը հանել, արագորեն կտրել երեք կողմից, հանել ֆիլտրը, դնել SSC (2x)-ով և 0,5% SDS-ով տաշտակի մեջ, սենյակային ջերմաստիճանի պայմաններում:

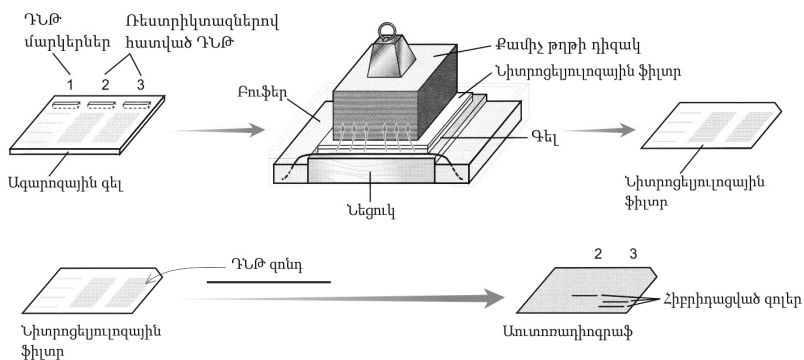
8. 5 րոպեից ֆիլտրը ըեղափոխել մեկ այլ տաշտակի մեջ՝ SSC (2x) և 0,1% SDS լուծույթով: Թեթևակի ճոճելով ինկուբացնել 2 ժամ, սենյակային ջերմաստիճանի պայմաններում:

9. Ֆիլտրը տեղափոխել SSC (0,1 x)-ով և 0,5% SDS-ով պլաստմասե սաղր տաշտակի մեջ, թեթևակի ճոճելով ինկուբացնել 15 րոպե, 68⁰C պայմաններում: Ինկուբացիան շարունակել թարմ բուֆերում ևս 30 րոպե:

10. Ֆիլտրը չորացնել վատման 3 MM թղթի վրա:

11. Ֆիլտրը փաթաթել Saran Wrap թաղանթի մեջ, դնել համապատասխան չափսի ռեճուզեն ժապավենի վրա՝ ռադիոակտիվ պատկեր ստանալու համար: Այդ ամբողջը դնել հատուկ տուփի մեջ և պահել մի քանի ժամից մինչև մի քանի օր:

12. Ժապավենը հանել և անմիջապես լուսապատկերել՝ կոնդենստի գոյացումից խուսափելու համար:



Նկար 6. Մաուզերն բլոտինգ

ՄԵԿՆԱԲԱՆՈՒՄ

1. Բոլոր գործողությունները կատարել ձեռնոցներով:
2. Լվացման ոչ մի փուլում թույլ չտալ, որպեսզի ֆիլտրը չորանա:

6. ԳԵԼ-ԷԼԵԿՏՐԱՖՈՐԵԶ

Էլեկտրաֆորեզը ԴՆԹ-ի մոլեկուլների կամ նրանց հատվածների՝ հաստատուն էլեկտրական դաշտում տարանջատման, նույնացման և մաքրման ստանդարտ մեթոդ է: Բացի այդ, գելում տարանջատման ընթացքում կարելի է անմիջականորեն հետևել հատվածների դիրքին, քանի որ ԴՆԹ-ի զուլերը կարելի է գելում ներկել ֆլուորեսցենտ և ներմուծվող ներկիչով՝ ցածր խտության էթիլիումի բրոմիդով: ԴՆԹ-ի մոլեկուլների կամ նրանց հատվածների տեղաշարժի արագությունը ազարոզային գելի միջով պայմանավորվում է հինգ կարևոր պարամետրներով:

1. **ԴՆԹ-ի մոլեկուլների չափսերը.** ԴՆԹ-ի գծային երկշղթա մոլեկուլները գելում տեղաշարժվում են մեկ ծայրը դեպի առաջ (Fisher, Dingman, 1971; Aaij, Borst, 1972), իրենց մոլեկուլային զանգվածների տասնորդական լոգարիթմին հետադարձ համեմատական արագությամբ (Helling et al., 1974):

2. **Ազարոզի խտություն.** ԴՆԹ-ի՝ միևնույն չափսի մոլեկուլները կամ նրանց հատվածները տարբեր խտության ազարոզային գելներում տեղաշարժվում են տարբեր արագությամբ: Ավելի բարձր խտության ազարոզում նրանց տեղաշարժման արագությունն ավելի դանդաղ է:

3. **ԴՆԹ-ի մոլեկուլների կոնֆորմացիա.** ԴՆԹ-ի՝ միևնույն մոլեկուլային զանգվածի մոլեկուլները, որոնք ունեն տարբեր կոնֆորմացիա (օղակաձև՝ չվնասված, օղակաձև՝ մեկ թելում կտրվածքով, գծային), գելում տեղաշարժվում են տարբեր արագությամբ: Նշված երեք ձևերի համեմատական շարժունությունը մեծապես կախված է ազարոզի խտությունից, ինչպես նաև այնպիսի գործոններից, ինչպիսիք են հոսանքի ուժը, բուֆերի իոնային ուժը և գերպարույրի գալարների խտությունը (վերջինս միայն օղակաձև՝ չվնասված մոլեկուլները դեպքում):

4. **Էլեկտրական դաշտի լարվածություն.** Յաճախ լարվածության դեպքում գծային ԴՆԹ-ի մոլեկուլների տեղաշարժման արագությունը ուղիղ համեմատական է կիրառվող լարմանը: Հատվածների առավելագույն տարանջատումը տեղի է ունենում 5 վոլտ/սմ լարվածության պայմաններում:

5. **ԴՆԹ-ի նուկլեոտիդային բաղադրություն և ջերմաստիճան.** ԴՆԹ-ի էլեկտրաֆորետիկ պահվածքն ազարոգային գելերում քիչ է կախված նուկլեոտիդային բաղադրությունից (Thomas, Davis, 1975) կամ գելի ջերմաստիճանից: Ազարոգային գելում էլեկտրաֆորեզը սովորաբար կատարում են սենյակային ջերմաստիճանի պայմաններում: Բացառություն են կազմում 0,5% ազարոգ պարունակող գելերը: Նրանք շատ փափուկ են, և նրանց հետ հարմար է աշխատել սառը պայմաններում (4°C):

6.1. ԳԵԼ-ԷԼԵԿՏՐԱՖՈՐԵԶ ԿԱՏԱՐԵԼՈՒ ՍԱՐՔԱՎՈՐՈՒՄՆԵՐ

Ներկայումս հորիզոնական թիթեղի տեսք ունեցող գելեր են օգտագործվում համապատասխան սարքերում, ինչն ունի հետևյալ առավելությունները.

- Կարելի է կիրառել ազարոգի ցածր խտություններ, քանի որ գելը ներքևից պահվում է ապակե կամ պլաստմասե ենթահիմքով:
- Գելի թիթեղը կարող է լինել տարբեր չափսերի:
- Գելի ձևավորումը և պահպանումը, ինչպես նաև հետագա գործողությունները բավականին պարզ են:
- Կարելի է կիրառել ամուր և ոչ թանկարժեք սարքեր:

Էլեկտրաֆորեզը սովորաբար կատարվում է տրիս-ացետատային, տրիս բորաթային կամ տրիս-ֆոսֆատային բուֆերներում (pH 7,5%-7,8%): Բուֆերների բաղադրությունը տե՛ս Հավելվածում:

Ավելի հաճախ կիրառվում է տրիս-ացետատը, քեև նրա բուֆերային ծավալը բավականին ցածր է, և երկարատև էլեկտրաֆորեզի ժամանակ այն հյուծվում է (անողը դառնում է հիմնային, իսկ կատողը՝ թթվային): Բազմակի կիրառման դեպքում նախընտրելի է տրիս-բորաթային բուֆերը, որն ունի մեծ ծավալ և ապահովում է ԴՆԹ-ի մոլեկուլների կամ հատվածների լավ անջատում:

ԽՆԳԻՐ XI.1. Ագարոզային գելերի պատրաստում

Աշխարհանքի ընթացք.

1. Ագարոզի փոշու հաշվարկված քանակը ավելացնել համապատասխան ծավալի էլեկտրաֆորեզի բուֆերի մեջ:

2. Խառնուրդը տաքացնել եռման ջրով բաղնիսում՝ մինչև ագարոզի լիովին լուծվելը:

3. Սառեցնել լուծույթը մինչև 50°C , ավելացնել էթիլդիոմի բրոմիդ (վերցնել սառը պայմաններում ոչ-լուսաթափանց սրվակում պահվող 10 մկգ/մլ խտությամբ բրոմիդի ջրային լուծույթից): Ագարոզում վերջնական խտությունը պետք է կազմի 0,5 մկգ/մլ:

4. Մաքուր չոր ապակու եզրերին կպցնել կպչող ժապավենն այնպես, որպեսզի ստացվի սաղր տաշտակ, լցնել ագարոզի պատրաստի լուծույթը:

5. Ապակու եզրերից մեկին ամրացնել հատուկ սանրիկ, որի ատամները գելում կձևավորեն փոսիկներ նմուշների համար: Անհրաժեշտ է, որպեսզի փոսիկի հատակի և ապակու միջև մնա ագարոզի շերտ՝ 0,5-1 մմ հաստությամբ: Այժմ գելի այս շերտը հանդես կգա որպես փոսիկի հատակ:

6. Երբ գելը պնդանա (30-45 րոպեից, սենյակային ջերմաստիճանի պայմաններում), թեթևակի ճոճելով սանրիկը հեռացվում է: Հեռացնել նաև կպչուն ժապավենը: Գելը տեղադրել էլեկտրաֆորեզի համար նախատեսված սարքի մեջ:

7. Ավելացնել էլեկտրաֆորեզի բուֆեր այնքան, որպեսզի վերջինիս շերտը 1 մմ հաստությամբ ծածկի գելը:

8. ԴՆԹ-ի նմուշները խառնել հատուկ ծանրացնող բուֆերի հետ (տե՛ս Հավելվածը), խառնուրդը որոշակի ծավալով լցնել գելերի համապատասխան փոսիկների մեջ:

ԴՆԹ-ի նվազագույն քանակը, որը հնարավոր է հայտնաբերել էթիդիումի բրոմիդ պարունակող գելը լուսանկարելուց հետո, կազմում է 0,2 մկգ, զուրի 0,5 սմ լայնության դեպքում: ԴՆԹ-ի մոլեկուլների պարզ կազմի վերլուծության ժամանակ 0,5 սմ լայնությամբ փոսիկի մեջ տեղադրում են 0,2-0,5 մկգ ԴՆԹ: Իսկ եթե ԴՆԹ-ի նմուշը պարունակում չափ մեծ քանակությամբ տարբեր չափսերի հատվածներ, ապա փոսիկի մեջ սովորաբար տեղադրում է 5-10 մկգ ԴՆԹ:

ԽՆԴԻՐ XI.2. ԴՆԹ-ի ներկում ազարոզային գելերում

ԴՆԹ-ն ազարոզային գելում տեսանելի դարձնելու առավել հարմար մեթոդներից է ֆլուորեսցենտ ներկիչով ներկումը (Sharp et al., 1973): Այդ ներկիչ մոլեկուլն իր կազմում ունի տափակ խումբ, որը ներդրվում է ԴՆԹ-ի ակոսներում՝ հարևան հիմքերի միջև և, կապվելով, ավելացնում է ֆլուորեսցենցիայի ուժգնությունը: ԴՆԹ-ով և ներկիչով կլանվող (համապատասխանորեն 260 նմ և 360-300 նմ սահմաններում) ուլտրամանուշակագույն ճառագայթումն արձակվում է տեսանելի սպեկտրի կարմրամարնջագույն շրջանում (590 նմ):

Եթե անհրաժեշտ է հետևել ԴՆԹ-ի հատվածների տարանջատման ընթացքին, էթիդիումի բրոմիդը կարելի է ավելացնել ինչպես գելի, այնպես էլ էլեկտրաֆորեզային բուֆերի մեջ: Այլ դեպքերում ԴՆԹ-ն ներկվում է անջատման ավարտից հետո:

Աշխատանքի ընթացք.

1. Գելը տեղադրել 0,5 մկգ/մլ էթիլիումի բրոմիդ պարունակող էլեկտրաֆորեզային բուֆերի կամ ջրի մեջ և պահում 45 րոպե սենյակային ջերմաստիճանի պայմաններում:

2. Չկապված էթիլիումի բրոմիդը հեռացնել, գելը լվանալով 1 մՄ MgSO_4 լուծույթում, և պահել 1 ժամ սենյակային ջերմաստիճանի պայմաններում:

Ուշադրություն. էթիլիումի բրոմիդը ուժեղ կանցեռոգեն է և մուտագեն: Նրանով ներկված լուծույթների և գելերի հետ աշխատելիս անպայման կրել ձեռնոցներ:

6.2. ԱՆՋԱՏՎԱԾ ՆՈՒԿԼԵԻՆԱՅԻՆ ԹԹՈՒՆԵՐԻ ՔԱՆԱԿԻ ՈՐՈՇՈՒՄ

6.2.1. ՆՈՒԿԼԵԻՆԱՅԻՆ ԹԹՈՒՆԵՐԻ ՔԱՆԱԿԻ ՈՐՈՇՈՒՄ ՍՊԵԿՏՐԱՖՈՏՈՄԵՏՐՈՎ

Նուկլեինային թթուների քանակի որոշման մպատակով չափում են լուծույթի կլանումը 260 նմ և 280 նմ ալիքների շրջաններում: Առաջին դեպքում չափումը թույլ է տալիս հաշվարկել նուկլեինային թթուների խտությունը նմուշում: $D=1$ օպտիկական խտությունը համապատասխանում է մոտավորապես 50 մկգ/մլ երկշղթանի ԴՆԹ-ի, 40 մկգ/մլ մեկշղթանի ԴՆԹ-ի և ՌՆԹ-ի, և 20 մկգ/մլ՝ օլիգոնուկլեոտիդների խտություններին: D -ի՝ 260 նմ և 280 նմ շրջանների նշանակությունների հարաբերակցությունը թույլ է տալիս դատել նուկլեինային թթուների մաքրության աստիճանի մասին: ԴՆԹ-ի և ՌՆԹ-ի մաքուր պատրաստույթներն ունեն համապատասխանաբար 1,8 և 2,0 D_{260}/D_{280} նշանակություններ:

**6.2.2. ԵՐԿՇՂԹԱԿ ԴՆԹ-Ի ՔԱՆԱԿԻ ՈՐՈՇՈՒՄՆ
ԷԹԻԳԵՌՈՒՄԻ ԲՐՈՄԵԴԻ ՖԼՈՐԵՍՑԵՆՑԻԱՅԻ
ՈՒԺԳՆՈՒԹՅԱՄ**

Եթե ԴՆԹ-ի քանակաը լուծույթում բավարար չէ սպեկտրաֆոտոմետրով որոշելու համար, կիրառում են էթիդիումի բրոմիդի ֆլուորեսցենցիայի ուժգնության մակարդակով որոշելու մեթոդը: Ֆլուորեսցենցիայի մեծությունը ուղիղ համեմատական է ԴՆԹ-ի ընդհանուր զանգավածի մեծությանը: Այդ պատճառով լուծույթում ԴՆԹ-ի քանակը որոշում են, համեմատելով նմուշների և մի շարք չափորոշիչների ֆլուորեսցենցիայի ուժգնության մակարդակները:

**ԽՆԴԻՐ XII. ԴՆԹ-ի խտության որոշում պլաստիկ
թաղանթի օգնությամբ**

Աշխատանքի ընթացք.

1. Պլաստիկ թաղանթը ձգել ՈՒՄ-ճառագայթիչի պատուհանի կամ սև թղթի թերթի վրա:
2. Թաղանթի վրա տեղադրել 1-5 մկլ ԴՆԹ-ի նմուշ:
3. Կողքին, որոշակի հերթականությամբ, տեղադրել հայտնի խտության ստանդարտ լուծույթների հաժախ ծավալներ՝ ըստ խտությունների աճող մեծությունների 0,5 մկգ/մլ-ից մինչև 20 մկգ/մլ:
4. Յուրաքանչյուր կաթիլին ավելացնել 2մկգ/մլ էթիդիումի բրոմիդ պարունակող TE բուֆերի հաժախ ծավալներ, խառնել:
5. Գնահատել նմուշներում ԴՆԹ-ի խտությունը ՈՒՄ լույսի ներքո, համեմատել ֆլուորեսցենցիայի մակարդակները նմուշում և ստանդարտներում:

ԽՆԴԻՐ XII.1. Ազարոզով քասի վրա ԴՆԹ-ի խտության որոշման մեթոդ

Աշխատանքի ընթացք.

1. Եթե ԴՆԹ-ի նմուշներում կան ֆլուորեսցենցիայի մակարդակն ուժեղացնող կամ նվազեցնող խառնուրդներ, ապա ԴՆԹ-ի նմուշները կարելի է տեղադրել 0,5 մկգ/մլ էթիլիումի բրոմիդ պարունակող 1% ազարոզային քիթեղի մակերեսին:

2. Գելը մի քանի ժամ պահել սենյակային ջերմաստիճանի պայմաններում, որպեսզի խառնուրդի մոլեկուլները ներթափանցեն ազարոզի մեջ: Նմուշները հետագոտել ՈՒՄ լույսի տակ:

ԽՆԴԻՐ XII.1.2. Մինի-գելի մեթոդ

Աշխատանքի ընթացք.

1. Խառնել ԴՆԹ-ի նմուշի 2 մկլ 0,4 մկլ ծանրացնող բուֆերի հետ (բրոմֆենոլային կապույտ), այդ խառնուրդը տեղադրել 0,5 մկգ էթիլիումի բրոմիդ պարունակող 0,8% ազարոզային մինի-գելի վրա:

2. Նույն կերպով խառնել 2-ական մկլ ստանդարտ լուծույթներից (0,5-50 մկգ/մլ) յուրաքանչյուրը բրոմֆենոլային կապույտի հետ և տեղադրել գելի վրա:

3. Էլեկտրաֆորեզը կատարել այնքան, մինչև բրոմֆենոլային կապույտ ներկիչը չառաջանա 1,5-2 սմ-ով:

4. Գելը 5 րոպե պահել 0,01 Մ $MgCl_2$ էլեկտրաֆորեզային բուֆերում՝ ներկիչը հեռացնելու նպատակով:

5. ՈՒՄ լույսի տակ համեմատել նմուշների և ստանդարտ լուծույթների ֆլուորեսցենցիայի մակարդակները և որոշել ԴՆԹ-ի խտությունը նմուշում:

ՀԱՎԵԼՎԱԾ

Օգտագործված սպասքը մանրէագերծել ավտոկլավում: Հատկապես կարևոր է ունենալ մանրագերծված Էպպեկոթրֆի փորձանոթներ (1,5 մլ) և ավտոմատ պիպետների փոխարինման ծայրակալներ: Որոշ դեպքերում խորհուրդ է տրվում օգտագործել սիլիկոնապատ սպասք (օր.՝ շատ քիչ քանակությամբ մեկշղթանի ԴՆԹ-ի հետ աշխատելիս, կամ Մաքսամ-Հիլբերթի մեթոդով նուկլեոտիդային հաջորդականությունը որոշելիս): Դրա համար անհրաժեշտ է.

1. Սպասքը տեղավորել ապակյա մեծ էքսիկատորի մեջ:
2. Էքսիկատորում գտնվող բաժակի մեջ լցնել 1 մլ դիքլորդիմեթիլսիլան:
3. Էքսիկատորը միացնել վակուումային պոմպին և միացնել 5 բուպեով:
4. Պոմպն անջատել և անմիջապես օդ թողել էքսիկատորի մեջ: Դա կապահովի գազանման դիքլորդիմեթիլսիլանի համասեռ տարածմանը:
5. Պոմպը նորից միացնել, ստեղծել վակուում, պահել այն 2 ժամ:
6. Էքսիկատորը բացել, սպասքն օգտագործելուց առաջ տաքացնել 2 ժամ, 180°C պայմաններում:

Ուշադրություն. Դիքլորդիմեթիլսիլանը վերին աստիճանի թունավոր և ցնդական միացություն է, հետևաբար աշխատել միայն արտածող պահարանի մեջ:

ՄԻՋԱՎԱՅՐԵՐ, ԴԵՂԱՄԻՋՈՑԱՅԻՆ ՊԱՏՐԱՍՏՈՒՔՆԵՐԻ ԽՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ, ՄՆՆԴԱՅԻՆ ՀԱՎԵԼՈՒՄՆԵՐ

Լիարժեք L-միջավայր.

տրիպտոն Bacto	10 գ
խմորիչի հանուք	5 գ
NaCl	5 գ
H ₂ O	1 Լ

Մանրեագերծումն իրականացվում է 1 ժամ, 0,5 ատմ պայմաններում: Մանրեագերծումից հետո (pH 7, 0):

Ազար կամ ազարոզ պարունակող միջավայրեր պատրաստելու համար, մանրագերծումից առաջ հեղուկ միջավայրին յուրաքանչյուր 1 Լ-ի հաշվարկով ավելացնել.

Bacto ազար	15 գ՝ թասերի համար
Bacto ազար	7 գ՝ վերին շերտի համար
Ազարոզ (Type-1)	15 գ՝ թասերի համար
Ազարոզ (Type-1)	7 գ՝ վերին շերտի համար

SM միջավայր՝ Ֆազը պահելու և բազմացնելու համար.

NaCl	5,8 գ
MgSO ₄ x 7H ₂ O	2 գ
1 Մ տրիս-HCl (pH 7,5)	50 մլ
2% դոնդողանյութ	5 մլ
H ₂ O	945 մլ

Մանրեագերծել 0,5 ատմ 0,5 ժամ: Ն ֆազի դեպքում աճեցման միջավայրը պարունակում է 0, 2% մալտոզ, որի լուծույթը ստանում են, լուծելով 20 գ մալտոզը 100 մլ ջրում, և մանրագերծում ջրի բաղնիսում

15 թույլ: Ստացված լուծույթից 1-ական մլ ավելացնել ամեն 100 մլ միջավայրին:

Ստորև բերված միացությունները ավելացվում են նվազագույն միջավայրերի մեջ՝ հետևյալ աշխատանքային խտություններով (մկգ/մլ).

L-ամինաթթուներ 20

Ազոտային հիմքեր, նուկլեոտիդներ 20

Վիտամիններ 2

Լուծույթները մանրագերծում են ջրի բաղնիսում 15 թույլ:

Հակաբիոթիկների սկզբնական լուծույթները պատրաստվում են հետևյալ խտություններով՝ ստորև բերված լուծիչներում (մկգ/մլ).

ա) մանրէագերծված ջրում

ամպիցիլին 100

կանամիցին 100

ստրեպտոմիցին 100

բ) 50% էթանոլում

տետրացիկլին 10

քլորամֆենիկոլ 25

Հակաբիոթիկների մեծ մասը տաքացնելիս քայքայվում է: Այդ պատճառով նրանք ավելացվում են մինչև 55⁰C սառեցված միջավայրերի մեջ:

ԲՈՒՖԵՐՆԵՐ ԵՎ ԼՈՒՃՈՒՅԹՆԵՐ

Ելքային լուծույթներ .

1 Մ տրիս

121, 1 գ տրիս-HCl

800 մլ H₂O

pH-ի անհրաժեշտ ցուցանիշներ ստանալու համար անհրաժեշտ է ավելացնել խտացրած HCl հետևյալ քանակությամբ .

pH	7.4	70 մլ
----	-----	-------

pH	7.6	60 մլ
----	-----	-------

pH	8.0	42 մլ
----	-----	-------

Լուծույթի ծավալը ջրով հասցնել 1 և մանրէագերծել:

0.5 Մ ԷԴՏԱ pH 8.0

186.1 գ Na₂ ԷԴՏԱ x 2H₂O

800 մլ H₂O

pH-ը հասցնել 8.0, ավելացնելով մոտավորապես 20 գ NaOH, լուծույթի ծավալը ջրով հասցնել 1 և: Մանրէագերծել ավտոկլավում:

3 Մ NaCH₃COO /նատրիումի ացետատ/

408.1 գ NaCH₃COO x 3H₂O

800 մլ H₂O

pH-ը հասցնել 5.2, ավելացնելով սառցային քացախաթթու, լուծույթի ծավալը ջրով հասցնել 1 և: Մանրէագերծել ավտոկլավում:

10% SDS /նատրիումի դոդեցիլսուլֆատ/

100 գ SDS

900 մլ H₂O

Տաքացնել մինչև 60°C և pH-ը հասցնել 7.2, ավելացնելով մի քանի կաթիլ խտացրած HCl: Մանրէագերծել ավտոկլավում:

SSC (20x)

175.3 գ NaCl

88.2 մատրիումի ցիտրատ

800 մլ H₂O

pH-ը հասցնել 7.0, ավելացնելով մի քանի կաթիլ 10 N NaOH, լուծույթի ծավալը ջրով հասցնել 1 լ: Մանրէագերծել ավտոկլավում:

Էթիդիումի բրոմիդ

1 էթիդիումի բրոմիդ

100 մլ H₂O

Ներկիչը լուծել, սրվակը փաթաթել ալյումինե փայլաթիթեղի մեջ, պահել 4⁰C պայմաններում:

Բոլոր աշխատանքային լուծույթները պատրաստվում են, օգտագործելով ելքային լուծույթները:

TE

10 մՄ տրիս-HCl (pH 7,4)

1 մՄ ԷԴՏՍ

Լուծույթի pH-ի փոփոխման ժամանակ օգտագործել անհրաժեշտ pH-ով ելքային տրիսի լուծույթ:

Դենսիտիի լուծույթ (50 x)

Ֆիկոլ 5 գ

Պոլիվինիլպիրոլիդոն 5 գ

BSA /ցուլի սիճուկային ալբումին/ 5 գ

H₂O 500 մլ

Պահել - 20⁰C պայմաններում:

Նախահաբրիդացման լուծույթ

SSC (6 x)

SDS 0.5%

Դենհարդտի լուծույթ (5 x)

100 մկգ/մլ սաղմոնի սերմի բնափոխված ԴՆԹ

H₂O

500 մլ

Հիբրդացման լուծույթ

SSC (6 x)

0.01 Մ ԷԴԹԱ

զոնդի բնափոխված ³²P նիշակիր ԴՆԹ

Դենհարդտի լուծույթ (5 x)

SDS 0.5%

100 մկգ/մլ սաղմոնի սերմի բնափոխված ԴՆԹ

H₂O

500 մլ

Ծանրացնող լուծույթ (6 x)

40% գլիցերին կամ սախարոզ

0.15 % բրոմֆենոլի կապույտ

ՌԵՍՏՐԻԿՏԱԶՆԵՐՈՎ ՃԵՂՔԱՎՈՐՄԱՆ ԲՈՒՖԵՐՆԵՐ

Ցածրադային բուֆեր

10 մՄ տրիս-HCl, pH 7.5

10 մՄ MgCl₂

1 մՄ դիթիոտրեիտոլ

Միջնադային բուֆեր

50 մՄ NaCl

10 մՄ տրիս-HCl, pH 7.5

10 մՄ MgCl₂

1 մՄ դիթիոտրեիտոլ

Քարծրաղային բուֆեր

100 մՄ NaCl

50 մՄ տրիս-HCl, pH 7.5

10 մՄ MgCl₂

1 մՄ դիթիոտրեյտոլ

ԷԼԵԿՏՐԱՖՈՐԵԶԱՅԻՆ ԲՈՒՖԵՐՆԵՐ

Տրիս-ացետատային բուֆեր (50 x)

Տրիս-HCl	242 գ
Սառցային քաղախաթթու	57.1 մլ
0.5 Մ ԷԴԹԱ, pH 8.0	100 մլ
H ₂ O՝ մինչև	1000 մլ

Տրիս-ֆոսֆատային բուֆեր (10 x)

Տրիս-HCl	108 գ
85% ֆոսֆորաթթու (1.679 մգ/մլ)	15.1 մլ
0.5 Մ ԷԴԹԱ, pH 8.0	40 մլ
H ₂ O՝ մինչև	1000 մլ

Տրիս-բորատային բուֆեր (5 x)

Տրիս-HCl	54 գ
Բորաթթու	27.5 գ
0.05 Մ ԷԴԹԱ, pH 8.0	20 մլ
H ₂ O՝ մինչև	1000 մլ

Սովորաբար օգտագործվում են մեծ ծավալի բուֆերներ: Տրիս-բորատային բուֆերն ունի մեծ բուֆերային ծավալ: Այն օգտագործելիս ստացվում են ԴՆԹ-ի մուշների նվազագույն լայնության զուլեր: Ել-

քային տասնապատիկ լուծույթը չի վարակվում, սակայն երկարատև պահելիս նրանում գոյանում է հիմքում լուծվող նստվածք:

Տրիս-ֆոսֆատային բուֆերը նույնպես ունի մեծ ծավալ: ԴՆԹ-ի գոլերը մոտավորապես նախորդի լայնության են: Նշենք, որ այս ելքային լուծույթն արագ վարակվում է:

Տրիս-ացետատային բուֆերն ունի համեմատաբար ցածր բուֆերային ծավալ և երկարատև օգտագործման ընթացքում կարող է առաջանալ բուֆերի շարունակական շրջանառության անհրաժեշտություն: Էլեկտրաֆորեզի ընթացքում բարձր լարում օգտագործելիս այս բուֆերը չի տաքանում: Ելքային լուծույթը կարող է վարակվել:

ԲԱԿՏԵՐԻԱԼ ՇՏԱՄԵՐԻ ՊԱՀՊԱՆՈՒՄԸ

0,7% ազարային սյուներում. բակտերիալ շտամերն աճեցնում են մետաղյա մանրէաբանական ասեղի օգնությամբ քարմ կուլտուրայի ներարկումով փորձասրվակի մեջ գտնվող 0,7% ազարային սյունի մեջ: 24 ժամ աճեցնելուց հետո վրան լցնում են մանրէազերծված վազելինի յուղ: Սրվակը հերմետիկորեն փակում են մանրէազերծված ռետինե խցանով: Այսպես պատրաստված կուլտուրան կարող է պահպանվել մի քանի տարի 40C պայմաններում:

40% գլիցերինում. 2 մլ քարմ կուլտուրային ավելացնում են 2 մլ 80% մանրէազերծված գլիցերին: Հերմետիկորեն փակված վիճակում այն պահպանվում է մի քանի տարի –10-ից –200C պայմաններում:

Լիոֆիլիզացված վիճակում. քարմ աճեցված մանրէները նոսրացվում են հեղուկ միջավայրում (1 մաս L արգանակ, 3 մաս արյան սիճուկ, 1 մաս 7,5% գլյուկոզայի լուծույթ): Մուսպենզիան արագորեն սառեցվում է հեղուկ ազոտում և չորացվում վակուումում: Չորացնելուց հետո սրվակը գոդվում է գազայրոցի վրա և այդ վիճակում կարող է պահպանվել ևս մի քանի տարի:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. **Глазко В. И., Глазко Г. В.,** Введение в генетику. КВИЦ, 2003.
2. **Сингер М., Берг П.,** Гены и геномы. М., Мир, 1998.
3. **Рыбчин В. Н.,** Основы генетической инженерии., 2002.
4. **Щелкунов С. Н.,** Генетическая инженерия., Новосиб. ун-т, 2004.
5. **Glick B., Pasternak J. J.,** Molekular biotechnology. Principles and applications of recombinant DNA, 2003.

ԲՈՎԱՆԳԱԿՈՒՅԹԻՈՆ

Ներածություն	3
Նախաբան	5
1. Վեկտորային մոլեկուլների ԴՆԹ-ի անջատում	8
1.1. Պլազմիդային վեկտորներ և պլազմիդային ԴՆԹ-ի անջատում	8
1.2. Ֆագային վեկտորներ և ֆագային ԴՆԹ-ի անջատում	16
2. Ռեստրիկցիոն էնդոնուկլեազներ	20
3. Ռեկոմբինանտ ԴՆԹ-ի ներմուծում բջիջների մեջ	24
4. Ռեկոմբինանտ կլոնների ճանաչում և ընտրում	28
5. ԴՆԹ-ի հոմոլոգիական հաջորդականությունների բացահայտում սաուզերն-բլոթինգի մեթոդով	38
6. Գել-էլեկտրաֆորեզ	43
6.1. Գել-էլեկտրաֆորեզ կատարելու սարքավորումներ	44
6.2. Անջատված նուկլեինային թթուների քանակի որոշում	47
6.2.1. Նուկլեինային թթուների քանակի որոշում սպեկտրաֆոտոմետրով	47
6.2.2. Երկշրթա ԴՆԹ-ի քանակի որոշումն էթիդիումի բրոմիդի ֆլուորեսցենցիայի ուժգնությամբ	48
Հավելված	50
Գրականություն	58

ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՍԱԼՍԱՐԱՆ

ԱԶԱՐՅԱՆ Ն. Հ.

**ԳԵՆԵՏԻԿԱԿԱՆ
ՃԱՐՏԱՐԱԳԻՏՈՒԹՅԱՆ
ԳՈՐԾՆԱԿԱՆ ԱՇԽԱՏԱՆՔՆԵՐ**

ՈՒՍՈՒՄՆԱԿԱՆ ՉԵՌՆԱՐԿ

Համակարգչային ձևավորումը՝ Կ. Չալաբյանի
Կազմի ձևավորումը՝ Ս. Դարիբյանի
Տեխ. խմբագրումը՝ Գ. Գրիգորյանի

Տպագրված է Time to Print օպերատիվ տպագրությունների սրահում
ք. Երևան, Խանջյան 15/55

Չափսը՝ 60x84 $\frac{1}{16}$: Տպ. մամուլ 3,75:
Տպաքանակը՝ 100:

ԵՊՀ հրատարակչություն

ք. Երևան, 0025, Ալեք Մանուկյան 1



ՄԱՍՏԱՐԱՎՈՐՈՒԹՅՈՒՆ
ՆՐԵՎԱՆ 2015