

УДК 636:575

## ПОЛУЧЕНИЕ ДНК-ЗОНДА ГЕНА CD11A СВИНЬИ

Е. В. ХМЕЛЕВА

Днепропетровский государственный аграрный университет

*Для изучения места локализации и роли, которую играет в обмене веществ свиной ген CD11A, в условиях лаборатории молекулярной генетики ветеринарного факультета Кордовского университета (Испания) был синтезирован ДНК-зонд на основе праймеров человека и нуклеотидов свиньи. В результате полимеразной цепной реакции были амплифицированы копии этой ДНК-последовательности и изучены в ходе электрофореза в агарозном геле. Лабораторным путем было доказано, что этот зонд действительно отвечает по своему составу ожидаемой последовательности нуклеотидов и способен к последующей гибридизации с хромосомами свиньи на предмет изучения места локализации гена CD11A и его связи через интегрины – с конкретными реакциями метаболизма свиней.*

*Ключевые слова: обмен веществ, интегрины, ДНК-зонд, ПЦР, лигирование, трансформация, компетентные клетки, плаزمиды.*

**В**ведение. С целью изучения особенностей обмена веществ у животных разных видов, закономерностей наследственной детерминации обмена веществ, влияния молекулярно-генетических факторов на формирование продуктивности животных используются различные методы. Среди них – изучение влияния конкретных генов животных, в том числе и вновь открываемых, на ход отдельных биохимических реакций и на обмен веществ организма в целом.

Главной целью исследований, проведенных в лаборатории молекулярной генетики ветеринарного факультета университета г. Кордова, было синтезировать и изучить всю нуклеотидную последовательность гена свиней CD11A. Дальнейший ход исследований будет направлен на обнаружение этого гена в естественной ДНК животных. Далее необходимо изучение взаимодействия этого гена, как и других генов семейства CD, синтезированных в данной лаборатории, с соответствующими глобулинами.

### Материалы и методы

Для синтеза гена свиней CD11A на первом этапе исследований были изучены компьютерные данные банка генов о структуре ДНК

человека, крупного рогатого скота и мыши и обнаружено наличие в ее нуклеотидной последовательности данного гена, уже изученного у этих видов и имеющего общие консервативные области.

**1 этап. Конструирование и синтез праймеров для ПЦР.** Для синтеза комплементарных цепей ДНК искомого гена ((1) 5' → 3' (2) 3' → 5') были выбраны и синтезированы две пары праймеров: P1-P2 длиной 24-мер и 21-мер соответственно и P3-P4 длиной 21-мер и 18-мер.

**2 этап. Подготовка ПЦР-смеси.** Необходимые компоненты: 1) десяти кратный буфер; 2) MgCl<sub>2</sub> (хранится и рассчитывается отдельно во избежание нежелательных биохимических реакций); 3) стерильная деионизированная вода; 4) 2 пары праймеров: P1-P2 и P3-P4; 5) матричная ДНК лимфоцитов свиньи; 6) ДНК-полимераза Taq; 7) смесь четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов.

Объем выше указанных реагентов был рассчитан следующим образом (с учетом контрольных реакций для обеих пар праймеров) (табл. 1).

**3 этап. Синтез и амплификация искомым последовательностей гена CD11A.** Выполняли 40 циклов амплификации по следующей программе:

нагревание 94 °C 5 мин;

денатурация 94 °C 30 с;

отжиг праймеров — 54 °C 30 с (для P1-P2)

и 56 °C 30 с. (для P3-P4);

полимеризация 72 °C 7 мин.

**4 этап. Проведение электрофореза в агарозном геле.** Для последующей детекции полученных ампликонов ожидаемой длины (745 pb для P1+P2 и 441 pb для P3+P4) в течение 30 минут проводили электрофорез в 1%-ном агарозном геле в присутствии размерных стандартных маркеров I/HindIII и ЖХ174/HaeIII при постоянном напряжении 300 В. Растворы реагентов, используемых для электрофореза, рассчитывали по следующей схеме (табл. 2).

После разделения фрагменты ДНК визуализировали на трансиллюминаторе.

**5 этап. Очистка ДНК.** Продукты первой амплификации очищали от избытка дезоксирибонуклеотидтрифосфа-

Таблица 1. Растворы реагентов для ПЦР

Ед. изм. компонентов	P1P2		P3P4	
	+	-	+	-
10x	10	10	10	10
MgCl <sub>2</sub>	4	4	4	4
дНТФ	2	2	2	2
Праймер прямой	2	2	2	2
Праймер обратный	2	2	2	2
Матричная ДНК	5	—	5	—
ДНК-полимераза	2	2	2	2
H <sub>2</sub> O	73	78	73	78
Всего	100	100	100	100

Таблица 2. Растворы для электрофореза

Реагент	Химическое соединение	Количество
Агарозный гель	Агар	0.5 мг
	Буфер 10x	50.0 мл
	Этидий бромистый	3 мкл
Маркер	Эозин метиленисиний	1.0 мкл
	H <sub>2</sub> O	8.0 мкл
	Стандартный маркер ( $\lambda$ /Hind и $\phi$ X)	2.0 мкл
	Итого:	10.0 мкл
Исследуемый образец	Эозин-метиленисиний	1.0 мкл
	H <sub>2</sub> O	7.0 мкл
	Исследуемый образец	2.0 мкл
	Итого:	10.0 мкл

тов и праймеров с помощью препаративной электрофореза в легкоплавкой агарозе при помощи стандартных методов "QI Aquick Gel Extraction Kit Protocol" [1] и "QI Aquick PCR Purification Kit Protocol" [2], в соответствии со следующими основными этапами: 1) взвешивание кусочка геля, содержащего исследуемый фрагмент ДНК, и пробирки, в которой он находился; добавление в пробирку 3 объемов буфера QG к 1 объему геля; 2) доведение содержимого до полного растворения геля и проверка цвета полученного раствора, который не должен отличаться от исходной окраски буфера QG; 3) добавление 1 объема изопропанола и смешивание без центрифугирования; 4) совмещение стандартной колонки из Kita с собирающей пробиркой (объем 2 мл) и центрифугирование в течение минуты; 5) удаление надосадочной жидкости и помещение стандартной колонки в собирающую пробирку; 6) добавление 0,5 мл буфера QG и центрифугирование в течение минуты; 7) отмывка, добавление 0,75 мл буфера PE; отстаивание смеси в течение

5 минут и центрифугирование в течение минуты; 8) удаление надосадочной жидкости и центрифугирование в течение 1 добавочной минуты; 9) перемещение стандартной колонки в чистую 1,5 мл микроцентрифужную пробирку, добавление 30 мкл стерильной деионизированной воды в центрифуговую мембрану; отстой пробирки в течение минуты и центрифугирование также 1 минуту.

**6 этап. Лигирование фрагментов гена CD11A – P1-P2 и P3-P4 со стандартным вектором системы p-GEM-T Easy-system.** При помощи стандартного метода провели моделирование двух конструкций, состоящих из стандартных векторов, содержащих, в свою очередь, 2 фрагмента гена, полученных на основе праймеров человека и нуклеотидов свиньи. Для этого в 1,5 мл пробирку поместили: 1) буфер 2x "Rapid Ligation" (5 мкл); 2) стандартный вектор системы p-GEM-T Easy-system (1 мкл); 3) растворы праймеров P1-P2 и P3-P4 (по 3 мкл); 4) ДНК-лигазу (1 мкл); 5) провели инкубирование реакции в течение ночи при  $t = 4^{\circ}\text{C}$ .

**7 этап. Трансформация.** Целью этого этапа было клонирование синтезированных фрагментов P1-P2 и P3-P4 вместе с вектором, устойчивым к ампициллину, при помощи компетентных клеток бактерии *E. Coli XL-Blue*. Результат предыдущего этапа – два раствора плагата (P1-P2 и P3-P4) в объеме 10 мкл каждый. Бактерии содержатся в жидкой среде в стандартных пробирках объемом 150 мкл в морозильной камере при  $-180^{\circ}\text{C}$ . Трансформация включает следующие этапы: 1) Ввести 1,8%  $\beta$ -меркаптоэтанола для увеличения проницаемости мембраны бактерий в отношении векторов со встроенными фрагментами P1-P2 и P3-P4 (все пробирки в ходе всех манипуляций содержатся только во льду); 2) Медленно, осторожно ввести и осторожно, поверхностно перемешать 15 мкл этой смеси с верхним слоем 150 мкл культуры бактерий (с предварительной выдержкой ос – в течение не более 2–5 минут) во льду до появления первых признаков появления жидкости в пробирке (т.е. первого сигнала о растаянии замерзшей культуры); 3) Выдержать смесь 10 минут во льду; 4) В каждую из двух чистых пробирок Eppendorf ввести сначала 50 мкл компетентных клеток с  $\beta$ -меркаптоэтанолом, затем – в верхний слой, осторожно (чтобы не убить бактерий) с легким поверхностным помешиванием по 5 мкл P1-P2 и P3-P4-лигатов (но не наоборот!); 4) Выдержать во льду 30 минут; 5) Не более 3 минут выдержать в термомиксере при  $t = 37^{\circ}\text{C}$  в вибрирующем режиме; 6) Выдержать 2 минуты во льду; 7) Под вытяжкой, в присутствии спиртовки в каждую из двух пробирок (P1-P2 и P3-P4) внести 500 мкл LB-medium и инкубировать в течение 1 часа при  $t = 37^{\circ}\text{C}$  в вибри-

рующем режиме; 8) Под вытяжкой, в присутствии спиртовки в каждую из 4 маленьких чашек Петри с содержащейся в застывшем состоянии LB-средой с агаром (по 2 чашки для P1-P2 и для P3-P4) внести 50 мкл IPTG и 50 мкл X-Gal и очень нежными осторожными движениями (чтобы не убить бактерии) распределить по всему пространству дна чашек прокаленной в огне спиртовки и охлажденной помехивающими движениями в течение нескольких секунд стеклянной палочкой Y-образной формы. (Без этих веществ осуществление трансформации невозможно. IPTG вносят в среду в качестве индуктора, чтобы включить в работу промотор гена, отвечающего за синтез  $\beta$ -галактоидазы, и начать экспрессию этого гена. Также вносят X-Gal, и в результате выработки пигмента обычно белые бактерии окрашиваются в голубой цвет. А внедрение нашего фрагмента изменяет информацию гена  $\beta$ -галактоидазы, и голубой пигмент не вырабатывается, колонии остаются белыми, но уже содержащими наш фрагмент. Таким образом, изменения цвета колоний бактерий являются индикатором, дающим основание судить об успешном или неудачном лигировании сконструированного нами вектора. В отсутствие наших фрагментов в плазмиду иницилирующая часть m-PHK выглядит в соответствии со схемой 2, а после внедрения одного из фрагментов – так, как показано на схеме 3).

В этом случае экспрессия такого гена делает колонии бактерий белыми – вместо обычного гена, продуцирующего голубой пигмент, этот новый, "необычный", ген со встроенным фрагментом уже не синтезирует молекулы обычного белка галактоидазы – гене-

Схема 2

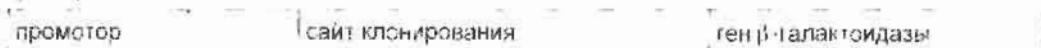
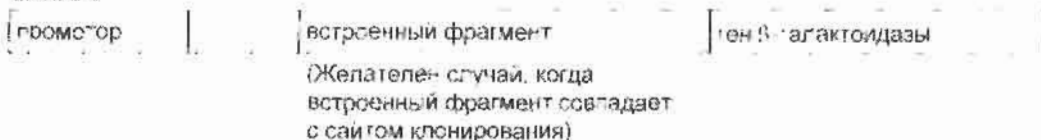


Схема 3



тическая информация из-за включения фрагмента резко изменилась. Поэтому, если колония белая, — значит, встроен наш фрагмент, который внес изменения, и голубой пигмент не образовался. Если колония голубая, значит, фрагмент не вошел, информация не изменилась, пигмент вырабатывается, но колония для наших исследований бесполезна. Таким образом, осуществляются два типа селекции компетентных клеток бактерии *E. Coli XL-Blue*: 1) становятся визуально заметными и пригодными к дальнейшим исследованиям те из них, в которые вошел вектор и сделал их резистентными против ампициллина, они не погибли; 2) селекция по цвету: отбирали для дальнейшей работы только белые колонии);

9) Под вытяжкой, в присутствии спиртовки ввести по 300 мкл каждой из полученных сред (P1-P2 и P3-P4) в 4 маленьких чашки Петри (по 2 чашки для P1-P2 и для P3-P4), выдержать сутки при  $t = 37^{\circ}\text{C}$ . После этого хранить при  $4^{\circ}\text{C}$ .

**8 этап. Перенос колоний из чашек Петри в раствор LB.** 1) Под вытяжкой, в присутствии спиртовки осторожно прикоснуться, проколов деревянной стерильной палочкой, к каждой из выбранных (самых крупных белых) колоний бактерий — индивидуальной

палочкой отдельной конкретной колонии; 2) Каждую палочку опустить в отдельную пробирку, промаркированную согласно общему количеству белых колоний с фрагментами P1-P2 и P3-P4 соответственно. В нашем случае — P1-P2 № 1, P1-P2 № 2, P1-P2 № 3, P1-P2 № 4 и P3-P4 № 1, P3-P4 № 2, P3-P4 № 3, P3-P4 № 4, P3-P4 № 5, P3-P4 № 6; 3) В каждую из этих пробирок поместить раствор следующего состава: а) среда LB-medium: 2,5 мл на каждую пробирку миккультуры, б) ампициллин: на 1 мл LB-medium — 2 мкл ампициллина. В нашем случае: на 10 пробирок — 25 мл LB-26 (для страховки); ампициллин: на 26 мл LB — 52 мкл. В итоге — на каждую пробирку — 2,5 мл раствора; 4) Инкубировать в течение ночи при  $t = 37^{\circ}\text{C}$  в вибрирующем режиме.

**9 этап. Очищение лизата.** Итак, на данном этапе было необходимо очистить от клеток бактерий размноженный стандартный вектор, содержащий встроенные фрагменты P1-P2 и P3-P4. Основной объем этих двух лизатов хранится при  $t = -20^{\circ}\text{C}$ , а из 5 мкл P1-P2 и P3-P4 лизатов был приготовлен раствор с рестриктазой, которая вырезала из вектора фрагменты P1-P2 и P3-P4 для последующего проведения электрофореза и их индивидуальной детекции. Последовательность внесения

образцов для очистки лизатов P1-P2 и P3-P4 от бактериальных клеток была осуществлена согласно методике "Production of a Cleared Lysate" [3]: 1) В каждую чистую пробирку для консервации бактериальной культуры поместить 400 мкл глицерола и 600 мкл культуры с размноженными в течение ночи плазмидами. Выдержать некоторое время во встряхивающем режиме; 2) Оставшийся (помимо 600 мкл) объем культуры перелить в пробирки Eppendorf объемом 2 мл (одновременно с п. 1); 3) Центрифугировать в течение 5 минут при максимальной скорости (12 000 оборотов); 4) Залить всю надосадочную жидкость, на дне пробирки остаются бактерии вместе с плазмидами и соответствующим встроенным фрагментом. Опрокинуть пробирки на чистую фильтровальную бумагу, чтобы стекла остатки жидкости – LB medium с ампициллином; 5) Пробирки поместить в штатив, добавить в каждую по 250 мкл раствора "Cell Resuspension Solution". Выдержать некоторое время в вибрирующем режиме; 6) Добавить 250 мкл раствора "Cell Lysis Solution". Перевернуть пробирки в руках (!) 4 раза кверху дном для лучшего перемешивания; 7) Выждать 1–4 минуты (максимум!) до прозрачного состояния суспендированной взвеси бактериальных клеток, когда их стенки полностью разрушаются и становятся невидимыми; 8) Добавить 10 мкл Alkaline Protease Solution перевернуть 4 раза для перемешивания. Инкубировать 5 минут при комнатной температуре; 9) Добавить 350 мкл Neutralization Solution, чтобы нейтрализовать все предыдущие растворы. Немедленно перевернуть 4 раза и встряхнуть; 10) Центрифугировать 10 минут. Centrifugation Protocol [4]; 11) Приготовить и подписать ко-

лонки. Из пробирок Eppendorf (без колонки) откачать автоматом-раскапывателем, рассчитанным на большой объем, всю надосадочную жидкость осторожно, не касаясь дна с разрушенными клетками бактерий. Слить эту жидкость осторожно в колонки, а пробирки Eppendorf с бактериальными клетками выбросить. В жидкости содержится в огромной концентрации вектор с нашими фрагментами – как P1P2, так и P3P4; 12) Центрифугировать колонки с приемными пробирками еще 1 минуту; 13) Слить всю жидкость из колонок. На дне их – плазмиды с фрагментами; 14) Добавить 750 мкл раствора "Column Wash Solution" и центрифугировать 1 минуту; 15) Слить всю жидкость, добавить "Wash Solution" еще раз – 250 мкл. Центрифугировать 2 минуты; 16) Слить всю жидкость и центрифугировать пустые колонки 1 минуту (этот пункт отсутствует в протоколе: это нововведение кафедры молекулярной генетики ветеринарного факультета университета Кордовы); 17) Слить всю жидкость, добавить 100 мкл "Nuclease Free Water". В этот момент колонки уже помещены в чистые подписанные приемные пробирки Eppendorf для длительного хранения, центрифугировать 1 минуту; 18) Вынуть из центрифуги, выбросить колонки, сохранить жидкость в приемных пробирках Eppendorf. Таким образом, последним раствором плазмиды вымываются с поверхности мембраны колонок в раствор, т.к. в дальнейшем можно работать с вектором в условиях раствора, а не твердого состояния.

**10 этап.** Выбор конкретных клонов, содержащих встроенный фрагмент гена CD11A на основе результатов электрофореза. На основе результатов предыдущего этапа исследований,



т.е. проведенного электрофореза, выбрали наиболее показательные "дорожки" в агарозном геле, соответствующие по длине теоретически ожидаемым размерам последовательностей ДНК фрагментов P1P2 и P3P4 изучаемого гена.

**11 этап. Подготовка синтезированных фрагментов к расшифровке нуклеотидных последовательностей.** Растворы, содержащие плазмиды со встроенными фрагментами и соответствующие порядковым номерам выбранных лучших клонов, помещаются в специальные пробирки для ПЦР (в объеме 6 мкл каждый) с целью освобождения синтезированных нами фрагментов от последовательности ДНК (стандартной, известной) несущей о их вектора pGEM-T Easy и последующей непосредственной расшифровки нуклеотидных последовательностей самих фрагментов P1P2 и P3P4. Также помещаются рестриктазы, которые с двух сторон вырезают синтезированный фрагмент из кольца плазмиды по сайтам рестрикции -- так, что в результате получаются два отрезка: 1) вектор pGEM-T Easy с известной нуклеотидной последовательностью; 2) синтезированный фрагмент. Затем распечатывается полная последовательность нуклеотидов вектора вместе с последовательностями P1P2 и P3P4 соответственно.

**12 этап. Расшифровка нуклеотидных последовательностей синтезированных фрагментов.** По сайту рестрикции двойной спирали ДНК вектора и прилежащих к нему нуклеотидов в КИТо, отображенных в распечатке, установили окончание отрезка вектора и начало синтезированного фрагмента по известным нам последовательностям нуклеотидов праймеров P1, P2, P3 и P4. Это

доказывает успешное получение в лабораторных условиях ДНК-зонда для поиска данного гена CD11A на хромосомах свиньи.

### Вывод

Полученная последовательность гена CD11A позволит продолжить изучение его структуры и изменчивости как части семьи рецепторов клеточных поверхностей для дальнейших исследований функции клетки.

### Список литературы

1. Qi Aquick Gel Extraction Kit Protocol.
2. Qi Aquick PCR Purification Kit Protocol.
3. Production of a Cleared Lysate Kit Protocol.
4. Centrifugation Protocol

Представлено В.С. Коноваловым  
Поступила 15.10.2007

### ОТРИМАНИЯ ДНК-ЗОНДА ГЕНА CD11A СВИНИ

О.В. Хмельова

Днепропетровский державний аграрний університет

Для вивчення місця локалізації та ролі, яку він грає в обміні речовин свиней ген CD11A, в умовах лабораторії молекулярної генетики ветеринарного факультету Кордовського університету (Іспанія) було синтезовано ДНК-зонд на основі траймерів людини та нуклеотидів свині. У результаті полімеразної ланцюгової реакції ампліфіковано копії цієї ДНК-последовательності та електрофоретично вивчено. Лабораторним шляхом доведено, що цей зонд дійсно за своїм складом відповідає досліджуваній нуклеотидній послідовності і може бути використаний для подальшої ідентифікації з хромосомами свині для з'ясування місця локалізації гена CD11A та його зв'язку —

через інтегрини — з певними реакціями метаболізму свиней

*Ключові слова:* обмін речовин, інтегрини, ДНК-зонд, ПТР, лігування, трансформація, компетентні клітини, плазмід

#### OBTAINING OF THE GENE CD11A DNA PROBE FOR SWINE

*E.V. Khmelova*

Dnepropetrovsk State Agrarian University

For studying the place of localization and the role which the gene CD11A plays in swine metabolism DNA-probe was synthesized on

the base of human primers and swine nucleosides in the conditions the Laboratory of molecular genetics of Veterinarian faculty of Cordoba University. In the result of PCR the copies of this sequence were amplified and studied within electrophoresis in agarose gel. It was proved by laboratory way that this probe really corresponds by its content to the expected sequence of nucleosides and is able to the further hybridization with swine chromosomes for studying of the place of localization the gene CD11A through integrines with concrete reactions of swine metabolism

*Key words:* metabolism, integrines, DNA-probe, PCR, ligation, transformation, competent cells, plasmid.