

© А. П. Галкин

СПб филиал Института общей генетики РАН, СПбГУ, отдел генетики БиНИИ СПбГУ, Санкт-Петербург

✿ **Практический курс «Методы генной инженерии» проводится для студентов магистратуры, обучающихся по различным программам, в том числе по программе «Экологическая генетика». В ходе курса студенты осваивают основные методы плазмидного конструирования, которые необходимы для работы в самых разных областях молекулярной биологии. В статье представлено резюме и программа курса «Методы генной инженерии».**

✿ **Ключевые слова:** плазмидное конструирование, рестрикция, лигирование, ПЦР, трансформация *E. Coli*

## МЕТОДЫ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ (ПРАКТИЧЕСКИЙ КУРС)

### РАЗВЕРНУТАЯ АННОТАЦИЯ КУРСА

В настоящее время методы генной инженерии широко используются почти во всех областях современной биологии, будь то систематика, физиология, молекулярная биология или генетика. Без идентификации конкретных генов, направленной регуляции уровня экспрессии, создания гибридных конструкций и получения мутаций, зачастую просто невозможно исследовать те или иные механизмы биологических процессов на молекулярном уровне. Экологическая генетика предполагает, в частности, разработку тест-систем для выявления мутагенных факторов внешней среды и анализ механизмов их воздействия на живые системы. Таким образом, освоение методов генной инженерии актуально и для специалистов, работающих в области экологической генетики.

Курс включает в себя комплекс основных методов, необходимых для плазмидного конструирования. Во вступительной лекции излагаются теоретические аспекты основных методов генной инженерии. Обсуждаются преимущества и недостатки различных подходов и возможности, которые они открывают для исследований в области молекулярной биологии. Особое внимание уделяется различным модификациям полимеразной цепной реакции (ПЦР) (обратная ПЦР, ПЦР в режиме реального времени, получение мутаций с помощью ПЦР) и выбору определенных термостабильных полимераз в зависимости от конкретных задач эксперимента. Кроме того, приводится классификация основных ферментов рестрикции и обсуждается механизм их действия.

После вступительной лекции, студентам предлагается самостоятельно выбрать и обосновать оптимальную стратегию плазмидного конструирования, имея заданный вектор и фрагмент ДНК, который предполагается встроить в плазмиду. Выбор конкретной конструкции, которую предполагается получить в ходе работы, определяется с учетом того, чтобы освоить наиболее широкий спектр методов. Затем студенты обучаются самостоятельно рассчитывать концентрации веществ и готовить необходимые растворы. В ходе этих занятий невозможно охватить весь комплекс методов современной генной инженерии, однако теоретически обсуждаются различные варианты и модификации методик. На практических занятиях осваиваются наиболее универсальные и оптимальные варианты методик, которые широко используются в России и за рубежом и дают хорошие результаты, при минимальных затратах времени и денежных средств. Как ни странно, наибольшие трудности у студентов магистратуры вызывает приготовление растворов определенной молярности и процентности, а также расчет оптимального соотношения молекул ДНК «вектора» и «вставки» при постановке реакции лигирования. Этим аспектам уделяется особое внимание.

Курс построен таким образом, что каждый студент самостоятельно осуществляет все этапы плазмидного конструирования, начиная от амплификации плазмидной ДНК в бактериях и заканчивая анализом результатов лигирования. Специфика курса заключается в том, что одно практическое занятие занимает примерно 8 часов. В связи с этим, требуется согласование учебных планов и выделение, как минимум, одного свободного дня в неделю. Учитывая разный уровень практической подготовки студентов и то, что в ходе занятий используются дорогостоящие ферменты и реактивы, одному преподавателю удобно вести занятия с группой не более чем из 6–7 человек. Зачет автоматически ставится всем студентам, которые присутствовали на всех занятиях и успешно освоили методики. В случае пропуска занятий

студент отвечает на вопросы, позволяющие оценить его знания по методам, освоение которых он пропустил.

Практика может проводиться на базе любой лаборатории, которая оснащена минимальным комплектом оборудования, который включает в себя:

центрифуги с охлаждением с роторами для работы с объемами от 1,5 до 1000 миллилитров, водяные бани, суховоздушные термостаты, дистилляторы, ламинары, амплификаторы, оборудование для электрофореза ДНК, трансиллюминаторы, холодильные камеры на +4 °С, –20 °С и –70 °С, автоматические пипетки.

Проведение занятий требует покупки следующих реактивов:

компонентов для твердой и жидкой среды LB для наращивания культуры *E. Coli*, а также реактивов, необходимых для бактериальной трансформации, фирменных наборов или отдельных реактивов для выделения и очистки плазмидной ДНК из бактерий, ферментов и буферов для рестрикции, полимеразной цепной реакции и лигирования ДНК, набора реактивов для выделения ДНК из агарозного геля и расходных материалов.

Безусловно, пройдя этот курс, студент не становится специалистом в области геномной инженерии, однако, эта подготовка дает возможность в дальнейшем использовать полученные навыки в своей научной работе.

#### ПРОГРАММА (36 ЧАСОВ)

1. Вступительная лекция — теоретические аспекты основных методов геномной инженерии.
2. Приготовление сред и растворов, необходимых для амплификации и выделения плазмидной ДНК из *E. Coli*.
3. Амплификация и выделение плазмидной ДНК.
4. Полимеразная цепная реакция.
5. Гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции.
6. Теоретическая лекция — различные модификации полимеразной цепной реакции, условий и факторы, влияющие на ее эффективность; теория лигирования, расчёт условий реакции лигирования.
7. Анализ результатов рестрикции с помощью агарозного электрофореза.

8. Постановка реакции лигирования.
9. Приготовление компетентной культуры *E. Coli*.
10. Трансформация компетентных клеток лигазной смесью.
11. Выделение плазмидной ДНК из бактерий в препаративных количествах, проверочная рестрикция и анализ результатов плазмидного конструирования на агарозном геле.

Методы, которые осваиваются студентами в ходе этого курса, описаны в следующих методических пособиях: Sambrook et al., 1989; Рыбчин, 1999; PCR Application Manual, Boehringer Mannheim, 1995.

Работа поддержана грантом «Ведущие научные школы» НШ-7623.2006.4

#### Литература

1. Рыбчин В. Н. Основы генетической инженерии / Рыбчин В. Н. // СПб.: СПбГТУ, 1999. — 521 с.
2. Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual / Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. // NY, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. — 495 p.
3. PCR Application Manual // Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica, 1995. — 195 p.

#### Methods of gene engineering

A. P. Galkin

✿ **SUMMARY:** The practical course “Methods of gene engineering” is organized for Master students involved in different education programs, including the program “Ecological genetics”. The course includes the training in the field of plasmid construction that is very useful for work in different areas of molecular biology. In this paper the annotation and program of course “Methods of gene engineering” are presented.

✿ **KEY WORDS:** plasmid construction, restriction, ligation, PCR, *E. coli* transformation