

Учебно-методические материалы учебного курса дисциплины

**«БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ДЛЯ
СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ»**

Авторы-составители:

Сидорчук Ю.В., к.б.н., н.с. ИЦиГ СО РАН
Киселёва А.А., к.б.н., с.н.с. ИЦиГ СО РАН

Новосибирск

2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
ВВЕДЕНИЕ	4
ОРГАНИЗАЦИЯ, ПРОВЕДЕНИЕ РАБОТ И ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ	5
Биотехнологическая лаборатория	5
Работы с химическими реактивами	9
ОКАЗАНИЕ ПЕРВОЙ ПОМОЩИ ПРИ НЕСЧАСТНЫХ СЛУЧАЯХ	13
Меры первой помощи при ожогах	13
Меры первой помощи при порезе	13
Меры первой помощи при отравлениях неорганическими веществами	13
Меры первой помощи при поражении электрическим током	14
ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ	15
Работа 1.1 ПОЛУЧЕНИЕ ГАПЛОИДОВ ТАБАКА <i>NICOTIANA TABACUM L.</i>	15
Работа 1.2 ПОЛУЧЕНИЕ ДИГАПЛОИДНЫХ ЛИНИЙ ПШЕНИЦЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПЫЛЬНИКОВ	17
Работа 1.3 АГРОБАКТЕРИАЛЬНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ	20
Работа 1.4 ТРАНСФОРМАЦИЯ ТАБАКА МЕТОДОМ ЛИСТОВЫХ ДИСКОВ	23
Работа 1.5 БИОБАЛЛИСТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ	24
Работа 1.6 ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ РЕПОРТЕРНЫХ ГЕНОВ	31
Работа 1.7 АНАЛИЗ ФЕНОТИПИЧЕСКОГО ПРОЯВЛЕНИЯ МАРКЕРНОГО ГЕНА <i>nptII</i> НА СЕЛЕКТИВНЫХ СРЕДАХ С АНТИБИОТИКОМ КАНАМИЦИНОМ	33
СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ	35
СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	38
ПРИЛОЖЕНИЯ	41

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

2,4-Д - 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота

мРНК – матричная РНК

МС – питательная среда Мурасиге и Скуга для выращивания растений в условиях *in vitro*

НУК - 1-нафтилуксусная кислота

о. е. – относительные единицы

п.н. – пар нуклеотидов

УФЛ – УФ-лучи

А – аденин

С – цитозин

DMSO – диметилсульфоксид

DTT – дитиотреитол

EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота

G – гуанин

GFP – зеленый флюоресцентный белок

LB – питательная среда для культивирования бактерий

OD – оптическая плотность

SDS – додецил сульфат натрия

Tris – $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$ – трис (гидроксиметил) аминметан, используется как компонент при приготовлении буферных растворов

T – тимин

YEP – питательная среда для культивирования бактерий

ВВЕДЕНИЕ

Генетическая инженерия растений представляет собой направление молекулярной биологии, которое включает в себя экспериментальные подходы, позволяющие создавать искусственные генетические структуры. Такие конструкции позволяют целенаправленно модифицировать растительные геномы путем переноса генов из разных гетерологических систем (вирусов, бактерий, насекомых, животных и человека).

Методы генетической инженерии позволяют из набора фрагментов ДНК и РНК, собрать гибридную структуру, подходящую для введения в клетки растений для экспрессии чужеродных генов.

Технологии создания генетически модифицированных или трансгенных растений включают несколько основных этапов:

- получение отдельных фрагментов ДНК (целевые, маркерные и репортерные гены, промоторы, терминаторы, энхансеры и другие регуляторные элементы);
- клонирование этих отдельных элементов в единую конструкцию для создания векторов для экспрессии чужеродных генов (трансгенов) в растительных клетках;
- перенос экспериментально созданных экспрессионных векторов в клетки растений;
- отбор трансформированных растительных клеток на селективных средах и регенерация из них полноценных растений-трансформантов;
- оценка по стабильности экспрессии перенесенных генов в трансгенных растениях, отбор отдельных трансформантов для дальнейшей селекционной доработки и оценка их биобезопасности.

ОРГАНИЗАЦИЯ, ПРОВЕДЕНИЕ РАБОТ И ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Биотехнологическая лаборатория

Биотехнологическая лаборатория размещаются в нескольких помещениях, которые в зависимости от объема работы и целевого назначения имеют определенную площадь, строение и оснащение. В каждой биолоборатории предусмотрены:

а) Комнаты для работы с химическими реактивами и для приготовления питательных сред, буферных растворов и т.д., где имеются лабораторные столы, шкафы вытяжные и для хранения реактивов и посуды, аналитические весы, рН-метр, электроплитки, водяные бани, магнитная мешалка, холодильники и шкафы (стеллажи) для хранения растворов, реактивов и готовых сред и т.д.

б) Помещения для стерилизации инструментов, посуды и питательных сред, в которых расположены сухожаровые шкафы, автоклавы, стеллажи и столы для размещения сред, инструментов и посуды (причем стерильные и нестерильные материалы размещаются отдельно), аппараты для получения дистиллированной и бидистиллированной воды.

в) Моечные комнаты, оснащенные мойками с горячей и холодной водой, аппаратами для получения дистиллированной воды, сосудами с дистиллированной и бидистиллированной водой, сушильными шкафами и стеллажами для хранения посуды.

г) Боксы (ламинарные боксы) или комната для проведения работ с отдельными группами биообъектов (растения, бактерии и т.д.) – посев на питательные среды и пр.

д) Культуральные комнаты:

– световое отделение, где регулируются температура и влажность воздуха, интенсивность освещения, предназначено для выращивания растительных культур на стеллажах с фиксированными и/или передвижными полками или суспензионных культур на шейкерах, роторных установках;

– темновое отделение оснащено тем же оборудованием, что и световое, исключая источники освещения (можно использовать и термостаты).

е) Лабораторные помещения для изучения биообъектов, например, растительных культур, где имеются весы, микроскопы, растворы красителей, предметные стекла и т.д.

ж) Помещение с холодильными-морозильными установками для сохранения культур растений, бактерий, выделенных нуклеиновых кислот.

з) Оранжереи и теплицы, в которых выращивают растительный материал, необходимый для исследований, или высаживают растения, полученные в ходе экспериментов.

и) ПЦР-лаборатория, которая обязательно должна быть разделена на

три зоны – по числу технологических операций: зона подготовки реакционной смеси («чистая зона»), зона пробоподготовки и электрофоретическая комната. Перемещение пробирок, штативов и пр. должно производиться только в одном направлении, при этом потоки не должны пересекаться (рис. 1).



Рис. 1. Устройство ПЦР-лаборатории и варианты перемещения

Все три зоны должны быть изолированными комнатами, снабженными предбоксиками и устройством фильтрации воздуха.

Комната для проведения электрофореза должна размещаться как можно дальше от двух других зон и иметь не связанную с другими зонами систему вентиляции. Это является одним из наиболее категорических требований при организации ПЦР-лаборатории.

Подготовку реакционной смеси следует проводить в ПЦР-боксе, снабженном электрическими розетками, лампами дневного и ультрафиолетового света. Запрещается внесение пробирок с положительными контролями как до, так и после обработки в комнату подготовки реакционной смеси («чистую зону»).

Изучаемый материал необходимо как можно быстрее обработать в комнате пробоподготовки. В эту же комнату должны поступать пробирки с реакционной смесью из «чистой зоны» для внесения в них препаратов ДНК. После этого пробирки помещают в амплификатор и, по окончании термоциклирования, не открывая крышек, переносят в комнату для электрофореза.

Все производственные комнаты должны быть снабжены необходимым оборудованием и расходными материалами, в том числе халатами, закрепленными за соответствующими помещениями. Кроме того, желательно предусмотреть отдельные

помещения для переодевания и хранения верхней одежды, приема пищи, складское помещение для лабораторных материалов.

Так как большая часть работ по генной инженерии и молекулярной биологии растений выполняется в стерильных условиях (*ламинар-бокс, боксовые помещения*), то необходимо соблюдать следующие требования:

1. Полы в лаборатории подлежат ежедневной влажной уборке с применением 1%-ного раствора хлорамина.
2. В начале и в конце рабочего дня боксовые помещения и предбоксники облучают бактерицидной лампой в течение 40–60 мин.
3. Перед началом и по окончании работ поверхность стола обрабатывают тампонами, смоченными 96%-ным этиловым спиртом.
4. Запрещается входить в бокс при включенной бактерицидной или ртутно-кварцевой лампе. Работу можно начинать только спустя 30–40 мин после выключения ламп.
5. В боксе и предбокснике не должно быть лишних предметов и оборудования, не предназначенных для работы, загораживающих выход из них и доступ к средствам пожаротушения.
6. Работать в боксе необходимо в спецодежде (халат, шапочка, сменная обувь, иногда – марлевая повязка).
7. Запрещается использовать спецодежду, предназначенную для работы в боксе, если на ней имеются следы от пролитых легковоспламеняющихся или горючих жидкостей.
8. Запрещается иметь в боксе легковоспламеняющиеся и горючие жидкости при работе со спиртовкой, а также исключается использование нательного белья из синтетических материалов.
9. Прежде чем зажечь спиртовую горелку, надо убедиться, что в ней нет неисправностей, что поблизости нет горючих жидкостей (спирт, эфир и др.). Зажигать спиртовку можно только спичкой.
10. Для тушения пожара, возникшего от загорания спирта (спиртовки), можно использовать воду или ткань, обильно смоченную водой.
11. Работы в боксе осуществляются при наличии одновременно не менее двух сотрудников.

При работе с *автоклавами* также необходимо строгое соблюдение правил эксплуатации и техники безопасности:

1. К обслуживанию автоклава могут быть допущены лица, достигшие 18 лет, прошедшие специальный инструктаж по безопасному обслуживанию автоклавов и имеющие удостоверение о сдаче технического минимума по их устройству и эксплуатации.

2. Автоклавы с электрическим нагревом должны быть заземлены. Пол стерилизационной у рабочих мест изолируется резиновыми ковриками или деревянными решетками.

3. Персонал, обслуживающий автоклавы, должен вести рабочий журнал, в котором записываются дата, время, режим стерилизации, кто проводил стерилизацию.

4. Открывание крышки автоклава, а также его ремонт разрешается только при полном отсутствии давления в автоклаве.

5. Во время открытия крышки автоклава обслуживающий персонал должен находиться в стороне от крышки.

6. При выгрузке из автоклава или сушильного шкафа стеклянной посуды следует пользоваться матерчатыми рукавицами или трикотажными перчатками.

Работы с использованием **электрооборудования** и **электроприборов** (шейкеры, электроплитки, водяные бани, микроволновые печи и др.) должны проходить под наблюдением.

При неисправности в работе электроприбора (например, подсветка в микроскопе) необходимо обратиться к преподавателю (лаборанту). Чинить самостоятельно приборы запрещается.

Необходимо ставить **электронагревательные приборы** только на теплоизоляционный слой (асбест и др.).

Нельзя ставить на **электроплитку** мокрые колбы и стаканы для нагревания, а также на разогретую плитку холодные колбы и другую стеклянную посуду (даже термостойкую).

Во избежание ожогов при нагревании и прокаливании никогда не следует брать голыми руками нагретые колбы, стаканы, чашки и пр., их необходимо обернуть полотенцем. Также следует принимать меры предосторожности при вытаскивании колбы с кипящей агарозой из **микроволновой печи**, так как при встряхивании содержимое колбы вскипает и можно получить ожоги.

При работе с **водяной баней** необходимо следить за тем, чтобы в ней всегда была вода и выставлена нужная температура. Нельзя пробовать степень нагрева воды рукой.

Шейкер должен быть заземлен и установлен в отдельном помещении на ровной горизонтальной не скользкой поверхности.

Включать шейкер следует после правильного и прочного закрепления колб в гнездах, балансирования ее правильной установкой колб. По окончании работы следует: отключить шейкер-качалку от электросети и снять колбы.

Перед центрифугированием необходимо обратить внимание на соответствие пробирок к установленному ротору и какие адаптеры нужно установить при необходимости. Перед центрифугированием центрифужные пробирки необходимо уравновесить. Нельзя останавливать ротор центрифуги рукой.

Работы с химическими реактивами

Такие работы требуют аккуратности и соблюдения правил техники безопасности:

Опыты с *ядовитыми веществами* и веществами, которые имеют сильно выраженный запах, можно проводить только в вытяжном шкафу.

Работа с *горючими и легковоспламеняющимися веществами*, горючими жидкостями должна проводиться в вытяжном шкафу и только при включенной вентиляции и при выключенных электроприборах и газовых горелках.

Перегонять и нагревать низкокипящие огнеопасные вещества (ацетон, бензол, эфиры, спирты и т.д.) необходимо в круглодонных колбах, изготовленных из тугоплавкого стекла на водяных или масляных банях, пользуясь при этом обратным холодильником в зависимости от температуры кипения данного вещества.

Отработанные горючие жидкости собирают в специально герметично закрывающуюся тару, которую в конце рабочего дня должны выносить из лаборатории для регенерации или уничтожения этих жидкостей. Для этих целей должны быть разработаны инструкции. **Спуск горючих жидкостей в канализацию запрещается!!!**

В случае разлива огнеопасных жидкостей необходимо немедленно выключить нагревательные приборы. Жидкость следует засыпать песком, который затем убрать деревянным совком и лопатой.

Все работающие с концентрированными *едкими щелочами и кислотами* по приготовлению растворов фенола, формалина, перекиси водорода, хлорамина и др. обязаны пользоваться защитными очками, резиновыми перчатками, прорезиненным фартуком и сапогами.

Запрещается ходить по лаборатории с концентрированными кислотами и щелочами, наливать их нужно только в отведенном для этого месте и необходимо внимательно следить за тем, чтобы реактивы не попадали на лицо, руки и одежду.

При приготовлении растворов серной, азотной и других кислот их необходимо вливать в воду тонкой струйкой при непрерывном помешивании. Доливать воду в кислоту запрещается!!!

При разбавлении концентрированной серной кислоты, смешивании концентрированных серной и азотной кислот и вообще при смешивании веществ, сопровождающемся выделением тепла, пользоваться только толстостенной химической или фарфоровой посудой. Расфасовка кислот производится с применением специальных сифонов и насосов.

Недопустимо засасывать кислоты в пипетку ртом. Для наполнения пипеток следует пользоваться резиновой грушей или другим приспособлением.

Растворять твердые щелочи следует путем медленного добавления их небольшими кусочками к воде при непрерывном перемешивании. Кусочки щелочи нужно брать только щипцами.

Отработанные кислоты и щелочи собираются в специальную посуду, и после нейтрализации сливаются в канализацию или в специально отведенное место. Минеральные кислоты нейтрализуют окисью магния или порошкообразной гашеной известью. Отработанные растворы минеральных кислот и едких щелочей допустимо дегазировать путем их смешивания, прибавляя небольшими порциями более концентрированный раствор к менее концентрированному. Средствами для нейтрализации пролитой щелочи служит борная кислота или уксусная эссенция (одна часть эссенции на восемь частей воды), для кислот – 5%-ный раствор соды.

Разлитые кислоты или щелочь необходимо немедленно засыпать песком или нейтрализовать, после чего провести влажную уборку.

При переливании жидкости нужно использовать воронки.

На всех банках, склянках и на любой другой посуде, в которой хранятся вещества, должны быть указаны их химическое название, молекулярная формула, данные фирмы-производителя, условия хранения, дата, до которой продукт годен к употреблению.

Не следует оставлять открытыми банки с реактивами.

Не загрязнять реактивы во время работы (не путать пробки от склянок, содержащих разные реактивы; избыток взятого реактива не выливать обратно в склянку; пользуясь пипеткой, набирать каждый реактив только предназначенной для этого пипеткой, ни в коем случае не путать их).

Категорически запрещается пробовать химические вещества на вкус. Нюхать вещества можно лишь осторожно, не вдыхая волной грудью, не наклоняясь над сосудом, а направляя к себе пары или газ движением руки.

Сухие реактивы брать с помощью лопаток, пластмассовых или металлических шпателей. Шпатель должен быть всегда сухим и чистым. После расходования следует его тщательно обтереть. Если реактив «слежался», чтобы его извлечь из банки, используют шпатель (вымытый и прокалённый).

Нельзя держать банку или стакан с реактивом, ее надо поставить на лабораторный стол и только после этого открывать.

При наливании реактивов нельзя наклоняться над сосудом, предотвращая попадания брызг на лицо или одежду.

Если к работе не дано указаний относительно дозировки реактивов, то брать их для проведения опытов необходимо в возможно меньшем количестве.

Для взвешивания химических веществ нужно учитывать диапазон и точность **весов**. С весами нужно обращаться всегда очень осторожно. Без нужды не следует переставлять весы с места на место.

Весы и место около них всегда должны быть чистыми. Если при взвешивании весы случайно окажутся загрязненными, надо немедленно вытереть их (**ни в коем случае не сдвигать!!!**). Нужно аккуратно снять чашку (и, если надо, верхний кожух весов); кожух вымыть и насухо протереть; весы протереть влажной тряпкой/салфеткой, насухо вытереть; всё собрать.

Для взвешивания всегда надо пользоваться какой-либо тарой или калёвкой. Нельзя насыпать непосредственно на чашку весов никаких веществ.

Легколетучие реактивы (такие как РНК-азы, ДНК-азы, протеиназы, бактериальные среды, SDS) взвешиваются с предосторожностями только под тягой, чтобы не загрязнить «окружающую среду».

Особая предосторожность и аккуратность необходимы при работе с **ферментами**, так как это самый уязвимый компонент реакции, требующий определённых pH, соли и температуры. Поэтому он вносится в последнюю очередь, когда все остальные компоненты уже добавлены и **смешаны!!!** В реакцию нужно брать точно указанные (или только чуть бóльшие) количества ферментов. Слишком большие количества ферментов опасно брать в реакцию, так как все ферменты содержат примеси, и иногда избыток фермента не только бесполезен, но и вреден.

Работать нужно с небольшими аликвотами ферментов, а не с исходными пробирками (если с ферментом что-то случится (загрязнение, инактивация), то будет потеряна лишь часть).

Пробирки с растворами ферментов следует хранить в надёжном морозильнике, извлекать из морозильника непосредственно перед внесением и как можно быстрее убирать обратно.

Пробирку с ферментом следует держать пальцами с боков на том уровне, на котором раствора фермента нет. На время проведения работ 0,2–0,5 мл эппендорф с ферментом можно помещать в охлаждённый эппендорф большего объема (например, 1,5 мл) и использовать его как адаптер или помещать в криоштатив (можно обыкновенный штатив для эппендорфов ставить на лед).

Перед тем как открыть пробирку, нужно кратковременным (~2–5") центрифугированием на микроцентрифуге сбросить её содержимое на дно.

Для проведения работ в биологических лабораториях используют **стеклянную и пластиковую посуду**.

Пластиковая посуда (чашки Петри, наконечники для автоматических пипеток-дозаторов, пробирки типа «эппендорф», центрифужные пробирки и т.д.) выпускается из пластика разного типа, поэтому нужно обращать внимание на маркировку, чтобы знать, какие химические вещества, реагенты и агрессивные смеси данный пластик выдерживает.

Стекло всегда должно быть чисто вымыто и ополоснуто дистиллированной водой.

Запрещается пользоваться разбитой или треснувшей посудой, ставить ее непосредственно на огонь и убирать битое стекло незащищенными руками.

Битое стекло следует складывать в специально отведенную емкость.

Все работы со стеклянной посудой необходимо проводить в защитных очках. Во избежание травмирования рук при работе со стеклом руки защищают полотенцем или куском материи.

При смешивании или разбавлении веществ, сопровождаемых выделением тепла, следует пользоваться термостойкой стеклянной или фарфоровой посудой. Нагретый сосуд нельзя закрывать притертой пробкой до тех пор, пока он не охладится.

Во избежание ожогов при нагревании и прокаливании никогда не следует брать голыми руками нагретые колбы, стаканы, чашки и пр., их необходимо обернуть полотенцем. Нагретые колбы нельзя ставить на холодную (мокрую, металлическую) поверхность.

Перенося сосуды с горячей жидкостью, надо держать их двумя руками: одной – за дно, другой – за горловину, используя при этом полотенце (чтобы избежать ожогов кистей и пальцев рук).

Размешивать реакционную смесь в сосуде стеклянной палочкой или шпателем надо осторожно, не допуская разлома сосуда, при этом необходимо держать сосуд за горловину.

Любая посуда (пробирки, колбы, стаканы, чашки Петри и пр.), с которой проводятся работы, должна быть подписана. Чаще всего чашки Петри подписываются только снизу (со стороны агара), чтобы не перепутать их, если приходится работать одновременно с двумя чашками. Обычно чашка Петри подписывается два раза.

Первый раз при заливке указываются:

- 1) культуральная среда (лучше давать краткие названия в виде аббревиатуры, а полное название и расшифровку состава, например, содержание гормонов, антибиотиков, и других добавок, записывать в лабораторный журнал);
- 2) дата (число и месяц).

Второй раз при высадке-высеве культуры (калусной культуры растений, бактерий и т.п.) указываются:

- 3) название культуры, микроорганизмов, плазмиды или библиотеки;
- 4) дата посева.

ОКАЗАНИЕ ПЕРВОЙ ПОМОЩИ ПРИ НЕСЧАСТНЫХ СЛУЧАЯХ

Меры первой помощи при ожогах

При термических ожогах на обожженное место нужно положить ватку, смоченную слабым раствором марганцовокислого калия.

Меры первой помощи при порезе

В случае пореза стеклом нужно сначала внимательно осмотреть рану и извлечь из нее осколки стекла, если они есть, а затем обмыть раненное место 2%-ным раствором перманганата калия, смазать йодом и завязать бинтом или заклеить лейкопластырем.

Меры первой помощи при отравлениях неорганическими веществами

Азотная кислота. Свежий воздух, покой, тепло. Вдыхание кислорода. Сульфадимезин или иной сульфаниламидный препарат (2 г), аскорбиновая кислота (0,5 г), кодеин (0,015 г). Искусственное дыхание. Консультация врача.

Серная кислота. Свежий воздух. Промыть верхние дыхательные пути 2%-ным раствором пищевой соды. В нос – 2–3 капли 2%-ного раствора эфедрина. Теплое молоко с содой, кодеин (0,015 г) или дионин (0,01 г). При попадании в органы пищеварения смазать

слизистую рта 2%-ным раствором дикаина. Промывание желудка большим количеством воды. Внутрь принять: столовую ложку оксида магния на стакан воды каждые 5 мин, яичный белок, молоко, крахмальный клейстер, кусочки сливочного несоленого масла, кусочки льда. Нельзя вызывать рвоту и применять карбонаты. Консультация врача.

При попадании на кожу или одежду кислоты надо смыть ее большим количеством воды, а затем 3–5%-ным раствором питьевой соды или разбавленным раствором аммиака.

Щелочи. Вдыхание теплого водяного пара (в воду добавить немного лимонной кислоты). Внутрь – тепкое молоко с медом, кодеин (0,015 г) или дионин (0,01 г). Горчичники. При попадании в органы пищеварения смазать слизистые оболочки рта и горла 1%-ным раствором новокаина.

Внутрь – по столовой ложке 1%-ного раствора лимонной кислоты каждые 3–5 мин, крахмальный клейстер с добавлением лимонной или уксусной кислоты, 2–3 столовые ложки растительного масла, кусочки льда. Консультация врача.

При попадании на кожу или одежду щелочи, после смывания ее большим количеством воды, нужно провести обработку 2–3%-ным раствором борной, лимонной или уксусной кислот.

Меры первой помощи при отравлениях органическими веществами

При отравлении эфиром, хлороформом, спиртом: свежий воздух; внутрь 0,03 г фенамина, или 0,1 г коразол, или 30 капель кордиамина, или 0,5 г камфоры. Искусственное дыхание и вдыхание кислорода.

Меры первой помощи при поражении электрическим током

Если пострадавший остается в соприкосновении с токоведущими частями, необходимо немедленно выключить ток с помощью пускателя, или вывернуть охранную пробку, или перерубить токопроводящий провод изолированным инструментом. Пострадавшего, пока он находится под током, нельзя касаться незащищенными руками (без резиновых перчаток). Если пострадавший потерял сознание, после выключения тока нужно немедленно, не дожидаясь врача, делать искусственное дыхание.

Общие требования к проведению работ:

1. Необходимо рационально строить свою работу.
2. Все работы проводить точно и аккуратно.
3. Работать следует быстро, но без спешки, которая неизбежно приводит к порче поставленного опыта.

Лабораторный стол нужно содержать в чистоте и не загромождать лишней посудой, реактивами, посторонними предметами.

Выполнять работы в специально отведенных помещениях и на специальном оборудовании.

По окончании работы необходимо привести в порядок лабораторный стол.

Реактивы необходимо расходовать экономно.

Не принимать пищу в лабораторных помещениях и из лабораторной посуды.

Работу с легковоспламеняющимися химическими веществами следует проводить в резиновых перчатках, прорезиненных фартуках и защитных очках, защитной маске.

Во всех лабораториях всегда должны быть ящики с песком, огнетушители и противопожарные одеяла.

Прежде чем приступить к работе, нужно ознакомиться с методикой выполнения и с соответствующими специальными правилами по эксплуатации оборудования или приборов.

Категорически запрещается оставлять действующие приборы без наблюдения.

Запрещается входить в лабораторию в верхней одежде.

Работать в биохимической лаборатории допускается только в специальном халате, так как вероятно возможность загрязнения, порчи одежды при попадании на нее едких реактивов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ

Работа 1.1 ПОЛУЧЕНИЕ ГАПЛОИДОВ ТАБАКА *NICOTIANA TABACUM L.*

Гаплоидными называются растения, которые имеют всего один набор хромосом, характерный для гамет. Для селекционного процесса гаплоидные растения представляют значительный интерес. Все рецессивные генные мутации в гаплоидных организмах не маскируются доминантными аллелями, что дает селекционерам возможность наблюдать их фенотипическое проявление. Как правило, гаплоиды отличаются от исходных родительских форм меньшими размерами и высоким уровнем стерильности, так как у них нарушено формирование мужских и женских гамет. Однако при культивировании *in vitro* может происходить спонтанное удвоение хромосом, или его можно вызвать искусственно, например, обработав колхицином клетки или растения. Полученные таким образом дигаплоиды фертильны, вполне жизнеспособны, характеризуются абсолютной гомозиготностью и, соответственно, являются ценным материалом для селекции. Гомозиготные растения используют для количественного генетического анализа, изучения взаимодействия генов, изучения генетической изменчивости, определения групп

сцепления, установления числа генов, действующих на количественные признаки, определения локализации полигенов.

Существуют два основных способа получения гаплоидов. Первый способ классический – отдаленная гибридизация, когда в зиготе отдаленного гибрида хромосомы одного из видов элиминируют. Этот метод чаще всего используется в селекции злаковых культур. Второй способ основан на методиках культивирования *in vitro*, где из неоплодотворенных половых клеток с редуцированным набором хромосом можно регенерировать целые растения – индуцированный андрогенез в культуре пыльников и пыльцы.

В клеточной инженерии чаще применяется второй метод. Для культуры пыльников используют целые пыльники, стерильно выделенные из бутонов в определенной фазе развития. Для большинства растений оптимальным сроком посадки пыльников на питательные среды является стадия "средних" или "поздних" одноядерных вакуолизированных микроспор. На этой стадии микроспоры высвобождаются из тетрад и готовятся к первому митозу. Пыльники помещают на твердую питательную среду, либо на поверхность жидкой питательной среды. Получение гаплоидных растений из изолированных пыльников может идти по двум направлениям: прямая регенерация соматических зародышей и косвенная - через каллусогенез. В первом случае внутри пыльников из отдельных пыльцевых зерен формируются проэмбриональные структуры, которые при определенных условиях культивирования развиваются в эмбриониды, дающие начало гаплоидным растениям. Во втором - пыльца делится, но клетки, возникшие в результате делений, быстро увеличиваются в размерах и, разрывая оболочку пыльцевого зерна, образуют каллус. В результате дальнейшего морфогенеза из этих каллусных клеток регенерируют растения.

Цель работы: получение гаплоидных растений табака методом индуцированного андрогенеза.

Материалы и оборудование: ламинар-бокс, холодильник, поддерживающий температуру 4°C, автоматические пипетки, стерильные и нестерильные наконечники универсальные, мерные цилиндры (1000, 50, 10 мл), колбы мерные (1 л), растения табака с цветочными бутонами, коммерческий хлорсодержащий отбеливатель, например, «Доместос», спиртовка, спички, спирт для спиртовок, спирт 70 -96% для обработки столешницы и инструментов, фарфоровый стакан, чашки Петри со средой, стерильные скальпели, стерильные пинцеты, стерильные препаровальные иглы, стерильные чашки

Петри, стерильная дистиллированная вода, стерильная фильтровальная бумага, лента лабораторная «Parafilm M», маркеры.

Ход работы:

- 1) Срезать стебли с бутонами на второй стадии развития и поставить в холодильник на 4 градуса на 1-7 суток;
- 2) После холодной обработки бутончики стерилизовать 20 минут в 20% «Доместосе» и дважды промыть стерильной водой по 10 минут;
- 3) Пыльнички извлечь из бутончиков с помощью скальпеля и препаровальных игл и поместить в чашки Петри на агаризованную среду (Табл. 1);
- 4) Чашки с пыльничками перенести в условия яркого освещения и повышенной температуры 26-28 градусов в факторостатную комнату;
- 5) Через 4 недели пыльнички трескаются и появляются гаплоидные растения, их необходимо пересадить на безгормональную MS, содержащую 1% сахарозы;
- 6) После укоренения и адаптации к условиям окружающей среды растения можно отмыть от среды и высадить в грунт.

Контрольные вопросы по практической работе 1.1.

1. Какие существуют основные способы получения гаплоидов?
2. Какие основные этапы получения гаплоидов с помощью индуцированного андрогенеза?
3. Как долго проводят обработку холодом стеблей табака с бутончиками перед извлечением пыльничков?

Работа 1.2 ПОЛУЧЕНИЕ ДИГАПЛОИДНЫХ ЛИНИЙ ПШЕНИЦЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПЫЛЬНИКОВ

1. Культивирование растений-доноров

Донорные растения выращивают в полевых условиях, условиях теплицы или в специальных климатических камерах. Необходимо создать оптимальные условия для выращивания здоровых растений, а именно – достаточное освещение, увлажнение, питание, отсутствие болезней, вредителей, поддержание температура 17°C - 25°C.

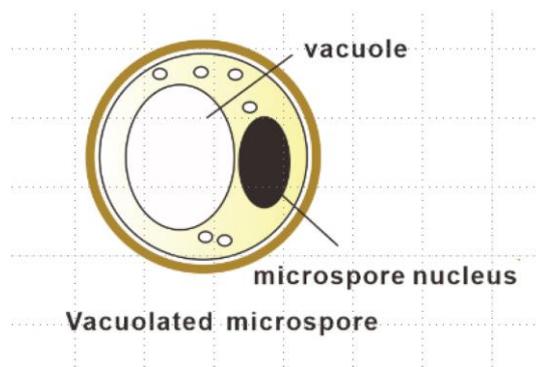


Рис. 2. Сильновакуолизованная микроспора (Рисунок по Shen et al., 2023)

2. Отбор донорных растений по фенотипу

Для выделения пыльников берут первые колосья с растений. Колосья желательно срезать в одно время суток (лучше всего ранним утром). Необходимо отбирать колосья, у которых пыльца находится в стадии сильновакуолизованной микроспоры (средняя или поздняя стадия одноядерной микроспоры) (Рис. 2). Фенотипически эта фаза соответствует расположению предфлагового листа на середине находящегося в листовой обертке колоса.

3. Холодовая предобработка

Срезанные колосья сразу помещаются в емкость с холодным 25% раствором макросолей среды Гамборга (B5) (Табл. 2) и выдерживают 5-9 дней в темноте при температуре $4 \pm 1^\circ\text{C}$.

4. Стерилизация колосьев, выделение и инокуляция пыльников

Поверхностная стерилизация колосьев проводится в стерильных условиях ламинарного бокса путем протирания листовой обертки 96% этиловым спиртом. В стерильных условиях при помощи препаровальной иглы, скальпеля, пинцета колос освобождают от листовой обертки. В качестве подложки для этой манипуляции можно использовать стерильную стеклянную пластину, плотную бумагу, тефлоновый коврик. Для каждого колоса подложку обрабатывают спиртом. От средней части оси колоса стерильными инструментами отделяются колоски. На этом этапе используют стерильную посуду (крышка или дно чашки Петри). Пыльники извлекают из двух боковых цветков каждого колоска с помощью стерильных игл. Выделенные пыльники помещаются в 10 см чашки Петри, содержащие 15-25мл индукционной питательной среды N6 с добавлением 2-3 мл жидкой. На одну чашку помещают до 250-ти пыльников. Крышка чашки Петри обжигается над пламенем спиртовки, чашка закрывается, боковая поверхность обматывается пищевой пленкой, либо парафилмом (парафилм в термостате может

трескаться, в результате среда высыхает, поэтому лучше использовать пленку) и помещается в термостат.

5. Инкубация до появления эмбриоидов

Чашки с пыльниками выдерживаются 3 дня в темноте при температуре 32°C (тепловой шок); далее – в темноте при температуре 28°C до массового появления эмбриоидов (4-6 недель); затем при температуре 25°C.

6. Регенерация

Эмбриониды достигшие 1мм и более пересаживают на регенерационную среду в пробирки или стаканы. В качестве регенерационной среды выбрана среда Гамборга В₅ (Табл. 2). Чашки Петри с эмбриоидами на индукционной среде в стерильных условиях ламинарного бокса освободить от пленки и обжечь края над спиртовкой, только после этого открыть. Пробирки с регенерационной средой накрытые фольгой обжечь над пламенем спиртовки по краю фольгированной крышки, открыть. Стерильным инструментом пересадить эмбрионид (несколько эмбриоидов) в пробирку, обжечь над пламенем край пробирки и крышку, закрыть пробирку и по краю фольги обмотать парафилмом. Пробирки с эмбриоидами оставить в термостате при 25°C, в темноте на сутки, затем поместить в культуральную камеру до образования растений-регенерантов и их развития до фенофазы кущения. Условия регенерации: температура 18-22°C; интенсивность освещения 20 тыс. лк; фотопериод 16/8 (свет/темнота) часов.

7. Высадка растений-регенерантов в грунт

Перед высаживанием растений в грунт, за 3-5 дней можно провести их адаптацию к внешним условиям, для этого проделать в крышке небольшие отверстия. Растения-регенеранты осторожно вытащить из пробирки, корни отмыть в воде от остатков питательной среды, растения высадить в горшки с грунтом и укрыть сверху пленкой, либо накрыть каждый горшок пластиковым стаканом. Необходимо проверить уровень плоидности растений-регенерантов путем подсчета числа хромосом в метафазных пластинках клеток кончика одного из корешков, либо по размеру замыкающих клеток устьиц. Гаплоидные растения следует подвергнуть обработке колхицином, для удвоения набора хромосом. Выращивание до созревания зерна происходит в теплице или в специальной климатической камере. Необходимо обеспечить комфортные условия для роста растений: полив, температура, освещенность, питание.

Культивирование происходит при $t = 24$ °C и при непрерывном освещении. Проростки на стадии трех листьев пересадить в вегетационные сосуды, наполненные грунтом для выращивания растений. Проростки накрыть стаканами для поддержания

влажности и периодически поливать разбавленной на $\frac{1}{2}$ средой Гамборга В5 (Табл 2), не содержащей витамины.

8. Обработка проростков колхицином

Приготовить 0,075% или 0.1 % водный раствор колхицина с добавлением 2 % DMSO (необходимый для лучшей транспортировки колхицина в клетки). Гаплоидные растения в стадии кушения вынуть из керамзита, остатки которого смыть с поверхности корней под легкой струей проточной воды. Кончики корней подрезать на 1-2 см. Проростки поместить в сосуд с колхицином на 4 часа. Отмыть корни обработанных растений под легкой струей водопроводной воды в течение 10 – 12 часов. Обрезать верхушки листьев примерно на 10 см.

Высадить растения в вегетационные сосуды с керамзитом и накрыть стаканами для поддержания высокой влажности и выращивать при $t = 16 - 18$ °С. После отрастания и восстановления растений продолжать их выращивание при стандартных условиях теплицы. Завязавшиеся семена у растений, обработанных колхицином, использовать для формирования ДГ-линий.

Важно: Каждый колос колхицинированного растения считать отдельной дигаплоидной линией.

Контрольные вопросы по практической работе 1.2.

1. Какие должны быть оптимальные условия для выращивания растений-доноров для изоляции пыльников?
2. Опишите фенотип растений, готовых для выделения пыльников?
3. Эмбриониды какого размера пересаживают на регенерационную среду?
4. Что считать отдельной дигаплоидной линией после проведения колхицинирования?

Работа 1.3 АГРОБАКТЕРИАЛЬНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ

Для трансформации клеток высших растений наиболее часто используют природные векторы для горизонтального переноса генов – плазмиды двух видов агробактерий: Ti-плазмиду *A. tumefaciens* и Ri-плазмиду *Agrobacterium rhizogenes*. Процесс заражения растительной клетки основан на переносе части генетического материала Ti- или Ri-плазмиды, называемого T-областью в клетки растений. Для инфицирования агробактериями на растении должны быть повреждения, так как в области поранений образуются вещества фенольной природы и низкомолекулярные сахара, которые

необходимы для активации генов вирулентности (*vir*-генов) бактерий. Продукты *vir*-генов обеспечивают процессинг T-ДНК и перенос ее в растительную клетку. Вырезание T-области из плазмиды, перенос и интеграция ее в клетку – сложный процесс, в котором принимают участие и активно взаимодействуют как многочисленные бактериальные белки, так и белки растения-хозяина.

Методики трансформации значительно различаются в зависимости от выбора экспланта, метода отбора трансформированных тканей и способами регенерации трансформированных растений. В наибольшей степени выбор методики трансформации зависит от вида, а часто даже сорта растений.

Основными этапами агробактериальной трансформации являются: подготовка агробактерии и собственно трансформация.

Часть 1. Трансформация клеток агробактерии рекомбинантной плазмидой

Цель работы: получить штамм *A. tumefaciens*, несущей рекомбинантную плазмиду для проведения агробактериальной трансформации табака.

Материалы и оборудование: мини центрифуга на 2400 об/мин, центрифуга с охлаждением на 8000 об/мин, стаканы для ротора на 50 мл, рН-метр, морозильная камера на -70°C , холодильник, ламинарный бокс, весы, термостат, термостат твердотельный, поддерживающий температуру от 20 до 95°C , термостатируемый шейкер, автоклав, водоструйный насос, ФЭК или спектрофотометр, кюветы, электрическая плитка, водяная баня, таймер, автоматические пипетки, мерные цилиндры (100 мл), мерные колбы (50, 100 мл), стаканы мерные (50, 100 мл) стерильные и нестерильные пробирки пластиковые «Eppendorf» объемом 1,5 мл, перчатки латексные или нитриловые, стерильные и нестерильные наконечники универсальные, криоштатив для пробирок объемом 1–2 мл, лед, спиртовка, 70%-ный этиловый спирт для протирания столешницы, вата, фарфоровый стакан, петля микробиологическая, спички, спирт для спиртовок, стерильный шпатель Дригальского, жидкий азот, сосуд Дьюара, широкогорлый термос, колбы и пробирки с жидкой средой YEP (Табл. 3) и селективными антибиотиками (Табл. 4), чашки Петри с агаризованной средой YEP, содержащей антибиотики, лента лабораторная «Parafilm M», 20 мМ CaCl_2 .

Ход работы:

Процедура трансформации агробактерий состоит из трех этапов: получения «компетентных» клеток, непосредственно введения в них плазмидной ДНК и скрининга агробактериальных клонов.

Этап 1. Получение компетентных клеток *Agrobacterium tumefaciens*. Нарастить ночную бактериальную культуру в 3 мл стерильной среды YEP. Перенести 2 мл культуры клеток в колбу с 50 мл стерильной среды YEP и наращивать до оптической плотности $OD_{600} = 0,5-1,0$ о.е. при комнатной температуре (от нескольких часов до ночи). Культуру охладить во льду и центрифугировать 8 мин при 4°C и 3000 об/мин. Супернатант удалить, осадок ресуспендировать в 2 мл 20 mM CaCl₂, охладить во льду и расфасовать по 100 мкл в охлажденные пробирки типа Eppendorf (все в стерильной посуде и пробирках!). Заморозить клетки в жидком азоте: жидкий азот налить в колбу широкогорлого термоса, пробирки поместить в криоштатив и в колбу с азотом, затем непосредственно использовать для трансформации или поместить на хранение в холодильник при -70°C. Замороженные клетки можно хранить несколько месяцев при -70°C и использовать по мере необходимости.

Этап 2. Трансформация компетентных клеток *Agrobacterium tumefaciens*.

К 200 мкл компетентных клеток *Agrobacterium tumefaciens* (штамм EH105) добавить 1 мкг плазмидной рекомбинантной ДНК, несущей целевой ген. Оттаивать клетки в течение 5 мин на водяной бане при 37°C и добавить 1 мл среды YEP (с антибиотиками), смесь инкубировать 3–5,5 ч при комнатной температуре и перемешивании. Центрифугировать в центрифуге Eppendorf при 3000 об/мин 5 мин. Осадок ресуспендировать в 100 мкл среды YEP и нанести на чашку с агаризованной средой YEP, содержащей антибиотики. Поместить чашку в термостат в перевернутом положении (крышкой вниз) и инкубировать в термостате 20–72 ч при 28°C до появления отдельных клонов.

Этап 3. Скрининг агробактериальных клонов

Скрининг клонов, содержащих плазмиду, включающую чужеродный целевой ген, проводят с помощью ПЦР. Плазмидную ДНК, используемую в качестве матрицы в ПЦР, выделяют методом быстрого лизиса агробактериальной культуры. Для этого часть трансформированного агробактериального клона стерильно перенести микробиологической петлей в пробирку типа Eppendorf, содержащую 100 мкл ТЕ-буфера (10 mM TrisHCl, 1 mM ЭДТА, pH 8,0), инкубировать 15 мин в термостате при 95°C, охладить и отобрать 1,5 мкл в пробирку (объемом 500 мкл) с готовой смесью для ПЦР (буфер, праймеры, комплементарные последовательности целевого гена, dNTP, Taq-полимераза (все компоненты «мастермикс» поставляются вместе с полимеразой производителем).

Аmplифицированные фрагменты ДНК анализируют при помощи электрофореза в агарозном 1,0 – 1,5%-ном геле в 1×TAE буфере. Оставшуюся часть агробактериального клона, скрининг которого подтвердил содержание в нем рекомбинантной плазмиды,

использовать для наращивания в необходимом объеме среды YEP с добавлением антибиотиков и использовать для трансформации растительных клеток.

Контрольные вопросы по практической работе 1.3.

1. Плазмиды каких видов агробактерий используют для трансформации растений?
2. До какой оптической плотности OD₆₀₀ нужно наращивать агробактерию для получения компетентных клеток?
3. Как выявляют клоны, содержащие плазмиду, включающую чужеродный целевой ген?

Работа 1.4 ТРАНСФОРМАЦИЯ ТАБАКА МЕТОДОМ ЛИСТОВЫХ ДИСКОВ

Цель работы: получение растений-трансформантов.

Материалы и оборудование: ламинарный бокс, термостат, автоматические пипетки, стерильные и нестерильные наконечники универсальные, мерные цилиндры (1000, 50, 10 мл), колбы мерные (1 л), стерильные растения табака 5–6-недельного возраста, ночная суспензионная культура *A. tumefaciens*, спиртовка, спички, спирт для спиртовок, спирт 70–96% для обработки столешницы и инструментов, фарфоровый стакан, чашки Петри со средой, пробирки со средой, стерильные скальпели, стерильные пинцеты, стерильные чашки Петри, стерильная дистиллированная вода, стерильная фильтровальная бумага, лента лабораторная «Parafilm M», маркеры.

Ход работы:

Трансформация методом листовых дисков заключается в совместном культивировании эксплантов листьев табака и ночной культуры *Agrobacterium tumefaciens*, во время которого происходит перенос T-ДНК Ti-плазмиды агробактерии в геном растения с последующей регенерацией трансформантов на селективной среде. Состав сред для культивирования тканей табака в условиях *in vitro* представлен в Табл. 5 и 6. Процесс получения трансформантов состоит из нескольких этапов.

1-й этап. Совместное культивирование листовых дисков и агробактерий. В качестве эксплантов используют листья, полученные от стерильных растений табака 5–6-недельного возраста, выращенных на агаризованной безгормональной среде Мурасиге – Скуга (Табл. 5). В условиях ламинарбокса в стерильной чашке Петри удалить срединную жилку листа, нарезать лист на фрагменты около 1 см², острым скальпелем нанести поранения.

Подготовленные экспланты аккуратно разложить нижней стороной вверх в чашки Петри на поверхность жидкой среды T₀ (Табл. 6), предварительно добавив в чашки 2–3 капли ночной культуры *A. tumefaciens*. Чашки Петри оставить на 2-е суток в затенённом месте при комнатной температуре.

2-й этап. Отмывание эксплантов. Стерильным носиком отобрать среду из чашки Петри, добавить стерильную дистиллированную воду и листовые диски осторожно перенести в другую чашку Петри со стерильной водой. Экспланты промыть пять раз и перенести в чашки Петри на жидкую среду T₁ (Табл. 6) с добавлением 20 г/л сахарозы, 500 мг/л цефотаксима для подавления роста *A. tumefaciens*. Чашки оставить на 2-е суток в затенённом месте при комнатной температуре.

3-й этап. Регенерация трансформантов на селективной среде. Экспланты промокнуть на стерильной фильтровальной бумаге и перенести в чашки Петри с агаризованной средой T₂ (Табл. 6). По мере образования каллуса экспланты перенести в пробирки со средой T₃ (Табл. 6), которая стимулирует побегообразование. Зелёные побеги перенести для укоренения в пробирки со средой T₄ (Табл. 6).

Укоренившиеся трансформанты перенести в грунт и выращивать при интенсивности освещения 20 тыс. люкс и фотопериоде 18/6 ч (день/ночь).

Контрольные вопросы по практической работе 1.4.

1. В чём заключается трансформация табака методом листовых дисков?
2. В каких условиях нужно выращивать растения для получения эксплантов для последующей трансформации методом листовых дисков?
3. Что необходимо сделать для регенерация трансформантов, полученных методом листовых дисков?

Работа 1.5 БИОБАЛЛИСТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ

Альтернативным агробактериальному методу доставки чужеродной ДНК в геном растений является биобаллистика (прямой метод доставки). Эта методика заключается в доставке инертных частиц (золотых или вольфрамовых) размером от 0,6 до 1,6 мкм, на которых иммобилизуется ДНК, с помощью специального устройства, называемого «генной пушкой». Как микроскопические пули, частицы пробивают клеточные стенки и мембраны и осуществляют прямую доставку экзогенной ДНК в клетки. Данный метод весьма эффективен для трансформации видов растений, которые плохо поддаются агробактериальной инфекции, например, злаков, а также применяется для трансформации

внеядерных геномов пластид и митохондрий. В данном руководстве будет рассмотрен стандартный протокол проведения биобаллистической трансформации с использованием «генной пушки» фирмы «BIO-RAD» (Рис. 3).

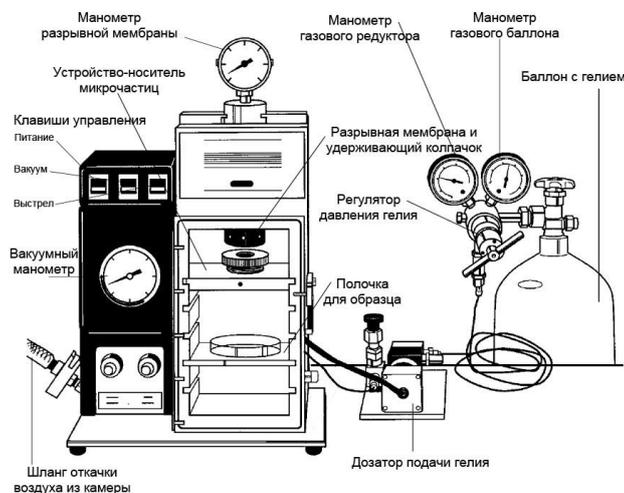


Рис. 3 Система доставки частиц «Генная пушка» - Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System (Bio-Rad, США)

Применение данного метода для доставки экзогенной ДНК в геном растений требует использования дорогостоящих расходных материалов. К расходным материалам относятся мембраны (мембраны-носители) для нанесения микрочастиц, разрывные мембраны, останавливающие сеточки, и собственно золотые или вольфрамовые микрочастицы, называемые микроносителями. Мембрану-носитель микрочастиц вместе с держателем называют макроносителем.

Процедура биобаллистической трансформации проводится в стерильных условиях, поэтому все расходные материалы, используемые для иммобилизации ДНК, растворы и сама «генная пушка» требуют стерилизации и должны располагаться в ламинарном боксе. Процедура биобаллистики подразделяется на три этапа: подготовка микрочастиц, иммобилизация на них ДНК и собственно биобаллистика. **Процедура, описанная в данном пособии, является стандартной и предлагается производителем, фирмой «BIO-RAD».**

<https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lsr/literature/10000070900.pdf>

Подготовка к биобаллистике.

Подготовка к биобаллистике включает в себя несколько этапов: стерилизацию микрочастиц (микроносителей), иммобилизацию плазмидной ДНК на микроносители, нанесение частиц на мембрану и подготовка пушки.

Материалы и оборудование: центрифуга «vortex», центрифуга на 8000 об/мин, весы, термостат, ламинар-бокс, генная пушка, газовый баллон с гелием, мембрана-носитель, автоклав, сухо-жаровой шкаф, морозильная камера на -20°C , электрическая плитка, таймер, автоматические пипетки, стерильные и нестерильные наконечники универсальные, мерные цилиндры (на 50 мл), колбы (на 50 мл), стерильные пластиковые пробирки «Eppendorf» объемом 1,5 мл, бактериальные фильтры 0,22 мкм, стерильные чашки Петри, перчатки стоматологические текстурированные нестерильные, штатив для пробирок объемом 1–2 мл, лента лабораторная «Parafilm M», спиртовка, спички, спирт для спиртовок, спирт для обработки столешницы и инструментов, фарфоровый стакан, стерильные пинцеты, фольга, интактная плазмида в концентрации 1 мкг/мкл, золотые или вольфрамовые частицы, 100%-ный (96%-ный) и 70%-ный этанол, стерильная дистиллированная вода, 50%-ный стерильный глицерин, 2,5 М CaCl_2 , 0,1 М спермидин, лед, изопропанол, чашки Петри с растительным материалом (калусная ткань, листовые экспланты и т.д.), маркеры.

Ход работы:

Этап 1. Подготовка (стерилизация) микрочастиц. Данная процедура подходит для стерилизации как золотых, так и вольфрамовых частиц (*Sanford et al. Methods in enzymology. 1993. Vol. 217. P. 482–509*). Стерилизацию частиц можно проводить в старильном помещении или ламинарном боксе.

1. Взвесить 30 мг частиц в силиконизированной пластиковой пробирке объемом 1,5 мл (подходят пробирки фирмы «Eppendorf»).
2. Добавить к частицам 1 мл 70%-ного этанола (v/v) и интенсивно встряхивать в течение 3–5 мин. Очень удобно использовать для этих целей мини-центрифугу с платформой для встряхивания («vortex»).
3. Оставить частицы в 70%-ном этиловом спирте на 15 мин.
4. Осадить частицы кратковременным центрифугированием при 2 500 об/мин в течение 20–30 с и удалить спирт пипеткой.
5. Добавить к частицам 1 мл стерильной дистиллированной воды.
6. Ресуспендировать золотые частицы в воде интенсивным встряхиванием («vortex») в течение 1 мин.
7. Оставить частицы в воде на 1 мин.
8. Осадить частицы кратковременным центрифугированием и удалить воду пипеткой. Повторить процедуру отмывки трижды. Во время отмывки золотые частицы могут осаждаться на стенках пробирки, что приводит к их потере, поэтому необходимо использовать качественный пластик.

9. После третьей отмывки добавить к частицам 500 мкл 50%-ного стерильного глицерина и очень тщательно ресуспендировать интенсивным встряхиванием. В результате получается суспензия частиц в глицерине с конечной концентрацией (без учета потерь) \approx 60 мг/мл. Частицы в глицерине можно сразу разделить на аликвоты по 50 мкл в стерильные пластиковые пробирки «Eppendorf» объемом 1,5 мл. В таком состоянии вольфрамовые частицы во избежание окисления необходимо хранить при температуре -20°C , золотые частицы можно хранить при комнатной температуре в течение двух недель, а при -20°C неограниченно долго.

Этап 2. Имобилизация плазмидной ДНК на частицах микроносителях). Все действия по иммобилизации ДНК на микрочастицы проводят в стерильных условиях ламинарного бокса. Рекомендуется все компоненты, используемые для составления смесей, держать на льду. Если частицы были заморожены, то их нужно разморозить и тщательно ресуспендировать интенсивным встряхиванием или перемешиванием с использованием системы «vortex» не менее 5 мин. Наличие агломератов частиц в суспензии недопустимо. Отобрать аликвоту в 50 мкл и перенести в пробирку объемом 1,5 мл.

Способ с использованием CaCl_2 /спермидина.

1. Постоянно перемешивая суспензию частиц на «vortex», последовательно, соблюдая очередность, добавить следующие компоненты:

– 5 мкл ДНК в концентрации 1 мкг/мкл. Важно соблюдать это правило, поскольку при больших концентрациях ДНК частицы агрегируют и потом их не удастся разбить;

– 50 мкл CaCl_2 в концентрации 2,5 М; – 20 мкл спермидина в концентрации 0,1 М.

4. Встряхивать на «vortex» в течение 2–3 мин, затем дать частицам осесть в течение 1 мин.

5. Осадить частицы кратковременным (15–20 с) центрифугированием и удалить надосадочную жидкость (достаточно центрифугировать на скорости 2 500 об/мин).

6. Добавить к частицам 140 мкл 70%-ного этанола, ресуспендировать пипетированием, затем осадить частицы кратковременным центрифугированием и удалить надосадочную жидкость.

7. Добавить к частицам 140 мкл 100%-ного этанола (можно использовать 96%-ный этанол), ресуспендировать пипетированием, затем осадить частицы кратковременным центрифугированием и удалить надосадочную жидкость.

8. Добавить к частицам 48 мкл 100%-ного этанола (можно 96%-ного этанола), аккуратно ресуспендировать пипетированием, можно кратковременно встряхнуть на «vortex».

Этап 3. Нанесение частиц на мембрану. Для этого используют мембраны-носители, закрепленные в держателях. На каждую мембрану нанести по 8 мкл суспензии микрочастиц с иммобилизованной ДНК, распределяя суспензию ровным слоем по диаметру отверстия в держателе. Очень важно суспензию постоянно пипетировать или встряхивать на «vortex», чтобы избежать образования агломератов частиц. Правильно подготовленные и распределенные частицы после высыхания спирта должны выглядеть как равномерно мутное пятно на мембране без видимых комочков.

После нанесения на мембрану частицы нужно подсушить в ламинарном боксе в потоке стерильного воздуха в течение часа или в течение 15 мин в вакуумном эксикаторе. Следует помнить, что после сушки мембраны с частицами должны быть использованы для биобаллистики в течение 2 ч.

Этап 4. Подготовка пушки (Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System) к работе и биобаллистика. На рисунке представлено схематическое устройство генной пушки производства фирмы «BIO-RAD».

Стерилизация:

1. Вакуумную камеру пушки, удерживающий колпачок разрывной мембраны, устройство-носитель микрочастиц и полочку для образца (Рис. 3) стерилизовать разбрызгиванием 96%-ного этанола. Удобно для этой цели использовать обычный опрыскиватель для комнатных растений. Нужно следить, чтобы спирт равномерно покрыл все детали. После обработки все части пушки необходимо просушить от спирта в стерильном потоке ламинарного воздуха.

2. Расходные материалы удобно стерилизовать заранее, прожаривая их в сухожаровом шкафу при температуре 180°C в течение 2 ч. Перед прожариванием расходные материалы в необходимом количестве раскладывают в чашки Петри и заворачивают в фольгу. Мембраны-носители микрочастиц, собранные с металлическими держателями, тоже можно стерилизовать в сухожаровом шкафу.

Следует отметить, что все расходные материалы для биобаллистики, указанные в п.2, можно стерилизовать ополаскиванием в изопропанолем с последующим тщательным высушиванием в потоке стерильного воздуха ламинарного бокса.

Этап 5. Подготовка пушки к биобаллистике:

3. Включить пушку (клавиша On/Off) и вакуумный насос (покупается отдельно). Можно использовать пластинчато-роторный насос НВР-4,5Д (быстрота действия – 1,25 л/с; предельный вакуум – $1,5 \times 10^{-1}$ мм.рт.ст.; двигатель – 0,25 кВт, частота вращения – 3 000 об/мин; масса – 10 кг), или любой другой с подходящими характеристиками.

4. Открыть вентиль на верхушке газового баллона и поворачивать регулятор давления гелия, пока показания на манометре газового редуктора не будут на 200 psi² больше того давления, при котором вы будете стрелять, т.е. давления, на которое рассчитана выбранная разрывная мембрана.

5. Смочить разрывную мембрану в изопропанолe (или взять стерильную, например, стерилизованную в жарочном шкафу) и поместить в удерживающий колпачок.

6. Навинтить удерживающий колпачок на место и, не прилагая лишних усилий, затянуть его с помощью стального стержня с ручкой (поставляется вместе с пушкой). Следует помнить, что ни в коем случае нельзя затягивать удерживающий колпачок, если в нем нет разрывной мембраны.

7. Собрать устройство-носитель микрочастиц:

– вставить стерильную останавливающую сеточку в металлическое гнездо на носителе;

– поместить мембрану с держателем, покрытую соответствующими частицами, в гнездо над останавливающей сеточкой частицами вниз;

– навинтить покрывающий каркасный колпачок.

8. Поместить собранное устройство-носитель микрочастиц в камеру на необходимой дистанции от удерживающего колпачка (в самые верхние пазы вакуумной камеры).

Следует помнить, что дистанция между удерживающим колпачком разрывной мембраны и каркасным колпачком устройства-носителя микрочастиц должна равняться диаметру стального стержня, с помощью которого затягивают удерживающий колпачок.

9. Поместить чашку Петри с культурой (каллусами, эксплантами, листьями и т.п.) на подставку и вставить подставку в камеру на необходимом расстоянии от устройства-носителя микрочастиц.

10. Плотно закрыть дверь вакуумной камеры на защелку.

Этап 6. Биобаллистика:

11. Активировать пушку нажатием клавиши вакуум (VAC) на передней панели пушки в верхнее положение. Это приводит к удалению воздуха из главной камеры. (Следует отметить, что клавиша вакуум имеет три положения: верхнее – VAC, среднее – VENT и нижнее – HOLD).

12. Позволить стрелке вакуумного манометра достигнуть необходимого давления и задержать вакуум при помощи клавиши HOLD путем надавливания ее в нижнее положение.

13. Нажать кнопку FIRE и наблюдать за стрелкой манометра на верхушке пушки (манометр разрывной мембраны). Когда давление гелия достигнет давления разрыва мембраны, произойдет выстрел, разрывная мембрана будет прострелена. Возникшая ударная волна гелия достигнет мембраны с микрочастицами и придаст им ускорение. Частицы с большой скоростью будут бомбардировать образец, а останавливающая сеточка предотвратит падение мембраны-носителя микрочастиц на образец.

14. После бомбардировки давление в камере выровнять нажатием клавиши VENT в среднее положение.

15. Открыть дверку вакуумной камеры, убрать образец с подставки и закрыть чашку Петри.

16. Вытащить и разобрать устройство-носитель микрочастиц. Удалить мембрану-носитель микрочастиц вместе с держателем и останавливающую сеточку.

17. Отвинтить удерживающий колпачок, содержащий разрывную мембрану, и удалить ее остатки.

18. Для следующего выстрела все повторить, начиная с пункта 5.

Этап 7. Завершение биобаллистики:

19. После завершения всех бомбардировок закрыть кран на баллоне с гелием и сделать несколько холостых выстрелов (при этом разрывная мембрана не нужна). Задержать клавишу HOLD на необходимом давлении и выстрелить нажатием кнопки FIRE. Операцию повторить несколько раз, пока стрелка на манометре газового редуктора не выйдет на «0». Нажать клавишу VENT в среднее положение, чтобы убрать вакуум и закрыть регуляторную крышку.

20. Выключить пушку и вакуумный насос.

21. Обработать вакуумную камеру, удерживающий колпачок, устройство-носитель микрочастиц 96%-ным этанолом и высушить перед помещением обратно в камеру.

Условия для биобаллистической трансформации. В Табл. 8 (приложение) приведены примерные условия, подходящие для трансформации различных типов клеток и тканей растений, рекомендованные производителем генной пушки. Однако в каждом конкретном случае эти условия подбираются и оптимизируются экспериментально.

Контрольные вопросы по практической работе 1.5.

1. Перечислите основные этапы биобаллистики?
2. Для чего в биобаллистике используют спермидин?
3. Как стерилизуют основные компоненты и пушки при подготовке к баллистике?
4. Для чего нужна кнопка HOLD в генной пушке?
5. Из чего состоит устройство-носитель микрочастиц?
6. До какого значения нужно открыть вентиль на верхушке газового баллона?

Работа 1.6 ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ РЕПОРТЕРНЫХ ГЕНОВ

Вместе с генами доминантных селективных маркеров, таких, например, как *nptII* или *bar*, необходимых для отбора трансгенных растений, в генетической инженерии используют так называемые репортерные гены (гены-репортеры). Данные гены, входящие в состав экспрессионных векторов по отдельности или вместе с целевыми генами, весьма удобны для исследования временных или тканевых особенностей их экспрессии. Особенно часто для этих целей используют ген β -глюкуронидазы (*gus*-ген, синонимы: *gusA*, *uidA*) и ген зеленого флуоресцентного белка (*gfp*-ген). Рассмотрим пример определения активности *gfp*-гена в растительных тканях в варианте транзientной экспрессии.

Выявление активности GFP

Зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein – GFP) в настоящее время является одним из самых распространенных репортерных белков, используемых в трансгенезе. Это можно объяснить наличием у GFP ряда особых свойств:

1. GFP способен флуоресцировать в видимой (зеленой) области спектра при облучении УФЛ ($\lambda = 488$ нм).
2. Для флуоресценции не требуется субстратов или кофакторов.
3. Белок стабилен и выдерживает обработку протеазами и денатурирующими агентами в течение нескольких часов.
4. Не обладает цитотоксичным эффектом.
5. Детекцию GFP можно осуществлять в режиме транзientной экспрессии, например, через 72 часа после трансформации.

6. Очень часто GFP используется в качестве флюоресцентной метки для тканевой или клеточной локализации целевых белков, поскольку он не нарушет их функции.

Длина GFP составляет 238 аминокислот, а молекулярная масса – 27 кДа. Хромофор представляет собой *n*-оксибензилиден-имидазолидинон. В его формировании принимают участие три аминокислоты в позиции 65–57. Хромофор образуется после синтеза белка путем окисления оксибензольной группы тирозина и автокаталитической циклизации. Молекула белка имеет структуру β-«консервной банки» (β-«can»), внутри которой располагается хромофор.

К настоящему моменту экспериментальные модификации первичной последовательности аминокислот хромофора привели к смещению эмиссионного спектра и созданию группы разноцветных автофлуоресцентных белков (АФБ) от желтого до синего. В дополнение к модификациям GFP в генной инженерии активно используются флуоресцентные белки и другого происхождения, например, АФБ оранжево-красного цвета – DsRed, выделенный из морской анемоны рода *Discosoma*.

Материалы и оборудование: стереомикроскоп Discovery.V8 (Carl Zeiss, Германия) с набором фильтров для детекции GFP, предметные и покровные стекла, гистологические иглы, пинцет, фосфатный буфер (PBS) с pH = 7,2, марлевые салфетки, фильтровальная бумага.

Ход работы:

На предметное стекло в каплю PBS-буфера поместить часть листа трансгенного растения или листа через 48-72 часа после биобаллистики. Накрыть препарат сверху покровным стеклом подходящего размера. При необходимости под покровное стекло можно добавить буферного раствора, чтобы удалить воздух. Поместить предметное стекло под объектив малого увеличения (10× или 20×) и рассмотреть образец в УФ-свете с использованием необходимого набора фильтров.

Контрольные вопросы по практической работе 1.6.

1. Для чего в генетической инженерии используют репортерные гены?
2. Какие гены чаще всего используют в качестве репортерных?
3. Какие свойства зеленого флюоресцентного белка (green fluorescent protein – GFP) делают его одним из самых распространенных репортерных белков, используемых в трансгенезе?

Работа 1.7 АНАЛИЗ ФЕНОТИПИЧЕСКОГО ПРОЯВЛЕНИЯ МАРКЕРНОГО ГЕНА *nptII* НА СЕЛЕКТИВНЫХ СРЕДАХ С АНТИБИОТИКОМ КАНАМИЦИНОМ

У трансгенных растений проявление чужеродных генов соответствует доминантным мутациям при полном доминировании, а их наследование подчиняется законам Менделя. Например, проявление маркерного гена *nptII* (доминантный селективный маркер) оценивается на селективной среде с антибиотиком канамицином. Канамицин в растительной клетке избирательно взаимодействует с 30S субъединицами рибосом хлоропластов, что приводит к нарушению синтеза хлорофилла и в итоге к нарушению фотосинтеза. Нарушение фотосинтеза вызывает замедление и остановку дальнейшего развития растений. В течение короткого промежутка времени (2–4 недели) растения на среде с канамицином белеют и погибают.

Бактериальный ген *nptII* кодирует фермент неомицинофосфотрансферазу II и обеспечивает устойчивость трансформантов к антибиотику канамицину. Проведение теста на устойчивость трансгенных растений к канамицину позволяет судить о наличии в геноме растения перенесенного гена-маркера *nptII*. Тест основан на анализе соотношений Km^+ - и Km^- -потомков в поколении от самоопыления исходного трансгенного растения. Соответствие фактического расщепления теоретическому и достоверность различий между группами растений оценивается по критерию согласия Пирсона (критерий χ^2). Данный подход достаточно прост и позволяет тестировать большие выборки растений на ранних стадиях онтогенеза в течение короткого промежутка времени (4–6 недель от начала эксперимента). По соотношению канамицин-устойчивых (Km^+) и канамицин-неустойчивых (Km^-) фенотипов потомков от самоопыления исходных трансформантов можно ориентировочно сделать вывод о числе копий трансгенов, интегрированных в геном растения. Полученные предварительные данные о числе копий подтверждают методами молекулярного анализа.

Определение числа инсерций *nptII*-гена в геноме трансгенных растений табака по соотношению Km^+ - и Km^- -фенотипов (канамициновый тест)

Материалы и оборудование: чашки Петри с растительным материалом, компьютер с программами электронных таблиц «MS Excel 2003» и прикладного пакета «StatSoft», лабораторный журнал, ручка, маркеры.

Ход работы:

Определение числа копий трансгена у трансгенных растений проводят по результатам подсчетов числа устойчивых и неустойчивых к антибиотику канамицину проростков

трансгенных растений табака, культивируемых на селективной среде с добавлением антибиотика канамицина. Для этих целей используют семена, полученные от самоопыления исходных трансгенных растений табака с геном *nptII*, собранных индивидуально с каждого отдельного растения (T_0). Предварительно цветки на каждом индивидуальном растении табака перед началом раскрытия бутонов изолируют марлевыми (ватными) изоляторами. Через 2–3 дня после изоляции бутонов изоляторы снимают и ватным тампоном переносят пыльцу из пыльников на рыльце пестика раскрывшегося бутона. Цветки вновь изолируют под марлевыми (ватными) изоляторами. После созревания семян семенные коробочки с семенами (поколение T_1) убирают отдельно с каждого растения и помещают в отдельные пакеты. На каждом пакете отмечают порядковый номер трансгенного растения, поколение и дату сбора. Пакеты с семенами рекомендовано хранить в сухом прохладном месте.

Для определения числа копий гена *nptII*, кодирующего фермент неомицинофосфотрансферазу, который обеспечивает растениям устойчивость к антибиотику канамицину, семена трансгенных растений табака предварительно стерилизуют. Для этого семена табака (T_1) отдельно из каждой коробочки, собранной индивидуально с каждого отдельного трансгенного растения, помещают в условиях культурального бокса в пакет из фильтровальной бумаги и стерилизуют в 96%-ном этиловом спирте в течение 1,5–2,5 мин. После стерилизации пакеты распечатывают, семена подсушивают в потоке стерильного воздуха ламинарного бокса и высевают в чашки Петри на среду МС (см. табл. 2) с добавлением 20 г/л сахарозы, 8 г/л агары и антибиотика канамицина в концентрации 200 мг/л. Через 4–6 недель оценивают реакцию проростков на антибиотик канамицин и подсчитывают соотношение Km^+ - и K^- -фенотипов. Если соотношение устойчивых и неустойчивых к антибиотику проростков будет соответствовать теоретически ожидаемому (3:1 или 15:1), то можно сделать предварительный вывод об интеграции в геном анализируемого трансгенного растения одной или двух независимых копий трансгена (Табл. 8).

Контрольные вопросы по практической работе 1.7.

1. Какой антибиотик используют для проявления маркерного гена *nptII*?
2. Как можно ориентировочно определить наличие и число копий трансгена в геноме растения, трансформированного плазмидой, содержащей ген-маркер *nptII*?
3. Какое соотношение устойчивых и неустойчивых к антибиотику проростков ожидается при интеграции в геном анализируемого трансгенного растения одной копии трансгена?

СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

Амплификация – увеличение числа копий фрагмента ДНК в результате полимеразной цепной реакции или при репликации вектора в клетках хозяина либо увеличение числа нуклеотидных последовательностей генома в результате дубликаций.

Бинарная векторная система – система двух плазмид, используемая для трансформации растений. Включает векторную плазмиду, в которую клонируется чужеродная ДНК, и плазмиду-помощник, которая обеспечивает перенос в растение векторной плазмиды посредством активации *vir*-области, включенной в ее состав.

Биобаллистика – способ доставки чужеродной ДНК, помещенной на поверхности золотых (или вольфрамовых) частиц, в цитоплазму растительной клетки с помощью специального прибора – генной пушки.

Вектор – искусственно сконструированная рекомбинантная молекула ДНК или природная ДНК, организованная, например, в виде плазмиды, которая способна автономно реплицироваться в клетке-реципиенте. Выполняет функцию переноса чужеродного фрагмента ДНК в клетку-реципиент с целью его клонирования и/или экспрессии.

Генная пушка – прибор, используемый для доставки чужеродной ДНК в клетки растений (преимущественно однодольных).

Гетерологичные белки – белки, не свойственные определенному природному организму, например рекомбинантные белки человека, синтезируемые трансгенными растениями с трансгенами, кодирующими соответствующие белки человека.

ДНКаза – фермент, расщепляющий двуцепочечную ДНК.

Кассета экспрессии – нуклеотидная последовательность, включающая один или более структурных генов вместе с их регуляторными элементами, которая переносится в геном растительной клетки как единое целое и обеспечивает экспрессию перенесенных генов.

Коинтегративная векторная система – двухплазмидная система для переноса клонированных генов в растительные клетки, основанная на гомологичной рекомбинации клонированных генов с резидентной неонкогенной *Ti*-плазмидой в клетках *A. tumefaciens*.

Кокультивирование – совместное культивирование клеток *in vitro*, используемое для их трансформации или селекции.

Маркерный ген – ген с четким фенотипическим проявлением (например, ген-*nptII*, кодирующий фермент неоминифосфотрансферазу II и обеспечивающий трансформированным клеткам растений устойчивость к антибиотику канамицину). В генетической инженерии маркерные гены включают в состав кассет экспрессии и

используют для отбора генетически-модифицированных (трансгенных) от нетрансгенных клеток.

Плазида – внехромосомная кольцевая ДНК, существующая в цитоплазме автономно. В генетической инженерии плазмиды используются в качестве векторов.

Полилинкер – искусственная нуклеотидная последовательность в составе клонирующего вектора, включающая уникальные перекрывающиеся сайты узнавания для рестриктаз.

Промотор – регуляторный район гена, представленный нуклеотидной последовательностью, прилежащей к началу кодирующей области гена и ответственной за инициацию его транскрипции.

ПЦР – полимеразная цепная реакция используется для увеличения количества исследуемого фрагмента ДНК в пробе.

Праймер – одноцепочечный олигонуклеотид, комплементарный границе анализируемого участка генома, используемый в качестве затравки в ПЦР.

Репортерный ген – ген с четким фенотипическим проявлением, кодирующий легко выявляемый продукт, активность которого в норме в растительной клетке отсутствует. В генетической инженерии используется для того, чтобы подтвердить успешность введения генетической конструкции в геном растительной клетки и ее способность экспрессироваться.

Рестриктаза – бактериальный фермент, производящий разрыв в двуцепочечных ДНК после распознавания специфической нуклеотидной последовательности.

Ревертаза – обратная транскриптаза (РНК-зависимая ДНКполимераза), фермент, с помощью которого осуществляется обратная транскрипция, т.е. синтез ДНК на матрице РНК.

РНКаза (рибонуклеаза) – фермент, катализирующий деградацию РНК.

Селективная среда – среда для культивирования клеток растений после трансформации. Используется для отбора трансформированных (трансгенных) клеток растений.

Терминатор транскрипции (стоп-кодон) – нуклеотидная последовательность ДНК, ответственная за прекращение транскрипции.

Т-область – нуклеотидная последовательность мегаплазмиды *A. tumefaciens*, ограниченная с обеих сторон несовершенными повторами, размером 25 п.н., которая вырезается с помощью специальных ферментов из плазмиды и с помощью транспортного белка переносится в растительную клетку.

Ti-плазмида – большая или мегаплазмида *A. tumefaciens*, используемая в генетической инженерии для агробактериального переноса чужеродной ДНК в геном растений.

Трансгенные растения – генетически модифицированные растения, в геном которых интегрированы искусственно созданные гены.

Фланкирующие области – области ДНК, располагающиеся по обе стороны от специфического локуса, гена или какой-либо иной нуклеотидной последовательности.

Целевой ген, или ген интереса, – нуклеотидная последовательность, включающая кодирующую область того гена, который исследователь предполагает перенести в геном растения.

Эксплант — фрагмент ткани или органа, инкубируемый на питательной среде самостоятельно или используемый для получения первичного каллуса.

Экспрессионный вектор – рекомбинантный вектор, включающий необходимый набор регуляторных элементов, обеспечивающих экспрессию включенных в него чужеродных генов

Экспрессия гена (выражение гена) – проявление записанной в гене генетической информации в форме мРНК и белка с последующим действием образовавшегося продукта на клетку (фенотипическое проявление).

Эндонуклеаза – фермент, катализирующий разрыв в одно- или двуцепочечной ДНК или РНК.

Энхансер – регуляторная последовательность, усиливающая экспрессию генов независимо от ориентации относительно промотора.

Vir-гены – нуклеотидная последовательность одной из плазмид *A. tumefaciens*, включающая 8 генов, организованных в виде оперона, координированная экспрессия которых обеспечивает вирулентность

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Основная учебная литература

1. Назаренко Л.В., Долгих Ю.И., Загоскина Н.В., Ралдугина Г.Н. Биотехнология растений: учебник и практикум для бакалавриата и магистратуры / – 2-е изд., испр. и доп. – М.: Издательство Юрайт, 2018. – 161 с. – (Серия: Университеты России). ISBN 978-5-534-05619-8

<https://urait.ru/book/biotehnologiya-rasteniy-471466>

2. Калашникова, Е.А. Клеточная инженерия растений: учебник и практикум для вузов / – 2-е изд. – Москва: Издательство Юрайт, 2020. – 333 с. – (Бакалавр и магистр. Академический курс). ISBN 978-5-534-11790-5

<https://urait.ru/book/kletochnaya-inzheneriya-rasteniy-471541>

3. Наумова А.А. Основы клеточной инженерии растений: практикум / Наумова А.А., Наумова Т.А., Кусачева С.А.. — Саратов : Вузовское образование, 2019. — 45 с. — ISBN 978-5-4487-0511-3. — Текст: электронный // Электронно-библиотечная система IPR BOOKS

<https://www.iprbookshop.ru/86301.html>

(Доступ к полнотекстовым ресурсам осуществляется через электронную библиотеку Новосибирского Государственного Университета).

5. Закиян С.М. и Медведев С.П. Методы геномного редактирования системой CRISPR-CAS9. Новосибирск, Изд-во СО РАН, 2020, 550 с. ISBN: 978-5-7692-1670-1 — Текст: электронный // Научная электронная библиотека Elibrary

<https://www.elibrary.ru/item.asp?id=46105692>

Дополнительная учебная литература.

1. Першина Л.А. Основные методы культивирования *in vitro* в биотехнологии растений: Учеб. пособие. 2-е изд., перераб. и доп. / Новосиб. гос. ун-т. Новосибирск, 2005. 142 с. ISBN 5-94356-320-2 (библиотека ИЦиГ СО РАН).

2. Лутова, Л.А. Биотехнология высших растений: Учебник / – Издание 2-е. СПб.:Издательство С.-Петербур. ун-та. 2010. – 240 с. ISBN 978-5-288-05048-0 (библиотека ИЦиГ СО РАН).

3. Долгих С.Г. Учебное пособие по генной инженерии в биотехнологии растений: учебное пособие / Долгих С.Г. — Алматы : Нур-Принт, 2014. — 141 с. — ISBN 978-601-278-045-1. — Текст : электронный // Электронно-библиотечная система IPR BOOKS

<https://www.iprbookshop.ru/67169.html>

4. Пак И.В., Трофимов О.В., Величко О.А. Введение в биотехнологию: Учебное пособие. – 3-е изд. – Издательство «Тюменский государственный университет», 2018. –160 с. – ISBN 978-5-400-01454-3. – Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. – URL: – Режим доступа: для авториз. пользователей.

https://biblioclub.ru/index.php?page=book_red&id=567615

5. Дрейпер Дж., Скотт Р., Армитидж Ф., Уолден Р. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство: пер. с англ. М.: Мир, 1991. 407 с. (библиотека ИЦиГ СО РАН).

6. Qi Y. Plant Genome Editing with CRISPR Systems: New York, NY: Springer New York, 2019. — DOI: 10.1007/978-1-4939-8991-1. — URL: — Режим доступа: для авториз. пользователей.

<https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4939-8991-1>

7. Jones H. D., Shewry P. R. Methods in Molecular Biology. Production and Characterization Protocols / Humana Press, 2009 — 353 p. — URL: — Режим доступа: для авториз. пользователей.

<https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-59745-379-0>

Ресурсы сети "Интернет"

1. Сайт Центральной научной сельскохозяйственной библиотеки.
<http://www.cnsnb.ru>

2. Научная электронная библиотека <http://elibrary.ru>

3. НГУ <https://e-lib.nsu.ru/dsweb/HomePage>

4. ИЦиГ <http://sites.icgbio.ru/library/>

5. Национальная электронная библиотека <https://rusneb.ru/>

6. Электронно-библиотечная система <https://e.lanbook.com/>

7. Университетская информационная система России <http://uisrussia.msu.ru>

8. Бесплатная библиотека on-line на Sibnet <http://lib.sibnet.ru>

9. Интернет-ресурс геномной и биомедицинской информации
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

10. Биоинформатические инструменты для работы с нуклеотидными последовательностями <https://eu.idtdna.com/pages>

11. Справочник по методам молекулярного клонирования:
<https://www.snapgene.com/resources#cloning-guides>

12. Ресурс SnapGene Academy с видео лекциями по методам молекулярной биологии и молекулярного клонирования <https://academy.snapgene.com/enrollments>

13. Сборник ресурсов (лекции, протоколы, вебинары, публикации) по геномному редактированию <https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/life-science/genome-editing/genome-editing-learning-center/genome-editing-resource-library.html>

14. Руководство по эксплуатации PDS 1000/HE <https://www.biorad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lsr/literature/10000070900.pdf>

ПРИЛОЖЕНИЯ

Подготовка биотехнологической лаборатории к работе

Основным условием культивирования клеток и тканей является соблюдение асептических условий. Асептика – система мероприятий, предупреждающих внесение (попадание) микроорганизмов из окружающей среды в материал для исследования, в питательные среды; предусматривает стерилизацию инструментов и материалов, обработку рук работников, соблюдение особых санитарно-гигиенических правил и приемов работы.

Имеются определенные требования к помещениям, где осуществляются процедуры по выделению тканей из растений, их высадке на питательную среду и т.д. В основном все эти работы проводят в ламинарном боксе. В этом случае асептика достигается обработкой внутренней поверхности УФ-светом от встроенной в боксе кварцевой лампы, подачей стерильного профильтрованного воздуха, направленного из ламинара наружу, и дезинфекцией поверхности стола спиртом.

Само помещение, где располагается бокс, стерилизуется с помощью ультрафиолетовых ламп, влажной уборки с моющими и обеззараживающими веществами (хлорамин, лизол и др.). Работающие в ламинар-боксе должны надевать стерильные халаты с рукавами и плотно прилегающими к руке манжетами, чтобы уменьшить вероятность попадания микроорганизмов с кожи в рабочее пространство бокса (также необходима сменная обувь).

Ламинарный бокс и техника работы в нем

Все работы с культурой клеток и тканей *in vitro* проводят в стерильных (асептических) условиях в стерильном боксе или ламинар-боксе, стерильными инструментами, в стерильной посуде, на стерильных питательных средах. В случае нарушения стерильности на средах развиваются микроорганизмы (грибы, бактерии), нарушающие состав среды и подавляющие рост растительных эксплантов.

Для стерилизации помещений (боксов для пересадки тканей, культуральных комнат) используют ультрафиолетовое облучение в течение 0,5– 2 ч (в зависимости от площади помещения). **Работы в облученном помещении начинают через 15–20 мин после отключения бактерицидных ламп, так как под действием ультрафиолетового излучения двухатомный кислород воздуха становится трехатомным озоном – газом, токсичным для человека!!!** Для достижения максимальной стерильности перед обработкой УФ все поверхности тщательно отмываются моющими средствами, водой и растворами хлорсодержащих веществ, поверхности ламинар-бокса обрабатывают 96%-ным

этиловым спиртом. Простерилизованные инструменты, материалы и все, что потребуется для работы, за исключением УФ-чувствительных компонентов (обычно это клеточные культуры растений, микроорганизмы и т.д.) помещают на стол ламинара и включают УФ-излучение. Через 20 мин выключают УФ и включают биофильтры. Для работы в ламинар-боксе надевают стерильный халат и шапочку, руки обрабатывают 70%-ным этиловым спиртом. Пинцеты, скальпели и препаравальные иглы помещают в стакан с 96%-ным этиловым спиртом. Перед каждой манипуляцией инструменты обжигают на пламени спиртовки. Большое значение имеют точность и отработанность движений при проведении асептических манипуляций и четкое продумывание последовательности этапов работы.

Приготовление стерильного глицерина

Способ 1. Нагревание в сушильном шкафу при температуре 180°C в течение 20–40 мин или при температуре 200°C в течение 10–20 мин.

Способ 2. Стерилизация паром при температуре 120,2°C в течение 2 ч. В этом случае глицерин должен находиться в герметично укупоренном сосуде и затем его еще помещают в специальную стерилизационную коробку, или двухслойную мягкую бязевую упаковку, или пергаментную бумагу.

Таблица 1

Состав питательной среды для индукции андрогенных гаплоидов

Компоненты	г/литр
Среда MS	4,4
Кинетин	0,2
НУК	0,1
Активированный уголь	10
Сахароза	20
Агар	7
pH 5,7 – доводить до добавления активированного угля	

Среды, используемые для культивирования пыльников пшеницы

Компоненты сред	Индукционная среда (среда N6), мг/л	Регенерационная среда (среда Гамборга B5), мг/л
Макроэлементы		
KNO ₃	2830	2500
(NH ₄) ₂ SO ₄	463	134
KH ₂ PO ₄	400	
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O		150
CaCl ₂ ·2H ₂ O	165	150
MgSO ₄ ·7H ₂ O	185	250
Источник железа		
Na ₂ EDTA	37,3	37,8
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8	27,8
Микроэлементы		
MnSO ₄ ·4H ₂ O	4,39	10
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1,5	2
H ₃ BO ₃	1,6	3
KI	0,80	0,25
CuSO ₄ ·5H ₂ O		0,025
CoCl ₂ ·6H ₂ O		0,025
Na ₂ MoO ₄ ·4H ₂ O		0,29
Источник углерода		
Сахароза	60 г/л	30 г/л
Мальтоза	30 г/л	
Витамины и органические добавки		
Миоинозитол		100
Тиамин-НСl (B ₁)	1,0	10
Пиридоксин-НСl (B ₆)	0,5	1,0
Никотиновая кислота (PP)	0,5	1,0
Глицин	2	
или		
Готовая среда с витаминами	4 г/л	3,2 г/л
Фитогормоны		
2,4-Д	1,0	
Кинетин		0,5
НУК		0,5
Агар	6,0 г/л	6,0 г/л

Таблица 3

Состав среды YEP

Компоненты среды	г/100мл
NaCl	0,5
Дрожжевой экстракт	1
Триптон (или пептон).	1
В агаризованную среду YEP добавить бакто-агар	1,5
С помощью 5М NaOH довести до pH = 7,4	
Автоклавировать при 1,2 атм (127°C) в течение 1 ч	

Таблица 4

Антибиотики: приготовление и хранение

Антибиотик	Среда	Концентрация, мкг/мл	Растворитель	Хранение
Рифампицин	YEP	50	Этиловый спирт	Холодильник, +4°C
Канамицин	YEP	50	Стерильная дистиллированная вода	Морозильная камера, -20°C
	Мурасиге – Скуга	200	– // –	– // –
Цефотаксим	Мурасиге – Скуга	500	– // –	– // –

Таблица 5

Состав агаризованной питательной среды Мурасиге – Скуга, мг/л

Компоненты среды	мг/л
KNO ₃	1900
KH ₂ PO ₄	170
NH ₄ NO ₃	1650
MgSO ₄ × 7H ₂ O	370

CaCl ₂ × 2H ₂ O	440
FeSO ₄ × 7H ₂ O	37,3
Na ₂ EDTA × 2H ₂ O	27,8
KI	0,83
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ × 4H ₂ O	22,3
CoCl ₂ × 6H ₂ O	0,025
CuSO ₄ × 5H ₂ O	0,025
ZnSO ₄ × 7H ₂ O	8,6
Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O	0,25
Тиамин HCl	1
Пиридоксин HCl	0,5
Никотиновая кислота	0,5
Сахароза	30 000
Агар	9 000
Дистиллированная вода	До литра
pH	5,8

Таблица 6

Состав сред для трансформации табака и получения растений-трансформантов

Компонент среды	Среда T ₀ Кокультивация	Среда T ₁ Отмывка от агробактерии	Среда T ₂ Индукция канамицин-устойчивого каллуса	Среда T ₃ Индукция побегообразования	Среда T ₄ Укоренение растений-регенерантов
Среда MC	1×	1×	1×	1×	1×
Сахароза	20 г/л	20 г/л	20 г/л	20 г/л	20 г/л
Агар	–	–	7 г/л	7 г/л	7 г/л
БАП	–	–	1 мг/л	0,1 мг/л	–
НУК	–	–	0,1 мг/л	–	–

Цефотаксим	–	500 мг/л	500мг/л	500мг/л	500мг/л
Канамицин	–	–	100 мг/л	100 мг/л	100 мг/л

Таблица 7

**Условия биобаллистики для различных типов клеток и тканей по рекомендациям
фирмы «BIO-RAD»**

Фаза роста	Плотность клеточной популяции	Осмотические стабилизаторы	Вакуум в камере, мм рт ст	Расстояние до образца, мм	Давление разрыва мембраны, psi	Размер частиц
Водоросли						
Экспоненциальная	10 ⁸ – 10 ⁹ на 100 мм чашки Петри	–	29	6	1300	0,6 мкм ЗОЛОТО
Растения: зародыши						
–	10 эксплантов на 100 мм чашки Петри	–	28	6	1300	1,0 мкм ЗОЛОТО
Растения: каллусы и клеточные культуры						
Экспоненциальная	0,75 мл насыщенной суспензии	–	28	9	1100	1,0 мкм ЗОЛОТО
Растения: внутриклеточные органеллы						
Экспоненциальная	5 x 10 ⁷ на 100 мм чашки Петри	–	28	6	1300	0,6 мкм ЗОЛОТО

**Оценка соотношений Km^+ - и Km^- -потомков от самоопыления
трансгенных растений табака на среде с антибиотиком канамицином**

Номер растения	Число растений F_2		Расщепление		χ^2
	Km^+	Km^-	фактическое	теоретическое	
1	173	45	3,8:1	3:1	2,21*
2	158	48	3,3:1	3:1	0,32
3	101	31	3,2:1	3:1	0,16
4	341	20	17,1:1	15:1	0,310*
5	334	9	37,1:1	15:1	7,697
6	248	11	22,5:1	15:1	1,773*

*Фактическое расщепление соответствует теоретическому при $\chi^2_{st0,05} = 3,64$ (d.f. = 1).