

ГБНОУ Санкт-Петербургский городской Дворец творчества
юных
Эколого-биологический центр "Крестовский остров"

Система для демонстрации метода полимеразной цепной
реакции (ПЦР)

Андронов Давид Русланович
ЧОУ "ЧШ ЦОДИВ"

Научный руководитель:
к.б.н. Румянцев А.М.
педагог доп. образования
ЭБЦ "Крестовский остров"

2024 г.

Оглавление

Раздел	Стр.
Введение	3
Обзор литературы	4
Цель и задачи работы	13
Методы	14
Результаты	19
Список литературы	25

Введение

Методы молекулярной биологии активно используются в различных научных исследованиях, в ходе медицинских анализов, по этой причине они проникают глубоко в жизнь человека.

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) часто упоминается в современной жизни, в частности, в связи с его использованием при анализе инфекционных заболеваний. Этот метод является золотым стандартом современной молекулярной биологии, медицинских исследований и активно применяется для решения совершенно разнообразных задач.

Демонстрация данного метода в рамках практических занятий в учебных заведениях, поможет подготовить будущих специалистов медицинских и биологических направлений. По этой причине демонстрация должна быть доступной, понятной и безопасной, не предполагающей больших финансовых затрат и с легкостью осуществимой в образовательных учреждениях.

В данной работе предложены компоненты системы проведения ПЦР для проведения таких практических занятий. В качестве источника геномной ДНК использованы дрожжи *S. cerevisiae*, часто применяемые в молекулярной биологии как модельный объект исследований. Этот вид дрожжей не патогенный, что позволяет использовать его штаммы в образовательных учреждениях при соблюдении основных правил работы с микроорганизмами.

1. Обзор литературы

1.1 Дрожжи как модельный объект современной биологии

Дрожжи - это искусственная экологическая группа организмов, не являющаяся монофилетической. Чаще под термином “дрожжи” понимаются различные представители отдела Аскомицетов (*Ascomycota*), утратившие мицелиальное строение. В данном проекте использован самый известный вид - пекарские дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*).

В природе дрожжи *S. cerevisiae* обитают на поверхности фруктов, однако их также можно обнаружить в лубе и на коре деревьев. Более того, в связи с использованием в пищевой промышленности, вид обитает в человеке. По данным исследований, у большинства людей и многих синантропных видов пекарские дрожжи присутствуют в микробиоме.

Жизненный цикл *S. cerevisiae* происходит с доминированием диплоидной фазы, которая сменяется гаплоидной путем образования аскоспор в результате мейоза. Слияние гаплоидных клеток приводит к возвращению к диплоидной фазе. Жизненная форма может варьировать в зависимости от условий. Дрожжи представлены либо отдельными клетками, либо псевдомицелиями, образующимися в результате почкования материнской клетки. Клетки *S. cerevisiae* имеют прочную клеточную стенку. В её состав входят бета-глюканы, хитин и маннаны.

Дрожжи *S. cerevisiae* могут демонстрировать разные типы метаболизма. При наличии глюкозы и кислорода в среде они

способны проводить ее полное окисление с получением 32 молекул АТФ на одну молекулу глюкозы. В случае дефицита кислорода дрожжи переходят к менее энергетически выгодному процессу гликолиза с получением 2 молекул АТФ на одну молекулу глюкозы. Этот процесс часто называют термином “брожение”, и его продуктами являются различные спирты.

Дрожжи используются человеком уже более 12 000 лет, с начала агрокультурной революции. Были найдены доказательства, что еще в Древнем Египте люди научились заготавливать пиво, а также печь первые хлебобулочные изделия с закваской, содержащей *S. cerevisiae*. По сей день этот вид дрожжей используется в индустрии для приготовления пива, различных других алкогольных напитков, выпекания хлеба, производства пищевых добавок.

Однако понимание процесса, стоящего за брожением и в целом использованием дрожжей в хозяйстве пришло совсем не сразу. Даже после появления относительно качественных микроскопов и методов исследования. Эта тема была плохо изучена в связи общепринятым на тот момент мнением, согласно которому, брожение - это химикофизический процесс, в котором живые организмы никакой роль не играют. Луи Пастер и Эдуард Бюхнер были одними из первых ученых, продемонстрировавших биогенную природу брожения.

Благодаря разработке эффективных и при этом простых методов культивирования дрожжей, многие исследователи начали использовать *S. cerevisiae* в качестве модельного объекта в микробиологии. Огромное значение в науке эти

дрожжи приобрели в середине XX века. Помимо удобства в микробиологических исследованиях, пекарские дрожжи показали различные преимущества в молекулярных и генетических исследованиях, главные из которых:

- Культивирование относительно простое и дешевое, скорость деления достаточно быстрая (примерно одно деление в 1.25 часа при 30°C).
- Жизненный цикл проходит через мейоз, поэтому это хороший модельный организм для генетических исследований.
- Доступность методов, позволяющих проводить генетические манипуляции (отбирать мутации, вносить делеции в гены и тд.).
- Огромная практическая значимость, стимулирующая активные научные исследования этого вида дрожжей.

Становление *S. cerevisiae* как модельного организма в молекулярной биологии и генетике привело к тысячам важных открытий в этой области. Например, первый полностью секвенированный геном эукариотного организма принадлежал именно этому виду. Благодаря дальнейшим исследованиям, были выявлены функции и роли большинства генов.

Таким образом, дрожжи *S. cerevisiae* играют огромную роль в разнообразных исследованиях в современной молекулярной биологии, медицине и генетике. Спектр их практического использования также чрезвычайно широк: от пищевой промышленности до производства лекарств.

В данном проекте предлагается использовать дрожжи *S. cerevisiae* и их геномную ДНК в ходе демонстрации метода полимеразной цепной реакции.

1.2. История открытия метода полимеразной цепной реакции (ПЦР)

ПЦР, или Полимеразная Цепная Реакция - это метод размножения (амплификации) определенных фрагментов ДНК. Этот биотехнологический метод был разработан в компании "Cetus" в 80-х годах двадцатого века химиком Кэри Муллисом (Kary Banks Mullis).

В связи с началом активной работы над генетическим материалом разных организмов в начале второй половины двадцатого века, возникла необходимость разработки эффективного метода изолирования определенных фрагментов ДНК в больших количествах. К началу 80-х годов уже существовали технологии для синтеза олигонуклеотидов, однако они были неэффективными и узконаправленными.

Впервые идея метода ПЦР пришла Кэри Муллису в апреле 1983 года. До этого он занимался синтезом олигонуклеотидов для различных исследований в компании "Cetus". Изначально Муллис посчитал, что столь простой и очевидный метод полимеразной цепной реакции должен был быть изобретен до этого, однако, проанализировав литературу и всевозможные источники, он пришел к выводу, что метод еще не был предложен.

Начиная с апреля 1983 года Муллис начал разрабатывать основы технологии для проведения первого эксперимента. Первые две пробных ПЦР прошли безуспешно, что было связано с некоторыми небольшими недочетами в организации

эксперимента и слишком большой длине амплифицируемого фрагмента. Взяв более короткий фрагмент для амплификации и исправив остальные недочеты, Муллис впервые провел ПЦР успешно.

В тот же самый день Муллис обратился в отдел патентов в “Cetus”. Сначала его поддержали, однако на следующий день президент компании не согласился патентовать метод, так как “Cetus” не занимался долгосрочными проектами. Компания искала наиболее прибыльные и быстрые для осуществления проекты и редко поддерживала и финансировала долгосрочные и коммерчески потенциально не прибыльные исследования и разработки.

Позднее Муллис пытался привлечь внимание руководства компании, показывая удобство метода ПЦР для некоторых важных проектов в “Cetus”, однако на его презентацию никто не обратил большого внимания. Еще одной причиной замедления развития метода стало отсутствие поддержки со стороны большинства коллег Муллиса.

Несмотря на все трудности с финансовой поддержкой, в компании была создана “ПЦР группа”, занимавшаяся дальнейшей разработкой ПЦР. Группа исследователей состояла из нескольких ученых, каждый из которых был специалистом в разных междисциплинарных направлениях.

28 марта 1985 года метод ПЦР был запатентован и стал важным для “Cetus” проектом. В дальнейшем патент был продан компании “Hoffman-LaRoche”, которая, обладая большими кадрами и финансовыми возможностями, вывела

метод ПЦР на современный уровень.

В современной молекулярной генетике, биологии и медицине ПЦР является незаменимым биологическим инструментом для исследований. За открытие и разработку этого метода Кэри Муллис получил Нобелевскую премию в области химии в 1993 году.

1.3. Принцип работы метода ПЦР

Суть метода ПЦР состоит в амплификации (размножении, копировании) определенного фрагмента ДНК. Главной особенностью этого биологического инструмента является возможность получения практически идеальных копий нужного фрагмента не в арифметической зависимости, а в геометрической, с потенциальным получением на основе одной исходной молекулы миллиардов фрагментов ДНК в процессе экспоненциального роста их числа.

Для проведения ПЦР требуется собрать в составе реакционной смеси различные компоненты, а именно:

- ДНК-матрицу, содержащую необходимую последовательность,
- праймеры, являющиеся олигонуклеотидами, комплементарными концам (границам) изучаемого фрагмента ДНК-матрицы
- нуклеотиды (дезоксирибонуклеозидтрифосфаты), служащие строительными блоками для синтеза новых фрагментов ДНК,
- фермент - ДНК-полимеразу, которая будет вести синтез ДНК,
- буферный раствор для ДНК полимеразы, содержащий соли, двухвалентные ионы (например, соли Mg^{2+})

Сам процесс ПЦР можно разделить на следующие

основные этапы:

1. Этап денатурации ДНК, проходящий при температуре около 95-98 °С. В таких условиях водородные связи между азотистыми основаниями противоположных цепей двуцепочечной ДНК разрываются. В результате двуцепочечная ДНК денатурирует на отдельные цепи.

2. Отжиг праймеров, проходящий при температуре около 45-55 °С. Добавленные в реакционную смесь праймеры представляют собой олигонуклеотиды – короткие фрагменты одноцепочечной ДНК. Они комплементарны последовательностям на границах нужного фрагмента ДНК. Понижение температуры приводит к их взаимодействию с соответствующими комплементарными участками с образованием водородных связей между праймерами и ДНК-матрицей.

3. Этап элонгации - синтез новых фрагментов ДНК, проходящий при температуре 72 °С. На этом этапе ДНК-полимераза начинает элонгацию (синтез) ДНК, достраивая новую цепь.

На следующем этапе цикл с теми же стадиями повторяется. Таким образом ходе одного цикла ПЦР на основе двух исходных цепей ДНК-матрицы синтезируются две новые молекулы с нужной нам последовательностью. Рассчитано, что при максимальной эффективности прохождения реакции на основе одной исходной молекулы ДНК, содержащей нужную последовательность за 30 циклов ПЦР будет размножено более одного миллиарда копий нужной последовательности

(<https://calculator.academy/pcr-cycle-calculator/>).

1.4. Метод электрофореза

В начале 20 века наиболее эффективным методом разделения биохимических смесей для анализа было центрифугирование. Однако этот метод на тот момент был неточен в связи с отсутствием технологии для производства качественных центрифуг. Еще одной причиной неудобства является ограниченные возможности анализа. Поскольку разделение при центрифугировании основывается преимущественно на массе молекул их разделение может быть не всегда эффективным.

В 1931 году биохимик Арне Тиселиус разработал способ электрофореза для изучения белков. За его работу над разработкой технологии и анализом строения белков Тиселиус получил Нобелевскую Премию в области химии в 1948 году.

Электрофорез - это процесс, позволяющий разделять молекулы, например, фрагменты ДНК, в зависимости от их размера и заряда. С помощью электрофореза возможно не только разделять фрагменты ДНК, но и оценивать их размеры в сравнении друг с другом.

Наиболее распространенным и простым методом электрофореза является агарозный электрофорез. В качестве основы для него используют гель из линейного полисахарида - агарозы. Такой гель помещается в буфер – раствор солей, который может проводить электрический ток.

Смеси фрагментов исследуемой ДНК помещаются в лунки сделанные в геле. Для предотвращения диффундирования

фрагментов ДНК в буфер вокруг геля в смесь фрагментов добавляют глицерин или другие вязкие вещества.

В буфер, в котором находится гель, также погружены электроды, к которым подключается блок питания. Молекулы ДНК обычно имеют отрицательный заряд за счёт большого количества остатков ортофосфорной кислоты. Под действием электрического поля они будут двигаться через агарозный гель к одному из электродов – аноду.

Агарозный гель обладает большой вязкостью, которая может также варьировать в зависимости от метода приготовления. Более длинные фрагменты ДНК испытывают большее сопротивление геля, поэтому их скорость передвижения существенно ниже, чем у коротких фрагментов. Благодаря этому смесь разделяется на отдельные части (фракции) в агаре.

После окончания электрофореза анализируются различные участки геля где находятся фракции разделенной смеси. ДНК очень плохо заметна невооруженным глазом. Поэтому для эффективного анализа используются красители. В стандартных лабораторных исследованиях часто используют красители, содержащие канцерогенные соединения брома. Однако, в данной работе и для безопасной работы в учебных заведениях используются безопасные флуоресцентные красители.

2. Цель и задачи работы

Цель работы заключалась в разработке и выборе доступных компонентов для проведения практических демонстраций полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи работы:**

- 1) Выбрать методику выделения геномной ДНК из дрожжей.
- 2) Подобрать праймеры для амплификации последовательностей генов дрожжей *S. cerevisiae*.
- 3) Подобрать условия для амплификации последовательностей генов *S. cerevisiae*.

3. Методы

3.1. Выделение геномной ДНК из дрожжей

Штамм дрожжей *S. cerevisiae* 1-GRF18 был предоставлен сотрудниками лаборатории биохимической генетики кафедры Генетики и биотехнологии СПбГУ. Штамм выращивали на чашках с твердой питательной средой YEPD содержащей 1% дрожжевого экстракта, 2% пептона, 2% глюкозы и 2% агара. При этом чашки помещали в термостат в температуру 30°C. Выделение ДНК из дрожжей проводили по методике представленной на сайте <https://www.protocols.io/view/dna-extraction-from-yeast-bp2l61o1dvqe/v1>.

Сначала готовили лизирующий раствор, содержащий на 1 мл: 700 мкл воды, 200 мкл 1М ацетата лития, 100 мкл 10% раствора додецилсульфата натрия.

Далее проводили выделение согласно следующей методике:

- 1) Перенести в нужное количество пробирок по 100 мкл лизирующего раствора.
- 2) Микробиологической петлей перенести клетки дрожжей в раствор.
- 3) Нагреть раствор с клетками до 70 °C на 5 минут.
- 4) Добавить 300 мкл этилового спирта (96%), перемешать.
- 5) Поместить в центрифугу на 5 минут при максимальных оборотах (в нашем случае 13400 g).
- 6) Удалить супернатант микропипеткой, не задевая осадок.
- 7) Добавить 500 мкл этилового спирта (70%).
- 8) Поместить в центрифугу на 5 минут при максимальных

оборотах.

9) Удалить надосадочную жидкость.

10) Сушить осадок 10-15 минут.

11) Растворить осадок в воде, перемешать.

12) Поместить в центрифугу на 5 минут при максимальных оборотах.

13) Отобрать супернатант, содержащий ДНК, в новую пробирку.

3.2. Метод ПЦР

Для проведения ПЦР были выбраны фрагменты следующих генов:

Ген *ACT1* кодирует актин, белок, являющийся частью цитоскелета и напрямую задействованный в делении клеток.

Ген *PKC1* кодирует серин/треонин киназу, участвующую в выстраивании клеточной стенки.

Ген *TDH1* кодирует глицеральдегидфосфатдегидрогеназу, которая превращает диоксиацетон-фосфат в 1,3-дифосфоглицерат в процессе гликолиза, важнейшего энергетического процесса.

Ген *TEF1* кодирует один из элангационных факторов, обеспечивающих перенос аминокислот к рибосоме во время трансляции.

Все перечисленные гены ответственны за жизненно важные процессы в клетках дрожжей. Выбор этих генов обусловлен тем, что у разных штаммов и родственных видов *S.cerevisiae* будут присутствовать эти гены, что гарантирует эффективность ПЦР независимо от выбранного штамма.

Для проведения ПЦР в работе были подобраны и использованы следующие праймеры к последовательностям генов дрожжей *S. cerevisiae*: *ACT1*, *PKC1*, *TDH1*, *TEF1*:

ACT1-F	TGTGTAAGCCGGTTTTGCC
ACT1-R	ACCGGCCAAATCGATTCTCA
PKC1-F	ACTCGCTCATTCAGTGGC
PKC1-R	AGAAATCGGGAACCAAATGAGC
TDH1-F	AGGTTGTCATCACTGCTCCA
TDH1-R	GTTCTACCACCTCTCCAGTCC
TEF1-F	CGAAAAGTTCGAAAAGGAAGCC
TEF1-R	TTCGTGCAATCTACAAGCAATGTG

Табл. 1. Прямые (F) и обратные (R) праймеры для генов *ACT1*, *PKC1*, *TDH1*, *TEF1*.

В данном исследовании была использована полимеразы Encyclo и сопутствующие реактивы от фирмы Евроген. Собирали смеси для ПЦР следующего состава:

- Раствор выделенной ДНК: 1 мкл
- Прямой праймер-F в концентрации 100мкМ/л: 0.2 мкл
- Обратный праймер-R в концентрации 100мкМ/л: 0.2 мкл
- Буфер 10x для полимеразы Encyclo: 2 мкл
- Раствор dNTP's (дезоксинуклеозидтрифосфатов) 50x: 0.4 мкл
- ДНК-полимераза Encyclo: 0.2 мкл
- Вода: 16 мкл

Суммарный объем смеси: 20 мкл

Была подобрана следующая программа для ПЦР:

1. Первичная денатурация - 95°C 3 минуты.

2. 27 циклов ПЦР:
 - денатурация - 95°C – 30 секунд,
 - отжиг праймеров - 50°C – 30 секунд,
 - элонгация - 72 °C – 2 минуты.
3. Конечная элонгация - 72 °C – 2 минуты.

3.3. Метод электрофореза в агарозном геле

В работе метод электрофореза в агарозном геле был использован для проверки результатов ПЦР и рестрикции. Использовался следующий протокол:

1. Приготовление смеси для геля (0,35 г агарозы для 0,7% геля добавляли в 50 мл буфера TAE - 40 mM Трис, 20 mM уксусная кислота, 1 mM ЭДТА).
2. Нагревание смеси в микроволновой печи до полного растворения агарозы, периодически помешивая.
3. Остужение раствора до 50°C. Добавление 4 мкл на 100 мл красителя dsSafe («Люмипроб»), размешивание и заливание гель в камеру.
4. Переливание TAE буфера в камеру для электрофореза.
5. Помещение геля после затвердения в камеру для электрофореза.
6. Помещение проб в лунки в геле в виде смеси с красителем для нанесения проб («Евроген»).
7. Подключение камеры к источнику питания (80 В).
8. Проведение электрофореза, слежение за ходом электрофореза по степени расхождения полос красителя.

9. Визуализация результатов электрофореза с использованием трансиллюминатора.

Результаты

3.4. Подбор праймеров для амплификации последовательностей генов дрожжей *S. cerevisiae*

Для проведения ПЦР требуются праймеры. Праймеры - это короткие последовательности ДНК, начиная с которых, ДНК-полимераза синтезирует новую цепь ДНК.

В исследовании были подобраны праймеры для последовательностей внутри четырех разных генов дрожжей *S. cerevisiae*: *ACT1*, *PKC1*, *TDH1*, *TEF1*.

В качестве примера приведен процесс подбора пары праймеров для гена *TEF1*, обеспечивающих в ходе ПЦР амплификацию фрагмента длиной 250 п.н.:

Последовательность генома *S. cerevisiae* (с картой генов) можно найти на сайте базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Взяли из этой базы последовательность гена *TEF1* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/850504>) в формате FASTA (FASTA - это тип записи последовательности ДНК от 5' к 3' концу):

```
atgggtaaagagaagtctcacattaacgttgctggtatcggatcatgctgattctggtaagt
ctaccactaccggtcatttgatttacaagtgtggtggtattgacaagagaaccatcgaaaagtt
cgaaaaggaagccgctgaattaggaaggggtcttcaagtagcgttgggtttggacaagtta
aaggctgaaagagaaagaggtatcactatcgatattgctttgtggaagttcgaaactccaaa
gtaccaagttaccggtattgatgctccaggtcacagagatttcatcaagaacatgattactggta
cttctcaagctgactgtgctatcttgattattgctgggtggtgctggtgaattcgaagccggtatctc
aaggatggtaaacagagaaacacgcttgggtttcaccttgggtgtagacaattgattggt
```

gctgtcaacaagatggactccgtcaaattgggacgaatccagattccaagaaattgtcaagg
aaacctccaactttatcaagaagggttggttacaacccaaagactgttccattcgccaatctct
ggttggaacggtgacaacatgattgaagctaccaccaacgctccatggtacaagggttggg
aaaaggaaaccaaggccggtgctgcaagggttaagactttgttgaagccattgacgccatt
gaacaaccatctagaccaactgacaagccattgagattgccattgcaagatgtttacaagatt
gggtgtattggtactgtgccagtcggttagagttgaaaccggtgtcatcaagccaggtatggttg
ttacttttggcccagctgggtgttaccactgaagtcaagtcggtgaaatgcatcacgaacaattg
gaacaagggtgtccaggtgacaacggttggttcaacgtaagaacggttccggttaaggaaatc
agaagaggtaacgtctgtggtgacgctaagaacgatccaccaagggttgcgcttcttcaa
cgctaccgtcattgtttgaaccatccaggtcaaattctgctggttactctccagtttggattgct
acactgctc **acattgctttagattcgacgaatt**gttggaaaagaacgacagaagatctggta
agaagttggaagaccatccaaagttctgaagtccggtgacgctgcttggcaagttcgttcc
atctaagccaatgtgtgtgaagcttccagtgataaccaccattaggttagattcgctgtcagag
acatgagacaaactgtcgctgtcggtgttatcaagtctgttgacaagactgaaaaggccgcta
aggttaccaaggctgctcaaaaggctgctaagaaataa

Непосредственно из последовательности выписали основу для первого праймера (прямого праймера) - **CGAAAAGTTCGAAAAGGAAG**

Для определения температуры плавления праймеров существуют специальные термодинамические формулы, однако удобнее всего воспользоваться специальными программами. В частности доступной на сайте <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>.

Проанализировали температуру плавления для основы первого праймера - 47.7°C. Это довольно низкая температура. Чтобы сделать ПЦР более надежной мы повысили температуру плавления праймера до 53°C, добавив к его

последовательности дополнительные нуклеотиды в соответствии с последовательностью гена (CC):

CGAAAAGTTTCGAAAAGGAAGCC

Для подбора второго (обратного) праймера выбрал в последовательности область, которой этот праймер будет комплементарен:

ACATTGCTTGTAGATTTCGACGAA

Чтобы получить последовательность самого праймера взяли обратную комплементарную последовательность. Сделали это с помощью сервиса на сайте https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html.

TTCGTCGAATCTACAAGCAATGT

Проанализировали температуру плавления для основы второго праймера – 51,7 °С. Чтобы сделать ПЦР более надежной мы повысили температуру плавления праймера до 54°С, добавив к его последовательности дополнительный нуклеотид в соответствии с последовательностью гена (G):

TTCGTCGAATCTACAAGCAATGTG

В итоге для гена *TEF1* подобрали праймеры, обеспечивающие в ходе ПЦР амплификацию фрагмента длиной 250 п.н. В таблице в разделе 3.2 представлены последовательности этих и других итоговых праймеров к генам *S. cerevisiae*.

3. 5 Отработка метода выделения геномной ДНК из дрожжей

Для демонстрации работы ПЦР требуется качественно выделенная геномная ДНК. Для осуществления выделения нужен удобный, простой и доступный метод, которым можно

воспользоваться на практических занятиях в учебных заведениях. Существует множество различных способов выделения ДНК из дрожжей.

В данной работе был проведен анализ литературы по методике выделения ДНК из дрожжей *S. cerevisiae*, в результате которого был выбран наиболее удобный и доступный метод, не включающий использование токсичных веществ и сложного оборудования. Также этот метод является надежным, то есть при его использовании полученная ДНК находится в хорошем качестве и подходит для проведения ПЦР. Реактивы, использованные в данном методе, доступны и не опасны для человека. Выбранный метод и ссылка на его источник представлены в разделе “Методы, 3.1”.

Дрожжи *S. cerevisiae*, штамм *1GRF-18*, выращивались на богатой питательными веществами среде YEPD. Из трех отдельных колоний была выделена геномная ДНК по описанному методу.

Далее, выделенную геномную ДНК анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле, методика которого описана в разделе “Методы, 3.3”. Результаты электрофореза представлены на рисунке 1.

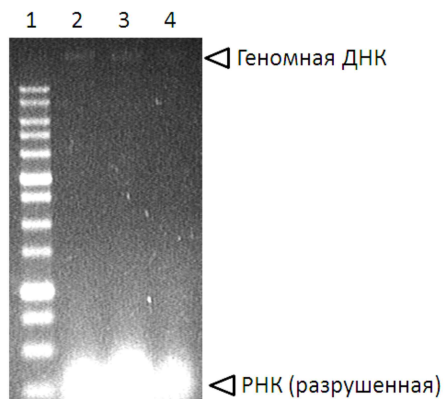


Рис.1. Результаты электрофореза проб геномной ДНК дрожжей *S. cerevisiae*

1 - маркер длин ДНК от компании Евроген, 2 - проба, выделенная из колонии №1, 3 - проба, выделенная из колонии №2, 4 - проба, выделенная из колонии №3.

Было показано, что геномная ДНК выделяется с помощью использованного метода. По результатам электрофореза было также обнаружено, что выделяется некоторое количество разрушенной РНК. Геномная ДНК была далее использована для проведения ПЦР.

3.6 Подбор условий для проведения ПЦР

Используя праймеры, подобранные для соответствующих генов дрожжей *S. cerevisiae*, была проведена ПЦР для каждого из фрагментов четырех разных генов. Для демонстрации эффективности этого метода в каждом случае были использованы образцы ДНК, выделенные отдельно из трех разных колоний штамма *1GRF-18*.

На представленных ниже рисунках приведены результаты анализа ПЦР с помощью метода электрофореза. Показано, что

ПЦР проходит стабильно и эффективно.

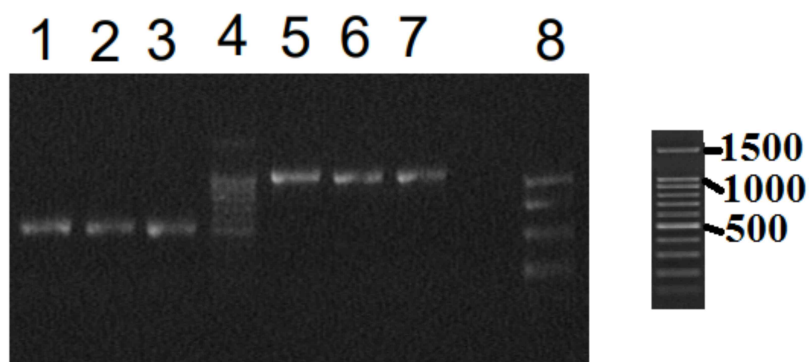


Рис. 2. Результаты ПЦР

1, 2, 3 - амплифицированный на основе ДНК из разных колоний фрагмент гена *ACT1* длиной 500 п.н.; 4 - маркер длин ДНК Евроген (100bp, справа приведено его изображение с сайта фирмы производителя); 5, 6, 7 - амплифицированный на основе ДНК из разных колоний фрагмент гена *TEF1* длиной 1000п.н.; 8 - смесь амплифицированных фрагментов в формате маркера.

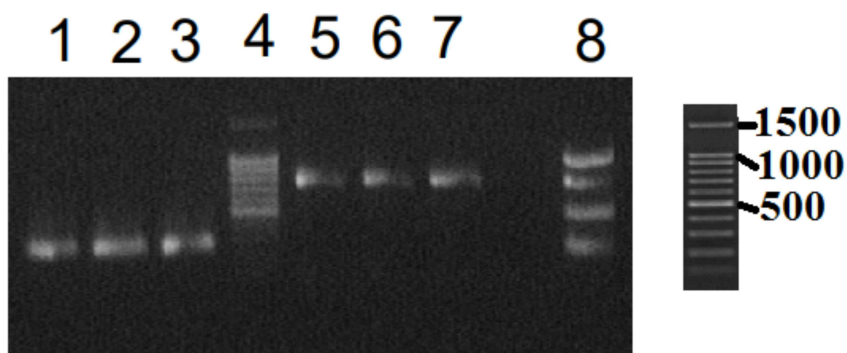


Рис.3. Результаты ПЦР.

1, 2, 3 - амплифицированный на основе ДНК из разных колоний фрагмент гена *TDH1* длиной 250п.н.; 4 - маркер длин ДНК Евроген (100bp, справа приведено его изображение с сайта фирмы производителя); 5, 6, 7 - амплифицированный на основе ДНК из разных колоний фрагмент гена *PKC1* длиной 750

п.н.; 8 - смесь амплифицированных фрагментов в формате маркера.

Амплифицированные фрагменты генов имеют ожидаемые размеры, что свидетельствует об эффективной и точной работе данного метода ПЦР во всех случаях. Более того после проведения демонстрации остатки реакционных смесей можно объединить и получить удобный маркер длин ДНК (рис. 2 и 3 дорожка 8).

Заключение

В данной работе предложены компоненты для проведения ПЦР – пары праймеров специфичные генам дрожжей *S. cerevisiae*. Также был выбран относительно простой и надежный метод для выделения геномной ДНК из дрожжей. Показано, что этот метод и ПЦР с подобранными праймерами хорошо сочетаются и работают эффективно. Они могут стать основой для проведения практических занятий в школах и других учебных заведениях.

Список литературы

1)	Систематика грибов, Н.П. Черепанова
2)	Современная ботаника, П. Рейвн, 1 том
3)	Протокол выделения ДНК: https://www.protocols.io/view/dna-extraction-from-yeast-bp2l61o1dvqe/v1
4)	Deoxyribonucleic Acid Polymerase from the Extreme Thermophile <i>Thermus aquaticus</i> , ALICE CHIEN, DAVID B. EDGAR, AND JOHN M. TRELAK*
5)	The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction, Kary B. Mullis