

<http://yadyra.ru>

**Российский Государственный Аграрный Университет
МСХА имени К.А. Тимирязева**



Кафедра селекции и семеноводства полевых культур

Отчёт о прохождении летней практики

Факультет:

Группа:

Студент:

Руководители:

**Москва
2005**

Оглавление

Краткая история и направления деятельности ИФР РАН и лаборатории экспрессии генома растений.....	3
Предыстория института	3
Институт как центр проведения фундаментальных исследований в стране в области физиологии растений	5
Лаборатория экспрессии генома растений.....	6
Введение	7
Цель работы	8
Литературный обзор.....	8
Фермент Супероксиддисмутаза	8
Образование активных форм кислорода	8
СОД – фермент многих организмов	9
Свойства супероксиддисмутазы	11
Использование ячменя в генетической инженерии	15
Место проведение летней практики	20
Материалы и методы.....	21
Характеристика использованной растительной культуры и условия выращивания.....	21
Микровыделение тотальной ДНК из растительной ткани	21
Состав буфера для гомогенизации.....	22
СТАВ-метод выделения ДНК.....	22
Определение содержания белков и углеводов в выделенной ДНК.....	23
Полимеразная цепная реакция	23
Состав реакционной смеси	24
Температурный режим.....	24
Праймеры	24
Электрофорез ДНК в 1% агарозном геле	25
Приготовление геля.....	25
Приготовление проб ДНК.....	25
Состав ТАЕ-буфера	25
Приготовление компетентных клеток агробактерии	25
Необходимые растворы:	26
Среда для выращивания агробактерии.....	26
Методика трансформации агробактерии	26
Результаты.....	27
Отчет по экскурсиям	28
Экскурсия в ИОГен	28
Экскурсия в НИИСХ ЦРНЗ.....	28
Экскурсия во ВНИИССОК.....	28
Экскурсия во ВНИИК	28
Экскурсия в Институт селекции плодовых культур	28
Включенная практика на плодоовощной станции МСХА	28

Краткая история и направления деятельности ИФР РАН и лаборатории экспрессии генома растений

Предыстория института

На Ботанической улице, рядом с Главным ботаническим садом РАН расположено одно из самых заслуженных учреждений Российской Академии Наук, Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева. В 50-е годы прошлого столетия на пустынной окраине Москвы была построена Станция искусственного климата, позволявшая создавать климат любой природной зоны. В специальных боксах имитировали климат полярных регионов и климат пустынь. Изучали влияние разных условий на растения. К началу 70-х годов около станции был построен уже целый институт, который вместе с Главным корпусом ботанического сада РАН теперь определяет городской вид.

Когда-то на месте института проходила граница между деревнями Марфино и Владыкино. Село Владыкино в XVI в. называлось Вельяминово (по имени владельца – боярина Вельяминова). В 1511 г. село стало принадлежать Богоявленскому монастырю. В 1619-1623 гг. - Пожарским. В 1624 г. оно пожаловано И.И. Шуйскому, который выстроил около 1628 г. новую деревянную церковь во имя Рождества Богородицы. Он завещал село Богоявленскому монастырю. В 1653 г. патриарх Никон выменял село у Богоявленского монастыря на село Покровское Московского уезда и село Бисерово Коломенского уезда и до 1722 г. село принадлежало патриархам. 19 мая 1690 г. село посетил Петр I. С 1722 по 1736 гг. село принадлежало Феофану Прокоповичу, у которого в гостях бывала Анна Иоановна. Нынешняя церковь Рождества Пресвятой Богородицы построена в 1859 г. Гаврилой Матвеевичем Толоконниковым. Около нее была похоронена великая артистка М.Н. Ермолова, прах которой после ликвидации кладбища был перенесен на Новодевичье кладбище.

Село Марфино расположено южнее и граничит с селом Останкино. Большая часть его территории занята Главным ботаническим садом РАН. Память о Марфино сохранилось в названиях небольшой Марфинской улицы. Марфинской управы и Марфинского тепличного комбината. Оно существовало до тех пор, пока не было поглощено Москвой. На территории села находится еще одно знаменитое

здание – Марфинская шарашка. На ул. Академика Комарова сейчас стоит частично закрытое другими зданиями двухэтажное строение. Его построил в 1885 г. Богоявленский монастырь, разместив там приют для бедных сирот – мальчиков духовного звания. В здании была церковь во имя иконы Божьей Матери «Утоли моя печали». После войны там организовали лабораторию («шарашку»), в которой работали А.И. Солженицын, Лев Копелев, и которая описана Солженицыным в романе "В круге первом" и в мемуарах Копелева. Именно в этом исторически знаменательном районе Москвы в 1956 г. был построен «фитотрон», или «Станция искусственного климата», а в 1964 г. переехал с Ленинского проспекта весь Институт физиологии растений Академии Наук.

Физиология растений – это одна из фундаментальных биологических наук, изучающая рост и развитие растений, их жизнедеятельность, основные закономерности существования и взаимодействие с другими организмами. Российская физиология растений как самостоятельная наука стала оформляться в начале XIX столетия. Она имеет большую историю, давние традиции и выдающиеся научные достижения.

Первые работы по истории этой науки выполнил К.А. Тимирязев, давший ряд блестящих исторических и биографических очерков.

Следует назвать также краткие обзоры В.Н. Любименко (1937), Н.А. Максимова (1943, 1945, 1947), работы К.Ф. Калмыкова (1954, 1961, 1962, 1965), Б.П. Строгонова (1967, 1981, 1996) и небольшое число сборников и статей, посвященных деятельности отдельных ученых–физиологов растений. Однако истории физиологии растений в нашей стране еще предстоит раскрыть свои многие тайны.

История физиологии растений в Академии наук СССР вообще не написана, хотя в этом отношении Академия сыграла большую роль в развитии как отечественной, так и мировой физиологии растений, а Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН – основной физиологический центр Академии - в 1990 г. отметил свое 100-летие. История Института – это в значительной степени история русской физиологии растений. Славные традиции Института, его успехи и неудачи в познании жизненных процессов растений, его влияние на отечественную и мировую науку не должны быть забыты. Они должны стать всеобщим

достоянием и послужить школой воспитания молодых физиологов растений.

Помимо фундаментальных исследований, Институт физиологии растений (или сокращено, ИФР РАН) играет важную роль в современной жизни Москвы. Он активно участвует в работах по сохранению зеленых насаждений в столице, оценке экологической обстановки в городе.

В 1967 г. был выпущен труд, посвященный главным образом развитию науки о жизни зеленого растения в Институте физиологии растений и ее влиянию на отечественную науку, подготовленный Б.П. Строгановым, А.Ф. Клешниным и А.Л. Курсановым. Книга «Богиня флоры в Москве» представляет собой переработанный и дополненный Вл.В. Кузнецовым и Н.И. Шевяковой краткий вариант изложения истории Института физиологии растений. С него начинается новая серия изданий «Москва биологическая», посвященная биологическим учреждениям г. Москвы. К этим учреждениям относятся Московский государственный университет им. Ломоносова, Институт лесоведения РАН, Главный ботанический сад РАН, Музей им. К.А. Тимирязева и множество других учреждений и институтов столицы.

Институт как центр проведения фундаментальных исследований в стране в области физиологии растений

В настоящее время в составе Института имеется 25 научных подразделений, в том числе 2 отдела, включающие 4 лаборатории и 4 группы, 13 лабораторий и 3 самостоятельные научные группы. Из 370 человек в институте имеется 250 научных сотрудников, среди которых 35 докторов и 120 кандидатов наук.

Основное научное направление деятельности Института – изучение регуляции и интеграции физиологических процессов в растительных системах различного уровня сложности в ходе онтогенеза и адаптации. Разрабатываются следующие крупные проблемы современной физиологии растений:

1. физиологические и молекулярные основы адаптации растений в связи с экологическими стрессами и глобальными биосферными явлениям
2. организация донорно-акцепторных систем и интеграция функций в целом растении на уровне межклеточных взаимодействий, биомембран, цитоскелета, рецепции и трансдукции сигналов
3. регуляция экспрессии генома в процессах клеточной дифференцировки и онтогенеза растений

4. физиология, биохимия и экология фотосинтеза, дыхания и фиксации азота как теоретическая основа продукционного процесса
5. биология фототрофных и гетеротрофных клеток растений как основа развития инновационных биотехнологий, сохранения метаболического и генетического биоразнообразия растений, создание и поддержание генетических коллекций и криосохранения редких и исчезающих видов растений.

Лаборатория экспрессии генома растений

Руководитель – профессор О.Н. Кулаева.

Лаборатория образована в 1971 г. по инициативе академика А.Д. Курсанова с целью усиления в стране работ по изучению молекулярного действия фитогормонов и их влияния на экспрессию генов. Это направление является в настоящее время одним из центральных в мировой науке о растениях, т.к. оно создает теоретическую базу для понимания регуляции онтогенетических программ растения, а также помогает решить задачи биотехнологии растений.

Лаборатория концентрирует свое внимание на изучении гормонов цитокининового типа, учитывая их взаимодействие с другими фитогормонами. Лаборатория является одним из центров изучения механизма действия цитокининов. Интерес лаборатории к цитокининам определяется, во-первых, их исключительной важностью в регуляции жизни растений (индукция деления клеток, дифференцировки побегов, формирования хлоропластов, задержки старения листьев и др.) и, во-вторых, тем, что сотрудниками лаборатории была открыта сигнальная роль цитокининов в системе корень - лист.

Работа лаборатории проводится по трем основным направлениям, которые тесно связаны друг с другом:

1. Рецепция и трансдукция цитокининового сигнала, включая цепь событий от связывания гормона с рецептором до регуляции экспрессии генов.
2. Проблема старения и его задержки цитокининами, включая генетические программы и гормональные сигналы.
3. Молекулярные аспекты биогенеза хлоропластов, роль цитокининов и их антагонистов в его регуляции.

Введение

Вступающий в силу XXI век именуют «веком биологии» с той же уверенностью, с какой называют прошедшее столетие «веком атомной физики». Одну из важнейших ролей в биологии нового тысячелетия, несомненно, будет играть генетическая инженерия растений. В условиях ограниченности земельных ресурсов и почти исчерпанных возможностях увеличения урожайности за счет традиционных факторов интенсификации земледелия (химизации, механизации, мелиорации земель) и методов селекции, внедрение новейших достижений биотехнологии и, в частности, генетической инженерии растений, является реальным направлением повышения продуктивности земледелия. Попытки селекционеров создать комплексно устойчивые сорта и гибриды сельскохозяйственных культур только традиционными методами селекции не привели к желаемым результатам. Генетическая инженерия позволяет наделить растение такими свойствами, которые тяжело получить селекцией. Это осуществляется путем конструирования *in vitro* функционально активных генетических структур, содержащих гены различных организмов, и введения таких конструкций в геном растения.

Генетически модифицированные растения широко применяются в таких отраслях биологии, как молекулярная биология, генетика, физиология растений для выяснения структурно-функциональных отношений между элементами как на клеточном, так и на организменном уровнях организации живой материи.

Однако область применения генетически модифицированных растений не исчерпывается значением для фундаментальной науки. Трансгенные растения используют в медицине – в качестве продуцентов важных пищевых и лекарственных веществ (белков, ферментов, антител, вакцин, низкомолекулярных соединений). Одним из новейших направлений является фиторемедиация – использование трансгенных растений для очистки почв, грунтовых вод от загрязнителей: тяжелых металлов, радионуклидов и др. Не менее интересен и другой аспект работ – получение трансгенных растений с измененными декоративными свойствами.

Но самое широкое применение генетически модифицированных растений – в сельском хозяйстве. Ключевой задачей в развитии сельского хозяйства является

увеличение производства зерна. В этой области усилия генетиков и биотехнологов направлены на получение растений с повышенной устойчивостью к биотическим и абиотическим факторам среды. Учеными были получены генетически модифицированные растения ценных сельскохозяйственных культур (соя, кукуруза, рис, хлопчатник и др.), устойчивых к гербицидам, низким температурам, засухе, насекомым, вирусам. Значительный интерес представляет получение растений, устойчивых к окислительному стрессу, как постоянному и обязательному компоненту всех видов стресса. Методами генетической инженерии можно встраивать в геном растений те гены, экспрессия которых прямо или косвенно препятствует окислительному стрессу, развивающемуся в неблагоприятных условиях среды.

Цель работы

Изучение методов анализа трансгенных растений на примере выявления генов Fe-SOD, Gus и Гер у ячменя.

Литературный обзор

Фермент Супероксиддисмутаза

Образование активных форм кислорода

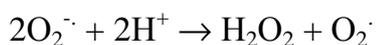
Образование активных форм кислорода в клетке происходит в ходе аэробного дыхания и фотосинтеза. Существует некоторая вероятность того, что первичный продукт восстановления кислорода – супероксидный анион-радикал покинет пределы дыхательной или фотосинтетической цепи и окажется в цитозоле. Эффективность этого события возрастает при «перегрузке» электронтранспортной цепи, когда возрастает восстановленность ее переносчиков. В дыхательной цепи донором электрона для кислорода может служить семихинонная форма убихинона. В фотосинтетической электронтранспортной цепи значительная часть $O_2^{\cdot -}$ (супероксид анион радикал) возникает на уровне акцепторов фотосистемы I и ферредоксина. В фотосистеме II одноэлектронное восстановление кислорода могут осуществлять пластохинон и пластоцианин.

В фотосинтетических реакциях возможна так же миграция энергии с возбужденной молекулы пигмента (хлорофилла) на кислород и перевод его в активное синглетное состояние $^1\text{O}_2$. Этот процесс может привести к деструкции фотосинтетических мембран.

Биологические системы адаптированы к аэробным условиям. Они защищены от токсического действия активных форм кислорода ферментными системами, антиоксидантами и тушителями синглетного кислорода.

Концентрация перекиси водорода в клетке контролируется каталазой, разлагающей перекись без образования активных продуктов, и пероксидазами, использующими перекись водорода для окисления всевозможных субстратов. Важную роль в удалении перекиси водорода из хлоропласта играет аскорбат-пероксидаза.

Антиоксиданты – вещества, защищающие биологические системы от окисления за счет взаимодействия со свободными радикалами. Одну из групп антиоксидантов образуют соединения, эффективно взаимодействующие с активными формами кислорода. Они резко снижают концентрацию супероксидных радикалов в системе, катализируя реакцию дисмутации (супероксиддисмутатаза), с образованием перекиси водорода и кислорода в триплетном состоянии:



Скорость реакции очень высока, порядка $2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$.

СОД – фермент многих организмов

Супероксиддисмутатаза является важнейшим элементом антиоксидантной защиты организма. Это фермент состоит из двух субъединиц с общей молекулярной массой 32 кДа, содержащий по одному атому меди и цинка (существует также марганец-содержащая СОД, обнаруженная в печени крысы и человека; в бактериальных клетках и клетках некоторых растений обнаружена железо-содержащая СОД).

Супероксиддисмутатаза обнаружена у хемотрофных прокариот, использующих O_2 (облигатно и факультативно аэробных форм), а также у изученных представителей из групп фотосинтезирующих прокариот. Среди анаэробов фермент найден у подавляющего большинства аэротолерантных форм. Исключение составляют некоторые молочнокислые бактерии, у этих

молочнокислых бактерий функцию нейтрализации O_2 выполняют ионы Mn^{2+} . В клетках некоторых видов молочнокислых бактерий не найдено ни супероксиддисмутазы, ни высоких концентраций Mn^{2+} . Эти виды характеризуются очень высокой чувствительностью к O_2 .

Число организмов с не выявленной до сих пор супероксиддисмутазой очень мало.

Супероксиддисмутаза – фермент, содержащий в активном центре в качестве простетической группы ионы металла. У прокариот – это атомы марганца и/или железа. Большинство изученных супероксиддисмутаз построено из двух идентичных субъединиц, каждая из которых содержит по одному атому металла. Fe- и Mn-ферменты сходны по аминокислотной последовательности. Попытки выявить связь между физиологическими и иными особенностями организмов и металлоформой содержащегося в них фермента не привели к определенному заключению. И та и другая формы супероксиддисмутазы обнаружены у представителей грамположительных и грамотрицательных прокариот, среди фото- и хемотрофов, облигатных анаэробов, аэробов и факультативно анаэробных форм. Более того, обе металлоформы супероксиддисмутазы могут присутствовать у одного организма и даже входить в состав молекулы одного фермента. Для некоторых видов показано, что синтез того или иного типа фермента зависит от наличия ионов металла в среде культивирования.

Супероксиддисмутаза изученных хемотрофных прокариот – не связанный с мембранами фермент, локализованный в цитоплазме. У *E. coli*, в клетках которой обнаружены Fe-, Mn- и Fe/Mn-формы фермента, Fe-супероксиддисмутаза локализована в периплазматическом пространстве, а Mn-содержащий фермент — в цитоплазме. В связи с этим высказывается предположение, что металлоформы фермента играют разную роль в защите клетки от O_2^- : Fe-содержащий фермент защищает клетку от экзогенных супероксидных анионов, а Mn-содержащий — от эндогенных.

Супероксиддисмутаза найдена у всех цианобактерий. В клетках *Anacystis nidulans* (*Synechococcus*) Fe-супероксиддисмутаза, составляющая до 90% от общего количества фермента, локализована в цитозоле клетки, а Mn-содержащая форма — в тилакоидах. Функция последней формы фермента сводится, вероятно, к

перехвату ионов O_2^- , возникающих в процессе фотосинтетического электронного транспорта.

Свойства супероксиддисмутазы

Было показано, что организмы различной степени сложности, утилизирующие кислород в процессах обмена, содержат ферменты, обладающие СОД-активностью. Ферменты различаются по первичной структуре и по природе металлов, входящих в активный центр. Cu,Zn-СОД можно рассматривать как эукариотический цитозольный фермент, Fe-СОД и Mn-СОД - как прокариотические ферменты, однако Mn-СОД содержится в митохондриальном матриксе эукариот; в ряде бактерий обнаружена Cu,Zn- СОД, а в некоторых растениях - Fe-СОД. СОД являются в основном внутриклеточными ферментами и лишь небольшая часть активности обнаружена в внеклеточных жидкостях млекопитающих в виде гликозилированного тетрамера Cu,Zn-СОД.

По активности СОД, органы млекопитающих различаются в десятки раз. Наивысшая активность Cu,Zn- и Mn-СОД обнаружена в печени. Высокой активностью Cu,Zn-СОД отличаются эритроциты, что позволяет использовать кровь как источник для выделения и очистки фермента.

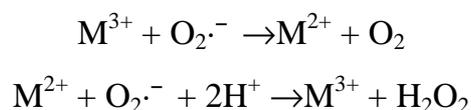
Cu,Zn-СОД обладает наибольшей активностью. Активность фермента не зависит от рН среды в области 5-9, в то время как активность Mn- и Fe-СОД снижается при значениях рН ниже нейтральных.

Для Cu,Zn-СОД из различных источников характерна микрогетерогенность, выявляемая при электрофорезе и изоэлектрофокусировании. Cu,Zn-СОД из печени цыпленка обнаруживает несколько форм с величинами рН в интервале 6,75-5,35. Множественные формы фермента являются, по-видимому, результатом посттрансляционной окислительной модификации, не затрагивающей активный центр.

Величина рН для Mn-СОД составляет 6,6 и для Fe-СОД - 4,9. Три вида СОД различаются также по чувствительности к цианиду. Цианид ингибирует только Mn-СОД. Но в достаточно высоких, нефизиологических концентрациях ингибирует Cu,Zn-СОД и Fe-СОД. Mn-СОД устойчива к действию перекиси водорода. Ферменты различаются также по степени ингибирования азидом.

Полная аминокислотная последовательность Cu,Zn-СОД установлена для ферментов по крайней мере из десятка различных источников. Cu,Zn-СОД представляет собой гомодимер с молек. массой 32 кДа. Сравнение аминокислотной последовательности СОД из различных источников показывает высокую степень консервативности структуры; так для Cu,Zn-СОД млекопитающих гомология достигает 70-80%, для фермента из дрожжей - 50-60%, однако для бактериальных ферментов гомология с эукариотическими ферментами не превышает 30%.

В каталитическом центре фермента происходит ряд реакций, затрагивающих ионы металлов:



В Cu-связывающий центр всех ферментов входят 4 His, в Zn-связывающий центр - 2 His и 1 Asp. Постоянными являются также Arg-141, существенный для каталитической активности, и единственный на субединицу дисульфидный мостик Cys-58 и 160. Установлено, что только СОД высших организмов имеют ацетилированную Т-концевую аминокислоту. Для Fe-СОД *E.coli* показано, что металлсвязывающие центры входят His26, His73, Asp156, His160, и фермент представляет собой димер, хотя у видов *Aquifex pyrophilus* и *Pseudomonas ovalis* Fe-SOD фермент – тетрамер.

Кристаллическая структура Cu,Zn-СОД из эритроцитов быка была установлена в 1982 г. Д.Тэйнером. Каждая субединица Cu,Zn-СОД имеет структуру бочонка (бета-барреля), образованного 8 антипараллельными бета-слоями, и содержит 3 выступающие внешние петли. Димер представляет собой удлинённый эллипсоид (33, 67, 36 А). Около 9% внешней поверхности каждой субединицы приходится на область контакта. В контакте участвуют первая и последние пары бета-слоев бета-барреля и области двух петель на участках 47-82 и 100-112 остатков.

Бета-Баррель асимметричен: бета-слои с 5 по 8 более короткие и с меньшим числом водородных связей, чем слои 1-4. Петли различаются по размерам и структуре. Наибольшая петля содержит дисульфидный мостик и область центра связывания Zn. Дисульфидная связь ковалентно соединяет большую петлю с

началом бета-слоя 8. Вторая петля имеет небольшой альфа-спиральный участок. Самая маленькая петля имеет форму греческого ключа.

Расстояние между атомами Cu активных центров составляет 33,8 Å. Разделение двух активных центров в пространстве и их кажущаяся идентичность позволяют предположить, что сильное димерное взаимодействие обеспечивает скорее структурную стабильность СОД, а не ферментативную функцию.

Cu(II) и Zn(II) расположены на дне глубокого, узкого канала на расстоянии 6,3 Å: Zn погружен полностью, Cu более открыта и доступна для растворителя. Боковая цепь His-61 образует мостик между Cu и Zn. Лигандами Cu являются His-44, His-46, His-61 и His-118, лигандами Zn - His-61, His-69, His-78 и Asp-81. Положение металлсвязывающих остатков стабилизировано сложной сетью водородных связей. Молекулярная поверхность канала активного центра образована 18 аминокислотными остатками, 16 из которых повторяются для СОД из различных источников. Е. Гетцофф в 1992 г получил мутантную Cu,Zn-СОД человека с заменой в канале активного центра Glu-132 и Glu-133 на Gln-остатки. Нейтрализация отрицательных зарядов Glu приводит к существенному увеличению скорости реакции дисмутации, по-видимому, за счет снижения электростатического барьера и увеличения скорости диффузии кислорода к активному центру. На дне узкой части канала имеются две ямы, в одной из которых располагается Cu, в другой - молекула воды. Поскольку структура Cu,Zn-СОД из различных источников отличается высокой консервативностью аминокислотных остатков в области активного центра, структуру Cu,Zn-СОД из эритроцитов быка, по-видимому, можно распространить на всю группу Cu,Zn-СОД.

Mn- и Fe-СОД впервые выделены из *E.coli*. Оба фермента обычно содержатся в виде гомодимера с молекулярной массой субъединицы 22 кДа. Однако встречаются бактерии, у которых Mn- и Fe-СОД присутствуют в виде тетрамера. В митохондриях эукариот Mn-СОД находится в виде гомодимера, гомологичного бактериальным ферментам, что хорошо согласуется с представлением о прокариотическом происхождении митохондрий. Анаэробы или анаэробно растущие факультативные бактерии обычно содержат Fe-СОД; при переходе к аэробному росту происходит индукция Mn-СОД. Fe- и Mn-СОД из различных

источников имеют значительную гомологию. Рентгеноструктурный анализ Mn-СОД из *E. thermophilus* и из *B. stearothermophilus*, Fe-СОД из *T. acidophilus*, *P. ovalis* и *E. coli* показал, что ферменты имеют сходную структуру. В структуру мономера Mn-СОД из *D. stearothermophilus* входят участки альфа-спиралей кислород – между Tyr-34 и His-26. Mn в активном центре связан с остатками His-26, His-81, His-167 и Asp163 и окружен гидрофобными остатками – тремя Tyr, тремя Trp и двумя Phe. Такое окружение должно способствовать стабилизации Mn(III), который в водной среде является сильным окислителем.

Каждая субединица Fe- и Mn-СОД состоит из двух доменов. Один домен содержит альфа-спирали, второй – альфа-спирали и бета-слои. Металлсвязывающий центр расположен между двумя этими доменами. Антипараллельные альфа-спирали альфа1 и альфа3 расположены под углом 35°. Спиральный сегмент альфа2 имеется в Mn-СОД и отсутствует в Fe-СОД. Фрагменты альфа1 и альфа3 «поставляют» по одному остатку His в качестве лигандов металла, второй домен - 1 His и 1 Asp. Второй домен можно представить как сэндвич с тремя спиральными участками (альфа4, альфа5, альфа6), бетаслоем в середине и вытянутой неспиральной цепью с другой стороны. Внутридоменная петля соединяет альфа3 с альфа4, благодаря этому лиганды металла принадлежат обоим доменам, и металл стабилизирует структуру фермента.

Молекулярный механизм действия Cu,Zn-СОД, основанный на данных рентгеноструктурного анализа и биохимических данных, предложен Д.Тэйнером и др. в 1983 г. Согласно этой модели радикал кислорода – связывается с Cu-центром таким образом, что один атом кислорода вытесняет молекулу воды из Cu-центра, а второй атом кислорода образует водородную связь с гуанидиновым азотом Arg-141. Связанный кислород восстанавливает Cu(II) до Cu(I) с одновременным расщеплением связи между His-61 и Cu. Кислород выделяется, один из атомов азота имидазольного кольца His-61 протонируется, а другой остается связанным с Zn. Затем второй радикал кислорода связывается с Cu(I) таким образом, что один атом кислорода образует водородную связь с протонированным атомом азота имидазольного кольца His-61, в то время как другой атом кислорода снова образует водородную связь с Arg-141. Перенос электрона от Cu(I), сопряженный с переносом протона от His-61, приводит к образованию Cu- гидропероксида. Второй

протон поступает от связанной в активном центре воды и образуется нейтральная молекула H_2O_2 .

В ранних исследованиях иону Zn в основном отводилась роль стабилизатора структуры фермента. Однако в последнее время высказываются предположения о его участии в катализе. В пользу этого говорят следующие данные. Так, активность Cu,Zn-СОД не зависит от рН среды в области 5-9, а активность СОД, лишенной Zn, зависит от рН, причем величина кажущейся рК составляет ~6,9, что может отражать рК His- 61. Далее, в Cu,Zn-СОД редокс-потенциал Cu равен 0,42 В, тогда как в водном растворе он составляет 0,17 В, а в Cu(II)-гистидиновых комплексах ~0,01 В. На первой стадии реакции происходят изменения геометрии комплекса Zn с лигандами. На второй стадии Zn обеспечивает протонизацию His-61, образующего мостик между Cu и Zn, и направляет этот протон для образования водородной связи и последующего переноса на второй кислородный радикал, завершая таким образом каталитический цикл. Zn(II), связанный с His-61, увеличивает рК NE2 до ~13.

СОД характеризуется необычайной структурной стабильностью и является одним из наиболее термостабильных глобулярных белков. Фермент активен в 8 М мочеvine; он не реагирует с дитионитробензоатом (ДТНБ) в 8 М гуанидингидрохлориде при рН 11,4 (24) в течение 24 часов. При выдерживании в 86%-ном этаноле при 24 в течение трех часов фермент теряет активность только на 10%.

В условиях нормального обмена супероксиддисмутаза поддерживают стационарную концентрацию супероксидных радикалов на определенном уровне, защищая тем самым клеточные структуры от повреждающего действия как самих радикалов кислорода, так и от появления гидроксильных радикалов, которые могут образовываться из кислорода и H_2O_2 .

Использование ячменя в генетической инженерии

В природе зерновые культуры часто подвергаются различным стрессам, что снижает урожайность. На уровне целого растения стресс проявляется через снижение интенсивности фотосинтеза и скорости роста. На молекулярном уровне негативное действие стрессовых условий заключается в окислительном повреждении биомолекул, как результат дисбаланса между образованием и

нейтрализацией АФК. Основные исследования биотехнологов направлены на создание улучшенных и принципиально новых генотипов сельскохозяйственных растений, обладающих повышенной устойчивостью к биотическим и абиотическим стрессовым факторам среды при сохранении и повышении их продуктивности и качества. На сегодняшний день при помощи самых разнообразных методов трансформации созданы трансгенные растения практически всех зерновых культур. Так сложилось, что ячмень (*Hordeum vulgare* L.) стоит особняком в списке достижений биотехнологов. Ячмень – важная зерновая культура с очень большим геномом, составляющим около 5000 Mb. Исследования по организации генома были ограничены, главным образом, генетическими маркерами и рассеянными данными сиквенированных частей генома. Сравнение 25-30% последовательностей геномов риса и ячменя показало, что отличаются они обширными хромосомными перестройками, включающими инверсии и межхромосомными транслокациями, характерными для генома ячменя. Оказалось также, что 72% однокопийных последовательностей генома ячменя также представлено и у риса, подтверждая, что большой геном ячменя возник за счет неравного кроссинговера (перекреста хромосом) и экстракопирования повторностей ДНК, но не из-за дупликации однокопийных последовательностей. Основное количество ячменя (70 % и более) используется на кормовые цели, используется в пивоваренной, пищевой, технической, фармацевтической промышленности, солома ячменя является наиболее полноценной по сравнению с другими зерновыми культурами.

Работы по введению чужеродных фрагментов ДНК в геном ячменя стали возникать в конце 80-х – начале 90-х годов. Протопласты, полученные из клеток мезофилла, алейронового слоя, ткани эндосперма или даже просто клеточной суспензии были использованы для демонстрации проникновения и экспрессии экзогенной ДНК посредством электропорации или применении полиэтиленгликоля. Применялся также и метод биобаллистики – частички инертного металла (вольфрам, золото или платина) с нанесенной на них целевой плазмидой использовались для встраивания и экспрессии чужеродной ДНК в геном клеток различных тканей ячменя, таких как эндосперм, каллус, незрелый зародыш, а также суспензии клеток. К середине 90-х годов сообщалось только об одной удачной работе по стабильной трансформации ячменя, в которой экзогенная ДНК

вводилась в протопласты с помощью полиэтиленгликоля, однако нормальных фертильных растений получено не было. В 1994 году Wan и Lemaux опубликовали работу, в которой впервые удалось получить большое число фертильных трансгенных растений ячменя. Трансформанты получали, обстреливая различные ткани этого злака – незрелые зародыши, молодой каллус, образовавшийся из зародышей, а также каллус, полученный из микроспоры. Из этих тканей авторы получили 91 независимо трансформированную линию каллуса, 36 из которой дали начало более 500 регенерантам фертильных растений ячменя, однако 41 линия образовала только растения-альбиносы. При помощи гибридизации ДНК подтверждено, что введенные гены стабильно передаются следующему поколению растений. Также были получены трансгенные растения ячменя с бактериальным геном β -глюканазы. В протопласты алейронового слоя под действием полиэтиленгликоля встраивалась конструкция с этим геном, наблюдалась его стабильная экспрессия не только у T_0 , но и у T_1 и T_2 поколений.

Трансформация при помощи бактерий *Agrobacterium tumefaciens* применялась большей частью для двудольных растений. Potrykus в 1990 году заключил, что этот метод неприменим для однодольных растений. Автор предположил, что в геноме двудольных присутствуют специфические сайты для встраивания T-ДНК, которых нет в геноме однодольных, однако сейчас показано, что встраивание происходит негомологично с помощью белков агробактериального кодирования, а также белков клетки-хозяина, обладающих нуклеазной и лигазной активностью, переносимых в растительную клетку вместе с T-ДНК и облегчающих ее встройку в геном. Механизм переноса T-ДНК на сегодняшний день достаточно исследован, чтобы утверждать, что не существует видимых препятствий для проникновения и встраивания T-ДНК в геном однодольных. Единственным требованием к повышению эффективности процесса является внесение веществ – активаторов вирулентности агробактерий, таких как ацетосерингон и других веществ фенольной природы. Это связано с тем, что природными хозяевами агробактерий являются двудольные, накапливающие эти вещества в вакуолях, тогда как однодольные либо не накапливают, либо накапливают эти вещества в недостаточных количествах для активации вирулентности агробактерий при поранении ткани. Для ячменя этот метод трансформации пробовали применить

некоторые исследователи. Такой стойкий интерес именно к этому методу объясним рядом преимуществ перед остальными, включающими целенаправленную доставку Т-ДНК в ядро, потенциально низкое число встраиваемых копий, а также интеграция преимущественно в транскрипционно активные участки хромосомы. В своих работах авторы наблюдали агроинфекцию и перенос Т-ДНК, однако интеграция в геном не подтверждалась. Tinday и McElroy в 1997 году впервые удалось подтвердить эффективность этого метода трансформации для ячменя. Из 1282 эмбрионов было получено 54 трансформированные линии, из которых получены растения. Эффективность трансформации составила 4,2%. Число копий Т-ДНК в различных линиях варьировало от одного до, по меньшей мере, десяти. Гены *bar* и *gus* передавались и экспрессировались у потомков следующего поколения. Стоит заметить, что для получения трансформантов не потребовалось активации вирулентности бактерий ацетосерингоном, однако для поранения ткани незрелых зародышей применялась биобаллистика – обстрел частичками золота. Свой успех авторы объясняют использованием «супервирулентного» штамма *Agrobacterium*, а также удачным подбором трансформируемого материала, способного к активному клеточному делению и, как следствие, эффективной регенерации.

За последние годы количество исследований в области получения трансгенных растений ячменя значительно возросло. И если ранее все эксперименты сводились к простому получению трансгенных растений, то именно в последние годы стали проводиться работы по усилению устойчивости ячменя к различного рода стрессам. Были получены трансформанты при бомбардировании каллуса из микроспоры ячменя. Трансгены несли конструкцию, содержащую гены *bar* (именно по этому гену был проведен первичный скрининг растений на устойчивость к гербициду), а также ген *Vst1*, позволяющий растению синтезировать чужеродный фитоалексин – ресвератрол, улучшающий устойчивость растений к грибковым патогенам. В результате несколько линий растений оказались более устойчивы к поражению *Botrytis cinerea*. При совместном использовании сразу двух методов – агробактериального и электропорации были трансформированы незрелые зародыши ячменя сорта Golden Promise геном *Rpg1* (клонированный из генома сорта Morex), повышающий устойчивость к линейной

ржавчине (*Puccinia graminis*). Некоторые из 42 полученных трансгенных растений проявляли более высокий уровень устойчивости, чем сорт-донор гена устойчивости. Заметной устойчивостью к линейной ржавчине обладали, в основном, растения с одной копией встраиваемого гена. Потомство от нескольких трансформантов показало расщепление, соответствующее законам Менделя – 3 : 1.

Работа Manoharan и Dahleen интересна тем, что в качестве объекта исследований они использовали коммерческий сорт ячменя, отличающийся слабой способностью к регенерации. В результате авторы не только получили 85 трансгенных растений (с генами *bar* и *gus*) от 13 линий каллуса, но и впервые разработали регенерационную систему для коммерческих сортов ячменя, что, вероятно, может сулить некоторую экономическую выгоду производителям. И только в 2004 году появилось сообщение о получении трансгенных растений с помощью только агробактериальной трансформации. При культивировании незрелых зародышей четырех разных сортов ячменя (*Golden Promise*, *Sloop*, *Chebec*, *Harrigton*) с *Agrobacterium tumefaciens*, несущих плазмиду с генами *bar* и *gfp*. GFP оказался удобным маркером для оценки эффективности трансформации при образовании стабильно трансформированного каллуса и регенерации растений из него. Эффективность трансформации каллуса составила 47- 76%. Регенеранты появились от всех четырех сортов, но только для сорта *Golden Promise* частота регенерации была заметно выше, подтверждая, что генотип является важной определяющей регенерационных способностей ячменя.

Нестабильность экспрессии чужеродных генетических элементов является общим феноменом у генетически модифицированных видов двудольных растений. Замолкание встроенных генов у потомства может превышать 50%. Инактивация экспрессии может происходить и у растений с единичной копией трансгена, однако это происходит реже, чем при встраивании в геном нескольких копий. На нестабильность экспрессии влияет и ряд других факторов, включающих присутствие инвертированных повторов в участке встраивания, оверэкспрессия трансгена, природа сайта инсерции, АТ/ГЦ – состав встраиваемого гена, а также факторы окружающей среды. Эти факторы могут действовать на различные механизмы транскрипционного или посттранскрипционного замолкания генов. В большинстве случаев замолкание встроенных генов коррелирует с многокопийным

встраиванием, перестройками последовательностей и случайной природой интеграции в геном. Многочисленные копии вызывают нестабильность их экспрессии путем инактивирования друг друга и растительных генов эпигенетическими механизмами, названными «косупрессия» или «замолкание генов». Это может быть вызвано также и гомологической рекомбинацией. По этим причинам уменьшение числа копий встраиваемых генов и упрощение их расположения должно обеспечить сохранение и экспрессию чужеродных фрагментов в геноме растения. Применение метода агробактериальной трансформации ведет к снижению количества встраиваемых копий, а также увеличению числа трансформантов с единственной копией чужеродного гена, хотя и не решает полностью проблемы замолкания встроенных фрагментов. Для увеличения количества трансгенных растений, несущих одну копию гена применяется также метод «агролистики», объединяющий биобаллистику и агробактериальную трансформацию и ингибиторы рекомбинации. Существуют и другие подходы к решению этой задачи. Например, использование рекомбинационной системы *cre/lox* бактериофага или системы, основанной на транспозонах кукурузы – активаторе (Ac) и диссоциаторе (Ds). В этой системе экзогенный фрагмент встраивается между неавтономными инвертированными повторами Ds-элемента и перемещается в различные участки генома в результате действия Ac-транспозазы.

Место проведение летней практики

Практическая работа проводилась в Лаборатории Экспрессии Генома (ЛЭГ) Института Физиологии Растений (ИФР) РАН, руководимой доктором биологических работ, профессором О.Н. Кулаевой. Научным руководителем работы является доктор биологических наук В.В. Кузнецов.

Материалы и методы

Характеристика использованной растительной культуры и условия выращивания

В качестве объекта в работе были использованы семена двух сортов ячменя – Луч и Golden Promise. Зерно сорта Луч средней крупности, растения отличаются устойчивостью к полеганию и максимальной урожайностью 92 ц/га. Особенностью сорта Луч является его высокая устойчивость к холоду – ячмень начинает прорастать при температуре 1–3 °С, всходы ячменя переносят заморозки до -6°С, а после предварительной закалки выдерживают температуру ниже -10°С. Этот сорт был специально выведен для выращивания в северо-восточных районах России. Незрелые зародыши этих сортов использовались для трансформации.

Незрелые зародыши (15 дневные) культивировались *in vitro* в условиях искусственного климата в инкубационных комнатах при $26 \pm 1^\circ\text{C}$, влажности 70%, освещенности 2.000 - 3.000 люкс и длине светового дня 16 часов.

Микровыделение тотальной ДНК из растительной ткани

1. Навеску растительного материала (150 мг) растирали до состояния белого порошка в эппендорфах (1,5 мл), охлажденных в жидком азоте.
2. В эппендорф заливали 0,5 мл буфера и ресуспендировали путем встряхивания в течении 5-7 мин.
3. Добавляли 0,5 мл фенол-хлороформа.
4. Смесь снова встряхивали.
5. Центрифугировали при 12 000 об/мин на микроцентрифуге в течение 5 мин.
6. Супернатант переносили в чистый эппендорф (1,5 мл) и добавляли 1 $\mu\text{л}$ РНКазы.
7. Встряхивали эппендорф и ставили в термостат при 37° на 1 час.
8. Добавляли 0,5 мл фенол-хлороформа и встряхивали смесь.
9. Центрифугировали при 12 000 об/мин на микроцентрифуге в течение 5 мин.
10. Далее проводили обработку равным объемом хлороформа для экстракции остатков фенола.

11. ДНК из водной фазы осаждали добавлением 3М ацетата натрия рН 5.5 (1/10 часть от общего V, т.е. 50 μ л) и равным объемом изопропилового спирта (500 μ л). Осторожно покачивали эппендорф, перемешивая компоненты смеси. При высокой концентрации ДНК выпадала «медуза».
12. Выдерживали на холоде (4°C) в течение 1 часа (либо оставляли на ночь).
13. Центрифугировали при 12 000 об/мин на микроцентрифуге в течение 3 мин.
14. Осадок промывали 500 μ л изопропиловым спиртом.
15. Центрифугировали при 12 000 об/мин на микроцентрифуге в течение 3 мин.
16. Осадок ДНК промывали 80% этиловый спиртом и подсушивали до исчезновения запаха спирта.
17. Растворяли в 70 μ л H₂O. Полученную пробу ДНК после оценки концентрации на электрофорезе использовали для ПЦР-анализа.

Состав буфера для гомогенизации

Компоненты буфера	Исходная концентрация	Доля компонента от конечного объема буфера	Мл компонента / 10 мл буфера
50 mM Трис-HCl буфер (рН 7,5)	1 M	1/20	0,5
150 mM NaCl	4 M	1/26,6	0,376
10 mM ЭДТА	0,2 M	1/20	0,5
2% SDS	10%	1/5	2
2% Sarcosyl	35%	1/17,5	0,571
Вода			6,052

СТАВ-метод выделения ДНК

1. 100 мг гомогенизированного образца поместить в стерильную пробирку, добавить 500 мкл СТАВ-буфера (20г СТАВ/L, 1,4 M NaCl, 0,1 M Tris/HCl, 20 mM EDTA), перемешать и инкубировать в течение 30 минут при 65°C.
2. Центрифугировать 10 минут при 12 000.
3. Верхнюю фракцию перенести в новую пробирку, содержащую 200 мкл хлороформа, перемешивать 30 секунд.
4. Центрифугировать 10 минут при 11 500.
5. Супернатант перенести в новую пробирку и добавить 2 объема СТАВ-раствора (5 г СТАВ/L, 0,04 M NaCl).
6. Смесь инкубировать 60 минут при комнатной температуре.
7. Центрифугировать 5 минут при 12 000.

8. Слить супернатант, осадок растворить в 350 мкл NaCl (1,2 М), добавить 350 мкл хлороформа, перемешивать 30 секунд.
9. Центрифугировать 10 минут при 12 000.
10. Водную пробу перенести в чистую пробирку, добавить 0,6 объема изопропанола, перемешать.
11. Центрифугировать 10 минут при 11 500.
12. Слить верхнюю фракцию, добавить 500 мкл 70% этанола, осторожно перемешать.
13. Центрифугировать 10 минут при 11 500.
14. Слить супернатант, высушить осадок и растворить снова в 100 мкл стерильной деионизированной воды.

Определение содержания белков и углеводов в выделенной ДНК

1. Растворяем 5 мкл ДНК в 3 мл H₂O
2. Измерение против воды
3. Измеряем раствор при разных длинах волн (230, 260, 280 нм) => узнаем содержание нуклеиновых кислот, белков и полисахаридов
4. Вычисляем отношение н.к./белок, н.к./полисахариды
5. В норме отношения должны быть 1,7 – 2,0
6. Определяем концентрацию н.к. исходя из того, что 1 оптическая единица = 50 мг/мл и с учетом разбавления

Полимеразная цепная реакция

ПЦР использовалась для тестирования ДНК на наличие определенного фрагмента.

Готовится реакционная смесь (в смесь не добавляют ДНК), разливается в эппендорфы, наслаивается вазелиновое масло (две капли), затем в масло приливается ДНК. Эппендорфы слегка встряхиваются, центрифугируются на 6000 об/мин вплоть до набора такой скорости микроцентрифугой («Short spin»), затем переносятся в аппарат для проведения ПЦР.

Состав реакционной смеси

(на пробу объемом 20 мкл):

ДНК	1,0 мкл
Taq – буфер	2,0 мкл
d NTP	2,0 мкл
Прямой праймер (15 пикоМ/мкл)	0,8 мкл
Обратный праймер (15 пикоМ/мкл)	0,8 мкл
Taq – полимеразы	0,6 мкл
Вода (дистиллированная, автоклавирован.)	12,8 мкл

Температурный режим

Стадия	Температура (°C)	Время	
Предварительная денатурация ДНК	94	3 мин	
Денатурация ДНК (в цикле)	94	1 мин	Блок: повторяется 35 раз
Отжиг праймеров	60*	40 сек*	
Синтез	72*	1 мин*	
Досинтез	72	10 мин	
Хранение(4C)	4	15 часов	

* – температура отжига праймеров и синтеза, а также время различно для разных праймеров. Приведены данные для пары праймеров (224/225) на внутреннюю область селективного гена npt II (канамицин-устойчивости).

Праймеры: для идентификации трансгенов была использована пара праймеров (224/225) на внутреннюю область селективного гена npt II (канамицин-устойчивости)

5' CGACGTTGTCACCTGAAGCGT 3' T отжига (224-primer)=60

5' AAGCACGAGGAAGCGGTCAG 3' T отжига (225-primer)=60

Аmplифицируется фрагмент размером **487 bp**.

Так же был проведен ПЦР-анализ на присутствие последовательности целевого гена FeSOD с праймерами SOD1/SOD2:

5' ACTCCCAATGCTGTGAATCC 3' T отжига (SOD 1 primer)=60

5' CTTCGGTGATGCAGAACTCA 3' T отжига (SOD 2 primer)=60

Аmplифицируется фрагмент размером **242 bp**.

Продукты ПЦР-реакции были визуализированы на электрофорезе в 1% агарозном геле с бромистым этидием (получены фотографии).

Электрофорез ДНК в 1% агарозном геле

Приготовление геля: В колбу добавляем 200мг агара, 20мл ТАБ-буфера. Доводим до кипения, охлаждаем (рука не должна обжигаться) добавляем 4μl бромистого этидия (1:10000). Заливаем гель в ванночку для электрофореза, делаем в нем кармашки с помощью гребенки.

Приготовление проб ДНК: 1μl краски, 5μl ДНК (для определения качества выделения ДНК), 8μl ДНК (для электрофореза продуктов ПЦР) и доводим водой до 15 μl. Наливаем в прибор ТАБ-буфер так, чтобы он закрыл электроды. Заливаем пробы пробы в кармашки и включаем ток (90V). После того, как ДНК зашла в гель прибавляем напряжение до 100V. Разгоняем до получения четкой картины.

Разные по массе фрагменты ДНК разделяются. Для определения примерного размера фрагмента на одном из треков разгоняется маркер (1 Kb).

Состав ТАЕ-буфера: (20x концентрация): 0,8 М-Трис HCl, 0,4 М CH₃COONa, 0,02 М EDTA, pH 8.0). При использовании буфер разбавляется.

Приготовление компетентных клеток агробактерии

1. Засеять 5 мл YEB среды с антибиотиком (Rf) агробактерию с чашки и наращивать в течении ночи.
2. Инокулировать подростом 95 мл YEB среды и наращивать примерно 4 часа при 28° C до плотности D590 0,5
3. Осадить клетки при 3 500 об/мин 10 мин., +5°С
4. Ресуспендировать осадок в 20 мл 150 mM NaCl очень нежно во льду.
5. Осадить клетки на 3 500 об/мин. при 0°С 10 мин., слить супернатант, осадок осторожно растворить на льду в 2 мл 20 mM CaCl₂, инкубировать 10 мин.
6. Расфасовать по стерильным эппендорфам и заморозить в жидком азоте, примерно по 200 мкл.
7. Хранить при -70°С

8. Если трансформацию ставят сразу, тогда перед тем как замораживать добавляют плазмиду и после заморозки медленно разморозить на льду и провести процедуру трансформации.

Необходимые растворы:

1. 150mM NaCl + 10mM Tris pH 7.0
per 100 ml 1M Tris pH 7.0 – 1ml
5M NaCl – 3ml
or Mr NaCl 58.5 150mM NaCl – 0.877g/100ml
2. 20mM CaCl₂+ 10mM Tris pH7.0
per 100 ml 1M Tris pH 7.0 – 1ml
1M CaCl₂ – 2ml
or Mr CaCl₂+2H₂O 146 20mM CaCl₂ 0.292g/100ml

Среда для выращивания агробактерии

1. 1.5г агара + 85 мл воды – автоклавировать
2. 10% р-р глюкозы – автоклавировать
3. Фосфотный буфер – холодная стерилизация (на 50мл р-ра)
K₂HPO₄ – 3g or K₂HPO₄*3H₂O – 3,93g
NaH₂PO₄ – 1g or NaH₂PO₄*2H₂O – 1,3g
4. Минеральные соли – холодная стерилизация (на 50мл р-ра)
NH₄Cl 1g
MgSO₄*7H₂O 0.3g
KCl 0.15g
CaCl₂ 0.15g Fe₂SO₄*7H₂O 50mg

Методика трансформации агробактерии

(все проводится в ламинаре, при температуре воздуха не выше 28°C)

1. Разморозить компетентные клетки на льду
2. Разлить аликвоты по стерильным эппендорфам, примерно по 100 мкл можно оставить и по 200мкл
3. Добавить и каждый эппендорф по 0.5 мкг плазмиды
4. Инкубировать на льду 15 минут
5. Температурный шок – 37°C 5минут
6. Быстро перенести и обратно в лед

7. Добавить в каждую пробирку по 0.5 мл питательной среды LB или 2YT без антибиотиков
8. Перенести жидкость в стерильные бакпечатки и поставить на качалку на 28°C 2 часа. Обороты качалки доводим, до 200 об/мин постепенно.
9. Разлить агаризованную питательную среду по чашкам
10. В горячий агар добавить по 5 мл 10% р-р глюкозы, фосфатного буфера, минеральных солей, после остывания до 45°C добавить антибиотики Rf до 75 мг/л, Km до 100мг/л
11. Размазать по поверхности питательной среды жидкую с агробактерией и оставить подсохнуть
12. Поставить в термостат на +28°C можно и меньше, до нарастания колоний
13. Отдельные колонии перенести на отдельные чашки петри, можно сразу заглицеринить после проверки вставки.

Результаты

Изучены следующие методы анализа трансгенных растений:

1. Микро- и макровыделение тотальной ДНК из растительных объектов (листья, семена), СТАВ-метод.
2. Определение качества выделения ДНК методом электрофореза.
3. Определение количества нуклеиновых кислот, белков, углеводов и их соотношения методом фотометрии.
4. Определение наличия трансформированных генов с помощью ПЦР.
5. Поиск подходящих праймеров с помощью компьютерной программы _____ на основании знания нуклеотидной последовательности гена.
6. Приготовление компетентных клеток агробактерии.

Отчет по экскурсиям

Экскурсия в ИОГен

Нас ознакомили с историей создания института, тематиками исследований действующих лабораторий. Объекты и темы весьма разнообразны. Были два выступления: первое было посвящено рассказу о белковых маркерах в сортовой идентификации запасного белка гордеина ячменя, второй доклад был о молекулярно-генетическом анализе полиморфизма эгилопса и о генетических рядах изменчивости в мейозе.

Экскурсия в НИИСХ ЦРНЗ

Были показаны новые сорта ячменя, яровой пшеницы, овса, озимой пшеницы, тритикале, ржи. На яровой пшенице проводят селекцию устойчивости к болезням и насекомым, на овсе изучают влияние рельефа на выравненность посева.

Экскурсия во ВНИИССОК

В экскурсию входило посещение музея, рассказ о лабораториях физиологии и биохимии, селекции и семеноводства, генетики и цитологии, биотехнологии, интродукции и семеноведения, гаметной селекции. Также были показаны теплицы.

Экскурсия во ВНИИК

В институте ведутся работы по селекции злаковых трав. Было рассказано об исследовании полиморфизма генов с помощью ДНК-маркеров. Также проводятся работы по маркированию клевера. В структуре института действуют отделы иммунитета, биотехнологии, клеточной селекции, молекулярно-генетического анализа. Была проведена экскурсия в теплицы и в лабораторию молекулярно-генетического анализа.

Экскурсия в Институт селекции плодовых культур

Было рассказано об основных направлениях работы. На полях показали новые сорта черешни, клубники, смородины, крыжовника и других культур. Было заострено внимание на факторах, по которым ведется селекция. Так, для черешни, лимитирующим фактором является зимняя температура.

Включенная практика на плодоовощной станции МСХА

Первые два дня были посвящены непосредственному участию в селекционном процессе овощной станции. Третий день практики был отведен для знакомства с селекцией плодовых культур.