

# НР

НАУКА В РЕГИОНЫ

## Методические материалы по биологии (ГИ)



Иннопрактика

2017

Данные методические материалы предназначаются преподавателям биологии средних школ. Это пособие поможет построить занятие и донести до учеников наиболее ясным и абсолютно понятным способом материал по теме «генная инженерия».

*Автор Е.И. Сальникова*



# ОСНОВЫ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Корректоры: И.Л. Киндяк  
Компьютерная верстка: К.Р. Гизатулин

---

# Предисловие

## Пояснительная записка

**Направленность дополнительной образовательной программы:** биологическая.

**Новизна, актуальность, педагогическая целесообразность:** данная программа нацелена на расширение кругозора школьников, на обучение их основам генетической инженерии. Актуальность состоит в том, что в программу включены как традиционные, так и новейшие методы клонирования, используемые повсеместно в молекулярно-биологических лабораториях. Педагогическая целесообразность состоит в формировании научного мировоззрения у школьников, знаний в области генной инженерии, обучении их работе в молекулярно-биологической лаборатории.

**Цель и задачи дополнительной образовательной программы:** Цель – формирование у школьников знаний и практических навыков в области основ генной инженерии.

**Задачи:** обучить школьников основам генетической инженерии, сформировать у них научное мышление, дать им опыт работы в научной лаборатории.

**Отличительные особенности данной дополнительной образовательной программы:** данная программа содержит новейшие методики в области генетической инженерии, в частности, планируется обучить школьников технике безлигазного клонирования.

**Возраст детей,** которые предположительно будут обучаться согласно данной программе, 7-9 класс, раннее введение курса связано со спецификой учебного заведения, введения в перечень компетенций JuniorSkills и профилей Олимпиады НТИ генной инженерии.

**Сроки реализации** дополнительной образовательной программы (продолжительность образовательного процесса, этапы): около 40 часов (возможно изменение сроков, связанное с

овладением практическими навыками).

**Формы и режим занятий:** занятия происходят очно в форме практикума, планируется вводная лекция.

**Ожидаемые результаты и способы их проверки:** предполагается усвоение школьниками основ работы в лаборатории молекулярной биологии и основных методов геномной инженерии. Проверка будет осуществляться в режиме письменных работ в конце каждого модуля.

**Формы подведения итогов:** написание учениками письменной работы, после чего будет следовать обсуждение и разбор ошибок.

## Учебно-тематический план дополнительной образовательной программы

Модуль, тема		Часы, тип занятия	Примечание: отрабатываемые УУД
Введение в геномную инженерию			
1	Нуклеиновые кислоты, белки. Строение, свойства.	Лекция	Приобрести базовые знания для дальнейших практических занятий. Сформировать понятие о том, как реализуется генетическая информация в живых клетках.

	Модуль, тема	Часы, тип занятия	Примечание: отрабатываемые УУД
2	Синтез белка. ДНК. РНК. Теоретические основы генной инженерии бактерий. Плазмиды. Опероны. Антибиотики и устойчивость к ним. Селективные среды.	Лекция	Приобрести базовые знания для дальнейших практических занятий. Сформировать понятие о том, как реализуется генетическая информация в живых клетках.
3	Лабораторное оборудование и техника безопасности. Приготовление растворов, необходимых для дальнейшей работы. Компетентные клетки. Трансформация бактерий.	Практическое занятие	Приобрести базовые навыки работы в лаборатории. Понять процесс и приобрести навыки трансформации бактерий плазмидой. Сформировать понятие о компетентности клеток.
4	Выделение плазмидной ДНК из культуры клеток E.coli.	Практическое занятие	Понять процесс и приобрести навыки выделения плазмидной ДНК из бактериальных клеток.

	Модуль, тема	Часы, тип занятия	Примечание: отрабатываемые УУД
5	Полимеразная цепная реакция (ПЦР): химический состав реакционной смеси, праймеры. Дизайн праймеров.	Практическое занятие	Научиться проводить полимеразную цепную реакцию. Приобрести навыки дизайна праймеров для ПЦР.
6	Электрофорез. Разделение фрагментов ДНК, полученных в результате ПЦР, в агарозном геле. Выделение ДНК из агарозного геля.	Практическое занятие	Приобрести навыки проведения электрофоретического разделения фрагментов ДНК в агарозном геле.
7	Рестрикция. Лигирование.	Практическое занятие	Приобрести навыки проведения рестрикции фрагментов ДНК и их соединения путем лигирования.
8	Трансформация.	Практическое занятие	Сформировать навыки трансформации бактерий лигазной смесью.
9	Подведение итогов самостоятельной работы	Урок-обсуждение 2 часа	Разбор ошибок, выводы, корректировка работы.

	Модуль, тема	Часы, тип занятия	Примечание: отрабатываемые УУД
10	Диагностика по модулю 1	Диагностика 1 час	Проверить базовые знания основ генной инженерии.
Безлигазное клонирование			
11	Мегапраймер. Полимеразная цепная реакция. Агарозный ДНК-электрофорез.	Практическое занятие	Закрепить основные навыки работы с ДНК в лаборатории.
12	Выделение мегапраймера из агарозного геля. Проведение полимеразной цепной реакции с мегапраймером.	Практическое занятие	Получить знания о современных методах клонирования. Приобрести навыки проведения ПЦР с мегапраймером.
13	Эпигенетические модификации. Метилирование ДНК. Рестрикция DpnI. Трансформация.	Практическое занятие	Получить знания о рестриктазах, работа которых зависит от эпигенетических модификаций. Закрепить навыки трансформации бактерий.
14	Подведение итогов самостоятельной работы	Урок-обсуждение 1 час	Разбор ошибок, выводы, корректировка работы.

Модуль, тема	Часы, тип занятия	Примечание: отрабатываемые УУД
15 Итоговая диагностика по модулю 2	Диагностика 2 часа	Проверить знания, полученные при прохождении данной образовательной программы.

Лекция – 2 часа, практическое занятие – 3 часа.

## Содержание дополнительной образовательной программы

### Введение в геномную инженерию

Клетка. Основные отличия бактериальной и эукариотической клеток. Ядро. ДНК. Антипараллельность нитей ДНК. ДНК-зависимая РНК полимеразы. Функции белков. Структура белка. Аминокислоты. Генетический код. Кодоны. Геном бактерий. Плазмиды. Опероны. Регуляция транскрипции на примере лактозного оперона. Компетентные клетки. Трансформация бактерий. Выделение ДНК из культуры клеток *E.coli*. Полимеразная цепная реакция. Праймеры. Дизайн праймеров. Электрофорез. Разделение фрагментов ДНК в агарозном геле. Выделение ДНК из агарозного геля. Рестрикция. Лигирование. Отбор клонов по фенотипу.

### Безлигазное клонирование

Понятие мегапраймера. Агарозный ДНК-электрофорез. Выделение мегапраймера из агарозного геля. Проведение полимеразной цепной реакции с мегапраймером. Эпигенетические модификации. Метилирование ДНК. Рестрикция DpnI.

---

## Методическое обеспечение

Лекции и практические занятия проводятся в очном режиме. Весь курс разделен на 2 тематических блока. По окончании каждого блока проводится диагностика в виде письменной проверочной работы.



# План занятий

## Урок 1

Вводное занятие. Лекция.

Вводное занятие. Лекция. Клетка. Ядро. Аминокислоты. Структура белка (кратко). Функции белков (кратко). ДНК. 3' и 5'-концы. Принцип “ДНК-РНК-белок”. Генетический код. Кодоны. ДНК-зависимая РНК полимераза.

**Нужно:**

- проектор с экраном (необязательно).

## Урок 2

Основы работы в лаборатории

Геном бактерий. Плазмиды. Опероны. Регуляция транскрипции на примере лактозного оперона.

---

## Урок 3

### Основы работы в лаборатории

Готовим чашки Петри. Готовим другие необходимые растворы: буфер ТАЕ для фореаза, 70% спирт, сток антибиотиков. Трансформируем клетки плазмидой, для последующего выделения. Варианты заданий: проверить компетентность клеток или посмотреть, что будет, если не сделать тепловой шок. Утром - убрать чашки в холодильник.

#### Нужно:

- компетентные клетки (Евроген)
- агар
- питательная среда для бактерий
- антибиотики
- трис, уксусная кислота, ЭДТА
  - ТАЕ можно приготовить самим, а можно купить готовый 50x в Еврогене
- пустые чашки Петри
- колбы, пипетки

Перед занятием в лаборатории обязательно необходимо объяснить учащимся, что такое лабораторный журнал и как он ведётся. Обычно все записывается прямо перед экспериментом, чтобы в ходе него сверяться с записями.

Для создания первого генно-модифицированного организма необходима ДНК (ген) с устойчивостью к антибиотику, и специальные клетки (компетентные). Процесс, при котором ДНК вводится в клетки - трансформация.

Прежде всего, нужно подготовить чаши Петри - то, где будут расти наши ГМ-бактерии. Что там есть?

- 
1. LB - питательная среда, где собрано все необходимое для роста бактерий
  2. агар - по сути, желатин (рассказать кратко про химию - смесь различных полисахаридов, выделяют из водорослей). Вот такая хорошая питательная среда, на ней же почти что угодно расти будет. Как мы поймем, что выросло именно то, что нам нужно? Как сделать так, чтобы росло только то, что нам нужно? Напомню, ДНК кодирует ген устойчивости к антибиотику.
  3. антибиотик.

Состав чашек записываем в журнал.

Готовим вместе чашки. Топим агар, заливаем чашки. Антибиотики - в холодильник ( $-20\text{ C}^\circ$ ). В холодильнике все должно лежать на местах. Наклейки на полки в холодильнике делаем прямо на уроке, чтобы дети приучались к порядку.

Пока чашки застывают, можно начинать трансформировать бактерии (нужен газон!). Все процедуры проводим строго по протоколу с соблюдением времени, последовательности, количества. Делаем записи в журнале.

### **Компетентные клетки. Штамм XL-1**

XL1-Blue: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacIqZ $\Delta$ M15 Tn10 (Tetr)]

При трансформации (примерно) -  $\text{CaCl}_2$ , тепловой шок клетка вбирает в себя всю окружающую ДНК.

Из всего этого нам важно то, что у клеток есть устойчивость к тетрациклину (Tn10). Остальное нас пока не очень волнует. (Для примера можно сказать, что означает какая-то одна запись.)

Что происходит при трансформации (примерно) -  $\text{CaCl}_2$ , тепловой шок клетка вбирает в себя всю окружающую ДНК.

Делаем тепловой шок, добавляем питательную среду, потом опять ждем минут 20-30. Обязательно нужно, чтобы все

---

всё записали в тетради-журналы (проверяю в это время), заканчиваем рассказ про клетки. Далее проводим центрифугирование клеток, высеваем на готовую чашку Петри, убираем в термостат.

Утром нужно, чтобы кто-то убрал чашки из термостата в холодильник.

## Урок 4

### Mini-prep

Выделение плазмидной ДНК из культуры клеток *E.coli*. Соскребаем с чашки клетки, выделяем ДНК. Рассказать подробно о принципах выделения (составы буферов и пр.).

#### Нужно:

- набор для выделения ДНК из клеток (Евроген)
- этиловый спирт 70
- эппендорфы на 1,5 мл
- пипетки
- спектрофотометр для того, чтобы измерить концентрацию ДНК (желательно)

Та плазида, которую мы помещали в *E.coli* на прошлом занятии, потребуются нам в дальнейшей работе в большом количестве. Вот, на чашке Петриросло много клеток (трансформировать нужно так, чтобы получился газон или близко к этому). Смотрим протокол выделения в еврогеновском наборе, разбираем его подробно.

Ресуспендируем полученную с чашки биомассу в 300 мкл раствора для ресуспендирования.

- 50 mM Tris-HCl pH 8.0

- 10 mM EDTA
- 100  $\mu\text{g/ml}$  RNaseA

Почему ресуспендируем клетки в буфере, а не в воде? - о каждом из компонентов по порядку:

Зачем в буфере RNКаза? - чтобы РНК не выделялась вместе с ДНК, емкость колонки фиксирована, поэтому ДНК будет больше;

Зачем ЭДТА? - в клетке есть ферменты, режущие ДНК. Нам они не нужны. Для их работы, как правило, нужны ионы Mg, Zn, Fe. Схема связи ЭДТА (хелатирующий агент) показана на рисунке 1. Соответственно, большинство ферментов в клетке перестает работать, и ДНК не будет повреждена.

Почему pH фиксирован? На следующих шагах нам важна кислотность среды, поэтому буфер для ресуспендирования делается фиксированным по pH, чтобы стандартизовать добавляемые объемы последующих растворов.

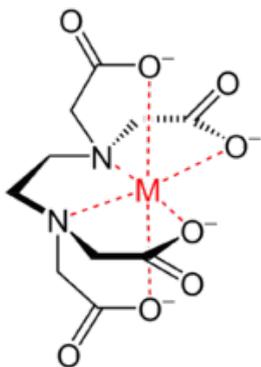


Рис. 1

300 мкл лизирующего раствора. Содержит 1% SDS и 200 mM NaOH (щелочь). Почему нужно инкубировать строго не более 5-ти минут? - SDS - очень жесткий детергент, геномная ДНК может денатурировать полностью, нити разойдутся слишком далеко, и она выделится вместе с плазмидой.

350 мкл нейтрализующего раствора, откручиваем. Что содержится в нейтрализующем растворе? - кислота для нейтрализации pH,

соль.

Зачем соль? - чтобы убрать детергент и остатки мембран клетки. Вообще говоря, если в раствор советского хозяйственного мыла насыпать соли, то выпадет осадок. Сейчас в мыло

---

добавляют ЭДТА, которое образует комплекс с ионами металла, поэтому осадка нет.

Нейтрализующий раствор осаждает геномную ДНК. Плазмида короткая, успевает за малое время ренатурировать и остаться в растворе. Геномная ДНК большая, по-нормальному ренатурировать не успевает, и выпадает в осадок.

Колонка. Промывочный раствор. Почему можно пропустить промывку раствором для удаления эндотоксинов? - мы не собираемся получать сверхчистую ДНК, нам просто нужно, чтобы ее было побольше.

Смываем ДНК с колонки. Почему обязательно нужно ждать 1 минуту перед финальной откруткой? - чтобы вода как следует впиталась в колонку, чтобы там не осталось сухих участков.

### **Что нужно помнить:**

1. 10% всегда остается на колонке (показать, если есть спектрофотометр)
2. теплой водой смывается больше, чем холодной
3. количество выделяемой ДНК нелинейно зависит от количества биомассы - с десятой части клеток выделяется половина ДНК

После того, как детально разобрали весь процесс, выделяем ДНК, по возможности измеряем концентрацию на спектрофотометре. Если его нет, то через занятие будем делать электрофорез на агарозном геле.

## **Урок 5**

### **Полимеразная цепная реакция (ПЦР)**

Нарабатываем ген GFP, который далее будем вставлять в вектор, выделенный на прошлом занятии.

---

## Нужно:

- Encyclo+ PCR kit (Евроген)
- ПЦРник (прибор)
- маленькие пробирки для ПЦР (200 мкл)
- пипетки
- спектрофотометр (желательно)
- компьютеры для написания праймеров (желательно с интернетом)

Что такое ПЦР? Видео. Антипараллельность нитей ДНК. Праймеры.

Полимераза. За счет чего она получает энергию для работы? (кидаем в смесь не обычные нуклеотиды, а АТФ, ГТФ. . .) Виды полимераз. Корректирующая активность. Выступающий нуклеотид на конце.

98С° - это много. Откуда взялась полимеразы, которая остается жива при такой температуре. Куриное яйцо при 98С° вполне себе варится, т.е. белков в нативном состоянии там толком не остается. (Тақ была выделена из бактерий, живущих в горячих источниках).

## Что нужно для ПЦР? Обсуждаем состав реакционной смеси:

1. буфер - что там есть? (магний, ДМСО)
  - (а) магний - для работы полимеразы (помните, когда выделяли ДНК, мы обсуждали, что для работы ферментов необходимы ионы металлов).
  - (b) ДМСО - добавлять необязательно. Помогает разойтись нитям ДНК.
2. праймеры
3. матрица
4. нуклеотиды (трифосфаты)

---

## 5. полимераза

Раскапываем ПЦР. Измеряем концентрацию ДНК на спектрофотометре, если возможно.

### Запускаем прибор. Вопросы:

- Зачем нагревается крышка? - Чтобы реакционная смесь не конденсировалась на холодной крышке
- Что делать, если прибор старый и крышка не нагревается? - капнуть сверху масла, оно не даст испаряться воде.
- Зачем прибор спрашивает про объем смеси? - допустим, установили объем 2 мкл, а налили 100. 100 мкл будут дольше нагреваться, попросту не успеют за то время, которое прибор отводит на нагрев 2 мкл.

Пока идет ПЦР, учимся писать праймеры. Основной критерий: чтобы не формировал стабильных шпилек, чтобы 3'-конец не портился. <http://eu.idtdna.com/calc/analyzer> - бесплатная онлайн-программа для анализа ДНК (на английском).

Вопрос - почему вообще существует такой параметр, как GC%? Три водородных связи, крепче, сложнее разойтись нитям.

По окончании ПЦР снова измеряем концентрацию ДНК. Все убираем в холодильник.

## Урок 6

### Агарозный электрофорез

- Что такое агароза? Как приготовить гель? Что происходит на молекулярном уровне? Готовим все вместе одну банку.
- Заряд ДНК. Электроды. Куда побежит ДНК?

- 
- Раскапываем. 30-40 минут ждем.
  - Почему состав буфера именно такой?
  - Как определить концентрацию ДНК по гелю?
  - Выделение ДНК из геля, используя набор Евроген для выделения ДНК.

## Урок 7

### Рестрикция и лигирование

Вектор уже должен быть выделен из клеток, так как в ките его совсем немного. Рестрикция минут 40, за это время рассказываю, что происходит.

Гоним гель, потом выделяем из геля. В конце - раскапываем лигирование, оставляем на ночь. Утром убираем в холодильник - на следующей неделе - трансформация.

Проводим электрофорез и выделение. В конце - проводим лигирование, оставляем на ночь. Утром убираем в холодильник - на следующей неделе - трансформация.

## Урок 8

### Трансформация (финал)

Каждому ученику по фасовке компетентных клеток, все трансформируют свои образцы. Каждый высевает на свою чашку Петри.

## Урок 9

Подведение итогов самостоятельной трансформации. Разбираем ошибки, делаем выводы.

---

## Урок 10

Разбор полетов. Что выросло, а что - нет.

## Урок 11

### Мегапраймер

Ставим с учениками ПЦР, чтобы из исходной ДНК получился мегапраймер с геном. Пока ПЦР идет (1,5 часа), рассказываю про безлигазное клонирование.

## Урок 12

### Мегапраймер (продолжение)

Проводим электрофорез, выделяем мегапраймер. Раскапываем длинную ПЦР всей плазмиды, чтобы утром убрать в холодильник.

## Урок 13

### DpnI и трансформация

Рестрикция матричной ДНК (была выделена из живых клеток, поэтому метилирована). ДНК, полученная в ходе ПЦР, не метилируется, и поэтому не разрезается DpnI.

Каждому ученику выдаем по фасовке компетентных клеток, все трансформируют свои образцы. Каждый высевает на свою чашку Петри.

Проблема: в наборе Еврогена всего 10 фасовок. Здесь важно трансформировать именно полную фасовку клеток, потому что эффективность безлигазного клонирования ниже, чем у обычного.

---

## Урок 14

Подведение итогов самостоятельной трансформации. Разбираем ошибки, делаем выводы.

## Урок 15

Диагностика по модулю 2.

## Необходимые материалы

Если ограничиться проектом по вставке гена GFP в вектор, то можно заменить Epcuslo полимеразу на Taq. При ПЦР всей плазмиды (безлигазное клонирование) Taq использовать нельзя (вешает хвост, делает ошибки).

Название	Номер	Наименование	Количество	Цена □
Набор реактивов для ПЦР Encyclo Plus PCR kit	PK101	смесь полимераз Encyclo	50x100 мкл	3900
		Encyclo буфер	10x600мкл	
		Encyclo Red буфер	5x1.2 мл	
		Encyclo GC буфер	2x3мл	
		Смесь дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (10 мМ каждого)	120 мкл	
		Вода, свободная от РНКаз	4.5 мл	
Набор для очистки ДНК из геля и реакционных смесей Cleanup Standard	BC022	Спин-колонки	50 шт	3200
		Собираемые пробирки на 2 мл (без крышки)	50 шт	
		Связывающий раствор	30 мл	
		Промывочный раствор (концентрат)	9 мл	
		Элюирующий раствор	2 x 1.5 мл	
Набор для выделения плазмидной ДНК Plasmid Miniprep	BC021	Спин-колонки	50 шт	3025
		Собираемые пробирки на 2 мл (без крышки)	50шт	
		РНКазы А (лиофилизированная)	1.5 мг	
		Ресуспендирующий раствор	14 мл	
		Лизирующий раствор	14 мл	
		Нейтрализующий раствор	19 мл	
		Промывочный раствор (концентрат)	9 мл	
		Элюирующий раствор	2x1.5 мл	
		Раствор для удаления эндотоксинов	11 мл	

- 
1. Еврогеновский практикум по геной инженерии
  2. Ферменты (рестриктазы)
    - (a) [BamHI](#)
    - (b) [HindIII](#)
    - (c) DpnI для проекта
  3. Компетентные клетки (Евроген) на 20-30 трансформаций. Их нужно хранить в -80, если в -20, то они недолго пролежат.
  4. Чашки Петри, среда для культивирования.
  5. Праймеры для проекта.

### Наборы:

1. [Набор реактивов для ПЦР Encyclo Plus PCR kit](#)
2. [Набор для очистки ДНК из геля и реакционных смесей Cleanup Standard](#)
3. [Набор для выделения плазмидной ДНК Plasmid Miniprep](#)

### Список литературы:

1. Манухов И.В., Коноплева М.Н. Учебное пособие к практическим занятиям по геной инженерии. Издательство МФТИ, Москва, 2014
2. [www.molbiol.ru](http://www.molbiol.ru)
3. [www.evrogen.ru](http://www.evrogen.ru)  
item Богданов А.А., Медников Б.М. Власть над геном: Кн. для внеклас. чтения учащихся 9—10 кл. сред. шк. — М.: Просвещение, 1989. — 208 с, ил. — (Мир знаний). ISBN 5-09-000440-4
4. [www.biomolecula.ru](http://www.biomolecula.ru)



# Оглавление

Предисловие . . . . .	5
Пояснительная записка . . . . .	5
Учебно-тематический план дополнительной об- разовательной программы . . . . .	6
Содержание дополнительной образовательной програм- мы . . . . .	10
Введение в генную инженерию . . . . .	10
Безлигазное клонирование . . . . .	10
Методическое обеспечение . . . . .	11
<b>План занятий . . . . .</b>	<b>13</b>
Урок 1 . . . . .	13
Урок 2 . . . . .	13
Урок 3 . . . . .	14
Урок 4 . . . . .	16
Урок 5 . . . . .	18
Урок 6 . . . . .	20
Урок 7 . . . . .	21
Урок 8 . . . . .	21
Урок 9 . . . . .	21
Урок 10 . . . . .	22
Урок 11 . . . . .	22
Урок 12 . . . . .	22
Урок 13 . . . . .	22
Урок 14 . . . . .	23
Урок 15 . . . . .	23

Необходимые материалы . . . . . 23