



Методы трансформации бактериальных и дрожжевых клеток

Спецпрактикум по биохимической генетике - Лекция 4

Старший преподаватель: PhD, Сmekенов Изат Темиргалиевич

Кафедра молекулярной биологии и генетики



ЦЕЛЬ ЛЕКЦИИ

Познакомить студентов с основными методами доставки рекомбинантной ДНК в бактериальные и дрожжевые клетки, их принципами, механизмами, условиями применения и факторами, влияющими на эффективность трансформации.

ЗАДАЧИ

- ✓ Объяснять различие между трансформацией, трансфекцией, конъюгацией и трансдукцией.
- ✓ Перечислять основные методы трансформации бактерий.
- ✓ Перечислять методы трансформации дрожжей.
- ✓ Описывать механизмы проникновения ДНК в клетку при разных методах.
- ✓ Определять параметры, влияющие на эффективность трансформации (фаза роста, чистота ДНК, состав среды, температура шока, напряжение при электропорации).
- ✓ Выбирать оптимальный метод трансформации в зависимости от типа клетки и задачи.
- ✓ Работать с терминами: компетентные клетки, эффективность трансформации, селекция трансформантов, плазмиды, маркеры резистентности.

Ключевые термины

Трансформация, Компетентные клетки, Электропорация, Тепловой шок, CaCl_2 -метод (Mandel-Higa), PEG/LiAc метод (для дрожжей), Селекция трансформантов, Эффективность трансформации (cfu/ μg DNA), Плазмиды и векторы, Biolistic delivery (gene gun), Агроинфильтрация (редко, но возможно для дрожжей с *Agrobacterium*).

1) Трансформация

- Процесс введения чужеродной ДНК в клетку с последующей экспрессией.
- Используется для генетической модификации бактерий, дрожжей и растений.

2) Компетентные клетки

- Клетки, подготовленные для эффективного поглощения ДНК.
- Могут быть натурально компетентными или искусственно подготовленными.

3) Методы трансформации

- Электропорация: использование кратковременного электрического импульса для образования пор в мембране.
- Тепловой шок (Heat shock): кратковременное повышение температуры для проникновения ДНК в клетки, чаще используется с CaCl_2 -компетентными бактериями.
- CaCl_2 -метод (Mandel-Higa): химическая обработка клеток и тепловой шок для трансформации бактерий.
- PEG/LiAc метод: химическая обработка дрожжей для введения ДНК с полиэтиленгликолем и ионами лития.
- Biolistic delivery (gene gun): механическое введение ДНК в клетки (часто растения).
- Агроинфильтрация: использование *Agrobacterium* для переноса генов (редко для дрожжей).

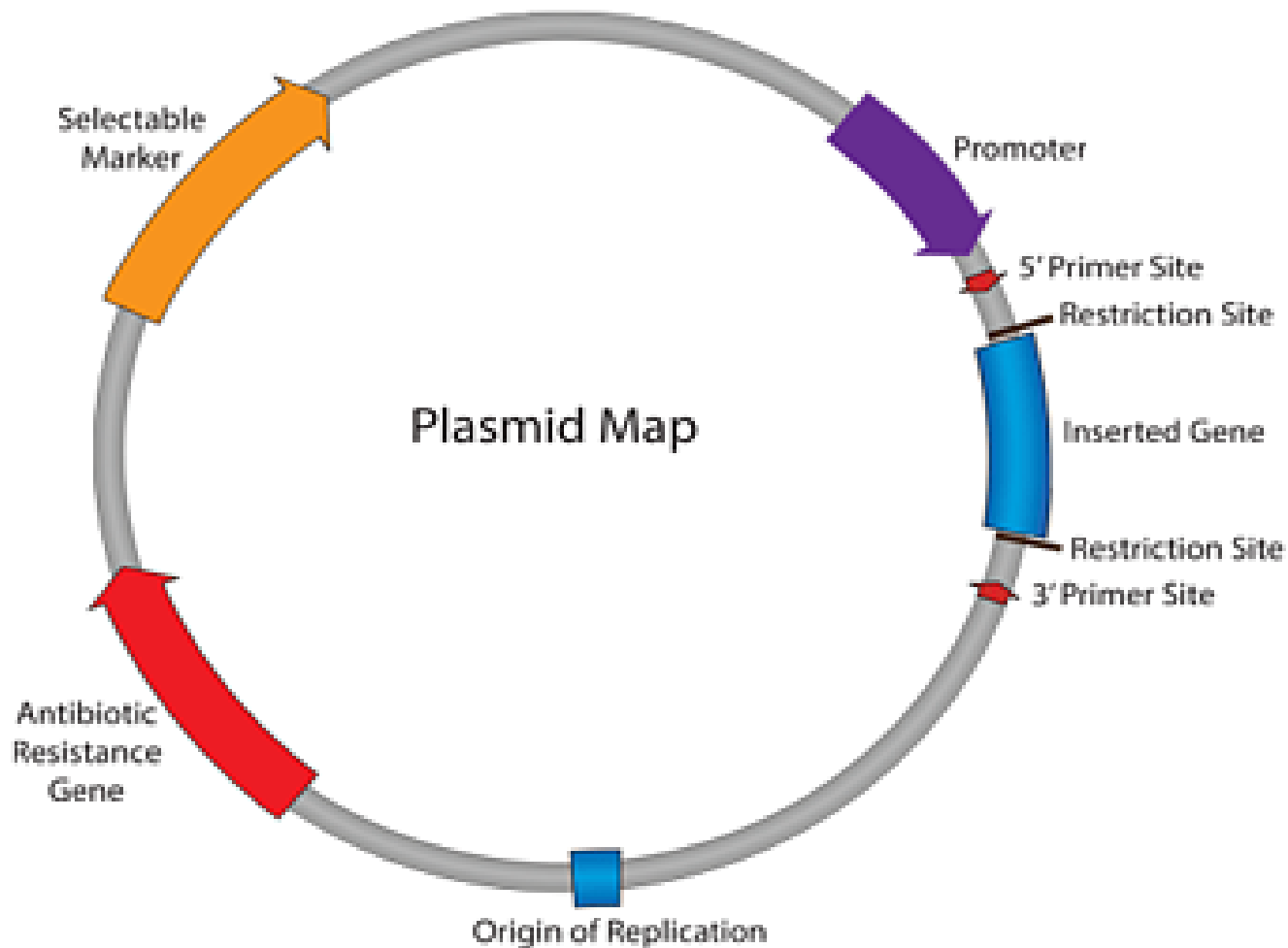
4) Селекция трансформантов

- Использование маркерных генов (антибиотики, аминокислотные дефекты) для выявления клеток, содержащих плазмиды.
- Эффективность трансформации
- Выражается как cfu/ μg DNA (количество колоний на микрограмм ДНК).
- Зависит от метода, состояния клеток и качества ДНК.
- Плазмиды и векторы
- Ключевые инструменты для трансформации; несут ген интереса и маркер для селекции.



ОСНОВНЫЕ ВОПРОСЫ

- 1) Что такое трансформация и для чего она используется?
- 2) Какие характеристики делают клетку компетентной для трансформации?
- 3) В чем разница между электрическим, химическим и механическим методами трансформации?
- 4) Как работают CaCl_2 -метод, PEG/LiAc метод и тепловой шок?
- 5) Что такое селекция трансформантов и какие маркеры применяются?
- 6) Как измеряют эффективность трансформации и от чего она зависит?
- 7) Как плазмиды и векторы обеспечивают перенос и экспрессию генов в клетках?
- 8) В каких случаях применяются Biolistic delivery и агроинфильтрация?



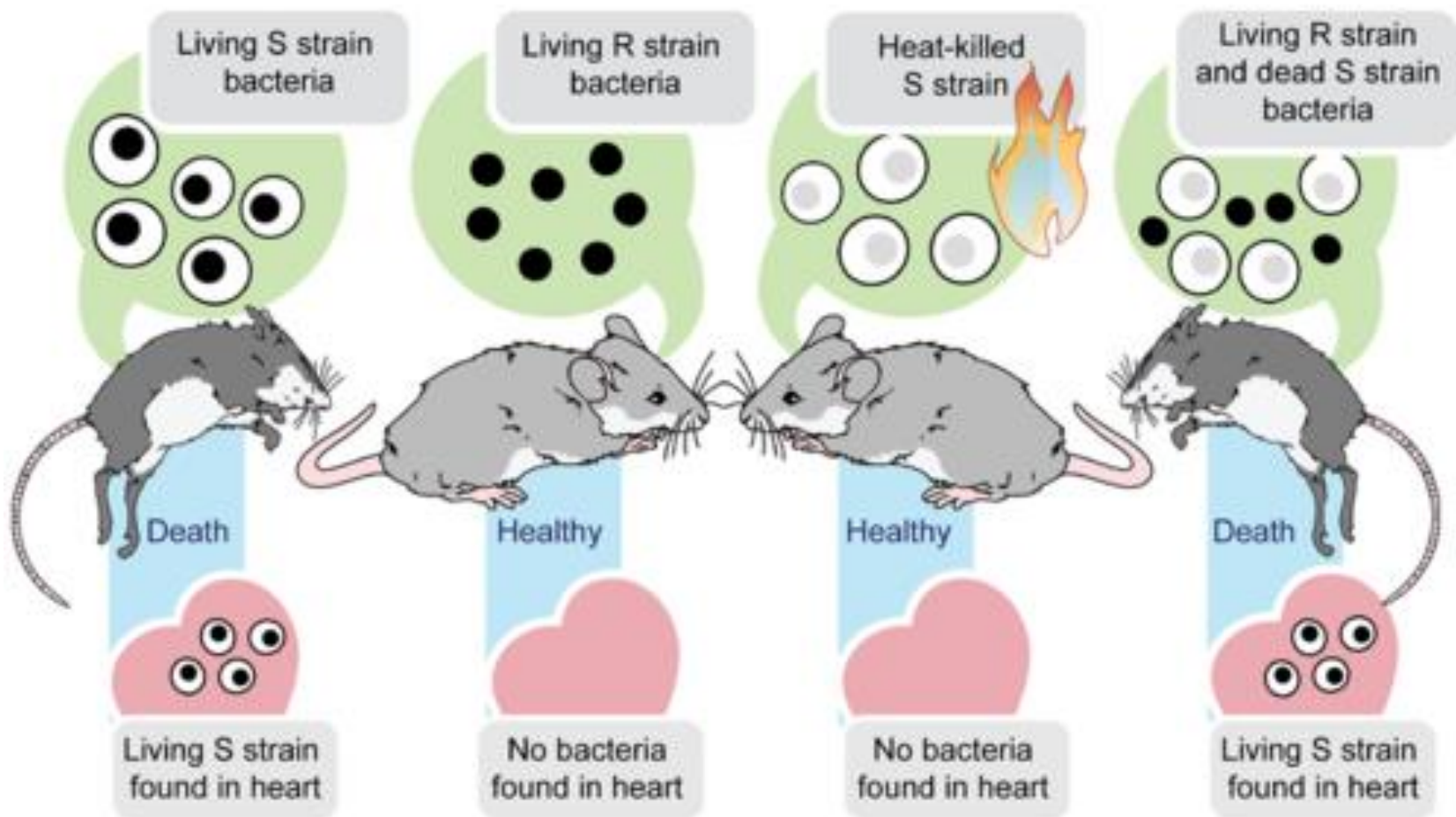
Плазмида - маленькие круглые кусочки ДНК, которые реплицируются независимо от хромосомной ДНК хозяина. (10-200 копий на клетку)
(Размер около 2-300 кб)

- **Источник репликации (репликон).** Источник репликации (ori) относится к определенному месту в цепи, в котором начинается репликация.
- **Полилинкер (множественные сайты клонирования)** - это одна из важнейших частей молекулы, это короткая последовательность ДНК, состоящая из нескольких сайтов для расщепления ферментами рестрикции.
- Некоторые из других компонентов плазмиды включают в себя:
- **Промоторная область** - это компонент плазмиды, который участвует в регуляции транскрипционных механизмов.
- **Сайт связывания праймера** - это короткая последовательность ДНК на одной цепи, которая обычно используется для целей ПЦР-амплификации или секвенирования ДНК.

Бактериальная трансформация

- **Бактериальная трансформация** - это процесс горизонтального переноса генов, при котором некоторые бактерии поглощают чужеродный генетический материал из окружающей среды. Впервые об этом сообщили в *Streptococcus pneumoniae* Гриффит в 1928 году.
- Трансформация является ключевым шагом в клонировании ДНК. Это происходит после рестрикционного расщепления и лигирования и переносит вновь полученные плазмиды в бактерии.
- Колонии с правильной плазмидой можно выращивать для получения больших культур идентичных бактерий, которые используются для продуцирования плазмиды или получения белка.

Эксперимент Грífфита был выполнен в 1928 году Фредериком Гриффитом, доказывает, что бактерии способны передавать генетическую информацию по механизму трансформации.



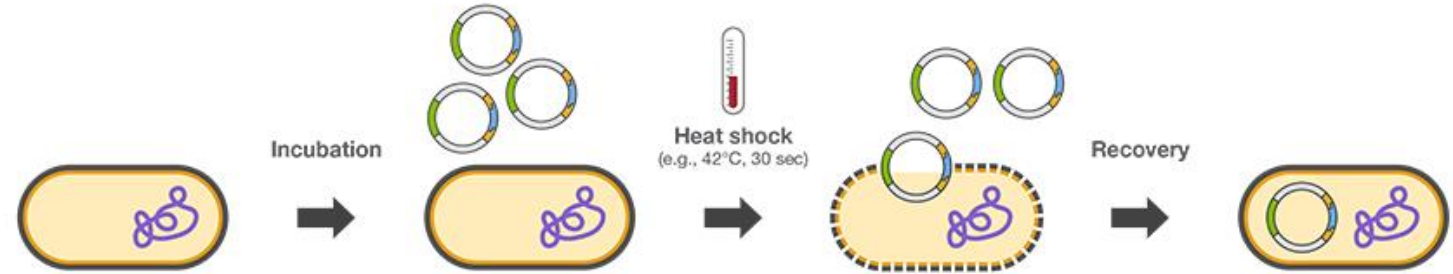
- ✓ Гриффит пришел к заключению, что неvirulentные бактерии штамма II-R трансформировались в virulentный штамм каким-то компонентом убитого штамма III-S.

Техника трансформации с CaCl_2

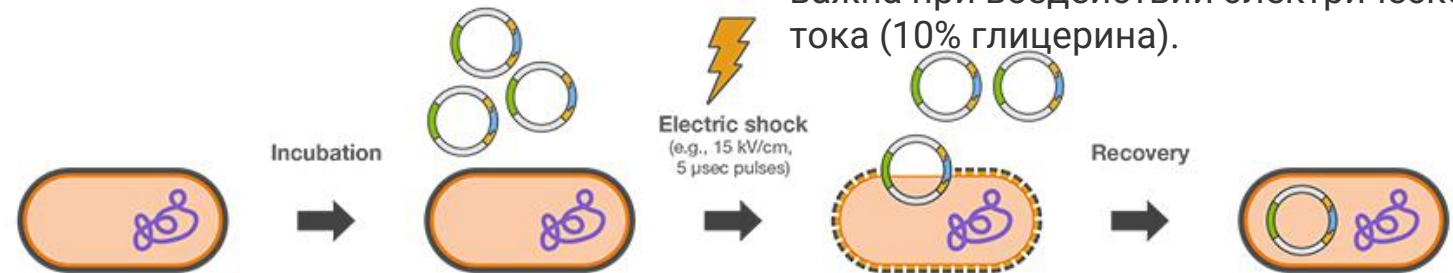
- Компетентные клетки - это бактериальные клетки, которые могут принимать внехромосомную ДНК или плазмиды (голую ДНК) из окружающей среды.
- Искусственная компетентность - это лабораторная процедура, при которой клетки пассивно делают проницаемыми для ДНК, используя неестественные условия.
- Метод трансформации хлорида кальция является наиболее эффективным методом среди компетентных протоколов подготовки клеток. Это увеличивает способность бактериальной клетки включать плазмидную ДНК, способствуя генетической трансформации.

Основные этапы трансформации

Chemical transformation

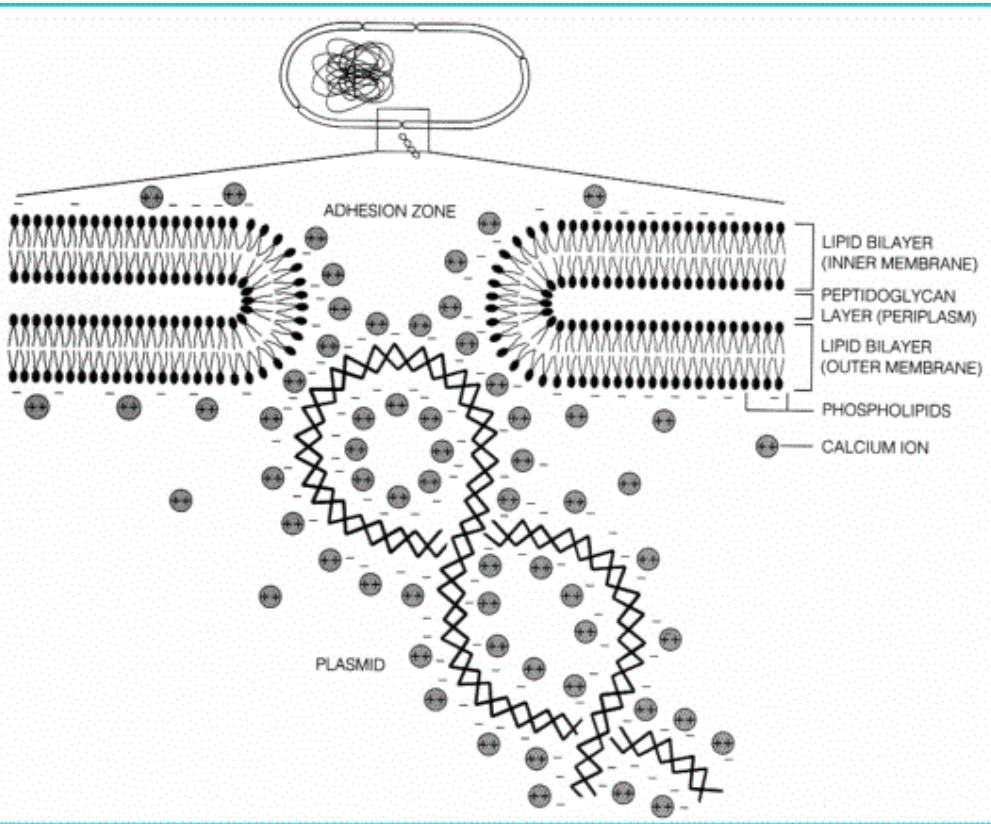


Electroporation



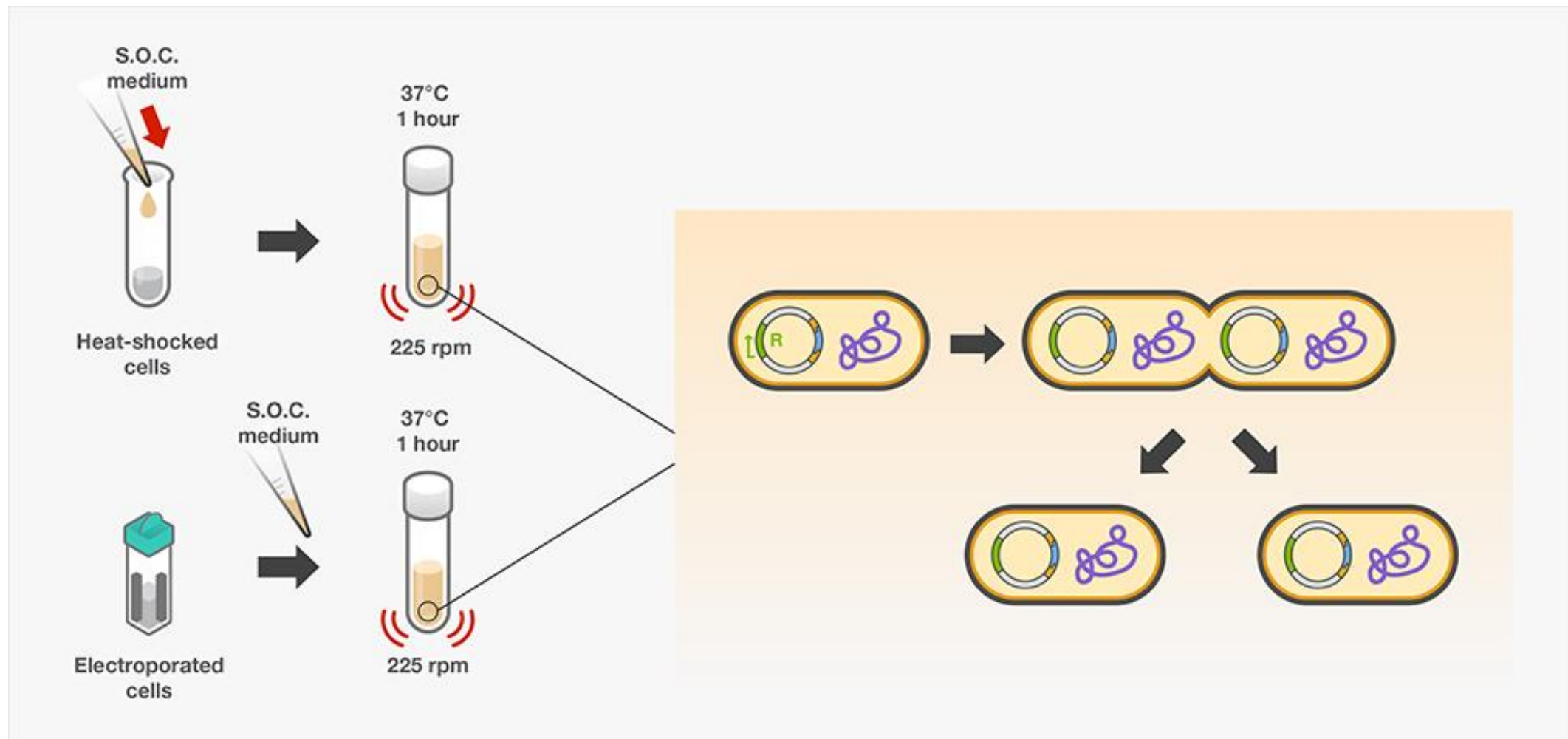
Среда с низким содержанием соли важна при воздействии электрического тока (10% глицерина).

Electrocompetent cell



Внехромосомная ДНК будет вынуждена проникать в клетку путем инкубации компетентных клеток и ДНК вместе на льду с последующим кратким тепловым шоком, который заставляет бактерии поглощать ДНК.

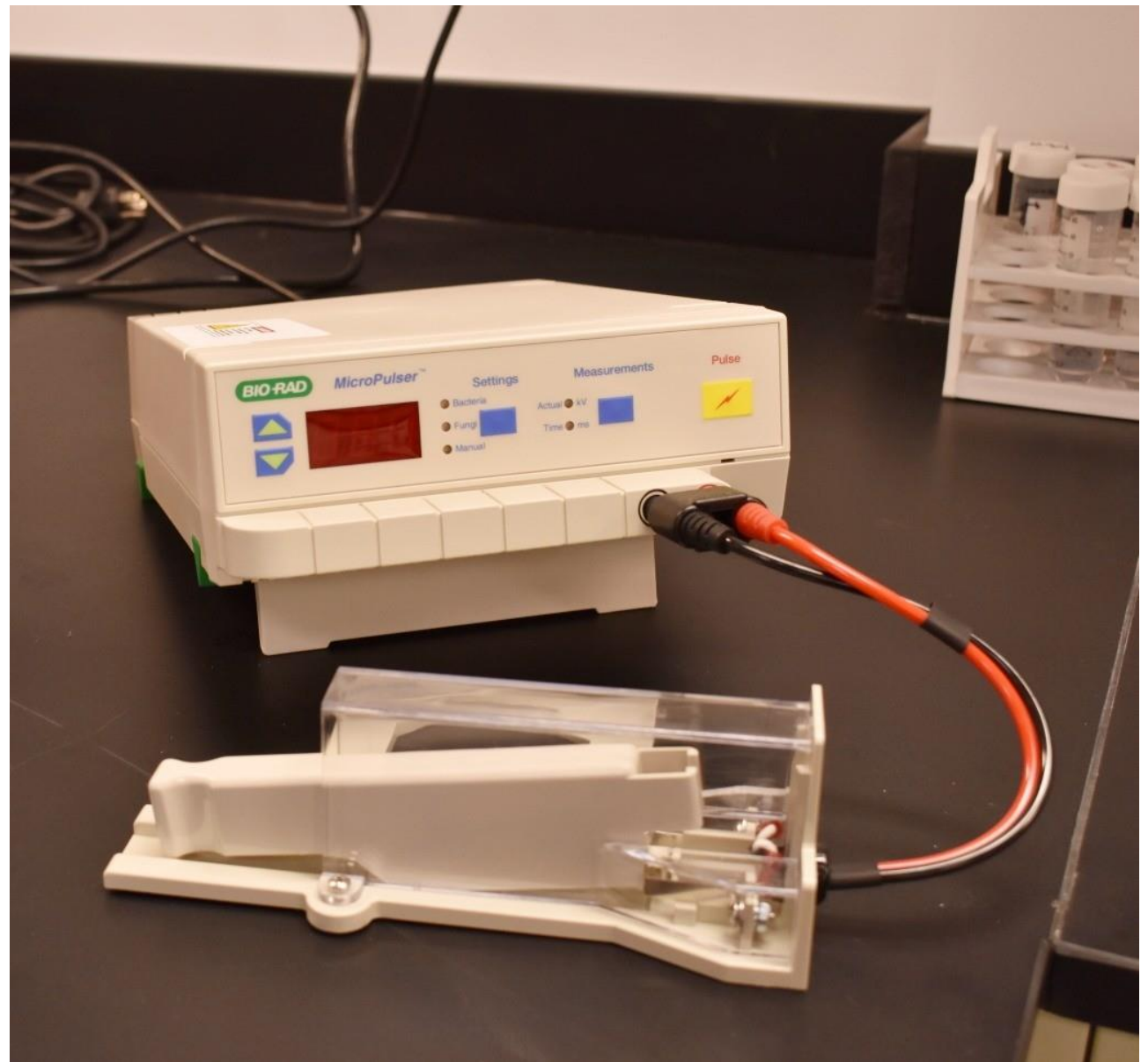
Стадия теплового шока сильно деполяризует клеточную мембрану клеток, обработанных CaCl_2 . Таким образом, уменьшение мембранного потенциала снижает негативность внутреннего потенциала клетки, что в конечном итоге позволяет перемещать отрицательно заряженную ДНК внутрь клетки.



- На стадии восстановления трансформированные клетки культивируют в 1 мл предварительно нагретого S.O.C. среда при 37 ° C со встряхиванием при 225 об / мин в течение 1 часа. S.O.C. среда, которая содержит глюкозу и $MgCl_2$, рекомендуется для максимальной эффективности трансформации. Использование S.O.C. среда, вместо Lennox L Broth (LB-среда), может увеличивать образование трансформированных колоний в 2–3 раза.



Кювета для электропорации



Электропоратор – Bio-Rad

• LB (Лурия-Бертани) жидкая среда

Реагенты	Количество для добавления
H ₂ O	до 1000 мл
Триптон	10 г
NaCl	10 г
Дрожжевой экстракт	5 г
Агар (для чашек)	15 г

ПОДГОТОВКА КОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ CaCl₂

БУФЕР:

60 mM CaCl₂, 10 mM PIPES, 15% об./об. глицерина, pH 7,0

Компоненты SOC среды.

20 g/L	Tryptone
5 g/L	Yeast Extract
4.8 g/L	MgSO ₄
3.603 g/L	dextrose
0.5g/L	NaCl
0.186 g/L	KCl

1 день:

1. Разведите клетки на обычном LB-чашке (без антибиотиков) и инкубируйте при 37 ° C в течение ночи.

День 2:

2. Вечер - отберите одну колонию для инокуляции 30 мл простого LB (без антибиотиков) и инкубируйте при 37 ° C в течение ночи при встряхивании.

3 день

3. Используйте 10 мл ночной культуры для инокуляции 200 мл простого LB (без антибиотиков), выращивайте при 37 ° C при встряхивании до тех пор, пока OD при 600 нм не достигнет ~ 0,6 (проверьте OD через 1 час)

4. Предварительно охладить четыре пробирки по 50 мл на бане с ледяной водой.

5. После достижения OD вылейте клетки в предварительно охлажденные пробирки и инкубируйте при 0°C в течение 15 минут.

6. Вращайте в большой настольной центрифуге при 4°C, 4000 об/мин, 10 минут.

7. Ресуспенсируйте каждый клеточный осадок с 15 мл стерильного ледяного буфера CaCl₂, осторожно пипетируя (не встряхивайте).

8. Инкубируйте клетки на ледяной бане 15 минут.

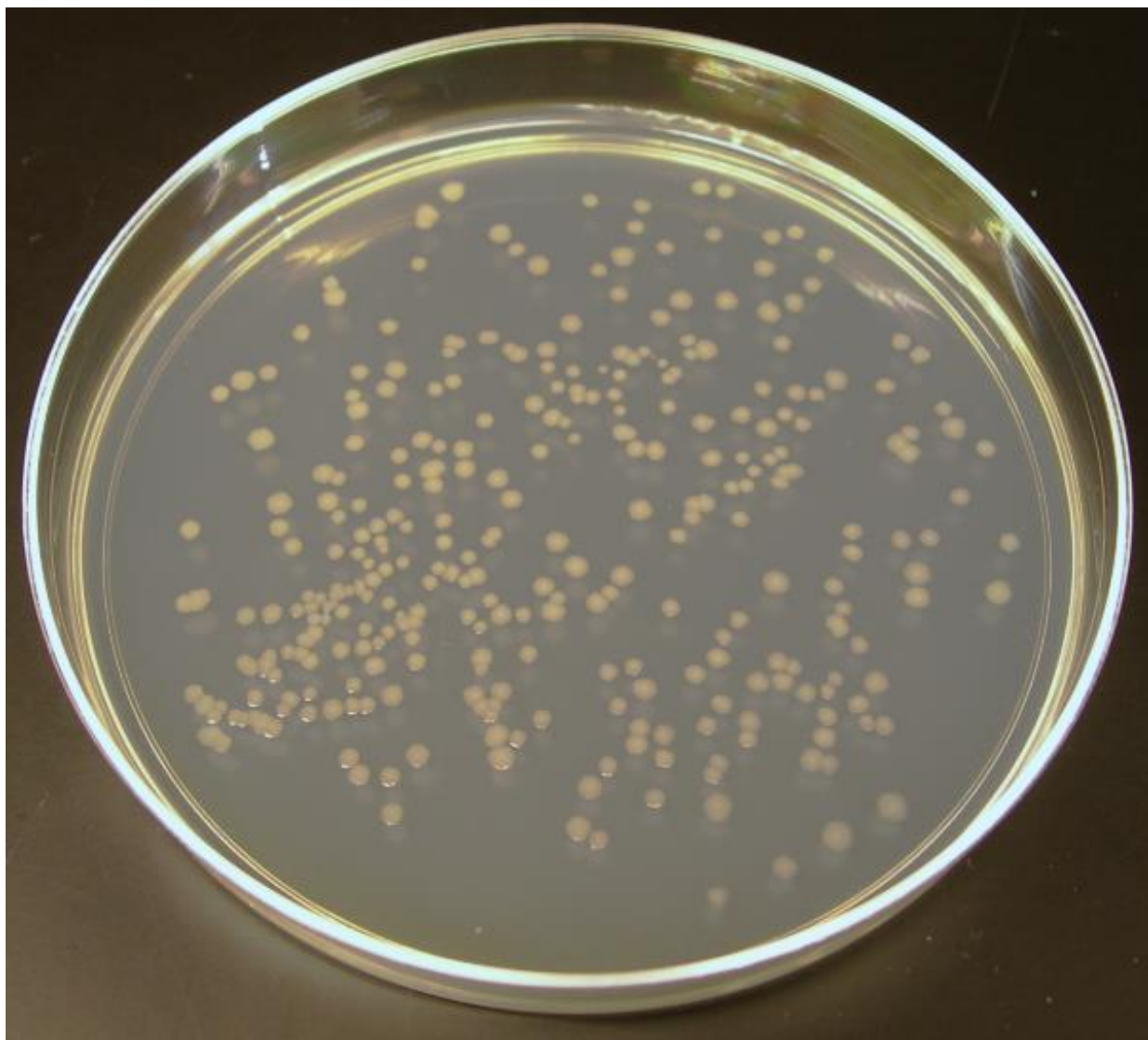
9. Спин клетки снова при 4°C, 4000 об/мин, 10 минут

10. Ресуспенсируйте каждый клеточный осадок в 4 мл стерильного ледяного буфера CaCl₂ (не встряхивайте)

11. Аликвотируйте клетки в аликвоты по 100 мкл в пробирках по 1,5 мл.

12. Пусть клетки инкубируют на льду в течение 1 часа

13. Поместите пробирки в стойки и заморозьте при -80 ° C.



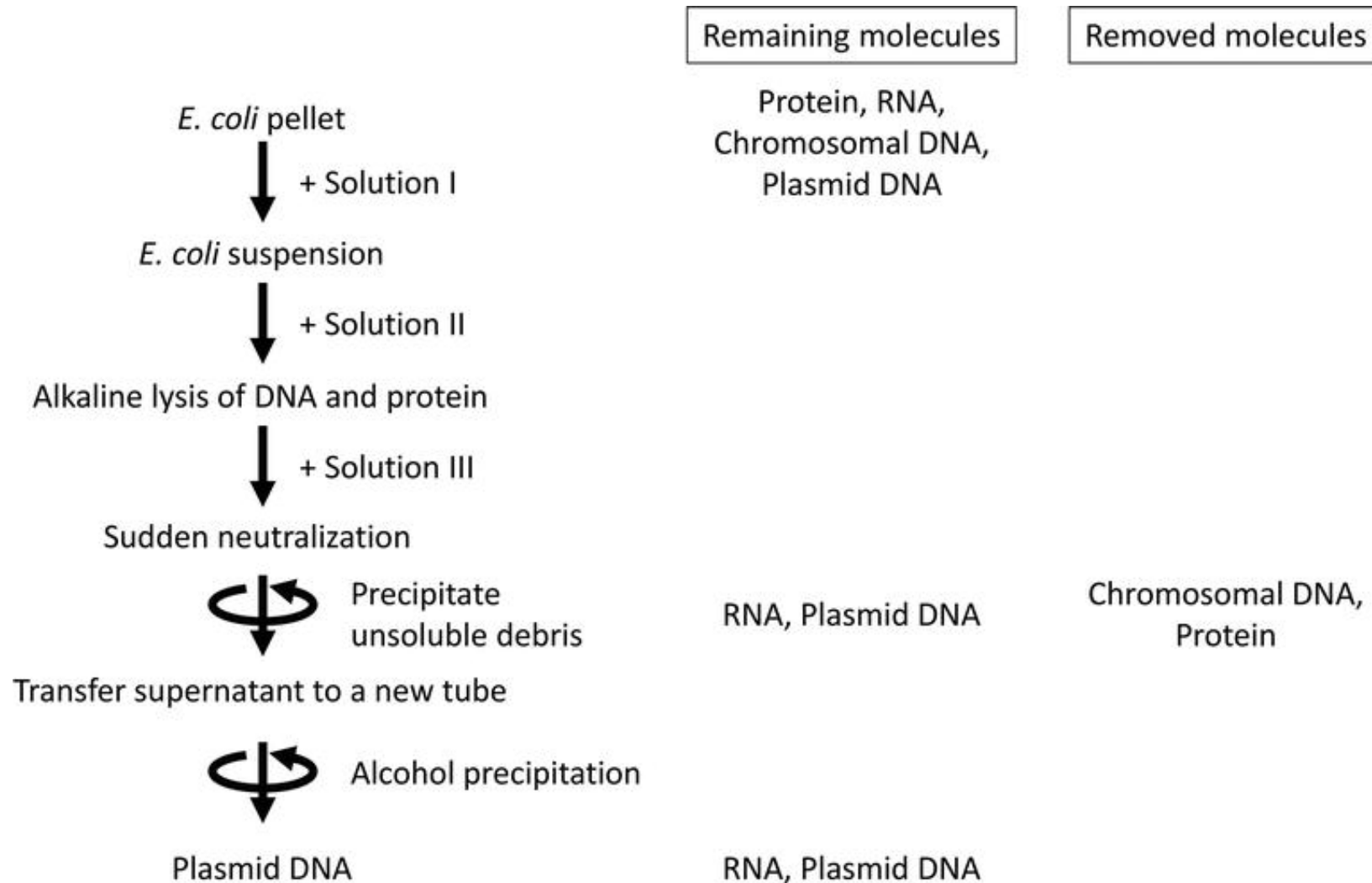
Выделение плазмид

- Очистка плазмиды - это метод, используемый для выделения и очистки плазмидной ДНК из геномной ДНК, белков, рибосом и клеточной стенки бактерий.
- Очистка плазмиды включает три основных этапа:
 - рост бактериальной культуры
 - сбор и лизис бактерий
 - очистка плазмидной ДНК.
- Одним из важных этапов очистки плазмиды является удаление РНК. Рибонуклеазу обычно используют для удаления РНК из образца плазмиды.

Принцип метода щелочного лизиса

- После ресуспендирования кишечной палочки в растворителе (раствор I; 25 мМ Трис / HCl (pH 8,0), 10 мМ ЭДТА) к образцу добавляют щелочной раствор (раствор II; 200 мМ NaOH, 1% SDS). В этом состоянии почти все белки денатурированы. Двухцепочечная структура ДНК также денатурирована до одноцепочечной. Однако даже в таком экстремальном состоянии суперскрученная плазмидная ДНК сохраняет свою структуру стабильной и не денатурированной. Через 5 минут добавляют инкубацию щелочного денатурированного высокосолевого буфера (раствор III; 3 М ацетат калия, pH 5,5) с целью внезапного изменения pH в растворе. В результате денатурированный белок и хромосомная ДНК не возвращаются к своей собственной структуре, что делает эти молекулы нерастворимыми. С другой стороны, плазмидная ДНК остается растворимой, поэтому этап центрифугирования легко отделяет плазмидную ДНК от остатков белков и хромосомной ДНК.

Окончательный принцип выделения плазмиды: денатурация двухцепочечной ДНК путем щелочного лизиса.



- **Yeast Extract–Peptone–Dextrose (YPD) Medium (Liquid or Solid)**

Реагенты	Количество для добавления
H ₂ O	до 1000 мл
Пептон	20 г
Дрожжевой экстракт	10 г
Декстроза	20 г
Агар (для чашек)	20 г

ПОДГОТОВКА КОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК

БУФЕРЫ:

1x TE-LiAc solution

10 mM Tris-HCl, pH 8.0, with 1mM EDTA and 0.1M lithium acetate

PEG-TE-LiAc solution

40% PEG in 10mM Tris-HCl, pH 8.0, with 1mM EDTA and 0.1 M Lithium acetate

1 день:

1. Разведите клетки на обычном YPD-чашке (без антибиотиков) и инкубируйте при 37°C в течение 3-х дней.

День 2:

2. Вечер - отберите одну колонию для инокуляции 5 мл простого YPD (без антибиотиков) и инкубируйте при 30°C в течение ночи при встряхивании.

3 день

3. Используйте 2,5 мл ночной культуры для инокуляции 50 мл простого YPD (без антибиотиков), выращивайте при 30°C при встряхивании до тех пор, пока OD при 600 нм не достигнет ~ 1,0 (проверьте OD через 2 час)

4. Предварительно охладить пробирку по 50 мл на бане с ледяной водой.

5. После достижения OD вылейте клетки в предварительно охлажденные пробирки и инкубируйте при 0°C в течение 15 минут.

6. Вращайте в большой настольной центрифуге при 4°C, 1000 rcf/мин, 5 минут.

7. Ресуспенсируйте каждый клеточный осадок с 10 мл стерильного ледяного буфера PEG-TE-LiAc, осторожно пипетируя (не встряхивайте).

8. Инкубируйте клетки на +4°C при 30 минут.

9. Спин клетки снова при 4°C, 1000 rcf/мин, 5 минут

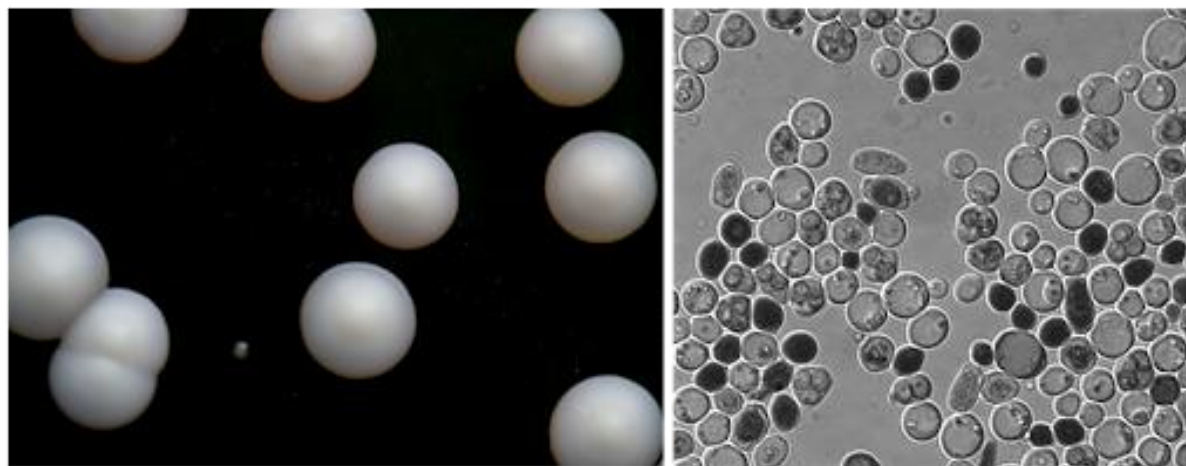
10. Ресуспенсируйте каждый клеточный осадок в 500 мкл стерильного ледяного буфера (не встряхивайте)

11. Аликвотируйте клетки в аликвоты по 100 мкл в пробирках по 1,5 мл.

12. Поместите пробирки в стойки и хранить при +4°C в течении 3х дней.

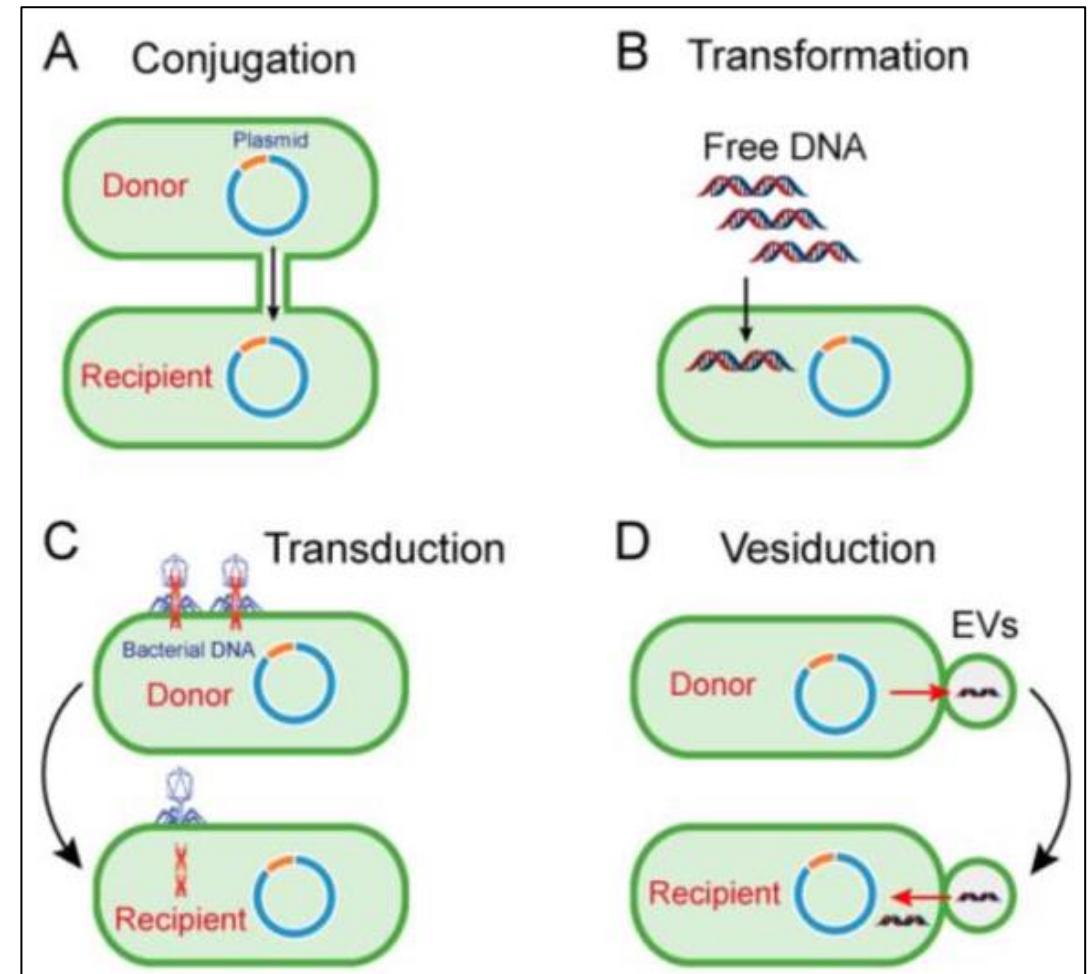
Дрожжевая трансформация

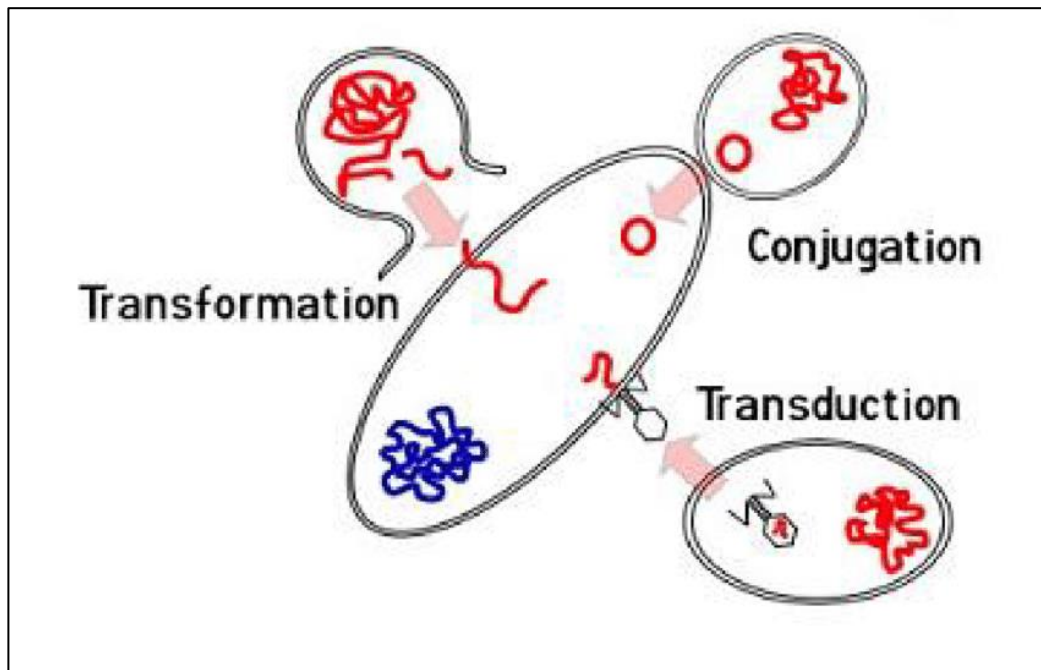
1. К компетентным клеткам добавить 10 мкл 10 мг/мл ДНК семенников лосося в стерильные микроцентрифужные пробирки, предназначенные для трансформации, и одну для отрицательного контроля.
2. Добавьте 1-3 мкг дрожжевой плазмидной ДНК (для изучения) в каждую пробирку и затем встряхните.
3. Добавить 400 мкл свежеприготовленного раствора PEG-TE-LiAc, встряхнуть и инкубировать при 30 ° C в течение 30 минут при встряхивании.
4. Необязательно - DMSO можно добавить до 10% (об./об.); с последующим тепловым шоком в течение 15 минут при 42°C.
5. Ц/ф в течение 30 секунд, ресуспендируйте клетки в стерильной YPD среде и инкубируйте 1,5 часа.
6. Нанесите на чашку YPD.
7. Инкубируйте 2-3 дня.



Способы передачи генетического материала в клетки

- ◆ 1. **Трансформация** – Поглощение клеткой свободной (извне) ДНК из окружающей среды.
 - ✓ у прокариот (бактерии — естественная или искусственная трансформация)
 - ✓ у эукариот (дрожжи, грибы — через LiAc, электропорацию и т.д.)
 - Пример: *E. coli* поглощает плазмиду с геном устойчивости к ампициллину после обработки CaCl_2 .
- ◆ 2. **Трансфекция** - Внесение чужеродной ДНК в эукариотические клетки животных (аналог трансформации, но термин используется только для эукариот).
 - ✓ Методы: липофекция, электропорация, вирусные векторы, кальций-фосфат, наночастицы.
 - Пример: Введение плазмиды с GFP в клетки HEK293.

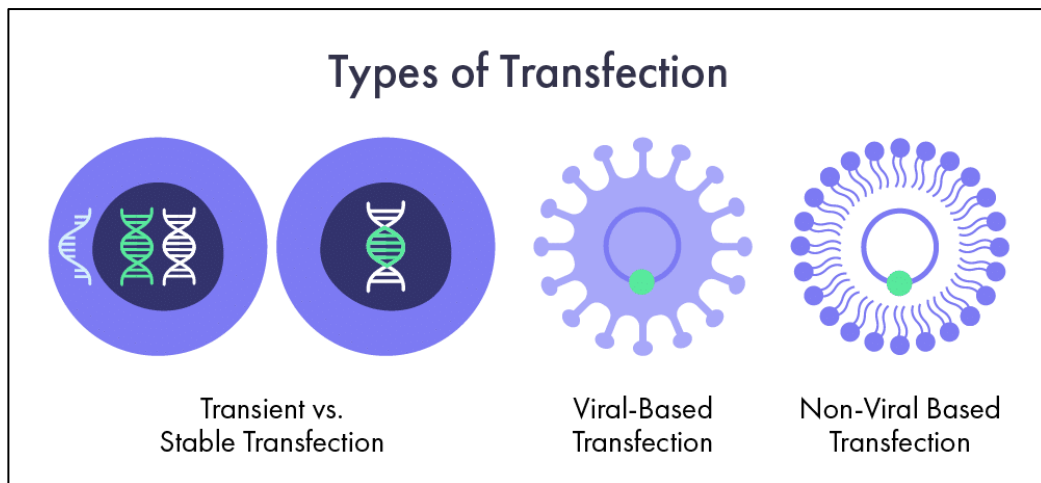




- **3. Конъюгация** - Передача ДНК от одной бактериальной клетки к другой через прямой контакт (половой пилус).

Кто участвует:

- донор (F^+) → реципиент (F^-).
- Тип ДНК: плазмиды / иногда фрагменты хромосомы.
- Пример: Передача F-плазмиды у *E. coli*.



- **4. Трансдукция** - Перенос ДНК из одной бактерии в другую с помощью бактериофага (вируса бактерий).
- Типы: Общая трансдукция — фаг переносит любой фрагмент бактериальной ДНК.
- Специализированная трансдукция — только фрагменты, рядом с сайтом интеграции фага.
- Пример: λ -фаг переносит гены бактерий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Щелкунов С.Н. «Генетическая инженерия», Учебно-справочное пособие. 3-е изд. Новосибирск: СУИ, 2008 – 514 с
2. Жимулев И.Ф. «Общая и молекулярная генетика» учебное пособие. Новосибирск: СУИ, 2007.
3. Sambrook J., Russell D.W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, NY.
4. Маниатис Т., Фрих Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984.
5. Green M.R., Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4th edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
6. Glick B.R., Pasternak J.J., Patten C.L. Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA. 5th edition. ASM Press, 2010.
7. Alberts B. et al. Molecular Biology of the Cell. 6th edition. Garland Science, 2014.
8. Lodish H., Berk A., Zipursky S.L. Molecular Cell Biology. 9th edition. W.H. Freeman, 2021.
9. Becker W.M. et al. The World of the Cell. 9th edition. Pearson, 2015.