ԱԶԱՐՅԱՆ Ն. Հ.

ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ԳԵՆԵՏԻԿԱՅԻ ԳՈՐԾՆԱԿԱՆ ԱՇԽԱՏԱՆՔՆԵՐԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱ-ՄԵԹՈԴԱԿԱՆ ՁԵՌՆԱՐԿ

ԵՐԵՎԱՆ
2006

Այս ուսումնական ձեռնարկում շարադրված են «Մոլեկուլային գենետիկա» առարկայի տեսական ծրագրին համապատասխանող փորձարարական խնդիրներ, միտված ուսանողների ինքնուրույն աշխատանք կատարելու ունակությունը զարգացնելուն: Աշխատանքները կատարելիս օգտագործվում են լաբորատորիաներում առկա հասանելի և մատչելի ռեակտիվներ և սարքավորումներ, ինչը կապահովի գործնական աշխատանքների արդյունավետ անցկացումը ԵՊՀ-ի Կենսաբանական ֆակուլտետի Բջջաբանության և գենետիկայի ամբիոնում և Հայաստանի Հանրապետության մասնագիտական այլ բուհերի համապատասխան ամբիոններում:

Փորձեր կատարելու մեթոդական գրականություն հայերեն լեզվով բացակայում է, ուստի և նպատակահարմար գտանք նախաձեռնել սույն ձեռնարկի պատրաստումը:

ՆԱԽԱԲԱՆ

Սույն ձեռնարկում առաջարկված խնդիրներն ուսանողներին ծանոթացնում են մանրէների և նրանց ֆագերի հետ աշխատելիս կիրառվող գենետիկական հետազոտությունների հիմնական մեթոդներին, ինչպես նաև մանրէաբանական տեխնիկայի եղանակներին: Բակտերիալ շտամերի և նրանց ֆագերի լայն կիրառումը գենետիկական հետազոտություններում բացատրվում է երկու հանգամանքով: Առաջին՝ արագ բազմանալու շնորհիվ կարճ ժամանակահատվածում կարելի է ստանալ այդ օրգանիզմների մեծ քանակ, և երկրորդ՝ մանրէների հապլոիդ լինելը հնարավորություն է ընձեռում անմիջապես հետևելու մուտացիաների կամ ռեկոմբինացիոն երևույթների հետևանքով ի հայտ եկող ֆենոտիպի փոփոխությանը, ինչն իր հերթին դյուրացնում է գենետիկական վերլուծությունը:

Ձեռնարկում արծարծված խնդիրները բաղկացած են վեց մասից: Սկզբում տրվում է տեսական տեղեկությունների այն նվազագույն ծավալը, որն անհրաժեշտ է խնդիրը կատարելու համար, հավելված որոշ գործնական խորհուրդներով: Ստացված արդյունքները մշակելու և վերլուծելու համար այդ գիտելիքը կարելի է լրացնել խնդրի առարկային վերաբերող տեսական ավելի լիարժեք տեղեկատվությամբ, անդրադառնալով *Գրականություն* բաժնում բերված աղբյուրներին: Այնուհետև ձևակերպվում է *Խնդրի նպատակը*:

Շտամեր և միջավայրեր մասում տրվում է օգտագործվող մանրէների և ֆագերի հակիրճ բնութագիրը, թվարկվում են նրանց աճեցման համար անհրաժեշտ լիարժեք, նվազագույն (մինիմալ) աղային և համապատասխան սելեկտիվ միջավայրերը: Վերջիններիս մանրամասն բաղադրությունը բերված է *Հավելված* բաժնում:

Որպեսզի աշխատանքն սկսելիս ուսանողներն ավելի հստակ պատկերացնեն խնդրի կատարման ընթացքն ամբողջությամբ և ընկալեն առանձին գործողությունների իմաստը, ներկայացված է նաև *Փորձի սխեման*, որին հետևում է *Աշխատանքի ընթացքը*: Այստեղ բերվում է խնդրի գործնական մասը կազմող հաջորդական գործողությունների մանրամասն նկարագրությունը: Որոշ փորձերում բերված են ընթացքը պատկերող սխեմաներ: Առաջարկվում են փորձերի արձանագրությունը վարելու համար աղյուսակներ:

Խնդիրները եզրափակում է *Նյութեր և սարքավորումներ* մասը, որում թվարկված են մեկ ուսանողին, ինչպես նաև խմբին փորձը կատարելու համար տրամադրվող կուլտուրաները, միջավայրերը, փորձամանները և սարքավորումները: Այստեղ չեն նշվել լաբորատոր աշխատանքներ կատարելիս մշտապես օգտագործվող լայն նշանակության սարքերը ու սարքավորումները, ինչպիսիք են ավտոկլավները, բարձր ջերմային չորանոցները, սառնարանները, փորձանոթների շտատիվները և այլն:

Ընդգծենք, որ մանրէների հետ աշխատելիս օգտագործվող ամանեղենը, միջավայրերը և լուծույթները պարտադիր կերպով մանրէազերծվում են:

Բոլոր փորձերում կիրառվում են մանրէների գենետիկայի դասական օբյեկտներ, այն է. Escherichia coli-ի տարբեր շտամեր և նրանց բակտերիաֆագերը՝ T4, λ:

Շտամերի և գենետիկական լոկուսների նշանակումները.

Hfr – E. coli K12 – շտամ, որում F պլազմիդը ինտեգրված է բակտերիալ քրոմոսոմի մեջ:

F^+ – շտամ, որում F պլազմիդը ավտոնոմ վիճակում է:

F^- – շտամ, որում F պլազմիդը բացակայում է:

$RP4^+$ – շտամ, որում RP4 պլազմիդը ավտոնոմ վիճակում է:

thr, leu, arg, pro, met, his, thi – տրեոնինի, լեյցինի, արգինինի, պրոլինի, մեթիոնինի, հիստիդինի, թիամինի (վիտամին B1) պահանջմունքները սահմանող լոկուսներ:

lac – լակտոզ շաքարը յուրացնելու ունակության բացակայություն:

str – կայունություն ստրեպտոմիցինի հանդեպ:

bla – կայունություն ամպիցիլինի հանդեպ:

kan – կայունություն կանամիցինի հանդեպ:

tet – կայունություն տետրացիկլինի հանդեպ:

r^- m^- – ռեստրիկտացնող և մոդիֆիկացնող համակարգերի խախտում:

ԽՆԴԻՐ 1

ԿԵՆՍՈՒՆԱԿ ԲՋԻՋՆԵՐԻ ՔԱՆԱԿԻ ՈՐՈՇՈՒՄԸ ԲԱԿՏԵՐԻԱԼ ՍՈՒՍՊԵՆԶԻԱՅՈՒՄ

Կենսունակ են համարվում բարենպաստ պայմաններում անսահման բազմանալու ունակ միաբջիջ օրգանիզմները: Էքսպերիմենտալ եղանակով մանրէների կենսունակությունը գնահատվում է լիարժեք ագարի վրա առաջացած գաղութների քանակով: Քանի որ մանրէների սուսպենզիայում բջիջների ընդհանուր քանակը չի համընկնում կենսունակ բջիջների քանակի հետ, ապա ցանկացած գենետիկական ուսումնասիրություն կատարելիս անհրաժեշտ է *գաղութների քանակը հաշվառելու* մեթոդով որոշել փորձում մասնակցող կենսունակ բջիջների քանակը: Նշված մեթոդը ենթադրում է բակտերիալ սուսպենզիայի նոսրացում, համապատասխան միջավայրերի վրա ցանքի կատարում և ապա՝ աճած գաղութների հաշվառում (ամեն մի կենսունակ մասնիկ, բազմանալով, կազմում է տեսանելի գաղութ և հեշտությամբ հաշվառվում է): Ունենալով այդ թիվը, համապատասխան նոսրացումը և ցանված նմուշի ծավալը, կարելի է որոշել սկզբնական սուսպենզիայում կենսունակ բջիջների քանակը հետևյալ բանաձևով.

$$T = n \times d \div V \qquad (1)$$

որտեղ.

T (տիտր) – կենսունակ միավորների քանակ մեկ մլ-ում,
n – Պետրիի թասերի վրա գաղութների քանակների միջինը,
d – նոսրացում,
V – ցանքի ծավալ:

Սովորաբար օգտագործվող 90-100 մմ տրամագծով Պետրիի թասերի վրա հաշվելու համար հարմար գաղութների թիվը 50-200 է: Տիտրի ճշգրիտ որոշումն ապահովելու համար անհրաժեշտ է հետևյալ պայմանների կատարումը.

1/ նոսրացում կատարելու ընթացքում նմուշները վերցնելուց առաջ սուսպենզիան մանրակրկիտ խառնել,

2/ յուրաքանչյուր նոսրացման համար օգտագործել առանձին պիպետ (բջիջները, նստելով պիպետի արտաքին պատերի վրա, հեռանում են աստիճանաբար, ինչը կարող է հանգեցնել ավելի բարձր ցուցանիշների),

3/ բակտերիալ կուլտուրան դարձնել համասեռ, առանց գնդիկների (առանձին գնդիկը կտա առանձին գաղութ, ինչը կարող է հանգեցնել ավելի ցածր ցուցանիշների),

4/ սնուցիչ միջավայրով Պետրիի թասերը նախապես չորացնել (թաց մակերեսի վրա բաժանվող բջիջների տարածումը կանխելու նպատակով):

Բակտերիալ սուսպենզիայի ցանք կատարելու համար օգտագործվում է մանրէաբանական մածկիչ (շպատել), որը յուրաքանչյուր ցանքից առաջ անհրաժեշտ է մանրէազերծել (թաթախել սպիրտի մեջ և այրել):

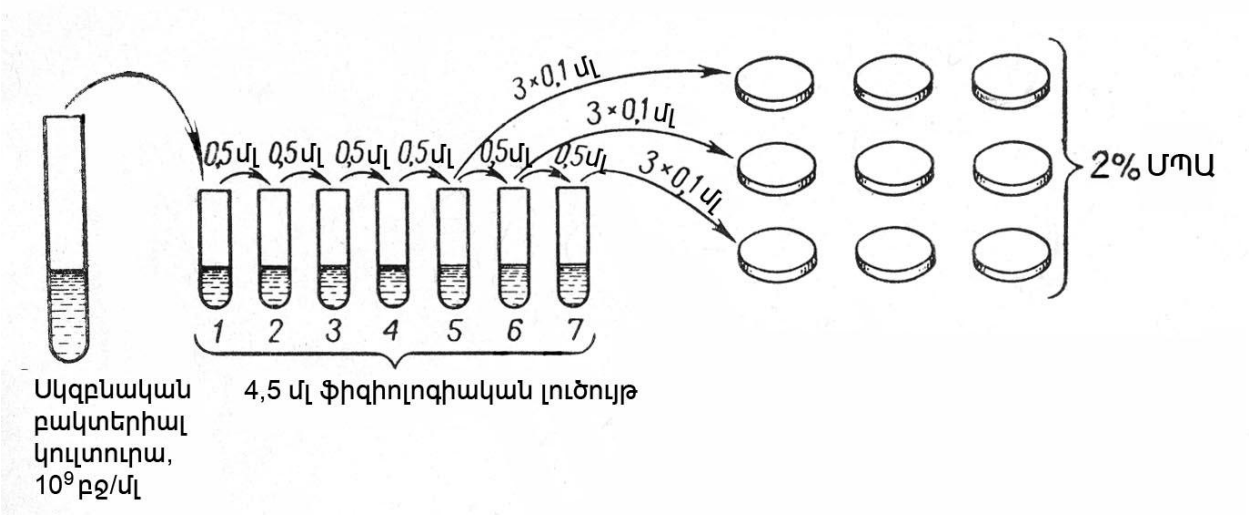
Խնդրի նպատակն է՝ որոշել կենսունակ բջիջների քանակը E.coli-ի շտամերի սուսպենզիաներում:

Շտամեր և միջավայրեր: Խնդիրը կատարելու համար օգտագործում են հետևյալ շտամերի հեղուկ արգանակային կուլտուրաները. E.coli J 53 pro met և C600 thr leu thi, որոնց ստանալու համար առանձին գաղութով վարակում են հեղուկ լիարժեք միջավայրը և ինկուբացնում 6-18 ժամ 37^0C պայմաններում:

Բակտերիալ սուսպենզիաների նոսրացումը կատարում են 0,05 M ֆոսֆատային բուֆերում (pH 7,0) կամ ֆիզիոլոգիական լուծույթում (pH 7,0): Որպես սնուցիչ միջավայր օգտագործում են 2% ագարացված մսապեպտոնային հեղուկ (ՄՊՀ):

Փորձի սխեմա: Կատարում են յոթ նոսրացում, ընդ որում յուրաքանչյուր հաջորդը նախորդից տասն անգամ նոսր: Այնուհետև համապատասխան միջավայրերով Պետրիի թասերի վրա վերջին երեք նոսրացումներից ցանք են կատարում: Թասերի վրա նախապես նշվում են բակտերիալ շտամի անվանումը, նոսրացման թիվը և ցանքը կատարելու ամսաթիվը: 24 ժամվա ընթացքում 37^0C ապահովող տերմոստատում ինկուբացնելուց հետո հաշվում են աճած գաղութների քանակը:

Աշխատանքի ընթացք: Օգտագործվում է 18-ժամյա (գիշերային) արգանակային բակտերիալ կուլտուրա, որից պատրաստում են երկու կրկնողությամբ յոթ հաջորդական նոսրացում: Այս նպատակով 14 փորձանոթների մեջ լցնում են 4,5 մլ բուֆերային կամ ֆիզիոլոգիական լուծույթ և յուրաքանչյուր կրկնողության սրվակները համարակալում են (1ից 7 թվերով): Առաջին սրվակի մեջ զգուշորեն, որպեսզի պիպետը չսուզվի հեղուկի մեջ, ավելացնում են 0,5 մլ սկզբնական բակտերիալ սուսպենզիա: Այս գործողությունը կրկնվում է յոթ անգամ, ամեն անգամ օգտագործելով նոր պիպետ (Նկար 1):



Նկար 1. Նոսրացումների և ցանքի սխեմա:

Առաջին փորձանոթում գիշերային կուլտուրան նոսրանում է 10 անգամ, երկրորդում՝ 10^2 անգամ, երրորդում՝ 10^3անգամ, և այդպես շարունակ մինչև

յոթերորդում՝ 10^7 անգամ: 5-րդ, 6-րդ և 7-րդ նոսրացումներից 0,1-ական մլ նմուշ ցանում են Պետրիի թասերի վրա (հիշեցնենք, որ ցանքը կատարվում է մանրէազերծված ապակյա մածկիչով): Բոլոր թասերը շրջված վիճակում տեղադրվում են 37^0C տերմոստատի մեջ և ինկուբացվում 24 ժամ: Հաջորդ օրը հաշվում են ամեն թասի վրա աճած գաղութները և արդյունքները գրանցում են Աղյուսակ 1-ում:

Աղյուսակ 1

Բակտերիալ սուսպենզիայի տիտրի որոշում

Նոսրացում	Գաղութների թիվ՝ ըստ թասերի քանակի			Տիտր
	1	2	3	
10^{-5}				
10^{-6}				
10^{-7}				

Բանաձև 1-ով հաշվարկվում է բակտերիալ կուլտուրայի տիտրը և գրանցվում աղյուսակում:

Նյութեր և սարքավորումներ: Մեկ ուսանողին. 2 մլ բակտերիալ սուսպենզիա, 40 մլ նոսրացնող լուծույթ, 14 փորձնարվակ, 12 Պետրիի թաս՝ լիարժեք միջավայրով, 10 հատ 1մլ-անոց պիպետ, 1 հատ 5մլ-անոց պիպետ, 1 մանրէաբանական մածկիչ: Խմբին. 1 տերմոստատ (37^0C):

ԽՆԴԻՐ 2

ՖԱԳԱՅԻՆ ԿՈՒԼՏՈՒՐԱՆԵՐԻ ՊԱՏՐԱՍՏՈՒՄ ԵՎ ՏԻՏՐԻ ՈՐՈՇՈՒՄ

Ֆագերը սպիտակուցային պատյանում նուկլեինային թթու պարունակող մասնիկներ են, որոնք վարակում են տեր բջիջները և բազմանում նրանց մեջ, օգտագործելով բջջի ֆերմենտային համակարգերը: Վարակումն սկսվում է բջջաթաղանթի վրա ֆագային մասնիկների ադսորբցիայից: Այնուհետև ֆագային գենոմը (ԴՆԹ-ն կամ ՌՆԹ-ն) ներմուծվում է բջջի մեջ և սկսվում է ֆագային գեների արտահայտումը (էքսպրեսիան) որոշակի հաջորդականությամբ՝ ԴՆԹ-ի սինթեզ, ի-ՌՆԹ-ի սինթեզ, ֆագոսպեցիֆիկ սպիտակուցների սինթեզ, ֆագային պատյանների ինքնահավաքում և, վերջապես, այդ դատարկ պատյանների մեջ ֆագային գենոմների ներթափանցում:

Առաջացած հասուն մասնիկները (քանակով 100-ից ավելի) պայթեցնում են բջիջը, այլ կերպ ասած՝ այն ենթարկում են *լիզիսի*, և դուրս մղվում միջավայր: Ամեն մի նոր մասնիկ վարակում է նոր բջիջ և նկարագրված գործընթացը կրկնվում է, բջջային մարգում առաջացնելով ֆագային գաղութներ փոսիկանման ստերիլ բծերի տեսքով, որոնք, ի տարբերություն ուռուցիկ բակտերիալ գաղութների, կոչվում են բացասական: Ֆագի՝ այս եղանակով զարգացումը կոչվում է *լիտիկ ցիկլ*: Այսպես են բազմանում թե՝ վիրուլենտ, թե՝ չափավոր ֆագերը:

Այդուհանդերձ, չափավոր ֆագերը կարող են զարգանալ նաև մեկ այլ ուղիով, որը կոչվում է *լիզոգեն ցիկլ*: Այս դեպքում ֆագային նուկլեինային թթուն բջջում, ֆագային ֆերմենտների օգնությամբ, ներմուծվում է բակտերիալ քրոմոսոմի մեջ: Իսկ ֆագային հատուկ սպիտակուցները՝ *ռեպրեսորները,* արգելակում են ֆագային գենոմի ավտոնոմ բազմացումը և ներմուծված ֆագային մասնիկը՝ *պրոֆագը,* լինելով բակտերիալ քրոմոսոմի մի մաս, կրկնապատկվում է նրա հետ:

Պրոֆագ պարունակող բակտերիալ շտամերը կոչվում են *լիզոգեն շտամեր*: Այսպիսի շտամերը վարակամերժ են նույն կամ ազգակից ֆագերի նկատմամբ: Պրոֆագը պարբերաբար դուրս է մղվում քրոմոսոմից և զարգանում վերը նկարագրված լիտիկ ուղիով:

Վիրուլենտ ֆագերի գաղութները՝ ստերիլ բծերը, բացարձակ թափանցիկ են, մինչդեռ չափավոր ֆագերը կազմում են խավար գաղութներ, քանի որ սերնդի մի մասը զարգանում է լիզոգեն ուղիով, իսկ լիզոգեն բջիջները, ինչպես նշվեց, չեն քայքայվում: Հենց սրանք էլ խավարություն են հաղորդում չափավոր ֆագերի գաղութներին:

Խնդրի նպատակն է՝ ստանալ խտացված ֆագային պատրաստուկներ վիրուլենտ T4 ֆագի և չափավոր λ ֆագի համար և որոշել նրանց տիտրը զգայուն բակտերիալ շերտի վրա առաջացած բացասական գաղութների հաշվառման եղանակով:

Շտամեր և միջավայրեր: Խնդրի մեջ օգտագործվում են E.coli B շտամի և E.coli JMC 1 շտամի էքսպոնենցիալ արգանակային կուլտուրաները, ինչպես նաև T4 և λ ֆագի սուսպենզիաները: Ֆագային սուսպենզիայի նոսրացումը կատարվում

է հեղուկ լիարժեք L միջավայրում: Ցանքը կատարվում է երկշերտային եղանակով, օգտագործելով 0,7% կիսահեղուկ ագար, որը և կազմում է երկրորդ շերտը:

Փորձի սխեմա: Խտացած ֆագային պատրաստուկ ստանալու համար տվյալ ֆագով (ֆագային մասնիկների քանակը պետք է կազմի 10^5) վարակում են զգայուն բջիջները և, խառնելով կիսահեղուկ ագարի հետ, ցանում լիարժեք միջավայրով Պետրիի թասերի վրա: Այնուհետև, համոզվելով որ վերին շերտը պնդացել է, թասերը շրջված վիճակում դրվում են 37^0C տերմոստատի մեջ՝ ֆագի բազմացման և դրան հետևող բջիջների լիզիսի համար: 24 ժամ անց վերին շերտում առաջացած ֆագային գաղութների քանակն այնքան է, որ նրանք գրեթե միաձուլվում են: Հավաքելով վերին շերտը և ցենտրիֆուգելով այն, վերնստվածքային հեղուկում ստանում են խտացած (10^9 - 10^{12}) ֆագային սուսպենզիա:

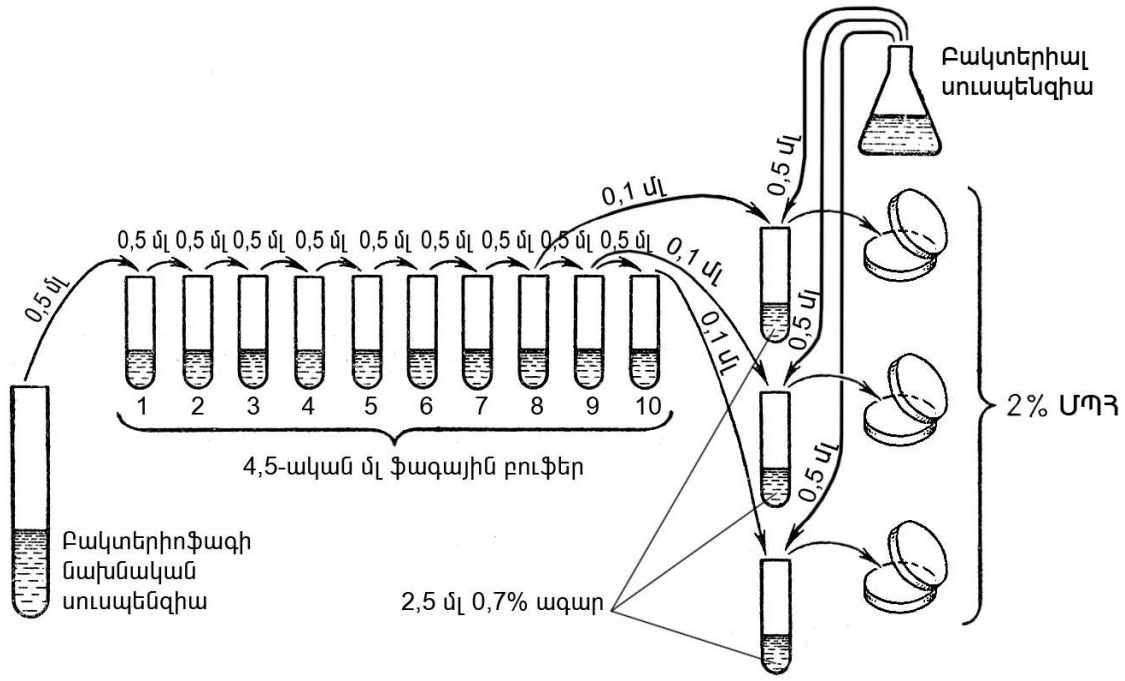
Ստացված սուսպենզիայում տիտրը որոշելու համար կատարում են տաս նոսրացում՝ յուրաքանչյուր հաջորդը նախորդից տասն անգամ նոսր: Այնուհետև համապատասխան միջավայրերով Պետրիի թասերի վրա վերջին երեք նոսրացումից ցանք են կատարում երկշերտային եղանակով: Պետրիի թասերի վրա նախապես նշված են. ֆագի տեսակը, նոսրացման թիվը և ցանքը կատարելու ամսաթիվը: 24 ժամ ինկուբացնելուց հետո (37^0C) հաշվում են աճած գաղութների քանակը:

Աշխատանքի ընթացք: Օգտագործվում են 2,5 ժամ աճեցված հեղուկ բակտերիալ կուլտուրաներ: 2,5 մլ 0,7% ագարը լցնում են 6 փորձանոթների մեջ և, որպեսզի այն չսառչի, տեղադրում են 46^0-47^0C ջրային բաղնիսի մեջ: Յուրաքանչյուր ֆագի համար 2-ական նոր փորձասրվակների մեջ լցնում են 0,5 մլ համապատասխան բակտերիալ կուլտուրա, ապա ավելացնում համապատասխան ֆագային նոսրացումից 0,1 մլ և ինկուբացնում 10-15 րոպե 37^0C տերմոստատի մեջ՝ ադսորբցիան ապահովելու համար: Այս բաղադրությունը լցնում են 0,7% ագար պարունակող փորձանոթների մեջ, թեթևակի խառնում և ցանում Պետրիի թասերի վրա: 24 ժամ ինկուբացնելուց հետո (37^0C) վերին շերտի վրա ավելացնում են 3-5 մլ L արգանակ և ապակյա մածկիչով հավաքում ցենտրիֆուգային փորձասրվակի մեջ: Ցենտրիֆուգում են 3000 պտույտ/րոպե արագությամբ 20 րոպե և վերնստվածքային հեղուկին (ֆագոլիզատին) ավելացնում են մեկ-երկու կաթիլ քլորոֆորմ՝ լիզիսից հետո մնացած բակտերիալ բջիջները ոչնչացնելու համար:

Ֆագոլիզատը տիտրելու համար անհրաժեշտ է. 2,5 ժամյա հեղուկ բակտերիալ կուլտուրա, երկու կրկնողությամբ տաս հաջորդական նոսրացում, 24 0,7% ագար պարունակող փորձասրվակ 46^0 C բաղնիսում:

Նոսրացումների պատրաստման եղանակը նույնն է ինչ **Խնդիր 1**-ի **Փորձի ընթացքում**:

Ցանքի փուլում համապատասխան ֆագային նոսրացումներից վերցնում են 0,1 մլ սուսպենզիա և ներմուծում համապատասխան կուլտուրայից 0,5-ական մլ պարունակող փորձասրվակի մեջ: 15 րոպե ադսորբցիայից հետո բաղադրությունը խառնում են 2,5 մլ 0,7% ագարի հետ և ցանում Պետրիի թասերի վրա (Նկար 2):



Նկար 2. Ֆագային սուսպենզիայի նոսրացման և ցանքի սխեմա

18-24 ժամ ինկուբացիայից հետո հաշվում են ստացված ֆագային գաղութների քանակը և արդյունքը գրանցում Աղյուսակ 1-ում: Տիտրը հաշվարկում են Բանաձև 1-ով:

Արդյունքների վերլուծության ժամանակ անհրաժեշտ է ուշադրություն դարձնել հետևյալին.

ա/ արդյո՞ք ստացված գաղութների քանակների միջև կա տասնապատիկ տարբերություն,

բ/ արդյո՞ք կրկնությունների արդյունքները համապատասխանում են միմյանց,

գ/ արդյո՞ք վիրուլենտ և չափավոր ֆագերի գաղութները համապատասխանում են իրենց բնութագրերին:

Նյութեր և սարքավորումներ: Մեկ ուսանողին. 3 մլ համապատասխան բակտերիալ սուսպենզիա (T = 10^9), 1 մլ ֆագային սուսպենզիա, 100 մլ նոսրացնող լուծույթ, 28 փորձասրվակ 0,7% ագարով, 28 Պետրիի թաս լիարժեք միջավայրով, 40 հատ 1 մլ-անոց պիպետ, 2 հատ 5 մլ-անոց պիպետ, 1 մանրէաբանական մածկիչ, 2 ցենտրիֆուգային փորձասրվակ: Խմբին. 1 տերմոստատ (37^0C), 1 ջրային բաղնիս (46^0C):

ԽՆԴԻՐ 3

ՄՈՒՏԱՑԻՈՆ ՏԵՍՈՒԹՅԱՆ ՀԱՍՏԱՏՈՒՄԸ ԼՈՒՐԻԱՅԻ ԵՎ ԴԵԼԲՐՈՒԿԻ ՖԼՈՒԿՏՈՒԱՑԻՈՆ ՏԵՍՏԻ ՄԻՋՈՑՈՎ

Զանազան գործոնների, այդ թվում նաև դեղորայքի հանդեպ կայուն մանրէների գոյացումը սելեկտիվ միջավայրերի վրա բացատրվում է 2 տեսությամբ. մուտացիոն և հարմարողական (ադապտիվ): Մուտացիոն տեսությունը բացատրում է այն սպոնտան մուտացիաներով, որոնք առաջացել են կուլտուրայի մեջ՝ նախքան նրա վրա սելեկտիվ ագենտի ներգործելը: Կուլտուրայի աճելու ընթացքում մուտացիայի ենթարկված բջջի սերունդը ստեղծում է տվյալ ագենտի հանդեպ կայուն կլոն, կամ գաղութ: Ըստ մուտացիոն տեսության, անկախ կուլտուրաների շարքում սպասելի է մուտանտների թվի կտրուկ տատանում, կախված կուլտուրայի աճի ընթացքում մուտացիայի գոյացման ժամանակից: Ելնելով ասածից, Լուրիան և Դելբրուկը մշակեցին և ներկայացրին մանրէներում մուտացիոն փոփոխականության առկայության առաջին ապացույցները:

Առաջարկվող ֆլուկտուացիոն տեստը հիմնված է մանրէների անկախ կուլտուրաներում մուտանտների թվի տատանումների (ֆլուկտուացիաների) հաշվառման և արդյունքների վիճակագրական վերլուծություններից բխող օրինաչափությունների վրա: Գործնականում ֆլուկտուացիոն տեստը հանգում է որոշակի ագենտների հանդեպ անկախ զուգահեռաբար աճեցված կուլտուրաների շարքում կայուն բջիջների թվի որոշմանը և արդյունքների համեմատմանը մեկ նույն կուլտուրայից վերցված նմուշների տվյալների հետ: Հարմարողական տեսության համաձայն, մեկ կուլտուրայում բոլոր բջիջներն ունեն որոշակի գործոնի հանդեպ կայունություն ձեռք բերելու հավասար հնարավորություններ: Այս դեպքում կայուն բջիջների քանակը ուղիղ համեմատական է պոպուլյացիայում բջիջների թվին և կախված չի կուլտուրայի աճելու ժամանակահատվածից: Հետևաբար, զուգահեռաբար աճեցվող կուլտուրաների շարքում կայուն բջիջները կհայտնաբերվեն մոտավորապես նույն քանակությամբ, այսինքն կտրուկ տատանումներ չեն դիտվի:

Ֆլուկտուացիոն տեստի արդյունքների վիճակագրական գնահատման համար որոշում են անկախ կուլտուրաների նմուշներում գոյացած կայուն բջիջների թվի դիսպերսիան և համեմատում մեկ կուլտուրայից վերցրած մի շարք նմուշներում գոյացած կայուն բջիջների թվի դիսպերսիայի հետ:

Դիսպերսիան տատանումների քառակուսիների գումարի միջինից շեղման և ազատության աստիճանների թվերի հարաբերակցությունն է: Հաշվարկվում է Բանաձև 3-ով.

$$\sigma^2 = \Sigma(M - \bar{M})^2 \div (n - 1) \qquad (2)$$

որտեղ. M – առանձին նմուշում կայուն բջիջների քանակ,
$\bar{M}$ – կայուն բջիջների միջին քանակ,
n – նմուշների քանակ:

Հետազոտություններից պարզվեց, որ անկախ կուլտուրաներից վերցված նմուշների դիսպերսիան զգալիորեն գերազանցում է մեկ կուլտուրայից վերցված նմուշների դիսպերսիայի մեծությունը:

Այսպիսով, Լուրիան և Դելբրուկն ապացուցեցին, որ պոպուլյացիայում նոր հատկանիշների գոյացումը կրում է մուտացիուն բնույթ:

Ներկայումս խնդրո առարկա տեստն օգտագործվում է սպոնտան մուտացիաների հաճախականությունը որոշելու համար: Այդ թիվը հավասար է հայտնաբերված մուտացիաների միջին թվի հարաբերակցությանը նոր առաջացած բջիջների թվին, որոնք գոյատևում են մեկ սերնդի գոյության միջին ժամանակահատվածի ընթացքում:

Հաճախականությունը հաշվարկվում է հետևյալ բանաձևով.

$$a = m \div N_t \qquad (3)$$

որտեղ. a – սպոնտան մուտացիաների հաճախականություն,
m – հայտնաբերված մուտանտների միջին թիվ,
N_t – նոր գոյացած բջիջների թիվ:

Քանի որ $N_t = (N_t - N_0) \div \ln 2$ (N_0 – բջիջների սկզբնական թիվ, N_t – բջիջների վերջնական թիվ), ապա `

$$a = m \times \ln 2 \div (N_1 - N_0) \qquad (4)$$

Ֆլուկտուացիոն տեստի անցկացման համար անհրաժեշտ է ապահովել հետևյալ պայմանների կատարումը.

1/ անկախ կուլտուրաների մեջ ցանվող բակտերիալ բջիջների սկզբնական թիվը պետք է լինի ոչ մեծ (E.coli-ի համար՝ 10-100 բջիջ), ինչը նվազեցնում է արդեն գոյացած մուտանտ բջիջների թիվը նմուշի մեջ ներթափանցելու հնարավորությունը,

2/ անկախ կուլտուրաների ծավալները և նրանց աճեցման ժամանակի տևողությունը պետք է լինեն սահմանափակ, քանի որ հակառակ դեպքում նրանց մեջ եղած տարբերությունները անհետանում են՝ ժամանակի մեջ տարածված մուտացիաների կուտակումների հետևանքով,

3/ բոլոր կուլտուրաները պետք է վարակվեն բջիջների նույն քանակությամբ և ինկուբացվեն համանման պայմաններում:

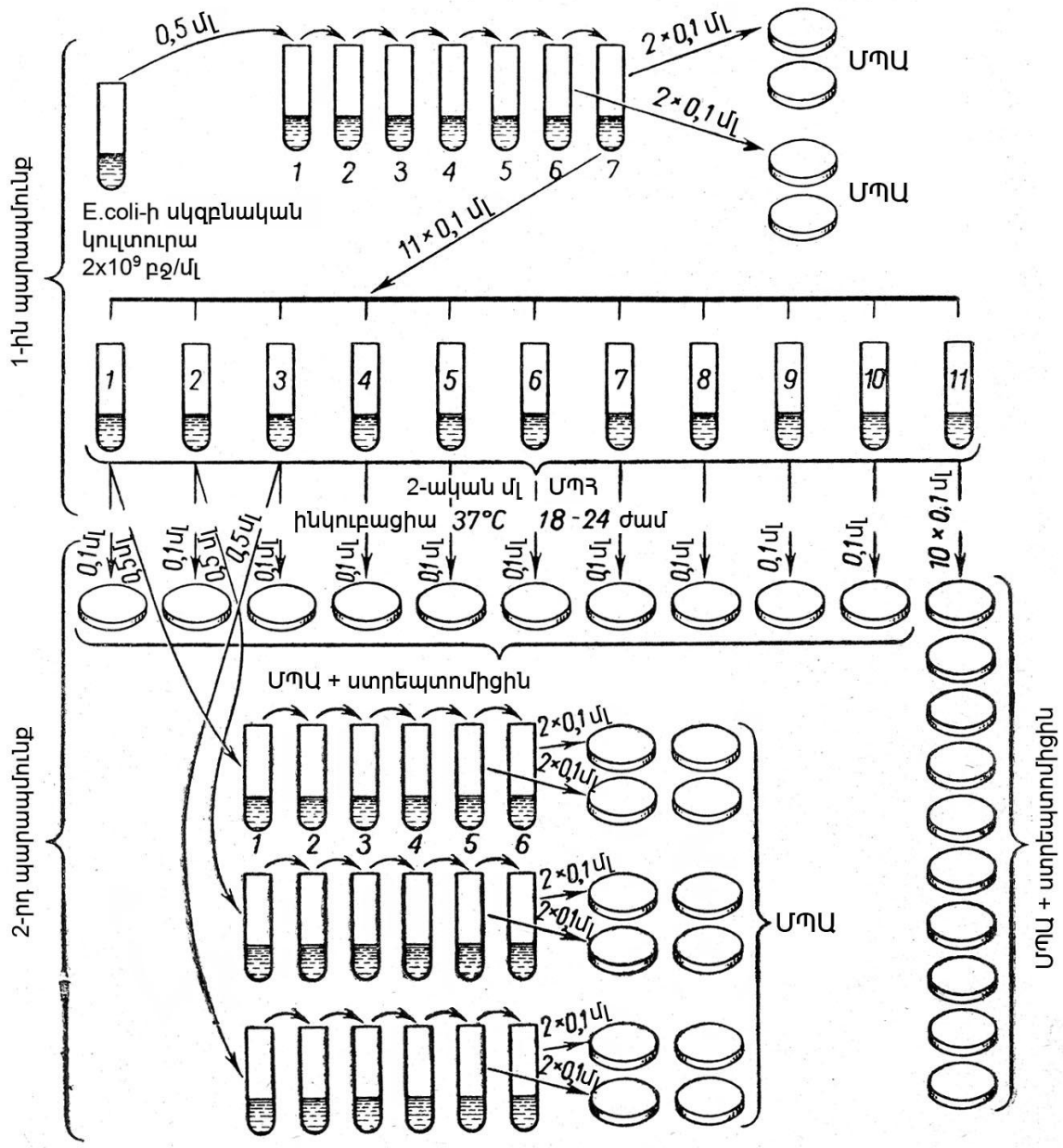
Խնդրի նպատակն է՝ ցուցադրել ֆլուկտուացիոն տեստի կիրառումը ա) E.coli կուլտուրայում առաջացող ստրեպտոմիցինի հանդեպ կայունություն ապահովող հատկանիշի մուտացիոն բնույթն ապացուցելու և բ) սպոնտան մուտացիաների հաճախականությունը որոշելու համար:

Շտամեր և միջավայրեր: Ուսումնասիրության առարկա է ստրեպտոմիցինի նկատմամբ զգայուն վայրի տիպի E.coli K 12 շտամը: Որպես լիարժեք միջավայր օգտագործվում է ՄՊՀ և մսապեպտոնային ագար (ՄՊԱ): Սելեկտիվ միջավայր է ծառայում ստրեպտոմիցին պարունակող (50 մկգ/մլ) ՄՊԱ-ն: Նոսրացումները կատարվում են 0,05 M ֆոսֆատային բուֆերում (pH 7,0):

Փորձի սխեմա: 11 փորձասրվակում ՄՊՀ-ն վարակում են ստրեպտոմիցինի հանդեպ զգայուն E.coli K 12-ի միևնույն քանակությամբ բջիջներով և ինկուբացնում 37^0C տերմոստատում 18-24 ժամ: Աճած կուլտուրաներում որոշում են ստրեպտոմիցինի հանդեպ կայուն բջիջների թիվը հետևյալ կերպ. 10 փորձանոթից (անկախ կուլտուրաներ) վերցնում են մեկական նմուշ և ցանում սելեկտիվ թասերի վրա: 11-րդ փորձանոթից (առաձնին կուլտուրա) վերցնում և ցանում են 10 նմուշ: Բացի այդ, 3 կամավոր ընտրված անկախ կուլտուրաներում որոշում են կենսունակ բջիջների պարունակությունը (T), ի տարբերություն նախորդի՝ ՄՊԱ-ի վրա:

Տերմոստատում ինկուբացումից հետո հաշվում են գաղութների թիվը բոլոր թասերում: Ստացված տվյալները ենթարկվում են վիճակագրական վերլուծության. հաշվարկում և համեմատում են անկախ կուլտուրաների և մեկ կուլտուրայից վերցված մի շարք նմուշների ստրեպտոմիցինի հանդեպ կայուն գաղութների միջին թվաբանականները և դիսպերսիաները: Ստացված տվյալների հիման վրա որոշում են ստրեպտոմիցինի հանդեպ կայունություն ապահովող հատկանիշի առաջացման մուտացիոն բնույթը, ինչպես նաև սպոնտան մուտացիայի հաճախականությունը:

Աշխատանքի ընթացք: Անկախ կուլտուրաներ ստանալու համար E.coli K 12 շտամի 18-ժամյա կուլտուրան (~$2\text{-}5\cdot10^9$) նոսրացնում են 10^7 անգամ, և այդ նոսրացումից 0,1-ական մլ ներմուծում են 2 մլ ՄՊՀ-ով 11 փորձասրվակների մեջ: Անկախ կուլտուրայում ցանված բջիջների քանակն իմանալու նպատակով 11 փորձանոթներից կամավոր ընտրված 3-ի մեջ որոշվում է տիտրը: Նշված 3 փորձանոթների սուսպենզիաները նոսրացնում են յոթ անգամ (ամեն նախորդը հաջորդից 10 անգամ խիտ): 6-րդ և 7-րդ նոսրացումներից 0,1-ական մլ ցանում են՝ յուրաքանչյուրը ՄՊԱ-ով 3 թասի վրա: Բոլոր 10 փորձասրվակներից (անկախ կուլտուրաներ) 0,1-ական մլ նմուշ ցանում են սելեկտիվ միջավայրերի վրա: 11-րդից (առանձին կուլտուրա) 0,1-ական մլ նմուշ ցանում են 10 թասի վրա (Նկար 3):



Նկար 3. Լուրիայի և Դելբրուկի Ֆլուկտուցիոն տեստի կատարում:

Թասերն ինկուբացնում են 37^{0}C տերմոստատում, որից հետո հաշվում են գաղութների քանակը բոլոր թասերի վրա: Ստացված տվյալները, ինչպես նաև դրանց հիման վրա կատարված տիտրերի հաշվարկների արդյունքները գրանցում են Աղյուսակ 2-ում:

<u>Աղյուսակ 2</u>

Սկզբնական և անկախ կուլտուրաներում E.coli K 12 շտամի տիտրի որոշում

Նոսրա-ցում	Սկզբնական կուլտուրա		Անկախ կուլտուրաներ			
	Գաղութների թիվ	Տիտր	Նմուշի #	Նոսրացում	Գաղութների թիվ	Տիտր
10^{-5}			1			
10^{-6}			2			
10^{-7}			3			

Մուտանտ գաղութների հաշվառման արդյունքները գրանցվում են Աղյուսակ 3-ում:

Աղյուսակ 3

Ստրեպտոմիցինի հանդեպ կայուն բջիջների քանակը E.coli K 12 անկախ և առանձին կուլտուրաների նմուշներում

Նմուշի #	Ստրեպտոմիցինի հանդեպ կայուն գաղութների քանակ առանձին կուլտուրայի նմուշներում	Կուլտուրայի #	Ստրեպտոմիցինի հանդեպ կայուն գաղութների քանակ անկախ կուլտուրայի նմուշներում
1		1	
2		2	
3		3	
4		4	
5		5	
6		6	
7		7	
8		8	
9		9	
10		10	
միջին թվաբանական		միջին թվաբանական	
Դիսպերսիա (σ^2)		Դիսպերսիա (σ^2)	

Նյութեր և սարքավորումներ: Մեկ ուսանողին. 2 մլ E.coli K 12 կուլտուրա (T = 2×10^9 բջիջ/մլ), 40 մլ ՄՊՀ, 80 մլ 0,05 M ֆոսֆատային բուֆեր (pH 7,0), 46 փորձասրվակ, 18 թաս ՄՊԱ-ով, 20 թաս ստրեպտոմինիցին պարունակող ՄՊԱ-ով (50 մկգ/մլ), 37 հատ 1 մլ-անոց պիպետ, 5 հատ 5 մլ-անոց պիպետ, 1 հատ ապակյա մանրէաբանական մածկիչ: Խմբին. 1 տերմոստատ (37^0C):

ԽՆԴԻՐ 4

ՈՒԼՏՐԱՄԱՆՈՒՇԱԿԱԳՈՒՅՆ ՃԱՌԱԳԱՅԹՆԵՐԻ /ՈՒՄՃ/ ՄԱՀԱՑՈՒ ԵՎ ՄՈՒՏԱԳԵՆ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ E.coli-ի ԲՋԻՋՆԵՐԻ ՎՐԱ

Գենետիկական վերլուծության հաջողությունը կախված է մեծ քանակով զանազան հատկանիշներով մուտանտների առկայությունից: Նրանց խաչասեռումը միմյանց հետ թույլ է տալիս ճշգրիտ քարտեզավորել ուսումնասիրվող հատկանիշների կառուցվածքային գենները: Բավարար քանակությամբ մուտացիաների առկայությունը հեշտացնում է այս կամ այն միացության կենսաքիմիական սինթեզի կամ տրոհման ուղիների ֆերմենտացիոն փուլերի որոշումը:

Տարբերվում են սպոնտան (առանց որևէ տեսանելի պատճառի կամ փորձարարի կողմից միտումնավոր ներգործության ի հայտ եկած) և մակածված (փորձարարի կողմից ֆիզիկական, քիմիական կամ կենսաբանական գործոնների ազդեցության արդյունքում ի հայտ եկած) մուտացիաներ: Մուտացիա առաջացնող գործոնները կոչվում են *մուտագեններ*:

Ակտիվ մուտագենների շարքին է պատկանում ՈՒՄՃ-ն:

ՈՒՄՃ-ն (260 նմ ալիքի երկարությամբ) E.coli-ի բջիջներում առաջացնում է պիրիմիդինային դիմերներ (թիմինային և ցիտոզինային): Այլ ֆոտոմիացություններ գոյանում են զգալիորեն սակավ քանակով: Հենց այդ երկարության ալիքի ներգործության ժամանակ է նկատվում ԴՆԹ-ի կողմից ՈՒՄՃ-ի առավելագույն կլանումը և դիտվում առավելագույն մահացու և մուտագեն ազդեցությունը, որը, ռեպարացիոն համակարգերի կողմից չշտկվելու դեպքում և անցնելով մեկ կրկնապատկման (ռեպլիկացիայի) ցիկլ, ամրանում է վերարտադրման ընթացքում և առաջացնում ԴՆԹ-ի նուկլեոտիդային հաջորդականության փոփոխում, այն է՝ մուտացիա: ՈՒՄՃ-ն առաջացնում է տարբեր տեսակի մուտացիաներ (հիմքերի փոխարինումներ, դելեցիաներ և այլն): Որպես ՈՒՄՃ-ի աղբյուր գործածվում են մանրէասպան (բակտերիցիդ) լամպեր, որոնք տեղադրվում են ճառագայթվող բջիջներից 60-70 սմ հեռավորության վրա:

Քանի որ ճառագայթման հետևանքով բջիջների զգալի մասը սպանվում է, իսկ մուտացիաներն իրականանում են միայն գոյատևած բջիջներում, անհրաժեշտ է որոշել կուլտուրաների կենսունակությունը ՈՒՄՃ-ի տարբեր չափաբաժիններ կիրառելիս:

Սովորաբար մուտացիաներ մակածելու համար օգտագործվում են ՈՒՄՃ-ի 0,1 – 1% կենսունակություն ապահովող չափաբաժիններ: Քանի որ E.coli-ն ունի ՈՒՄՃ-ի ազդեցության վնասվածքների ռեպարացիայի արդյունավետ մեխանիզմներ, ընդ որում վերջիններիս որոշ տեսակները խթանվում են տեսանելի լույսի ներքո, ապա ճառագայթումը և դրան հետևող բոլոր գործողությունները պետք է կատարվեն մթության մեջ կամ կարմիր լույսի տակ:

Հայտնի է, որ բջիջներն ակտիվորեն կլանում են ՈՒՄՃ-ն, հետևաբար ճառագայթվող բջջային սուսպենզիայի բարձր խտության դեպքում նրանք վահանավորում են ՈՒՄՃ-ն, ինչը նշանակում է, որ ճառագայթման ընթացքում խիտ

կուլտուրան անհրաժեշտ է անընդմեջ խառնել: Դրա կարիքը չկա, եթե սուսպենզիայի խտությունը չի գերազանցում 10^8 բջիջ/մլ:

Ճառագայթումը գերադասելի է կատարել անգույն բուֆերային լուծույթներում, քանի որ սնուցիչ արգանակը ինտենսիվ կերպով կլանում է ՈՒՄՃ-ները, նվազեցնելով նրանց ընդհանուր չափաբաժինը: Բացի այդ, ճառագայթների ազդեցության տակ արգանակում գոյանում են թունավոր միացություններ, որոնք ավելացնում են մահացությունը:

Մահացու ազդեցությունը կախված է նաև կուլտուրայի հասակից: Էքսպոնենցիալ փուլում բջիջներն ավելի զգայուն են, քան ստացիոնար փուլում:

ՈՒՄՃ-ի մուտագեն ազդեցությունը հայտնաբերելու համար հաճախ օգտագործվում են հետադարձ մուտացիաները (ռեվերսիաները), որոնք շատ հարմար են, քանի որ, շնորհիվ սելեկտիվ միջավայրերի օգտագործման, հնարավոր է դառնում մեծացնել ուսումնասիրվող պոպուլյացիայի չափերը: Ճառագայթված կուլտուրան անմիջապես ցանում են նշված միջավայրերի վրա: 48 ժամ ինկուբացնելուց հետո (37^0C) հաշվում են առաջացած մուտանտ գաղութների քանակը: Մուտանտ բջիջների խտությունը հաշվարկում են հետևյալ բանաձևով.

$$r = M \div N \qquad (5)$$

որտեղ.
r – մուտանտ բջիջների խտություն,
M – մուտանտ բջիջների քանակ,
N –կենսունակ բջիջների ընդհանուր քանակ:

Հետազոտվող նմուշում մակածված մուտացիաների հաճախականությունը որոշելու համար մակածված մուտացիաների խտության թվից հանում են նույն նմուշում սպոնտան մուտացիների խտության թիվը: Հետադարձ մուտանտները հայտնաբերվում են սելեկտիվ միջավայրերի վրա վայրի ֆենոտիպը վերականգնվելու դեպքում: Նրանց թիվը սովորաբար աննշան փոքր է: Այդ իսկ պատճառով հետադարձ մուտացիաների խտությունը և հաճախականությունը արտահայտվում է մուտանտների թվի և կենսունակ բջիջների թվի հարաբերակցությամբ:

Ուղիղ մուտացիաներ (ինչպես օրինակ, որոշ հակաբիոտիկների հանդեպ կայունություն ապահովող մուտացիաները) ստանալիս սելեկտիվ միջավայր են հանդիսանում լիարժեք ագարացված և համապատասխան հակաբիոտիկ պարունակող միջավայրերը:

Խնդրի նպատակն է՝ ցուցադրել ՈՒՄՃ-ի մահացու և մուտագեն ազդեցությունը բակտերիալ բջջի վրա, կախված ՈՒՄՃ-ի չափաբաժիններից:

Շտամեր և միջավայրեր: Աշխատանքում օգտագործվում է E.coli C 600 (leu thr thi) շտամը: Որպես աճեցման միջավայրեր օգտագործվում են լիարժեք ՄՊՀ-ն և ՄՊԱ-ն, ինչպես նաև սինթետիկ հեղուկ և ագարացված M-9 միջավայրերը: Սելեկտիվ միջավայրեր ստանալու նպատակով, սինթետիկ միջավայրի մեջ՝ լեյցինի գենով հետադարձ մուտանտներ հայտնաբերելու համար ավելացվում է տրեոնին և տիամին (միջավայր TT1): Մինչդեռ տրեոնինի գենով հետադարձ մուտանտներ հայտնաբերելու համար սինթետիկ միջավայրի մեջ ավելացվում են լեյցին և տիամին (միջավայր LT1):

Բակտերիալ բջիջների նոսրացումների համար օգտագործվում է ֆիզիոլոգիական լուծույթ:

Փորձի սխեմա: ՈՒՄՃ-ի տարբեր չափաբաժիններով ճառագայթում են E.coli C600 շտամի սուսպենզիան: Մի մասը ճառագայթման չի ենթարկվում (բաղդատման համար): Ճառագայթումից հետո ճառագայթված և բաղդատման սուսպենզիաներից ցանք են կատարում լիարժեք և սելեկտիվ միջավայրերով թասերի վրա: Լիարժեք միջավայրի վրա աճած գաղութների թվով որոշում են երկու սուսպենզիաների տիտրերը (այդ տիտրերի հարաբերակցությունից ելնելով դատում են ՈՒՄՃ-ի մահացու ազդեցության մասին): Սելեկտիվ միջավայրի վրա աճած գաղութների թվով որոշում են հետադարձ մուտացիների խտությունը: Ճառագայթված և բաղդատման սուսպենզիաներում գոյացած մուտացիաների խտությունների տարբերությամբ գնահատում են ՈՒՄՃ-ի մուտագեն ազդեցությունը:

Աշխատանքի ընթացք: Փորձի համար անհրաժեշտ է E.coli C600 (T = 10^8-10^9 բջիջ/մլ) կուլտուրան էքսպոնենիցալ փուլում: Բակտերիալ բջիջները լվանում են աճեցման միջավայրից 10 րոպե ցենտրիֆուգելով (6000 պտույտ/րոպե), նստվածքը նոսրացնում են ֆոսֆատային բուֆերի սկզբնական ծավալի մեջ: Ճառագայթումը՝ ՈՒՄՃ-ի տարբեր չափաբաժիններով (15, 30, 60, 90 վայրկյան) իրականացվում է 5 սմ տրամագծով Պետրիի թասերի մեջ: Յուրաքանչյուր թասում ճառագայթվող կուլտուրաների ծավալը 2 մլ է: ՈՒՄՃ-ի ողջ ընթացքում, բակտերիալ սուսպենզիան խառնելու նպատակով, թասերը թեթևակի տարուբերում են: Կենսունակ բջիջների խտությունը որոշելու համար վերցնում են 0,5-ական մլ նմուշներ ճառագայթված և բաղդատման սուսպենզիաներից և նոսրացնում:

Բաղդատման սուսպենզիան նոսրացնում են 10^6 անգամ: Ցանքը կատարում են ՄՊԱ-ով թասերի վրա 10^{-5} և10^{-6} նոսրացումներից:

Ճառագայթված կուլտուրաները, ճառագայթման չափաբաժիններից ելնելով, ցանում են համապատասխան նոսրացումներից 2-ական թասերի վրա հետևյալ եղանակով.

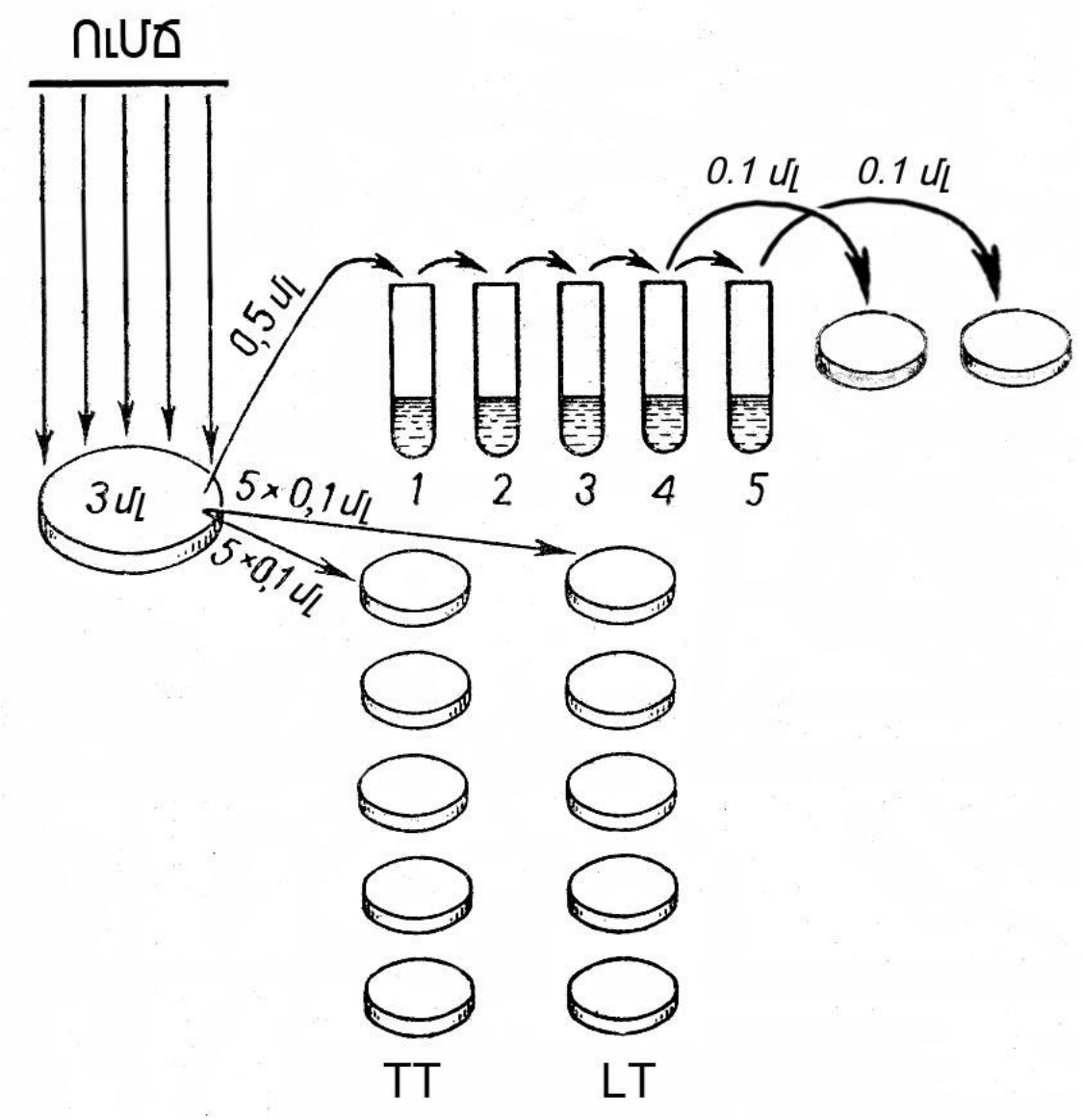
15'' - նոսրացում՝ մինչև 10^5, ցանք՝ 10^{-4} և10^{-5} նոսրացումներից,

30'' - նոսրացում՝ մինչև 10^4, ցանք՝ 10^{-3} և10^{-4} նոսրացումներից,

60'' - նոսրացում՝ մինչև 10^3, ցանք՝ 10^{-2} և10^{-3} նոսրացումներից,

90'' - նոսրացում՝ մինչև 10^2, ցանք՝ 10^{-1} և10^{-2} նոսրացումներից:

Բաղդատման և չորս ճառագայթված սուսպենզիաներում հետադարձ մուտանտների խտությունը որոշելու նպատակով նմուշները ցանում են սելեկտիվ միջավայրերի վրա (Նկար 4):



Նկար 4. ՈՒՄՃ-ի մահացու և մուտագեն ազդեցության ուսումնասիրության սխեմա:

Բոլոր թասերն ինկուբացնում են 24-48 ժամ տերմոստատում, որից հետո հաշվում են լիարժեք և սելեկտիվ միջավայրերի վրա աճած գաղութների քանակը: Արդյունքները գրանցում են Աղյուսակներ 4 և 5 համապատասխանաբար:

Աղյուսակ 4

ՈՒՄՃի մահացու ազդեցությունը E.coli C 600 բջիջների վրա

Նոսրացում	Գաղութների թիվ ըստ ՈՒՄՃ-ի չափաքանակի				
	0’’ (բաղդատում)	15’’	30’’	60‘’	90’’
10^{-1}					
10^{-2}					
10^{-3}					
10^{-4}					
10^{-5}					
10^{-6}					
T					
Կենսունակություն %					

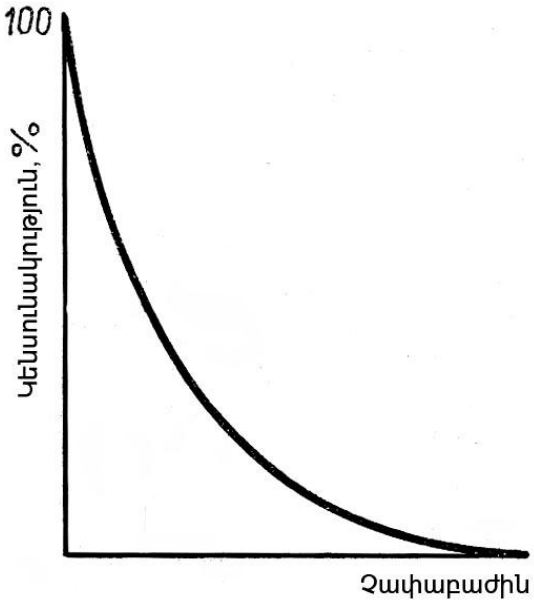
Աղյուսակում գրանցված տվյալներով հաշվարկում են համապատասխան տիտրերը և որոշում ճառագայթված բջիջների կենսունակության տոկոսային հարաբերակցությունը բաղդատման ցուցանիշի հանդեպ:

Աղյուսակ 5

ՈՒՄՃի մուտագեն ազդեցությունը E.coli C 600 բջիջների վրա

Չափա-բաժին	Նմուշի տիտր	Սելեկտիվ միջավայրերի վրա գաղութների թիվ		Գոյացած մուտանտների խտություն յուրաքանչյուր 10^8 բջիջներում		Մակածված մուտացիաների հաճախականություն	
		LT	TT	thr	leu	thr	leu
0’’							
15’’							
30’’							
60’’							
90’’							

ՈՒՄՃ-ի մահացու ազդեցությունը կարելի է արտահայտել գրաֆիկով. աբսցիս առանցքի վրա նշվում են չափաբաժինները, իսկ օրդինատի վրա՝ կենսունակությունը (%) (Նկար 5):



Նկար 5. ՈՒՄՃ-ի չափաբաժնի ազդեցության կոր:

Թվաբանական սանդղակում կենսունակության կորը նախ կտրուկ իջնում է, ապա թեքությունը նվազում է և կորն ընդունում է գրեթե հորիզոնական տեսք:

Հավաստիության համար անհրաժեշտ է ունենալ փորձի մի քանի կրկնողության արդյունքներ: Որպես կրկնողություն կարելի է ընդունել խմբի առանձին ուսանողների կատարած փորձը:

Նույթեր և սարքավորումներ: Մեկ ուսանողին. 15 մլ E.coli C 600 բջիջների սուսպենզիա (T = 2 × 10^{10} բջիջ/մլ) 0,05 M բուֆերում (pH 7,0), 200 մլ 0,05 M ֆոսֆատային բուֆեր, 20 թաս ՄՊԱ-ով, 25-ական թաս LT և TT ագարով, 25 փորձասրվակ 4,5 մլ բուֆերային լուծույթով, 4 Պետրիի թաս (D = 5 սմ), 35 հատ 1 մլ-անոց պիպետ, 5 հատ 5 մլ-անոց պիպետ, 1 մանրէաբանական ապակյա մածկիչ: Խմբին. մեկ 37^0 C տերմոստատ, ցենտրիֆուգա, ՈՒՄՃ-ի լամպ, վայրկյանաչափ:

ԳԵՆԵՏԻԿԱԿԱՆ ՌԵԿՈՄԲԻՆԱՑԻԱՆ

ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐՈՒՄ

XX դարի կեսերին հայտնաբերվեց, որ կոմբինատիվ փոփոխականությունը, որի շնորհիվ նոր օրգանիզմներն օժտվում են երկու ծնողների հատկանիշներով, բնորոշ է նաև մանրէների համար: Գեների նոր զուգակցությունների գոյանալը մանրէներում իրականանում է 3 տեսակի գենետիկական փոխանակման մեխանիզմներով, դրանք են՝ կոնյուգացիան, տրանսդուկցիան և տրանսֆորմացիան: Այս պրոցեսների հայտնաբերումը և օգտագործումը գենետիկական վերլուծության նպատակով նպաստեցին մանրէների գենետիկական կազմակերպման պարզաբանմանը:

ԽՆԴԻՐ 5

ԿՈՆՅՈՒԳԱՑԻԱ

Կոնյուգացիան գենետիկական տեղեկատվության միակողմանի փոխանցում է, որի համար անհրաժեշտ պայման է հանդիսանում երկու բջիջների միջև անմիջական շփումը: Այս երևույթը՝ բարձրագույն օրգանիզմների համանման պրոցեսի օրինակով, կոչվում են սեռական: Բջիջներից մեկը հանդես է գալիս որպես դոնոր (արական բջիջ), իսկ մյուսը՝ ռեցիպիենտ (իգական բջիջ): Դոնորային բջիջը տարբերվում է լրացուցիչ արտաքրոմոսոմային օղակաձև ԴՆԹ-ի մոլեկուլի առկայությամբ: Մոլեկուլի կազմում կան գեներ, որոնք կոդավորում են դոնորային բջջի մակերեսի վրա սեռական թելիկների՝ *պիլիների* գոյացումը: Պիլիները բջիջների անմիջական շփման ժամանակ հանդես են գալիս որպես կամրջակ, որով և տեղի է ունենում ԴՆԹ-ի փոխանցումը մեկ բջջից մյուսին: Բացի նշված գեներից, այդ ԴՆԹ-ի մոլեկուլի կազմում կան նաև գեներ, որոնք ապահովում են նրա կրկնապատկումը, ինչպես նաև գեներ, որոնք կոդավորում են մոլեկուլի՝ փոխադրում իրականացնելու ունակությունը:

Ներկայացված արտաքրոմոսոմային ԴՆԹ-ի մոլեկուլները կոչվում են *պլազմիդներ*: Նրանցից ոմանք պարունակում են միայն ինքնակրկնապատկման գեներ և չեն պարունակում ֆենոտիպորեն արտահայտվող այլ գեներ: Այսպիսի պլազմիդները կոչվում են *կրիպտիկ*, կամ քողարկված: Կան պլազմիդներ, որոնք, թվարկածներից բացի, ունեն նաև դեղամիջոցների հանդեպ կայունություն կոդավորող, տարբեր ֆերմենտների և տոքսինների սինթեզ կոդավորող և այլ հատկություններ որոշող գեներ:

Պլազմիդները կարող են գտնվել բջջի մեջ *ինքնուրույն* (ավտոնոմ) կամ *ինտեգրված* վիճակում: Ինքնուրույն վիճակում պլազմիդը կրկնապատկվում է և շփման ժամանակ բջջից բջիջ է փոխանցվում անկախ բակտերիալ քրոմոսոմից: Ինտեգրված վիճակում, երբ պլազմիդային ԴՆԹ-ն ներմուծված է բակտերիալ

քրոմոսոմի մեջ և կրկնապատկվում է նրա կազմում, այն ապահովում է քրոմոսոմային գեների փոխանցումը ռեցիպիենտ բջջին:

Այսպիսի պլազմիդներից առաջինը հայտնաբերվել և նկարագրվել է *F* (fertility – պտղաբերություն) պլազմիդը: Ինքնուրույն վիճակում F պլազմիդ պարունակող բջիջները նշվում են F^+: F պլազմիդ չպարունակող ռեցիպիենտ բջիջները նշվում են F^-:

Հետագայում տարբեր բակտերիալ տեսակներում հայտնաբերվել են նաև այլ պլազմիդներ, որոնք ևս ունակ են փոխանցվելու դոնորից ռեցիպիենտին: Այդ թվին են պատկանում դեղամիջոցների հանդեպ կայունություն ապահովող *R* (resistance – դիմադրողականություն) պլազմիդները:

$F^+ \times F^-$ խաչասեռման ժամանակ գոյանում են ռեցիպիենտ բջջի բոլոր հատկանիշները կրող բջիջներ, որոնք լրացուցիչ ձեռք են բերել նաև F պլազմիդը, դառնալով դոնորային (F^+) բջիջներ: Այդպիսի բջիջներ գոյանում են 10^{-4} հաճախականությամբ: Որոշ խաչասեռոմներից բոլոր դեպքերում չէ որ ռեցիպիենտ բջիջը ձեռք է բերում դոնորային բջջի հատկություն: Պարզվել է, որ դա տեղի է ունենում, երբ դոնորում պլազմիդային ԴՆԹ-ն ներմուծված է բակտերիալ քրոմոսոմի մեջ: Այդ դոնորները նշվում են *Hfr* (high frequency recombination – բարձր հաճախականությամբ ռեկոմբինացիա): Կոնյուգացիոն խաչասեռումներից ստացված բջիջները կոչվում են *ռեկոմբինանտ* բջիջներ, կամ *տրանսկոնյուգանտներ*:

Կոնյուգացիայի ժամանակ տեղի ունեցող գենետիկական ռեկոմբինացիայի գործընթացը բաժանվում է մի քանի փուլի. ա) դոնոր և ռեցիպիենտ բջիջների հանդիպում, բ) նրանց միջև հաստատուն շփման կայացում և կամրջակի գոյացում, գ) գենետիկական տեղեկատվության փոխանցում, դ) ռեկոմբինանտ բջիջ հանդիսացող զիգոտի կազմավորում: Եթե դոնորը F^+ է, բոլոր զիգոտները դառնում են F^+:

Hfr դոնորի դեպքում գործընթացն ունի հետևյալ առանձնահատկությունները.

1. Տեղեկատվության փոխանցման փուլում առաջին հերթին, խիստ կողմնորոշված և հատուկ կարգով, փոխանցվում են քրոմոսոմային գեները: Բջիջների շփման ժամանակ օղակաձև բակտերիալ քրոմոսոմը ճեղքվում է ինտեգրված F սեռական գործոնին պատկանող հատուկ լոկուսում (O), և հենց այստեղից էլ սկսվում է քրոմոսոմային գեների փոխանցումը: O լոկուսի տեղակայումը և փոխանցման ուղղությունն սպեցիֆիկ են և կախված են պլազմիդի ներմուծման կետից: Սրանով է պայմանավորված տարբեր Hfr դոնորային շտամերի առկայությունը:

2. Գեների փոխադրման արագությունն ստանդարտ պայմաններում անփոփոխ է: Դա նշանակում է, որ դոնորի յուրաքանչյուր գեն հայտնվում է ռեցիպիենտ բջջում խաչասեռումն սկսվելուց որոշակի ժամանակ անց:

3. Փոխադրումը մասնակի է. քրոմոսոմի՝ ռեցիպիենտ բջիջ փոխադրվելու ընթացքում բջիջների միջև շփումը կարող է խախտվել, ինչի հետևանքով փոխադրումը կարող է ընդհատվել և ռեցիպիենտ բջջում կհայտնվի քրոմոսոմի արդեն փոխանցված մասը միայն: Կախված գեների և փոխադրման սկիզբ հանդիսացող O կետի միջև եղած հեռավորությունից՝ գեների թափանցման հավանականությունը ռեցիպիենտ բջջի մեջ նվազում է էքսպոնենցիալ օրինաչափությամբ:

Դոնորի գենոմի մի մասը պարունակող այսպիսի զիգոտները ոչ լրիվ դիպլոիդ են և կոչվում են *մերոզիգոտներ*: Մերոզիգոտի մեջ հայտնված դոնոր-գեներից յուրաքանչյուրը ռեցիպիենտ քրոմոսոմի մեջ քրոսինգովերի շնորհիվ ինտեգրվելու հավասար հնարավորություններ ունի: Ռեցիպիենտի կողմից դոնորային հատկանիշների ձեռքբերումը տեղի է ունենում անընդմեջ գրադիենտով: Այդ իսկ պատճառով կոնյուգացիան կարելի է օգտագործել գենետիկական քարտեզավորման նպատակով: Մեկ րոպեում դոնորից ռեցիպիենտ է փոխանցվում հիմքերի մոտ 40 000 զույգ, այսինքն բակտերիալ քրոմոսոմի մոտ 1%-ը: Հետևաբար, ամբողջ բակտերիալ քրոմոսոմի փոխանցումը կպահանջի մոտ 90-100 րոպե: Եթե խաչասեռումն իրականացվի դոնոր-ռեցիպիենտ կապի պարբերաբար ընդհատումով, ապա գեները կարելի է քարտեզավորել ըստ նրանց՝ ռեցիպիենտ բջջում հայտնվելու ժամանակի: Բջջում հայտնվելը գնահատվում է տվյալ գենը ժառանգած ռեկոմբինանտ գաղութների գոյացմամբ:

Ռեկոմբինանտների քանակը հաշվարկելու համար կոնյուգացիոն խառնուրդից ցանքեր են կատարվում մի շարք սելեկտիվ միջավայրերի վրա, որտեղ կարող են աճել միայն այն գենն ստացած բջիջները, որի (գենի) բացակայության դեպքում տվյալ միջավայրում ռեցիպիենտ բջիջներ աճել չեն կարող: Այս ռեկոմբինանտերի գոյացման հաճախականությունն արտահայտվում է նրանց և կոնյուգացիոն խառնուրդում դոնորային բջիջների քանակների տոկոսային հարաբերակցությամբ:

Խնդիրը բաղկացած է 2 առաջադրանքից:

ԱՌԱՋԱԴՐԱՆՔ 1

ԳԵՆԵՐԻ ԴԱՍԱՎՈՐՄԱՆ ԿԱՐԳԻ ՈՐՈՇՈՒՄՆ ԸՍՏ ՆՐԱՆՑ ՓՈԽԱՆՑՄԱՆ ԳՐԱԴԻԵՆՏԻ

Առաջադրանքի նպատակ: Պրոլինի (pro) և մետիոնինի (met) գեների տեղակայման որոշումը E.coli քրոմոսոմի վրա:

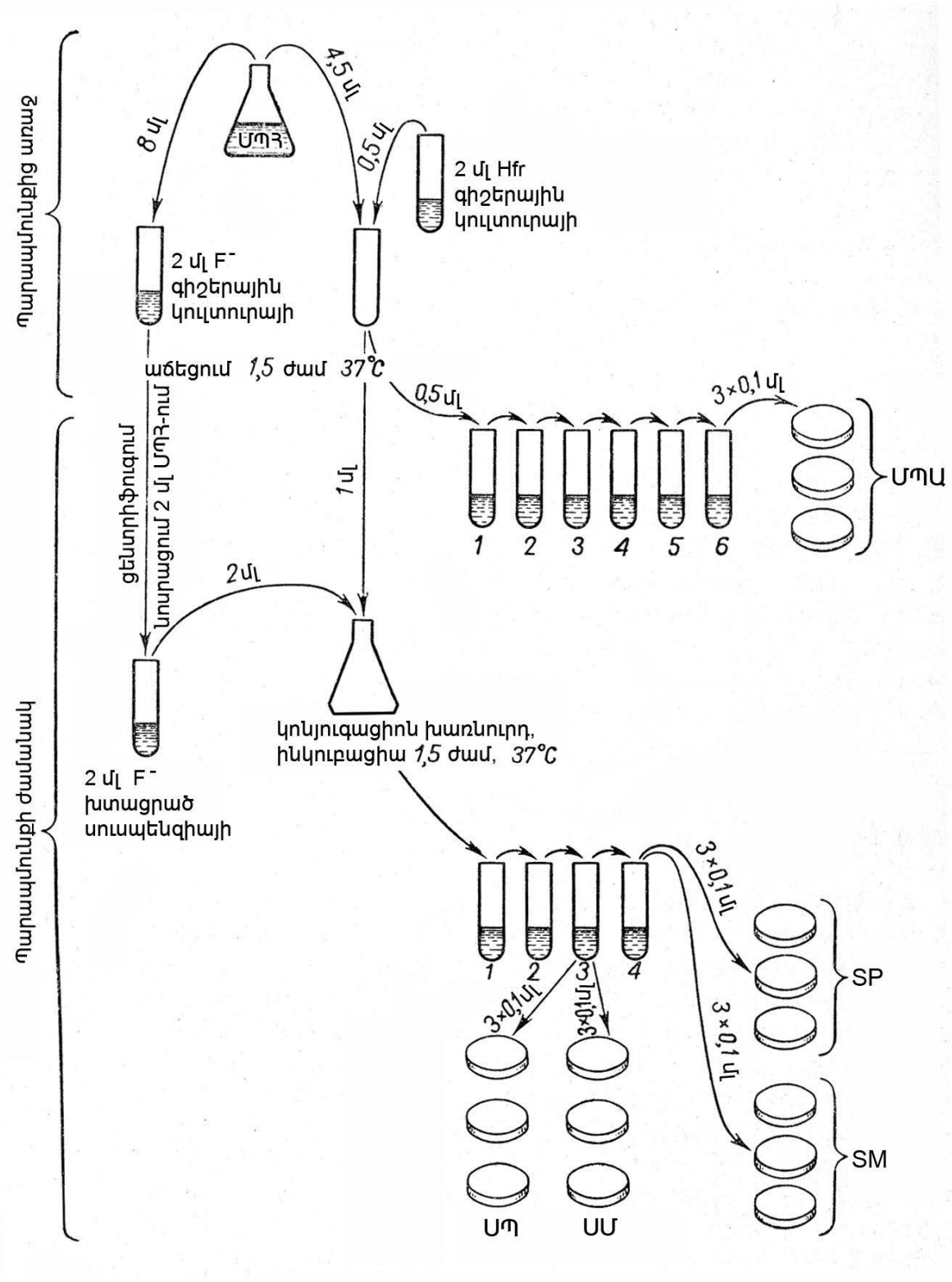
Շտամեր և միջավայրեր: Խաչասեռման ժամանակ օգտագործվում են E.coli P13 Hfr str-s շտամը (դոնոր) և E.coli J 53 F^- pro met str-r շտամը (ռեցիպիենտ): Որպես լիարժեք օգտագործվում են ՄՊՀ և ՄՊԱ միջավայրերը, իսկ որպես մինիմալ՝ հեղուկ և ագարացված M9 միջավայրը: Ստրեպտոմիցին և պրոլին պարունակող (SP) և ստրեպտոմիցին և մետիոնին պարունակող (SM) սելեկտիվ միջավայրեր ստանալու համար M9 միջավայրին ավելացնում են համապատասխան նյութեր: Ստրեպտոմիցինը ներմուծվում է մինչև 100 մկգ/մլ, իսկ ամինաթթուները՝ 10մկգ/մլ խտություններ ստանալը: Նոսրացումները կատարվում են ֆիզիոլոգիական լուծույթում:

Փորձի սխեմա: Կատարվում է E.coli P13 Hfr str-s և E.coli J 53 F^- pro met str-r շտամերի խաչասեռում: Արդյունքում գոյանում են երկու ծնողական շտամերի հատկանիշները զուգակցող ռեկոմբինանտներ: Համապատասխան սելեկտիվ միջավայրերի վրա կատարում են ռեկոմբինանտների ընտրություն՝ ըստ յուրաքանչյուր երկու ուսումնասիրվող մարկերի: Ռեկոմբինանտների գոյացման

հաճախականությունն արտահայտվում է նրանց՝ և կոնյուգացիոն խառնուրդում դոնորային բջիջների քանակների տոկոսային հարաբերակցությամբ: Որոշվում է այդ գեների դասավորման հերթականությունը քրոմոսոմի փոխանցման սկզբնական կետի (O) հանդեպ:

Աշխատանքի ընթացք: Պարապմունքի նախօրեին ծնողական շտամերի կուլտուրաները ցանում են 2 մլ արգանակ պարունակող փորձասրվակների մեջ և ինկուբացնում 18 ժամ 37^0C տերմոստատում: Այնուհետև ռեցիպիենտ կուլտուրան նոսրացնում են 5 անգամ. ավելացնում են 8 մլ մինչև 37^0C տաքացրած թարմ ՄՊՀ): Դոնորային բջիջները նոսրացնում են 10 անգամ. 0,5 մլ գիշերային կուլտուրային ավելացնում են 4,5 մլ տաքացրած թարմ ՄՊՀ: Երկու փորձասրվակները ինկուբացնում են թափահարիչի վրա 37^0C տերմոստատում 1,5 ժամ: Ուսանողներն ստանում են պատրաստի 2 մլ դոնորային և 10 մլ ռեցիպիենտ կուլտուրաներ: Ռեցիպիենտ կուլտուրան անմիջապես տեղափոխվում է ցենտիֆուգային փորձասրվակ: 6 000 պտույտ/րոպե արագությամբ 10 րոպե ցենտրիֆուգելու արդյունքում ստացվում է բակտերիալ բջիջների նստվածք, որը լուծում են 2 մլ թարմ ՄՊՀ-ում:

Խաչասեռման համար 50 մլ փորձանոթի մեջ ներմուծում են 1 մլ դոնորային և 2 մլ ռեցիպիենտ կուլտուրաների սուսպենզիաներ: Խառնուրդն ինկուբացնում են 1,5 ժամ 37^0C տերմոստատում: Խաչասեռման ժամանակահատվածում կատարում են Hfr դոնորային բջիջների նոսրացումներ, ինչի համար նրանց սուսպենզիայից պատրաստում են 6 տասնապատիկ նոսրացում: Վերջինից 0,1-ական 3 նմուշ ցանում են ՄՊԱ-ով թասերի վրա և դնում 37^0C տերմոստատի մեջ: Միևնույն ժամանակ ստուգվում են ծնողական շտամերը: Մասնավորապես, պետք է համոզվել, որ 2 շտամերի բջիջներն ընդունակ չեն գաղութներ առաջացնել սելեկտիվ միջավայրերի վրա. ստրեպտոմիցինի առկայությունը խոչընդոտում է դոնորի աճը, իսկ անհրաժեշտ ամինաթթուների պակաս լինելը՝ ռեցիպիենտի աճը: Խաչասեռման ավարտից հետո կոնյուգացիոն խառնորդը նոսրացնում են 10^4 անգամ: 10^{-4} և 10^{-3} նոսրացումներից ցանք են կատարում SP և SM սելեկտիվ միջավայրերի վրա: Թասերն ինկուբացնում են 48 ժամ (Նկար 6):



Նկար 6. E.coli P13 Hfr str-s × E.coli J 53 F⁻ pro met str-r շտամերի խաչասեռում:

Ռեկոմբինանտ գաղութները հաշվում են սելեկտիվ միջավայրի վրա, իսկ Hfr գաղութները՝ ՄՊԱ միջավայրի վրա: Արդյունքները գրանցում են Աղյուսակ 6-ում:

Աղյուսակ 6

Պրոտոտրոֆ ռեկոմբինանտների գոյացության հաճախականությունը E.coli P13 Hfr str-s × E.coli J 53 F⁻ pro met str-r շտամների կոնյուգացիոն խաչասեռումում

Միջավայր	Գաղութ	Նոսրացում	Գաղութների քանակ	Կոնյուգացիոն խառնուրդում բջիջների խտություն	Ռեկոմբինանտ գաղութների պարունակություն (100 Hfr բջիջում)
SP	met^+	10^{-3}			
		10^{-4}			
SM	pro^+	10^{-3}			
		10^{-4}			
ՄՊԱ	Hfr	10^{-6}			

Ստացված տվյալների հիման վրա որոշվում է պրոլին և մեթիոնին գեների դասավորման կարգը E.coli քրոմոսոմում:

Նյութեր և սարքավորումներ: Մեկ ուսանողին. 10 մլ թարմացրած արգանակային ռեցիպիենտ կուլտուրա, 3 մլ դոնորային կուլտուրա, 50 մլ ֆիզիոլոգիական լուծույթ, 10 մլ ՄՊՀ, 3 հատ ՄՊԱ-ով Պետրիի թաս, 6-ական SP-ով և SM-ով Պետրիի թաս, 1 հատ 50 մլ ծավալի փորձանոթ, 10 փորձասրվակ, 17 հատ 1 մլ-անոց պիպետ, 2 հատ 5 մլ-անոց պիպետ, 1 մանրէաբանական ապակյա մածկիչ:

ԱՌԱՋԱԴՐԱՆՔ 2

ԱՎՏՈՆՈՄ RP4 ՊԼԱԶՄԻԴԻ ՓՈԽԱՆՑՈՒՄԸ E.coli K12 RP4 և R⁻ ՇՏԱՄԵՐԻ ԽԱՉԱՍԵՌՈՒՄՈՒՄ

Առաջադրանքի նպատակ: Որոշել ավտոնոմ RP4 պլազմիդի փոխանցման հաճախականությունը E.coli C 600 RP4 str-s և J53 str-r խաչասեռման ընթացքում և ցույց տալ, որ RP4 պլազմիդի՝ ամպիցիլին, տետրացիկլին և կանամիցին հակաբիոտիկների հանդեպ կայունություն ապահովող 3 գեները փոխանցվում են միևնույն հաճախականությամբ:

Շտամեր և միջավայրեր: Խաչասեռումներում օգտագործվում են E.coli-ի C600 leu thr thi str-s RP4 (bla tet kan) և J53 R⁻ pro met str-r շտամերը: RP4 պլազմիդի bla tet kan գեների առկայությունը պայմանավորում է C600 շտամի բջիջների կայունությունը ամպիցիլինի (Ap), տետրացիկլինի (Tc) և կանամիցինի (Km) նկատմամբ: Որպես լիարժեք օգտագործվում է ՄՊԱ միջավայրը, իսկ որպես սելեկտիվ՝ ՄՊԱ+ ստրեպտոմիցին + ամպիցիլին (ՄՊԱՍԱ), ՄՊԱ + ստրեպտոմիցին + տետրացիկլին (ՄՊԱՍS) և ՄՊԱ + ստրեպտոմիցին + կանամիցին (ՄՊԱՍԿ)

միջավայրերը: Ստրեպտոմիցինի, ամպիցիլինի և կանամիցինի պարունակությունը սելեկտիվ միջավայրերում կազմում է 100 մկգ/մլ, իսկ տետրացիկլինինը՝ 20 մկգ/մլ: Նոսրացումները կատարվում են ֆիզիոլոգիական լուծույթում:

Փորձի սխեմա: Լիարժեք հեղուկ միջավայրում կատարում են երկու E.coli շտամերի խաչասեռում. C600 leu thr thi str-s RP4 (bla tet kan) և J53 R^- pro met str-r: Կոնյուգացիոն խառնուրդը ինկուբացնում են 2,5 ժամ առանց թափահարման, որից հետո սելեկտիվ միջավայրերի վրա ցանում են խառնուրդից վերցված նմուշները: Սելեկտիվ միջավայրերում ստրեպտոմիցինի առկայությունը բացառում է դոնոր շտամի աճը (այն զգայուն է ստրեպտոմիցինի հանդեպ), իսկ ամպիցիլինը, տետրացիկլինը և կանամիցինը բացառում են ռեցիպիենտ շտամի աճը (այն զգայուն է այդ 3 հակաբիոտիկների հանդեպ): Ցանքից հետո թասերն ինկուբացնում են 24 ժամ 37^0 C տերմոստատում, ապա հաշվում են ռեկոմբինանտ գաղութների քանակը վերը թվարկված սելեկտիվ միջավայրերի վրա: Որոշում են ռեկոմբինանտների գոյացման հաճախականությունը, բոլոր սելեկտիվ միջավայրերի վրա ռեկոմբինանտների հաճախականությունները համեմատում են միմյանց հետ: Նրանց հավասար լինելը վկայում է այն մասին, որ բոլոր ռեկոմբինանտները ստացել են RP4 պլազմիդը ամբողջովին:

Աշխատանքի ընթացք: Դոնոր և ռեցիպիենտ կուլտուրաների խաչասեռման նախապատրաստումը, կոնյուգացիոն խառնուրդի պատրաստումը*, դոնորային շտամի կենսունակ բջիջների քանակի որոշումը, ինչպես նաև ծնողական շտամերի՝ սելեկտիվ միջավայրերի վրա աճելու ունակությունը կատարվում են, ինչպես նկարագրված է **Առաջադրանք 1-**ում:

Խաչասեռման ավարտից հետո կոնյուգացիոն խառնուրդը նոսրացնում են 10^3 անգամ: Սկզբնական խառնուրդից (10^{-0}), 10^{-1}, 10^{-2} և 10^{-3} նոսրացումներից 0,1-ական մլ նմուշներ ցանում են վերը նշված սելեկտիվ միջավայրերով 3-ական թասերի վրա: 24 ժամ անց հաշվում են ռեկոմբինանտ գաղութների քանակը բոլոր տեսակի սելեկտիվ թասերի վրա, ինչպես նաև դոնորային գաղութների քանակը ՄՊԱ միջավայրի վրա: Արդյունքները գրանցում են Աղյուսակ 7-ում:

Աղյուսակ 7

* Տվյալ առաջադրանքի համար դոնոր-ռեցիպիենտ հարաբերակցությունը կազմում է 1:10, որն ստանալու համար 0,5 մլ դոնորային սուսպենզիային ավելացնում են 2 մլ ռեցիպիենտ և 2,5 մլ թարմ ՄՊՀ:

RP4 ավտոնոմ պլազմիդի փոխանցման հաճախականությունը
E.coli C 600 (RP4) str-s × J53 R^- str-r կոնյուգացիոն խաչասեռումում

Միջավայր	Ռեկոմբինանտ գաղութ	Նոսրացում	Գաղութների քանակ	Կոնյուգացիայի հաճախականություն
ՄՊԱՍԱ	Ap^r	Սկզբնական		
		10^{-1}		
		10^{-2}		
		10^{-3}		
ՄՊԱՍՏ	Tc^r	Սկզբնական		
		10^{-1}		
		10^{-2}		
		10^{-3}		
ՄՊԱՍԿ	Km^r	Սկզբնական		
		10^{-1}		
		10^{-2}		
		10^{-3}		
ՄՊԱ	C 600 RP4	10^{-6}		

Նյութեր և սարքավորումներ: Մեկ ուսանողին. թարմացված դոնոր (2 մլ) և ռեցիպիենտ (3 մլ) կուլտուրաներ, 50 մլ-անոց 1 փորձանոթ, 3 մլ ՄՊՀ, 9 փորձասրվակ, ՄՊԱ-ով 3 Պետրիի թաս, 8-ական Պետրիի թաս բոլոր տեսակի սելեկտիվ միջավայրերց, 18 հատ 1 մլ-անոց պիպետ, 3 հատ 5 մլ-անոց պիպետ, 1 մանրէաբանական ապակյա մածկիչ, 100 մլ ֆիզիոլոգիական լուծույթ: Խմբին. 37^0C տերմոստատ:

ԽՆԴԻՐ 6

ՏՐԱՆՍԴՈՒԿՑԻԱ

Տրանսդուկցիան բակտերիաների գենետիկական ռեկոմբինացիայի մեխանիզմ է, որում դոնորից ռեցիպիենտին գենետիկական տեղեկատվության փոխանցումը իրականացվում է չափավոր բակտերիաֆագի օգնությամբ: Տարբերվում են *ոչ-սպեցիֆիկ* և *սպեցիֆիկ* տրանսդուկցիաներ: Սպեցիֆիկ (սահմանափակ) տրանսդուկցիայի ժամանակ բակտերաֆագը փոխանցում է միայն իր ինտեգրման տեղին հարևան գենները, մինչդեռ ոչ-սպեցիֆիկ (ընդհանուր) տրանսդուկցիայի ժամանակ բակտերիաֆագը կարող է հավասար հավանականությամբ փոխանցել դոնորային քրոմոսոմի ցանկացած հատված:

Ոչ-սպեցիֆիկ տրանսդուկցիան ընթանում է հետևյալ կերպ:

Բակտերիաֆագը բազմանում է լիտիկ եղանակով դոնորի զգայուն ոչ-լիզոգեն բջիջներում: Ֆագային մասնիկների հասունացման ընթացքում բակտերիալ ԴՆԹ-ի ոչ մեծ հատված կարող է պատահականորեն հայտնվել ֆագային գլխիկի մեջ: Այն դեպքում, երբ բակտերիաֆագի այդիպիսի հասուն մասնիկը վարակում է ռեցիպիենտ բակտերիալ բջիջը, վերջինիս մեջ ներմուծվում է նաև բակտերիաֆագի մասնիկի կազմում հայտնված դոնորային քրոմոսոմի հատվածը: Ռեցիպիենտ բջջի մեջ ներմուծված հատվածի և տեր քրոմոսոմի միջև զույգ թվով քրոսինգովերների արդյունքում տեղի է ունենում փոխանակում և գոյանում են գենետիկական ռեկոմբինանտներ (տրանսդուկտանտներ):

Տրանսդուկցիայի ընթացքում փոխանցվող ԴՆԹ-ների չափերը սահմանափակվում են ֆագային գլխիկի ծավալով և չեն գերազանցում բակտերիալ քրոմոսոմի երկարության 2-3%: Հետևաբար, բացառվում է 3%-ից ավել հեռավորության վրա գտնվող գեների փոխանցումը մեկ հատվածով:

Ընդհանուր տրանսդուկցիայի հաճախականությունը յուրաքանչյուր գենի համար հավասար է 10^{-5}-10^{-6}, այսինքն, տրանսդուկտանտի գոյանալը հազվադեպ պատահող երևույթ է: Անկախ իրադարձությունների արդյունքում տրանսդուկցիոն ֆագային մասնիկում երկու մարկերների հայտնվելու հավանականությունը չնչին է:

Երկու գեների միաժամանակ փոխանցումը ռեցիպիենտին հնարավոր է միայն այն դեպքում, եթե նրանք շախկապված են, այսինքն տեղակայված են քրոմոսոմի նույն հատվածում: Համատեղ տրանսդուկցիայի հաճախականությունը կախված է գեների շախկապվածության աստիճանից. որքանով մոտ տեղակայված լինեն գենները, այնքանով բարձր կլինի փոխանցման հաճախականությունը: Համատեղ տրանսդուկցիայի հաճախականությունը թույլ է տալիս դատել տվյալ երկու գենները բաժանող տարածության մասին:

Ոչ-սպեցիֆիկ տրանսդուկցիան իրականացվում է P1 ks չափավոր ֆագով:

Խնդրի նպատակ: Որոշել arg H, met B, ilv D գեների շախկապվածության աստիճանները E.coli K12 շտամի քրոմոսոմում:

Շտամեր և միջավայրեր: Որպես դոնոր օգտագործվում է E.coli P13 Hfr H շտամը, իսկ որպես ռեցիպիենտ՝ E.coli 1450 thi arg H met B ilv D his շտամը: Տրանսդուկցիան իրականացվում է P1 ks չափավոր ֆագով, որի հանդեպ զգայուն են ինչպես դոնոր, այնպես էլ ռեցիպիենտ շտամերը: Սնուցող միջավայր է

հանդիսանում L արգանակը, 2% L ագարը և 0,7% L ագարը: Բոլոր միջավայրերի մեջ ավելացվում է ֆագի բազմանալու համար անհրաժեշտ $CaCl_2$ (0,15 mM/մլ):

Որպես նվազագույն օգտագործվում է ագարացված M-9 միջավայրը, իսկ որպես սելեկտիվ՝ ա) M-9 + հիստիդին + մեթիոնին + իզոլեյցին + վալին (ՀՄԻՎ), բ) M-9 + հիստիդին + արգինին + իզոլեյցին + վալին (ՀԱԻՎ), գ) M-9 + հիստիդին + արգինին + մեթիոնին (ՀԱՄ), դ) M-9 + հիստիդին + մեթիոնին (ՀՄ), ե) M-9 + հիստիդին + իզոլեյցին + վալին (ՀԻՎ), զ) M-9 + հիստիդին + արգինին (ՀԱ):

Ֆագը նոսրացնելու և տրանսդուկցիոն խառնուրդ ստանալու համար օգտագործվում է ֆոսֆատային բուֆեր՝ $CaCl_2$-ի պարունակությամբ: Տրանսդուկցիոն խառնուրդը նոսրացնելու համար ֆոսֆատային բուֆերին ավելացվում է նատրիումի ցիտրատ (1մգ/մլ), որը չեզոքացնում է կալցիումի իոնները: Այդպիսով դադարեցվում է բակտերիալ բջիջների հետագա վարակումը ֆագային մասնիկներով:

Փորձի սխեմա: Պրոտոտրոֆ դոնորային E.coli P13 Hfr H շտամի բջիջները վարակվում են P1 ks ֆագով, և բջիջների լիզիսից հետո ստանում են ազատված ֆագային մասնիկների բարձր տիտրով ֆագային սուսպենզիա: Ստացված պատրաստուկն օգտագործում են տրանսդուկցիոն խաչասեռման նպատակով, ինչի համար նրանով վարակում են ռեցիպիենտ շտամի՝ արգինին, մեթիոնին, հիստիդին և իզոլիցին-վալին ամինաթթուների նկատմամբ աուքսոտրոֆ բջիջներ: Համապատասխան լոկուսները E.coli-ի գենետիկական քարտեզի վրա տեղակայված են 3,5 րոպեի սահմաններում: Ֆագ–ռեցիպիենտ բջիջների խառնուրդը ինկուբացնում են 1,5-2 ժամ 20^0 C պայմաններում, ինչը նպաստում է բջիջների ֆագի ներթափանցմանը բջիջների մեջ: Այնուհետև խառնուրդից 0,1-ական մլ նմուշներ ցանում են սելեկտիվ միջավայրերի վրա՝ դոնորի սելեկտիվ մարկերներից (arg H^+, met B^+, ilv D^+) որևէ մեկը ժառանգած ռեկոմբինանտներ (տրանսդուկտանտներ) հայտնաբերելու նպատակով: Համապատասխան սելեկտիվ թասերի վրա աճած տրանսդուկտանտ գաղութների թիվը հաշվելով, որոշում են տրանսդուկցիայի հաճախականությունը (տրանսդուկտանտի թիվը հարաբերված մեկ ֆագային մասնիկի) յուրաքանչյուր մարկերի համար: Ապա յուրաքանչյուր տեսակի տրանսդուկտանտների գաղութները ցանում են սելեկտիվ միջավայրերի վրա՝ դոնորից ժառանգված ոչ-սելեկտիվ մարկերներ հայտնաբերելու նպատակով: Օրինակ, arg H^+ տրանսդուկտանտները ցանում են համապատասխան սելեկտիվ միջավայրերի վրա, որպեսզի հայտնաբերեն ժառանգված met B^+ և/կամ ilv D^+ ոչ-սելեկտիվ մարկերները: Ստացված տվյալների հիման վրա որոշում են համատեղ տրանսդուկցիայի հաճախականությունը երեք ուսումնասիրվող մարկերների համար բոլոր զույգ համակցություններում: Եզրակացություն է արվում մարկերների շղթայակցման աստիճանի մասին:

Աշխատանքի ընթացք (5 պարապմունք)**:**

Պարապմունք առաջին. <u>Դոնորային շտամի բջիջների վարակում P1 ks բակտերիաֆագով:</u>

Օգտագործվում է E.coli P13 Hfr H դոնորային շտամի թարմացված կուլտուրա աճեցման էքսպոնենցիալ փուլում: Դրա համար անհրաժեշտ է գիշերային կուլտուրայի 0,1 մլ նոսրացնել 5 մլ L արգանակում և թափահարելով աճեցնել 1,5-2 ժամ 37^0C պայմաններում մինչև 1-2 $\times$ 10^8 բջիջ/մլ խտություն: Ստացված կուլտուրայից 1-ական մլ լցնում են փորձասրվակների մեջ և դնում 37^0C

ջրային բաղնիսի մեջ: Այդ նմուշների մեջ ավելացնում են 0,1-ական մլ $CaCl_2$ պարունակող բուֆերում գտնվող P1 ks ֆագային սուսպենզիայից (T = 10^7 մասնիկ/մլ): Խառնուրդն ինկուբացնում են 10 րոպե, ինչը բավարար է դոնորային բջիջների վրա ֆագային մասնիկների ադսորբցիան ապահովելու համար: Այնուհետև ավելացնում են 2,5-ական մլ 46^0C աստիճանի 0,7% L ագար: Խառնելուց հետո սրվակների պարունակությունը լցնում են 2% L ագարով Պետրիի թասերի վրա: Թասերն ինկուբացնում են 18-24 ժամ 37^0C տերմոստատում:

Պարապմունք երկրորդ. Տրանսդուկցիա կատարող ֆագային պատրաստուկի ստացում և տիտրում:

Նախորդ պարապմունքի ժամանակ ցանված թասերի մեջ ավելացնում են 3-ական մլ $CaCl_2$ պարունակող բուֆեր: Յուրաքանչյուր թասում 0,7% ագարի վերին շերտը մածկիչով զգուշորեն տրորում են և լցնում ցենտրիֆուգային սրվակի մեջ: Ֆագային մասնիկների էքստրակցիայի նպատակով սրվակները թափահարում են և ապա 10 րոպե ցենտրիֆուգում 6 000 պտույտ/րոպե: Վերնստվածքային լուծույթին ավելացնում են 2-3 կաթիլ քլորոֆորմ: Խառնուրդն ուժեղ թափահարում են և կրկին ցենտրիֆուգում նույն պայմաններում: Վերնստվածքը զգուշորեն լցնում են նոր սրվակի մեջ: Պահում են սառնարանում (4^0C): Նրանից պատրաստում են 8 հաջորդական տասնապատիկ նոսրացումներ և վերջին երեք նոսրացումներից 0,1-ական մլ ցանում են համապատասխան բակտերիալ մարգի վրա: Այդ նպատակով վերոհիշյալ նոսրացումներից 2-ական նմուշ (0,1 մլ) լցնում են 1-ական մլ դոնորային կուլտուրայով 6 սրվակի մեջ: Սրվակներն ինկուբացնում են 10 րոպե (37^0 C): Ավելացնում են 0,7% L ագար: Խառնուրդը թեթևակի թափահարում են և լցնում 2% L ագարով թասերի վրա: Ինկուբացնում են 18-24 ժամ (37^0 C):

Պարապմունք երրորդ: Տրանսդուկցիա կատարող ֆագային պատրաստուկի (P1 ks Ֆագոլիզատի) տիտրի որոշում: Տանսդուկցիոն խաչասեռում:

Երկրորդ պարապմունքի ժամանակ ցանված Ֆագային գաղութները հաշվում են, որոշում են տիտրը (Բանաձև 1), որից հետո կատարում են տրանսդուկցիոն խաչասեռում. E.coli 1450 ռեցիպիենտ շտամի թարմացված կուլտուրան (T = 1-2 × 10^8 բջիջ/մլ) ցենտրիֆուգում են (10 րոպե 6 000 պտույտ/րոպե) և նոսրացնում 2 մլ $CaCl_2$ պարունակող բուֆերում: Նոր սրվակում այդ նոսրացումից 1 մլ խառնում են արդեն պատրաստված տրանսդուկցիա կատարող ֆագային պատրաստուկի հետ՝ 1 բջջին 5-10 ֆագային մասնիկ հարաբերակցությամբ: (*Ֆագային մասնիկ / բջիջ* հարաբերակցությունը հայտնի է որպես *վարակման բազմաքանակություն*:) Խառնուրդը ինկուբացնում են 1,5-2 ժամ սենյակային (20^0 C) ջերմաստիճանի պայմաններում՝ բակտերիալ բջիջների լիզիսը կանխելու հանար: Ռեցիպիենտ բջիջների մնացած 1 մլ սուսպենզիայից 0,1-ական մլ ցանվում է սելեկտիվ միջավայրերի վրա՝ ուսումնասիրվող լոկուսների հնարավոր հետադարձ մուտացիաները հաշվի առնելու նպատակով: Ինկուբացիան ավարտվելուց հետո տրանսդուկցիոն խառնուրդը ցենտրիֆուգում են (10 րոպե 6 000 պտույտ/րոպե): Նստվածքը նոսրացնում են 2 մլ նատրիումի ցիտրատ պարունակող բուֆերում: Այդ տրանսդուկցիոն սուսպենզիայից նույն բուֆերում պատրաստում են յոթ տասնապատիկ նոսրացումներ: 10^{-6} և 10^{-7} նոսրացումներից 2% L ագարի վրա ցանքս են կատարում՝ սուսպենզիայում կենսունակ բջիջների խտությունը որոշելու համար: 10^{-0}, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} նոսրացումներից 0,1-ական մլ նմուշներ ցանում են ՀՄԻՎ, ՀԱԻՎ և ՀԱՄ միջավայրերով 3-ական թասերի վրա (ամեն մի միջավայրից

ստացվում է 12 թաս ցանքս, ընդամենը՝ 36 թաս): Ցանված թասերը ինկուբացնում են (37^0 C). սելեկտիվ ագարով թասերը՝ 48 ժամ, իսկ L ագարով՝ 24 ժամ:

Պարապմունք չորրորդ: Տրանսդուկցիայի հաճախականության որոշում յուրաքանչյուր մարկերի համար: Տրանսդուկտանտների ցանք սելեկտիվ միջավայրերի վրա (100-ական գաղութ):

Կատարվում է գաղութների հաշվառում՝ առանց թասերը բացելու. L ագարի վրա հաշվում են ռեցիպիենտի կենսունակ բջիջների թիվը և Բանածև 1-ով հաշվարկում նրանց տիտրը: Սելեկտիվ միջավայրերի վրա հաշվում են հետադարձ մուտանտների և տրանսդուկտանտների թիվը: Ստացված տվյալները գրանցում են Աղյուսակ 8-ում:

Աղյուսակ 8

arg H, met B և ilv D^+ գեների համար ոչ-սպեցիֆիկ տրանսդուկցիայի հաճախականության որոշում

Տրանսդուկցիայում մասնակցող կենսունակ բջիջների թիվ			Սելեկտիվ միջավայր	Քանակը տրանսդուկցիոն խառնուրդի մեջ				Հաճա-խակա-նություն
Նոսրացում	Գաղութ	Տիտր		Ռեվերտանտ	Տրանսդուկտանտ			
					Նոսրացում	Գաղութ	Տիտր	
10^{-5}			ՀԱԻՎ					
10^{-6}			ՀԱՄ					
10^{-7}			ՀԻՎՄ					

Սահմանվում է տրանսդուկցիայի հաճախականությունը arg H, met B, ilv D գեների համար, որից հետո որոշվում է ուսումնասիրվող մարկերների համատեղ տրանսդուկցիայի հաճախականությունը բոլոր զույգ համակցություններում, ինչի համար վերը նշված 3 տեսակի տրանսդուկտանտներից 100-ական գաղութ ցանում են սելեկտիվ միջավայրերի վրա՝ դոնորից ժառանգած ոչ-սելեկտիվ մարկերների հայտնաբերման նպատակով: arg H^+ տրանսդուկտանտները ցանվում են ՀԻՎ և ՀՄ միջավայրերի վրա՝ arg H^+ met B^+ և arg H^+ ilv D^+ տրանսդուկտնանտեր հայտնաբերելու համար: met B^+ տրանսդուկտանտները ցանում են ՀԱ և ՀԻՎ, իսկ ilv D^+ տրանսդուկտանտները՝ ՀԱ և ՀՄ միջավայրերի վրա՝ համապատասխան զույգ գեներ ժառանգած տրանսդուկտանտներ հայտնաբերելու նպատակով: Թասերն ինկուբացնում են 48 ժամ (37^0 C):

Պարապմունք հինգերորդ: Համատեղ տրանսդուկցիայի հաճախականության որոշում: Թասերը դիտարկում են և հաշվում համապատասխան սելեկտիվ միջավայրերի վրա առաջացած ոչ-սելեկտիվ գեներ ժառանգած տրանսդուկտանտների քանակը: Արդյունքները գրանցում են Աղյուսակ 9-ում:

Աղյուսակ 9

Սելեկտիվ և ոչ-սելեկտիվ գեների համատեղ ոչ-սպեցիֆիկ տրանսդուկցիայի հաճախականություն

Տրանսդուկտանտ	Սելեկտիվ միջավայր	Ընտրվող տրանսդուկտանտ	Հետադարձ մուտանտ	Երկու գեն ժառանգած տրանսդուկտանտ	Հաճախականություն (%)
Arg H^+	ՀԻՎ				
	ՀՄ				
met B^+	ՀԱ				
	ՀԻՎ				
Ilv D^+	ՀԱ				
	ՀՄ				

Համատեղ տրանսդուկցիայի հաճախականությունն արտահայտվում է երկուական ուսումնասիրվող գեն ժառանգած գաղութների թվի և ստուգված գաղութների քանակի (100) տոկոսային հարաբերակցությամբ:

Տվյալները վերլուծելուց հետո արվում են եզրահանգումներ՝ մարկերների հաջորդականության և E.coli K 12 գենետիկական քարտեզի վրա նրանց միջև եղած տարածության մասին:

Նյութեր և սարքավորումներ:

Պարապմունք առաջին: Մեկ ուսանողին. 5 մլ E.coli K 12 Hfr H (2×10^8 բջիջ/մլ) էքսպոնենցիալ կուլտուրա, 2,5 մլ 0,7% L ագարով 3 փորձասրվակ, 2% L ագարով 3 Պետրիի թաս, 2 հատ 1 մլ-անոց պիպետ և 1 հատ 5 մլ-անոց պիպետ: Խմբին. ջրային բաղնիսներ 37^0 C և 46^0 C:

Պարապմունք երկրորդ: Մեկ ուսանողին. 50 մլ $CaCl_2$ պարունակող բուֆեր, 6 փորձասրվակ 2,5 մլ 0,7% L ագարով, 6 Պետրիի թաս 2% L ագարով, 10 մլ-անոց 1 հատ ցենտրիֆուգային փորձասրվակ, 15 փորձասրվակ, 15 հատ 1 մլ-անոց պիպետ, 2 հատ 5 մլ-անոց պիպետ, 1 մածկիչ: Խմբին. դոնորային E.coli P13 Hfr H կուլտուրա T = 10^8 բջիջ/մլ, քլորոֆորմ, ջրային բաղնիսներ 37^0 C և 46^0 C, ցենտրիֆուգա:

Պարապմունք երրորդ: Մեկ ուսանողին. 10 մլ E.coli 1450 շտամի էքսպոնոնցիալ կուլտուրա (T = 2×10^8 բջիջ/մլ), 5 մլ $CaCl_2$ պարունակող բուֆեր, 50 մլ նատրիում ցիտրատով բուֆեր, 2,5-ական մլ 0,7 % L ագարով 4 փորձասրվակ, 2 % L ագարով 4 Պետրիի թաս, 13-ական թաս հետևյալ սելեկտիվ միջավայրերով. ՀԱԻՎ, ՀԱՄ, ՀԻՎՄ, 2 ցենտրիֆուգային փորձասրվակ, 7 փորձասրվակ, 16 հատ 1 մլ-անոց պիպետ, 2 հատ 2 մլ-անոց պիպետ, 1 հատ 5 մլ-անոց պիպետ, մածկիչ:

Խմբին. ցենտրիֆուգա, ջրային բաղնիս (46^0 C):

ԽՆԴԻՐ 7

ՊԼԱԶՄԻԴԱՅԻՆ ԴՆԹ-ՈՎ E.coli ԲՋԻՋՆԵՐԻ ԳԵՆԵՏԻԿԱԿԱՆ ՏՐԱՆՍՖՈՐՄԱՑԻԱ

Բակտերիաների գենետիկական տրանսֆորմացիան գենետիկական փոխանակման միջոց է, որի հետևանքով, քրոմոսոմային կամ պլազմիդային մեկուսացված ԴՆԹ-ի մոլեկուլի ներմուծման արդյունքում, փոփոխվում է բջջի գենոտիպը: Տրանսֆորմացիայի ընթացքը բաղկացած է մի քանի փուլից. ա/ ԴՆԹ-ի ադսորբցիա բջջի մակերեսի վրա, բ/ ԴՆԹ-ի ներմուծում բջջի մեջ, գ/ քրոմոսոմային դոնորային ԴՆԹ-ի ինտեգրում ռեցիպիենտի քրոմոսոմի մեջ՝ քրոսինգովերների զույգ քանակի շնորհիվ ԴՆԹ-ի հոմոլոգ հատվածների ռեկոմբինացիոն փոխանակման արդյունքում: Ի տարբերություն քրոմոսոմայինի՝ պլազմիդային ԴՆԹ-ն չի ինտեգրվում ռեցիպիենտ բջջի քրոմոսոմի մեջ:

Քրոմոսոմային դոնորային ԴՆԹ-ի նվազագույն երկարությունը ~500 զույգ նուկլեոտիդ է, սակայն ռեկոմբինացիայում սովորաբար մասնակցում են ~200 հազար զույգ նուկլեոտիդ երկարությամբ ԴՆԹ-ի հատվածներ: Եթե դոնորային ԴՆԹ-ն պլազմիդային է, ապա գոյացած տրանսֆորմանտները ձեռք են բերում տվյալ ԴՆԹ-ով պայմանավորված հատկություններ: Էկզոգենային ԴՆԹ-ն ներթափանցում է միայն այն բջիջների մեջ, որոնք գտնվում են այսպես կոչված *կոմպետենտ* վիճակում: Կոմպետենտ վիճակը բակտերիաներին բնորոշ է աճեցման որոշակի փուլում: Գրամ-դրական բակտերիաները կոմպետենտ են աճեցման բավականին երկար ժամանակահատվածում, այդ իսկ պատճառով նշված բակտերիաներում տրանսֆորմացիան կատարվում է բնական պայմաններում: Գրամ-բացասական բակտերիաների կոմպետենտ վիճակը կարճաժամկետ է, ուստի և նրանց տրանսֆորմացիայի համար անհրաժեշտ կոմպետենտ բջիջներն ստացվում են արհեստականորեն, մշակելով նրանց $CaCl_2$ լուծույթով: Տրանսֆորմացիայի հաճախականության վրա ազդում է ոչ միայն ռեցիպիենտ բջիջների վիճակը, այլև ԴՆԹ-ի պատրաստուկի հատկությունները (գալարման աստիճանը, չափերը), նրա խտությունը և բակտերիաների տեսակը: ԴՆԹ-ի տրանսֆորմացիոն ակտիվության մակարդակը նրա կառուցվածքային ամբողջականության ցուցանիշ է հանդիսանում:

Տրանսֆորմացիան, ինչպես կոնյուգացիան և տրանսդուկցիան, օգտագործվում է գեների քարտեզավորման նպատակով: Գենային ճարտարագիտության զարգացումը թելադրեց նաև տրանսֆորմացիայի օգտագործումը ԴՆԹ-ի ռեկոմբինանտ մոլեկուլների՝ E.coli-ում բազմացման և նրանց արտահայտման ուսումնասիրության համար:

Խնդրի նպատակն է՝ ստանալ RP4 կամ pBR322 պլազմիդներ պարունակող տրանսֆորմանտներ և համեմատել վերջիններիս գոյացման հաճախականությունը:

Շտամեր և միջավայրեր: Օգտագործվում է E.coli C600 thr leu thi r^- m^-, RP4 (55 կիլոհիմք) և pBR322 (4,6 կիլոհիմք) պլազմիդների ԴՆԹ-ի պատրաստուկներ: Աճեցման համար կիրառվում են հեղուկ և ագարացված L միջավայրեր: Սելեկտիվ

միջավայրերը պարունակում են ամպցիլին (ԼԱ), կանամիցին (ԼԿ) և տետրացիկլին (ԼS):

Փորձի սխեմա: Պատրաստում են E.coli C600 շտամի կոմպետենտ բջիջների սուսպենզիա և կատարում տրանսֆորմացիոն խաչասեռում դոնորային ԴՆԹ-ի հետ (RP4 և pBR322): Սելեկտիվ միջավայրերի վրա ընտրում են համապատասխան ռեկոմբինանտները, որոշում տրանսֆորմացիայի հաճախականությունը և համեմատում մեծ և փոքր պլազմիդների տրանսֆորմացիաների արդյունավետությունը:

Աշխատանքի ընթացք (2 պարապմունք)**:**

Պարապմունք առաջին. Կոմպետենտ բջիջների պատրաստում և տրանսֆորմացիայի կատարում: E.coli C600 thr leu thi r^-m^- գիշերային կուլտուրան 20 անգամ նոսրացնում են գոլ L արգանակով և, 1,5 ժամ (37^0 C) թափահարելով, աճեցնում մինչև 2×10^7 բջիջ/մլ տիտրը: Այնուհետև ստացված կուլտուրայից 1,5 մլ լցնում են ցենտրիֆուգային փորձասրվակի մեջ և ցենտրիֆուգում 5 րոպե 10 000 պտույտ/րոպե 0^0C պայմաններում: Առաջացած նստվածքը նոսրացնում են 200 մկլ 0,1 M $CaCl_2$ լուծույթում: Այս վիճակում սրվակը պահում են 0^0C պայմաններում 25 րոպե, որից հետո նորից ցենտրիֆուգում են և նստվածքը նոսրացնում 10մկլ 0,1 M $CaCl_2$ լուծույթում: Ստացված բջիջներին ավելացնում են ԴՆԹ-ի լուծույթ (3-5 մկգ/մլ) և խառնուրդն ինկուբացնում 15 րոպե 0^0C պայմաններում: Սրվակը տեղափոխում են 37^0C ջրային բաղնիսի մեջ և պահում 5 րոպե: Այնույետև խառնուրդին ավելացնում են 1 մլ գոլ L արգանակ և ինկուբացնում 1 ժամ 37^0C առանց թափահարելու: Նմուշները 0,1-ական մլ ցանում են սելեկտիվ միջավայրերի վրա (յուրաքանչյուրից 2-ական թաս): Նույն միջավայրերի վրա (յուրաքանչյուրից 1-ական թաս) ցանում են ռեցիպիենտ կուլտուրան, օգտագործվող հակաբիոտիկների հանդեպ նրանց զգայունությունը հաստատելու համար: Թասերը դնում են տերմոստատի մեջ (37^0 C) և ինկուբացնում 24 ժամ:

Պարապմունք երկրորդ. Տրանսֆորմացիայի արդյունքների հաշվառում և գրանցում: Նախորդ պարապմունքի ընթացքում ցանված թասերը դիտում են և հաշվում սելեկտիվ միջավայրերի վրա տրանսֆորմանտների գաղութների քանակը: Համոզվում են, որ նույն միջավայրերի վրա ռեցիպիենտ շտամի գաղութները բացակայում են: Արդյունքները գրանցում են Աղյուսակ 10-ում:

Աղյուսակ 10

E.coli C600 շտամի RP4 և pBR322 պլազմիդների ԴՆԹ-ով տրանսֆորմացիայի հաճախականությունը

Պլազմիդային ԴՆԹ	Սելեկտիվ միջավայրերում տրանսֆորմանտների թիվ			Հաճախականություն
	ԼԱ	ԼԿ	ԼS	
RP4				
pBR322				

Տրանսֆորմացիայի հաճախականությունն արտահայտվում է տրանսֆորմանտների քանակի և ԴՆԹ-ի խտության թվի հարաբերակցությամբ:

Նյութեր և սարքավորումներ: Մեկ ուսանողին. 2 մլ թարմացրած E.coli C 600 կուլտուրա, 5-ական մկգ RP4 և pBR322 պլազմիդների ԴՆԹ, 1 մլ $CaCl_2$ լուծույթ (0,1 M), 1 մլ L արգանակ, սառույց, 2 հատ 1,5 մլ ծավալով միկրոցենտրիֆուգային փորձասրվակ, վերը նշված սելեկտիվ միջավայրերով 2-ական Պետրիի թաս, 1 հատ 2 մլ-անոց պիպետ, 200, 100 և 10 մկլ ծավալով միկրոպիպետներ, մածկիչ: Խմբին. ջրային բաղնիս 37^0 C, տերմոստատ 37^0 C, միկրոցենտրիֆուգա:

ՀԱՎԵԼՎԱԾ

Գենետիկական փորձերում օգտագործվքղ ապակյա անոթները (Պետրիի թասերը, անոթները, սրվակները, պիպետները և մածկիչները) մանրէազերծվում են չոր շոգիով չորանոցում: Այն պահից, երբ անոթները չորանոցի մեջ տեղադրվելուց հետո ջերմաստիճանը չորանոցում հասնում է պահանջվածին, մանրէազերծումը կատարվում է. 140^0C-ի դեպքում՝ 3 ժամ, 160^0C-ի դեպքում՝ 2 ժամ և 170^0C-ի դեպքում՝ 1 ժամ: Պետրիի թասերը և պիպետները մանրէազերծում են հատուկ տուփերում կամ թղթի մեջ փաթաթած: Աճեցման միջավայրերի, բուֆերների, շաքարների լուծույթների մանրէազերծումը կատարվում է ավտոկլավում: Ստորև բերվում են մանրէազերծման պայմանները յուրաքանչյուր միջավայրի համար.

Աճեցման միջավայրեր:

<u>Լիարժեք L միջավայր.</u>

տրիպտոն Bacto	–	10 գ
խմորիչի հանուք	–	5 գ
NaCl	–	10 գ
H_2O	–	1 լ

Մանրէազերծումն իրականացնում են 1 ժամ 0,5 ատմ-ի պայմաններում: Մանրէազերծումից հետո pH 7,0:

2% L միջավայրի ագարացված տարբերակը պատրաստում են, ավելացնելով 20 գ ագար, իսկ 0,7%՝ 700 մգ ագար:

<u>Նվազագույն միջավայր M-9.</u>

KH_2PO_4	–	3 գ
Na_2 HPO_4	–	6 գ
NaCl	–	0,5 գ
NH_4Cl	–	1 գ
H_2O	–	1 լ

Մանրէազերծումն իրականացնում են 1,5 ժամ 1 ատմ-ի պայմաններում: Մանրէազերծումից հետո pH 7,0:

Անհրաժեշտ ամինաթթուների լուծույթները պատրաստում են հետևյալ խտություններով.

D, L ամինաթթուներ	–	40 մգ/մլ
L ամինաթթուներ	–	20 մգ/մլ

Լուծույթները մանրէազերծում են ջրային բաղնիսում 10-15 րոպե եռացնելով

Շաքարների լուծույթների սկզբնական խտությունը 20% է, իսկ միջավայրում կազմում է 0,2%:

Բուֆերային լուծույթներ:

<u>Ֆագային բուֆեր $CaCl_2$-ով.</u>

KH_2PO_4	–	3 գ
Na_2 HPO_4	–	7 գ
NaCl	–	5 գ
$MgSO_4$	–	10 մլ 0,1 M լուծույթից
$CaCl_2$	–	10 մլ 0,01 M լուծույթից
H_2O	–	1 լ

pH 7,0

Բուֆերը մանրէազերծում են 0,5 ատմ 30 րոպե: $MgSO_4$ և $CaCl_2$ լուծույթները մանրէազերծում են առանձին-առանձին:

Ֆագային բուֆեր նատրիումի ցիտրատով.

KH_2PO_4	–	3 գ
$Na_2 HPO_4$	–	7 գ
NaCl	–	4 գ
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	–	0,2 գ
Na ցիտրատ	–	100 մլ 0,5 % լուծույթից
H_2O	–	1 լ

pH 7,0

Բուֆերը մանրէազերծում են 0,5 ատմ 30 րոպե: Na ցիտրատի լուծույթը մանրէազերծում են առանձին:

ԲԱԿՏԵՐԻԱԼ ՇՏԱՄԵՐԻ ՊԱՀՊԱՆՈՒՄԸ՝

0,7% ագարային սյուներում. բակտերիալ շտամերն աճեցնում են մետաղյա մանրէաբանական ասեղի օգնությամբ թարմ կուլտուրայի ներարկումով փորձասրվակի մեջ գտնվող 0,7% ագարային սյունի մեջ: 24 ժամ աճեցնելուց հետ վրան լցնում են մանրէազերծված վազելինի յուղ: Սրվակը հերմետիկորեն փակում են մանրէազերծված ռետինե խցանով: Այսպես պատրաստված կուլտուրան կարող է պահպանվել մի քանի տարի 4^0C պայմաններում:

40% գլիցերինում. 2 մլ թարմ կուլտուրային ավելացնում են 2 մլ 80% մանրէազերծված գլիցերին: Հերմետիկորեն փակված վիճակում այն պահպանվում է մի քանի տարի –10-ից –20^0C պայմաններում:

Լիոֆիլիզացված վիճակում. թարմ աճեցված մանրէները նոսրացվում են հեղուկ միջավայրում (1 մաս L արգանակ, 3 մաս արյան սիճուկ, 1 մաս 7,5% գլյուկոզայի լուծույթ): Սուսպենզիան արագորեն սառեցվում է հեղուկ ազոտում և չորացվում վակուումում: Չորացնելուց հետո սրվակը զոդվում է գազայրոցի վրա և այդ վիճակում կարող է պահպանվել ևս մի քանի տարի:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Алиханян С. И., Акифьев А. П., Чернин Л. С., *Общая генетика*, М., Высшая школа, 1985. ,
2. Гершензон С. М., *Мутации*, Киев, Наук. думка, 1991.
3. Глазко В.И., Глазко Г.В. *Введение в генетику.* КВІЦ, 2003.
4. Жимулёв И.Ф. *Общая и молекулярная генетика.* Новосибирск: Сиб. унив изд-во,2003.
5. Инге-Вечтомов С. Т., *Генетика с основами селекции,* М., Высшая школа, 1989 .
6. Мейнел Г., *Бактериальные плазмиды*, М., Мир, 1976.
7. Прозоров А. А., *Генетическая трансформация у микроорганизмов,* М. Мир, 1966.
8. Ричмонд М., *Устойчивость бактерий к антибиотикам,* М., Мир, 1975
9. Сингер М., Берг П. *Гены и геномы* ,М., Мир, 1998.
10. Смит К., Хенеуолт Ф., *Молекулярная фотобиология*, М., 1972.
11. Стент Г., *Молекулярная генетика*, М., 1974.
12. Хейс У., *Генетика бактерий и бактериофагов,* М., 1965.

Բ Ո Վ Ա Ն Դ Ա Կ Ո Ւ Թ Յ Ո Ւ Ն