

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ

ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

УДК 547.96; 577.11

№ госрегистрации

Инв. №

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИФАВ РАН,

член-корреспондент РАН,

 С.О. Бачурин

« 2 » декабрь 2015 г.



**«МЕТОДИКА АНАЛИЗА КОРРЕКТНОСТИ РЕКОМБИНАЦИИ В ГЕНОМЕ,
АКТИВИРОВАННОЙ ТАМОКСИФЕНОМ, С ПОМОЩЬЮ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА
ФЛАНКИРОВАННЫХ УЧАСТКОВ ДНК.»**

СТП-14.621.21.0008.15-2015

Ответственный исполнитель
Заведующий лабораторией,
к.б.н.

 С.Г. Ключков
« ____ » _____ 2015 г.

Черноголовка, Московская обл. 2015

Оглавление

1. Наименование методики измерений	3
2. Назначение методики измерений и область применения	3
3. Нормативные ссылки	3
4. Погрешность измерений	4
5. Требования к показателям точности измерений	4
6. Условия измерений	4
7. Требования к средствам измерений, вспомогательным устройствам, материалам, реактивам при выполнении данной методики	4
7.1. Реактивы	4
7.2. Материалы	4
7.3. Оборудование	4
8. Операции, связанные с выполнением данной методики	5
8.1 Выделение ДНК фенол-хлороформным методом	5
8.2 Детекция делетирования участка генома гена альфа-синуклеина между FLP-сайтами методом конвенционной ПЦР.	5
8.3 Детекция Lox-P сайтов в заданных участках первого и второго интронов гена альфа-синуклеина методом конвенционной ПЦР	6
8.3 Анализ ДНК в агарозном геле	8
9. Обработка и оформление результатов измерений	8
10. Требования безопасности, охраны окружающей среды	8
11. Требования к квалификации операторов	9

1. Наименование методики измерений

Настоящий документ СТП-14.621.21.0008.15-2015 устанавливает методику «Методика анализа корректности рекомбинации в геноме, активированной тамоксифеном, с помощью генетического анализа фланкированных участков ДНК.»

2. Назначение методики измерений и область применения

Настоящая методика описывает процедуры, выполнение которых необходимо для оценки корректности рекомбинации в геноме, активированной тамоксифеном. Основными областями применения данной методики являются биологические и медицинские науки (контроль индуцированной рекомбинации в геноме кондиционных нокаутов)

3. Нормативные ссылки

В настоящей методике использованы нормативные ссылки на следующие стандарты и документы:

ГОСТ Р 8.563-2009 Государственная система обеспечения единства измерений. Методики (методы) измерений

СТП – 1.42.02 – 2002 Стандарты предприятия. Общие требования к построению, изложению, оформлению, содержанию, обозначению и порядку введения

ГОСТ 1.5—2001 Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Общие требования к построению, изложению, оформлению, содержанию и обозначению

ГОСТ Р ИСО 9000—2008 Системы менеджмента качества. Основные положения и словарь.

4. Погрешность измерений

Не устанавливаются.

5. Требования к показателям точности измерений

Не устанавливаются.

6. Условия измерений

Не устанавливаются.

7. Требования к средствам измерений, вспомогательным устройствам, материалам, реактивам при выполнении данной методики.

7.1. Реактивы

1. Протеиназа К (Amresco, США)
2. Фенол (Sigma Aldrich, Германия)
3. Хлороформ (ACROS Organics, США)
4. 96% этанол
5. TAG pol (Fermentas, США)
6. ДНК-маркер (Thermo Scientific, Великобритания)
7. Агароза (Sigma Aldrich, Германия)
8. Бромистый этидий (AppliChem, Германия)

7.2. Материалы

- 1 Наконечники для микропипеток (Eppendorf AG, Германия)
2. Пробирки тонкостенные 0,2 мл (Eppendorf AG, Германия)
- 3 Пробирки 1,5 мл (Eppendorf AG, Германия)

7.3. Оборудование

- 1 Амплификатор Mastercycler nexus (Eppendorf AG, Германия)
2. Транслюминатор BioSpectrum AC Chemi HR 410 (UVP, США)
3. Камера для электрофореза (Bio-Rad, США)
4. Источник питания (Bio-Rad, США)

5. Термостат твердотельный (Helicon, Россия)
6. Настольная центрифуга (Eppendorf AG, Германия)
7. Микропипетки (Eppendorf AG, Германия)

8. Операции, связанные с выполнением данной методики

8.1 Выделение ДНК фенол-хлороформным методом

В пробирку, с исследуемой пробой, объемом 1.5 ml внести по 200 µl лизирующего буфера с Протеиназой К и инкубировать при 55°C в течении ночи. Пробы центрифугировать 1' при 5000 rpm. Супернатант отобрать в новую пробирку, перемешать на вортексе. Добавить равный объем (здесь 200 µl) фенола (pH 8.0); хорошо перемешать на вортексе, пока не побелеет. Центрифугировать 10' на 13 000 rpm. Супернатант (водную фазу) отобрать в новую пробирку, добавить 200 µl фенола, перемешать. Центрифугировать 10' на 13 000 rpm. Повторить данную процедуру дважды. Добавить равный объем (здесь 200 µl) фенол-хлороформной смеси (1:1). Центрифугировать 10' на 13 000 rpm. Супернатант отобрать в новые пробирки; добавить 5 µl 5M NaCl (до конечной конц. 200 mM). Натрий связывается с ДНК и образуется осадок. Далее добавить 2 объема 96% этилового спирта. Перемешать. Центрифугировать 2' на 13 000 rpm. Супернатант осторожно удалить; к осадку добавить 1 ml 70% этилового спирта, перемешать. Центрифугировать 2' на 13 000 rpm. Супернатант осторожно удалить. Повторить данную процедуру дважды. Подсушить при комнатной температуре 2-3 часа. Растворить в 50-100 µl воды без нуклеаз.

8.2 Детекция делетирования участка генома гена альфа-синуклеина между FLP-сайтами методом конвенционной ПЦР.

Детекцию трансгенной FLP кассеты в геноме мыши осуществляли методом конвенционного ПЦР с использованием следующих праймеров:

ActFlpeFor CACTGATATTGTAAGTAGTTTGC

ActFlpeRev CTAGTGCGAAGTAGTGATCAGG

ПЦР проводили на амплификаторе Mastercycler nexus (Eppendorf AG, Германия). Реакцию проводили в объеме 25 мкл в буфере, содержащем: 300 mM Трис-НСl pH 8.0, 166 mM (NH₄)₂SO₄, 25 mM MgCl₂; дНТФ в концентрации 0,2 mM. Конечная концентрация праймеров составляла 0,5 мкМ каждый. В качестве матрицы использовали 1 мкл ДНК. В реакционную смесь добавляли 1,25 ед. Taq-полимеразы (NEB, Великобритания). Программа для ПЦР включала первичную денатурацию (2 мин при 94°C), затем 35 циклов: 30 сек при 94°C, 30 сек при 55°C и 1 мин при 68°C. Затем финальная элонгация 5 мин при 68°C. Размер амплифицированного фрагмента составляет 720 bp.

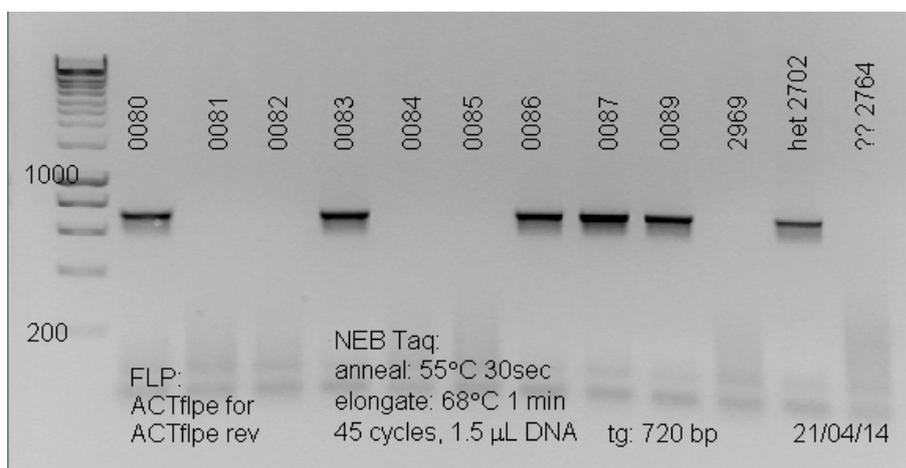


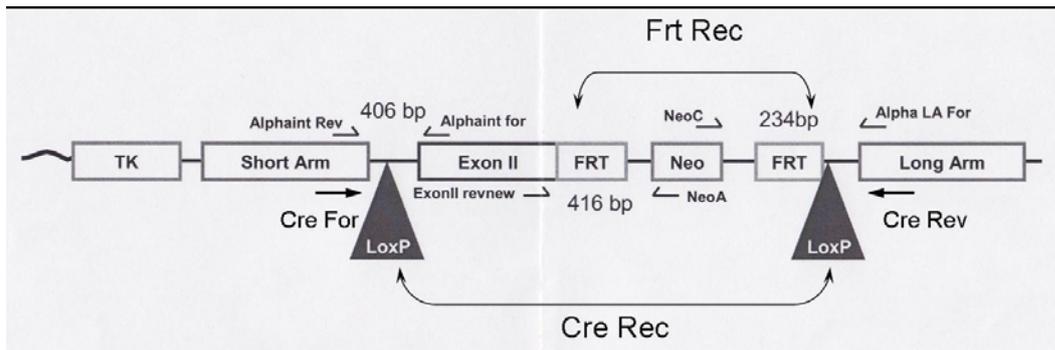
Рисунок 1 Визуализация ПЦР-фрагмента размером 720 bp в 1%-ном агарозном геле.

8.3 Детекция Lox-P сайтов в заданных участках первого и второго интронов гена альфа-синуклеина методом конвенционной ПЦР.

Анализа присутствия в геноме коровой линии фланкирующих последовательностей loxP-сайтов осуществляли методом конвенционного ПЦР с использованием следующих праймеров:

Exon1RevNew_AU GACATGTATGGCAGTAAGCC

ReverseFlippedLA_AU CCACTGACCAAGTGATCCCT



ПЦР проводили на амплификаторе Mastercycler nexus (Eppendorf AG, Германия). Реакцию проводили в объеме 25 мкл в буфере, содержащем: 300 мМ Трис-НСl рН 8.0, 166 мМ (NH₄)₂SO₄, 25 мМ MgCl₂; дНТФ в концентрации 0,2 мМ. Конечная концентрация праймеров составляла 0,5 мкМ каждый. В качестве матрицы использовали 1 мкл ДНК. В реакционную смесь добавляли 1,25 ед. Taq-полимеразы (NEB, Великобритания). Программа для ПЦР включала первичную денатурацию (2 мин при 95°C), затем 45 циклов: 30 сек при 95°C, 30 сек при 58°C и 1 мин при 68°C. Затем финальная элонгация при 68 °C 5 мин. Размер амплифицированного фрагмента составляет 683bp для дикого типа и 381bp в случае loxP фланкирования.

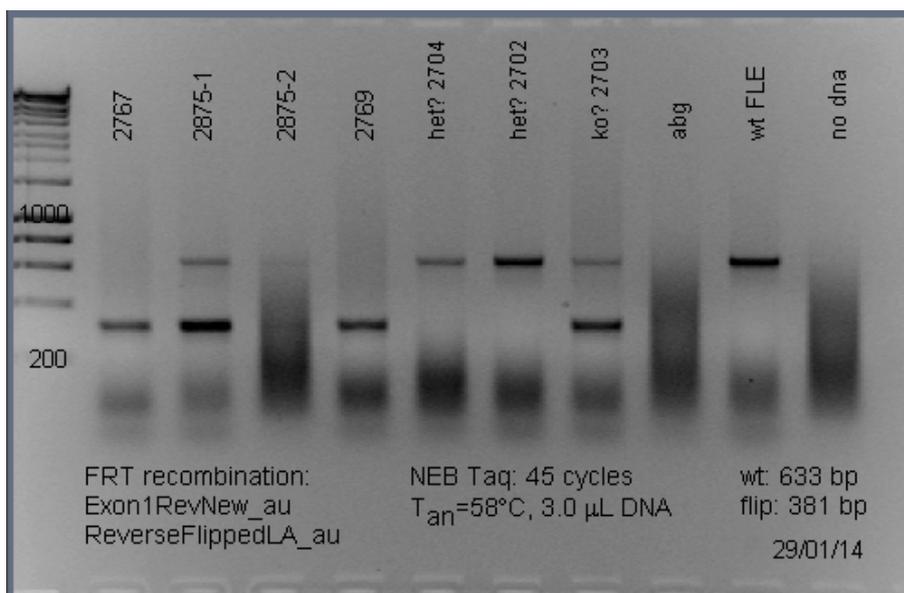


Рисунок 3 Визуализация ПЦР-фрагментов размером 683 пн (немодифицированный вариант) и 381 пн (модифицированный Lox-P сайтами вариант) в 1%-ном агарозном геле.

8.3 Анализ ДНК в агарозном геле

Электрофорез проводили в 2% агарозном геле в буфере TAE, содержащем 40 mM Трис-НСl, 20 mM уксусной кислоты и 1 mM EDTA, с добавлением бромистого этидия до концентрации 0,5 мкг/мл в приборе Bio-Rad (США). К пробам перед нанесением добавляли по 3 мкл буфера для нанесения, содержащем 5% глицерина, 0,025% BFS, 0,2% 50x TAE) на каждые 25 мкл образца. В качестве маркера для определения молекулярных весов фрагментов ДНК использовали ДНК-маркер GeneRuler 1 kb (Fermentas, США). Документацию электрофореграмм осуществляли с помощью прибора BioSpectrum AC Chemi HR 410 (UVP, США), после визуализации ДНК в проходящем ультрафиолетовом свете.

9. Обработка и оформление результатов измерений

Не производится

10. Требования безопасности, охраны окружающей среды

Помещение должно соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009. Содержание вредных веществ в воздухе не должно превышать норм, установленных ГН 2.2.5.1313-03 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны». Организация обучения работников безопасности труда – по ГОСТ 12.0.004.

При выполнении измерений необходимо соблюдать требования, изложенные в технической документации к приборам.

11. Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений могут быть допущены штатные сотрудники, имеющие соответствующую профессиональную подготовку, прошедшие соответствующий инструктаж, освоившие метод в процессе тренировки