тРНК: Таинственное исчезновение

Исследует Лаборатория эволюции бактериальных геномов

Геномы исследованных бактерий характеризуются высоким разнообразием, проявляющемся в различии ряда важнейших свойств. Так, примером тому может служить присутствие/отсутствие некоторых генов, кодирующих тРНК.

Нам стало интересно почему же тРНК, несущие некоторые из антикодонов, редки или вовсе отсутствуют в бактериях E.coli.

Мы предположили, что подобные тРНК снижают выживаемость бактерий в естественных условиях. Если наша гипотеза верна, то отсутствие этих тРНК можно объяснить уменьшением фитнесса под действием естественного отбора.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Поскольку подобный эксперимент проводится впервые, нам было необходимо подобрать оптимальную температуру для ПЦР. Выяснилось, что для ATT-тРНК реакция лучше всего протекает при 44-45, а ATC хорошо амплифицируется при любой температуре.

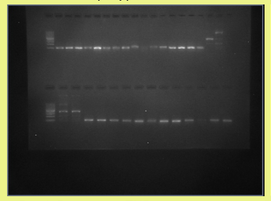

Рис.1. Результаты ПЦР: успешно

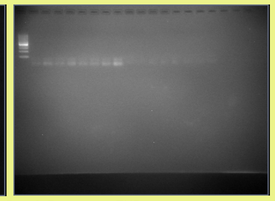

Рис. 2. Результаты ПЦР: реакция не прошла

Anti-codon	Concentration, ng/μl	260/280 ratio
ATT	33,74	1,84
ATC	40,48	1,86
ACT	17,17	1,76
ACC	41,55	1,75
AGC	42.28	1,85
CAT	35,80	1,86
TAG	27,29	1,80

Табл. 1. Результаты очистки продуктов ПЦР

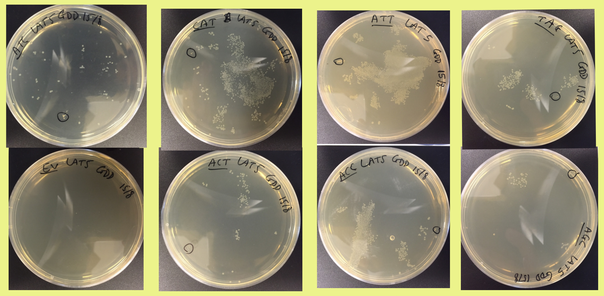

Рис. 4-10. Культуры трансформированных бактерий

ВЫВОДЫ

Как мы это делали?
Материалы и методы

Для внедрения в геном E. coli генов, кодирующих нужные нам тРНК, нами были использованы коммерческие плазмиды.

~No-template PCR - разновидность ПЦР, характеризующаяся отсутствием ДНК-матрицы. Использова***лись только*** праймеры, которые, соединившись, далм нужные тРНК. Поскольку оптимальный режим ПЦР для данного эксперимента неизвестен, реакцию проводили при 44˚C, 48˚C, 52˚C, 54˚C, 57˚C, 60˚C, а также 45˚C=> 60˚C и 60˚C=> 45˚C. Реакция пошла только с четвертой попытки, когда мы заменили полимеразу.

Однако после ПЦР в растворе остались примеси, которые необходимо удалить: соли буфера, dNTP и т.д. Для решения этой проблемы мы провели PCR-пурификацию.

В последнем этапе молекулярного клонирования тепловой шок позволил клеткам E.coli «поглотить» плазмиды, содержащие интересующие нас гены.

PCR

Электрофорез

Электрофорез в агарозном геле проводился для оценки качества продуктов ПЦР, а также для разделения полученных фрагментов ДНК по длине.

Очистка

Рестрикция

Лигирование

Трансформация

Рестрикция проводилась с использованием двух ферментов: EcoRI and NOTI.
Процесс лигирования позволил связать исследуемые гены с векторами.

Получение генов, кодирующих ТРНК

Разделение ДНК по длине

Получение чистых продуктов

Молекулярное клонирование

School of molecular and theoretical biology

Следствие вели:
Зарина Бикмуллина,
Георгий Столетов, Гаурав Диван
Дипа Агаше