

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ПЛАЗМИДНОЙ ДНК ИЗ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ШТАММОВ *E.coli* DH 5A И TG1

Колоскова Е.М., Езерский В.А.

*ВНИИ физиологии, биохимии и питания животных, филиал ФНЦ  
животноводства – ВИЖ им. Л.К. Эрнста, Боровск Калужской обл.,  
Российская Федерация*

Поскольку от очистки плазмидной ДНК зависят эффективность рестрикции плазмиды для подготовки фрагментов для дальнейшего клонирования, качество процедуры секвенирования, трансфекции соматических клеток и микроинъекции зигот многоклеточных живых организмов зависит от степени чистоты препарата. Качество плазмидной ДНК, выделенной из штаммов, содержащих ген *endA*, кодирующий эндонуклеазу I *E. coli*, обычно недостаточно для проведения генно-инженерных манипуляций. Для очистки плазмидной ДНК, выделенной из таких *endA*<sup>+</sup> штаммов, как *E. coli* TG1, необходим дополнительный этап очистки. Цель данного исследования – разработка усовершенствованной методики выделения и очистки плазмидной ДНК из трансформированных штаммов *E. coli* для получения препарата нужного качества при проведении последующих этапов рестрикции и трансфекции соматических клеток. Показано, что, включение первой отмывки сорбированной ДНК хаотропным раствором в протокол выделения при использовании спин-колонок для выделения плазмидной ДНК и суспензий с гранулами силикагеля, даёт качество плазмиды, достаточное для проведения рестрикции. Для препаративного выделения плазмидной ДНК из *E. coli* TG1 сочетание метода щелочного лизиса с фенол-хлороформной экстракцией свежеприготовленного раствора ДНК тоже позволяет получать препараты необходимого качества.

*Ключевые слова: штаммы E. coli, выделение плазмиды, очистка ДНК*

*Проблемы биологии продуктивных животных, 2019, 4: 105-112*

### Введение

При создании генетических конструкций одной из самых часто осуществляемых процедур является наработка фрагментов целевой ДНК или готовых конечной и промежуточных плазмид в препаративных количествах. В классической методике клонирования ДНК используют способность клеток бактерий поглощать и реплицировать кольцевые молекулы плазмидной ДНК.

Клонируемый фрагмент ДНК – это либо ПЦР-амплификат геномной ДНК с использованием специально подобранных праймеров, либо фрагмент, вырезанный из ранее полученной рекомбинантной плазмиды с помощью рестриктаз. В качестве переносчика («вектора») в первом случае служит одна из плазмид для клонирования ПЦР-продуктов (например, *pTZ57R/T*), во втором – кольцевая плазида, линейаризованная с помощью соответствующих рестриктаз. В обоих случаях создается лигазная смесь, содержащая плазмиду-вектор с клонируемым фрагментом ДНК и ДНК-лигазу. В результате лигирования образуется новая рекомбинантная плазида. При обработке специально подготовленного большого количества бактериальных клеток *E. coli* некоторые из них поглощают плазмиду (процесс трансформации). Компетентна, т.е. способна поглощать плазмидную ДНК, только небольшая фракция клеток. После проникновения в бактерию происходит репликация плазмидной ДНК и начинается экспрессия маркеров устойчивости к лекарственным препаратам, в результате чего трансформанты приобретают устойчивость к антибиотику. Как правило, используют плазмиды, придающие трансформированной бактериальной клетке резистентность к

определенному антибиотику, что позволяет использовать селективные среды. Трансформированные клетки реплицируют плазмиду вместе с собственным геномом. Из полученного клона плазмиду выделяют и далее используют по назначению.

Компетентные клетки *E. coli* высокого качества можно приобрести у коммерческих фирм (например, ZYMO RESEARCH CORP), либо приготовить самостоятельно с использованием традиционных или модифицированных методов (Tu et al., 2005).

Все методы получения плазмидной ДНК включают три основных этапа: 1) рост бактерий и амплификация плазмиды; 2) сбор бактерий и их лизис; 3) очистка плазмидной ДНК. От степени очистки ДНК зависят эффективность её рестрикции, качество процедур секвенирования и подготовки фрагментов для проведения последующих этапов клонирования, трансфекции соматических клеток и микроинъекции зигот многоклеточных живых организмов (Великов, 2013).

Эффективность трансформации разных штаммов *E. coli* в одних и тех же условиях бывает разной (Liu et al., 2014): среди исследованных в этой работе двух из восьми штаммов - TG1 и Dh5 $\alpha$ , у первого из них были преимущества по скорости роста и эффективности трансформации, что соответствует и нашим наблюдениям. Несмотря на это, использование штамма TG1 с целью получения высокоочищенной стабильной ДНК довольно проблематично; в отличие от Dh5 $\alpha$ , бактериальная ДНК штамма TG1 содержит ген *endA*, кодирующий эндонуклеазу I *E. coli*, обладающую неспецифической активностью по расщеплению двухцепочечной ДНК. Исследование, проведенное на различных штаммах *E. coli* (дикого типа или *endA*-), показало, что при инкубировании плазмидной ДНК в экстрактах штаммов *endA*<sup>+</sup> происходила её деградация, а в мутантах *endA*- деградации не было. Качество ДНК, полученной из мутантов *endA*-, в целом было выше, чем качество ДНК, полученной из штаммов *endA*<sup>+</sup> (Schoenfeld et al., 1995). В случае *E. coli* Dh5 $\alpha$  – мутанта *endA*-, проблем с очисткой плазмидной ДНК обычно не бывает.

Использование фенол-хлороформного метода очистки практически всегда даёт плазмидную ДНК хорошего качества даже из *endA*<sup>+</sup> штаммов, однако этот метод выделения и очистки ДНК довольно трудоёмок, токсичен и используется не часто, несмотря на то, что фенол-хлороформный метод экстракции ДНК считается стандартным (Sambrook et al., 1989; Ehrh, Schnappinger, 2010).

В современных лабораториях для выделения ДНК обычно применяют специализированные коммерческие наборы, в которых используются спин-колонки, содержащие пористую мембрану на основе кремния, избирательно связывающую нуклеиновые кислоты. Наборы для выделения ДНК делают весь процесс намного проще и быстрее, чем классические методы. Лизирующий буфер содержит высокую концентрацию хаотропной соли (гуанидин HCl, гуанидинтиоцианат, мочевины), дестабилизирующей внутри- и меж-молекулярные взаимодействия. В буфере для лизиса могут быть детергенты, ферменты (протеиназа K, RNазы). При прохождении высокохаотропного лизата сквозь мембрану колонки, ДНК связывается с диоксидом кремния. Для удаления примесей обычно используют два этапа промывки. Первая промывка может содержать хаотропную соль для удаления остаточного белка. В некоторых наборах она не предусмотрена. В любом случае применяется промывка этанолом для удаления солей, иногда двукратная. В инструкции к набору LumiPure для выделения плазмидной ДНК, например, первый промывочный буфер содержит гуанидин гидрохлорид (GuHCl) (<[www.lumiprobe.com](http://www.lumiprobe.com)>). Наборы NucleoSpin (MACHEREY-NAGEL, Германия <[www.mn-net.com](http://www.mn-net.com)>) для выделения плазмидной ДНК тоже содержат первый промывочный буфер с высокой ионной силой, состав которого не приводится.

Мы обычно пользуемся набором Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit (#K0502, <<https://www.fishersci.ca/shop/products/genejet-plasmid-miniprep-kit-promotion/ferk0502pm>>) с рекомендацией двукратной спиртовой промывки. Относительно недавно появилась версия руководства, в которой рекомендовано для очистки плазмидной ДНК из штаммов *E. coli* с высокой эндонуклеазной активностью использовать промывочный раствор (Wash Solution I,

#R1611), разбавленный изопропанолом. В состав набора этот компонент не включён. В наборе Plasmid Miniprep (Кат. # BC021) (<<http://evrogen.ru/kit-user-manuals/BC021.pdf>>) по инструкции предусмотрена только одна спиртовая промывка. Плазмидная ДНК, выделенная из *E. coli* без дополнительной доочистки нестабильна и быстро деградирует, особенно в условиях проведения реакций рестрикции.

Цель данной работы – оптимизировать выделение чистой плазмидной ДНК из штамма *E. coli* TG1, содержащего эндонуклеазу I.

### Материал и методы

В работе использовали следующие ферменты и реактивы: рестриктазы BamHI, XbaI, EagI (10 ед/мкл); 10×Buffer Y+/ Tango, 10×Buffer O. Для промежуточного клонирования ПЦР-продуктов использовали T4 DNA Ligase (5 ед/мкл), 10×T4 DNA Ligase Buffer, pTZ57R/T набора InsTAclone PCR Cloning Kit <<http://www.thermoscientific.com/fermentas>>. Для электрофореза использовали агарозу (Biotechnology Grade), Amresco США (Хеликон <<https://helicon.ru/catalog/>>).

Для приготовления хаотропного раствора использовали гуанидинтиоцианат (GuTC) (Хеликон), NaCl (Диам).

В работе использовали бактериальные штаммы *E. coli* Dh5α и *E. coli* TG1. Для получения компетентных клеток применяли стандартную методику инкубации клеток *E. coli* при низкой температуре в растворе, содержащем ионы Ca (Маниатис и др., 1984).

Реактивы: среда SOB (2% триптон; 0,5% дрожжевой экстракт; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM MgSO<sub>4</sub>); буфер TB (10 mM HEPES; 15 mM CaCl<sub>2</sub>; 55 mM MnCl<sub>2</sub>; 0,25 M KCl); ДМСО.

Трансформацию компетентных клеток *E. coli* Dh5α и *E. coli* TG1 проводили по методике и с реагентами набора Transform-Aid Bacterial Transformation Kit. Трансформированные клетки высевали по 10-25 мкл на среду Лурия-Бертани (ЛБ), содержащую ампициллин (Am<sup>+</sup>), 100 мкг/мл и 1,5%-ый агар. Выросшие клоны пересеивали на такую же ЛБ-Am<sup>+</sup> среду. ДНК из клонов для ПЦР-анализа выделяли с помощью лизирующей смеси с протеиназой К. Подходящий клон нарабатывали в 100 мл ЛБ-Am<sup>+</sup> среды.

*Выделение плазмидной ДНК* проводили несколькими способами:

- с использованием набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit (по инструкции),
- методом щелочного лизиса (Birnboim, Doly 1979).

Реактивы: а) ресуспенсирующий буфер (25 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM глюкоза, 10 mM ЭДТА), б) лизирующий раствор – 0,2 н NaOH, 1% SDS (sodium dodecyl sulfate); в) нейтрализующий раствор – 5 M калий ацетат, pH 4,8; г) промывочный раствор – 70% этанол, 17 mM NaCl; ТЕ буфер – 10 mM Tris-HCl, 1 mM ЭДТА, pH 7,5-8

- методом фенол-хлороформной экстракции (Маниатис и др., 1984).

Реактивы: смесь фенол-хлороформ (1:1) (фенол, насыщенный 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 0,1% оксихинолин, 0,2% β-меркаптоэтанол); хлороформ; изопропанол; 5 M NaCl.

5 M гуанидинтиоцианат (GuTC), 2M NaCl.

*Качество и количество выделенных плазмид* и фрагментов рестрикции оценивали визуально в УФ свете после электрофореза образцов в агарозном геле (АГ). Электрофорез проводили в горизонтальном АГ в ×0,5 Tris-боратном буфере (ТВЕ), pH 8,0 с бро-мистым этидием, используя набор оборудования фирмы Hoeffer (США).

Размер фрагментов ДНК в АГ оценивали, используя в качестве стандарта DNA Ladder Mix (Fermentas). Расщепление плазмидной ДНК рестриктазами проводили стандартными методами с учетом активности и условий работы каждого фермента, описанных в сертификатах анализа или справочных каталогах (Fermentas).

## Результаты и обсуждение

Ранее, при проведении одной из трансформаций *E. coli* DH5 $\alpha$  лигазной смесью, содержащей плазмиду для клонирования ПЦР-продуктов *pTZ57R/T*, как побочный продукт был получен клон с кольцевой плазмидой *pTZ57R/T*. Плазмиду наработали и очистили как потенциальный вектор для клонирования рестриктных фрагментов целевой ДНК. Кольцевой плазмидой *pTZ57R/T* трансформировали компетентные клетки *E. coli* TG1. Один из клонов, содержащих плазмиду размером 2886 п.н., наработали в 25 мл ЛБ Am<sup>+</sup> среды и разделили на аликвоты. Из трёх аликвот плазмидную ДНК выделяли с использованием набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit, применяя несколько вариантов промывки:

1. по инструкции, две промывки Wash Buffer I;
2. 5 М гуанидинтиоцианат (GuTC), 2 М NaCl: вода в соотношении 3:1 (по объёму)\*, две промывки Wash Buffer I
3. 5 М GuTC, 2 М NaCl : изопропанол в соотношении 3:1 (по объёму), две промывки Wash Buffer I.

*Примечание:* \* 5 М GuTC, 2 М NaCl, содержащий Phenol Red в качестве рН индикатора подкисляли 5 М ацетатом калия, рН 4,8, до приобретения желтого цвета.

Для проверки качества выделенных плазмид готовили рестриктные смеси с добавлением (или без добавления) рестриктазы *VamHI* (табл. 1). Вариант без добавления рестриктазы предназначен для обнаружения остаточной эндонуклеазной активности. Смеси инкубировали 12 ч при 37°C.

Таблица 1. Проверочная рестрикция *pTZ57R/T*, выделенной с разными способами отмывки

Вариант обработки	Компоненты, мкл				
	Плаزمида, (30 нг/мкл)	10× буфер YТ	<i>VamHI</i> (10 ед/мкл)	H <sub>2</sub> O	Итого, мкл
1-1 -	2	2	-	5	10
1-2	2	2	1	6	10
2-1 5 М GuTC, 2 М NaCl :	2	2	-	5	10
2-2 вода	2	2	1	6	10
3-1 5 М GuTC, 2 М NaCl :	2	2	-	5	10
3-2 изопропанол	2	2	1	6	10

Несмотря на то, что три исходных свежесвыделенных образца на электрофоре-грамме визуально не отличаются, при инкубировании образца, отмытого только с использованием спирт содержащего промывочного раствора, в рестриктном буфере без рестриктазы ДНК полностью деградировала (рис. 1, 1-1). Использование раствора 5 М GuTC, 2 М NaCl с добавленной водой или изопропанолом полностью избавляло плазмидную ДНК, выделенную из *E. coli* TG1 от эндонуклеаз (рис. 1: 2-2, 3-2).

Хаотропный раствор 5 М GuTC, 2 М NaCl применяют в методике выделения ДНК из органов и тканей животных на суспензии силикагеля как первый этап избавления от примесей; в этой методике используются промывочный раствор 5 М гуанидинтиоцианат (GuTC), 2 М NaCl : вода (3:1).

В создании плазмиды, содержащей плечи гомологии к областям гена WAP кролика и вставку гена зелёного флуоресцирующего белка под цитомегаловирусным промотором (*cmvEGFP*), для получения промежуточных и целевой рекомбинантных плазмид использовали стандартные процедуры трансформации лигазной смесью компетентных клеток, преимущественно *E. coli* Dh5 $\alpha$ . Если трансформация не происходила, или количество трансформантов, скорость роста и количество выделенной плазмидной ДНК были недостаточны, применяли штамм *E. coli* TG1.

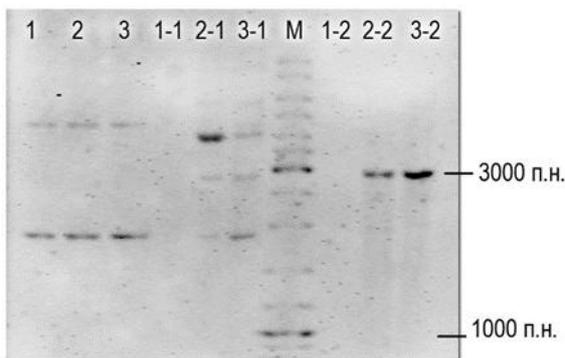


Рис. 1. Электрофореграмма плазмиды *pTZ57R/T* выделенной из *E. coli* TG1 и результат её рестрикции.

0,8% агарозный гель,  $\times 0,5$  ТБЕ;

*M* - маркер размеров ДНК;

Группа 1,2,3 – плазмиды, выделенная с разными вариантами доочистки;

Группа 1-1,2-1,3-1 – *pTZ57R/T*, инкубация без рестриктазы,

группа 1-2,2-2,2-3 – *pTZ57R/T* + *VamHI*

Очищенные из АГ после электрофореза в ТАЕ-буфере ПЦР-амплификаты 5'- и 3'-*HarbWAP* клонировали в *pTZ57R/T*. Лигазными смесями трансформировали компетентные клетки *E. coli* TG1. Клоны 5-7 и 5-8, содержащие плазмиду *pTZ5'HarbWA* размером 3743 п.н., и клоны 3-2 и 3-5, содержащие плазмиду *pTZ3'HarbWA* размером 3605 п.н., наработали и плазмидную ДНК выделили с использованием набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit, применив вариант промывки 5 М GuTC, 2 М NaCl : вода (3:1). Рестрикцию с *VamHI* проводили как для *pTZ57R/T*, сократив время инкубации до 1,5 часа (рис. 2). В результате были очищены плазмиды *pTZ5'HarbWAP*, содержащая 5' фрагмент размером 840 п.н. гена *WAP* кролика, и *pTZ3'HarbWAP*, содержащая 3' фрагмент размером 680 п.н.

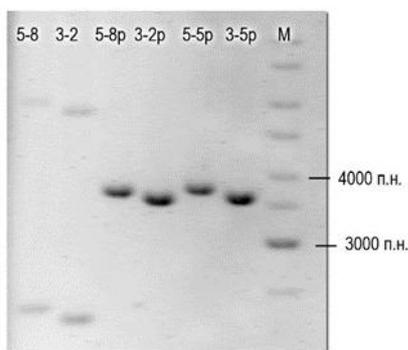


Рис. 2. Электрофореграмма плазмид *pTZ5'HarbWA* и *pTZ3'HarbWA*, выделенных из клонов *E. coli* TG1 и результат рестрикции (0,8% агарозный гель,  $\times 0,5$  ТБЕ);

*M* – маркер размеров ДНК;

5-8, 3-2 – плазмиды, выделенные с промывкой хаотропным агентом;

5-8p, 3-2p и далее – плазмиды, выделенные из соответствующих клонов + *VamHI*

Довольно часто возникает необходимость наработки плазмидной ДНК в больших количествах, и тогда предпочтительно использовать классические методы выделения плазмидной ДНК, несмотря на их трудоемкость.

**Щелочной метод выделения.** Плазмидная ДНК имеет ковалентно замкнутую кольцевую форму и гораздо меньшие размеры, чем бактериальная хромосома. Осаждённые центрифугированием бактериальные клетки лизируют, обычно с помощью ЭДТА и лизоцима, разрушающего клеточную стенку. В щелочных условиях (при pH  $\sim$  12) происходит денатурация только линейных молекул ДНК клетки-хозяина, плазмидные молекулы не денатурируют. При нейтрализации клеточного лизата в присутствии солей высокой концентрации, хромосомная ДНК, белки и РНК выпадают в осадок. Препараты плазмидной ДНК, получаемые из штамма *E. coli* DH5 $\alpha$ , оказываются достаточно чистыми для обработки рестриктирующими эндонуклеазами и последующего клонирования. Однако плазмидную ДНК, очищенную таким же образом из клонов *E. coli* TG1, не удаётся нормально рестрицировать (рис. 3: А,Б), она постепенно деградирует даже при хранении при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Для удаления загрязнений мы последовательно (сразу же) использовали фенол: хлороформный метод экстракции ДНК, выделенной щелочным методом. При обработке загрязнённого белком раствора ДНК фенолом денатурированные белки после центрифугирования

конденсируются на границе раздела фаз, водная фаза последовательно промывается смесью фенол-хлороформ и чистым хлороформом. Оставшиеся в водном растворе другие органические соединения клетки и низкомолекулярные вещества при осаждении ДНК спиртом остаются в растворе. Осадок ДНК растворяют в буфере ТЕ. Использование фенол-хлороформного метода очистки даёт плазмидную ДНК хорошего качества (рис. 3: С, D). Если этот шаг был опущен, плазмидная ДНК из endA<sup>+</sup> штамма *E. coli* TG1 деградировала (рис. 3: А)

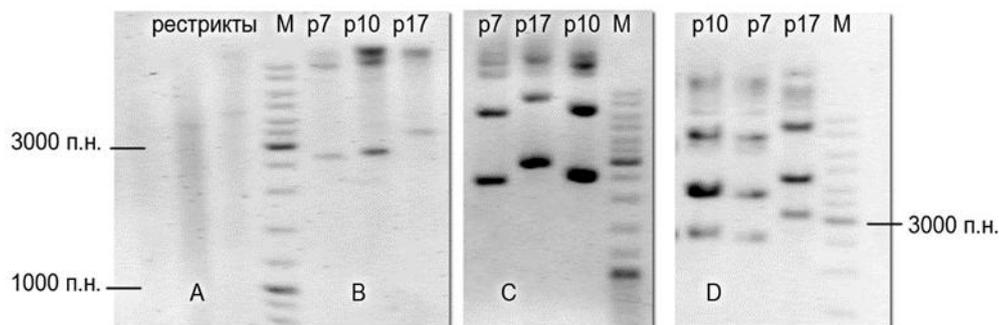


Рис. 3. Электрофореграмма плазмид p7, p10, p17 (промежуточных плазмид на основе pTZ57R/T, содержащих фрагменты гена  $\beta$ -лактоглобулина KPC), выделенных из клонов *E. coli* TG1 и их рестриктов с рестриктазой *EagI* (0,8% агарозный гель,  $\times 0,5$  ТБЕ). М – маркер размеров ДНК; В – плазмиды, выделенные с использованием коммерческого набора; А – те же плазмиды, инкубированные с *EagI* 2 ч при 37°C; С – плазмиды, выделенные и последовательно очищенные методом щелочного лизиса и фенол-хлороформной экстракции из объема 25 мл ЛБ At<sup>+</sup>; D – те же плазмиды, инкубированные с *EagI* 1,5 ч при 37°C (рестрикция неполная, но хорошо заметны линейные фрагменты размером около 3700 п.н. для p10 и p7, 4500 п.н. для p17).

Иногда остаточная эндонуклеазная активность всё же проявляется и после такой жёсткой очистки ДНК. При проверке качества плазмиды *pBluescriptII KS(+)*, выделенной из endA<sup>+</sup> и endA<sup>-</sup> штаммов, было показано, что фенол-хлороформная экстракция улучшает качество выделения не для всех испытанных endA<sup>-</sup> штаммов; качество плазмиды, выделенной из штамма TG1, оставалось недостаточным для секвенирования (Taylor et al., 1993).

### Заключение

Иногда исследователи в силу разных причин ограничены в выборе штаммов *E. coli* для клонирования и в возможностях очистки плазмидной ДНК, выделенной из таких endA<sup>+</sup> штаммов, как *E. coli* TG1. При использовании устаревших версий коммерческих наборов спин-колонок для выделения плазмидной ДНК, и других наборов, в которых не предусмотрена дополнительная промывка раствором хаотропных агентов (даже самодельных колонок или суспензий с гранулами силикагеля), включение первой отмывки сорбированной ДНК хаотропным раствором в протокол выделения даёт качество плазмиды, достаточное для проведения рестрикции. Для препаративного выделения плазмидной ДНК из *E. coli* TG1, сочетание метода щелочного лизиса с фенол-хлороформной экстракцией свежеполученного раствора ДНК тоже даёт препарат необходимого качества.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Великов В.А. Молекулярная биология. Практическое руководство. – Саратов: Саратовский источник, 2013. – 84 с.
2. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. В кн.: Молекулярное клонирование (Методы генетической инженерии). – М.: Мир, 1984. – С. 239-241.

3. Birnboim H.C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // *Nucleic Acids Res.* – 1979. – Vol.7. – No. 6 – P. 1513-1523.
4. Ehrt S., Schnappinger D. Isolation of plasmids from *E. coli* by alkaline lysis. – In: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 235: *E. coli* plasmid vectors. (N. Casali, A. Preston, Eds). – Totowa, NJ: Humana Press Inc., 2010. – P.75-78.
5. Liu X., Liu L., Wang Y., Wang X., MaY. and Li Y. The study on the factors affecting transformation efficiency of *E. coli* competent cells // *Pak. J. Pharm. Sci.* – 2014. – Vol. 27. – No. 3(Supp.). – P. 679-684.
6. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* – N.Y.: Cold Spring Harbor Publ., 1989. – Vol. 1-3. – P. 479.
7. Schoenfeld T., Mendez J., Storts D.R., Portman E., Patterson B., Frederiksen J., Smith C. Effects of bacterial strains carrying the endA1 genotype on DNA quality isolated with wizard (TM) plasmid purification systems // *Promega Notes.* – 1995. – Vol. 53. – P. 12-19.
8. Taylor R.G., Walker D.C. and McInnes R.R. *E.coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing // *Nucl. Acids Res.* – 1993. – Vol. 21. – No. 7. – P. 1677-1678.
9. Tu Z., He G., Li K.X., Chen M.J., Chang J., Chen L., Yao Q., Liu D. P., Ye H., Shi J., Wu X. An im-proved system for competent cell preparation and high efficiency plasmid transformation using different *E. coli* strains // *Electr. J. Biotechn.* – 2005. – Vol. 8. – No. 1. DOI: 10.2225/vol8-issue1-fulltext-8

#### REFERENCES

1. Birnboim H.C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979, 7(6): 1513-1523.
2. Ehrt S., Schnappinger D. Isolation of plasmids from *E. coli* by alkaline lysis. In: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 235: *E. coli* plasmid vectors (N. Casali, A. Preston, Eds). Totowa, NJ: Humana Press Inc., 2010, P. 75-78.
3. Liu X., Liu L., Wang Y., Wang X., MaY., Li Y. The Study on the factors affecting transformation efficiency of *E. coli* competent cells. *Pak. J. Pharm. Sci.* 2014, 27(3, Supp.): 679-684.
4. Maniatis T., Fritch E., Sembruk Dzh. In: *Molekulyarnoe klonirovanie. (Metody geneticheskoi inzhenerii)* (Molecular cloning. Genetic engineering techniques). Moscow: Mir Publ., 1984, P. 239-241. (In Russian)
5. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* N.Y.: Cold Spring Harbor Publ., 1989, Vol. 1-3, 479 p.
6. Schoenfeld T., Mendez J., Storts D.R., Portman E., Patterson B., Frederiksen J. Smith C. Effects of bacterial strains carrying the endA1 genotype on DNA quality isolated with Wizard(TM) plasmid purification systems. *Promega Notes Magazine.* 1995, 53:12-19.
7. Taylor R.G., Walker D.C., McInnes R.R. *E.coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucl. Acids Res.* 1993, 21(7): 1677-1678.
8. Tu Z., He G., Li K.X., Chen M.J., Chang J., Chen L., Yao Q., Liu D. P., Ye H., Shi J., Wu X. An improved system for competent cell preparation and high efficiency plasmid transformation using different *Escherichia coli* strains. *Electr. J. Biotechn.* 2005, 8(1). DOI: 10.2225/vol8-issue1-fulltext-8
9. Velikov V.A. *Molekulyarnaya biologiya. Prakticheskoe rukovodstvo* (Molecular biology. Practical guide). Saratov: Saratovskii istochnik Publ., 2013, 84 p. (In Russian)

**Isolation and purification of plasmid DNA  
from transformed strains of *E. coli* DH 5 $\alpha$  and TG1**

Koloskova E.M., Ezerskii V.A.

*Institute of Animal Physiology, Biochemistry and Nutrition - Branch of Ernst Federal  
Research Center for Animal Husbandry, Borovsk, Kaluga oblast, Russian Federation*

ABSTRACT. Since the purification of plasmid DNA depends on the efficiency of restriction of the plasmid for preparing fragments for further cloning, the quality of the sequencing procedure, transfection of somatic cells, and microinjection of zygotes of multicellular living organisms depend on the degree of purity of the preparation. The quality of plasmid DNA isolated from strains containing the endA gene encoding *E. coli* endonuclease I is usually not sufficient for genetic engineering manipulations. An additional purification step is required to purify plasmid DNA isolated from endA<sup>+</sup> strains such as *E. coli* TG1. The aim of this study is to develop an improved technique for the isolation and purification of plasmid DNA from transformed *E. coli* strains to obtain a preparation of desired quality for subsequent stages of restriction and transfection of somatic cells. It is shown that the inclusion of the first washing of sorbed DNA with a chaotropic solution in the isolation protocol using spin columns to isolate plasmid DNA and suspensions with silica gel granules gives a plasmid quality sufficient for restriction. For preparative isolation of plasmid DNA from *E. coli* TG1, the combination of the alkaline lysis method with phenol-chloroform extraction of a freshly prepared DNA solution also allows one to obtain a preparation of the required quality.

*Keywords: E. coli strains, plasmid isolation, DNA purification*

**Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology, 2018, 4: 105-112**

Поступило в редакцию: 18.10.2019.

Получено после доработки: 24.10.2019

**Колоскова Елена Михайловна**, к.б.н., с.н.с., тел. 8 (910)590-92-83; heleko3@yandex.ru  
**Езерский Вадим Александрович**, к.б.н., с.н.с., тел. 8 (906)642-59-92; ez.vadim@yandex.ru