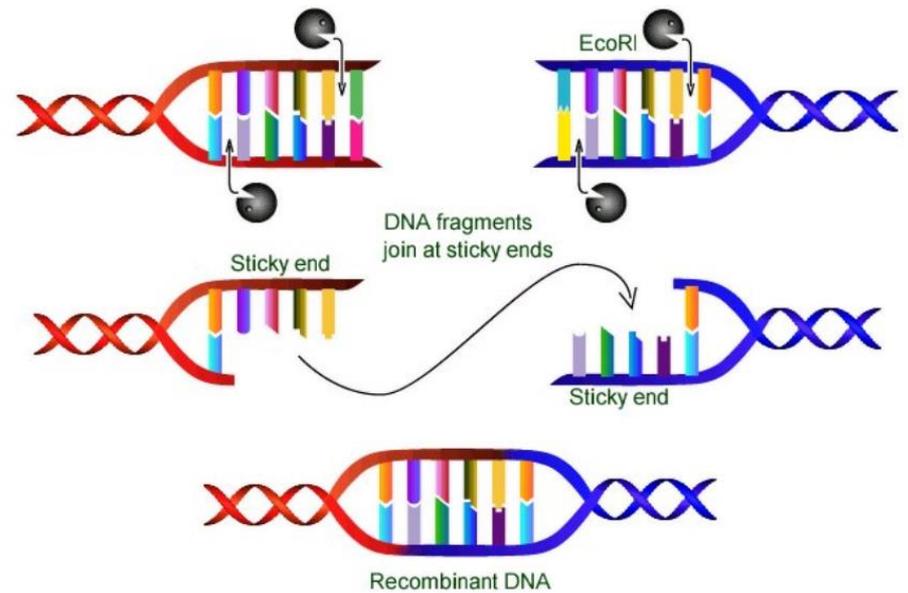
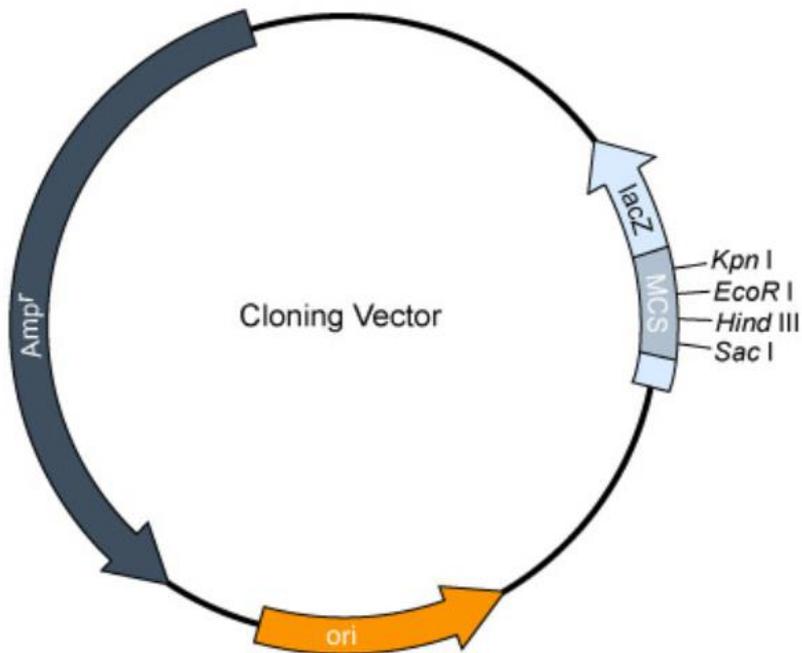


# Основы генной инженерии и биотехнологии



## Лекция 2

## Клонирование ДНК

# План лекции

1. Что такое «клонирование»?
2. Выделение и разделение нуклеиновых кислот
3. Основные ферменты, используемые в генной инженерии
4. Векторы: плазмидные, фаговые, искусственные хромосомы

# Что такое «клонирование»?

*В генной инженерии:* получение «клона»:  
препарата идентичных молекул ДНК

**или**

«идентичных» живых организмов

В случае ДНК два пути решения задачи:

1. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)
2. Рекомбинантные молекулы ДНК

# Для чего нужны клоны ДНК?

Для удобства проведения исследований

*Работать с индивидуальными молекулами ДНК трудно, но возможно*

# Клонирование ДНК

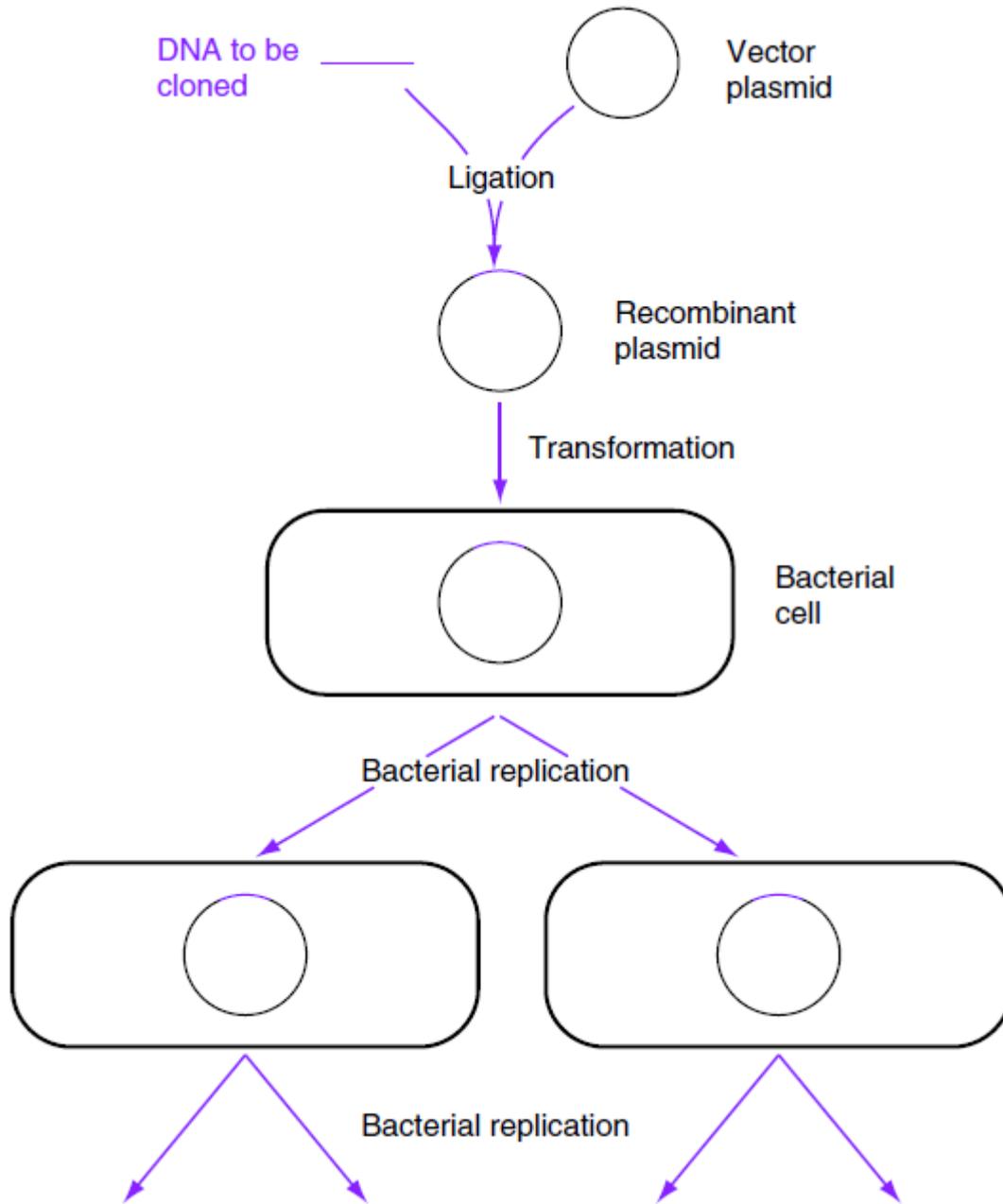
**Цель – получение клона идентичных последовательностей**

**1 – Объединение вектора со вставкой чужеродной ДНК**

**2 – Введение рекомбинантного вектора в клетки**

**3 – Размножение клеток (получение клона клеток)**

**или амплификация молекул нуклеиновых кислот - ПЦР**

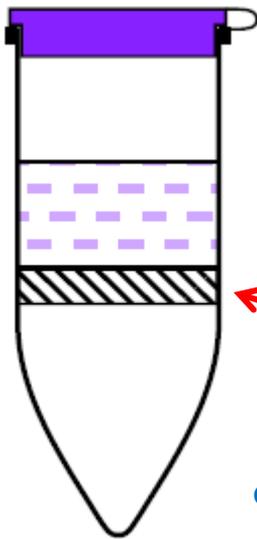


# **Выделение нуклеиновых кислот**

*Прежде чем клонировать  
последовательность, необходимо  
выделить содержащую ее суммарную ДНК*

# Фенольный метод выделения ДНК

Нейтральные значения pH

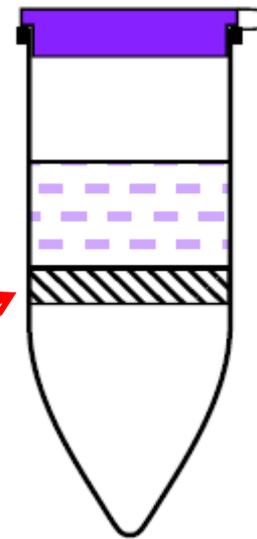


Водная фаза  
(ДНК и РНК)

Денатурированные белки

Фенольная фаза

Кислые значения pH



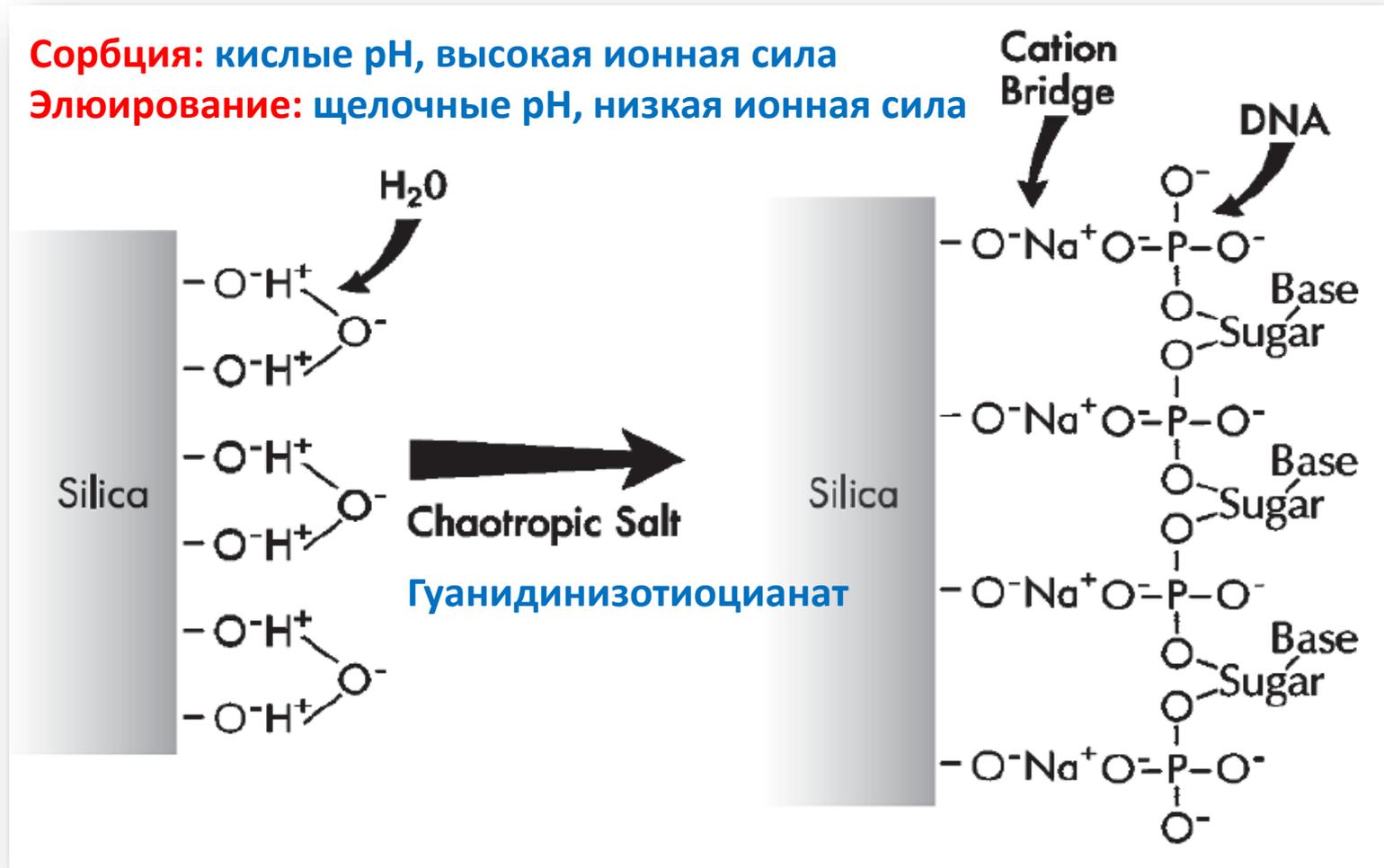
Водная фаза  
(РНК)

Фенольная фаза  
(ДНК)

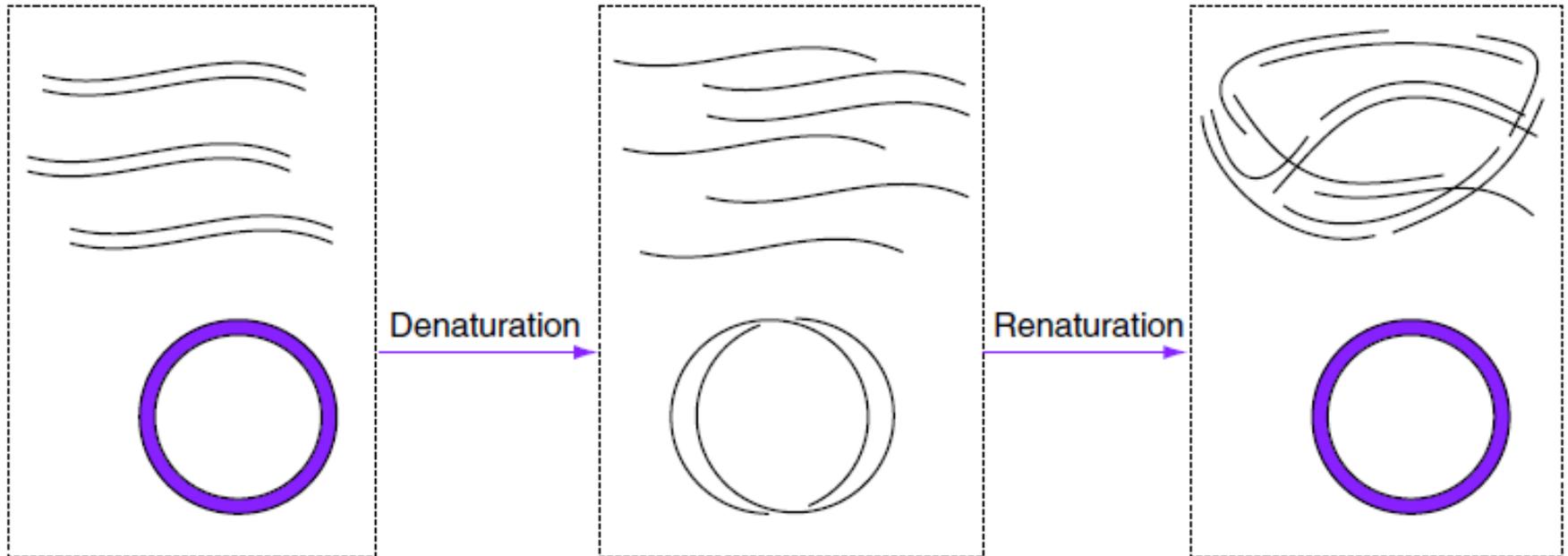
# Взаимодействие ДНК с поверхностью стекла

**Сорбция:** кислые pH, высокая ионная сила

**Элюирование:** щелочные pH, низкая ионная сила



# Щелочной метод выделения бактериальных плазмид



**pH 8,0**

Фрагменты  
линейной ДНК и  
кольцевая  
плазмидная ДНК

**pH 12,0**

Кольца плазмидной  
ДНК остаются  
зацепленными друг  
за друга

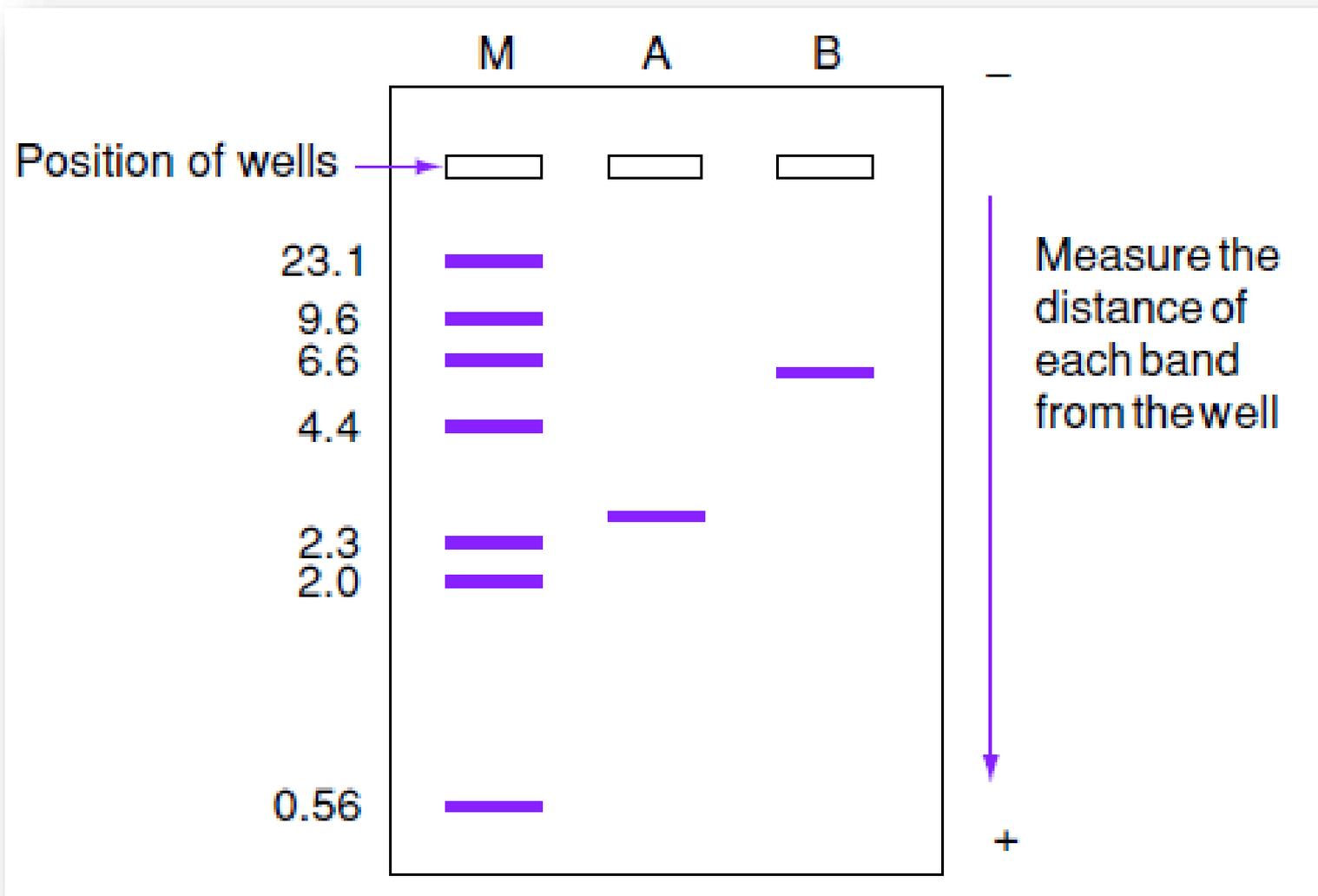
**pH 8,0**

Линейная ДНК  
агрегирует,  
кольцевая  
восстанавливается

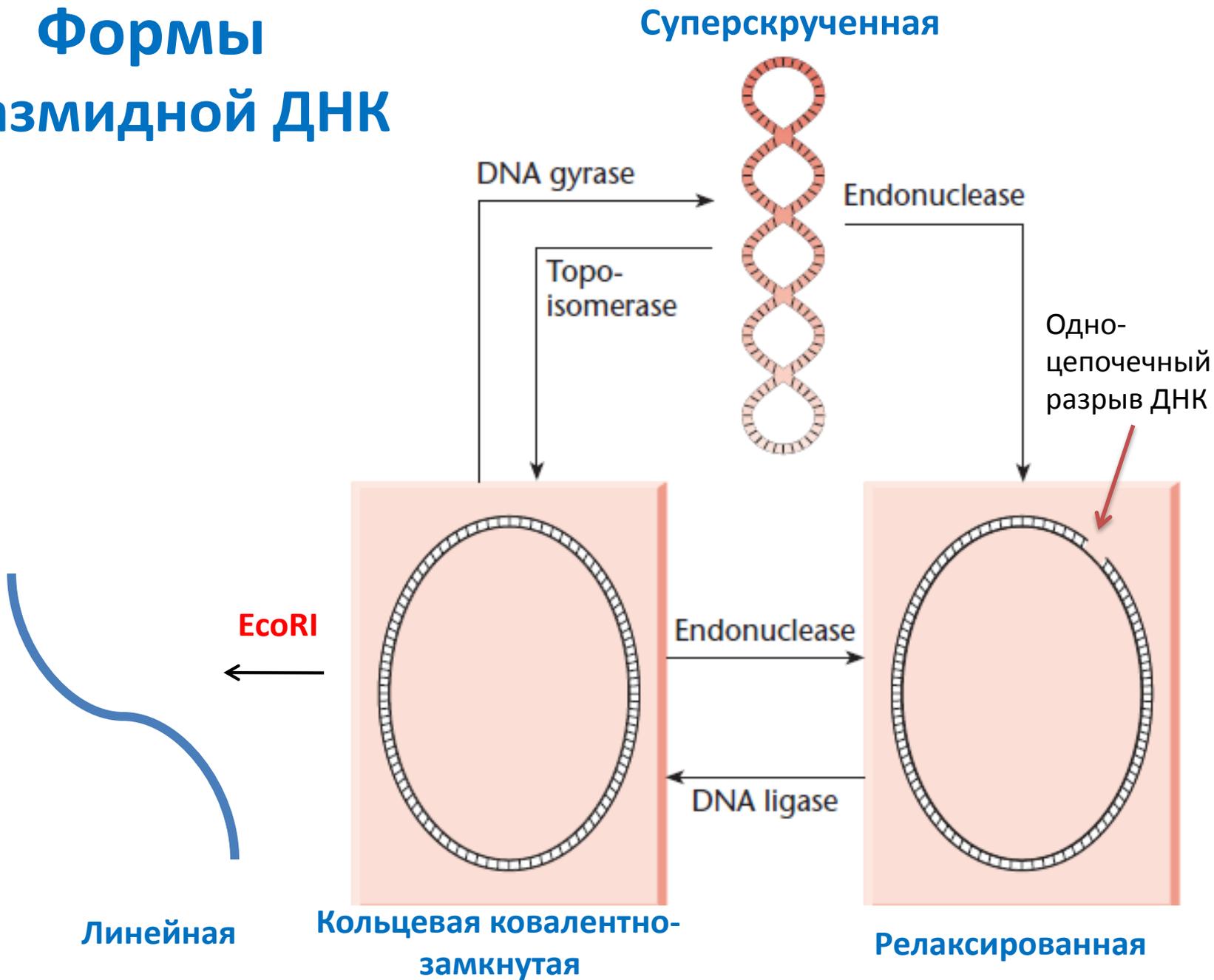
# **Разделение нуклеиновых кислот**

**Цель: обогащение препаратов  
нуклеиновых кислот нужными  
последовательностями**

# Аналитический электрофорез молекул ДНК в агарозном или полиакриламидном геле



# Формы плазмидной ДНК



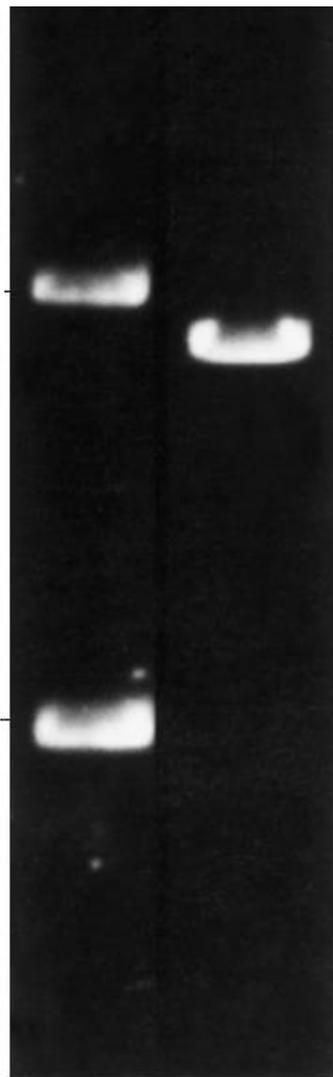
# Электрофоретическая подвижность разных форм плазмиды в присутствии бромистого этидия

Direction of migration



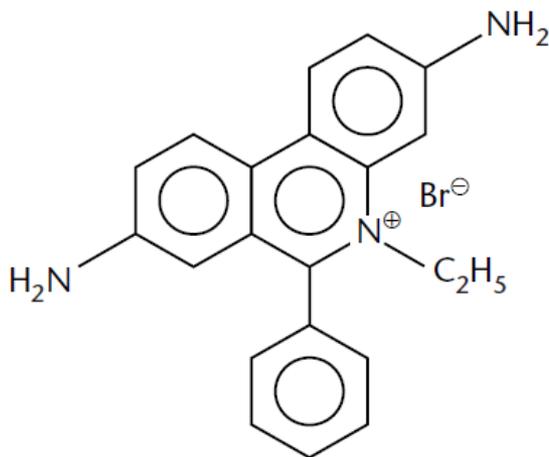
Релакс

Супер.



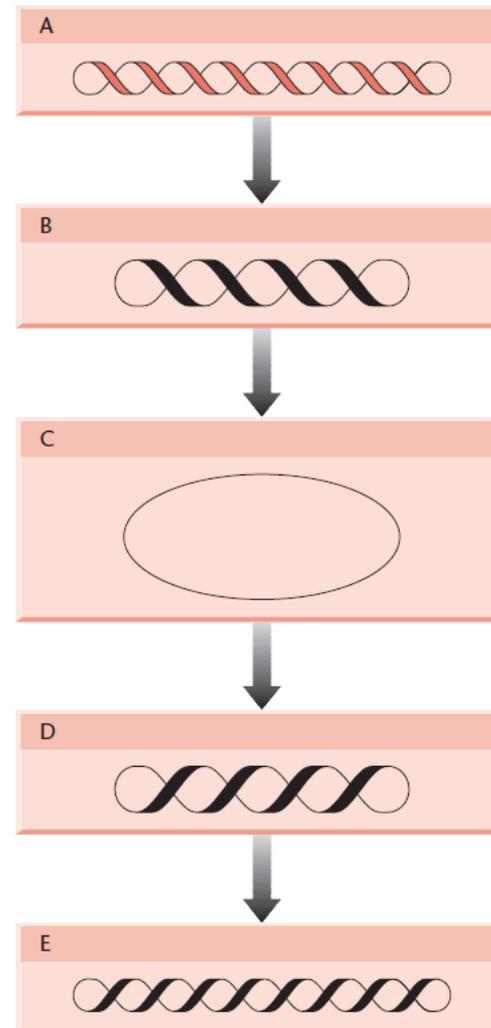
Предел визуальной чувствительности – 50 нг ДНК/полоса

Линейная

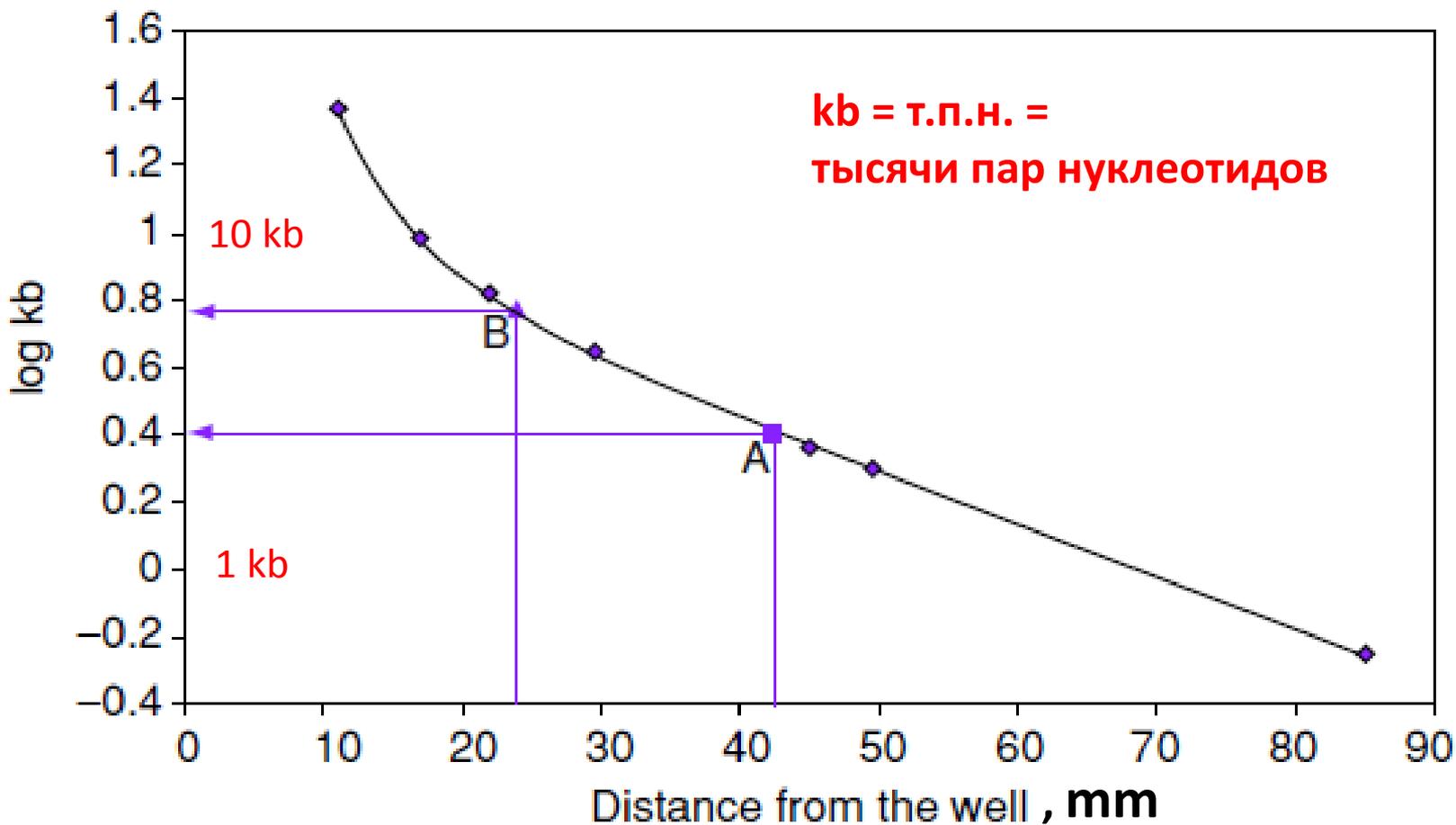


Бромистый этидий

Увеличение отношения EtBr/ДНК

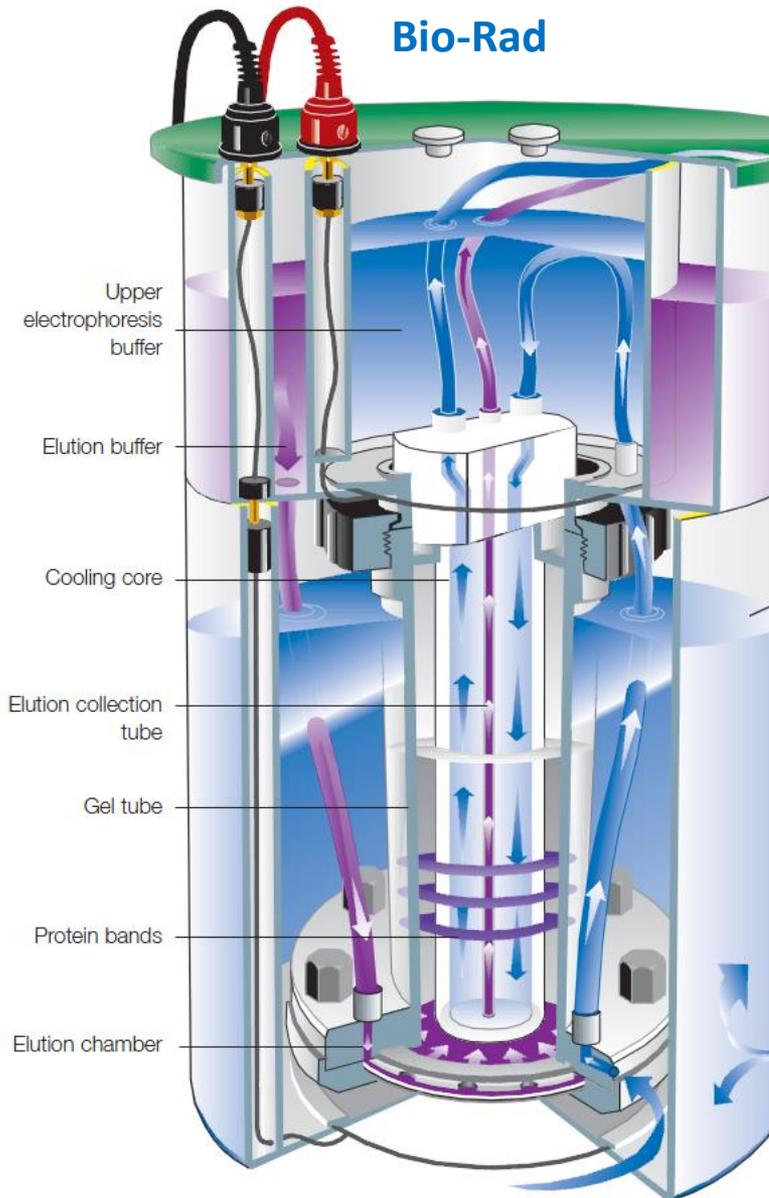


# Калибровочная кривая для определения размеров фрагментов ДНК



Model 491 Prep Cell

Bio-Rad

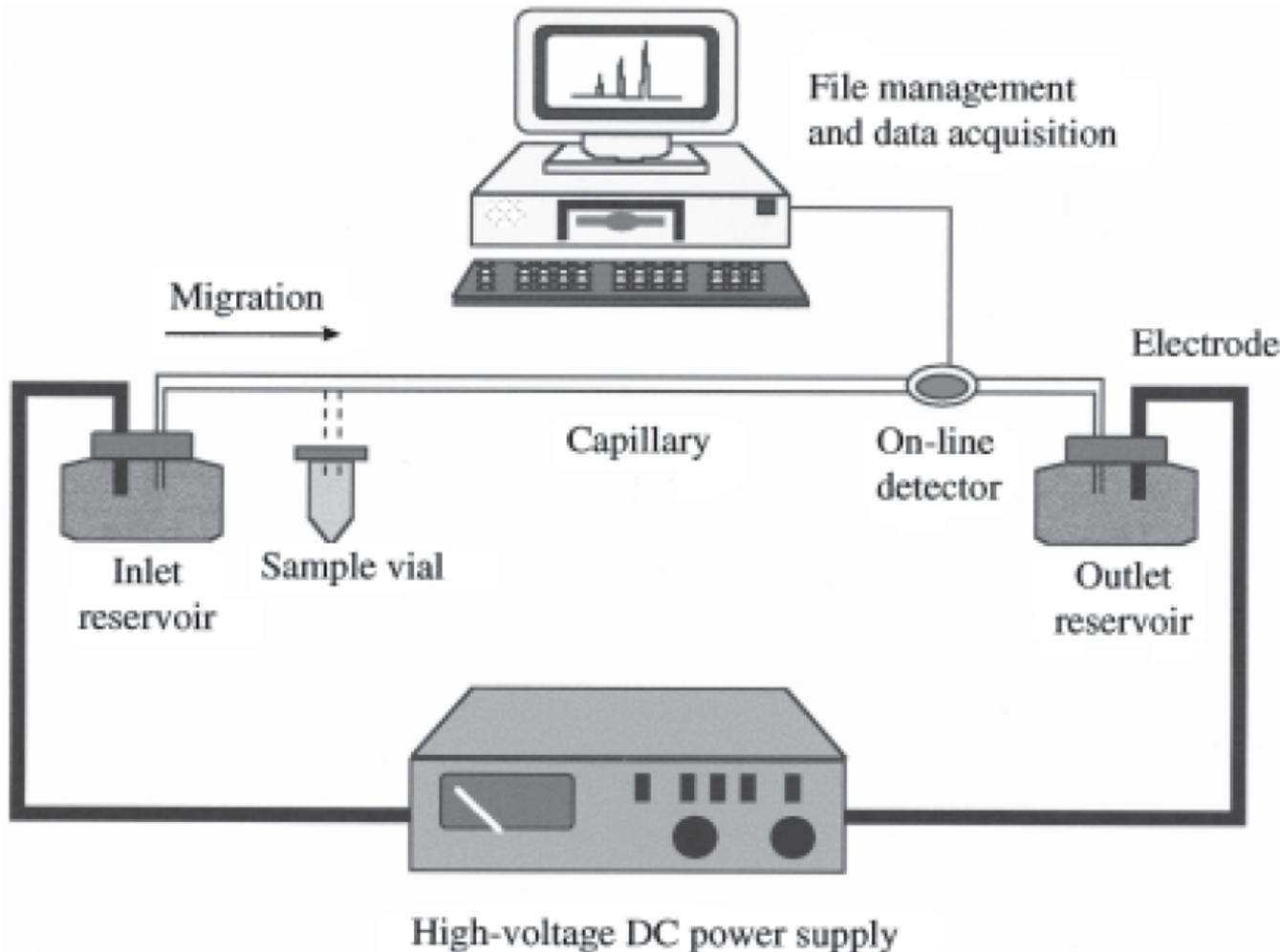


# Препаративный гель-электрофорез

- Максимальный объем образца – 15 мл
- Разделяемое вещество – 1-500 мг
- Агарозный или полиакриламидный гели



# Капиллярный электрофорез



Капилляр - диаметр  
50-100 мкм

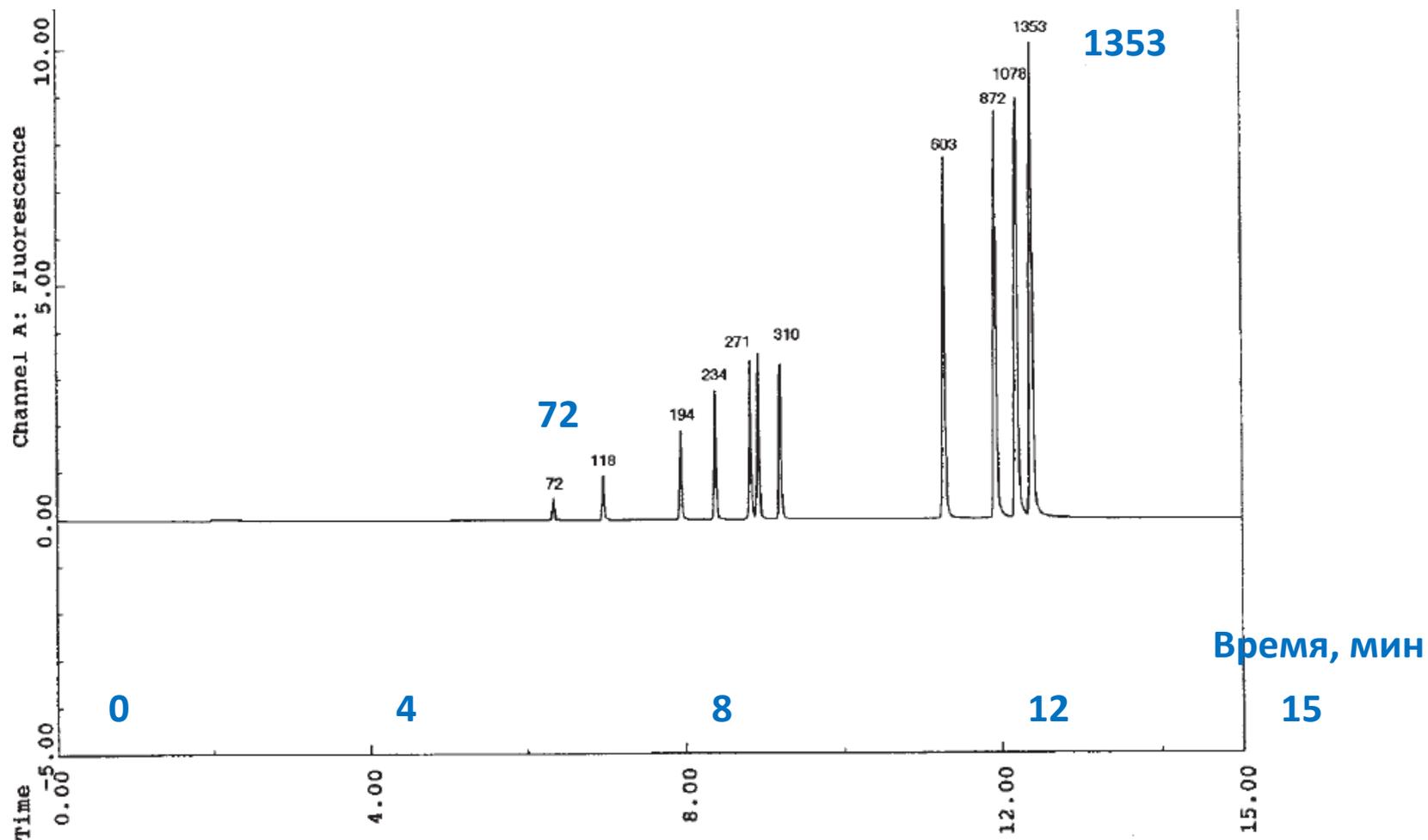
Быстрое  
теплорассеяние

Флуоресцентный  
детектор  
обеспечивает  
высокую  
чувствительность

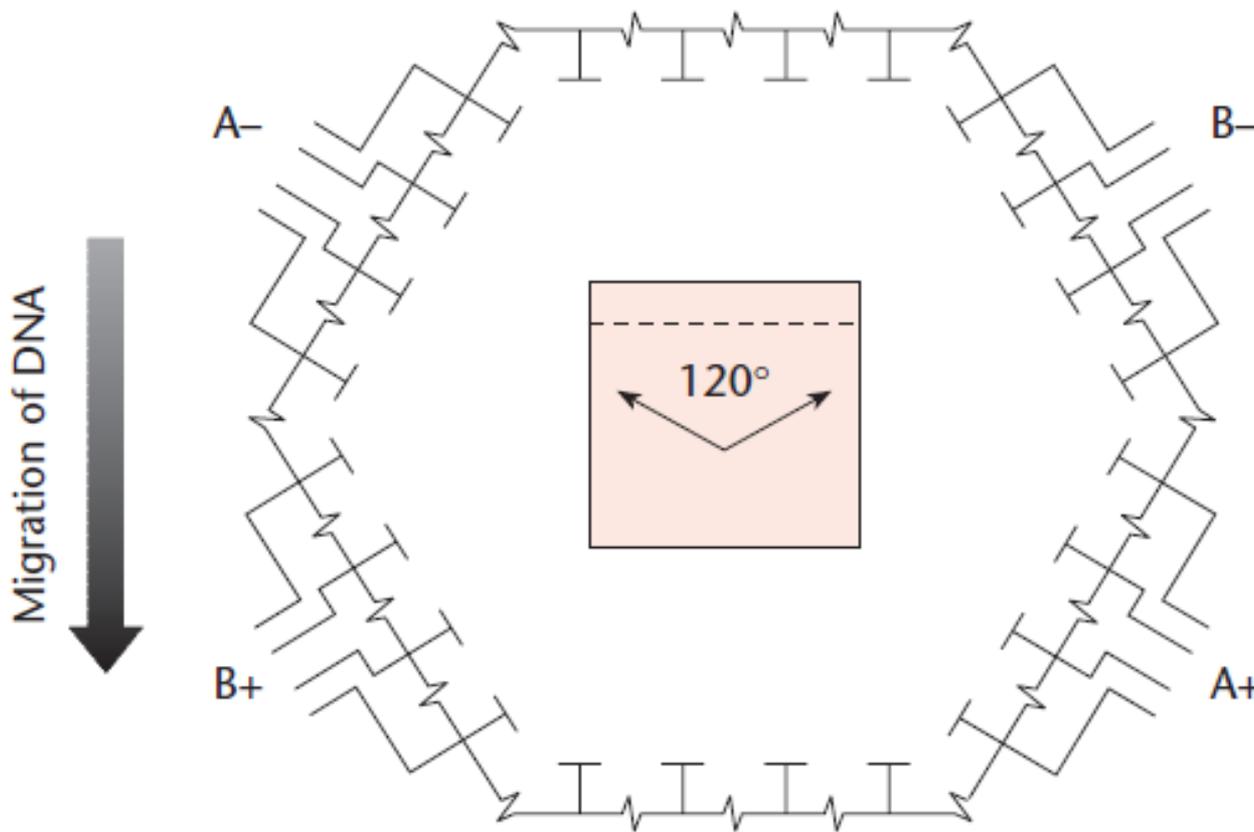
Фрагментный  
анализ ДНК

Автоматический  
анализ результатов в  
реальном времени

# Разделение *Hae*III-фрагментов ДНК фага ØX174 с помощью капиллярного электрофореза



# Электрофорез в импульсном электрическом поле

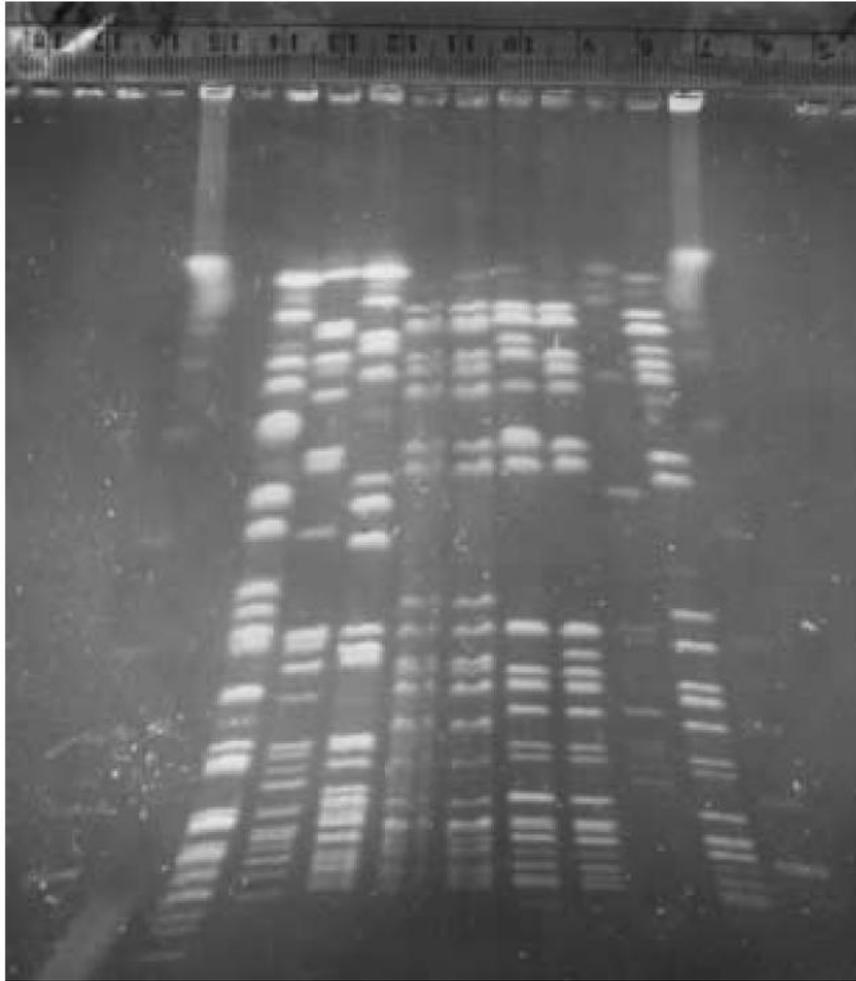


❖ Разделение ДНК до 10 м.п.н., рутинно – 200-300 т.п.н.

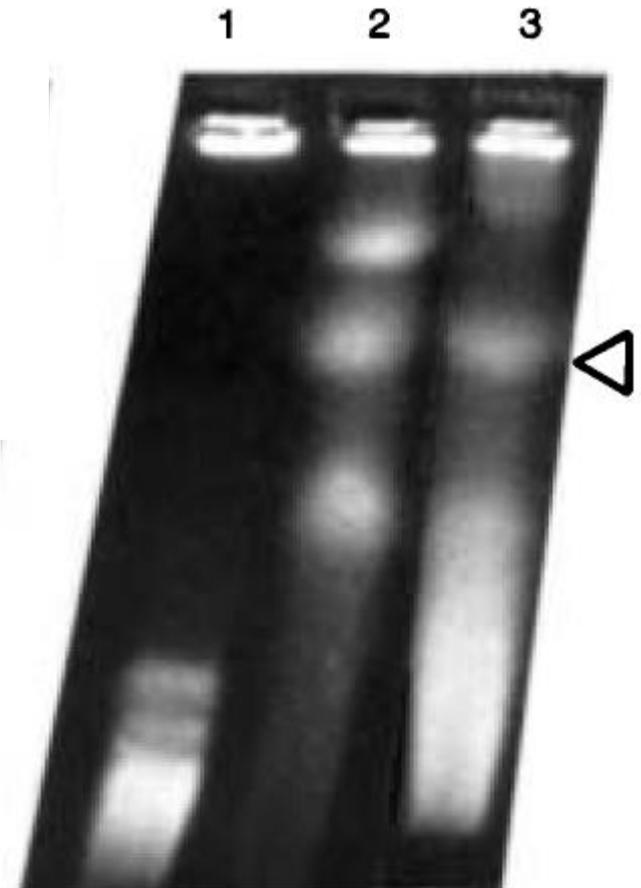
❖ Параметры полей А и В программируются независимо, обеспечивая движение НК в одном направлении

❖ Недостаток – сложная картина

# Разделение крупных фрагментов ДНК электрофорезом в импульсном электрическом поле



Рестрикция хромосом разных штаммов *E.coli*

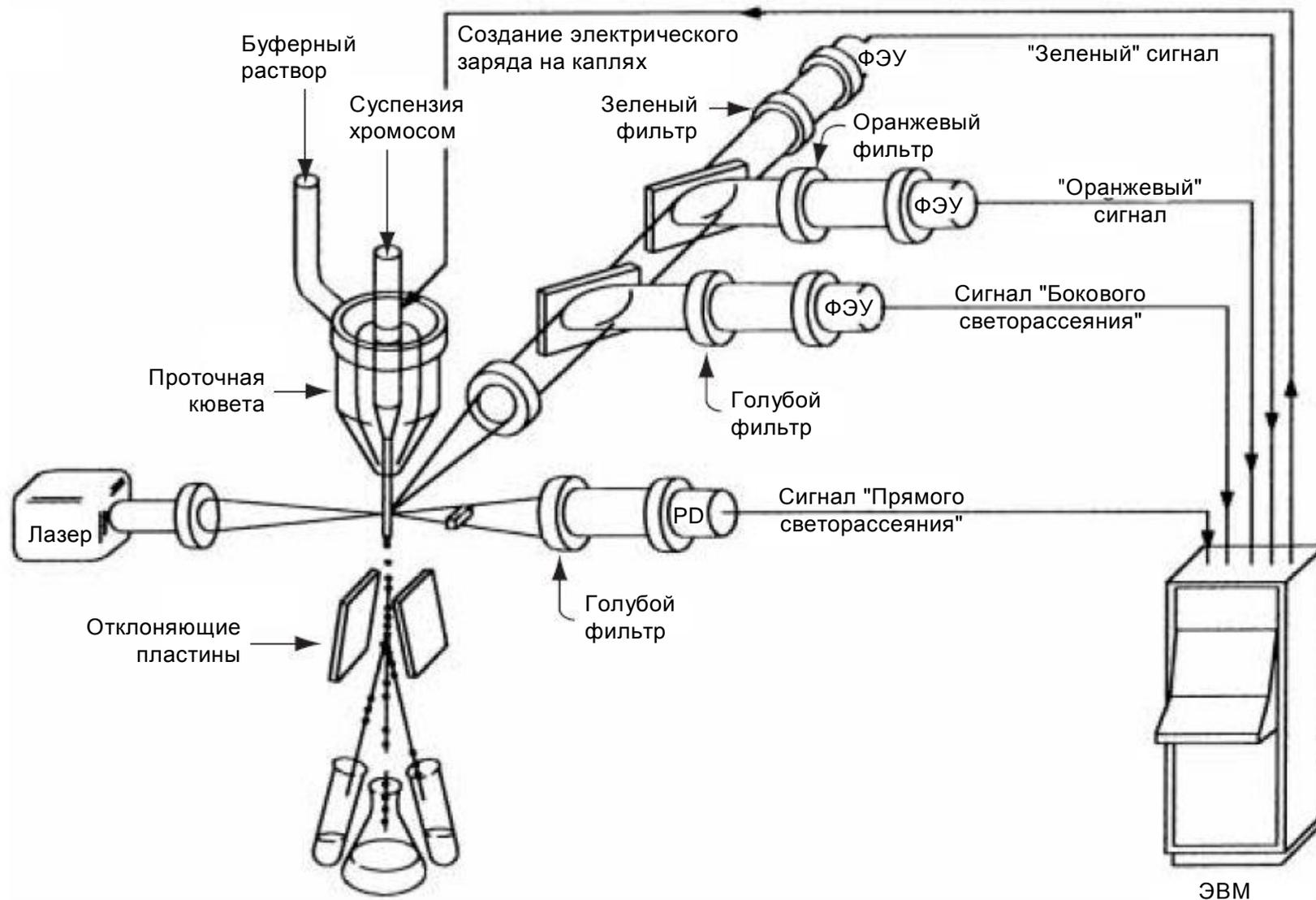


Хромосомы дрожжей: **2** – *S. pombe*,  
**3** – *S. cerevisiae* самая большая  
хромосома ~1,5 м.п.н.

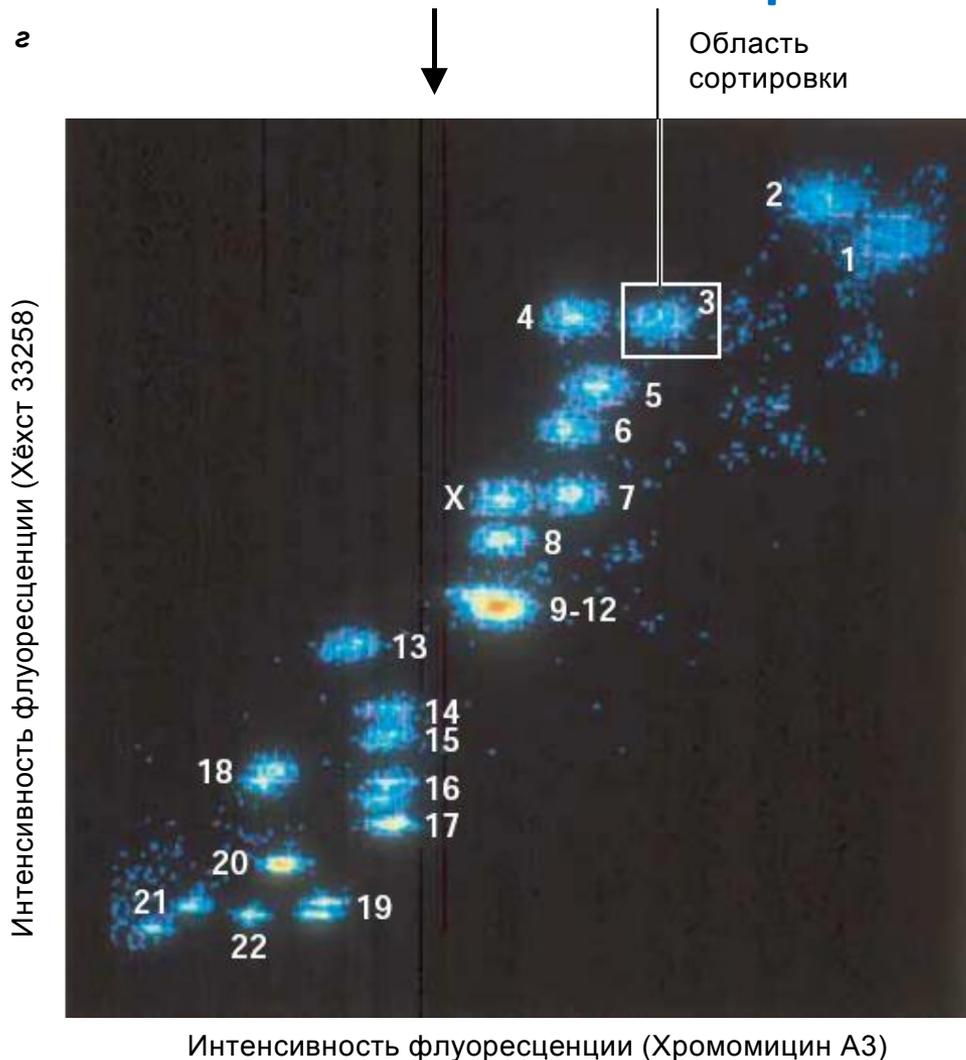
# **Хроматография нуклеиновых кислот**

**Метод разделения веществ основанный на их различиях в распределении между подвижной и неподвижной фазами**

# Сортировка микрочастиц в четырёхпараметрическом проточном цитометре



# Пример разделения метафазных хромосом человека с помощью двухлазерного проточного цитометра



- ❖ FACS (fluorescence-activated cell (chromosome) sorting)
- ❖ до  $10^5$  частиц/мл суспензии
- ❖ рассеянный свет: форма, размер и состав (по преломлению света) т.е. метаболическое состояние клеток
- ❖ число фотодетекторов определяет кол-во измеряемых параметров (обычно 5-6)
- ❖ Хёхст 33258 – АТ-пары
- ❖ хромомоциин А3 – GC-пары
- ❖ разделение гомологичных хромосом 19 и 21 родителей
- ❖ обычно  $10^3$  частиц/сек или 40 хромосом/сек (1000/23)
- ❖ YAC –  $6,4 \cdot 10^7$  хр. (21 день)

# **Ферменты, используемые в генной инженерии**

*Генные инженеры используют  
элементы генетических систем,  
функционирующие в природе*

# Первые два класса систем рестрикции-модификации

RMS Type	Subunit Arrangement	Examples	Substrate (^=cleavage)	Methyl Added	
I		<i>EcoB</i>	TG <u>A</u> N <sub>8</sub> TGCT ( N6m <u>A</u> ) A <u>G</u> CAN <sub>8</sub> N <sub>7</sub> AGC		
		<i>EcoK</i>	AACN <sub>6</sub> GTGC ( N6m <u>A</u> ) L <u>T</u> G <sub>9</sub> N <sub>6</sub> C <u>G</u> AC		
		<i>StySKI</i>	CGATN <sub>7</sub> GTTA G <u>T</u> ACN <sub>7</sub> ATCC		
II		<i>EcoRI</i>	G^A <u>A</u> TTC (N6m <u>A</u> )		<p>Подчеркнуты нуклеотиды, метилируемые в ДНК</p>
		<i>HhaI</i>	G <u>C</u> G^C (5m <u>C</u> )		
		<i>PvuII</i>	CAG^ <u>C</u> TG (N4m <u>C</u> )		
IIS		<i>FokI</i>	GGATGN <sub>9</sub> ^ C <u>C</u> ATCCN <sub>13</sub> ^	(N6m <u>A</u> ) (N6m <u>A</u> )	<p>Подчеркнуты нуклеотиды, метилируемые в ДНК</p>
		<i>HphI</i>	GGTGAN <sub>8</sub> ^ C <u>C</u> ATCCN <sub>7</sub> ^	(N6m <u>A</u> ) (5m <u>C</u> )	
		<i>MboII</i>	GAAGAN <sub>8</sub> ^ C <u>C</u> ATCCN <sub>7</sub> ^	(N6m <u>A</u> ) (N4m <u>C</u> )	

# Эндонуклеазы рестрикции класса II (рестриктазы) – основной инструмент генной инженерии

- ❖ Узнают специфические последовательности – сайты рестрикции
- ❖ Активны в виде димеров в присутствии ионов  $Mg^{2+}$

# Номенклатура рестриктаз класса II

*HaeI*, *HaeII*, *HaeIII* – *Haemophilus aegypticus*, открыты  
в указанной последовательности

*Hinc* и *Hind* – *Haemophilus influenzae*, штаммы *c* и *d*

# Субстратная специфичность рестриктаз класса II

## Палиндромные сайты

мелкощепящие: *Bgl*I (GGCC), крупнощепящие: *Eco*RI (GAATTC), *Not*I (GCGGCCGC)

## Частично вырожденные сайты

*Hinc*II (GT<sup>Y</sup>RA<sup>C</sup>, Y = p<sup>Y</sup>rimidine, R = pu<sup>R</sup>ine),

## Разорванные сайты

*Bgl*I (GCCN<sub>5</sub>GGC, N = a<sup>N</sup>y)

## Квазисимметричные сайты

*Btr*I (C<sup>A</sup>C↓G<sup>T</sup>C, класс IIQ)

## Двойные сайты:

*Sfi*I (GGCCN<sub>5</sub>GGCC)

## Разрезание со смещением - класс IIS

(*Foc*I GGATGN<sub>9,13</sub> S<sup>h</sup>ifted cleavage) Последовательности липких концов уникальны

## Изменение субстратной специфичности в неоптимальных условиях

*Eco*RI - GAATTC, *Eco*RI\* - AATT (Mg<sup>2+</sup>, органические растворители)

# Изомеры рестриктаз

## ❖ *Изошизомеры*

Рестриктазы разных видов бактерий, узнающие одинаковые сайты рестрикции и одинаково их расщепляющие.

*Метилчувствительные рестриктазы:*

*HpaII* и *MspI* (CCGG) – первый не расщепляет ДНК, если хотя бы один из остатков C метилирован;

N-метилирование остатков A – *Sau3A* (и GATC и G<sup>Me</sup>ATC), *DpnI* (только G<sup>Me</sup>ATC), *MboI* (только GATC)

## ❖ *Гетерошизомеры*

Узнают одинаковые сайты рестрикции, но по-разному их расщепляют (*KpnI* - G↓GTACC, *Asp7181* - GGTAC↓C)

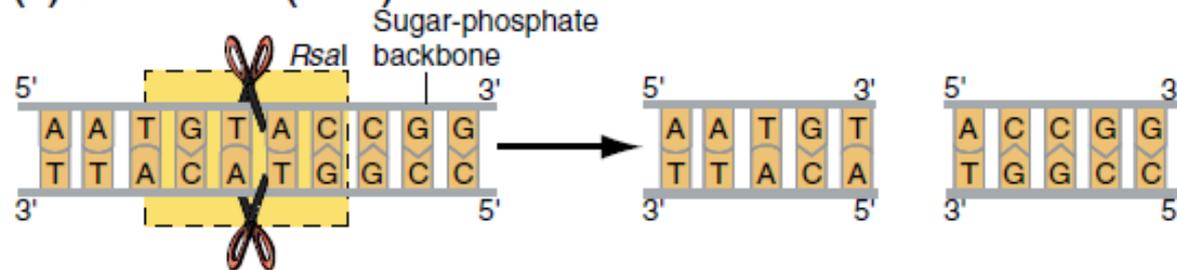
## ❖ *Изокаудомеры*

Узнают разные сайты рестрикции, но создают одинаковые липкие концы.  
Лигирование с потерей сайта рестрикции

*NotI* GC\*GGCC GC    *Bsp120I* G\*GGCC C    *BamHI/BclI/BglII/BstYI/DpnII*

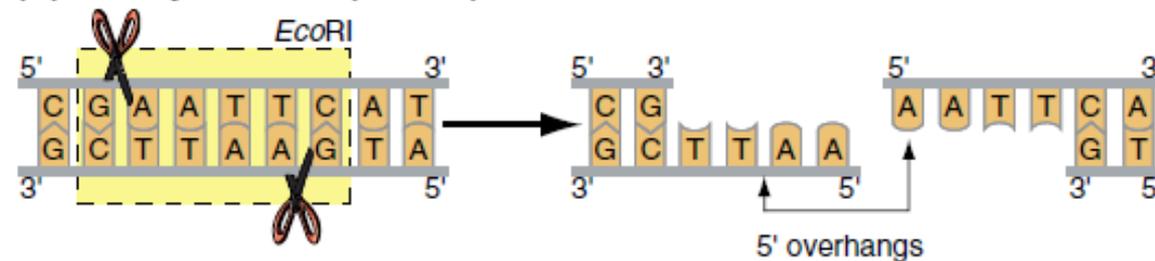
# Формы разрывов ДНК, образующихся под действием рестриктаз класса II

(a) Blunt ends (*RsaI*)



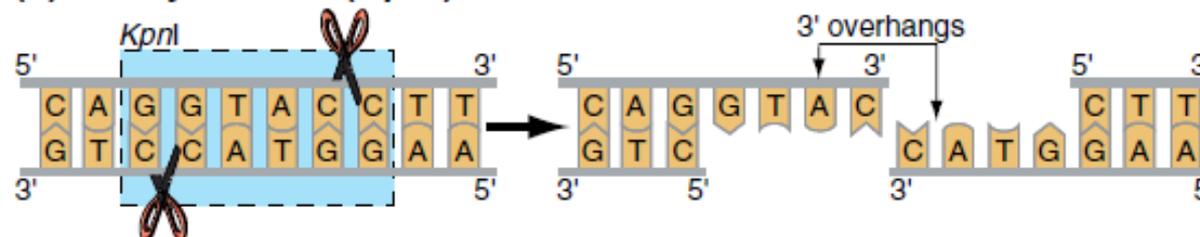
«Тупые» концы

(b) Sticky 5' ends (*EcoRI*)



5'-выступающие

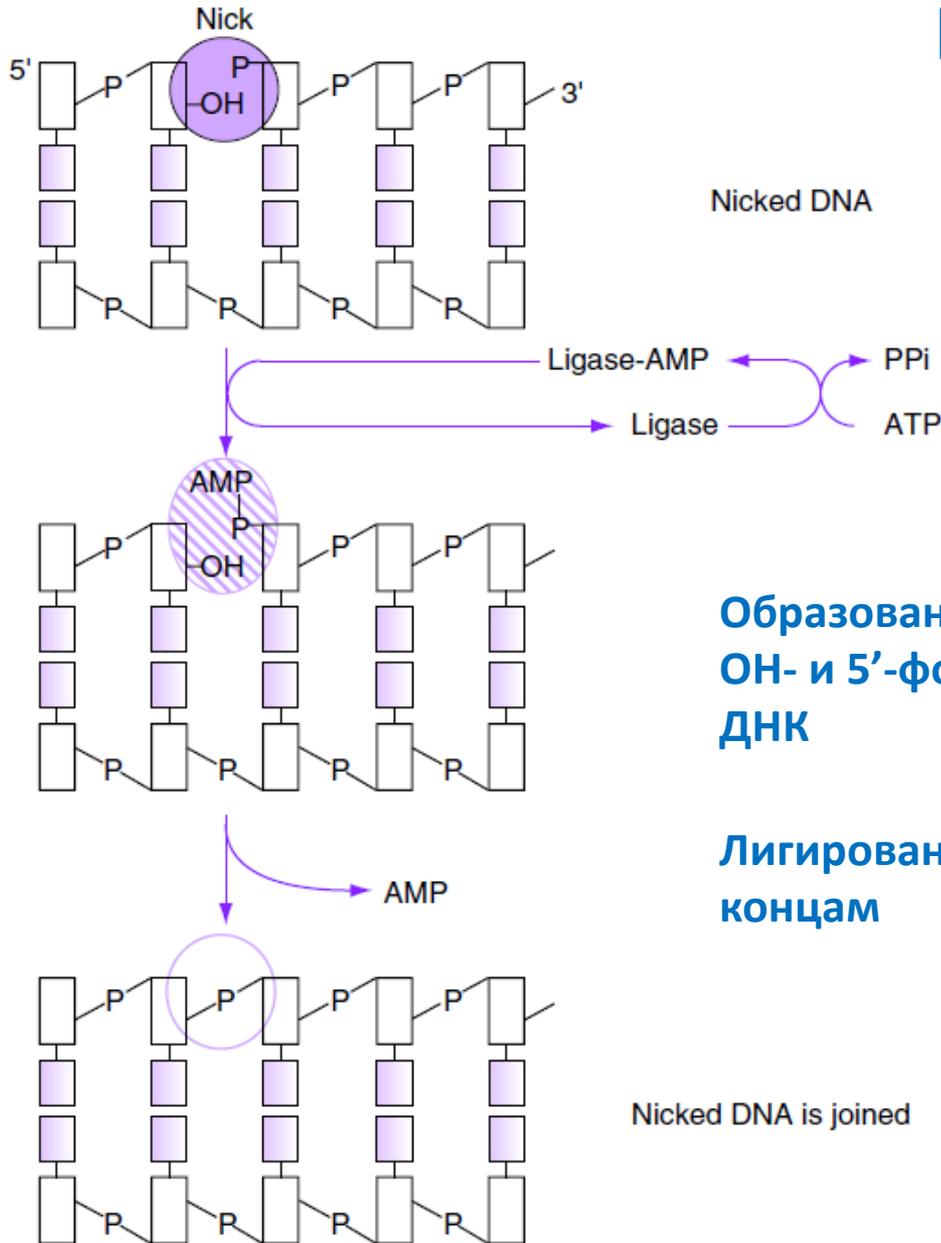
(c) Sticky 3' ends (*KpnI*)



3'-выступающие



# Механизм действия Т4-ДНК-лигазы

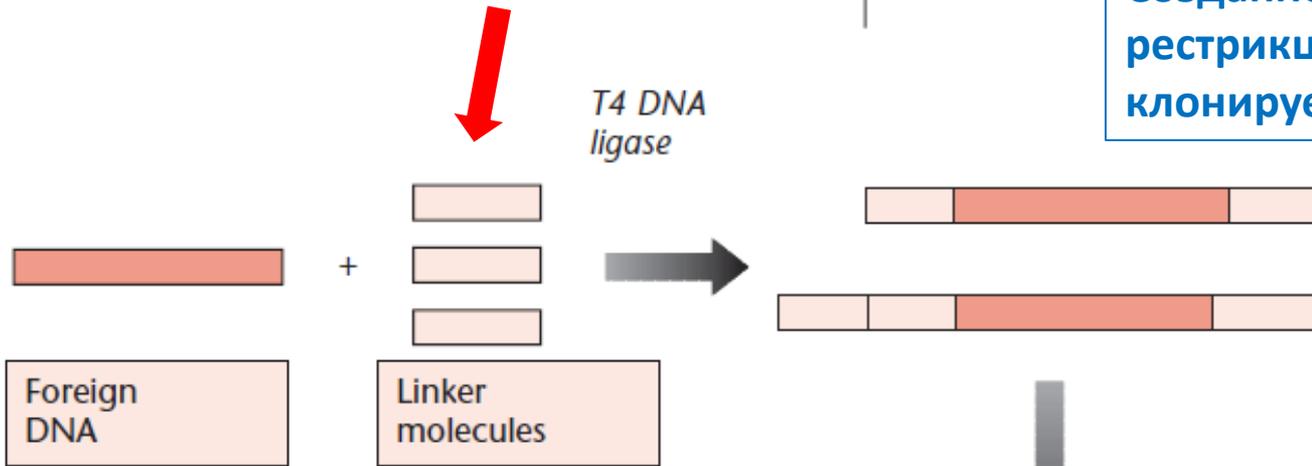
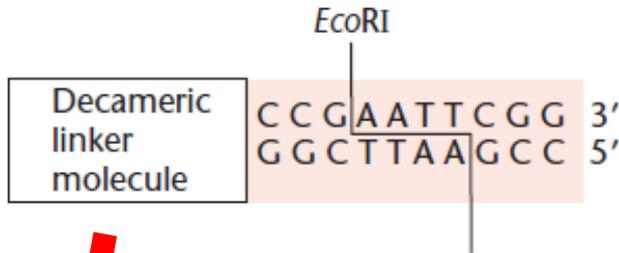


**Образование фосфодиэфирной связи между 3'-ОН- и 5'-фосфатной группами одноцепочечных ДНК**

**Лигирование фрагментов ДНК по «тупым» концам**

# Линкеры

Создание новых сайтов рестрикции на концах клонируемых молекул ДНК



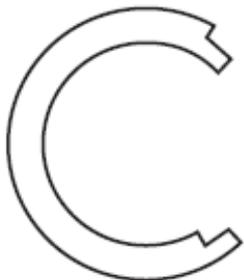
Лигирование по «тупым» концам

Foreign DNA

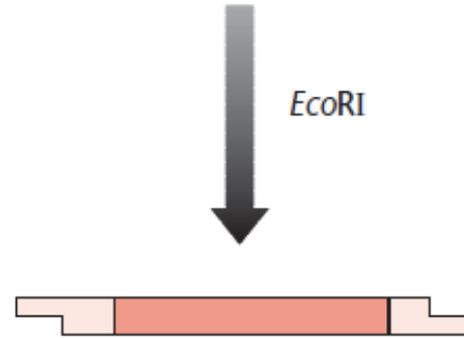
Linker molecules

EcoRI

Расщепление EcoRI



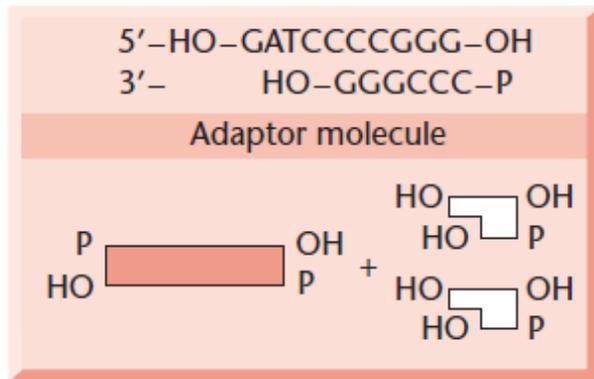
Vector



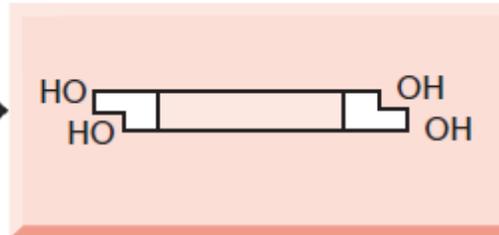
DNA ligase

Лигирование по «липким» концам, клонирование

# Адаптеры

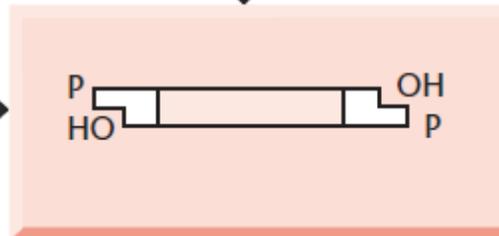
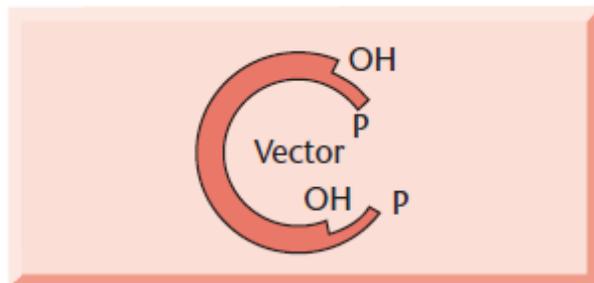


T4 DNA  
ligase,  
ATP

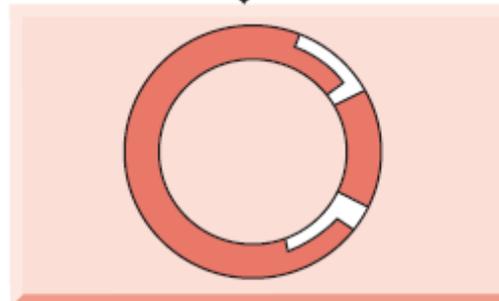


Лигирование по  
«тупым» концам  
(димеризации  
адаптеров  
не происходит)

Polynucleotide  
kinase, ATP



Фосфорилирование  
концов вставки



Лигирование по  
«липким» концам,  
клонирование

Создание новых сайтов  
рестрикции на концах  
клонлируемых молекул ДНК  
без использования рестриктаз

# Щелочная фосфатаза и полинуклеотидкиназа

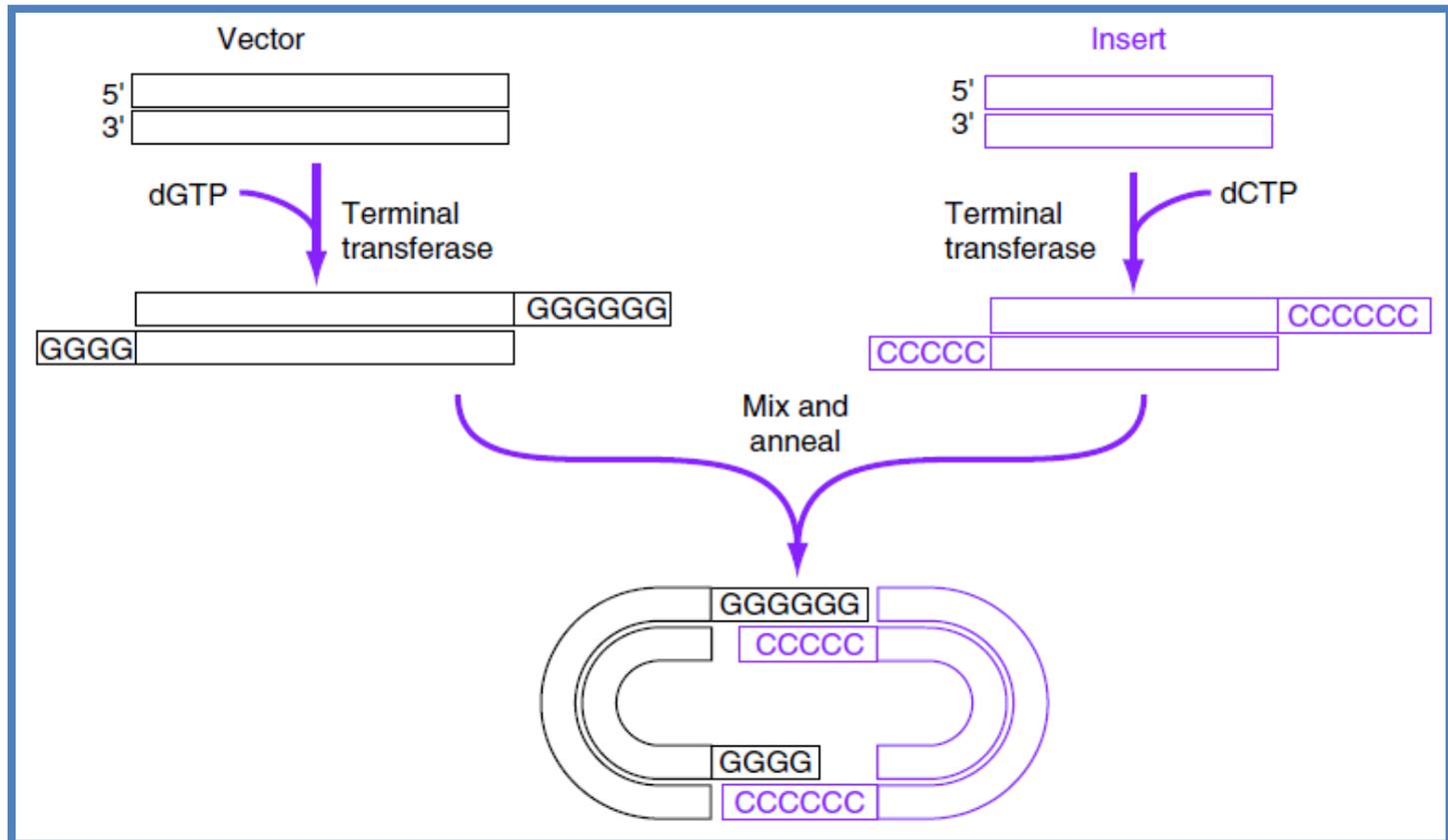
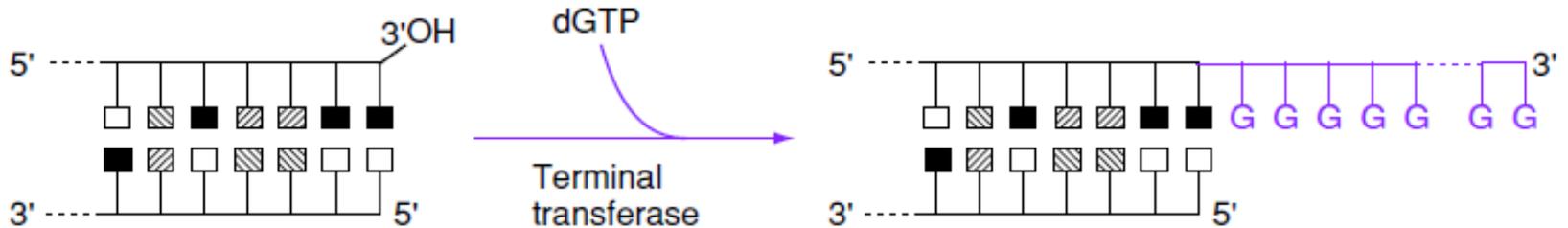
## Щелочная фосфатаза:

- ❖ Оптимальные значения pH - щелочные
- ❖ Удаление 5'-фосфатных групп (дефосфорилирование) из ДНК, РНК и нуклеотидов
- ❖ Фосфатаза кишечника телят (calf intestinal phosphatase - CIP). Термолабильна

## Полинуклеотидкиназа бактериофага T4:

- ❖ Перенос  $\gamma$ -фосфатной группы АТФ на 5'-ОН-группу фрагментов ДНК (фосфорилирование). Введение радиоактивной метки, подготовка к лигированию

# Терминальная трансфераза в синтезе гомополимеров и клонировании



# ДНК-зависимые ДНК-полимеразы

## ❖ ДНК-полимераза I (Pol I) (EC 2.7.7.7)

Мол. масса 109 кДа, Активности: 5'→3'-полимераза, 5'→3'- и 3'→5'- (корректирующая) –экзонуклеазы. Введение концевой метки в ДНК, ник-трансляция, синтез 2-й цепи кДНК.

Фрагмент Кленова: мол. масса 76 кДа (инкубация с субтилизином), отсутствует 5'→3'-экзонуклеазная активность, введение метки, одноцепочечные зонды.

Термостабильные ДНК-полимеразы

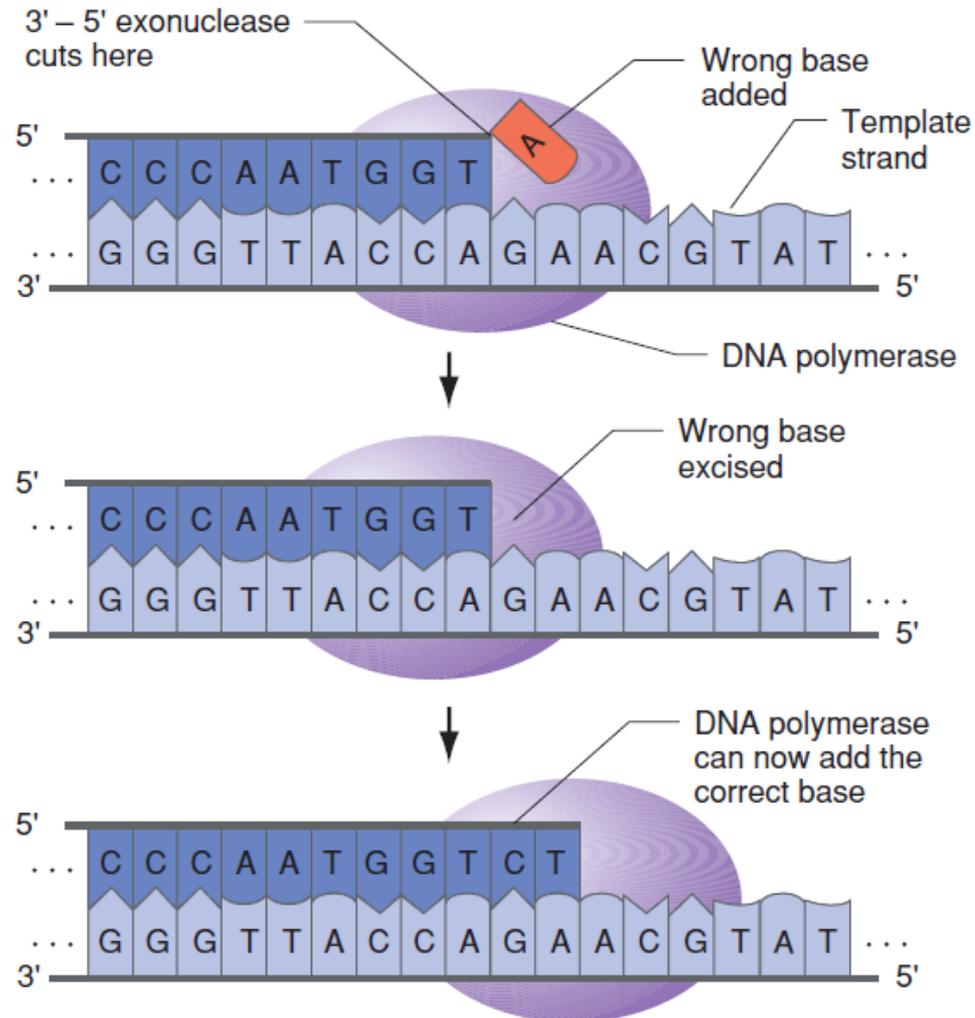
## ❖ T4-ДНК-полимераза

Мол. масса 114 кДа, отсутствует 5'→3'-экзонуклеаза, введение метки, «шлифовка» концов ДНК 3'→5'- экзонуклеазой.

## ❖ T7-ДНК-полимераза

«Секвеназа» - искусственно снижена 3'→5'- экзонуклеазная активность, повышены процессивность и скорость синтеза ДНК. «Термосеквеназа» - получена из *Taq*-ДНК-полимеразы – повышено сродство к ddNTPs, снижена активность 5'→3'-экзо

# Коррекция неправильно включенного нуклеотида 3'→5'-экзонуклеазой ДНК-полимеразы



# Обратные транскриптазы (ОТ)

- ❖ ОТ вируса миелобластома птиц (AMV RT) – димер, хорошо транскрибирует сильно структурированные матрицы
- ❖ ОТ вируса мышинного лейкоза Молони (M-MLV RT) – мономер, рекомбинантный фермент
- ❖ ОТ ВИЧ-1 – транскрибирует как РНК, так и ДНК

Нуждаются в ДНК-затравке (праймере)

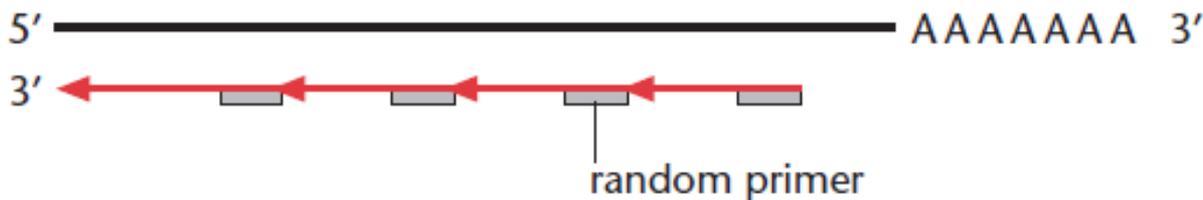
Обладают активностью РНКазы Н, деградирует РНК-матрицу в процессе синтеза первой цепи

Мутанты рекомбинантной M-MLV RT без РНКазы Н более эффективны в синтезе первой цепи кДНК

Высокая частота ошибок – до  $5 \times 10^{-3}$ /нуклеотид

# Три стратегии синтеза кДНК обратной транскриптазой

Random primer



Случайный праймер

Oligo (dT) primer

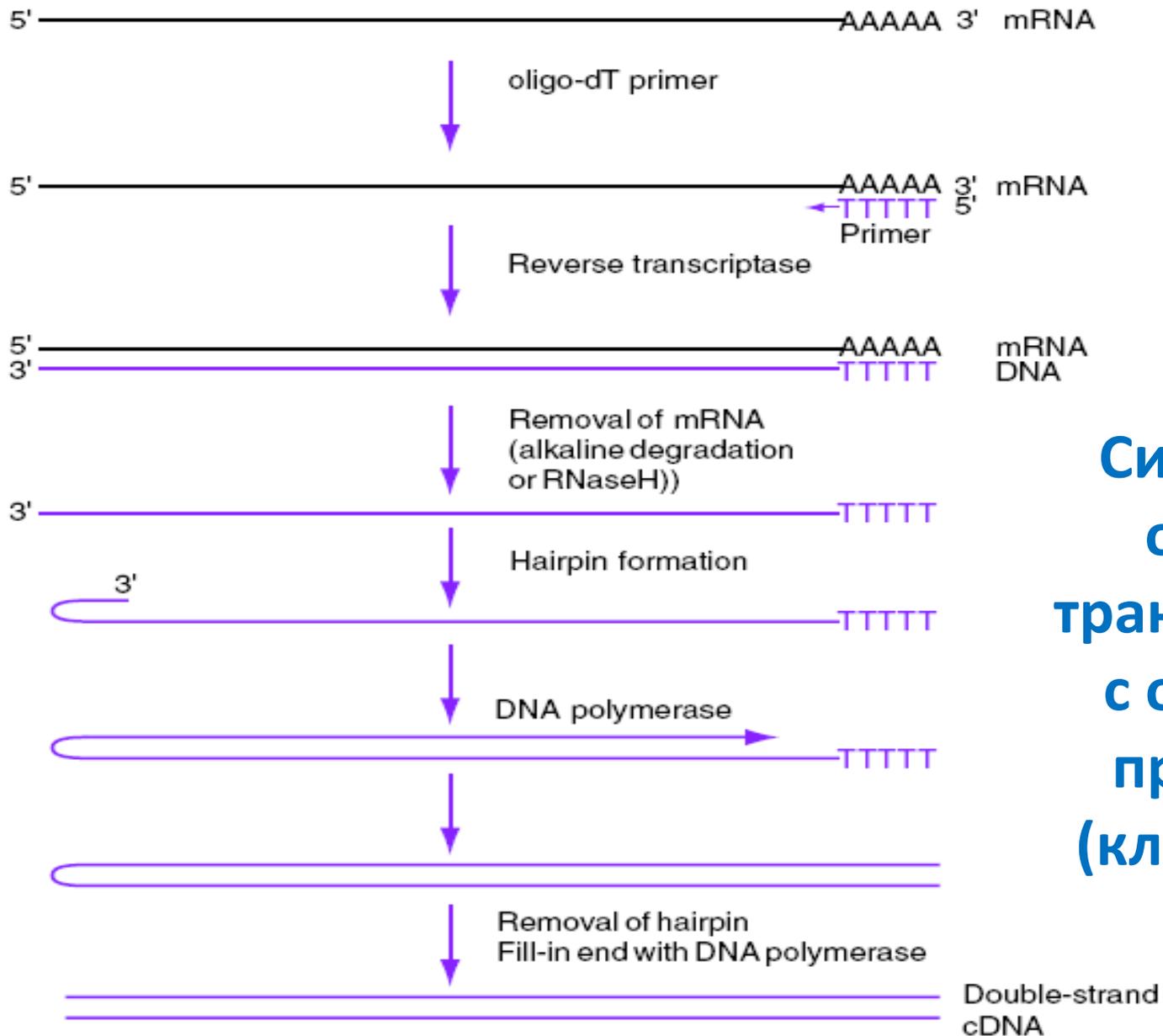


Олиго(dT)-праймер

Sequence-specific primer

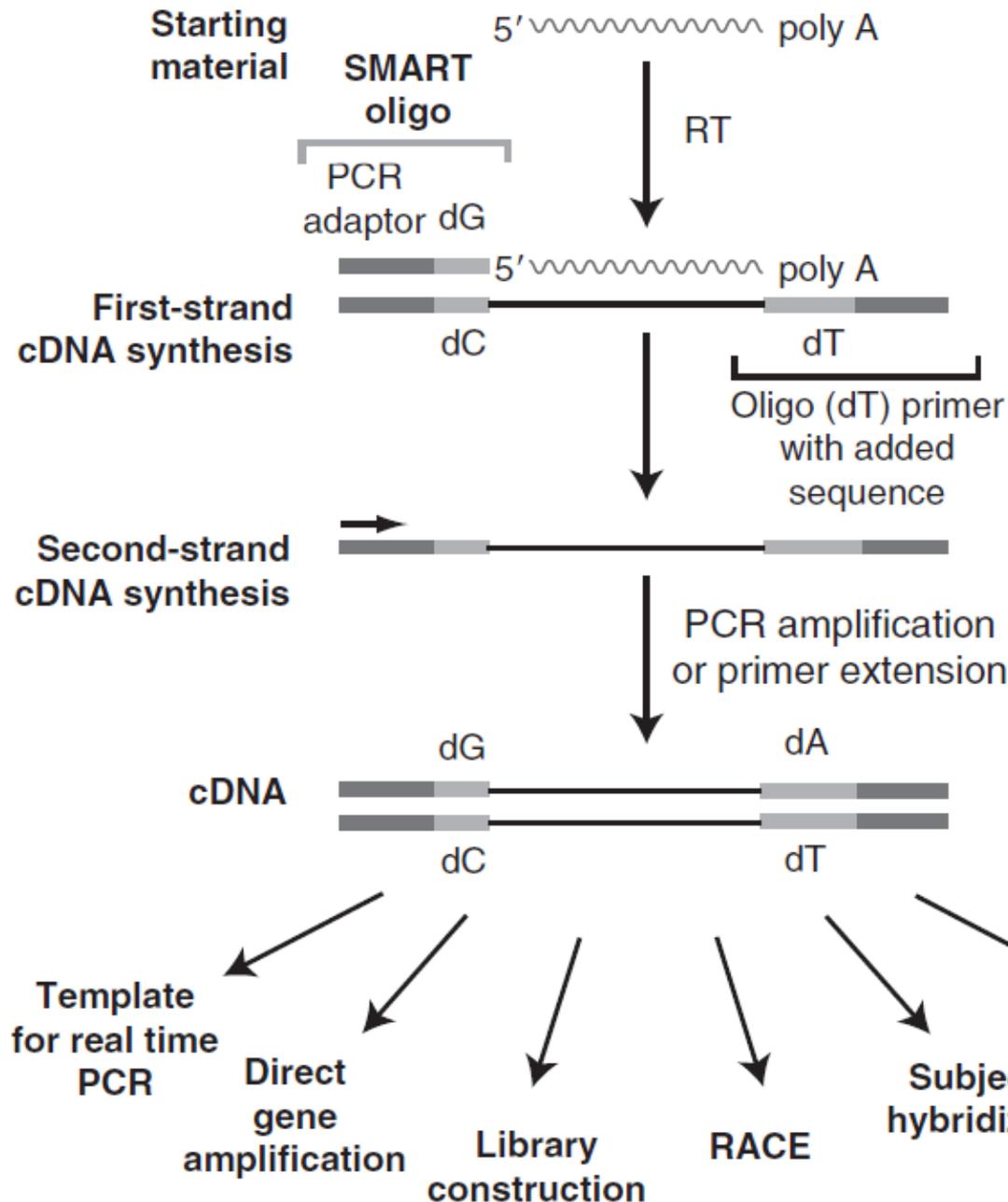


Специфический праймер



**Синтез кДНК  
обратной  
транскриптазой  
с олиго-(dT)-  
праймером  
(классический  
метод)**

# SMART-синтез кДНК



- Олиго-dC присоединяется независимо от матрицы обратной транскриптазой
- Олиго-dG с адаптером исходно добавлен в реакционную смесь и используется ОТ в качестве матрицы для завершения синтеза первой цепи кДНК

# Векторы

Молекулярно-генетические конструкции, предназначенные для переноса генетического материала в клетки живых организмов

- ❖ Клонировующие векторы (Cloning vectors)
- ❖ Экспрессирующие векторы (Expression vectors)
- ❖ Векторы для слияния генов (Gene fusion vectors)
- ❖ Бинарные (челночные) векторы (Shuttle vectors)

# Свойства, которыми должен обладать любой вектор

- ❖ Способность к длительному существованию в клетках-хозяевах (репликация автономная или в составе хромосом)
- ❖ Наличие биохимических или генетических маркеров, которые позволяют обнаруживать его присутствие в клетках
- ❖ Должны допускать встраивание чужеродной ДНК без нарушения своей функциональной целостности

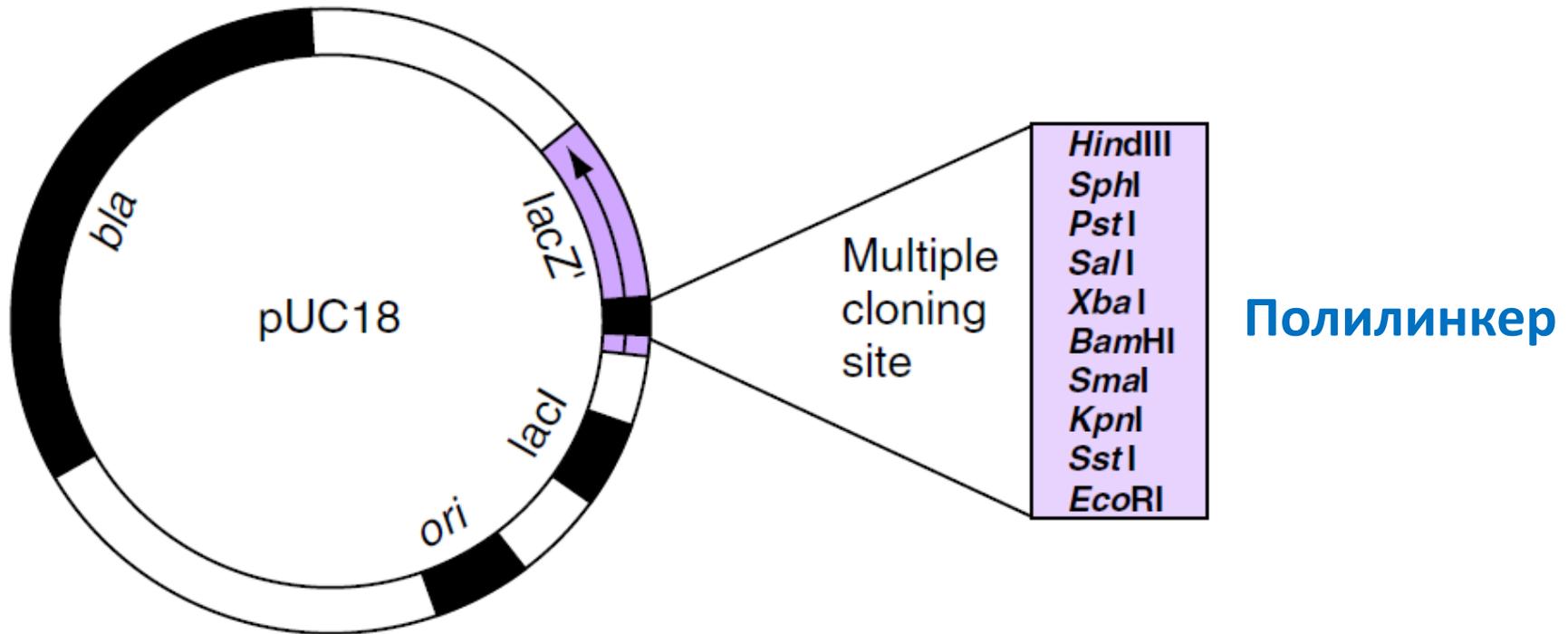
A microscopic image showing numerous circular, yellowish plasmid vectors against a dark blue background. The plasmids vary in size and shape, some appearing as simple circles while others are more complex or tangled. A central blue rectangular box contains the text 'Плазмидные векторы' in yellow.

# Плазмидные векторы

# Биологические свойства бактериальных плазмид, используемые в векторах

- ❖ Молекулярные эндосимбионты – автономная репликация
- ❖ Негативный контроль числа копий
  - ❖ Низкокопийные (1-2 копии на клетку)
  - ❖ Высококопийные (10-100 копий на клетку)
- ❖ Консервативность размера
  - ❖ Минимальный размер определяется элементами внутриклеточной автономии
  - ❖ Ограничения на размер вставки чужеродной ДНК
- ❖ Совместимость разных плазмид в клетке
  - ❖ Группы несовместимости
  - ❖ Случайная сегрегация в дочерние клетки

# Плазмидный вектор pUC18



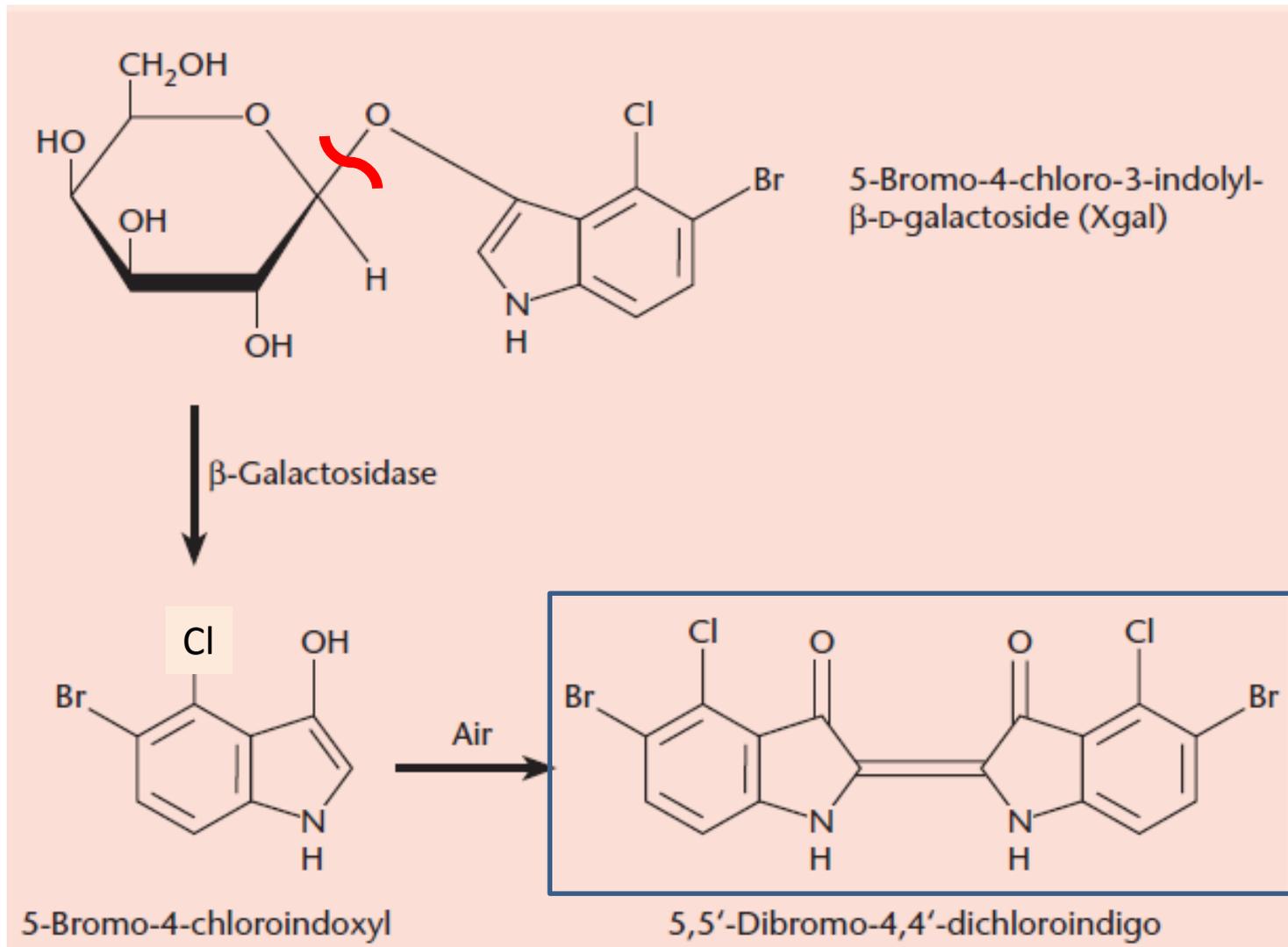
***bla*** – Ген β-лактамазы, селективируемый маркер (устойчивость ампициллину)

***ori*** – Точка начала репликации (origin)

***lacZ'*** – N-концевая часть гена β-галактозидазы (кодирует 146 из 1021 АК-остатков), селективируемый маркер (хромогенный субстрат X-Gal)

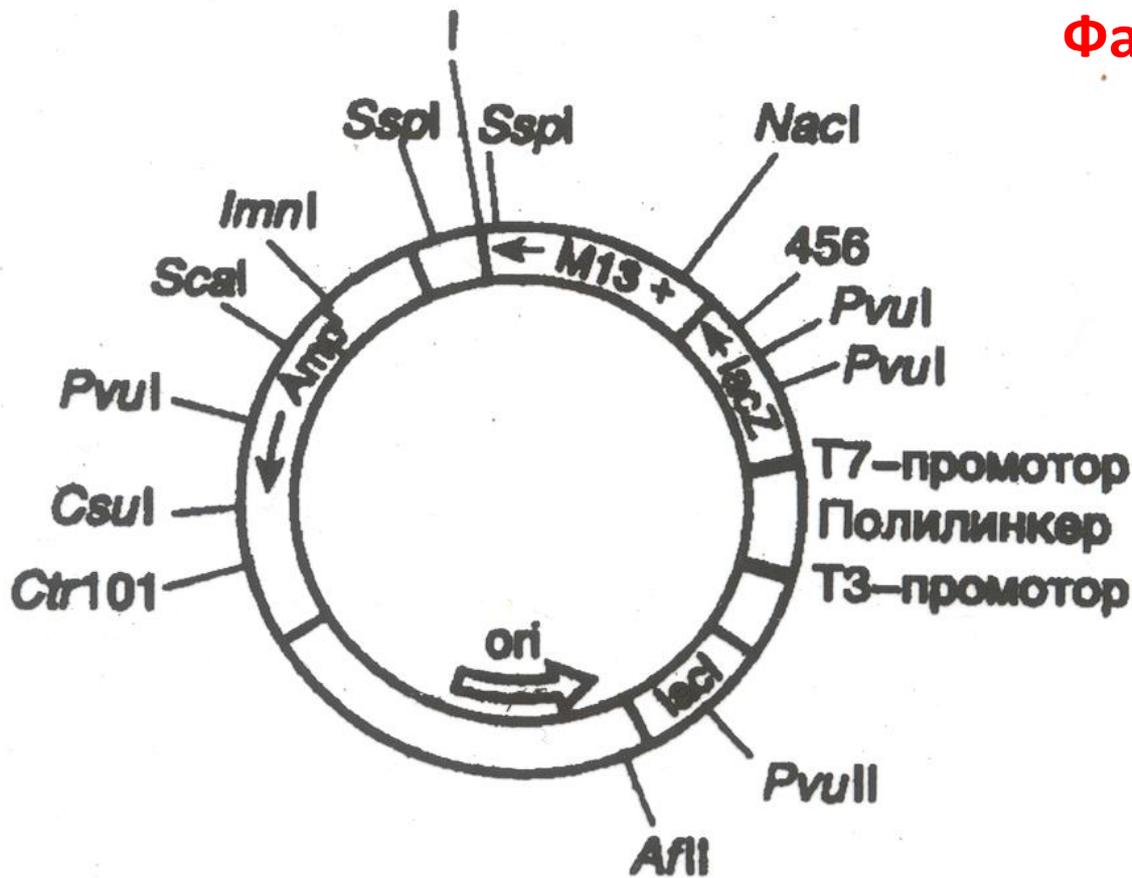
***lacI*** – Ген Lac-репрессора (Индуктор – IPTG)

# Расщепление Xgal β-галактозидазой



# Плазмидный вектор Bluescript

Фагмида (Phagemid)

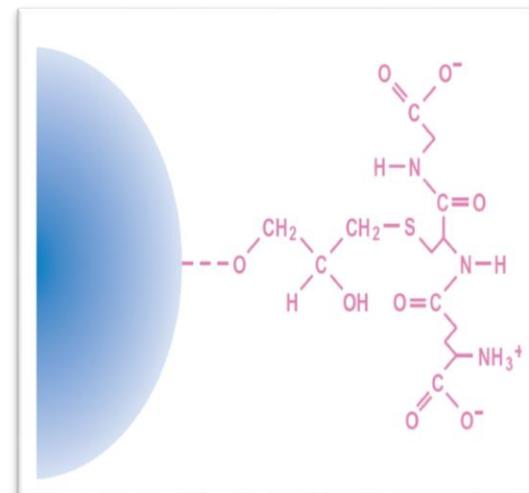
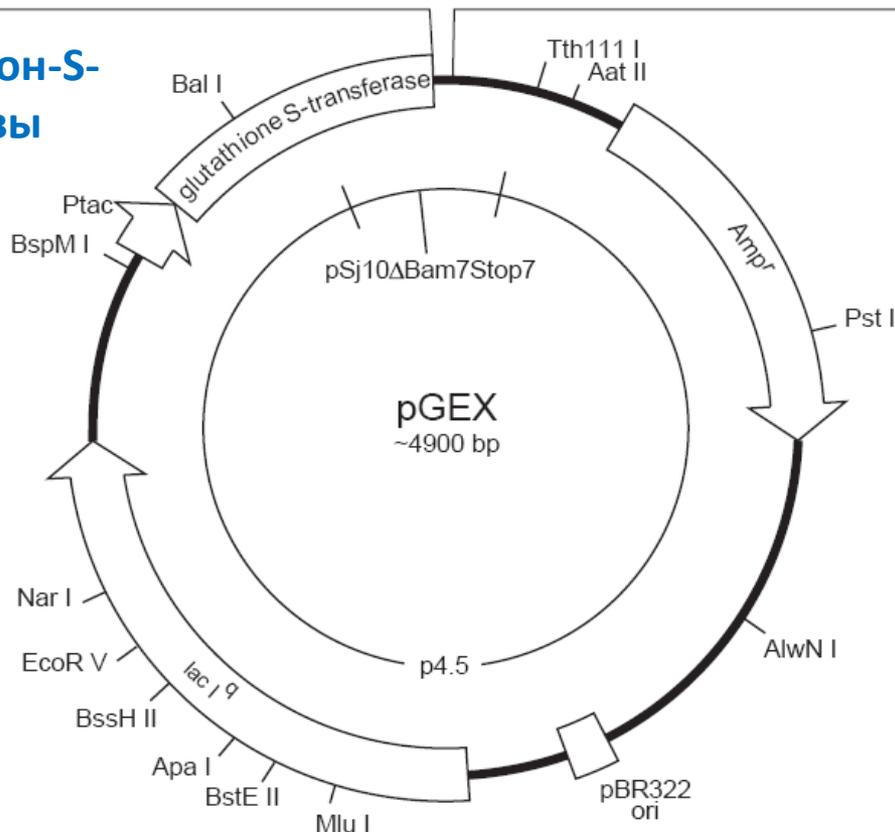


# Вектор для слияния генов pGEX-P-3

PreScission Protease

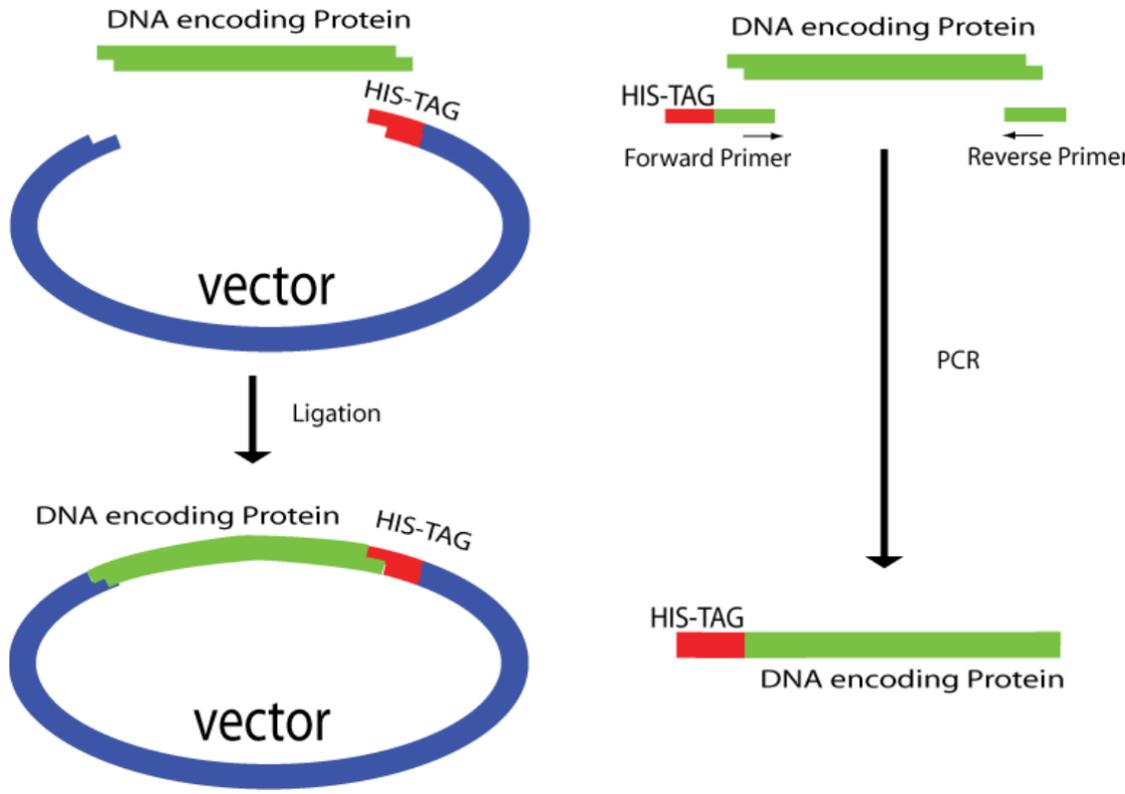
Leu	Glu	Val	Leu	Phe	Gln	Gly	Pro	Leu	Gly	Ser	Pro	Asn	Ser	Arg	Val	Asp	Ser	Ser	Gly	Arg
CTG	GAA	GTT	CTG	TTC	CAG	GGG	CCC	CTG	GGA	TCC	CCG	AAT	TCC	CGG	GTC	GAC	TCG	AGC	GGC	CGC
									BamH I		EcoR I		Sma I		Sal I		Xho I		Not I	

## Ген глутатион-S-трансферазы

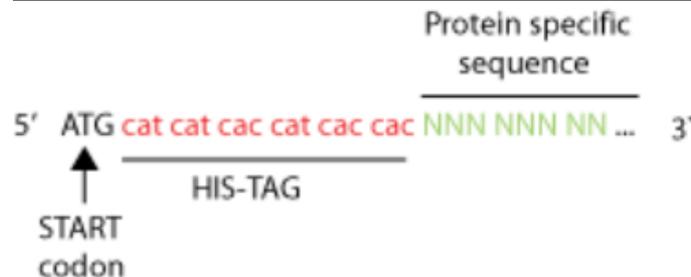


Иммобилизованный глутатион

# Гексагистидиновая аффинная метка (His<sub>6</sub>)



Можно присоединять и к С-концу белка



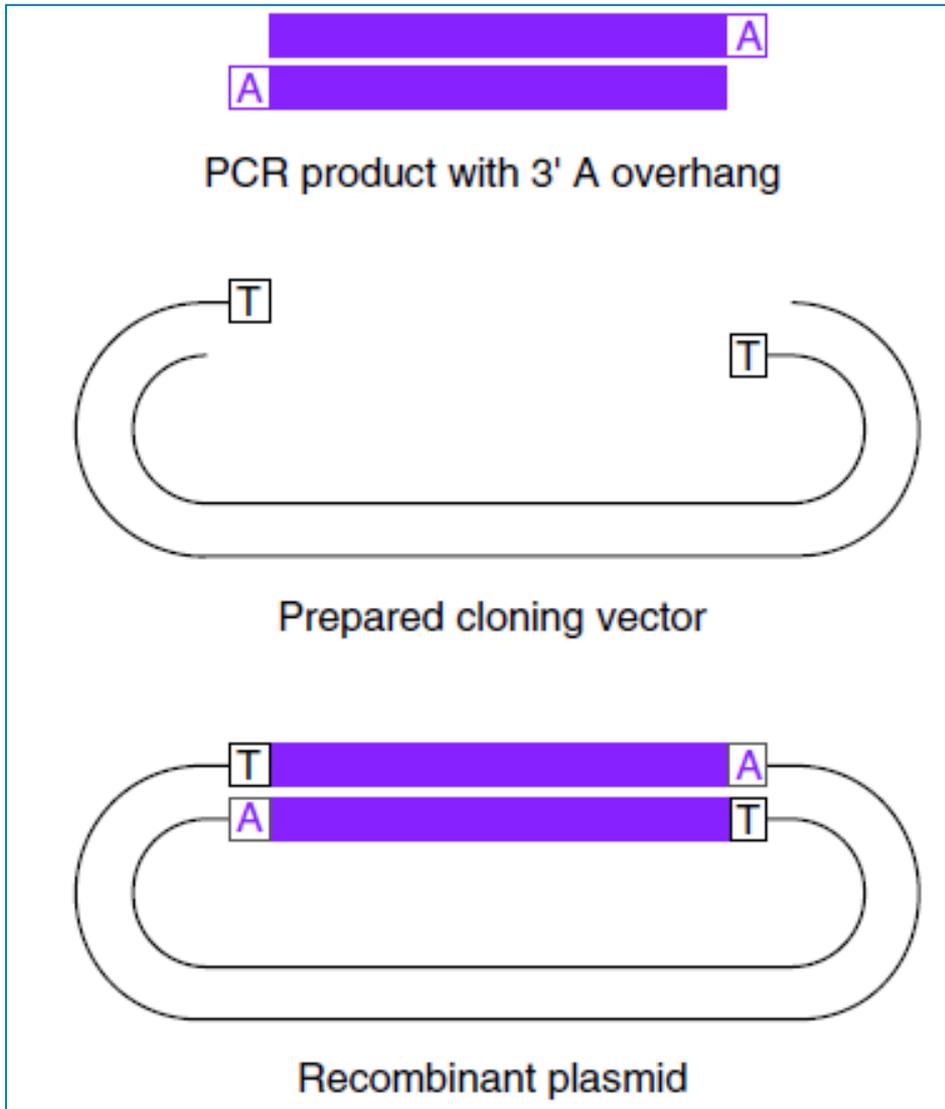
**Ni<sup>2+</sup>** - наиболее часто используется, низкая специфичность

**Co<sup>2+</sup>** - самая высокая специфичность

**Cu<sup>2+</sup>** - самая большая прочность связи с His<sub>6</sub>

**Элюенты:** имидазол, низкие значения pH (0.1 М глицин pH 2.5) или хелаторы (ЭДТА)

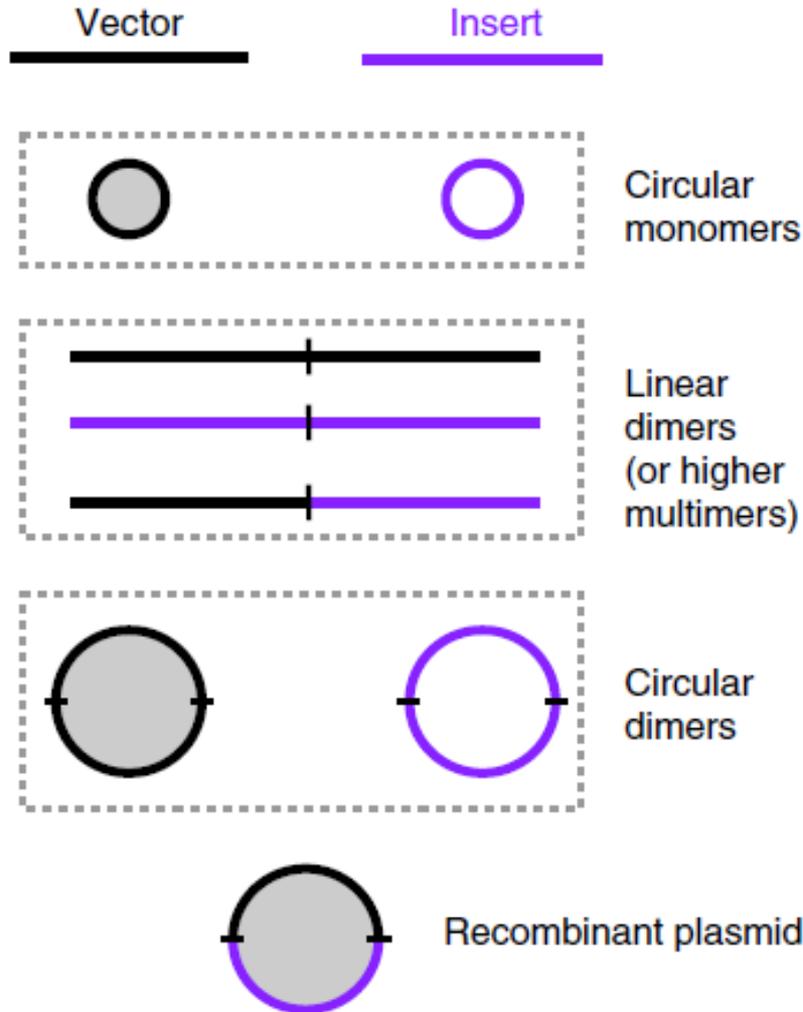
# TA-Клонирование продуктов ПЦР



**Таq-ДНК-полимераза образует в продукте ПЦР 3'-выступающие А-концы независимо от матрицы**

# Побочные продукты лигирования вектора и вставки

## ВСТАВКИ



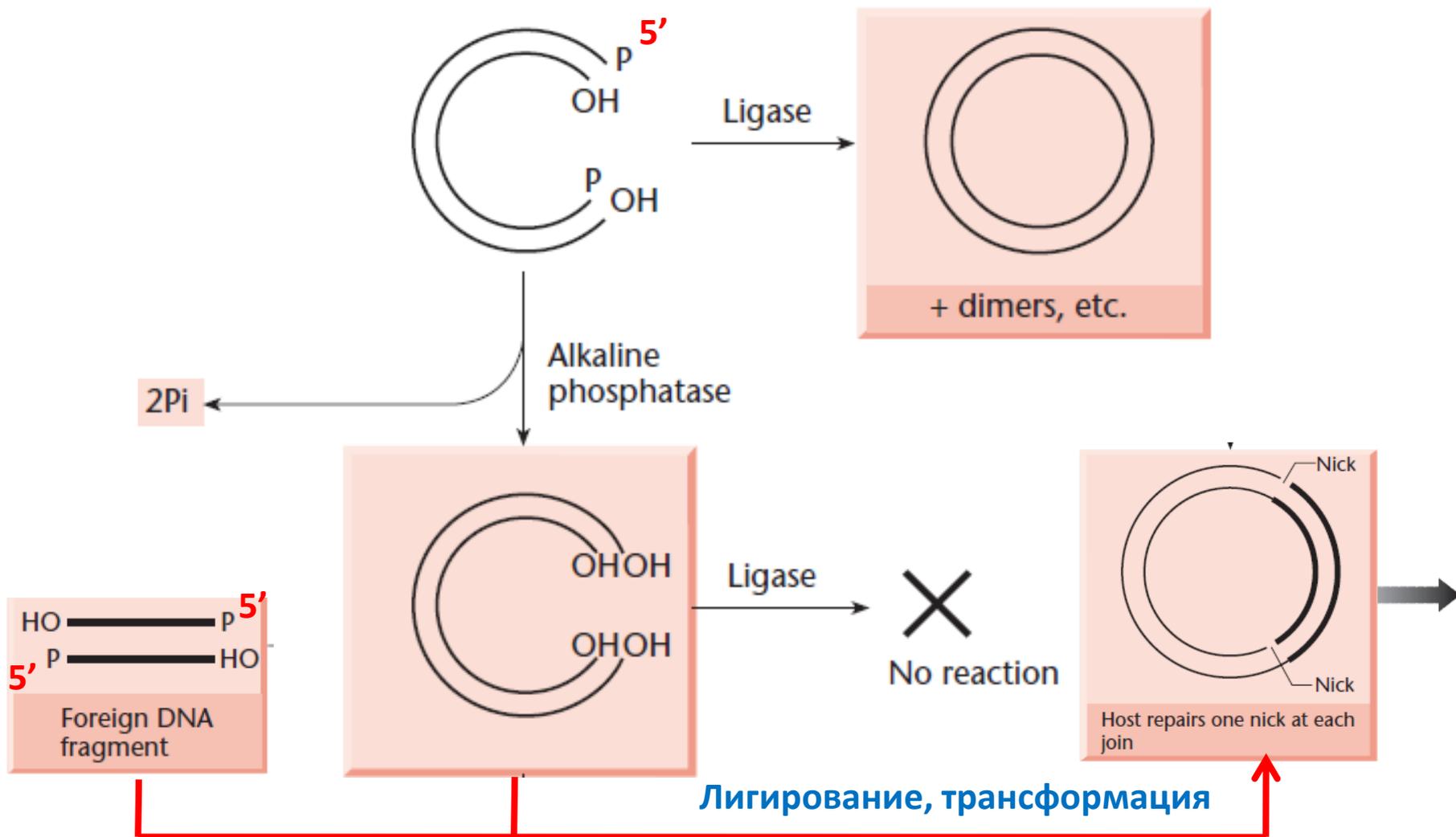
Кольцевые мономеры

Линейные ди-, три-, ...  
мультимеры

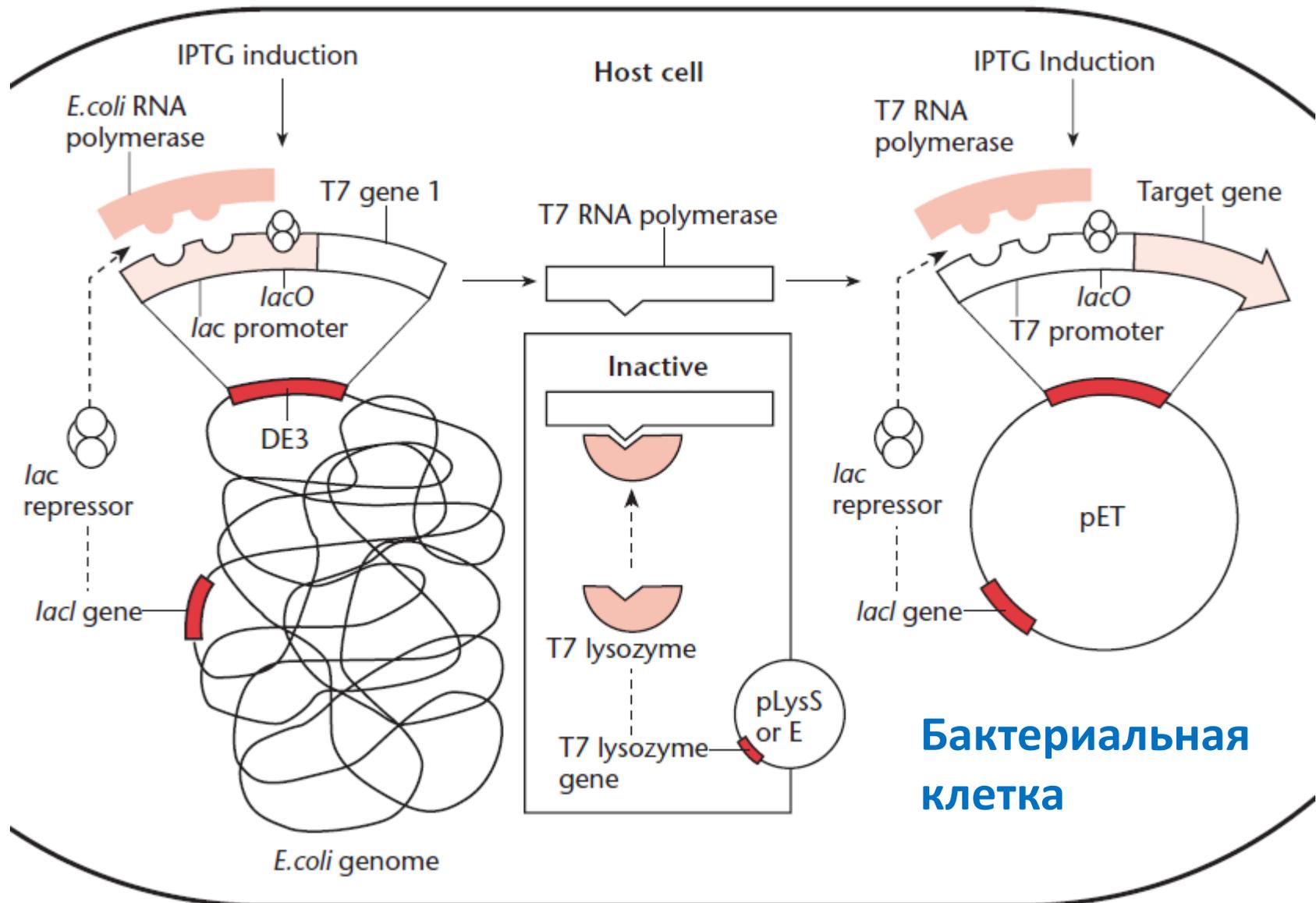
Кольцевые димеры

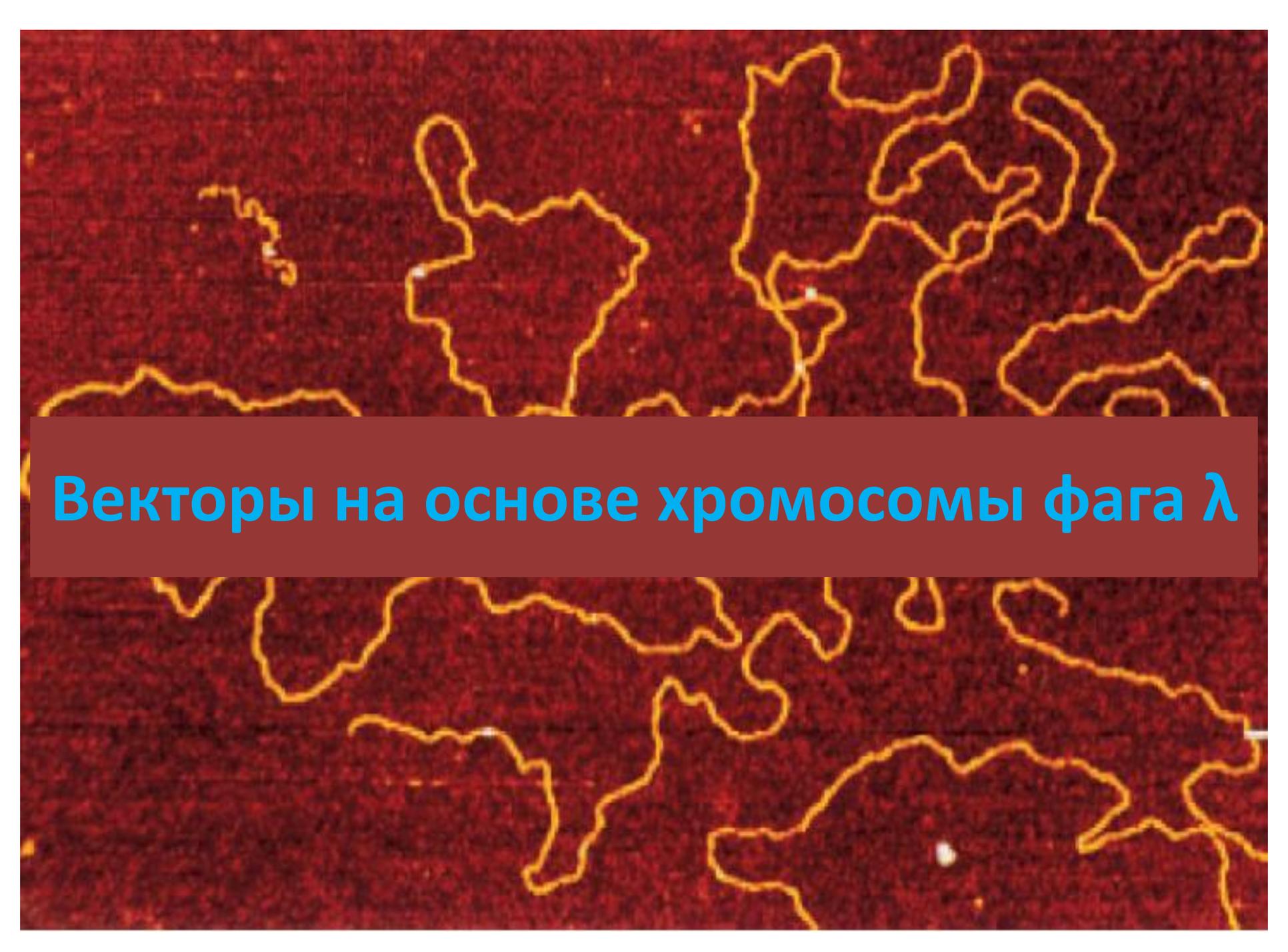
Рекомбинантная плазмида

# Предотвращение образования плазмидного вектора без вставки с помощью щелочной фосфатазы



# Регуляция экспрессии генов в векторе pET



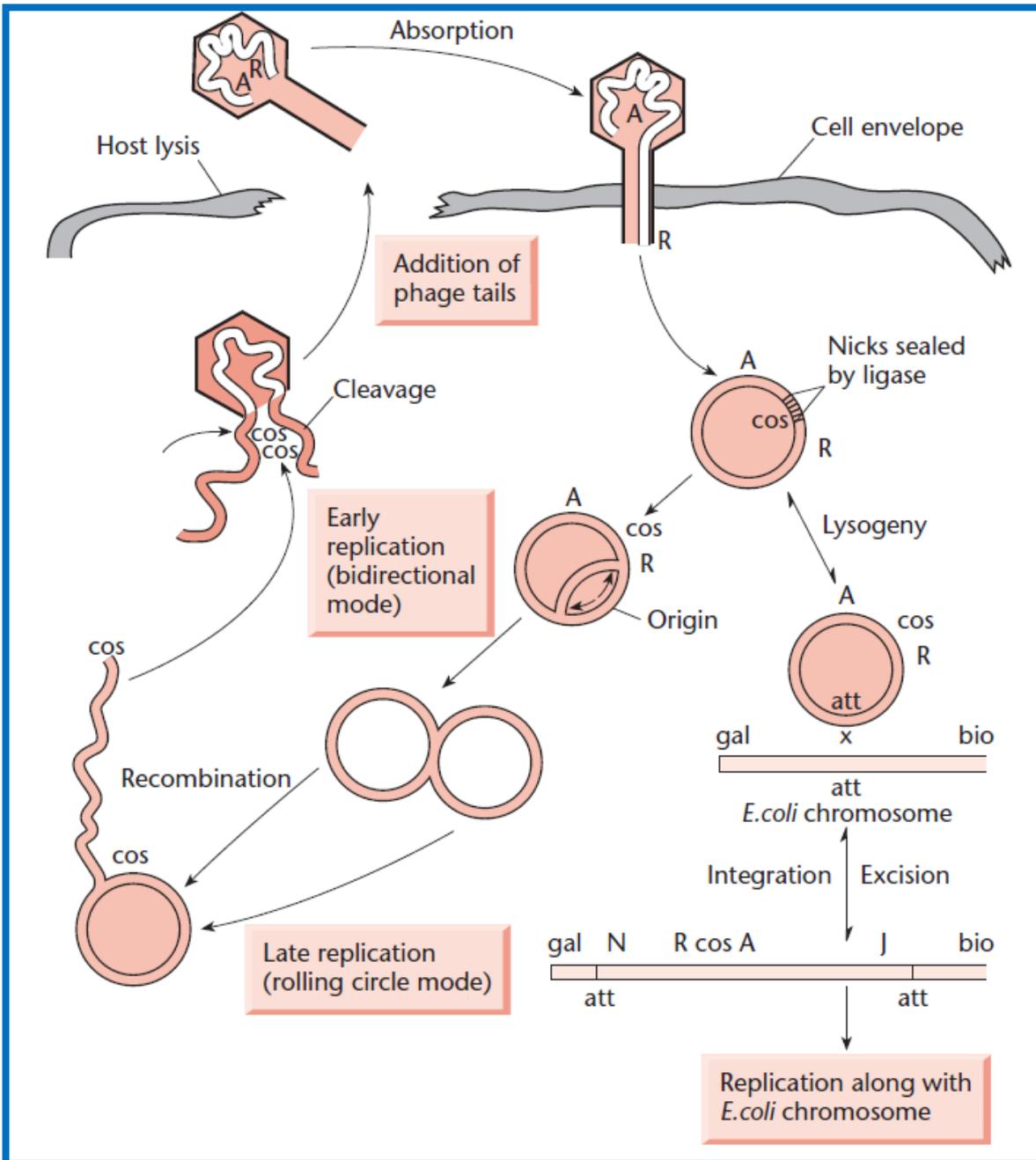
The image is an electron micrograph showing several long, thin, and highly convoluted DNA molecules. These molecules are colored in a bright yellow or orange hue, contrasting sharply with the dark, grainy reddish-brown background. The molecules vary in length and complexity, with some appearing as single, winding lines and others as more intricate, tangled structures. A prominent feature is a large, complexly folded molecule in the upper right quadrant. Another notable molecule is a shorter, more tightly coiled one in the upper left. The overall appearance is that of a collection of individual chromosomes, likely from lambda phages, as indicated by the text overlay.

**Векторы на основе хромосомы фага  $\lambda$**

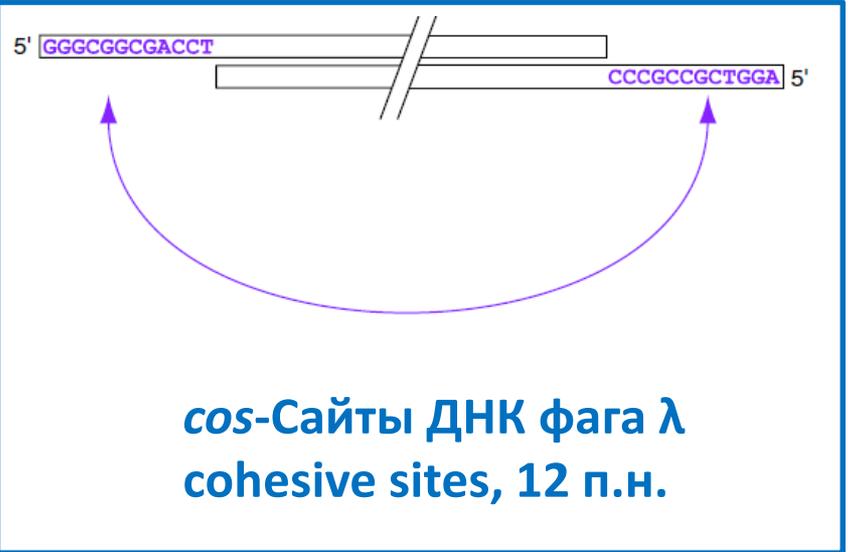
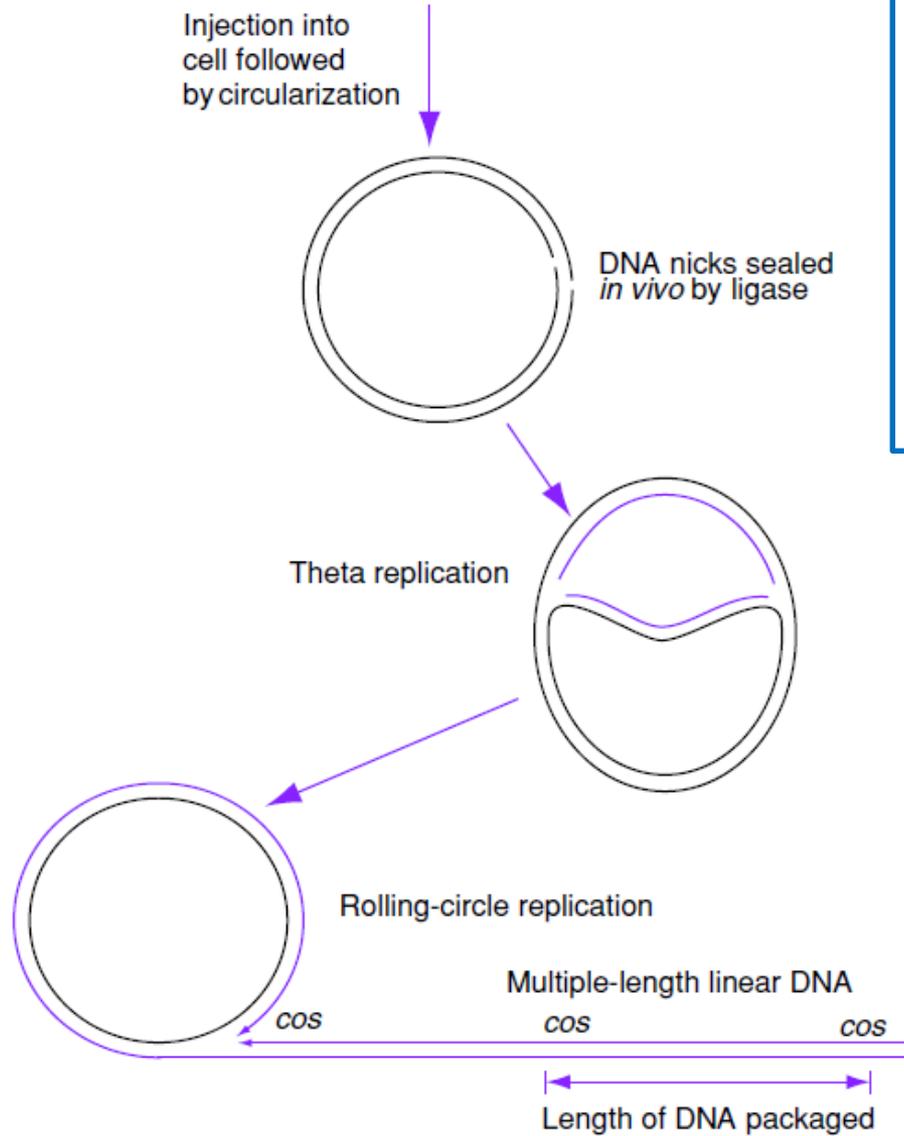
# Жизненный цикл фага λ

- Два пути развития бактериофага:
- 1. Лизогенный:** интеграция в хромосому хозяина
  - 2. Литический:**
    - а) Двухсторонняя θ-репликация;
    - б) Катящееся кольцо

**Фазмиды** (phasmid - фаговые плазмиды) Содержат **att-сайт**, что позволяет встраиваться в геном фага λ (lifting)

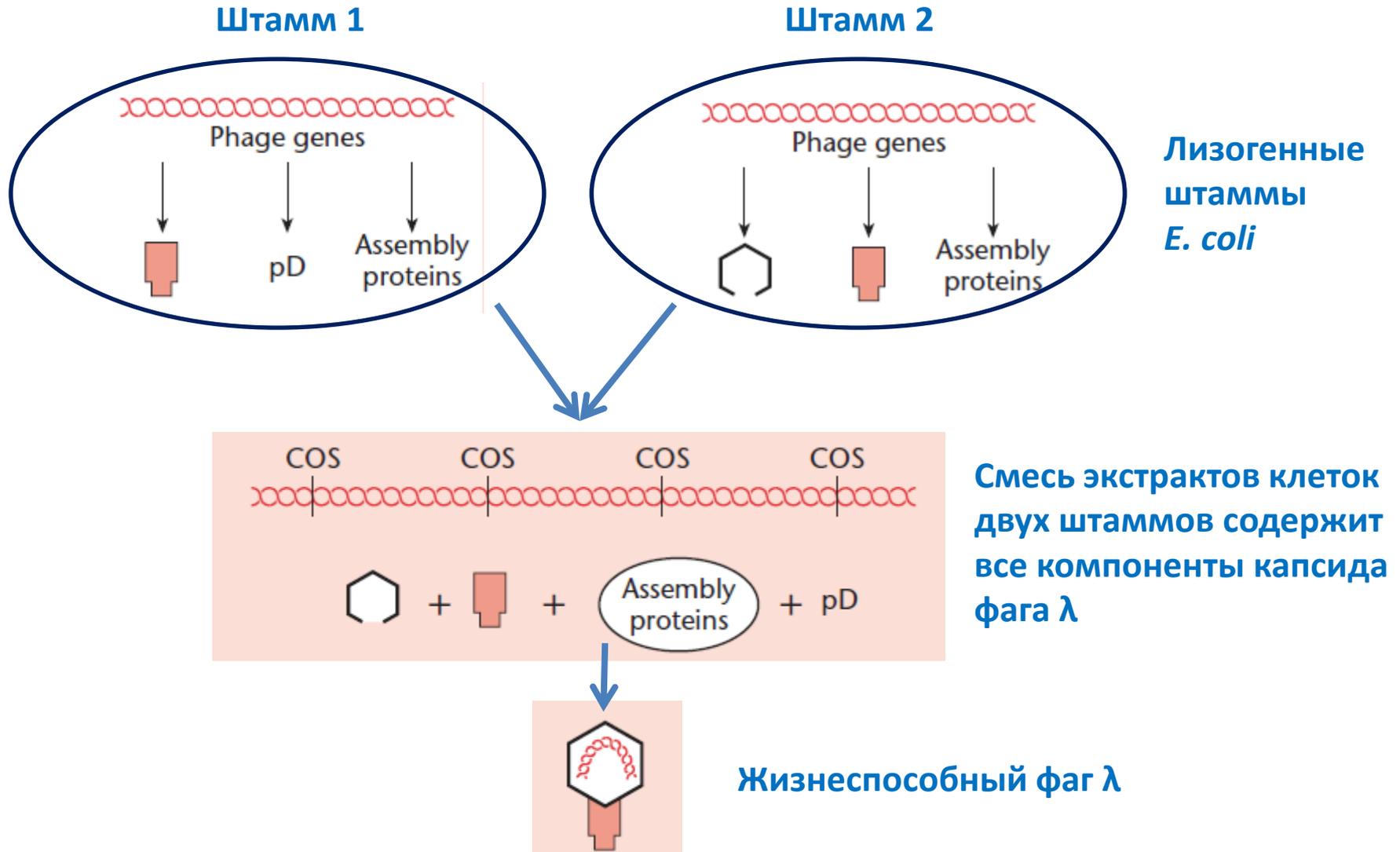


Linear DNA, with sticky ends, in phage particle

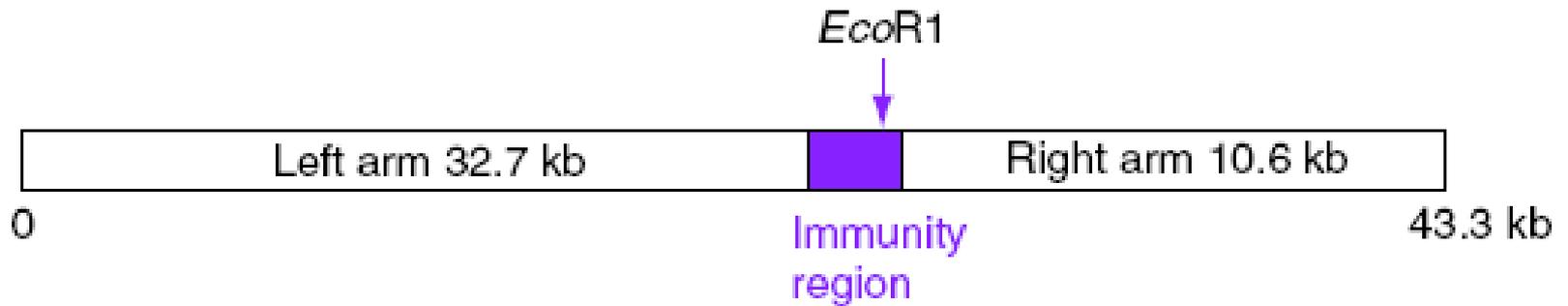


# Репликация ДНК фага λ

# Упаковка ДНК фага $\lambda$ *in vitro*

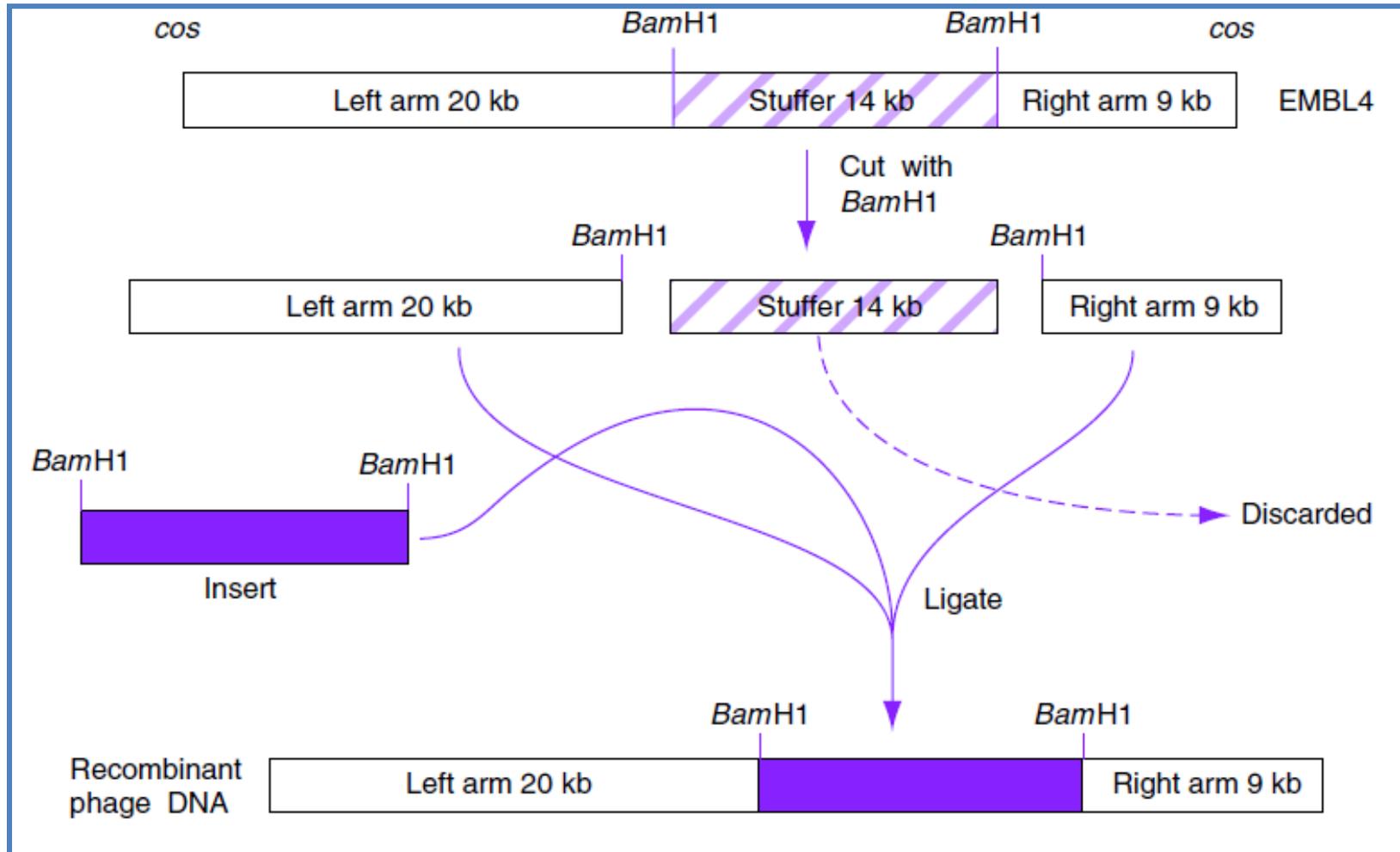


# Инсерционный вектор лямбда gt10

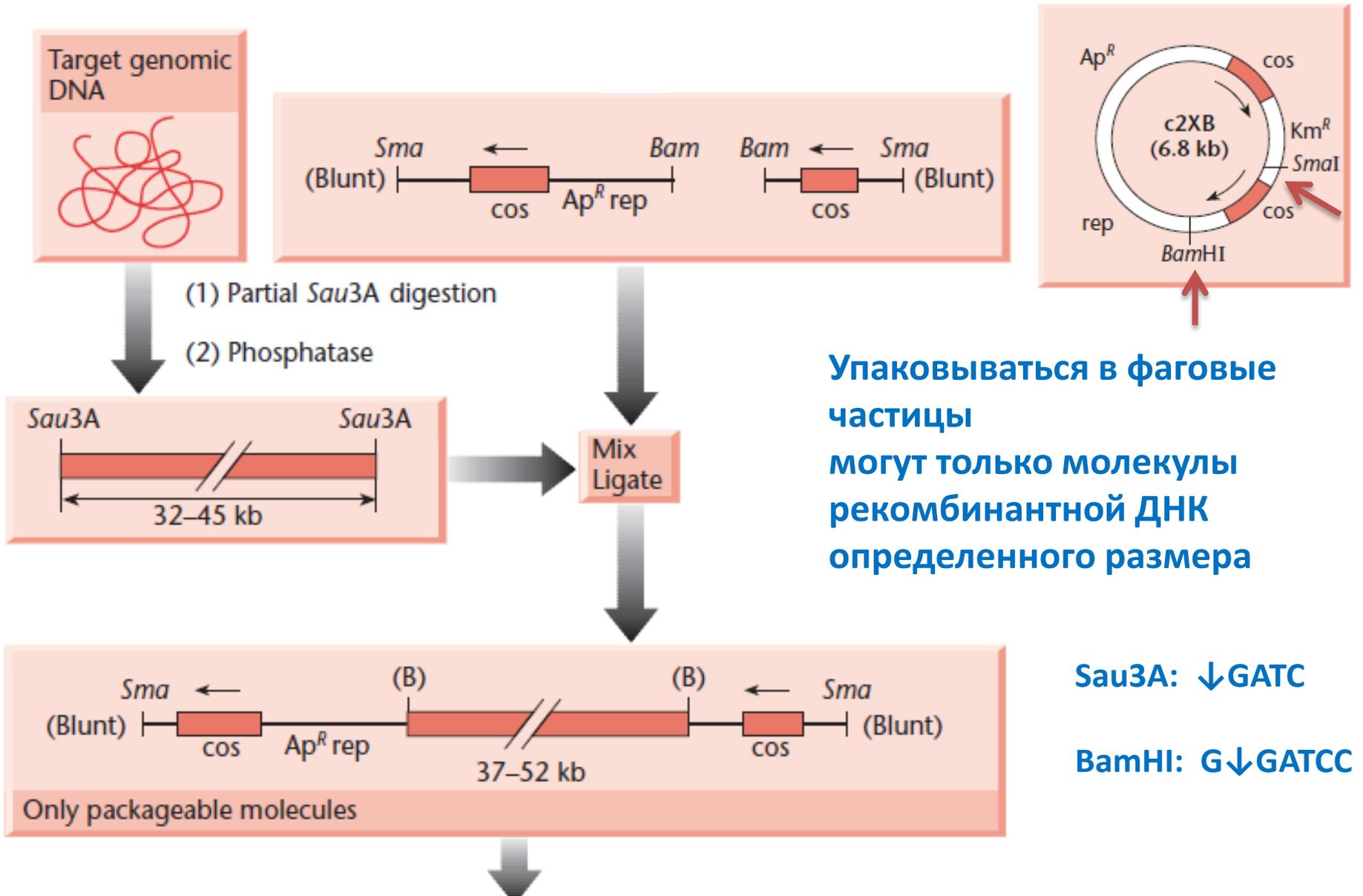


Вставка чужеродной ДНК до **7,6 т.п.н.** по *EcoRI*-сайту

# Использование вектора лямбда EMBL4 с замещением внутренней области



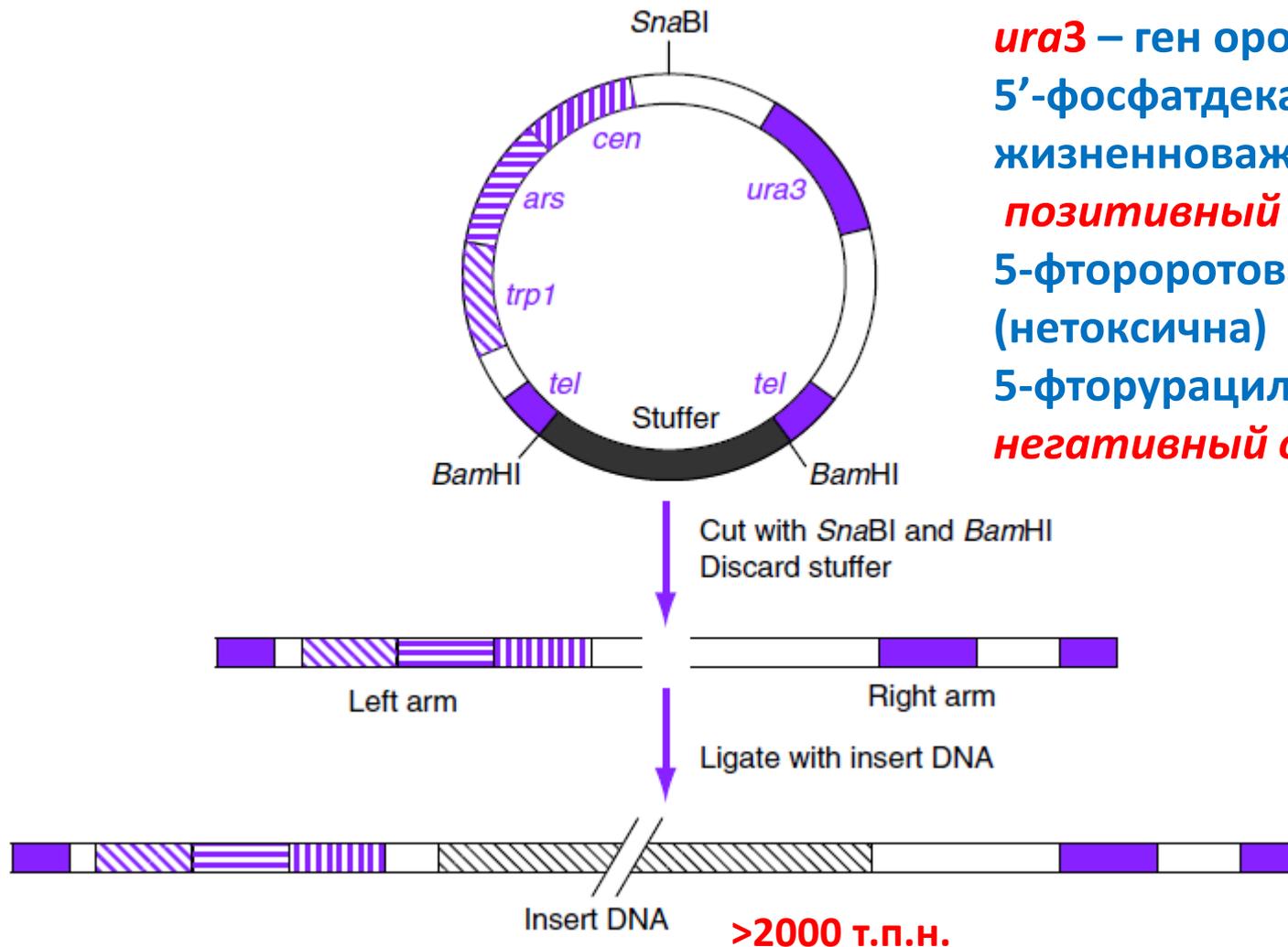
# Космидный вектор (космида) c2XB



# Искусственные хромосомы



# Искусственная хромосома дрожжей YAC (Yeast Artificial Chromosome)



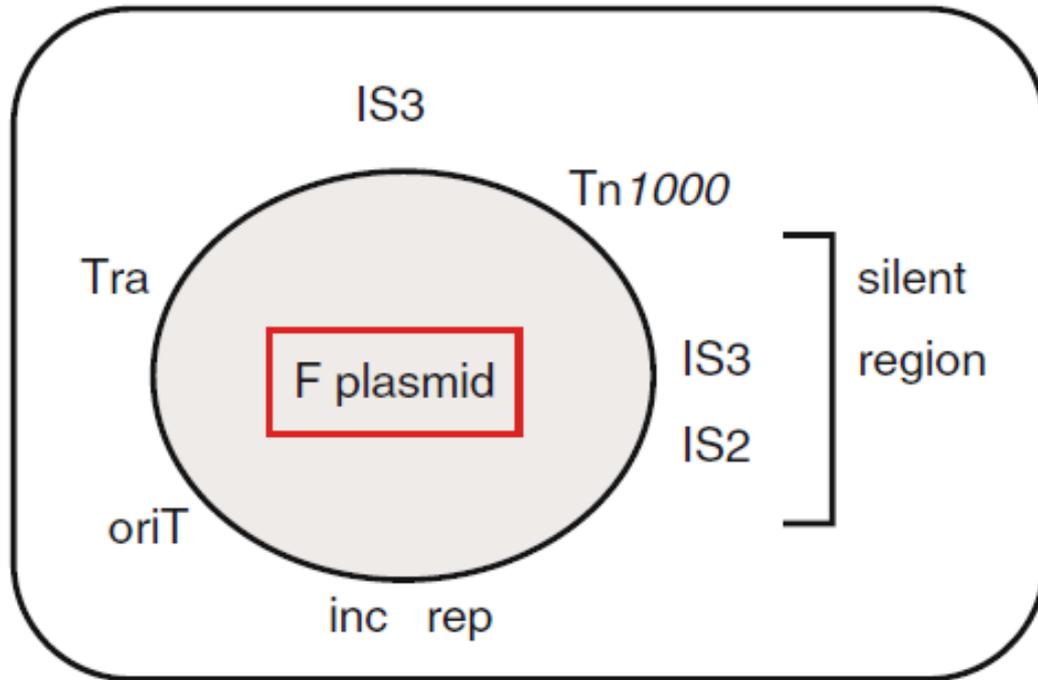
*ura3* – ген оротидин-5'-фосфатдекарбоксилазы  
жизненноважный:

**позитивный отбор**

5-фтороротовая кислота  
(нетоксична)

5-фторурацил (токсичен)  
**негативный отбор**

# Половой фактор (F-фактор) *E.coli*



100 т.п.н., ~30 генов

1-2 копии на клетку

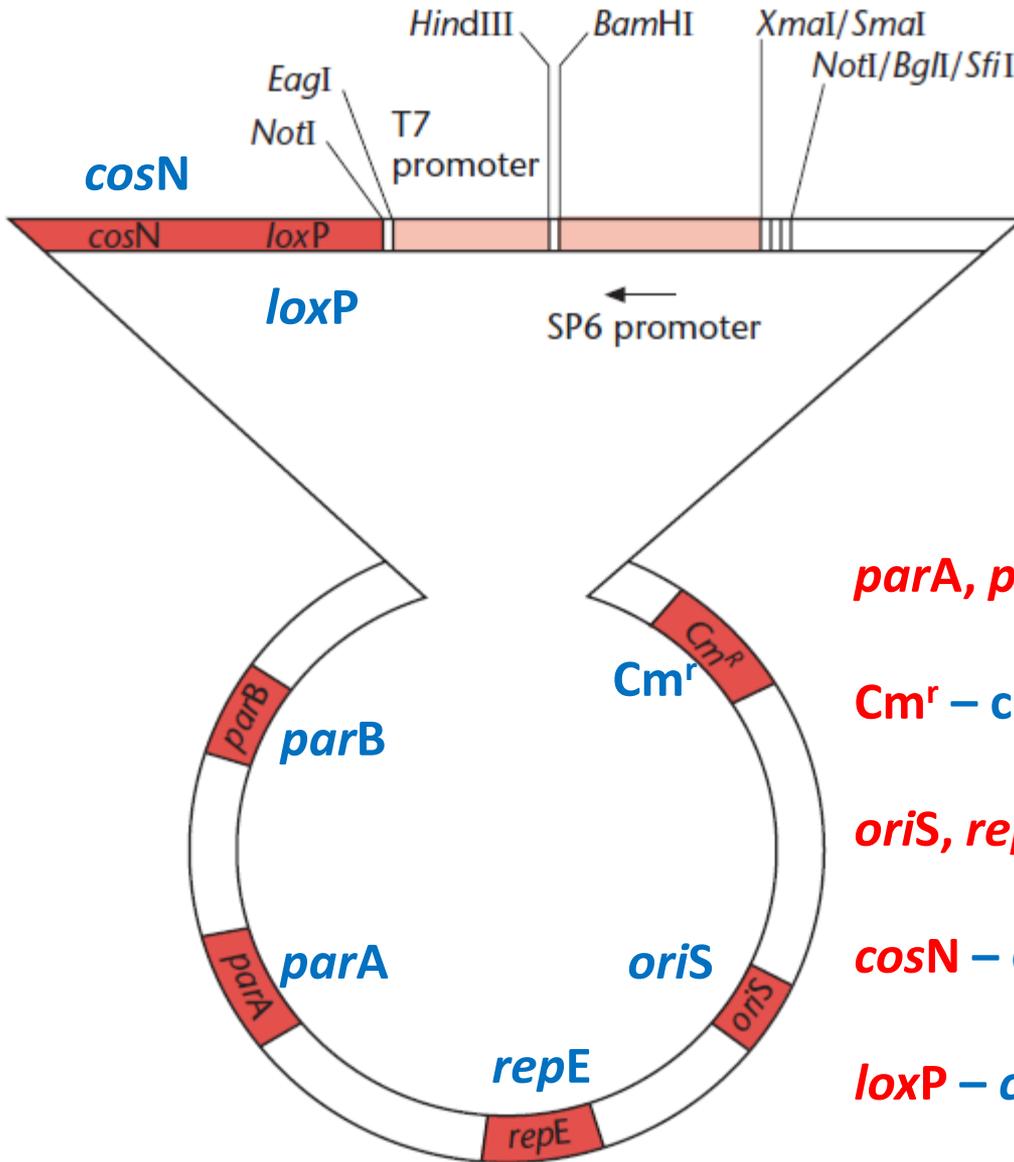
Эписома – способна  
встраиваться в  
хромосому бактерии

**inc, rep** – вегетативная репликация (если остаются только они – миниплазида, **фозмида** – небольшая плазида)

**Tra** – перенос плазмиды в процессе конъюгации (>12 генов)

**oriT** – точка начала переноса F-фактора в реципиентные клетки

# Бактериальная искусственная хромосома (BAC)



**Емкость** – 300 т.п.н.

**Стабилен** на протяжении  
100 генераций

*parA, parB* – контроль числа копий (1-2)

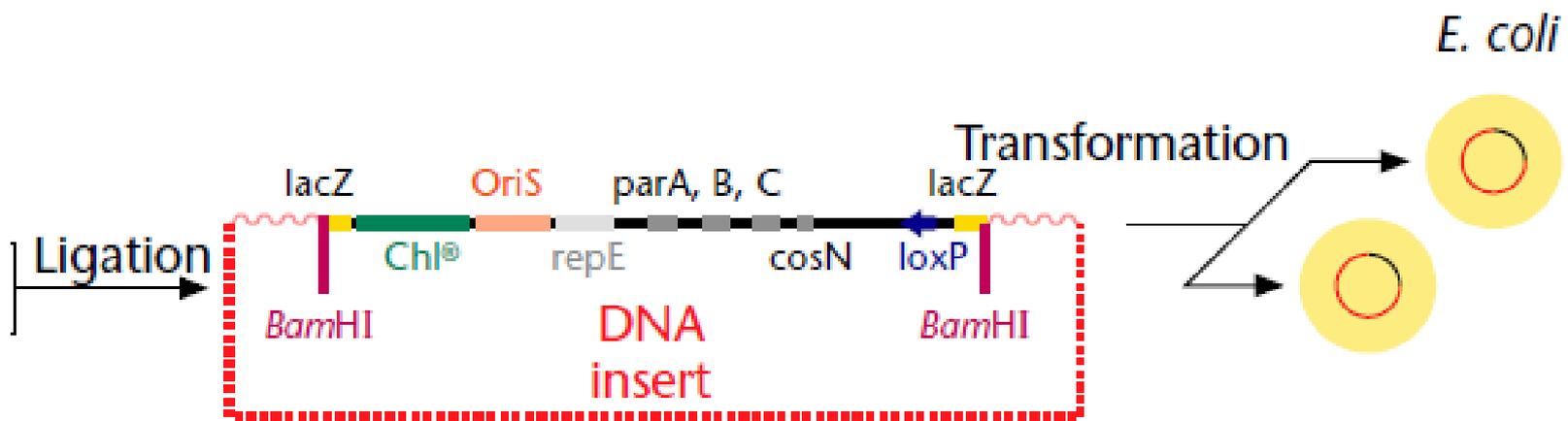
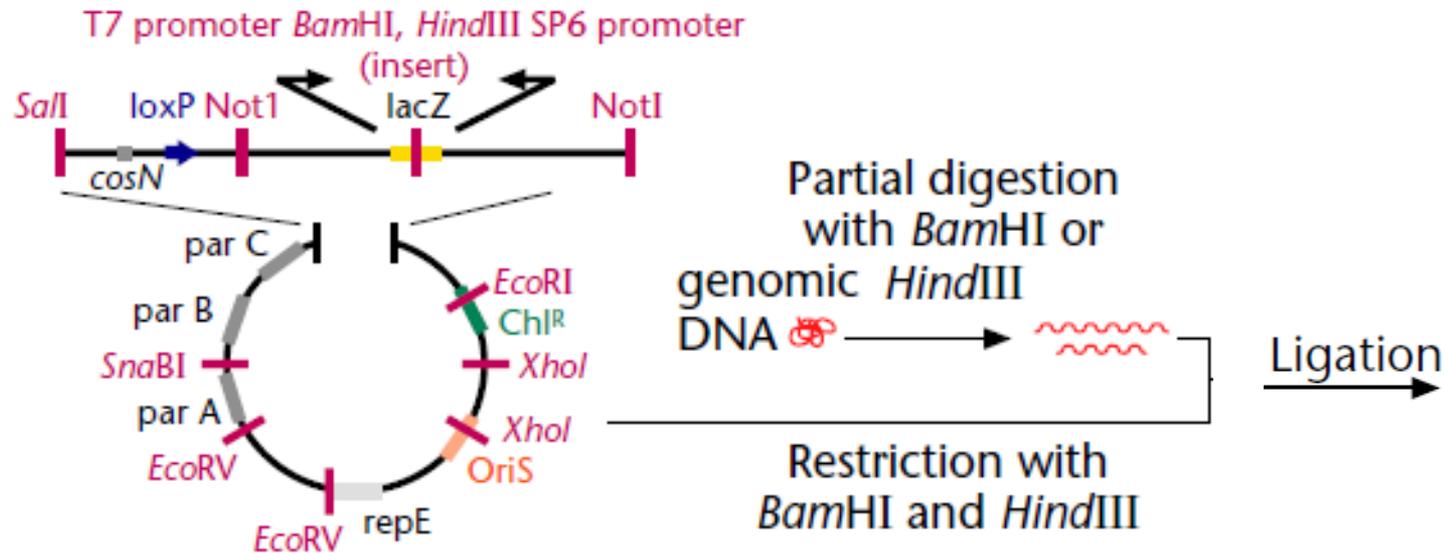
*Cm<sup>r</sup>* – селектируемый маркер

*oriS, repE* – односторонняя репликация

*cosN* – сайт терминазы  $\lambda$

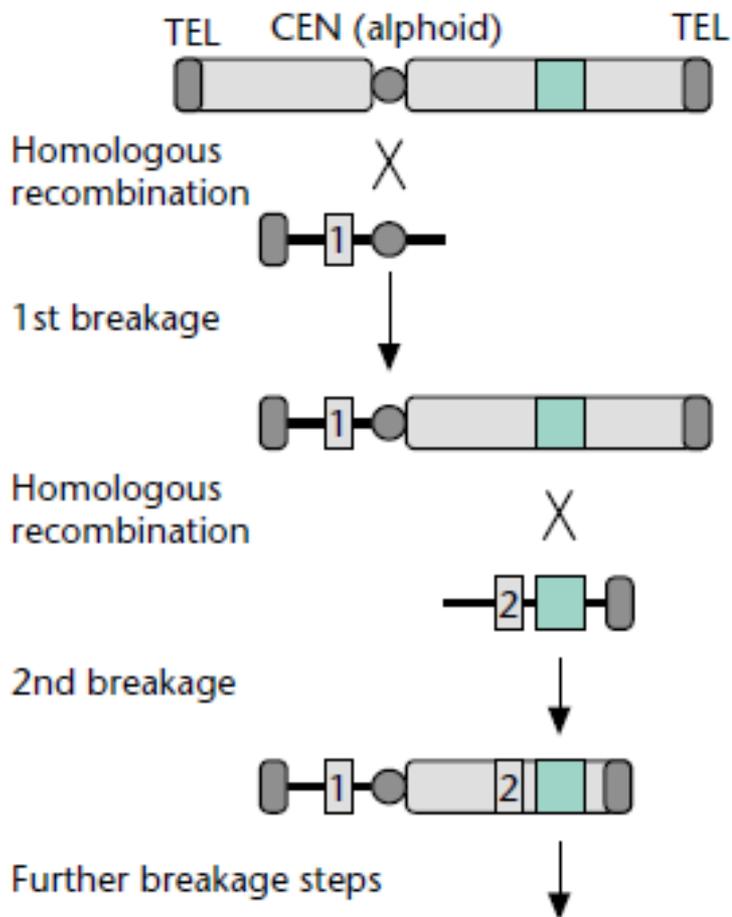
*loxP* – *cre*-рекомбиназа фага P1

# Клонирование ДНК с помощью ВАС

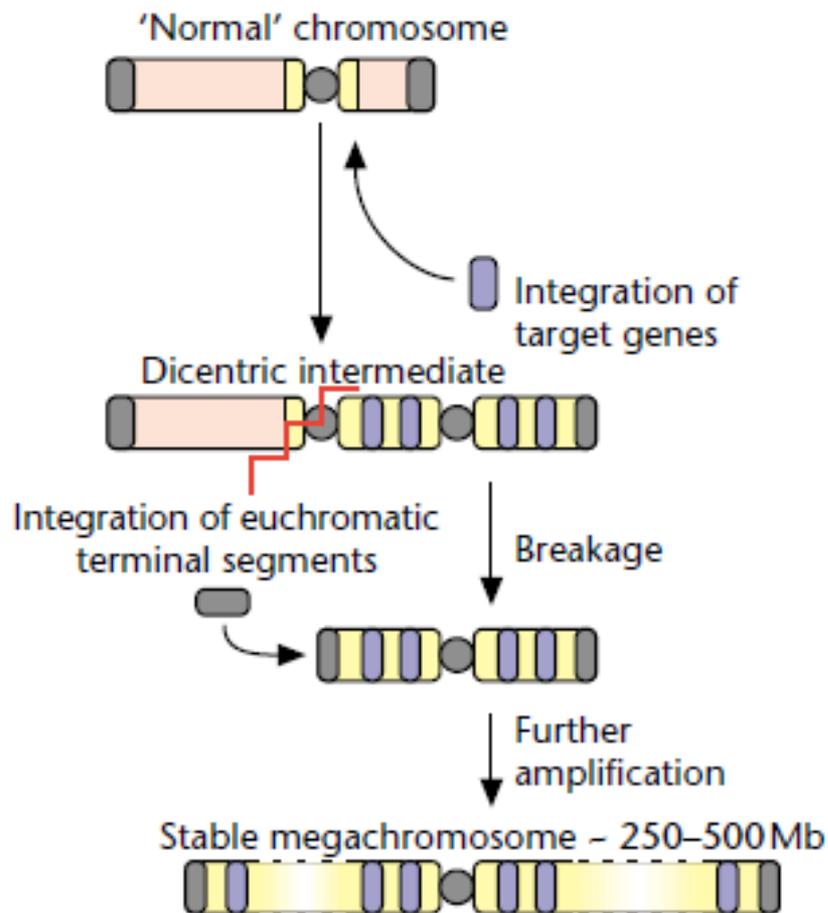


# Получение искусственных хромосом животных методом «сверху-вниз»

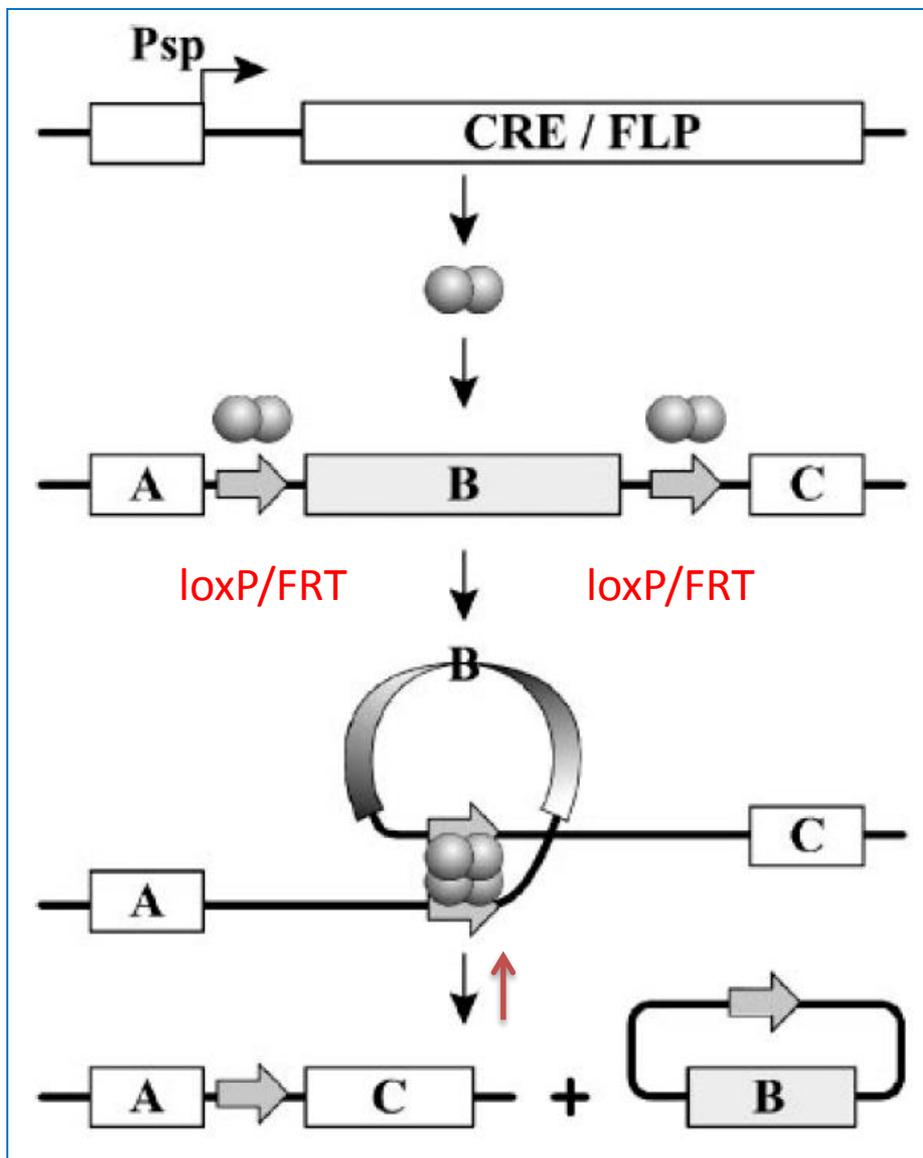
## Targeted chromosome fragmentation (TCF)



## Satellite DNA-based Artificial Chromosome (SATAC)



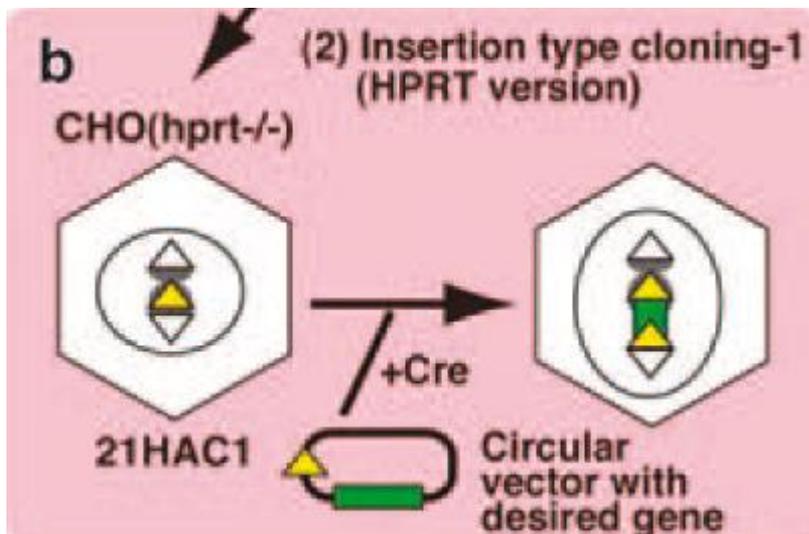
# Принцип действия системы сайт-специфической рекомбинации Cre/lox и введение гена в 21HAC



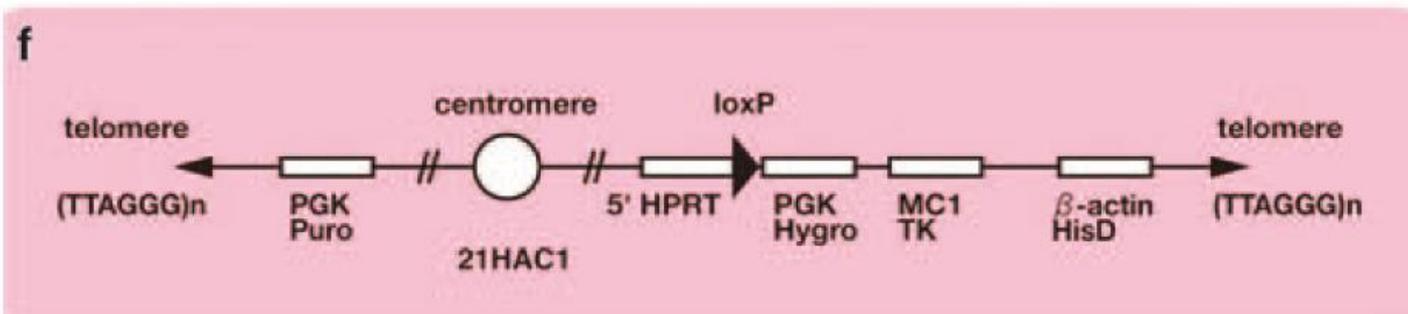
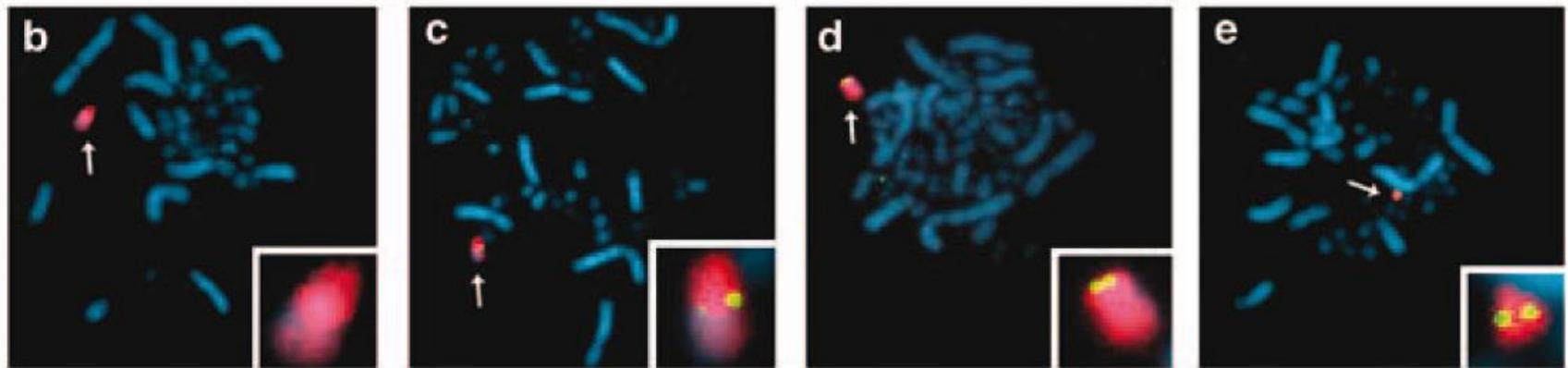
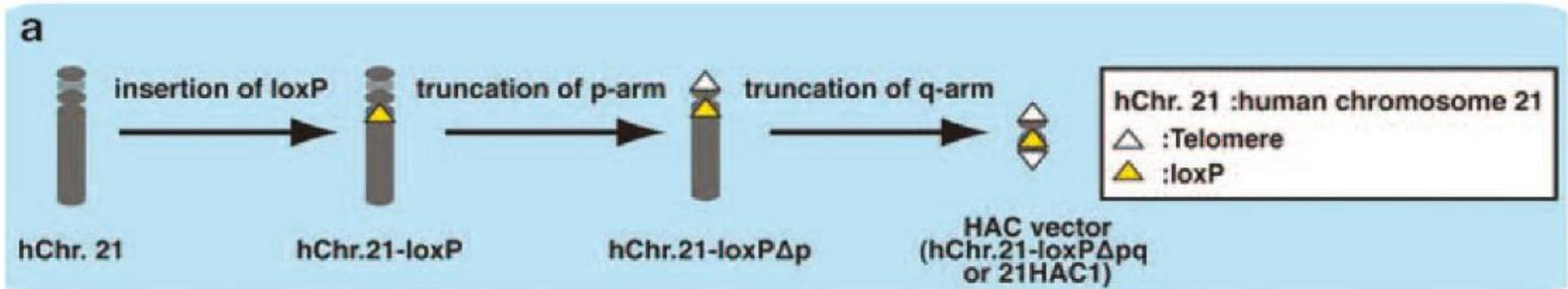
❖ Димерные рекомбиназы **Cre** (фаг P1) или **Flp** (дрожжи) взаимодействуют со специфическими сайтами **loxP** или **FRT** (18-звенные инвертированные повторы, разделенные 8-звенной коровой последовательностью)

❖ Гомологичная рекомбинация происходит в 8-звенной коровой последовательности

❖ **Psp** – тканеспецифический (или индуцируемый) промотор

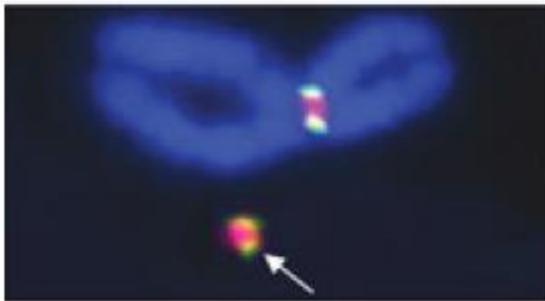
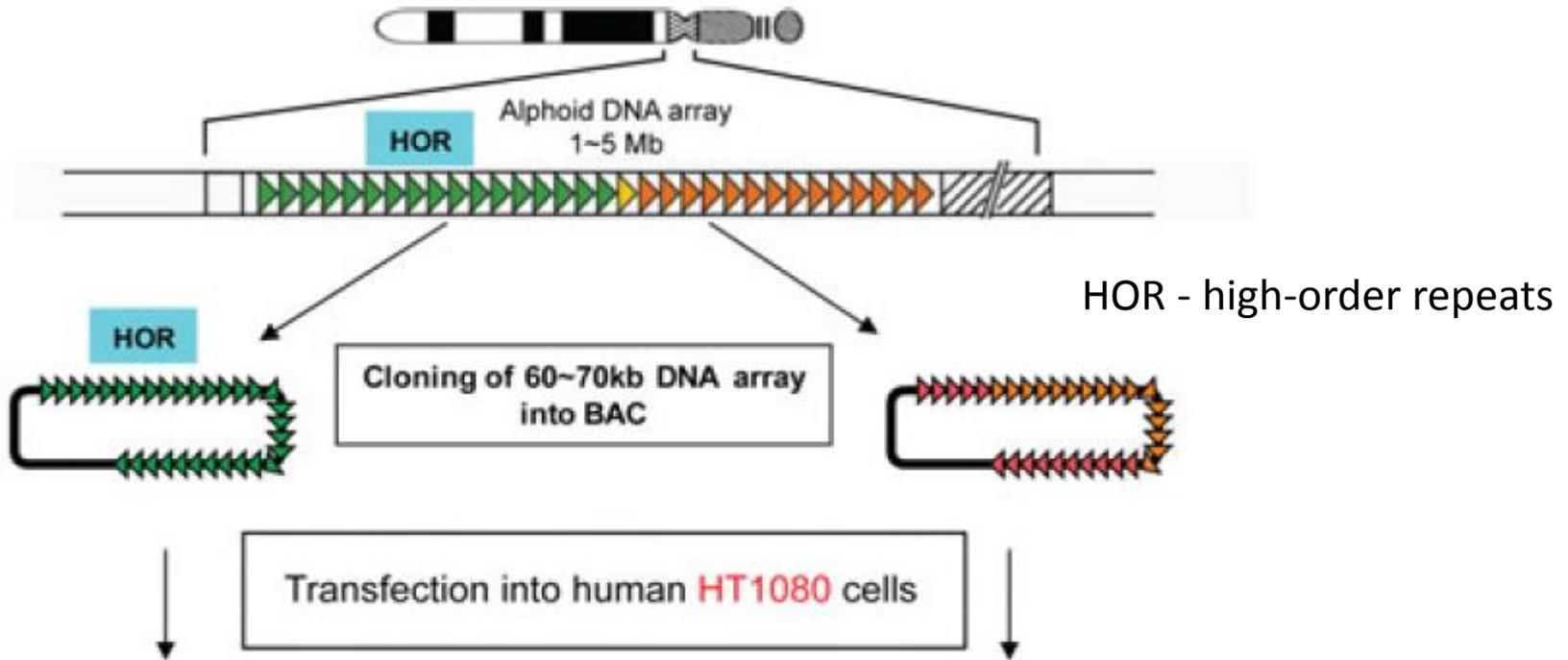


# Получение искусственной хромосомы человека (НАС) методом «сверху вниз» фрагментацией хромосомы 21

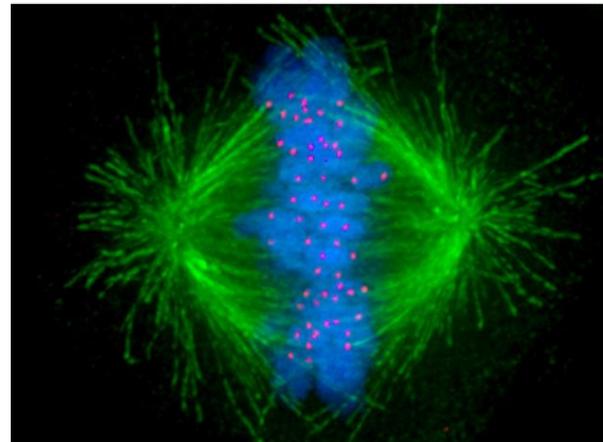


Итоговая  
НАС

# Конструирование HAC методом «снизу вверх»



HAC



Митоз в клетках человека.  
Микротрубочки – зеленые, ДНК – голубая, кинетохоры - красные

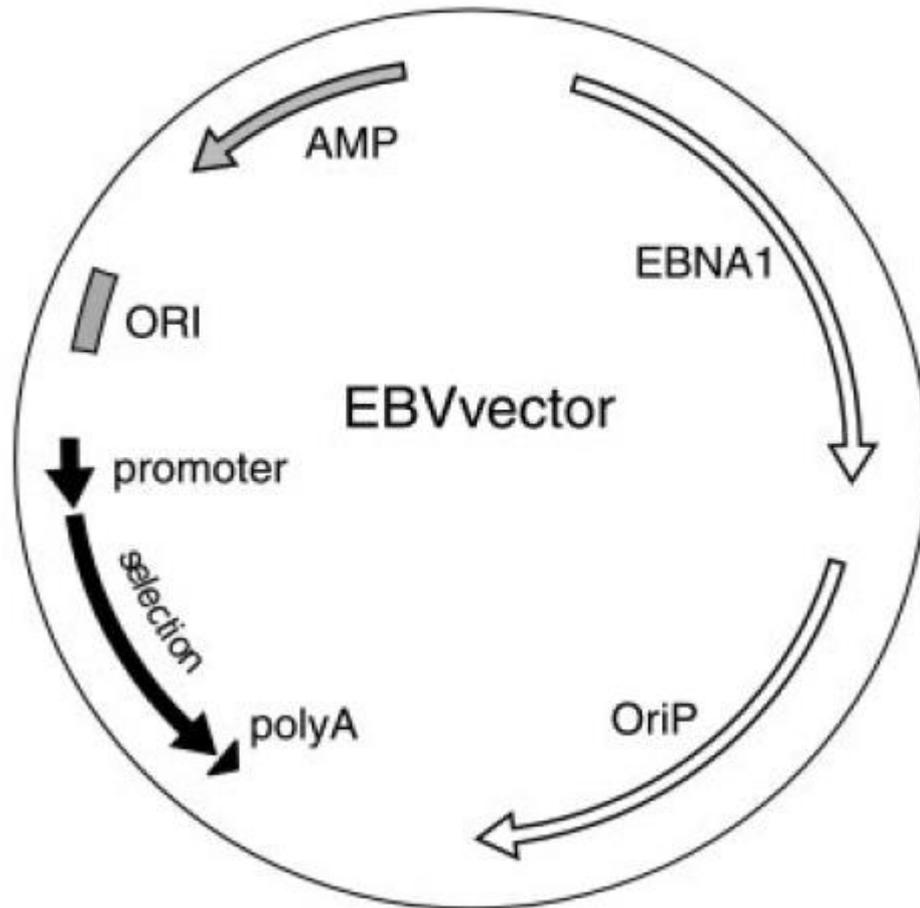
# Евгений Витальевич Ананьев, 1970-е



Искусственные  
хромосомы  
кукурузы

Первооткрыватель  
мобильных  
генетических  
элементов у  
дрозофилы

# Внехромосомные (эписомные) векторы для экспрессии рекомбинантных генов в клетках ЖИВОТНЫХ



Челночный эписомный вектор на основе вируса Эпштейна-Барр

**EBNA1** – Epstein-Barr nuclear antigen 1

**OriP** – Область начала репликации в клетках животных

**ORI** – Область начала репликации в бактериальных клетках

**AMP** – Ген устойчивости к ампициллину

**polyA** – сайт полиаденилирования

20-300 копий на клетку. Стабильно распределяются между дочерними клетками.

# Емкости векторов разных классов

Вектор	Емкость (т.п.н.)	Применение
Плазмиды	15	Библиотеки кДНК
Бактериофаг лямбда	25	Геномные библиотеки Библиотеки кДНК
Космиды	30-45	Геномные библиотеки
РАС	70-90	То же
ВАС	100-500	То же
УАС	250-2000	То же
МАС	>2000	Генотерапия

# Способы введения ДНК в бактериальные клетки

❖ Трансформация  $10^7$ -  $10^8$  колоний/мкг ДНК

❖ каналы, холодовой шок, ионы магния, рубидия  
гексаминкобальтхлорид

❖ Трансфекция

❖ Электропорация  $10^9$ -  $10^{10}$  колоний/мкг ДНК

❖ шок электрическим полем высокой напряженности  
(3-5 мсек), поляризация мембран, обратимое  
повреждение