

Практикум по генной инженерии, задача 3

Идентификация 3'- и 5'-концевых фрагментов целевых транскриптов

Время выполнения – 2 учебных дня.

Задача включает два или три последовательных раунда быстрой амплификации 3'-концевого фрагмента кДНК флуоресцентного белка из кораллового полипа *Clavularia* (3'-RACE). В результате выполнения задачи должен быть получен гомогенный продукт ПЦР длиной около 550 п.о., соответствующий 3'-концевой последовательности мРНК. В качестве дополнительной задачи можно провести клонирование продукта 3'-RACE. Если учебный центр оснащен необходимым оборудованием, можно провести также секвенирование продукта 3'-RACE.

При проведении задачи учащиеся отрабатывают навыки постановки и оптимизации условий ПЦР, приобретают представление о полном цикле процедуры идентификации полноразмерных транскриптов.

В качестве стартового материала может быть использована кДНК, полученная при выполнении задачи 2, или контрольная кДНК из набора *Clavularia* FP cloning set.

- ▶ В целях экономии времени, процедура 5'-RACE вынесена за рамки лабораторной работы и рассматривается только теоретически.

Материалы и оборудование для выполнения задачи

- Набор для практикума *Clavularia* FP cloning set (Евроген, кат. # MB001)
- Набор для ПЦР Encyclo Plus PCR kit (Евроген, кат. # PK101)
- Набор праймеров Mint RACE primer set (Евроген, кат. # SK004)
- Минеральное масло для молекулярно-биологических работ или аптечное вазелиновое масло (если амплификатор не имеет нагревающейся крышки)
- Амплификатор
- Настольная центрифуга
- Пробирки для ПЦР (0.5 или 0.2 мл)
- Штатив для пробирок
- Стерильные наконечники для пипеток
- Автоматические пипетки на 10-20, 200 и 1000 мкл
- Перчатки
- Реактивы и оборудование для гель-электрофореза
 - Агароза
 - 1X Трис-ацетатный буфер (40 мМ Трис-ацетат, pH 7,8-8,0; 1 мМ ЭДТА)
 - ▶ Удобно иметь 10-кратный стоковый раствор буфера и разводить его до однократного перед использованием.

- Концентрированный раствор бромистого этидия, 10 мг/мл (хранить при +4 °С в темной склянке)
- Буфер для нанесения проб (10 мМ Трис-НСI, рН 7.8; 0,025% бромфеноловый синий; 0.025% ксиленцианол; 30% глицерин; 25 мМ ЭДТА)
- Маркер молекулярных длин ДНК (1 kb или 100 bp DNA ladder)
- Камера для агарозного гель-электрофореза, включая основную камеру, прозрачный для ультрафиолета лоток для геля (20 x 10 см), бортики для гелевого лотка, гребенку
- Источник постоянного тока
- Весы
- Трансиллюминатор
- Система гель-документации
- Стеклоянная колба

Если планируется клонирование продукта 3'-RACE, дополнительно понадобятся:

- Набор для выделения плазмидной ДНК (Евроген, кат. # BC021)
- рAL-TA вектор (Евроген, кат. # TA001)
- Компетентные клетки для химической трансформации (XL1-Blue, DH5 α или другие recA(-) штаммы любого производителя, например Евроген, кат. # CC001)
- ▶ *Компетентные клетки могут быть приготовлены согласно стандартным протоколам.*
- Т4 ДНК-лигаза с 10x буфером
- Среда для культивирования бактерий LB, жидкая и агаризованная на чашках Петри
- Термостат +37 °С для чашек Петри
- Водяная баня (+42 °С)
- Шпатель микробиологический (Дригальского)
- Пробирки для ПЦР в стрипах по 8–12 штук (желательно)
- Черный и цветной фломастеры-маркеры