

Практикум по генной инженерии, задача 4

Аmplификация полной кодирующей последовательности гена флуоресцентного белка и его направленное клонирование в бактериальный экспрессионный вектор

Время выполнения – 6 учебных дней (3 полных учебных дня + интервал 2 дня + 1 полный учебный день).

Задача включает амплификацию и направленное клонирование в экспрессионный вектор полной кодирующей последовательности гена флуоресцентного белка, отбор целевых клонов и выделение плазмидной ДНК.

При проведении задачи учащиеся закрепляют навыки постановки ПЦР, учатся рассчитывать количество компонентов для реакции лигирования, проводить трансформацию бактерий, отбирать клоны со вставкой, выделять плазмидную ДНК, приобретают представление о полном цикле процедуры клонирования от стадии амплификации до получения препарата плазмидной ДНК, выделенной из отдельного клона.

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

Материалы и оборудование для выполнения задачи

- Набор для практикума *Clavularia FP cloning set* (Евроген, MB001)
- Набор для ПЦР Encyclo Plus PCR kit (Евроген, PK101)
- Набор для очистки ДНК из геля и реакционных смесей (Евроген, BC022)
- Минеральное масло для молекулярно-биологических работ или аптечное вазелиновое масло (если амплификатор не имеет нагревающейся крышки)
- Компетентные клетки для химической трансформации (XL1-Blue, DH5 α или другие recA(-) штаммы любого производителя, например, Евроген, CC001)
- ▶ *Компетентные клетки могут быть приготовлены согласно стандартным протоколам.*
- T4 ДНК-лигаза с 10x буфером
- Ферменты рестрикции BamHI и HindIII с соответствующим реакционными растворами (например, 10X буфер W (Sibenzime) или 10X буфер 2 (NEB); 10X раствор БСА, 1 мг/мл)
- Среда для культивирования бактерий LB, жидкая и агаризованная на чашках Петри
- Ампициллин
- Набор для выделения плазмидной ДНК (Евроген, BC021)
- Шпатель микробиологический (Дригальского)
- Амплификатор

- Вортекс (желательно)
- Настольная центрифуга
- Водяной термостат
- Ледяная баня
- Холодильник (+16°C)
- Термостат для чашек Петри (+37°C)
- Термостатическая качалка (+37°C)
- Спиртовая или газовая горелка
- Флуоресцентный бинокляр или микроскоп с фильтром FITC (желательно)
- Пробирки для ПЦР (0,5 или 0,2 мл)
- Штатив для пробирок
- Стерильные наконечники для пипеток
- Стерильные культуральные пробирки (10-15 мл), стеклянные или полипропиленовые
- Пробирки для ПЦР в стрипах по 8-12 штук (желательно)
- Черный и цветной фломастеры-маркеры
- 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°C в темной склянке)
 - Буфер для нанесения проб (10 мМ Трис-HCl, pH 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
 - Стеклянная колба