

Практикум по генной инженерии, задача 4

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

Время выполнения: 6 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* (кат. # MBO01, Евроген).

Материалы и оборудование для выполнения задачи 4

- Набор для практикума *Clavularia FP cloning set* (кат. # MBO01, Евроген).
- Набор для ПЦР *Encyclo Plus PCR kit* (кат. # PK101, Евроген).
- Набор *Cleanup Standard* для очистки ДНК из геля и реакционных смесей (кат. # BC022S, Евроген).
- T4 ДНК-лигаза (кат. # LK101S, Евроген).
- Набор *Plasmid Miniprep 2.0* для выделения плазмидной ДНК (кат. # BC221, Евроген).
- Минеральное масло для молекулярно-биологических работ (если амплификатор не имеет нагревающейся крышки).
- Компетентные клетки для химической трансформации (XL1-Blue, DH5 α или другие *recA(-)* штаммы любого производителя, например, кат. # CC001, Евроген).
- 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.
- Реактивы и оборудование для гель-электрофореза (Приложение 1).
- Реактивы и оборудование для ПЦР-скрининга (Приложение 6).
- Шпатель микробиологический (Дригальского).
- Амплификатор.
- Вортекс.
- Мини-центрифуга.
- Водяной термостат.
- Ледяная баня.
- Холодильник (+16 °С).
- Термостат для чашек Петри (+37 °С).
- Термостатическая качалка (+37 °С).
- Спиртовая или газовая горелка.
- Трансиллюминатор, длина волны 295–365 нм.
- ▶ *Дополнительно желательно иметь оборудование для детекции флуоресценции: флуоресцентный бинокляр или микроскоп с фильтром FITC.*
- Пробирки для ПЦР (0.5 или 0.2 мл).
- Стерильные культуральные пробирки (10–15 мл), стеклянные или полипропиленовые.
- Автоматические дозаторы на 10, 20, 200 и 1 000 мкл.
- Наконечники для дозаторов с фильтрами.
- Штатив для пробирок.
- Перчатки.