

Практикум по генной инженерии, задача 5

Экспрессия гена флуоресцентного белка в бактериях *E.coli*, визуализация и выделение рекомбинантного белка

Время выполнения: 2 учебных дня.

Задача включает наращивание биомассы, продуцирующей рекомбинантный белок, и визуализацию флуоресценции как доказательство функциональной активности этого белка. В процессе работы учащиеся приобретают представление об экспрессии генов в бактериальной гетерологической системе, знакомятся с процедурой экспрессочистки рекомбинантного белка из клеточного лизата.

В качестве стартового материала могут быть использованы трансформированные бактерии, полученные при выполнении задачи 4, или контрольная плаزمиды, вложенная в набор Clavularia FP cloning set (кат. # MB001, Евроген). В последнем случае лабораторная работа должна включать трансформацию бактерий контрольной плазмидой.

- ▶ *В качестве дополнительной задачи рекомендуется провести анализ флуоресцентного белкового препарата на полиакриламидном геле (SDS-PAAG) и на спектрофлуориметре.*

Материалы и оборудование для выполнения задачи 2

- Набор для практикума Clavularia FP cloning set (кат. # MB001, Евроген) (если не выполнялась задача 4).
- Среда для культивирования бактерий LB, жидкая и агаризованная на чашках Петри.
- Ампициллин.
- Буфер для озвучивания (50 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7.5–8; 300 мМ NaCl).
- Хелатный сорбент для очистки белков с His-мишенью (например, Protino Ni-IDA или Ni-ТЕД (Macherey-Nagel), NiNTA-agarose (Qiagen)).
- Раствор ЭДТА для элюции белка, 100 мМ, pH 8.0.
- Оборудование для детекции флуоресценции (трансиллюминатор (295 нм) или любая УФ-лампа).
- Вортекс (желательно).
- Термостат для чашек Петри (+37 °C)
- Мини-центрифуга.
- Ультразвуковой гомогенизатор.

- 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.