

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 экспресс-очистки 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. 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

- 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)
- Настольная центрифуга
- Ультразвуковой гомогенизатор
- Пробирки (1,5 или 0,2 мл)
- Штатив для пробирок
- Стерильные наконечники для пипеток
- Стерильные культуральные пробирки (10-15 мл), стеклянные или полипропиленовые
- Автоматические пипетки на 10-20, 200 и 1000 мкл
- Перчатки

Если не выполнялась задача 4 дополнительно потребуются:

- Набор для практикума *Clavularia* FP cloning set (Евроген, MB001)
- 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.*
- Водяной термостат
- Ледяная баня
- Сухой термостат для чашек Петри (+37°C)
- Термостатическая качалка (+37°C)
- Шпатель микробиологический (Дригальского)
- Спиртовая или газовая горелка
- Настольная центрифуга