

Лабораторная работа №2

Рестрикция - подготовка вектора (линеаризация) и клонируемого фрагмента ДНК к лигированию

Рестрикция ДНК

Принцип метода: эндонуклеазы рестрикции II класса (рестриктазы) катализируют гидролиз молекулы ДНК в строго определенных сайтах, содержащих узнаваемую данной рестриктазой последовательность нуклеотидов. В результате гидролиза определенной рестриктазой возникает разрыв цепи, и, образуется фрагмент ДНК со строго определенными концами. Размер данного фрагмента можно рассчитать. Далее целевой фрагмент может быть очищен от прочих компонентов реакции. Для этого смесь разделяется в агарозном геле методом электрофореза, фрагмент нужной длины вырезается из геля и проводится его выделение на колонке.

Реактивы: вектор (плазида pQe-30), эндонуклеазы рестрикции (HindIII, BamHI), соответствующий 10× буфер, стерильная вода, минеральное масло.

Расходные материалы: наконечники 200 мкл, эппендорфы 1,5 мл.

Информационные материалы: описание рестриктаз (<http://russia.sibenzyme.com/products/restrictases>), последовательность ДНК плазмиды pQe-30, последовательность ДНК ПЦР-фрагмента.

Оборудование: термостат

Биологический материал: образцы, содержащие амплификат, плазида pQe30.

Ход работы:

1. Выберите буфер, обеспечивающий оптимальную ферментативную активность пары рестриктаз BamH I и Hind III.
2. Рассчитайте количество компонентов реакционной смеси:

Компонент	Количество	Объем на одну реакцию, мкл	Общий объем на n реакций, мкл
ДНК плазмиды /амплификат	20 мкл		вносить после
10× рестрикционный буфер	1/10 конечного объема		
Фермент (BamH I), 20 е.а./мкл	10 е.а.		
Фермент (Hind III), 20 е.а./мкл	10 е.а.		
Стерильная вода	до конечного объема	25 мкл	

3. Приготовьте смесь на n проб ДНК, для этого смешайте в общей пробирке воду, буфер и ферменты в количестве необходимом для проведения n реакций (общий объем n×5 мкл) и разнести по 5 мкл в пробирки, содержащие 20 мкл гидролизуемой ДНК (1 мкг ДНК плазмиды или амплификат).

4. Аккуратно смешайте компоненты реакции в пробирке. Покройте реакционную смесь каплей минерального масла для предотвращения испарения.

5. Инкубируйте смесь при 37 °С в течение 1 часа.

6. Выполните препаративный электрофорез в 1% агарозном геле.

Выделение целевого фрагмента ДНК из геля

Принцип метода: Под действием нагревания в буферном растворе агарозный гель растворяется. Выделение фрагмента ДНК происходит за счет обратимой сорбции ДНК на колонке. При высокой концентрации соли ДНК сорбируется на колонке и может быть элюирована раствором с низким содержанием солей.

Реактивы: Набор для выделения фрагментов ДНК Clean up Standart (Evrogen), маркер молекулярного веса M12 (Сибэнзим).

Расходные материалы: наконечники 1000, 200 мкл, эппендорфы 1,5 мл.

Оборудование: автоматические дозаторы переменного объема 10-100, 100-1000 мкл, водяная баня / термостатируемый шейкер, спектрофотометр Nanodrop2000.

Биологический материал: образцы агарозного геля, содержащие ДНК.

Ход работы:

1. Пользуясь электронными материалами к работе, рассчитайте ожидаемую длину клонируемого фрагмента ДНК и длину линейаризованной плазмидной ДНК после рестрикции.
2. Поместите гель в трансиллюминатор. Визуализируйте ДНК в геле при длине волны 365 нм во избежание апуринизации ДНК, аккуратно вырежьте фрагмент геля, содержащий целевой фрагмент ДНК.
3. Взвесьте пробирку. Поместите фрагмент геля в заранее взвешенную пробирку. Взвесьте пробирку с гелем. Рассчитать массу кусочка геля.
4. Добавьте требуемое количество (3 объема) связывающего буфера. Инкубируйте пробирку при 55 °С до полного растворения геля.
5. Нанести раствор на колонку. Процентрифугируйте 30 сек 13,4 т.о.
6. Добавьте 700 мкл промывочного раствора. Процентрифугируйте 30 сек 13,4 т.о.
7. Пустую колонку процентрифугируйте 60 сек 13,4 т.о.
8. Перенесите колонку в чистую пробирку. Нанесите на колонку 30 мкл элюирующего буфера. Процентрифугируйте 30 сек 13,4 т.о.
9. Проанализируйте полученный элюат методом гель электрофореза. Определить концентрацию ДНК в элюате на приборе Nanodrop2000.

Интерпретация результатов:

При анализе проб, полученных после элюции, методом электрофореза в агарозном геле должен быть выявлен один фрагмент ДНК ожидаемой длины (соответствующий линейаризованному вектору или клонируемому фрагменту ДНК).

