

Лабораторная работа № 3

Лигирование и трансформация бактериальных клеток.

Принцип метода: Метод лигирования ДНК основан на способности лигазы фага T4 сшивать как липкие так и тупые концы линейных фрагментов ДНК. Обязательным условием для работы лигазы является наличие фосфатной группы на 3'-конце.

Метод химической трансформации бактериальных клеток основан на увеличении эффективности поглощения ДНК бактериальной клеткой в результате предварительной обработки солями (индукция компетентности). В присутствии ионов Ca^{2+} тепловой шок (инкубация при 37-42 °С, «хит-шок») вызывает фазовый переход липидов внешней мембраны из двухслойной в гексогональную и экзогенная ДНК легко проникает в клетку. Выход трансформатов составляет 10^5 - 10^7 на 1 мкг интактной плазмидной ДНК (для pBR322). Для получения рекомбинантного клона клетки могут быть трансформированы плазмидой или непосредственно лигазной смесью.

Для работы с бактериальной культурой все растворы среды, посуда, наконечники, пробирки должны быть стерильны!

Реагенты: среда LB, дистиллированная вода, антибиотик (ампициллин, 50 мг/мл), набор для быстрой сшивки ДНК (СибЭнзим).

Расходные материалы: одноразовые пластиковые наконечники 10 мкл, 200 мкл, 1000 мкл, эппендорфы объемом 0,6 и 1,5 см³.

Оборудование: сканирующий спектрофотометр с набором спектрофотометрических кювет с толщиной поглощающего слоя 10 мм, ламинарный шкаф, автоматические дозаторы переменного объема 0,5-10 мкл, 10-50 мкл, 100-1000 мкл, миницентрифуга Eppendorf, лабораторная термостатируемая качалка, вортекс, термостат твердотельный настольный (или водяная баня), термостат суховоздушный, холодильник, стерильная стеклянная колба 250 мл (2 шт), стерильные стеклянные культуральные пробирки, стерильные чашки Петри, спиртовка, шпатель, петля микробиологическая.

Биологический материал: клонируемый фрагмент ДНК, линейаризованный вектор, компетентные клетки *E.coli*, плазмиды pQe-30, pQe30-TagGFP

Ход работы:

Приготовление культуральных сред:

LB-среда – в стерильной колбе 12,5 г LB среды растворить в 0,5 л дистиллированной воды. Проавтоклавировать.

LB-бакто-агар - в стерильной колбе 12,5 г LB среды, 8 г бакто-агара растворить в 0,5 л дистиллированной воды. Проавтоклавировать.

1. После остывания LB-бакто-агар до 70 °С добавьте ампициллин до конечной концентрации 50 мкг/мл (1/1000) в LB-бакто-агар и разлейте в стерильные чашки Петри. Оставьте в ламинаре при горячей спиртовке до застывания бакто-агара.
2. Приготовьте смесь для лигирования. Оптимальное соотношение вектор:фрагмент при лигировании по «липким» концам составляет от 1:3 до 1:5. Учитывая концентрацию фрагмента и линейаризованного вектора (полученных в результате выполнения ЛБ2) смешайте в пробирке:

Компонент	Объем, мкл
Стерильная вода	
2× буфер для лигазы	10
Линейаризованный вектор (~25 нг).	
Фрагмент ДНК (~ 25 нг)	
T4 лигаза (10000 е.а./мкл)	1
Суммарный объем	20

3. Инкубируйте 5 минут при комнатной температуре.

4. Разморозьте компетентные клетки на льду.
5. К 100 мкл компетентных клеток добавьте 100 нг плазмиды pQe-30 (отрицательный контроль), pQe-30-TagGFP (положительный контроль) или лигазную смесь. Аккуратно перемешайте (обрезанным носиком);
6. Выдержите во льду 30 минут;
7. Хит-шок – поместить пробирки в твердотельном термостате и инкубировать 5 минут при 37 °С.
8. Добавить 1 мл LB-среды и инкубируйте в суховоздушном термостате при 37 °С 40-60 минут.
9. Центрифугируйте 3 минуты при 6000 об/мин на настольной центрифуге, удалите 1 мл надосадочной жидкости и ресуспендируйте осадок;
10. Высейте клетки (осадок) на чашки Петри с селективной средой LB-агар (содержащей ампициллин);
11. Через 16 часов инкубации засеянных чашек при 37 °С в термостате и поместите их в холодильник (4°C) для созревания белка.
12. Проведите подсчет трансформированных колоний.

Интерпретация результатов: Рост колонии зеленоватого цвета на селективной среде свидетельствует о приобретении клетками плазмиды, несущей ген устойчивости к антибиотику и ген рекомбинантного зеленого флуоресцентного белка (TagGFP).