

Лабораторная работа №1

Амплификация нуклеотидной последовательности кодирующей целевой белок

Принцип метода: Метод ПЦР основан на многократном избирательном копировании (амплификации) определённого участка нуклеиновой кислоты ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*). Копируется участок, который ограничен последовательностями комплементарными прямому и обратному праймерам.

Реактивы: dNTP, прямой праймер, обратный праймер, 10x буфер для ПЦР, ДНК-полимераза, стерильная вода, минеральное масло для ПЦР

Расходные материалы: Одноразовые пластиковые наконечники 200 мкл, 1000 мкл, эппендорфы 1.5, 0.6 мл.

Оборудование: термостат твердотельный настольный или водяная баня, автоматические дозаторы переменного объема 0,5-10 мкл, 10-50 мкл, 100-1000 мкл, миницентрифуга Eppendorf, амплификатор, вортекс

Приготовление растворов:

TE буфер – 10 mM трис, 1 mM ЭДТА, pH 8,0.

Биологический материал: чашка Петри с колониями лабораторного рекомбинантного штамма *E.coli*, трансформированного плазмидой, несущей ген целевого белка.

Ход работы:

1. Одну колонию с чашки перенести в 100 мкл TE-буфера. Инкубировать 10 минут в термостате при 98 °C.
2. Центрифугировать при 13400 об/мин в течение 1 минуты. Супернатант, содержащий ДНК, использовать для постановки ПЦР (ДНК-матрица).
3. Рассчитать количество компонентов необходимое для постановки одной реакции ПЦР и приготовления ПЦР-смеси для постановки n+2 реакций (положительный и отрицательный контроль).

Компонент	Конечная концентрация	Объем, мкл
dNTP, 10 мкМ каждого	0,2 мкМ	
Прямой праймер, 10 мкМ	0,2 мкМ	
Обратный праймер, 10 мкМ	0,2 мкМ	
10x буфер для ПЦР	1x	
ДНК-полимераза, 2 е.а./мкл	1 е.а.	
Стерильная вода	-	
ДНК-матрица		5
Суммарный объем	-	50

4. Приготовить реакционную смесь для ПЦР, смешивая компоненты в указанном в таблице порядке, без добавления ДНК-матрицы. Перемешать на вортексе и разнести в пробирки по 45 мкл.

5. Внести в каждую пробирку 5 мкл ДНК-матрицы (супернатант полученный в п.2), положительный контрольный образец (ДНК плазмиды pQe-30 TagGFP, 0.2 мкг/мл), в отрицательный контроль внести воду.

Сверху добавить каплю минерального масла, чтобы поверхность была покрыта маслом (для предотвращения испарения). Сбросить капли на вортексе 30 секунд.

6. Перенести пробирки в амплификатор и осуществить амплификацию по следующей программе:

	Температура, °C	Время, сек	N циклов
Начальная денатурация	95	300	1
Денатурация	95	15	24
Отжиг праймеров	60	15	
Элонгация	72	15	
Финальная элонгация	72	120	1

7. Провести анализ ПЦР продукта методом гель-электрофореза.

Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле

Принцип метода: Под действием силы электрического поля фрагменты ДНК, несущие отрицательный заряд, мигрируют в геле от катода к аноду. В результате происходит разделение фрагментов нуклеиновых кислот по размеру (длине) и форме (в случае, если нуклеиновая кислота образует вторичные структуры, например шпильки). Молекулы, имеющие большую молекулярную массу, движутся в геле медленнее.

Реактивы: (квалификация реагентов ОСЧ или Molecular biology grade): агароза, трис, уксусная кислота, ЭДТА, соляная кислота, бромфеноловый синий (БФС)/ ксиленцианол (КЦ), глицерин, бромистый этидий, натрия гидроксид, маркер молекулярного веса (соответствующий размеру разделяемых фрагментов).

Расходные материалы: наконечники 200 мкл.

Оборудование: камера для горизонтального электрофореза, источник тока, термостойкая колба на 200 мл, автоматический дозатор переменного объема 0,5-10 мкл, водяная баня / микроволновая печь, трансиллюминатор/система визуализации гелей.

Приготовление растворов:

50x TAE буфер (pH 8.0) – Трис - 242 г, уксусная кислота - 57,1 мл, 0,5 М ЭДТА (pH 8.0, доводить сухой щелочью) - 200 мл, довести объем водой до 1 л.

Буфер для внесения образцов – 0,5% БФС/ КЦ, 20% глицерин, 10 мМ, трис (8.0).

Бромистый этидий 1% водный раствор.

Биологический материал: образцы, содержащие нуклеиновые кислоты.

Ход работы:

1. Собрать заливочный столик, установить гребенки;
2. Приготовить 1x TAE буфер (40 мМ Трис, 20 мМ уксусная кислота, 1 мМ ЭДТА). Для этого к 20 мл 50x TAE добавить 980 мл дистиллированной воды (т.е. довести до 1 л);
3. В термостойкую колбу добавить навеску 1,2 г агарозы и 120 мл 1xTAE (1% гель). Колбу поставить в микроволновую печь на 1,5 минуты при максимальной мощности или на водяную баню до полного растворения агарозы;
4. После остывания до 70 °С добавить в гель 10 мкл 1% раствора бромистого этидия. Размешать как при титровании и вылить в планшкетку. После того как гель станет из прозрачного мутновато-белым - полимеризация завершена. Вытащить гребенку;
*Гель можно хранить в полиэтиленовом герметичном пакете при +4°C (1-2 недели);
5. Поместить гель в камеру;
6. Заполнить камеру 1xTAE буфером, так чтобы буфер покрывал гель;
7. К 10 мкл анализируемого образца, содержащего ДНК, добавить по 1 мкл буфера для внесения образцов;
8. Внести образцы, маркер молекулярного веса ДНК в карманы геля. На дорожку вносить 10 мкл амплификата или 0,02-0,15 мкг ДНК;
9. Электрофорез проводить при соответствующем напряжении 150 В (в течение 20-60 минут в зависимости от длины анализируемого фрагмента ДНК). Следить за движением красителя в геле.
10. После завершения процесса, достать гель из камеры и проанализировать гель под УФ-светом на трансиллюминаторе.

Интерпретация результатов:

Под УФ-светом выявляются светящиеся полосы, положение которых в геле соответствует молекулярной массе фрагмента нуклеиновой кислоты. Для определения молекулярной массы используют маркер длин фрагментов. После электрофореза в геле должна выявляться полоса ожидаемой длины. Подвижность линейных и кольцевых молекул зависит от % геля, скорости электрофореза. Линейный маркер не позволяет точно оценить размер