

Исследовательская работа «Внедрение клонированного гена флуоресцентного белка кораллового полипа в геном бактерии»

Сайгина Арина, 11X класс

СУНЦ МГУ, 2024

Цель исследования:

Внедрить ген флуоресцентного белка кораллового полипа в геном бактерии.

Задачи исследования:

- Изучить информацию по данному разделу;
- Проверить возможность экспрессии эукариотического белок-кодирующего гена в прокариотическом организме;

Идея исследования:

После вставки эукариотического белок-кодирующего гена в прокариотический организм, в нем должен начать экспрессироваться белок, который мы идентифицируем при помощи его способности к флуоресценции.

Гипотеза исследования:

Эукариотический белок-кодирующий ген будет экспрессироваться в прокариотическом организме

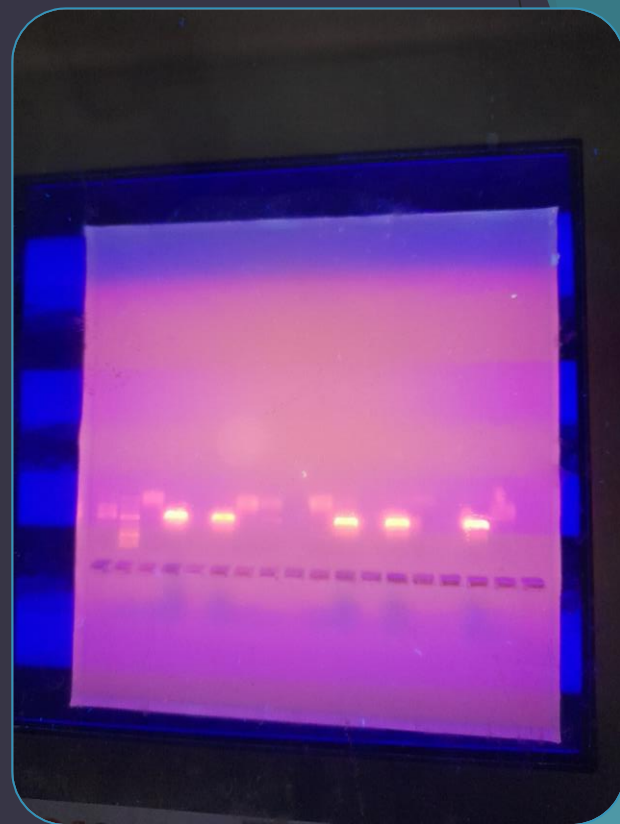
Ход исследования

5 День. Реамплификация. Электрофорез.

Смесь 1	Смесь 2
Буфер (5 мкл)	Буфер (5 мкл)
F-праймер (1 мкл)	F-праймер (1 мкл)
R-праймер (1мкл)	R-праймер (1мкл)
ДНК-полимераза Encyclo (1 мкл)	ДНК-полимераза Encyclo (1 мкл)
ПЦР-контроль, разбавленные в 100 раз (3 мкл)	ПЦР-продукт (2 мкл)
H2O (38 мкл)	H2O (39 мкл)

Master-mix

5 День. Реамплификация. Электрофорез.



5 День. Новая ПЦР для контроля и для продукта. Очистка ДНК. Рестрикция.

Методика очистки ДНК:

1. ПЦР-продукт (40 мкл) + связывающий буфер S (350 мкл)
2. Нанести на колонку
3. Центрифугирование 1 минуту (7000 g; 10000 rpm)
4. Добавить промывочный раствор (700 мкл) } Повторить 2 раза
5. Повторить п.3
6. Центрифугирование, 5 мин сушки
7. Добавить 50 мкл элюирующего буфера, предварительно сменив нижнюю пробирку
8. Повторить п.3



Колонка для хроматографии

5 День. Новая ПЦР для контроля и для продукта. Рестрикция.

Смесь для рестрикции 1	Смесь для рестрикции 2
2 мкл BamHI	2 мкл HindIII
3 мкл буфера	3 мкл буфера
25 мкл ДНК	25 мкл ДНК

6 День. Электрофорез. Лигирование. Приготовление среды для бактерий.

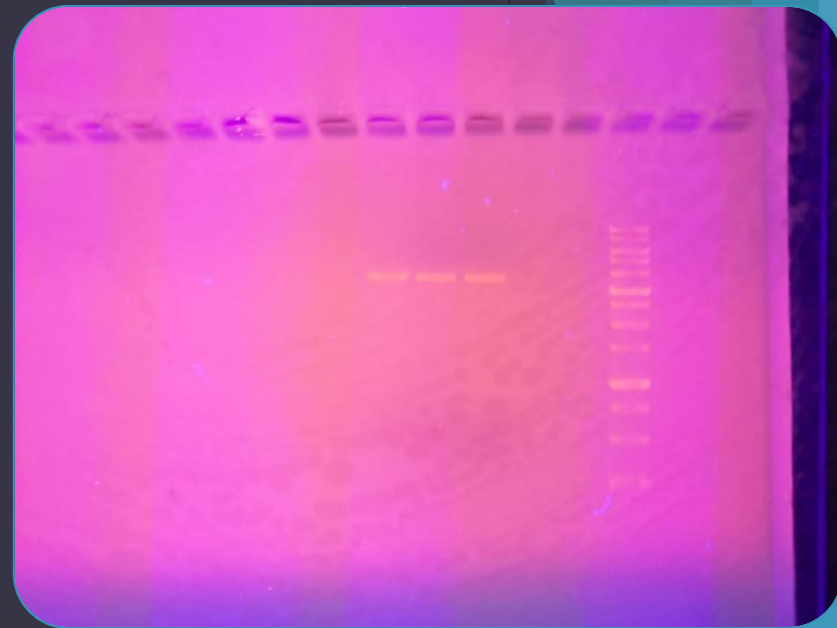
Электрофорез линейризованной плазмиды:

$V = 100 \text{ В}$

$T = 45 \text{ минут}$

$V(\text{ladder}) = 5 \text{ мкл}$

$V(\text{вектор}) = 40 \text{ мкл: } 3 \text{ по } 13 \text{ мкл}$



6 День. Электрофорез. Лигирование. Приготовление среды для бактерий.

Смесь для лигирования:

- Вектор 2 мкл
- Вставка 15 мкл
- Буфер 4 мкл 5x
- Лигаза 1 мкл



6 День. Электрофорез. Лигирование. Приготовление среды для бактерий.

Приготовление среды для культивирования бактерий:

1. Дрожжевой экстракт (1 г)
2. NaCl (2 г)
3. Пептон (2 г)
4. Агар (3 г)
5. Ампицилин(антибиотик)



7 День. Трансформация.

1. Разморозка бактериальных клеток
2. Добавить 20 мкл лигазной смеси
3. 1 мкл контрольной плазмиды
4. Heat-shock 3 минуты 42 °С в термостате
5. 10 минут на льду
6. 300 мкл среды LB
7. 45 минут 37 °С
8. Посев



Жидкий азот

ВЫВОДЫ:

Гипотеза подтвердилась - эукариотический белок-кодирующий ген экспрессируется в прокариотическом организме, и бактерия с внедренным в РНК клонированным до этого геном флуоресцентного белка кораллового полипа действительно флуоресцирует.

Спасибо за внимание!