

## §4 Заключительный этап: командная часть

Наработка плазмидной ДНК в бактериальных клетках с последующим рестриктивным анализом и виртуальным клонированием в плазмиду с заданными свойствами

### Материалы и оборудование.

#### Оборудование:

| Оборудование            |                  | Количество | Комментарии   |
|-------------------------|------------------|------------|---|
| Автоклав                |                  | 1          |   |
| Центрифуга              |                  | 1          | 4500rpm-14,3k rpm, для микропробирок типа Эппендорф   |
| Центрифуга              |                  | 2          | 4500 rpm 8 гнезд для фальконов или нунков объемом 50мл, 16 гнезд для фальконов 15мл   |
| Горелки                 |                  | 8          | 1 в каждый ламинар при наличии требований лабораторрии работы с культурой бактерий только в ламинаре. При наличии возможности работать на лабораторном столе в пламени горелки - 1 или 2 на команду |
| Холодильник             | +4               | 1          | Хранение сред и чашек петри с культурой бактерий  |
|                         | -20              | 1          | Хранение плазмид  |
|                         | -70              | 1          | Хранение компетентных клеток и реактивов для рестрикционного анализа и электрофореза  |
| Термостат статичный     |                  | 1          | Выращивание бактерий на чашках Петри  |
| Термостат шейкер        |                  | 1          | Платформы: 16 фальконов по 15мл, 8 колб по 0,5л. Вместо него может использоваться статичный термостат с шейкером без подогрева.   |
| Термостат твердотельный |                  | 2          | Для пробирок типа эппендорф на 1,5-2 мл   |
| Ледогенератор           |                  | 1          | Мелкий лед или снег   |
| Водяная баня            |                  | 2          | Прогрев сред  |
| Автоматические дозаторы | 1-10мкл          | 9          |   |
|                         | 2-200 или 10-100 | 9          |   |

|                                    |          |   |  |
|------------------------------------|----------|---|--|
|                                    | мкл      |   |  |
|                                    | 100-1000 | 9 |  |
| Дистилятор                         |          | 1 |  |
| Деионизатор                        |          | 1 |  |
| Весы                               |          | 8 | Точность до 0,01г  |
| Вортекс                            |          | 2 |  |
| Ламинар                            |          | 8 | При наличии возможности работать с культурами бактерий на столе в пламени горелки не нужен |
| Таймер                             |          | 8 | Можно использовать телефон   |
| Пинцет                             |          | 8 | Средние без зубца  |
| Плотики для пробирок типа эпендорф |          | 8 | Для водяной бани и льда  |
| Спектрофотометр Nanodrop           |          | 1 |  |
| Рамка для заливки агарозного геля  |          | 1 | Не менее 24 лунок, подходящая под ванну.   |
| Ванна для электрофореза            |          | 1 |  |
| Источник тока для электрофореза    |          | 1 |  |
| Трансляминатор и камера            |          | 1 | Для съемки геля  |
| Компьютеры                         |          | 8 | Доступ к сети Интернет, офис, программа Snapgene, комплект плазмидных карт                 |

### Расходные материалы:

| Расходник                            | Кол во |
|--------------------------------------|--------|
| Чашки петри пластиковые, 10см        | 50шт   |
| Насадки для автоматического дозатора |        |
| 1250 в штативе                       | 10     |
| 200 в штативе                        | 10     |
| 20 в штативе                         | 10     |

|  |          |
|--|----------|
| зубочистки   | 100      |
| Колбы, 500мл                                       | 20       |
| Штативы для фальконов и эппендорфов                | 27       |
| Фальконы 15мл                                      | 100      |
| Фальконы 50мл                                      | 100      |
| Эппендорфы (конические 1,5-1,8)                    | 1000     |
| Перчатки   |          |
| xs   | 2        |
| s  | 3        |
| нитриловые   | 1        |
| m  | 2        |
| l  | 1        |
| Ложки пластиковые                                  |          |
| большие  | 10       |
| чайные   | 10       |
| Банки стеклянные скрышками (автоклавируемые) 500мл | 10       |
| Серологические пипетки                             |          |
| 10мл   | 50       |
| 25мл   | 50       |
| Парафильм  | 1 рулон  |
| Мед. шапочки одноразовые                           | 2 пачки  |
| Бахилы   | 20 пачек |
| Пульвезлизатор                                     | 10       |
| Термос 3-5л  | 1        |
| Бактериологическая петля                           | 10       |
| Шпатель Дригальского, стекло                       | 16       |

|  |          |
|--|----------|
| Дозатор на пипетки                     | 9        |
| Маркеры                                | 12       |
| Очки                                   | 40       |
| Халаты                                 | 40       |
| Зажигалка                              | 8        |
| Ножницы для парафильма                 | 2        |
| Мерный цилиндр                         | 16       |
| Полотенца                              | 6 пачек  |
| Бюкс                                   | 12       |
| Губка для мытья посуды                 | 1        |
| Ершик                                  | 1        |
| Фольга                                 | 2 рулона |
| Банка для автоклавирования эппендорфов | 16       |
| Контейнер для сухого льда (без чехла)  | 1        |
| Емкости для льда                       | 8        |

### Реактивы:

| Реактив                                       | Условия хранения | Количество              |
|---|------------------|-------------------------|
| Жидкий азот                                   | Дьюар 25С        |                         |
| Лед   | Ледогенератор    |                         |
| Chloroquine                                   | -20              | 1 пробирка              |
| Дистиллированная, ультрадистиллированная вода | 25               | -                       |
| Плазмиды                                      | -20              | зависит от концентрации |
| CaCl <sub>2</sub>                             | 4                | 1 фалькон               |
| HBS   | 4                | 1 фалькон               |
| Набор для выделения плазмидной ДНК MidiPrep   |                  | 1                       |

|                                   |     |             |
|-----------------------------------|-----|-------------|
| Бакто-тритон                      | 25  | 100г        |
| Дрожжевой экстракт                | 25  | 100г        |
| NaCl                              | 25  | 200г        |
| Спирт 96%                         | 25  | 5 л         |
| Агар                              | 25  | 100г        |
| Средство для мытья лаб посуды, 7х | 25  | 1л          |
| Ампицилин                         | -20 |             |
| Компетентные клетки Top 10        | -80 | 10 пробирок |
| TFB1                              | 25  | 1 банка     |
| TFB2                              | 25  | 1 банка     |
| Изопропанол                       | 25  | 100 мл      |
| 5M NaCl                           | 25  | 10 мл       |
| Сухой лед                         |     |             |

### Требования к помещению для проведения командной задачи:

1. Наличие всего перечисленного выше оборудования, возможность обеспечить к нему равный доступ для всех команд.
2. Возможность организовать для каждой команды отдельное рабочее место в ламинаре либо на лабораторном столе (если правила лаборатории позволяют работу с бактериальными культурами в пламени горелки)
3. Рабочее место каждой команды должно включать:
  - a. Свободное рабочее пространство
  - b. Набор автоматических дозаторов (по одному каждого типа) на подставке
  - c. Набор наконечников для дозаторов (по 1 коробке каждого типа)
  - d. Спиртовую горелку
  - e. Бюкс со спиртом
  - f. Подставки для пробирок -3
  - g. Пульвезизатор с этанолом 70%
  - h. Стерильные инструменты и емкости, в соответствии с необходимым для текущего дня работы
  - i. Аликвоты реактивов в соответствии с необходимым для текущего дня работы.
  - j. На последнем этапе работы все лабораторное оборудование должно быть убрано, на рабочем месте остается только компьютер.

4. Помещение должно достаточно проветриваться для нахождения в нем всех участников
5. Возможность стерилизации помещения ультрафиолетом (ультрафиолетовые лампы) до начала и после окончания работы
6. Возможность проведения в помещении кратких лекций по ходу работы – доска или флип-чарт с маркерами, экран с проектором либо телевизионный экран с возможностью подключения компьютера.
7. Может быть полезно иметь отдельную комнату, используемую в ходе первой части работы (см. методику) как помещение, где можно работать с компьютером/ делать записи вне лаборатории.

**Инженерный набор для финального соревнования команд:**

| Часть 1   |  |
|---|--|
| Ламинар   |  |
| Горелка   |  |
| Набор автоматических дозаторов на подставке       | По 1 дозатору каждого объема (см. список оборудования) |
| Набор наконечников для дозаторов                  | По 1 коробке для каждого объема                        |
| Бюкс со спиртом                                   | 1  |
| Подставки для пробирок                            | 3  |
| Пульверизатор с этанолом 70%                      | 1  |
| День 1  |  |
| Чашки Петри, залитые твердой средой               | 3  |
| Эппендорфы чистые                                 | 10   |
| Эппендорф с компетентными бактериальными клетками | 1  |
| Емкость для льда                                  | 1  |
| Лед   |  |
| Плотики для пробирок типа эппендорф               | 1  |
| Твердотельный термостат                           | 1  |
| Среда LB, без антибиотика                         | 1мл  |
| Центрифуга для пробирок типа эппендорф            | 1  |
| Шпатель Дригальского                              | 2  |

|  |        |
|--|--------|
| Маркер   | 1      |
| Водяная баня                                       | 1      |
| День2  |        |
| Фальконы 15мл                                      | 5      |
| Среда LB, без антибиотика                          | 200мл  |
| Ампицилин, разведенный                             | 150мкл |
| Зубочистки (стерилизованные)                       | 10     |
| Маркер   | 1      |
| Колбы стеклянные 500мл                             | 2      |
| Термостат с шейкером                               | 1      |
| День 3   |        |
| Центрифуга охлаждаемая для фальконов на 15 и 50 мл | 1      |
| Фальконы 15 мл                                     | 10     |
| Набор MidiPrep:                                    |        |
| Ресуспендирующий раствор                           | 5мл    |
| Лизирующий раствор                                 | 5мл    |
| Нейтрализующий раствор                             | 8мл    |
| Силиконовые колонки                                | 1      |
| Промывочный раствор                                | 12мл   |
| Элюирующий раствор                                 | 1мл    |
| Фальконы 50мл                                      | 5      |
| Твердотельный термостат                            | 1      |
| Раствор NaCl 5M                                    | 10мл   |
| Этанол 96%   | 20мл   |
| Центрифуга для пробирок типа эппендорф             | 1      |

|  |       |
|--|-------|
| Деионизированная вода                                      | 10мл  |
| Холодильник -20 °С   | 1     |
| Маркер   | 1     |
| День 4   |       |
| Пробирка с полученной плазмидой                            | 1     |
| Деионизированная вода                                      | 10мл  |
| Спектрофотометр Nanodrop                                   | 1     |
| Буфер для рестриктаз                                       | 50мкл |
| Рестриктаза BAM H1   | 2мкл  |
| Рестриктаза SAL1   | 2мкл  |
| Пробирки типа эппендорф чистые                             | 10    |
| Маркер   | 1     |
| Залитая рамка с агарозным гелем, добавлен бромистый этидий | 1     |
| Краска для электрофореза                                   | 10мкл |
| Маркер для электрофореза                                   | 10мкл |
| Электрофорезная камера                                     | 1     |
| Источник тока для электрофореза                            | 1     |
| Буфер для электрофореза                                    | 1     |
| Трансляминатор   | 1     |
| Компьютер, загружен набор плазмидных карт                  | 1     |
| Часть2   |       |
| Компьютер, список необходимых программ см. оборудование    | 2     |

**Регламент решения командной задачи:**

- Работа проводится в командах по 3-5 человек.



- У каждой команды есть закреплённое за ней рабочее место, набор оборудования и реактивов, а так же максимальное количество расходных материалов, которые команда может использовать.
- Все сложное уникальное оборудование – центрифуги, спектрофотометр, транслюминатор, а так же установку для электрофореза, термостаты, команды используют совместно. Под контролем проводящих задачу.
- Команды работают в соответствии с выданной каждой команде методикой. Распечатка методики так же является лабораторным журналом команды, необходимо отмечать выполненные пункты и записывать расчётные и полученные в ходе измерений значения
- Каждый этап работы команды оценивается отдельно ( см. Оценка командной задачи). При провале на каком-то из этапов, команда не получает баллы за данный этап, но может продолжить работать, используя соответствующие материалы организаторов.
- Команды каждый день начинают и заканчивают работу одновременно.

#### Оценка командной задачи:

|   |   |    |    |
|---|---|----|----|
| Перетрансформация компетентных клеток и посадка на чашки Петри                  | Рост колонний в первой чашке Петри, отсутствие зароста  | 20 | 40 |
|   | Рост колонний во второй чашке Петри, отсутствие зароста | 20 |    |
| Пересев на малый и большой объем  | Рост бактерий в малом объеме                            | 10 | 20 |
|   | Рост бактерий в большом объеме                          | 10 |    |
| Выделение плазмиды и измерение концентрации и качество выделения (по нанодропу) | Концентрация плазмиды не менее 20 мкг/мкл               | 20 | 60 |
|   | 280 (наличие белков в продукте) выше 1                  | 20 |    |
|   | 230 (наличие олигосахаридов в продукте) выше 1          | 20 |    |
| Рестрикционный анализ   | Расчет  | 25 | 40 |
|   | Рестрикция (выполнение реакции)                         | 15 |    |
| Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК в агарозном геле                  | Расчет  | 25 | 40 |
|   | Форез (приготовление смеси и успешный электрофорез)     | 15 |    |
| Определение плазмиды  | Плаزمида определена верно с первой попытки              | 30 | 30 |

|  |   |    |    |
|--|---|----|----|
|  | Плазмида определена верно со второй попытки   | 15 |    |
|  | Плазмида определена с третьей и более попытки   | 0  |    |
| Выбор вектора с заданными свойствами для переноса гена целевого белка в клетки млекопитающих путем трансфекции   | Выбран вектор, который экспрессируется в клетках млекопитающих  | 5  | 50 |
|  | Вектор содержит сайты рестриктаз, выбранных командой  | 10 |    |
|  | Использование выбранных рестриктаз позволяет корректно вырезать ген целевого белка из исходной плазмиды | 5  |    |
|  | Использование выбранных рестриктаз позволяет вставить ген целевого белка корректно                      | 15 |    |
|  | После сборки вектор позволяет оценить эффективность трансфекции   | 15 |    |
| Выбор набора векторов с заданными свойствами для переноса гена целевого белка в клетки путем инфекции (более сложный вариант решения, выполняется вместо предыдущего пункта) | Выбран вектор, который экспрессируется в клетках млекопитающих  | 5  | 70 |
|  | Вектор содержит сайты рестриктаз, выбранных командой  | 10 |    |
|  | Использование выбранных рестриктаз позволяет корректно вырезать ген целевого белка из исходной плазмиды | 5  |    |
|  | Использование выбранных рестриктаз позволяет вставить ген целевого белка корректно                      | 15 |    |
|  | После сборки вектор позволяет оценить эффективность инфекции  | 15 |    |
|  | Правильно выбран один из компонентов для сборки лентивирусных частиц в паковочной клеточной культуре    | 10 |    |
|  | Правильно выбраны все компоненты для сборки лентивирусных частиц в паковочной клеточной культуре        | 10 |    |

**Методика работы:****Часть 1. Нарботка плазмидной ДНК в бактериальных клетках с последующим рестриктным анализом****День первый****Трансформация бактерий целевой плазмидой:**

- Заранее прогреть чашки в термостате +37°C
- Эппендорф с клетками разморозить на льду 15 минут.
- Добавить плазмиду к клеткам. На 100 мкл клеток 5 мкл плазмиды.
- Инкубируем смесь на льду 15 минут.
- Инкубируем смесь в термостате 42°C, не больше 1 минуты!
- Инкубируем смесь на льду, 5 минут.
- Добавить 800 мкл среды LB, без антибиотика.
- Инкубируем смесь в термостате, 37°C, 60 минут
- Концентрируем клетки центрифугированием, 3000 rpm, 3 минуты
- Аккуратно сливаем супернатант и оставляем на дне примерно 100 мкл раствора.
- Ресуспендируем клеточный осадок и сажаем на чашку Петри, втирая стеклянным шпателем до полного высыхания поверхности среды.
- Подписываем каждую чашку петри: название или номер команды, дата, название плазмиды
- Ставим чашки в термостат 37°C на ночь.

**День второй****Скалывание бактерий на малый объем**

- Берем 3 фалькона на 15 мл и добавляем по 2 мл бактериальной среды LB.
- В каждую пробирку с LB средой добавляем антибиотик ампициллин в соотношении 1 мкл к 1000 мкл среды.
- Берем чашку, отбираем 3 единичные колонии бактерий. Обводим их маркером и присваиваем им порядковые номера.
- Открываем чашку Петри и держим ее в одной руке. Второй рукой берем носик для пипетки и аккуратно касаемся им колонии бактерий.
- Носик с бактериями опускаем в пробирку и неплотно закрываем крышку. Закрываем чашки Петри.

- Процедуру скалывания выполняем для двух других колоний бактерий.
- Пробирки ставим в термостат с шейкером на 37<sup>0</sup>С до вечера.

### Переливание жидкой бактериальной культуры на большой объем

- Берем 2 стеклянные колбы на 500 мл и наливаем в них по 50 мл бактериальной среды LB.
- В LB среду добавляем антибиотик ампициллин в соотношении 1 мкл к 1000 мкл среды.
- Отбираем 2 наиболее удачные пробирки (утренняя культура) с явным мутным осадком внутри.
- Берем пробирку с утренней бактериальной культурой и выливаем всё ее содержимое в колбу.
- Эту же процедуру выполняем для второй пробирки.
- Подписываем колбы: название или номер команды, дата, название плазмиды
- Колбы ставим на ночь в термостат с шейкером на 37<sup>0</sup>С.

### День третий

#### Выделение плазмидной ДНК набором MidiPrep

Все центрифугирования проводят в охлаждаемой центрифуге для 15 и 50 мл фальконов при +4<sup>0</sup>С на скорости 4500-5000 об/мин.

#### Перед началом работы:

- Охладите «Нейтрализующий раствор» на льду;
- Нагрейте «Элюирующий раствор» до +50<sup>0</sup>С.
- Перенесите по 15 мл бактериальной культуры в два 15 мл фалькона, осадите клетки центрифугированием 4500 грм в течение 10 минут. Полностью удалите супернатант.
- Перенесите остаток (по 10 мл) бактериальной суспензии в два 15 мл фалькона, осадите клетки центрифугированием 4500 грм в течение 10 минут. Полностью удалите супернатант.
- Центрифугируйте пробирку с осадком 30 сек, 4500 грм. Удалите остатки супернатанта пипеткой.
- Добавьте по 2 мл «Ресуспендирующего раствора» в оба фалькона и тщательно ресуспендируйте.
- Добавьте по 2 мл «Лизирующего раствора» в оба фалькона. Осторожно перемешайте содержимое пробирки, переворачивая пробирку до тех пор, пока лизат не станет прозрачным, но не более 4 минут (для предотвращения денатурации плазмидной ДНК). **Не используйте вортекс: быстрое перемешивание приводит к разрыву бактериальной хромосомы и загрязнению препарата плазмиды геномной ДНК.**
- Добавьте по 3 мл в оба фалькона предварительно охлажденного «Нейтрализующего раствора», перемешайте содержимое, переворачивая пробирку до образования творожистой взвеси. Инкубируйте 10 минут во льду или при +4<sup>0</sup>С. **Не используйте вортекс.**
- Центрифугируйте 15 мл фальконы в течение 30 мин, 4500 грм. Перенесите осветленный супернатант (верхняя часть) в новую 15 мл пробирку. Постарайтесь отбирать только прозрачную фазу.
- Центрифугируйте пробирку с супернатантом в течении 10 минут, 4500 грм.

- Возьмите новый 50 мл фалькон и поместите в него спин-колонку.
- Перенесите 7 мл осветленного бактериального лизата из первого 15 мл фалькона в колонку. Центрифугируйте колонку 1 минуту.

**В процессе центрифугирования плазмидная ДНК сорбируется на силиконовом носителе колонки.**

- Перенесите 7 мл осветленного бактериального лизата из второго 15 мл фалькона в колонку.
- Удалите фильтрат (нижняя часть) из собирательной 50 мл пробирки.
- Добавьте 5 мл «Промывочного раствора» в колонку. Центрифугируйте колонку 30 сек. Фильтрат слить.
- Добавьте 5 мл «Промывочного раствора» в колонку. Центрифугируйте колонку от 5 до 15 мин, до полного осушения колонки. Фильтрат слить.
- Поместите колонку в новую 50 мл пробирку.
- Нанесите на мембрану 500-900 мкл предварительно нагретого до 50°C «Элюирующего раствора». Инкубируйте 1 минуту при комнатной температуре.
- Центрифугируйте колонку 5 минут, 4500 rpm для сбора очищенной ДНК. Очищенная ДНК пригодна для любых генно-инженерных приложений.
- Добавьте 1/10 от получившегося объема 5М NaCl и 2 объема 96% этанола.
- Перенесите полученную смесь в эппендорфы и подпишите их.
- Центрифугируйте эппендорфы 10 минут, 10-13 rpm.
- Аккуратно отберите супернатант и добавьте 70% этанол.
- Центрифугируйте 5 минут, 10-13 rpm.
- Аккуратно отберите пипеткой супернатант и высушите днк на воздухе. Хорошо высушенная ДНК становится прозрачной.
- Разведите полученный осадок в 50 мкл деионизированной воды.
- Прогреть ДНК 5 минут на 45°C.
- Уберите в холодильник на -20°C.

## День четвертый

### Измерение концентрации плазмидной ДНК на спектрофотометре

- Включаем спектрофотометр и промываем пьедестал несколько раз водой.
- Делаем обнуление спектрофотометра на деионизированную воду.
- Берем пробирку с полученной плазмидной ДНК и отбираем из нее 2 мкл.
- Наносим 2 мкл ДНК на пьедестал и делаем измерение. (концентрация, 260/280, 260/230)
- Процедуру, указанную в пункте 4 повторить еще 2 раза.
- Полученные значения усредняются

### Рестрикционный анализ полученной плазмиды

Рассчитываем количество рестрикционной смеси

| Плазмиды | Конц. плазмидной ДНК в | V, ДНК (мкл) | Буфер для рестриктаз | Количество | V H <sub>2</sub> O (мкл) | Фермент | V (мкл) | Фермент | V (мкл) | Общий объем смеси |
|----------|------------------------|--------------|----------------------|------------|--------------------------|---------|---------|---------|---------|-------------------|
|          |                        |              |                      |            |                          |         |         |         |         |                   |

|   | водном<br>растворе |  | (название и<br>кратность) | (мкл) |  |           |   |      |   |        |
|---|--------------------|--|---------------------------|-------|--|-----------|---|------|---|--------|
| 1 | 5<br>мкг/мкл       |  |                           |       |  | ВAM<br>Н1 | 2 | SAL1 | 2 | 50 мкл |

#### Условия:

1. Количество ферментов добавляется не больше 10 % от объема реакции.
2. При расчете количества буфера учитывается его кратность.
3. Количество мкл плазмиды на одну реакцию рассчитывается исходя из ее концентрации.
4. Обе рестриктазы должны хорошо работать в одном буфере.

- Берем эппендорф и добавляем в него рассчитанные количества веществ. Рестриктазы добавляются в последнюю очередь и содержатся только во льду!
- Слегка перемешиваем содержимое пробирки и осаживаем капли на стенках.
- Подписываем и ставим эппендорф в термостат на 37<sup>0</sup>С (1,5 или 2 часа).

#### Электрофорез

- Собрать рамку для заливки геля.
- Приготовить 120 мл 1% агарозного геля, растворить агарозу путем нагревания. Дать немного остыть.
- Добавить 12 мкл бромистого этидия и перемешать
- Залить гель в рамку, вставить гребенку и оставить застывать его на 15 -20 минут.
- За время застывания геля подготовить пробы для анализа. Взять 20 мкл пробы и смешать с краской (учитываем кратность разведения краски).
- Взять 10 мкл маркера и смешать его с краской. (учитываем кратность разведения краски).
- Разобрать рамку, и не вытаскивая гребенку поместить в электрофорезную камеру.
- Осторожно вытащить гребенку из геля не вынимая его из буфера.
- Нанести пипеткой пробы в образовавшиеся после удаления гребенки карманы.
- Внимательно следим за расположением проб относительно "+". Отрицательно заряженная ДНК побежит в эту сторону.
- Накрываем крышкой и выставляем напряжение в 120 В (1 час).
- Просматриваем полученные результаты рестрикции при помощи трансиллюминатора.

Сравниваем полученные результаты с картами плазмид, загруженными в ваши компьютеры и определяем, с какой плазмидой вы работали.

#### Часть 2. Перенос гена целевого белка в другой вектор.

## **День пятый.**

На предыдущих этапах работы вы с помощью рестрикционного анализа выяснили, с какой плазмидой имели дело. Эта плазида является частью аденовирусной векторной системы. Данная плазида содержит ген родопсинового канала, применяемый для исследований в области оптогенетики.

Аденовирусный вектор обладает рядом существенных недостатков, например, канцерогенностью, делающих его непригодным для длительных прижизненных исследований на животных.

Следовательно, нужно перенести ген родопсинового канала в вектор, более подходящий для работы с лабораторными животными и обладающий заданными характеристиками. Вам предлагается использовать две возможные схемы доставки в эукариотическую клетку: трансфекция и лентивирусный вектор. Необходимо подобрать нужные ферменты для рестрикции и нужный вектор из каталогов компаний, занимающихся их производством. Команда должна поставить себя на место исследовательской группы, столкнувшейся с этой задачей в реальности, и правильно выбрать реактивы.

Цель участников:

**Разработать схему переноса гена целевого белка в вектор с заданными характеристиками.**

Решение задачи принимается в виде заполненной формы для заказа плазмиды/плазмид и ферментов рестриктаз с указанием их каталожного номера от производителя.

(Форма будет загружена в ваши компьютеры).

### **Ход работы:**

На ваши компьютеры будет загружена программа Snapgene и файл плазмиды, с которой вы работали на предыдущем этапе.

Нужно изучить плазмидную карту и выбрать рестриктазы с единичными сайтами рестрикции в этой плазмиде, которые подходят для того, чтобы вырезать целевой ген.

Конечный вектор должен обладать следующими характеристиками:

1. Экспрессироваться в млекопитающих
2. Давать вам возможность оценить эффективность внедрения вектора

Вы имеете право выбрать стратегию переноса. Трансфекция более простая в исполнении, но обладает меньшей эффективностью переноса и более стрессовая для клеток, чем инфекция лентивирусным вектором. Однако, инфекция сложнее и потребует от вас подобрать не одну, а несколько плазмид. Кроме того, инфекция требует предварительной сборки вирусных частиц в паковочной клеточной линии.

Вам предлагается воспользоваться для поиска плазмид следующей базой данных:  
<https://www.addgene.org/vector-database/>

Для поиска каталожного номера рестриктаз вы можете использовать следующие каталоги:

<https://www.neb.com/products/restriction-endonucleases>

<https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-restriction-modifying-enzymes/restriction-enzymes-thermo-scientific.html>

<https://worldwide.promega.com>

[http://www.clontech.com/UY/Products/Molecular\\_Biology\\_Tools/Restriction\\_Enzymes/Restriction\\_Enzyme\\_Overview](http://www.clontech.com/UY/Products/Molecular_Biology_Tools/Restriction_Enzymes/Restriction_Enzyme_Overview)

У вас есть только одна возможность отправить заказ на рестриктазы и вектор/векторы (в случае инфекции). Если заказанные вами компоненты позволят вырезать целевой ген из вашей плазмиды, переклонировать его в новый вектор, и вектор будет корректно экспрессироваться в клетках млекопитающих, вы решили задачу верно.

Ответы:

ответами на практическую часть задачи являлись выращенные бактериальные культуры:  
День 1: рост бактерий на чашках Петри



День 2:



Рост

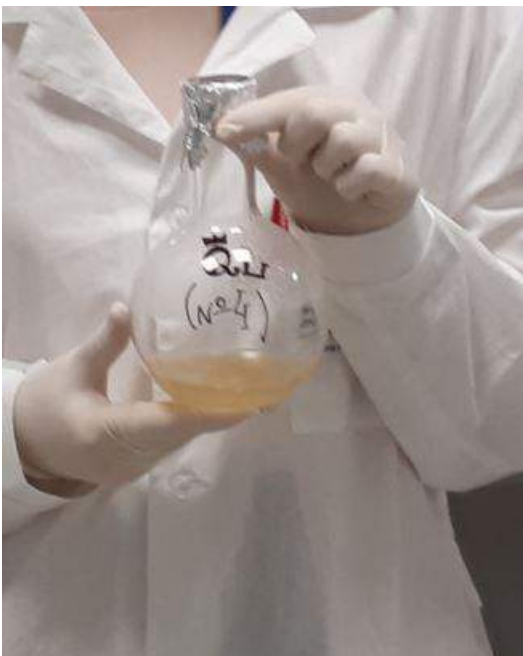
в

малом

объеме



Рост бактерий в большом объеме:



День 3. Концентрация выделенной плазмиды и ее чистота по показаниям спектрофотометра:

|  |
|--|
| Концентрация плазмиды не менее 20 мкг/мкл      |
| 280 (наличие белков в продукте) выше 1         |
| 230 (наличие олигосахаридов в продукте) выше 1 |

День 4.

Рестрикционный анализ:

Ответ зависел от концентрации плазмидной ДНК в водном растворе, полученном командой. Пример для концентрации 774,5 мкг/мкл

| Плазмиды | Конц. плазмидной ДНК в водном растворе | V, ДНК (мкл) | Буфер для рестриктаз (название и кратность) | Количество (мкл) | V H <sub>2</sub> O (мкл) | Фермент | V (мкл) | Фермент | V (мкл) | Общий объем смеси |
|----------|--|--------------|---|------------------|--------------------------|---------|---------|---------|---------|-------------------|
| 1        | 5 мкг/мкл                              | 6,5          | 10  | 5                | 34,5                     | ВАМН1   | 2       | SAL1    | 2       | 50 мкл            |

Электрофорез и результаты определения плазмиды.

№ плазмиды = 3

День 5.

Задача 5 дня имела большую вариативность решения, т.к. участникам предлагалось работать с реально существующими базами векторов и реактивов. Участникам необходимо было заполнить и выслать форму «заказ реактивов». Пример ответа, позволяющего набрать полный балл. Заказ реактивов для переноса гена целевого белка в клетки путем инфекции:

|   |                   |
|---|-------------------|
| Рестриктаза номер 1. Фирма-производитель  | ThermoFisher      |
| Рестриктаза номер 1. Каталожный номер   | FD0054            |
| Рестриктаза номер 2. Фирма-производитель  | ThermoFisher      |
| Рестриктаза номер 2. Каталожный номер   | FD0274            |
| Заказываемый вектор номер 1.<br>Фирма-производитель   | Addgene           |
| Заказываемый вектор номер 1. Каталожный номер   | 39481             |
| Заказываемый вектор номер 2<br>(оболочечный) Фирма-производитель (если вы выбрали <u>лентивирусную инфекцию</u> ) | Addgene           |
| Заказываемый вектор номер 2<br>(оболочечный). Каталожный номер (если вы выбрали <u>лентивирусную инфекцию</u> )   | 12259             |
| Заказываемый вектор номер 3 (пакующий) .<br>Фирма-производитель (если вы выбрали <u>лентивирусную инфекцию</u> )  | Addgene           |
| Заказываемый вектор номер 3 (пакующий) .<br>Каталожный номер (если вы выбрали <u>лентивирусную инфекцию</u> )     | 12260             |
| Название и номер команды  | Псевдоспектива №1 |