

Раздел малого практикума по биохимии «Задачи по генной инженерии».

Авторы курса: доцент Н.Н. Киреева, ст.н.с., к.б.н. Д.В. Серебряная

Программа курса

Задача 1. Получение и характеристика препарата плазмидной ДНК pET23a+/rhcTnI. Выделение и очистка плазмидной ДНК из «ночной» культуры бактерий. Определение концентрации ДНК полученной плазмиды. Определение концентрации и чистоты полученного препарата плазмиды методом горизонтального электрофореза в агарозном геле. Электрофоретические методы анализа ДНК. Электрофорез в агарозном геле.

Задача 2. Анализ плазмиды ret23a+/rhcTnI с помощью рестрикционного анализа и полимеразной цепной реакции. Проведение рестрикционного анализа выделенной плазмиды. Эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы). Анализ плазмиды pET23a+/rhcTnI методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Полимеразная цепная реакция. Состав компонентов реакционной смеси ПЦР. Трансформация бактерий штамма Rosetta 2(DE3)pLysS полученной плазмидой pET23a+/rhcTnI. Трансформация *E. coli*.

Задача 3. Экспрессия рекомбинантного тропонина I сердца человека. Структура лактозного оперона. Экспрессия рекомбинантных белков в рЕТ-системе. Размножение *E. coli* в питательных средах. Питательные среды для роста *E. coli*. Факторы, оказывающие влияние на рост бактерий.

Задача 4. Анализ экспрессии рекомбинантного тропонина I методом электрофореза в полиакриламидном геле. Особенности синтеза рекомбинантных белков в бактериальной системе экспрессии. Определение локализации белка в бактериальной клетке после экспрессии. Выбор подходящих вектора и штамма бактерий для экспрессии растворимого белка. Идентификация и очистка рекомбинантного белка.

Список рекомендуемой литературы:

1. Н.Н. Киреева, Д.В. Серебряная. Методы генной инженерии в биохимии. Учебно-методическое пособие. Москва, Биофак МГУ им. М.В.Ломоносова. 2017.
2. Серебряная Д.В., Розов Ф.Н. Практическая генная инженерия. Учебно-методическое пособие. Москва, «Цифровичок», 2013.
3. pET System Manual, Novagen, 2003.
4. Plasmid DNA, QIAGEN protocol, 2001.
5. Sambrook J. & Russel D.W. Molecular cloning. A laboratory manual, 2001.
6. Watson J.D., et al. Molecular biology of the gene. 5th ed. "Pearson", 2004.

Проведение и анализ экспрессии целевого белка

