

ПРОГРАММА
6-й практической школы
«ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ
РАЗНООБРАЗИЯ СООБЩЕСТВ ПОЧВЕННЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ»

Центр коллективного пользования
«Молекулярные технологии» ИБВВ РАН
(10 – 24 октября 2011 г.)

I. ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ

10-12 октября

1. Введение в генную инженерию. Ферменты, используемые в генной инженерии. Принципы клонирования ДНК с использованием плазмидных векторов. Использование бактерий для генно-инженерных исследований.

2. Теоретические основы полимеразной цепной реакции. Необходимость амплификации индивидуальных фрагментов ДНК для химического анализа. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) как один из способов амплификации специфических фрагментов *in vitro*. Принципы метода ПЦР.

3. Теория клонирования генов. Задачи, требующие клонирования фрагментов ДНК. Примеры гетерогенности продуктов ПЦР, обусловленной аллельным полиморфизмом и гетерозиготностью, требующих последующего клонирования. Лигирование ПЦР-продуктов в плазмидные векторы. Клонирование генов в клетках *E.coli*. Прямая селекция клонов, содержащих плазмиду со вставкой ПЦР-продукта.

4. Использование электрофореза для разделения продуктов ПЦР.

II. ПРАКТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ

13 октября (чтв)

1. Общая схема основных этапов практической работы по изучению генетического разнообразия сообществ почвенных водорослей.

2. Особенности пробоотбора почвенных водорослей. Ознакомление с природными образцами и монокультурами водорослей.

3. Приготовление растворов для различных этапов работы (выделение ДНК, ПЦР).

4. Автоклавирование посуды (чашек Петри, колб, одноразового пластика). Рекомендации по обращению с автоматическими пипетками.

14 октября (птн)

1. Выделение тотальной ДНК из монокультур живых водорослей (или модельного объекта – хлореллы); монокультур, фиксированных в 70%-ном спирте и природных фиксированных образцов различными методами – с помощью сорбентов, методом ферментативного лизиса и модификацией последнего с использованием процедуры замораживания-оттаивания. Завершение работы на этапе осаждения ДНК спиртом.

2. Автоклавирование твердых и жидких сред LB.

15 октября (сбт)

1. Продолжение работы по выделению ДНК. Отмывание выделенной накануне тотальной ДНК от солей.

2. Электрофорез ДНК, полученной с использованием различных методов выделения, в агарозном геле. Визуализация ДНК на агарозных гелях, фотографирование гелей, редактирование изображения.

3. Планирование постановки ПЦР на 2 парах группспецифичных праймеров (для зеленых водорослей -Forward ChloroF, Reverse ChloroR; для сине-зеленых водорослей -

СYA106L, СYA781R). Выбор ключевых условий - типа полимеразы, температурно-временного режима, в том числе температуры и времени предварительного нагрева, температуры отжига, времени элонгации, необходимости достройки концов и др., концентрации двухвалентных катионов, а также объема реакционной смеси.

Расчет реакции. Маркировка пробирок. Составление смеси, содержащей общие реакционные компоненты, распределение по пробиркам. Внесение специфических компонентов (в условиях, минимизирующих риск загрязнения). Установка пробирок в термоциклер и выбор нужной программы.

4. Самостоятельная работа по расчетам компонентов ПЦР-смеси.

5. Электрофорез ПЦР-продуктов в агарозном геле. Положительные и отрицательные контроли. Типовые причины отсутствия продукта реакции при решении поставленных задач. Причины возможных ошибок и преодоление возникших затруднений.

6. Пересев культур *E.coli* (TG и XL-1) с чашек Петри (M9) на питательную среду (LB).

16 октября (вск)

1. Экскурсия по Борку: художественный музей, аквариумы ихтиологического корпуса, опытно-экспериментальная база Сунога, музей природы (11-00).

2. Соблюдение стерильности и техники безопасности при работе с лабораторными штаммами микроорганизмов. Подготовка культур *E.coli* (штаммы XL, TG-1) к работе.

3. Ознакомление с этапами практической работы по клонированию.

17-18 октября (пнд, вт)

1. Приготовление растворов для лигирования ПЦР-продуктов в векторы.

2. Пересевы культур *E.coli* с целью синхронизации и селекции типичных колоний *E.coli* (TG и XL-1).

3. Постановка ПЦР и выделение ПЦР-продуктов для последующего лигирования в плазмидный вектор.

4. Посев клеток *E.coli* в жидкую среду LB для ночной культуры.

19 октября (ср)

1. Пересев ночной культуры *E.coli* для трансформации.

2. Лигирование ПЦР-продуктов в плазмидные векторы.

3. Трансформация клеток *E.coli*. Приготовление компетентных клеток. Тепловой шок и собственно трансформация. Посев культуры *E.coli* на агаризованную среду с ампициллином.

20 октября (чтв)

1. Способы отбора рекомбинантных клонов. Селекция по признакам антибиотикорезистентности и утилизации лактозы. Векторы, несущие маркер *lacZ'*, и отбор колоний по цвету на чашках с хромогенным субстратом. Бело-голубой скрининг колоний. Подсчет колоний и определение фенотипа.

2. Посев отобранных клонов в жидкую автоклавированную среду с ампициллином для наращивания биомассы.

3. Выделение плазмидной ДНК.

21-22 октября (птн, сб)

1. Постановка контрольной ПЦР.

2. Подготовка ПЦР-продукта к секвенированию («вареные клоны», пробы для длительного хранения).

23 октября (вск)

Отчет участников школы о результатах проделанной работы.