

Университет Сакена Сейфуллина  
Кафедра "Микробиологии и биотехнологии"

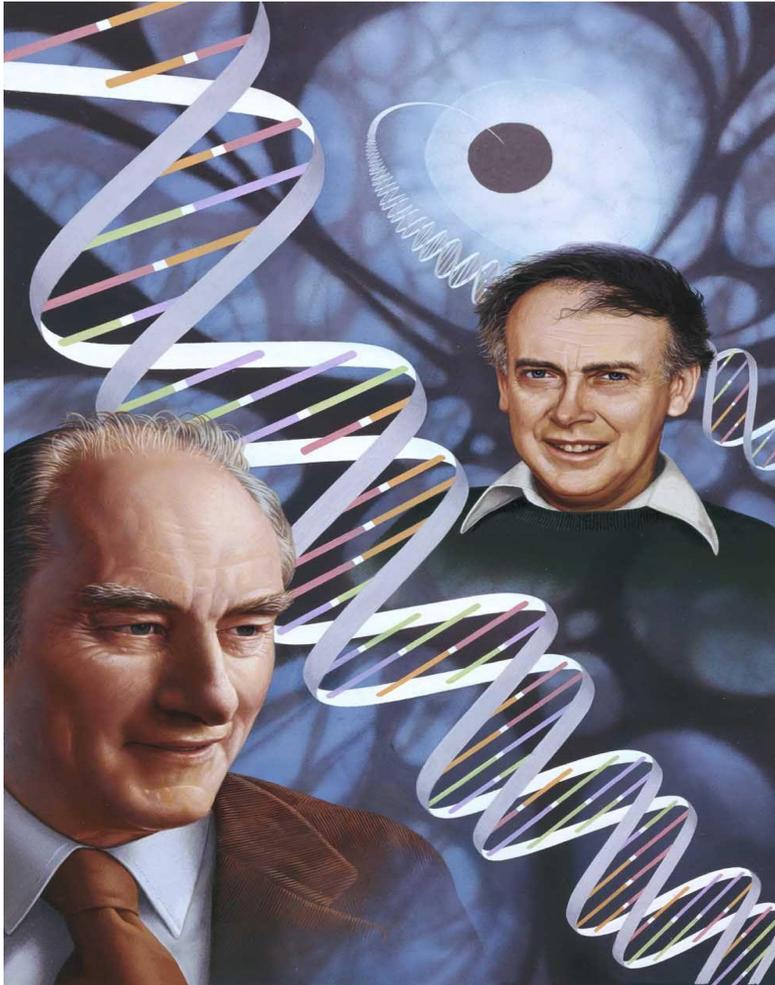
## Тема: Выделение ДНК(вставка/вектор)

Выполнили: магистранты 18-10 группы  
Нурпеисов А, Сымакулова Ж,  
Хасенова Б, Мурат А.

# План:

- 1. ДНК. Основные понятия
- 2. Вставка/Вектор для клонирования ДНК
- 3. Выделение ДНК

# ДНК



## Дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК)

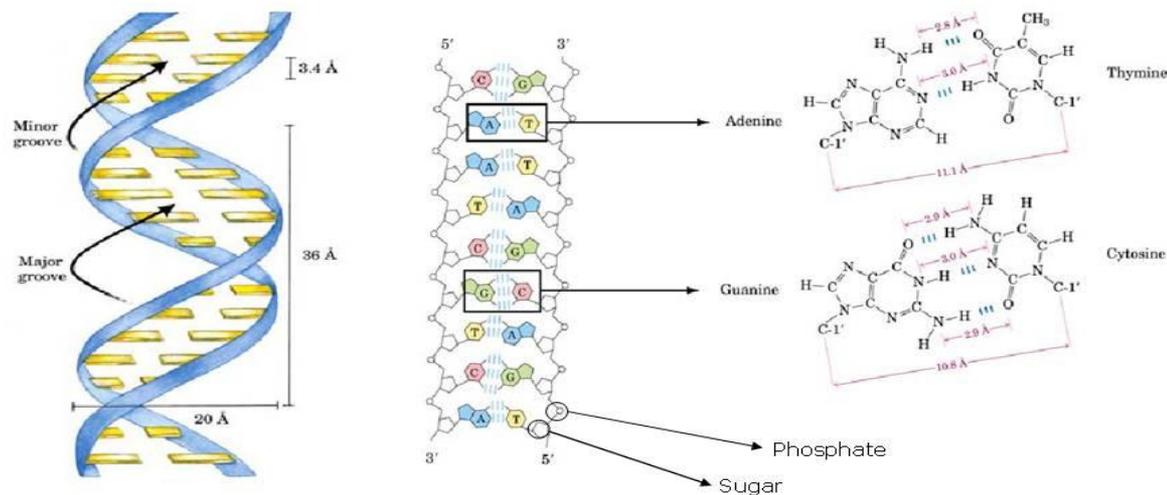
представляют собой универсальный источник информации по всем генетическим признакам любого вида.

Впервые воссоздать модель двухцепочечной ДНК и обосновать ее удалось ученым Френсису Крику и Дж. Уотсону в 1953 году. Пространственная структура ДНК, представляющая собой две спирали, состоит из единиц - нуклеотидов, она является индивидуальным признаком каждого вида.

В клетках эукариот (животных, растений и грибов) ДНК находится в ядре клетки в составе хромосом, а также в некоторых клеточных органоидах (митохондриях и пластидах). В клетках прокариотических организмов (бактерий и архей) кольцевая или линейная молекула ДНК, так называемый нуклеоид, прикреплена изнутри к клеточной мембране. У них и у низших эукариот (например, дрожжей) встречаются также небольшие автономные, преимущественно кольцевые молекулы ДНК, называемые плазмидами.

# Структура ДНК

Watson-Crick base pair structures



С химической точки зрения ДНК - это длинная полимерная молекула, состоящая из повторяющихся блоков - нуклеотидов. Каждый нуклеотид состоит из азотистого основания, сахара (дезоксирибозы) и фосфатной группы.

Связи между нуклеотидами в цепи образуются за счёт дезоксирибозы (С) и фосфатной (Ф) группы (фосфодиэфирные связи).

В соответствии с моделью, предложенной в 1953 г. Дж. Уотсоном и Ф. Криком, вторичная структура ДНК представляет собой *двухцепочечную правозакрученную спираль* из комплементарных друг другу антипараллельных полинуклеотидных цепей. Для вторичной структуры ДНК решающим являются две особенности строения азотистых оснований нуклеотидов. Первая заключается в наличии групп, способных образовывать водородные связи. Вторая особенность заключается в том, что пары комплементарных оснований А - Т и Г-Ц оказываются одинаковыми не только по размеру, но и по форме.

Благодаря способности нуклеотидов к спариванию, образуется жесткая, хорошо стабилизированная двухцепочечная структура.

На основе тщательного анализа рентгенограмм выделенных ДНК установлено, что двойная спираль ДНК может существовать в виде нескольких форм (А, В, С, Z и др.). Указанные формы ДНК различаются диаметром и шагом спирали, числом пар оснований в витке, углом наклона плоскости оснований по отношению к оси молекулы.

**ДНК имеет одну очень важную особенность** - это способность к репликации. Другими словами, копировать себя полностью и переносить в следующее поколение. Иногда в процессе копирования в структуре дезоксирибонуклеиновой кислоты происходит сбой - мутация. Одно азотистое основание меняется на другое. В ходе таких изменений в ДНК происходит эволюция приводящая к вымиранию вида или его доминантности.

Существуют и абсолютно разрушительные мутации, такие как трисомии (самая известная синдром Дауна), моносомии, микроделеции и т.д. Молекула ДНК находится в ядре, выполняя множество различных функций. Несмотря на то, что основная роль вещества – хранение информации гена, соединения отвечают за следующие виды работ: · кодируют аминокислоту; · контролируют работу клеток организма; · вырабатывают белок для внешнего проявления генов.





Молекула ДНК, дала возможность человечеству имеет использовать структуру нуклеотидных соединений в различных направлениях. В первую очередь для диагностики наследственных заболеваний. Для моногенных заболеваний в результате сцепного наследования. При выявлении истории инфекционных, онкологических эксцессов. А также в судебной медицине для идентификации личности. Возможностей использования ДНК очень много, на сегодняшний день имеется список моногенных болезней, что вышли из списка смертельных, благодаря концепции развития строения соединений и диагностики молекулярного биополя. В перспективе можно говорить о «генетическом документе новорожденного», который будет содержать весь список распространенных заболеваний индивидуального характера. Все молекулярно-генетические процессы еще не изучены, это довольно сложный и трудоемкий механизм. Возможно, многие генетические болезни смогут предотвратить уже в скором будущем, изменив структуру зародившейся жизни человека!

В основе молекулярного клонирования лежит встраивание нужного фрагмента ДНК (*вставки*) в другую молекулу ДНК (*вектор*), которая способна включать в себя новые последовательности ДНК, обеспечивать их перенос в системы, где созданная *in vitro* ДНК будет воспроизводиться *in vivo*, давая начало новому клону клеток, отличному фенотипически от исходных клеток хозяина (*реципиента*). Исходя из этого, *вектор*, в данном случае генетический, представляет собой молекулу ДНК, которая должна соответствовать определенным требованиям.

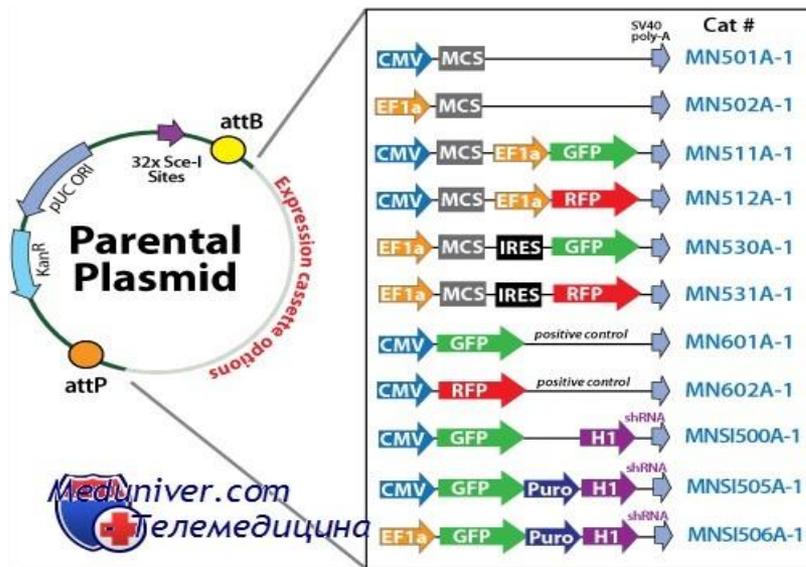
1. Способность к автономной репликации, т.е. обладание *ori* (точка инициации репликации). Другими словами – генетический вектор должен содержать последовательности нуклеотидов, обеспечивающие не только его собственную репликацию, но и воспроизведение встроенной в него вставки чужеродной ДНК.

2. Наличие в структуре вектора хотя бы одного *уникального*, т.е. встречающегося на молекуле ДНК только один раз, сайта для какой-либо эндонуклеазы рестрикции, по которому происходит встраивание вставки ДНК.

3. Наличие в структуре ДНК вектора *селективного маркера* – гена или генов, кодирующих белки, которые отсутствуют в клетках реципиента, например – белки, обеспечивающие устойчивость к антибиотикам. Это обеспечивает возможность вести отбор клонов, содержащих вектор со встроенной вставкой ДНК.

4. Небольшой размер ДНК вектора.

5. Обеспечение достаточной копийности в клетке-хозяине.



*Вставка* – это чужеродная ДНК, встроенная в вектор

*Вектор* – это молекула ДНК, которую используют для переноса рекомбинантной ДНК в клетку-хозяина с целью ее размножения и клонирования

### Характеристика вектора:

- Вектор должен содержать точку начала репликации (**origin**) для самостоятельной репликации в клетке-хозяине.
- Вектор должен иметь два селективных маркера для отбора и клонирования трансформированных клеток хозяина

В качестве генетических векторов используют:

- Плазмиды
- Космиды (плазмиды, которые содержат COS-сайты фага лямбда)
- Бактериофаги
- Вирусы
- Yac (yeast artificial chromosomes) – искусственные хромосомы дрожжей

## **Строение рекомбинантной ДНК.**

Гибридная ДНК имеет вид кольца. Она содержит ген (или гены) и вектор. Вектор - это фрагмент ДНК, обеспечивающий размножение гибридной ДНК и синтез конечных продуктов деятельности генетической системы - белков. Большая часть векторов получена на основе фага лямбда, из плазмид, вирусов SV40, полиомы, дрожжей и др. бактерий. Синтез белков происходит в клетке-хозяине. Наиболее часто в качестве клетки-хозяина используют кишечную палочку, однако применяют и др. бактерии, дрожжи, животные или растительные клетки. Система вектор-хозяин не может быть произвольной: вектор подгоняется к клетке-хозяину. Выбор вектора зависит от видовой специфичности и целей исследования. Ключевое значение в конструировании гибридной ДНК несут два фермента. Первый - рестриктаза - рассекает молекулу ДНК на фрагменты по строго определенным местам. И второй - ДНК-лигазы - сшивают фрагменты ДНК в единое целое. Только после выделения таких ферментов создание искусственных генетических структур стало технически выполнимой задачей.

## **Этапы сборки рДНК.**

Для создания молекулы рДНК, необходимо:

1. изолировать ДНК из клетки-донора (будь то животная клетка или клетка растения),
2. обработать выделенную ДНК и плазмиду (молекулу-вектор) одними и теми же рестриктазами и смешать их вместе. “Липкие концы” донорской ДНК образуют водородные связи с липкими концами плазмиды, затем происходит “сшивание” рекомбинантной молекулы с помощью лигаз.
3. Модифицированная плазида переносится в бактерию, которая потом увеличивает копии той генетической информации, которую мы внесли в плазмиду.

# Выделение ДНК

Большинство современных методов выделения ДНК из тканей растительного и животного происхождения состоят из следующих этапов:

разрушение клеточных стенок (при их наличии);

лизис клеточных мембран;

очистка от ингибиторов ферментативных реакций (ПЦР, рестрикции).

Разрушение клеточных стенок осуществляется механически перетиранием с оксидом кремния (или оксидом алюминия) или с использованием жидкого азота. Этот этап можно проводить непосредственно в лизис-буфере, используемом для разрушения клеточных мембран.

Лизис клеточных мембран происходит в лизис-буфере: под воздействием поверхностно-активных веществ или хоатропных солей происходит разрушение липидного бислоя. В состав лизис-буфера могут входить протеиназа К, разрушающая протеины или РНКаза для удаления РНК (в больших количествах может ингибировать ПЦР и др. ферментативные реакции).

После разрушения клеточных стенок и лизиса мембран образуется мультикомпонентная смесь (раствор), содержащий, в том числе, ДНК.

После стадии лизиса возможны 3 основных принципиальных классических подхода для очистки целевой ДНК:

Очистка раствора с помощью методов органической экстракции (с помощью фенола, хлороформа) с последующим осаждением ДНК спиртами и растворением в воде и ТЕ-буфере.

Дифференциальная сорбция ДНК на твердом носителе (чаще всего силикагели с повышенным отрицательным зарядом или модифицированной поверхностью). Сорбент с локализованной на его поверхности ДНК промывается органическими растворителями, затем ДНК смывается водой или ТЕ-буфером.

Дифференциальная сорбция примесей, селективное осаждение ДНК, с последующей промывкой органическими растворителями и растворением в воде или ТЕ-буфере. Технология реализована в наборах реагентов DiamondDNA, ABT, Ilc.

Каждый из этих подходов имеет свои достоинства и недостатки и выбирается исследователем исходя из объекта, задач и бюджета научного проекта.

В первом случае ДНК получается высокомолекулярной (фрагменты молекул имеют длину более 15000 нуклеотидных пар), однако возможны значительные потери ДНК, остаточные загрязнения протеинами, фенолом и хлороформом – сильными ингибиторами ПЦР. Используемые реагенты высокотоксичны.

При использовании методов, основанных на нуклеосорбции, ДНК имеет высокую степень очистки, однако, возможна ее сильная фрагментация, а остаточные количества сорбента в конечном растворе ДНК также могут ингибировать ферментативные реакции. В настоящее время крупными разработчиками наборов и систем для выделения ДНК используется принцип сорбции ДНК на сорбенте, запрессованном в микроколону для центрифугирования, существенным недостатком таких наборов являются их высокая стоимость и потери ДНК после многократных промывок колонки, необходимых для удаления примесей.

Метод DiamondDNA, подобно первому методу, позволяет выделять большое количество высокомолекулярной ДНК, но значительно более скор и безопасен.

Далее приводится ряд протоколов классических методов экстракции и очистки ДНК из объектов растительного и животного происхождения.

Спасибо за внимание!