

Генетическая инженерия — совокупность приёмов, методов и технологий получения рекомбинантных РНК и ДНК, выделения генов из организма (клеток), осуществления манипуляций с генами и введения их в другие организмы.

Генетическая инженерия является инструментом *биотехнологии*, используя методы таких биологических наук, как молекулярная и клеточная биология, цитология, генетика, микробиология, вирусология.

Генная инженерия служит для получения желаемых качеств изменяемого или генетически модифицированного организма.

Генная инженерия позволяет непосредственно вмешиваться в генетический аппарат, применяя технику молекулярного клонирования.

Примерами применения генной инженерии являются:

1. получение новых генетически модифицированных сортов зерновых культур
2. производство человеческого инсулина путём использования генномодифицированных бактерий
производство эритропоэтина в культуре клеток
3. получение новых пород экспериментальных мышей для научных исследований

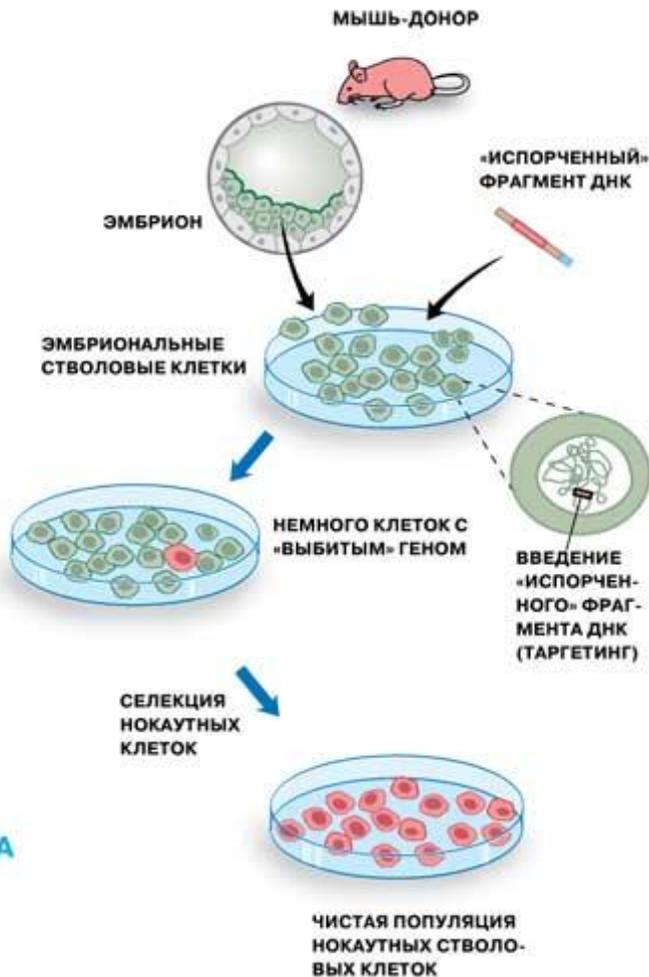
Основные этапы решения генно-инженерной задачи:

1. Получение изолированного гена.
2. Введение гена в вектор для переноса в организм.
3. Перенос вектора с геном в модифицируемый организм.
4. Преобразование клеток организма.
5. Отбор генетически модифицированных организмов (**ГМО**) и устранение тех, которые не были успешно модифицированы.

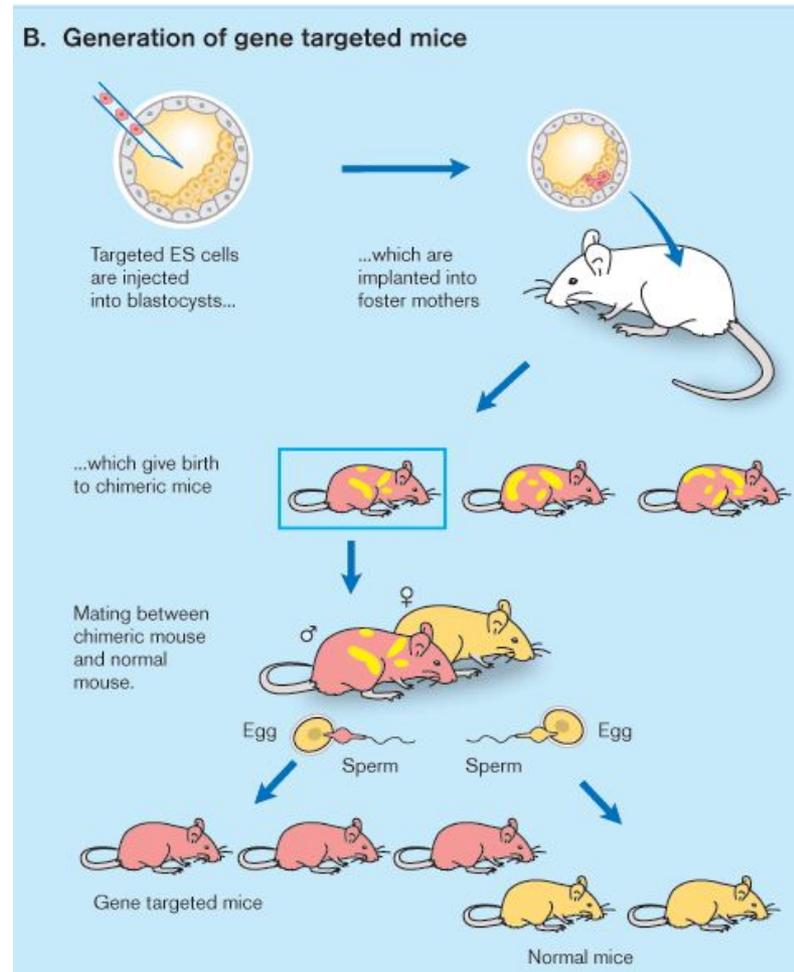
Применение в научных исследованиях

Нокаут гена. Для изучения функции того или иного гена может быть применен нокаут гена. Так называется техника удаления одного или большего количества генов, что позволяет исследовать последствия подобной мутации. Для нокаута синтезируют такой же ген или его фрагмент, изменённый так, чтобы продукт гена потерял свою функцию. Для получения нокаутных мышей полученную генно-инженерную конструкцию вводят в эмбриональные стволовые клетки, где конструкция подвергается соматической рекомбинации и замещает нормальный ген, а измененные клетки имплантируют в

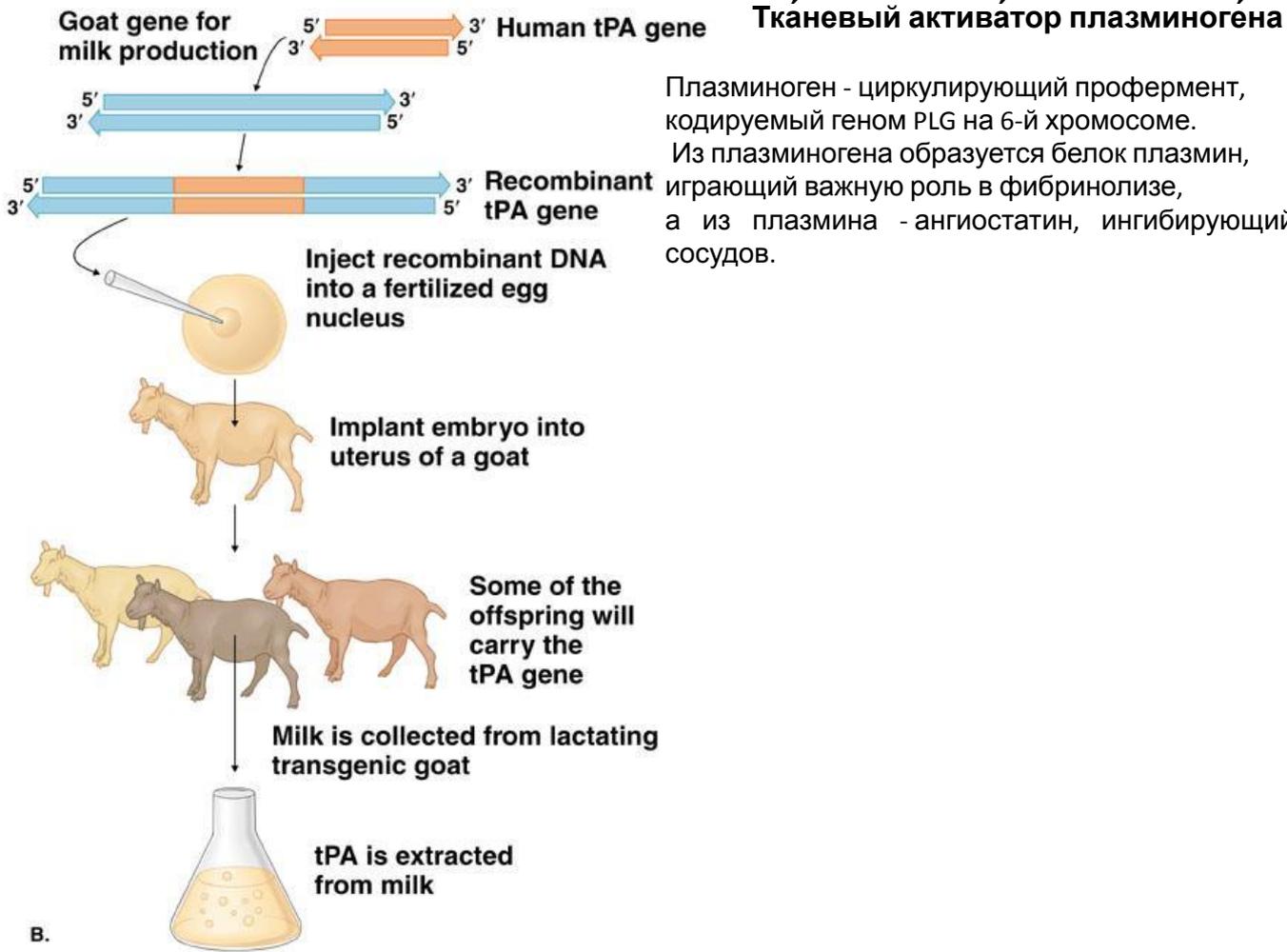
€



A



Искусственная экспрессия. Логичным дополнением нокаута является искусственная экспрессия, то есть добавление в организм гена, которого у него ранее не было. Этот способ генной инженерии также можно использовать для исследования функции генов. В сущности процесс введения дополнительных генов таков же, как и при нокауте, но существующие гены не замещаются и не повреждаются.



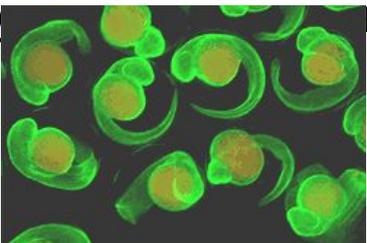
Тканевый активатор плазминогена

Плазминоген - циркулирующий профермент, кодируемый геном PLG на 6-й хромосоме. Из плазминогена образуется белок плазмин, играющий важную роль в фибринолизе, а из плазмина - ангиостатин, ингибирующий рост сосудов.

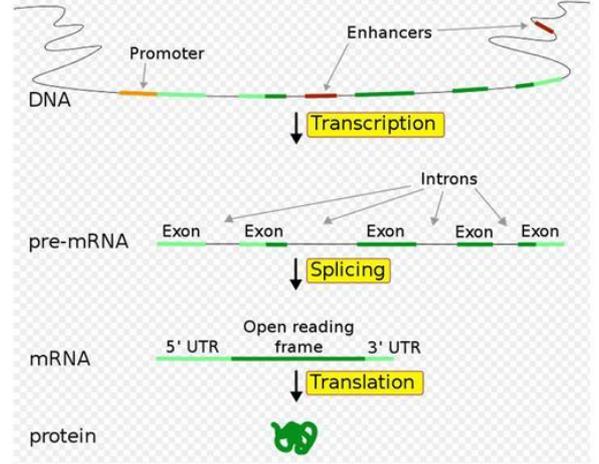
Исследование механизма экспрессии

В таких экспериментах задачей является изучение условий экспрессии гена. Особенности экспрессии зависят прежде всего от небольшого участка ДНК, расположенного перед кодирующей областью, который называется **промотор** и служит для связывания факторов транскрипции.

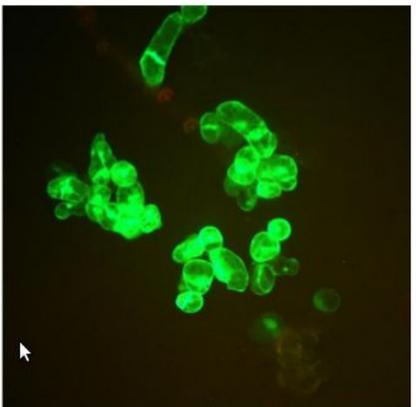
Этот участок вводят в организм, поставив после него вместо собственного гена репортерный, например, GFP или фермента, катализирующего легко обнаруживаемую реакцию. Кроме того, что функционирование промотора в тех или иных тканях в тот или иной момент становится хорошо заметным, такие эксперименты позволяют исследовать структуру промотора, убирая или добавляя к нему фрагменты ДНК, а также изучать его функции.



Структура типичного эукариотического белок-кодирующего гена (промотор, энхансер, экзон, интрон, сплайсинг)



б. Система для биобаллистики PDS-1000/He Biolistic фирмы BIO RAD



в. GFP-флюоресценция суспензионной культуры клеток табака

Визуализация продуктов генов. Используется, когда задачей является изучение локализации продукта гена. Одним из способов мечения является замещение нормального гена на слитый с репортёрным элементом, например, с геном зелёного флуоресцентного белка (GFP).

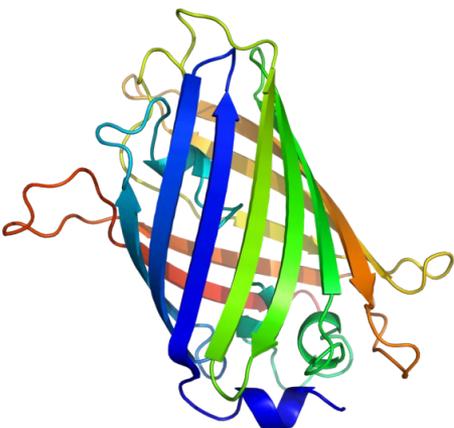
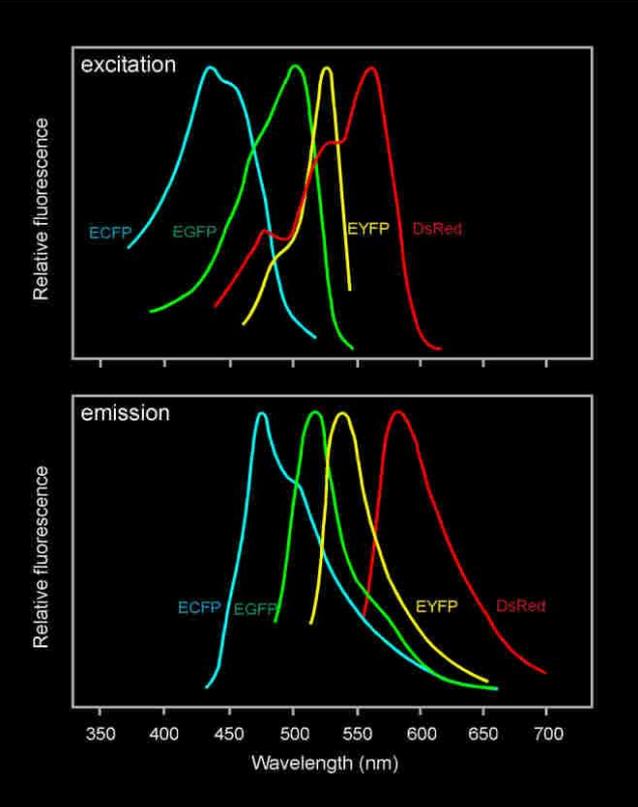
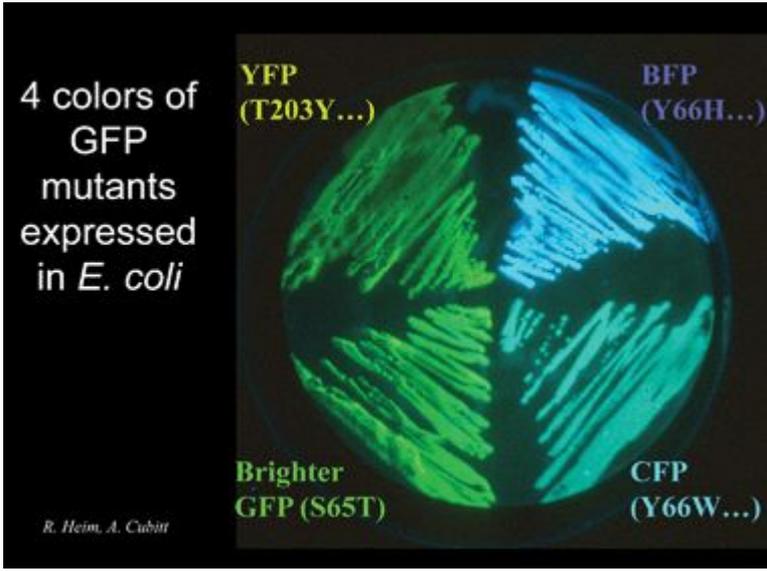
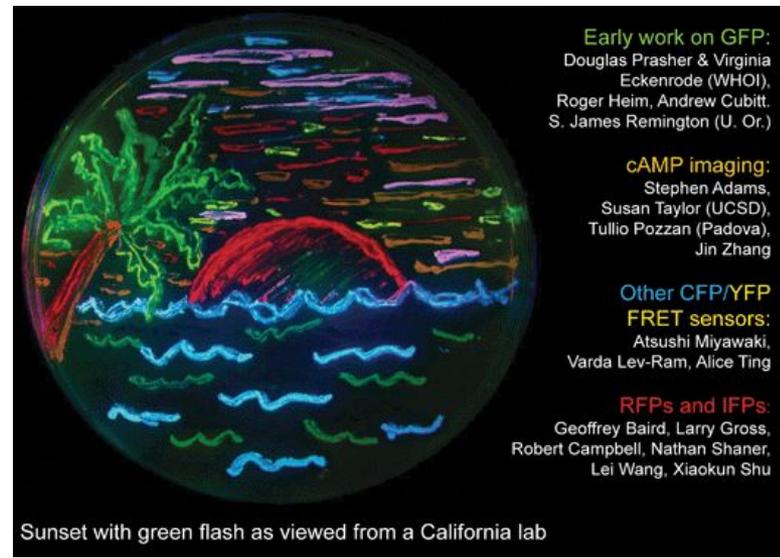
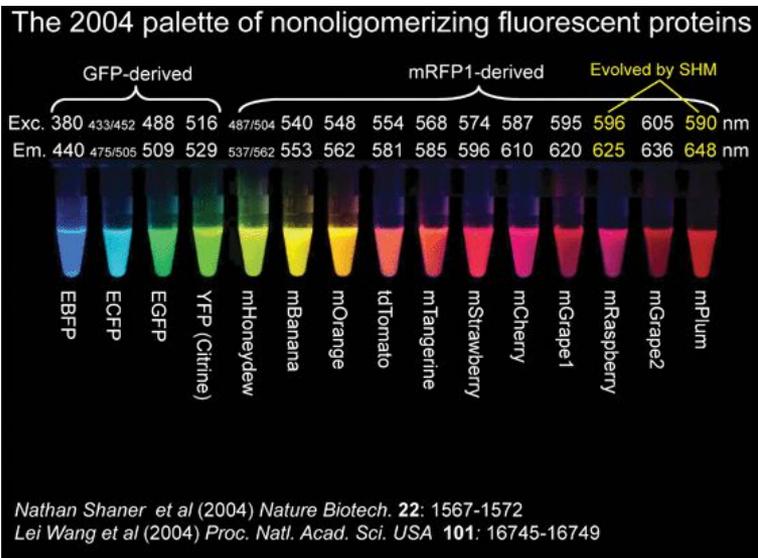
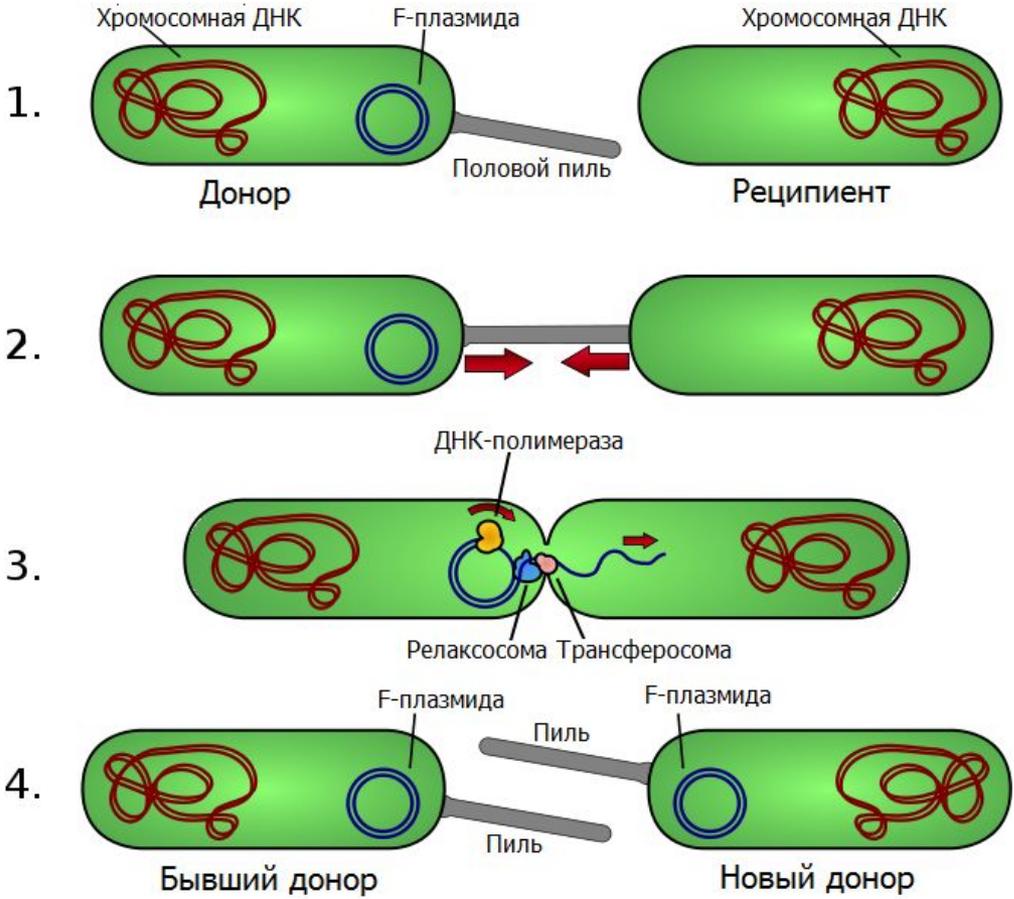


Схема строения зелёного флуоресцентного белка



Этот белок (GFP), флуоресцирующий в голубом свете, используется для визуализации продукта генной модификации. Хотя такая техника удобна и полезна, ее побочными следствиями может быть частичная или полная потеря функции исследуемого белка. Более изощрённым, хотя и не столь удобным методом является добавление к изучаемому белку не столь **больших олигопептидов**, которые могут быть обнаружены с помощью специфических антител.

Техника введения генов в бактерии была разработана после того, как Фредерик Гриффит открыл явление бактериальной трансформации. В основе этого явления лежит примитивный половой процесс, который у бактерий сопровождается обменом небольшими фрагментами нехромосомной ДНК, плазмидами. Плазмидные технологии легли в основу введения искусственных генов в бактериальные клетки.



Значительные трудности были связаны с введением готового гена в наследственный аппарат клеток растений и животных. В природе наблюдаются случаи, когда чужеродная ДНК (вируса или бактериофага) включается в генетический аппарат клетки и с помощью её обменных механизмов начинает синтезировать «свой» белок. Учёные исследовали особенности внедрения чужеродной ДНК и использовали как принцип введения генетического материала в клетку. Такой процесс получил название **трансфекция**.



Способы прямого введения генов в клетку

Трансфекция

Микроинъекция

Электропорация

Метод «мини-клеток»

Упаковка в липосомы

Электронная пушка

Трансформация клеток

В 1970 году Мандель и Хига показали, что совместная инкубация *E. coli* и фага Лямбда при 0с в присутствии хлорида Са ведет к трансфекции

Таким образом, клетки *E. coli* и чужеродная ДНК продуктивно взаимодействуют при двух

основных условиях:

- низкой температуре
- наличию в среде двухвалентных катионов

Эффективность трансформации можно повысить различными способами:

- обрабатывая клетки растворителями и сульфгидрильными агентами
- выращивание клеток в среде с повышенным содержанием ионов Mg (10-20mM)
- тепловой шок
- введение моновалентных катионов
- добавление диметилсульфоксида
- добавление ионов Rb

Трансформация клеток

Доля компетентных клеток составляет 0,01-10% от общего числа жизнеспособных клеток

Частота трансформации = количество колониеобразующих единиц на 1 мкг ДНК

Обычно используют 0,01-0,1 мкг ДНК на пробу

В зависимости от плазмиды и целей работы надо очень внимательно выбирать штамм клеток!

Компетентные клетки **обеспечивают**:

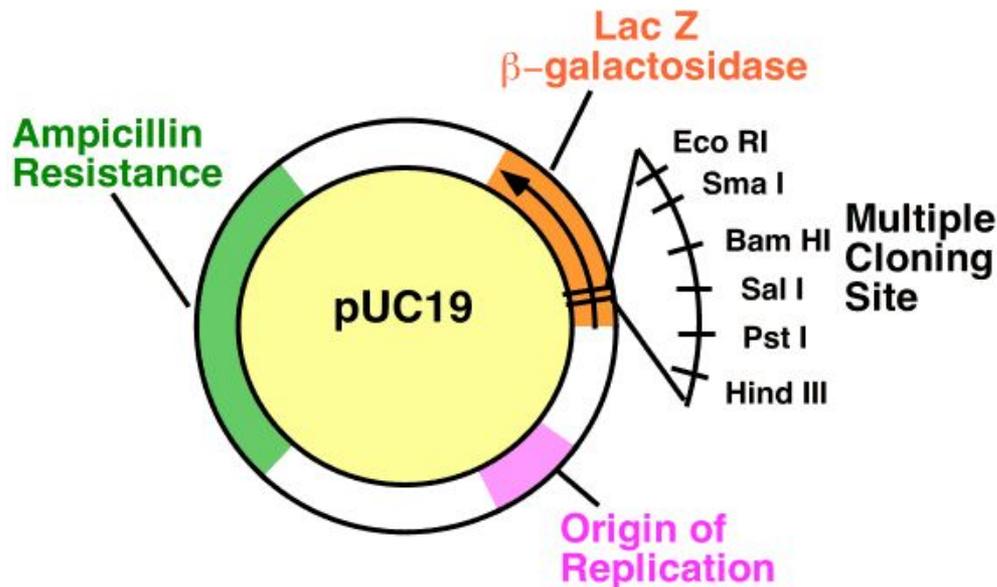
- высокую эффективность трансформации большинством плазмидных и λ -векторов
- возможность бело-голубой селекции

Трансформация

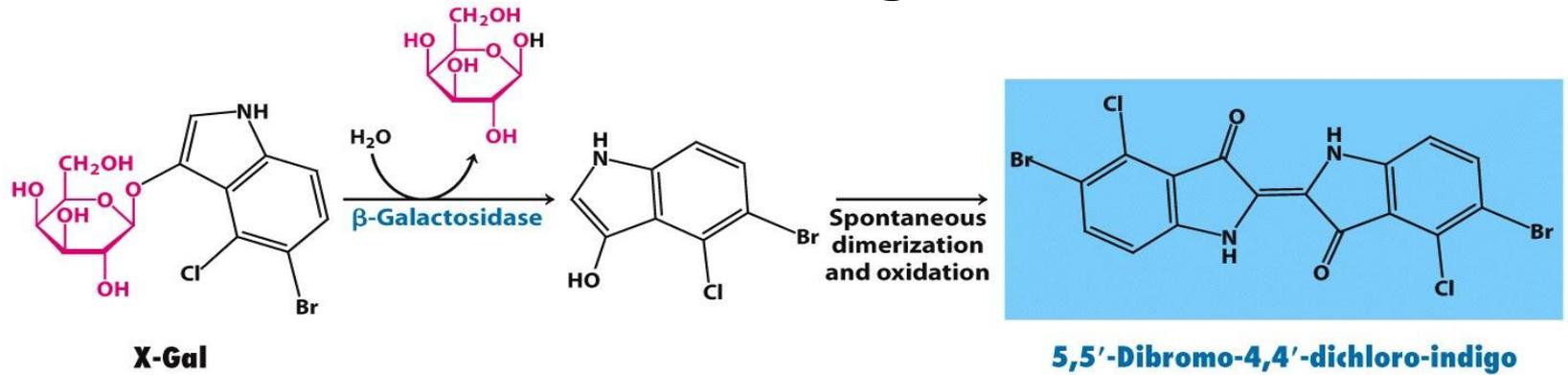
Замороженные компетентные клетки *E. coli* штамм **XL1-Blue** предназначены для химической трансформации неочищенной лигазной смесью (или другой ДНК, находящейся в умеренно солевом буфере).

клеток

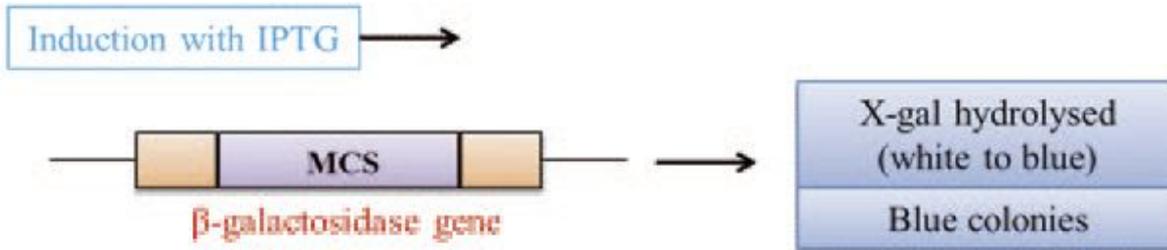
XL1-Blue генотип: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]*



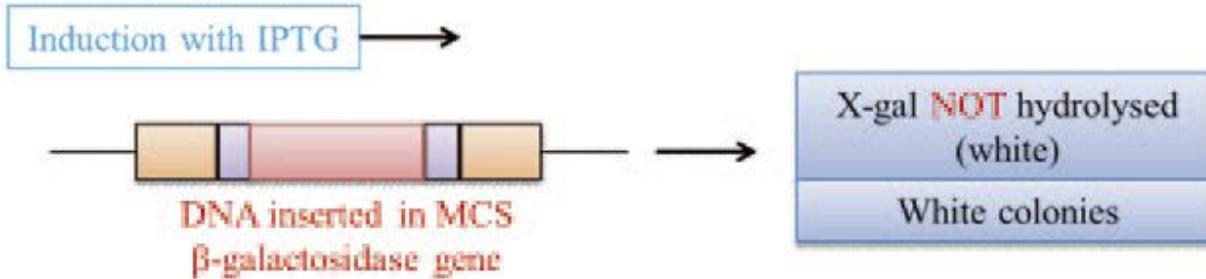
Бело-голубая



В питательную среду добавляют: антибиотик, X-gal, IPTG



a non-recombinant vector i.e. no insert



b recombinant vector i.e. insert within MCS



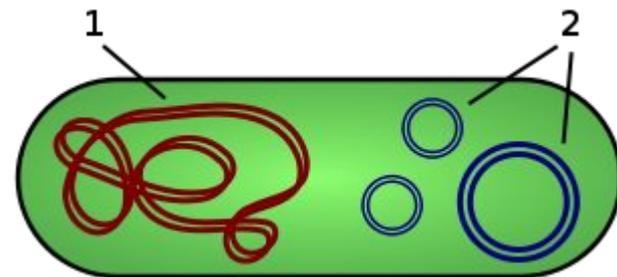
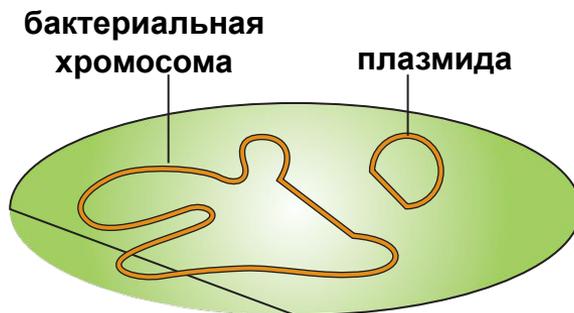
Плазмиды – это внехромосомные факторы наследственности, представляющие собой небольшие кольцевые двухцепочечные молекулы ДНК, которые располагаются в цитоплазме и способны к автономной репликации.

В плаزمидах закодирована информация необходимая для репликации плазмид в бактериях, а также информация о дополнительных признаках, сообщающих бактериям преимущества в тех или иных условиях обитания и в стрессовых ситуациях.

В одной клетке может быть несколько плазмид, совокупность которых называют **плазмотипом**.

Плазмиды могут интегрировать в бактериальную хромосому, тогда их называют **эписомами**.

Самые маленькие плазмиды содержат менее 2 тысяч пар оснований, **мегаплазмиды** включают сотни тысяч пар оснований (обычно до 600 тыс.)



Таким образом, генетические признаки микроорганизмов могут кодироваться не только бактериальной хромосомой, но и плазмидами.

Плазмиды — это двуцепочечные ДНК-молекулы, которые существуют в клетках независимо от генома.

В одной клетке может содержаться до нескольких десятков различных плазмид.

Транскрипция и трансляция генетического материала плазмид осуществляется молекулярным аппаратом клетки-хозяина.

Плазмиды реплицируются независимо от ДНК-генома бактерий и практически независимо от стадии клеточного цикла.

Плазмиды передаются от клетки к клетке в ходе клеточного деления, а также при конъюгации.

Число копий плазмиды в клетке может существенно варьировать. Это зависит от генетических особенностей как клетки, так и плазмиды.

Плазмиды, находящиеся "под ослабленным контролем", могут размножаться до тех пор, пока их количество не достигнет 10-200 копий на клетку (**высококопийные плазмиды**).

Если же плаزمида находится "под строгим контролем", она реплицируется с той же скоростью, что и геном бактерии. Такие плазмиды содержатся в клетке в одной или в нескольких копиях (**низкокопийные плазмиды**).

Для клонирования рекомбинантных ДНК стараются использовать плазмиды первого типа.

Классификация плазмид

По способности инициировать **процесс конъюгации**

Конъюгативные (половые, трансмиссивные)

Имеют более крупные размеры; содержат область tra-генов (tra - от TRAnsfer genes), то есть генов, белковые продукты которых обеспечивают конъюгацию. Продукты tra-генов вызывают формирование пили, образуют комплекс ферментов, изменяющих ДНК нужным образом во время переноса, а также противодействуют прикреплению пилей других бактерий к клеточной стенке данной.

Неконъюгативные (нетрансмиссивные)

Не содержат области tra-генов, а потому не способны к самостоятельной передаче генетического материала в другие бактериальные клетки. Однако могут использовать белковые продукты трансмиссивных плазмид из той же бактериальной клетки для передачи своего ДНК-материала в ходе конъюгации.

Мобилизуемые

Некоторые исследователи выделяют также класс мобилизуемых плазмид, которые содержат только часть tra-генов. Они также способны передавать свой ДНК-материал в ходе конъюгации, используя белковые продукты трансмиссивных плазмид, находящихся в той же клетке.

По обычному **числу копий плазмиды** данного типа в клетках:

Высококопийные

Низкокопийные

По размеру: большие, средние и малые (космиды)

По группам несовместимости

Совместимость — это способность двух или нескольких плазмид стабильно сосуществовать в одной клетке. Родственные плазмиды обычно не совместимы друг с другом, и вместе образуют одну группу несовместимости.

По функции:

Половые *F-плазмиды* (от англ. Fertility — способность к размножению). Содержат трагены, способны инициировать половой процесс у бактерий — конъюгацию.

Плазмиды устойчивости — *R-плазмиды* (от англ. Resistance — устойчивость). Кодировать белковые продукты, обеспечивающие устойчивость бактерий к антибиотикам и различным ядам.

Col-плазмиды — содержат **гены бактериоцинов** — белков, подавляющих жизнедеятельность бактерий других разновидностей. Средство борьбы за существование.

Название этих плазмид происходит от англ. Colicinogeny — колициногенность, т.е. способность продуцировать колицин. Колицином был назван первый открытый бактериальный токсин, направленный против других бактерий. Он был обнаружен у бактерии *E.coli*, а потому назван колицином. Позднее подобные по функции вещества были найдены у многих других бактерий. Тогда класс веществ получил более точное название бактериоцинов.

Плазмиды биодеградациии — плазмиды, продукты которых позволяют утилизировать необычный пищевой или энергетический субстрат (например, салициловую кислоту). *Вирулентные плазмиды*, продукты которых способны сделать бактерию патогенной.

Многие плазмиды используются в качестве векторов молекулярного клонирования в *E.coli*.

Для того, чтобы плазмиду можно было использовать в качестве вектора, она должна обладать следующими свойствами:

1. Быть небольшого размера.
2. Находиться под ослабленным контролем.
3. Иметь один или несколько селективных маркеров, по которым можно вести отбор полученных трансформантов.
4. Содержать единичный уникальный сайт (или единичные уникальные сайты) разрезания в области, которая не существенна для репликации плазмиды.
5. Вставка не должна нарушать последовательность, существенную для сохранения самой плазмиды.

Какие модули и специфические участки можно встретить в созданных человеком плаزمидях?

Ori – участок начала репликации. Чаще это модуль из плазмиды под ослабленным контролем т.е. высококопийной), но в некоторых случаях, образование малого числа копий оказывается полезным (в экспериментах по изучению **регуляции** клонированных бактериальных генов в *E.coli* при большом числе копий регуляторные эффекты могут маскироваться).

Два разных **ori**: в **челночных векторах**, которые должны реплицироваться в двух разных хозяевах соответственно с использованием разных ферментных систем (например в *E.coli* и в дрожжах).

Ген устойчивости к одному или более антибиотикам.

Уникальный сайт рестрикции или полилинкер (MSC) – блок уникальных сайтов рестрикции.

Промоторы для РНК-полимераз *E.coli* (SP6, T3, T7) для получения транскриптов с клонированных последовательностей *in vitro*.

Промоторы для эукариотических РНК-полимераз (например 35S-промотор вируса мозаики цветной капусты, если далее предполагается транскрибирование клонированной последовательности в растениях). Промотор должен быть узнаваем РНК-поллимеразами тех клеток, в которых предполагается транскрипция стоящего под ним гена.

Регулируемые промоторы (в экспрессирующих векторах) – *trp*, *lac*, *tac*, *LacUV5*, *trc* и другие.

RBS-сайт – синтетическая последовательность, соответствующая последовательности Шайна-Дальгарно, обеспечивающая трансляцию полученных с плазмиды транскриптов у прокариот (при экспрессии в бактериях).

Поли-А-сигнал для получения полноценного транскрипта с клонированной последовательности.

Терминаторы транскрипции – чтобы транскрипция клонированной вставки ею и ограничилась.

Стоп-кодона трансляции – важно для экспрессирующих векторов

Гены LacZ, lacI, lacI^q – для цветной селекции трансформантов.

F1 – область начала репликации фага f1, ее наличие позволяет при заражении фагом-помощником получать одну из нитей плазмиды – ту, в которой эта область находится.

Область, к которой существуют праймеры, позволяющие секвенировать клонированную последовательность по Сэнгеру.

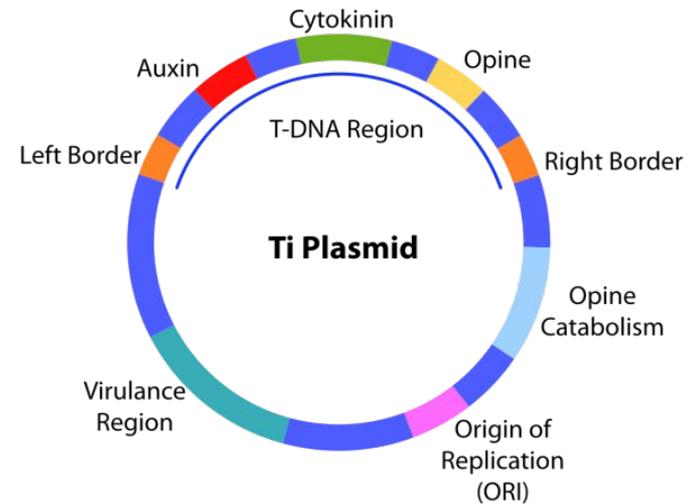
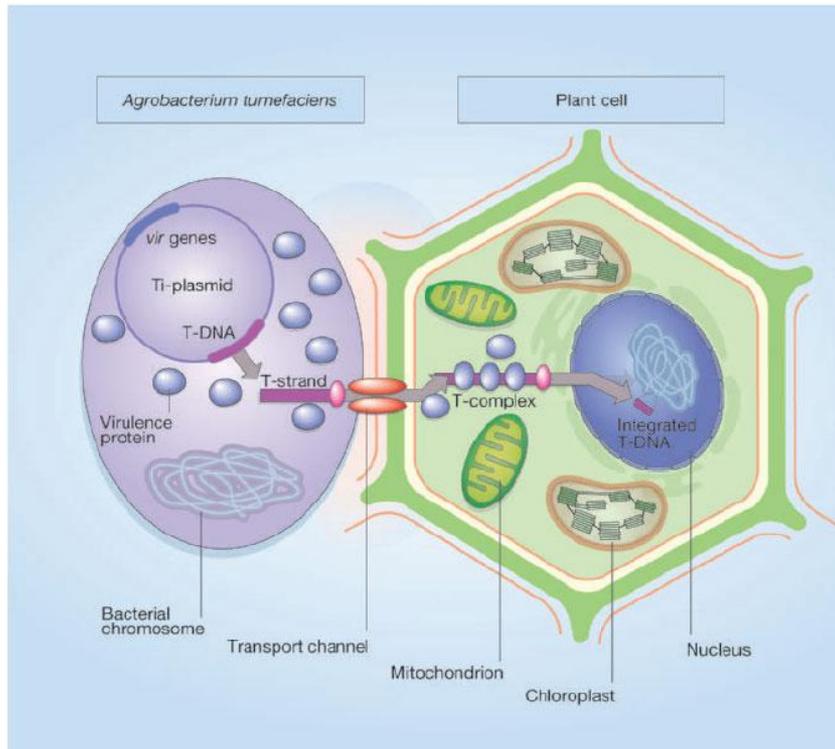
И так далее. и тому подобное - кому что нужно.....

Для успешной конъюгации бактериальные клетки не обязательно должны принадлежать к одному виду.

Показана даже возможность передачи посредством конъюгации генов **от бактерий эукариотам: растениям и грибам.**

Например, бактерии рода *Agrobacterium* (семейство Rhizobia) содержит Ti и Ri плазмиды, которые переносятся в клетки растений, внедряются в ядро и изменяют их метаболизм, в результате чего клетки начинают вырабатывать опины, которые *Agrobacterium* использует как источник углерода и энергии.

В Ti и Ri плазмидах существуют две системы генов, кодирующих свой перенос. Это *vir* гены для переноса в растения и *tra* гены для переноса в другие бактерии.



Agrobacterium tumefaciens — грамотрицательная, облигатно аэробная палочковидная почвенная бактерия рода *Agrobacterium*.



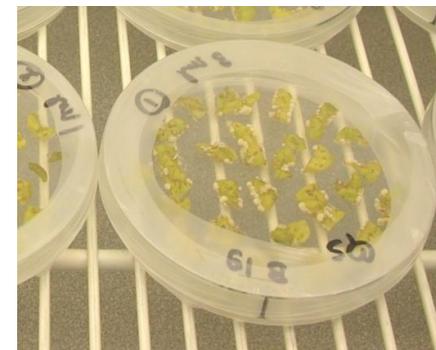
Электронная микрофотография *Agrobacterium tumefaciens* в процессе инфицирования клетки моркови, начало передачи плазмиды.

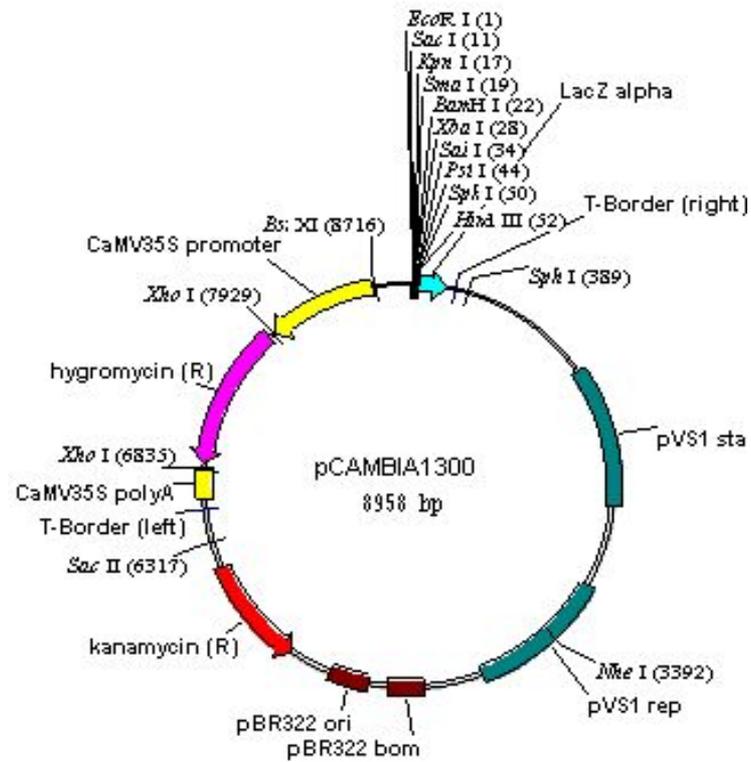
Ввиду способности *A. tumefaciens* трансформировать клетки растений, бактерия сейчас активно используется для привнесения генетического материала с целью генетической модификации растений.

A. tumefaciens способна трансформировать как **двудольные растения**, так и некоторые **однодольные растения** и некоторые **микроскопические грибки**.

Были разработаны специальные векторы на основе Ti-плазмиды с удалёнными генами фитогормонов и опинов для привнесения чужеродной генетической информации в геном растений с целью получения растений с желаемыми полезными признаками.

S. chacoense, трансформированные при помощи *A. tumefaciens*.
Кусочки листа с начатым каллусообразованием





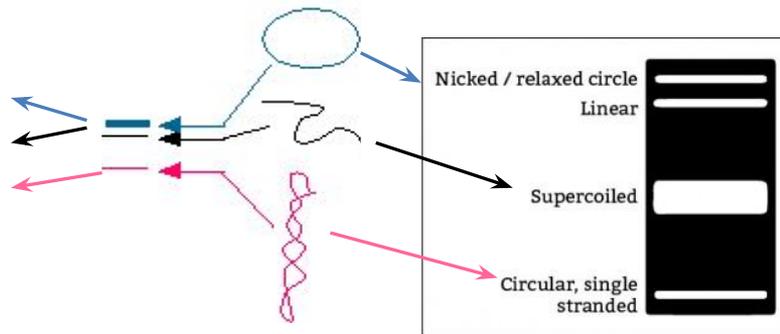
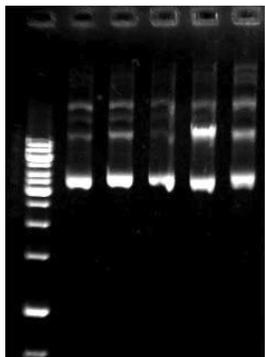
Геометрия Плазмид

Кольцевые плазмиды

Линейные плазмиды

Хотя большинство плазмид представляют собой **кольцевые молекулы**, в настоящее время известно много примеров бактерий с **линейными плазмидами**. Поскольку линейным плазмидам необходим механизм репликации концов, которого нет у кольцевых хромосом, **линейные плазмиды** обычно имеются у бактерий с также линейными хромосомами.

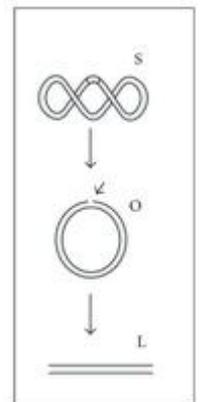
Кольцевые плазмиды могут иметь более одной топологической конфигурации, что обеспечивается соотношением противоположного действия ДНК-гираз и топоизомераз. Обычно плазмидная ДНК находится в виде ковалентно **замкнутого суперскрученного кольца**. Если одна из цепей ДНК претерпевает разрыв, то суперскрученная плаزمида расплетается в **простое кольцо**, которое при электрофорезе медленнее, чем суперскрученная форма, проходит через агарозный гель. Если разрыв претерпевают в противоположных позициях обе цепи ДНК, то образуется **линейная форма**. Вдобавок из-за гомологичной рекомбинации плазмидные мономеры могут объединяться в димеры, которые из-за своих более крупных размеров медленнее мономеров проходят в агарозном геле при электрофорезе. Явление различной скорости прохождения различных форм плазмид через агарозный гель при электрофорезе используется для их электрофоретического разделения.



суперскрученного кольца

простое кольцо

линейная форма



Conformation of Plasmid DNAs

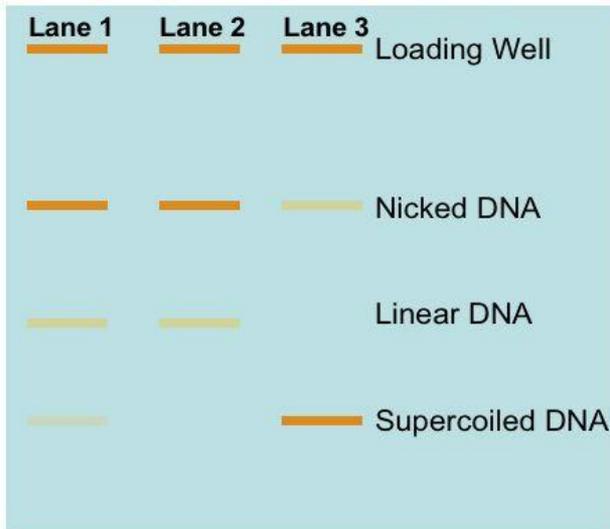


Figure 2. Testing Plasmid DNA by agarose gel electrophoresis

Typical plasmid preparations generally yield both nicked and supercoiled DNA. Lane 1 shows DNA that has been damaged and has mostly nicked DNA. Lane 2 shows DNA completely damaged. Lane 3 shows a good plasmid preparation with mostly supercoiled DNA.

The **relative electrophoretic mobility** (speed) of these DNA conformations in a gel is as follows:

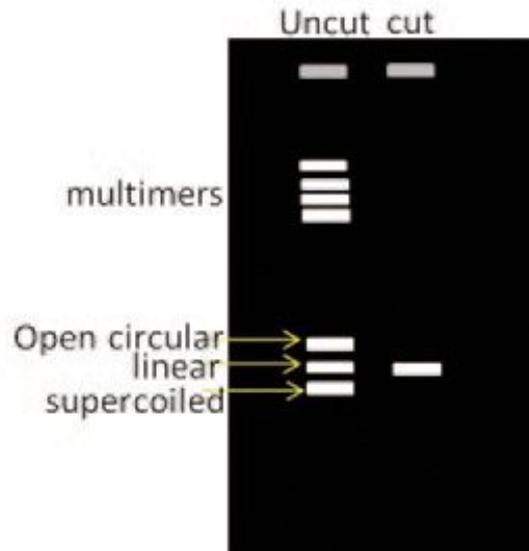
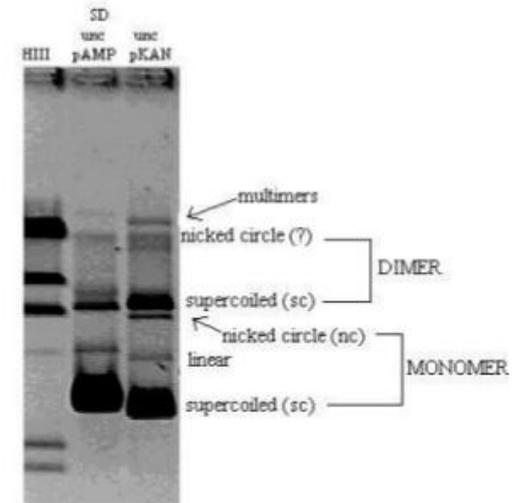
Nicked Open Circular (slowest)

Linear

Relaxed Circular

Supercoiled Denatured

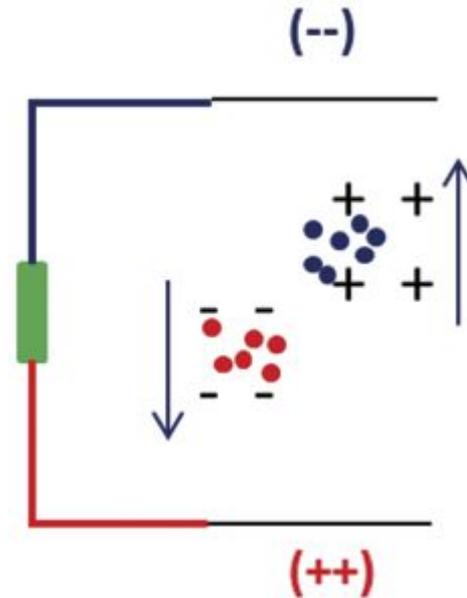
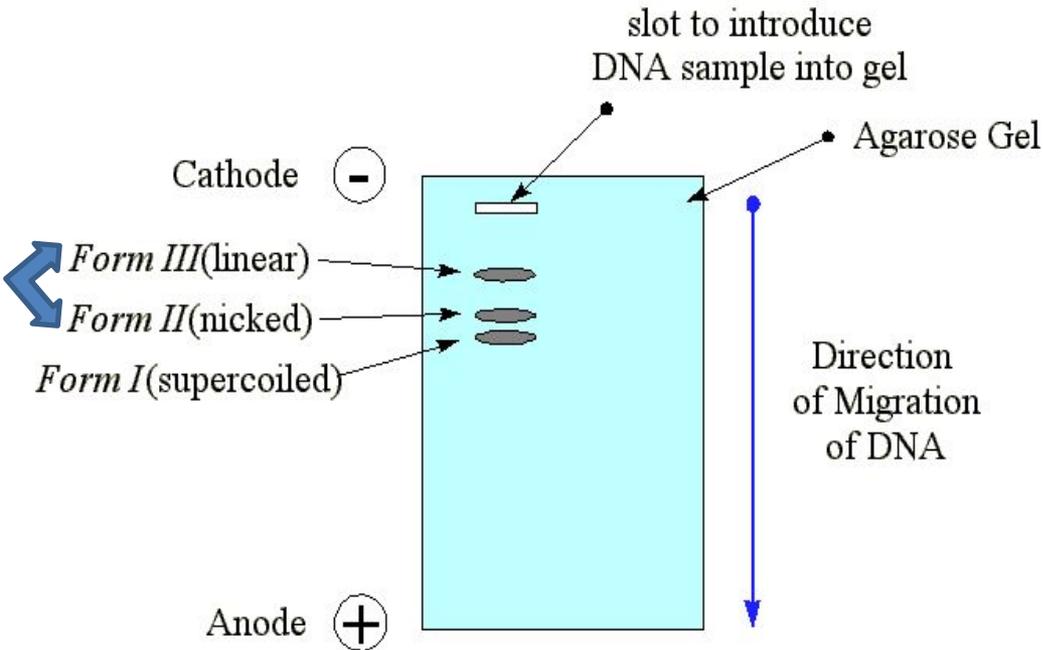
Supercoiled (fastest)



Plasmid DNA banding pattern when subjected to agarose gel electrophoresis on 1 % agarose

Agarose Gel Electrophoresis of DNA

(gel is run in the horizontal position)



Migration of charged molecules towards their respective electrodes in response to the difference in electric field

Ферменты – инструменты генной инженерии

Рестриктазы или рестриктирующие эндонуклеазы, - это ферменты, “узнающие” определенные последовательности (сайты рестрикции) в двухцепочечной ДНК и расщепляющие молекулу в этих сайтах. Их выделяют преимущественно из прокариотических клеток.

Рестриктазы – орудие защиты бактерий от чужеродных нуклеиновых кислот.

Рестриктирующая активность совмещена с метилирующей: своя родная ДНК в определенных сайтах защищена метильными группами, внесенными собственными метилазами процессе репликации и не может быть разрезана в этих сайтах. Чужая ДНК в точно таких же сайтах не метилирована, и это является сигналом к ее разрезанию рестриктазами.

Открытие рестриктаз в 1970-х годах вместе с разработкой способов секвенирования ДНК послужило основным толчком для развития генетической инженерии. За открытие рестриктаз **Вернер Арбер, Даниел Натанс и Хамилтон Смит** также были удостоены Нобелевской премии (1978 г.).

Ферменты рестрикции- модификации

I тип

Модифицирующая (метилирующая) активность, АТФ-зависимая рестриктирующая активность, проявляемая одним и тем же белком.

Метилазная активность конкурирует с рестриктазной: то есть если не разрежет, то обязательно прометирует.

Узнают специфический сайт, тот же сайт метилируют, но режут далеко от него, на расстоянии от 7 до 400 нуклеотидов в случайных точках

III тип

Модифицирующая (метилирующая) активность, АТФ-зависимая рестриктирующая активность, проявляемая одним и тем же белком

Это гетеродимеры, состоящие из двух субъединиц: одна узнает и метилирует специфический сайт, другая режет на расстоянии около 25 нуклеотидов от этого сайта.

Метилирующая активность конкурирует с рестриктазной

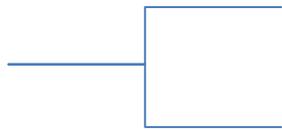
II тип

Состоят из двух белков:
рестриктирующая эндонуклеаза
модифицирующая метилаза
Используются в молекулярном клонировании
Специфически разрезают ДНК внутри или около своих сайтов

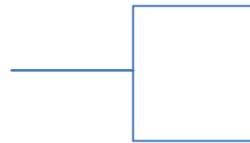
Сейчас известно уже около 500 рестриктаз, выделенных из самых разных микроорганизмов

Названия рестриктазам часто даются по первым буквам микроорганизмов, из которых они были выделены, например:

EcoRI – из E.coli



**BamHI- из Bacillus amiloliquefaciens
(гнилостные бактерии)**



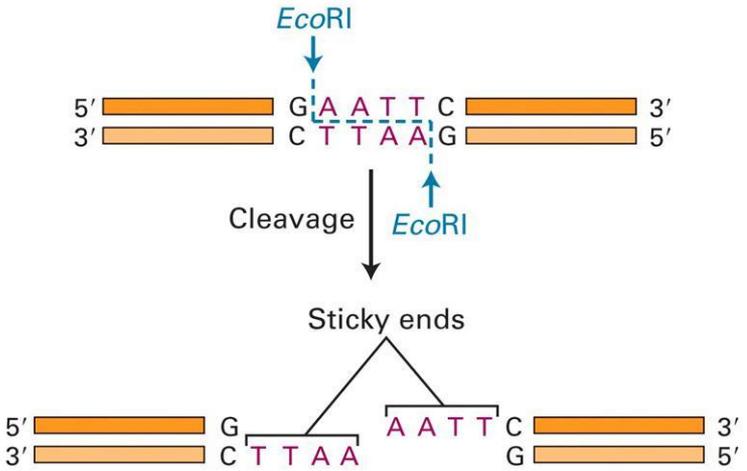
**MboI – из Moraxella boris
(возбудитель инфекций нижних дыхательных путей)**



Типичная рестриктаза – **EcoRI** – димер (2x31тыс.). Она режет по очереди сначала одну цепь, а потом другую. Последовательности, фланкирующие сайт узнавания, определяют выбор цепи, которая будет разрезана, и таким образом влияют на эффективность разрезания.

Рестриктазы разрезают ДНК внутри или около своих сайтов, которые обычно представляют собой последовательность двухцепочечной ДНК длиной **4-6 нуклеотидов**, обладающую осью симметрии второго порядка.

Restriction enzyme



В результате разрыва образуются фрагменты с выступающими липкими 5' – концами. Каждый такой конец может взаимодействовать с любым другим концом, комплементарным ему. Таким образом, любые молекулы ДНК, содержащие одинаковые сайты рестрикции можно соединять друг с другом и в результате получать рекомбинантные молекулы.

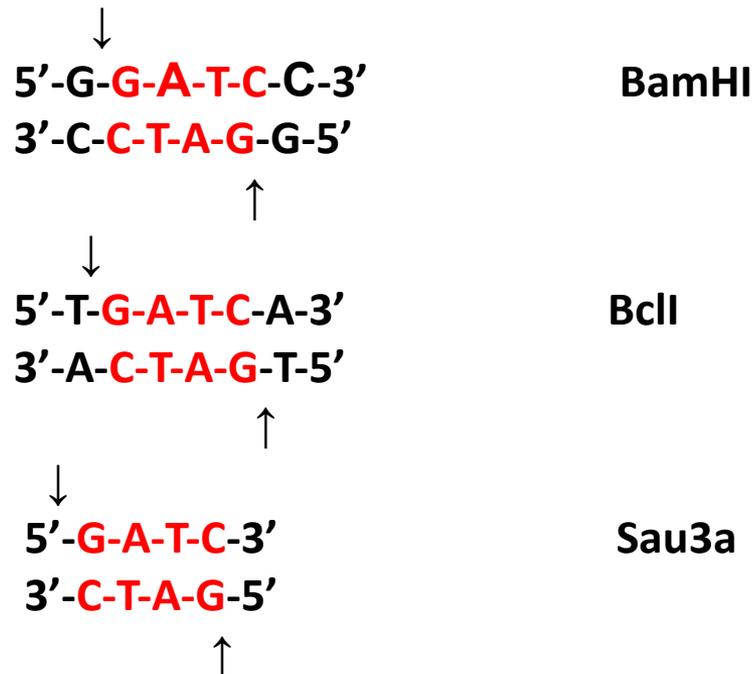
Многие ферменты рестрикции катализируют разрывы, в результате которых образуются фрагменты ДНК с выступающими 5' – концами, под действием других – с выступающими 3' – концами, третьи разрезают ДНК по оси симметрии с образованием фрагментов с тупыми концами.

При разрезании могут образовываться как тупые, так и липкие концы. Липкие концы могут иметь длину от 2 до 4 нуклеотидов и быть 3'-выступающими (PstI) или 5' -выступающими (BamHI) .

Одинаковые липкие концы могут образоваться при действии разных рестриктаз: например BamHI, BclI, MboI и Sau3a образуют выступающий 5'-конец:

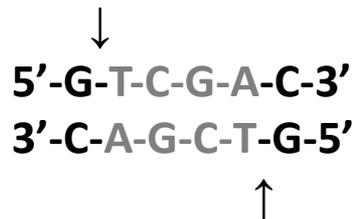
5'-GATC-3'

хотя сайты узнавания у них различаются:

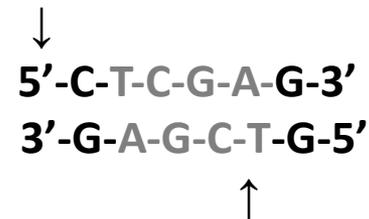


Липкие концы, образованные при действии разных рестриктаз, могут оказаться комплементарными друг другу, что позволяет сшивать фрагменты ДНК, разрезанные разными рестриктазами, только не следует забывать, что при таком сшивании сайты узнавания обеих или одной из рестриктаз могут исчезнуть:

Сайт узнавания Sall



Сайт узнавания XhoI



Липкие концы, которые получаются при разрезании этими рестриктазами:

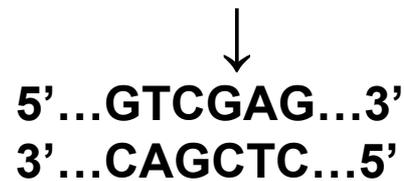
Sall



XhoI

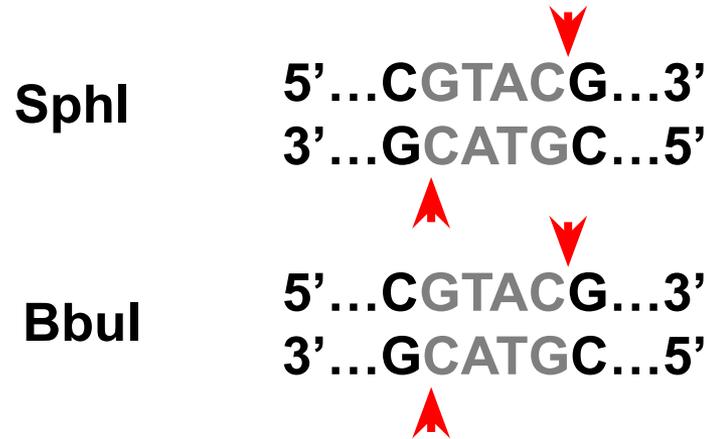


Лигирование



- оба сайта узнавания исчезают !

Рестриктазы, выделенные из разных источников и узнающие один и тот же сайт, называются **изошизомерами**. Важно, что узнают они один и тот же сайт и режут его одинаково (например Sph I и Bbu I).



Изошизомеры — это пары эндонуклеаз рестрикции, имеющих специфичность к распознаванию одинаковых последовательностей, но иногда отличающихся по наличию **метилованных нуклеотидных остатков**, и разрезающих эти последовательности в одинаковых местах.

Первый выделенный фермент для узнавания и специфического разрезания заданной последовательности, называют **прототипом**, а все остальные подобные рестриктазы называют **изошизомерами**.

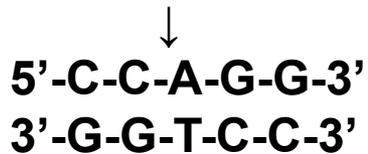
Изошизомеры выделяют из разных штаммов бактерий и поэтому разные изошизомеры могут требовать *разных условий реакции*.

Гетерошизомеры (неошизомеры)

Фермент, узнающий такую же последовательность, но разрезающий её по-другому, называют **гетерошизомером (неошизомером)**.

Изошизомеры, таким образом, являются частным случаем гетерошизомеров. Например, рестриктазы *Sma* I (GGG[^]CCC) и *Xma* I (G[^]GGCCC) являются гетерошизомерами, но не изошизомерами друг для друга.

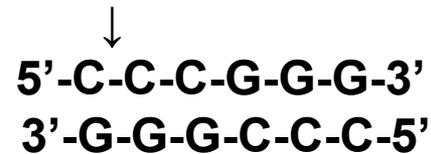
BstNI



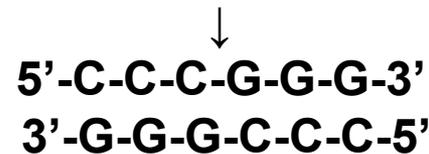
EcoRII



XmaI



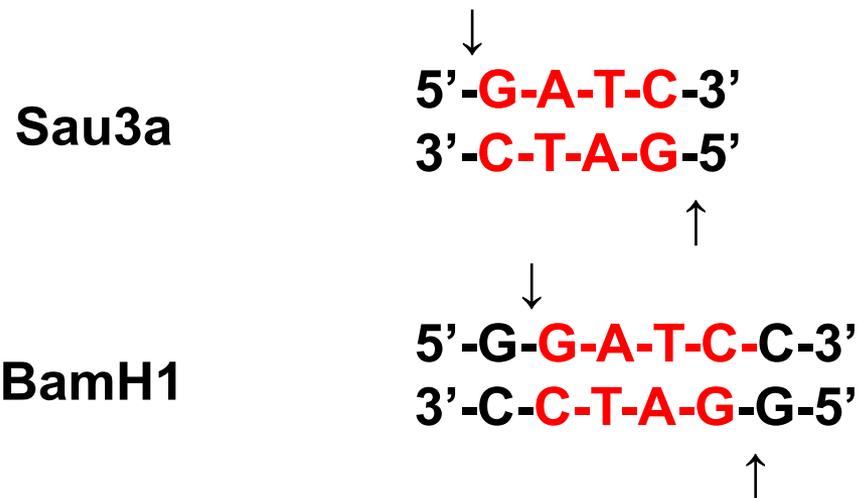
SmaI



Изокаудомеры

Рестриктазы, распознающие совершенно разные последовательности, но образующие одинаковые концы, называют **изокаудомерами**.

Иногда тетрануклеотидные последовательности, узнаваемые одними рестриктазами, находятся внутри гексануклеотидных последовательностей, узнаваемых другими рестриктазами, например:



Из предположения, что участки узнавания рестриктазами распределены по цепи случайно, следует, что тетрануклеотидная мишень будет встречаться один раз на каждые 256 нуклеотидов (4^4), тогда как гексануклеотидная мишень должна встречаться один раз на каждые 4096 нуклеотидов (4^6).

Поэтому при разрезании одной и той же ДНК BamH1 дает крупные фрагменты, а Sau3a – более мелкие.

Фрагменты ДНК, полученные рестрикцией Sau3a могут быть клонированы в векторы, содержащие сайт рестрикции BamH1.

Примеры сайтов узнавания и способов разрезания ДНК для рестриктаз типа II

Рестриктаза	Сайт узнавания. Стрелки указывают способ разрезания.	Примечания
BamHI	↓ 5'-G-G-A-T-C-C- 3'-C-C-T-A-G-G- ↑	Узнается палиндром из 6 пар нуклеотидов, при разрезании образуется выступающий 5'-конец длиной 4 нуклеотида
PstI	↓ 5'-C-T-G-C-A-G- 3'-G-A-C-G-T-C- ↑	Узнается палиндром из 6 пар нуклеотидов. Образуется выступающий 3'-конец длиной 4 нуклеотида
Clal	↓ 5'-A-T-C-G-A-T- 3'-T-A-G-C-T-A- ↑	Узнается палиндром из 6 пар нуклеотидов, образуется 5'-выступающий липкий конец длиной всего в 2 нуклеотида
HaeII	↓ 5'-R-G-C-G-C-Y- 3'-Y-C-G-C-G-R- ↑	Узнается палиндром из 6 пар нуклеотидов, но есть «нестрогие». R-пиримидин, Y – пурин. Образуется выступающий 3'-конец.
SmaI	↓ 5'-C-C-C-G-G-G- 3'-G-G-G-C-C-C- ↑	Узнается палиндром из 6 пар нуклеотидов. Разрез с образованием «тупых» концов.
HinI	↓ 5'-G-A-N-T-C- 3'-C-T- <u>N</u> -A-G- ↑	Узнается 5 пар оснований, но палиндром разделен нуклеотидом N – любым (и, соответственно, ему комплементарным). Разрез приводит к образованию выступающего 5'-конца длиной 3 нуклеотида
MboI, Sau3a	↓ 5'-G-A-T-C- 3'-C-T-A-G- ↑	Узнается палиндром из 4-х пар нуклеотидов, образуется выступающий 5'-конец длиной 4 нуклеотида.
HpaII	↓ 5'-C-C-G-G- 3'-G-G-C-C- ↑	Узнается палиндром из 4-х пар нуклеотидов, при разрезании образуется 5'-выступающий конец длиной 2 нуклеотида
HaeIII	↓ 5'-G-G-C-C- 3'-C-C-G-G- ↑	Узнается палиндром из 4-х пар оснований, разрез происходит с образованием «тупых» концов
NotI	↓ 5'-G-C-G-G-C-C-G-C- 3'-C-G-C-C-G-G-C-G- ↑	Узнается палиндром из 8 пар нуклеотидов, при разрезании образуется 5'-выступающий липкий конец длиной 4 нуклеотида.
Bgl I	↓ 5'-GCCNNNNNGGC- 3'-CGG <u>NNNNN</u> CCG- ↑	Узнается палиндром из 6 пар нуклеотидов, разделенных любыми 5-ю парами нуклеотидов (N-нуклеотид, <u>N</u> -комплементарный ему нуклеотид)

Некоторые выводы, которые можно сделать, изучая сайты разрезания для рестриктаз

- I. Одинаковы липкие концы могут образоваться при действии разных рестриктаз: например BamHI, BclI, MboI и Sau3a образуют выступающий 5'-конец 5'-GATC-3', хотя сайты узнавания у них различаются*

- II. Разные рестриктазы (не изошизомеры) могут узнавать одну и ту же последовательность, но резать ее по-разному*

- III. Иногда тетрануклеотидные последовательности, узнаваемые одними рестриктазами, находятся внутри гексануклеотидных последовательностей, узнаваемых другими рестриктазами*

Эффективность рестрикции

Помимо сайта узнавания, рестриктазам нужны соседние любые нуклеотиды для нормальной посадки. Это важно, когда разрезание идет по двум близко лежащим сайтам или при обрезании ПЦР-ных фрагментов.

Условия рестрикции

- Температура – 37 °С или как указано в паспорте
- Время – зависит от количества ДНК и активности рестриктаз
- Буферы – низко-, средне- и высокосолевого, для SmaI – отдельный
- Последовательность разрезания при использовании разных рестриктаз., требующих разных буферов - сначала в низкосолевого, потом добавить соль и следующую рестриктазу
- Хранение – при -20 °С в буфере с 50% глицерином. В процессе работы – только во льду!

Для каждого фермента рестрикции существуют оптимальные условия реакции, которые приводятся в описании, прилагаемом фирмой-изготовителем. Основные параметры – это температура инкубации и состав буфера. К температурному режиму предъявляются достаточно жесткие требования, тогда как различия между буферами чаще всего незначительны. По требованию к составу буфера рестриктазы делятся на три группы: ферменты, лучше всего функционирующие при высокой ионной силе, ферменты, для которых желательны средние ее значения, и ферменты, работающие в буферах с низкой ионной силой.

Буферы, используемые при расщеплении рестриктирующими эндонуклеазами

Ионная сила буфера	NaCl мМ	Tris-HCl PH 7,5	MgCl мМ	Дитиотреитол мМ
Низкая	0	10	10	1
Средняя	50	10	10	1
Высокая	100	50	10	1

Примечание: рестриктаза SmaI плохо работает во всех буферах, и для нее готовят специальный буфер.

Обычно все буферные растворы готовят в виде исходных растворов 10-кратной концентрации и хранят при -20°C неопределенно долгое время. К имеющимся в продаже рестриктазам обычно прилагаются соответствующие им буферы.

Сами рестриктазы стабильны при хранении при -20°C в буферах, содержащих 50% глицерина. Ферменты, вынутые из морозильной камеры, следует держать только во льду и не дольше, чем это необходимо.

Когда ДНК необходимо обработать двумя и более рестриктазами, реакцию можно проводить одновременно при условии что все ферменты функционируют в одном и том же буфере. В противном случае следует первым использовать фермент, работающий в буфере с более низкой ионной силой, после этого в реакционную смесь добавить необходимое количество соли и второй фермент и продолжить инкубацию.

Прежде, чем начать работать, следует запомнить следующее

1. Рестриктазы никогда не вынимаются из ледяной бани или холодного штатива.
2. Рестриктазы отбирают только новыми наконечниками.
3. Рестриктазы находятся в буфере с глицерином. Он густой, поэтому взять 1

мкл

наконечником не совсем просто. Лучше взять меньше, чем больше. Объем добавленной в пробу рестриктазы не должен превышать 1/10 от объема смеси для

рестрикции, иначе избыток глицерина ингибирует реакцию.

4. Для рестрикции надо использовать только тридистиллированную воду.

Следует

использовать только новые наконечники, т.к. на вымытых наконечниках могут оставаться фрагменты неизвестных вам нуклеиновых кислот, и вы рискуете

Смесь для рестрикции содержит:
заклонировать именно их, а не нужный вам фрагмент.
Плазмиду или ДНК фрагмент

Рестриктазу(зы)

Соответствующий буфер

TDW

Если плаزمида при выделении не очищена от РНК, то в смесь добавляют рибонуклеазу. Она не мешает рестрикции. Сама РНК процессу рестрикции также не мешает, но она часто мешает увидеть в электрофорезе нужный фрагмент или чисто его вырезать из агарозы.

Смесь для рестрикции обычно готовят, начиная с воды. Рестриктазу добавляют последней.

Время рестрикции плазмидной ДНК в стандартном случае составляет 1- 1,5 часа.

Если требуется разрезать большое количество ДНК или внести фермент в большое количество проб, то следует иметь в виду, что **1 ед. активности рестриктазы** – это количество фермента, рестрицирующее **1 мкг ДНК** за **1 час** при стандартной температуре.

Количество фермента может быть уменьшено за счет увеличения времени реакции.

При аналитической рестрикции предварительно готовится рестрикционная смесь, содержащая все необходимые компоненты кроме ДНК

Другие ферменты молекулярного клонирования

ДНК-полимераза *E.coli*

5'-3'- полимераза

5'-3' экзонуклеаза

3'-5' экзонуклеаза

Применение:

Nis – трансляция – при наличии точечного разрыва фермент 5'-3'-экзонуклеазной активностью съедает все, что справа, а 5'-3'- полимеразной активностью достраивает цепь от точки разрыва. Таким образом, разрыв перемещается вдоль всей цепи до самого конца. Так зашивают бреши и получают зонды. (3'-5'-экзонуклеазной активностью фермент сам себя проверяет)

Достраивание второй цепи к-ДНК. На РНК первая цепь ДНК синтезируется обратной транскриптазой. Потом в пробу добавляют одновременно РНК-азу H и ДНКП I. РНК-аза H разрушает РНК, при этом частично остаются фрагменты РНК, аналогичные фрагментам Оказки, которые служат затравками для ДНКП I.

Можно затупить 3'-выступающие концы, образовавшиеся при действии рестриктаз (использование 3'-5'-экзонуклеазной активности) в присутствии dNTP (активность на двуцепочечной ДНК блокируется 5'-3'-полимеразной активностью), но на практике для этой цели используют ДНКП фага T-4, у нее эта активность на порядок выше.

Фрагмент Кленова

Получают протеолизом ДНКП I.

5'-3'- полимераза

3'-5' экзонуклеаза

Применение:

Достраивание укороченных 3'-концов.

Теоретически возможно затупление выступающих 3'-концов в присутствии dNTP, но для этого используют более активную ДНКП фага T-4.

Возможен синтез второй цепи к-ДНК, но лучше использовать ДНКП I, т.к. она сама себя проверяет и, следовательно, делает меньше ошибок.

Секвенирование по Сэнгеру

Синтез зондов с рассеянной затравкой (в отличие от действия ДНКП I получаются короткие меченые куски, длина которых соответствует расстоянию между участками отжига олигов рассеянной затравки).

ДНК-полимераза фага T-4

5'-3'-полимераза

3'-5'-экзонуклеаза

Применение

1. Достраивание укороченных 3'-концов
2. Затупление выступающих 3'-концов в присутствии дезоксинуклотидтрифосфатов.
3. Секвенирования по Сэнгеру (фермент имеет большую процессивность, чем фрагмент Кленова)
4. Сайт-направленный мутагенез (достраивание второй цепи после отжига с праймером)
5. Синтез второй цепи к-ДНК.

Полинуклеотидкиназа фага T-4

Фосфорилирует фрагменты ДНК, у которых отсутствуют 5'-концевые фосфаты

Применение:

Фосфорилирование ПЦР-ных фрагментов (если они перед клонированием не обрабатываются рестриктазами – рестриктазы режут так, что на 5'-конце остается фосфатная группа).

Фосфорилирование синтетических полилинкеров

Щелочная фосфатаза

Отщепляет 5'-фосфатную группу

Применение:

Предотвращение сшивания вектора самого на себя при клонировании по единственному сайту.

ДНК-лигаза

Применение:

Сшивает липкие и тупые концы ДНК

Нуклеаза S

Деградирует однонитчатую ДНК – выступающие концы и однонитчатые петли

Применение:

Затупление 5'-выступающего липкого конца. Вообще 5'-выступающий липкий конец предпочтительно не удалять. Лучше достраивать укороченный 3'-конец.

Выступающий 3'-конец тоже можно затупить, но лучше это делать фрагментом Кленова.

- (При низкой температуре (20°) нуклеаза S1 избирательно расщепляет выступающие одноцепочечные концы, не затрагивая двухцепочечные участки молекулы ДНК. Однако, если реакция проведена не до конца, некоторые выступающие нуклеотиды могут остаться неотщепленными, а при слишком длительной инкубации или избытке фермента могут отщепиться 2-3 нуклеотида от тупого конца. При высокой температуре до 70 градусов – активность этой нуклеазы только увеличивается, но одновременно увеличивается и количество одноцепочечных участков ДНК, поэтому двуцепочечная ДНК расщепляется гораздо быстрее при высокой температуре.)

Обратная транскриптаза

Применение:

Синтез первой цепи кДНК на матрице РНК

Терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза

Применение:

Пришивание к 3'-концу [поли(dA)], [поли (dG)] и др. в процессе получения липких концов.

ПолиА-полимераза

Применение:

Нематричное пришивание полиА к 3'-концу РНК, что делает возможным использование олиго-dТ в качестве затравки при синтезе кДНК

РНК-полимеразы фагов Т7, Т3, SP6

Применение:

Получение транскриптов *in vitro*

Получение РНК-зондов

Какие приемы обычно используют при создании конструкций?

Как соединять фрагменты рекомбинантной ДНК?

1. **Липкие концы** – сшиваем лигазой по липким концам.

2. **Тупые концы** – сшиваем лигазой по тупым концам.

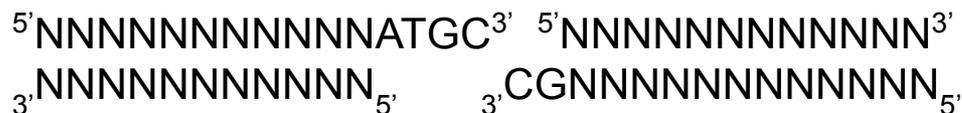
3. **Один конец тупой** – другой липкий. Можно затупить липкий конец.

↔ 3'-выступающий конец тупится Т-4ДНК-полимеразой в присутствии дезоксинуклеотидтрифосфатов.

↔ 3'-укороченный конец достраивается Кленовым.

↔ 5'-выступающий конец обычно не удаляют, а предпочитают достраивать укороченный 3'-конец. Но в принципе его можно удалить нуклеазой S1 или нуклеазой из проростков фасоли.

4. Липкие концы разной длины



↔ брешь застраивают Кленовым в присутствии dA и dT, потом лигируют

7. Ориентация фрагмента

- В случае клонирования по двум разным сайтам с липкими концами ориентация фрагмента задана однозначно.
- Фрагмент может вставиться в двух разных ориентациях, если концы тупые, или фрагмент вырезан только одной рестриктазой. Тогда надо проверять ориентацию. Для этого играют с имеющимися сайтами разрезания. Смысл этих игр: если у нас одна ориентация, то при рестрикции такими-то и такими-то рестриктазами получатся одни фрагменты, а если ориентация другая – то другие фрагменты. Каждая такая ситуация уникальна, и все решается подбором.

8. Полезные сведения

- Рестриктазы NcoI и SphI режут с образованием АУГ-кодона (то есть потенциально иницирующего кодона трансляции, если он к тому же попадет в рамку считывания).
- Рестриктаза XbaI режет с образованием стоп-кодона трансляции (опять-таки, если он попадет в рамку считывания).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — экспериментальный метод молекулярной биологии, способ значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе).

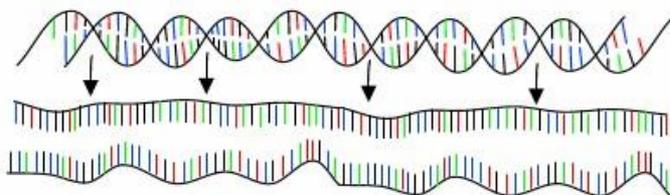
Помимо простого увеличения числа копий ДНК (этот процесс называется **амплификацией**), ПЦР позволяет производить множество других манипуляций с генетическим материалом:

1. введение мутаций, сращивание фрагментов ДНК
2. широко используется в биологической и медицинской практике:
 - а) для диагностики заболеваний (наследственных, инфекционных)
 - б) для установления отцовства
 - с) для клонирования генов
 - д) выделения новых генов

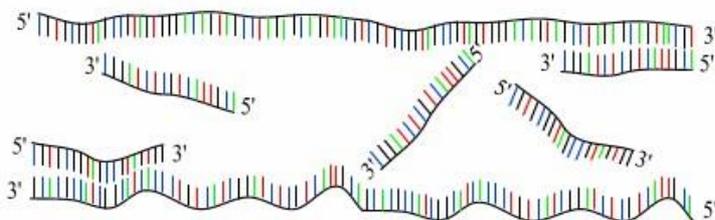
Принципиальная схема ПЦР

Метод основан на многократном избирательном копировании определённого участка ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*). При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце.

30-40 циклов из 3 этапов

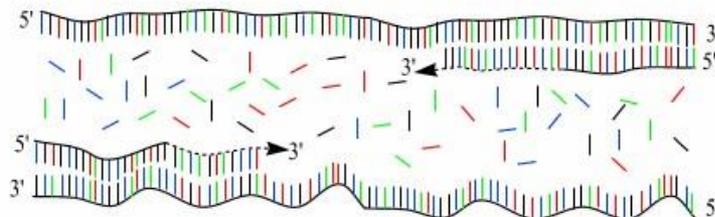


Шаг 1: денатурация



Шаг 2: отжиг

прямой и обратный
праймеры!!!



Шаг 3: удлинение цепи

только dNTP's

Проведение ПЦР

С помощью ПЦР амплифицируются короткие (до 10 kb) участки ДНК с известными концами

Для проведения ПЦР в простейшем случае требуются следующие компоненты:

- *ДНК-матрица*, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать
- *Два праймера*, комплементарные концам требуемого фрагмента
- Термостабильная *ДНК-полимераза*
- *Дезоксинуклеотидтрифосфаты* (A, G, C, T)
- *Буферный раствор*

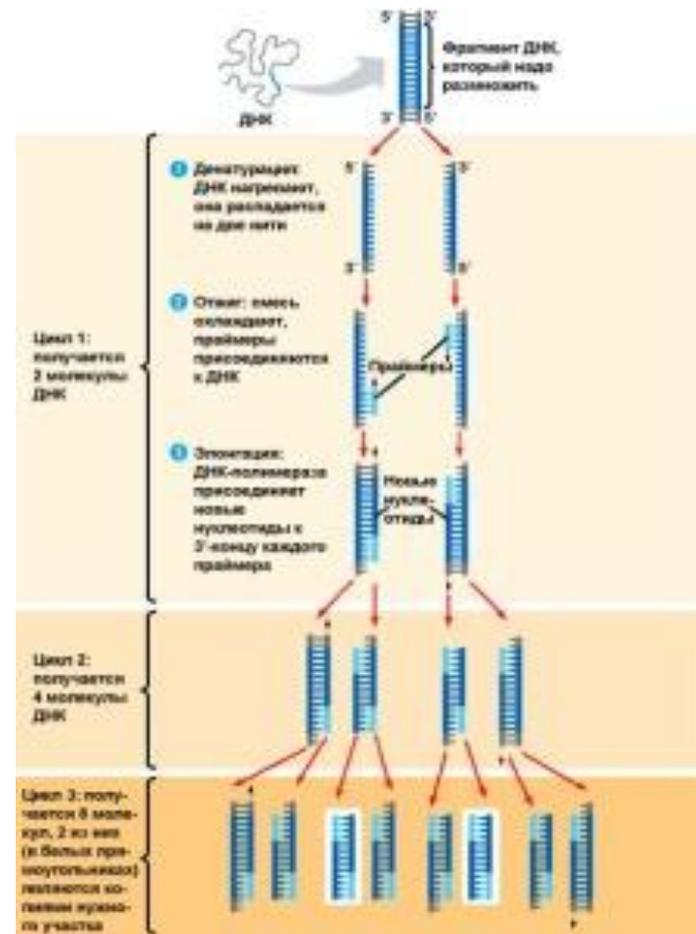
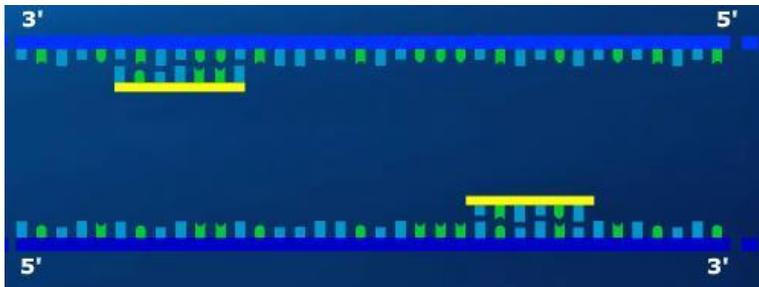


ПЦР проводят в амплификаторе (термоциклёре) — приборе, обеспечивающем периодическое охлаждение и нагревание пробирок, обычно, с точностью не менее $0,1^{\circ}\text{C}$



Праймеры

Специфичность ПЦР основана на образовании комплементарных комплексов между матрицей и праймерами, короткими синтетическими олигонуклеотидами длиной 18—30 букв. Каждый из праймеров комплементарен одной из цепей двуцепочечной матрицы, обрамляя начало и конец амплифицируемого участка.



Важнейшая характеристика праймеров — **температура плавления (T_m)** комплекса праймер-матрица.

Она определяется, как температура, при которой половина сайтов связывания праймера занята. Если праймер короткий и T_m мала, то праймер может оказаться частично комплементарен другим участкам матричной ДНК, что может привести к появлению неспецифических продуктов.

Сверху температура плавления ограничена оптимумом действия полимеразы, активность которой падает при температуре выше 80 °С.

Температура плавления олигонуклеотидов наиболее точно рассчитывается с использованием наиболее подходящих термодинамических расчетов по формуле:

$$T_m^{\text{primer}} = \frac{\Delta H}{\Delta S + R \ln (c/4)} - 273.15^\circ\text{C} + 16.6 \log_{10} [K^+]$$

H – это энтальпия, S – энтропия для образования спирали, R – молярная газовая константа, а c – концентрация праймеров.

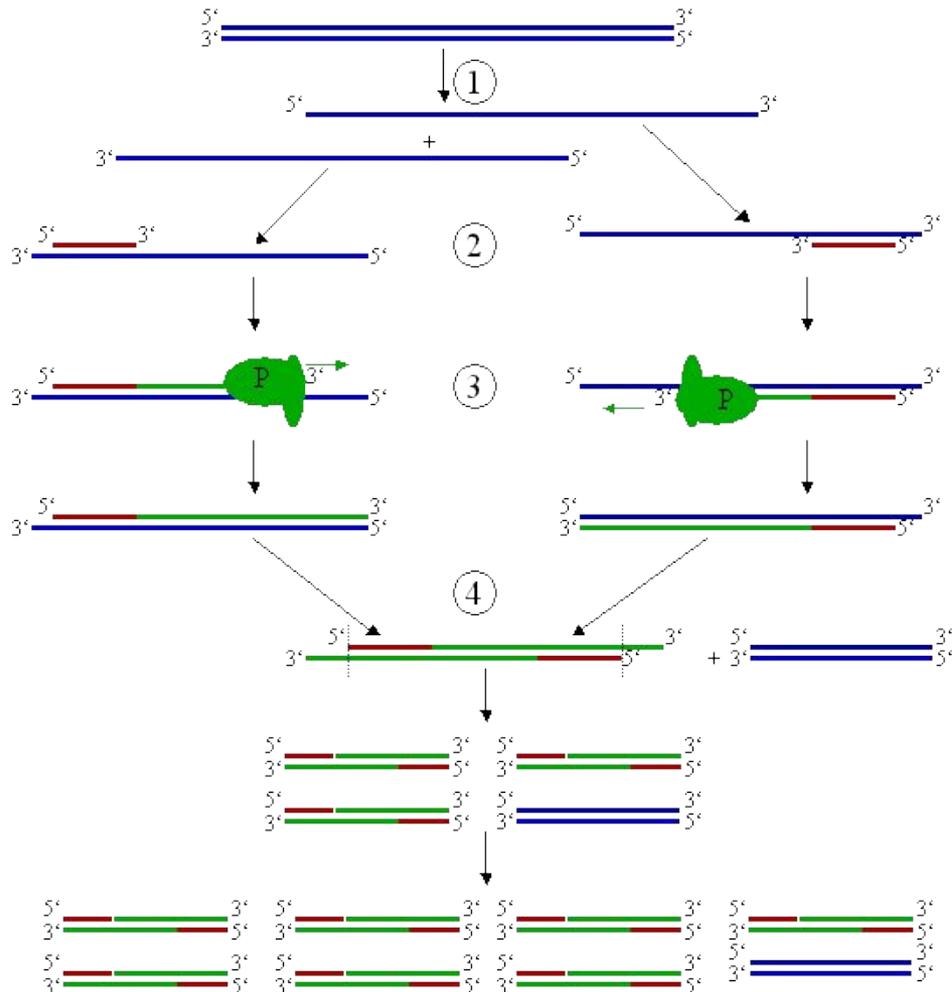
$$T_m \text{ primer} = 4*(G+C)+2*(A+T)-12$$

При выборе праймеров желательно придерживаться следующих критериев:

1. Размер праймера должен быть 16-25 нуклеотидов. Меньше 16-ти: слабая связь с целью
2. Разница в температуре плавления праймеров - не более 5 градусов
3. Ц+Г должно быть 50-60 %
4. Для улучшения качества отжига рекомендуется подбирать праймеры так, чтобы последние несколько нуклеотидов 3' - конца праймера содержали GC-основания
5. Отсутствие внутренней вторичной структуры (праймеры не должны быть само- и взаимнокомплиментарными)
6. Отсутствие комплементарности между 3'-концами (чтобы не образовывалось праймер-димеров)
7. Оптимальная концентрация праймеров подбирается эмпирически, но не должна быть больше 50 пикомолей на пробирку - иначе начнётся неспецифический отжиг праймеров
8. Упрощенный расчет оптимальной температуры отжига праймера:
 $T_m = [(A+T) \times 2 \text{ }^\circ\text{C}] + [(G+C) \times 4 \text{ }^\circ\text{C}]$ (если суммарная длина олигонуклеотида не превышает 20 оснований)
 $T_m = 22 + 1.46([2 \times (G+C)] + (A+T))$ (если суммарная длина олигонуклеотида составляет 20-30 оснований)
9. Область отжига праймеров должна находиться вне зон мутаций, делеций или инсерций в пределах видовой или иной, взятой в качестве критерия при выборе праймеров, специфичности.

Ход реакции

Обычно при проведении ПЦР выполняется 20—35 циклов, каждый из которых состоит из трех стадий



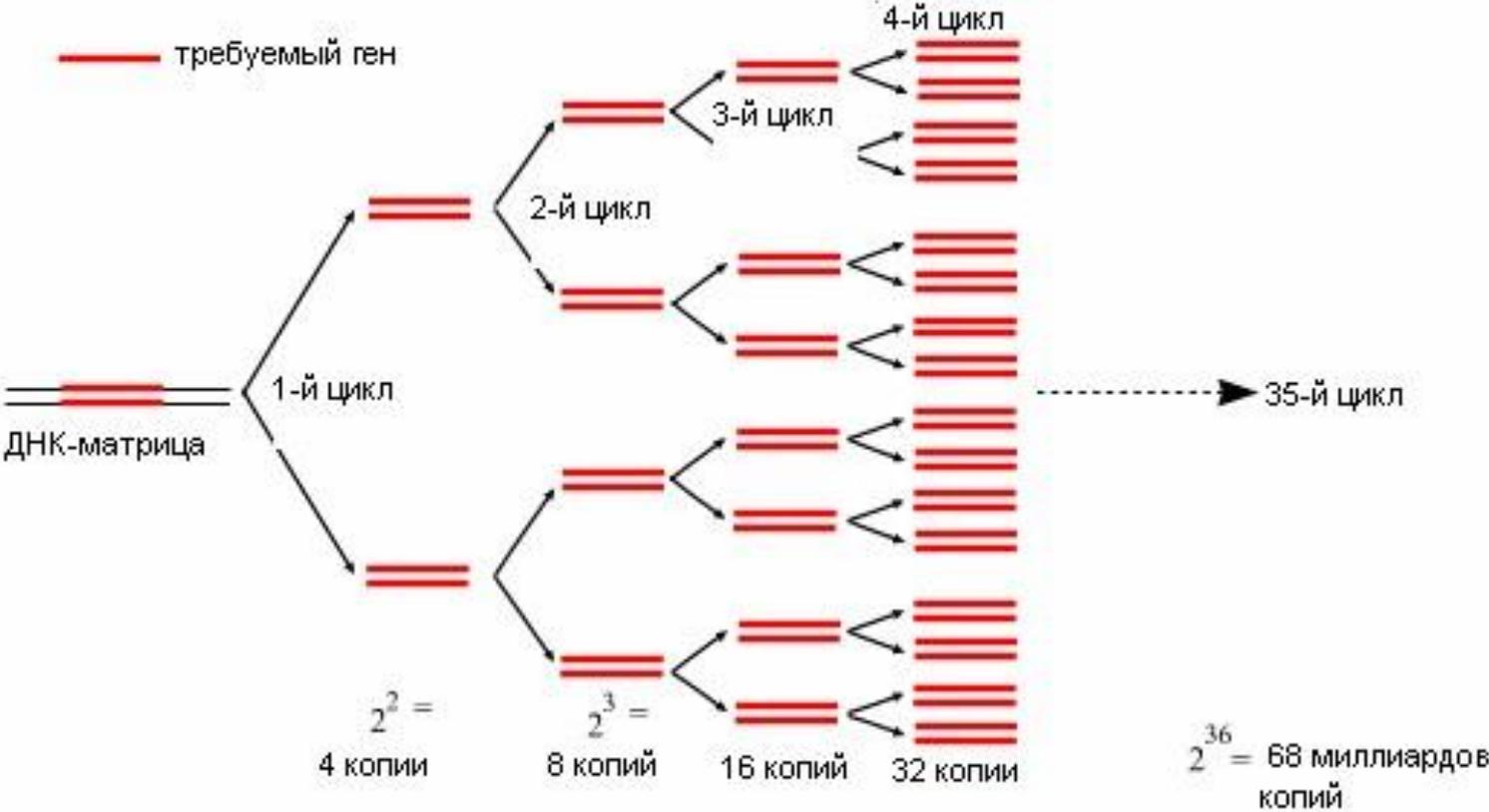
1. Двухцепочечную ДНК-матрицу нагревают до 94—96°C (или до 98°C, если используется особенно термостабильная полимераза) на 0,5—2 мин., чтобы цепи ДНК разошлись. Эта стадия называется *денатурацией* — разрушаются водородные связи между двумя цепями. Иногда перед первым циклом проводят предварительный прогрев реакционной смеси в течение 2—5 мин. для полной денатурации матрицы и праймеров.

2. Когда цепи разошлись, температуру понижают, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей. Эта стадия называется *отжигом*. Температура отжига зависит от праймеров и обычно выбирается на 4—5°C ниже их температуры плавления. Время стадии — 0,5—2 мин.

3. ДНК-полимераза реплицирует матричную цепь, используя праймер в качестве затравки. Это — стадия *элонгации*. Температура элонгации зависит от полимеразы. Часто используемые полимеразы Taq и Pfu наиболее активны при 72°C. Время элонгации зависит как от типа ДНК-полимеразы, так и от длины амплифицируемого фрагмента. Обычно время элонгации принимают равным одной минуте на каждую тысячу пар оснований.

4. Закончен первый цикл. Две получившиеся ДНК-цепи служат матрицей для следующего цикла, поэтому количество матричной ДНК в ходе каждого цикла удваивается. После окончания всех циклов часто проводят дополнительную стадию *финальной элонгации*, чтобы достроить все одноцепочечные фрагменты. Эта стадия длится 10—15 мин.

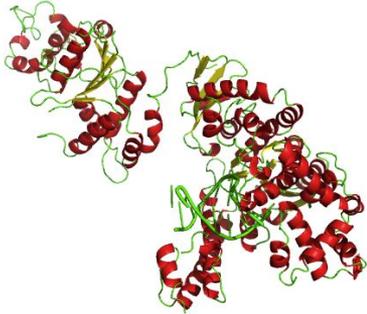
Экспоненциальная амплификация ДНК в методе ПЦР



PCR Polymerase chain reaction.mp4

ДНК полимераза

Первой использованной термостабильной ДНК полимеразой была **Taq ДНК** полимераза, выделенная из бактерий *Thermus aquaticus*. Впервые открыта Томасом Броком и Хадсоном Фризом в районе Больших Фонтанов Йеллоустонского национального парка.



Taq-полимераза была впервые охарактеризована в 1976 году. Этот фермент состоит из 832 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу около 94 кДа



Характеристика некоторых ДНК полимераз, используемых для ПЦР

	Taq/ AmpliTaq®	Vent™	Deep- Vent™	Pfu	Tth	UITma™
Источник	Thermus aquaticus	Thermococcus litoralis	Pyrococcus GB-D	Pyrococcus furiosus	Thermus thermophilus	Thermofoga maritima
Применение	Taq: природное AmpliTaq: для генетической инженерии	Для генетической инженерии. Высокая термостабильность	Для генетической инженерии	Высокоточная амплификация	Для генетической инженерии	Для генетической инженерии
T_{1/2} активности при 95° С (мин.)	40	1380	400	> 120	20	> 50 ^a
5' к 3' экзонуклеазная активность	да	нет	нет	нет	да	нет
3' к 5' экзонуклеазная активность	нет	да	да	да	нет	да
Продуктивность	50-60	?	7	?	30-40	?
Скорость удлинения цепи (нукл./сек)	75	?	> 80	60	> 33	?
Полученные концы ДНК	3'А	> 95% тупых	> 95% тупых	?	3'А	Тупые
Мол.вес в кДа	94	?	?	92	94	70

Реакционные буферы и $MgCl_2$ в реакциях

ПЦР

В дополнение к реагентам, непосредственно участвующим в реакции, метод ПЦР требует подходящего буфера. Состав буфера зависит от типа и характеристики фермента, который предполагается использовать, и большинство поставщиков обычно предоставляют 10x (десятикратный) буфер для использования с соответствующим ферментом. Наиболее обычный реакционный буфер, используемый с Taq/AmpliTaq® ДНК полимеразой содержит:

10 mM Tris, pH 8.3

50 mM KCl

1.5 – 2.5 mM $MgCl_2$

Присутствие дивалентных катионов является критическим для ПЦР. Концентрация $MgCl_2$ в конечной реакционной смеси обычно находится в пределах от 0.5 до 5.0 mM, и оптимальная концентрация определяется эмпирически

Mg^{2+} ионы:

1. образуют растворимый комплекс с dNTP, который необходим для присоединения нуклеотидов
2. стимулируют полимеразную активность
3. увеличивают T_m взаимодействия праймер/матрица (и, следовательно, стабилизируют взаимодействие дуплекса)
 - i. Низкая концентрация Mg^{2+} приводит к снижению выхода продукта (или к его полному отсутствию)
 - ii. Высокая концентрация Mg^{2+} приводит к накоплению неспецифичных продуктов вследствие неправильной работы праймера.

Некоторые ДНК полимеразы достигают оптимального уровня активности только в присутствии таких добавок, как хелатные агенты: DMSO, PEG 6000, формамид, глицерин, спермидин и неионные детергенты

«Эффект плато»

Процесс накопления специфических продуктов амплификации по геометрической прогрессии идет лишь ограниченное время, а затем его эффективность критически падает – «эффект плато».

Термин «эффект плато» используют для описания процесса накопления продуктов ПЦР на последних циклах амплификации, когда количество ампликонов достигает 0,3–1 пмолей.

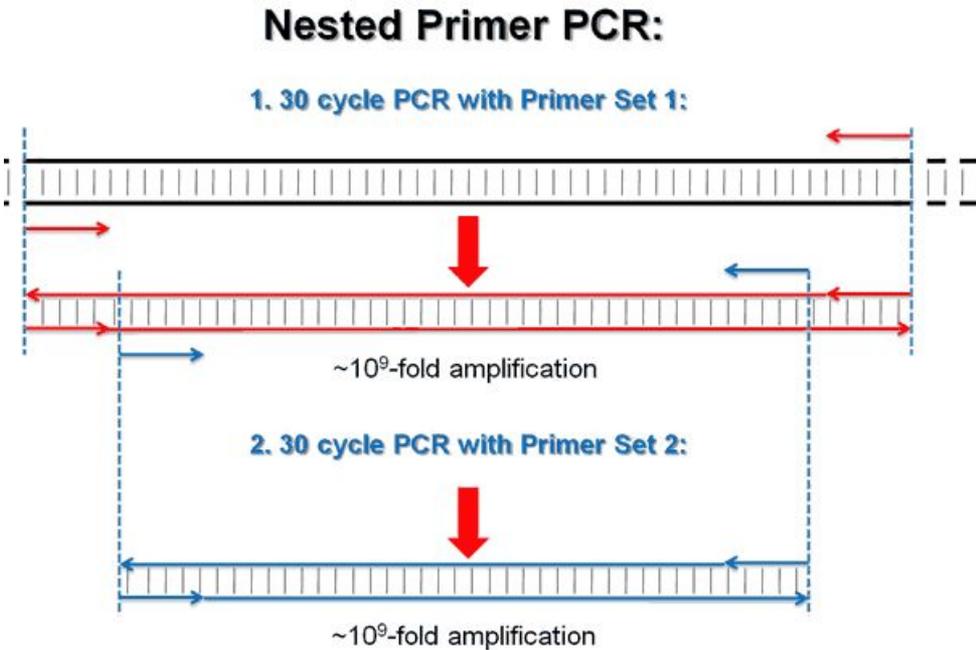
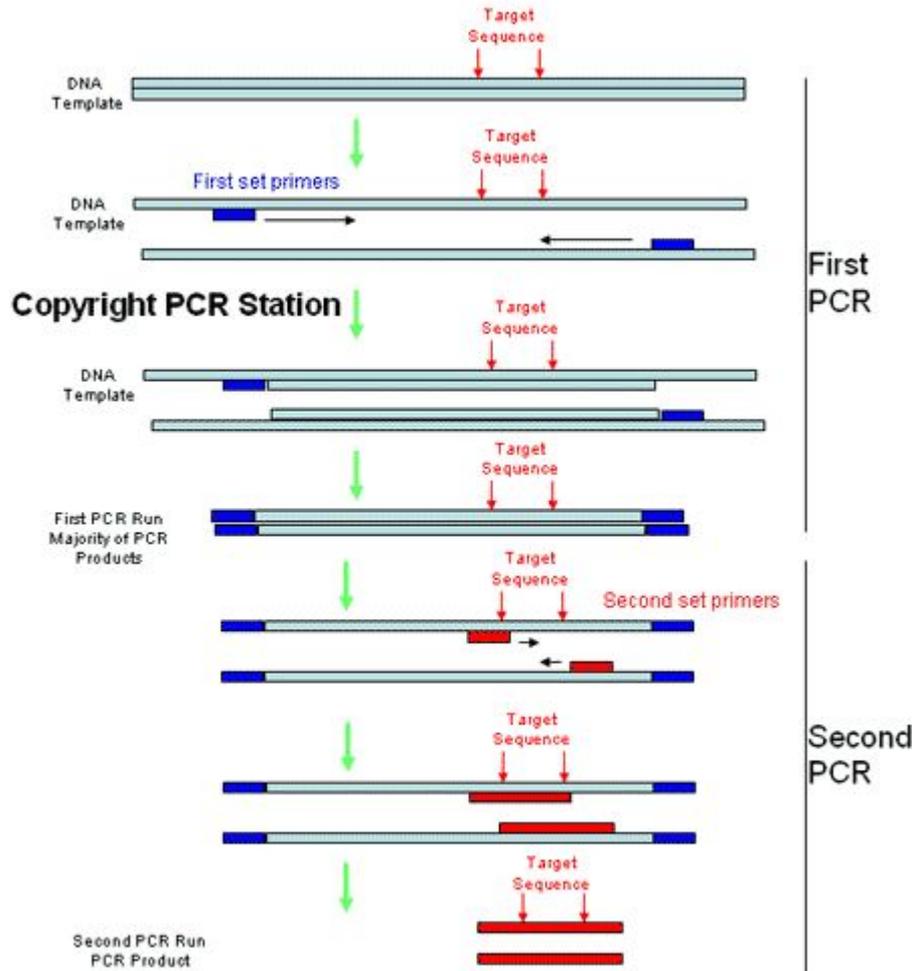
В зависимости от условий и количества циклов реакции амплификации, на момент **достижения «эффекта плато»** влияют:

1. Утилизация субстратов (dNTP и праймеров)
2. Стабильность реагентов (dNTP и фермента)
3. Количество ингибиторов, включая пирофосфаты и ДНК-дуплексы
4. Неспецифические продукты и праймер-димеры, конкурирующие за праймеры, dNTP и полимеразу
5. Концентрация специфического продукта за счет неполной денатурации при высокой концентрации ампликонов

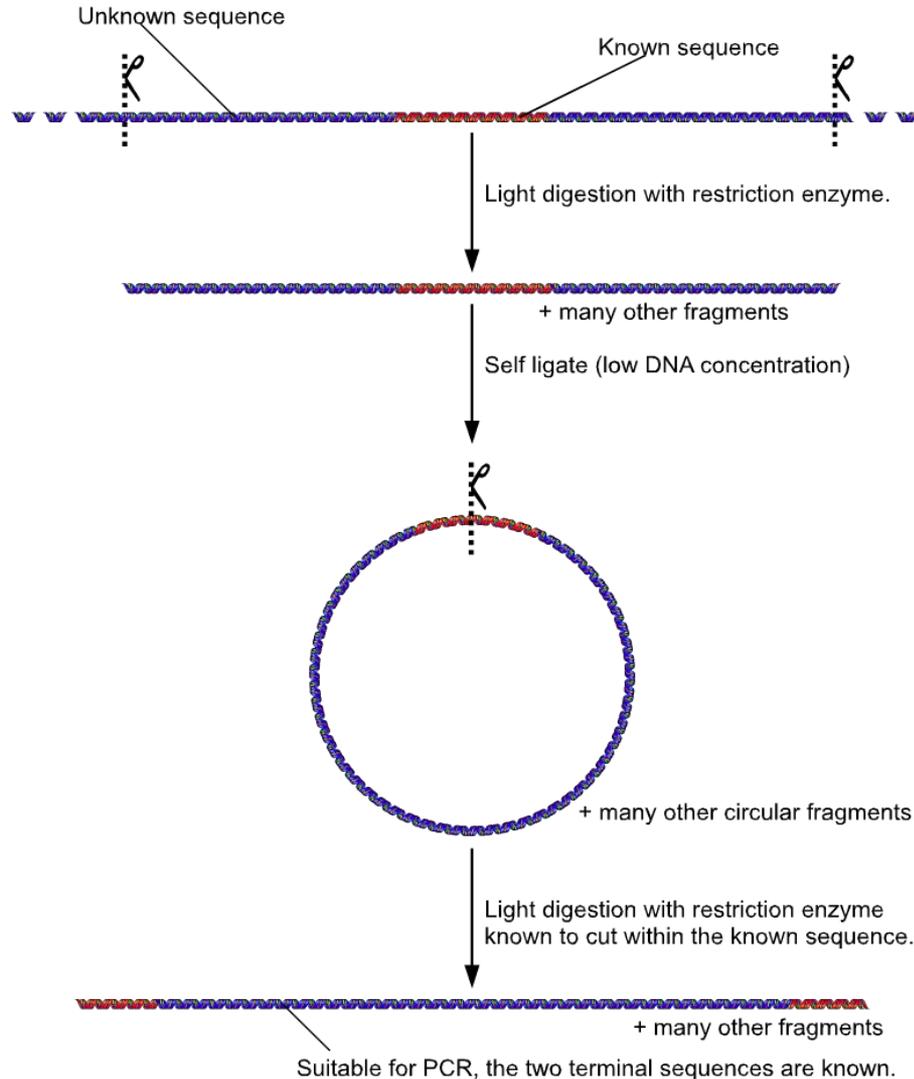
Некоторые разновидности ПЦР

- 1. «Вложенная» ПЦР (Nested PCR) - есть вторая пара праймеров, которая амплифицирует кусочек полученного кусочка.
- 2. «Инвертированная» ПЦР (Inverse PCR) - перед проведением ПЦР с помощью серии ферментативных реакций как бы приклеивают известные фрагменты на концы неизвестного, чтобы можно было его амплифицировать.
- 3. ПЦР с обратной транскрипцией (Reverse Transcription PCR, RT-PCR) - берется РНК (молекула, которая является промежуточным этапом между ДНК и белками в живой клетке), а из нее с помощью фермента обратной транскриптазы получают ДНК, с которой уже проводят ПЦР. Это удобно, например, для того, чтобы выявить, какие именно гены в данной клетке экспрессируются.
- 4. Ассиметричная ПЦР (Assymetric PCR) - если нужны продукты амплификации преимущественно одной из двух цепей ДНК. Добавляют неравное количество праймеров.
- 5. Количественная ПЦР в реальном времени (Quantitative real-time PCR) - используются флуоресцентно меченые реагенты, и специальный прибор рассматривает пробирку, в которой идет реакция, и сообщает: "готово столько-то продукта! а теперь уже вдвое больше!"
- 6. ПЦР длинных фрагментов (Long-range PCR) - чтобы амплифицировать длинный (больше 10 тысяч пар оснований) фрагмент, используют ПЦР с двумя полимеразам: одна из них, Taq-полимераза, может синтезировать длинную цепь, а вторая, ДНК-полимераза с 3'5'-экзонуклеазной активностью, может исправить ошибки, допущенные первой.
- 7. Multiplex PCR - добавляют несколько пар праймеров и одновременно амплифицируют несколько фрагментов.

Вложенная ПЦР ([Nested PCR](#) (англ.)) — применяется для уменьшения числа побочных продуктов реакции. Используют две пары праймеров и проводят две последовательные реакции. Вторая пара праймеров амплифицирует участок ДНК внутри продукта первой реакции.

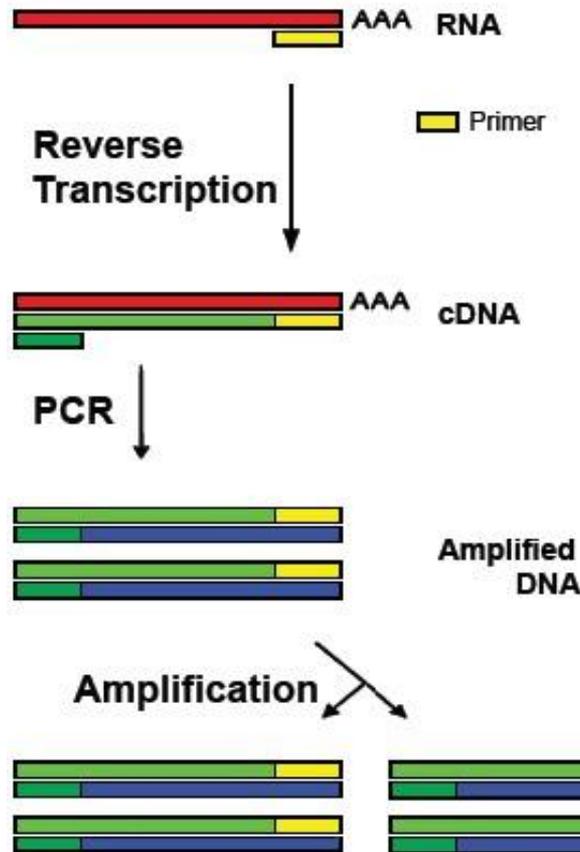


Инвертированная ПЦР (Inverse PCR (англ.)) — используется в том случае, если известен лишь небольшой участок внутри нужной последовательности. Этот метод особенно полезен, когда нужно определить соседние последовательности после вставки ДНК в геном. Для осуществления инвертированной ПЦР проводят ряд разрезов ДНК рестриктазами с последующим соединением фрагментов (лигирование). В результате известные фрагменты оказываются на обоих концах неизвестного участка, после чего можно проводить ПЦР как обычно.



ПЦР с обратной транскрипцией (Reverse Transcription PCR, **RT-PCR**) — используется для амплификации, выделения или идентификации известной последовательности из библиотеки РНК.

Перед обычной ПЦР проводят на матрице мРНК синтез одноцепочечной молекулы ДНК с помощью ревертазы и получают одноцепочечную кДНК, которая используется в качестве матрицы для ПЦР. Этим методом часто определяют, где и когда экспрессируются данные гены.

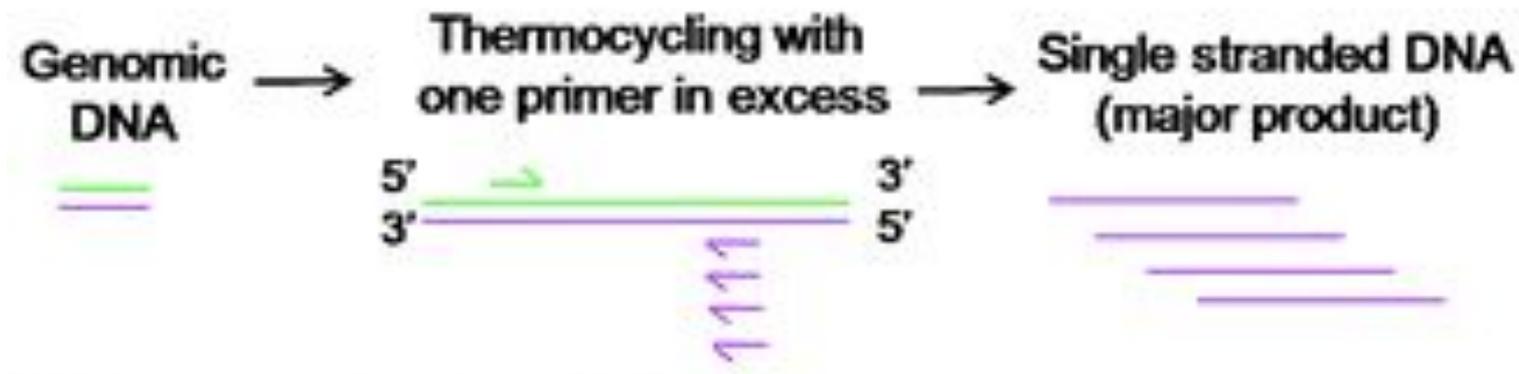


Асимметричная ПЦР (англ. *Asymmetric PCR*) — проводится тогда, когда нужно амплифицировать преимущественно одну из цепей исходной ДНК. Используется в некоторых методиках секвенирования и гибридизационного анализа.

ПЦР проводится как обычно, за исключением того, что один из праймеров берется в большом избытке.

Модификаций этого метода является англ. *Linear-After-The-Exponential-PCR (LATE-PCR)*, в котором используются праймеры с разной концентрацией, и праймер с низкой концентрацией подбирается с высокой (температурой плавления), чем праймер с высокой концентрацией. ПЦР проводят при высокой температуре отжига, тем самым удаётся поддержать эффективности реакции на протяжении всех циклов.

A) Asymmetric PCR



Количественная ПЦР (Quantitative PCR, Q-PCR (англ.)) или **ПЦР в реальном времени** — используется для непосредственного наблюдения за измерением количества конкретного ПЦР продукта в каждом цикле реакции.

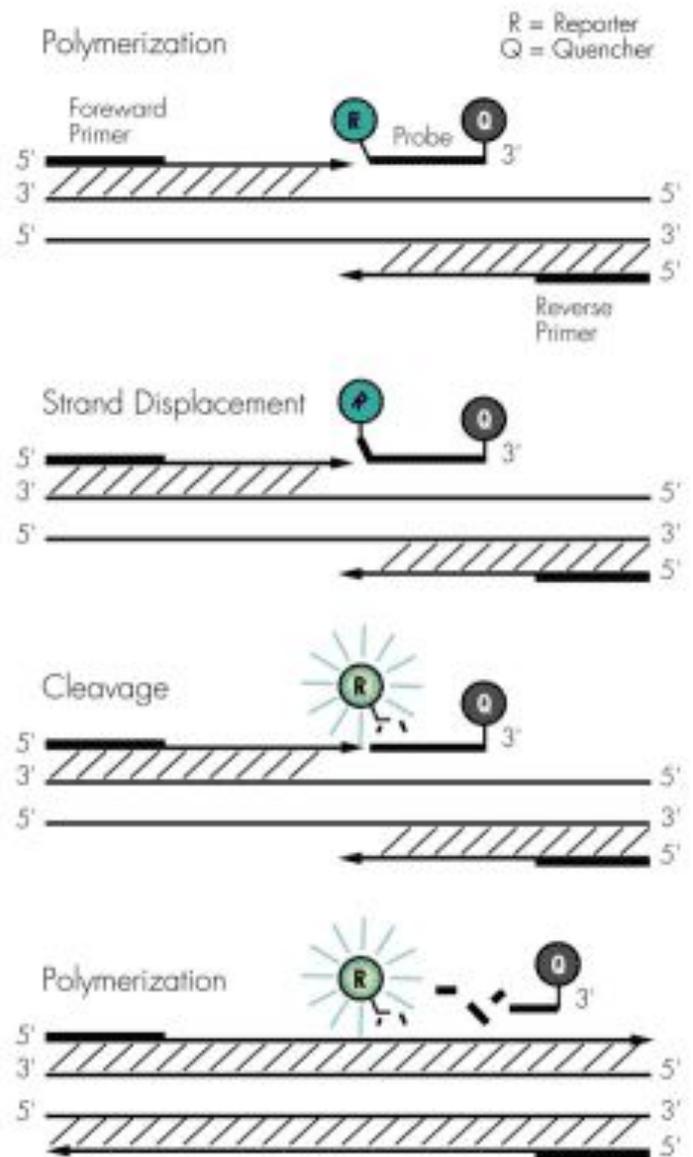
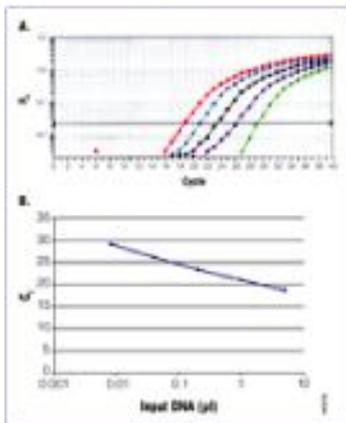
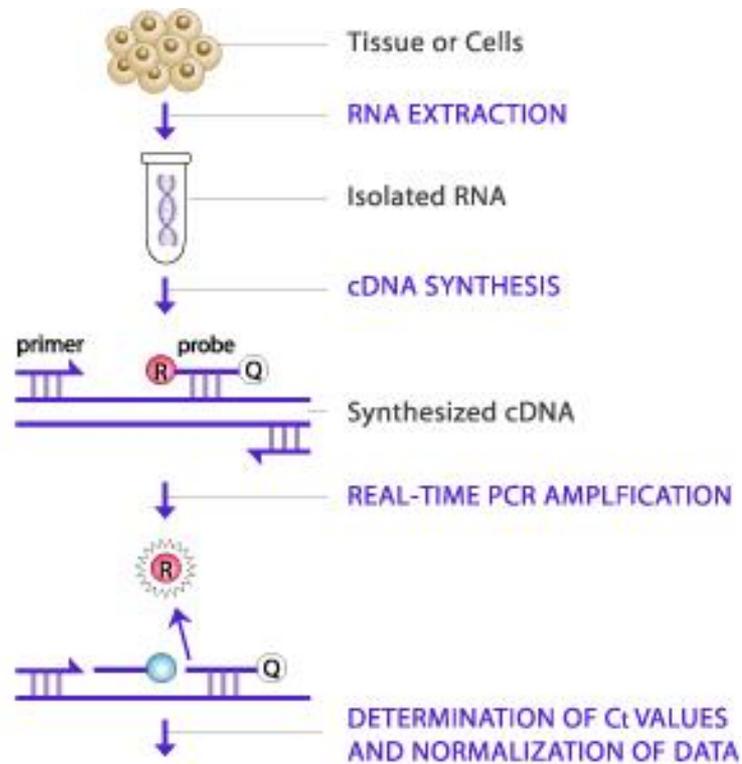
В этом методе используют флуоресцентно-меченые праймеры или ДНК-зонды для точного измерения количества продукта реакции по мере его накопления; или используется флуоресцентный интеркалирующий краситель *Sybr Green I* (но лучше использовать **SYTO 13**), который связывается с двухцепочечной ДНК.

Sybr Green I обеспечивает простой и экономичный вариант для детекции и количественного определения ПЦР-продуктов в ходе ПЦР в режиме реального времени без необходимости использования специфичных флуоресцентных зондов или праймеров.

В ходе амплификации краситель *SYBR Green I* встраивается в малую бороздку ДНК ПЦР продуктов и испускает более сильный по сравнению с несвязанным красителем флуоресцентный сигнал при облучении синим лазером.

SYBR Green I совместим со всеми известными на сегодняшний день приборами для проведения ПЦР в режиме реального времени.

Максимум поглощения для *SYBR Green I* находится при длине волны 494 нм. Кроме главного, в спектре красителя имеются два небольших дополнительных максимума поглощения — при 290 нм и 380 нм. Максимум испускания для *SYBR Green I* находится при длине волны 521 нм (зелёный)



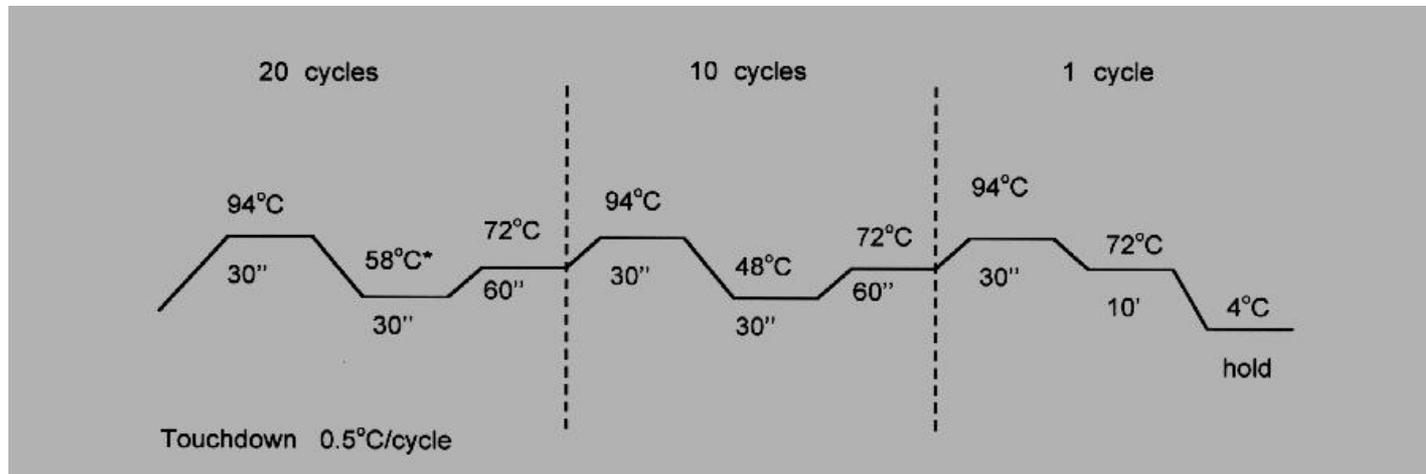
Ступенчатая ПЦР (Touchdown PCR (англ.)) — с помощью этого подхода уменьшают влияние неспецифического связывания праймеров.

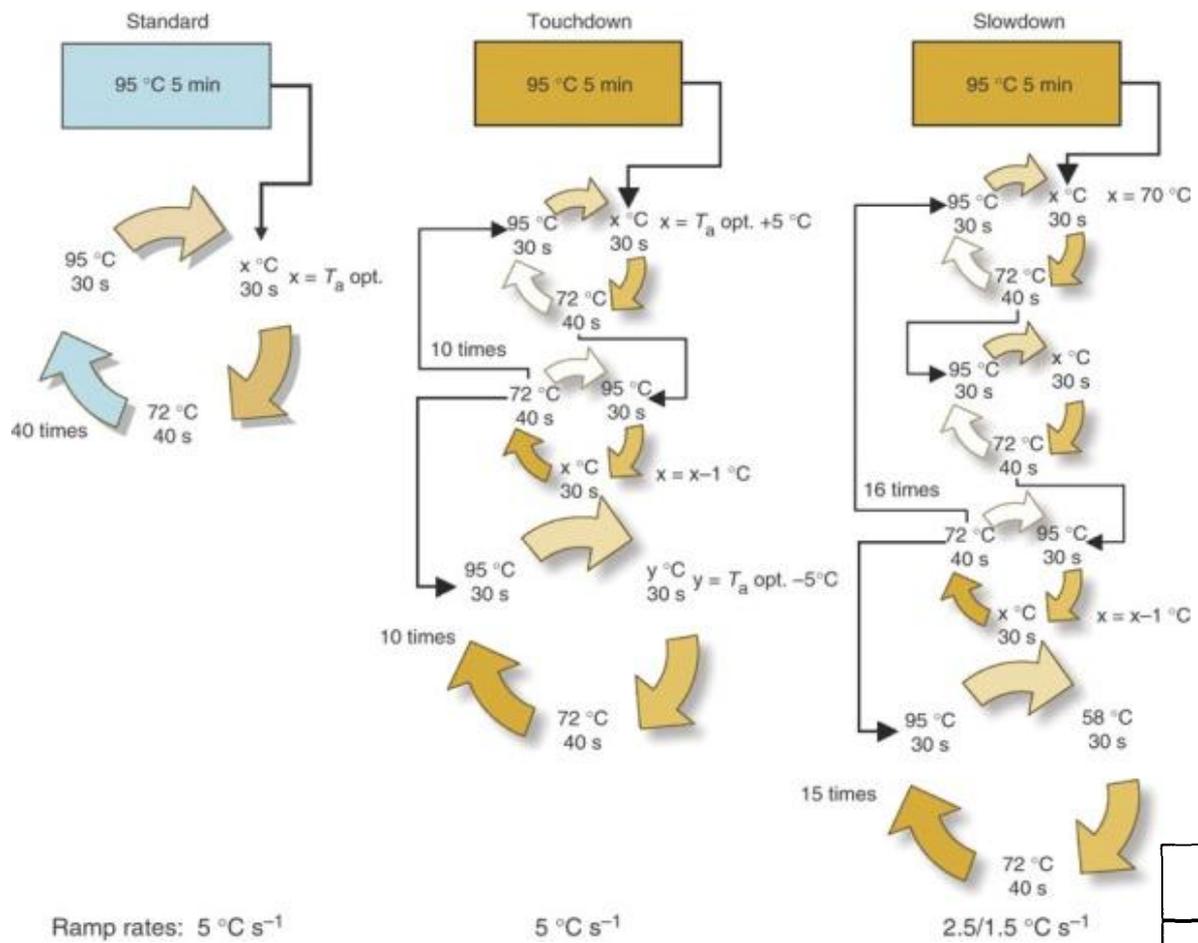
Первые циклы проводят при температуре выше оптимальной температуры отжига, затем каждые несколько циклов температуру отжига постепенно снижают до оптимальной.

Это делается для того, чтобы праймер гибридизовался с комплементарной цепью всей своей длиной; тогда как при оптимальной температуре отжига, праймер частично гибридизуется с комплементарной цепью.

Частичная гибридизация праймера на геномной ДНК приводит к неспецифической амплификации, если участков связывания для праймера достаточно много.

В большинстве случаев, первые десять ПЦР циклов, можно проводить при температуре отжига в 72-75°C, а затем сразу снизить до оптимальной, например до 60-65°C.

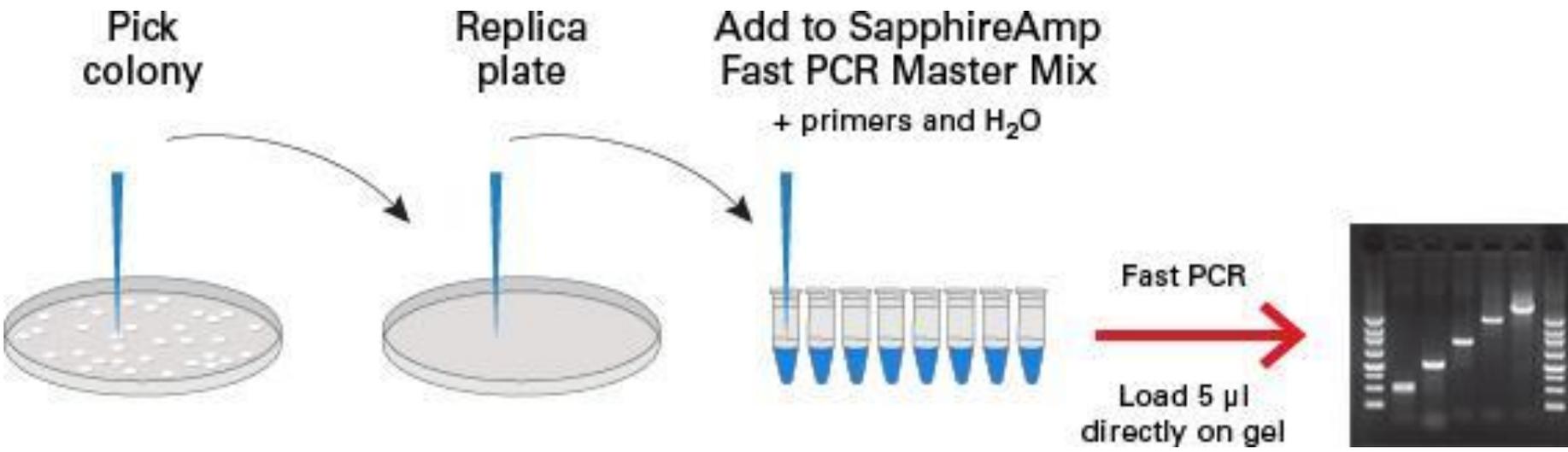




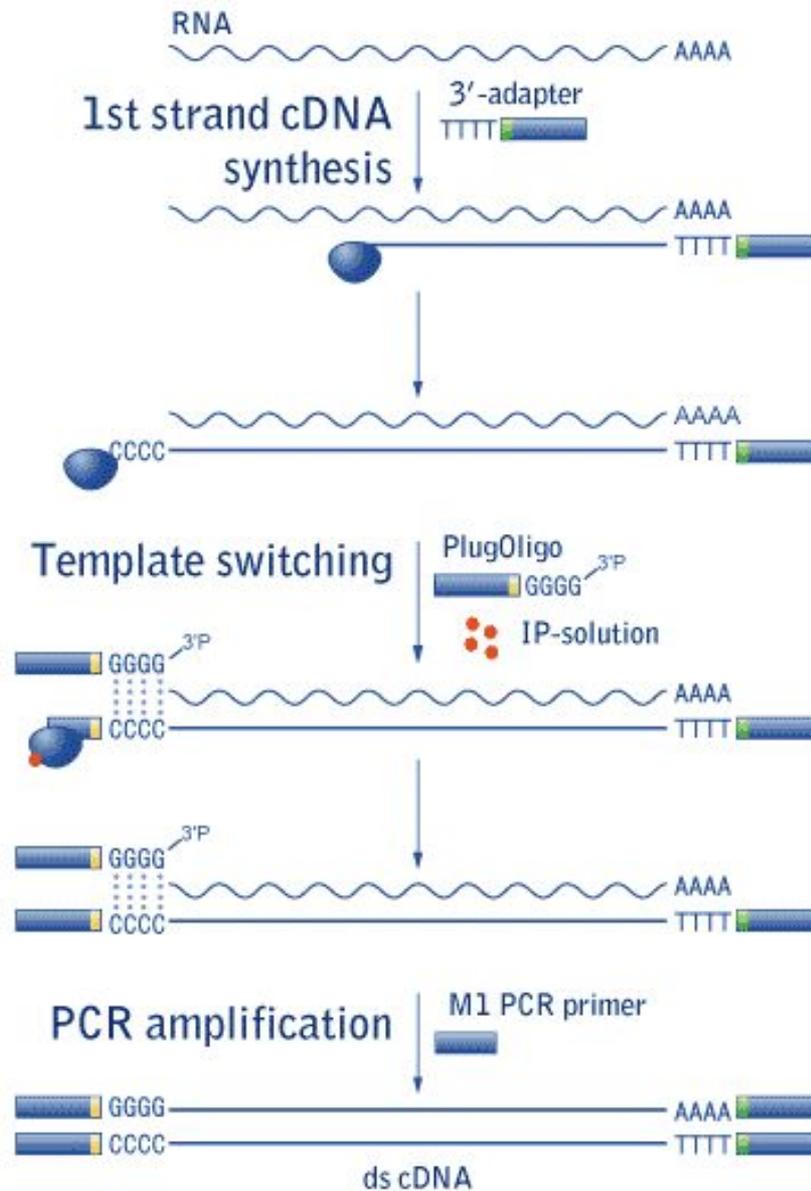
95°C	10 mins	12 cycles
95°C	30 sec	
60°C down 0.7°C per cycle	30 sec	
72°C	1 min	23 cycles
95°C	30 sec	
56.6°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	2 min	

Метод молекулярных колоний (ПЦР в геле, англ. *Colony - PCR Colony*) —

акриламидный гель полимеризуют со всеми компонентами ПЦР на поверхности и проводят ПЦР. В точках, содержащих анализируемую ДНК, происходит амплификация с образованием молекулярных колоний.



ПЦР с быстрой амплификацией концов кДНК (англ. *Rapid amplification of cDNA ends, RACE-PCR*).



CIP treatment to remove 5' PO₄ from degraded mRNA, rRNA, tRNA and DNA



and
TAP treatment to remove cap
from full-length mRNA



5' RACE Adapter Ligation
to decapped mRNA



reverse transcription



PCR



FirstChoice™ RLM-RACE 5' RACE



reverse transcription
with 3' RACE Adapter



PCR

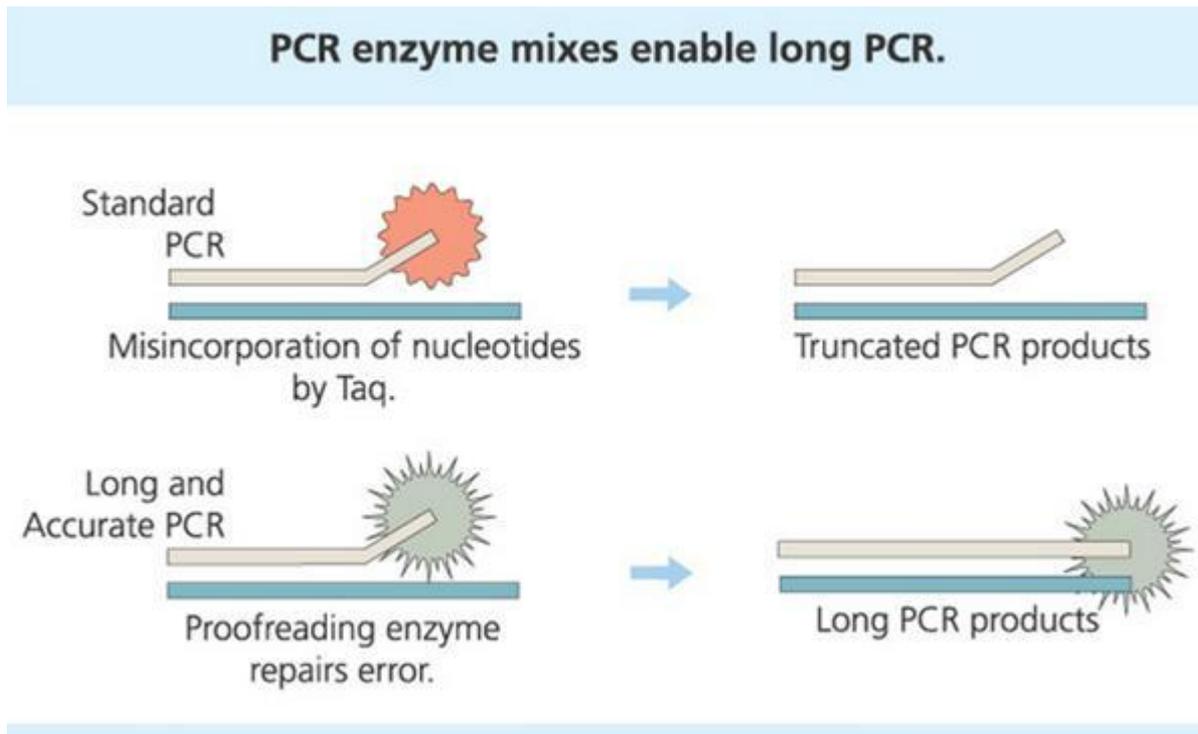


FirstChoice™ RLM-RACE 3' RACE

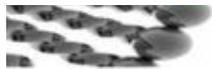
ПЦР длинных фрагментов (англ. *Long-range PCR*) — модификация ПЦР для амплификации протяженных участков ДНК (10 тысяч и более оснований).

Используют смесь двух полимераз, одна из которых — *Taq*-полимераза с высокой процессивностью (то есть, способная за один проход синтезировать длинную цепь ДНК), а вторая — ДНК полимераза с 3'-5' экзонуклеазной активностью, обычно это *Pfu* полимераза.

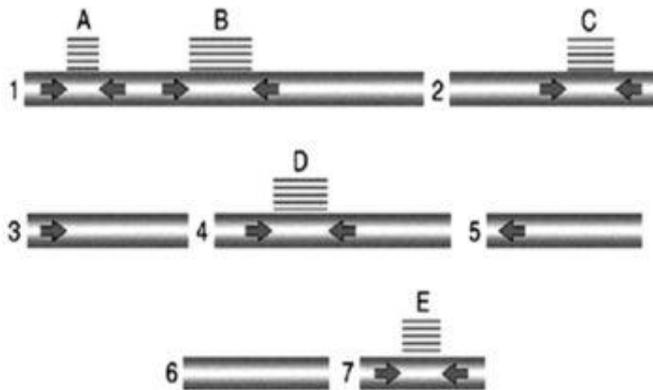
Вторая полимеразы необходима для того, чтобы корректировать ошибки, внесённые первой, так как *Taq*-полимераза останавливает синтез ДНК если был добавлен не комплементарный нуклеотид. Этот не комплементарный нуклеотид удаляет *Pfu* полимераза. Смесь полимераз берётся в отношении 50:1 или даже меньше 100:1, где *Taq*-полимеразы берётся в 25—100 раз больше по отношению к *Pfu*-полимеразе.



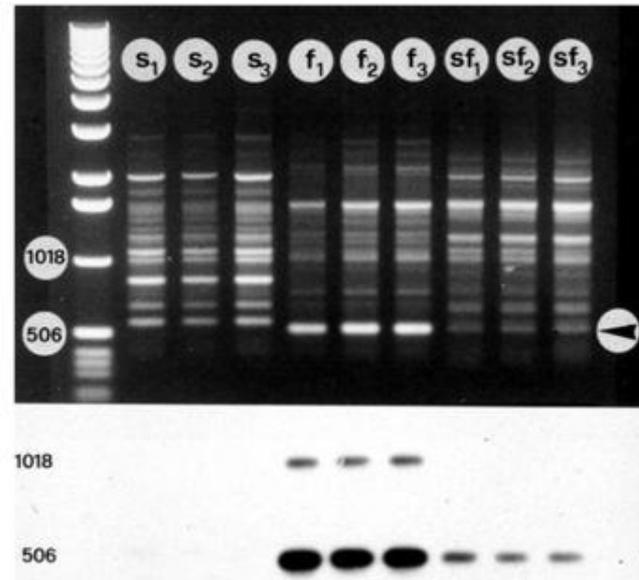
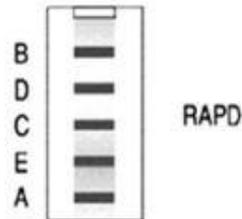
RAPD (англ. *Random Amplification of Polymorphic DNA*), ПЦР со случайной амплификацией полиморфной ДНК — используется тогда, когда нужно различить близкие по генетической последовательности организмы, например, разные сорта культурных растений, породы собак или близкородственные микроорганизмы. В этом методе обычно используют один праймер небольшого размера (около 10 п.н.). Этот праймер будет частично комплементарен случайным участкам ДНК исследуемых организмов. Подбирая условия (длину праймера, его состав, температуру и пр.), удаётся добиться удовлетворительного отличия картины ПЦР для двух организмов.



• ПЦР с использованием одного декануклеотидного праймера



⇒ ПРАЙМЕРЫ
 ≡≡≡ АМПЛИФИЦИРОВАННЫЕ
 ФРАГМЕНТЫ
 1-7 ХРОМОСОМЫ

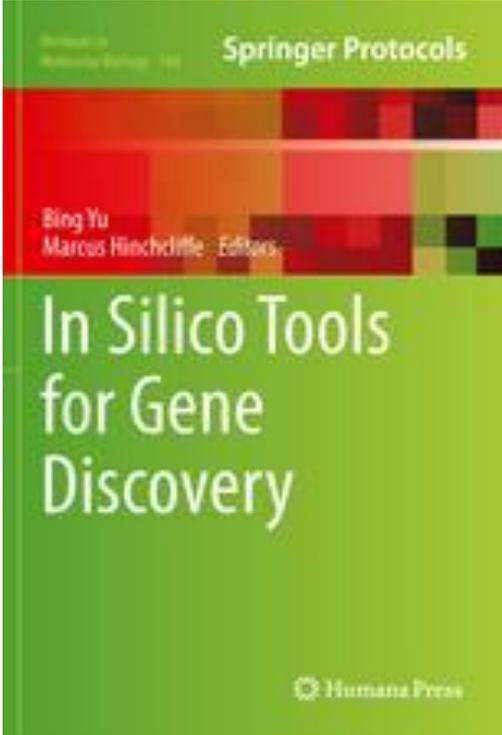


RAPD analysis of somatic hybrid plants (sf1-sf3)
 M.sativa + M.falcata with the random primer RP7.
 (S. Arcioni et al.)

Групп-специфическая ПЦР (англ. *group-specific PCR*) — ПЦР для родственных последовательностях внутри одного или между разными видами, используя консервативные праймеры к этим последовательностям. Например, подбор универсальных праймеров к рибосомальным **18S** и **26S** генам для амплификации видоспецифического межгенного спейсера: последовательность генов **18S** и **26S** консервативна между видами, поэтому ПЦР между этими генами будет проходить для всех исследуемых видов.

Противоположный этому методу является — **Уникальная ПЦР** (англ. *unique PCR*), в котором задача состоит в подборе праймеров для амплификации только конкретной последовательности среди родственных последовательностей.

Виртуальная ПЦР (англ. in silico PCR, цифровая ПЦР, электронная ПЦР, e-ПЦР) — математический метод компьютерного анализа теоретической полимеразной цепной реакции с использованием списка последовательностей праймеров (или ДНК-зондов) для предсказания потенциальной амплификации ДНК исследуемого генома, хромосомы, кольцевой ДНК или любого другого участка ДНК



A

```

BC052781  ...TATCAACAATACCTGCTTTTACACCAAGAAGTGGACATAGTTTAGGTAATGCTTTCACCTGACCTACGCCAAATTTGTATCTACTGTGGGGCTTCAAACACAGGAGAAGTG
AB055311  ...TTATCAACAATACCTGCTTTTACACCAAGAAGTGGACATAGTTTAGGTAATGCTTTCACCTGACCTACGCCAAATTTGTATCTACTGTGGGGCTTCAAACACAGGAGAAGTG
AB008515  ...TTATCAACAATACCTGCTTTTACACCAAGAAGTGGACATAGTTTAGGTAATGCTTTCACCTGACCTACGCCAAATTTGTATCTACTGTGGGGCTTCAAACACAGGAGAAGTG
AF306510  ...TTATCAACAATACCTGCTTTTACACCAAGAAGTGGACATAGTTTAGGTAATGCTTTCACCTGACCTACGCCAAATTTGTATCTACTGTGGGGCTTCAAACACAGGAGAAGTG
AF064606  ...TTATCAACAATACCTGCTTTTACACCAAGAAGTGGACATAGTTTAGGTAATGCTTTCACCTGACCTACGCCAAATTTGTATCTACTGTGGGGCTTCAAACACAGGAGAAGTG
BC019886  ...TTATCAACAATACCTGCTTTTACACCAAGAAGTGGACATAGTTTAGGTAATGCTTTCACCTGACCTACGCCAAATTTGTATCTACTGTGGGGCTTCAAACACAGGAGAAGTG
BC063849  ...TTATCAACAATACCTGCTTTTACACCAAGAAGTGGACATAGTTTAGGTAATGCTTTCACCTGACCTACGCCAAATTTGTATCTACTGTGGGGCTTCAAACACAGGAGAAGTG
    
```

PRIMER SELECTION

FORWARD PRIMER
sequence: ACCAAGAAT ④

REVERSE PRIMER
sequence complement? yes no
sequence: TGGGGCTTC

run in silico PCR

PRIMER INFORMATION

PRIMER	LENGTH	%GC	TM	LOC.	SEQUENCE
FORWARD	23	34.78	62	e4	ATACCTGCTTT TACACCAAGAAT
REVERSE	21	52.38	64	e6	GAAGCCCCAC AGTAGGATACA

⑥ You can test your primers with ASePCR by clicking [here](#)

IN SILICO PCR RESULT

TRANSCRIPT	PCR PRODUCT LENGTH	SEQUENCE
BC052781	87	sequence
AB055311	87	sequence
AB008515	87	sequence
AF306510	87	sequence
AF064606	reverse primer is not in this transcript	
BC019886	87	sequence
BC063849	64	sequence

B

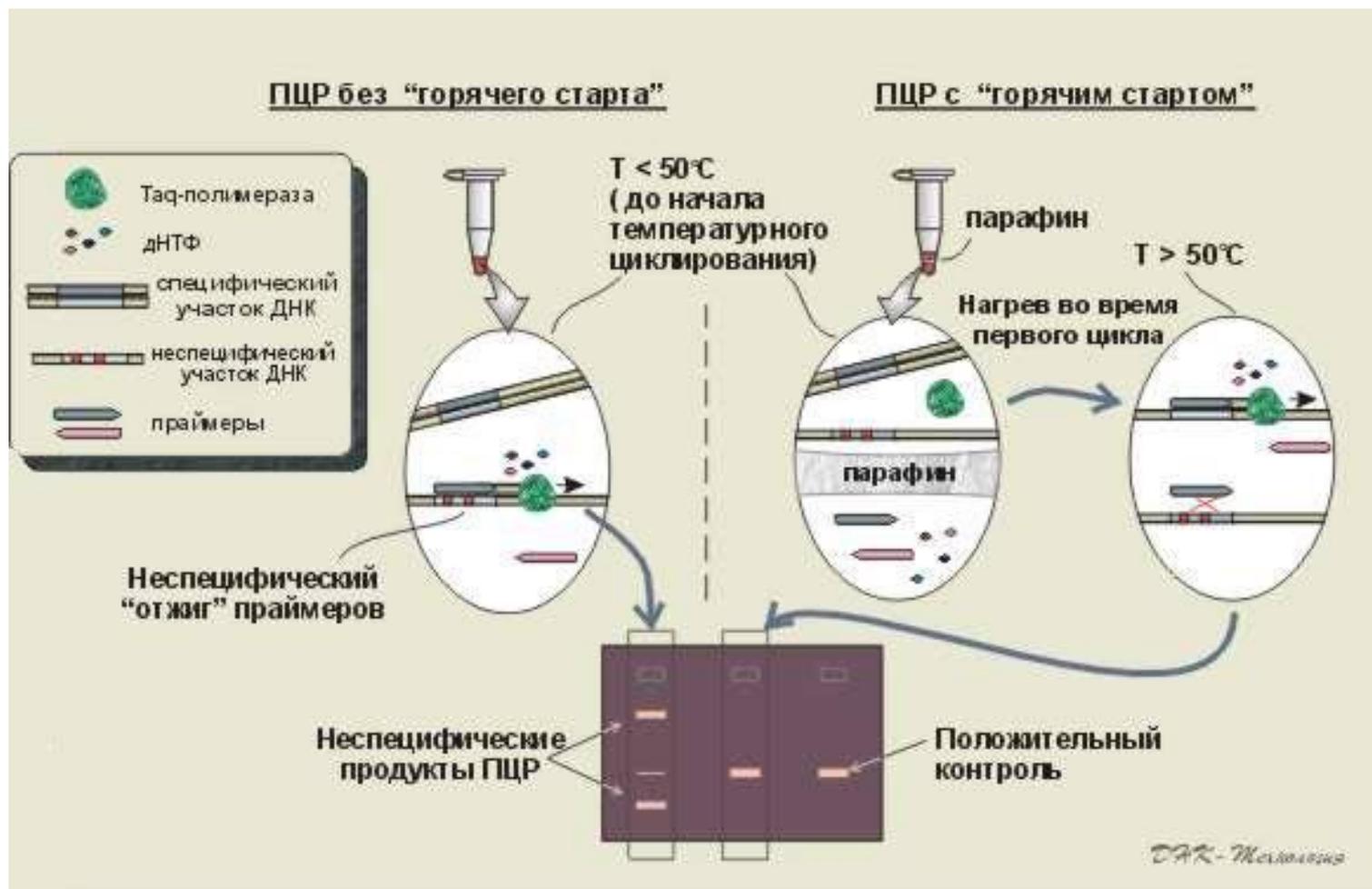
frag.	probe start-end	genomic start-end	percent of identity
56.1	1-25	79263-79287	100

frag.	probe start-end	genomic start-end	percent of identity
57.1	1-25	79287-79311	100

frag.	probe start-end	genomic start-end	percent of identity
58.1	1-25	85958-85982	100

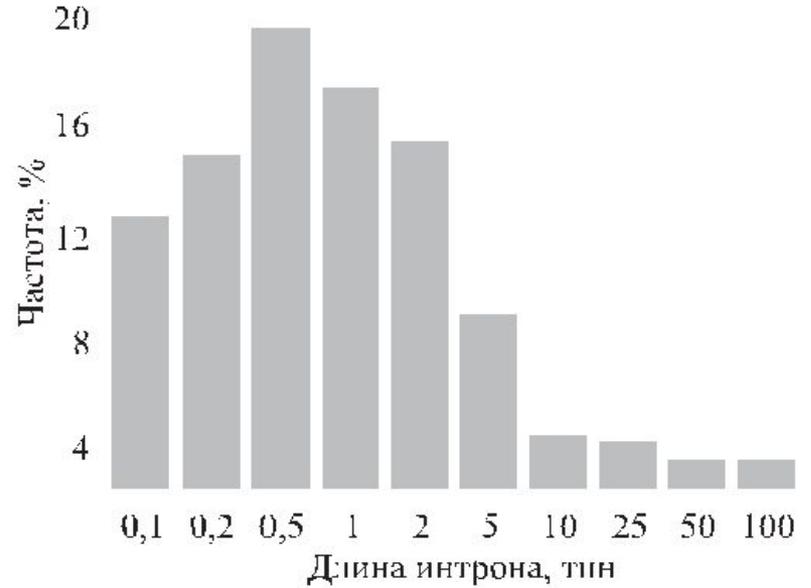
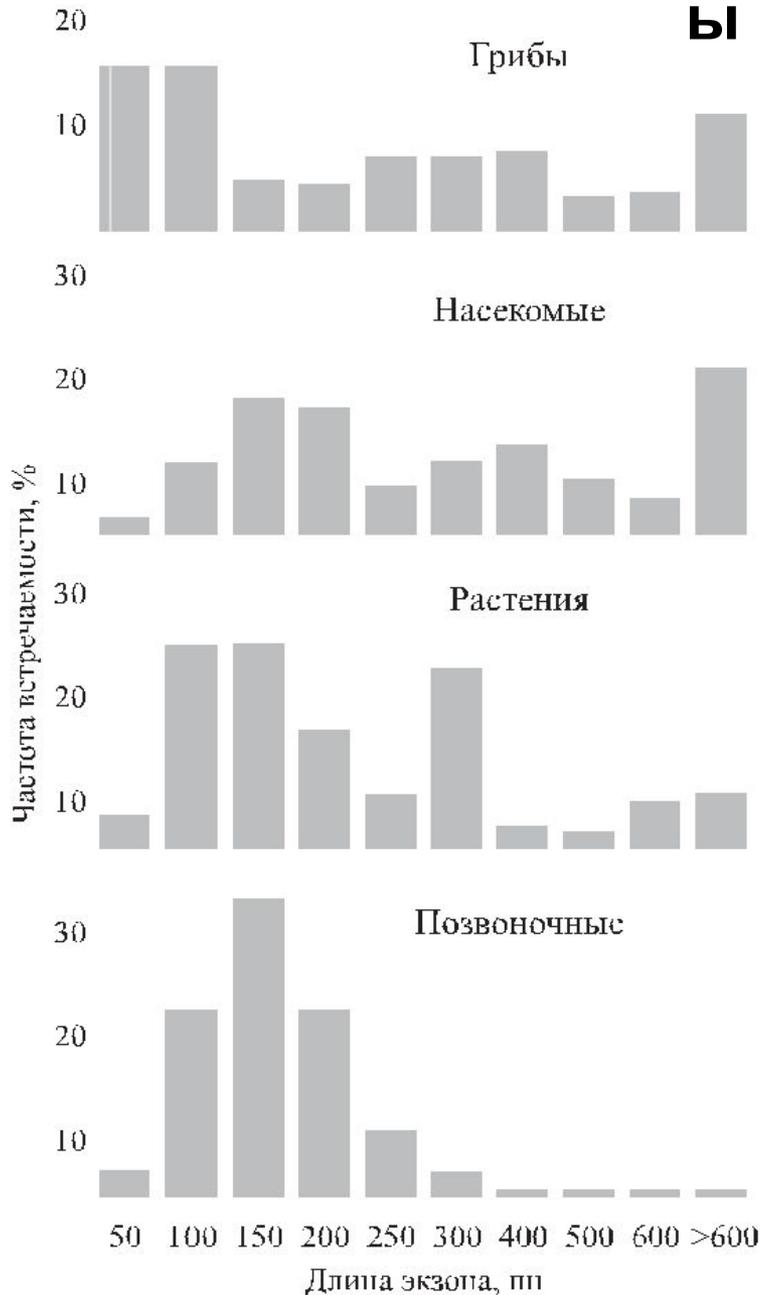
ATGATCCACITTTGGACGAGAGCTGC
ATGATCCACITTTGGACGAGAGCTGC ③

ПЦР с использованием горячего старта (англ. *Hot-start PCR*) — модификация ПЦР с использованием ДНК-полимеразы, в которой полимеразная активность блокируется при комнатной температуре антителами или имитирующими антитела небольшими молекулами типа Affibody, то есть в момент постановки реакции до первой денатурации в ПЦР. Обычно первая денатурация проводится при 95 °С в течение 10 минут.



Интроны

Ы



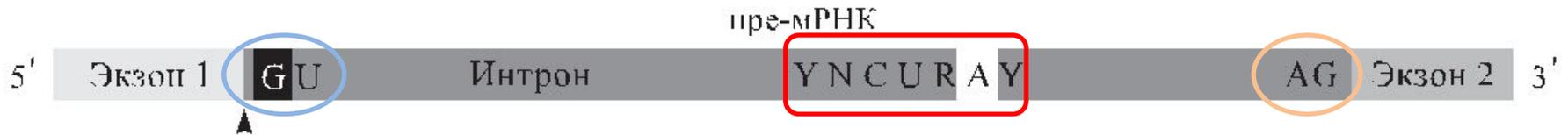
Длина интронов в генах позвоночных

Длина интрона может быть разной- от нескольких десятков пар нуклеотидов до многих тысяч

Общая длина всех интронов часто значительно превышает суммарную длину экзонов

Интроны всегда (для генов, кодирующих белки) имеют

на 5'-конце **GT**, а на 3'-конце-**AG**



Последовательность в точке ветвления

Разрезание 5' экзон-интронного соединения и образование структуры «лассо»



Разрезание 3' экзон-интронного соединения и лигирование двух экзонов



пре-мРНК

Аденин в точке ветвления

5' Экзон 1 **GU** Интрон **A** **AG** Экзон 2 3'

5'-конец

U1

U1 snRNP присоединяется к 5'-концу интрона

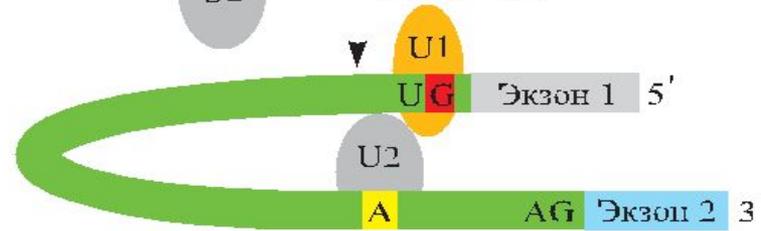
3'-конец

5' Экзон 1 **GU** Интрон **A** **AG** Экзон 2 3'

U1

U2

U2 snRNP присоединяется к точке ветвления, и интрон изгибается



U5

U4

U6

U5

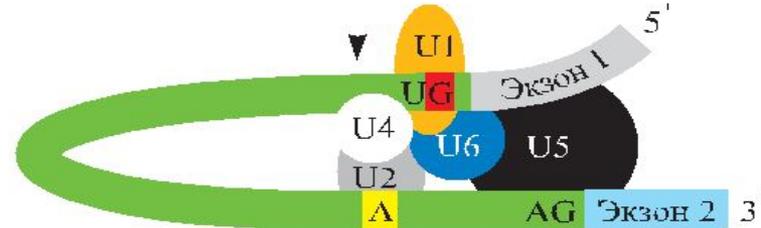
U4

U4

U6

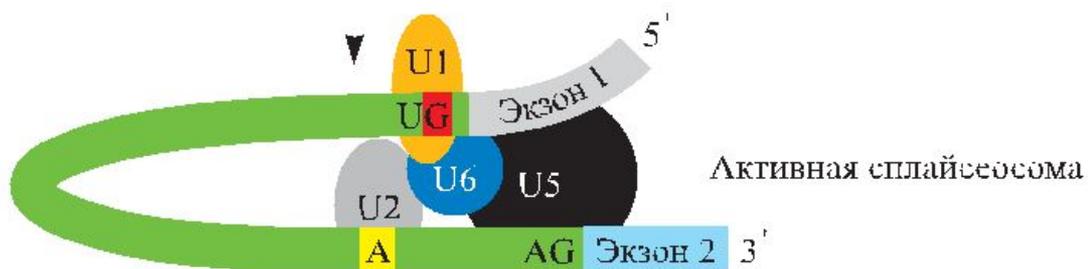
U4/U6 и U5 snRNP связываются с U1 и U2, и образуется петля

U6



➤ U4 U4 snRNP высвобождается

▶ U4 U4 snRNP высвобождается



Сплайсинг

Экзон 1 Экзон 2
Зрелая РНК

