

Лекция 3

# Технология рекомбинантных ДНК

Профессор Хрусталева Л.И.

С использованием ряда слайдов,  
подготовленных к.б.н. Фесенко И.А

# Клонирование ДНК *in vivo*

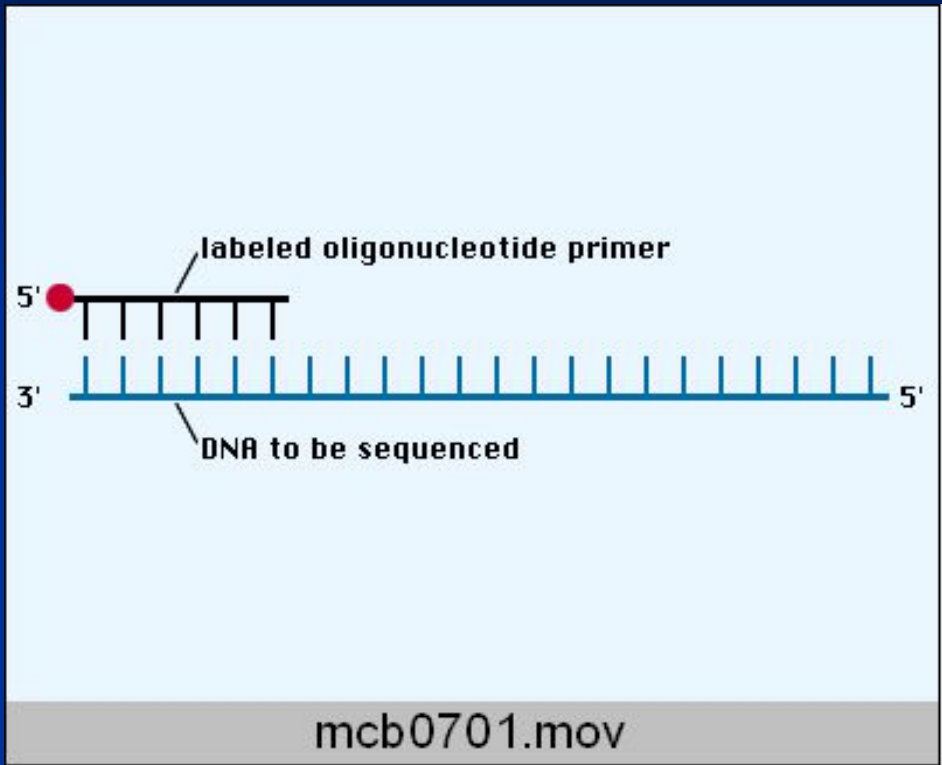
Вектор	Размер клонированной ДНК
плазмида	20 kb
космида	40 kb
ВАС	300 kb
УАС	1000 kb

**Космиды** – векторы , созданные путем вставки COS последовательности от фага  $\lambda$  в небольшую (5 kb) плазмиду. Клонирование осуществляют в *E. coli*.

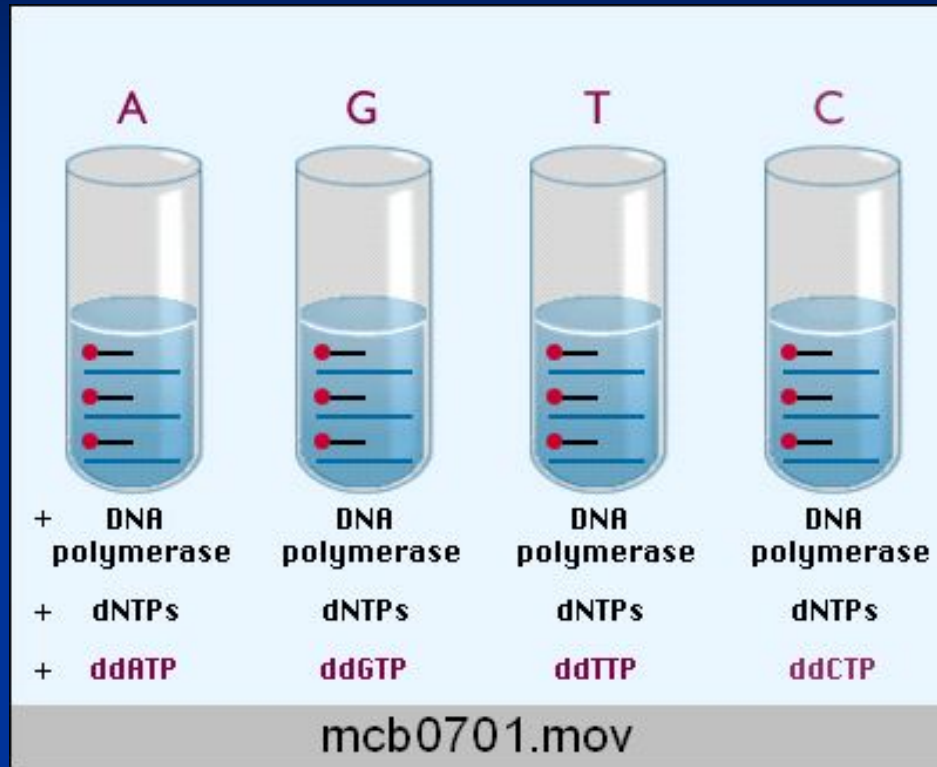
**BAC (Bacterial Artificial Chromosome)** – векторы (кольцевые), созданные на основе бактериальной F-плазмиды. Клонирование осуществляют в *E. coli*.

**YAC (Yeast Artificial Chromosome)** – векторы (линейные), представляющие собой искусственную дрожжевую хромосому, в состав которой входит дрожжевые ориджин репликации, теломеры, центромеры и вставленный участок геномной ДНК животного. Клонирование осуществляют в дрожжевых клетках.

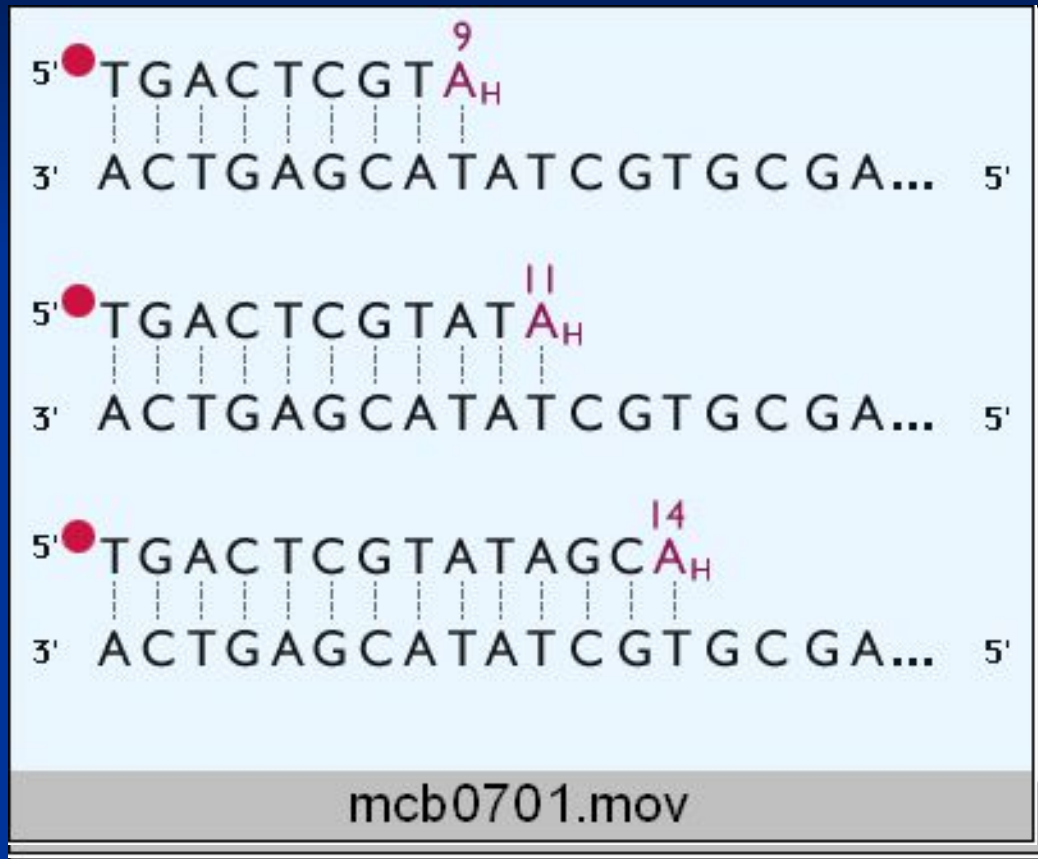
# Секвенирование ДНК – определение последовательности нуклеотидов в очищенном фрагменте ДНК



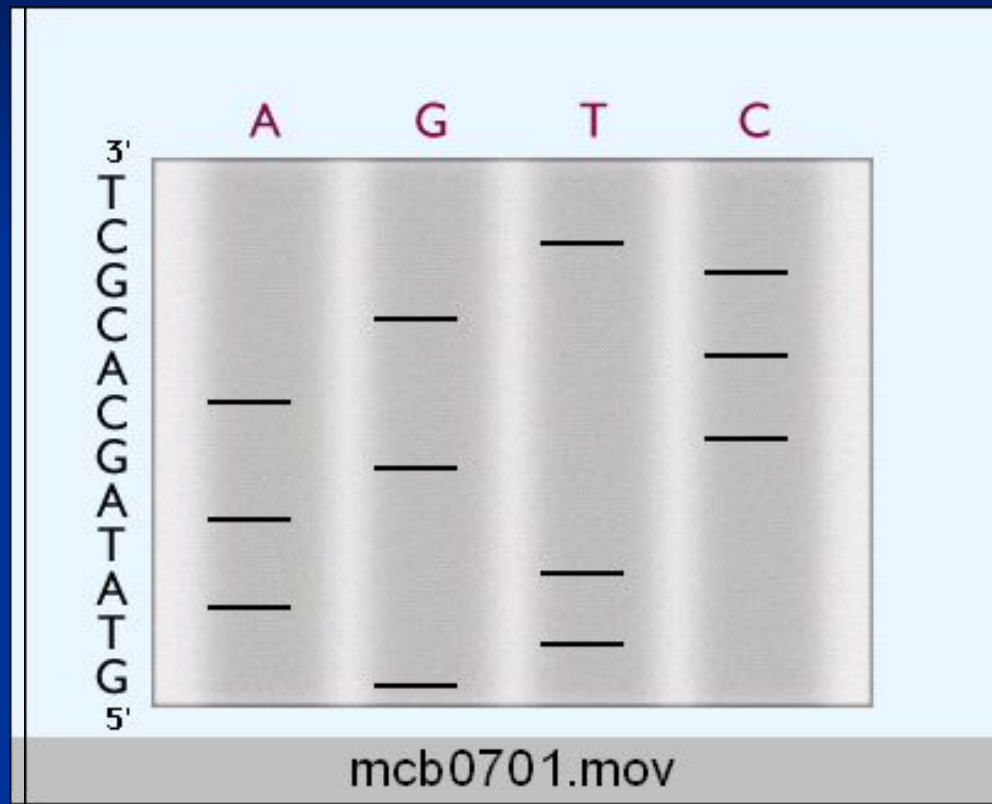
# Секвенирование ДНК



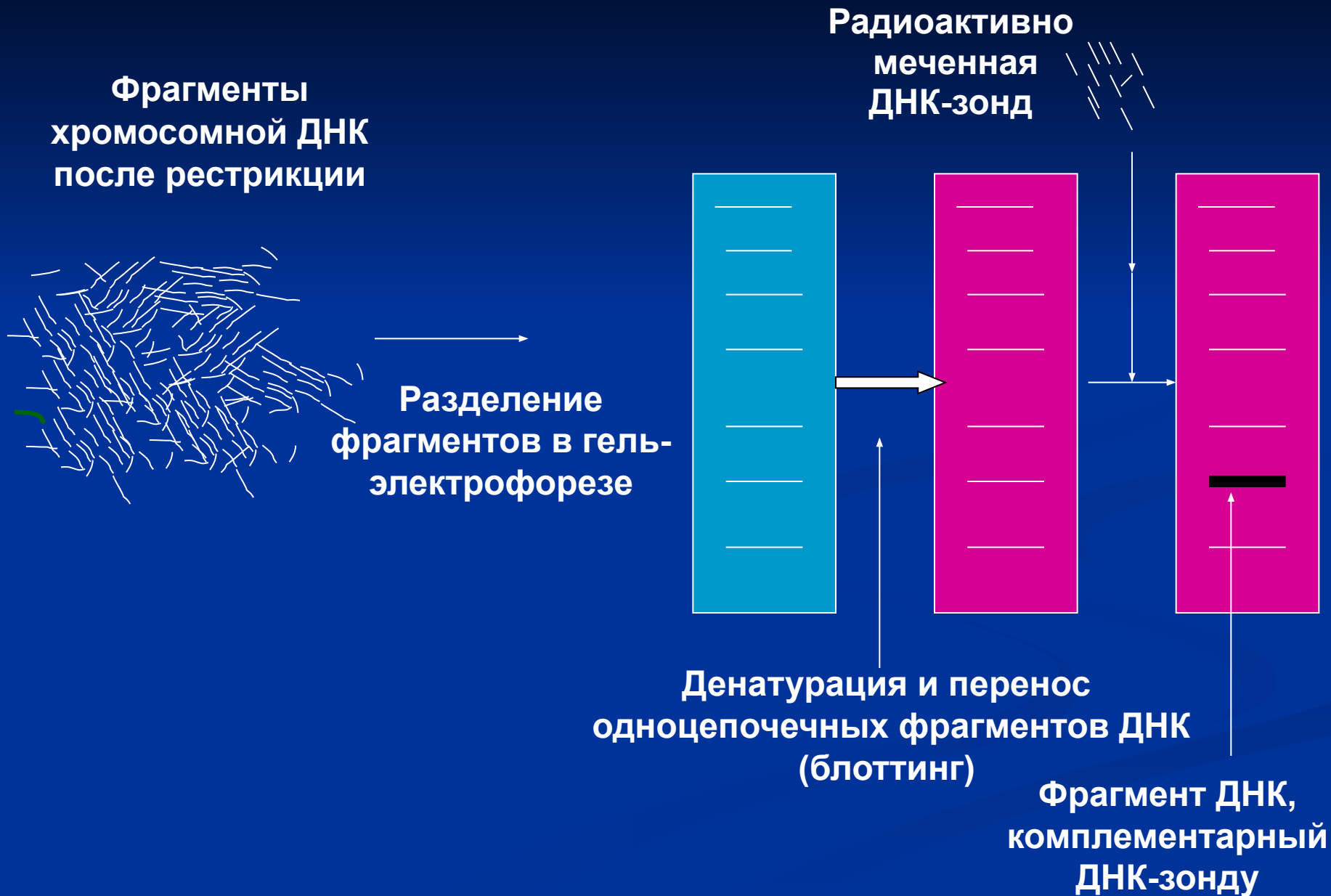
# Секвенирование ДНК



# Секвенирование ДНК



# Саузерн-блоттинг





# Саузерн-блоттинг

Более 500 наследственных болезней человека связаны с нарушениями какого-то одного гена

## Дородовая диагностика наследственных болезней

Серповидноклеточной анемия – нуклеотидная замена в  $\beta$ -цепи гемоглобина GAG на GTG

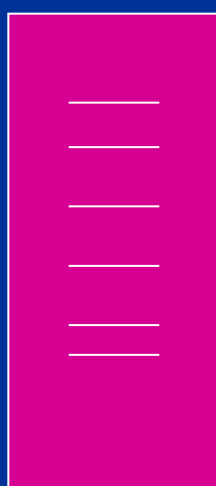
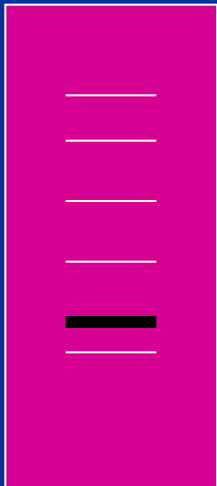
ДНК здорового плода

ДНК плода с

серповидноклеточной анемией

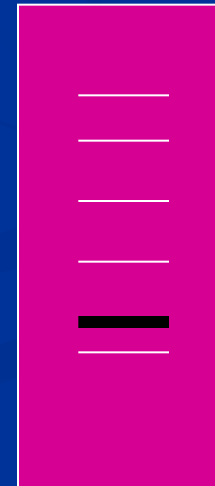
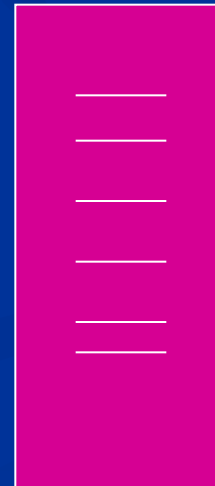
GAG

GTG

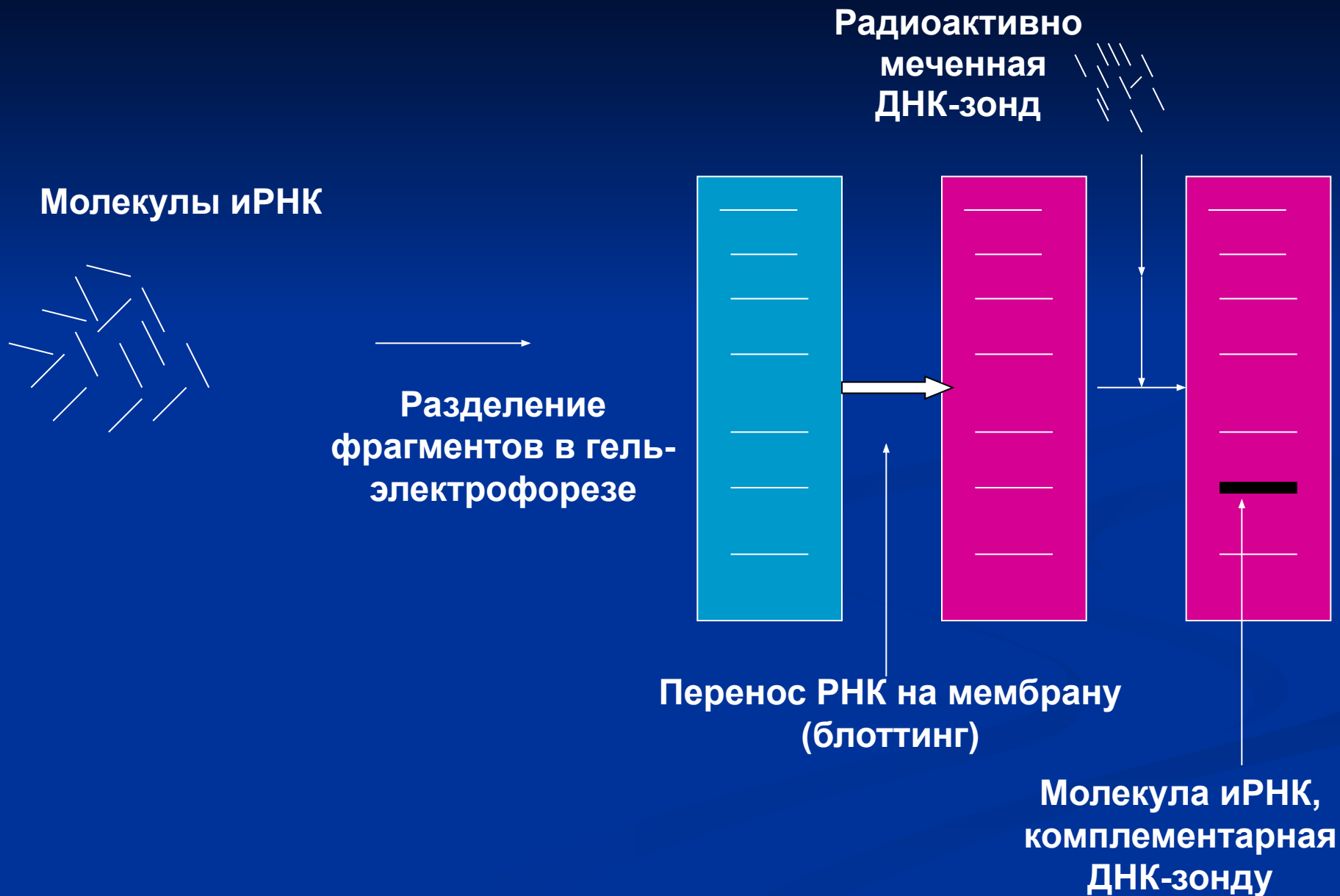


GAG

GTG



# Нозерн-блоттинг



# Полимеразная цепная реакция

ПЦР

The lower half of the slide features a gold background with several thick, blue, wavy lines that flow from the right side towards the left, creating a sense of movement and depth.

**ПЦР – быстрый и эффективный метод, позволяющий *in vitro* амплифицировать, или делать много копий, небольших фрагментов ДНК**

Полимеразная цепная реакция была изобретена в середине 80-х годов и имела революционное значение для молекулярной биологии, медицинской диагностики, судебной экспертизы, эволюционной биологии и мн.др.

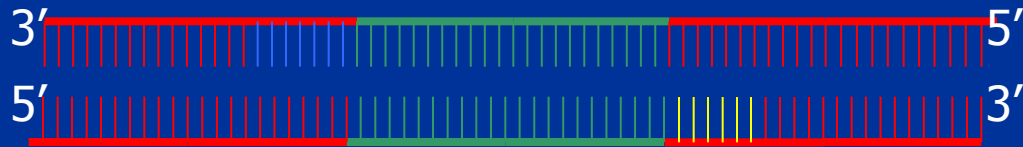
**Cary Mullis во время вручения Нобелевской премии в 1993**



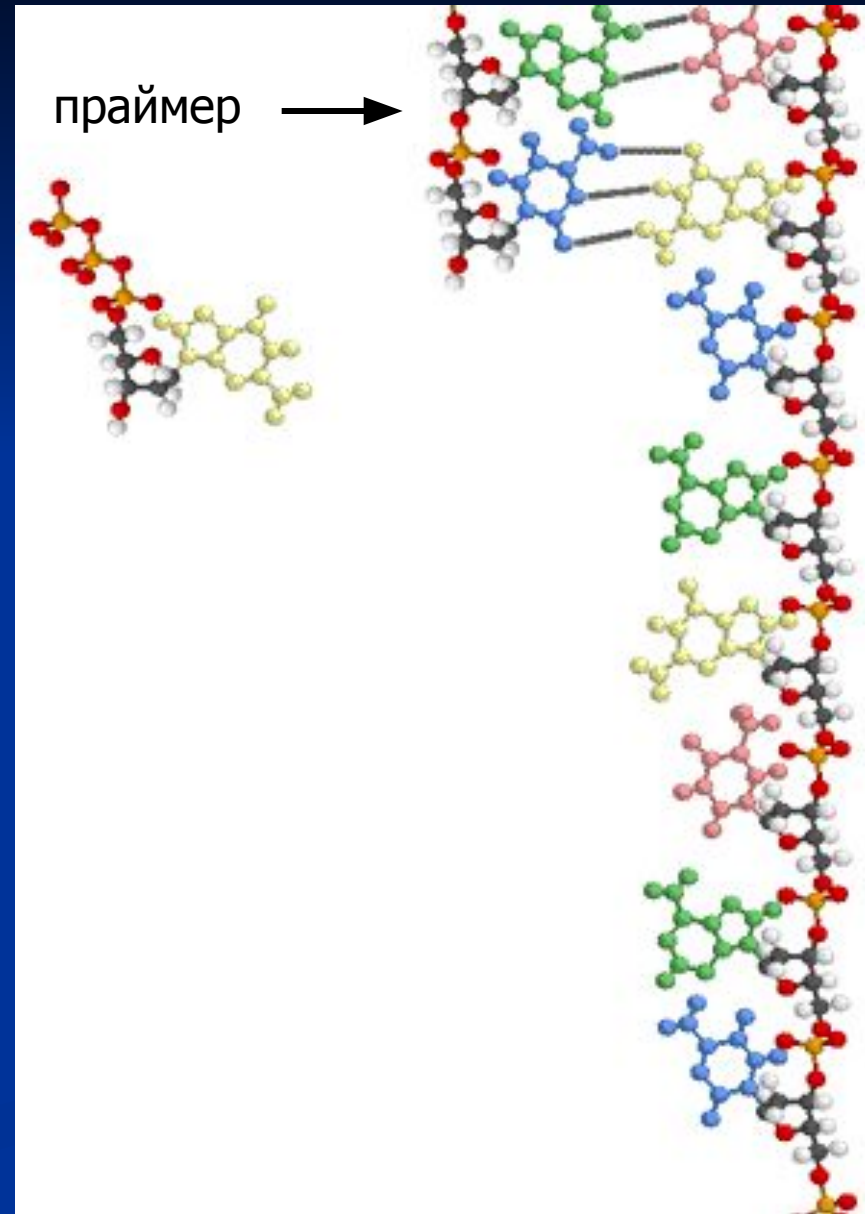
В ПЦР используются особенности репликации ДНК:

- для копирования ДНК используется ДНК-полимераза
- однонитевая ДНК-матрица (получают нагреванием раствора ДНК)
- точка начала копирования определяется с помощью праймеров
- ДНК-полимераза использует нуклеотиды для строительства новых цепей

# ДНК-полимераза начинает копирование присоединением нуклеотидов к праймеру



*Праймер* – одноцепочечный фрагмент ДНК, образующий затравку на ДНК-матрице



**ПЦР реакция включает в себя 3 этапа:**

***Денатурация*** – на этом этапе создается одноцепочечная ДНК, при температуре 94<sup>0</sup>С

***Отжиг праймеров*** – на этом этапе праймеры гибридизуются с матричной ДНК, создавая затравку

***Элонгация*** – на этом этапе ДНК-полимераза синтезирует новые цепи (при температуре 72<sup>0</sup>С)

**Повторяющиеся циклы,  
включающие денатурацию  
ДНК-мишени, отжиг  
праймеров, последующее  
удлинение праймеров дают  
огромное количество ДНК**





Начальный материал для ПЦР это небольшое количество ДНК ( может быть даже одна молекула ДНК) , содержащая нуклеотидную последовательность, которую необходимо клонировать.

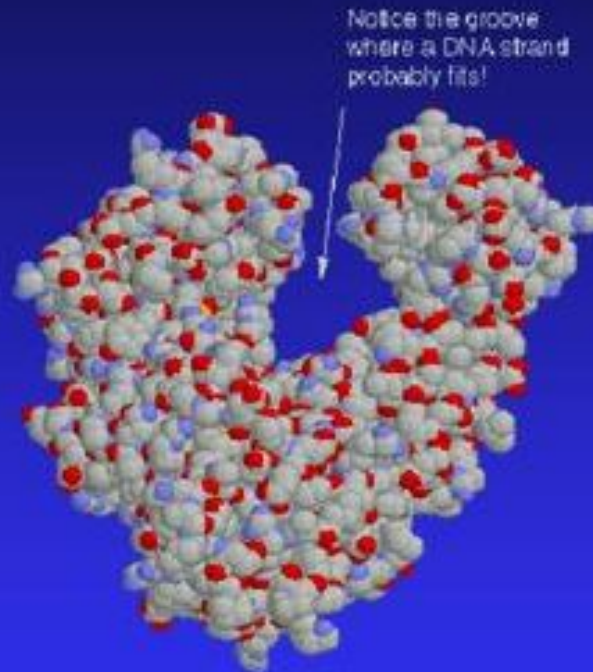
Важное усовершенствование техники ПЦР произошло после открытия бактерий, живущих в горячих источниках. ДНК-полимераза этих бактерий работает при температуре 72<sup>0</sup>С.

Изначально, для ПЦР использовалась ДНК-полимераза кишечной палочки, но этот фермент чувствителен к температуре и разрушается при денатурации ДНК.

ДНК-полимераза выделенная из этих бактерий называется *Taq-полимераза*.

# Ферменты

## *Taq*-полимераза



3-D модель *Taq*-полимеразы

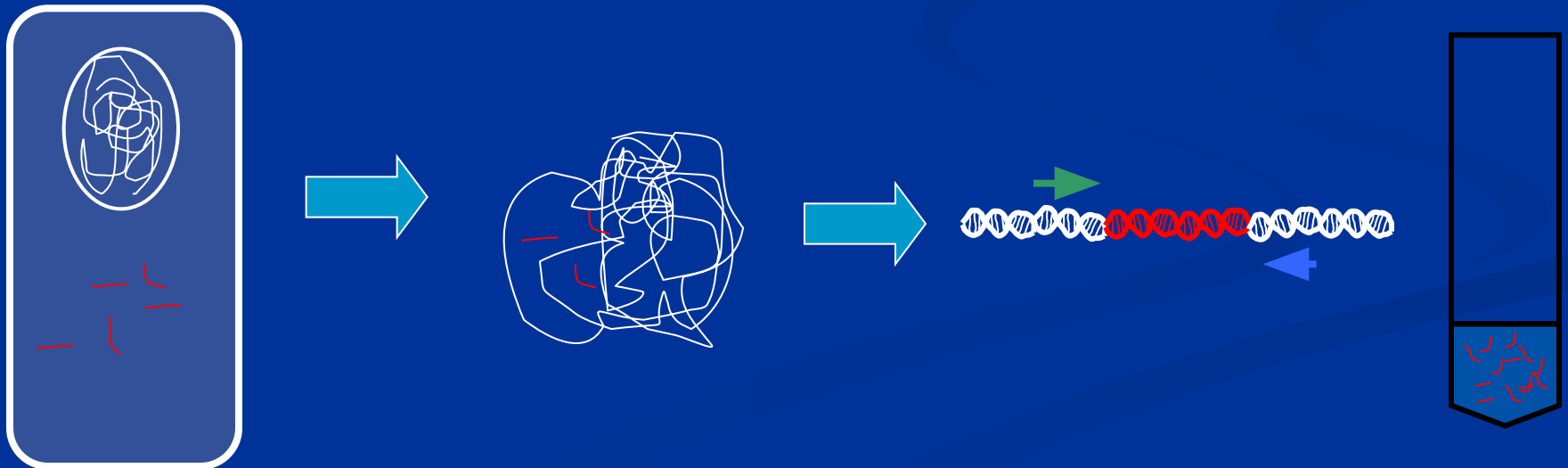
- термостабильна
- не обладает 3'-5' экзонуклеазной активностью

# Области применения ПЦР

## Диагностика инфекционных заболеваний

### Преимущества применения ПЦР:

1. ПЦР выявляет специфическую ДНК возбудителя и прямо указывает на возбудителя инфекции



**2. Высокая чувствительность – ПЦР дает возможность обнаруживать патогенные бактерии и вирусы даже в тех случаях, когда другими методами их выявление невозможно.**

**3. Высокая специфичность – в исследуемом материале выявляется уникальный, характерный только для данного возбудителя фрагмент ДНК**

**4. Быстрота получения результата – определение возбудителя занимает около 1 дня**

**5. Работа с любым биологическим материалом – возможна детекция в материале полученном от больного животного**

**6. Безопасность работы с исследуемым материалом – материал может быть дезинфицирован перед работой**

**В ветеринарии используют наборы для определения туберкулеза, сибирской язвы, чумы свиней, чумы плотоядных, хламидиоза, микоплазмоза у птиц, бешенства**

**Срок диагностики составляет 8-10 часов**

**ПЦР также используется для определения**

**микробиологического загрязнения в продовольствии, косметике, лекарственных препаратах. Разработаны наборы для диагностики загрязнения сальмонеллой, стафилококком, листерией.**

## **В палентологии**

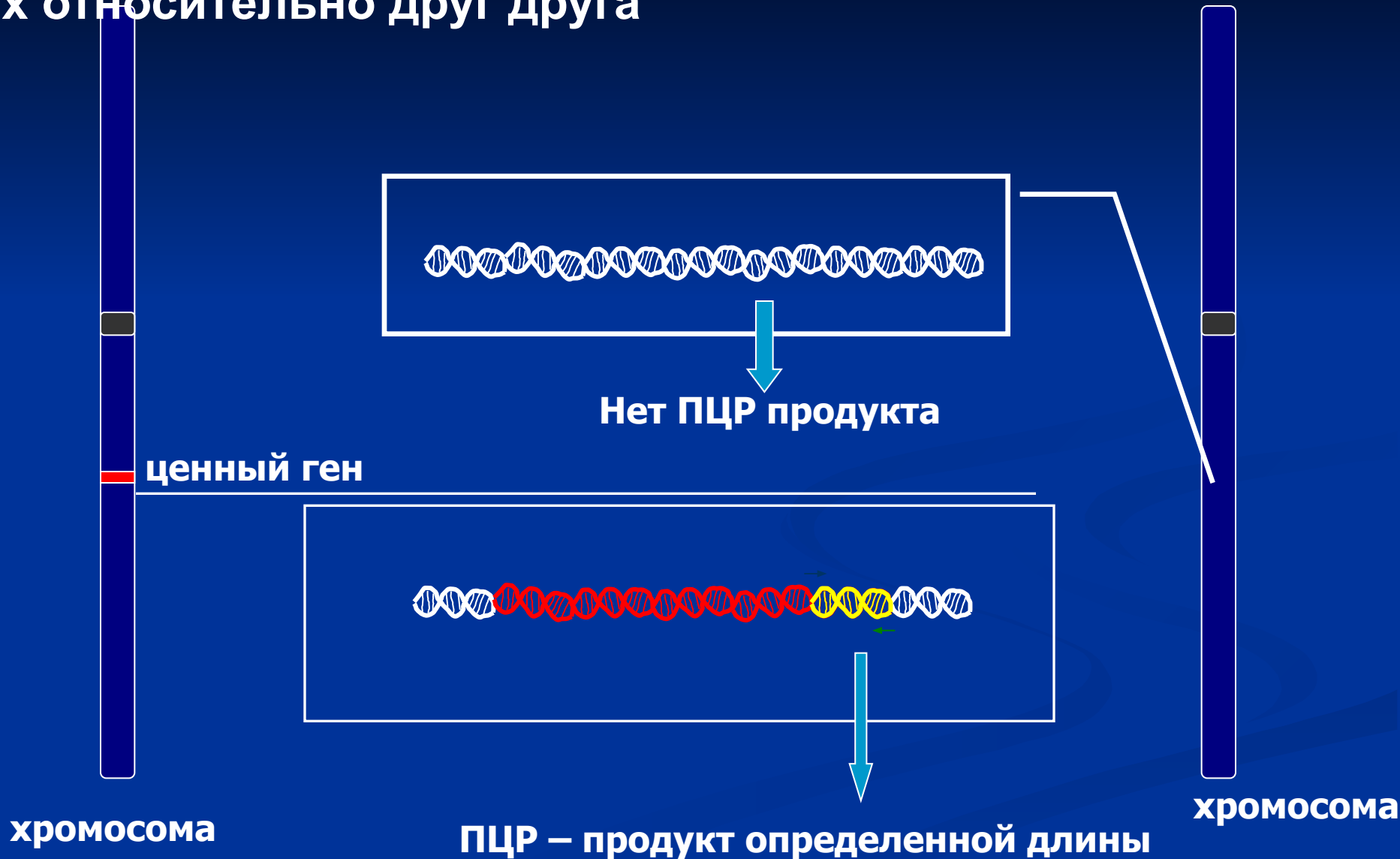
**С помощью ПЦР можно амплифицировать ДНК из ископаемых остатков. Например, из листьев растения обнаруженных в пластах миоцена (около 18 млн.) была выделена ДНК и использована для ПЦР. Была клонирована часть гена 1,5-рибулозобифосфат карбоксилазы. На основе данных о нуклеотидном составе этого участка растение было отнесено к семейству Магнолиевых**

# Маркирование геномов животных

Целью широкомасштабного картирования генов на хромосомах с/х животных является разработка молекулярно-генетических маркеров, тесно сцепленных с главными генами хозяйственно-ценных признаков

Молекулярные маркеры позволяют получать информацию об изменчивости генов и выявлять отдельные гены и генные ансамбли, несущие желательный комплекс признаков

**Маркер – это «метка», которая может быть использована для идентификации определенных генов и локализации их относительно друг друга**





## Преимущества ДНК-маркеров:

-маркирование можно проводить в любой стадии роста, экономя время, место и ресурсы

-признаки, например устойчивость к болезням могут быть оценены вне зависимости от наличия инфекции

-ДНК-маркеры выявляют полиморфизм в ДНК, поэтому возможно исключить влияние окружающей среды на выражение признака

Удобный ДНК-маркер должен обладать следующими признаками:

-должен быть дешевым и легко используемым

- тесно сцеплен с маркируемым признаком

- должен выявлять гетерозиготы (быть кодоминантным)

# Маркирование количественных признаков (QTL)

Среди генов, контролирующих молочную продуктивность и качество молока выделяют группу генов вносящих наибольший вклад в этот количественный признак:

**$\alpha$ S1-казеин,                      к-казеин,                       $\beta$ -  
лактоглобулин**

Аллель – одна из двух (или нескольких) альтернативных структурных форм гена

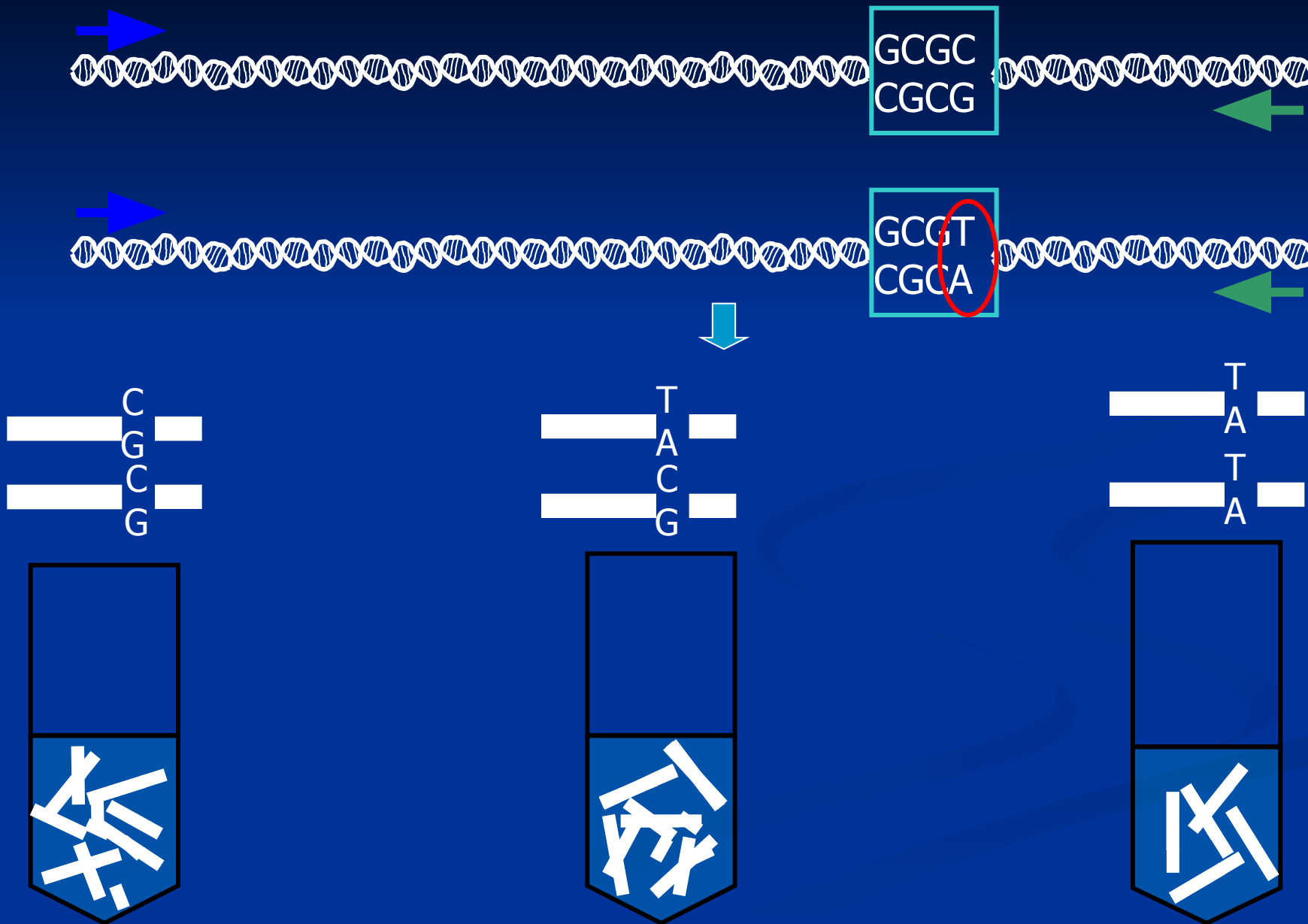
Для получения молока, идеального для производства сыра, необходимо проводить селекцию коров по таким генотипам:

**$\alpha$ S1 – казеин CC (плотный сгусток)**

**$\beta$  - казеин BB или CC (хорошее сычужное свертывание)**

**$\beta$  - лактоглобулин BB (высокая массовая доля казеина)**

# Анализ злокачественной гипертермии у свиней



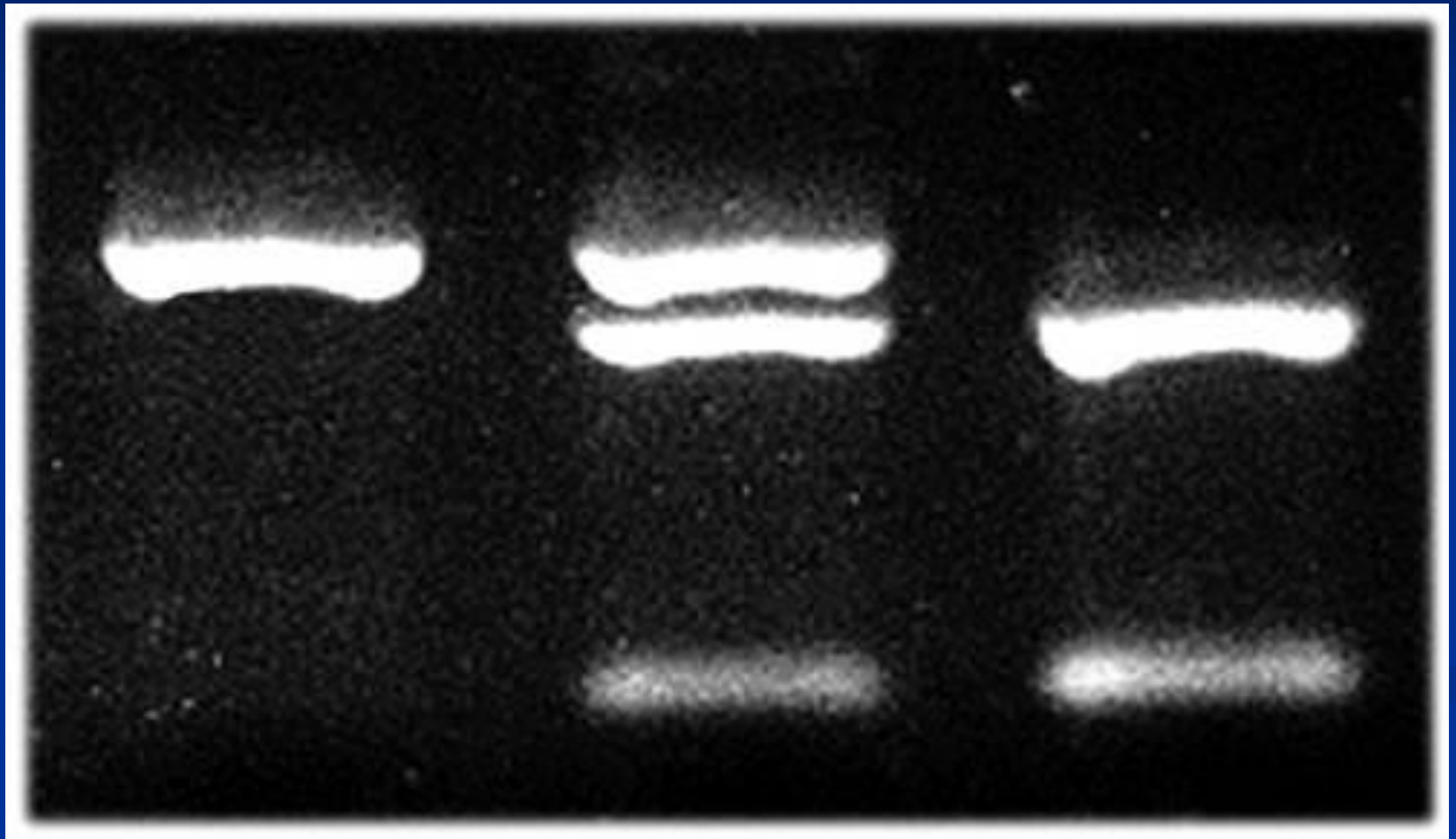
# Электрофореграмма

Скрытый носитель

Больное животное

мутантного гена

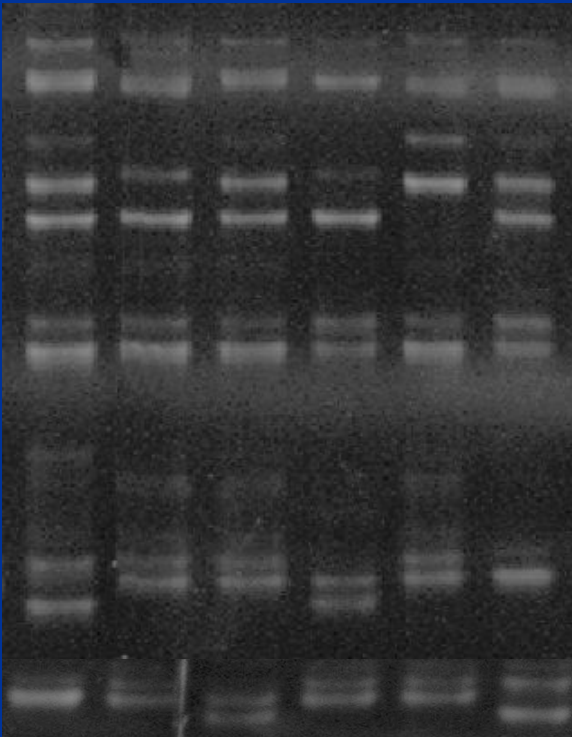
Здоровое животное



# Паспортизация животных

Паспортизация или соответствие с/х животных тем или иным породам

Для каждой породы имеется свой набор генетических маркеров, которые выявляются с помощью ПЦР



1 2 3 4 5 6



1,6 исходные родители  
2-5 потомство

# Выявление генетических заболеваний на ранних стадиях развития

Широкий обмен генетическим материалом между разными странами сопровождается распространением различных инфекционных заболеваний, а также заболеваний, вызываемых редкими мутациями, возникающими у представителей коммерческих пород

У телят голштинской породы недавно обнаружена генетическая болезнь VLAD – дефицит адгезивности лейкоцитов.

Единственным существующим в настоящее время методом, позволяющим безошибочно выявить носителей мутантного гена, является ПЦР-анализ, с последующей рестрикцией.

Установлено, что 15% племенных быков голштинской породы в Америке является носителем данной мутации.

Ежегодные убытки в результате гибели больных телят составляют 5 млн. долларов

# Исследования в молекулярной биологии и генетике

ПЦР широко используется в научных исследованиях. ПЦР применяется в эволюционной биологии, клонировании генов, мутагенезе *in vitro*, изучении структуры геномов и многих других исследованиях



# Проверь себя!

1. Опишите свойства ферментов, которые осуществляют клонирование ДНК, секвенирование ДНК, ПЦР и получение кДНК.
2. Как можно выделить определенную последовательность ДНК из геномной ДНК?
3. Фрагмент ДНК имеет следующую последовательность 3'-GGCGTATTC-5'. Он отсеквенирован с помощью ферментного метода. Сколько бэндов всего будет на геле? Сколько бэндов и каков их размер будет при электрофорезе в каждой из четырех смесей?



4. Какие различия между Саузерн-, Нозерн-, Вестерн- и дот-блоттингами?
5. Какие последовательности ДНК содержит библиотека кДНК?
6. Можно ли последовательность белка определить с помощью библиотеки геномной ДНК?
7. Как иРНК может быть переведена в кДНК?
8. Будет ли зависеть ПЦР продукт от: а) направленности праймеров, б) сиквенса праймеров, в)  $T_m$  праймеров?