Лекция 3

Технология рекомбинантных ДНК

Профессор Хрусталева Л.И.

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

Клонирование ДНК *in vivo*

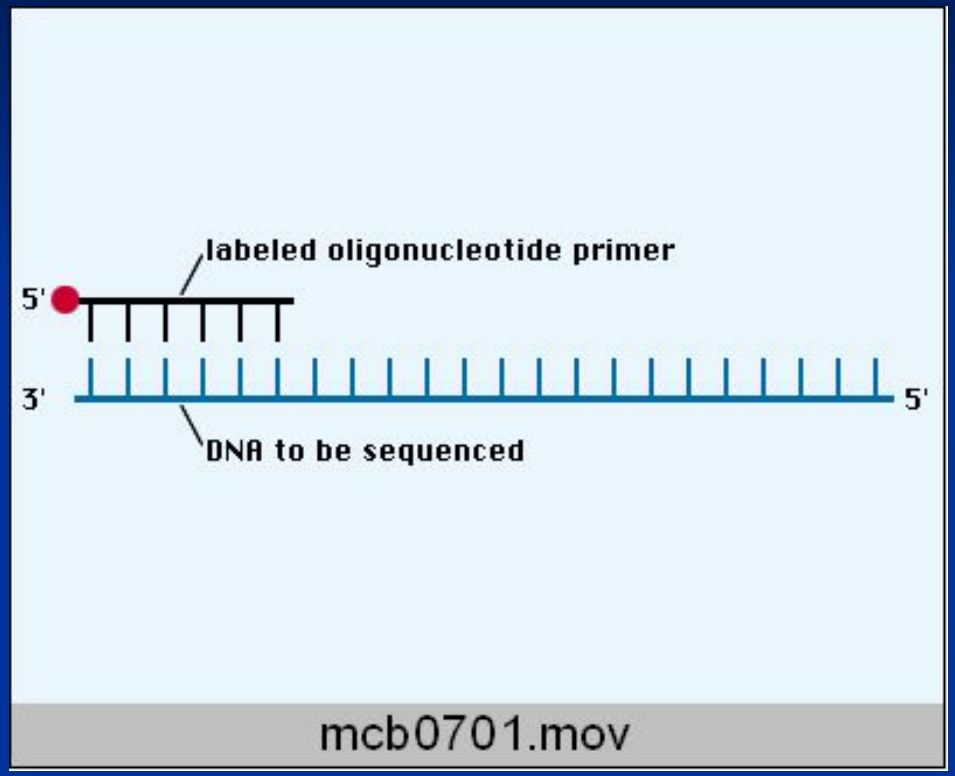
Вектор	Размер клонируемой ДНК
плазмида	20 kb
космида	40 kb
BAC	300 kb
YAC	1000 kb

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

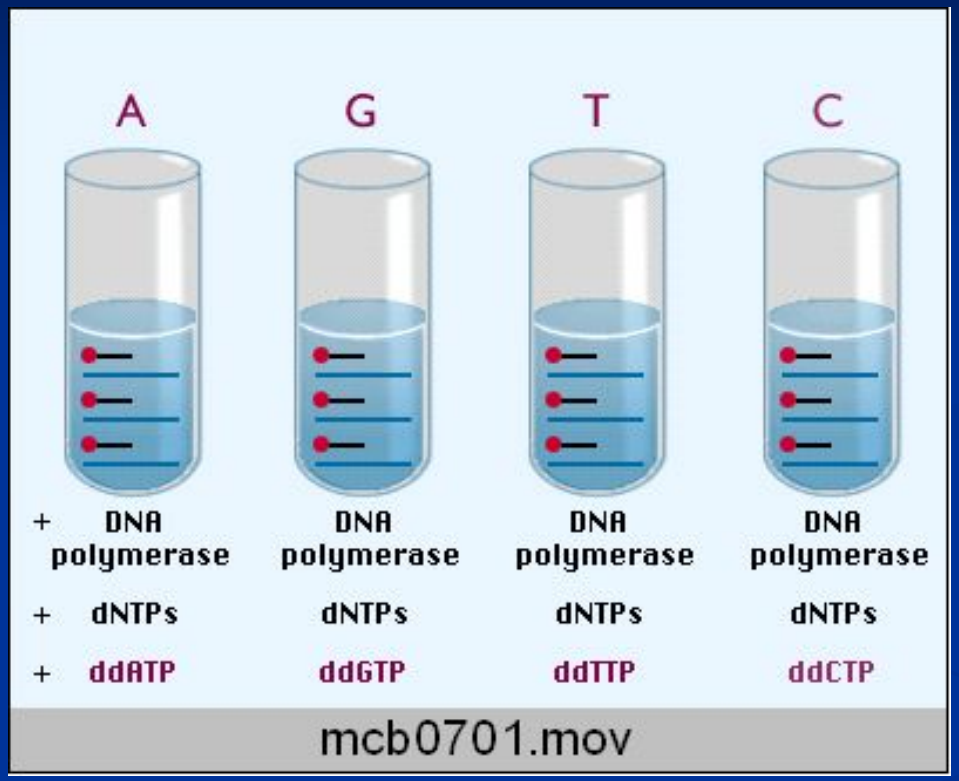
BAC **(Bacterial Artificial Chromosome) – векторы (кольцевые), созданные на основе бактериальной F-плазмиды. Клонирование осуществляют в E. coli.**

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

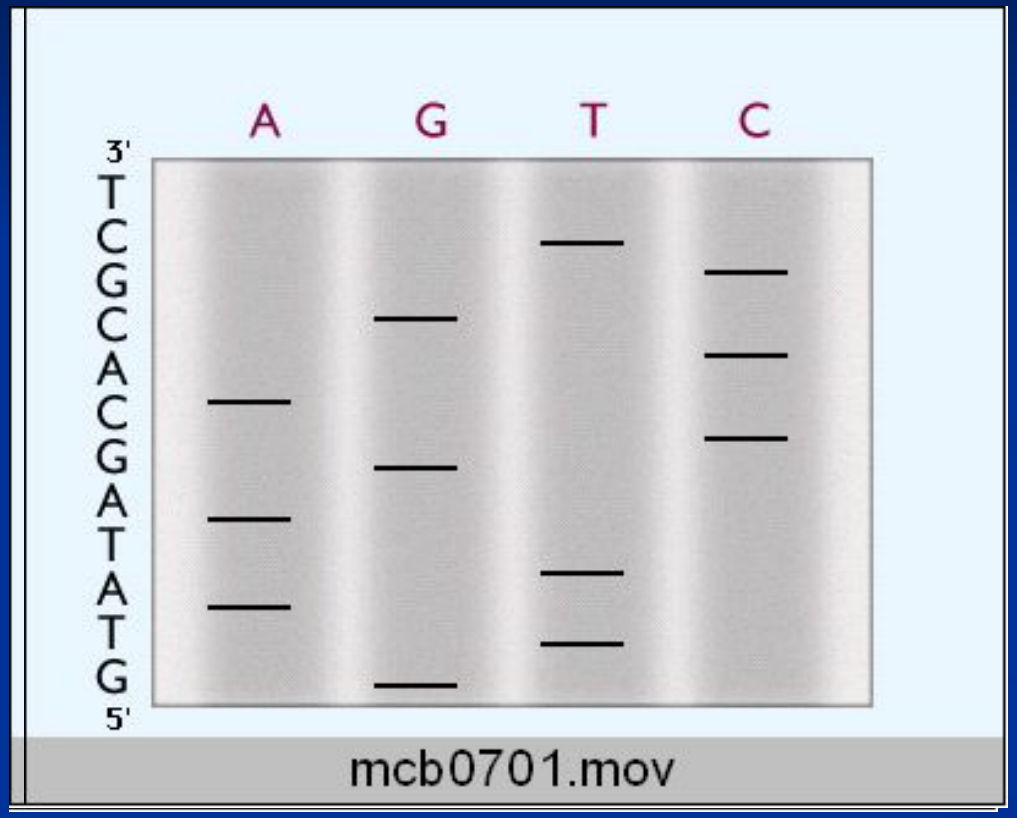


Секвенирование ДНК

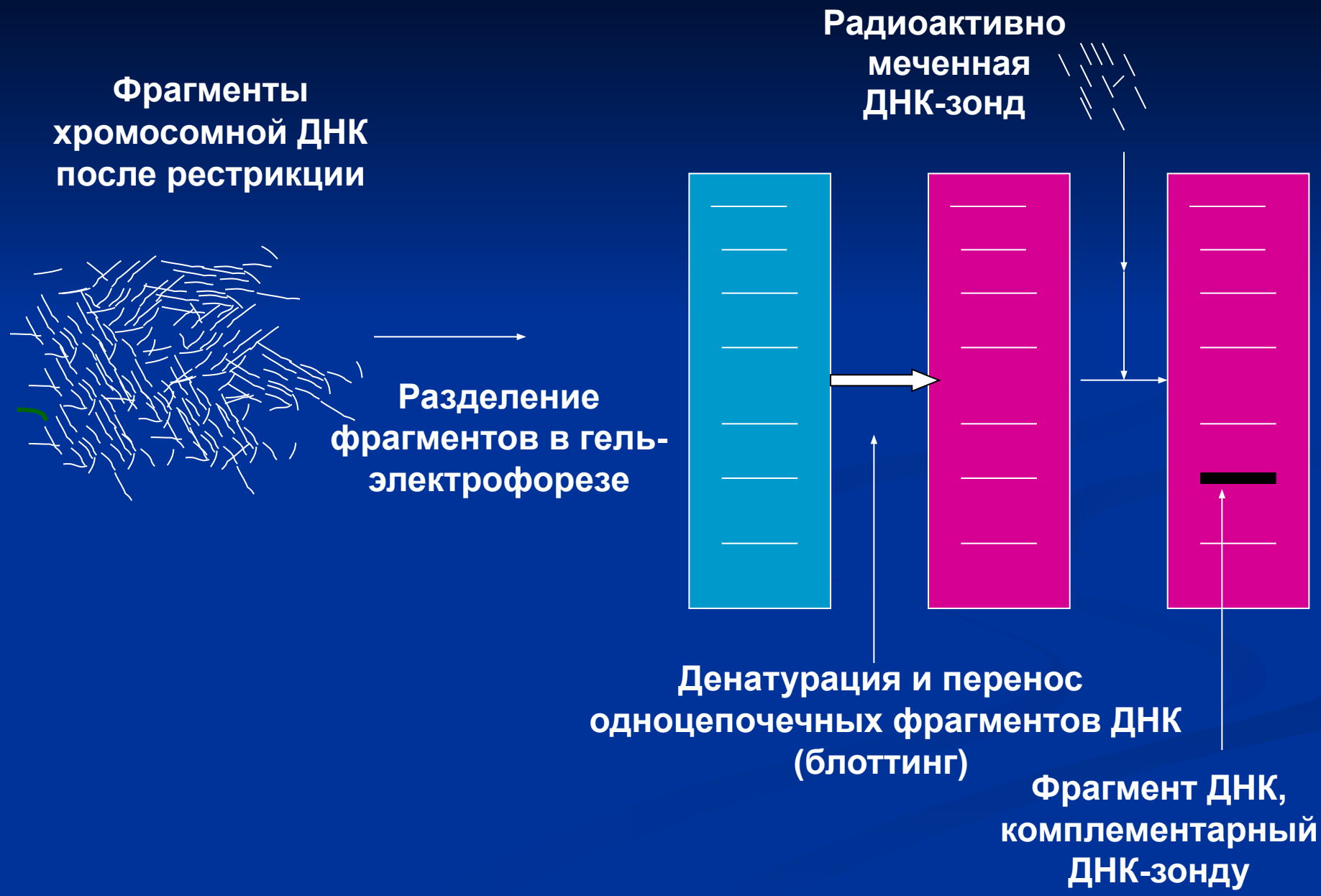


Секвенирование ДНК

Секвенирование ДНК



Саузерн-блоттинг



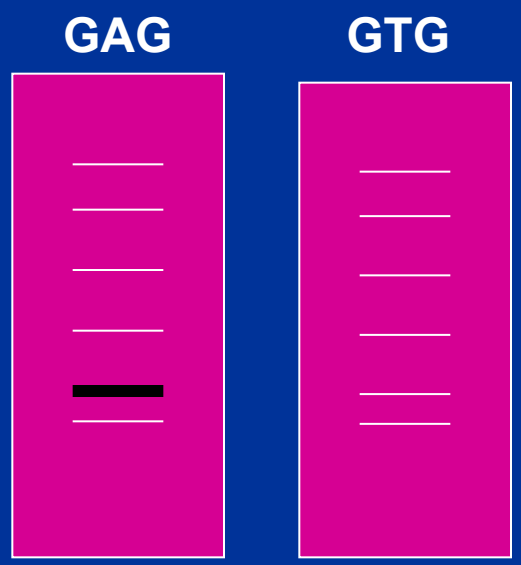
Саузерн-блоттинг

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

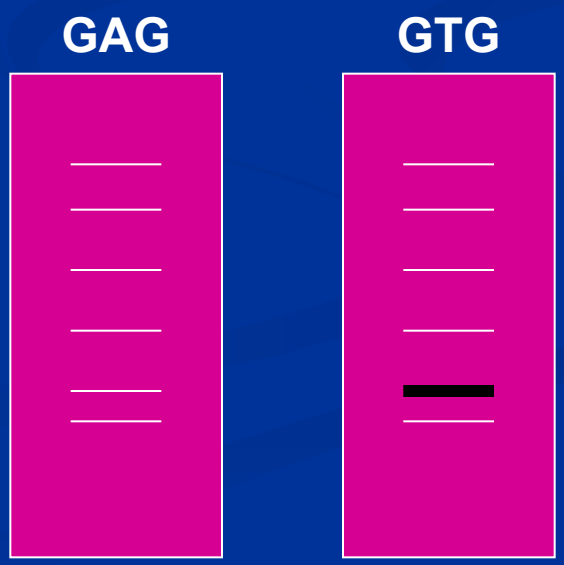
Дородовая диагностика наследственных болезней

Серповидноклеточной анемия – нуклеотидная замена в β-цепи гемоглобина GAG на GTG

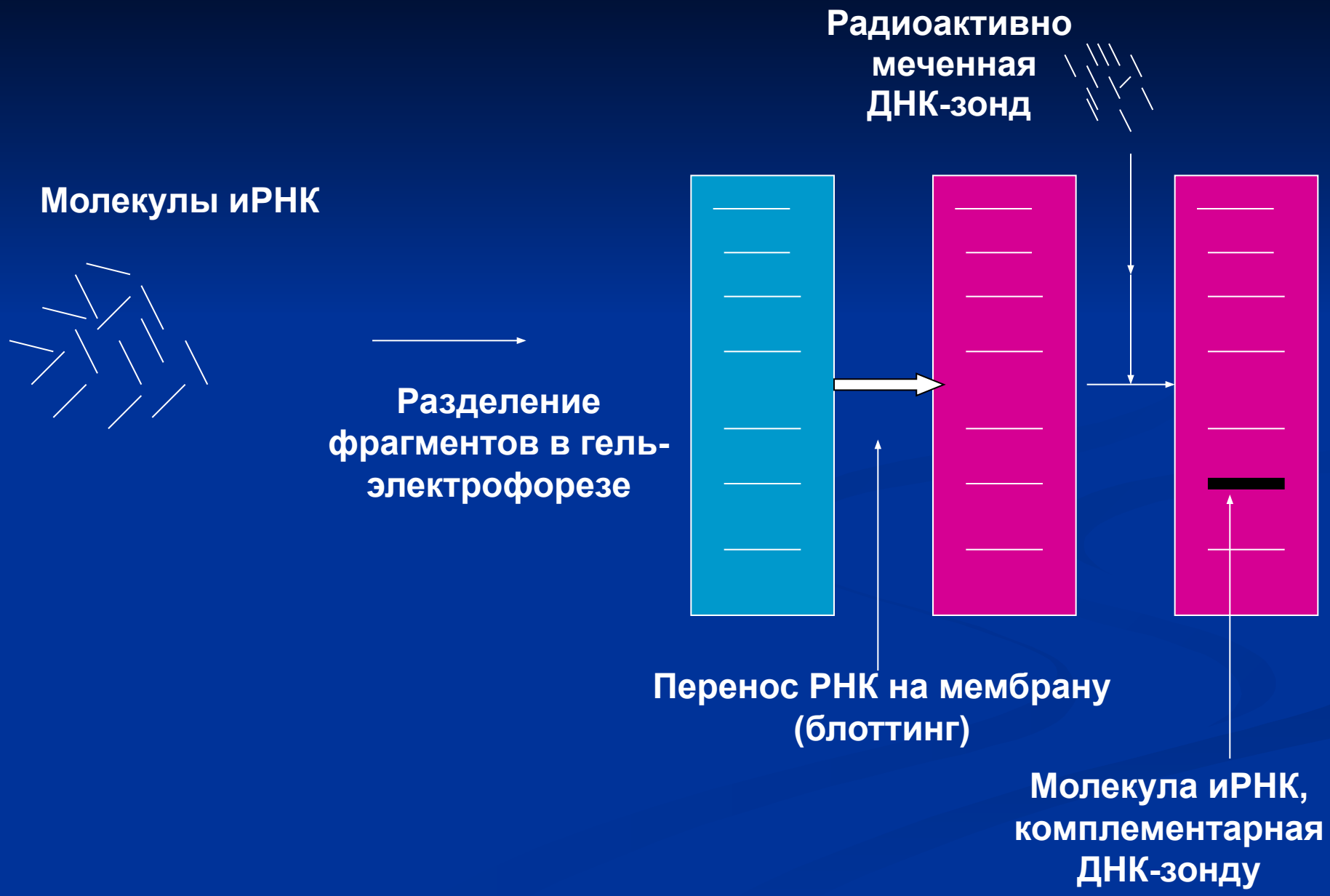
ДНК здорового плода



ДНК плода с серповидноклеточной анемией



Нозерн-блоттинг



Полимеразная цепная реакция

ПЦР

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 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:

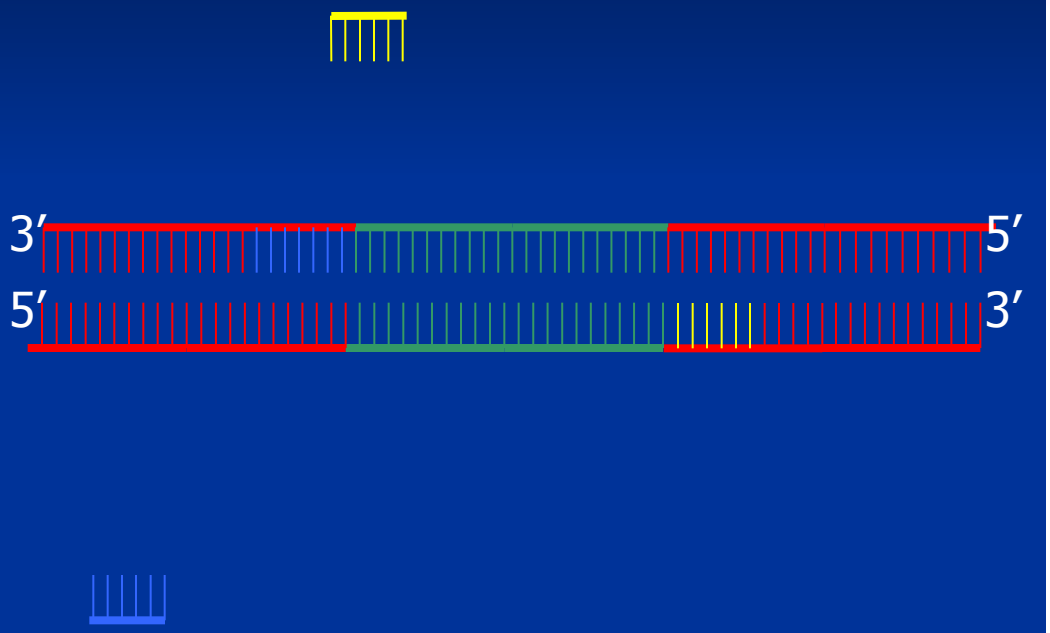
-для копирования ДНК используется ДНК-полимераза

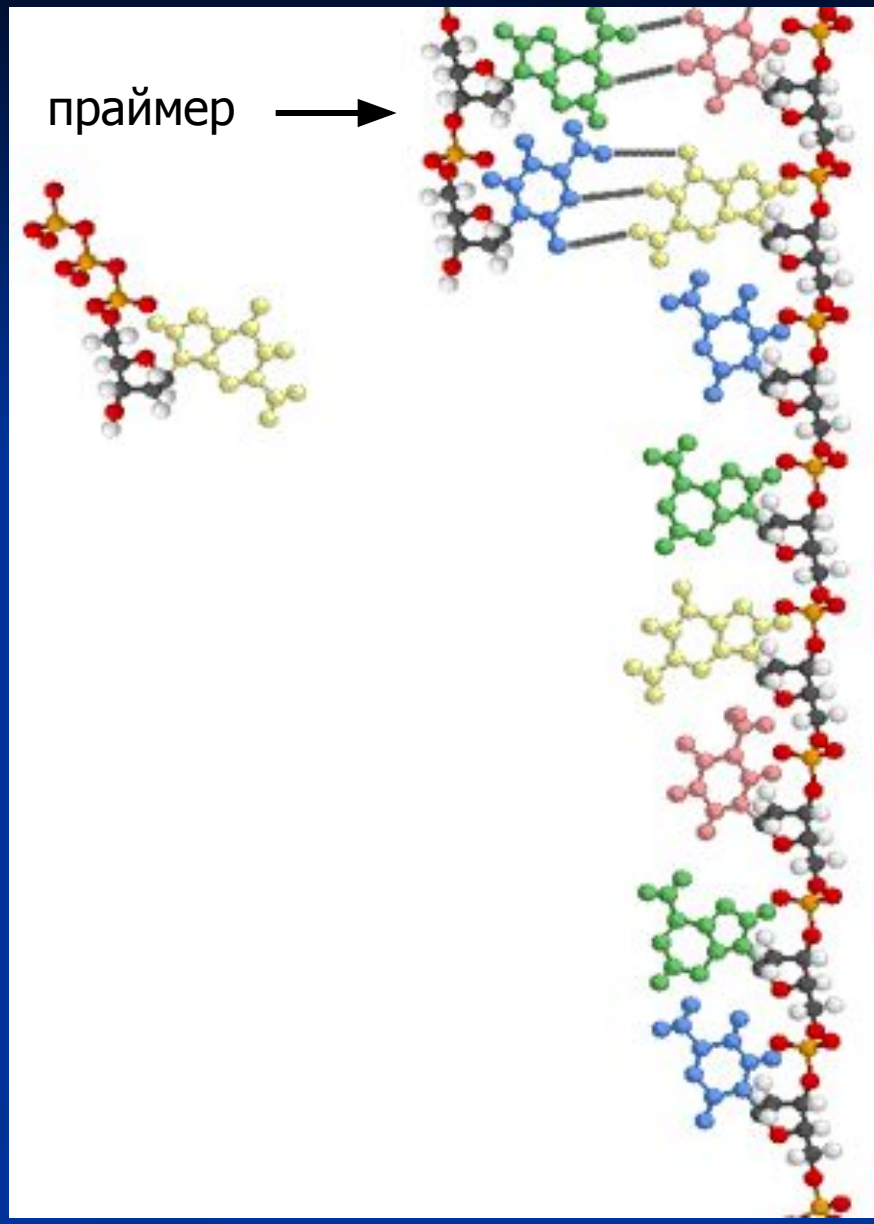
- однонитевая ДНК-матрица (получают нагреванием раствора ДНК)

- 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^{0}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^{0}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 72^0С.

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.*

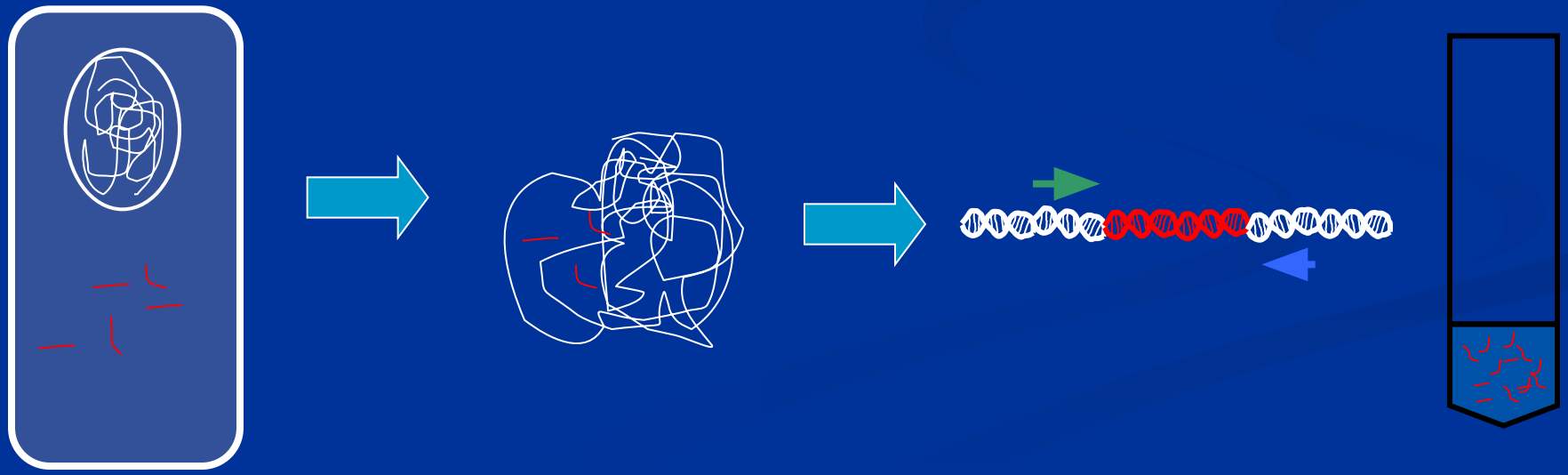
- **термостабильна**
- **не обладает 3’-5’ экзонуклеазной активностью**

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, стафиллококом, листерией.

В палентологии

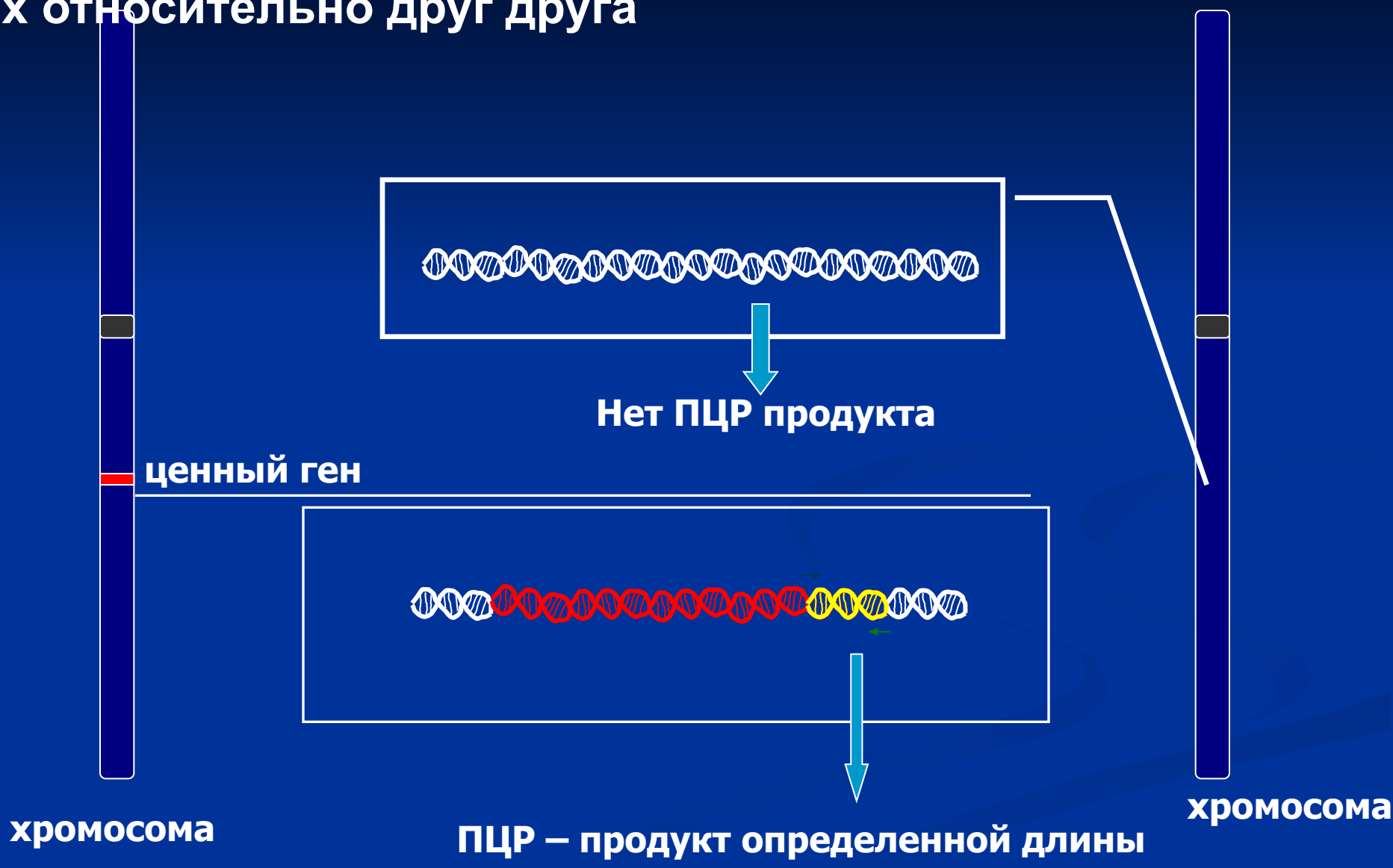
С помощью ПЦР можно амплифицировать ДНК из ископаемых остатков. Например, из листьев растения обнаруженных в пластах миоцена (около 18 млн.) была выделена ДНК и использована для ПЦР. Была клонирована часть гена 1,5-рибулозобифосфат карбоксилазы. На основе данных о нуклеотидном составе этого участка растение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

αS1-казеин, к-казеин, β-лактоглобулин

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

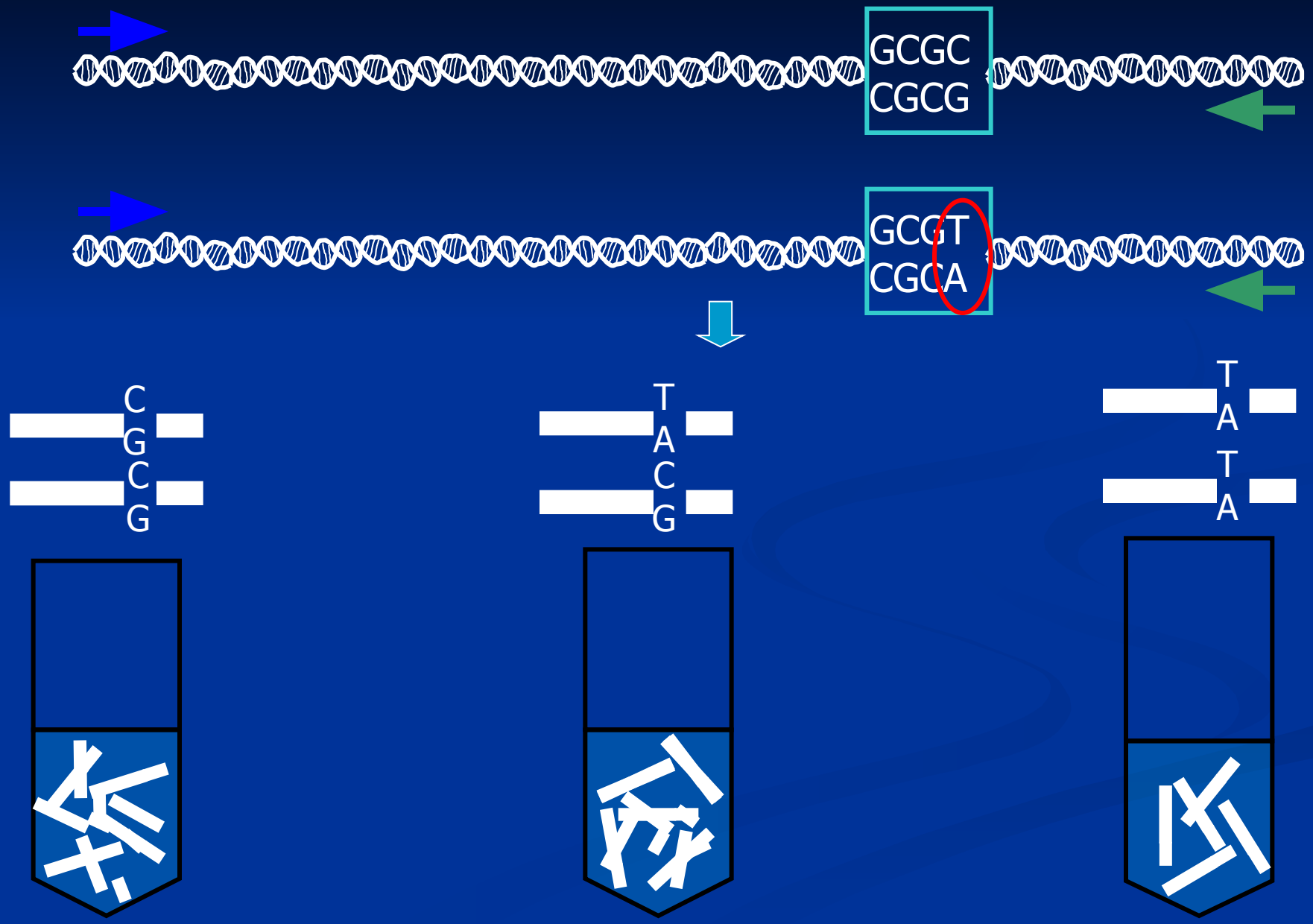
Для получения молока, идеального для производства сыра, необходимо проводить селекцию коров по таким генотипам:

αS1 – казеин CC (плотный сгусток)

β - казеин BB или CC (хорошое сычужное свертывание)

β - лактоглобулин BB (высокая массовая доля казеина)

Анализ злокачественной гипертермии у свиней

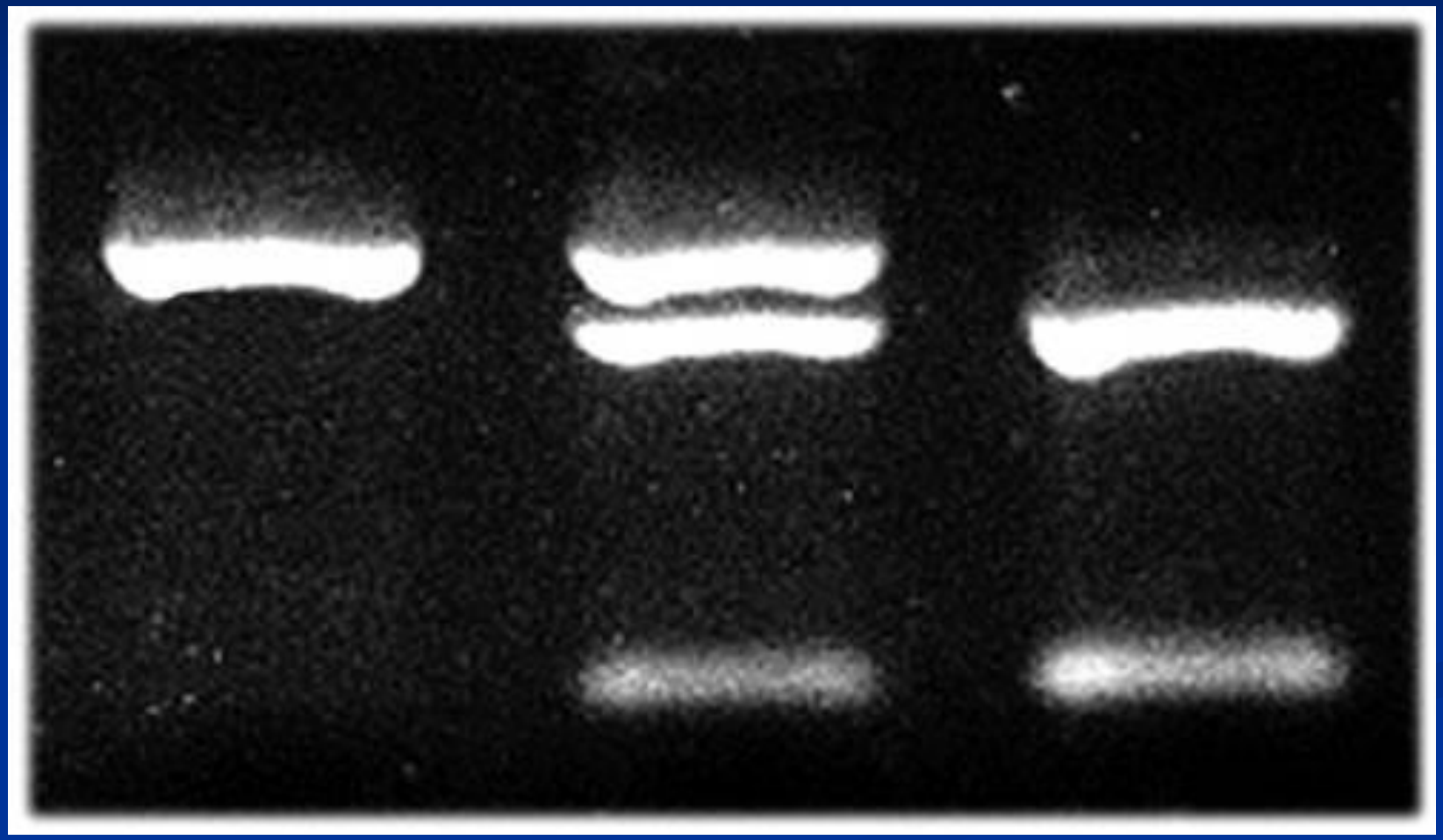


Электрофореграмма

Больное животное

Скрытый носитель мутантного гена

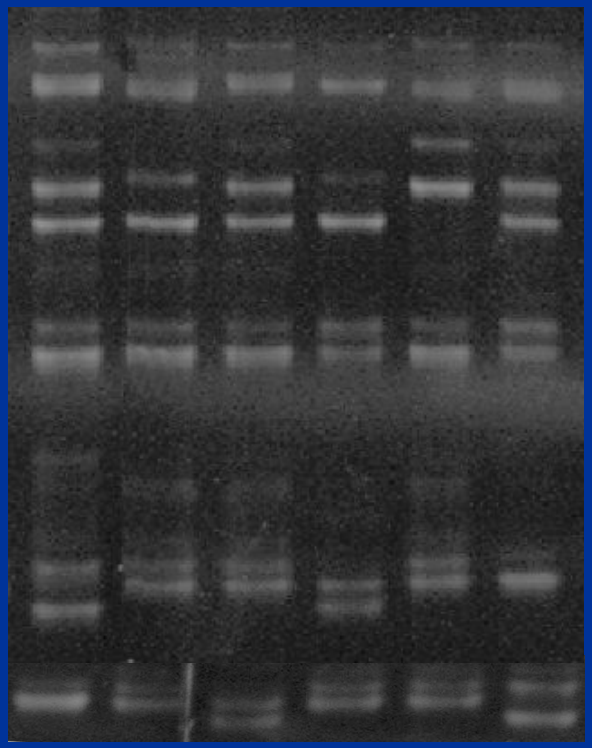
Здоровое животное



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 BLAD – дефецит 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 электорофорезе 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) Tm праймеров?