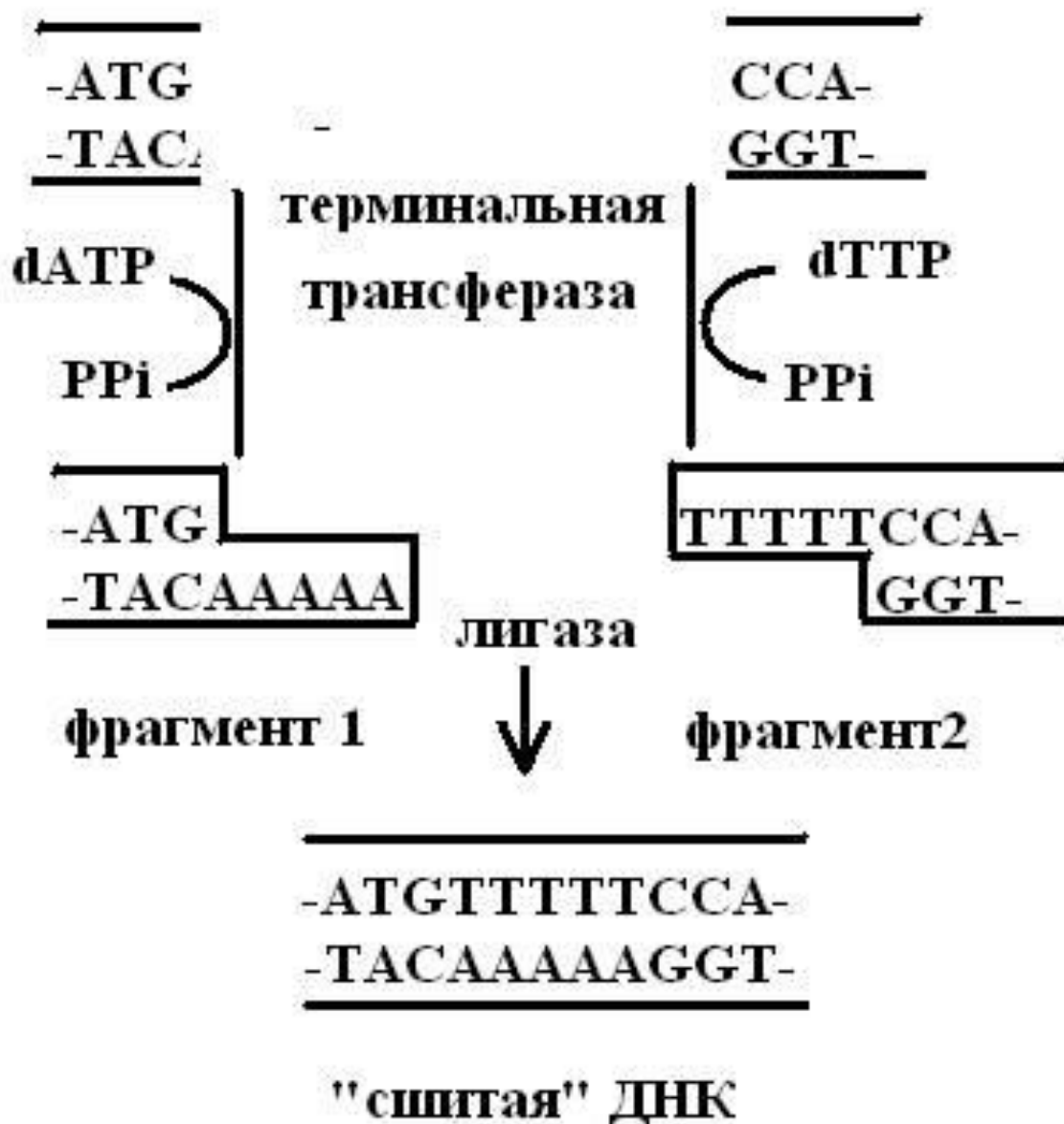


# Основы генетической инженерии

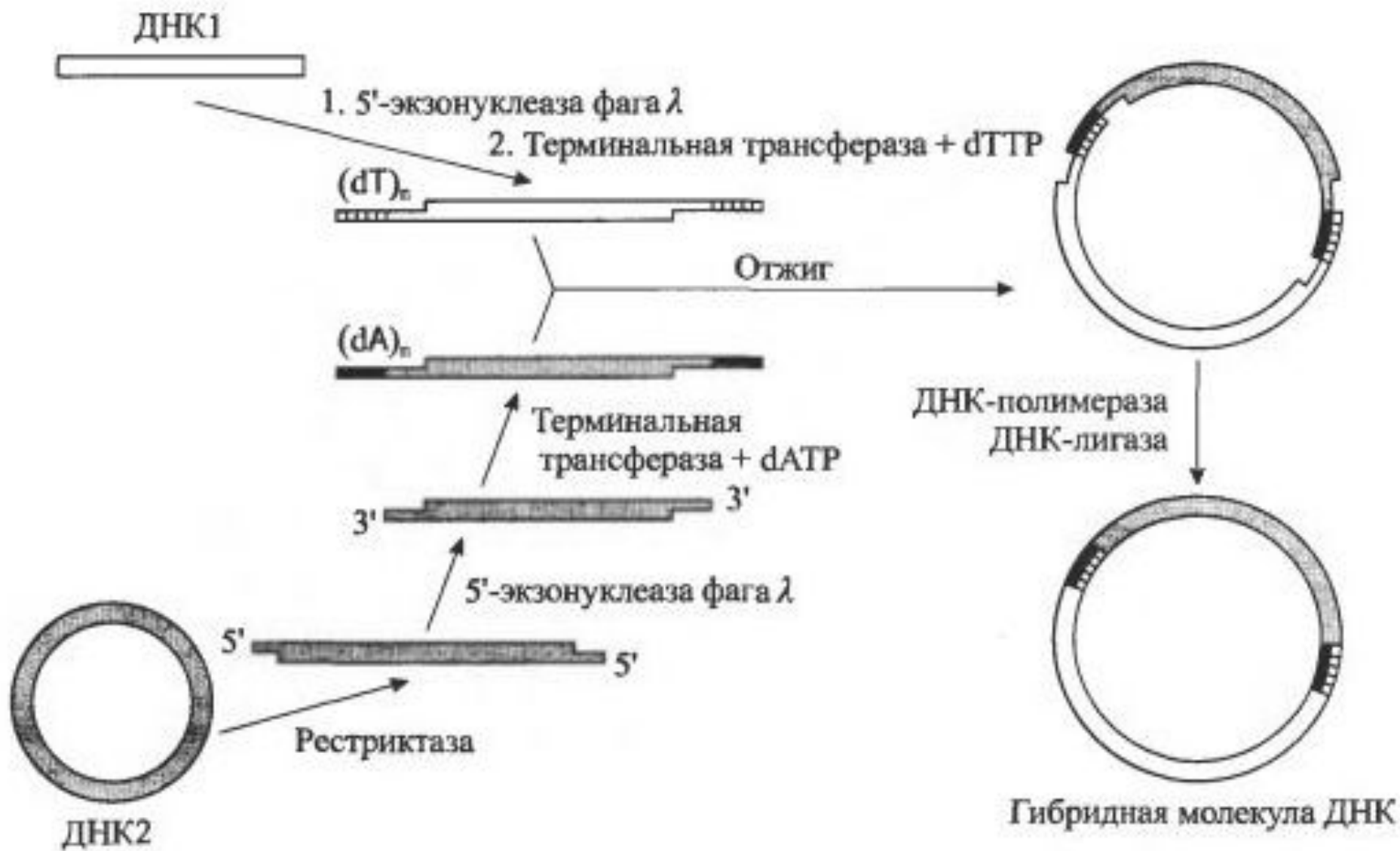
## Тема 3. Методы конструирования рекомбинантных ДНК

2016

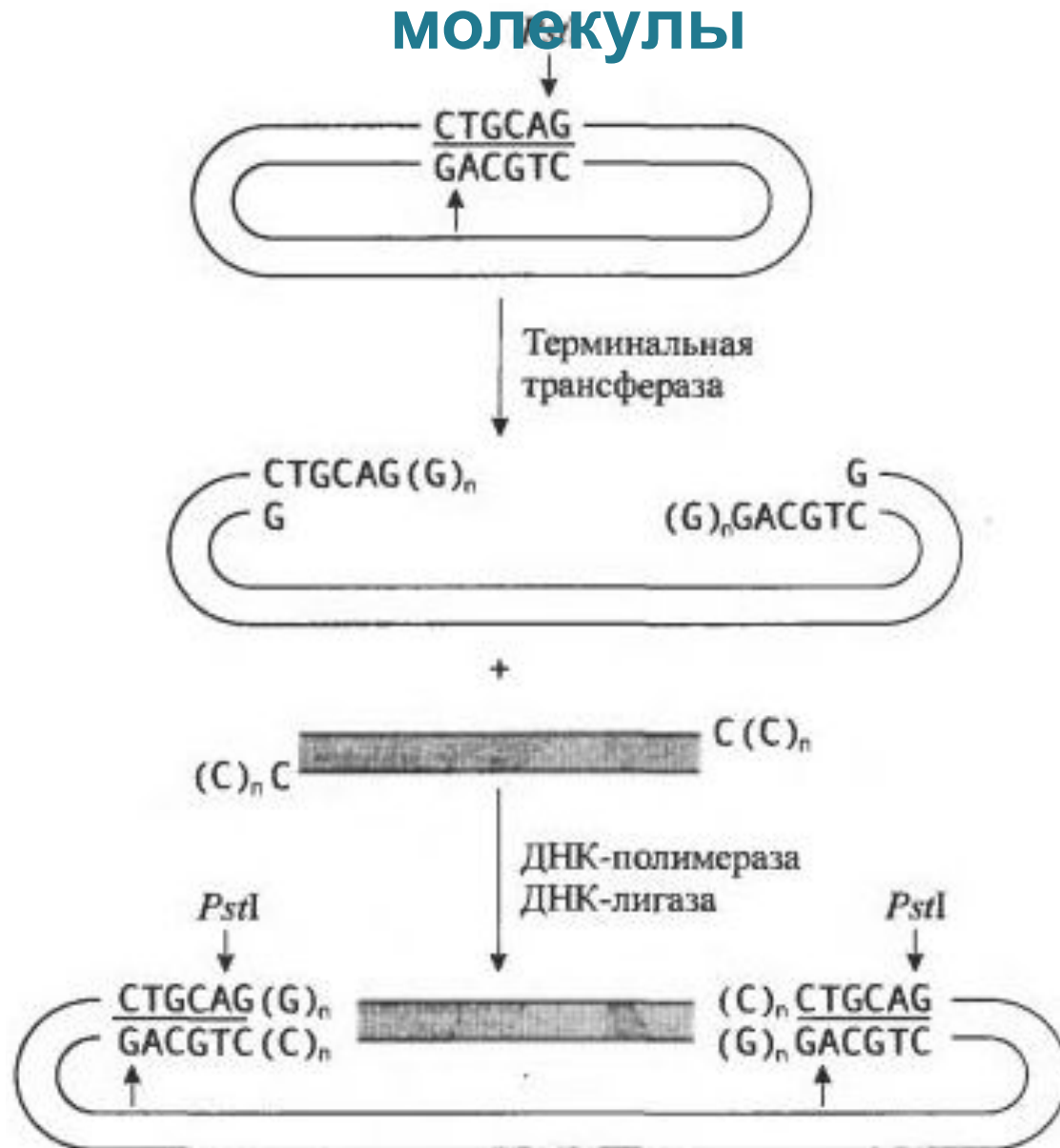
# Создание «липких» концов и сшивка фрагментов ДНК коннекторным методом



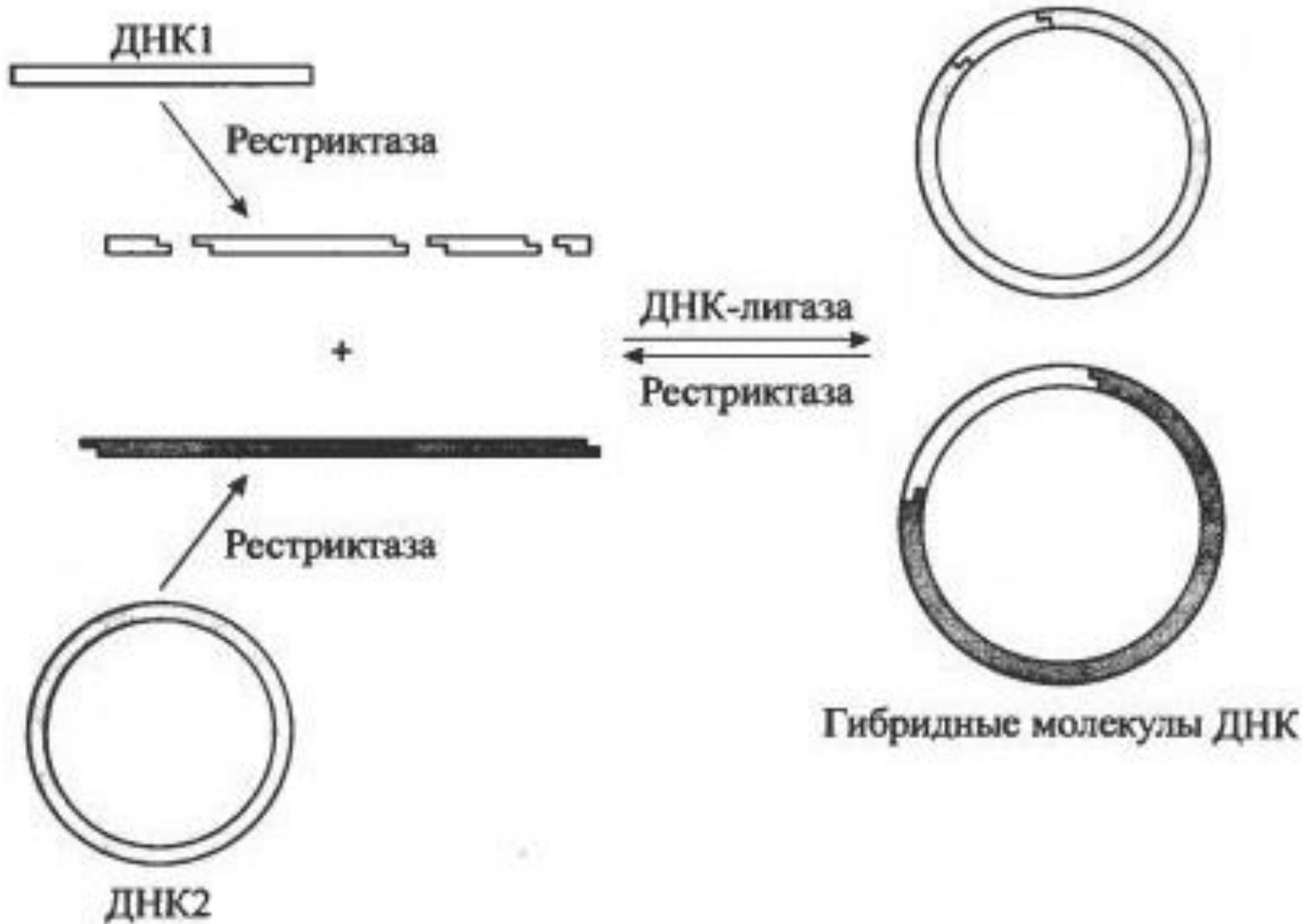
# Коннекторный метод



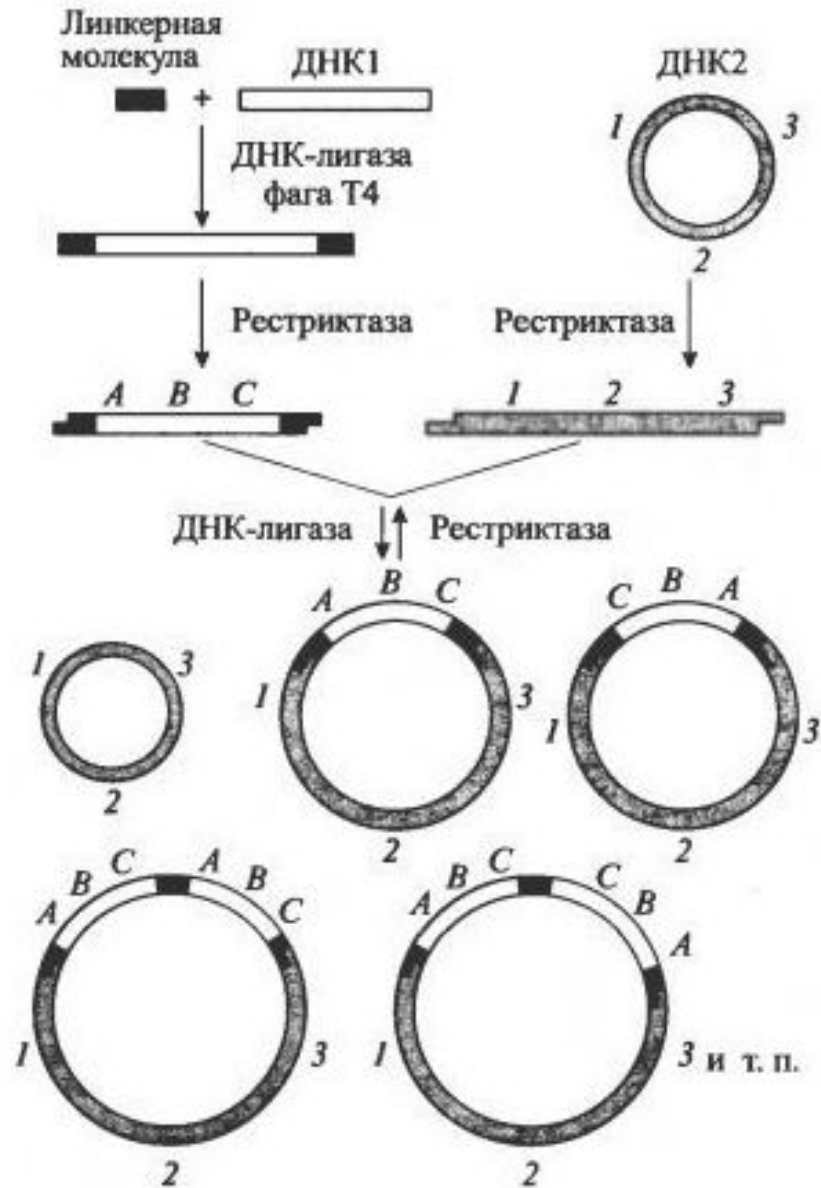
# Схема клонирования коннекторным методом фрагментов ДНК по *Pst*I-участку векторной молекулы



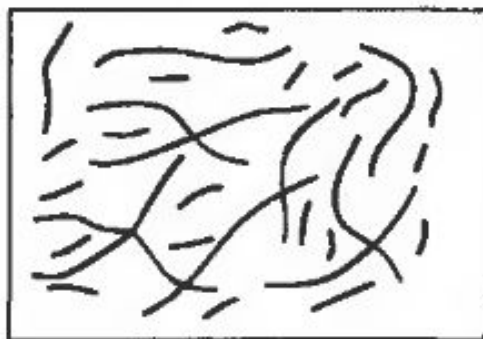
# Рестриктазно-лигазный



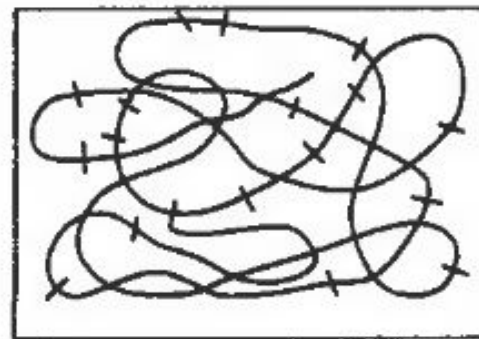
# Схема использования линкерных молекул для конструирования гибридных ДНК



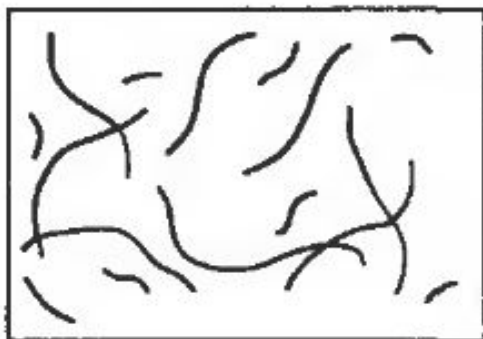
# Влияние концентрации фрагментов ДНК на спектр продуктов лигазной реакции



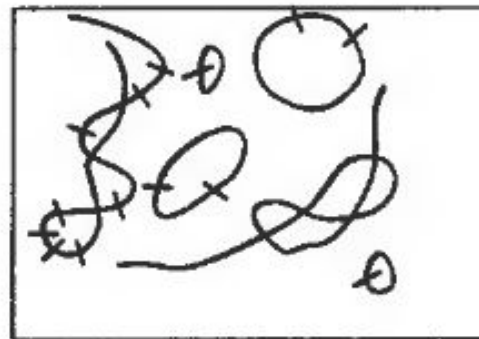
$a$



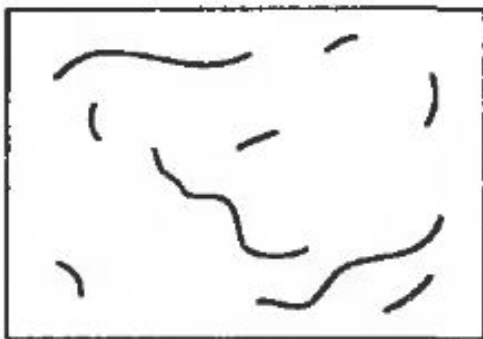
высокая



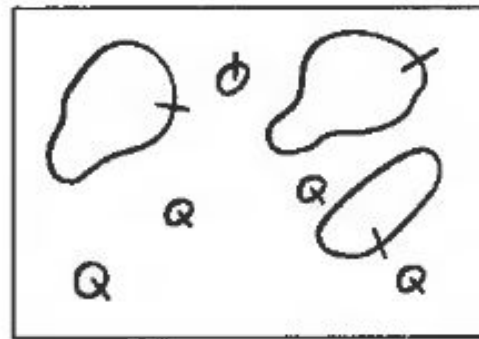
$b$



средняя



$b$



низкая  
концентрация  
фрагментов

Рестриктазы

Участки распознавания  
и места разреза ДНК

**Bam I**

5`-Г-↓Г-А-Т-Ц-Ц-3`  
3`-Ц-Ц-Т-А-Г↑-Г-5`

**EcoR I**

5`-Г-↓А-А-Т-Т-Ц-3`  
3`-Ц-Т-Т-А-А↑-Г-5`

**Hind III**

5`-А-↓А-Г-Ц-Т-Т-3`  
3`-Т-Т-Ц-Г-А↑-А-5`

**Hae III**

5`-Г-Г-↓Ц-Ц-3`  
3`-Ц-Ц-↑Г-Г-5`

**Hpa II**

5`-Ц-↓Ц-Г-Г-3`  
3`-Г-Г-Ц↑-Ц-5`

**Sma I**

5`-Ц-Ц-Ц↓-Г-Г-Г-3`  
3`-Г-Г-Г-↑Ц-Ц-Ц-5`

Некоторые рестриктазы и расщепляемые ими последовательности.

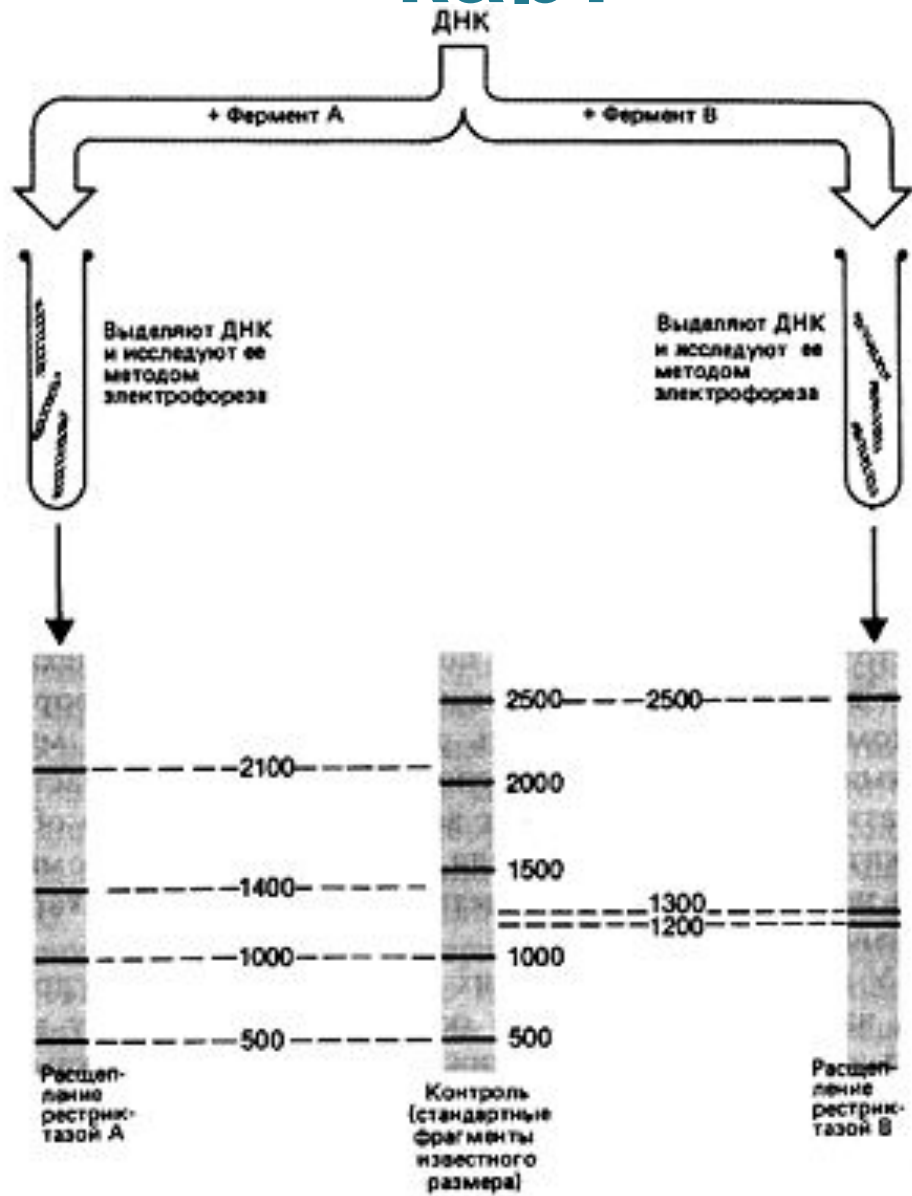


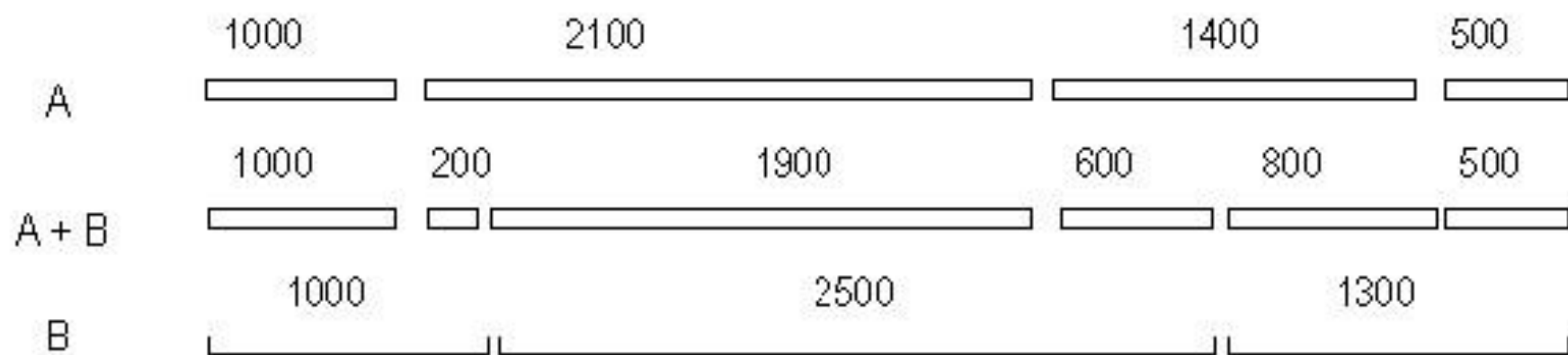
**Образцы  
ДНК,  
помещенны  
е в гель**



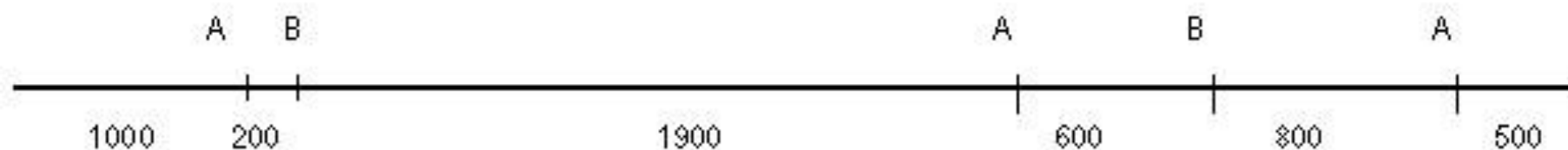
**Под действием  
электрического  
тока фрагменты  
движутся**

# Построение рестрикционных карт





Карта этого фрагмента ДНК:



**1. Имеется последовательность из 39 нуклеотидных пар двухцепочечной ДНК следующего состава:**

5`-ЦЦТ.ТАГ.ГЦЦ.ТГА.АТТ.ААГ.ГЦА.АТА.ГТГ.ТГА.АТТ.  
ЦАЦ.АТГ-3`

3`-ГГА.АТЦ.ЦГГ.АЦТ.ТАА.ТТЦ.ЦГТ.ТАТ.ЦАЦ.АЦТ.ТАА.  
ГТГ.ТАЦ-5`

**Каким способом и на сколько частей можно разрезать эту ДНК?**

## 1. Решение:

В данной последовательности ДНК имеется два участка распознавания:

**ГААТТЦ** для рестриктазы EcoR I и **ГГЦЦ** для Hae III (табл ).

Поэтому искомая ДНК может быть разрезана в двух местах с образованием трёх различных фрагментов следующих последовательностей:

1) 5`-ЦЦТТАГГ-  
3`-ГГААТЦЦ-

2) -ЦЦТГААТТААГГЦААТАГТГТГ-  
-ГГАЦТТААТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТТАА-

3) -ААТТЦАЦАТГ-3`

**2. Рестрикционный фермент  
N<sub>1</sub>nd III разрезает ДНК по  
последовательности ААГЦТТ.**

**Насколько часто этот фермент  
будет разрезать  
двухцепочечную ДНК? (Какова  
средняя длина фрагментов  
разрезанной ДНК?).**

## 2. Решение:

Частота встречаемости фрагмента из 6 нуклеотидных пар для Hind III составит

$$(1/4)^6 = 1/4096,$$

так как вероятность для одного нуклеотида занять конкретное место в цепочке ДНК составляет  $1/4$ , а таких мест имеется 6.

⇒ среднее расстояние между участками разрезания рестриктазой Hind III составит около 4 тысяч нуклеотидных пар (4 тысячи баз или 4 килобазы).

**Кб, килобаза** (*kb, kilobase*) — единица, используемая для выражения размера нуклеиновых кислот,  
1 кб = 1000 нуклеотидов, или пар оснований (п. о.), в двухцепочечной ДНК.



3. Гаплоидный геном человека содержит около  $3 \times 10^9$  н.п. ДНК. Если вы порежете человеческую ДНК рестрикционным ферментом **EcoRI**, узнающим гексамерную последовательность **GAATTC**, то **сколько различных рестрикционных фрагментов будет получено?**

### 3. Решение:

Вероятность для любого из четырех нуклеотидов занять конкретное место в цепочке составляет  $1/4$ .

Вероятность для 2 нуклеотидов (например, АГ) составит  $1/4 \times 1/4 = (1/4)^2$ ,

а вероятность для специфической гексамерной последовательности будет равна  $(1/4)^6 = 1/4096$ .

Следовательно, EcoRI будет разрезать молекулу человеческой ДНК в среднем один раз на 4096 нуклеотидных пар.

Если молекула ДНК разрежется  $n$  раз, то в результате получается  $n+1$  фрагмент.

Гаплоидный геном из  $3 \times 10^9$  нуклеотидных пар содержит около 732 422 ( $3 \times 10^9 / 4096$ ) мест разреза для рестриктазы EcoRI.

Если бы полный геном человеческой ДНК состоял из одной молекулы, то EcoRI могла бы разрезать его на  $732\,422 + 1$  фрагмент.

Но поскольку места разрезания распределены по 23 хромосомам, то в результате полного расщепления человеческой ДНК рестриктазой EcoRI должно получиться  $732\,422 + 23$  рестрикционных фрагмента.

**4. Ниже приведены последовательности двух фрагментов ДНК, выделенных из организмов разных видов.**

**1) 5`- АГЦ АТА ЦТГ ТГА АТТ ЦАЦА-3`  
3`-ТЦГ ТАТ ГАЦ АЦТ ТАА ГТГТ-5`**

**2) 5`-АТГ ААТ ТЦТ ТАГ ЦАТ АЦ-3`  
3`-ТАЦ ТТА АГА АТЦ ГТА ТГ-5`**

**С помощью каких ферментов можно получить гибридную молекулу ДНК из этих фрагментов? Опишите**

**Решение:** На первом этапе необходимо разрезать представленные фрагменты ДНК разных видов с помощью подходящих рестрикционных ферментов. В данном случае можно использовать рестриктазу EcoRI, которая расщепит ДНК двух видов на четыре новых фрагмента 1а, 1б и 2а, 2б с липкими концами ААТТ и ТТАА:

1а) 5`-АГЦАТАЦТГТГ                      1б) ААТТЦАЦА-3`  
3`-ТЦГТАТГАЦАЦТТАА                      ГТГТ-5`

2а) 5`-АТГ                                      2б) ААТТЦТТАГЦАТАЦ-3`  
3`-ТАЦТТАА                                      ГААТЦГТАТГ-5`

В ходе второго этапа необходимо смешать нужные нам фрагменты 1а и 2б. В результате выступающие липкие концы скрепятся между собой, как им и положено, водородными связями в силу комплементарности.

5`-АГЦАТАЦТГТГ А-А-Т-Т-ЦТТАГЦАТАЦ-3`  
3`-ТЦГТАТГАЦАЦ-Т-Т-А-А ГААТЦГТАТГ-5`

Окончательное скрепление фрагментов 1а и 2б двух молекул ДНК производит специализированный фермент ДНК-лигаза, которая “сшивает” между собой сахарофосфатные остовы обоих фрагментов с образованием полной структуры двойной спирали ДНК