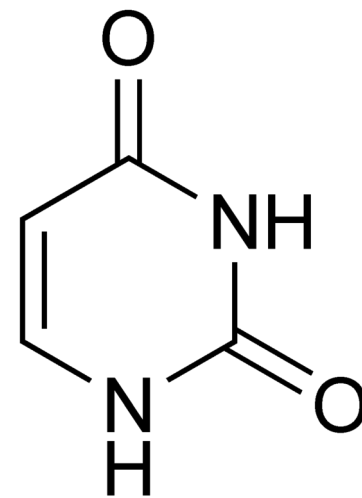
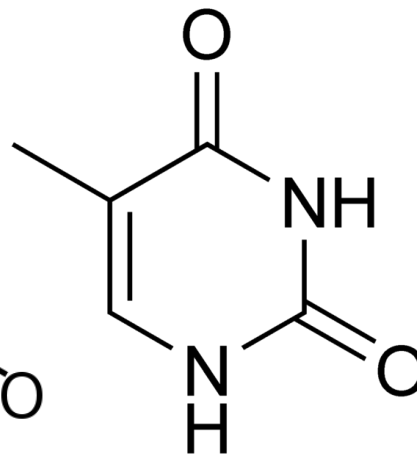
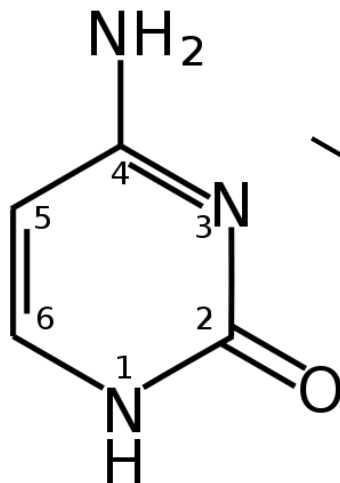
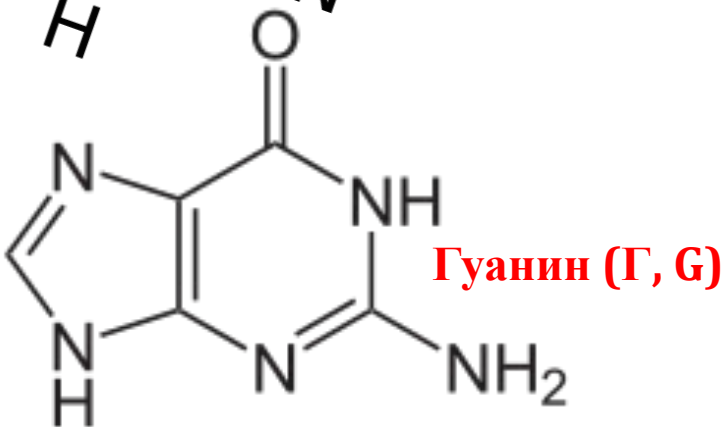
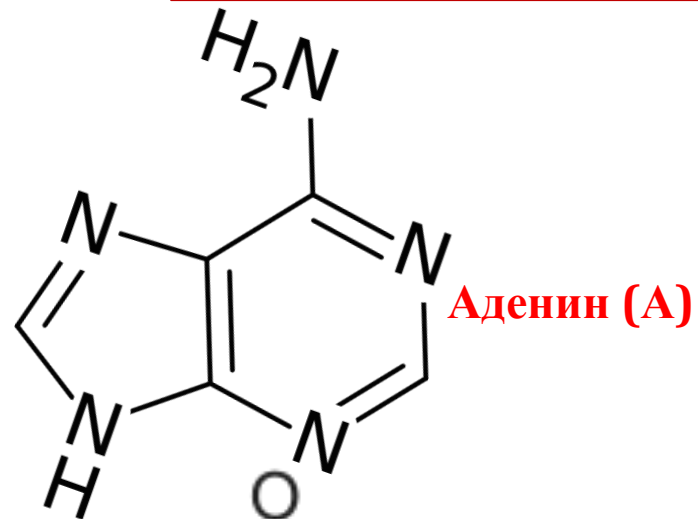




Генетическая инженерия



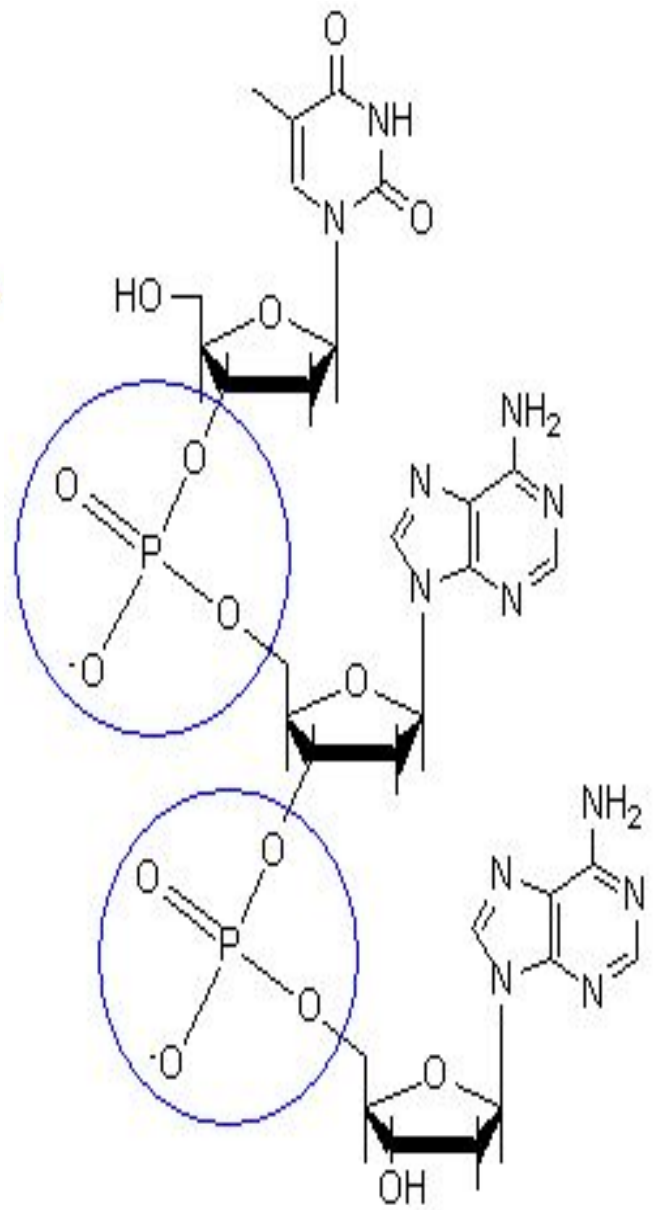
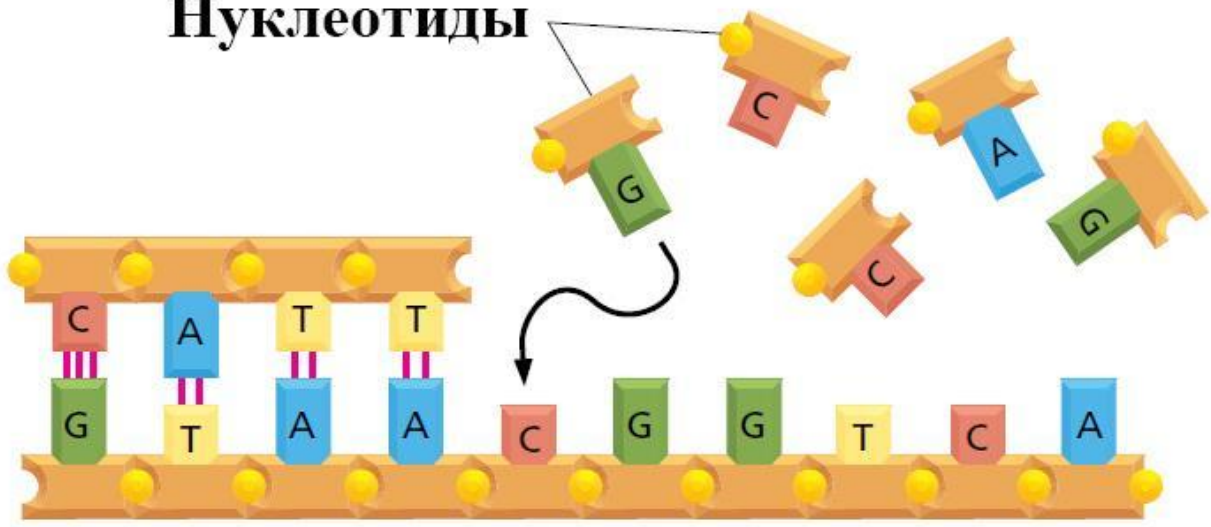


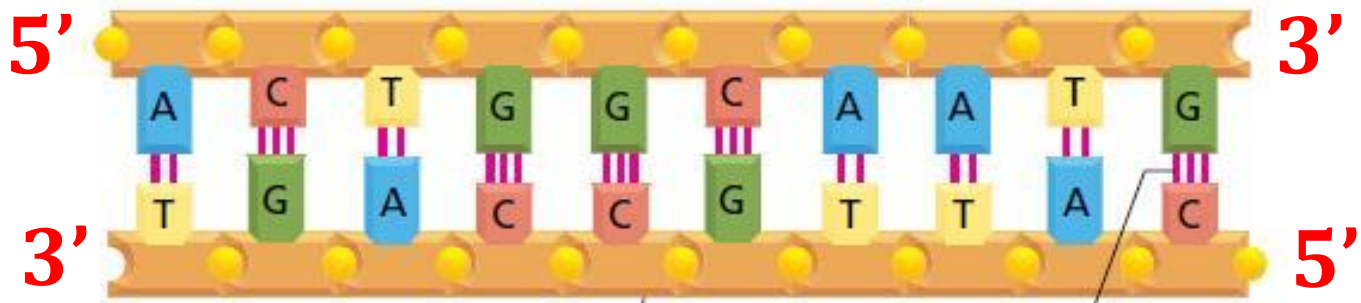
Цитозин (Ц, C)

Тимин (Т)

Урацил (У, U)

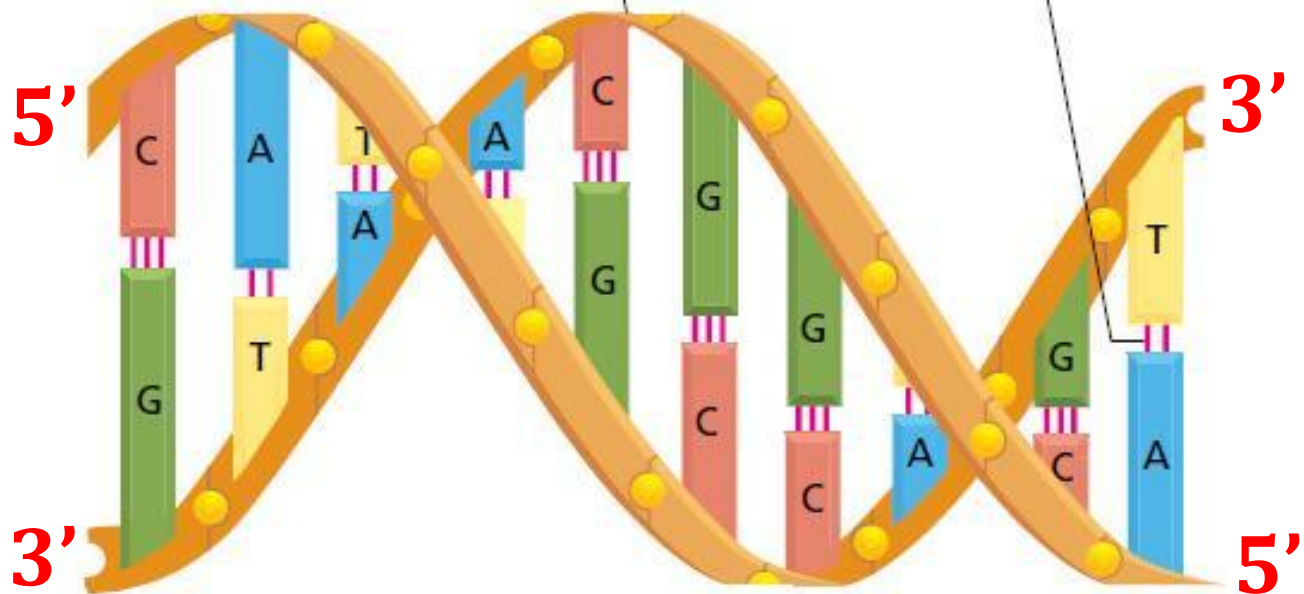
Нуклеотиды

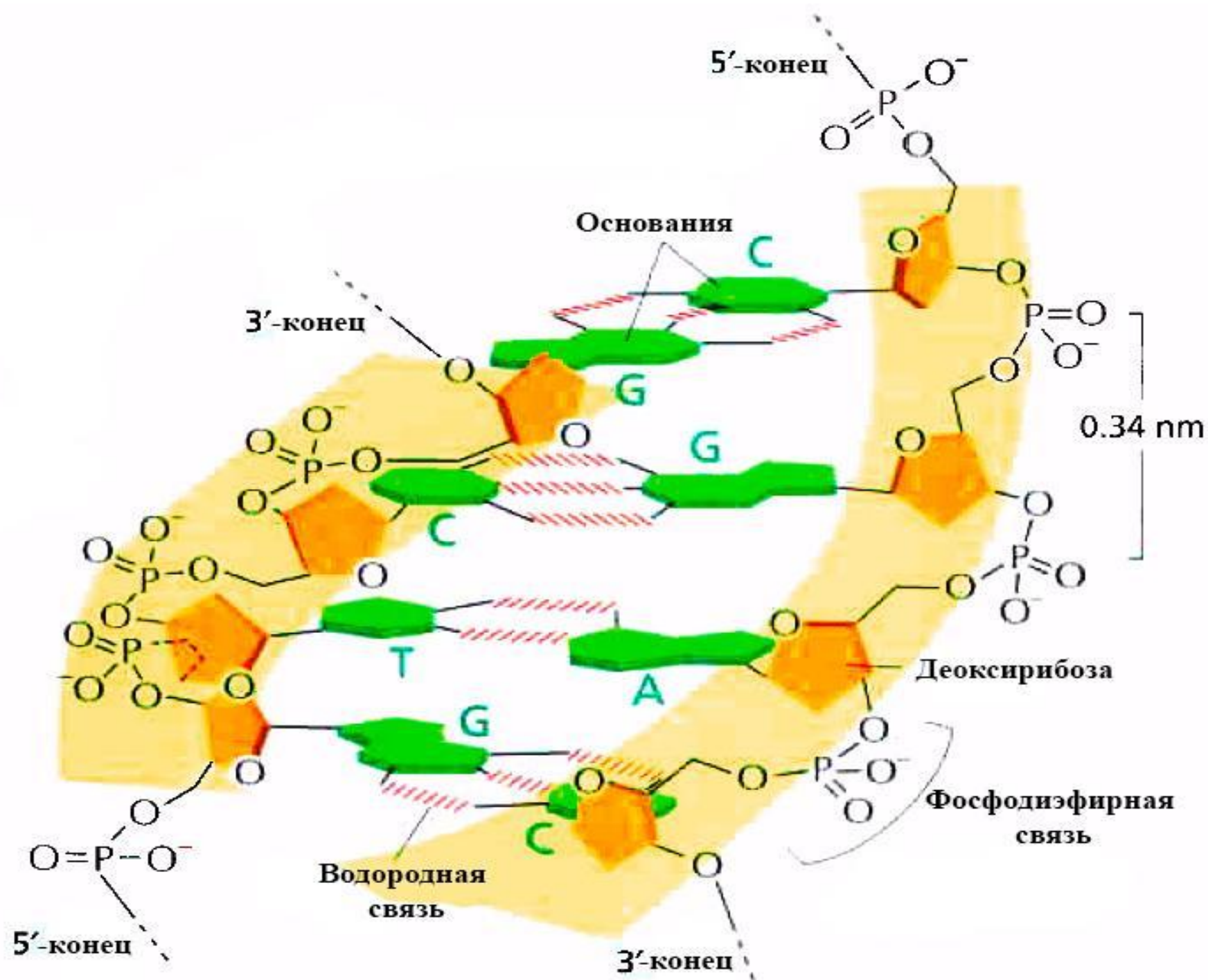




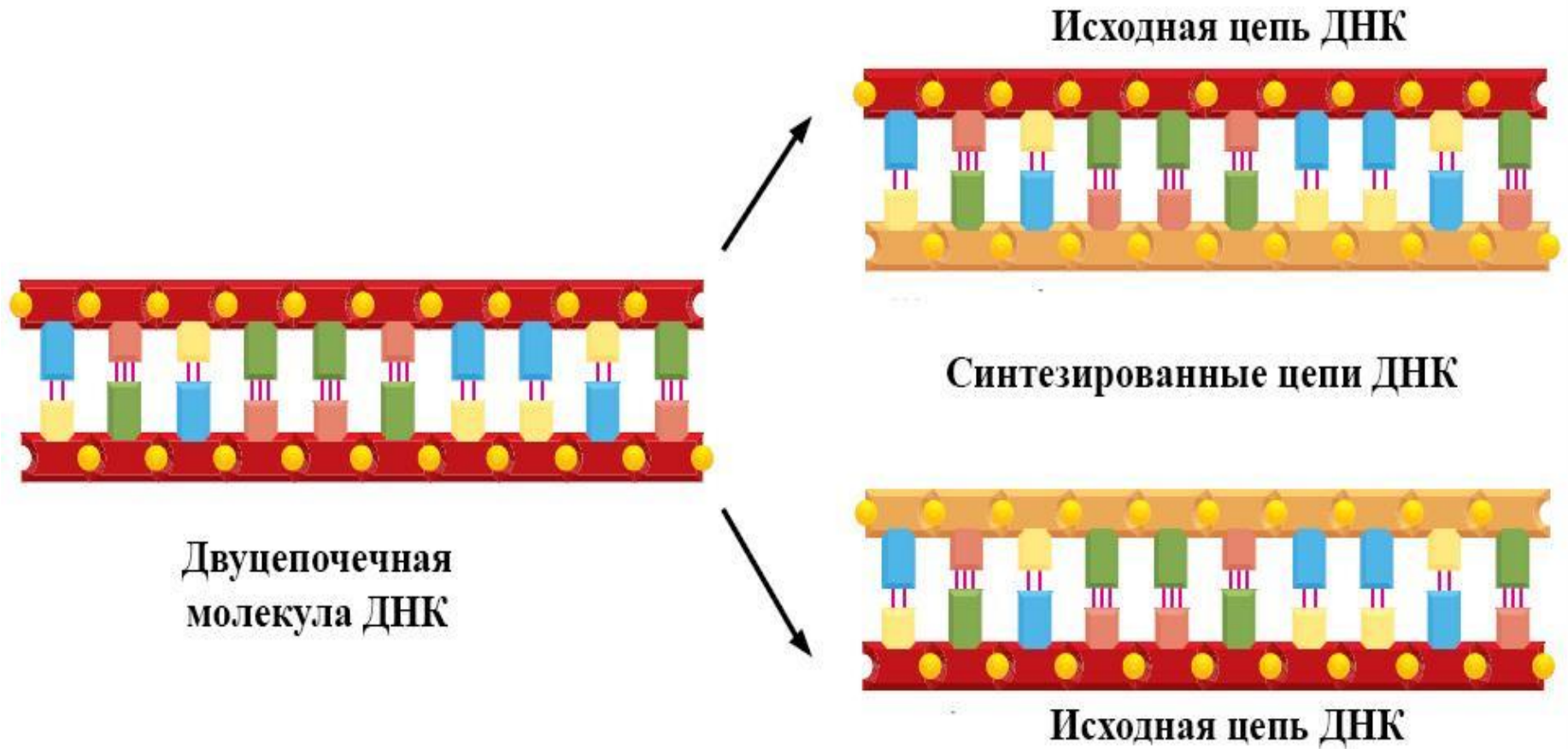
Сахарофосфатный
остов

Комплементарные
нуклеотиды

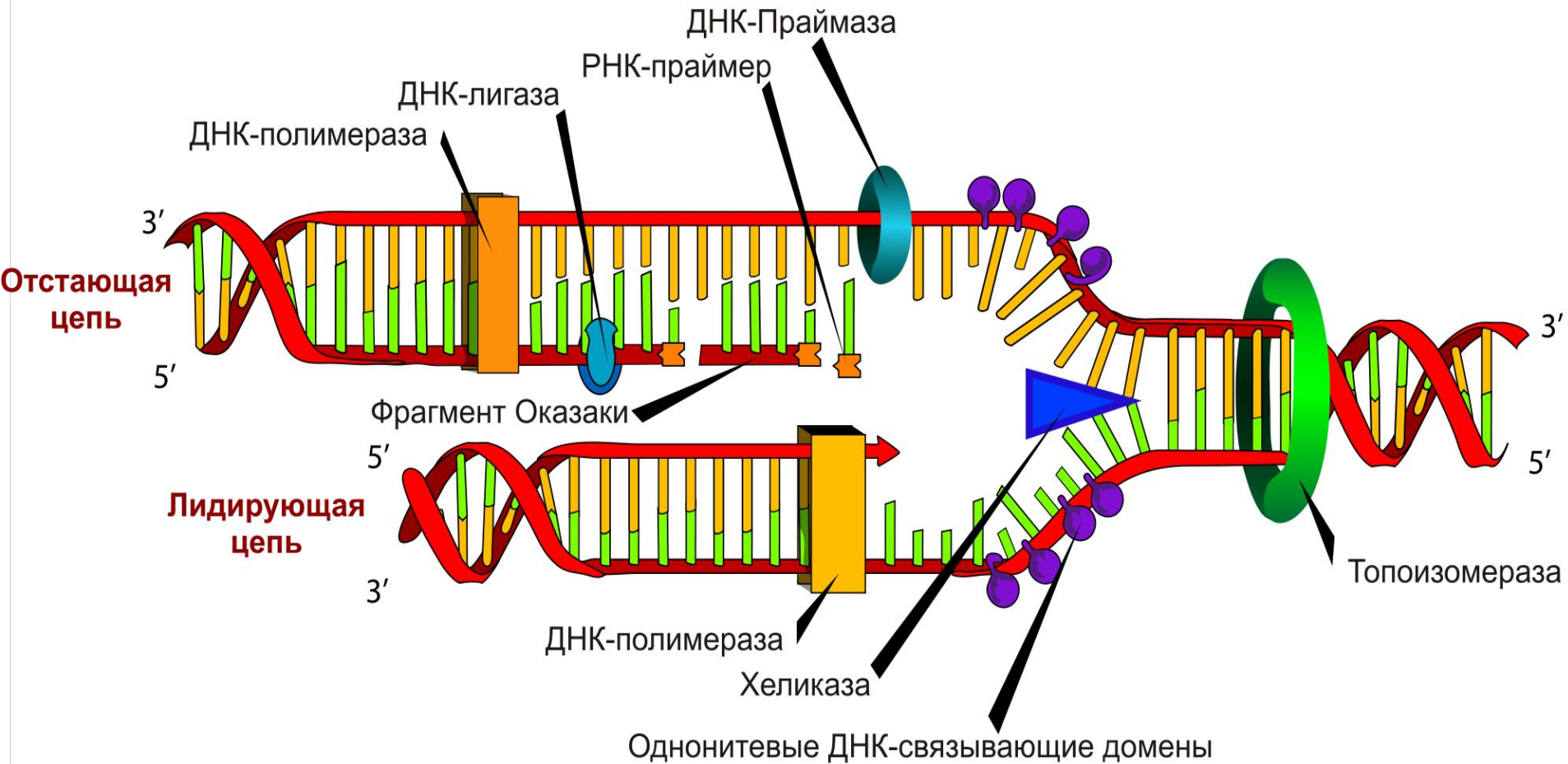


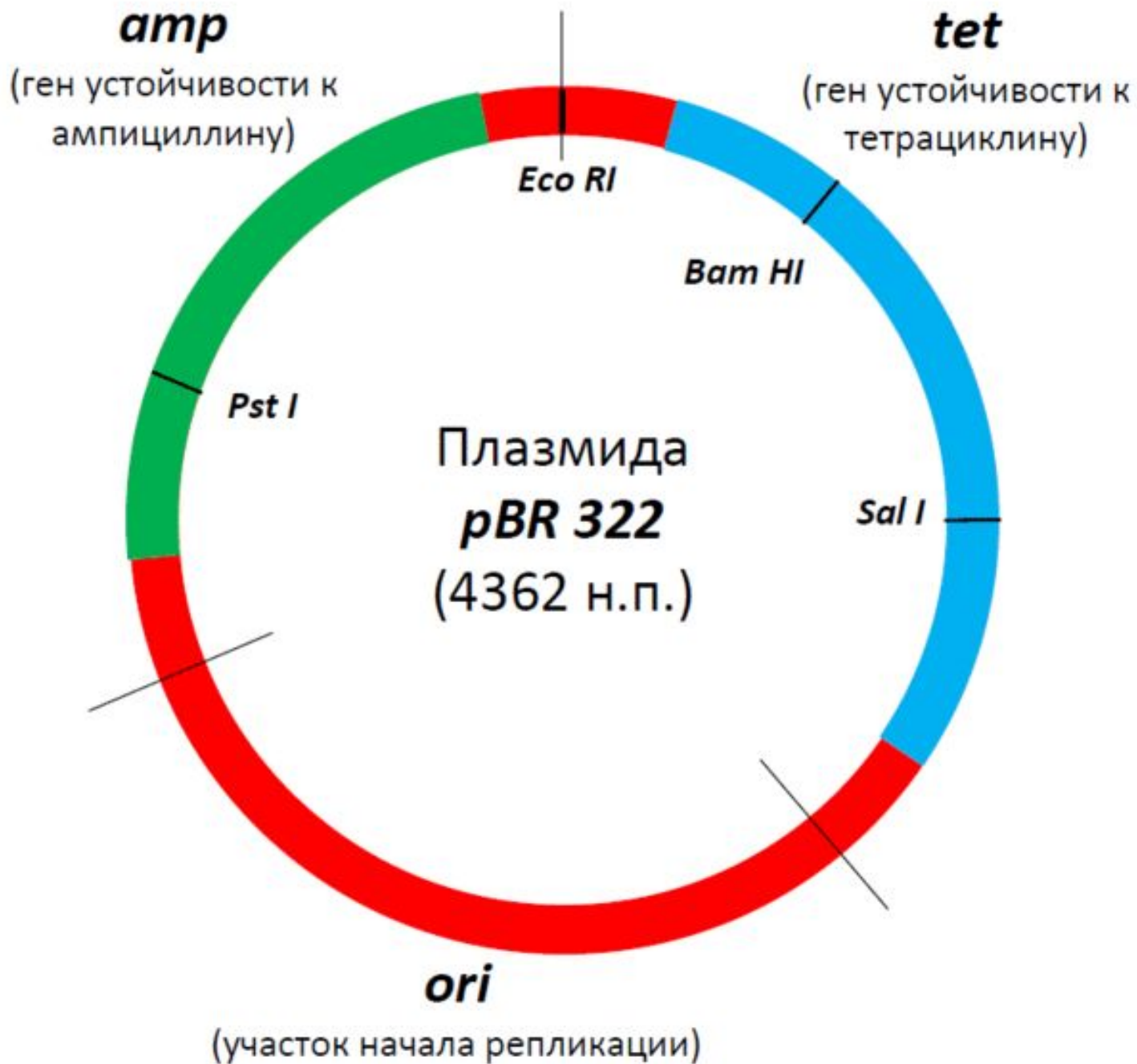


Репликация ДНК



Репликация ДНК

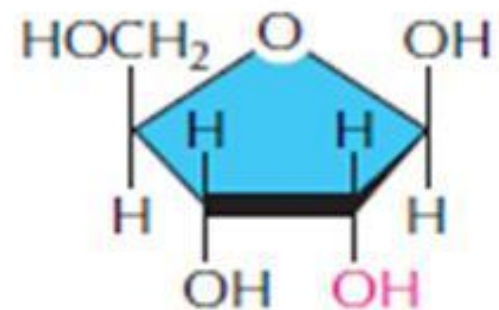




ttctcatgtttgacagcttatcatcgataagotttaatgcggtagtttatcacagttaaattgctaacgcagtcaggcaccgtgtagaaaotacaatgacgctcatcg
tcatcctcggcaccgtcaccctggatgctgtaggcataggcttggttatgcccgtactgcccggcctcttggcgggatatcgccattccgacagcatcgccagtcactat
ggcgtgctgctagcgcctatatgcggtgatgcaatttctatgcccacccttctcgggagcactgctccgaccgcttggccgcccagtcctgctcgcttcgctacttgg
agccactatcgactacgcgatcatggcgaccacaccctcctgtggatcctctacgcccggacgcacgtggccggcatcaccggcgccaaggtgcccgttgcctggccct
atatcgcccagacatcaccgatggggaagatcgggctcggcacttcgggctcatgagcgcctgttttcggcgtgggtaagggtggcaggccccgtggccgggggactggtgggc
gccatctccttgcatgcaccattccttgcggcggcggtgctcaacggcctcaacctactactgggctgcttccctaatgacaggagtcgcataagggagagcgtcgaccgat
gcccttgagagccttcaaccagtcagctccttcgggtggcgcggggcatgactatcgctcggcacttatgactgcttctttatcatgcaactcgtaggacaggtgc
cggcagcgcctcgggtcatttctcggcgaggacogcttctcgtggagcgcgacgatgacggcctgctcgttgggtaattcggaatcttgcaagcctcgcctcaagcctc
gtcactgggtcccggccacaaagcttctcggcgagaagcaggccattatcgcccggcatggcggccgacgcgctgggctacgtcttgcctggcgttcggcagcgcgaggctggat
ggccttccccattatgattcttctcgttccggcggcatcgggatgcccgcgcttgcaggccatgctgctccaggcaggtagatgacgaccatcagggacagcttcaaggat
cgctcgcggctcttaccagcctaacttcgatcactggaccgctgatcgtcaaggcgatttatgcccgcctcggcgagcacatggaacgggttggcatggattgtaggcgc
gccctataccttgtctgctccccgcggttgcgtcgcggtgcatggagcgggcccacctcgacctgaatggaagccggcgccacctcgctaaccggattcaccactccaaga
attggagccaatcaattcttgcggagaactgtgaatgcccgaaccacccttggcagaacataccatcgctccgccaatctccagcagccgcacgcggcgcatctcggg
cagcgttgggtcctggccacgggtgcgatgatcgtgctcctgtcgttggagaccggctaggctggcgggggtgccttactggttagcagaatgaaaccgatacgcg
agcgaacgtgaagcagctgctgctgcaaacgctcgcgacctgagcaacaacatgaaatggtcttcgggttccgctgttctgtaaagtctggaaacgcgggaagtcagcgc
tgcaccattatgttccggatcgtcatcgcaggatgctgctggctaccctgtggaacacctacatctgtatctaacgaagcgtggcattgacctgagtgatcttctctg
gtcccgcgcgatccataccgacagttgtttaccctcacaacgcttccagtaaccgggcatgttcatcatcagtaaccgctatcgtgagcatcctctctcgttctcatcggtat
tcattacccccatgaaacagaaaaccccccttacacggaggcatcagtgacaaaacaggaaaaaacgccccttaacatggcccgttatacagaagccagacataaacgctt
ctggagaaaactcaacgagctggacgcggatgaaacaggcagacatctgtgaaatcgttcaacgaccgctgatgagcttaccgcagctgcctcgcgcttccggtgatga
cggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagcttgcctgtaagcggatgcccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgctcagcgggtggtggcgggt
gtcggggcgcagccatgaccagtcacgtagcgaatagcggagtgatactggcttaactatgcccgcacagagcagattgtactgagagtgaccataatgcccgtgtaaa
taccgcacagatgcccgaaggagaaaataccgcatcaggcgccttccgcttccctcgcctcactgactcgcctcgcctcggctcgttccggctcggcgagcggtaacagctcac
tcaaaggcggtaataacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaaggccaggaaaccgtaaaaaggccgcgttgcctggc
gtttttccataggtcctcgcctccctgacgagcatcacaacaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaaaccgcagaggactataaagataccaggcgttccccctggaa
gtcctcctcgtgcgctctcctgttccgacctgcgccttaccggaatcctgtccgccttctccttccgggaagcgtggcgccttctcatagctcagcgtgtaggtatctc
agttcgggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccgctcagcccgaccgctgcgccttatccgtaactatcgtcttgagtcacaaccggtaag
acacgacttatcgcactggcagcagccactggtaaacaggattagcagagcagggatgtagggcgtgctacagagttcttgaagtgggtggcctaactacggctacacta
gaaggacagtatgttgatctgcgctcgtcgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaaacaaaccaccgctggtagcgggtgggtttttt
gtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggctcgaagcctcagtggaacgaaaactcagtttaagggat
ggctcatgagattatcaaaaaggatcttccactagatccttttaattaaaaatgaagttttaaatacaatctaaagtataatgagtaaacctgggtcgtgacagttaccaat
gcttaatcagtgaggcaccatctcagcgaatcgtctattcgttcatccaatagttgctgactccccgctcgtgtagataactacgatcgggagggcttaccatctggc
cccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccgctccagatttatcagcaataaacagccagccggaaggccgagcgcagaaagtggtcctgcaactttatc
cgcctccatccagctctattaatgttgcgggaagctagagtaagtagttcggcagttaatagtttgcgcaacgcttgttgccattgctgagggcatcgtggtgctcagct
cgtcgttgggtatggcttcatcagctccggttcccacgatcaaggcaggttacatgataccccatggtgtgcaaaaaagcgggttagctcctcggctcctccgatcgtt
gtcagaagtaagttggccgagtggtatcactcatgggtatggcagcactgcataattctcttactgtcatgccaatccgtaagatgctttctgtgactggtgagttactc
aaccaagtcattctgagaaatggtgatgcccgcagccgagttgctcttgcggcgctcaacacgggataaacccgcgccacatagcagaactttaaagtgctcatcattg
gaaaacgcttctcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctggttgagatccagttcgaatgtaaccactcgtgcaaccaactgatcttcagcatctttactttcacc
agcgttctcgggtgagcaaaaacagggaaggcaaaaatgcccgcaaaaagggaataaggcgcacagggaaatggtgaaatctcactcttcttcttctcaataattatggaag
cattatcaggggttattgtctcatgagcggatataatgtgaaatgtaatttagaaaaataaacaataaggggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgctc
aagaaaccattatcatgacattaacctataaaaaataggcgtatcacgagggcccttctcgtcttcaagaa

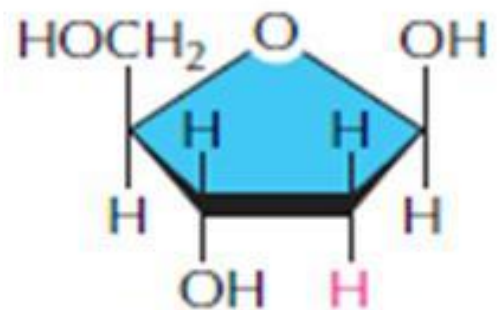
Современная концепция гена





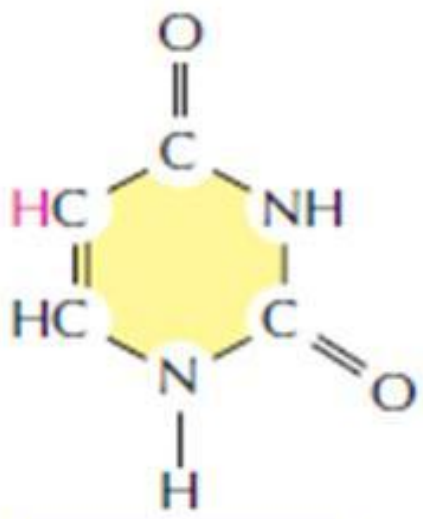
рибоза

Используется
в РНК

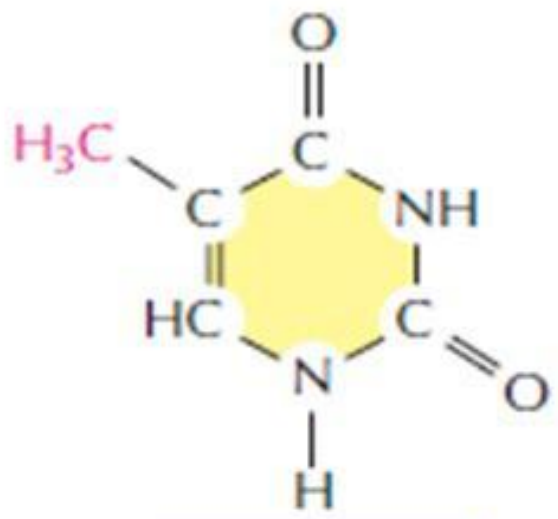


деоксирибоза

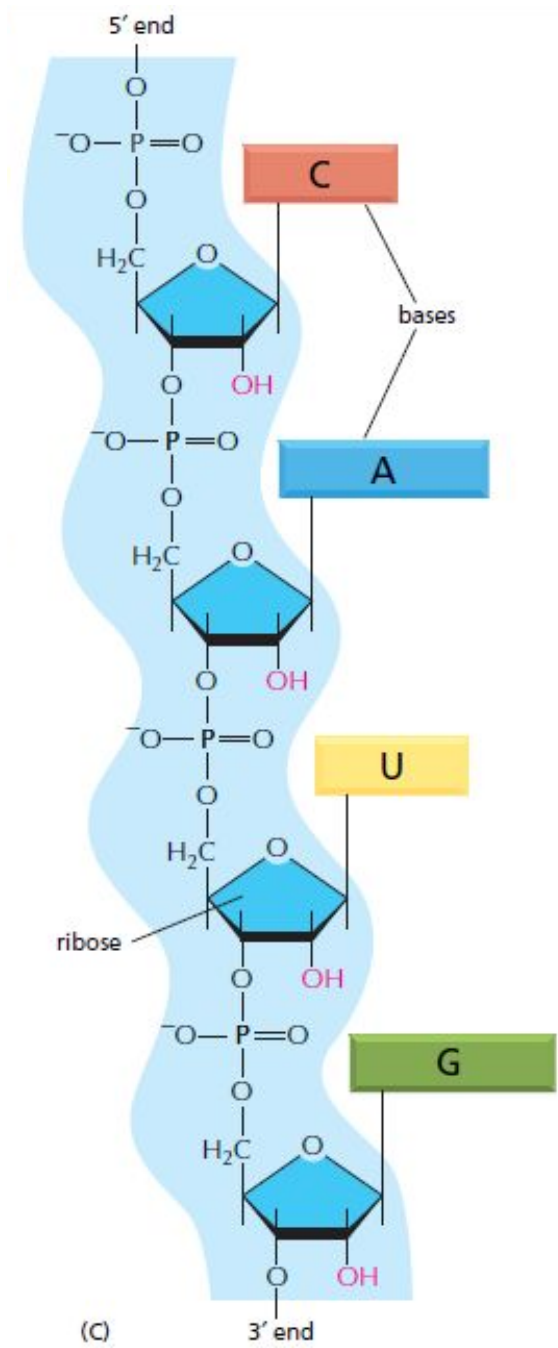
Используется
в ДНК



Урацил



Тимин



ДНК



ТРАНСКРИПЦИЯ



РНК

РНК



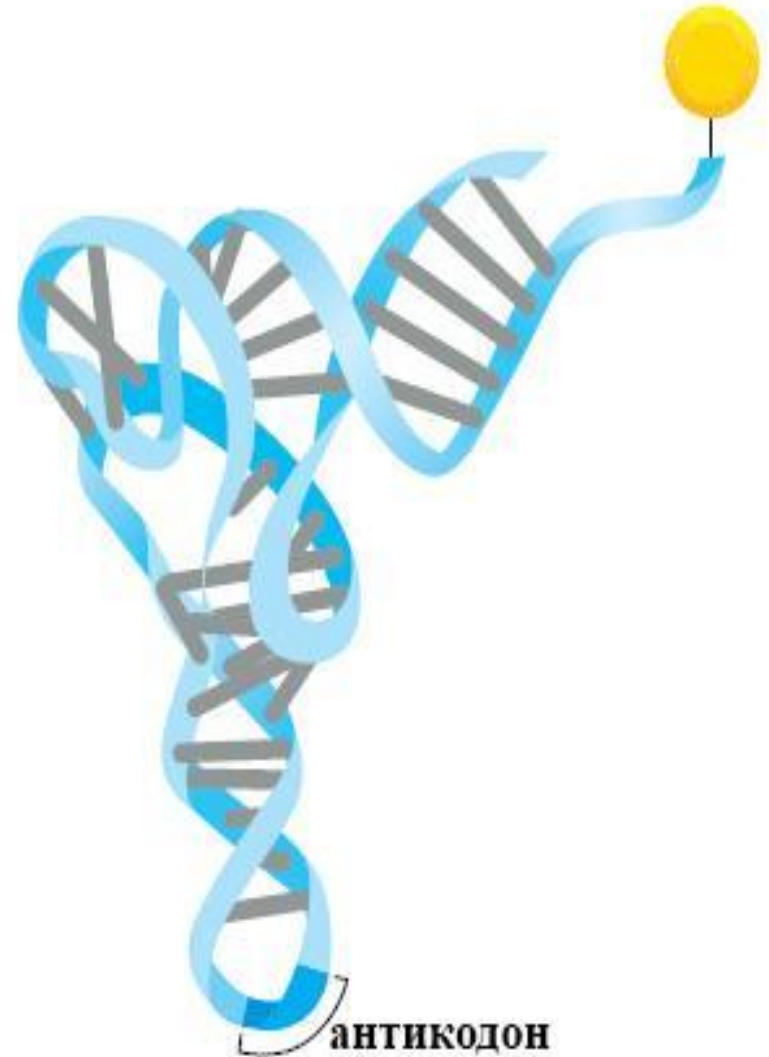
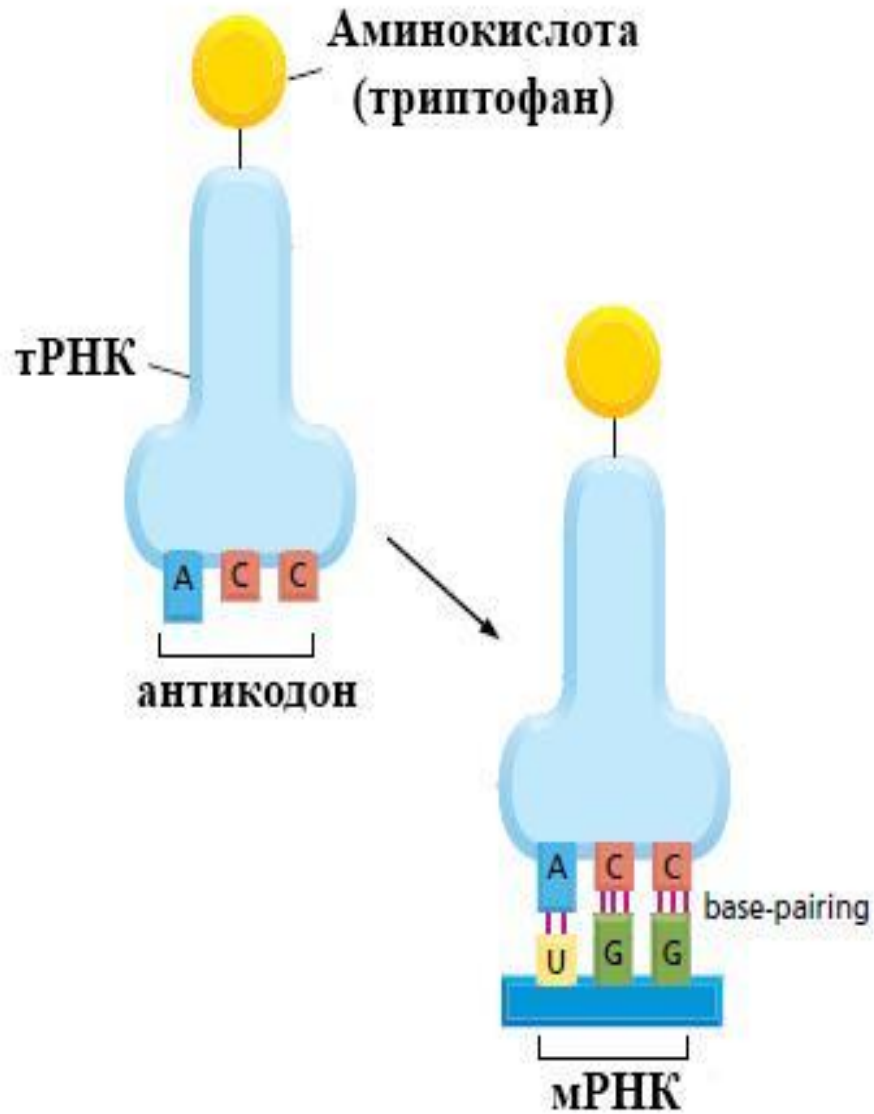
ТРАНСЛЯЦИЯ

БЕЛОК



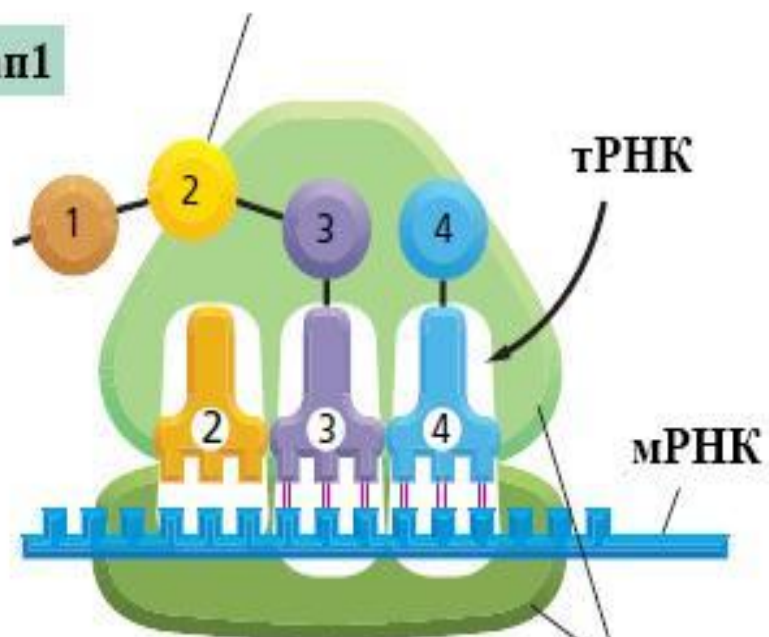
АМИНОКИСЛОТЫ

Трансляция

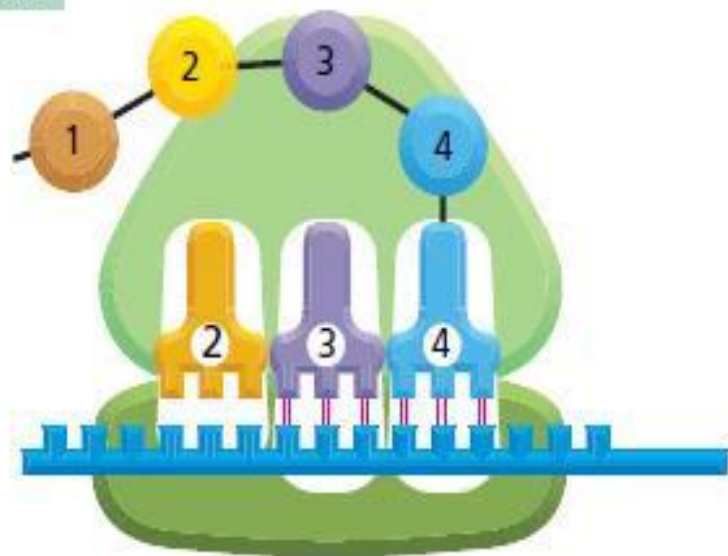


растущая полипептидная цепь

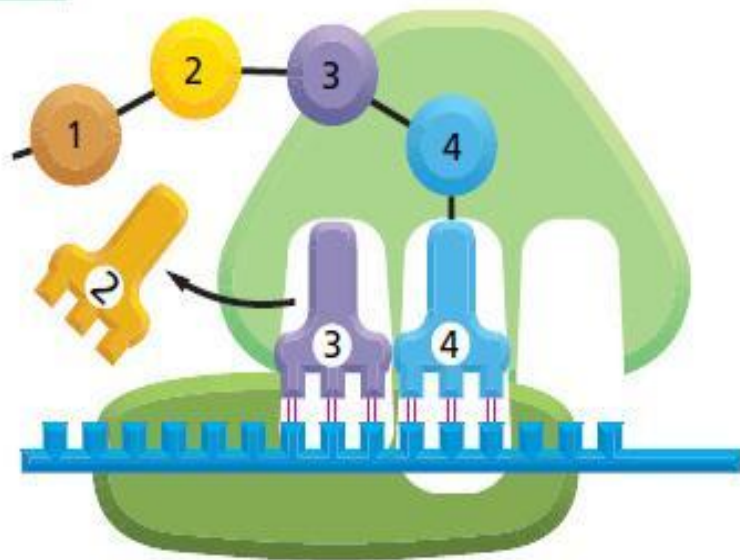
Этап 1



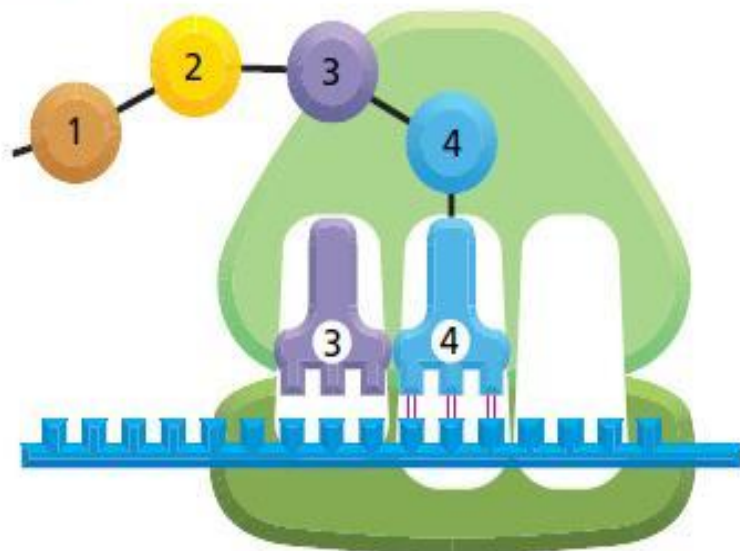
Этап 2



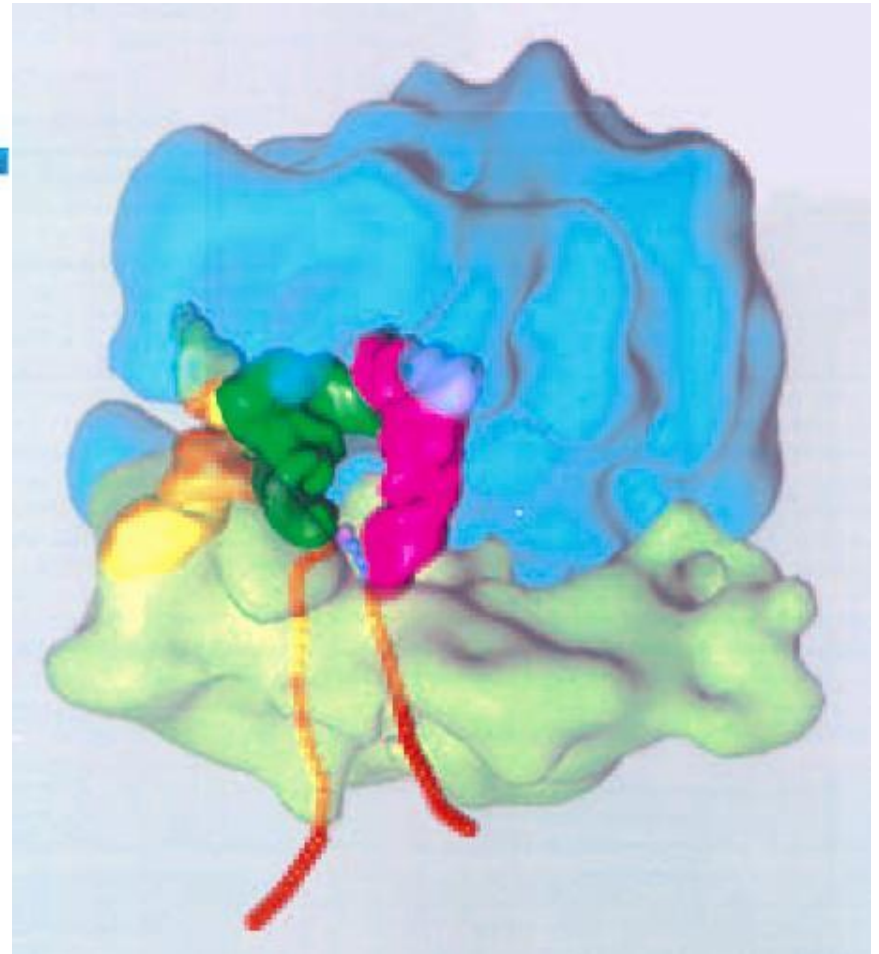
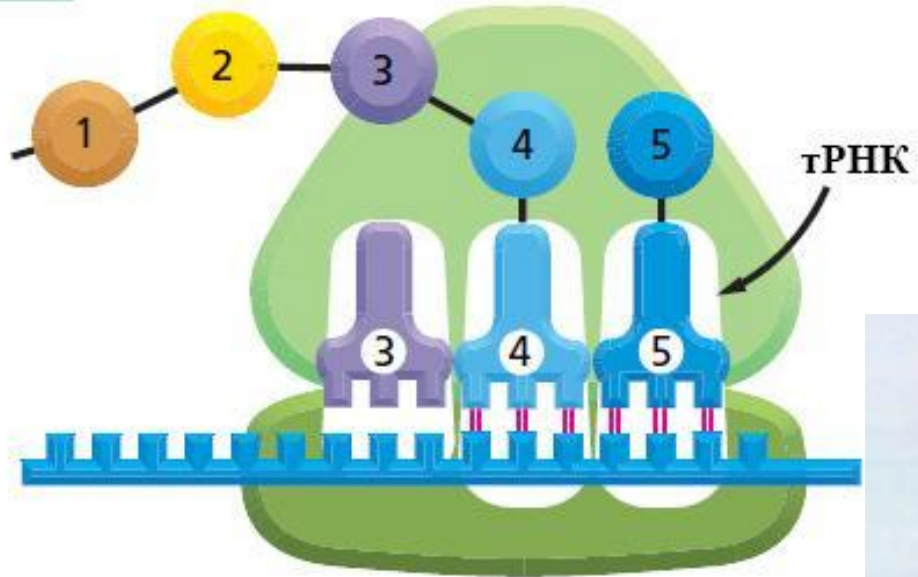
Этап 3

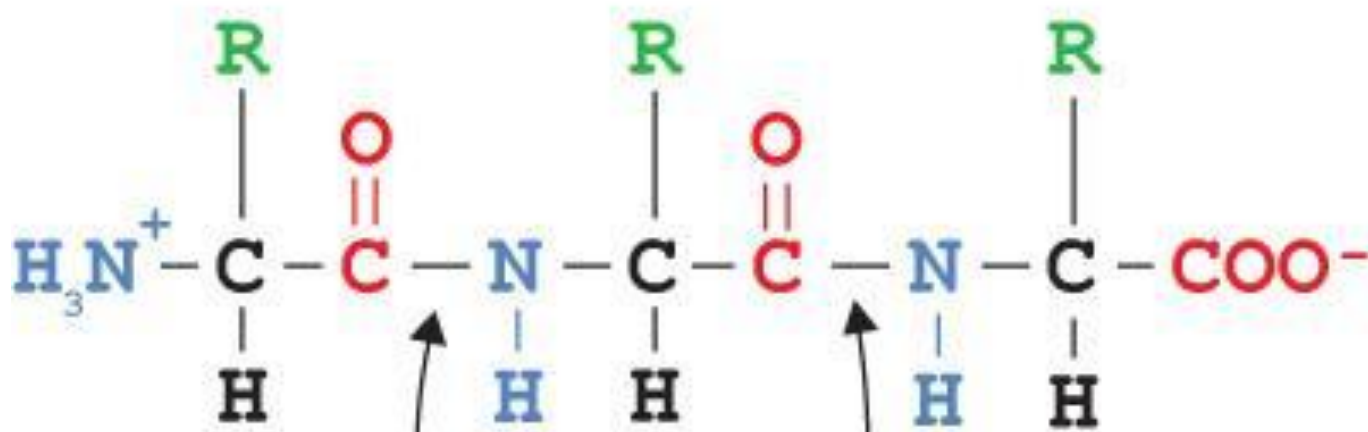
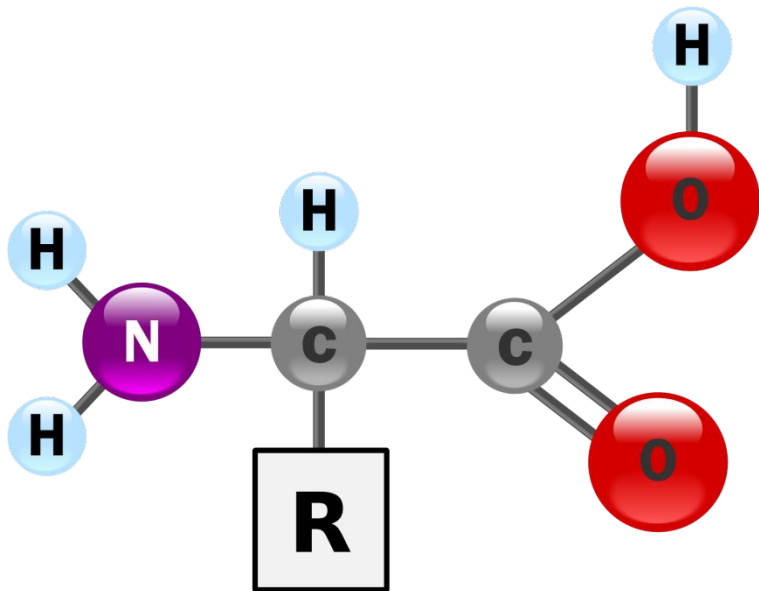
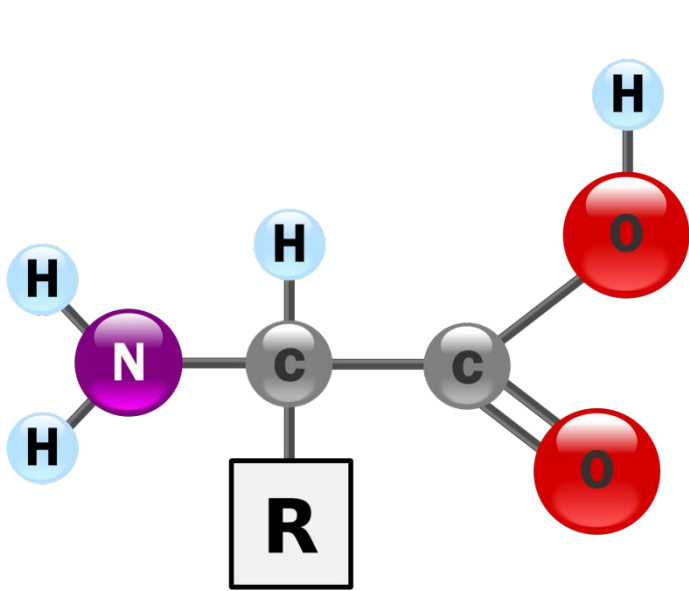


Этап 4



Этап 1



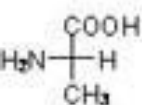


Пептидная связь

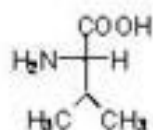
АМИНОКИСЛОТЫ

НЕПОЛЯРНЫЕ

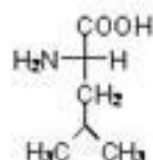
ПОЛЯРНЫЕ НЕЗАРЯЖЕННЫЕ



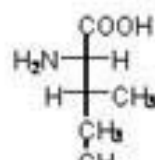
L-Аланин
Ala



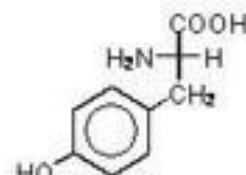
L-Валин
Val



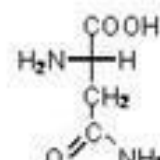
L-Лейцин
Leu



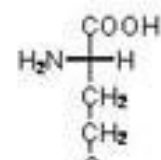
L-Изолейцин
Ile



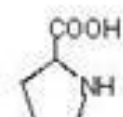
L-Тирозин
Tyr



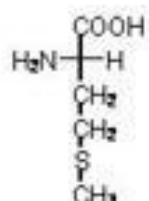
L-Аспарагин
Asn



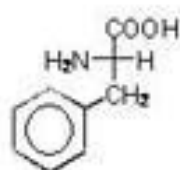
L-Глутамин
Gln



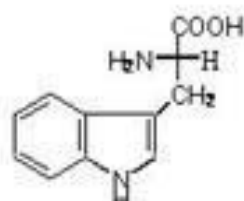
L-Пролин
Pro



L-Метионин
Met



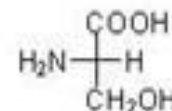
L-Фенилаланин
Phe



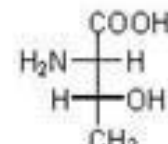
L-Триптофан
Trp



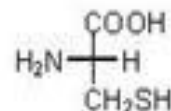
Глицин
Gly



L-Серин
Ser

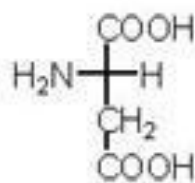


L-Треонин
Thr



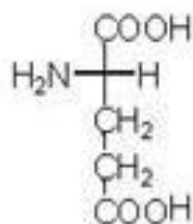
L-Цистеин
Cys

ЗАРЯЖЕННЫЕ



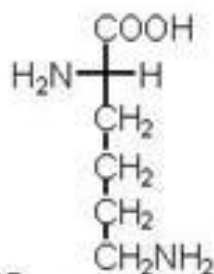
L-Аспарагиновая
кислота

Asp



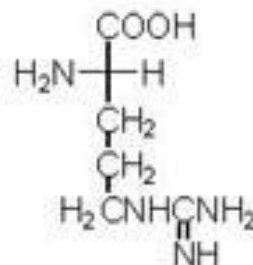
L-Глутаминовая
кислота

Glu



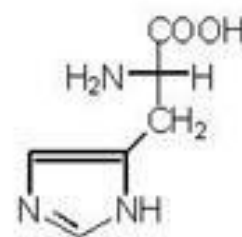
L-Лизин

Lys



L-Аргинин

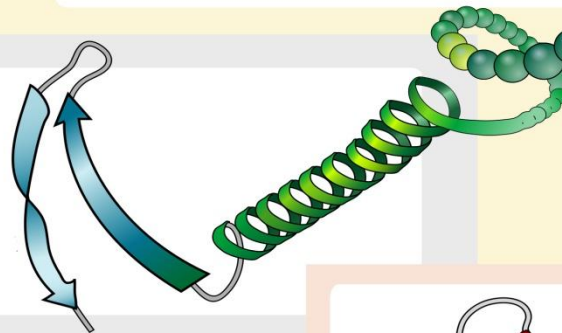
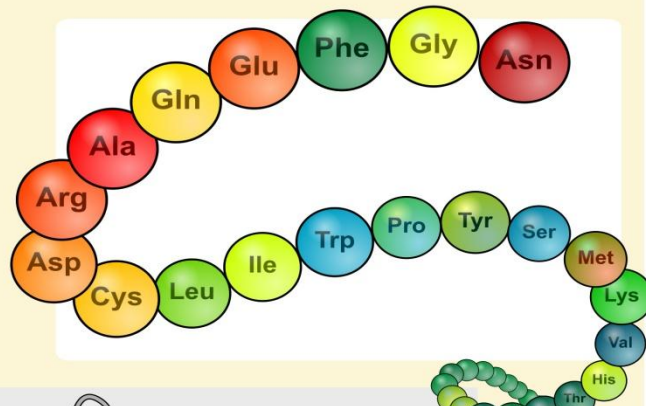
Arg



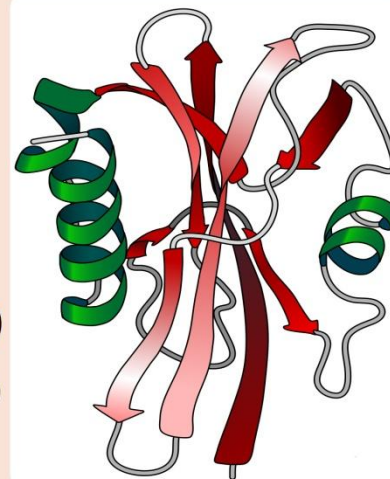
L-Гистидин

His

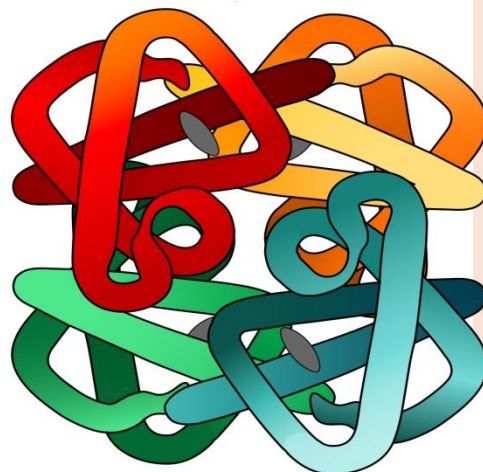
ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА



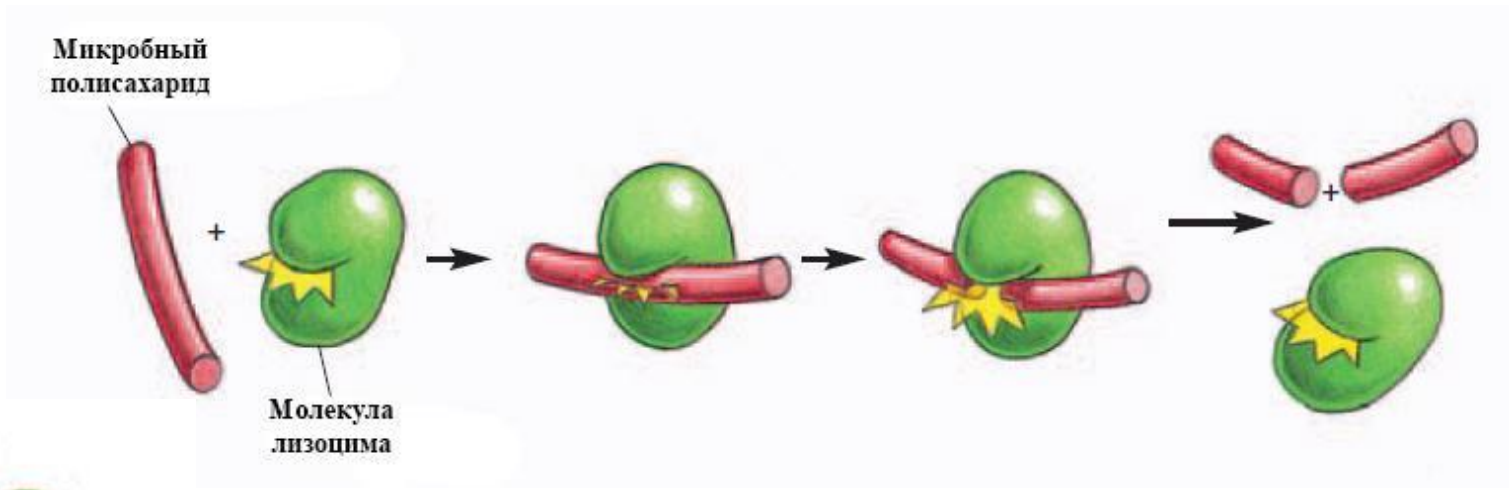
ВТОРИЧНАЯ СТРУКТУРА



ТРЕТИЧНАЯ СТРУКТУРА



ЧЕТВЕРТИЧНАЯ СТРУКТУРА



ЛИЗОЦИМ

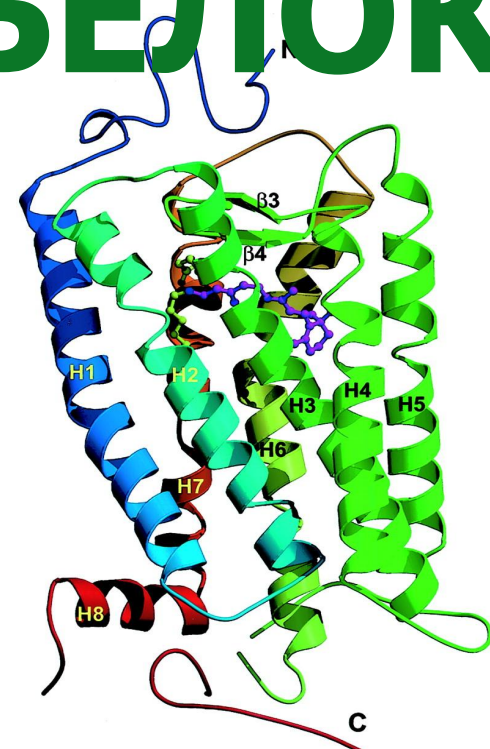
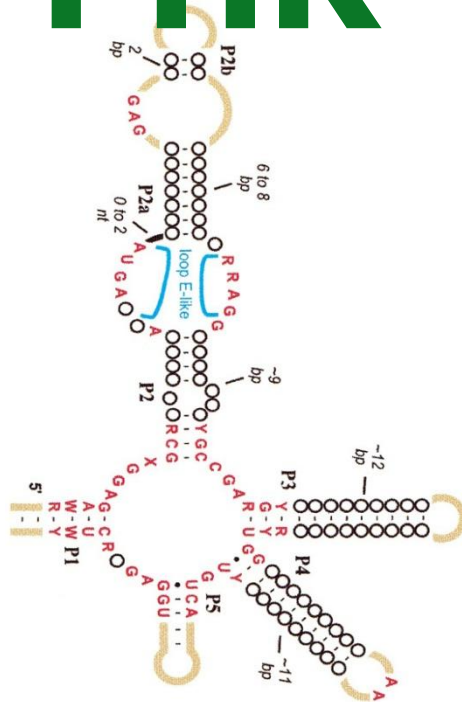
Центральная догма молекулярной биологии

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА → СВОЙСТВА

транскрипция

трансляция

ДНК → РНК → БЕЛОК



Биотехнология в современном мире

Красная биотехнология

Биофармацевтика, медицинская диагностика.

Зеленая биотехнология

Сельское хозяйство. БТ окружающей среды – биотопливо, биоудобрения, биоремедиация, геомикробиология.

Белая биотехнология

Промышленная биотехнология. Биоиндустрия на основе генной инженерии.

Желтая биотехнология

Пищевая биотехнология, наука о питании.

Синяя биотехнология

Аквакультура, прибрежная и морская биотехнология.

Коричневая биотехнология

Биотехнология засушливых зон и пустынь.

Черная биотехнология

Биотерроризм, биологическое оружие, биопреступления, противоурожайные действия.

Фиолетовая биотехнология

Патенты, публикации, открытия, права интеллектуальной собственности.

Золотая биотехнология

Биоинформатика, нанобиотехнология.

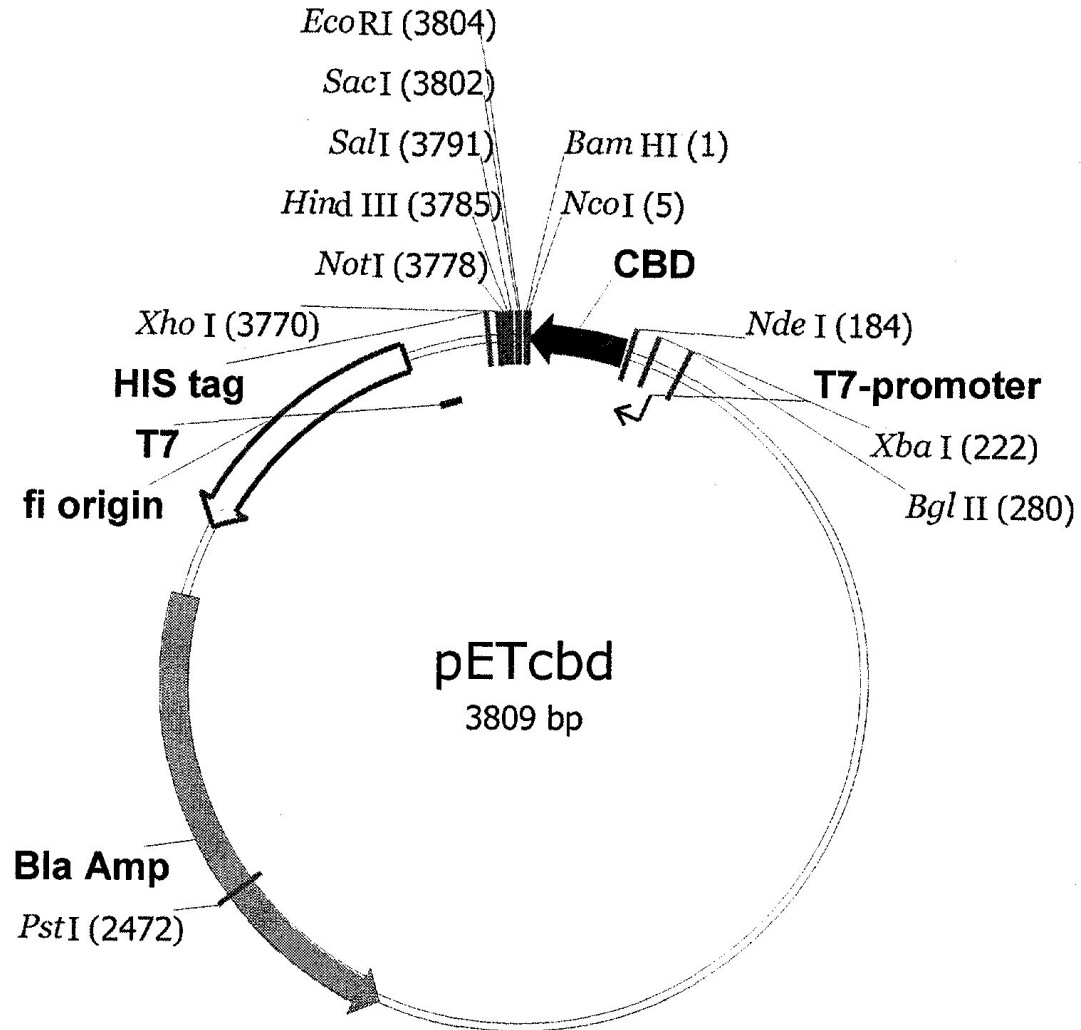
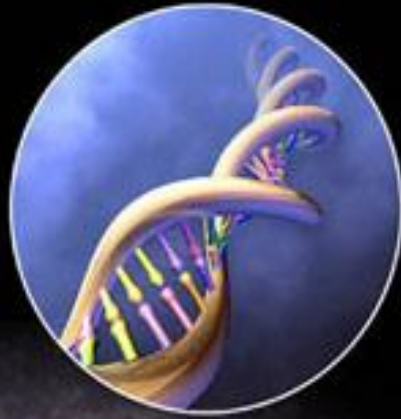
Серая биотехнология

Классическая ферментация и технологии биопроцессов.

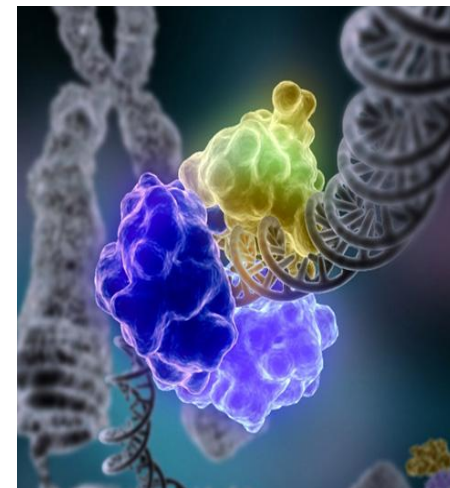
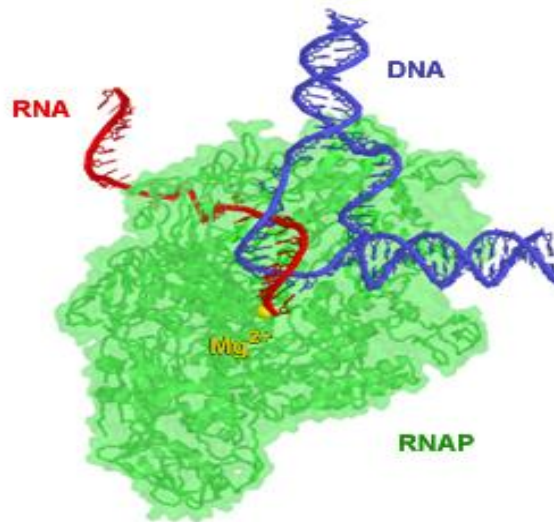
Предпосылки возникновения генной инженерии и история развития

- 1902** А. Гаррод: «Ген – это пропись приготовления одного химического соединения»
- 1928** Опыты Ф. Гриффитса: «Свойство убитого пневмококка – способность образовывать капсулу – перешло к живой бактерии...»
- 1944** О. Эйвери, К. МакЛеод, М. МакКартти: «ДНК, выделенная из клеток S-штамма и добавленная в культуру R-штамма, трансформировала их в гладкую форму. Это свойство сохранялось при дальнейшем размножении»
- 1953** Дж. Уотсон, Ф. Крик: «ДНК представляет собой двойную спираль»
- 1961** М. Ниренберг, И. Маттеи: « триплет UUU соответствует фенилаланину»
- 1968** М. Мезельсон, Р. Юань выделили первые рестриктазы *EcoK* и *EcoV*
- 1978** Компания «Genentech» впервые был клонирован ген инсулина человека
- 1983** К. Мюллис провел полимеразную цепную реакцию (ПЦР)
- 1990** Национальный институт здоровья США запустил проект «Геном

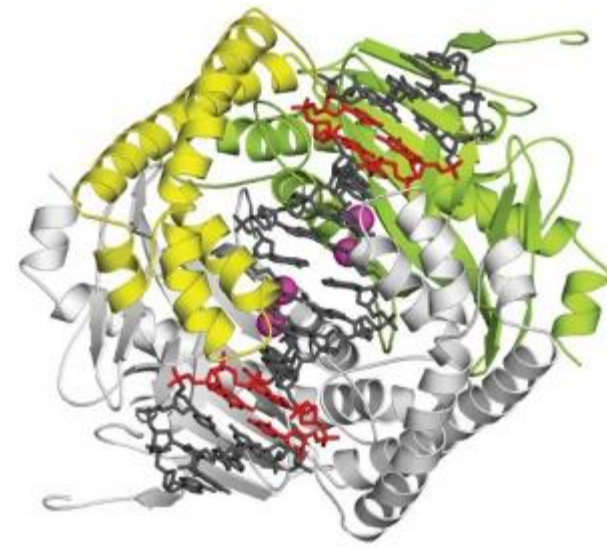
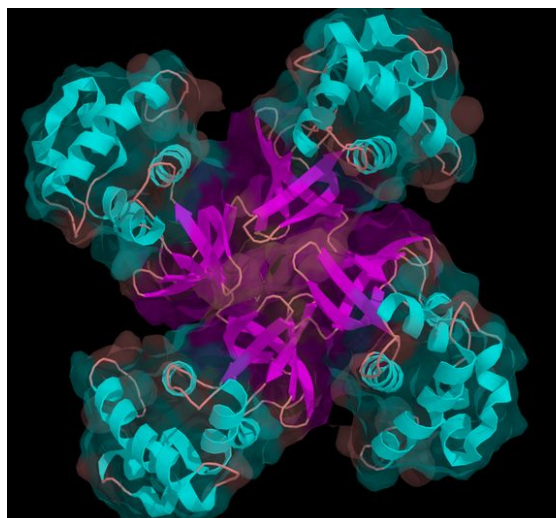
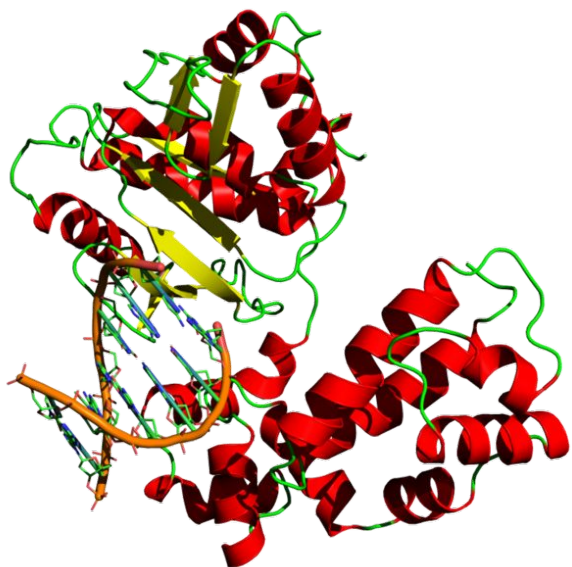
Рекомбинантная ДНК



Фиг. 1



Ферменты, применяемые в генетической инженерии

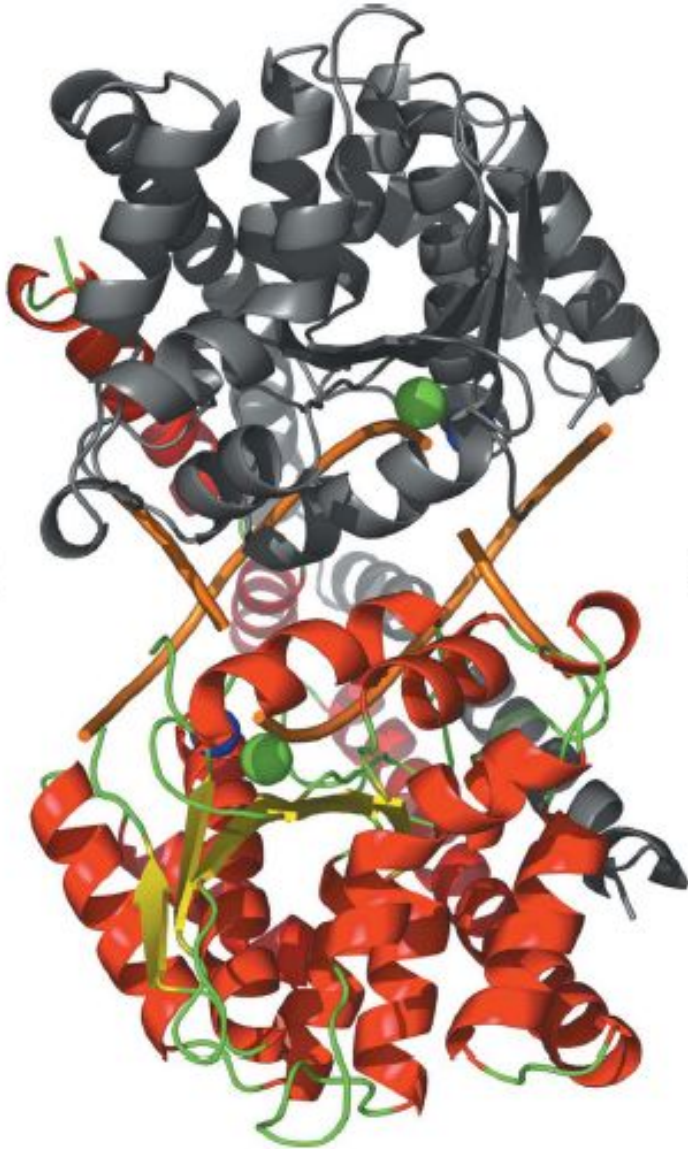


I. РЕСТРИКТАЗЫ (ЕС 3.1.21.) ЭНДОНУКЛЕАЗЫ РЕСТРИКЦИИ)

РЕСТРИКТАЗЫ II типа

HindIII

(Haemophilus influenzae)

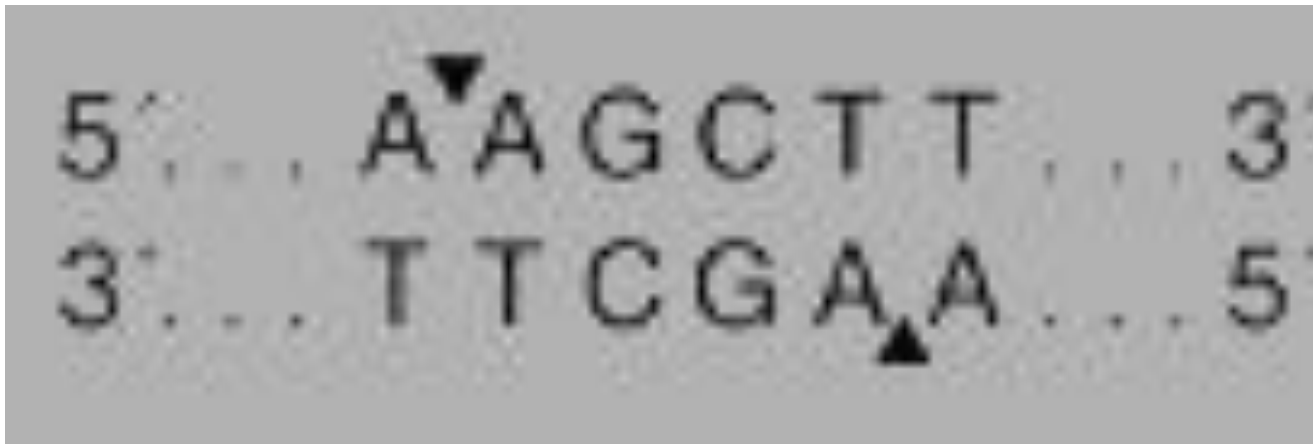


```
5'... AAGCTT... 3'  
3'... TTCGAA... 5'
```

4 – 14 нуклеотидов

ПАЛИНДРОМЫ

**А РОЗА УПАЛА НА ЛАПУ
АЗОРА**

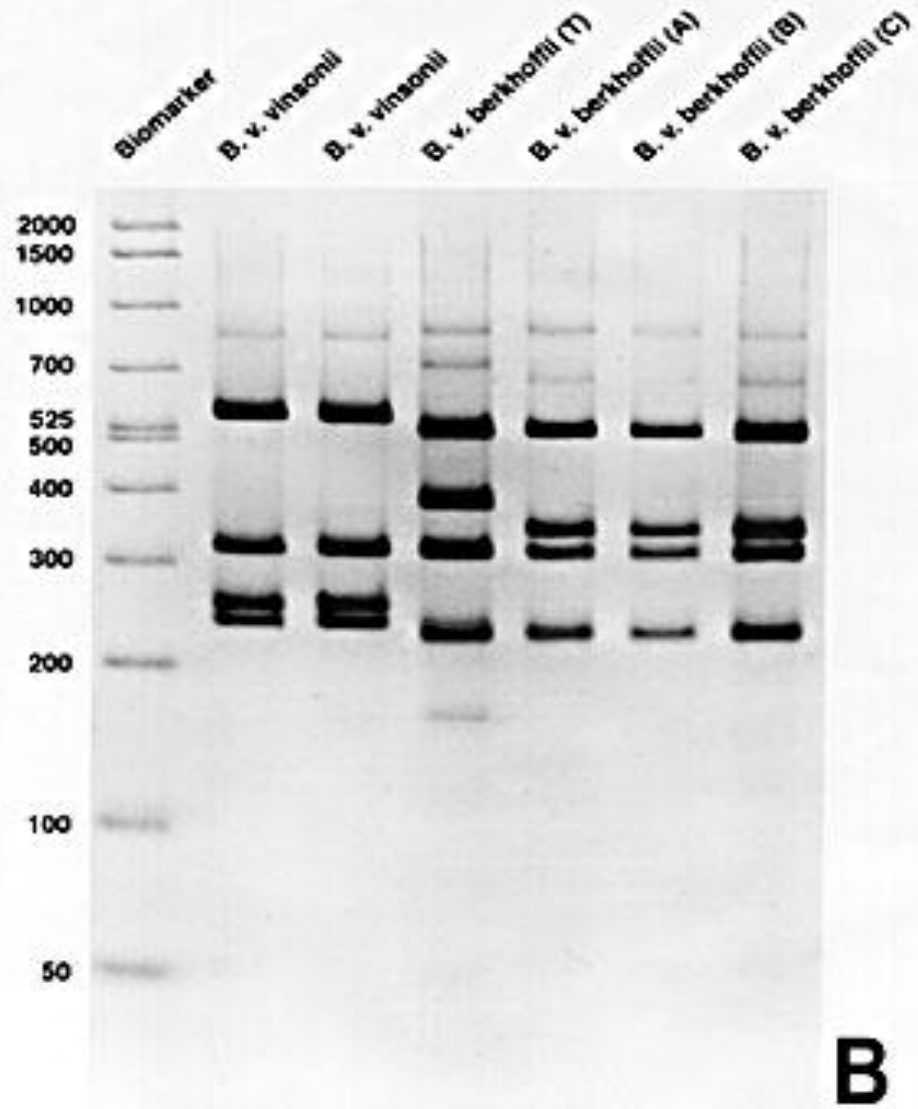
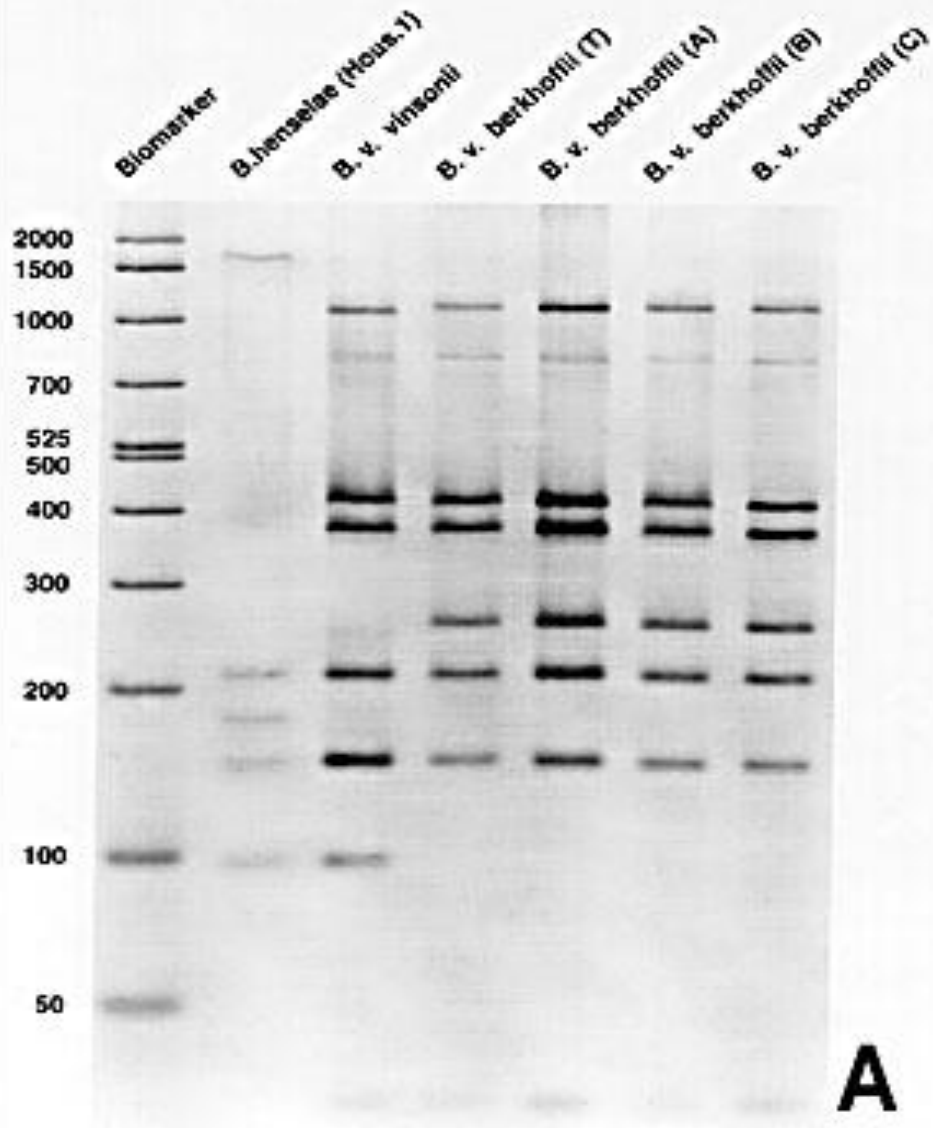


**По обеим цепям ДНК в одном
направлении читаются
одинаково**

Рестриктазы в генной инженерии

<i>EcoRI</i> (<i>E. coli</i> RY13)	5'... G [▼] AATTC... 3' 3'... CTTAAG [▲] ... 5'
<i>NdeI</i> (<i>Neisseria denitrificans</i>)	5'... CATATG... 3' 3'... GTAT [▲] AC... 5'
<i>BamHI</i> (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H)	5'... GGATCC... 3' 3'... CCTAGG [▲] ... 5'
<i>BglII</i> (<i>Bacillus globigii</i>)	5'... A [▼] GATCT... 3' 3'... TCTAGA [▲] ... 5'
<i>PmeI</i> (<i>Pseudomonas mendocina</i>)	5'... GTTT [▼] AAAC... 3' 3'... CAAAT [▲] TTG... 5'

Restriction fragment length polymorphism (RFLP-analysis)



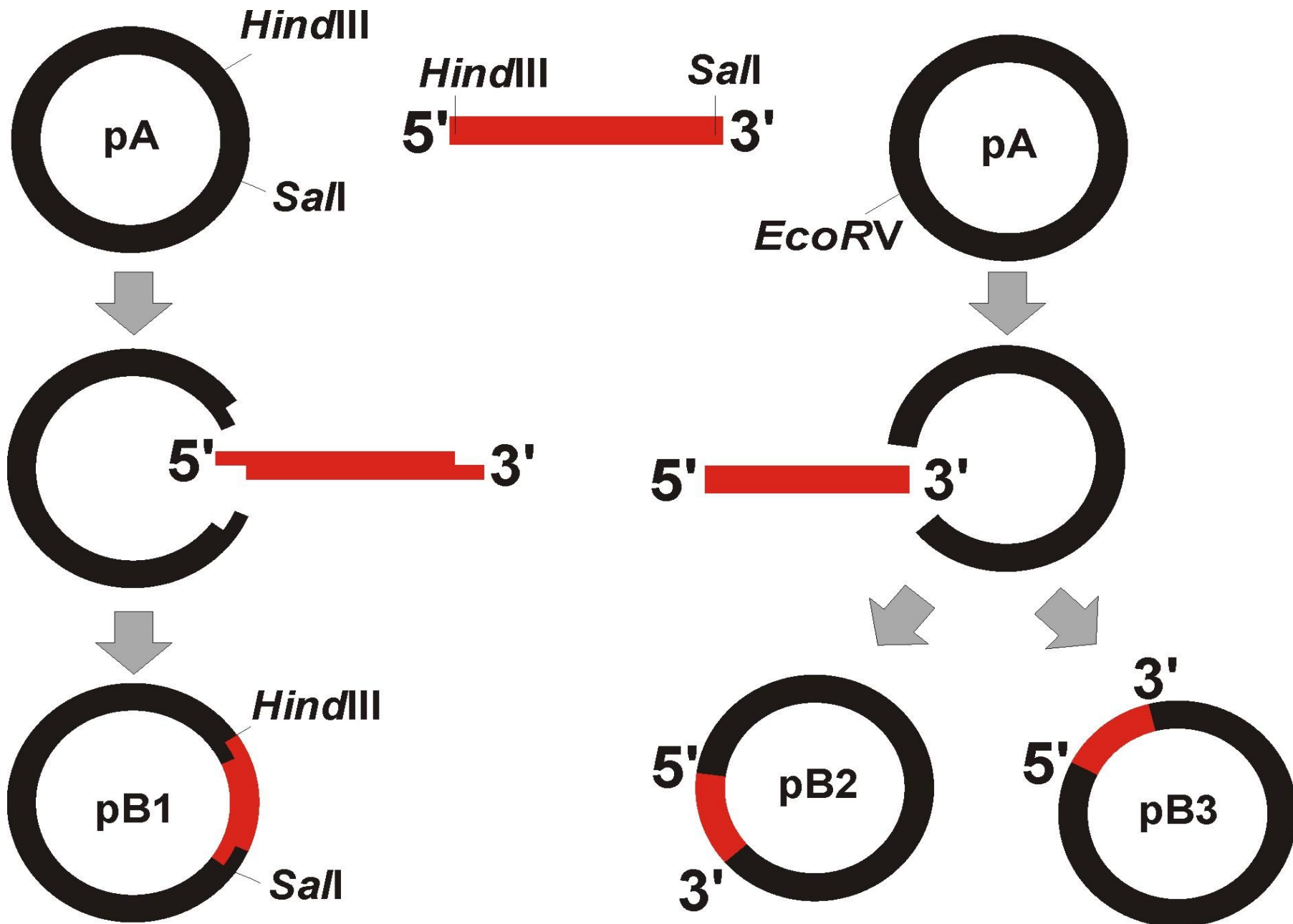
II. ЛИГАЗА (ЕС 6.5.1.1)

ДНК-лигаза фага Т4



Единица активности лигазы соответствует количеству фермента, необходимого для лигирования фрагментов ДНК фага λ (300 мкг/мл), полученных рестрикцией ферментом *HindIII*, за 30 минут при температуре 16°C.

Лигирование по липким и тупым концам



V. Нуклеазы – гидролитические ферменты, расщепляющие фосфодиэфирные связи в нуклеиновых кислотах

Нуклеазы



Экзонуклеазы

Эндонуклеазы

Экзонуклеаза III *E. coli*
(катализирует последовательное отщепление нуклеотидов из дцДНК в направлении 3'-----5')

Экзонуклеаза фага λ
(катализирует последовательное отщепление 5'-мононуклеотидов при наличии фосфатных групп)

Экзонуклеаза Bal31
(*Alteromonas espejina*).
(катализирует последовательное отщепление нуклеотидов с обоих концов)

Нуклеаза S1 (*Aspergillus orizae*)

Нуклеаза Mung Bean

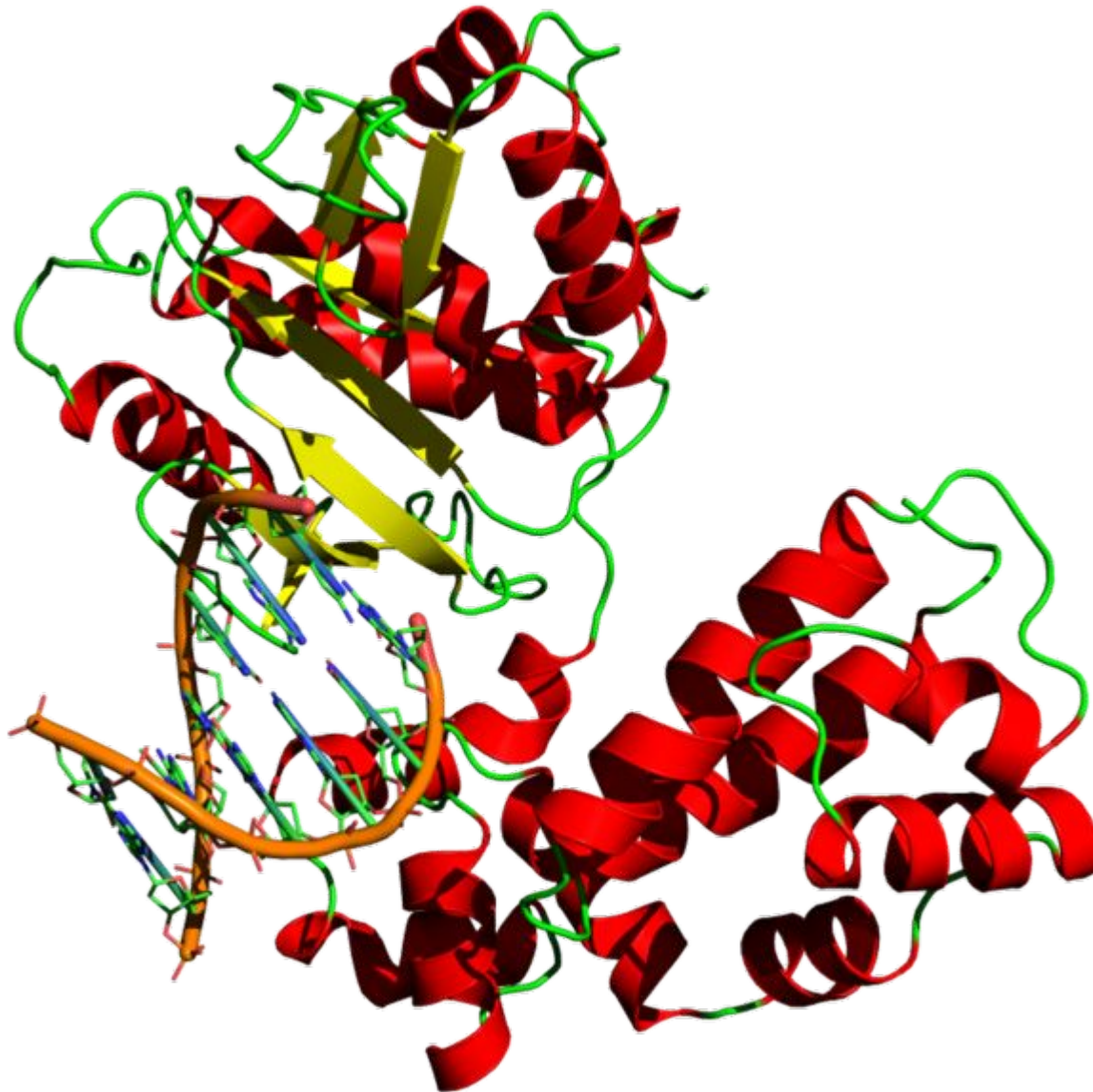
Нуклеаза P1 (*Penicillium citrinum*)

(распознает и расщепляет одноцепочечные участки в одноцепочечных разрывах)

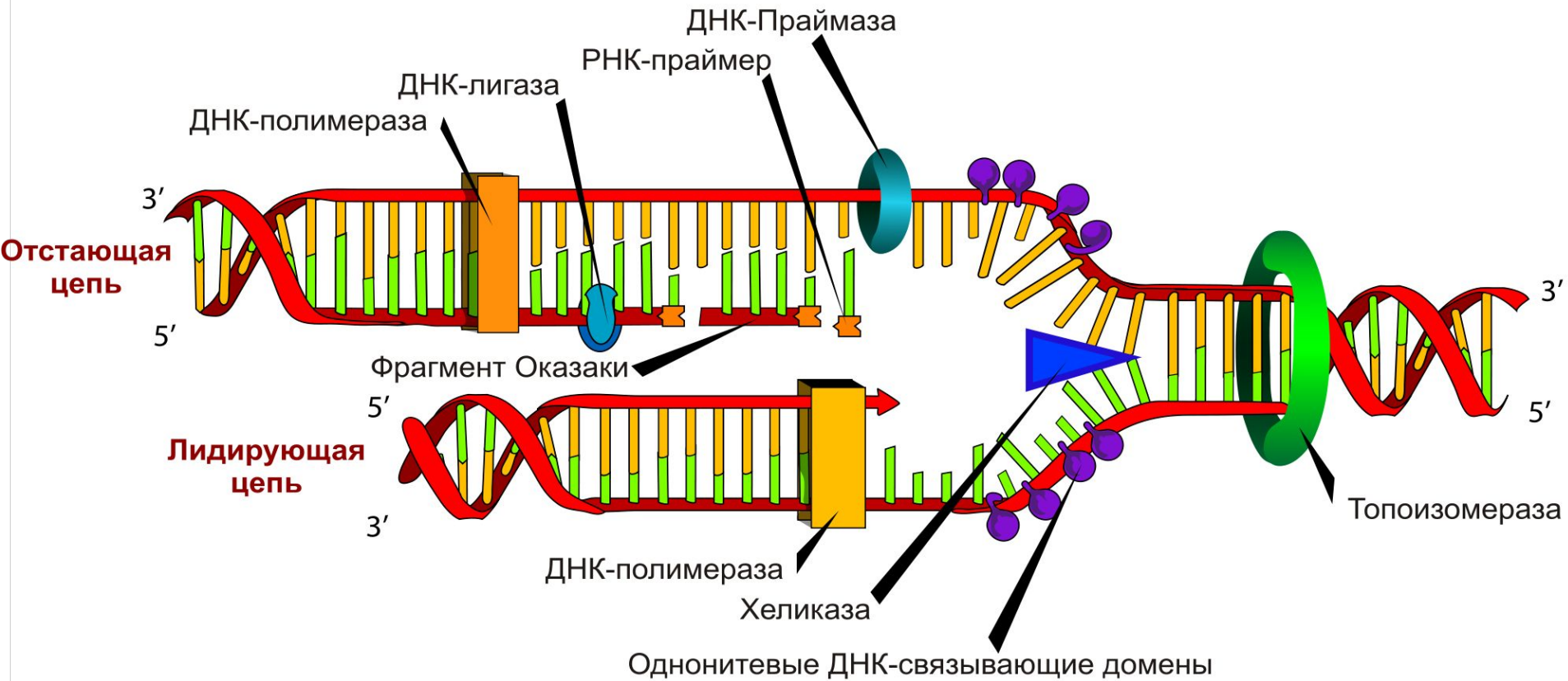
РНКазаА (расщепляет фосфодиэфирные связи, образованные пиримидиновыми нуклеотидами)

ДНКазаI

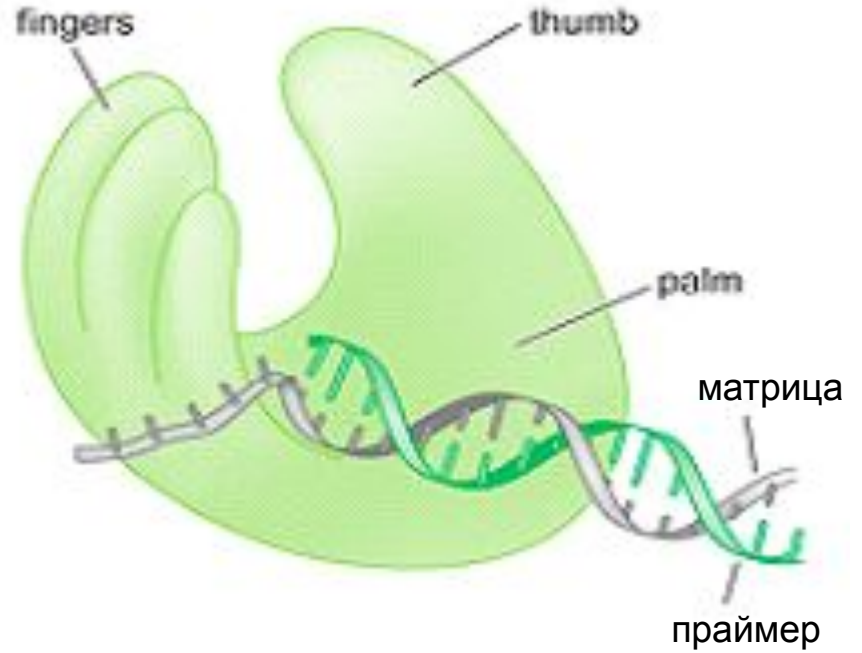
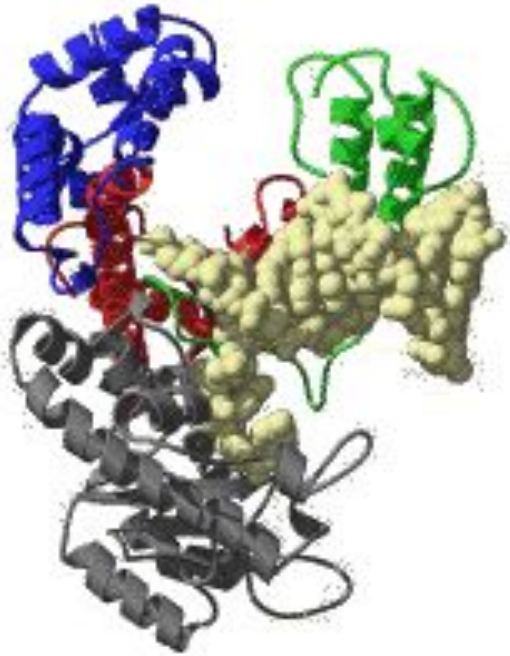
V. ДНК-полимеразы



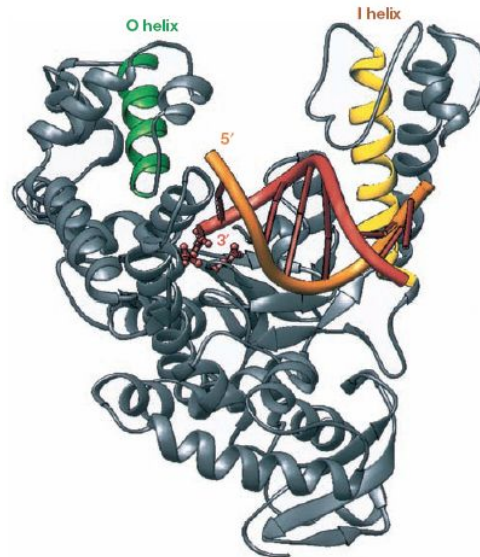
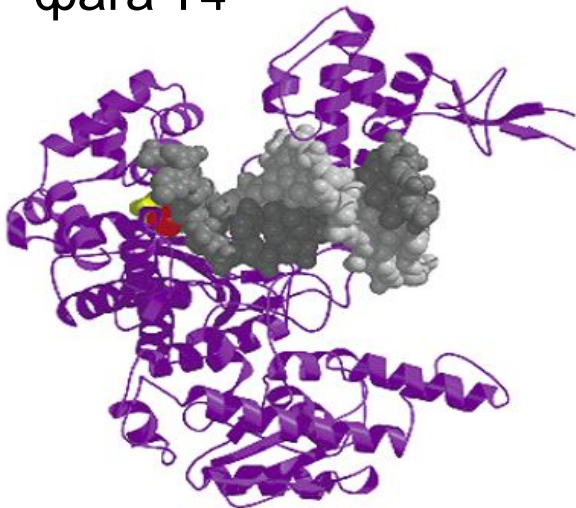
Репликация ДНК



Фрагмент Кленова



ДНК-полимераза фага Т4



ДНК полимераза *Thermus aquaticus*

ДНК-полимеразы термофильных археобактерий

Полимераз а	Источник	3'-5' эндо нуклеазная активность	Ошибка	Особенности
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>	-	10^{-4}	Добавляет полиА последовательнос ти на концы фрагмента
<i>Vent</i>	<i>Thermococcus litoralis</i>	+	4×10^{-5}	
<i>Deep Vent</i>	<i>Pyrococcus</i> sp. GB-D	+	4×10^{-5}	
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>	+	2×10^{-6}	Высокоточная

История открытия



Апрель **1983** г – идея ПЦР

Декабрь **1983** г – осуществление ПЦР

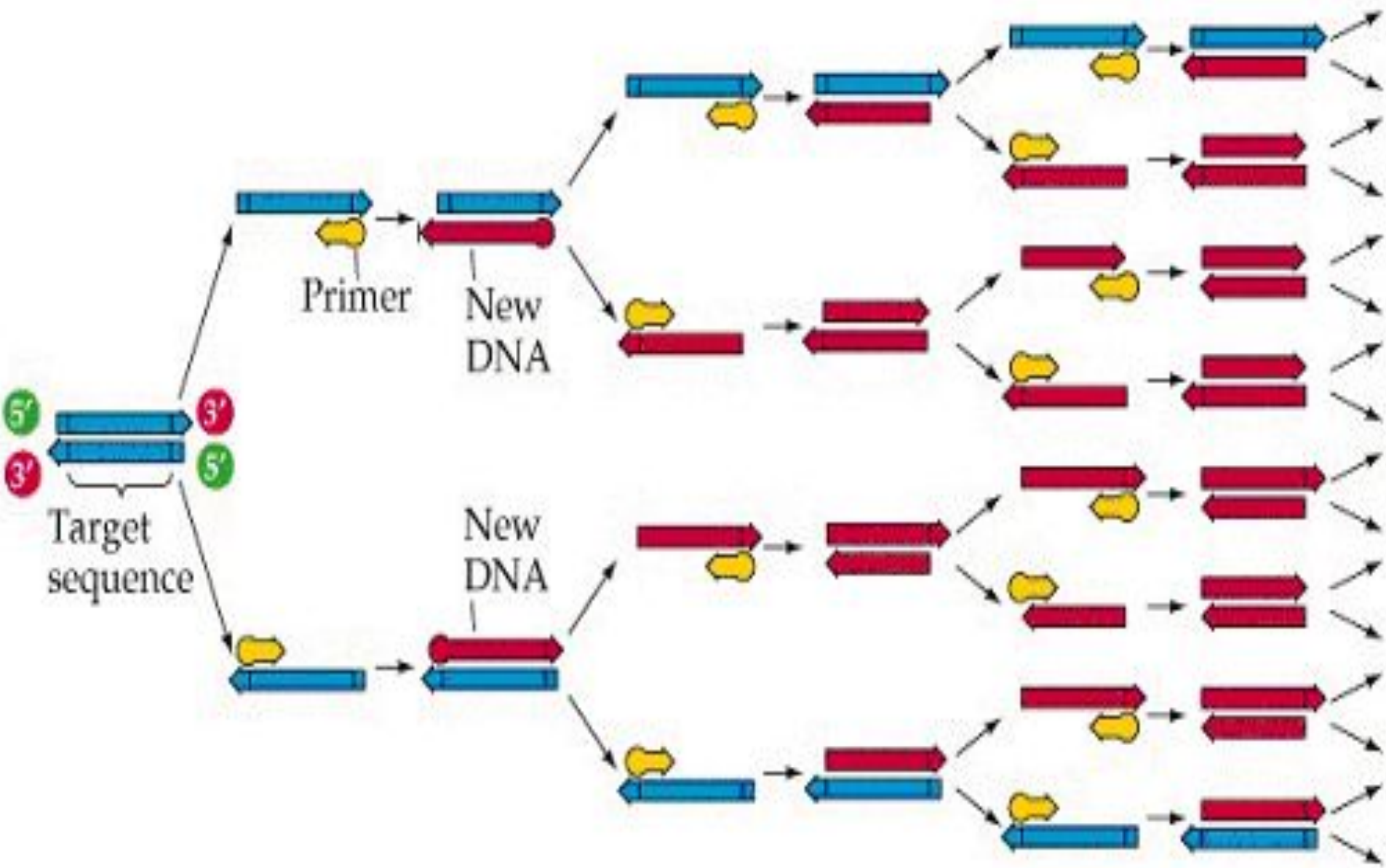
1993 г – Нобелевская премия по химии



Что такое ПЦР?

По сути, это упрощенная версия репликации бактерий, при которой возрастает количество копий специфической последовательности ДНК. Их называют ПЦР-продуктами или ампликонами.

Что такое ПЦР?



Сравнение ПЦР и репликации *in vivo* (1)

Общие процессы

ПЦР

Репликация

Назначение

Для получения миллионов копий ДНК размером до 15 – 20 kb

Для получения одной копии ДНК размером несколько Mb. Геном *E. coli* – 4.6 Mb

Денатурация: разделение цепей дцДНК

Для разрыва водородных связей используется нагревание матрицы ДНК до $T > 94$ градусов

Фактор начала репликации разделяет цепи ДНК в ориджине и вовлекает другие необходимые факторы в репликацию. Цепи ДНК остаются связанными перед репликативной вилкой.

Топоизомераза постепенно расплетает спираль ДНК перед репликативной вилкой. Геликаза разрушает водородные связи между цепями ДНК

SSB-белки предотвращают спаривание ДНК

Отжиг праймеров на оцДНК

ДНК праймеры сконструированы комплементарно матрице. Праймеры химически синтезированы

РНК-праймеры (затравки) производятся при помощи РНК-праймазы, которая считывает матрицу ДНК

Сравнение ПЦР и репликации *in vivo* (2)

Общие
процессы

Построение второй цепи ДНК при помощи ДНК-полимеразы, которая добавляет нуклеотиды в 5'-3' направлении

Завершение репликации

ПЦР

Термостабильная ДНК-полимераза «удлиняет» ДНК-праймер Нуклеотиды, использующиеся в построении цепи, добавляются в реакцию исследователем

В момент, когда полимераза достраивает участок ДНК, ограниченный праймерами

Репликация

ДНК-полимераза III строит лидирующую цепь непрерывно, а отстающую цепь ДНК между РНК-праймерами в 5'-3' направлении. Образуются фрагменты Оказаки. РНК-нуклеотиды праймеров заменяются на ДНК при помощи ДНК-полимеразы I .

Фосфодиэфирная связь сахаро-фосфатного остова соединяется при помощи лигазы

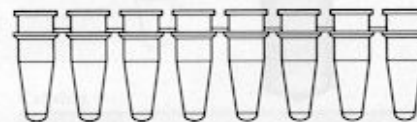
Нуклеотиды, используемые в репликации, синтезируются в результате специальных метаболических реакций в клетке.

Заканчивается в момент изготовления полной копии ДНК, которая переходит в другую клетку при делении.

Компоненты реакции ПЦР

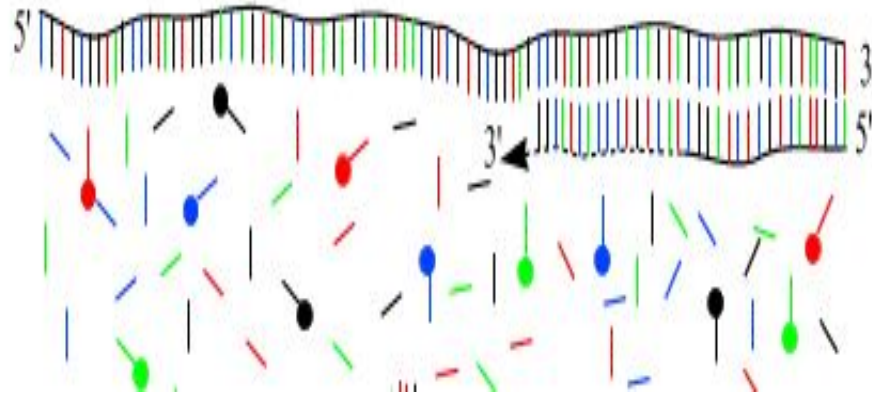
Компоненты реакции	Концентрации стоковых растворов	Конечная концентрация на одну реакцию
ДНК-матрица (DNA template)	----	50 – 500 нг геномной ДНК 50 пк – 50 нг плазмидной ДНК
dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)	10 мМ	0.2 мМ
MgCl ₂	50 мМ	1 – 6 мМ
Буфер для ПЦР (PCR buffer)	10x	1x
Прямой праймер (Forward primer)	100 мкМ	0.1 – 1 мкМ
Обратный праймер (Reverse primer)	100 мкМ	0.1 – 1 мкМ
ДНК-полимераза	В зависимости от типа полимеразы и ее производителя	Не более 1 – 2 мкл (до 2 ед.)
Вода MQ	-----	До конечного объема (обычно от 10 – 100 мкл)
Минеральное масло	В случае использования амплификатора без нагрева крышки	

Master Mix (MM)



Рабочий цикл ПЦР

Temperature, °C



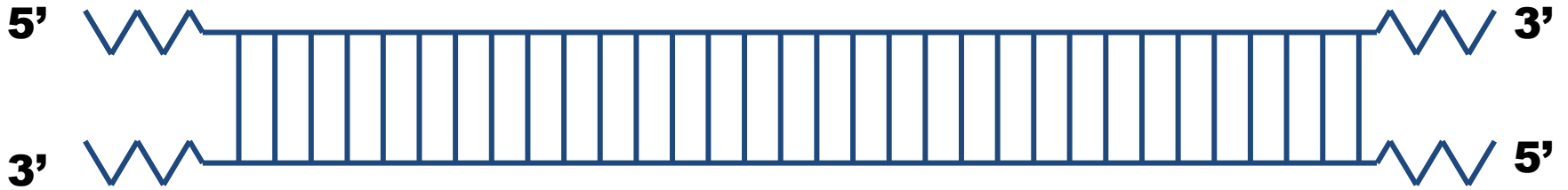
90 - 99 °C
денатурация

40 - 70 °C отжиг

72 - 75 °C
амплификация

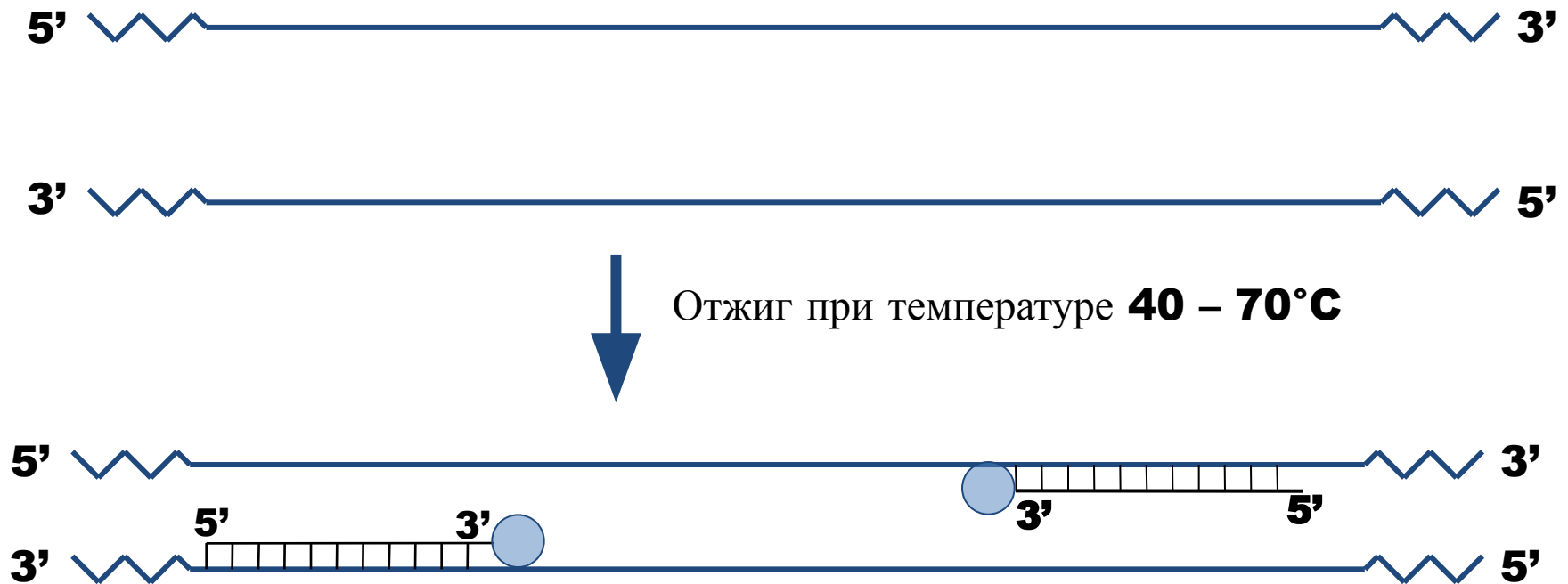
90 - 99 °C
денатурация

Денатурация



Отжиг праймеров

- Праймеры комплементарно связываются с ДНК, согласно их температуре плавления
- ДНК-полимераза связывается с дцДНК фрагментом



Температура плавления (T melting, Tm)

Под температурой плавления понимают температуру, при которой половина молекул гибридизована (находится в двуцепочечном состоянии), а половина находится в растворе. Данный параметр является характеристикой олигонуклеотида для конкретных условий среды.

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 2 (A+T) + 4 (G+C)$$

При длине праймера < 20 нуклеотидов

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 81.5 + 16.6 \lg l + 0.41 (\%G + \%C) - 500/N$$

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 81.5 + 0.41 (\%G + \%C) - 675/N$$

При длине праймера > 20 нуклеотидов

Oligo calculator

Расчет оптимальной температуры денатурации ампликона

$$T_m = 81.5 + 16.6 \log \left[\frac{[\text{SALT}]}{1.0 + 0.7[\text{SALT}]} \right] + 0.41(\%G + C) - \frac{500}{L}$$

where L = the length of the amplicon in bp. $\%G + C$ is calculated using the formulae

$$\%G + C = \frac{\text{G} + \text{C bases in the amplicon}}{\text{total number of bases in the amplicon}} \times 100$$

and

$$[\text{SALT}] = [\text{K}^+] + 4[\text{Mg}^{2+}]^{0.5}$$

$$T_d = T_m + 3-4^\circ\text{C}$$

Температура отжига ($T_{annealing}$, T_a)

Под температурой плавления понимают температуру, соответствующего режима в программе амплификации, оптимальную с точки зрения эффективности, специфичности или других параметров ПЦР.

✓ Если температура будет ниже оптимальной, то праймер будет отжигаться неспецифически, что приведет к получению побочных продуктов реакции.

✓ Если температура будет выше оптимальной, то продукта будет мало (зато высокая специфичность), либо не будет вообще.

Зависит от температуры плавления:

$$T_a = T_m - 5^{\circ}\text{C} \text{ (по Ребрикову)}$$

$$T_a = T_m - 10^{\circ}\text{C} \text{ (по Патрушеву)}$$

Зависит от вида полимеразы:

$$T_a = T_m \pm 10^{\circ}\text{C}$$

Задача №1

Определите температуры плавления и отжига следующего олигонуклеотида:

5' GGCATTTAGCTTAGGC 3'

Решение:

N=16: A=3, T=5, Г=5, Ц=3

$$T_m = 2 (A+T) + 4 (Г+Ц) = 2(3+5) + 4(5+3) = 48^{\circ}\text{C}$$

$$T_a = 48 - 5 = 43^{\circ}\text{C}$$

Задача №2

Определите температуры плавления и отжига следующего олигонуклеотида:

5' GGCATTTAGCTTAGGGCTTAAGGCGGGAG 3'

Решение:

$$N=28: A=6, T=7, G=11, C=4, \%G=11*100/28 = 39.3, \%C = 4*100/28 = 14.3$$

$$T_m (^{\circ}C) = 81.5 + 0.41(\%G + \%C) - 675/N = 81.5 + 0.41(39.3 + 14.3) - 675/28 = 79.4$$

$$T_a = 79.4 - 10 = 69.4^{\circ}C$$

$$T_m = 2(6+7) + 4(11+4) = 86^{\circ}C$$

Термодинамический расчет температуры отжига

Table 8.1 Enthalpy (ΔH°) values for nearest-neighbor nucleotides (in kcal/mol). Reproduced from Quartin and Wetmur (1989).

First nucleotide	Second nucleotide			
	dA	dC	dG	dT
dA	-9.1	-6.5	-7.8	-8.6
dC	-5.8	-11.0	-11.9	-7.8
dG	-5.6	-11.1	-11.0	-6.5
dT	-6.0	-5.6	-5.8	-9.1

Table 8.2 Free-energy (ΔG°) values for nearest-neighbor nucleotides (in kcal/mol). Reproduced from Quartin and Wetmur (1989).

First nucleotide	Second nucleotide			
	dA	dC	dG	dT
dA	-1.55	-1.40	-1.45	-1.25
dC	-1.15	-2.30	-3.05	-1.45
dG	-1.15	-2.70	-2.30	-1.40
dT	-0.85	-1.15	-1.15	-1.55

$$T_m = \frac{T^\circ \Delta H^\circ}{\Delta H^\circ - \Delta G^\circ + RT^\circ \ln(C)} + 16.6 \log \left[\frac{(\text{SALT})}{1.0 + 0.7(\text{SALT})} \right] - 269.3$$

$$(\text{SALT}) = (\text{K}^+) + 4(\text{Mg}^{+2})^{0.5}$$

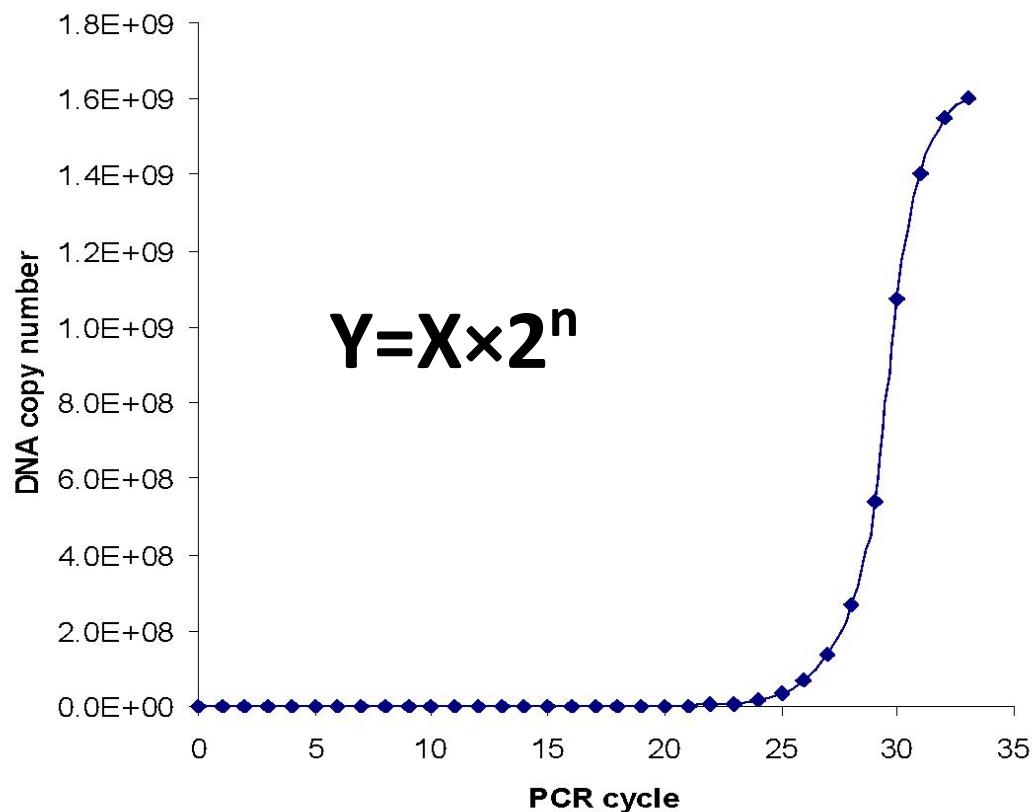
Конструирование (дизайн) праймеров:

При подборе праймеров зачастую удобно использовать программное обеспечение, упрощающее поиск подходящих регионов или даже выбирающее «оптимальную пару праймеров». Однако наиболее точно праймеры подбираются (проверяются) вручную по следующим параметрам:

1. Длина 18 – 24 нуклеотида;
2. Четыре и более 3'-концевых нуклеотида не должны быть комплементарны самому праймеру, праймеру в паре;
3. Температура отжига должна лежать в диапазоне 50 – 65 °C;
4. Температура обоих праймеров должна быть сходной;
5. На 3'-конце праймера должны находиться тугоплавкие нуклеотиды Г или С

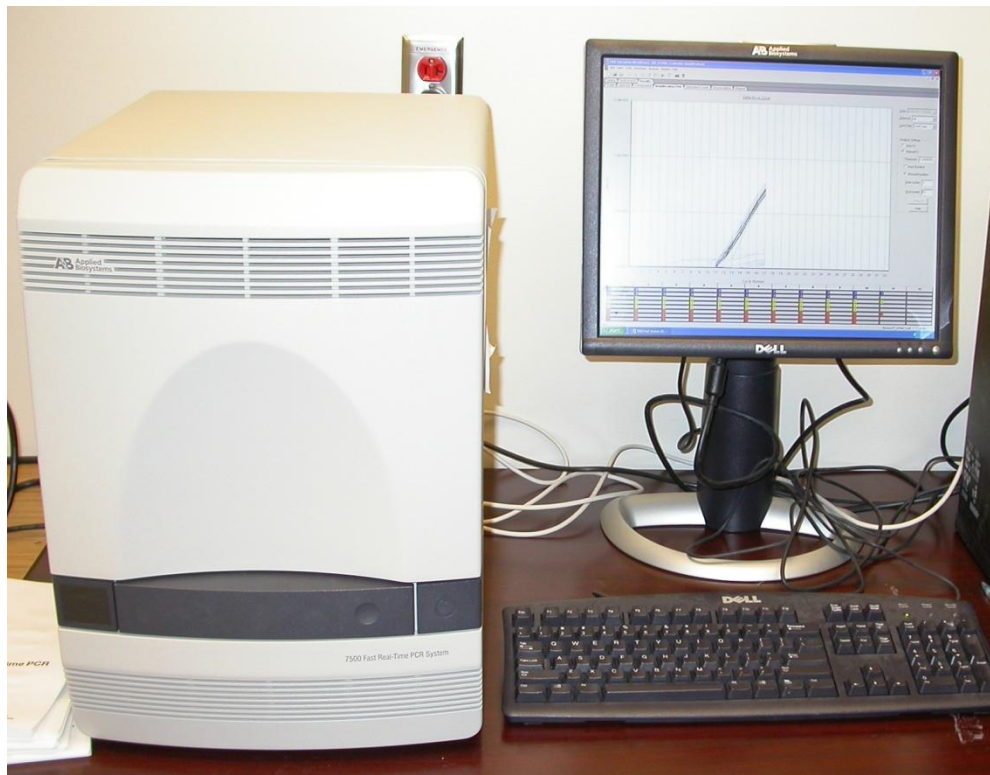
Эффективность ПЦР

CYCLE NUMBER	DNA copy number
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1,024
11	2,048
12	4,096
13	8,192
14	16,384
15	32,768
16	65,536
17	131,072
18	262,144
19	524,288
20	1,048,576
21	2,097,152
22	4,194,304
23	8,388,608
24	16,777,216
25	33,554,432
26	67,108,864
27	134,217,728
28	268,435,456
29	536,870,912
30	1,073,741,824
31	1,400,000,000
32	1,500,000,000
33	1,550,000,000
34	1,580,000,000



$$Y = X(1 + E)^n$$
$$\log Y = \log X + n \log(1 + E)$$

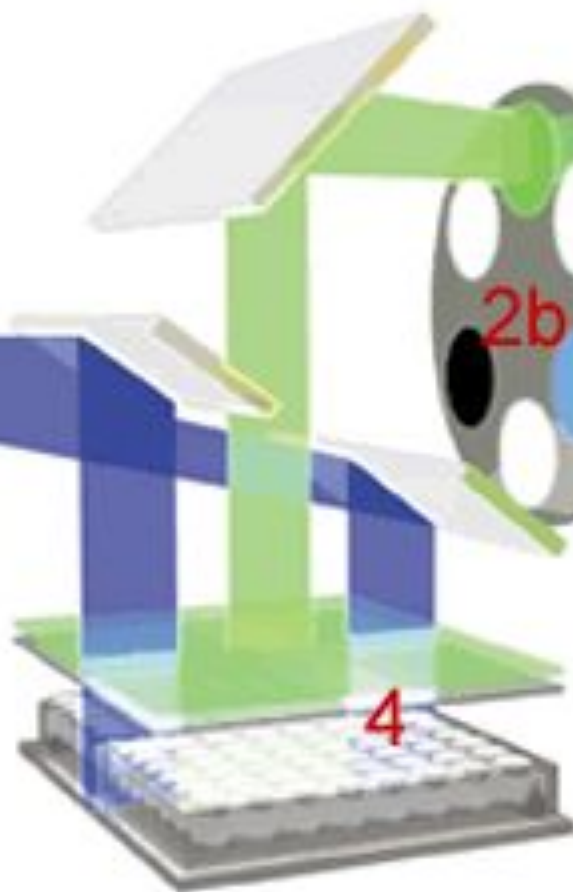
ПЦР в реальном времени



1. Источник излучения

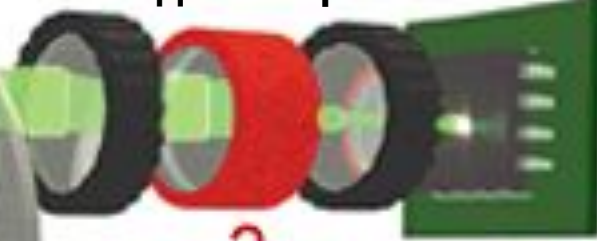


2а. Фильтр возбуждения



4. образцы

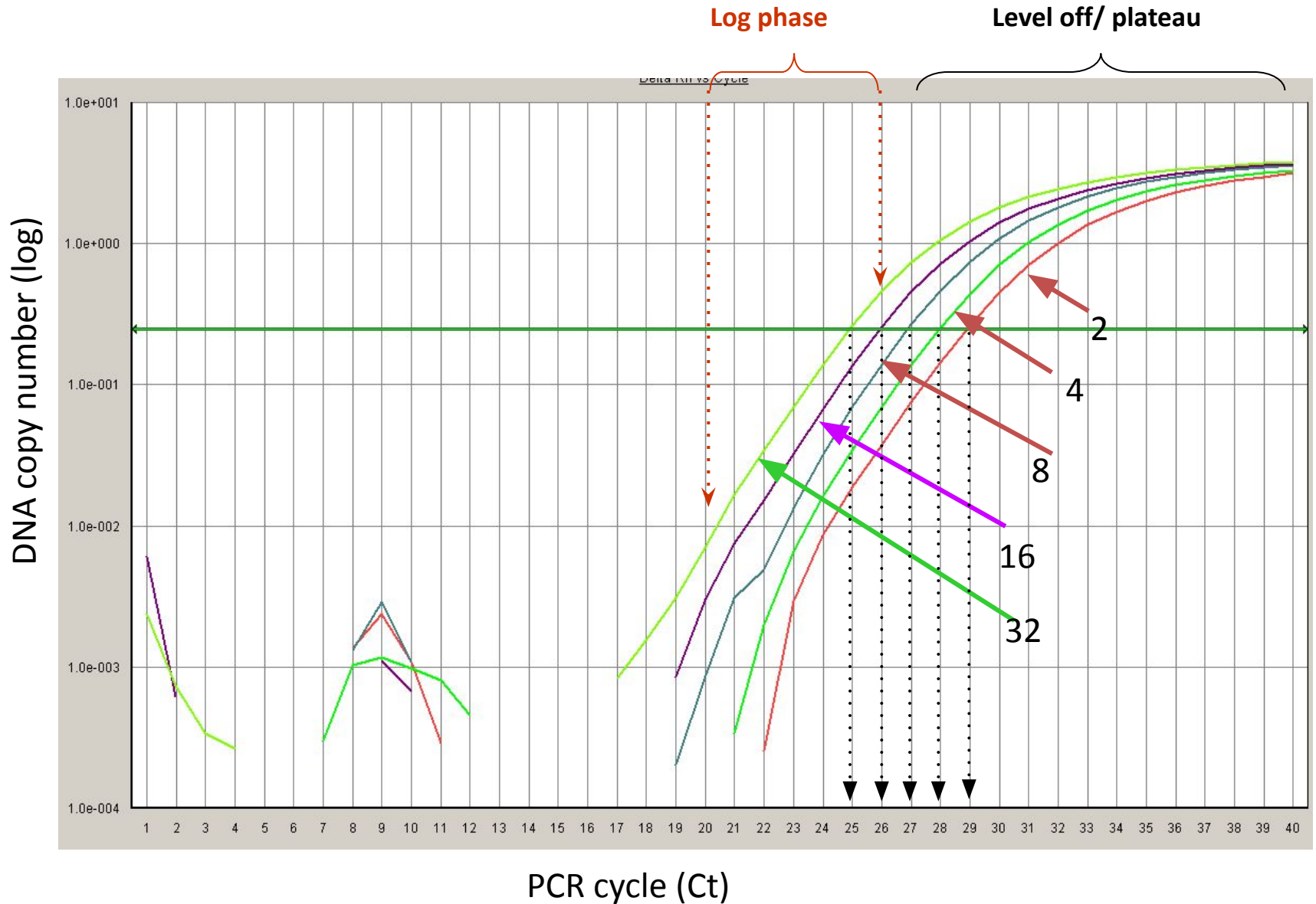
2в. Фильтр эмиссии



3. Усилитель

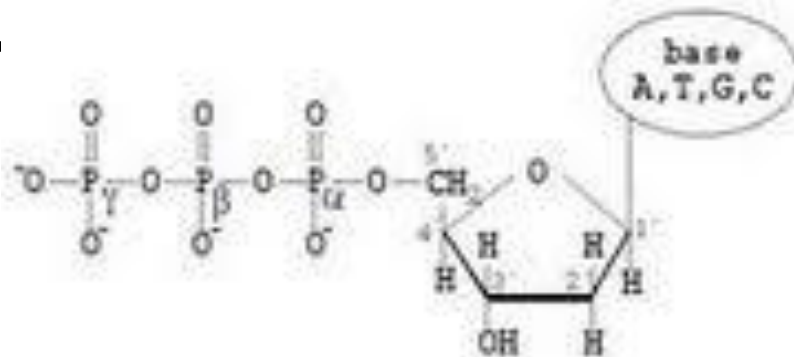
5. Полупроводниковый детектор

Amplification Plot of real-time PCR

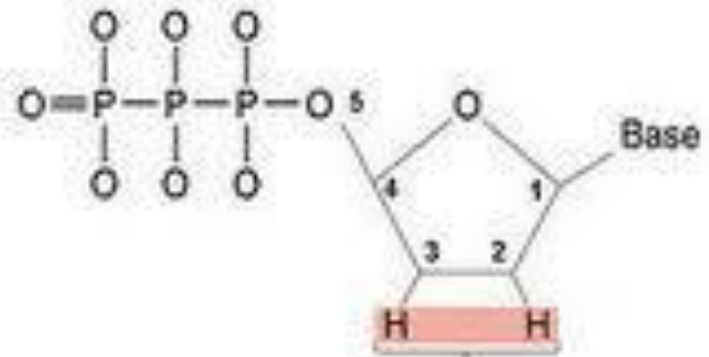


Секвенирование по Сэнглеру

В 1977 г. автор способ ферментативного секвенирования, получивший название метода терминирующих аналогов трифосфатов. В качестве праймеров использовали синтетические олигонуклеотиды. Специфическую терминацию синтеза обеспечивали добавлением в реакционную смесь помимо четырех типов dNTP еще и одного из 2',3'-дидезоксинуклеозидтрифосфатов (ddATP, ddTTP, ddCTP или ddGTP), который способен включаться в растущую цепь ДНК, но не способен обеспечивать дальнейшее копирование из-за отсутствия 3'-ОН группы. Отношение концентраций dNTP/ddNTP авторы подбирали экспериментально, так, чтобы в итоге получить набор копий ДНК различной длины. Таким образом, для определения первичной структуры исследуемого фрагмента ДНК требовалось провести четыре реакции копирования: по одному типу терминаторов в каждой из реакций. После этого полученные продукты разгонялись в полиакриламидном геле на соседних дорожках и по расположению полос определялась после,



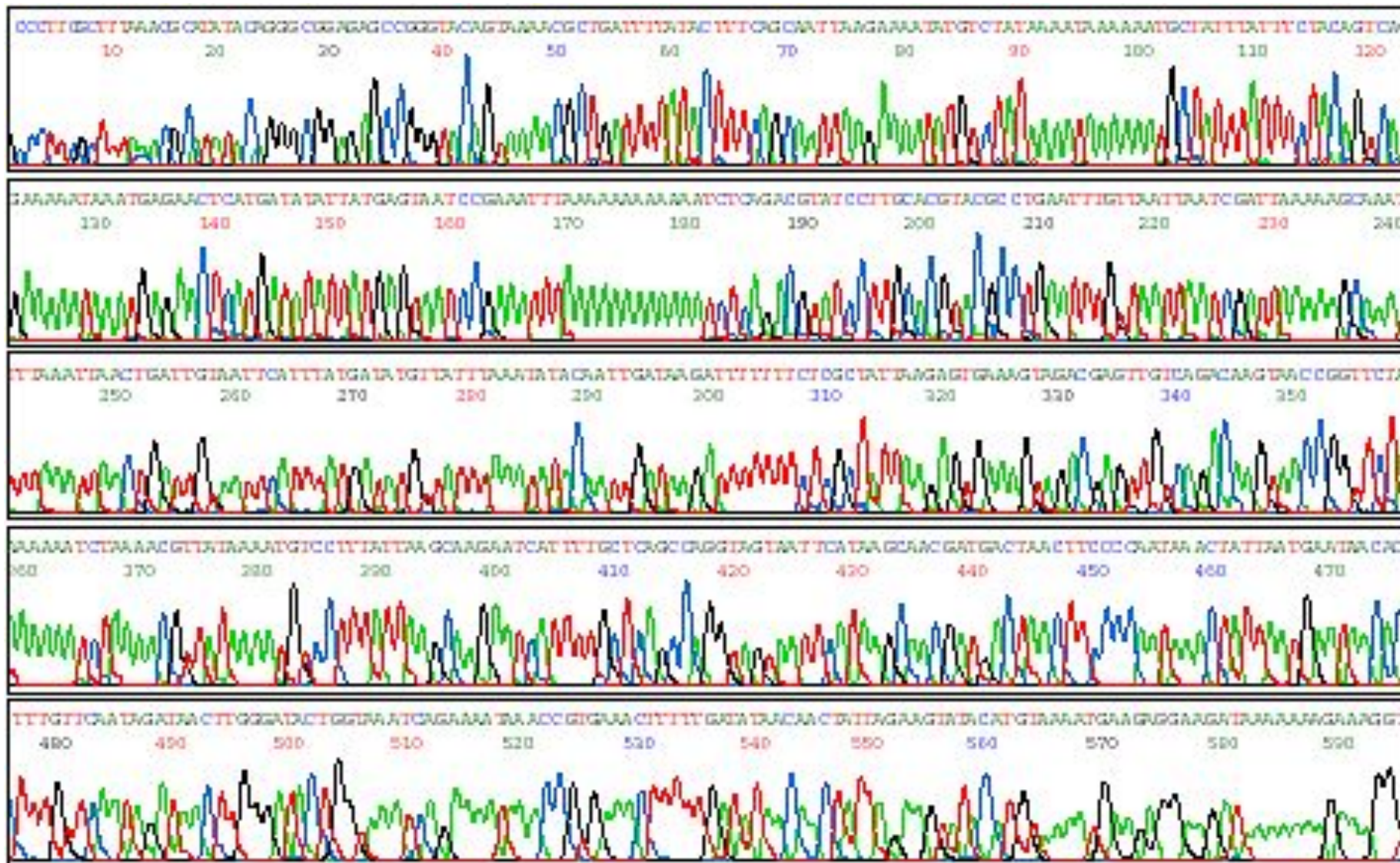
dNTP



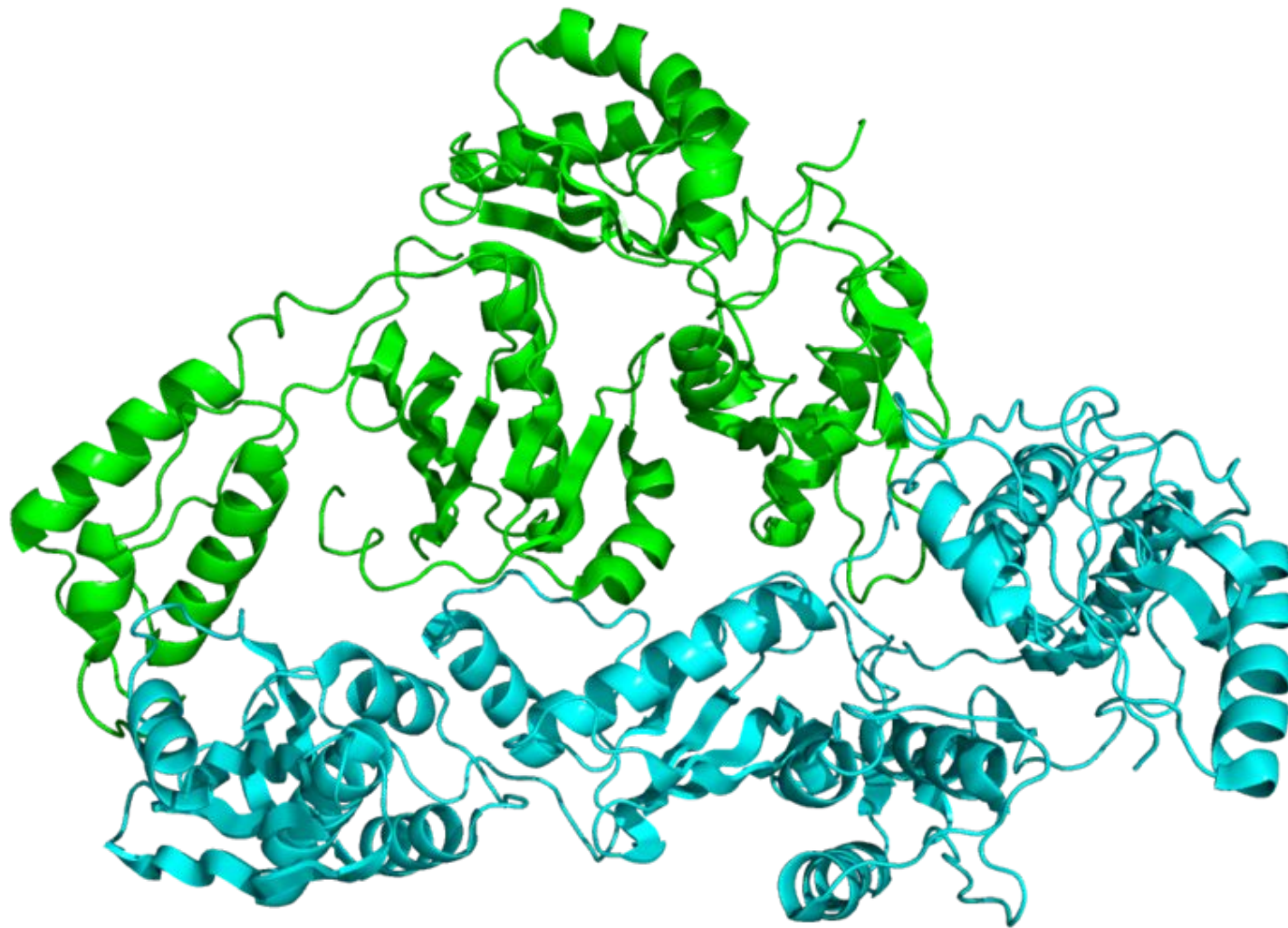
ddNTP

Секвенирование ДНК

Использование электрофореза в капиллярах, автоматическое считывание флуоресценции на границе выхода из геля



Обратная транскриптаза (КФ 2.7.7.49) (ревертаза)

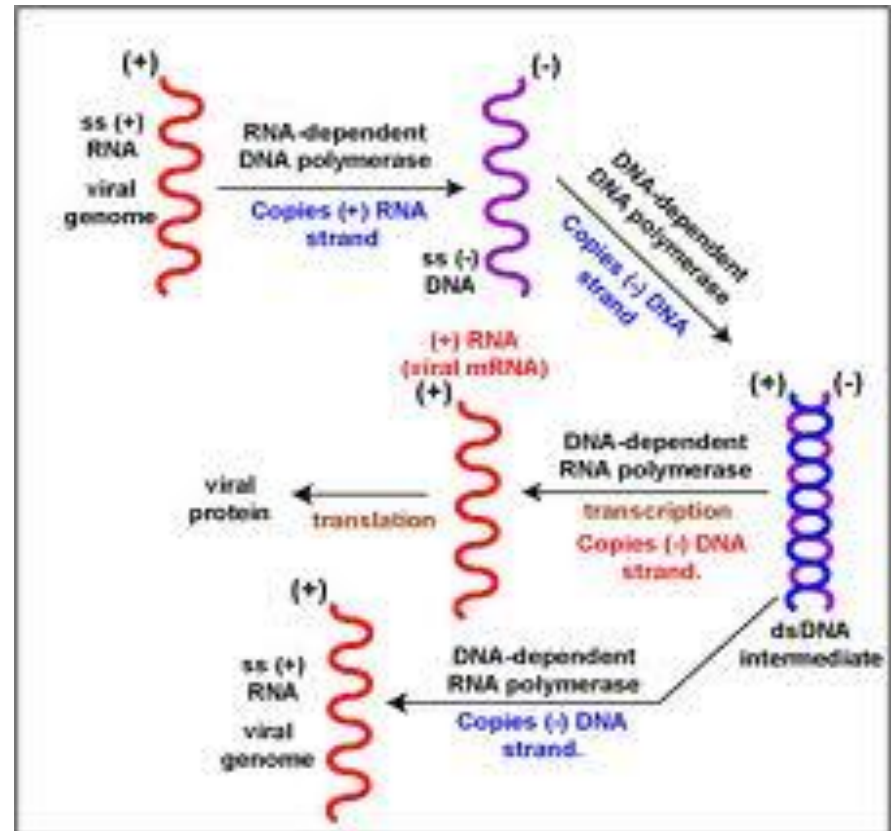
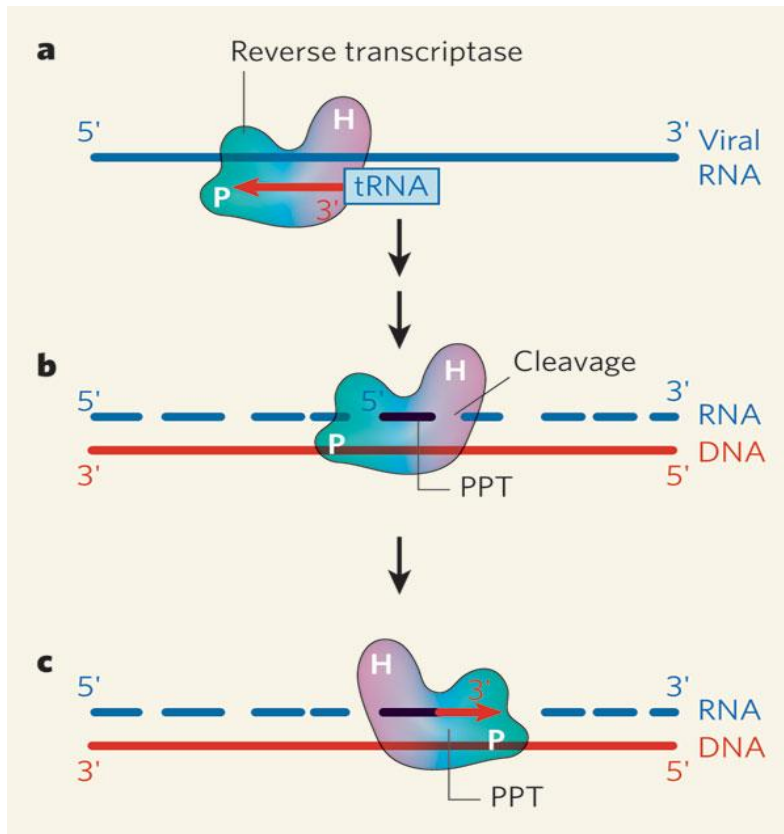


Функции обратных транскриптаз

Ферменты катализируют синтез ДНК на матрице РНК в процессе обратной транскрипции.

Обладает:

- РНК-зависимой ДНК (РНК)-полимеразной активностью;
- Активностью РНКазы H, ДНК-эндонуклеазной активностью ;
- ДНК-зависимой ДНК-полимеразной активностью.



Обратные транскриптазы в генной инженерии

Обратная транскриптаза вируса миелобластоза птиц (Avian Myeloblastosis Virus, AMV)

Помимо 5'-3' полимеразной активности, обладает 5'-3' и 3'-5' экзорибонуклеазными активностями. Способна расщеплять ДНК-РНК гибриды по процессивному механизму, т.е. обладает активностью РНКазы Н.

Обратная транскриптаза вируса лейкоза мышей Молони (Moloney Murine Leukemia Virus, MMLV)

Обладает ДНК- и РНК-полимеразной активностью. Активность РНКазы Н выражена значительно ниже.

ПРИМЕНЕНИЕ РЕВЕРТАЗ

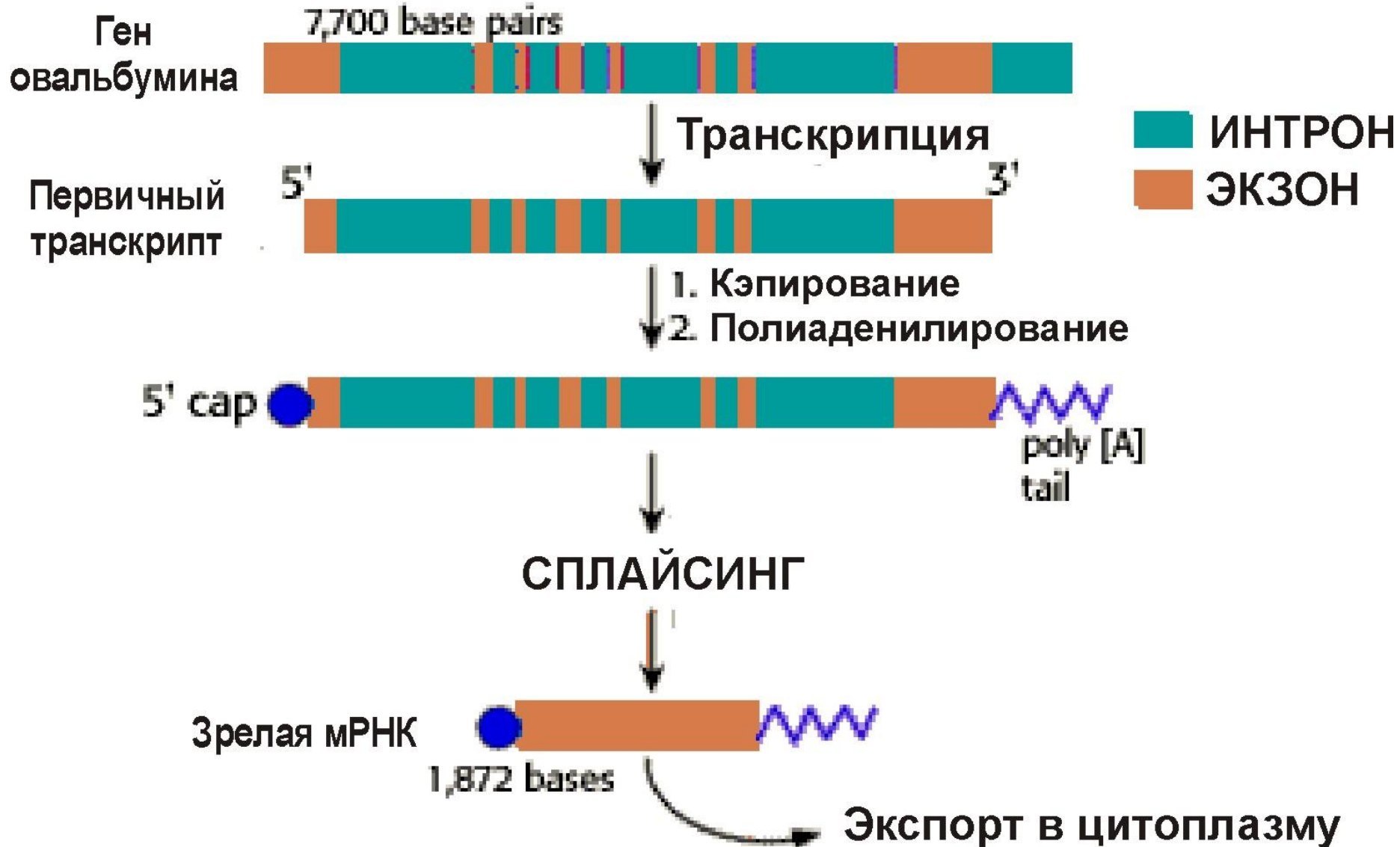
Получение молекул кДНК для изучения функций генов и их продуктов;

Экспрессионный анализ;

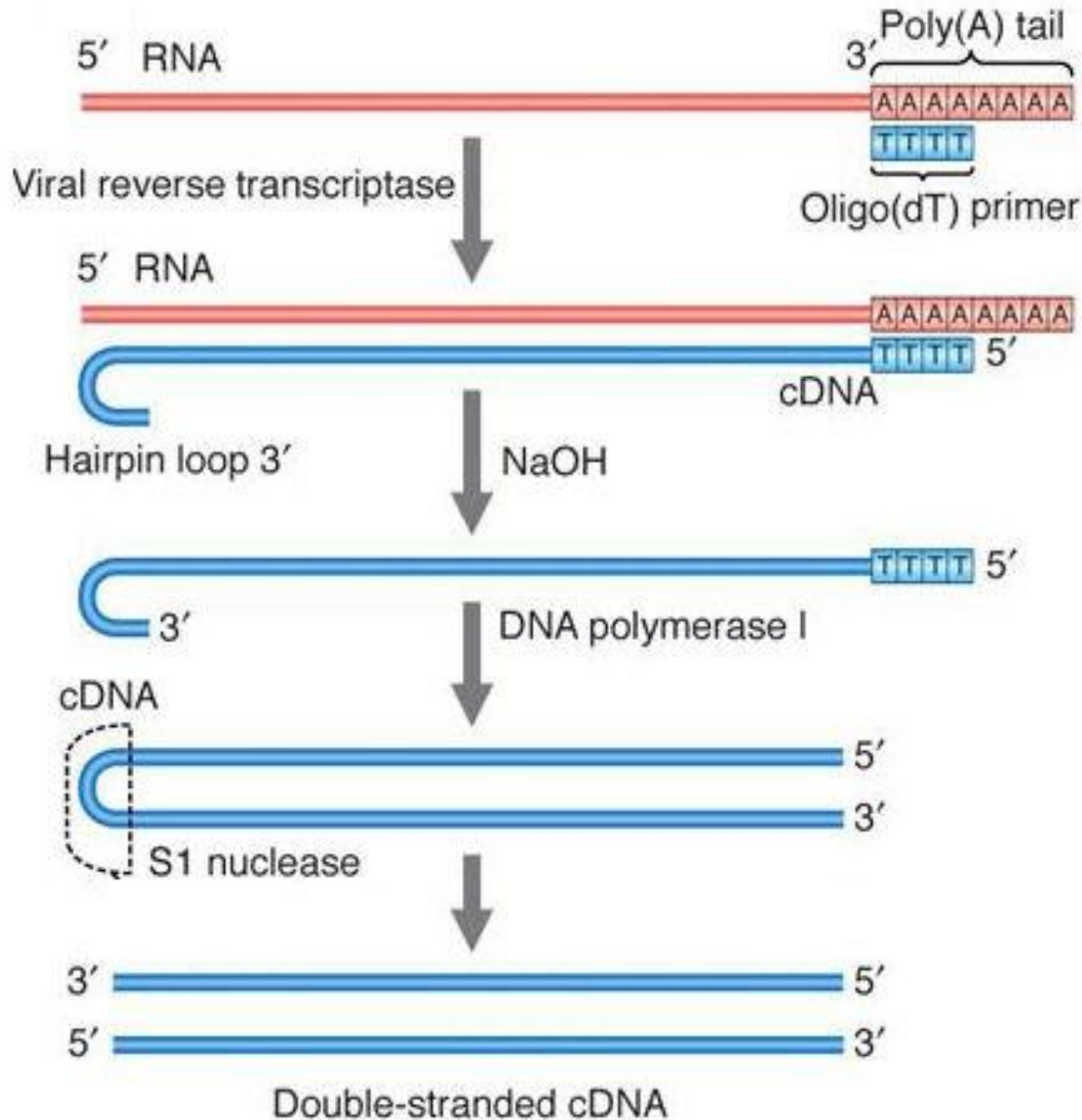
Создание геномных библиотек;

Введение радиоактивной метки в ДНК.

Процессинг РНК



Реакция ОТ



Рабочая температура:
37⁰С;
Время реакции:
1 час;
Ионы магния;
Чистая матрица
(обработка ДНКазой);
В реакцию
добавить
ингибиторы
РНКаз

ДНК-полимераза *Tth*

Обратная транскрипция и ПЦР в одной пробирке !!!

Условия	Значения
Оптимальная концентрация фермента	0.5 – 5 ед. на реакцию (1 ед.)
Оптимальный pH	9.0 при 25°C
Оптимальная концентрация Mg ²⁺	1 – 10 мМ (1.5 мМ)
Оптимальная концентрация Mn ²⁺	1 – 4 мМ (в зависимости от пары праймеров)
Оптимальная температура	72°C для ПЦР, 60 – 70°C для ОТ (30 мин.)
ПЦР продукт	обычно до 1000 п.н. (не более 2000 – 3000 п.н.)
Введение модифицированных нуклеотидов	Полимераза применяется для введения радиоактивных, флуоресцентных, биотинилированных нуклеотидов в состав ДНК
Активность РНКазы Н	Не наблюдается

Что такое вектор?

Вектор – молекула ДНК, используемая в генетической инженерии для передачи генетического материала другой клетке.

Свойства векторов

- 1. Способность к автономной репликации;**
- 2. Емкость вектора;**
- 3. Наличие маркерного гена.**

Свойства векторов

По функциям:

1. Векторы для клонирования
2. Векторы для экспрессии
3. Векторы для трансформации

По месту применения:

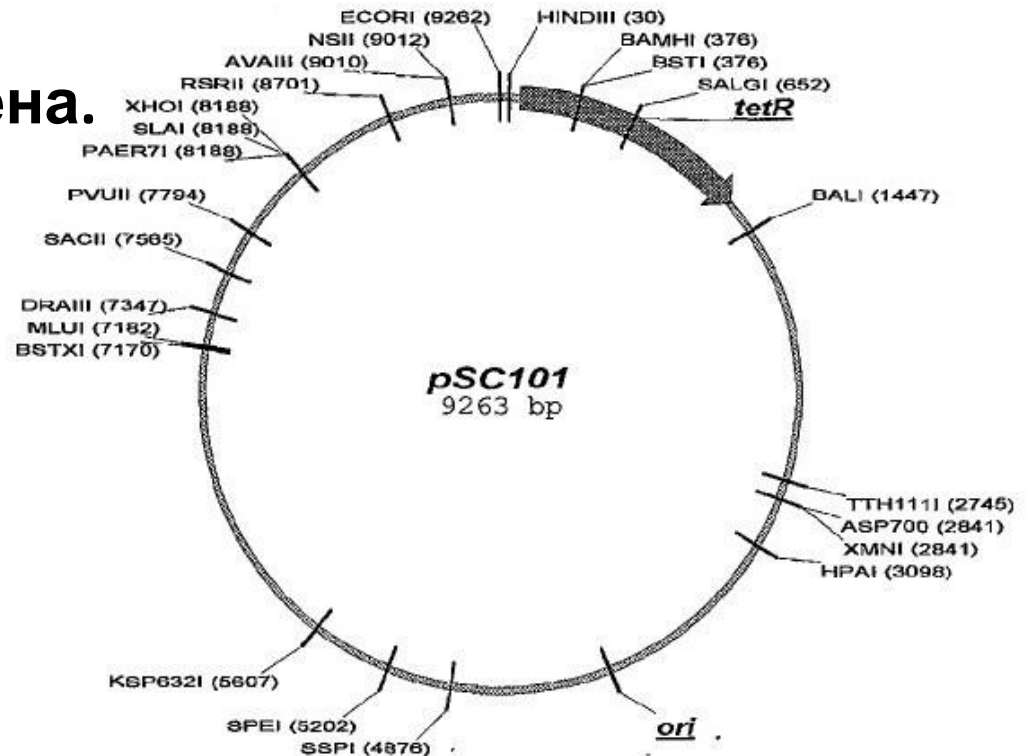
1. Бактериальные
2. Эукариотические
3. Челночные (бинарные) (shuttle).

Плазмидная ДНК бактерий

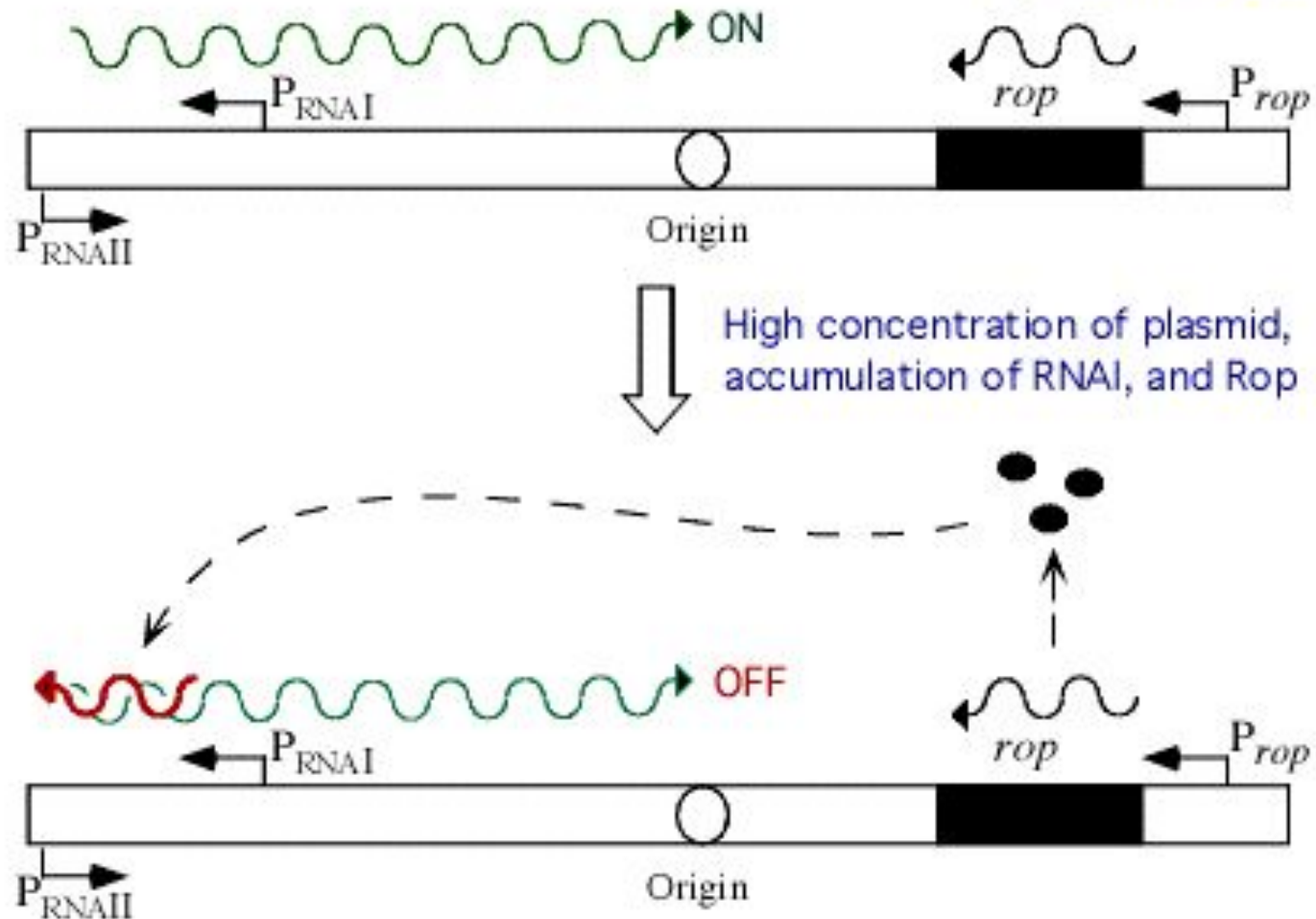
Способность к автономной репликации;
(ориджин репликации, *ori*)

Емкость вектора;
(до размеров самой плазмиды, но обычно до 70%,
сайты рестрикции)

1. Наличие маркерного гена.
(R-плазмиды)



Локусы контроля репликации плазмидной ДНК



Создание плазмид с повышенной

КОПИЙНОСТЬЮ

Плаزمида Ori Копийность классификация

pUC pMB1* 500 – 700 **высококопийная**

pBluescript ColE1 300 - 500 **высококопийная**

pGEM pMB1* 300 - 700 **высококопийная**

pTZ pMB1* > 1000 **высококопийная**

pBR322 pMB1* 15 - 20 **низкокопийная**

pACYC p15A 10 - 12 **низкокопийная**

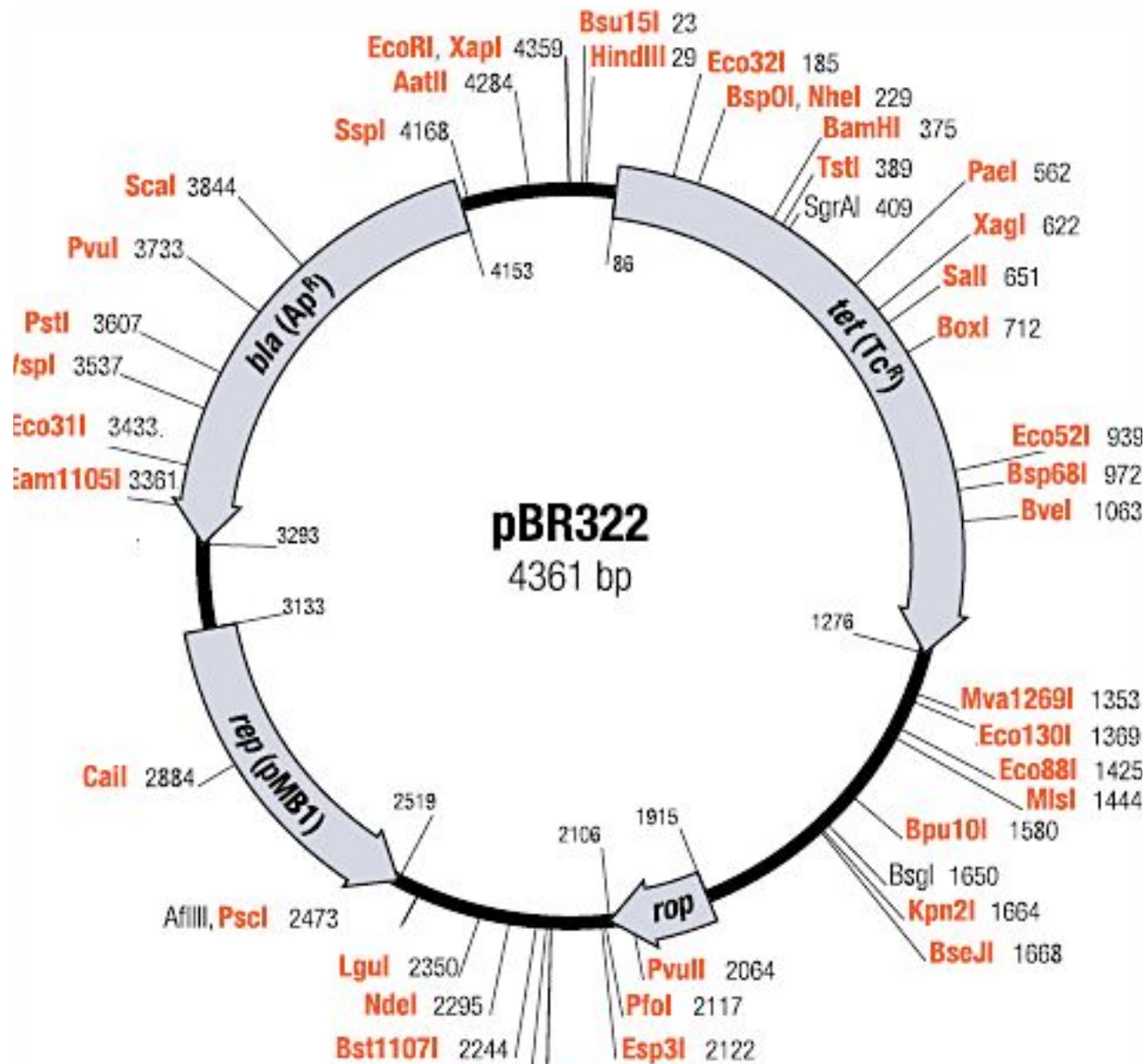
ColE1 ColE1 15 – 20 **низкокопийная**

pSC101 pSC101 ~5 **очень низкокопийная**

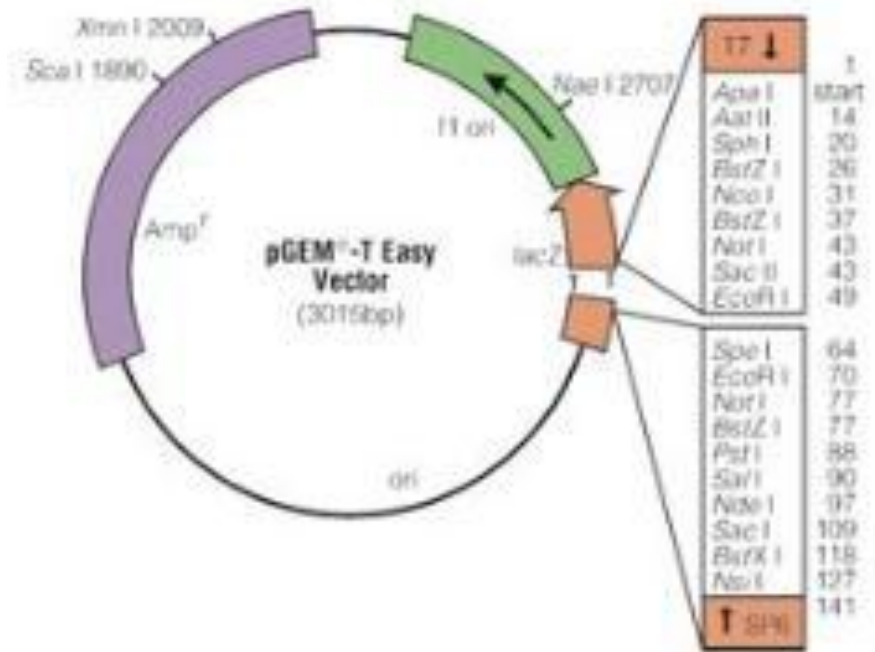
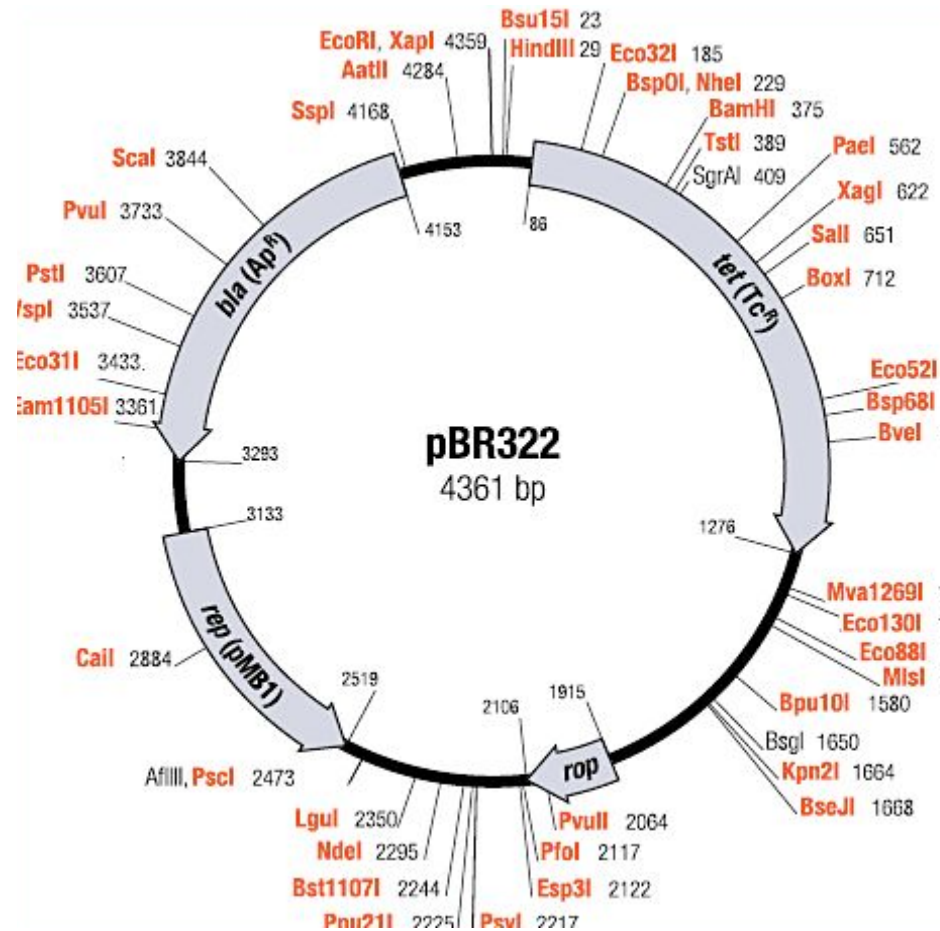
Селективные маркеры

Продукт	AO	Mr, Da
Beta-lactamase (ampicillin/carbenicillin resistance)	286	31515
Chloramphenicol acetyltransferase	219	25663
Hygromycin resistanse	344	38317
Kanamycin resistanse	271	30979
Neomycin resistance	264	29051
Tetracycline resistance (Tn10)	401	43276
Zeocin resistance	127	13665

Емкость плазмиды



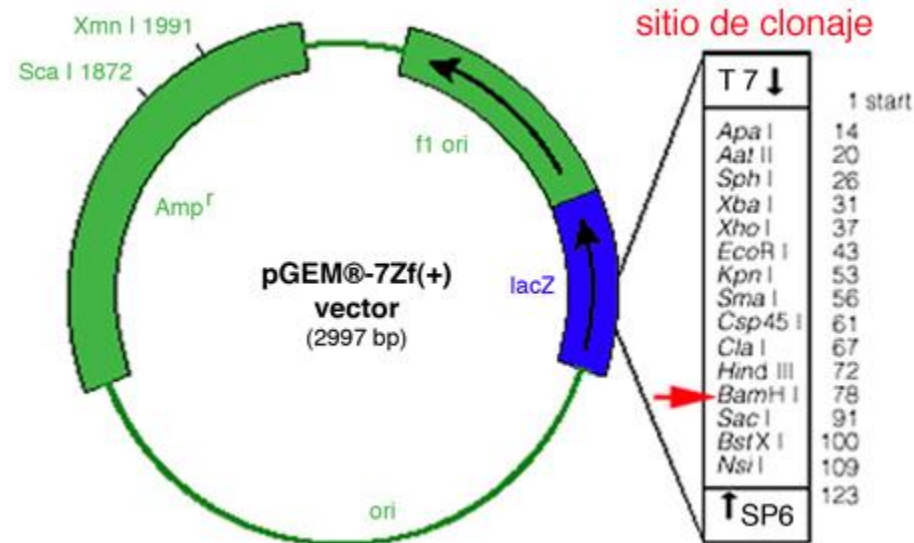
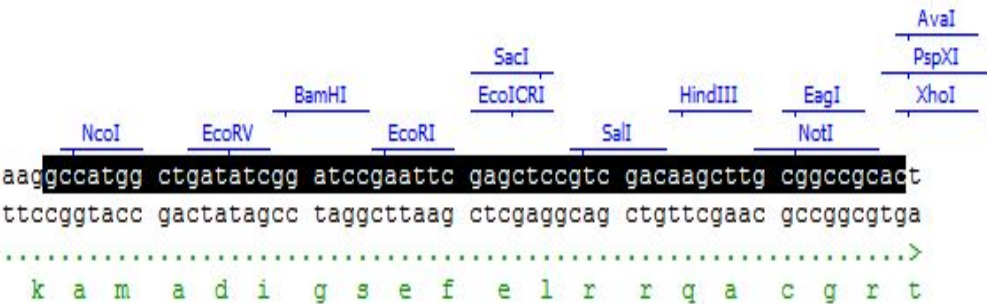
Отличие векторов и плазмид



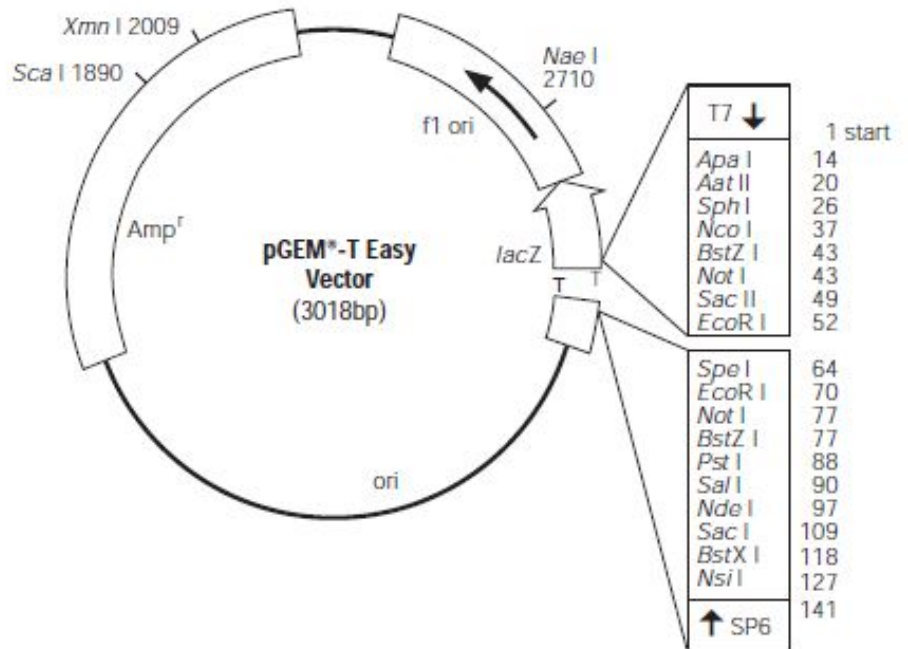
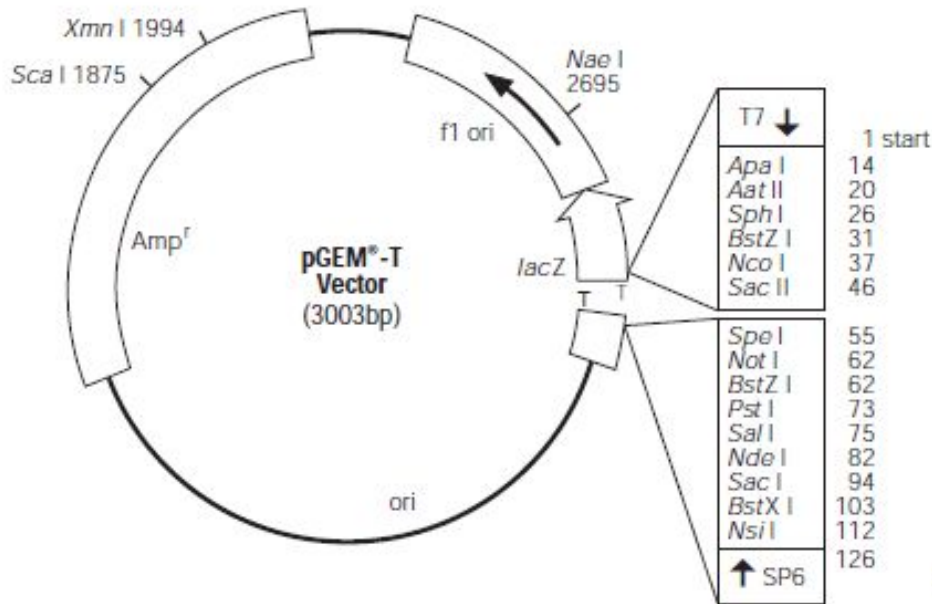
Уникальные сайты, емкость плазмид до 10 kb!!!

Полилинкер (MCS)

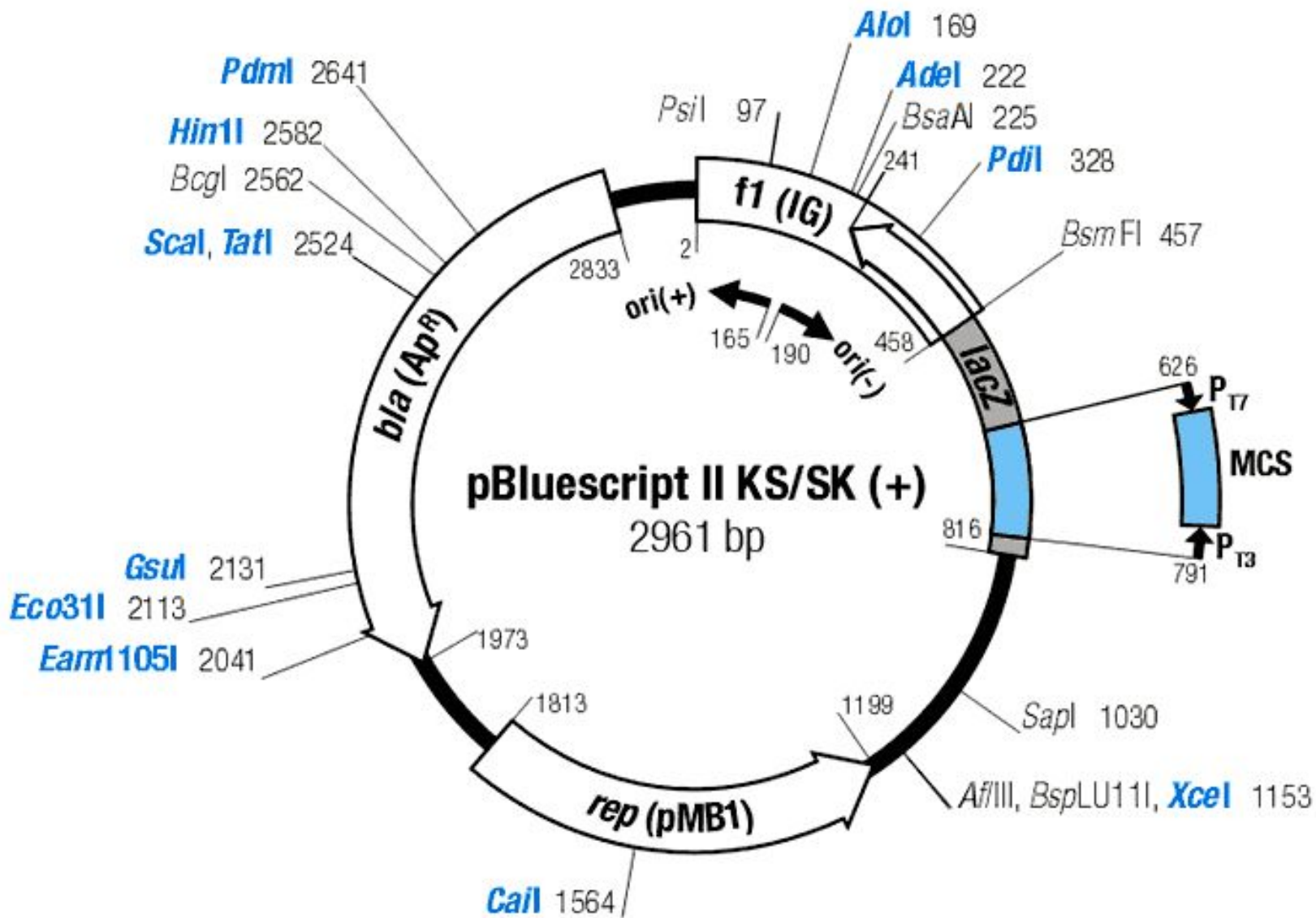
небольшой, искусственно синтезированный фрагмент ДНК, который представляет собой последовательность, содержащую сайты рестрикции для наиболее используемых ферментов



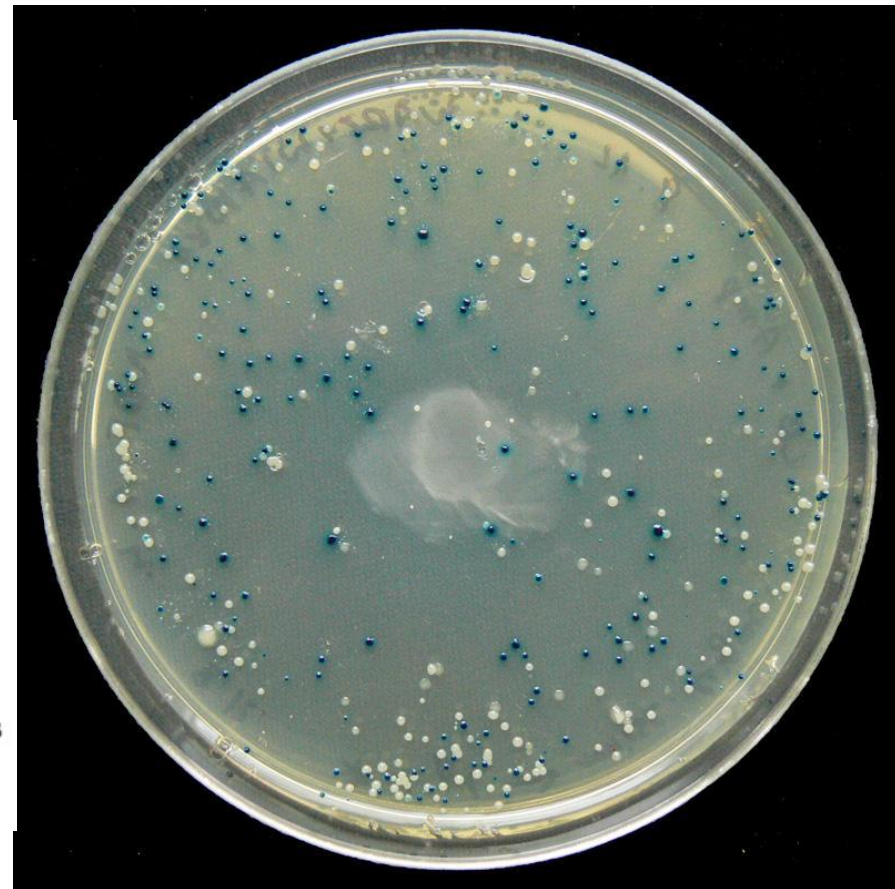
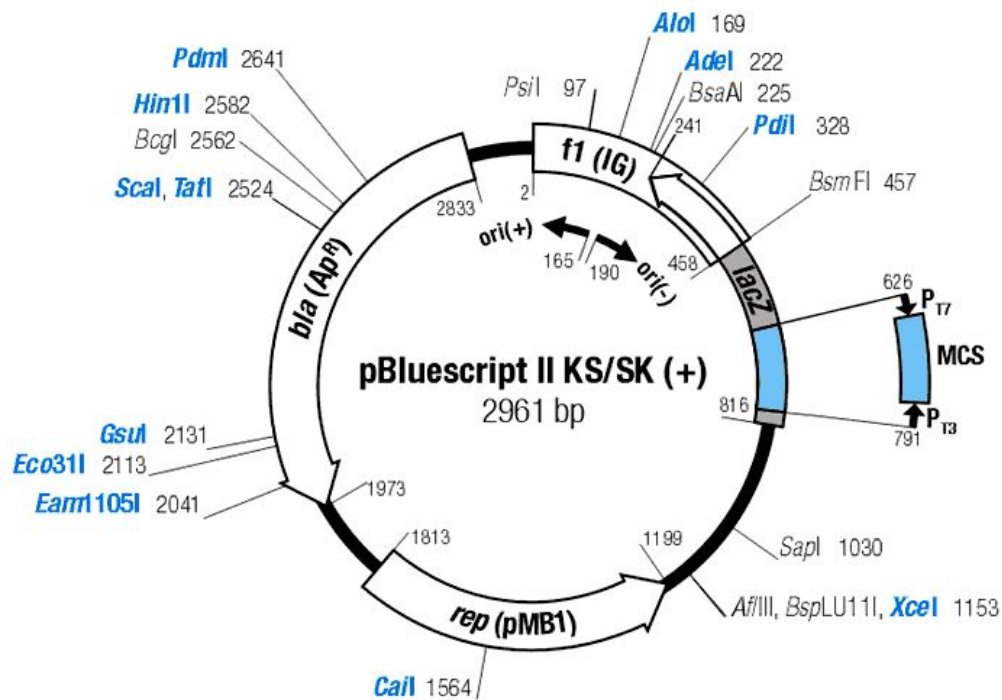
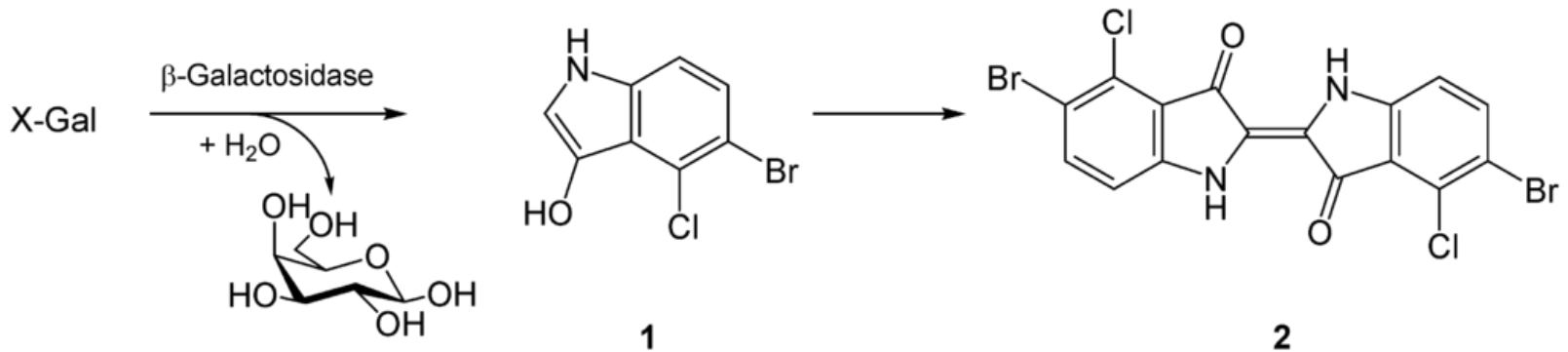
Серии векторов



Бело-голубая селекция

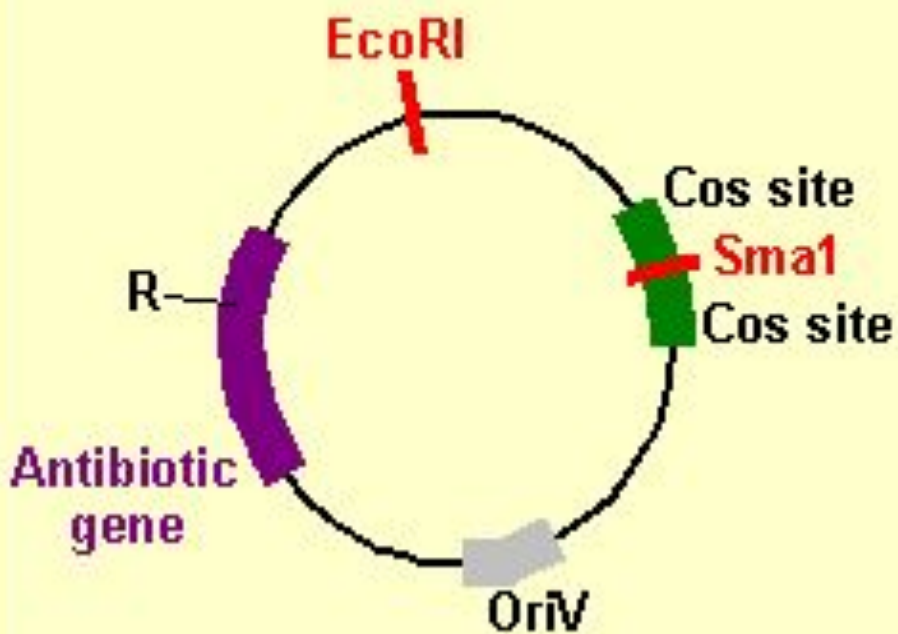


Бело-голубая селекция



Космиды

Это гибридный тип векторов, совмещающий в себе свойства плазмиды и фага λ. Они конструируются на основе репликона плазмиды и содержат cos-сайты. Предназначены для больших фрагментов ДНК (35 – 45 kb).



KEY

OriV - origin of replication.

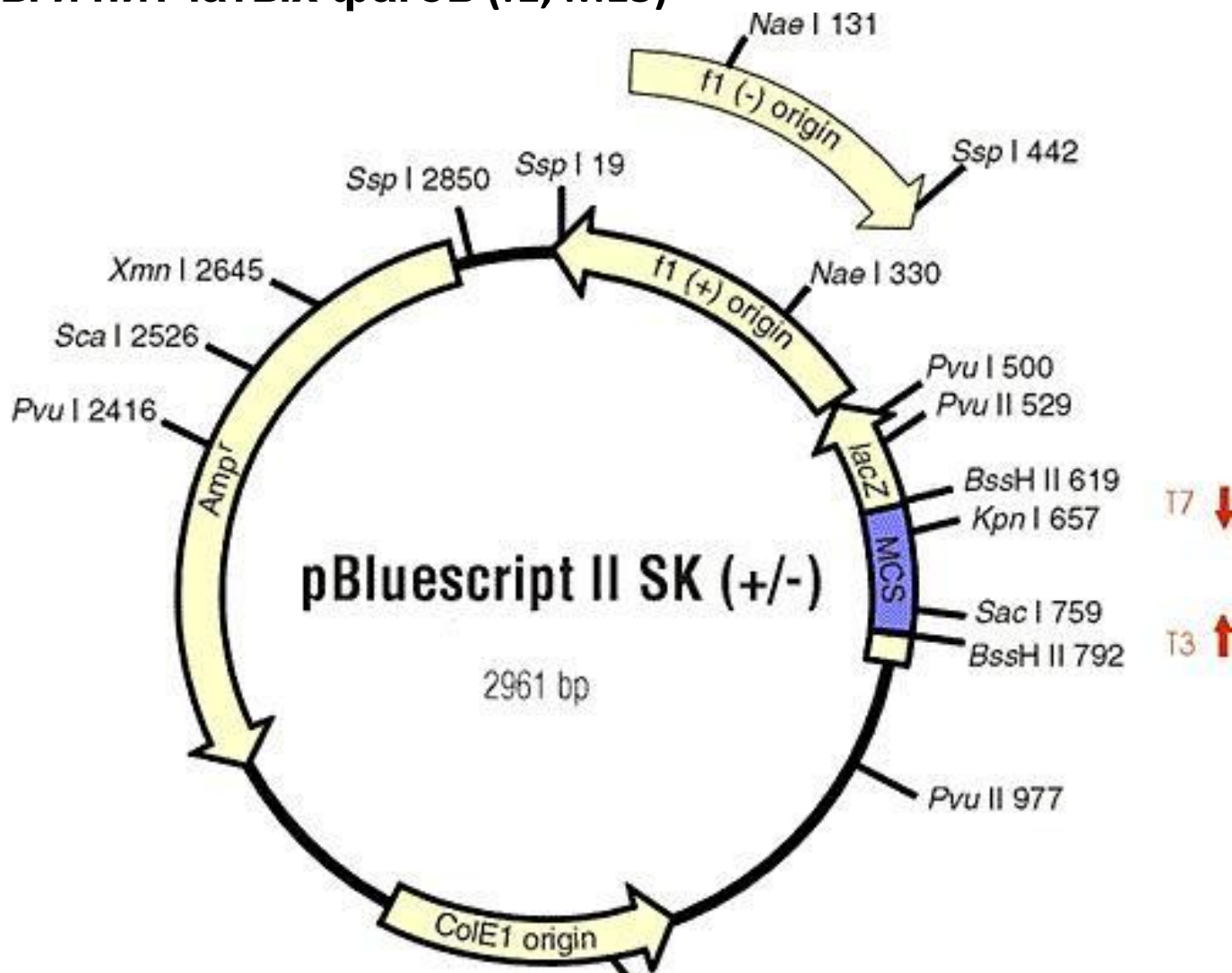
Cos sites - provide blunt ends.

R - recombinant site

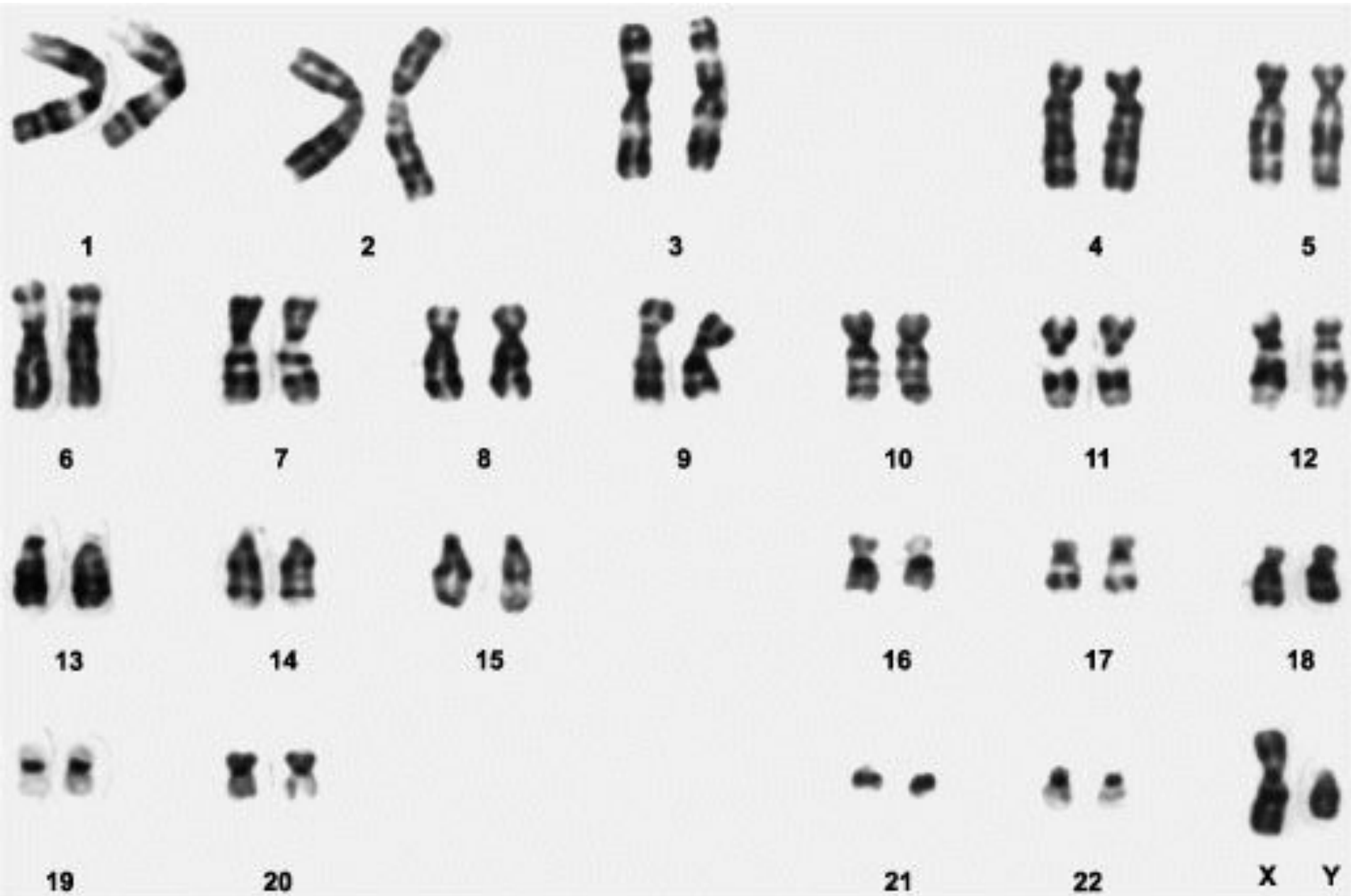
EcoRI } - Restriction endonuclease
SmaI } recognition sequence.

Фазмиды (фасмиды, фагмиды)

Это гибридный тип векторов, совмещающий в себе свойства плазмиды и нитчатых фагов (f1, M13)



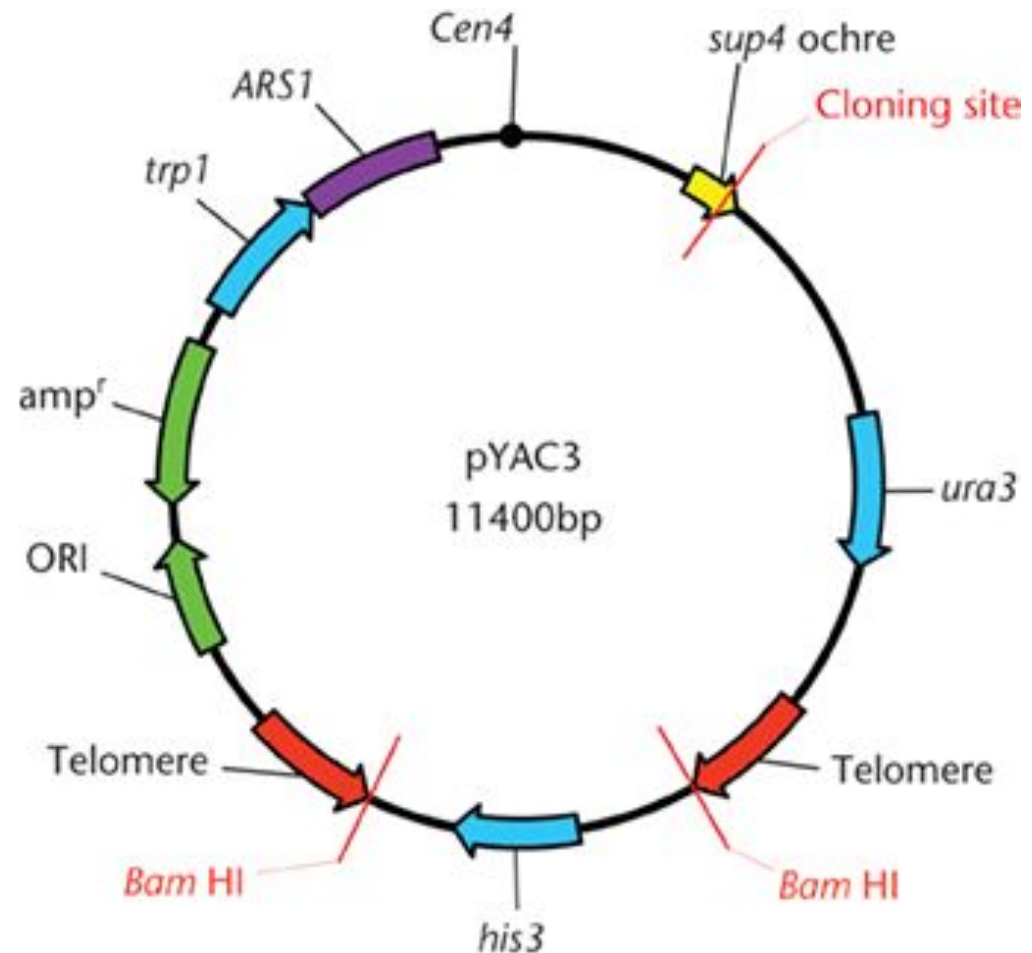
Искусственные хромосомы



Искусственные хромосомы дрожжей (yeast artificial chromosomes, YACs)

Cen4 – центромера дрожжей;
ORI – ориджин бактерий;
Telomere – теломерные последовательности;
ARS1 – автономная реплицирующаяся последовательность
Cloning site – полилинкер
AmpR, trp1, ura3, his3 – селективные маркеры
Sup4 – красно-белая селекция

Применение:
Клонирование больших фрагментов генома: 100 – 2000 kbp (1000 kbp)



Создание геномных библиотек



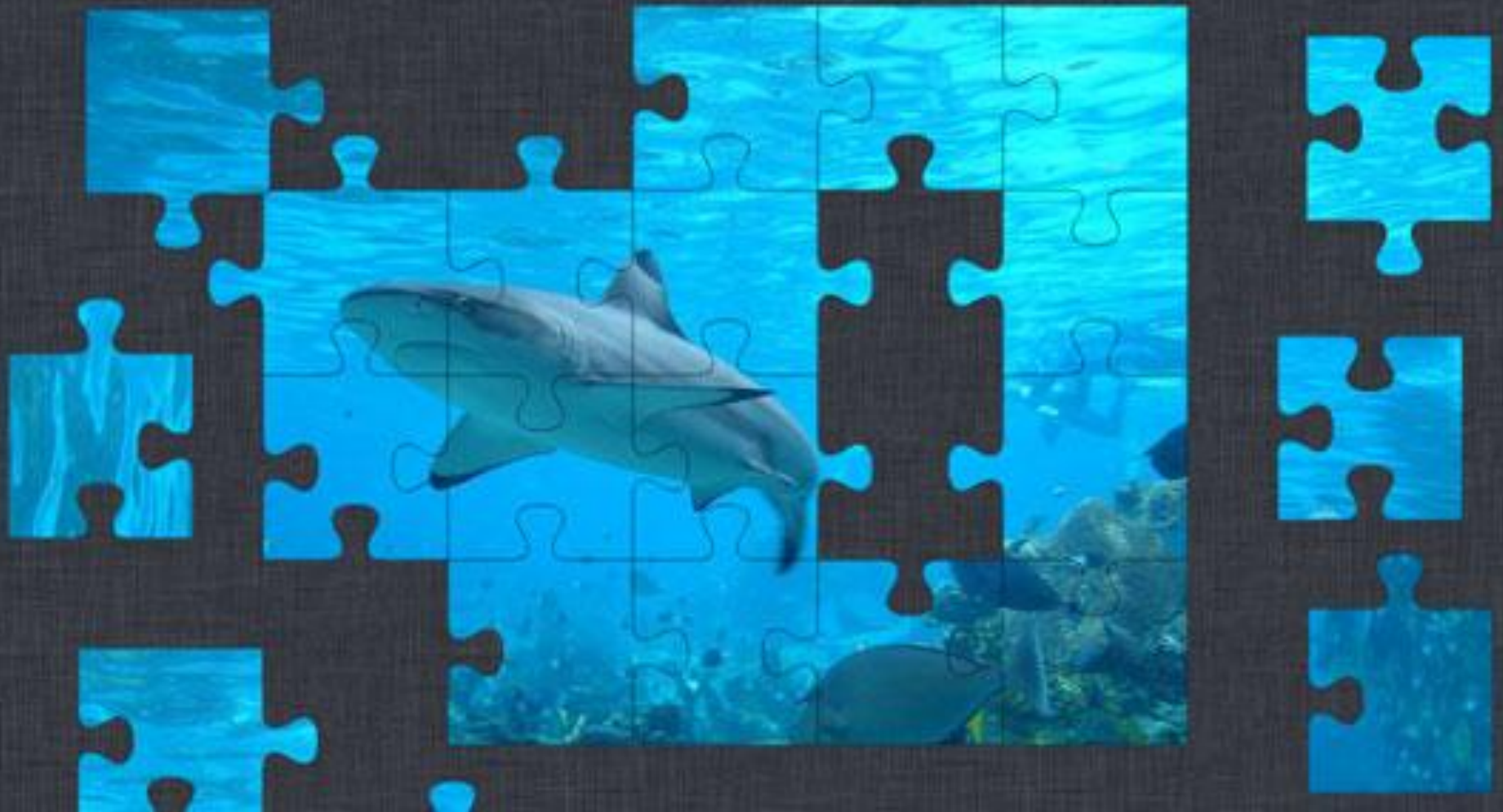
Геномные библиотеки (банки генов)

Геномная библиотека – фрагменты генома, клонированные в фаге λ (фаговые библиотеки) или в ВАС/РАС/УАС векторах (ВАС/РАС/УАС библиотеки)

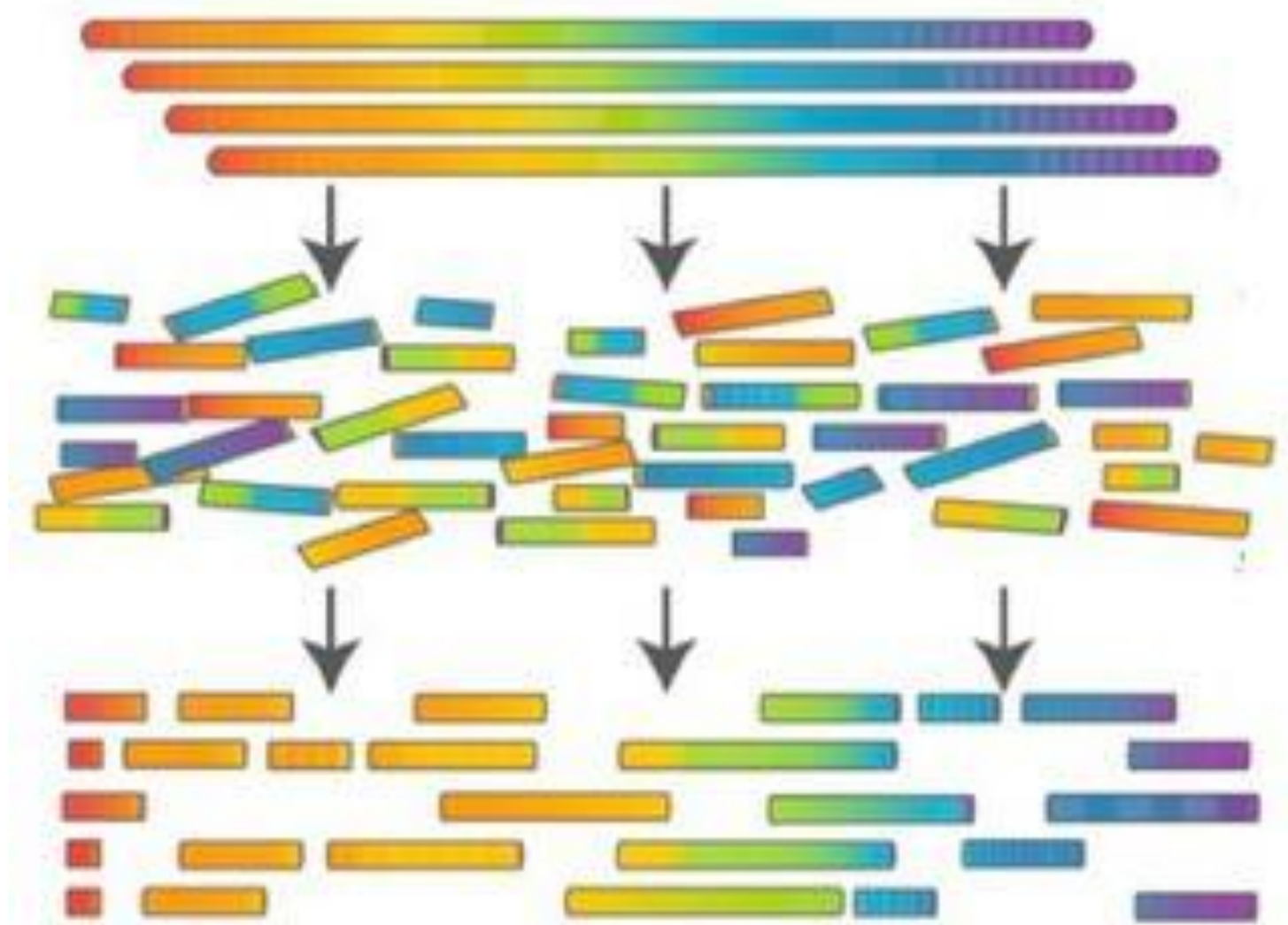
Геномная библиотека – совокупность фрагментов, составляющих целый геном.

Геномная библиотека позволяет работать не с целым геномом, а его конкретными участками.

Принцип конструирования геномных библиотек



Перекрывающиеся последовательности



**Перекрытие – в скольких фрагментах у вас
будет 1 участок ДНК**

II Этап. Создание геномной библиотеки



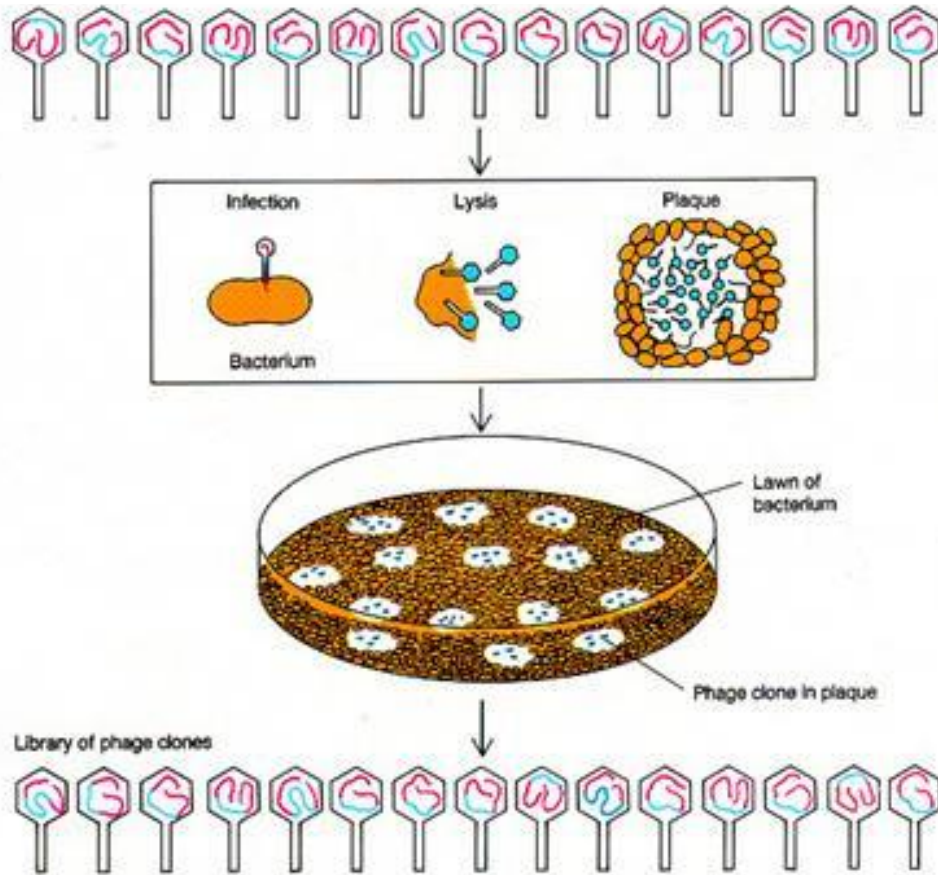
↓ T4 ДНК лигаза



Левое и правое плечо фага с адапторами *HindIII*



III Этап. Клонирование геномной библиотеки



Расчет количества клонов, необходимых для получения геномной библиотеки

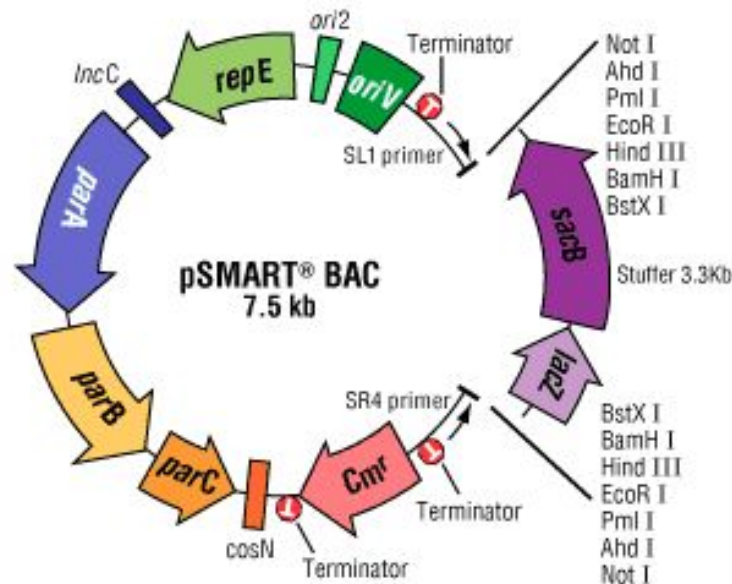
$$N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln(1 - f)}$$

Где N – количество клонов, P – вероятность того, что клонотека содержит требуемую последовательность, f – доля генома, в среднем, представленная в каждом клоне

$$N = \frac{\ln(1 - 0,99)}{\ln\left(1 - \frac{20}{420000}\right)} = 9,67 \times 10^4 \text{ колоний}$$

ВАС, РАС библиотеки

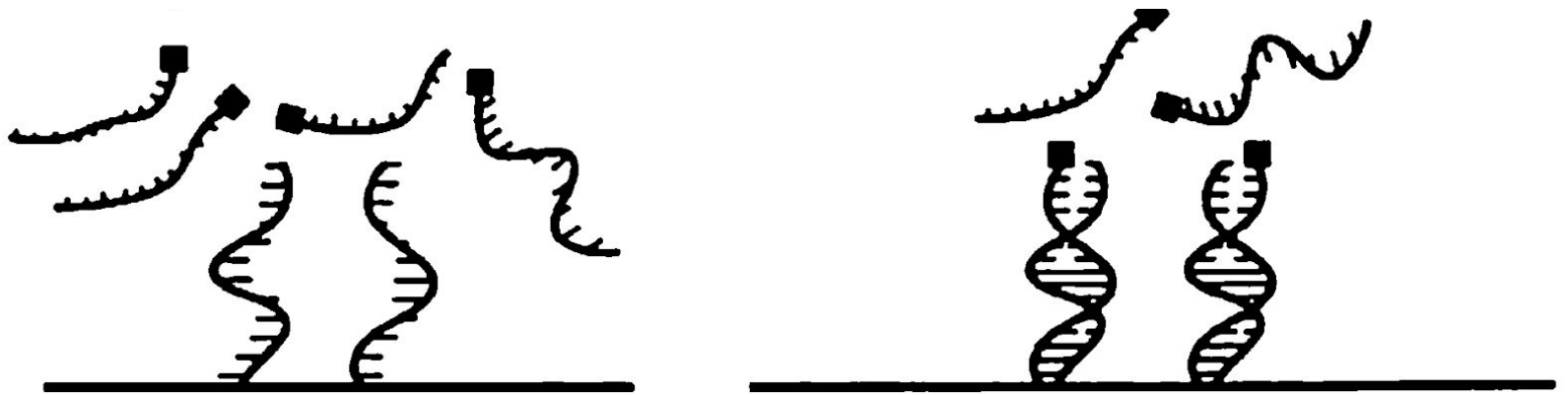
Сложно выделять ДНК (фрагментация редкощепящими рестриктазами или не режут вообще)



$$N = \frac{\ln(1 - 0,99)}{\ln\left(1 - \frac{250}{420000}\right)} = 7734 \text{ колонии}$$

Поиск (скрининг) клонов в библиотеке

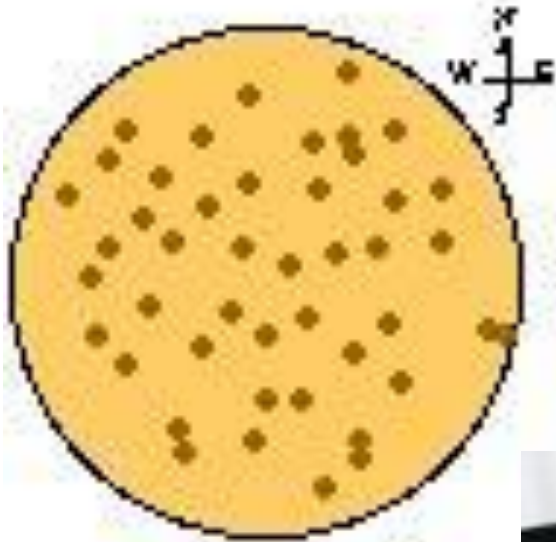
Гибридизация – отжиг цепи ДНК на
комплементарной ей цепи ДНК



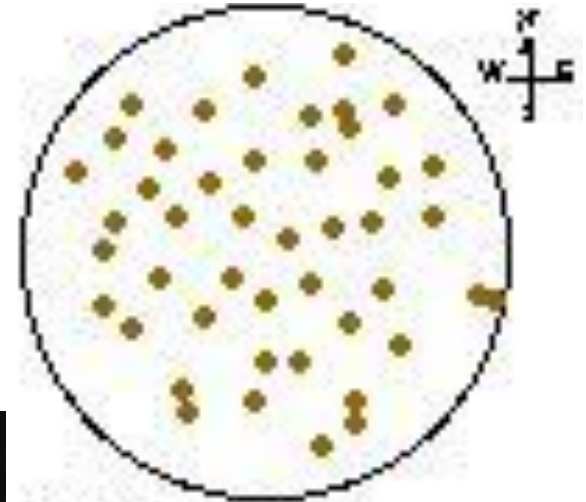
Принцип проведения скрининга



Гибридизация: получение реплики



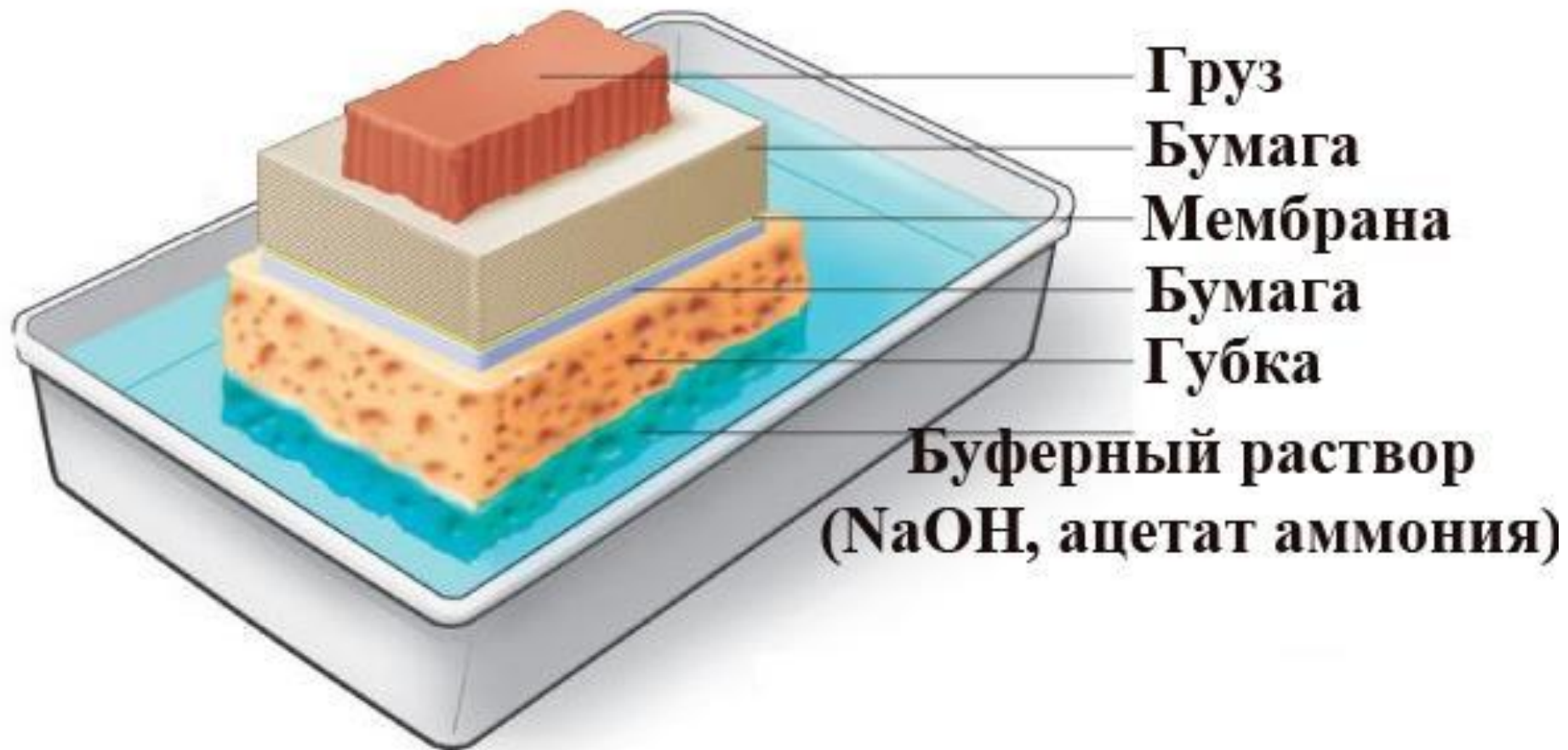
Чашка Петри



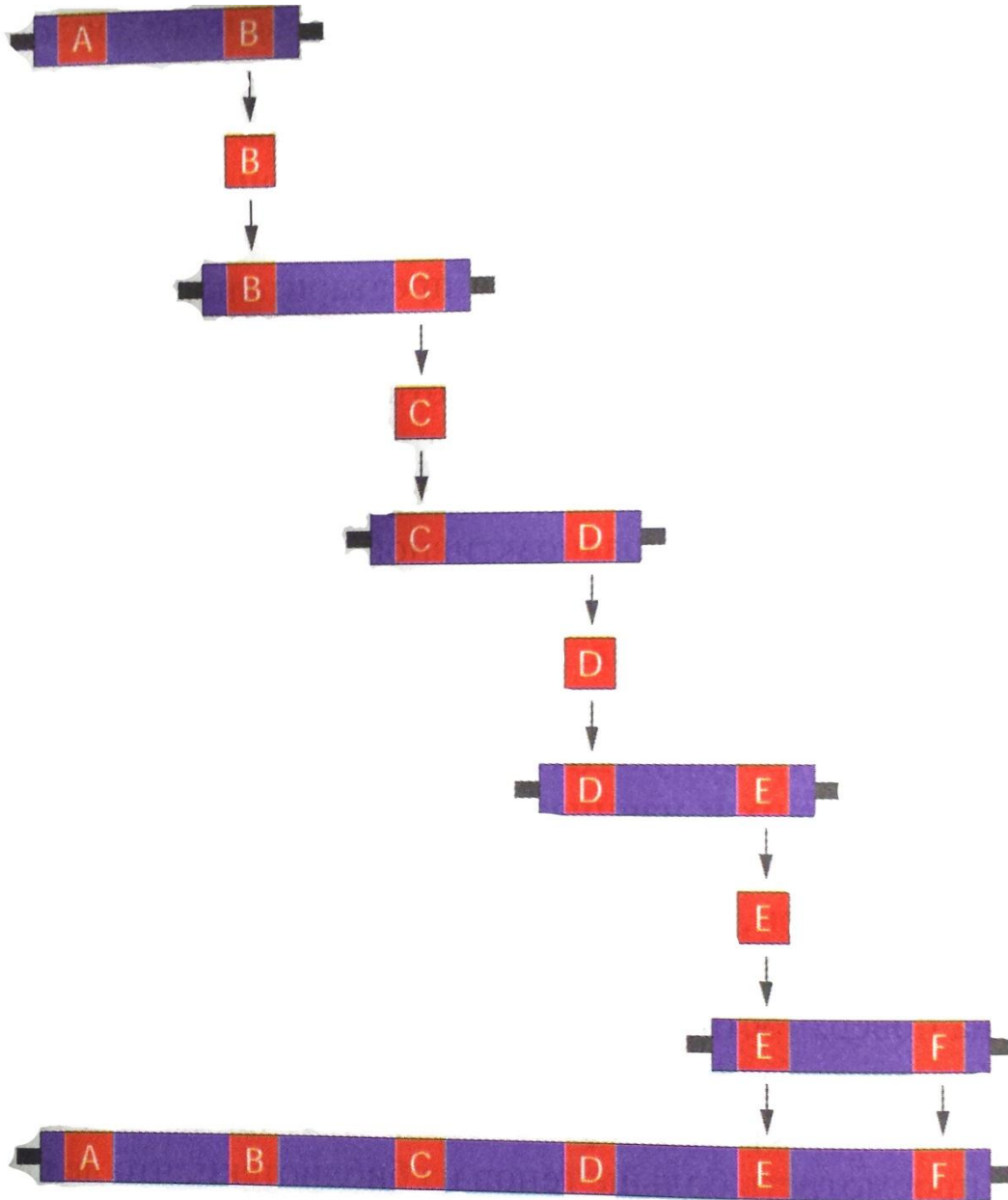
Нитроцеллюлозная
(нейлоновая) мембрана



Блоттинг (по Саузерну)



Прогулка по хромосомам



Библиотеки кДНК

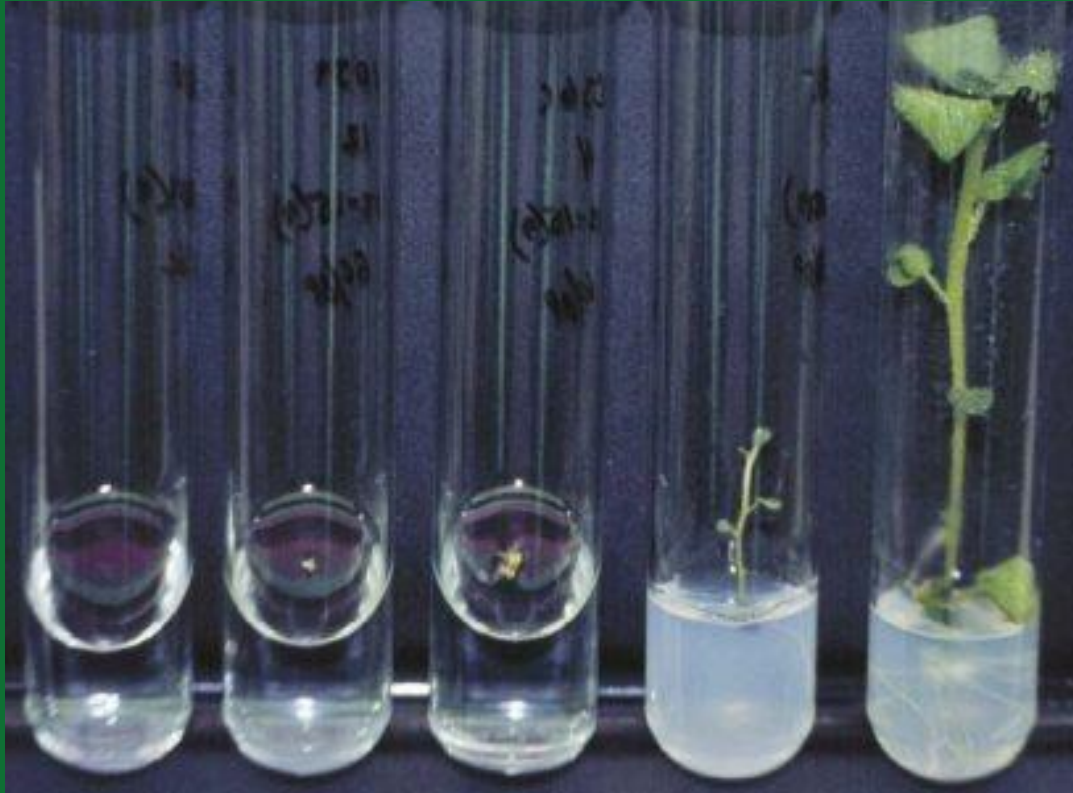


ТРАНСГЕННЫЕ

РА



50-е годы XX века



Получение культур *in vitro*
- растений «в пробирке»

1983 год, первое трансгенное растение



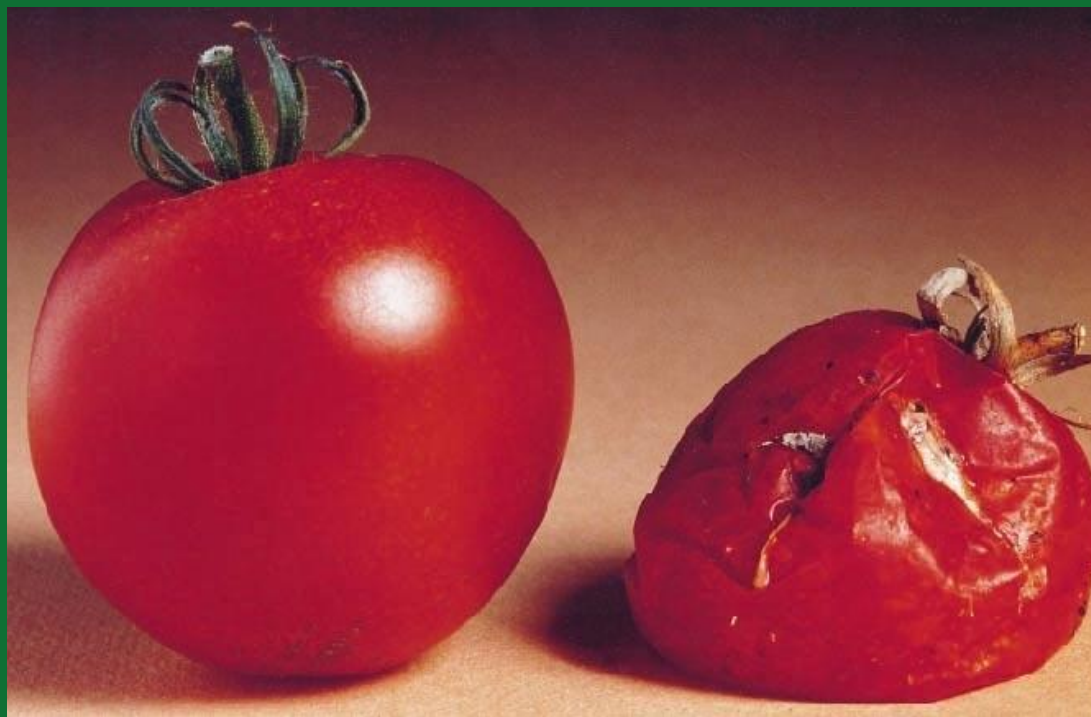
Растение табака, устойчивое к
канамицину

**1990 год, первое трансгенное
растение, пошедшее «в поля»**



**Растения хлопка, устойчивые к
насекомым**

1994 год, томаты «flavr savr»



Устойчивость к
бактериальным гнилям

1995 год, Monsanto



MONSANTO



Соя, устойчивая к гербицидам

MONSANTO



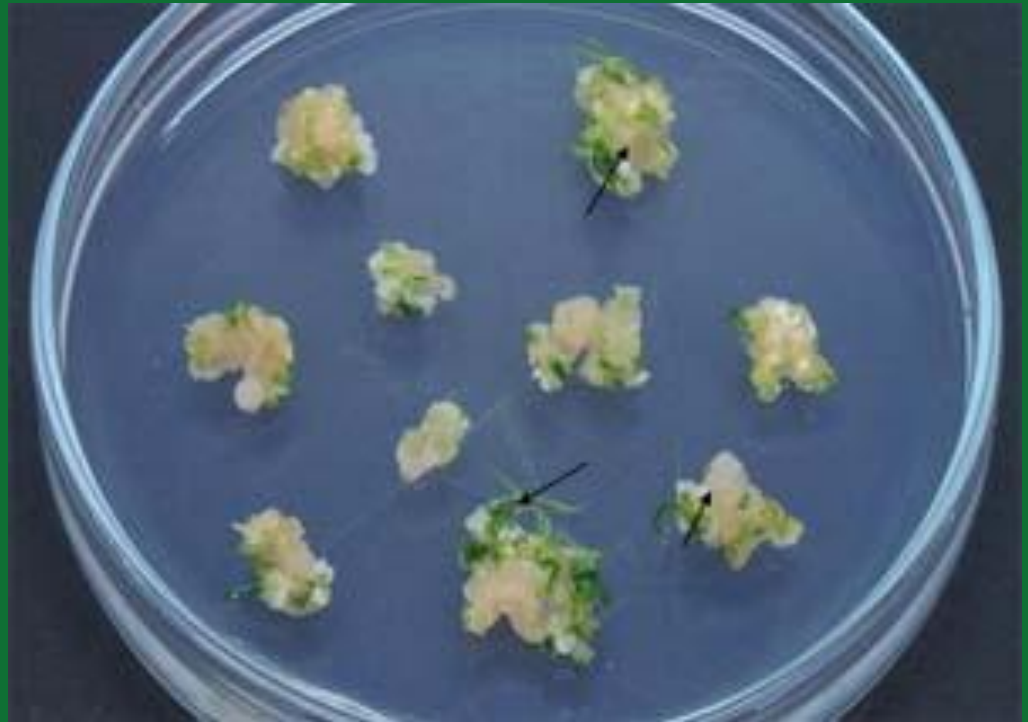
- Картофель, устойчивый к колородскому жуку
- Кукуруза, устойчивая к кукурузной огневке, гербицидам
- Папайя, устойчивая к вирусу кольцевой пятнистости

Suntory – голубая трансгенная роза (дигидрокверцетин 5'-гидролаза)



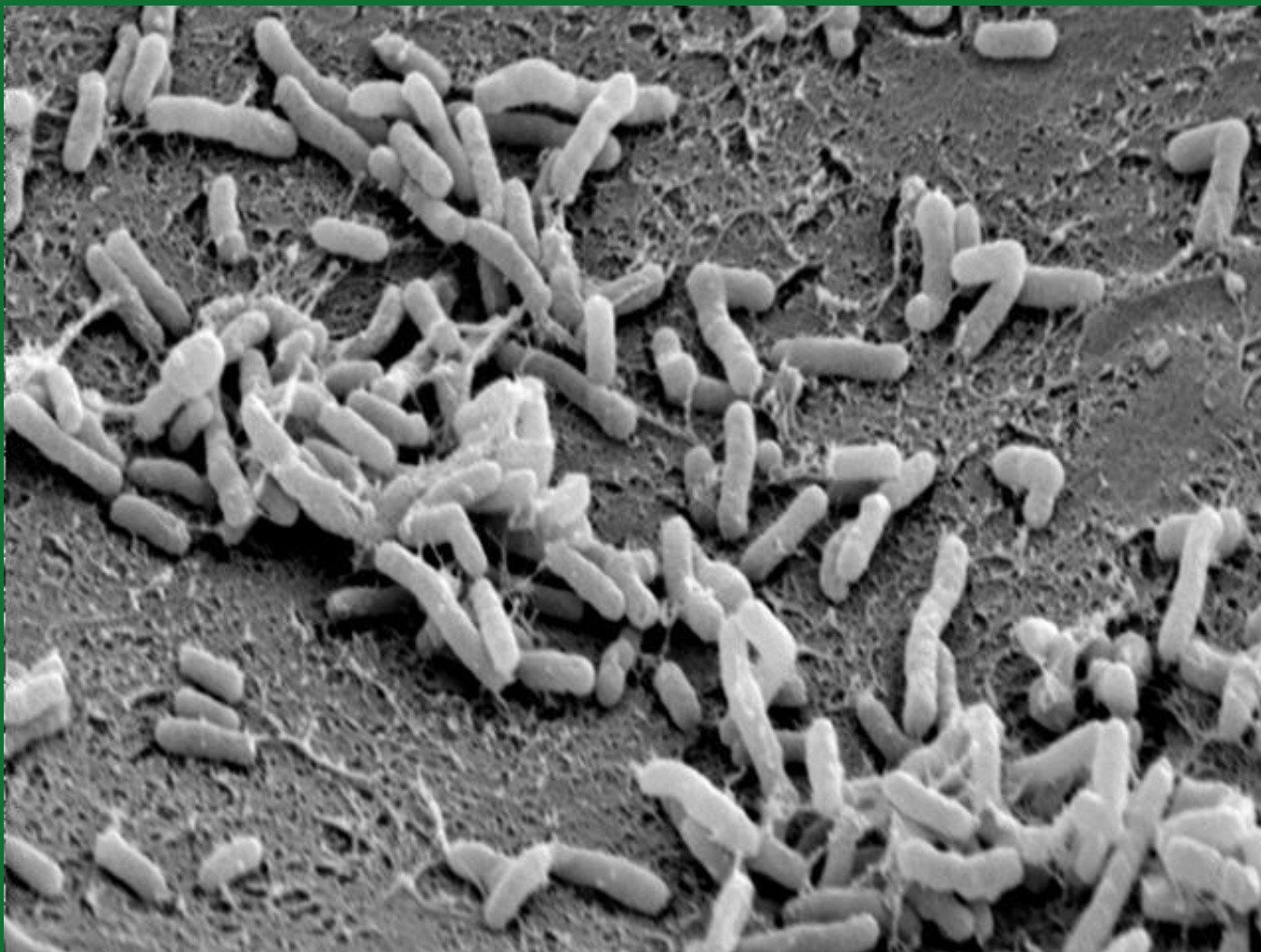
Как получают трансгенные растения?

- Получение культур и регенерация культур *in vitro*



- трансформация клеток

Агробактериальная трансформация



Agrobacterium tumefaciens
(*A. tumefaciens*)

A. tumefaciens ВЫЗЫВАЕТ БОЛЕЗНЬ КОРОНЧАТЫХ ГАЛЛОВ

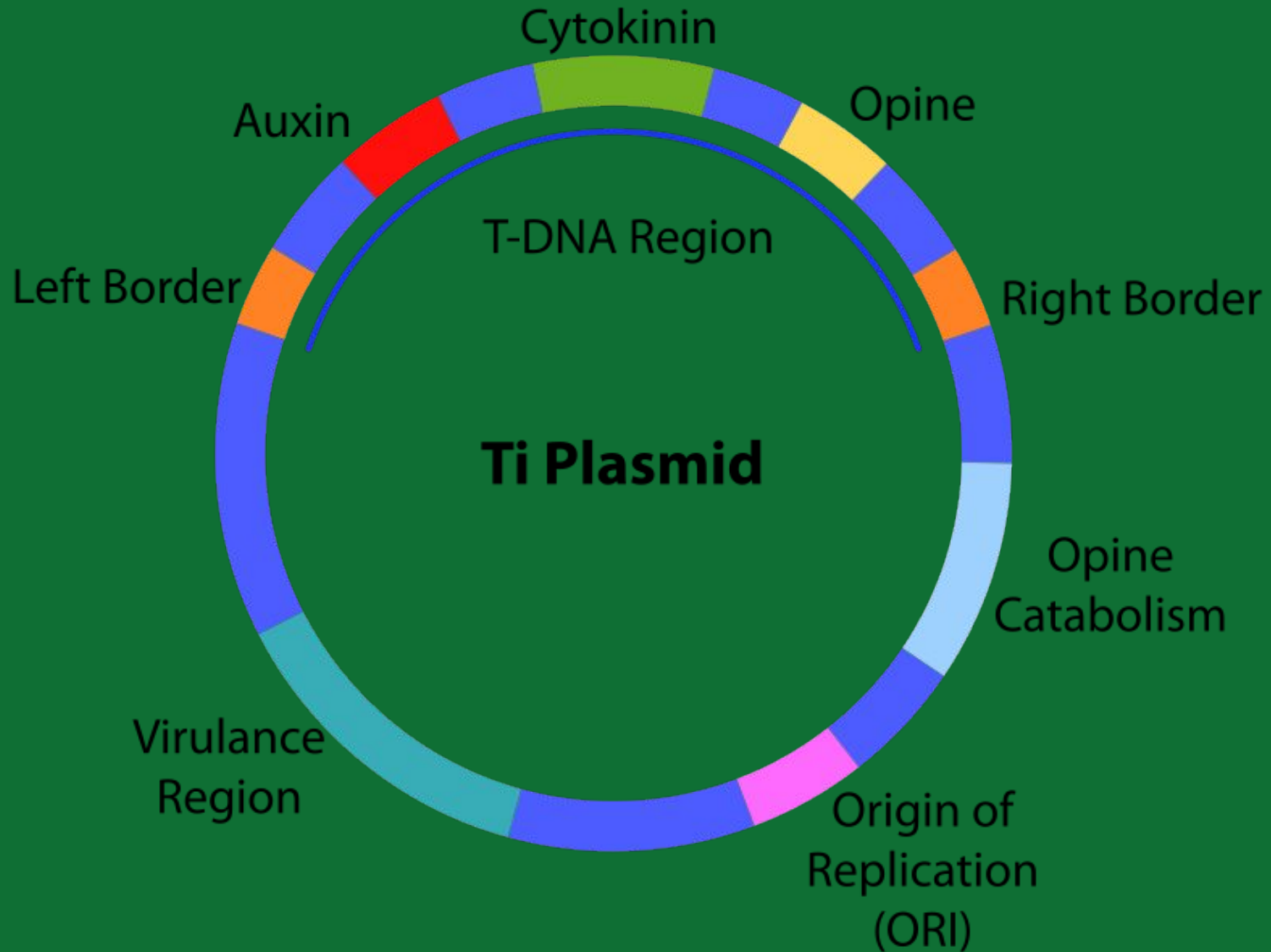


Корончатые галлы состоят из

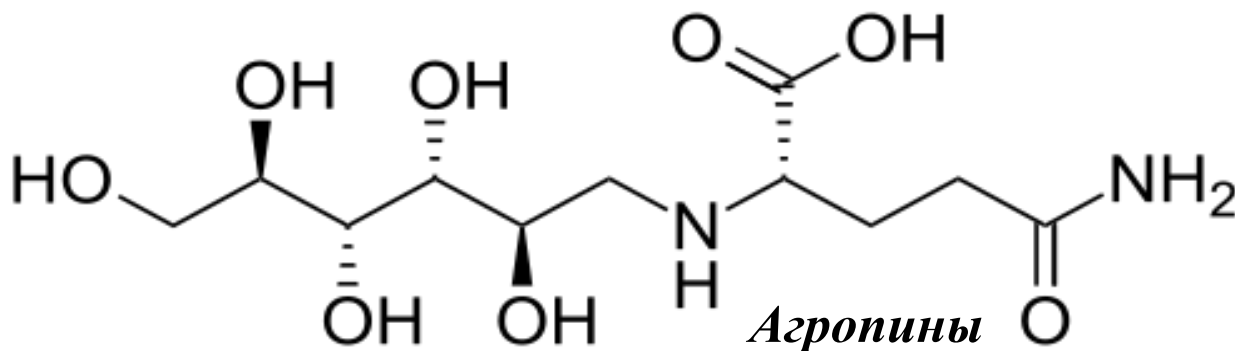
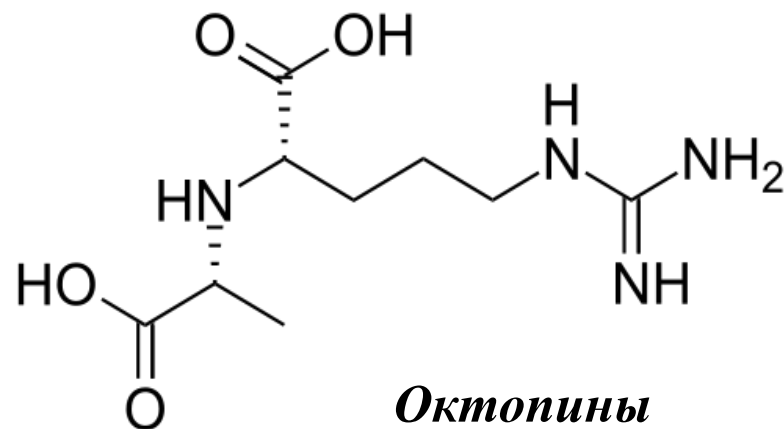
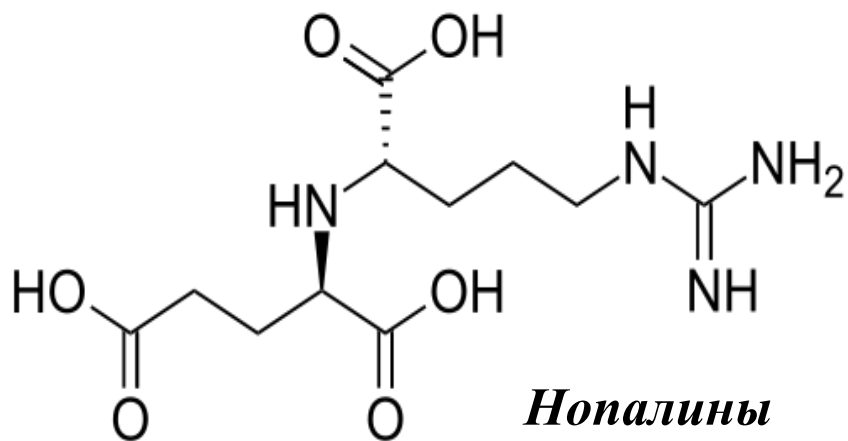


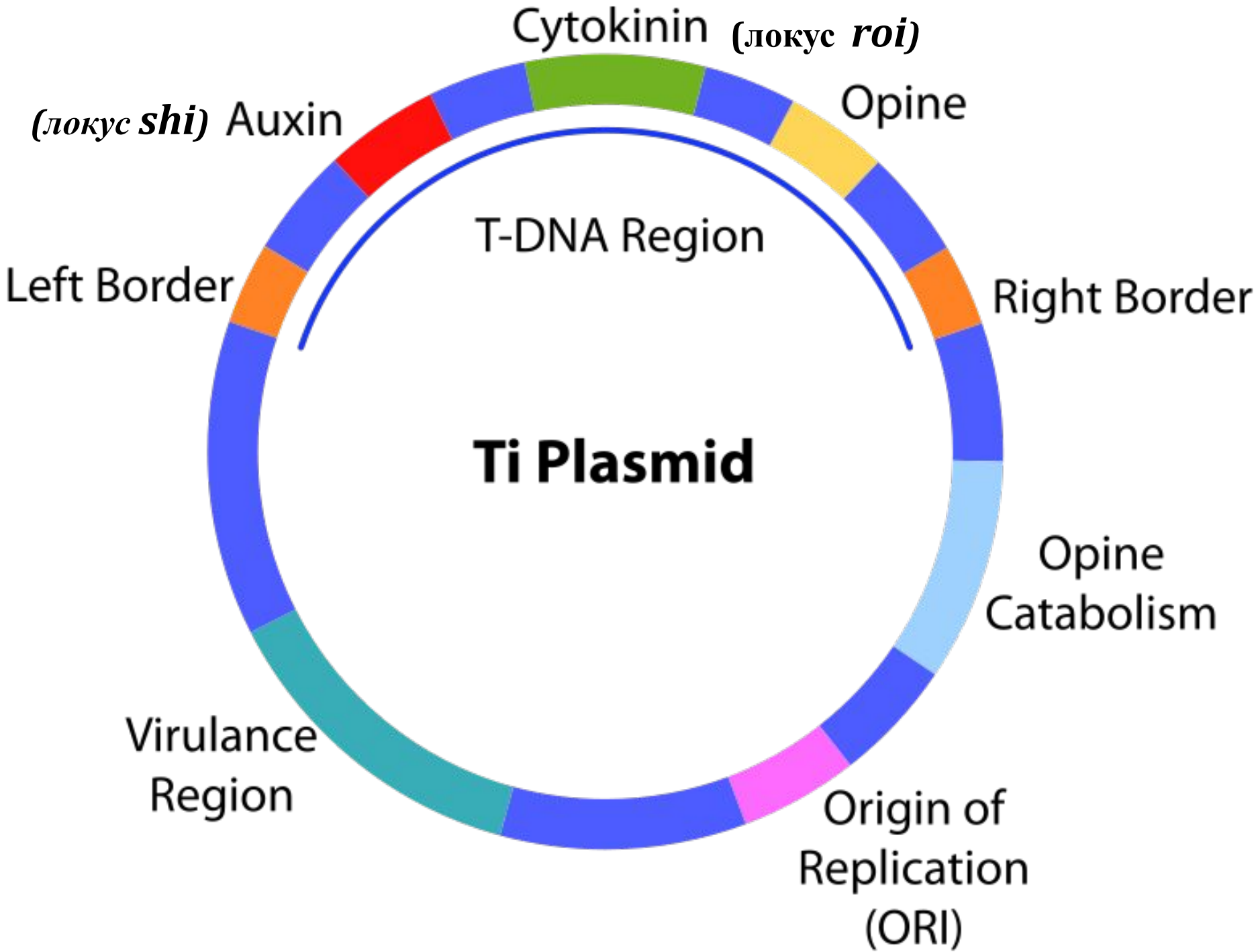
дифференцированных клеток

A. tumefaciens – плазмидосодержащая бактерия

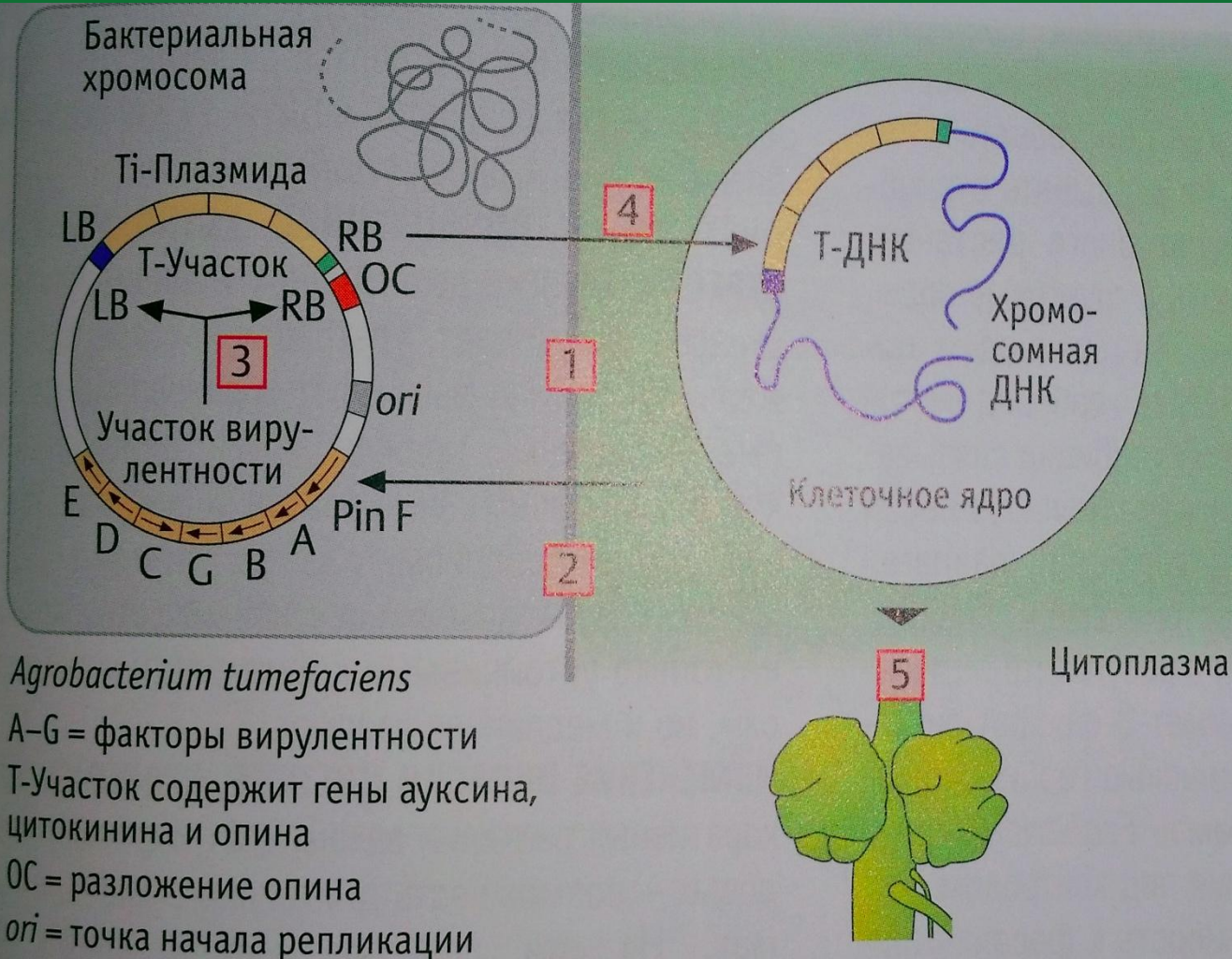


Опины – источники азота и энергии агробактерии





Агробактериальная трансформация



- 1 *A. tumefaciens* прикрепляется к поврежденной растительной клетке
- 2 Растительная клетка синтезирует хемотоксический сигнал и активирует область вирулентности
- 3 Область вирулентности Ti-плазмиды активирует T-участок
- 4 T-Участок встраивается в растительную хромосому в виде линейного одноцепочечного участка
- 5 Ауксины и цитокинины инициируют рост опухоли, опин является источником углерода для *A. tumefaciens*

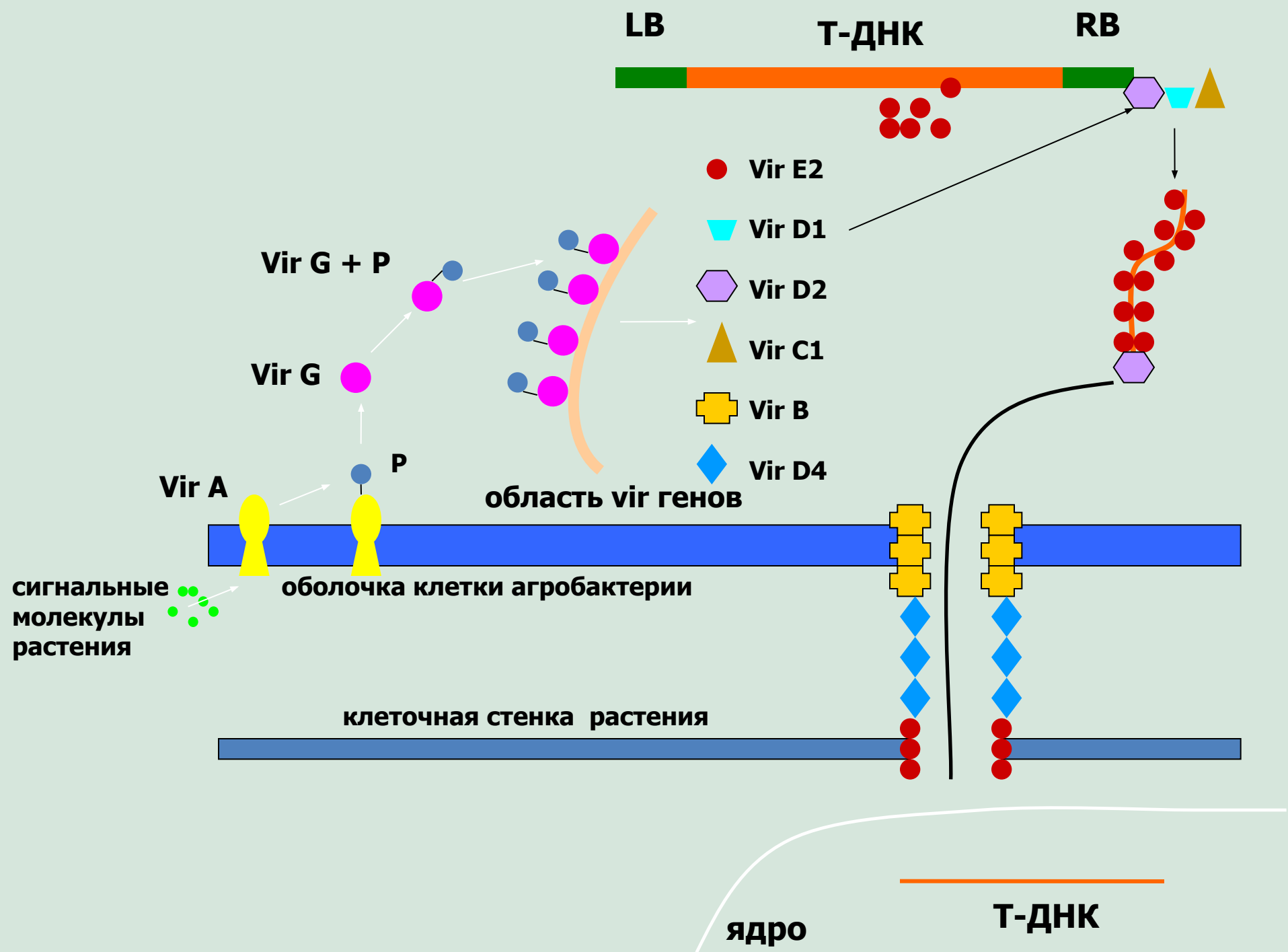
Agrobacterium tumefaciens

A-G = факторы вирулентности

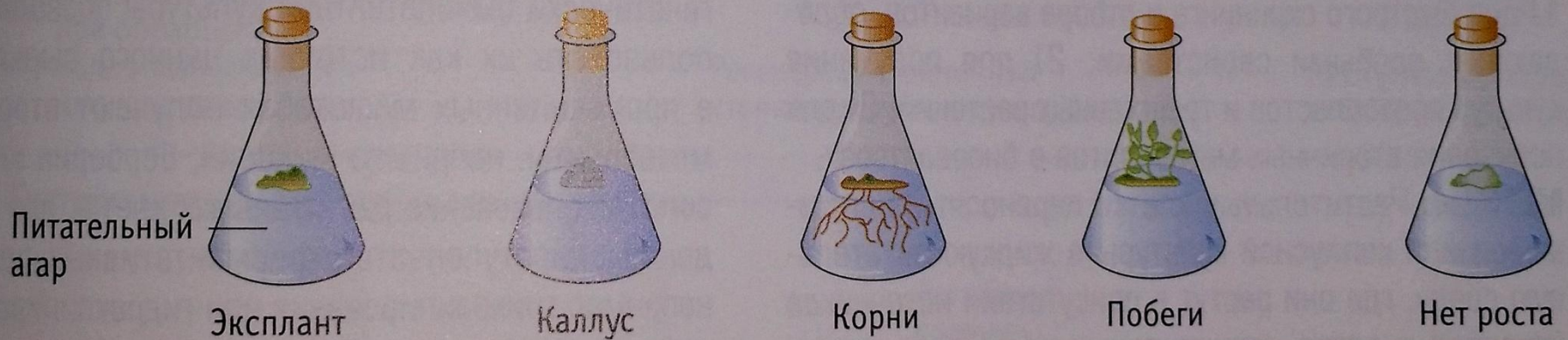
T-Участок содержит гены ауксина, цитокинина и опина

OC = разложение опина

ori = точка начала репликации



Влияние растительных гормонов на клетку



	Эксплант	Каллус	Корни	Побеги	Нет роста
Ауксин	–	3,00 мг/л	3,00 мг/л	0,03 мг/л	–
Цитокинин	–	0,2 мг/л	0,02 мг/л	1,00 мг/л	0,2 мг/л

	Составу	Функция*
Ауксин	3-Индолилуксусная кислота, (2,4-дихлорфенокси)уксусная кислота (синтетический ауксин) и другие	Индукцирует рост в длину, в больших концентрациях ингибирует образование корней и деление клеток
Цитокинины	Кинетин, 6-бензаминопурин Абсцизовая кислота Гибберелин и другие	Стимулирует образование каллуса Стимулирует дифференцировку Стимулирует деление клеток и рост в длину

Оценка устойчивости трансгенных линий сахарной свеклы к действию гербицида «Баста»

ТРАНСГЕННЫЕ ЛИНИИ

ТРАНСГЕННЫЕ ЛИНИИ

КОНТРОЛЬ



КОНТРОЛЬ



ТРАНСГЕННЫЕ
ЛИНИИ

ТРАНСГЕННЫЕ
ЛИНИИ

КОНТРОЛЬ

Получение трансгенного картофеля





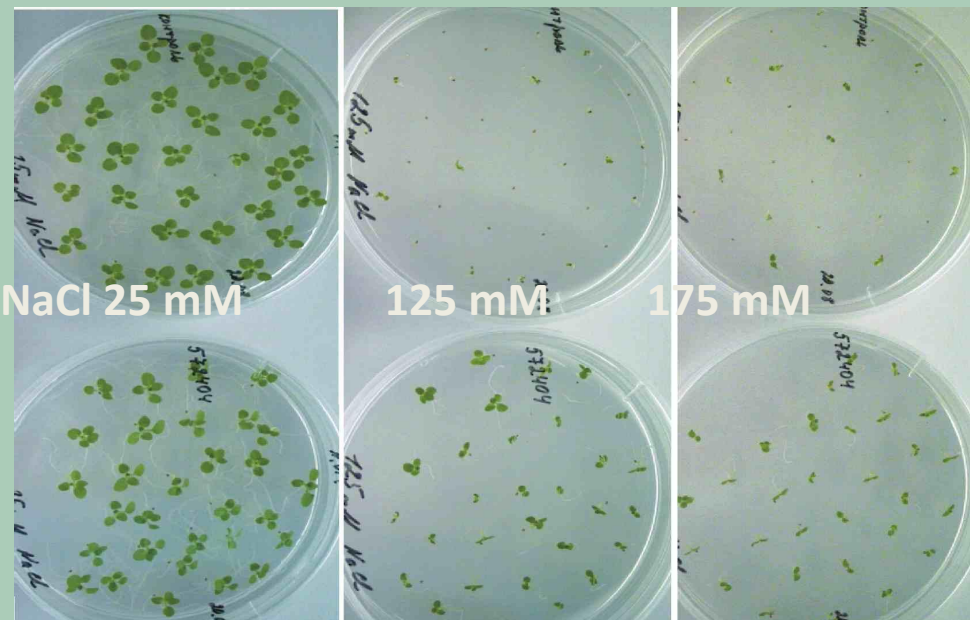
ГМ сорт
Невский

ГМ сорт
Луговской

Контрольные растения

Участок, зарегистрированный МВК ГИД, Краснодар, ВНИИБЗР

Растения табака, несущие ген *RPP* H⁺ пирофосфатазы *Rpodospirillum rubrum*, обуславливающий устойчивость к засолению



Контрольные растения

Прорастание семян при различной концентрации NaCl в среде



Трансгенные растения

Рост контрольных и трансгенных растений на различных концентрациях NaCl в среде



Контрольные растения, 150 mM NaCl

Трансгенные растения, 150 mM NaCl

РИС (*Oryza sativa*)

- Основной пищевой продукт, производимый в мире
- Низкое содержание витамина А и железа

“Золотой” рис с повышенным содержанием β -каротина



Получение лекарственных препаратов в растениях



«Съедобные» вакцины

