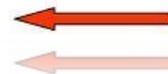


ФГБОУ ВО ДВГМУ МИНЗДРАВА РОССИИ

Палиндромы и рестриктазы.

*Выполнила: Ковалева Наталья,
студентка 1 курса группы № 103
педиатрического факультета*

*Проверил: Кожушнян Владимир Сергеевич,
преподаватель*



*г. Хабаровск
2018*

Определение палиндрома.

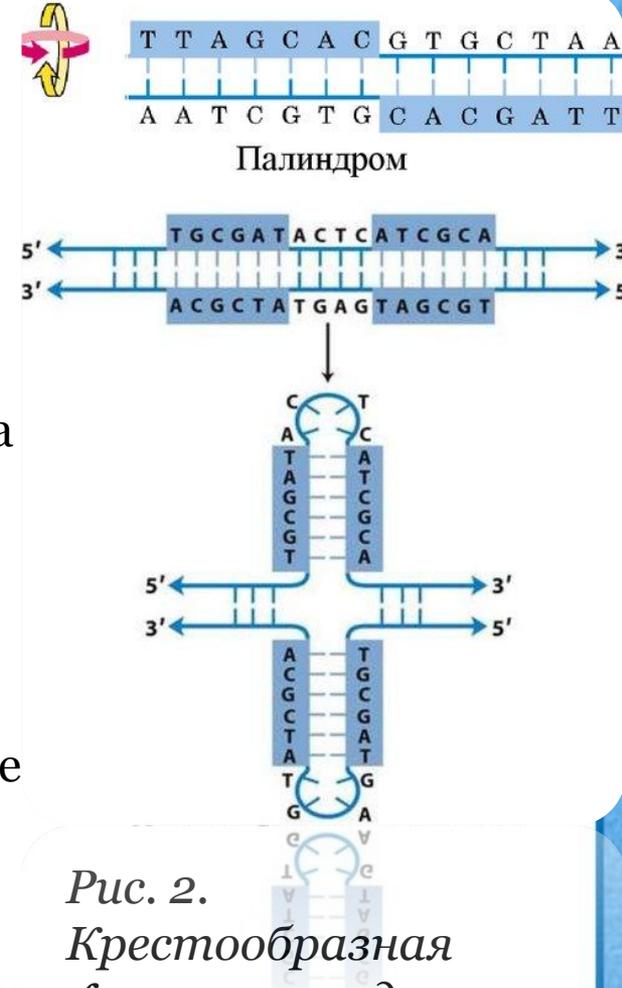
- ❖ **Палиндром** (palindrome): последовательность ДНК, состоящая из смежных инвертированных повторов, одинаково считывающихся и в левом направлении одной цепи, и в правом направлении другой цепи.
- ❖ **Палиндромные последовательности** — это последовательности оснований, которые одинаково читаются вперед и назад, как, например, последовательность букв радар.
- ❖ Поскольку цепи ДНК обладают антипараллельным направлением, то считают, что последовательность является палиндромной, если она идентична, когда читается в направлении от 5'- к 3'-концу на верхней и 3'- к 5'-концу на нижней цепи.

**5'-GAATTC-3',
комплементарная
цепь:
3'-CTTAAG-5'.**

Рис. 1. Палиндромная последовательность цепи ДНК.

Крестообразная форма палиндрома.

- ❖ В природных двунитевых ДНК часто встречаются палиндромные последовательности, обладающие осью симметрии второго порядка и способные образовывать симметричные крестообразные структуры.
- ❖ В этих крестообразных структурах точка скрещивания может смещаться за счет изменения размера шпильек.
- ❖ Палиндромные области могут быть *несовершенными*, и в этом случае в шпильках крестообразной структуры должны появляться некоплементарные пары оснований или вытолкнутые из спиральных областей основания.
- ❖ **Устойчивые крестообразные структуры** в палиндромных областях **возникают лишь в кольцевых ДНК.**



Линейная форма палиндрома.

- ❖ **В линейной ДНК крестообразная структура палиндромных областей** является термодинамически невыгодной по сравнению с регулярной двунитевой формой и может **наблюдаться в некоторых случаях лишь как метастабильное состояние.**

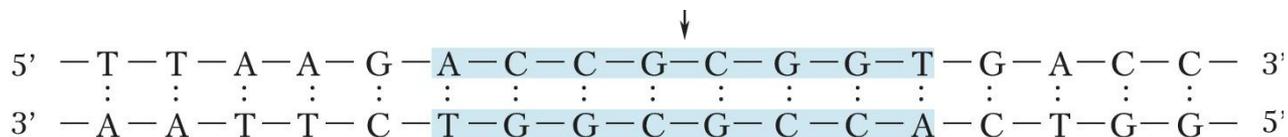


Рис. 3. Линейная форма палиндрома ДНК.

Открытие крестообразных структур в природных кольцевых ДНК.

- ❖ **Образование крестообразных структур** в природных кольцевых ДНК было открыто в 1980 г. Д.Лилли и почти одновременно Р.Уэллсом в 1981 году.
- ❖ Лилли установил, что крестообразные структуры образовывались с разной степенью эффективности в трех различных палиндромах.
- ❖ Размеры всех палиндромных областей, в которых были зарегистрированы крестообразные структуры, оказались довольно близки. Они отвечали образованию 9 - 13 пар оснований в спиральных областях каждой из спилек креста, а петли спилек состояли из 3- 5 оснований.
- ❖ Аналогичные результаты тем же методом нуклеазного зондирования были получены и в лаборатории Уэллса.

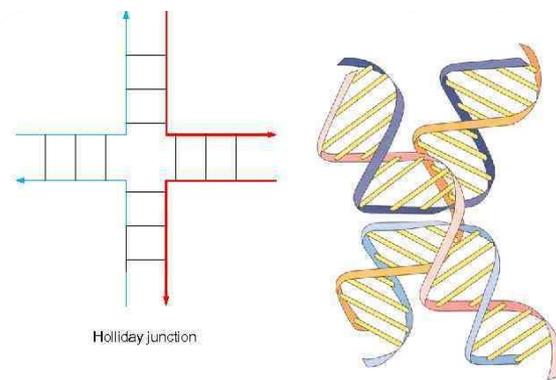


Рис. 4.
Крестообразные структуры в кольцевых ДНК.

Эндонуклеазы как часть системы рестрикции-модификации.

- ❖ В ходе эволюции бактерии развили способность синтезировать так называемые рестрицирующие ферменты (эндонуклеазы), которые стали частью клеточной (бактериальной) системы рестрикции-модификации.
- ❖ У бактерий системы рестрикции-модификации являются внутриклеточной иммунной системой защиты от чужеродной ДНК.

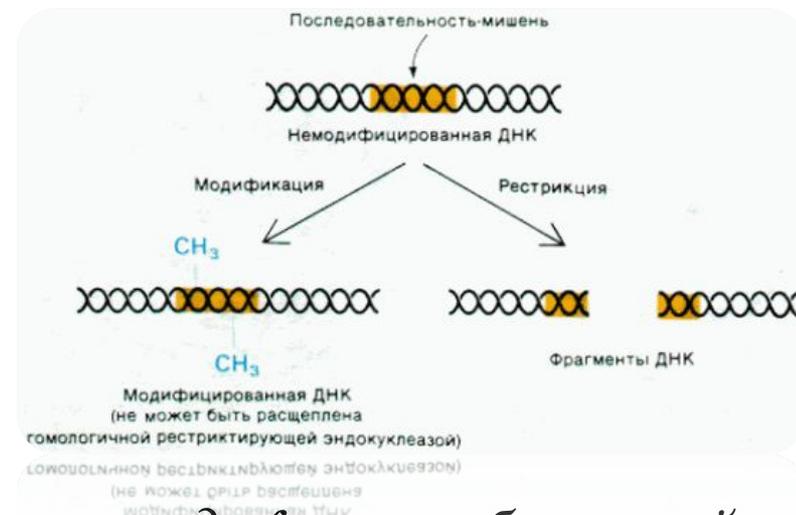


Рис. 5. Система рестрикции-модификации бактерий.

Способ защиты бактериальных клеток от чужеродных ДНК.

- ❖ С целью защиты бактерии в ходе эволюции развили также способность «метить» собственную ДНК метилирующими основаниями на определенных последовательностях.
- ❖ По этой причине чужеродная ДНК из-за отсутствия в ней метилирующих групп на тех же последовательностях плавится (разрезается) на фрагменты разными бактериальными рестриктазами, а затем деградируется бактериальными экзонуклеазами до нуклеотидов.
- ❖ Таким образом бактерии защищают себя от ДНК растений и животных, в организме которых они обитают временно (как патогены) или постоянно (как сапрофиты).

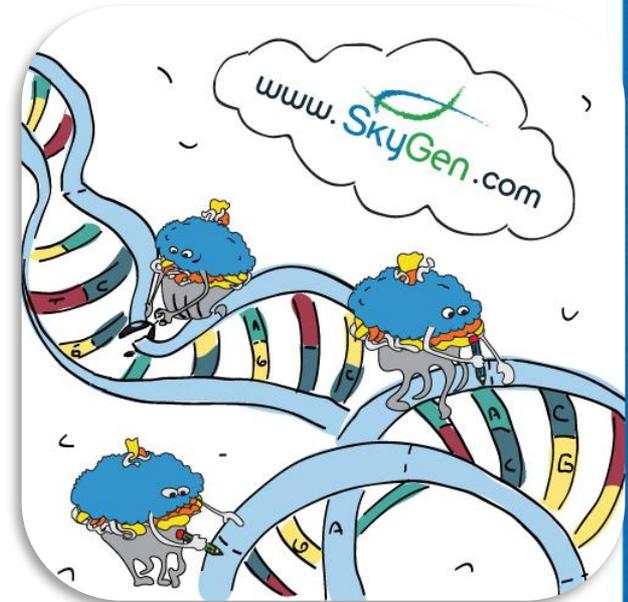


Рис. 6. Фрагментация чужеродной ДНК бактериальными рестриктазами.

Эндонуклеазы, осуществляющие рестрикцию молекул ДНК.

❖ Рестриктазы впервые были выделены из *E. coli* в 1968 г. Оказалось, что они способны разрезать (плавить) молекулы ДНК на разных сайтах (местах) рестрикции. Эти ферменты получили название **эндонуклеаз класса I**.

❖ Затем у бактерий были обнаружены **эндонуклеазы класса II**, которые распознают в чужеродной ДНК сайты рестрикции специфически и на этих сайтах тоже осуществляют рестрикцию. *Именно ферменты этого класса стали использовать в генной инженерии.*

❖ Учеными также были открыты и **ферменты класса III**, которые плавят ДНК рядом с сайтами распознавания, но эти ферменты не имеют значения в генной инженерии.

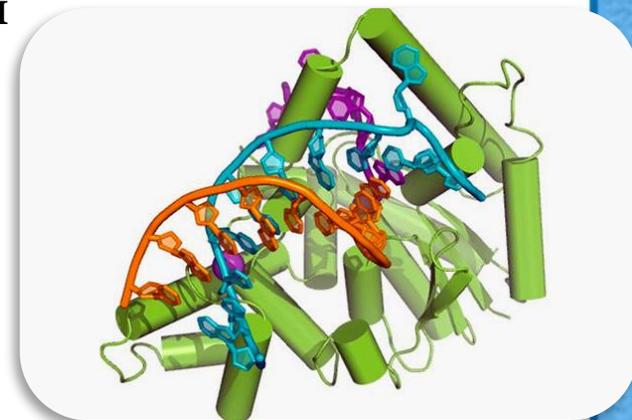


Рис. 7.
Эндонуклеазы,
осуществляющие
рестрикцию.

Палиндромы как сайты рестрикции ДНК.

- ❖ Действие системы рестрикции-модификации «рационализуется» так называемыми **палиндромными** (распознающими последовательностями) азотистых оснований, которые **являются сайтами рестрикции ДНК.**
- ❖ Палиндромы могут быть любых размеров, но **большинство тех палиндромов**, которые используют в качестве сайтов узнавания рестриктазами, состоят из 4, 5, 6 и реже 8 оснований.

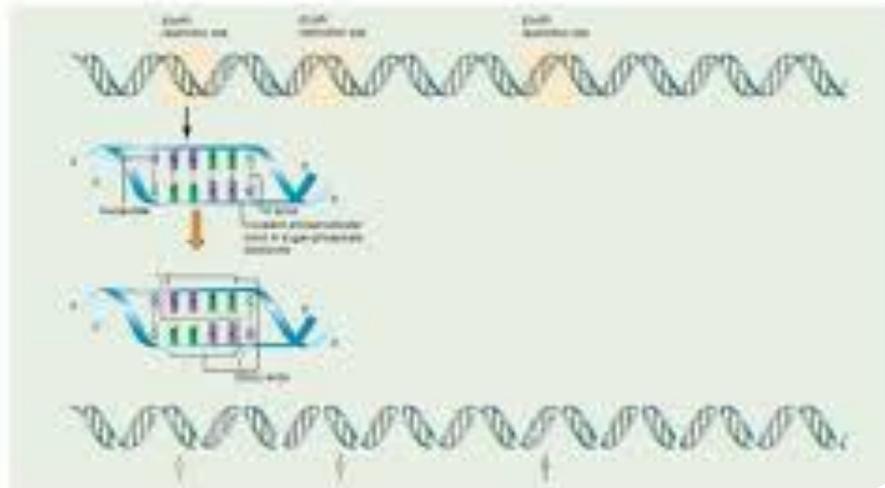


Рис. 8. Палиндромы, узнаваемые рестриктазами.

Характерные особенности рестриктаз.

- ❖ **Рестриктазы** — это абсолютно необходимый инструмент в генной инженерии для вырезания интересующих фрагментов (генов) из больших молекул ДНК.
- ❖ Поскольку известно более 100 ферментов рестрикции, то это позволяет сделать выбор рестриктаз и селективное вырезание фрагментов из исходной ДНК.
- ❖ Замечательной особенностью рестриктаз является то, что они продуцируют разрезы молекул на несколько фрагментов (рестриктов) ДНК уступами, в результате чего в образующихся концах одна цепь длиннее другой, образуя своеобразный хвост.
- ❖ Такие концы (хвосты) получили название **«липких» концов**, т. к. они способны к самокомплементарности.

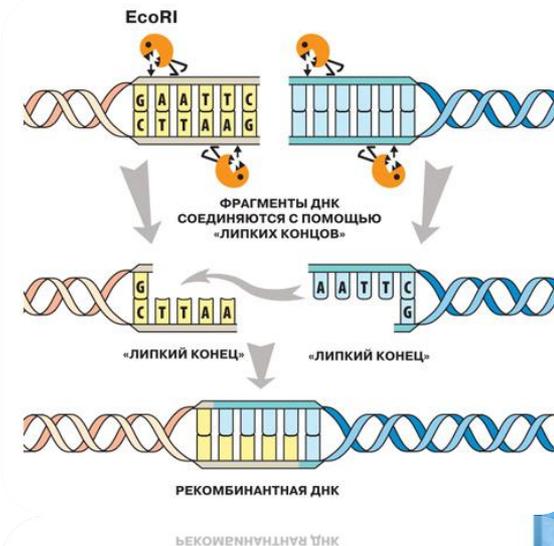


Рис. 9.
«Липкие концы».

Результаты рестрикции.

- ❖ Так, известная рестриктаза – фермент из системы рестрикция–модификация *E. coli* вместо того, чтобы плавить ДНК в центре палиндромной последовательности узнавания, плавит ДНК за пределами центра и продуцирует 4 самокомплементарных («липких») конца, состоящих из разного количества нуклеотидов, а именно:

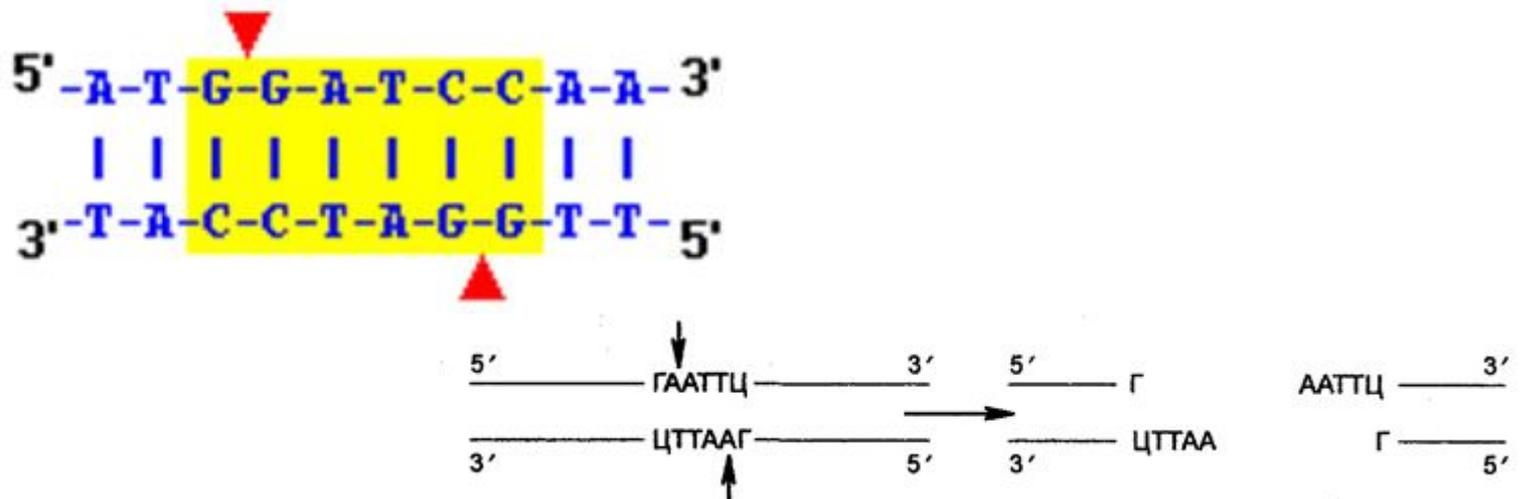


Рис. 10. Плавка ДНК рестриктазами за пределами центра.

Достижение эффективности смыкания ДНК-фрагментов.

- ❖ «Липкие» концы в генно-инженерных опытах полезны по той причине, что они могут быть воссоединены комплементарно при низких температурах, что позволяет эффективное смыкание ДНК-фрагментов.

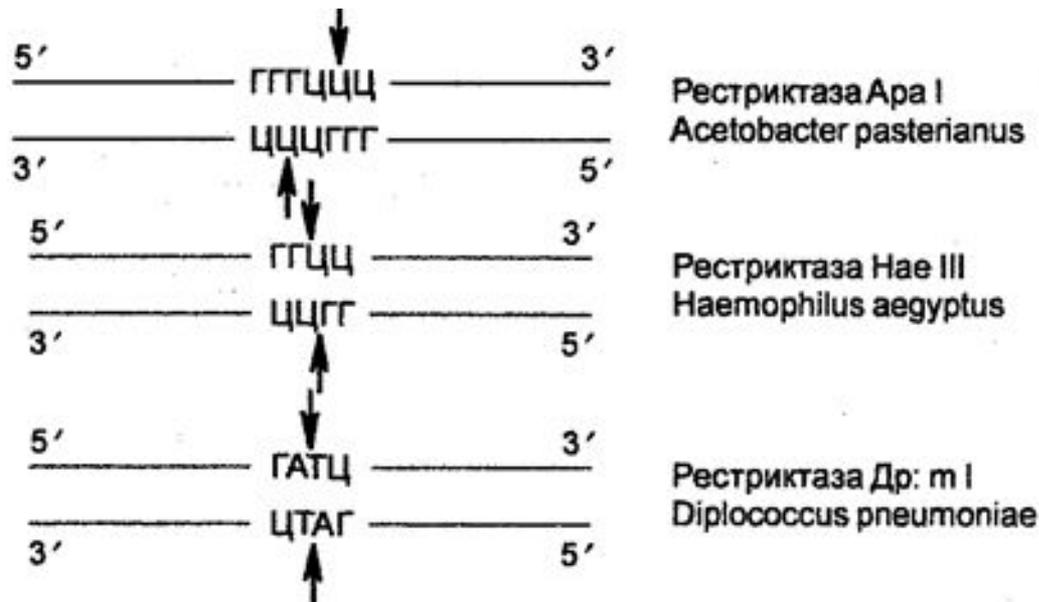


Рис. 11.

Комплементарное воссоединение «липких» концов.

Электрофорез как метод фракционирования рестрицированной ДНК.

- Сайты распознавания и сайты плавления в случае других рестриктаз имеют другое содержание.
- Так, вслед за рестрикцией ДНК из рестрикционной смеси выделяют рестрикционные ДНК-фрагменты (ДНК-рестрикты), которые необходимы затем для объединения с вектором.
- Для выделения ДНК-рестриктов прибегают к электрофорезу, поскольку с помощью этого метода рестрицированную ДНК очень легко фракционировать благодаря размерам фрагментов-рестриктов и благодаря константным отношениям электрический заряд-масса.



Рис. 12.
Электрофорез.

Механизм проведения электрофореза.

- ❖ Фрагменты в электрическом поле мигрируют в ходе электрофореза при частоте, зависящей от их размеров (массы). Чем больше (длиннее) фрагмент, тем медленнее он мигрирует в электрическом поле.
- ❖ Материалом, в котором проводят электрофорез, являются незаряжающиеся агароза и полиакриламид.
- ❖ Для опознавания фрагментов используют этидий бромид, который красит фрагменты, что ведет к их более легкому обнаружению.
- ❖ Результативность электрофореза очень высока, поскольку с его помощью могут быть разделены фрагменты, размеры которых составляют от 2 до 50 000 оснований.



Рис. 13.
Электрофорез.

Построение рестрикционных карт.

- ❖ После электрофореза фрагменты из агарозы выделяют с помощью разных методов.
- ❖ На основании результатов сравнения размеров рестриктов одной и той же ДНК, полученных с помощью разных рестриктаз, строят рестрикционные карты, на которых показывают сайты рестрикции каждой из использованных рестриктаз.
- ❖ В практическом плане рестрикционные карты позволяют определять не только размеры рестриктов, но и выяснять расположение в молекулах ДНК локусов тех или иных генов.

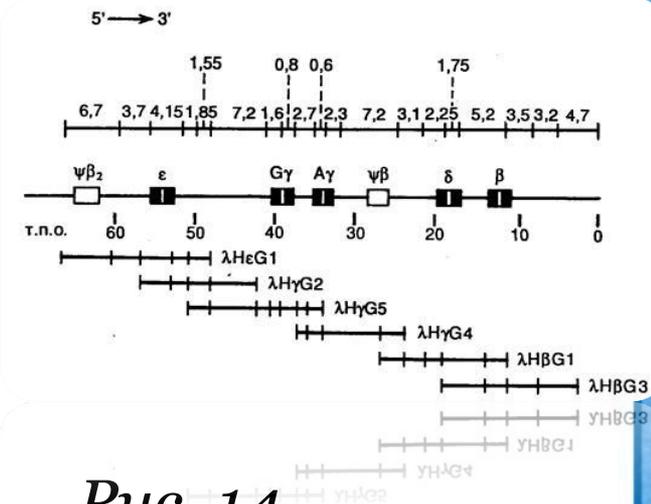


Рис. 14.
Рестрикционные карты.

Методы секвенирования.

- ❖ Выделенные после электрофореза из агарозных гелей фрагменты ДНК (рестрикты) можно предварительно подвергнуть секвенированию, т. е. определить в них нуклеотидную последовательность.
- ❖ Для этого используют **химический и ферментативный методы секвенирования**.
- ❖ **Химический метод** основан на получении меченных радиоактивным фосфором (^{32}P) фрагментов и удалении из этих фрагментов одного из оснований с последующим учетом результатов радиоавтографии гелей, содержащих эти фрагменты.
- ❖ **Ферментативный метод** основан на том, что в конец анализируемого фрагмента вводят нуклеотид, используемый затем в синтезе разных фрагментов *in vitro*, анализируемых на нуклеотидную последовательность электрофоретически.
- ❖ Для изучения специфических последовательностей нуклеотидов в молекуле ДНК используют также **гибридизацию** ДНК-ДНК, РНК-РНК, ДНК-РНК.

Использование комплементарной ДНК в процессах рестрикции у высших организмов.

❖ Поскольку у высших организмов в ходе транскрипции синтезируется гетерогенная ДНК, корректируемая процессингом, то в генной инженерии обычно используют **комплементарную ДНК (кДНК)**, которую получают при использовании в качестве матрицы мРНК, на которой обратная транскриптаза синтезирует одноцепочечную ДНК (кДНК), являющуюся копией мРНК.

❖ В последующем эти одноцепочечные ДНК превращают в двухцепочечные ДНК.

❖ Считают, что кДНК содержит непрерывные нуклеотидные последовательности (транскрибируемые и транслируемые).

❖ Именно кДНК используют для рестрикции.

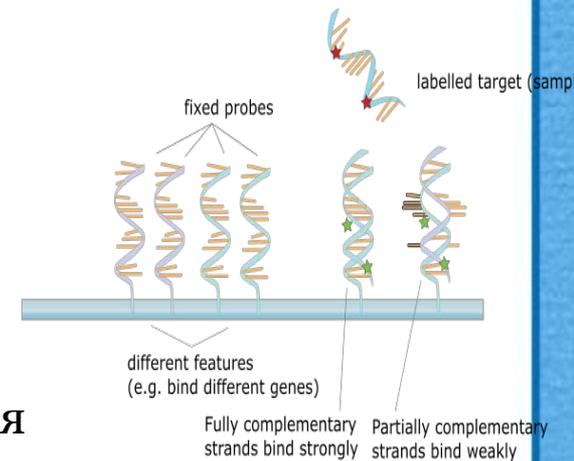


Рис. 15.
Комплементарная ДНК.

Список литературы.

- ❖ [А.С. Коничев, Г.А. Севастьянова. Молекулярная биология, Москва, издательский центр «Академия», 2012 г., 395 стр.](#)
- ❖ http://medbiol.ru/medbiol/slov_sverd/00026ed3.htm
Палиндромная последовательность.
- ❖ http://medbiol.ru/medbiol/slov_sverd/00026ed3.htm
Палиндром. Справочник химика.
- ❖ <https://studopedia.info/1-70801.html>
Ферменты - рестриктазы и рестрикция ДНК.
- ❖ http://www.biotechnolog.ru/ge/ge3_3.htm
- ❖ Механизм действия рестриктаз, системы метилирования ДНК.

Спасибо за внимание.

