

Анализ нуклеиновых кислот

Занятие 1

Молекулярное клонирование

Этапы

- Вырезание интересующего участка ДНК с помощью *эндонуклеаз рестрикции (рестриктаз)*
- Встраивание его в *вектор* с помощью *ДНК-лигаз*
- Введение *рекомбинантной* ДНК в клетку
- Отбор клеток, содержащих рекомбинантную ДНК

Молекулярное клонирование

Эндонуклеазы рестрикции

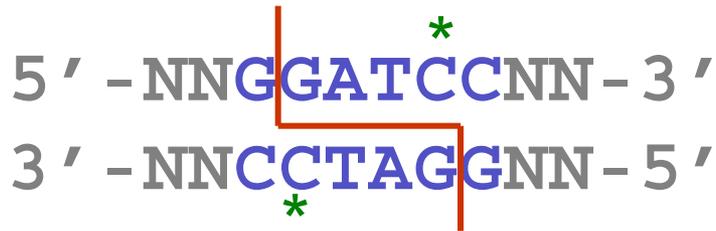
Разделяют на 3 типа:

- I
 - 3 субъединицы: R, M, S – до 700 кДа
 - требуют АТФ, SAM, Mg^{2+}
 - разрезают на значительном и случайном расстоянии от сайта узнавания
- II
 - гомодимеры $\approx 2 \times 30$ кДа
 - требуют только Mg^{2+}
 - разрезают в пределах сайта узнавания в строго определенном месте
- III
 - по строению напоминает I тип
 - требуют АТФ, Mg^{2+}
 - разрезают на расстоянии $\approx 24-27$ нуклеотидов от сайта узнавания

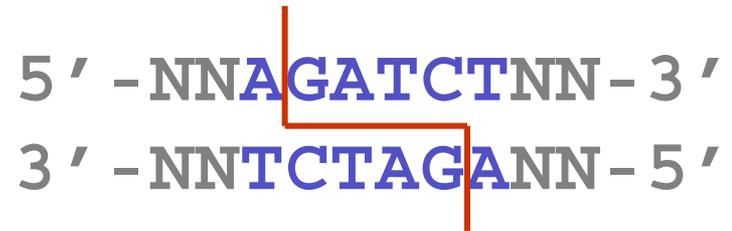
Молекулярное клонирование

Эндонуклеазы рестрикции

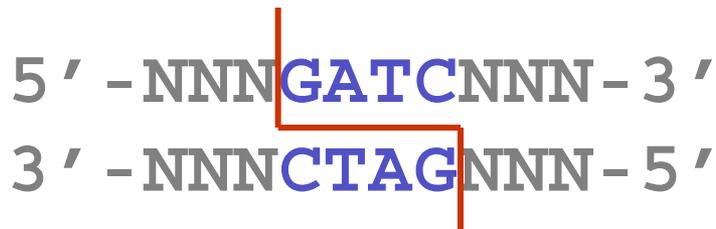
*Bam*H I



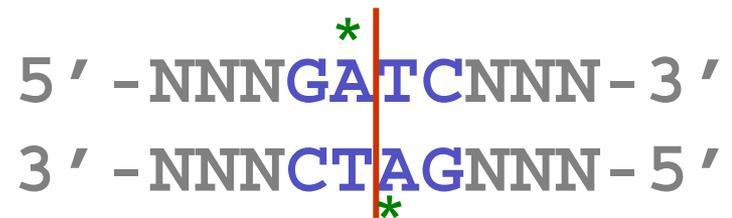
Bgl II



Mbo I



Dpn I



Молекулярное клонирование

Эндонуклеазы рестрикции

Изошизомеры – рестриктазы, узнающие одинаковые сайты.

GATC

Mbo I – **A** не метилирован

Dpn I – **A** метилирован

Sau IIIa – наличие метилирования **A** безразлично

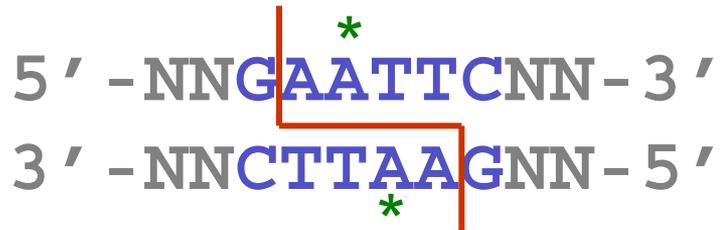
Гетерошизомеры – изошизомеры, разрезающие по-разному.

Пример: *Mbo* I и *Dpn* I

Молекулярное клонирование

Эндонуклеазы рестрикции

EcoR I



pH 7.3, NaCl, MgCl₂

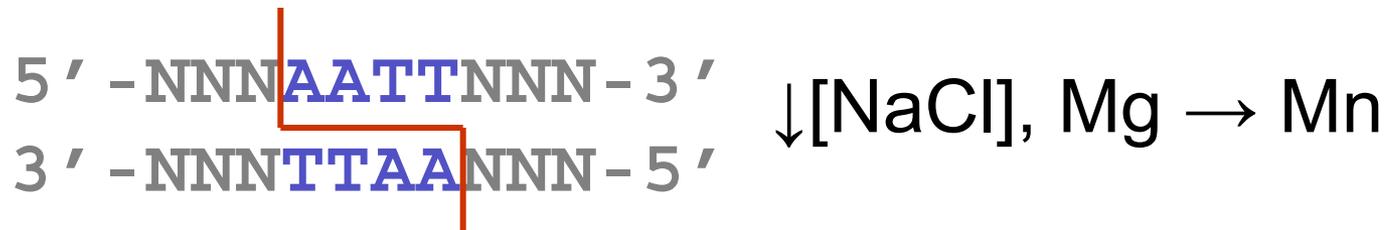
Молекулярное клонирование

Эндонуклеазы рестрикции

EcoR I



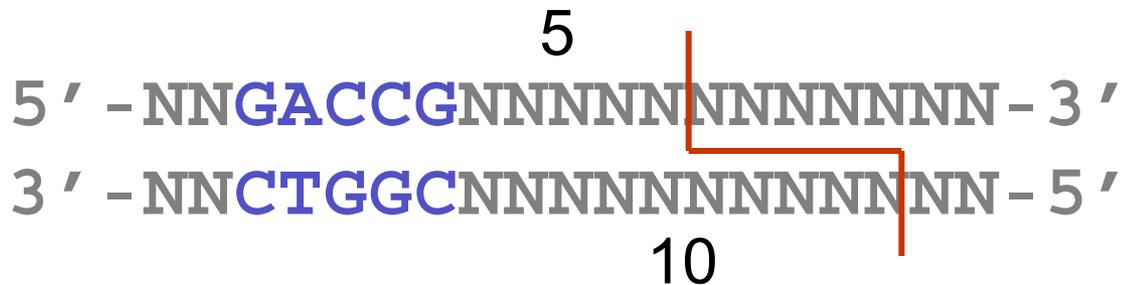
Вторичная («штриховая») активность:



Молекулярное клонирование

Эндонуклеазы рестрикции

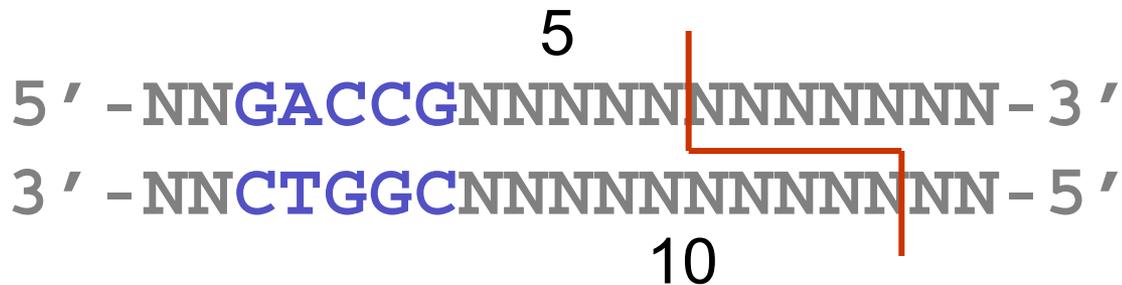
*Hga*I (подтип IIS)



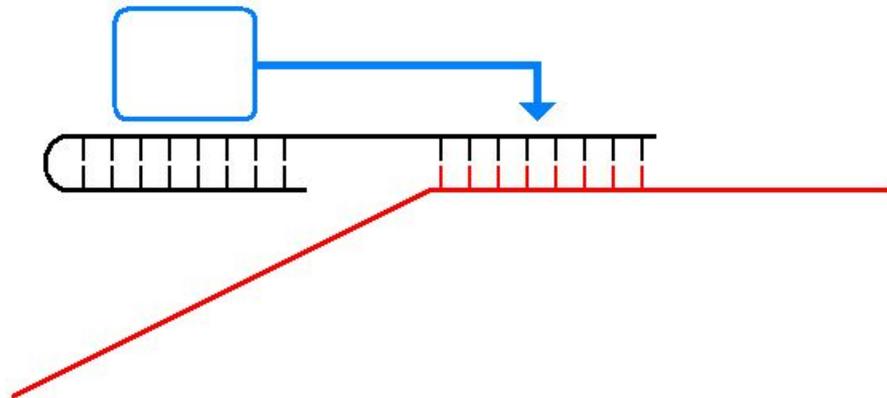
Молекулярное клонирование

Эндонуклеазы рестрикции

HgaI (подтип IIS)



Разрезание 1-цепочечной ДНК в нужном месте



Молекулярное клонирование

ДНК-лигазы

- Наиболее распространенная – из фага Т4
- Соединяет 5'-фосфат и 3'-ОН
- Требуется АТФ, Mg^{2+}
- Лигирует липкие и тупые концы

Молекулярное клонирование

Методы получения рекомбинантных ДНК

- Коннекторный
- Рестриктазно-лигазный
- С помощью линкеров

Молекулярное клонирование

Векторы

В качестве векторов используются

- плазмиды
- хромосомы вирусов
- фрагменты эукариотических хромосом

Молекулярное клонирование

Векторы

Необходимые свойства векторной молекулы

- Возможность встраивания чужеродной ДНК
- Способность размножаться в клетках хозяина и передаваться в следующие поколения
- Наличие селективируемых маркеров

Желательно для вектора на основе плазмиды:

- Ослабленный контроль репликации

Молекулярное клонирование

Введение рекомбинантной ДНК в клетку –
трансформация

Методы:

- Биологические
 - вирусы
 - клеточные рецепторы
- Физические
 - электропорация
 - лазер
- Химические
 - ионы металлов (Ca^{2+} , Rb^{2+})
 - диэтиламиноэтил-декстран
 - липосомы
- Механические
 - микроинъекция
 - бомбардировка

Молекулярное клонирование

Отбор клеток, содержащих рекомбинантную ДНК

- Гены устойчивости к антибиотикам
- Гены ферментов

Молекулярное клонирование

Отбор клеток, содержащих рекомбинантную ДНК

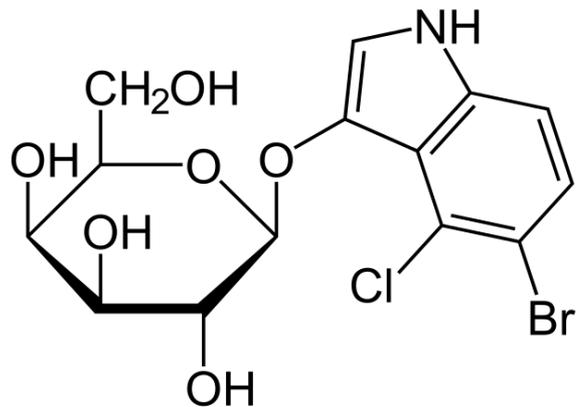
Маркер на основе гена *LacZ* из лактозного оперона

β - галактозидаза

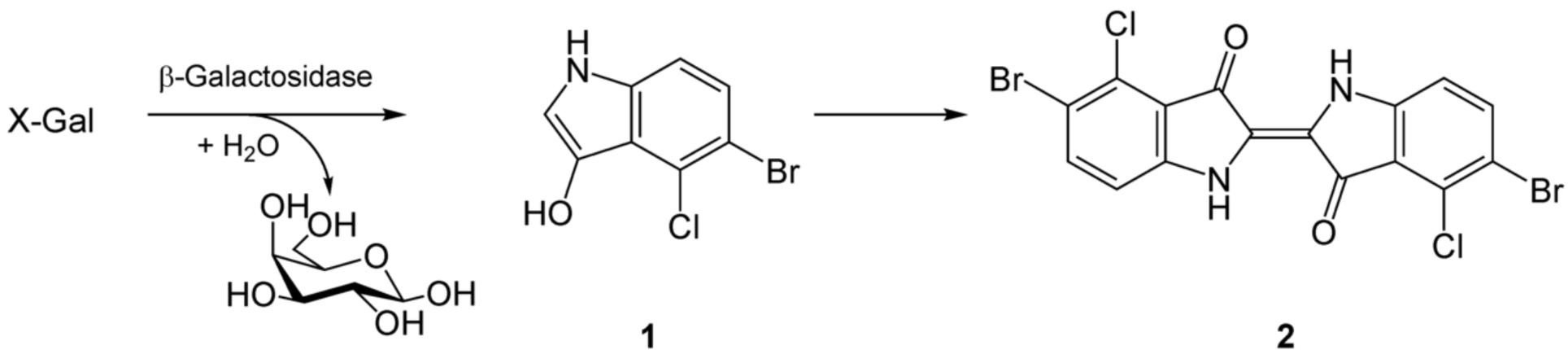
	В природе	В эксперименте
Индуктор	лактоза	<i>IPTG</i> (изопропил-тиогалактозид)
Реакция	лактоза → глюкоза + галактоза	<i>X-gal</i> → окрашенный продукт

Молекулярное клонирование

Отбор клеток, содержащих рекомбинантную ДНК



X-gal (5-бром-4-хлор-3-индоил- β -D-галактопиранозид)



Молекулярное клонирование

Отбор клеток, содержащих рекомбинантную ДНК

Маркер на основе гена *LacZ* из лактозного оперона

В плазмидном векторе:

LacZ' – 5'-концевой участок *LacZ* → α -донор

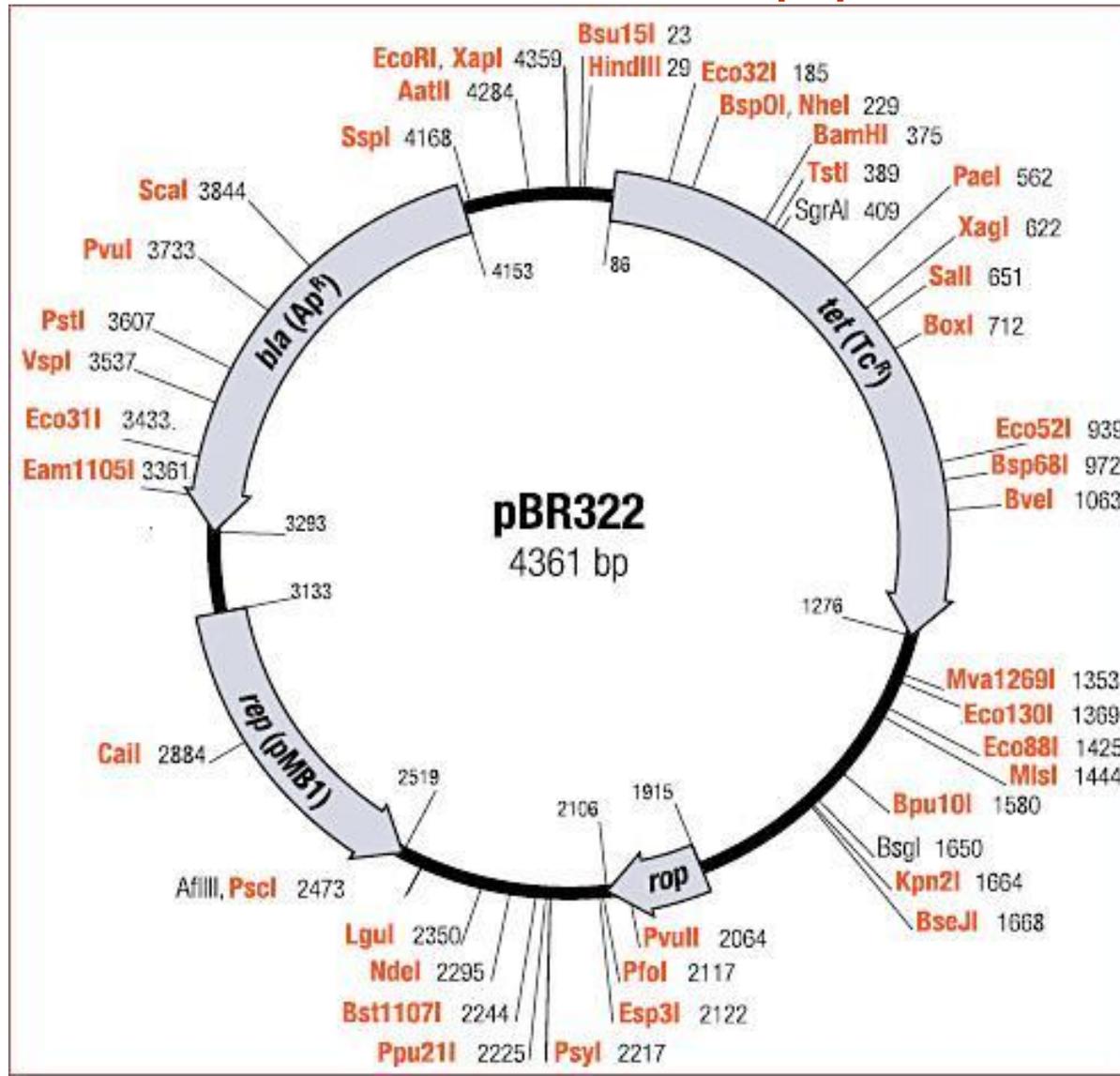
В клетке:

мутация в 5'-концевой области *LacZ* → α -акцептор

Взаимная комплементация

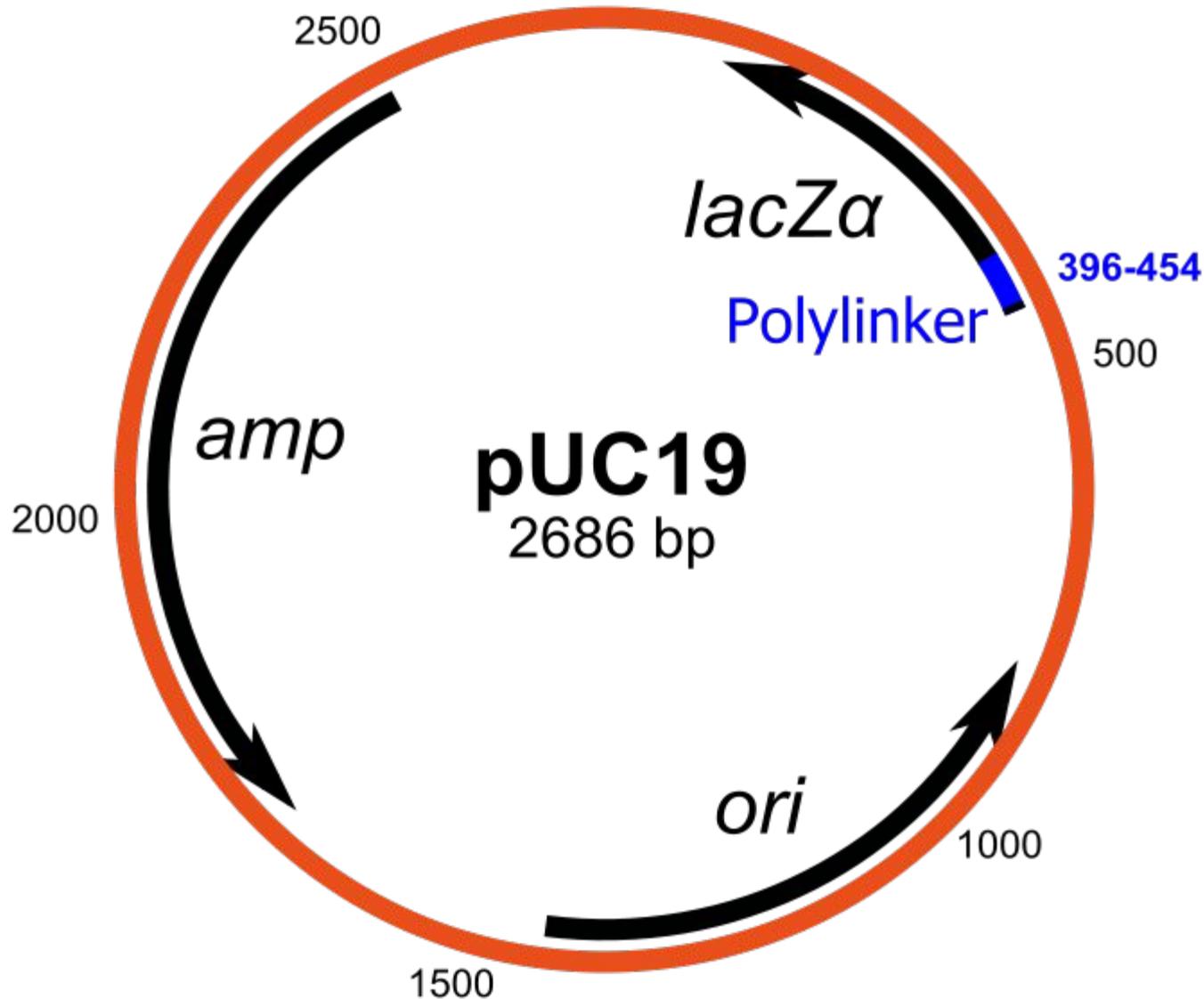
Молекулярное клонирование

Плазмидный вектор pBR322



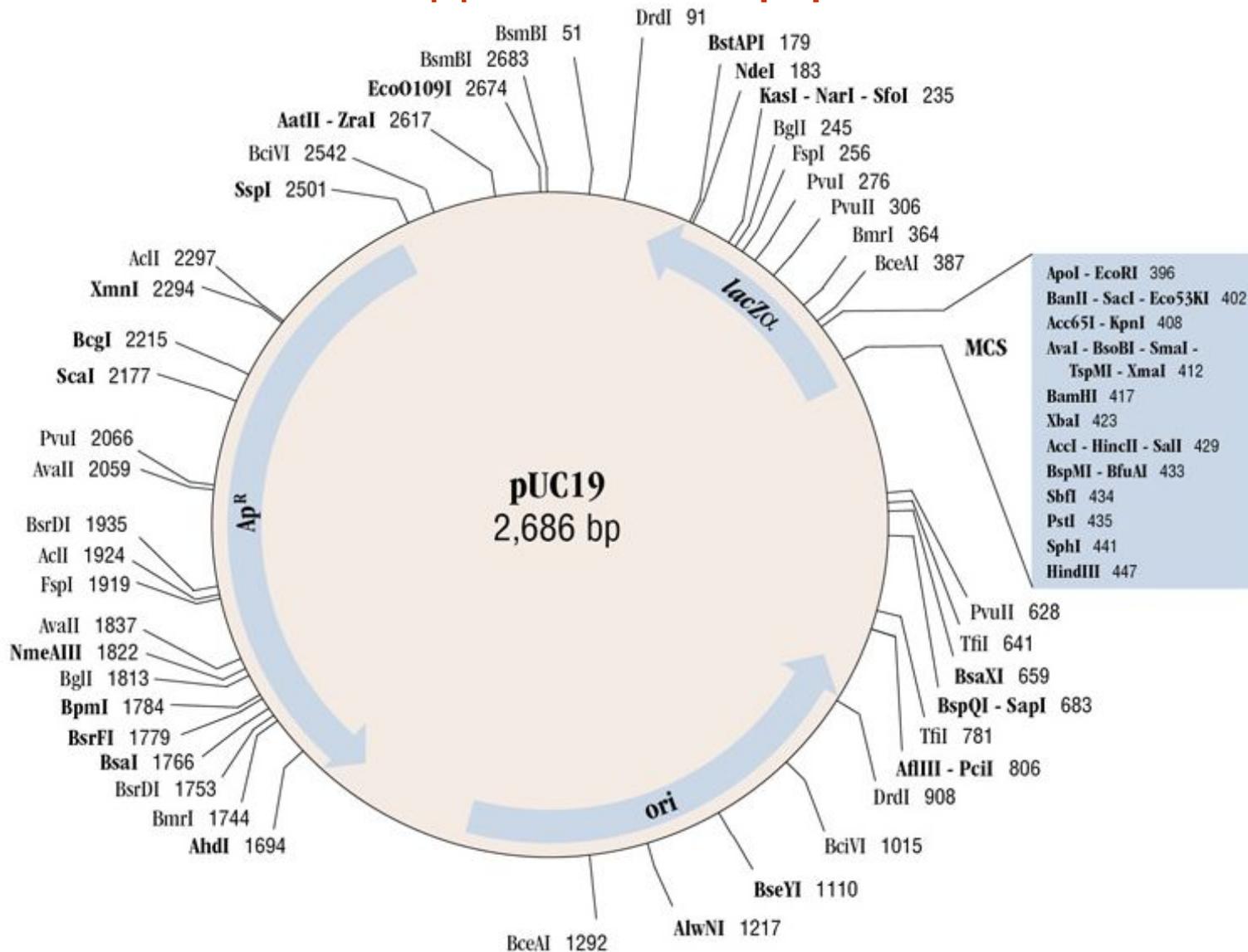
Молекулярное клонирование

Плазмидный вектор pUC19



Молекулярное клонирование

Плазмидный вектор pUC19

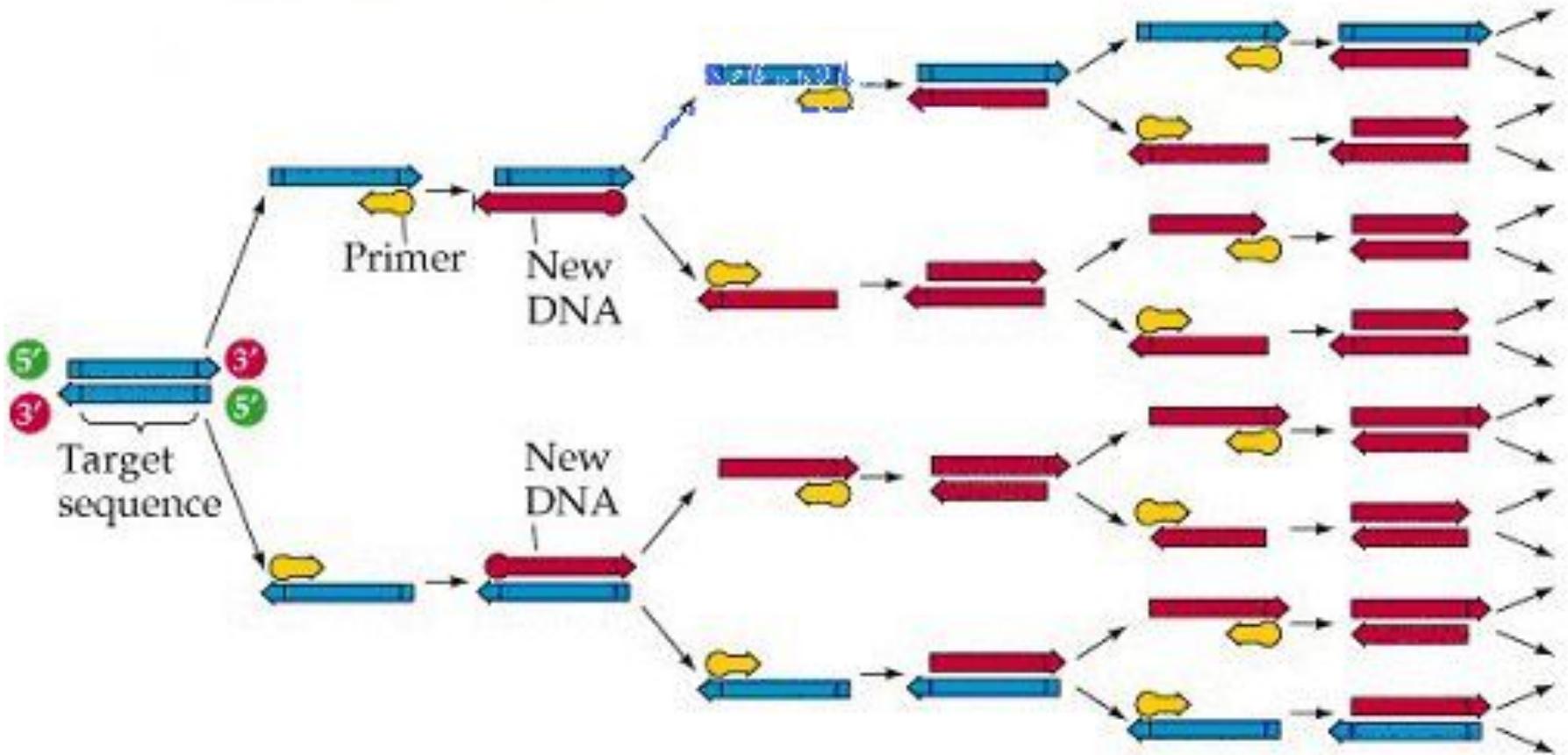


Молекулярное клонирование

Плазмидный вектор pUC19



Полимеразная цепная реакция



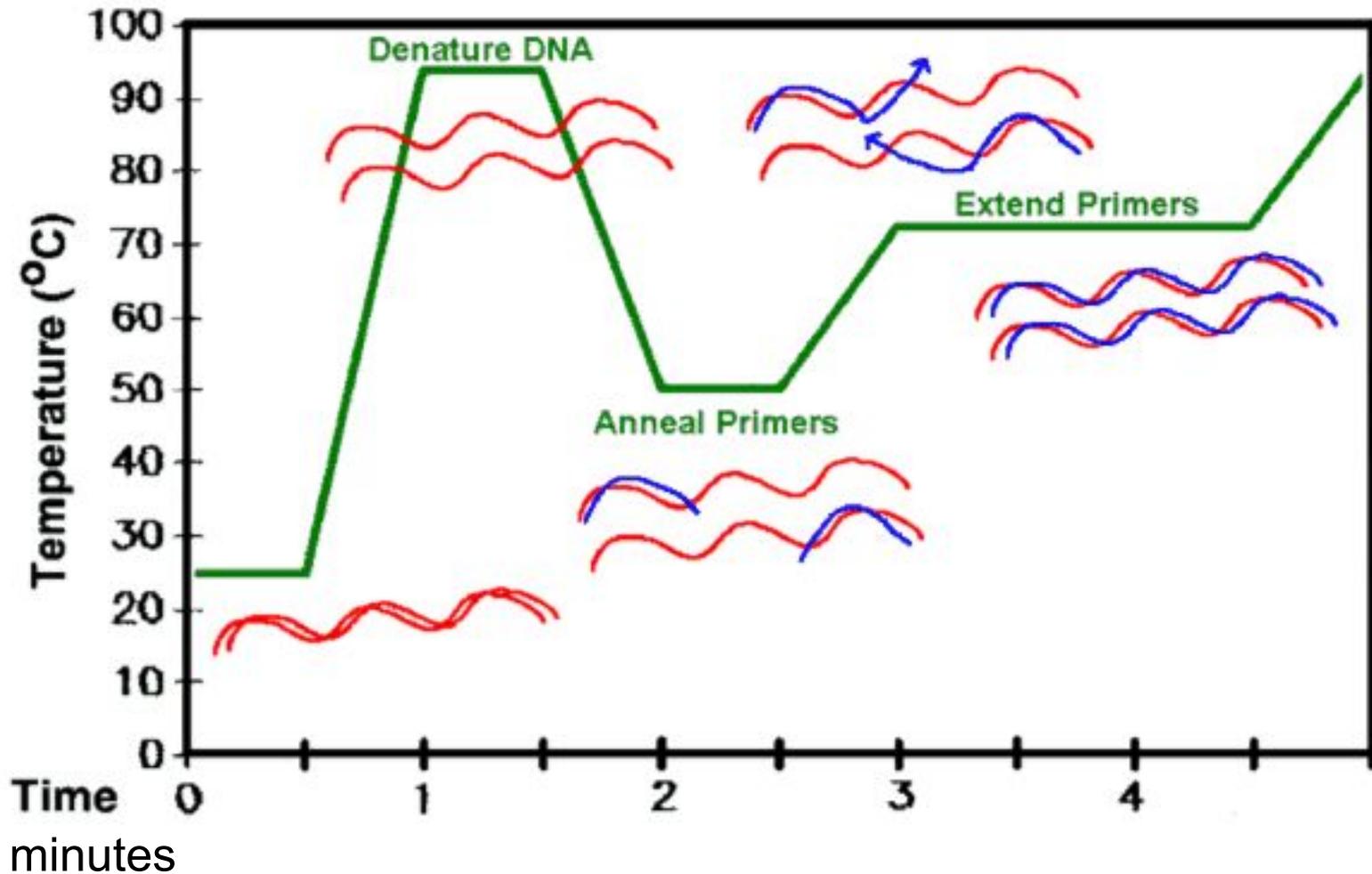
Полимеразная цепная реакция

.

Компоненты:

- ДНК-матрица
- Два праймера, комплементарные концам интересующего фрагмента
- Термостабильная ДНК-полимераза
- Дезоксирибонуклеотидтрифосфаты
- Буферный раствор

Полимеразная цепная реакция



Выделение плазмидной ДНК

Метод щелочного лизиса Бирнбойма–Доли

- Лизоцим → разрушение клеточной стенки
- SDS → разрушение мембраны
- pH 12 → денатурация хромосомной ДНК
- pH 5 → ренатурация плазмидной ДНК
- центрифугирование

Определение концентрации НК

Фотометрическая абсорбция

- максимум поглощения при 260 нм