

# 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

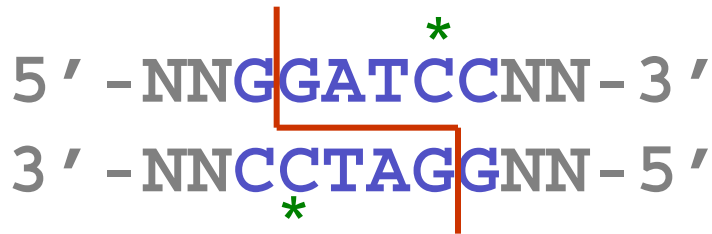
Разделяют на 3 типа:

- 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

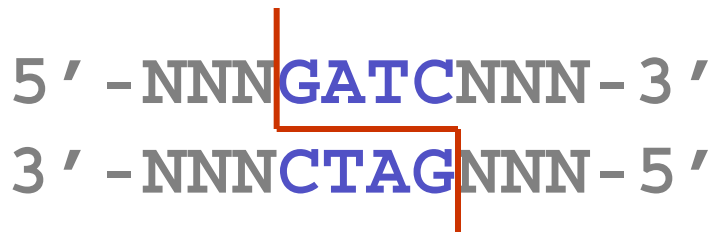
*Bam*H I



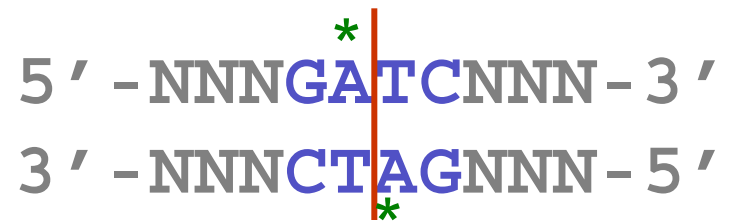
*Bgl* II



*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

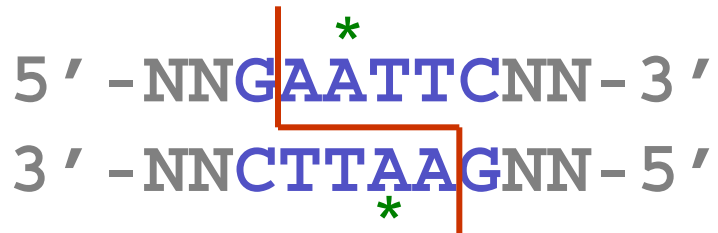
*Гетерошизомеры* – изошизомеры, разрезающие по-разному.

Пример: *Mbo* I и *Dpn* I

# Молекулярное клонирование

## Эндонуклеазы рестрикции

*EcoR* I

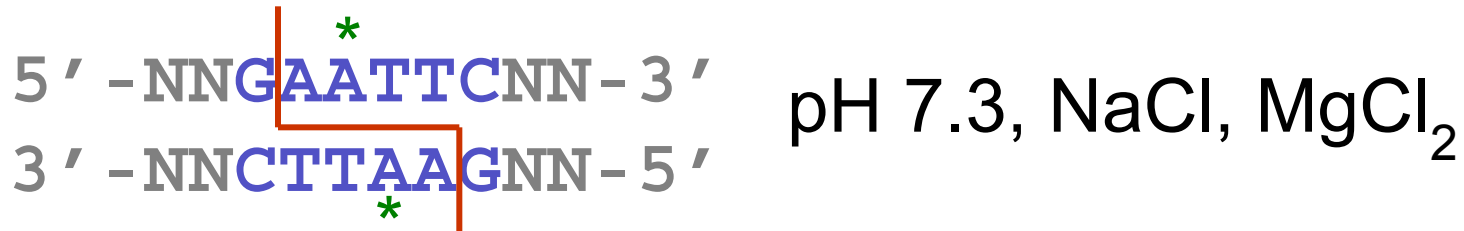


pH 7.3, NaCl, MgCl<sub>2</sub>

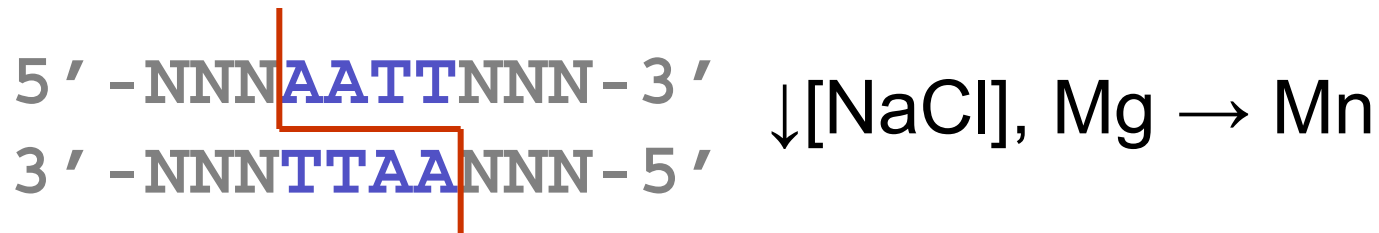
# Молекулярное клонирование

## Эндонуклеазы рестрикции

*EcoR* I



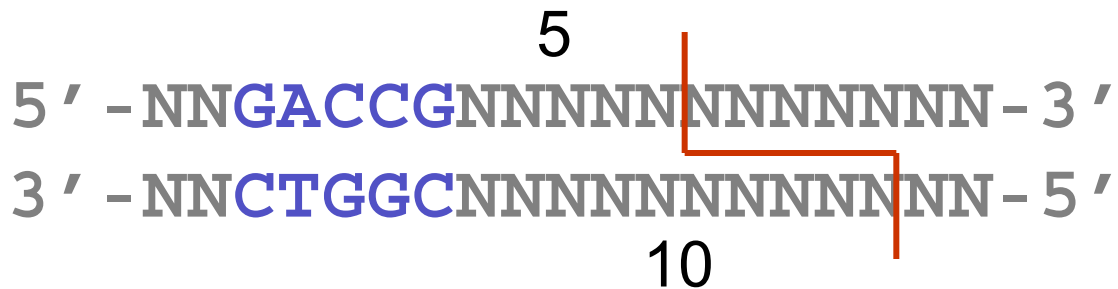
*Вторичная* («штриховая») активность:



# Молекулярное клонирование

## Эндонуклеазы рестрикции

*Hga*I (подтип IIS)

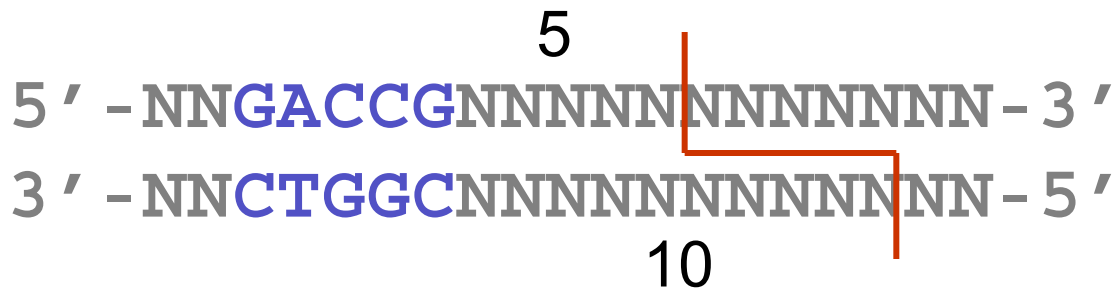




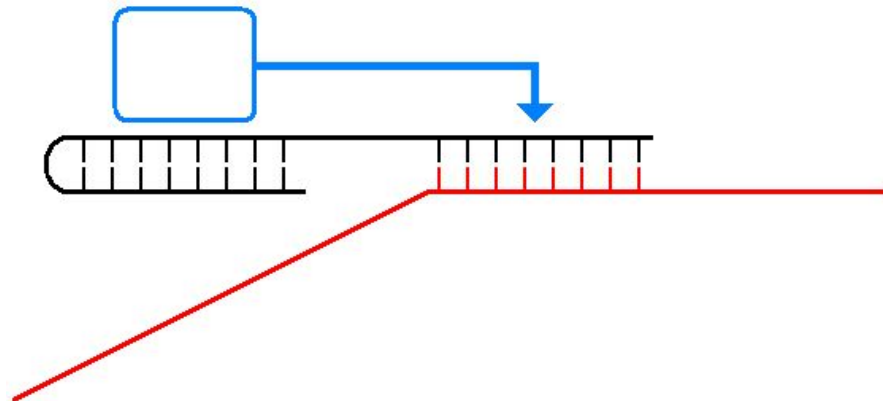
# Молекулярное клонирование

## 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 ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Rb}^{2+}$ )
  - 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

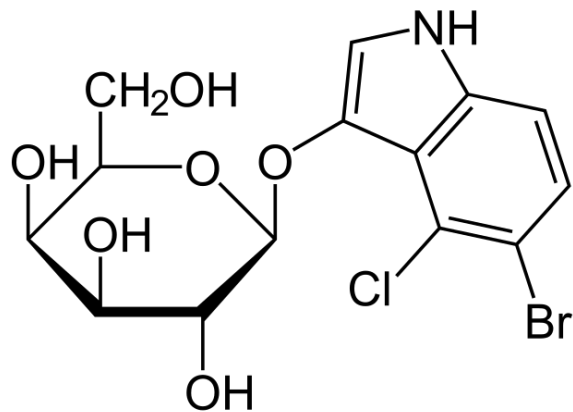
*$\beta$  - галактозидаза*

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

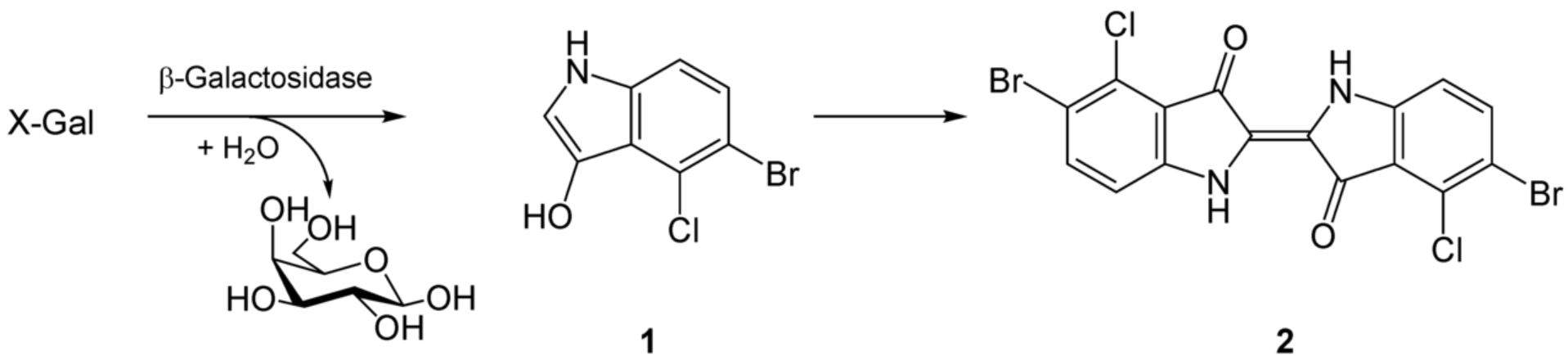


# Молекулярное клонирование

## Отбор клеток, содержащих рекомбинантную ДНК



X-gal (5-бром-4-хлор-3-индоил- $\beta$ -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*

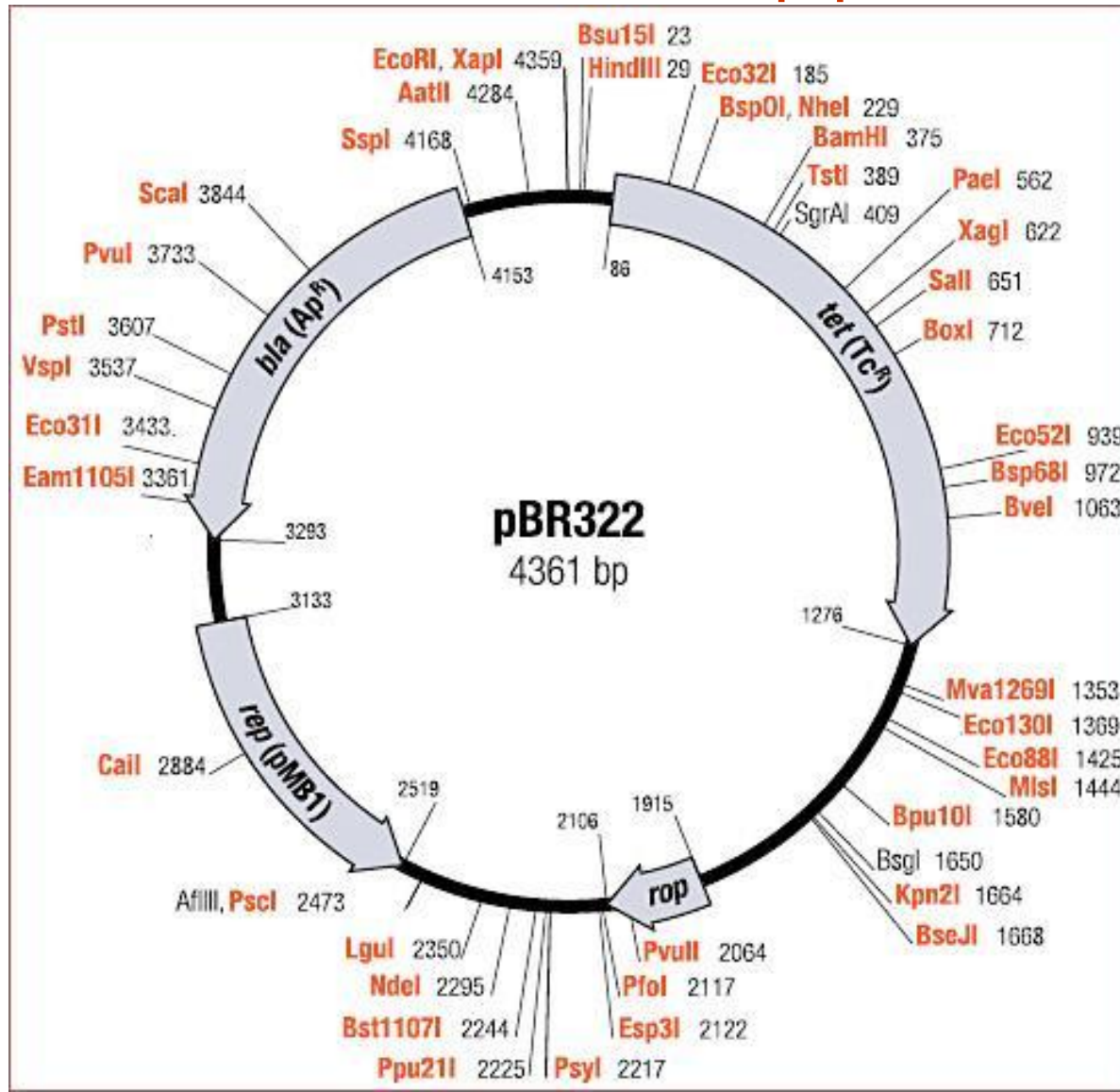
В клетке:

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

*Взаимная комплементация*

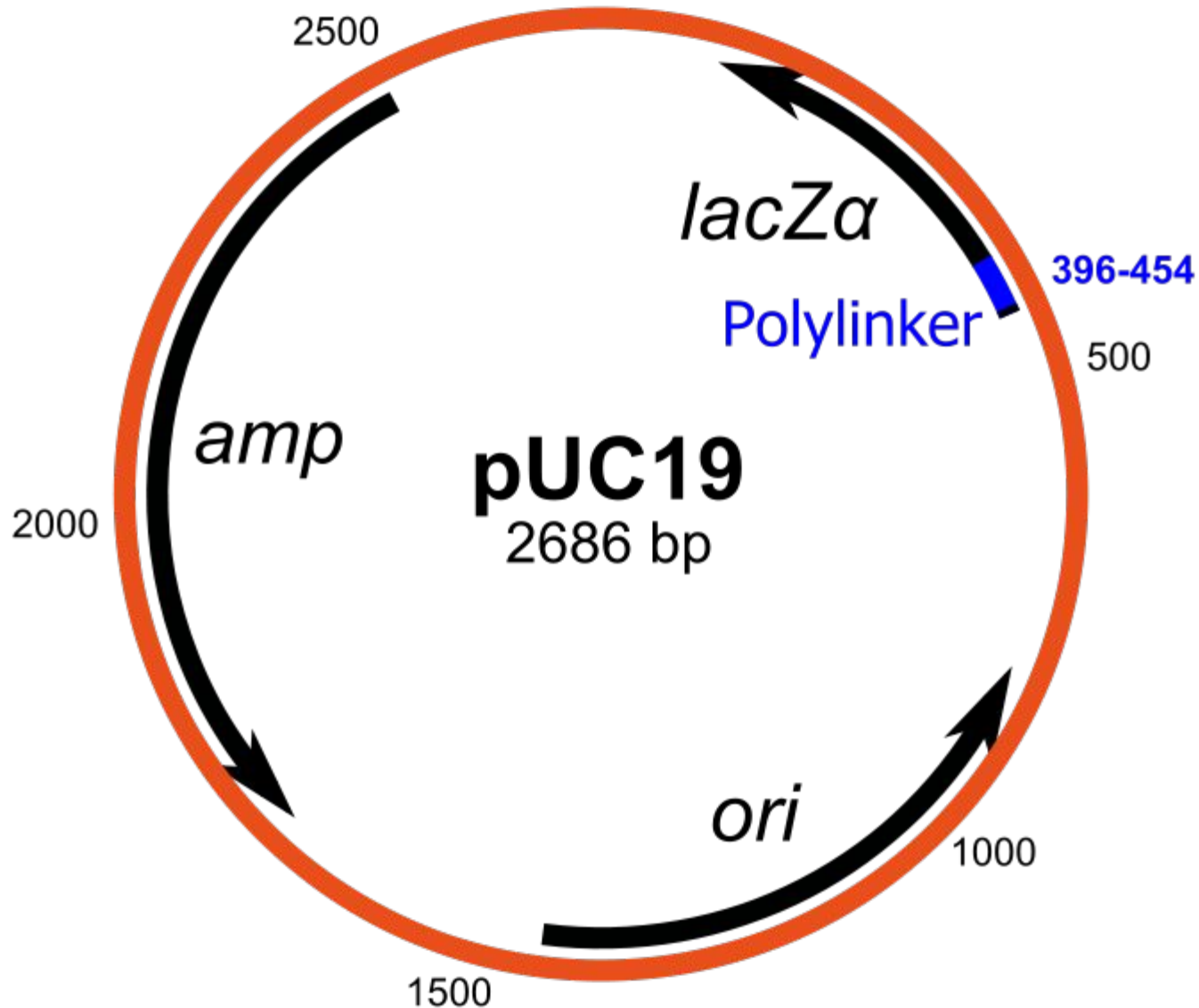
# Молекулярное клонирование

## Плазмидный вектор pBR322



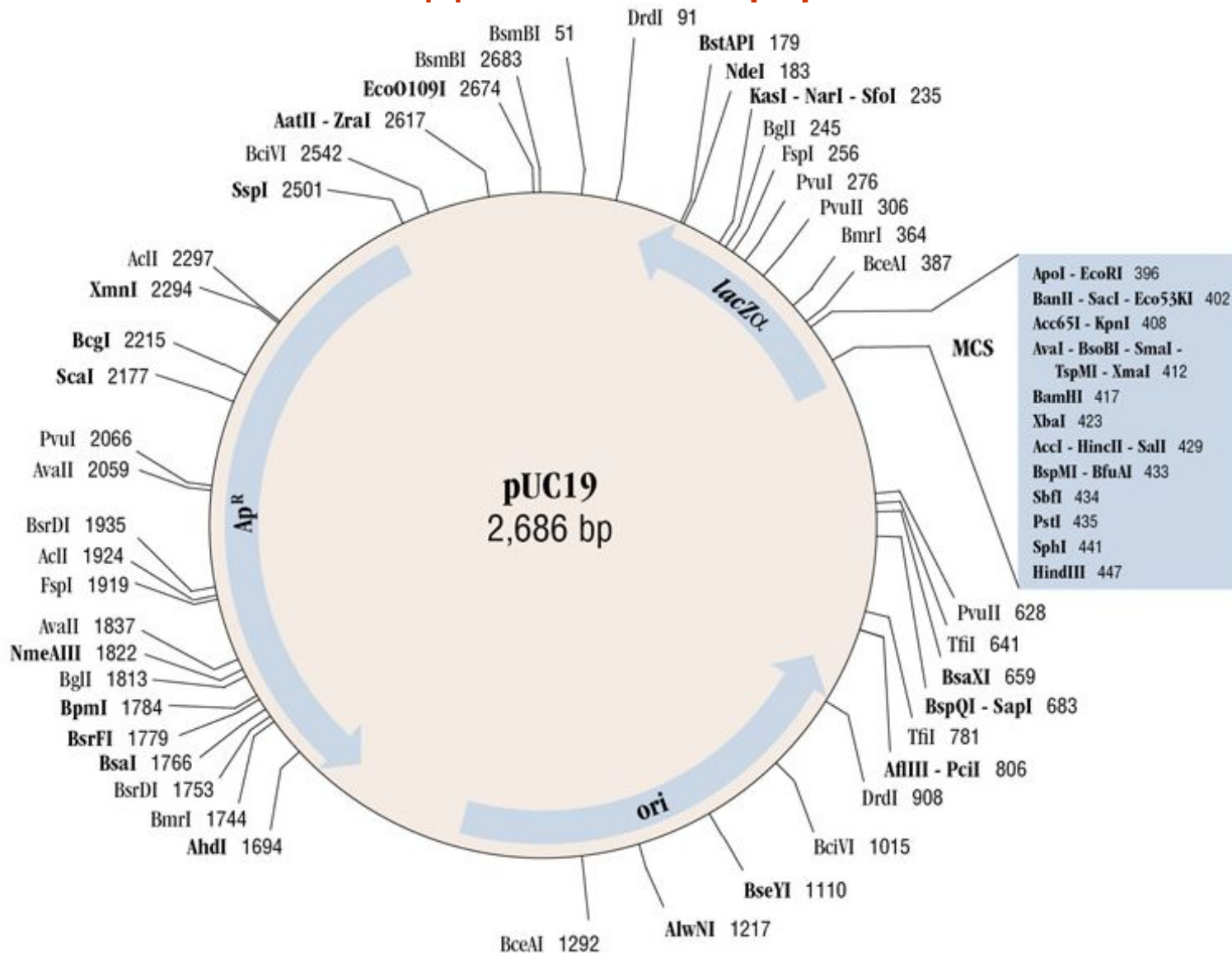
# Молекулярное клонирование

## Плазмидный вектор pUC19



# Молекулярное клонирование

## Плазмидный вектор pUC19



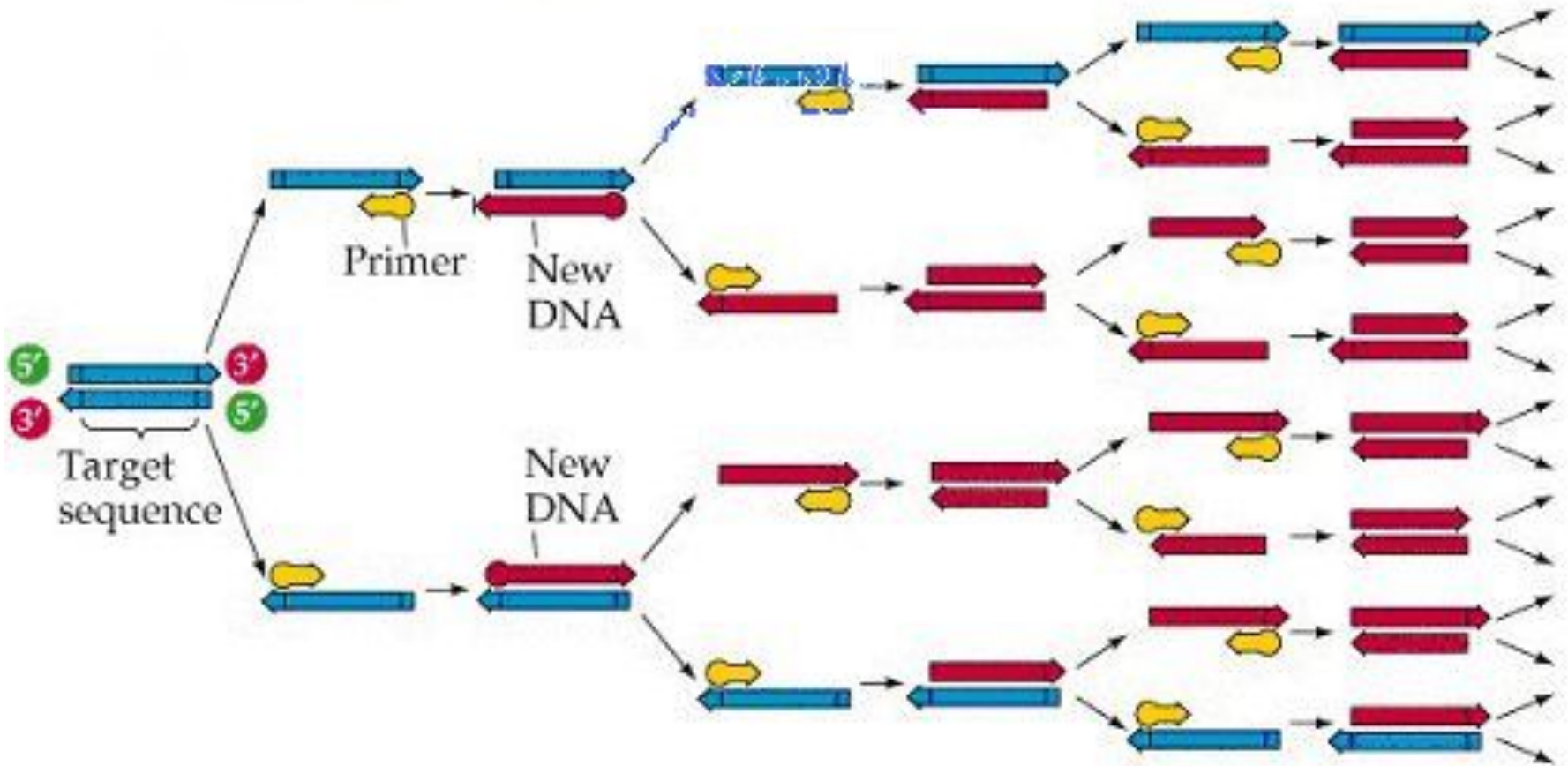
# Молекулярное клонирование

Плазмидный вектор pUC19





# Полимеразная цепная реакция



# Полимеразная цепная реакция

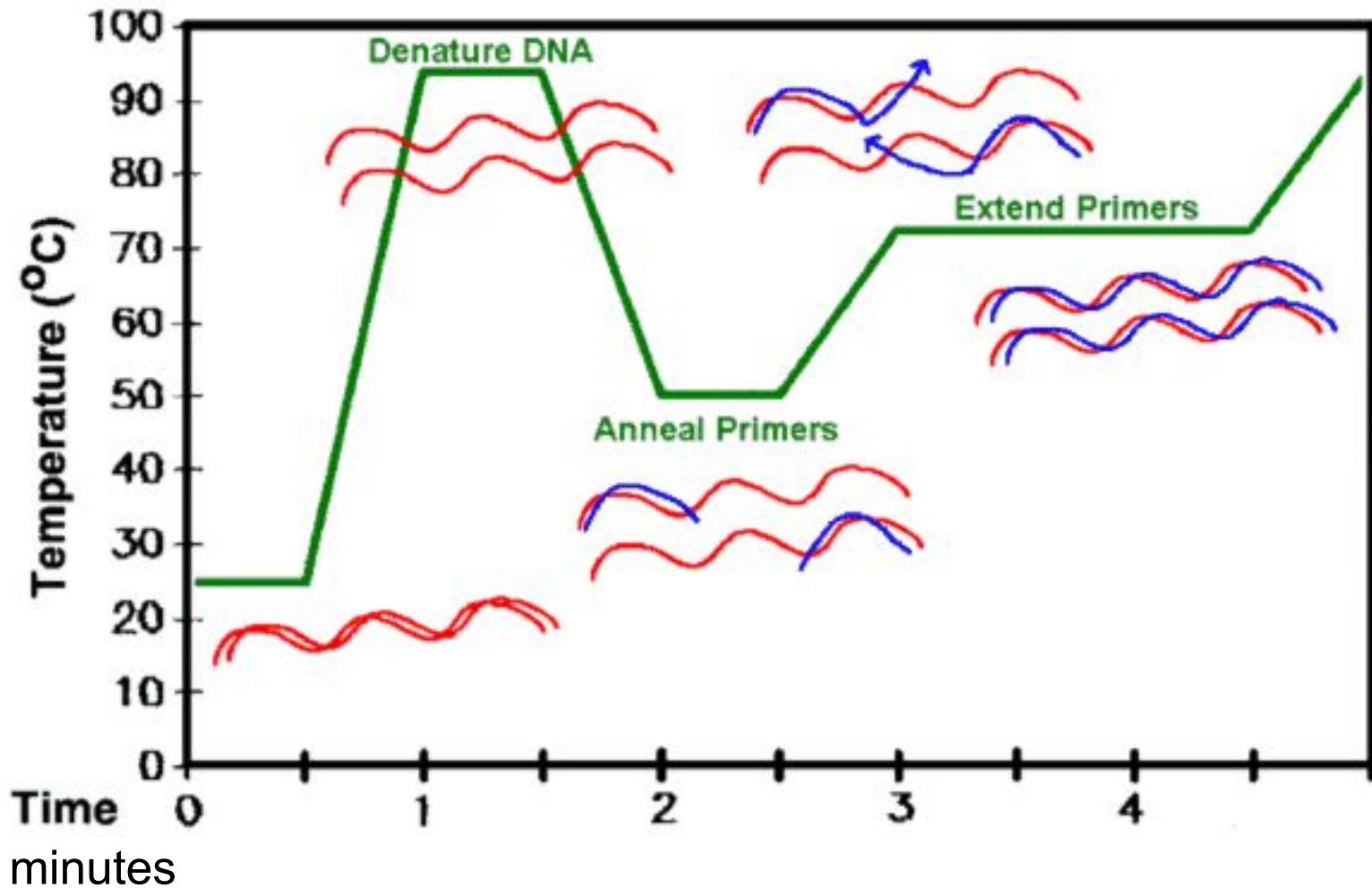
.

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
- рН 12 → денатурация хромосомной ДНК
- рН 5 → ренатурация плазмидной ДНК
- центрифугирование

# Определение концентрации НК

## Фотометрическая абсорбция

- максимум поглощения при 260 нм