

Лекция 10. Клонирование генов

Часть 2. Внеклеточное молекулярное клонирование (метод полимеразной цепной реакции)

Содержание:

1. Теория и технология метода ПЦР..... 
2. Прикладное использование метода ПЦР..... 

1

Теория и технология метода ПЦР



Полимеразная цепная реакция (ПЦР) - метод клонирования последовательности ДНК (гена) в искусственных условиях (*in vitro*) на основе многократно повторяющейся реакции полимеразного копирования фрагмента ДНК с использованием фланкирующих праймеров, комплементарных его 3'-концам.

Амплификация - многократное копирование фрагмента ДНК.

Ампликон – продукт амплификации.





ДНК-мишень

1-й
праймер

АТГГТТТ



3' АТГГТАЦЦАААТТАГЦЦЦТАТТТАТАТАТАААГЦТТТ 5'

5' ТАЦААТГГТТТААТЦГГГАТААААТАТАТАТТЦГААА 3'

ТАТААГ

2-й
праймер



Основные компоненты ПЦР:

- ДНК-мишень – фрагмент ДНК, подлежащий амплификации;
- два праймера - синтетических нуклеотида длиной 15 – 30 нуклеотидов, комплементарных 3'- концам ДНК- мишени (выполняют роль ДНК-затравки и ДНК- зонда);
- ДНК-полимераза;
- свободные нуклеотиды.

ПЦР – полициклический процесс каждый цикл которого включает 3 этапа:

1. Денатурация ДНК путем нагревания реакционной смеси до 95°C ;
2. Отжиг праймеров на 3'-концах ДНК-мишени (при $50 - 70^{\circ}\text{C}$);
3. Элонгация – синтез комплементарных цепей на матрице ДНК-мишени.

Число циклов ПЦР: 30...50.



1-й цикл

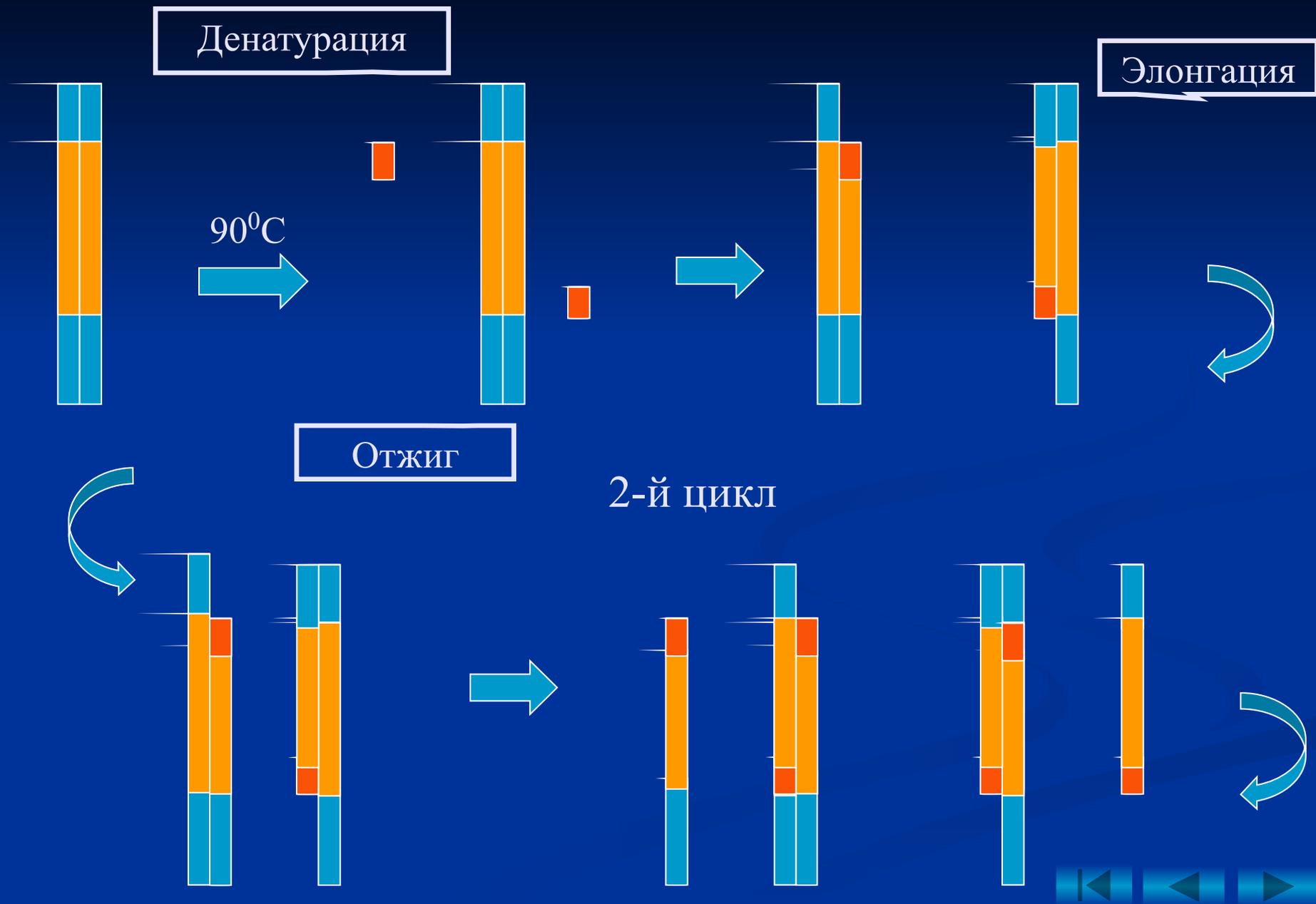
Денатурация

90°C

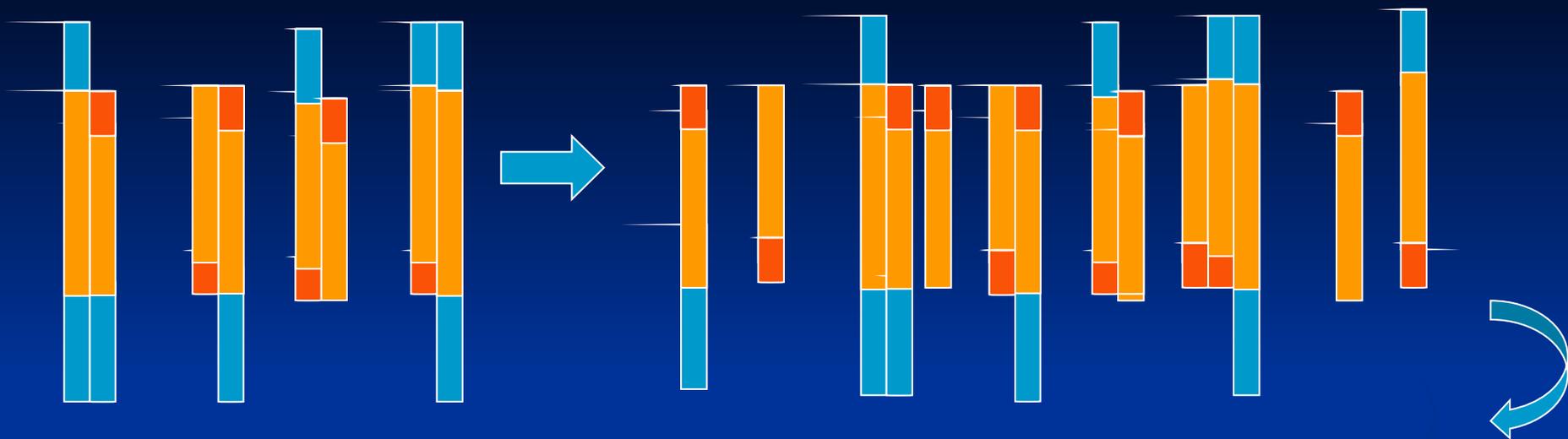
Элонгация

Отжиг

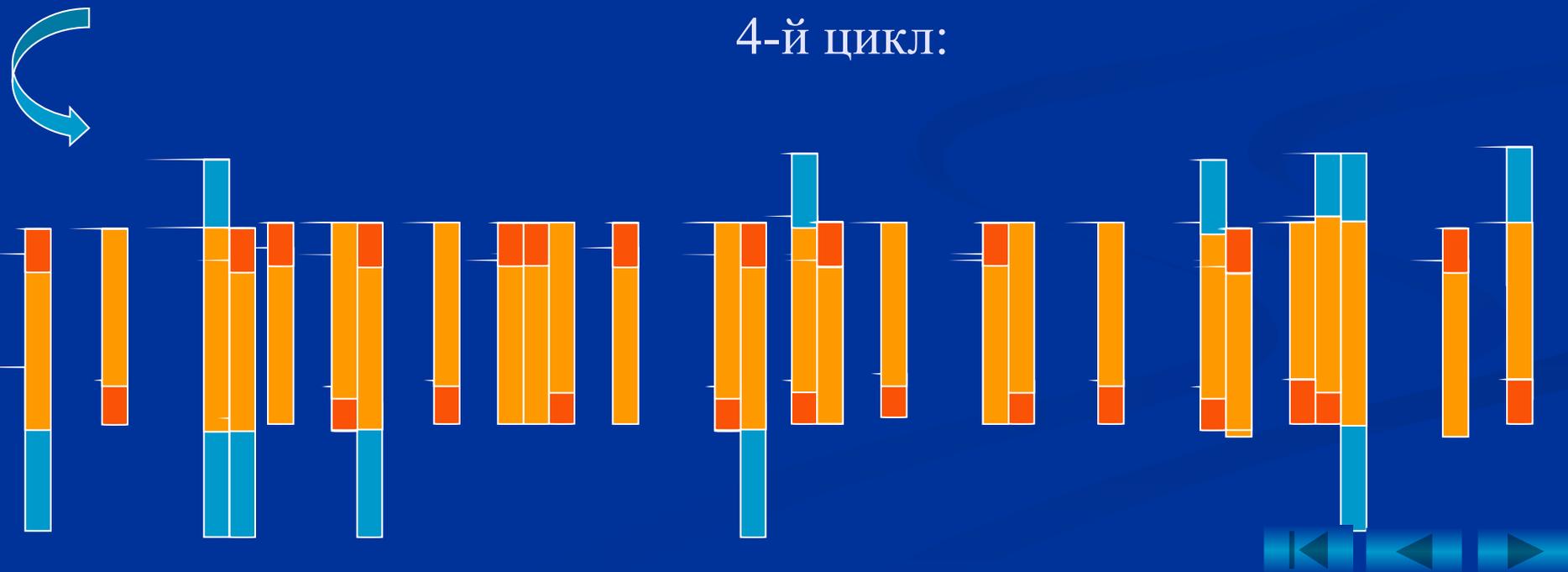
2-й цикл



3-й цикл:



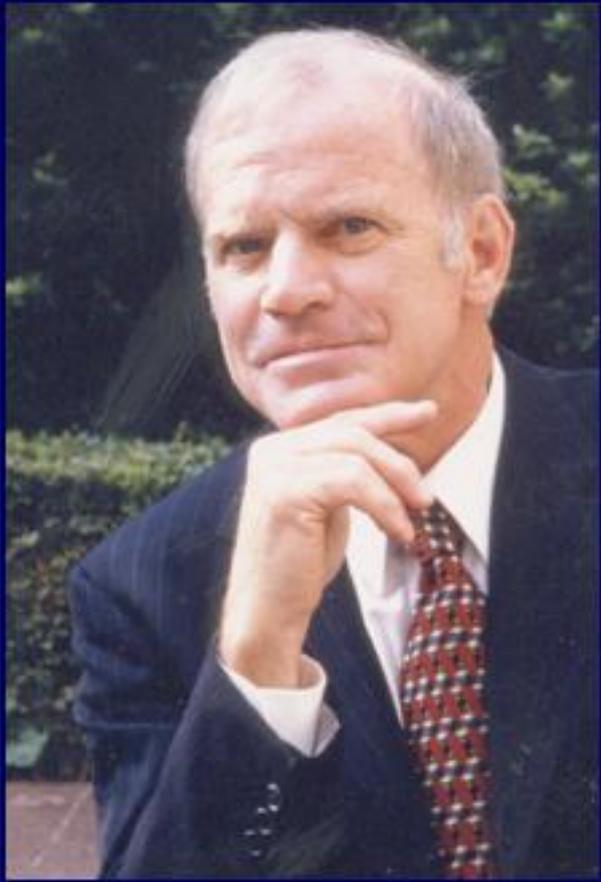
4-й цикл:



В ходе ПЦР количество амплифицируемого фрагмента ДНК-мишени увеличивается в прогрессии:

Конечный результат ПЦР – наработка такого количества вещества специфического фрагмента ДНК (мкг), которое можно зафиксировать уже визуально.

ПЦР – мощный «усилитель» сигнала о каком-либо биологическом объекте в виде уникальной, присущей только ему последовательности его генома.



В 1985 г. Карл Мюллис – запатентовал изобретенный им метод амплификации ДНК путем полимеразной цепной реакции.

В 1993 г. за изобретение ПЦР удостоен Нобелевской премии по химии.

Карл Мюллис
(род. 1944, Северная
Каролина, США)



Технология метода ПЦР

1. Выделение образца ДНК

2. Подготовка реакционной смеси (20...100 мкл)

□ подбор праймеров

- праймеры должны быть строго гомологичны амплифицируемому участку ДНК и ограничивать область генома уникальную по длине и нуклеотидной последовательности с нулевой вероятностью повторения в геноме.



- ДНК полимераза – применяется термостабильная ДНК-полимераза из бактерии *Thermophilus aquaticus* (*Taq*-полимераза) – выдерживает температуру 95⁰С.

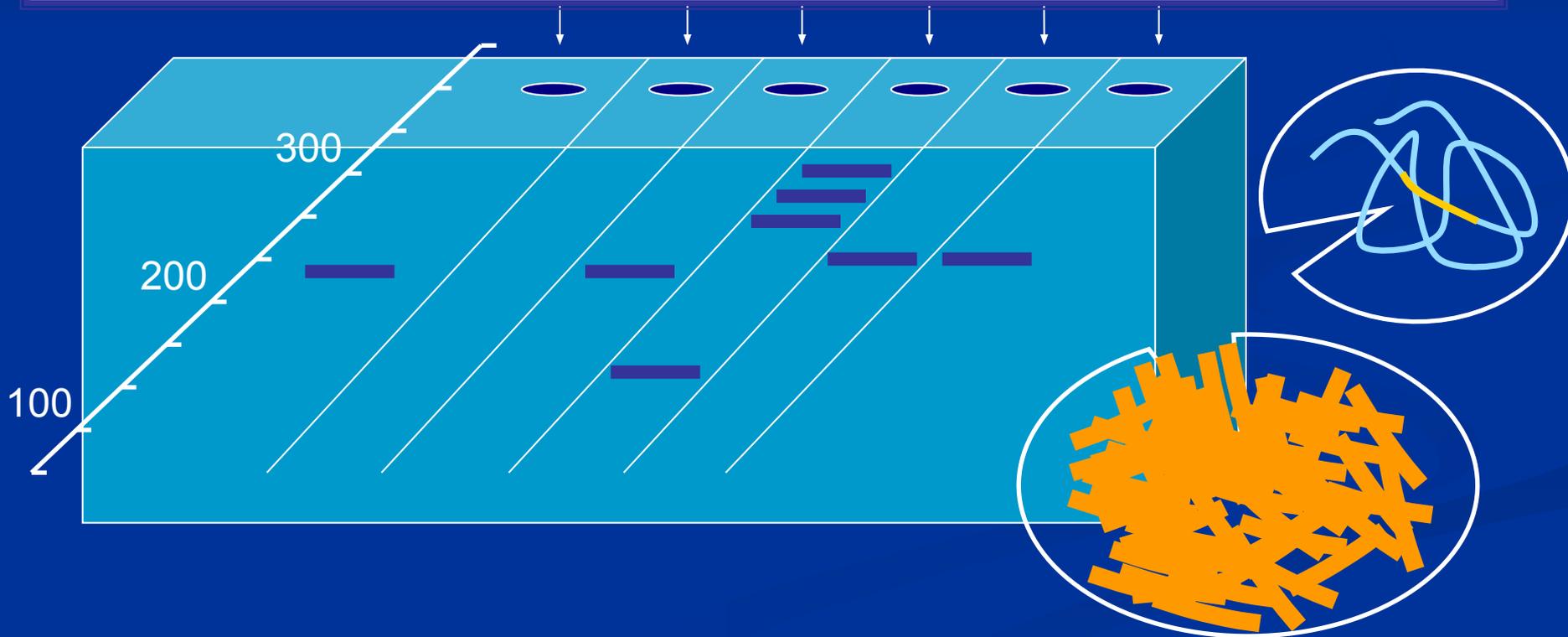


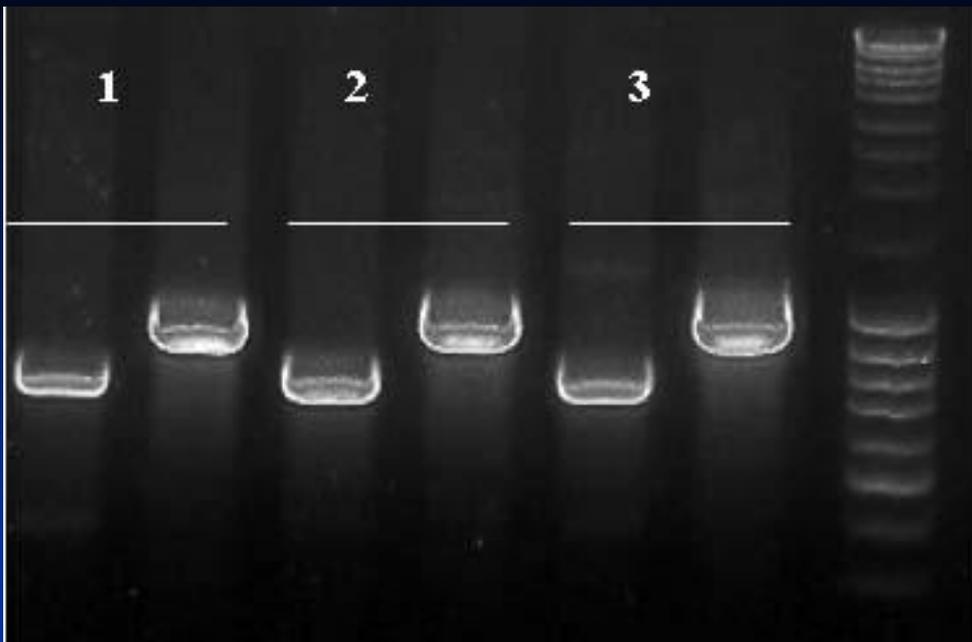
3. Амплификация – проводится в приборах–амплификаторах.



4. Оценка результатов ПЦР

- проводится путем разделения продуктов амплификации электрофорезом с последующим сравнением с контрольным фрагментом заданной длины.

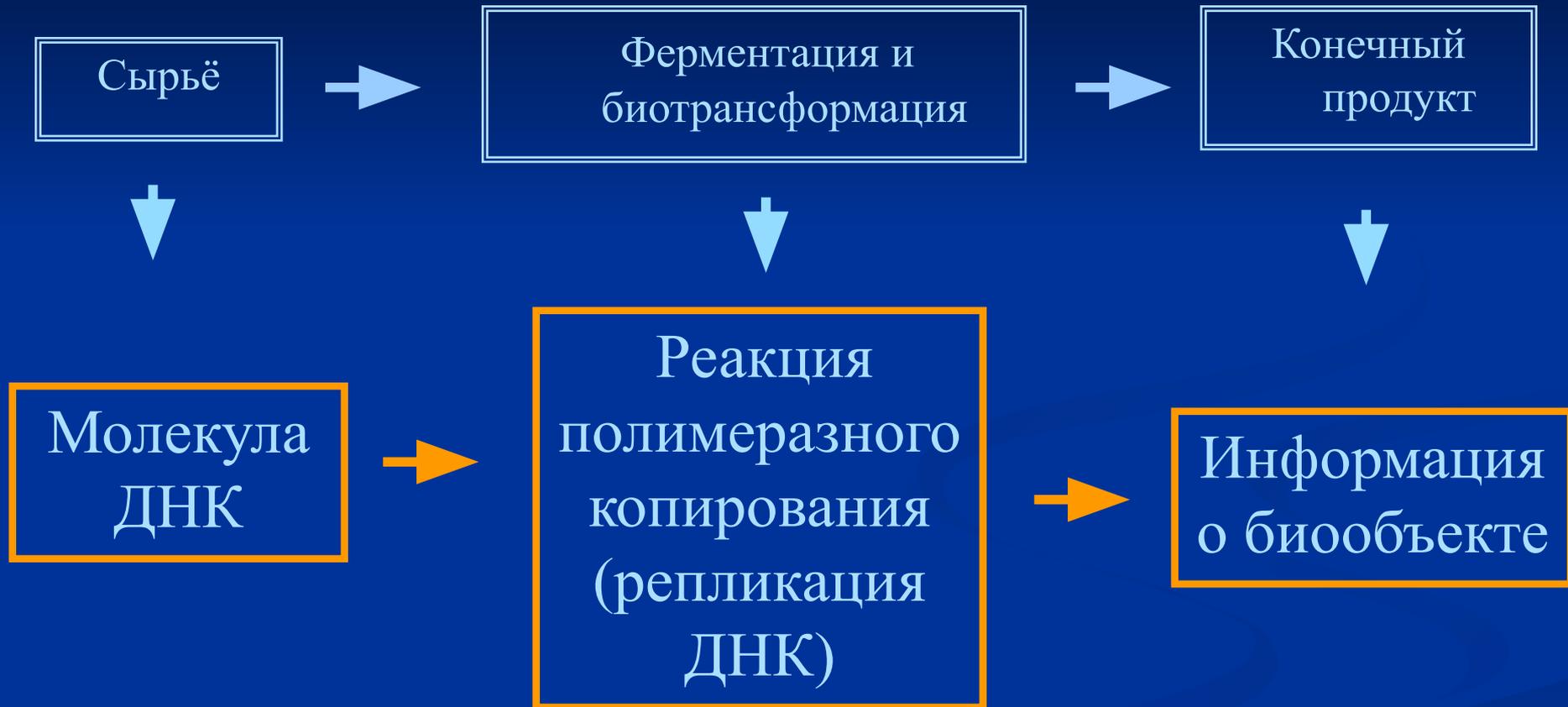




Трансиллюминатор



ПЦР: биотехнология или нет ?



2

Прикладное использование метода ПЦР



ПЦР – современный диагностический инструмент, позволяющий идентифицировать биологические объекты по ничтожно малым количествам биоматериала.

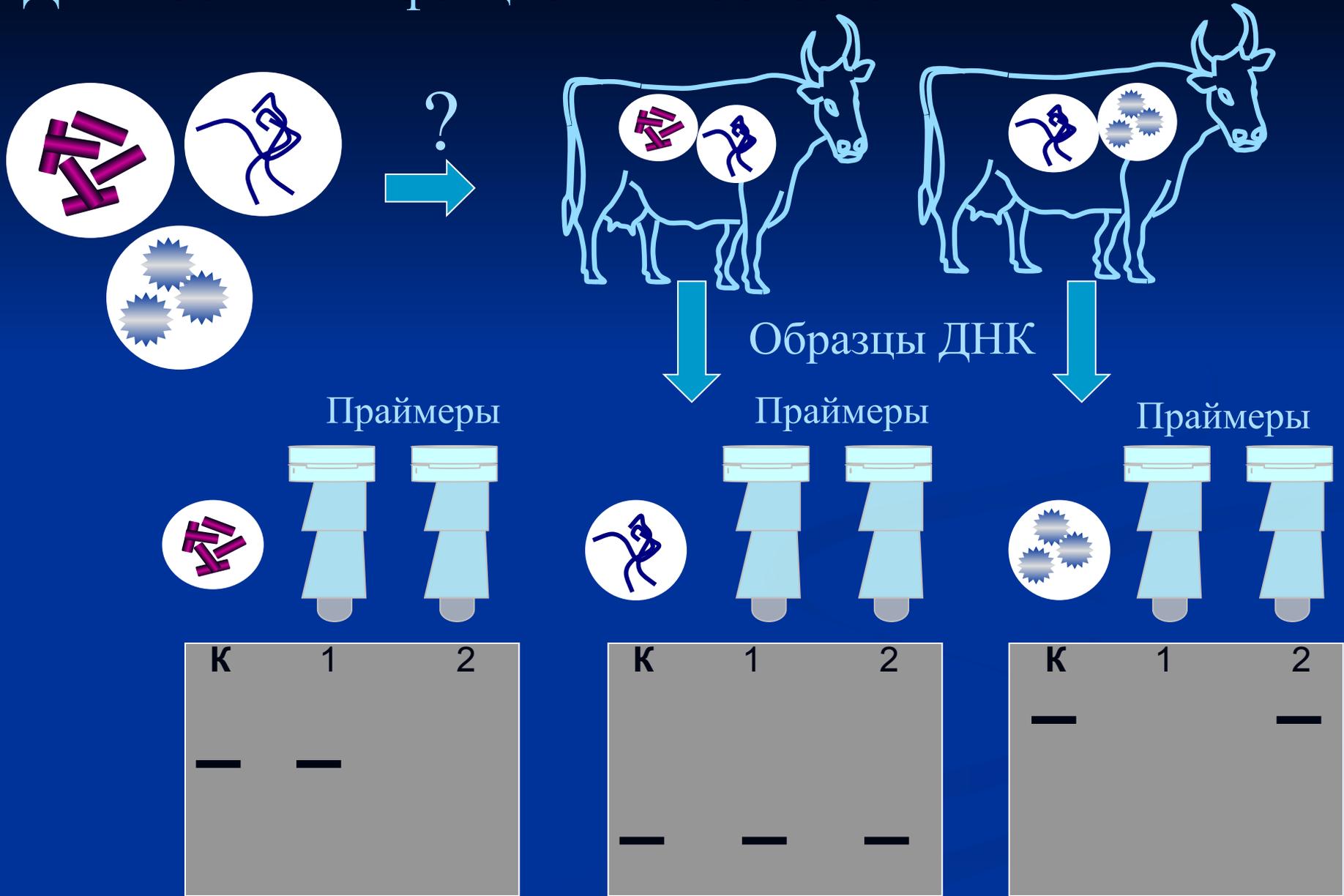
ДНК-диагностика (гено-диагностика) – методы получения информации о биологических объектах на основании выявления особенностей их генома.

Основные направления :

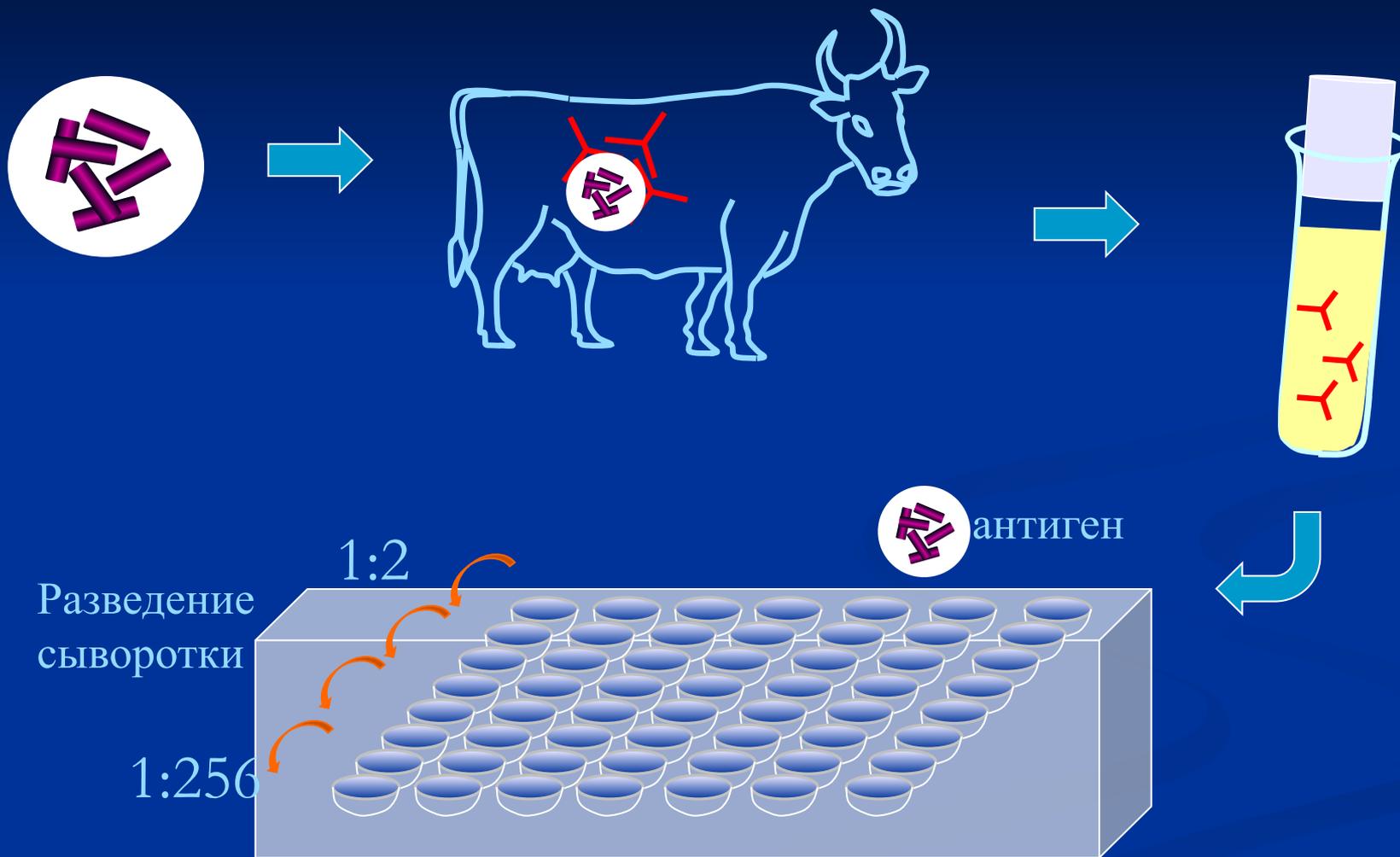
1. диагностика инфекционных болезней
2. диагностика наследственных болезней
3. ДНК-идентификация личности
4. ДНК-диагностика качества продуктов питания

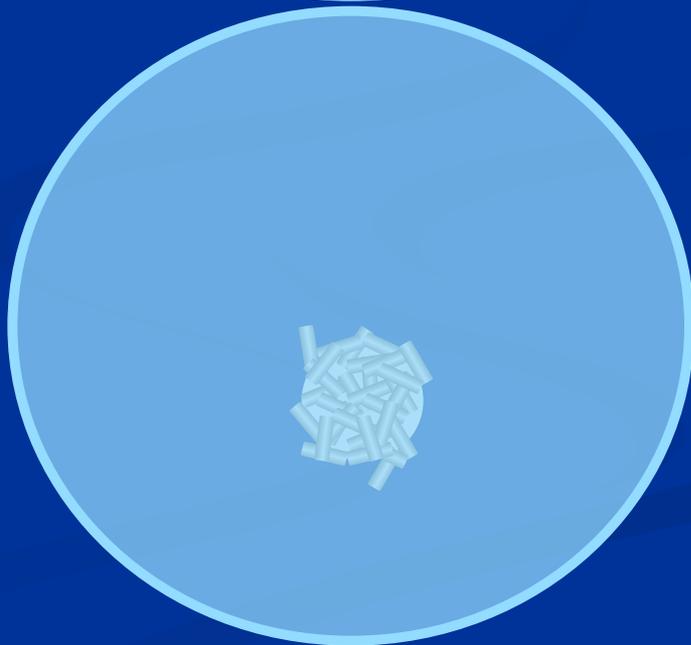
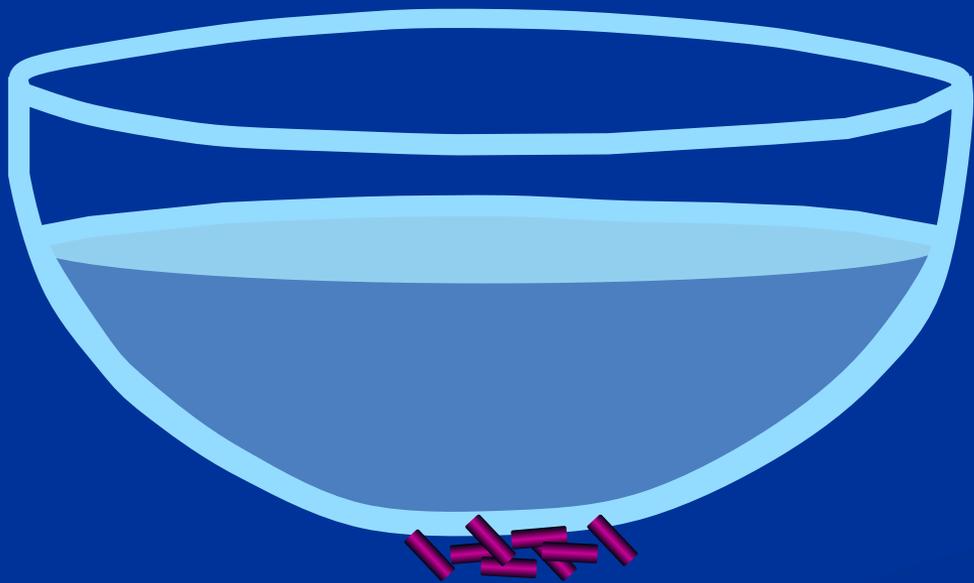
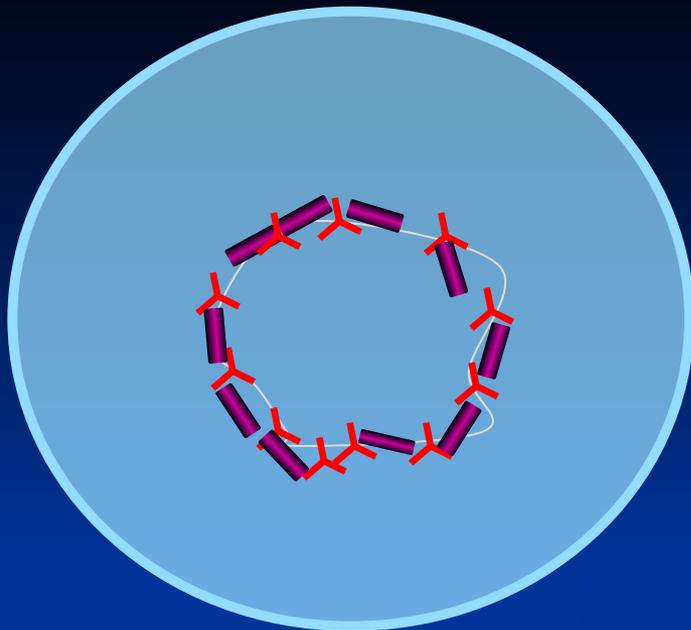
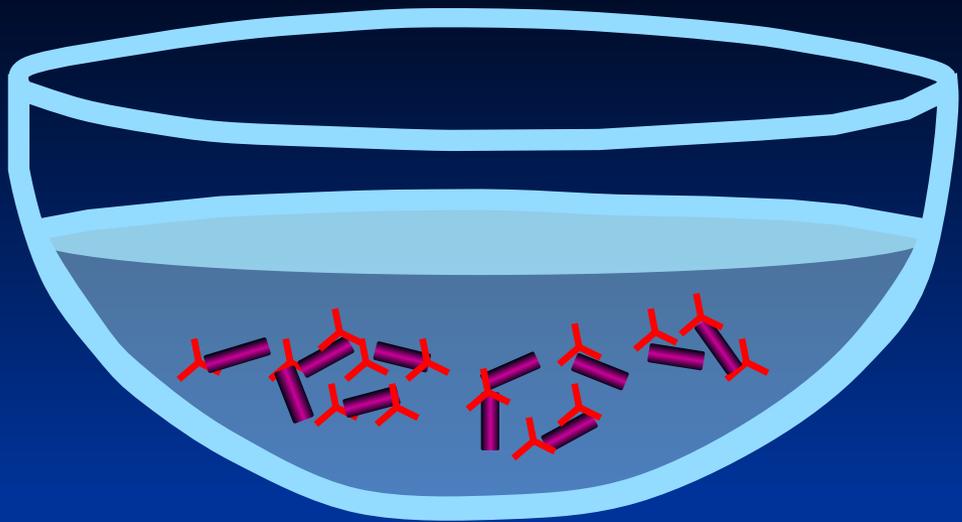


Диагностика инфекционных болезней



Иммунологический метод диагностики



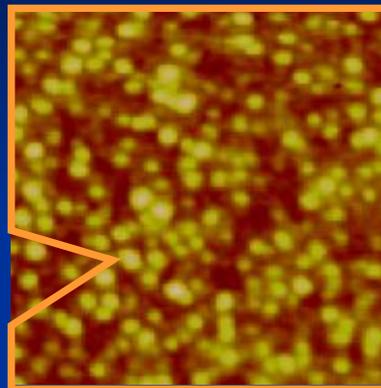


Преимущества ПЦР-диагностики:

- специфичность
- высокая чувствительность – раннее обнаружение инфекции

ДНК-идентификация

- молекулярно-генетические маркеры половой принадлежности

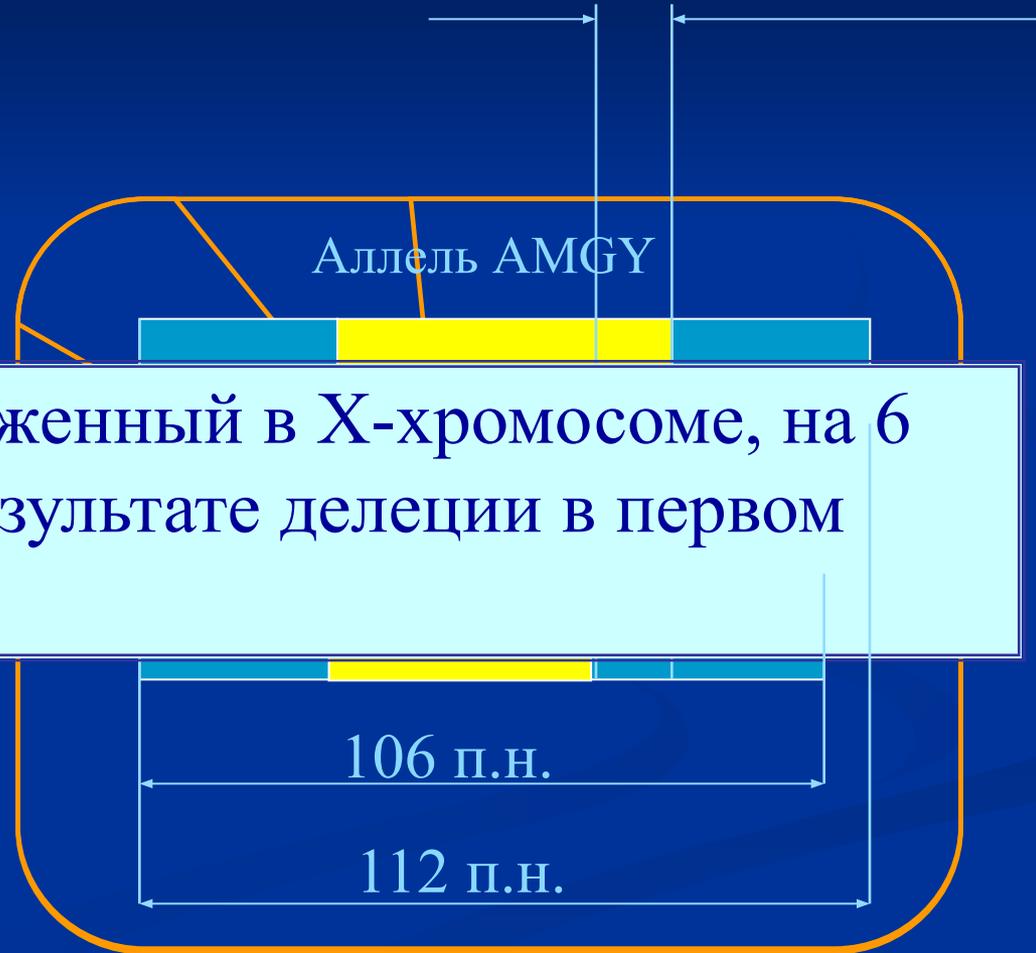
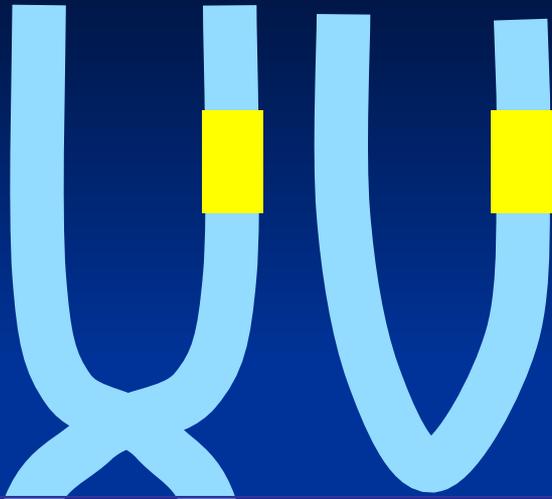


Амелогенин – белок,
образующий структурный

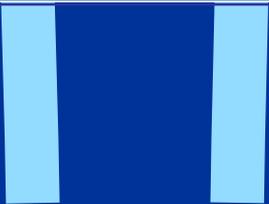
У человека ген амелогенина (AMG) – белка, образующего структурный матрикс зубной эмали, локализован в половых хромосомах X и Y.

Различия в аллелях гена амелогенина человека

Делеция 6 нуклеотидов в первом интроне аллеля AMGX



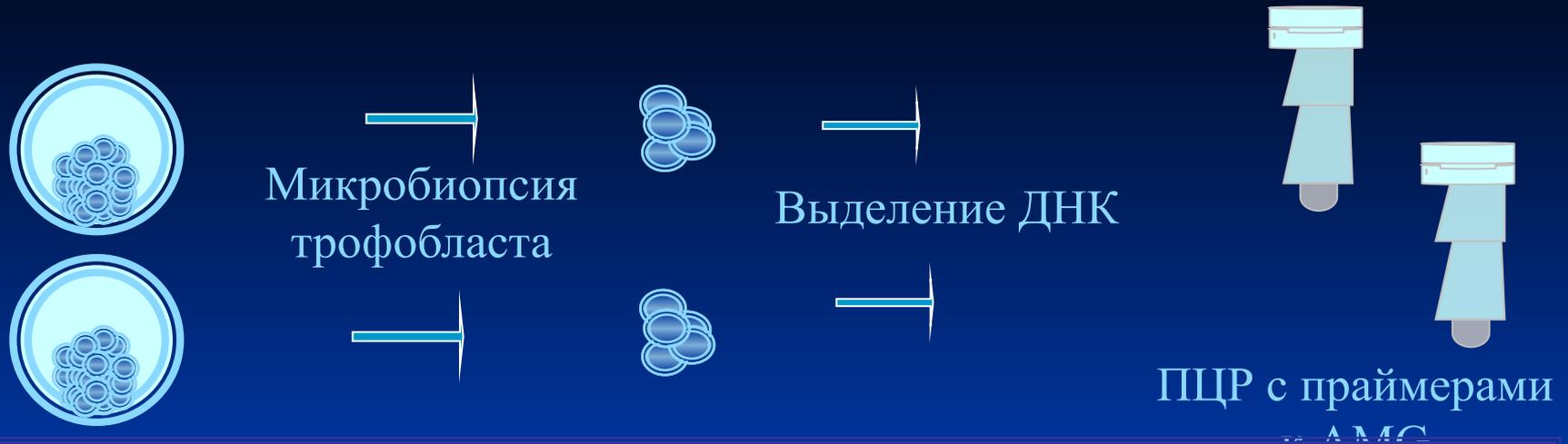
Аллель AMGX, расположенный в X-хромосоме, на 6 нуклеотидов короче в результате делеции в первом интроне.



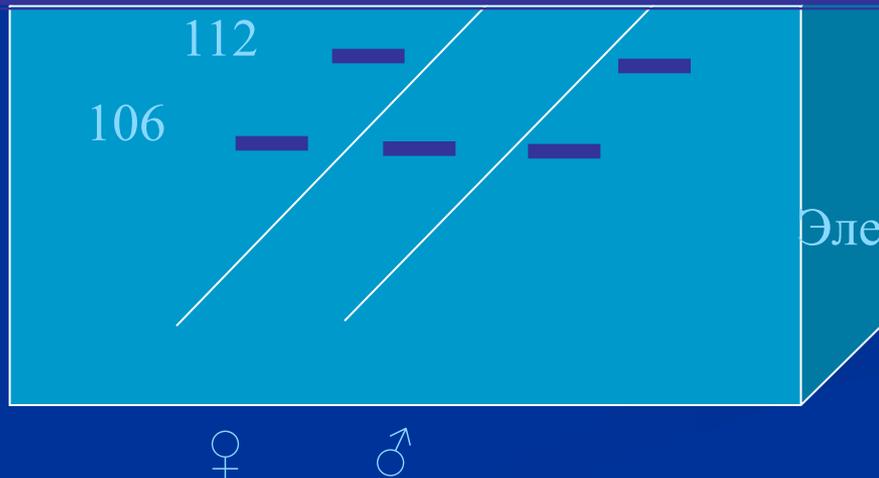
X-хромосома



Технология определения пола эмбрионов



При идентификации пола, определяются фрагменты обеих аллелей длиной, соответственно, 112 (AMGY) и 106 (AMGX) пар нуклеотидов.



Электрофорез продуктов ПЦР

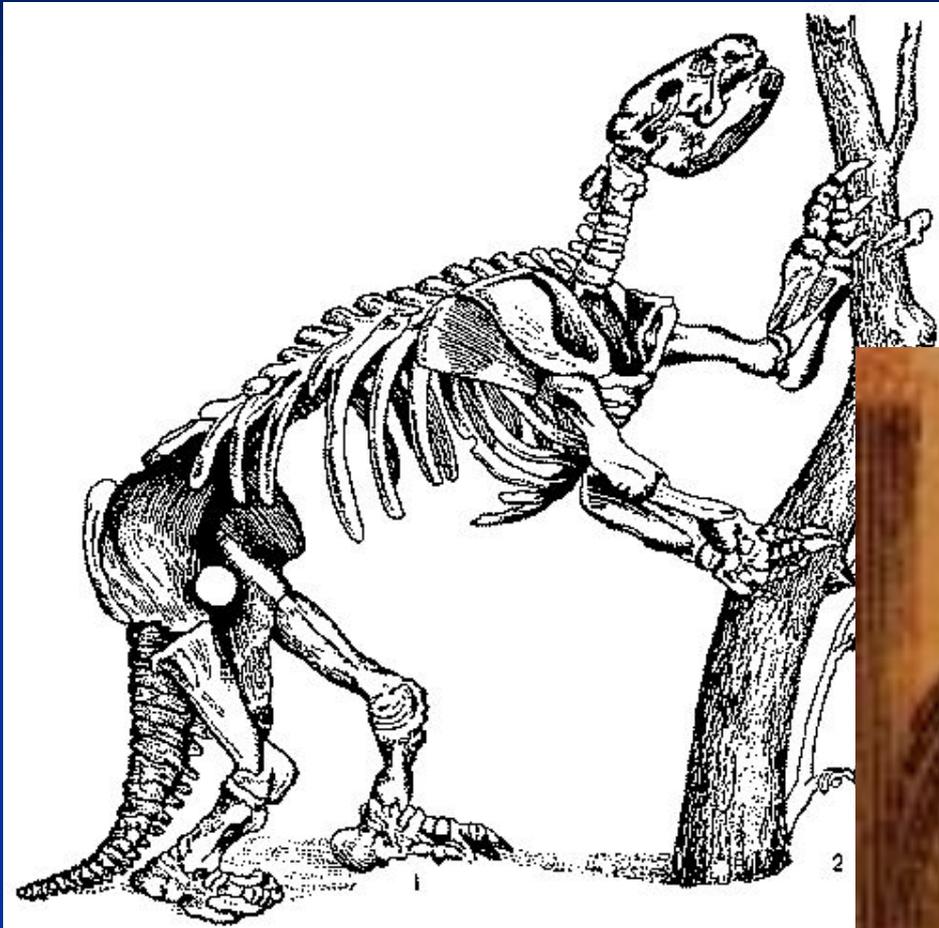
ПЦР- диагностика качества продуктов питания

Микробное загрязнение продуктов

Выявление в пищевых продуктах трансгенов

Определение посторонних примесей биологического происхождения, снижающих качество продукции

Молекулярная археология и палеонтология - изучение ДНК из найденных при раскопках каких-либо содержащих ее древних объектов.



Самой древней ДНК – 120...135 млн. лет.

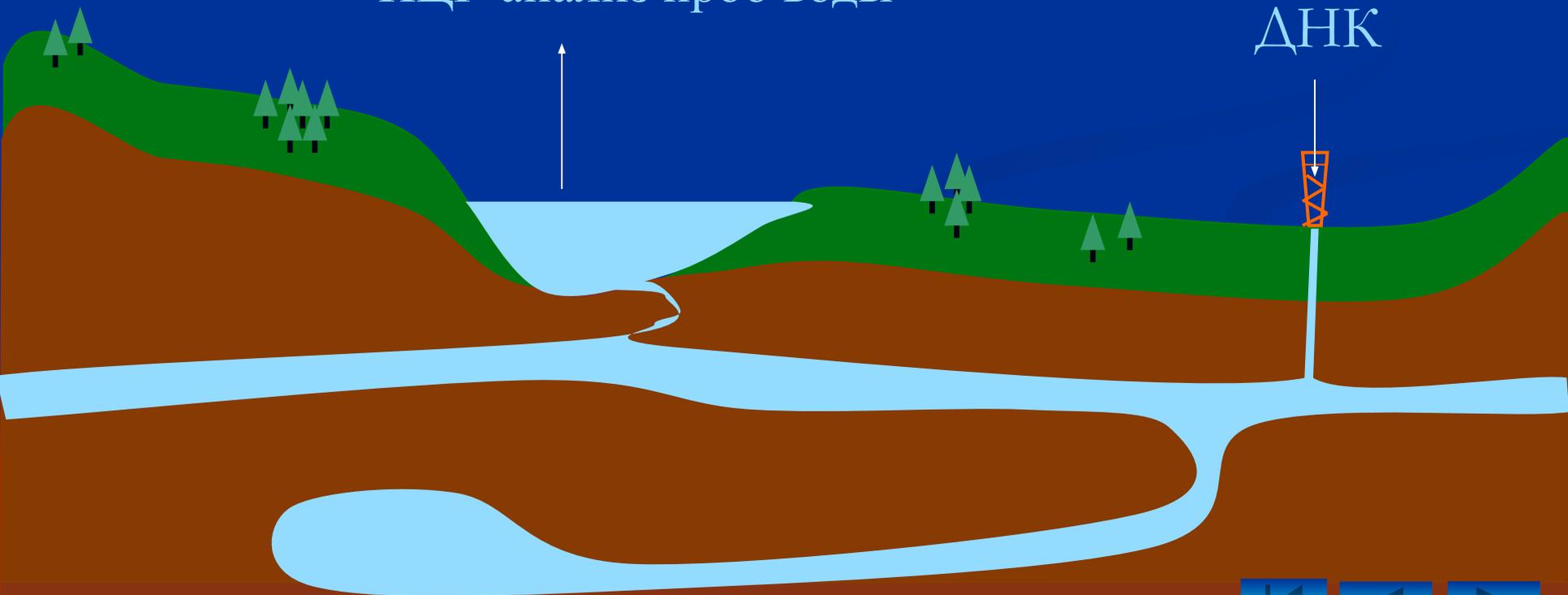


ПЦР в гидрогеологии – исследование перемещения подземных вод.



ПЦР-анализ проб воды

ДНК



Конец

