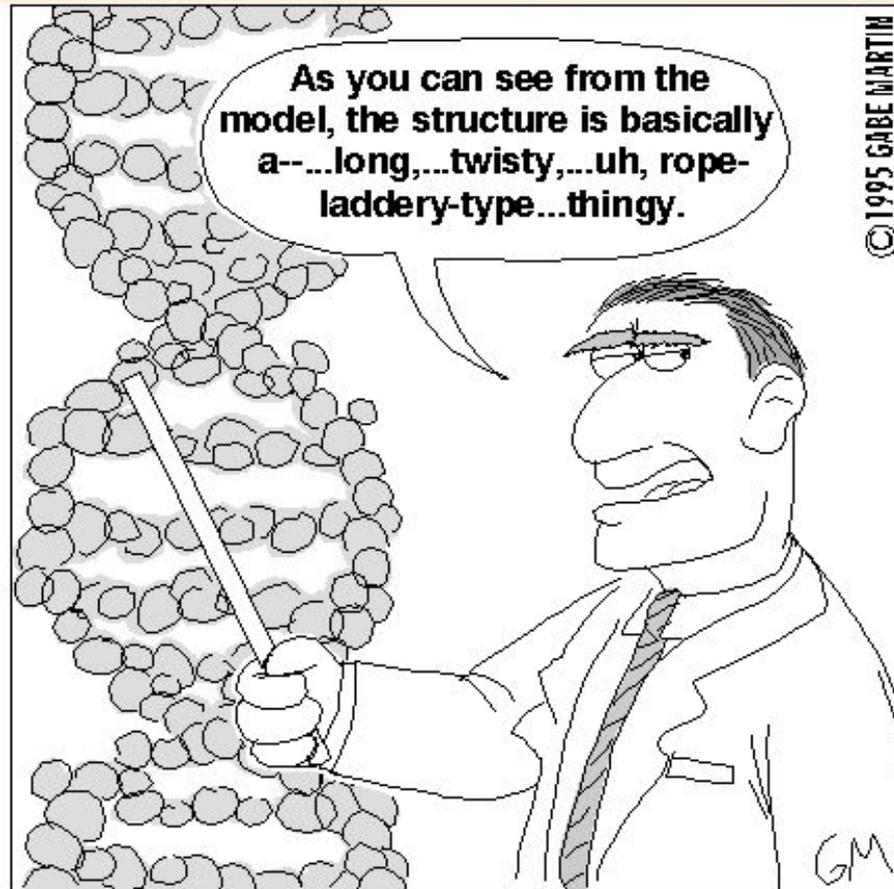


# Технология рекомбинантных ДНК

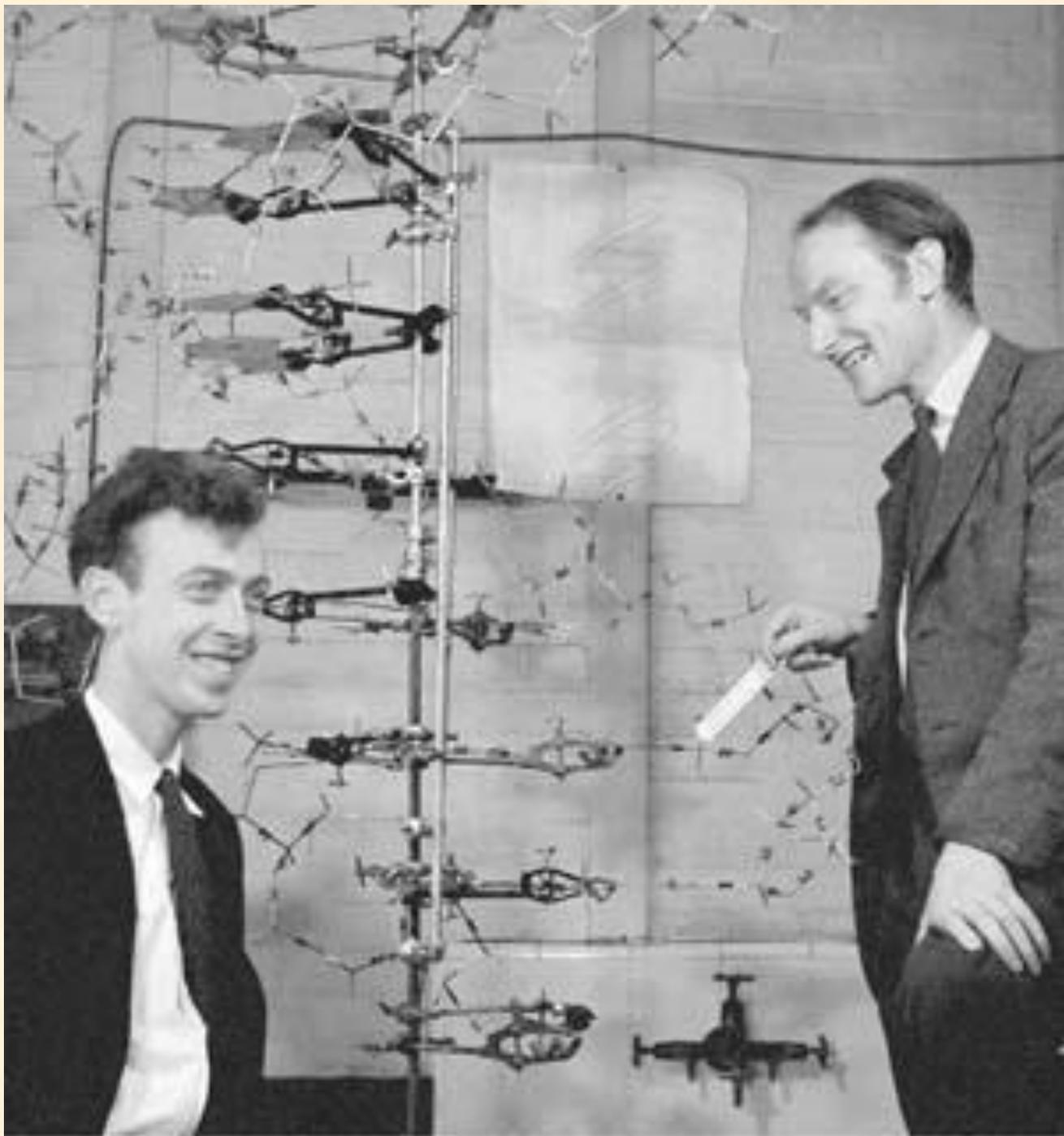
№2

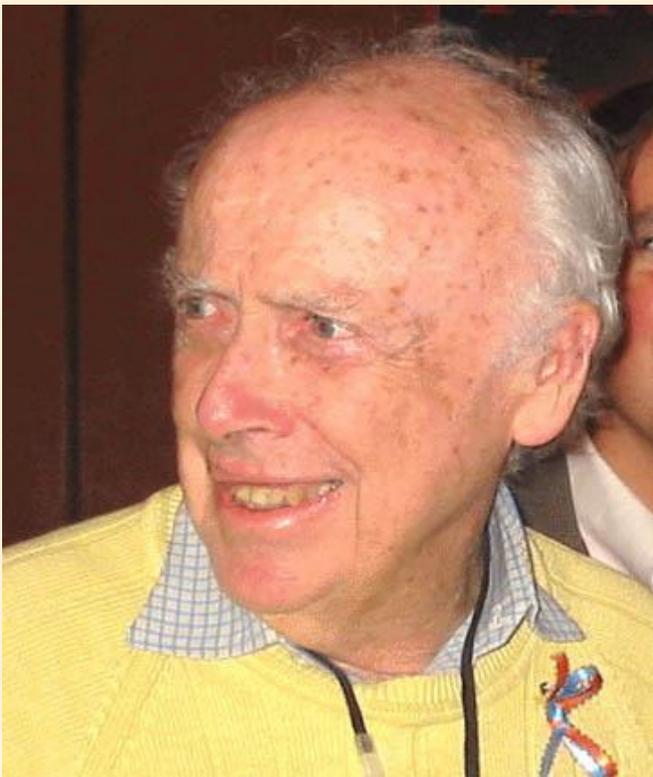


**1953: The structure of the DNA molecule is first described.**

- **Генная инженерия, или технология рекомбинантных ДНК, это совокупность экспериментальных процедур, позволяющая осуществлять перенос генетического материала (ДНК) из одного организма в другой.**

- Если внести в организм (растение, микроорганизм, животное или даже человек) новые гены, то можно наделить его новой желательной характеристикой, которой до этого он никогда не обладал. Изменения генов прежде всего связано с преобразованием химической структуры ДНК: изменение последовательности нуклеотидов в хромосомной ДНК, выпадение одних и включение других нуклеотидов меняют состав образующихся на ДНК молекулы РНК, а это, в свою очередь, обуславливает новую последовательность аминокислот при синтезе. В результате в клетке начинает синтезироваться новый белок, что приводит к появлению у организма новых свойств.
- **Генная инженерия берет свое начало в 1973 году, когда генетики Стэнли Коэн и Герберт Бойер внедрили новый ген в бактерию кишечной палочки (*E. coli*).**





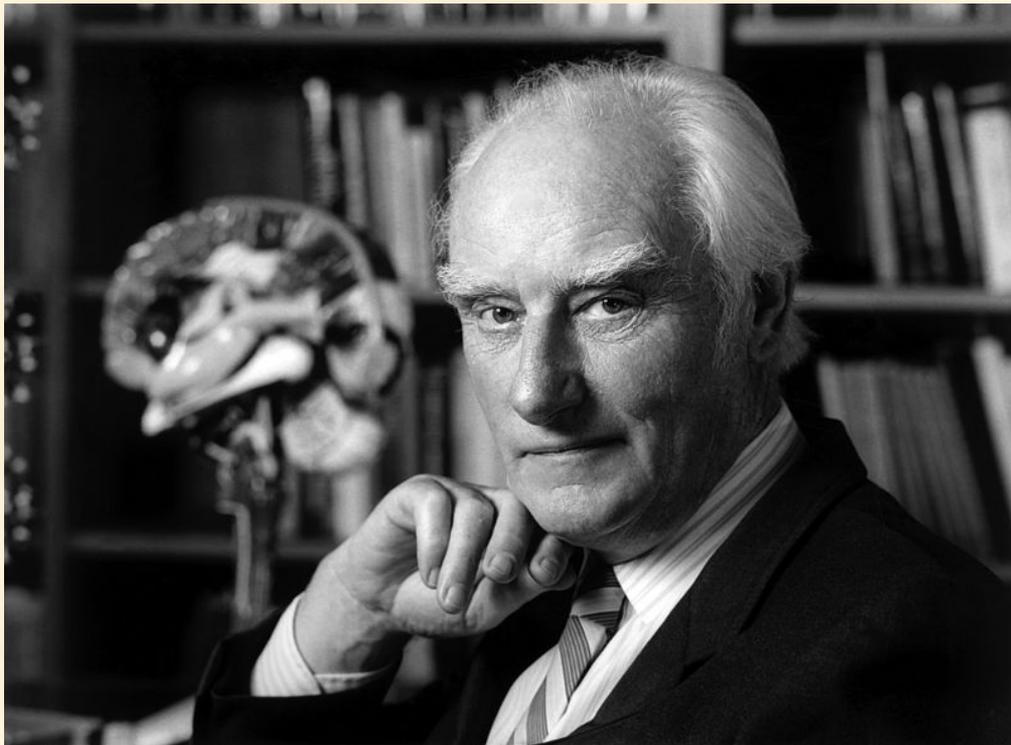
## Джеймс Дьюи Уотсон

Джеймс Дьюи Уотсон ([англ. James Dewey Watson](#), род. [6 апреля 1928](#), род. 6 апреля 1928, [Чикаго, Иллинойс](#), род. 6 апреля 1928, Чикаго, Иллинойс) — американский [биолог](#), род. 6 апреля 1928, Чикаго, Иллинойс) — американский биолог. Лауреат [Нобелевской премии по физиологии и](#)

С детства, благодаря отцу, Джеймс был зачарован наблюдениями за жизнью птиц. В возрасте 12 лет Уотсон участвовал в популярной радиовикторине [Quiz Kids](#) для интеллектуальных молодых людей. Благодаря либеральной политике Роберта Хатчинса он поступил в колледж в возрасте 15 лет. Прочитав книгу [Эрвина Шрёдингера](#) «Что такое жизнь с точки зрения физики?» Уотсон изменил свои профессиональные интересы с изучения [орнитологии](#) на изучение [генетики](#). В 1947 году получил степень бакалавра [зоологии](#).

С детства, благодаря отцу, Джеймс был зачарован наблюдениями за жизнью птиц. В возрасте 12 лет Уотсон участвовал в популярной радиовикторине Quiz Kids для интеллектуальных молодых людей. Благодаря либеральной политике Роберта Хатчинса он поступил в колледж в возрасте 15 лет. Прочитав книгу Эрвина Шрёдингера «Что такое жизнь с точки зрения физики?» Уотсон изменил свои профессиональные интересы с изучения орнитологии на изучение генетики. В 1947 году получил степень бакалавра зоологии.

С детства, благодаря отцу, Джеймс был зачарован наблюдениями за жизнью птиц. В возрасте 12 лет Уотсон участвовал в популярной радиовикторине Quiz Kids для интеллектуальных молодых людей. Благодаря либеральной политике Роберта Хатчинса он поступил в колледж в возрасте 15 лет. Прочитав книгу Эрвина Шрёдингера «Что такое жизнь с точки зрения физики?» Уотсон изменил свои профессиональные интересы с изучения орнитологии на изучение генетики. В 1947 году получил степень бакалавра зоологии.



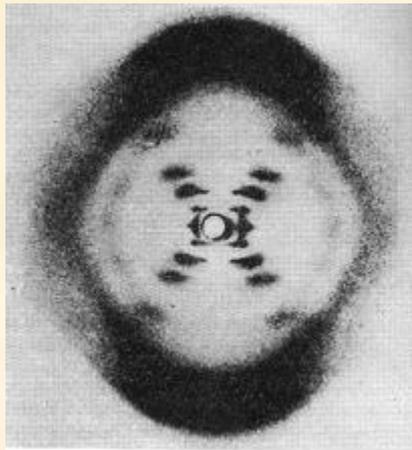
Фрэнсис Крик

- Фрэнсис Крик ([англ. Francis Crick](#), [8 июня](#), 8 июня [1916](#), 8 июня 1916, [Нортгемптон](#), 8 июня 1916, Нортгемптон — [28 июля](#), 8 июня 1916, Нортгемптон — [28 июля](#) [2004](#), 8 июня 1916, Нортгемптон — [28 июля](#) 2004, [Сан-Диего](#), 8 июня 1916, Нортгемптон — [28 июля](#) 2004, [Сан-Диего](#), [Калифорния](#), 8 июня 1916, Нортгемптон — [28 июля](#) 2004, [Сан-Диего](#), [Калифорния](#)) — [британский](#), 8 июня 1916, Нортгемптон — [28 июля](#) 2004, [Сан-Диего](#), [Калифорния](#)) — британский [молекулярный биолог](#), 8 июня 1916, Нортгемптон — [28 июля](#) 2004, [Сан-Диего](#), [Калифорния](#)) — британский молекулярный биолог, врач и [нейробиолог](#), 8 июня 1916, Нортгемптон — [28 июля](#) 2004, [Сан-Диего](#), [Калифорния](#)) — британский молекулярный биолог, врач и нейробиолог. Лауреат [Нобелевской премии](#), 8 июня 1916, Нортгемптон — [28 июля](#) 2004, [Сан-Диего](#), [Калифорния](#)) — британский молекулярный биолог, врач и нейробиолог. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине [1962](#), 8 июня 1916, Нортгемптон — [28 июля](#) 2004, [Сан-Диего](#), [Калифорния](#)) — британский молекулярный биолог, врач и нейробиолог. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине 7 1962 г. — совместно с [Джеймсом Д. Уотсоном](#), 8 июня 1916, Нортгемптон —



Уилкинс Морис Хью  
Фредерик

- Уилкинс (Wilkins) Морис Хью Фредерик (15.12.1916, Понгароа, Новая Зеландия), английский биофизик, удостоенный в 1962 Нобелевской премии по физиологии и медицине (совместно с [Дж. Уотсоном](#) Уилкинс (Wilkins) Морис Хью Фредерик (15.12.1916, Понгароа, Новая Зеландия), английский биофизик, удостоенный в 1962 Нобелевской премии по физиологии и медицине (совместно с Дж. Уотсоном и [Ф. Криком](#)) за открытия в области молекулярной генетики. Вместе с семьёй в возрасте шести лет переехал в Англию. Окончил Кембриджский университет; в 1940 получил степень доктора философии в Бирмингемском университете. Во время Второй мировой войны занимался радаром. В течение двух лет работал в Калифорнийском университете в Беркли в рамках Манхэттанского проекта. С 1946 работал в Кингз-колледже в Лондоне (с 1962 возглавлял отдел молекулярной биологии, с 1970 – профессор биофизики, с 1981 – почётный профессор).
- Уилкинс известен своими работами по рентгеноструктурному анализу дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). **Исследуя рассеяние рентгеновских лучей на кристаллах ДНК, он со своими коллегами по Кингз-колледжу получил данные, свидетельствующие о том, что молекула ДНК – регулярная структура, имеющая форму спирали. Эти результаты послужили основанием для построения Уотсоном и Криком знаменитой модели ДНК – [двойной спирали](#).** Впоследствии Уилкинс исследовал структуру рибонуклеиновых кислот (РНК) – молекул, участвующих в синтезе белков в клетке. Автор ряда работ по биофизике нервной системы.
- Выдающиеся биологи



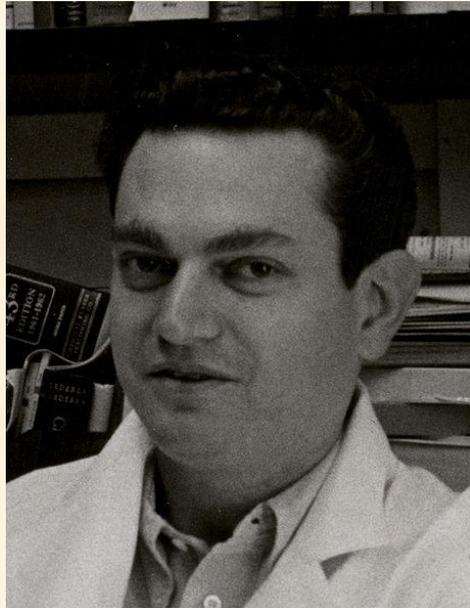
**Розалинда  
получала лучшие  
в мире  
рентгенограммы  
ДНК**

- Розалинд Франклин ([англ. Rosalind Franklin](#)) (**25 июля**) (25 июля **1920**) (25 июля 1920 — **16 апреля**) (25 июля 1920 — 16 апреля **1958**) (25 июля 1920 — 16 апреля 1958) — английский биофизик и учёный-рентгенограф, занималась изучением структуры **ДНК**.
- Родилась в Лондоне в состоятельной еврейской семье. Окончив школу, поступила в **Кембриджский университет**, где получила звание кандидата наук по физической химии. После войны переехала в Париж, где занималась исследованиями в области применения рентгеноструктурного анализа.
- В 1950 году вернулась в Англию для работы в Лондонском университете над исследованием структуры ДНК. Сделанные Розалиндой Франклин снимки отличались особой чёткостью и, по некоторым сведениям, послужили основанием для выводов о структуре ДНК, сделанных и опубликованных впоследствии в журнале «Nature» работавшими в Кавендишской лаборатории Кембриджского университета **Джеймсом Уотсоном** В 1950 году вернулась в Англию для работы в Лондонском университете над исследованием структуры ДНК. Сделанные Розалиндой Франклин снимки отличались особой чёткостью и, по некоторым сведениям, послужили основанием для выводов о структуре ДНК, сделанных и опубликованных впоследствии в журнале «Nature» работавшими в Кавендишской лаборатории Кембриджского университета Джеймсом Уотсоном и **Фрэнсисом Криком**.
- За это открытие Уотсон и Крик получили Нобелевскую премию в 1962 году. Розалинды 9 Франклин к тому моменту уже не было в живых. Частый контакт с рентгеновским излучением стал причиной повреждения её здоровья.



**Чаргафф Эрвин**

- **Чаргафф Эрвин (Chargaff) (р. 1905 на территории нынешней Украины), американский биохимик. По происхождению австриец. С 1928 в США. Исследовал химический состав и структуру нуклеиновых кислот. Определил количественное соотношение азотистых оснований, входящих в их состав (правило Чаргаффа), установил видовую специфичность ДНК.**
- **1945 год (события в Японии) сильно повлиял на представление Чаргаффа о роли науки. Он понял, что это не новый вид бизнеса, а часть общечеловеческой культуры.**
- **Возможно, после этих событий у ученого проснулся талант публициста. Это уже не ученому, а публицисту Эрвину Чаргаффу принадлежат слова:**
- **"уровень развития государства определяется тремя составляющими: отношением к деревьям отношением к детям отношением к родному языку."**



**Маршалл Уоррен Ниренберг**

- **Маршалл Уоррен Ниренберг (1927-2010) — американский биохимик и генетик, лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине в 1968 году (совместно с Робертом Холли и Харом Гобиндом Кораной) «за расшифровку генетического кода».** Член **Национальной академии наук США** Маршалл Уоррен Ниренберг (1927-2010) — американский биохимик и генетик, лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине в 1968 году (совместно с Робертом Холли и Харом Гобиндом Кораной) «за расшифровку генетического кода и его роли в синтезе белков».

## Георгий Антонович Гамов

- **Георгий Антонович Гамов (1904-1968)**  
*- Физик*  
**ТЕОРЕТИК БОЛЬШОГО ВЗРЫВА**
- **Американский физик, астрофизик, член Национальной АН (с 1953 г.). Род. в Одессе. Образование получил в Новороссийском (Одесском) (1922—1923 гг.) и Ленинградском (1923—1928 гг.) ун-тах. В 1928—1931 гг. проходил стажировку в Геттингенском, Копенгагенском и Кембриджском ун-тах. В 1931—1933 гг. работал в Ленинградском физико-техническом ин-те. С 1934 г. работал в США, в 1934 —1956 гг. — профессор физики ун-та им. Дж. Вашингтона, с 1956 г. — ун-та в Колорадо.**
- В марте 1932 года Георгий Гамов становится членом-корреспондентом АН СССР, самым молодым в ее истории.

СССР зовут страной убийц и хамов.

Недаром.

Вот пример:

советский парень Гамов.

Чего хотите вы от таких людей?!

Уже до атомов добрался, лиходей!

- Начиная с **1982 года** фирмы США, Японии, Великобритании и других стран **производят генно-инженерный инсулин**. Клонированные гены человеческого инсулина были введены в бактериальную клетку, где начался синтез гормона, который природные микробные штаммы никогда не синтезировали.
- Около **200 новых диагностических препаратов** уже **введены в медицинскую практику**, и более **100 генно-инженерных лекарственных веществ** находится на стадии клинического изучения. Среди них лекарства, излечивающие артрозы, сердечно-сосудистые заболевания, некоторые опухолевые процессы и, возможно, даже СПИД. Среди нескольких сотен генно-инженерных фирм **60%** работают над производством лекарственных и диагностических препаратов.

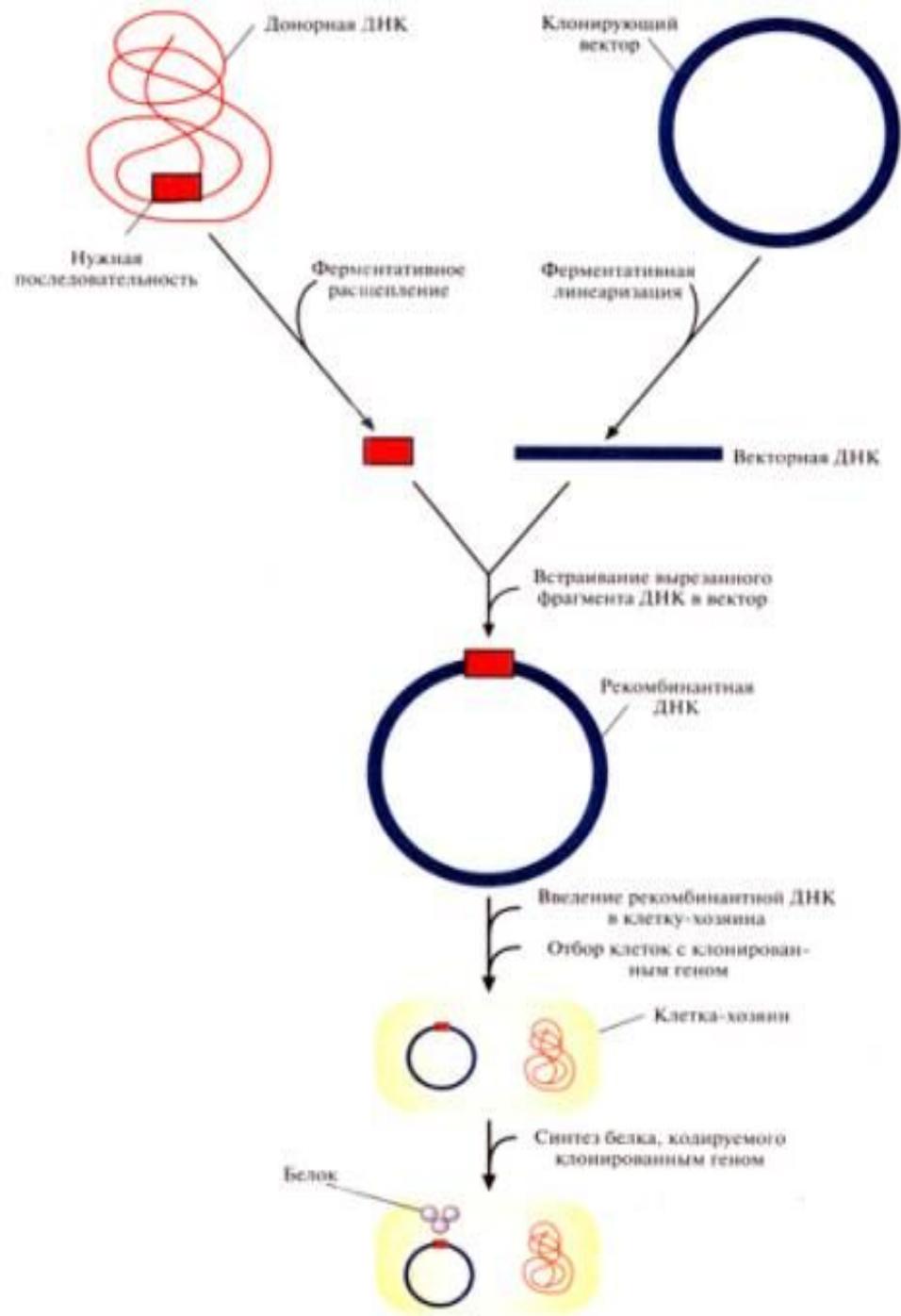
- **Технология рекомбинантных ДНК использует следующие методы:**
- **специфическое расщепление ДНК рестрицирующими нуклеазами, ускоряющее выделение и манипуляции с отдельными генами;**
- **быстрое секвенирование всех нуклеотидов в очищенном фрагменте ДНК, что позволяет определить границы гена и аминокислотную последовательность, кодируемую им;**
- **конструирование рекомбинантной ДНК;**
- **гибридизация нуклеиновых кислот, позволяющая выявлять специфические последовательности РНК или ДНК с большей точностью и чувствительностью, основанную на их способности связывать комплементарные последовательности нуклеиновых кислот;**
- **клонирование ДНК:** амплификация *in vitro* с помощью цепной полимеразной реакции или введение фрагмента ДНК в бактериальную клетку, которая после такой трансформации воспроизводит этот фрагмент в миллионах копий;
- **введение рекомбинантной ДНК в клетки или организмы.**

- **Рекомбинация** - перераспределение генетического материала; это любой процесс, способный привести к возникновению клеток с двумя или более наследственными детерминантами, по которым их родители различались между собой и которые соединены новым способом.
- Рекомбинация может происходить путем
  - - обмена клеточными ядрами,
  - - целыми молекулами ДНК,
  - - частями молекул ДНК.
- Такая рекомбинация обязательно происходит у млекопитающих при образовании половых клеток. У вирусов и бактерий генетическая рекомбинация происходит реже, чем у животных. В природе обмен генетическим материалом, за которым следует рекомбинация, происходит обычно между организмами одного и того же, или близких видов. *In vitro* (с помощью генной инженерии) можно осуществлять обмен между далекими видами; в результате удастся осуществить ***такие изменения генома, которые естественным путем вряд ли могли бы возникнуть.***

- В России и за рубежом методом генной инженерии получен ряд ценных медицинских препаратов, в том числе **инсулин человека** и противовирусный препарат **интерферон**. И хотя эта технология еще только разрабатывается, она сулит достижение огромных успехов и в медицине, и в сельском хозяйстве. В медицине, например, это весьма перспективный путь создания и производства **вакцин**. В сельском хозяйстве с помощью рекомбинантной ДНК могут быть получены **сорта культурных растений, устойчивые к засухе, холоду, болезням, насекомым-вредителям и гербицидам**.
- **Приступая к клонированию, в распоряжении биотехнолога-исследователя должны быть способы соединения исходных генов с вектором и введения рекомбинантных репликонов в клетку-хозяина. Необходимо также уметь отличать клетки, содержащие рекомбинантный репликон, от исходных реципиентных клеток.**

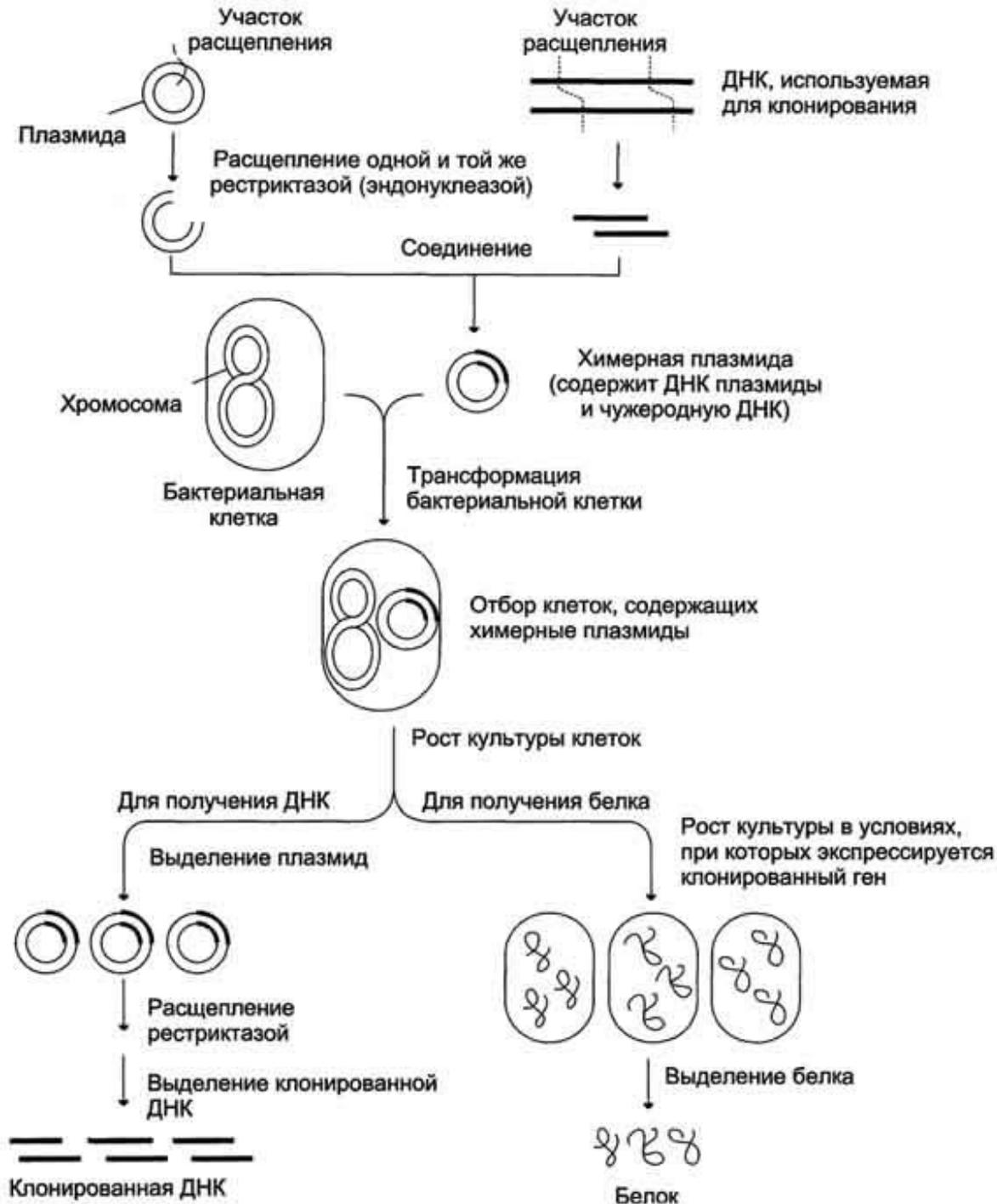
# Клонирование рекомбинантной ДНК

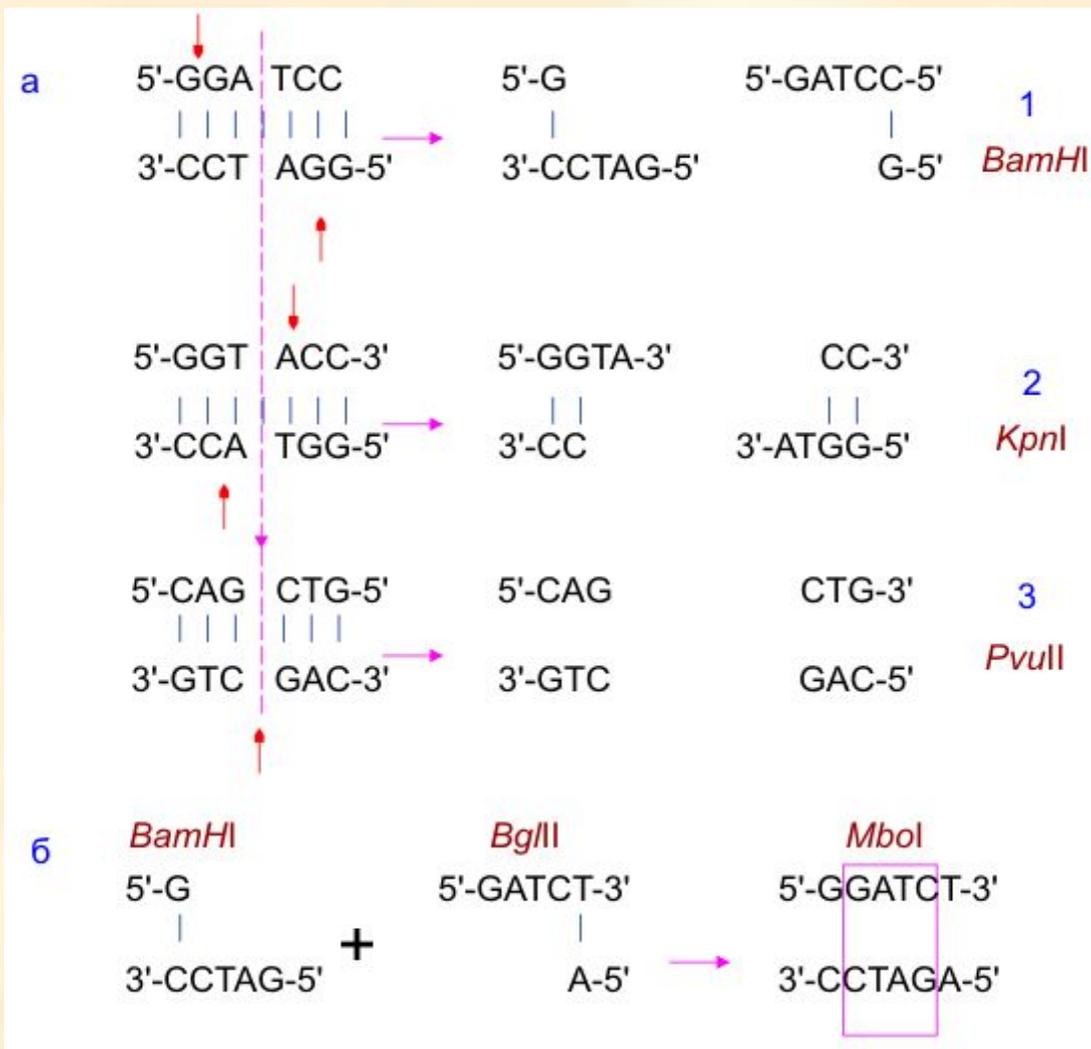
- Универсального набора методик не существует, но чаще всего эксперименты с рекомбинантной ДНК проводят по следующей схеме:
- **1. Из организма - донора нужных генов - экстрагируют нативную ДНК, подвергают ее ферментативному гидролизу и соединяют с другой ДНК с образованием новой, рекомбинантной молекулы.**
- **2. Полученную реконструкцию вводят в клетку хозяина, где она реплицируется и передается потомкам. Этот процесс называется трансформацией.**
- **3. Идентифицируют и отбирают клетки, несущие рекомбинантную ДНК.**
- **4. Получают специфический белковый продукт, синтезированный клетками-хозяевами, что служит подтверждением клонирования искомого гена.**
- Стратегия переноса функциональной единицы наследственности (гена) из одного организма в другой разработана американскими учеными **Стенли Коэном и Гербертом Бойером в 1973 г**



## Схема клонирования рекомбинантной ДНК

# Схема клонирования ДНК в бактериальных клетках



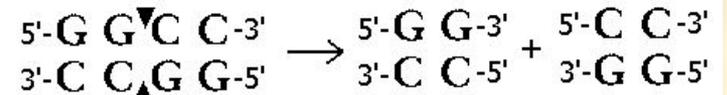


- **Формы разрывов двухцепочечных ДНК под действием рестриктаз**
- **а - 5'-выступающие (1), 3'-выступающие "липкие" (2) и "тупые" (3) концы ДНК, образующиеся под действием рестриктаз *Bam*HI, *Kpn*I и *Pvu*II соответственно. Стрелками обозначены места разрывов цепей ДНК, пунктирной линией - ось симметрии сайтов рестрикции; б - лигирование с потерей сайта рестрикции**

# Эндонуклеазы рестрикции

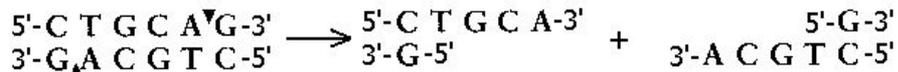
- Название *Pst* I образуется из названия источника энзима- микроорганизма *Providencia stuartii*. При разрезании этим ферментом получают отрезки ДНК с "липкими" концами. Существуют эндонуклеазы, разрезающие ДНК с образованием тупых концов, например:

*Pal* I

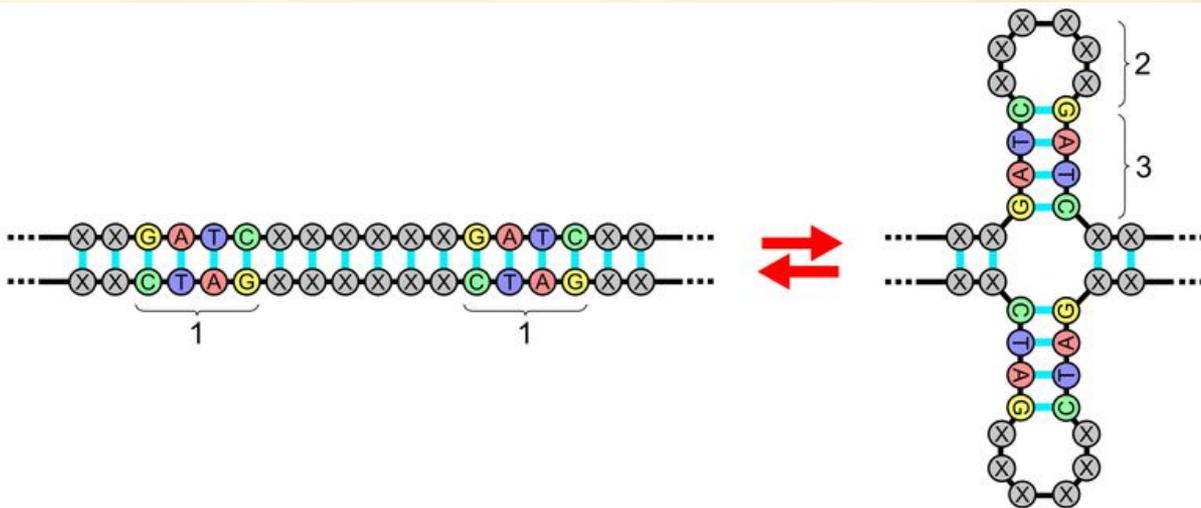


Source: *Providencia alcalifaciens*

*Pst* I



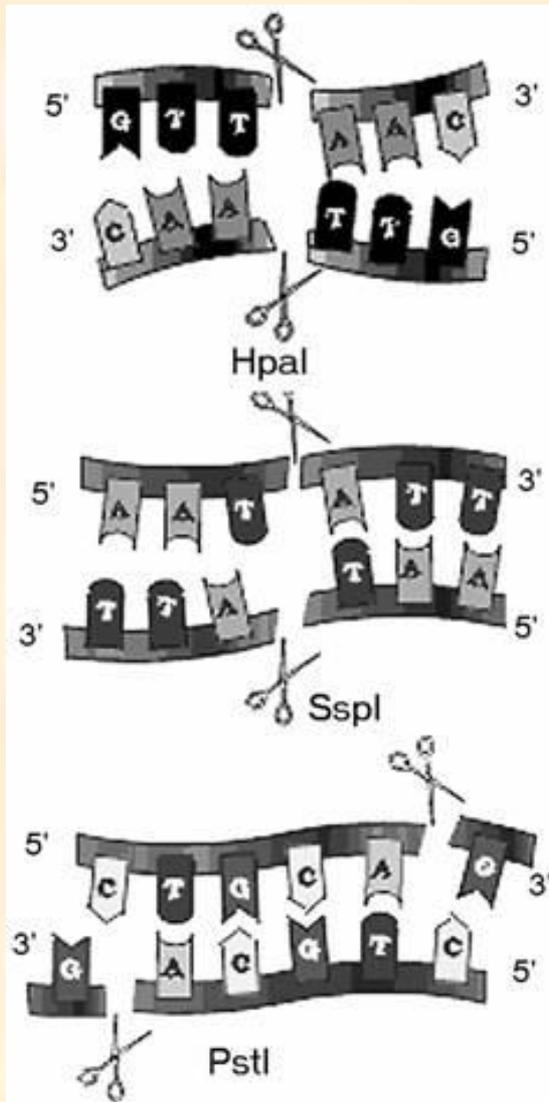
Source: *Providencia stuartii*



**Palindrome of DNA structure**

1. Palindrome, 2. Loop, 3. Stem

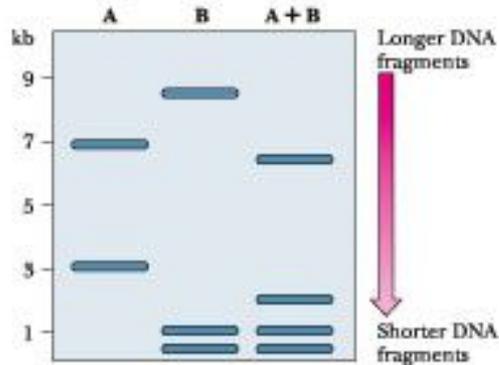
- **Открытие двуспиральной структуры ДНК явилось началом молекулярной генетики, открытие системы модификации-рестрикции стало основой генной инженерии. За открытие ферментов модификации-рестрикции В. Арбер, Д. Натансон и Г. Смит были удостоены в 1978 г. Нобелевской премии.**
- **Естественная функция рестриктаз - защита бактериальной клетки от вирусной инфекции. Они рестрицируют, т.е. ограничивают, размножение чужеродной ДНК путем ее деградации. Собственная ДНК клетки остается нативной, т.к. она специфически модифицирована. Первая рестриктаза была получена в 1970 г.**
- **Рестриктазы (рестрицирующие эндонуклеазы типа II) узнают определенные сайты ДНК (обычно 4-6 нуклеотидов), и расщепляют молекулу в этом месте. Играют ключевую роль при генном клонировании.**
- **Номенклатура: род организма - прописная буква, вид - две строчные, римские цифры - порядковый номер данной эндонуклеазы среди прочих, выделенных из данного микроорганизма.**



- *Streptomyces albus* - Sal,
- *Escherichia coli* - Eco
- Hind II, Hind I, Hind III (*Haemophilus influenzae*)
- Рестриктазы обозначают буквой R (R Hind III),
- метилазы - M (M Hind III).

- **Расщепление рестрицирующими эндонуклеазами имеет еще одно применение. Когда два разных образца ДНК обрабатывают одной и той же рестриктазой с образованием фрагментов с липкими концами, а затем смешивают эти образцы, то благодаря комплементарному спариванию липких концов фрагментов разных образцов могут образовываться новые комбинации генов - рекомбинантные ДНК.**
- **За технологию получения рекомбинантных ДНК в 1980 г. П. Бергу была присуждена Нобелевская премия, поскольку этот подход оказал грандиозное воздействие на все дальнейшее течение молекулярной биологии.**
- **Фрагменты удерживаются вместе водородными связями, образующимися между 4 основаниями липких концов. Но эти связи недостаточно прочны, чтобы молекулы в растворе оставались стабильными длительное время.**
- **Необходим инструментом для восстановления связи между 3' гидроксильной концевой группой одной цепи и 5' фосфатной группой другой цепи. Им является **ДНК-лигаза бактериофага Т4**. Этот фермент катализирует образование фосфодиэфирных связей между концами полинуклеотидных цепей, которые уже удерживаются вместе благодаря спариванию липких концов. Кроме того, ДНК-лигаза "сшивает" тупые концы, которые сближаются друг с другом после того, как объединяемые фрагменты связываются с ферментом.**

Treatment of a linear 10kb DNA molecule with endonucleases gave the following results:



Treatment with restriction endonuclease **A** gave 2 fragments, one 7 kb in size and one 3 kb in size, as judged by gel electrophoresis.

Treatment of another sample of the 10 kb DNA with restriction endonuclease **B** gave three fragments, 8.5 kb, 1.0 kb, and 0.5 kb.

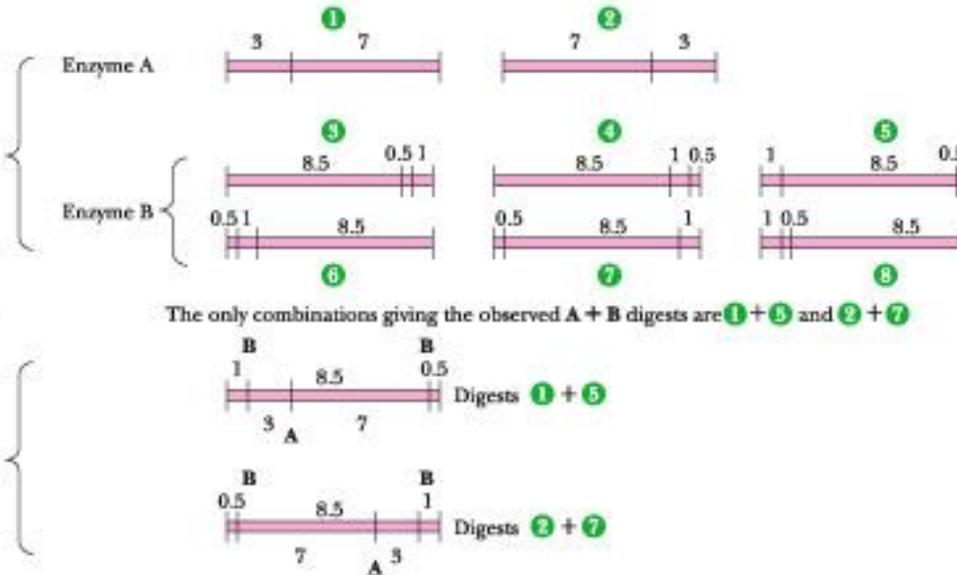
Treatment of a third sample with both restriction endonucleases **A** and **B** yielded fragments 6.5, 2, and 0.5 kb.

The observed electrophoretic pattern

Restriction mapping: consider the possible arrangements:

Which arrangements are correct?

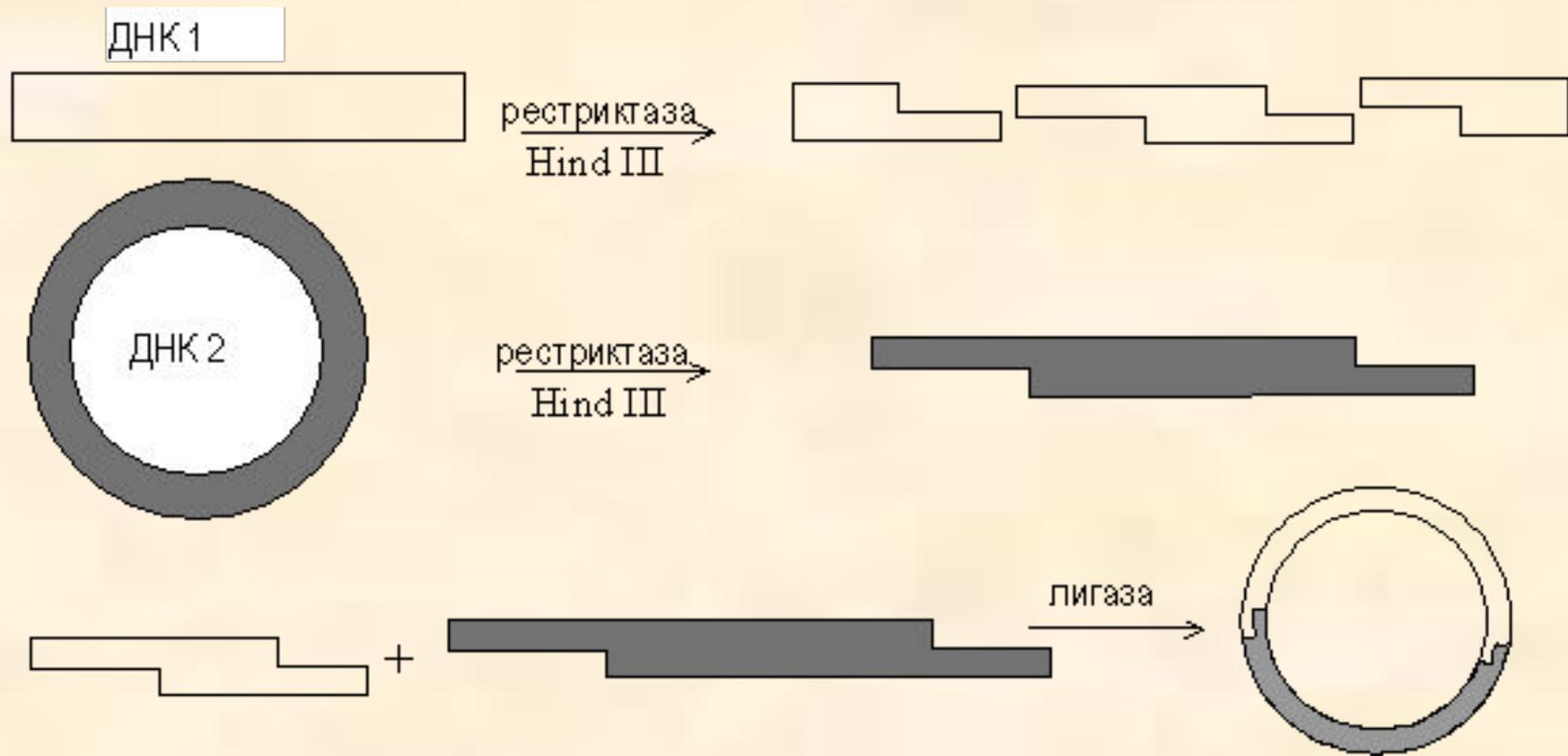
Possible maps of the 10kb fragment:



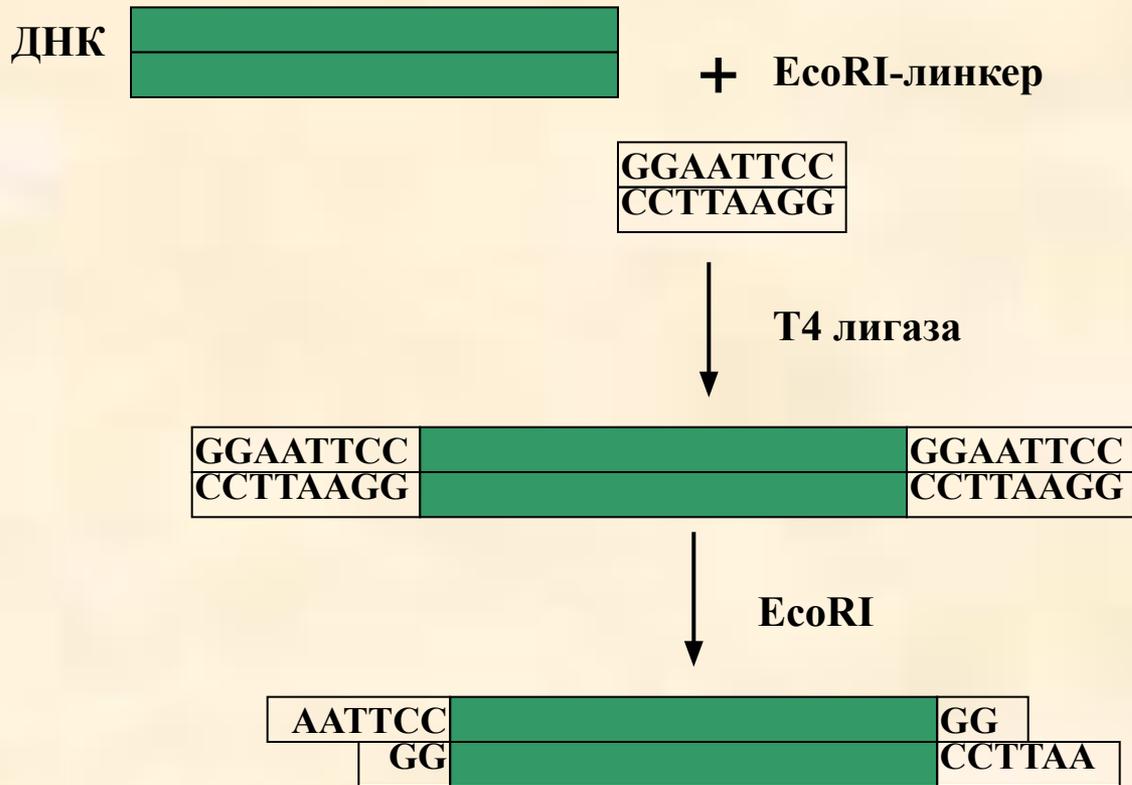
To decide between these alternatives, a fixed point of reference, such as one of the ends of the fragment, must be identified or labeled. The task increases in complexity as DNA size, number of restriction sites, and/or number of restriction enzymes used increases.

## Рестрикционное картирование

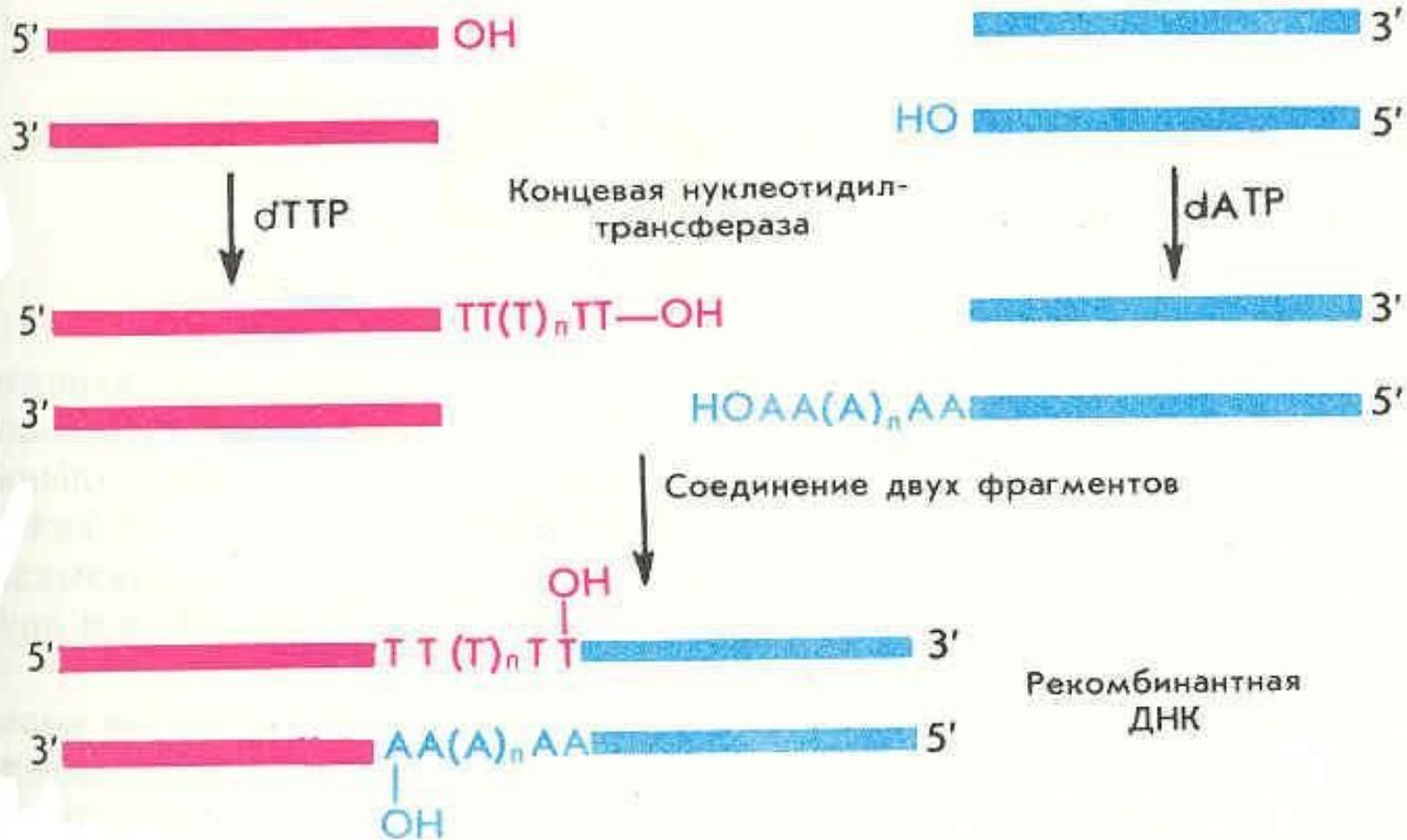
- Restriction mapping of a DNA molecule as determined by an analysis of the electrophoretic pattern obtained for different restriction endonuclease digests. (Keep in mind that a dsDNA molecule has a unique nucleotide sequence and therefore a definite polarity; thus, fragments from one end are distinctly different from fragments derived from the other end.)



**Схема рестриктазно - лигазного метода**



- **Соединение двух фрагментов ДНК с помощью линкеров**
- Для обеспечения возможности расщепления рекомбинантных ДНК по местам соединения вектора и вставки используются также специальные приемы, наиболее распространенным из которых является метод линкеров.



- **Соединение двух фрагментов ДНК коннекторным методом**
- Нередко применяется так называется коннекторная техника получения рекомбинантных ДНК. Она заключается в том, что с помощью **концевой нуклеотидилтрансферазы** к 3'-концу одного фрагмента присоединяется гомополинуклеотид, например поли(dT) или поли(dC), а к 3'-концу другого фрагмента - полинуклеотид, комплементарный используемому в первом случае, т. е. поли(dA) или поли(dC) (рис.). При добавлении фрагментов друг к другу они комплексуется за счет образования комплементарных пар оснований между концевыми гомополинуклеотидами, а затем соединяются в клетке-хозяине с помощью ее ферментативного аппарата.



## Терминальная трансфераза, поли-А - полимераза

-АТГ  
-ТАЦААААА

фрагмент 1

ТТТТТ ЦЦА-  
ГГТ-

фрагмент 2

-АТГ ТТТТТЦЦА-  
-ТАЦАААААГГТ-

«сшитая» ДНК

# Векторы

- **Объединение разных молекул само по себе бесполезно, если рекомбинантные ДНК не будут реплицироваться в в клетке-хозяине. Таким образом, если одна часть рекомбинантной молекулы ДНК несет нужный ген, который предполагается клонировать, то другая часть должна содержать информацию, необходимую для репликации этой ДНК в клетке. Для этого используют клонирующие векторы.**
- **Вектор - молекула ДНК, автономно реплицирующаяся в клетке хозяина; к вектору можно присоединить фрагмент ДНК, чтобы обеспечить его репликацию. Vector (лат. - несущий).**

- **Молекула вектора должна отвечать определенным требованиям:**
- **небольшой размер**, т.к. эффективность переноса экзогенной ДНК в *E. coli* значительно снижается при длине плазмиды > 15 т.п. н.;
- **наличие уникального сайта рестрикции**, в который может быть осуществлена вставка;
- **наличие генетических маркеров** для оптимальной селекции рекомбинантных клеток.
- В качестве векторов для включения чужеродной ДНК в клетки *E. coli* используются плазмиды (термин предложен Дж. Ледербергом) и бактериофаги. И те и другие являются репликонами.
- Многие плазмиды, представляющие собой двухцепочечные кольцевые молекулы ДНК, содержат гены, которые придают содержащим их бактериям некоторые фенотипические признаки, такие, как устойчивость к антибиотикам, солям тяжелых металлов и т. д.

# Плазмиды и бактериофаги

- **Плазмиды - внехромосомные, автономно реплицирующиеся двухцепочечные кольцевые молекулы ДНК.**

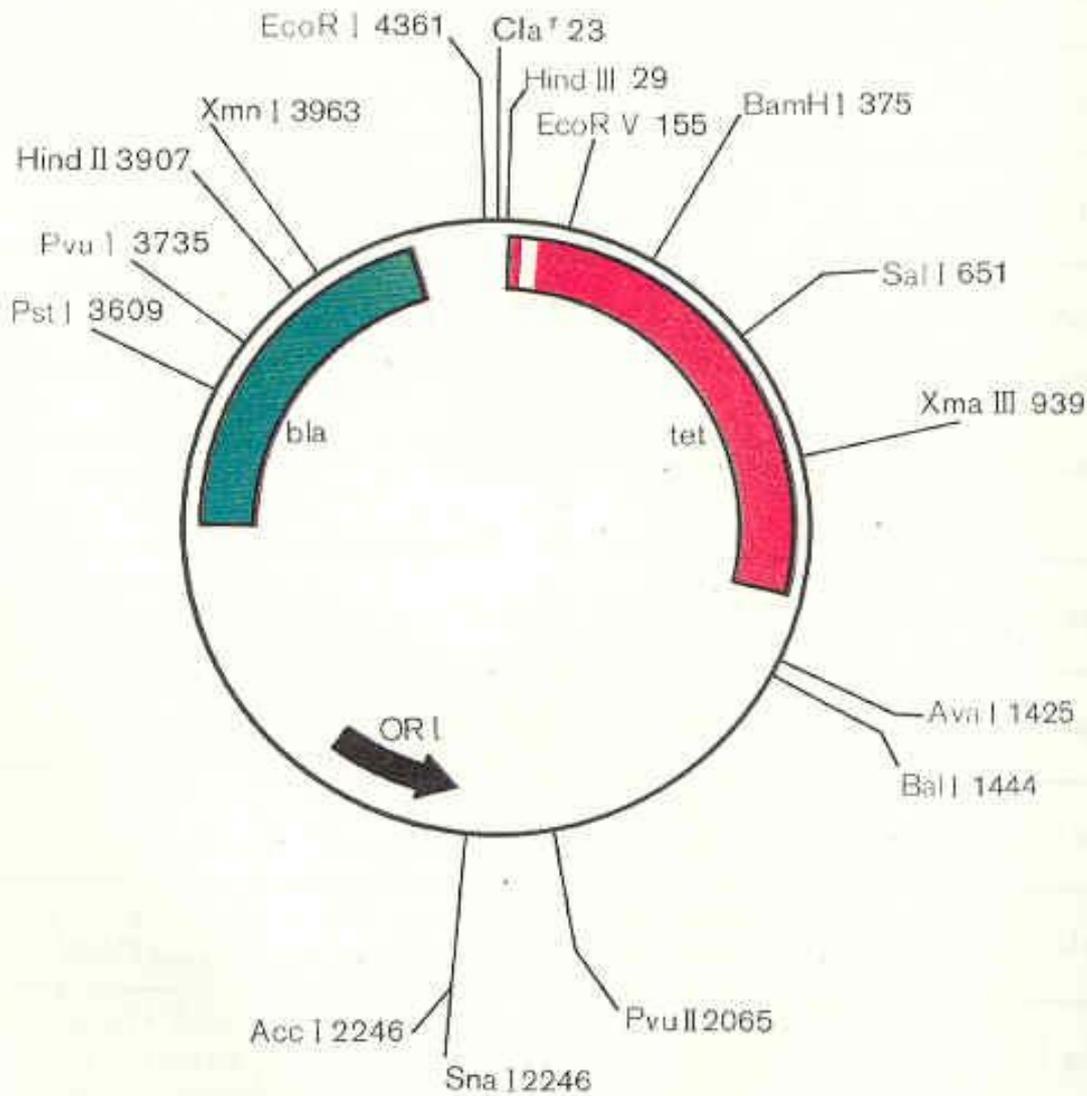
- **Плазмиды есть практически у всех бактерий.**

**Одни из них содержат информацию, обеспечивающую их собственный перенос из одной клетки в другую (F-плазмиды), другие несут гены устойчивости к антибиотикам (R-плазмиды) или специфические наборы генов, ответственных за утилизацию метаболитов (D-плазмиды деградации).**

**Есть плазмиды, в которых не обнаружены гены, выполняющие какие-то определенные функции (криптические плазмиды, от англ. cryptic- скрытый, латентный).**

- В 80-е годы плазмидный вектор *pBR322* был один из самых популярных универсальных векторов. Его размер составляет 4 361 п.н. Номенклатура: p- (от англ. plasmid), BR- от фамилий авторов, сконструировавших эту плазмиду - Ф. Боливар и Р. Родригес); 322- цифровое значение, взятое из их протоколов. Плаزمида реплицируется в *E. coli* с образованием большого числа копий, в другие бактериальные клетки переносится с трудом.

- **Специально сконструированы векторные плазмиды, позволяющие отличать клетки, содержащие рекомбинантные молекулы, от исходных бактериальных клеток. В качестве примера на рисунке приведена плазида pBR322, которая содержит два гена, программирующие устойчивость к двум различным антибиотикам - тетрациклину (ген tet) и ампициллину (ген bla). В гене tet находятся уникальные участки расщепления рестриктазами HindIII, BamHI и SmaI, а в гене bla - участок расщепления PstI. Если "разрезать" плазмиду любой из рестриктаз, участок расщепления которой находится в гене tet, и соединить ее методом липких концов с чужеродным фрагментом ДНК, то в полученной рекомбинантной молекуле останется нетронутым только ген bla, а ген tet утрачивает свою активность, поскольку его последовательность разрывается вставкой. Наоборот, при разрезании плазмиды рестриктазой PstI и внедрении в этот участок фрагмента ДНК инактивируется ген bla тогда как ген tet продолжает обеспечивать синтез белка, придающего E. coli устойчивость к тетрациклину. Использование такой методологии позволяет быстро идентифицировать клетки, содержащие рекомбинантные плазмиды.**



## Плазмидный вектор pBR322

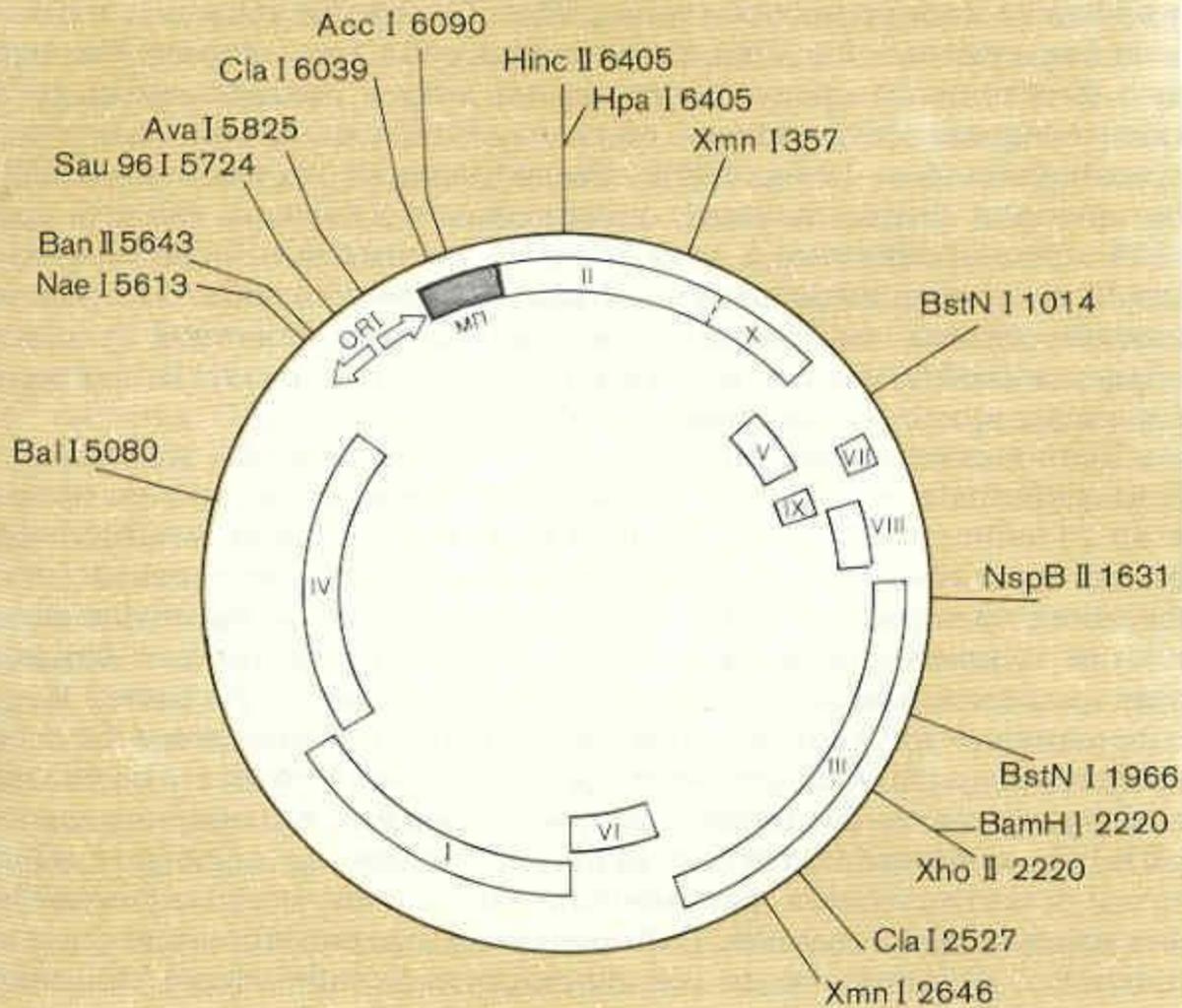
- **Размеры плазмид варьируют** от <1 до >500 т.п.н. Каждая из них содержит **сайт начала репликации (ori)**, без которого репликация плазмиды в клетке хозяина была бы невозможной.
- Некоторые плазмиды представлены в клетке 10-100 копиями, они называются **высоко-копийными**. **Низко-копийные** плазмиды присутствуют в клетке в 1-4 числе копий. На долю плазмидной ДНК обычно приходится 0.1-5% суммарной клеточной ДНК.
- Если 2 или более плазмиды не могут сосуществовать в одной и той же клетке, то они принадлежат к одной **группе несовместимости**. Плазмиды, относящиеся к разным группам несовместимости, беспрепятственно существуют в одной клетке независимо от числа копий.
- Различают плазмиды **с узким и широким спектром хозяев**. Первые могут реплицироваться в клетках одного вида (сайт инициации репликации у них высоко специфичен), вторые - в разных бактериальных клетках (сайт инициации репликации у них менее специфичен).

- **Чтобы уменьшить количество нежелательных комбинаций между фрагментами ДНК, плазмидную ДНК после рестрикции обрабатывают щелочной фосфотазой. ДНК-лигаза не может сшить концы обработанные фосфотазой, и объединяет только фрагменты разных ДНК.**
- **Рекомбинантная ДНК имеет кольцевую структуру, но в ней два разрыва, которые устраняются после репликации.**

- **Другие плазмидные векторы.** Например, более сложно устроенная плаزمида **pUC19** длиной 2689 п.н.
- **Некоторые плазмиды устроены очень сложно, но все системы клонирования отвечают двум основным требованиям:**
  - - наличие нескольких сайтов для клонирования и
  - - возможность достаточно простой идентификации клеток с рекомбинантной ДНК.
- **Уникальные сайты рестрикции выполняют двойную функцию:**
  - - встраивание чужеродной ДНК в вектор и
  - - вырезание клонированной последовательности из вектора.

- Для всех рутинных процедур широко используется *E. coli*; в качестве клеток-хозяев часто используют другие бактерии, например, *Bacillus subtilis* и *Agrobacterium tumefaciens*.
- В векторы, которые функционируют в *E. coli*, **можно встроить второй сайт инициации репликации**, обеспечивающий их репликацию в других клетках. Это так называемые **ЧЕЛНОЧНЫЕ** векторы. Создано множество плазмидных векторов, которые содержат **1 сайт начала репликации ДНК для широкого спектра хозяев**.

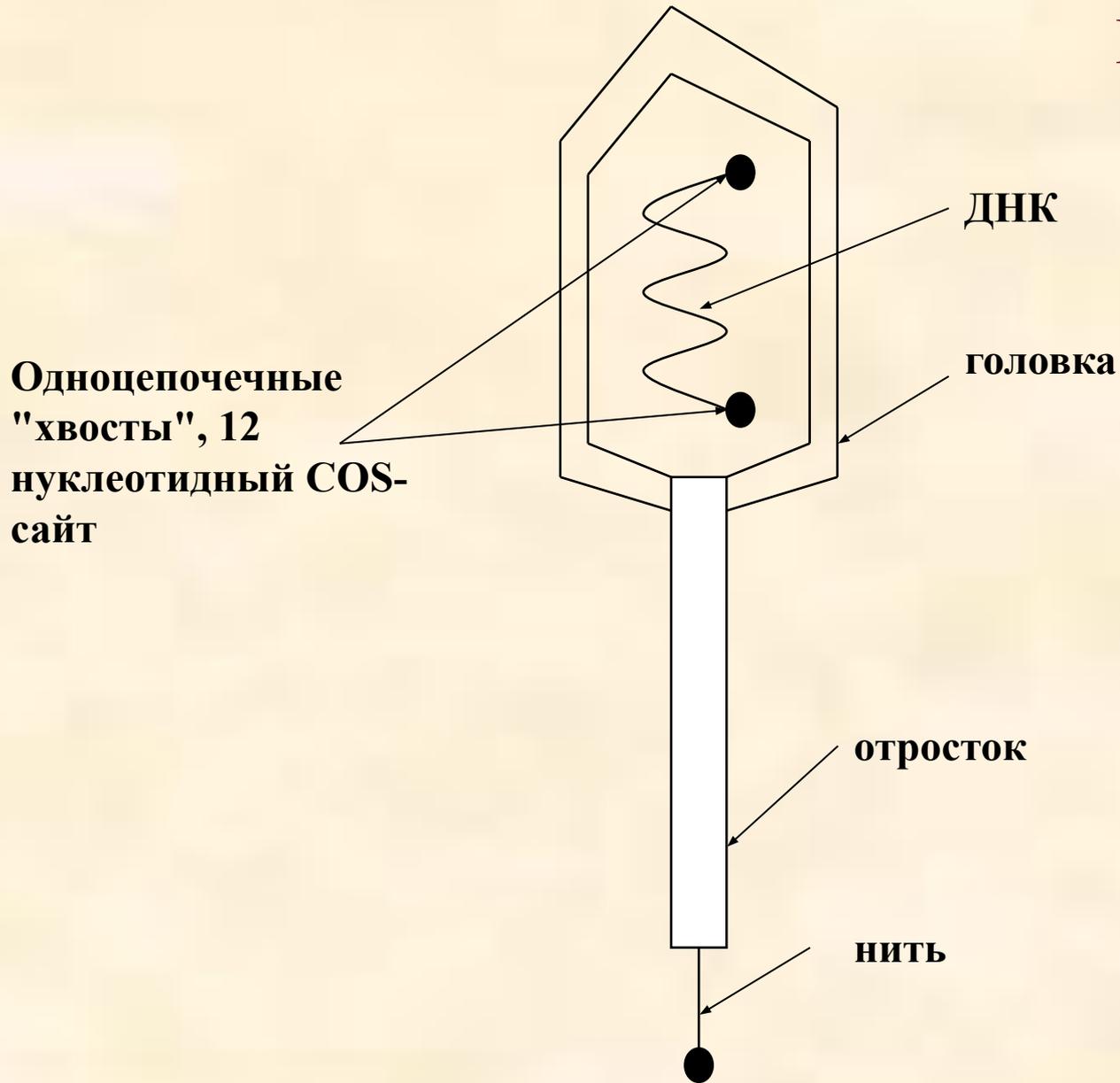
- Важную группу векторов, широко используемых при установлении первичной структуры ДНК, составляют нитевидные бактериофаги, такие, как M13, *fd* и *fl*.

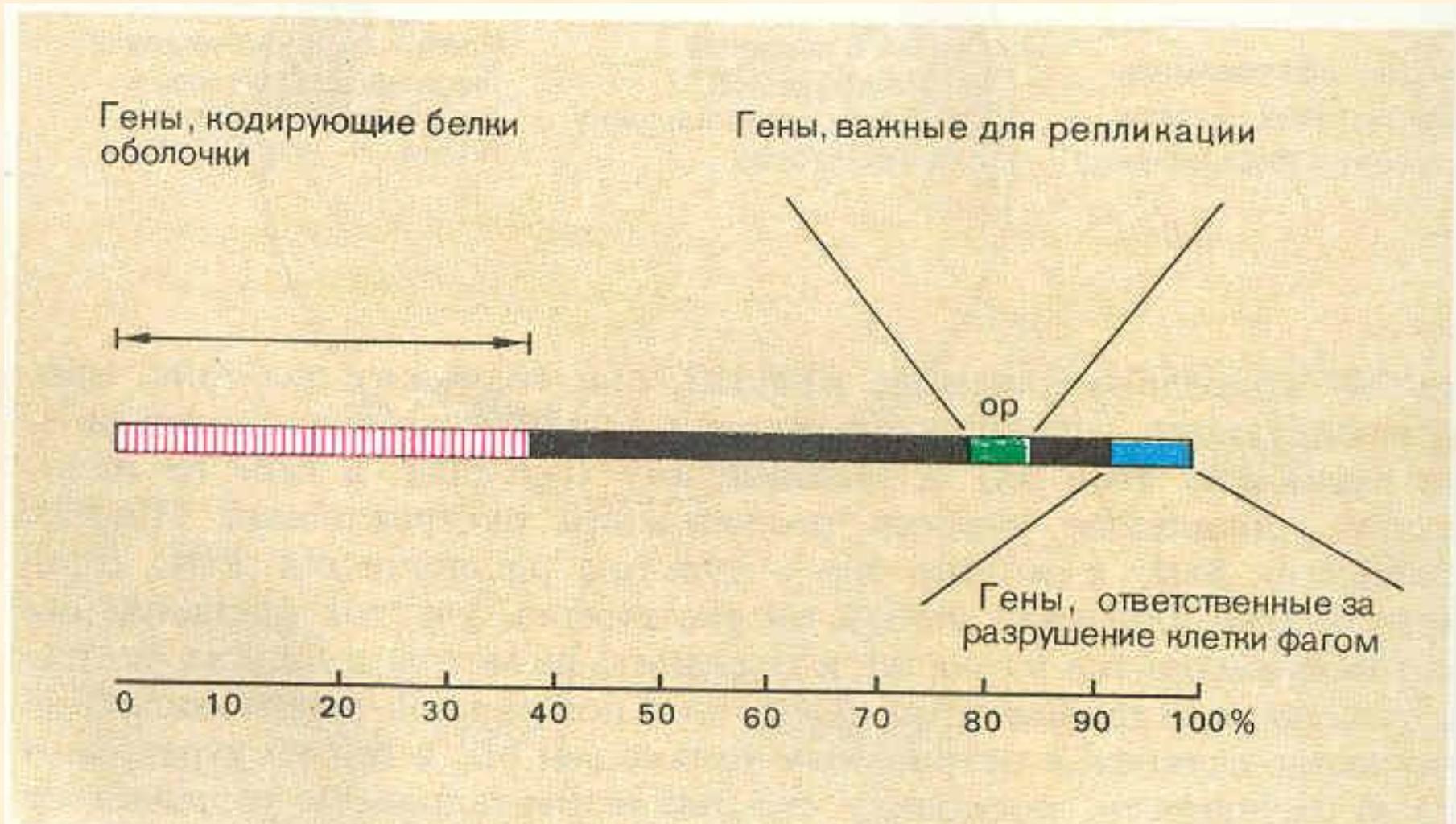


- Фаг M13** представляет собой **одно-цепочечную циклическую ДНК** длиной **около 6500 нуклеотидов**. После инфицирования бактериальной клетки одноцепочечная ДНК фага превращается в двухцепочечную репликативную форму (RF), которая во всех отношениях подобна плазмиде. Кроме того, фаговая ДНК содержит короткий участок (500 нуклеотидов), названный **межгенной последовательью (МП)**, несущественный для ее жизнеспособности.

• Таким образом, выделив репликативную форму ДНК и расщепив ее в области несущественного участка, можно с помощью лигазы вставить в место разрыва чужеродную ДНК. Введение рекомбинантной двухцепочечной молекулы в клетку *E. coli* приводит к ее репликации, синтезу (+) -цепи, упаковке последней в белковый чехол и выделению фага в среду. Далее инфицированная нитевидным фагом клетка, продолжая делиться, хотя и с замедленной скоростью, постепенно выделяет в окружающую среду большое количество фага. Этот фаг содержит в вирионе одноцепочечную циклическую ДНК, в которую встроена одна из цепей чужеродной ДНК.

# Бактериофаг $\lambda$





**Упрощённая генетическая карта фага-лямбда (зачерченный участок соответствует генам, несущественным для размножения фага)**

- Если яДНК >52 т.п.н., она не упакуется в головку, если <38 т.п.н., то фаг не будет инфекционным.
- На ранней стадии литического цикла бактериофаг представляет головку, к которой прикреплена линейная молекула, состоящая из нескольких сегментов по 50 т.п.н., разделенных cos-сайтами. Разрезание ДНК осуществляет фермент, находящийся у входа в головку.

После проникновения фага лямбда в клетку *E. coli* события могут развиваться по двум сценариям.

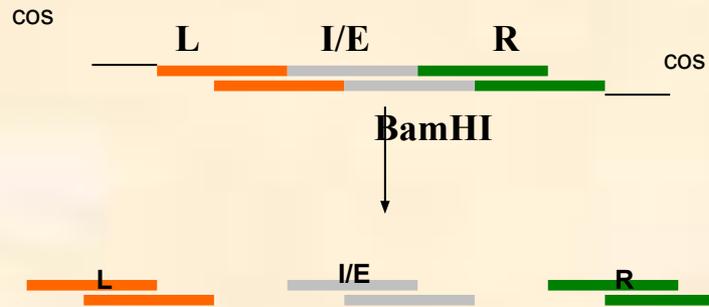
Если реализуется **ЛИТИЧЕСКИЙ ЦИКЛ**, фаг начинает **интенсивно размножаться** и через ~20 минут клетка разрушается с высвобождением до 100 новых фаговых частиц.

При альтернативном варианте ДНК фага включается в **хромосому *E. coli*** и реплицируется вместе с генами. Однако при недостатке питания фаговая ДНК высвобождается и запускает литический цикл.

С помощью **плазмидных векторов** можно клонировать фрагменты ДНК длиной до **10 т.п.н.** В некоторых случаях, например, при создании геномных библиотек, часто приходится работать с более крупными фрагментами. Для этого были разработаны векторы на основе бактериофага лямбда *E. coli*.

Большое разнообразие векторов существует на основе **бактериофагов**, в них используется особенность фага, состоящая в том, что значительная часть его ДНК (**20 т.п.н.** из 50 т.п.н. генома бактериофага лямбда *E. coli*) не нужна для размножения фага в клетке (рис.). Это позволяет вводить чужеродную ДНК в ДНК фага при использовании его в качестве вектора, причем длина вставляемого фрагмента может быть существенно больше величины фрагмента, встраиваемого в плазмиду.

## ДНК фага λ



ДНК, фрагмент  
которой надо  
клонировать

BamHI, фракционирование  
по размеру

BamHI, фрагмент  
15-20 т.п.н.

ДНК-лигаза + пустые головки +  
собранные отростки



Упаковка in vitro

Трансформация  
клеток E. coli

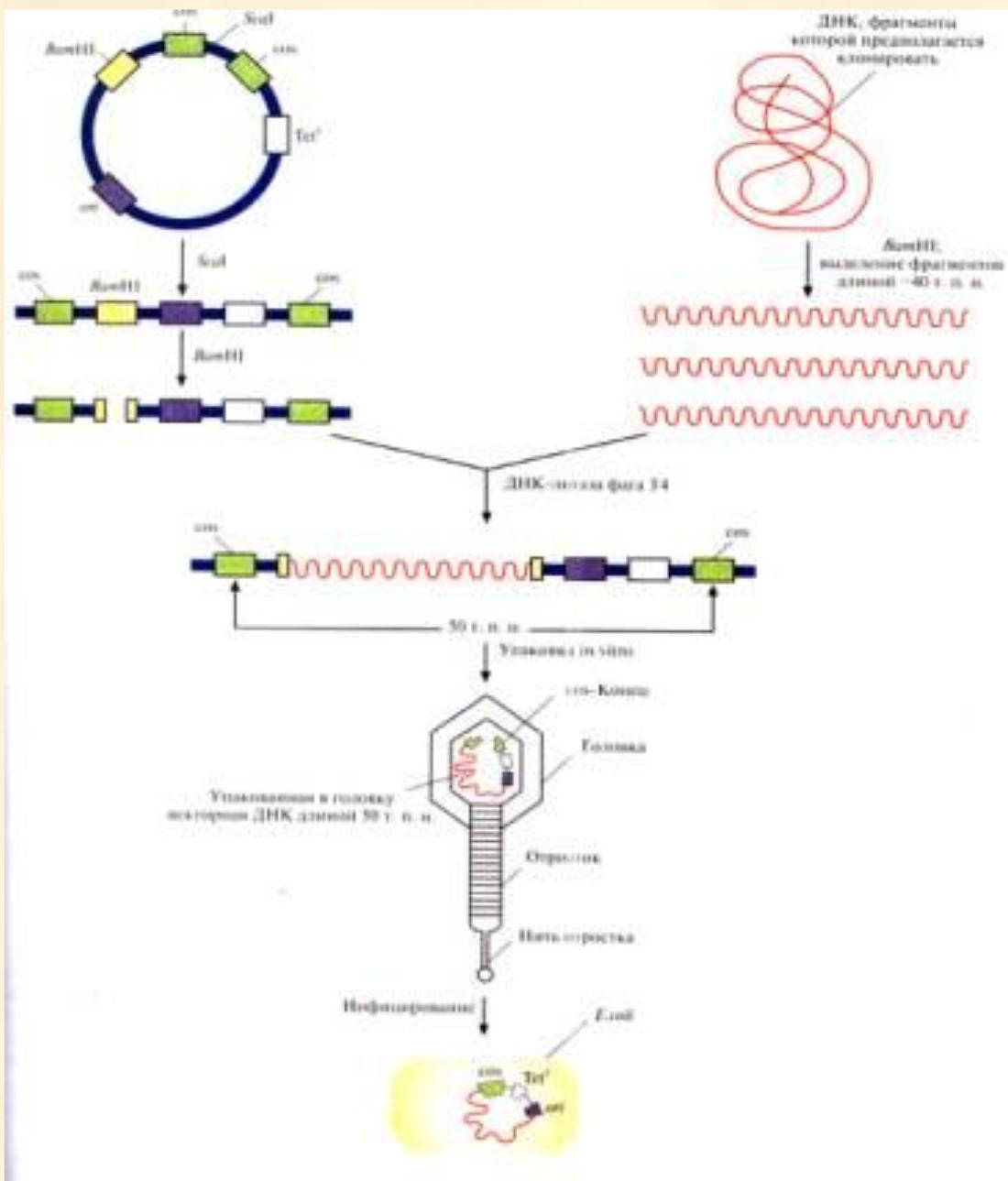
Бляшки не  
образуются



BamHI, фрагмент  
15-20 т.п.н.

Бляшки  
образуются

- L- левое плечо, содержит генетическую информацию о головке и отростке фага;
- R- правое плечо, ведает репликацией ДНК и лизисом;
- I/E- ответственен за интеграцию (integration) и исключение (excision).



- **Космиды**

- Векторы, называемые космидами, могут включать до **40 т.п.н.** чужеродной ДНК и при этом активно амплифицироваться в *E. coli* как плазмиды. Космиды объединяют в себе свойства плазмидных векторов и векторов на основе фага  $\lambda$ . Например, широко используется космида pLFR-5 (~6 т.п.н.). Она имеет два *cos*-сайта, полилинкер с 6 уникальными сайтами рестрикции, точку начала репликации (*ori*) и ген устойчивости к тетрациклину (Tetr).

- **Фазмиды**

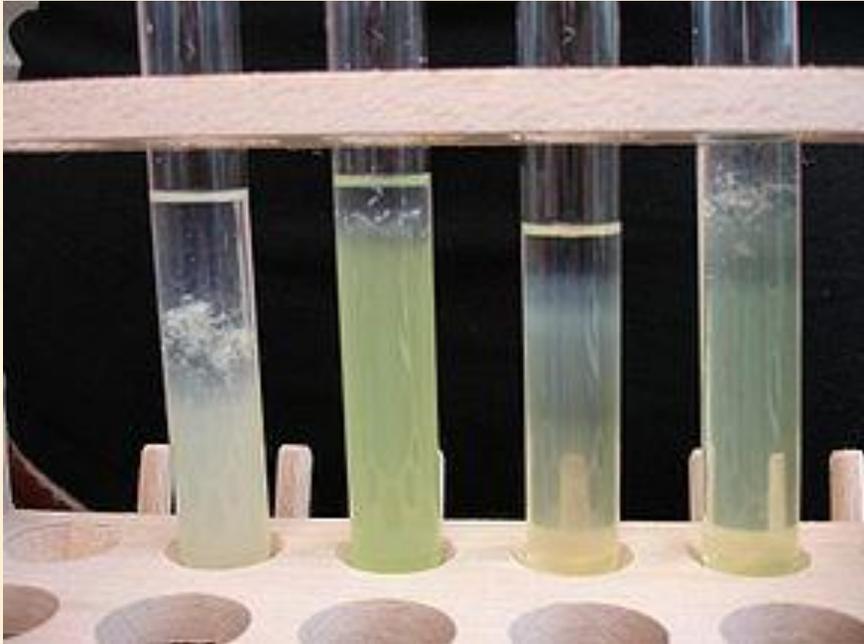
- Космиды являются по-существу плазмидными векторами, "присвоившими" *cos*-сайт фага лямбда для осуществления эффективной упаковки *in vitro*.
- **Истинными гибридами между плазмидой и фагом являются фазмиды - линейные дуплексные молекулы ДНК, концы которых представляют собой сегменты ДНК фага лямбда, содержащие гены, необходимые для литической инфекции, а средняя часть - линейаризованную плазмиду. 60 Т.П.Н.**

# Искусственные хромосомы

- Векторные системы для клонирования очень крупных фрагментов ДНК, **>100 т.п.н.** Необходимы, например, при картировании генома человека или при идентификации отдельных генов.
- Для клонирования фрагментов ДНК **от 100 до 300 т.п.н.** сконструирован низкокопийный плазмидный вектор на основе бактериофага P1 - химерная конструкция, называемая **искусственной хромосомой на основе фага P1.**
- Создан стабильный вектор, способный интегрировать вставки длиной от 150 до 300 т.п.н. на основе F-плазмиды (F- фактора, или фактора фертильности) *E. coli*, которая представлена 1-2 копиями, с селекционной системой *lacZ'* векторов рUC. Эта реконструкция называется **бактериальной искусственной хромосомой (BAC, от англ. bacterial artificial chromosomes).**
- **human artificial chromosome**

## Получение ДНК для клонирования

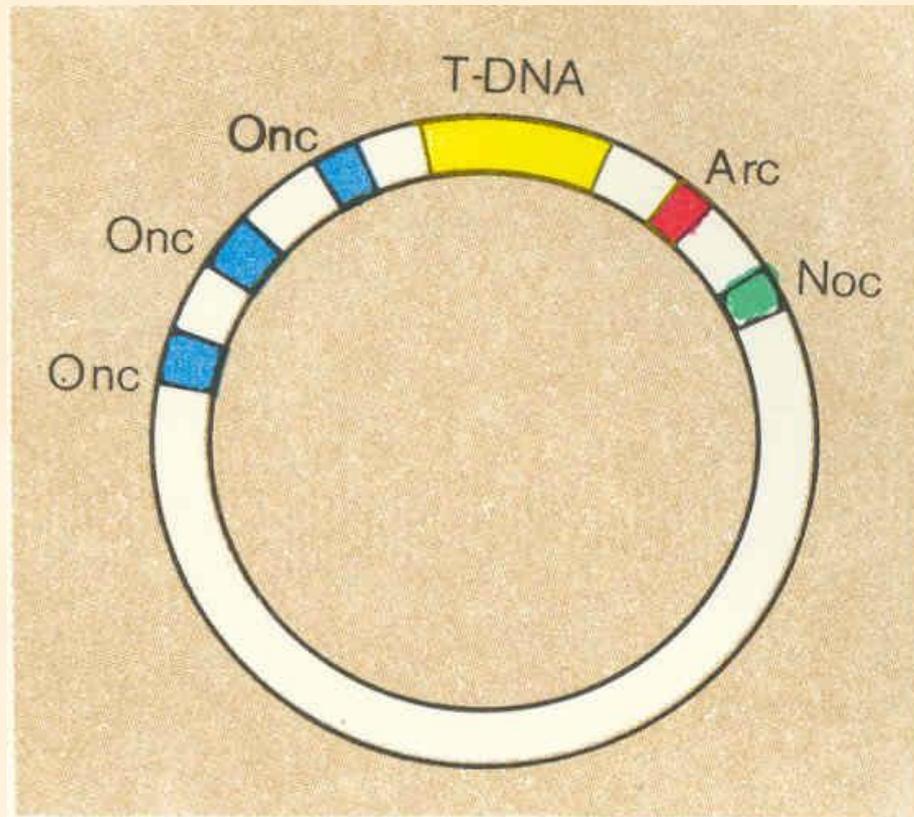
- *ДНК для клонирования может быть получена*
- *химико-ферментативным синтезом,*
- *обратной транскрипцией мРНК или*
- *путем непосредственного расщепления геномной ДНК нужной рестрикционной эндонуклеазой.*



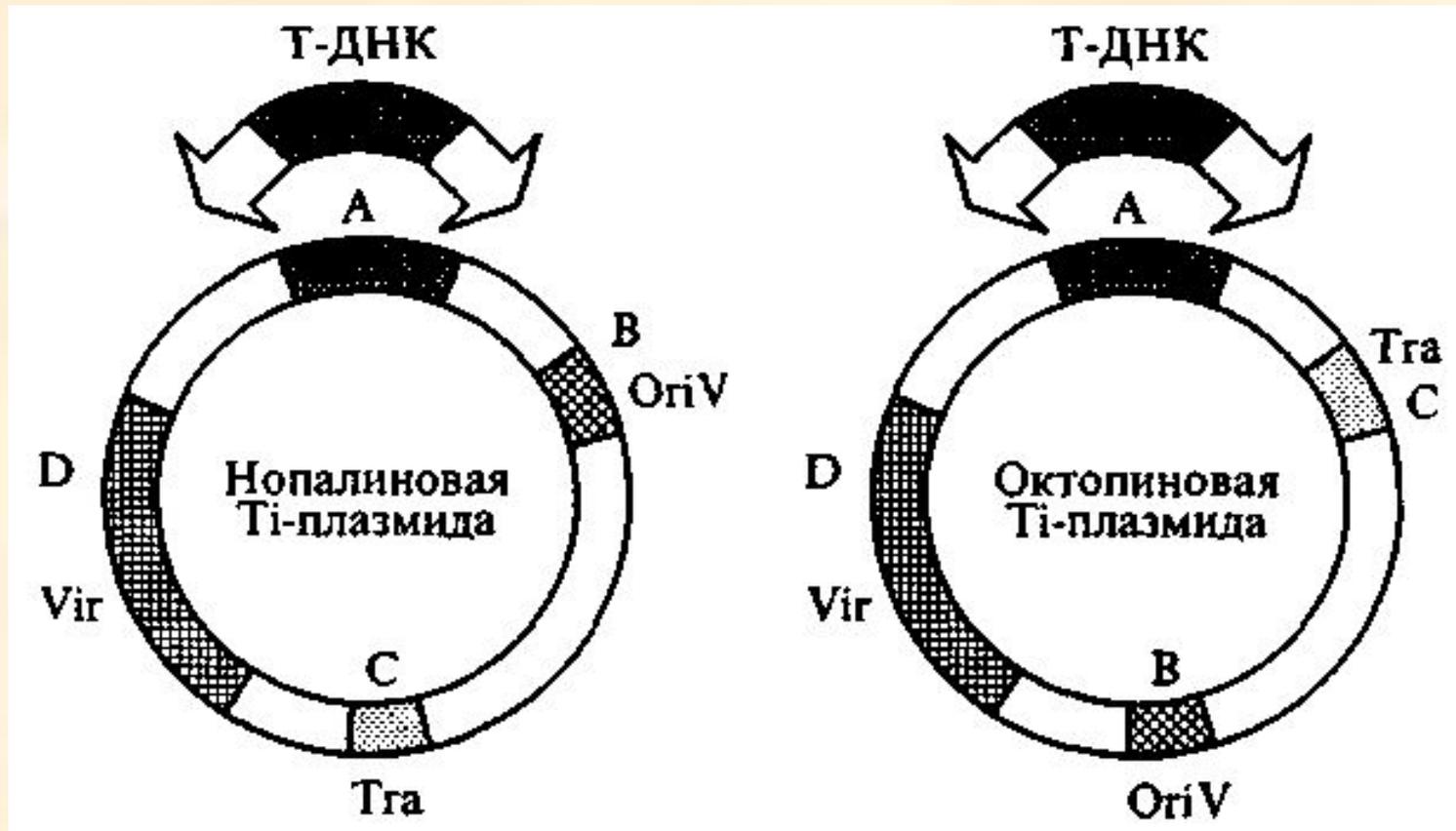
- Выделение ДНК методом СПИРТОВОГО осаждения.
- ДНК выглядит как клубок белых нитей

## **Типы векторов для введения гена в растительную клетку:**

- **Плазмиды агробактерий**
- **Хлоропластная и митохондриальная ДНК**
- **Транспозоны**

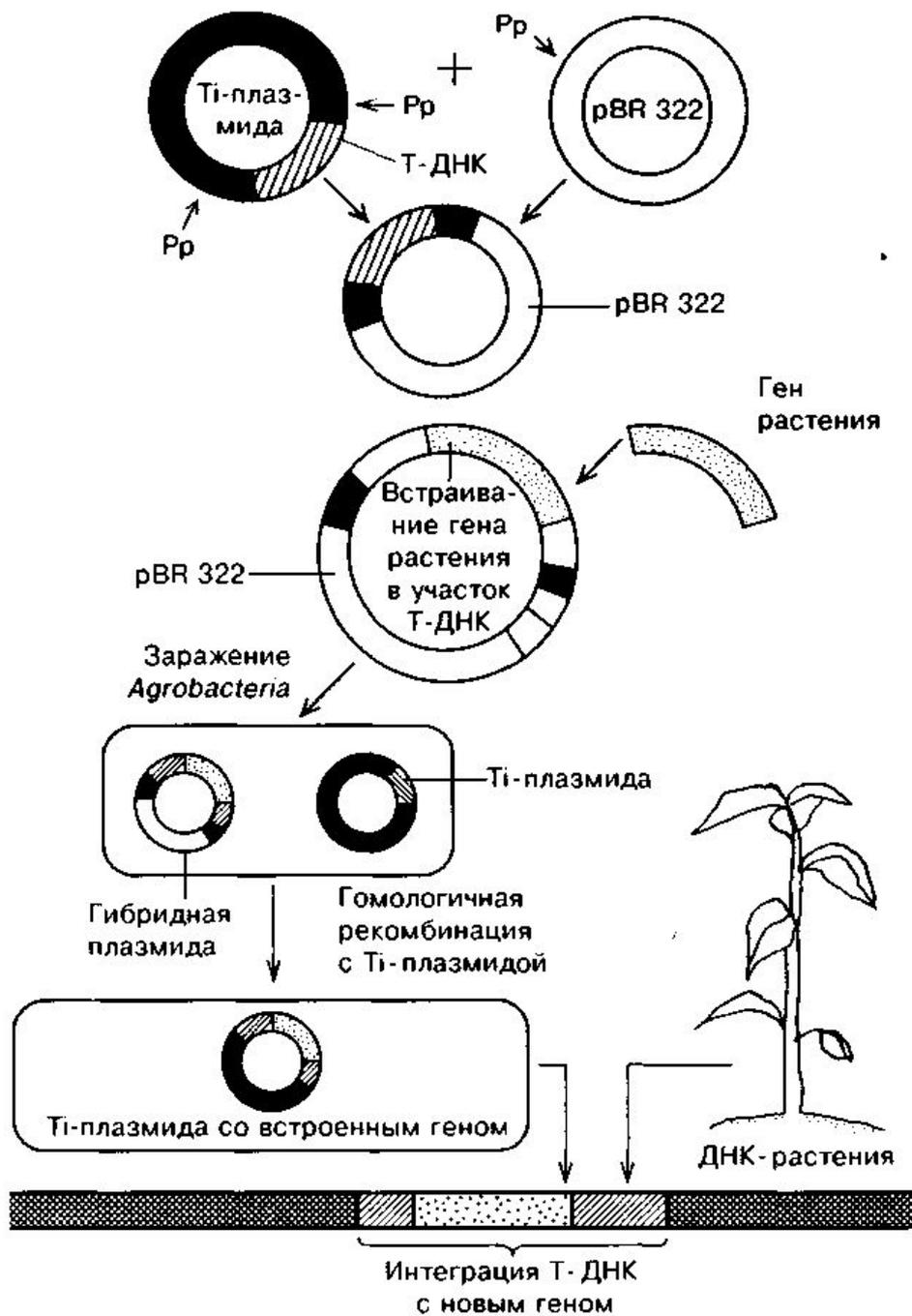


- **Физическая карта нопапиновой Ti- плазмиды. Гены Onc ответственны за онкогенность, ген Nos - за синтез нопапина, ген Arc - за деградацию аргинина**
- *Ti-Плазмиды способны трансформировать практически все двудольные растения, что делает их перспективным вектором для введения чужеродных ДНК в растения*



### Структура Ti-плазмид нопалинового и октопинового типа

- Продукты генов T-ДНК вызывают образование у растений корончатых галлов.
- Опины – уникальные продукты, синтезируются в корончатом галле, затем секретируются и могут использоваться в качестве источника углеводов.



## Создание коинтегративного вектора на основе Ti-плазмиды

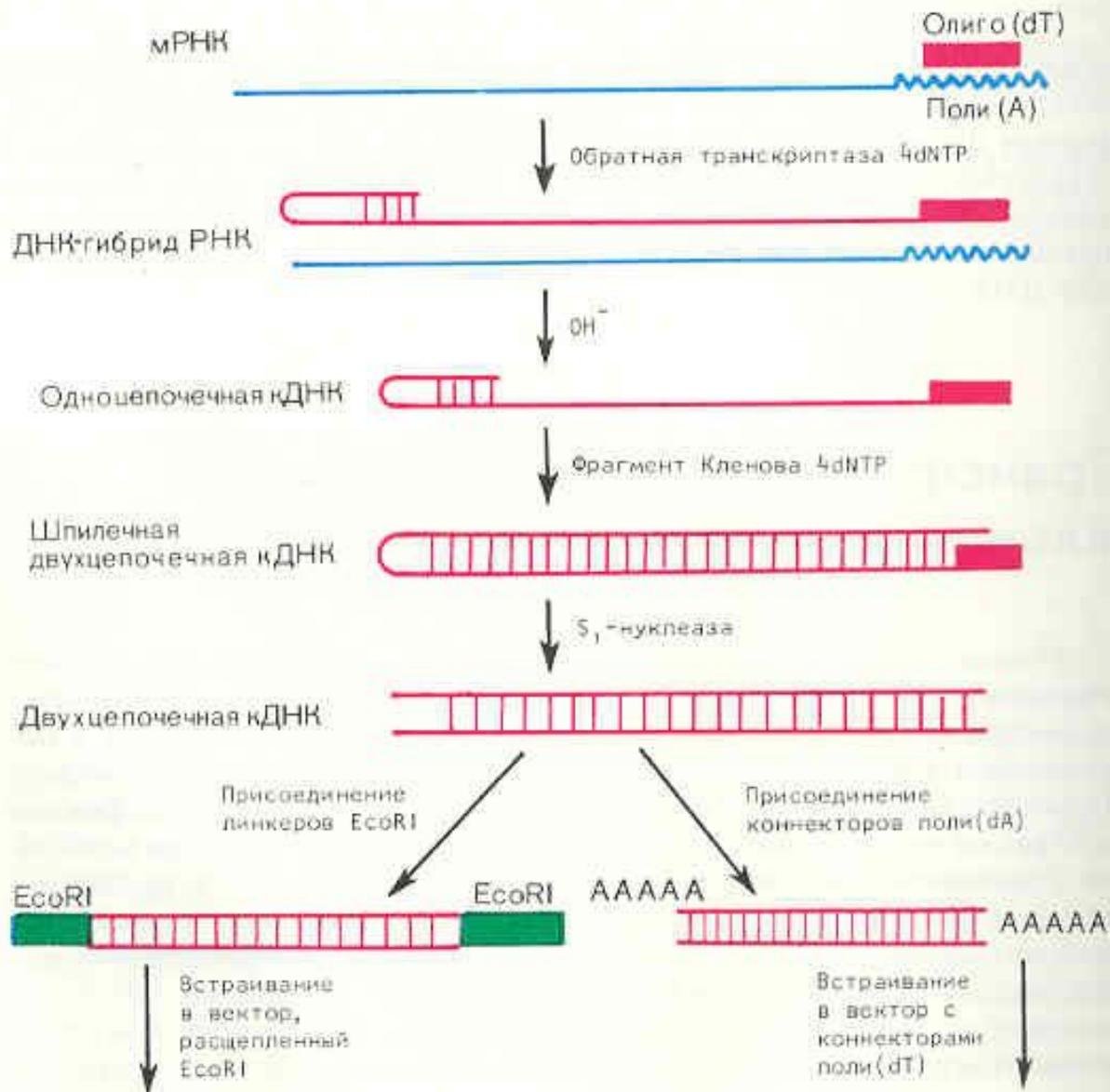
Pp - расщепление рестриктазой

- *К сожалению, трансформированные Т-ДНК клетки пока не способны давать полноценные растения. Однако были получены мутанты Т-ДНК, трансформирующие растительные клетки и не подавляющие их способности превращаться в растение. Внедрение чужеродных генов в Т-ДНК, под контроль промоторов, способных функционировать в растении, которое может быть осуществлено с помощью специально сконструированных векторов, дает возможность включать их в геном растительных клеток и получать растения, содержащие новую генетическую информацию.*

- Для улучшения свойств сельскохозяйственных растений необходимо внедрение в них такой генетической информации, которая делала бы их
  - устойчивыми к засухе, заморозкам,
  - позволяла расти на засоленных почвах,
  - придавала способность фиксировать азот и
  - устойчивость к сельскохозяйственным вредителям.
- 
- Это осуществляют переносом соответствующих генов из растений, обладающих подобными свойствами. Так, в качестве примера можно привести создание петунии (*Petunia*) или табака (*Nicotiana tabacum*), устойчивых к гербициду глифосату, путем введения в клетки растений гена, дающего резистентный к этому веществу фермент. Из полученных таким образом клеток вырастали затем целые взрослые растения

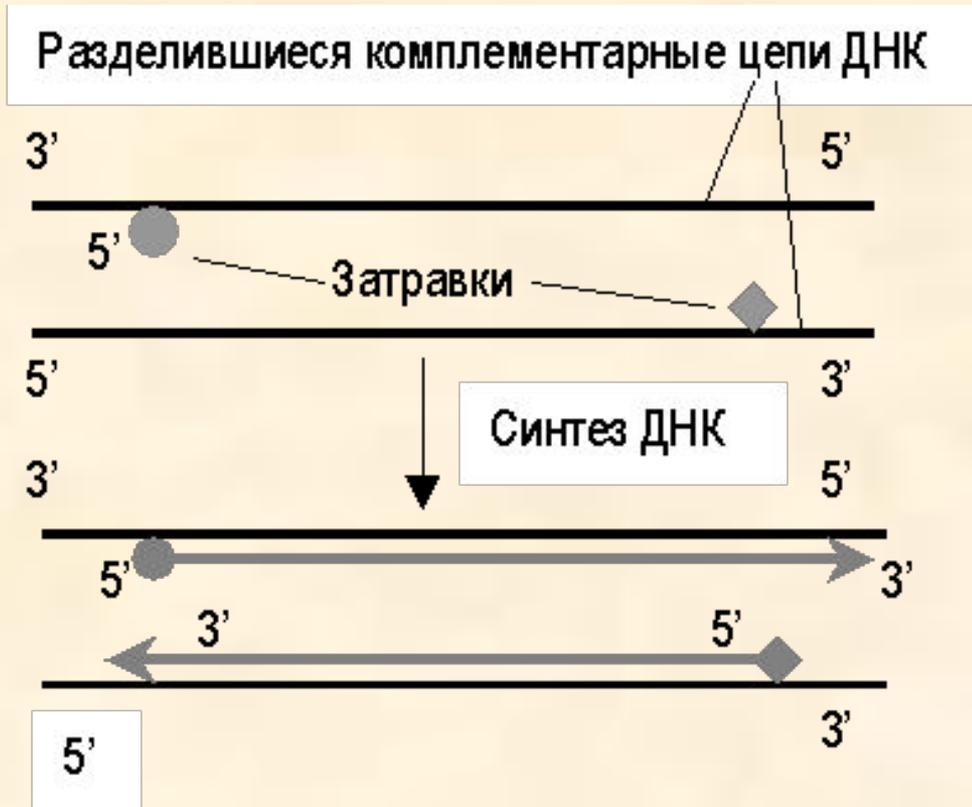
# Обратная транскрипция

- При обратной транскрипции эукариотической мРНК чаще всего используется тот факт, что на ее 3-конце обычно содержится поли (А)-последовательность, благодаря которой в качестве затравки для обратной транскрипции можно применять олиго(dT). На первой стадии обратная транскриптаза синтезирует одноцепочечную ДНК, комплементарную мРНК. Эта ДНК обычно содержит на 3-конце "шпильку". После удаления РНК обработкой щелочью или РНКазами образующаяся одноцепочечная ДНК служит затравкой-матрицей для фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I, который при наличии четырех dNTP достраивает вторую цепь. В результате образуется шпильчатая структура, превращаемая в истинную двухцепочечную кДНК обработкой SI-нуклеазой

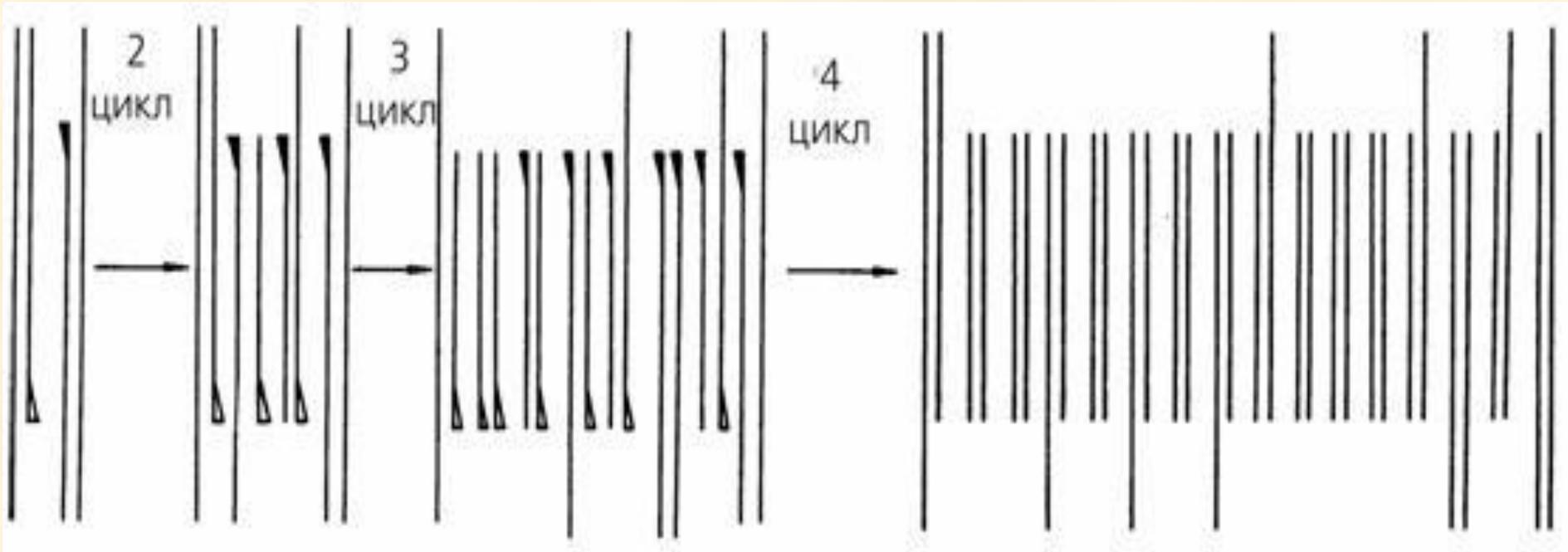


## Обратная транскрипция

# Полимеразная цепная реакция (ПЦР)



- В 1985 году **К. Мюлис** с сотрудниками разработали метод клонирования последовательностей ДНК *in vitro*, который получил название полимеразной цепной реакции (ПЦР).

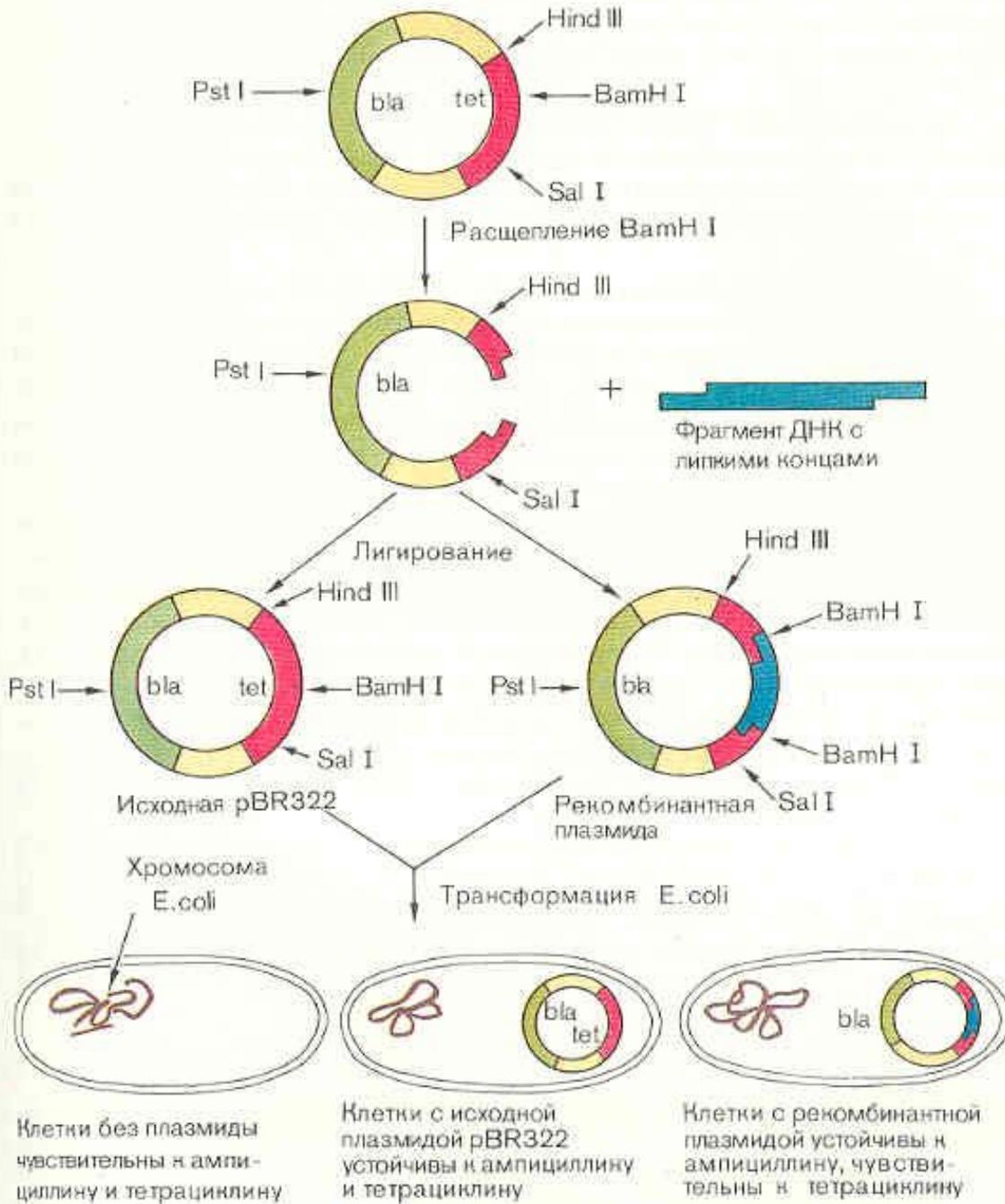


**Схема полимеразной цепной реакции**

# ТРАНСФОРМАЦИЯ

- **Трансформацией** называется процесс введения плазмиды в клетку, вызывающий наследственные изменения в ней.
- Практически наиболее общий способ трансформации и трансфекции основан на том, что *при обработке клеток бактерий хлористым кальцием их мембрана становится проницаемой для ДНК*. Эффективность проникновения экзогенной ДНК в клетку низка. Для плазмид типа pBR322 можно получить  $10^6 - 10^7$  трансформантов при добавлении 1 мкг плазмиды к обработанным хлористым кальцием клеткам, т. е. *из каждых  $10^4 - 10^5$  плазмид в клетки попадает только одна*. Поэтому среди бактерий, подвергшихся трансформации, только небольшая часть оказывается трансформированной.
- Для сохранения рекомбинантной ДНК в клетке-хозяина в первоначальном виде необходимо, чтобы в клетке отсутствовали гены, кодирующие синтез рестриктаз, которые могут привести к ее деградации, и чтобы клетки имели фенотип ResA- (такие клетки не способны к общей рекомбинации).

- **Техника использования плазмиды pBR322 для отбора рекомбинантных клеток**

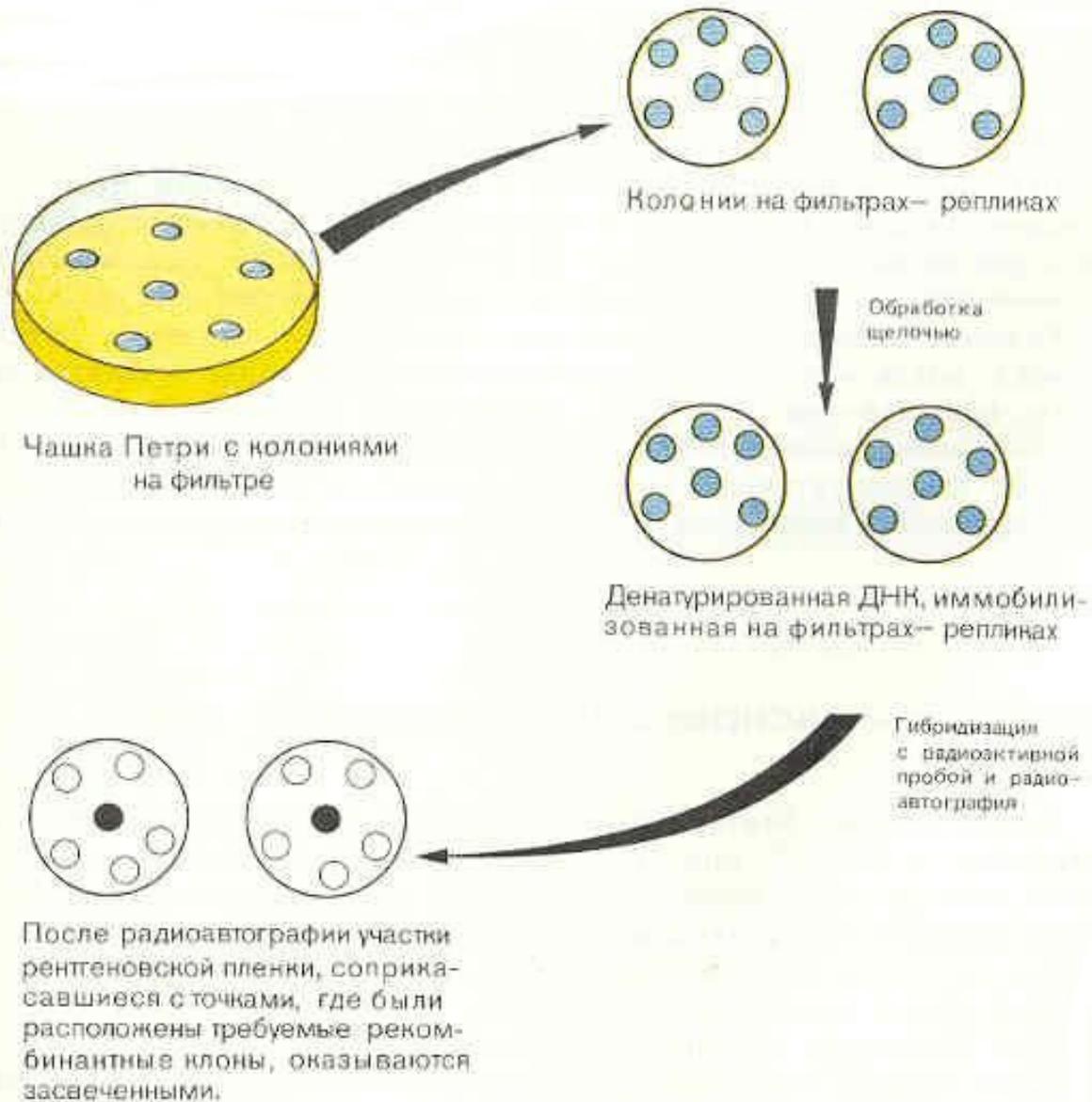


**Расщепление исходной плазмиды pBR322 по сайту BamHI и последующее лигирование с фрагментом ДНК приводит к смеси исходных и рекомбинантных плазмид.**

**При введении этой смеси в *E. coli* образуются клетки трех типов - не содержащие плазмиду, содержащие исходную pBR322 и клетки с рекомбинантной плазмидой.**

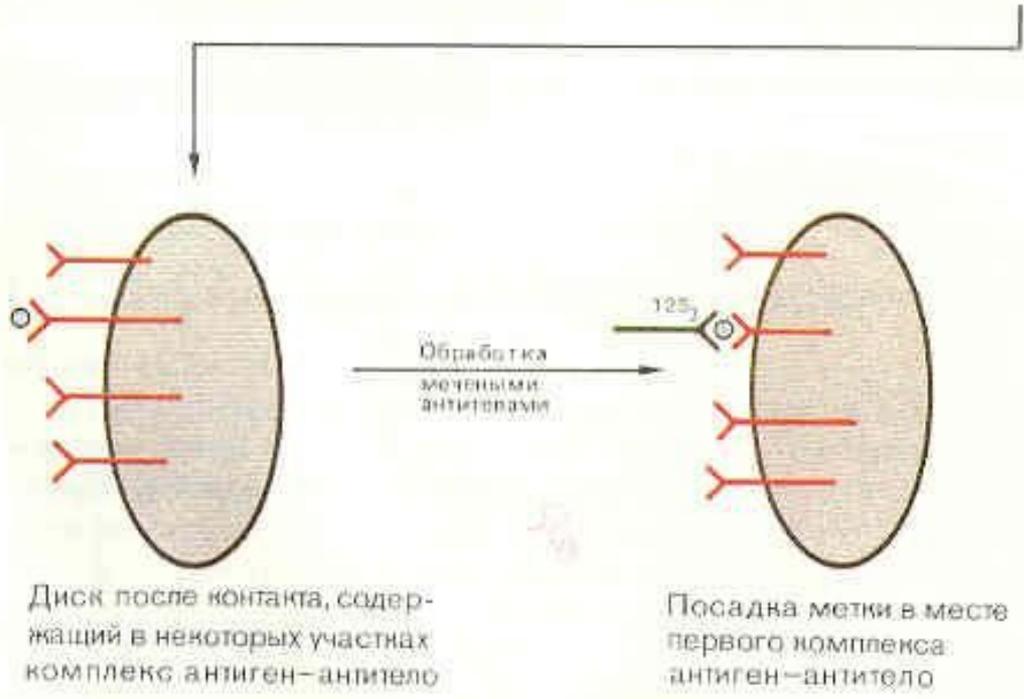
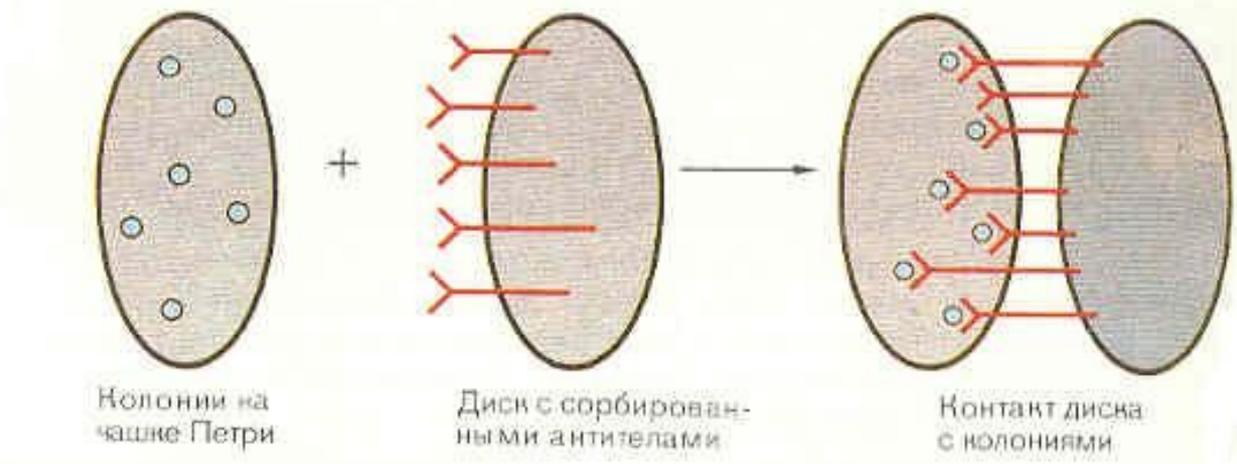
**Их легко отличить по различной устойчивости к антибиотикам**

- Если вставка содержит гены, способные к экспрессии в новом хозяине, рекомбинантные клоны могут быть идентифицированы по синтезируемому ими продукту. Однако чаще приходится *идентифицировать непосредственно нуклеотидную вставку, для чего используют методы гибридизации (рис.)*.
- *Радиоактивные "пробы" получают*
- *химическим синтезом (в тех случаях, когда известна последовательность искомой вставки или белка, который она кодирует),*
- *выделением индивидуальных или сильно обогащенных мРНК с последующим их иодированием изотопом иода-125, а также*
- *ферментативным синтезом соответствующих кДНК с использованием фосфор-32 меченых дезоксирибонуклеозидтрифосфатов*



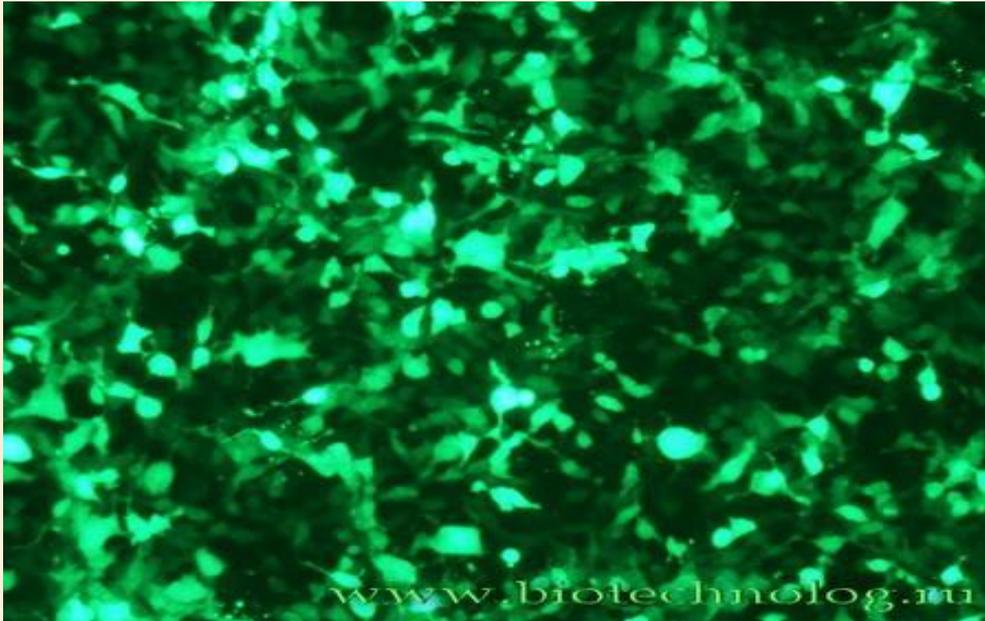
## Поиск рекомбинантных клонов методом радиоавтографии

- **Метод идентификации экспрессирующих клонов зависит от свойств продукта экспрессии. Если этот продукт обладает собственной биологической активностью, то он может быть идентифицирован по ее проявлению.** Например, если экспрессии подвергается ген, кодирующий **фермент**, то клоны идентифицируют по наличию в них соответствующей **ферментативной активности**; клоны, синтезирующие **интерферон**, - по **противовирусной активности** клеточных экстрактов и т. д.
- Однако **наиболее общими являются методы иммунохимического анализа**, применимые как в случае прямой экспрессии, так и при синтезе гибридных белков.



**Иммунохимическая  
идентификация  
экспрессирующих  
клонов**

## 2 группы маркерных генов, позволяющие отличить трансформированные клетки эукариот:



- 1. ***Селективные гены***, отвечающие за устойчивость к антибиотикам (канамицину, тетрациклину, неомицину и др.), гербицидам (у растений). Это могут быть гены ауксотрофности по какому-либо субстрату и т.д. **Основной принцип работы такого маркера – способность трансформированных клеток расти на селективной питательной среде, с добавкой определенных веществ, ингибирующих рост и деление нетрансформированных, нормальных клеток.**
- 2. ***Репортерные гены***, кодирующие нейтральные для клеток белки, наличие которых в тканях может быть легко тестировано; гены  $\beta$ -глюкуронидазы (GUS), зеленого флюоресцентного белка (GFP), люциферазы (LUC), хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT)

Бактерии приобретают генетическую информацию путем

- трансформации (получение ДНК из культуральной среды)
- конъюгации (можно определить порядок следования генов в хромосомах)
- трансдукции (общая и специфическая, ДНК попадает вместе с бактериофагом)

- *Процесс инфекции клеток с помощью чужеродных ДНК, приводящий к образованию зрелого фагового потомства, называется **трансфекцией**.*
- Отделение трансформированных клеток от общей массы выполняется в процессе клонирования.
- *Операция клонирования заключается в посеве бактериальной суспензии определенной концентрации на твердую питательную среду, например на агар с питательными добавками в чашке Петри таким образом, чтобы на 1 см<sup>2</sup> поверхности приходилось 5 - 10 бактерий. Бактериальная клетка, попавшая на поверхность агара, начинает делиться, и в конечном счете в точке локализации образуется семейство ее потомков в виде маленькой колонии, по внешнему виду похожей на шляпку гриба. Эта колония называется **клоном**. Каждая клетка исходной суспензии образует свой клон, все клетки которого имеют свойства бактерии-родоначальника.*

ДНК может вводиться в клетки в различных формах:

- «голой»
- лигированной (в составе вектора)
- комплексированной (в липосомах, частицах золота, с декстраном, и т.п.)
- в составе вирусных частиц

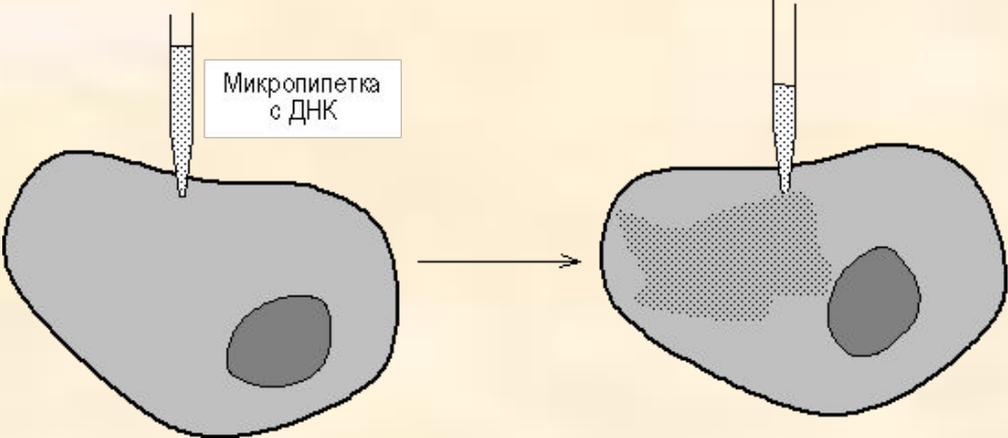
## **Способы прямого введения генов в эукариотическую клетку:**

- **Прямое введение гена в клетку осуществляют несколькими способами:**
- **Трансфекция**
- **Микроинъекция**
- **Электропорация**
- **Метод «мини-клеток»**
- **Упаковка в липосомы**
- **Электронная пушка**

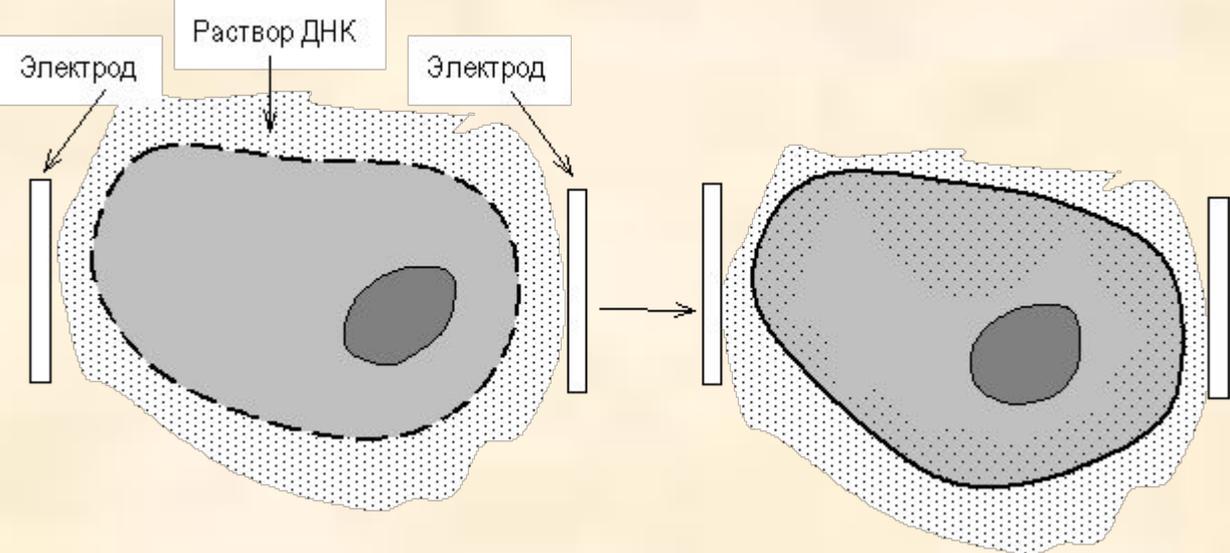
**Таблица 1.** Методы внесения ДНК в эукариотические клетки и область их применения

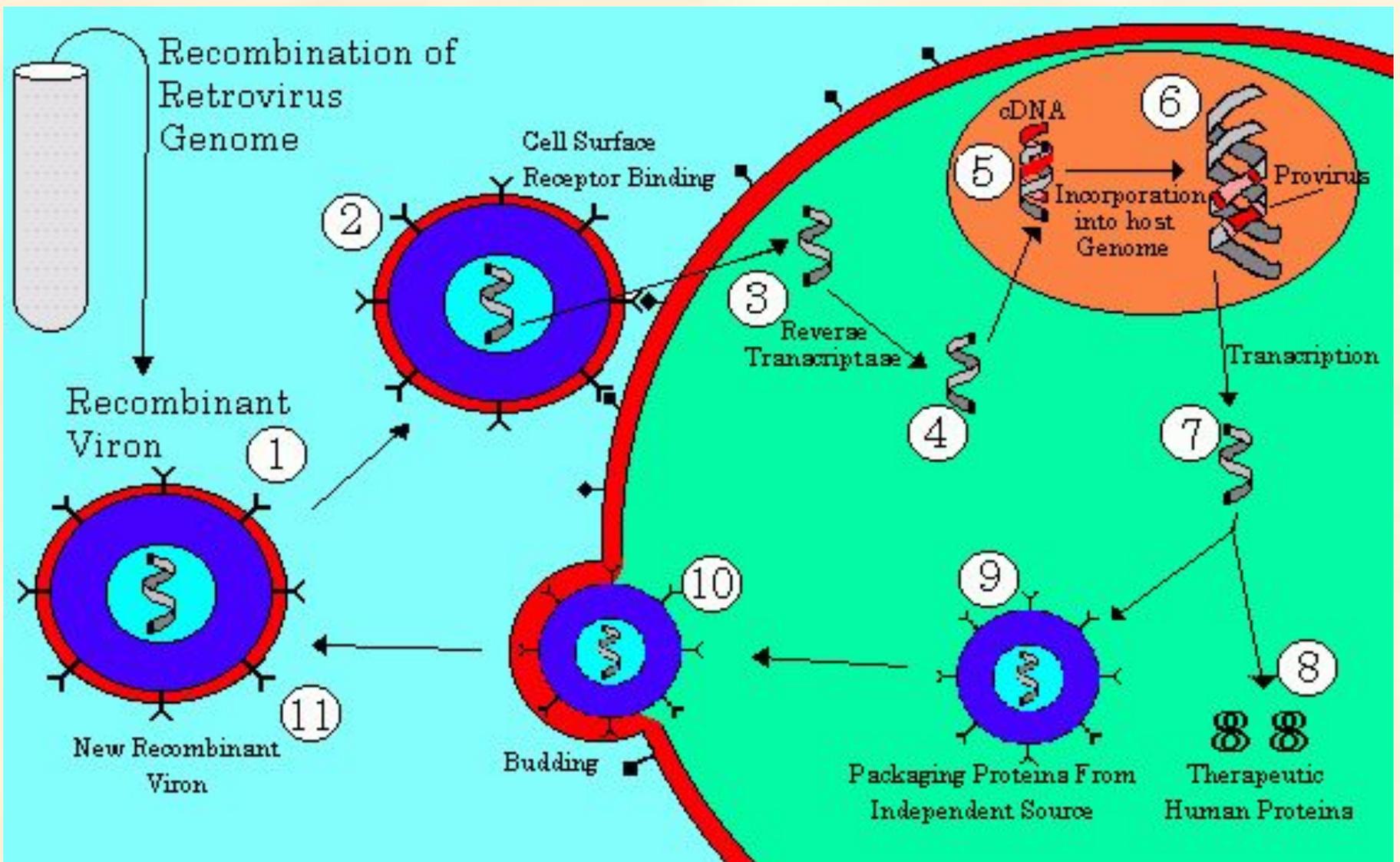
Методы переноса ДНК	Применимость для доставки генов	
	в культивируемые клетки	в ткани
Химические		
осаждение ДНК фосфатом Са	+	—
Физические		
электропорация	+	—
микроинъекция	+	—
бомбардировка частицами	+	+
простая инъекция	—	+
Слияние		
липосомы	+	+
Опосредованное рецепторами поглощение		
ДНК-белковые комплексы	+	+
Рекомбинантные вирусы		
аденовирусы	+	+
ретровирусы	+	—

# Микроинъекция ДНК



# Электропорация





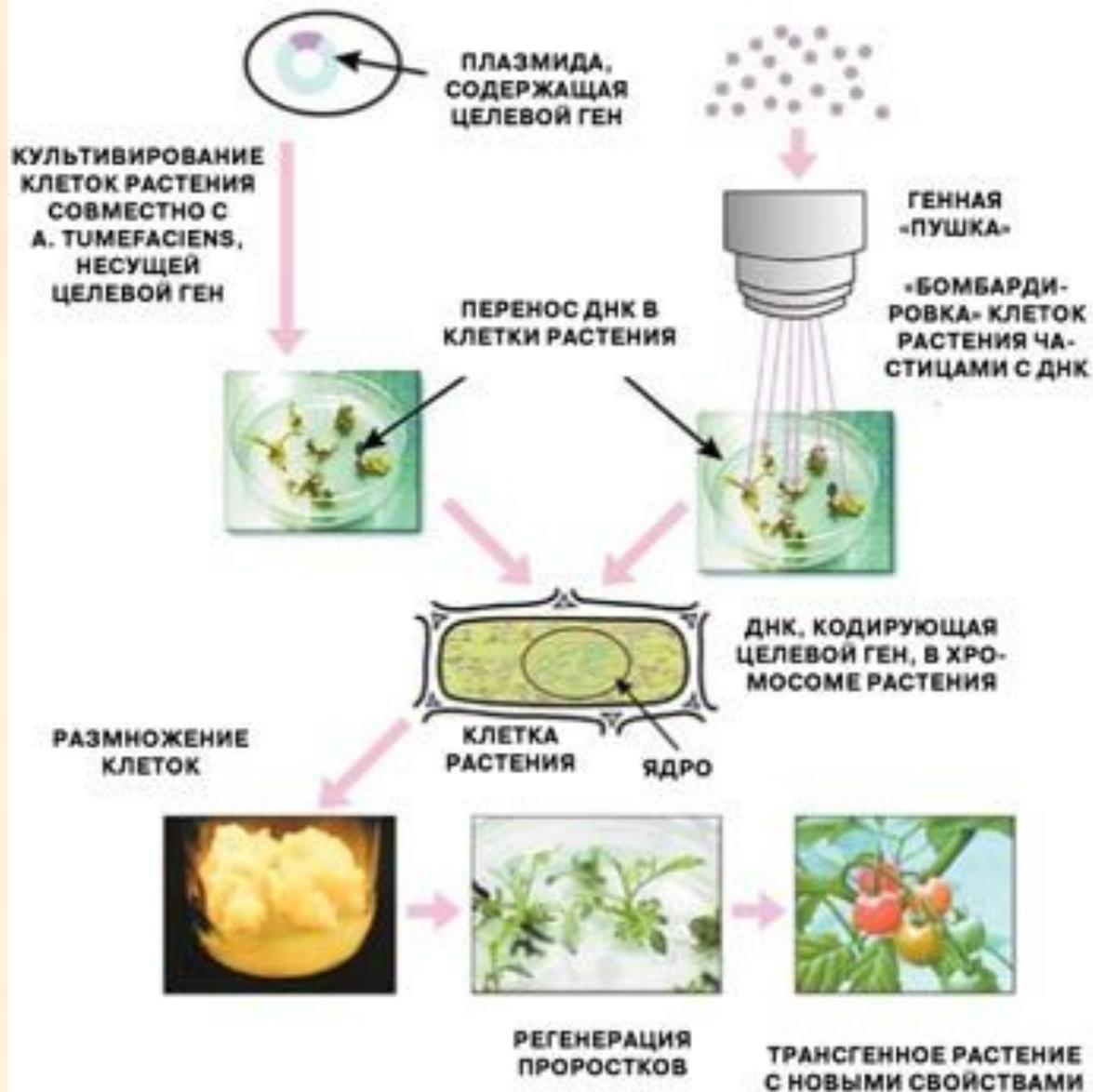
**Схема доставки генов в клетку методом вирусного вектора**

## АГРОБАКТЕРИАЛЬНЫЙ МЕТОД

AGROBACTERIUM TUMEFACIENS

## БАЛЛИСТИЧЕСКИЙ МЕТОД

ЧАСТИЦЫ, ПОКРЫТЫЕ ДНК, СОДЕРЖАЩЕЙ ЦЕЛЕВОЙ ГЕН



# Методы клонирования ДНК

## *Геномные библиотеки, клонирование ДНК*

После того, как ДНК сшита в пробирке, ее необходимо размножить.

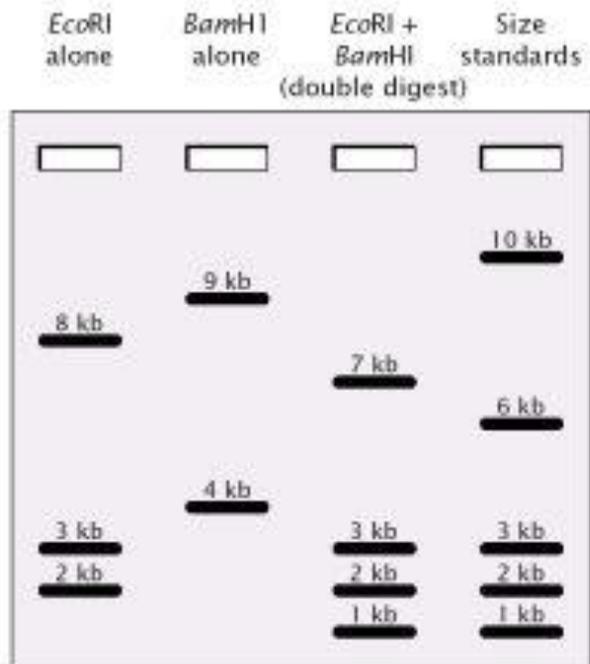
Существует два подхода к клонированию ДНК.

- Первый подход предполагает использование бактериальных или дрожжевых клеток для размножения введенной в них чужеродной ДНК.
- Второй способ представляет собой амплификацию ДНК *in vitro*.

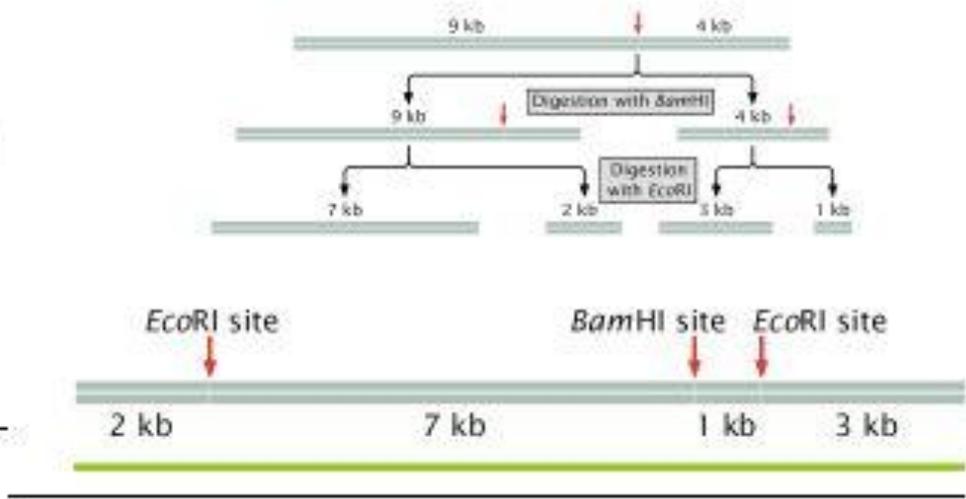
## *Клонирование ДНК *in vivo**

Используя микроорганизмы, можно создавать два типа библиотек ДНК:

- геномную и
- клоновую (кДНК).



Wei

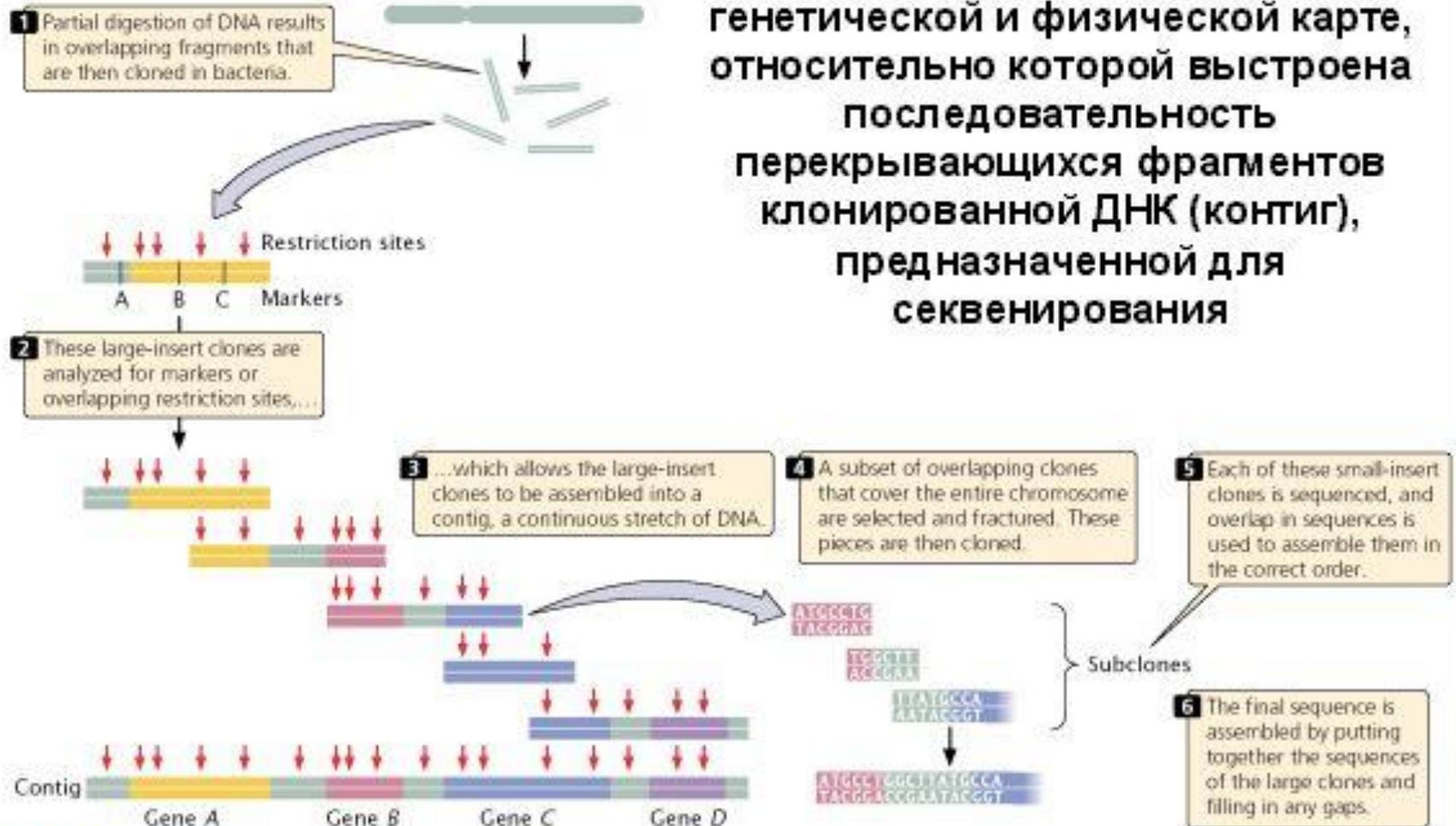


Структура фрагмента ДНК выявляется по положению участков расщепления специфическими ферментами – рестрикционными эндонуклеазами (рестриктазами). Каждая рестриктаза узнает последовательность нуклеотидов определенной длины и состава. Например, рестриктаза *EcoRI* узнает последовательность GAATTC, а рестриктаза *Bam*HI – GGATTC

Размер получившихся фрагментов устанавливают, разделяя их в геле под действием электрического тока - чем меньше фрагмент, тем быстрее он движется (слева - результат такого деления).

Расщепление фрагмента ДНК каждой рестриктазой по отдельности и их смесью позволяет создать рестрикционную карту фрагмента.

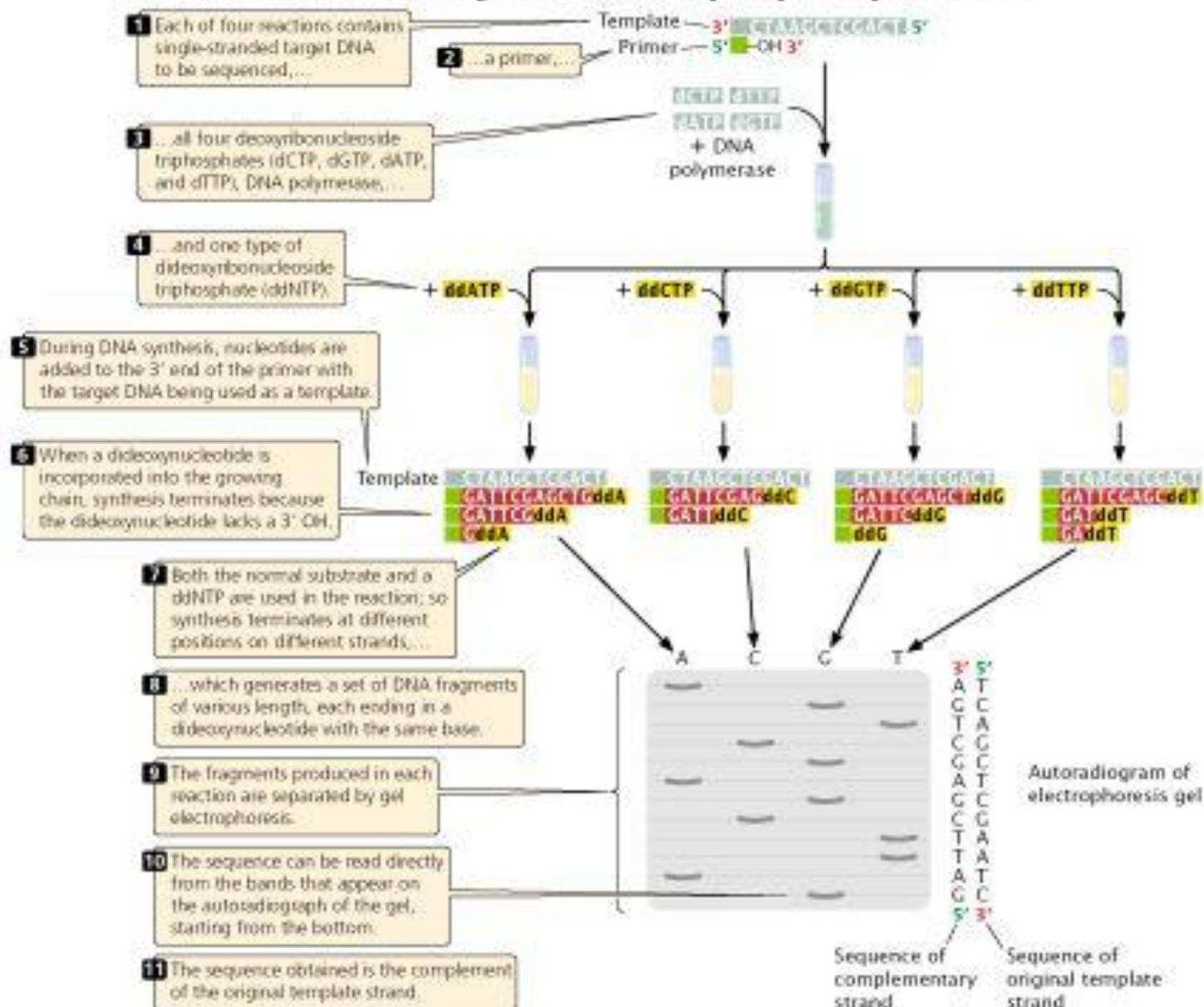
Секвенирование всего генома может быть основано на детальной генетической и физической карте, относительно которой выстроена последовательность перекрывающихся фрагментов клонированной ДНК (контиг), предназначенной для секвенирования



**19.11** Map-based approaches to whole-genome sequencing rely on detailed genetic and physical maps to align sequenced fragments.

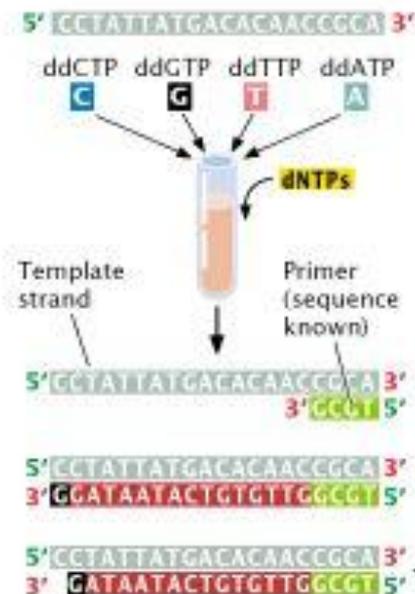


# Метод секвенирования ДНК, основанный на терминеции синтеза дидезоксинуклеотидтрифосфатами

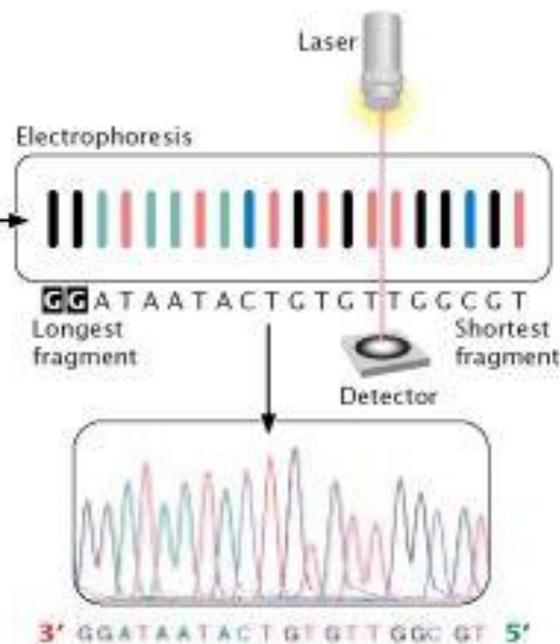


## Автоматизация секвенирования: каждый из четырех ddNTP имеет флюоресцентную метку своего цвета

- 1 A single-stranded DNA fragment whose base sequence is to be determined (the template) is isolated.
- 2 Each of the four ddNTPs is tagged with a fluorescent dye, and the Sanger sequencing reaction is carried out.
- 3 The fragments that end in the same base have the same colored dye attached.
- 4 The products are denatured, and the DNA fragments produced by the four reactions are mixed and loaded into a single well on an electrophoresis gel. The fragments migrate through the gel according to size,...
- 5 ...and the fluorescent dye on the DNA is detected by using a laser beam and detector.
- 6 Each fragment appears as a peak on the computer printout; the color of the peak indicates which base the peak represents.
- 7 The sequence information is read directly into the computer, which converts it into the complementary—target—sequence.



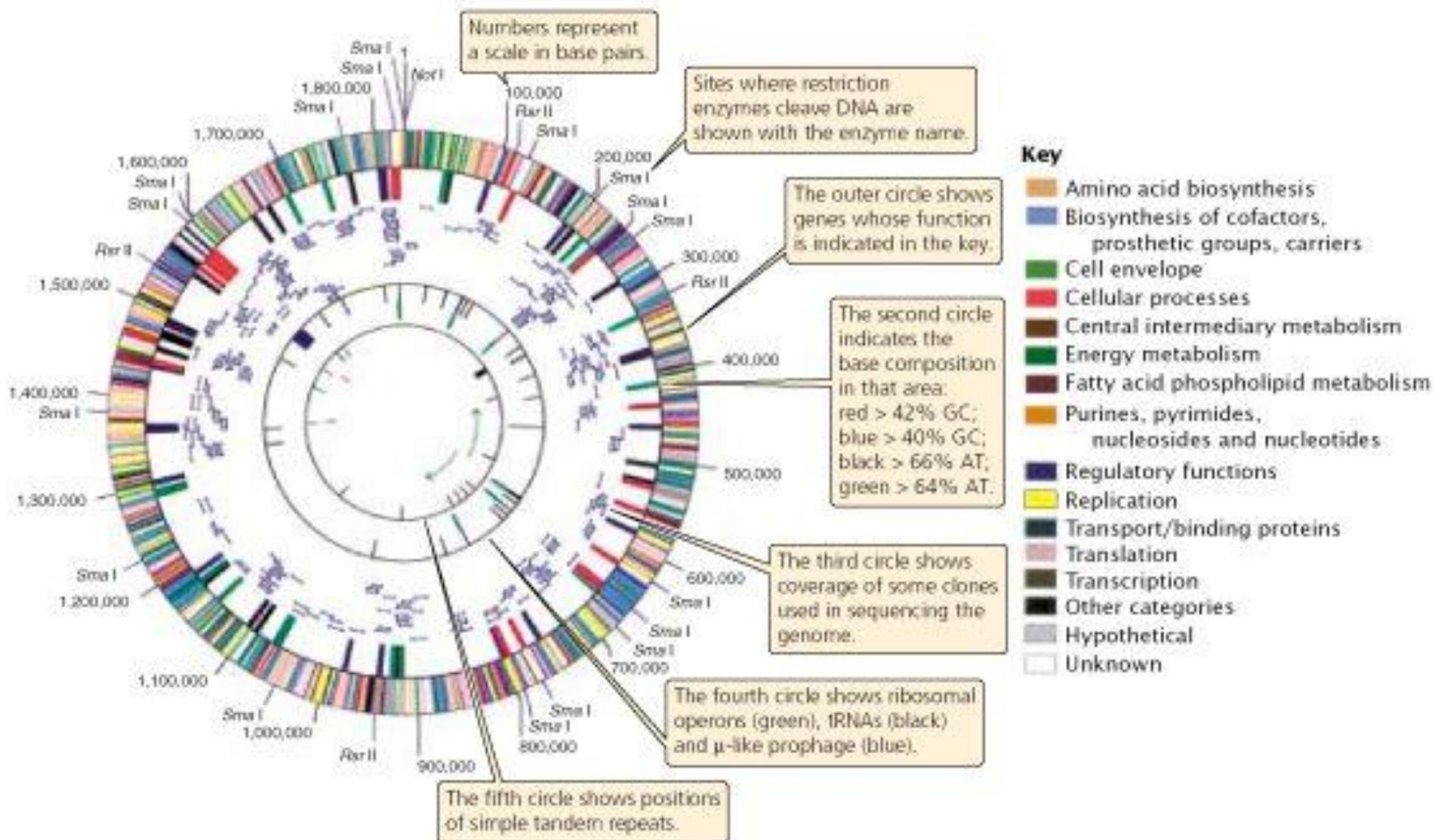
**Терминированные фрагменты ДНК фракционируются электрофоретически**



**Фрагмент каждого размера имеет цвет, соответствующий одному из четырех ddNTP**



# Бактерия *H. influenzae* была первым свободно живущим организмом, геном которого был секвенирован (TIGR, США)



# Библиотека кДНК

- Создание кДНК начинается с синтеза на матрице РНК с помощью обратной транскриптазы комплементарной нити ДНК. Затем создают щелочные условия, разрушают цепь РНК на нуклеотиды, после чего с помощью ДНК-полимеразы синтезируют комплементарную цепь ДНК. При этом образуется фрагмент ДНК с тупыми концами. Такую ДНК встраивают в плазмиды и вводят в клетки бактерий. При амплификации плазмиды образуется клон комплементарной копии ДНК (кДНК).
- **Преимущества клоновой ДНК перед клонами геномной ДНК в том, что кодирующая белок нуклеотидная последовательность гена ничем не прерывается**

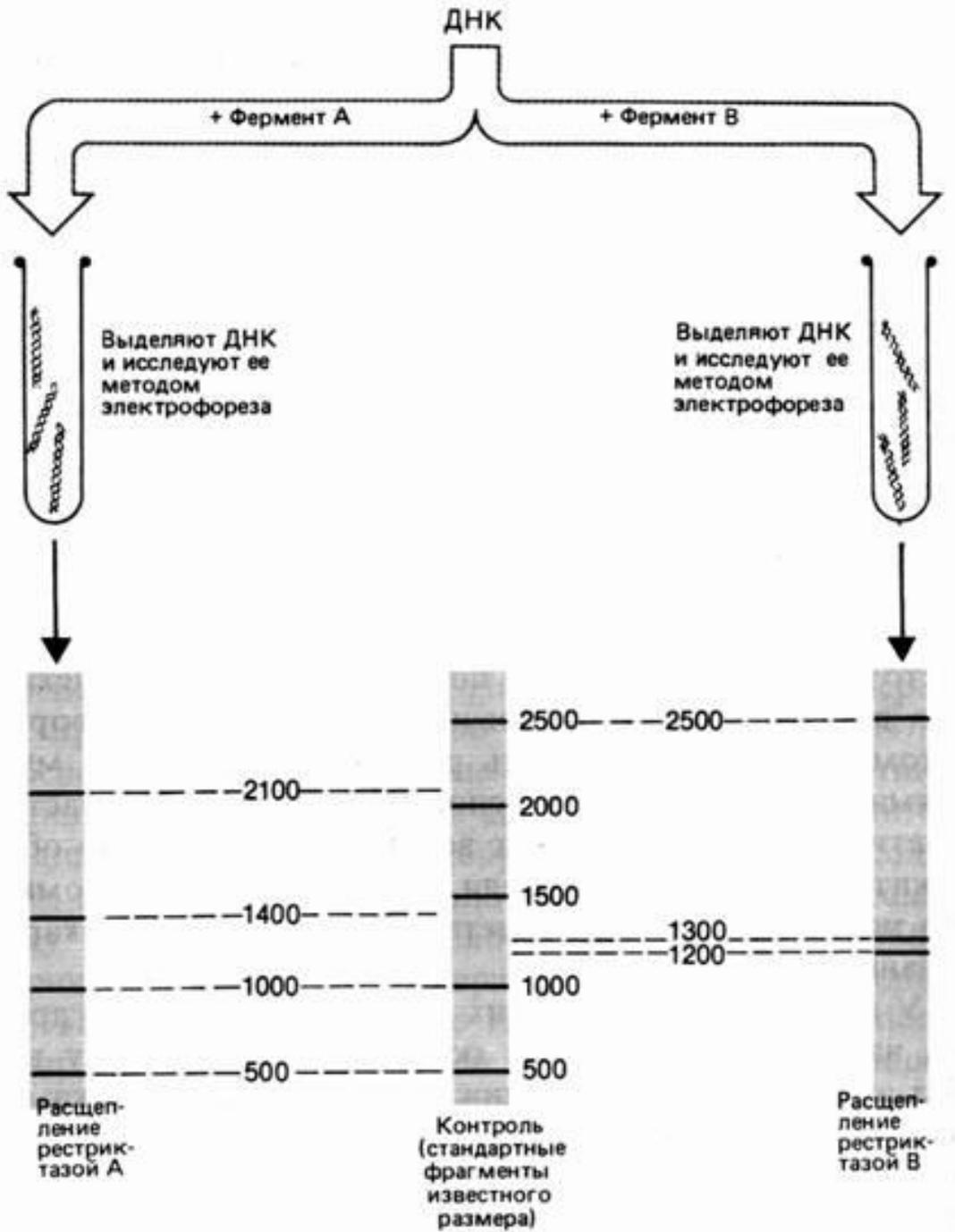


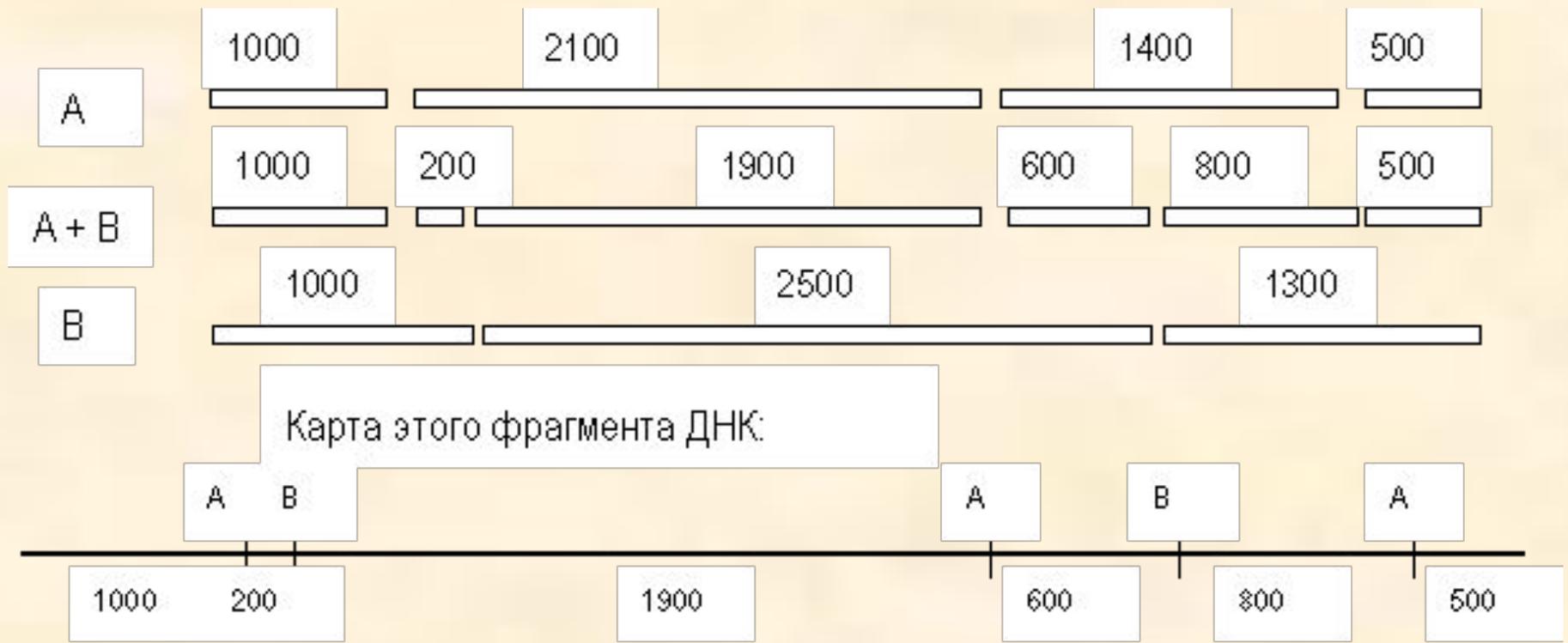
# Введение гена в клетку

- ***Селективные и репортерные гены***
- Ввести рекомбинантный ген в клетку можно 2 способами: используя векторы или путем прямого введения.
- ***Требования к векторной ДНК, ее состав***
- Вектор - молекула ДНК или РНК, состоящая из двух компонентов: векторной части (носителя) и клонируемого чужеродного гена. Задача вектора – донести выбранную ДНК в клетку-реципиент, встроить ее в геном, позволить идентификацию трансформированных клеток, обеспечить стабильную экспрессию введенного гена.
- Таким образом, вектор должен быть небольшим, способным поддерживаться в клетке-хозяине (реплицироваться), многократно копироваться (амплифицироваться), экспрессировать соответствующий ген (содержать соответствующие регуляторные последовательности), должен иметь маркерный ген, позволяющий различать гибридные клетки для эффективной селекции их; должен быть способен передаваться в клетку соответствующего организма.

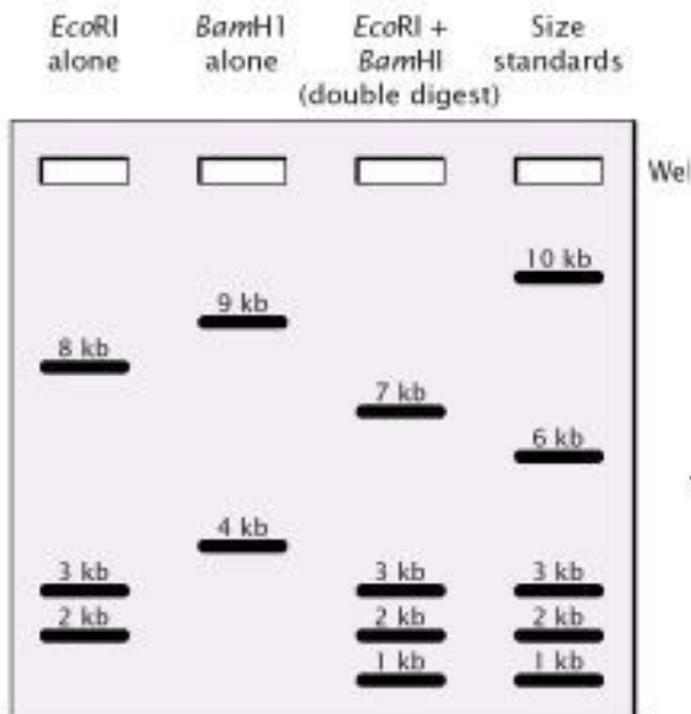


# Результаты электрофореза после обработки фрагмента ДНК разными рестриктазами

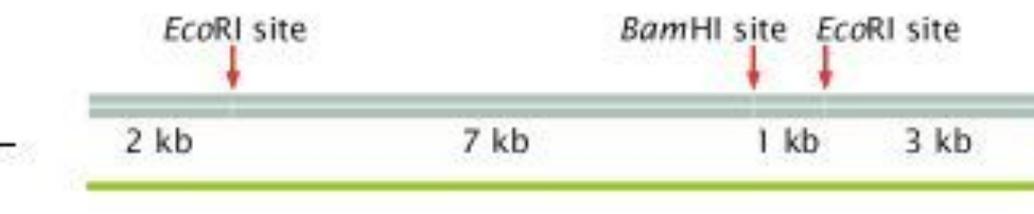
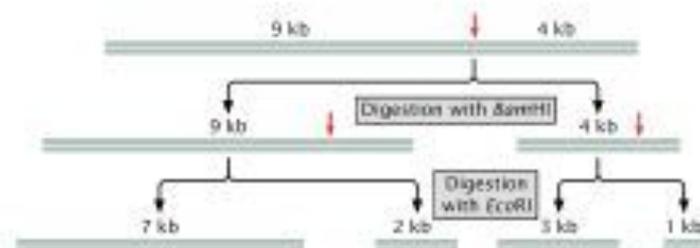




- Анализ фрагментов рестрикции и карта фрагмента ДНК



Wel



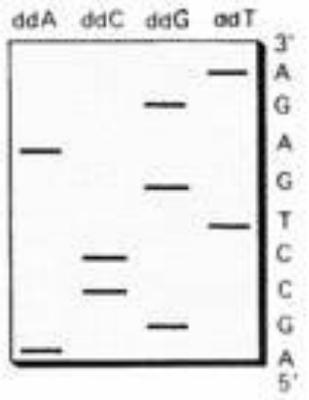
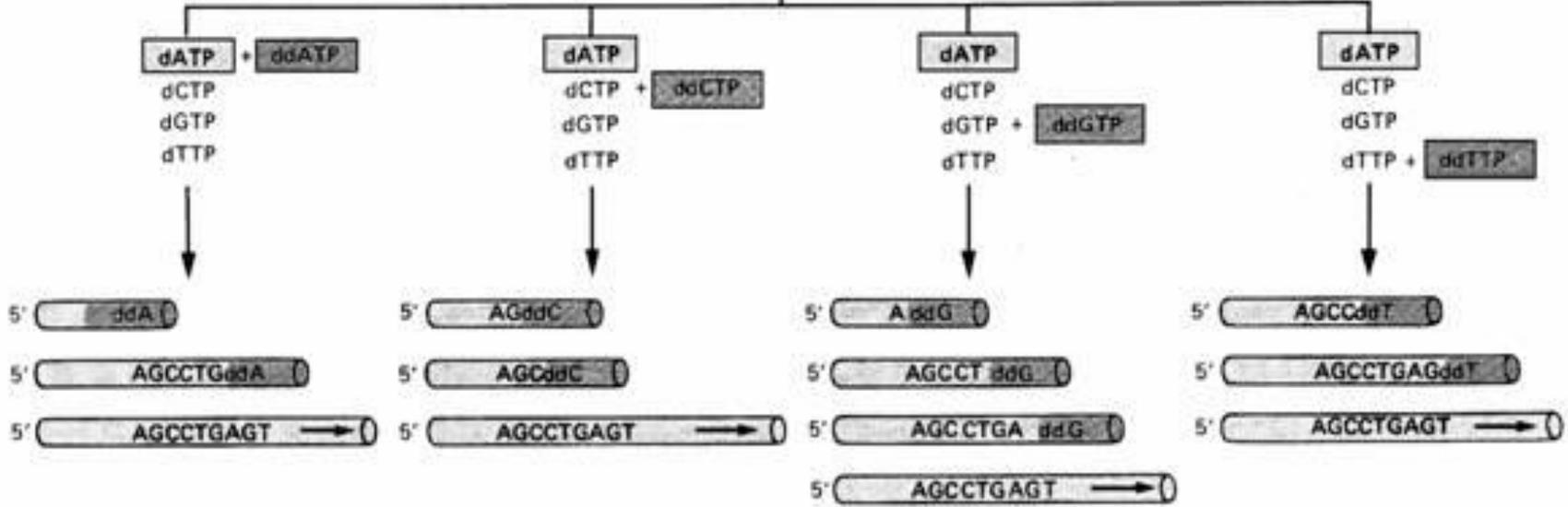
Структура фрагмента ДНК выявляется по положению участков расщепления специфическими ферментами – рестрикционными эндонуклеазами (рестриктазами). Каждая рестриктаза узнает последовательность нуклеотидов определенной длины и состава. Например, рестриктаза *EcoRI* узнает последовательность GAATTC, а рестриктаза *BamHI* – GGATTC

Размер получившихся фрагментов устанавливают, разделяя их в геле под действием электрического тока - чем меньше фрагмент, тем быстрее он движется (слева - результат такого разделения).

Расщепление фрагмента ДНК каждой рестриктазой по отдельности и их смесью позволяет создать рестрикционную карту фрагмента.

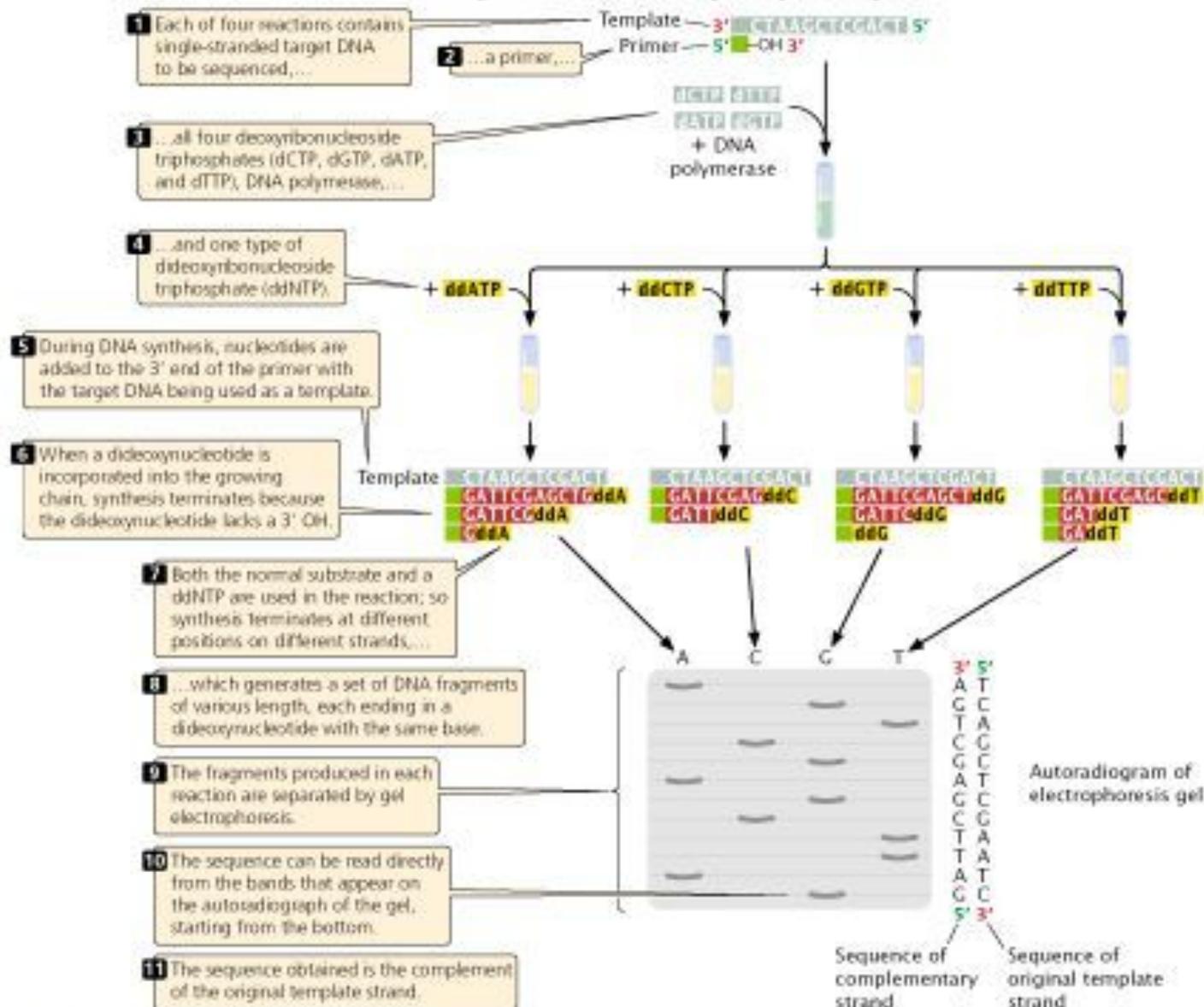
Матрица 3' TCGGACTCA 5'  
 Праймер 5' ( )

ДНК-полимераза I



- Ферментативный метод секвенирования ДНК

# Метод секвенирования ДНК, основанный на терминеции синтеза дидезоксинуклеотидтрифосфатами



1 A single-stranded DNA fragment whose base sequence is to be determined (the template) is isolated.

2 Each of the four ddNTPs is tagged with a fluorescent dye, and the Sanger sequencing reaction is carried out.

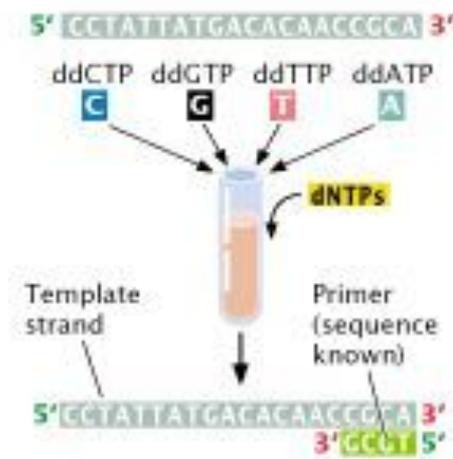
3 The fragments that end in the same base have the same colored dye attached.

4 The products are denatured, and the DNA fragments produced by the four reactions are mixed and loaded into a single well on an electrophoresis gel. The fragments migrate through the gel according to size,...

5 ...and the fluorescent dye on the DNA is detected by using a laser beam and detector.

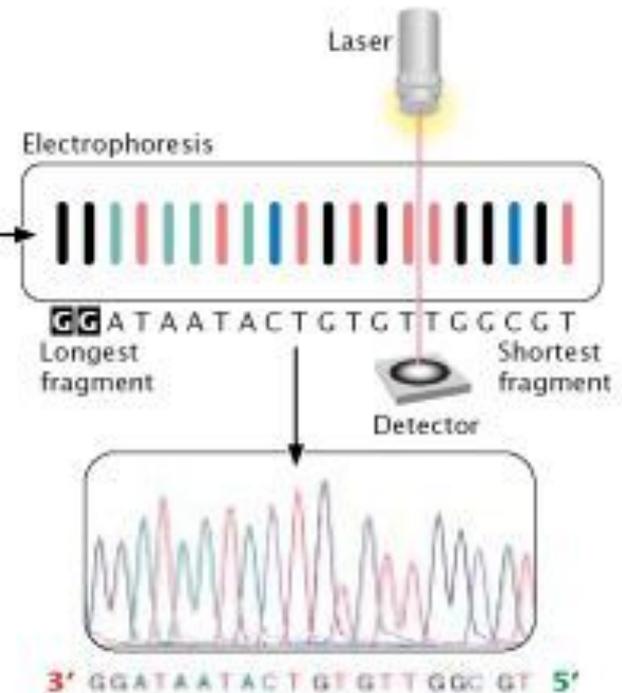
6 Each fragment appears as a peak on the computer printout; the color of the peak indicates which base the peak represents.

7 The sequence information is read directly into the computer, which converts it into the complementary—target—sequence.



**Терминированные  
фрагменты ДНК  
фракционируются  
электрофоретически**

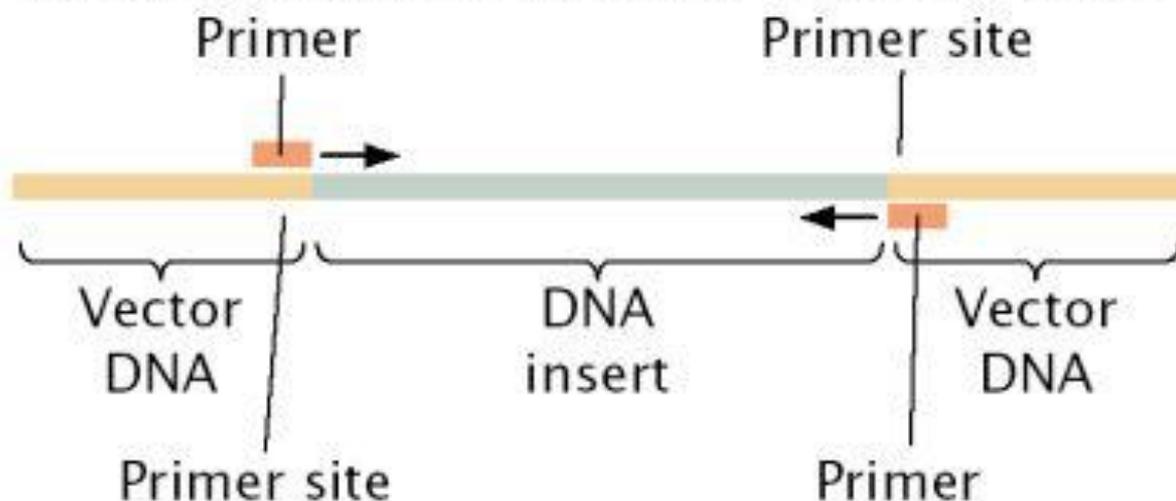
**Автоматизация  
секвенирования: каждый  
из четырех ddNTP имеет  
флуоресцентную метку  
своего цвета**

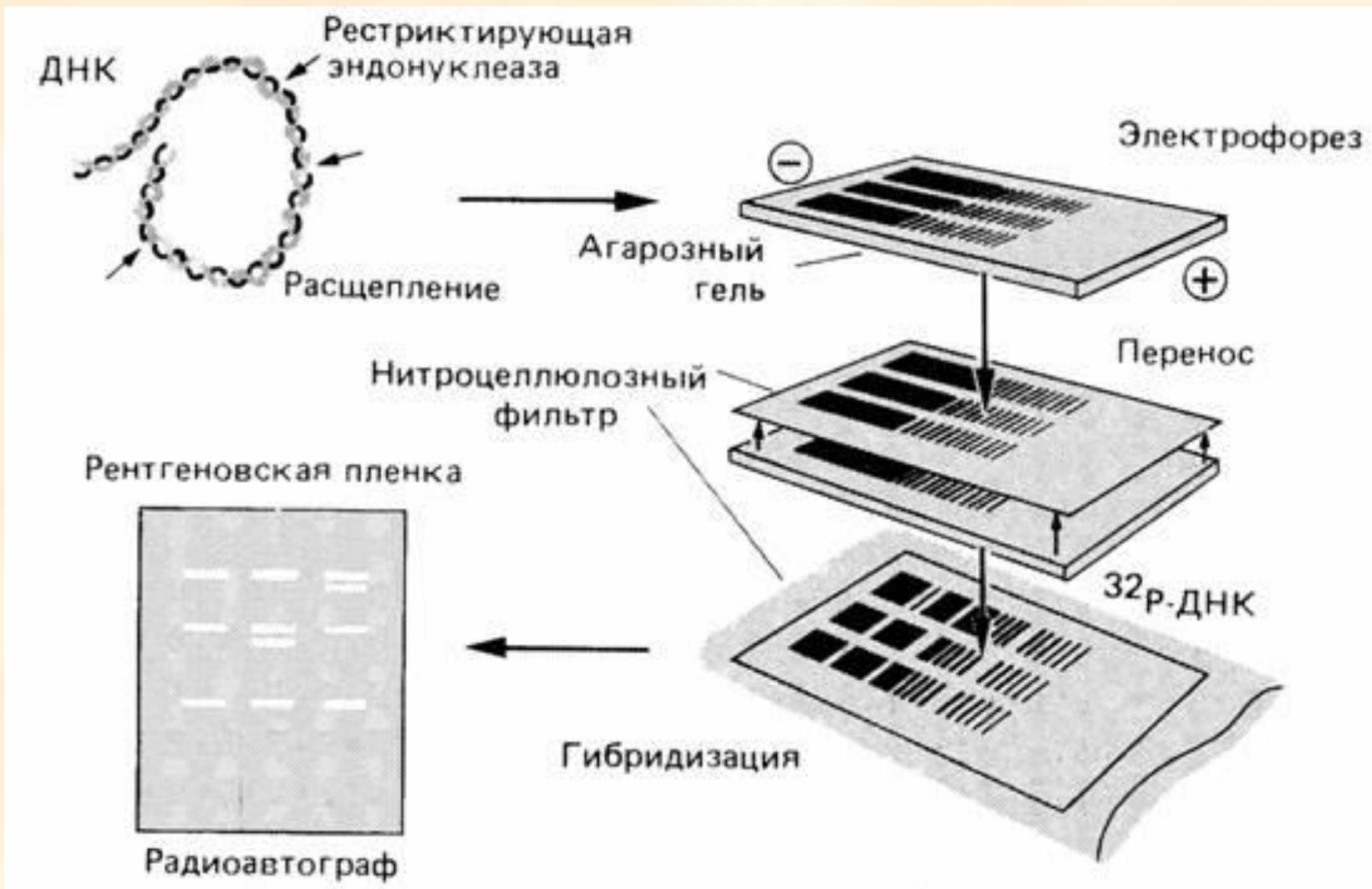


**Фрагмент каждого размера имеет цвет,  
соответствующий одному из четырех  
ddNTP**

Участки молекулы ДНК, распознаваемые праймерами для секвенирования, присоединены к исследуемому фрагменту ДНК путем вставки. Исследуемый фрагмент ДНК вставляют в векторную молекулу ДНК. Участки вектора, прилегающие к вставке, содержат последовательности нуклеотидов, комплементарные универсальным секвенирующим праймерам – левому и правому.

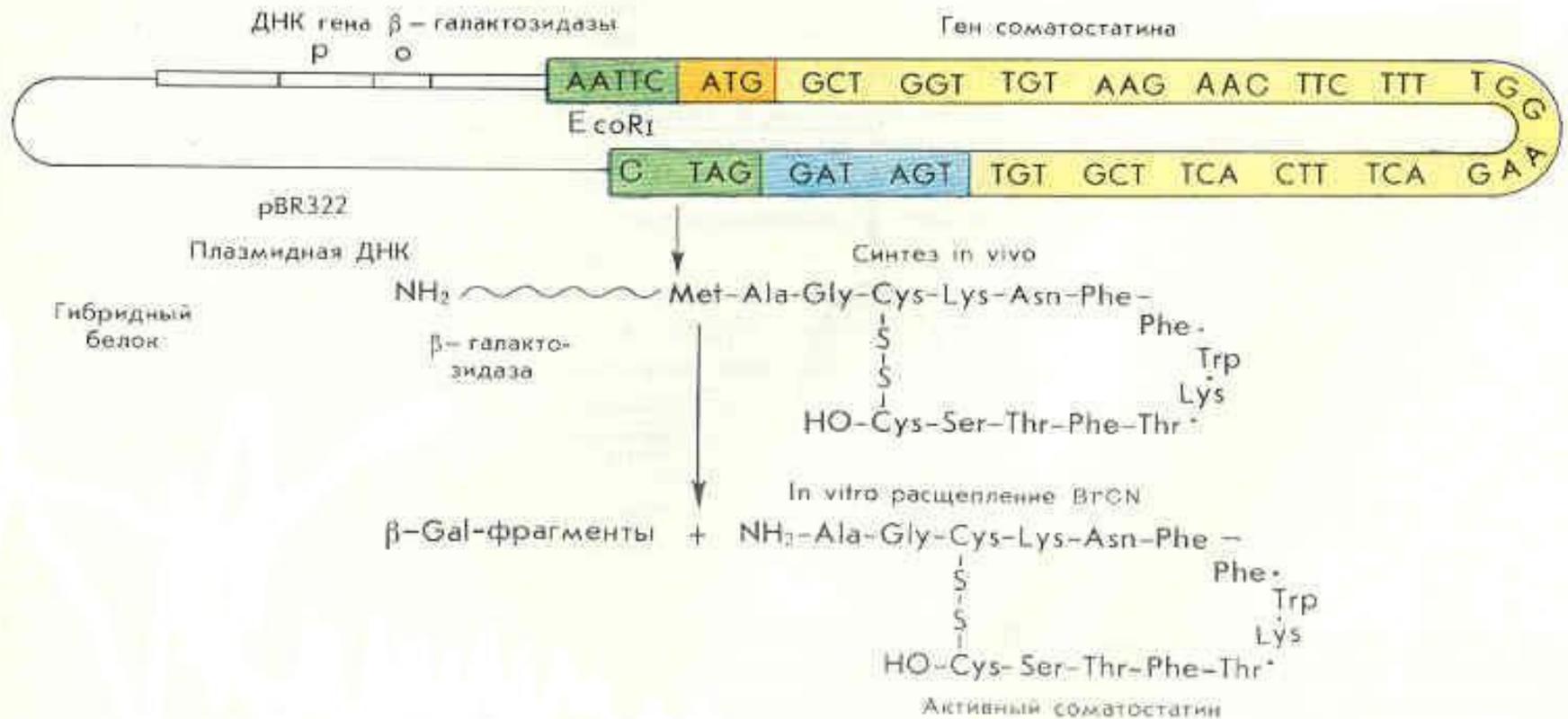
С этих праймеров иницируется синтез ДНК *in vitro*

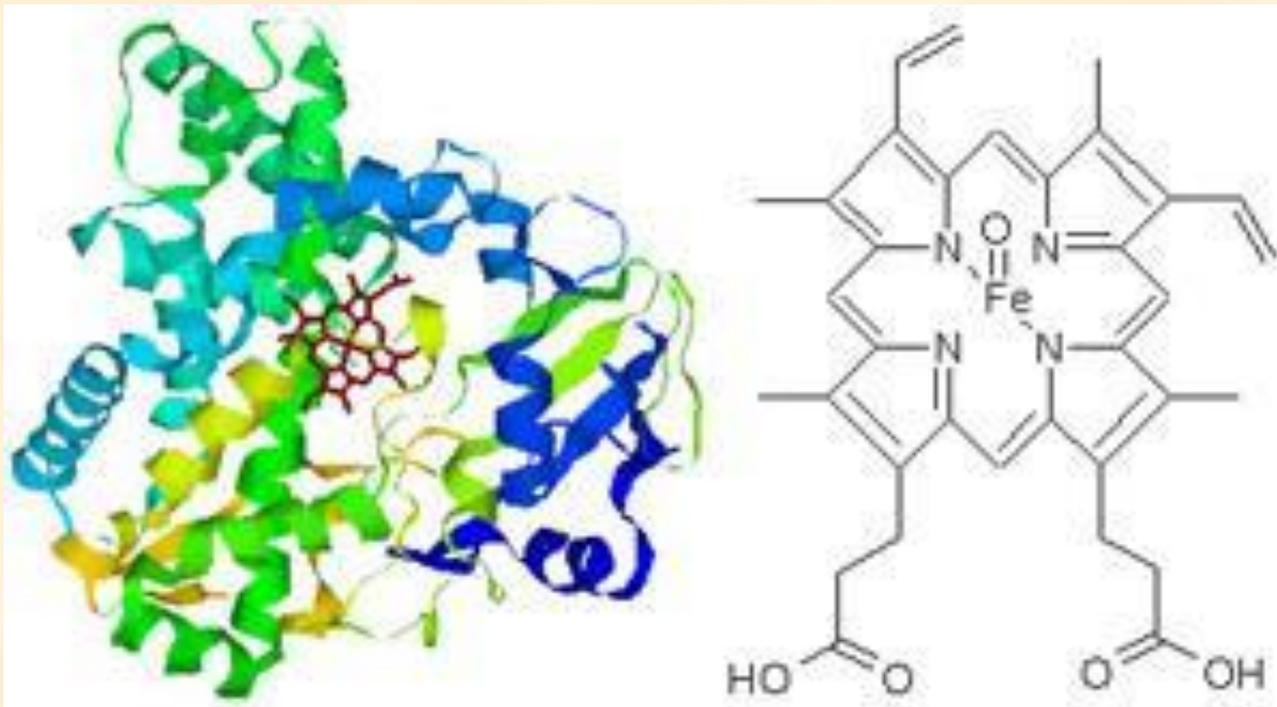




- **Блоттинг ДНК по Саузерну**

# Получение гонадотропного гормона соматостатина через гибридный белок -бета-галактозидазу





- Ученые из России и США при поддержке [Роснауки](#) Ученые из России и США при поддержке Роснауки и фонда [CRDF](#) собираются с помощью компьютера построить *искусственные белки с запрограммированными функциями*, а потом на опыте проверить справедливость своих расчетов. Такое сочетание математического расчета и биологического эксперимента должно сэкономить немало сил и денег.
- По-видимому, ведущую роль в структурной организации *цитохромов P450 (на рисунке)* и их взаимодействии с химическими веществами играют определенные пространственные конфигурации отдельных фрагментов белка, характерные складки и спирали этой длинной молекулы (изображение с сайтов [quanta.synchem.kyoto-u.ac.jp](http://quanta.synchem.kyoto-u.ac.jp) и [www.steve.gb.com](http://www.steve.gb.com))

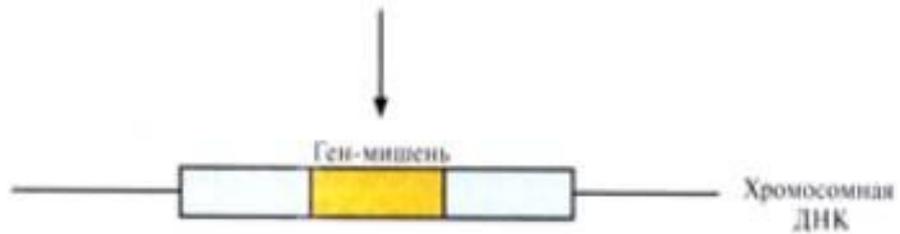
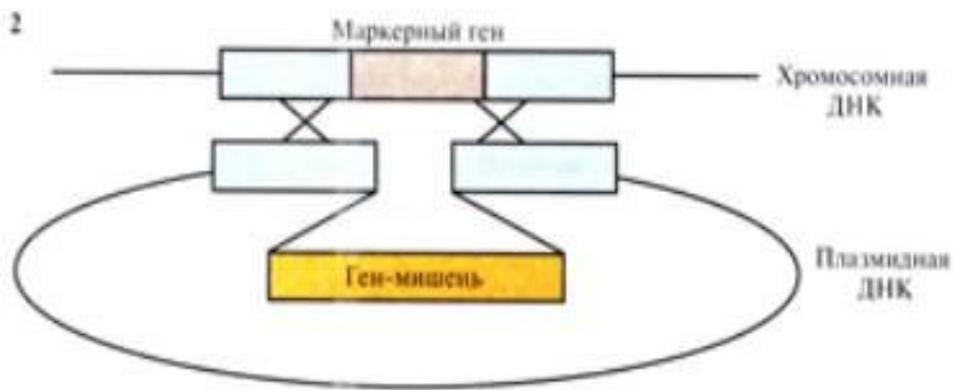
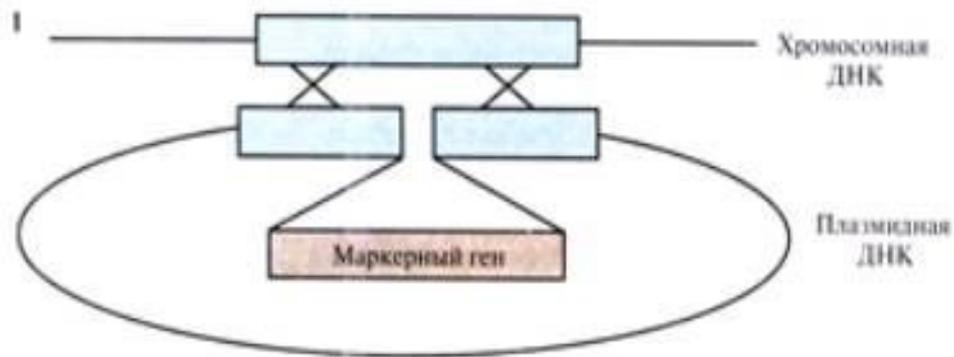
- **Совсем недавно главным орудием биохимика были хроматограф или установка для электрофореза, а ныне их потеснил компьютер: специалисты по биоинформатике создали специальные программы для моделирования биохимических процессов и поведения сложных молекул. К реальному эксперименту приступают только тогда, когда все тупиковые направления отсеяны и перед глазами исследователя открывается прямой путь к поставленной цели. Именно такой подход использовали исследователи из [НИИ биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича РАМН](#) Совсем недавно главным орудием биохимика были хроматограф или установка для электрофореза, а ныне их потеснил компьютер: специалисты по биоинформатике создали специальные программы для моделирования биохимических процессов и поведения сложных молекул. К реальному эксперименту приступают только тогда, когда все тупиковые направления отсеяны и перед глазами исследователя открывается прямой путь к поставленной цели. Именно такой подход использовали исследователи из НИИ биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича РАМН во главе с кандидатом биологических наук А. В. Лисицей и их американские коллеги из [Университета Вандербилта](#) во главе с доктором Ларисой Подуст (Larissa M. Podust). Финансовую поддержку проекту оказали Роснаука и фонд CRDF, а создавать ученые будут искусственные *белки семейства [цитохромов P450](#)*.**

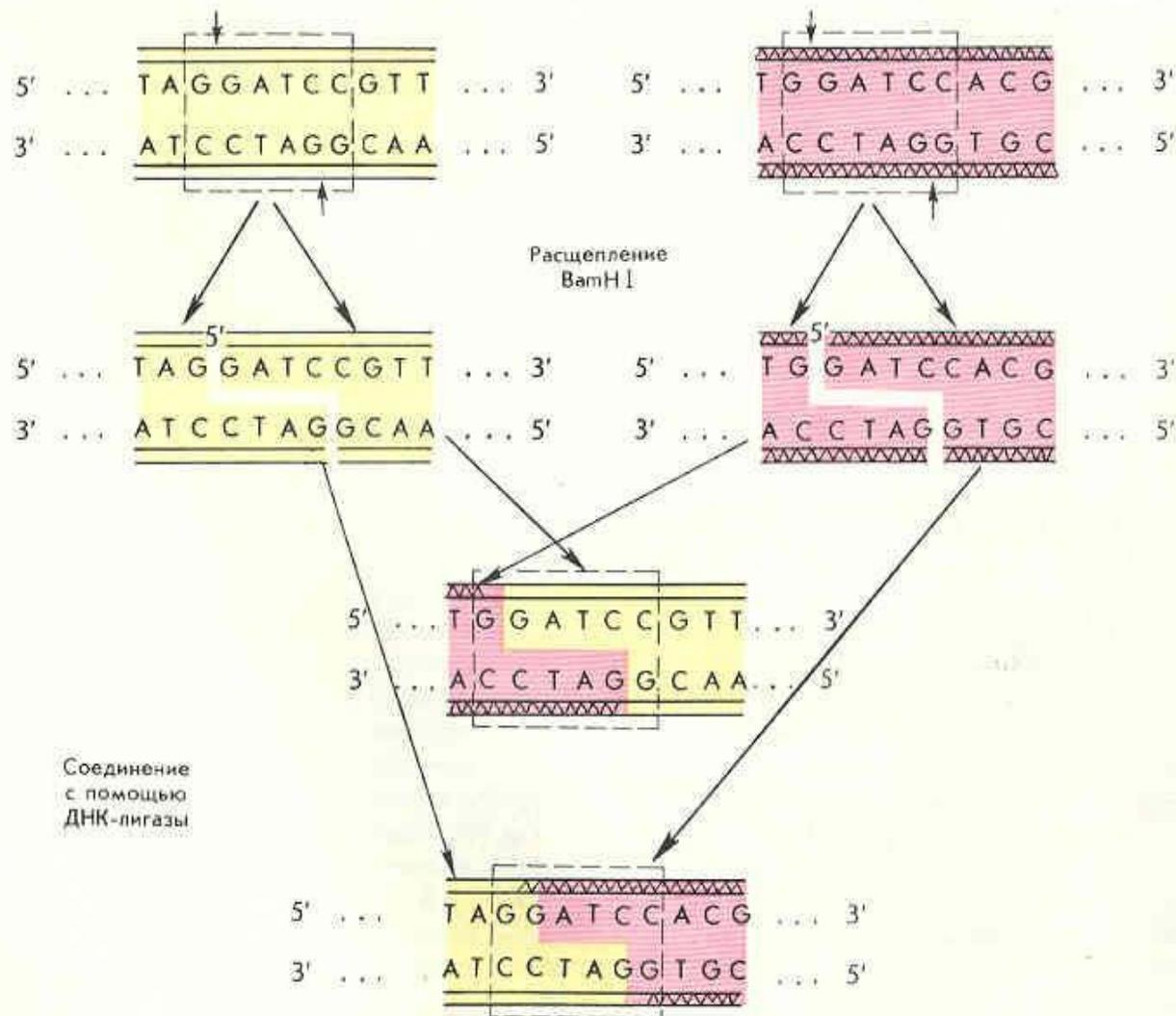
- *Белки этого семейства играют важную роль в организме: они отвечают за окисление вредных для клеток чужеродных химических соединений — ксенобиотиков. Окисление способствует выведению ксенобиотиков из организма, обеспечивая защиту клеток от химического удара*

- **Основная идея ученых — рассматривать различные структурные элементы реально существующих белков в качестве своеобразного конструктора, из которого можно собирать *искусственные белки-химеры*, сочетающие в себе компоненты нескольких различных структур. Предполагается, что химеры смогут выполнять заранее запрограммированную биологическую функцию. Зачем это нужно? Ответ прост: *искусственные белки на основе цитохромов P450 могут быть использованы биотехнологами для проведения сложных химических синтезов, ведущих к созданию прототипов лекарств, препаратов агрохимии и много другого.***
- **Главный вопрос, стоящий перед исследователями: по каким правилами можно «играть» в конструктор, состоящий из элементов белков? «Примерно три года назад мы выдвинули гипотезу о том, что ведущую роль в структурной организации цитохромов P450 и их взаимодействии с химическими веществами играют мотивы, то есть определенные пространственные конфигурации отдельных фрагментов белка, характерные складки и спирали этой длинной молекулы, — говорит Андрей Валерьевич Лисица. — Именно их мы будем определять на первом этапе работы. Затем с помощью компьютера станем заменять одни мотивы на другие, и расчет трехмерных структур позволит отобрать такие белки-химеры, которые примут нужную пространственную конфигурацию и будут отвечать за определенные функции, а не останутся после синтеза бессмысленной цепочкой молекул. Дальше же к работе приступит нейрокompьютер».**

- **Этим модным словом специалисты по биоинформатике обозначают программу, построенную в виде сети виртуальных нейронов — что-то вроде упрощенного представления мозга. Такая сеть способна накапливать информацию и обучаться. На примере экспериментально известных реакций целого спектра веществ с цитохромами P450 сеть будет обучаться узнавать верные варианты взаимодействия. Потом ей дадут задание оценить, с какими веществами будет взаимодействовать искусственный белок, созданный из элементов природных структур. Работа будет считаться успешной, если удастся доказать, что разработанная методика позволяет правильно прогнозировать функции искусственных белков.**
- **«Современные методы генной инженерии позволяют достаточно легко сделать трансгенный (рекомбинантный) организм, который станет синтезировать спроектированную на компьютере белок-химеру, — говорит А. В. Лисица. — Необходимые препараты для этого сделают и передадут нам американские коллеги, а мы в России будем клонировать микроорганизмы, очищать выработанный ими белок и с помощью американских реагентов проверять их активность. Если всё сложится удачно, наработанные препараты искусственных белков будут отправлены в Университет Вандербилта, где их закристаллизуют, а затем проведут исследование структуры для оценки правильности компьютерных моделей. В этих опытах будет участвовать один из наших студентов, который поедет в США для приобретения навыков белковой кристаллографии. Разработанную же в ходе работы статистическую модель можно будет использовать для рационального построения других белков с новыми или улучшенными свойствами».**







- Способы соединения фрагментов ДНК, используемые в генной инженерии: Многие рестриктазы, расщепляя ДНК, дают липкие концевые фрагменты типа EcoRI, BamHI, SmaI, PstI и др. При расщеплении одной и той же рестриктазой различных ДНК образуются одинаковые липкие концы и полученные фрагменты соединяются друг с другом по этим концам ДНК-лигазой. Различные ДНК могут быть соединены при помощи ДНК-лигазы и по тупым концам.

**Расщепление молекул ДНК рестриктазой BamHI и соединение полученных фрагментов ДНК-лигазой**