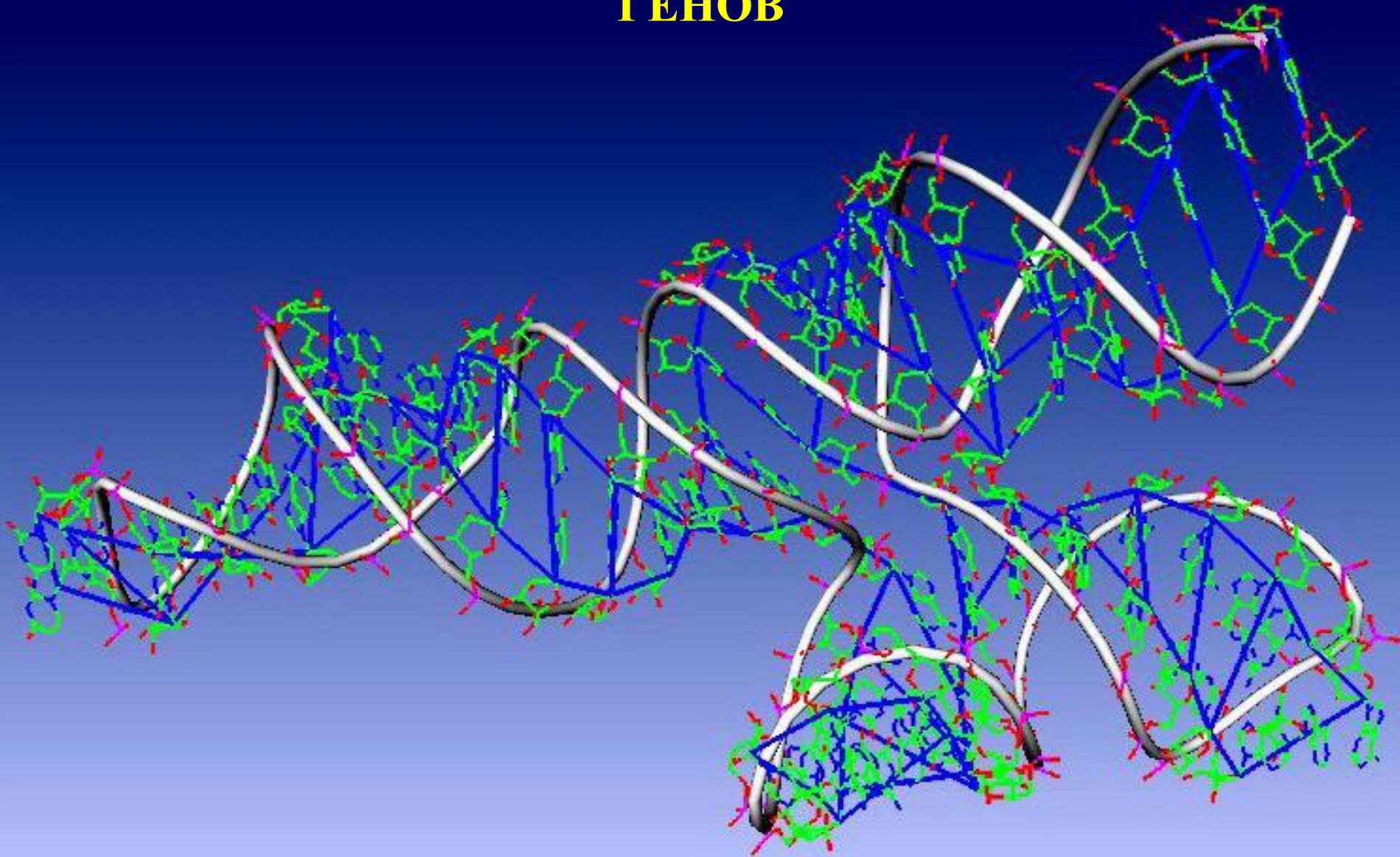
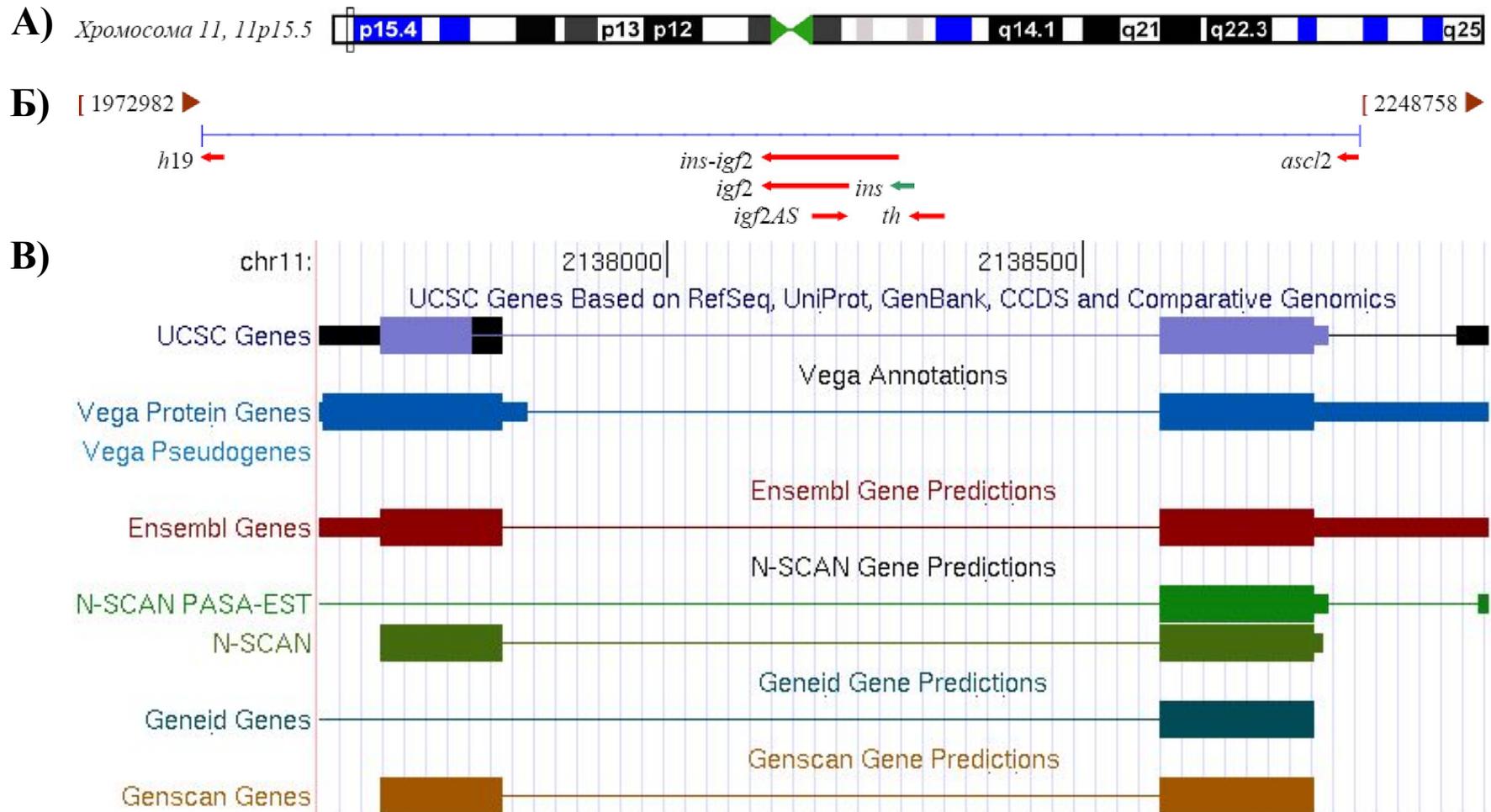


КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНОВ, СОЗДАНИЕ ГЕНОМНЫХ И кДНК-БИБЛИОТЕК, ИСКУССТВЕННЫЙ СИНТЕЗ ГЕНОВ

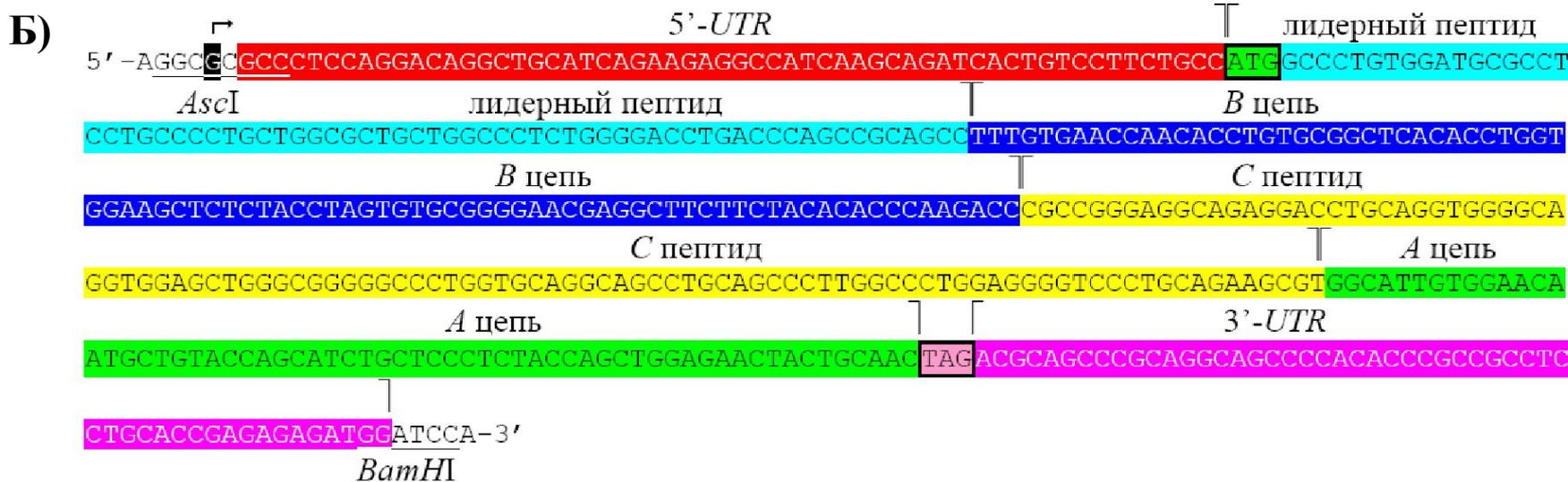
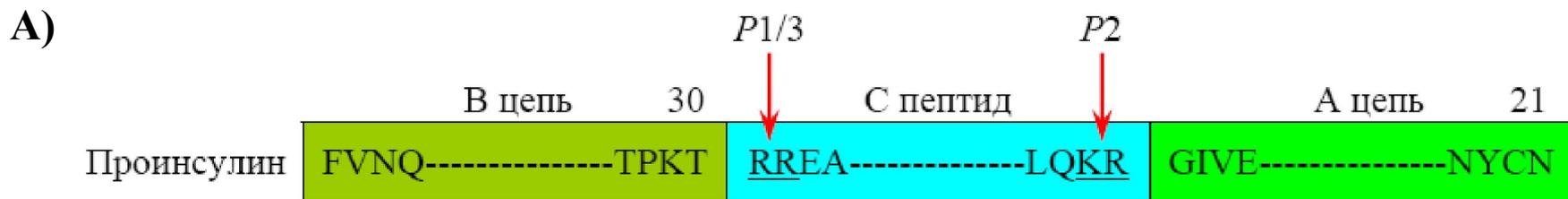


ГЕН-МИШЕНЬ: ГЕН, КОДИРУЮЩИЙ ПРЕПРОИНСУЛИН ЧЕЛОВЕКА



Геномная локализация (А), геномный контекст (Б) и структура (В) гена препроинсулина человека

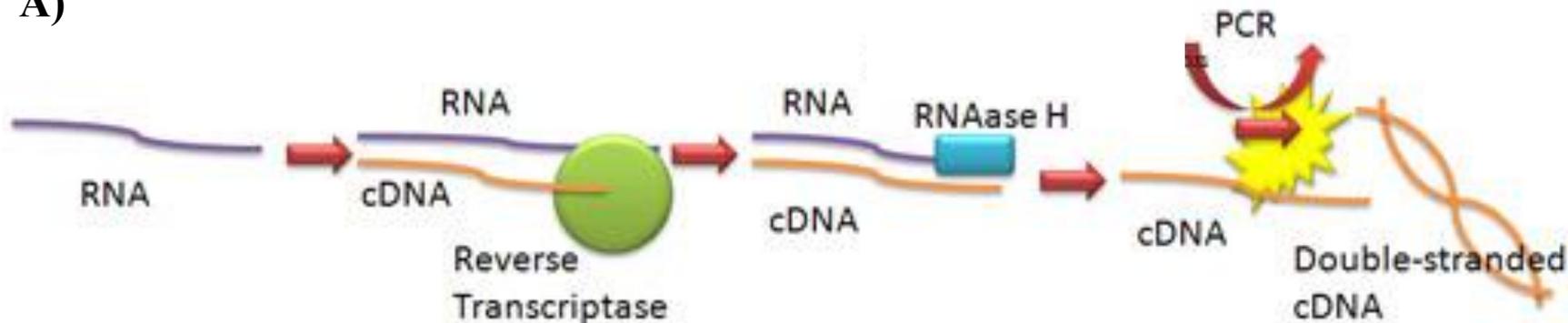
ГЕН-МИШЕНЬ: ГЕН, КОДИРУЮЩИЙ ПРЕПРОИНСУЛИН ЧЕЛОВЕКА



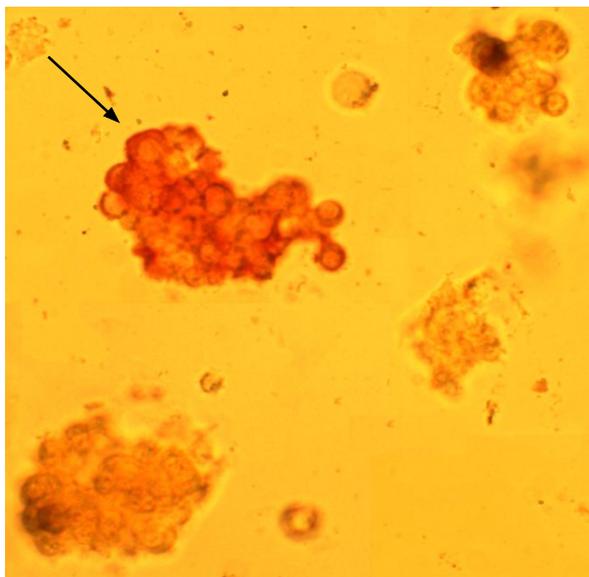
Процессинг природного проинсулина человека (А) и минимально необходимая нуклеотидная последовательность для его эктопической экспрессии (Б)

ГЕН-МИШЕНЬ: ГЕН, КОДИРУЮЩИЙ ПРЕПРОИНСУЛИН ЧЕЛОВЕКА

А)



Б)



В)

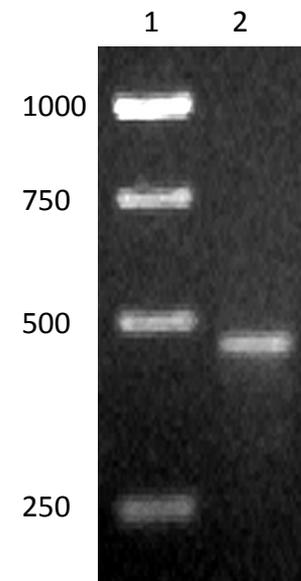


Схема синтеза двуцепочечной кДНК на мРНК-матрице (А), выделенной из клеток панкреатических островков (Б).

Продукт амплификации кДНК гена препроинсулина человека (В)

СИНТЕЗ кДНК

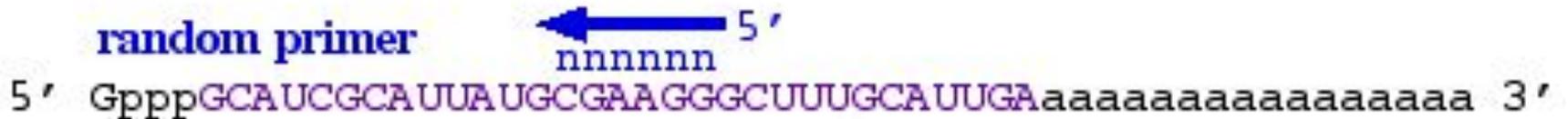
oligo dT primer



specific primer

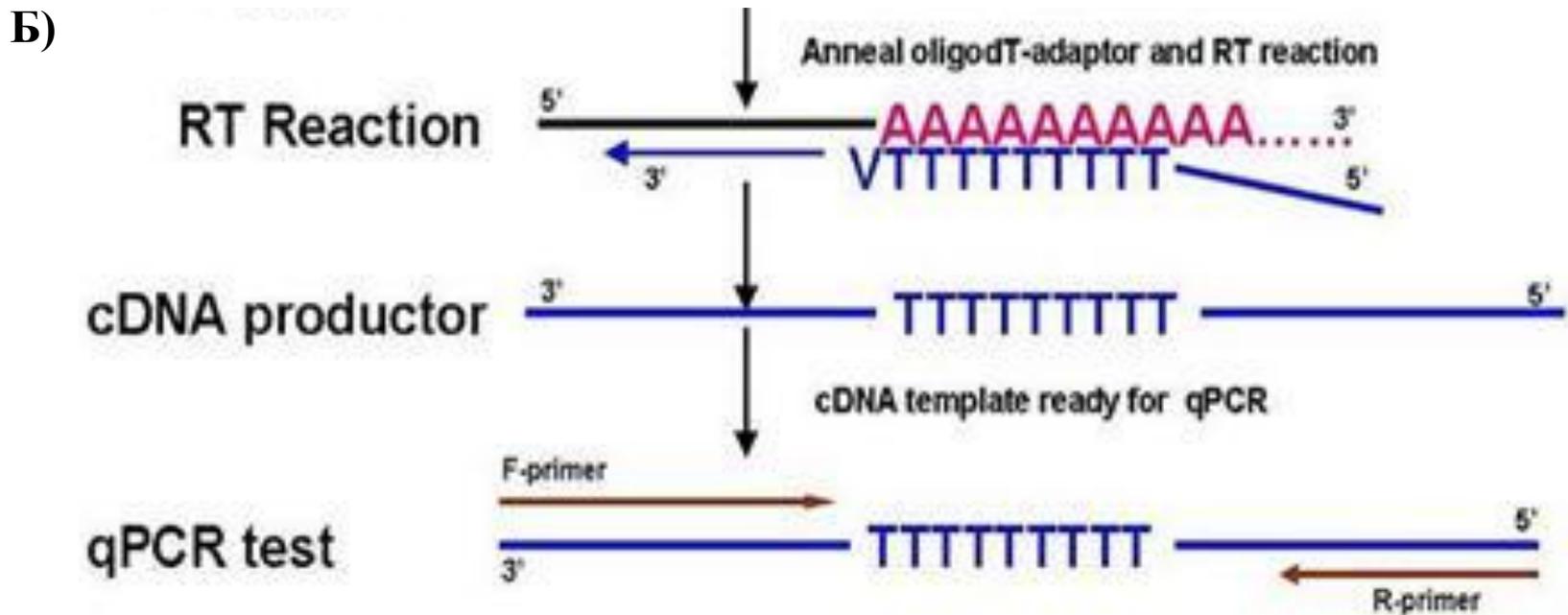
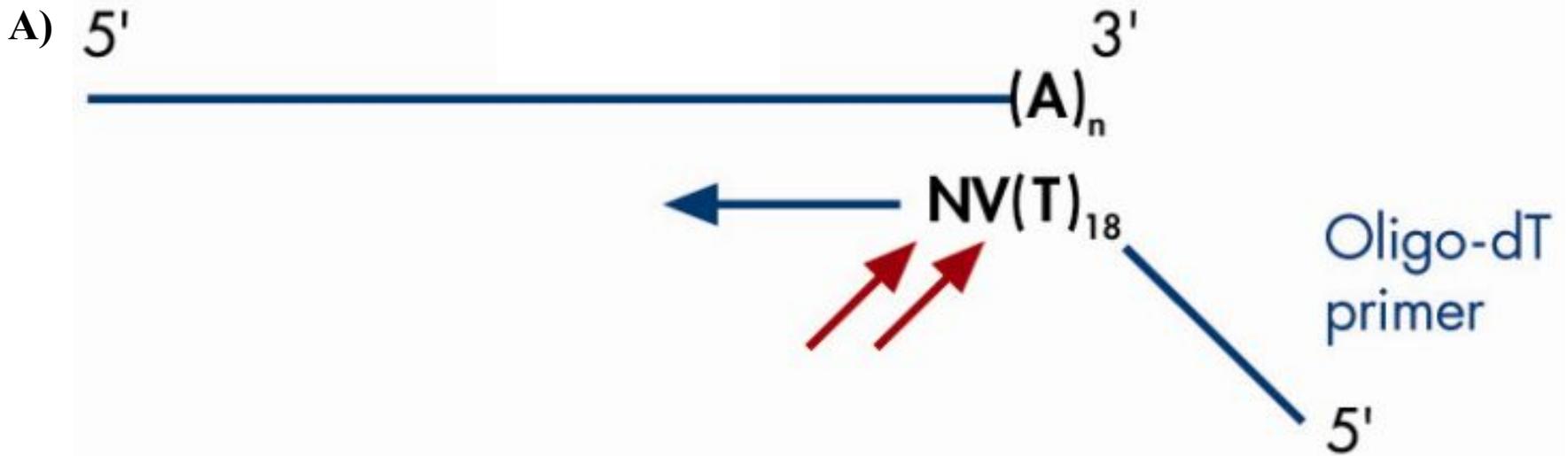


random primer



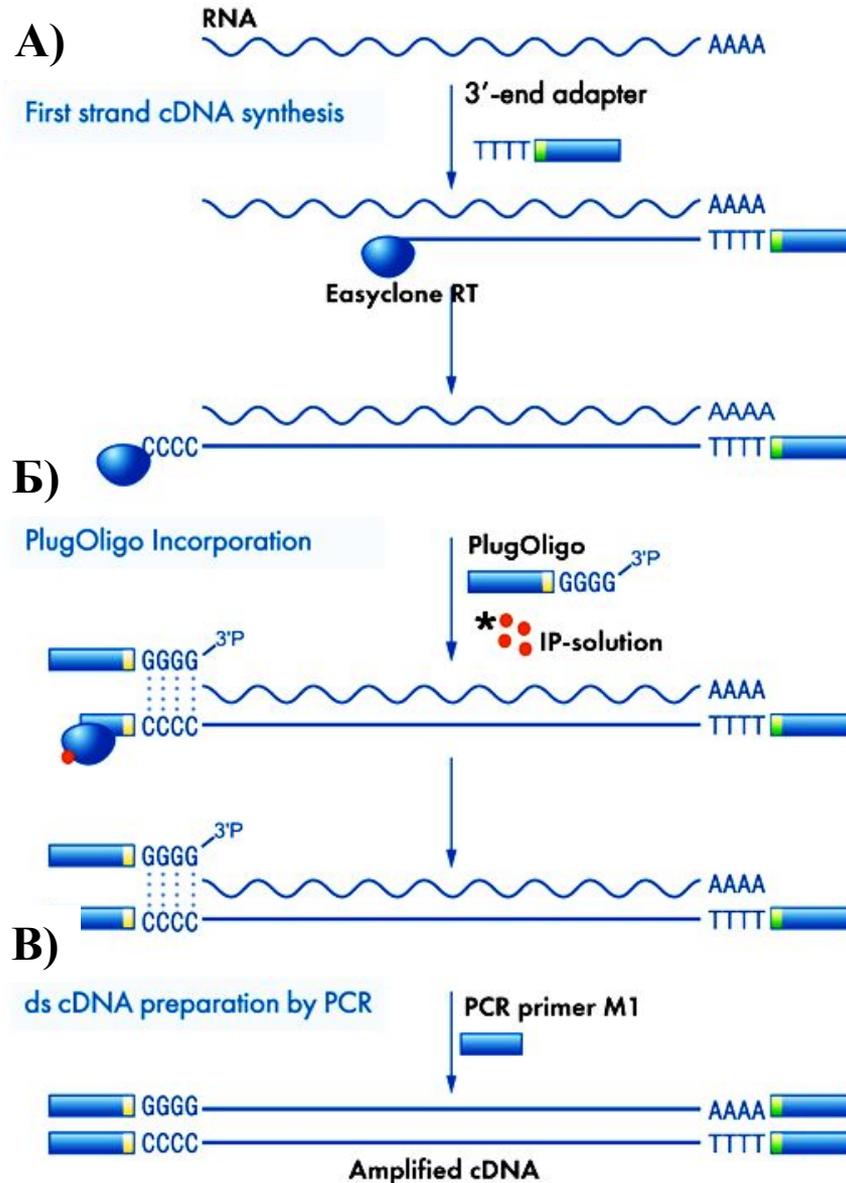
Праймирование при синтезе кДНК

СИНТЕЗ кДНК



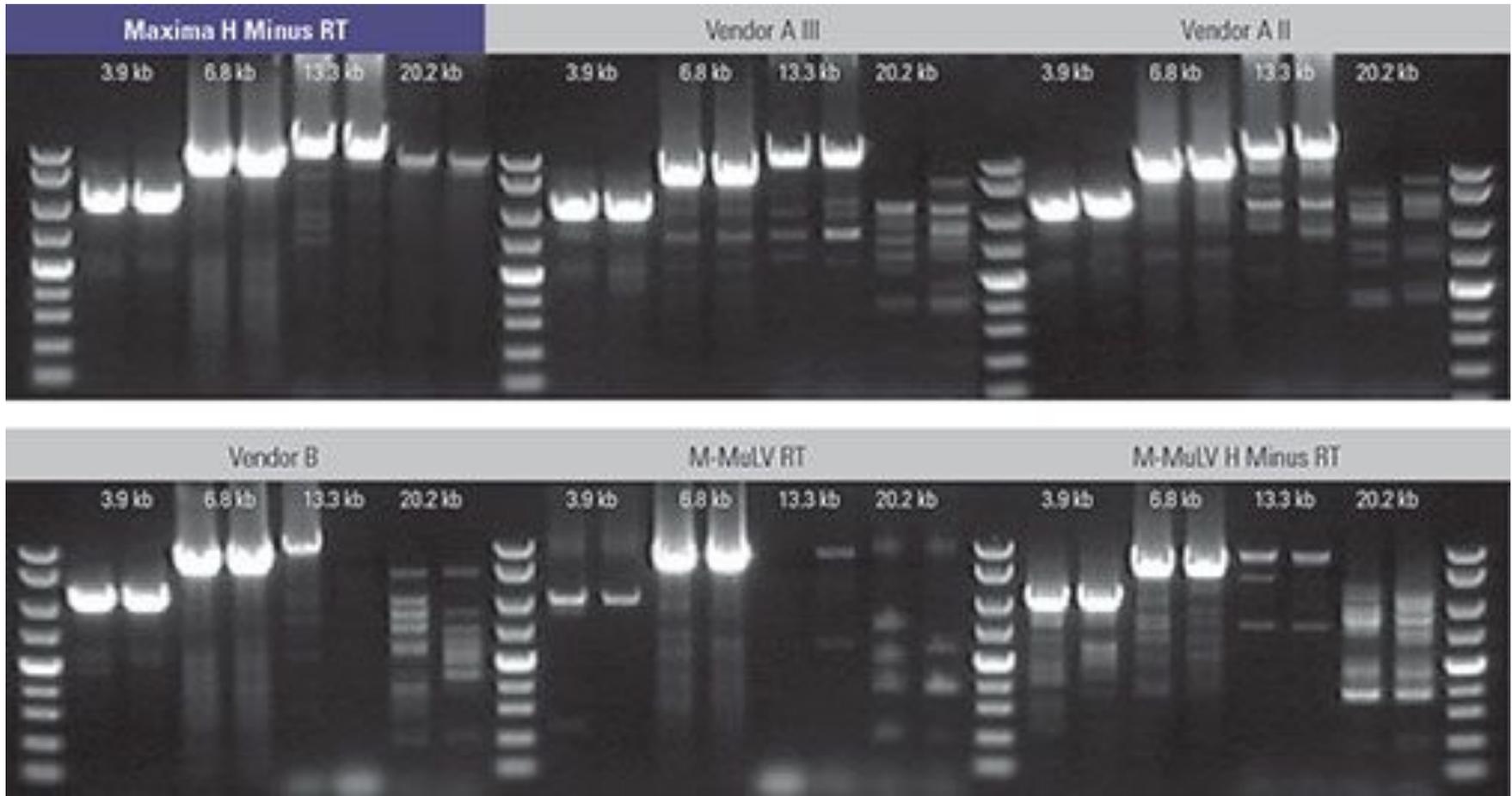
Модификации oligo(dT) праймера

СИНТЕЗ κДНК



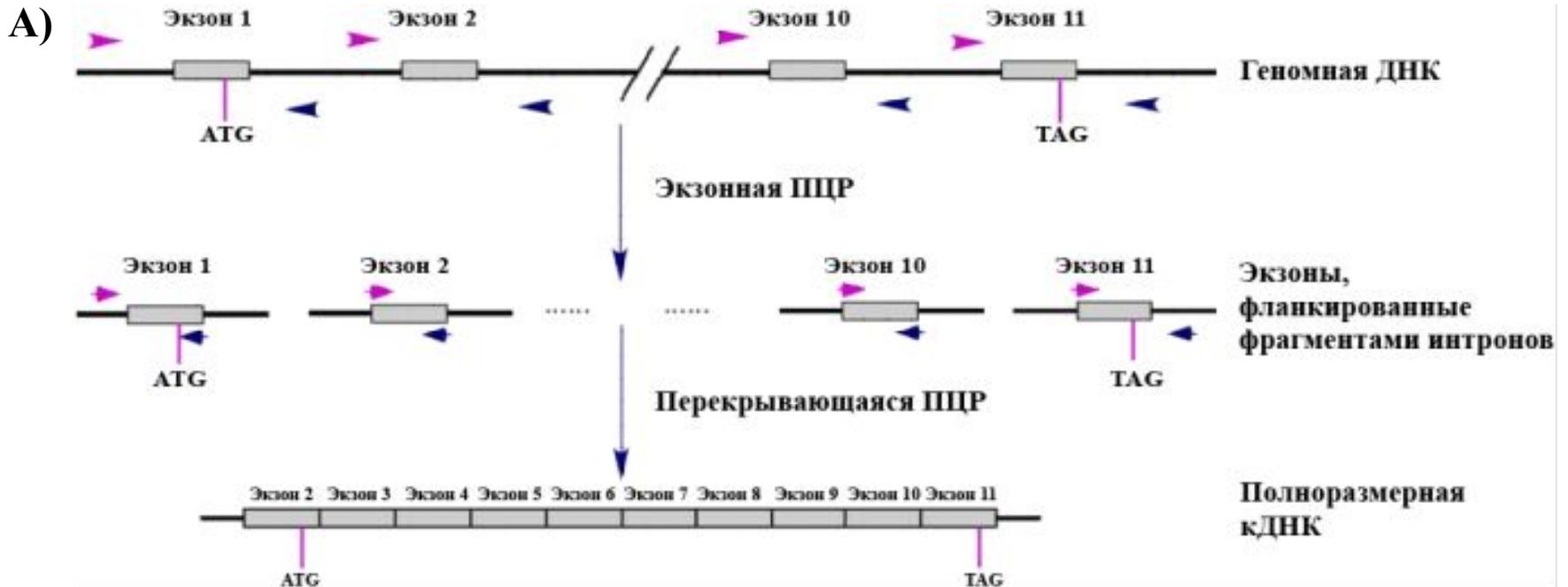
Синтез полноразмерной κДНК

СИНТЕЗ ДЛИННЫХ ФРАГМЕНТОВ кДНК



Синтез длинных фрагментов кДНК с помощью Maxima H Minus Reverse Transcriptase компании Thermo Scientific

СИНТЕЗ ГЕНА С ПОМОЩЬЮ ЭКЗОННОЙ ПЦР



Б)

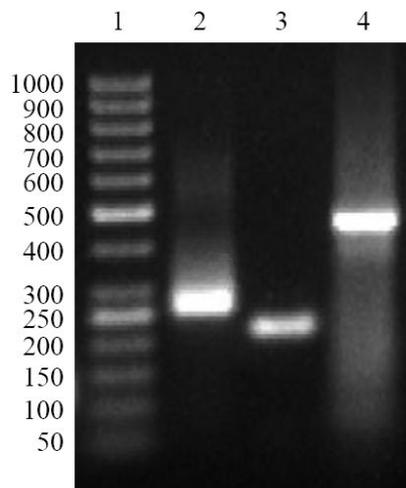
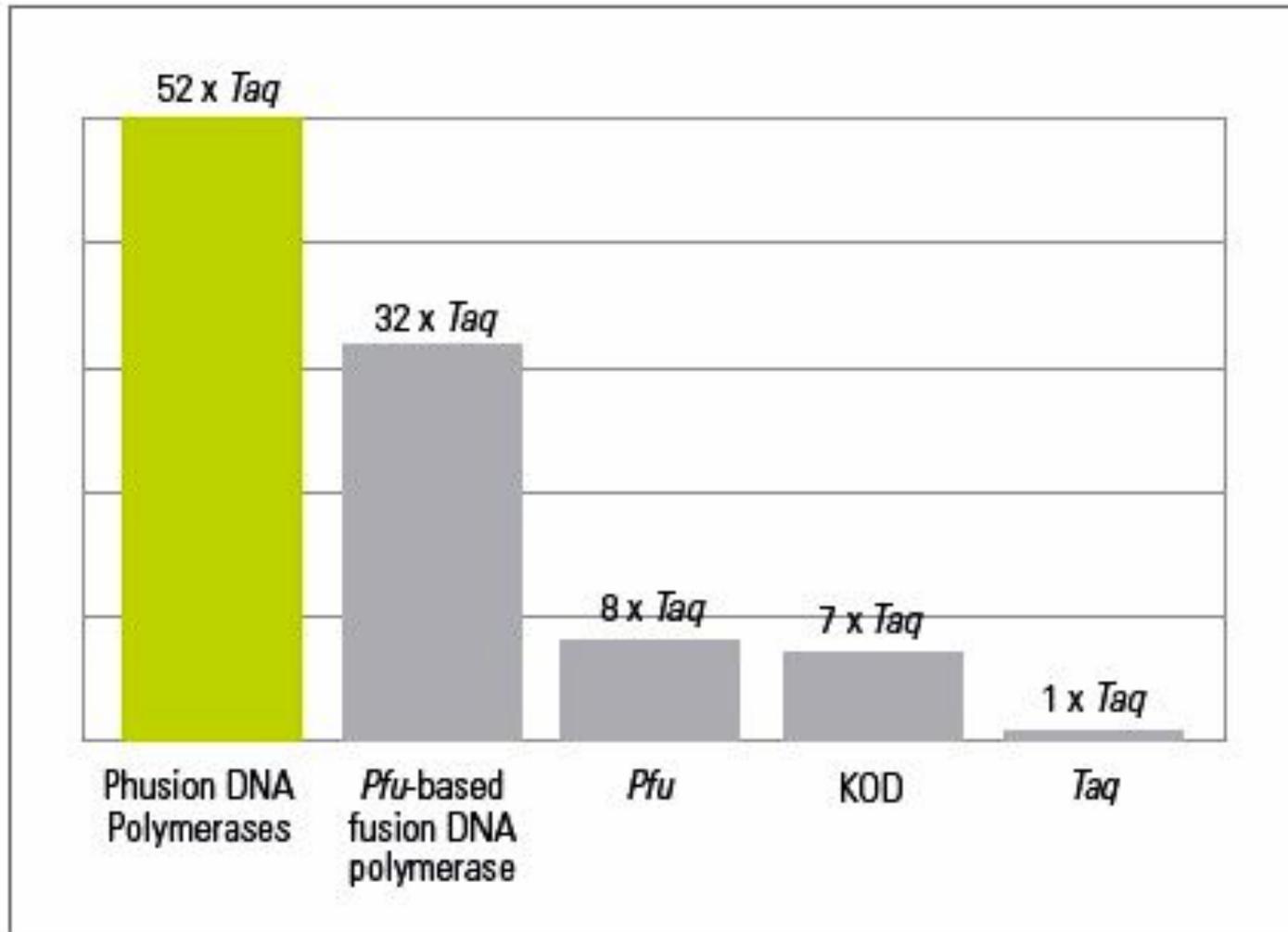


Схема экзонной ПЦР (А)

и ее использование для синтеза целевого гена (Б)

ТОЧНОСТЬ И ПРОТЯЖЕННОСТЬ СИНТЕЗА ФРАГМЕНТОВ ГЕНОМНОЙ ДНК



Точность синтеза фрагментов ДНК с помощью Phusion High-Fidelity DNA Polymerase компании Thermo Scientific

ТОЧНОСТЬ И ПРОТЯЖЕННОСТЬ СИНТЕЗА ФРАГМЕНТОВ ГЕНОМНОЙ ДНК

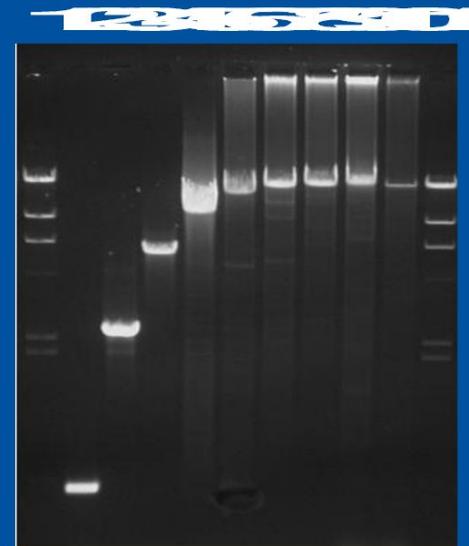
DyNAzyme™ EXT DNA Polymerase - 40 kb amplification

- 1 λ DNA - Hind III digest
- 2 0.5 kb
- 3 2.6 kb
- 4 6.0 kb
- 5 10 kb
- 6 15 kb
- 7 20 kb
- 8 25 kb
- 9 30 kb
- 10 40 kb
- 11 λ DNA - Hind III digest

Reaction conditions:

0,5- 20 kb 2 ng of lambda DNA or M13 DNA, 1 μ M of each primer, 360 μ M each dNTP, 2,0 mM MgCl₂ in 1x EXT buffer and 0,5-2 U of DyNAzyme EXT.

25-40 kb 2 ng of lambda DNA, 1 μ M of each primer, 500 μ M each dNTP, 2,3 mM MgCl₂ in 1x EXT buffer and 0.5-2 U of DyNAzyme EXT.



Синтез длинных фрагментов ДНК с помощью DyNAzyme EXT DNA Polymerase

СОЗДАНИЕ ПОЛНОСТЬЮ СИНТЕТИЧЕСКИХ ГЕНОВ

А) 1 11 21 31 41 51
 FVNQHLCGS **D** LVEALYLVCG ERGFFYT **DPT** **GGGPRR**GIVE QCC **H**SICSLY QLENYCN

Б) 5' -AGGC**GC** **GCCCTCCAGGACAGGCTGCATCAGAAGAGGCCATCAAGCAGATCACTGTCSTTCTGCC** **ATG** **GCCSTGTGGATGCGCCT** лидерный пептид
AcsI 5'-UTR
 лидерный пептид В цепь
CCTGCCCCTGCTGGCGCTGCTGGCCSTCTGGGGACCTGACCCAGCCGCAGCC **TTTGTGAACCAACACCTGTGCGGGTCA** **GATCTGGT**
 В цепь линкерный пептид А цепь
GGAAGCTCTCTACCTAGTGTGCGGGGAACGAGGCTTCTTCTACACAGATCCTACC **GGTGGTGGTCCGCGTTCGT** **GGCATTGTGGAACA**
 А цепь 3'-UTR
ATGCTGT **CATAGCATCTGCTCCSTCTACCAGCTGGAGAACTACTGCAAC** **TAG** **ACGCAGCCCGCAGGCAGCCCCACACCCGCCGCTC**
CTGCACCGAGAGAGATGG **ATCCA**-3'
BamHI

Аминокислотная последовательность одноцепочечного инсулина SCI-57 человека (А) и нуклеотидная последовательность, его кодирующая (Б)

СОЗДАНИЕ ПОЛНОСТЬЮ СИНТЕТИЧЕСКИХ ГЕНОВ

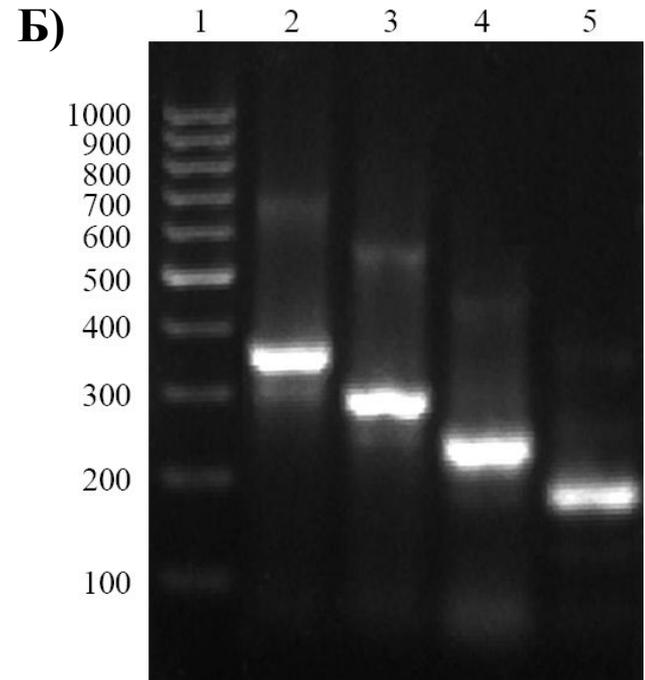
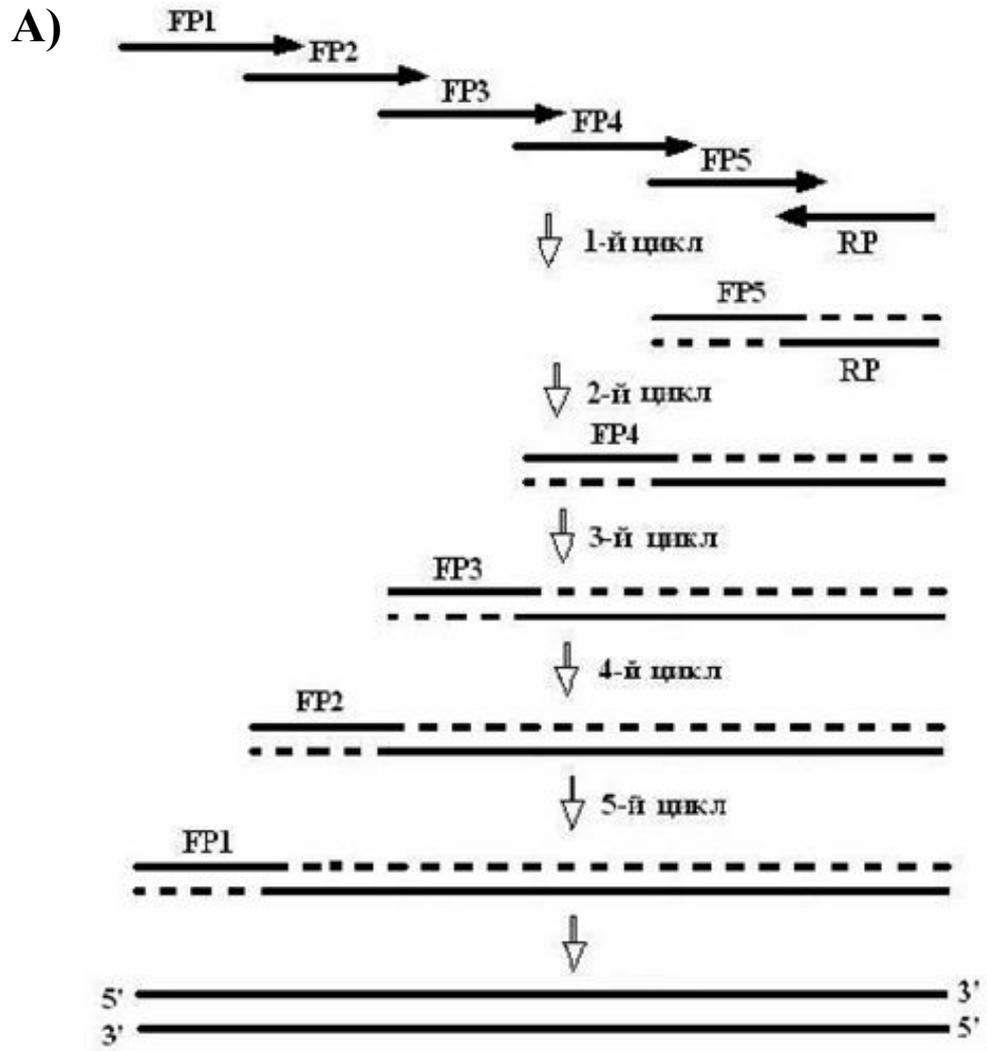
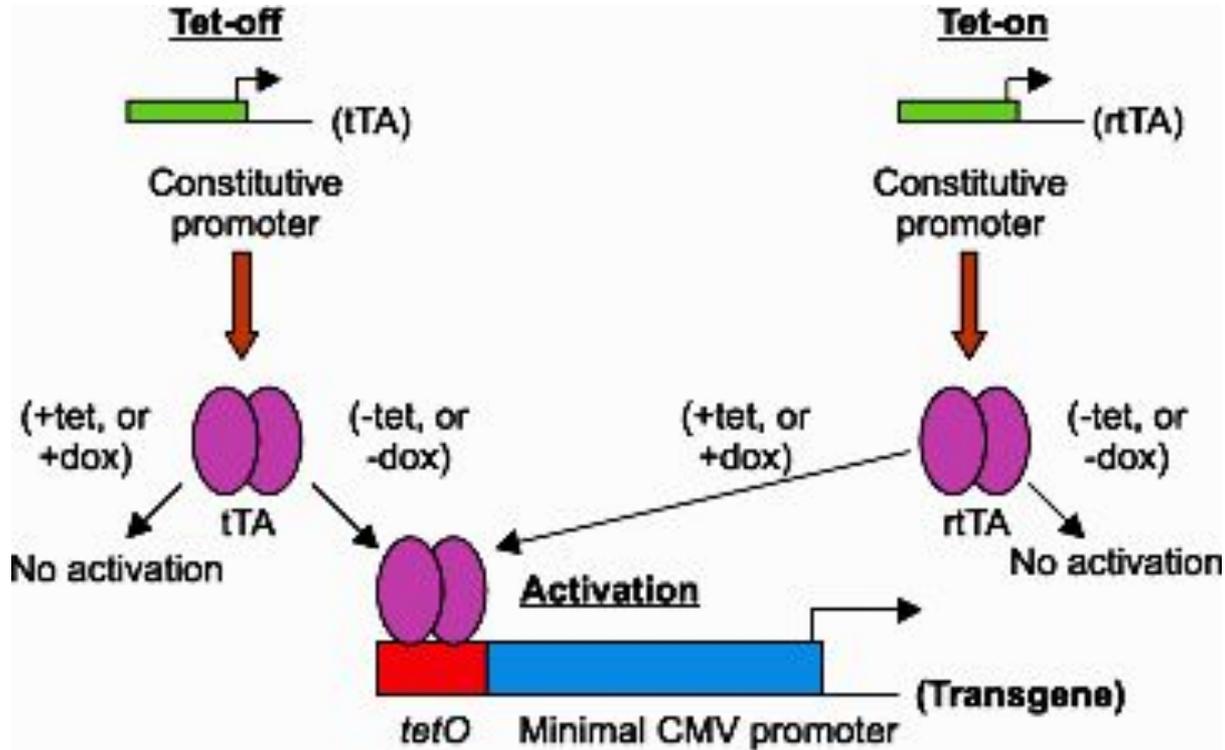


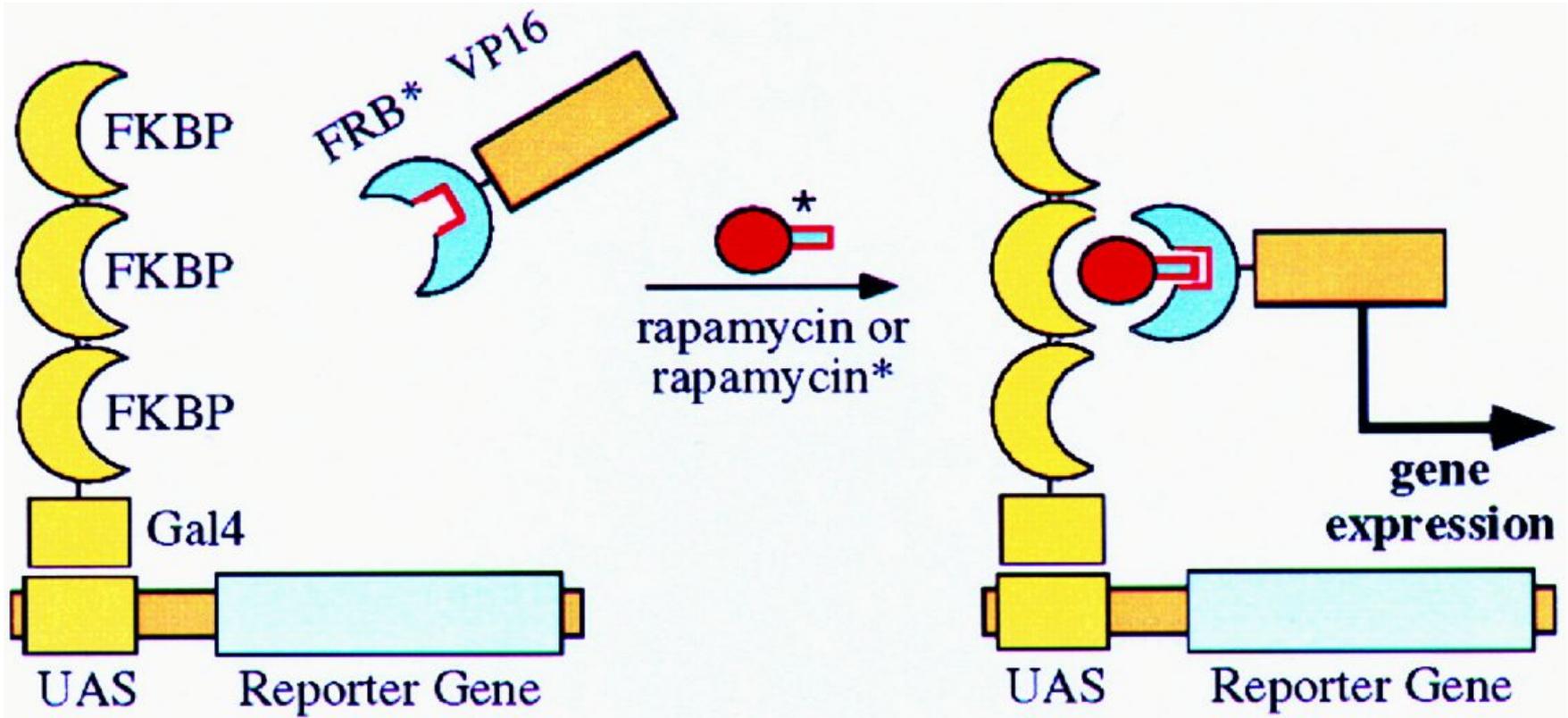
Схема синтеза нуклеотидной последовательности гена с помощью перекрывающихся олигонуклеотидов (А) и результаты использования данной схемы для синтеза гена SCI-57 человека (Б)

СИСТЕМЫ ИНДУЦИБЕЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ



Система индуцибельной экспрессии трансгена, основанная на тетрациклин/доксциклин контролируемом транскрипционном активаторе

СИСТЕМЫ ИНДУЦИБЕЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ



FKBP12: FK506-связывающий белок;

FKB: FKBP-рапамицин связывающий домен белка, ассоциированного с комплексом FKBP-рапамицин;

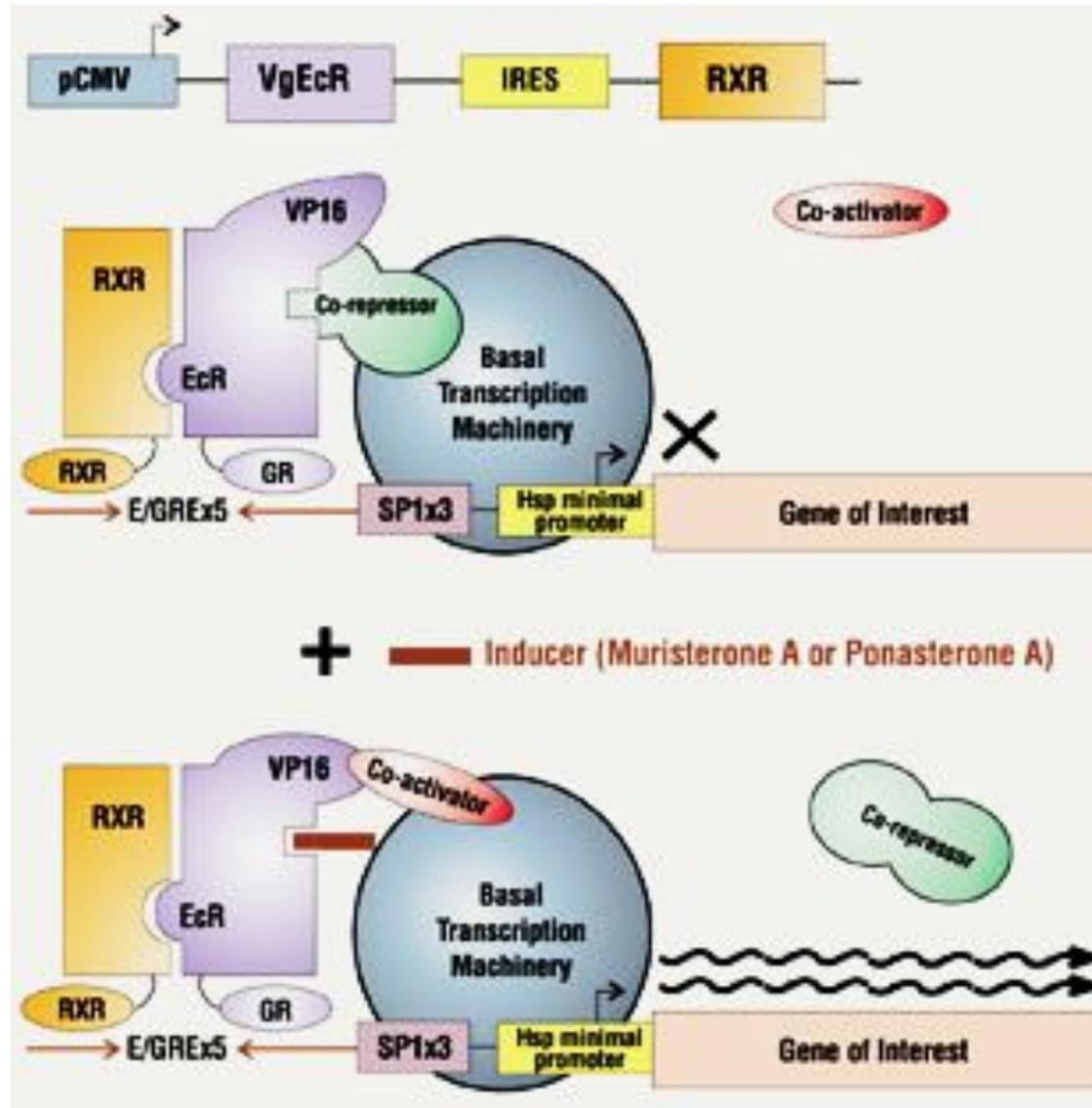
VP16: транскрипционный домен белка VP16 герпесвируса;

Gal4: ДНК-связывающий домен транскриптора GAL4 дрожжей;

UAS: 5'-фланкирующая активирующая последовательность

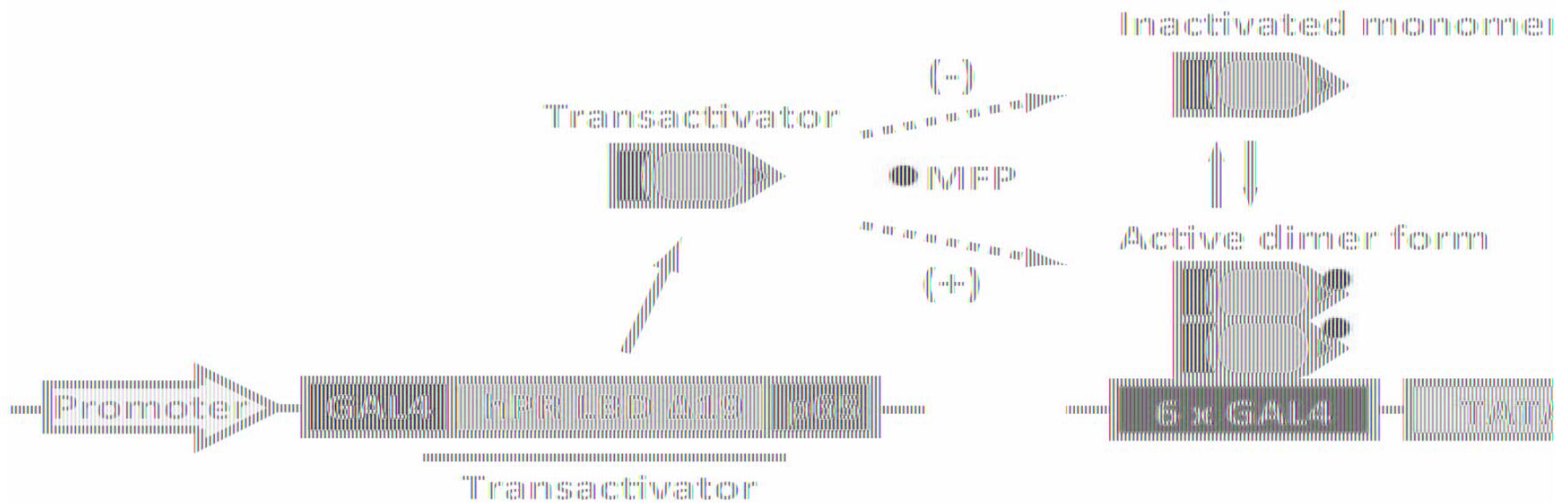
Система индуцибельной экспрессии трансгена, основанная на рапамицин контролируемом транскрипционном активаторе

СИСТЕМЫ ИНДУЦИБЕЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ



Система индуцибельной экспрессии трансгена, основанная на экдизон контролируемом транскрипционном активаторе

СИСТЕМЫ ИНДУЦИБЕЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ



MFP – мифепристон

Система индуцибельной экспрессии трансгена, основанная на прогестерон контролируемом транскрипционном активаторе