

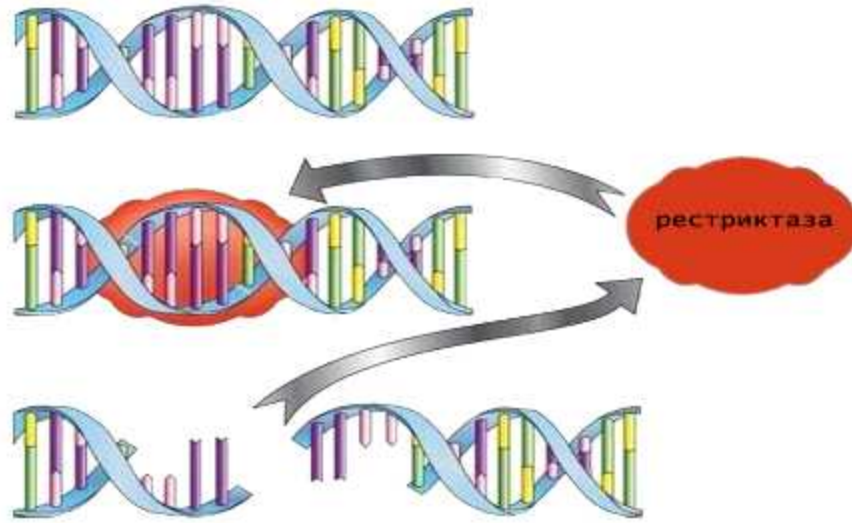
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Кафедра Молекулярной биологии и генетики

Тема: Рестрикционный анализ .

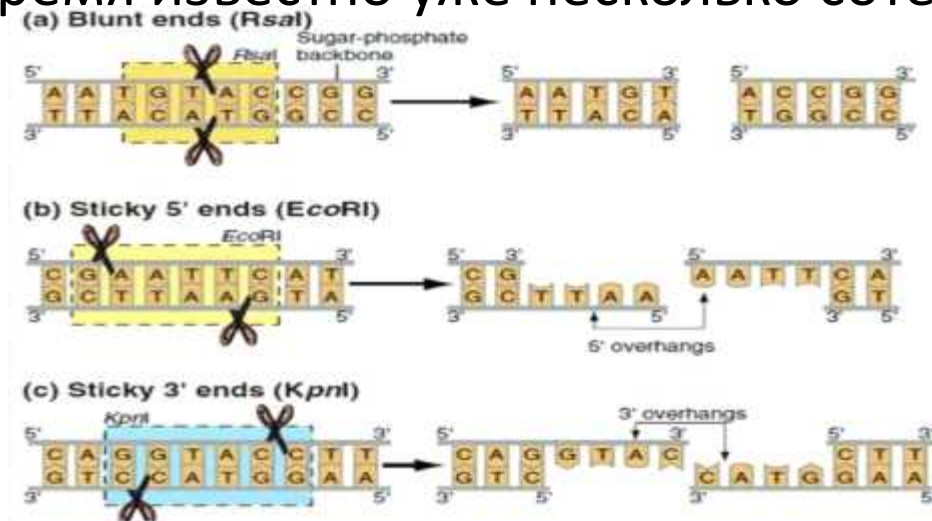
Студентка гр. 301 Петрова Мария Игоревна
Преподаватель Замарин Антон Александрович
Волгоград
2021

1. Рестрикционный анализ

- Данный метод основан на применении ферментов, носящих название рестриктаз.
- Рестриктазы - это ферменты, узнающие и атакующие определенные последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК (сайты рестрикции).
- При проведении целенаправленного поиска конкретных точковых мутаций важная роль принадлежит использованию рестрикционных эндонуклеаз (рестриктаз)



- Ценным свойством рестрикционных эндонуклеаз является распознавание ими специфических нуклеотидных последовательностей длиной от 4 до 10 нуклеотидов, в результате чего фермент осуществляет рестрикцию.
- Каждая рестриктаза распознает и разрезает в фиксированном месте строго определенную, специфичную для себя нуклеотидную последовательность - сайт рестрикции (сайт узнавания).
- В настоящее время известно уже несколько сотен различных рестриктаз.



- В тех случаях, когда точковая мутация изменяет естественный сайт узнавания для определенной рестриктазы, данный фермент не сможет расщепить мутантный амплифицированный фрагмент ДНК; в некоторых случаях, напротив, мутация приводит к появлению нового сайта узнавания для той или иной рестриктазы, отсутствующего в норме. В обеих описанных ситуациях мутантный и нормальный ПЦР-продукты дадут различные по длине фрагменты рестрикции, что можно будет легко обнаружить при электрофорезе.



2. Этапы рестрикционного анализа

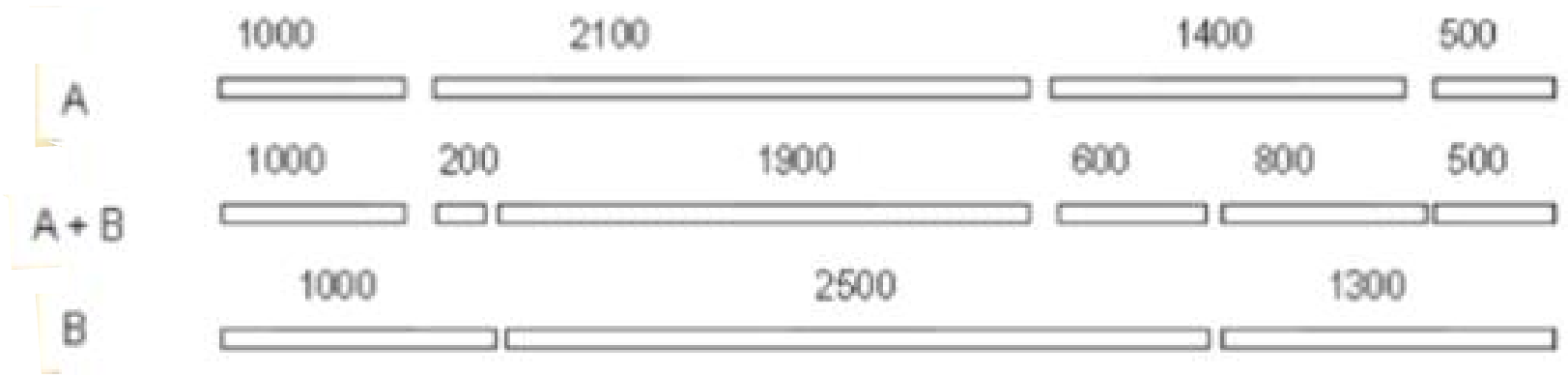
- Выделение ДНК;
- Рестрикция ДНК;
- Электрофорез.



- Выделение ДНК: 3 мл венозной крови с помощью коагулянтов разделяют на плазму, лейкоциты и эритроциты. Затем при взаимодействии лейкоцитов с детергентами происходит лизис или разрушение клетки. Мягкое центрифугирование помогает осадить ядра клетки на дно пробирки. Надосадочную жидкость, оставшуюся после центрифугирования, сливают, добавляют протеолитические ферменты, из-за чего происходит разрушение ядерной оболочки и высвобождается ДНК. Затем происходит фенольная и хлороформная очистка ДНК, что помогает удалить молекулы белков, липидов и углеводов. В результате из одного грамма ткани получают 2 миллиграмма, необходимого для исследования ДНК.

- Рестрикция ДНК – разрезание двухцепочечной молекулы ДНК с помощью ферментов - рестриктаз (их насчитывается около 150 видов). Рестриктаза разрезает молекулу ДНК в специальных районах – сайт рестрикции. Сайт рестрикция-участок ДНК, состоящий из 4-12 пар нуклеотидов, где конкретный вид рестриктазы разрушает фосфодиэфирные связи между нуклеотидами в каждой из цепи ДНК. У каждой рестриктазы есть свой сайт рестрикции. Для диагностики наследственных болезней используют симметричную рестрикцию—это, когда на концах разрезанных участков нет свободной валентности - по-другому называют тупые концы.

- Например, при частичном расщеплении ДНК ферментом А могут образовываться фрагменты 3100 п. н., 1400 п. н. и 500 п. н. Сопоставив их с данными полного расщепления (2100, 1400, 1000 и 500), можно сразу поставить рядом 2100 и 1000 (фрагмент 3100). А получив фрагмент 3500 – расположить рядом 2100 п. н. и 1400 п. н.



Карта этого фрагмента ДНК:



3. Использование рестрикционного анализа в других методах

- Этот метод используется также как начальный этап метода определения последовательности нуклеотидных пар (секвенирования) и метода молекулярной гибридизации.
- 1) Секвенирование позволяет довольно быстро определить полную нуклеотидную последовательность ДНК длиной 100-500 нуклеотидных пар. Это необходимо для выяснения структуры, функций, возможностей рекомбинации и амплификации молекул или фрагментов молекул нуклеиновых кислот.
- С помощью ферментов ДНК разделяют на фрагменты и определяют в них позиции нуклеотидов химическим или энзиматическим методом.

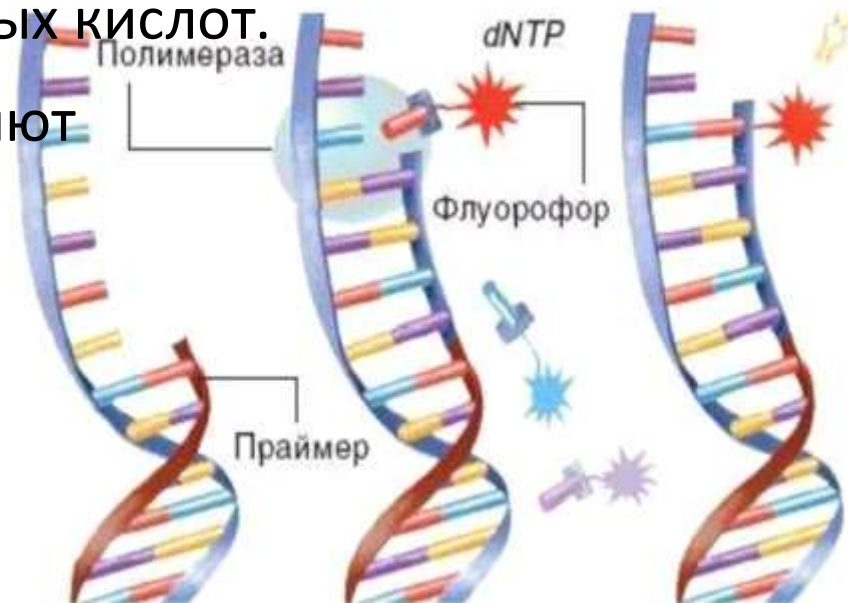


Схема химического метода определения нуклеотидных последовательностей (по А.С. Коничеву и Г.А. Севастьяновой, 2003): 1-10 длина (число нуклеотидов)

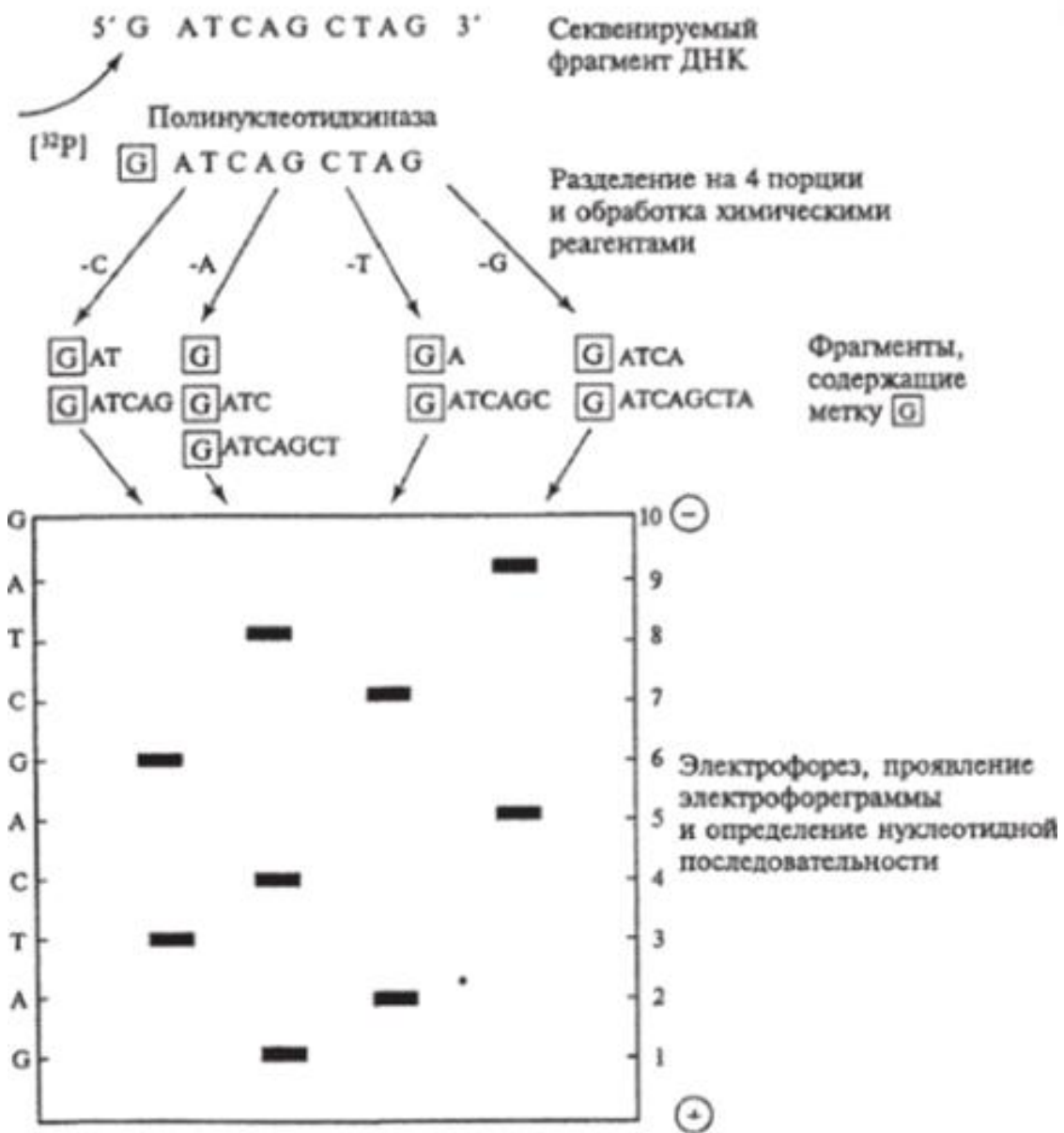
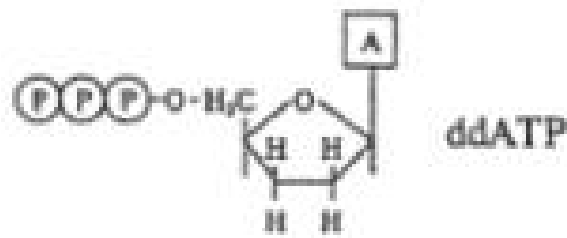
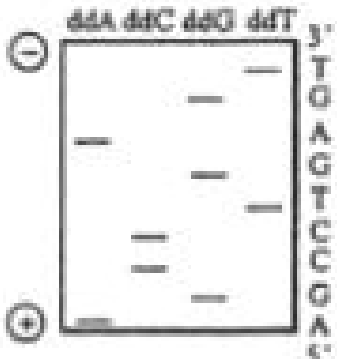
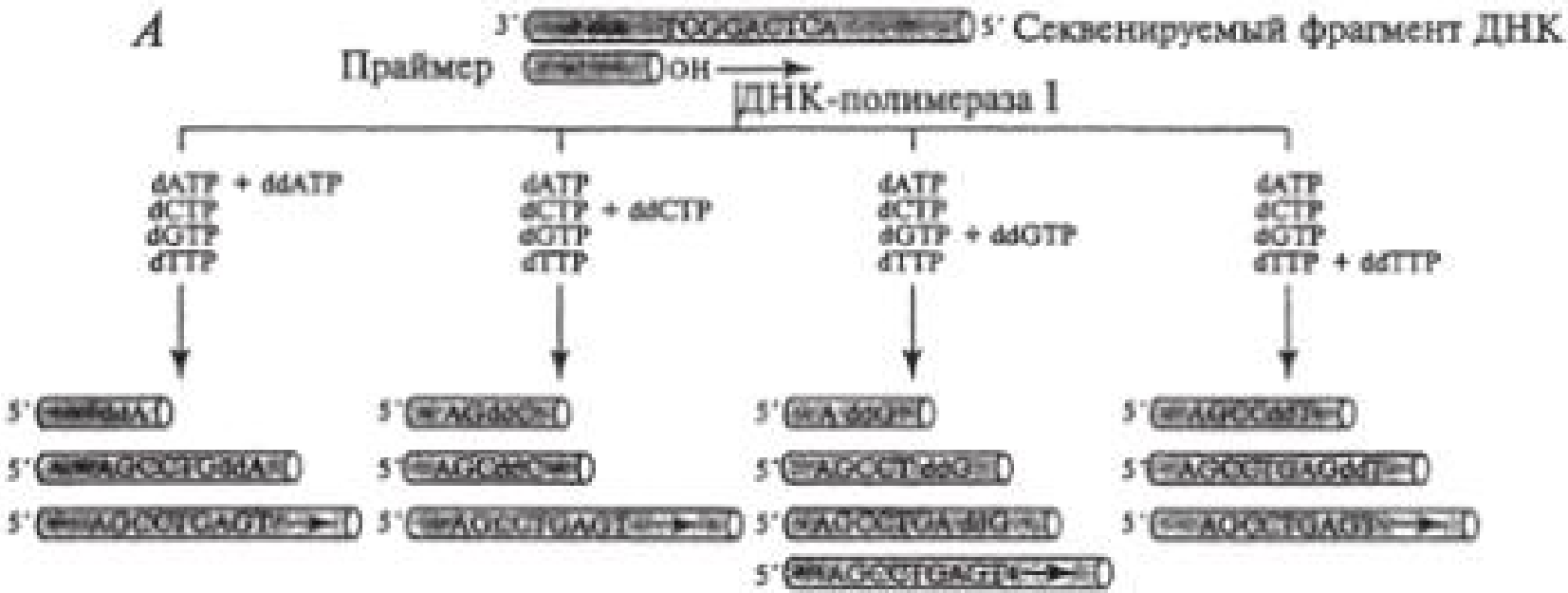


Схема ферментативного метода определения нуклеотидных последовательностей (по А.С. Коничеву и Г.А. Севастьяновой, 2003).



3.2 Метод молекулярной гибридизации

- Этот метод используется для выявления степени сходства различных ДНК
- Исследуемую ДНК нагревают в щелочной среде для расплетения ее на две отдельные нити.
- Одну из них закрепляют на специальном фильтре.
- Этот фильтр помещают в раствор, содержащий радиоактивный зонд .
- Затем температуру реакционной смеси понижают, чтобы создать условия для восстановления двухцепочечной структуры ДНК.
- В случае, если исследуемая ДНК и ДНК эталонного штамма относятся к одному виду – в реакционной смеси формируется двухцепочечная ДНК. При отрицательной реакции двухцепочечная ДНК не формируется . Реакцию оценивают по степени гомологии – проценту восстановленных связей между двумя цепочками ДНК.

Заключение

- Рестрикционный анализ ДНК широко используется в молекулярно-биологических исследованиях и прикладных работах и является одним из наиболее важных инструментов при изучении ДНК. Большое разнообразие существующих эндонуклеаз рестрикции (ЭР) позволяет проводить расщепление ДНК по более чем 150 сайтам узнавания. Рестрикционный анализ проводится для самых различных ДНК, начиная от небольших фрагментов длиной несколько десятков нуклеотидных пар, и вплоть до целых геномов эукариот размерами более 1 млрд. пар оснований.
- Рестрикционный анализ значительно упрощает обнаружение известных точковых мутаций и в настоящее время широко используется для прямой ДНК-диагностики наследственных заболеваний.

