

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

РЕФЕРАТ

по дисциплине «Методы и объекты генетического анализа»

Тема: Рестрикционный анализ .

Студентка гр. 301 _____ Петрова Мария Игоревна

Преподаватель _____ Замарин Антон Александрович

Волгоград

2021

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
1.Рестрикционный анализ.....	4
1.1 Рестриктазы.....	4
1.2 Использование рестрикционных эндонуклеаз.....	5
2. Этапы рестрикционного анализа.....	7
3. Использование рестрикционного анализа в других методах.....	9
3.1 Определение последовательности нуклеотидных пар.....	9
3.1.1. Химический метод	9
3.1.2 Энзиматический метод	10
3.2 Метод молекулярной гибридизации	12
Заключение.....	13
Список использованных источников	14

Введение

Целью данной работы является изучение рестрикционный анализа, а так же рестрикционных эндонуклеаз.

Рестрикционный анализ – изучение ДНК с применением эндонуклеаз рестрикции, то есть ферментов, которые вносят в ДНК двуцепочечный разрыв, но только в тех местах, где встречается специфическая для каждой конкретной рестриктазы последовательность нуклеотидов.

Комбинируя гель-электрофорез с использованием рестриктаз, можно картировать ДНК. Для этого сопоставляют результаты гидролиза исследуемого фрагмента каждой рестриктазой в отдельности и их комбинациями. Затем эти фрагменты разделяют с помощью электрического поля и оценивают их размеры. Результаты совместного гидролиза показывают, содержится ли сайты узнавания разных рестриктаз внутри фрагмента, вычленяемого определенной рестриктазой. Если они присутствуют, то такой фрагмент исчезает в геле и превращается в два и более субфрагмента с такой же суммарной длиной. Сопоставив размеры фрагментов, можно определить локализацию сайтов рестрикции.

1. Рестрикционный анализ

Данный метод основан на применении ферментов, носящих название рестриктаз. Рестриктазы представляют собой эндонуклеазы, которые расщепляют молекулы ДНК, разрывая фосфатные связи не в произвольных местах, а в определенных последовательностях нуклеотидов. Особое значение для методов молекулярной генетики имеют рестриктазы, которые узнают последовательности, обладающие центральной симметрией и считывающиеся одинаково в обе стороны от оси симметрии. Точка разрыва ДНК может или совпадать с осью симметрии, или быть сдвинута относительно нее.

1.1 Рестриктазы

Рестриктазы (рестрицирующие эндонуклеазы, эндонуклеазы рестрикции) - это ферменты, узнающие и атакующие определенные последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК (сайты рестрикции).

Еще в 1953 году было обнаружено, что ДНК определенного штамма *E. coli*, введенная в клетки другого штамма (например, ДНК штамма В - в клетки штамма С) не проявляет, как правило, генетической активности, так как быстро расщепляется на мелкие фрагменты.

В 1966 году было показано, что это явление связано со специфической модификацией хозяйской ДНК - она содержит несколько метилированных оснований, отсутствующих в немодифицированной ДНК, причем метилирование (добавление к основанию метильной группы) происходит уже после завершения репликации. Бактерия способна отличить свою собственную ДНК от любой вторгающейся «чужеродной» именно по типу ее модификации. За «метку» отвечают метилирующие ферменты модификации, так называемые ДНК-метиلاзы. Различие в модификации делает чужеродную ДНК чувствительной к действию рестрицирующих ферментов, которые узнают отсутствие метильных групп в соответствующих сайтах.

Системы рестрикции и модификации широко распространены у бактерий; их существование играет важную роль в защите резидентной ДНК от загрязнения последовательностями чужеродного происхождения.

Рестриктаза, которая расщепляла неметилованную ДНК была выделена в 1968 г. Мезельсоном и Юанем. Этот фермент был высокоспецифичен по отношению к определенной последовательности ДНК, но расщеплял молекулы неспецифически, в другом месте, на некотором удалении от участка узнавания. Вскоре, в 1970 г. Смит и Вилькокс выделили из *Haemophilus influenzae* первую рестриктазу, которая расщепляла строго определенную последовательность ДНК (Hind III). Поскольку разные бактерии по-разному метят свою ДНК, то и рестриктазы должны узнавать разные последовательности. И действительно, с тех пор выделены рестриктазы, узнающие более 150 сайтов рестрикции (мест расщепления ДНК).

1.2 Использование рестрикционных эндонуклеаз.

При проведении целенаправленного поиска конкретных точковых мутаций важная роль принадлежит использованию рестрикционных эндонуклеаз (рестриктаз) - особых клеточных ферментов, выделяемых из различных штаммов бактерий. Ценным свойством рестрикционных эндонуклеаз является распознавание ими специфических нуклеотидных последовательностей длиной от 4 до 10 нуклеотидов, в результате чего фермент осуществляет рестрикцию, т.е. разрезание этих последовательностей в составе двунитевой молекулы ДНК.

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 и, следовательно, столько же различных вариантов коротких нуклеотидных последовательностей, образующих сайты рестрикции. 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.

Таким образом, при необходимости быстрой детекции какой-либо определенной точечной мутации задача сводится к компьютерному поиску соответствующей рестриктазы, сайт узнавания которой локализован в месте нарушенной нуклеотидной последовательности; обработка ПЦР-продуктов такой рестриктазой позволит легко дифференцировать нормальные и мутантные аллели.

2. Этапы рестрикционного анализа

Выделение ДНК;

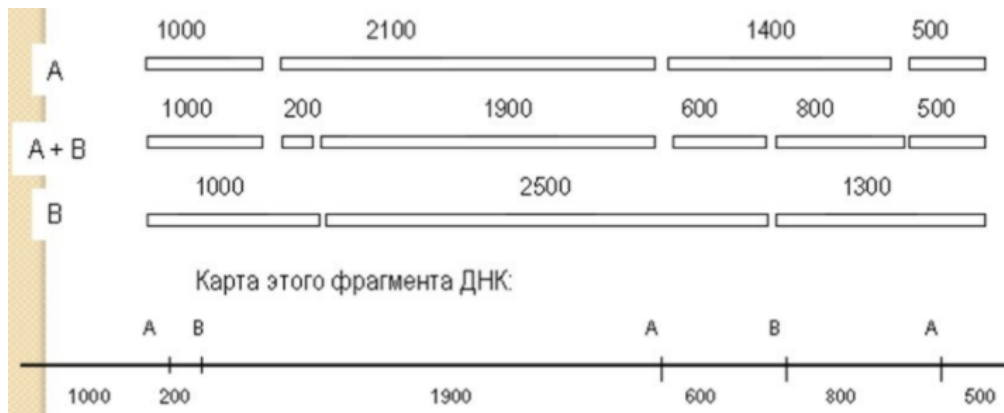
Рестрикция ДНК;

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.



3. Использование рестрикционного анализа в других методах

Этот метод используется также как начальный этап метода определения последовательности нуклеотидных пар (секвенирования) и метода молекулярной гибридизации.

3.1 Определение последовательности нуклеотидных пар

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.

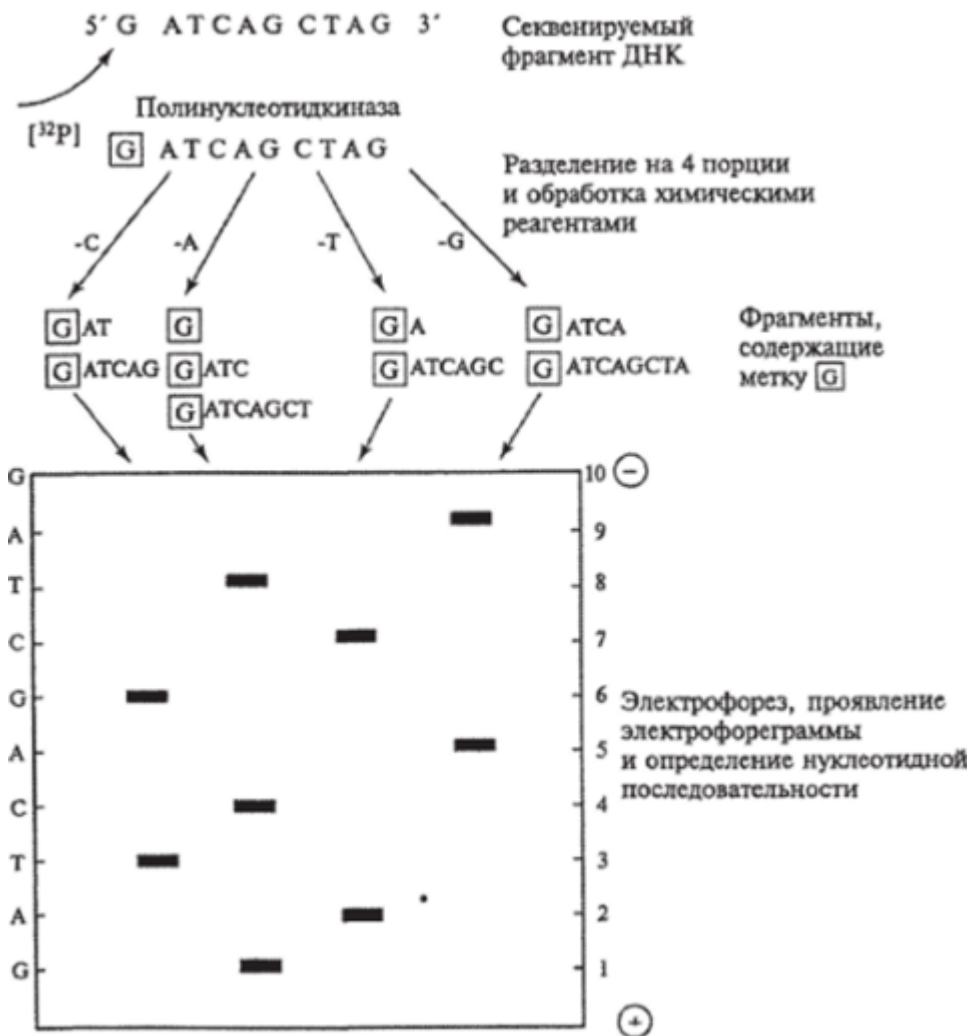
3.1.1. Химический метод

Химический метод был предложен в 1976 г. А. Максмом и У. Гилбертом. Он основан на химической дегфракционируемых методом электрофореза радиоактивно меченных фрагментов радиации ДНК — специфической химической модификации пуриновых и пиримидиновых оснований с последующими выщеплением модифицированных нуклеотидов из цепи ДНК и анализом образовавшихся продуктов методом гель-электрофореза. Перед началом опыта один из концов фрагмента ДНК метят с помощью изотопа фосфора ^{32}P . Полученные электрофореграммы проявляют с помощью рентгеновской пленки. Таким образом, фракционируя на одной гелевой пластине фрагменты, образовавшиеся после специфического выщепления каждого из четырех нуклеотидов (А, Т, Г и Ц), можно непосредственно читать нуклеотидную последовательность секвенируемой ДНК по проявленной электрофореграмме.

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.



Энзиматический метод

3.1.2 Энзиматический метод

Энзиматический метод, разработанный М. Сэнгером, основан не на химическом, а на ферментативном подходе. Сэнгер использовал ДНК-полимеразу I (рис. 4.5). Анализируемый фрагмент ДНК используют в качестве матрицы в реакции полимеразного копирования (синтеза

комплементарной цепи ДНК) с помощью ДНК-полимеразы I *E. coli*. Метод получил название «плюс-минус-метод», поскольку реакцию полимеризации в нем изначально проводили либо в отсутствие одного из четырех типов нуклеотидов («минус»-система), либо в присутствии только одного нуклеотида («плюс»-система), что ограничивает возможность наращивания полинуклеотидной цепи, т. е. останавливает (терминирует) ее синтез из-за недостатка соответствующего нуклеотида. Затем для остановки синтеза стали использовать специальные молекулы — терминаторы. Продукты реакций анализируют методом электрофореза, и секвенируемую последовательность считывают с радиоавтографа, так же как при анализе химического секвенирования.

В настоящее время определение точной нуклеотидной последовательности любого фрагмента ДНК вполне разрешимая задача. Уже определены последовательности не только сотен генов про- и эукариот, но и геномы многих организмов (более 800). Зная последовательность гена и генетический код, легко определить аминокислотную последовательность кодируемого им белка.

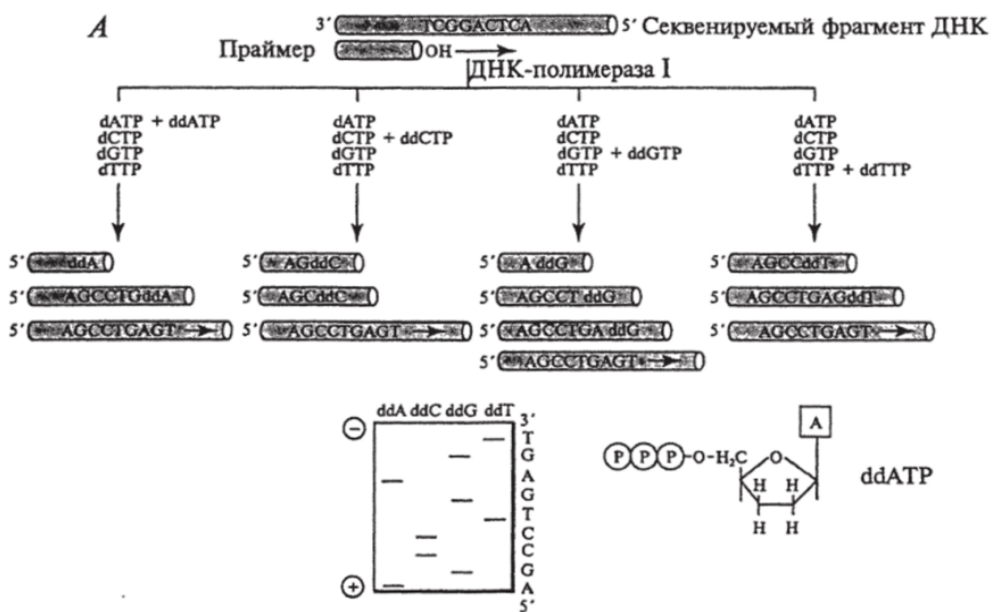


Схема ферментативного метода определения нуклеотидных последовательностей (по А.С. Коничеву и Г.А. Севастьяновой, 2003).

3.2 Метод молекулярной гибридизации

Этот метод используется для выявления степени сходства различных ДНК (при идентификации микроорганизмов проводят сравнение ДНК выделенного штамма с ДНК эталонного штамма).

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 (одноцепочечную молекулу ДНК эталонного штамма, меченную радиоактивным изотопом).

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 (для оценки реакции используется биохимическая методика). На практике все связи двух цепочек полностью не восстанавливаются из-за высокого уровня генетической изменчивости микроорганизмов, поэтому 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.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

https://studme.org/271482/tehnika/opredelenie_nukleotidnoy_posledovatelnosti_sekvenirovanie

<https://medknigaservis.ru/wp-content/uploads/2019/01/NF0010095.pdf>

www.biotechnolog.ru/ge/ge2_2.htm

vmede.org/index.php?topic=593.0

<https://meduniver.com/Medical/Neurology/1474.html>

<https://studfile.net/preview/8669343/page:11/>