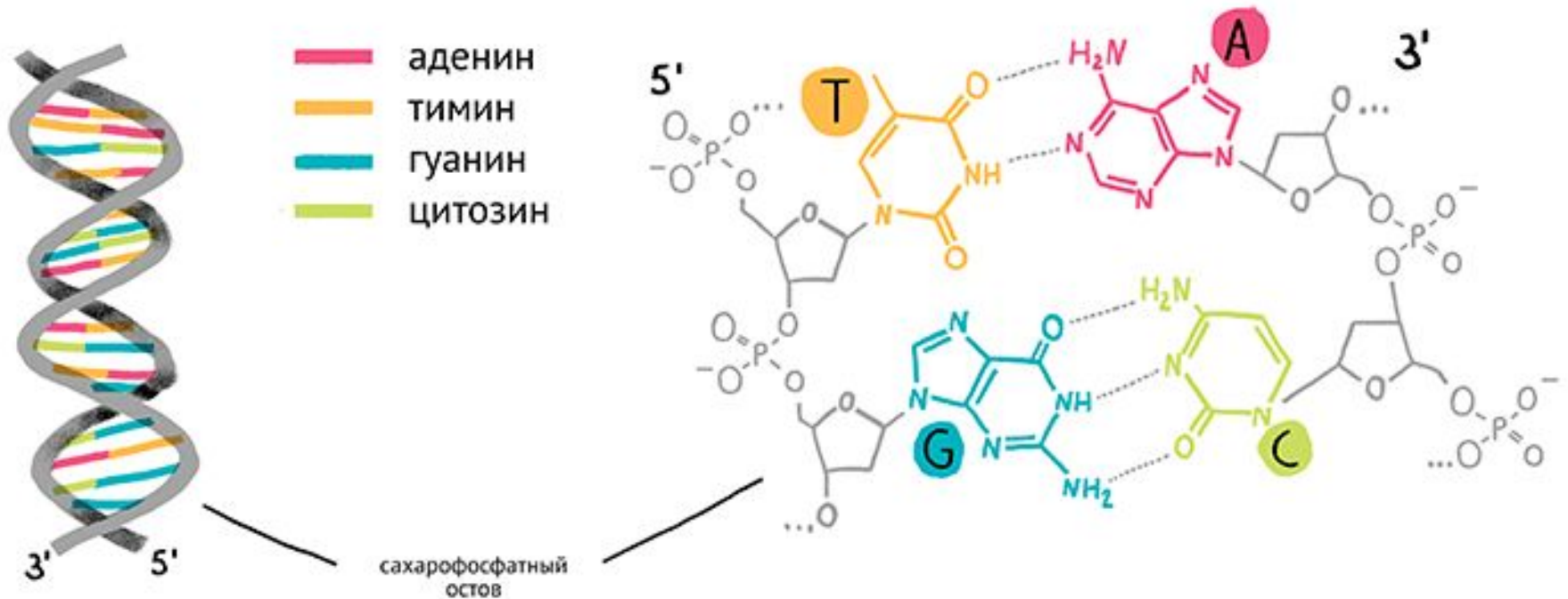
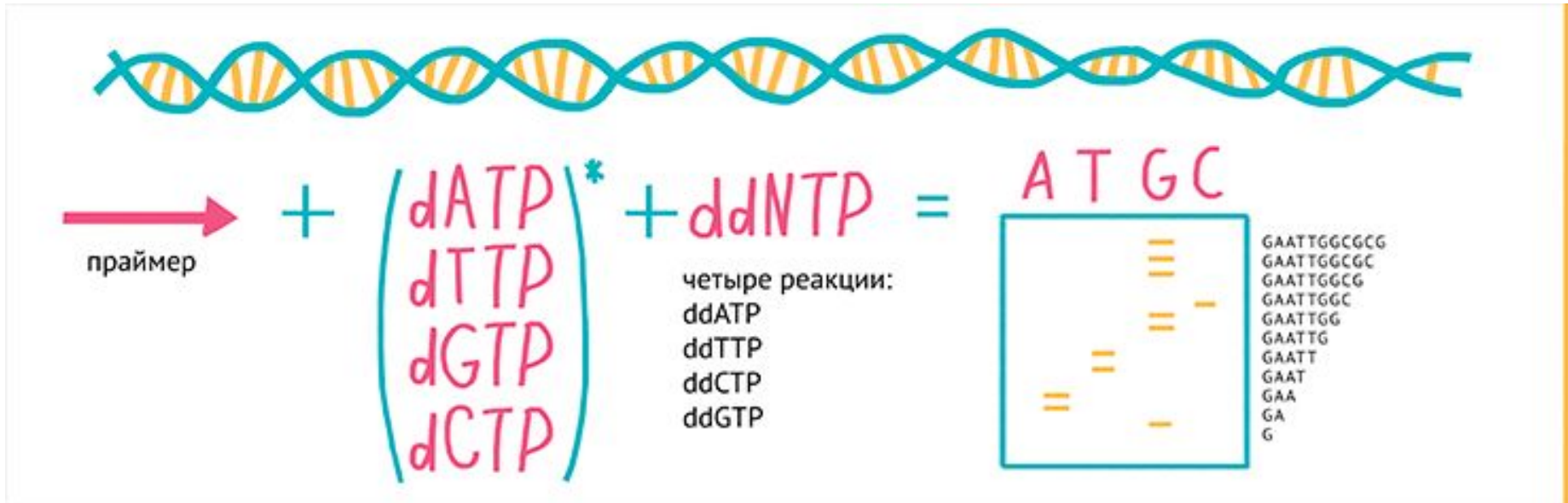


СЕКВЕНИРОВАНИЕ



(определение нуклеотидной последовательности) — это расшифровка первичной структуры линейных молекул ДНК или РНК.

Энзиматический метод.

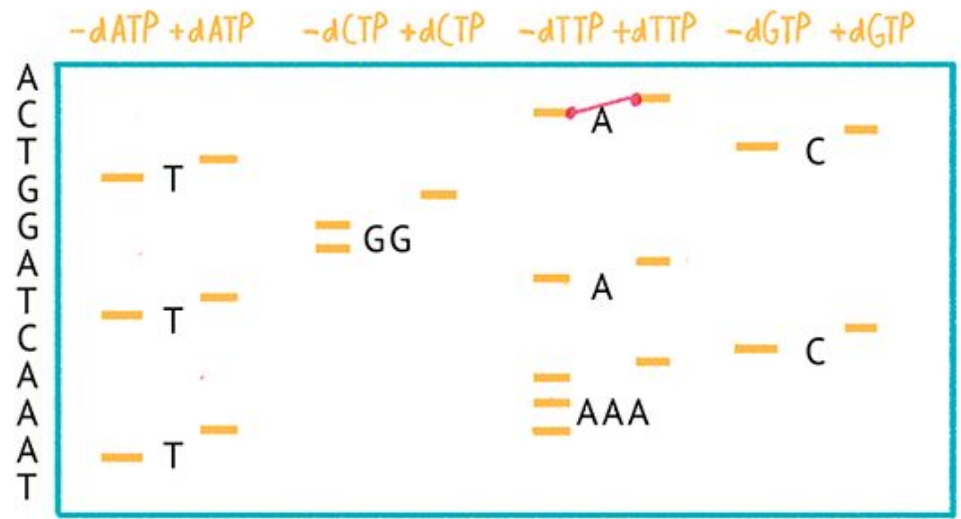
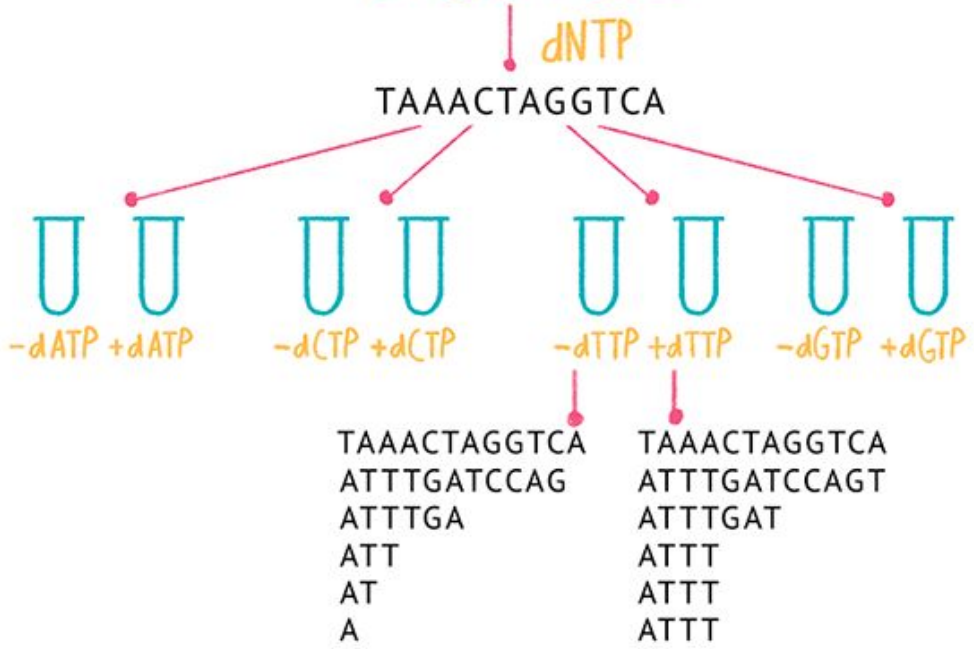


таким образом в каждой пробирке образуется набор фрагментов ДНК разной длины, которые заканчиваются одним и тем же нуклеотидом. Затем полученные фрагменты визуализируют с помощью электрофореза и, сравнивая длины фрагментов из четырех реакций с ddATP, ddTTP, ddCTP или ddGTP, восстанавливают последовательность ДНК.

Пиросеквенирование

Во время цикла пиросеквенирования при образовании фосфодиэфирной связи между матричной цепочкой ДНК и нуклеотидом синтезируемой цепи выделяется пирофосфат, который запускает каскад химических реакций, приводящих к выделению АТФ, необходимой для реакции окисления люциферина с выделением кванта света, который фиксируют аналоговой интегральной микросхемой (ПЗС-матрицей), состоящей из светочувствительных фотодиодов.





Химический метод.

один из дезоксинуклеотидов радиоактивно помечен по α-положению фосфата (32P)

Далее результаты визуализируют с помощью электрофореза, и определяют последовательность ДНК, исходя из того, что в «плюс»-системе терминация (прерывание) ПЦР происходит после конкретного dNTP, а в «минус»-системе — перед ним

Гибридизация

Солевой раствор ДНК
 $\uparrow t$ 100°C pH=13 \rightarrow

Для определения
нужен **ДНК-зонд** –
комплементарная
цепь ДНК

Это обратимо :
ренатурация $t=65^\circ\text{C}$ \rightarrow
восстановление
двойной спирали

ДНК диссоциирует на
2 цепи (денатурация)

Введение нового гена в клетку

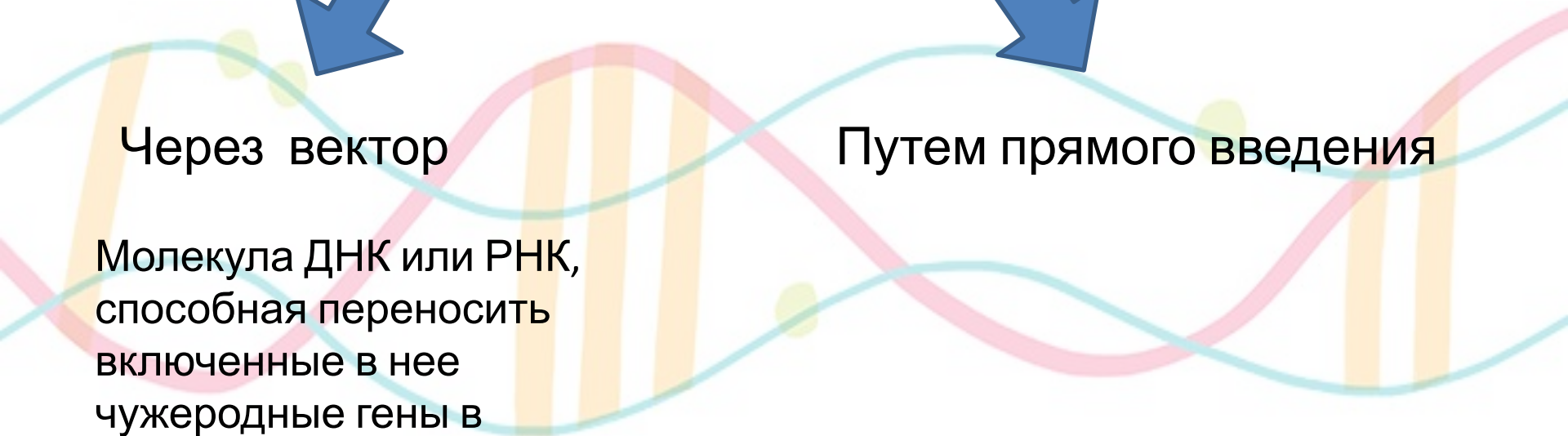


Через вектор

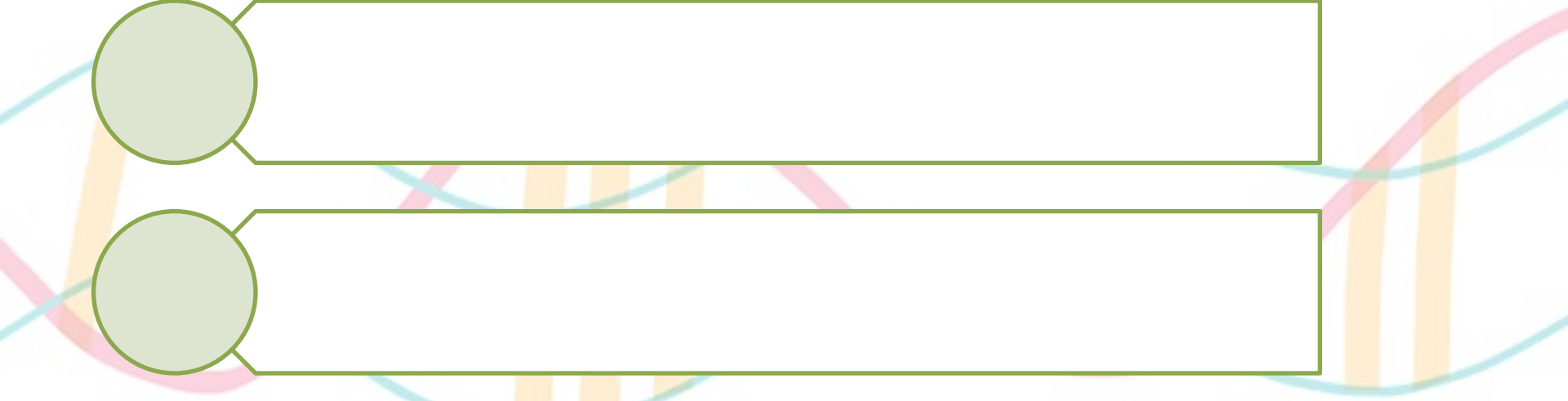
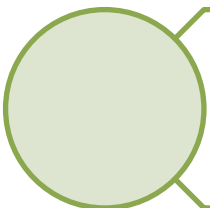
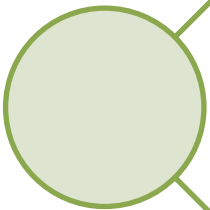
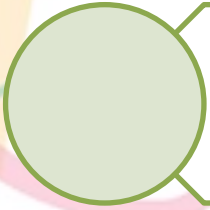
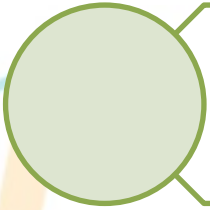
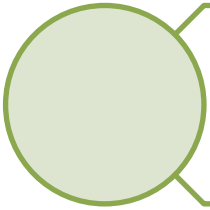
Молекула ДНК или РНК, способная переносить включенные в нее чужеродные гены в клетку, где эти молекулы реплицируются автономно или после интеграции с геном



Путем прямого введения

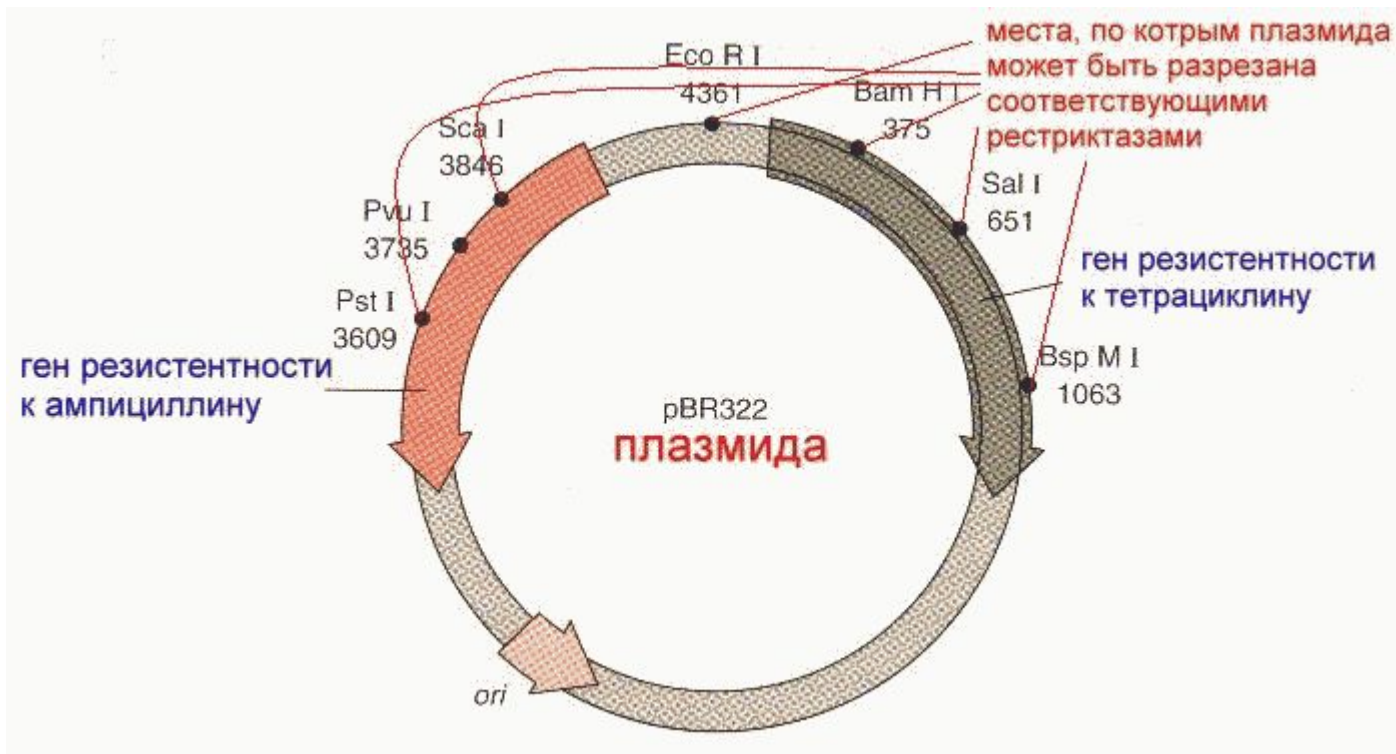


Свойства вектора:



плазмиды

Небольшие внехромосомные, автономно реплицирующиеся кольцевые молекулы ДНК, которые есть в бактериальной клетке



Вирусы

- ДНК будет под контролем сильного вирусного промотора → высокий уровень экспрессии генов
- Но у них небольшая ёмкость

Челночные векторы

- Чаще используют вектор с одним сайтом для работы с *E. coli*, и встраивают второй сайт инициации
- Напр.: плаزمида pBR322 + район транскрипции ДНК вируса

Транспозоны

- это сегменты ДНК, которые контролируют собственное перемещение из одного сайта ДНК в другой путем выхода из исходного сайта и внедрения в новый сайт хромосомы или плазмиды

Векторные системы, предназначенные для клонирования крупных фрагментов ДНК

- космиды — участки плазмидных ДНК (ген-маркер) и ДНК бактериофаг (оболочка)
- фазмиды — искусственные гибриды между фагом и плазмидой
- бактериальная искусственная хромосома
- дрожжевая искусственная хромосома

Методы прямого переноса генов в клетку

- Трансформация — увеличению проницаемости ее клеточной оболочки: обрабатывают ледяным раствором CaCl_2 , выдерживают при температуре $42\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 1,5 мин.
- Трансдукция — перенос бактериальной ДНК из одной клетки в другую бактериофагом.
- Трансфекция — введение ДНК, адсорбированной на кристаллах фосфата кальция (кальциевый преципитат), в клетку путем фагоцитоза

- Электропорация — импульсов высокого напряжения электрического тока → на клеточную мембрану → временное образование большого количества пор → увеличивает проницаемость мембран.
- Микроинъекции ДНК — с помощью тонкой микроиглы и микроманипулятора вводить в клетку или прямо в ядро векторную ДНК с включенным в нее трансгеном
- Упаковка в липосомы — оболочки из фосфолипидов (способны непосредственно сливаться с мембраной клетки или поглощаться клетками → разрушение оболочки липосом и высвобождение ДНК)

- Биологическая баллистика —
Метод базируется на напылении рекомбинантной ДНК на мельчайшие частицы золота или вольфрама, которыми бомбардируют клетки. Бомбардировку осуществляют с помощью генной пушки за счет перепада давления или под действием электрического разряда. При достаточной скорости эти частицы могут непосредственно проникать в ядро, что сильно повышает эффективность трансформации.