

**Практическая работа №7**  
**Химический синтез генов.**  
**Направленный мутагенез ДНК.**

# Получение неприродных форм белков

## **Белки с измененными свойствами:**

- Повышение каталитической эффективности реакции (соотношение  $V_{max}/K_m$ )
- Повышение стабильности к pH, температуре, окислению
- Синтез белка в нефизиологических условиях. В безводных средах
- Устранение зависимости от кофактора – в непрерывных промышленных процессах
- Мутации активного центра – повышение специфичности, снижение побочных реакций.
- Повышение устойчивости к протеазам повышение выхода, упрощение очистки.
- Аллостерический центр – снижение ингибирования продуктом. Повышение выхода.

## **Белковая инженерия – создание неприродных форм белков**

- Анализ трехмерной структуры (кристаллография, моделирование) реконструкция генов в соответствии с желаемыми изменениями
- Доменные белки - манипуляция доменами белков
- Гибридные белки

# Химико-ферментативный метод (Кораны)

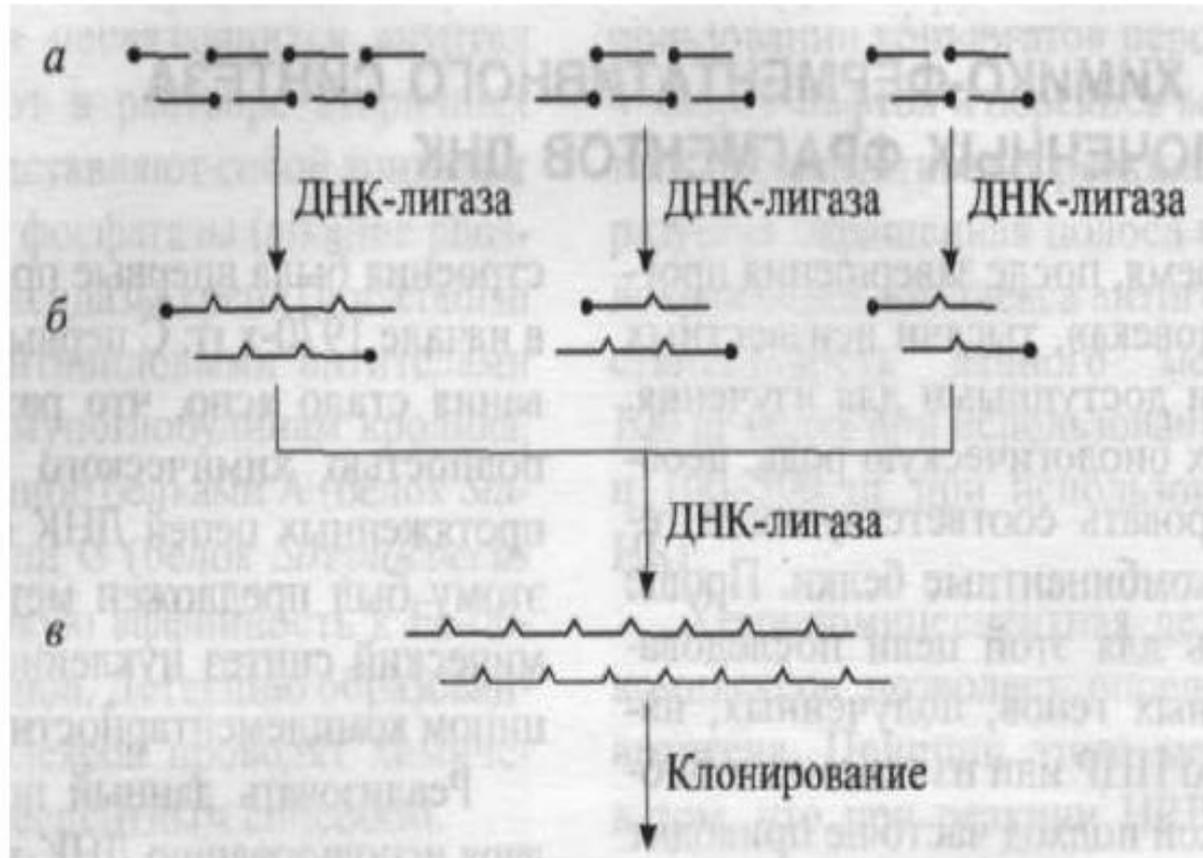


Рис. 1.38. Схема химико-ферментативного синтеза ДНК по Коране:

*a* — синтетические олигомеры; *б* — дуплексы-интермедиаты; *в* — целевой фрагмент двухцепочечной ДНК  
Черным кружком обозначен 5'-концевой фосфат

# Модификации метода Кораны

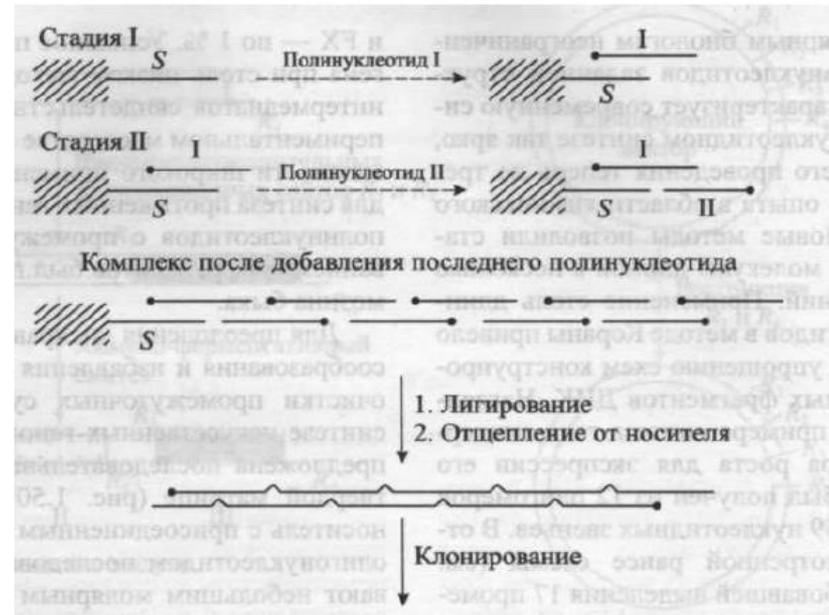
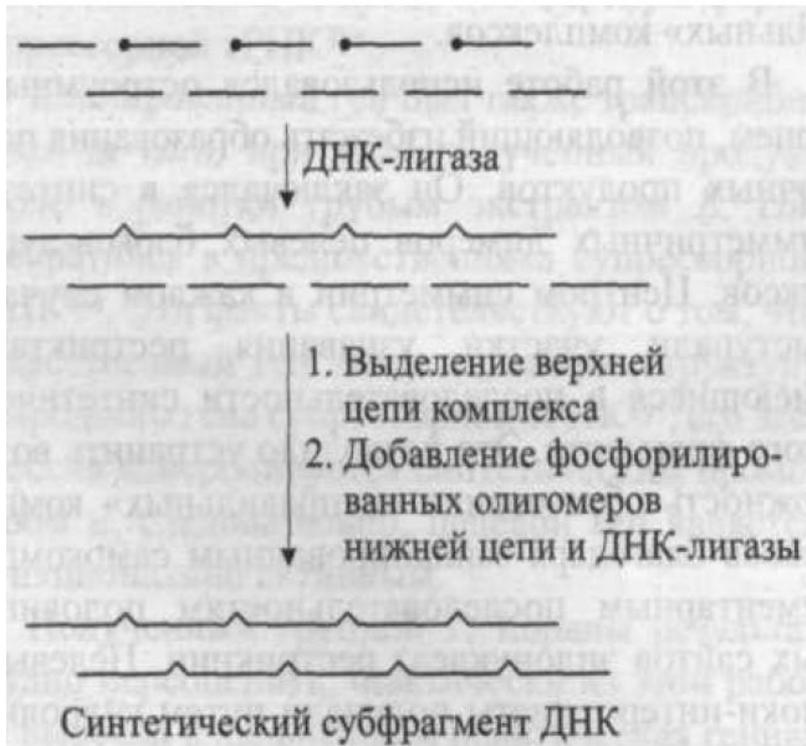


Рис. 1.50. Схема твердофазного конструирования искусственной ДНК.

5 — стартовый олигонуклеотид, присоединенный к твердому носителю.  
Черным кружком обозначен 5'-концевой фосфат

- Раздельная сшивка цепей субфрагмента ДНК
- Клонирования промежуточных дуплексов
- Модульная сборка в векторах
- Последовательная сборка ДНК на твердой матрице

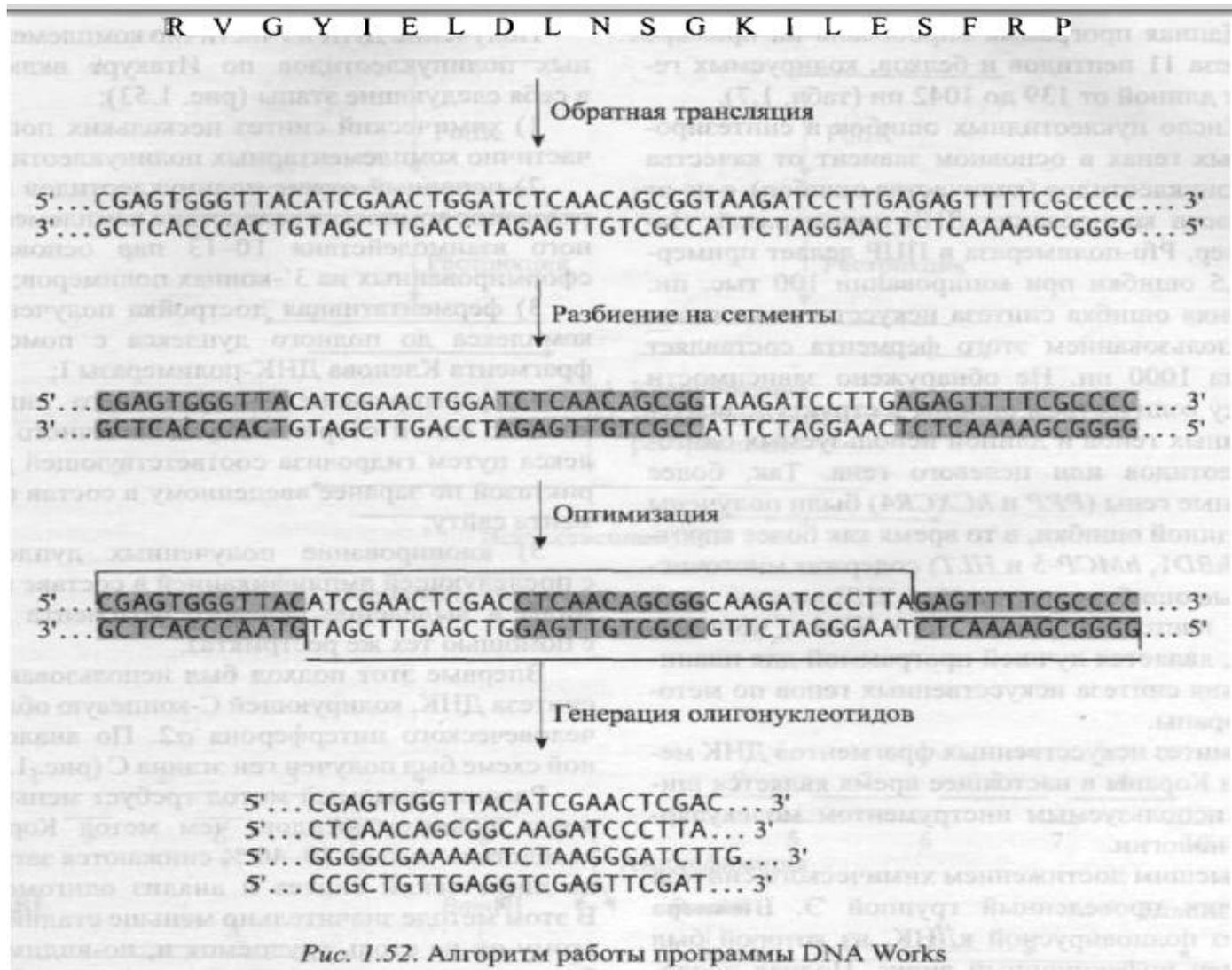


Рис. 1.52. Алгоритм работы программы DNA Works

# Конструирование ДНК-дуплексов из частично комплементарных полинуклеотидов (К.Итакура)

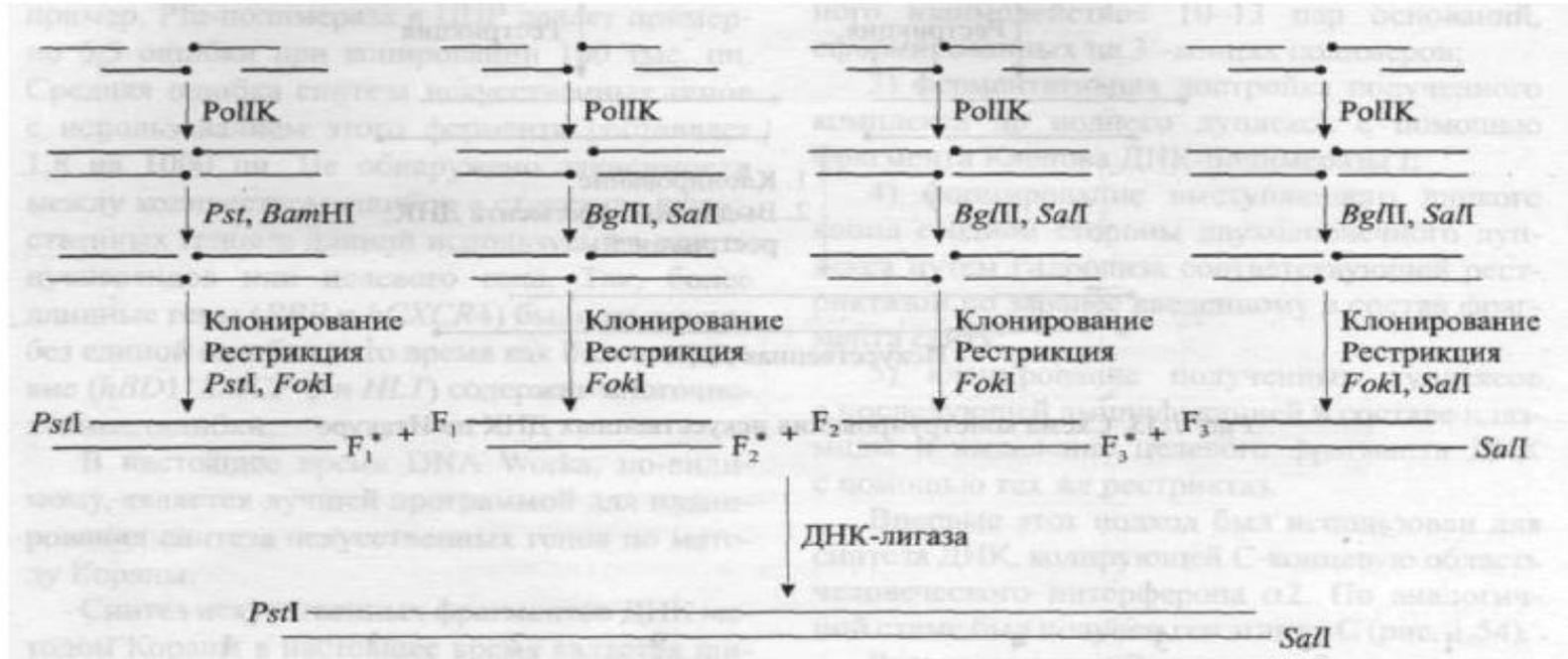


Рис. 1.56. Схема конструирования гена IL-2.

$F_i$ ,  $F_i^*$  — взаимодополнительные одноцепочечные последовательности нуклеотидов, образующиеся под действием рестриктазы *FokI*

# Конструирование из сверхдлинных полинуклеотидов (В.Мандеки)

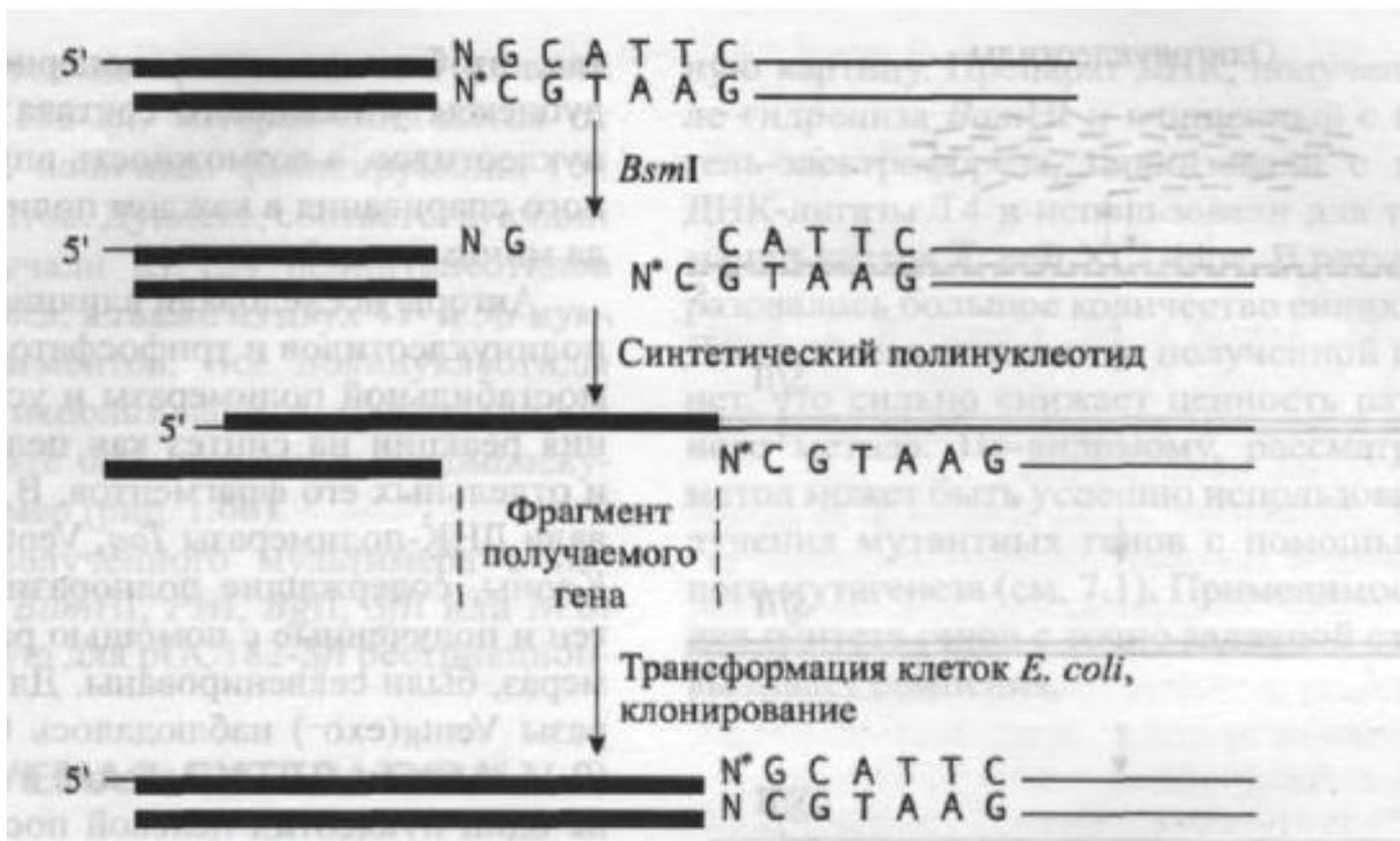
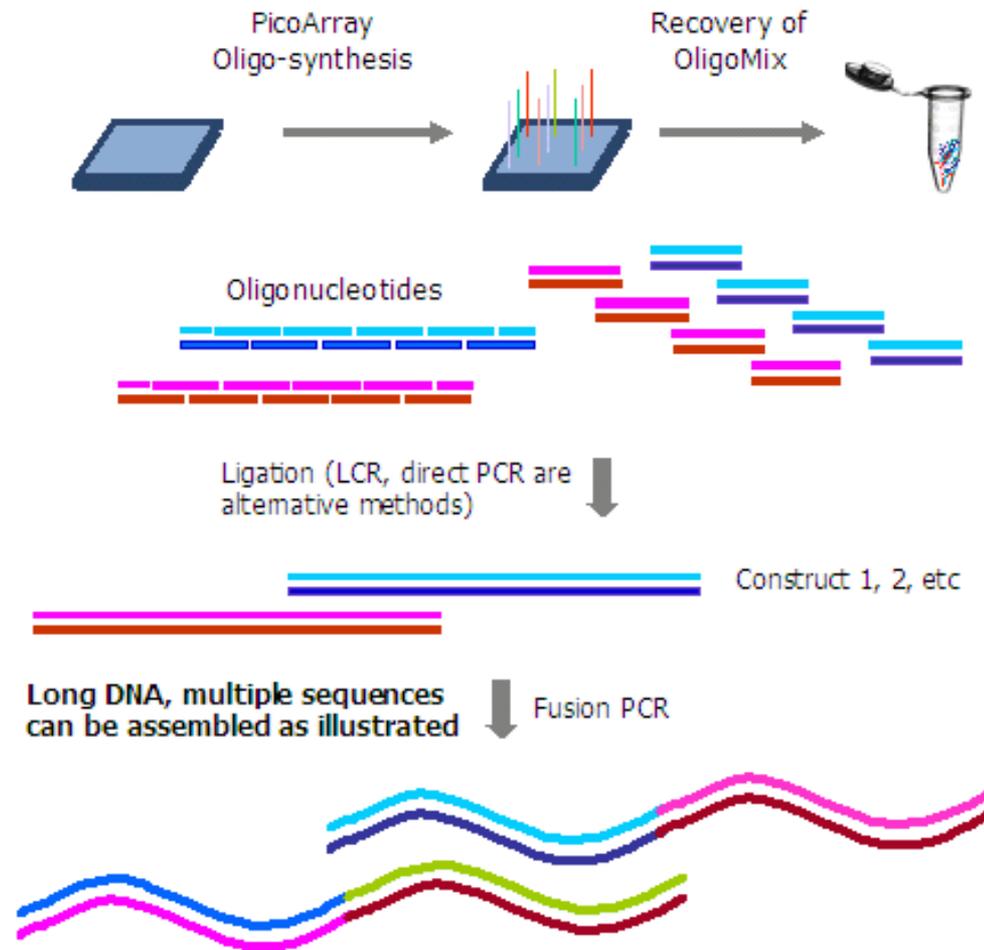


Рис. 1.57. Конструирование искусственных генов по Мандеки.

Жирная черта — • последовательность синтезируемого гена, тонкая — вектора

# Синтез генов методом ПЦР

## Simultaneous Synthesis of Multiple Long DNA Sequences



Tian, J. et al. (2004) *Nature* 432, 1050-1054.

# Сегмент-направленный мутагенез. При обработке бисульфитом натрия

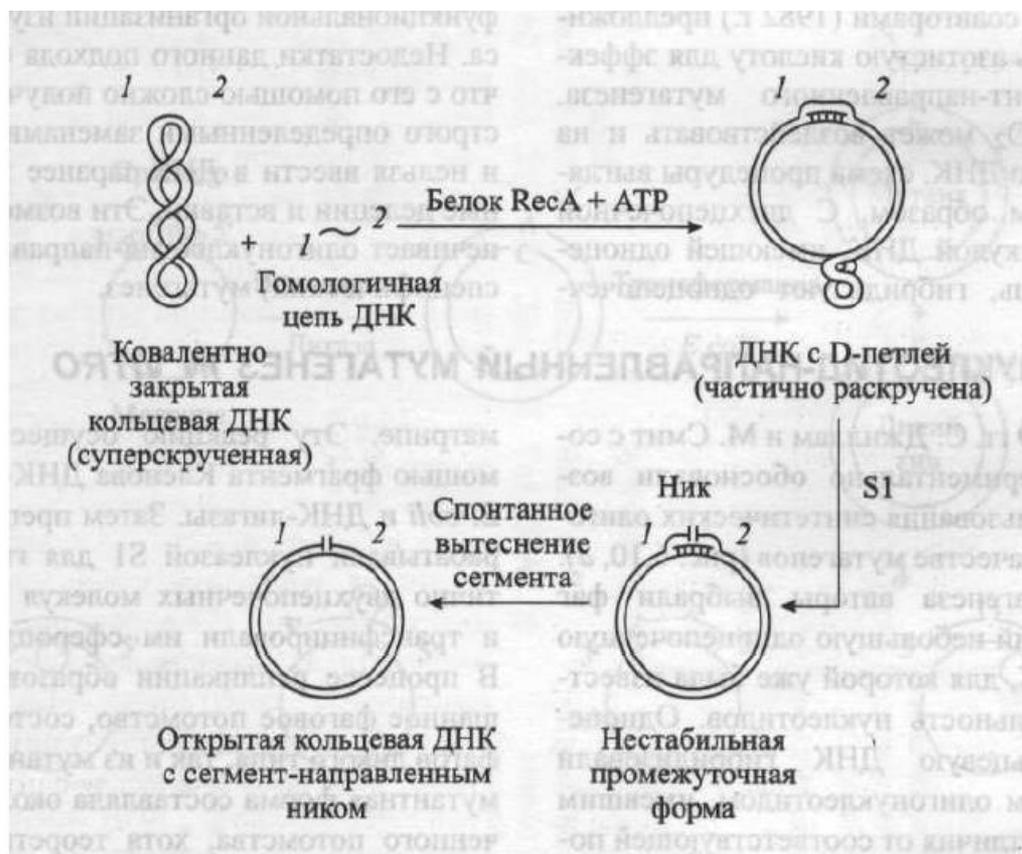
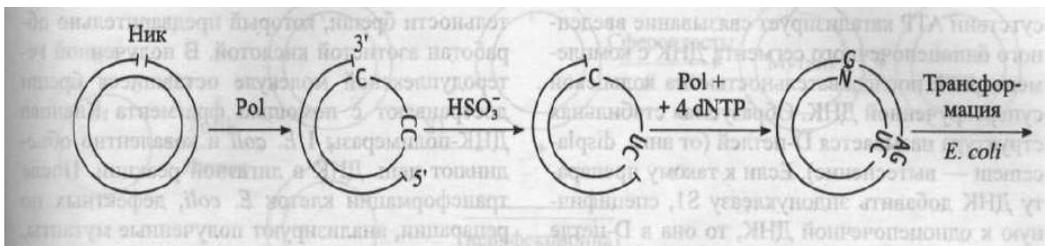
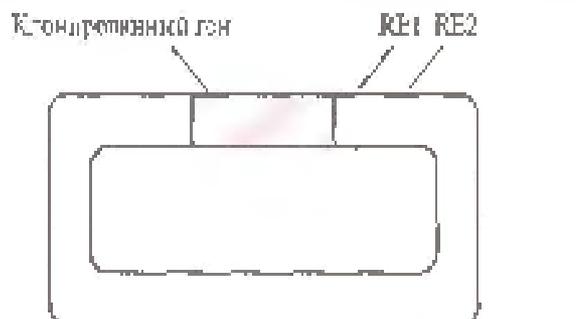


Рис. 6.9. Схема процедуры сегмент-направленного введения ника

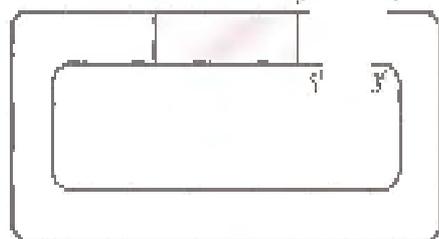
# Использование аналогов нуклеотидов



Обработка двумя  
сверхнуклеазными  
рестриктазами

Укороченный 3'-конец

Укороченный 5'-конец

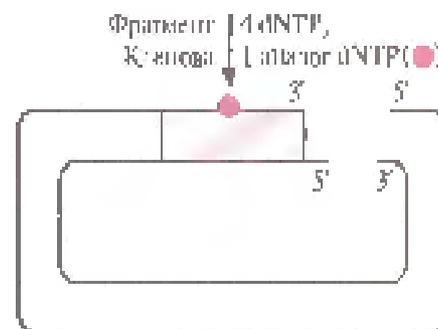


Вспомогательная  
связкация BamHI



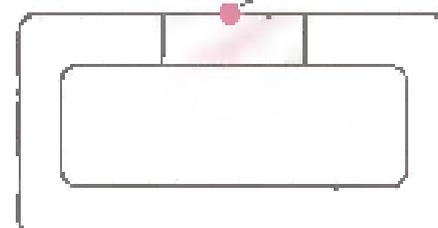
Фрагменты 4 dNTP,  
К-эпова

3' 5'



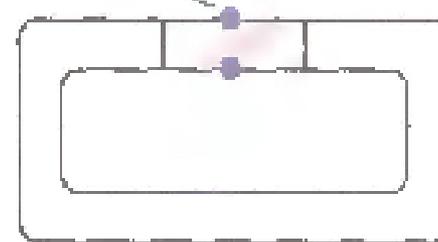
Нуклеазы 5'  
Лигаза

Вспомогательные  
аналоги dNTP



Мультиплектная пара  
нуклеотидов

Трансформация E. coli



# Сайт-направленный мутагенез (= олигонуклеотид-направленный)

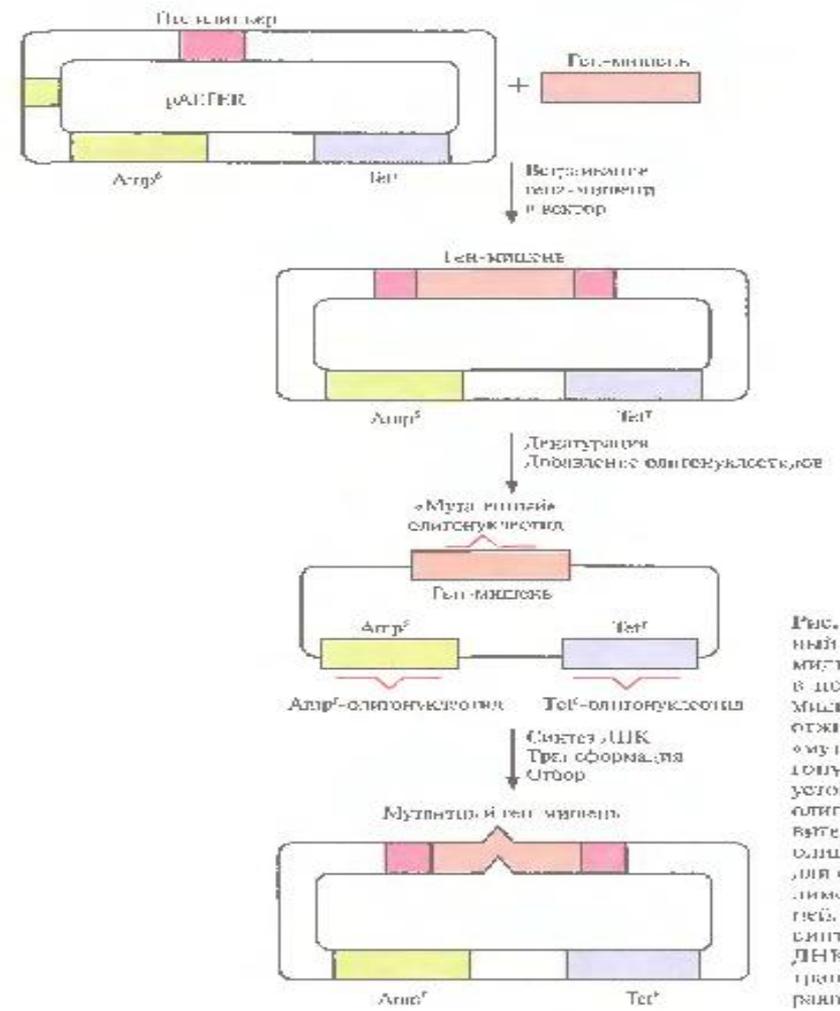
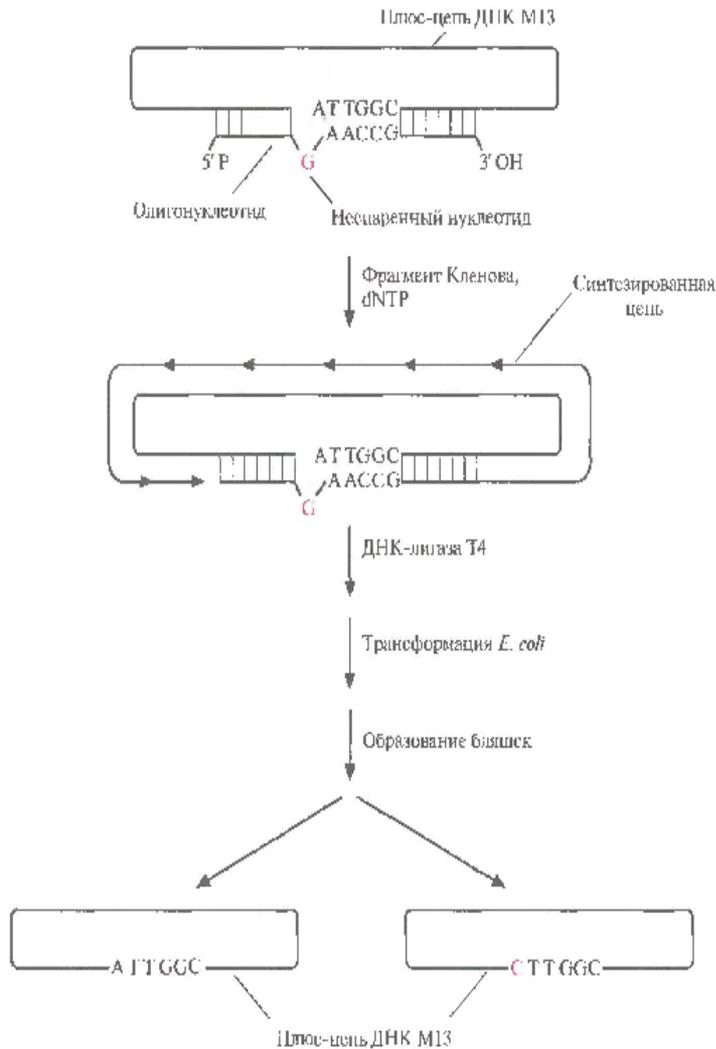
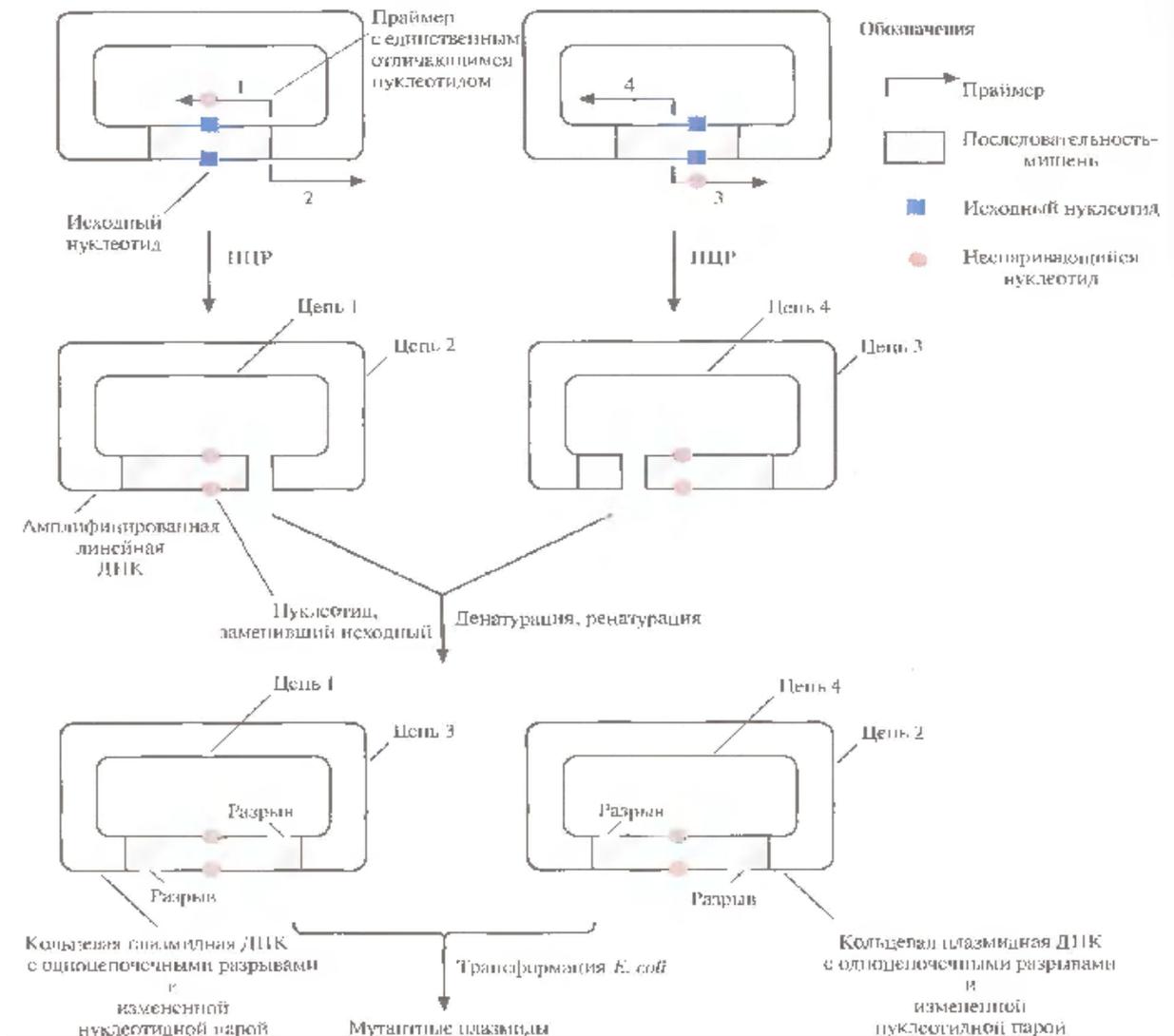
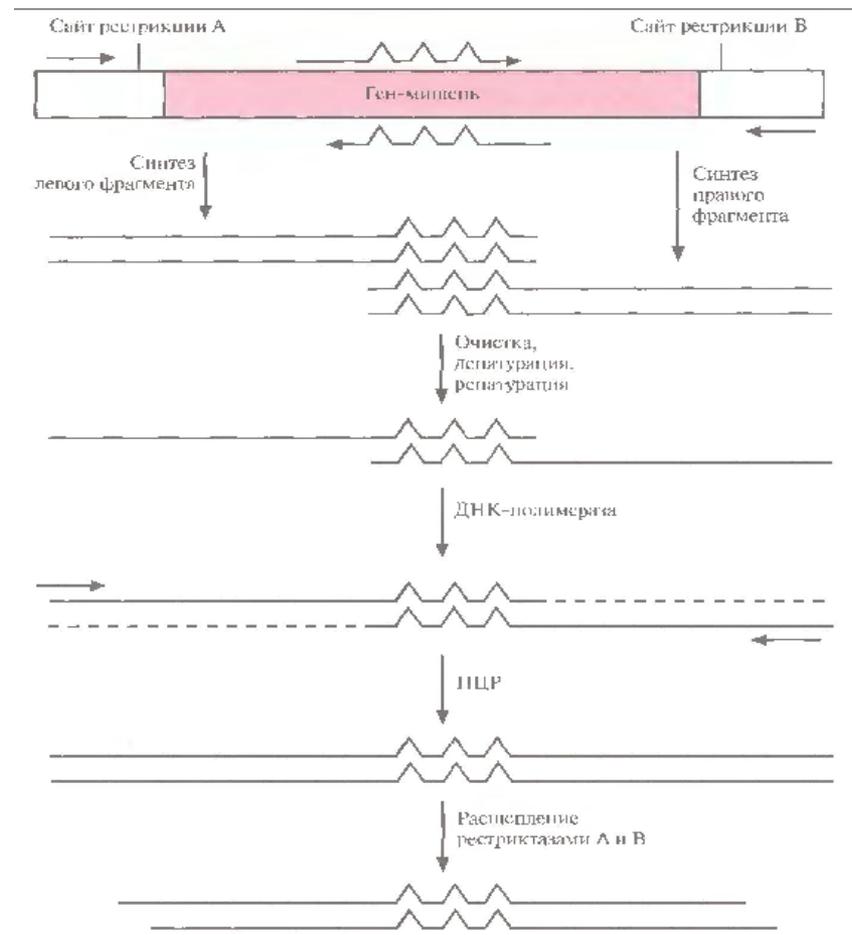
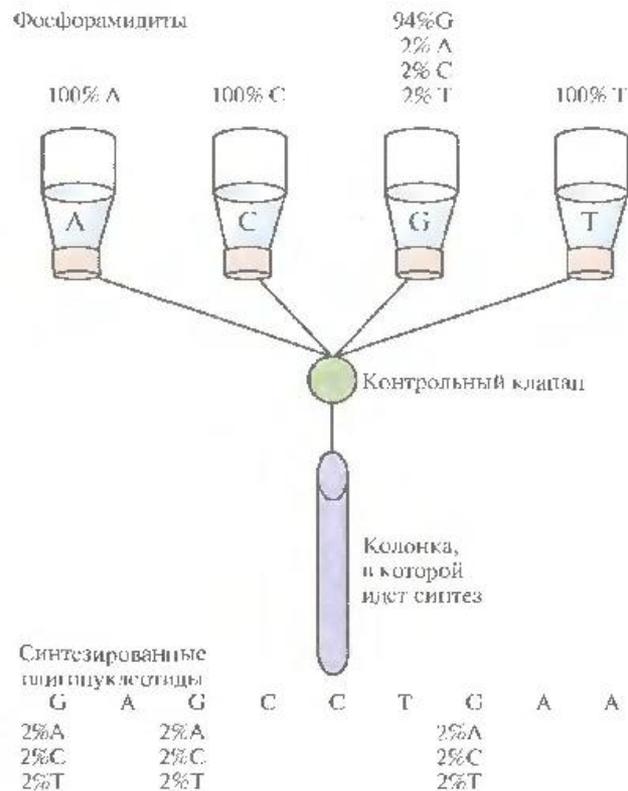


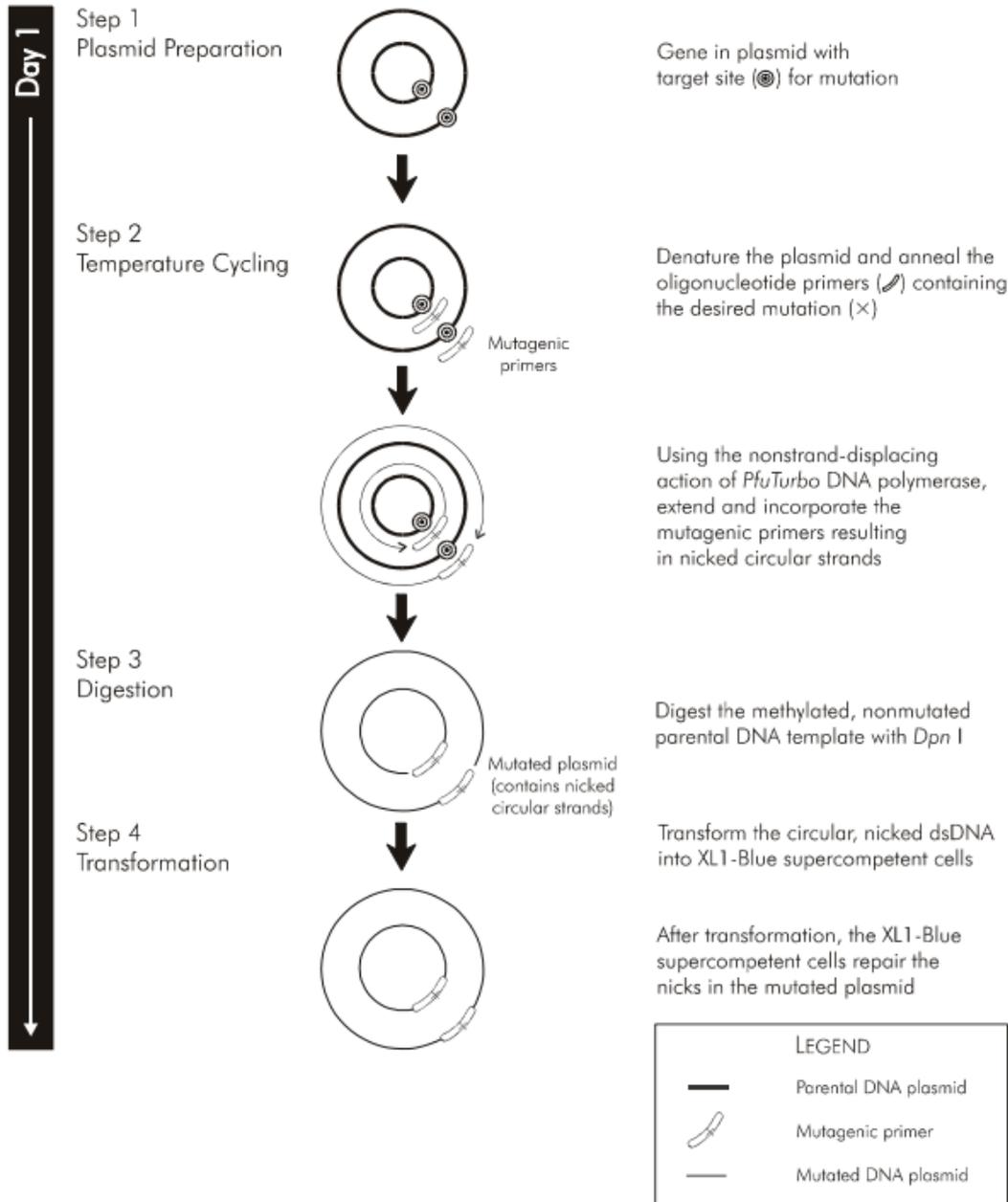
Рис. 1. Мутационный олигонуклеотид в ДНК-мишени. Олигонуклеотид «мутагенный» олигонуклеотид. Синтез ДНК. Трансформация O108. Мутационный ген-мишень.

# Олигонуклеотид-направленный мутагенез с использованием ПЦР



# ПЦР с вырожденными праймерами





**FIGURE 1** Overview of the QuikChange® site-directed mutagenesis method.

