

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)

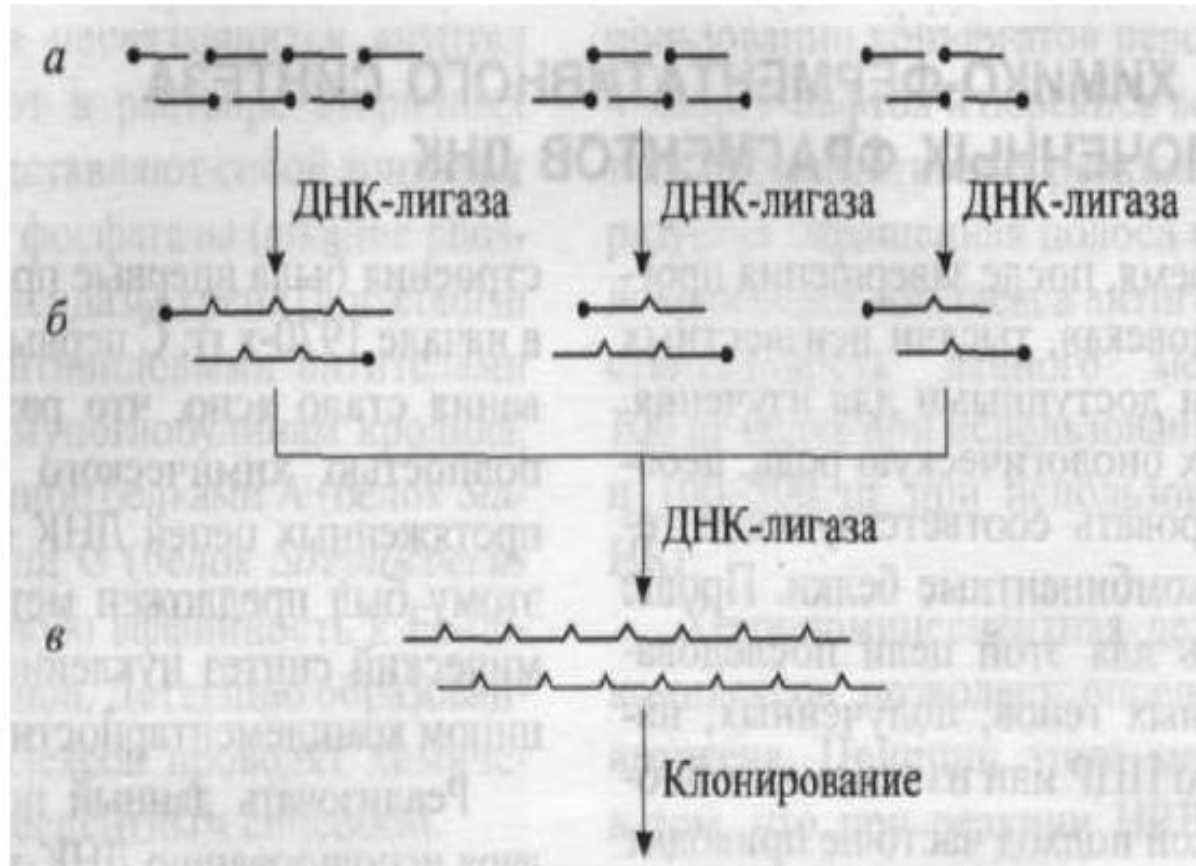


Рис. 1.38. Схема химико-ферментативного синтеза ДНК по Коране:

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

Модификации метода Кораны

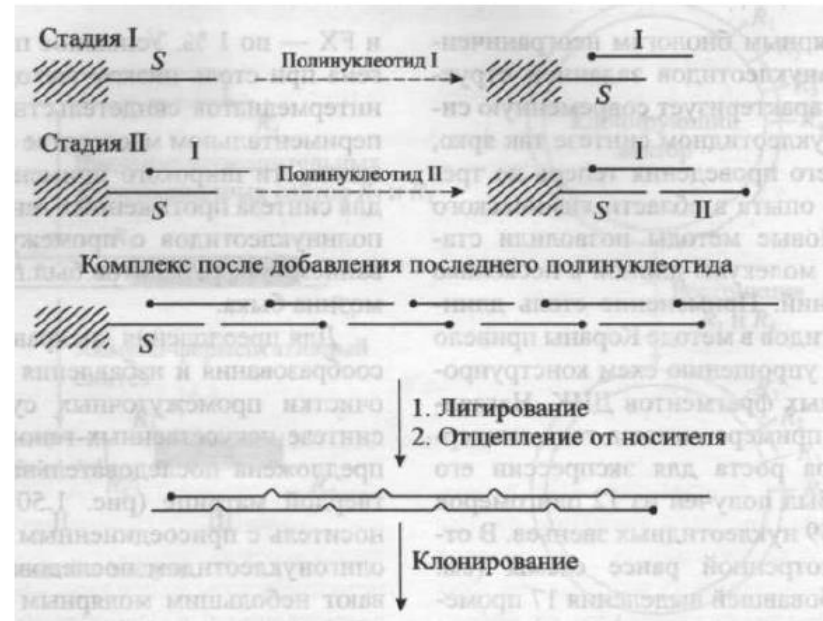
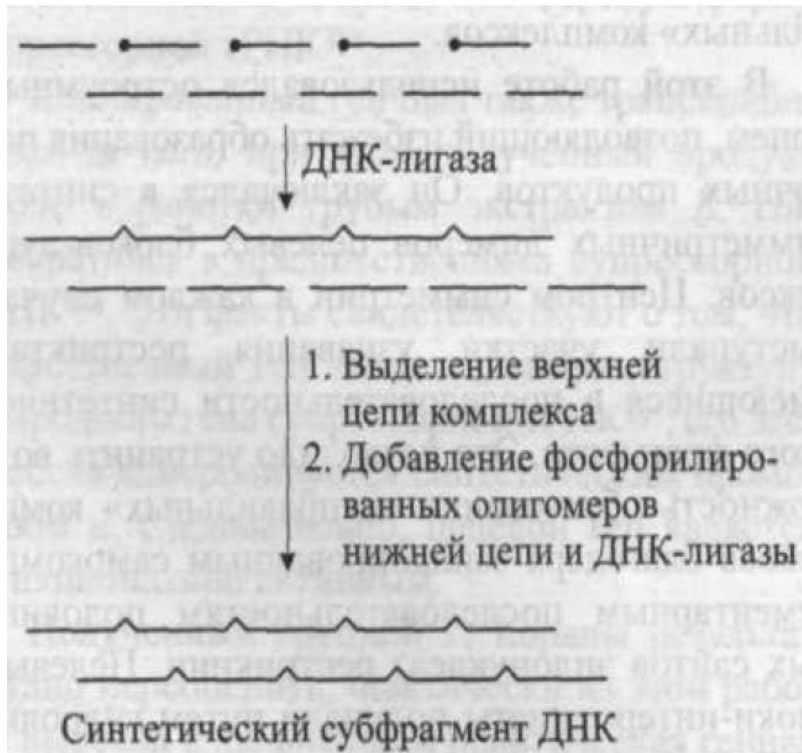
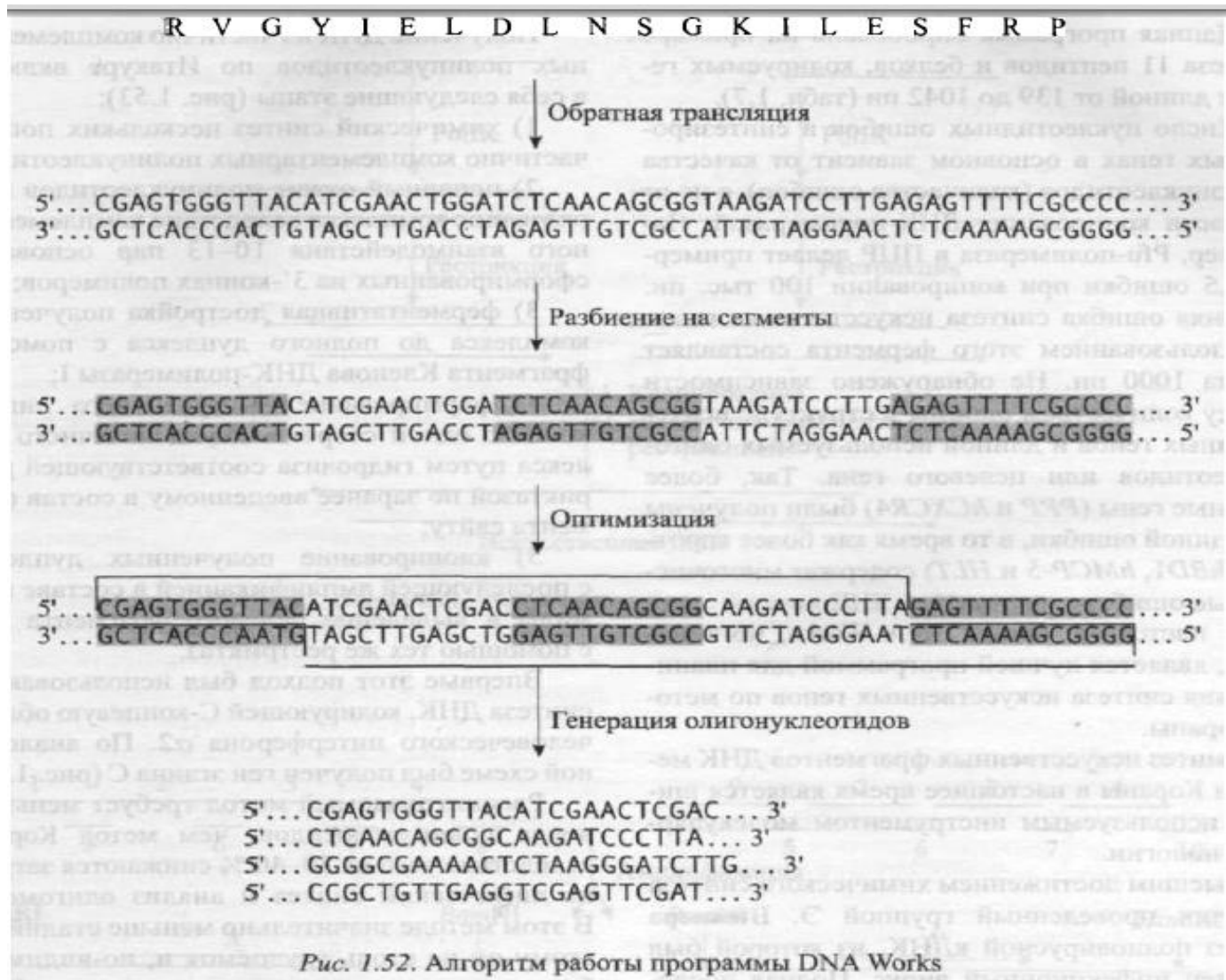


Рис. 1.50. Схема твердофазного конструирования искусственной ДНК.

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



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

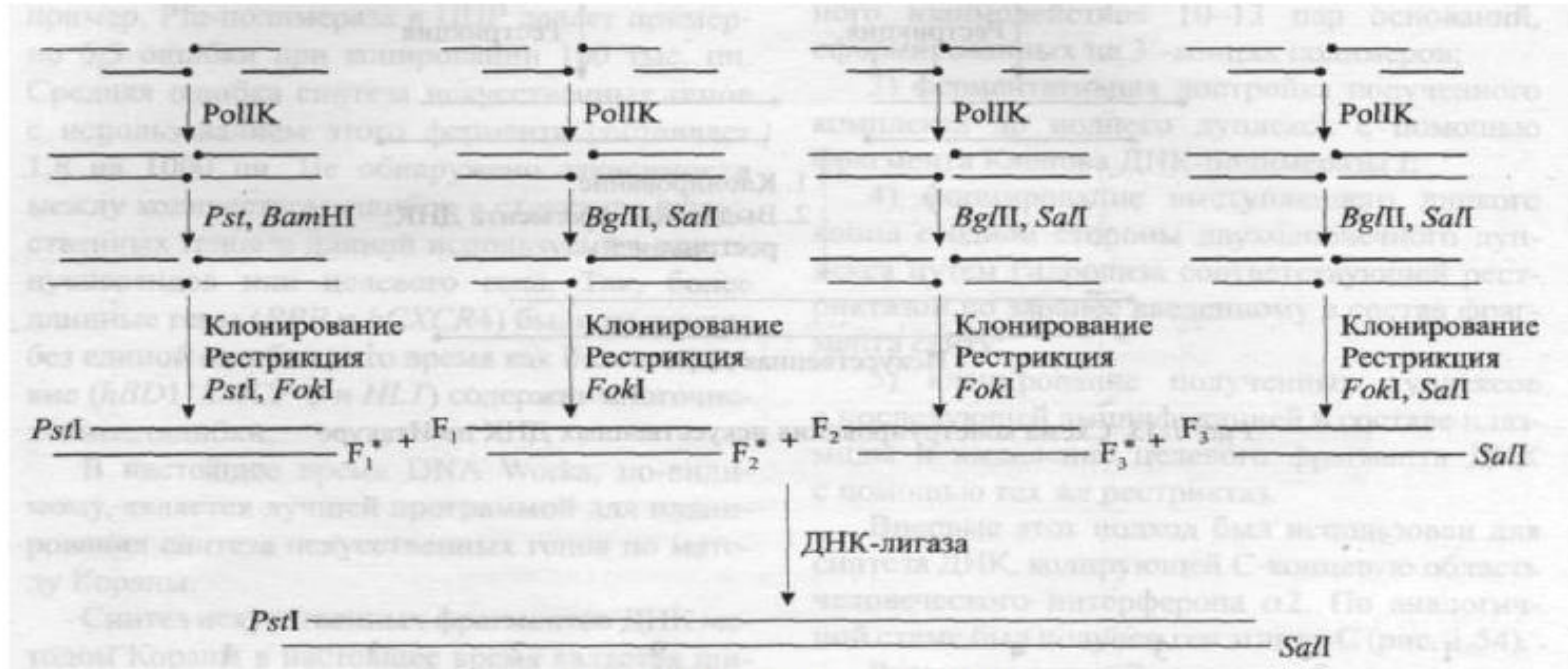


Рис. 1.56. Схема конструирования гена IL-2.

F_i, F_j — взаимокплементарные одноцепочечные последовательности нуклеотидов, образующиеся под действием рестриктазы *FokI*

Конструирование из сверхдлинных полинуклеотидов (В.Мандеки)

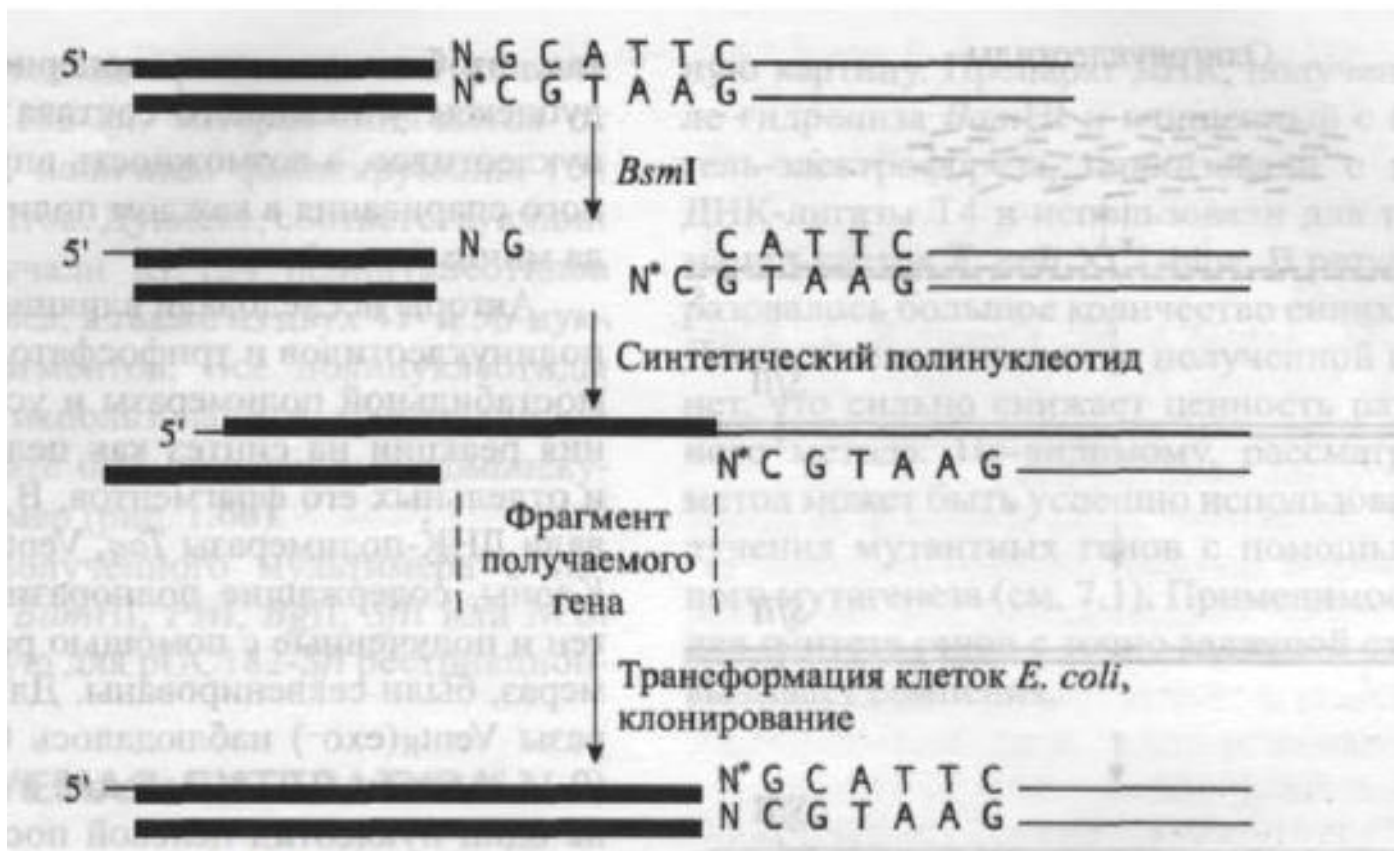
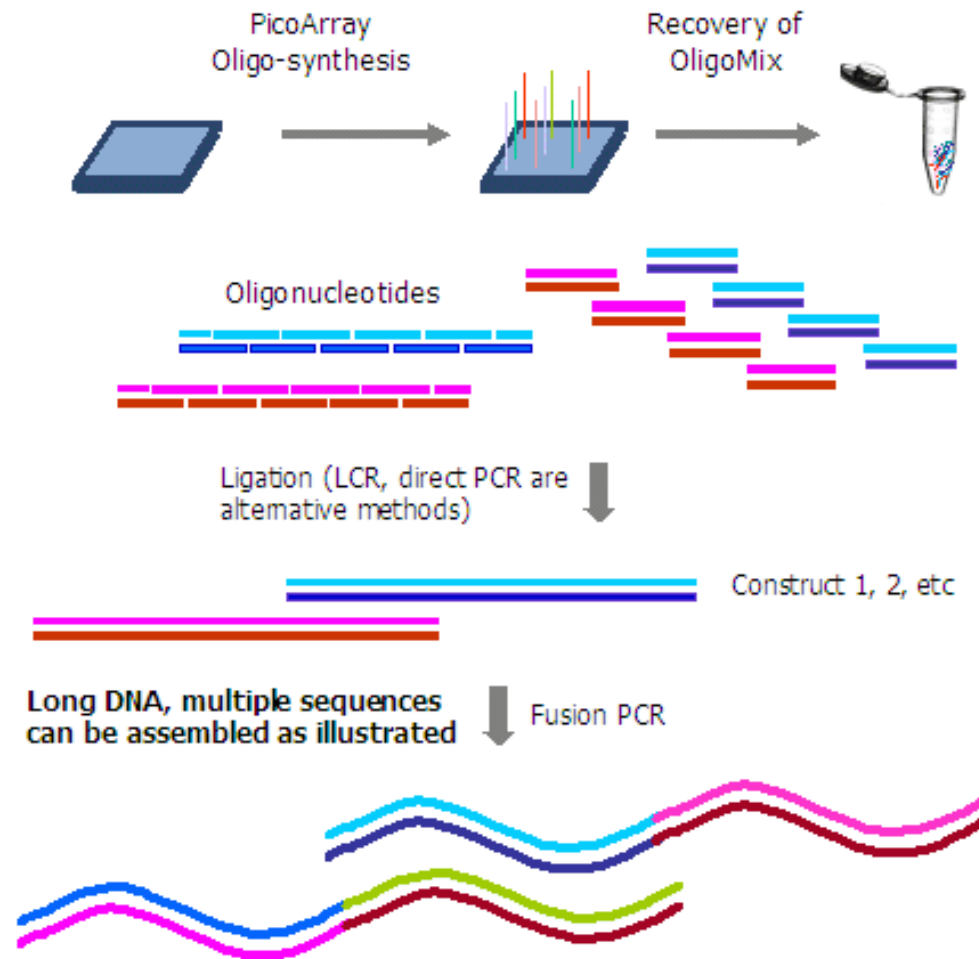


Рис. 1.57. Конструирование искусственных генов по Мандеки.

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

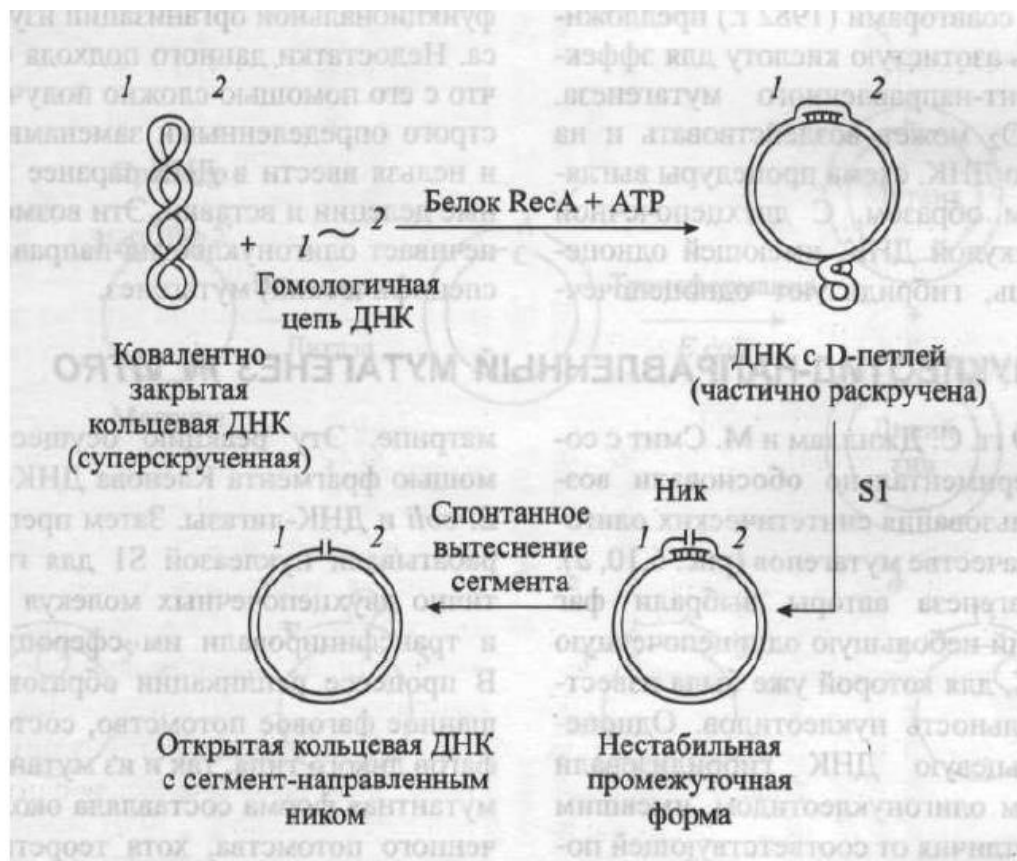
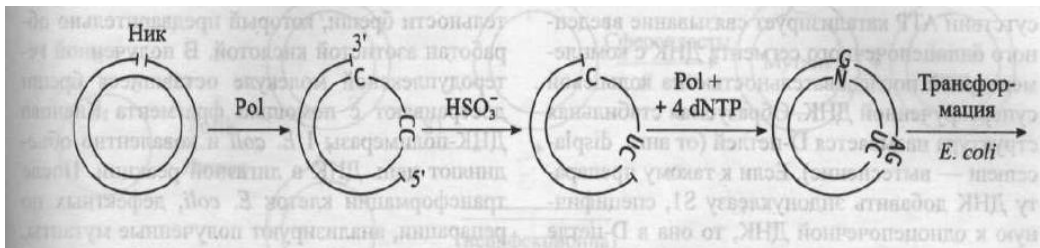
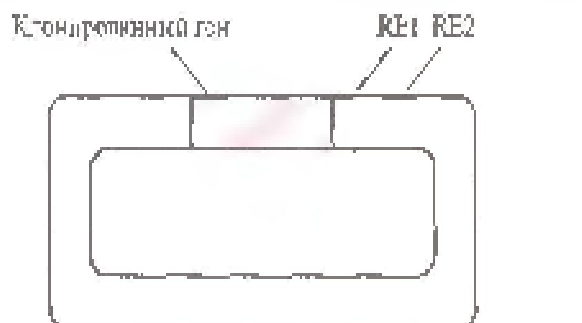


Рис. 6.9. Схема процедуры сегмент-направленного введения ника

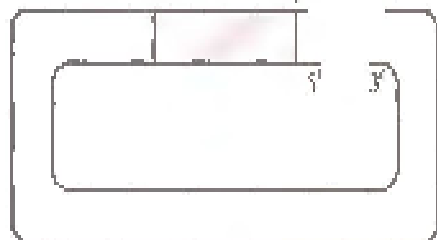
Использование аналогов нуклеотидов



Обработка двумя
сверхнуклеазными
рестриктазами

Укороченный 3'-конец

Укороченный 5'-конец

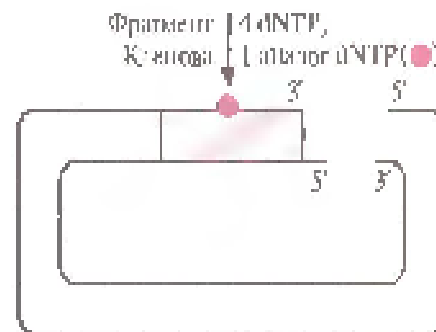


Вспомогательная
связующая РвсIII



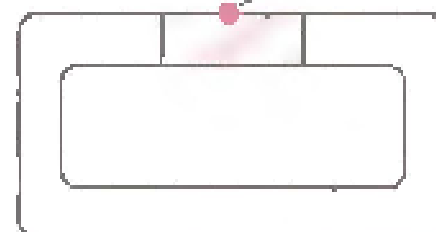
Фрагменты 4 dNTP,
К-эпова

3' 5'



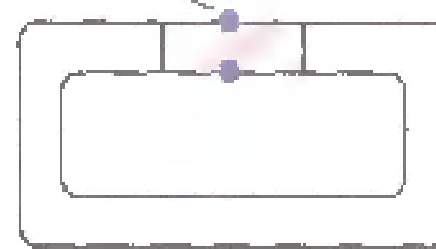
Нуклеазы 5'
Лигазы

Вспомогательные
аналоги dNTP



Мультиплетная пара
нуклеотидов

Трансформация *E. coli*



Сайт-направленный мутагенез (=олигонуклеотид-направленный)

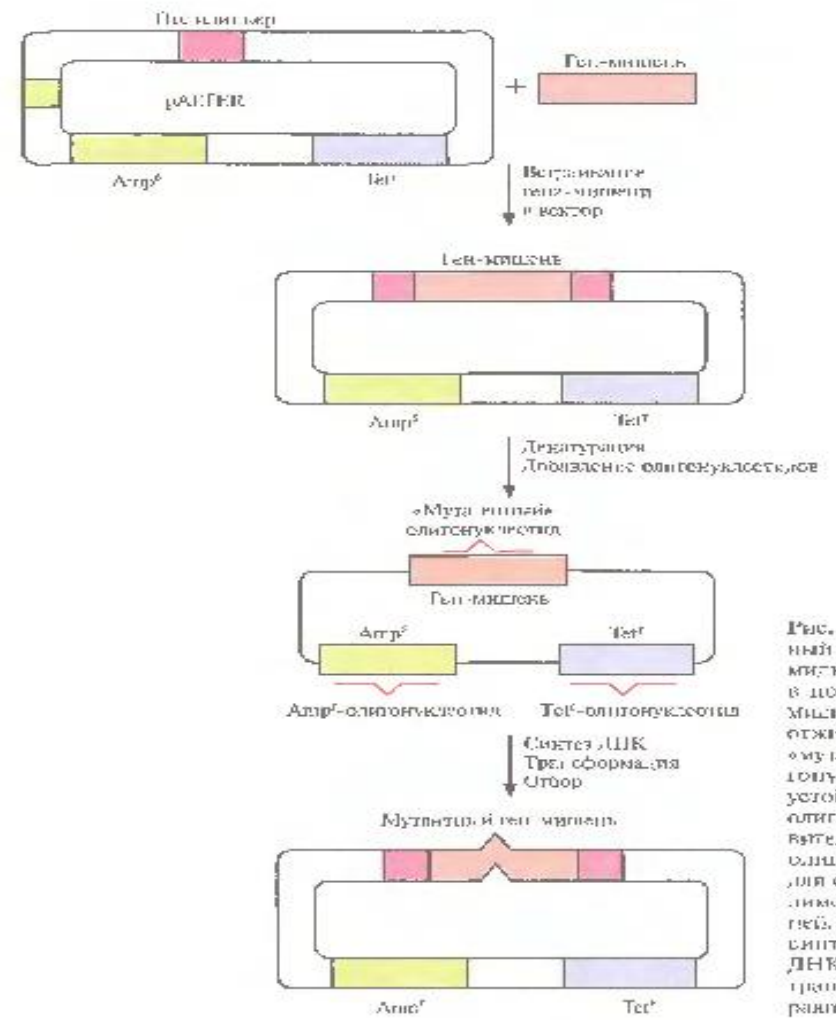
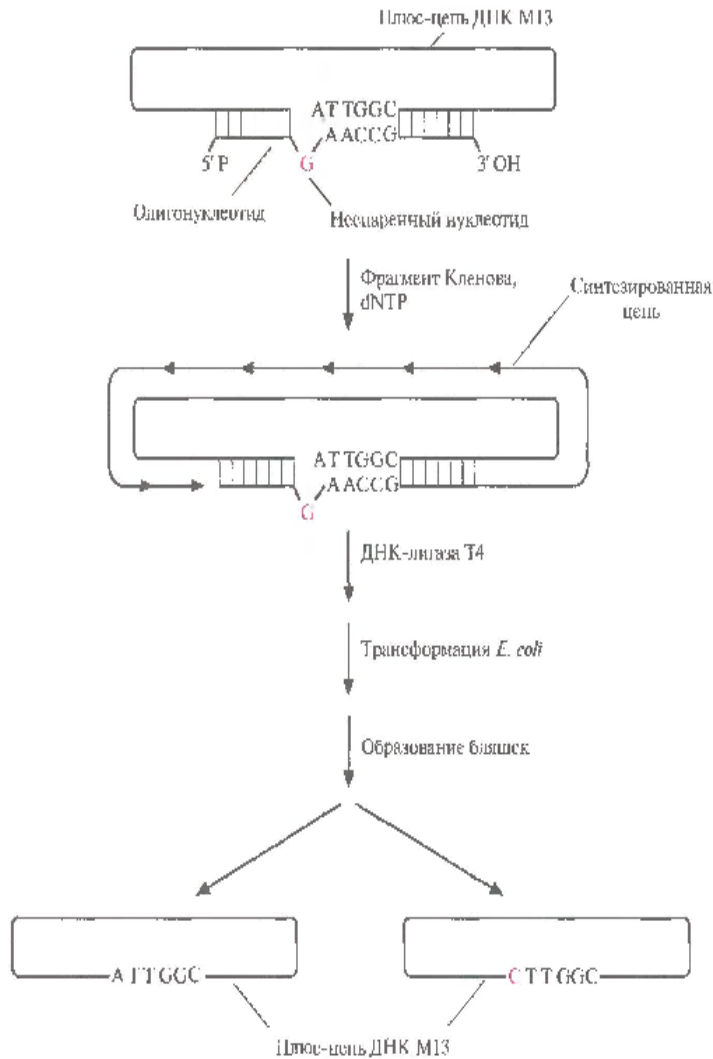
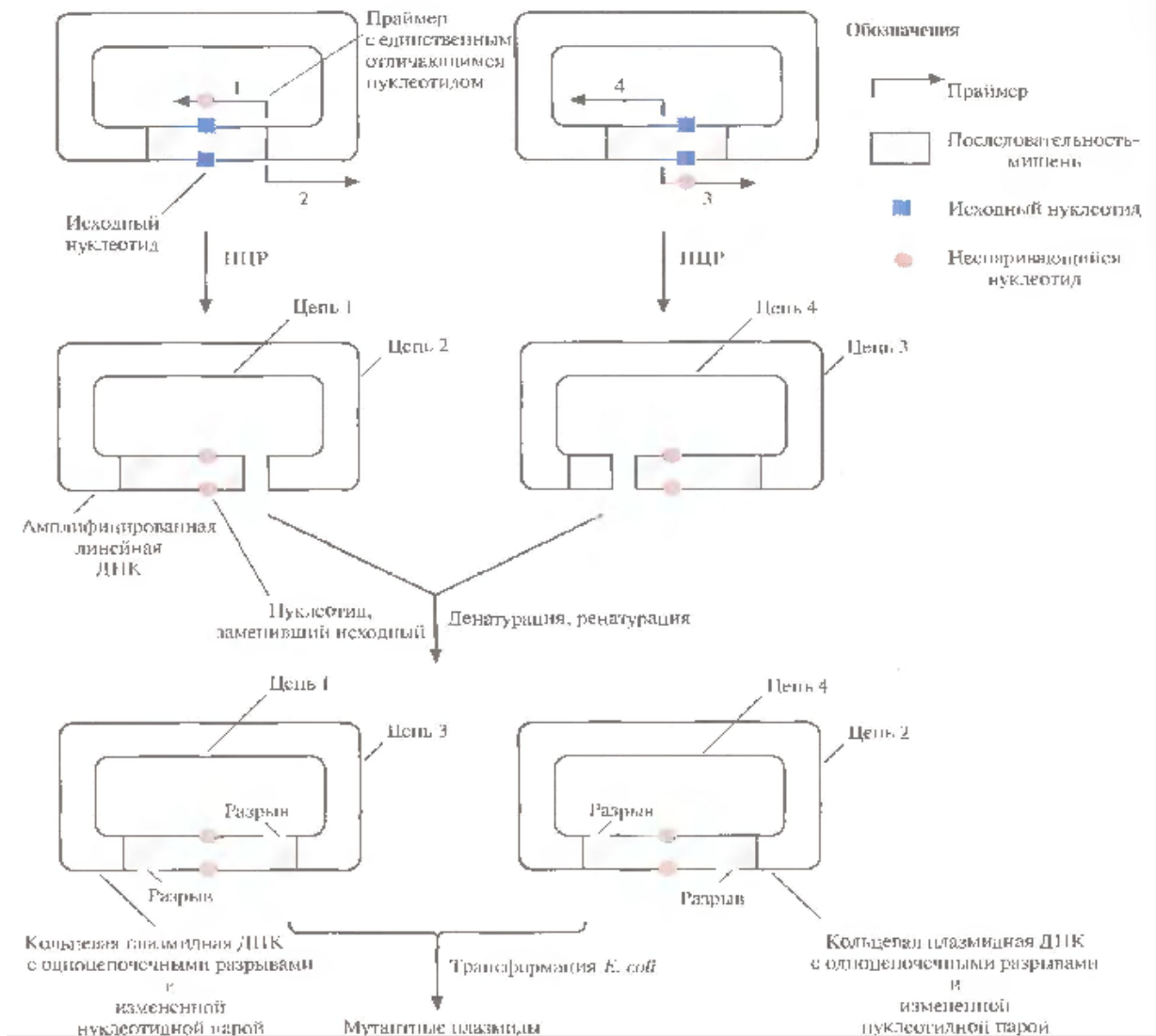
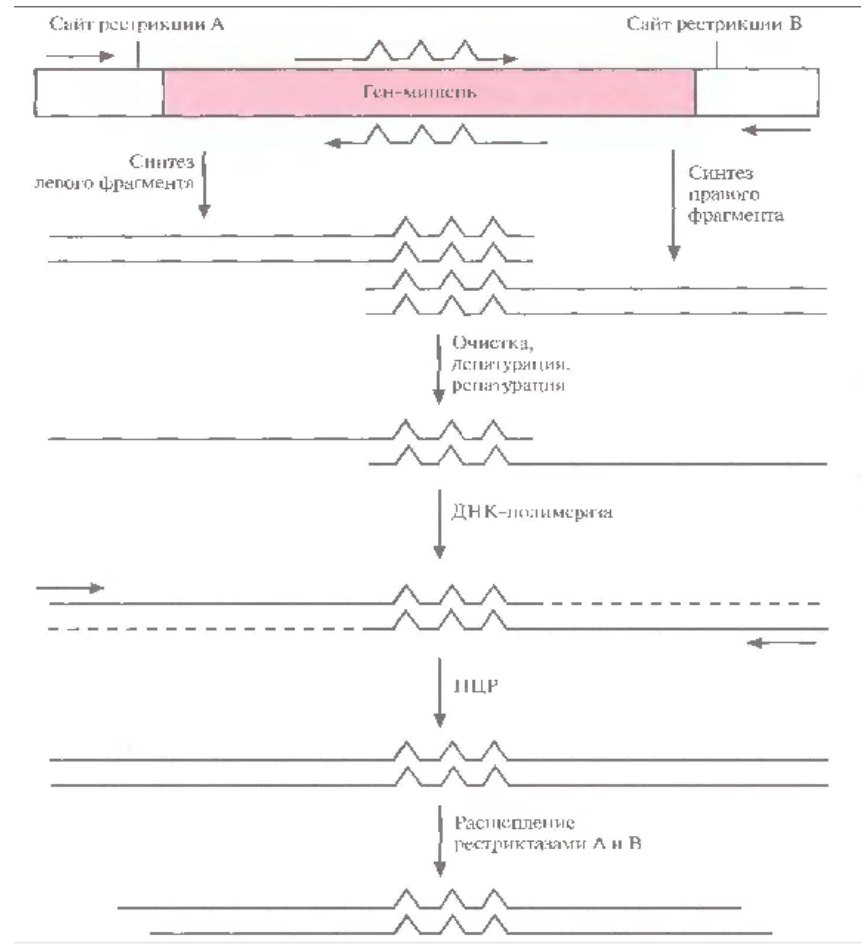
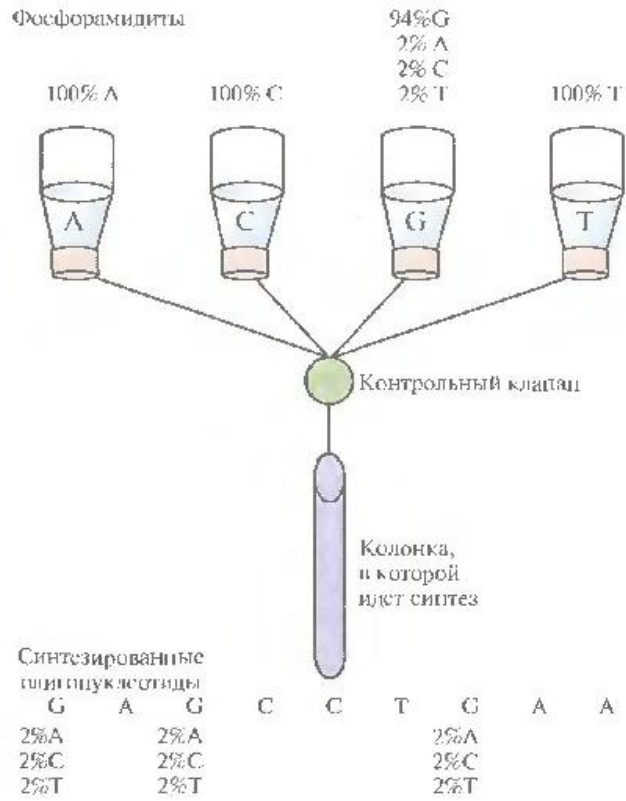


Рис. 1. Мутация сайта-мишени в ДНК-мишени с помощью олигонуклеотида «мутагенный» олигонуклеотид.

Олигонуклеотид-направленный мутагенез с использованием ПЦР



ПЦР с вырожденными праймерами



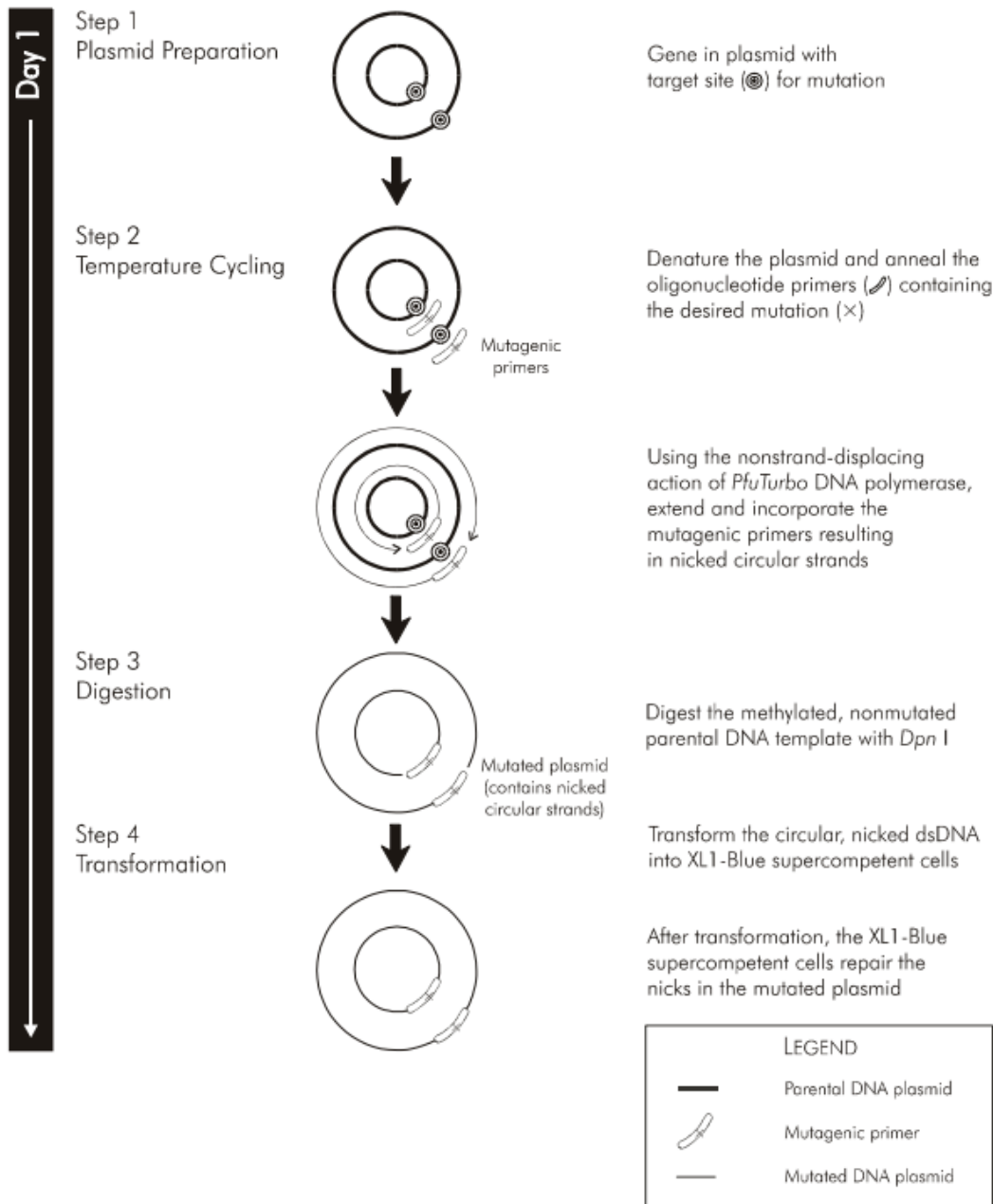


FIGURE 1 Overview of the QuikChange® site-directed mutagenesis method.

