

УДК 575
ББК 28.54
Г344

Авторский коллектив:

Галина Анатольевна Журавлева — доктор биологических наук, профессор кафедры генетики и биотехнологии СПбГУ;

Светлана Евгеньевна Москаленко — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Санкт-Петербургского филиала Института общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, доцент кафедры генетики и биотехнологии СПбГУ;

Евгений Евгеньевич Андронов — кандидат биологических наук, заведующий лабораторией микробиологического мониторинга и биоремедиации почв ФГБНУ ВНИИСХМ, старший научный сотрудник кафедры генетики и биотехнологии СПбГУ, ведущий научный сотрудник Почвенного института им. В. В. Докучаева;

Татьяна Валерьевна Матвеева — доктор биологических наук, профессор кафедры генетики и биотехнологии СПбГУ;

Елена Александровна Андреева — кандидат биологических наук, научный сотрудник Санкт-Петербургского филиала Института общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, старший преподаватель кафедры генетики и биотехнологии СПбГУ

Рецензенты: академик РАН, проф. И. А. Тихонович, проф. Т. В. Кузнецова

Генная инженерия в биотехнологии (семинары) / Г. А. Журавлева, Г344 С. Е. Москаленко, Е. Е. Андронов и др. — СПб.: Эко-Вектор, 2017. — 135 с. : ил.

ISBN 978-5-906648-43-3

Учебное пособие «Генная инженерия в биотехнологии (семинары)» подготовлено в соответствии с ФГОС ВО по специальности 020400 «Биология», авторы — Г. А. Журавлева, С. Е. Москаленко, Е. Е. Андронов, Т. В. Матвеева, Е. А. Андреева. Пособие основано на семинарских занятиях, проводимых уже более 10 лет на биологическом факультете Санкт-Петербургского государственного университета в начале 4-го курса бакалавриата. Семинарские занятия являются дополнением к курсу «Генная инженерия и биотехнология». Авторами подробно рассмотрены основные приемы генной инженерии, каждое занятие содержит задачи (с решениями) и вопросы. Пособие проиллюстрировано высококачественными рисунками, отражающими и дополняющими текст. Пособие является актуальным, так как подобная литература на русском языке практически отсутствует. Пособие предназначено для студентов и аспирантов биологических факультетов университетов, педагогических и сельскохозяйственных вузов, а также для научных сотрудников, работающих с использованием методов генной инженерии и биотехнологии.

УДК 575
ББК 28.54

ISBN 978-5-906648-43-3

© ООО «Эко-Вектор», 2017
© Коллектив авторов, 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|------------|
| Список сокращений | 6 |
| Предисловие..... | 8 |
| Занятие 1. Ферменты генетической инженерии. | |
| Эндонуклеазы рестрикции..... | 9 |
| 1.1. Структура ДНК..... | 9 |
| 1.2. Эндонуклеазы рестрикции..... | 10 |
| 1.3. Метилтрансферазы..... | 15 |
| 1.4. Задачи к занятию 1..... | 16 |
| 1.5. Вопросы и задачи на повторение к занятию 1..... | 18 |
| Занятие 2. Ферменты генетической инженерии (продолжение) | 19 |
| 2.1. Лигаза..... | 19 |
| 2.2. Щелочная фосфатаза..... | 20 |
| 2.3. Полимеразы..... | 21 |
| 2.3.1. ДНК-полимераза I <i>E. coli</i> | 21 |
| 2.3.2. ДНК-полимераза фага T4..... | 22 |
| 2.3.3. РНК-зависимая ДНК-полимераза, или обратная транскриптаза..... | 22 |
| 2.4. Терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза..... | 24 |
| 2.5. Полинуклеотидкиназа фага T4..... | 25 |
| 2.6. Нуклеазы..... | 26 |
| 2.6.1. Нуклеаза S1..... | 26 |
| 2.6.2. Нуклеаза Ba131..... | 27 |
| 2.6.3. Другие нуклеазы..... | 27 |
| 2.7. Задачи к занятию 2..... | 28 |
| 2.8. Вопросы и задачи на повторение к занятию 2..... | 29 |
| Занятие 3. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)..... | "30 |
| 3.1. Принцип ПЦР..... | 30 |
| 3.2. Выбор полимеразы..... | 33 |
| 3.3. Подбор праймеров..... | 34 |

| | |
|---|-----------|
| 3.4. Процедура постановки ПЦР..... | 36 |
| 3.5. Контроли ПЦР..... | 37 |
| 3.6. Детекция результатов ПЦР методом гель-электрофореза | 38 |
| 3.7. Оптимизация ПЦР..... | 39 |
| 3.8. Области применения ПЦР..... | 40 |
| 3.9. Типы ПЦР..... | 42 |
| 3.9.1. Градиентная ПЦР..... | 42 |
| 3.9.2. Мультиплексная ПЦР..... | 42 |
| 3.9.3. Вложенная (nested) ПЦР..... | 43 |
| 3.9.4. ПЦР с использованием вырожденных праймеров | 43 |
| 3.10. Перспективы использования ПЦР..... | 44 |
| 3.11. Задачи к занятию 3..... | 45 |
| 3.12. Вопросы и задачи на повторение к занятию 3..... | 47 |
| Занятие 4. Секвенирование ДНК..... | 49 |
| 4.1. Секвенирование ДНК по Сэнгеру (метод терминирующих нуклеотидов)..... | 49 |
| 4.2. Стратегия секвенирования протяженных участков.. | 54 |
| 4.3. Методы секвенирования следующего поколения (NGS) | 56 |
| 4.4. Задачи к занятию 4..... | 60 |
| 4.5. Вопросы и задачи на повторение к занятию 4..... | 61 |
| Занятие 5. Молекулярные ДНК-маркеры..... | 62 |
| 5.1. Маркеры, основанные на использовании рестрикции: ПДРФ (полиморфизм длин рестриционных фрагментов) | 63 |
| 5.2. Методы, основанные на ПЦР..... | 64 |
| 5.2.1. RAPD..... | 64 |
| 5.2.2. STR..... | 66 |
| 5.2.3. Идентификация SNP..... | 67 |
| 5.3. Комбинированные методы: AFLP, или полиморфизм длин амплифицированных фрагментов..... | 68 |
| 5.4. Секвенирование специфических последовательностей | 70 |
| 5.5. Применение молекулярных маркеров..... | 71 |
| 5.5.1. Судебно-медицинская экспертиза..... | 71 |
| 5.5.2. Филогенетические исследования..... | 72 |
| 5.5.3. Построение генетических карт..... | 72 |
| 5.5.4. Диагностика заболеваний..... | 72 |

| | |
|--|-----|
| 5.6. Задачи к занятию 5..... | 74 |
| 5.7. Вопросы и задачи на повторение к занятию 5..... | 78 |
| Занятие 6. Молекулярное клонирование..... | 79 |
| 6.1. Векторы для клонирования..... | 79 |
| 6.2. Бактериальные штаммы для клонирования и экспрессии генов..... | 88 |
| 6.3. Клонирование протяженных участков. Библиотеки генов..... | 89 |
| 6.4. Подготовка фрагмента к клонированию..... | 90 |
| 6.5. Молекулярное клонирование..... | 92 |
| 6.6. Отбор клонов с рекДНК..... | 93 |
| 6.7. Задачи к занятию 6..... | 93 |
| 6.8. Вопросы и задачи на повторение к занятию 6..... | 95 |
| Занятие 7. Методы идентификации трансгена и изучения его экспрессии. Методы изучения глобальной экспрессии генов .. | 96 |
| 7.1. Методы идентификации трансгена..... | 96 |
| 7.2. Изучение экспрессии генов на уровне РНК..... | 98 |
| 7.2.1. Нозерн-блот-анализ..... | 98 |
| 7.2.2. ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскрипцией)..... | 100 |
| 7.2.3. ПЦР-РВ (ПЦР в реальном времени)..... | 101 |
| 7.2.4. Изучение глобальной экспрессии генов на уровне РНК..... | 108 |
| 7.3. Изучение экспрессии генов на уровне белка..... | 110 |
| 7.3.1. Вестерн-блоттинг..... | 111 |
| 7.3.2. Двумерный гель-электрофорез..... | 113 |
| 7.3.3. Масс-спектрометрия..... | 114 |
| 7.3.4. Изучение глобальной экспрессии генов на уровне белка..... | 114 |
| 7.4. Задачи к занятию 7..... | 115 |
| 7.5. Вопросы и задачи на повторение к занятию 7..... | 118 |
| Решения задач..... | 119 |
| Приложение..... | 132 |
| Список использованной литературы..... | 134 |