

Непосредственное конструирование рекомбинантных молекул ДНК следует после того, как получены рестрикты исследуемой ДНК и векторной ДНК. Оно заключается в смыкании сегментов-рест-риктв исследуемой ДНК с рестриктом векторной ДНК, которая в результате рестрикции превращается из кольцевой в линейную ДНК.

Чтобы сомкнуть фрагменты исследуемой ДНК с ДНК-вектора, используют ДНК-лигазу. Лигирование будет успешным, если смыкаемые структуры обладают 3'-гидроксил и 5'-фосфатной группами и если эти группы расположены соответствующим образом одна относительно другой. Фрагменты объединяются через их «липкие» концы в результате са-мокомплементарности. При высоких концентрациях фрагментов последние время от времени становятся в правильное положение (напротив друг друга). Многие ре-стриктазы, такие как Eco R I, продуцируют «липкие» концы, состоящие из 4-х оснований. Процесс лигирования «липких» концов, состоящих из четырех оснований, происходит при пониженной температуре (до 12°C).

Если при рестрикции образуются фрагменты без «липких» концов, то их «насильственно» конвертируют в молекулы с

«липкими» концами, используя фермент трансферазу. Этот фермент добавляет нуклеотиды к 3'-концу ДНК. На одном фрагменте может быть добавлен поли-А-хвост, на другом — поли-Т-хвост. Для генерации любых желаемых концов ДНК используют также так называемую полимеразную цепную реакцию (ПНР). Принцип ПЦР основан на денатурации выделенной из клеток ДНК и «отжиге» ее с добавлением к ренатурирующимся цепям ДНК-олигонуклеотидов, состоящих из 15—20 нуклеотидов каждый. Эти олигонуклеотиды должны быть комплементарны последовательностям в целях, разделенных расстояниями в 50-2000 нуклеотидов. Будучи «затравкой» для синтеза ДНК *in vitro*, они позволяют ДНК-полимеразе копировать те участки, которые находятся между «затравками». Это копирование дает большое количество копий изучаемого фрагмента ДНК.

Пехов А. П. Биология с основами экологии. Серия «Учебники для вузов. Специальная литература» — 2000.