**Дәріс 1. Клондау технологиясының даму тарихы**

Клондау(грек. clon – ұрпақ, бұтақ) – организмдерді жыныссыз жолмен көбейту арқылы сол организмдерге ұқсас ұрпақтар алу. 20 ғ-дың 60-жылдарының басында кейбір жоғары сатыдағы өсімдіктер мен жануарларды Клондау әдістері жете зерттелді. Бұл әдістерге даму сатысын аяқтап, толық жетілген клеткалар ядросында организмнің барлық белгілері болатыны туралы ақпарат анықталғаннан кейін қол жеткізілді. Клондау кезінде клеткадағы белгілі гендер жоғалмайды (тек Клондау процесіне қосылмаған гендер ғана жойылып отырады). Клондау туралы алғашқы мағлұматты Корнелль универстетінің (АҚШ) профессорлары жүргізген тәжірибелерден көруге болады. Олар өсуге қажетті қоректік заттар мен гормондары бар ортада сәбіз тамырының жеке клеткаларын өсіру арқылы, осы өсімдіктің жаңа формасын алды. Кейінірек Ұлыбританияның Оксфорд университетінің ғалымы Д.Гердон (1933 ж. т.) алғаш рет жануар омыртқасын Клондауға болатынына қол жеткізді. Ол өзінің ядросы алдын ала ультракүлгін сәулелері арқылы жойылған құрбақаның жұмыртқаклеткасына, ішек клеткаларынан алынған ядроны егу (қондыру) арқылы әуелі итбалықты, соңынан сол ядро алған құрбақаға ұқсас дарабасты алды. Бұл тәжірибелер тек дифференциалданған (арнайы) клеткаларда организмнің дамуына қажетті барлық ақпараттардың болатынын дәлелдеп қана қоймай, сондай-ақ, жоғары сатыдағы организмдерді, соның ішінде адамды да, Клондауға болатынын көрсетті. Клондау арқылы өте пайдалы өсімдік сорттарын алуға және мал тұқымын асылдандыруға болады. Бірақ Клондаудың мұндай әдістері (өсімдік сорттары мен асыл тұқымды мал алатын) адамдарға қолдануға келмейді. Теориялық түрде әйелдің де, еркектің де генетикалық көшірмелерін жасауға болады. Бірақ клондалатын клетка даму сатысының барлық кезеңдерінен өтуі керек, міне, сол кезде клеткаға сыртқы ортаның қалай әсер ететіні әлі толық анықталған жоқ. <http://student.zoomru.ru/bio/klondau/240711.1920201.s1.html>

 **Дәріс 2. Клондау. Клондаудың принциптері мен әдістері**

Клондау - бұл ДНҚ үзінділерін оқшаулау және анықтау әдістерінің бірі, сондай-ақ оларды шектеусіз мөлшерде алу. Оқшауланған және анықталған фрагменттер молекулалық талдау және ДНК зондтары, ген кітапханаларын құру үшін пайдаланылуы мүмкін. Бактерияларда арнайы әдіс қолданылады және бір бактериялық колонияның барлық туындылары бірдей ДНҚ фрагменттеріне ие болғандықтан, олар клондар болып табылады.

ДНҚ фрагментін клондау бірқатар кезеңдерді қамтиды:

 1) клондалған ДНҚ бөлігін векторлық ДНҚ молекуласына (химерлі молекуланың - рекомбинантты ДНҚ-ны қалыптастыру) енгізу;

2) осы құрылғыны бактериялы қабылдаушы жасушаға енгізу;

3) рекомбинантты ДНҚ бар жасушаларды идентификациялау және оларды таңдау (әдетте селективті ортада жүзеге асырылады);

4) рекомбинантты ДНҚ бар (шын мәнінде клондау) жасушалардың қажетті санын алу. Қажет болған жағдайда қабылдаушы клеткаларда клондалған геннің өрнегі индуцияланады және оған кодталған ақуыз алынады.

 <https://medicalplanet.su/genetica/137.html>

**Дәріс 3. Өсімдіктерді клондау**

Маманданған ұлпаның кез келген тірі жасушалары лайықты қоректік ортада өсіргенде, өздерінің тотипотенттік қасиетін жүзеге асырып, регенерация арқылы бүтін өсімдікке айнала алады. Жеке жасушаларда сол өсімдік түріне тән барлық белгілері мен қасиетері сақталған бүтін өсімдіктің түзілуі клондық көбейту технологиясының негізін қалайды. Клон (грек. сlon – отпрыск, ветвь) – жыныссыз жолмен, яғни вегетативтік көбею жолымен түзілетін организм.

Өсімдіктердің клондық микрокбеюі деген өсімдіктердің in vitro жағдайында жыныссыз жолмен көбеюі. Соның нәтижесінде пайда болған өсімдіктер бастапқы өсімдікпен және өзара бір-бірімен генетикалық тұрғыдан айнымастай бірдей болады.

Бұл биотехнологиялық әдістің дағдылы вегетативтік жолмен көбеюмен салыстырғанда бірталай артықшылықтары бар, атап айтқанда:

1.Көбею коэффициенті өте жоғары. Мысалы, гербера, бүлдірген, хризантема, раушанның бір өсімдігінен in vitro жағдайында бір жылдың ішінде 1 миллионнан астам клон өсімдіктер алуға болады. алма ағашының бір бүршігінен 8 айдың ішінде 60 мыңнан астам өркен шығады. Таңқурайдың бір бұтадағы меристемаларын бөліп алып өсіріп жылына 50 мыңға дейін өсімдік алуға болады. сонымен, микрокөбеюдің коэффициенті басқа вегетативтік көбею әдістерімен салыстырғанда мыңдаған есе артық.

2.Микрокөбеюмен қатар өсімдіктер вирустар мен патогендік микроорганизмдерден сауықтырылады.

3.Сұрыптау процесін жылдамдату. Жаңа сорттарды тез көбейтіп, оларды ауыл шаруашылық өндіріске пайдалану мерзімі едәуір қысқарады.

4.Вегетативтік жолмен көбейе алмайтын өсімдіктерді мысалы, пальманы тек in vitro жағдайында көбейтуге болады. Осы әдіспен өнеркәсіп деңгейінде бірқатар өсімдіктерді көбейтеді.

5.Үнемділік. Арнайы бөлмеде стеллаждарда орналасқан пробиркаларда жыл ойы мыңдаған өсімдіктерді өсіру арқылы теплицалар алаңы үнемделеді.

6.Жас өсімдіктерді алу, яғни кәрі дарақтарды жасарту.

7.Өсу процесінің жыл бойы үзбеуге болады, әсіресе бұл дамуында тыныштық кезеңі болатын өсімдіктерді көбейтуге тиімді.

1. Клондық микрокөбейтудің т.рлі әдістерін ғалымдар ол кезде өтетін морфогенездің өзгешеліктеріне қарай жіктейді. Н.В.Катаева мен Р.Г.Бутенко былай жіктеуді ұсынады: а) бұрыннан болған меристемалардан өскен өсімдіктер; б) жаңадан пайда болған меристемалардан өскен өсімдіктер.Бірінші типті өсімдіктер бүтін өсімдікте бұрыннан болған меристемаларды (сабақтың апексі, қолтық және бұйыққан бүршіктері) активтендіру жолымен пайда болады. Бұл меристемадан шыққан өсімдіктер генетикалық жағынан аналық өсімдікпен пара-пар, өйткені апекстерді in vitro жағдайында өсіргенде олар генетикалық тұрақтылығын сақтайды. Екінші типті өсімдіктер in vitro жағдайында пайда болған бүршіктер мен эмбриоидтардан алынады. Бұл өсімдіктерде маманданған және каллус жасушаларынан шыққандығына байланысты генетикалық өзгергіштіктер орын алуы мүмкін. Сондықтан, шыққан клондар бастапқы өсімдіктен біршама ауытқып кете береді. Сөйтіп бұл әдісті тек каллустары тұрақты немесе регенеранттарда пайда болған өзгерістер табиғи өзгергіштіктен аспайтын өсімдіктерге пайдалануға болады. *Уәлиханова Г.Ж. Өсімдік биотехнологиясы. Алматы. Қазақ университеті, 2001.*

**Дәріс 4. Жануарларды клондау әдістері**

Клондау – алғашқы бір молекуладан, жасұшадан немесе дарақтан көп үлгілер алу процессі. Клондалған жануарларға бір дарақтан (немесе бір ұрықтан) шыққан генетикалық ұқсас ағзалардың тобын жатқызады. Мал шаруашылық тәжірибеде «құрастырылған» жануарларды алу технологиясының екі түрі бар – түрдің ішінде және түрлердің арасында. Түрдің ішінде «құрастырғанда» клондалған, түрлердің арасында «құрастырғанда» - химералық жануарлар алынады.

Клондалған жануарларды алу екі әдісін айырады:

Имплантацияға дайындалған ұрықтың дисекция әдісі. Осындай әдіспен алған жануарларды монозиготтық егіздер деп атайды.

Энуклеарды жұмыртқа жасұшаларына сома жасұшаларынан алынған ядроны отырту.

*Дисекция әдісі.* Монозиготты жануарлар алу негізінде тотипотенттік (әр бір бластомераның ұрықтан бөлінгенде өмір сүре алатын тұқым беру қасиеті) жатыр, ал осындай әдіспен клондарды алу негізінде жануарлардың биологиялық ерекшеліктері жатыр – бір жұмыртқалы егіздерді табу.

Монозиготты жануарларды алу әдістемесі келесі процедуралардан тұрады.

1. Ұрғашы-донордың жыныс жолдарынан 2-8 бластомералық бөліну кезеңіндегі ұрықтарды алу.

2. Пеллюцид зонасын алу. Алу екі әдісін айырады: 1) микроманипулярлы құралдың астында механикалық бөлу; 2) фермент проназаның көмегімен ферментативтық әсер ету.

3. Ұрықты бөлек бластомераларға бөлу.

4. Бөлініп алынған бластомераларды энуклеардық жұмыртқа жасұшасына инъециялау.

5. Құрастырылған ұрықты агар цилиндіріне кіргізу. Агар ұрғашының жыныс жолында ерімейді, ұрыққа дамуға жағдайлар тұылады.

6. In vivo культивирлеу.Ұрықты агармен бірге реципиенттің жұмыртқа жолына кіргізеді. Реконструкциядан өткен ұрықтарды культивирлеу үшін реципиент ретінде қойлармен қолданады. Ұрықтарды бластоциста кезеңінедейін культивирлейді. Кейіннен лапаротомия әдісімен бластоцистаны жұмыртқа жолынан алып, агарды алып тастап, ұрықты бағалайды.

7. Биологиялық толық ұрықтарды ұрғашы-реципиенттің ипсилатералдық мүйізшесіне еңгізеді.

*Энуклеация әдісі.* Әдіс келесі процедуралардан тұрады:

1. Овуляциядан өткен жұмыртқа жасұшаны донордың репродуктивтық жолынан алып дайындау.

2. Микроинемен ұрықтандырылмаған жұмыртқа жасұшаны полярлы дененің астында кесіп цитохалазин қосылған фосфаттық ортаға салады.

3. Пипеткамен полярлы денені және оның қасындағы цитоплазманы бір сағат культивирлеуден кейін сорып алады. Сонымен жұмыртқа жасұшасы екіге бөлінеді. Полярлы дененің бар жартысында метафаза ІІ кезеңіндегі хромосома бар (жұмыртқа жасұшаның «ядролық» жартысы). Екінші бөлекте ядролық құрылымдар жоқ («энуклеардық» жарты).

4. Жануарлардың сома жасұшаларынан бөліп алған ядроларды «энуклеардық» жұмыртқа жасұшасына салады.

5. Электроқосылудан кейін ұрықтың цитоплазмасымен ядроны фосфаттық буферге салады.

6. Ұрықтарды агарға салу (әдістемесі жоғарыда көрсетілген).

7. In vivo культивирлеу. Реципиенттің жұмыртқа жолдарына ұрықтар отырғызылып 4-6 күн инкубацияға жатады.

8. Ұрықтарды алып биологиялық толықтығын анықтау.

9. «Құрастырылған» ұрықты ақырғы реципиентке отырту.

# Дәріс 5. Адам және жануарларда ғылыми және практикалық мақсаттардағы трансгеноз

Биотехнологияда адам және жануарлар клеткаларын пайдаланудың кезеңі 1949 жылдан басталады. Ол кезде американдық бір топ ғалымдар Эндерс, Уоллес және Робинс адам ұрығының бұлшық ет және тері клеткаларының дақылдарында полиомиелит вирусын өсірген. Соңынан вирустарға көбірек адам ұрығының және ересек маймылдың бүйрек клеткалары, тауық эмбрионының амниотикалық қабығы өзіне тез қабылдағыш болып келетіні анықталды. Эксперименттік зерттеу жұмыстарының барысында әрдайым дақылда болатын, егілетін клеткалар линиялары алынды. Мысалы, жатыр мойнының карцинома клеткалары (Helа), хомяктардың эмбриондарының бүйрек клеткалары (ВНК-21), жасыл мартышкалардың бүйрек клеткаларын (Verо) айтуға болады. Олар әлемдегі көптеген лабораторияларда вирустарды бөліп алуда және таза вирустық препараттар өндіруде, вирустық инфекцияларды зерттеуде, олардың профилактикасы мен емдеу шараларына вакцина дайындау үшін пайдаланылады. Егілетін клеткалық дақылдарды алғанға дейін вирустар біріншілік клеткалар дақылдарында өсірілді. Бірақ, жаңа әдіс вирустарды таза күйінде бөліп алумен қатар, диагностикалық және профилактикалық вакцина дайындау үшін қажетті вирустық материалдарды үлкен масштабта өндіруге мүмкіндік туғызды. Қазіргі кезде қиял ретінде көрінетін, ал болашақта адамның өзін клондау мәселесі биотехнология шеше алу мүмкіншілігін уақыт көрсетеді. Адам және жануарлардың клеткалық дақылдарын басқада бағалы заттарды алуда пайдалану, дифференцияланған клеткаларды дақылдау, егілетін клеткалардың тұрақсыздығы сияқты мәселерді шешумен байланысты. Сондықтан, қазіргі кезде клеткалық дақылдарды биотехнологияға жетістікпен енгізілген мысалдардың саны өте кем. Мысал ретінде, адам және тышқан клеткаларының суспензиялық дақылдары арқылы антивирустық гликопротеид – интерферонын, сонымен қатар тәжірибе жүзінде адам, өгіз және шошқа ұйқы безінің бета-клеткасының егілетін линияларын пайдалану арқылы инсулин гормонын өндіруді айтуға болады.

Клеткаларды дақылға айналдыру процесінде клетка аралық байланыстар бұзылып, механикалық зақымдаудың нәтижесінде, клетканың беті өзгеріске ұшырайды, сондықтан, клеткалық дақылдар әдісінің әріқарай жетілуі, клеткалардың организмдегі жағдайын ескере отырып, дақылдау жағдайларын оптимизациялау және стабилизациялау әдістерін өңдеумен байланысты болады. Клеткалар дақылдары бағалы фенотиптік белгілерін ұзақ уақыт аралығында сақтап қалуы да шешімді талап ететін мәселелердің бірі болып табылады. Осындай шешімнің бір жолы – қалыпты дифференцияланған және трансформацияланған клеткаларды біріктіру нәтижесінде түзілген, гибридті клеткаларды алу болып табылады. Мысалы, қалыпты лимфоциттер мен миеломды клеткаларды біріктіруден алынған гибрид дақылдану процесінде шексіз өсуге және белгілі антиденелер синтездеуге қабілетті болып келеді.

Гибридомды әдіс – бір ғана антигенді детерминантқа қарсы бағытталған және жоғары спецификалық, бір клетканың ұрпағы түзетін, моноклонды антидене алуға мүмкіндік береді. Қазіргі кезде, моноклонды антидене өндірісі, биотехнологияда маңызды орынды иеленуде. Моноклонды антиденелер ферменттер мен белоктардың полиморфизмін, есуді реттеу механизмін және соматикалық клеткалардың пролиферациясын, сәйкессіздіктің антигендерін, дифференцияланған клеткалардың әр түрлі типін сипаттайтьш, антигендерді зерттеу үшін пайдаланады. Моноклонды антиденелердің тағы бір практикалық маңыздылығы диагностикалық, емдік және профилактикалық заттар ретінде, биологиялық активті заттардың таза препараттарын (лейкоциттік интерферон) алуда қолданылады. Гибридомдық әдісті қолданумен байланысты өндірістің масштабы жөнінде американдық қаражаттық мекемелерінің мәліметтері бойынша, мынандай фактыларды келтіруге болады: 1987 жылы моноклонды антидене негізіндегі диагностикалық препараттарды өндіруге 500 млн доллар, ал 1990 жылы тек ісік (рак) ауруларының диагностикумдарын айтуға 2 млрд доллар қаржы жұмсалынды. Ғалымдар көптеген қан ауруларына да қарсы күрес жүргізуде, осы мәселені шешудің бір жолы «қолдан қан жасау». <https://baribar.kz/student/8661/adam-zhane-zhanuarlarda-ghylymi-zhane-praktikalyq-maqsattardaghy-transgenoz/>

**Дәріс 6. Клондау технологиясында гендік кітапханаларды құру және скрининг жасау әдістері**

"Хромосомада секіру" әдісі бойынша клондау технологиясының ерекшелігі әр түрлі мыңдаған нуклеотидтердің ара қашықтығын анықтамай -ақ бөліп алуға мүмкіндік береді. «Хромосомадан секіру» әдісі бойынша гендер кітапханасын жасау, геномдық ДНҚ-ны сирек-сіңіретін шектеу ферменттерімен шектеу (әдетте, шектеу учаскелері шамамен 200 кб қашықтықта орналасқан ең ыңғайлы фермент секіргіш ұзындығы болып табылады). Бұл фрагменттер кішкентай маркерлік геннен, әдетте, supF генімен (ұзындығы = 7 кб) Х фаг арқылы, циклизацияланалы. Нәтижесінде, соңғы өңірлер бастапқыда бірнеше жүз кб қашықтықта. бір-бірінен тек маркер генінің ұзындығымен жойылады. Сақина молекулаларын рестриктаза ферменті арқылы байланыстыруды шектеу (көбінесе EcoR1-ні қолданып) кезінде маркер генін және оның флангиялық тізбектерін қоса алғанда ұзындығы шамамен 20 кбит / с фрагменттер таңдалады. Векторға енгізілгенде, осы генді қамтитын тек дәйекті теріс маркер генінің қабылдаушы жасушаларында күшейтіледі. Содан кейін клон бастапқы дәйектілікке тән ДНҚ зондымен будандастыру арқылы анықталады. Кейінгі субклондау кезінде плазмидті векторда екі субклинон алынды. Бір субклон бастапқы дәйектілікке тән ДНҚ зондымен будандастырады, екіншісі - осы ДНҚ зондымен будандастырылмайды және секірудің ұзындығы бойынша бастапқы молекуланың шыққан бөлігінен бөлінетін ДНҚ фрагменті бар. ДНК-ның үлкен фрагменттері бар геномдық кітапханаларды құрастырғаннан кейін, және карталарының құрастырылу кезінде «жаяу» және «хромосомадан секіру» әдістері өзектілігін жояды. <https://medicalplanet.su/genetica/139.html>

**Дәріс 7. Молекулалық клондауда ген дозасының әсері**

Классикалық генетикада геннің дозасының әсері жақсы белгілі, белгілі бір геннің көшірмелерінің санының организмнің геномының ұлғаюы оның протеиндік өнім деңгейінің пропорционалды өсуіне әкеледі. Гендік инженерия әдіснамасының пайда болуымен геннің доза әсері клондалған гендердің ақуыз өнімдерінің кірістілігін арттыру жолындағы алғашқы қадам болды. Геннің жоғары дозасы фагтардың және плазмидалардың ДНҚ-на негізделген E. coli жасушалары үшін жасалған бірнеше көшірме векторларын пайдалану арқылы қол жеткізіледі. Мультикопиялы плазмидті векторларды құру үшін плазимидтер репликалауды әлсіреуі немесе идентификациялау функциясына сәйкес жылу сезімтал мутациялармен бірге қолданылады. Бірінші типтегі векторлардан ColEl плазмид пен оның көптеген туындылары (2.2.1-ні қараңыз) кеңінен 20-60 данадағы жасушада кеңінен қолданылған. Тіпті бірінші гендік-инженерлік жұмыстарда Типтофан синтезінде A және E. coli антранилат синтетазаны ColEl плазмидасына гендердің құрамына кіретін ДНҚ фрагменті енгізілгеніне қарамастан, осы ферменттердің белсенділігінің деңгейін 40 және 18 есеге арттырып, жабайы штамммен салыстырғанда түрі: гибридті плазмидтің көшірмесі бұл жағдайда шамамен 25 молекула болатын. рМВ9 плазмидіндегі sbcB + генін қамтитын ДНҚ фрагменті клондау арқылы E. coliде экзонуклеаза I белсенділігінің деңгейінің 25 есе ұлғаюына қол жеткізілді, егер dnaB, dnaC, dnaE және dnaZ гендері бар E. coli хромосомалық үзінділері бірдей векторға енгізілген болса көшірме қуаттылықтың өсуі есебінен тиісті ақуыздарды өндіру 3-10 есе артты. <http://bookzie.com/book_347_glava_63_5.8.7._PRAVO_NA_FIRMENNOE_NAIM.html>

**Дәріс 8. Экспрессия деңгейіндегі клондалған гендердің транскрипция тиімділігінің әсері**

Клондалған генмен анықталған ақуызды өндіру деңгейі осы геннің кодтау дәйектілігінің транскрипциясы тиімділігіне үлкен әсер етеді. ДНҚ транскрипциясы фермент РНҚ полимеразы арқылы жүзеге асырылады. E. coli жасушасында осы ферменттің шамамен 3 мың молекуласы бар. E. coli RNA полимеразы - бірнеше түрлі бөліктен тұратын күрделі белоктар: β '(156 кДа), β (151 кДа) және (37 кДа) және o (молекулярлық массалар әртүрлі кр-субуництер үшін әр түрлі). Фермент молекуласындағы қосалқы заттар ковалентті байланыстарсыз біріктіріледі. Бұл комплекстегі cг-бөлімшесінде ең аз шектелген. Ерекше ферментативті белсенділік формуласы кор-фермент деп аталады . РНК полимеразының осы формасы E әрпімен белгіленеді. Еркін күйде фермент толық RNA полимераза емес, өйткені геннің транскрипциясын бастау ДНҚ сигналдарын дұрыс тани алмайды. O-бөлімшесі ферментпен біріктірілген кезде, / 3 '/ S03 формуласы бар голоцензия (Eo) құрылады. Σ-субуниті немесе o-факторы голоциздердің ДНҚ-ның белгілі бір аймақтарымен байланысының ерекшелігін қамтамасыз етеді. EO негізгі байланыстыратын ДНҚ тізбектері орын алады және ДНҚ-ның бірін толықтыратын РНК тізбегін синтездеудің бастамасы промоторлар деп аталады. <http://bookzie.com/book_347_glava_64_5.9._OBSHHIE_POLOZHENIJA_OB_OB.html>

**Дәріс 9. ДНК клондау үшін гендік инженерияның векторлары**

Ген клондау - алушы жасушаларда, пропорционалды және эукариотттағы жеке гендерді оқшаулау мен күшейтуді қамтитын процедура. Қажетті генді қамтитын бұл жасушалар: а) генмен кодталған ақуыздың үлкен мөлшерін; б) жоғары дәрежеде тазартылған түрдегі гендер қолданылады.

Ген клондау процесі бірнеше кезеңдерді қамтиды:

1. Қажетті генді алу:

а) эндонуклецияны шектеу арқылы геномдық ДНҚ-ның бөлінуі (қатаң анықталған жерде ДНҚ молекуласының эндонуклеациялау;

б) тек кішкентай ДНҚ үзінділерін химиялық синтездеу арқылы (өйткені белок молекуласындағы амин қышқылының қалдықтарының тізбегін білу арқылы әрдайым генетикалық кодқа сәйкес ақуызды кодтайтын ДНҚ фрагментіндегі нуклеотидтің дәйектілігін анықтай алады). Осылайша, химиялық синтездеу жолымен соматостатинді синтездеуге жауап беретін ген алынады;

в) мРНК молекулалары дене жасушаларынан оқшауланады және кері транскриптаз ферменті (РНҚ-тәуелді ДНҚ-лимазид) көмегімен қажетті геннің ДНҚ көшірмелері жойылады. Мысалы, ұйқы безі жасушаларының инсулин синтезі туралы ақпаратты алып жүретін мРНК оқшауланған. Ал вирустармен зарарланған клеткалардан РНК-да оқшауланған, олар интерферон синтезі туралы ақпаратты қамтиды.

2. ДНҚ молекуласының композициясына оқшауланған немесе алынатын ДНҚ фрагментін енгізу - рекомбинантты ДНҚ алу. Вектор молекулярлық «такси» сияқты, мысалы, ДНК-ны бактериялық жасушаның ішіне көшіре алатын етіп жасай алады. Векторлардың екі негізгі түрі бар: бактериялық плазмидалар (көбіне екі немесе одан да көп антибиотиктерге төзімділік үшін жауапты) және қалыпты (трансекцияға қабілетті) бактериофагтар.

**Дәріс 10. Эукариоттардың құрылымдық гендерін клондау**

Гендердің құрылымы мен функцияларын зерттеудегі заманауи кезеңнің жетістіктері гендік-инженерлік технологияларды дамыту және кеңінен қолдану, соның ішінде түрлі организмдердің ДНҚ фрагменттерін (гендерін) клондау әдістері. Молекулалық клондау үшін фосфодиэфирлік байланыстарының бұзылуымен және молекуланың сызықты фрагменттерінің қалыптасуымен ДНҚ молекуласының нақты нуклеотидтік тізбектерін жабуға болатын («қиып алу») эндонуклеотидтерді (шектеу ферменттері) шектеуі мүмкін ферменттер пайдаланылады. Клондалған гендердің тасымалдаушылары (векторлары) ретінде әдетте вирустардың немесе бактериялық плазмидалардың кіші дөңгелек ДНҚ молекулалары пайдаланылады. Мысалға, 6-нуклеотидті инверттелген дәйекті (5'-GAATTC-3 'бір жолақ және 3'-CTTAAG-5' екіншісі) біріктіретін ДНҚ молекуласының сегменттерін «тану» қабілетті EcoR1 шектеу энзимінің әрекеті; молекуланың әрқайсысының Г және А нуклеотидтерінің арасындағы үзілістерді енгізіңізеді. Осы талшықтарды әрі қарай бөліп алу молекуланың қалыптасқан фрагменттерінің бірқалыпты («жабысқақ») ұштарының пайда болуына әсер етеді, алайда молекуланың құрылымын қалпына келтіруге қабілетті лигаза ферменттерінің көмегімен қосымша принцип бойынша оңай біріктіруге болады. <https://megalektsii.ru/s511t9.html>

**Дәріс 11. Полимеразды тізбекті реакция (ПТР)**

Әдістің қағидасы. ПТР әдісінің негізінде зерттеліп отырған түрдің ДНҚ-ның сол түр үшін айрықша белгі болып саналатын тәнді бөлігін (фрагментін) еселеп көшірмеден (амплификация) өткізіп алу жатыр. Мұндай көшіруді дезоксирибонуклеозид-трифосфаттардың (дНТФ) және праймерлер деп аталатын ДНҚ синтезінің жасанды олигонуклеотидтерінің қатысуымен термостабилді ДНҚ-полимераза ферменті жүзеге асырады. Праймерлер ДНҚ-ның тәнді бөлігімен комплементарлы болып келеді және ДНҚ синтезі тек солардың арасында ғана өтетіндей етіп бағытталған. Нәтижесінде ДНҚ-ның бізге қажетті бөлігінің көшірмелерінің саны көбейе береді. Әр цикл үш кезеңнен тұрады. Әр кезеңнің белгілі бір температуралық режимі болады.

1) ДНҚ-ның қос спиралінің тарқатылуы (ДНҚ денатурациясы) 63-95 0 С-та жүзеге асады.

2) Праймерлердің ДНҚ бөлігіне қосылуы комплементарлы түрде праймерлердің сол жұбына тәнді температурада жүзеге асады.

3) ДНҚ-ның жаңа тізбегінің синтезі 72 0 С температурада жүзеге асады. Көшірудің (амплификацияның) 30-35 циклынан кейін ДНҚ бөлігінің 10 көшірмесі дайын болады., ал бұл өз кезегінде агарлы гелдегі электрофорезден кейін реакция нәтижесін көзбен көруге мүмкіндік береді. <https://medlec.org/lek-27062.html>

**Дәріс 12. Биотехнологиялық өндірістерде рекомбинантты микроорганизмдерді пайдалану.**

Белок өнімдерін алудан басқа, гендік инженерия жетістіктері түрлі құнды молекулярлық ақуыздық емес қосылыстар - витаминдер, аминоқышқылдар, антибиотиктер алуда аса маңызды болып табылады. Біріктірілген ДНҚ технологиясын қолдану арқылы микроорганизмдердің метаболизмін өзгертуге, жаңа гендерді енгізуге немесе қолданыстағыны түрлендіруге болады. Осындай өзгерістердің басты мақсаты - қолданыстағы субстратты әдетте химиялық және микробиологиялық әдістердің комбинациясы арқылы алынған құнды өнімге айналдыруға қабілетті жаңа ферментативті белсенділігі бар рекомбинантты микроорганизмді құру. <https://poznayka.org/s83172t1.html>

**Дәріс 13. Өсімдіктердің қоректік маңызын арттыруда гендік инженерия технологиясын қолдану.**

Өсімдіктердің метаболизмі инженериясы сыртқы гендерді енгізу немесе қабылдаушы жасушаның генін модификациялау жолымен жаңа биохимиялық реакциялардың трансгендік жасушасын жасауға бағытталған. Өсімдіктер метаболизмге арналған ең қолайлы объектілердің бірі болып табылады. Негізгі биологиялық қосылыстарды синтездеудің жолдары бірдей болғанымен, олардың соңғы өнімдері таңқаларлық әртүрлілігімен ерекшеленеді: қант, хош иісті қосылыстар, май қышқылдары, стероидті қосылыстар және басқа да биологиялық белсенді заттар. Өсімдіктер ондаған, мыңдаған табиғи өнімдерді береді, олардың көпшілігі фармакология мен өнеркәсіп үшін құнды болып табылады. Кейбір маңызды дәрі-дәрмектерді өндірушілер - бұл әлемнің көптеген дамыған елдерінің қалыпты климаттық аймақтарында ауылшаруашылық өндірісіне қол жеткізе алмайтын бірегей тропикалық және эндемикалық өсімдіктер. Арнайы органикалық қосылыстардың бағытталған синтезін анықтайтын және оларды тиісті өсімдіктерге көшіруді анықтайтын гендердің осындай өсімдіктерінен оқшаулануы оларды маңызды биологиялық белсенді заттардың жаңа өндірушілеріне айналдырады. Көптеген өсімдіктер құнды биологиялық қосылыстардың биосинтезінің прекурсорларын қамтиды, бірақ олардың осы қосылыстарға айналуы үшін ферменттер жоқ. Жиі метаболиздік техника үшін, клеткаға бір ғана генді ауыстыру жеткілікті. <https://medbe.ru/materials/problemy-i-metody-biotekhnologii/oblasti-primeneniya-gennoy-inzhenerii-rasteniy/>

**Дәріс 14. Бағалы биологиялық активті ақуыздарды өндіруші ретінде қолданылатын трансгенді жануарлар.**

Ауыл шаруашылық биотехнологиясының маңызды міндеттерінің бірі трансгендік жануарларды өсіру болып табылады, бұл өнімділігі жоғары және ауруларға төзімділік және құнды биологиялық белсенді заттардың өндірушілері деп аталатын жануарлардың биореакторларын жасау болып табылады. Генетикалық тұрғыдан өсу гормонын, ақуыздарды кодтайтын гендер: өсу гормоны (GH), өсу гормонын босату коэффициенті (РФ) және инсулинмен ұқсас GH факторы (GFRD) ерекше қызығушылық тудырады. ХХ ғасырдың 70-жылдарының соңында жануарлардың өсу гормонының гені E. coli геномына біріктірілген. E. coli-ден оқшауланған GH жануарлардың лактациясына және өсіміне, сондай-ақ гипофиз ГХ-ға әсер ететін ынталандырушы әсеріне ие екендігі көрсетілді. Генетикалық инженерия әдістерінің көмегімен кең масштабты қолдану арқылы алынған өсім гормоны тәулігіне 13 мг дозада сүт өнімділігін 23-31% -ға арттырды. Әр екі аптада бір рет және тіпті айда бір рет қолдануға мүмкіндік беретін ұзартылған әрекетті дайындаудың формалары әзірленеді. ГР-дың күнделікті инъекциясымен жас малды, шошқа мен қойлар күнделікті салмақтың өсуін 20-30% -ға ұлғайта алды, бұл өсім бірлігіне азық-түлікті тұтынудың айтарлықтай төмендеуімен болды. Шошқаларды өсіруде ақуыз мөлшері артып, тіндердегі майдың мөлшері азайды, бұл ет өнімдерінің сапасын арттырды. <https://helpiks.org/4-85697.html>

**Дәріс 15. Прокариоттардың генетикалық трансформациясы**

Фитопатогендер өсімдіктерде белсенді болған кезде қорғаныш реакцияларының механизмдері енгізіледі. Бұл жағдайда өсімдіктерде белсенді жауаптар екі негізгі бағыт бойынша жүзеге асырыла алады: біріншіден, инфекцияға жауап ретінде, уландырғыш заттардың синтезі басталады және патогендердің өмірлік белсенділігін шектейді, нәтижесінде олар тіршілігін жояды болады. Екіншіден, қорғаныс әрекеті ретінде өсімдіктердің зақымдануын және өсімдіктердің жасуша қабырғаларының лигнизациясы арқылы қол жеткізуге болатын немесе гидрокипролинге және басқа қосылыстарға бай гликопротеиндердің есебінен жасуша қабырғаларын нығайтуға жол бермейтін құрылымдық кедергілер жасалуы мүмкін, бұл фитопатогендердің зақымдануына әкеледі. Вирустармен, бактериялардан және саңырауқұлақтардан инфекцияға жауап ретінде, ең көп зерттелген хитиназдарды және β-1,3-глюканаздарды қоса алғанда, ерекше PR-ақуыздары (патогенезбен байланысты белоктар)атап өтуге болады. Бұл ферменттер саңырауқұлақтардың өсуін, сондай-ақ бактериялардың кейбір түрлерін тоқтатады. Хитиназ және глюканаза ақуыздарының фунгицидтік әсері, сондай-ақ оларды бірыңғай гендер арқылы кодтау эксперименталды түрде дәлелденді. Сондықтан, хитиназ және глюканаз гендері фитопатогендерге төзімді трансген өс імдіктерін алу үшін гендік инженерияда қолданылады. <https://helpiks.org/8-88506.html>