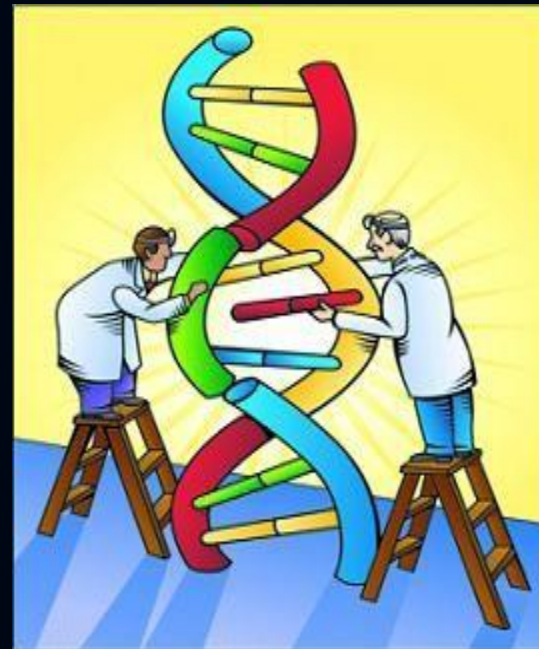


Тақырып

Гендік инженерия негіздері



Жоспар:

- 1. Гендік инженерия әдістері**
- 2. Құрылымдық ген және векторлар**
- 3. Рекомбинантты ДНҚ молекуласын құрастыру**
- 4. Агробактерия плазмидаларын вектор ретінде қолдану**
- 6. Полимеразалық тізбектік реакция**

- **Гендік инженерия** - биотехнологияның негізгі құрамдас бөлігі.
- **Гендік инженерия 1970** –ші жылдары қалыптасты, бүгінгі таңда үлкен жетістіктерге жетті.
- **Гендік инженерия әдістері**
- бактериялардың, ашытқылардың сүтқоректілердің клеткаларын өзгертіп кез келген белокты синтездейтін масштабты **"фабрикаларын"** құрайды.
- Бұл белоктардың құрылымы мен функцияларын жан-жақты зерттеп, оларды медицинада (дәрілік препараттарды алуға) қолдануға мүмкіндік береді.

Гендік инженерия әдістері

- **Гендік инженерия** – **in vitro** жағдайында функционалды ырықты генетикалық құрылымдарды **(рекомбинантты ДНК)** конструкциялау, **жасанды генетикалық бағдарламаларды жасау.**



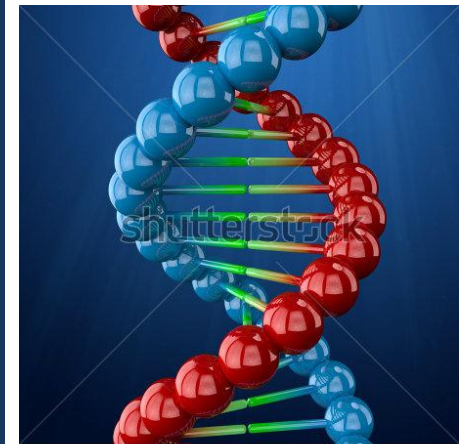
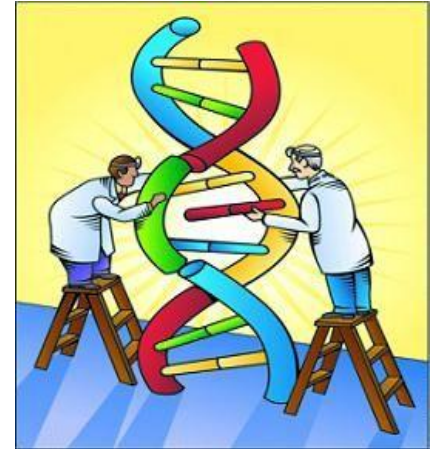
• Гендік инженерия

клеткадан тыс нуклеин қышқылдардың молекулаларын
манипуляциялау

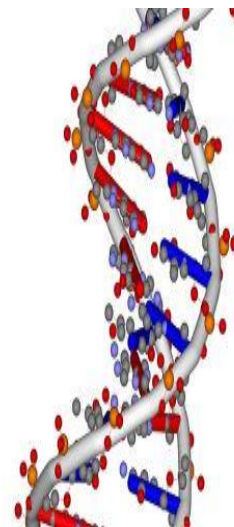
құрастырылған жаңа гендер
конструкцияларын тірі организм
клеткасына енгізу

осы гендердің **экспрессиялануы** негізінде
жаңа қасиеттердің тұқым қуалауы

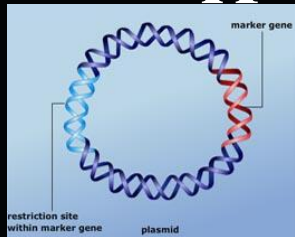
генетикалық материалдардың
жаңа комбинацияларын алу



- **Құрылымдық ген** – белок құрамындағы аминқышқылдардың бірізділігін, жалғасу реттілігін белгілейді.
- **Құрылымдық генде** метаболизм нәтижесінде түзілетін заттардың (**белоктың, иРНҚ**) коды жазылады.
- **Құрылымдық генде** оның ырықтығын бақылайтын бөлік болмайды.
- **Құрылымдық гендердің** репликация және транскрипция сигналдарын **ВЕКТОР** қамтамасыз етеді



Вектор – құрамында бөтен ген және сол генді тасымалдаушы векторлық бөліктен тұратын ДНҚ немесе РНҚ молекуласы.



Вектордың атқаратын міндеті

- таңдап алынған ДНҚ-ны реципиент-клеткаға тасымалдау,
- таңдап алынған ДНҚ-ны геномға ендіру,
- трансформацияланған клеткалардың идентификациялануына мүмкіндік тудыру,
- тасымалданған геннің тұрақты экспрессиясын қамтамасыз ету.

• Векторлардың түрлері:



- Бактериялық плазмидалар; (E.Coli плазмидалары)
- **Вирустар;**
- Космидттер мен фазмидтер (гибридті векторлар, құрамында фаг пен плазмидалардың ДНҚ бар);
- Вироидтар;
- Агробактерия **Agrobacteria** (**tumefaciens**) плазмидалары;
- Хлоропласттық және **МИТОХОНДРИЯЛЫҚ** ДНҚ

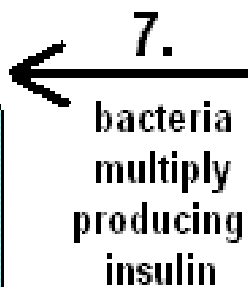
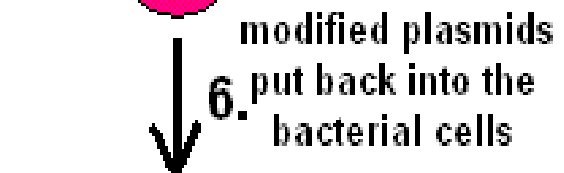
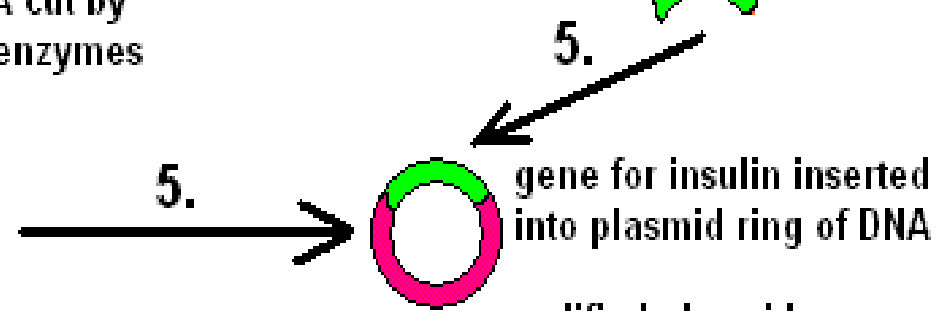
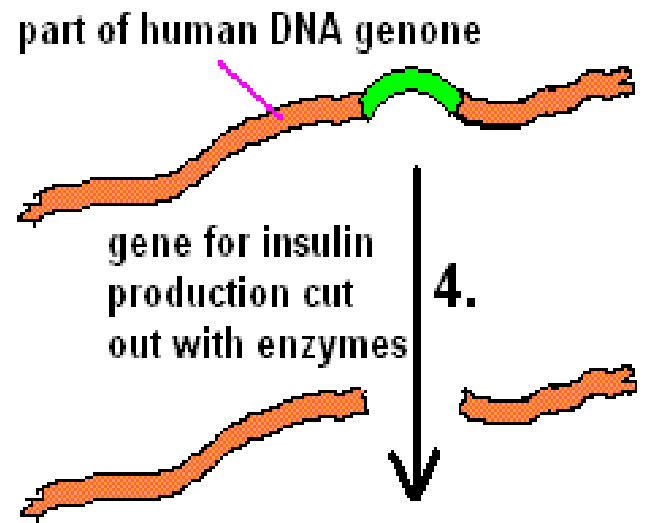
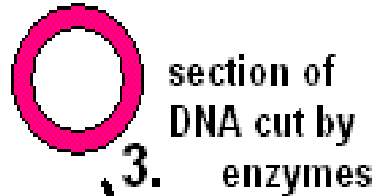
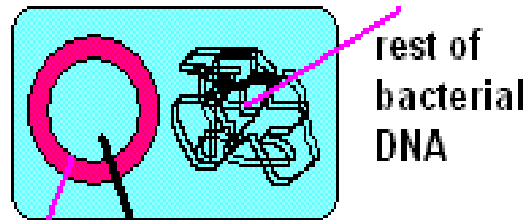
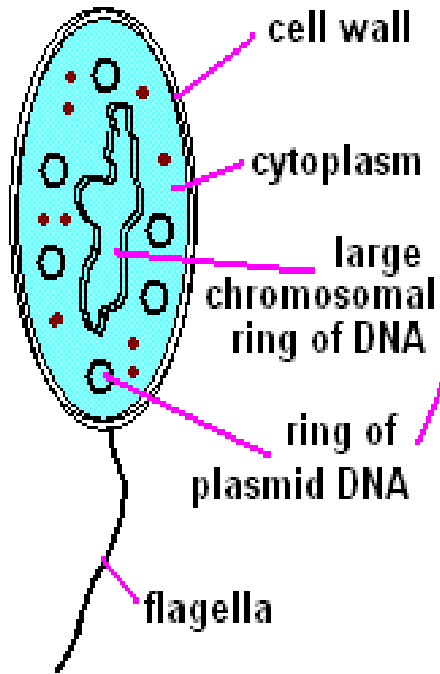
- Векторлар ретінде көбінесе ішек таяқшасы **E.coli** және басқа да бактериялардың **плазмидалары** қолданылады.
- Бактерияларда басты хромосомадан басқа көптеген (200-ге дейін) кішкентай сақина тәрізді болып тұйықталған қос тізбекті ДНҚ молекулалары (плазмиддалар) кездеседі.
- Олар бірнеше мың нуклеотидтерден тұрады.
 - **Плазмидалар** өз бетінше репликацияланады.
 - Құрылымдық генді векторға тіркеп қосқанда рекомбинантты (будан) ДНҚ пайда болады.

Векторға қойылатын талаптар

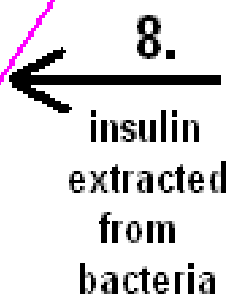
- ✓ ауданы кіші ,
- ✓ қожайын-клеткада **репликациялануға** қабілетті,
- ✓ **амплификацияланатын**,
- ✓ ген экспрессиясын тудыратын,
- ✓ құрамында **маркерлік ген** болатын (бұдан клеткаларды ажыратуға мүмкіндік беретін),
- ✓ Құрамында **рестриктаза үзе алатын нуклеотидтер тізбегі** болу керек,
- ✓ **тасымалдануға қабілетті** болуы тиіс

Insulin production - example of GENETIC ENGINEERING

Starter bacterial cell 1.

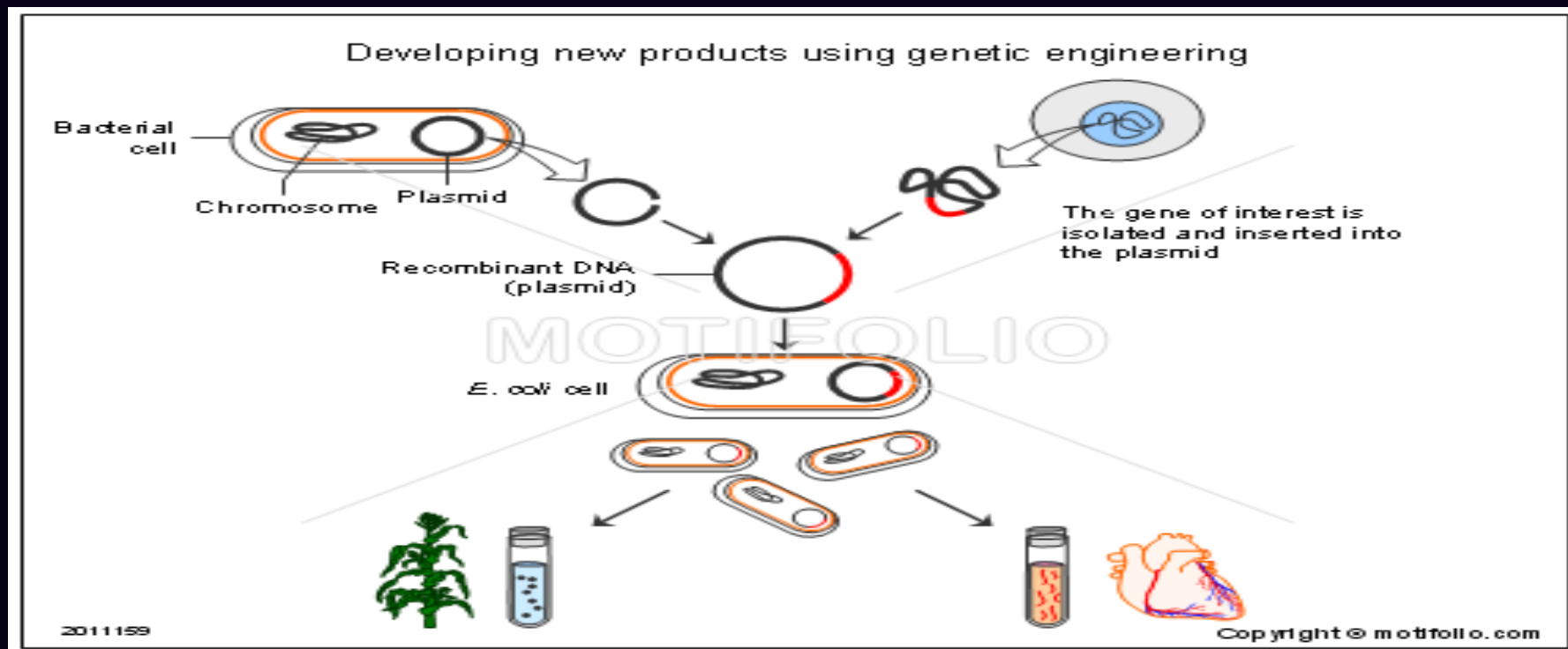


insulin



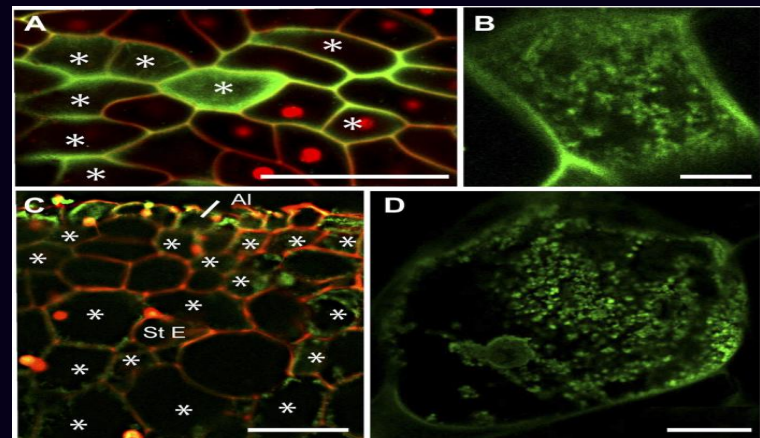
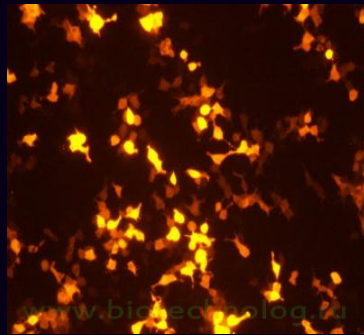
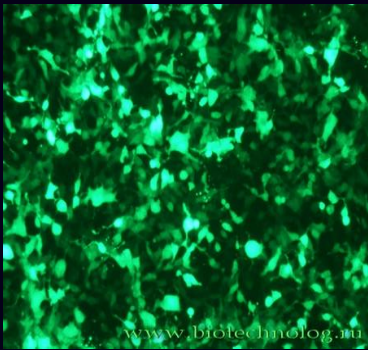
Маркер гендері

1. Селективті гендер—антибиотиктерге (канамицин, тетрациклин, неомицин) және гербицидке төзімді қасиеттерге жауап береді.

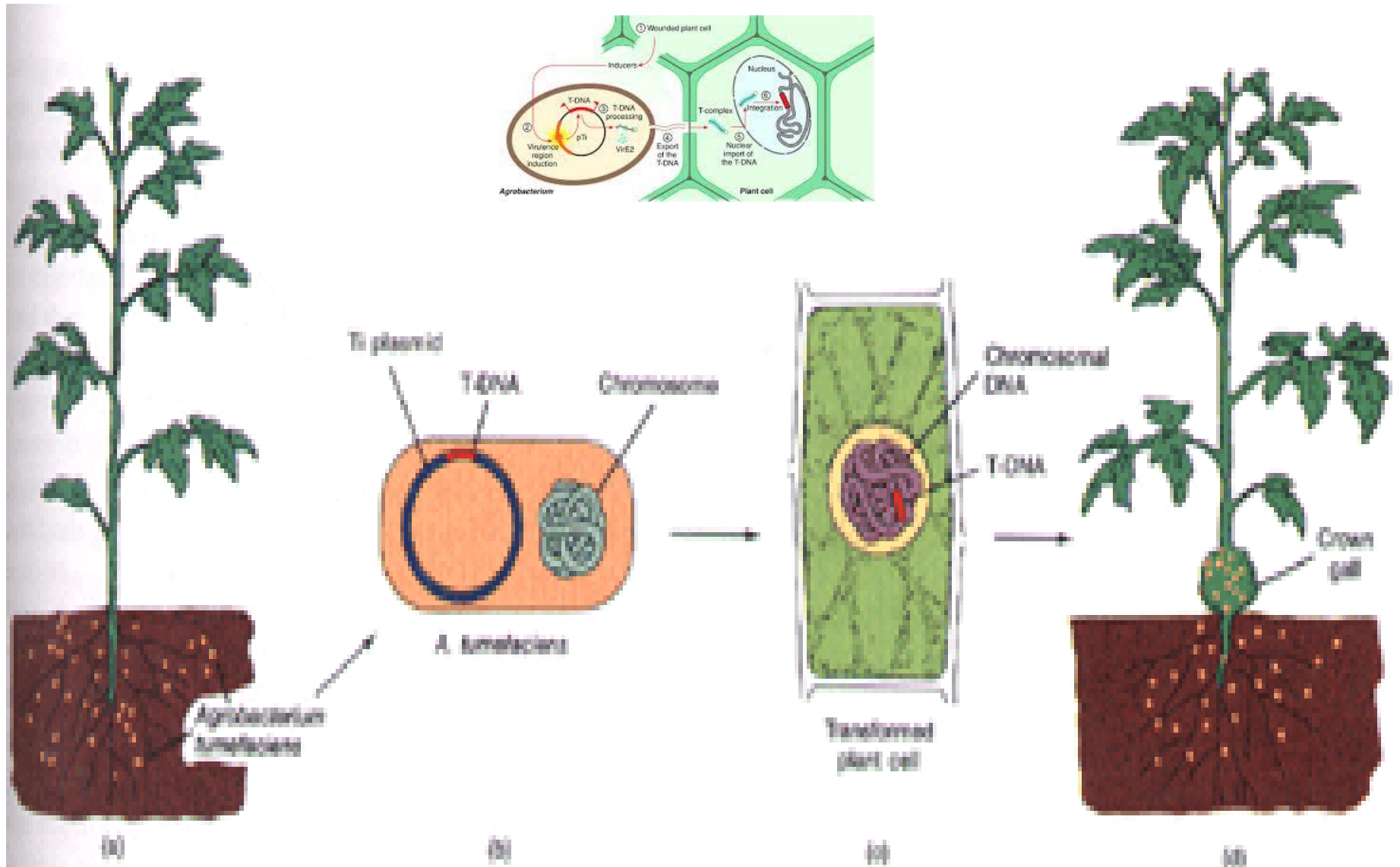


Маркер гендері

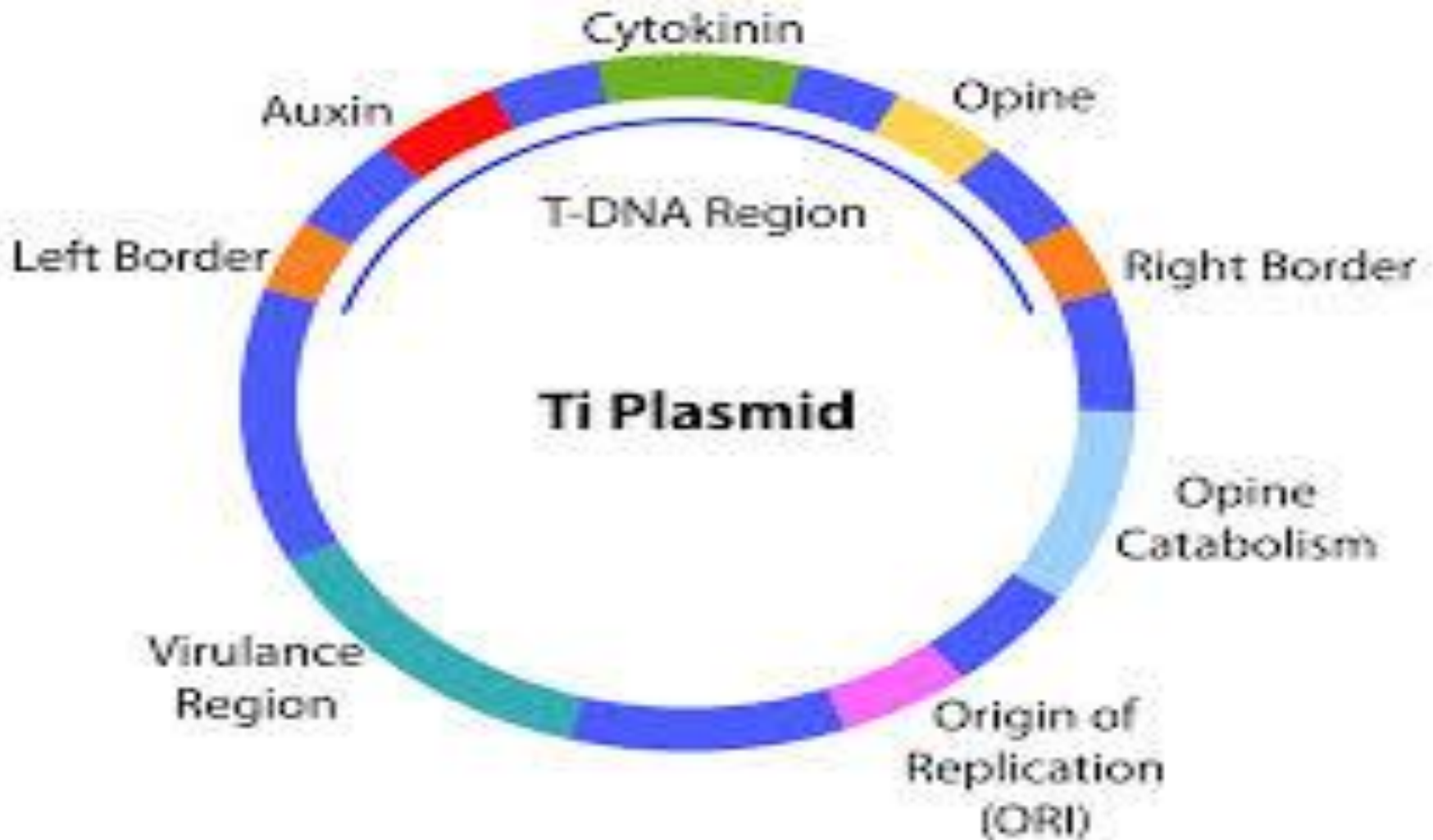
2. Репортер гендер –клеткаларға тән емес (нейтралды) белоктарды кодтайды. Олардың ұлпаларда болуы оңай айқындалады. Оларға: **бетта-глюкуронидазалар** (GUS), **Жасыл флюоресцентті белок** (GFP), **Люциферазалар** (LUC), **Хлорамфениколацетилтранс-феразалар** (CAT) жатады.



Агробактерия плазмидаларын вектор ретінде қолдану

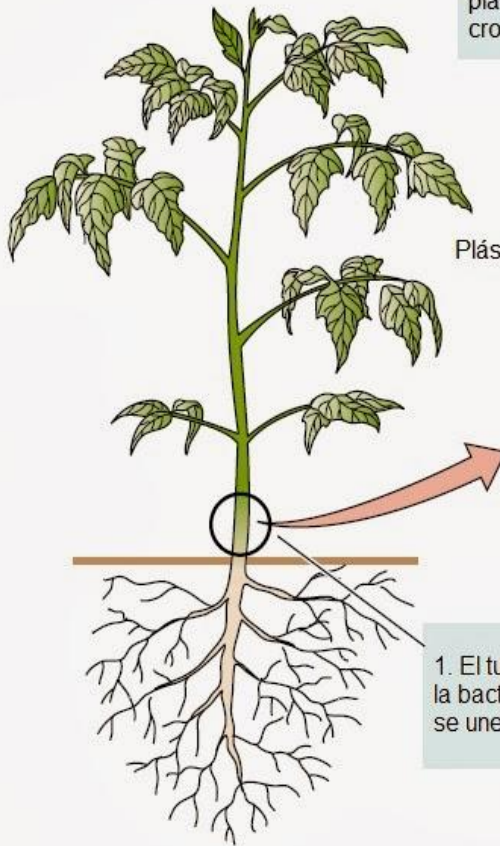


Ti-плазмиданың генетикалық картасы

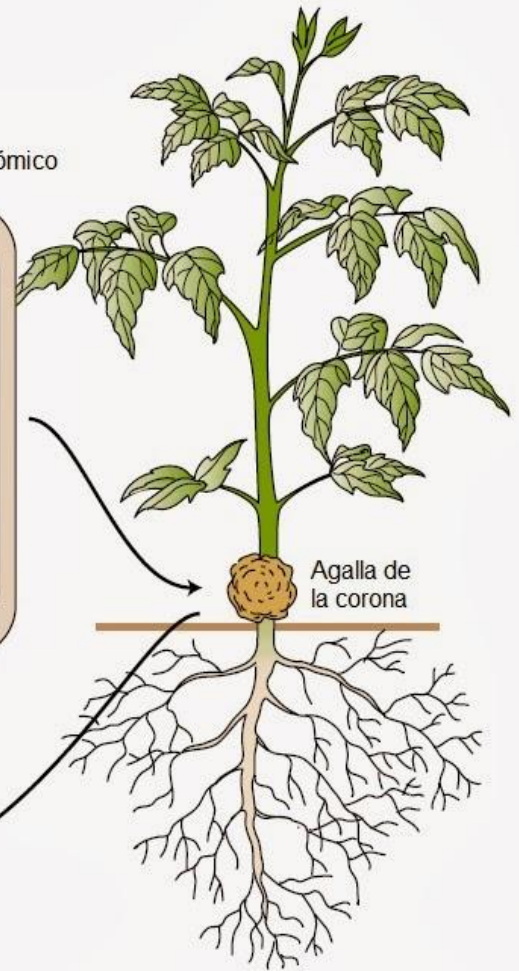
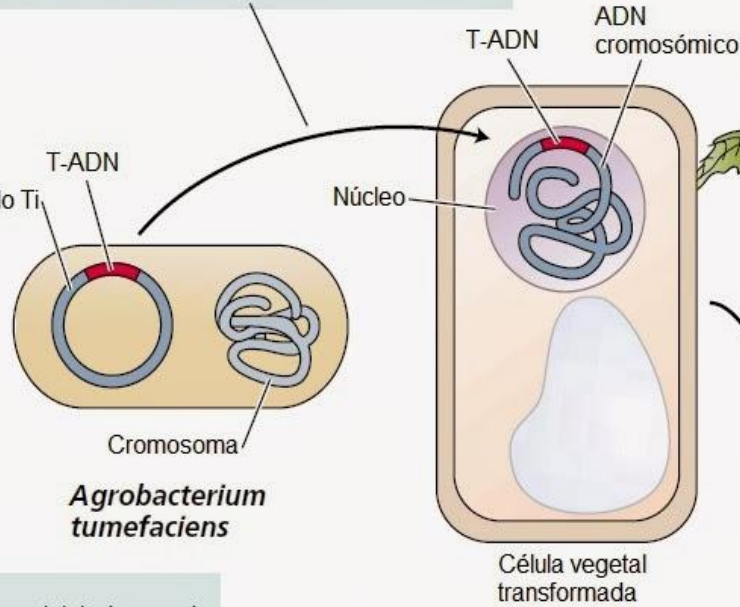




2. Una bacteria virulenta carga un plásmido Ti además de su propio ADN cromosómico. El T-ADN en el plásmido entra a la célula y se integra al ADN cromosómico de la célula.



1. El tumor es iniciado cuando la bacteria entra a una lesión y se unen a las células.



3. Las células transformadas proliferan para formar un tumor, la agalla de la corona.



4. El tejido del tumor puede ser "curado" de la bacteria por incubación a 42°C. El tumor libre de la bacteria puede ser cultivado indefinidamente en la ausencia de hormonas.

ДНҚ молекуласын клондау

Полимеразалық тізбектік реакция (ПЦР), К.Мюллис, 1958 ж.

1. ДНҚ үлгісіне көп мөлшерде
20 нуклеотидтерден тұратын екі
түрлі синтетикалық
олигонуклеотид – праймерлер
қосады.

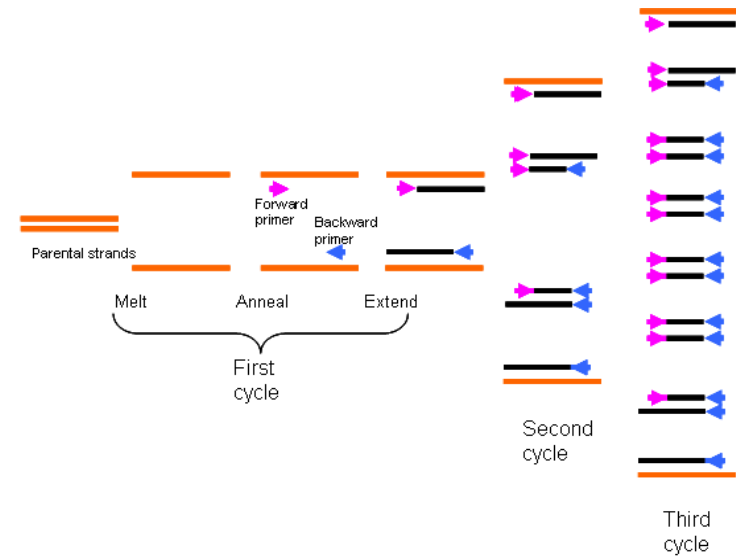
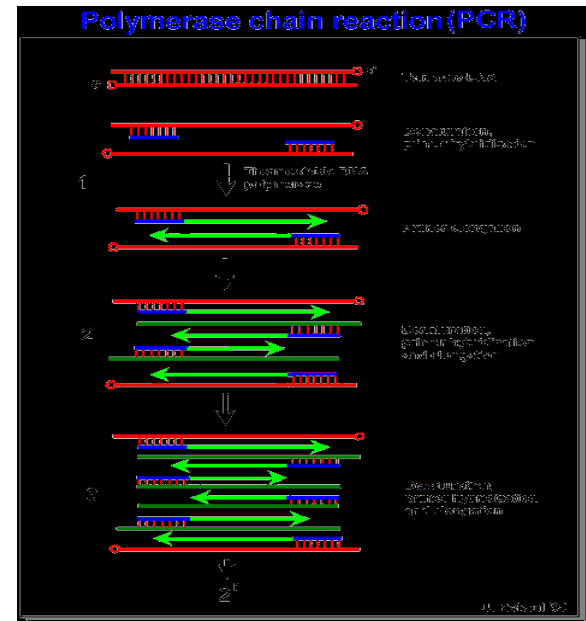
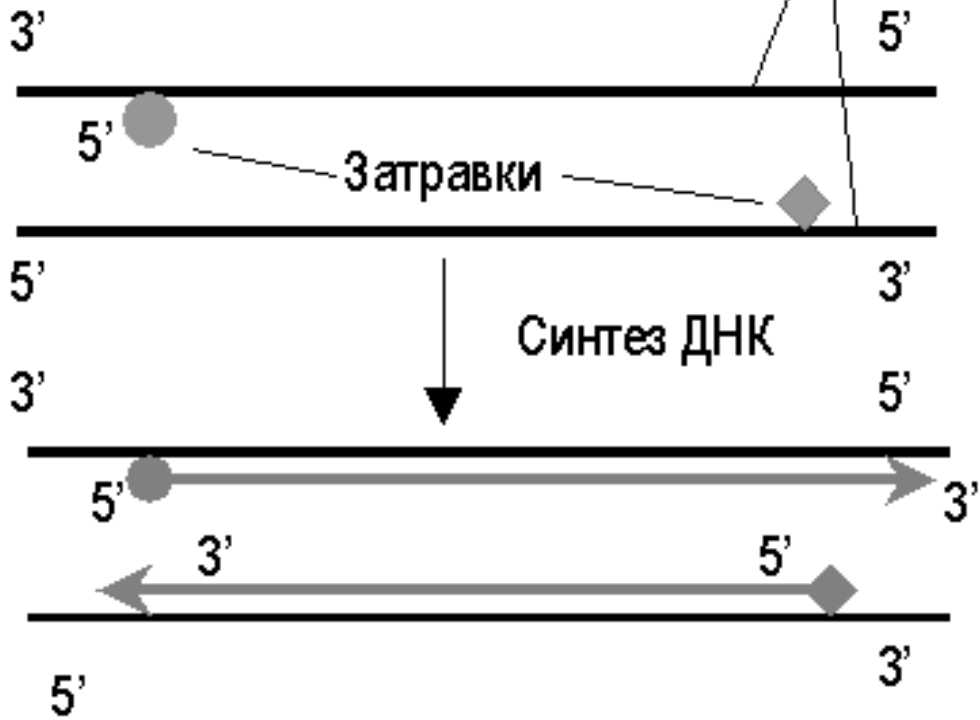
1. Праймерлердің әр қайсысы
ДНҚ фрагментінің 3' соңына
комплементарлы келеді.



3. ДНҚ-ның қос тізбегін ажырату үшін қыздырады, осыдан кейін температураны төмендетеді. Бұл жағдайда праймерлер ДНҚ тізбегіндегі комплементарлы аймақтармен байланысады.

4. Ортаға нуклеотидтер мен ДНҚ – полимеразаны қосқанда, бастапқы ДНҚ тізбегіне комплементарды тізбек синтезделеді. Нәтижесінде ДНҚ фрагменттері түзіледі.

Разделившиеся комплементарные цепи ДНК

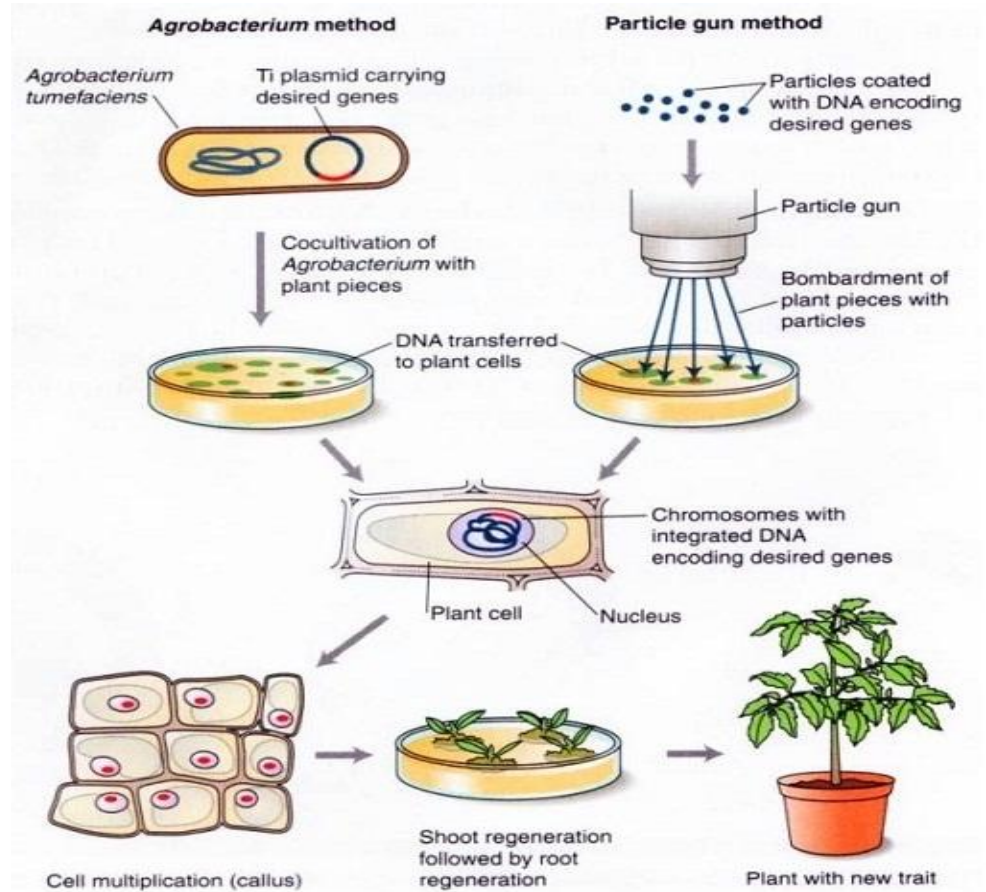


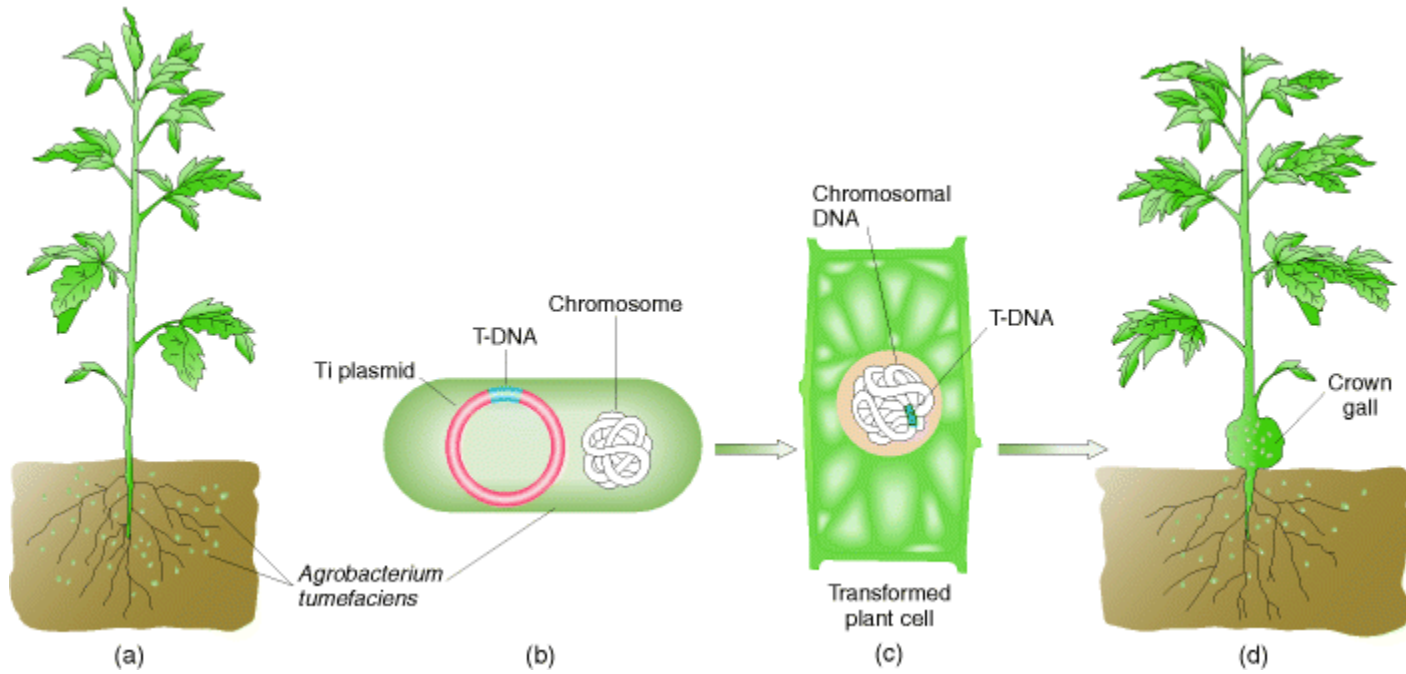
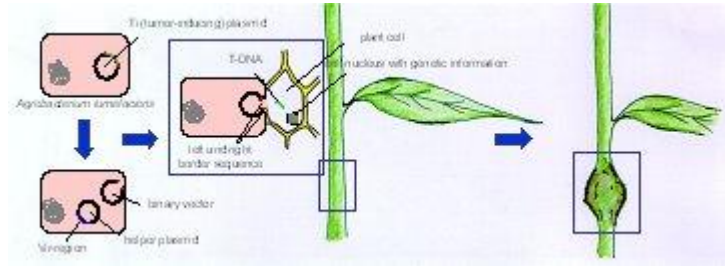
- Полимеразалық тізбектік реакцияға термофильді бактерияның Thermus aquaticus ДНҚ-полимеразасы (Тақ- полимераза) қолданылады.

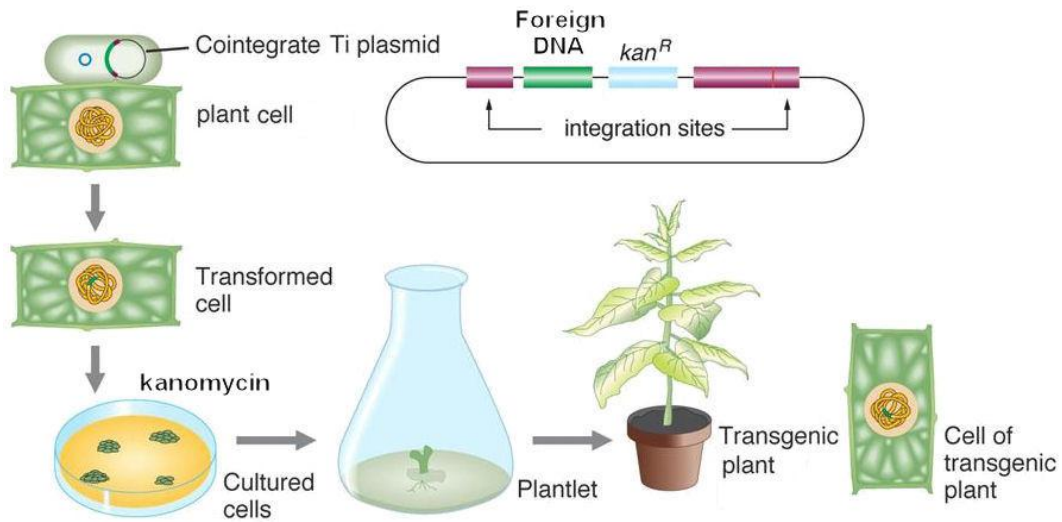
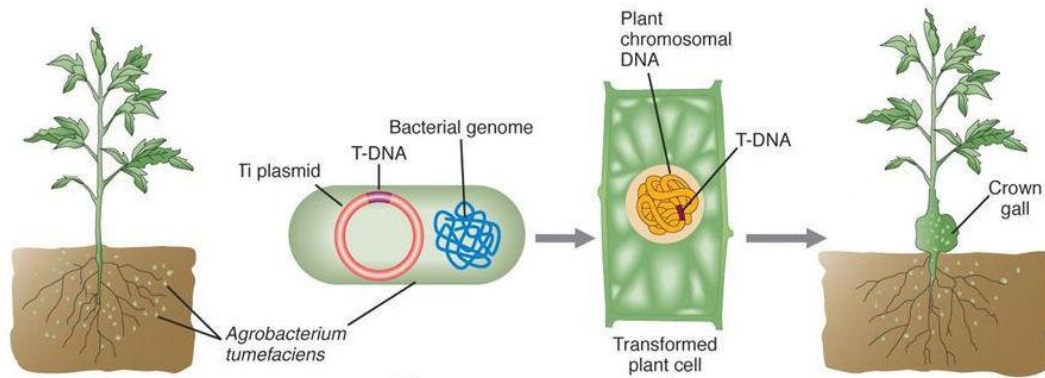
Тақ- полимеразаның қасиеті

- температуралық оптимумы -70°C .
- 95°C инактивацияланбайды,
- термотұрақты, денатурацияға ұшырамайды, тұрақты болады (ортаға бір рет қана қосылады).

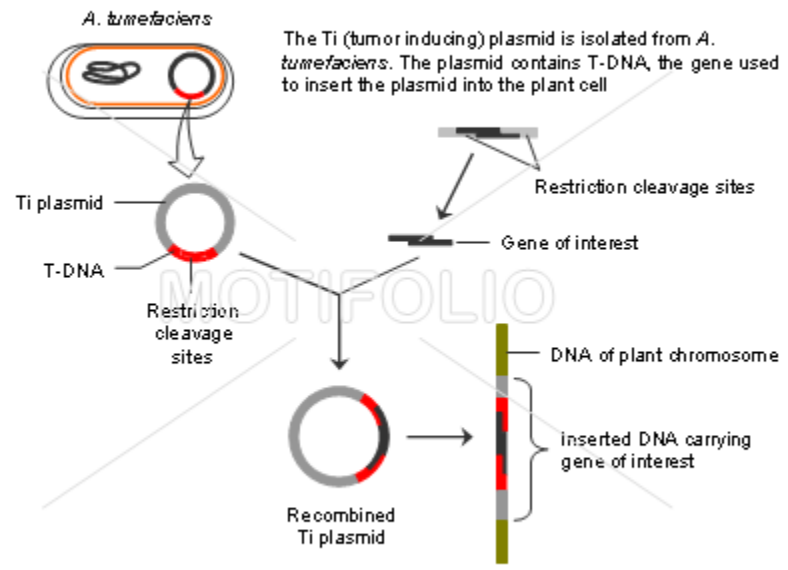
PAXMET!!!





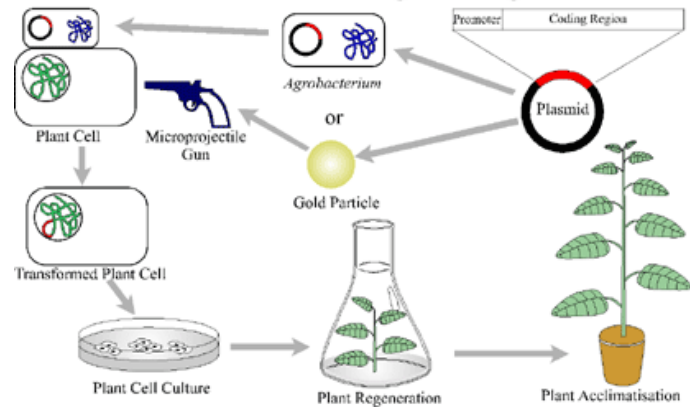


The Ti plasmid as a vector in plant genetic engineering



The result is a transgenic plant

Plant Genetic Engineering



Рестриктазалар
(“рестриктазалар”, “эндонуклеазалық рестриктазалар”,
“спецификалық эндодезоксирибонуклеазалар”)



Бактериялардағы барлық рестрикциялаушы эндонуклеазалар спецификалық қысқа ДНК тізбегін танып, солармен байланысқа түседі.

Яғни, ДНК тізбегіндегі танылған сайт немесе соған жақын сайт қырқылады, бұл ферменттің табиғатынан тәуелді болады.



Бактериялық штамм ДНК тізбектерін метилдеуге қабілетті болады. Метилаза метил топтарын рестрикцияланатын фрагменттің аденин және цитозин қалдықтарына қосады. Метилденген сайт рестрикцияға төзімді келеді. Яғни, метилдеу ДНК қиылуынан қорғайды.

Рестриктаза



Рестриктазалардың 1-ші класы
ДНҚ молекуласын кез келген
жерінен кеседі

Рестриктазалардың 2-ші және 3-ші кластары
ДНҚ молекуласындағы белгілі бір нуклеотидтік
тізбектерді танып, оларды сайттардың ішінде
немесе сол сайттардан алшақ жерден қияды

Рестриктазалар

1-ші және 3-ші класс ферменттері күрделі суббірлікті құрылымдардан тұрады

Олар екі түрлі: модификациялаушы (метилдеуші) және АТФ-ке тәуелді эндонуклеазалық белсенділік қасиеттеріне ие.

2-ші класс ферменттері
✓ **2-кі жеке белоктан: рестрикциялаушы эндонуклеазадан және ✓ модификациялайтын метилазадан тұрады.**

Гендік инженерияда осы класс ферменттерін қолданады.

Осы ферменттер кофактор ретінде магний ионын қажет етеді

Бүгінгі таңда 2-ші класс ферменттерінің 500 аса түрі табылған.

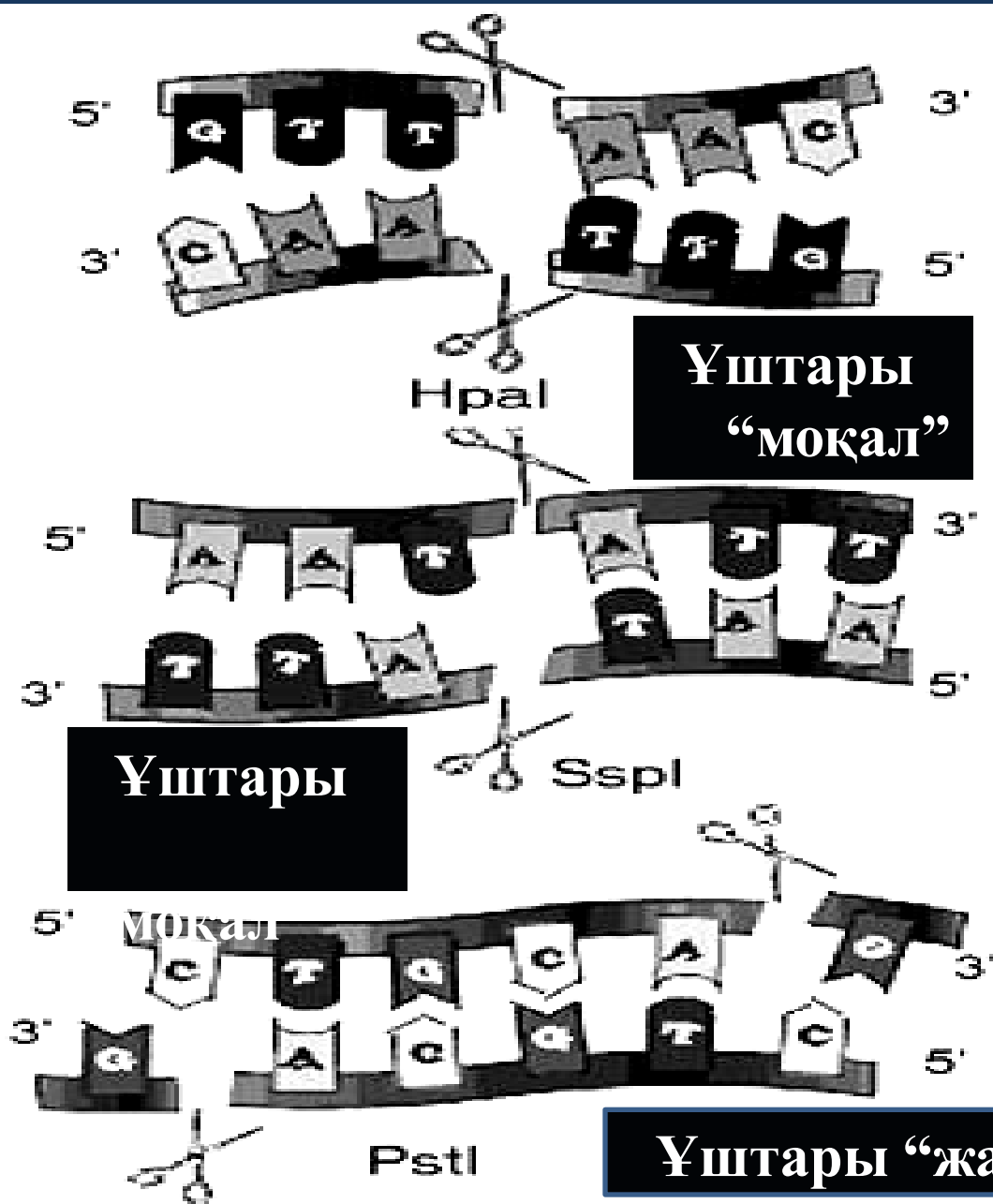
Осы ферменттер көбінесе ДНҚ тізбегіндегі

4 –тен 6-ға дейін нуклеотид жұптарын

таниды.

➤ 4-нуклеотид жұптарын танитын рестриктазаларға - Hpa II , Alu (Arthobacter luteus)

➤ 6-нуклеотид жұптарын танитын рестриктазаларға - Eco R I (Escherichia coli), Hind III (Haemophilus influenzae)



Рестриктазалардың
ДНҚ
молекуласының
нуклеотидтік
тізбектерін қию
түрлері

ДНҚ фрагменттерін тігу



жабысқақ
ұштар
арқылы тігу



моқал ұштар
арқылы тігу



әр түрлі
жабысқақ
ұштарды тігу

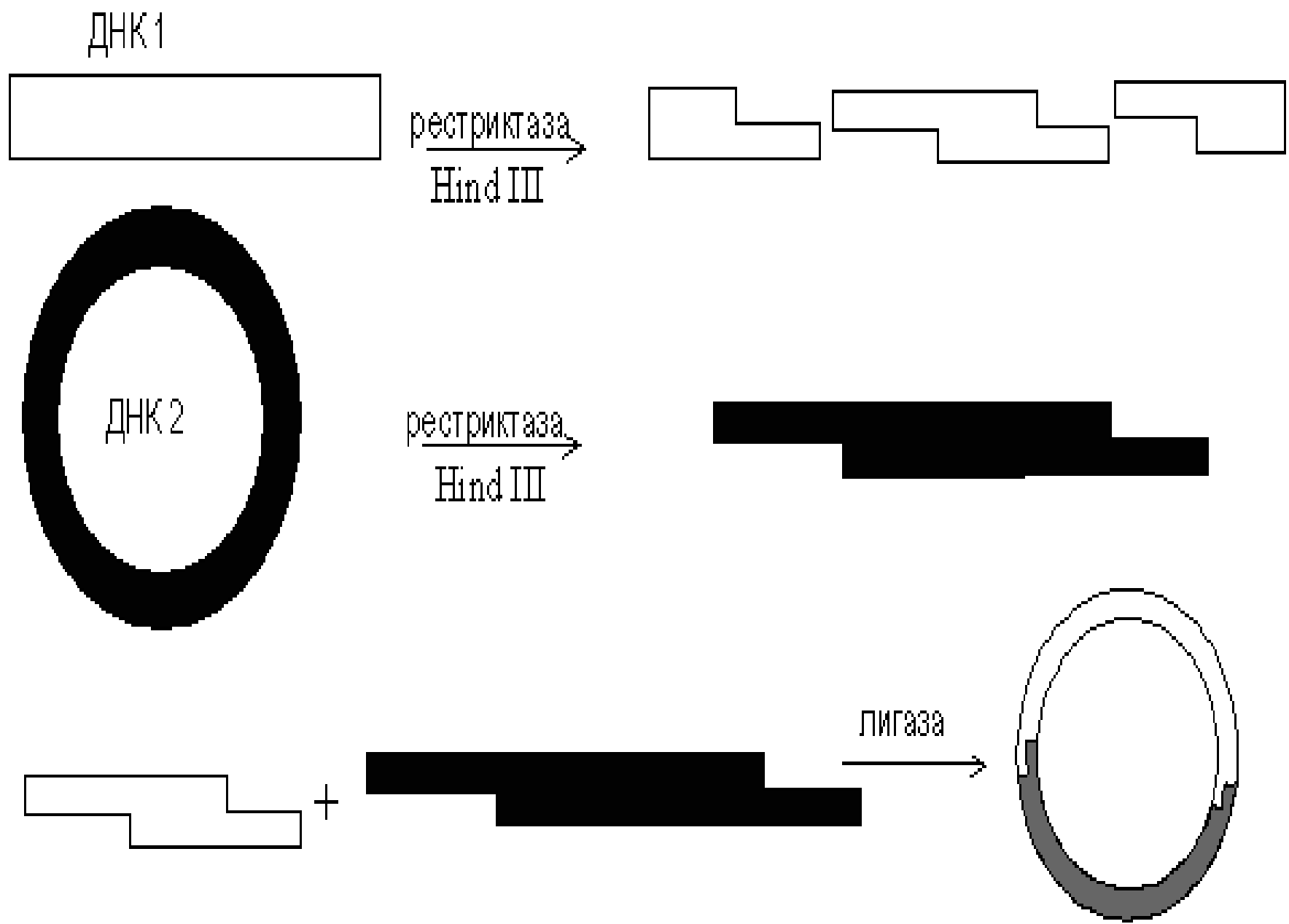
Жабысқак ұштар арқылы тігу
(кең таралған әдіс, С.Козн, 1973 ж.)

➤ Pst I рестриктазалар ДНҚ-н қос тізбегін бірдей қашықтықта, симметриялық көлденең бағытта қияды.

➤ Сондықтан ДНҚ молекуласының қос тізбегі “текпішек” тәрізді, яғни өзара комплементарлы қиылады.

➤ Бұл тізбектердің ұштары “жабысқак” болады. Тізбектер өзара тек комплементарлы ұштарымен жалғанады.

➤ Ал оларды өзара тігу ДНҚ-лигаза ферментімен жүзеге асырады.



ДНК фрагменттерін моқал ұштар
арқылы тігу (коннекторлы әдіс),

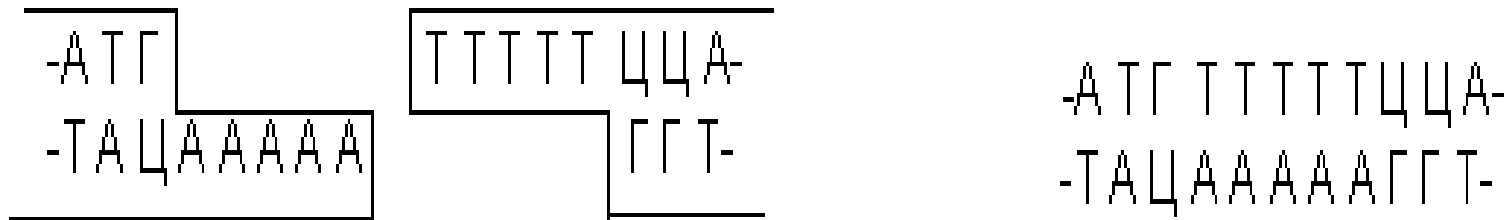
Пол Берг, 1972 ж Стенфорд универ, АҚШ

- Бұл ортада ДНК-лигаза концентрациясы мен ДНК-ның моқал ұштары көп болған жағдайда жүзеге асады. Әдістің тиімділігі біріншіге қарағанда төмен.
- Сонымен қатар, жабысқақ ұштарды моқал ұштарға ферментативтік жолмен жалғауға болады. Ол үшін бұзау тимусынан алынған ұштық трансфераза ферментін қолданады.
- Осы фермент нуклеотидтерді ДНК-ң 3' тізбегіне жалғайды.

- **In vitro** жағдайында құрастырылатын рекомбинантты ДНҚ фрагментіндегі ДНҚ тізбегінің 3¹ ұшына ұштық дезоксинуклеотидилтрансфераза арқылы бір тізбекті белгілі бір ұзындықтағы (dA) олиго сегменттерді, ал екінші фрагменттің ұшына сондай ұзындықта (dT) олиго сегменттерді жалғап, оларды өзара араластыру арқылы бір біріне тігуге болады.

(dA) және (dT) - олиго сегменттер өзара сутектік байланыс арқылы жалғанады.

Ал осы фрагменттердің ковалентті байланысуы ДНК-лигаза ферменті арқылы жүреді.



фрагмент 1

фрагмент 2

«сшитая» ДНК

Тізбектердің ұштары комплементарлы гибрид молекулаларының түзілу эффективтілігі жоғары болады.

ДНК фрагменттерін әр түрлі жабысқақ ұштары арқылы тігу (Шеллер, 1977 ж.)

Әр түрлі эндонуклеазалық рестриктазалар арқылы кесілген ДНК молекулаларының әр түрлі ұштары бар фрагменттерін, яғни комплементарлы емес ұштарын тігу линкерлер (жалғағыштар) арқылы жүргізіледі.

Линкерлер — химиялық жолмен синтезделген олигонуклеотидтер, олар рестрикция сайттарынан немесе олардың комбинацияларынан тұрады.

- **Гендік жалғастырушылардың (линкерлердің) алуан түрлі жиынтығы болады.**
- **Оларды қолданғанда гендік ақпарат экспрессиясының ережесін ескеру керек.**
- **Көп жағдайда линкерлердің ортасына қандайда бір генетикалық элемент, мысалы, промотор несесе рибосомамен байланысқан бөлікті қосады.**
- **Бұл жағдайда линкерлер гендерді өзара жалғап қана қоймай, олардың экспрессиясын да қамтамасыз етеді.**

- Линкерлердің “моқал” – “жабысқақ” ұштары болады.
- Қажет жағдайда линкерлердің “жабысқақ” ұштарын “моқал” ұштарға айналдыруға болады.
- Ол “жабысқақ” ұштарды эндонуклеаза S1 арқылы кесуге болады. S1 тек бір тізбекті ДНҚ тізбегін ғана бұзады.
- Немесе ДНҚ полимераза 1 арқылы бір тібекті ДНҚ –нің жабысқақ ұштарында екінші тізбекті қосады (жалғайды).

ДНҚ молекуласындағы нуклеотидтердің тізбегін анықтау (секвенирлеу) әдісі

Әдістің маңызы:

- ✓ ДНҚ молекуласындағы генетикалық маңызды аймақтарды айқындау;
- ✓ ДНҚ молекуласын секвенирлеу әдісін жетілдіру;
- ✓ Рекомбинантты ДНҚ молекуласын құрастыру.

Артықшылығы

- Рестрикциялық эндонуклеазалармен қиылған, ұзындығы 100-500 нуклеотид жұптарынан тұратын ДНҚ фрагменттерінің нуклеотидтік тізбегін анықтау өте жылдам жүргізіледі.

Секвенирлеу

Химиялық әдіс
(Максим және
Гильберт)

Таңбаланған
изотоп – P^{32}
немесе
флюоресцентті
таңбалар
қолданылады.

Ферментативтік
(Сэнгер) әдіс

ДНК полимераза I

Химиялық секвенирлеу

- Таңбаланған ДНҚ препаратын 4 порцияға бөліп, әр бөлікті реагентпен (реагент - төрт негіздің біреуін немесе екеуін бұзатын қасиетке ие болады) өңдейді. Мұнда әр бір ДНҚ молекуласында бір немесе бірнеше ақау тудыратын жағдай тудыру қажет.
- ДНҚ молекуласын бұзу екі сатыдан тұрады:
- бірінші сатыда - азоттық негіздің модификациясы жүреді;
- Екінші сатыда –негіздер түсіп қалатын ДНҚ аймағын гидролиздейді.
- Нәтижесінде таңбаланған фрагменттер алынады, оларды электорфорезде бөліп алады.

Ферментативтік секвенирлеу әдісі

Клеткада ДНҚ полимераза I репликация процесіне қатысады, яғни ДНҚ синтезделу барысында Оказаки фрагменттерінің арасындағы бос орындарды толтырады.

Пробиркада осы ферменттердің жұмысына ДНҚ-нің ізашарлары – дезоксирибонуклеотидүшфосфаттар (dNTP), бір тізбекті матрица және матрицада қос тізбекті кішігірім аудан затравка (синтездің басталу орны) болуы қажет.

Нуклеотидтердің спецификалық тізбегін
будандастыру арқылы анықтау

(Саузерн бойынша ДНҚ блоттинг әдісі, 1975 ж.)

- ДНҚ молекуласын 100°C қыздырып, рН-13 дейін жеткізсе ДНҚ қос тізбегі денатурацияланады. Мұнда негіздердің арасындағы комплементарды байланыс бұзылады. Бұл қайтымсыз процесс, яғни температураны 65°C түсіргенде ДНҚ қос тізбегі қайта спиральданып қалпына келеді.
- Осы процесті ренатурация немесе будандастыру деп атайды.
- Будандасу процесі өзара комплементарлы кез келген дара тізбектермен жүреді, мәселен:
ДНҚ-ДНҚ, РНҚ-РНҚ, ДНҚ-РНҚ.

- Тест жүргізу үшін таза бір тізбекті ДНҚ-ң фрагменті алынады, ол анықталатын тізбекке комплементарлы болу керек. Ол фрагментті клондау немесе химиялық жолмен алады.
- Индикатор ретінде қолданылатын бір тізбекті – ДНҚ-зонды деп атайды. Ол 15-1000 нуклеотидтерден тұрады. Оларды әр түрлі мақсатта қолданады.
- ДНҚ –зондты анализдейтін клеткадан бөліп алынған РНҚ мен бұдандастыру арқылы ген экспрессиясының бар жоғын анықтауға болады. Егер бұдандасы жүрмесе, ген жұмыс жасамайтыны білдіреді.
- ДНҚ-зонды –тұқым құалайтын ауруларды диагностикалауға қолданады.

- Тұқым қуалайтын ауруларды тудыратын мутациялар рецессивті болады, адам ақауы бар гендерді ата-анасының екеуінен де алған жағдайда аурудың қозуы жүзеге асады.
- Аномальды эмбриондарды ерте анықтаған дұрыс.
- Мысалы гемоглобиннің бэта тізбегінде ГАГ – ГТГ мен ауысқанда орақ тәрізді анемия клеткаларын тудыратын мутант генін экспрессияланады. Бұл жағдайда 20 негізден тұратын олигонуклеотидті синтездеп, радиоактивті таңбамен таңбалайды.
- Амнион сұйықтығы бар эмбрион клеткаларынан ДНК бөліп алып бұдандастыруға қолданады. Егер эмбрион дефектті болса, тест оң болады.

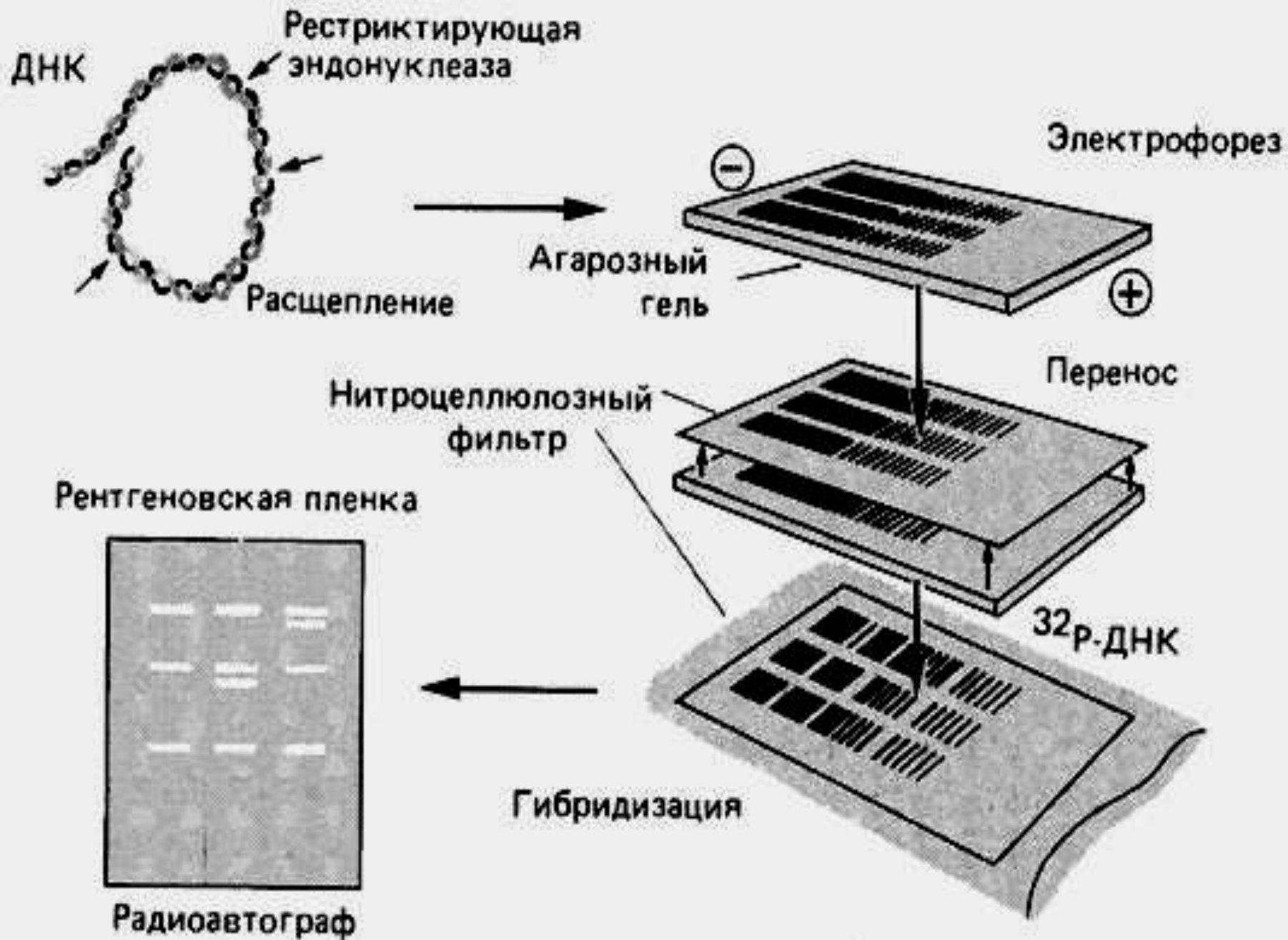
Талдау әдісін жүргізу тәртібі

- Зерттелетін ДНҚ-ны рестриктазалармен гидролиздейді, осыдан кейін оны электрофорезде фракциялайды. Кесілген фрагменттерді нитроцеллюлазалы фильтрге орналастырып, таңбаланған олигонуклеотидтермен бұдандастырады.

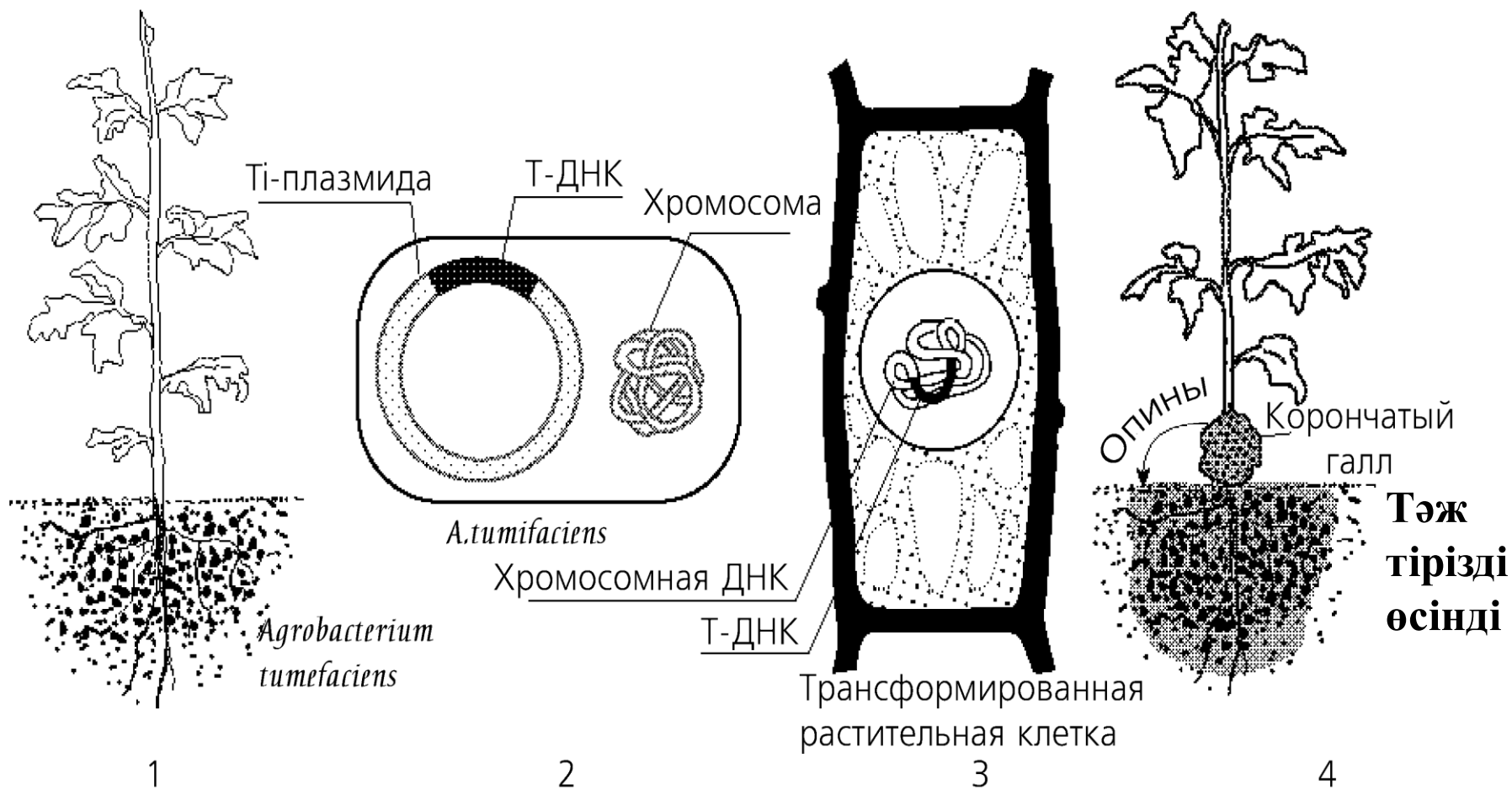
1. ДНҚ молекуласын агароза гелінде электрофорезден өткізді.
2. Гельдегі ДНҚ –ны сілтімен денатурациялайды.
3. Сілтіні нейтралдап, гель пластинкасын нитроцеллюлозамен қаптайды.



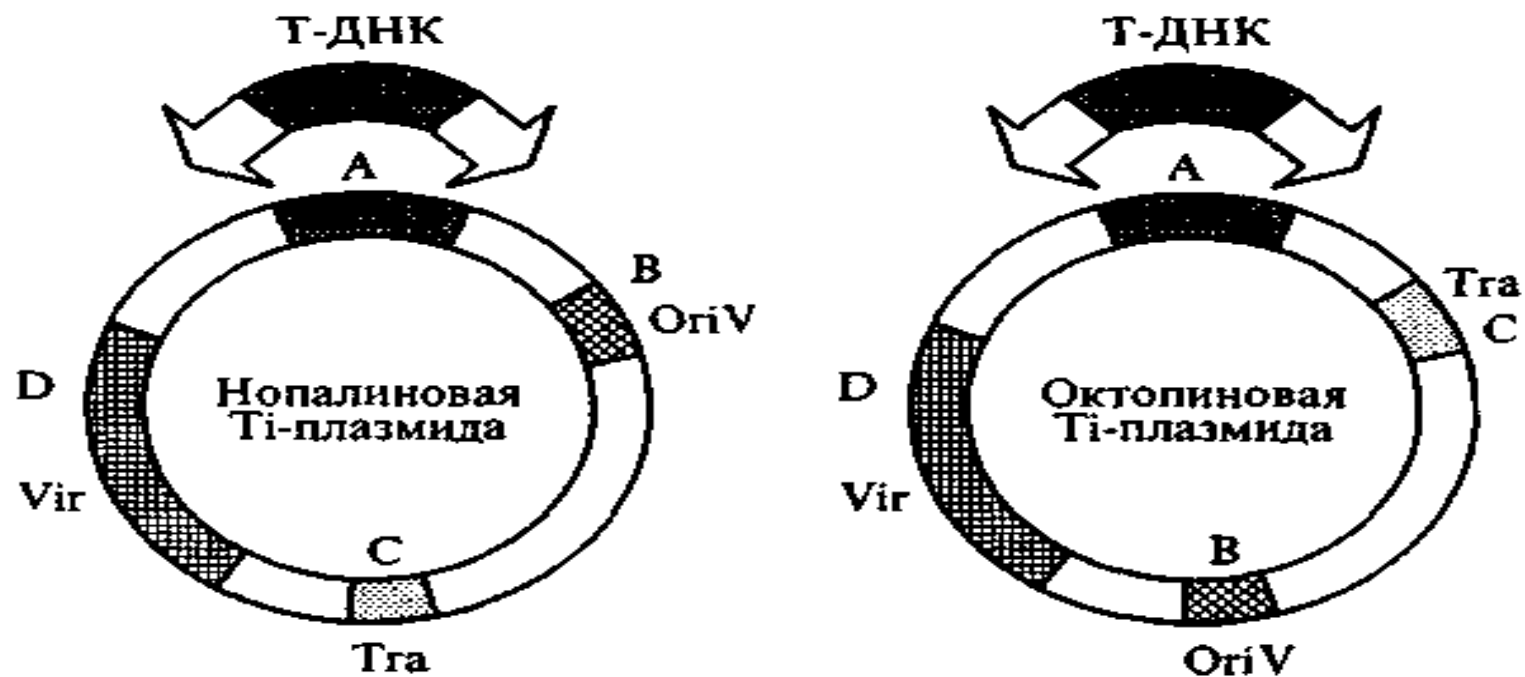
1. Нитроцеллюлозаның үстіне фильтр қағаздарын (бір бума) қояды. Қағаздарға гельден буфер ерітіндісі баяу сіңіріледі,
2. ДНҚ гельден нитроцеллюлозалық фильтрге өтеді. Оны вакуумда 80°C қыздырғанда ДНҚ нитроцеллюлозамен қайтымсыз байланысады (иммобилизденеді).
3. Иммуобилизденген ДНҚ-ны радиоактивті таңбаланған ДНҚ мен бұдандастырады.



ДНК –ні клеткаға Ті және Rі плазмидалар арқылы ендіру

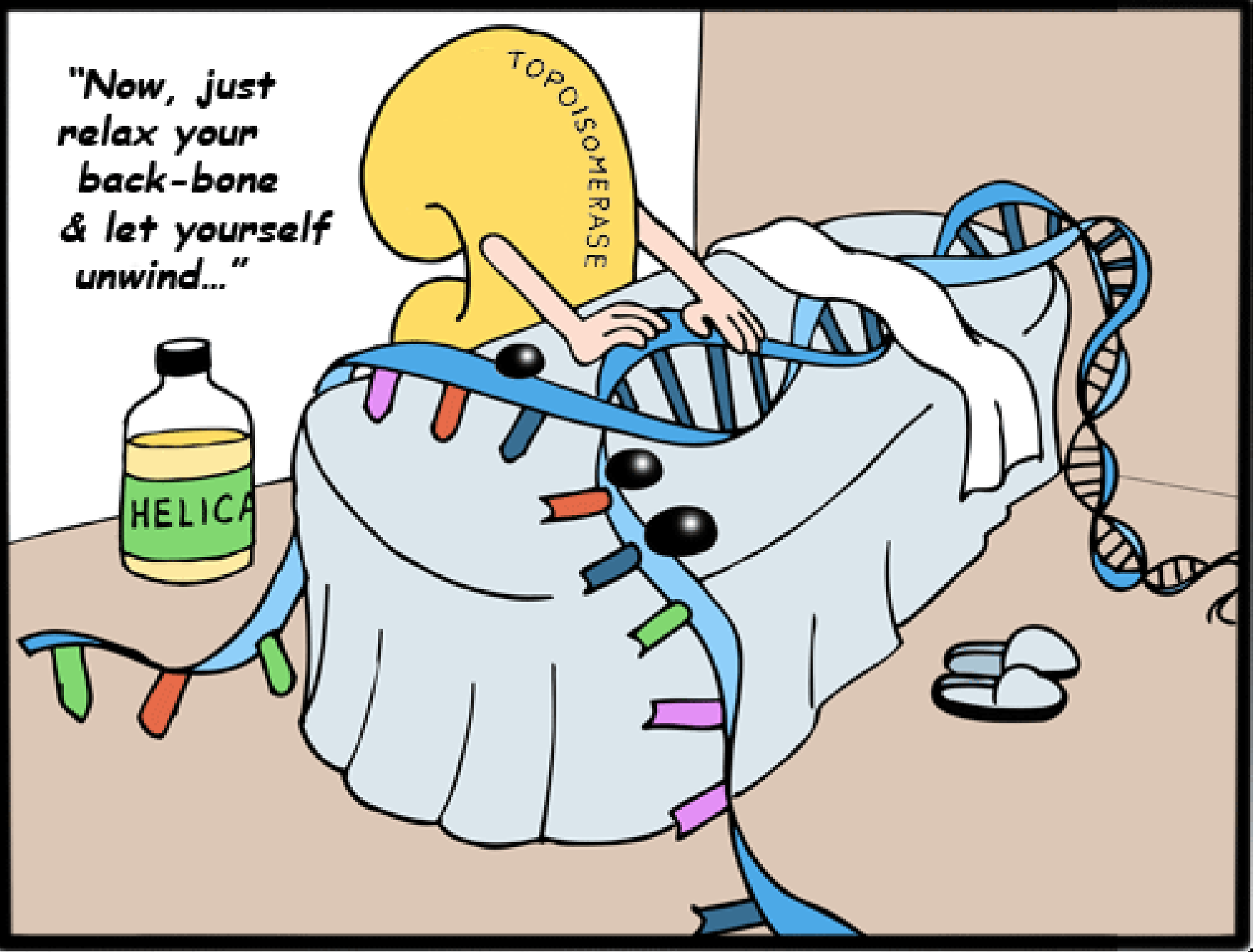


Бактерия штамына байланысты ісік клеткалар окопинді немесе наполинді синтездейді



Нопалинді және октопинді Ті-плазмидалардың құрылыстары

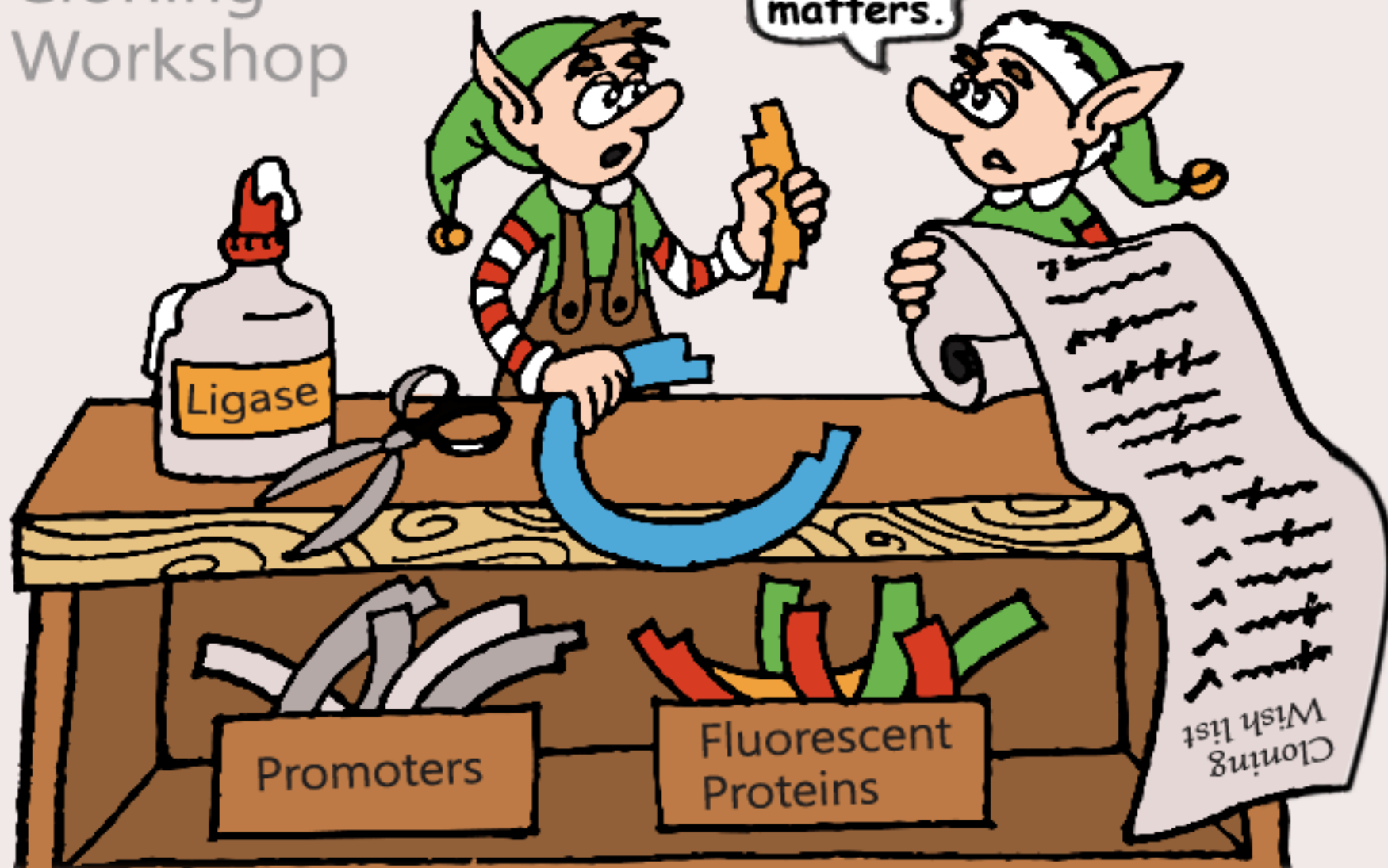
*"Now, just
relax your
back-bone
& let yourself
unwind..."*

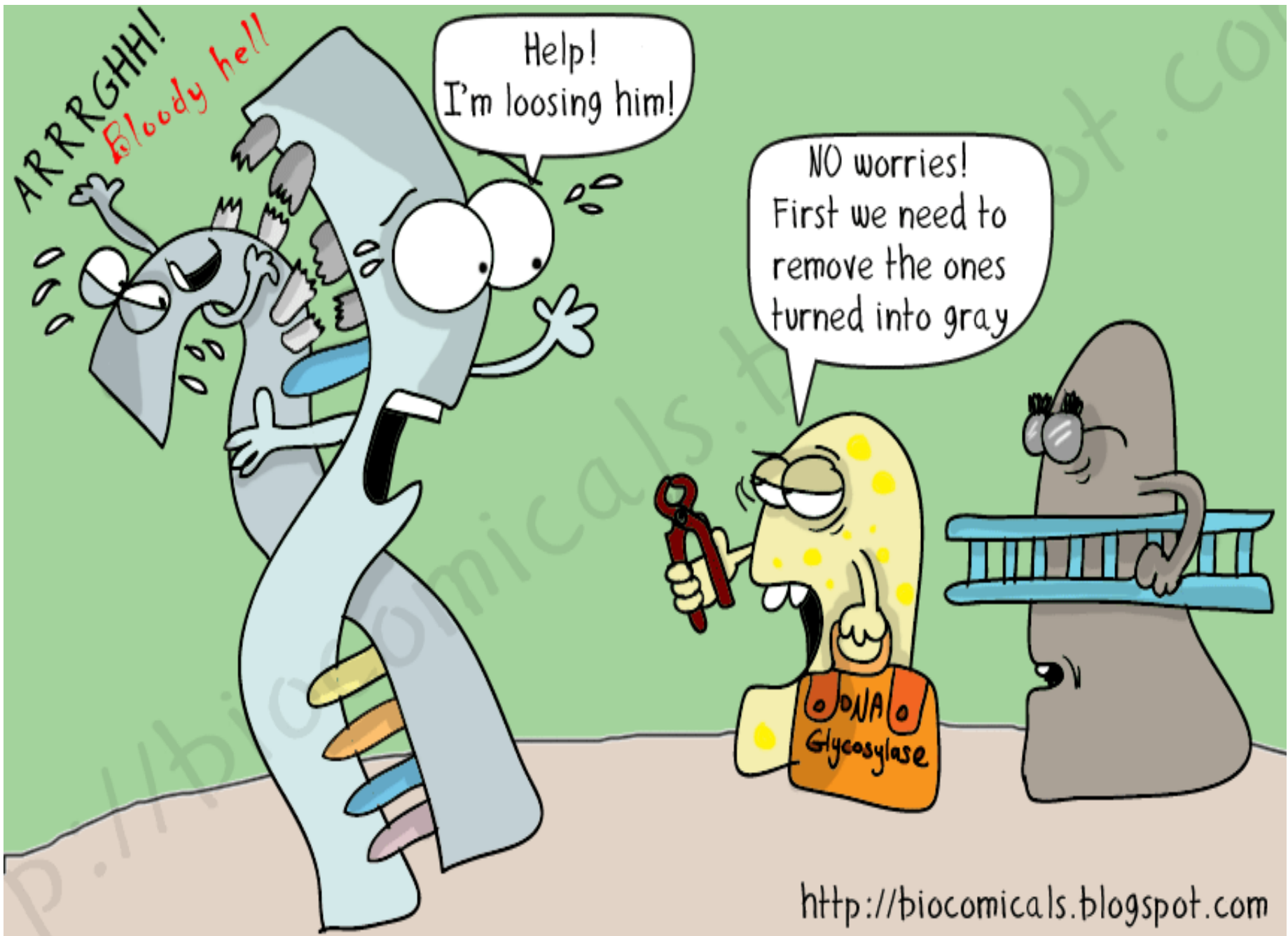


The Cloning Workshop

I wonder which orientation the insert goes in ???

Oh, I doubt it matters.







УХОДЯ!

**ВЫКЛЮЧИ
СВЕТ!**

risovach.ru







dreamstime.com







*Ultraviolet Source
Eye and Skin Hazard*

**DO NOT ENTER ROOM WHEN UV (BLUE)
LIGHTS ARE ON**

GERMICIDAL LAMP

UNIVERSITY OF WASHINGTON ENVIRONMENTAL HEALTH AND SAFETY RADIATION SAFETY (206) 543-0463



**observe cleanliness and order
in the laboratory**





www.shutterstock.com · 21556477



Gene gun Helios™ by BioRad is used to transfect cells in cultures and plant leaves







©2011 Union of Concerned Scientists

SPRINGERS 2011

