

Қазақстан Республикасы білім және ғылым министрлігі
Е. А. Букетов атындағы Қарағанды мемлекеттік университеті
Биология-география факультеті
Ботаника кафедрасы

Гендік инженерия

5B070100-Биотехнология мамандығы үшін.

Курс: 4

Семестр: 7

Машжан Ақжігіт Сембайұлы

№ 1 дәріс

Гендік инженерияға кіріспе.

Жоспары

- I. Гендік инженерия ғылымының даму тарихы
- II. Гендік инженерия шешетін мәселелер
- III. Гендік инженерия пәнінің әдістері

I. Гендік инженерия ғылымының даму тарихы

Ген инженериясы молекулалық биологияның жаңа саласы. Ол лабораториялық әдіс арқылы генетикалық жүйелер мен тұқымы өзгерген организмдерді алу жолын қарастырады. Ген инженериясының пайда болуы генетиканың, биохимияның, микробиологияның және молекулалық биологияның жетістіктерімен байланысты.

Молекулалық биология ғылыми жетістіктерінің нәтижесінде пайда болған ген инженериясы организмнің бағалы қасиетін сақтап қана қоймай оған жаңа әрі саналы қасиет те бере алады. «Инженерия» деген атау құрастыру деген мағынаны білдіреді. Яғни ген инженериясы дегенді ген құрастыру деп түсіну қажет. Ген инженериясының дәуірі басталмай тұрып 1969 жылы Г. Корана нуклеотидтерді белгілі бір жүйемен орналасқан ДНҚ синтезінің методологиясын жасап берген.

I. Гендік инженерия ғылымының даму тарихы

Ген инженериясының дүниеге келген уақыты 1972 ж. деп есептеледі. Сол жылы Т. Берг алғаш рет пробиркада үш түрлі микроорганизмнің ДНҚ-ларының фрагменттерінен жаңа гибридтік ДНҚ құрастырды. Бірақ маймылдың рак вирусының, бактериофагтың және ішек бактериясының гендік ДНҚ-ларынан құрастырылған ол гибридтік ДНҚ-ның клетка ішінде ойдағыдай жұмыс істей алатындығы тексерілмеді, себебі құрамында рак вирусының нуклеин қышқылы болғандықтан ғалымдар тәуекелге бармады.

Клеткада жұмыс істей алатын гибридтік ДНҚ-ны 1973-74 жылдары С. Коэн мен Г. Бойер құрастырды. Олар басқа организмнен бөліп алған ДНҚ фрагментін (генін) бактерия плазмидасының құрамына енгізді. Ол плазмидадағы бөтен гендердің алғаш рет жаңа организм ішінде жұмыс істей алатынын көрсетті. Соның артынша-ақ дүние жүзінің көптеген лабораторияларында жұмыс істей алатын әр түрлі плазмидалар алынды. Совет елінде ондай бөтен гені бар плазмида академик А.А. Баевтың басшылығымен жасалды.

I. Гендік инженерия ғылымының даму тарихы

- 1945-1950 ж.ж. Бірінші рет жануарлар жасушаларының культуралары өсірілді.
- XX ғ. 50 – ші жылдары адам жасушасының бірінші культуралары өсірілді.
- 1970 ж. Г. Смит және В. Арбер рестриктаза бөліп алды.
- 1972 ж. П. Берг С. Коэн, Х. Бойер рекомбинанты *in vitro* ДНК алды, ол SV-40 маймыл ДНК-ның бөліктерінен және *E. coli* мен λ фаг бактерияларының ДНК сынан құрастырылған еді.
- 1975. ж. Ф. Сэнгер ДНК анықтаудың тікелей әдісін ұсынды.
- 1978 ж. Генді-инженериялық инсулин жасалды, ол кәдімгі ақуызға өте ұқсас болды.
- 1978 ж. Англияда бірінші пробиркадағы адам Луиза Браун дүниеге келді.
- 1985 ж. 4 қаңтарында Лондон қаласының бір клиникасында бірінші суррогатты ана атанған миссис Коттон қызды өмірге әкелді.
- 1986 ж. В гепатиты мен көптеген вирустық аруларға қарсы генді-инженериялық вакцина және генді-инженериялық интерферон жасалды.

I. Гендік инженерия

ҒЫЛЫМЫНЫҢ ДАМУ ТАРИХЫ

- 1990 ж. Адамның генетикалық картасын құрастыру үшін халықаралық проект бастау алды. (Human Genome Project)
- 1993 ж. Генетикалық өзгертілген өнімдерді дүкен сөрелерінде сатуға рұқсат берілді.
- 1993 ж. К. Мюллис ПЦР әдісін ойлап тапқан үшін Нобел сыйлығының лауреаты атанды.
- 1995 ж. Бактерия гені *Haemophilus influenzae* толық сиквенделді.
- 1996 ж. Ашытқы санырауқұлағы сиквенделді. (*Saccharomyces cerevisiae*)
- 1997 ж. Я. Уилмут және К. Кэмпбел Рослин Эдинбург институтында жануар эмбрионынан саулық Доллиды клондады.
- 2001 ж. Ауыл шаруашылық өсімдігінің (күріш) бірінші толық генетикалық картасы құралды.
- 2008 ж. 1000 адам геномын сиквендеу бойынша жоба басталды. (1 геномы сиквенделген адам Ф. Крик)
- 2010 ж. Крейг Вентр алғашқы “микоплазма микоидес” *JCVI syn 1.0* ағзасының геномын құрастырды.

II. Ген инженериясы шешетін мәселелер:

- 1) генді химиялық немесе ферментті қолдану жолымен синтездеу;
- 2) әр түрлі организмнен алынған ДНҚ фрагменттерін бір-бірімен жалғастыру (ДНҚ рекомбинанттарын алу);
- 3) бөтен генді жаңа жасушаға векторлық ДНҚ арқылы жеткізу және олардың қызмет жасауын қамтамасыз ету;
- 4) жасушаларға гендерді немесе генетикалық жүйелерді енгізу және бөтен белокты синтездеу;
- 5) бөтен генге ие болған жасушаларды таңдап бөліп алу жолдарын ашу.

III. Гендік инженерия пәнінің әдістері

Ген инженериясында генді мынадай әдістермен алуға болады:

- клеткадағы ДНҚ-дан тікелей кесіп алу;
- химиялық жолмен синтездеу;
- аРНҚ-дан кері транскриптаза арқылы синтездеу.

1. Бірінші әдіс ген инженериясының дамуының алғашқы кезеңінде қолданыла бастады. Белгілі организмнің ДНҚ-сын түгелімен белгілі рестриктазалармен үзіп, қажетті фрагменттер алады. Содан кейін оны клетка ішіне арнайы плазмидалармен енгізеді, Ол үшін плазмиданы да рестриктазалармен үзеді, оған алынған ДНҚ фрагменттерін қосып жалғап, қайтадан бүтін плазмидалар алады. Бұл плазмидалардың әрқайсысының құрамында бір немесе бірнеше бөтен ДНҚ фрагменті (гені) болады, әрі қарай ол плазмидаларды қайтадан бактерияға енгізеді. Осының нәтижесінде бактерия клеткасының әрқайсысында басқа организм генінің, бір түрі болады

III. Гендік инженерия пәнінің әдістері

2. Химиялық жолмен жасанды генді 1969 жылы Г. Корана синтездеген. Бірақ оған жалғасқан промотор тізбегі мен транскрипцияны аяқтайтын кодондар болмағандықтан, ол клетка ішінде ешбір қызмет көрсете алмады. Гендрді химиялық синтездеуге нуклеин қышқылдарындағы нуклеотидтердің орналасу тәртібін анықтау әдісін тапқаннан кейін ғана мүмкіндік туды. Бұл әдістерді тапқан Д. Джильтберт пен Ф. Сэнгер. Ғалымдар генді белоктың құрамындағы амин қышқылдарына қарап отырып синтездеуді де үйренді, (3 нуклеотид — 1 кодон — 1 амин қышқылы деген заңдылық бойынша). Соның ішінде қолдан синтезделген ең ұзын ген, адамның самототропин (өсу) гені, ол 584 нуклеотидтен тұрады. Оны бактериядағы басқа геннің промоторына жалғастырып, плазмида арқылы бактерия клеткасына енгізді. Соның нәтижесінде бактерияның бір клеткасы 3 млн-ға дейін адам самототропин молекуласын жасай алатын болды. Адам инсулині де химиялық жолмен синтезделіп, осы айтылған жолмен бактерияға енгізілді.

III. Гендік инженерия пәнінің әдістері

3. Жасанды әдіспен генді ферменттік синтезге сүйене отырып, кері транскрипция механизмнің көмегімен алуға да болады. Бұл механизм РНҚ-ға тәуелді ДНҚ-полимеразаның немесе кері транскриптазаның (ревертазалар) белсенділігіне байланысты. Бұл фермент ең алғаш он-когендік (залалды ісік) вирустарды зерттегенде табылған. Фермент әртүрлі РНҚ-ларда, синтетикалық полинуклеотидтерді қоса, ДНҚ-ның көшірмесін құра алатын қабілеті бар. Ревертазаның көмегімен, сәйкес аРНҚ-ның қатысуымен, іс жүзінде кез келген бөліп алуы жақсы игерілген генді алуға болады. Бұл әдісті белгілі бір тіндерде (тканьдарда) өте қарқынды транскрипцияланатын гендерге қолдану тиімді.

№ 2 дәріс

Гендік инженерияда қолданылатын ферменттер.

Жоспары

- I. Ферменттер класификациясы.
- II. Рестриктазалар
- III. ДНК-лигаза
- IV. ДНК-полимераза
- V. Кері транскриптаза

I. Ферменттер класификациясы.

- Гендік инженерия молекулалық генетикадан бастау алады, бірақ өзінің пайда болуымен генетикалық энзимология мен нуклейн қышқылдарының химиясының жетістіктеріне міндетті, себебі молекулалық манипуляциялардың негізгі құралы ол ферменттер.
- Гендік инженерияда келесі ферменттер қолданылады:
 - Рестриктазалар
 - ДНК-лигаза
 - ДНК-полимераза
 - Кері транскриптаза

II. Рестриктазалар

- **Рестрикция эндонулеазалары, рестриктазалар** (лат. *restrictio* — шектеу) — Гидролаза классына жататы ферменттер тобы, нуклеин қышқылдарының гидролиз реакциясын катализдейді. Экзонуклеазалардан айырмашылығы, нуклейин қышқылын сонынан емес ортасынан ыдыратады.
- 1953 ж бірнеше зертханада белгілі бір *E. Coli* штаммының ДНҚ-сын басқа штамның жасушасына енгізгенде ол ешқандай генетикалық белсенділік білдірмеді, себебі тез арада кішкентай бөлшектерге ыдыратылып отырған. Ең бірінші 1968 ж рестриктаза ферменттерін тапқан Мезельсон мен Юань, олар оны ішек таяқшасының *EcoK-12* штаммынан бөліп алды. Дәл сондай ферменттерді *E. Coli*-дің *EcoB* штамдарынан табылды. Кейінірек 1970 ж Смит және Вилькос *Haemophilus influenzae*-дан ДНҚ-ның қатал белгілі бір тізбектегі ретін кесетін бірінші рестриктаза ферментін алды.

II. Рестриктазалар

- Рестрикция – белгілі бір тізбекте нуклеотидтер қатарын танып 2 тізбекті ДНҚ-ны бөлшектерге кесу. Осы рестрикцияға қарама қарсы процесс ол модификация. Осы модификация кезінде метилтрансфераза ферменті ДНҚ-ның аденин мен цитозин қалдықтарына метильді топтар қосады дәл рестриктаза ферменті бекейтін жерге. Нәтижесінде метилденген тізбек рестриктаза ферментіне тұрақты болады.

II. Рестриктазалар

- 1973 ж Смит және Натанс рестриктазалардын номенглатурасын ұсынды, ол келесі тармақтардан тұрды :
- ❖ Әр ферменттің атауын құру үшін сол микроорганизім атауының бірінші әріпі қай туысқа жататының ал қалған екі әріпі қай түрге жататының көрсетеді. *Streptomyces albus* - **Sal**, *Escherichia coli* - **Eco**
- ❖ Қажет болған жағдайда серотиптің немесе штамын көрсетіледі, мысалы Eco B.
- ❖ Бір бактериямен кодталатын әртүрлі рестрикция-модификация жүйелері римдік әріппен белігленеді: Hind II, Hind I, Hind III (*Haemophilus influenzae*).
- ❖ Рестриктазалар - R (R Hind III) әріпімен белгіленеді, метилазалар - M (M Hind III) әріпімен белгіленеді.

II. Рестриктазалар

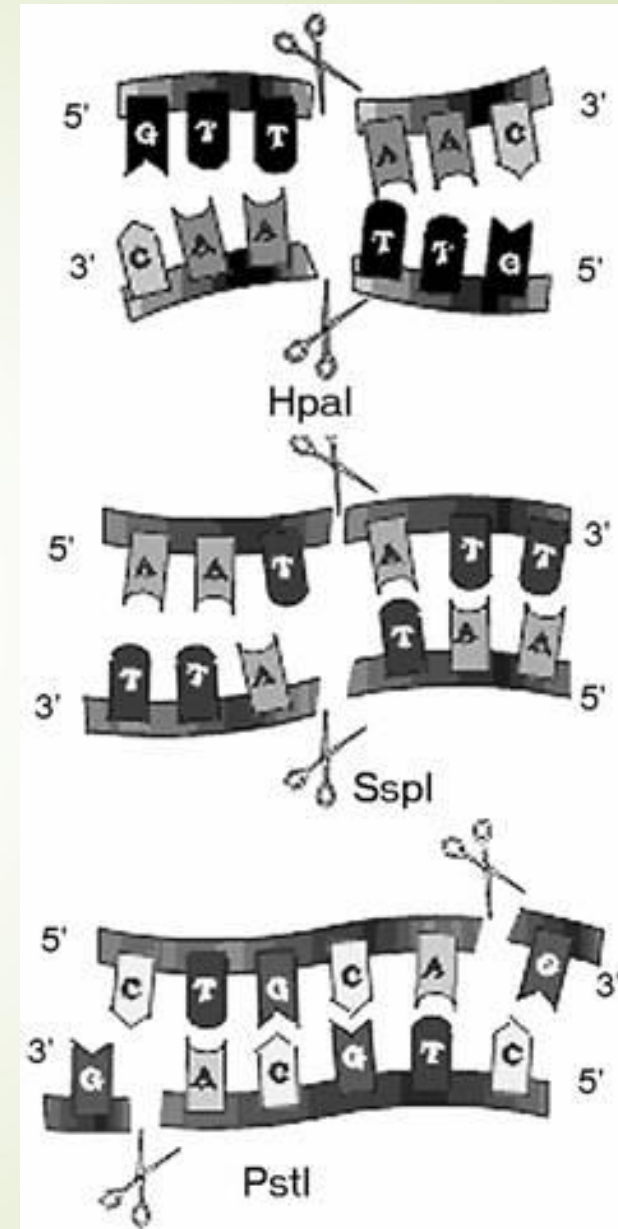
- ❖ Жаңа рестриктазалардың ашылуына байланысты, 1978 ж Робертс номенглатураға өзгерістер енгізді: егер қысқартулар бірнеше фермент атауымен сәйкес келсе, онда бірінші 2 әрпі өзгеріссіз қалып, ал үшінші әрпі түрлік атаудын келесі әріптерінен алынады:

Haemophilus parainfluenzae - Hpi I

Haemophilus parahaemolyticus - Hph I.

II. Рестриктазалар

- Рестриктазалар ДНҚ әртүрлі ыдыратады (1 сурет).
- Біреулері симетрия осі бойынша тура үзілістер жасаса (Hpa I, Ssp I), басқалары жылжытып саты тәрізді кеседі (Pst I).
- Бірінші жағдайда жабысқақ емес ("тупые") ұштар қалыптастырса екінші жағдайда жабысқақ ("липкие") ұштар қалыптастырады және олар бір-біріне комплементарлы ұзындығы 4 нуклеотид аймақтарынан тұрады. Осындай бөлшектер рекомбинанты ДНҚ құрастыру үшін қолайлы.



II. Рестриктазалар

Рестриктазаларды 3 негізгі классқа бөледі.

- 1 –ші класс рестриктазалары ерікті жерлерде үзінділер жасайды. Мысалы осы классқа жататын *EcoK* (*Escherichia coli* K12) рестриктазасы арнайы тізбекті танып 400-700 арақашықтықта кеседі.
- 2 –ші класс рестриктазалары (мысалы *EcoRI*) ұзындығы 4-8 нуклеотидтер жұбынан тұратын полиндромды тізбекті таниды және сол жерде кеседі. (шалаш типті) *EcoRI* гексо (6) нуклеотидті тізбекті танып жабысқақ түптерді қалыптастырып кеседі, ол А мен G арасын кеседі.
- 3 – ші класс рестриктазалары ұзындығы 5-6 нуклеотидтер жұптарын танып ДНҚ-ны тану сайтына 24-27 арақашықтығында кеседі.

II. Рестриктазалар

- 1 және 3 класс ферменттері күрделі суббірлікті құрылымға ие, олар екі белсенділікке ие: модификациялық және АТФ-тәуелді эндонуклеазалық.
- 2 –ші класс рестриктазалары екі бөлек ақуыздан тұрады: рестрикциялаушы эндонуклеазалар және модификациялаушы метилаза, сол себепті осы класс ферменттерін гендік инженерияда кен қолданады. Олар Mg иондарын қажет етеді кофактор ретінде.
- 2- ші класс рестриктазалары мелко және крупно шипящие деп бөлінеді.
- Мелко шипящи – тетра нуклеотид таниды (*Hpa II, Alu*)
- Крупно шипящи гексо нуклеотид таниды (*Eco RI, Hind III*)

II. Рестриктазалар

- Әртүрлі микроорганизімдерден бөлінген ферменттер арасынан ДНҚ-да бірдей (одни и те же последовательности) тізбектерді танып кесетін түрлері де кездеседі, олар Изошизомерлер деп аталады.
- Изошизомерияның шынайы және жалған түрлерін ажыратады. Шынайы түрінде фермент бірдей тізбектерді танып дәл сол жерден кеседі, жалған түрінде бірдей тізбектерді танып сол тізбектің басқа жерінде үзіліс жасайды.

II. Рестриктазалар

Рестриктазаның әсер ету механизімі және ДНҚ-ны метилдеу системасы.

Рестриктианың нысана ретінде көбіне 4-6 полиндромды жұп негіздер қолданады (типа шалаш). Рестрикция реакциясы екі сатыда жүреді. Бірінші ДНҚ-ны бір тізбегі кесіледі, кейін екінші тізбегі кесіледі. Кесілген жерлерде экзонуклиазалық дегродация жүруі мүмкін, сол жерлерде АТФ-тың күшті гидролизі жүреді.

- Толық метилденген сайт рестрикцияға да модификацияға да тәуелді емес.
- Жартылай метилденген сайт рестрикция ферменттерімен танылмайды, бірақ метилаза көмегімен толық метилденуі мүмкін.
- Метилденбеген сайт рестриктаза ферментінің немесе метилаза ферментінің субстраты болады.

III. ДНК-лигаза

- **Лигаза** (лат. *ligāre* — тігу, біріктіру) әртүрлі молекулалардың (белоктардың, нуклеин қышқылының, пептидтердің т. б.) бір-бірімен қосылуына катынасатын ферменттер тобы. Табиғатта кең тараған, ақуыздарды, липидтерді, көмірсуларды түзуде үлкен роль атқарады. 100-ден астам лигазалар белгілі. Кейінгі кезде олар нуклеин қышқылдарын «тігу» үшін биотехнология саласында айрықша қолданылып жүр. Олар өзгеше биологиялық қасиетке ие жаңа ген жасауда да өз орнын алады.
- ДНК-лигаза — қос тізбекті ДНК-ның біреуі үзіліп қалғанда фосфодиэфир байланысты 5'- фосфорилді және 3'- гидроксилді топтар арасында қалыптастырып, үзілген жерді "тігеді. Осы байланысты қалыптастыру үшін лигазалар АТФ-тің пирофосфарилді байланысының гидролиз энергиясын қолданады. Ең кең тараған қол жетімді коммерциялық фермент ол Т4 бактериофагінің ДНК-лигазасы.

III. ДНК-лигаза

- Гендік инженерияда ДНК-лигазаның екі түрін қолданады. Олар бір-бірінен әсер етуі және кофакторды қажет етуі жағынан ерекшеленеді.
- *E. Coli*-дің ДНК-лигазалары кофактор ретінде дифосфопиридинуклеотидті қажет етсе, ал Т4-фагтың лигазасы Mg^{2+} иондарын қажет етеді. Т4-фагтың лигазасы универсалды, себебі ол жабысқақ түптерді байланыстырып қана қоймай, жабысқақ емес екі тізбекті ДНК бөлшектерінің бірігуін де катализдейді, сол себепті ол жиірек қолданады.

IV. ДНК-полимераза

- Бірінші рет ДНК-полимераза 1958 ж E. Coli-дан Коренберг және қызметкерлермен бірге бөлініп алынды.
- ДНК-полимераза — ДНК репликациясына қатысатын фермент. Бұл класс ферменті ДНК-ның нуклеотидтер тізбегінің бойында дезоксирибонуклеотидтердің полимеризациясын катализдейді, оны фермент оқып шаблон ретінде қолданады. Бұл фермент молекулалық салмағы 103 кДа болатын мономерлі полипептидті тізбектен тұрады және 3 доменді құрылымнан тұрады, әр домен өзіне тән ферментативті белсенділіктен тұрады.

IV. ДНҚ-полимераза

- 1. 5'-3' полимеразалық белсенділікке ие. Реакция үшін бір тізбекті ДНҚ-матрица және осы бөлікке комплементарлы 3'-ОН сонымен праймер фрагменті қажет.
- 2. 3'-5' экзонуклеазалық белсенділікке ие. 3'-ОН сонынан біртізбекті, екітізбекті ДНҚ-ны гидролиздейді. 3'-5' экзонуклеаза ДНҚ-синтезі кезіндегі қателіктерді жояды. 3'-5' экзонуклеаза ДНҚ-ның тек қана бірікпеген бөліктерінде диэфирлі байланыстарды ыдыратады.
- 3. 5'-3' экзонуклеазалық белсенділікке ие. Бос 5'-сонынан бастап екі тізбекті ДНҚ-ның бір тізбегін (цепь) деграциялайды. 5'-3' экзонуклеазаның 3'-5' экзонуклеазадан айырмашылығы 5'-3' экзонуклеаза ДНҚ-ның тек қана біріккен бөліктерінде диэфирлі байланыстарды ыдыратады, оған қоса 3'-5' экзонуклеаза бір мезетте бір нуклеотидті кесе (расщеплять), 5'-3' экзонуклеаза 5'-сонына ұзындығы 10-қалдықтан тұратын олигонуклеолитдерті кесе алады.

V. Кері транскриптаза

- **Ревертаза** — кері транскриптаза. Кері транскрипция (яғни РНҚ негізінде ДНҚ түзу) жүргізетін фермент. Өте сирек фермент, ол тек ретровирустардың құрамында табылған. Трансферазалар тобына жатады. Оның әсерінен ең алдымен РНҚ — ДНҚ буданы пайда болады, одан соң ДНҚ-полимеразасының катынасуымен ДНҚ түзіледі, ол тізбек екі есе көбейеді. 1964 ж Темин РНҚ-матрицасында комплементарлы ДНҚ синтездейтін вирусспецификалық фермент бар екендігі жәйлі гипотеза ұсынды. Көптеген таппыныстардың нәтижесінде 1970 ж Темин мен Мизутани және олардан тәуелсіз Балтимор іздеген ферментті “Раус саркома” вирусының клеткадан тыс вириондарының припаратынан табады.

V. Кері транскриптаза

Кері транскриптаза үш ферментативті белсенділікке ие.

1. ДНК-полимеразалық, ол матрица ретінде ДНК-ны да РНҚ-ны да қолданады.
2. РНҚаза Н белсенділігі, РНҚ-ДНК гибрид құрамында РНҚ-ны гидролиздейді, бірақ бір немесе екітізбекті РНҚ-ны емес.
3. ДНК-эндонуклеазалық белсенділік.

Бірінші екі белсенділік вирустық ДНК-ны синтездеу үшін қажет, ал эндонуклеаза вирустық ДНК-ны қожайын жасушасына енгізіп синтезді бастау үшін қажет деп есептеледі, себебі ревертазаға басқа ферменттер секілді қысқа екі тізбекті аймақ қажет. (Праймер ретінде)

V. Кері транскриптаза

- Кері транскрипция реакцияларын арнайы тандалған жағдайларда және РНҚазалық белсенділікке ие күшті ингибиторларды қолдану арқылы іске асырады.
- Матрица ретінде кДНҚ-ның бірінші тізбегі (цепь) қолданылады. Бұл реакция ревертазамен немесе *E. Coli*-дің ДНҚ-полимераза I көмегімен де катализдеуге болады. Синтез аяқталғанан кейін пайда болған екі тізбекті кДНҚ-ны клоңдалған векторға тасымалдауға болады.

№ 3 дәріс

Векторлар

Жоспары

I. Векторлар және оларға қойылатын талаптар

II. Вектор түрлері

I. Векторлар және оларға қойылатын талаптар

- *Вектор* деп бөтен генетикалық материалды (ДНҚ фрагментін) клеткаға (реципиенттің) тасымалдауға қабілетті ДНҚ молекуласын айтады. Векторлар — ген тасығыштар, ал вектор деген сөздің өзі бағыттағыш деген мағынаны білдіреді.
- ДНҚ молекуласын векторсыз, мысалы, бактериялық клеткаға енгізсе, онда оларды бактериялық ферменттер ыдыратып жібереді. Кейбір жағдайда ДНҚ сақталуы мүмкін, бірақ клетканың бөлінуінде олар тұқым қуаламайды. Осындай жағдай болмас үшін векторлық молекулалар қолданылады.

I. Векторлар және оларға қойылатын талаптар

Векторларды эксперименттік жолмен құрастырады және оларға келесі талаптар қойылады:

- 1) Репликация сайты (Ori);
- 2) құрамында рестриктазалар танып, үзе алатын нуклеотидтер тізбегі болуы керек, әйтпесе векторға ДНҚ фрагментін енгізу мүмкін емес;
- 3) оның, бір немесе бірнеше таңбаланған гендері (маркерлері) болуы керек, сол таңбалар бойынша қажет геннің клетканың (реципиенттік) ішіне енгенін анықтайды;
- 4) вектордың, клетка ішіндегі көшірмелері жеткілікті мөлшерде болуы керек.
- 5) Мөлшері үлкен болмауы тиісті.
- 6) Вектордың көбиюіне жасуша ішінде ештеңе бөгет жасамауы тиісті.

I. Векторлар және оларға қойылатын талаптар

Векторлық молекуланың шығу көзі болып бактериялық плазмидалар мен вирустар (әсіресе фагтар) саналады.

Векторлардың негізгі 6 түрі бар.

- 1. Плазида
- 2. Космида
- 3. Фазмида
- 4. Шаттл вектор
- 5. Жасанды бактериалды хромосомалар
- 6. Жасанды ашытқы хромосомалар

1. Плазмида

- Плазмидалар — хромосомадан тыс репликацияланатын ДНК молекуласы. Плазмидалар көбінесе бактерияларда кездеседі, ол екі тізбекті сақина молекулалары. Вектор ретінде мөлшері 15—20 мың н. ж. дейінгі, көбінесе 2-ден 10 мың н. ж. құралған кішігірім плазмидалар қолданылады. Плазмидалық векторлар генді бактерияларға тасымалдап, оның тиімді жұмысын қамтамасыз ете алады. Плазмида терминің ең бірінші рет америкалық молекулалық биолог Джошуа Ледербергпен 1952 ж. ұсынылды.

1. Плазмида

□ Мөлшері және саны

Кейбір плазмидалардың жасушадағы саны 10-100 көшірме (copies) оларды көп көшірмелі плазмидалар д.а.

Егер жасушада көшірме саны 1-4 аралығында болса оны аз көшірмелі плазмида д.а.

□ Геометриясы

Плазмидалардың көбісі сақиналы (кольцевые) болсада тізбекті (линейные) плазмидасы бар бактерияларда кездесіді.

Плазмида	Иесі	Плазмида мөлшері (мың н.ж)	Геометриясы	Жасушада плазмиданың көшірмелер саны
pUB110	<i>Bacillus subtilis</i>	2,3	Сақиналы	20—50
ColE1	<i>Escherichia coli</i>	6,6	Сақиналы	10—30
lp25	<i>Borrelia burgdorferi</i>	24,2	Тізбекті	1—2

1. Плазмида

□ Плазмиданы жасушаға тасмалдау жолдары.

1. Конъюгация

2. Трансдукция

3. трансформация

1. Плазмида

Плазмидалар қызметі

Плазмидалардың көбісі иесінің фенотипінде айтарлықтай өзгерістер әкелмейді. Басқалары керсінше жасуша иесіне белгілі бір қоршаған ортада тірі қалуға көмек беретін қасиетер болуына жауапты.

1. Плазмида

Плазмидалардың жасушадағы қызметі әралуан түрлі, оларға келесілер жатады:

- Гемолизин синтезі - *Hly-плазмида*;
- Ауыр металдарға төзімділік;
- Энтеротоксиндердің синтезі - *Ent-плазмида*;
- УФ – төзімділік;
- Антиген синтезі – антиген колонизациялаушы плазмидаоар;
- рестрикция-модификация жүйелері;
- Камфораны ыдарату (*SAM n.*), ксилолды (*XYL n.*), салицилатты (*SAL n.*) (*Pseudomonas* кейбір штамдарынан табылған).

1. Плазмида

- F-плазмида - *Escherichia coli* K-12 жасушасының конъюгативті эписомасы, бактериялардың жыныстық көбиюінің біртүрлі – конъюгацияға қатысатын жасушалық элемент. Сақиналық ДНҚ-ның мөлшері 94,5 мың н.ж. Ода өзінің репликация бастайтын сайты - *oriV* және ұзу нүктесі бар – *oriT*.
- R-плазмида- сақиналы екі тізбекті ДНҚ молекуласы, бұл плазмидада репликация механизмі және жасуша реципиентке резистенттілік қасиетін беруге жауапты гендері бар, бұдан басқа белгілі бір антибиотикке тұрақтылық көрсететін гендері бар.
- Col-плазмида – колицин деген ерекше ақуыздарды синтездейді, басқа бактериялардың өсуі мен көбиюін тежейді бірақ оны өндіруші бактерияға зиянсыз. Бұл феномен 1925 ж. А. Gratia *E. coli*. Штаммынан табады.

1. Плазмида

Плазмида	Иесі	Мөлшері (мың. н. ж.)	Қызметі
pT181	<i>Staphylococcus aureus</i>	4,4	Тетрациклинге төзімділік
ColE1	<i>Escherichia coli</i>	6,6	Колицин түзілуі және оған төзімділік
pMB1	<i>Escherichia coli</i>	8,5	рестрикция- модификация жүйелері
pGKL2	<i>Kluyveromyces lactis</i>	13,5	Киллер-Плазмида
pI258	<i>Staphylococcus aureus</i>	28,0	Ауыр металдардың иондарына төзімділік
pX01	<i>Bacillus anthracis</i>	181,7	Энтеротоксиннің синтезі

1. Плазмида

- Плазмидаларды классификациялайтын бірнеше системалар бар, олар келесі ерекшеліктерге негізделген:
- топология (тізбекті немес сақиналы),
- Репликация механизмі бойынша,
- Плазмидадағы маркерлік гендерге байланысты,
- Көшірмелерге байланысты,
- конъюгативті / конюгативті емес.

2. Космида

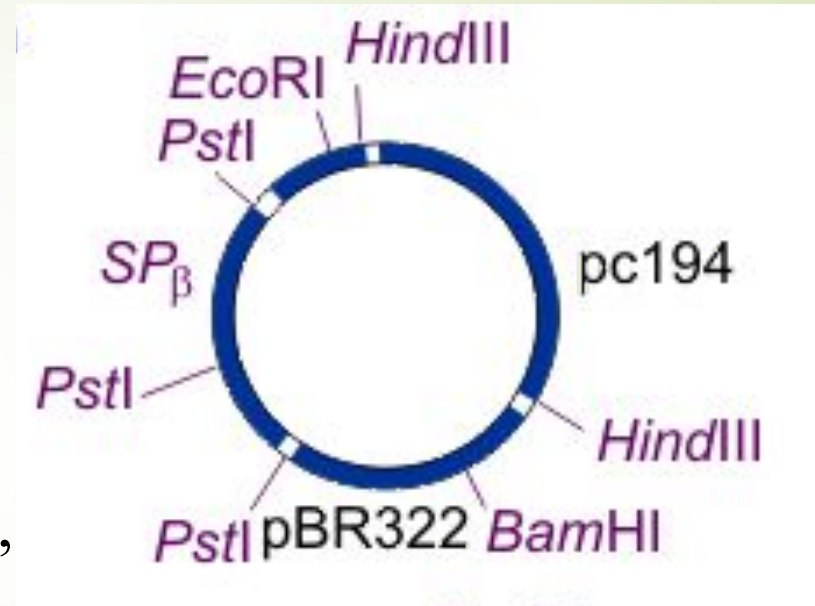
- Космида (Cosmides) — құрамында лямбда фагтың ДНҚ сының фрагменті және cos-телімі (участок) бар плазмида. Гендік кітапханалар құру үшін қолданылады. Космидаларды бірінші рет 1978 ж. Коллинс және Брюнинг құрастырады. Космида көмегімен 32-47 мың н.ж болатын мөлшердегі ДНҚ-ны тасмалдауға болады, салыстырмалы түрде плазмида көмегімен тек 4-5 мың н.ж мөлшерде ДНҚ-ны ғана тасмалдауға болады. Оған қоса космидалар фагты бөлшектерге оралады, бұл оларды трансдукция көмегімен бактерияға енгізуге мүмкіндік береді, және космида жасанды түрде құрастырылады.

3. Фазмида

- Фазмида (phasmid) [грек. *pha(gos)* — жеуші және *plasma* — құрастырылған] — гибридті вектор, фаг және плазмида геномының бөліктерінен құралған. Фазмидаға бөтен ДНҚ-ны еңгізгенен кейін бір жағдайларда фаг ретінде, басқа жағдайларда плазмида ретінде дамиды.

4. Шаттл вектор

- Рекомбинанты вектор, прокариот және эукариот жасушаларында репликациаланатын аймақтары бар. Мысалы рFN7 плазмидасы екі репликон біріктіруінен пайда болған, біреуі *B. Subtilis* –тің рC194 плазмидасынан бастау алса, екіншісі *E. Coli* - рBR322 плазмидасы, бұл қасиет векторға *E. Coli*-де және *B. Subtilis*-де репликациялануға мүмкіндік береді.



5. Жасанды бактериалды хромосомалар

ВАС F-фактордың репликация инициация нүктесі мен екі жас жасушаға плазмидтердің ажыратылуын қамтамасыз ететін плазмидтік векторлар. ВАС плазмидтерді бактериялық хромосомадан бөліп алу оңай. ВАС-тар ұзындығы 100-3000 кб болатын рекомбинатты ДНҚ-ны қабылдай алады. ВАС адам геномы жобасында хромосомалардың үлкен бөліктерін клондау мен секвенирлеу кезінде қолданды.



6. Жасанды ашытқы хромосомалар

S. Cerevisiae үшін экспрессияланатын 3 вектор түрі бар:

1. Эписомалық, немесе плазмидалық векторлар (YEps)
2. Интеграциялық векторлар (Yips)
3. Жасанды ашытқы хромосмалары (YAC)

6. Жасанды ашытқы хромосомалар

1. Плазмидалық векторлар секреттелетін және секреттелмейтін гетерологиялық ақуыздарды алу үшін кен қолданылады. Бірақ плазмида негізіндегі экспрессия системалары жасушаны үлкен көлемде (>10 л) өсірген кезде тұрақты болмайды.
2. Экспрессиялаушы вектордың хромосомалық ДНҚ-ға интеграциясы кезінде стабилді рекомбинатты ағза пайда болатына қарамастан екінші типті вектор кен қолданыс таппады, себебі клондалған геннің көшірмелер саны хромосомаға бір генмен шектеледі, басқа сөзбен айтқанда ақуыздың шығымы төмен болады.
3. *E. coli* жасушаларында өсірілген және ашытқы (*S. Cerevisiae*) жасушаларына енгізілген кіші плазмидалар. ҮАС экариотты хромосоманың кішкентай моделі. ҮАС-тар құрамына репликация ориджині, селективті маркерлер мен клетка бөліну процесінде ҮАС-тың жаңадан пайда болған клеткаларына сегрегациясын қамтамасыз ететін 2 теломера мен 1 центромера кіреді. Бөтен ДНҚ фрагменттері ҮАС-тың ортасында орналасқан рестрикция сайттарына енгізіледі. ҮАС-тар ұзындығы 200 кб-дан (1 кб = 1000 н.ж) 2 мегабазға (1 мб = 1 миллион н.ж) дейін үлкен ДНҚ фрагменттерін енгізуге мүмкіншілік береді. ҮАС-тар ВАС-тар секілді адм геномы жобасында маңызды рөл атқарды.

№ 4 дәріс

Геннің химиялық синтезі.

1. Ашылу тарихы.
2. ДНҚ Синтезатор
2. Химиялық синтездің фосфорамидиті әдіс

1. Ашылу тарихы.

Берілген нуклеотидтер тізбегі бойынша ДНҚ - синтездеу әдісін 1969 жылы Г. Корана ұсынған болатын. Ашытқы тРНҚ-ның гені осылай синтезделді. Бұл ген 77 н. ж. құралған. Алдымен, ұзындығы 5—12 нуклеотидтерден тұратын ДНҚ-ның қысқа фрагменттері синтезделді, одан соң олар арнайы ферменттің (лигаза) әсерімен бір-бірімен қосылды. Алайда, алғаш синтезделген бұл генді ішек таяқшасының клеткасына енгізген кезде жұмыс істей алмады, өйткені онда реттеуші элементтер — промотор және терминация бөліктері жоқ болатын. Кейін, 1976 ж. Г. Корана қызметкерлерімен тирозиннің тРНҚ-ының генін синтездей алды. Геннің ұзындығы 126 н. ж. тең болды, оған 52 н. ж. құралған промотор, 21 н. ж. — терминатор және ұштарына тетрануклеотидтер (ААТТ және ТТАА) жалғанды. Нәтижесінде, осы генді бактериофаг арқылы E. Coli клеткасына енгізгенде олар өз функциясын көрсете алды.

2. ДНҚ Синтезатор

Қазіргі кезде гендерді автоматты синтездейтін құралдар бар. 1980 ж. Итакура алғаш өзі алдын ала берілген тізбек бойынша 6 сағ. ішінде 12-н.ж. тұратын олигонуклеотидті синтездеуге қабілетті автоматты жұмыс істеуші компьютерді қолданды. Мұндай жабдықтардың 1982 жылғы бағасы 36000—39500 долларға тең болатын. Егер 1979 жылы 120 н. ж. генді синтездеу үшін екі жыл керек болса, ал 1981 ж. бұл мақсатқа үш күнде жетуге болды.

ДНК синтезатор. (Biosset)



2. Химиялық синтездің фосфорамидиті әдісі

Кәзіргі уақытта химиялық синтездің ең кең атарлған әдісі. Бастапқы құрушы блоктар ретінде модификацияланған дезоксирибонуклеозидтер болып табылады. Синтез 8 сатыдан тұрады.

2. Химиялық синтездің фосфорамидиті әдісі

1. Бірінші нуклеозидті қатқыл (твердый носитель) тасымалдаушыға бекіту.

2. Шаю (Отмывание).

3. ДМТ ыдырауы.

4. Шаю.

5. Активтендіру және біріктіру.

6. Шаю.

7. Кэппирлеу.

8. Тотығу.

Олигонуклеотидтің босауы

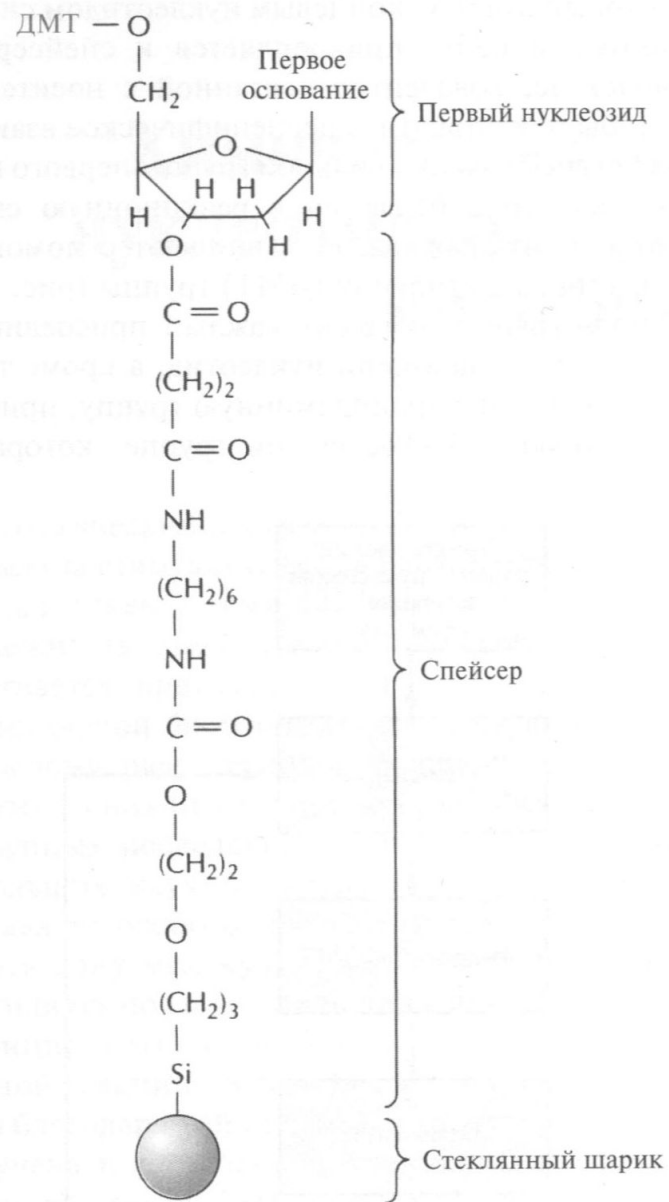
Тазарту

N
цикл
дер

2. Химиялық синтездің фосфорамидиті әдісі

1. Синтездің бірінші сатысында өсіп келе жатқан ДНҚ тізбегі қатқыл инерты тасымалдаушыда бекітіледі, көбінесе санылаулы шыны шариктер қолданылады. Осының арқасында барлық реакцияларды бір ыдыста іске асыруға мүмкінді береді, яғни әр этаптан кейін қажет емес реагенттерді шайып жаңа реагенттерді қосу секілді процестерді іске асыруға мүмкіндік береді.

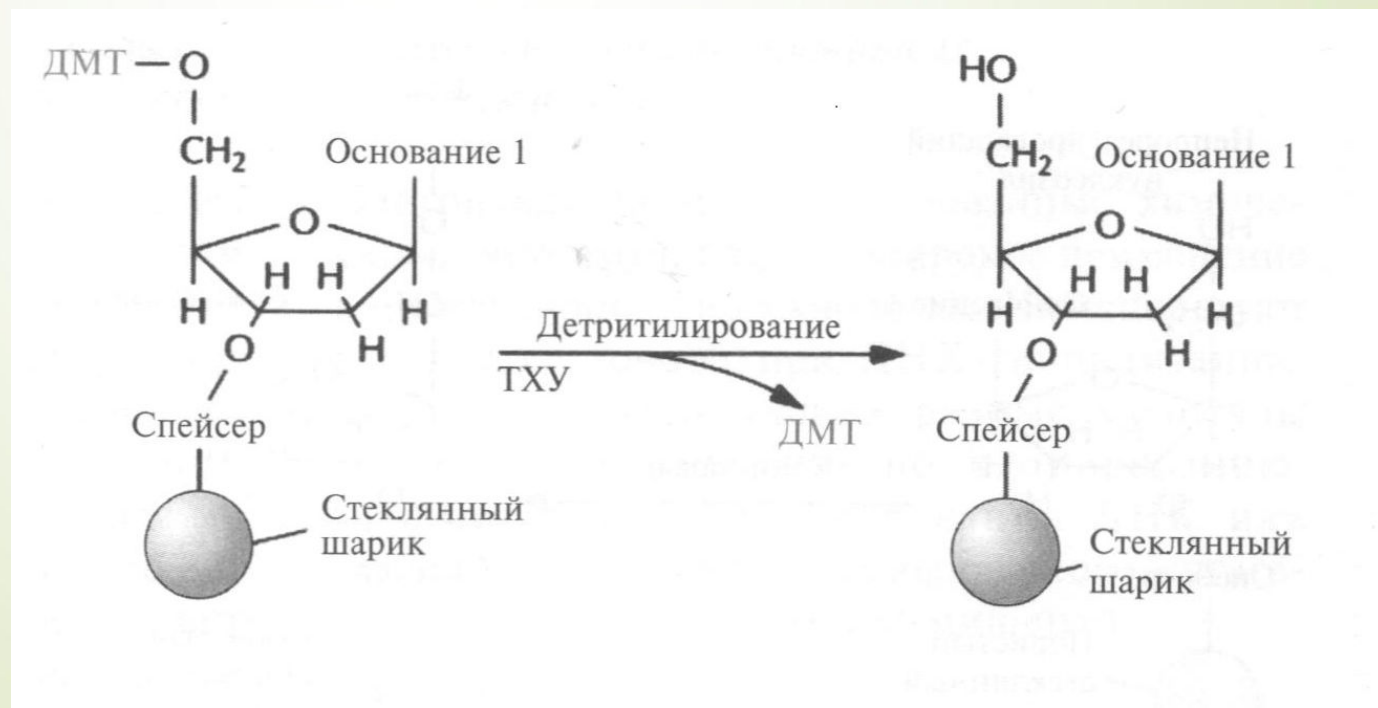
Спецификалық емес байланыстарды болдырмас үшін екінші нуклеотидті реакциялық қоспаға қоспай тұрып бірінші нуклеотидтің 5'-гидроксильді тобына (ДМТ) диметокситритильді топпен қорғайды. Бұл топт әр келесі қосылған нуклеотидте болады, ал 3'-гидроксильді топқа спейсерді молекула бекейді, ал оған өз кезегінде шыны шарик бекиді.



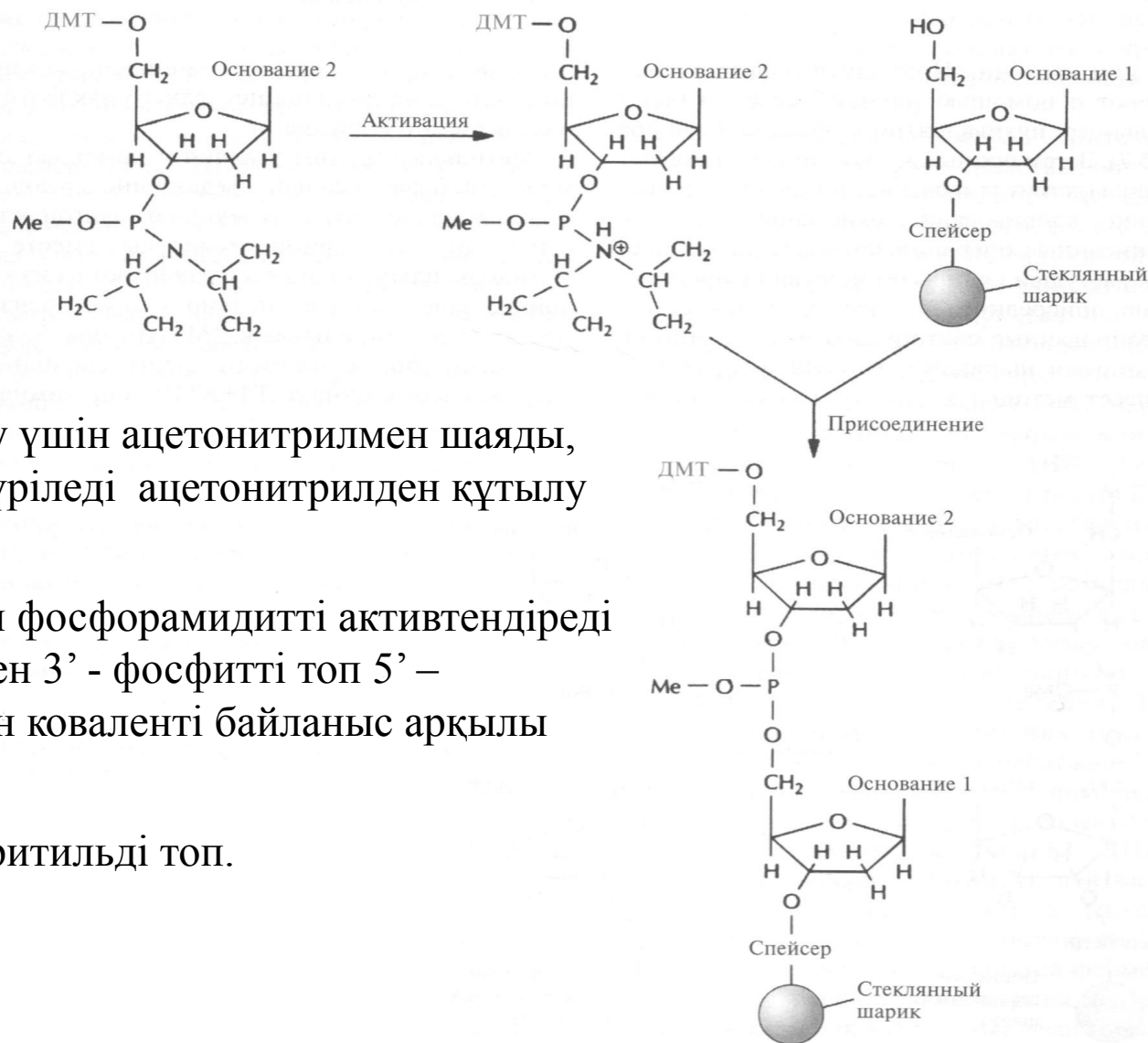
2. Химиялық синтездің фосфорамидиті әдісі

2. Сатыда колонкадан су мен басқада нуклеофилді заттарды жою үшін сусыздандырылған реагент көмегімен (ацетонитрил) шайып, кейінен ацетонитрилді шығару үшін аргонмен үреді.

3. Сатыда трихлоруксус қышқылымен (ТХУ) нуклеотидты шайады. Бұл 5' ДМТ-ді (диметокситритиль) бекітілген нуклеотидтен ыдыратып, реакциянды қасиетін сол топқа қайтару үшін іске асырады.



2. Химиялық синтездің фосфорамидиті әдісі



4. ТХУ-нан құтылу үшін ацетонитрилмен шаяды, кейінен аргонмен үріледі ацетонитрилден құтылу үшін.

5. Сатыда Тетразол фосфорамидитті активтендіреді сонын нәтижесінден 3' - фосфитті топ 5' - гидроксилді топпен коваленті байланыс арқылы байланысады.

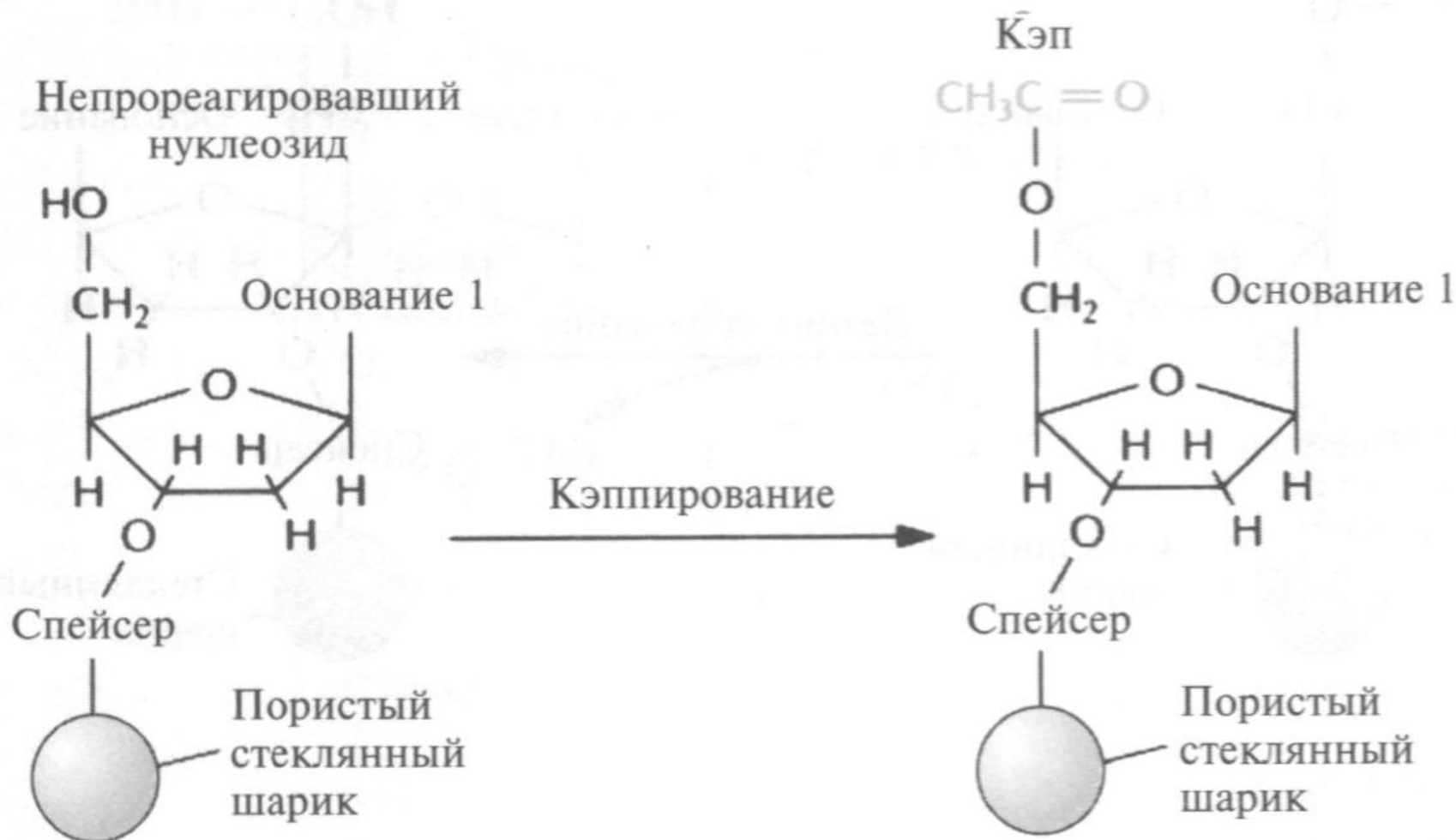
DMT- диметокситритильді топ.

ME- метильді топ.

2. Химиялық синтездің фосфорамидиті әдіс

6. Сатыда қосылмаған фосфорамидит және теразол аргонмен үрлеп шығарады.
7. Сатыда жауап қатпаған 5' – гидроксилді топты уксусты ангидрид және диметиламинопиридин көмегімен ацетилидейді. Себебі тасымалдаушыдағы барлық нуклеозидтер фосфорамидитпен байланыспауы мүмкін. Егер осы кезенді іске асырмаса бірнеше кезеннен кейін синтезделіп жатқан олигонуклеотидтер ұзындығы және нуклеотидтер тізбегі жағынан айырмашылықтары болуы мүмкін.

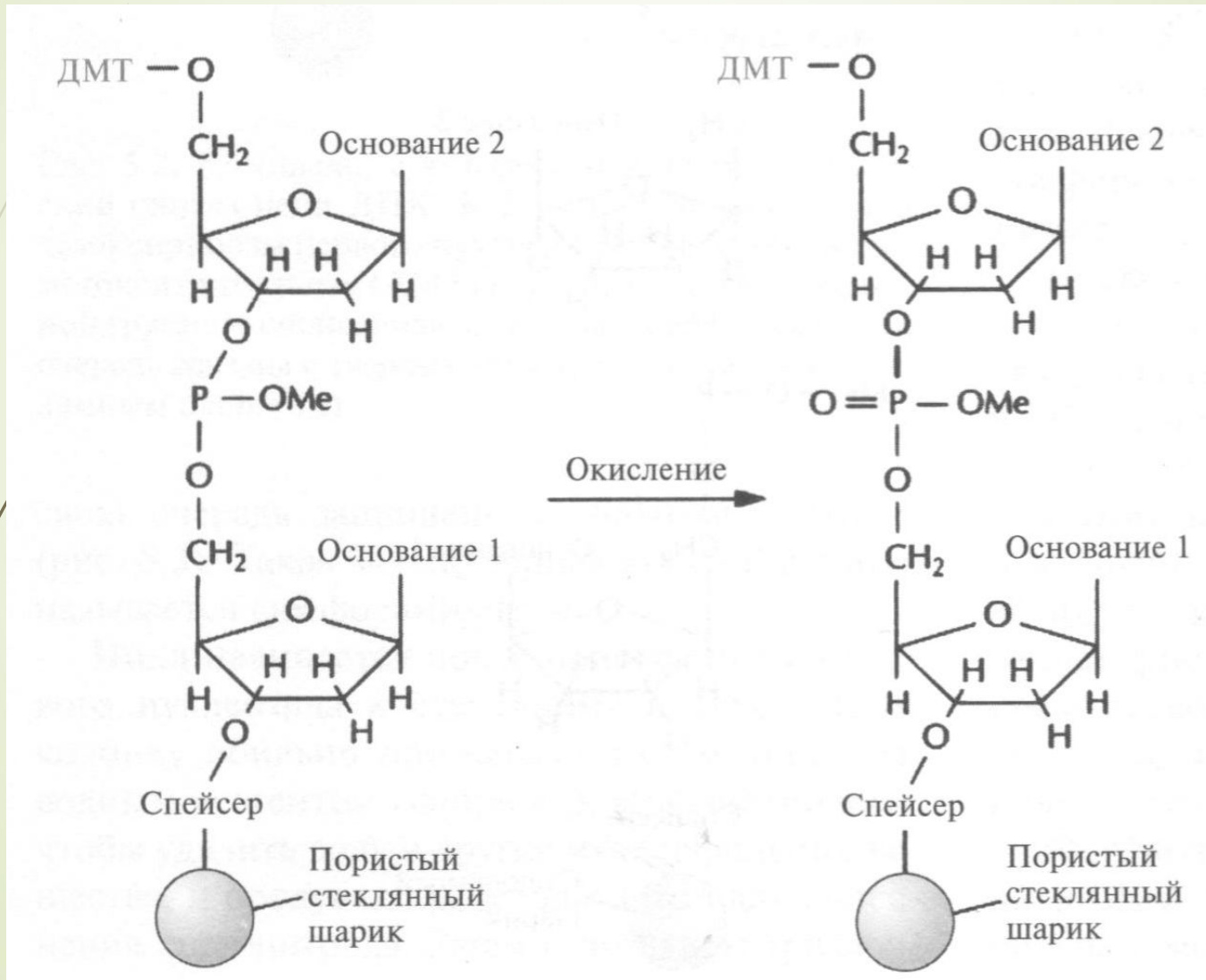
2. Химиялық синтездің фосфорамидиті әдісі



2. Химиялық синтездің фосфорамидиті әдісі

8. Сатыда нуклеотидер арасында қалыптасқан фосфиттриэфирлі байланыс қалыпты болмауы мүмкін, осы байланыс қышқылдар әсерінен үзілуі мүмкін. Сол себепті фосфиттриэфирлі байланысты иод ерітіндісі арқылы стабильді 5 валентті фосфаттриэфриға дейін тотықтырады. Содан кейін калонканы жуып барлық цикілді қайталайды.

2. Химиялық синтездің фосфорамидиті әдісі



2. Химиялық синтездің фосфорамидиті әдісі

Жоғарыдағы цикл бағдарламаға сәйкес өсіп келе жатқан тізбекке соңғы нуклеозид жалғанып бітпегенше қайталана береді. Соңғы шықан өнім таза болу үшін әрбір кезеңдегі нуклеотидтердің бірігу эффективтілігі 98% төмен бомауы керек. ДНҚ синтезаторды Өндіруші фирмалар бекіну эффективтілігі 98% төмен болмайтының кебілдейді. Бірақ ол көрсеткішке жету үшін өте таза химикаттар мен реагенттер қолданылуы тиісті. Көбіне жоғары тазалыққа жету үшін ВЖХ немесе электрофорез көмегімен қосымша тазартылады.

2. Химиялық синтездің фосфорамидиті әдісі

Циклдың эффективтілігі циклдың ұзындығына байланысты.

Эффективность, %	Средний выход, %				
	<i>n</i> = 20	<i>n</i> = 40	<i>n</i> = 60	<i>n</i> = 80	<i>n</i> = 100
90	12	1,5	0,18	0,02	0,003
95	36	13	4,6	1,7	0,6
98	67	45	30	20	13
99	82	67	55	45	37
99,5	90	82	74	67	61

№ 5 дәріс

Генді инженериялық манипуляциялар.

Генді инженериялық манипуляция кезендері:

1. Қажетті ДНҚ-ны бөліп алу.
2. Вектор.
3. Трансформация және селекция.

Генді инженериялық манипуляция кезендері:

- Биологиялық зерттеулердің көбісі бір қарапайым процестен басталады яғни – жасушаға бөгде генетикалық материал енгізіледі. Бұл процесс молекулалық клондау деп аталады. Осы процесс көмегімен гендік модификацияланған ағзалар алуға және бөлек гендерді қыстырып сөндіруге және т.б процестерді іске асыруға болады.
- Бірақ жасушаға бөгде генді енгізу қарапайым естілгенімен, бұл ұзың, қиын және көп этапты процесс.

1. Қажетті ДНҚ-ны бөліп алу.

Біздің мақсатымыз жасушаға белгілі бір генді енгізу болғандықтан, ең бірінші бізге жасауға қажетті зат ол – қажетті генді белгілі бір жолмен алу және оған қоса ол генді көп мөлшерде алу. Жасушаға енетін бөгде ген – **енуші ген** (insert) д.а.

Оны бірнеше әдіспен алуға болады:

Біріншіден, біз қажетті генді тиесілі ағзадан бөліп ала аламыз. Қарапайым мысал ретінде біздің **енуші ген** бұл пілдің белгілі бір гені. Олай болса бізге келесі әрекеттерді іске асыру керек:

- Пілдің тінін (такн) үлгісін алу.
- Сол үлгіден ДНҚ-ны бөліп алу.
- Сол ДНҚ дан бізге қажетті генді көп мөлшерде оқшаулап алу. (Ол үшін ПЦР қолданылады. Бірақ ПЦР көмегімен генді алу үшін, біз сол геннің нуклеотидтік тізбегін білуіміз қажт.)

Екіншіден, егер бізге қажетті пілдің гені гендер кітапханасында болса, онда біз сол кітапханадан ала саламыз.

Үшіншіден, енуші ген міндетті түрде бізге белгілі ағза болмауы мүмкін, зерттеуші ол генді өзі ойлап табуы мүмкін, және ол генді жасанды түрде синтездеп алуға болады.

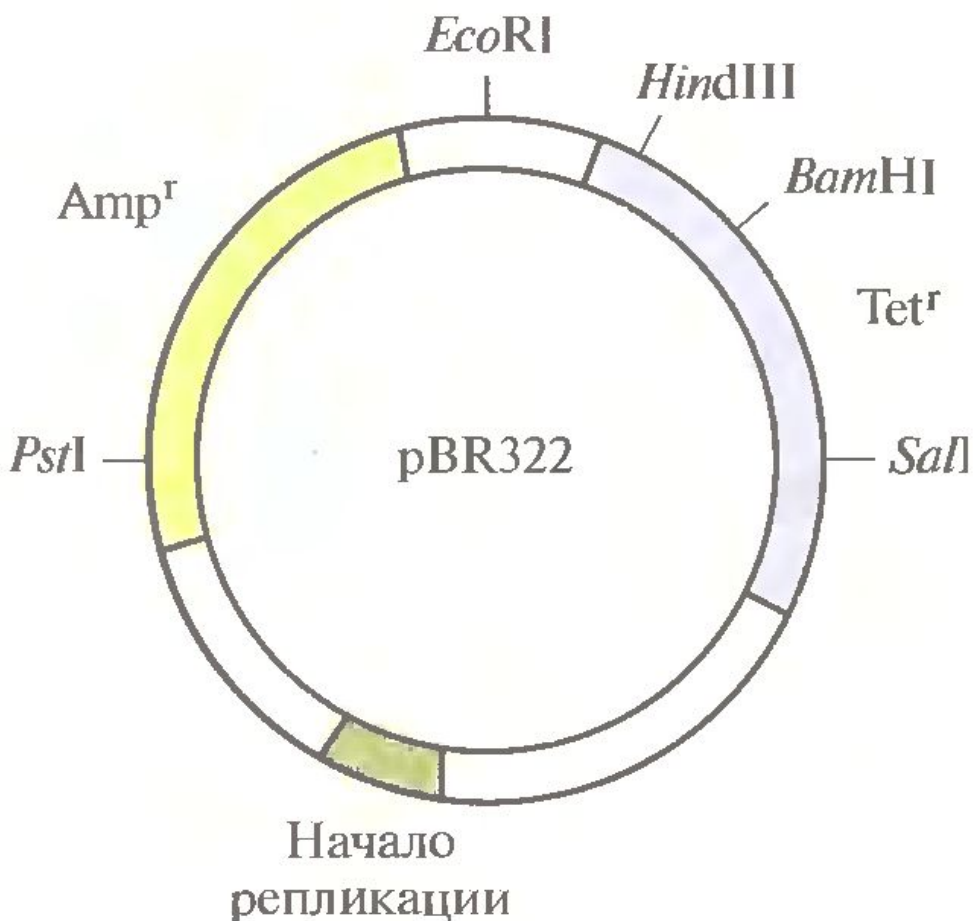
2. Вектор.

Жасушаға жалғыз енуші генді (insert) ешқандай қолдаусыз енгізу мәнсіз зат. Себебі жасушада көптеген қорғаушы ДНҚ ферменттер бар. (нуклеазалар класы) Сол себепті енуші генге (insert) арнайы «тасмалдаушы жүйе» қажет яғни вектор.

Векторлардың бірнеше түрлері бар, бірақ ішінде ең кең қолданылатыны ол – плазмидалар.

2. Вектор.

80-нінші жылдары pBR322 плазмидалық векторы ең әйгілі және уневирсалды векторлардың бірі болған. Плазмида ұзындығы 4361 н. ж. Ампицилин және тетрациклин антибиотиктеріне тұрақты екі гені бар. Tet генінде уникалді сайттар *Bam*HI, *Hind*II, *Sal*I үшін, және *Pst*I сайты *Amp* генінде орналасқан (негізі осындай сайттар саны 40-қа жуық), ал *Eco*RI кодталмайтын тізбектере орналасқан, және *E. coli* жасушасында репликацияланатын басталу сайты бар. Бөгде ДНК *Bam*HI сайтына орнығады.



2. Вектор.

Промоторлар, Энхансерлер, сайленсерлер.

Әрбір жұмыстеуші геннің алдында қысқа ДНҚ аймағы Промотор бар. Дәл сол жерге РНК полимераза бекиді. Промоторлар әр түрлі болады:

Біріншіден олар күші жағынан әртүрлі болады.

Екіншіден прокариот және эукариот промоторлары әртүрлі.

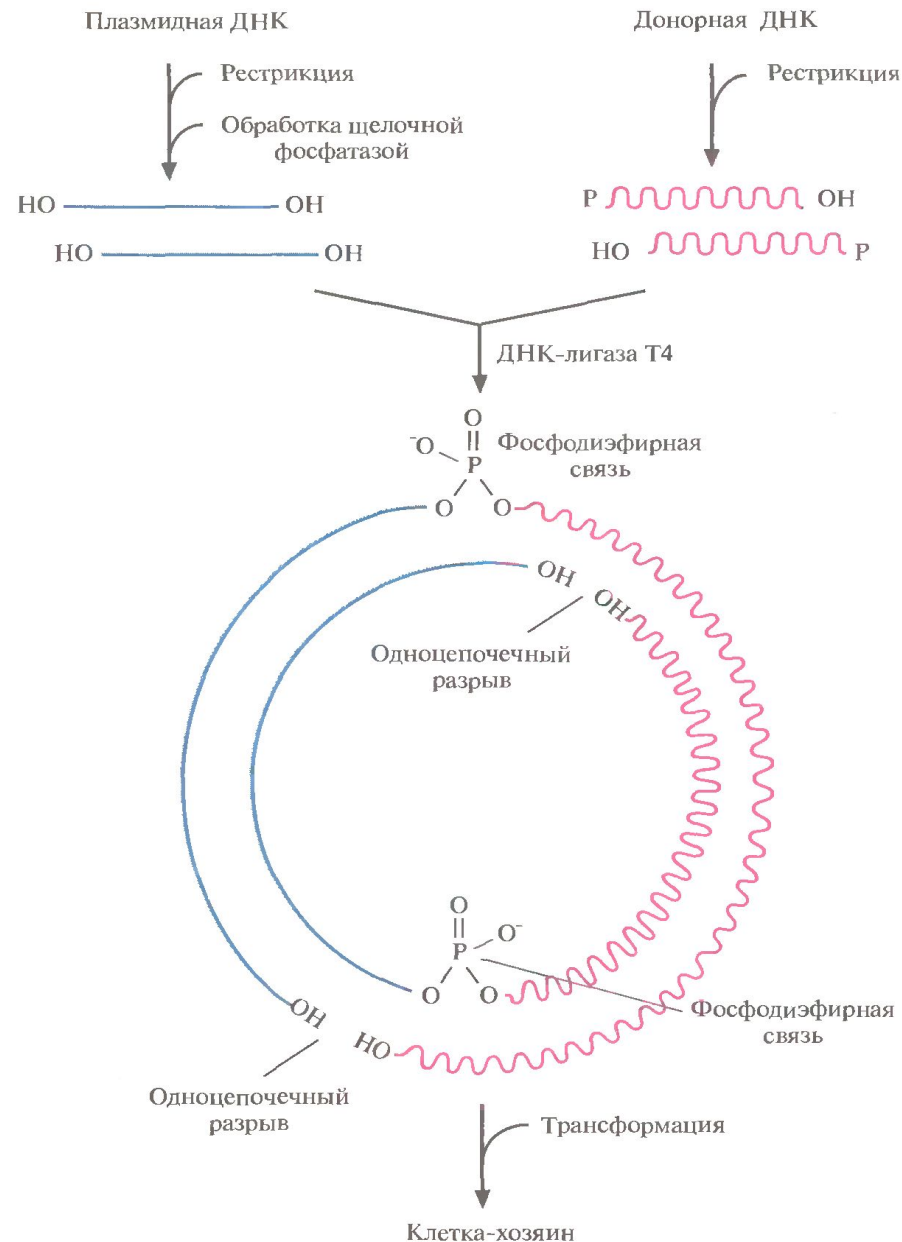
Үшіншіден эукариоттарда РНК полимеразаның бірнеше типі бар. Әр РНК полимеразаны өзінің танитың промоторлары болады.

Төртіншіден әртүрлі промоторлар әртүрлі қосылады. Біреулер әрдайым жұмыс істеп тұрса, екіншілері керсінше белгілі бір жағдайларда ғана жұмыс істейті. (тем. Белгілі бір зат.)

Эукариоттарда промоторлардан басқа ген экспрессияны регуляциялайтын ДНҚ аймақтары бар, энхансерлер (транскрипцияны күшейткіштер), сайленсерлер (транскрипцияны бәсендетушілер).

3. Трансформация және селекция.

Бактерия плазмиданы жұту процесі трансформация д.а. Трансформация іске асу үшін келесі жағдайлар қажет: Антибиотикке тұрақты екі геннің біреуін рестриктаза көмегімен кеседі нәтижесінде жабысқақ ұштары бар түзу тізбек пайда болады. Осы пайда болған тізбекті донорлы тізбекпен араластырады, ары қарай бұл қоспаны Т4 бактериофагтың ДНК-лигазасымен араластырады. Нәтижесінде рекомбинантты ДНК молекуласы пайда болады, оларда екі бір тізбекті үзілістері болсада оның бөліктері екі фосфодиэфирлі байланыстармен ұсталып тұрады. Трансформацияланған келтакада репликациядан кейін біртізбекті үзілістер жасуша иесінің лигазаларының көмегімен біріктіріледі.



3. Трансформация және селекция.


Трансформация қасиет барлық бактерияларға тән емес, яғни тек компетентті жасушаларға ғана тән. Сол себепті плазмиданы бактерияға енгізген кезде біз алдынала білеміз, бактериялардың көбісіне плазмида еңбейтіндігін, яғни трансформацияланған бактериялар саны аз болатындығын. Сол себепті бізге тек трансформацияланған жасушаларды ғана бөліп алу керек. Ол үшін қарапайым бірақ өте тапқыр әдіс қолданылады.

3. Трансформация және селекция.

Ол әдістің мәні келесі: Біз pBR322 плазмидасында Amp және Tet антибиотикке төзімді гендері бар екенін білеміз (Selectable marker). Сол себепті осы плазмида енген жасуша сол антибиотикке төзімді болады және сол антибиотик бар ортада өмір сүре алады. Бірінші кезеңде жасушаны трансформациядан кейін ампицилин бар ортада өсіреді.


Трансформацияланған жасуша тірі қалады. Бірақ егер жасуша ампицилин бар ортада өсе оның ішінде бізге қажетті ген бар деген сөз емес, сол себепті келесі кезекте Tet ортада жасушаларды қайта өсіреді. *Vam*NI сайты Tet генінде ораналасқандықтан *Vam*NI сайтына енген ДНҚ фрагменті ол сайтты бұзады және жасуша Tet бар ортада өсе алмайды, бір сөзбен айтқанда бізге қажетті ген *Vam*NI сайтына енгенің білдіреді.

Екінші кезеңде осы екі нұсқаны бөледі. Көшіру әдісі арқылы ампицелин ортасында өскен жасушаларды тетрацеклин бар Қ.О көшіреді. Тетрацеклин бар Қ.О өспеген жасушалар болса оларда гибридті плазмида бар деген сөз. Ампицелин бар Қ.О өскен бірақ тетрацеклинді Қ.О өспеген жасушаларды тандап аладыда жаңа Қ.О өсіреді.



№ 6 дәріс

ДНҚ-ны секвенирлеу

1. Секвенирлеу тарихы
 2. Сэнгер әдісі
- 

1. Секвенирлеу тарихы

- Секвенирлеу бұл – нуклеин қышқылдарының нуклеотидтік ретін анықтау әдісі. Жоғары эффективті секвенирлеу әдісінің пайда болуына көптеген әдістердің бірігуі әкеп соқты, солардың ішіне келесі әдістер жатады:
- Елеулі орын алатын әдістің бірі бұл электрофорез әдісі, бұл әдістің дамуы не бәрі 1 нуклеотид ұзындығы болатын олигомерлерді бөлуге мүмкіндік берді.
- Азотты негіздердің спецификалық химиялық модификация әдісі.
- Р 32 изотопы арқылы ДНҚ тізбегіндегі ақырғы (концевых) нуклеотидтердің радиоактивті таңбалау әдісі.
- ДНҚ тізбектерін ДНҚ полимеразамен көшіру әдісі.

1. Секвенирлеу тарихы

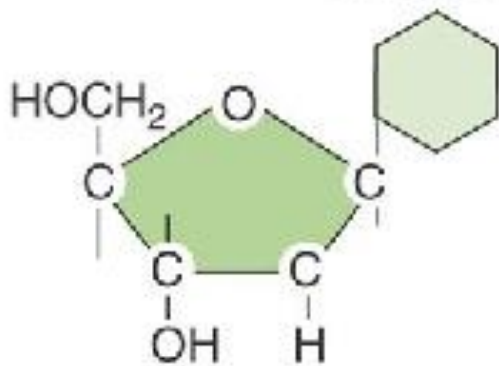
- ДНК-ның құрылымын анықтаудың көптеген әдістері белгілі, солардың ішінде Максам және Гильберт ұсынған химиялық әдіс немесе 1977 ж. Ф. Сэнгер ұсынған дидеокси әдісі. Кәзіргі уақыта басқа да жаңа әдістер ашылуда мысалға Шотган (Shotgun) секвенирлеу әдісі, бірақ Сэнгер ұсынған әдісі кен ауқымда қолданылады.

2. Сэнгер әдісі

- Сэнгер ұсынған әдісте ерекше дидезоксирибонуклеотидтер (ddNTP) деп аталатын модификацияланған нуклеотидтер қолданылады. ddNTP-тердің кәдімгі dNTP-терден кішкентай айырмашылығы бар. Олардың қантының 3-ші көміртегісінде гидроксилді-ОН тобының орнына сутегі тобы болады. ddNTP ДНҚ тізбегіне енген кезде, фосфодиэфирлік байланысқа қажетті ОН тобы болмағандықтан, тізбек ұзара алмайды; нәтижесінде тізбек терминацияланады.

2. Сэнгер әдісі

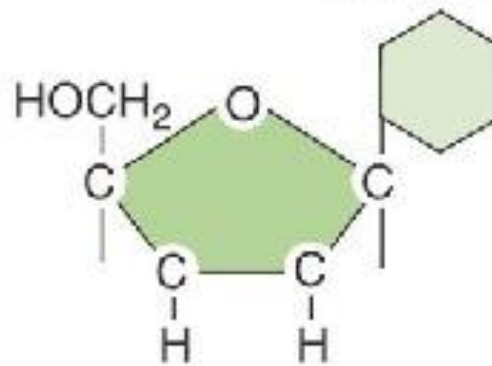
Азот негізі
Nitrogen base



dNTP

Дезоксинуклеотид

Азот негізі
Nitrogen base



ddNTP

Ди-дезоксинуклеотид

2. Сэнгер әдісі

- Сэнгердің дәстүрлі тәсілінде 4 бөлек реакциялық пробиркалар алынады. Әр пробиркада праймер, 4 dNTP оның біреуі радиоактивті таңбаланған және бір ddNTP болады. Праймерден жаңа тізбек синтезі басталғаннан кейін ДНҚ полимераза тізбекке кездейсоқ қалыпты dNTP-тың орнына ddNTP-ты енгізеді де, тізбек ұзаруын тоқтатады. Уақыт өткен сайын ddNTP-тер барлық тізбектерге енеді де, ұзындығы әртүрлі фрагменттер түзеді. Сэнгердің дәстүрлі тәсілінде ДНҚ тізбектерінің ажыратылуы айырмашылығы бір нуклеотид болатын фрагменттерді ажырата алатын жіңішке полиакриламидті гелде жасалады. Авторадиограммадан алынған тізбек төменнен жоғары қарай оқылады.

2 Сэнгер әдісі

