

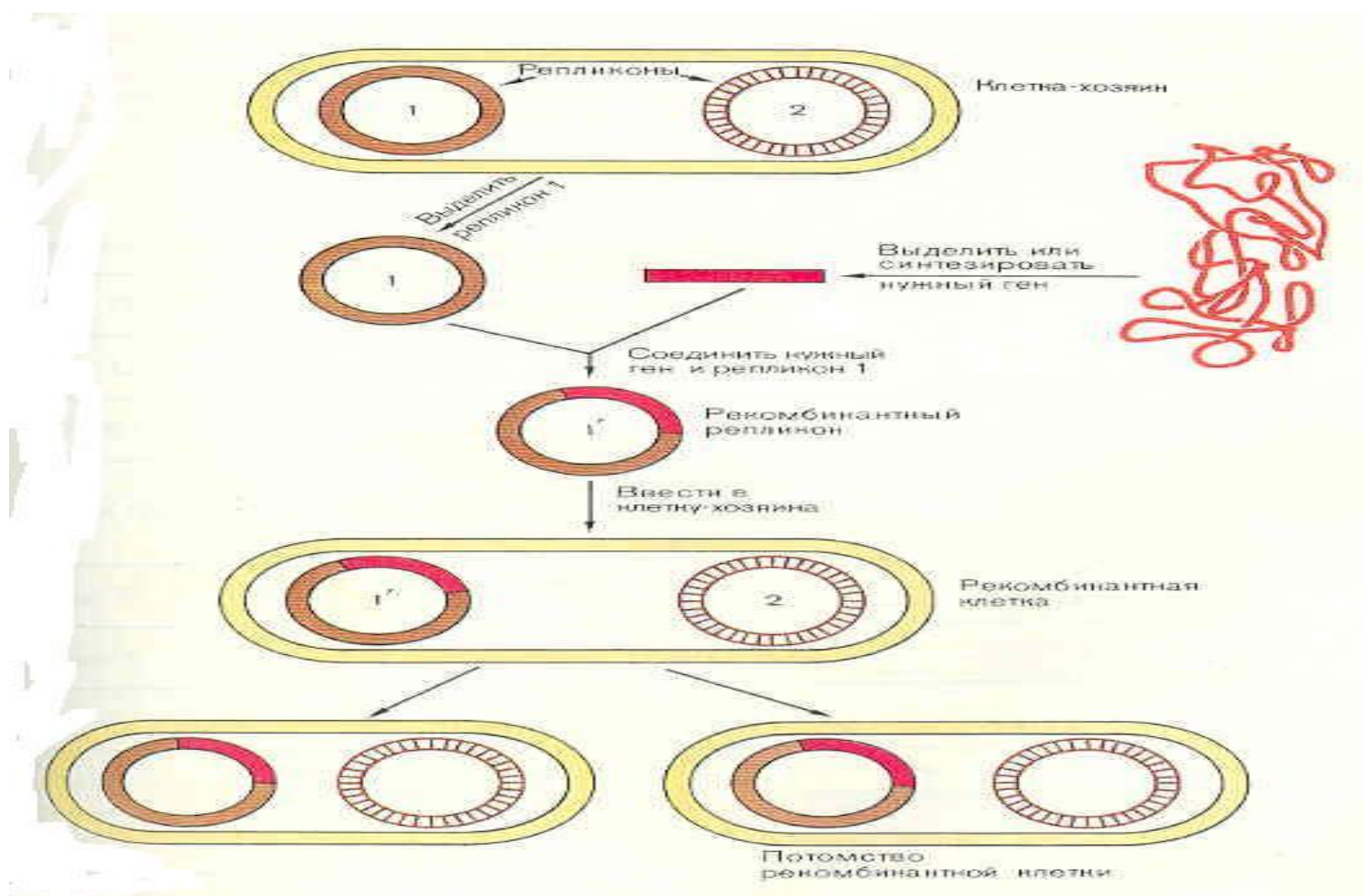
Гендік инженерия


Жоспар:

- 1) Гендік инженерия әдістері.
- 2) ДНК молекуласын бөліп алу.
- 3) Рестриктаза ферменті және ДНК молекуласын бөліп алу.
- 4) Генетикалық векторлар.
- 5) Рекомбинантты ДНК молекуласын құрастыру.
- 6) Клеткаға рекомбинантты ДНК молекуласын енгізу.

Орындаған: Мамбетова С.
Мұқажан Д.
Тексерген: Анапияев Б.

Гендік инженерия белгілі бір мақсатта ДНК молекуласын (генді) клондауға және құрастыруға бағытталған әртүрлі тәжірибелік тәсілдер жиынтығы. 1972ж. Американдық биохимик *П.Берг* – тұңғыш тәжірибелерді іске асырды.





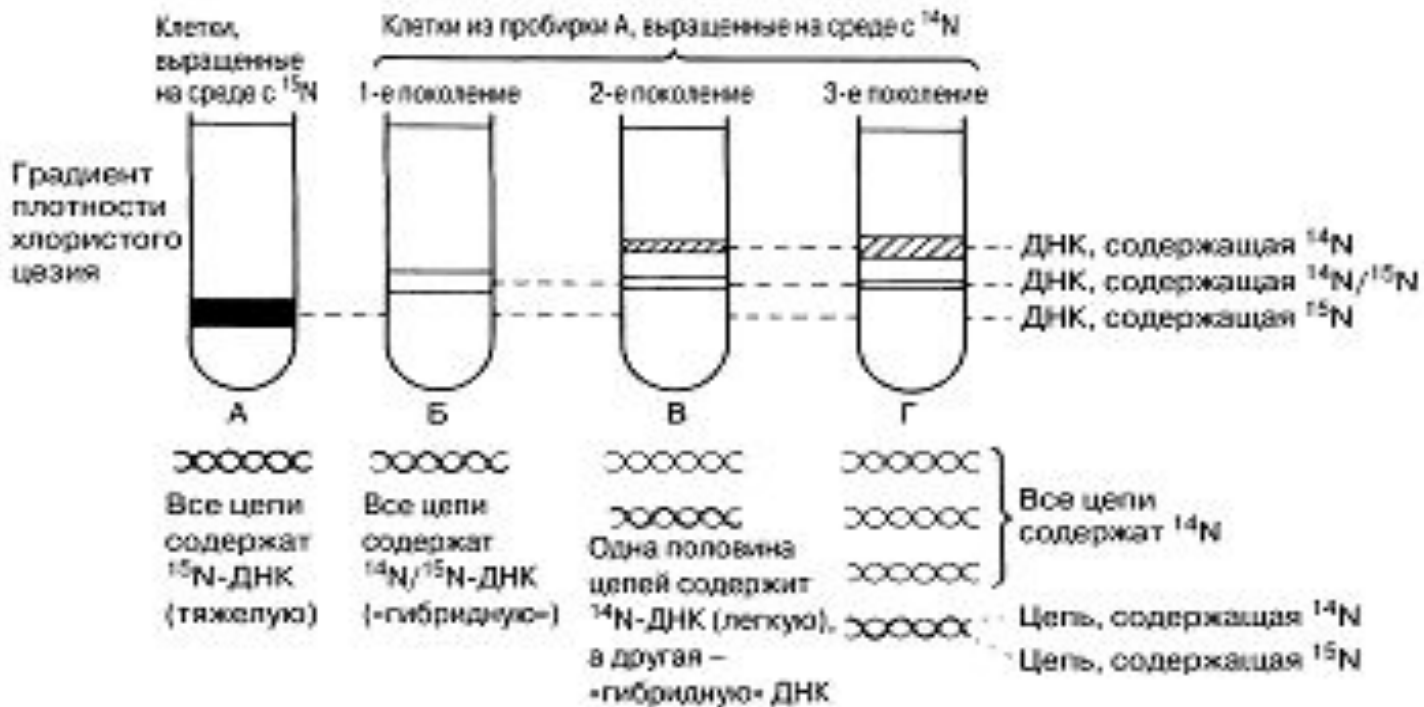
Бір генді клондауға бағытталған ген-инженерлік тәжірибені орындауға бірнеше сатыларды ажыратып қарайды:


1. Зерттеуге алынған организмнен ДНК молекуласын бөліп алу және ДНК-векторды бөліп алу.
2. Рестриктаза ферменті арқылы бастапқы организмнің ДНК молекуласын кесінділерге кесу және түзілген рестрикциялық қосылыстан керекті генді бөліп алу.
3. Будан ДНК молекуласын алу мақсатында бастапқы ДНК вектор ДНК молекулаларын жабыстыру.
4. Алынған ДНК молекуласын трансформациялау жолмен басқа организмге, мысалы *E. Coli* бактериясына н/е дене клеткасына енгізу.
5. Будан ДНК молекуласы бар бактерияларды қоректік ортаға егу.
6. Олардың колониясын анықтау.
7. Клондалған ДНК молекуласын бөліп алу және оның азоттық негіздерін секвенирлеу арқылы сипаттау.

Клетканы бұзғаннан кейін, мәселен, *лизоцим* арқылы сығындыға кейбір белоктарды активсіздендіру және мембрананы еріту мақсатында *детергент* қосады.

○ Сығындыдығы хромасомалық ДНК молекуласынан қарапайым *центрифугалау* арқылы алады. ДНК молекуласын тазалауда хроматография әдісі көп қолданылады.

CsCl ерітіндісі градиентінде бромды этидий көмегімен жоғары жылдамдықта центрифугалау әдісін қолданамыз.






Рестриктазалар-бұл геномдық ДНК молекуласынан зерттеуге қажетті бөлікті кесетін ферменттер.

Алғаш рет *E. Coli* бактериясынан бөліп алған. Олар ДНК молекуласынан әртүрлі рестрикциялық сайттарын кесу қабілетіне ие. Рестрикциялық сайттары-азотты негіздер полиндромдар, тура және бірдей оқылатын тізбектер.

Қазіргі кезде 100 астам рестриктаза белгілі, ДНК молекуласын селективті кесуге мүмкіндік береді.

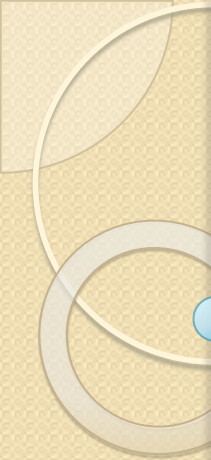


ДНК бөліктерін бөліп алу үшін *электрофорез* әдісі қолданылады, яғни рестрикт бөліктерді электр тоғының көмегімен зарядталмайтын арнайы агарозды н/е полиакриламидті геледе жүргізеді.

ДНК бөліктерін анық көру мақсатында оны бромды этидий арқылы бояйды. Электрофорез әдісінің нәтижесі өте жоғары, 2-50 000 негізге дейінгі аралықта ДНК молекуласының бөліктерін ажыратуға болады. Электрофорез процесінен кейін агарозды н/е полиакриламидті геледегі ДНК молекуласының бөліктерін бөліп алғаннан кейін оларды секвенирлеуге болады.

Секвенирлеу-белгілі ДНК молекуласындағы нуклеотидтердің саны мен ретін,жалғыз-жалғыздан ретті түрде ыдырату арқылы анықтау.





Химиялық әдіс -радиоактивті фосфор арқылы белгіленген бөліктерді алуға, осы бөліктерден бір негізді алып тастауға ж/е келесі реттегі радиоавтография әдісі арқылы нәтижелерді есепке алуға негізделген.

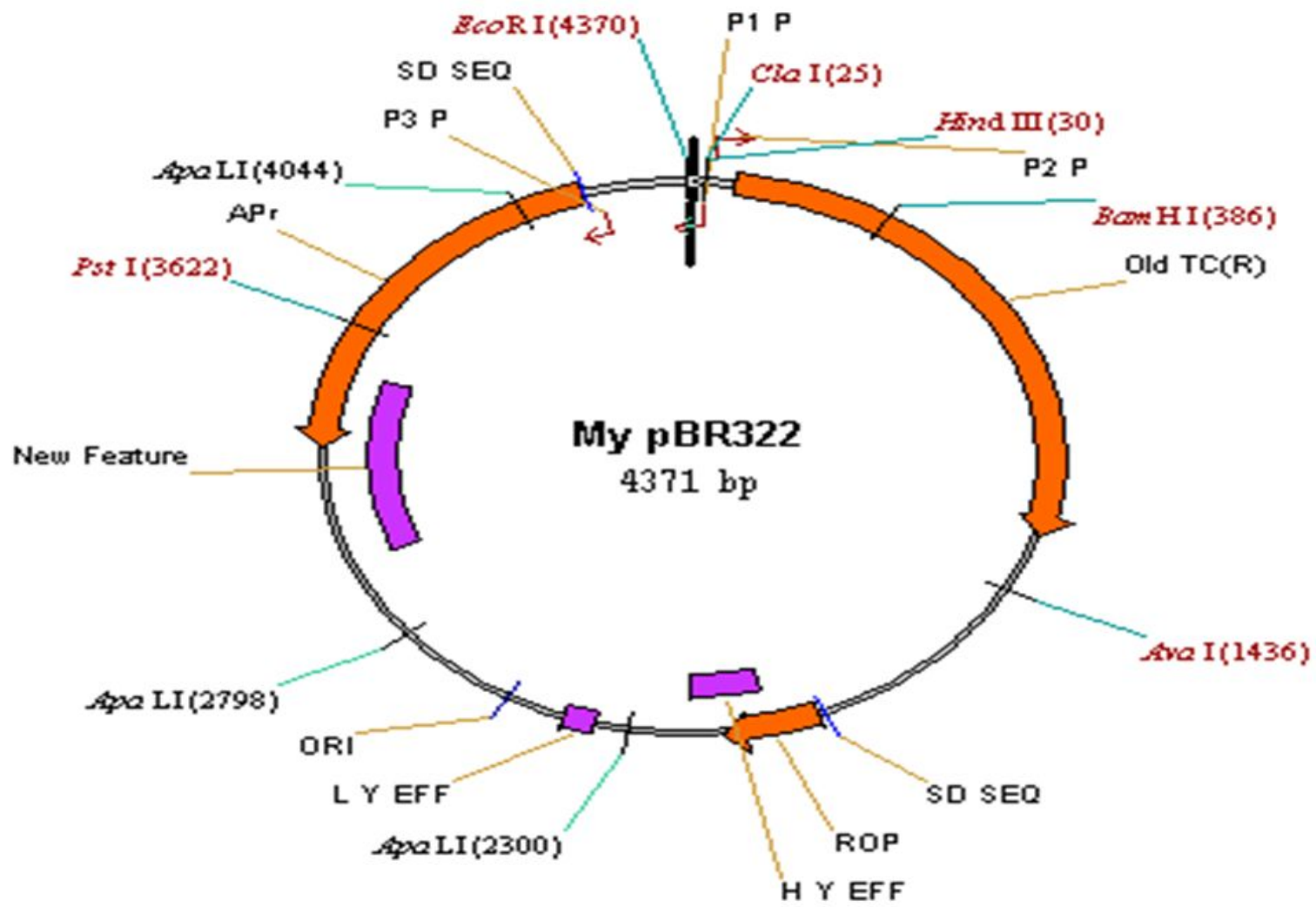
Ферментативті әдіс -талданатын бөліктің соңына нуклеотидтерді енгізеді де , жағдайында әртүрлі бөліктердің синтезін жүргізу арқылы электрофорез әдісімен талдауға негізделген.

ДНК молекуласындағы арнайы нуклеотидтік тізбектерді зерттеу үшін ДНК-ДНК, РНК-РНК, ДНК-РНК, Нозерн және Саузерн блот гибридизация әдістері қолданылады.

Генетикалық векторлар.

Табиғи плазмидалық векторлар белгісіз болғандықтан, қазір барлық плазмидалық векторлар қолдан құрастырылған. Құрастыруда бастапқы материал рестриктазалар арқылы алынған R-плазмидалар.

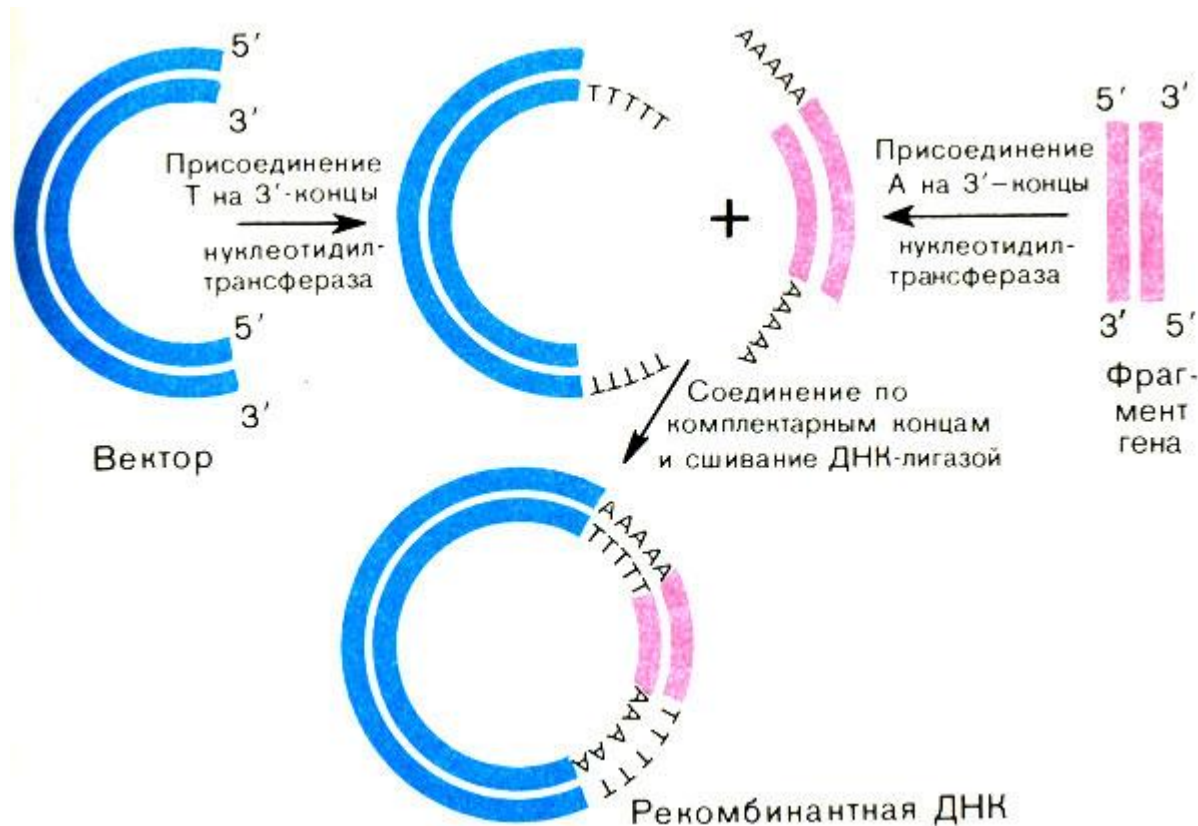
М.:ампициллин ж/е тетрациклинге резистентті гендері бар pBR 322 плазмидалық векторын клондалатын, ДНК бөлігі бар бактерия селекциясына өте қолайлы етеді,яғни 20-астам рестриктаза ферменттеріне Eco R L, Hind III, Pst I, Pva II, Sal I арн. 1 ғана рестрикция сайты болады.



Зерттелетін ж/е векторлық ДНК молекулаларын қабыстыру үшін *ДНК-лигаза ферменті* қолданылады.

Егер 3`-гидроксил соңы мен `5-фосфатты топ соңдары және бұл топтар б-біріне сәйкес орналасқан болса, онда молекулалар арасында тігілу сәтті жүреді.

Комплементарлы принципке сай ДНК бөліктері «жабысқақ» соңдарымен бірігеді. «жабысқақ» соңдар ген-инженерлік тәжірибелерде маңызды, өйткені төменгі температурада олар комплементарлы принципке қайта бірігеді және тиімді қабысуына әсер етеді.



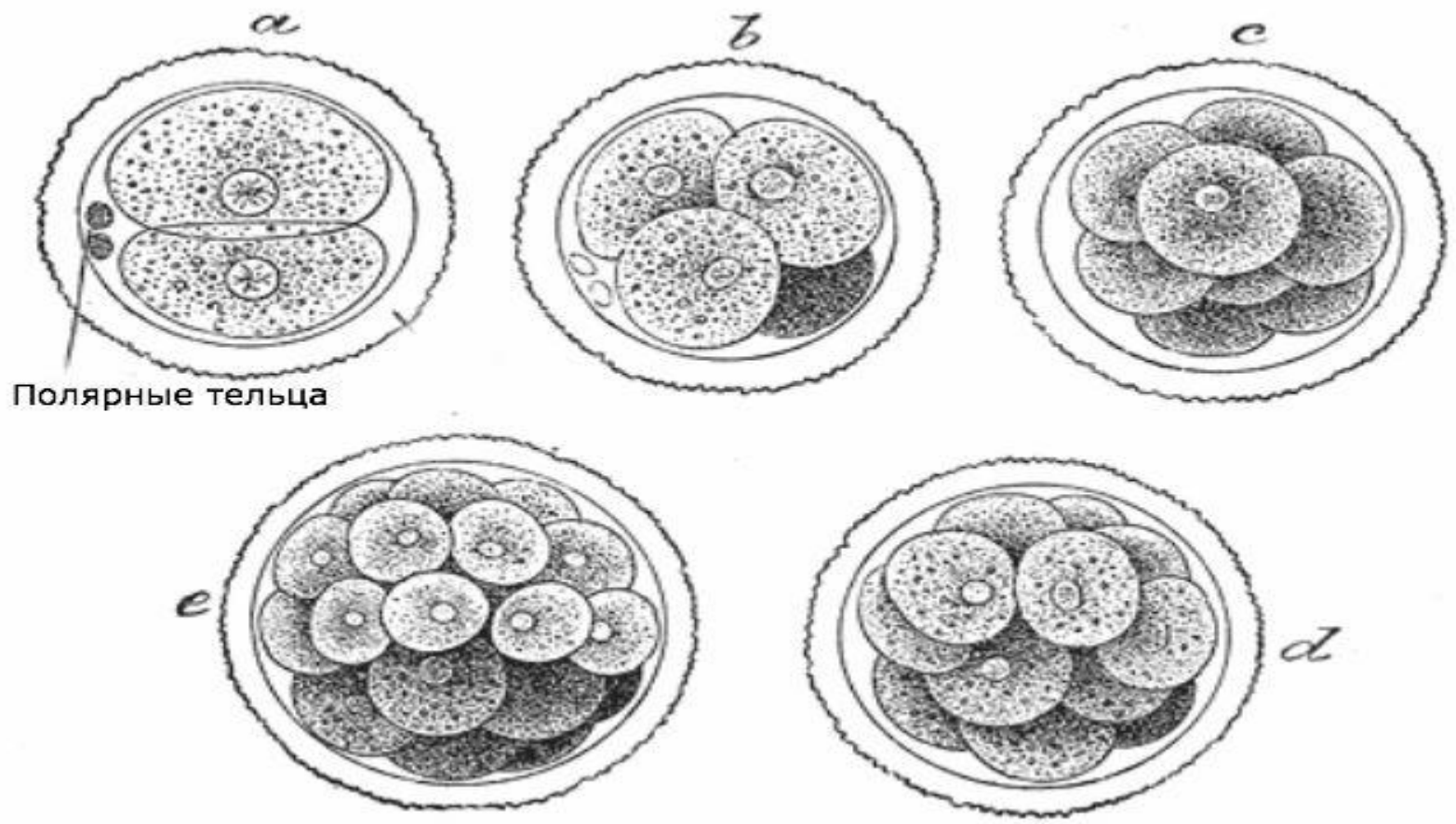
Егер де рестрикция нәтижесінде «жабысқақ» соңдарсыз бөліктер түзілсе, онда оларды «жабысқақ» соңдары бар молекулаларға *трансфераза* ферменті көмегімен тасымалдайды. Бұл фермент нуклеотидтерді ДНК-ң 3`-соңына жалғайды.


ДНК молекуласның қажетті тізбегін алу үшін полимеразды тізбекті (ПТР) әдісін қолданады. Және де ДНК-полимераза ферментіне нуклеотид тізбегін көшіру үшін – праймерлер мүмкіндік береді.



Рис. 5. Встраивание изолированного гена в генетический вектор

Рекомбинанты ДНК молекуласын клеткаға енгізу.





Клеткаға ДНК молекуласының ену жиілігін арттыру мақсатында *электрополяция* әдісін, яғни клетканы қарқынды электр аумағында өңдеуден өткізгеннен кейін қолданады. Бұл өңдеуден өткен клеткалардың мембраналарында қуыстар п.б. ж/е ДНК молекуласының ішке өтуіне қолайлы жағдай туындайды.

Әрі қарай рекомбинантты ДНК молекуласы енген бактерияларды қоректі клеткалардың өсуіне қолайлы ж/е антибиотиктерге бай қоректік ортаға егеді.




Гендерді тірі ағзаға табиғи жолмен енгізу әдістері.

-генді реципиент клеткасына интродукциялау ж/е сол клетканы ретрансплантациялау

-генді реципиент ағзасына инъекциялау

-эмбрион геномына клондаған гендерді интродукциялау



Қоректік ортада өсіп шыққан барлық трансформаттар колониялары ДНК молекуласының әртүрлі бөліктері(гендер) болатын геномдық н/е кДНК болады. Мұндай ДНК молекулаларының қоры гендік-инженерлік жұмыстарда кеңінен қолданылатын ДНК кітапханасын құрайды.



Пайдаланылған Әдебиеттер:

1) А. Пехов «Биология» 658-682 бет.

2) С. Ж. Стамбеков «жалпы генетика» Алматы -
1993