



ӘЛ-ФАРАБИ АТЫНДАҒЫ ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ
БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ БИОТЕХНОЛОГИЯ ФАКУЛЬТЕТІ
МОЛЕКУЛАЛЫҚ БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ГЕНЕТИКА
КАФЕДРАСЫ

ДӘРІС 3. РЕКОМБИНАНТТЫ ДНҚ ҚҰРАСТЫРУ ӘДІСТЕМЕЛЕРІ

Лектор: PhD, қауымдастырылған
профессор Тайпақова С.М.

Жоспар:

- **Рекомбинантты ДНҚ молекуласын құрастыру кезеңдері**
- **Гендік инженериядағы генді бөліп алу әдістері**
- **Рекомбинантты ДНҚ құрастыру әдістері**
- **Рек ДНҚ құрастырудың жабысқақ ұштар әдісі**
- **Рек ДНҚ құрастырудың коннекторлық әдісі**
- **Рек ДНҚ құрастырудың ДНҚ лигазаға тәуелсіз әдістері**

Рекомбинантты ДНҚ молекуласын құрастыру кезеңдері

- 1) Мақсатты генді алу;
- 2) Рекомбинантты ДНҚ молекуласын құрастыру ;
- 3) Бөтен генді реципиент клеткаға векторлық ДНҚ арқылы жеткізу және олардың экспрессиясын қамтамасыз ету;
- 4) Бөтен генге ие болған клеткалар скринингі.

- **Гендік инженериядағы генді бөліп алу әдістері**
- 1. Генді тікелей бөлу әдісі
- 2. Генді синтездеудің химиялық әдісі
- 3. Ферменттік (энзимдік) әдіс.

- **Табиғи генді тікелей бөлу**

- Генетикалық материалдан — ДНҚ-дан арнайы ферменттердің (рестрикциялық эндонуклеазалардың) көмегімен қажет ген «кесіліп» алынады.
- Бұл әдістің елеулі кемшіліктері бар:
- Біріншіден, ДНҚ-дан қажет генді танып, кесе алатын ферментті таңдап алу қиын. Фермент генді әрқашанда нақты шекарасында емес әр қилы үзеді: не геннің екі жағынан артық нуклеотидтерді үзуі, не түгел үзбеуі мүмкін, мұндай ДНҚ фрагменттерінің қызметі жеткіліксіз, сондықтан оларды пайдалану мүмкін болмайды.
- Екіншіден, эукариоттық организм геномының экзон-интрондық құрылысы, олардың гендерін бактерияларға енгізгенде функциялық тұрғыдан қиындық туғызады, өйткені бактериялық клеткада сплайсинг процесі (интрондардың кесілуі) өтпейді.
- Үшіншіден, егер ген барлық ДНҚ-ның аз ғана бөлігін құраса, онда оны бөлу мен анықтауда елеулі қиындықтар пайда болады. Сондықтан бұл әдіс негізінен генетикалық эксперименттер талабына сәйкес вирус пен бактериялардың генін бөлуде қолданылады.

• 2. Генді-синтездеудің химиялық әдісі.

- Бұл әдісте белоктың немесе полипептидтің бірінші құрылымы (амин қышқылдар қатары) белгілі болса, оның генінің нуклеотидтер қатары химиялық жолмен синтезделеді.
- Берілген нуклеотидтер тізбегі бойынша ДНҚ – синтездеу әдісін 1969 жылы, ген инженериясының дәуірі басталмаған кезде-ақ, 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, онан 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.
- 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.
- Қазіргі уақытта Г. Корана өңдеген әдістер бірқатар жасанды гендерді синтездеу үшін қолданылады. Осындай жолмен адамның — инсулин және интерферон гендері синтезделді.). 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.

3. Генді синтездеудің ферменттік әдісі.

Жасанды әдіспен генді ферменттік синтезге сүйене отырып, кері транскрипция механизмнің көмегімен алуға да болады. Бұл механизм (РНҚ-ға тәуелді ДНҚ-полимеразаның немесе кері транскриптазаның) белсенділігіне байланысты.

Ең алдымен, клеткалардан аРНҚ бөліп алады

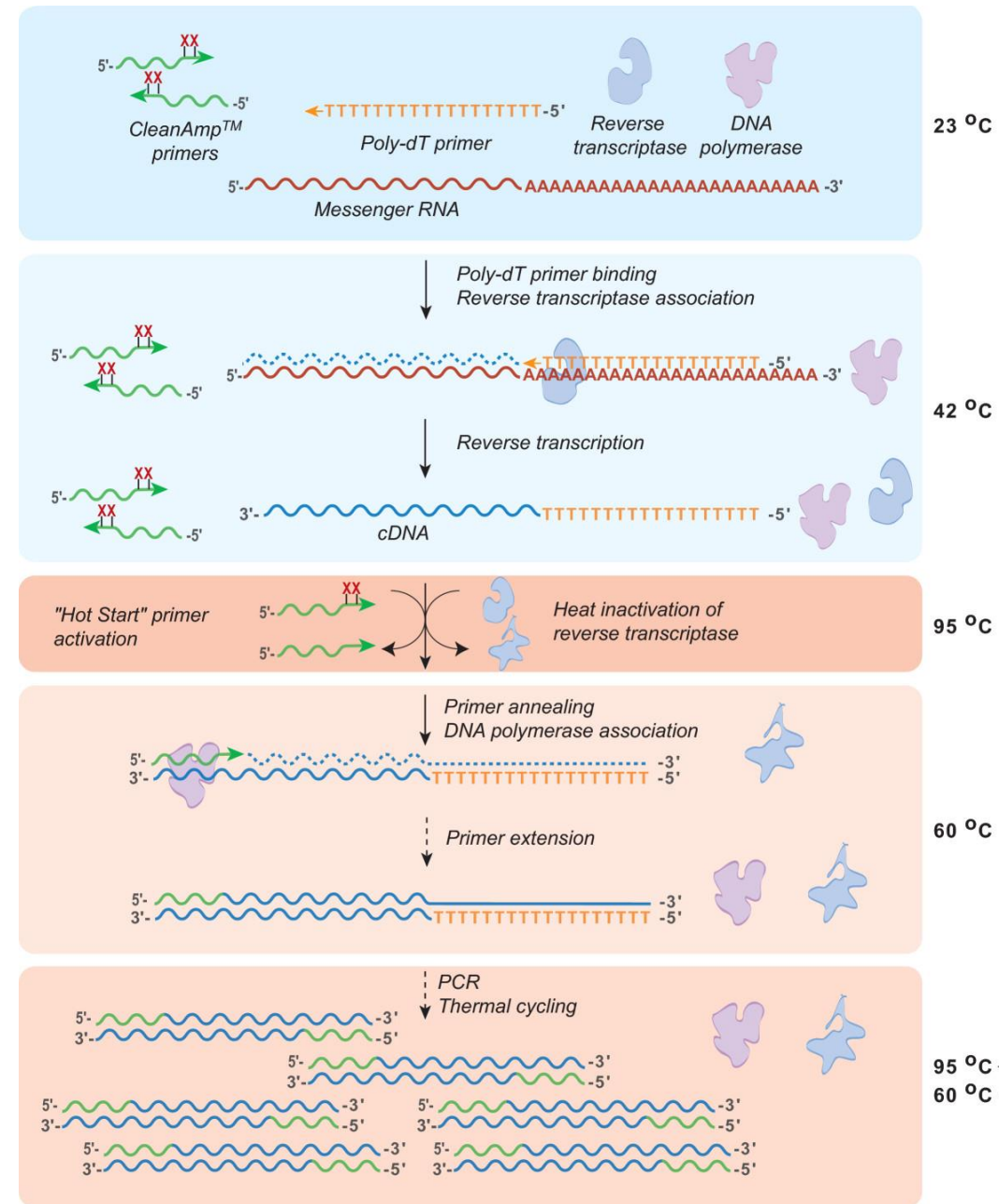
Бұдан кейін кері транскриптаза ферментінің көмегімен бөлінген аРНҚ-да комплементарлы ДНҚ (кДНҚ) синтезделеді. Кері транскрипция процесінде мРНҚ-да кДНҚ-ның синтезі басталуы үшін мРНҚ-ның 3'— ұшына комплементарлы «ашытқы»-олигонуклеотид қажет. Жаңа кДНҚ тізбегі синтезделуі үшін тағы Mg иондары мен dNTP керек.

Жаңа кДНҚ синтезделіп біткеннен кейін, оны тазалап, ДНҚ-ның екінші тізбегін синтездеу үшін матрица ретін де пайдаланады. Ол үшін ортаға ревертазаны немесе ДНҚ-полимеразаны қосады.

ДНҚ-ның екінші тізбегінің синтезі басталуы үшін олигонуклеотид керек, әйтпесе кДНҚ-ның 3'— ұшы белгісіз себептермен шпилькалы құрылым түзейді, Осы құрылым екінші ДНҚ-ның синтезін инициациялай алады.

ДНҚ-ының екінші тізбегі синтезделіп болғаннан кейін, оның алғашқы кДНҚ-ымен қосылған (шпилькалы) бөлігі S1 нуклеаза ферментінің әсері арқылы ажырайды, нәтижесінде қос тізбекті ген алынады, оны қос тізбекті комплементарлы ДНҚ (қт-кДНҚ) деп атайды.

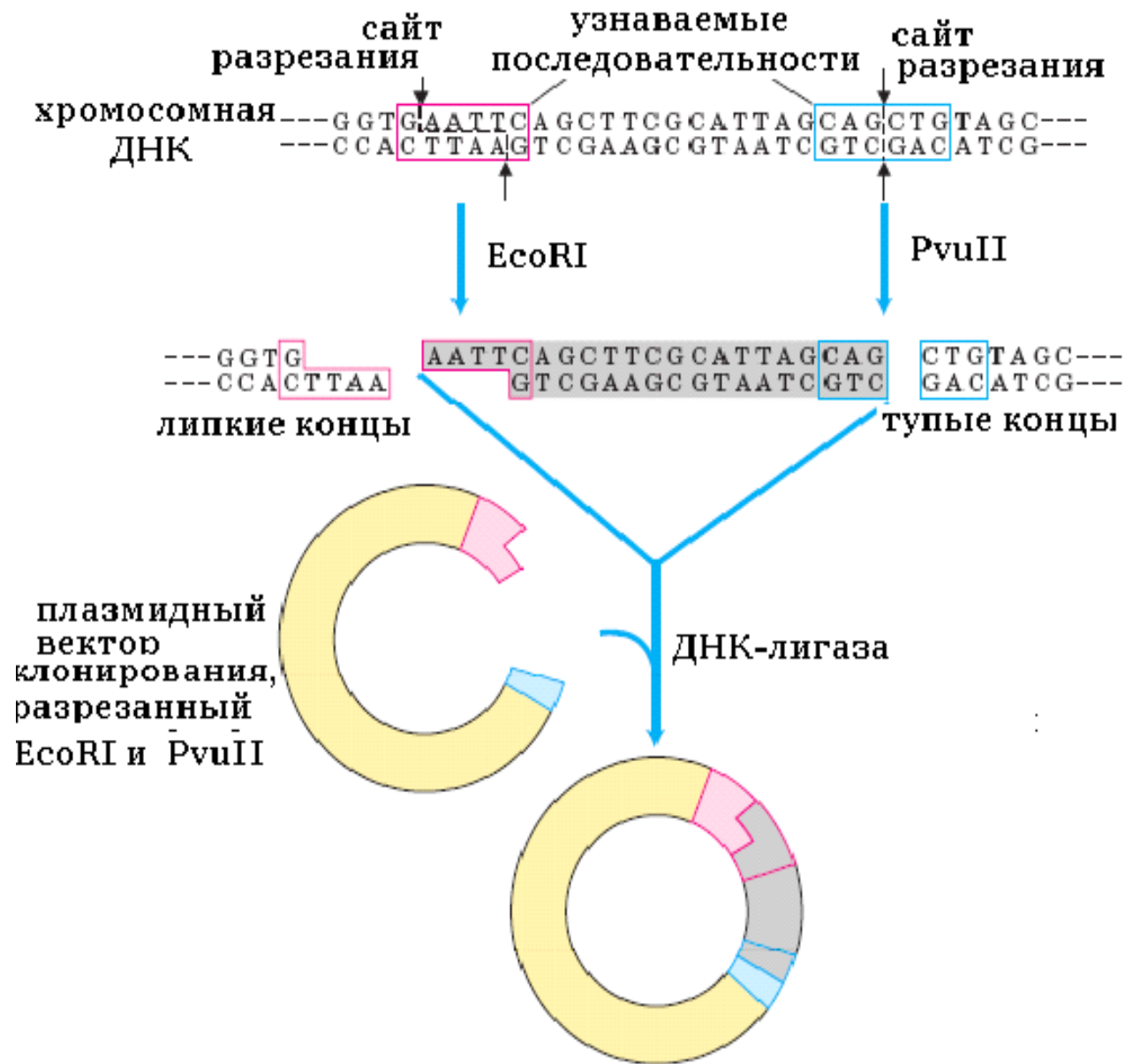
Кері транскриптаза ферменті арқылы синтезделген гендерді бактерия клеткасына енгізбестен бұрын, оларға реттеуші элементтер жалғайды. Прокариоттарда сплайсинг өтпейтінін ескерсек, онда генді ферменттік жолмен синтездеу үшін матрица ретінде гяРНҚ-ны емес, жетілген аРНҚ пайдалану керек.



Рекомбинантты ДНК құрастыру әдістері

Рек ДНК құрастырудың жабысқак ұштар әдісі.

Рекомбинантты ДНК құрастырудың ең кең таралған әдісі рестриктазаларды қолдануға сүйенеді. Ол жабысқак ұштар әдісі деп аталады. Бұл әдісте рекомбинантты ДНК құрастыру Коэн-Бойер үлгісі бойынша іске асады. Ген де (бөтен ДНК үзіндісі де) және векторда бір рестрикциялық ферменттің көмегімен үзіледі, нәтижесінде олардың ұштары бір-біріне комплементарлы, яғни жабысқак болғандықтан гибридік (немесе химерлі) ДНК молекуласына ДНК лигаза ферментінің көмегімен оңай бірігеді. ‘Жабысқак ұштар әдісі өзі танитын ДНК бөлігін симметрия өсінен біршама қашықтықта үзетіп рестриктазаларға сүйенеді.

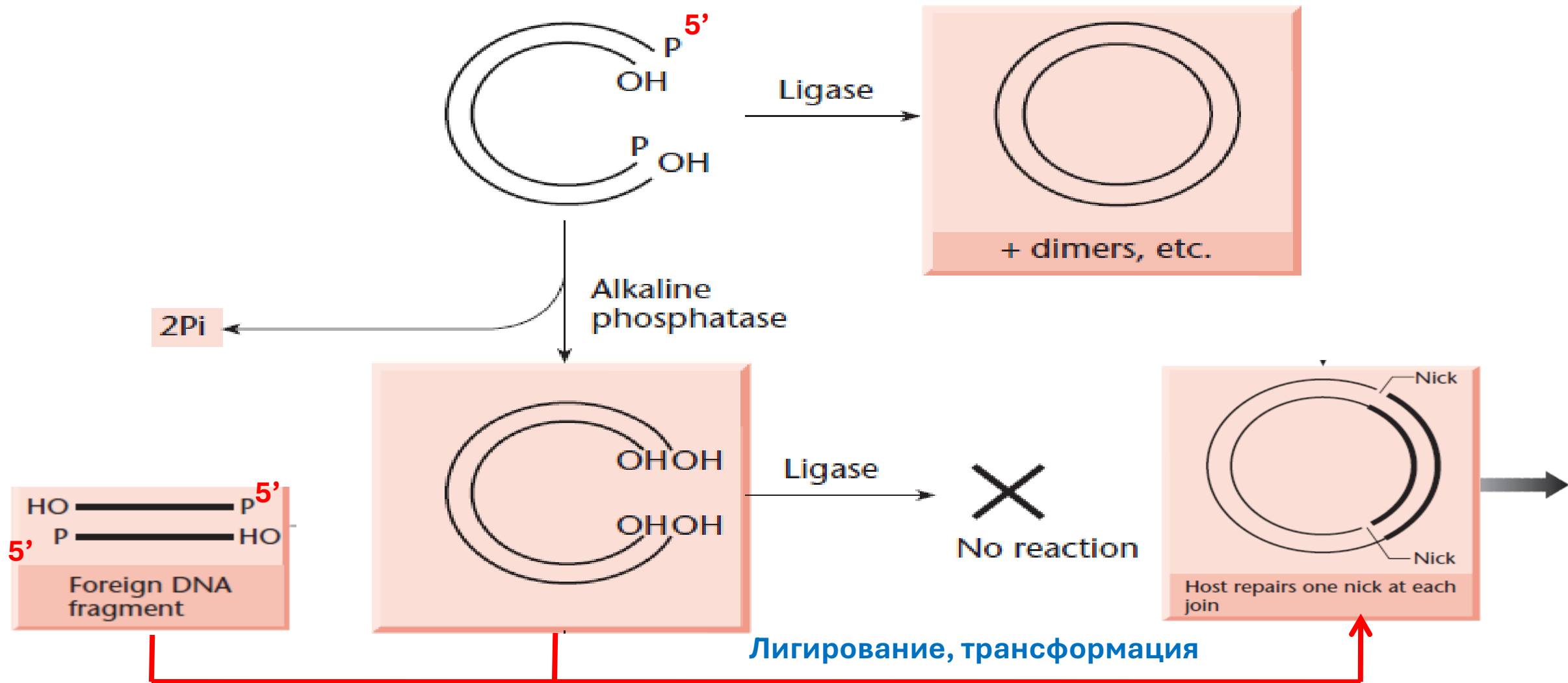


Рекомбинантты ДНҚ-ны жабысқақ ұштар әдісі бойынша құрастырудың жақсы жақтары және кемшіліктері бар.

Алынған гибридтік ДНҚ тізбегінде рестриктаза тани алатын бөліктердің қалпына келуі әдістің жақсы жағын сипаттайды. Бұл бөтен ДНҚ фрагментін осы рестриктазаның әсерімен салыстырмалы оңай бөліп алуға мүмкіндік береді.

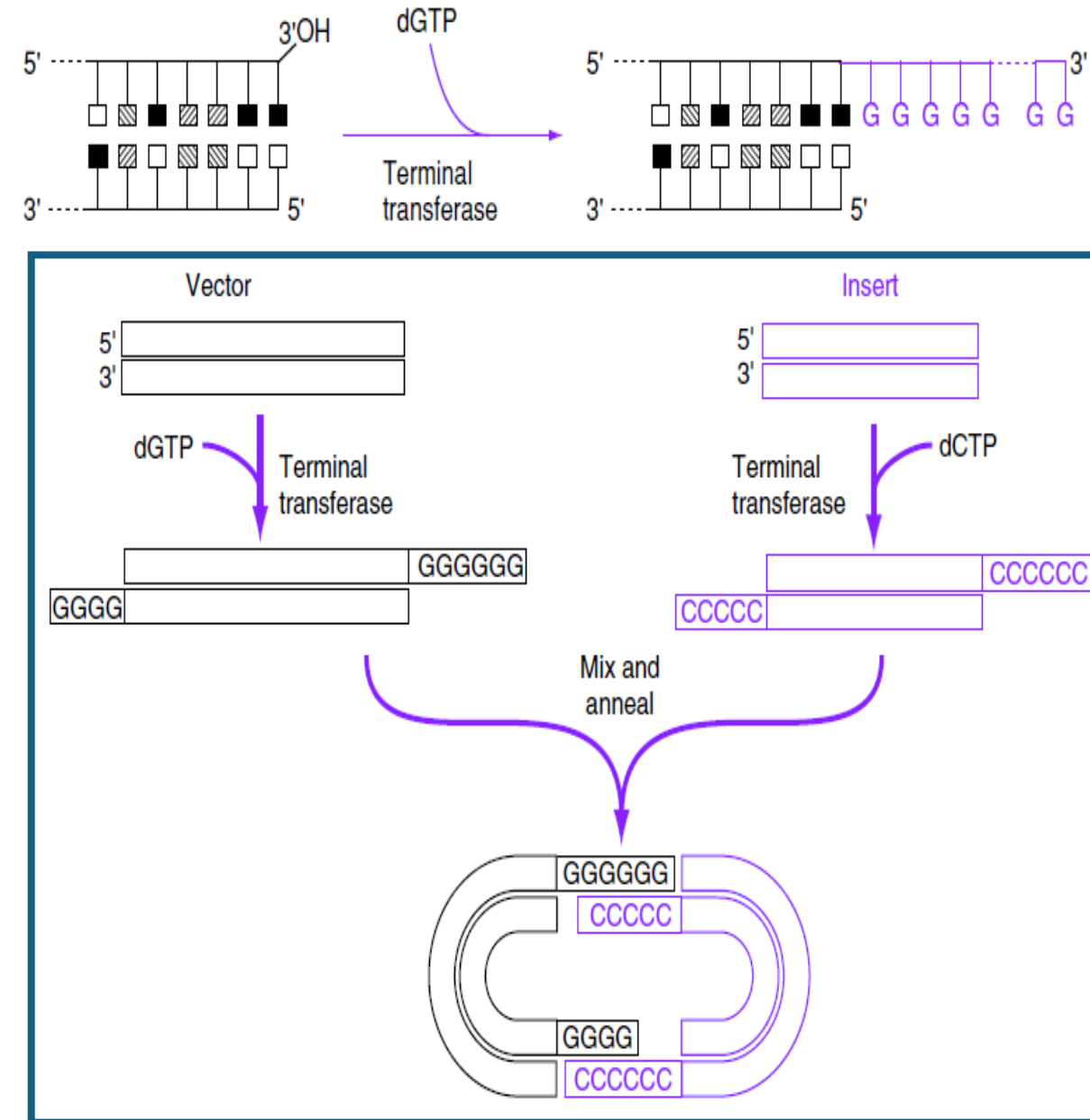
Ал, рестриктаза арқылы алынған барлық тізбектердің – жабысқақ ұштардың бір-бірімен (гомологты тізбектер) реассоцияланып (қайтадан бірігуі) кетуі әдістің кемшілігін көрсетеді. Осының нәтижесінде векторлық молекулалардың бірқатар бөлігі ендірмелермен емес, өз ұштарымен тікелей әрекеттесуі арқасында қалпына келеді, ал басқа векторлар болса бірнеше біріккен бөтен ДНҚ молекулаларынан құралған ендірмелермен қосылып кетуі мүмкін. Сондықтан бір ғана ендірмесі бар гибридтік векторларды іріктеу жұмысын асыру керек.

Ендірімесіз вектордің қайта тігілуін тсілтілі фосфатазаның көмегімен алдын-алу



Рек ДНҚ құрастырудың коннекторлық әдісі

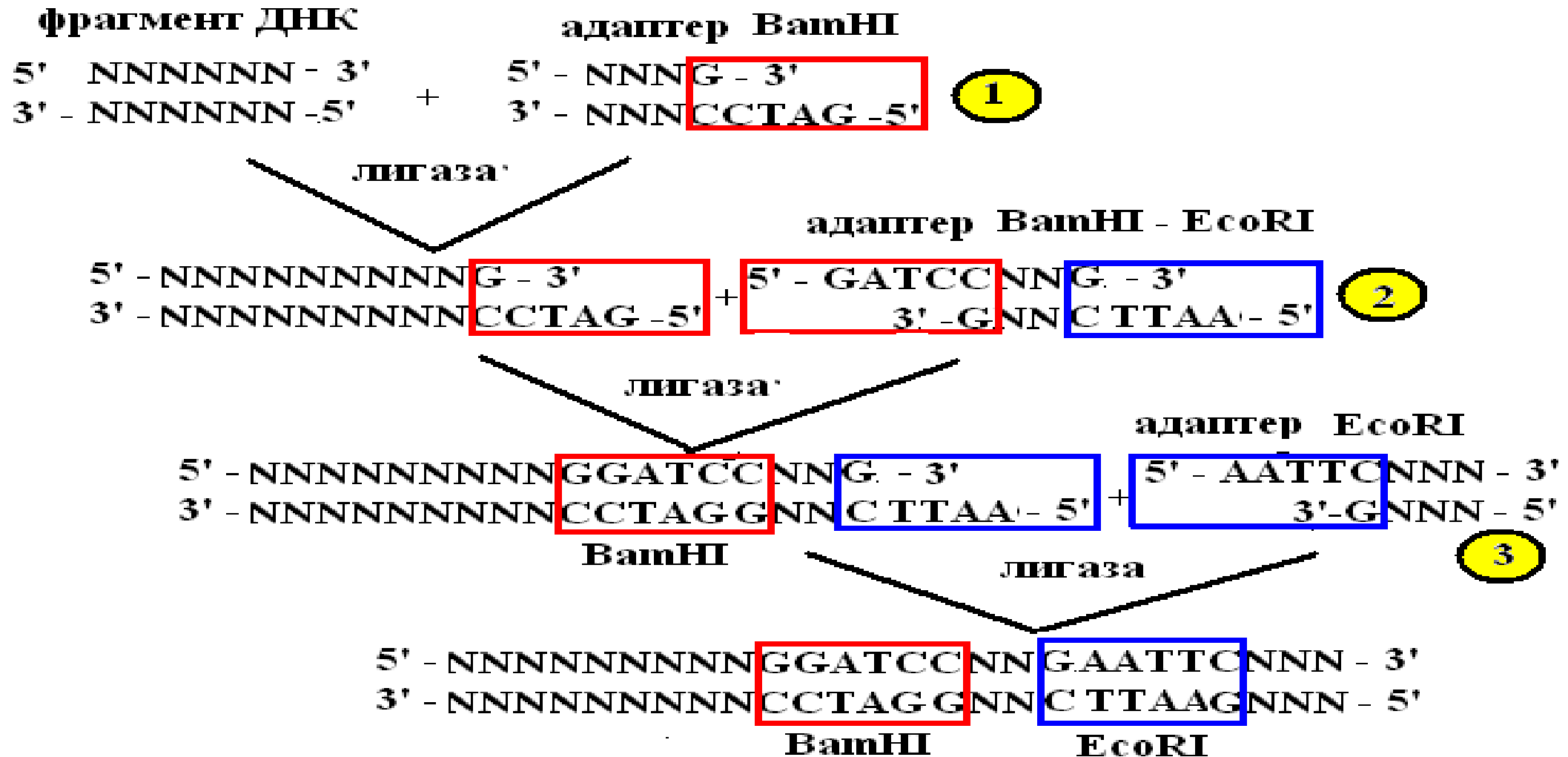
- Гомополимерлі ұштар әдісінде немесе конекторлық симметрия өсімен үзетін рестриказа арқылы алынған ДНҚ фрагменттерінің «доғал» ұштарына (шығыңқы бір тізбекті бөлігі жоқ) терминалдык трансфераза ферментінің көмегімен гомонуклеотидтер, мысалы ДНҚ-ның 3'— ұштарына поли (Т) немесе поли (Ц), ал векторлық ДНҚ-ның 3'— ұштарына поли (А) немесе поли (Г) жалғанады. Гомополимерлі ұштардан құралған ДНҚ фрагменттерін (бетен ДНҚ және вектор) бір ортаға қосса, олар комплементарлы жұп негіздерін түзеп, оңай бір молекулаға бірігеді. Немесе ДНҚ фрагментіне де, вектордың ұшына да синтетикалық қос тізбек (линкер) жалғайды. Сонан соң линкерді танитын және оны жабысқақ етіп рестриктазамен үзеді. Осылайша бұл жолмен де жабысқақ ұштар алынады. Рекомбинантты ДНҚ молекуласын құрастырудың бұл әдісі Лобан-Берг идеясына сүйенеді.



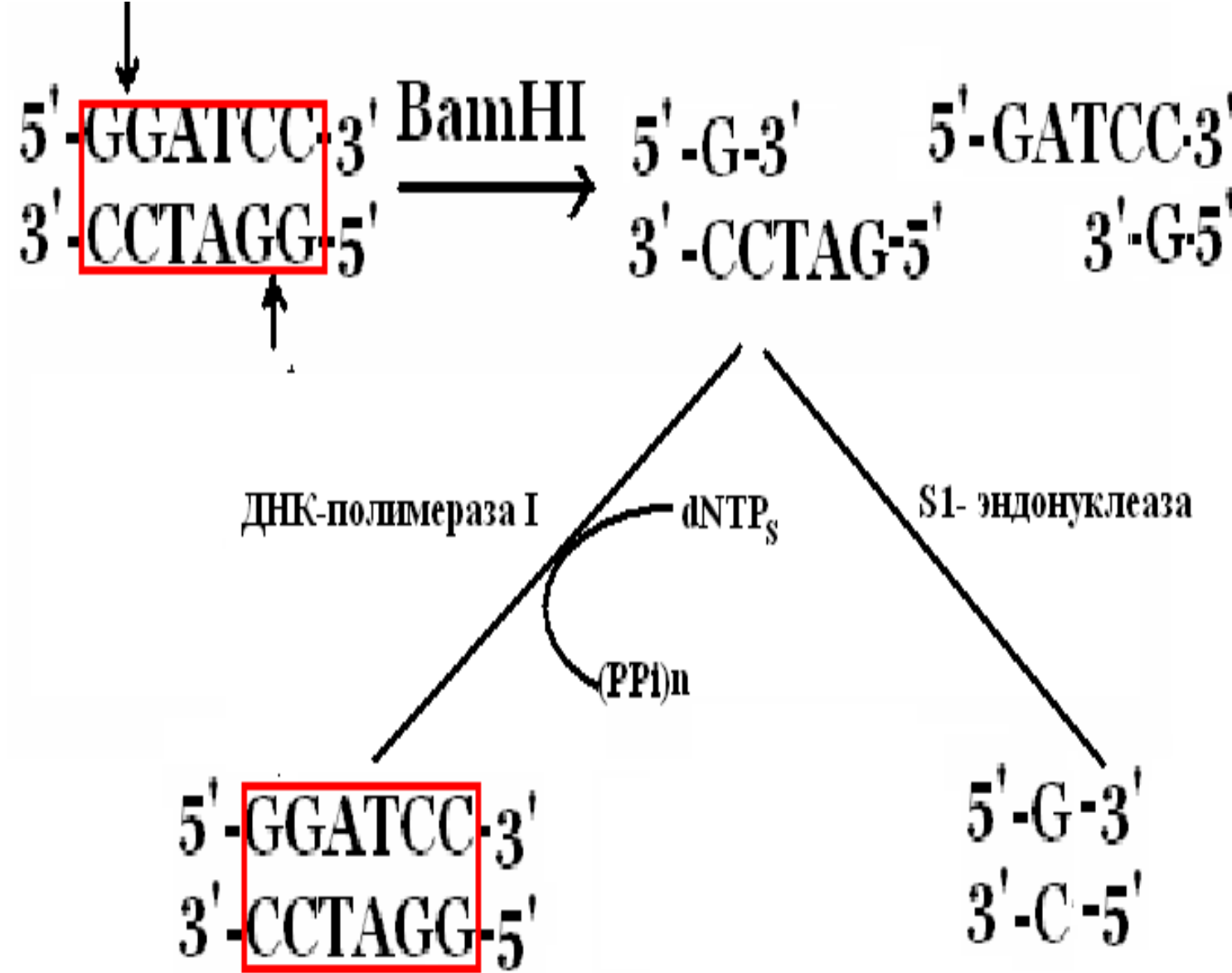
Әртүрлі жабысқақ немесе жабысқақ және доғал ұштары бар фрагменттерді тігу

- Әр түрлі рестрикциялық эндонуклеазалардан пайда болған және әртүрлі, яғни комплементарлық емес жабысқақ ұштары немесе доғал және жабысқақ ұштары бар ДНҚ фрагменттерін біріктіру қажет болған жағдайда, адаптерлер (to adapt – переделывать) немесе линкерлер (to link – байланыстыру үшін) қолданылады. Бұл молекулалық «переходниктер».

- Әр түрлі адаптерлердің көмегімен ДНҚ фрагменттерінің ұштарын өзгерту: “доғал - жабысқақ” (1); «Жабысқақ - жабысқақ» (2); «Жабысқақ - доғал» (3).

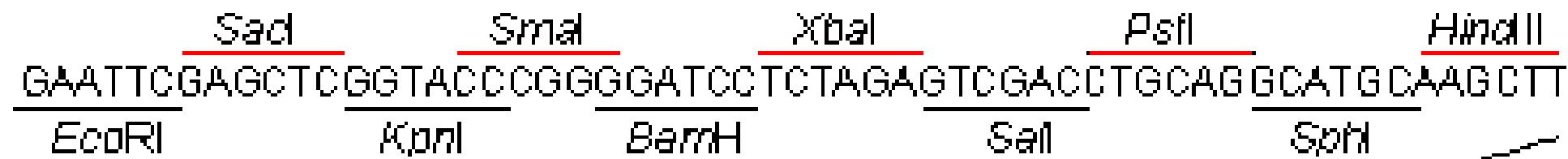


• Рестрикциялық ДНҚ фрагменттерінің жабысқақ ұштарын доғал ұштарға



Рекомбинантты ДНҚ молекуласын құрастырудың ыңғайлы әдісі — доғал ұштарды жалғау (тігу). Оның негізіне T4 фагынан бөлінген ДНҚ-лигаза ферментінің доғал ұшты екі ДНҚ молекуласын жалғау қабілеттілігі жатады. Бұл әдістің артықшылығы оның кез келген соңғы нуклеотидтер тізбегін жалғай алатындығынан тұрады. Егер белгілі екі тізбекті араларына ендіреусіз жалғау керек болса, онда бұл әдісті пайдалану өте ыңғайлы.

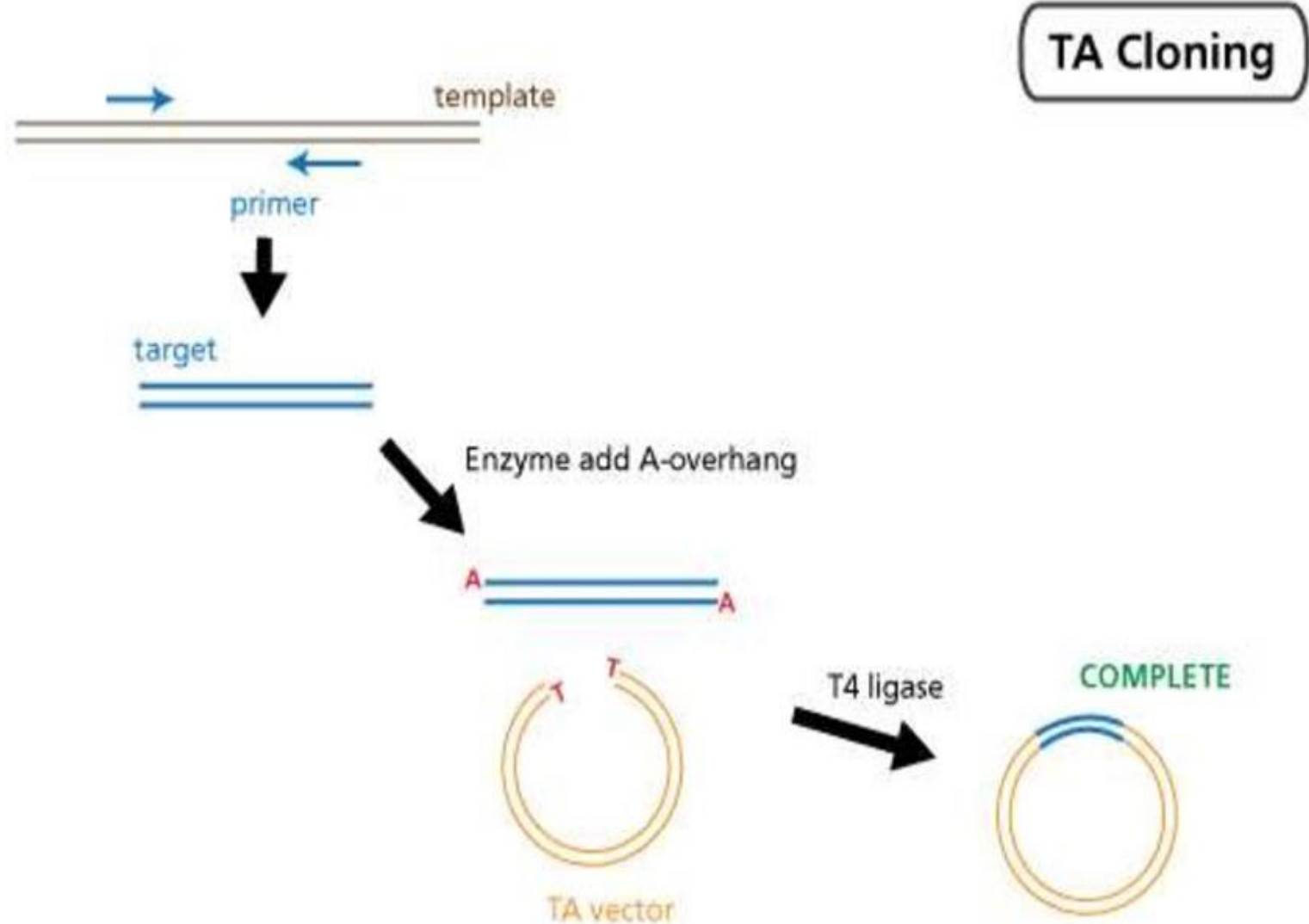
- Рекомбинантты ДНҚ құрастырудың қаралған үш әдісінің бірнеше модификациялары (өзгешеліктері) бар және де ген мен векторлық молекуланың ерекшелігіне байланысты методологиясы әртүрлі болуы мүмкін. Көпшілік жағдайда линкер технологиясы қолданылады.
- Бірнеше рестрикциялық эндонуклеазалары үшін рестрикция сайттары бар олигонуклеотидтер полилинкерлер немесе көбтік клондау сайттары (MCS) деп аталады.



Полинкер

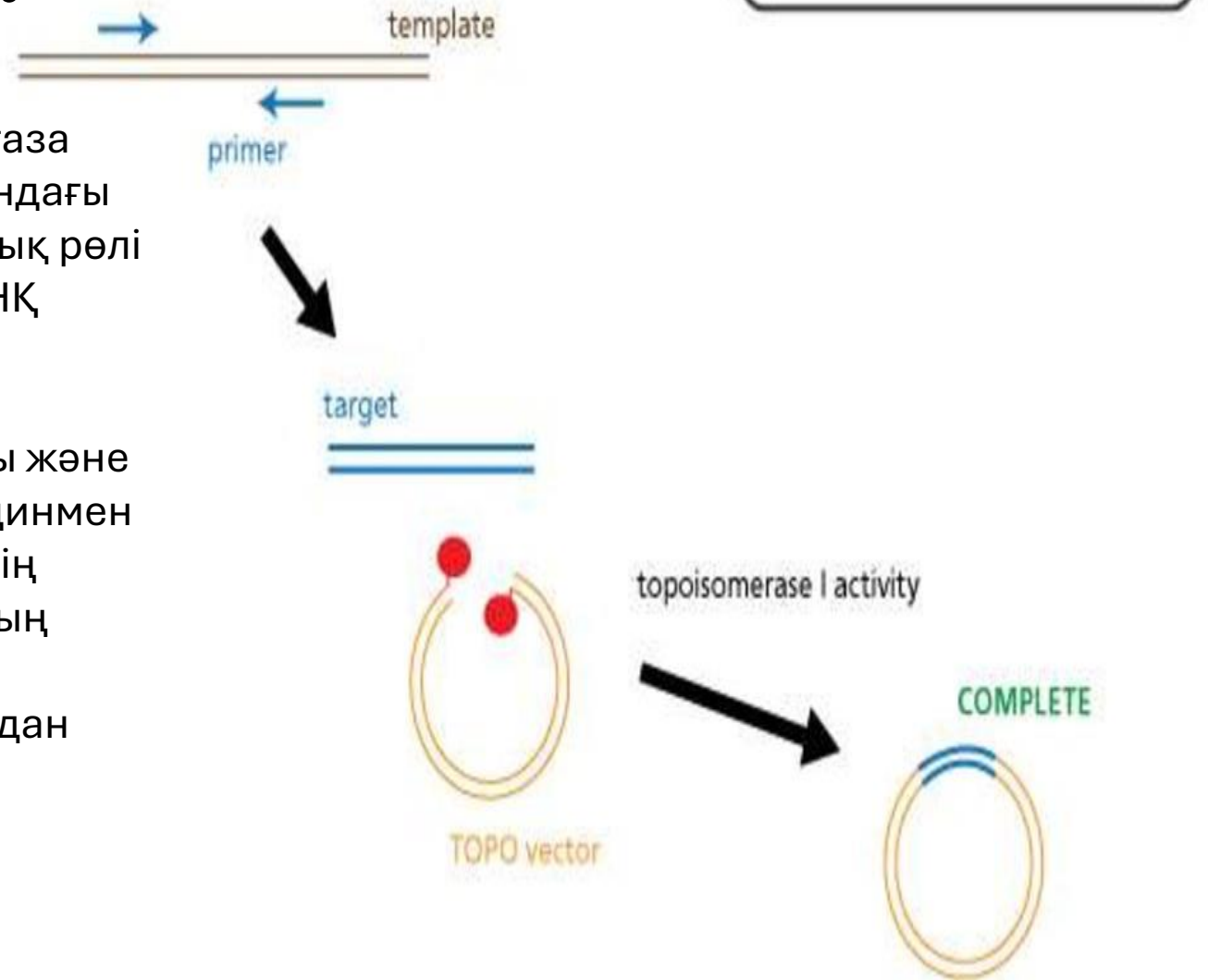
ТА клондау

ТА клондау (жылдам клондау немесе Т клондау деп те аталады) шектеу ферменттерінің қатысуынсыз және дәстүрлі клондауға қарағанда оңай әрі жылдамырақ субклондау әдісі болып табылады. Техника әртүрлі ДНҚ фрагменттеріндегі аденин (А) және тиминнің (Т) (комплементарлы негіздік жұптар) гибридтену және лигазаның қатысуымен біріктіру қабілетіне негізделген. ПТР өнімдері әдетте өнімнің 3' ұшына аденин қосатын Тақ ДНҚ полимераза­сының көмегімен амплификацияланады. Мұндай ПТР амплификацияланған ендірмелер комплементарлы 3' тимин жабысқақ ұштары бар сызықтық векторларға клондалады.

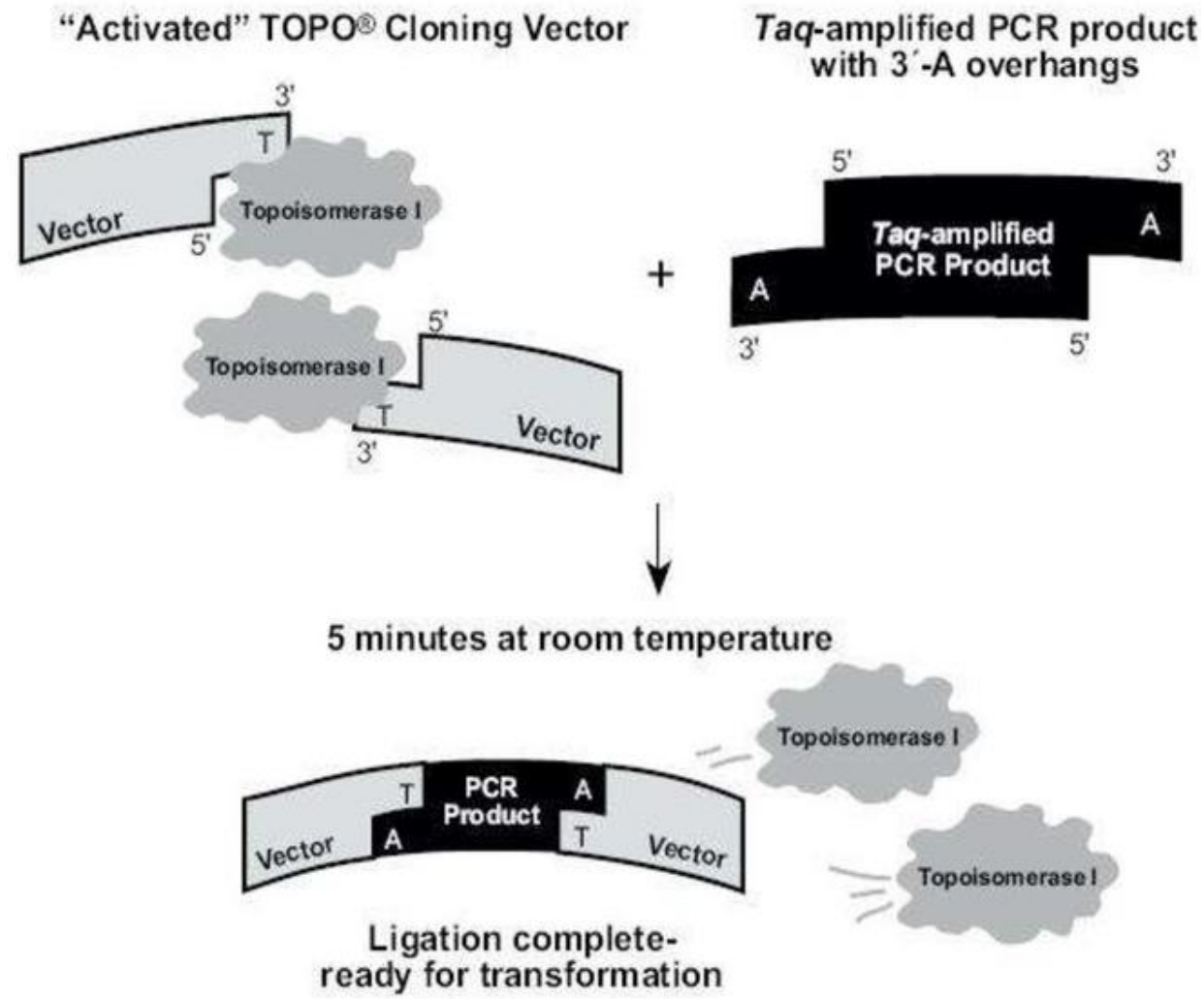
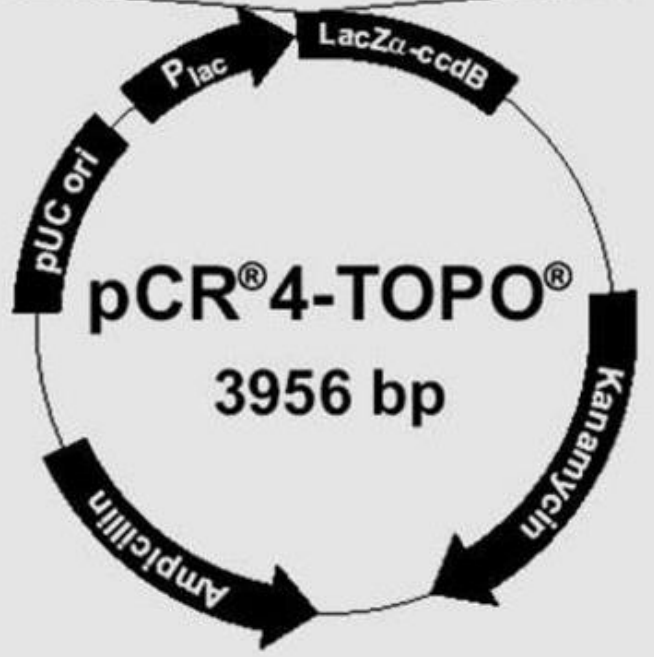
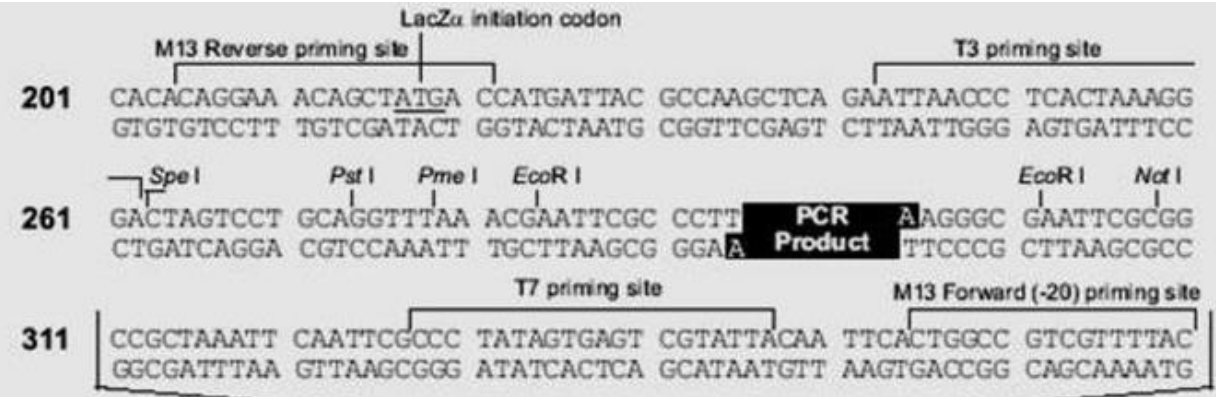


Лигазасыз ТОРО клондау

Әдіс рестрикциялық эндонуклеаза ретінде де, лигаза ретінде де әрекет ететін топоизомераза I қатысуындағы реакцияға негізделген. Бұл ферменттің биологиялық рөлі репликация кезінде аса ширатылған сақиналы ДНҚ молекуласын кесу және кейіннен ширату арқылы босаңсуы болып табылады. Vaccinia вирусы топоизомераза I (C/T) ССТТ тізбегін арнайы таниды және ДНҚ-да бір тізбекті үзілісті енгізе отырып, 3'-тимидинмен ковалентті байланыс түзеді. Үзіліс бір ДНҚ тізбегінің екіншісіне қатысты еркін айналуын және спиралдың босаңсуын қамтамасыз етеді. Осыдан кейін топоизомераза I кесілген тізбектің ұштарын қайтадан тігіп, 3'-тимидинмен байланысты үзіп, босатылады. ТОРО® векторлары



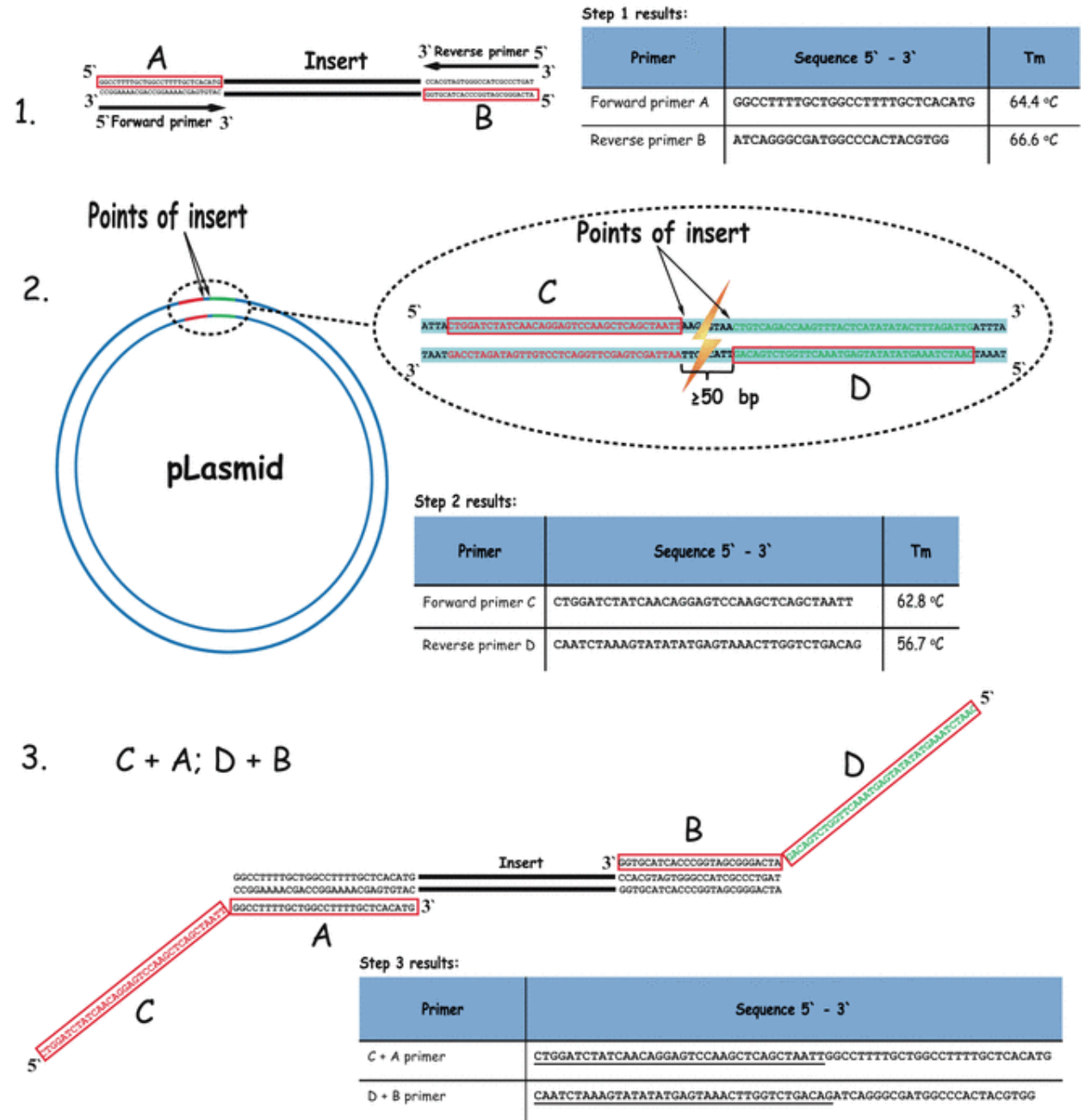
ТОРО клондау векторы

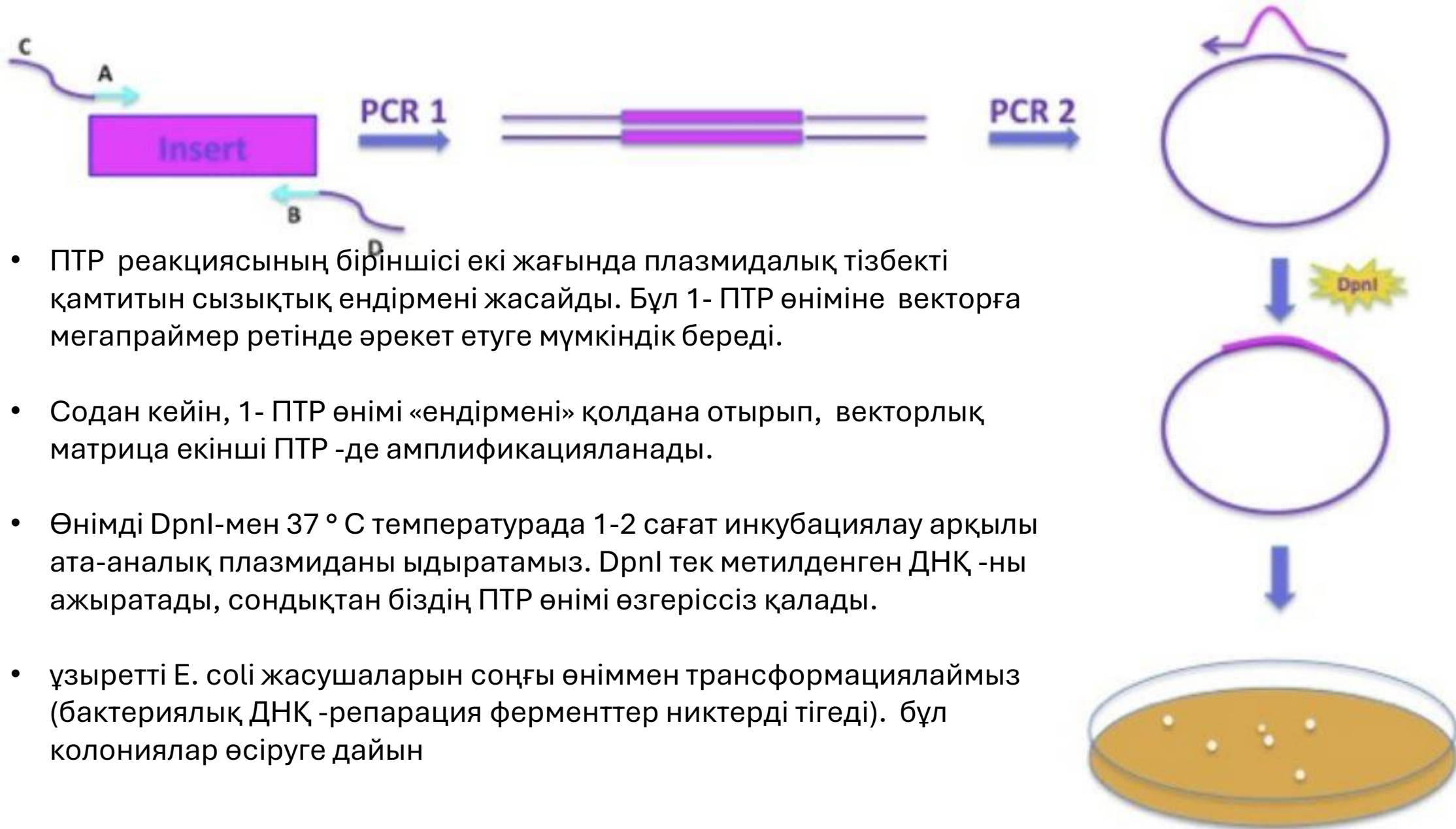


Overlap Extension PCR Cloning- Қабаттастыру арқылы ПТР клондау

Бұл дәстүрлі рестрикциялық әдістеріне қарағанда тез, сенімді және қателіктерді жоюға оңай рестрикция ферменті мен T4 ДНҚ лигазасына тәуелсіз әдіс. Тек екі ПТР реакциясы көмегімен, ДНҚ фрагментін плазмидаға кірістіруге болады

Нысанды генді амплификациялау үшін сәйкес праймерлерді жобалаңыз (онлайн праймерді жобалау құралдарының көптеген түрі бар). Плазмидадағы кірістіру сайттарын таңдаңыз (олар бір-біріне жақын болуы мүмкін, бірақ олар бір-бірінен бірнеше жүз жұп нуклеотидте қашықтықта болған кезде жақсы жұмыс істейді). Плазмиданың «жоғарғы» тізбегіндегі ендірменің сол жақ нүктесінен жоғары қарай және плазмиданың «төменгі» тізбегінің кірістіру оң жақ нүктесінен төмен қарай 30 – 40 жн таңдаңыз. Бұл тізбектерді праймерлеріңізге қосыңыз. 60-65°C Tm қажет екенін есте сақтаңыз – бұл сіздің табысқа жету мүмкіндігіңізді арттырады. Tm бағалау үшін Олиго калькуляторын пайдаланыңыз.





- ПТР реакциясының біріншісі екі жағында плазмидалық тізбекті қамтитын сызықтық ендірмені жасайды. Бұл 1- ПТР өніміне векторға мегапраймер ретінде әрекет етуге мүмкіндік береді.
- Содан кейін, 1- ПТР өнімі «ендірмені» қолдана отырып, векторлық матрица екінші ПТР -де амплификацияланады.
- Өнімді DpnI-мен 37 ° C температурада 1-2 сағат инкубациялау арқылы ата-аналық плазмиданы ыдыратамыз. DpnI тек метилденген ДНҚ -ны ажыратады, сондықтан біздің ПТР өнімі өзгеріссіз қалады.
- ұзыретті E. coli жасушаларын соңғы өніммен трансформациялаймыз (бактериялық ДНҚ -репарация ферменттер никтерді тігеді). бұл колониялар өсіруге дайын