



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

ДӘРІС 8. ӨСІМДІКТЕР ГЕНДІК ИНЖЕНЕРИЯСЫ

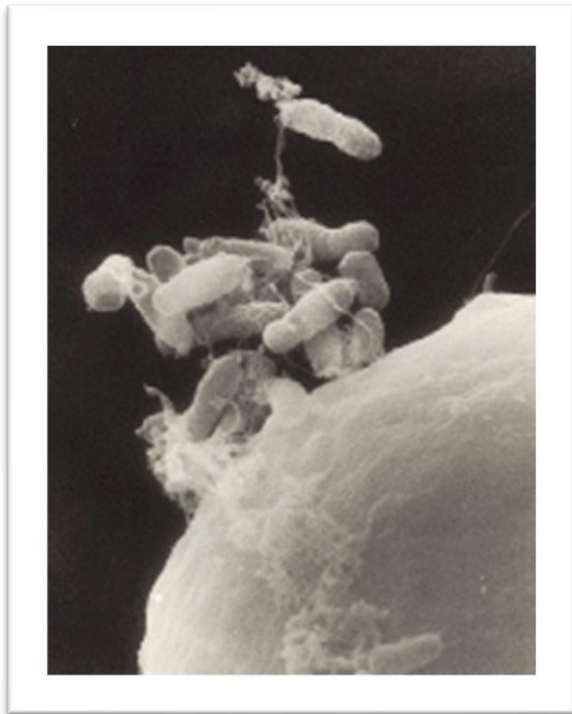
Лектор: PhD, қауымдастырылған
профессор Тайпақова С.М.

Жоспар:

- **Агробактериялар**
- **Ri-плазмида**
- **Ti-плазмида. T-ДНК (transferred DNA) гендері**
- **Агробактериалық трансформацияның негізгі этаптары**
- **Өсімдіктер клеткаларын трансформациялау**
- **Маркерлік гендер**

..Агробактериялар..

- ***Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*)** — Rhizobium туысына жататын таяқша пішінді, грамм теріс, шартты аэробты топырақ бактериялары. Қос жарнақты өсімдіктердің фитопатогені. Фитопатоген залалданған өсімдіктерде тәжді галл тудырады. Гендік инженерияда өсімдік трансформациялауда қолданылады.



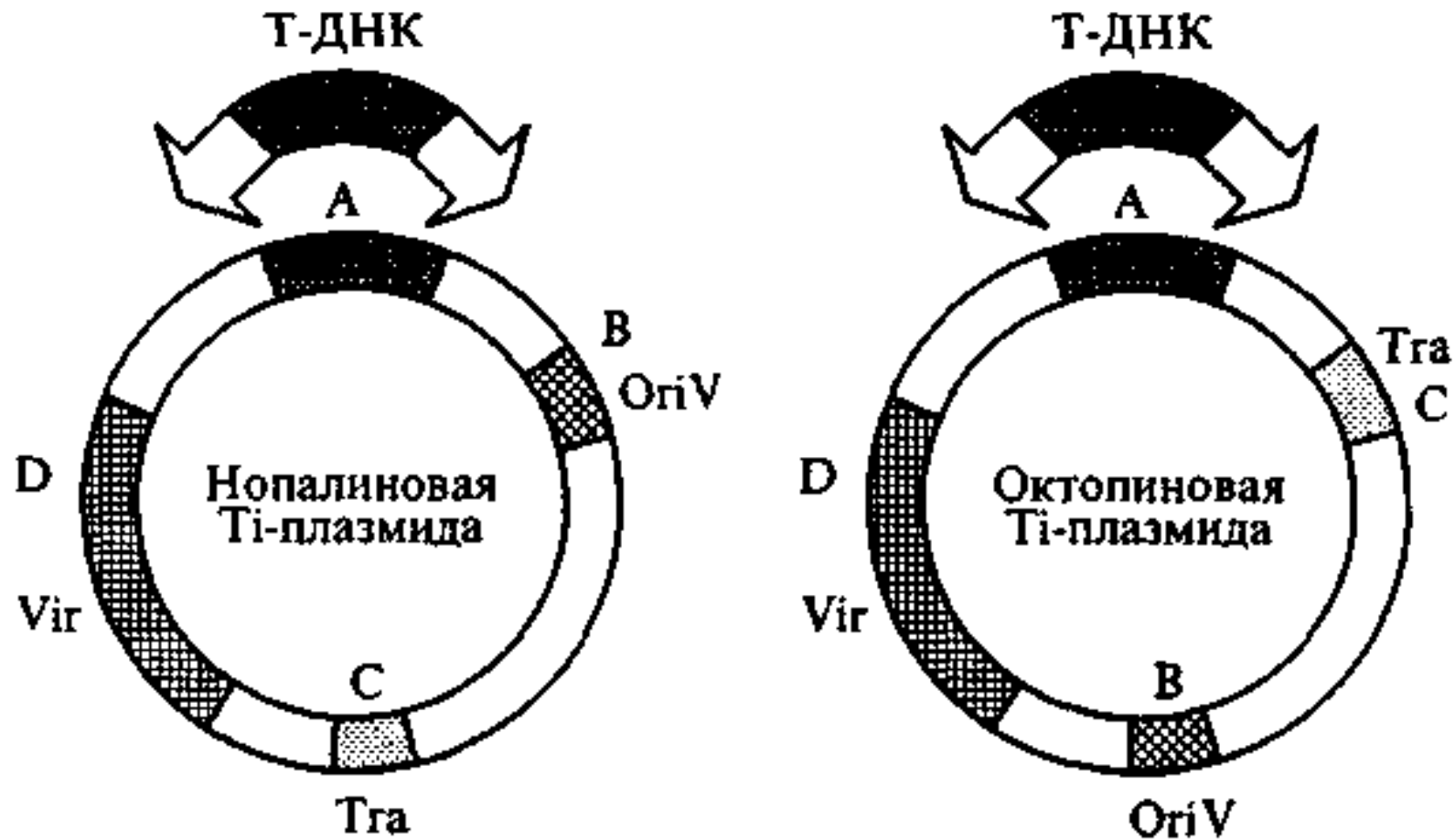
*Тамырда түзілген тәжді галл.

* **A. Tumefaciens** бактериялы табиғы механизм арқылы өз плазмидасын өсімдікке тасымалдай алады. Табиғатта бактериялар өсімдіктердің зақымдалған жеріне бекініп, плазида бөлігі өсімдік клеткасына енеді. Нәтижесінде өсімдік клеткалары тәжді галл атты ісік түзеді. Бұл плазмидалық ДНҚның эукариот клеткасына тасымалдануының табиғатта кездесетін жалғыз мысалы және генетикалық ақпараттың тасымалдануының бұл механизмі генетикалық инженерияда қолдануға өте тиімді

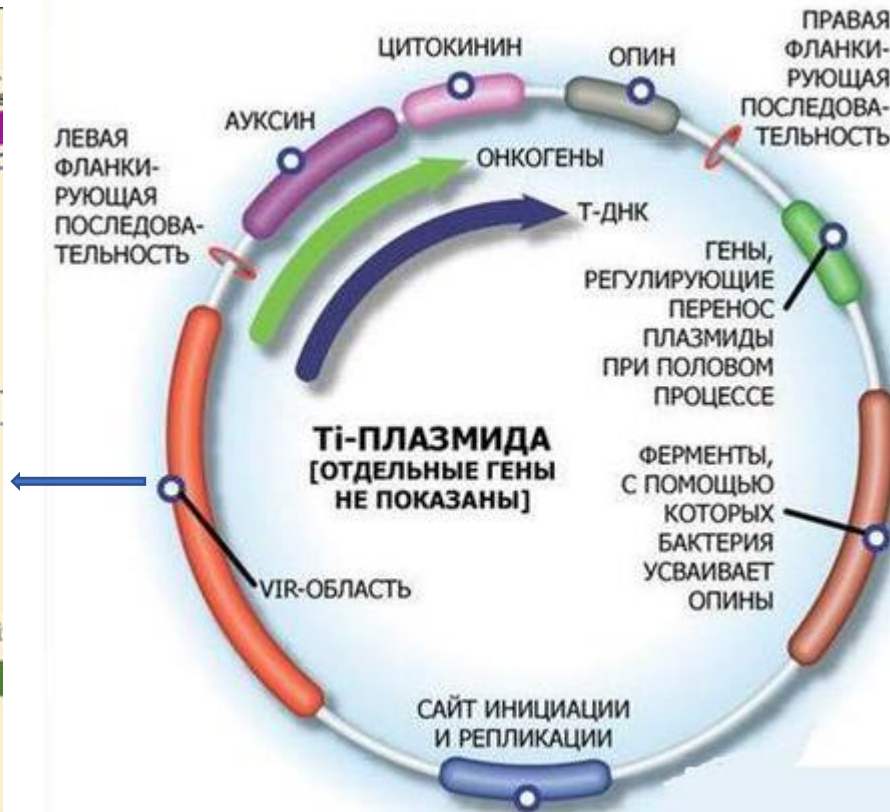
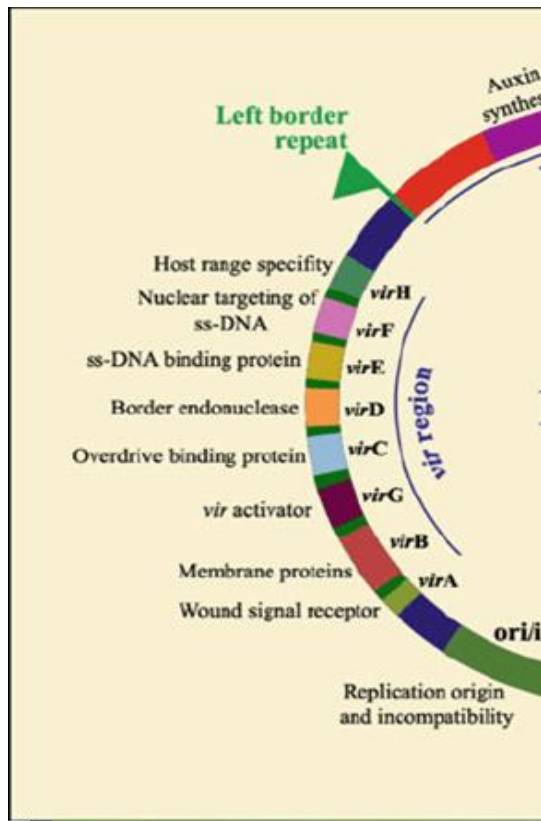


1907 жылы Э. Смит пен К. Таунсенд. *A. Tumefaciens* бактерияларының патогендігін анықтады

1974 ісік тудырушы агент Ti (tumor inducing) – плазмидасы екендігі анықталды.



Нопалиндік және октопиндік Тi-плазмидаларының структурасы



RB 5' ... GXX TGXCAGGATATATXXXXXXGTXAXX ... 3'
 LB 5' ... XGG TGGCAGGATATATXXXXXTGTAAX ... 3'

Ті-плазмидасының структурасы

Ті плазида -200-250 мжн.

- Т-ДНК (transferred DNA) –10-30 мжн.

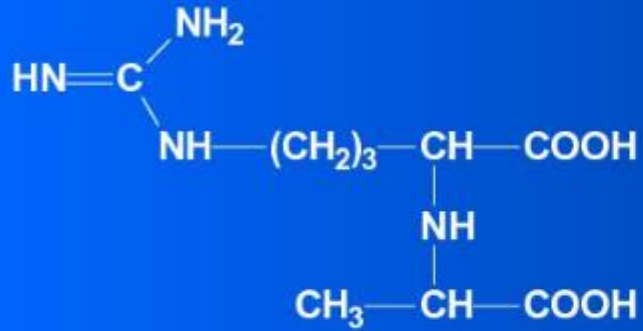
Ауксиндер (Индол -3-сірке қышқылы) -тамыр мен өскіндердің түзілуі және соматикалық эмбриогенез индукциясы

Цитокинины (кинетиндер) - тамыр түзілуін тежейді

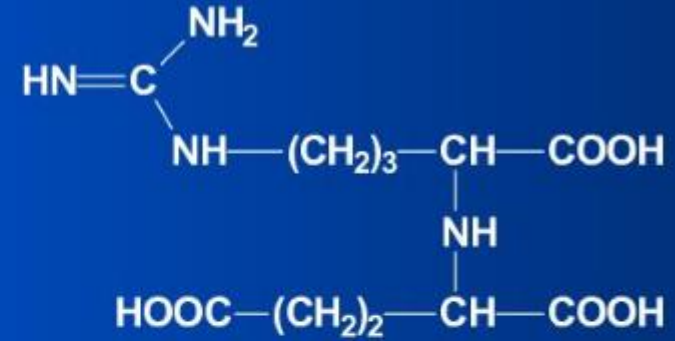
Опидер (октопин, нопалин) -аргинин туындылары

- 35 *vir* гені.
- 25 жн тура қайталанулар.

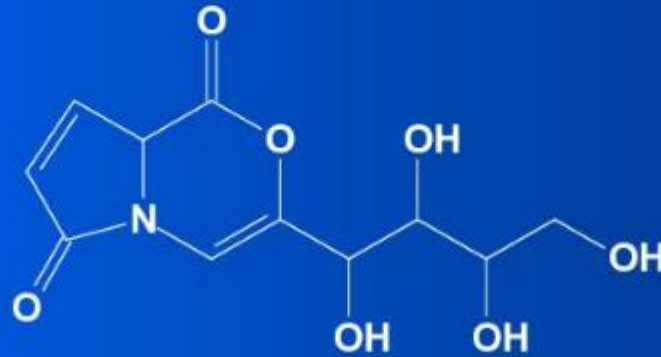
Опины



октопин



нопалин

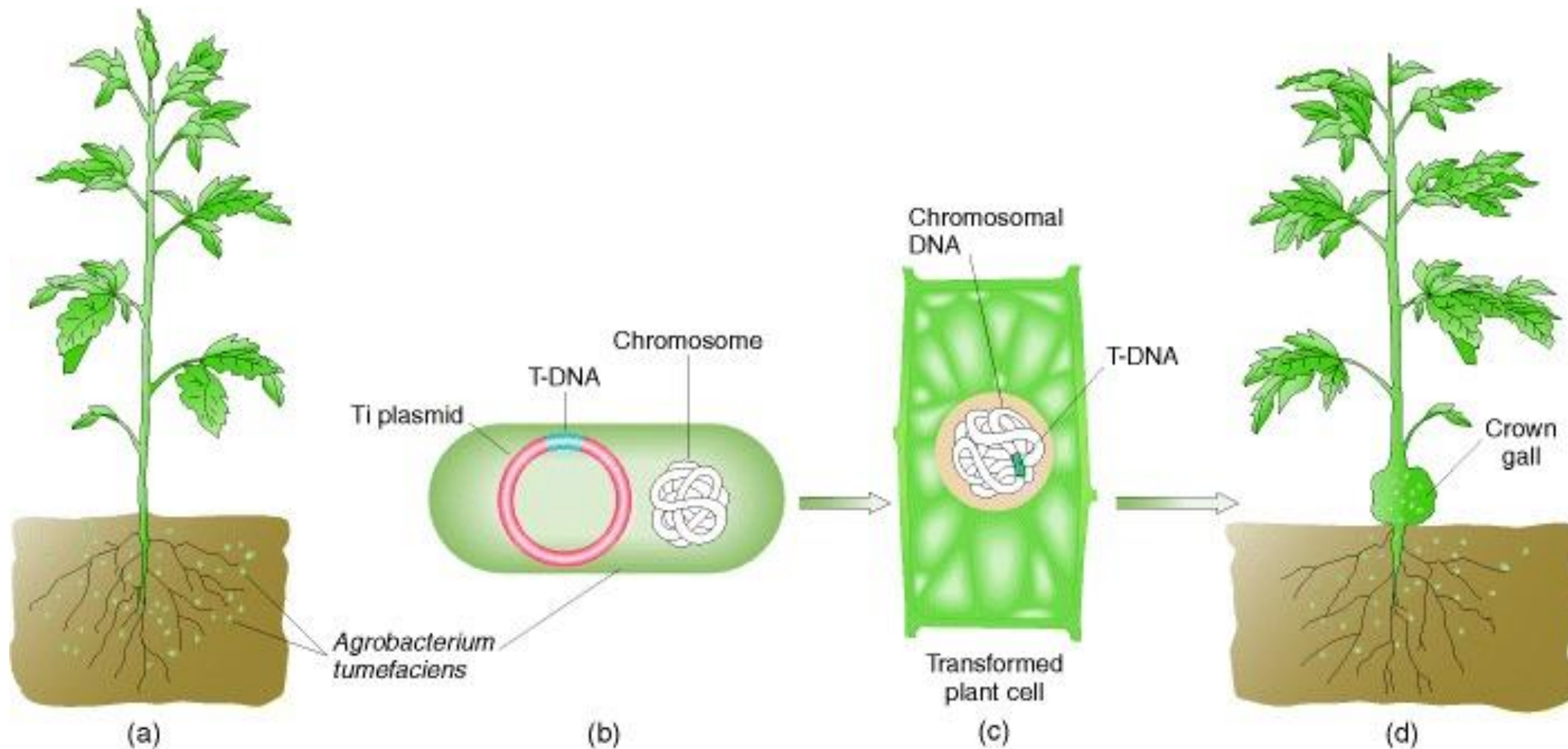


агропин

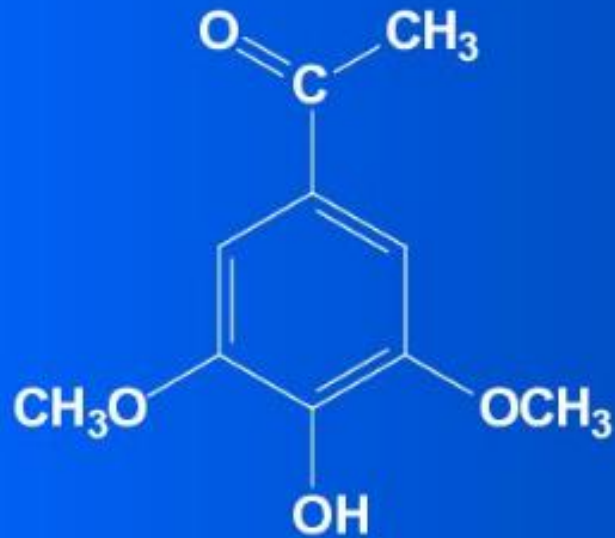
Опиндердің бірнеше түрі белгілі: октопин, нопалин, агропин, манопин, агроцинапин.

Опиндер *Agrobacterium tumefaciens* бактерисымен залалданған өсімдіктердің тәжді галл өсіндісінде түзіліп, агробактериялардың қорек көзі болып табылады.

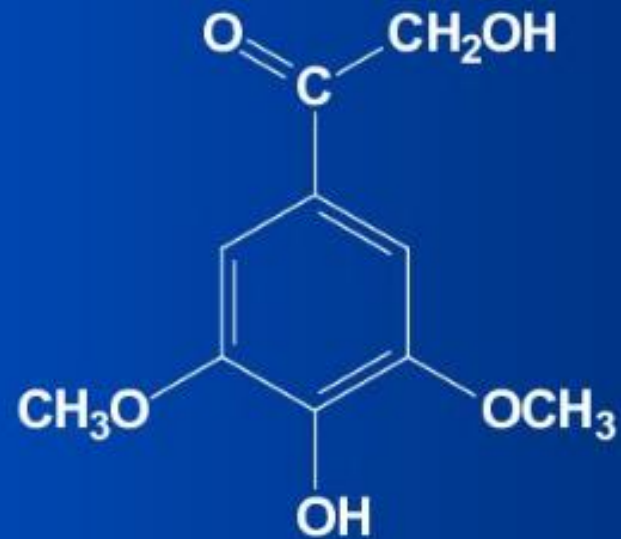
A. *Tumefaciens* бактерияларымен өсімдіктердің генетикалық трансформациясы



Өсімдіктің *A. Tumefaciens* бактериясымен генетикалық колонизациялануы : а- агробактериялар ризосферада тіршілік етеді; б - *A. Tumefaciens* құрылысы; с –Т-ДНК геномға енуі; d – ісіктің туындауы

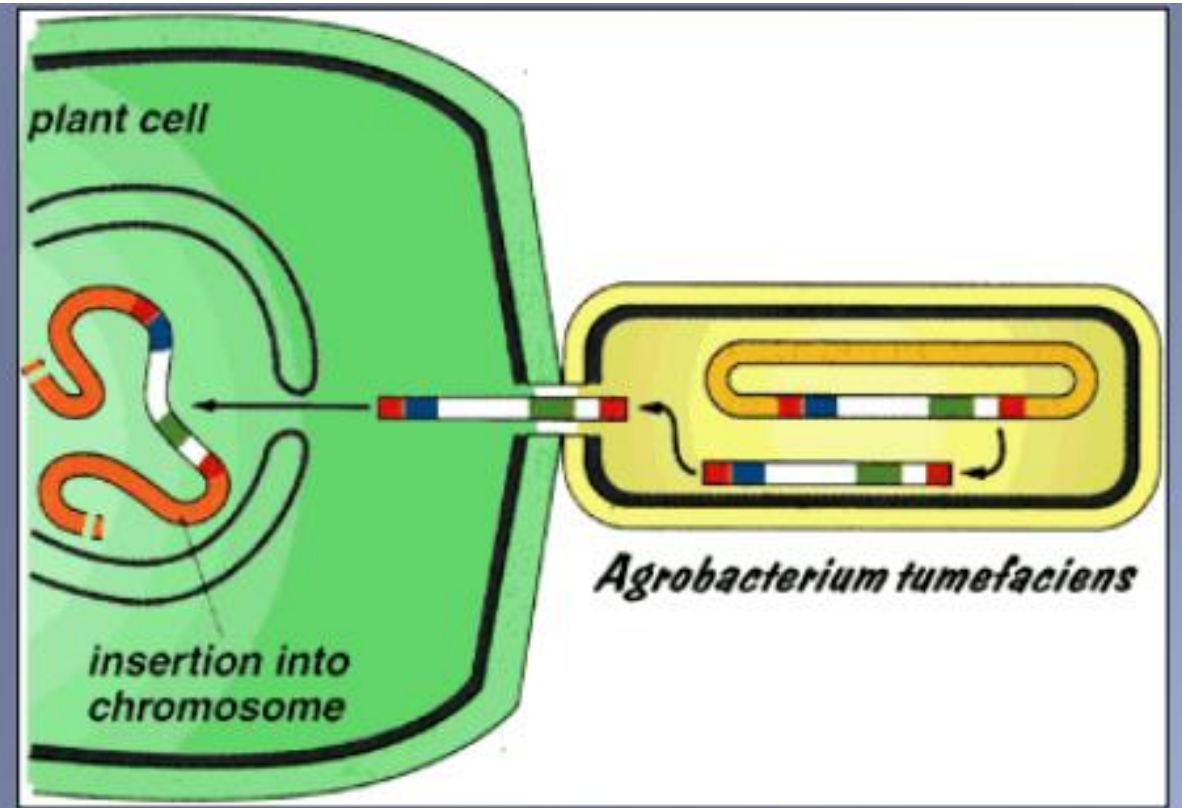
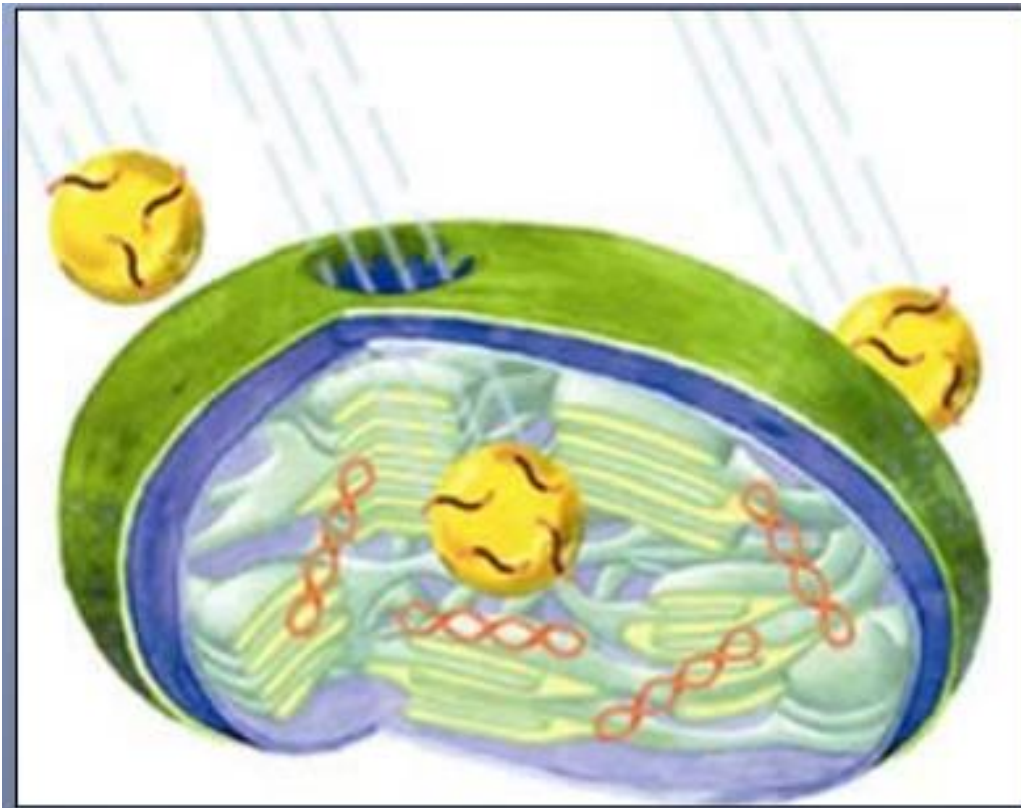


ацетосирингон

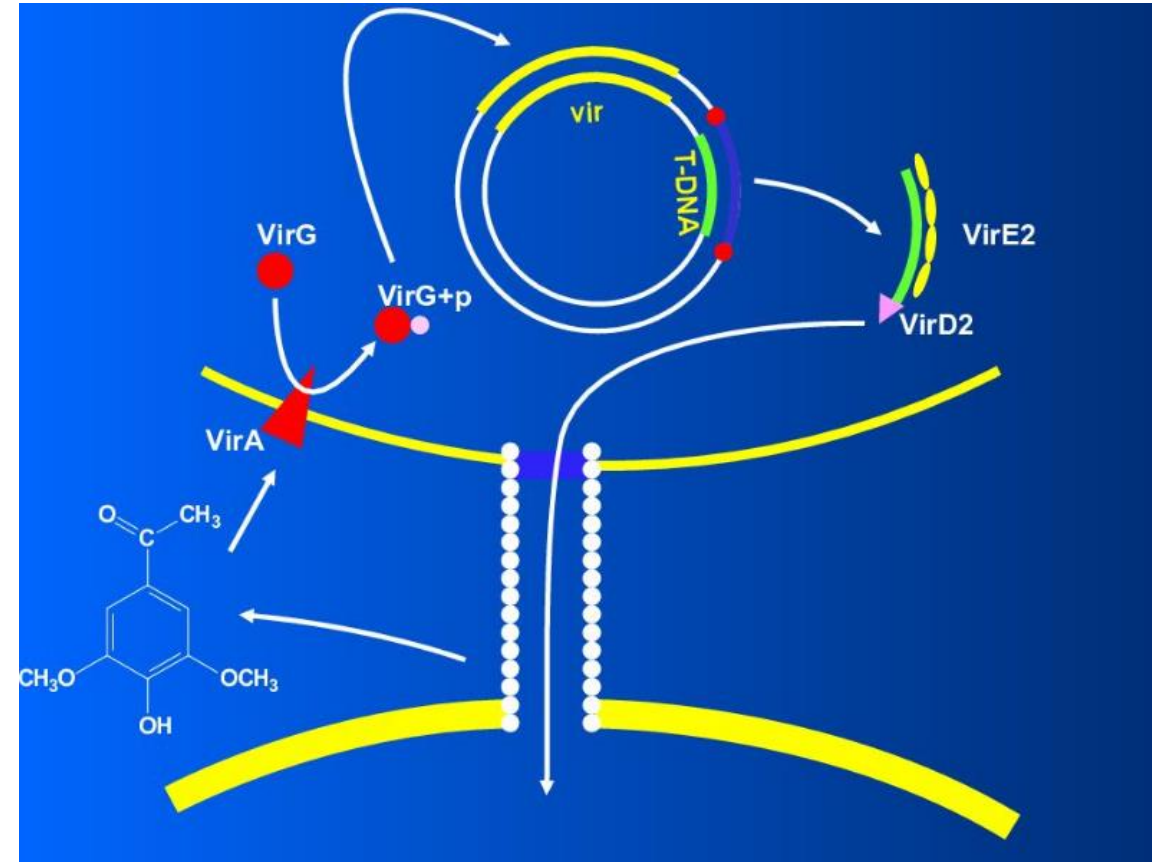
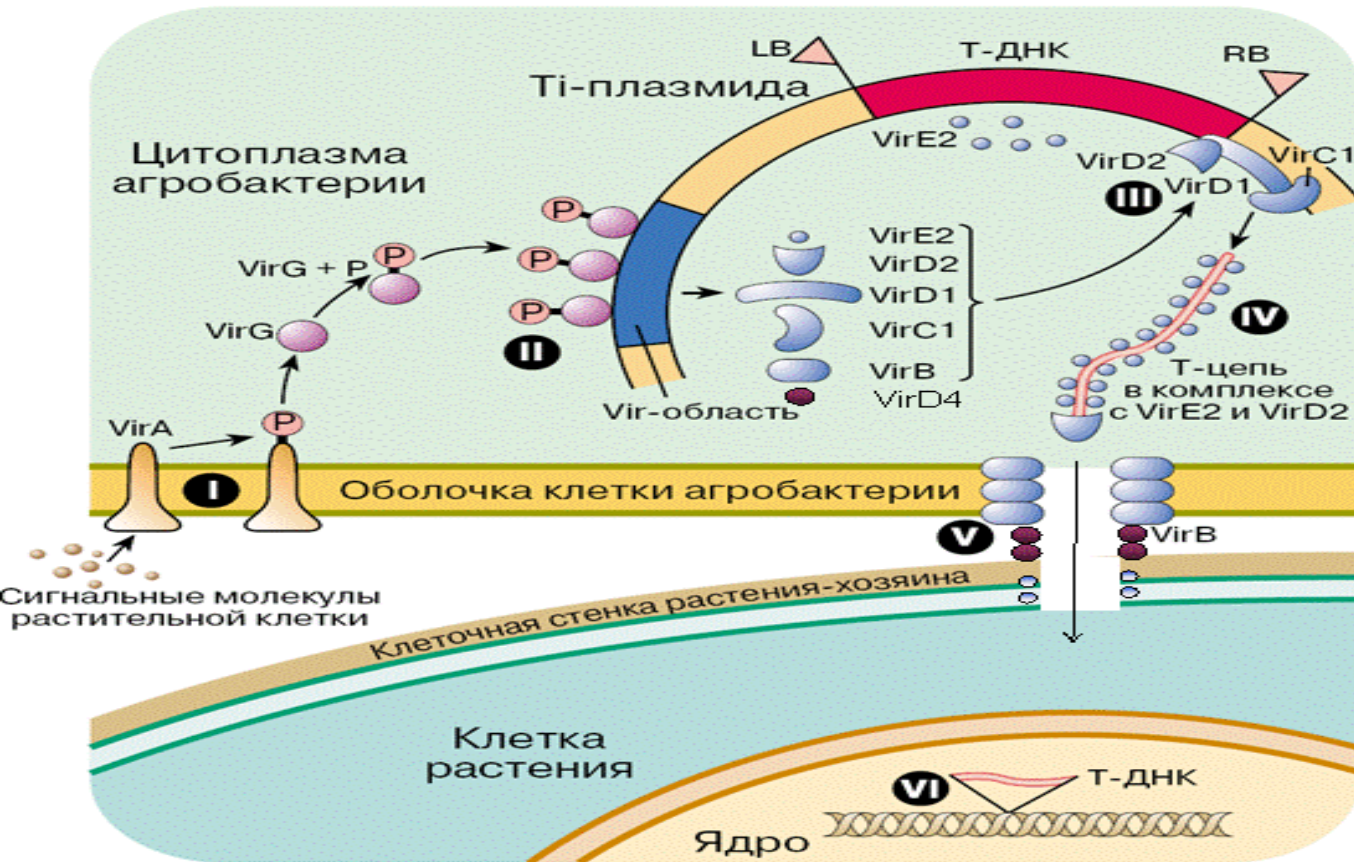


гидроксиацетосирингон

vir гендерінің активтенуін өсімдік жарақатынан бөлінетін рН 5,0-5,8 фенолды қосылыстарға бай сөлі шақырады



Агробактериалық трансформацияның негізгі этаптары



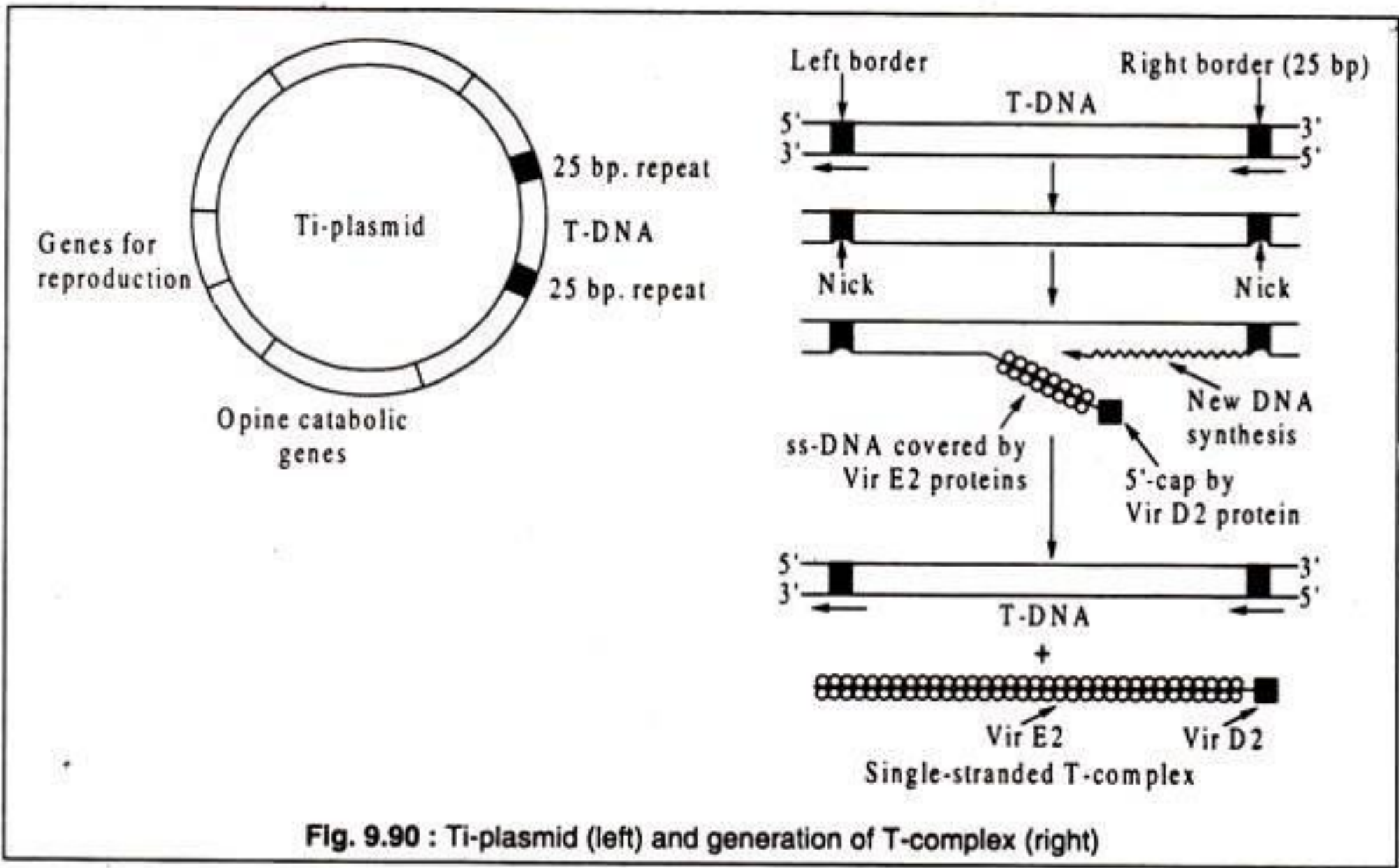
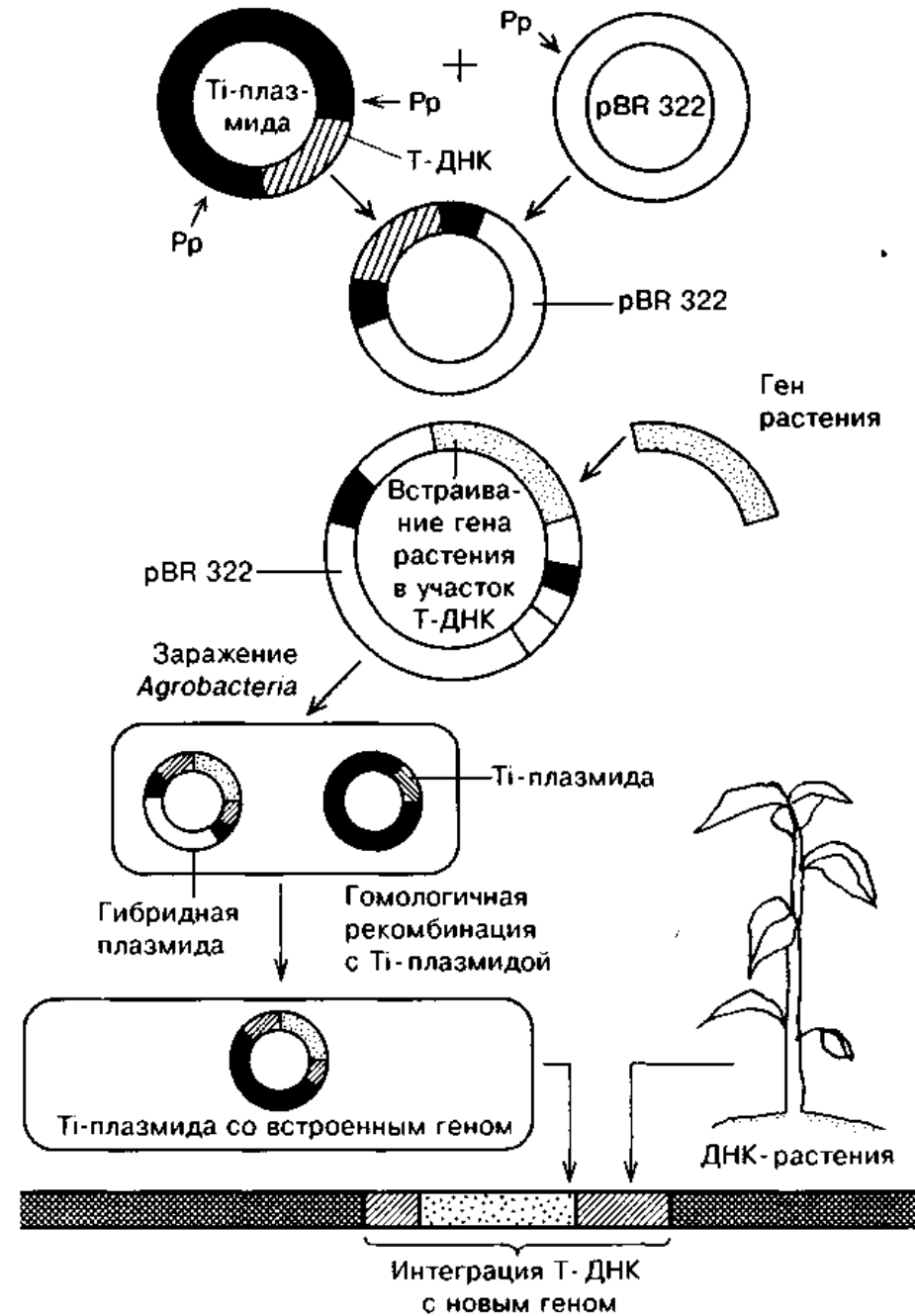
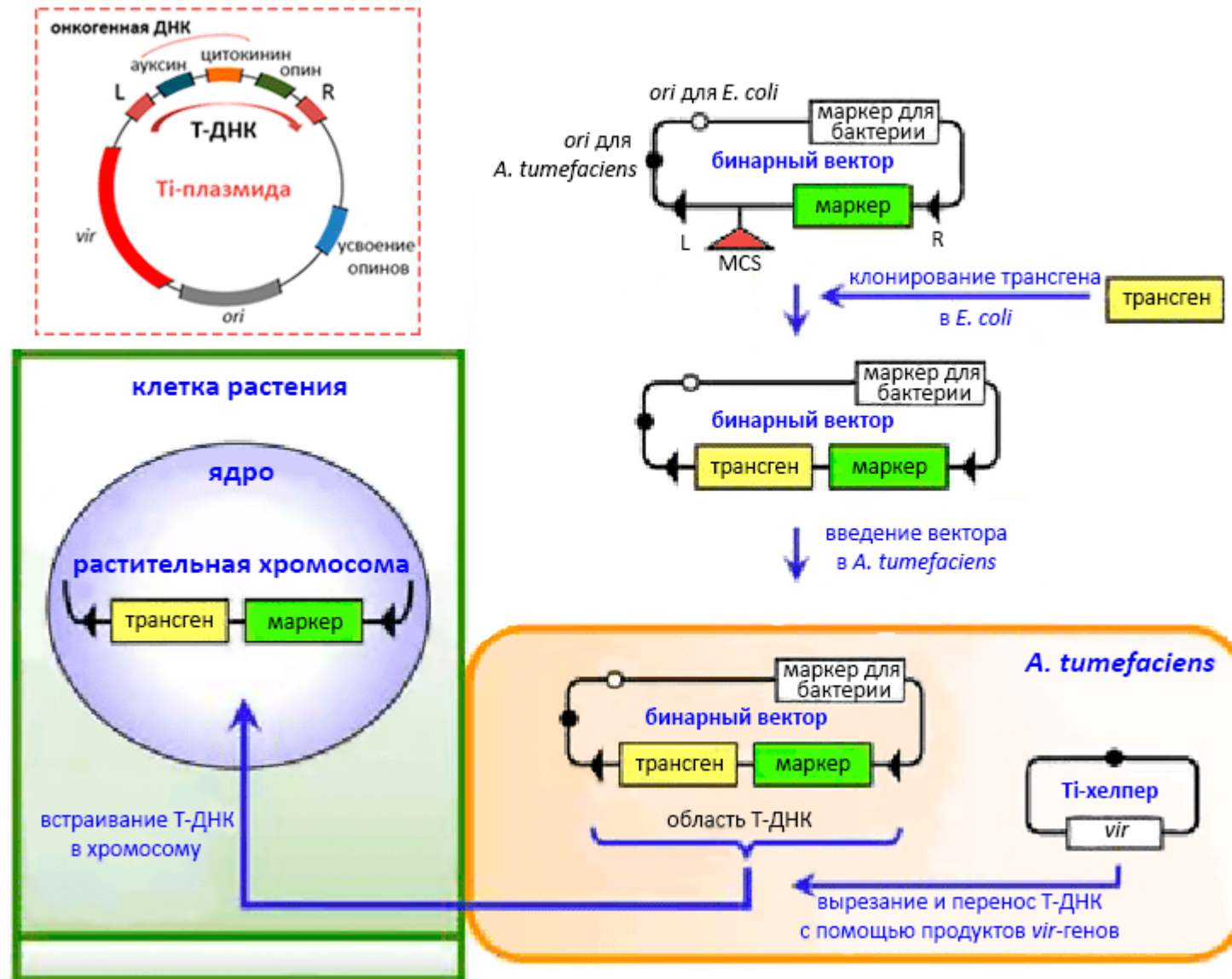


Fig. 9.90 : Ti-plasmid (left) and generation of T-complex (right)

Коинтегративтік векторлық жүйе



Бинарлық векторлық жүйе



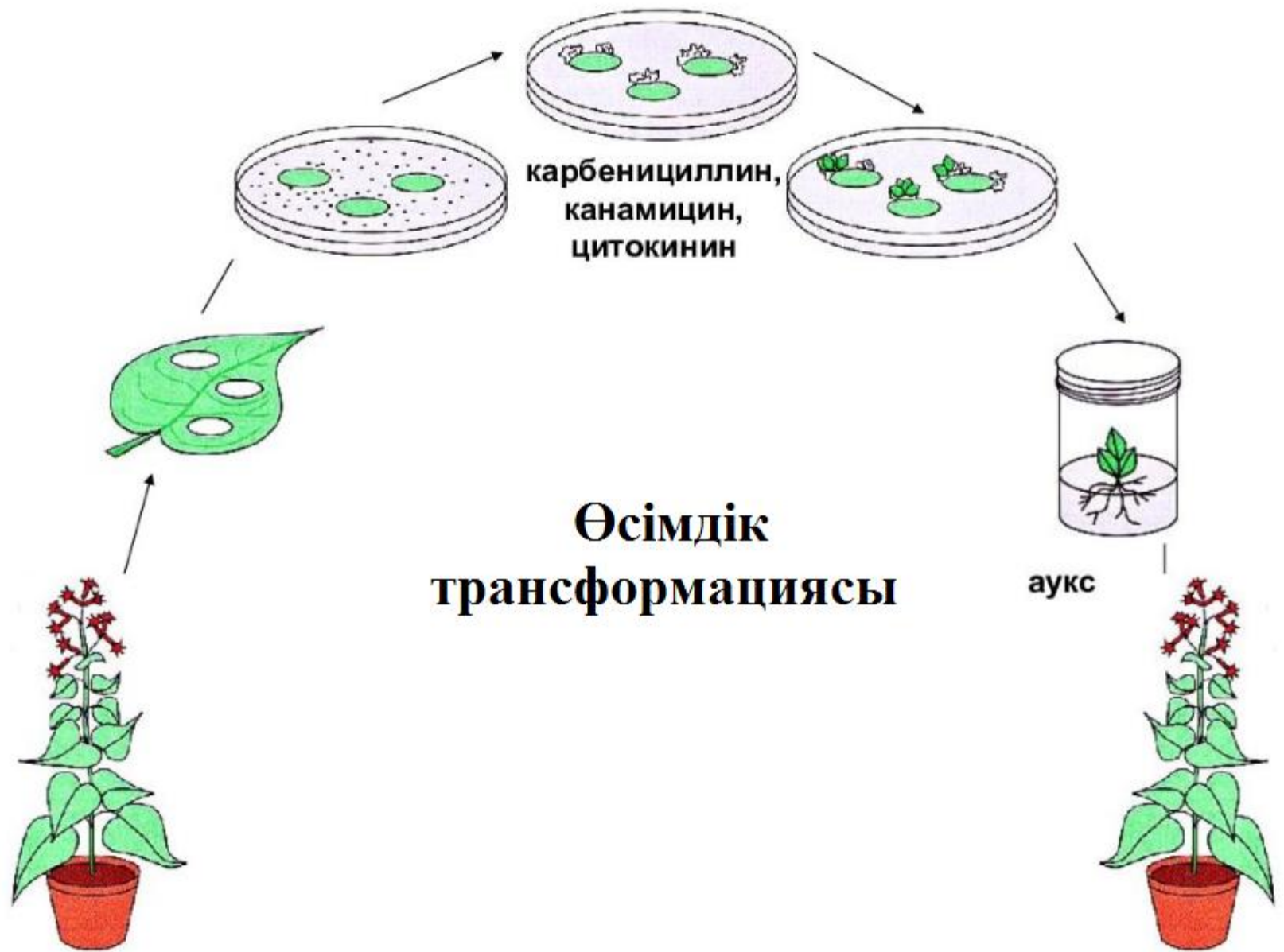
Vir-ауданы және Т-ДНК әртүрлі плазмидада орналасады

Өсімдіктерді трансформациялау векторларында қолданылатын маркерлік гендер мысалдары

Селективный маркер	Субстраты (селективные агенты)	Чувствитель- ность ткани контрольного растения, мкг/мл
Ген неомицинфосфо- трансферазы II (<i>nptII</i>)	Неомицин Канамицин ¹ G-418	50-250 5-35 3-10
Ген гигромицинфосфо- трансферазы (<i>hpt</i>)	Гигромицин-В	3-10
Ген устойчивости к блеомицину (<i>Ble</i>)	Блеомицин	1-5
Ген дигидрофолат- редуктазы (<i>dhfr</i>)	Метотрексат ¹ Триметоприм	0,01-0,5 8-16

Бөгде генді өсімдік клеткасына тасымалдаудың негізгі тәсілдері:

- *Agrobacterium tumefaciens* бактериясы көмегімен
- Тура физикалық тасымалдау жолдары:
 - Микробөлшектермен бомбалау
 - Электропорация;
 - Полиэтиленгликольмен өңдеу;
 - Бөгде ДНҚ молекуласын липосома құрамында тасымалдау



карбенициллин,
канамицин,
цитокинин

Өсімдік трансформациясы

аукс

ТЕРМИНДЕР

Эксплант - *in vitro* жағдайында өсіруге алынған өсімдік ұлпасының немесе мүшесінің фрагменті Қолайлы стерилді қоректік ортаға орналастырылған эксплант біраз уақыт өткеннен кейін өсе бастайды да каллус пайда болады. Бұл процесс **каллустың түзілуі** немесе **каллусогенез** деп аталады.

Каллус дегеніміз дифференцияланбаған жасушалардың жинақталып ерекше ұлпа түзуі. Егер осы каллустың бөліктерін жаңа қоректік ортаға отырғызса, онда олар шектеусіз өсе алады. Өсімдік ұлпасының стерилденген кішкене бөлшегін Петри чашкасының немесе пробиканың ішіне агарозды қоректік ортаға орналастырады. Содан кейін ұлпада жасушалар белсенді түрде бөліне бастайды. Өсімдік клеткасы тез өсіп каллус түзеді.

«**Өсімдік жасушасын қолдан өсіру**» ол бөлініп алынған жасушаны, ұлпаны, мүшелерді, ұрықты және тұтас өсімдік-регенерантты қолдан өсіретін барлық **in vitro** жұмыстарын қамтиды.

In vitro термині (лат.- шыныда, әйнекте) стерильді жасанды қоршаған ортада өтетін процестердің жағдайларын сипаттау үшін қолданылады.

In vivo (лат. – тіршілікте) организмнің тіршілік процестерінің табиғи стерильді емес ортада өтуі.

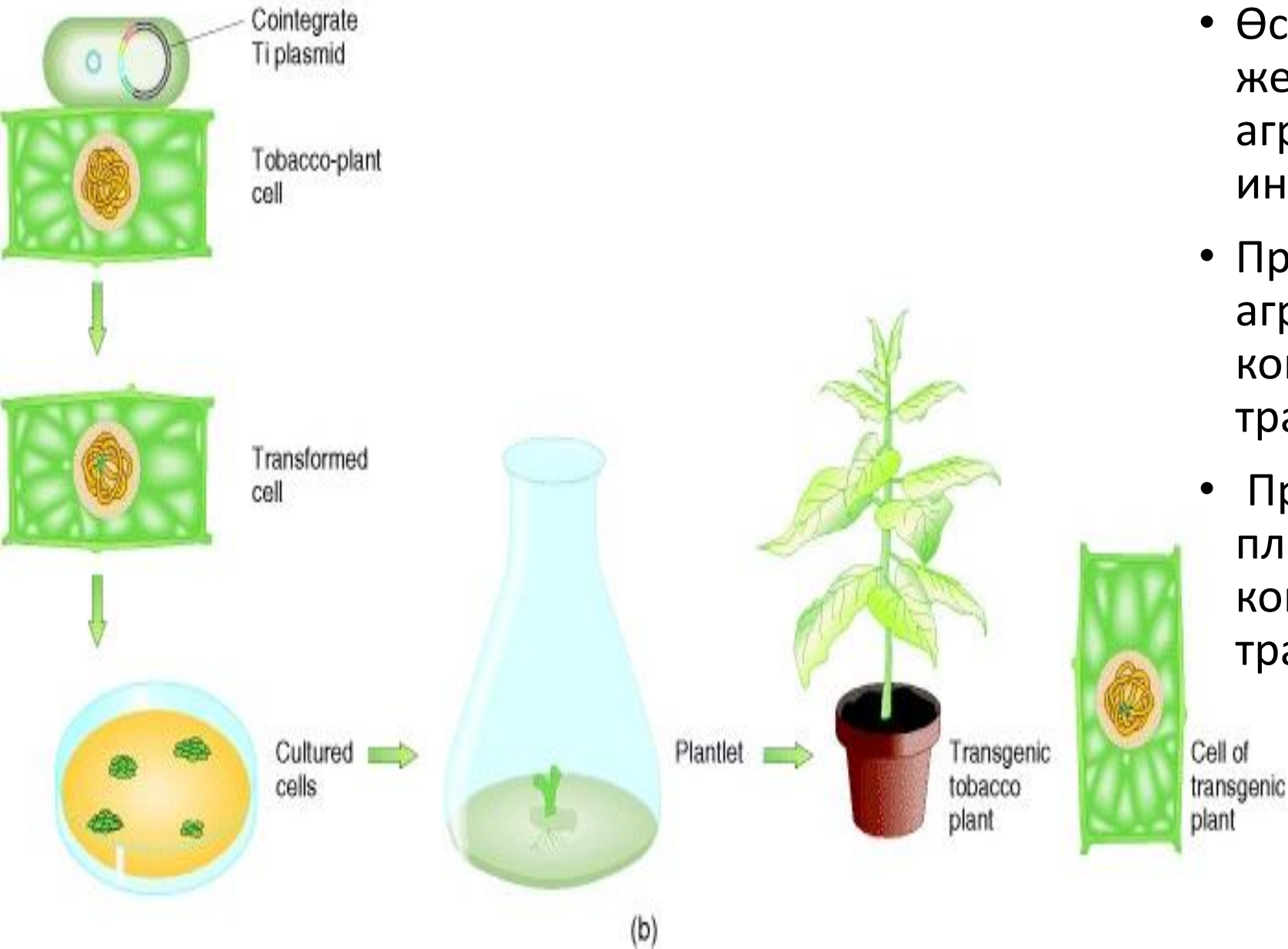
Өсімдік-регенерант дегеніміз асептикалық түрде алынған, тамыры мен өркені мәдени ортада қалыптасқан өсімдік, демек *in vitro*.

Тотипатенттілік (лат. *totus* – барлық, тұтас, *potential* – күш) – тұтас организмге дейін дамуын қамтамасыз ететін өзіне тән генетикалық ақпаратты сақтап, үйлестіретін жасушаның қасиеті. Теориялық түрде кез келген өсімдік жасушасы өзін бөліп алған организмге дейін дамуға потенциалды түрде қабілетті және ол белгілі бір жағдайларда қолдан өсірілген. Бұл қасиет тотипатенттілік деп аталады.

Агробактериялық тасымалдау жүйесінің басты кемшілігі астық тұқымдастарын трансформациялауға қабілетсіздігі



Ti-плазмидасын өсімдік клеткасына енгізу



- Өсімдіктің жарақаттанған жеріне конструкцияланған агробактерий штаммын инокуляциялау
- Протопласттарды агробактериялармен кокультивациялау арқылы трансформациялау
- Протопласттарды Ti-плазмидамен кокультивациялау арқылы трансформациялау

Ti-плазмидасын өсімдік клеткасына енгізу

- Өсімдіктің жарақаттанған жеріне конструкцияланған агробактерий штаммын инокуляциялау
- Протопласттарды агробактериялармен кокультивациялау арқылы трансформациялау
- Протопласттарды Ti-плазмидамен кокультивациялау арқылы трансформациялау



МИКРОИНЪЕЦИЯ - генетикалық конструкция улеткаға инъекцияланады



БИОБАЛЛИСТИКА - $d = 0.1-3$ мкм вольфрам, платина не алтын бөлшектерін рекомбинантты ДНК конструкциясымен қаптап, өсімдік клеткасына жоғары жылдамдықта атқыланады. Пушка зарядтары клетка мембранасын бұзып цитоплазма мен ядроға енеді

ЭЛЕКТРОПОРАЦИЯ- клетка мембранасында жоғары импульсті ток көзімен өңдеу арқылы уақытша саңылаулар пайда болып, экзогенді ДНК клеткаға енеді