



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

ДӘРІС 2. ГЕНДІК ИНЖЕНЕРИЯДА ҚОЛДАНЫЛАТЫН НЕГІЗГІ ФЕРМЕНТТЕР

Лектор: PhD, қауымдастырылған
профессор Тайпақова С.М.

Жоспар:

- **Рекомбинантты ДНҚ кұрылысында қолданылатын ферменттер**
- **Рестрикциялық ферменттер (эндонуклеазалар)**
- **ДНҚ лигазалар**
- **ДНҚ полимеразалар**
- **Кері транскриптаза**
- **Терминальді трансфераза**
- **Полинуклеотид киназа**
- **Поли-А полимераза**
- **Сілтілі фосфатаза**

Рекомбинантты ДНҚ құрылысында қолданылатын ферменттерді бірнеше топқа бөлуге болады:

- - ДНҚ молекуласын қысқа ДНҚ фрагменттеріне кесетін ферменттер (рестрикциялық ферменттер);
- - ДНҚ (полимераза) немесе РНҚ (кері транскриптаза) негізінде ДНҚ синтездейтін ферменттер;
- - ДНҚ фрагменттерін (лигаза) қосатын, тігетін ферменттер;
- - ДНҚ фрагменттерінің ұштарының құрылымын өзгертуге мүмкіндік беретін ферменттер (терминальды трансфераза, полинуклеотид киназа, сілтілі фосфатаза) .

ДНК молекуласын қысқа ДНК фрагменттеріне кесетін ферменттер

Рестрикциялық ферменттер (эндонуклеазалар)

1. Рестриктизалалық ферменттердің ашылуы
2. Рестриктизалалық ферменттердің типтері
3. Рестрикция –модификация жүйесі

- Гендік инженерия молекулалық генетикадан бастау алады, бірақ өзінің пайда болуымен генетикалық энзимология мен нуклеин қышқылдарының химиясының жетістіктеріне міндетті, себебі молекулалық манипуляциялардың негізгі құралы ол ферменттер.
- Ген инженериясының немесе рекомбинантты ДНҚ технологиясының қалыптасуы ерекше ферменттер класы — эндонуклеазалардың немесе рестриктазалардың ашылуымен және қолданылуымен байланысты.
- Рестрикция ферменттерін 1972 ж. В. Арбер бактерия клеткасында ашты. Барлық бактериялар қос тізбекті ДНҚ-ның белгілі нуклеотидтер бөлігін үзе алатын бір немесе бірнеше рестриктазаларды синтездейді. Рестрикция ферменттерінің клеткадағы қызметі — бактерияға енген бөтен ДНҚ молекуласынан қорғау,
- Рестрикция тоқтату деген мағынаны білдіреді. Рестрикция ферменттері фагтың нуклеин қышқылын үзіп, оның бактериялық клеткада кебеюіне жол бермейді.

Рестрикция эндонулеазалары, рестриктазалар (лат. *restrictio* — шектеу) — Гидролаза классына жататы ферменттер тобы, нуклеин қышқылдарының гидролиз реакциясын катализдейді.

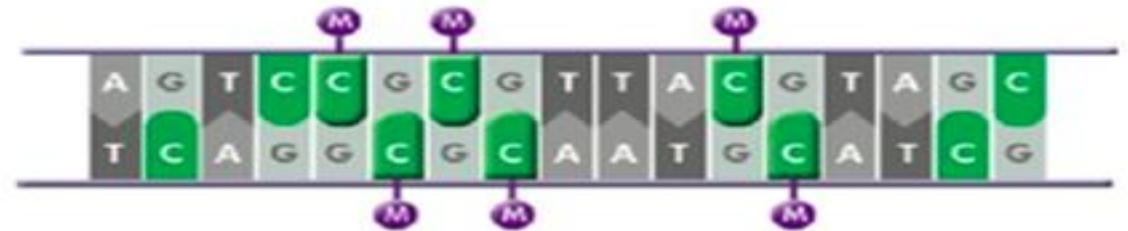
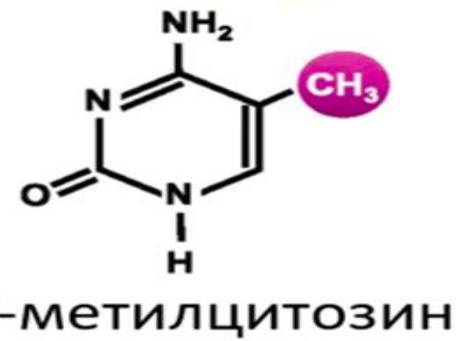
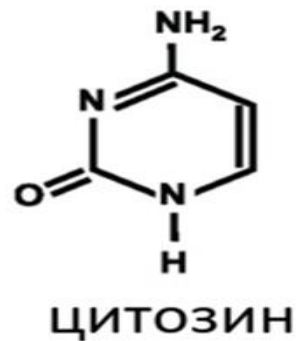
Экзонуклеазалардан айырмашылығы, нуклейин қышқылын сонынан емес ортасынан ыдыратады.

1953 ж бірнеше зертханада белгілі бір *E. Coli* штаммының ДНҚ-сын басқа штманың 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 *EcoV* штамдарынан табылды. Кейінірек 1970 ж Смит және Вилькос *Haemophilus influenzae*-дан ДНҚ-ның қатал белгілі бір тізбектегі ретін кесетін бірінші рестриктаза ферментін алды.



Рестрикция процесі бактерияларда өте кеңінен таралған: бактерияларда рестриктаза ферменттерінің болуы оларды бөгде ДНҚ молекулаларынан сақтайды, яғни бактериялар аталған ферменттер арқылы қорғанып отырады. Бактерия өзінің геномын сол өзіндегі рестриктаза ферменттерінен аденин және цитозин нуклеотидтерін метилдеу арқылы, яғни «арнайы белгілеу» арқылы қорғайды.

ДНҚ молекуласының метильденуі



ДНҚ-ның төрт негізінің ішінен аденин мен цитозин метилденуі мүмкін. ДНҚ метильденуі кезінде цитозин негізін 5-метилцитозинге айналдыру үшін цитозин сақинасының 5-ші көміртегіне метил тобы қосылады. Бұл цитозиннің қалдық модификация процесі ДНҚ метилтрансфераза деп аталатын ферментпен катализденеді. Өзгертілген цитозин негізі гуанин негізінің жанында болады. Сондықтан ДНҚ қос спиральды құрылымында модификацияланған цитозин негіздері бір-біріне қарама-қарсы ДНҚ тізбегінде болады.

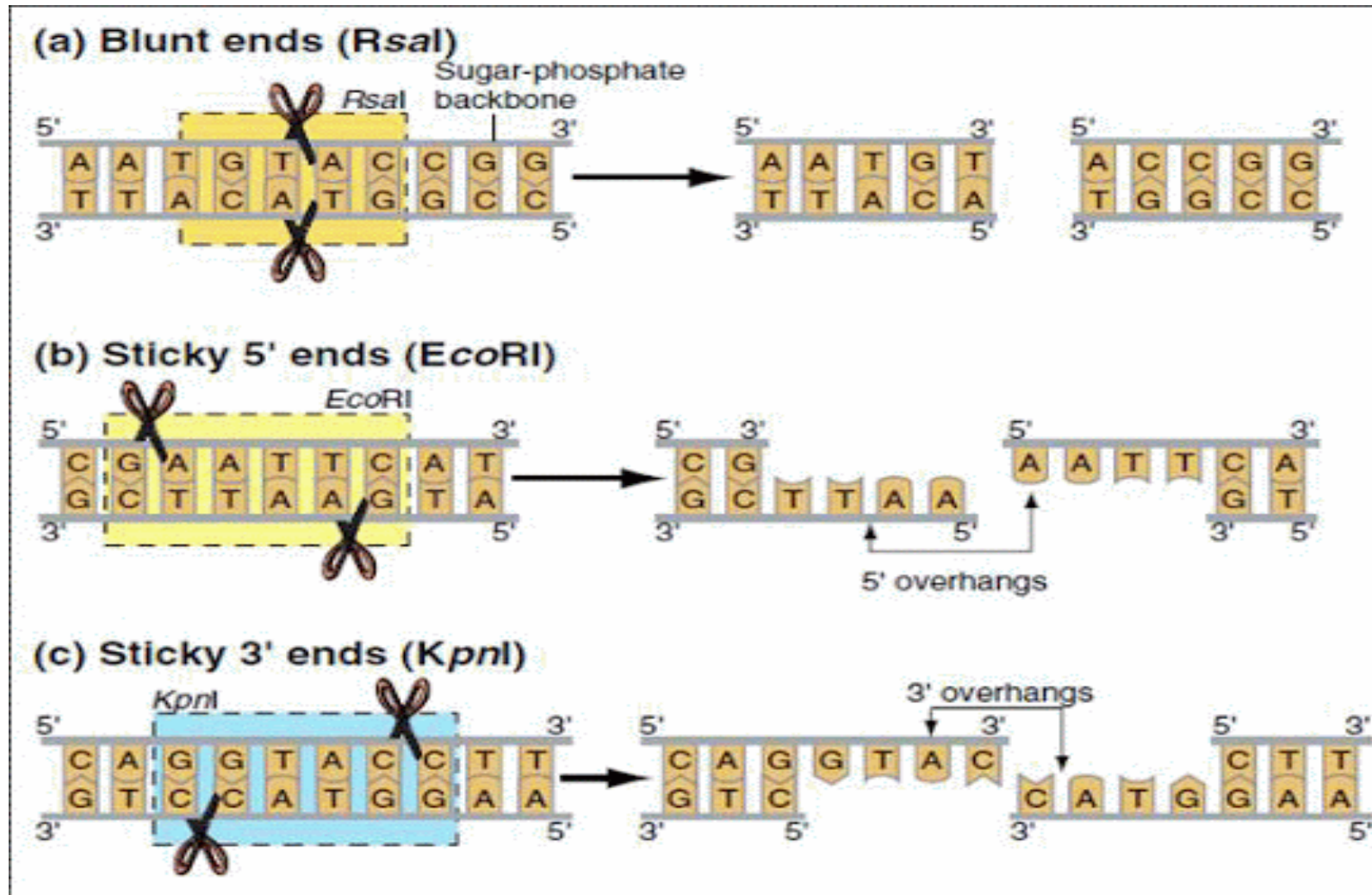
Аденин метильденуі - бұл өсімдіктерде, бактериялар мен сүтқоректілерде болатын процесс. Өсімдіктер мен басқа организмдердің ДНҚ метильденуі үш түрлі реттілік контекстінде кездеседі. Олар CG, CHH және CHG, мұнда H не Аденин, Тимин немесе Цитозинді білдіреді.

ДНҚ метильденуі дегеніміз не?

Гендердің экспрессиясын бақылау үшін ДНҚ молекуласына метил топтары қосылатын эпигенетикалық процесс ДНҚ метильденуі деп аталады. ДНҚ метильденуі ДНҚ тізбегін өзгертпейді, бірақ ДНҚ белсенділігіне әсер етеді. Бұл процесс ағзаның қалыпты дамуы үшін қажет және организмнің көптеген маңызды процестерімен байланысты, олар хромосоманың тұрақтылығын сақтау, эмбриональды даму, канцерогенез, қартаю, х-хромосомаларды инактивациялау және транспозитивті элементтердің репрессиясы. Метильдену процесі геннің промоторлы аймағында болған кезде, ол ген транскрипциясының репрессиясына қатысады.

ДНҚ метильденуі - ДНҚ нуклеотидтерінің бірізділігін өзгертпестен ДНҚ молекуласының модификациялануы. (СН₃) метил тобы молекулаға қосылып, оның белсенділігін арттыруы немесе төмендетуі мүмкін. Ол гендердің транскрипция процесіне тікелей әсер етеді және гендердің экспрессиясын бақылайды

Рестриктазалар – ДНҚ молекуласында белгілі бір аймақтарын танып (рестрикция сайттары) және осы аймақты кесетін қабілетке ие ферменттер.



Рестрикция сайты – рестриктаза ферменті танитын және аталған фермент арқылы кесілетін ДНҚ молекуласындағы қысқа нуклеотидтік тізбектер (шамамен 4-8 жұп нуклеотидтен тұрады).



EcoRI

5' ...G A A T T C...3'
3' ...C T T A A G...5'

Available as a FastDigest enzyme for rapid DNA digestion



ThermoFisher
SCIENTIFIC

Search All

HindIII



Contact Us

Sign In

Quick Order



Popular

Shop All Products

Applications & Techniques

Services & Support

About Us

Connect Your Lab

Home > Shop All Products > PCR & Cloning Enzymes > Restriction Enzymes > HindIII (10 U/μL)

Thermo Scientific™

HindIII (10 U/μL)



Catalog number: ER0501

Related applications: [Restriction Enzyme Cloning](#)

Contact us for support

	Catalog number	Unit size	Price (EUR)
☆	ER0501	5,000 units	Contact Us
☆	ER0502	5 x 5,000 units	Contact Us
☆	ER0505	10,000 units	Contact Us

supplycenter
by Thermo Fisher Scientific

Product overview [Manuals](#) [MSDS](#) [FAQs](#)

Description

5' A|A G C T T 3'
3' T T C G A↑A 5'

Thermo Scientific HindIII restriction enzyme recognizes A[^]AGCTT sites and cuts best at 37°C in R buffer. See [Reaction Conditions for Restriction Enzymes](#) for a table of enzyme activity, conditions for double digestion, and heat inactivation for this and other restriction enzymes. Note: Also available as a [FastDigest](#)

Specifications

Compatible Buffer:	10x Buffer R
Enzyme:	Hind III
Methylation	Not CpG methylation-sensitive, Not dam

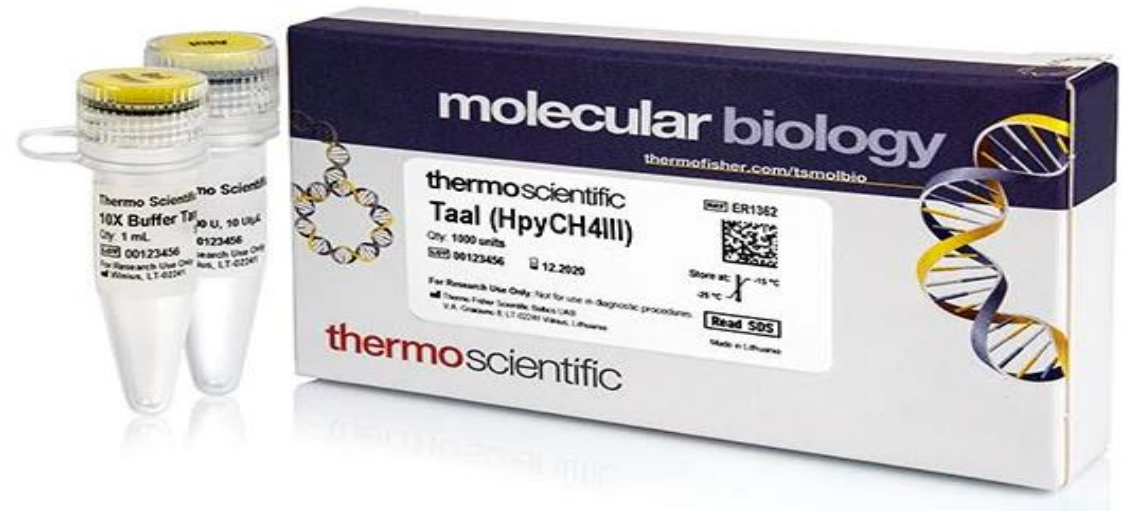


Рестриктаза ферменттері кез келген организмнің (адам, жануар, өсімдік, бактерия немесе вирус) ДНҚ тізбектерін кесуге қабілетті. Тек фермент танитын (комплементарлы) аймақ болса болғаны.

Яғни, бір-біріне мүлде ұқсамайтын организмдердің ДНҚ тізбектерін бір рестриктаза ферментімен өңдеу арқылы, келесі ретте оларды құрастыруға немесе «тігуге» болады.

Рестриктазалар екі тізбекті ДНҚ молекуласында арнайы орындарға ғана жабыса алады, яғни әр рестриктаза ДНҚ молекуласында тек өзіне тән ғана орынды «таниды» және сол жерді «кеседі».

Қазіргі кезде шамамен 3500 астам рестрикциялық ферменттер анықталған және олардың 600-ден астамы коммерциялық түрде шығарылып, ғалымдар арқылы ғылыми-зерттеу жұмыстарында қолданылады.



Рестриктазаларды белгілеу (номенклатура)

1968 жылы зерттеушілер М. Мезельсон және Р. Юань *Escherichia coli* бактериясының K12 штаммынан рестриктаза ферментін бөлгенін жариялады. Осыған ұқсас фермент басқа *Escherichia coli* бактериясының В штаммынан да бөлініп алынды.

1970 жылы зерттеушілер Х. Смит и К. Вилькоккс *Haemophilus influenzae* бактериясынан *HindIII* рестриктазасын бөліп алады. Бұл бактерия ДНҚ молекуласының белгілі бір аймағын танып қоймай, сонымен бірге оны кесетіні анықталды.

1978 жылы Нобель сыйлығын алған

1978 Nobel Prize Winner in Physiology or Medicine



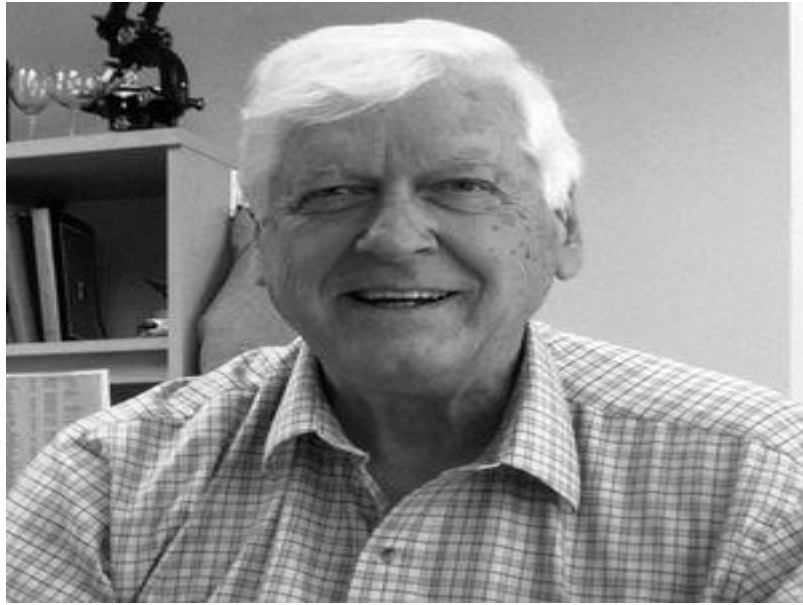
Werner Arber



Daniel Nathans



Hamilton Smith



1973 жылы зерттеушілер Хамилтон Смит және Даниел Натанс рестриктаза ферменттерін белгілеудің принциптерін ұсынды:

- Рестриктаза ферменттерін белгілеу оның бөлініп алынған микроорганизмінің туыс белгілеуінің бас әріпін және түр белгілеуінің екі әріпін қолдану (мысалы, *Streptomyces albus* - **Sal**, *Escherichia coli* – **Eco**)
- Эндонуклеазаларды — R, метилазаларды — M символдарымен белгілейді.

- Туыс-түр белгілеуінен кейін қажет болған жағдайда штамм типі де белгіленеді, мысалы: *Haemophilus influenzae* d — Hind, *Escherichia coli* B — EcoB.
- Егер клетканың бір типінен екі және одан көп рестрикция ферменттері бөлінген болса онда оларды рим цифрларымен (I, II, III т.с.с) нөмірлейді. Осы номенклатура сүйеніп
- *Haemophilus influenzae* d – HindI, HindII, HindIII.

Көптеген рестриктаза ферменттерінің ашылуына орай 1978 жылы ғалым Робертс осы белгілеулерге мынадай қосымша енгізді:

Егер де рестриктазаның атауын қысқартқанда бір-бірімен ұқсас болса, онда алғашқы екі әріпін өзгеріссіз қалдырады, ал үшінші әріп сол түр атауының екінші түр атауында кездеспеген әріпін алуға негізделген.

***Haemophilus parainfluenzae* - Hpa I**

***Haemophilus parahemolyticus* - Hph I.**

ДНҚ молекуласын кесуі

Көптеген рестрикциялық сайттар симметриялы, яғни **палиндром** (*palindrome*) түрінде орналасқан болады. Палиндром – ДНҚ молекуласының 5'→3' бағытында екі тізбекте де бірдей оқылуын айтады. Әр рестрикциялық фермент өзінің арнайы нуклеотидтік тізбегін таниды және сол орыннан кеседі. Нәтижесінде ДНҚ-ның қос тізбегі симметриялы үзіледі.

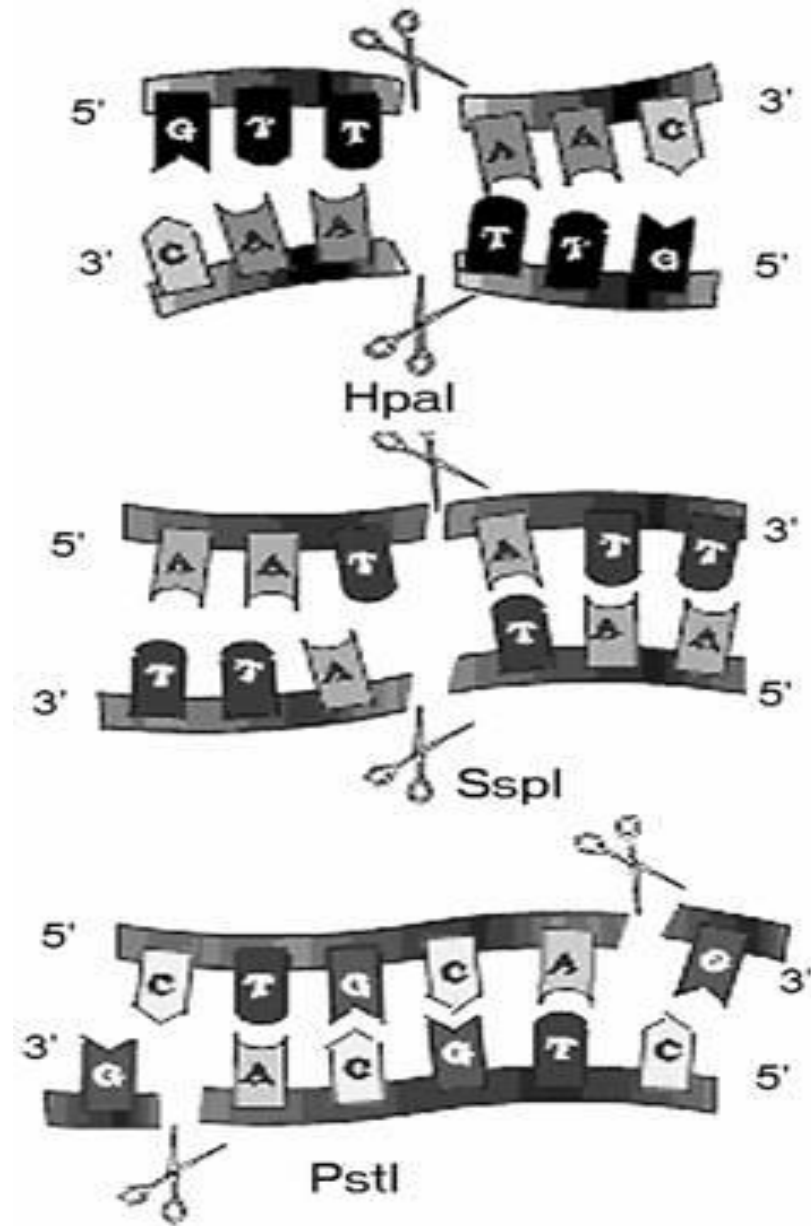
Палиндром

ДНҚ молекуласының 5'→3' бағытында екі тізбекте де бірдей оқылуын айтады.



Рестриктазалар

- Рестриктазалар ДНК әртүрлі ыдыратады.
- Біреулері симетрия осі бойынша тура үзілістер жасаса, 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 ДНК құрастыру үшін қолайлы.
- Мысалы, Pst I ферменттері ДНК тізбектерін кескенде олардың **сондары когезивті** (немесе «**жабысқақ**») деп те аталады) (*cohesive*) болады.
- Ал, басқа Hpa I және Ssp I ферменттері ДНК молекуласының екі тізбегін де бір нуклеотидтен, яғни «**шорт**» кеседі, нәтижесінде **доғал сондар** пайда болады (*blunt*).



Рестриктазаларды жіктеу

Рестриктазаларды негізінен 3 типке жіктейді:

1-ші тип рестриктазалары ДНҚ молекуласын белгілі бір тізбегін таниды және осы тізбектің жанында қос тізбекті ДНҚ молекуласын кез-келген нүктеде кеседі және кесудің өзі қатаң спецификалық тұрғыда жүрмейді. Мысалы, *Escherichia coli* K12 бактериясынан бөлінген **EcoK** рестриктазасы арнайы тізбекті танып 400-700 арақашықтықта кеседі.

2-ші тип рестриктазалары ДНҚ тізбегінің 4-8 нуклеотидтер жұбынан тұратын полиндромды тізбектерді таниды және осы аймақта ғана кесуге қабілетті. Мысалы, **EcoRI**, **XbaI** рестриктазалары ДНҚ молекуласын белгілі-бір нүктелерде ғана кесе алады.

3-ші типке жататын рестриктазалар ұзындығы 5-6 нуклеотид жұптарын танып, ДНҚ молекуласының тану сайтынан 24-27 нуклеотидтік арақашықтықта кесуге қабілетті. (мысалы, EcoPI)

Рестриктазаларды жіктеу

- 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 кең қолданады. Екінші жағынан; рестриктазаның II типі ғана бірдей нуклеотид тізбектерінің фрагменттері бар ДНҚ препараттарын алуға және әр түрлі геномдардан алынған фрагменттерден химерлі ДНҚ молекуласын құрастыруға мүмкіндік туғызады. Олар Mg иондарын қажет етеді кофактор ретінде.
- 2- ші класс рестриктазалары мелко- және крупношепящие деп бөлінеді.
- Мелкошепящие – тетрануклеотид таниды (*Hpa II, Alu*)
- Крупношепящие гексо нуклеотид таниды (*Eco RI, Hind III*)

Рестриктазалар жіктелуі

- 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 тани алға-нымен, оларды әр түрлі үзеді.

-

Рестриктазаның әсер ету механизімі және ДНҚ-ны метилдеу системасы.

Рестриктианың нысана ретінде көбіне 4-6 полиндромды жұп негіздер қолданады. 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.

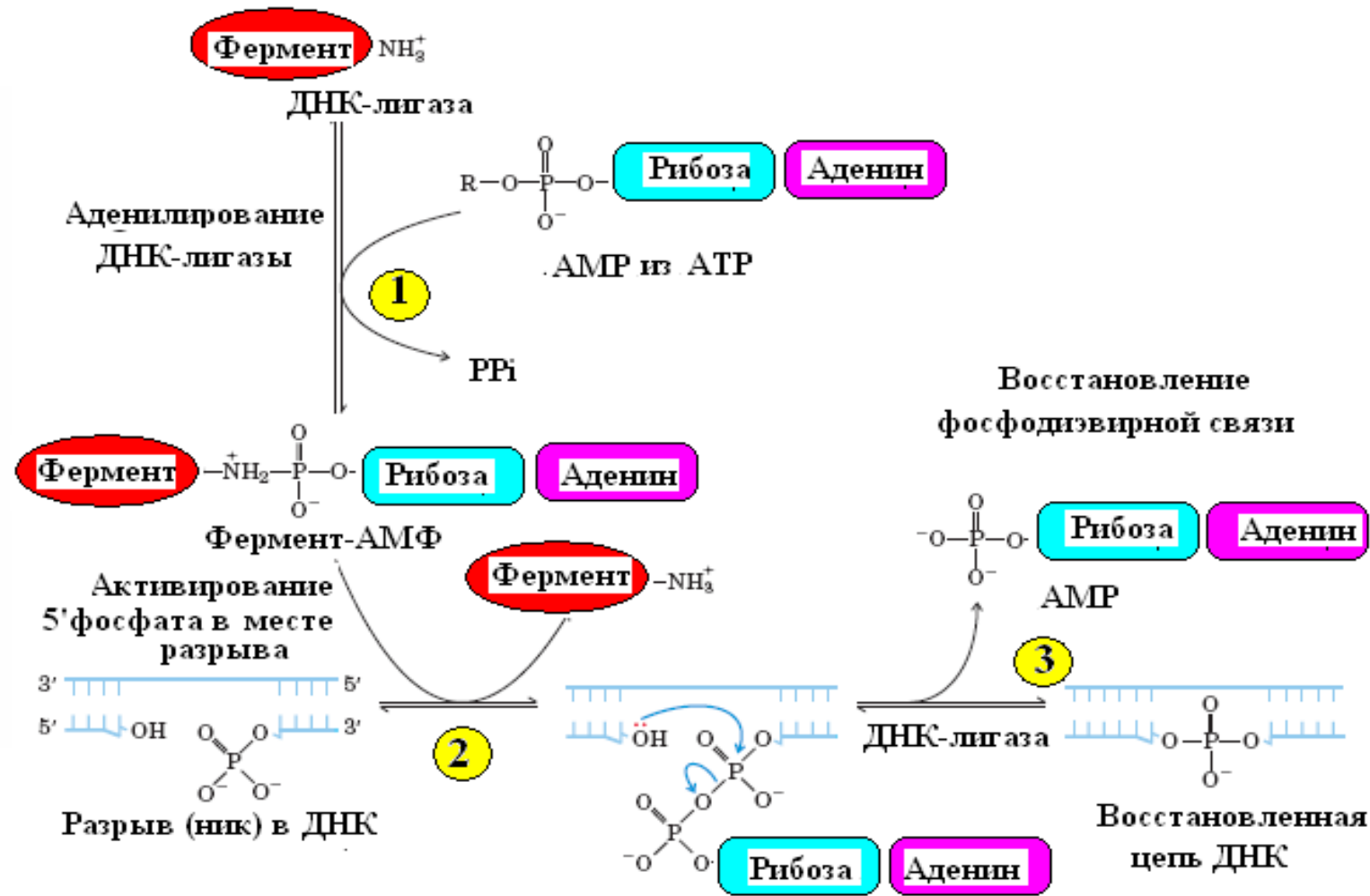
- Толық метилденген сайт рестрикцияға да модификацияға да тәуелді емес.
- Жартылай метилденген сайт рестрикция ферменттерімен танылмайды, бірақ метилаза көмегімен толық метилденуі мүмкін.
- Метилденбеген сайт рестриктаза ферментінің немесе метилаза ферментінің субстраты болады.

**ДНҚ фрагменттерін (лигаза) қосатын,
тігетін ферменттер**

ДНК-лигаза

- **Лигаза** – ДНК-ның бос ұштарын бір-біріне жалғайтын фермент. Бұл фермент қалыпты клеткаларда ДНК синтезіне және репарация (қалпына келу) процестеріне қатысады, яғни ДНК молекуласының біраз бүлінген жерлерін қалпына келтіруге қатысады.
- 1961 жылы Мезельсон мен Вейгл I фагы негізінде рекомбинация ажыраудан және ДНК молекулаларының қайта қосылуынан тұратынын көрсетті. Бұл ДНК фрагменттерін тігуге қатысатын ферментті іздеуге бастама болды. 1967 жылы осындай ферменттер табылды және ДНК лигаза деп аталды. Ол екі тізбекті нуклеин қышқылы молекуласында фосфодиэфирлі байланыстың синтезін катализдейді.
- Басқаша айтқанда, ДНК лигазалар қант қалдықтары арасында байланыс түзе отырып, қатар орналасқан нуклеотидтерді тігеді. ДНК лигазалар ДНК репарация процестерінде, ДНК репликация процестеріне - ДНК тізбегінің екі еселенуіне өте қажет.
- 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 T4-фагтың лигазасы Mg^{2+} иондарын қажет етеді. T4-фагтың лигазасы универсалды, себебі ол жабысқақ түптерді байланыстырып қана қоймай, жабысқақ емес екі тізбекті ДНК бөлшектерінің бірігуін де катализдейді, сол себепті ол жиірек қолданады.

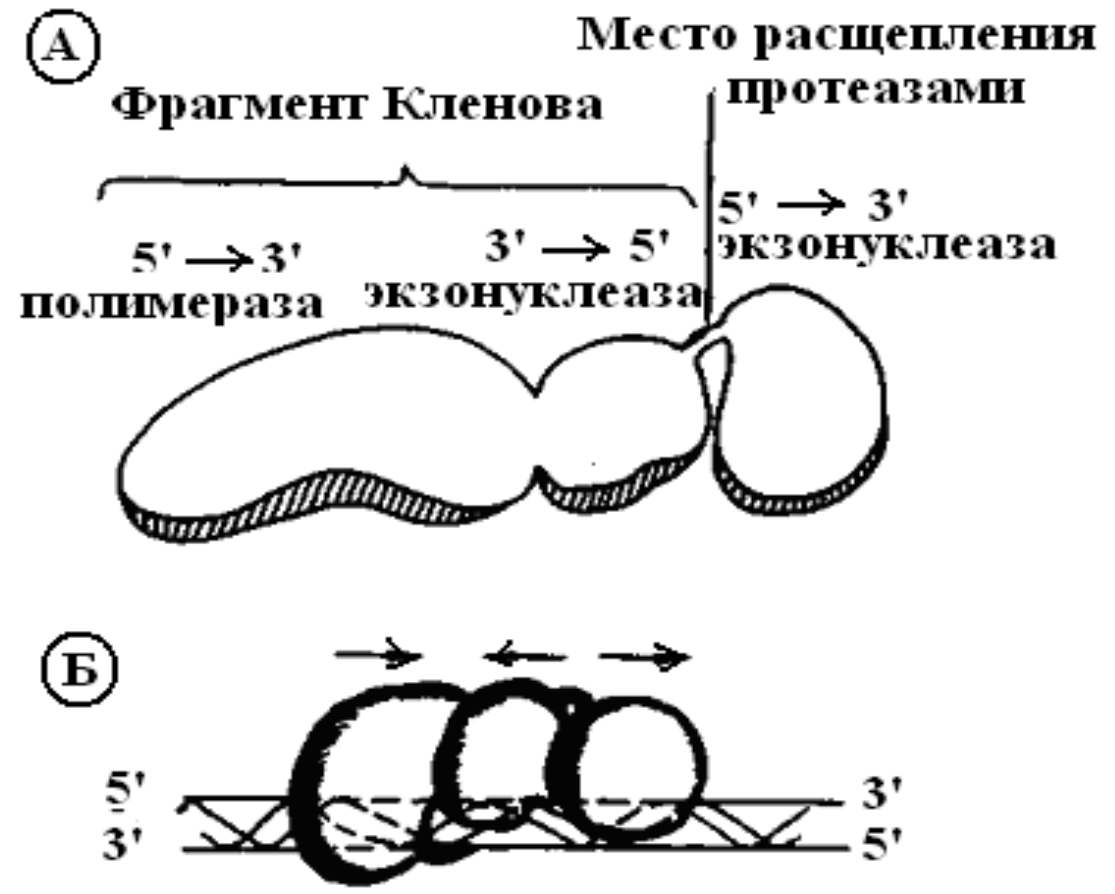
- ДНК-лигаза — қос тізбекті ДНК-ның біреуі үзіліп қалғанда фосфодиэфир байланысты 5'- фосфорилді және 3'- гидроксилді топтар арасында қалыптастырып, үзілген жерді "тігеді".
- ДНК-лигаза механизмі - бір нуклеотидтің («акцептор») 3'-гидроксил ұштары мен екіншісі нуклеотидтің («донор») 5'-фосфат ұшы арасында екі ковалентті фосфодиэстер байланысының түзілуі.
- Әрбір түзілген фосфодиэфирлік байланыс үшін екі АТФ молекуласы жұмсалады. Лигаза реакциясы төрт сатыда жүреді:
- Белсенділік сайтын реорганизациялау, мысалы, ДНК сегменттеріндегі үзілістер немесе Оказаки фрагменттері және т.б.
- Ферменттің активтілік орталығында лизин қалдықтарының аденилденуі (АМФ қосылуы), нәтижесінде пирофосфат бөлінеді;
- АМФ-тің донор деп аталатын 5'-фосфатына ауысуы, пирофосфат байланысының түзілуі;
- Донордың 5'-фосфаты мен акцепторының 3'-гидроксилі арасында фосфодиэфирлік байланыс қалыптастыру.



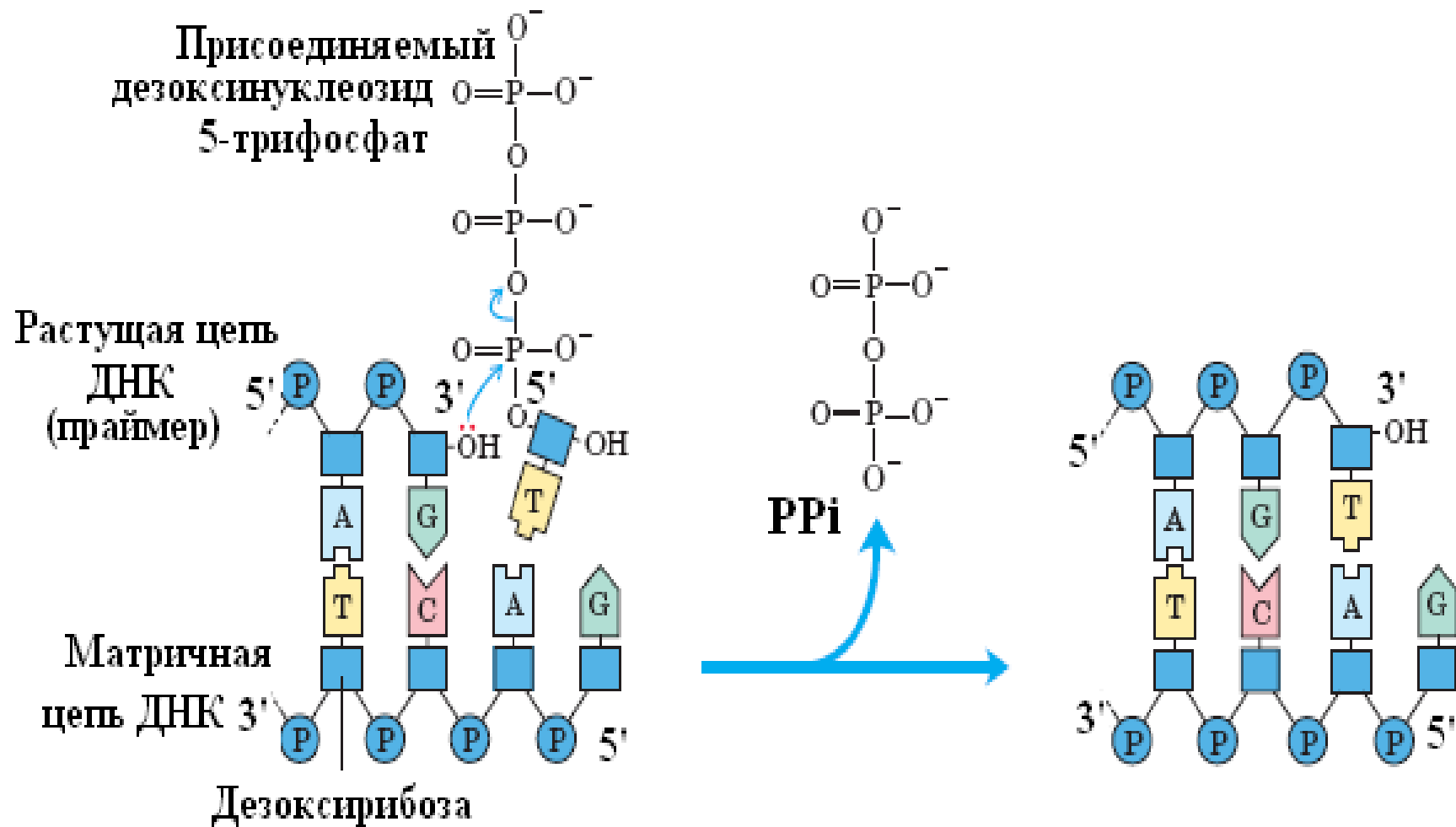
**ДНК (полимераза) немесе РНК (кері
транскриптаза) негізінде ДНК синтездейтін
ферменттер**

ДНК-полимераза

- Бірінші рет ДНК-полимераза 1958 ж Е. Селі-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 100 кДа болатын мономерлі полипептидті тізбектен тұрады және 3 доменді құрылымнан тұрады, әр домен өзіне тән ферментативті белсенділіктен тұрады.

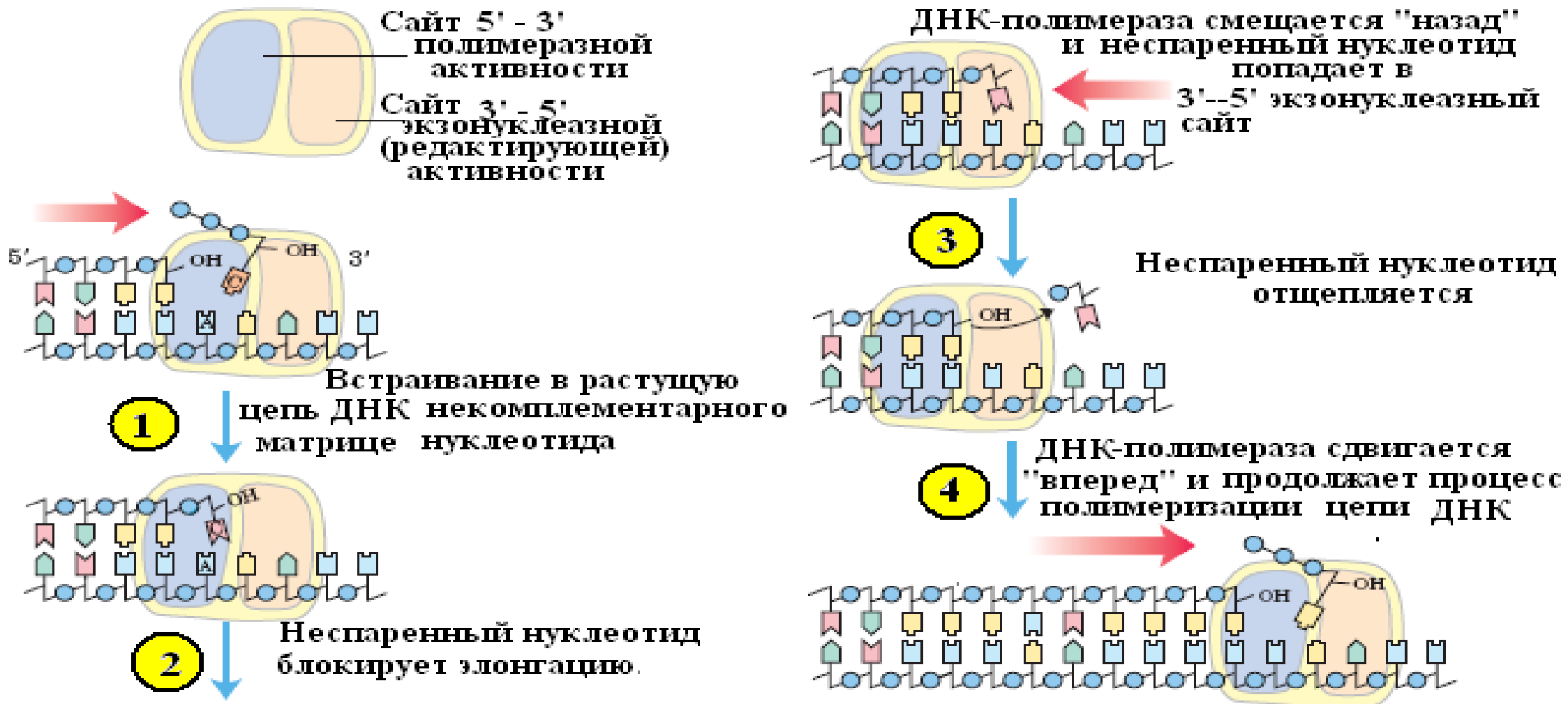


- 1. 5'-3' по лемиразалық белсенділікке ие. Реакция үшін бір тізбекті ДНК-матрица және осы бөлікке көмплементарлы 3'-ОН сонымен праймер фрагменті қажет.



- 2. 3'-5' экзонуклеазалық белсенділікке ие. 3'-ОН сонынаң біртізбекті, екітізбекті ДНҚ-ны гидролиздейді. 3'-5' экзонуклеаза ДНҚ-синтізі кезіндегі қателіктерді жояды. 3'-5' экзонуклеаза ДНҚ-ның тек қана бірікпеген бөліктерінде диэфирлі байланыстарды ыдыратады.

ДНҚ-полимераза I



- 3. 5'-3' экзонуклеазалық белсенділікке ие. Бос 5'-сонынан бастап екі тізбекті ДНҚ-ның бір тізбегін (цепь) деградациялайды. 5'-3' экзонуклеазаның 3'-5' экзонуклеазадан айырмашылығы 5'-3' экзонуклеаза ДНҚ-ның тек қана бірікен 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.

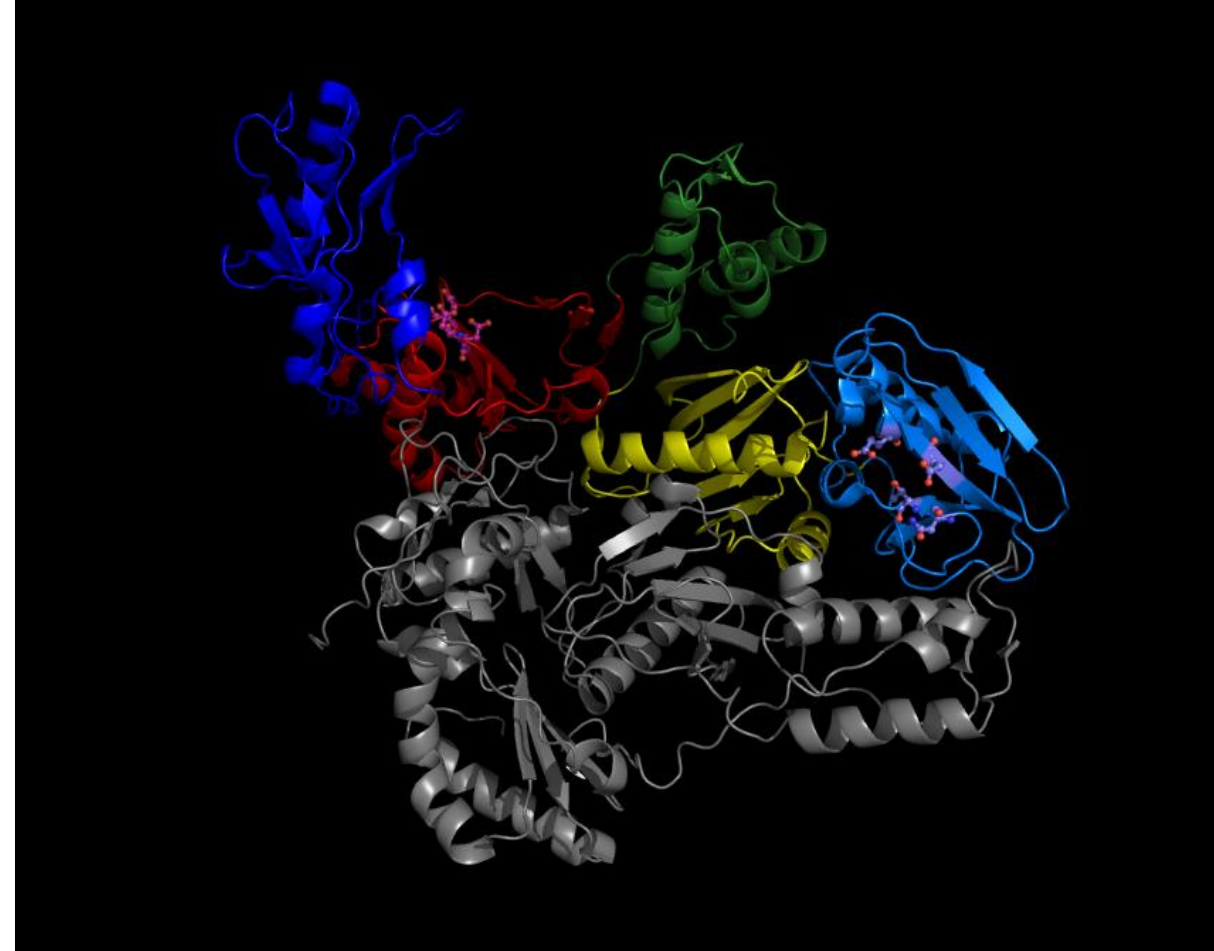
- 5' → 3' полимераза және 3' → 5' экзонуклеазалардан тұратын ДНҚ-полимеразаның бифункционалды бөлігі Кленов фрагменті деп аталды (оны сипаттаған авторлардың бірінің атымен).



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 тапшыныстардың нәтижесінде 1970 ж Темин мен Мизутани және олардан тәуелсіз Балтимор іздеген ферментті “Раус саркома” вирусының клеткадан тыс вириондарының припаратынан табады. Бұл РНҚ-тәуелді ДНҚ-полимераза кері транскриптаза, немесе ревертаза деп аталды.

- Ең егжей-тегжейлі зерттелген -құстар ретровирусының ревертазасы. Әрбір вирионда осы ферменттің, шамамен, 50 молекуласы бар. Кері транскриптаза екі суббірліктерден тұрады - а (65 кДа) және b (95 кДа), эквимольярлы мөлшерде болатын. Кері транскриптаза кем дегенде үш ферменттік активтілікке ие:
- 1) ДНҚ полимеразалық, аналық ретінде РНҚ ны және ДНҚны да пайдаланатын;
- 2) Н РНҚазалық активтілік, РНҚ-ДНҚ гибриді ішіндегі РНҚ-ны гидролиздейтін, бірақ бір немесе екі тізбекті РНҚ-ны емес;
- 3) ДНҚ эндонуклеазалық активтілік.
- Алғашқы екі активтілік вирустық ДНҚ синтезіне керек, ал эндонуклеаза вирустық ДНҚ-ның қожайын жасушасы геномына интеграциялануына маңызды болуы мүмкін.

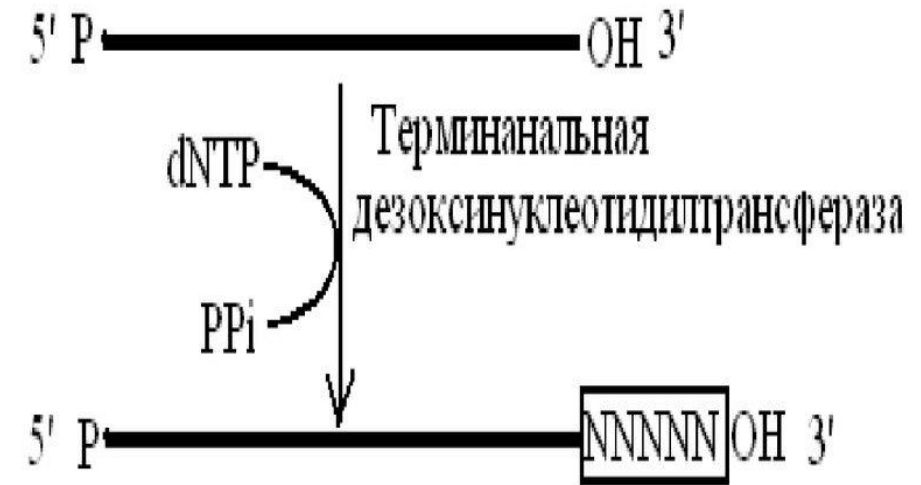


ДНҚ фрагменттерінің ұштарының құрылымын өзгертуге мүмкіндік беретін ферменттер (терминальды трансфераза, полинуклеотид киназа, сілтілі фосфатаза)

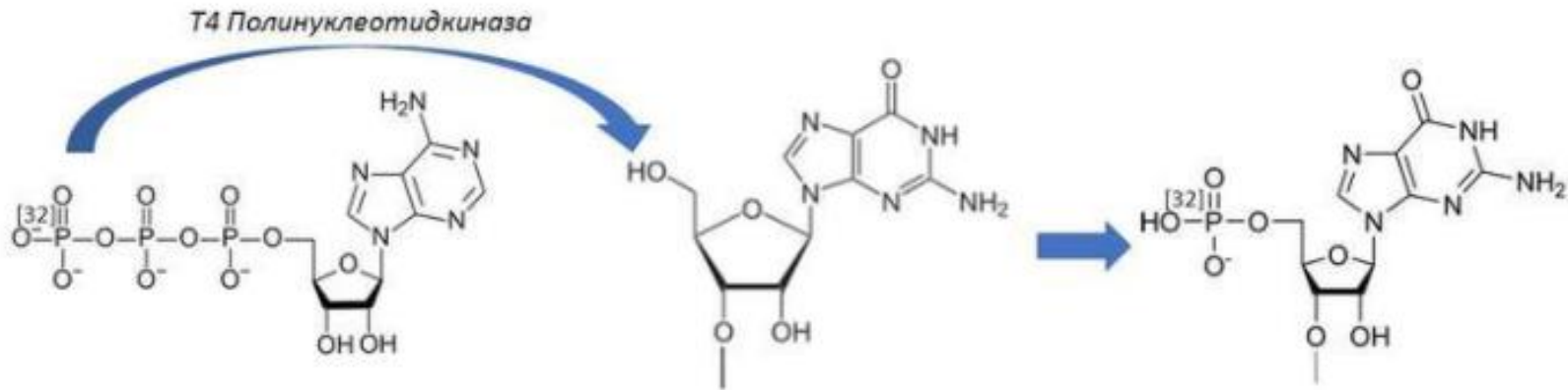
• Терминалды трансфераза

- ДНҚ фрагментінің 3-ОН тобына дезоксинуклеозид монофосфаттарын қосуды катализдейтін фермент, органикалық емес пирофосфат бөлінеді.
- Ферментті Боллум 1962 жылы бұзау тимусында тапқан.
- Mg^{2+} иондарының кофакторы ретінде қолданған кезде оның субстраты - 3'-ОН ұшы бар бір тізбекті ДНҚ немесе 3'-ОН ұшы бар ұштары шығыңқы екі тізбекті ДНҚ.
- Егер Co^{2+} кофактор ретінде қолданылса, онда бұл фермент дезоксинуклеотидтердің қос тізбекті ДНҚ-ның 3'-ОН ұшына бекінуін катализдей алады.
- Терминалды трансферазы бағытталған реакцияға тек бір типтегі дезоксинуклеотидтерді енгізгенде гомополимерлі 1-тізбекті 3'-ұшты ДНҚ молекулалары түзіледі. Дәл сол сияқты, басқа ДНҚ молекулаларына біріншісін толықтыратын гомополимерлі 3'-ұштар синтездеу мүмкін. Алынған ДНҚ препараттарын белгілі бір жағдайларда араластыру гибридті ДНҚ молекулаларының түзілуіне әкелуі мүмкін. Терминалды дезоксинуклеотидилтрансфераза көмегімен 1972 жылы *in vitro* жағдайында ДНҚ молекулаларының рекомбинациясы бойынша алғашқы тәжірибе жасалды.

- **Терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза** (терминальная трансфераза) синтезирует полинуклеотидную цепь в безматричном синтезе. Используется для создания липких концов.



- Реакция, катализируемая терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазой.
- N- любой из четырех дезоксинуклеотидов: А,Т,Г или С



- **Полинуклеотидті киназа.**

- Бұл полинуклеотидтік тізбектерді өзгертетін тағы бір фермент. Бұл ДНҚ мен РНҚ молекулаларының 5'-терминалды гидроксил топтарын арнайы фосфорландыратын фосфотрансфераза.
- T4 Полинуклеотид киназасы γ -фосфаттың АТФ-тен ДНҚ, РНҚ, олигонуклеотидтер немесе нуклеозид 3-монофосфаттардың 5'-терминалды ОН тобына өтуін катализдейді. Бұл реакция қайтымды. АДФ болған кезде полинуклеотидті киназа 5-фосфатаза белсенділігін көрсетеді және 5-фосфорланған полинуклеотидтік тізбектер мен АТФ арасындағы фосфат топтарының алмасуын катализдейді (алмасу реакциясы)
- Фосфатаза мен полинуклеотид киназаның кезекті әрекеті тізбектегі таңбаланбаған 5'-терминалды фосфомоноэфирдің қандай да бір өзгертусіз радиоактивтіге ауыстырылуына әкеледі. АТФ-тің γ -фосфат тобын ДНҚ фрагменттерінің 5'-ОН-тобына ауыстыру (фосфорлану).
- Қолданылуы:
- Радиоактивті белгіні енгізу,
- Полинуклеотидті киназа радиоактивті таңбаланған зондтарды алу
- лигированиеге дайындық

- **Поли (А) полимераза** - *E. coli* полимеразасын 1973 жылы Сиппель ашқан. Ол поли (А) тізбектерінің бір тізбекті РНҚ молекулаларының 3'-ОН ұшына бекітілуін катализдейді.

- Қолданылуы:

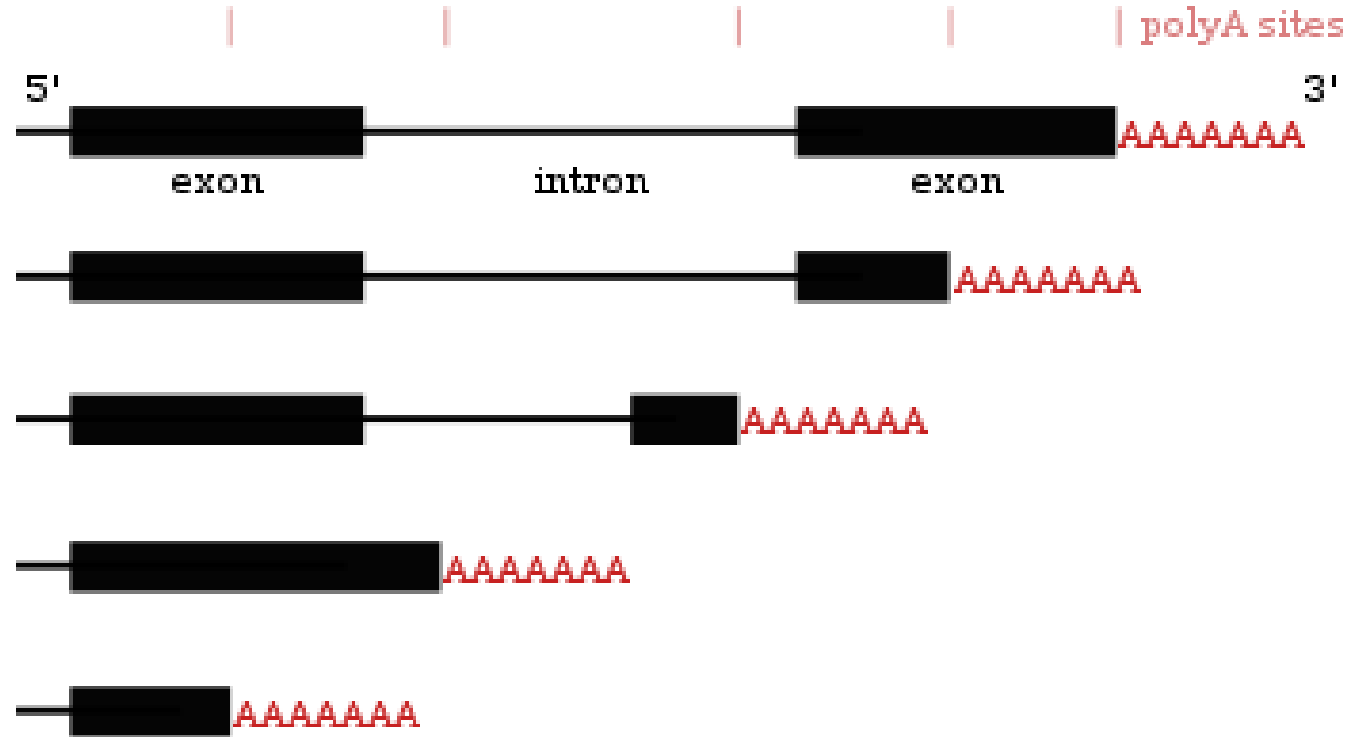
- РНҚ-ның 3'-ұшына радиоактивті АТФ немесе кордицепин (3'-дезоксиаденозин) таңбалау үшін

- РНҚ молекулаларын комплементарлы ДНҚ көшіруге дайындық үшін.

- Клондау немесе аффинді тазарту үшін РНҚ полиаденилдеу;

- Эукариотты жасушаларға трансфекция кезінде РНҚ трансляциясының тиімділігін арттыру;

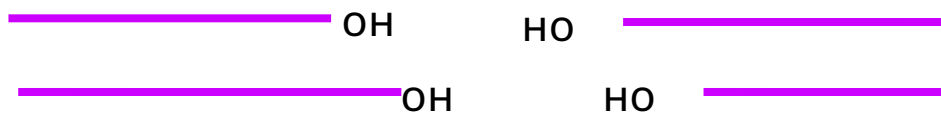
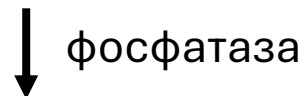
- Биотин-АТР және СуЗ / 5 модификацияланған негіздерін жалғау үшін



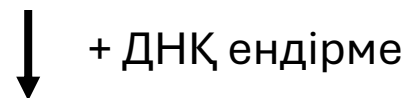
Сілтіді фосфатаза



«Жабысқақ» соңдар



Эфирлік байланыс түзіле алмайды



Лигирование тек бөгде ген ендірілген іске асырылуы мүмкін

