



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

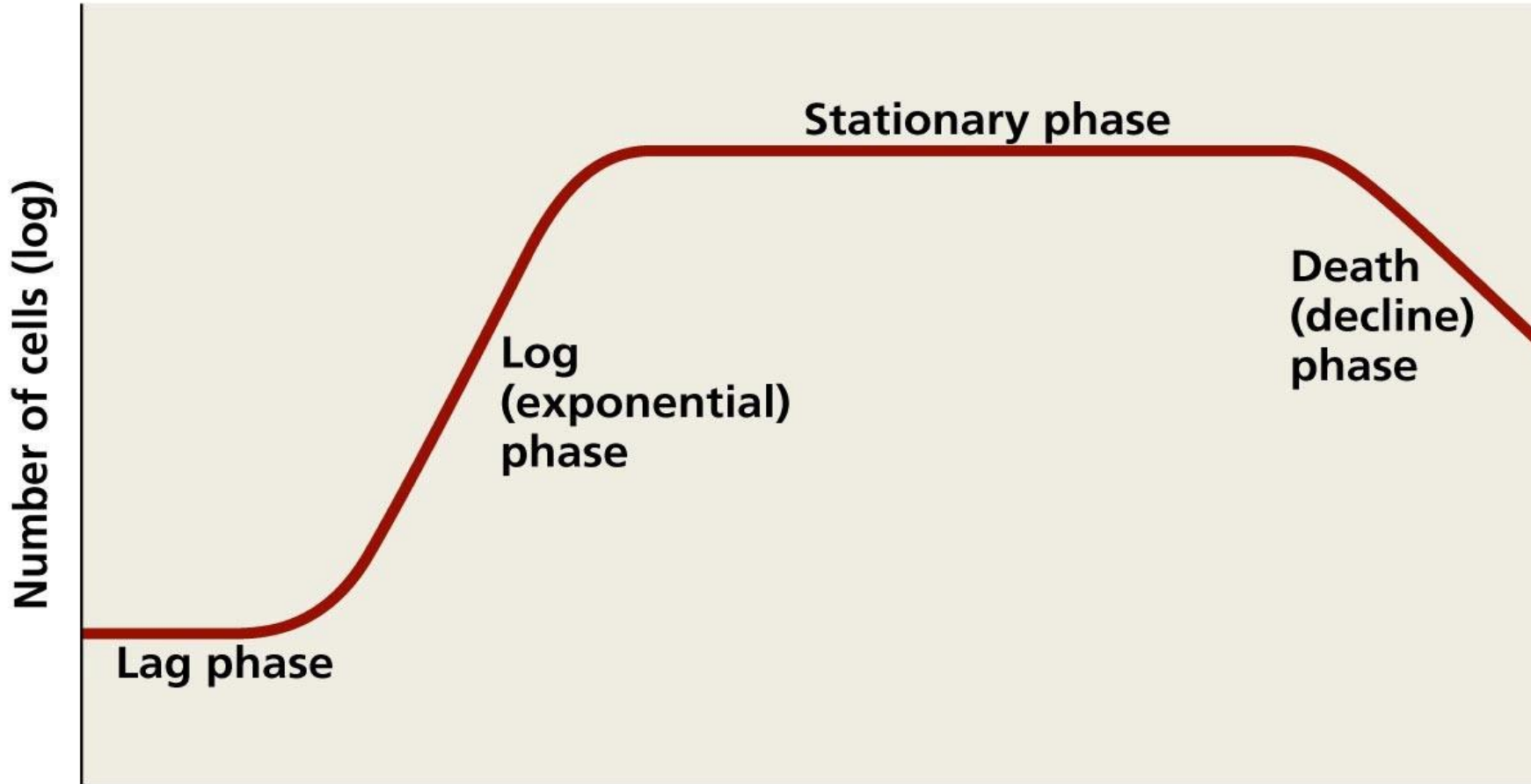
ДӘРІС 5. ТРАНСФОРМАЦИЯ ӘДІСТЕРІ ТРАНСФОРМАЦИЯЛАНҒАН КЛЕТКАЛАР СКРИНИНГІ

Лектор: PhD, қауымдастырылған
профессор Тайпақова С.М.

Жоспар:

- **Жасушалардың табиғи құзыреттілігі**
- **Трансформация әдістері**
- **Трансформацияланған клеткалар скринингі**
- **Селективті маркерлік гендер**

Жасушаның ДНҚ-ны сырттан сіңірудің индукцияланбаған қабілетін «**табиғи құзыреттілік**» деп атайды.



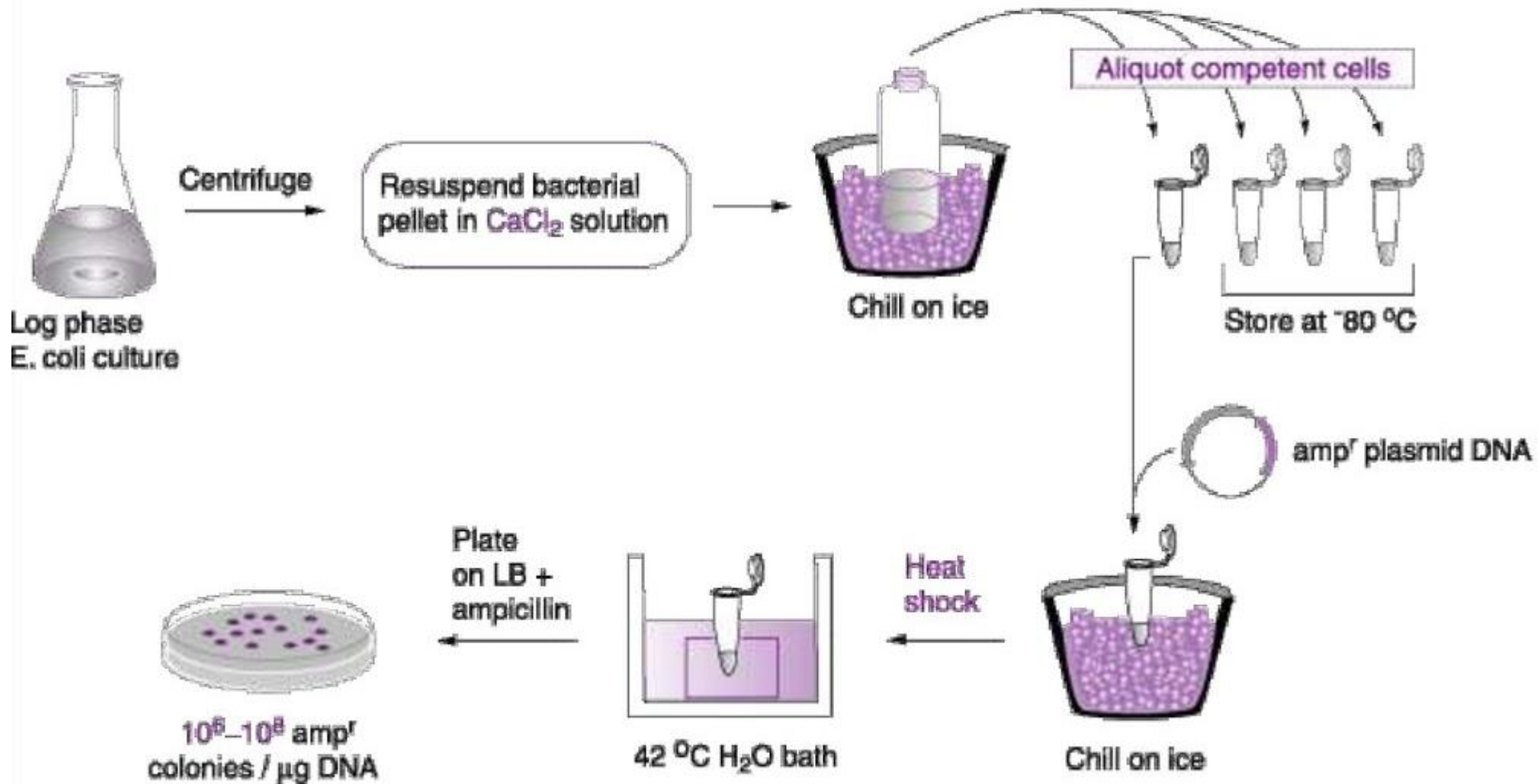
Бактериялардың жасанды құзыреттілігін құрудың екі негізгі әдісі бар:

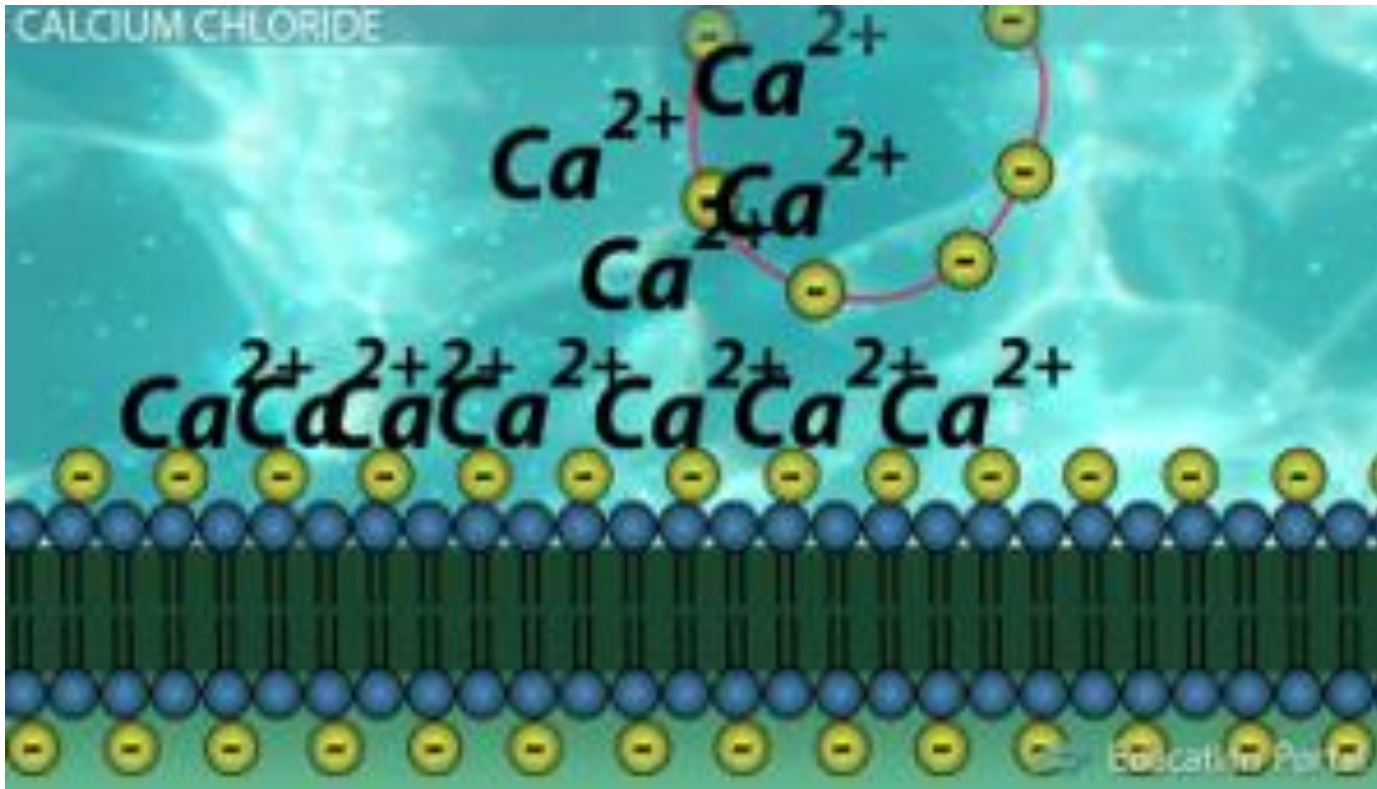
1. жасушалық культураны екі валентті иондармен өңдеу, содан кейін қысқа мерзімді қыздыру немесе *температуралық шок* әдісі
2. *электропорация*.

Дақылдағы бактериялар санының уақытқа тәуелділігінің графигі. Log- фазасы - бұл өсу кезеңі, одан кейін платоға шығып пен өшу фазасы жалғасады, онда жасушаларға қоректік заттар жетіспейді және токсиндер жинақталады.

Трансформация

Температуралық шок

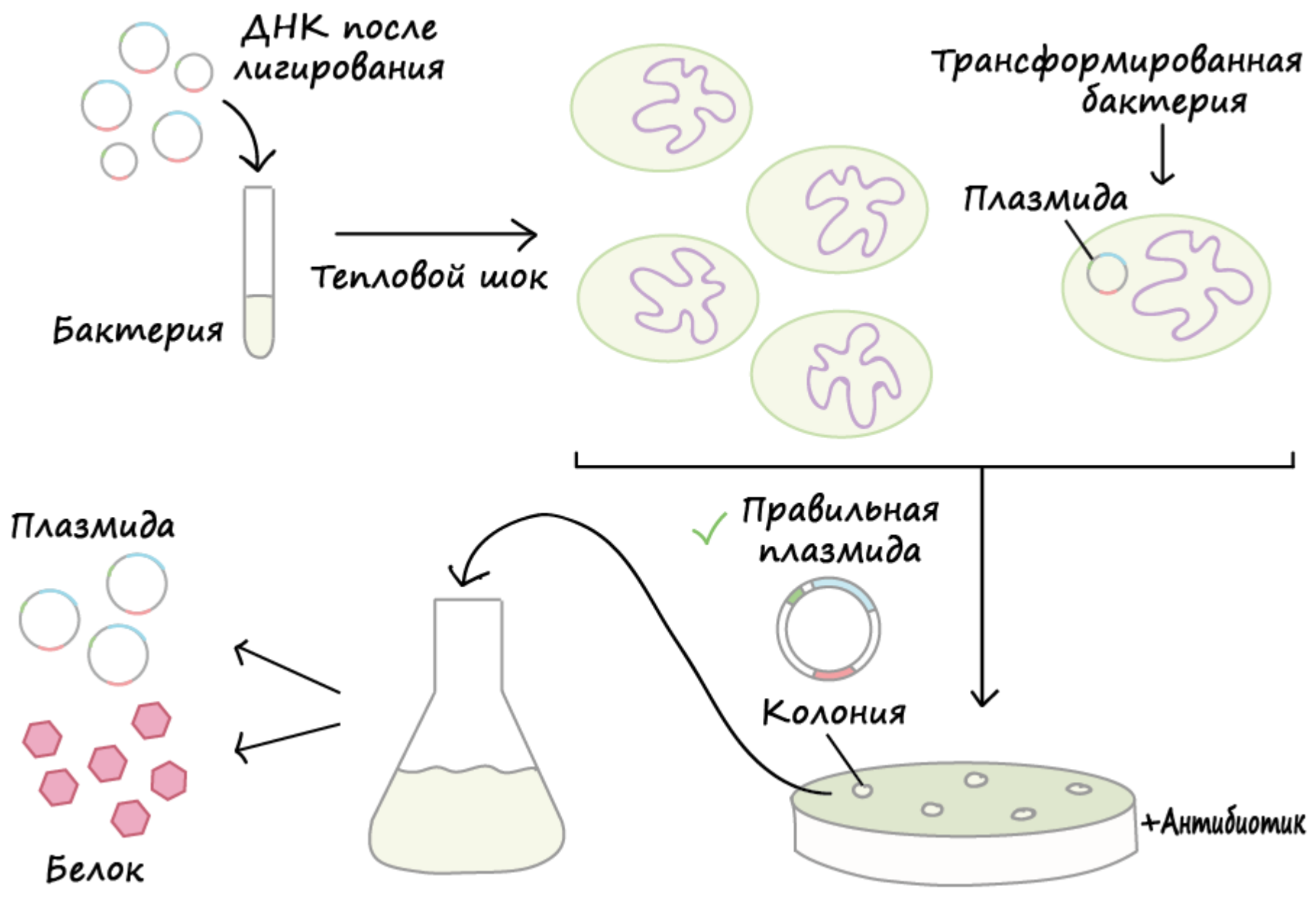




Ca²⁺ + иондарының трансформация кезінде қатысу механизмі.

Біріншіден, иондар теріс зарядталған ДНҚ топтарына (сары шеңберлер) және мембраналық анкерлі полисахаридтерге (сары шеңберлер) жабысады. Содан кейін ионның арқасында ДНҚ -ны жасуша бетіне бекітетін «полисахарид (-)» - «ион Ca (2+)» - «ДНҚ (-)» көпірінің бір түрі пайда болады.

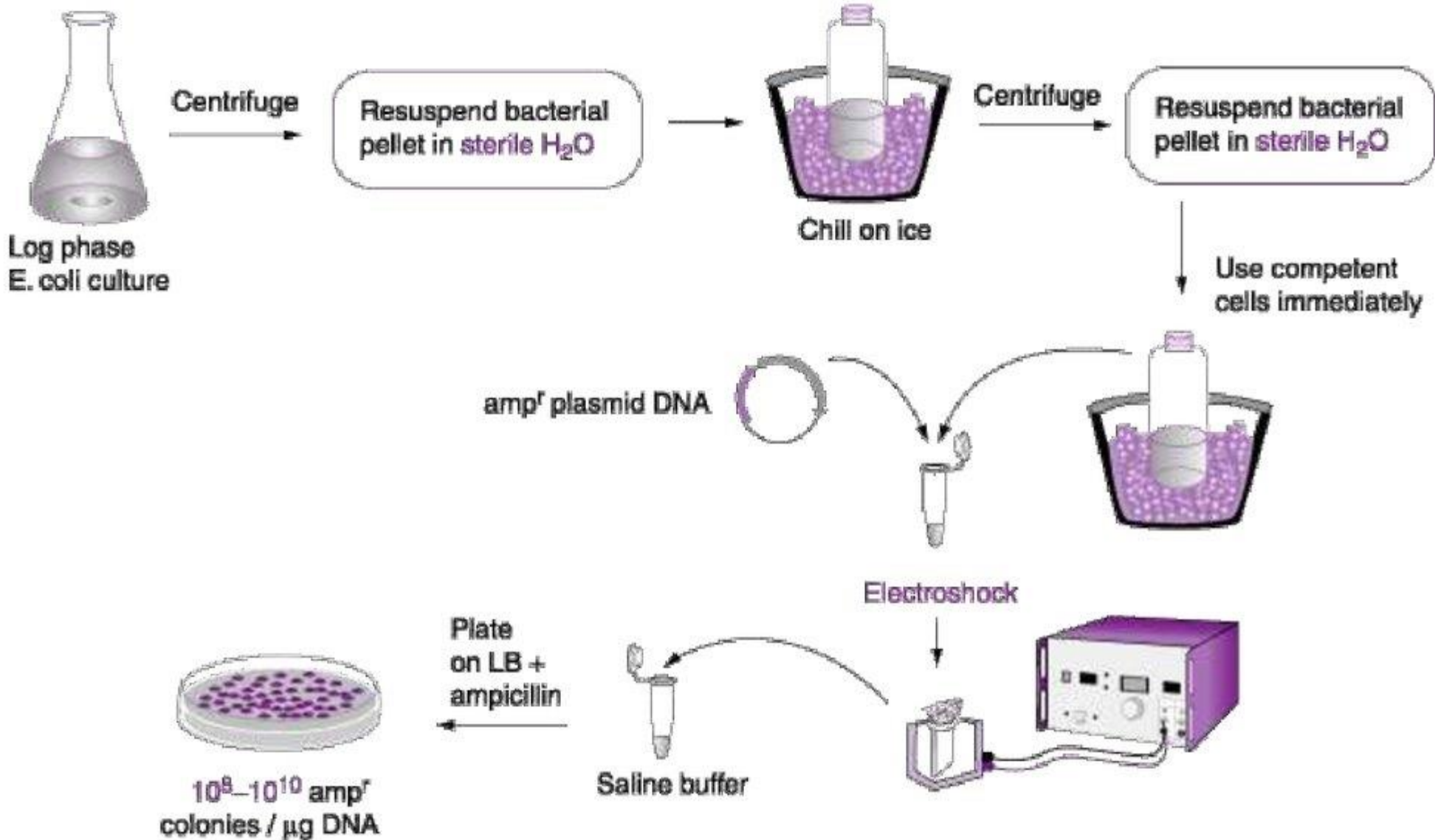
1. Кейбір ақпарат көздері Ca²⁺ жоғары концентрациясы жасуша мембранасында саңылаулардың пайда болуына және ДНҚ -ның зақымдалуына себеп болады деп мәлімдейді және ДНҚ -ның зақымдануы жасушаның құзыретті күйге енуі үшін сигнал екендігі бұрын анықталған;
2. Басқа мәліметтер бойынша бұл иондар жасушаға плазмидалық векторды бекітетін «көпір» қызметін атқарады. Оң зарядталған иондар бір мезгілде бактериялардың сыртқы мембранасындағы теріс зарядталған полисахаридтер тобына және теріс зарядталған плазмидті ДНҚ топтарына қосылады. Егер ортада иондар болмаса, онда ДНҚ жасушадан ығыстырылатын еді, ал зерттеушіге бұл мүлде қажет емес.



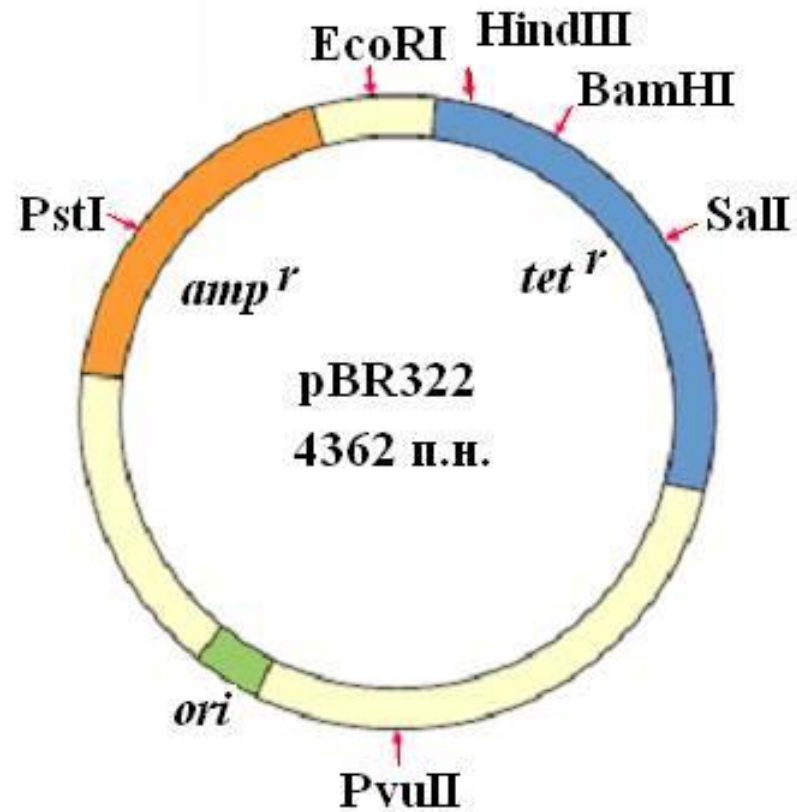
Электропорация - бұл электр өрісінің әсерінен липидті екі қабатты мембранада тесіктердің пайда болуы.

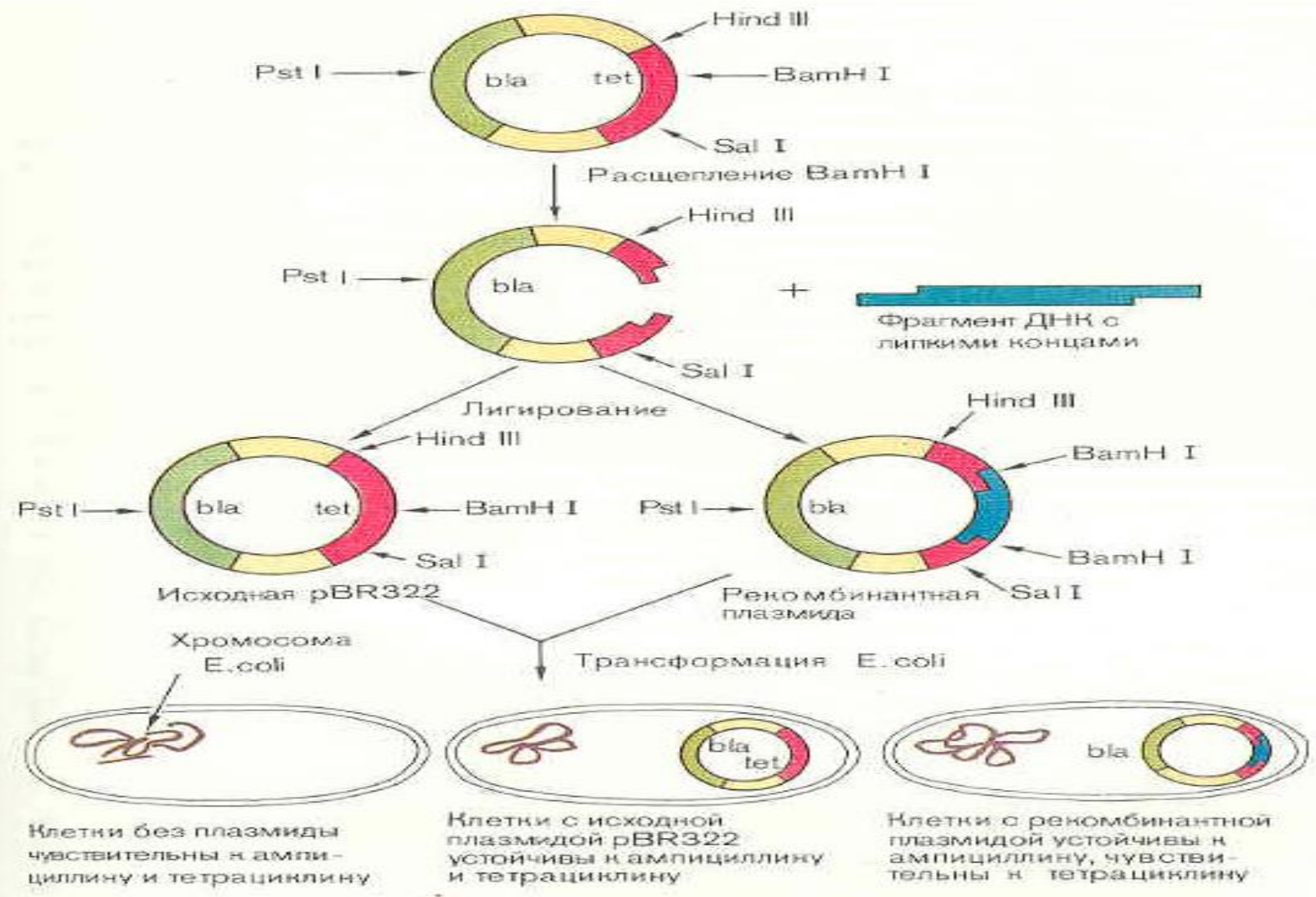


Электропорация



Плазмидалық вектор pBR322







Рост в присутствии
ампициллина тетрациклина



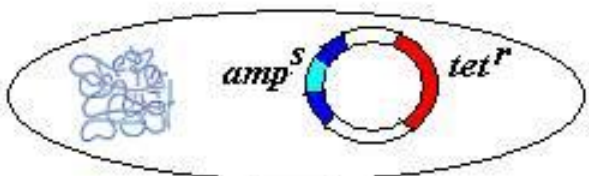
—

—



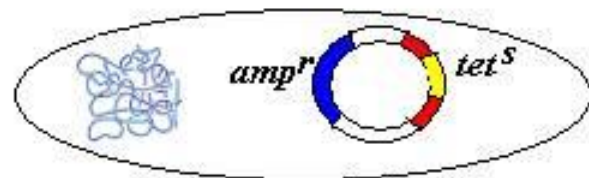
+

+



—

+



+

—



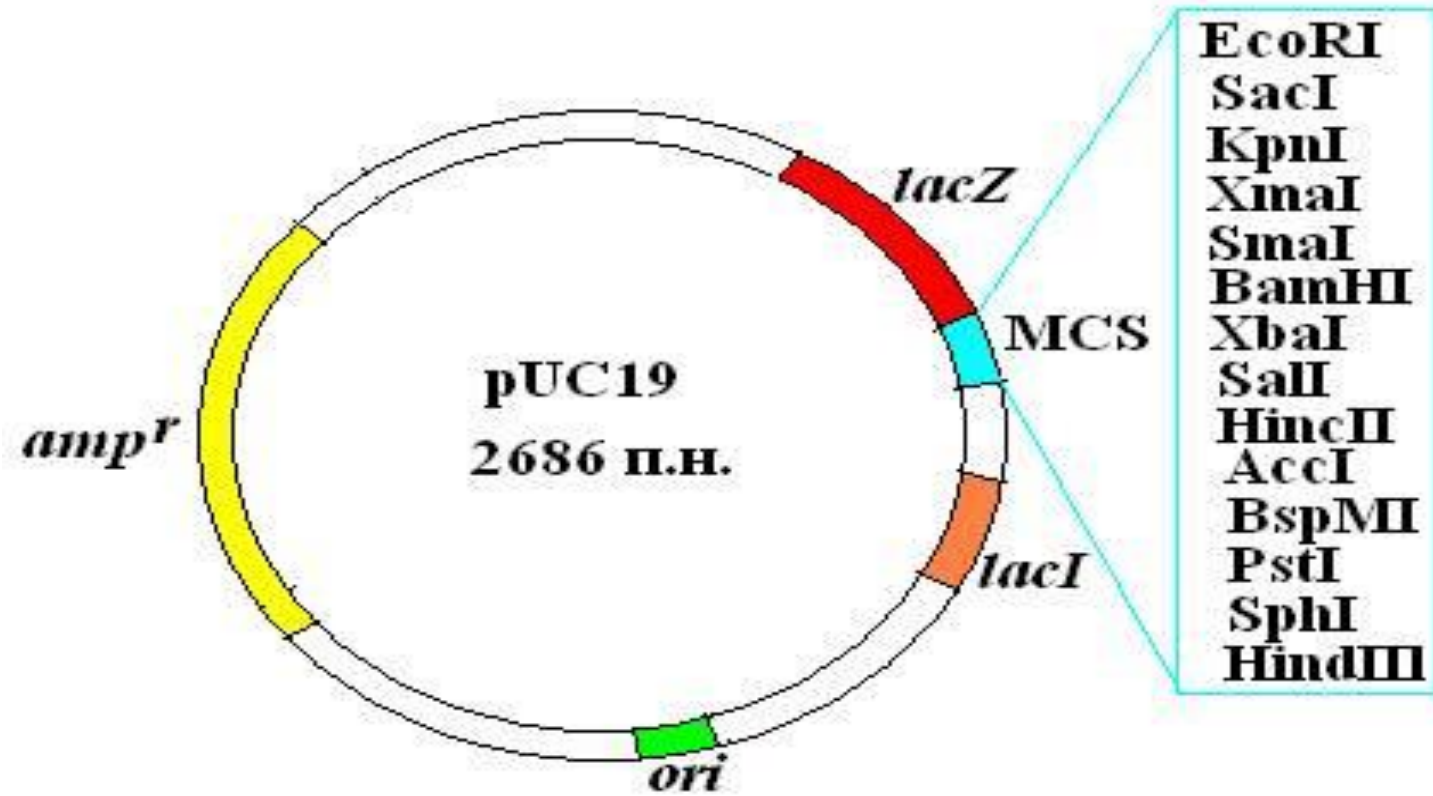
—

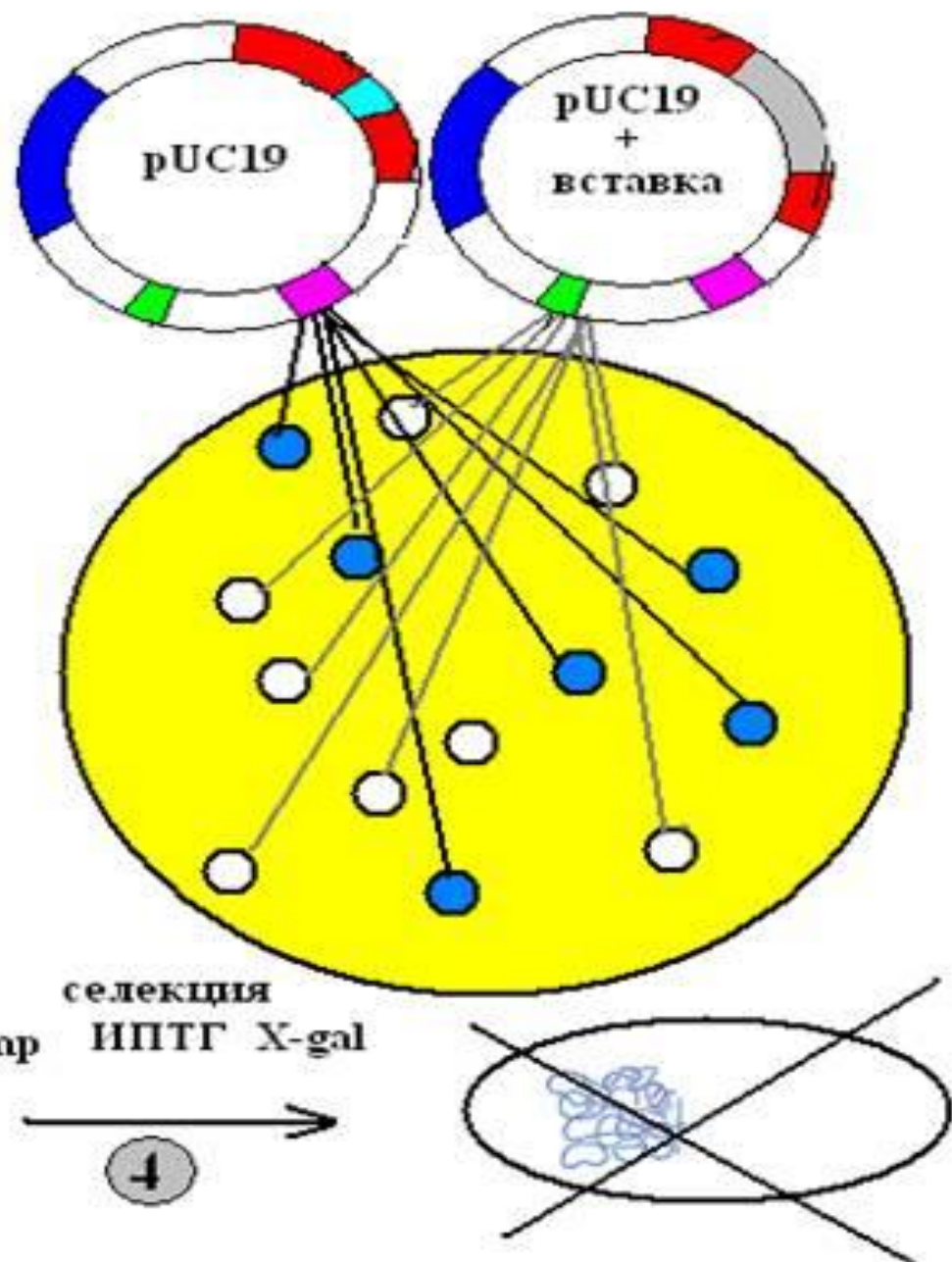
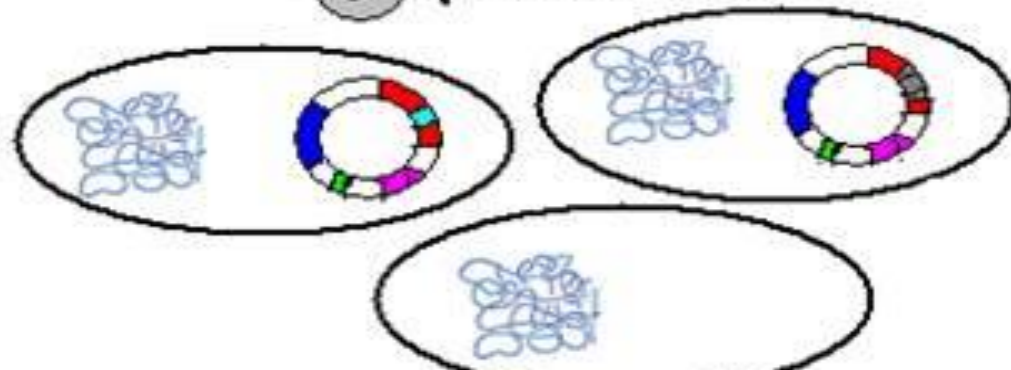
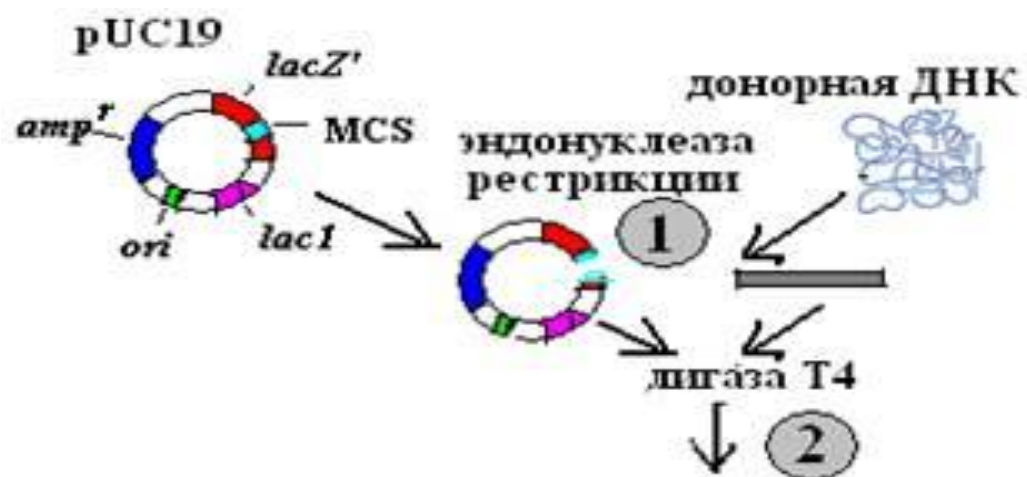
—

вставки ДНК

— +

чувствительный (s)
устойчивый (r)





Селективті және репортерлік маркерлік
гендер

Трансформацияланған жасушаларды ажыратуға мүмкіндік беретін маркерлік гендердің екі тобын ажыратуға болады :

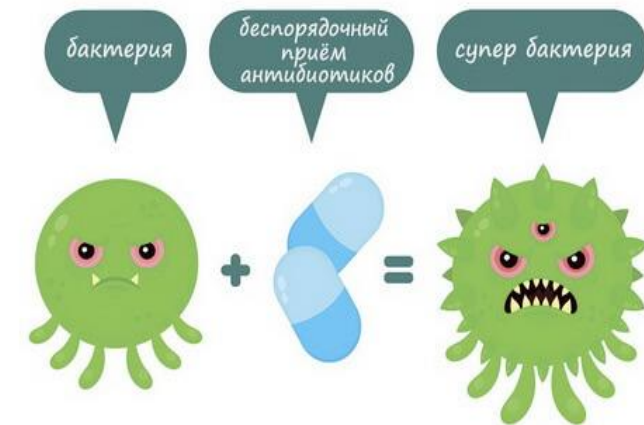
1. Селективті гендер, антибиотикке тұрақтылықты қамтамасыз етеді.

Бактерияларда : канамицин, тетрациклин, ампицилин, неомицин және т.б.

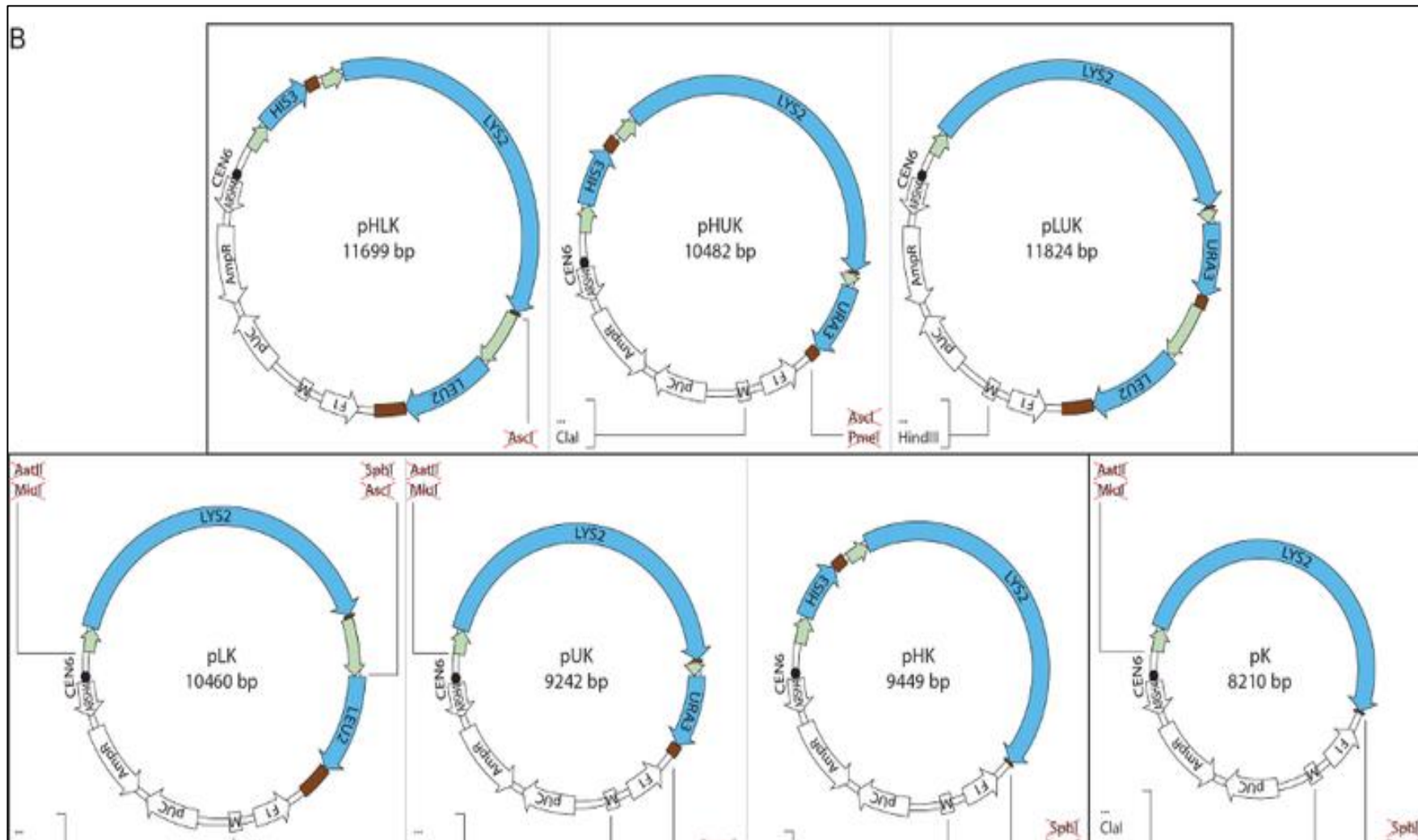
Өсімдіктерде: гербицидтер және кестеде көрсетілген гендер и гены представленные в таблице.

Таблица 19.1. Примеры использования селективных маркеров в векторах для трансформации растений

Селективный маркер	Субстраты (селективные агенты)	Чувствительность ткани контрольного растения, мкг/мл	Конструкции	Резистентность, обеспечиваемая гибридной конструкцией, мкг/мл
Ген неомицинфосфотрансферазы II (<i>nptII</i>)	Неомицин	50–250	$p_{nos}^2-nptII/nos$ poly(A)	75–1000
	Канамицин ¹	5–35	$p_{35S}-CaMV^3-nptII/nos$ poly(A)	
	G-418	3–10		
Ген гигромицинфосфотрансферазы (<i>hpt</i>)	Гигромицин-В	3–10	$p_{nos}-hpt/nos$ poly(A) $p_{19S}-CaMV-hpt/nos$ poly(A)	30–100
Ген устойчивости к блеомицину (<i>ble</i>)	Блеомицин	1–5	$p_{35S}-CaMV-ble/nos$ poly(A)	5–10
Ген дигидрофолатредуктазы (<i>dhfr</i>)	Метотрексат ¹	0,01–0,5	$p_{nos}-dhfr/nos$ poly(A)	0,05–0,5
	Триметоприм	8–16		

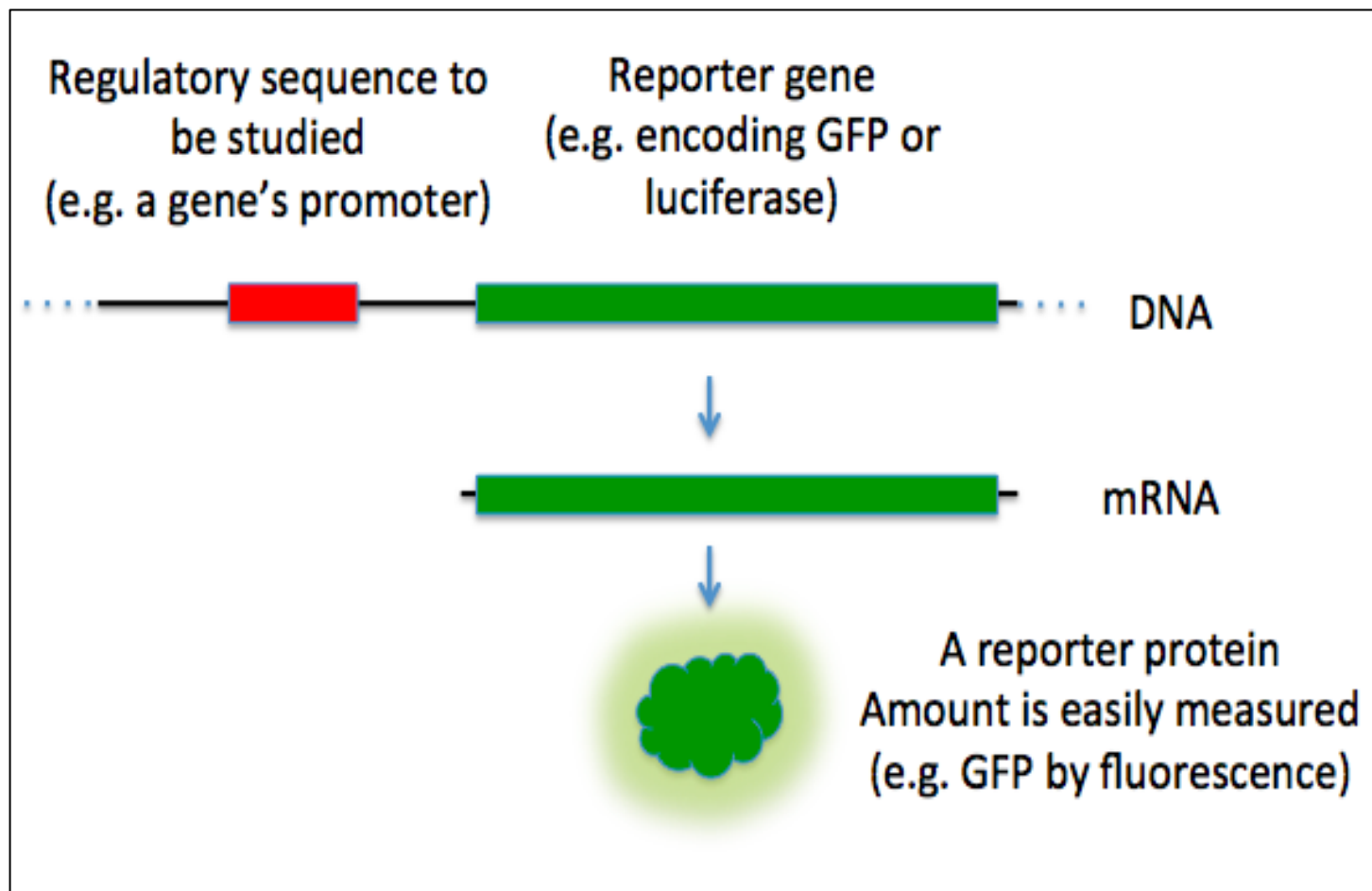


- Сонымен қатар кейбір субстрат үшін *ауксотрофтылық гендері* болуы мүмкін.
- Мұндай маркердің жұмыс істеуінің негізгі принципі-трансформацияланған жасушалардың қалыпты жасушалардың өсуін және бөлінуін тежейтін немесе мутантты трансформанттардың іріктелуін қамтамасыз ететін белгілі бір заттардың қосылуымен селективті қоректік ортада өсу қабілеті.



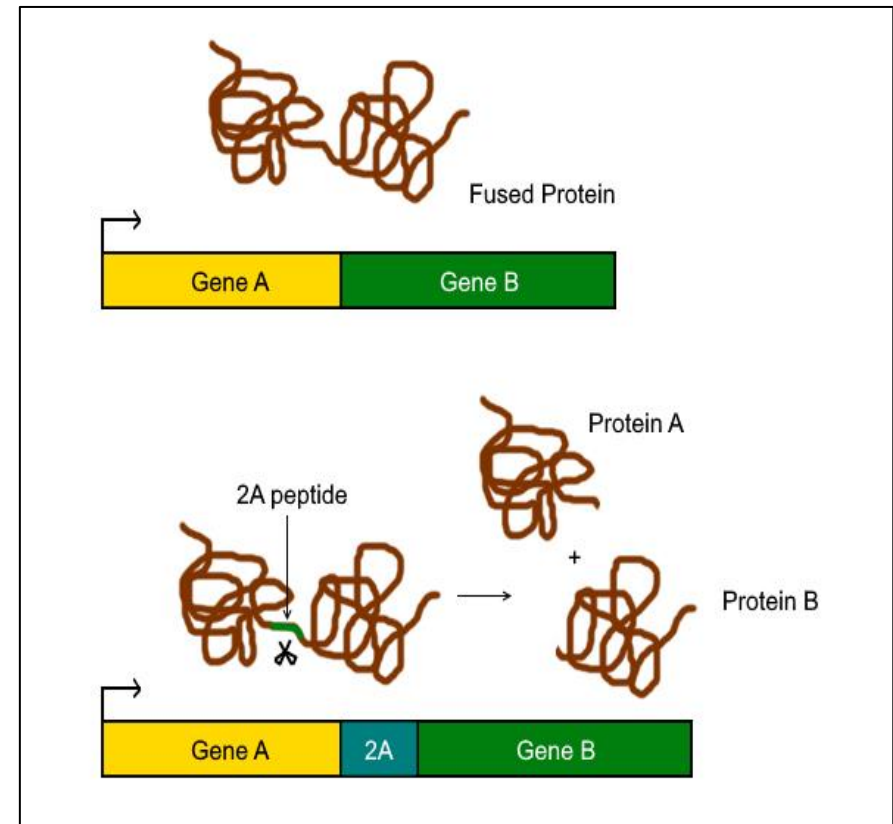
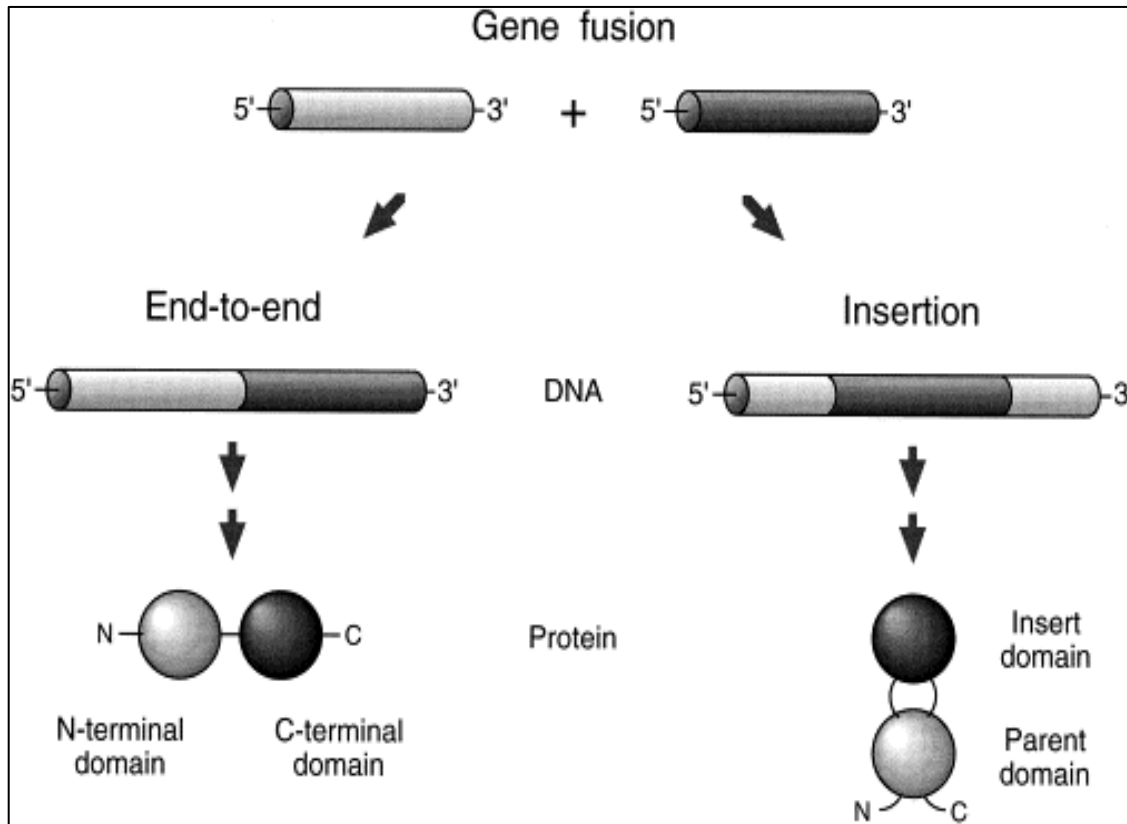
2. Жасушалар үшін бейтарап протеиндерді кодтайтын *репортер -гендер*, олардың ұлпада болуын оңай тексеруге болады.

Репортер гендері бірегей ферментативті белсенділігі бар және ДНҚ элементтерінің транскрипциялық қасиеттерін бағалау үшін қолданылатын белоктарды кодтайды.



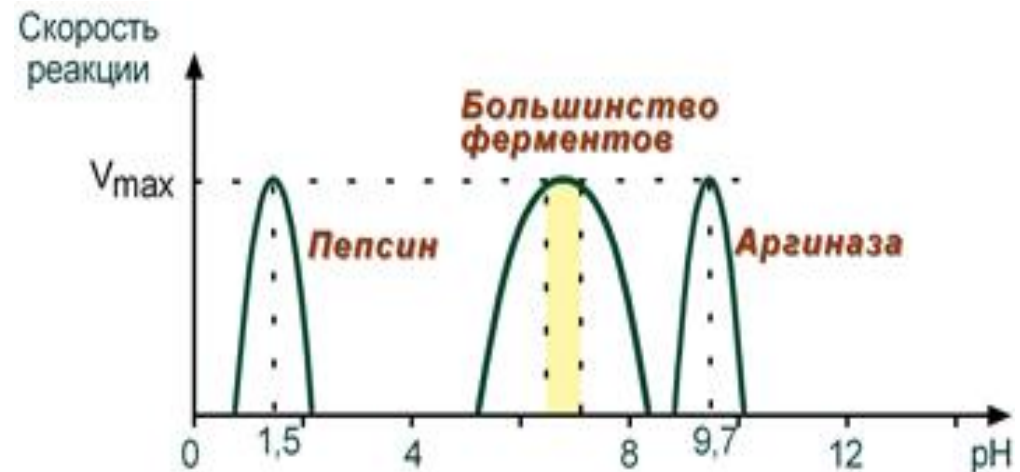
Ең жиі қолданылатын репортер гендері- β -глюкуронидаз (GUS), жасыл флуоресцентті ақуыз (GFP), люцифераза (LUC) және хлорамфеникол ацетилтрансфераза (CAT). Бүгінгі таңда осы арсеналдан GUS және GFP гендері жиі және LUC және CAT гендері аз дәрежеде қолданылады.

Нысанды геннің реттеуші тізбектері оңай талданатын ақуызды кодтау аймағына қосылады.



Ферменттің белсенділігі *бірлікпен* (U) өлшенеді, бұл 1 минутта трансформацияланған субстраттың (немесе түзілген өнімнің) микромолімен көрсетілетін ферменттің катализдейтін реакция жылдамдығын көрсетеді

- *Фермент бірлігі* - рН мен температураның белгілі бір жағдайында 1 мкмоль субстраттың конверсиясын катализдейтін фермент мөлшері.
- *Ферменттердің спецификалық белсенділігі* ақуыздың миллиграммындағы фермент бірлігінің саны.



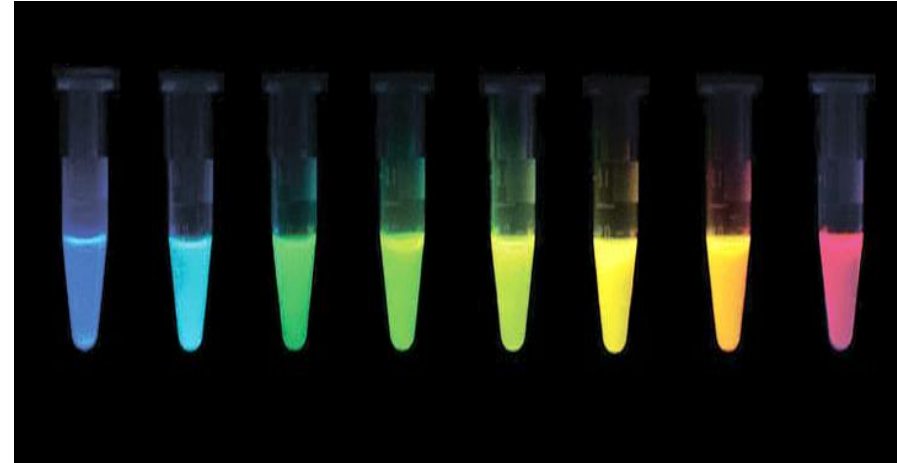
Ферменттердің белсенділігі флуоресценция немесе хемилюминесценция сіңіруі арқылы анықталады.

Флуорометриялық

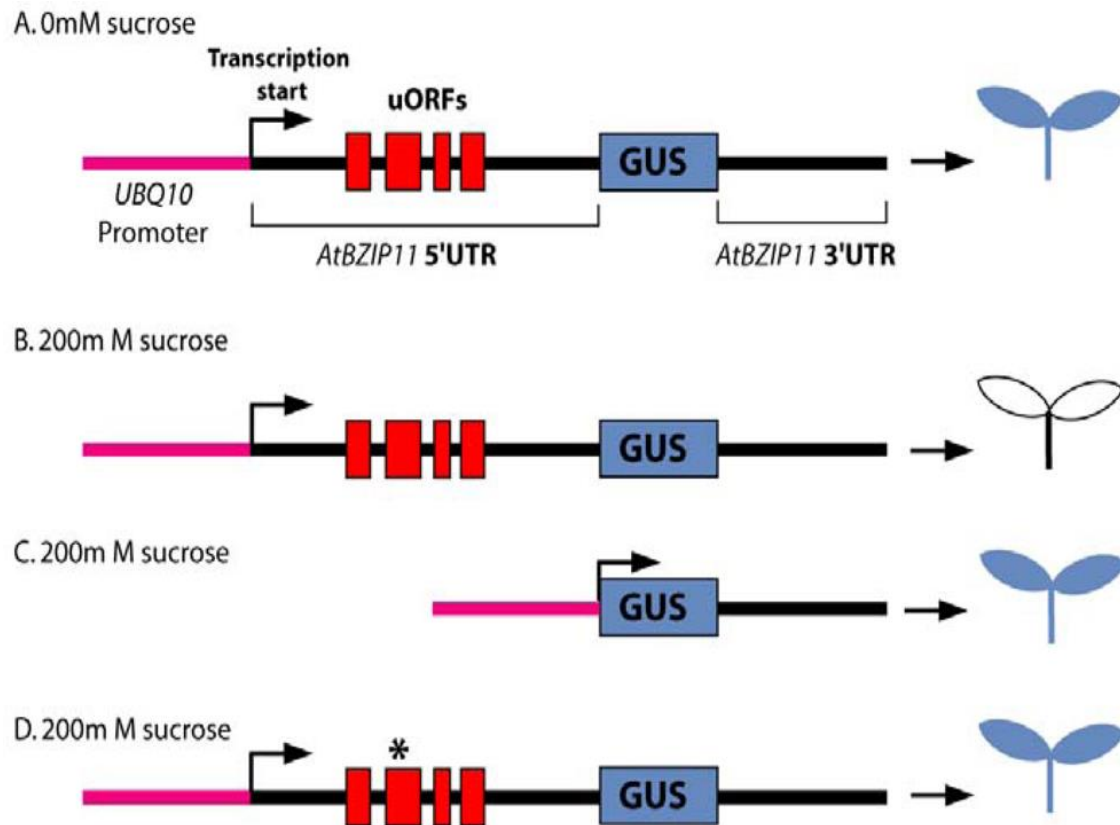
Флуоресценция - бұл молекуланың басқа толқын ұзындығында жарықты жұтқаннан кейін бір толқын ұзындығында жарық шығаруы. Флуорометриялық талдаулар ферменттік реакцияны өлшеу үшін өнімнен субстраттың флуоресценциясының айырмашылығын қолданады. Бұл талдаулар, әдетте, спектрофотометриялық анализдерге қарағанда әлдеқайда сезімтал, бірақ жарық әсер еткенде көптеген флуоресцентті қосылыстардың қоспалары мен тұрақсыздығынан болатын кедергілерден зардап шегуі мүмкін.

Хемилюминесцентті

Хемилюминесценция - бұл химиялық реакция нәтижесінде жарықтың шығуы. Кейбір ферментативті реакциялар жарық шығарады және оларды өнім түзілуін анықтау үшін өлшеуге болады. Талдаудың бұл түрлері өте сезімтал болуы мүмкін, себебі шығарылған жарықты фото пленкамен бірнеше күн немесе апта бойы түсіруге болады, бірақ оларды есептеу қиын, себебі реакция шығаратын барлық жарық анықталмайды.



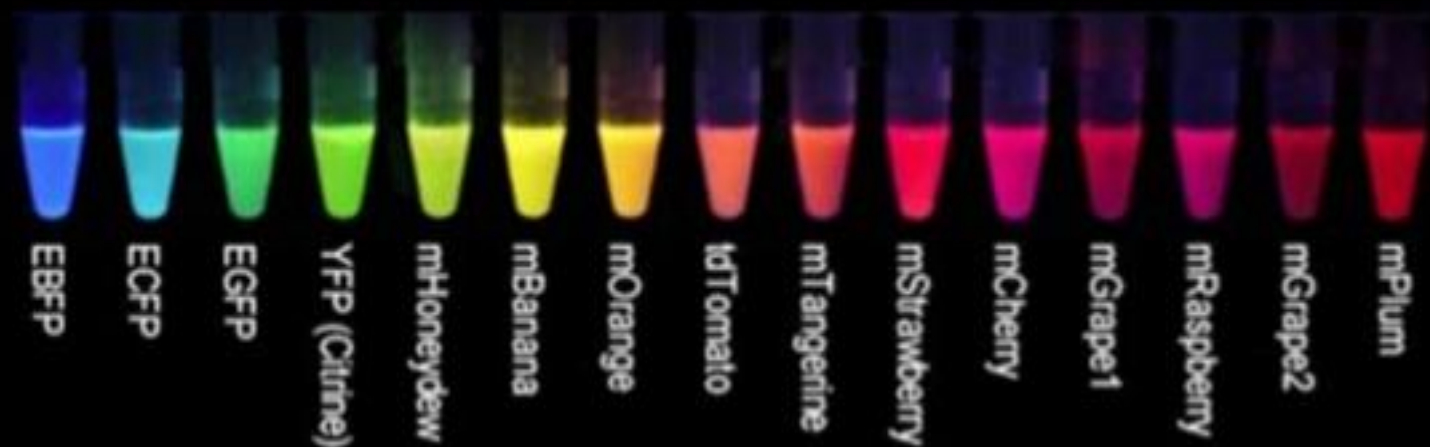
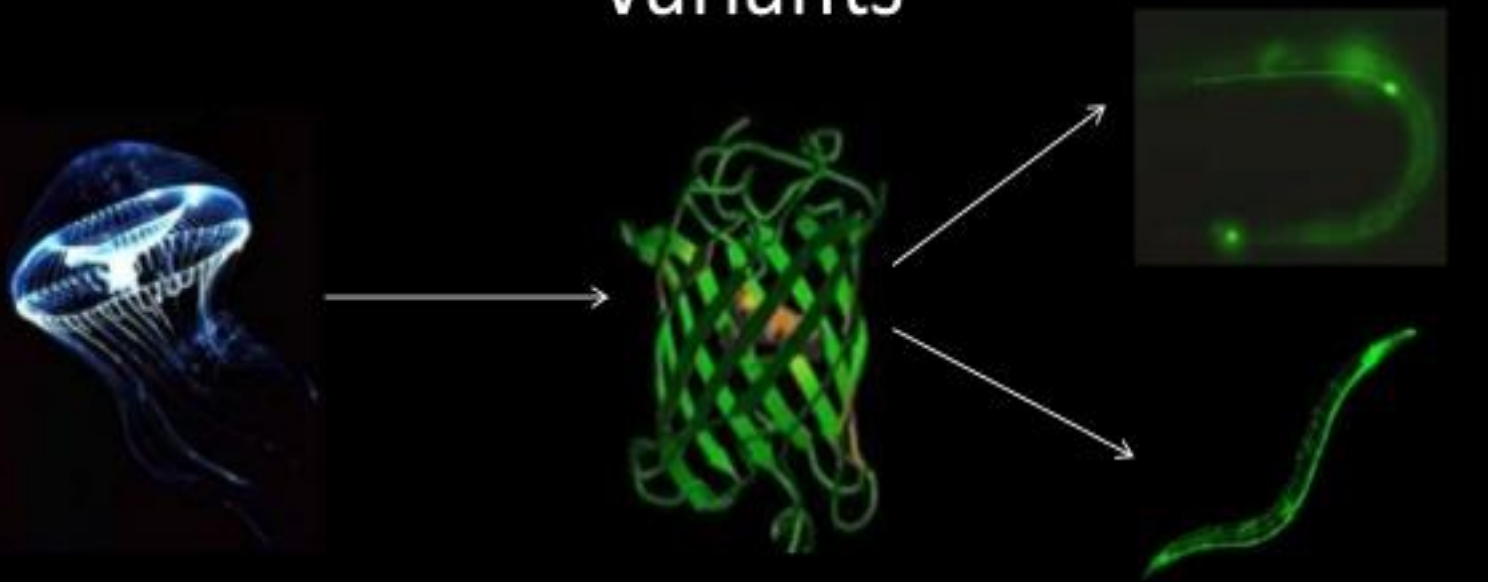
- Қазіргі уақытта репортер гені ретінде қолданылатын **GUS**-молекулалық салмағы 68 кДа болатын **β -глюкуронидазаны** кодтайтын *Escherichia coli* модификацияланған гені. GUS қоршаған ортаның кең ауқымында белсенді. Оңтайлы белсенділік **pH 5-8 және 37 ° C** байқалады. Ол табиғи және синтетикалық **глюкуронидтердің** кең спектрін гидролиздей алады, бұл ферменттік белсенділікті спектрофотометриялық немесе флюорометриялық анықтауға, сондай-ақ ұлпаларды *in situ* гистохимиялық бояуына (мысалы, көк) мүмкіндік беретін сәйкес субстраттарды таңдауға мүмкіндік береді. Тірі жасушаларда GUS ақызы да өте тұрақты және бірнеше сағаттан бірнеше күнге дейін белсенді болады.



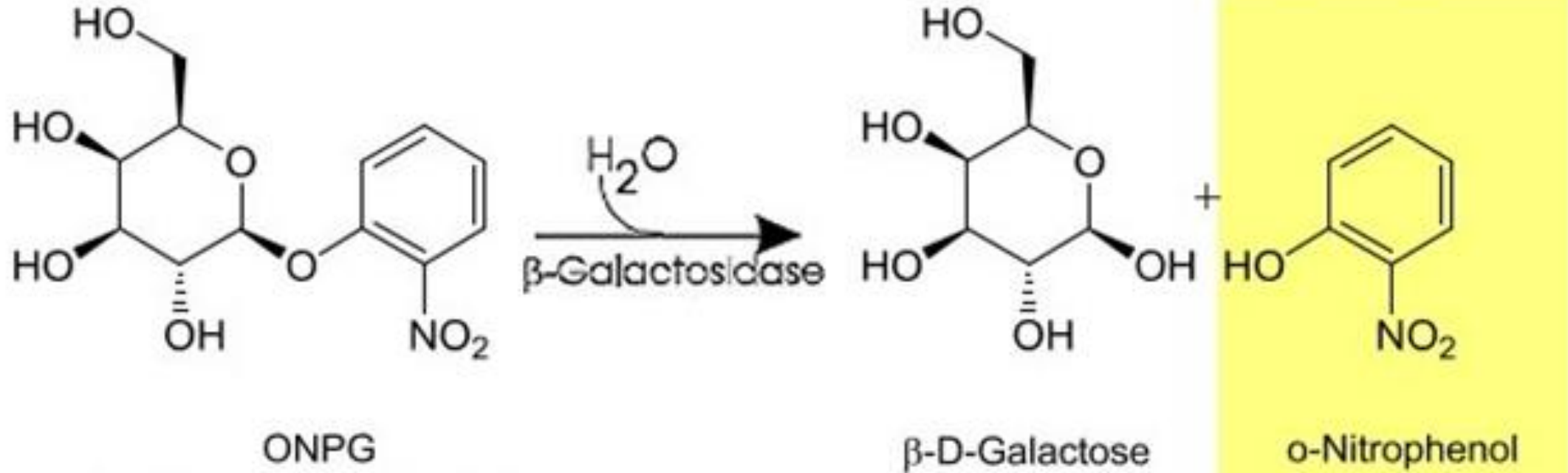
- **GFP** (жасыл флуоресцентті ақуыз - жасыл флуоресцентті ақуыз, немесе жасыл флуоресцентті ақуыз) 1962 жылы Шимомуражіне оның әріптестерімен люминесцентті медуза *Aequorea victoria* -дан ашылған.
- **GFP** генін 1992 жылы Prasher және басқалар клондайды. Ал бірнеше жыл ішінде бұл генді әр түрлі про-эукариотты организмдермен жұмыс жасауда репортер ген ретінде белсенді қолдану басталды.
- Қазіргі уақытта GFP гені бүкіл әлем бойынша жүздеген зерттеулерде қолданылады және олардың саны тез өсуде. Бұл жылдам өсу GFP ақуызының ерекше қасиеттеріне байланысты, яғни оның ұзақ толқынды ультракүлгін сәулелену кезінде көрінетін (жасыл) спектрлік аймақта флуоресценциялау қабілетіне байланысты. Бұл флуоресценция ақуызға тікелей байланысты және оның көрінуі үшін субстрат немесе кофактор қажет емес. Осы қасиеттің арқасында GFP гені-трансгенді организмдермен әр түрлі *in vivo* зерттеулер жүргізуге мүмкіндік беретін өте перспективалы репортер-ген.
- Жақында *Discosoma* sp. теңіз анемонынан қызыл жарықта флуоресценциялайтын басқа ақуыз DsRed бөлінді.



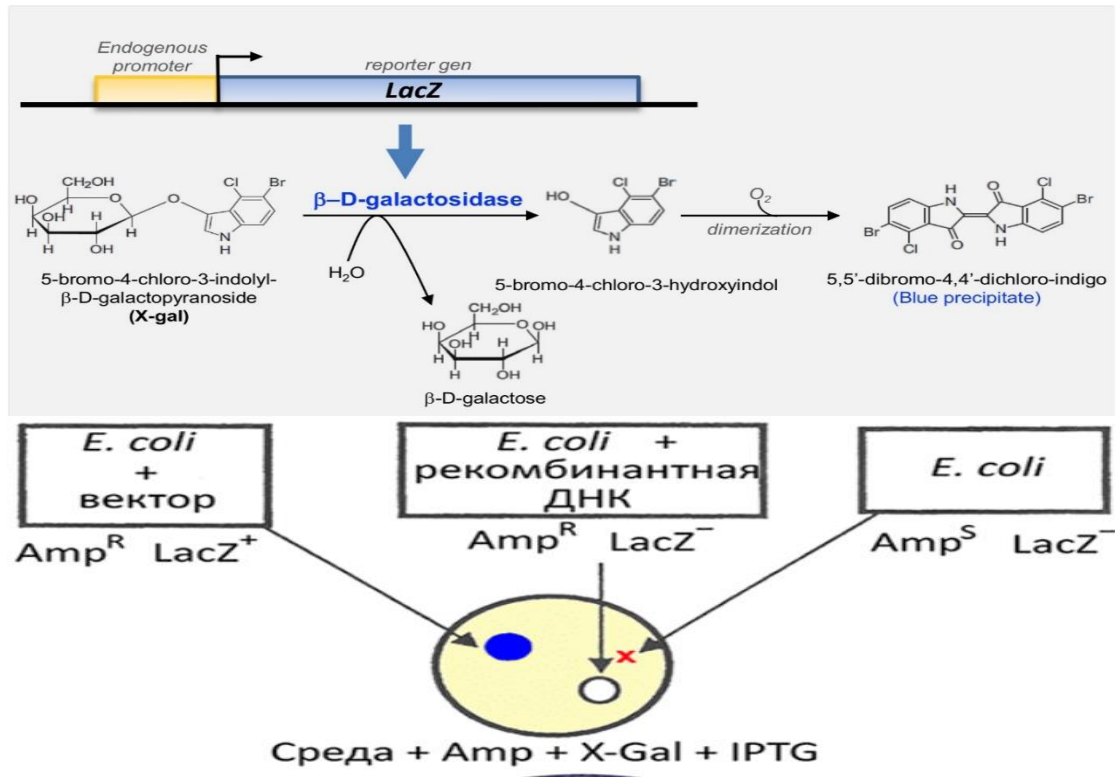
The Green Fluorescent Protein and Variants



β-галактозидаза



- В-галактозидтердің, соның ішінде лактозаның гидролизін катализдейтін β-галактозидаза ферменті *E. coli* **LacZ** генімен кодталады.
- Ферменттердің белсенділігі жасушасыз сығындыларда β-галактозидаза арқылы о-нитрофенил-Р-о-галактопиранозид (ONPG) субстратының гидролизін өлшейтін қарапайым фотометриялық талдау көмегімен өлшенеді.



- β -галактозидазаны X-Gal (5-бromo-4-хлоро-3-индоил β -D-галактозид) субстратының көмегімен гистохимиялық жолмен де бақылауға болады.
- β -галактозидазаны репортер-фермент ретінде қолданудың ықтимал кемшілігі-сүтқоректілердің кейбір ұлпаларында, соның ішінде миында β -галактозидазаның эндогендік белсенділігінің болуы. Бірақ бұл ферменттің рН оптимумы төмен (рН 3,5), ал *E. coli* ферментінің рН оптимумы 7,3. Жалған оң нәтижелерді талдауды рН 7.5 кезінде жүргізу және бақылау ретінде қалыпты ұлпаның сығындысын қосу арқылы азайтуға болады.

ИСТОЧНИКИ:

- 1. Gorman, C. M., Moffat, L. F., and Howard, B. H. (1982) Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyl transferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 2, 1044-1051.
- 2. Sleight, M. J. (1986) A non-chromatographic assay for expression of the chloramphenicol acetyl transferase gene in eucaryotic cells. *Anal. Biochem.* 156, 251-256.
- 3. Fowler, A. V. and Zabin, I. (1983) Purification, structure and properties of hybrid β galactosidase proteins. *J. Biol. Chem.* 258, 14,354-14,358.
- 4. Gorman, D. R., Rossant, J., Clapoff, S., Breitman, M. L., and Tsui, L.-C. (1987) In situ detection of β galactosidases in lenses of transgenic mice with a crystallin/lacZ gene. *Science* 235, 456-458.
- 5. Shimohama, S., Rosenberg, M. B., Fagan, A. M., Wolff, J. A., Short, M. P., Breakefield, X. O., Friedmann, T., and Gage, F. H. (1989) Grafting genetically modified cells into the rat brain: characteristics of β galactosidase as a reporter gene. *Mol. Brain. Res.* 5, 271-278.
- 6. de Wet, J. R., Wood, K. V., DeLuca, M., Helinski, D. R., and Subramanian, S. (1987) Firefly luciferase gene: Structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 7, 125-137.
- 7. Brasier, A. R., Tate, J. E., and Habener, J. F. (1989) Optimized use of the firefly luciferase assay as a reporter gene in mammalian cell lines. *BioTechniques* 7, 1116-1122.
- 8. Nguyen, V. T., Morange, M., and Bensaude, O. (1988) Firefly luciferase luminescence assays using scintillation counters for quantitation in transfected mammalian cells. *Anal. Biochem.* 171, 404-408.