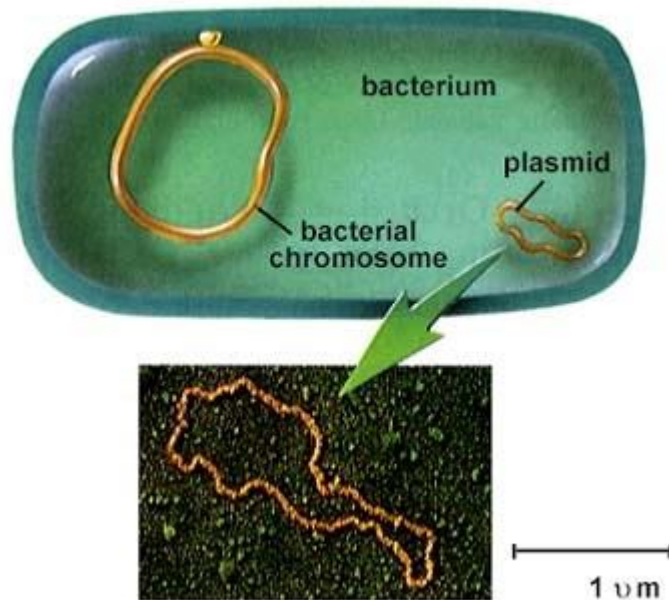


Общая характеристика векторов, используемых в технологиях рекомбинации ДНК. Классификация. Основные свойства. Емкость векторов.



Лектор: Старший преподаватель,
Кафедры молекулярной биологии и генетики,
PhD, Сmekенов И.Т.
Предмет: Рекомбинация ДНК

Цель лекции

Изучить общую характеристику векторов, используемых в технологиях рекомбинации ДНК, их классификацию, основные свойства и ёмкость, а также рассмотреть процессы трансформации бактерий.

Задачи

1. Рассмотреть основные типы векторов и их классификацию в контексте рекомбинации ДНК.
2. Обсудить ключевые свойства векторов, включая стабильность, селективные маркеры и механизмы репликации.
3. Изучить процессы трансформации бактерий и их значение для внедрения рекомбинантной ДНК.

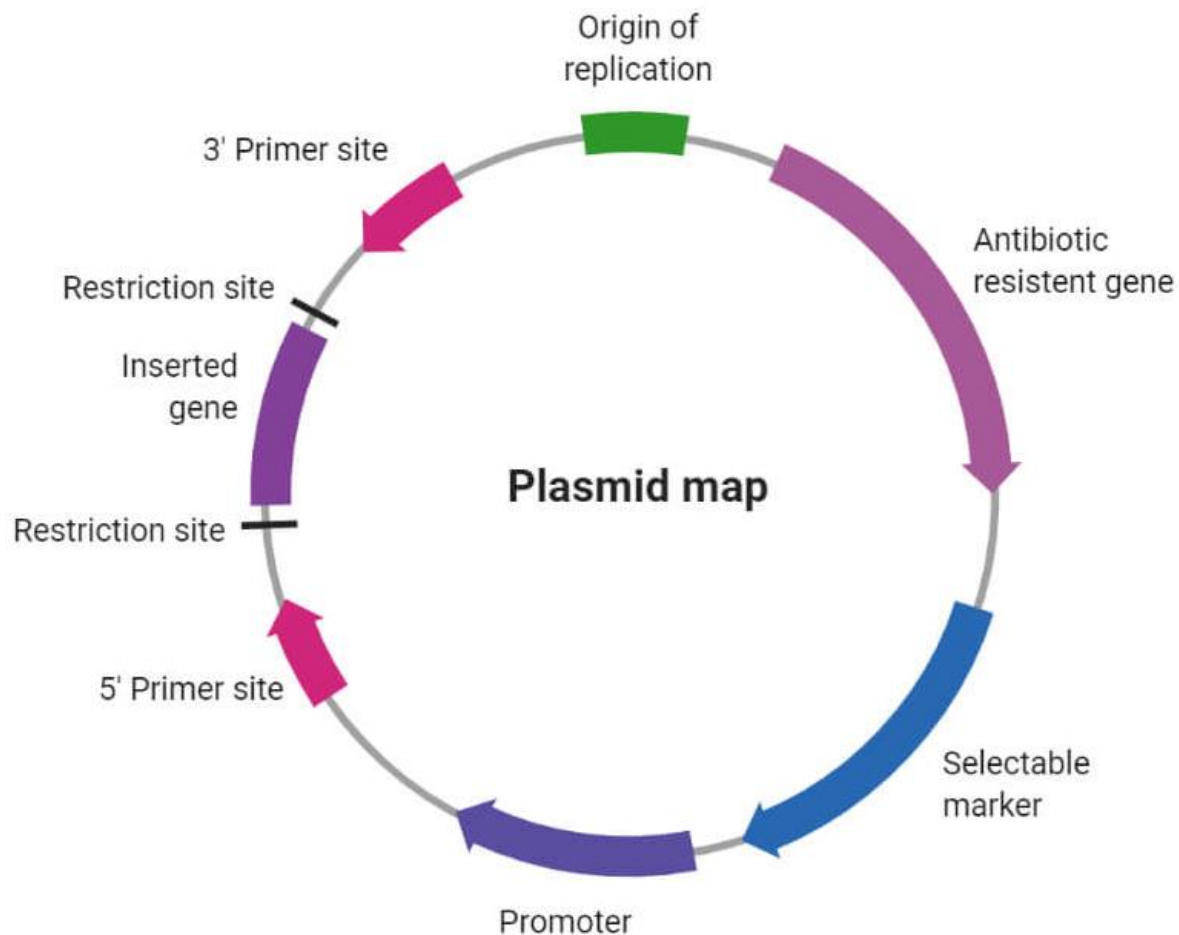
Ключевые слова: Векторы рекомбинации ДНК, Классификация векторов, Основные свойства векторов, Ёмкость векторов, Процессы трансформации бактерий.

Определение

- **Вектор** - это вещество, обычно фрагмент ДНК, который несет последовательность ДНК или другого генетического материала и вводит его в новую клетку.
- - Это автономная самореплицирующаяся кольцевая молекула ДНК.



Функции и особенности

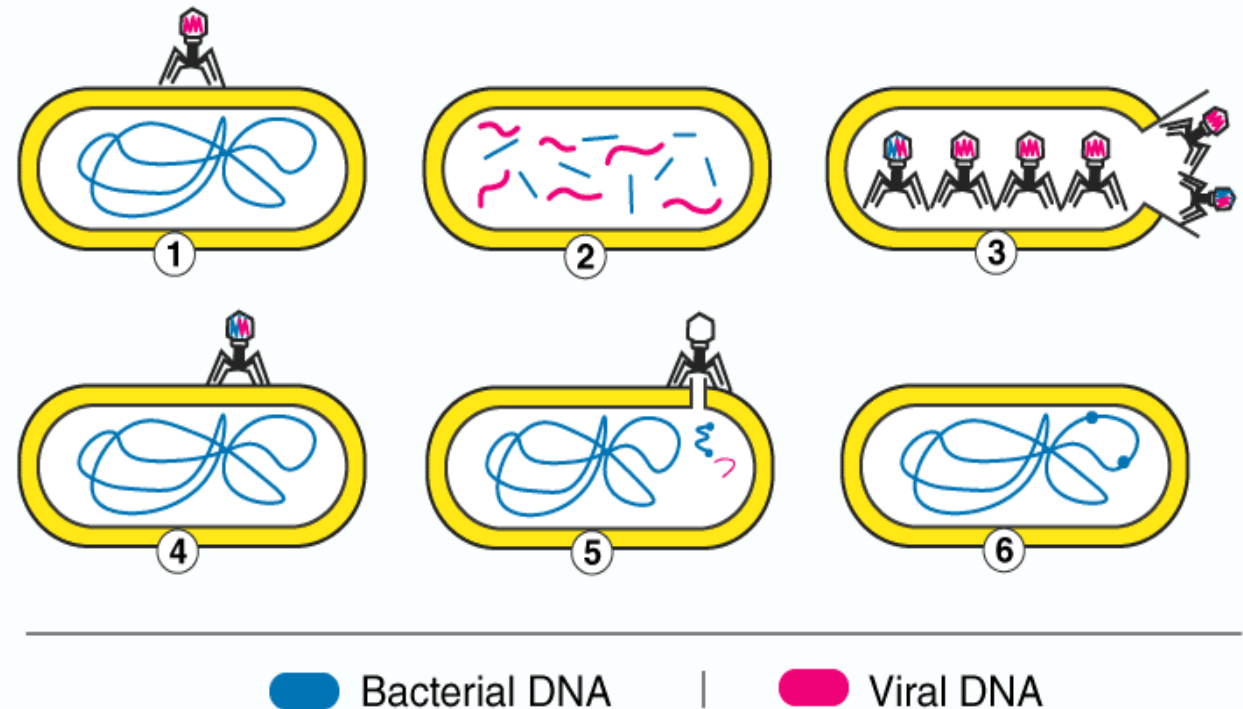


- Векторы действуют как **средства передачи** генетического материала от одной клетки к другой для различных целей, таких как размножение, экспрессия или изоляция.
- Векторы используются в качестве **инструмента** в процедурах молекулярного клонирования, чтобы ввести желаемую вставку ДНК в клетку-хозяин.
- Векторы обычно имеют **вставку**, также известную как трансген, которая несет рекомбинантную ДНК, и более крупную последовательность, называемую **backbone**, ответственной за структуру вектора.
- Векторы можно разделить на разные типы в зависимости от различных характеристик. Таким образом, выбор векторов зависит от цели процесса.

- Векторы являются важным компонентом процесса генной инженерии, поскольку они образуют основу для переноса фрагментов ДНК из одной клетки в другую.
- Векторы обладают особыми свойствами, которые несут последовательности генов и позволяют им выживать в клетке-хозяине.
- Хотя векторы обычно представляют собой последовательности ДНК, вирусы и другие частицы также могут функционировать как векторы в таких процессах, как **трансдукция**.
- Векторы можно повторно использовать для нескольких процессов, так как они могут быть восстановлены в конце процесса.

- ✓ **Трансдукция** - это способ генетической передачи от одной бактерии к другой через вирус.

Бактериальная трансдукция



Некоторые характерные черты векторов

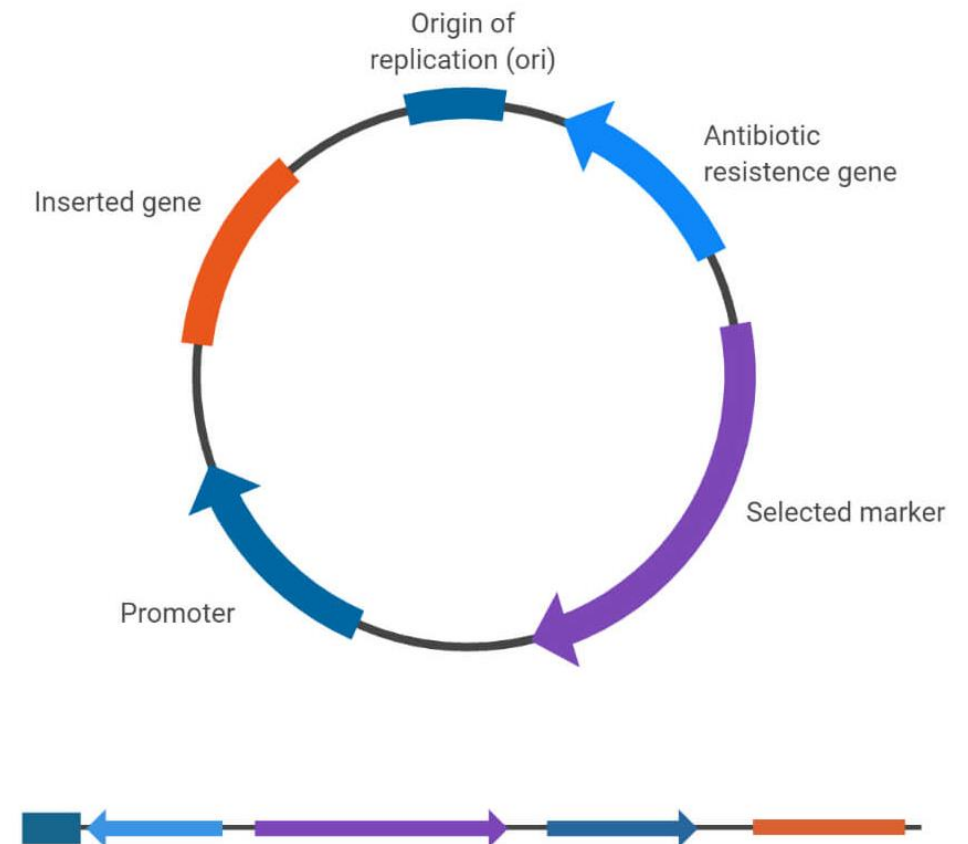
1. Векторы должны иметь возможность автономного воспроизведения.
2. Размер идеального вектора также должен быть достаточно маленьким, чтобы он мог быть включен в геном хозяина.
3. Векторы должны легко выделяться и очищаться, поскольку их необходимо восстанавливать и повторно использовать для нескольких процессов.
4. Чтобы вектор был эффективным, они также должны иметь определенные компоненты, которые облегчают процесс определения того, получила ли клетка-хозяин вектор (ген устойчивости к антибиотику или маркерные гены).
5. Многие векторы также требуют уникальных сайтов узнавания рестрикционных ферментов, которые позволяют встраивать векторную ДНК в присутствии специфических рестрикционных ферментов.
6. В случае процессов переноса генов важно, чтобы вектор был способен интегрировать себя или рекомбинантную ДНК в геном клетки-хозяина. Важно, чтобы введение рекомбинантной ДНК в вектор не влияло на цикл репликации вектора.

Типы векторов

1. Векторы для Клонирования

- Клонировующие векторы представляют собой векторы, которые способны к автономной репликации и, таким образом, используются для репликации рекомбинантной ДНК в клетке-хозяине.
- Клонировующие векторы отвечают за определение того, какие клетки-хозяева подходят для репликации определенного сегмента ДНК.
- Клонировующие векторы также относятся к разным типам, которые определяются различными характеристиками, уникальными для каждого типа вектора.

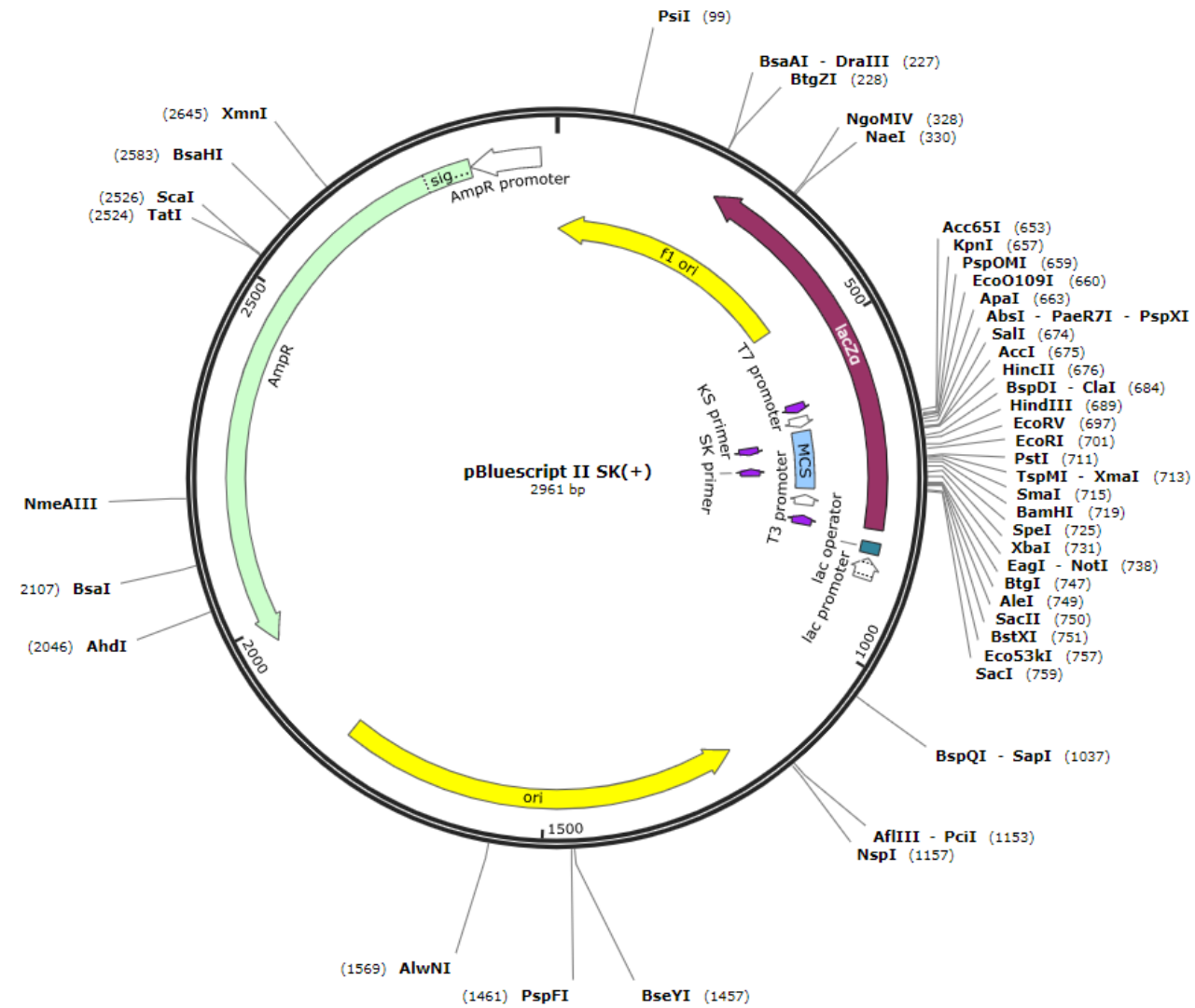
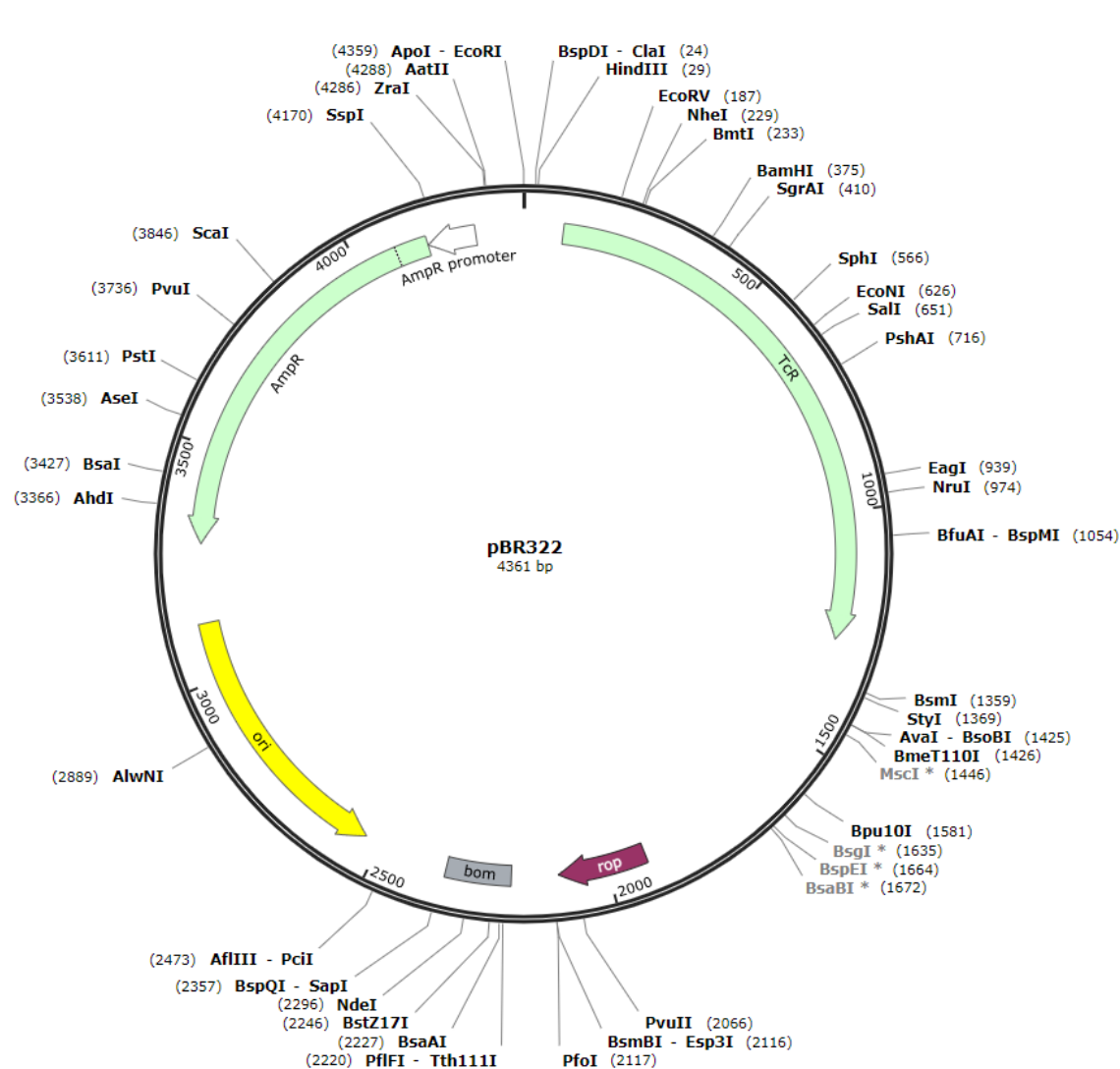
Plasmid Vectors



а. Плазмидный вектор

- Плазмиды представляют собой внехромосомные автономные реплицирующиеся двухцепочечные кольцевые молекулы ДНК.
- От 1-500 kb 10-100 копий на бактериальную клетку
- Несут фенотипические признаки
- Плазмиды могут нести вставку ДНК размером менее 20 т.п.н., поскольку эффективность клонирования и стабильность плазмиды уменьшаются с увеличением размера векторов.
- Бактериальные плазмиды содержат последовательности ***Ori***, которые не только контролируют репликацию плазмиды, но также определяют возможность сосуществования двух плазмид в одной и той же клетке-хозяине.

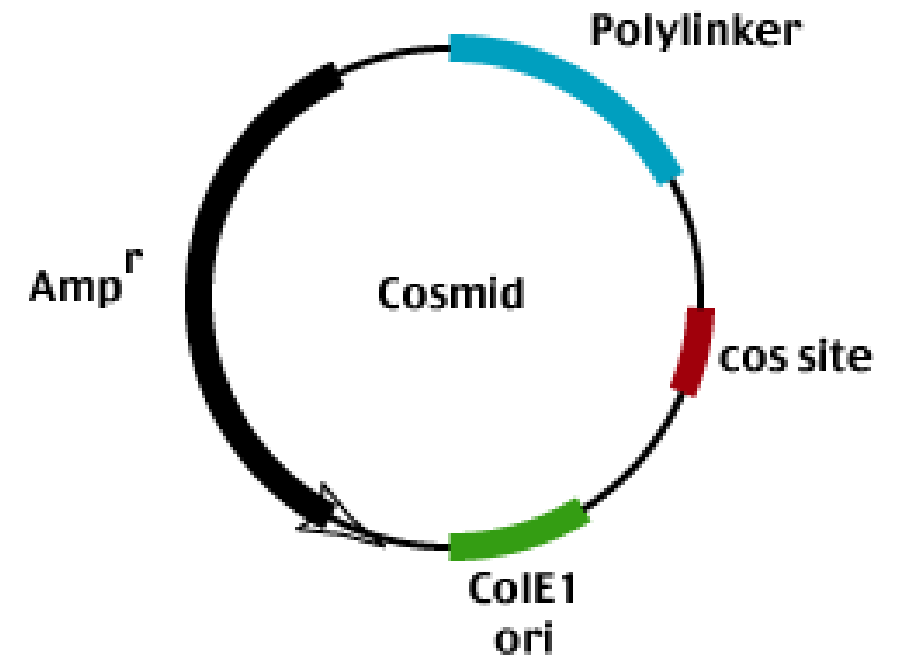
Некоторые из наиболее широко используемых плазмид - это векторы **pBR322**, **pUC** и **pBluescript**, которые используют *E. coli* в качестве хозяина.

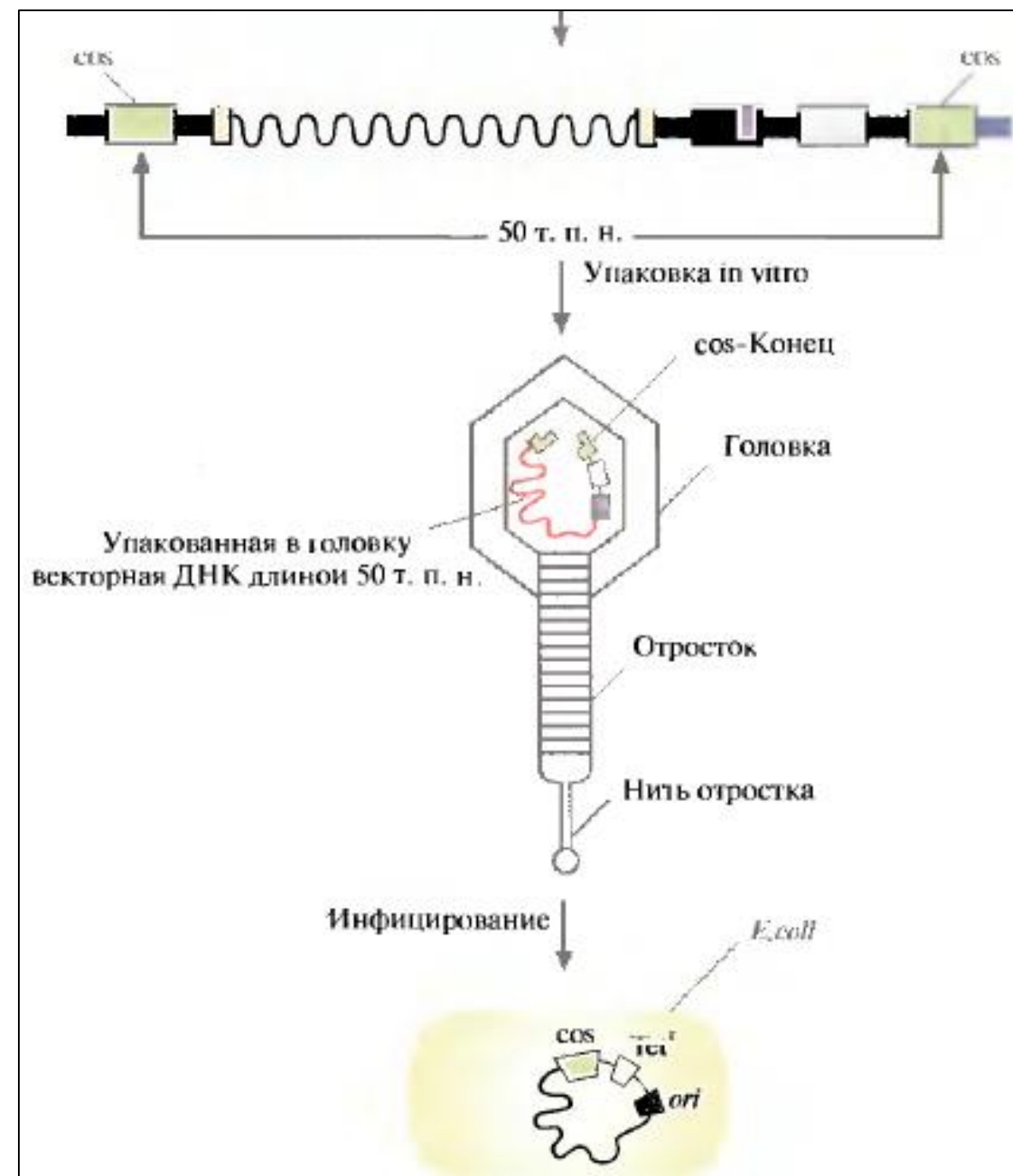
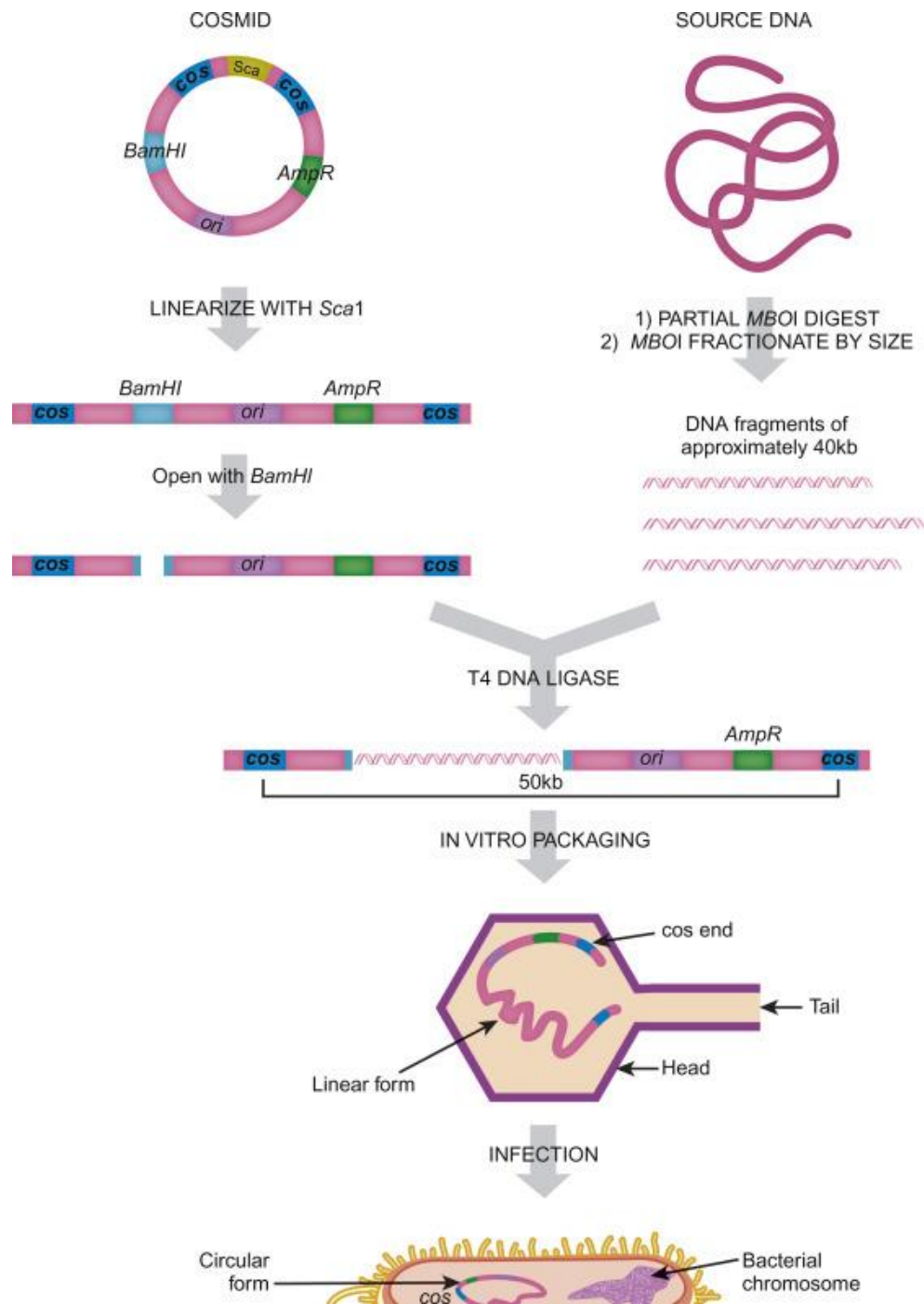


6. Космид

Космиды представляют собой векторы, в которые вставлен участок лямбда-фага, которые способны включать до 40 т.п.н. чужеродной ДНК (pLFR-5, около 6 т.п.н.) и упаковываться в капсиды.

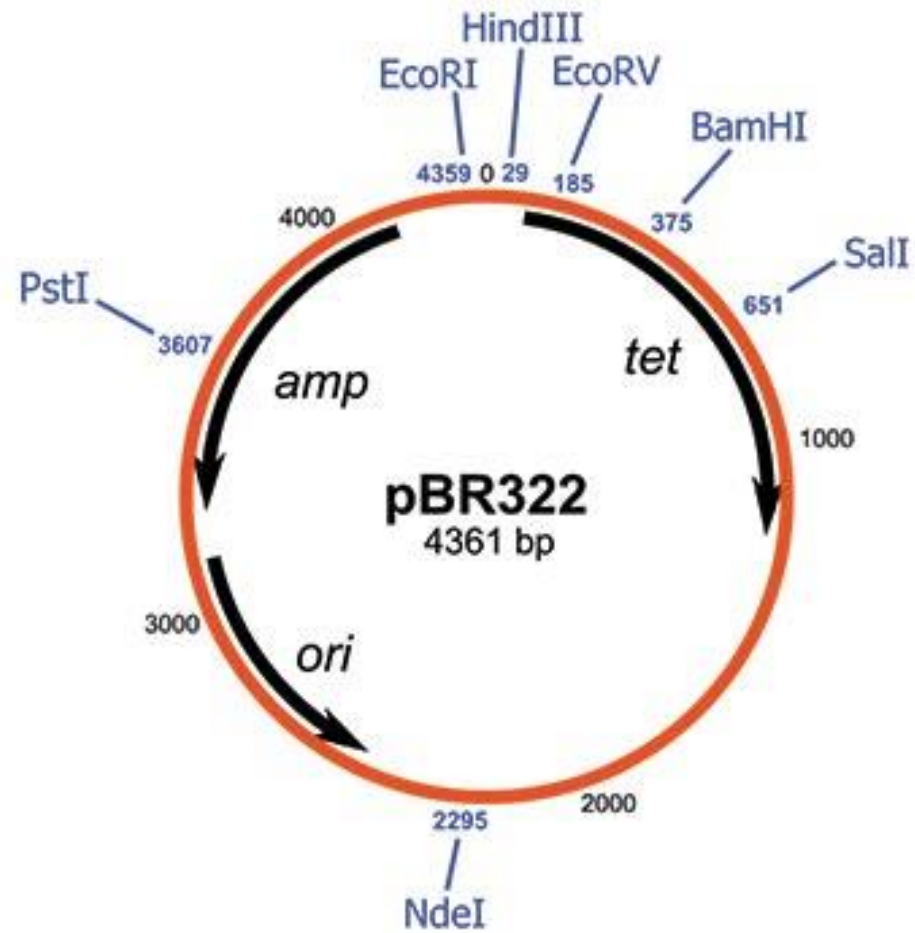
- ✓ Космидные векторы получают путем встраивания области **cos** фагового вектора в плазмидные векторы.
- ✓ Он может нести последовательности ДНК размером от **28 до 46 т.п.н.**
- ✓ Космидные векторы созданы для того, чтобы включать в себя молекулы ДНК большого размера, которые не могут переноситься плазмидами.
- ✓ Гибридная структура космиды позволяет фаговым головкам встраиваться во все донорские ДНК для переноса. Одним из примеров полученных и используемых на практике космидных векторов является космида **pHC79**, которая представляет собой *cos*-содержащее производное вектора **pBR322**.



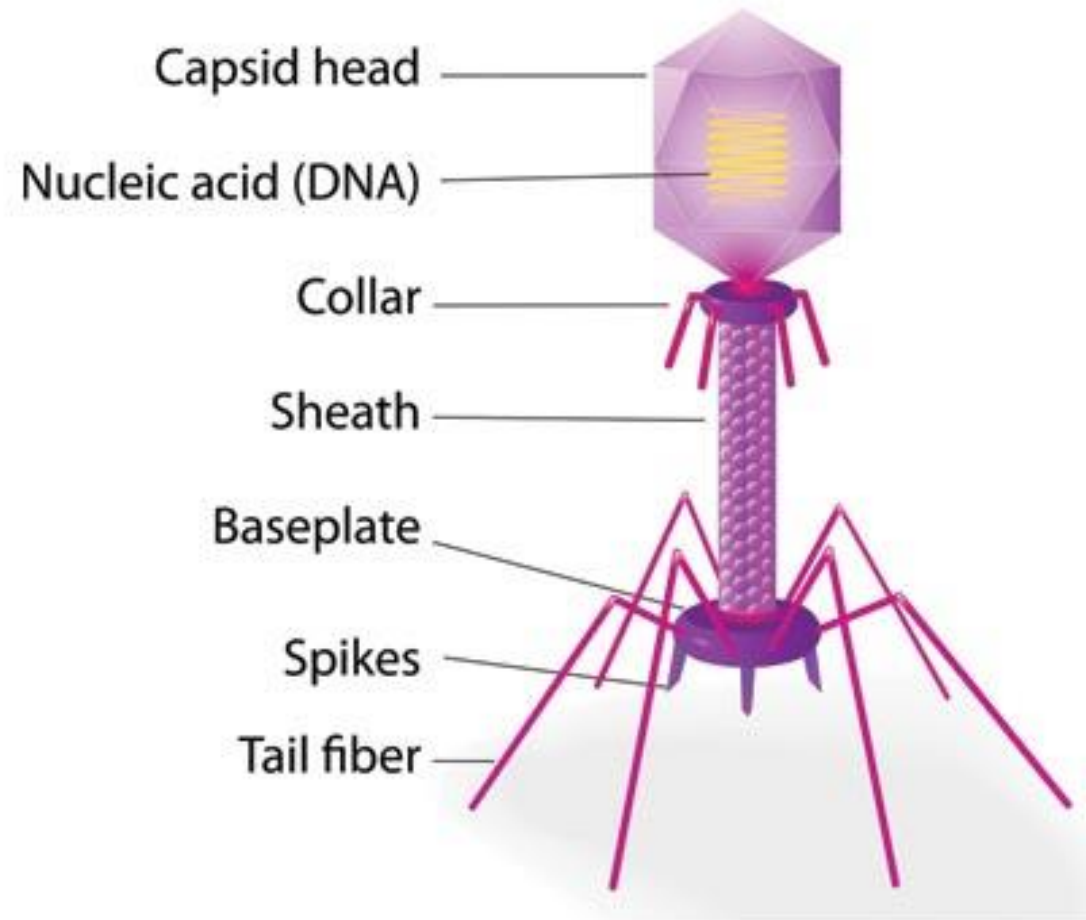


в. Вектора на основе бактериофага

- **Фазмиды** - это молекулярные векторы, которые представляют собой искусственные гибриды фага и плазмиды. Может развиваться как фаги или плазмиды.
- **Векторы-бактериофаги** - это вирусы, которые инфицируют только бактерии и эффективно трансформируют их, неся при этом большие вставки.
- Наиболее важной особенностью фага является система упаковки, которая позволяет встраивать крупные эукариотические гены и их регуляторные элементы.
- Некоторые из обычных фагов, используемых в качестве векторов, включают **фаги M13**, **фаги λ** и **фаги P1**.



Plasmid



Bacteriophage

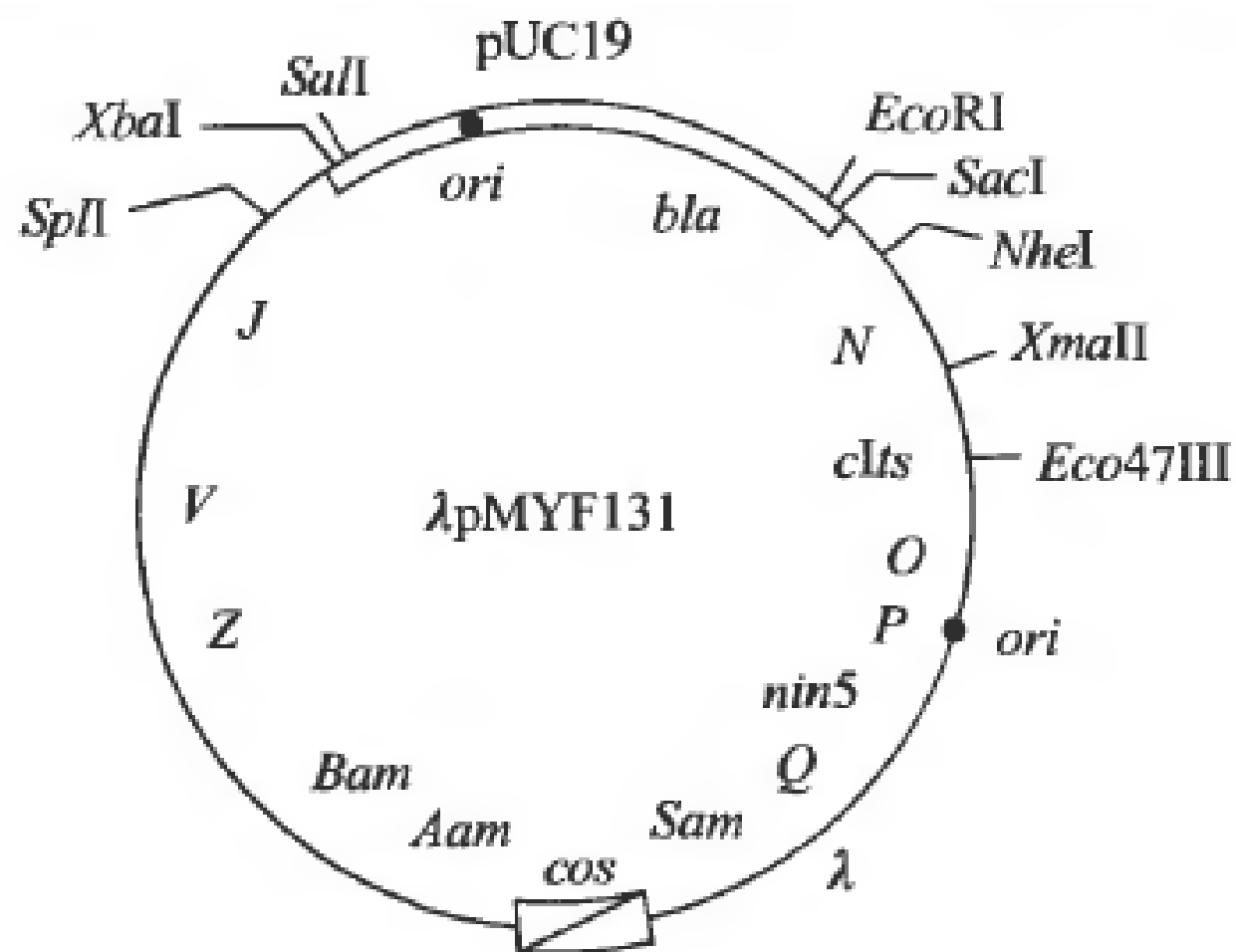
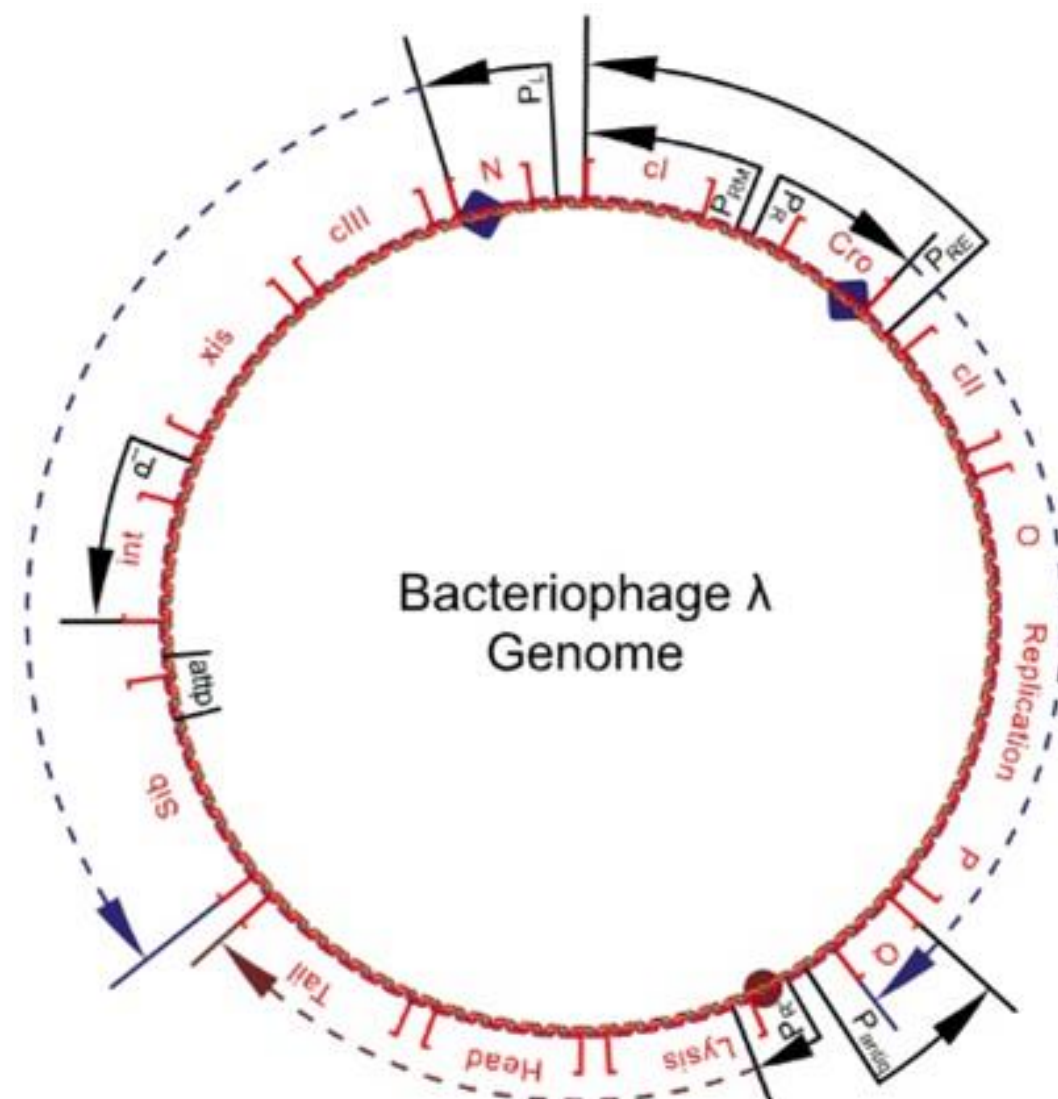
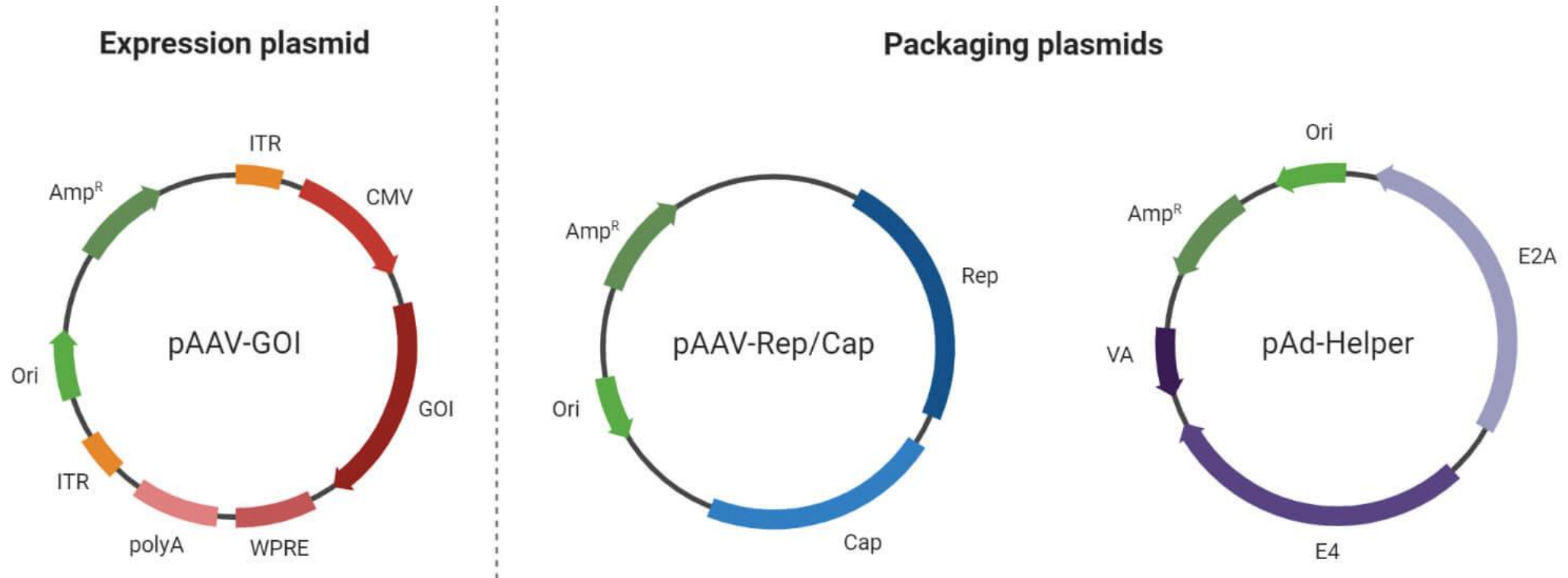


Рис. 2.24. Карта фазмиды λ pMYF131

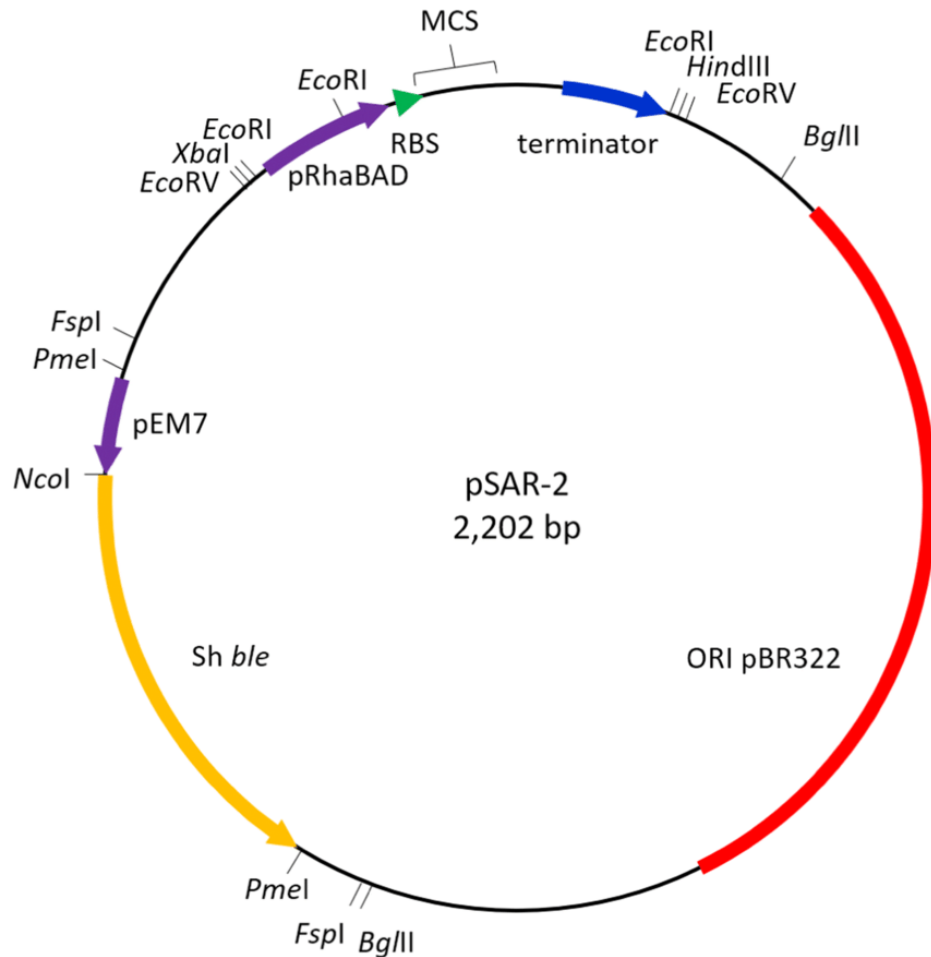


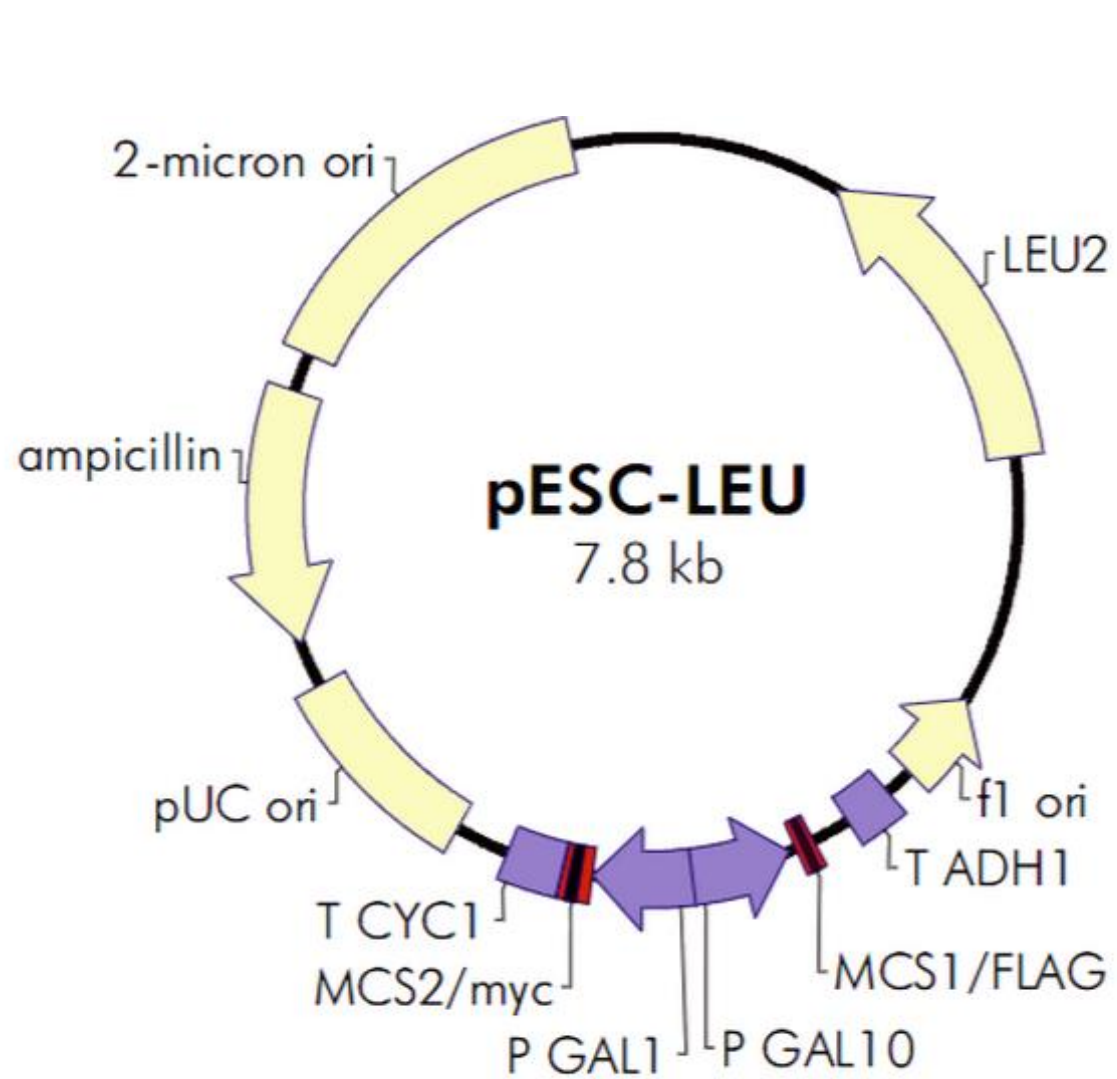
2. Вектора на основе вирусов

Adeno-Associated Virus Plasmids

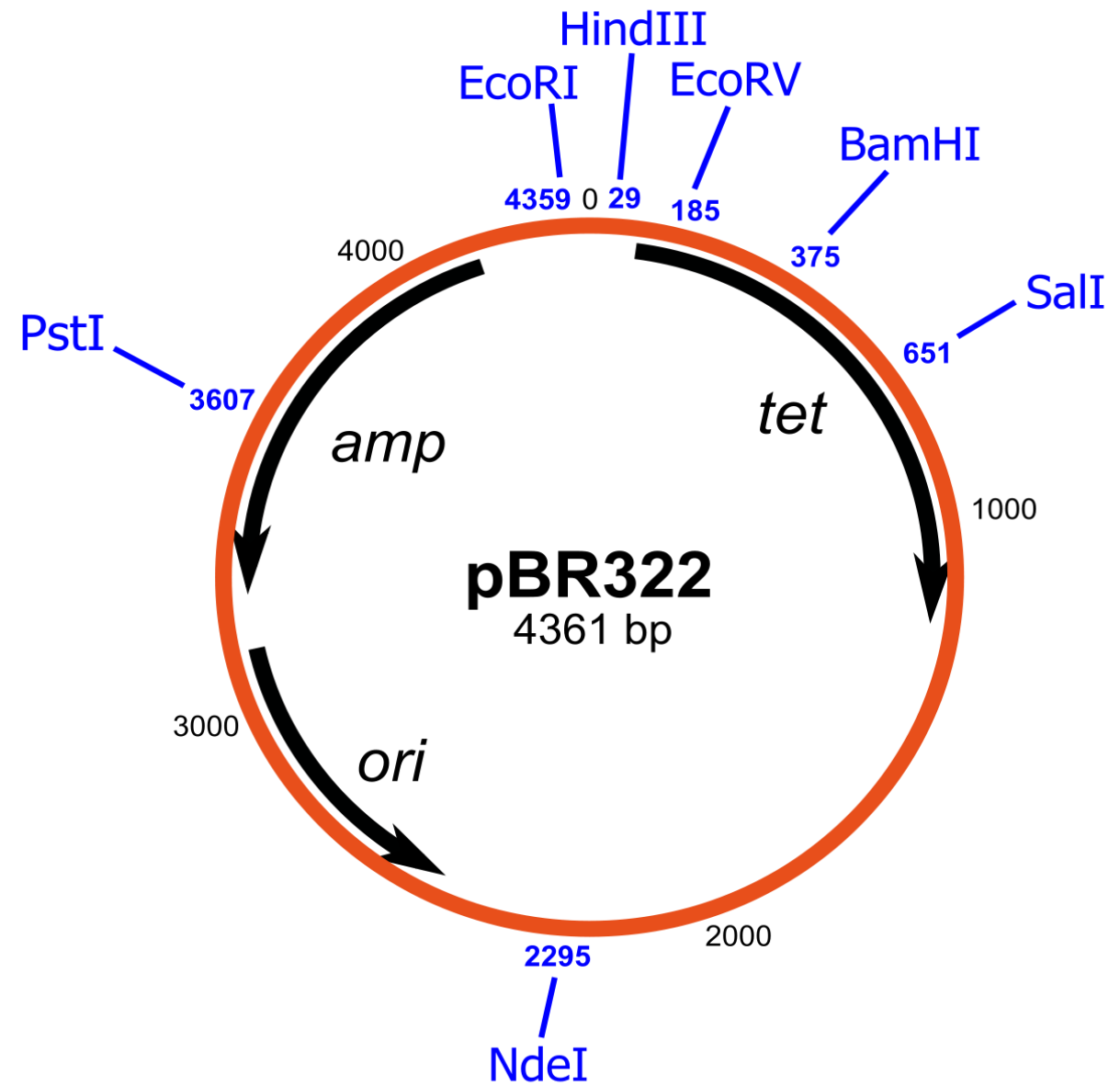


3. Вектор экспрессии. Векторы экспрессии - это векторы, которые обеспечивают экспрессию клонированных генов для определения успешного процесса клонирования. (**pET28c**)



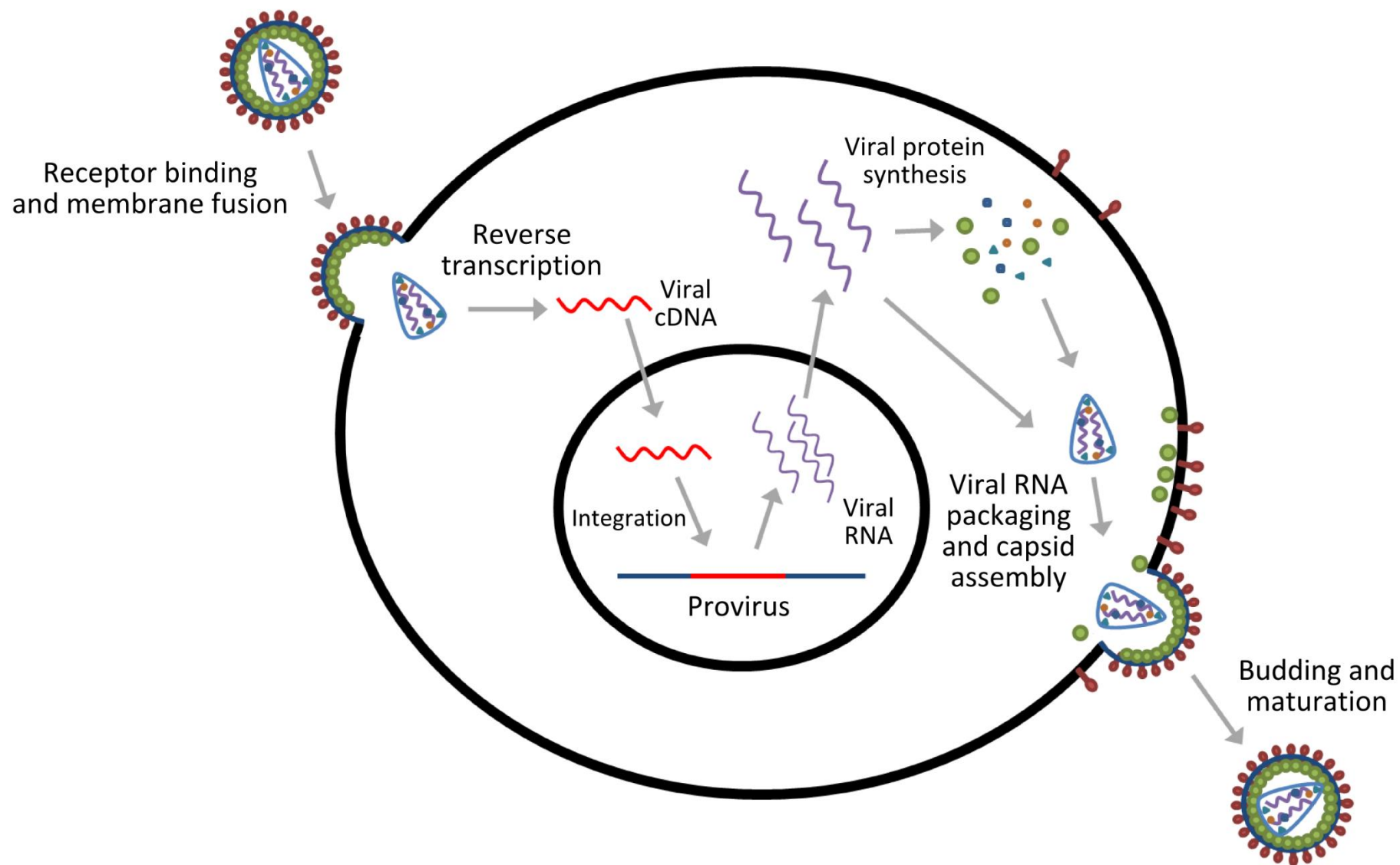


- Yeast plasmid

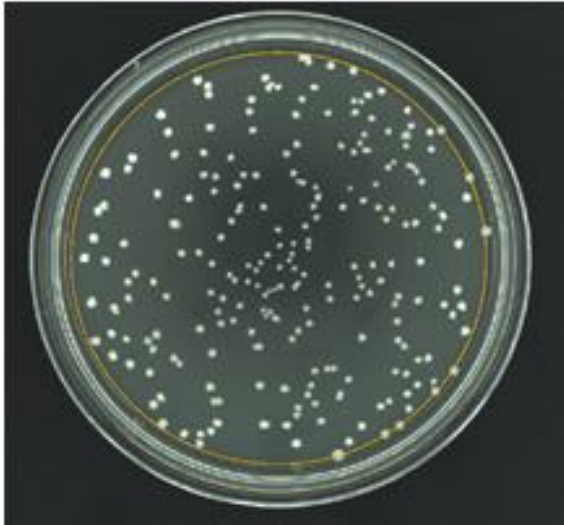


- Bacterial plasmid

Трансфекция – введение в клетку НК вируса с последующим образованием вирусного потомства.



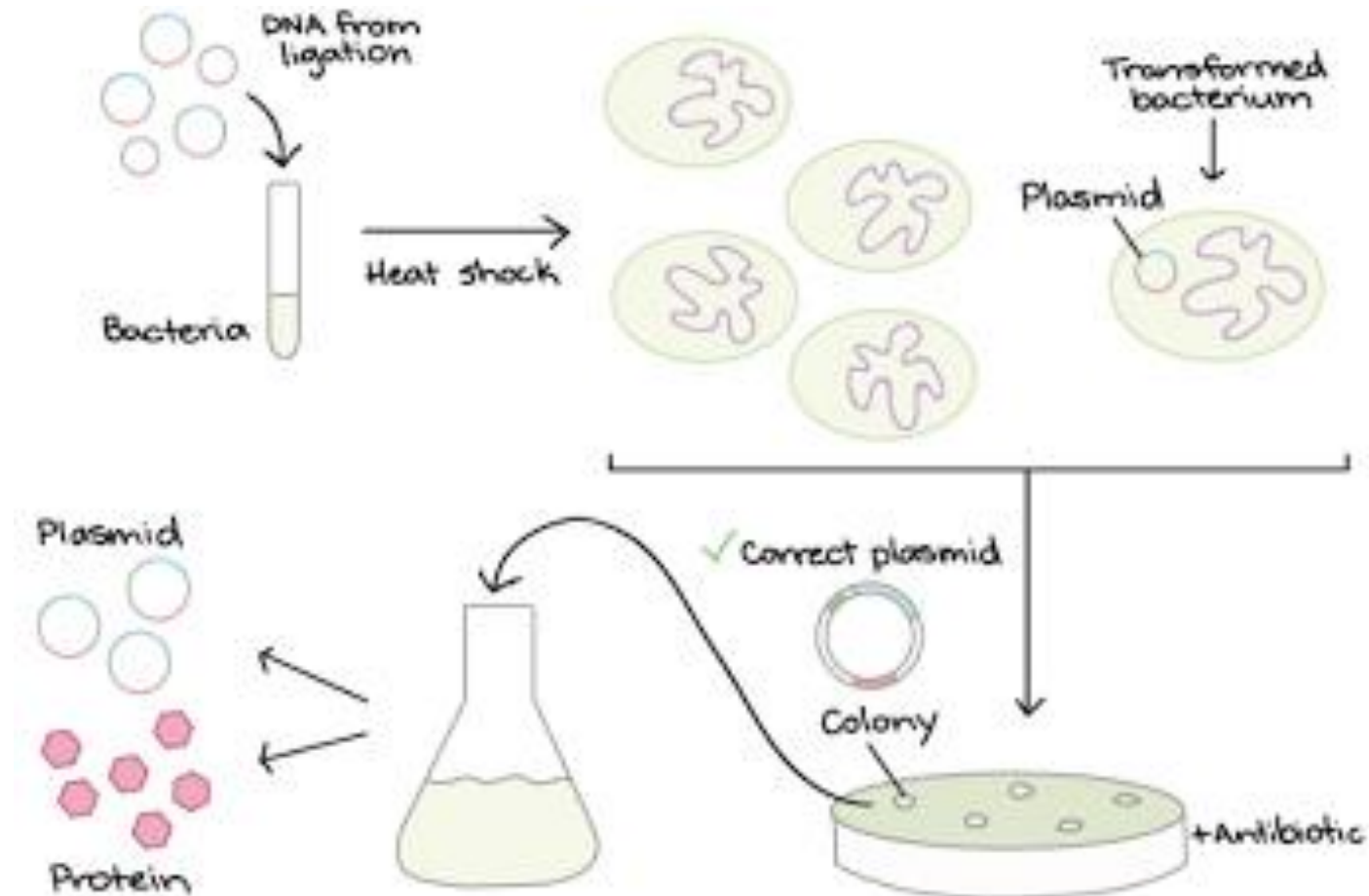
Трансформация – процесс, в результате которого экзогенная ДНК проникает в реципиентную клетку и вызывает у нее наследуемые изменения.



Колонии
бактерий

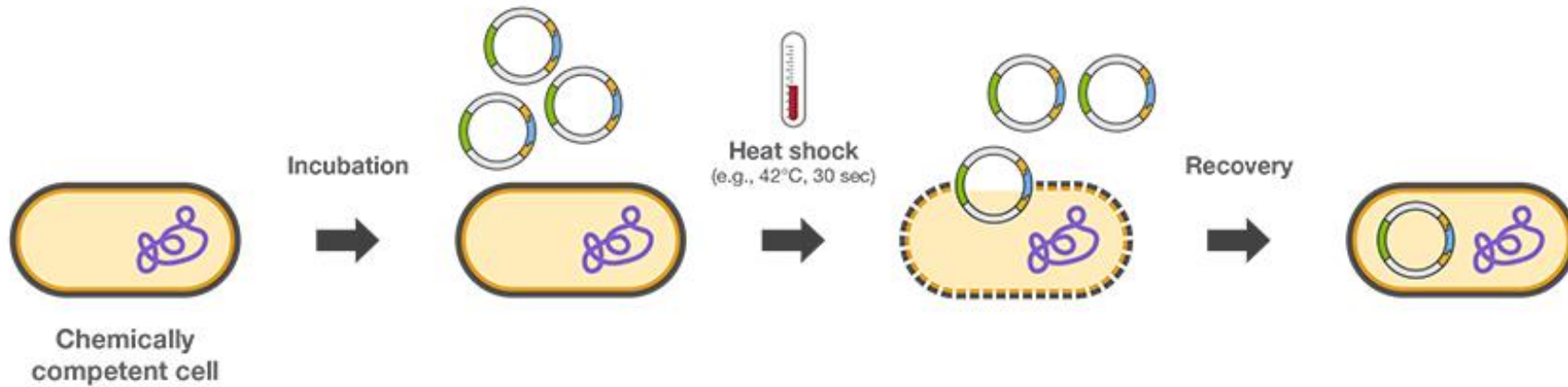


Колонии
дрожжей



Компетентность – физиологическое состояние клетки, когда она способна поглощать НК из окружающей среды

Chemical transformation



Electroporation

