



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

## ДӘРІС 4. ПРОКАРИОТ ЖҮЙЕСІНДЕ КЛОНДАУДЫҢ МОЛЕКУЛАЛЫҚ ВЕКТОРЛАРЫ

Лектор: PhD, қауымдастырылған  
профессор Тайпақова С.М.

## **Жоспар:**

- **Өзгертілген генетикалық материалды тасымалдау векторлары.**
- **Векторлық ДНҚ-ға қойылатын талаптар, оның қасиеттері**
- **Шығу табиғатына қарай векторлар түрлері:**

**Ген инженериясының негізгі мақсаты** синтезделген немесе бөлініп алынған нысанды генді клеткаға тасымалдау саналады. Бұл мақсат ДНҚ-ның векторлық молекулалары немесе қысқаша векторлар (тасымалдаушы немесе тасығыш) көмегімен іске асады.

**Вектор** деп бөтен генетикалық материалды (ДНҚ фрагментін) реципиент клеткаға тасымалдауға қабілетті ДНҚ молекуласын айтады. ДНҚ молекуласын векторсыз, мысалы, бактериялық клеткаға енгізсе, онда олар бактериялық ферменттер- нуклеазалар әсерінен ыдырап кетеді. Кейбір жағдайда ДНҚ сақталуы мүмкін, бірақ клетканың бөлінуінде олар жаңа клеткаларға берілмейді. Осындай жағдай болмас үшін векторлық молекулалар қолданылады. Векторлар — нысанды генді тасымалдаушы ДНҚ молекуласы, ал вектор деген сөздің өзі бағыттағыш деген мағынаны білдіреді. Сонымен бірге, векторларды рекомбинантты ДНҚ-ның міндетті бөлігі деп түсіну керек.

**Векторларды эксперименттік жолмен құрастырады және оларға мынадай талаптар қойылады:**

1) Вектор клетка ішіне өзімен бірге бөтен генді алып кірген соң, автономды репликациялана (көбейе) алатын болуы керек,, ол үшін векторға ДНҚ репликациясын бастайтын ерекше нуклеотидтер тізбегін (Ori) енгізеді;

2) Құрамында нысанды генді клондауға мүмкіндік беретін, рестриктазалар танып, үзе алатын рестрикциялық сайттар болуы керек, онсыз векторға ДНҚ фрагментін енгізу мүмкін емес;

3) Трансформацияланған клеткалардың анықтауға және реципиент клеткасында селективті бақылау үшін құрамында бір немесе бірнеше селективті маркерлік гендері болуы керек;

4) Вектордың, клетка ішіндегі копиялары (көшірмелері) жеткілікті мөлшерде болып, тұрақты сақталуы керек.

5) Мөлшері үлкен болмауы тиісті.

6) Вектордың көбиюіне жасуша ішінде ештеңе бөгет жасамауы тиісті

## **Шығу табиғатына қарай векторлар бөлінеді:**

- 1. Плазмидалық векторлар.**
- 2. Вирустық векторлар**
- 3. Гибридтік векторлар: Космидтер, Фазмидтер**
- 4. Жасанды хромосомалар.**

# 1. Плазмида

- Плазмидалар — хромосомадан тыс автономды репликациялана алатын қос тізбекті сақиналы ДНҚ молекуласы. Олар әртүрлі бактерия клеткаларында кездеседі. Мөлшері 2мжн-300мжн жетеді.
- Вектор ретінде мөлшері 15мың н. ж. дейінгі, көбінесе 2-ден 10 мың н. ж. құралған кішігірім плазмидалар қолданылады. Плазмидалық векторлар генді бактерияларға тасымалдап, оның тиімді жұмысын қамтамасыз ете алады. Плазмида терминің ең бірінші рет америкалық молекулалық биолог Джошуа Ледербергпен 1952 ж. ұсынылды.

# Плазмида типтері

- F-плазмида - фертильділік факторы немесе жыныс плазмидасы. *Escherichia coli* K-12 жасушасының конъюгативті эписомасы, бактериялардың жыныстық көбеюінің біртүрлі түрі – конъюгацияға қатысатын жасушалық элемент. Сақиналық ДНҚ-ның мөлшері 94,5 мың н.ж. Онда өзінің репликация бастайтын сайты - *ori V* және үзу нүктесі бар – *oriT*. F-плазмидалар. Бактериялардың шағылысу процесін зерттегенде, клетканың генетикалық материалдың доноры болу қабілеті арнайы F-факторының болуымен байланысты болатын [ағылшын. фертильділік]. F-плазмидалар F-пили синтезін басқарады, донорлық бактериялардың (F<sup>+</sup>) реципиент бактерияларымен (F<sup>-</sup>) жұптасуын жеңілдетеді. Осыған байланысты «плазмида» терминінің өзі бактериялардың «жыныстық» факторын (Джошуа Лёдерберг, 1952) белгілеуге өсинылған. F-плазмидалары автономды және интеграцияланған болуы мүмкін. Хромосомаға енгізілген F-плазмида осы типтегі бактериялардың рекомбинациясының жоғары жиілігін қамтамасыз етеді, сондықтан оларды Hfr-плазмидтер деп те атайды. [ағылшыннан high frequency of recombinations, рекомбинациялардың жоғары жиілігі].
- R-плазмида, R- фактор немесе төзімділік факторы - сақиналы екі тізбекті ДНҚ молекуласы, бұл плазмидада репликация механизімі және реципиент клеткаға резистенттік қасиетін беруге жауапты гендері бар. R-плазмидтер [ағылшын тілінен алынған. төзімділік] дәрілік препараттарға (мысалы, антибиотиктер мен сульфаниламидтерге), сондай-ақ ауыр металдарға төзімділікті кодтайды. Резистенттік гендері әр түрлі: плазмидамен кодталатын пенициллинді бұзатын β-лактамазалардан тетрациклиннің жасушаларда жиналуына жол бермейтін мембраналық ақуыздарға дейін. Бактериялық популяцияларға төзімділік плазмидаларының тез таралуына байланысты антибиотиктерге төзімділік мәселесі күн өткен сайын өткір болып келеді. Бактериялар әр түрлі антибиотиктерден қорғайтын бірнеше плазмидалар есебінен немесе әр түрлі антибиотиктерге төзімділік гендері бар бір плазмида салдарынан бірнеше антибиотиктерге төзімділікке ие бола алады. R плазмидаларына резистенттік факторларының жасушадан жасушаға ауысуына жауап беретін барлық гендер жатады.

# Плазмида типтері

- **Конъюгативті емес плазмидалар** әдетте грам-позитивті коккаларға тән, бірақ кейбір грамтеріс микроорганизмдерде де кездеседі (мысалы, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*). Әдетте олардың мөлшері кішкентай (молекулалық салмағы шамамен  $1 - 10 \cdot 10^6$  D). Көптеген кішкентай плазмидалар (бір жасушада 30-дан көп) кездеседі, өйткені тек осындай мөлшердің болуы олардың жасуша бөлінуі кезінде ұрпақтан ұрпаққа таралуын қамтамасыз етеді. Егер бактерияларда конъюгативті және конъюгативті емес плазмидалар қатар болса, конъюгативті емес плазмидалар жасушадан жасушаға ауыса алады. Конъюгация кезінде донор бактерия генетикалық материалын конъюгативті плазмидаға байланыстыру арқылы конъюгативті емес плазмидаларды реципиент бактерияға бере алады.
- **Бактериоциногенез плазмидалары** ақуыз өнімдері-бактериоциндердің синтезін кодтайды, олар бір немесе жақын туысқан түрлердің бактерияларын өлтіреді. Бактериоциндердің түзілуін кодтайтын көптеген плазмидаларда плазмидалардың конъюгациясы мен ауысуына жауап беретін гендер жиынтығы да бар. Мұндай плазмидалар салыстырмалы түрде үлкен (молекулалық салмағы  $25-150 \cdot 10^6$  D), олар грамтеріс таяқшаларда жиі анықталады. Ірі плазмидалар әдетте бір жасушада 1 ~ 2 данадан болады. Олардың репликациясы бактериалды хромосомалардың репликациясымен тығыз байланысты.



# Плазмида типтері

- Патогенділігі плазмидалар көптеген түрлердің, әсіресе энтеробактериялардың вируленттік қасиеттерін басқарады. Атап айтқанда, F-, R-плазмидалар мен бактериоциногендік плазмидаларға токсиннің түзілуін кодтайтын *tox+* -транспозондар (миграциялы генетикалық элемент) жатады. Көбінесе *tox+* транспозондары түзілуін бактериалды хромосомалардың гендері басқаратын жасушалық протеазалармен белсендірілетін, бүтін протоксиндердің (мысалы, дифтерия немесе ботулинум) синтезін кодтайды.
- Col-плазмида – колицин деген ерекше ақуыздарды синтездейді, басқа бактериялардың өсуі мен көбиюін тежейді бірақ оны өндіруші бактерияға зиянсыз. Бұл феномен 1925 ж. А. Gratia E. Coli штамынан табады.
- Дегдадациялық плазмида- ерекше метоболиттер деградациясына жауапты гендер жиынтығына ие. Көміртегі немесе энергия көзі ретінде пайдалану үшін қажетті табиғи (мочевина, көмірсулар) және табиғи емес (толуол, камфора, нафталин) қосылыстардың ыдырауына арналған ферменттерді кодтайтын бірқатар плазмидалар табылды, бұл оларға басқа бактерияларға қарағанда таңдамалы артықшылықтар береді. Мұндай плазмидалар патогендік бактерияларға аутомикрофлора өкілдеріне қарағанда артықшылық береді.
- Криптикалық плазмидалар- латентті, яғни белгілі бір функция атқармайтын, қожайын клеткасында фенотиптік өзгерістер шақырмайтын плазмидалар

# Плазмидалар

Плазмида	Иесі	Мөлшері (мың. н. ж.)	Қызметі
pT181	<i>Staphylococcus aureus</i>	4,4	Тетрациклинге төзімділік
ColE1	<i>Escherichia coli</i>	6,6	Колицин түзілуі және оған төзімділік
pMB1	<i>Escherichia coli</i>	8,5	рестрикция-модификация жүйелері
pGKL2	<i>Kluyveromyces lactis</i>	13,5	Киллер-Плазмида
pI258	<i>Staphylococcus aureus</i>	28,0	Ауыр металдардың иондарына төзімділік
pX01	<i>Bacillus anthracis</i>	181,7	Энтеротоксиннің синтезі

# Плазмидалар

- Плазмидаларды классификациялайтын бірнеше системалар бар, олар келесі ерекшеліктерге негізделген:
- Топология немесе геометриясы (сызықты немес сақиналы),
- Репликация механизмі бойынша,
- Плазмидадағы маркерлік гендерге байланысты,
- Көшірмелер санына байланысты,
- конъюгативті / конюгативті емес.

# Топологиясы бойынша плазмидалар

- СЫЗЫҚТЫ
- сақиналы

Плазмида	Иесі	Плазмида мөлшері (мың н.ж)	Геометриясы	Жасушада плазмиданың көшірмелер саны
pUB110	<i>Bacillus subtilis</i>	2,3	Сақиналы	20—50
ColE1	<i>Escherichia coli</i>	6,6	Сақиналы	10—30
lp25	<i>Borrelia burgdorferi</i>	24,2	Тізбекті	1—2

# Репликация механизмі бойынша

- Кейбір плазмидаларда репликация инициациясының спецификалық сайты болуына байланысты тек бір типті клеткаларда ғана репликациялана алады
- Келесі түрлерінде бұл сайт спецификалылығы төмен болғандықтан олар әртүрлі бактерия клеткаларында репликациялана алады
- Осыған орай тар және кең спектрлі қожайынды плазмидалар болып бөлінеді

# Плазмидалардың копия саны

Клеткадағы копия саны бойынша

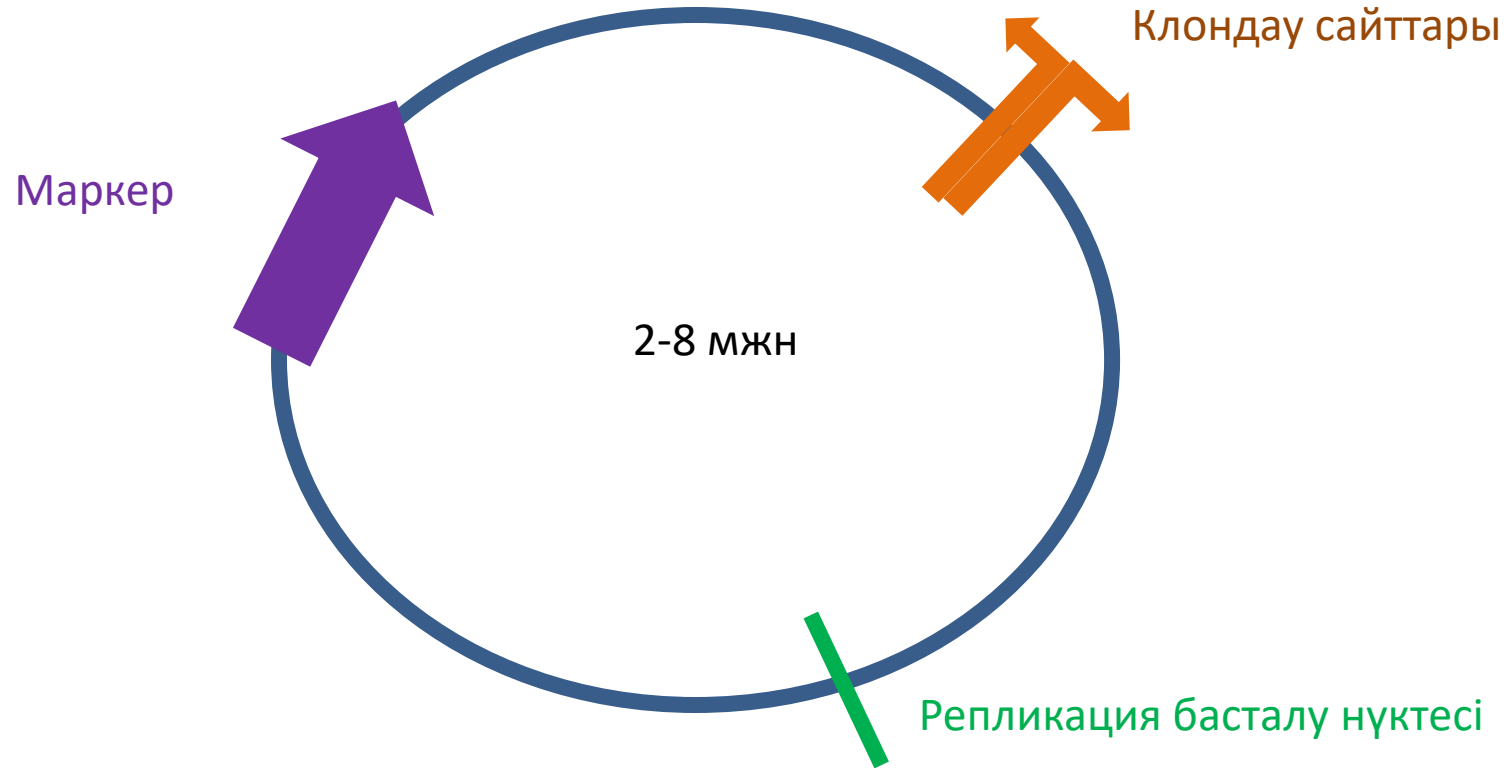
1-4	Аз копиялы
10	Орташа копиялы
100	Көп копиялы

Хлорамфиникол – геномдық ДНҚ синтезінің ингибиторы. Плазмидалық ДНҚ синтезіне әсер етпейді

# Плазмидаларды вектор ретінде қолдануға қойылатын шарттар

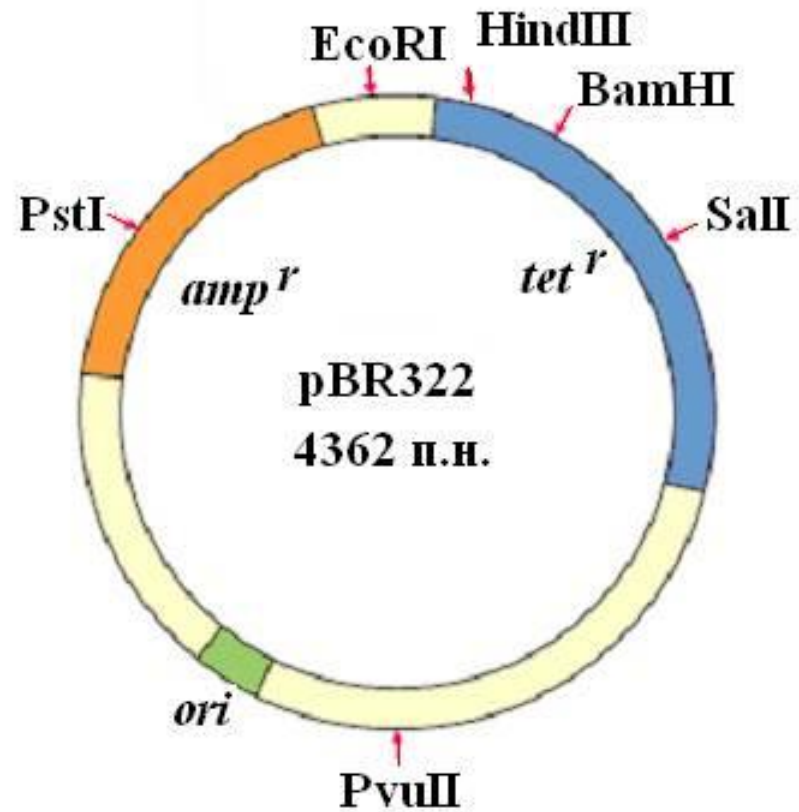
1. Мөлшері шағын болуы қажет
2. Уникальды рестрикциялық сайты болу шарт
3. Бір немесе бірнеше селективті маркерлік гендері болуы керек
4. Репликацияның басталу нүктесі

# Плазмидаларды вектор ретінде қолдануға қойылатын шарттар





# Плазмидалық вектор pBR322

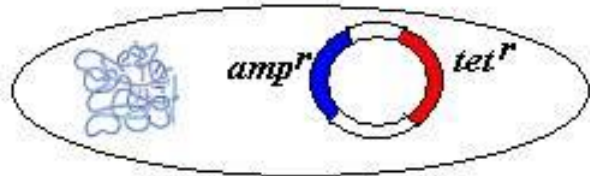


Рост в присутствии  
ампициллина    тетрациклина



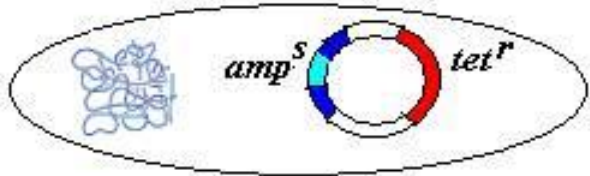
—

—



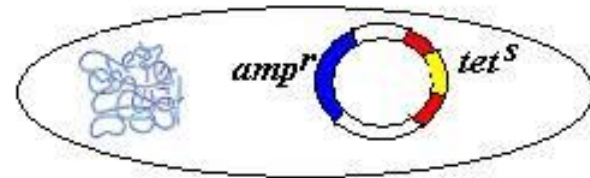
+

+



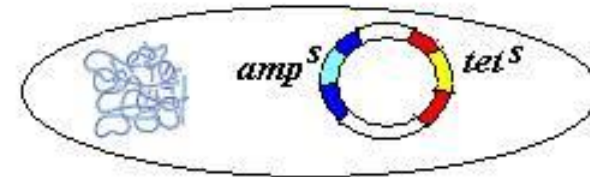
—

+



+

—



—

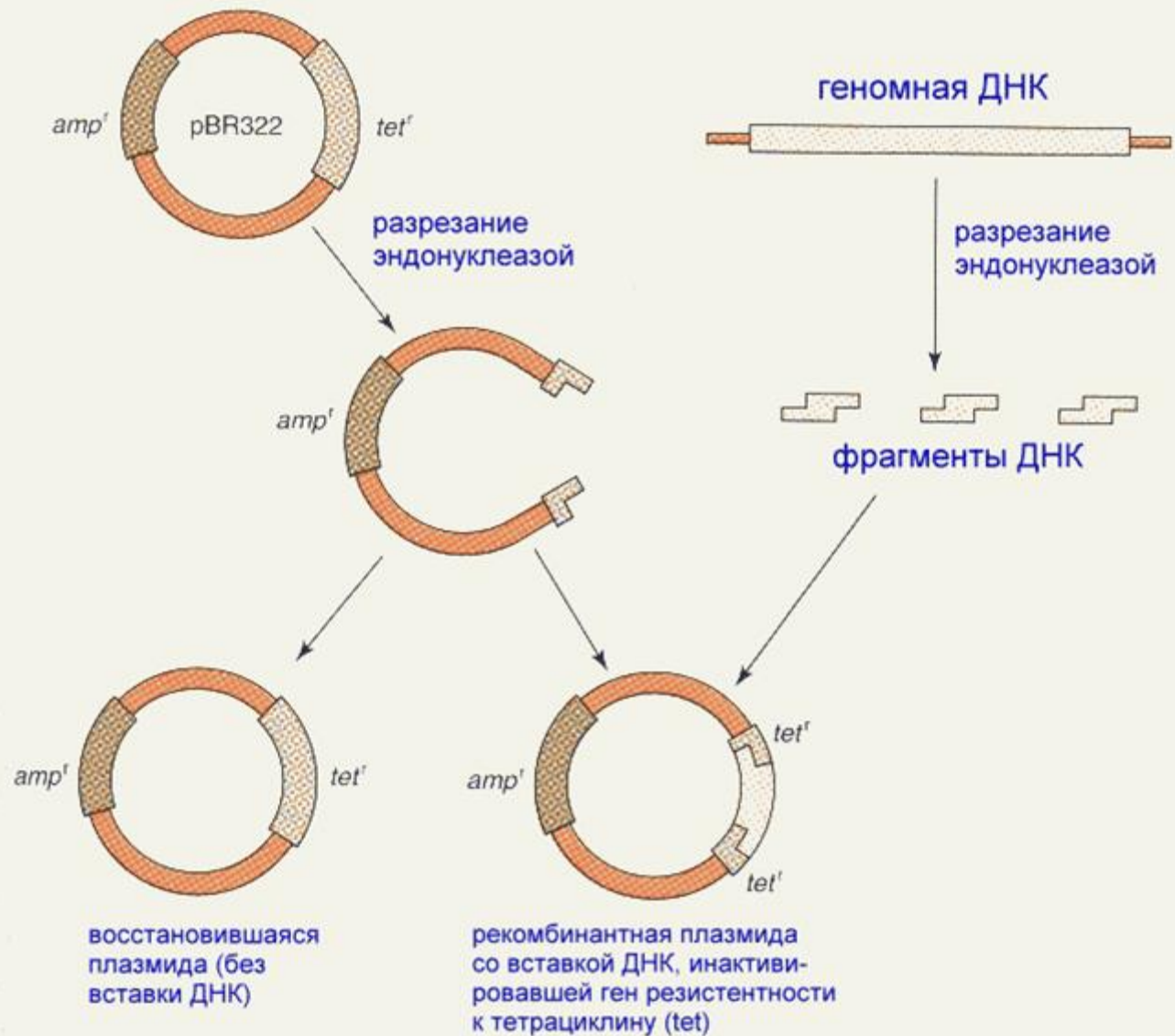
—

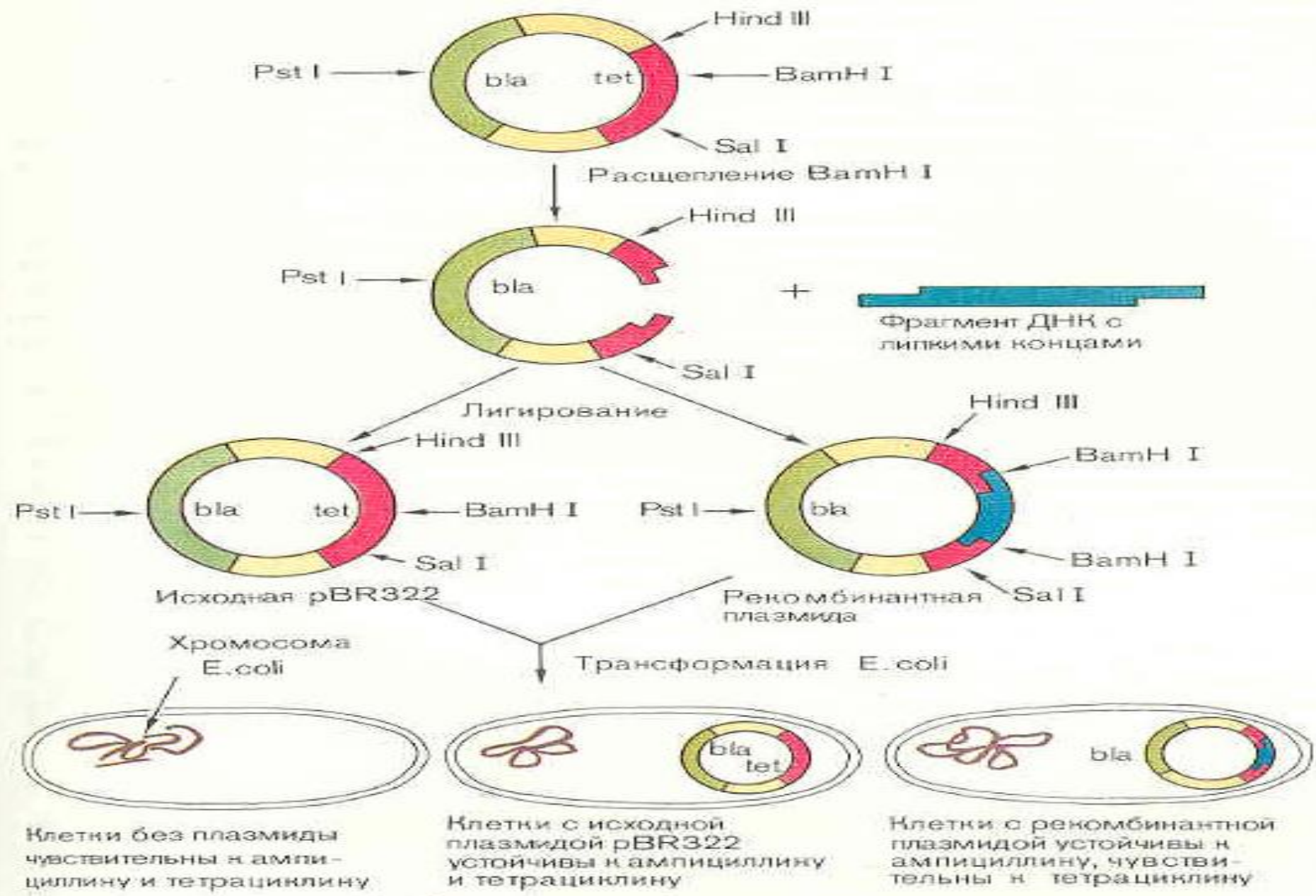
 вставки ДНК



чувствительный (s)  
устойчивый (r)

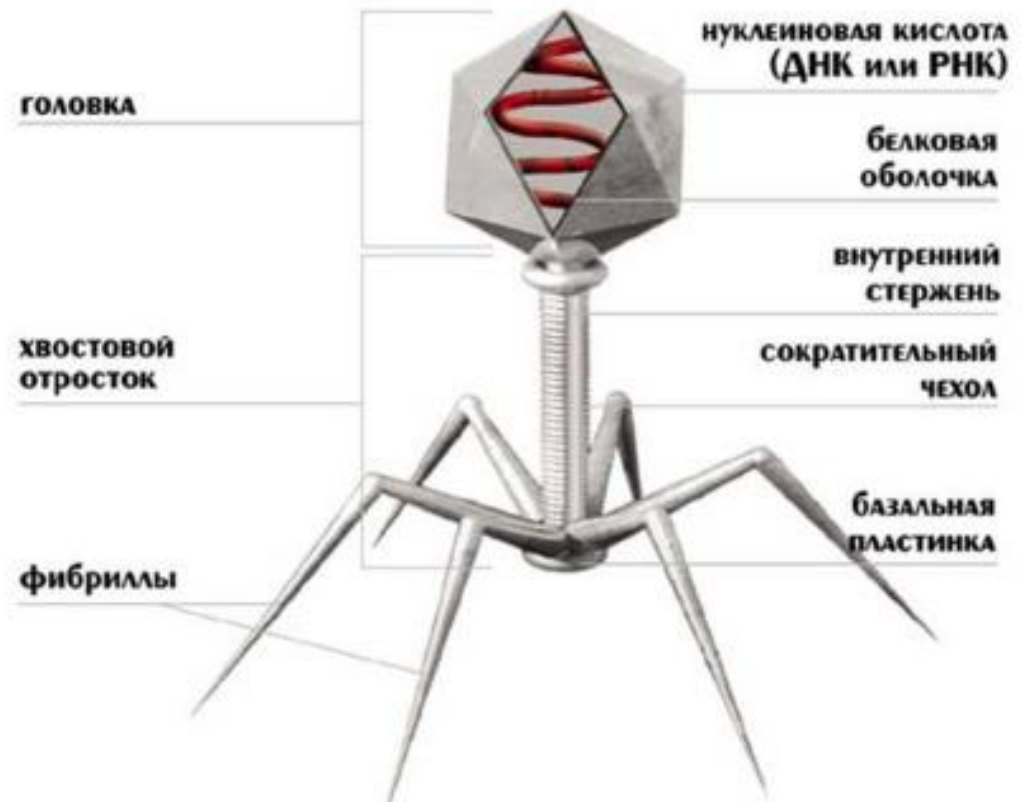
1 инактивация вставкой





# λ фаг негізіндегі вектор

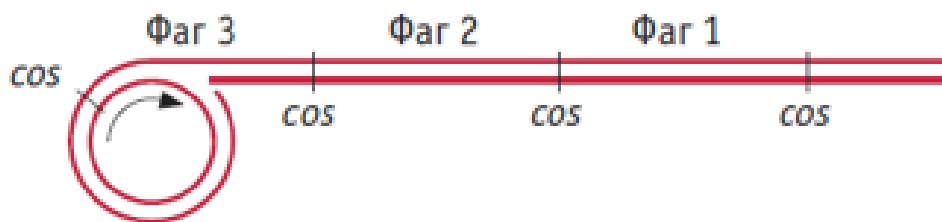
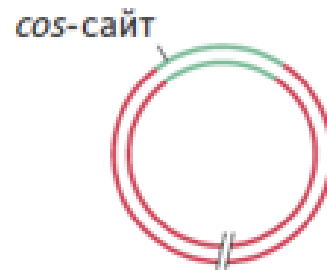
1. Геномы 48 490 жұп нуклеотидтен тұратын қос тізбекті, сызықтық ДНҚ. екі жағында да 5' соңында 12 нуклеотидтік бір тізбекті сегменттер бар. Бұл бір тізбекті сегмент - Cos сайты деп аталатын «жабысқақ ұштар». Cos сайты қожайын клеткасының цитоплазмасында бактериофаг геномының циклдік күйге айналдырады. Сондықтан сақиналы фаг геномының ұзындығы 48502 ж.н.
2. Геномының 1/3 бөлігі бөгде генмен алмастырыла алады;
3. Ендімесі жоқ геном фагтық бөлшекпен қапталмайды
4. 8-24 м.ж.н. ұзындықтағы ДНҚ фрагментін клондауға мүмкіндік береді



### Линейная форма ДНК фага λ



### Кольцевая форма ДНК фага λ



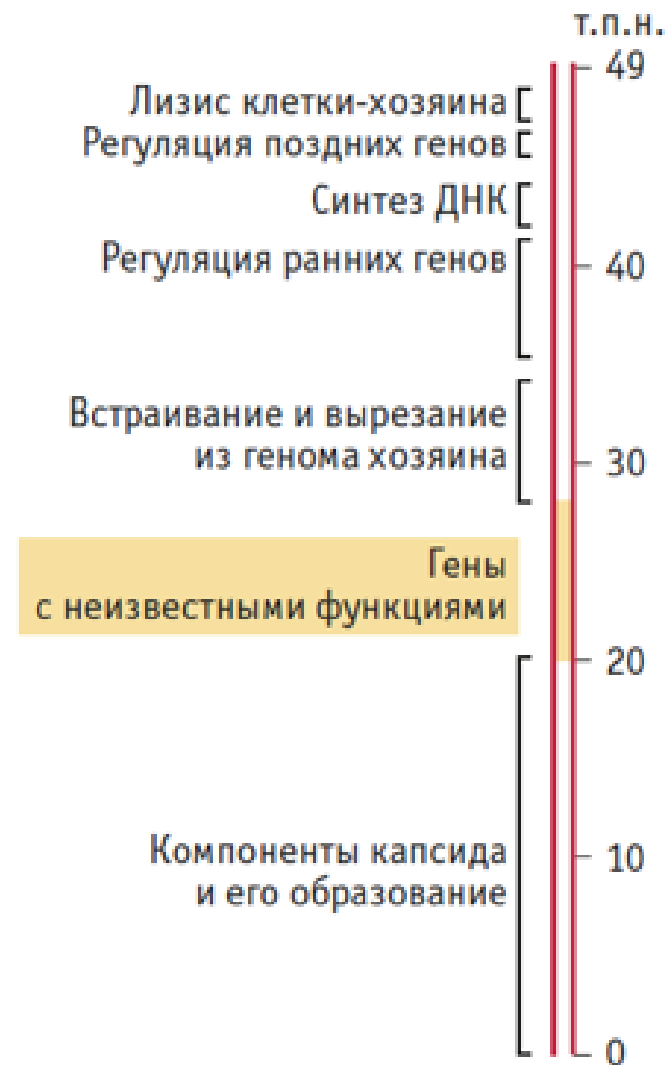
Разворачивание конкатемера из молекул ДНК фага λ



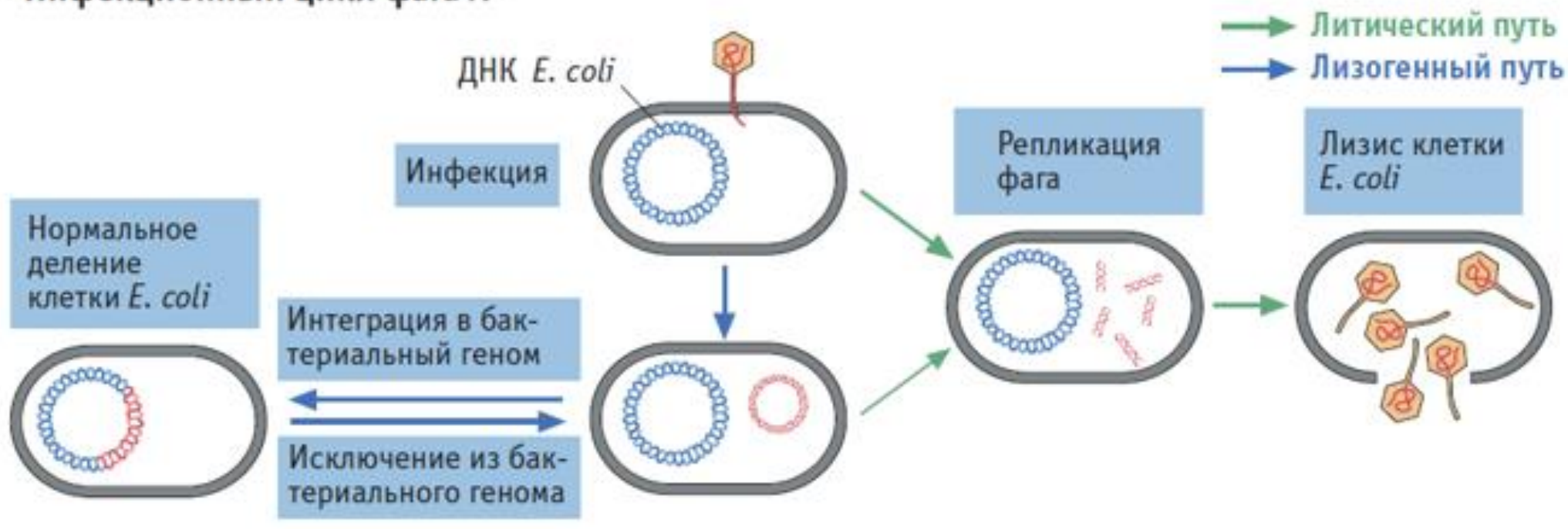
Эндонуклеаза (Δ), закодированная в геноме фага λ, расщепляет конкатемер по *cos*-сайтам

Образование новых фаговых частиц

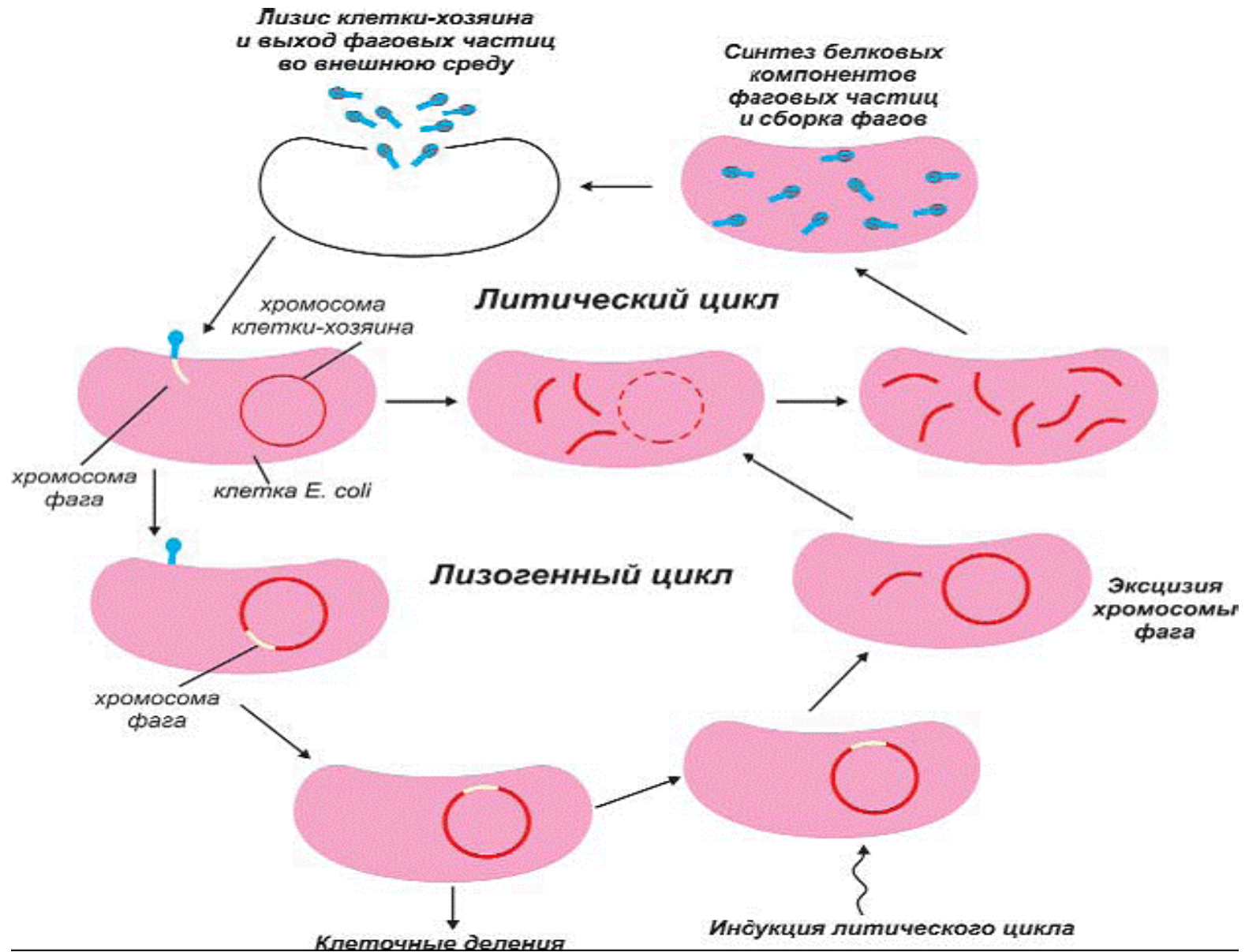
### Генетическая карта фага λ



# Инфекционный цикл фага $\lambda$

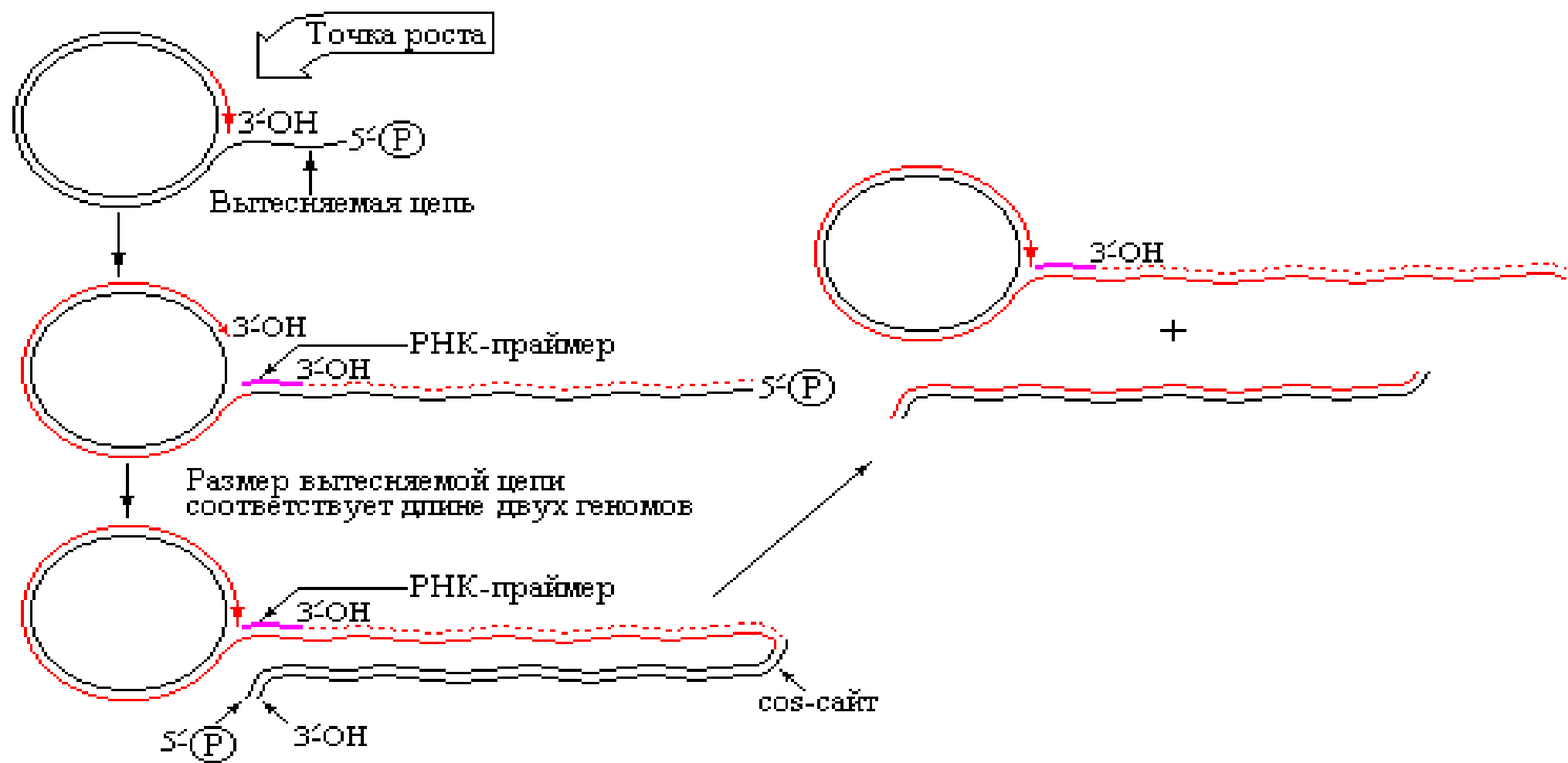


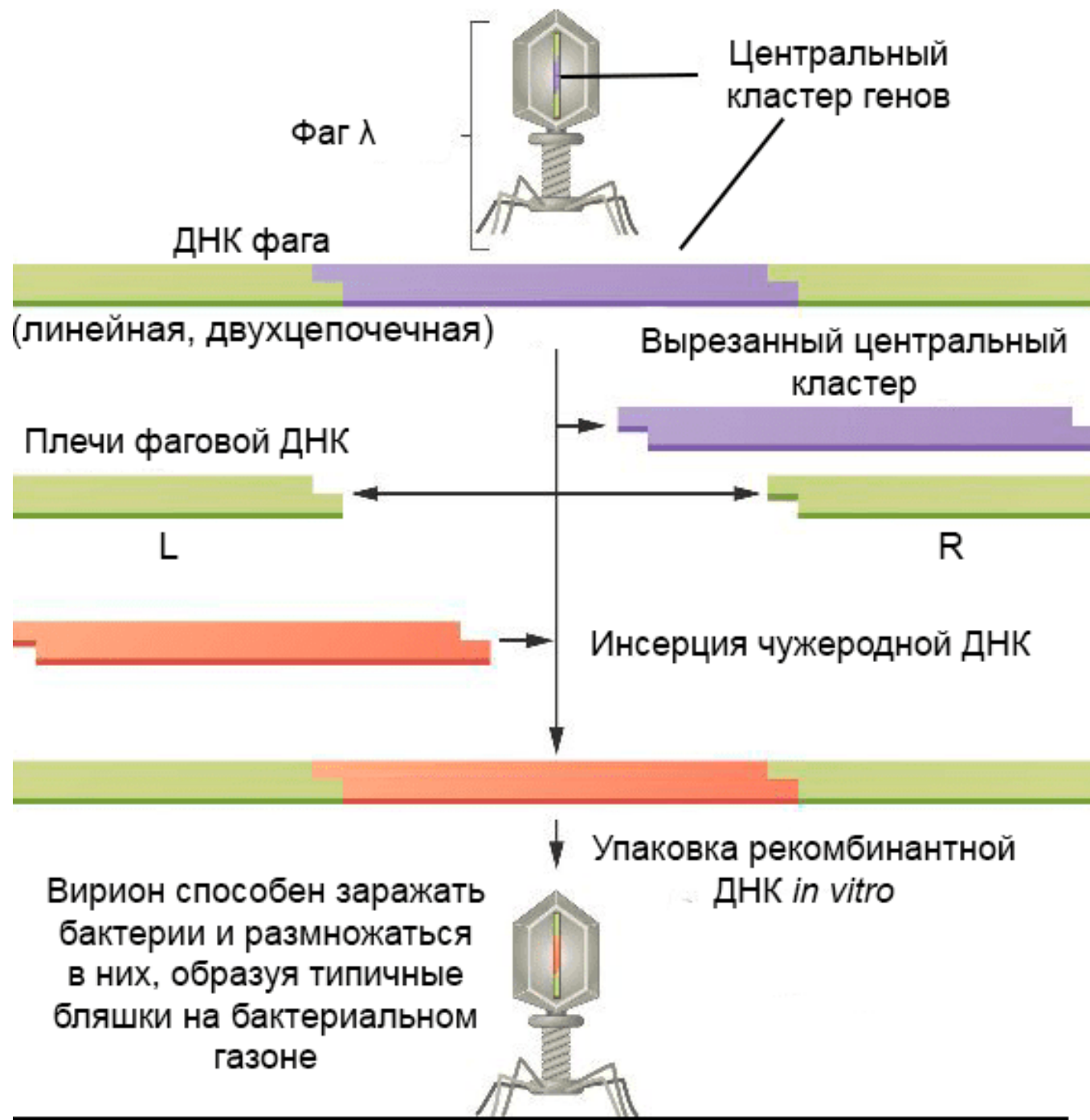
# λ фагының тіршілік циклі





# Айналымалы сақина типімен ДНК репликациясы





1

Головка



Линейная молекула ДНК  
бактериофага λ

1

2

3

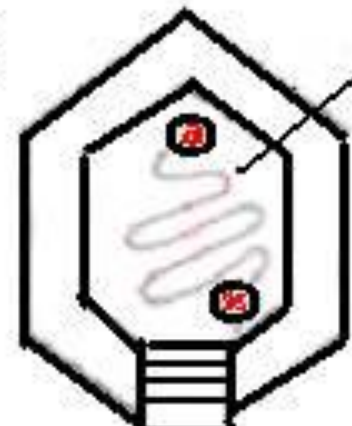
4

*cos*-сайт

2

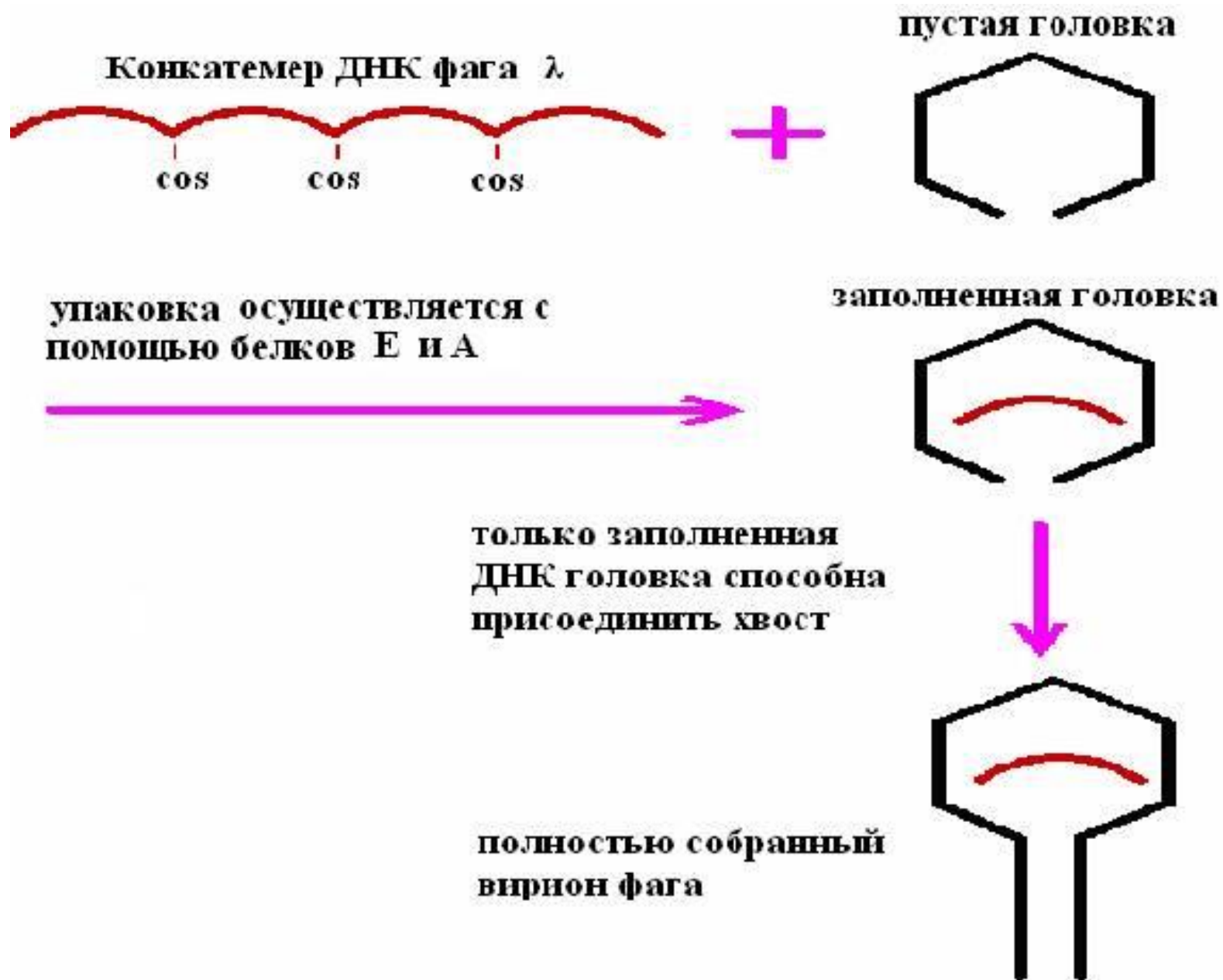
ДНК

Головка



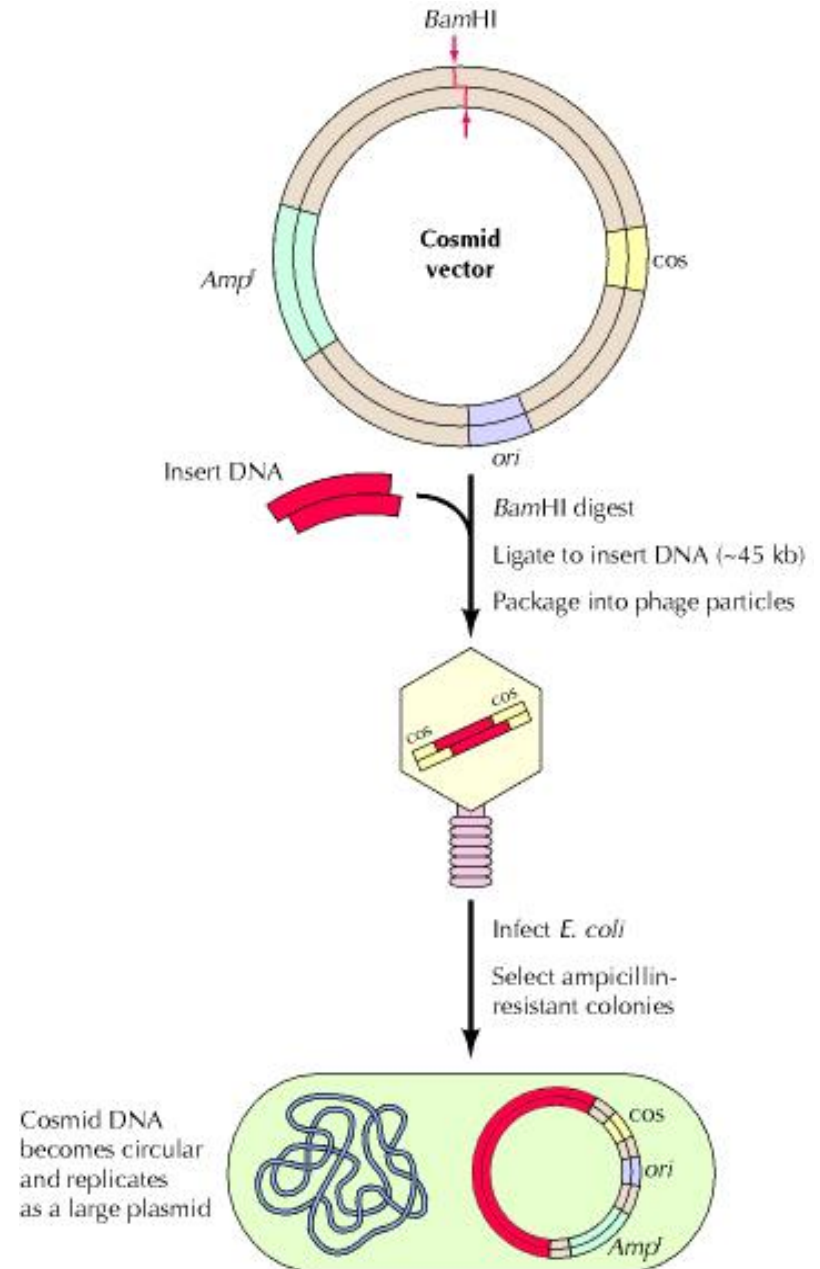
Отросток

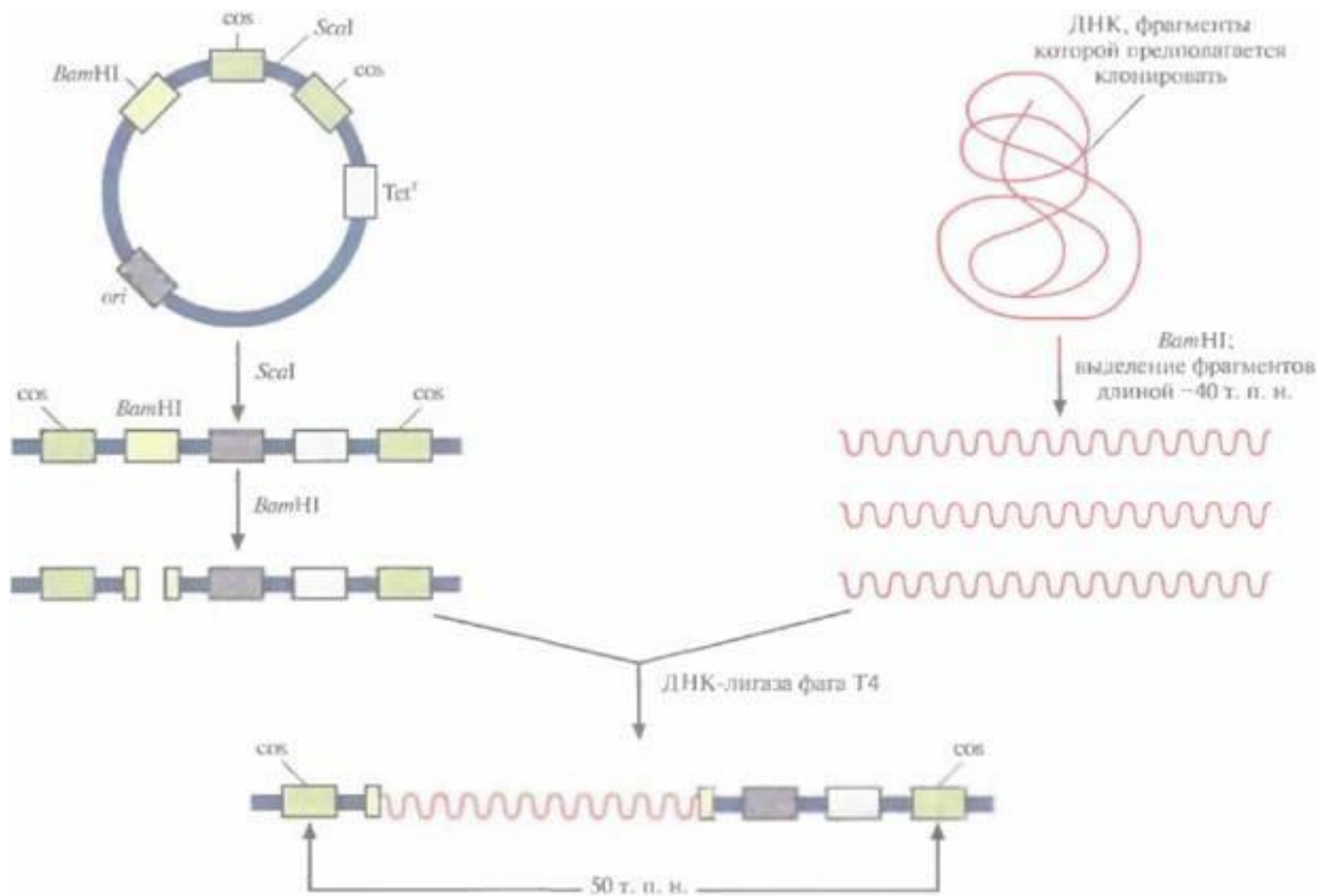
Нить



### 3. Космида

- Космида (Cosmides) — құрамында лямбда фагтың ДНҚ сының фрагменті және *cos*-телімі (участок) бар плазмида. Гендік кітапханалар құру үшін қолданылады. Космидаларды бірінші рет 1978 ж. Коллинс және Брюнинг құрастырады. Космида көмегімен 32-47 мың н.ж болатын мөлшердегі ДНҚ-ны тасмалдауға болады, салыстырмалы түрде плазмида көмегімен тек 4-5 мың н.ж мөлшерде ДНҚ-ны ғана тасмалдауға болады. Оған қоса космидалар фагты бөлшектерге оралады, бұл оларды трансдукция көмегімен бактерияға енгізуге мүмкіндік береді, және космида жасанды түрде құрастырылады.

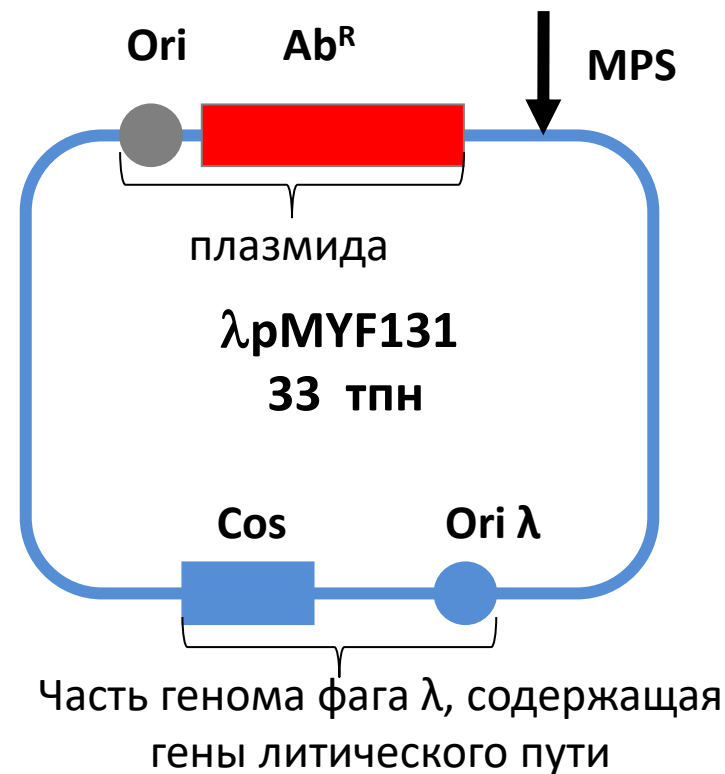






## 4. Фазмида

- Фазмида (phasmid)
- [грек. *pha(gos)* — жеуші және *plasma* — құрастырылған] — гибридті вектор, фаг және плазмида геномының бөліктерінен құралған. Фазмидаға бөтен ДНҚ-ны еңгізгенен кейін бір жағдайларда фаг ретінде, басқа жағдайларда плазмида ретінде дамиды.



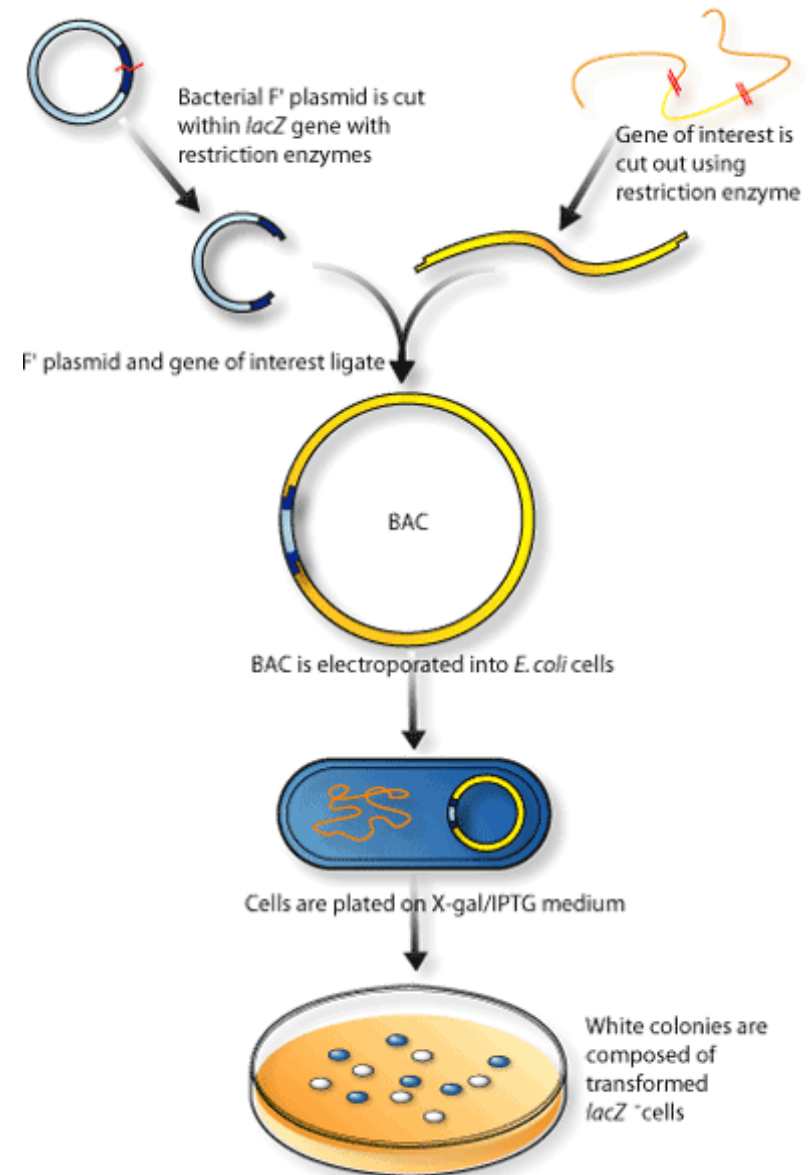


## 5. Шаттл вектор

- Рекомбинанты вектор, прокариот және эукариот жасушаларында репликациаланатын аймақтары бар.

# 6. Жасанды бактериалды хромосомалар

ВАС F-фактордың репликация инициация нүктесі мен екі жас жасушаға плазмидтердің ажыратылуын қамтамасыз ететін плазмидтік векторлар. ВАС плазмидтерді бактериялық хромосомадан бөліп алу оңай. ВАС-тар ұзындығы 100-3000 кб болатын рекомбинатты ДНҚ-ны қабылдай алады. ВАС адам геномы жобасында хромосомалардың үлкен бөліктерін клондау мен секвенирлеу кезінде қолданды.

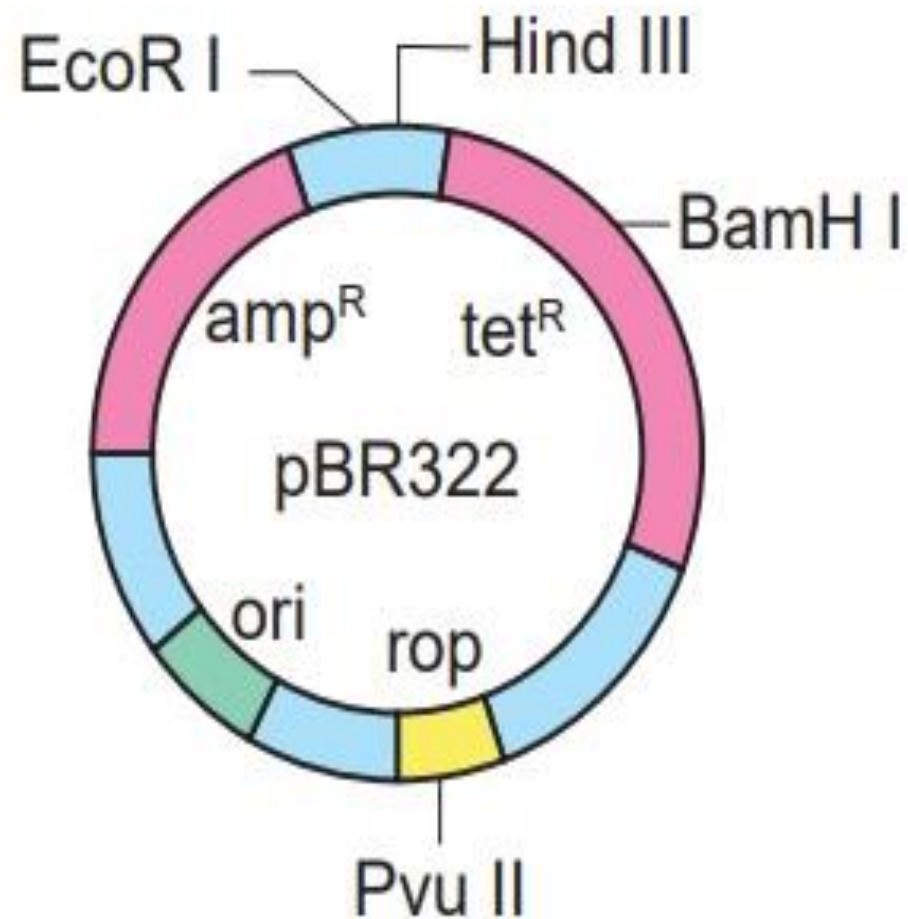


## **Вектор түрлері:**

- Клондаушы;
- Интеграциялаушы;
- Экспрессиялаушы.

# Клондаушы вектор

- Клондау векторы қызығушылық тудыратын генді қожайын ағзаға беру құралы ретінде әрекет етеді.
- Ол қожайын жасушаға ену қабілетіне ие.
- Клондаушы векторының маңызды сипаттамасы-рестрикция ферменттерімен өңдеу арқылы ДНҚ-ның қажетсіз сегментін оңай енгізу және алып тастау.
- Клондау векторы репликация басталу нүктесінен, таңдалған маркерден, репортер генінен және рестрикция сайттарынан тұрады.
- Репликацияның басталу нүктесінің болуы клондау векторын қожайын ағза механизмін қолдана отырып, жасуша ішінде көбеюге мүмкіндік береді, осылайша бірнеше копия ала алады.
- Таңдалған маркер антибиотиктерге төзімді ген болып табылады. Бұл рекомбинантты ДНҚ-ны енген қожайын жасушаларын рекомбинантты ДНҚ-ны енбеген жасушалардан ажыратуға мүмкіндік береді.
- Репортер гені сәтті клондарды анықтауға және осылайша оларды тексеруге көмектеседі.

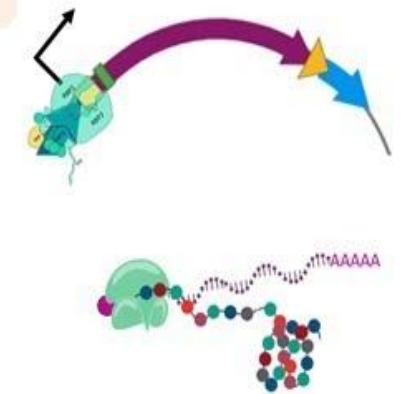
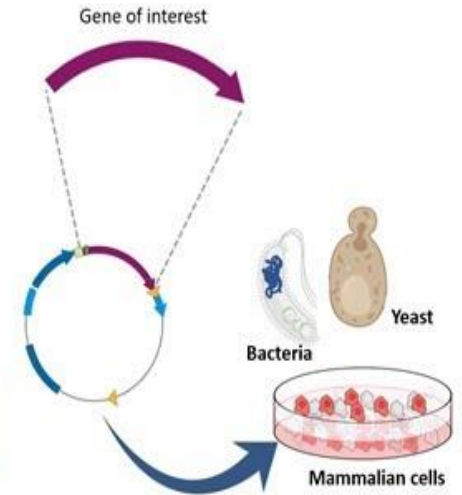
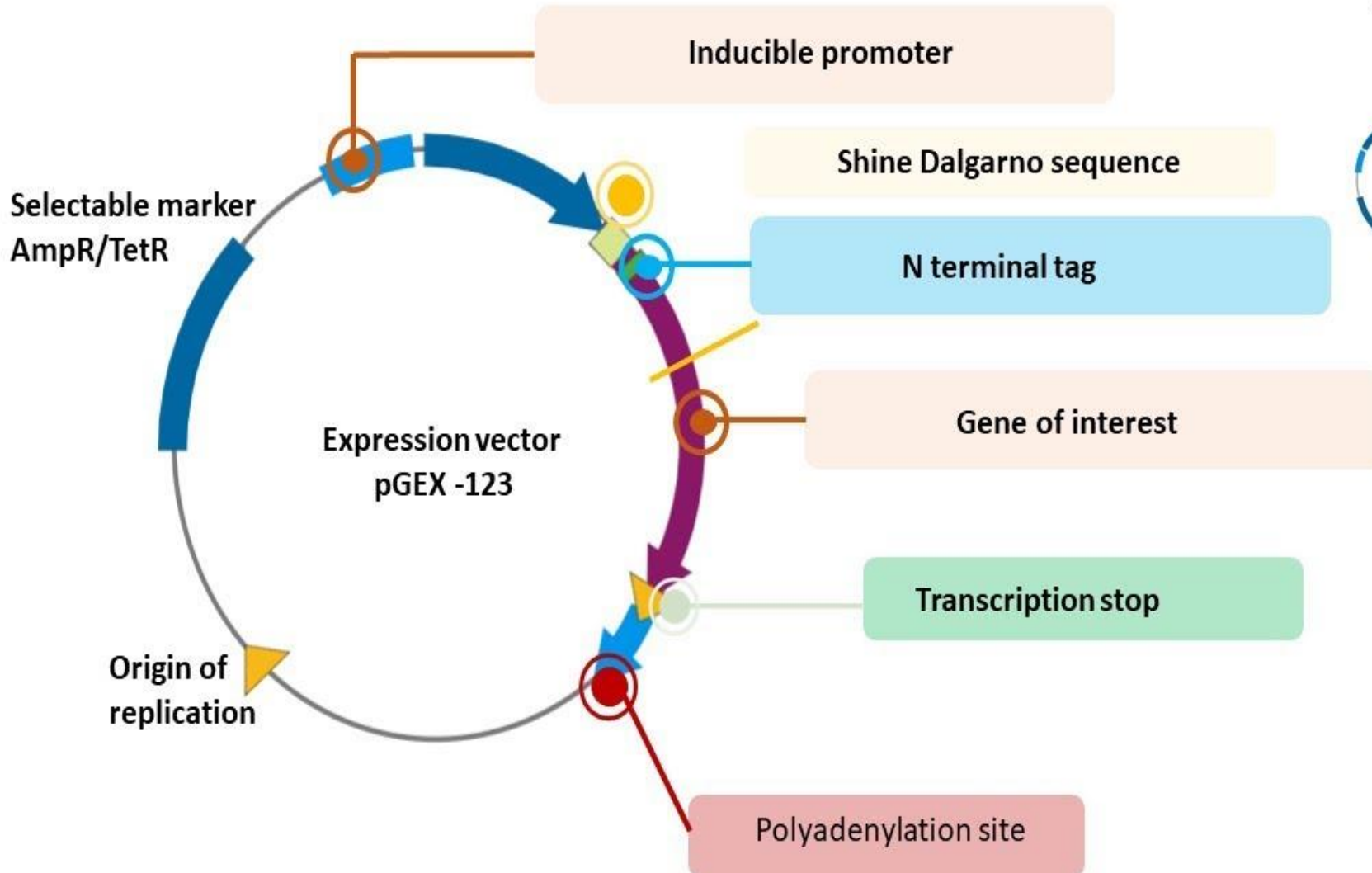


**Figure 10:** E-coli cloning vector (pBR 322)

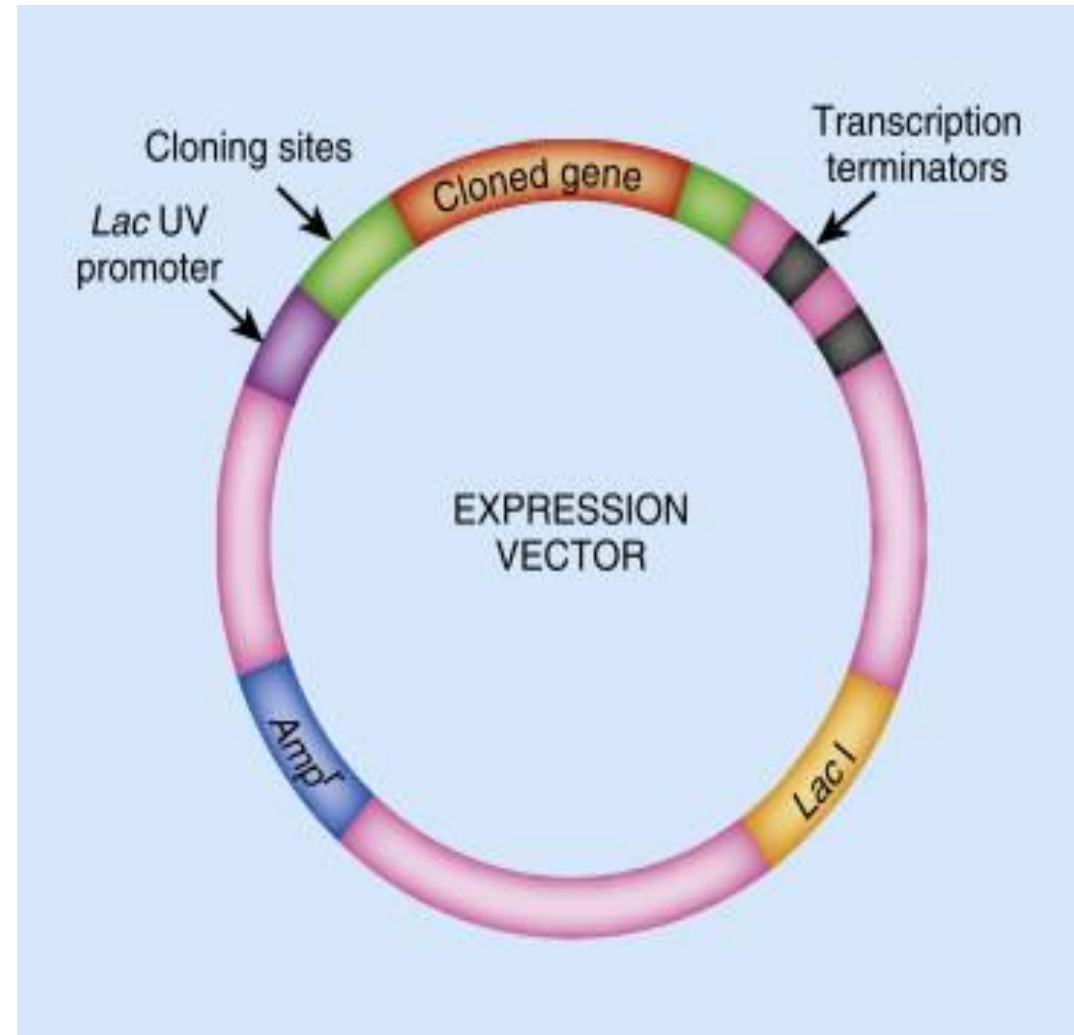
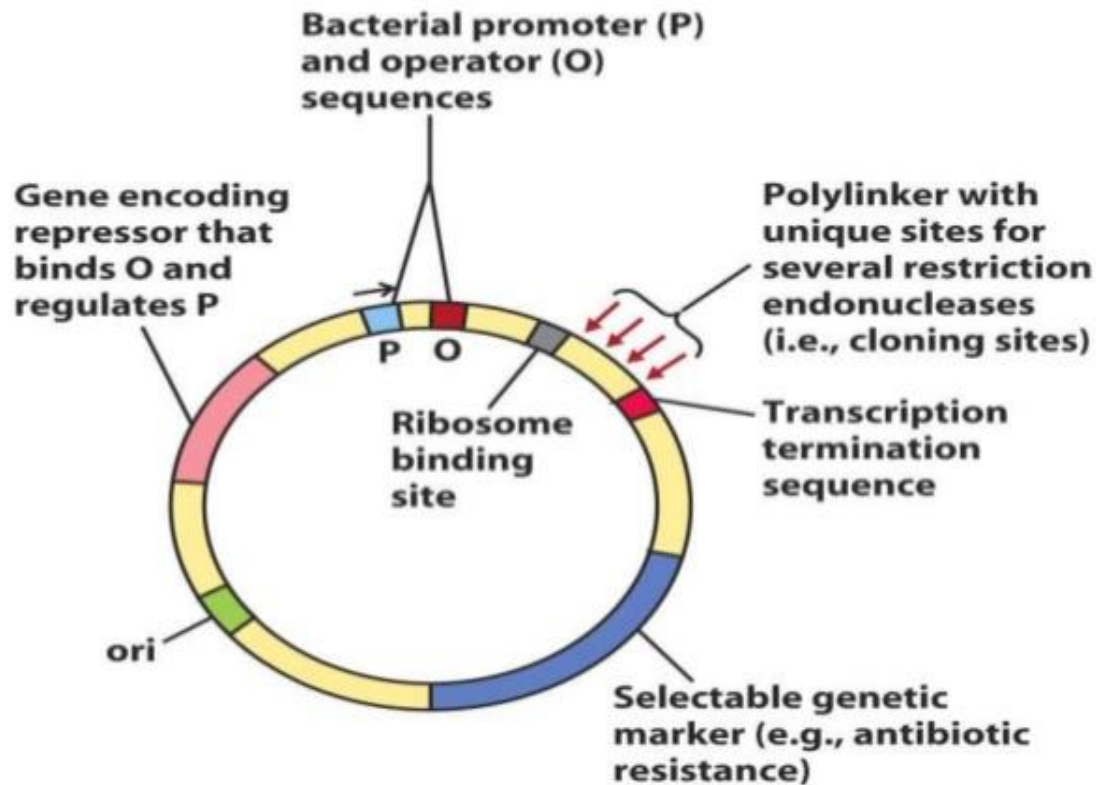
# Экспрессиялаушы векторлар

- Ол қожайын жасушада ақуыз синтезі үшін қолданылады.
- Экспрессиялаушы векторда реттеуші элементтердің барлығы: энхансерлер, промотор, терминация аймағы, транскрипция/ трансляция инициация сайттары болады.
- Барлық осы реттеуші элементтер қожайын организмнің механизмдерін қолданады.
- Клондаушы векторға тән барлық қасиеттерге ие.
- Қолдану аясы өте кең.

# Expression vectors



# Expression vector





Ерекшеліктері	Клондаушы вектор	Экспрессиялаушы вектор
Анықтамасы	бұл ДНҚ-ның кішкене бөлігі, ол қызығушылық тудыратын өзге генді қожайын жасушаға енгізу үшін қолданылады.	Бұл плазмида қызығушылық тудыратын генді қожайын ағзаға енгізіп қана қоймайды, сонымен қатар ақуыз өнімінің тиісті көрінісі арқылы енгізілген генді талдауға көмектеседі
Қызметі	Қызықтырушы өзге геннің бірнеше көшірмесін алу мақсатында қолданылады	Енгізілген қызықтырушы геннің өнімін (мРНҚ немесе протеин) алу, талдау мақсатында қолданылады.
Түрлері	Плазмида, космидтер, фагтар, ВАСs, YACs, MACs	Тек плазмидалар
Қасиеттері	Кәдімгі клондаушы вектор репликацияның басталу нүктесі, рестрикция сайттары, енгізілетін ген және антибиотикке тұрақты сайттардан тұрады	Клондаушы векторға тәр қасиеттермен қатар экспрессиялаушы векторларда реттеуші элементтері болады: энхансерлер, промотор, терминация аймағы, транскрипция/ трансляция инициация сайттары болады.

Генетикалық инженерияда негізгі қызығушылықты  
экспрессиялаушы векторлар тудырады.

Клондалған геннің *E.coli*-де тиімді экспрессиясы келесі шарттарға  
тәуелді болып келеді:

- Бөгде геннің кодтаушы тізбегі үздіксіз;
- Ген *E.coli* РНҚ полимеразасы тани алатын промотор бақылауының  
астында орналасқан;
- *E.coli*-дің белок синтездеуші аппараты арқылы мРНҚ  
трансляциясы дұрыс бағытта жүзеге асады.

Промотор-бұл геннің транскрипциясы басталатын ДНҚ аймағы. Промоторлар экспрессивті векторлардың маңызды құрамдас бөлігі болып табылады, өйткені олар РНҚ полимеразасының ДНҚ-мен байланысын басқарады. РНҚ полимераза ДНҚ-ны мРНҚ-ға транскрипциялайды, нәтижесінде ол функционалды ақуызға айналады.

Активтілігі бойынша промоторлар 2-ге бөлінеді:

Конститутивті	Индукцибельді
<p>бақылайтын геннің тұрақты транскрипциясын қамтамасыз ететін реттелмейтін промоутер</p>	<p>реттелетін промоутер; белгілі бір химиялық немесе биологиялық агент немесе физикалық әсерден активтенеді</p>

# Гендік инженерияда қолданылатын промотор түрлері

Биотехнологияда қолданылатын гендерді клондау эксперименттерінің негізгі мақсаты – қожайын ағзада таңдалған геннің экспрессиялануы үшін тиімді жағдайларды таңдау.

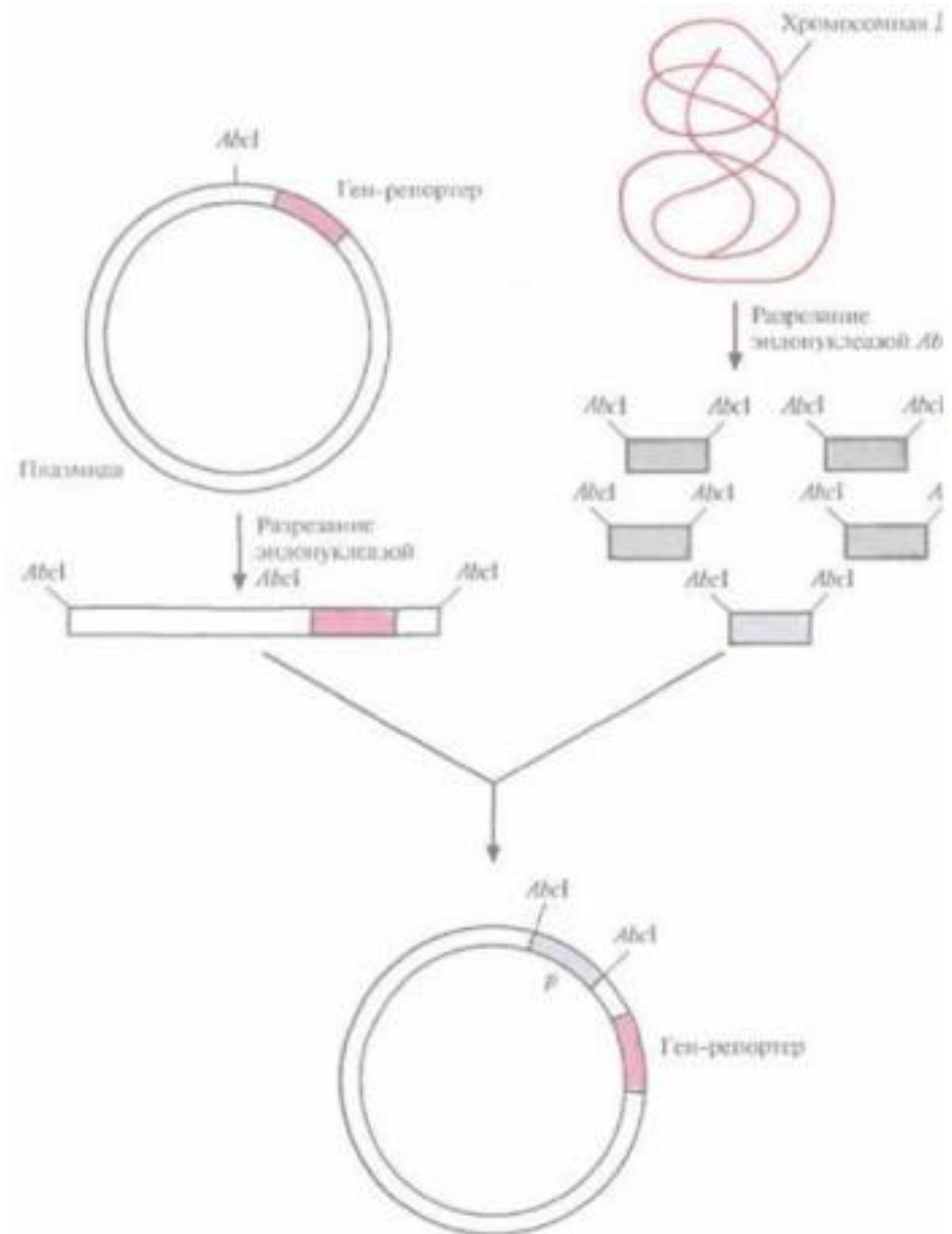
Экспрессия жүйелерінің молекулалық-биологиялық қасиеттерінің ішінде мыналар маңызды:

- промотор мен транскрипция терминаторының түрі;
- мРНК-ны рибосомамен байланыстыру беріктігі;
- клондалған геннің көшірмелерінің саны және оның локализациясы;
- синтезделген өнімнің соңғы локализациясы;
- қожайын ағзадағы трансляция эффективтілігі;
- қожайын ағзадағы түзілген өнімнің тұрақтылығы.

Кез келген геннің тиімді экспрессиясы үшін оған реттелетін мықты промотор қажет. Мұндай промоторлардың РНҚ-полимеразасына сезімталдығы жоғары болады. Ал промотордың реттелуі жасушаға (және зерттеушіге) транскрипцияны қатаң бақылауға мүмкіндік береді.

Клондалған гендердің экспрессиясы үшін жақсы зерттелген *E. coli*-дің *lac* (лактоза)- оперон промоторы кеңінен қолданылады. Сонымен қатар басқа промотор түрлері де бар. Олардың идентификациясы үшін промоторлық аймағы жоқ, өнімі оңай анықталатын ген репортер алдына кездейсоқ ДНҚ фрагментін енгізеді. Егер ген экспрессиясы жүрсе, онда клондалған фрагмент функционалды промоторға ие деп танылады.

# Күшті реттелетін промоторлерді анықтау



# Индукцибельді промоторлар

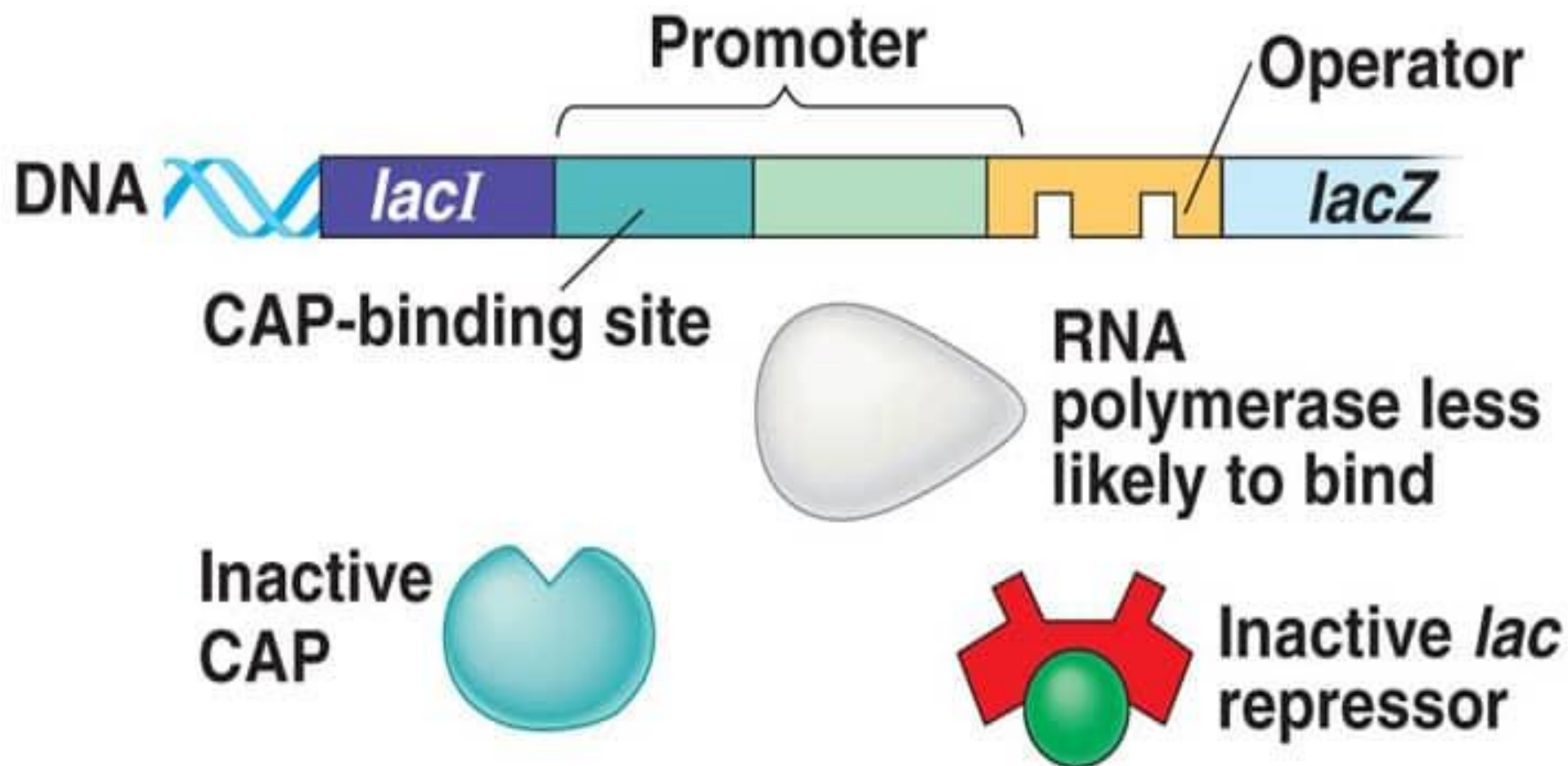
Кеңінен қолданылатын индукцибельді промоторлар:

- *E. coli* –дің *lac*- и *trp*-оперон промоторлары;
- Арнайы құрастырылған *lac*-промотор және *trp*-промотор);
- бактериофаг  $\lambda$  pL промоторы ;
- T7 бактериофаг 10 генінің промоторы.





# Лас промотор

- Ортада лактоза болмаған жағдайда репрессивті күйде болады;
- Активациясы ортаға лактозы немесе изопропил- $\beta$ -D-тиогалактопиранозида (ИПТГ) қосу арқылы жүзеге асады;
- Сонымен қатар Лас промотордың реттелуі катаболизм активатор белогі CAP арқылы жүзеге асады.



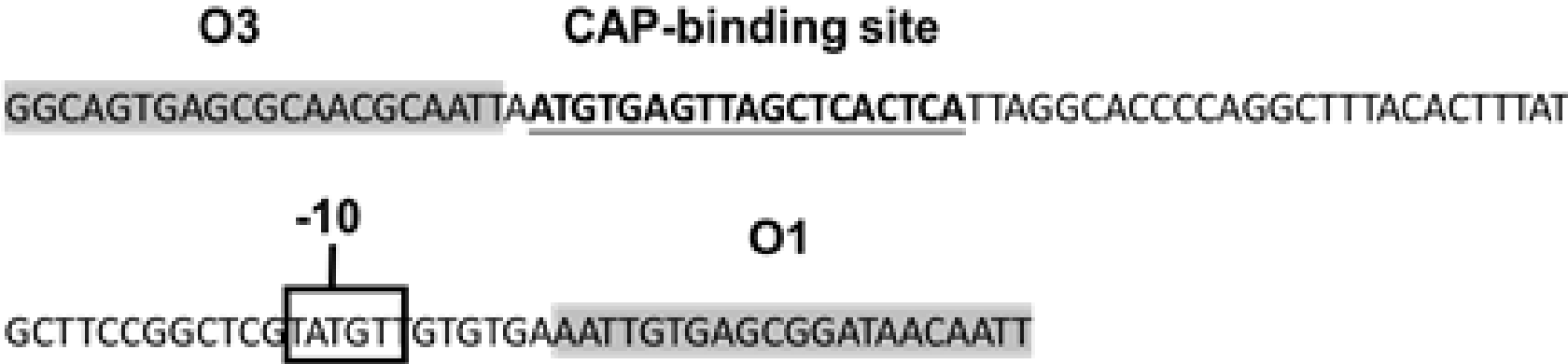


**(b) Lactose present, glucose present (cAMP level low): little *lac* mRNA synthesized**

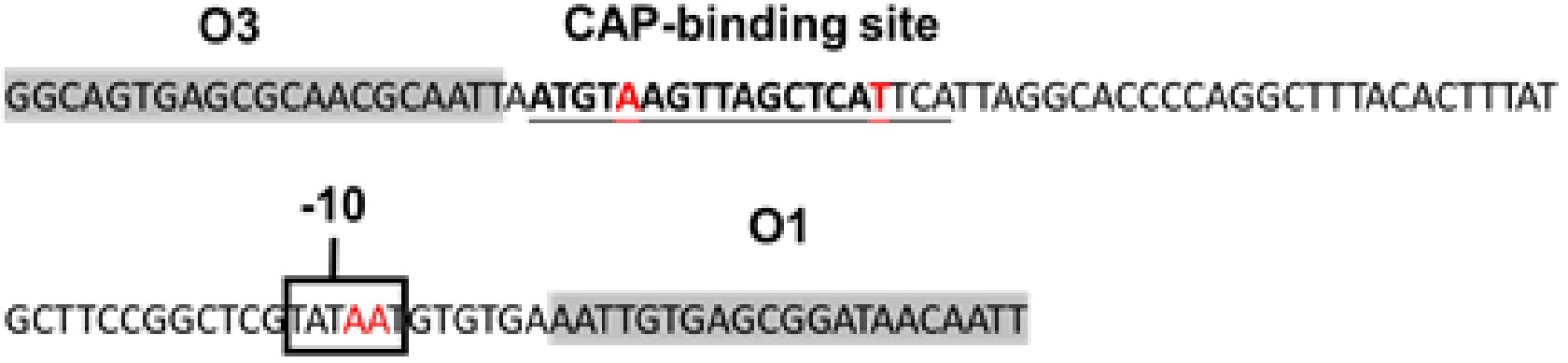
Концентрация глюкозы	Концентрация лактозы	Концентрация cAMP	Область <i>lac</i> -промотора/оператора	Уровень транскрипции
Низкая	Низкая	Высокая	 <p>Diagram showing the <i>lac</i> operon structure: Promotor (yellow), Operator (purple), and Gen (orange). A cAMP-CAP complex (blue oval) is bound to the Promotor, and a <i>lac</i>-Репрессор (red rounded rectangle) is bound to the Operator.</p>	Низкий
Высокая	Низкая	Низкая	 <p>Diagram showing the <i>lac</i> operon structure: Promotor (yellow), Operator (purple), and Gen (orange). A <i>lac</i>-Репрессор (red rounded rectangle) is bound to the Operator.</p>	Низкий
Высокая	Высокая	Низкая	 <p>Diagram showing the <i>lac</i> operon structure: Promotor (yellow), Operator (purple), and Gen (orange). No repressor is bound.</p>	Низкий
Низкая	Высокая	Высокая	 <p>Diagram showing the <i>lac</i> operon structure: Promotor (yellow), Operator (purple), and Gen (orange). A cAMP-CAP complex (blue oval) is bound to the Promotor, and RNA-полимераза (red rounded rectangle) is bound to the Promotor, with an arrow indicating transcription direction.</p>	Высокий

Плазмидті экспрессиялаушы векторларда негізінен lac-промотордың өзгертілген — lacUV5 промоторы қолданылады.

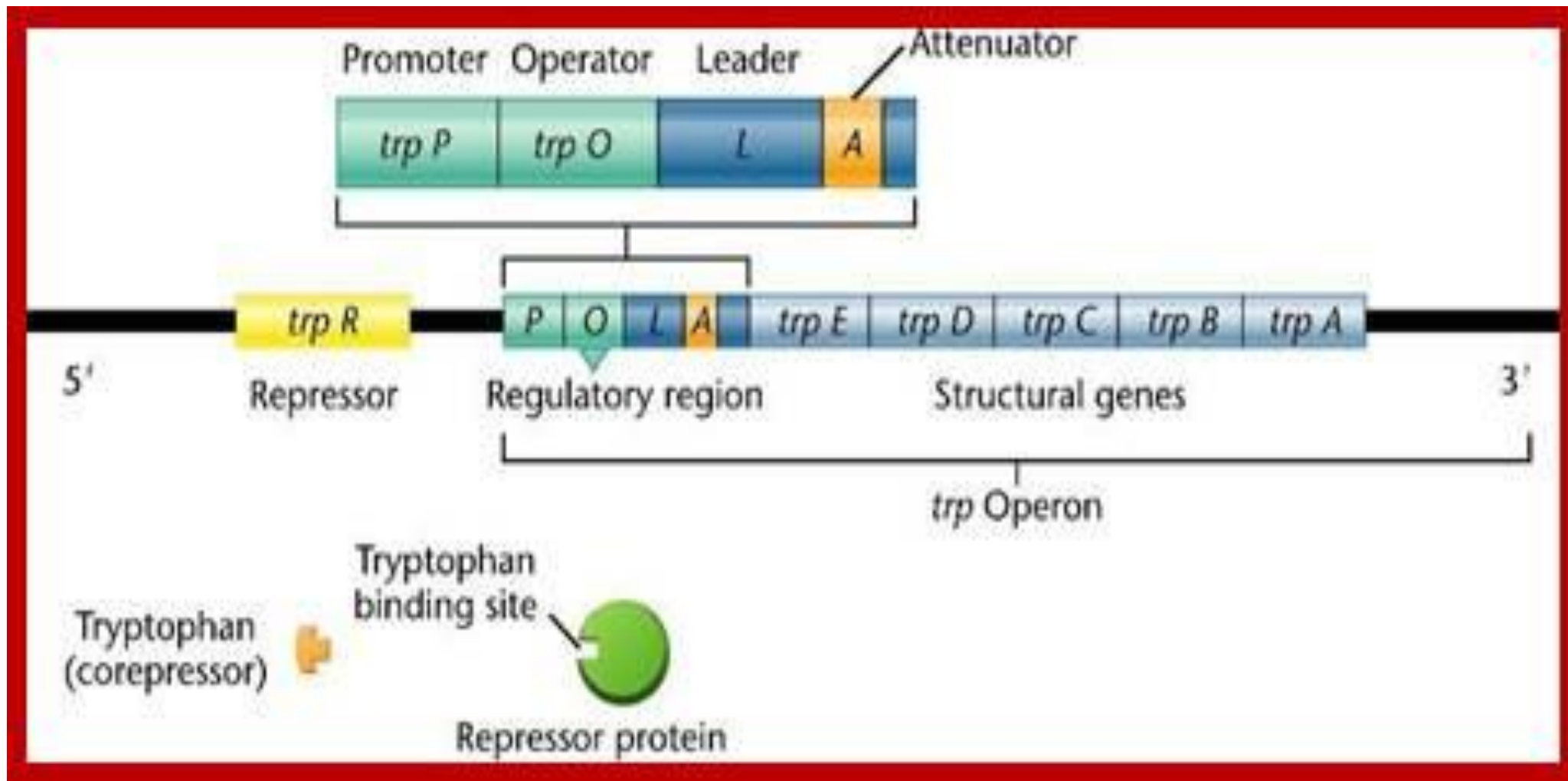
### WT Lac Promoter



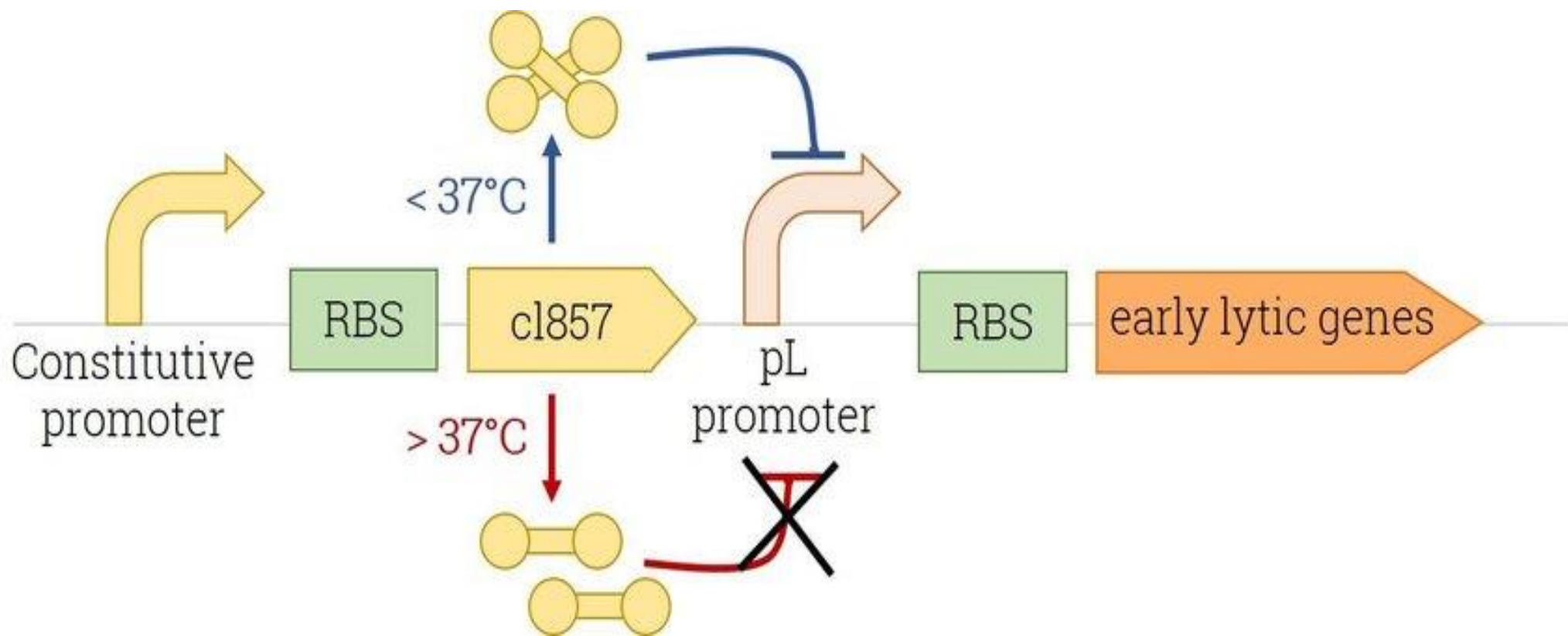
### L8-UV5 Lac Promoter



**Trp промоторы** Trp операторымен байланысатын және *trp* оперонының транскрипциясын болдырмайтын триптофан—Trp репрессор кешенінің әсерінен өшеді. Trp промоторының активтенуі (қосылуы) триптофан ортада болмаған кезде немесе 3-индолилакрил қышқылы қосылған кезде жүзеге асады.

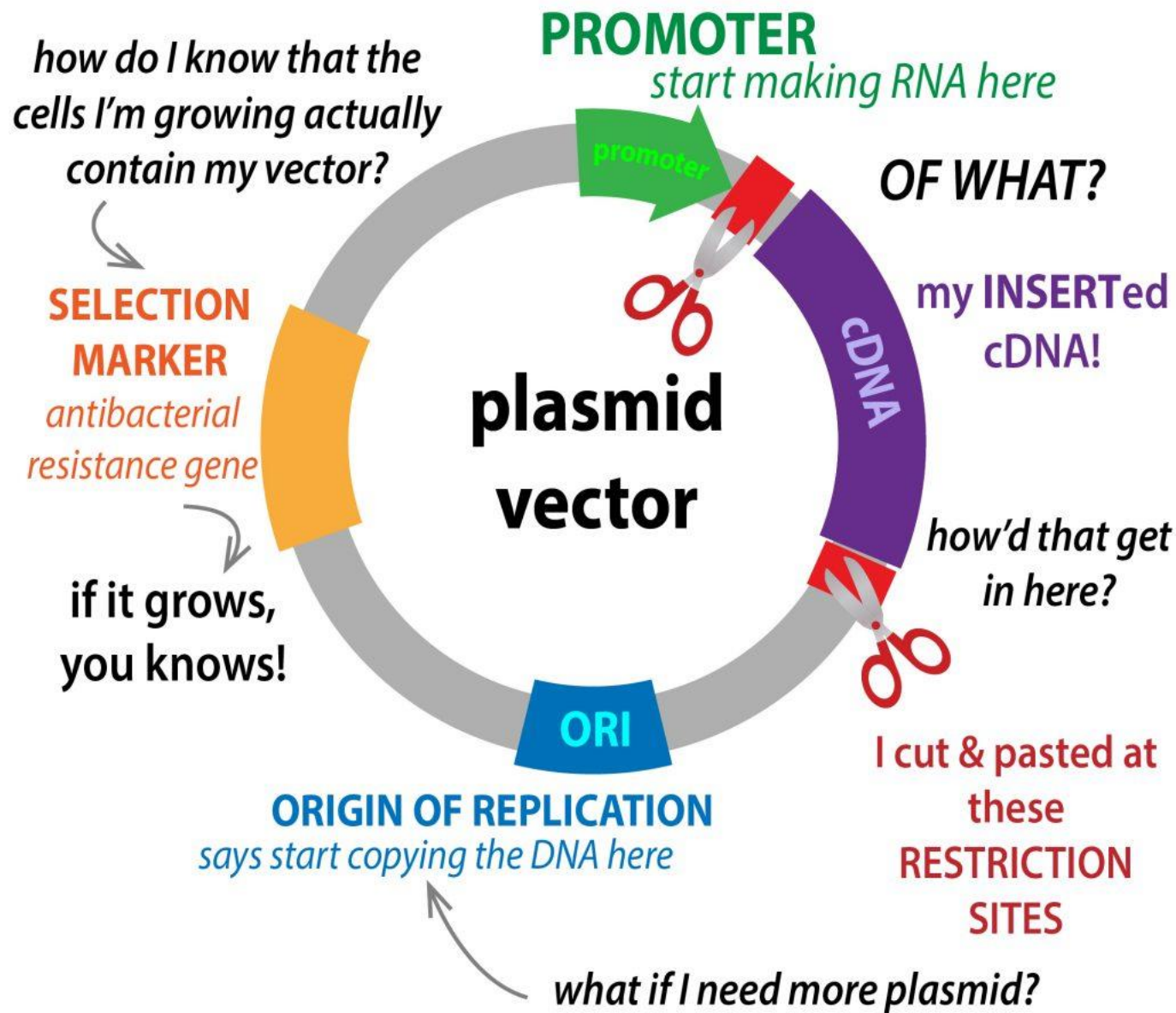


pL промоторы  $\lambda$  бактериофагының cI репрессор белогі арқылы реттеледі. pL –промотор транскрипциясын реттеуде қазіргі таңда мутантты cI857 белогі қолданылады. Ол температураға сезімтал келеді. Бұл репрессорды синтездейтін жасушалар алдымен 28-30 °C температурада өсіріледі; бұл жағдайда репрессор pL промоторынан транскрипцияны блоктайды. Культура қажетті фазаға жеткенде (әдетте log фазасының ортасы) температура 42 °C дейін көтеріледі, онда cI857-репрессор белсендігін жояды және транскрипция басталады.



# T7 бактериофагының промоторы

T7 бактериофагының промоторынан транскрипция үшін тиісті РНҚ полимераза қажет. Бұл промоторды қолдану үшін T7 фагінің РНҚ полимеразаға жауапты генін профаг  $\lambda$  құрамындағы E. Coli хромосомасына lac-промотор бақылауының астында енгізеді. Сосын ортаға IPTG қосу арқылы T7 бактериофагының РНҚ полимеразасы синтезін индукциялайды, сәйкесінше біраз уақыттан соң нысана ген транскрипциясы мен трансляциясы жүреді.





**GENE** in a plasmid

transcription RNA Polymerase  
T7 uses its own one of these

**mRNA**

translation ribosomes

T7 uses the bacteria's these

**PROTEIN**

Recombinant protein overexpression

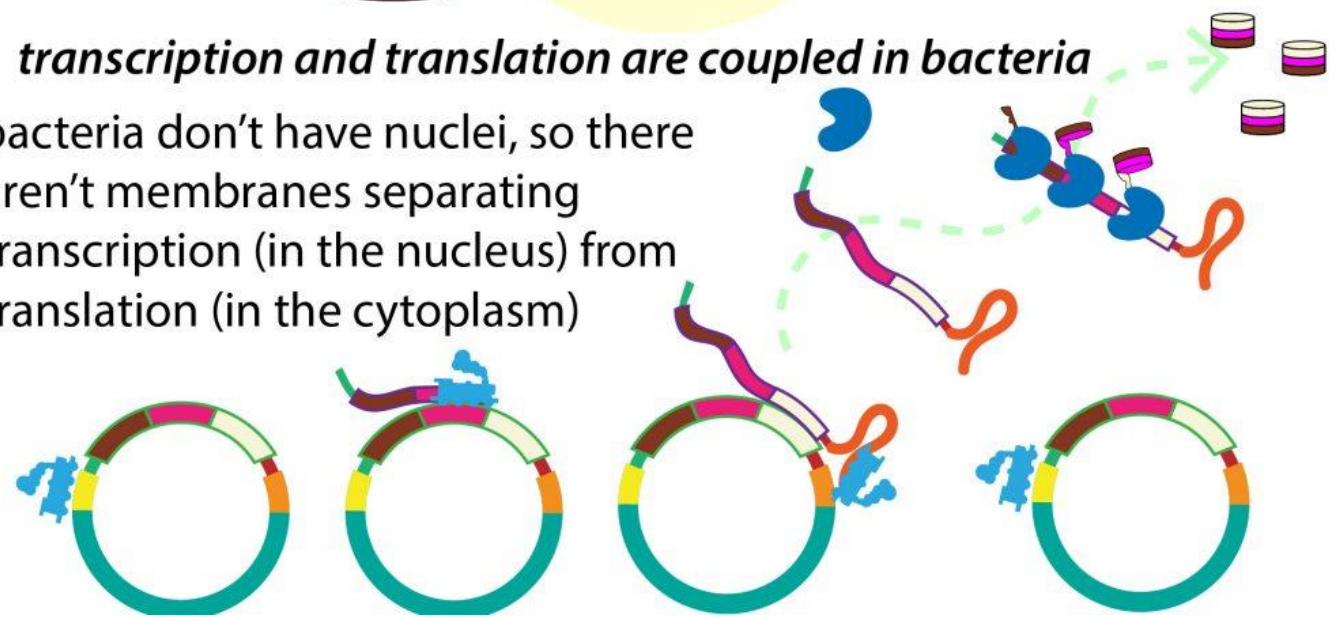


T7 promoter tells T7 RNA Pol to latch on and start transcribing DNA into RNA

T7 terminator tells T7 RNA Pol "gene's over" - it can stop transcribing

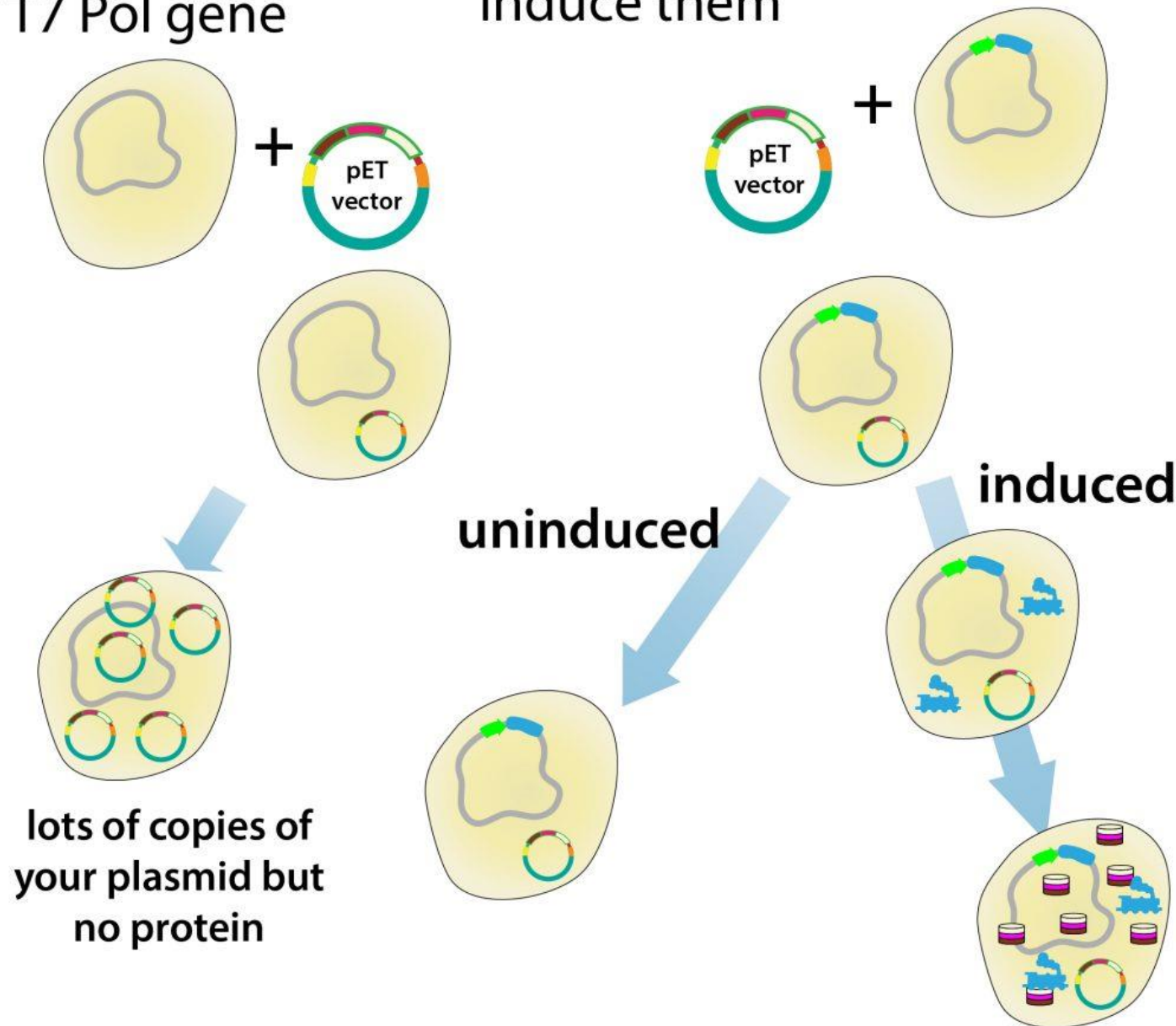
*transcription and translation are coupled in bacteria*

bacteria don't have nuclei, so there aren't membranes separating transcription (in the nucleus) from translation (in the cytoplasm)

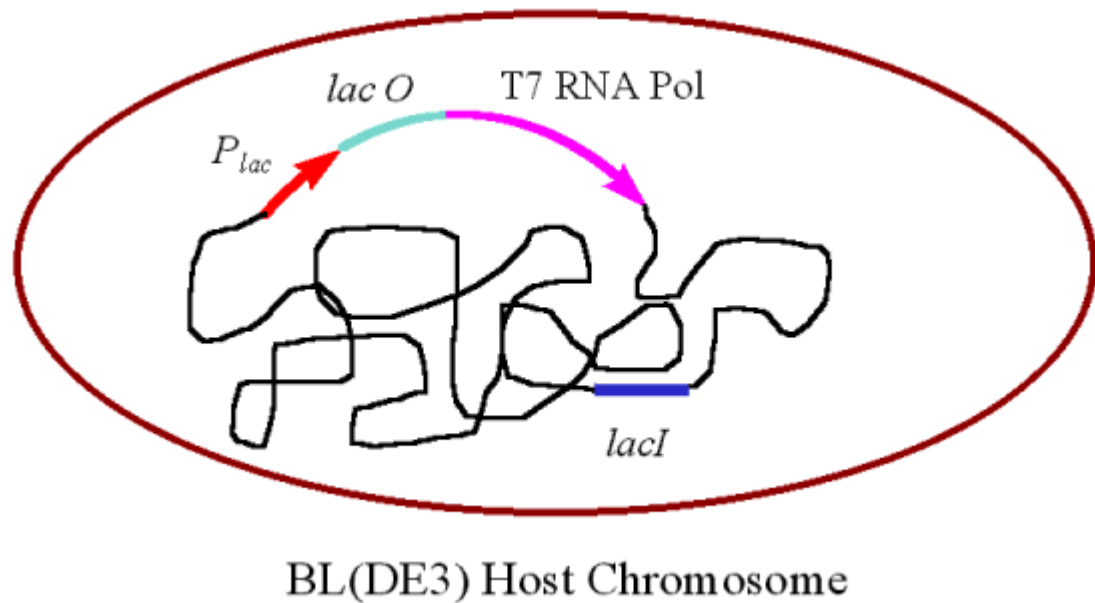
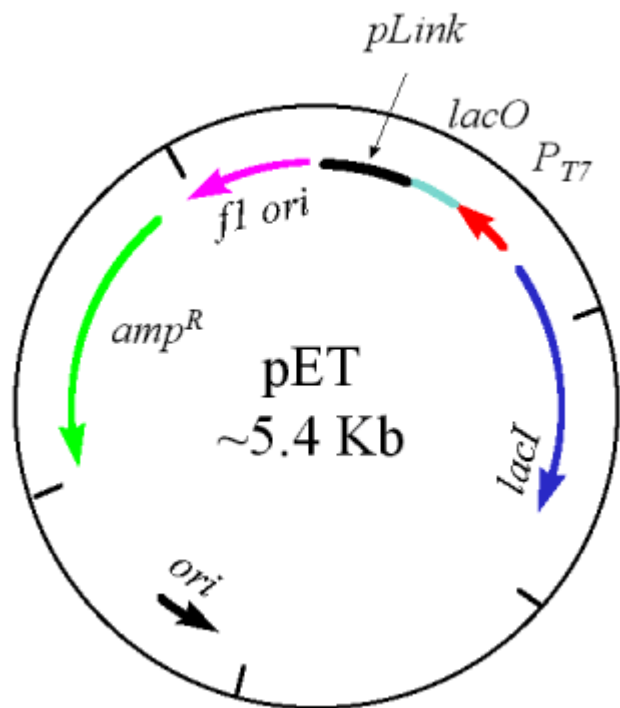


**cloning cells**  
don't have the  
T7 Pol gene

**expression cells** do, but they  
don't make T7 Pol until you  
induce them

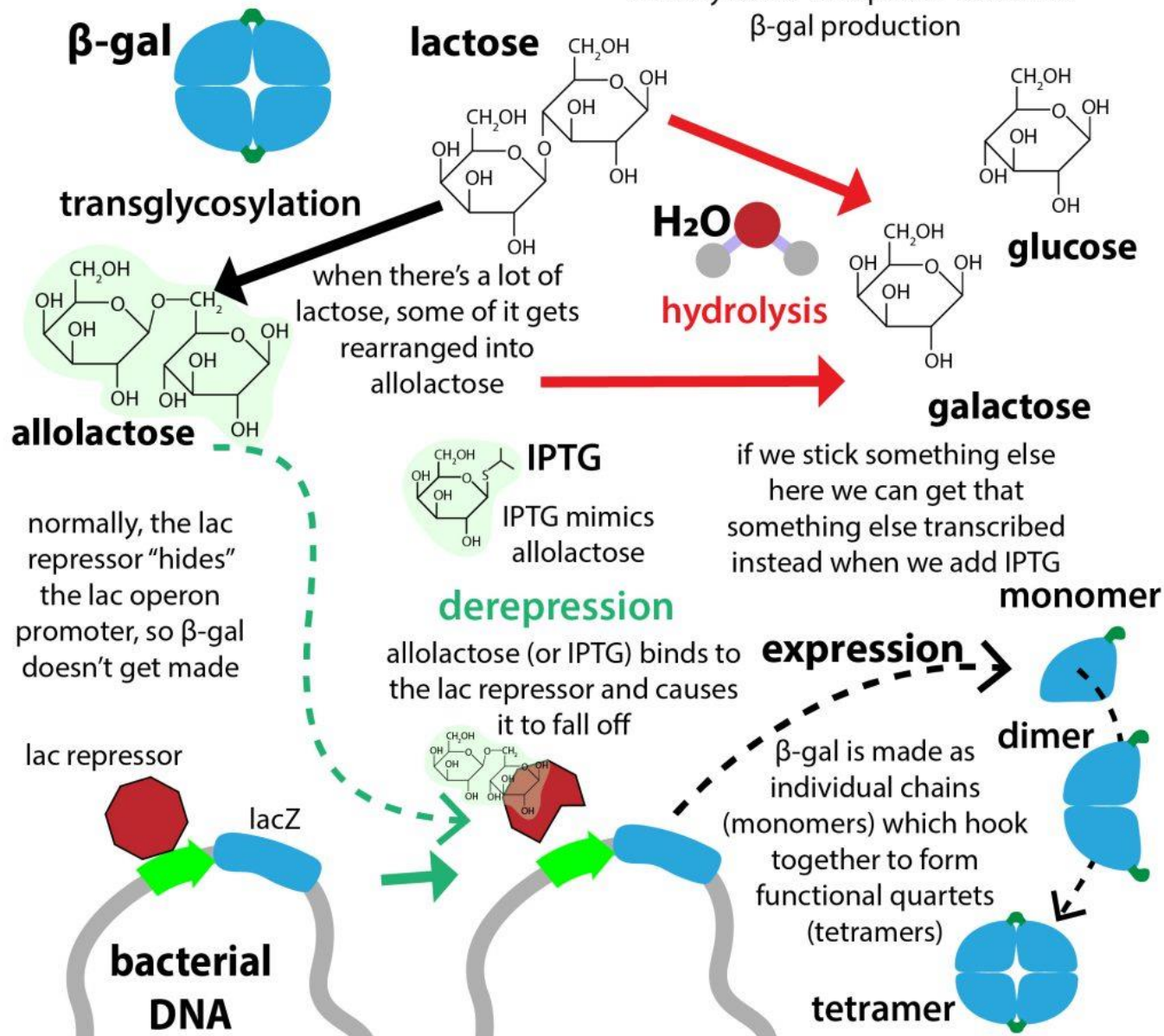


# рЕТ экспрессиялық жүйесі

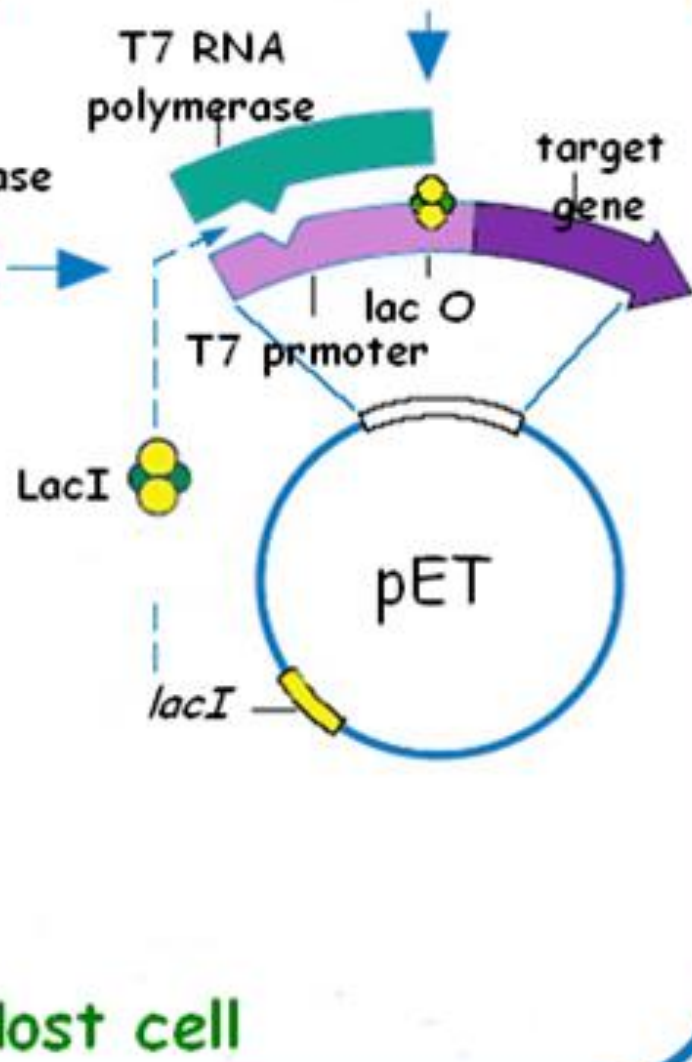
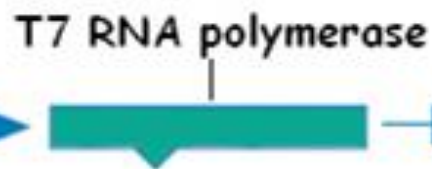
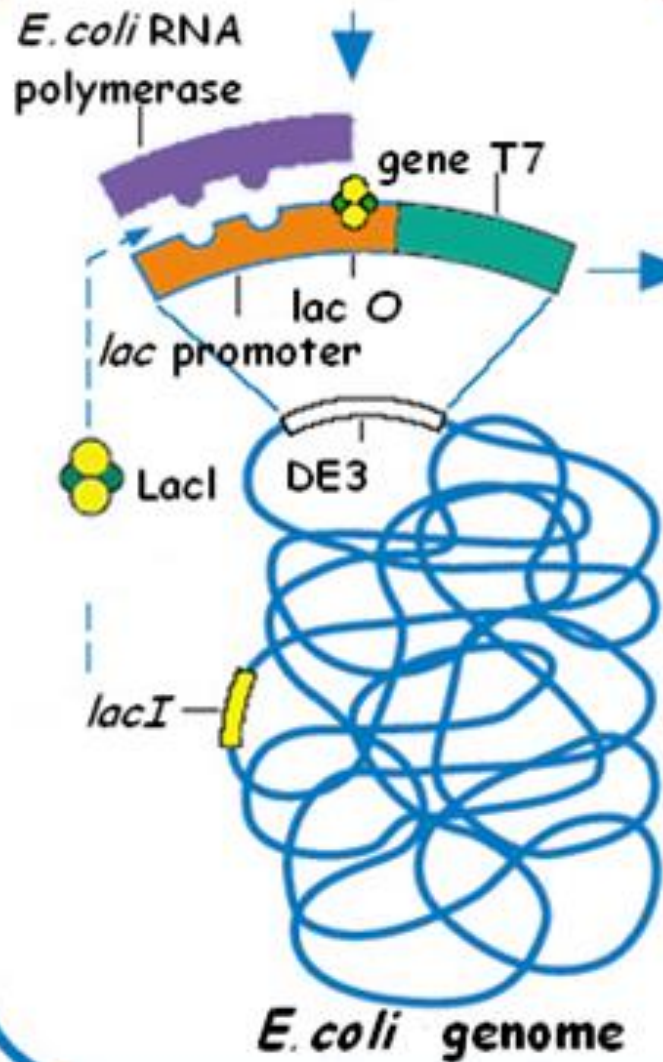


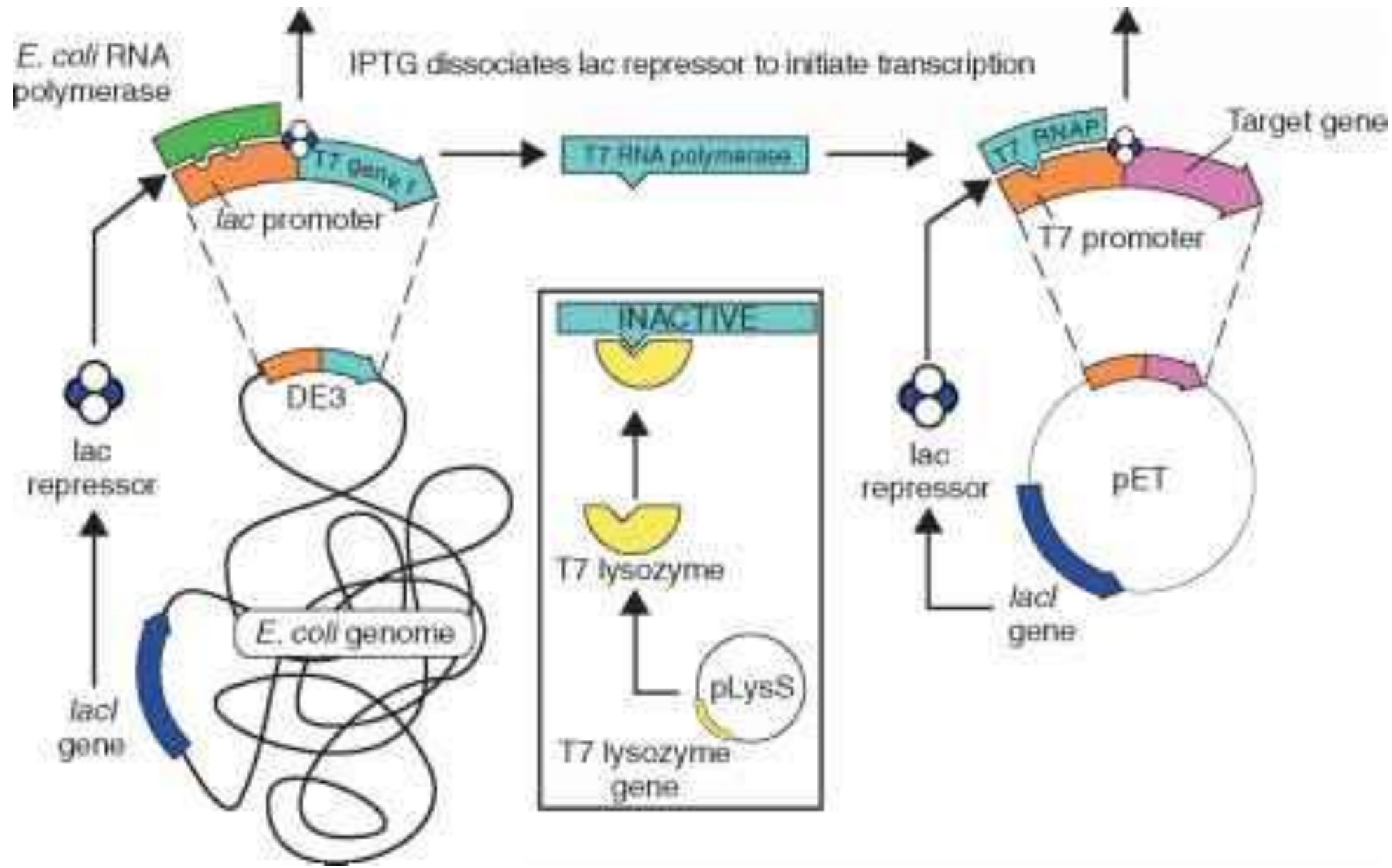
Bacteria only make lactose-breaker ( $\beta$ -galactosidase) when there's lactose to break - and not enough glucose (which they prefer)

so they use a "lac operon" to control  $\beta$ -gal production



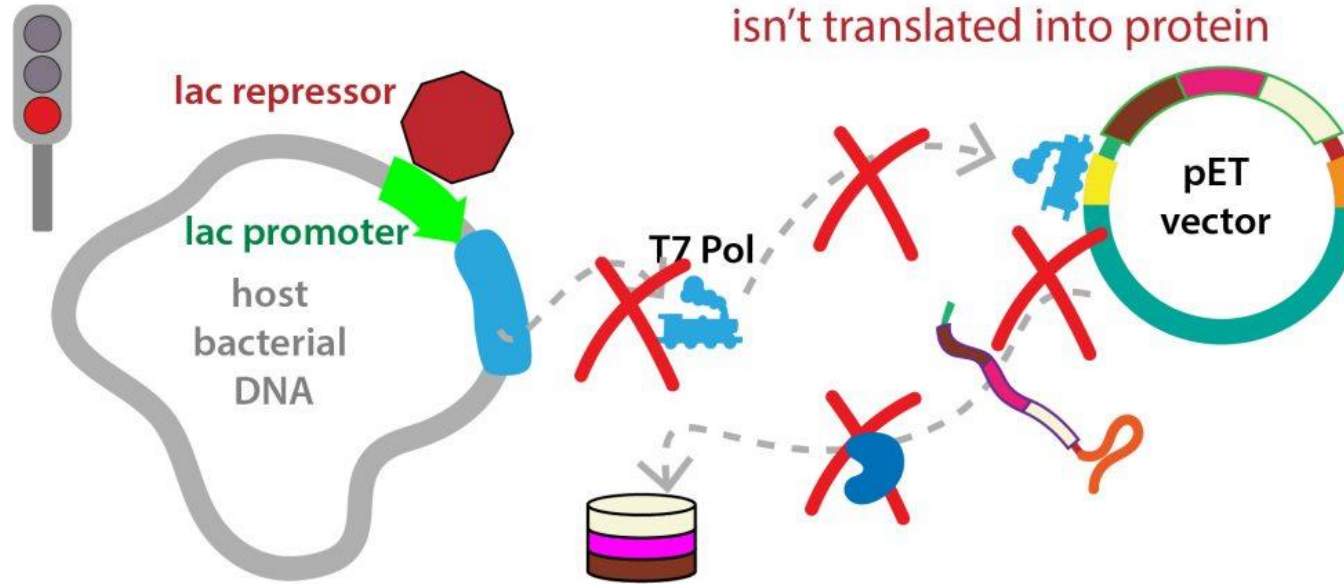
# IPTG induction





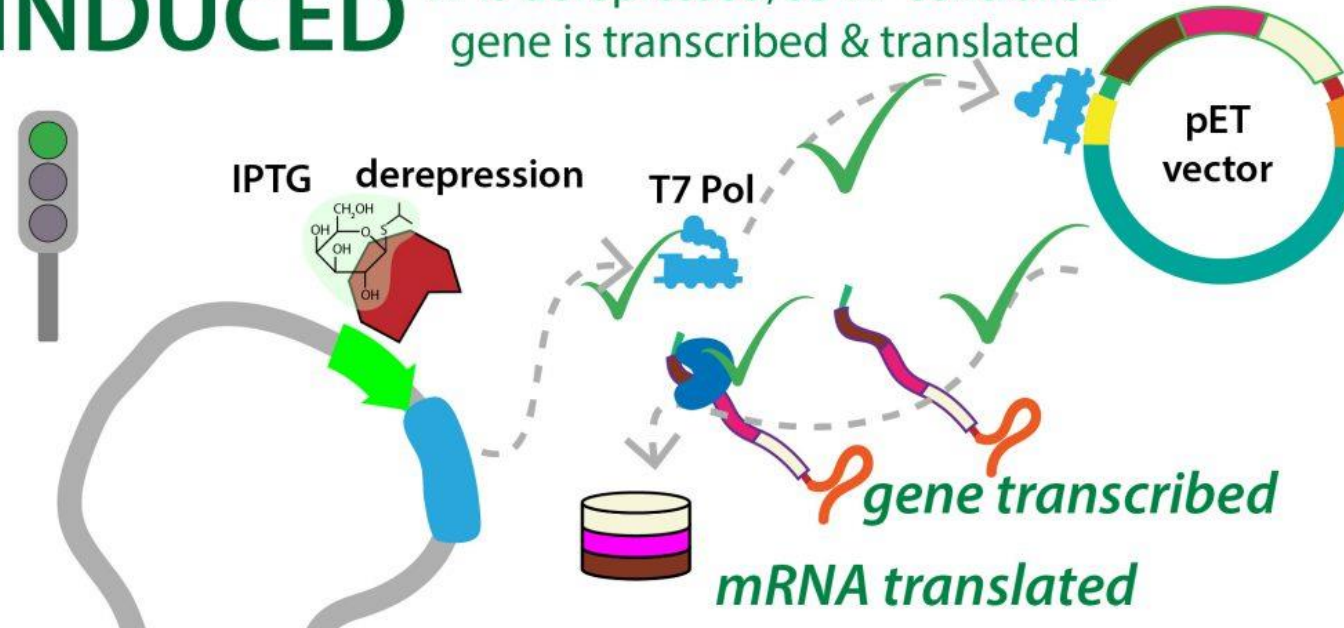
# UNINDUCED

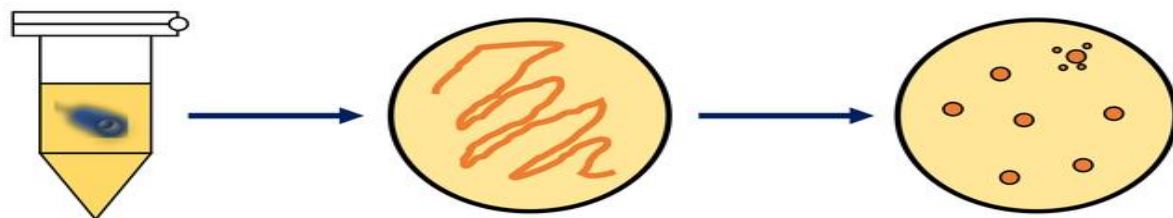
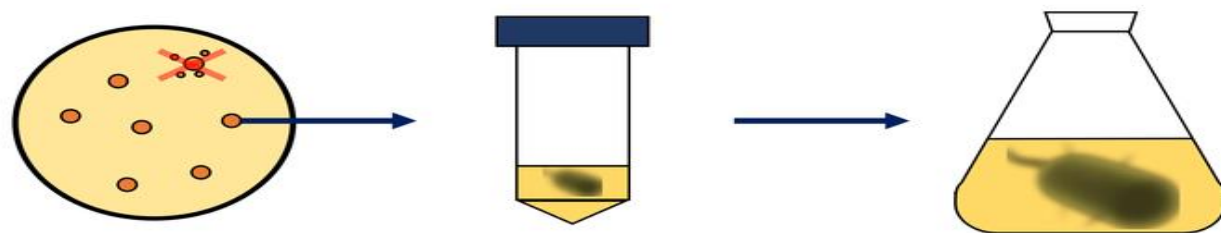
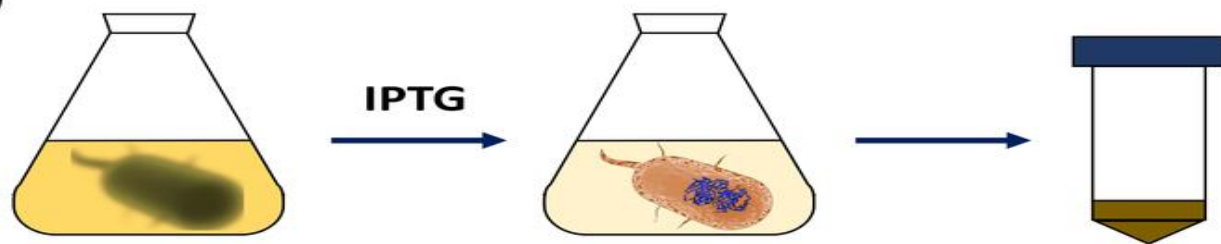
T7 repressed, so T7-controlled gene isn't transcribed into mRNA, and thus isn't translated into protein



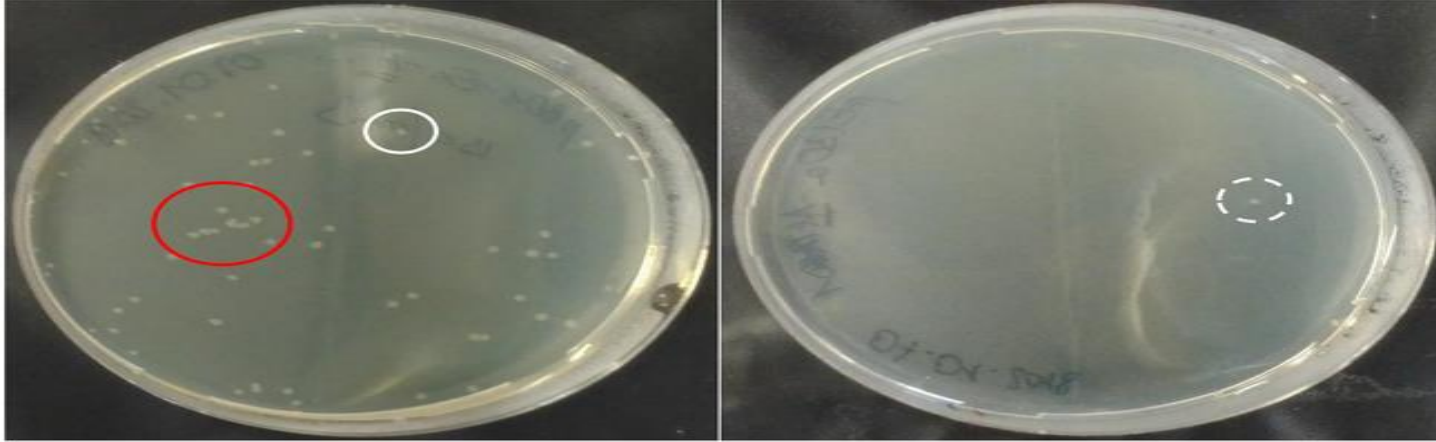
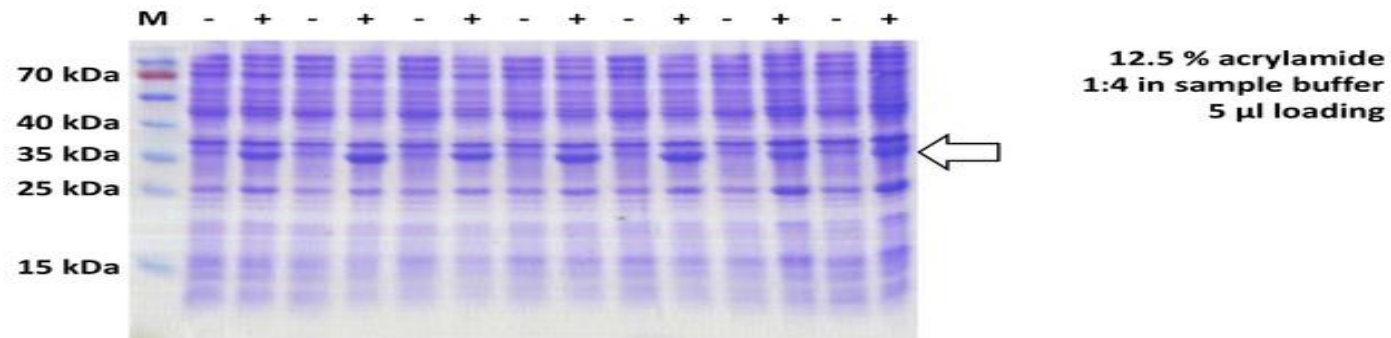
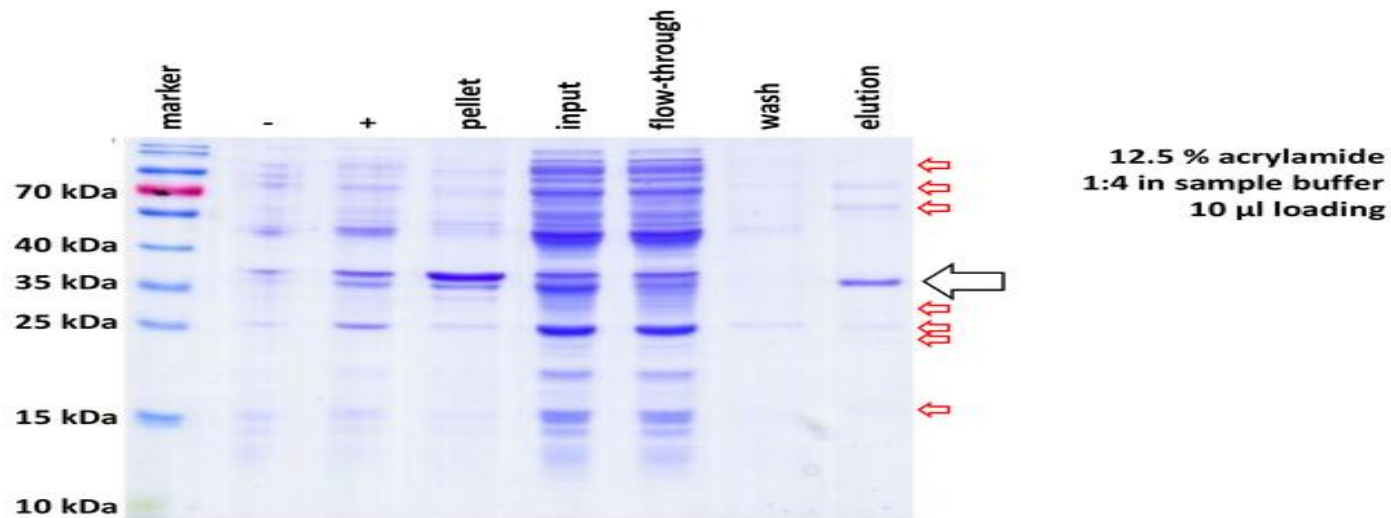
# INDUCED

T7 is derepressed, so T7-controlled gene is transcribed & translated



**A****B****C****D**



**A****B****C**

# Интегративті векторлар

- Интеграция-бұл плазмидтік ДНҚ мен қожайын жасушаның хромосомаларының гомологиялық тізбегі арасындағы рекомбинацияның нәтижесі.
- Интегративті плазмидтер көп жағдайда суицидтік векторлар, яғни қабылдаушы қожайын клеткада репликацияланбайтын векторлар, сондықтан олар қожайын клетка ДНҚ-на біріктіріледі немесе жоғалуы керек.

