

Рестриктазалар және молекулалық клондау

CNE9131 ДНҚ технологиялары · 6B05105 Биотехнология

6-апта · Жаниязов Ж.А., аға оқытушы

Дәріс жоспары

- Рестриктазалар және олардың тану тізбектері
- Жабысқақ және тұйық ұштар
- Клондау кезеңдері
- Клондау векторлары, плазмида картасы
- Рекомбинантты клондарды іріктеу

6 / 15

апта · клондау

Рестриктазалар: ДНҚ «қайшысы»

1970

Х. Смит HindII
ферментін бөліп алды

1978

Арбер, Натанс, Смит
— Нобель сыйлығы

4–8 н.

тану тізбегінің типтік
ұзындығы

II тип

клондауда
қолданылатын топ

Бактерияларда рестриктазалар бөгде ДНҚ-дан (мысалы, фагтан) қорғайды.

Тану тізбектері

Фермент	Тану тізбегі (^ — кесу орны)	Ұштары
EcoRI	G [^] AATTC	жабысқақ (5')
BamHI	G [^] GATCC	жабысқақ (5')
HindIII	A [^] AGCTT	жабысқақ (5')
SmaI	CCC [^] GGG	тұйық

Жабысқақ және тұйық ұштар

Жабысқақ ұштар

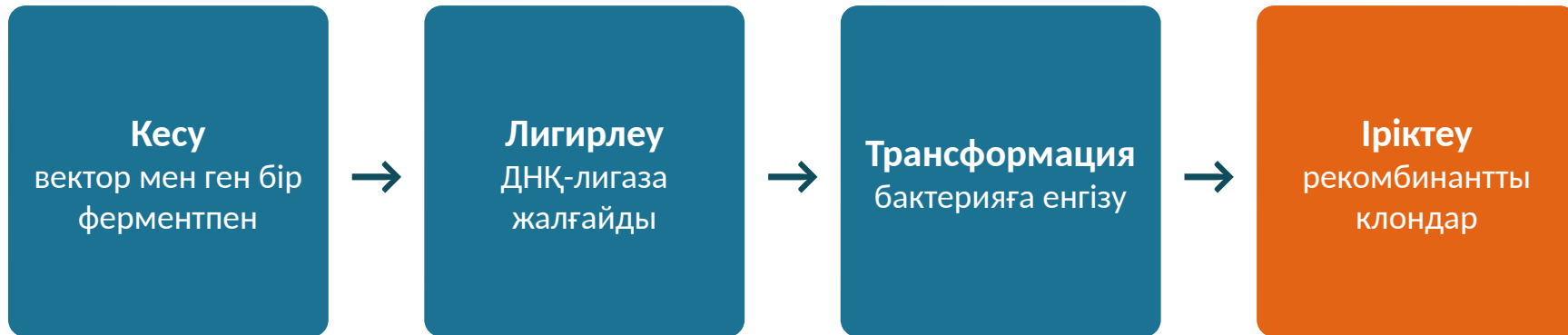
Шығыңқы бір тізбекті ұштар комплементарлы, лигирлеу тиімді әрі бағытты

Тұйық ұштар

Шығыңқы жоқ, кез келген тұйық ұшты жалғауға болады, бірақ тиімділігі төмен

Тану тізбектері палиндромды: екі тізбекте де $5' \rightarrow 3'$ бағытында бірдей оқылады.

Клондау кезеңдері



Нәтиже: мақсатты ген бар және жасуша бөлінгенде көбейетін рекомбинантты ДНҚ.

Клондау векторлары

Вектор	Қыстырма көлемі
Плазмида (pUC19)	шамамен 10 мың н.ж.-ға дейін
λ-фаг	≈ 20 мың н.ж.-ға дейін
Космида	≈ 35–45 мың н.ж.
ВАС	100–300 мың н.ж.

Плазмида картасы

- *ori* — репликация басталатын нүкте, көшірме санын анықтайды
- Селективті маркер, мысалы *AmpR*
- MCS — көп клондау орны, бірнеше рестрикция нүктесі
- *lacZα* — көк-ақ іріктеуге арналған

MCS

көп клондау орны

Рекомбинанттарды іріктеу

Антибиотик

Тек вектор алған жасушалар антибиотикті ортада өседі

Көк-ақ іріктеу

X-gal және IPTG: ақ колония — қыстырмасы бар

Колония-ПЦР

Қыстырманың болуын жылдам тексереді

Рестрикциялық талдау

Плазмиданы кесіп, геледе фрагмент өлшемін салыстыру

Қорытынды және бақылау сұрақтары

- Рестриктаза қандай қызмет атқарады?
- Жабысқақ ұш неге ыңғайлы?
- Плазмида векторының негізгі элементтерін атаңыз
- Ақ колония нені білдіреді?
- Тапсырма: ПР №6 «Вектор картасын талдау»

40–55

бет • [2] Green, Sambrook