

ВЕКТОРЫ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИОФАГА

ЛИТИЧЕСКИЙ ЦИКЛ РАЗВИТИЯ

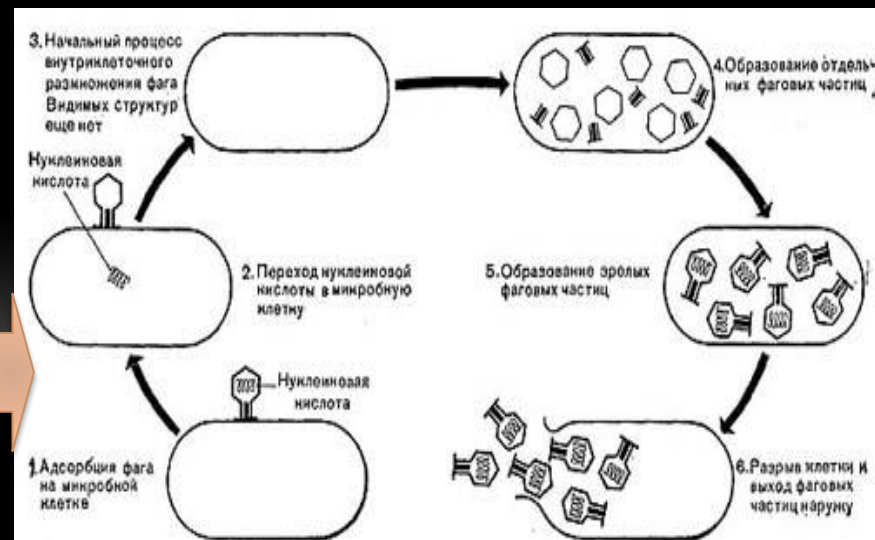
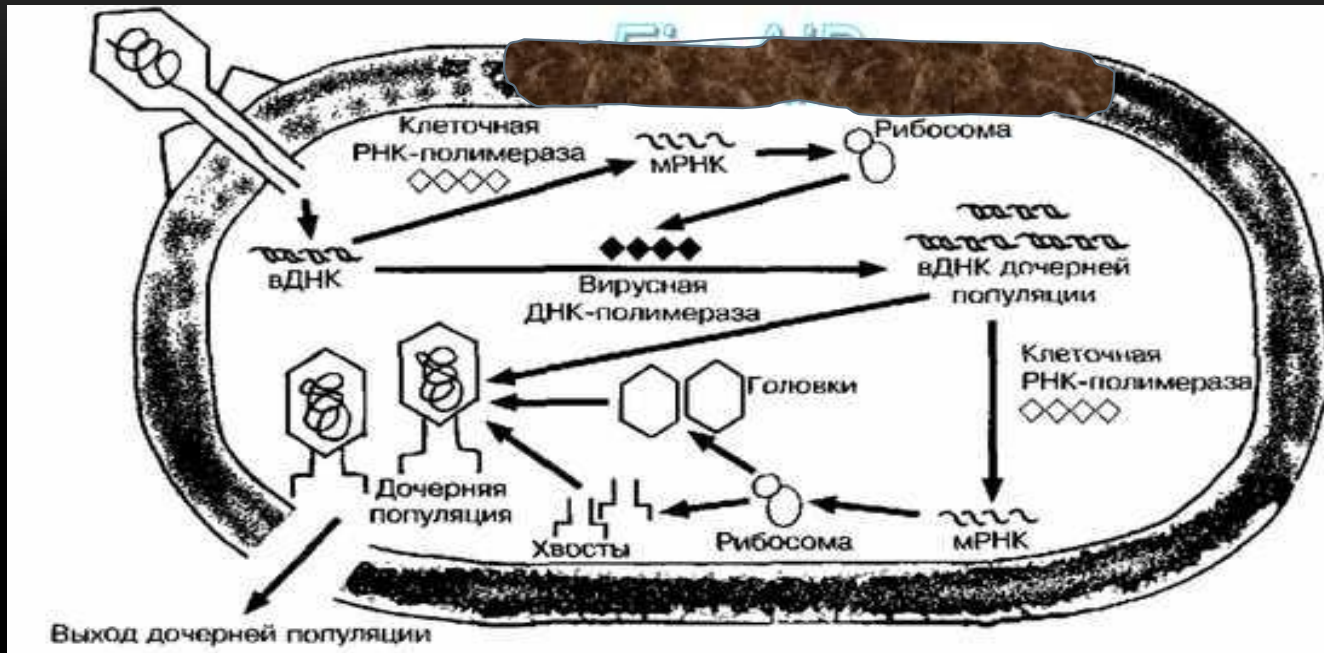
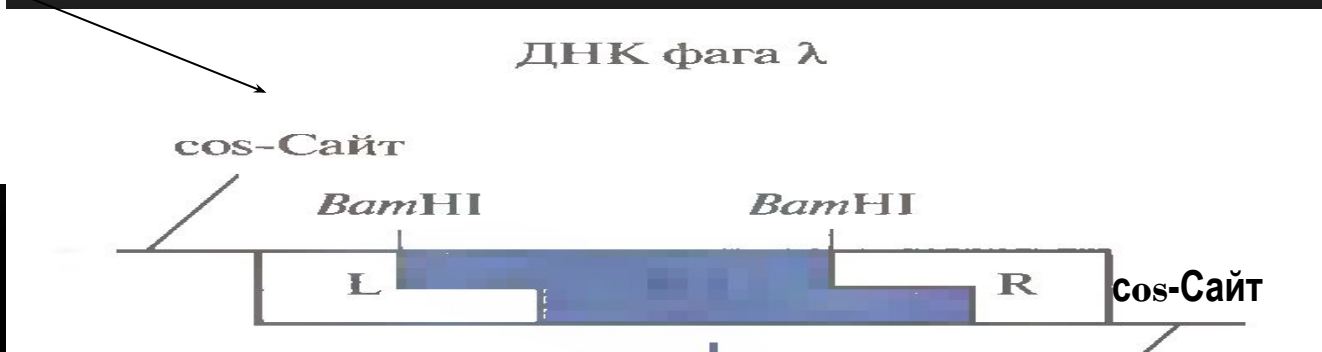
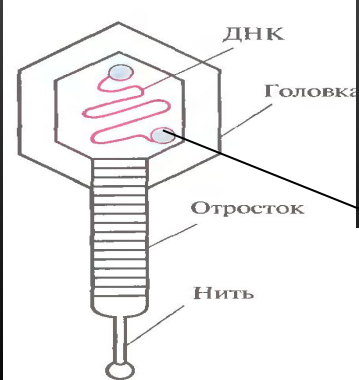


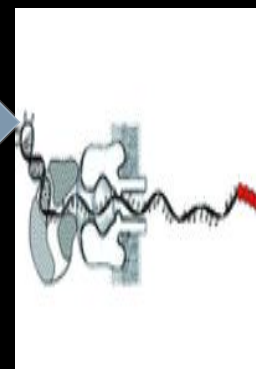
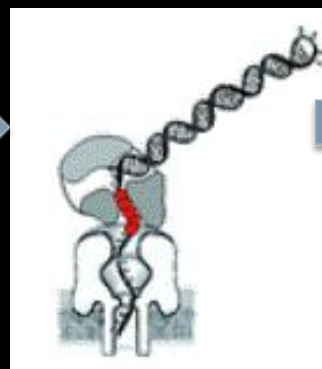
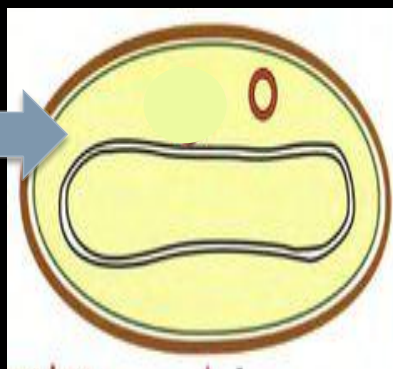
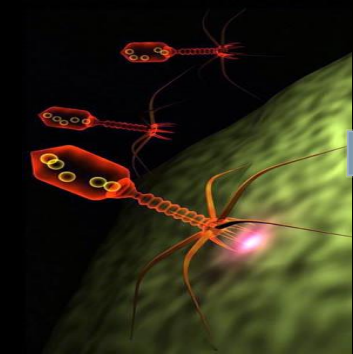
Схема размножения фага

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ ЛИТИЧЕСКОГО
ПУТИ РАЗВИТИЯ БАКТЕРИОФАГА – СБОРКА
ВНУТРИ КЛЕТКИ НОВЫХ ФАГОВ**

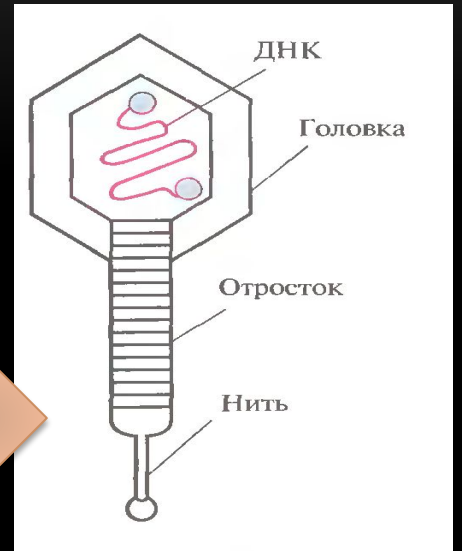
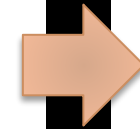
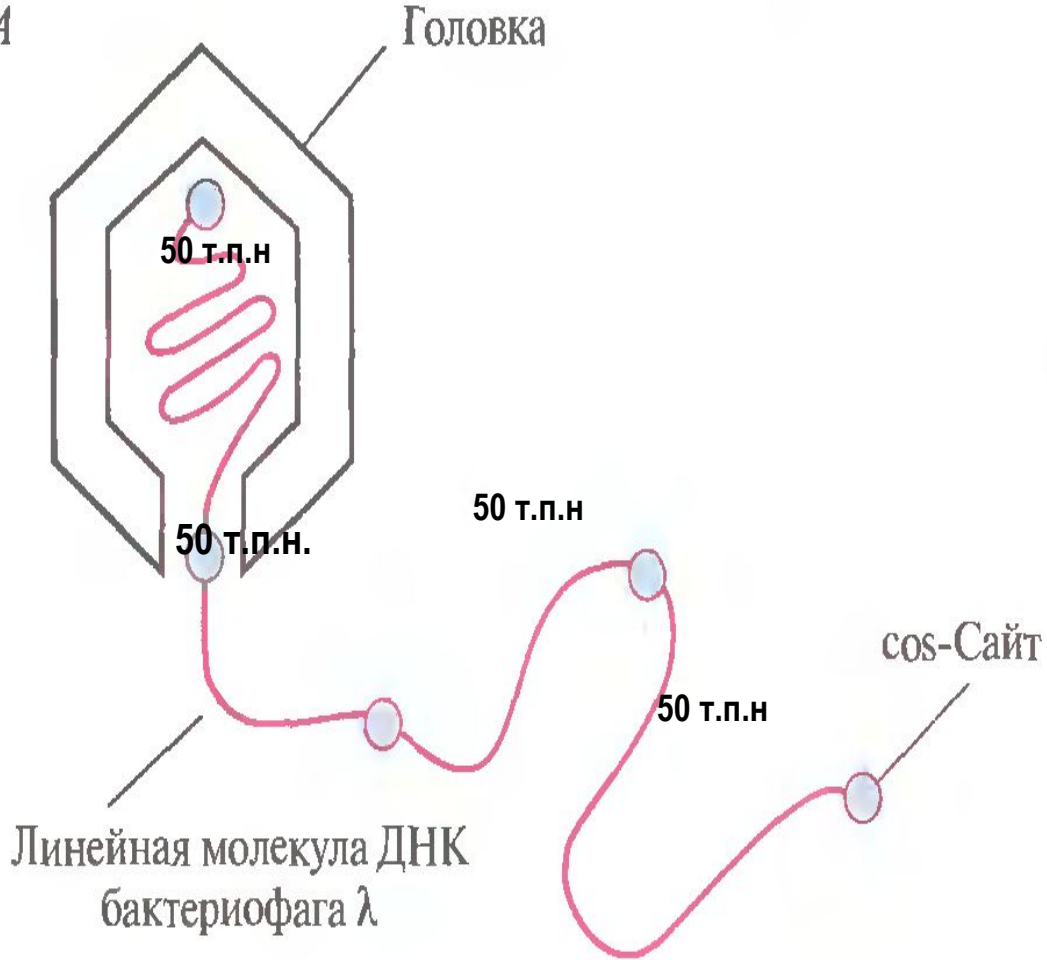
Схема строения фаговой ДНК



После того, как фаговая ДНК попадает в клетку кишечной палочки, липкие концы соединяются и образуется кольцевая молекула, подобная плазмиде, которая способна реплицироваться автономно за счет эксплуатации ферментов и нуклеотидов клетки-хозяина.



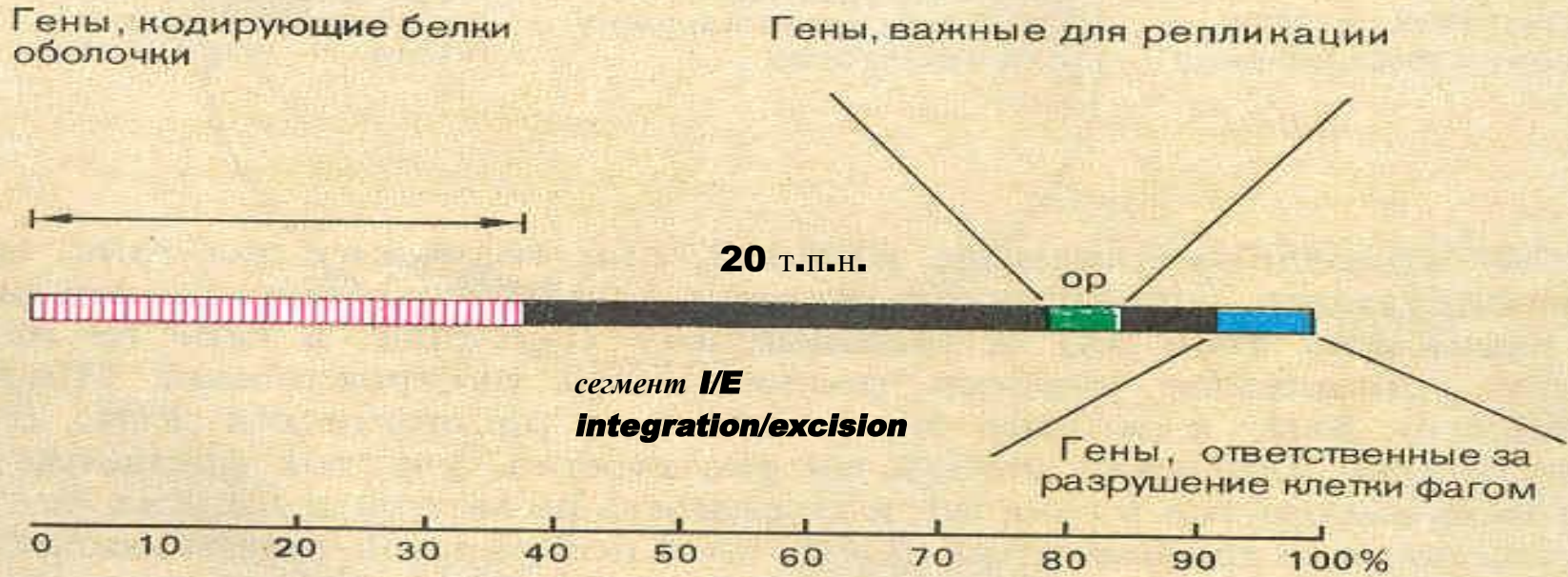
A



ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФАГА В КАЧЕСТВЕ ВЕКТОРА.

ПОЛУЧЕНИЕ рекДНК НА ОСНОВЕ НУКЛЕИНОВОЙ
КИСЛОТЫ ФАГА

Генетическая карта фага-λ

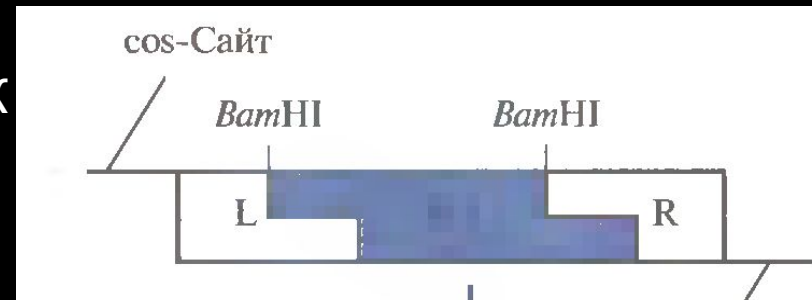


черный участок - *сегмент I/E*
(*integration/excision*)

соответствует генам, несущественным для размножения фага, отв. за встраивание в ДНК клетки-хозяина (т.е. за путь лизогении) = 20 т.п.н.



Bam HI

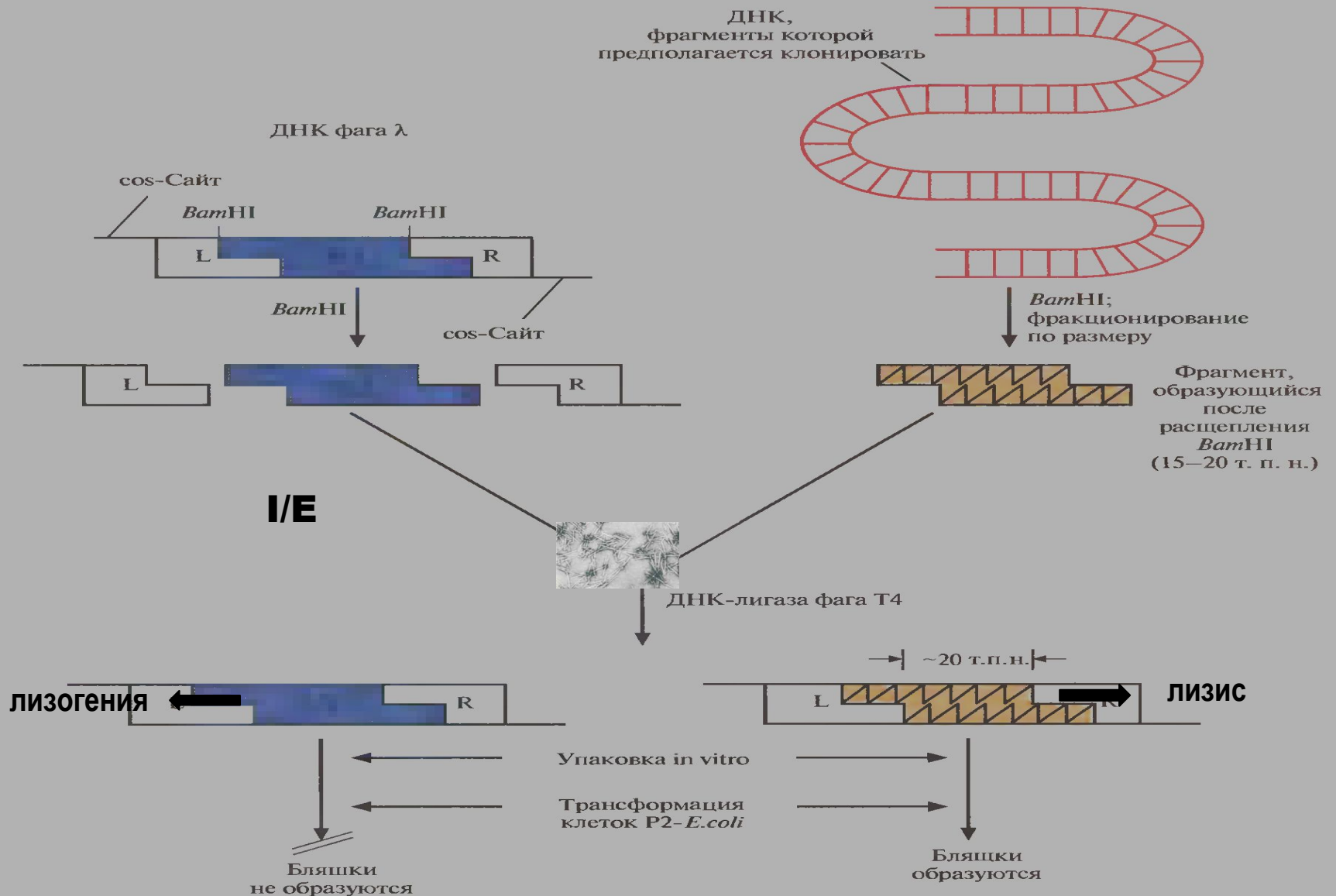


ЭВРИКА !!!

идея:

- заменить часть фаговой ДНК, которая **несущественна для размножения фага (I/E)** фрагментом донорной ДНК, кодирующей синтез полезных БАВ.
 - Условие: донорная ДНК должна иметь размер, эквивалентный размеру исключенного участка ДНК, т.е. 20 тпн.

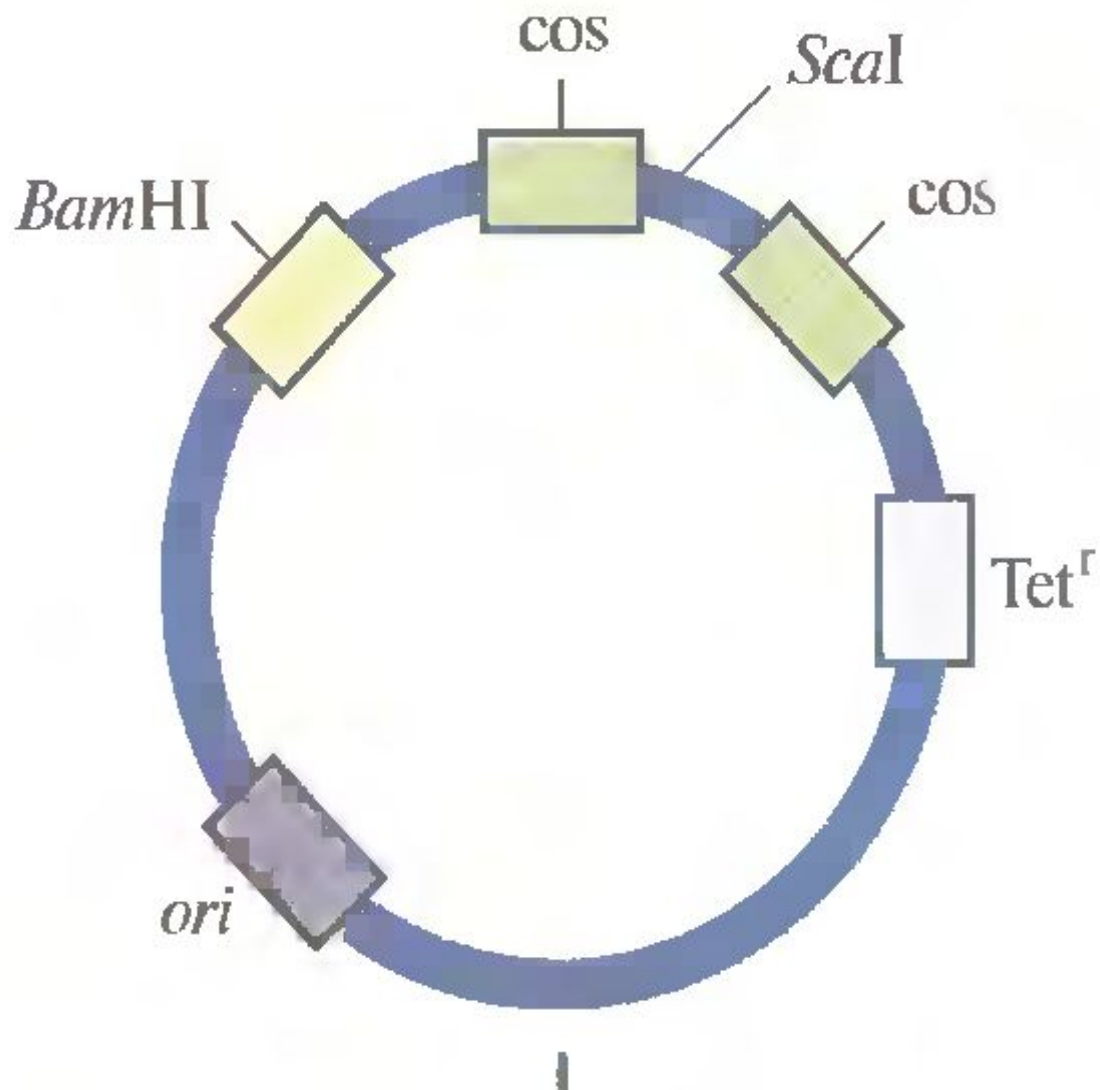
ТЕХНОЛОГИЯ РЕКОМБИНАЦИИ ДНК С ПРИМЕНЕНИЕМ ВЕКТОРА НА ОСНОВЕ БАКТЕРИОФАГА λ



НА ПРАКТИКЕ:

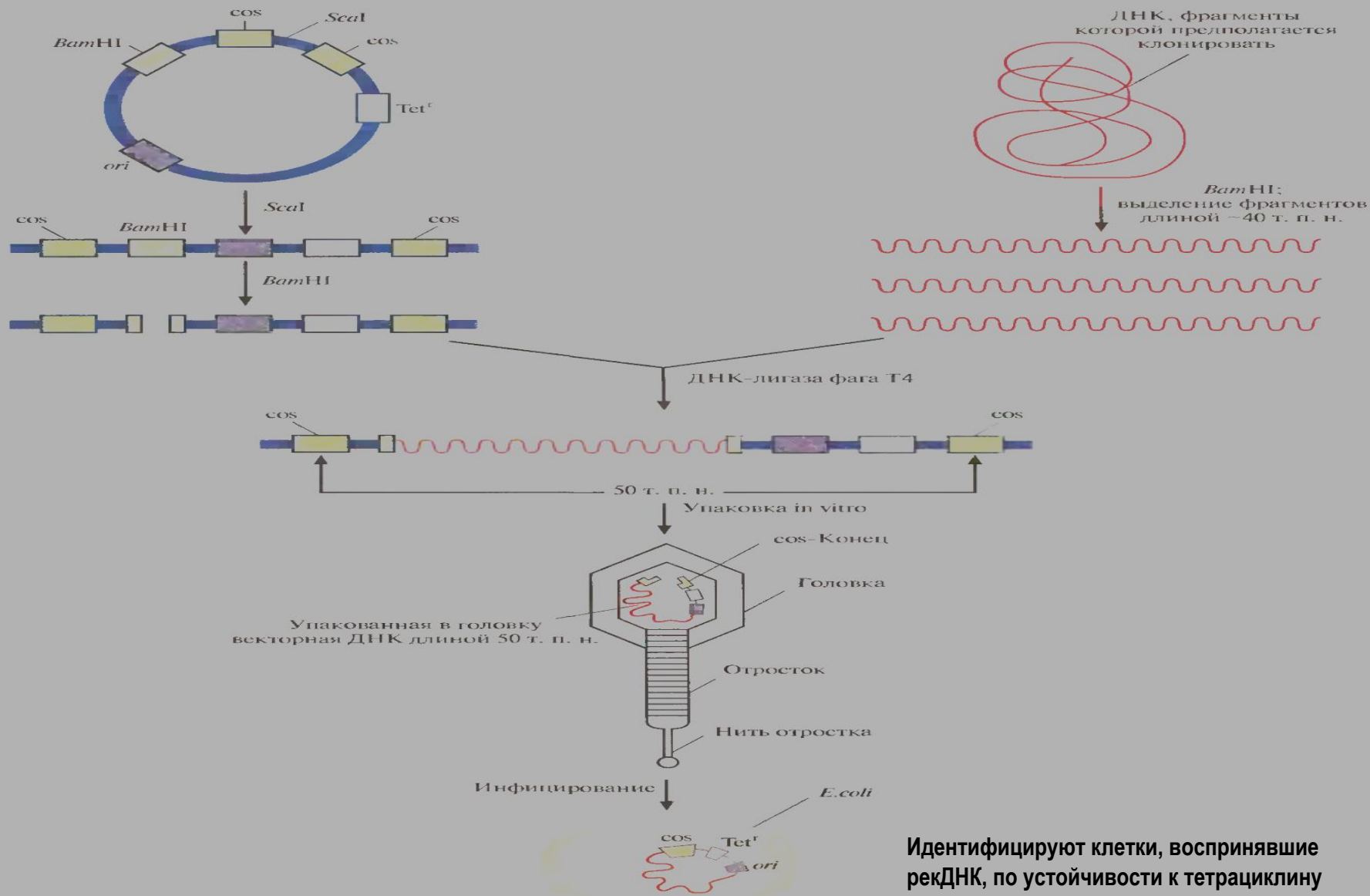
- к суспензии подготовленных бактерий добавляется ДНК фага
- осуществляется посев суспензии на чашку Петри с плотной питательной средой на основе агара.
- Инкубация
- Клетки, **не** содержащие ДНК фага, размножаются на агаре и дают мутный "газон", заполняющий всю поверхность чашки.
- В тех точках, куда попали бактерии с ДНК фага, остаются прозрачные просветы - **бляшки (негативные колонии)**.
 - Образование бляшек связано с тем, что ДНК фага реплицируется в клетке и дает зрелые фаговые частицы. Затем фаговые частицы попадают в среду, заражают окружающие клетки и разрушают их. В результате каждая бляшка состоит из потомков фагов, содержащих одну и ту же ДНК - копию ДНК, попавшей в клетку.
- Негативные колонии, образованные **«рекомбинантными» фагами**, идентифицируют и выделяют с помощью методов иммунологического скрининга, радиоавтографии и др. (см. ниже)

КОСМИДНЫЕ ВЕКТОРЫ - ПЛАЗМИДЫ, ИМЕЮЩИЕ **COS**-КОНЦЫ



ТЕХНОЛОГИЯ РЕКОМБИНАЦИИ ДНК С ПРИМЕНЕНИЕМ КОСМИДНОГО

ВЕКТОРА



Идентифицируют клетки, воспринявшие рекДНК, по устойчивости к тетрациклину