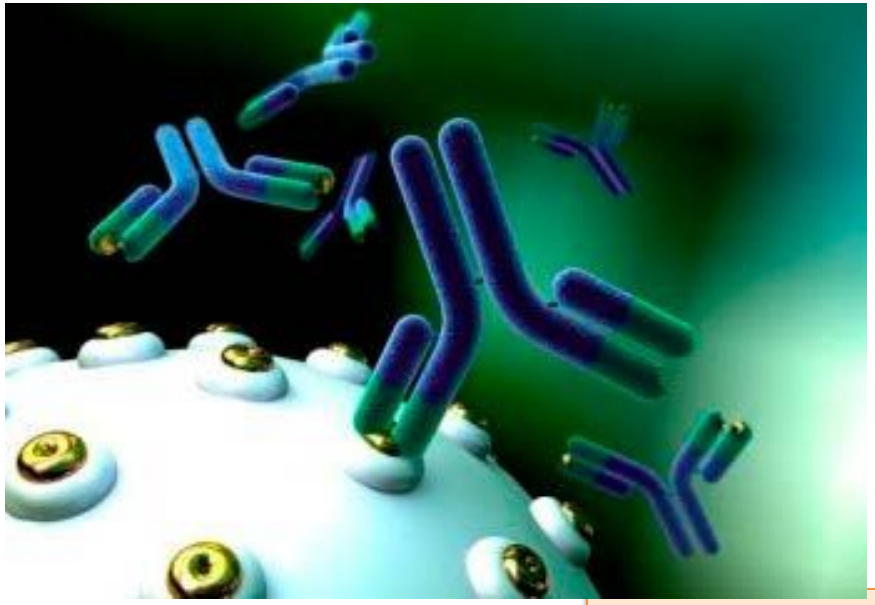
Казахский национальный университет им. аль-Фараби
Факультет биологии и биотехнологии
Кафедра молекулярной биологии и генетики

СРС №1.Тема 2. «Скрининг библиотеки геномной ДНК.»



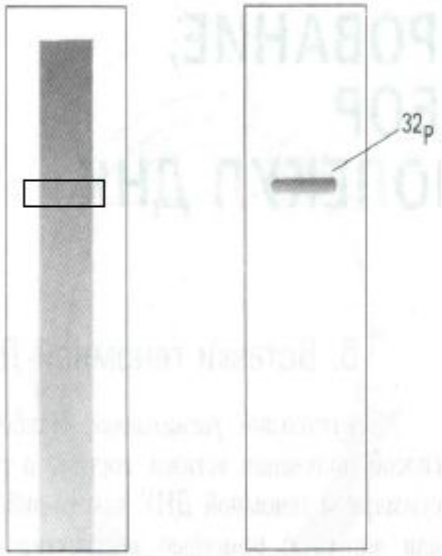
Выполнили: МХБТ 16-01К
Проверила: Токубаева А.

Содержание:

- Что такое «библиотека генов?»
- Этапы создания геномов библиотек
- Скрининг геномных библиотек
- Банк генов
- Способы получения фрагментов ДНК, на основе примеров.
- Амплификация библиотек (геномной)
- Список литературы

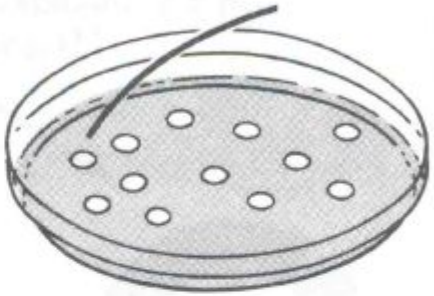
Библиотеки генов

Электрофорез в агарозном геле

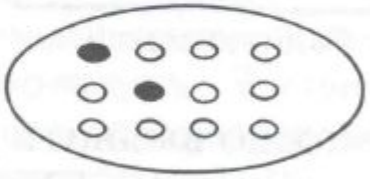


Прокрашивание бромистым этидием

Блот-гибридизация ДНК

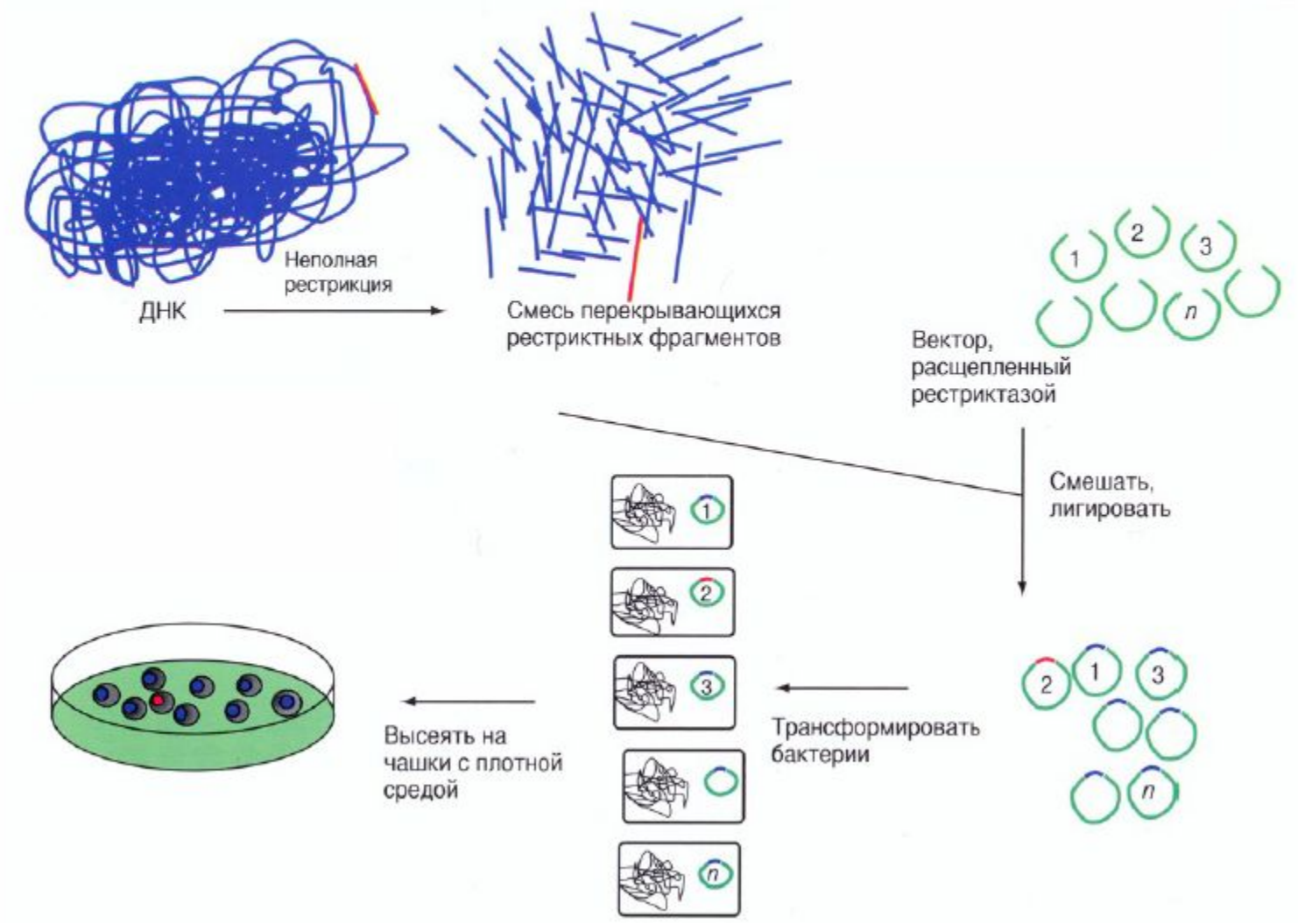


Гибридизация колоний

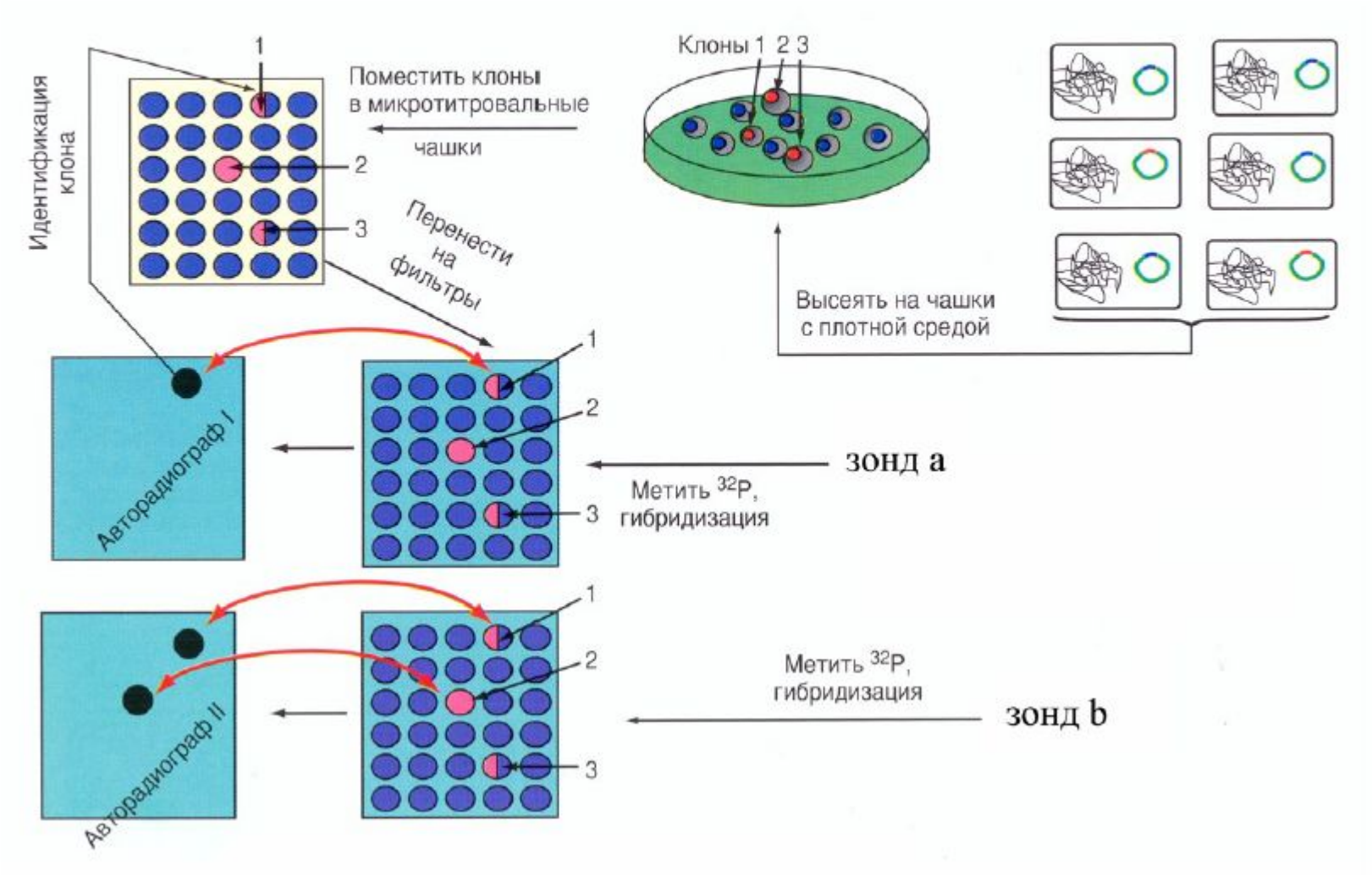


Чтобы решить задачу поиска индивидуального гена какого-либо организма, надо проанализировать очень большое количество рекомбинантов, которые в совокупности содержат полную (или почти полную) коллекцию всех последовательностей ДНК данного организма. Такая коллекция называется **библиотекой генов**.

Этапы создания геномных библиотек



Скрининг геномных библиотек



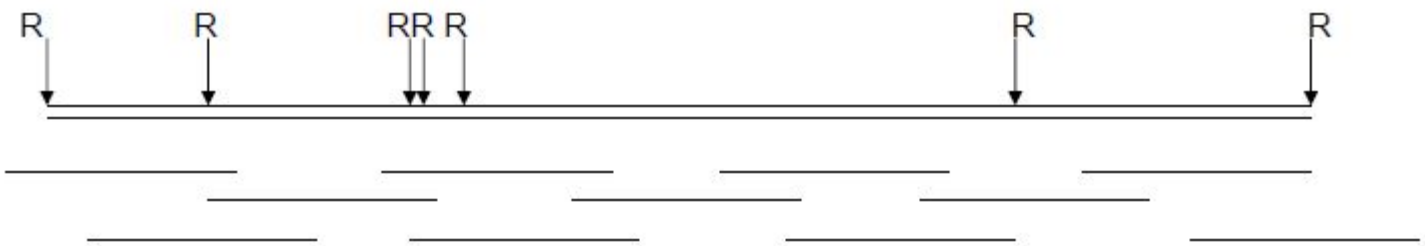
БАНК ГЕНОВ (библиотека генов)

- набор фрагментов ДНК, в котором представлены все гены организма.
-
- Банк генов представляет собой культуру микроорганизмов (бактерии, дрожжи), в каждую клетку которых введена векторная ДНК, несущая один из фрагментов этого набора.
- Банк генов можно длительно хранить в замороженном состоянии и при необходимости выделять отдельные микроорганизмы, содержащие фрагменты ДНК с нужными генами, и размножать их.

Способ получения фрагментов ДНК – случайное статистическое расщепление

Sau3A - *256*
EcoRI - *4096*
NotI - *65336*

DMD - $2x10^6$ bp,
79 экзонов,
кДНК – 14 000 bp.



(нет систематического исключения какой-либо последовательности)

<u>Способы получения перекрывающихся фрагментов ДНК:</u>

- механический (ультразвук);

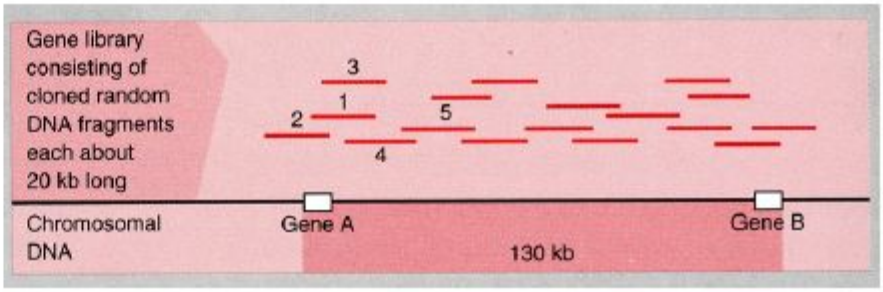
- частичный гидролиз двумя рестриктазами с участком узнавания 4 нукл.;

- удобное упрощение – использовать частичный гидролиз одной рестриктазой (*Sau3A*).

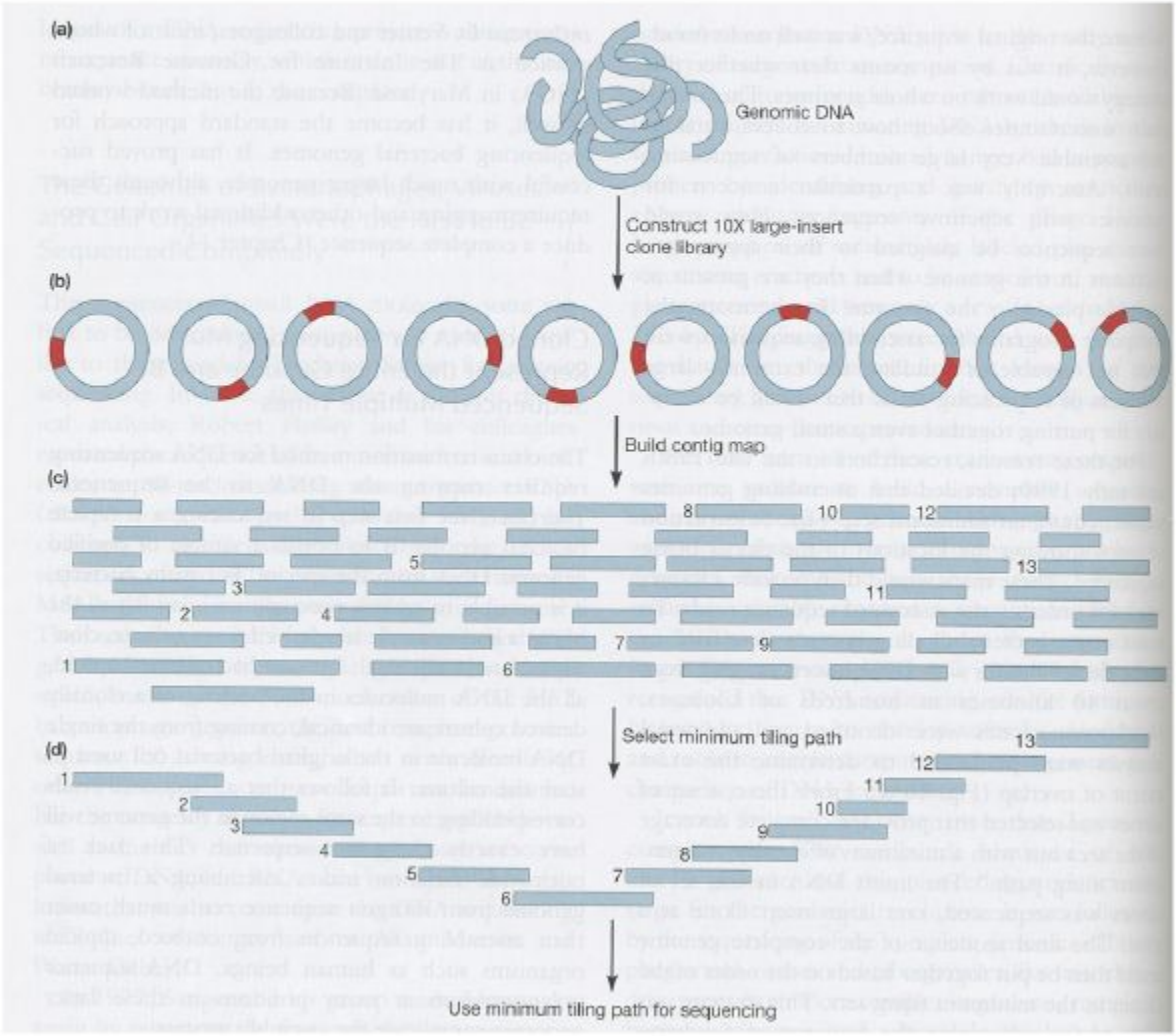
Перекрывающиеся клоны

↓

прогулка по хромосоме



An overlapping clone map



Сколько клонов нужно анализировать?

Организм	ДНК	N_{20}	N_{45}	N_{300}	N_{1000}
Бактерии	4.2×10^6	920	430		
Дрожжи	1.4×10^7	3 200	1 400		
Дрозофила	1.4×10^8	32 000	14 000		
Человек	3.3×10^9	760 000	340 000	46 000	15 000
Пшеница	1.7×10^{10}	3 900 000	1 700 000		

P=99%

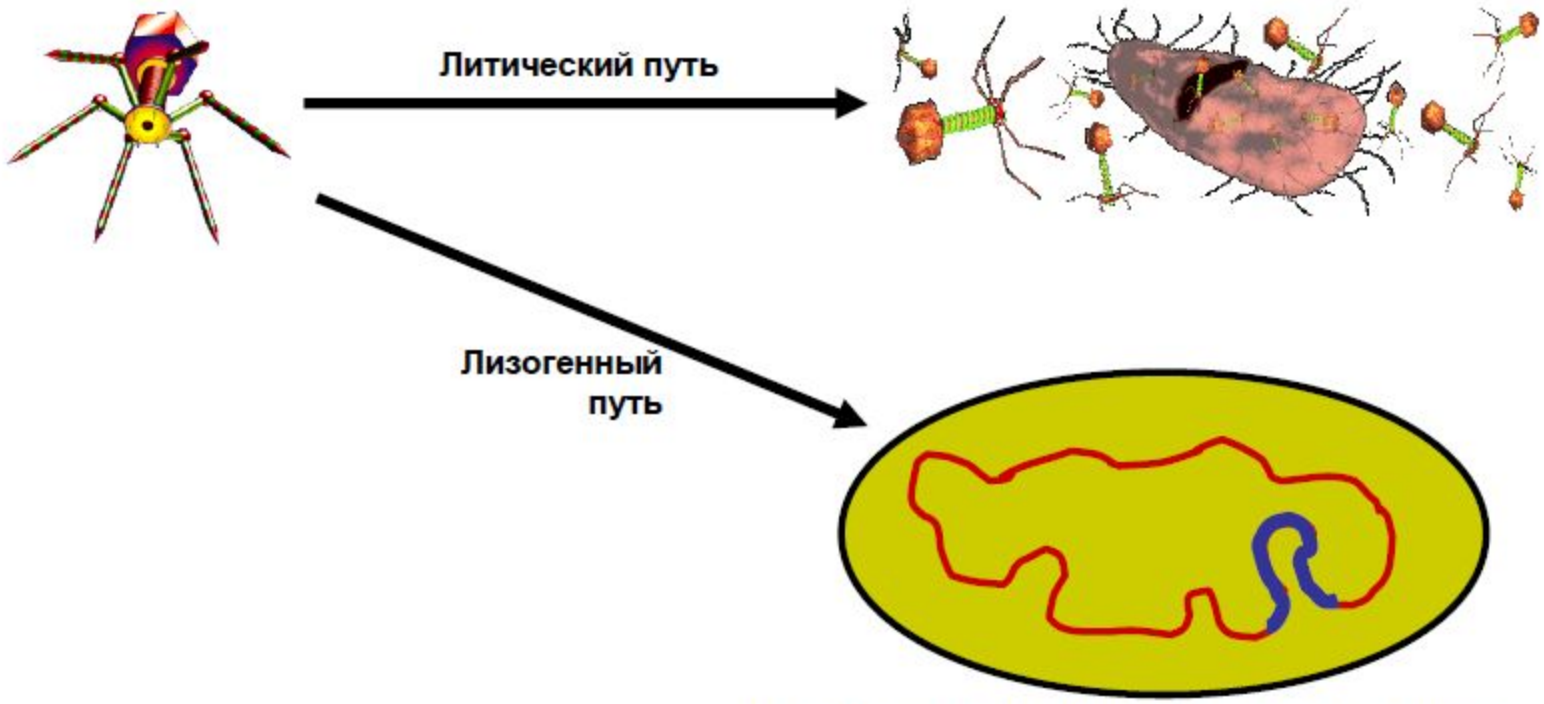
$$N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln(1 - l / L)}$$

P – вероятность включения любой последовательности ДНК в статистическую библиотеку из
N - независимых клонов;
L – длина генома;
l - средняя длина фрагмента.

Векторы для библиотек:

1. Плазмиды;
2. Бактериофаг лямбда;
3. Космиды;
4. YAC'и;
5. BAC'и;
6. PAC'и.

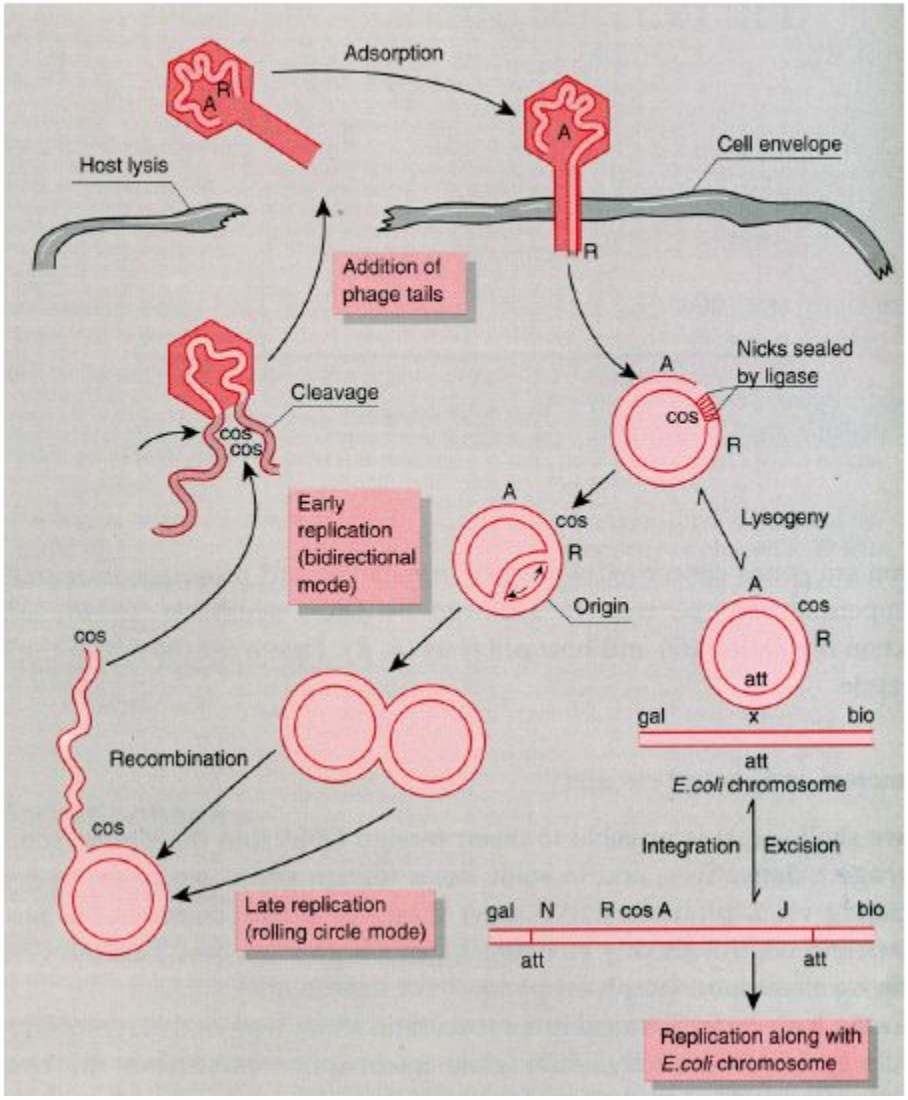
Лизогенный и литический пути развития фага



Встраивание ДНК фага в геном бактерии и дальнейшее существование в форме профага

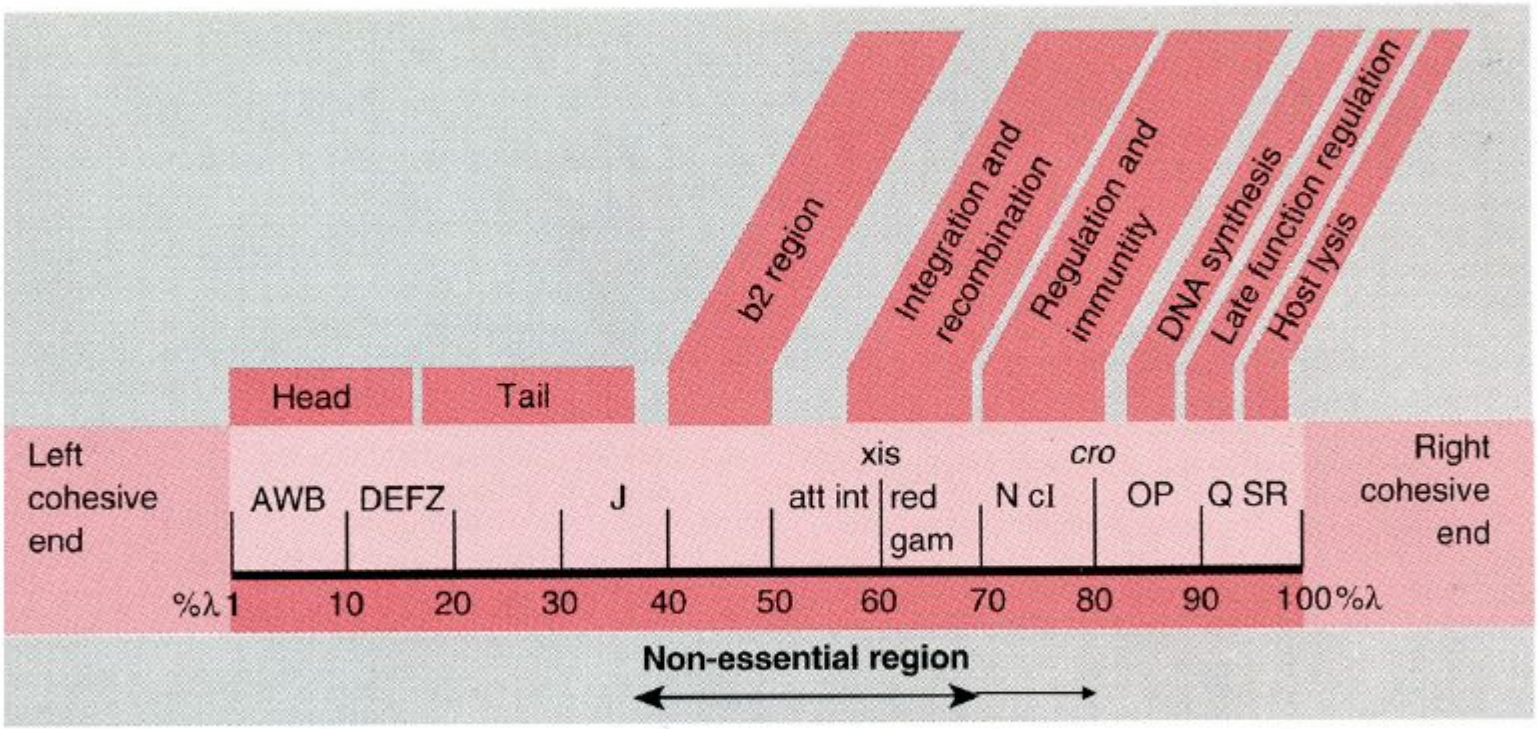
Жизненный цикл фага лямбда

Литический путь



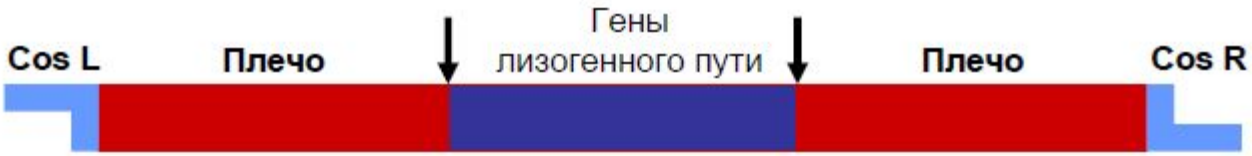
Лизогенное состояние

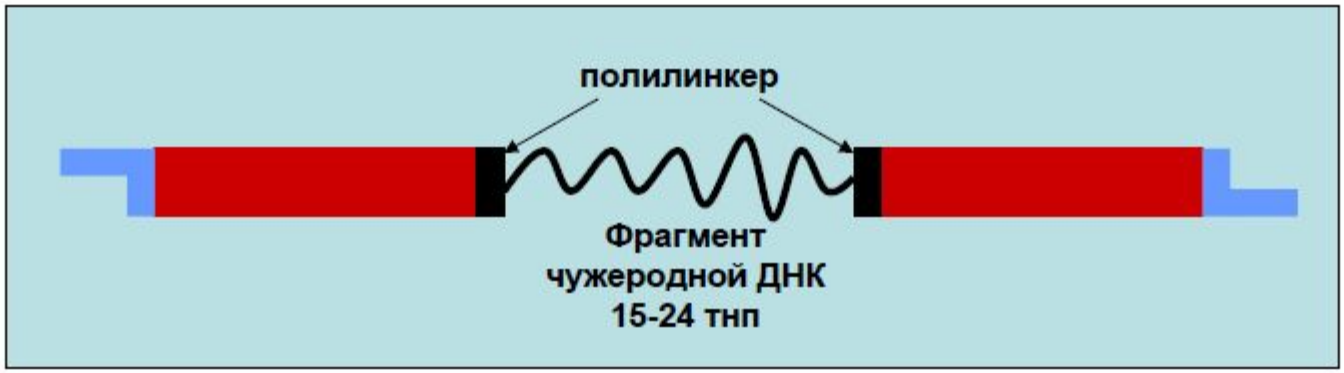
Бактериофаг лямбда

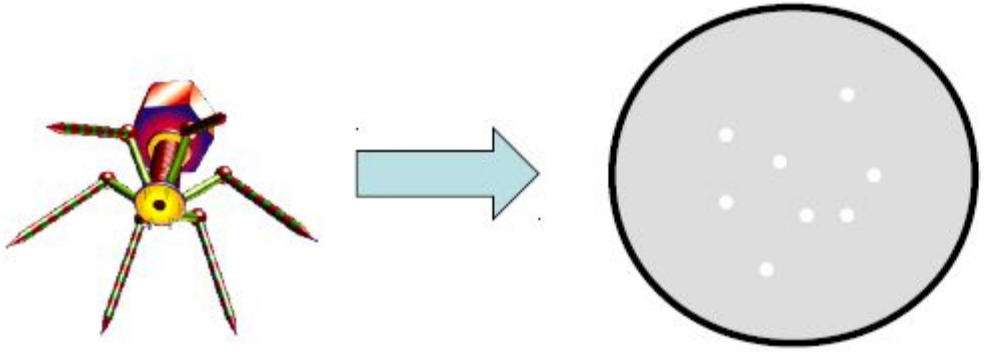


Геном фага лямбда - 48.5 kb;
Не существенный район – 40% (20 kb);
Упаковывается ДНК от 38 до 52 kb;
Емкость вектора замещения – от 9 до 23 kb, инсерционного вектора – 3-4 kb.

Конструирование вектора замещения





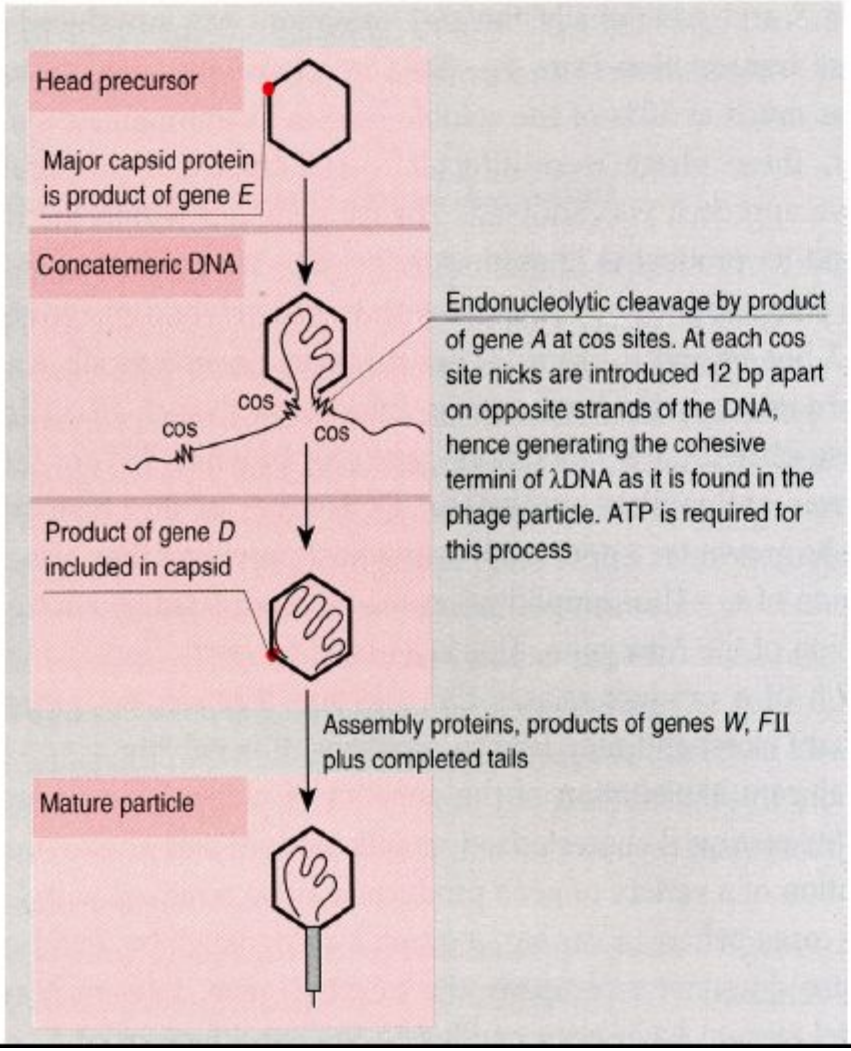


ПРЕИМУЩЕСТВА

Протяженные вставки
Удобное введение в клетки
Амплификация

Упаковка фаговых частиц *in vivo*

Трансфекция – 10^3 – 10^4 бляшек на мкг вектора; инфекция – 10^6 бляшек на мкг вектора.



Капсидный белок – продукт гена E

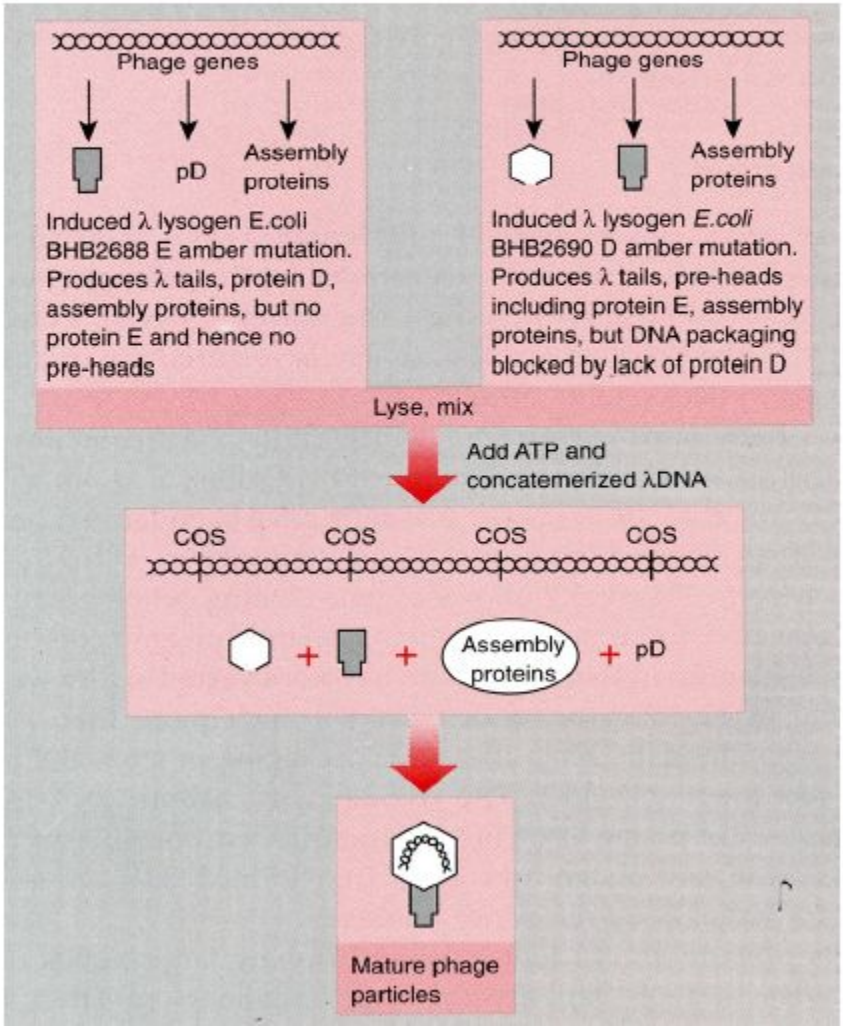
Эндонуклеаза – продукт гена A

Продукт гена D включается в капсид

Белки сборки – продукты генов W,FII…

tails

Упаковка фаговых частиц in vitro

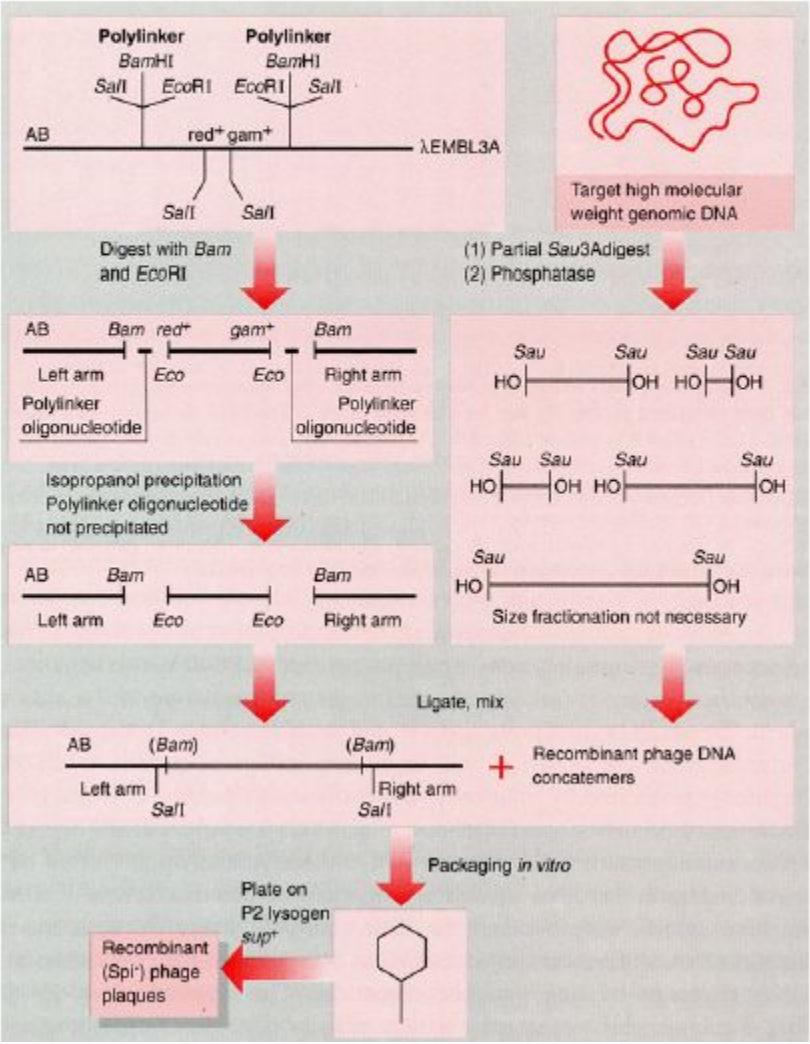


1. D, A, tails, белки сборки; мутантный E;

2. E,A, tails, белки сборки; мутантный D;

Смесь: D, E, A, tails, белки сборки;

Создание библиотеки генов на основе λ вектора EMBL3A



Левое и правое плечи при лигировании без центрального района не упаковываются;

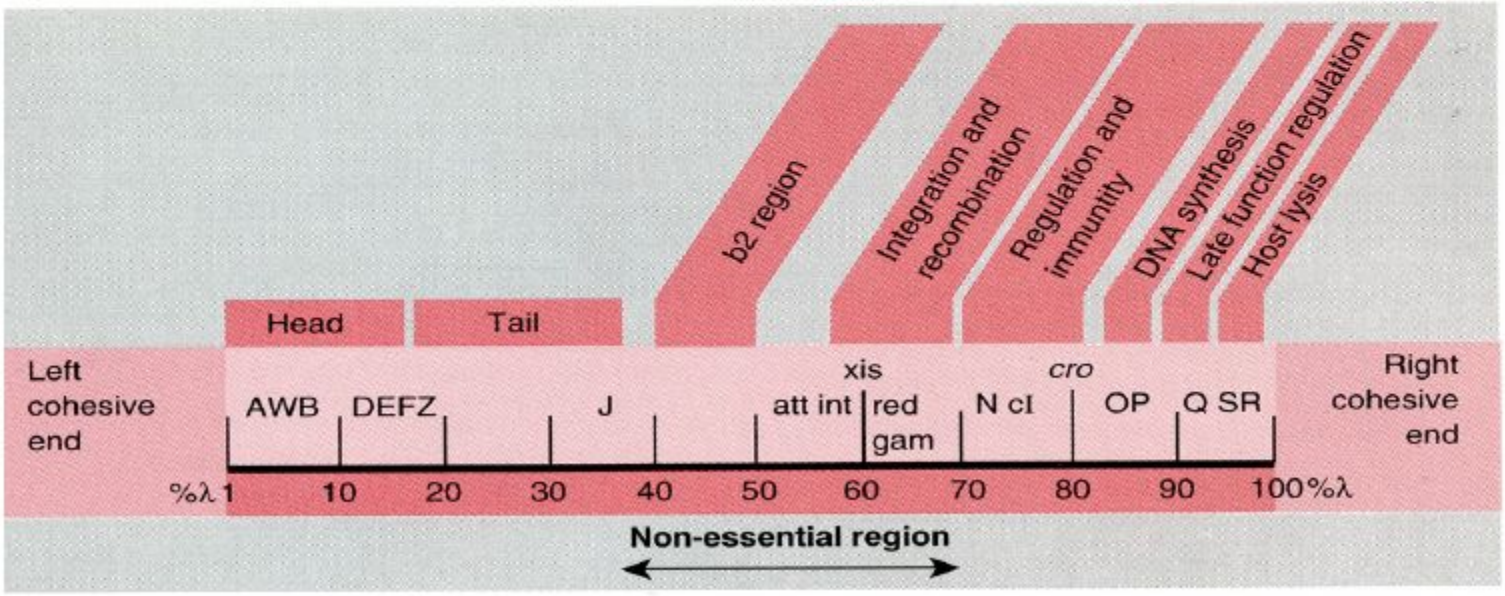
центральный район не лигируется с плечами;

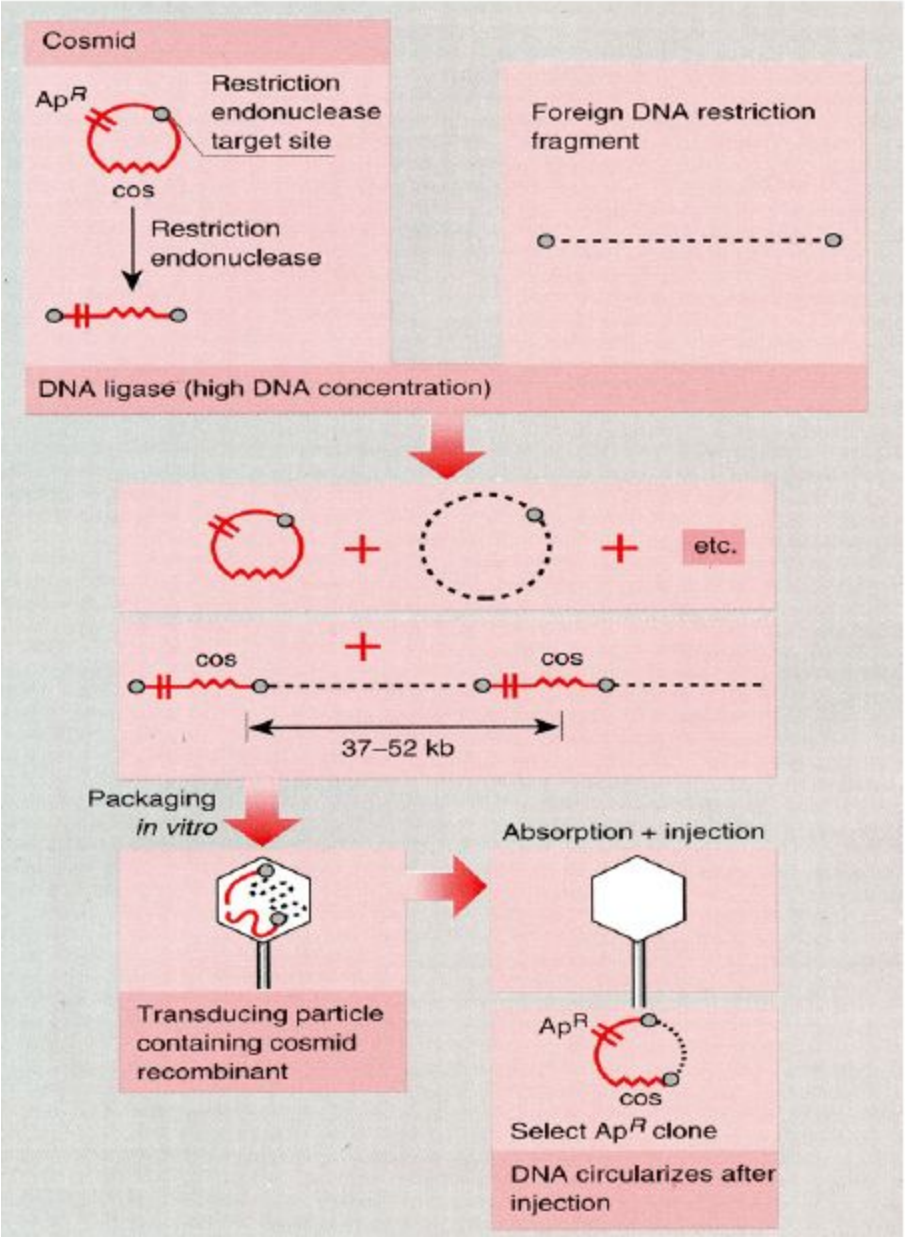
лигирование двух и более ставок не происходит вследствие дефосфорилирования;

можно вставки дополнительно фракционировать по размеру.

Генетическая селекция рекомбинантов

- *Spi+* (sensitive to P2 inhibition)
- фаги не могут размножаться на *E.coli,* лизо-
- генных по фагу P2 (ответственны гены *red* и
- *gam)*. Рекомбинанты, у которых удален
- центральный фрагмент, позитивно селекти-
- руют на P2 лизогенных штаммах *E.coli* .





Космиды

Космиды – плазмидные векторы, в которые встроен участок генома фага λ (Cos-сайт), обеспечивающий упаковку этой молекулы ДНК в фаговую частицу.

Репликация – плазмидного типа;

упаковка конкатемерной ДНК *in vitro;*

эффективность инфекции 10^4 - 5 x 10^5 колоний на микрограмм;

емкость вектора 45 kb.

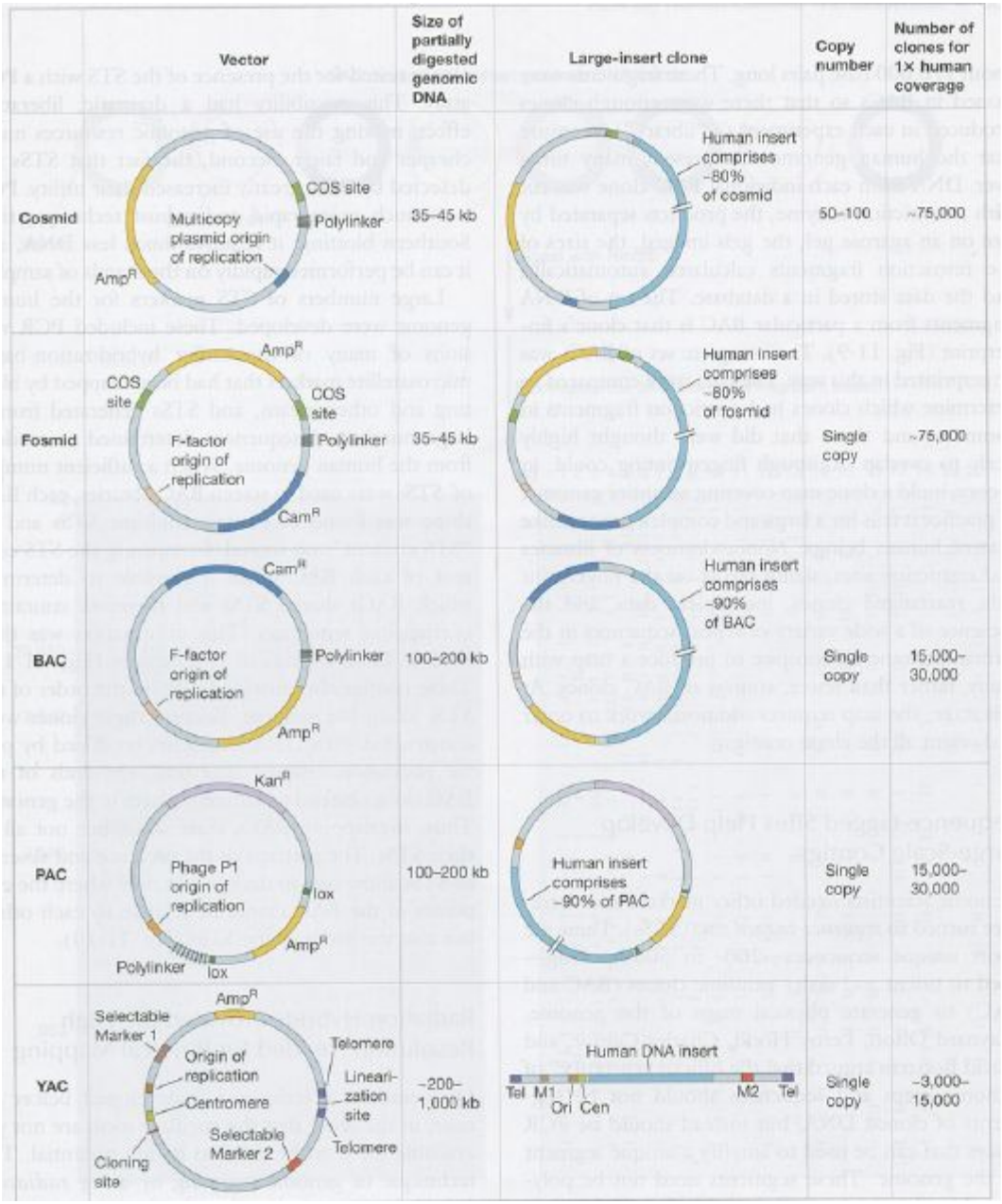
Cos – сегмент содержит cos-сайты и последовательности, необходимые для связывания терминазы.

Недостатки:

1. Скринировать фаговые бляшки легче, чем бактериальные колонии;
2. Фаги легче хранить и амплифицировать.

Амплификация библиотек

- 1. Начинать с более, чем полной библиотеки;
- 2. Рост при низкой плотности бляшек (колоний), иначе возможна рекомбинация;
- 3. Не амплифицировать второй раз;
- 4. Не амплифицировать в жидкой среде;
- 5. Лучше сделать новую библиотеку, чем использовать амплифицированную



Системы для клонирования больших вставок

Вектор	емкость (kb)
Космида	35-45
BAC	100-300
PAC	100
YAC	100-1000

BAC - bacterial artificial chromosome

На основе полового фактора F *E.coli;*

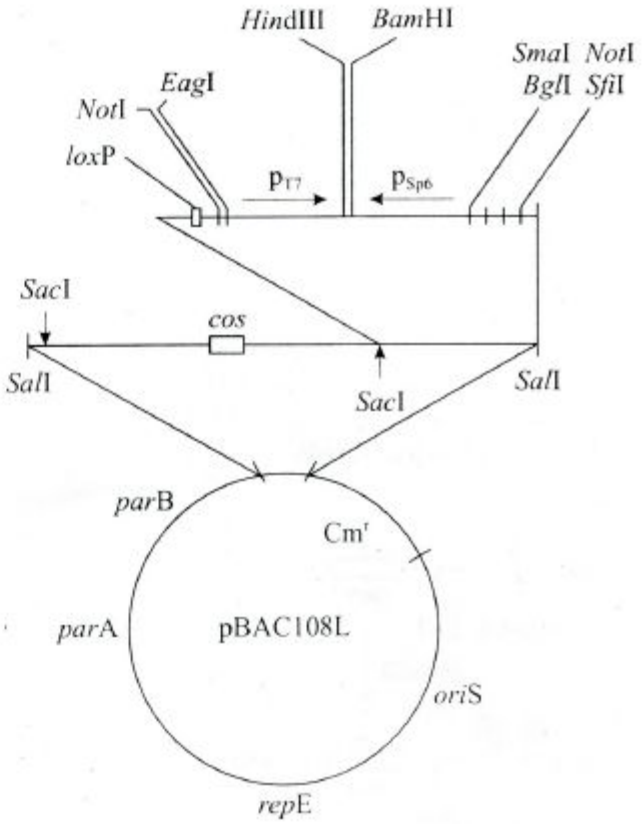
Регуляторные локусы:
- ***oriS, repE*** *(*обуславливает однонаправленную репликацию *фактора F с oriS)*;

-***parA, parB*** *(*правильное распределение фактора F между делящимися клетками и поддержание копийности на уровне 1-2 молекул на клетку);

-По сайту ***loxP*** ДНК может быть расщеплена рекомбиназой Cre фага P1, по сайту ***cos*** – эндонуклеазой фага лямбда (для последующего мечения и рестрикционного картирования вставки).

P_{T7} и **P_{SP6}** – синтез РНК-зондов для «прогулки по хромосоме».

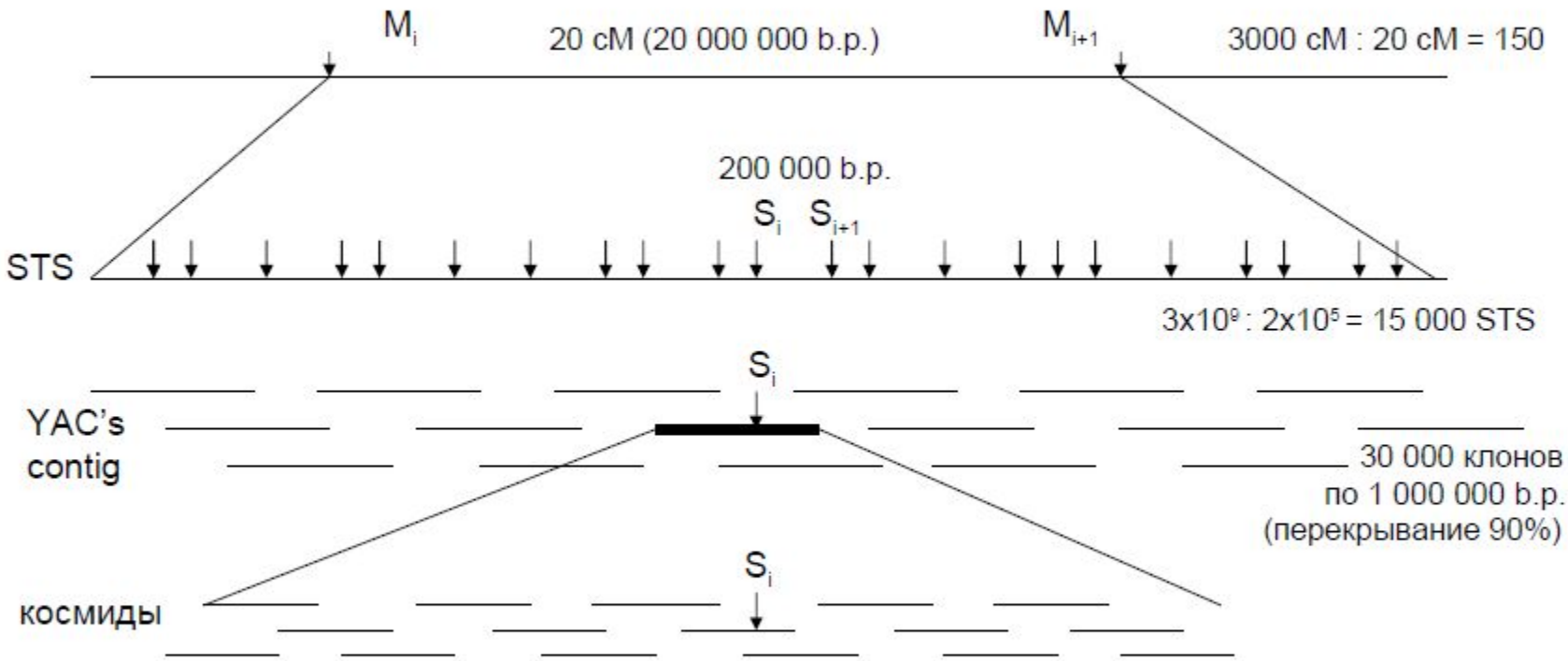
ДНК человека: - частичный гидролиз *HindIII (100-300 кв);*
- фракционирование пульс-электрофорезом;
- лигирование с расщепленным *HindIII* и дефосфорилированным вектором;
- электропорация;
- отбор по устойчивости к хлорамфениколу



Карта векторной плазмиды pBAC108L

Структурная стабильность протяженных вставок в BAC-системе существенно выше, чем в YAC-системе

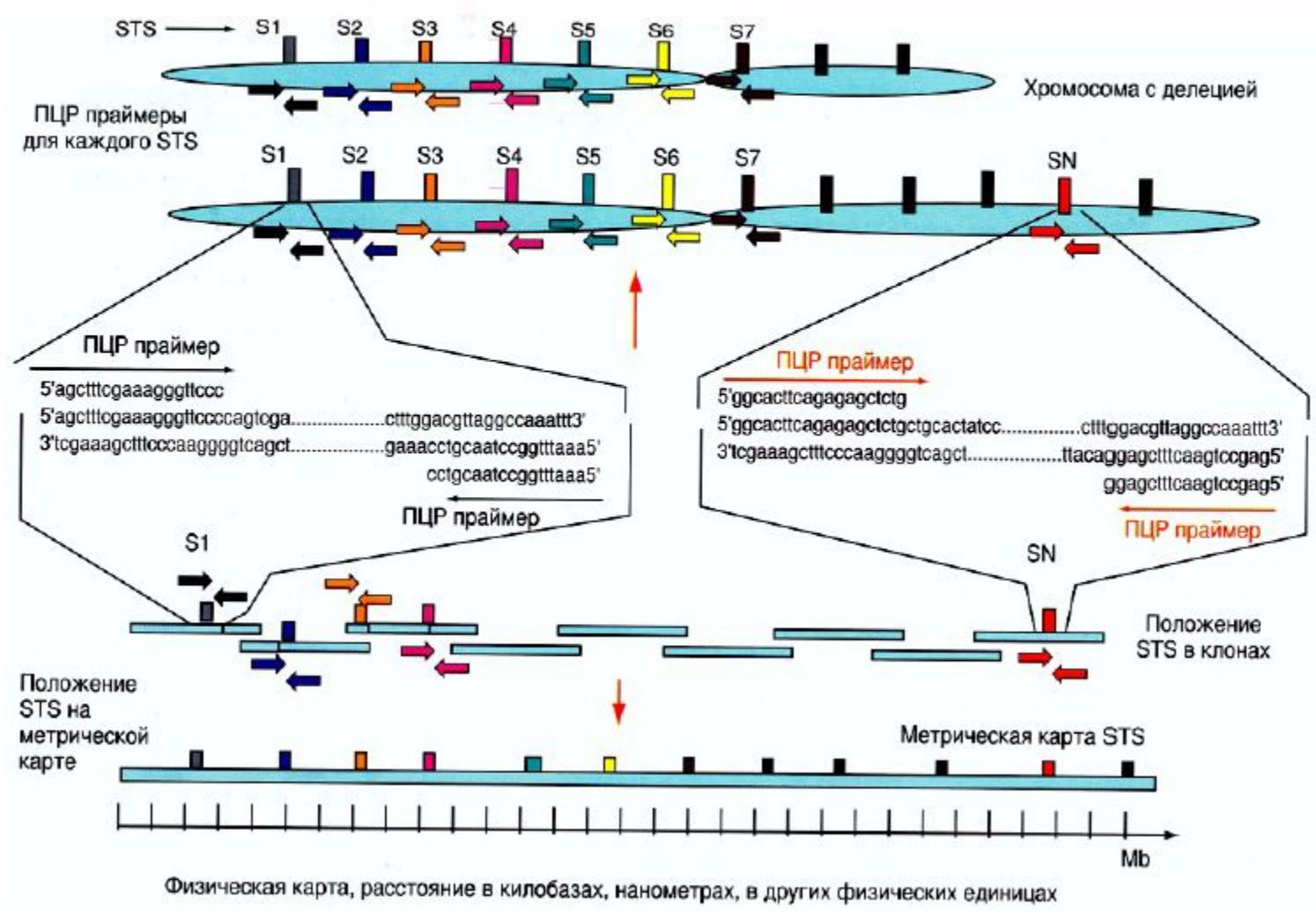
Интеграция генетической и физической карты генома человека



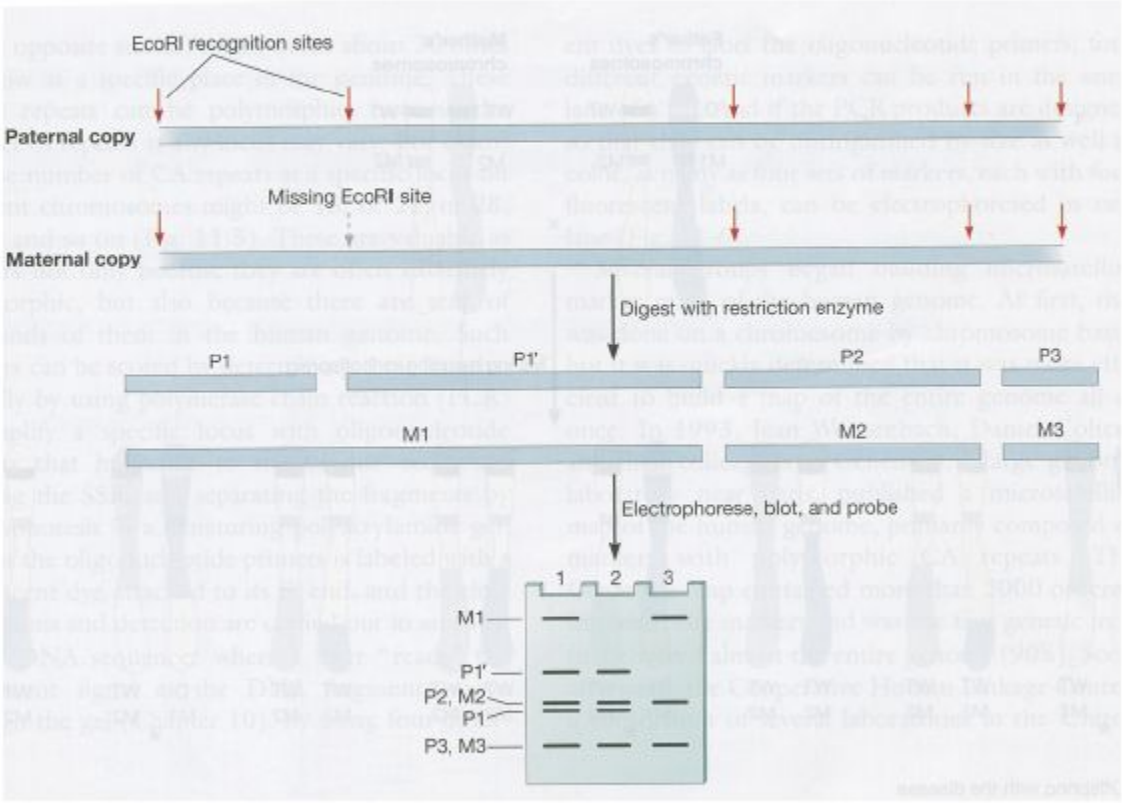
M – фенотипический маркер (полиморфный ген);

STS – sequence tagged site (пара праймеров, которая позволяет амплифицировать уникальный фрагмент генома)

Принцип картирования с помощью STS



Restriction site fingerprinting

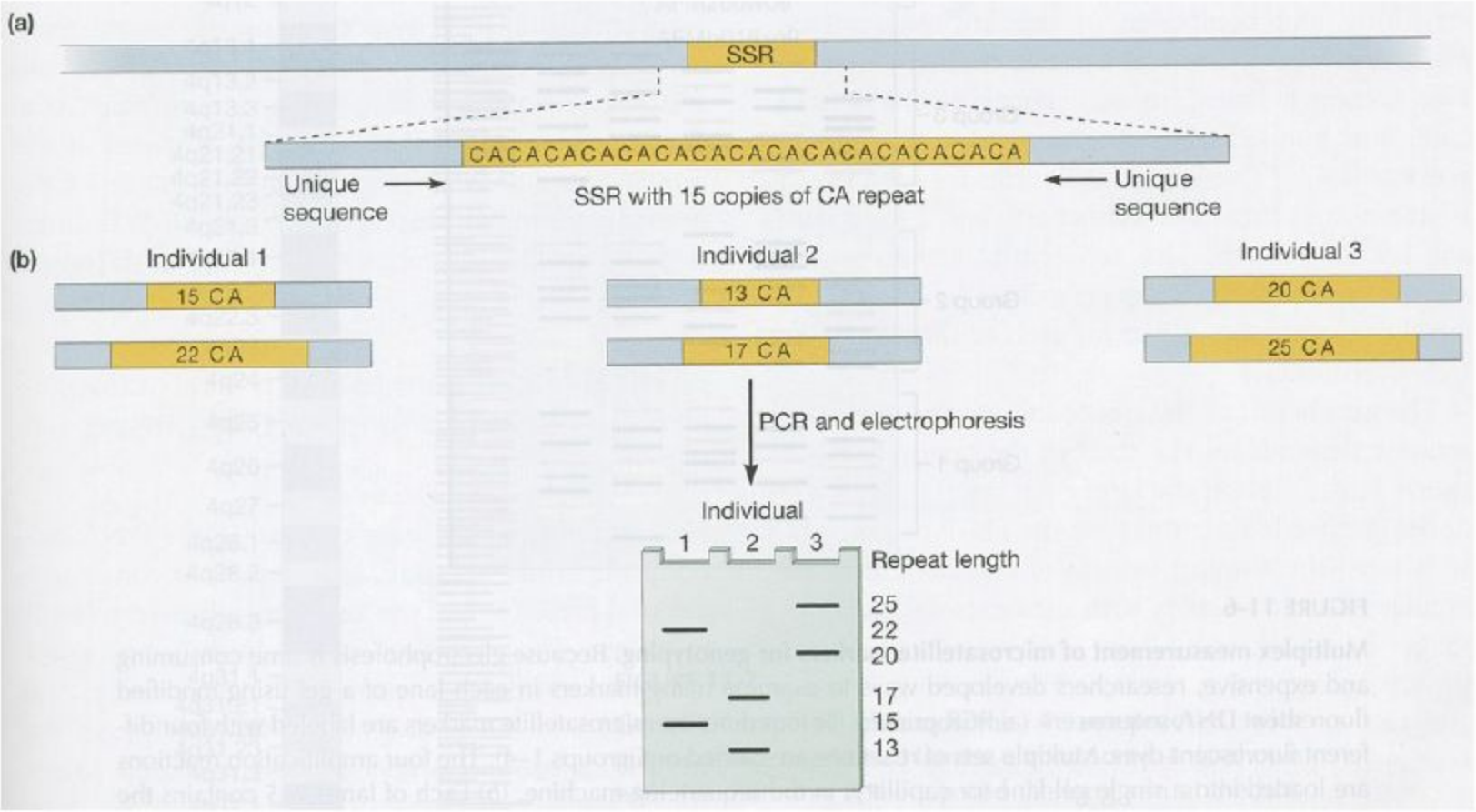


ДНК каждого индивидуального BAC-клона обрабатывали рестриктазой (*Eco*RI или *Hind*III, например),
продукты фракционировали электрофорезом, создавали базы данных длин рестриктных фрагментов (фингерпринт BAC–клона).

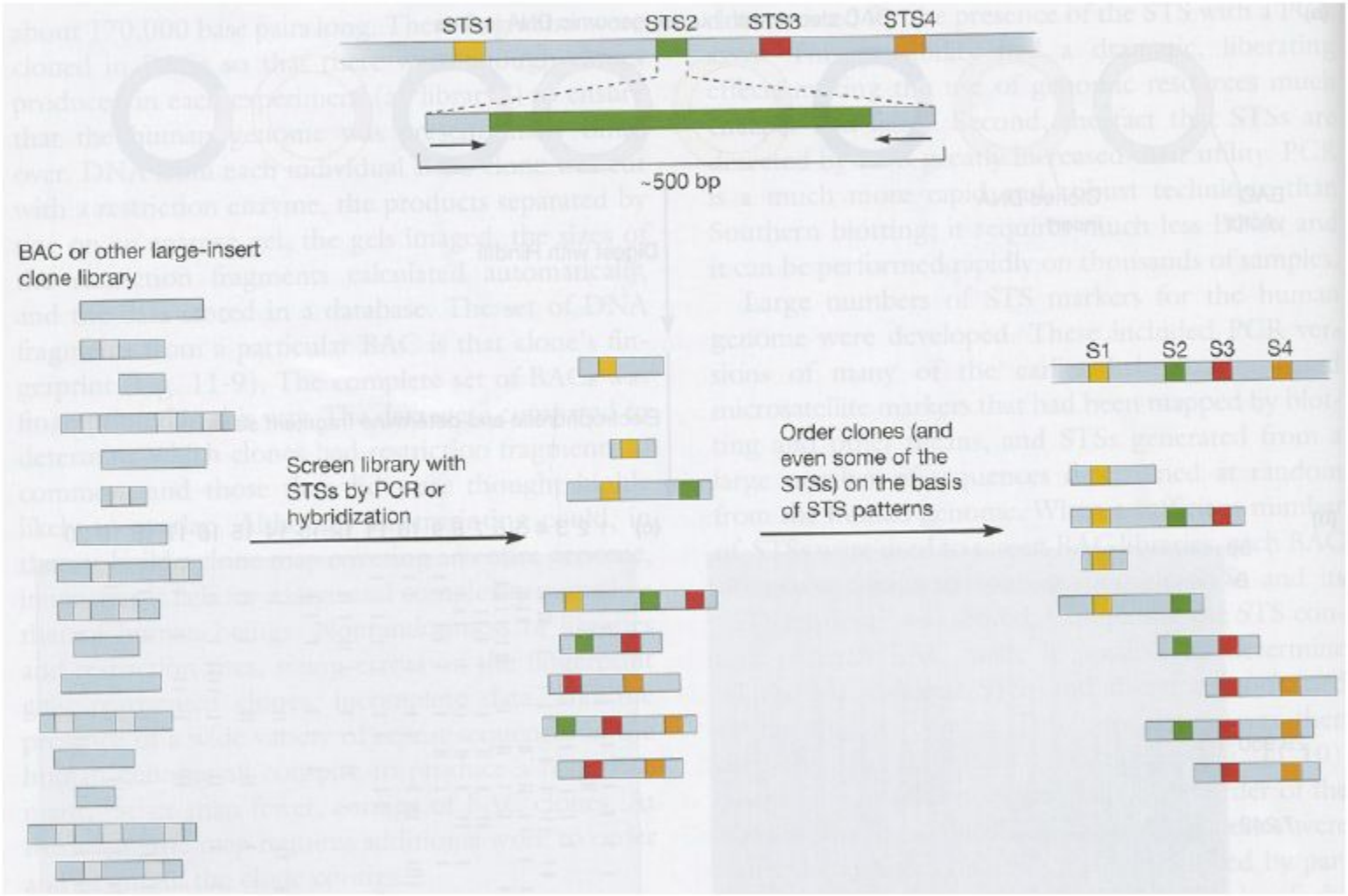
Общие рестриктные фрагменты – перекрывание BAC-клонов – попытка создания физической карты генома.

Но создать полный контиг BAC-клонов человеческого генома этим способом не удалось.

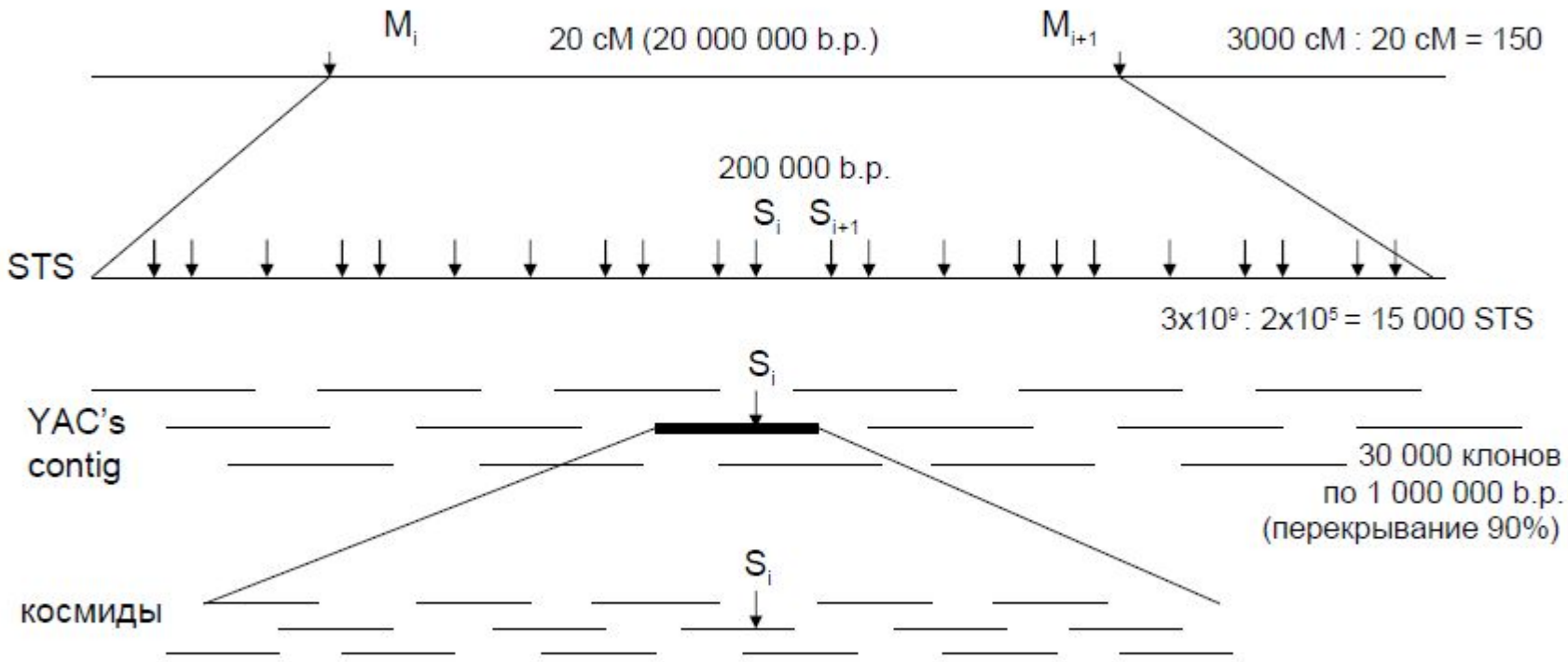
Использование микросателитов в качестве генетических маркеров



STS - картирование



Интеграция генетической и физической карты генома человека



M – фенотипический маркер (полиморфный ген);
STS – sequence tagged site (пара праймеров, которая позволяет амплифицировать уникальный фрагмент генома)

Список литературы:

- https://ru.wikipedia.org/wiki
- Бобкова А.Ф., Чирков С.Н. 1983. Применение иммуноферментного анализа для диагностики вирусных заболеваний растений. Сельскохоз. биол., № 5, 32 — 36.
- Гнутова Р.В. 1993. Серология и иммунохимия вирусов растений. М.: Наука. — 301 с.