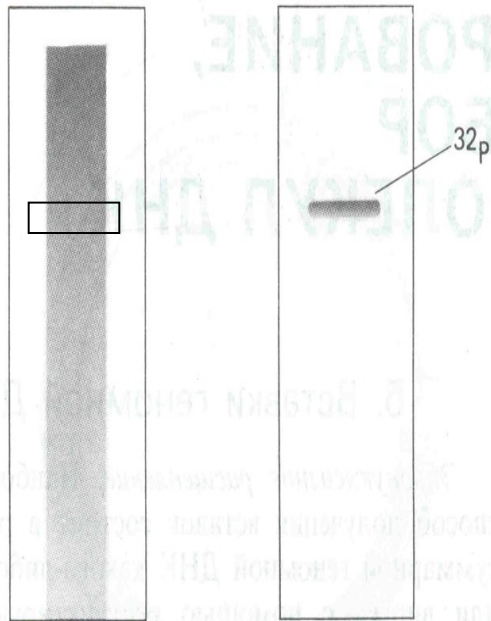


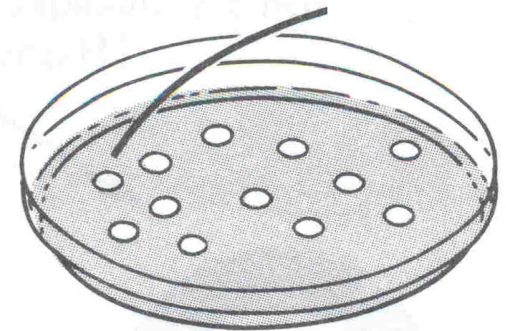
# Библиотеки генов

Электрофорез в агарозном геле

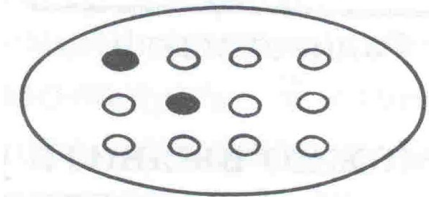


Прокрашивание  
бромистым этидием

Блот-гибридизация  
ДНК

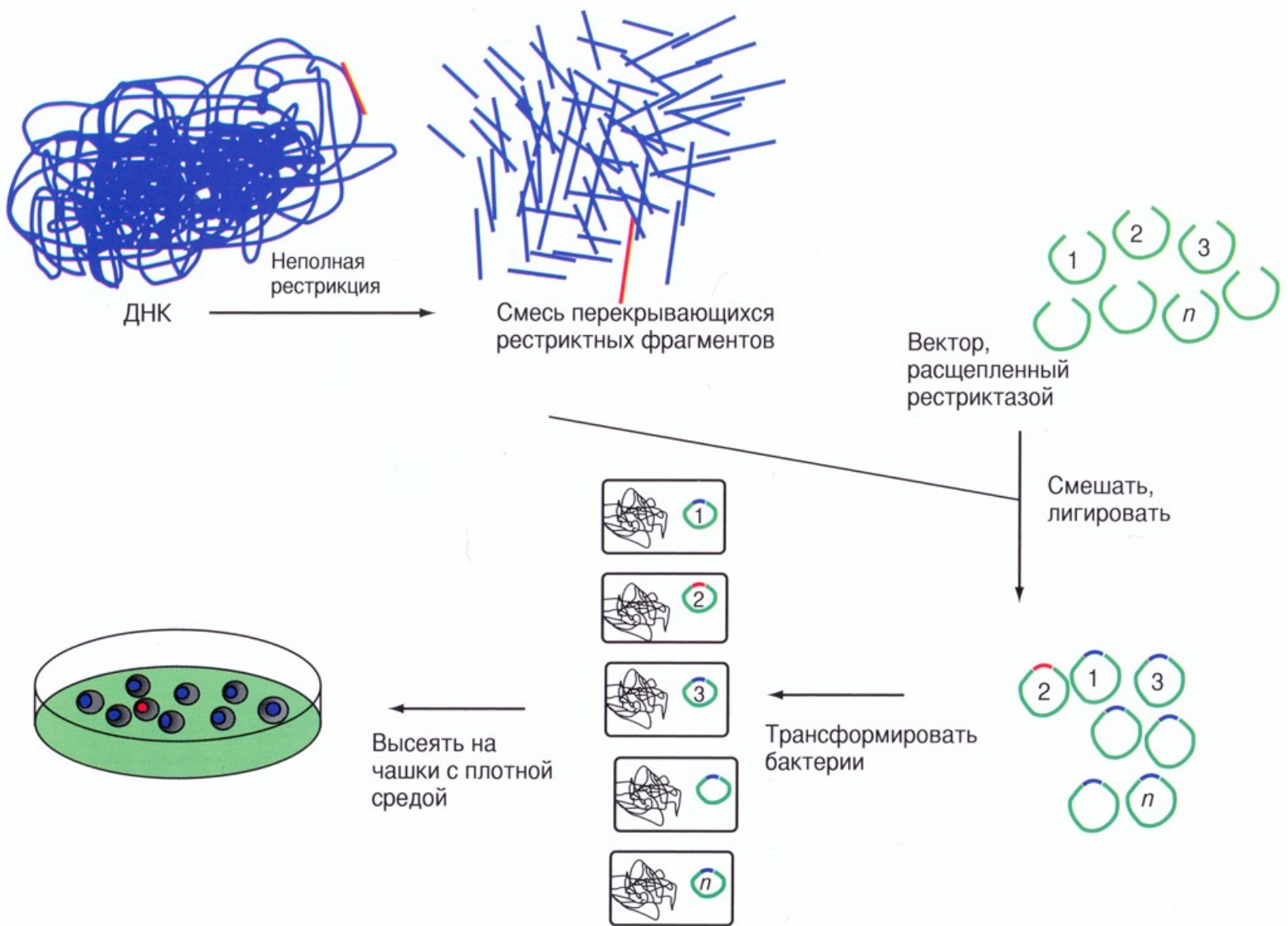


Гибридизация колоний

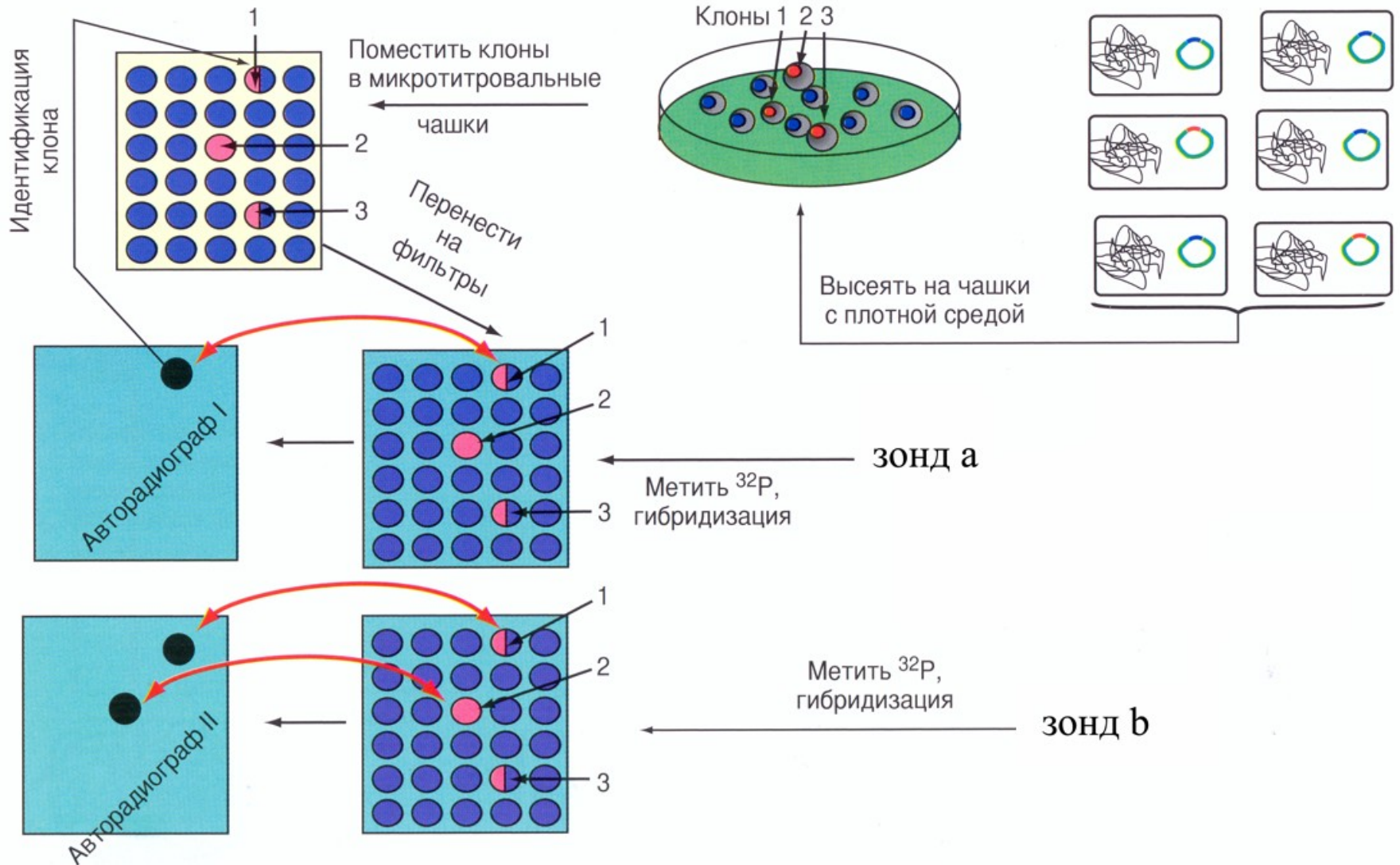


Чтобы решить задачу поиска индивидуального гена какого-либо организма, надо проанализировать очень большое количество рекомбинантов, которые в совокупности содержат полную (или почти полную) коллекцию всех последовательностей ДНК данного организма. Такая коллекция называется **библиотекой генов**.

# Этапы создания геномных библиотек



# Скрининг геномных библиотек



# БАНК ГЕНОВ

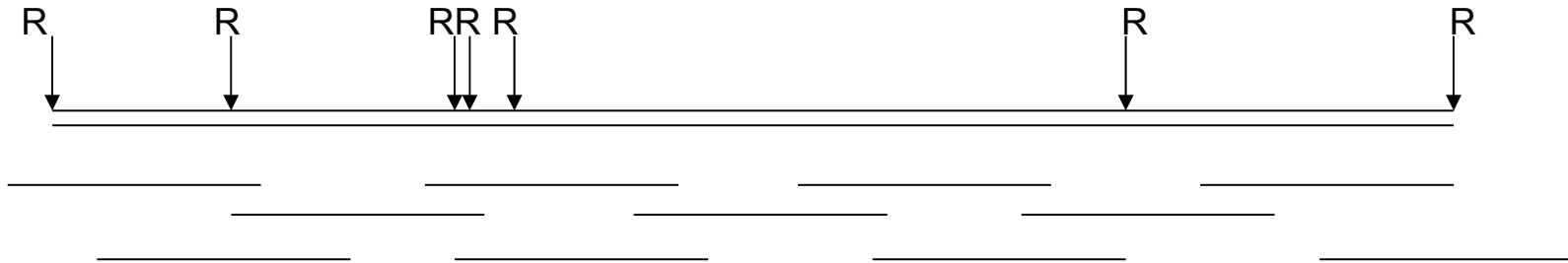
## (библиотека генов)

- 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 размножить их.

# Способ получения фрагментов ДНК – случайное статистическое расщепление

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

*DMD* -  $2 \times 10^6$  bp,  
79 экзонов,  
кДНК – 14 000 bp.



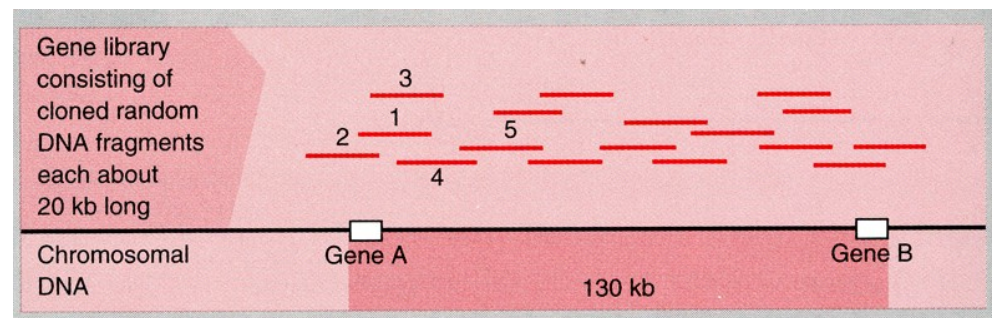
(нет систематического исключения какой-либо последовательности)

## Способы получения перекрывающихся фрагментов ДНК:

- механический (ультразвук);
- частичный гидролиз двумя рестриктазами с участком узнавания 4 нукл.;
- удобное упрощение – использовать частичный гидролиз одной рестриктазой (*Sau3A*).

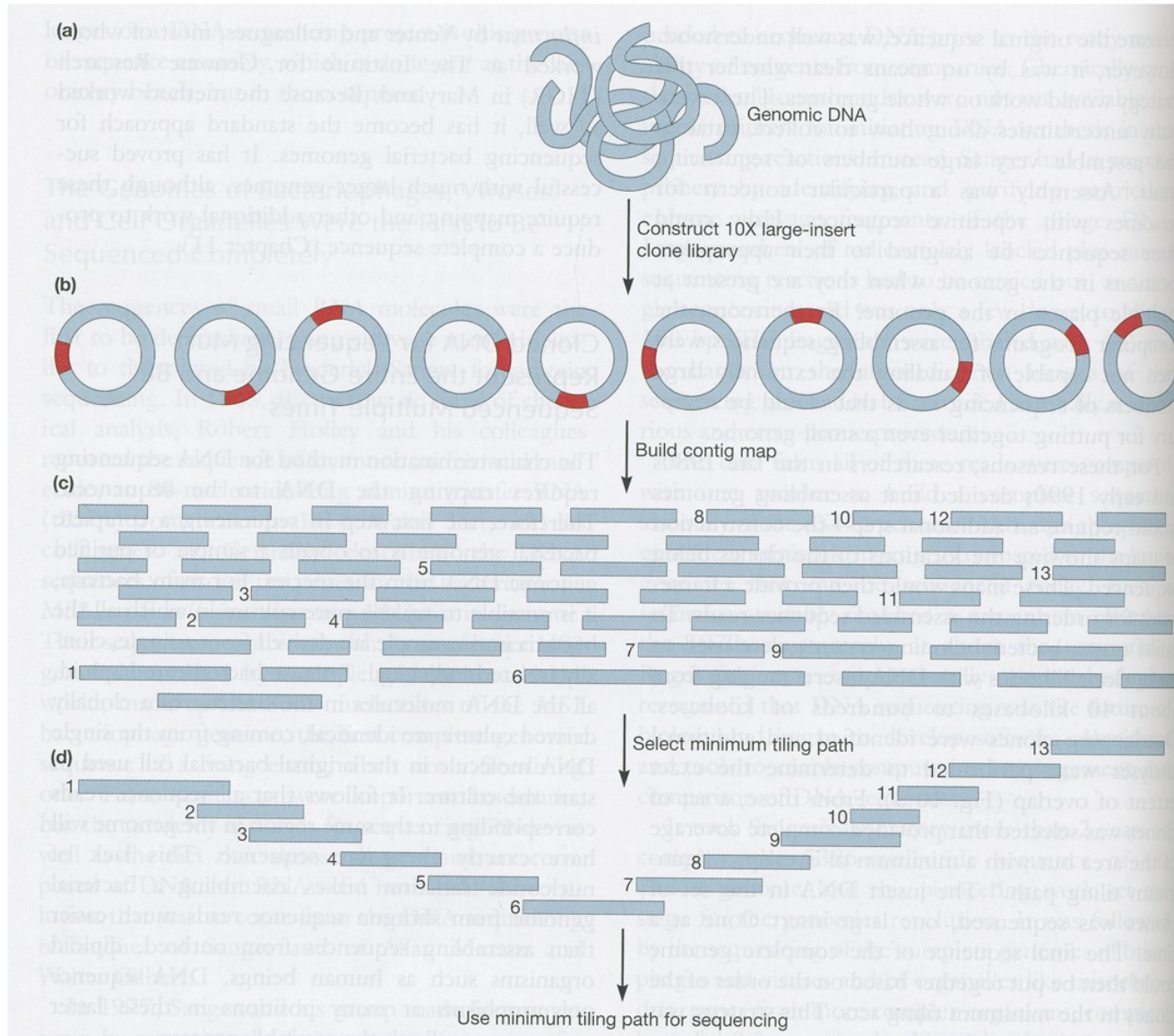
## Перекрывающиеся клоны

↓  
прогулка по хромосоме





# An overlapping clone map



# Сколько клонов нужно анализировать?

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

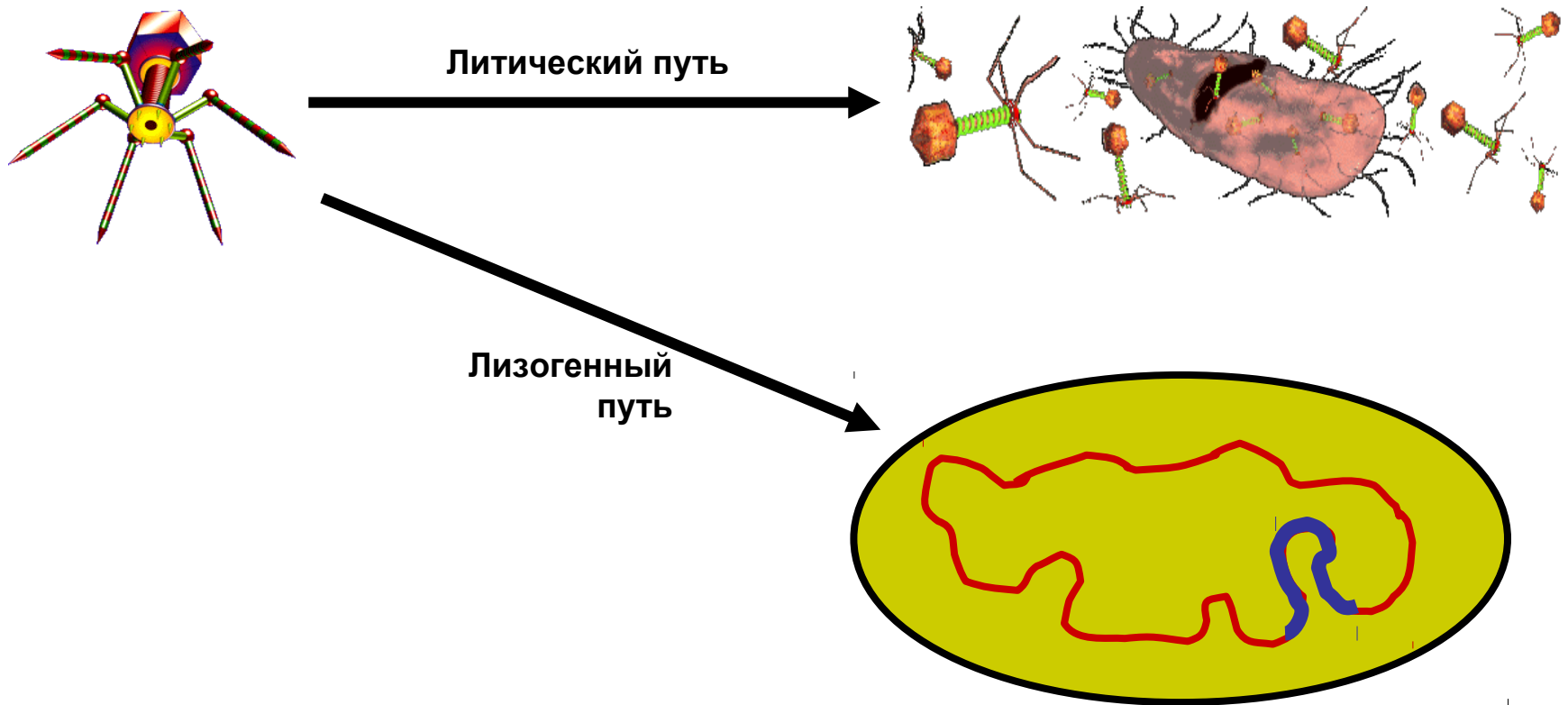
L – длина генома;

l - средняя длина фрагмента.

## Векторы для библиотек:

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

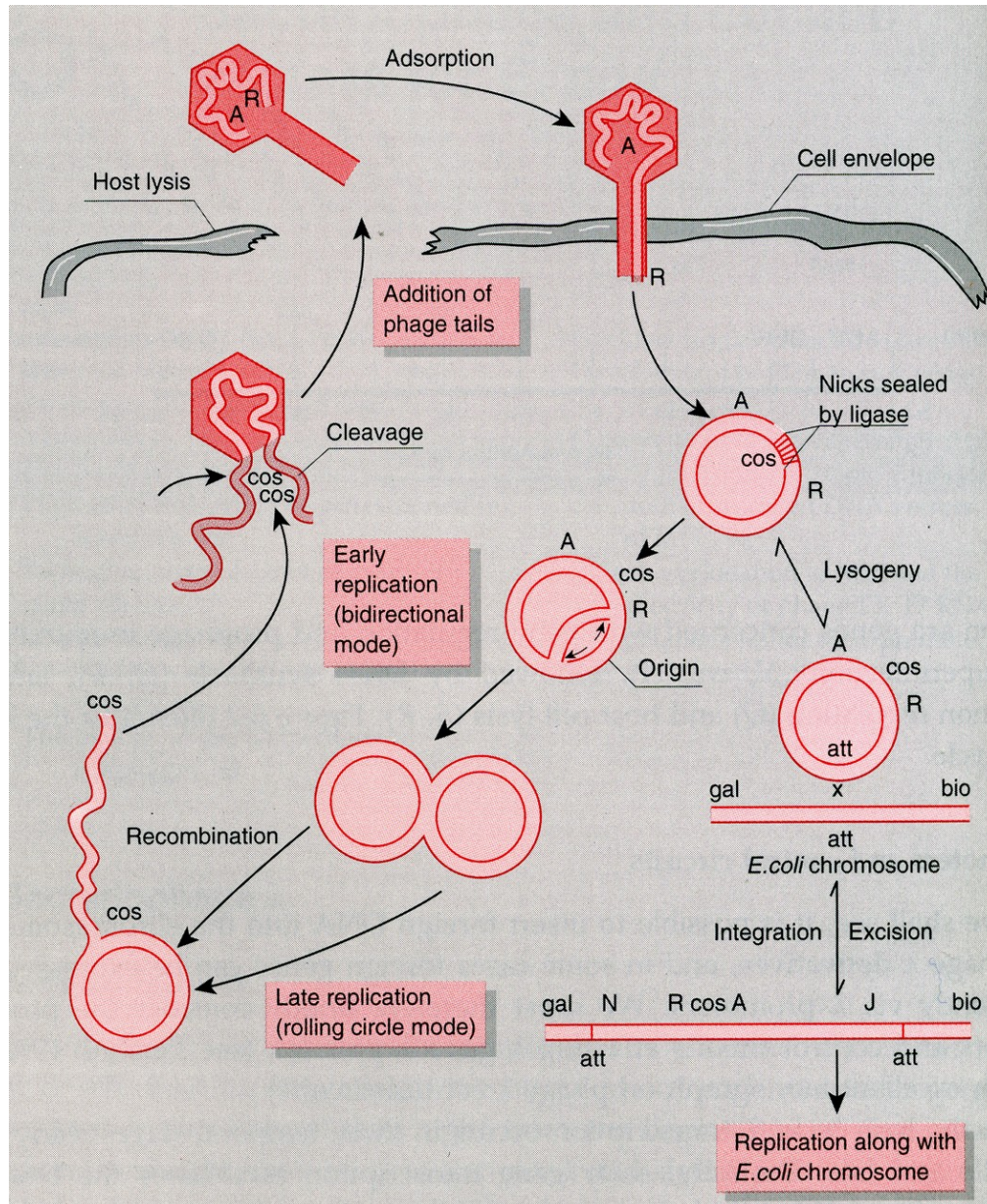
# Лизогенный и литический пути развития фага



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



# Жизненный цикл фага лямбда

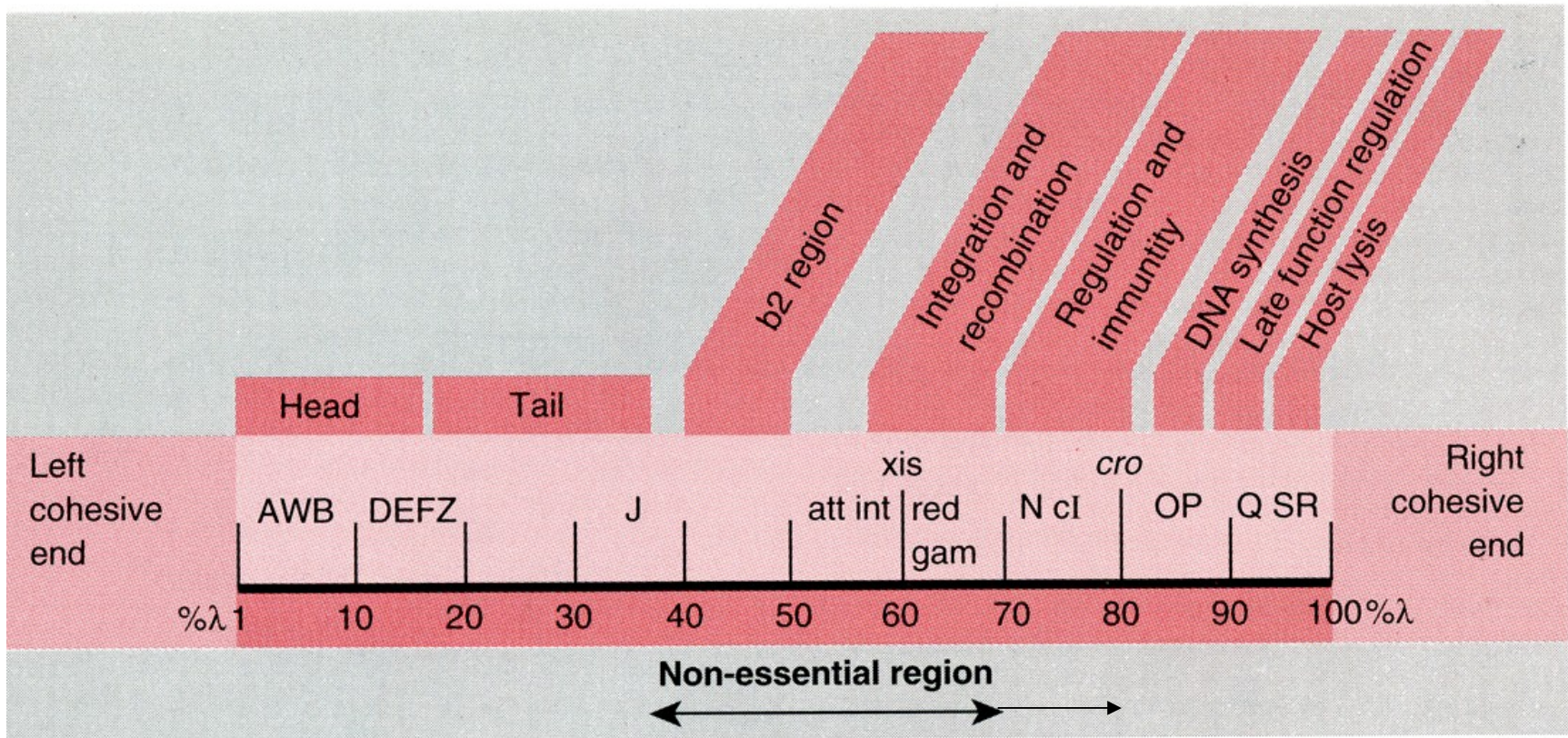


Литический путь

Лизогенное состояние



# Бактериофаг лямбда



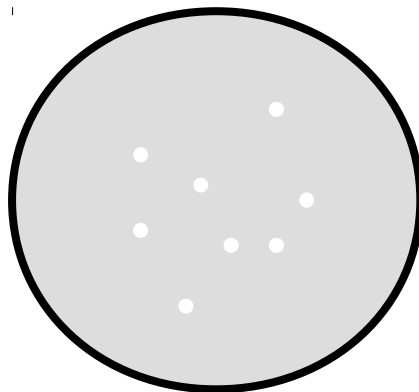
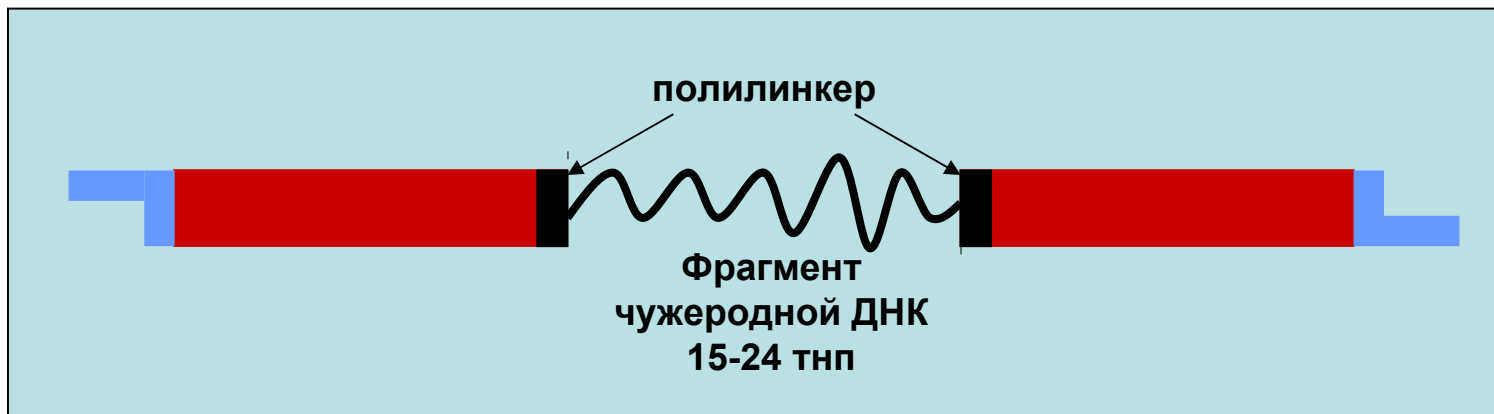
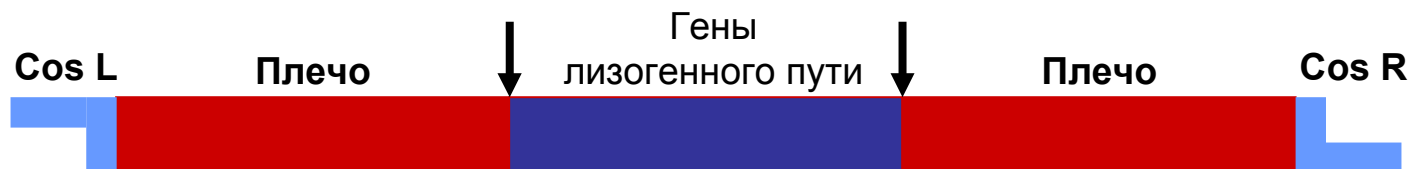
Геном фага лямбда - 48.5 kb;

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



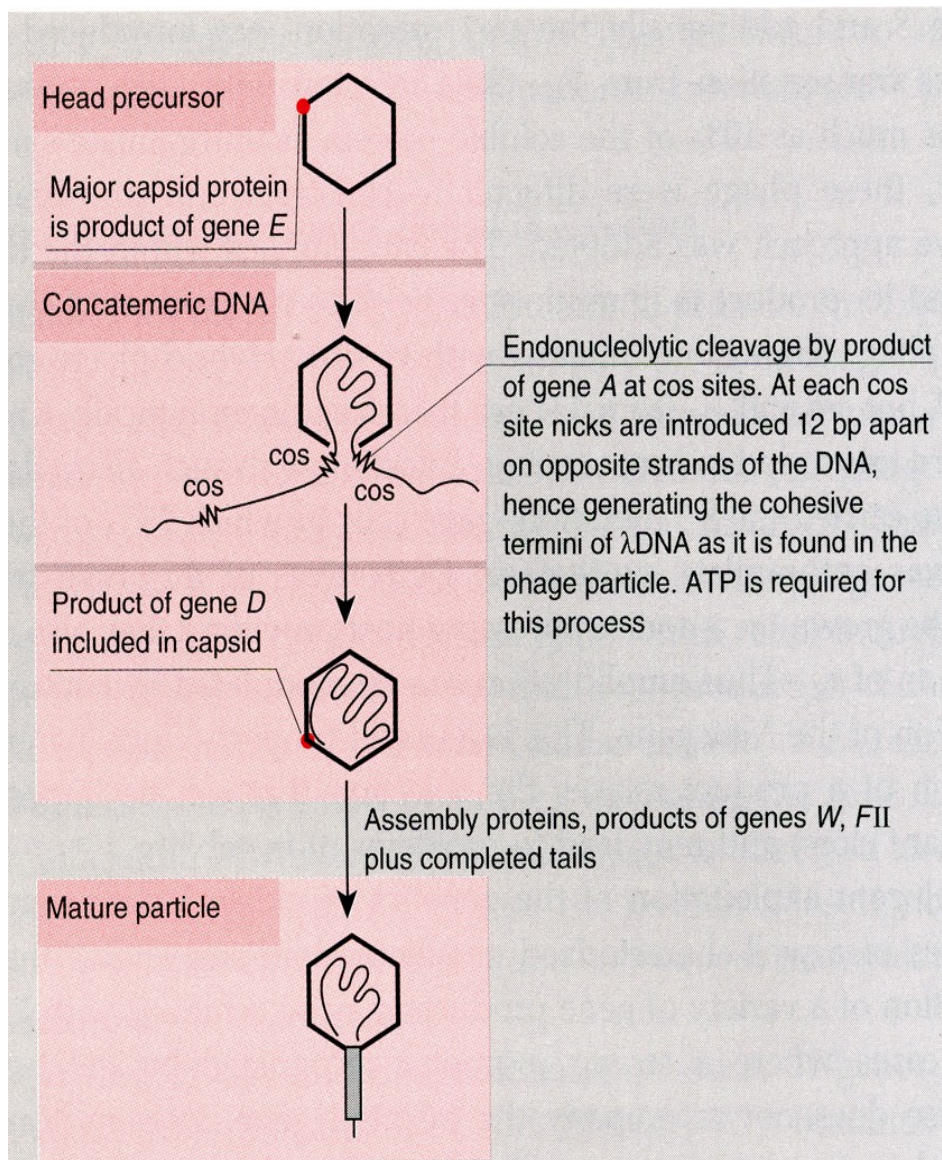
## ПРЕИМУЩЕСТВА

Протяженные вставки  
Удобное введение в клетки  
Аmplификация



# 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*

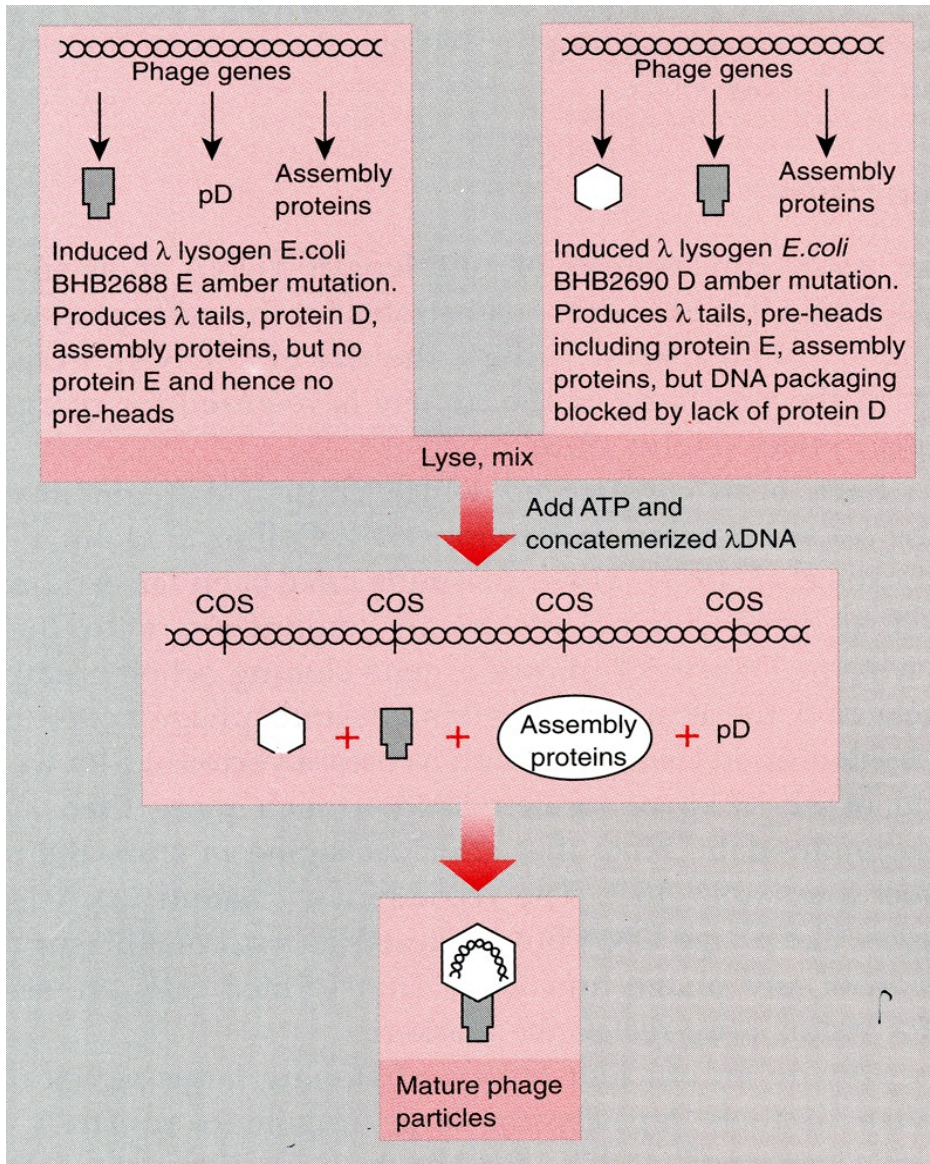
*Продукт гена D включается в капсид*

*Белки сборки – продукты генов W, FII...*

*tails*



# Упаковка фаговых частиц in vitro

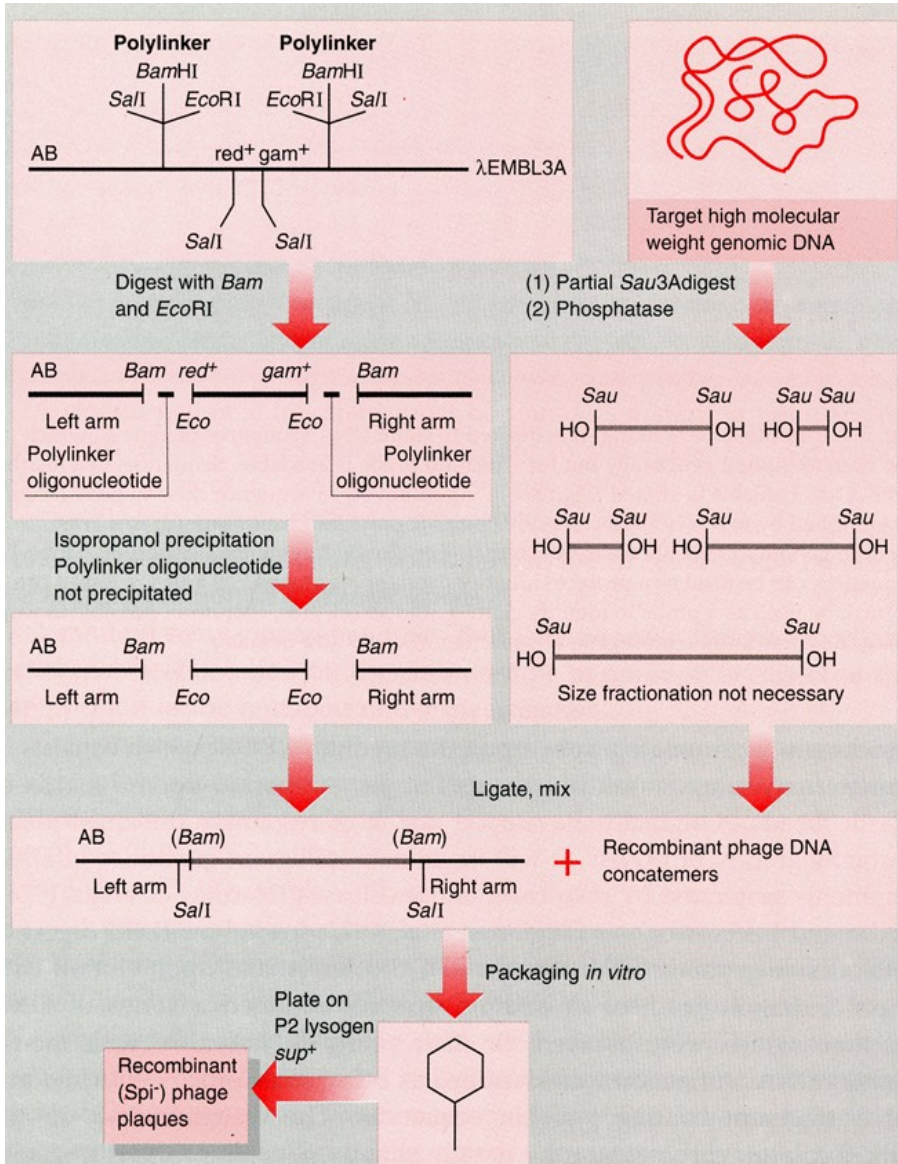


1. *D, A, tails, белки сборки; мутантный E;*

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

*Смесь: D, E, A, tails, белки сборки;*

# Создание библиотеки генов на основе $\lambda$ вектора EMBL3A



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

центральный район не лигируется с плечами;

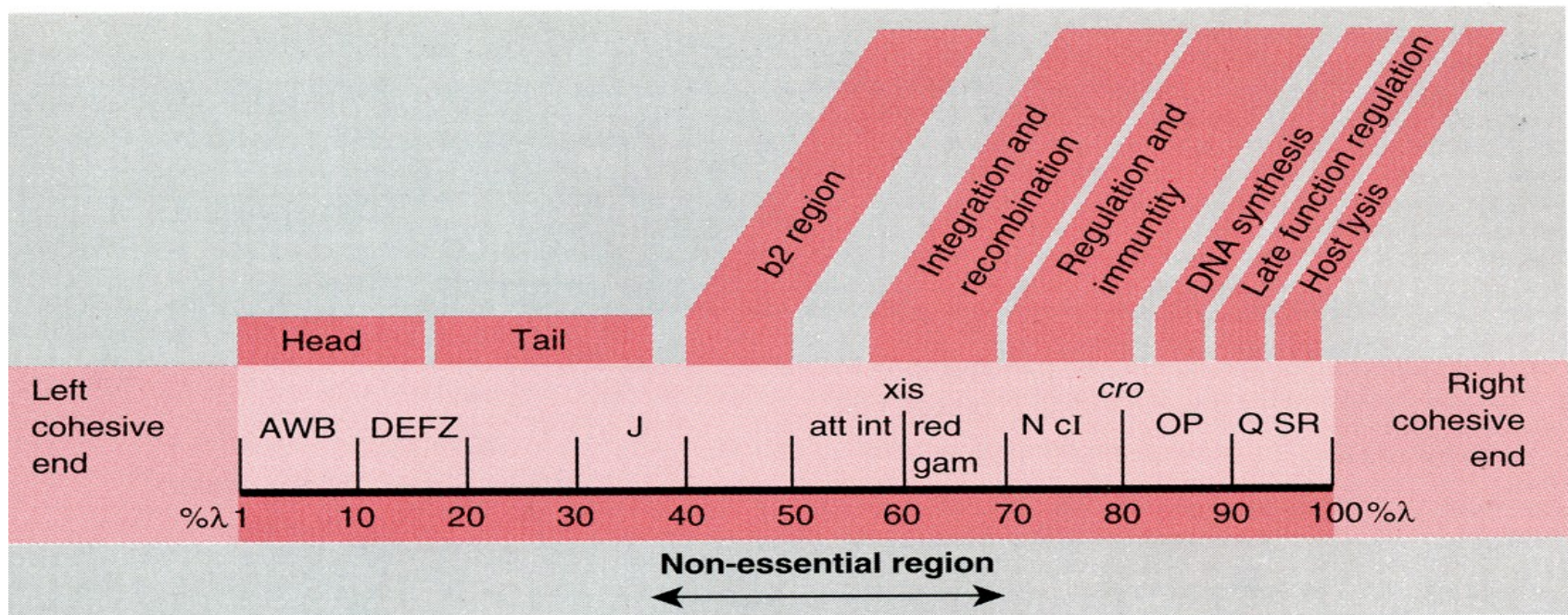
лигирование двух и более ставок не происходит вследствие дефосфорилирования;

можно вставки дополнительно фракционировать по размеру.

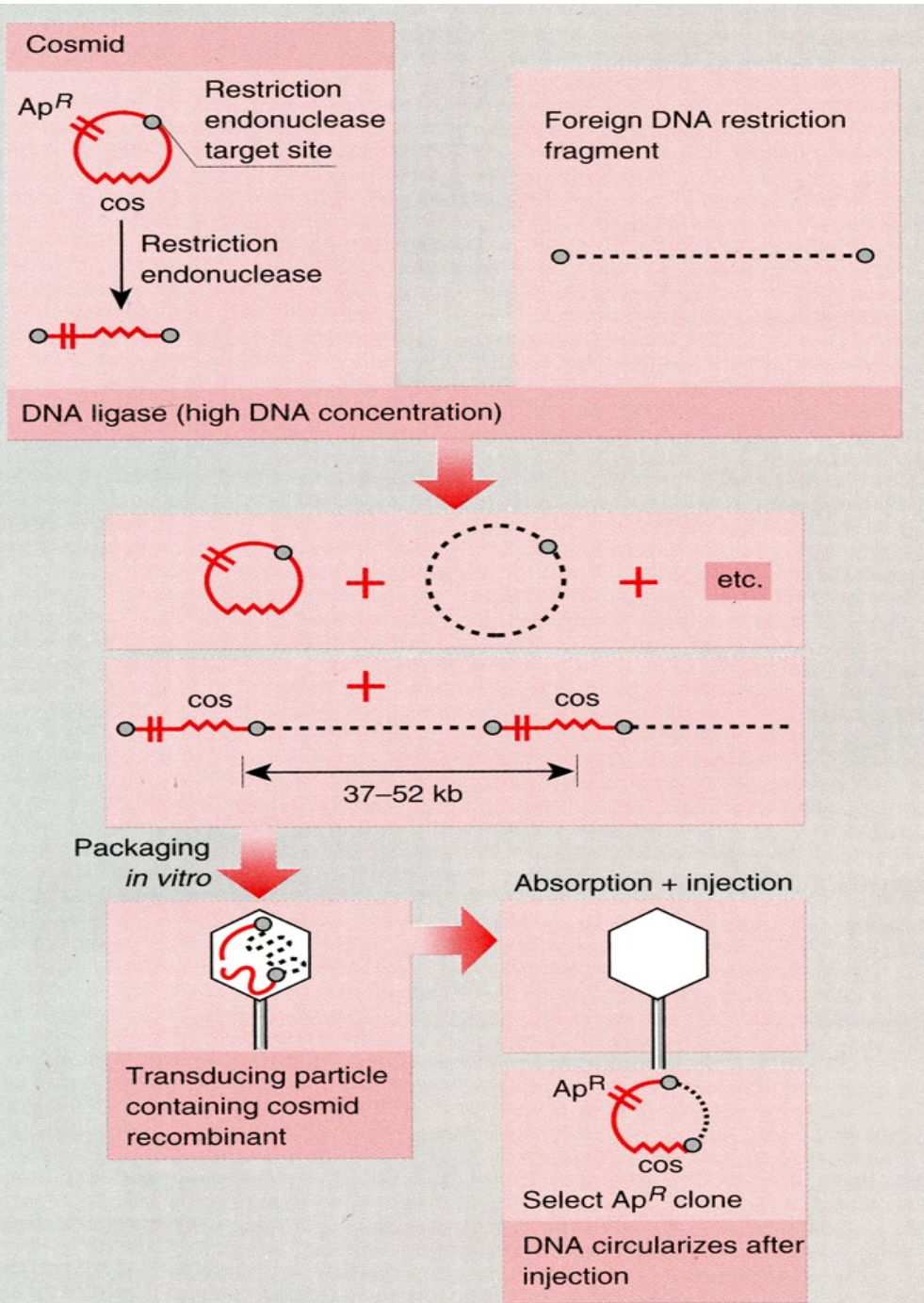


# Генетическая селекция рекомбинантов

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







# КОСМИДЫ

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

Репликация – плазмидного типа;

упаковка конкатемерной ДНК *in vitro*;

эффективность инфекции  $10^4 - 5 \times 10^5$  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

	Vector	Size of partially digested genomic DNA	Large-insert clone	Copy number	Number of clones for 1X human coverage
Cosmid		35-45 kb		50-100	~75,000
Fosmid		35-45 kb		Single copy	~75,000
BAC		100-200 kb		Single copy	15,000-30,000
PAC		100-200 kb		Single copy	15,000-30,000
YAC		~200-1,000 kb		Single copy	~3,000-15,000



# BAC - bacterial artificial chromosome

На основе полового фактора F *E.coli*;

Регуляторные локусы:

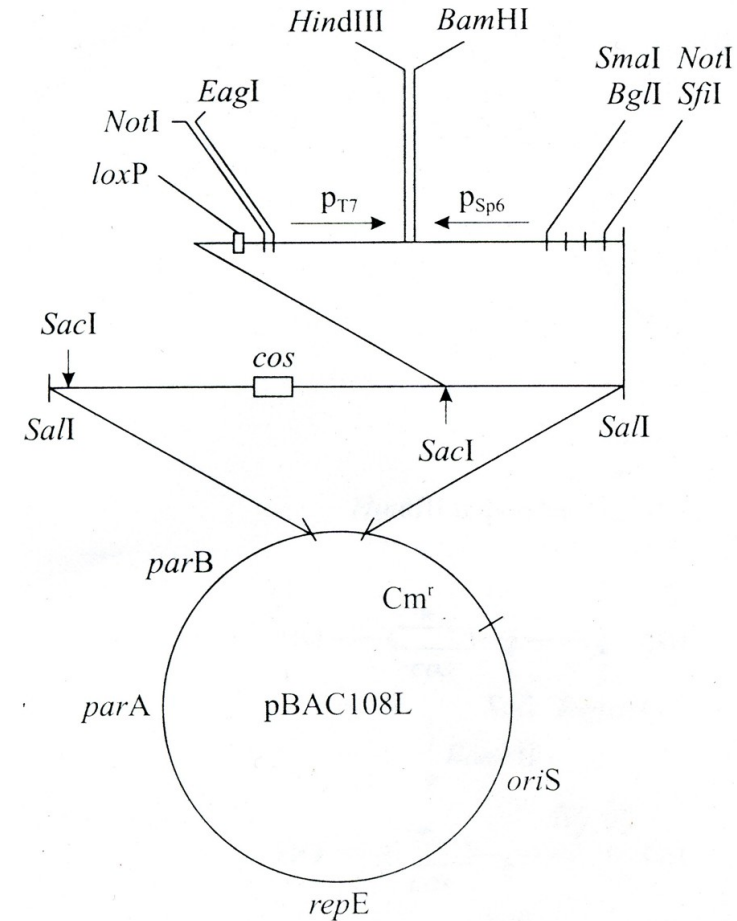
- **oriS**, **repE** (обуславливает однонаправленную репликацию фактора F с *oriS*);

- **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<sub>T7</sub>** и **P<sub>Sp6</sub>** – синтез РНК-зондов для «прогулки по хромосоме».

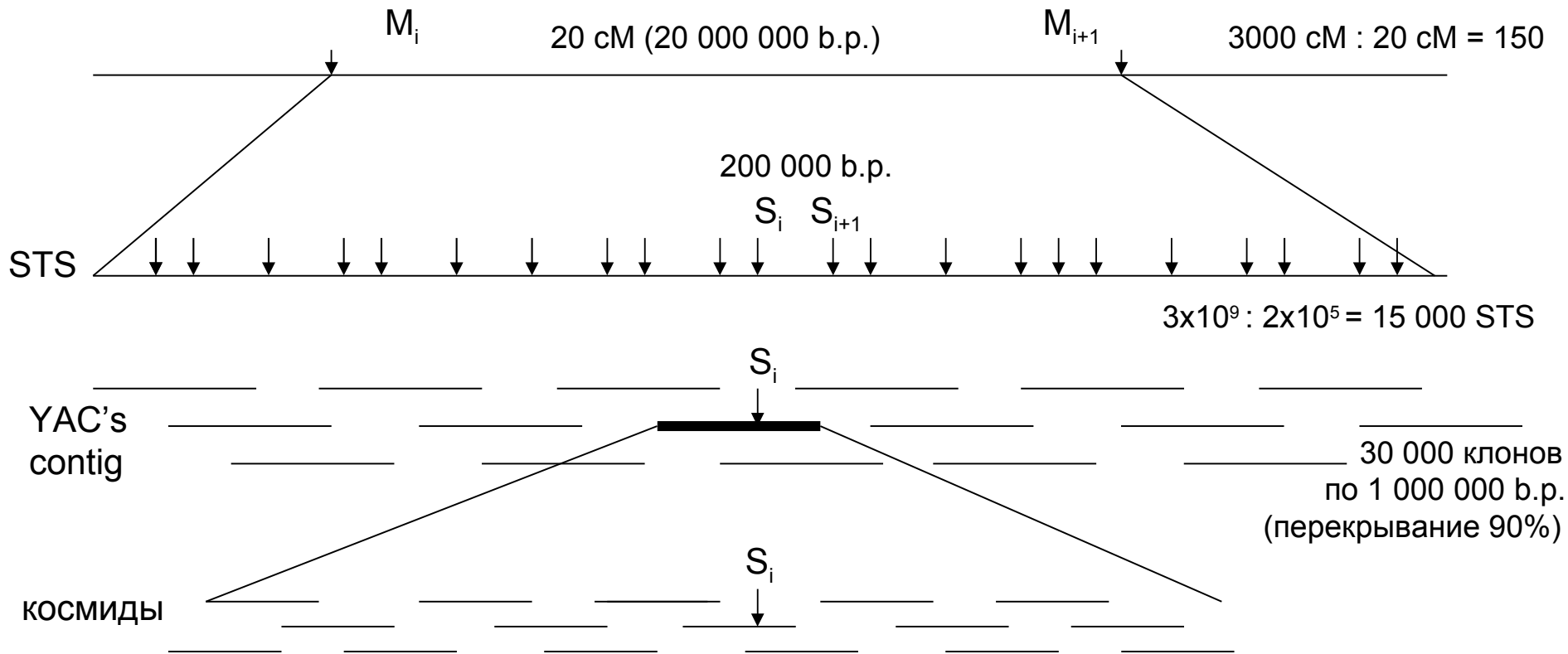
ДНК человека: - частичный гидролиз *HindIII* (100-300 кб);  
- фракционирование пульс-электрофорезом;  
- лигирование с расщепленным *HindIII* и дефосфорилированным вектором;  
- электропорация;  
- отбор по устойчивости к хлорамфениколу



Карта векторной плазмиды pBAC108L

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

# Интеграция генетической и физической карты генома человека

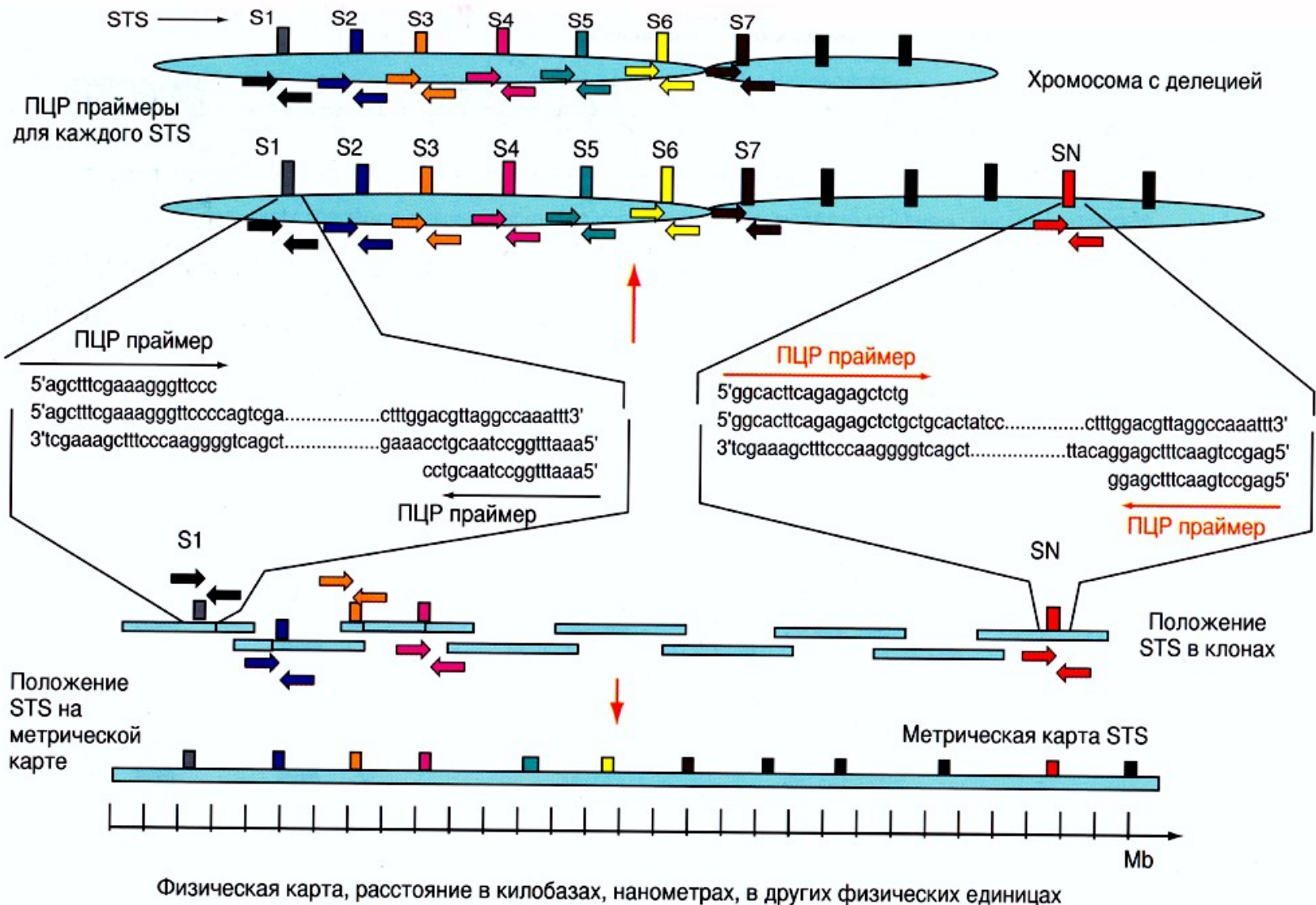


M – фенотипический маркер (полиморфный ген);

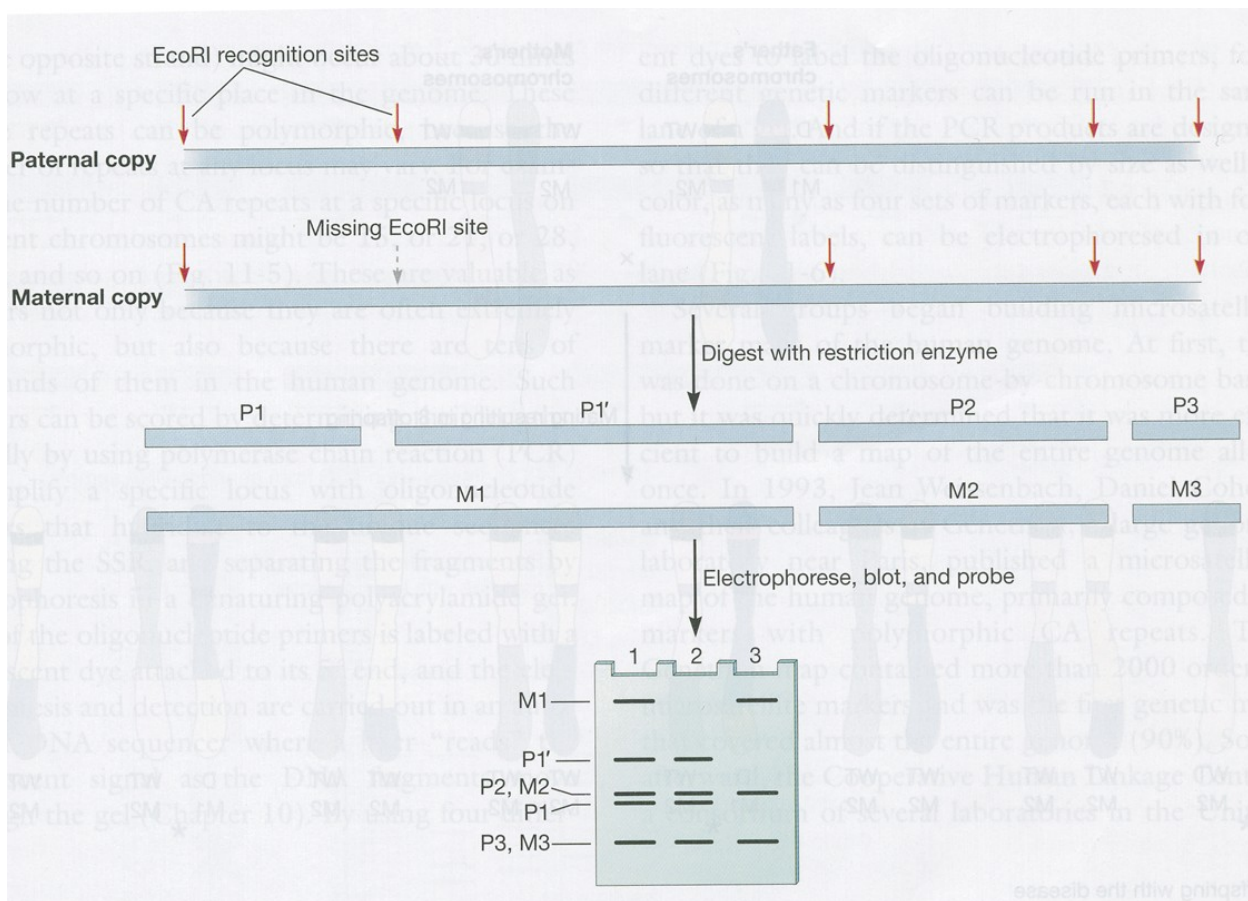
STS – sequence tagged site (пара праймеров, которая позволяет амплифицировать уникальный фрагмент генома)



# Принцип картирования с помощью STS



# Restriction site fingerprinting

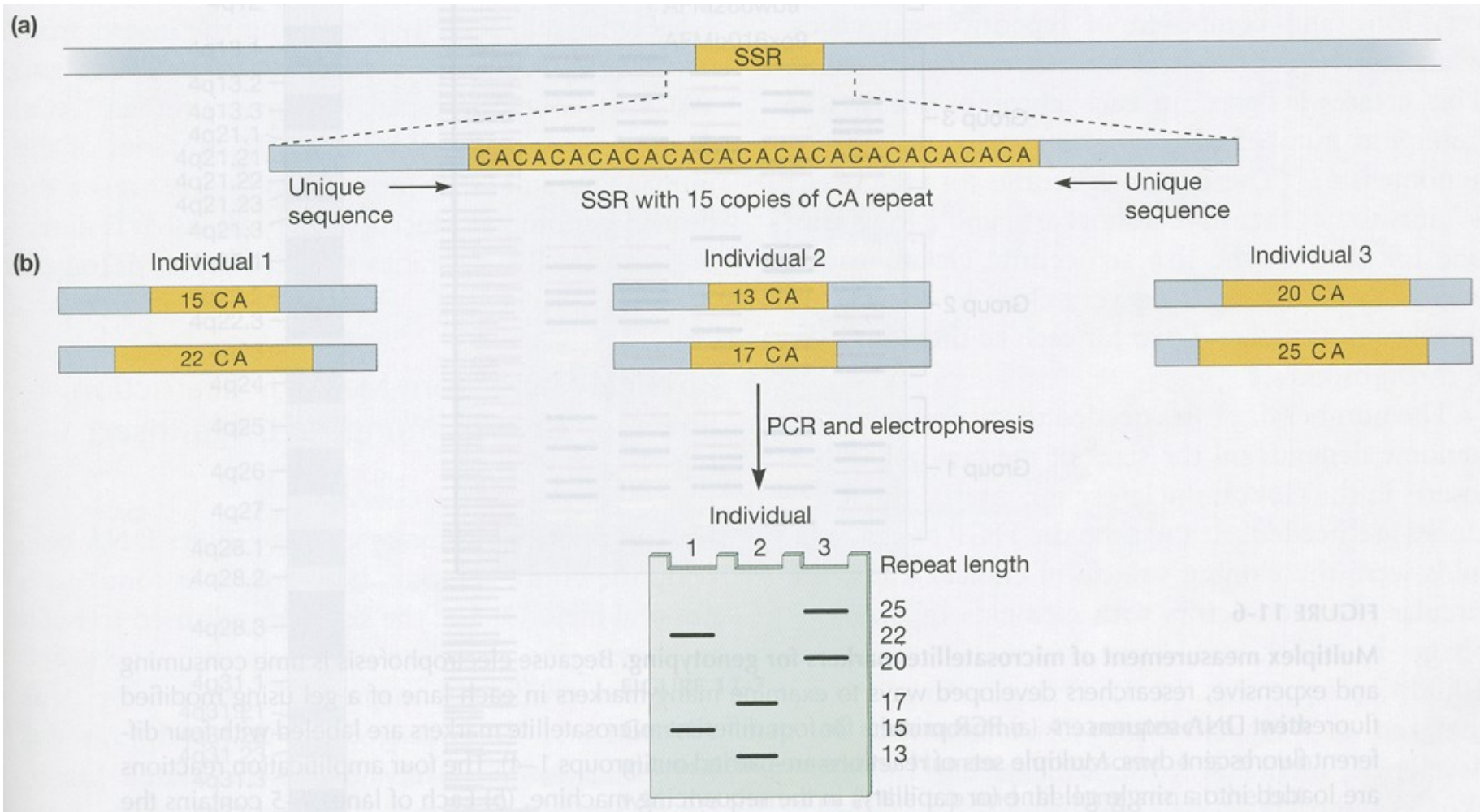


ДНК каждого индивидуального ВАС-клона обрабатывали рестриктазой (*EcoRI* или *HindIII*, например), продукты фракционировали электрофорезом, создавали базы данных длин рестриктных фрагментов (фингерпринт ВАС-клона).

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

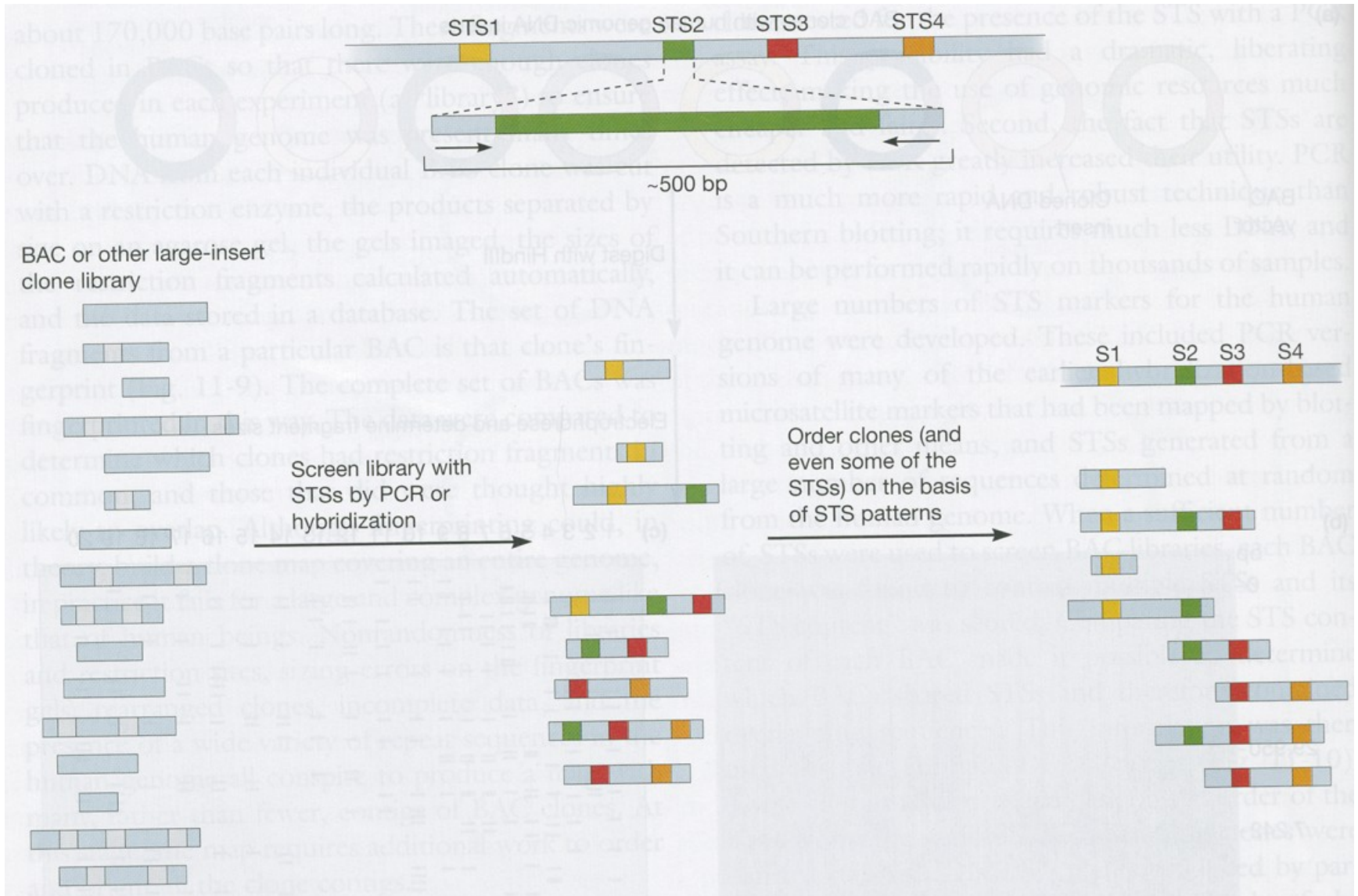
Но создать полный контиг ВАС-клонов человеческого генома этим способом не удалось.

# Использование микросателитов в качестве генетических маркеров

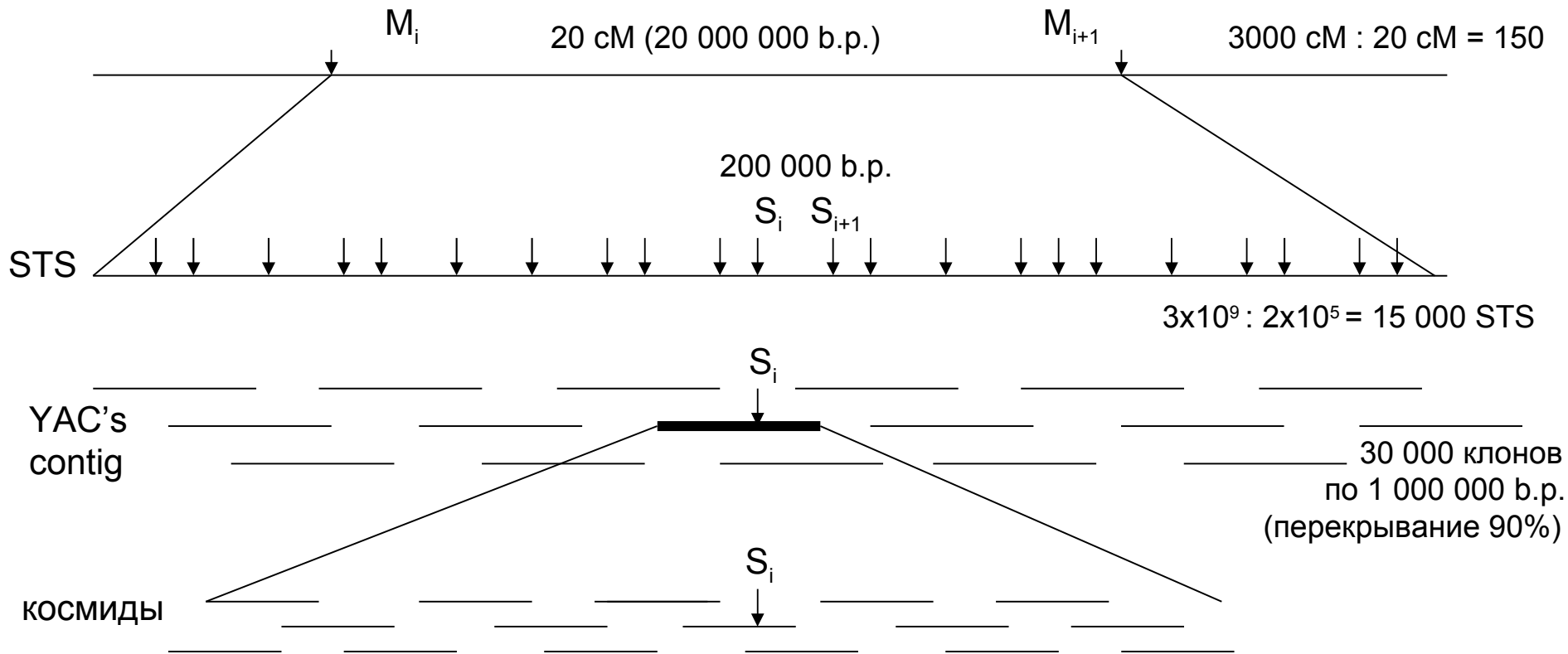




# STS - картирование



# Интеграция генетической и физической карты генома человека



M – фенотипический маркер (полиморфный ген);

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