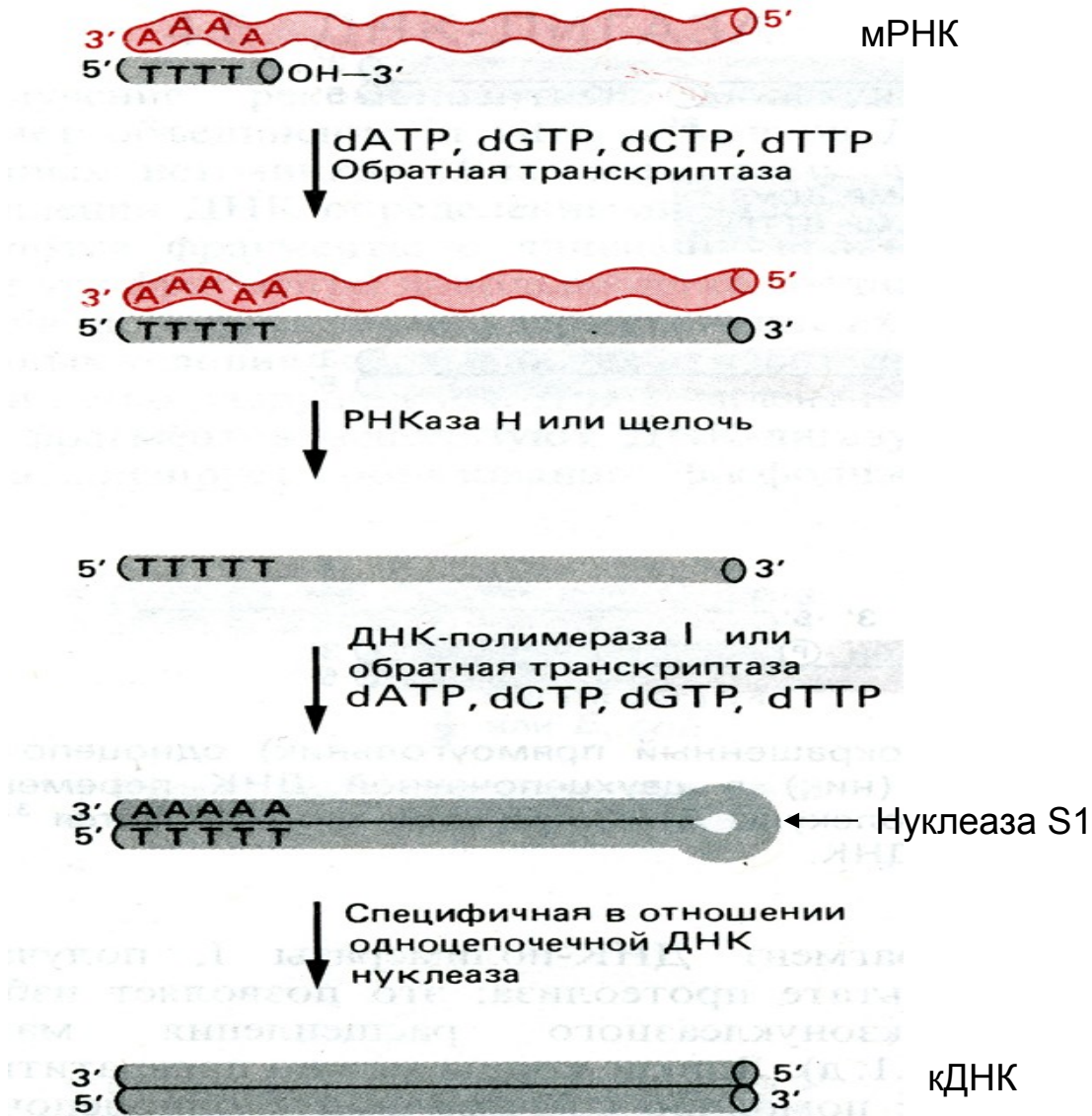


Библиотеки КДНК

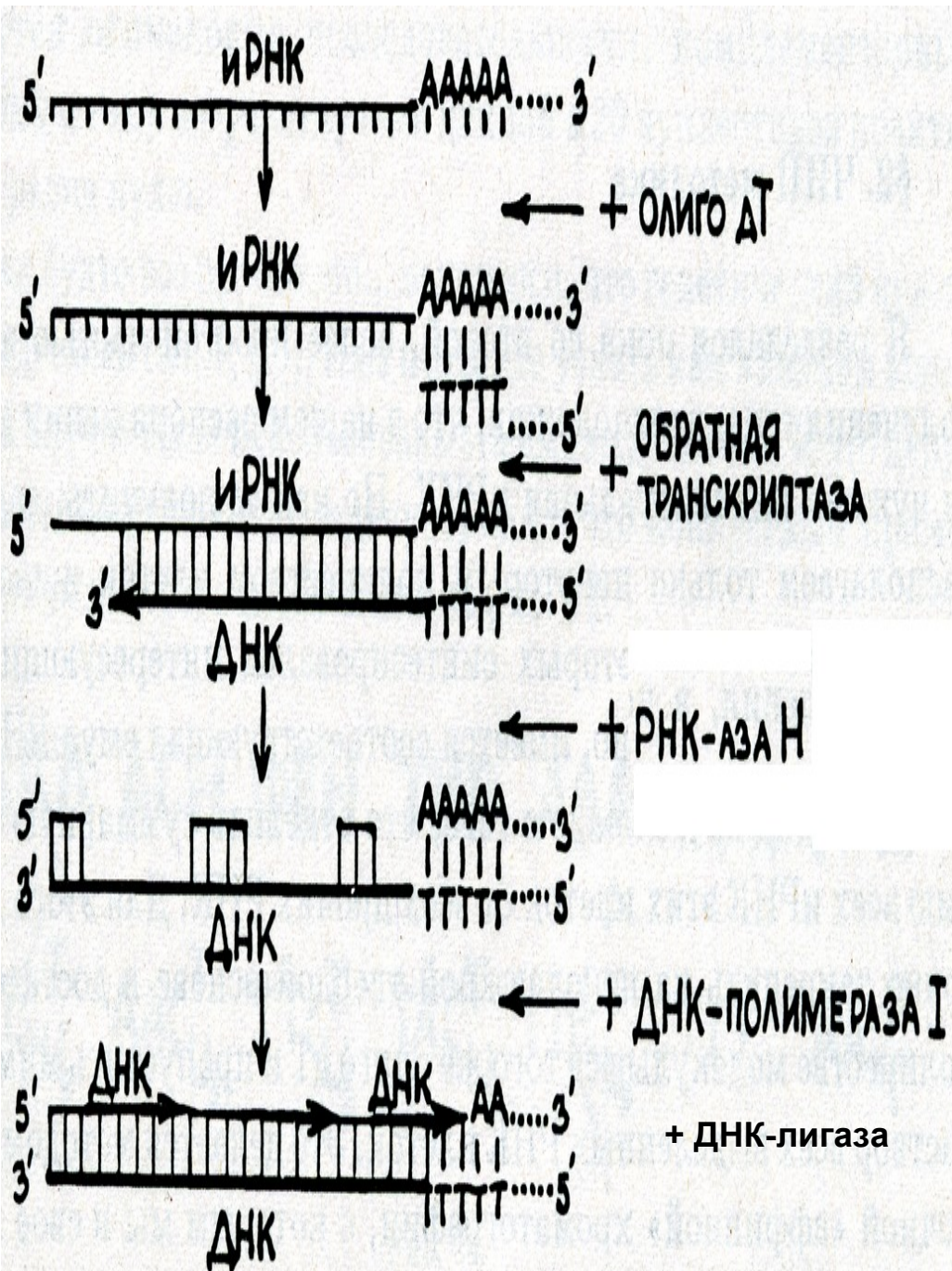
А.Г.Евстафьева

24 февраля 2011 г.

Получение кДНК



Получение кДНК



(вариант – использовать
статистический

Получение библиотеки кДНК

Обработка кДНК метилазой *EcoRI*



лигирование *EcoRI* линкеров



обработка *EcoRI*



лигирование в соответствующий вектор



трансформация

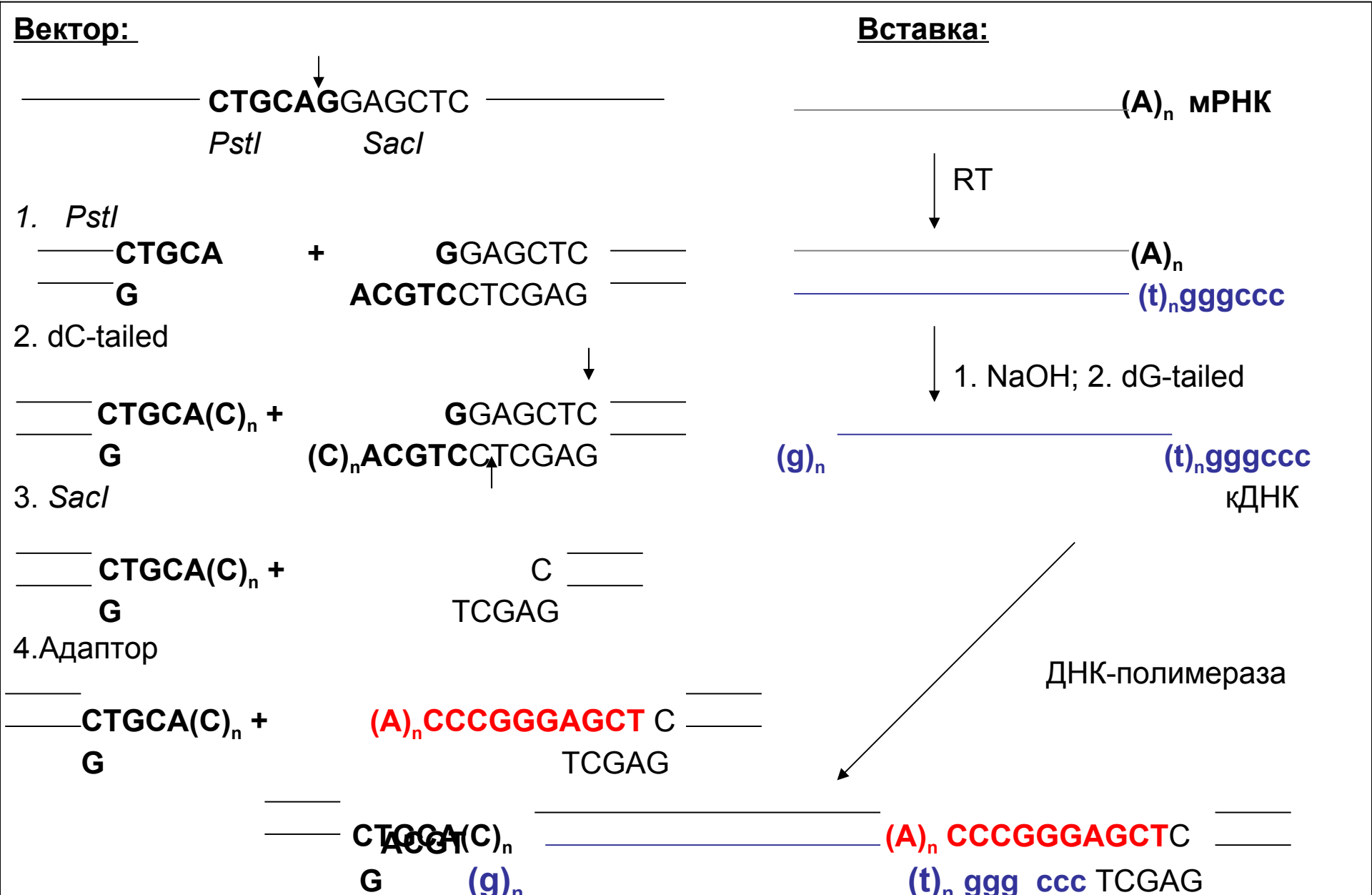


скрининг

XXGAATTCYY

YYCTTAAGXX

Получение библиотеки кДНК (Stratagene)

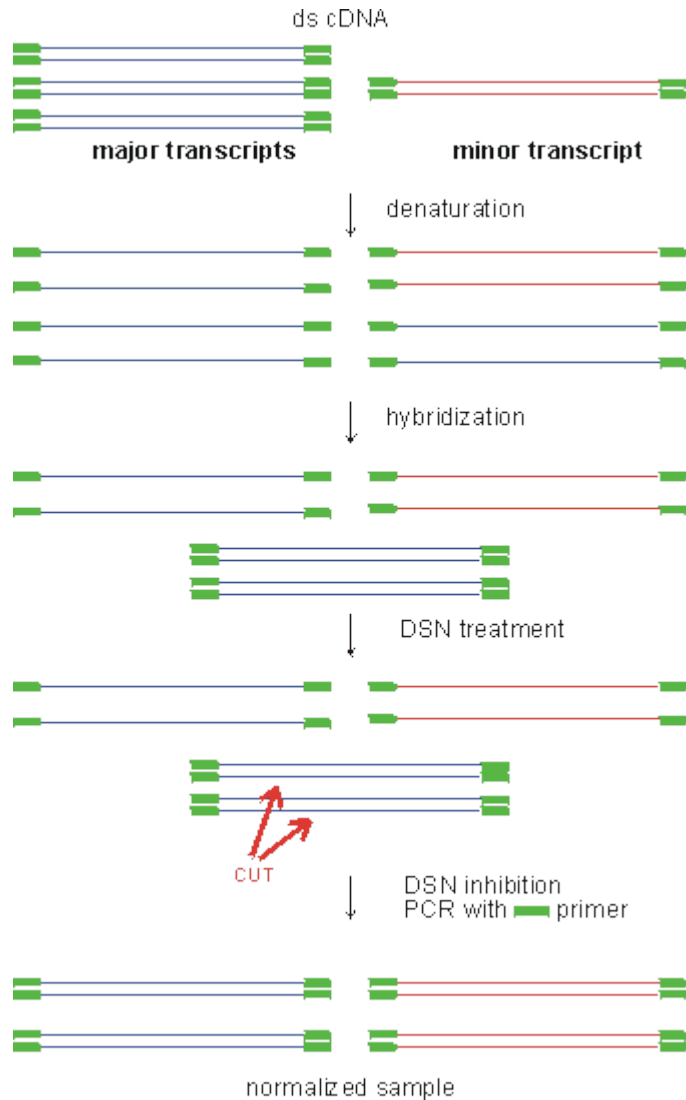


Размер библиотеки кДНК

Классы мРНК: высококопийные и низкокопийные

Источник	число разных РНК	кол-во молекул на клетку
Печень	9	12000
	700	300
	11500	15
Яйцевод	1	100000 (овальбумин)
	7	4000
	12500	5

Метод нормализации кДНК

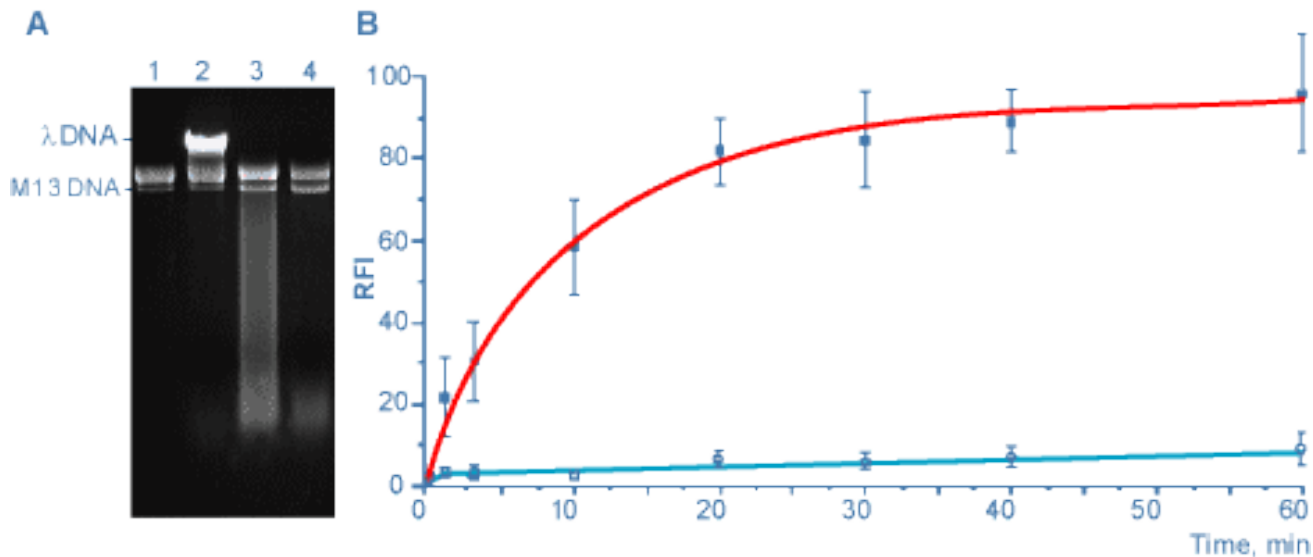


Нормализация кДНК приводит к выравниванию концентраций транскриптов в образце тотальной кДНК

Использование нормализованных библиотек позволяет значительно повысить эффективность поиска редких генов.

Метод **нормализации кДНК** использует уникальные свойства термостабильной **дуплекс-специфической нуклеазы камчатского краба** (DSN). Метод основан на более высокой скорости ренатурации (образования дцДНК) многокопийной кДНК по сравнению с низкокопийной.

Свойства DSN

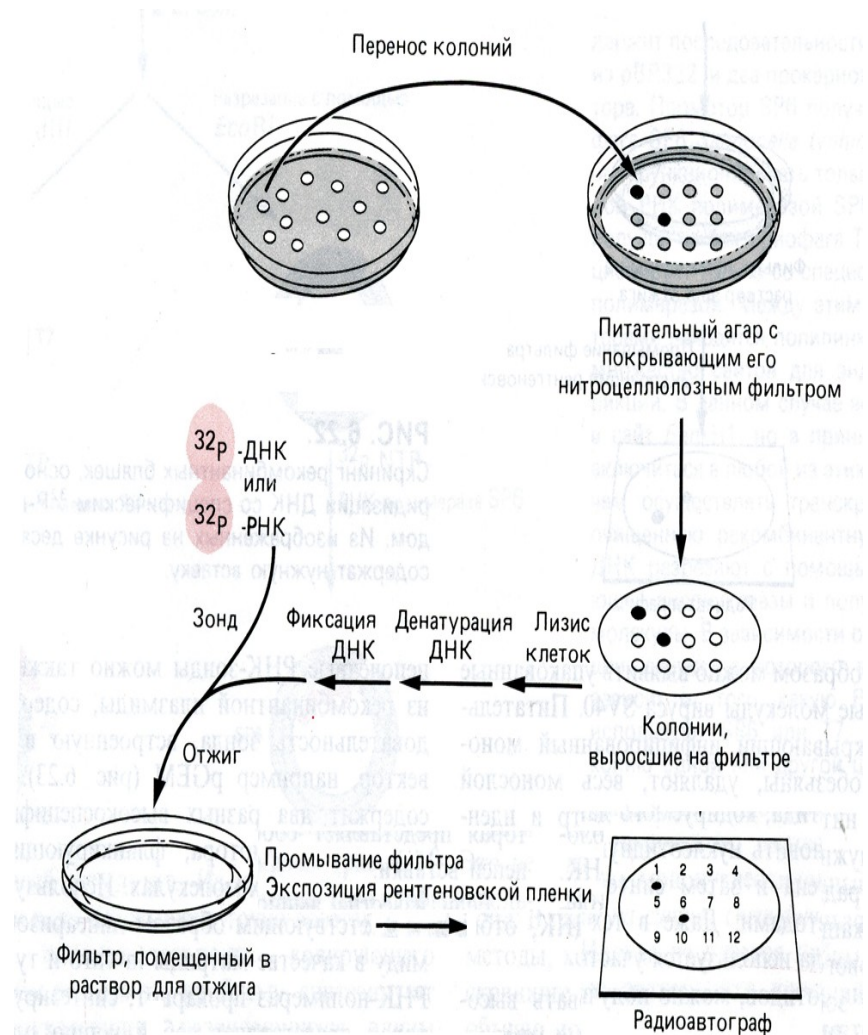


- **DSN** гидролизует дц ДНК и ДНК-РНК гибриды и почти не гидролизует оц ДНК (Рис. 1) или РНК.
- (A) Действие **DSN** на оц ДНК фага M13 и на дц ДНК фага λ .
- (1, 2) – инкубация без нуклеазы. (1) – ДНК фага M13, (2) – смесь ДНК фага M13 и ДНК фага λ .
- (3; 4) – обработка **DSN** в течение 1.5 мин (3) и 5 мин (4).
- Приведен 0,9% агарозный гель, окрашенный бромистым этидием.
- (B) Действие **DSN** на 20-звенные олигонуклеотиды. Красная линия – дц ДНК; голубая линия – оц ДНК.
- Олигонуклеотид, меченый флуоресцентным донором на 5'-конце и тушителем флуоресценции на 3'-конце, использовался как одноцепочечная ДНК.
- Для получения двуцепочечного субстрата его смешивали с эквимольным количеством комплементарного олигонуклеотида.
- Измеряли интенсивность флуоресценции.

Скрининг библиотек кДНК

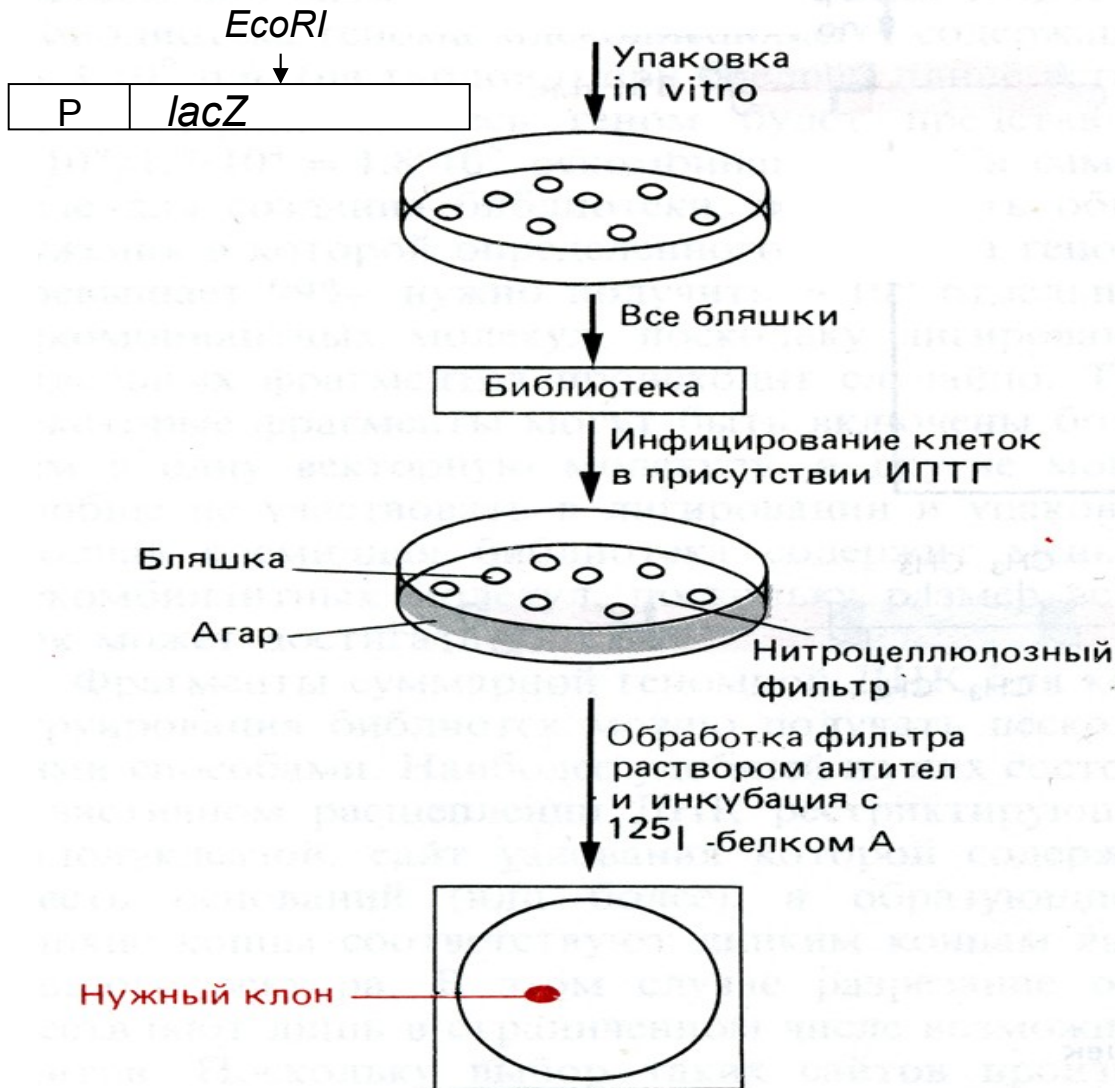
- 1. Генетические методы
- 2. Иммунохимические методы
- 3. Гибридизация нк
- 4. Дифференциальный скрининг

Гибридизация колоний (бляшек)



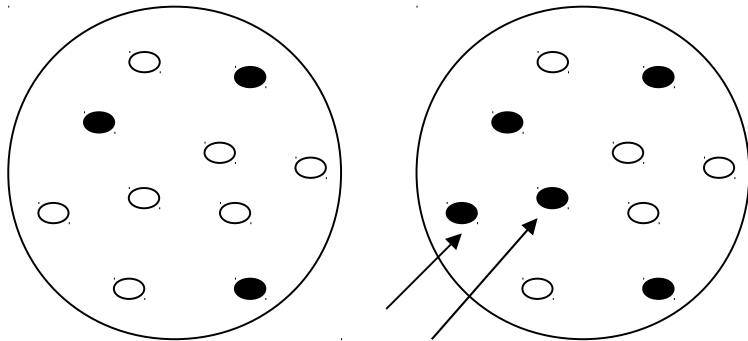
Иммунохимический скрининг

Вектор λ gt11



Дифференциальный скрининг

Дифференциальный скрининг – выделение тканеспецифичных или индуцибельных κ ДНК (developmentally regulated)



Меченая
мРНК (κ ДНК)
из ткани А
(клеток не
индуцированных)

меченая
мРНК (κ ДНК)
из ткани В
(клеток
индуцированных)

Две реплики библиотеки κ ДНК

Зонд

Вычитательная гибридизация (B-A)

- 1. Получают мРНК и синтезируют одноцепочечную кДНК из ткани B;
- **(tester)**
- 2. Гибридизация с избытком биотинилированной мРНК ткани A;
- **(driver)**
- 3. Гибриды сорбируются на стрептавидин-сефарозу;
- 4. В растворе остаются только кДНК, специфичные для ткани B;
- **(target)**
- 5. Синтез второй цепи и создание библиотеки из этой кДНК.

Эукариотические системы хозяин – вектор: дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*

Получение лекарств и пищевых веществ;

Суррогатная дрожжевая генетика;

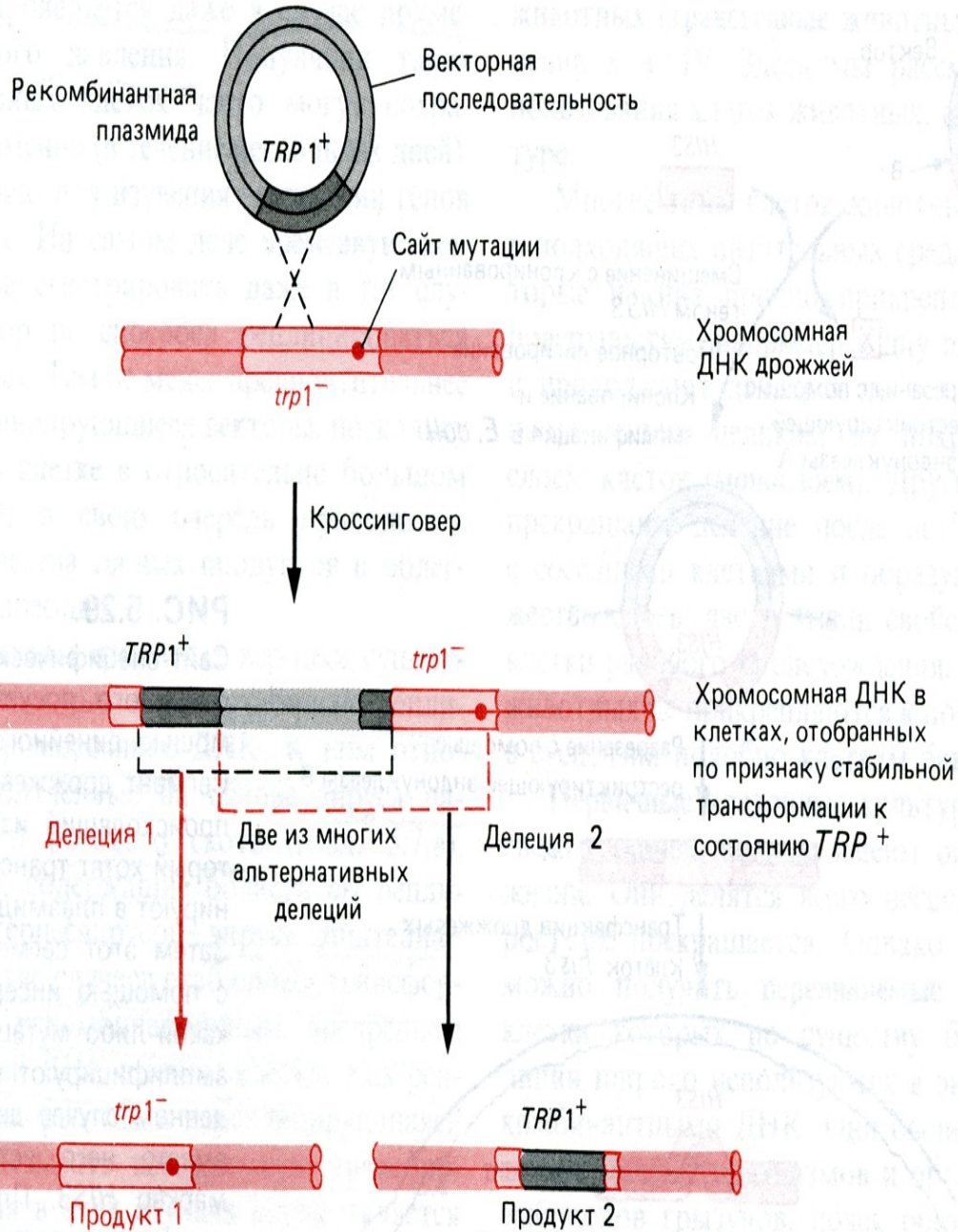
Пост-трансляционные модификации (гликозилирование по участку Asn-X-Ser/Thr в процессе секреции – присоединяются остатки маннозы)

Дрожжевые векторы:

1. YIp интегративные
2. YEр эписомальные
3. YRp репликативные
4. YCr центромерные
5. YAC дрожжевые искусственные хромосомы

Селективные маркеры:
URA3, LEU2, TRP1, HIS3

1. Интегративные плазмиды



2.Эписомальные плазмиды

2 мкм – плазида дрожжей (6318 bp);

ori – ориджин репликации;

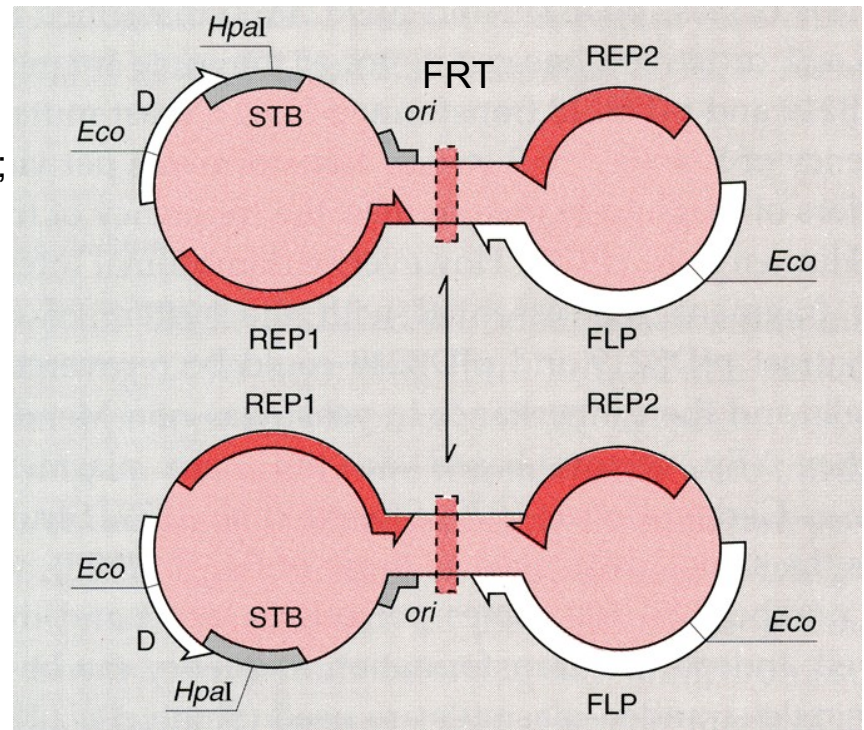
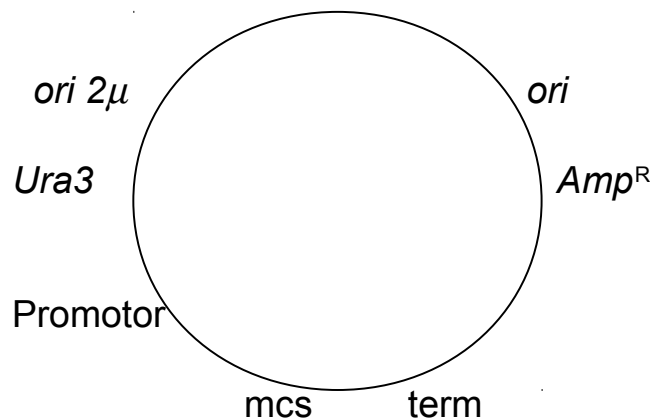
REP1, *REP2* – гены, участвующие в репликации,

D – локус амплификации (50-100 копий на клетку);

STB – локус, обеспечивающий равное распределение плазмид между материнской и дочерней клетками;

FLP – сайт-специфическая рекомбиназа.

Шатл-векторы:



Репликативные (3) и центромерные (4) плазмиды

YRp:

ARS – autonomously replicating sequence;

1-20 копий на клетку;

Нестабильность (ассоциированы с материнской клеткой).

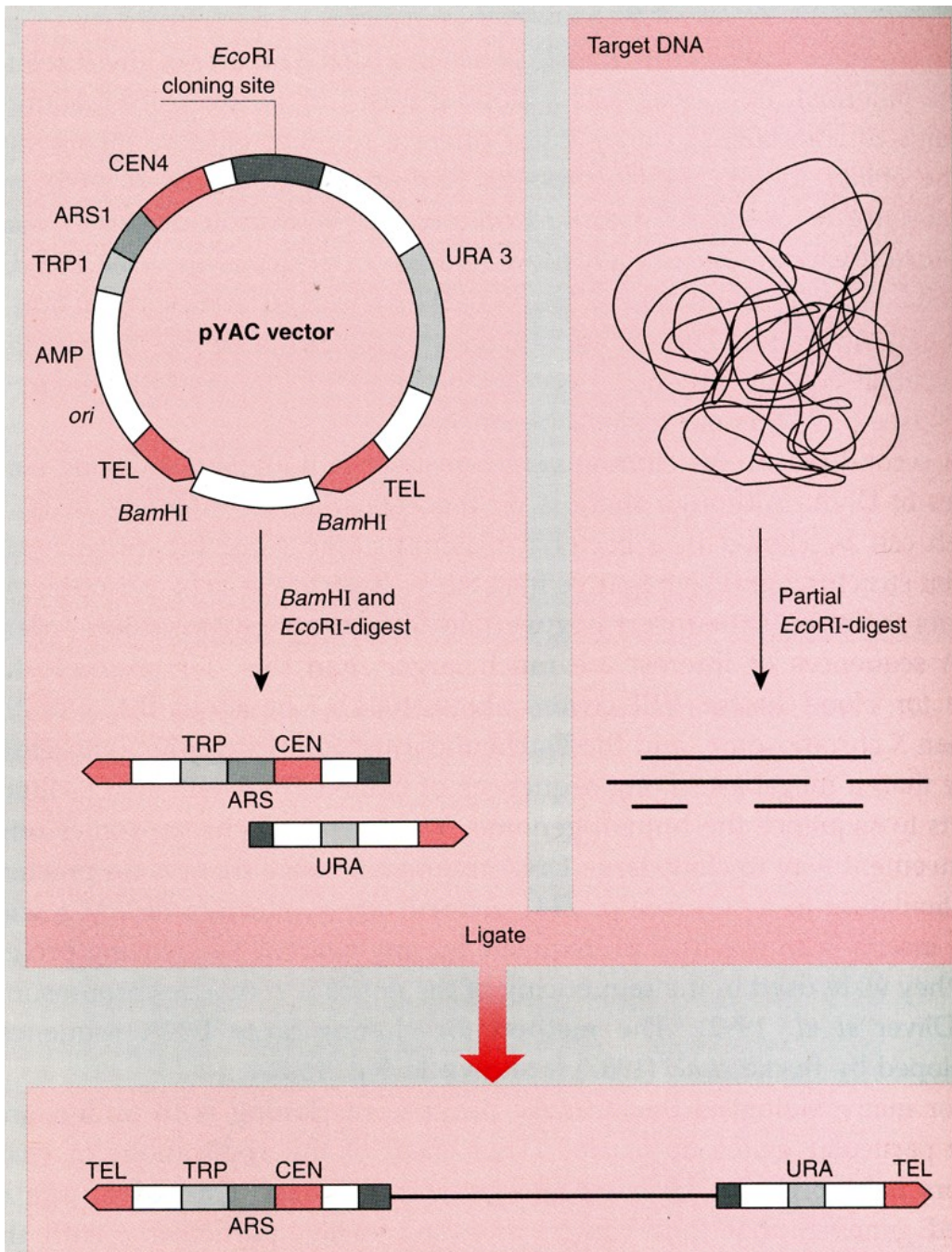
YCp:

CEN – центромерные участки;

1-2 копии на клетку;

Стабильность (при мейозе сегрегация по Менделю).

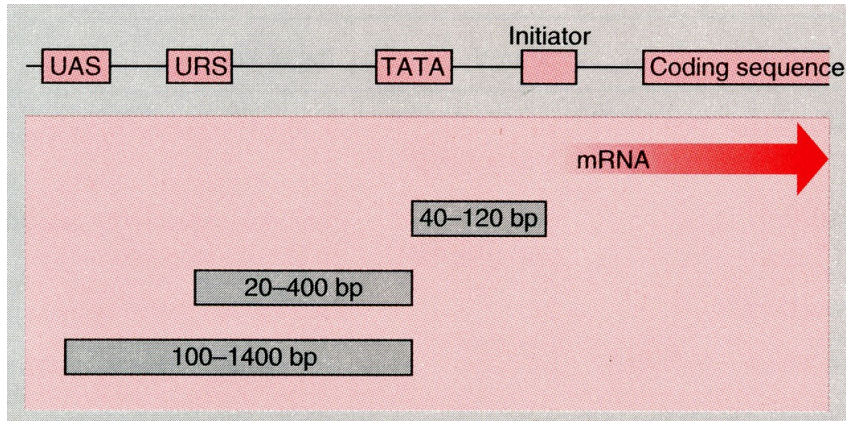
УАС'и



- ТЕL-теломеры;
- 1-2 копии на клетку;
- Стабильность возрастает с длиной вставки.

Экспрессия в клетках дрожжей

Дрожжевые промоторы



Трансляция:

5' – Cap-----A₋₃ NN **ATG** G₄-----

Промотор	сила	регуляция
PGK (фосфоглицераткиназный)	4+	20-кратная индукция глюкозой
GAL1 (галактокиназный)	3+	1000-кратная индукция галактозой
PHOS (кислой фосфатазы)	2+	200-кратная репрессия фосфатом
ADH (алкогольдегидрогеназный)	2+	конститутивный
CUP1 (металлотинеиновый)	+	20-кратная индукция ионами меди