

Раздел 4

СОЗДАНИЕ И СКРИНИНГ БИБЛИОТЕК ГЕНОВ

Получение библиотек ДНК

- **Геномная библиотека** – это совокупность всех нуклеотидных последовательностей геномной ДНК организма, клонированная в виде фрагментов в векторах.
- Другие названия – **клонотека** , **банк генов**.
- Вторым видом библиотек является **библиотека кДНК** - это совокупность ДНК-копий всех мРНК клетки, клонированная в векторах.

Репрезентативность геномных библиотек

$$N = \frac{\ln (1 - P)}{\ln (1 - f/G)}$$

N – число клонов, которое необходимо получить для создания библиотеки, где с вероятностью P (обычно 0.95 и выше), будет встречаться любой фрагмент генома

f – размер фрагмента генома (зависит от типа используемого вектора, а также от среднего размера гена в геноме)

G – размер генома

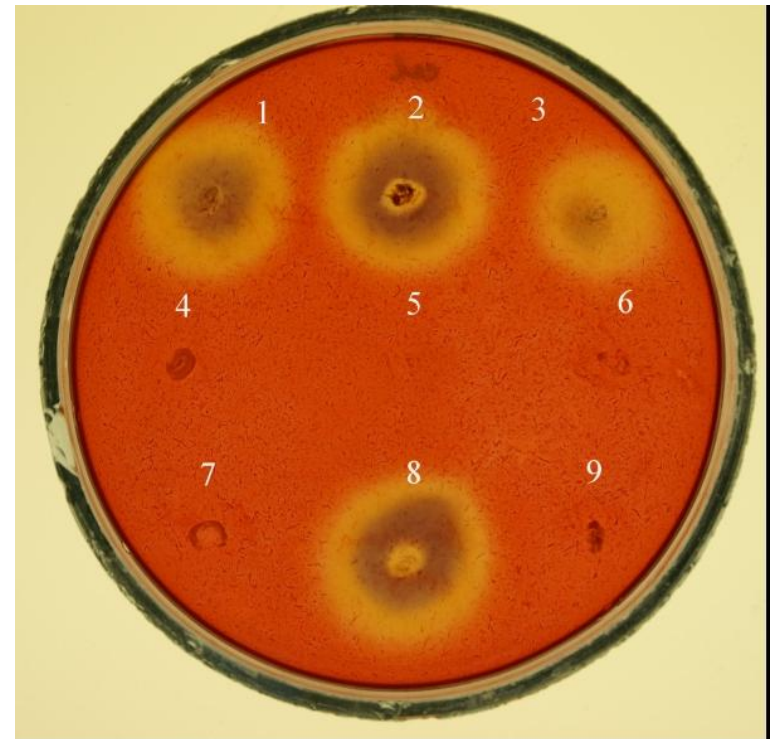
**Количество клонов в геномных библиотеках
различных организмов, обеспечивающее 99%-ную вероятность встречае-
мости определенного гена**

Источник ДНК	Средний размер гаплоидного генома, п.н.	Количество клонов для векторов			
		λ	космида	P1	YAC, BAC
		20*	45*	95*	300*
Кишечная палочка	$4,7 \cdot 10^6$	1100	480	220	73
Дрожжи	$1,4 \cdot 10^7$	3200	1400	680	210
Дрозофила	$1,8 \cdot 10^8$	41000	18000	8700	2800
Человек	$3,0 \cdot 10^9$	690000	310000	150000	46000
Пшеница	$1,7 \cdot 10^{10}$	3900000	1700000	820000	260000

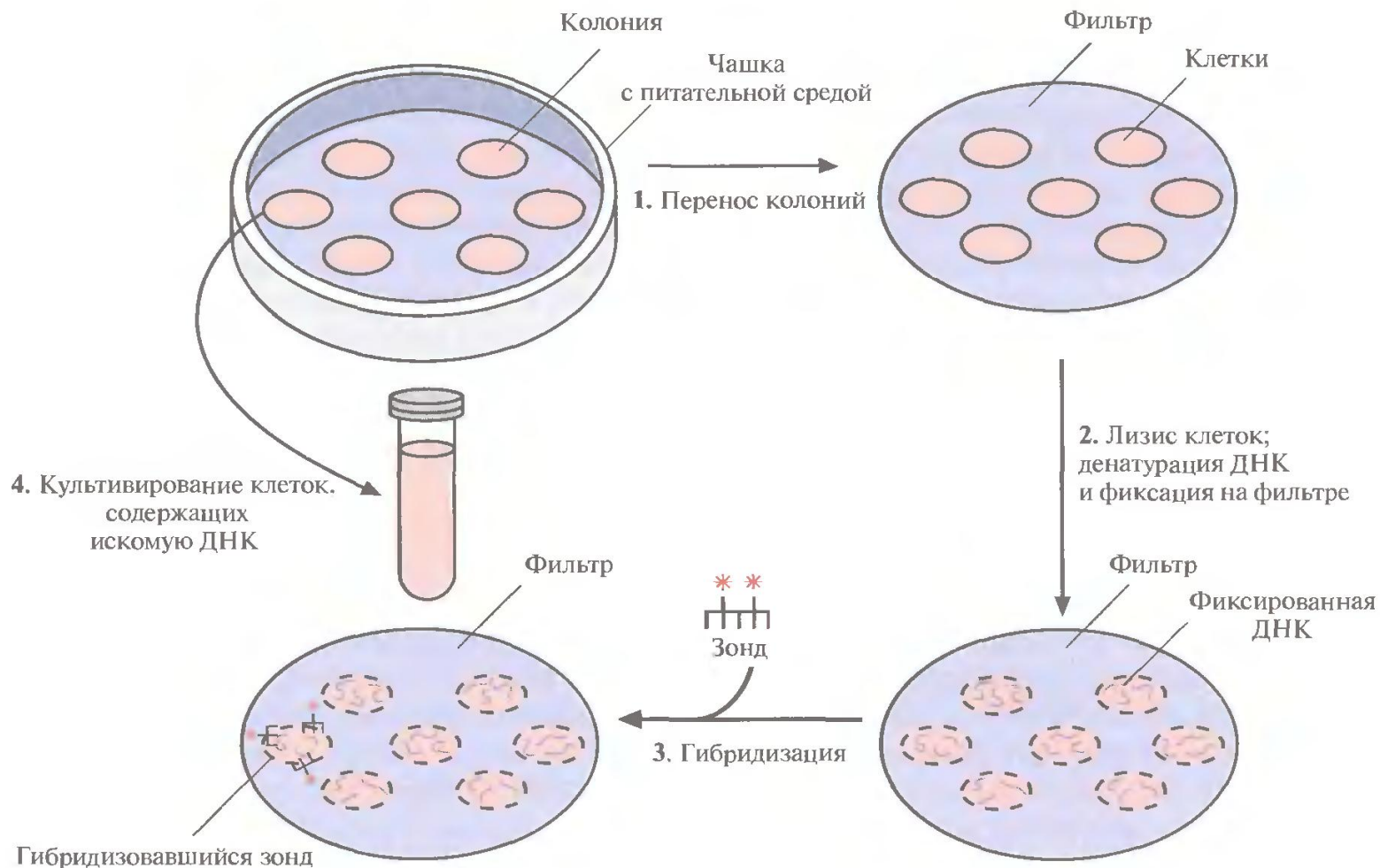
*Средний размер вставок — в т.п.н.

Прямой отбор нужного клона

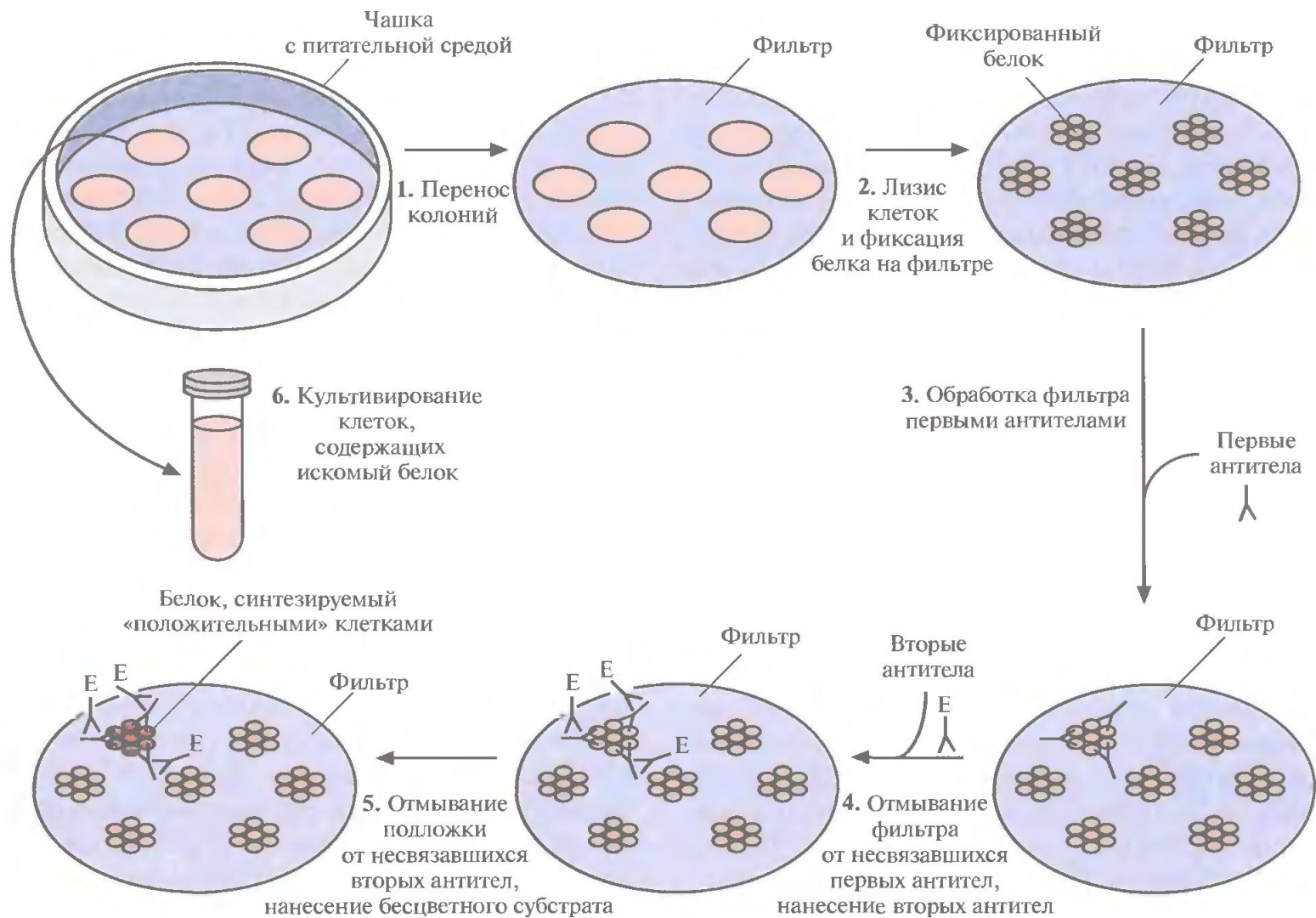
- Фенотипический метод
- Генетический метод



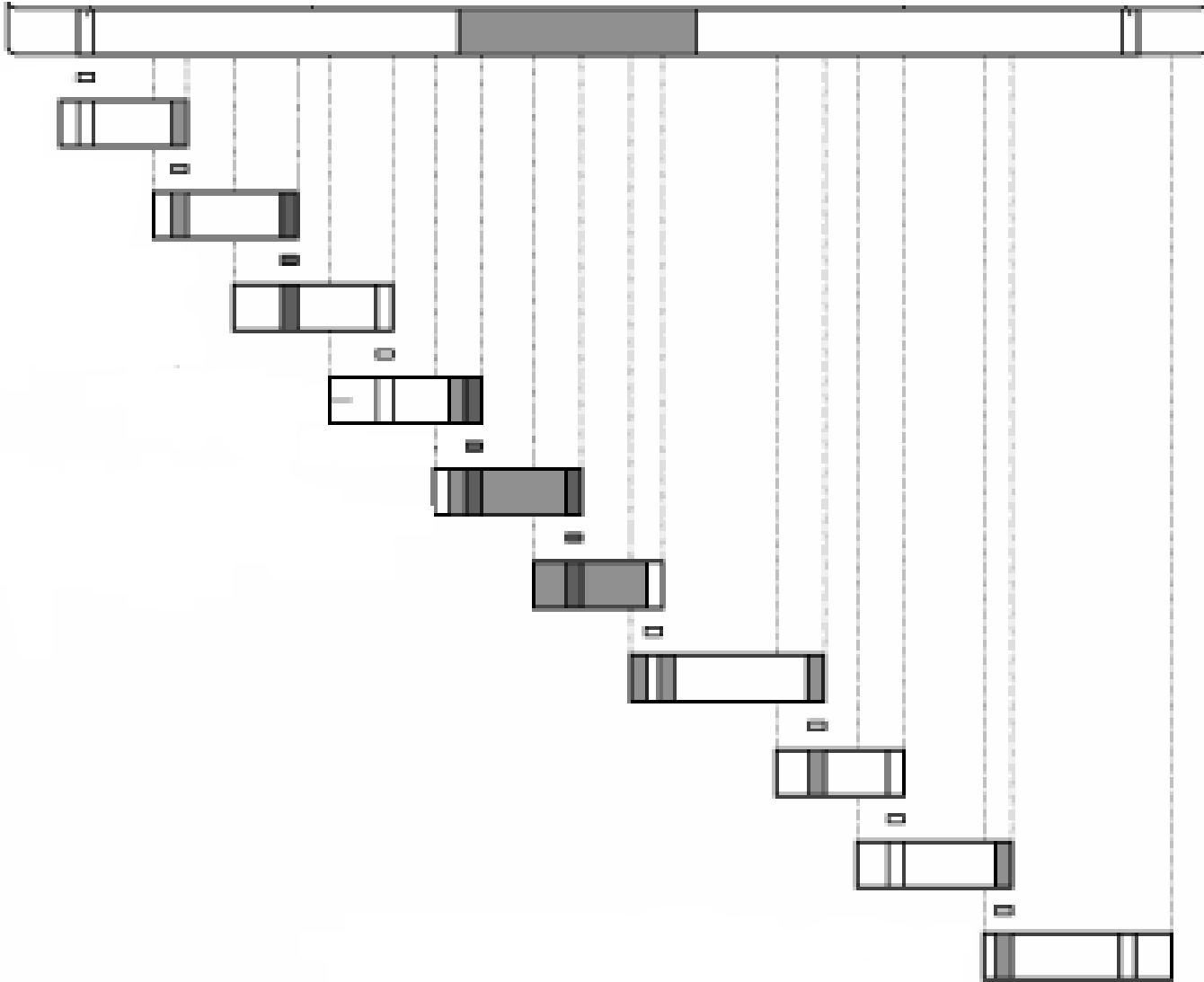
Скрининг с помощью метода гибридизации колоний



Иммунодетекция продуктов генов

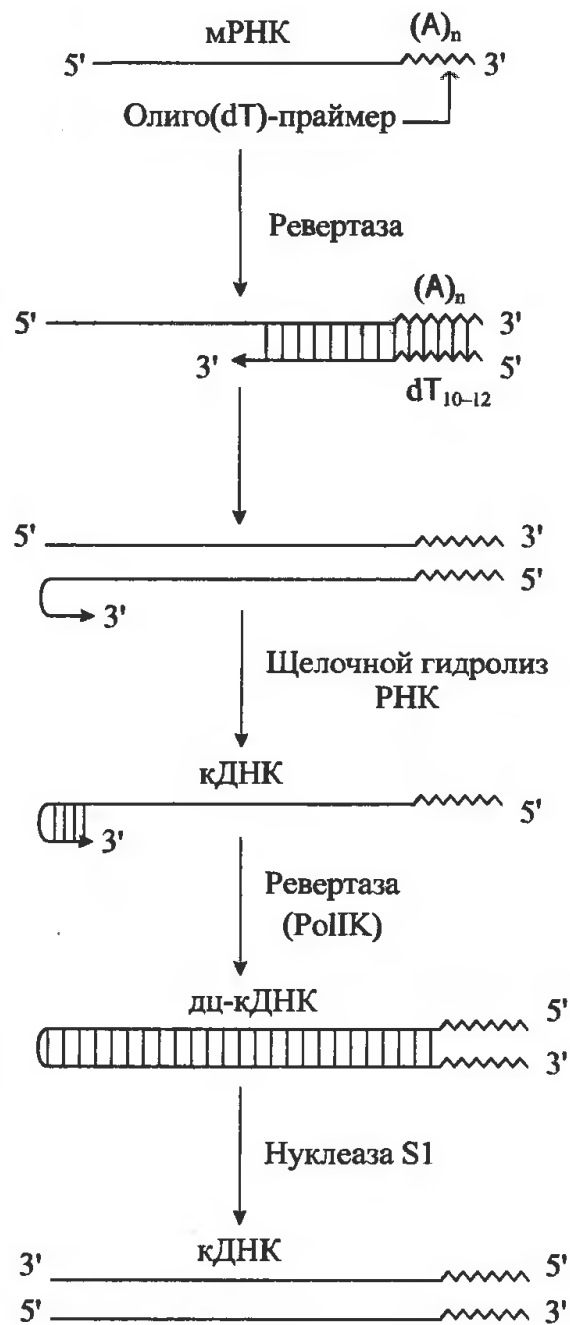


Получение связанных библиотек – метод “прогулки по хромосоме”



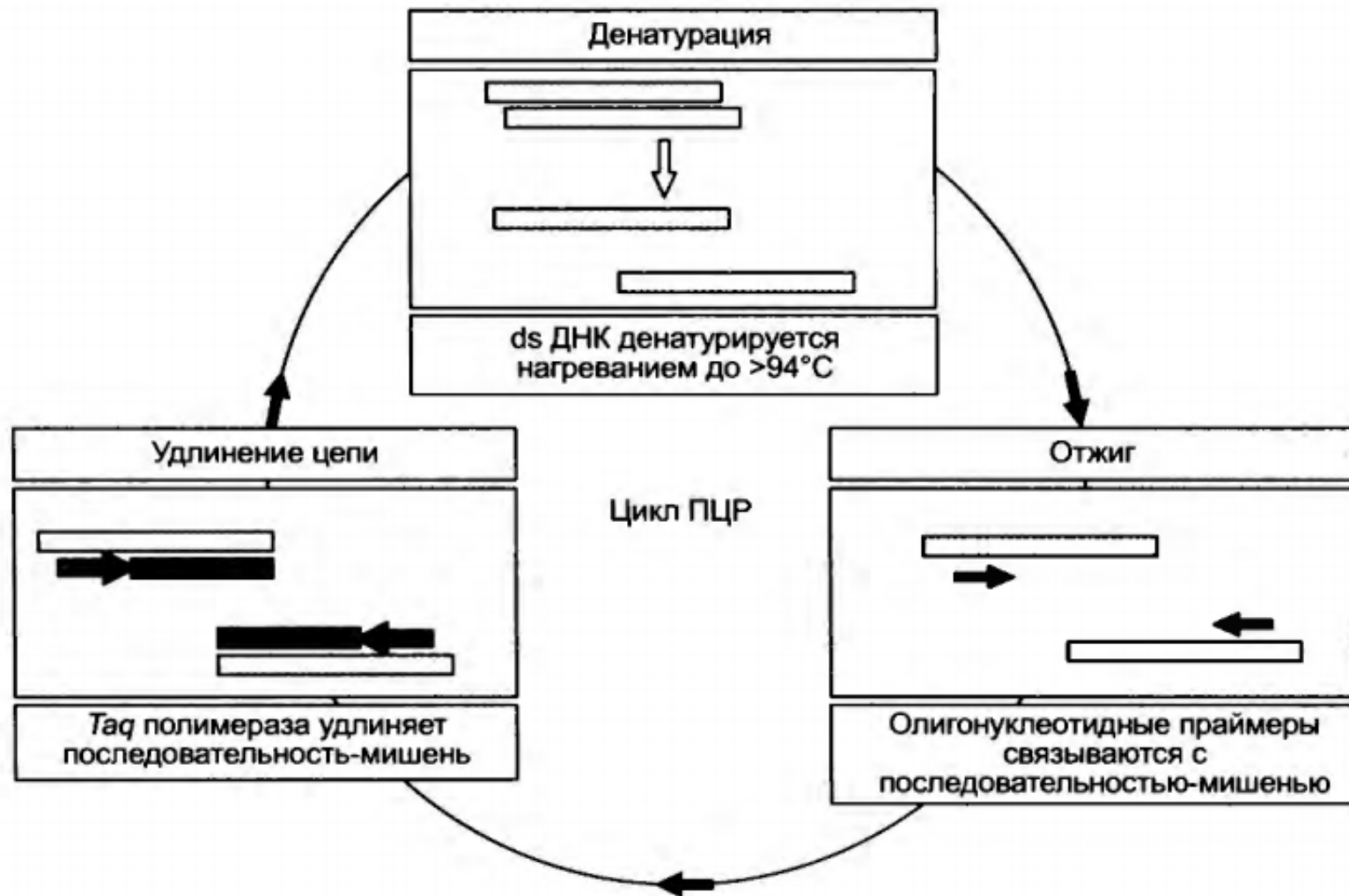
Библиотеки кДНК

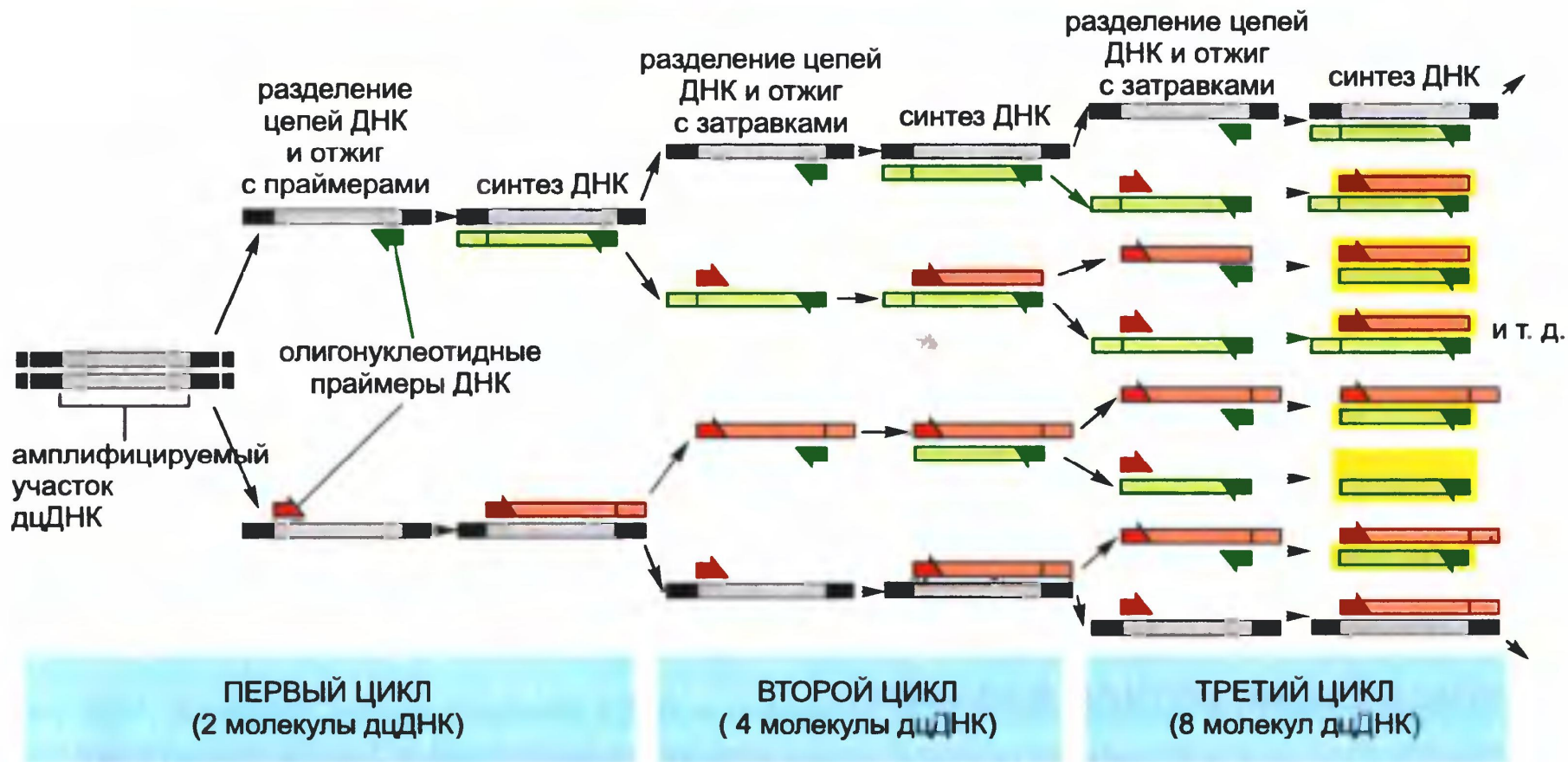
- Поиск по транскриптому клеток.
- Можно использовать **плазмидные вектора**.
- Представлены не все продукты генов, т.к. транскрипция тканеспецифична.
- Представлены только кодирующие последовательности генов.



Метод полимеразной цепной реакции

- Метод позволяет быстро получить большое число копий любого участка ДНК *in vitro* (**амплификация ДНК**).
- Характеристики метода ПЦР:
 - чувствительность**
 - специфичность**
 - точность синтеза**





Дизайн пары праймеров

- Длина 18–30 нуклеотидов
- Температура отжига 50-70 °C
- Приблизительно одинаковые t° отжига
- GC состав 40-60%
- Наличие 1-2 G/C на 3'-конце (но не больше)
- Отсутствие гомополимерных участков
- Отсутствие участков с вторичной структурой, особенно на 3'-конце
- Отсутствие взаимной комплементарности

Термостабильные полимеразы

- *Taq*: *Thermus aquaticus*
- *Tth*: *T. thermophilus* HB-8 (ОТ-ПЦР)
- *P. kodakaraensis* (Thermococcus) (высокая скорость синтеза)
- *Pfu*: *Pyrococcus furiosus* (высокоточная)

Применение метода ПЦР

Анализ последовательностей ДНК

Типирование ДНК (RAPD ПЦР)

Выявление специфических последовательностей ДНК

Выявление наличия мутаций, SNP

Изоляция целевых генов

Конструирование рекомбинантной ДНК
(ПЦР с перекрывающимися праймерами)

Сайт-направленный мутагенез

Секвенирование

Повышение специфичности ПЦР

- Избегать контаминации ДНК
- Техника “горячего старта” (hot-start)
- Вложенная (“гнездовая”, nested) ПЦР
- Ступенчатая ПЦР (touchdown)

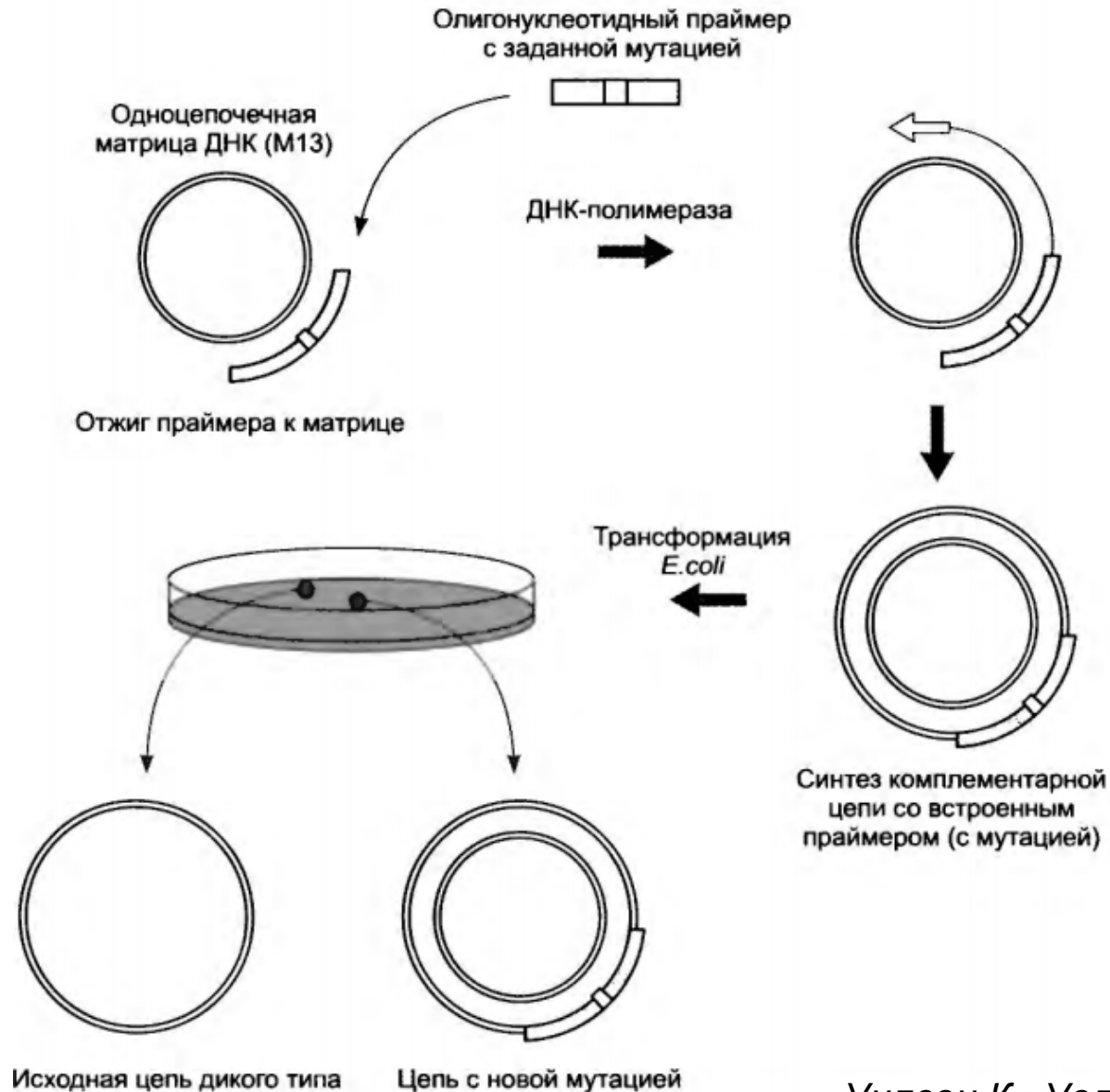
ПЦР в реальном времени

- ПЦР с образованием короткого продукта (~100 п.н.)
- Добавляются специальные зонды или красители
- Измерение динамики накопления продукта позволяет рассчитать количество матрицы
- Используются амплификаторы специальной конструкции

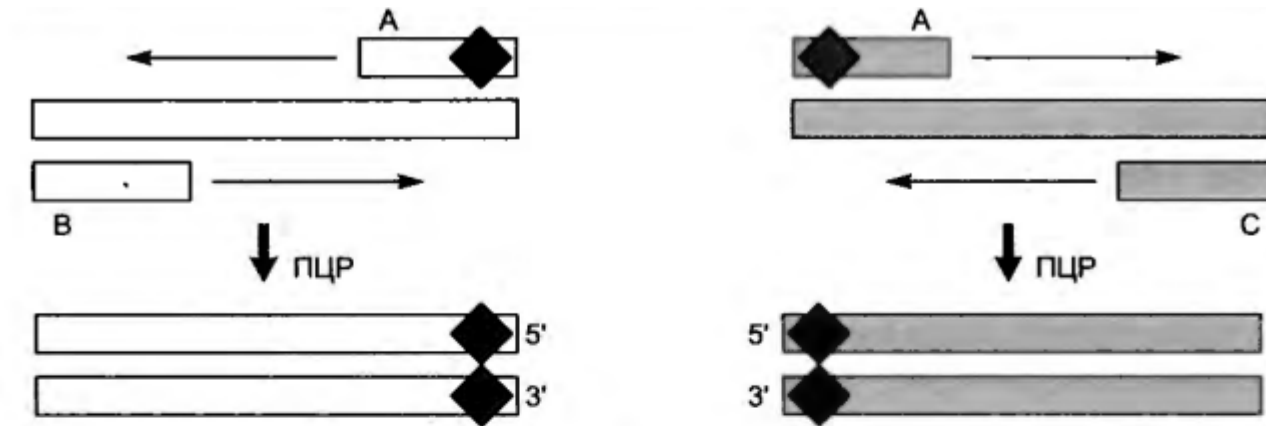
Сайт-специфический мутагенез

- Мутагенез с помощью олигонуклеотидов
- Мутагенез с помощью ПЦР
- Сегмент-специфический мутагенез

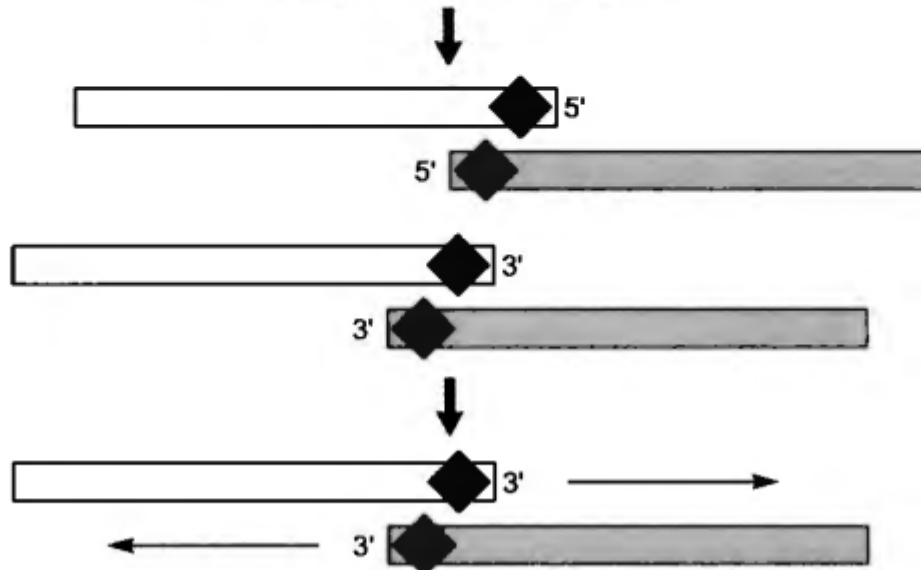
Мутагенез с помощью олигонуклеотидов



Мутагенез с помощью ПЦР



Денатурация и отжиг ПЦР-продуктов



Перекрывающиеся в области 3'-концов ПЦР-продукты, полученные с помощью праймеров В и С

Сегмент-специфический мутагенез

- ПЦР, склонная к ошибкам
(недостаток одного из нуклеотидов,
избыток Mg^{2+} ,
внесение Mn^{2+})

Секвенирование ДНК

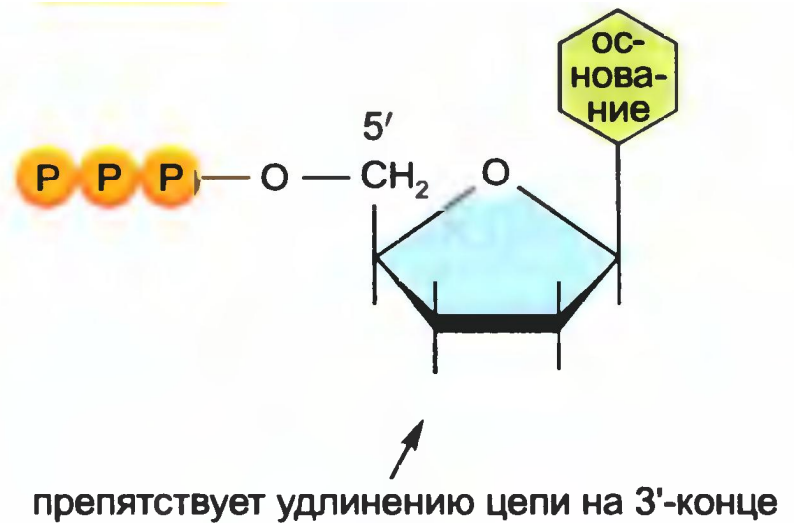
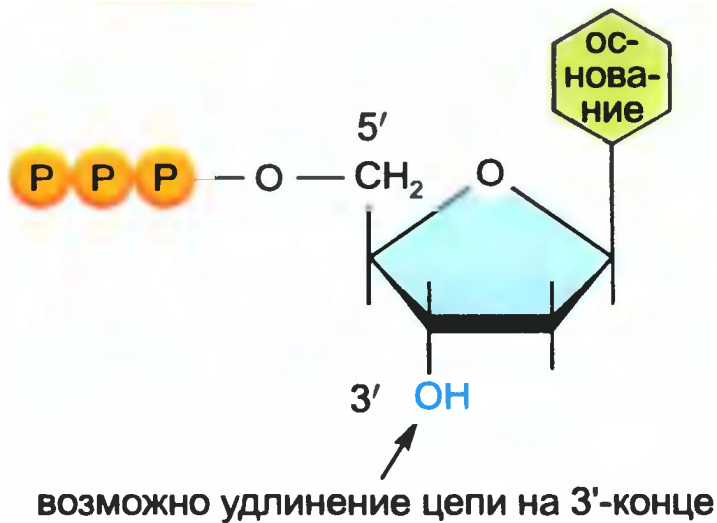
Секвенирование – определение первичной структуры (последовательности нуклеотидов) молекулы ДНК

Тысяч пар нуклеотидов в день на секвенирующий прибор

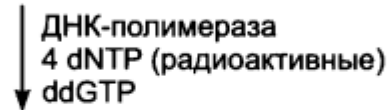
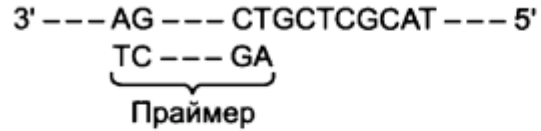


Метод Сэнгера (метод полимеразного копирования, метод обрыва цепи)

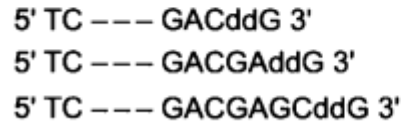
Основан на синтезе ДНК в присутствии терминирующих дидезоксинуклеотидов (ддНТФ)



Фрагменты для секвенирования, клонированные в фаг M13

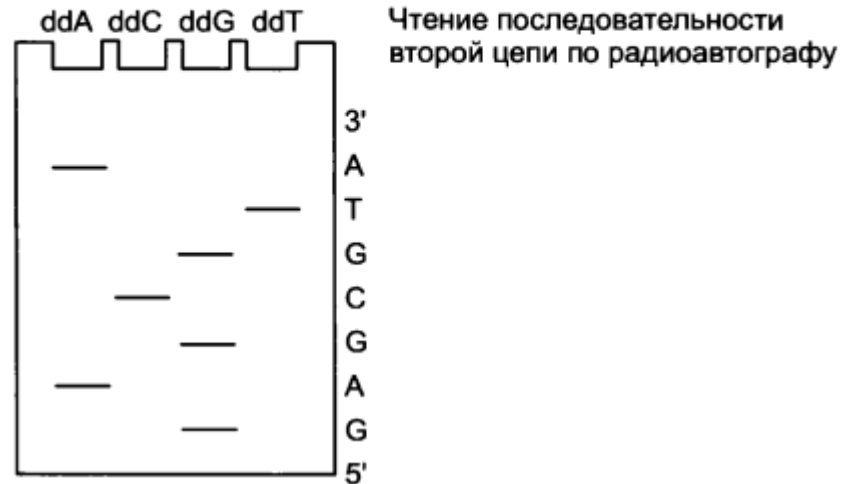


Синтез комплементарных цепей

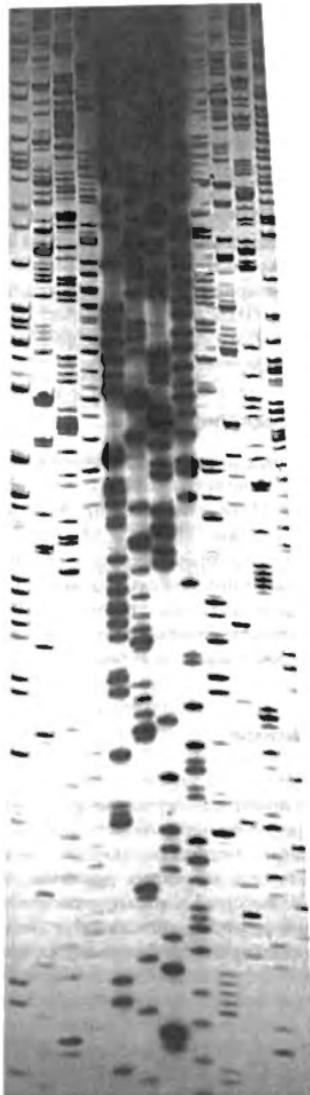


Денатурация для разделения цепей

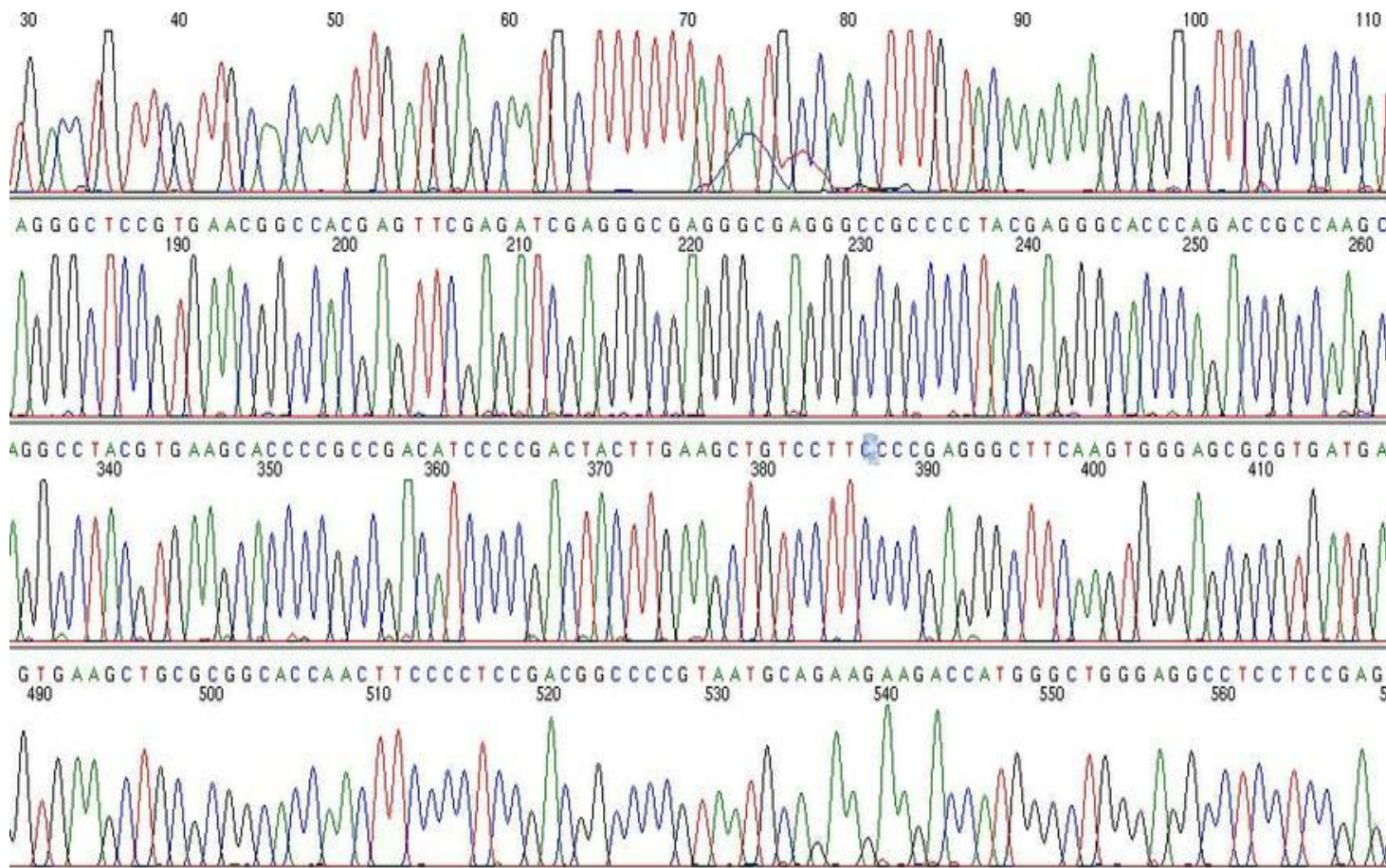
Секвенирующий гель для разделения нанесенных рядом продуктов реакций с ddA, ddC, ddG, ddT



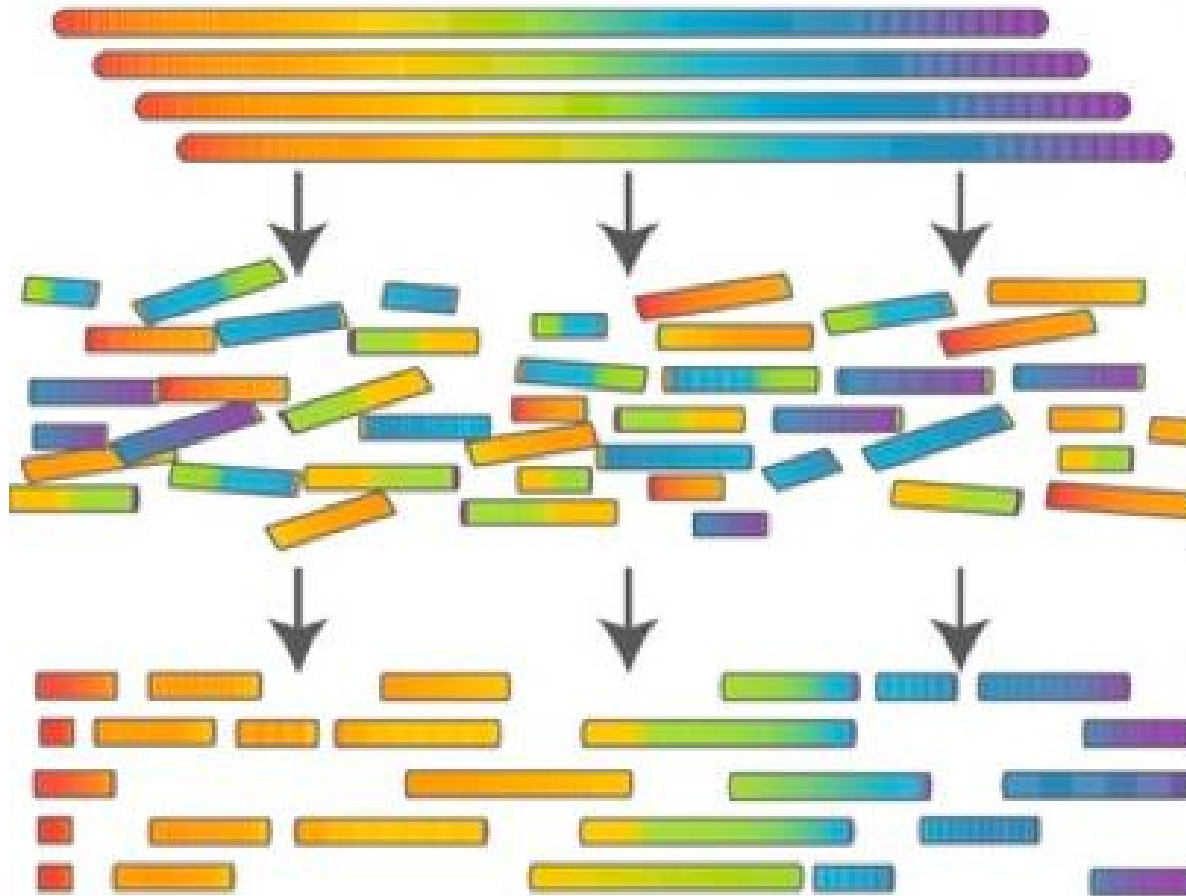
1 2 3
ACGTACGTACGT



Направление электофореза ↓



Метод “дробовика”



ATGTTCCGATTAGGAAACCTATCTGTAACCTGTTTCATTCAGTAAAAGGAGGAAATATA