

# МЕТОДЫ АНАЛИЗА ГЕНОВ И ГЕНОМОВ

- I. **Создание геномной библиотеки (банка генов)**
- II. **Скрининг банка генов**
- III. **Клонирование структурных генов эукариот. Банк кДНК**

# I. **Создание геномной библиотеки (банка генов)**

- ***Геномная библиотека*** –

коллекция клонов ДНК, содержащая хотя бы по одному экземпляру каждого из фрагментов ДНК, входящего в состав генома данного вида.

- ***Полная геномная библиотека***

*по определению содержит весь геном данного организма.*

## *Хромосомная библиотека*

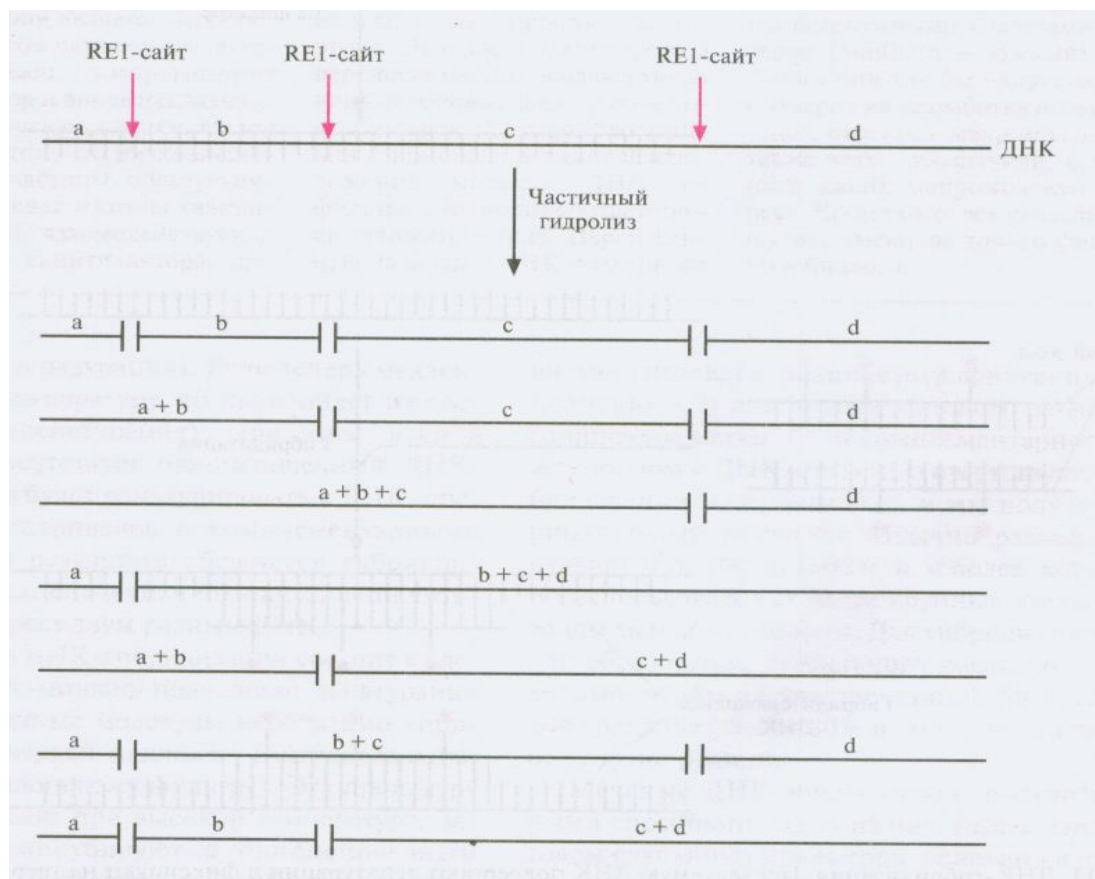
- Коллекция, клонов ДНК, содержащая хотя бы по одному экземпляру каждого из фрагментов ДНК, входящего в состав индивидуальной хромосомы

# ***Создание геномной библиотеки (банка генов, банка клонов)***

Процесс разделения геномной ДНК на клонируемые элементы и введение этих элементов в клетки-хозяева

# Этапы создания геномных библиотек:

1. Выделение ДНК организма;
2. Фрагментация ДНК с помощью рестриктаз:



(продолжение):

3. Присоединение полученного фрагмента к векторным молекулам (*плазмидного* или *фагового* происхождения);
4. Введение рекомбинантных ДНК в реципиентные бактерии;
5. После их встраивания в векторы и введения в реципиентные бактерии получают набор клонов бактерий или рекомбинантных фагов, различающихся по включенным фрагментам ДНК.

*Первую геномную библиотеку создали Т. Маннатис с сотрудниками: ДНК из генома *D.melanogaster* клонировали в клетках *E.coli*.*

## **II.Скрининг банка генов**

***Поиск клона (клонов),  
несущего искомую  
последовательность ДНК***

## Методы поиска клона (скрининга):

1. **Гибридизация** с меченым **ДНК-зондом** с последующим радиоавтографическим анализом;
2. **Иммунологический** скрининг;
3. **Скрининг по активности белка**, кодируемого геном-мишенью.

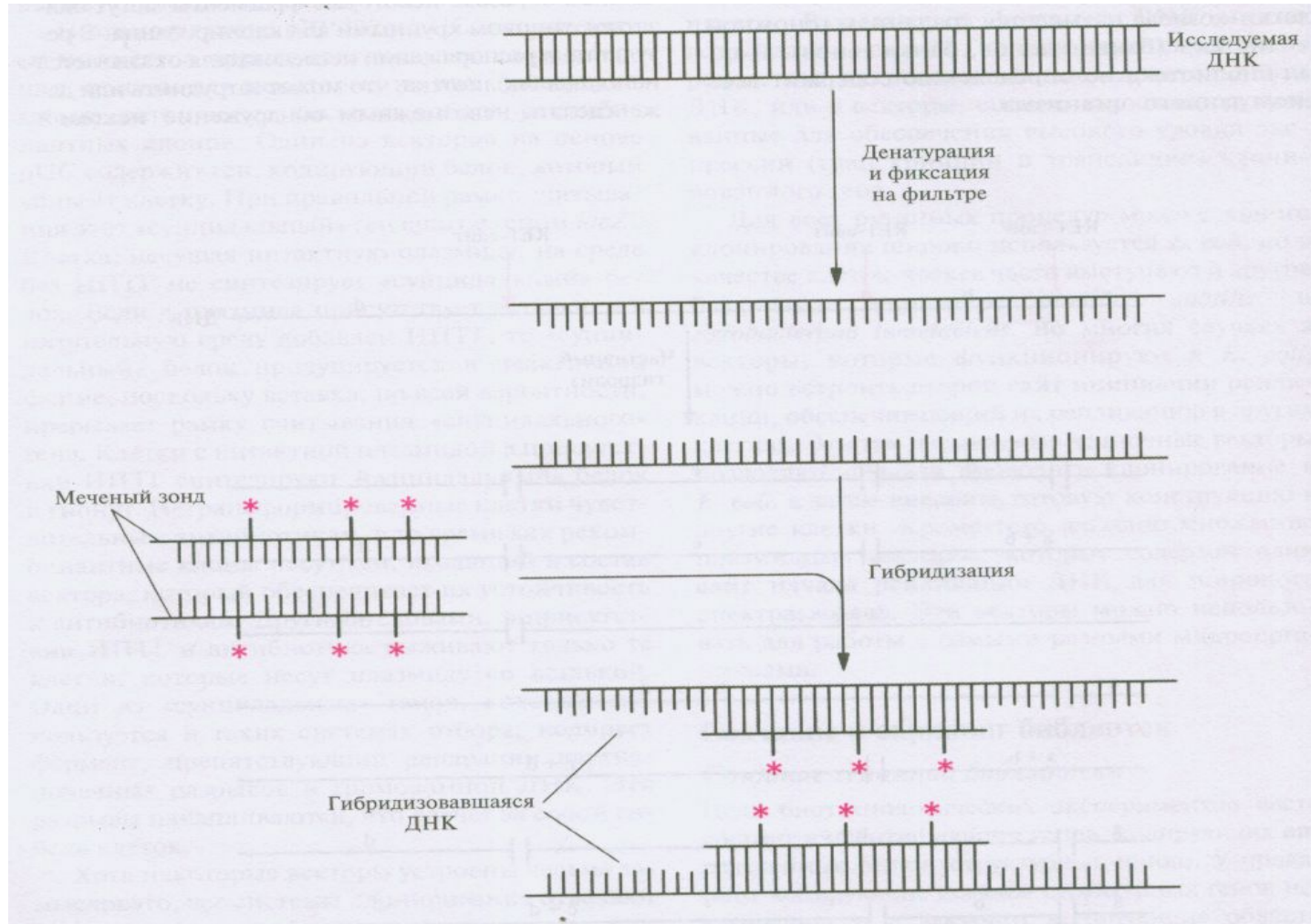


# 1. Скрининг с помощью гибридизации

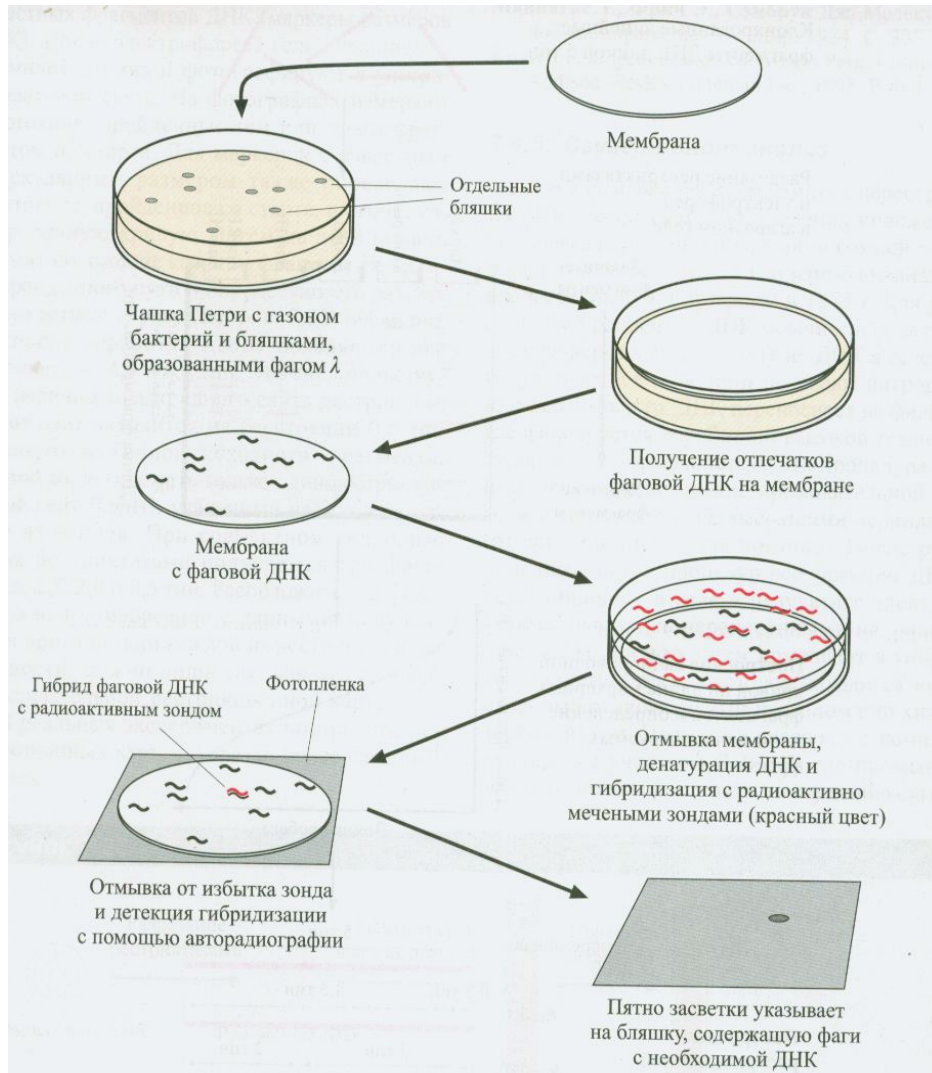
**Гибридизация** позволяет:

- идентифицировать нуклеотидные последовательности в очень низкой концентрации;
- определять, какое **количество копий** последовательности ДНК, комплементарный ДНК-зонду, присутствует **в геноме клетки**.

**Инструментарий ДНК-гибридизации - ДНК-зонд, чистый фрагмент ДНК (от 100 до 1000 п. н), комплементарный к тому фрагменту, который надлежит выявить. Получают клонированием или химическим путем, метят по 32P.**



## Скрининг библиотеки, заключенной в фаге $\lambda$ .



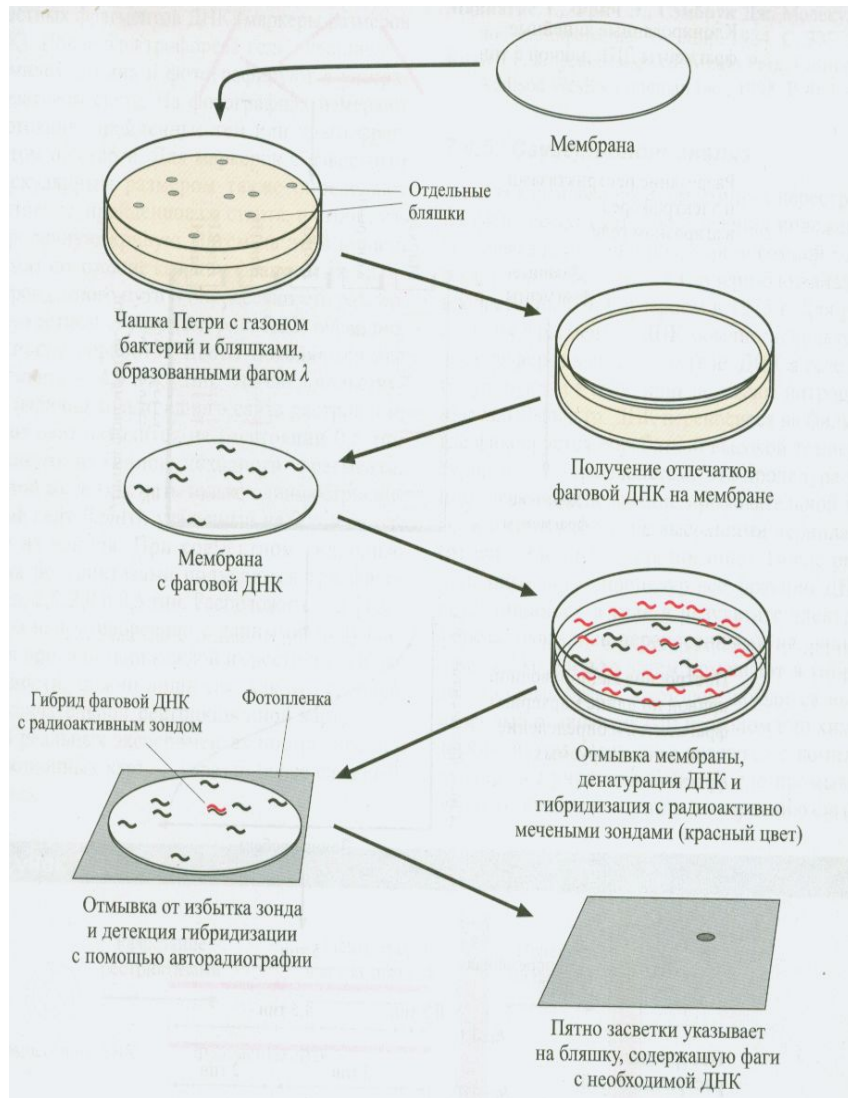
Выращивают газон бактерий *E.coli*, на который помещают суспензию фагов, содержащих геномные клоны.

В тех участках, где фаги инфицировали бактерии и размножились, образуется бляшка.

Каждая бляшка состоит из большого числа потомков одиночной фаговой частицы, размножившихся в инфицированных и лизированных бактериях.

Каждый раз, когда бактерия лизируется, освобождаются не только упакованные фаговые частицы, но и неупакованная ДНК.

**(продолжение)**



На этот газон на несколько минут кладут мембранный фильтр - ДНК из бляшки связывается с ним.

ДНК денатурируют на одиночные нити, после чего фильтр инкубируют с меченым зондом.

Гибридизация меченого зонда с ДНК из бляшки выявляется в виде темного пятна засветки на фотопленке.

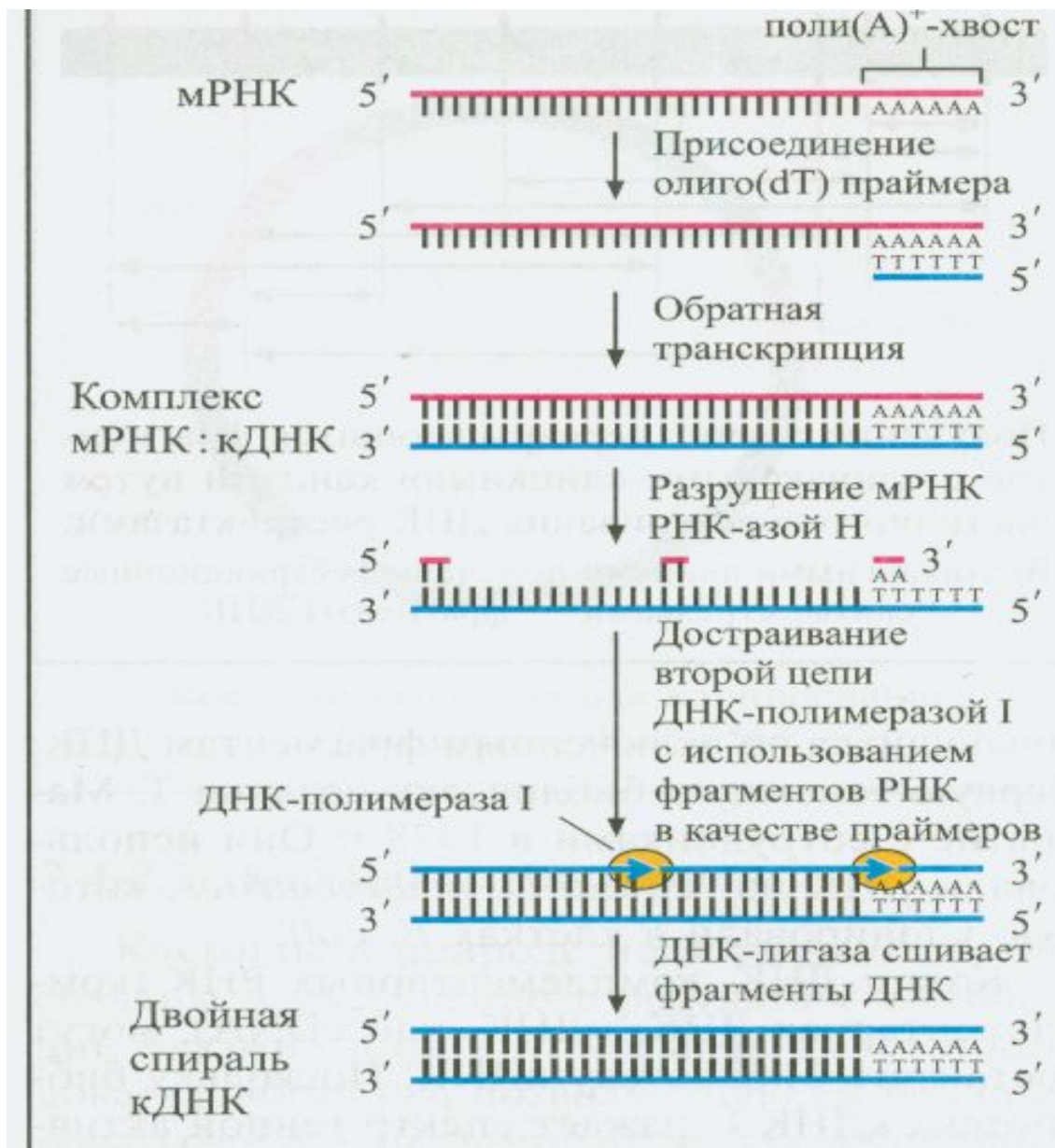
По положению засвеченного пятна находят бляшку на газоне.

Фаги с этой бляшки можно собрать и, инфицировав новые бактерии, размножить фаги, а, следовательно, и клон до количеств, необходимых для молекулярного анализа.

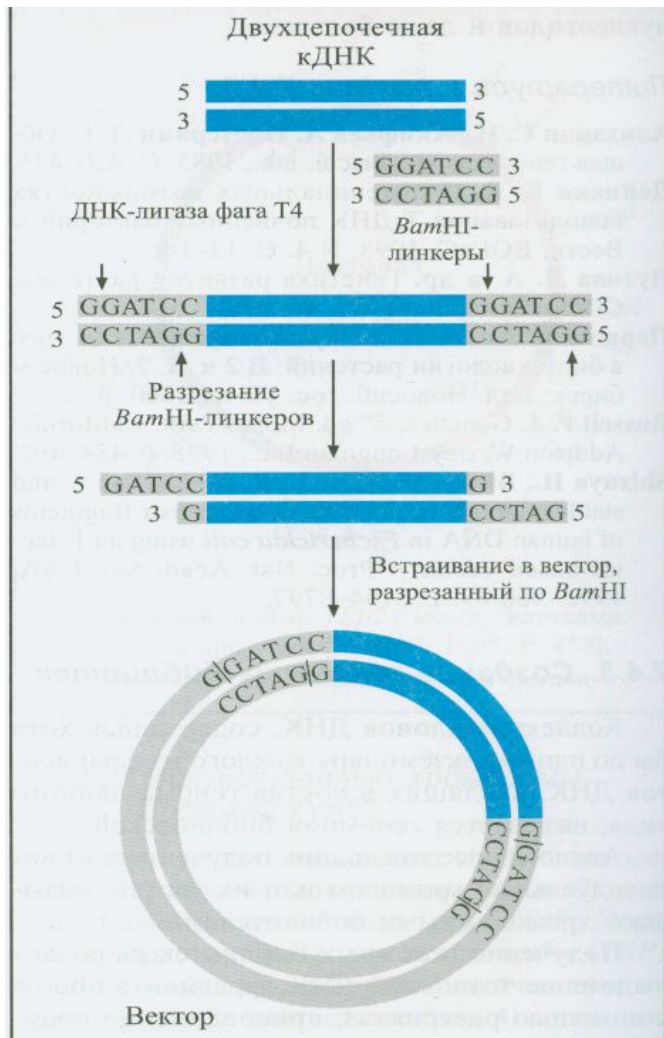
### III. Клонирование структурных генов эукариот. Банк кДНК

- **кДНК** - синтезированные *in vitro* комплементарные ДНК-копии клеточных мРНК.
- Таким образом, **кДНК представляют собой гены без интронов и не содержат регуляторных элементов генов.**
- **Банк кДНК** - коллекция ДНК-копий мРНК клеток конкретной ткани на определенной стадии развития организма.

## Этапы синтеза кДНК



# Клонирование фрагментов кДНК с помощью линкеров, содержащих сайт рестрикции *Bam*HI



- К молекулам кДНК с помощью ДНК-лигазы добавляют линкер – короткий фрагмент ДНК (8-12пн).
- Линкер содержит сайт узнавания рестриктазы *Bam*HI.
- кДНК лигируют с векторной ДНК