

Геном и геномные библиотеки

Геном

- Совокупность генов гаплоидного набора хромосом конкретного организма.

Геномная библиотека

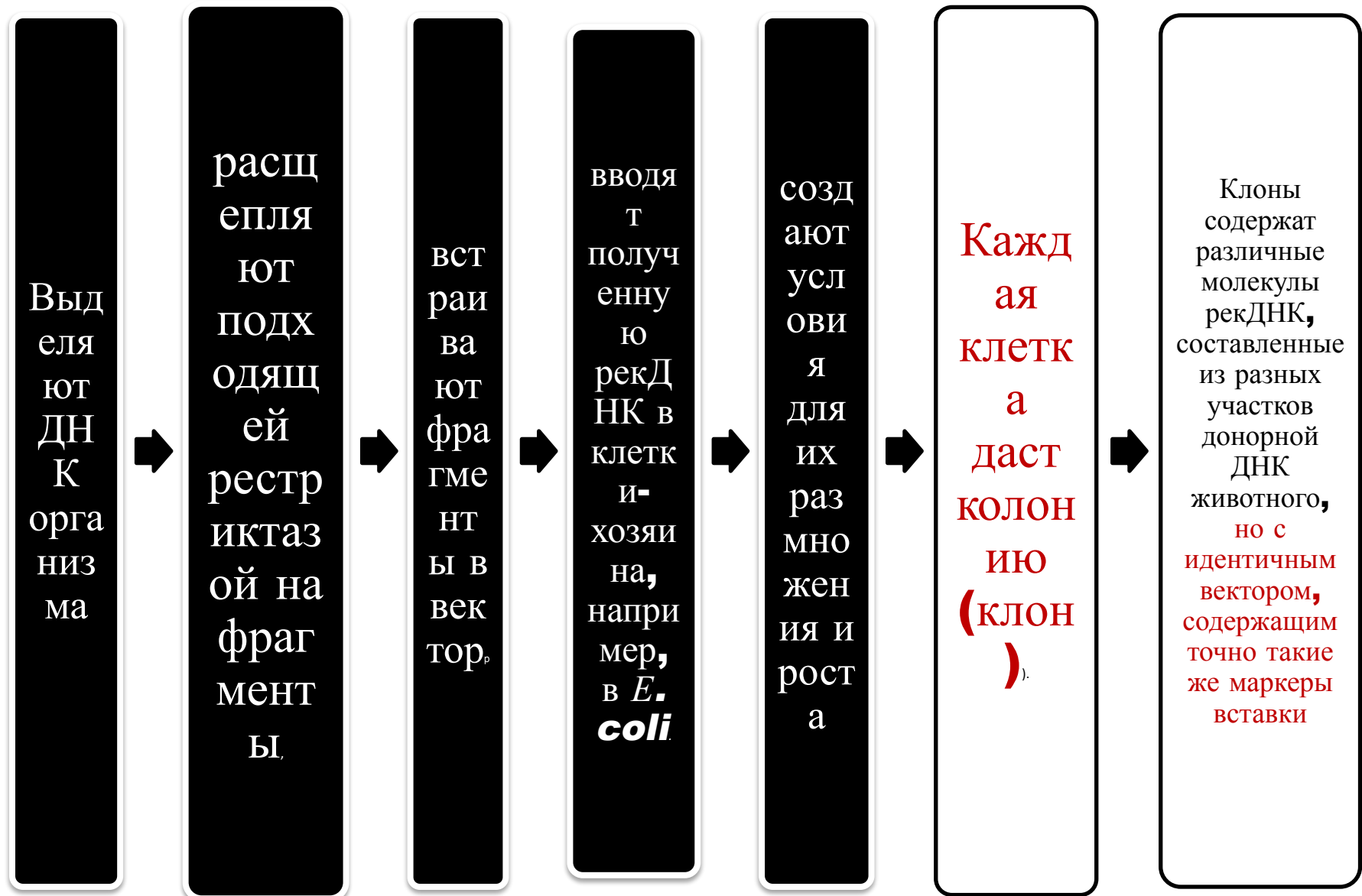


Созданы геномные библиотеки многих организмов

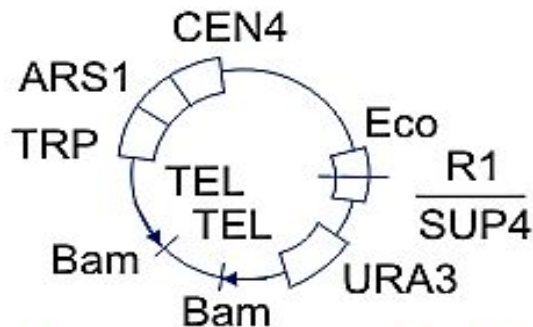
- Набор клонированных фрагментов ДНК, в совокупности составляющих индивидуальный геном.
- Для создания геномной библиотеки конкретного организма ДНК расщепляют рестриктазами, каждый фрагмент встраивают в вектор и вводят в клетки-хозяева. Клетка, получившая рекДНК, размножившись, образует колонию - клон. Жизнедеятельность таких клеток можно поддерживать длительное время.

- в т.ч. человека.

Основные стадии технологии создания геномной библиотеки



Искусственная хромосома дрожжей со вставкой **100-700** т.п.н.

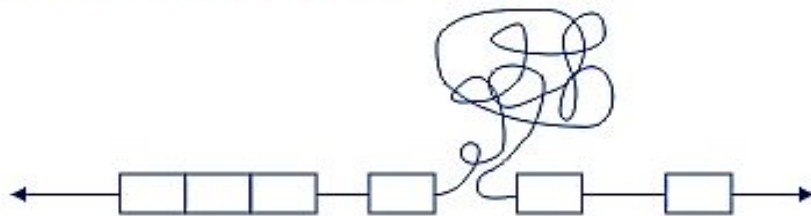


1 расщепление *Bam*HI

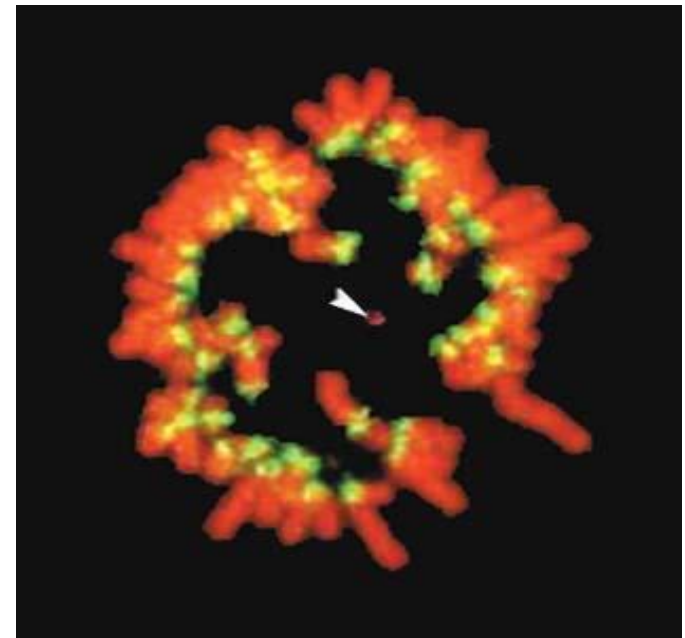
2 расщепление *Eco*RI



3 лигирование с крупными
*Eco*RI - фрагментами ДНК



- 1 - линейаризация ДНК вектора рестриктазой *Bam*HI;
- 2 - расщепление линейаризованной ДНК вектора рестриктазой *Eco*RI с образованием "плечей";
- 3 - введение в вектор клонируемого *Eco*RI-фрагмента ДНК



Искусственная мини-хромосома дрожжей (пока без истинных генов, кодирующих белки). Электронная микроскопия

Введение рекДНК в клетку

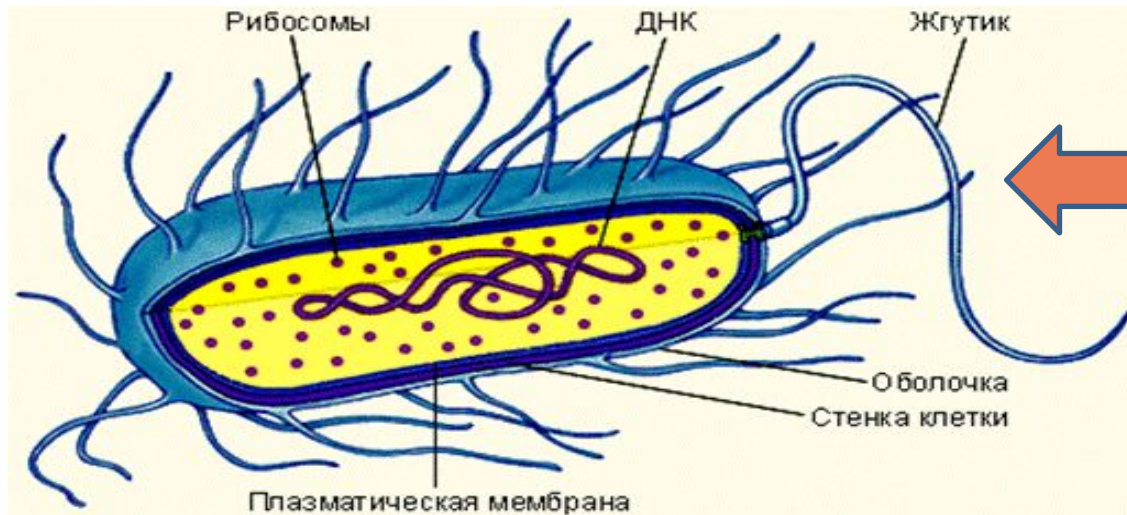
ТРАНСФОРМАЦИЯ

- введение рекДНК в клетку

Клетка, принявшая рекДНК:

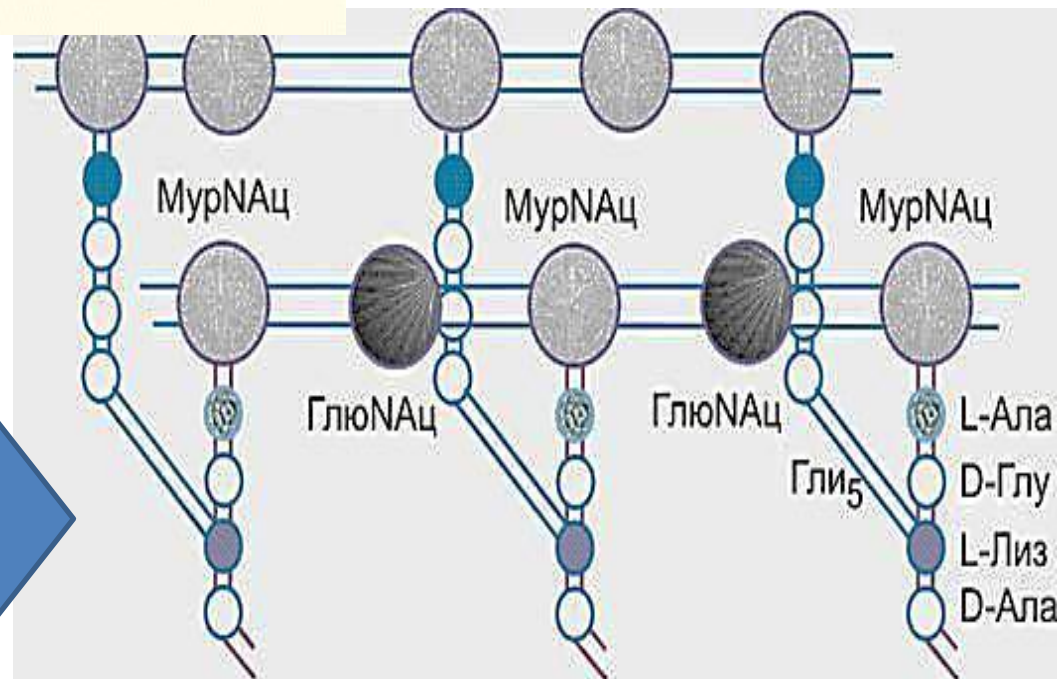
- клетка-хозяина,**
- клетка-реципиент,**
- клетка-продуцент,**
- компетентная клетка,**
- клетка-акцептор и т.д.**

Схема строения пептидогликана бактерий (муреиновый мешок)



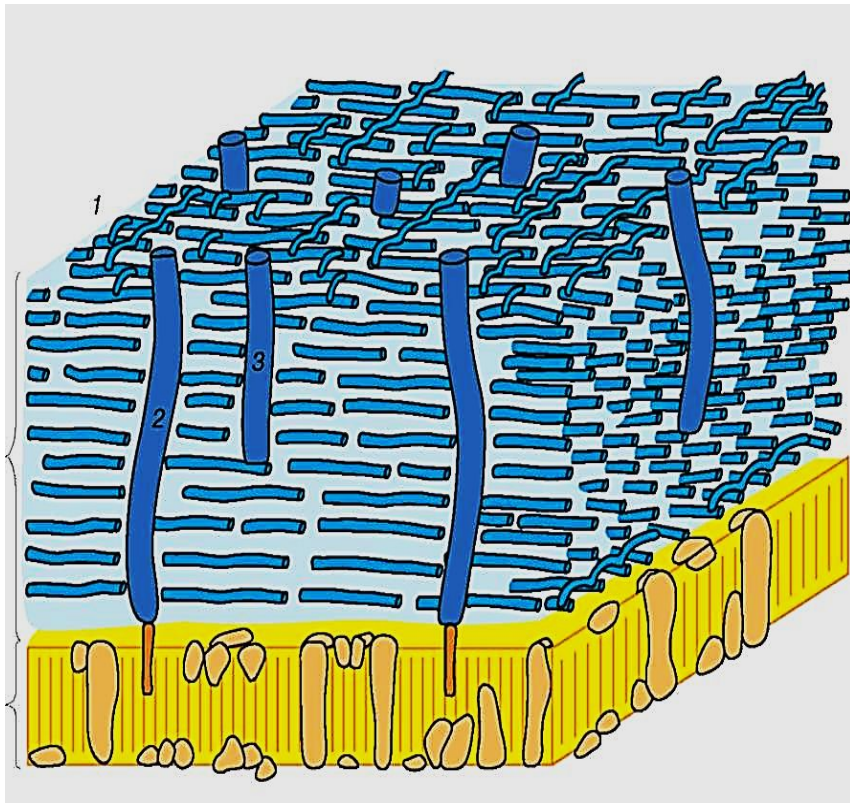
Модель бактериальной (прокариотической) клетки, созданная на основе электронной микроскопии

остов из N-ацетилмурамовой кислоты (MurNAc) и N-ацетилглюкозамина (ГлюNAc); боковые пептиды, состоящие из L-аланина (L-Ала), **D-глутамата** (D-Глу), L-лизина (L-Лиз) и **D-аланина** (D-Ала); пептидные (Гли5) поперечные мостики.

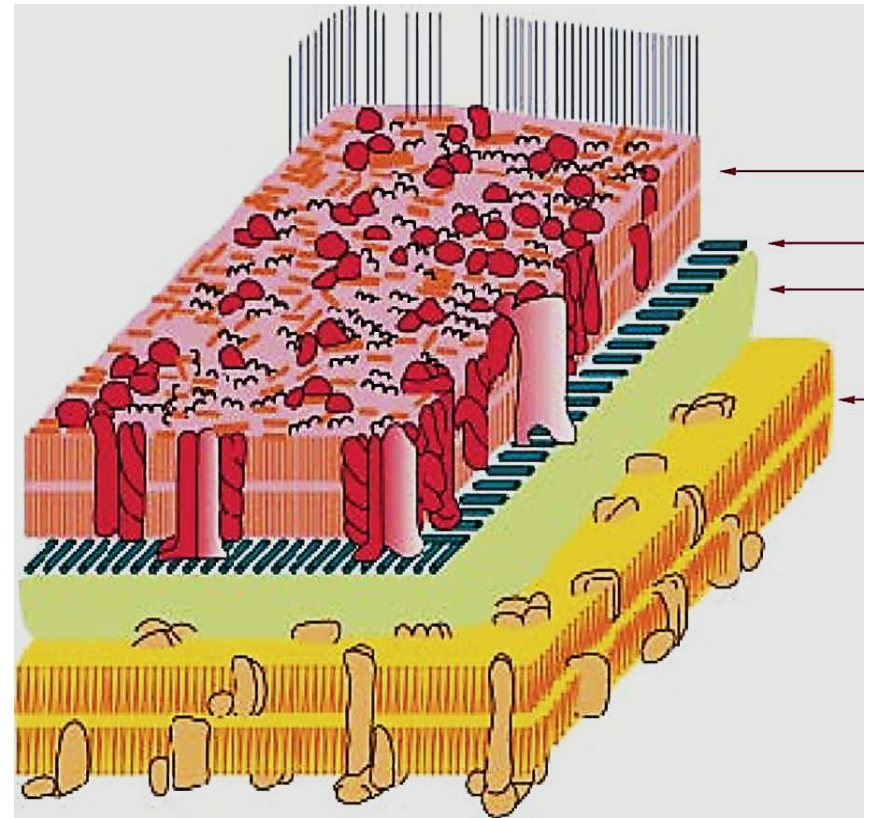


Структура клеточной стенки бактерий (схема)

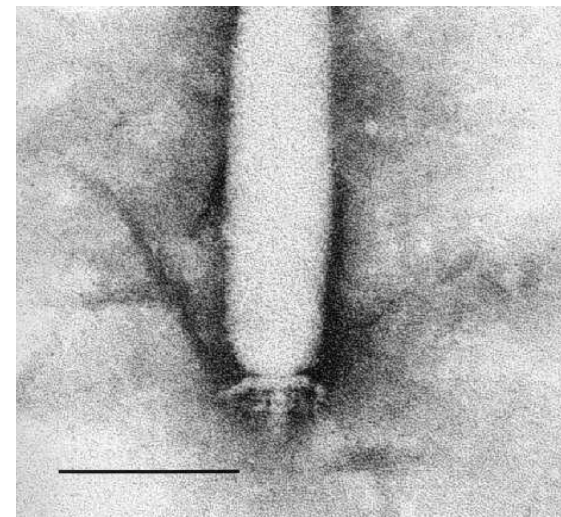
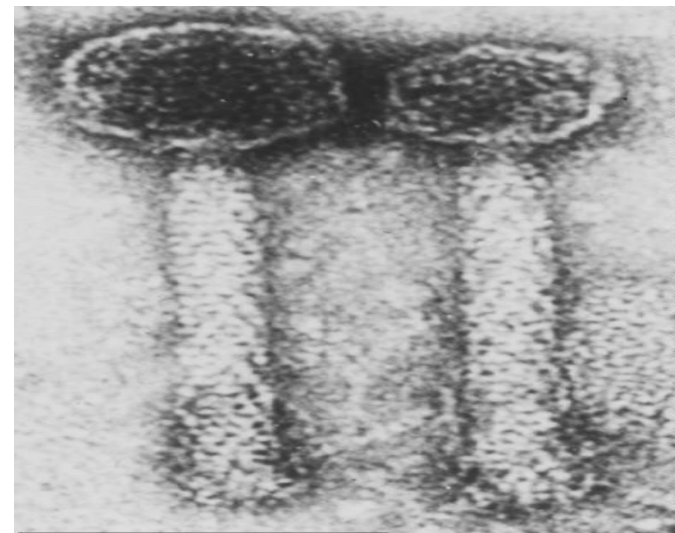
Грамположительных (Gr+)



Грамотрицательных (Gr-)



Инфицирование фагом λ клетки *E.coli*



Для бактерий наиболее оптимальным способом доставки реДНК являются БАКТЕРИОФАГИ (применение ограничено из-за лизиса клетки-хозяина)

ТРАНСФОРМАЦИЯ - введение рекДНК в клетку

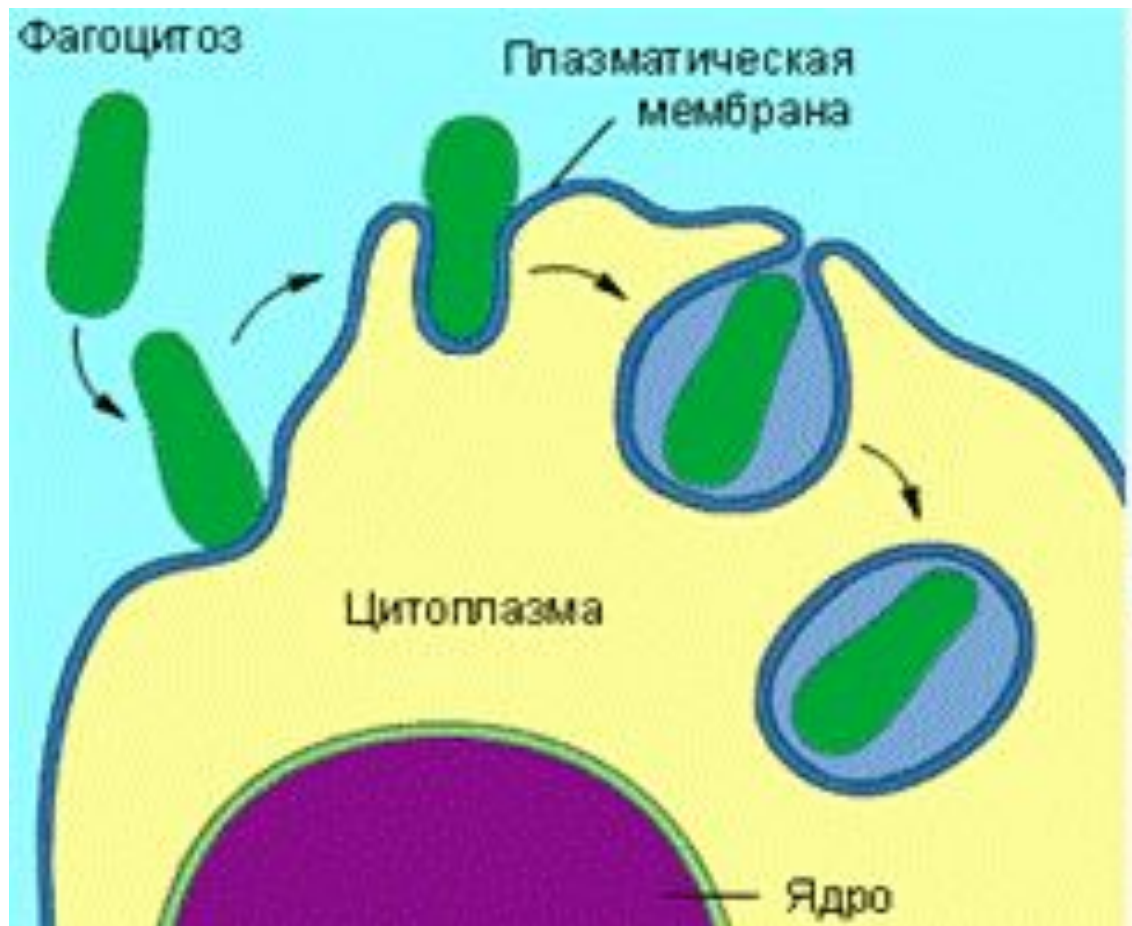
≡клетку-хозяина, ≡ клетку-реципиент, ≡
клетку-продуцент, ≡ компетентную
клетку, ≡клетку-акцептор и т.д.

Способы повышения проницаемости клеточных стенок:

- Химическая обработка
 - **(CaCl₂ + нагревание)**
- Физические методы
 - Электропорация
 - УЗ
- Биохимические методы
 - ферментативная обработка

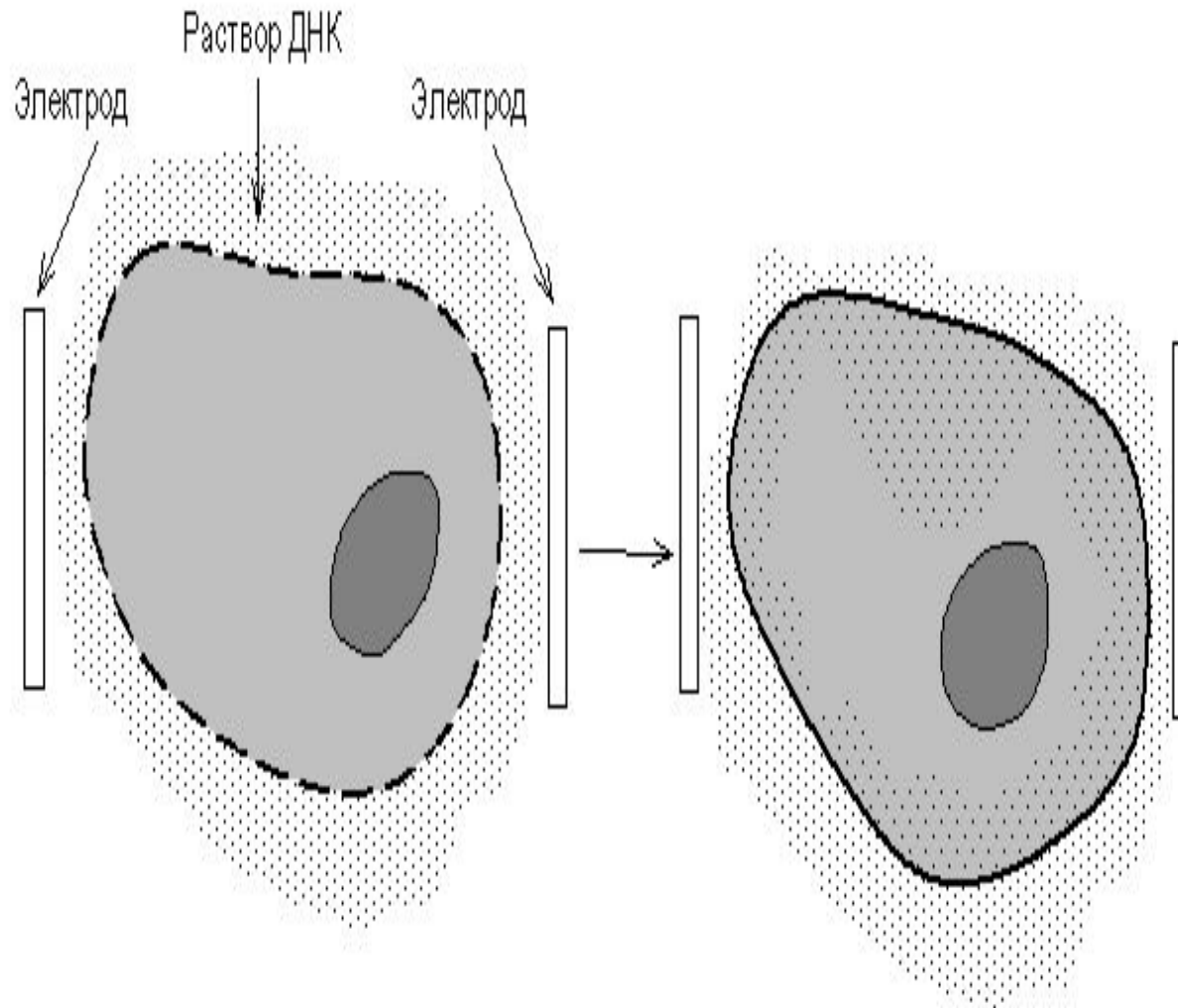
Химическая обработка клеток

Конц. CaCl_2 + 42°C, 1,5 минут



Схематическое
изображение
фагоцитоза
эукариотической
клетки

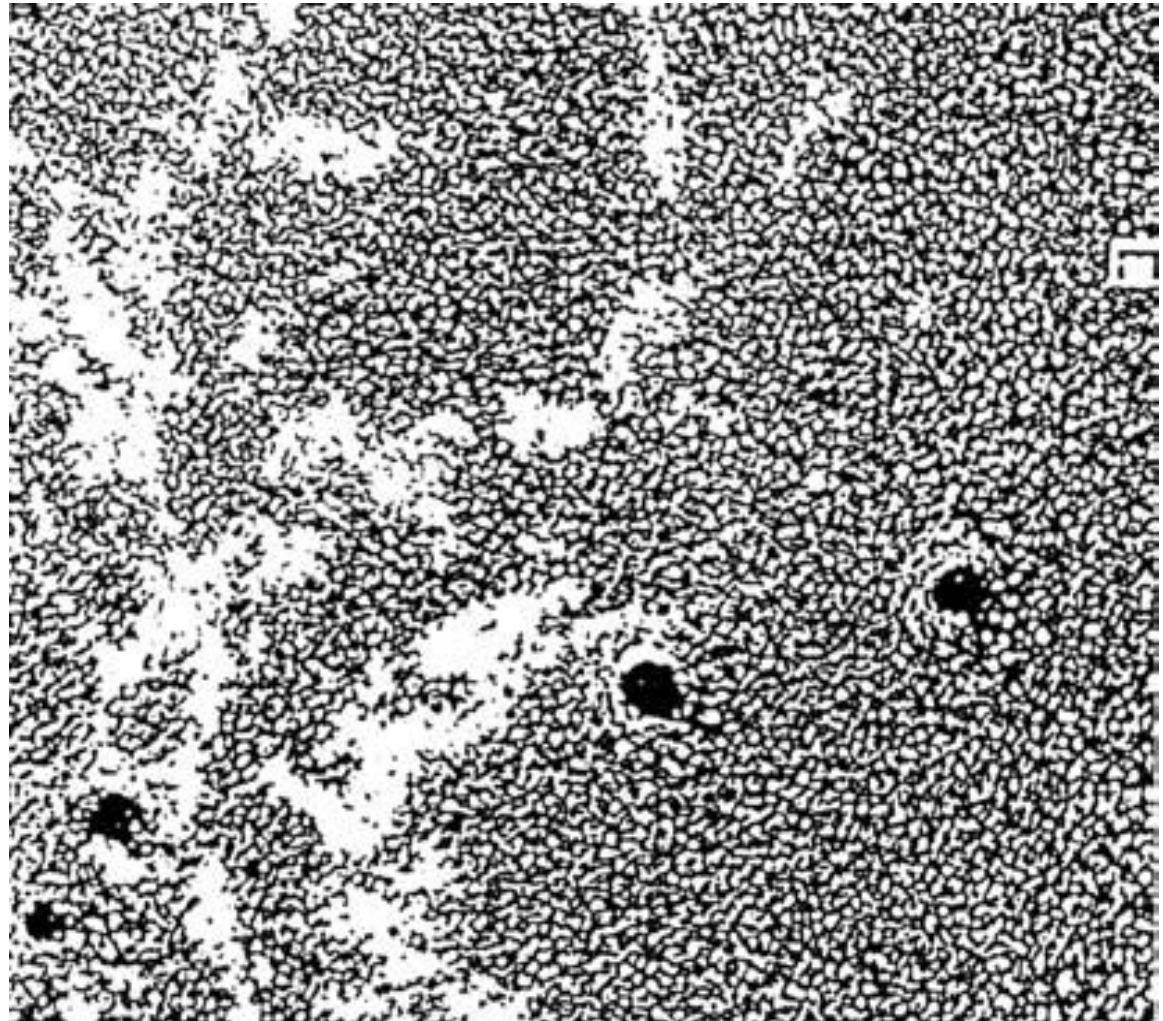
Метод электропорации



Высоковольтные импульсы (напряжение 200 - 350 В, длительность импульса 54 мс) приводят к образованию пор (электропробой) в цитоплазматической мембране

Электропорация.

Появление пор в
липидном бислое в
результате
воздействия
импульсного
электрического поля.
Диаметр пор сост.
десятки
нанометров,
соизмерим с
размером рекДНК



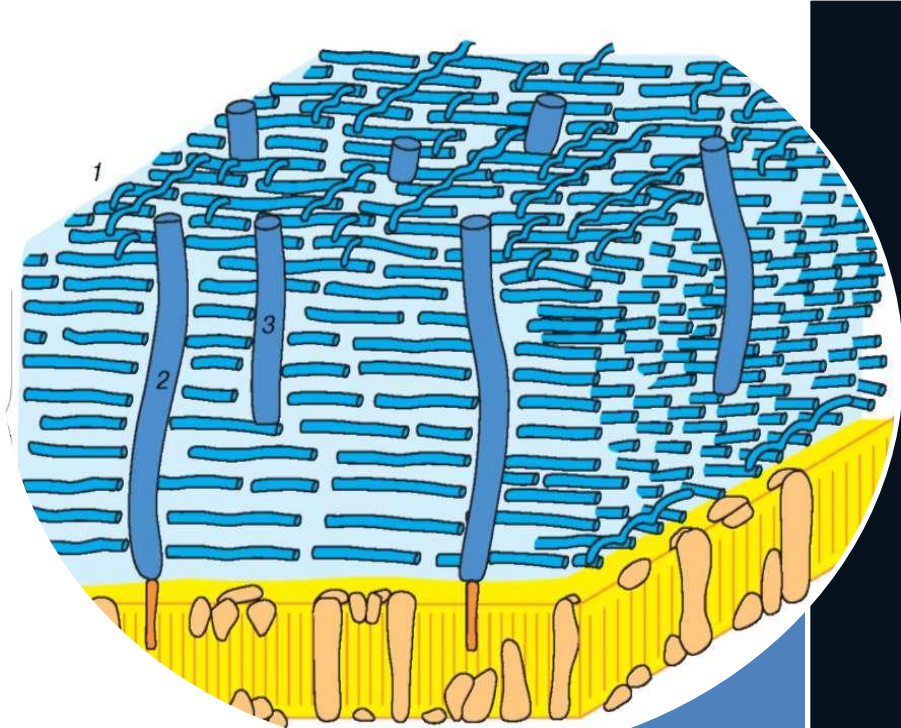
Электронная микрофотография клеток после электропорации

УЗ порация

Биохимический метод увеличения проницаемости клеточных стенок.

*Основан на использовании ферментов,
обратимо разрушающих клеточную стенку*

Схема строения клеточной стенки грамположительных бактерий



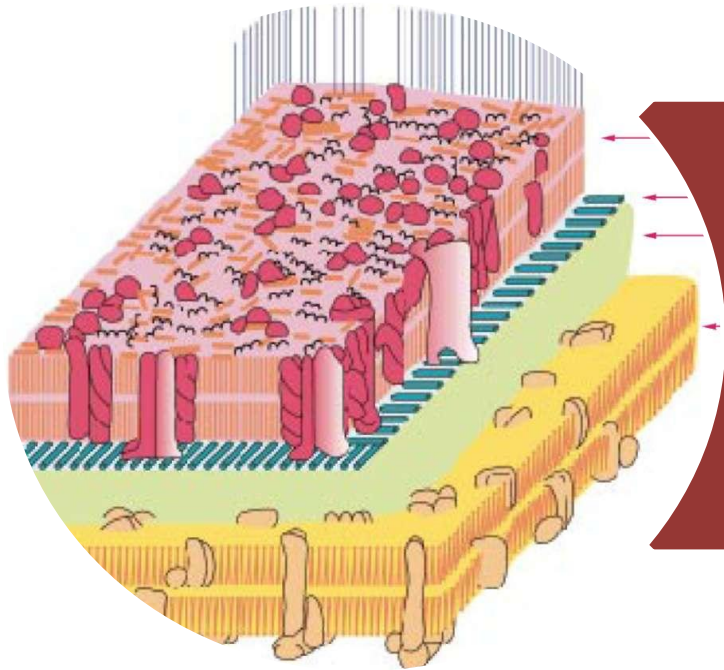
1 -слой пептидогликана (N-ацетилглюкозамина и остатков N-ацетилмурамовой к-ты, соединенных пептидными мостиками)

б - цитоплазматическая мембрана;

в - периплзма

Реорганизация структуры КС легко протекает под воздействием фермента, разрушающего пептидные мостики – **ЛИЗОЦИМА яичного белка**

Схема строения клеточной стенки **грамотрицательных** бактерий



a – внешний липидный слой,
б -пептидогликан,
в - периплазма,
г - цитоплазматическая мембрана

Клеточная стенка покрыта слоем липидов. Для реорганизации структуры используют **лизоцим в сочетании с ЭДТА**

У дрожжей клеточные стенки состоят из β -глюканов и частично фосфорилированных маннатов

фотография клеточной стенки дрожжевой клетки

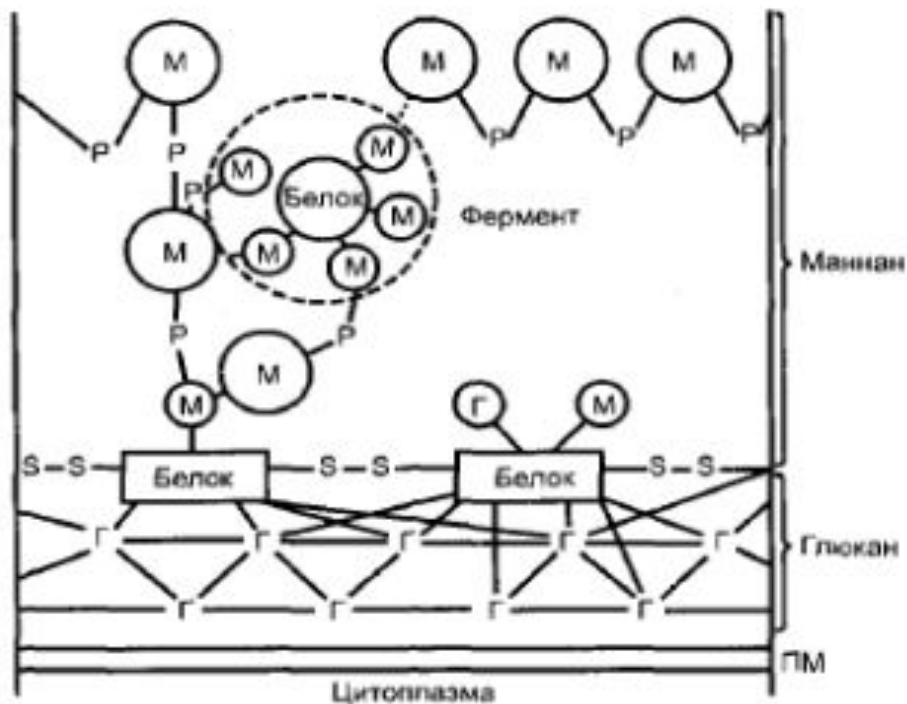


Рис. 1.5. Схема строения клеточной стенки дрожжей (по Котык А., Яначек К.)

М – маннан; Г – глюкан; Р – фосфат; ПМ – плазматическая мембрана



Figure 2: Yeast cell wall

Комплексный дрожжелитический препарат - ферменты фосфоманназа, β -глюканаза-**1,3**

Плесневые (низшие) грибы

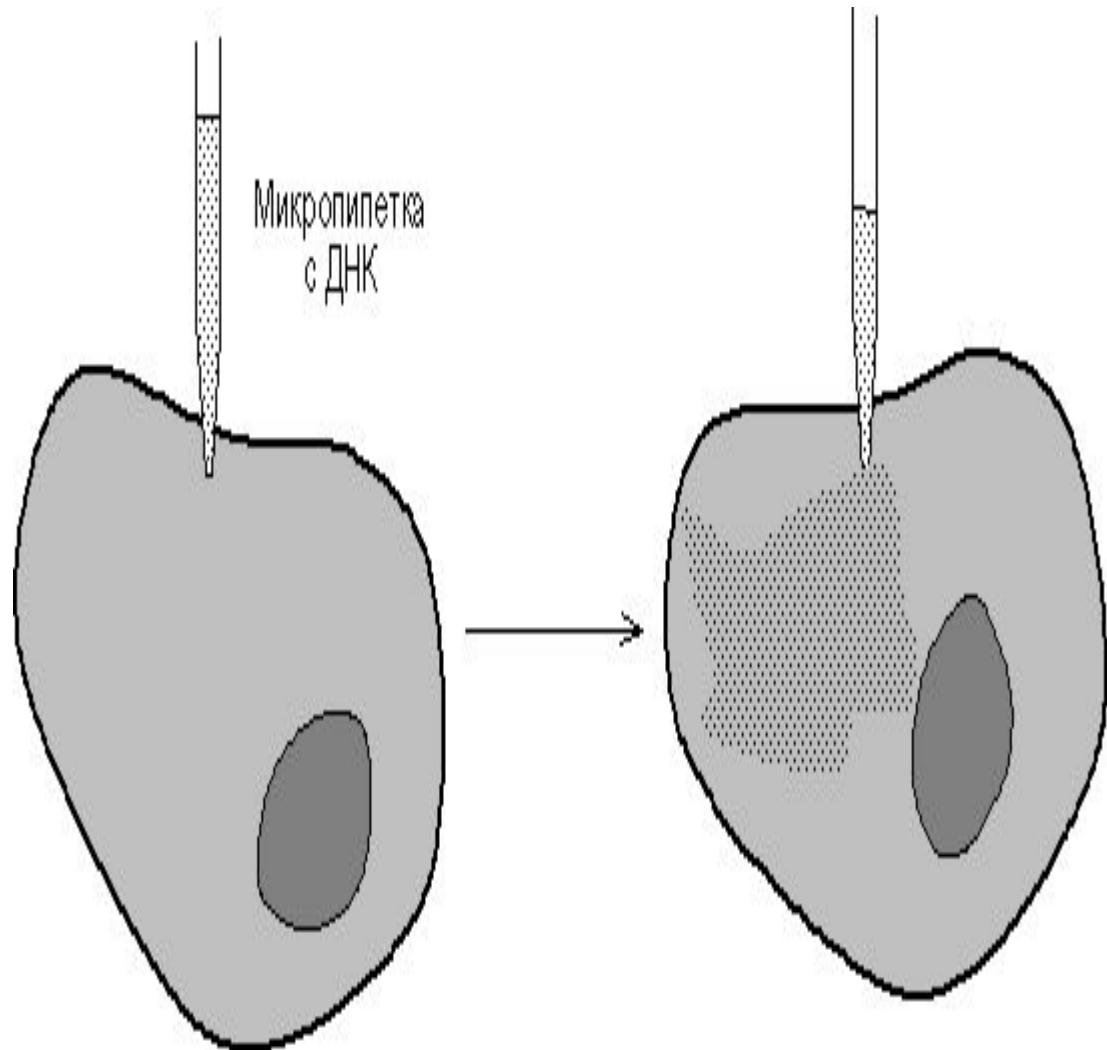
- клеточная стенка состоит из α - и β -глюканов, гликопротеидов и хитина.

Для их разрушения используют комплексный дрожжелитический препарат, содержащий ферменты

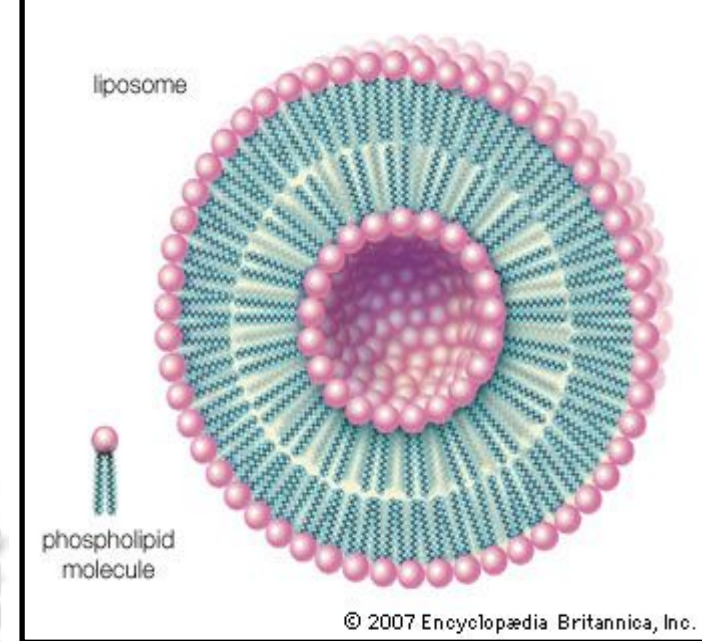
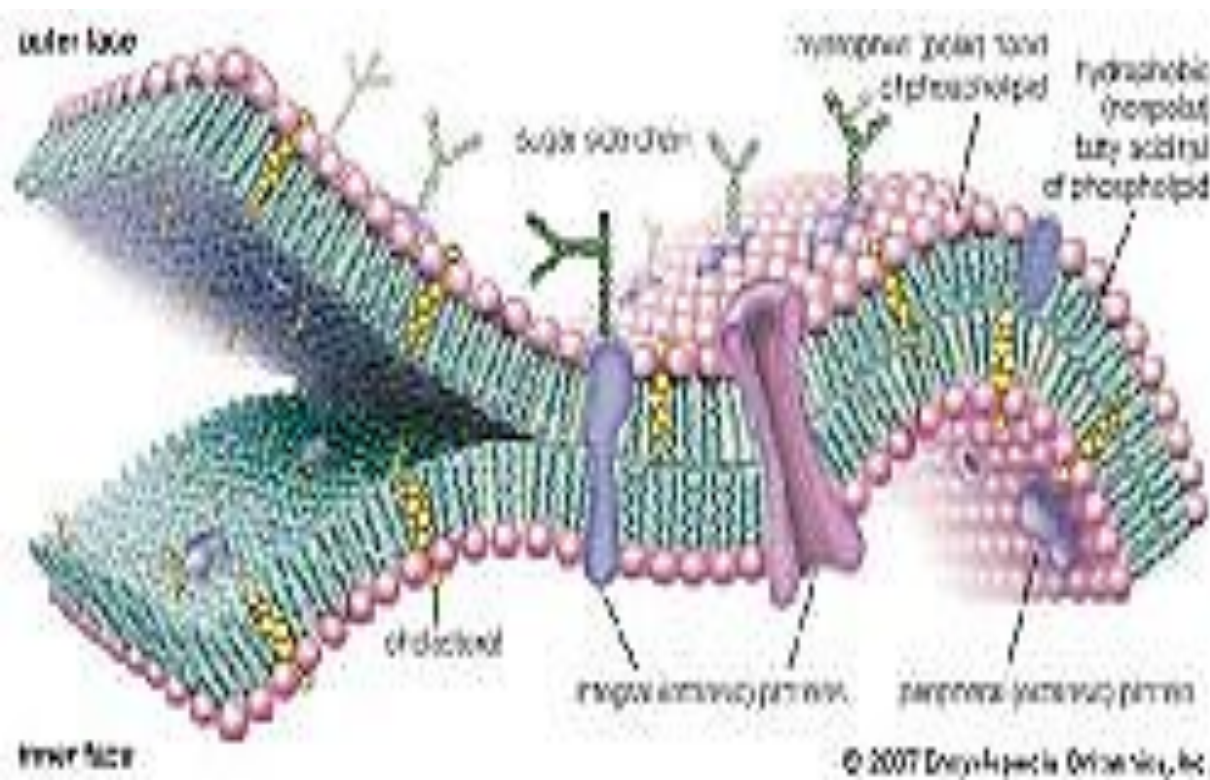
- фосфоманназу,
- β -глюканазу-**1,3** или **-1,6**,
- хитиназу

Введение чужой ДНК в клетку путем микроинъекции

Только в крупные
соматические клетки
(неполовые)
многоклеточных
организмов



Трансформация липосомами.



Липосома. Схема

Биологические мембраны (цитоплазматические клеточные). СХЕМА

Технология липосом

Смесь фосфолипидов и воды подвергают воздействию

- УЗ,
- замораживанию и оттаиванию,
- экструзии через фильтры с наноразмерными порами

При изготовлении липосом используется раствор рекДНК, часть этого раствора оказывается замкнутой внутри липосомального контейнера.

рекДНК встраиваются в мембрану липосомы и могут доставляться в клетку

Метод биологической баллистики