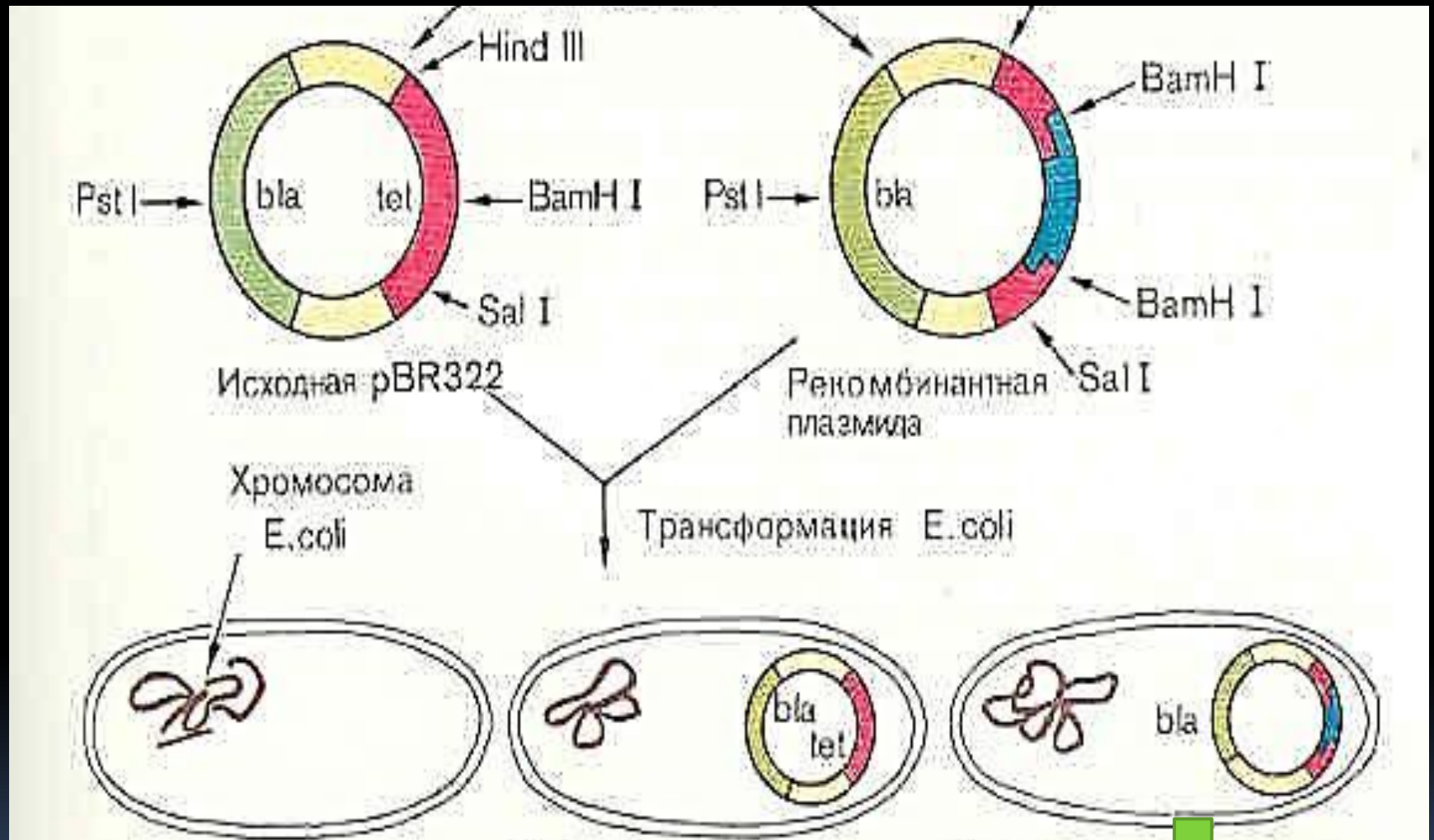


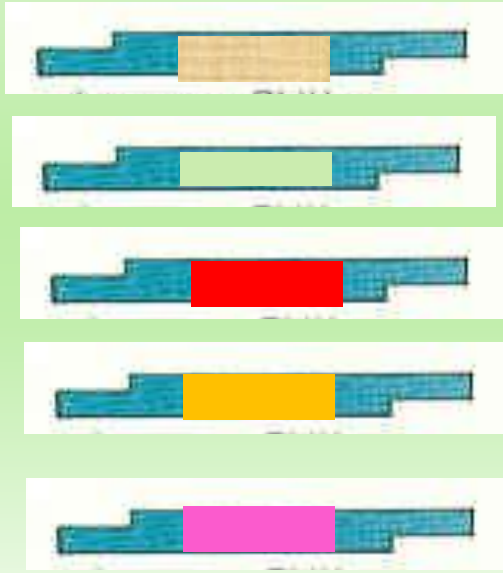
**ПОИСК, ИДЕНТИФИКАЦИЯ И
ОТБОР** трансформированных
клеток, содержащих в
рекомбинантной ДНК
ЗАДАННЫЙ СТРУКТУРНЫЙ ГЕН

Прием (техника) инактивации маркера вставки



Клетки инокулируют на ПС и создают условия для их размножения и роста. Каждая клетка даст колонию клеток с рекДНК

Различные фрагменты ДНК (гены)
одного организма с одинаковой
векторной ДНК



клетки с рекомбинантной плазмидой
высевают на плотную ПС.
Образуются колонии (клоны)
клеток, которые содержат
разные гены одного и того же
организма



Совокупность колоний
клеток, содержащих разные
рекДНК (гены) одного
организма = **ГЕНОМНАЯ
БИБЛИОТЕКА**

В какую из тысяч
трансформированных клеток
(или фагов) **попал**
интересующий нас ген?

Как распознать клетку,
несущий **рекДНК** с тем
самым геном, который
кодирует нужный белок
(продукт)?



Методы идентификации генов, кодирующих определенные белки, из геномных библиотек

- Скрининг путем гибридизации с меченым ДНК-зондом
- Иммунологический скрининг

Наиболее распространенный способ

1. СКРИНИНГ ПУТЕМ ГИБРИДИЗАЦИИ С МЕЧЕНЫМ κ ДНК-ЗОНДОМ

**κ ДНК-ЗОНД - РАДИОАКТИВНО МЕЧЕНАЯ ДНК,
ХАРАКТЕРНАЯ ДЛЯ КОНКРЕТНОГО СТРУКТУРНОГО ГЕНА.**

Гибридизация с меченым ДНК-зондом. Схема

Выделяют
нужный белок
и опред. его

амнокислот.

Последовательн
ость (М-д
**Sanger F,
1952**)

Синтезируют
соответств.
олигонуклеотид
**(М-д Р.
Меррифилда)** и
метят его,
радиоактивными
изотопами
фосфора;

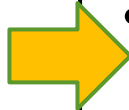
Находят кодирующую его
нуклеотидную
последовательность, пользуясь
шифром кодонов

Меченый олигонуклеотид
используют как
гибризационный
зонд для выделения
нужного структурного
гена из геномной библиот.

- Гибридизация нуклеиновых кислот —
 - соединение ***in vitro*** комплементарных одноцепочечных нуклеиновых кислот в одну двухцепочечную молекулу.
 - Возможна гибридизация молекул:
 - одноцепДНК - ДНКодноцеп
 - одноцепДНК - РНК

Протокол гибридизации ДНК

Двухцепочечную **ДНК**
разогревают в щелочном
буфере

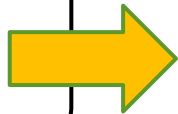


• Денатурация -

- водородные связи между комплементарными азот. основаниями разрушаются и цепочки расходятся
- **одноц.ДНК + одноц.ДНК**

Добавляют другую денатурир. **одноц.ДНК + одноц.ДНК**

Смесь медленно
охлаждают



• Отжиг -

- одноцеп.ДНК образ. водор. связи между комплементарными основаниями (не менее **80%** оснований д.б. комплементарны)



Происходит либо воссоединение первоначальных молекул, либо образование гибридных молекул ДНК:

ДНК

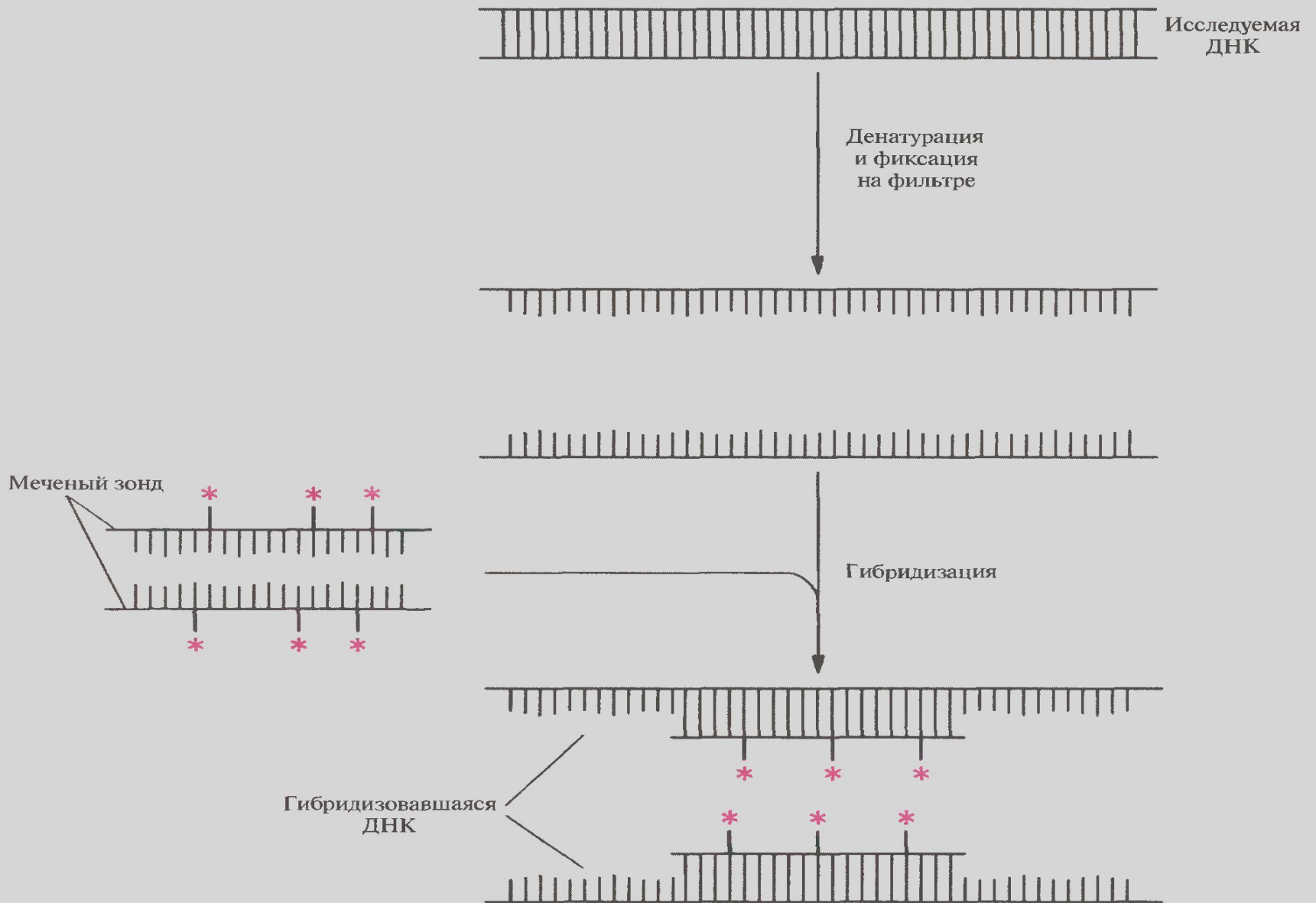
либо

одноц.ДНК-ДНКодноц

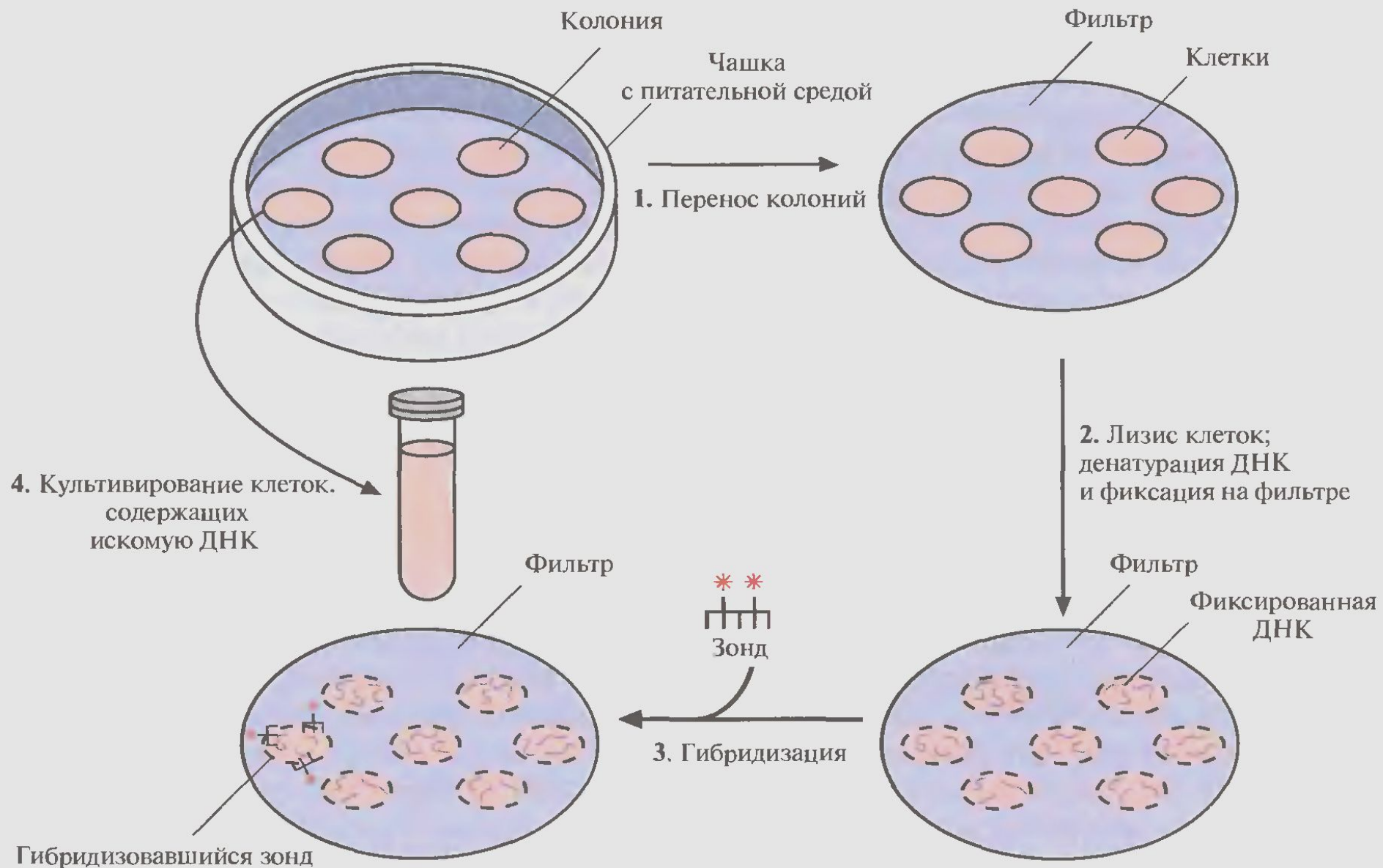
либо

ДНК

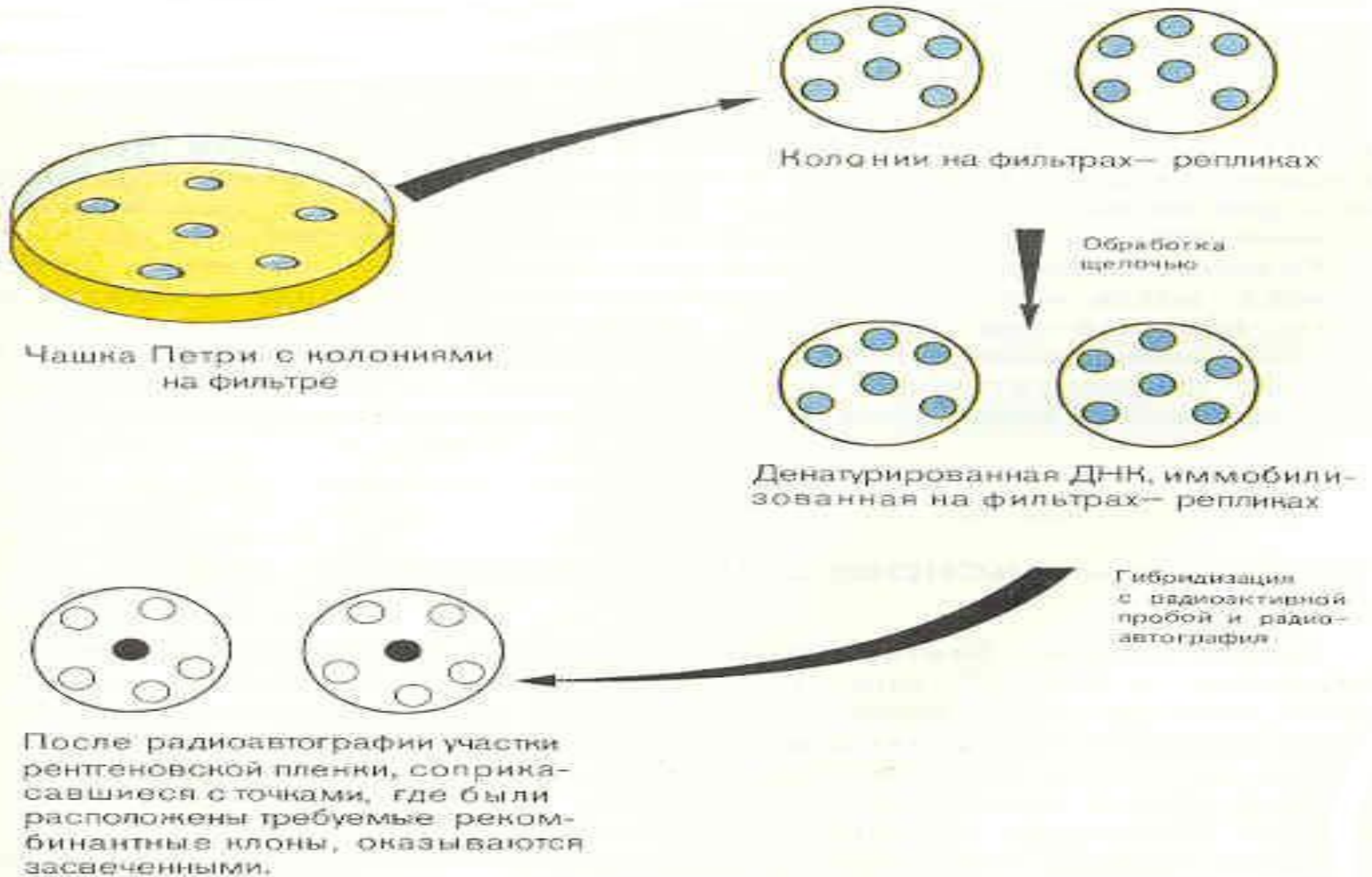
ДНК-гибридизация. Схема



Скрининг геномной библиотеки ДНК путем гибридизации с меченым ДНК-зондом. Схема



Поиск рекомбинантных клонов методом радиоавтографии



2. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ

Используется, если отсутствует ДНК-зонд или его невозможно создать

Иммунологический скрининг

Обязательные процедуры:

- выделяют нужный белок и тщательно очищают от примесных белков;
- иммунизируют им экспериментальных животных с целью выработки АТ к этому белку (используют как АГ);
- выделяют выработанные АТ животного и очищают;
- очищенные АТ используют для скрининга геномных библиотек

Иммунологический скрининг геномной библиотеки. Схема

