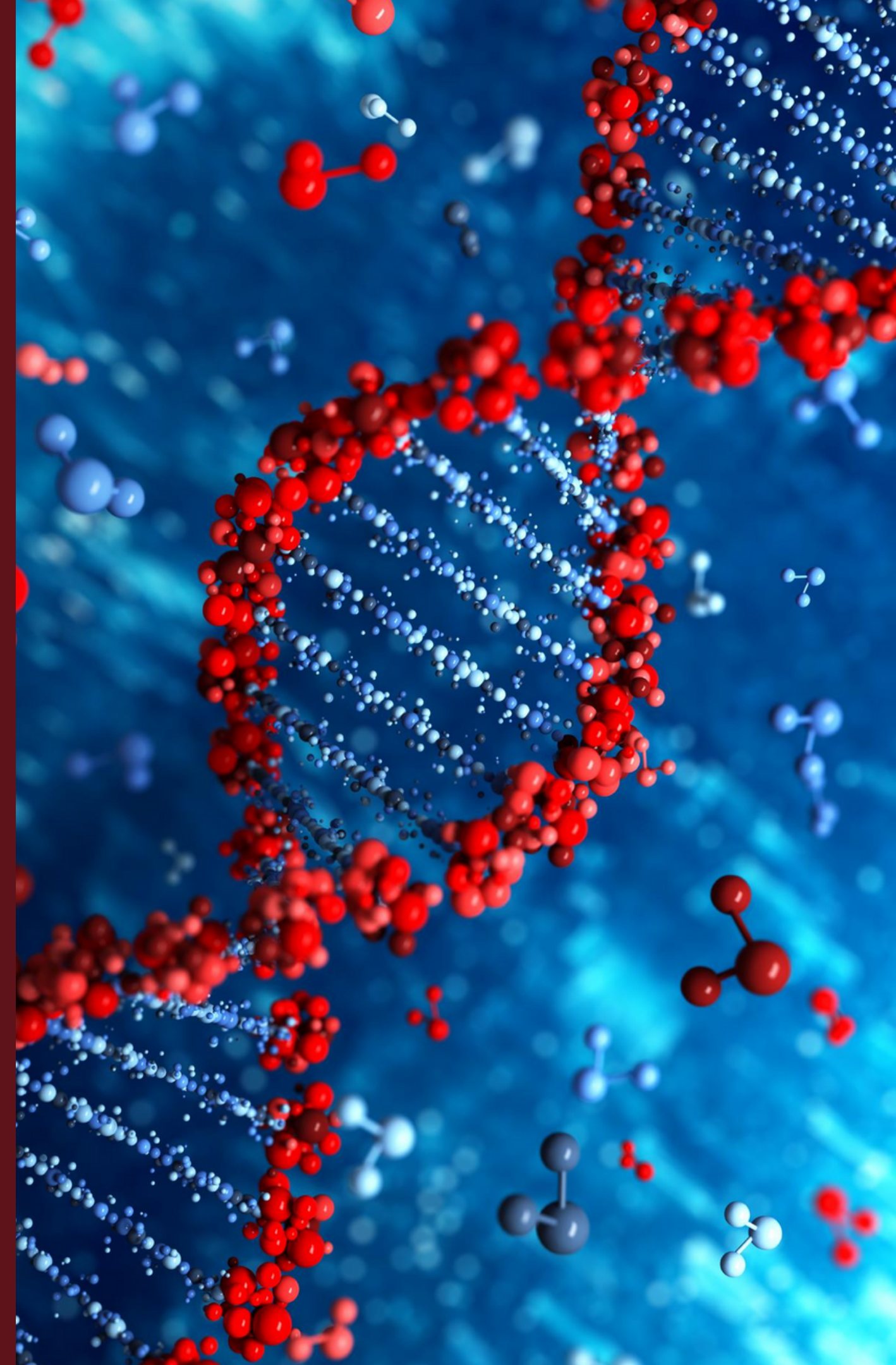


Клонирование крупных фрагментов ДНК

Преподаватель: Хабиев Алибек
Талгатбекович



С помощью плазмидных векторов можно клонировать фрагменты ДНК длиной до 10 т. п. н. Однако при создании геномных библиотек часто приходится работать с более крупными фрагментами. Для этого были созданы векторы:

- На основе ДНК фагов, в частности, на основе ДНК бактериофага λ E.Coli
- Космиды
- Искусственные бактериальные хромосомы (ВАС)

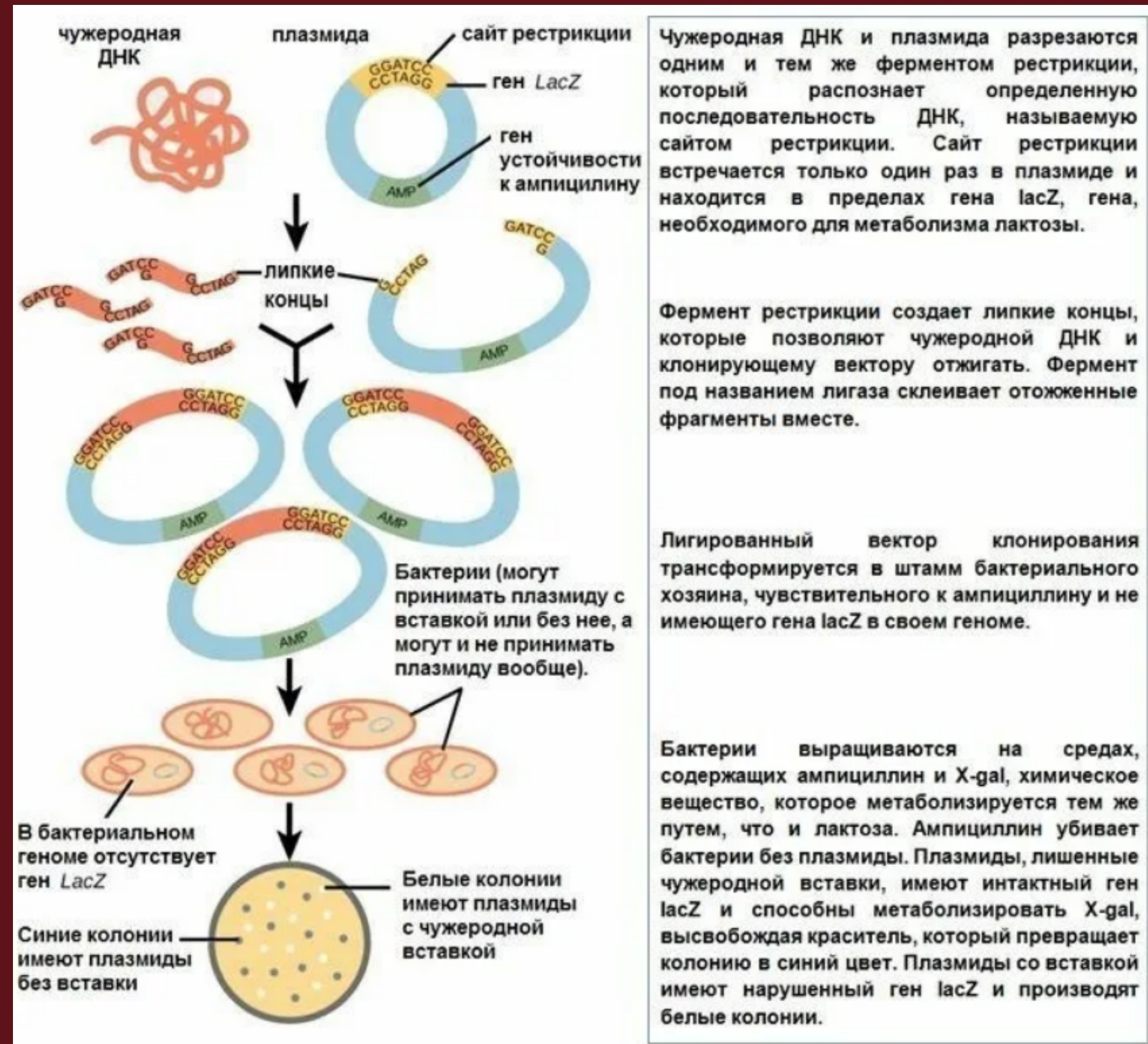
Клонирование фрагмента ДНК



Наиболее часто встречающиеся векторы для клонирования ДНК- плазмиды

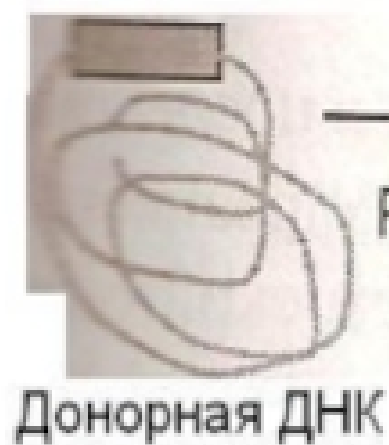
Плазмиды-маленькие кольцевые ДНК, встречающиеся в бактериях и часто переносящие гены устойчивости к антибиотикам. Плазмиды не являются частью основного генома бактерии, поскольку встречаются штаммы, как с плазмидами, так и без. Благодаря малому размеру и кольцевой структуре плазмидных ДНК их легко отделить от геномной ДНК бактерии

Как происходит процесс клонирования с помощью плазмид



Этапы клонирования фрагмента ДНК с использованием плазмидного вектора

Клонируемая последовательность

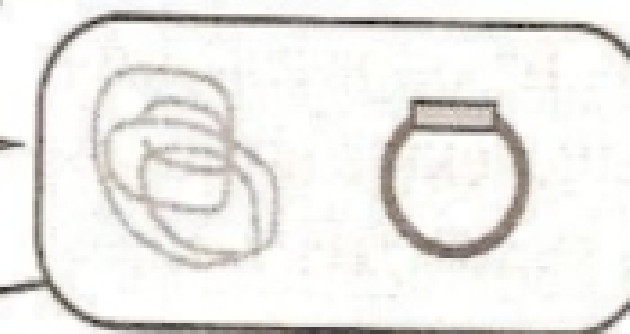


Лигирование (встраивание фрагмента в вектор)



Трансформация

Клетка-хозяин



Синтез белка, кодируемого клонированным геном

Белок



Рекомбинантная ДНК

Отбор клонов на селективной среде

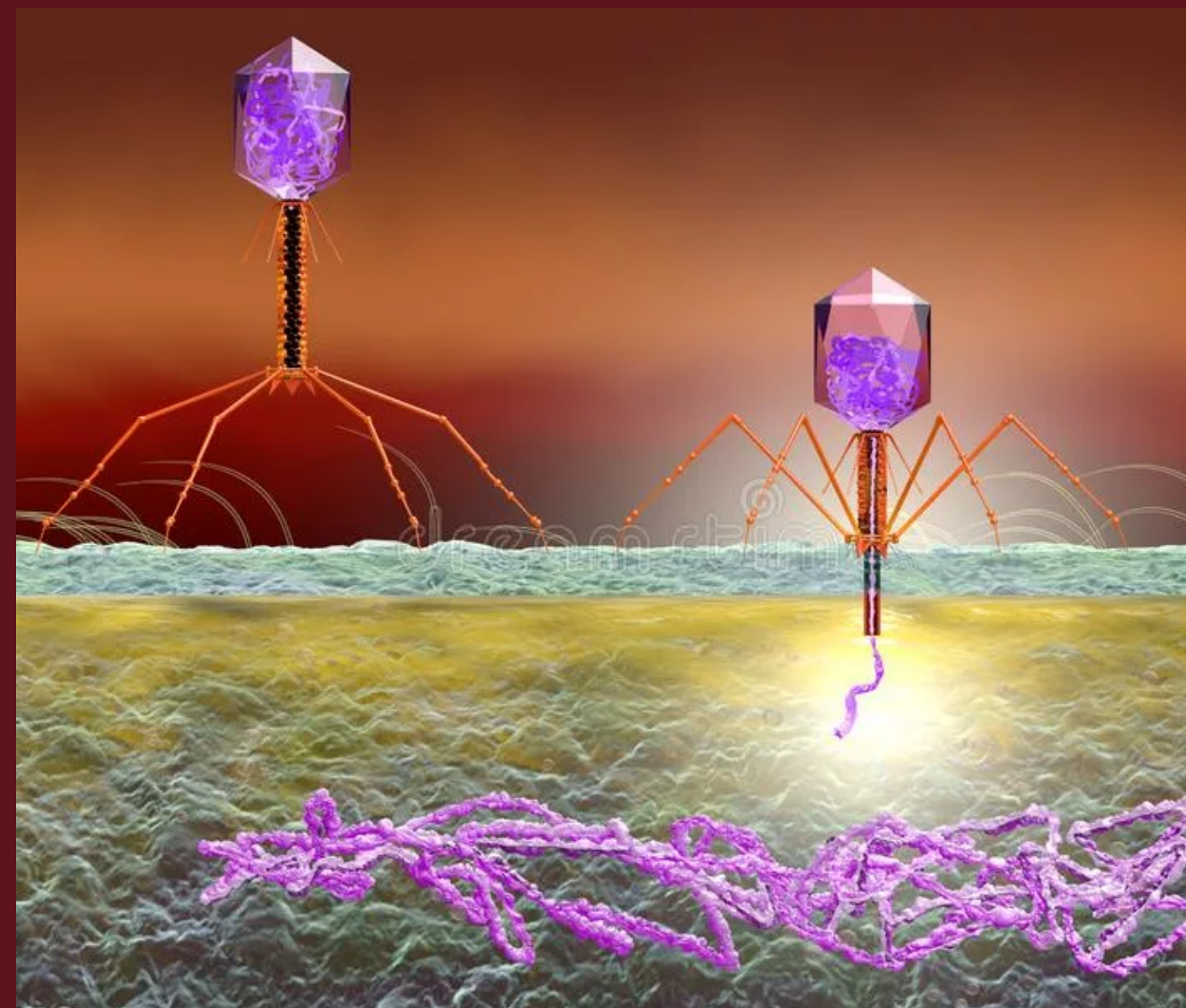


Векторы на основе бактериофага λ *E. coli*.

Фаг λ содержит двухцепочную ДНК размером 48500 п.н.

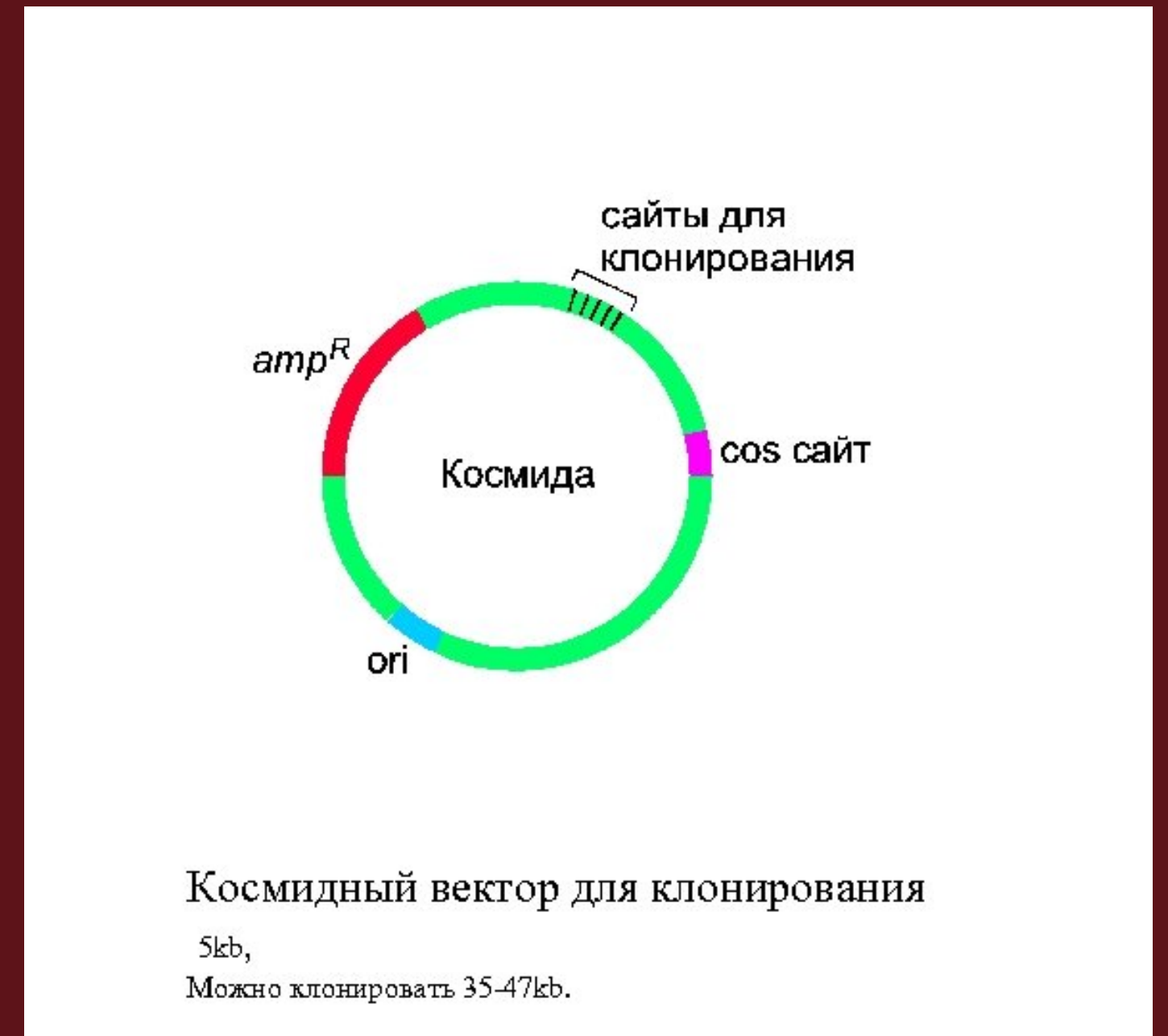
Она упакована в головку в виде линейной молекулы с однонитевыми комплементарными концами (липкие концы)

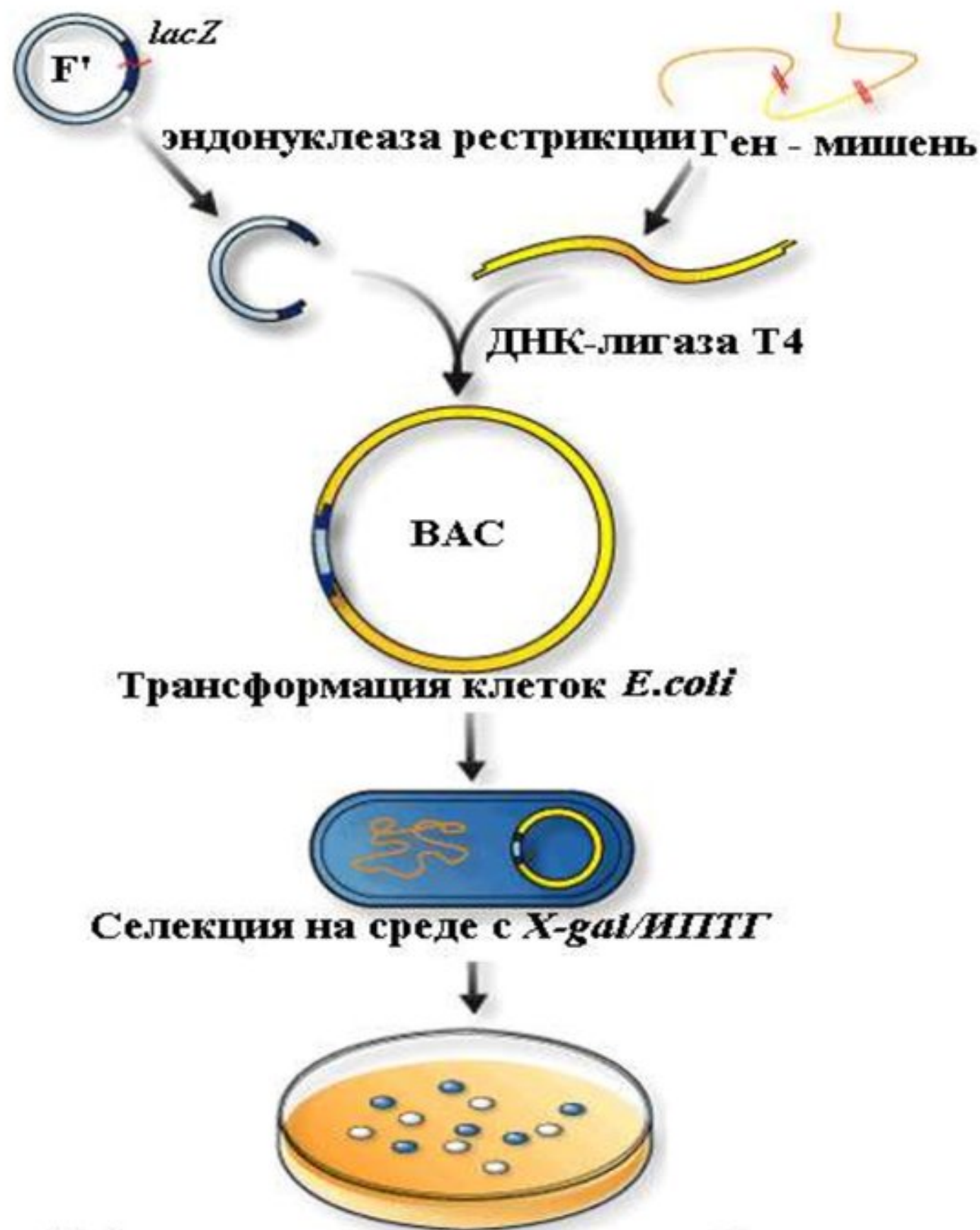
После проникновения в клетку липкие концы взаимно спариваются, молекула замыкается в кольцо и сшивается ДНК лигазой. Места спаривания липких концов получили название Cos-сайтов. В составе векторов на основе фага λ можно клонировать фрагменты длиной 15000 п.н




КОСМИДЫ

Плазмиды, содержащие *cos*-участок (липкие концы) ДНК фага λ . Благодаря сайтам они могут быть введены в клетку путем обычной инфекции, в результате чего эффективность получения рекомбинантных клеток возрастает в 100 и более раз. В космидных векторах можно клонировать фрагменты ДНК размером 33000-39000 н.п, поэтому они предназначены для встраивания крупных генов и создания клоно-клеток генов эукариот





**Клонирование фрагментов
 ДНК большого размера с
 помощью ВАС**


 F' плаزمида
 (фактор фертильности) *E.coli*
 с системой *lac Z'* из рUC

Отбор индивидуальных клонов с
 рекомбинантной ДНК (белые колонии)

- **Векторные системы для клонирования очень крупных фрагментов ДНК (вставки >100 т.п.н.) имеют большую ценность при анализе сложных эукариотических геномов. Для клонирования фрагментов ДНК размером от 100 до 300 т.п.н. был сконструирован низкокопийный плазмидный вектор на основе бактериофага P1 –искусственная хромосома на основе фага P1. На основе F-плазмиды E.coli создана BAC (bacterial artificial chromosomes).**

спасибо за внимание!