

# Геном и геномные библиотеки

# Геном

- Совокупность генов гаплоидного набора хромосом конкретного организма.

# Геномная библиотека

а

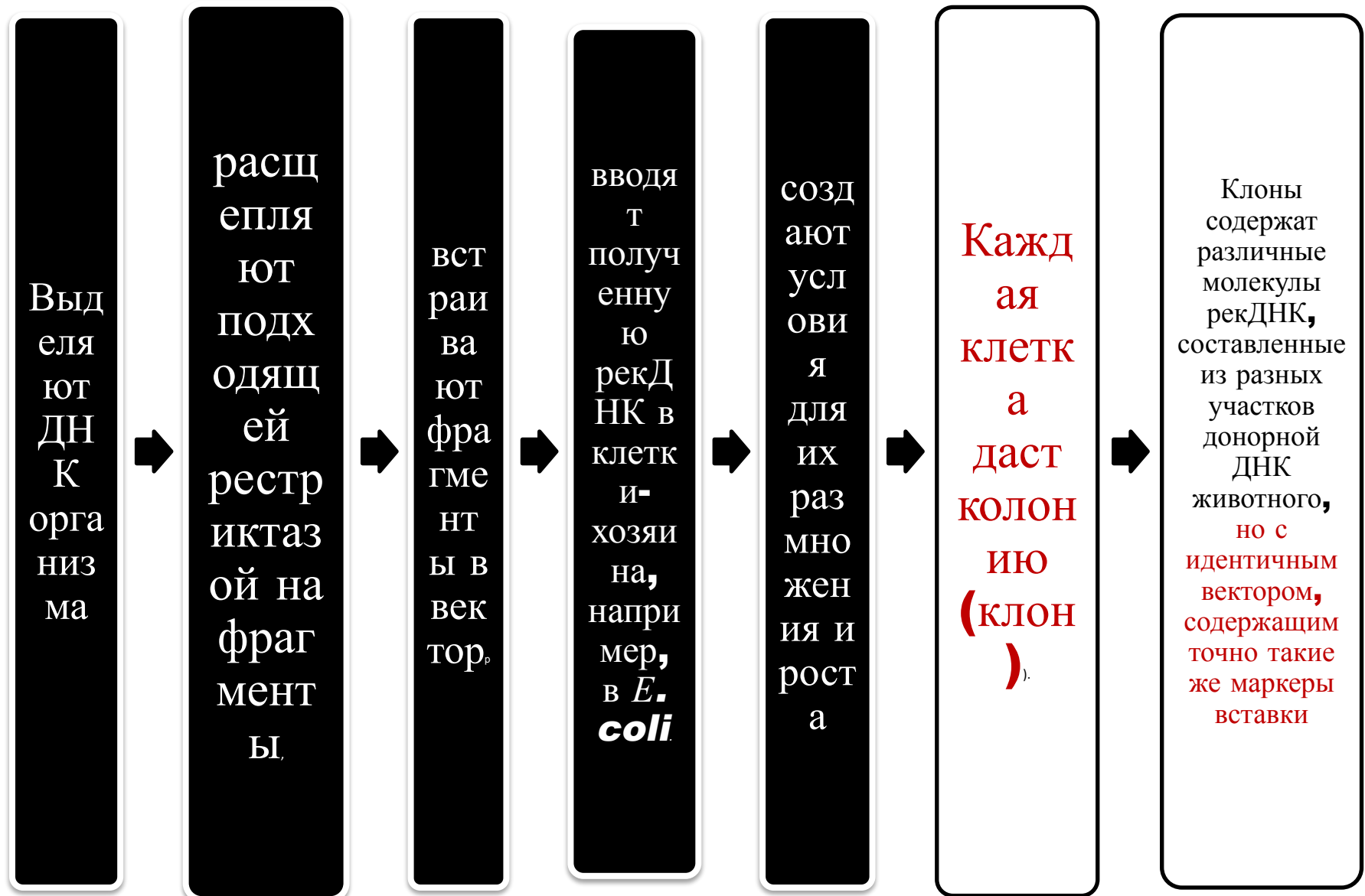


- Набор клонированных фрагментов ДНК, в совокупности составляющих индивидуальный геном.
  - Для создания геномной библиотеки конкретного организма ДНК расщепляют рестриктазами, каждый фрагмент встраивают в вектор и вводят в клетки-хозяева. Клетка, получившая рекДНК, размножившись, образует колонию -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

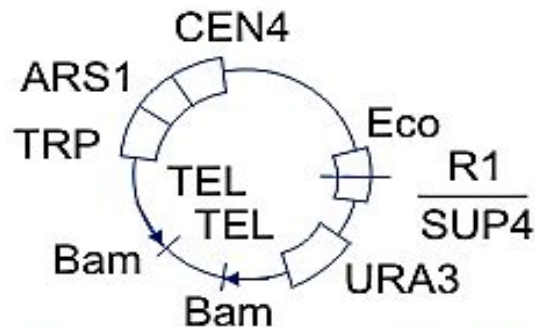
Созданы геномные библиотеки многих организмов

- в т.ч. человека.

# Основные стадии технологии создания геномной библиотеки



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

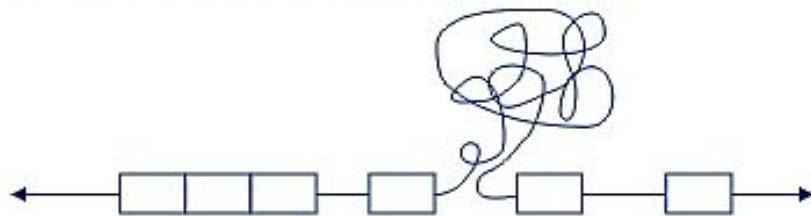


1 расщепление *Bam*HI

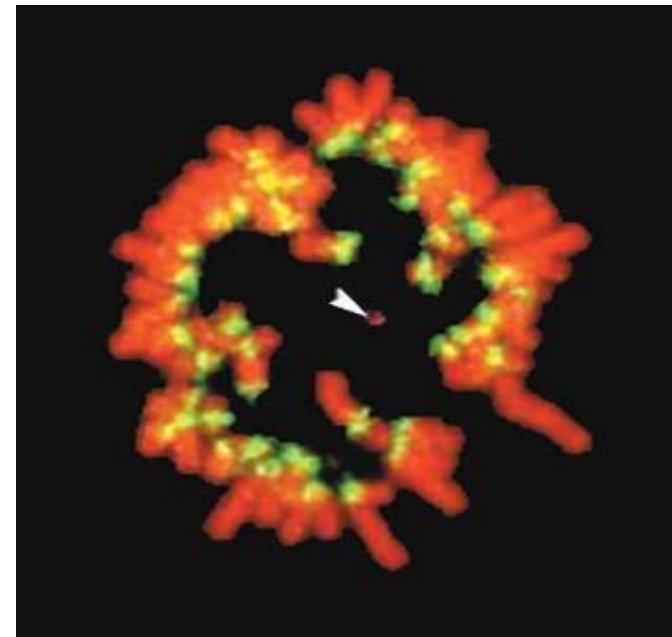
2 расщепление *Eco*RI



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**

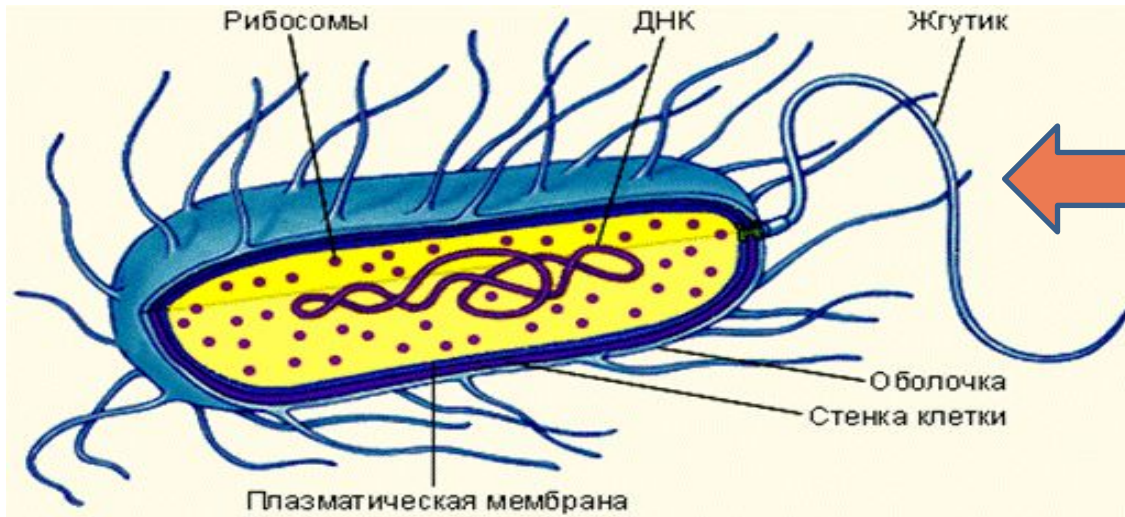
# ТРАНСФОРМАЦИЯ

- введение рекДНК в клетку

**Клетка, принявшая рекДНК:**

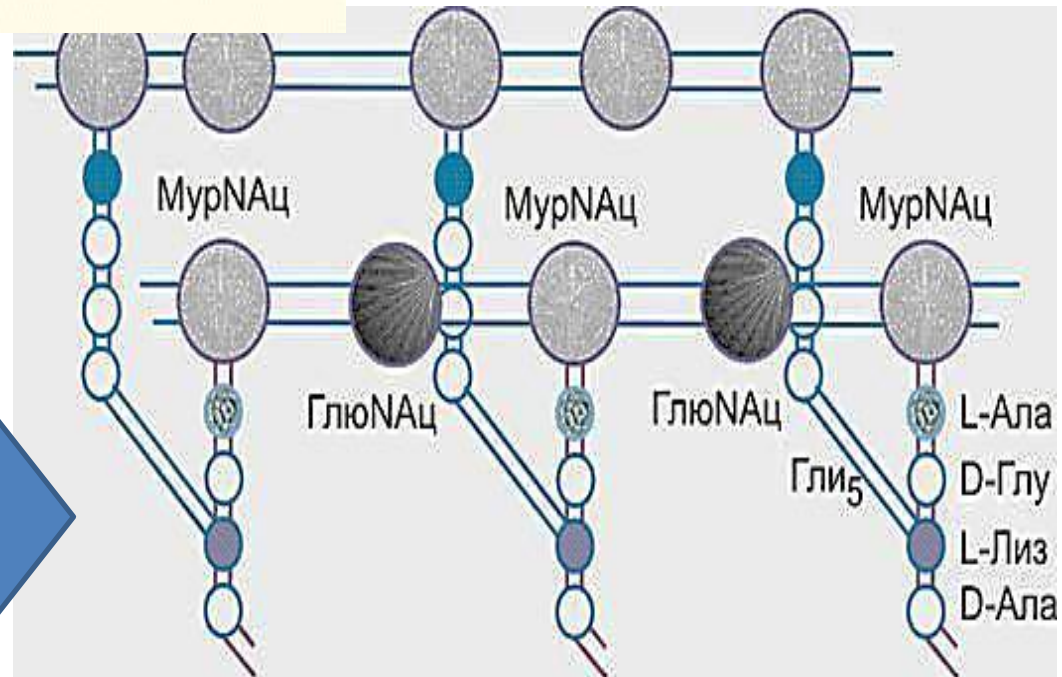
- клетка-хозяина,
- клетка-реципиент,
- клетка-продуцент,
- компетентная клетка,
- клетка-акцептор и т.д.

# Схема строения пептидогликана бактерий (муреиновый мешок)



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

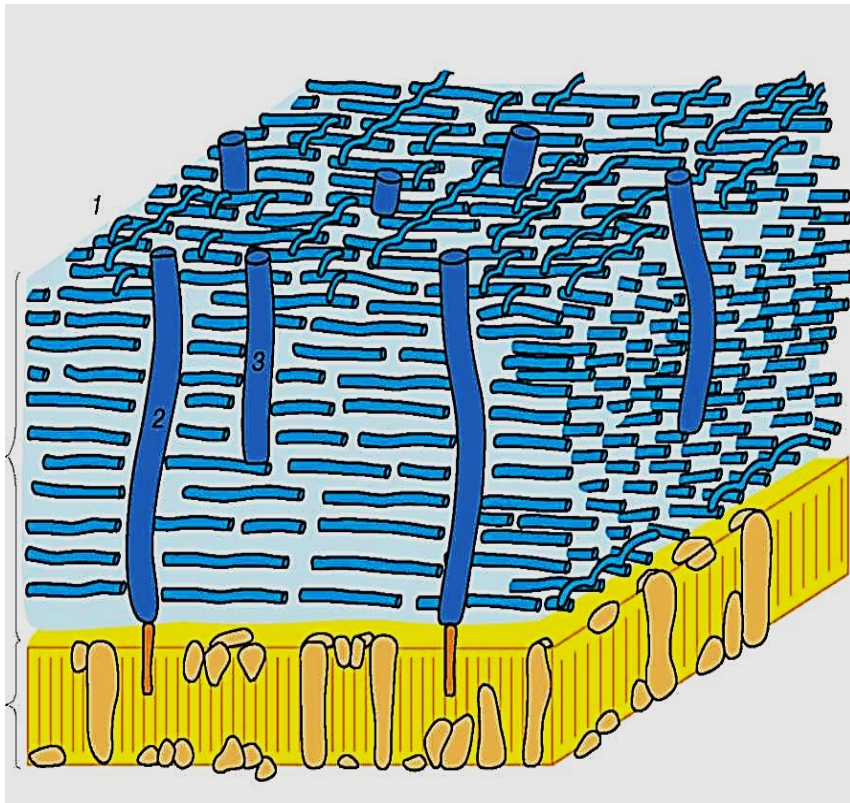
остов из N-ацетилмурамовой кислоты (MurNAc) и N-ацетилглюкозамина (ГлюNAc); боковые пептиды, состоящие из L-аланина (L-Ала), D-глутамата (D-Глу), L-лизина (L-Лиз) и D-аланина (D-Ала); пептидные (Гли5) поперечные мостики.



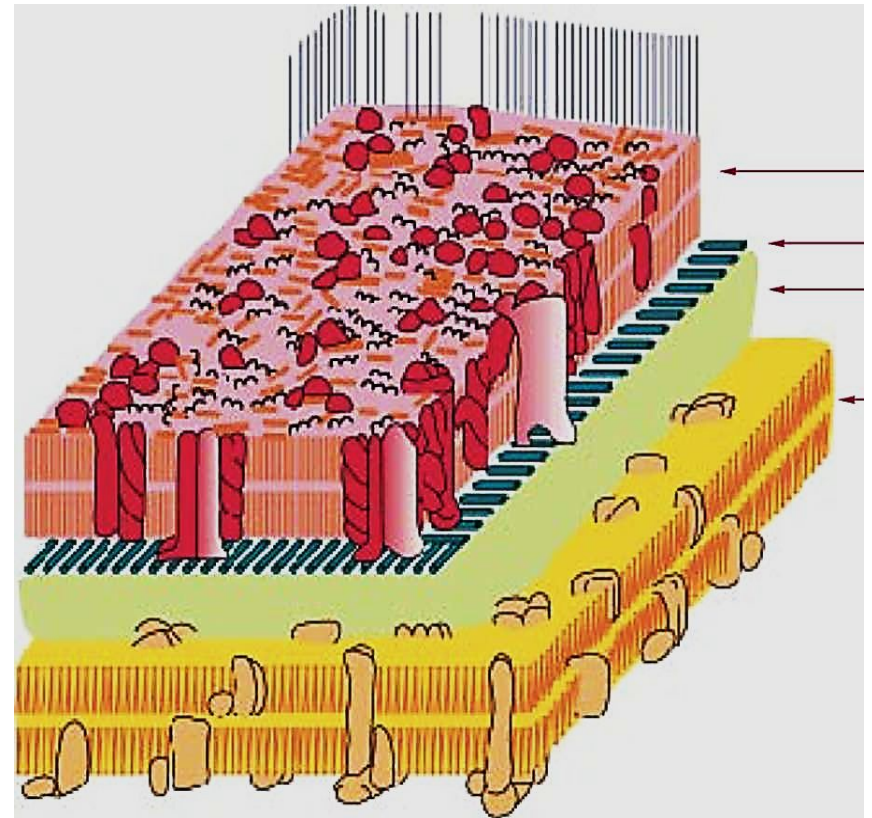


# Структура клеточной стенки бактерий (схема)

## Грамположительных (Gr+)

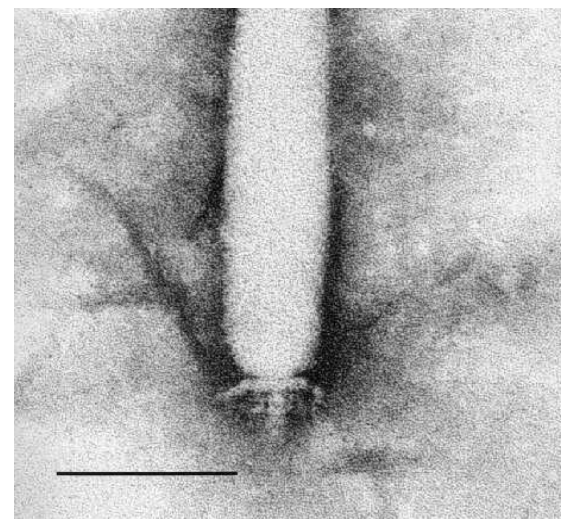
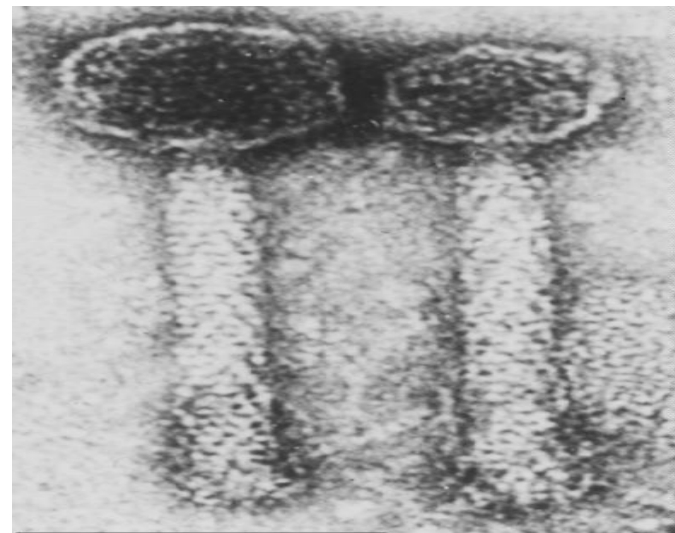


## Грамотрицательных (Gr-)





# Инфицирование фагом $\lambda$ 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
  - **(CaCl<sub>2</sub> + нагревание)**
- Физические методы
  - Электропорация
  - УЗ
- Биохимические методы
  - ферментативная обработка

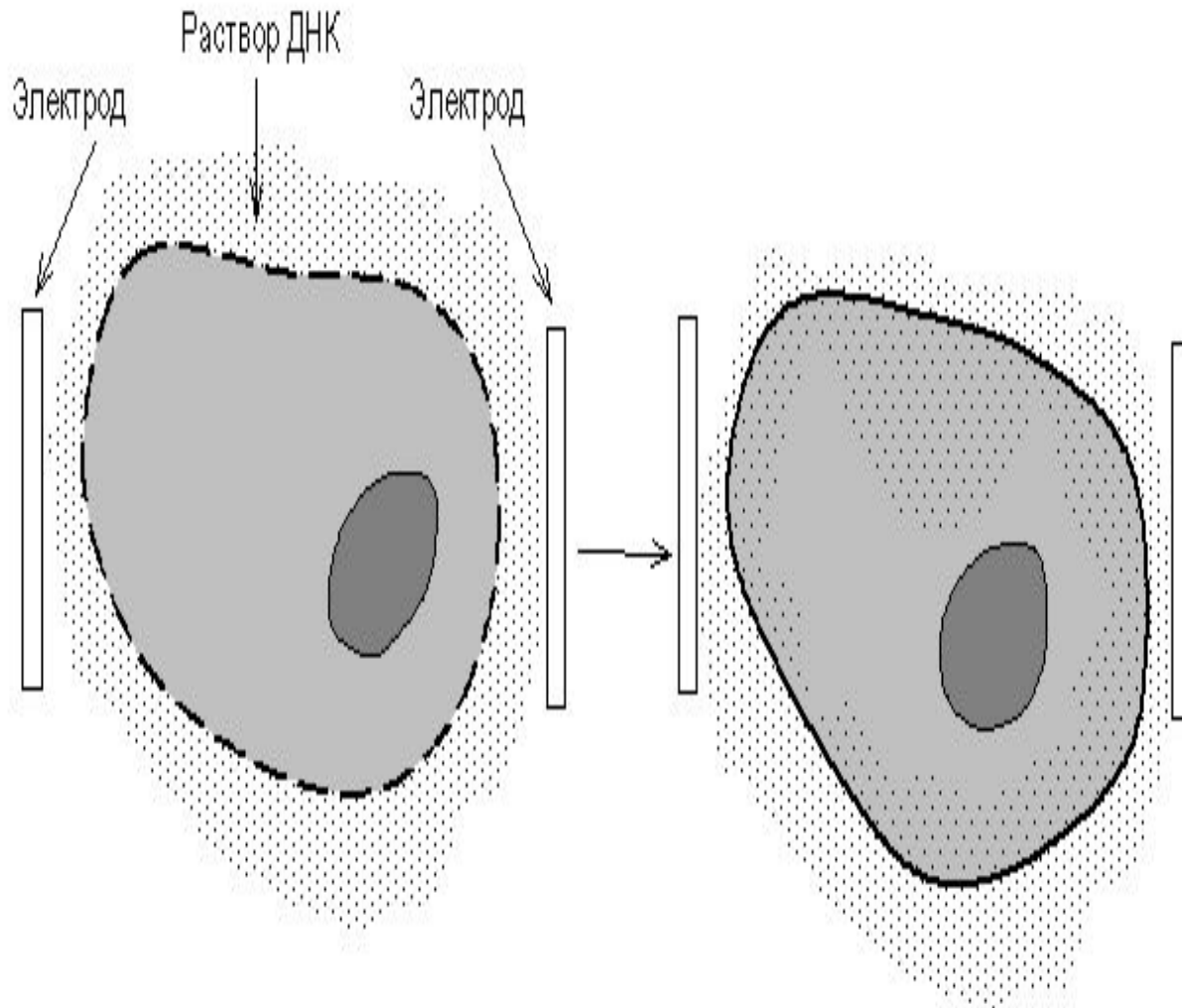
# *Химическая обработка клеток*

Конц.  $\text{CaCl}_2$  + 42°C, 1,5 минут



Схематическое  
изображение  
фагоцитоза  
эукариотической  
клетки

# Метод электропорации

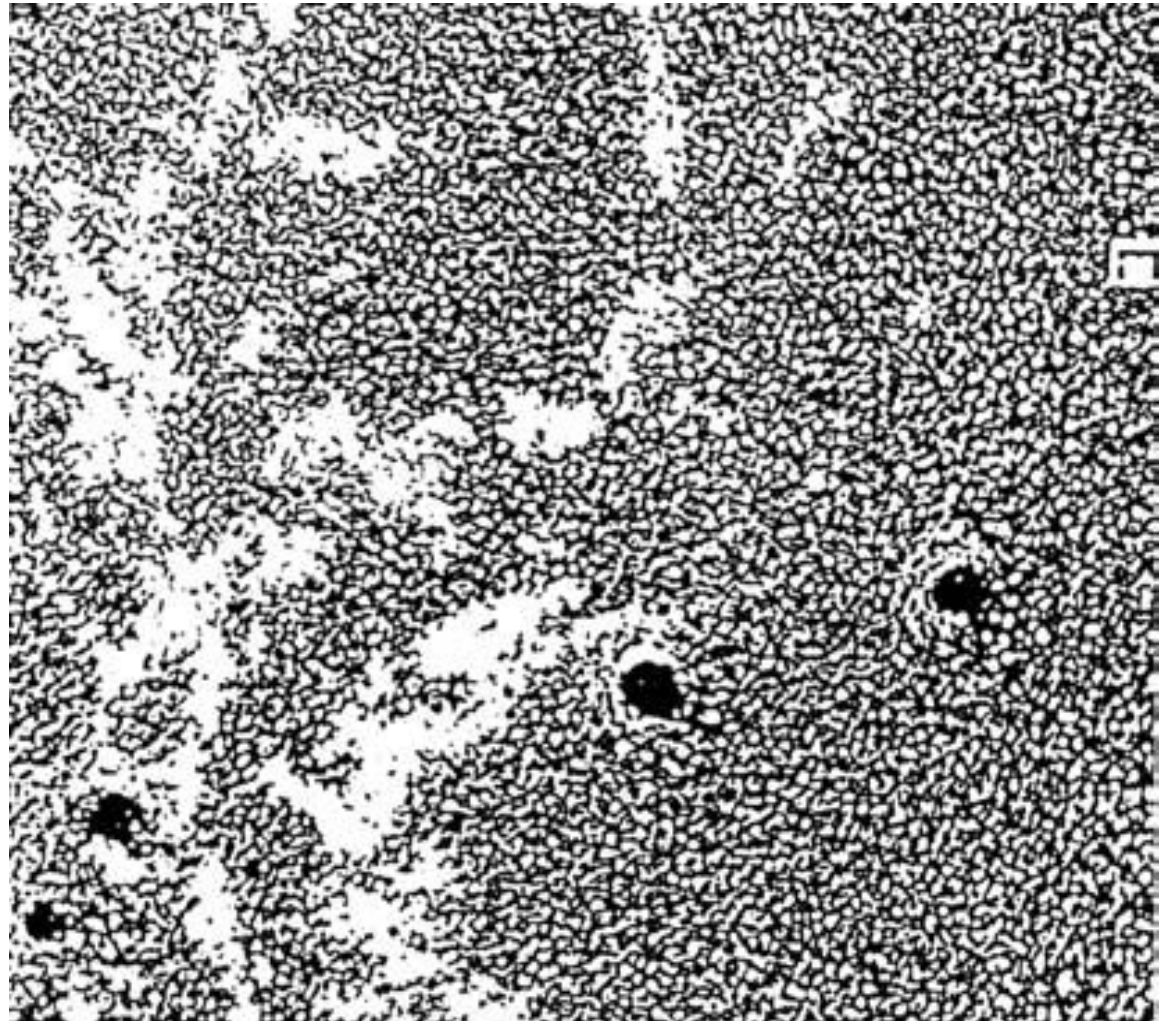


Высоковольтные импульсы (напряжение 200 - 350 В, длительность импульса 54 мс) приводят к образованию пор (электропробой) в цитоплазматической мембране



# 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

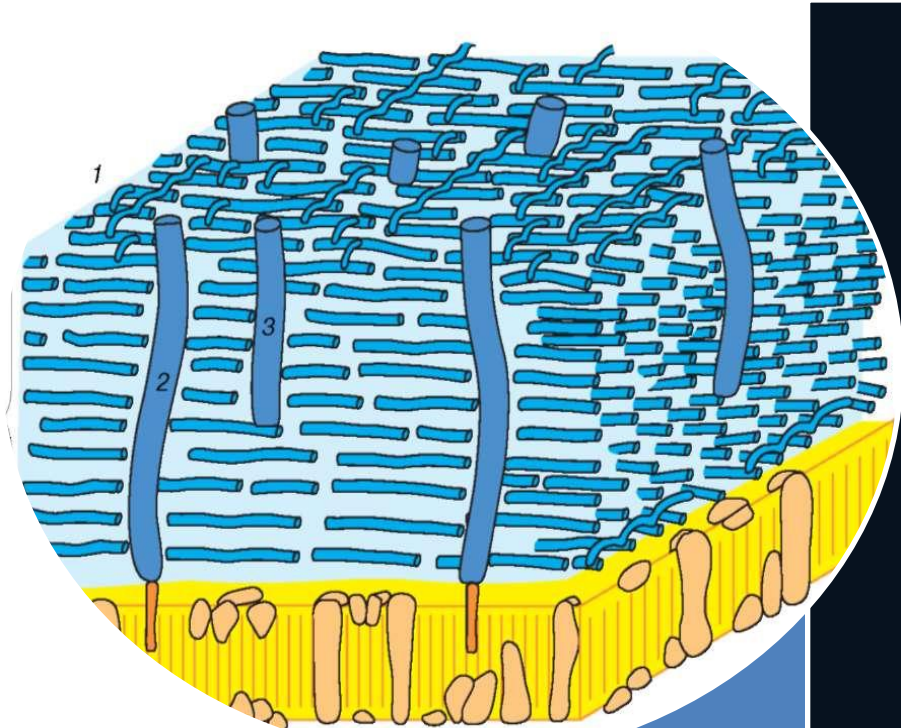
УЗ порация



## **Биохимический метод увеличения проницаемости клеточных стенок.**

*Основан на использовании ферментов,  
обратимо разрушающих клеточную стенку*

# Схема строения клеточной стенки грамположительных бактерий



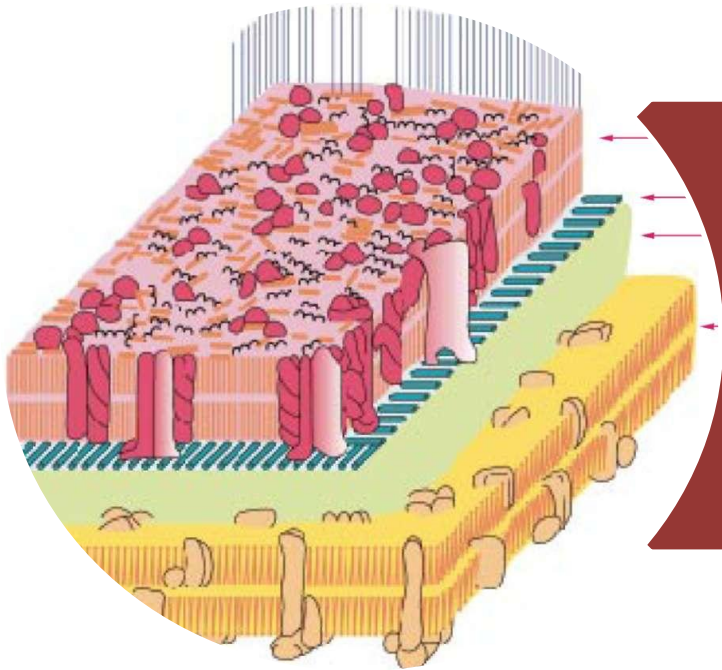
**1** -слой пептидогликана (N-ацетилглюкозамина и остатков N-ацетилмурамовой к-ты, соединенных пептидными мостиками)

*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  $\beta$ -глюканов и частично фосфорилированных маннатов

фотография клеточной стенки дрожжевой клетки

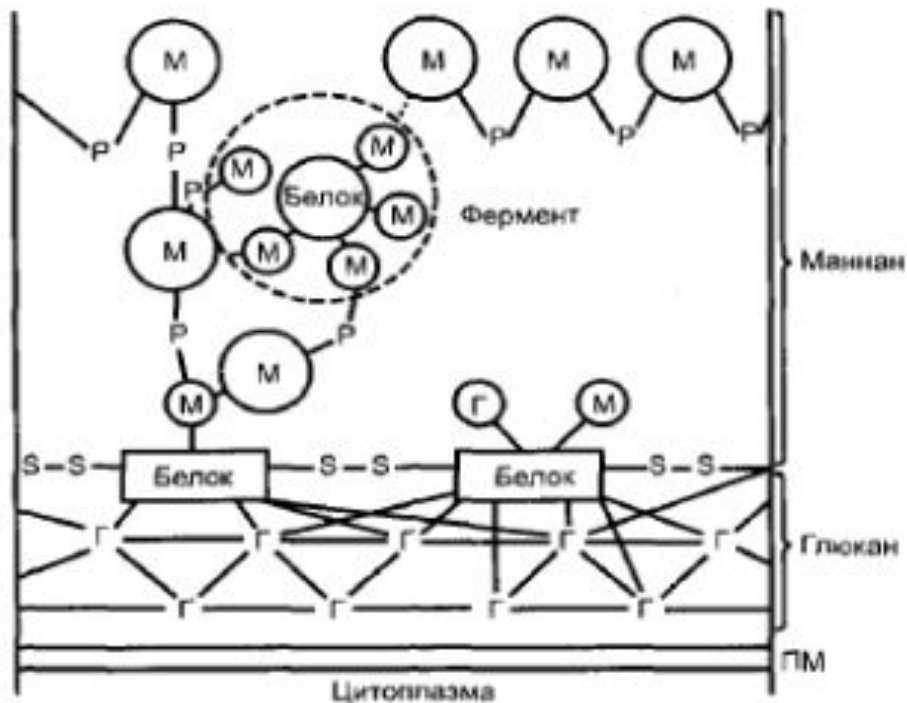


Рис. 1.5. Схема строения клеточной стенки дрожжей (по Котык А., Яначек К.)

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



Figure 2: Yeast cell wall

Комплексный дрожжелитический препарат - ферменты фосфоманназа,  $\beta$ -глюканаза-**1,3**

# Плесневые (низшие) грибы

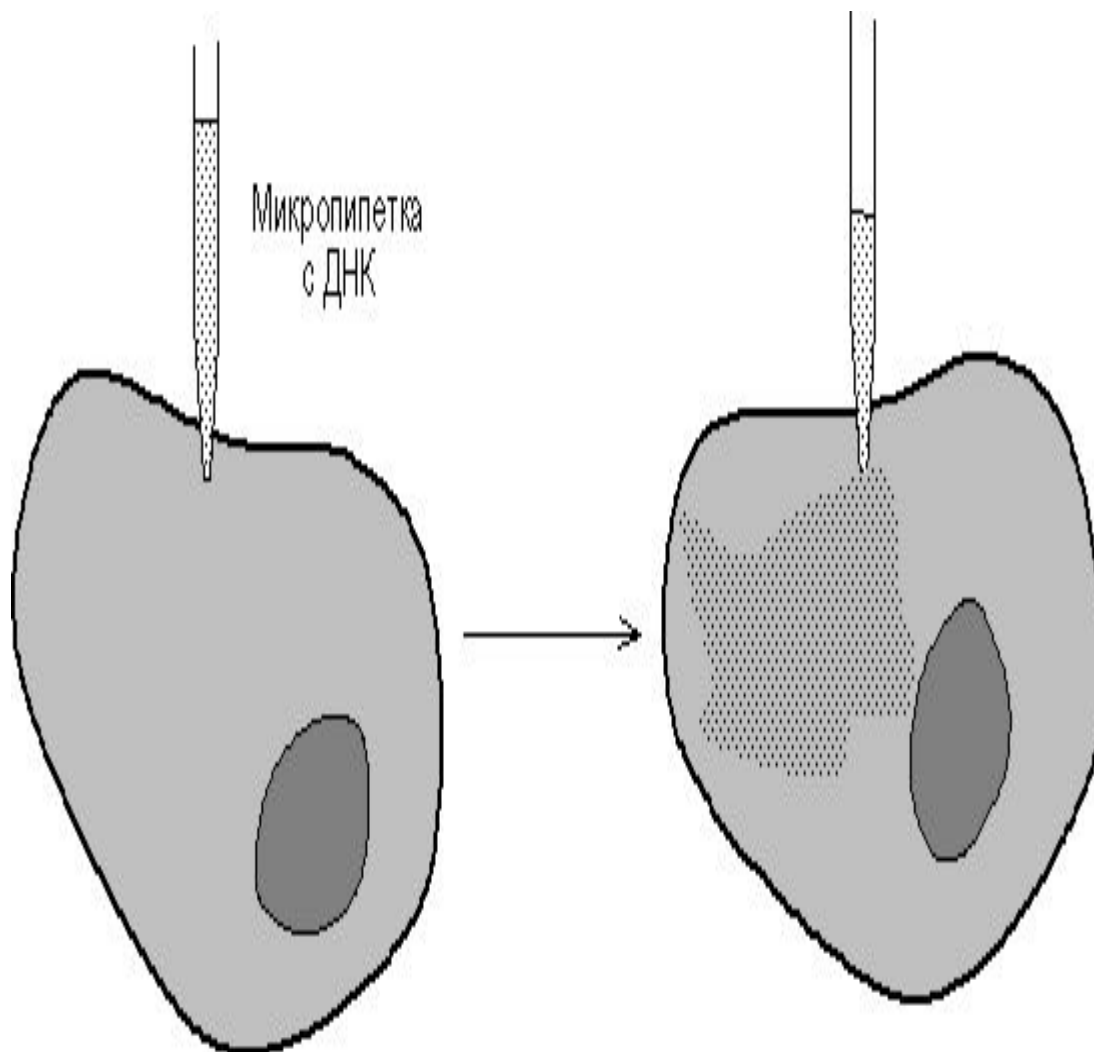
– клеточная стенка состоит из  $\alpha$ - и  $\beta$ -глюканов, гликопротеидов и хитина.

Для их разрушения используют комплексный дрожжелитический препарат, содержащий ферменты

- фосфоманназу,
- $\beta$ -глюканазу-**1,3** или **-1,6**,
- хитиназу

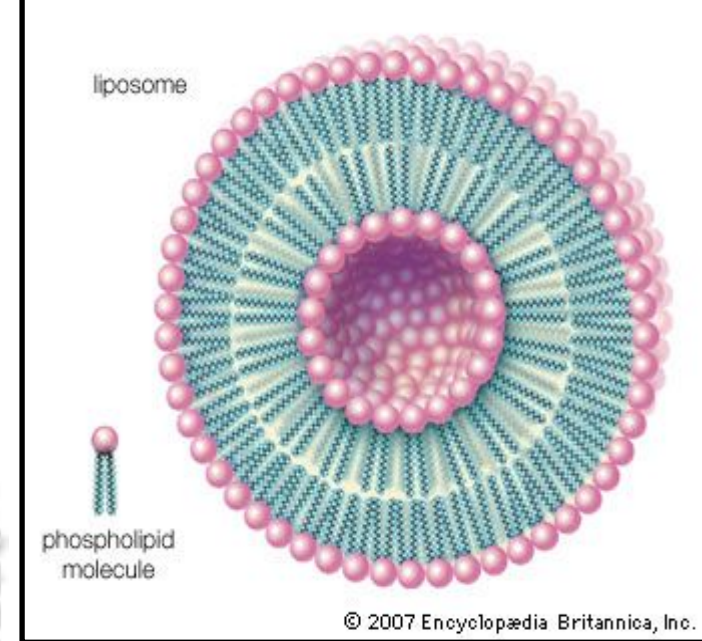
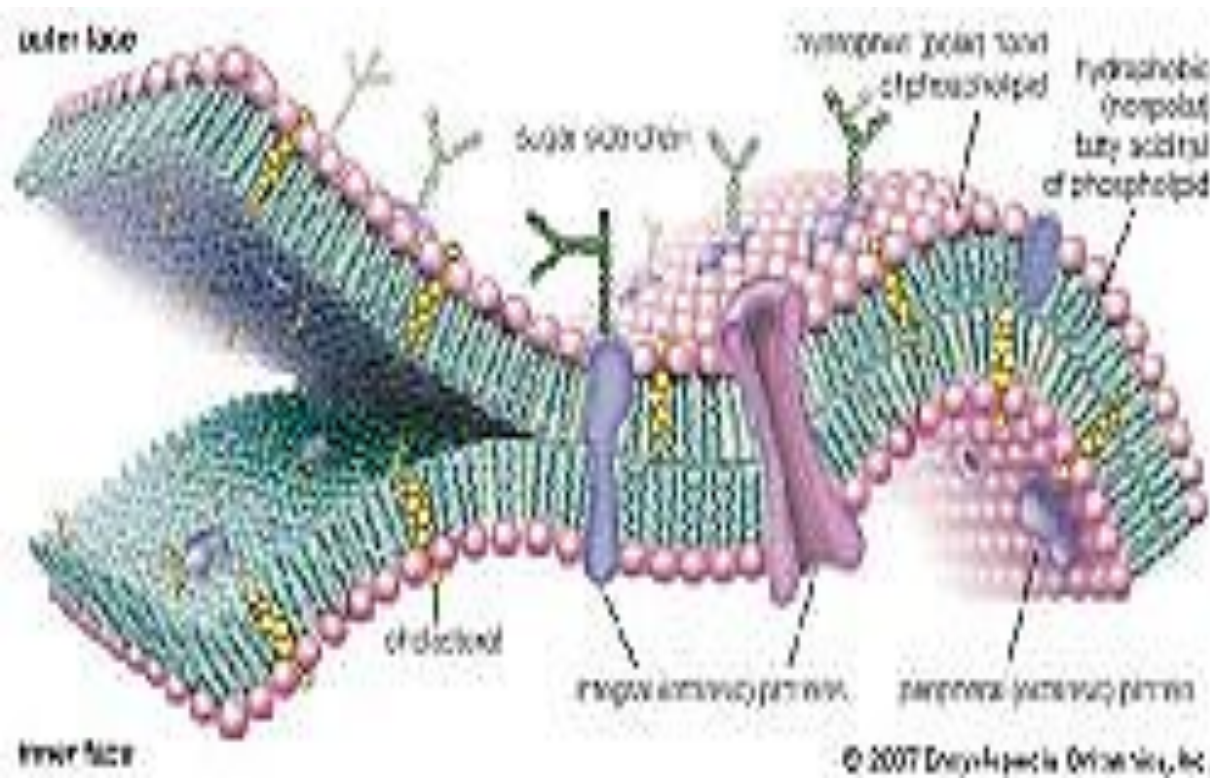
# Введение чужой ДНК в клетку путем микроинъекции

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*