Лекція 4

**Генні банки та геномні біоліотеки**

1. Створення.

Процес розподілення геномної ДНК на елементи для клонування, введення цих елементів у клітини-господарі має назву створення геномної бібліотеки.

За допомогою рестриктази сумарну ДНК конкретного організму розділяють на фрагменти, додають вектор (плазмідний або бактеріофаг), попередньо оброблений тією же рестриктазою, і всю цю суміш використовують для;

А) трансформації бактерій

Б) Отримані фрагменти з’єднують з ДНК векторів за допомогою лігази і, за можливістю, упаковують у підготовлені головки фагових часточок. Бібліотеку зберігають у вигляді фагового банку під хлороформом при t= -70° С. Таким чином бібліотека здатна зберігатися десятки років.

 2. Ампліфікація (клонування).

Клітина бактерії, яка отримала гібридну ДНК, розмножуючись, утворює клон. Набір клонів бактерій що містять різні рекомбінантні молекули (увесь геном певного організму) складають **геномну бібліотеку (банк генів).**

Зазвичай зберігають клони у вигляді бактеріальних колоній або бляшек на агарових пластинках розміром 23 х 23 см та щільністю 100 000 – 150 000 клонів на пластинку [наприклад, геном людини вміщується на 1-8 пластинках в залежності від вектора, що використовувався.

**Експресіонну бібліотеку** створюють аналогічним методом, але з використанням не тотальної геномної ДНК, а кДНК, отриманої з пулу мРНК даної клітини. Тобто, враховує лише ту частину геному, яка експресується в даній тканині на даній стадії онтогенезу за певних умов.

 Але для клонування еукаріотичних структурних генів необхідні спеціальні методики. Прокаріоти не здатні видаляти інтрони з первинних РНКтранскриптів, тому правильна трансляція еукаріотичних мРНК у бактеріальній клітині неможлива.

Саму мРНК не можна вмонтувати у ДНК-вектор, спочатку на ній необхідно синтезувати дволанцюгову ДНК. Для цього послідовно використовують дві різні полімерази: зворотну транскриптазу й фрагменти Кленова ДНК- полімерази I. Матрицею в цьому синтезі слугує молекула зрілої мРНК, а каталізує його зворотна транскриптаза, що продується деякими ретровірусами.

 У реакційну суміш додають фрагмент Кленова ДНК-полімерази I E. coli, що добудовує другий ланцюг ДНК, використовуючи перший ланцюг як матрицю. Він приєднує дезоксинуклеотиди до зростаючого ланцюга, внаслідок цього створюється безінтронна клонована ДНК, так звана **кДНК.**

Різні кДНК можна вбудовувати в плазмідний вектор і отримати кДНКбібліотеку.

1. Скринінг бібліотеки (**розшук клону (клонів), які містять необхідну послідовність ДНК.**)

Ампліфікацію фагової бібліотеки (розмноження) отриманих геномних клонів, а також розшук необхідного клону проводять при зараженні фаговою бібліотекою бактеріальних клітин, які потім висівають на чашках Петрі з агаризованим середовищем. Повний гаплоїдний набір клітин ссавців містить біля 3 · 109 пар основ. При ємності вектора 15 т.п.н. бібліотека може містити біля 1 млн. фагових часточок. Перевірка мільйона фагових бляшок дозволяє перевірити весь геном на наявність необхідного гена. Так можна ідентифікувати ті фагові часточки, які містять послідовність дослідженого гена, розмножити ДНК цієї послідовності і проводити з нею подальші маніпуляції.

Для **розшуку бактеріального клону (клонів), які містять необхідну послідовність ДНК** використовують такі методи: гібридизацію з міченим ДНК-зондом з наступним радіоавтографічним або флуоресцентним аналізом; імунологічний скринінг (ідентифікація одиничного об’єкта шляхом перевірки чисельних об’єктів); скринінг за активністю білку, який кодується геном – мішенню.

**Гібридизація нуклеїнових кислот з міченим ДНК-зондом**

Якщо водний розчин ДНК нагріти до 100°С або рН до 13, то ДНК дисоціює є на 2 ланцюги (**денатурує**). Цей процес є зворотнім: витримка ДНК при 65°С відновлює структуру подвійної спіралі. Це ренатурація або **гібридизація**. Процеси гібридизації відбуваються між будь-якими одинарними ланцюгами, якщо вони комплементарні: **ДНК - ДНК, РНК - РНК, ДНК - РНК.**

Дослідити факт гібридизації можна при використанні маркованих зондів.

**ДНК-зонд** - одноланцюговий фрагмент ДНК, комплементарний тій послідовності, яку необхідно виявити (індикатор її наявності). Отримують його або клонуванням (на мРНК), або шляхом хімічного синтезу.

Для виявлення гібридизації, т. е. з'єднання з шуканою нуклеїновою кислотою, гібридизаційні зонди несуть яку-небудь мітку, що виявляється лабораторними приладами, найчастіше такою міткою служить радіоактивний ізотоп (**32P** 35S **3H** 14**C** 131**I**) або флюорофор.

Існує кілька різних методів мічення комплексу між зондом та ДНК-мішенню. Традиційним способом є **радіоактивне мічення зонд**а за допомогою введення в ДНК радіоактивних ізотопів 33Р, 32Р, 35S. Після гібридизації зразки-мішені виявляють за допомогою радіоавтографії. Фільтр у темряві накривають рентгенівською плівкою, а після певного часу (від кількох годин до декількох діб) її виявляють і по засвічених смугах визначають, у фрагментах якої довжини знаходиться комплементарна зонду нуклеотидна послідовність.

Недолік радіоактивних зондів - їх нестабільність через нетривалий час життя ізотопів (32Р - 14,5 діб) та швидкого радіолізу зонда. Використання ізотопів з більш тривалим періодом напіврозпаду призводить до зниження чутливості та подовжує час, необхідний для радіоавтографії. Крім того, для роботи з ізотопами потрібні спеціально оснащені лабораторії.

Найбільш широко використовують нерадіоактивне мічення. Найбільш поширеною нерадіоактивною репортерною групою, що включається до складу оліго- та полінуклеотидних зондів, є вітамін біотин (природний кофактор групи ферментів – карбоксилаз) або дигоксигенін.

**Біотин** (вітамін Н), широко поширений у природі і синтезований кишковими мікроорганізмами, сам по собі маркером не є. Біотинільоване похідне дУТФ (біо-УТФ) включається в утворювані ДНК-полімеразами ланцюги замість тиміну і здатне до комплементарних взаємодій з аденіном. Біотин має надзвичайно високу спорідненість до білку авідину, що міститься в курячому яйці, а також до його бактеріального аналога - стрептавідину (константа дисоціації комплексу біотин-авідін 10-15 М). Ці білки ковалентно зшивають (кон'югують) або з флуорохромами, або з ферментами, що каталізують утворення забарвлених продуктів. Як флуорохроми, і ферменти можна зшивати і з антитілами до (стрепт)авидину. Такі кон'югати, міцно зв'язуючись з біотином, введеним в оліго- або полінуклеотидний зонд, дозволяють виявляти до 0,1 пг (1 пікограм = 10-12 г) ДНК-мішені.

 Цей комплекс можна поєднати або з флуоресцентою міткою або з певним ферментом:

- Якщо зонд несе **флуоресцентну мітку**, фільтр фотографують в ультрафіолетовому світлі.

- Використовуючи біотинілований фермент і зонд, що несе один або кілька залишків біотину, можна здійснити ферментативну детекцію пов'язаного з зоною мішенню. Авідин зв'язується з комплексом, що утворився, з двох гомологічних ланцюгів ДНК і приєднує біотинілований фермент, який виявляють за допомогою відповідного забарвленого субстрату. Метод має нижчу чутливість, ніж радіохімічний. Підвищити чутливість можна, збільшивши кількість залишків біотину, введених у зонди.

**Дигоксигенін.** Подібно до біотину, нерадіоактивною репортерною групою може служити дигоксигенін – стероїд з рослини наперстянки (Digitalis purpurea), ), у природі розповсюджений набагато рідше, ніж біотин. У зв'язку з цим використання діг-мічених зондів для гібридизації дозволяє знизити рівень неспецифічного зв'язування при детекції сигналу в порівнянні з біотинильованими пробами.

Основний спосіб введення в зонд дигоксигеніну такий же, як для біотину, - включення дНТФ, що несе цю сполуку (діг-дУТФ) в полінуклеотид в ході полімеразної реакції. І дигоксигенін і біотин є гаптенами, тобто антигенними детермінантами, з якими специфічно та міцно зв'язуються відповідні антитіла, кон'юговані з ферментом, що утворює забарвлений продукт, або з будь-яким флуорохромом

**Флуорохроми**. На відміну від біотину та дигоксигеніну флуорохроми самі по собі є сигнальними сполуками. Вони здатні випромінювати світло певної довжини хвилі при збудженні їх короткохвильовим світлом. Так, флуоресцеїн, один із найпоширеніших барвників, при збудженні ультрафіолетом з довжиною хвилі 485 нм має максимум випромінювання у видимій ділянці – 515 нм і світиться зеленим.

Той факт, що одна молекула флуоресцентного барвника здатна багаторазово зазнавати циклу “збудження-випромінювання”, забезпечує високу чутливість зондів, мічених флуорохромами.

В олігонуклеотидні зонди флуорохроми вводяться різними хімічними способами, а полінуклеотидні – або хімічним шляхом після модифікації гетероциклічних основ, або ферментативним в полімеразних реакціяхз використанням флуорохромованих аналогів НТФ або дНТФ.

Існують дві модифікації флуоресцентної гібридизації *in situ*: пряма флуоресцентна *in situ* гібридизація **(*direct fluorescence in situ hybridization* або *DFISH)*** та непряма **– *FISH* (*Fluorescence in situ Hybridization)*.** В останньому варіанті флуорохром несе не сам зонд, а білок, що має високу спорідненість до репортерної групи зонда.

Гібридизація in situ дозволяє встановлювати локалізацію у певному районі хромосоми того чи іншого маркера. Як останній можуть виступати окремий ген або його частина, що не кодує білок, нуклеотидна послідовність, нетранскрибовані послідовності різної довжини, що повторюються, мобільні генетичні елементи і т.д. Використання декількох зондів, що несуть флуорохроми з різними спектрами випромінювання, дозволяє одночасно локалізувати в хромосомах різні нуклеотидні послідовності гібридизацією *in situ*. При каріологічному аналізі метод FISH дозволяє надійно ідентифікувати метафазні хромосоми та наявність у них перебудов, з'ясовувати походження зайвого хромосомного матеріалу, проводити аналіз віддалених гібридів, проводити філогенетичні дослідження, вивчати структурні особливості організації хромосом та ін.

Існують ДНК-зонди: 1. **Хромосом-специфічні (центромерні)** [СЕР](http://www.biovitrum.ru/catalogue/category/1155/) (Chromosome Enumeration Probe) — предназначені для ідентифікації центромерних регіонів хромосом та виявлення кількісних порушень каріотипа.

1. **Ген-специфічні зонди —** [LSI](http://www.biovitrum.ru/catalogue/category/1155/) (Locus Specific Identifiers) — гібридизуються з унікальними послідовностями ДНК.
2. **ДНК-зонди до тіломірних ділянок хромосом** - TEL (Telomeric Probe) - призначені для виявлення делецій та перебудов, що зачіпають кінцеві ділянки плечей хромосом. Такі зонди специфічні для р- або q-пліч хромосом (p - коротке плече, q - довге) і комплементарні ділянці довжиною близько 300 тисяч нуклеотидних пар від кінця хромосоми. Як правило, ДНК-зонди для коротких і довгих плечей хромосом пов'язані з різними флуорофорами, що дозволяє виявляти на одному препараті обидва тіломірні ділянки хромосоми.

Цифровий запис мікрозображень відкрив можливість переведення в псевдоколір не тільки комбінації флуорофорів, а й співвідношення їх інтенсивностей. Цей підхід виявився продуктивним для розробки **методу багатобарвного бендингу хромосом (MuliColor Banding — МСВ)**. Цей метод призначений проведення детального аналізу окремої хромосоми. Локус-специфічні ДНК-зонди мітять різними флуорофорами або комбінаціями флуорофорів так, що рівень сигналу кожного із ДНК-зондів варіює за інтенсивністю. Перекриття профілів інтенсивності сигналів ДНК-зондів забезпечує варіації співвідношень інтенсивностей флуоресценцій різних флуорофорів вздовж хромосоми. Співвідношення інтенсивностей можуть бути переведені в псевдокьлір, і, таким чином, кожній точці зображення, а, отже, кожному з хромосомних локусів, відповідатиме свій псевдоколір.

 **Ферменти, що використовуються як репортерні групи.** Як репортерну групу використовують також деякі ферменти, здатні каталізувати утворення великої кількості молекул пофарбованого продукту. Широко застосовують, наприклад, **пероксидазу та лужну фосфатазу**. Перший фермент у присутності перекису водню окислює деякі ароматичні сполуки до нерозчинних у воді темнозабарвлених продуктів. Другий здатний дефосфорилювати органічні сполуки, які при цьому перетворюються на окислені киснем сильно забарвлені продукти. Якщо ці ферменти кон'юговані з синтетичними олігонуклеотидами, вони виступають безпосередньо як нерадиоактивные мітки. Однак їх найчастіше використовують для непрямого виявлення зондів, мічених біотином або дигоксигеніном. При дот-гібридизації темнозабарвлені продукти видно неозброєним оком, при гібридизації *in situ* - у світловому мікроскопі. Якщо потрібна кількісна оцінка продукту, що утворився, то проводять колориметричну детекцію на фотоколориметрі або денситометрі.

Найбільша чутливість (до 10-19 М) досягається з нерадіоактивними зондами, що виявляються за допомогою лужної фосфатази у варіанті хемілюмінесценції. Субстрат лужної фосфатази адамантил1,2 діокситанфосфат після дефосфорилування розпадається з випромінюванням світла при довжині хвилі 470 нм. Детекція здійснюється дуже просто - експозицією фотоплівки від декількох хвилин до декількох годин.

Використовуючи кДНКові зонди та гібридизаційний аналіз можна ідентифікувати потрібний клон з геномної бібліотеки.

Якщо в чашках Петрі або на агарових пластинках до середовища, де посіяні різні колонії *E. coli*, які зберігають геномну бібліотеку, прикласти фільтр з нітроцелюлози або нейлону, то кожна колонія розділиться – частина лишиться на чашці, а частина відіб'ється на фільтрі.

Лугом та протеазами бактерії на фільтрі руйнуються, а ДНК гідролізується. Високою температурою у вакуумній пічці (або ультрафіолетом) ланцюги ДНК міцно зв'язуються з нітроцелюлозою.

На фільтр наносять мічену кДНК потрібного гена. кДНК-зонд буде комплементарно гібридизуватися тільки з фрагментом геномної ДНК, який містить потрібний ген. Це дає можливість з'ясувати, в якій колонії бактерій знаходиться потрібний ген. Колонію відбирають, виділяють з неї ДНК та аналізують для підтвердження того, що потрібний ген «спіймали». Ця процедкра лежить в основі технології гібридизації ДНК за Саузерном ( блоттінг).

**Гібридизація за Саузерном (блот- гібридизація).**

Суть методу полягає в тому, що спочатку фрагменти рестрикції ДНК, розділені в агарозном гелі, денатуруються до одноланцюгових молекул, а потім увесь електрофоретичний спектр ДНК відбивається (**blotting**) за рахунок капілярних сил на прикладеній до гелю мембрані нітроцелюлози (плівці), після чого фіксується за допомогою високої температури. Далі мембрана поміщається в гібридизаційний буфер, що містить радіоактивно мічений **ДНКовий зонд** - коротку специфічну послідовність ДНК.

Зонд здатний гібридизуватися з певним фрагментом ДНК і зв'яжеться тільки з однією або декількома конкретними фракціями з усього електрофоретичного спектру отриманих рестрикційних фрагментів ДНК. Зондом, наприклад, може служити синтетичний олігонуклеотид, послідовність якого відповідає частині певного гена. На останньому етапі до мембрани нітроцелюлози, що містить увесь спектр отриманих фрагментів ДНК, включаючи фракції, що гібридизувалися з радіоактивно міченим зондом, прикладають рентгенівську плівку. На плівці (авторадіограмі) після експозиції виявляються засвічені місця, що відповідають міченим фракціям ДНК. Це метод дістав назву **Саузерн-блот гібридизації.**

