

Q3 Procedury przeszukiwania

Hasła		
Przeszukiwanie	Przeszukiwanie biblioteki genowej w celu wyizolowania jednego określonego klonu polega zwykle na użyciu kwasu nukleinowego jako sondy do hybrydyzacji. Sonda wiąże się z komplementarną sekwencją, co pozwala na zidentyfikowanie potrzebnego klonu.	
Kolonijna i łysinkowa hybrydyzacja	Kopie kolonii lub łysinek znajdujących się na szalkach Petriego, przeniesionych metodą „odcisku” na odpowiedni filtr, inkubuje się w roztworze zawierającym znakowaną sondę. Po hybrydyzacji i przemyciu określa się lokalizację związanego znacznika (sondy). Grupę kolonii/łysinek, z którymi związała się sonda, rozcieńcza się i ponownie wysiewa na płytki, a po kolejnych etapach przeszukiwania tą samą sondą otrzymuje się pojedyncze klonu.	
Przeszukiwanie oparte na ekspresji	Większość klonów biblioteki ekspresyjnej cDNA produkuje białko kodowane przez cDNA lub jego część. W niektórych wektorach produktem translacji kodowanego przez cDNA polipeptydu może być białko fuzyjne połączone z β -galaktozydazą kodowaną przez wektor. W celu wyszukania określonego klonu biblioteki ekspresyjnej można taką bibliotekę przeszukiwać za pomocą przeciwciał wiążących kodowane białko, stosując procedurę podobną do hybrydyzacji łysinkowej.	
Przeszukiwanie oparte na funkcji białka	Partie klonów biblioteki ekspresyjnej są analizowane pod względem funkcji poszukiwanego genu, np. aktywności enzymatycznej czy zdolności przywrócenia fenotypu poprzez funkcjonalną komplementację. Pozytywnie ocenione partie są następnie dzielone i ponownie sprawdzane aż do otrzymania pojedynczego klonu.	
Tematy pokrewne	Budowa wektorów do klonowania (P1) Bakteriofagi, kosmidy, wektory YAC i BAC (Q1)	Charakterystyka klonów (R1)

Przeszukiwanie

Przeszukiwaniem (ang. *screening*) nazywamy proces identyfikacji określonego klonu z interesującym nas genem wśród bardzo dużej liczby innych klonów zawartych

w bibliotece genowej. Do identyfikacji klonów można wykorzystać fragment cDNA lub podobną sekwencję jako **sondę molekularną**, ale wymagana jest pewna znajomość genu lub jego produktu. Sonda molekularna musi być wyznakowana, aby można ją było wykryć. Jeśli produkt białkowy jest dostępny w ilości wystarczającej do określenia części jego sekwencji aminokwasowej (patrz temat A5), to można przygotować mieszaninę wszystkich możliwych sekwencji DNA, które mogłyby kodować tę sekwencję aminokwasową (patrz temat K1). Odpowiednio zaprojektowane oligonukleotydy stanowią zwykle sondę molekularną do przeszukiwania biblioteki poprzez **hybrydyzację**. Jednym z najczęściej stosowanych sposobów przygotowania sond DNA do przeszukiwania bibliotek jest PCR (patrz temat R3). Tak sporządzone sondy nazywamy **sondami PCR**. Krótkie sondy oligonukleotydowe można łatwo uzyskać metodą zautomatyzowanej, chemicznej syntezy (patrz temat Q2) i zastosować bezpośrednio w hybrydyzacji lub użyć je do PCR w celu przygotowania dłuższych sond do hybrydyzacji. Jeżeli można zaprojektować parę starterów dla danej sekwencji, to do przeszukiwania biblioteki można bezpośrednio zastosować reakcję PCR, ponieważ pozytywny wynik uzyskuje się tylko wtedy, gdy w danej puli klonów znajdzie się taki, który tę sekwencję zawiera. Pozytywne pule klonów są dzielone tak długo, aż zidentyfikuje się pojedynczy klon. Gdyby wytworzono przeciwciała przeciwko białku (patrz temat A5), można by je wykorzystać do wykrycia obecności klonu, w którym dochodziło do jego ekspresji; zwykle jako część białka fuzyjnego. Biblioteki cDNA, które umożliwiają ekspresję funkcjonalnego białka, mogą być przeszukiwane pod względem aktywności biologicznej białka, którego genu szukamy.

Kolonijna i łysinkowa hybrydyzacja

Koloniami nazywamy zgrupowania komórek widoczne na zestalonej agarowej pożywce, z których każda powstała w wyniku namnażania jednej komórki bakteryjnej. Łysinkami nazywamy punkty z widoczną lizą, będącą wynikiem infekcji fagiem (np. wektorem λ) (patrz temat P2). Mimo że biblioteki genowe w fagu tworzą łysinki, a nie kolonie, obydwie metody przeszukiwania są zasadniczo takie same. Pierwszy etap polega na przeniesieniu DNA zawartego w łysinca lub kolonii na **filtr nylonowy** lub **nitrocelulozowy**, jak pokazano na *rys. 1*. Ponieważ łysinki to powierzchnie pożywki, na których bakterie ulegają lizie, fagowy DNA jest dostępny bezpośrednio i będzie się wiązał z filtrem, który położymy na powierzchni szalki Petriego. Kolonie bakteryjne przeniesione w podobny sposób na filtr trzeba najpierw poddać lizie w celu uwolnienia DNA. Przeniesienie kolonii z szalki Petriego na filtr (wykonanie **repliki płytki**) polega zwykle na przyklejeniu bakterii do filtra nałożonego bezpośrednio na płytkę Petriego. Lizę bakterii przyklejonych do filtra przeprowadza się, zanurzając je w roztworze proteazy i SDS. Oryginalną płytkę przechowuje się w celu zapewnienia wzrostu i izolacji odpowiedniego klonu (tj. kolonii ze zrekombinowanym plazmidem) po jego identyfikacji. Zrekombinowany fag λ może być izolowany z łysinek pozostałych na płytkach. W obu przypadkach DNA na filtrze poddaje się alkalicznej denaturacji w celu uzyskania pojedynczych nici, które ulegają związaniu z filtrem w wyniku zapiekania czy naświetlania UV. Filtr jest następnie zanurzany w roztworze zawierającym