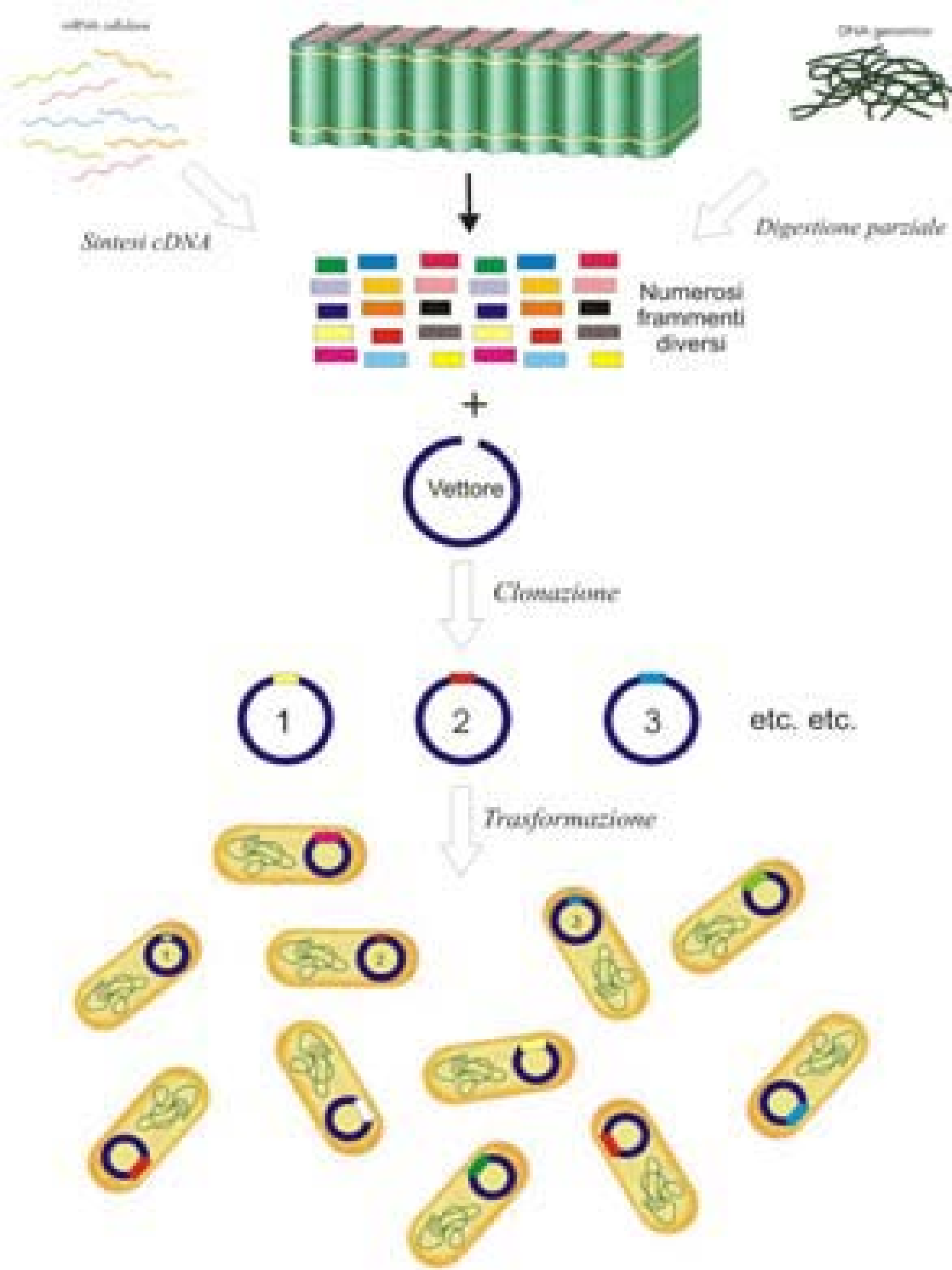


Librerie geniche

Le librerie di DNA sono collezioni di cloni ricombinanti ottenuti da una popolazione complessa di frammenti di DNA genomico o cDNA

(DNA complementare un RNA messaggero).

Ogni clone ricombinante ospita un frammento di DNA diverso. Una buona libreria contiene tutta l'informazione presente nel DNA genomico o cDNA di partenza.

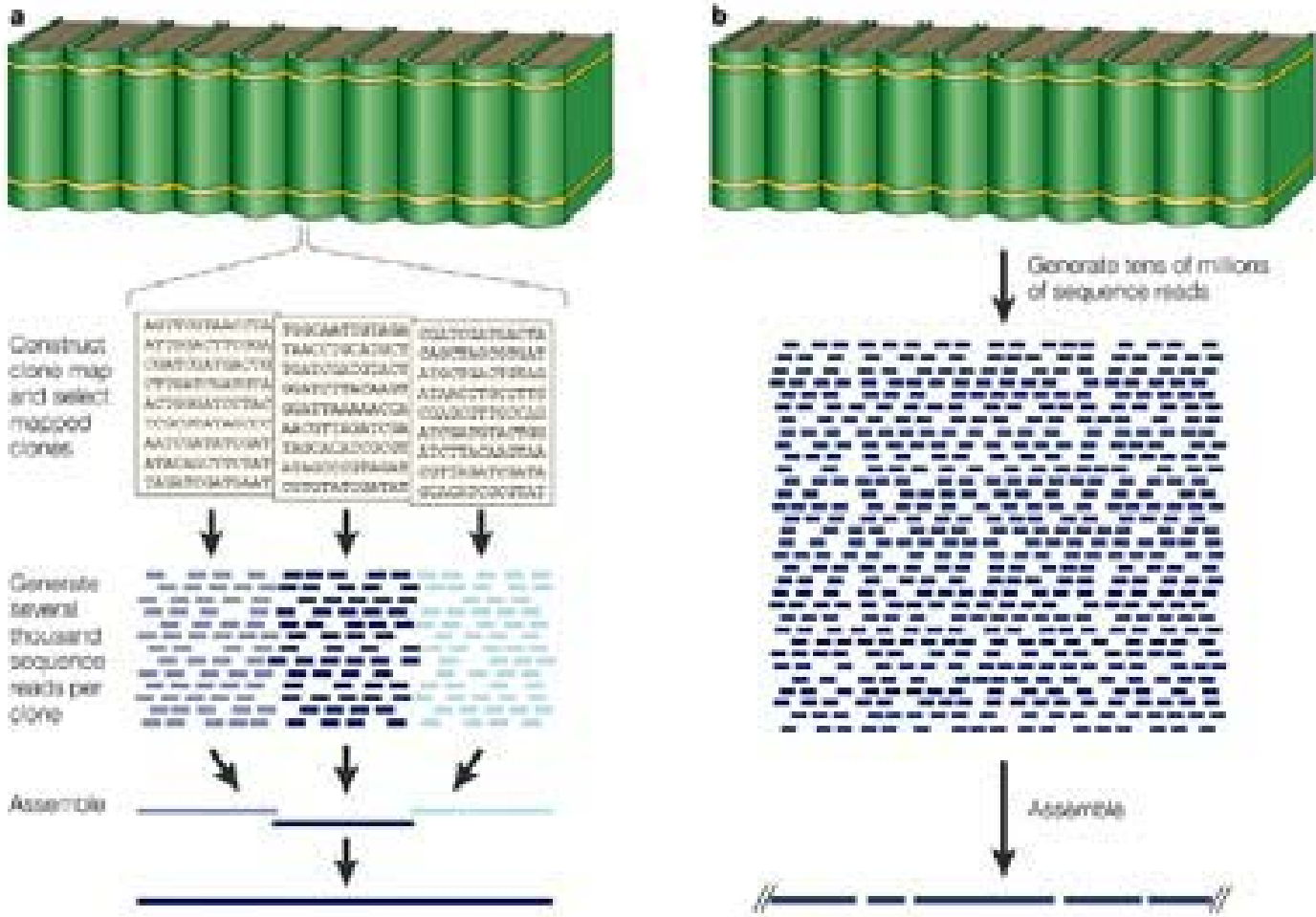


Ridondanza dell'informazione

Sebbene ogni clone batterico ospiti un plasmide ricombinante diverso, la stessa sequenza di DNA genomico può essere rappresentata più volte in una libreria: I frammenti ottenuti per digestione parziale contengono sequenze sovrapposte. Alcuni frammenti possono essere sovra- o sottorappresentati, dato che le basi che fiancheggiano il sito di riconoscimento influenzano la velocità di taglio di molti enzimi di restrizione (esempio *EcoRI*: lucido 2-4). Metodi alternativi per la costruzione delle librerie di DNA genomico prevedono la frammentazione del DNA con metodi fisici (es. per sonicazione). In questi casi la rottura del DNA è più uniforme, ma le estremità risultano estremamente danneggiate.

Approccio dei contigui di cloni

L'intero genoma è suddiviso in cloni sovrapposti con inserti di grandi dimensioni, in modo da ricostruire una mappa fisica, cromosoma per cromosoma, dell'intera sequenza di DNA.



Posizionare correttamente i cloni sul genoma richiede tempo. Tuttavia nella fase di rifinitura è molto utile sapere che il "gap" da riempire si trova in un punto particolare di un ben determinato cromosoma.

Vettori ad alta capacità

Vettori che possono ospitare frammenti di DNA di grandi dimensioni:

Da : Sambrook et al. (2001)

TABLE 4-1 High-capacity Vectors for Genomic Cloning

VECTOR	CAPACITY (kb)	REPLICON	HOST	COPY NUMBER	INTRODUCTION INTO CELLS	SCREENING FOR RECOMBINANTS	RECOVERY OF CLONED DNA
Cosmid	30-45	colE1	<i>E. coli</i>	high	transduction	not necessary	alkaline extraction
P1	70-100	P1	<i>E. coli</i>	1 (amplifiable)	transduction	<i>lacZ</i>	alkaline extraction
PAC	130-150	P1	<i>E. coli</i>	1	electroporation	<i>lacZ</i>	alkaline extraction
BAC	120-300	F	<i>E. coli</i>	1	electroporation	<i>in</i> -complementation	alkaline extraction
YAC	250-400	ARS	yeast	1	transformation	<i>ade2</i>	pulse-field gels

Stabilità delle sequenze clonate

La caratteristica più apprezzata di un vettore ad alta capacità è quella di propagare stabilmente la sequenza originale di DNA senza modificarla:

- Vettori considerati affidabili: P1, PAC e BAC
- Vettori con dubbia stabilità degli inserti: cosmidi, YAC