

# Isolation of genes

**Prof. Dr. Abdul Hussein Moyet  
AlFaisal**

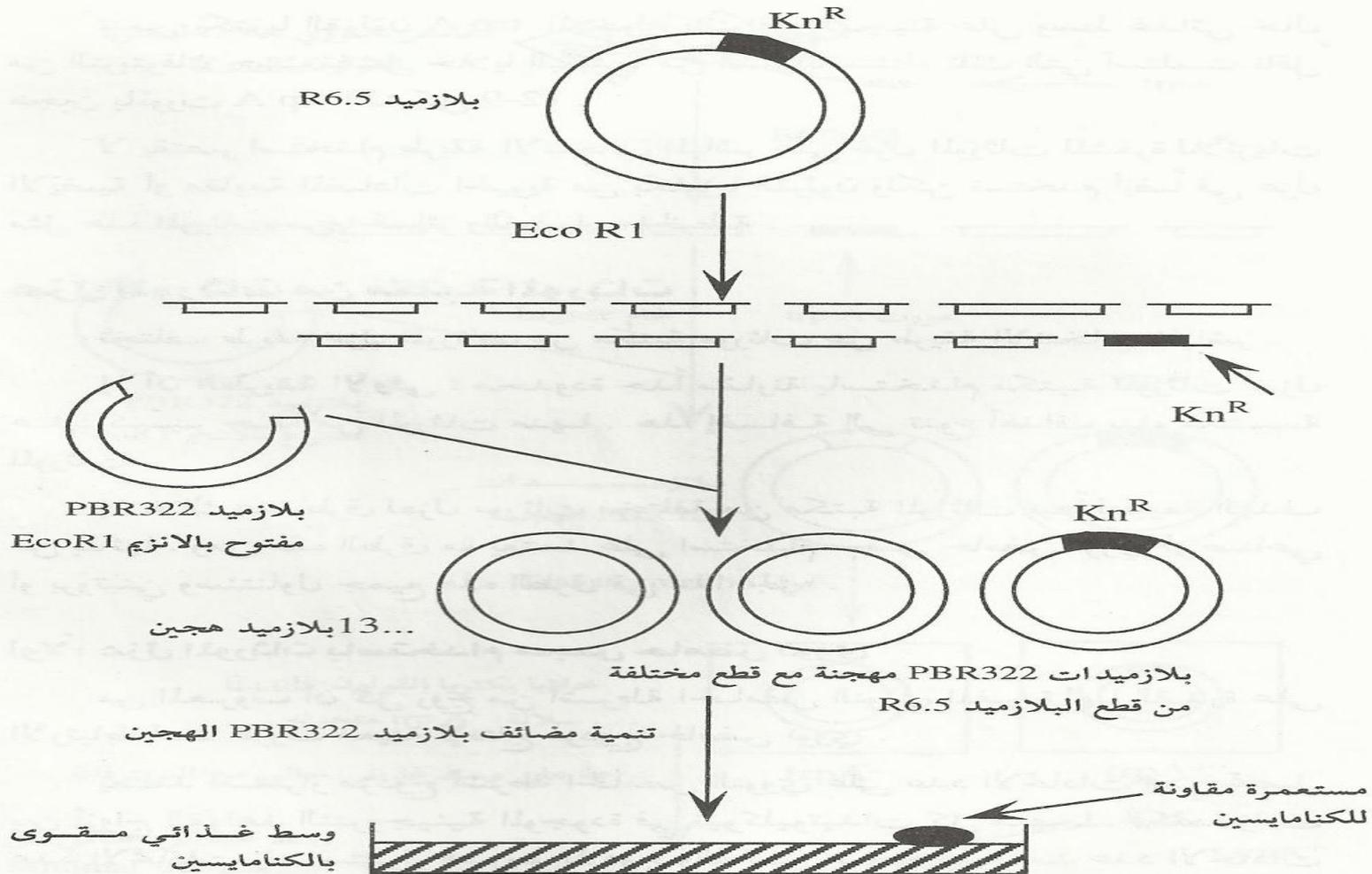
**Ph.D. in Cancer Cellular &  
Molecular Genetics  
Wales University- UK.**

# Isolation of genes

1. Direct gene isolation
2. Isolation of genes from genomic .1  
Library
3. Isolation of gene from cDNA .2  
library.

# Direct gene isolation

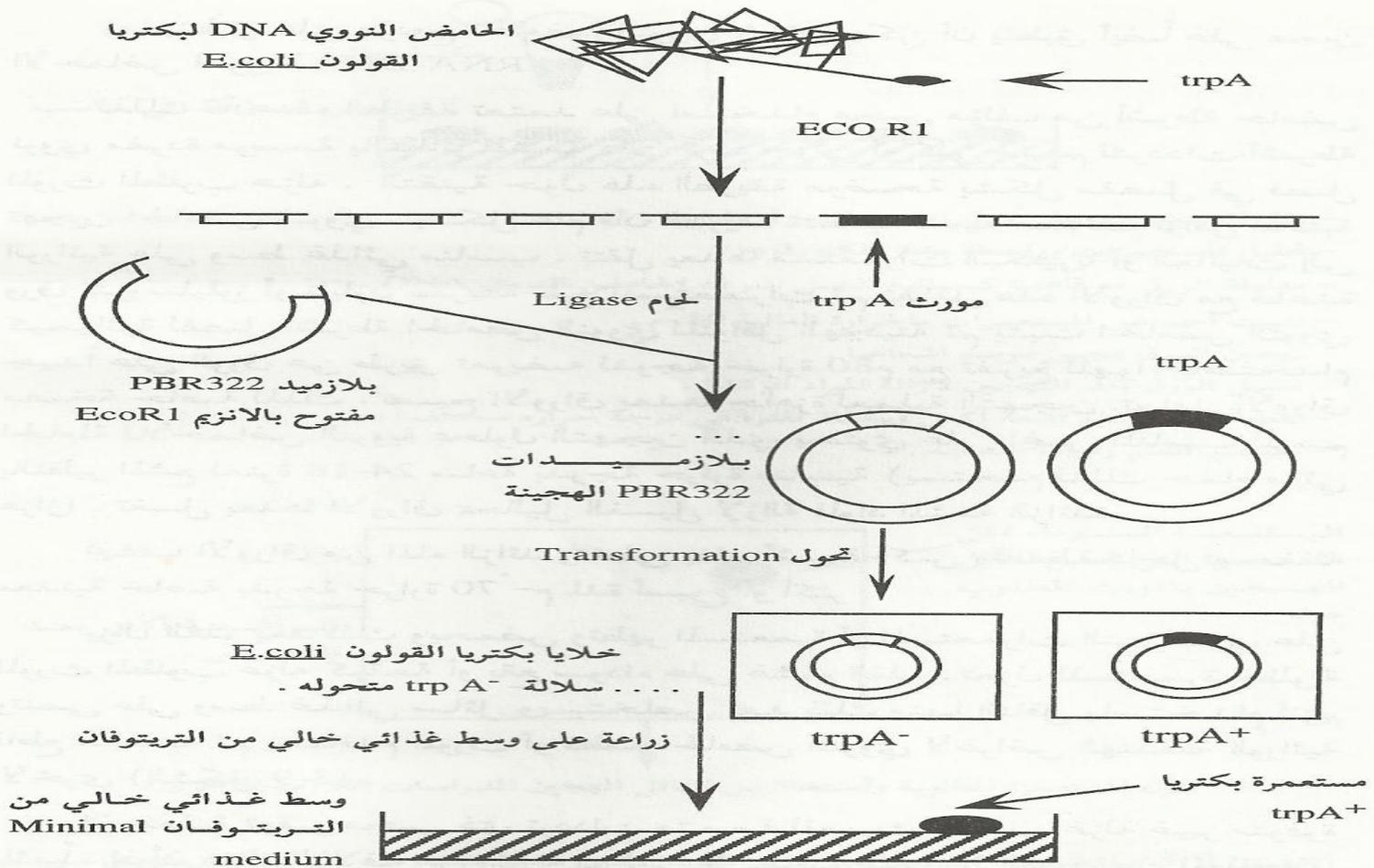
## e.g. Kanamycin gene isolation



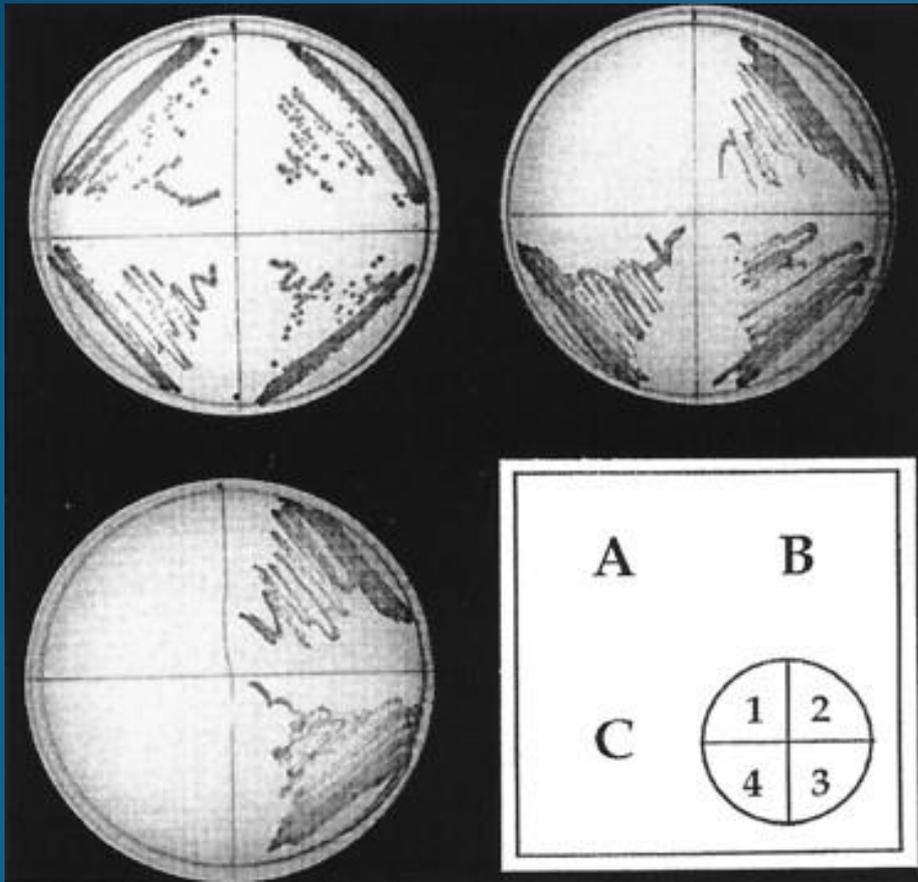
(شكل 1-9): عزل مورث مقاومة الكناميسين من بلازميد R6.5 بطريقة الانتخاب المباشر

# Direct gene isolation

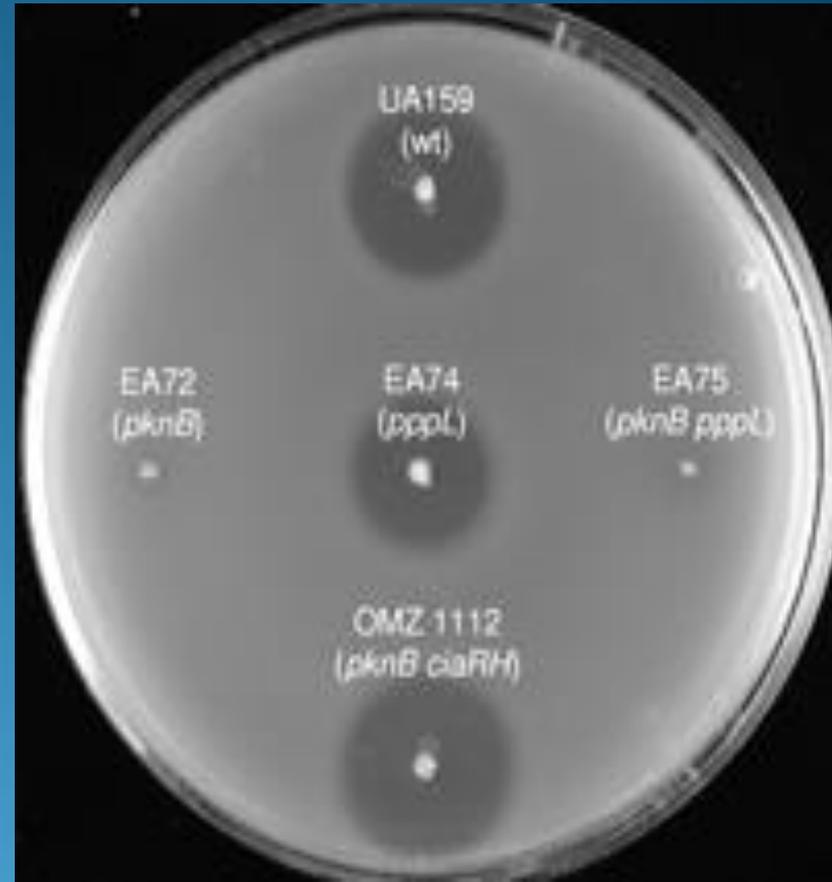
## e.g. trp A gene isolation



(الشكل 9-2): عزل مورث trp A من بكتريا القولون *E. coli* بطريقة الانتخاب المباشر



Media + **Tryptophan**



Media + **Kanamycin**

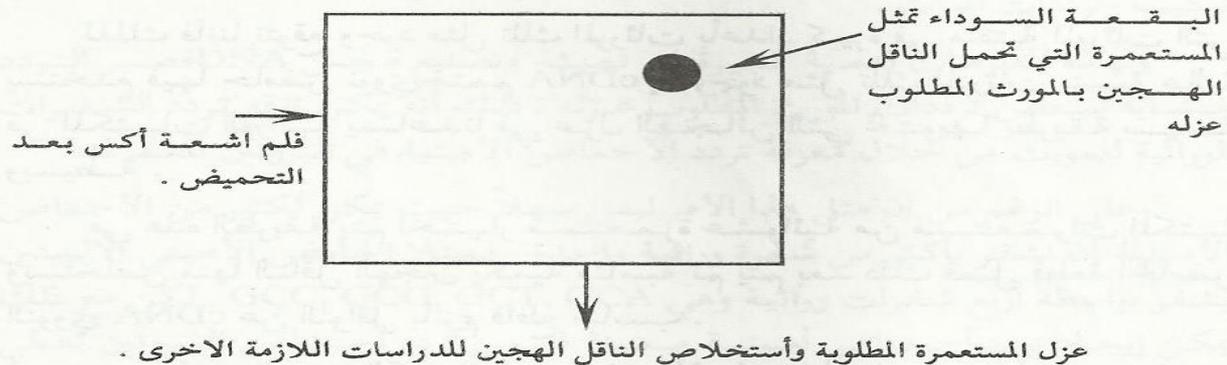
Using Selective Media to identify the right clones

## **2. Isolation of genes from genomic Library**

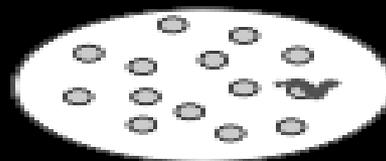
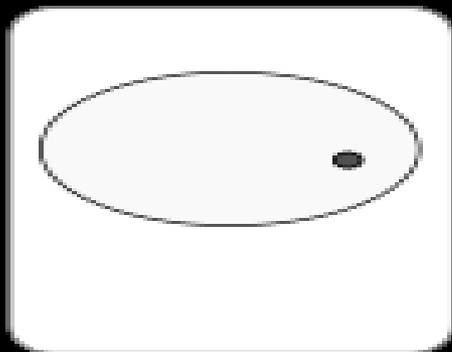
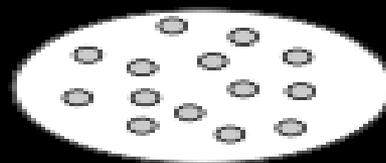
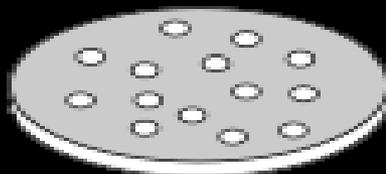
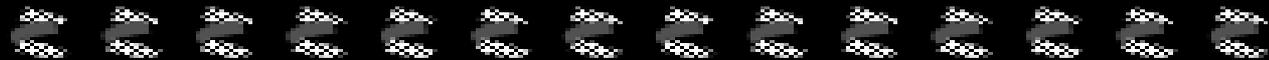
**Using Labeled Probe**



- نقل المستعمرات على ورق نايتروسليلوز أو نايلون .
- تحليل المستعمرات بواسطة بخار الكلورفورم .
- معاملة الورق مع قاعدة كيميائية لفصل اشعة الحامض النووي DNA .
- تثبيت أحماض المستعمرات بالحرارة العالية 80° م .
- تهجين الورق بمجس موسم اشعاعياً .
- غسل الورق بعد التهجين لازالة المواد الزائدة .
- تغطية الورق بفلم اشعة أكس ويحفظ لفترة في درجة حراره منخفضة .
- تحميض الفلم وقراءة النتيجة .



(الشكل 9-3): الطريقة العامة في عزل مورث معين باستخدام مجس حامض نووي موسم إشعاعياً



### **3. Isolation of gene from cDNA library.**

#### **Random Gun Shot Method**

- 1. Gliadin gene isolation from cDNA library.**
- 2. Insulin genes isolation from cDNA library.**

# Random Gun Shot Method

1. Plating a diluted aliquot from the library.
2. Isolate a random colony.
3. Extract the cloned vector from the bacteria.
4. Use the cloned vector or the cloned DNA fragment as a probe to identifying the high number of homologous clones.
5. Repeat steps 2 to 4 until you find the high number of homologous clones- the target gene.

## Predicted Oligonucleotided Method

This method is useful to isolate un identified gene by using proteins to predict an Oligonucleotide to use it as a probe.

### Isolation of Cytochrome C from yeast

1. Extract total proteins from yeast
2. Isolate cytochrome C protein from other proteins
3. Sequencing of CC protein-CC protein composed from 103 amino acids.

GLY- SER- ALA- LYS-LYS - GLY- ALA-THR-LEU-PHE - LYS-THR-ARG-CYS- GLU- 15  
LEU- CYS- HIS- THR- VAL- GLU - LYS- GLY - GLY-PRO- HIS - LYS-VAL - GLY- PRO- 30  
ASN-LEU- HIS- GLY- ILE- PHE- GLY-ARG- HIS- SER- GLY- GLN- ALA- GLN- GLY- 45  
TYR- SER- TYR- THR- ASP-ALA- ASN- ILE- LYS-LYS- ASN- VAL- LEU-TRP- ASP- 60  
GLU-ASN-ASN- MET- SER-GLU- TYR- LEU-THR- ASN- PRO-LYS- LYS- TYR- ILE- 75  
PRO-GLY-THR-LYS- MET-ALA- PHE- GLY-GLY- LEU- LYS- LYS-GLU- LYS- ASP- 90  
ARG-ASN- ASP- LEU0 ILE- THR- TYR- LEU- LYS- LYS- ALA- CYS- CLU 103

2. Looking carefully to the protein sequence to select a good region which give less possibilities to build oligonucleotides.

Example:

في الموقع 59 لغاية الموقع 64 (64) TRP- ASP- GLU-ASN -ASN-MET يمكن أن يعطي توقعاً لترددات الحامض النووي DNA في هذا الموقع كالتالي :

ATG- AAT(C) AAT(C)- GAA (G)- GAT (c)- TGG

وهذا يعني أن هناك احتمالاً لبناء 16 قطعة حامض نووي قصيرة يتألف كل منها من 18 نيوكليوتيداً .

أما في حالة اختيار تردد الأحماض الأمينية في الموقع الذي يبدأ بالحامض الأميني 65 وينتهي بالحامض الأميني 70 .

((70) ASN-THR-LEU-TYR-GLU-SER(65)) والذي يلي الموقع السابق فإنه يؤدي إلى توقع وجود عدة الآلاف من الاحتمالات لبناء قطع حامض نووي قصيرة مؤلفة من 18 نيوكليوتيداً .

3. Prepare probes from these oligonucleotides to identify the Cytochrome C gene.

# Homologous Gene Method

This method used when we have a homologous gene – with at least 40% similarity- from other organism.

**Example:**

The similarity between Mice insulin gene and Human insulin gene give the chance for us to use it to identified each others.

# Multigenes Family Method

This method used to isolate genes that have similarity in their function or they are evolutionary related. So we can use one gene as a probe to identify the others.

## Examples:

Cytochromes Family,  
Immunoglobulin Family,  
Antigens Family,  
Blood antigens Family

## **Immunological Method**

**This method based on using antibody- antigen against gene protein.**

- 1. Grow library bacteria on plate media, Incubate.**
- 2. Transfer bacteria colonies to nitrocellulose or polyphenel filter.**
- 3. Treat filter with chloroform vapor to lyses the colonies to release the proteins.**
- 4. Fix proteins and dry the filter.**
- 5. Treat the filter with antibodies, Wash then treat with fluorescent antigens, wash, Dry filter and examine under UV.**
- 6. The illuminated colony will contain the target gene.**

# Thank you



[Http://maomao520.yeah.net](http://maomao520.yeah.net)