

Isolation of genes

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

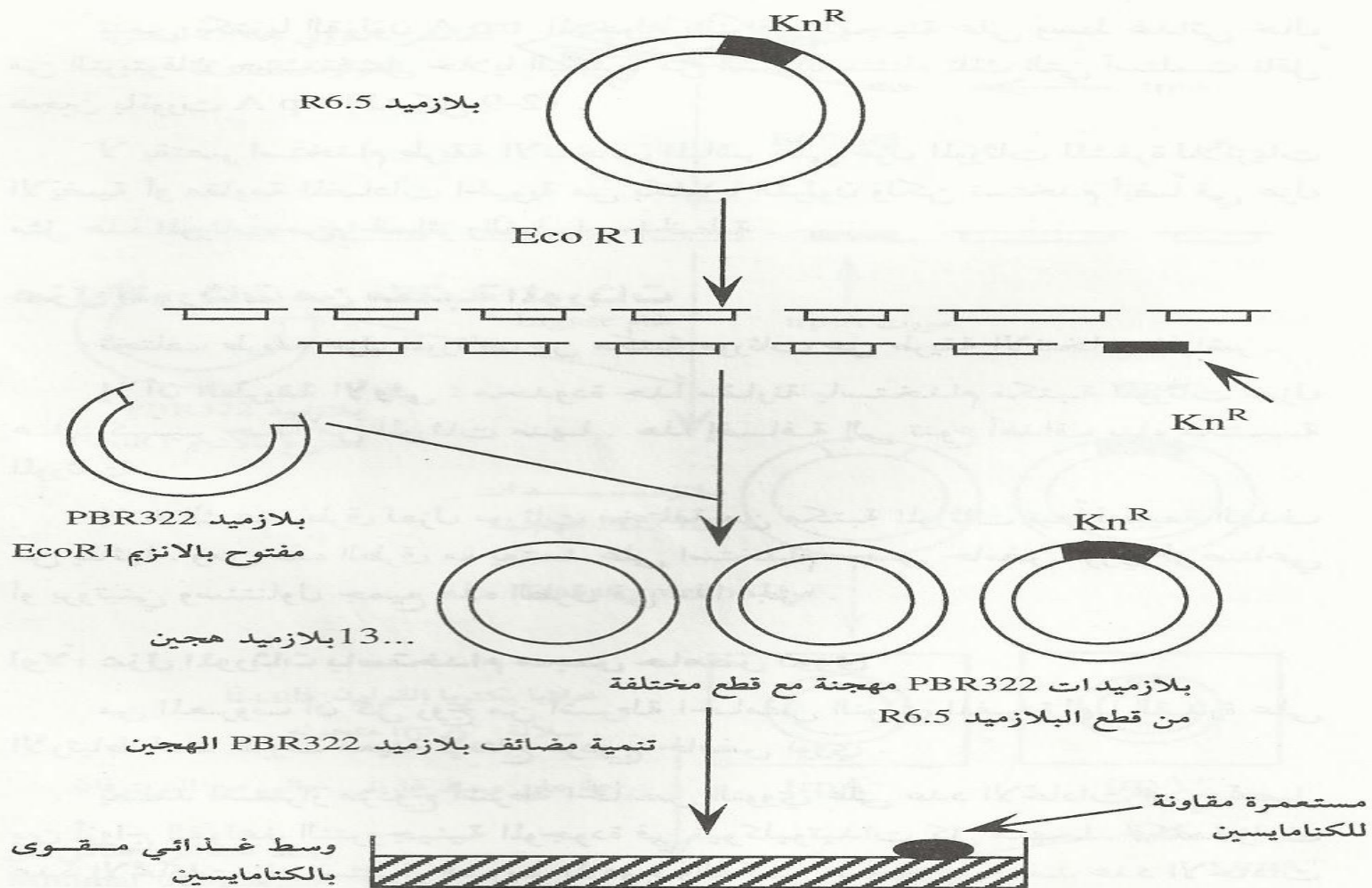
**Ph.D. in Cancer Cellular &
Molecular Genetics
Wales University- UK.**

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

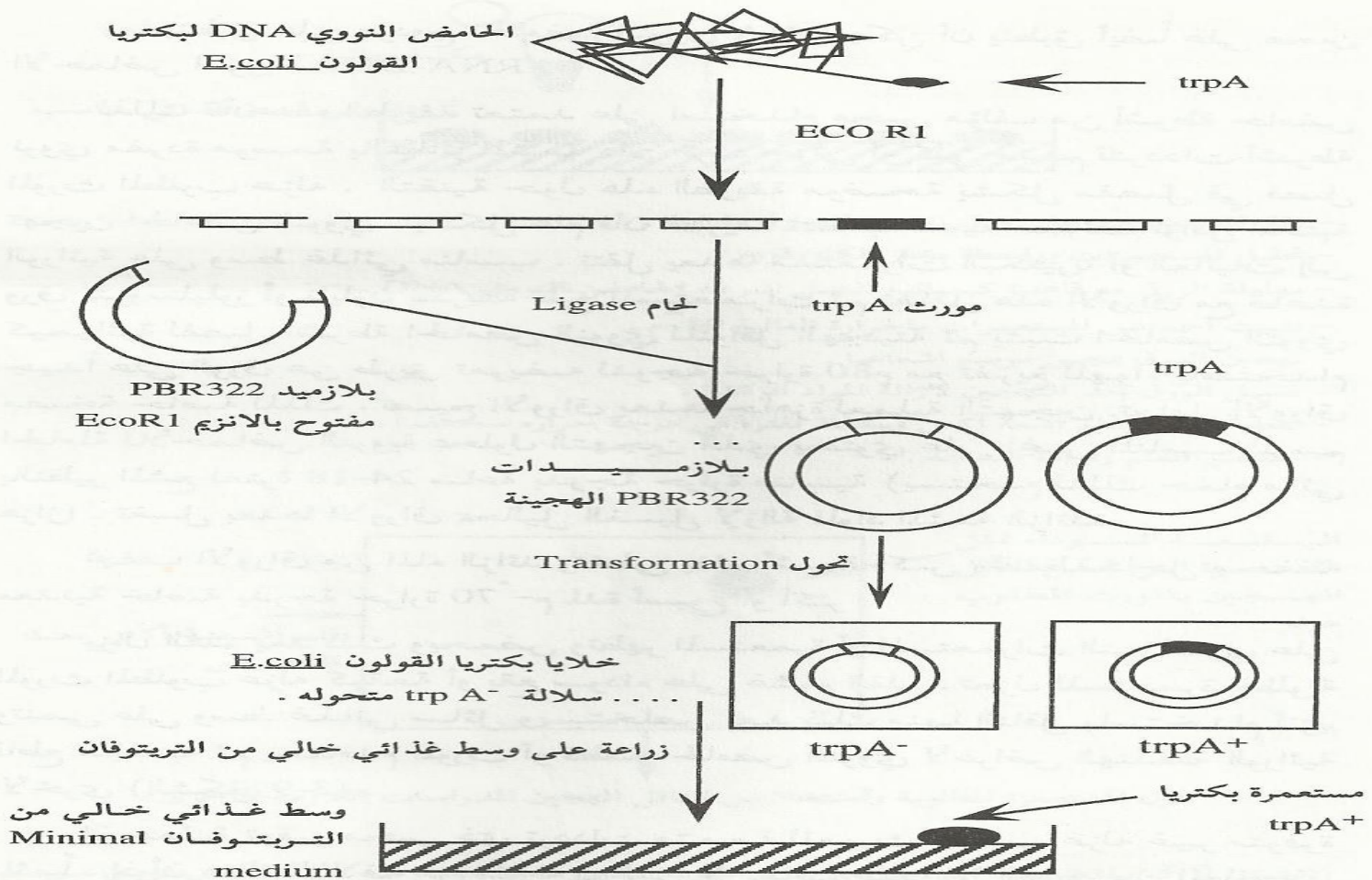
e.g. Kanamycin gene isolation



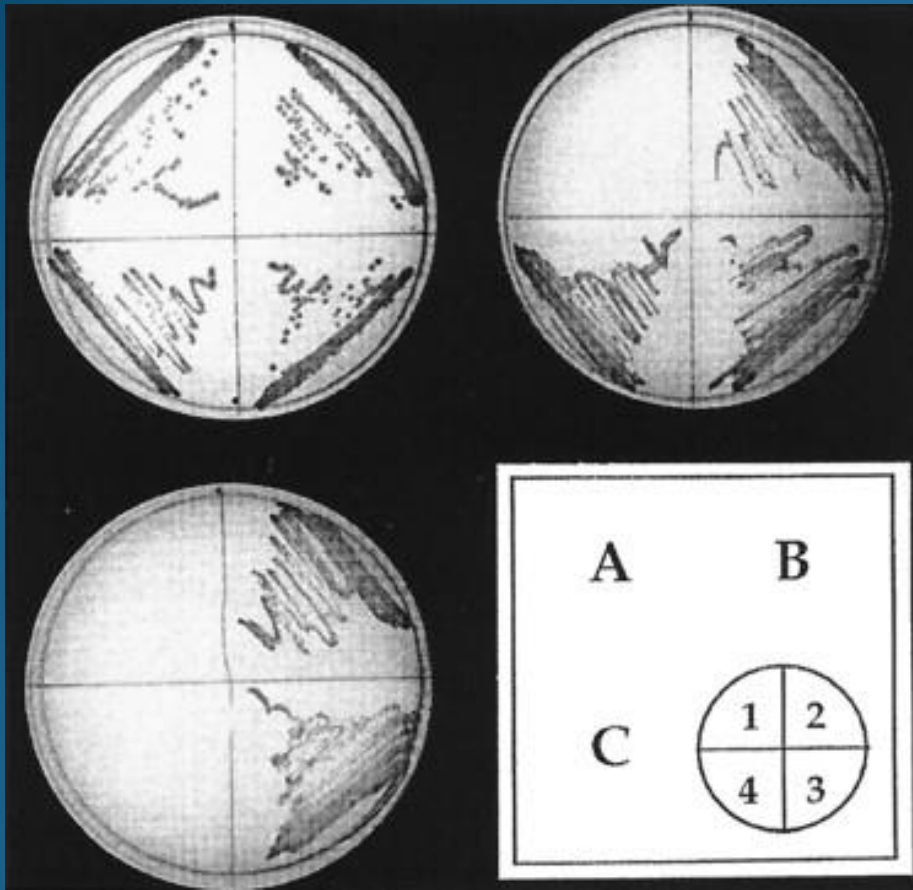
(شكل 1-9): عزل مورث مقاومة الكناميسين من بلازميد R6.5 بطريقة الانتخاب المباشر

Direct gene isolation

e.g. trp A gene isolation



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



Media + **Tryptophan**



Media + **Kanamycin**

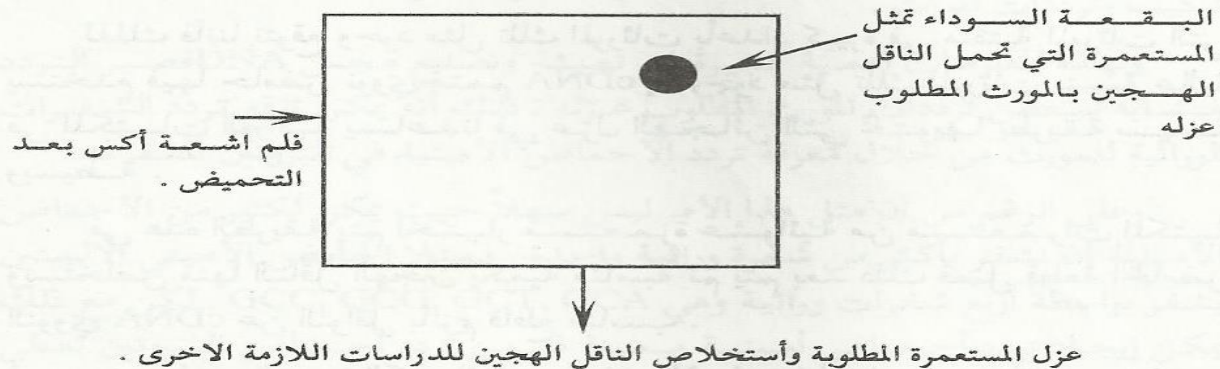
Using Selective Media to identify the right clones

2. Isolation of genes from genomic Library

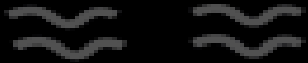
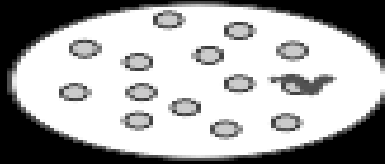
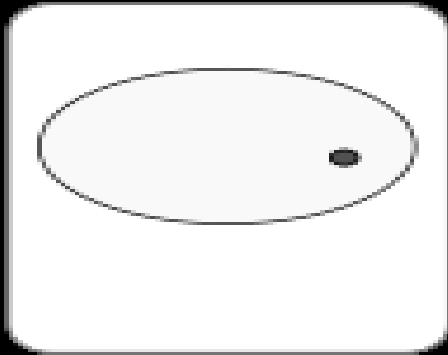
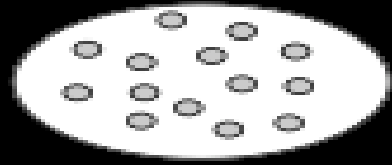
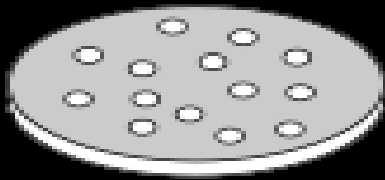
Using Labeled Probe



- 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)