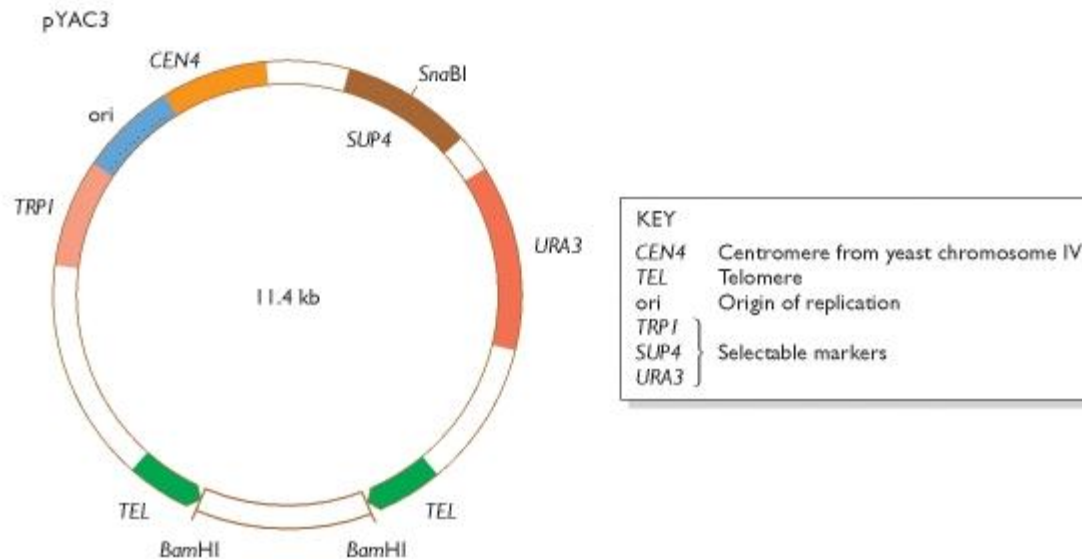


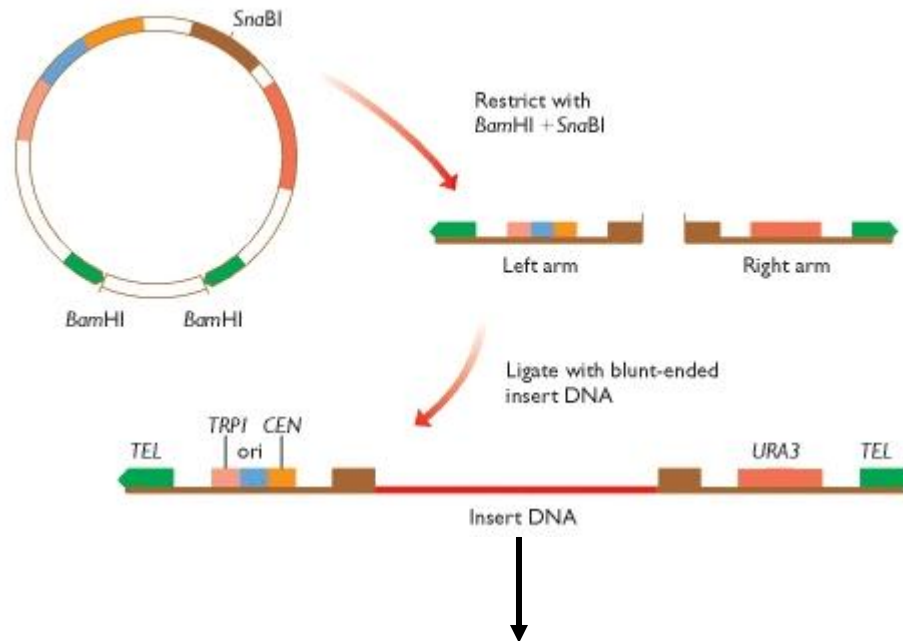
# Mapeo físico de Genomas

## Cromosomas de levadura artificiales (YAC)

Pueden contener insertos de DNA entre 100 y 3000 Kb



# Clonación en YACs



Las células auxotrofas para uracilo y triptofano se transforman en medio mínimo y solo crecerán las que contienen al YAC.

Si el vector contiene 2 brazos derecho o dos izquierdos no crecerán

Las células porque requerirán que en el medio se encuentre uno de los nutrientes.

La presencia del inserto se checa por inactivación del gen *SUP4*.

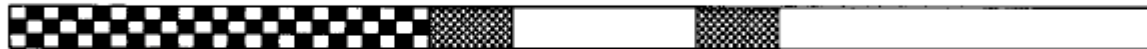
## Problemas asociados con los YACs



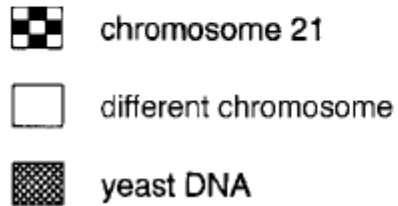
Quimeras



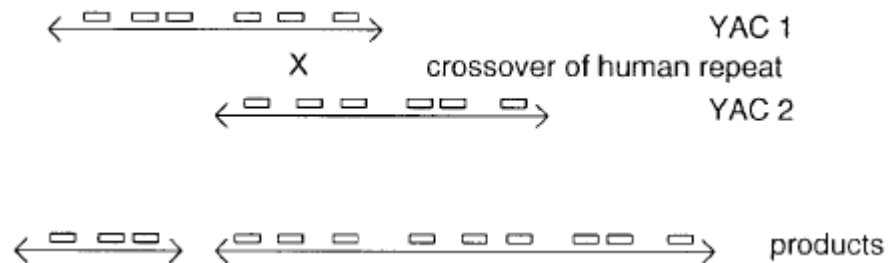
Deleciones



Inserciones



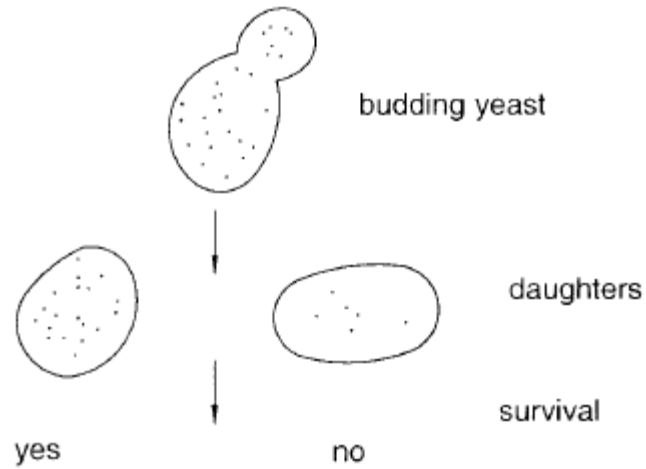
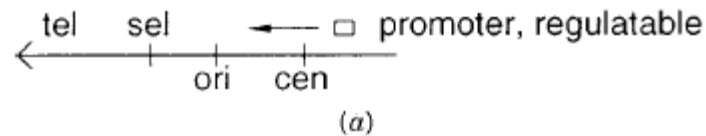
## Formación de quimeras por recombinación



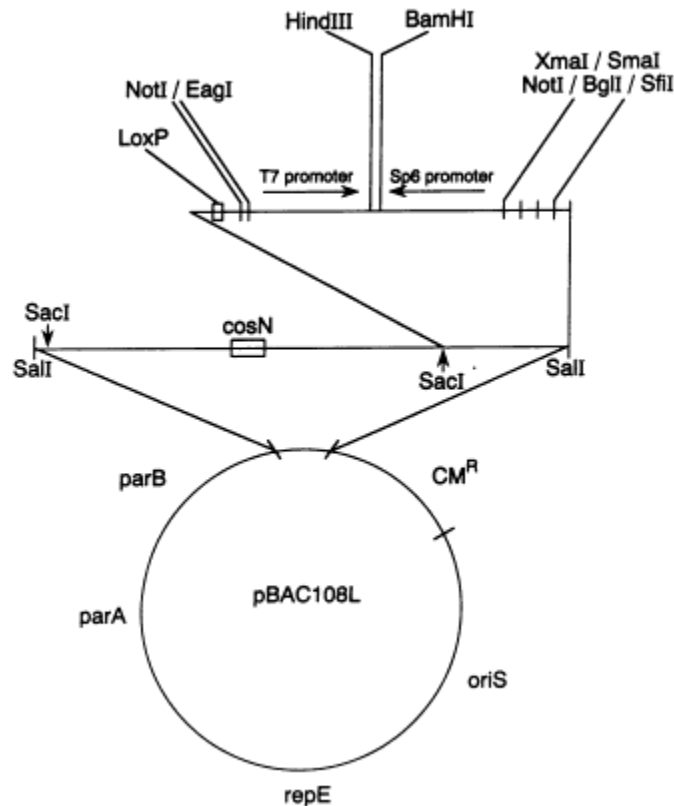
# Problemas asociados con los YACs

Extracción de DNA ¿como separarlos de los otros cromosomas?

Baja concentración de DNA obtenido en la extracción



# Cromosomas bacterianos artificiales (BAC)

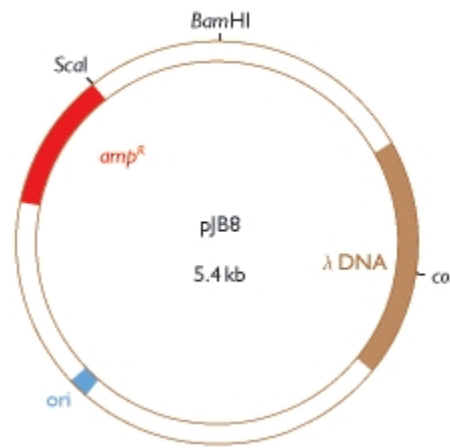


**Clonar fragmentos de hasta 100 kb, más estables que los YACs**

Se pueden separar fácilmente del DNA cromosomal de *E.coli*.  
se obtienen en concentraciones Mayores que los YACs

# Cosmidos

Plásmido que contiene un sitio  $\lambda$  cos



Esta secuencia cos es lo único que se necesita para que el resto de la molécula de DNA sea reconocida por las proteínas del fago  $\lambda$  como genoma  $\lambda$  y el DNA sea empaquetado en el fago  $\lambda$ .

El fago  $\lambda$  puede empaquetar hasta 52 Kb de DNA y si el cosmido es de 5.4 kb se pueden agregar hasta **46 Kb**

# Preparar una Biblioteca de DNA genómico

Tenemos que considerar el numero de clonas que se  
necesitaran

Sizes of human genomic libraries prepared in different types of cloning vector

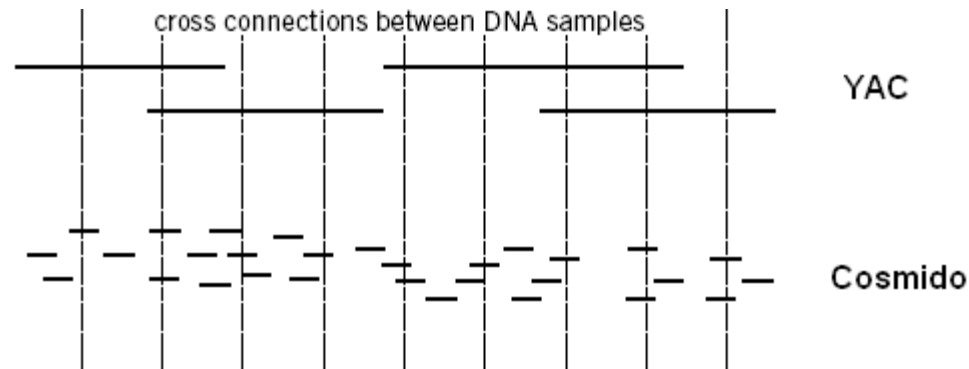
Type of vector	Insert size (kb)	Number of clones*	
		P = 95%	P = 99%
Cosmid, fosmid	40	240 000	370 000
P1	125	77 000	118 000
BAC, PAC	300	32 000	50 000
YAC	600	16 000	24 500

\* Calculated from the equation:  $N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-\frac{a}{b})}$

where  $N$  is the number of clones required,  $P$  is the probability that any given segment of the genome is present in the library,  $a$  is the average size of the DNA fragments inserted into the vector, and  $b$  is the size of the genome.

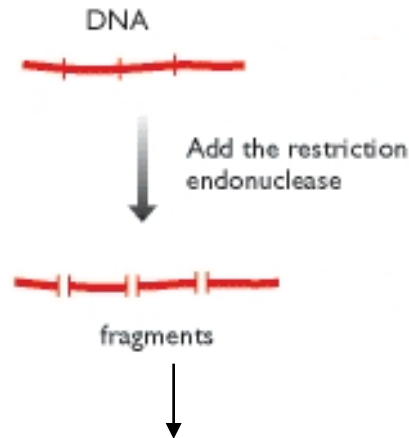
# Preparar una Biblioteca de DNA genómico

- Tenemos que considerar se necesita manejar un diferentes tipos de muestras: YACs, BACs, cosmidos





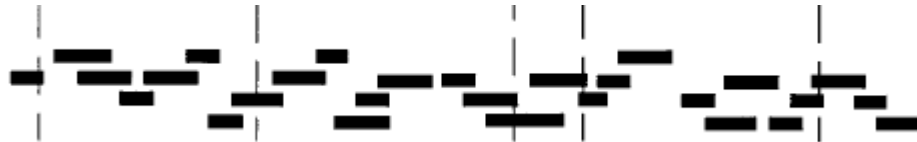
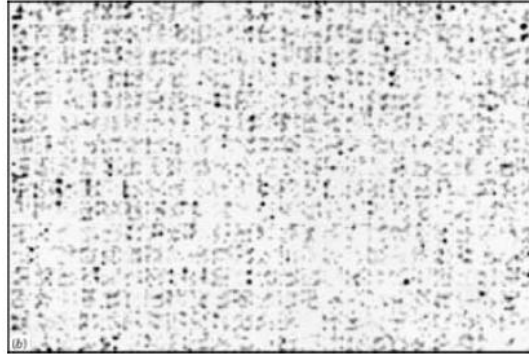
# Preparar una Biblioteca de DNA genómico



**Clonan en un cosmido,  
BAC o YAC**

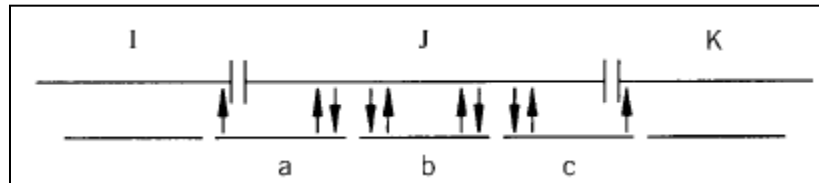
# ¿Cómo ordenamos la biblioteca?

Utilizando un arreglo de sondas



# ¿Cómo ordenamos la biblioteca si tenemos vectores de diferente tamaño?

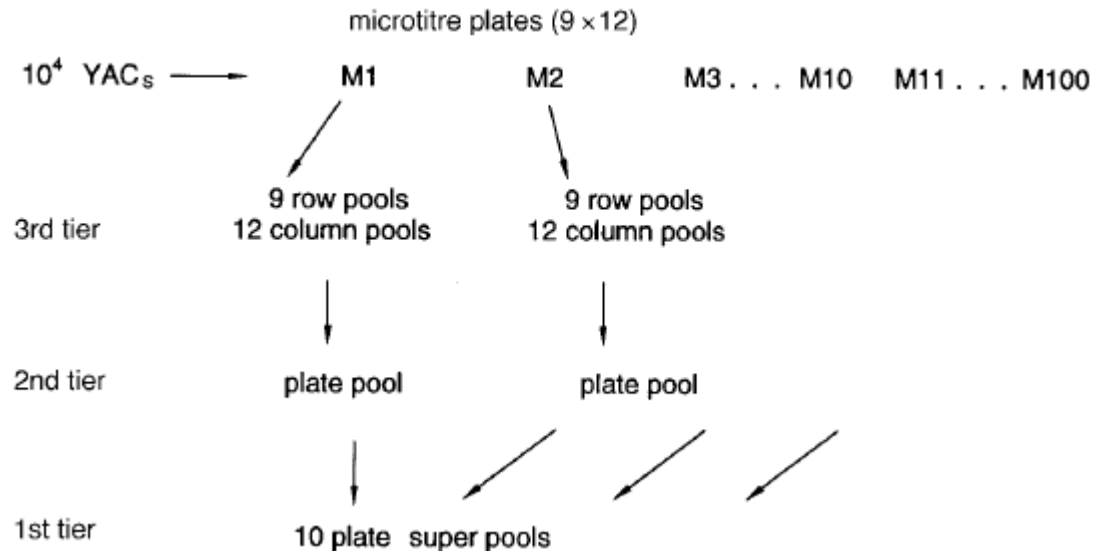
Teniendo un denso conjunto de blancos que abarcan un región



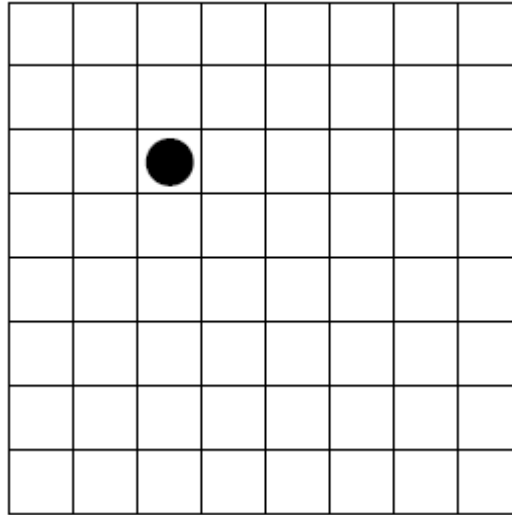
# ¿Cómo encontramos en la biblioteca una clona de interés?

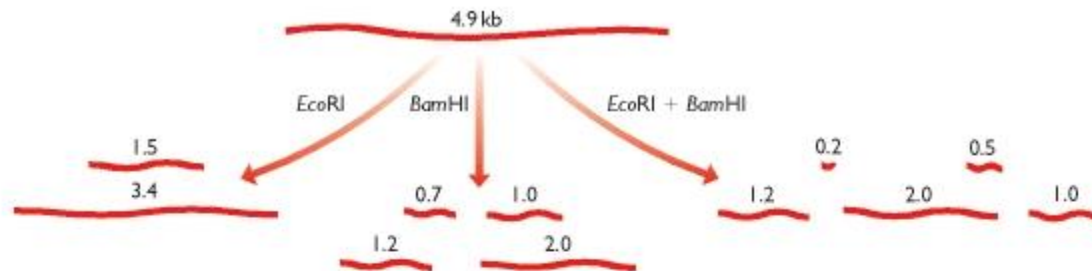
Utilizando una sonda contra nuestra  
Secuencia de interés

Type of vector	Insert size (kb)	Number of clones*	
		P = 95%	P = 99%
Cosmid, fosmid	40	240 000	370 000
P1	125	77 000	118 000
BAC, PAC	300	32 000	50 000
YAC	600	16 000	24 500



# ¿Cómo encontramos en la biblioteca una clona de interés?





#### INTERPRETATION OF THE DOUBLE RESTRICTION

##### Fragments

##### Conclusions

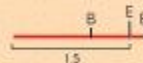
0.2 kb, 0.5 kb

These must derive from the 0.7 kb *Bam*HI fragment, which therefore has an internal *Eco*RI site:



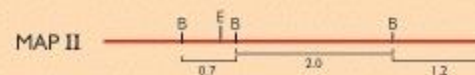
1.0 kb

This must be a *Bam*HI fragment with no internal *Eco*RI site. We can account for the 1.5 kb *Eco*RI fragment if we place the 1.0 kb fragment thus:



1.2 kb, 2.0 kb

These must also be *Bam*HI fragments with no internal *Eco*RI sites. They must lie within the 3.4 kb *Eco*RI fragment. There are two possibilities:



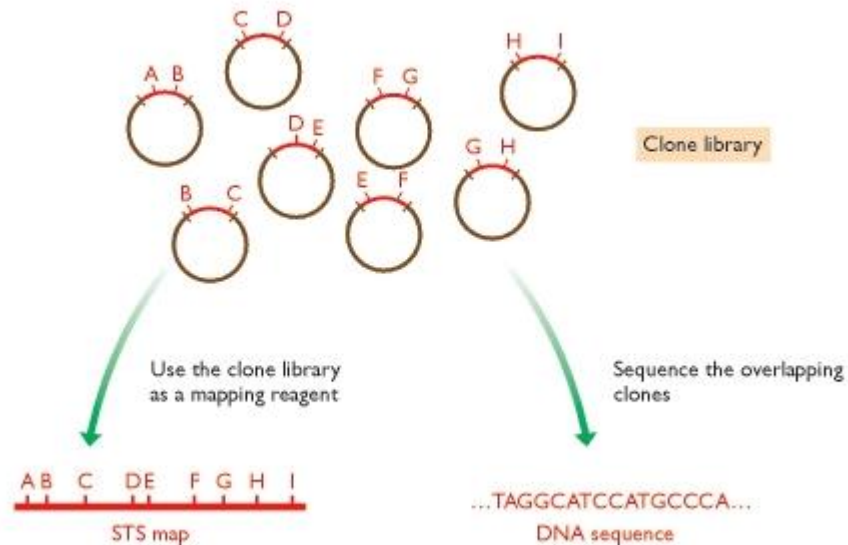
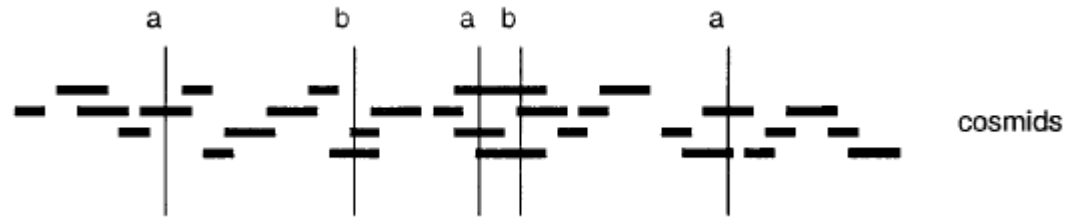
#### PREDICTED RESULTS OF A PARTIAL *Bam*HI RESTRICTION

If Map I is correct, then the partial restriction products will include a fragment of  $1.2 + 0.7 = 1.9$  kb

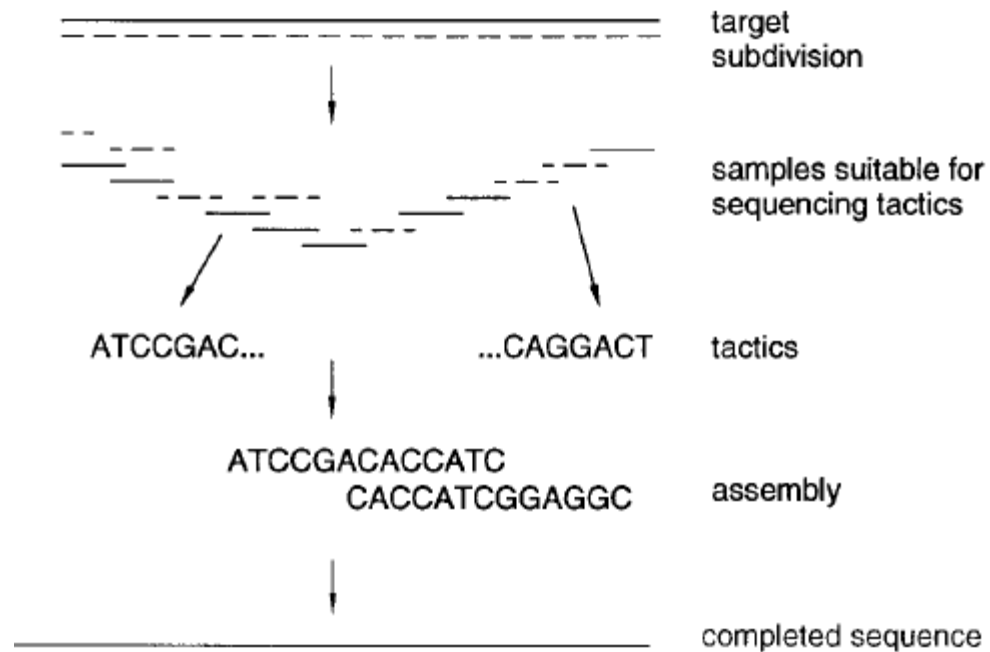
If Map II is correct, then the partial restriction products will include a fragment of  $2.0 + 0.7 = 2.7$  kb



# Biblioteca ordenada Fisicamente

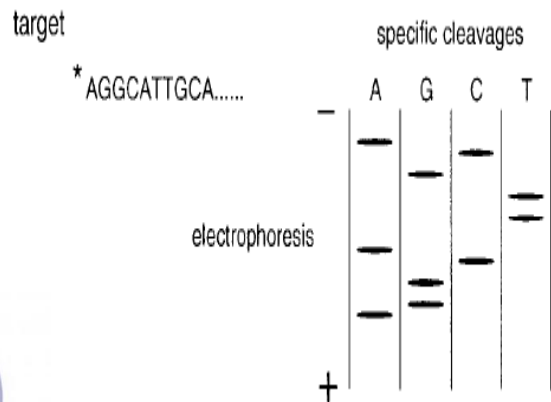
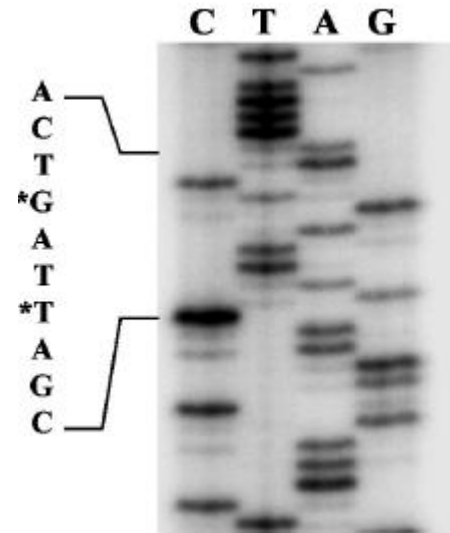
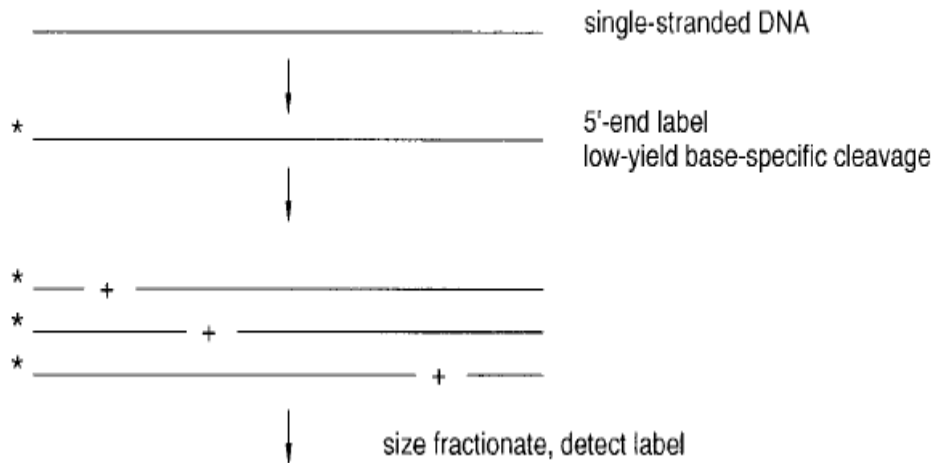


# Proyecto de Secuenciación



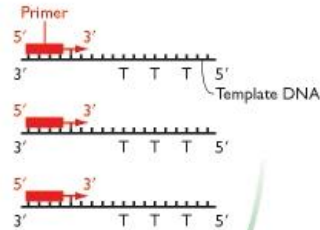


# Secuenciación por el metodo de Maxam-Gilbert.

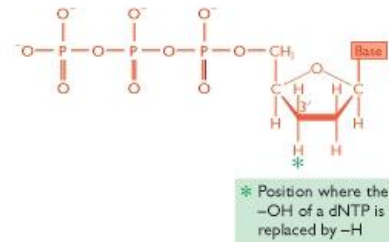


# Secuenciación por el método de Sanger.

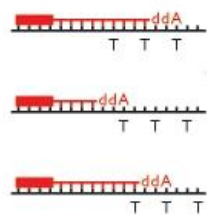
(A) Initiation of strand synthesis



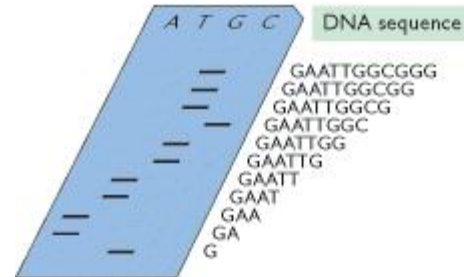
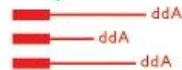
(B) A dideoxynucleotide



(C) Strand synthesis terminates when a ddNTP is added

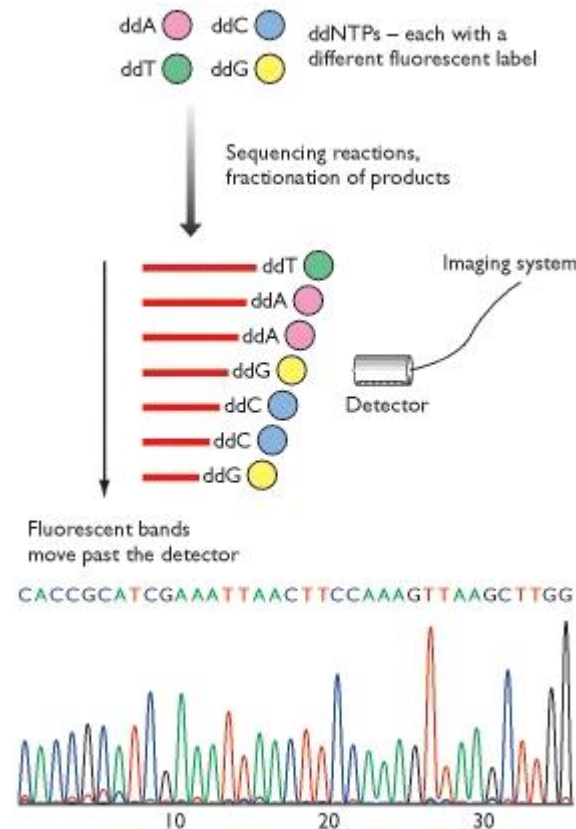


The 'A' family

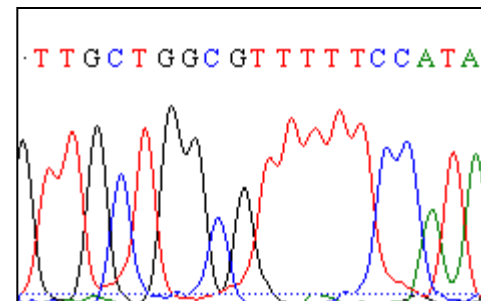
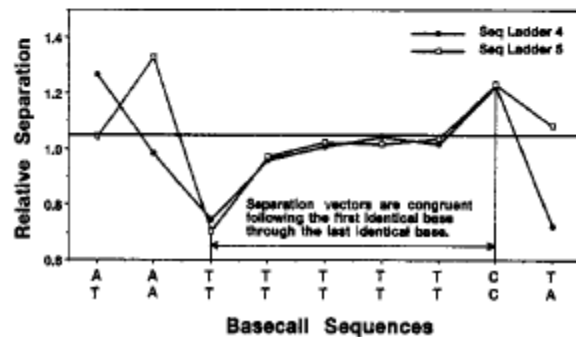
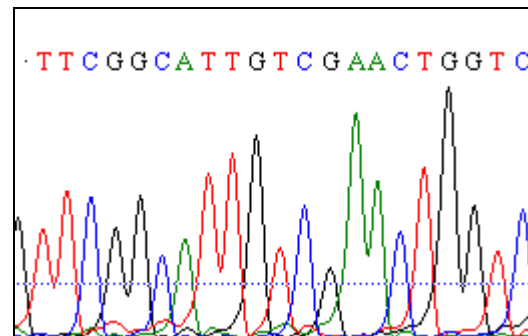
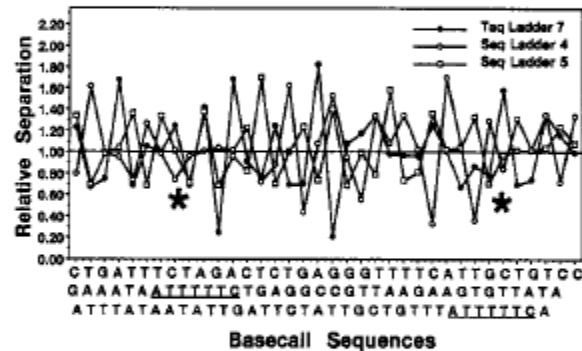
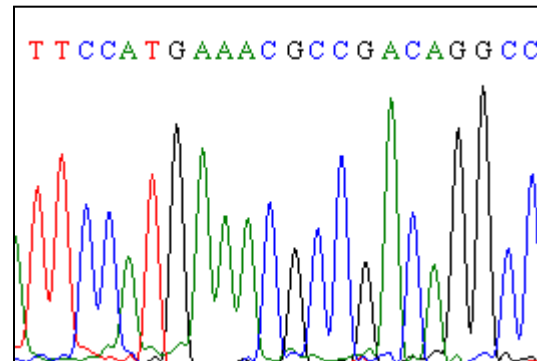
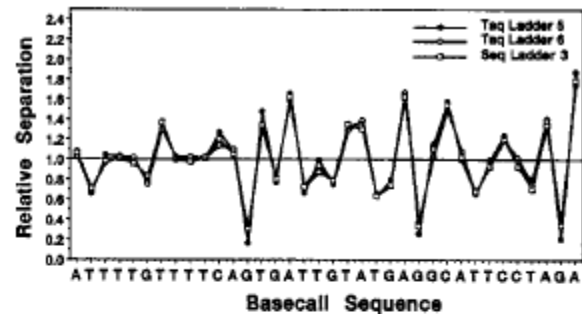


Requiere el uso de un oligonucleotido, DNA polimerasa, dNTPs y [dideoxinucleotidos](#)

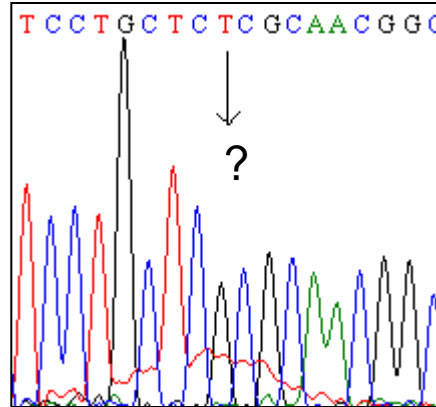
# Secuenciación por el método de Sanger.



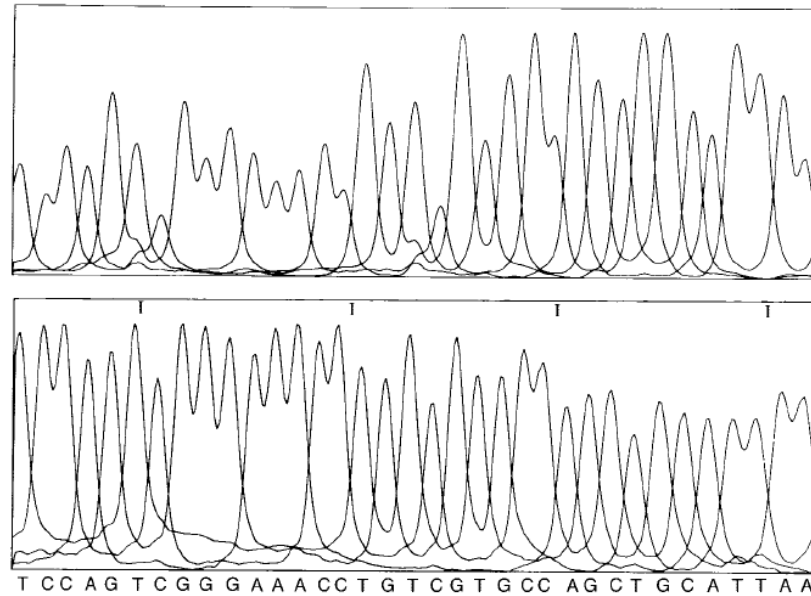
# Factores a considerar en la lectura de una reacción de secuencia (separación entre las bases en las diferentes partes del electroferograma)



# Factores a considerar en la lectura de una reacción de secuencia (asignación automática de las bases por el programa)



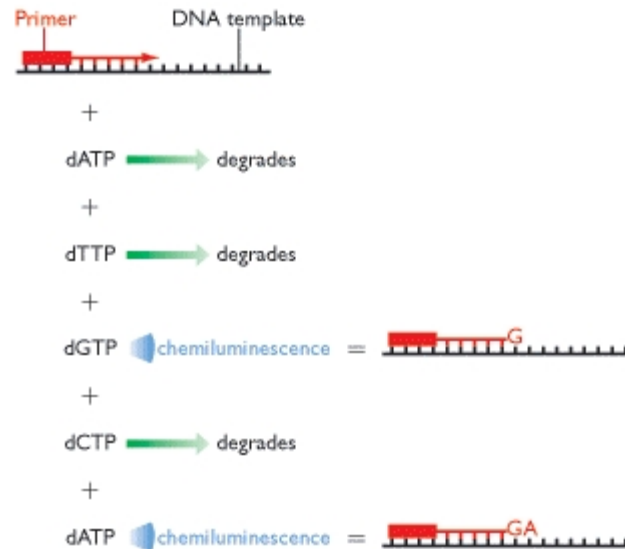
# Factores a considerar en la lectura de una reacción de secuencia (altura de los picos de las bases)



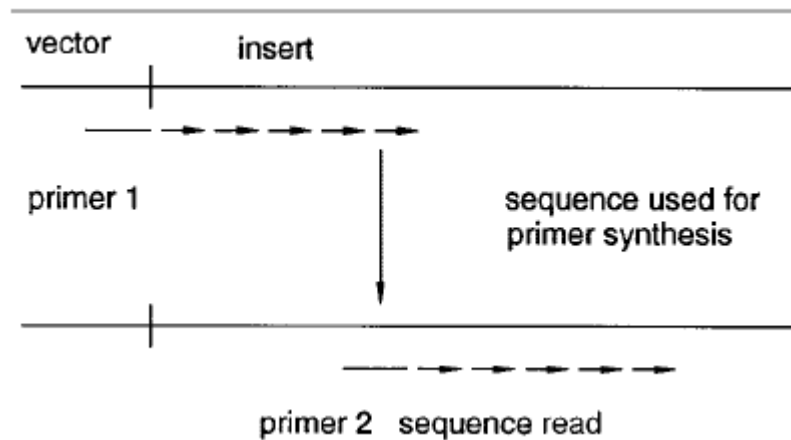
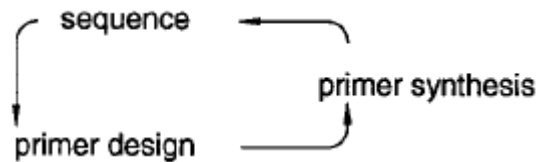
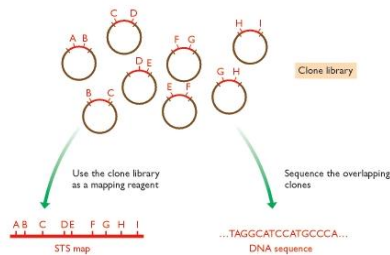
# Pirosecuenciación

La síntesis de la cadena complementaria es llevada a cabo en **ausencia de dideoxinucleótidos**.

Cada dNTP se agrega individualmente junto con una nucleotidasa que degrada al dNTP si no se incorporó en la cadena que esta siendo sintetizada, la incorporación del nucleótido es detectado por un destello de quimioluminiscencia inducido por el pirofosfato liberado del dNTP.

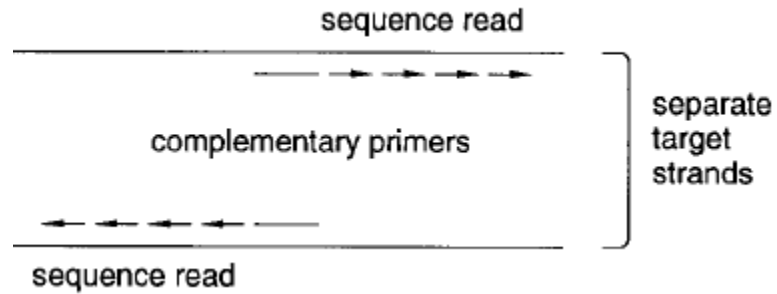


# Proyecto de Secuenciación



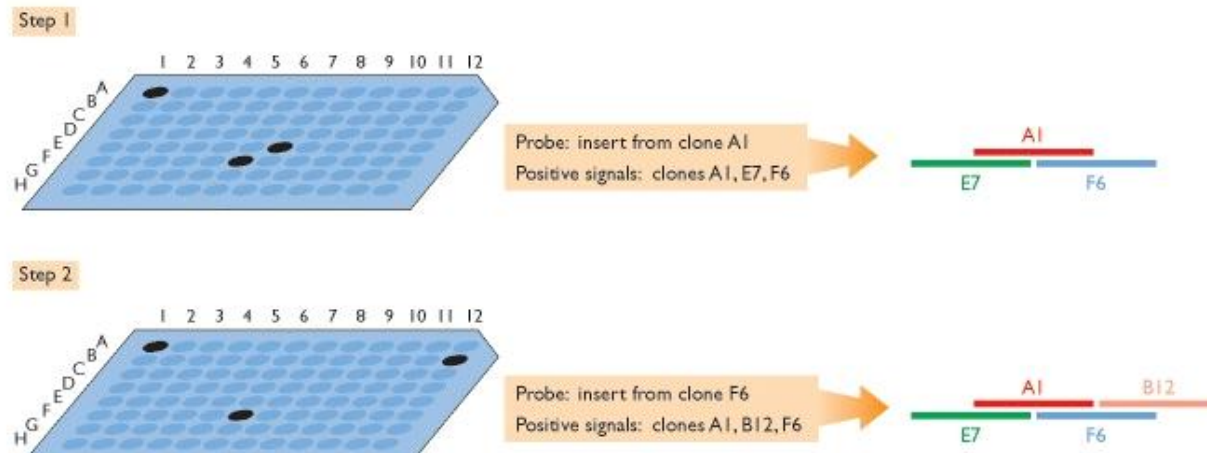


# Proyecto de Secuenciación

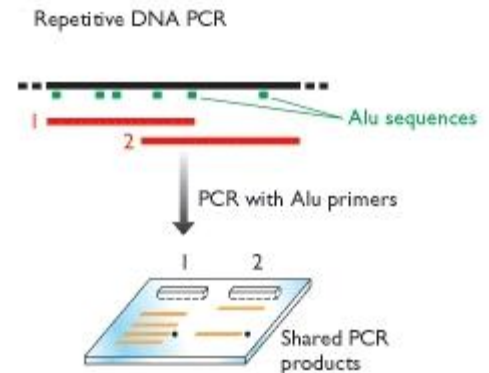
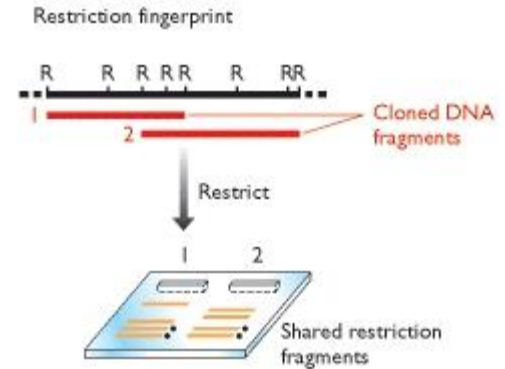
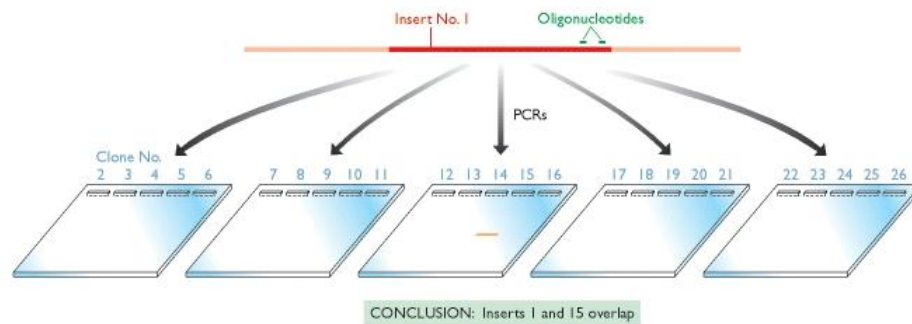


# Ensamble del genoma por el método de los contig

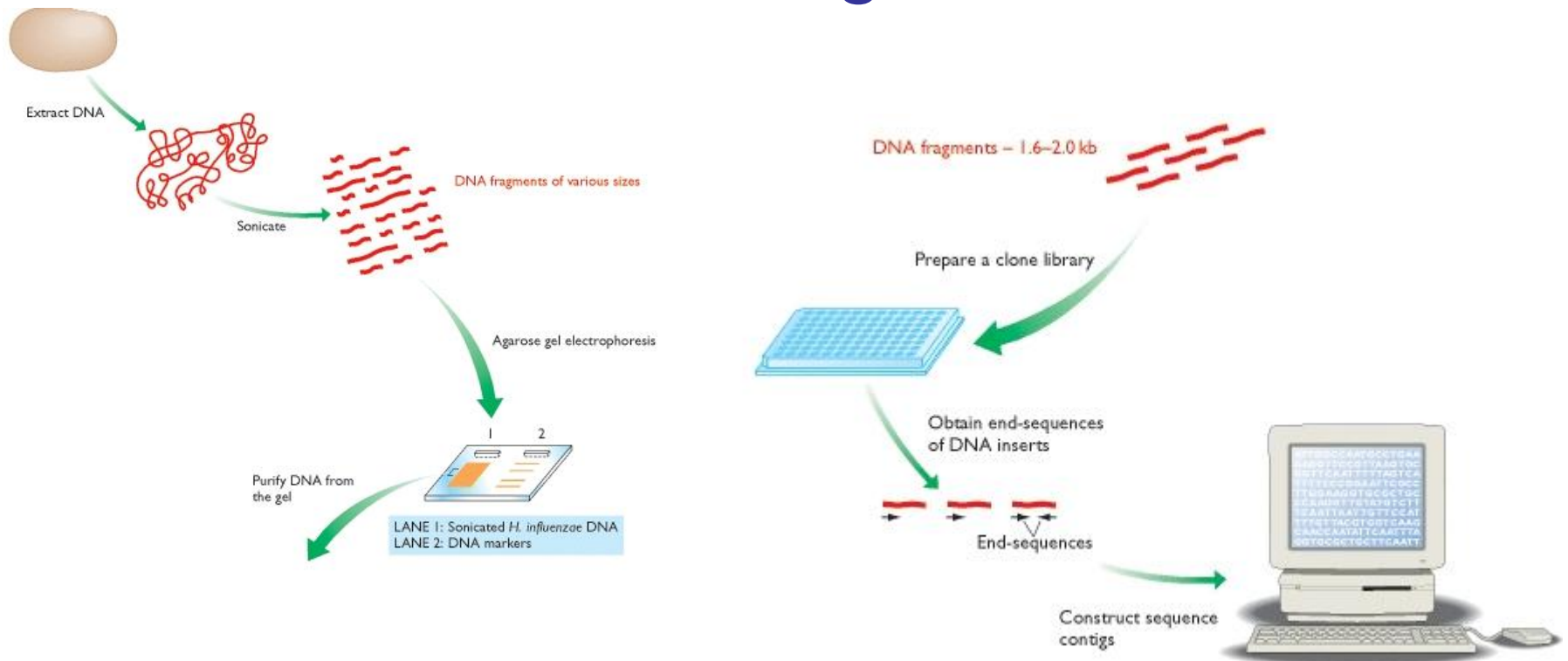
Un contig es construido identificando las **clonas** que contiene fragmentos que se **sobrelapan** y despues son secuenciadas cada una de las clonas Individualmente. Idealmente los fragmentos clonados se ubican en relación con un mapa fisico.



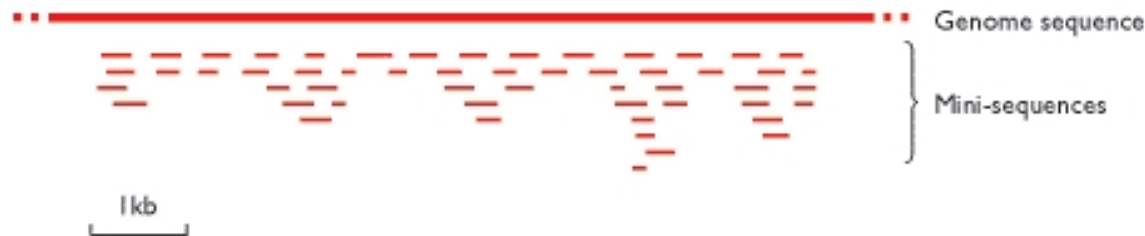
# Ensamble del genoma por el método de los contig



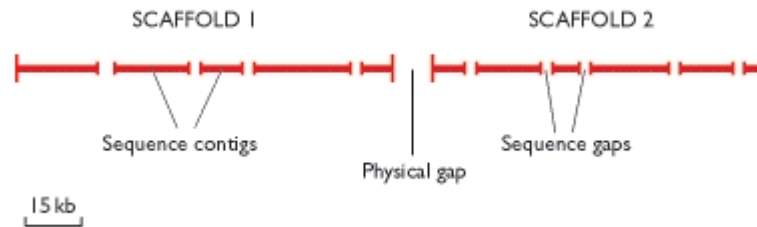
# Ensamble del genoma por el método de shotgun



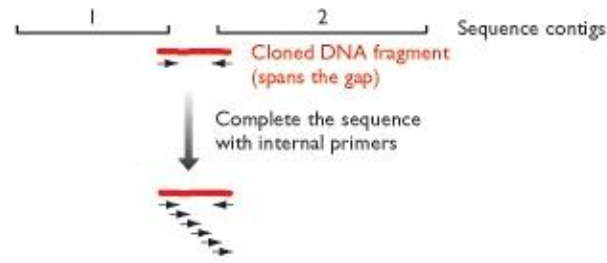
# Ensamble del genoma por el método de shotgun



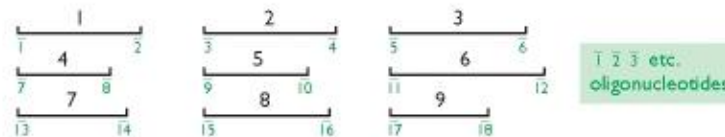
La naturaleza **aleatoria** del método ocasionara que algunas **partes del Genoma serán cubiertas más veces** que otras y por lo tanto tendremos Una secuencia genómica incompleta.



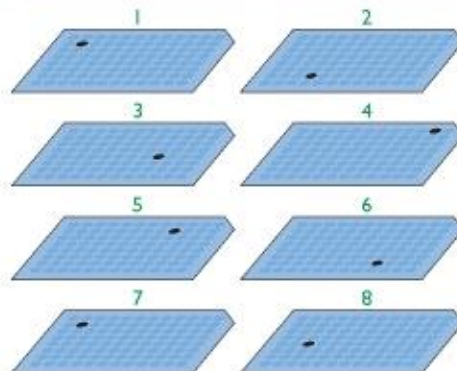
# Ensamble del genoma por el método de shotgun (llenar los huecos)



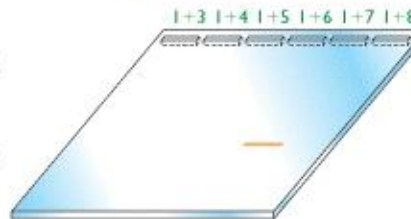
(B) Closing a 'physical gap'



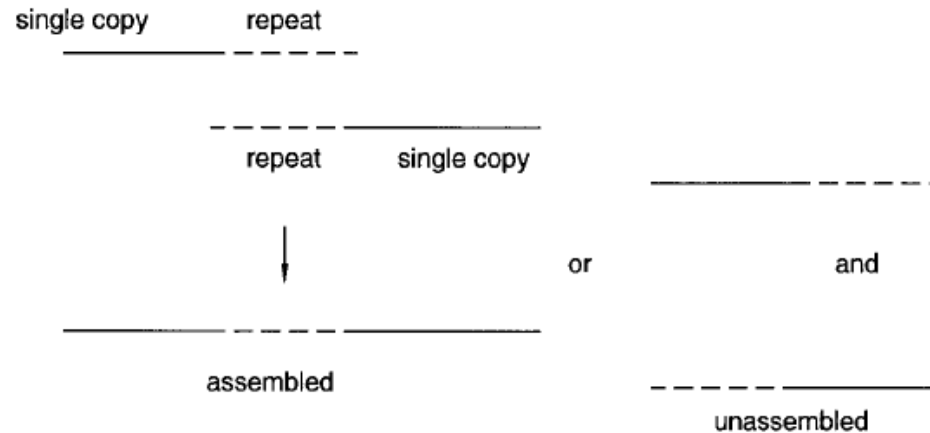
Probe a second clone library with oligonucleotides

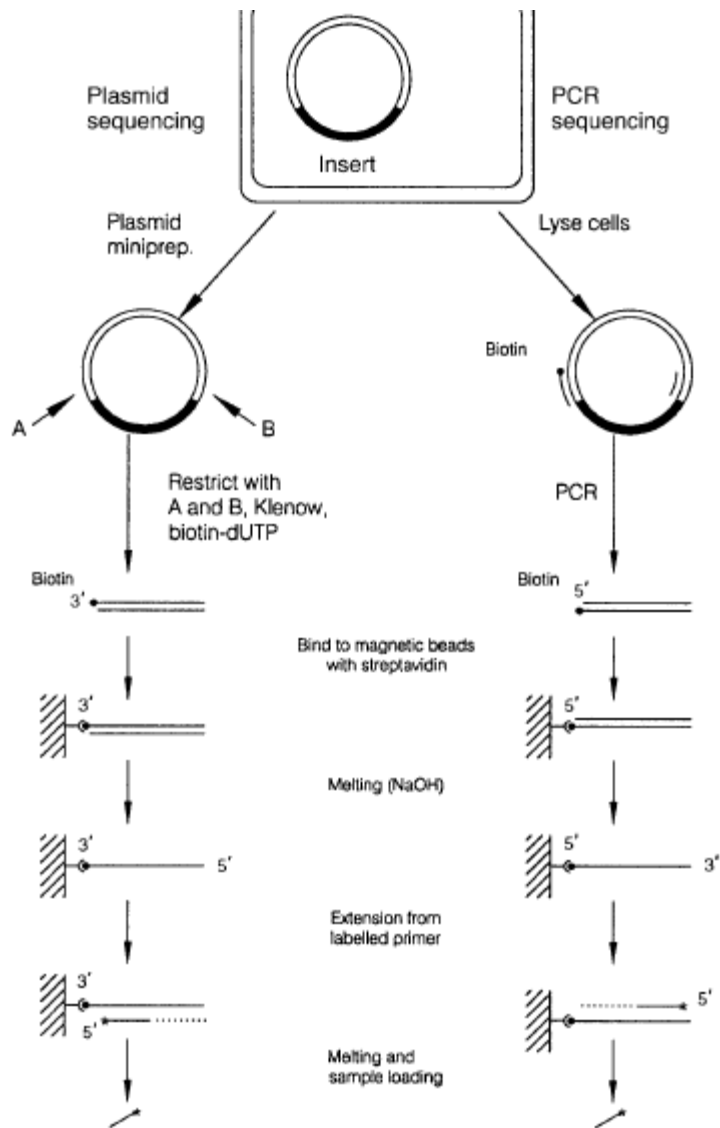


PCR with pairs of oligonucleotides

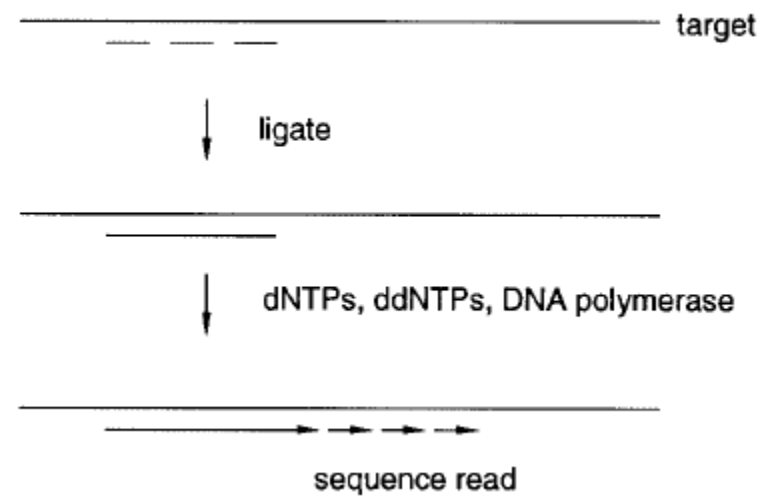


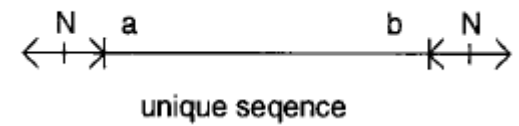
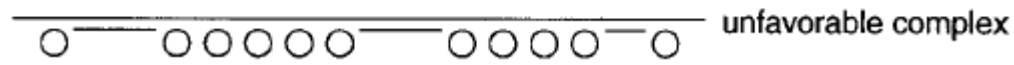
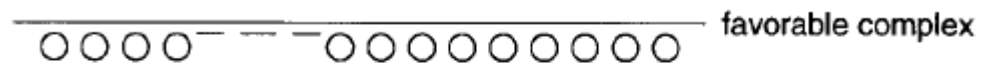
# Ensamble del genoma por el método de shotgun (secuencias repetidas)

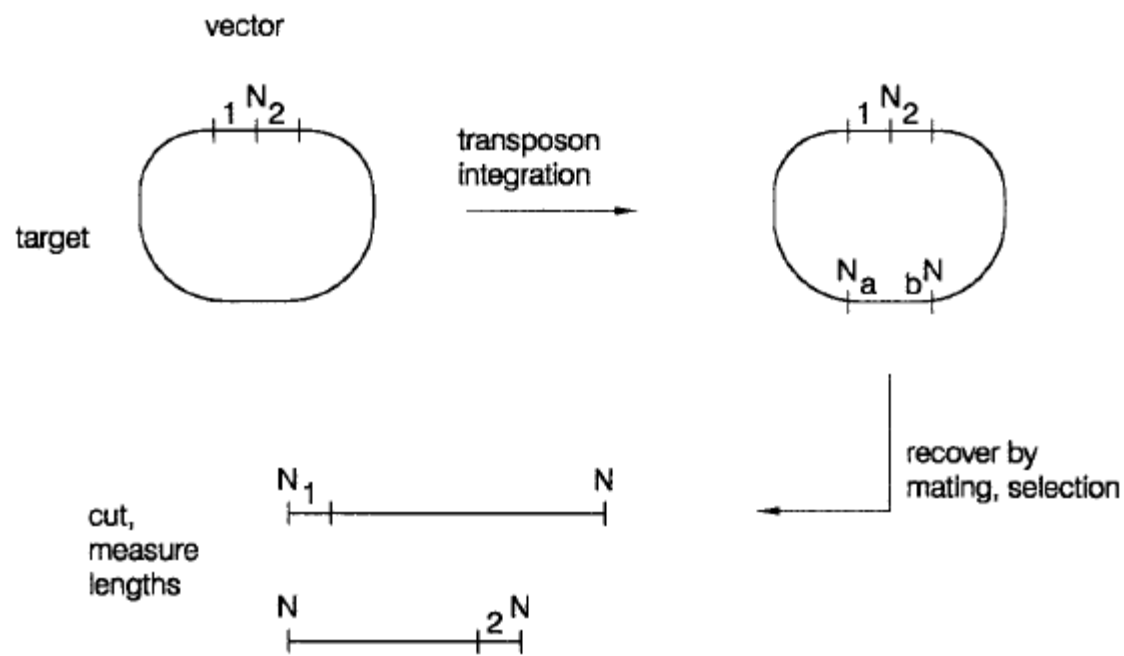








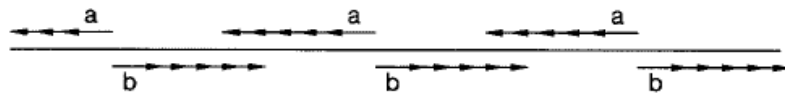




a b      a b      a b      a b      a b

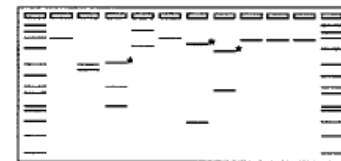
selected evenly spaced transposons

(a)

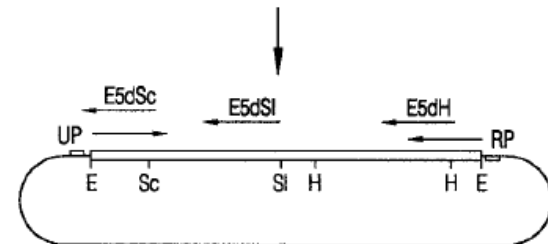


sequences read

M B E H N P Sc SI Sm Sp Xb M



reigate and transform  
*Hind*III, *Sac*I, and *Sal*I digests  
sequence "delta clones"

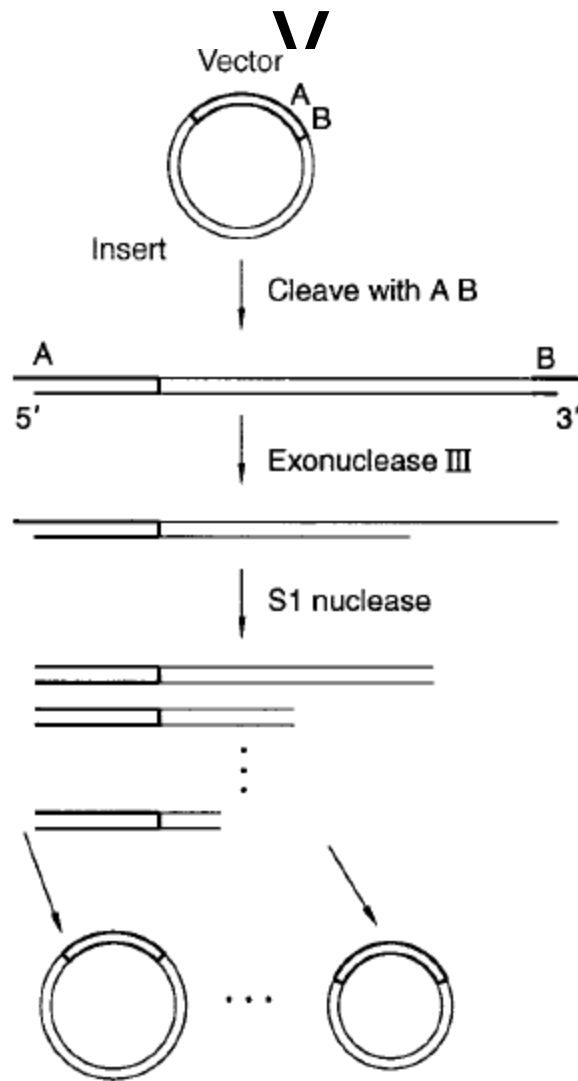


over 65% of the insert sequenced



EMEBIO Y FARMA A.C.

Tu ingreso al posgrado en la UNAM y el IPN



AAAA  
↓ reverse transcriptase

DNA TTTT  
RNA AAAAA

DNA TTTT  
self-priming ↓ reverse transcriptase

TTTT  
AAAA

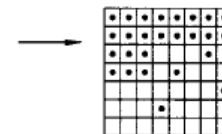
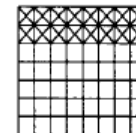
↓ S1 nuclease

TTTT  
AAAA

↓ ligate into cloning vector

TTTT  
AAAA  
subclone as needed

clones sequenced



unwanted duplicates

pick clones not yet hit and continue

