

3 - Cartographie des génomes

C. ROGEL-GAILLARD

INRA-CEA, Laboratoire de Radiobiologie et d'Etude du Génome, 78352 Jouy-en-Josas cedex

e-mail : Claire.Rogel-Gaillard@biotec.jouy.inra.fr

Les banques de grands fragments d'ADN

Résumé. Les banques de grands fragments d'ADN constituent depuis une quinzaine d'années une avancée technologique remarquable pour l'étude des génomes complexes. En effet, chaque fragment cloné, jusqu'à 2 mégabases dans des chromosomes artificiels de levures (YAC) et 200 kilobases dans des chromosomes artificiels de bactéries (BAC), représente une petite région chromosomique qui contient un ou plusieurs gènes avec des éléments de régulation proximaux et distaux, ainsi que des marqueurs associés. Des collections de clones représentatives d'un génome entier ont été produites. Ces banques de grands fragments d'ADN sont intensivement utilisées pour la cartographie intégrée des génomes et sont les éléments fondateurs des programmes de grand séquençage, dont celui de l'Homme. Les clones de grands fragments d'ADN constituent, de plus, un matériel puissant pour élaborer les outils et concepts de la génomique fonctionnelle de demain.

L'ADN nucléaire des mammifères forme un ensemble d'environ 3 milliards de nucléotides (3000 mégabases ou Mb) organisé en chromosomes dont la taille moyenne est, chez l'Homme, de l'ordre de 150 Mb. Aucune technique de biologie moléculaire ne permet actuellement le clonage de molécules d'ADN de cette taille. Pour étudier un gène, une région chromosomique voire un génome, il est donc nécessaire de couper l'ADN en fragments de taille manipulable qui, clonés individuellement, constituent une collection de fragments d'ADN ou banque. Le clonage de grands fragments d'ADN a révolutionné la cartographie et l'étude fonctionnelle des génomes complexes car le changement d'ordre de grandeur des fragments clonés a permis la constitution de banques d'ADN représentatives d'un génome entier.

1 / Les grands fragments d'ADN génomique

Qu'est-ce qu'un grand fragment d'ADN génomique ?

Les plasmides classiques sont compatibles avec le clonage de fragments d'ADN qualifiés de petits car ils contiennent de 100 paires de bases à plusieurs kilobases (kb). Les cosmides, apparus ultérieurement, ont constitué un apport technologique important car ils ont permis le clonage de fragments d'ADN dont la taille peut atteindre 50 kb. L'arrivée récente de nouvelles techniques, en particulier le clonage dans des chromosomes artificiels de levure (YAC) et de bactérie (BAC) (revue de Billault *et al* 1996), rend maintenant possible la manipulation de

fragments d'ADN dont la taille peut aller jusqu'à 2 Mb et 0,2 Mb, respectivement. Ces grands fragments d'ADN génomique permettent dorénavant de travailler à l'échelle d'une petite région chromosomique contenant un ou plusieurs gènes (figure 1).

Un outil au carrefour de la cartographie et de l'étude fonctionnelle des génomes complexes

Les grands fragments d'ADN génomique ont des intérêts multiples (figure 2). Ils représentent l'outil de base en cartographie physique des génomes et leur taille a réduit considérablement le nombre de clones requis pour réaliser des alignements ou contigs de plusieurs Mb, ce qui rend possible l'établissement de cartes physiques pour un génome entier (Arratia *et al* 1991). Les grands fragments d'ADN donnent un accès direct à des informations de séquence. Ils fournissent des sondes efficaces pour une localisation cytogénétique par la technique d'hybridation en fluorescence (FISH) et ces sondes sont utilisables dans plusieurs espèces, ce qui favorise des avancées rapides en terme de cartographie comparée des génomes. Les grands fragments d'ADN constituent aussi un réservoir de marqueurs génétiques polymorphes de type microsatellite ou SNP (Single Nucleotide Polymorphism). En ce qui concerne la génomique fonctionnelle, un grand fragment d'ADN peut être utilisé comme sonde pour hybrider des filtres d'ADNc et identifier des transcrits. En outre, les grands fragments d'ADN contiennent des gènes dans leur environnement génomique originel, avec les éléments cis- et trans-régulateurs nécessaires à leur expression. Ils constituent de ce fait un outil puissant pour des études d'expression *in vitro* et de transgénèse.

Figure 1. Echelles relatives des fragments d'ADN clonés, suivant les vecteurs. Le haut de la figure présente un segment théorique d'ADN sur lequel sont représentés des marqueurs polymorphes (ovales gris), quatre gènes avec un nombre variable d'exons (carrés blancs), une orientation de la transcription (flèches) et des éléments de régulation (carrés noirs).

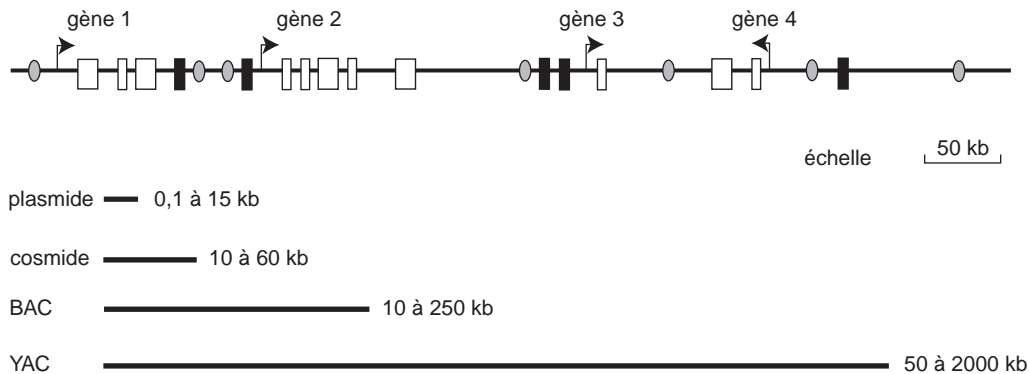
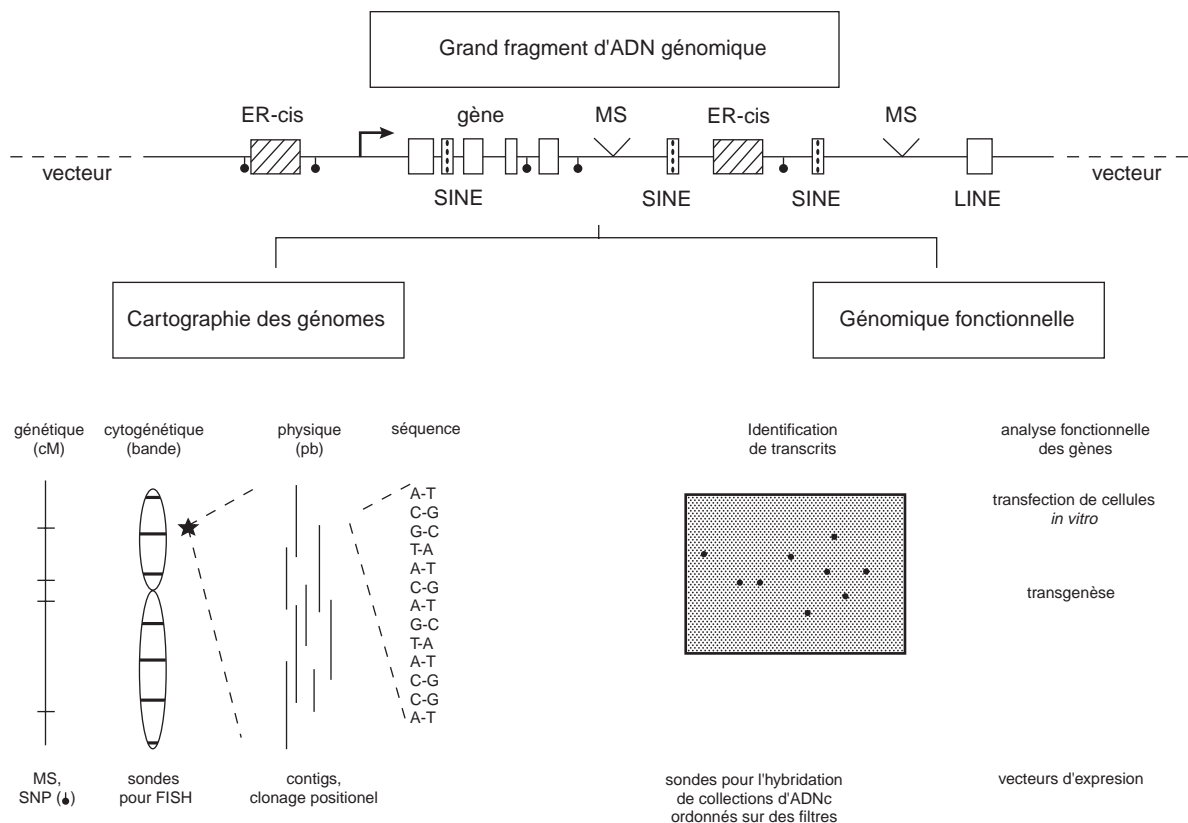


Figure 2. Les grands fragments d'ADN génomique et leur intérêt pour les études de cartographie et de génomique fonctionnelle. cM : centiMorgan, pb : paire de bases, SINE : Short Interspersed Element, LINE : Long Interspersed Element, ER : élément de régulation, MS : microsatellite, SNP : Single Nucleotide Polymorphism.



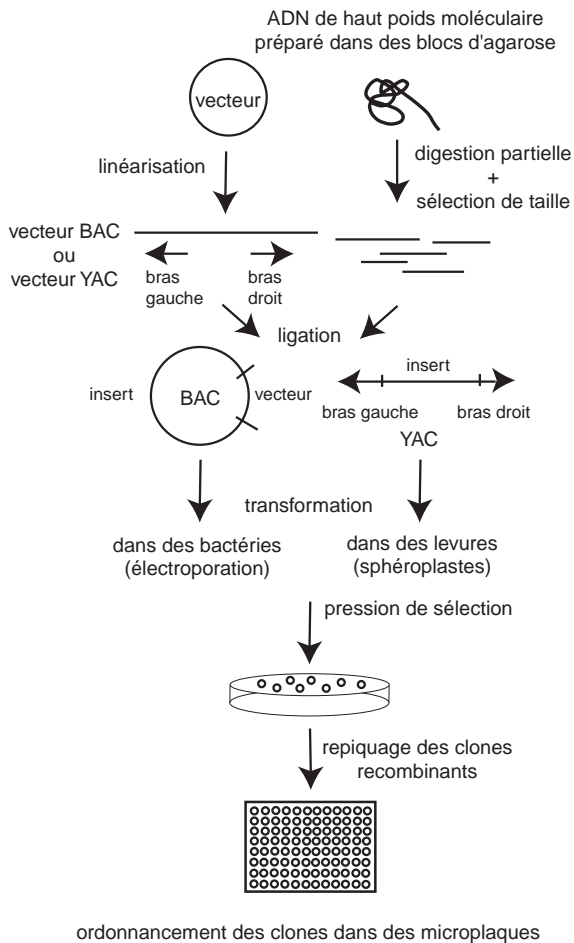
2 / Le clonage de grands fragments d'ADN génomique

Le changement d'échelle des fragments d'ADN clonés est dû à la mise en place conjointe de plusieurs techniques : la séparation de molécules d'ADN de plusieurs Mb par électrophorèse en champ pulsé, la préparation d'ADN de haut poids moléculaire sans dégradation et l'élaboration de nouveaux systèmes de clonage. Ces trois aspects sont indissociables pour appréhender la manipulation des grands fragments d'ADN (revue de Billault *et al* 1996).

Un principe commun : le clonage de fragments d'ADN chevauchants

Le clonage des grands fragments, quel que soit le système hôte-vecteur choisi, consiste à préparer le vecteur et l'ADN génomique, à effectuer une ligation *in vitro* et à transformer les cellules-hôtes. Une pression de sélection adaptée au vecteur et à la cellule-hôte permet ensuite le repérage des clones recombinants (figure 3).

Figure 3. Principe du clonage de grands fragments d'ADN dans des YAC ou des BAC.



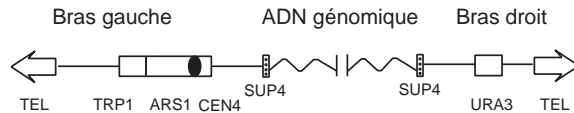
Pour la préparation d'ADN de haut poids moléculaire, des cellules - lymphocytes ou fibroblastes - sont incluses dans des blocs d'agarose à bas point de fusion. L'extraction d'ADN est réalisée directement par diffusion des principes actifs au travers de l'agarose. L'ADN ne subit ainsi que peu de contraintes physiques, ce qui limite les cassures de la molécule. On procède ensuite à une digestion partielle de l'ADN par une enzyme à six bases qui coupe théoriquement la molécule tous les 2 à 10 kb. Ce sont souvent les enzymes EcoRI et Hind III qui sont choisies. Une digestion partielle dans des conditions bien contrôlées avec de l'ADN de haut poids moléculaire non dégradé permet ainsi le clonage de fragments d'ADN chevauchants, puisque les coupures enzymatiques ne sont pas toutes réalisées au même endroit. Les blocs d'ADN digérés sont ensuite déposés dans un gel d'agarose pour migration par électrophorèse en champ pulsé avec des témoins de taille. La zone correspondant à la taille souhaitée pour le clonage est repérée et découpée du gel pour que s'ensuivent la ligation avec le vecteur, la transformation, la sélection des clones et leur ordonnancement en microplaques.

Clonage de grands fragments de 100 à 2000 kb dans des chromosomes artificiels de levures

Initialement, le clonage de grands fragments d'ADN a été réalisé avec succès dans des chromosomes artificiels de levures (appelés YAC, pour Yeast Artificial Chromosomes) (Burke *et al* 1987,

revue de Billault *et al* 1996). Un YAC est une molécule linéaire organisée comme un chromosome de levure (figure 4) avec un télomère à chaque extrémité (TEL), une origine de réplication (ARS), un centromère (CEN). L'ADN est cloné entre les deux bras d'un vecteur, chaque bras contenant un gène de sélection. Le système qui a été le plus couramment utilisé associe le vecteur de clonage pYAC4 à la souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* AB1380. Les bras gauche et droit contiennent des gènes qui synthétisent, respectivement, le tryptophane (TRP1) et l'uracile (URA3) (figure 4). L'insertion d'un fragment d'ADN génomique entre les deux bras du vecteur entraîne la coupure du gène de levure SUP4 qui intervient dans la synthèse d'adénine. Ainsi, les clones recombinants sont repérés par leur couleur rouge sombre en comparaison des clones non recombinants qui sont blancs. Les fragments clonés peuvent atteindre 2000 kb.

Figure 4. Chromosome artificiel de levure (YAC) dans le vecteur pYAC4 (abréviations : voir texte).



Les YAC ont montré leur efficacité pour le clonage de gènes, la cartographie physique de génomes entiers, en particulier celui de l'Homme (Chumakov *et al* 1995) et la transgénèse (Peterson *et al* 1997). Ils sont très modulables de par leur capacité de recombinaison homologue dans la levure et sont ainsi susceptibles de subir des modifications par ajout de nouveaux gènes de sélection, fragmentation des inserts (Reeves *et al* 1992) et ciblage de mutations ou de délétions (Duff *et al* 1996). La banque de YAC humaine la plus célèbre et probablement la plus utilisée est la banque de mégaYAC qui a été construite par le Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (CEPH) à Paris.

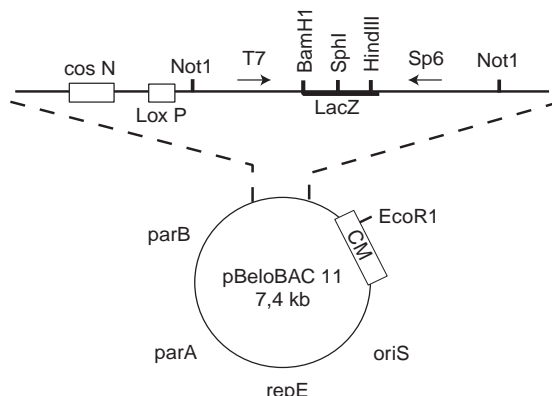
Les YAC présentent toutefois des inconvénients, en particulier une instabilité des fragments clonés caractérisée par la perte de certains inserts ou des délétions internes. Dans la majorité des banques, environ 50 % des YAC sont chimériques, ce qui signifie qu'ils contiennent des fragments d'ADN non contigus dans le génome. Ce phénomène, non expliqué clairement, serait dû à des coligations de fragments indépendants au cours du clonage ou à des phénomènes de recombinaison entre deux YAC distincts entrés simultanément dans la même cellule de levure au cours de la transformation. Une amélioration de la technique des YAC a consisté à proposer des combinaisons de vecteurs et de souches de levures qui réduisent ce taux de chimérisme à moins de 10 % et stabilisent les inserts (Kouprina *et al* 1999). Il faut également signaler qu'il n'existe pas de technique simple de purification d'ADN de YAC puisqu'il est, en taille, comparable aux autres chromosomes de levure. Il convient donc de réaliser des électrophorèses en champ pulsé et de repérer le chromosome surnuméraire sur gel pour être en mesure de le séparer des autres chromosomes de levures. La construction des banques de YAC a été freinée depuis le développement de systèmes de clonage plus faciles à manipuler.

Clonage de grands fragments de 50 à 200 kb dans des chromosomes artificiels de bactéries

Des avancées récentes ont permis le clonage de grands fragments d'ADN dans des bactéries par la mise au point de conditions d'électroporation favorables et la construction de vecteurs dérivés du facteur épisomique F de *Escherichia coli* (BAC, pour Bacterial Artificial Chromosome) (Shizuya *et al* 1992) ou du bactériophage P1 (PAC, pour P1-derived Artificial Chromosome) (Ioannou *et al* 1994). Les BAC et les PAC sont des molécules circulaires superenroulées à l'état natif. Ces deux systèmes sont basés sur un contrôle strict du nombre de copies des plasmides dans les bactéries : une à deux copies par cellule. Les vecteurs PAC possèdent un système d'amplification du nombre de copies que ne possèdent pas les vecteurs BAC. Le maintien des plasmides à un nombre faible de copies par cellule serait un garant de leur stabilité. Les vecteurs BAC et PAC sont conçus avec des sites de clonage et des séquences flanquantes qui permettent la linéarisation des inserts. Ils contiennent les promoteurs T7 et Sp6 pour une transcription *in vitro* et un séquençage direct de l'ADN. Les banques de BAC et de PAC ne contiennent que de l'ordre de 5 % de clones chimériques. La préparation d'ADN pur de BAC ou de PAC est aisée en dépit d'un rendement faible dû au petit nombre de copies par cellule. Les techniques de construction de ces banques, bien qu'encore délicates, sont moins lourdes que les techniques de production de YAC.

Le clonage dans des BAC s'est beaucoup développé depuis la construction du vecteur pBeloBAC 11 (figure 5), qui utilise le système de complémentation α du gène LacZ : les colonies recombinantes sont blanches alors que les colonies non recombinantes sont bleues (Kim *et al* 1996).

Figure 5. Vecteur pBeloBAC11. Il contient des gènes qui contrôlent la réplication unidirectionnelle du facteur F (*oriS* et *repE*) et son nombre de copies (*parA* et *parB*). La sélection des clones est réalisée avec le gène de résistance au chloramphénicol (*CM^R*). Le clonage, souvent au site *HindIII*, interrompt le fragment LacZ.



Les BAC et PAC constituent le matériel de base des programmes de cartographie physique et de grand séquençage, dont celui de l'Homme. Les banques de BAC sont plus nombreuses que celles de PAC. La petite taille du vecteur BAC, en comparaison des vecteurs PAC de l'ordre de 20 kb, a été un critère de choix en faveur des BAC pour les programmes de séquençage. Au plan fonctionnel, en dépit de leur plus petite taille par rapport aux YAC, les BAC se sont révélés efficaces dans des expériences de transgénèse chez la souris (Yang *et al* 1997).

3 / Représentativité d'une banque pour un génome

Plusieurs critères définissent la qualité d'une banque d'ADN génomique : l'absence de chimérisme, la répartition des clones sur tous les chromosomes et la capacité de réaliser des contigs de plusieurs Mb sans discontinuité. Il est par suite aisé de conclure que plus une banque contient de clones, plus elle a des chances de satisfaire les critères précédents. Il convient toutefois de moduler ces propos par la taille du génome étudié.

Notion d'équivalent-génome et de redondance

Un calcul simple consiste à multiplier le nombre de clones d'une banque d'ADN par leur taille pour avoir la taille totale de la molécule virtuelle d'ADN qui a été clonée. Le rapport entre le chiffre obtenu et la taille théorique du génome étudié indique le nombre d'équivalent-génome haploïde de la banque. Des modélisations mathématiques ont montré que le pourcentage de chance de trouver une séquence unique dans une banque était de 60 % pour 1 équivalent-génome, de 80 % pour 2 équivalents-génomes et de 90 à 99 % pour 3 à 10 équivalents-génomes (Arratia *et al* 1991). Ces études indiquent aussi que la capacité maximum de clonage d'un génome dans un système donné est atteinte avec environ 10 équivalents-génomes. Si des régions sont mal clonées, il est plus adapté de changer le système de clonage plutôt que de chercher à augmenter la taille de la banque déjà existante.

Tableau 1. Nombre de clones d'ADN génomique requis pour différents systèmes de clonage chez les mammifères.

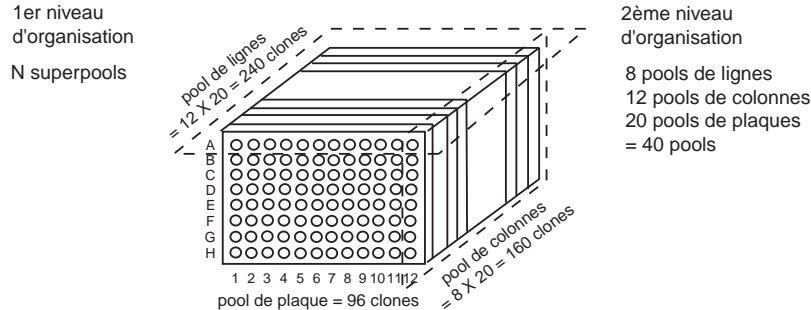
Nombre d'équivalents génomes	5	10
Cosmides (45 kb)	333 333	666 666
BAC ou PAC (150 kb)	100 000	200 000
YAC (1000 kb)	15 000	30 000

Taille des banques

Il est courant d'assimiler la taille des génomes de mammifères à celle de l'Homme. Par suite, la taille des banques d'ADN génomique chez l'Homme donne une assez bonne idée des objectifs à atteindre pour les génomes des mammifères domestiques. Le tableau 1 indique le nombre de clones correspondant à des banques de 5 ou 10 équivalents-génomes pour différents systèmes de clonage.

Il est important d'adapter le nombre de clones d'une collection en fonction des projets. La cartographie physique complète d'un génome nécessite une saturation maximum du génome et la construction de plusieurs banques différentes d'environ 10 équivalents-génomes chacune. Ce matériel est déjà constitué chez l'Homme. En revanche, un projet de cartographie dans une espèce encore mal connue peut être initié avec des collections réduites de clones, de l'ordre de 3 à 5 équivalents-génomes.

Figure 6. Exemple d'organisation en trois dimensions des pools de BAC pour le criblage d'une banque par PCR. Les clones, au préalable ordonnés dans des microplaques, sont mélangés par séries de 20 plaques pour constituer des superpools d'ADN. Dans ce premier niveau d'organisation, chaque superpool contient $20 \times 96 = 1920$ clones. Les N superpools de la banque sont chacun subdivisés en 8 pools de lignes, 12 pools de colonnes et 20 pools de plaque. Le nombre N de superpools dépend du nombre total de clones de la banque.



4 / Organisation et criblage des banques

En dépit de la taille des fragments d'ADN, le nombre de clones à manipuler et à conserver reste considérable. Il convient donc d'organiser scrupuleusement leur rangement et leur utilisation pour repérer rapidement les clones intéressants. Les clones seront identifiés par PCR ou par hybridation sur des filtres.

Conservation et ordonnancement des clones dans des microplaques

Les clones recombinants sont repiqués dans des microplaques à 96 ou 384 puits et conservés à -80°C en double exemplaire. Chaque clone a donc une adresse unique qui correspond au numéro de la microplaque et à sa coordonnée ligne-colonne. Pour conserver une banque de BAC de 5 équivalents-génomes, il faut prévoir deux jeux d'environ 1040 microplaques à 96 puits.

Criblage des banques d'ADN par PCR

Le nombre de clones dans une banque étant très conséquent, il convient d'optimiser le nombre de PCR nécessaires à l'isolement d'un clone. Une méthode, très utilisée, consiste à organiser des mélanges ou pools de clones, suivant un schéma présenté dans la figure 6. Les clones sont organisés par groupes de microplaques à 96 puits qui définissent des superpools d'ADN. Chaque superpool est subdivisé en 8 pools de lignes, 12 pools de colonnes et x pools de plaques, x étant variable d'une banque à l'autre. L'ADN est préparé pour chaque type de pool. Le criblage d'une banque s'effectue donc en deux temps : une première série de PCR avec l'ADN des superpools identifie le ou les superpool(s) positif(s) et une deuxième série de PCR avec les pools de lignes, plaques et colonnes permet de trouver l'adresse du clone. Par exemple, une banque de BAC de 5 équivalents-génomes pourra être organisée en 52 superpools de 20 microplaques. L'identification d'un clone sera réalisée après une première série de 52 PCR, suivie d'une deuxième série de 40 PCR par superpool positif. Le clone identifié est ensuite mis en culture à partir de la microplaque-mère conservée à -80°C .

Confection de filtres à haute densité pour un repérage des clones par hybridation

Une deuxième technique de criblage des banques consiste à réaliser des filtres sur lesquels ont été déposés tous les clones de la banque individuellement. Les clones sont repérés par hybridation des membranes avec une sonde. Une automatisation est indispensable, afin d'obtenir une bonne régularité et une forte densité des dépôts. Les colonies sont déposées en double sur chaque membrane pour éviter les erreurs de lecture et les faux positifs. Des filtres à haute densité permettent de déposer de l'ordre de 55 000 échantillons, soit 27 500 clones distincts sur une membrane de 22 cm de côté. Dans ces conditions, une banque de BAC de 5 équivalents-génomes pourra être organisée avec un jeu de 4 filtres.

5 / L'atelier Grands Fragments d'ADN du Département de Génétique animale de l'INRA

Les banques de grands fragments d'ADN se multiplient, aussi bien dans le domaine animal que végétal. Des centres de ressources existent aux Etats-Unis, qui produisent des banques dont certaines sont commercialisées et les nouvelles ressources disponibles sont régulièrement mises à jour. Deux sites Internet peuvent être consultés : <http://www.chori.org/bacpac/> et <http://informa.bio.caltech.edu>.

Au sein de l'INRA se sont également construites plusieurs banques de grands fragments. Leur utilisation allant croissant, l'INRA a mis en place, au printemps 1999, un atelier pour produire et gérer les banques de grands fragments pour les animaux domestiques. Cet atelier, commun aux unités du Département de Génétique animale, est hébergé à Jouy-en-Josas par le Laboratoire de Radiobiologie et d'Etude du Génome, conjointement avec le Laboratoire de Génétique biochimique et de Cytogénétique. Cet atelier de service a pour objectifs la gestion des banques existantes (tableau 2), leur criblage à la demande, la confection de filtres à haute densité et la production de clones.

Tableau 2. Banques disponibles à l'atelier Grands Fragments d'ADN (Département de Génétique animale, INRA Jouy-en-Josas) pour les différentes espèces animales.

Clones	Nature	Nombre	Taille moyenne (kb)	Nombre d'équivalents-génome
Bovin	YAC	21 500	750	6
Bovin	BAC	105 984	115	4
Cheval	BAC	39 168	110	1,5
Caprin	BAC	61 444	155	3,5
Lapin	BAC	84 480	97	2,7
Ovin	BAC	89 280	123	3
Porc	YAC	33 792	280	3
Porc	BAC	107 520	137	5

6 / Récents développements et perspectives

Vers une modulation des vecteurs de clonage de BAC

La technique des BAC est en progrès constant et les développements actuels visent à augmenter la taille des fragments clonés, à diversifier les sites de clonage mais aussi à rendre les BAC aussi modulables que les YAC pour des études fonctionnelles (Frengen *et al* 1999). Des expériences de recombinaison homologue dans la bactérie ont été tentées avec succès (Yang *et al* 1997). Une telle approche permet d'envisager, par exemple, l'analyse fonctionnelle de plusieurs mutants d'un même gène par simple modification du BAC initial. Cette technique de recombinaison homologue est déjà largement exploitée avec les YAC (Duff *et al* 1996).

Vers un clonage ciblé de gènes ou de régions chromosomiques

Les banques produites jusqu'à présent sont des collections aléatoires de fragments chevauchants dont l'utilisateur espère qu'elles représentent au mieux le génome étudié. Elles sont, de plus, construites avec de l'ADN d'un nombre restreint d'individus d'une race donnée et l'effort fourni pour une banque n'est pas reproduit à façon pour chaque animal intéressant. Il existe donc actuellement un manque pour le clonage en parallèle de grands fragments d'ADN équivalents à partir de l'ADN d'individus différents. Une approche, très novatrice et originale, a pour objet le clonage ciblé de grands fragments d'ADN par la technique de Transformation Associated Recombination ou TAR cloning (Kouprina *et al* 1998). Les auteurs de cette technique exploitent conjointement le clonage dans des YAC et des BAC et ont mis au point des vecteurs et des souches de levure qui permettent la construction de YAC peu chimériques et très stables (Kouprina *et al* 1999). Cette approche a déjà permis la construction de banques spécifiques de chromosomes et le clonage direct de familles de gènes, voire de gènes uniques. Certains vecteurs contiennent des gènes de sélection qui les rendent exploitables directement pour une expression dans des cellules de mammifères. Cette technologie pourrait permettre le clonage sélectif de différents allèles d'un même gène à partir d'ADN d'individus ayant des phénotypes distincts.

Vers la production de chromosomes artificiels de mammifères

La construction de chromosomes artificiels de mammifères (MAC), déjà considérés comme des outils potentiels majeurs pour la thérapie génique somatique, constitue un enjeu très compétitif pour la décennie à venir. Des ébauches de MAC chez la souris et chez l'Homme sont déjà construites et les résultats sont prometteurs (Grimes et Cooke 1998). La maîtrise des YAC et des BAC est un moteur important de la réussite de cette nouvelle technologie.

Conclusion

Les banques de grands fragments d'ADN ont accéléré l'établissement des cartes intégrées des génomes complexes et le séquençage exhaustif du génome humain est annoncé pour 2001 ou 2003 suivant les équipes. Ces banques permettent d'initier l'étude d'espèces pour lesquelles peu d'outils étaient disponibles jusqu'à présent. En ce qui concerne les animaux domestiques, à l'INRA ont déjà été construites des banques pour les bovins, les porcins, les petits ruminants (chèvre et mouton), les équins, le lapin. La comparaison des avantages et inconvénients des YAC et des BAC conduit souvent à choisir les BAC car, en dépit de leur taille de 5 à 10 fois inférieure à celle des YAC, ils sont stables et rarement chimériques. Il est toutefois important de souligner que les banques de YAC et de BAC sont complémentaires dans leur contenu et que les cartes physiques sont établies par alignement simultané des deux types de clones lorsqu'ils sont disponibles. La finesse et la richesse des cartes sont accrues lorsque les clones de YAC et de BAC sont associés. L'utilisation des banques de grands fragments pour la cartographie et le séquençage des génomes est une étape qui verra bientôt son achèvement au profit des programmes de génomique fonctionnelle. Les YAC sont déjà très utilisés pour des expériences d'expression de gènes en cultures de cellules et en transgénèse et préfigurent ce que pourraient être les chromosomes artificiels de mammifères. Les travaux en cours indiquent que les BAC seront aussi des outils performants pour l'analyse fonctionnelle des gènes. Les clones de grands fragments d'ADN présentent donc l'intérêt majeur de répondre efficacement à quelques questions d'aujourd'hui et de contribuer à la préparation des outils et concepts de demain.

Références

- Arratia R., Lander E.S., Tavare S., Waterman M.S., 1991. Genomic mapping by anchoring random clones: a mathematical analysis. *Genomics*, 11, 806-827.
- Billault A., Susini L., Soravito de Franceschi C., 1996. Les vecteurs YAC et BAC. *Technoscope Biofutur*, 153.
- Burke D.T., Carle G.F., Olson M.V., 1987. Cloning of large segment of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science*, 236, 806-811.
- Chumakov I.M., Rigault P., Le Gall I., Bellanne-Chantelot C., Billault A., Guillou S., Soularue P., Guasconi G., Poullier E., Gros I., *et al*, 1995. A YAC contig map of the human genome. *Nature*, 377, 175-297.
- Duff K., Huxley C., 1996. Targeting mutations to YACs by homologous recombination. *Methods in Molecular Biology*, vol 54: YAC Protocols, 187-198. D. Markie Humana Press Inc, Totowa, NJ.
- Frengen E., Weichenhan D., Zhao B., Osoegawa K., van Geel M., de Jong P.J., 1999. A modular, positive selection bacterial artificial chromosome vector with multiple cloning sites. *Genomics*, 58, 250-253.
- Grimes B., Cooke H., 1998. Engineering mammalian chromosomes. *Human Molecular Genetics*, 7, 1635-1640.
- Ioannou P.A., Amemiya C.T., Garnes J., Kroisel P.M., Shizuya H., Chen C., Batzer M.A., de Jong P.J., 1994. A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. *Nature Genetics*, 6, 84-89.
- Kim U.J., Birren B.W., Slepak T., Mancino V., Boysen C., Kang H.L., Simon M.I., Shizuya H., 1996. Construction and characterization of a human bacterial artificial chromosome library. *Genomics*, 34, 213-218.
- Kouprina N., Campbell M., Graves J., Campbell E., Meincke L., Tesner J., Grady D.L., Doggett N.A., Moyzis R.K., Deaven L.L., Larionov V., 1998. Construction of human chromosome 16- and 5-specific circular YAC/BAC libraries by in vivo recombination in yeast (TAR cloning). *Genomics*, 53, 21-28.
- Kouprina N., Nikolaishvili N., Graves J., Koriabine M., Resnick M.A., Larionov V., 1999. Integrity of human YACs during propagation in recombination-deficient yeast strains. *Genomics*, 56, 262-273.
- Peterson K.R., Clegg C.H., Li Q., Stamatoyannopoulos G., 1997. Production of transgenic mice with yeast artificial chromosomes. *Trends in Genetics*, 13, 61-66.
- Reeves R.H., Pavan W.J., Hieter P., 1992. Yeast artificial chromosome modification and manipulation. *Methods in Enzymology*, 216, 584-603.
- Shizuya H., Birren B., Kim U.J., Mancino V., Slepak T., Tachiri Y., Simon M., 1992. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using F-factor-based vector. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 89, 8794-8797.
- Yang X.W., Model P., Heintz N., 1997. Homologous recombination based modification in *Escherichia coli* and germline transmission in transgenic mice of a bacterial artificial chromosome. *Nature biotechnology*, 15, 859-865.