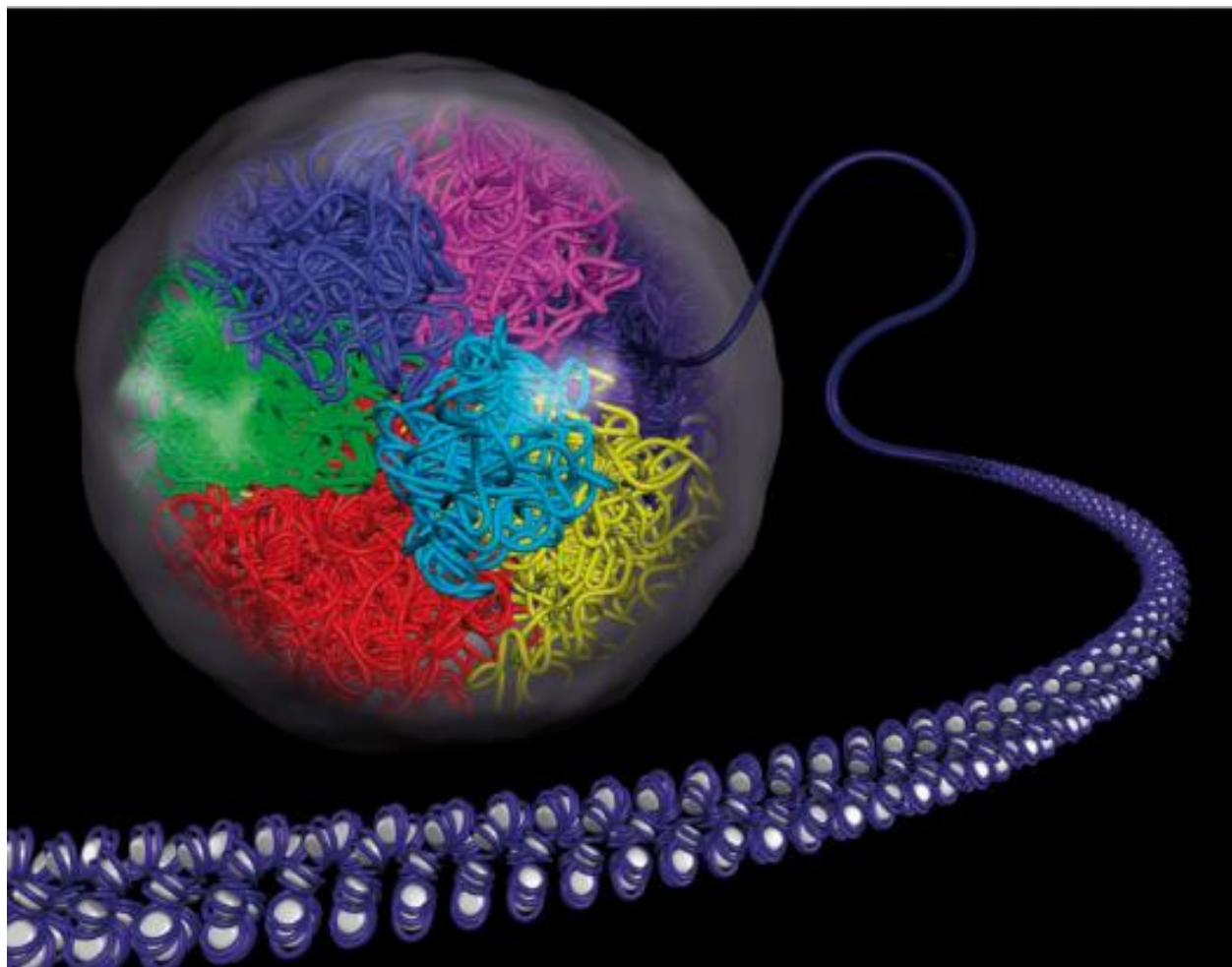


Основы генной инженерии и биотехнологии

Лекция 4

Анализ
геномов и
экспрессии
генов на
уровне
транскрипции



На предыдущих лекциях мы научились

- ❖ Выделять нуклеиновые кислоты и клонировать их с помощью ПЦР и векторов**

Сегодня научимся

- ❖ Получать физические карты генов, хромосом и больших геномов**
- ❖ Исследовать экспрессию генов на уровне транскрипции**

Библиотека (клонотека) фрагментов ДНК

Набор *клонированных* фрагментов ДНК, представляющих весь геном или его определенную часть

- ❖ Геномные библиотеки
- ❖ Хромосомные библиотеки
- ❖ Библиотеки кДНК

Коммерческие геномные библиотеки и библиотеки кДНК

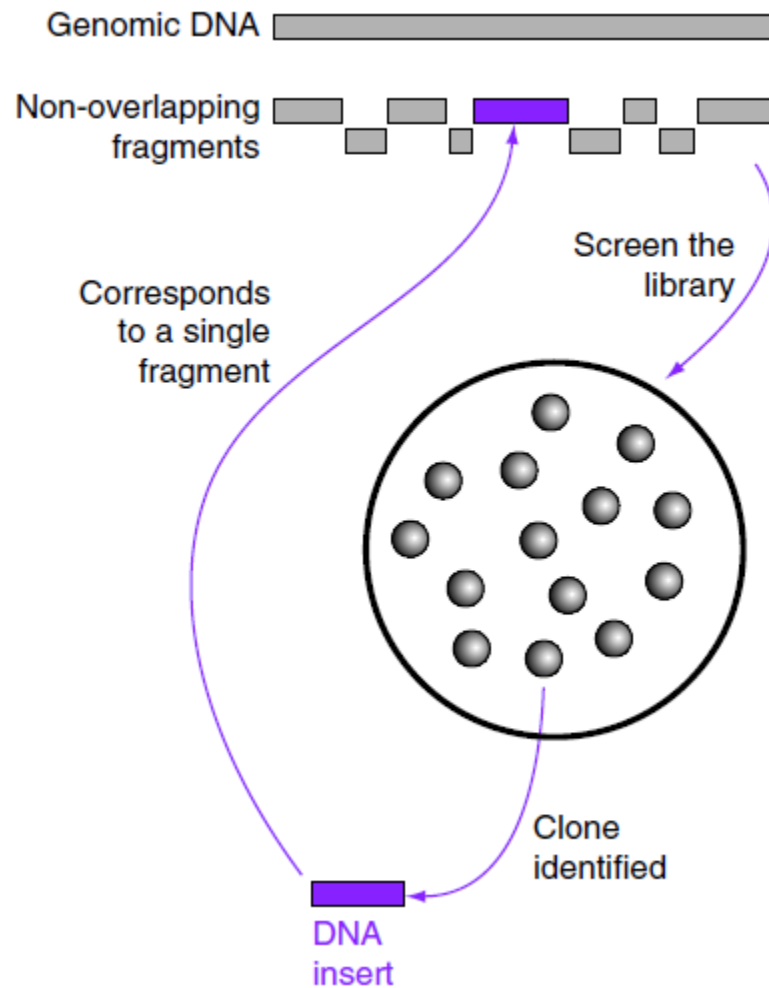
Этапы создания библиотеки ДНК

1. Выбор и подготовка вектора
2. Подготовка геномной ДНК или кДНК
3. Лигирование фрагментов ДНК с вектором
4. Введение рекомбинантных ДНК в клетки
5. Консервация библиотеки

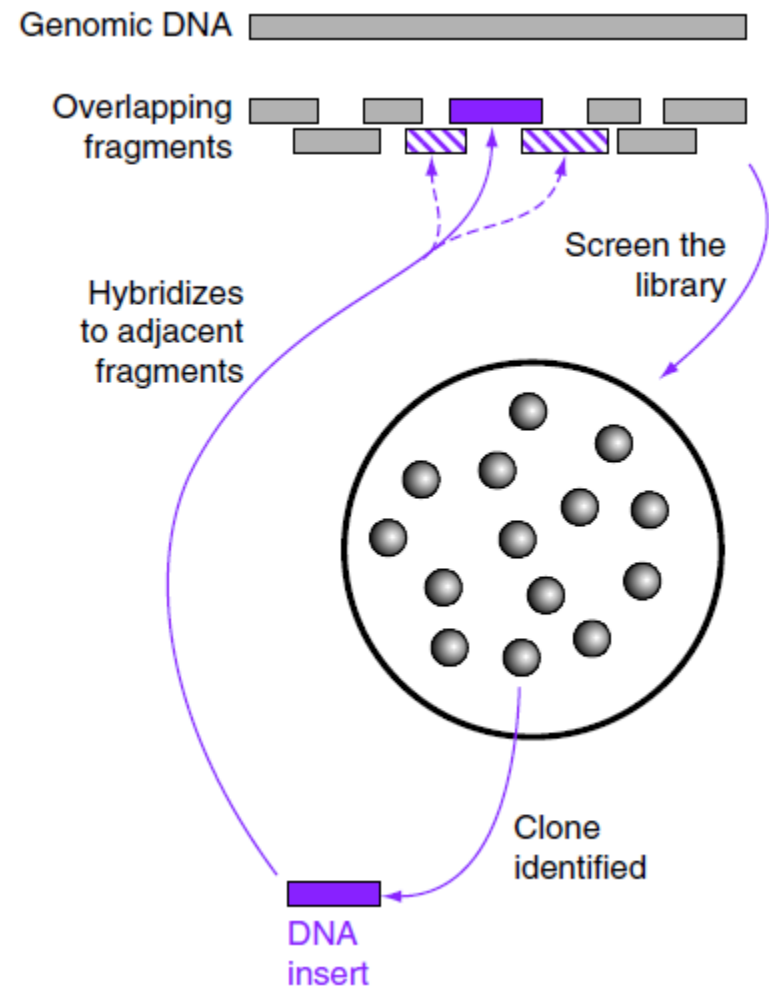
Емкости векторов разных классов

Вектор	Емкость (т.п.н.)	Применение
Плазмиды	15	Библиотеки кДНК
Бактериофаг лямбда	25	Геномные библиотеки Библиотеки кДНК
Космиды	30-45	Геномные библиотеки
РАС	70-90	То же
ВАС	100-500	То же
УАС	250-2000	То же
МАС	>2000	Генотерапия

Геномные библиотеки, построенные из неперекрывающихся и перекрывающихся фрагментов ДНК

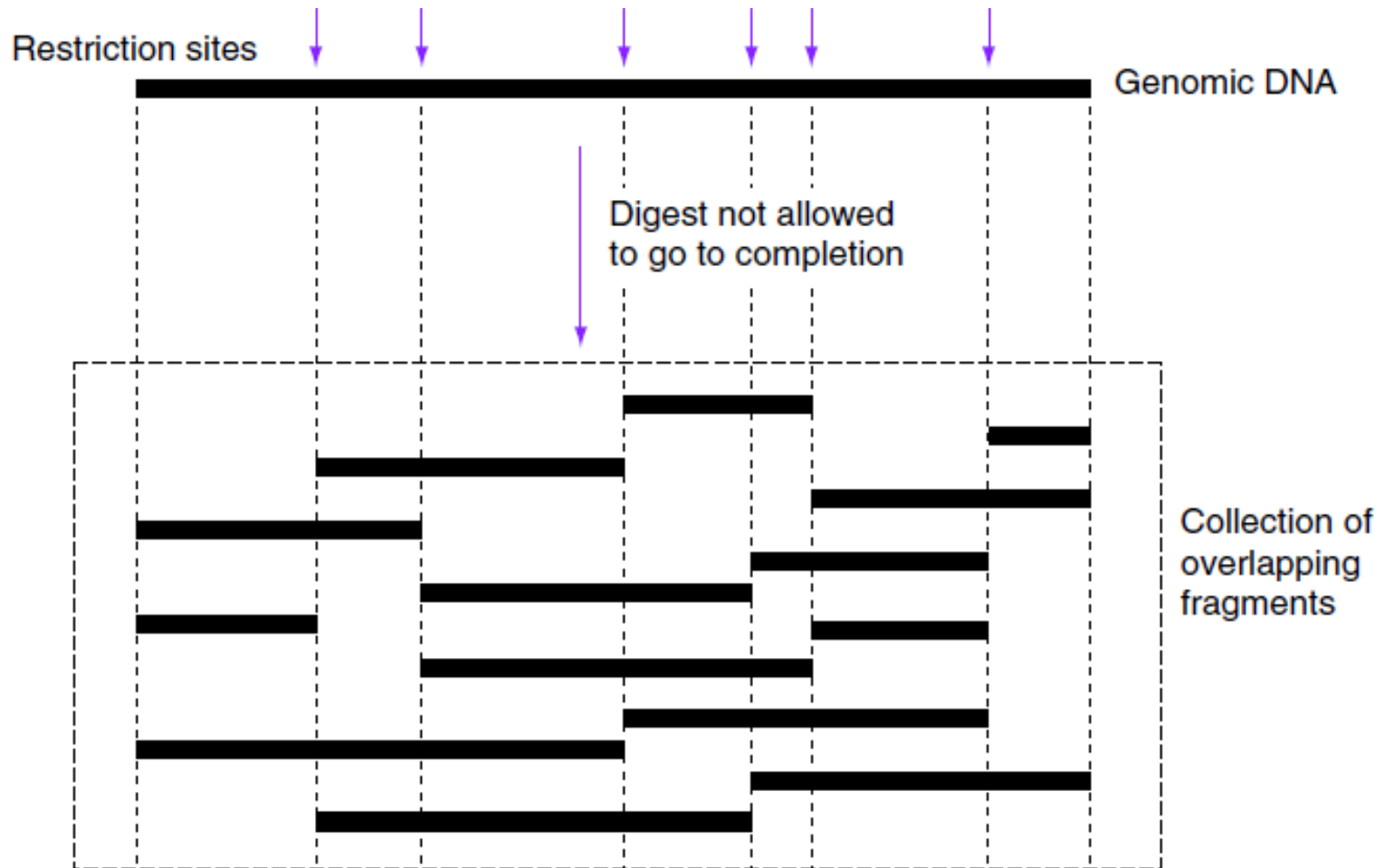


Выделение конкретных последовательностей



Построение физических карт

Частичное (неполное) расщепление ДНК рестриктазами



Репрезентативность библиотеки

Библиотека
Конгресса США,
Вашингтон, округ
Колумбия

>30 миллионов
книг



**Вероятность, с которой в ней представлена
любая последовательность генома или его
исследуемой части**

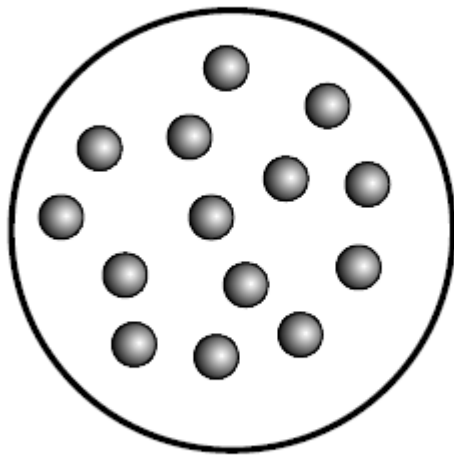
Размер библиотеки, в которой любая часть генома представлена с вероятностью 99%

Вектор	Размер вставки (т.п.н.)	Размер библиотеки ($\times 10^3$ клонов)	
		Бактерии	Животные
Плазмиды	4	4,6	3500
Фаг λ	18	1,0	770
Космиды	40	0,458	350
ВАС	300	0,059	46

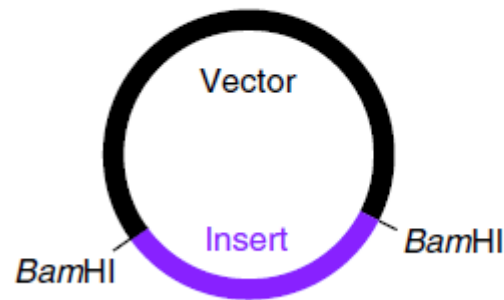
Размеры генома:

Бактерии – $\sim 4 \times 10^6$ п.н., животные – $\sim 3 \times 10^9$ п.н.

Library of *Bam*HI fragments
in a plasmid vector



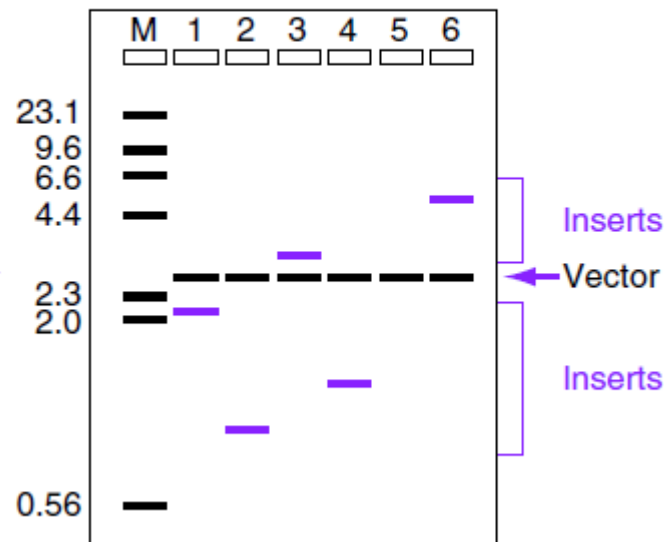
Recombinant plasmid



Plasmid preparation
from individual clones

*Bam*HI digest

Agarose gel



Оценка качества библиотеки фрагментов ДНК

Плазмиды шести
случайных клонов
подвергают
рестрикции по сайту, в
который были
введены вставки
рекомбинантной ДНК,
и продукты
рестрикции
анализируют
электрофорезом в
агарозном геле

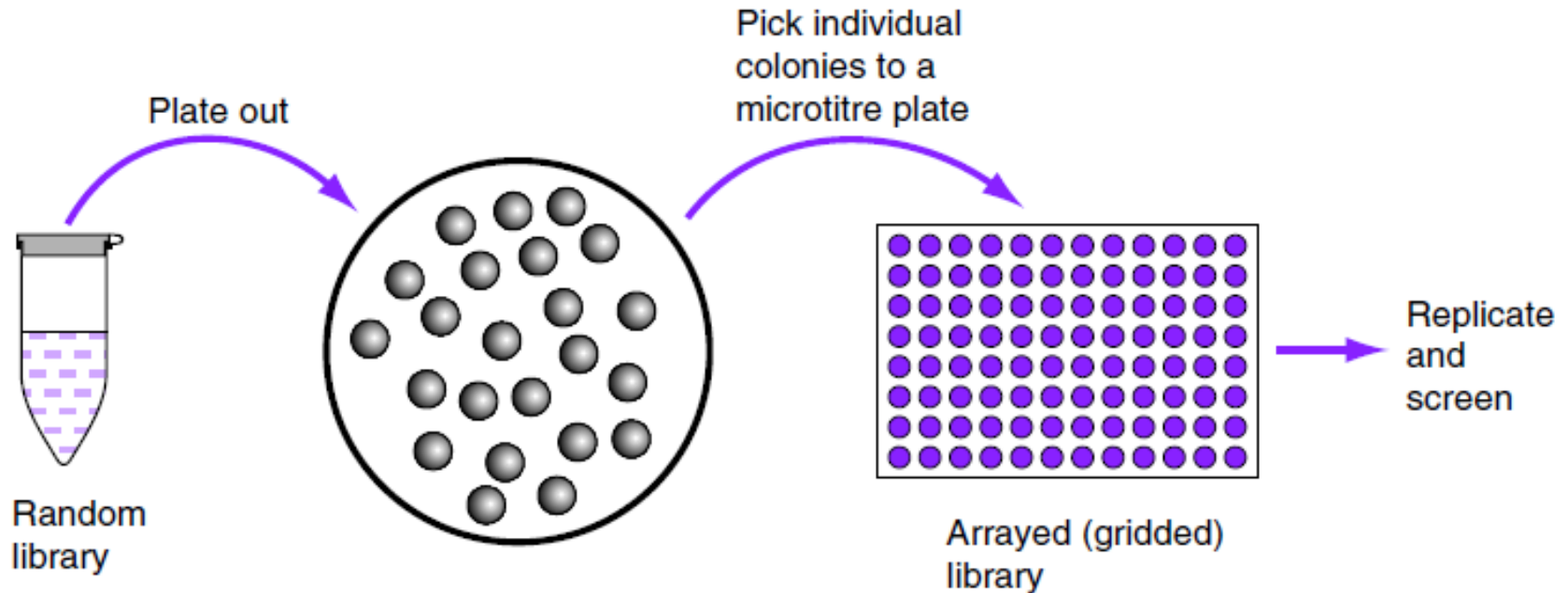
Консервация библиотеки фрагментов ДНК

Криоконсервация при -70°C

❖ *Бактерии* – в виде суспензии в питательной среде с 30% глицерином

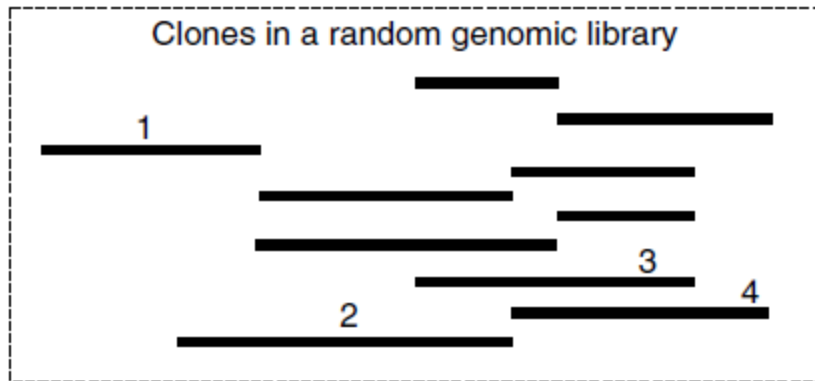
❖ *Бактериофаги* – в виде суспензии в присутствии диметилсульфоксида (ДМСО)

Упорядоченные библиотеки: матрицы случайных клонов



После посева на чашки Петри индивидуальные колонии бактерий выращивают в виде матрицы на твердой питательной среде или в 96-луночных планшетах

Упорядоченные библиотеки: перекрывающиеся фрагменты ДНК



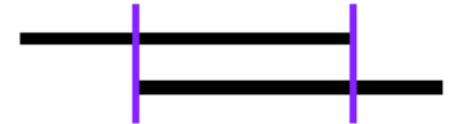
(a) Clone 1 hybridizes to clone 2



(b) Clone 2 hybridizes to clone 3



(c) Clone 3 hybridizes to clone 4

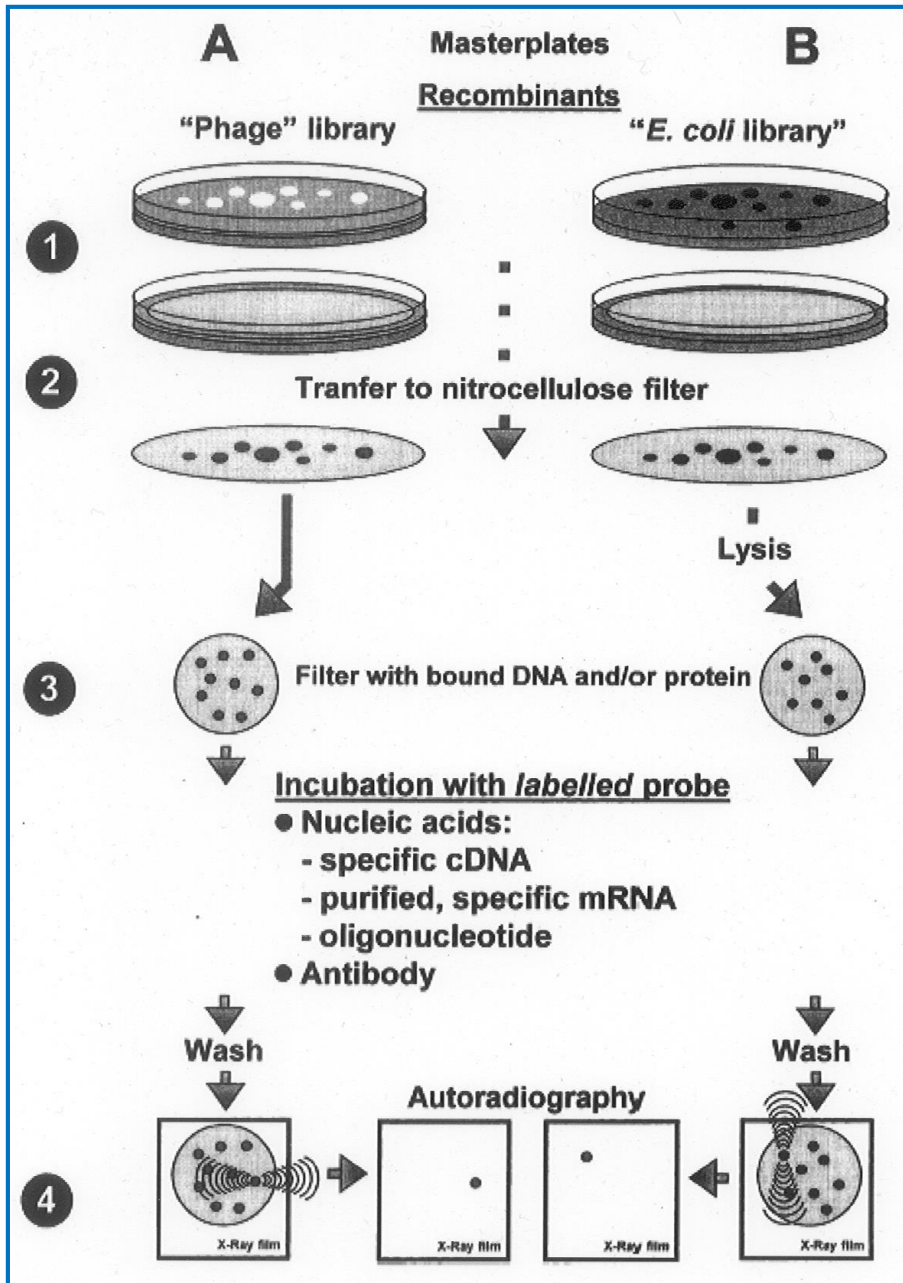


Случайные фрагменты ДНК библиотеки объединяют в **контиги**

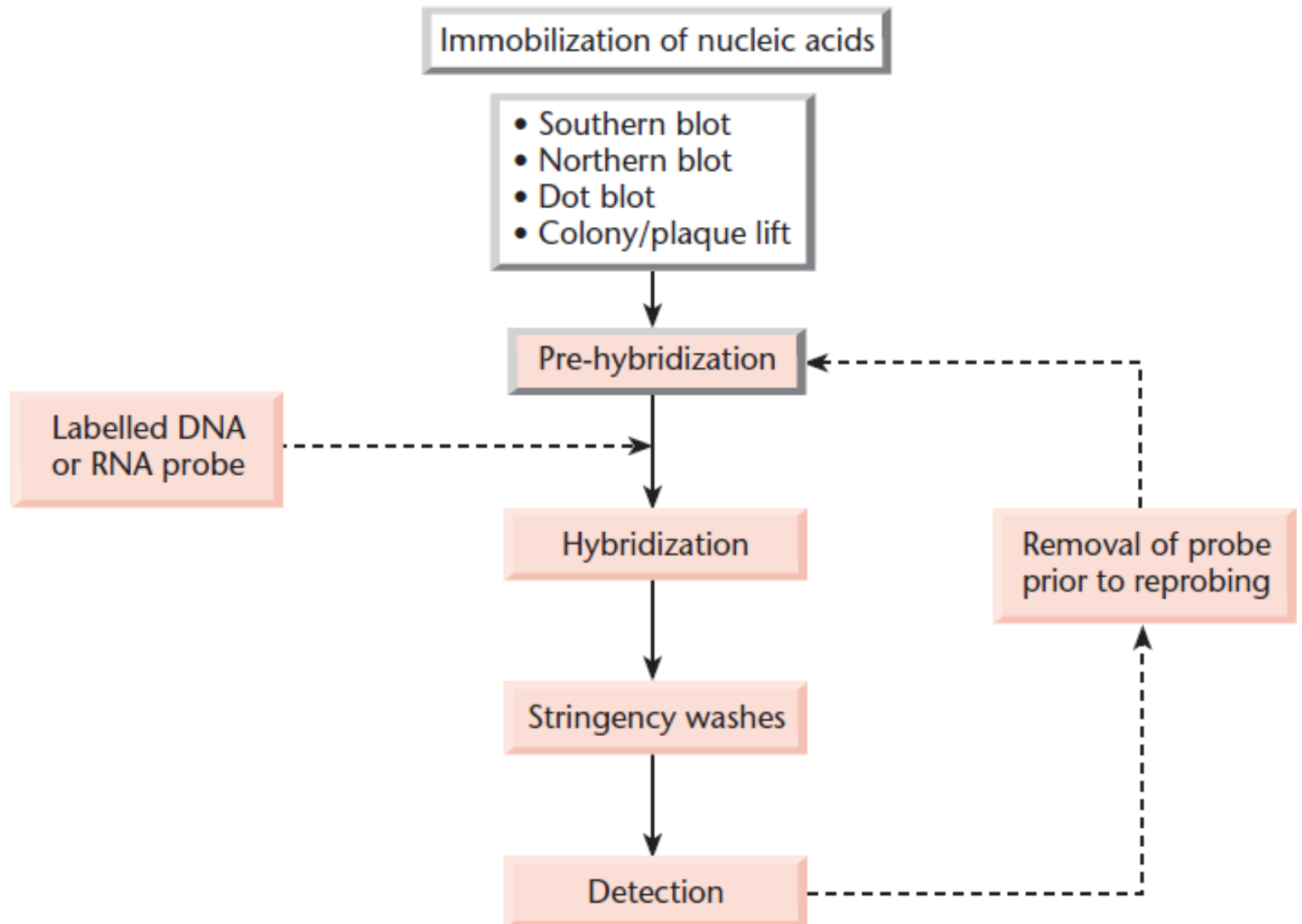
Отбор нужных клонов из фаговых и бактериальных библиотек

Часть каждой бактериальной колонии или фаговой бляшки переносят на мембрану, ДНК освобождают и гибридизуют с меченым олигонуклеотидным зондом

Отбор с помощью ПЦР



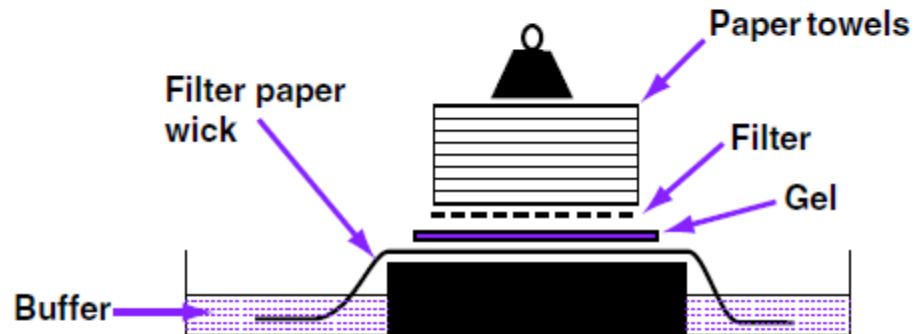
Блоттинг нуклеиновых кислот



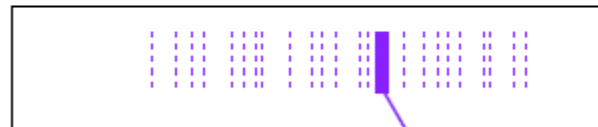
Гибридизация по Саузерну



Гель



Перенос
фрагментов
ДНК



Positive band

Результат
авторадио-
графии

Edwin M. Southern (1938)

Схема переноса фрагментов НК на мембрану
Southern , 1975-1979

Физическое картирование генома

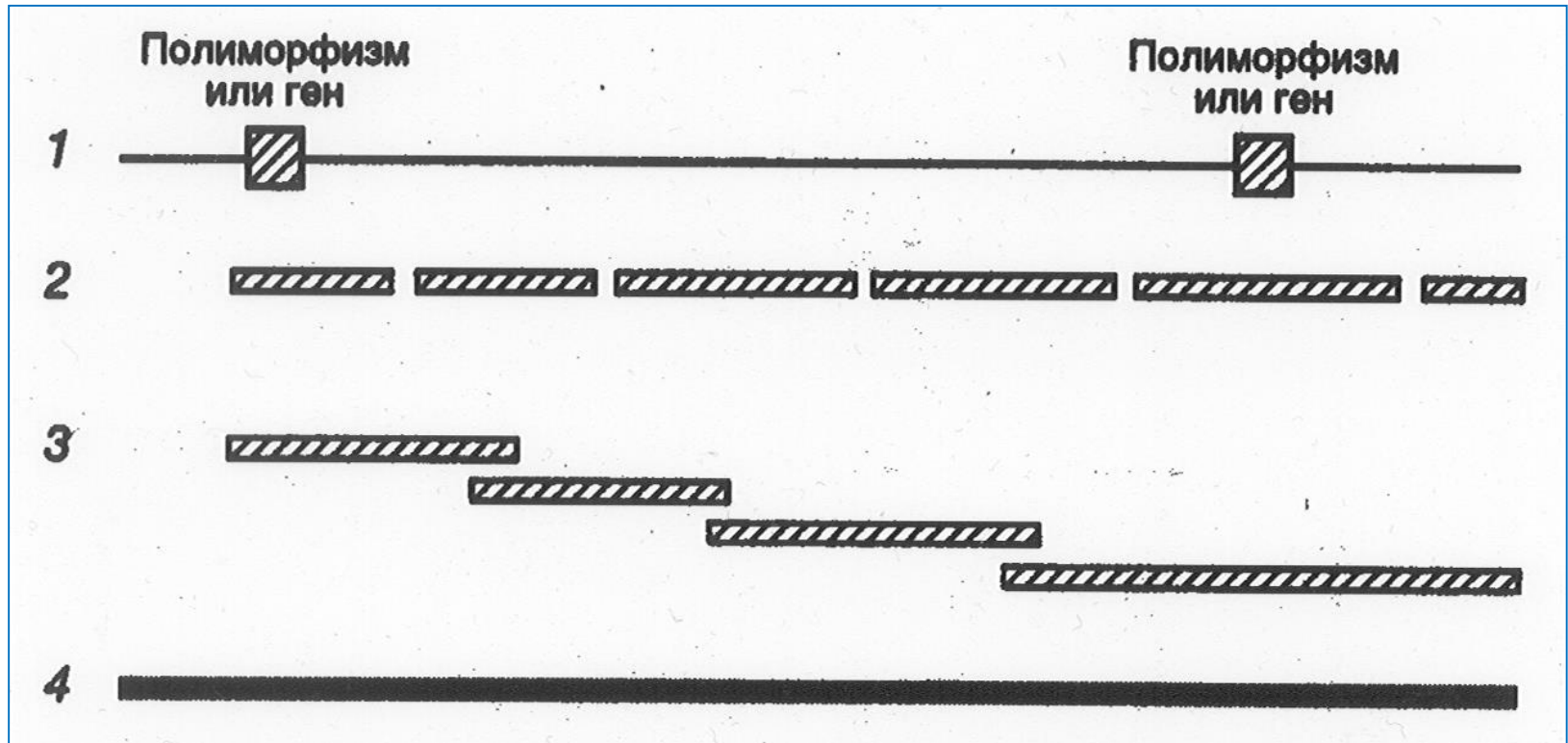
203 million bases

Cherubism (familial benign giant-cell tumor of the jaw)
Dopamine receptor
Huntington disease
Night blindness, congenital stationary, type 3
Retinitis pigmentosa, autosomal recessive
Retinal degeneration, autosomal recessive
Wolfram syndrome
Craniosynostosis, Adelaide type
Phenylketonuria
Parkinson disease, familial
Pituitary tumor-transforming gene
Stargardt disease
Dentin dysplasia, Shields type II
Leukemia, acute myeloid
Periodontitis, juvenile
Muscular dystrophy, limb-girdle, type 2E
Melanoma growth-stimulating activity
Hyper-IgE syndrome
Renal tubular acidosis
Mucopolidosis
Lymphocytic leukemia, acute T-cell
Alcoholism, susceptibility to
Wolfram syndrome
Sclerostylosis
Huriez syndrome
Rieger syndrome



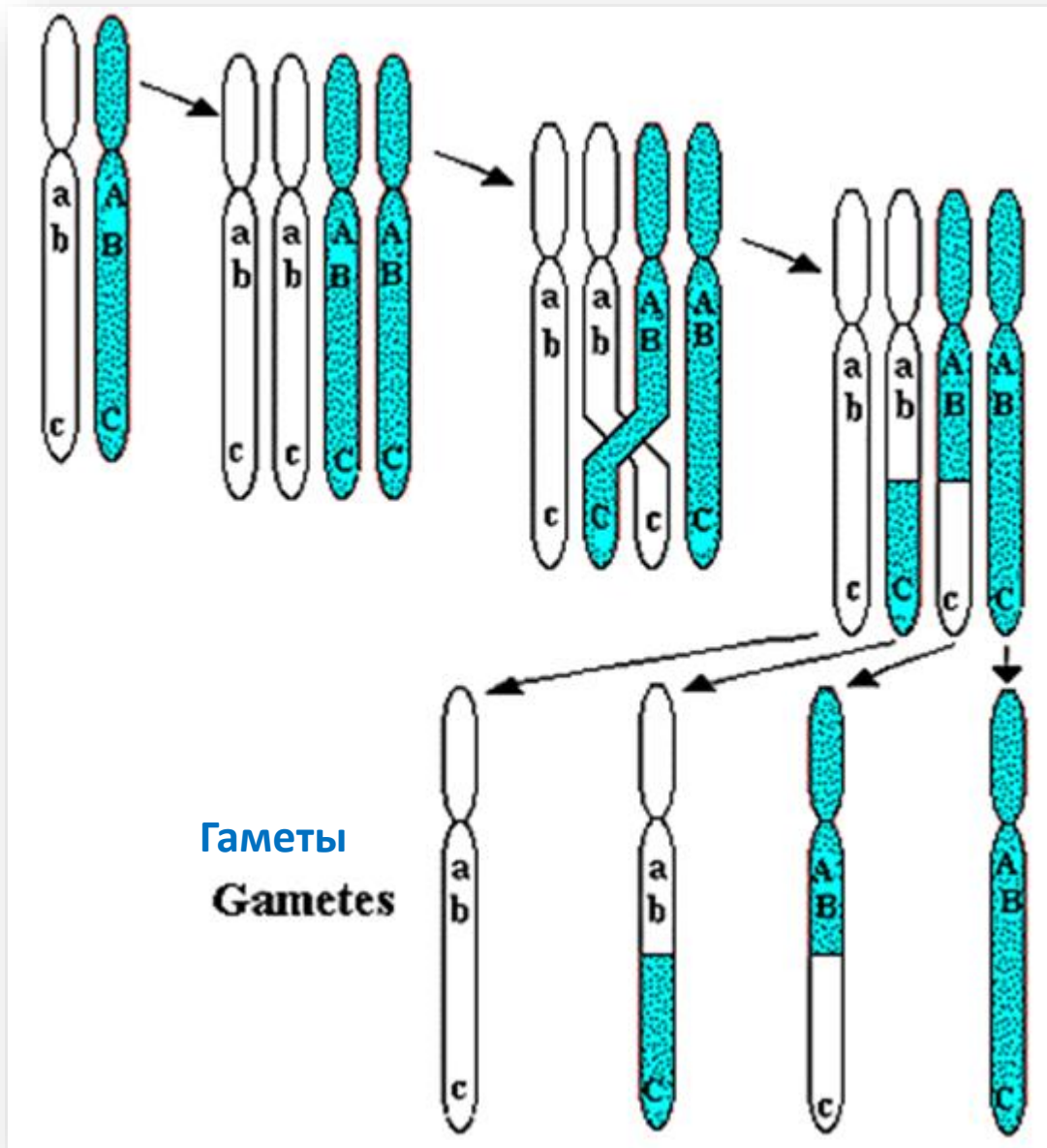
Deafness, autosomal dominant
Achondroplasia
Hypochondroplasia
Thanatophoric dysplasia, types I and II
Crouzon syndrome with acanthosis nigricans
Muencke syndrome
Mucopolysaccharidosis
Wolf-Hirschhorn syndrome
Hypodontia
Dopamine receptor
Ellis-van Creveld syndrome
Weyers acrodermal dysostosis
Huntington-like neurodegenerative disorder
Retinitis pigmentosa, autosomal recessive
Psoriasis susceptibility
Analbuminemia
Amelogenesis imperfecta
Piebaldism
Mast cell leukemia
Mastocytosis with associated hematologic disorder
Germ cell tumors
Dentinogenesis imperfecta
Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia
Parkinson disease, type 1
Polycystic kidney disease, adult, type II
Hypogonadotropic hypogonadism

Четыре типа генетических карт геномной ДНК



- 1 – Генетическая карта сцепления,
- 2 – Физическая рестриктазная карта,
- 3 – Физическая карта контигов (YAC, BAC),
- 4 – Исчерпывающая физическая карта в виде последовательности нуклеотидов

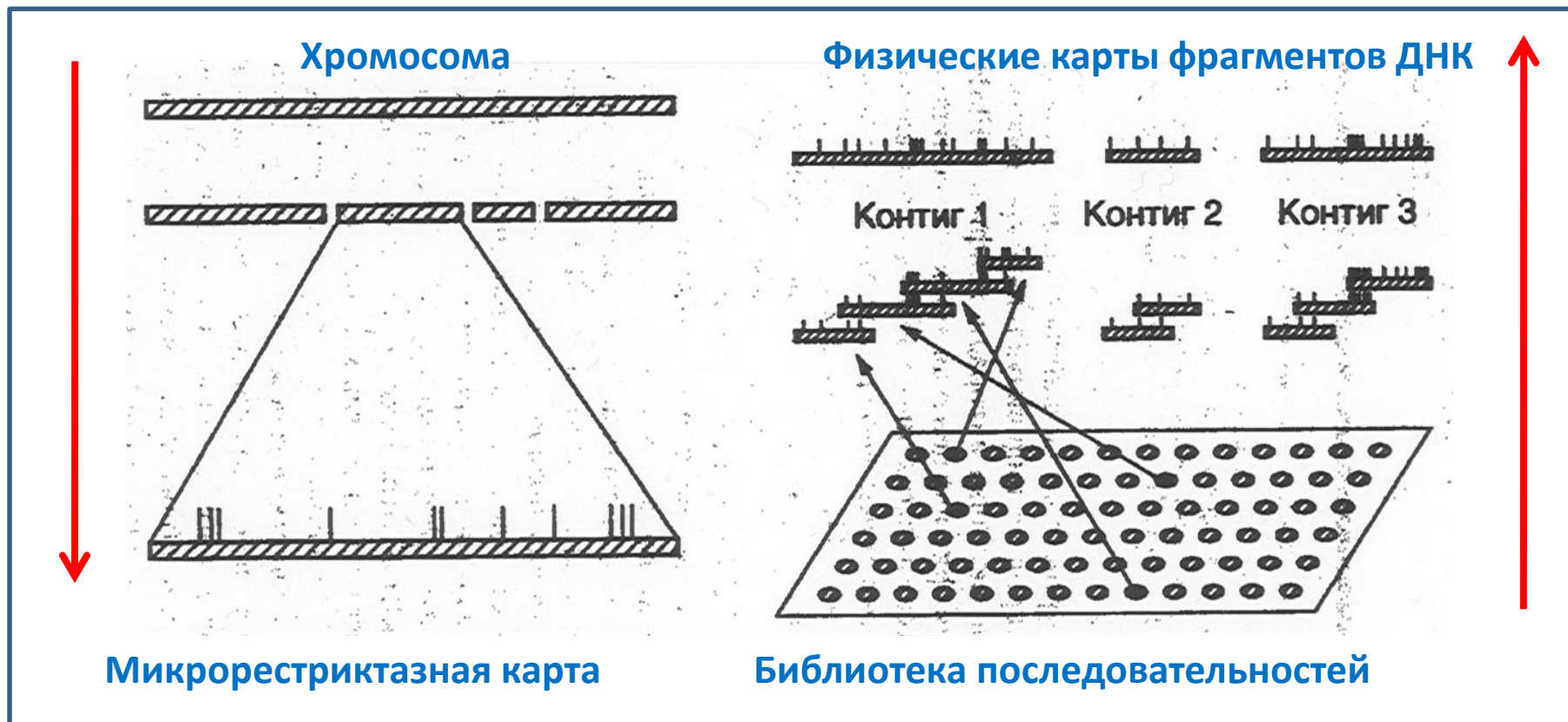
Кроссинговер в мейозе



1 сантиморганида (сМ)
соответствует расстоянию
между генами,
рекомбинация между
которыми происходит с
частотой 1%.

1 морганида (М) = 100 сМ

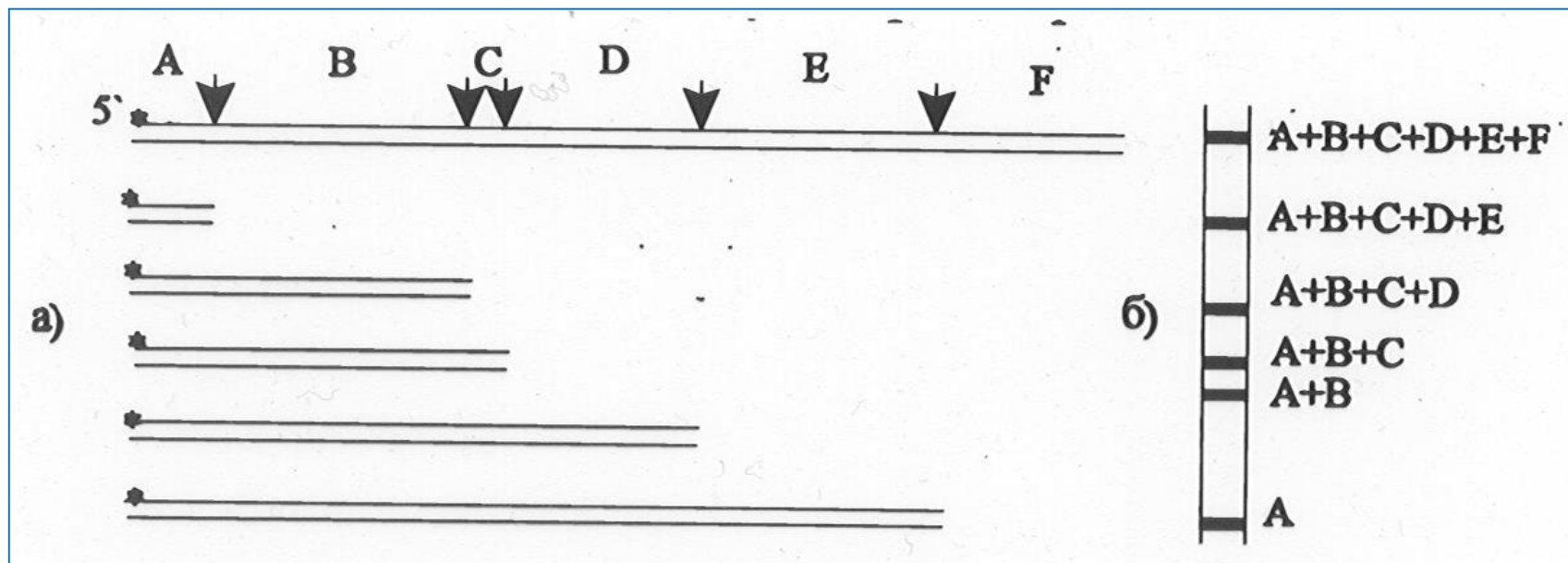
Две стратегии построения физических карт ДНК



Картирование сверху вниз

Картирование снизу вверх

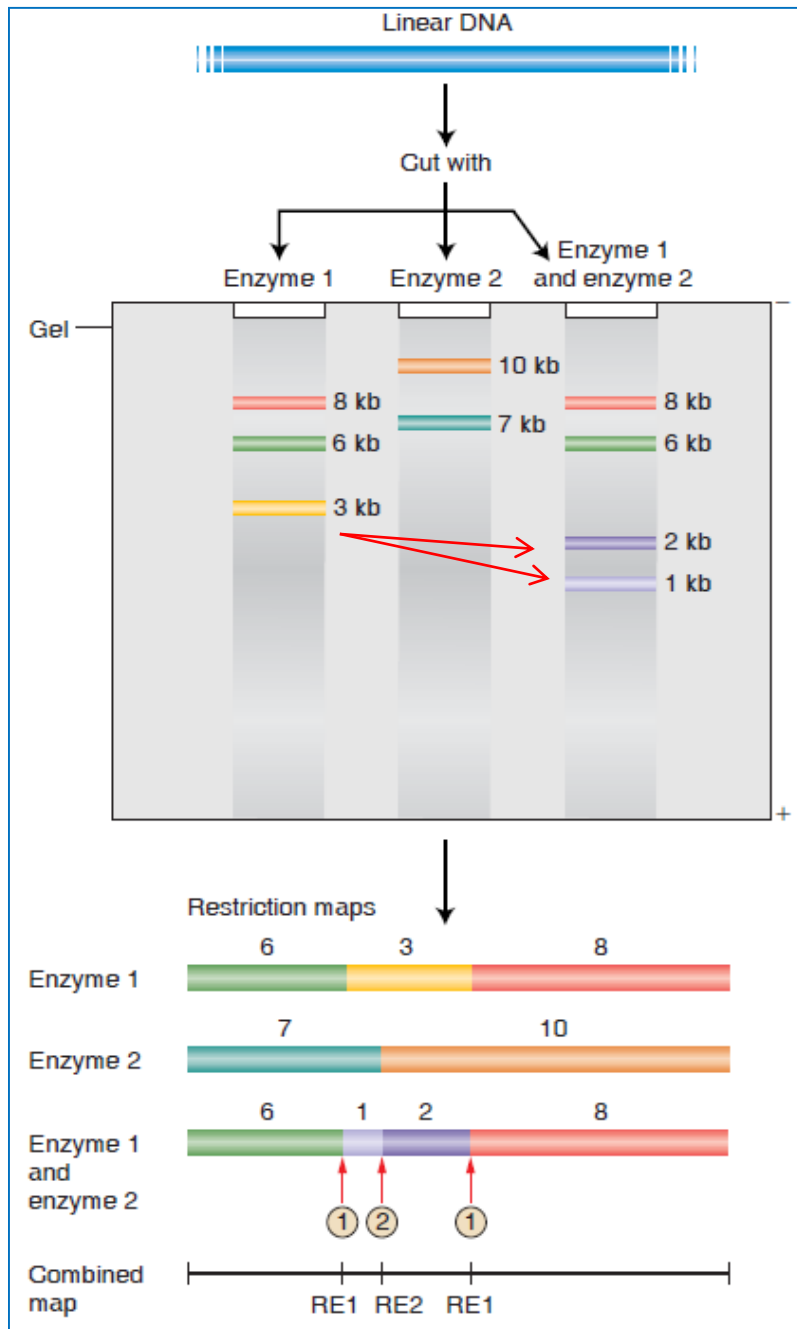
Рестриктазное картирование ДНК с использованием 5'-концевой метки



- ❖ Введение метки в 5'-конец фрагмента ДНК
- ❖ Неполное расщепление фрагмента рестриктазой
- ❖ Электрофоретическое разделение образовавшихся фрагментов ДНК

Рестриктазное картирование ДНК с использованием двух рестриктаз

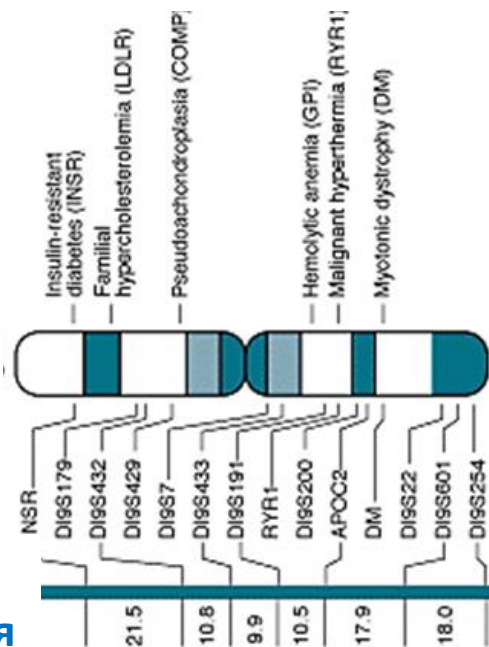
Разрезание фрагмента в 3 т.п.н. рестриктазой 2 указывает на то, что он находится в центре анализируемой последовательности



Физические карты хромосомы 19 человека

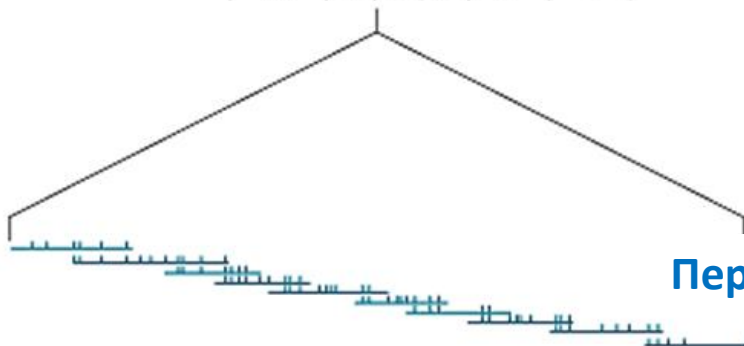
Физ. карта
низкого
разрешения

Генетическая
карта сцепления



Упорядоченные маркеры

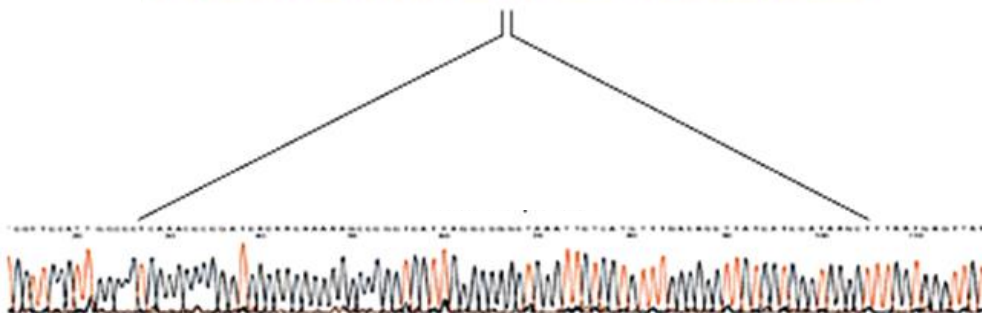
Расстояние в сантиморганидах



Перекрывающиеся клоны



Рестриктазная карта контига



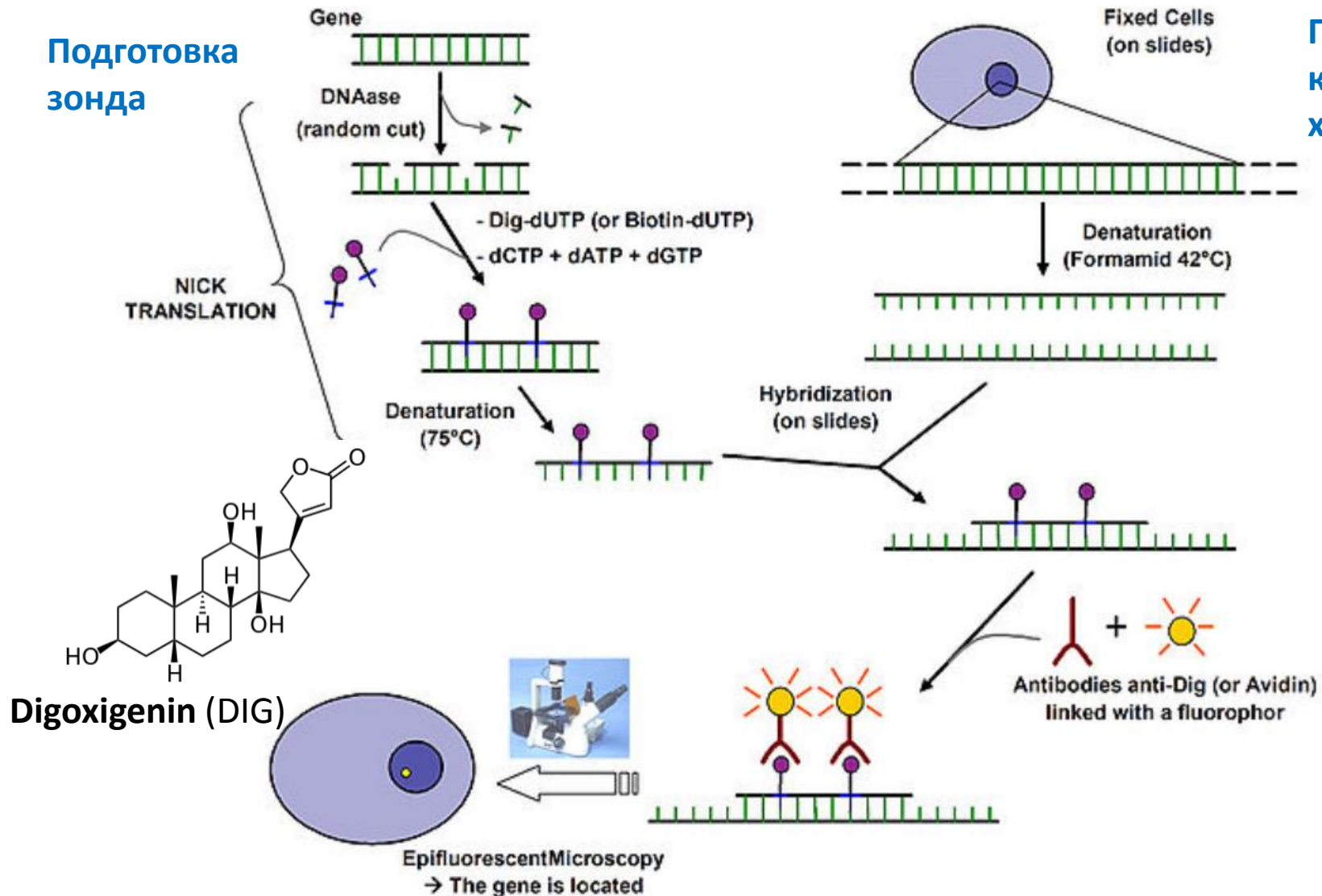
Последовательность
нуклеотидов

Флуоресцентная гибридизация *in situ*

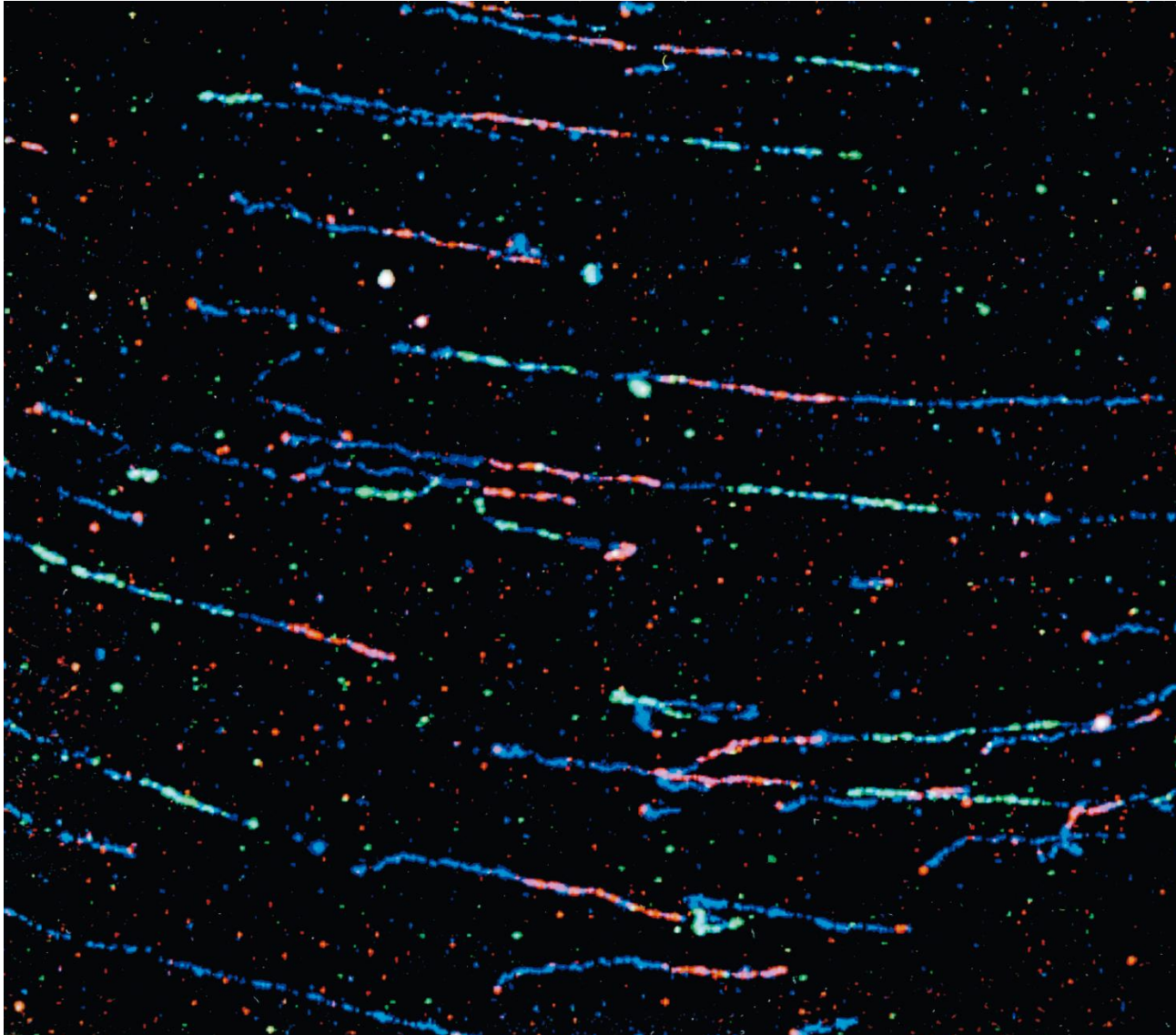
FISH – Fluorescent *In Situ* Hybridization

Подготовка зонда

Подготовка клеток или хромосом



Физическое картирование YAC-ДНК с помощью FISH



FISH –
флуоресцентная
гибридизация in situ

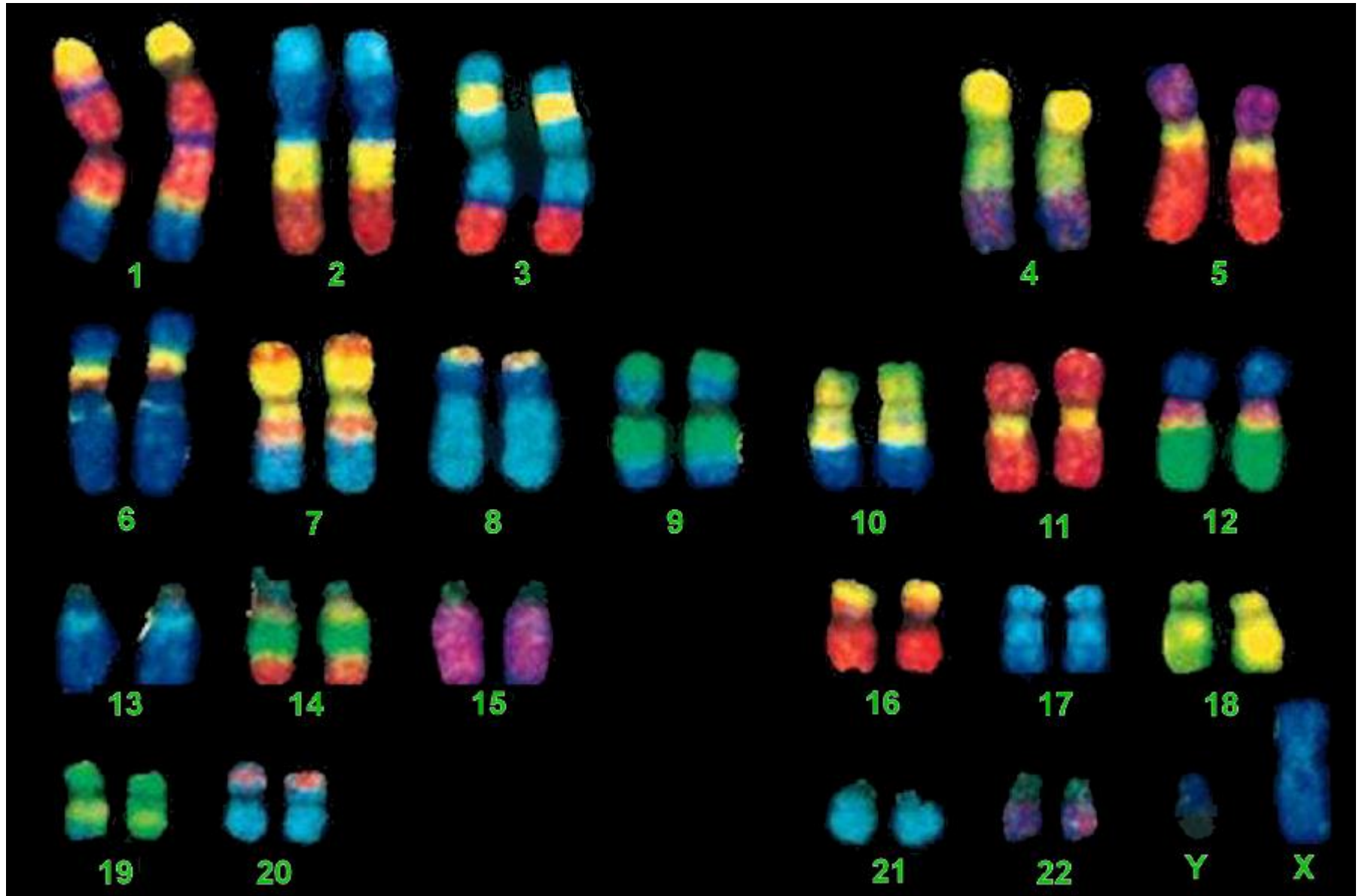
Голубой цвет -
индивидуальные
цепи YAC-ДНК

Красный и **зеленый** –
меченые
полинуклеотидные
зонды

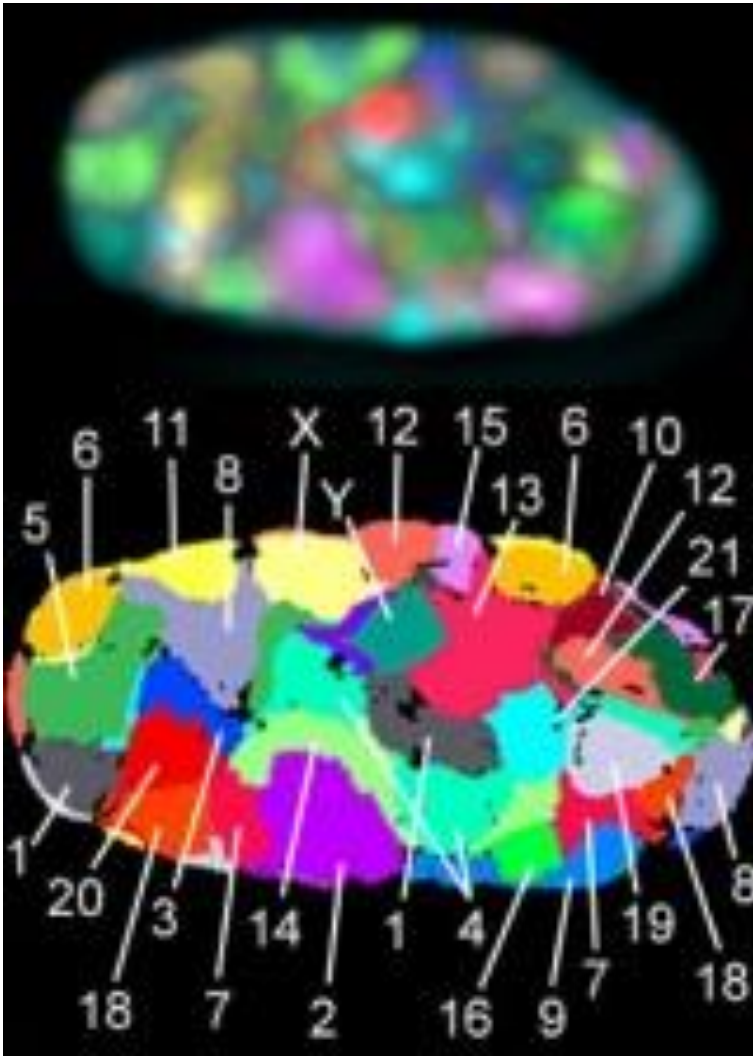
Разрешение метода –
от 3 до 5 т.п.н.

Флуоресцентная
микроскопия

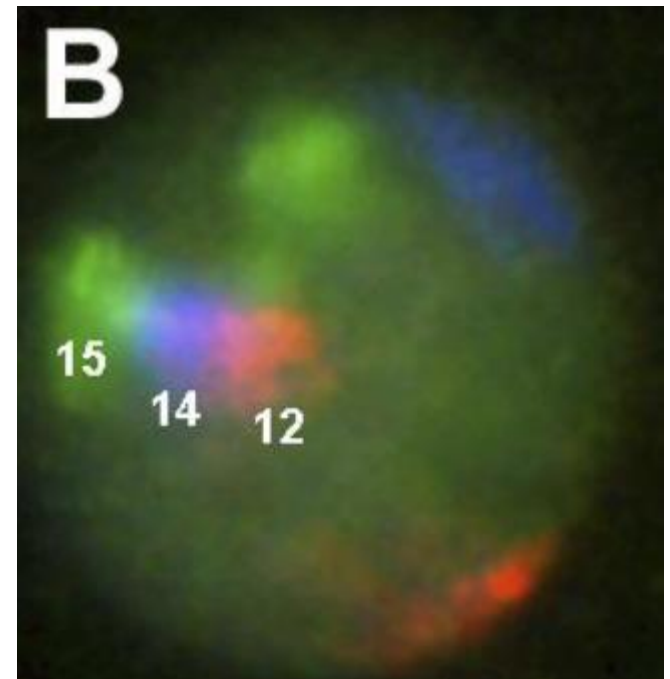
Идентификация всех хромосом человека методом FISH (Chromosome Painting)



Хромосомные территории в интерфазных ядрах (многоцветная FISH)

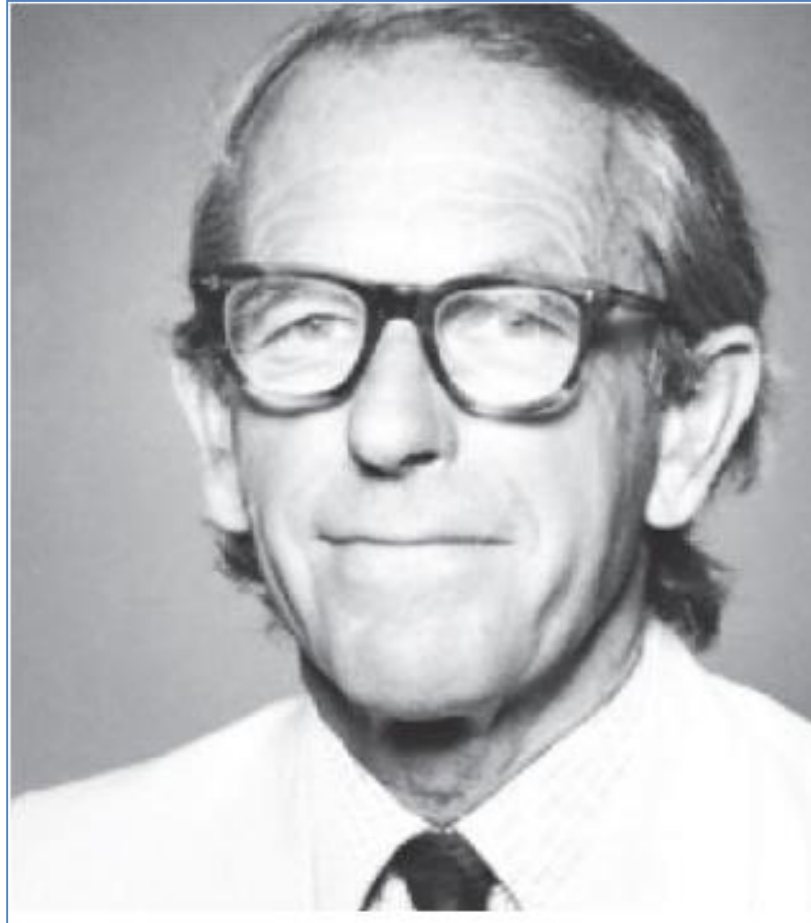


Хромосомы в интерфазном ядре фибробластов человека



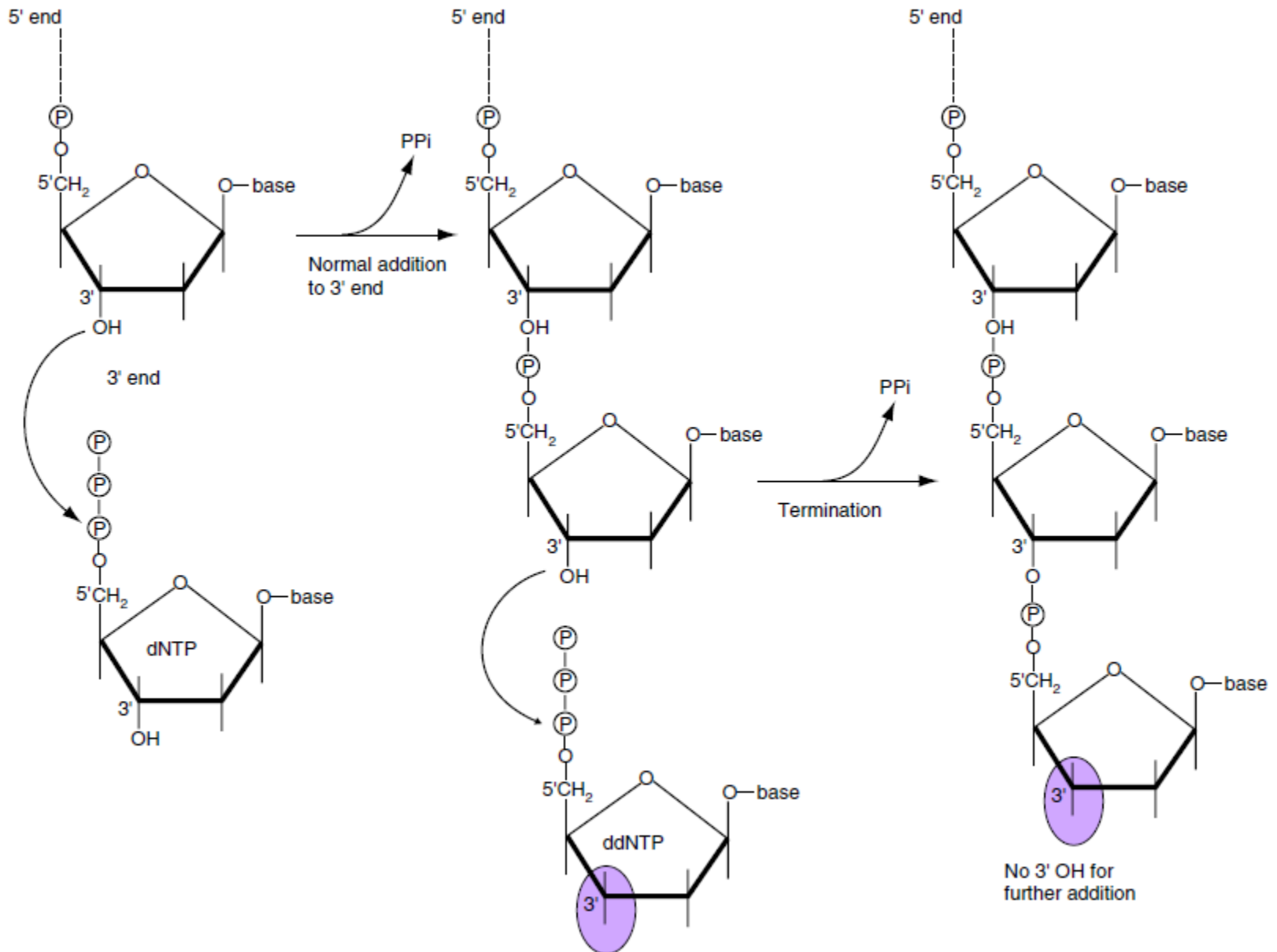
Хромосомы 12, 14 и 15 в интерфазном ядре лимфоцитов мыши

Секвенирование ДНК по методу Сэнгера

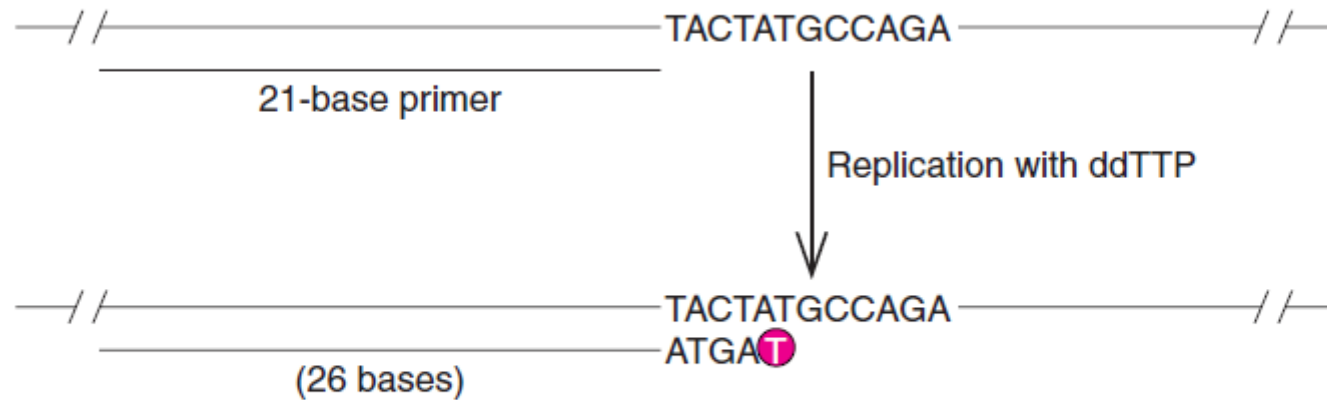


Frederick Sanger

Терминация синтеза ДНК под действием ddNTP



(a) Primer extension reaction:



Секвенирование
ДНК по методу
Сэнгера

(b) Products of the four reactions:

Products of ddA rxn

Template: TACTATGCCAGA

(22) A

(25) ATG^A

(27) ATGAT^A

Products of ddC rxn

Template: TACTATGCCAGA

(28) ATGATA^C

(32) ATGATACGGT^C

Products of ddG rxn

Template: TACTATGCCAGA

(24) AT^G

(29) ATGATAC^G

(30) ATGATACG^G

Products of ddT rxn

Template: TACTATGCCAGA

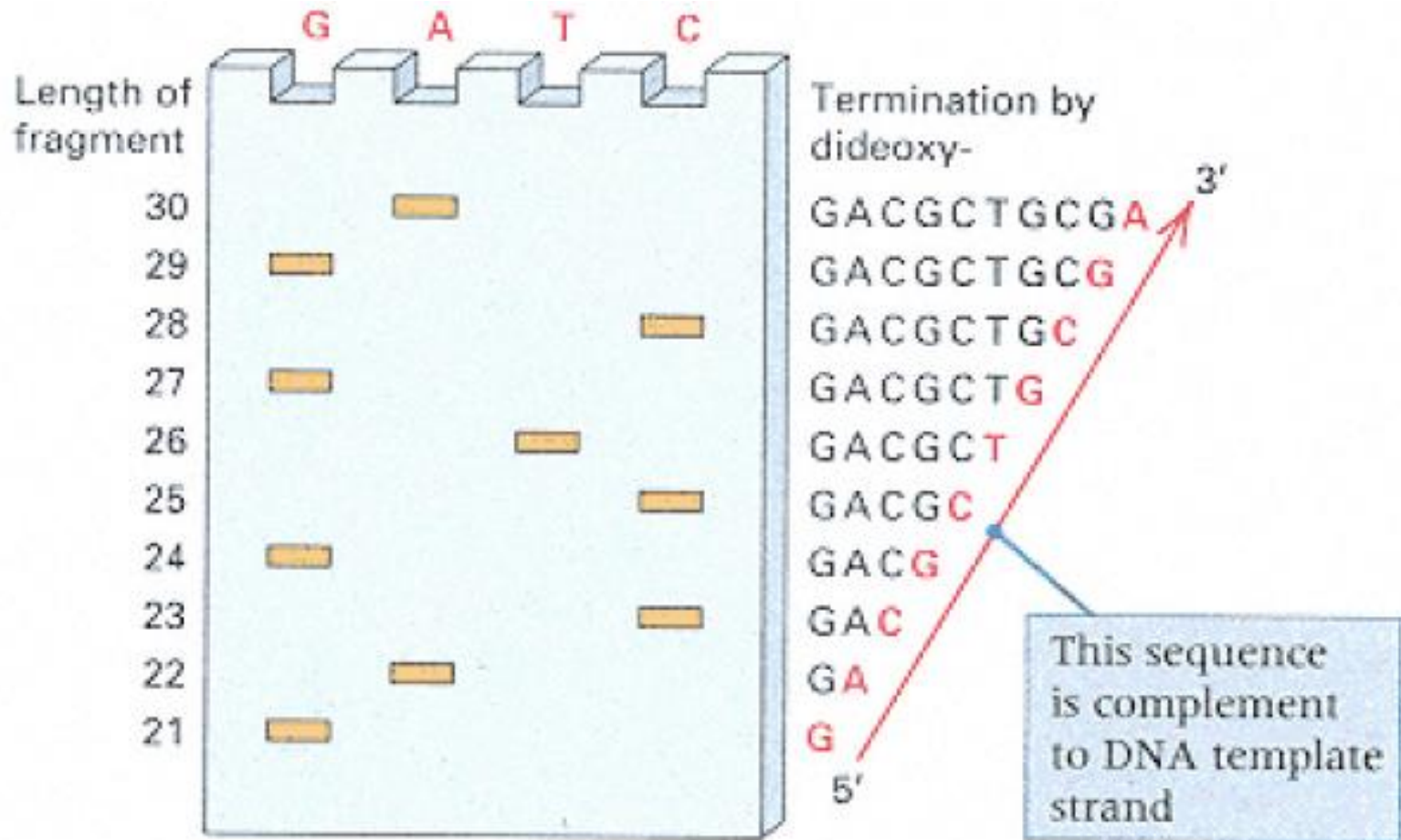
(23) A^T

(26) ATGA^T

(31) ATGATACGG^T

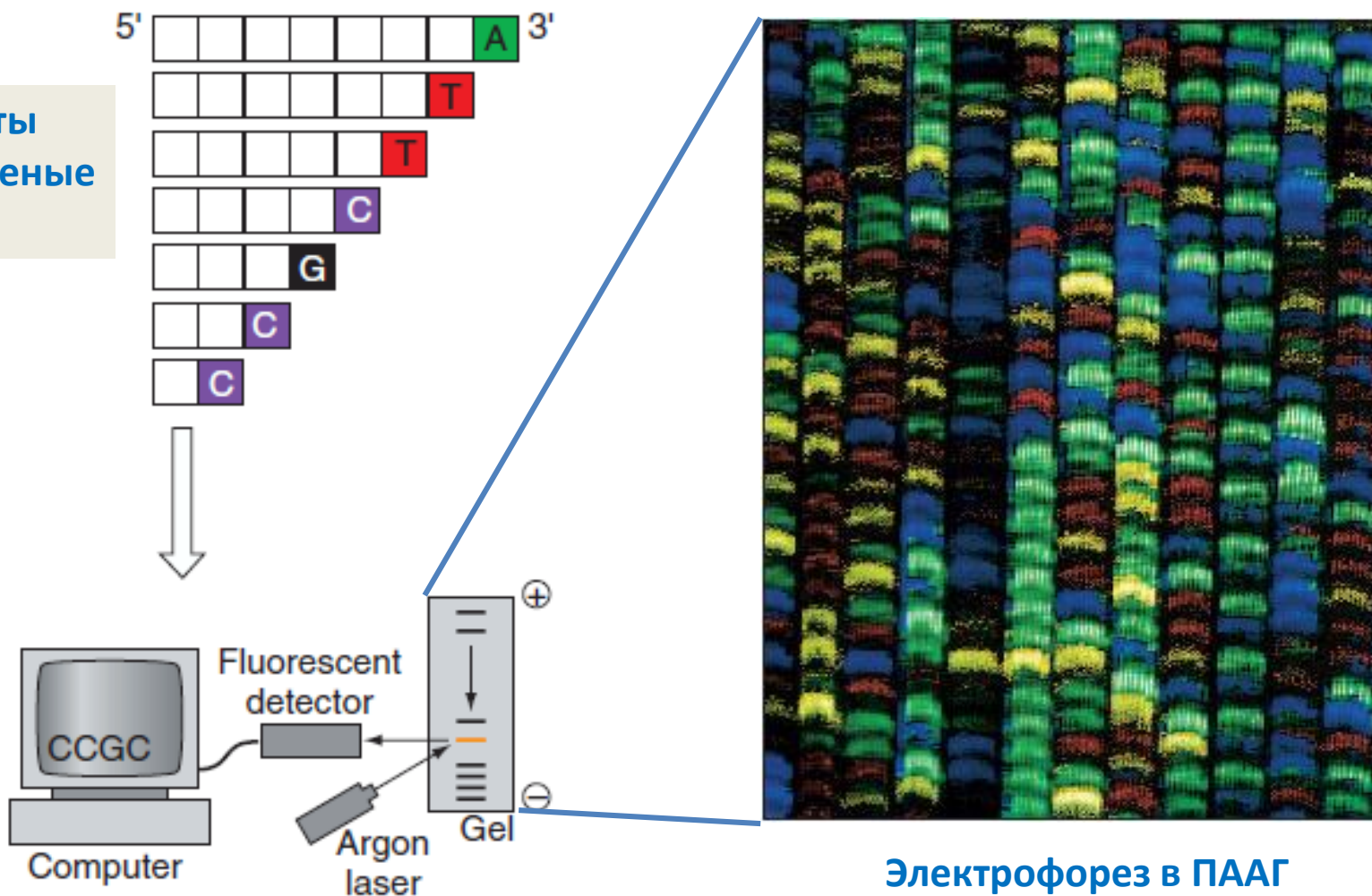
(33) ATGATACGGTC^T

Электрофоретическое разделение продуктов терминации синтеза ДНК в присутствии ddNTPs



Секвенирование ДНК по методу Сэнгера на автоматическом секвенаторе

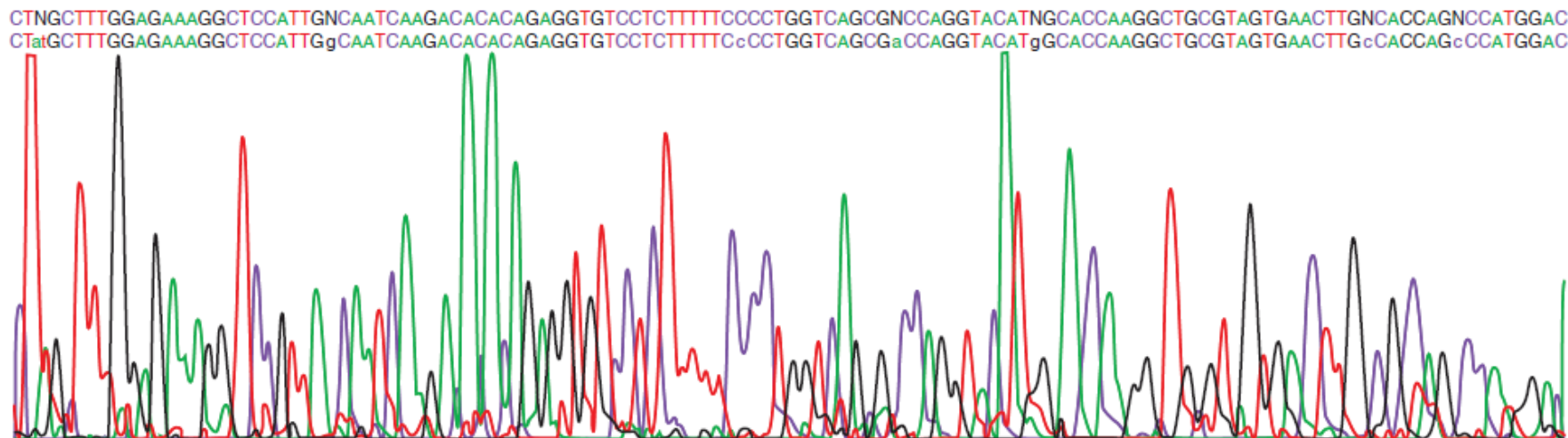
Фрагменты
ДНК, меченые
ddNTPs



Электрофорез в ПААГ

В одной пробирке присутствуют все 4 ddNTPs, меченые флуоресцентными красками

Результат секвенирования ДНК по методу Сэнгера на автоматическом секвенаторе

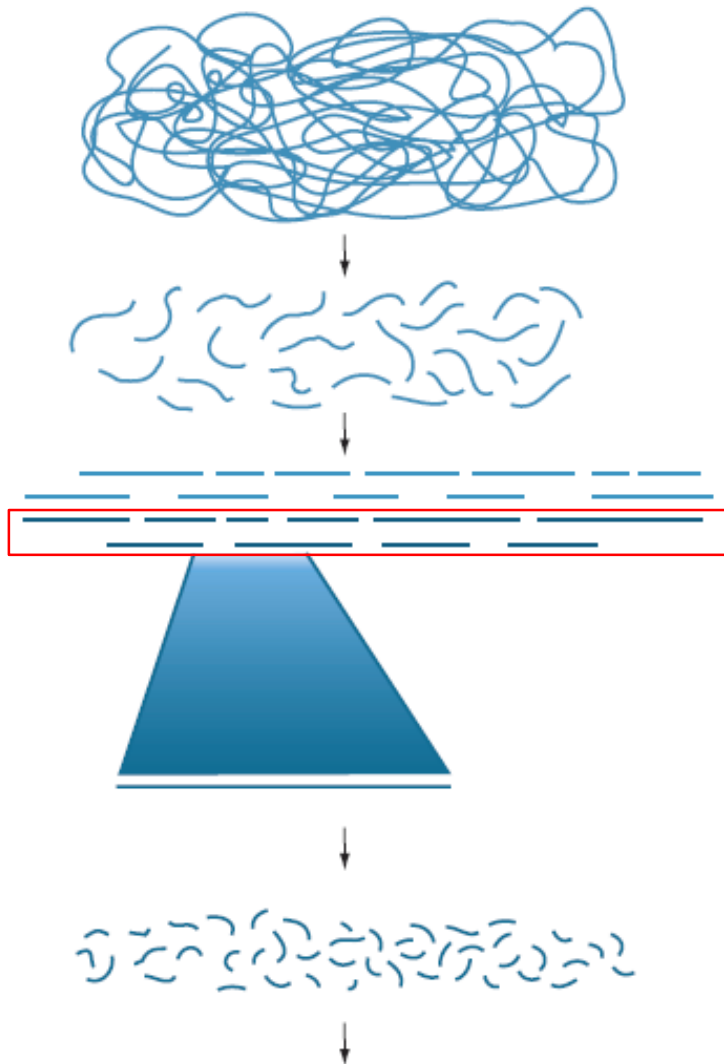


Компьютерная запись флуорограммы одной из дорожек ПААГ геля или одного капилляра

Вверху генерированная компьютером последовательность нуклеотидов

N – неуверенно распознанный нуклеотид (уточняется вручную – вторая строка сверху)

Стратегия секвенирования больших геномов методом дробовика (Shotgun method)



Геномная
ДНК

ВАС-
библиотека

Упорядоченные клоны, объединенные в
протяженные контиги: выбирается
наиболее короткий путь секвенирования

ВАС-клон, выбранный для секвенирования

Фрагменты ВАС, секвенируемые методом
дробовика

:CGTAAATGGGCTGATCATGCTTAAA
TGATCATGCTTAAACCCTGTGCATCCTACTG...

Объединение клонов по перекрыванию

:CGTAAATGGGCTGATCATGCTTAAACCCTGTGCATCCTACTG...

Собранная последовательность

Заполнение пробела между двумя контигами хромосомной ДНК



Прогулка по хромосоме:

- ❖ Олигонуклеотидные зонды к известным концевым последовательностям индивидуальных клонов
- ❖ Переход к неизвестной соседней последовательности

Центр по секвенированию геномов животных по методу Сэнгера

Одна машина может
анализировать 96 образцов
одновременно (96 капилляров),
750 п.н. за один прогон, 6
прогонов в день,
Итого:
одна машина может определять
~345 600 п.н. в один день



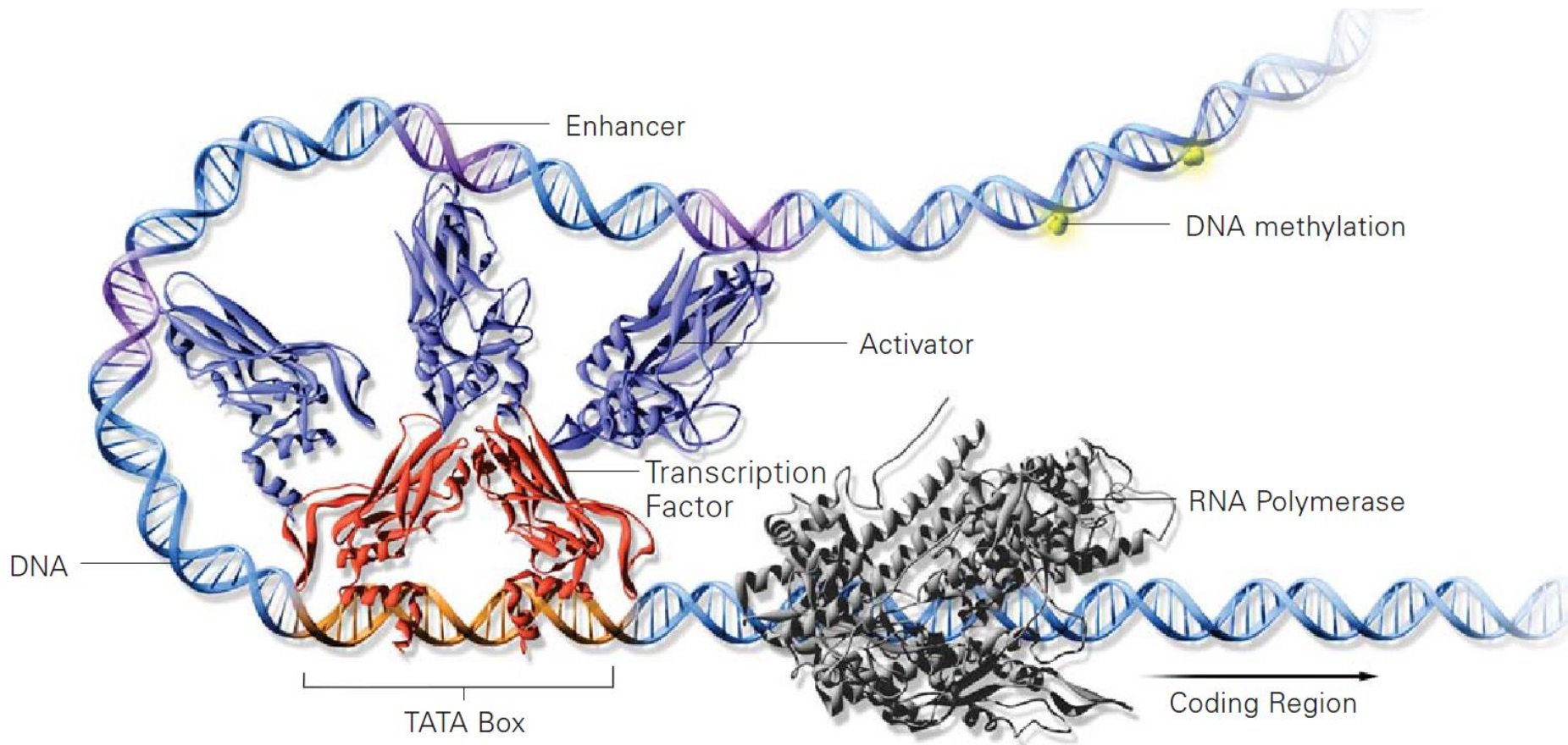
Секвенатор нового (второго) поколения, основанный на параллельном секвенировании ДНК



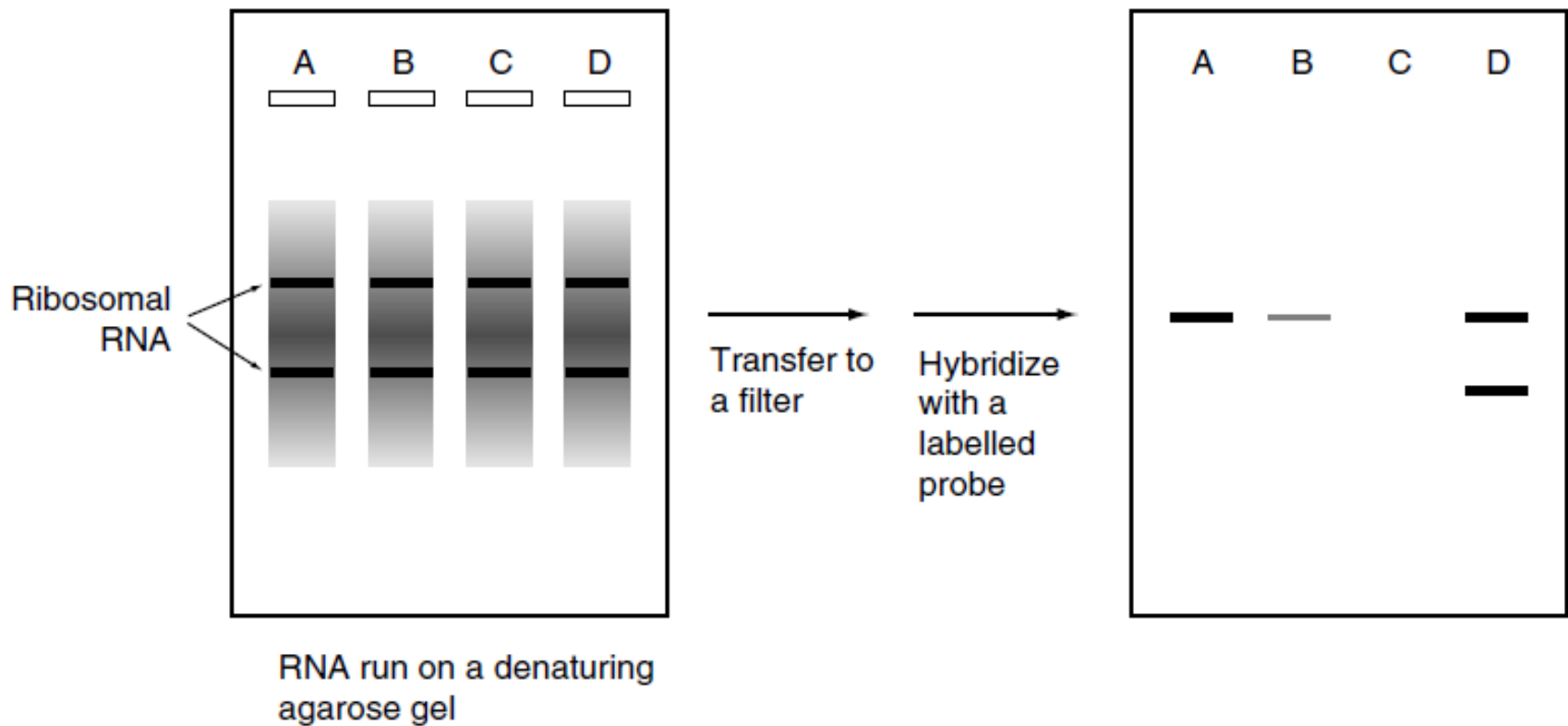
Applied Biosystems

**По производительности
заменяет несколько
сотен секвенаторов ,
основанных на методе
Сэнгера**

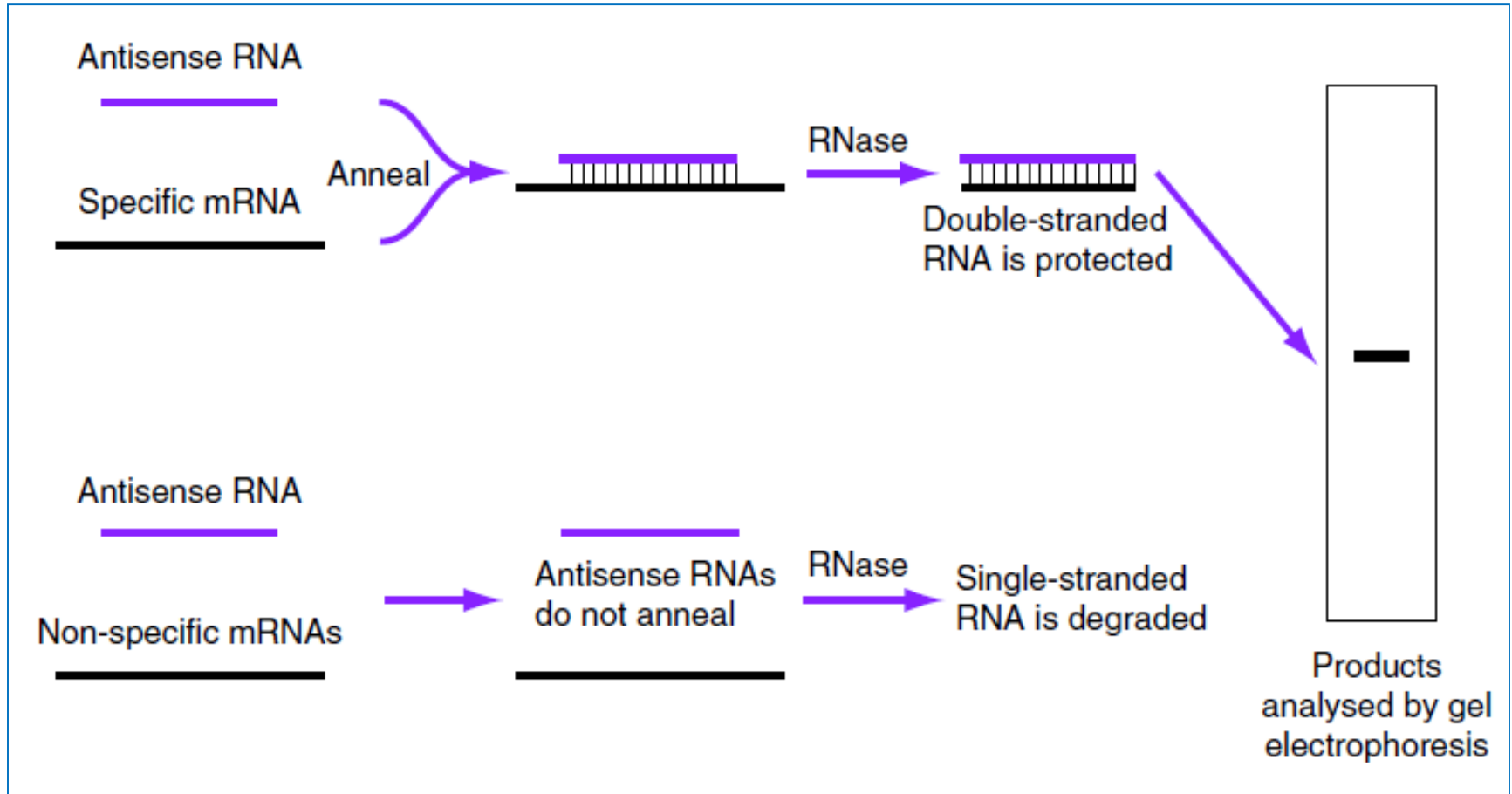
Исследование экспрессии генов на уровне транскрипции



«Северный» блоттинг (Northern blotting)



Обнаружение мРНК путем защиты от действия РНКазы (*RNAse protection assay*)



Преимущества перед Северным блоттингом: 1) Большая чувствительность; 2) более точная количественная оценка содержания мРНК; 3) Большая устойчивость к деградации РНК

5' Polyadenylated mRNA AAAAAAA 3'

Reverse transcriptase

5' Polyadenylated mRNA AAAAAAA 3'

First-strand cDNA TTTT++++ 5'

Anchor

Denature
Anneal primer
Extend

5' Gene-specific primer

5' AAAA**** 3'
3' First-strand cDNA TTTT++++ 5'

Denature
Anneal primer
Extend

5' AAAA**** 3'
3' TTTT++++ 5'

++++ 5' Anchor-specific primer

Denature
Anneal primers
Extend

5' Gene-specific primer

5' AAAA**** 3'
3' TTTT++++ 5'

++++ 5'

**Быстрая амплификация
3'-концов мРНК: 3'-RACE**

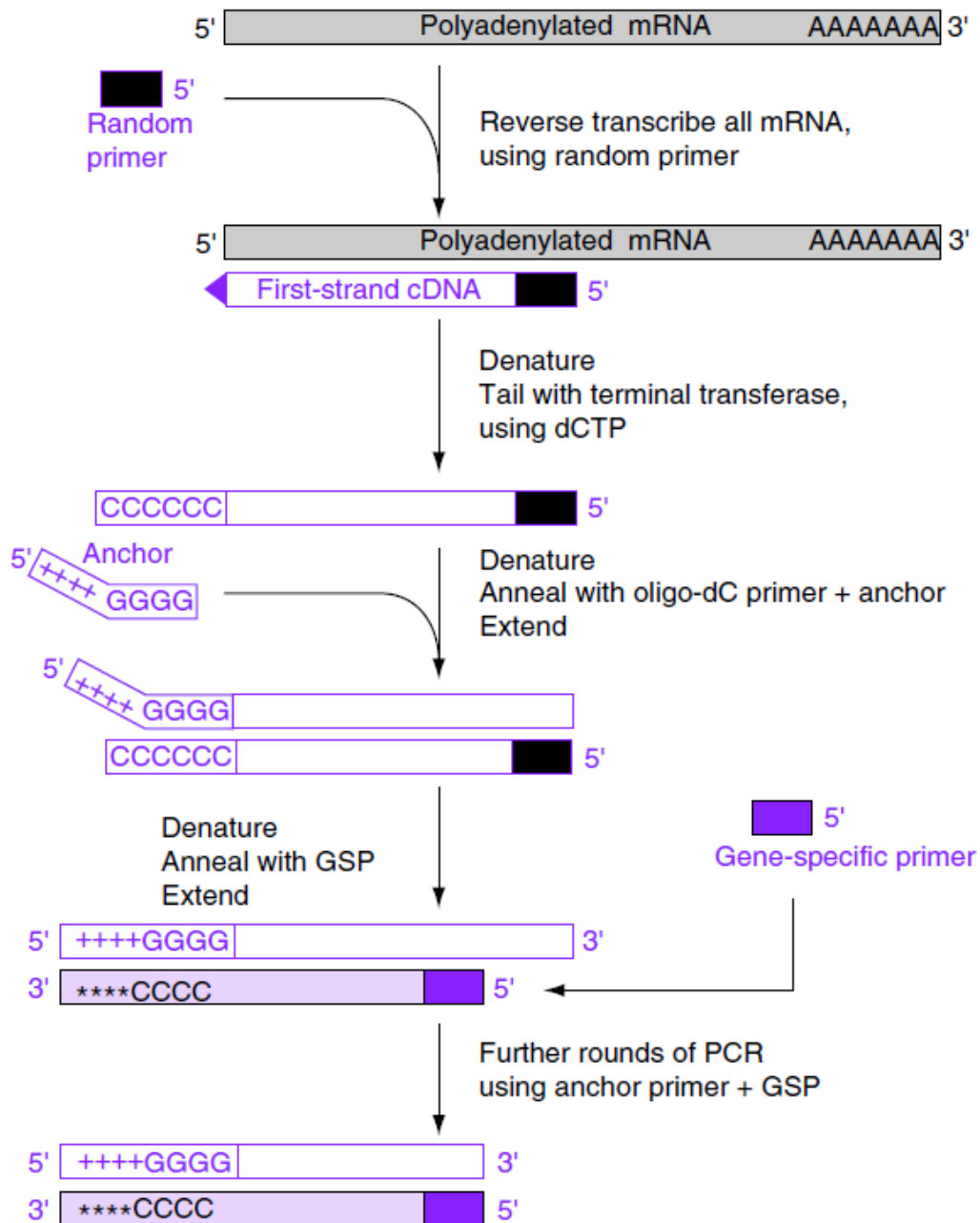
Поиск терминаторов

**Rapid amplification
of cDNA ends**

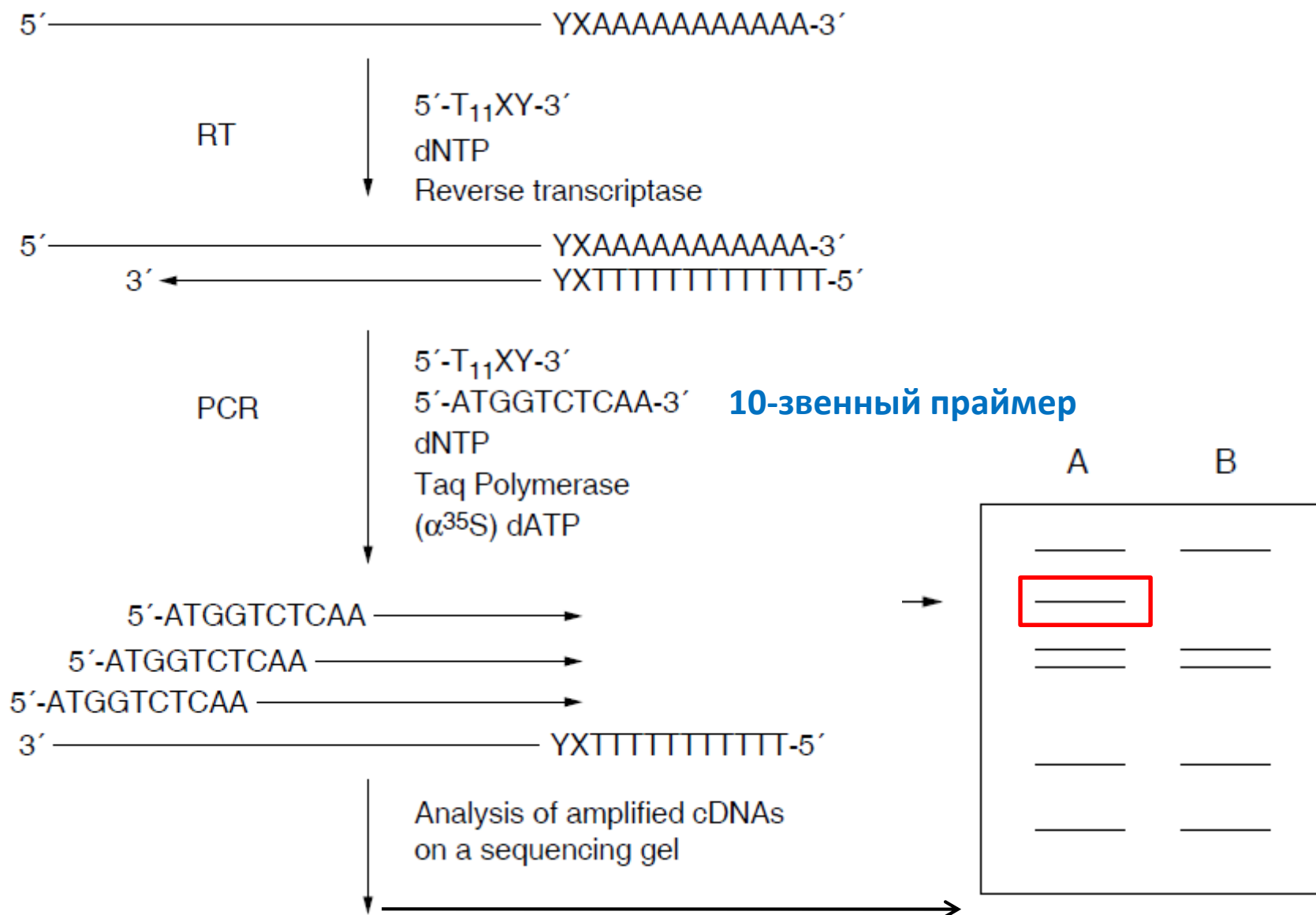
Быстрая амплификация 5'- концов мРНК: 5'-RACE

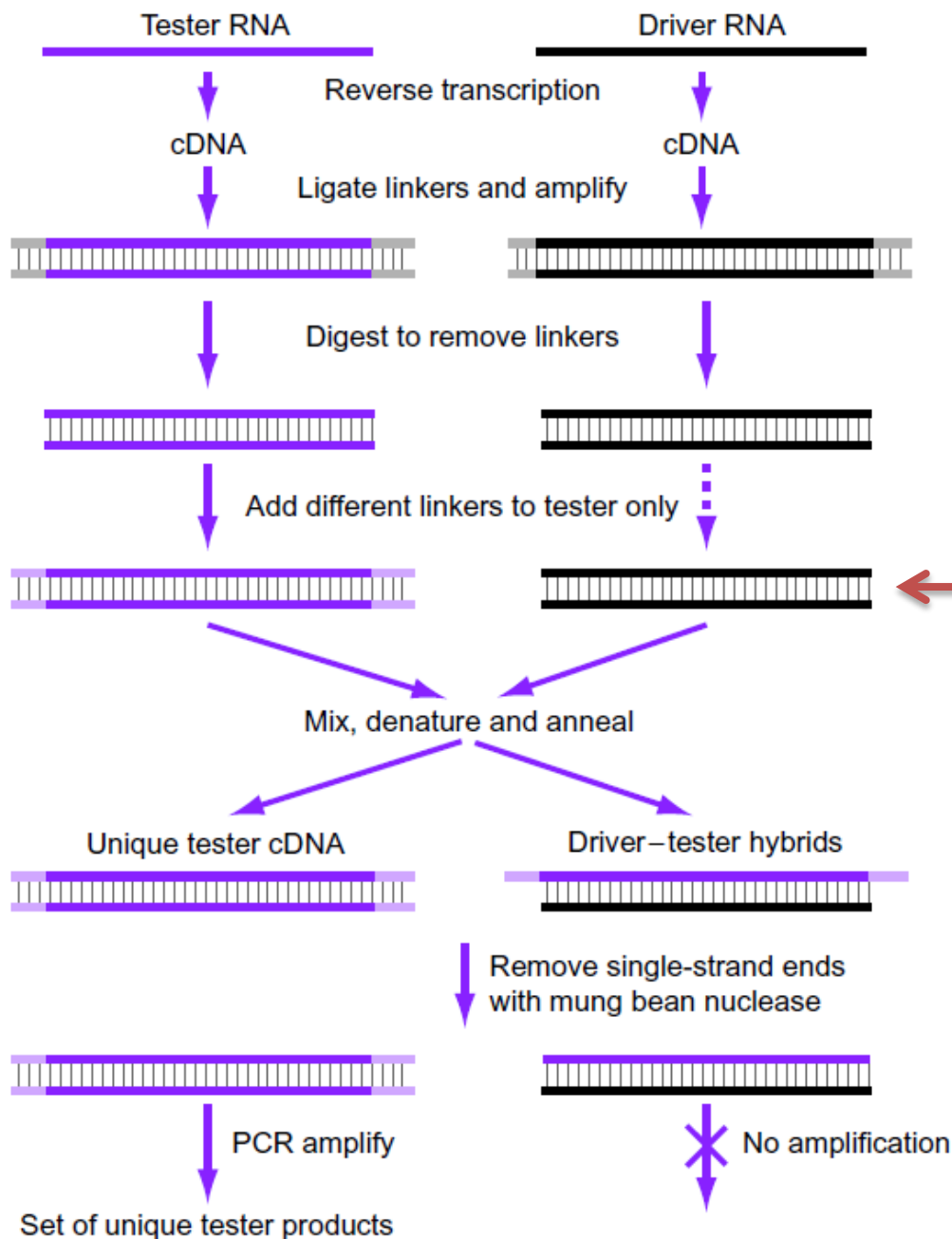
Поиск промоторов, в
т.ч. альтернативных

Rapid amplification
of cDNA ends



Дифференциальный дисплей (DD)





**Анализ
репрезентативных
различий в мРНК**

← **Драйверная кДНК в 100-кратном
избытке**

**Representational
Difference Analysis
(RDA)**

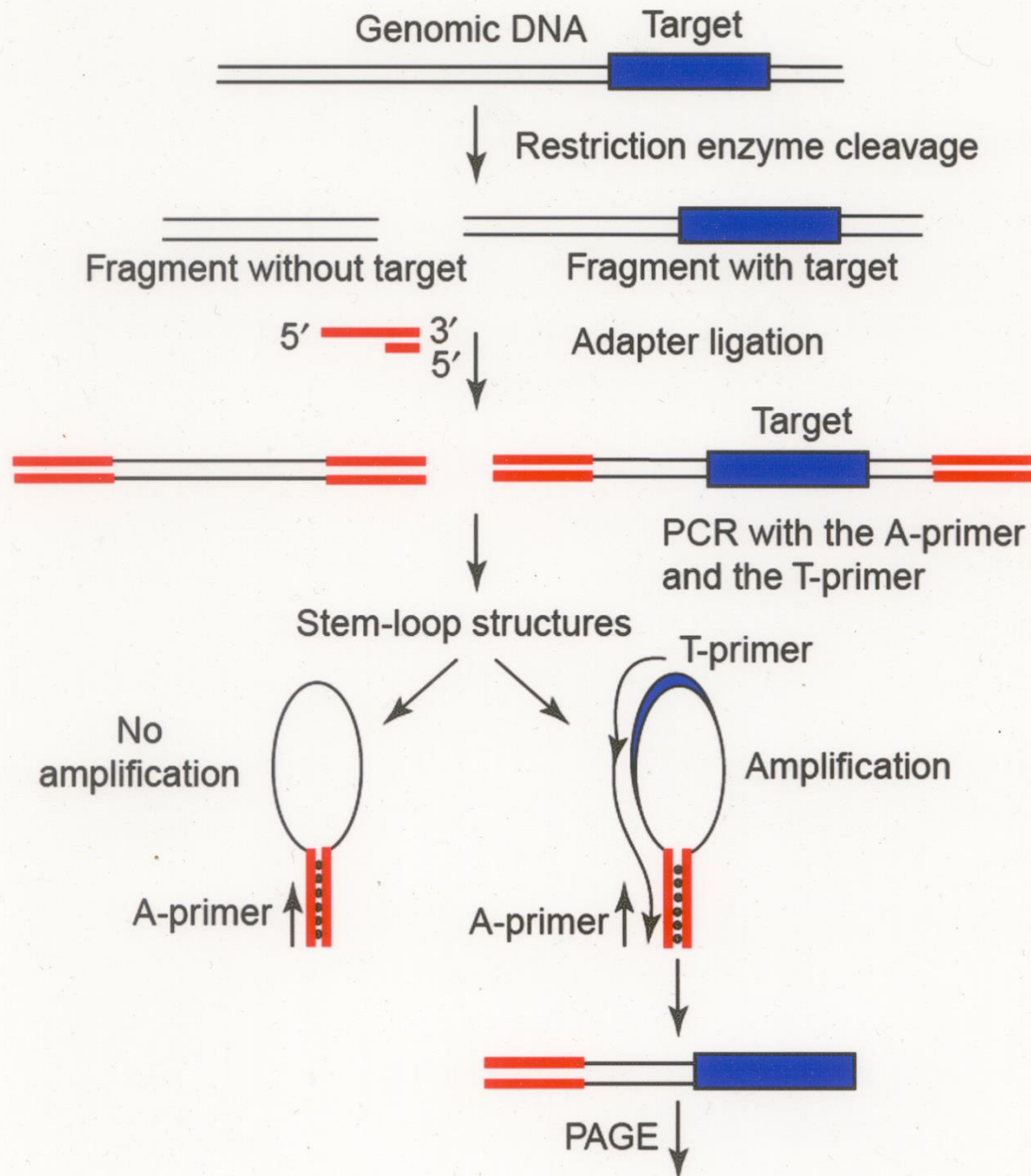
**Получение EST-маркеров
(Expressed-Sequence Tag)
длина – 10-15 п.н.**



Sequencing of concatemers

Супрессия ПЦР «Принцип сковородки»

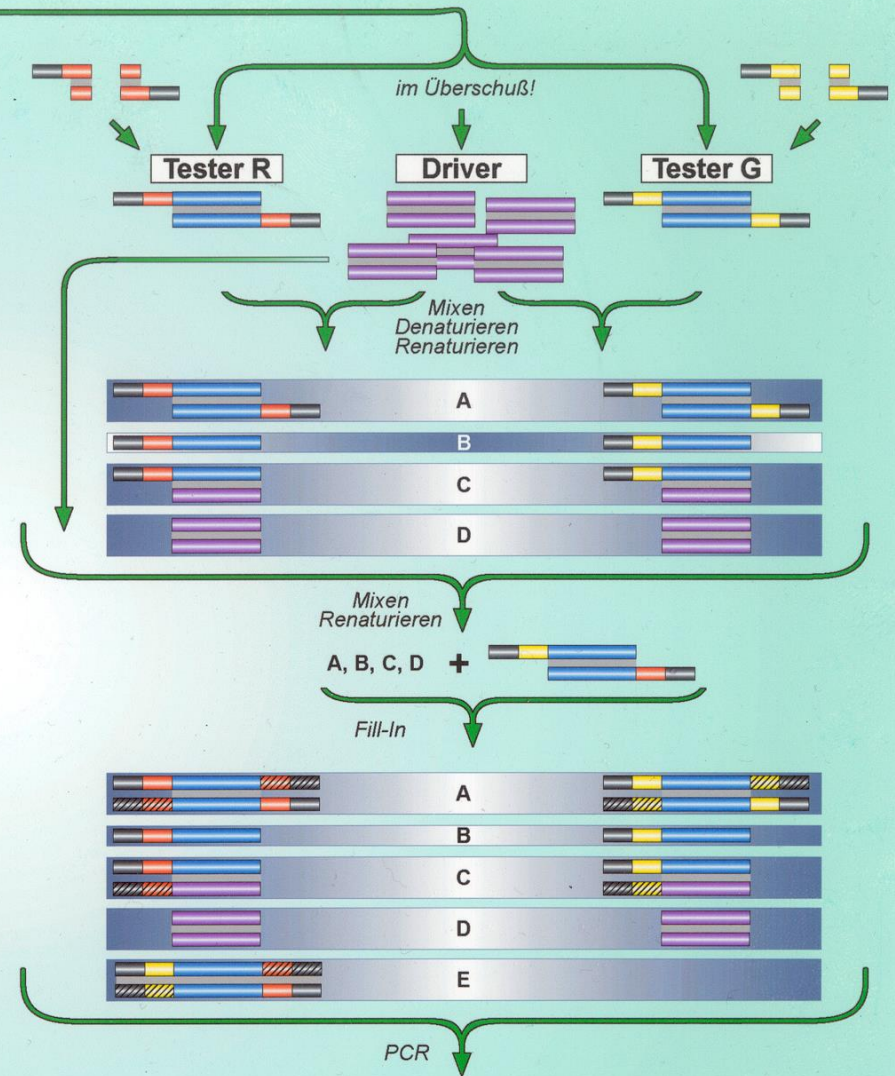
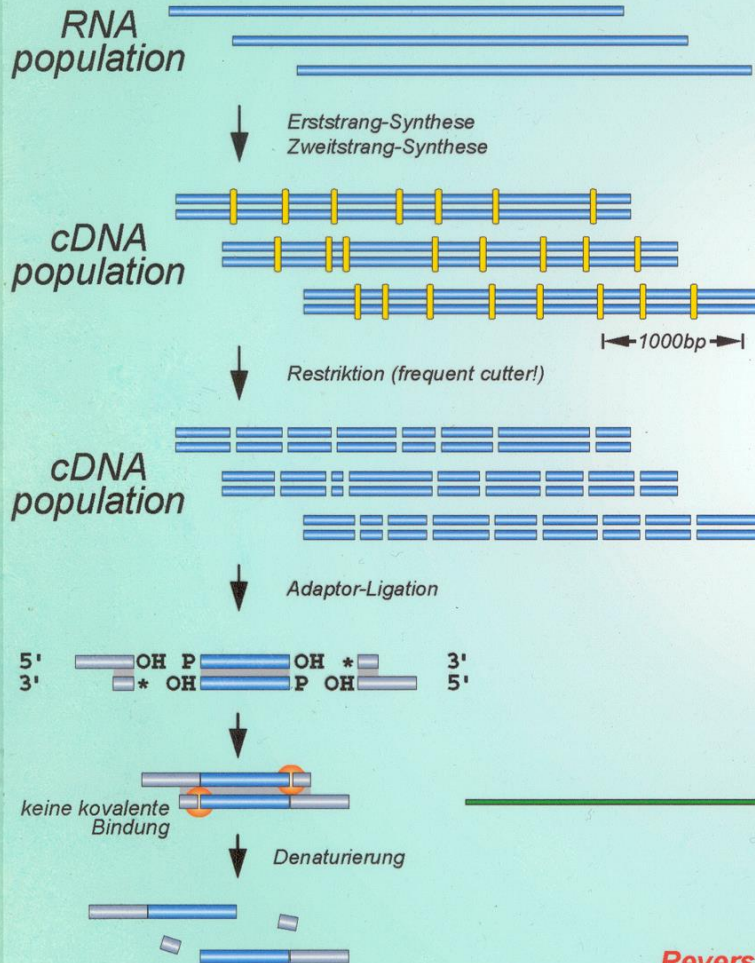
Выявление неизвестной
последовательности,
прилегающей к известной
последовательности



При отжиге адаптеров
самих на себя
эффективная
амплификация
происходит только с
последовательностей
адаптера и внутреннего
праймера

Супрессорная вычитающая гибридизация

Suppression subtractive hybridization



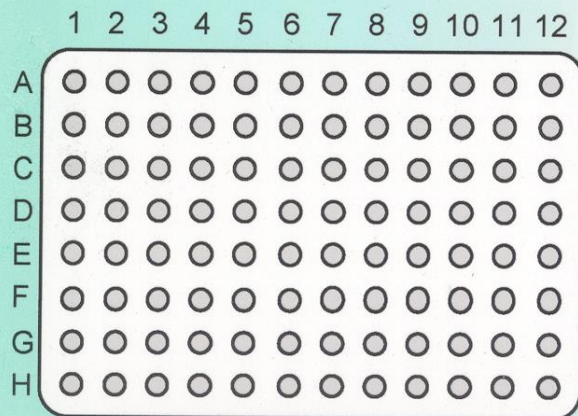
RT-PCR
Northern
Reverse Northern
Microarray

Tester-spezifische Transkripte (?)
Klonierung der Fragmente
Analyse der Klone

Обратный Северный блоттинг/Саузерн

Angeordnete Klone (Array) aus der Subtraktion.

Träger: Nylon Membran



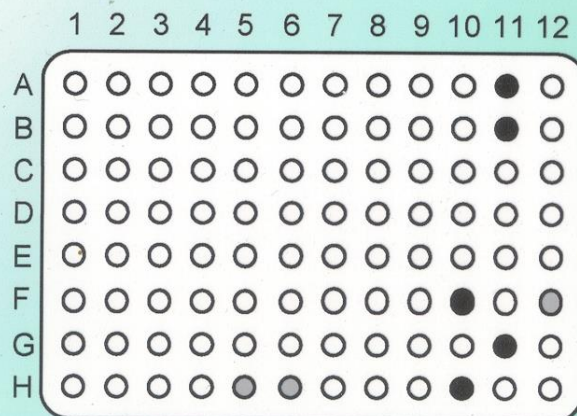
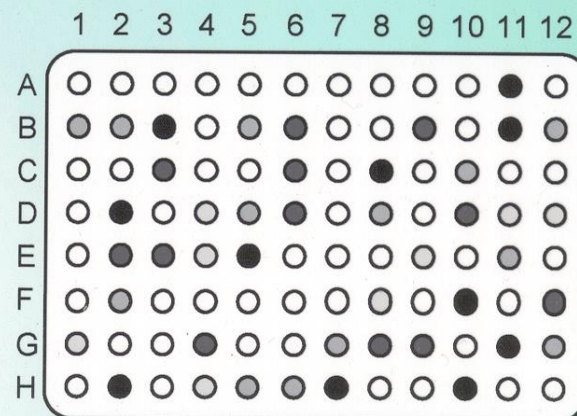
Reverse Northern / Southern:
 Fixierte (klonierte) Target
 RNA/DNA bekannter Sequenz.
 Die Sonde ist ein komplexes
 Nukleinsäuregemisch.
 (Inverser Ansatz)

Tester population*

Hybridisierung
 Exposition

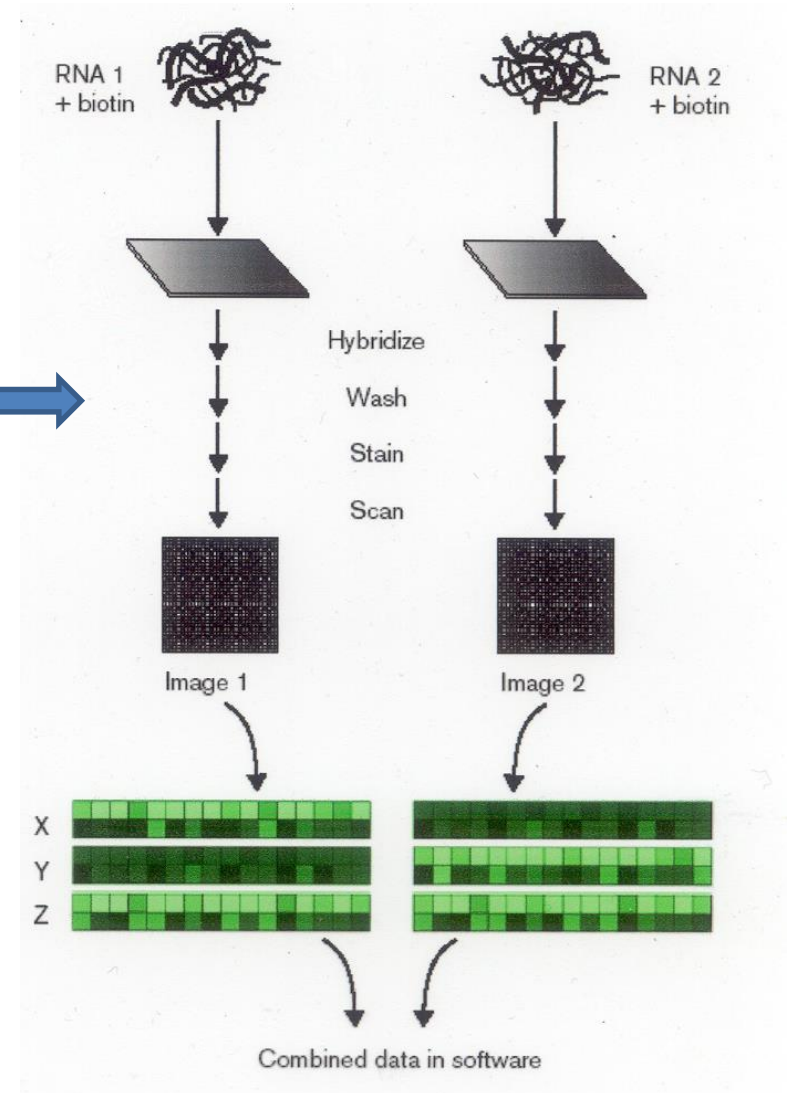
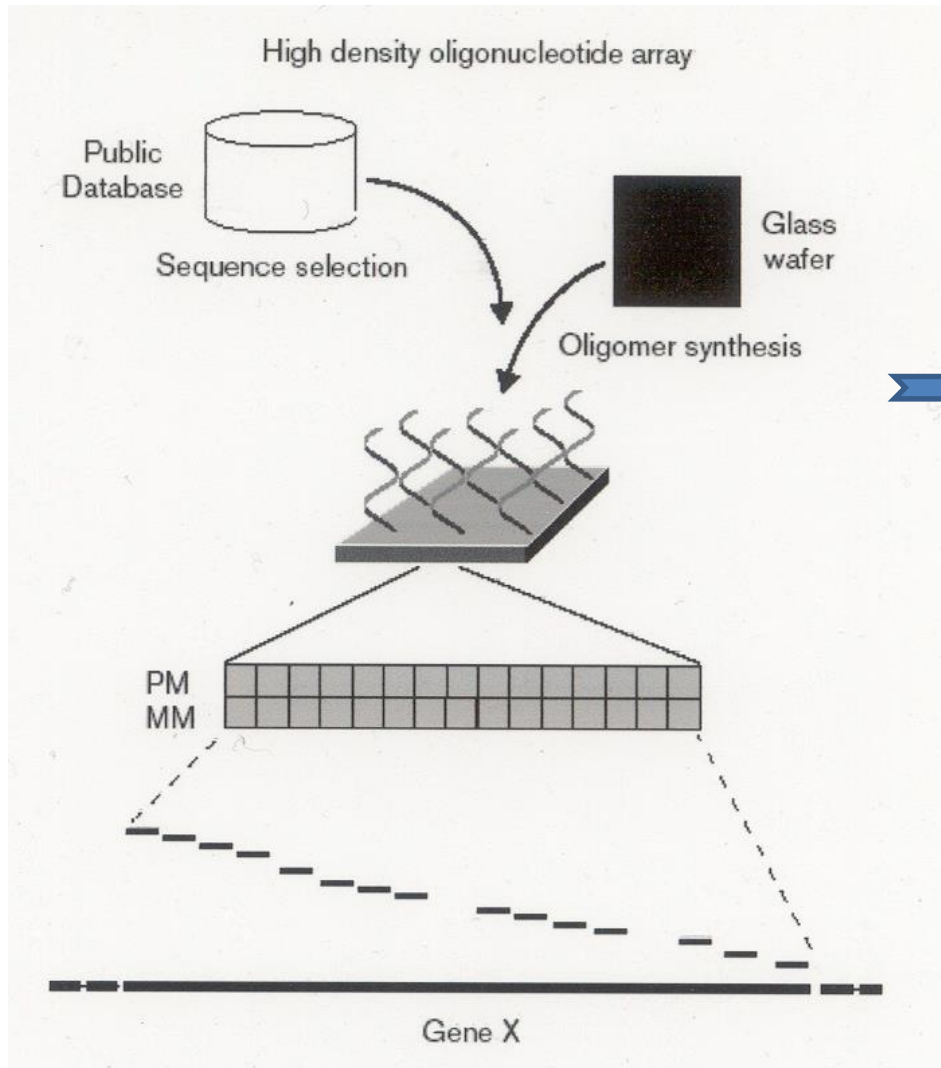
Driver population*

* Driver und Tester sind
 markiert (= Sonde) /
 komplexe Gemische von
 Nukleinsäure



Клоны отдельных кДНК, уникальных для тестерной популяции мРНК, иммобилизовали на фильтре и гибридизовали с мечеными мРНК тестерной или драйверной популяций

Олигонуклеотидный биочип высокой плотности



Биочип с иммобилизованными ДНК

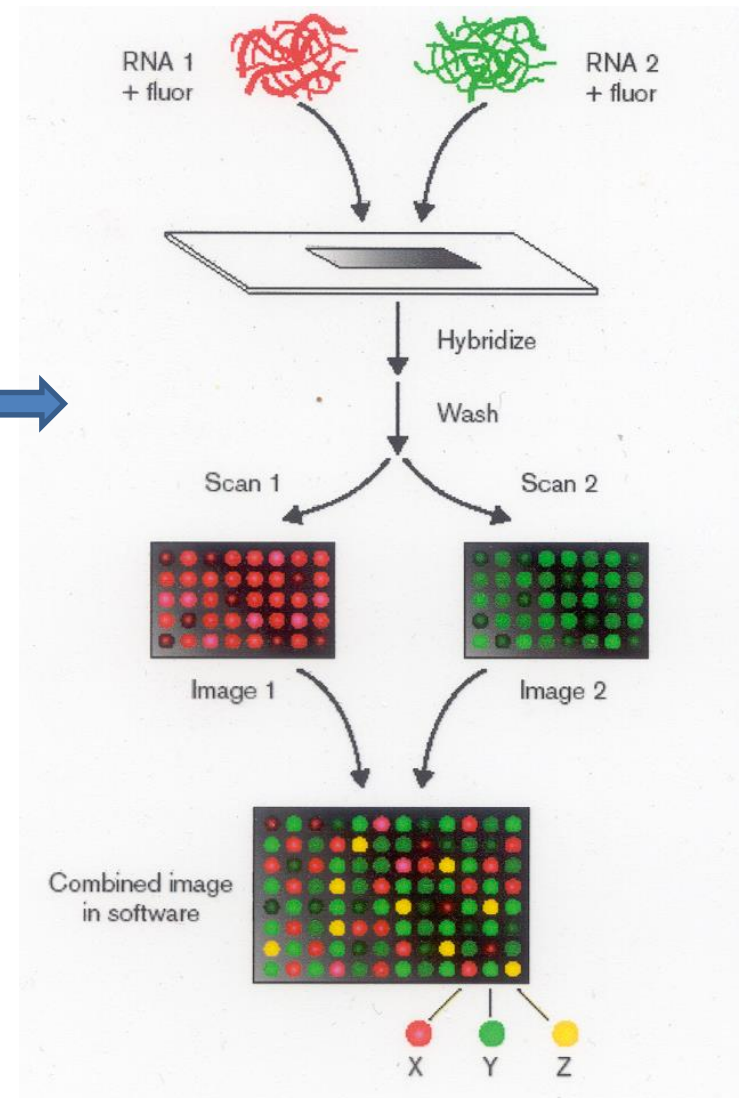
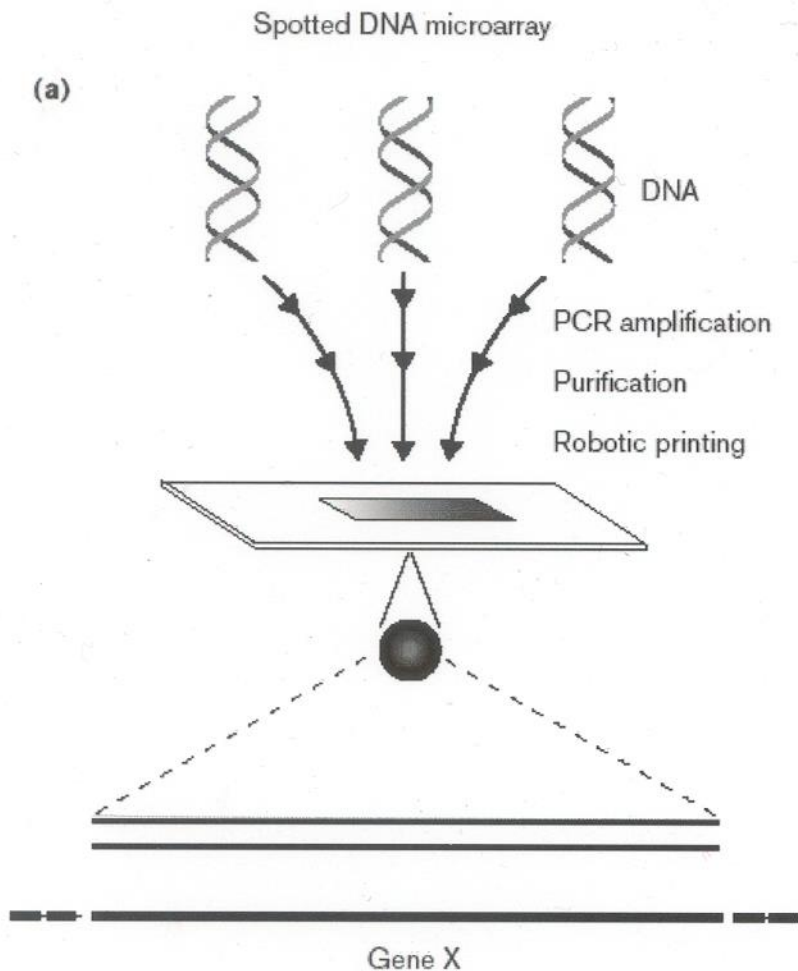
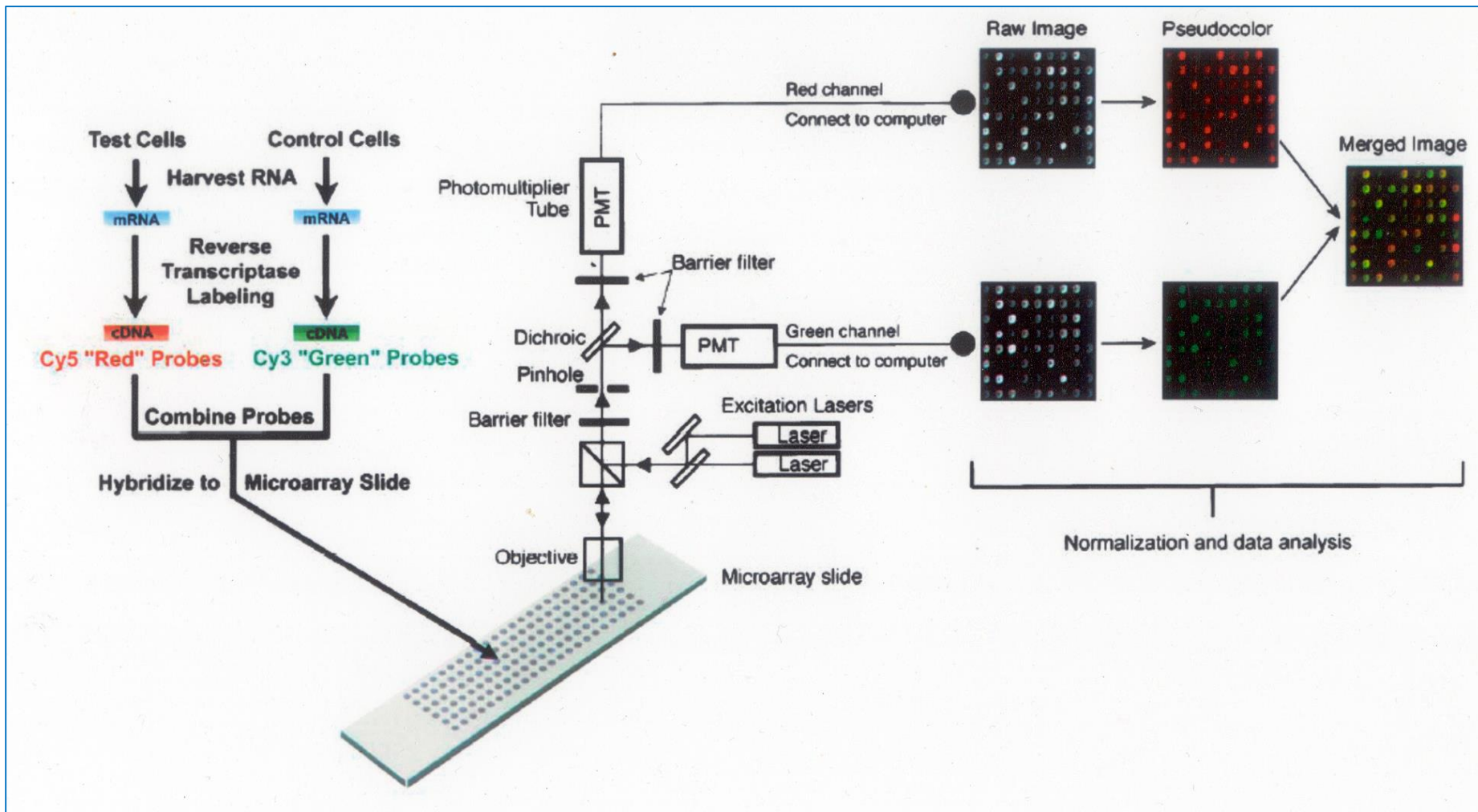
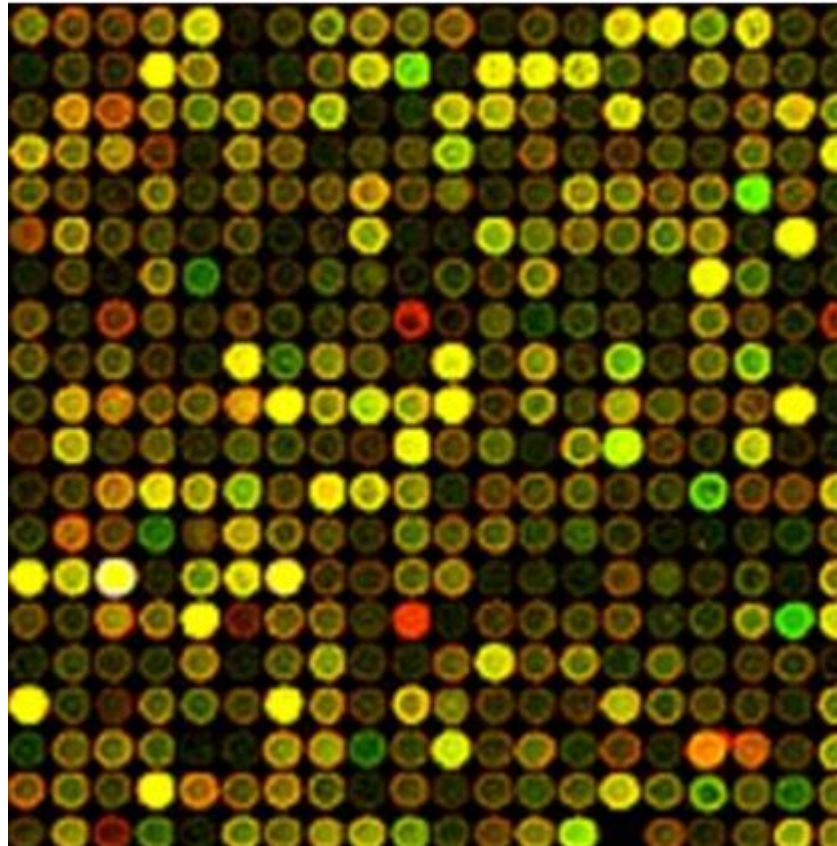


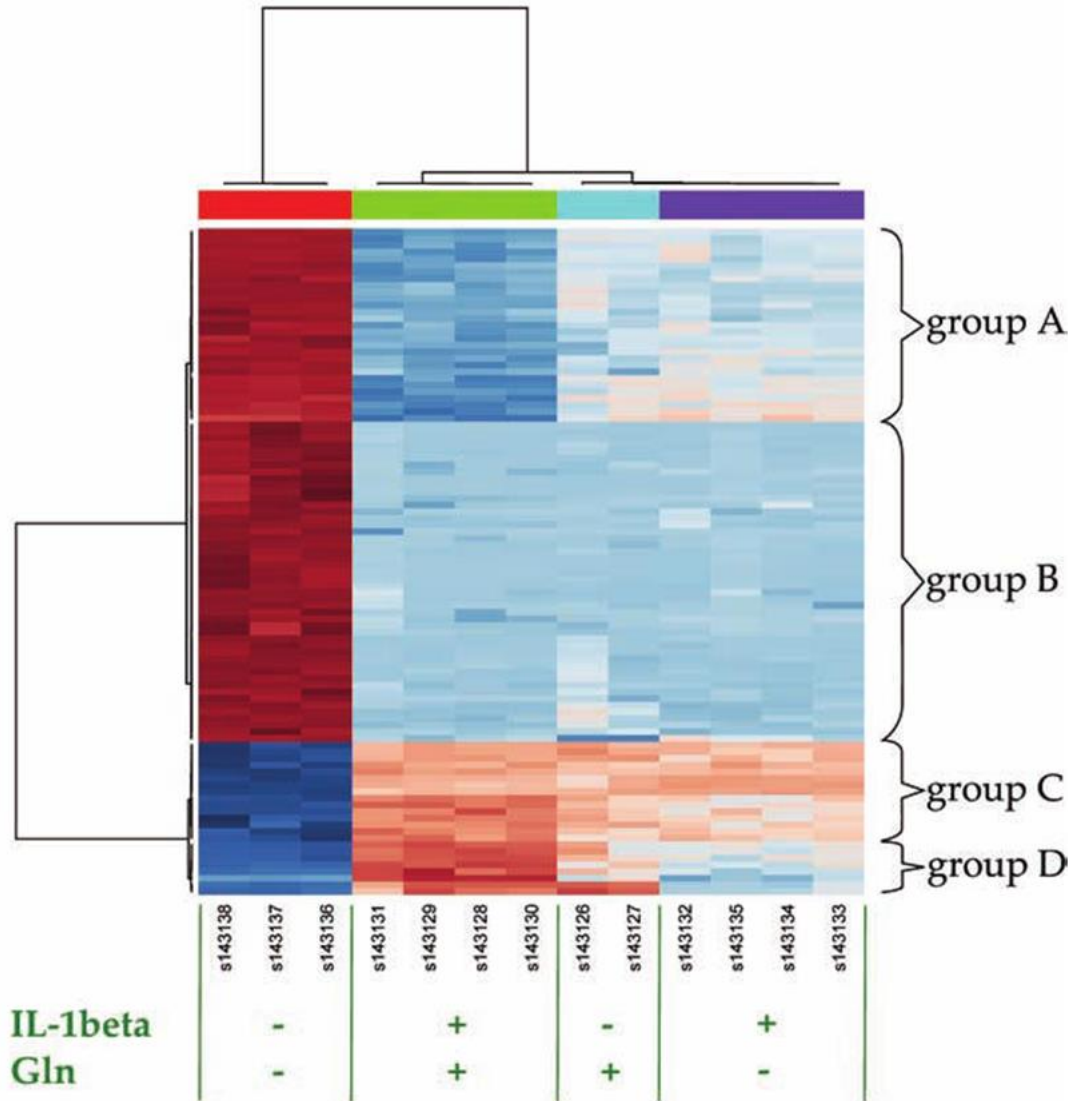
Схема сканирования ДНК-биочипа считывающим устройством



Олигонуклеотидный биочип после компьютерного псевдоокрашивания



Представление данных с помощью «тепловой карты» (heat map)



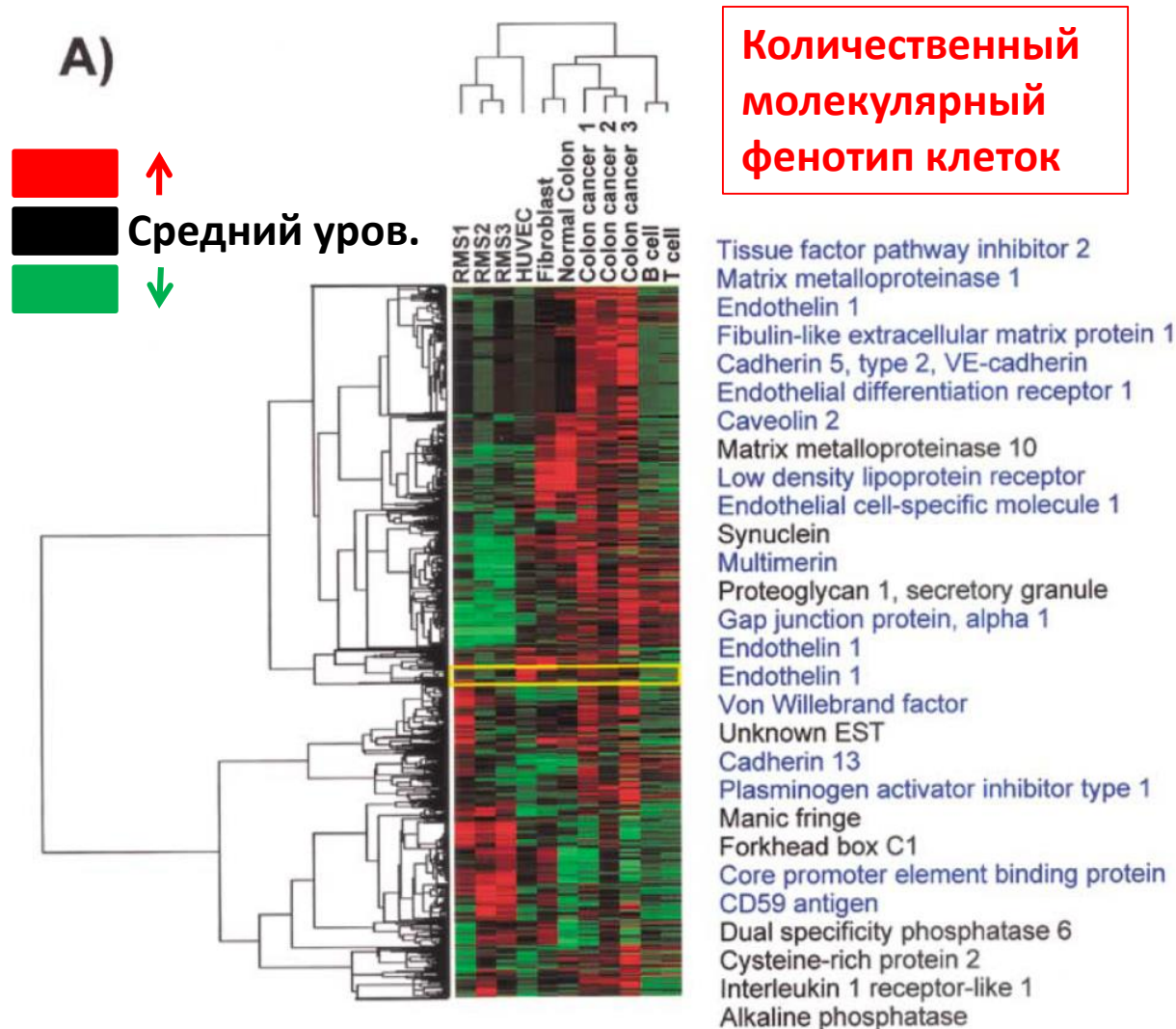
Влияние глюкозамина (*Gln*) и интерлейкина 1 β (*IL-1beta*) на транскрипцию исследуемых 100 генов в культивируемых клетках.

Красный – повышенный уровень транскрипции
Синий – пониженный уровень (абсолютные значения)

Гены сгруппированы по ответу на воздействие (+) Gln и/или IL-1 β

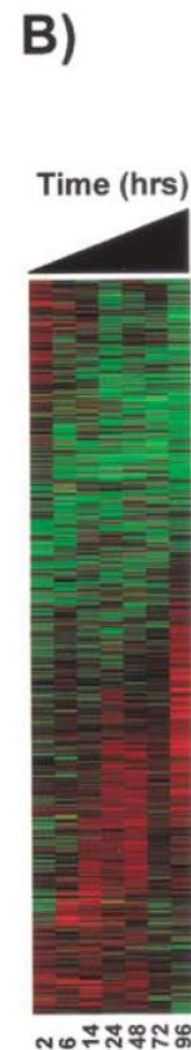
Гены – в строках, клетки – в столбцах

Исследование транскрипции с помощью биочипов



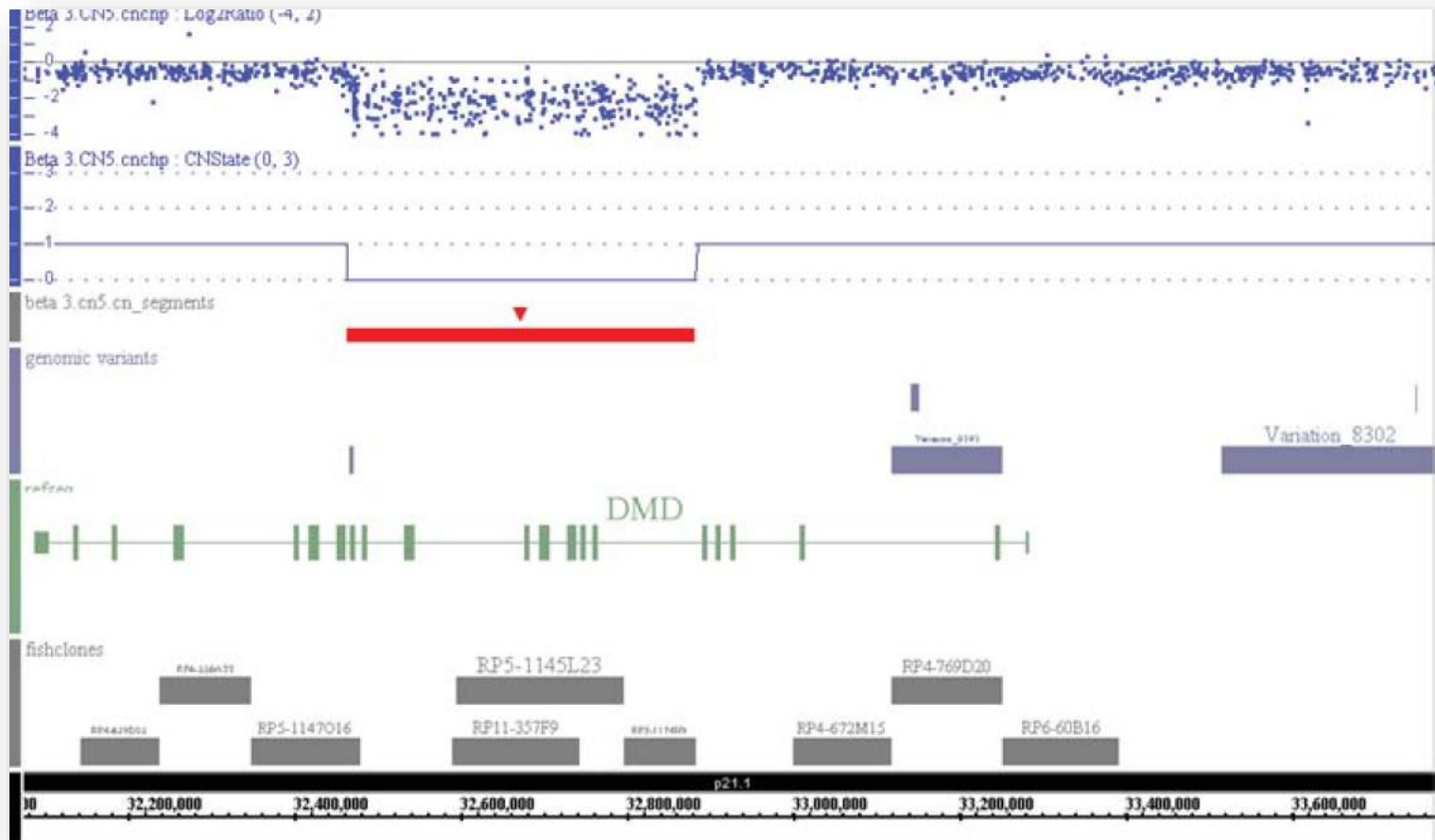
Транскрипция 4132 генов в клетках разных типов у человека. Выделены клетки эндотелия

**Количественный
молекулярный
фенотип клеток**



Клетки аденокарциномы, обработанные ингибитором

Выявление делеции длиной в 419 т.п.н. на хромосоме Хр21.1 человека с помощью биочипа Affimetrix SNP Array 6.0



Биочип содержит 1,8 млн маркеров, в том числе 900 000 зондов для индивидуальных SNP, равномерно распределенных вдоль генома человека

Дифференциальная экспрессия экзонов гена CD44 в метастазирующей опухоли (тепловая карта)

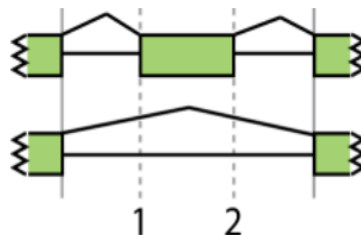
Биочип Affimetrix Exon 1.0 ST

Охвачен весь транскриптом человека:
в среднем:

4 зонда на каждый экзон и

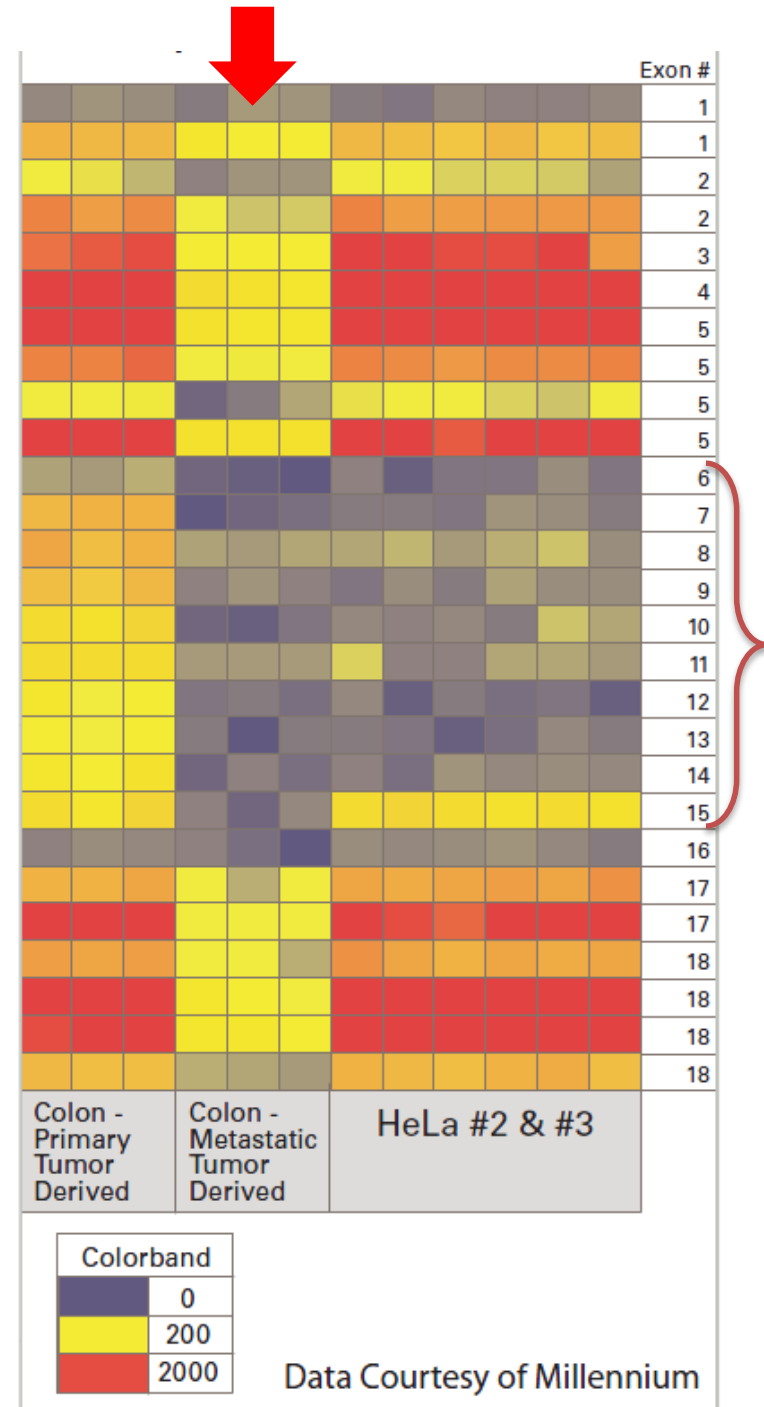
40 зондов на каждый ген по двум цепям ДНК

Нормальный сплайсинг

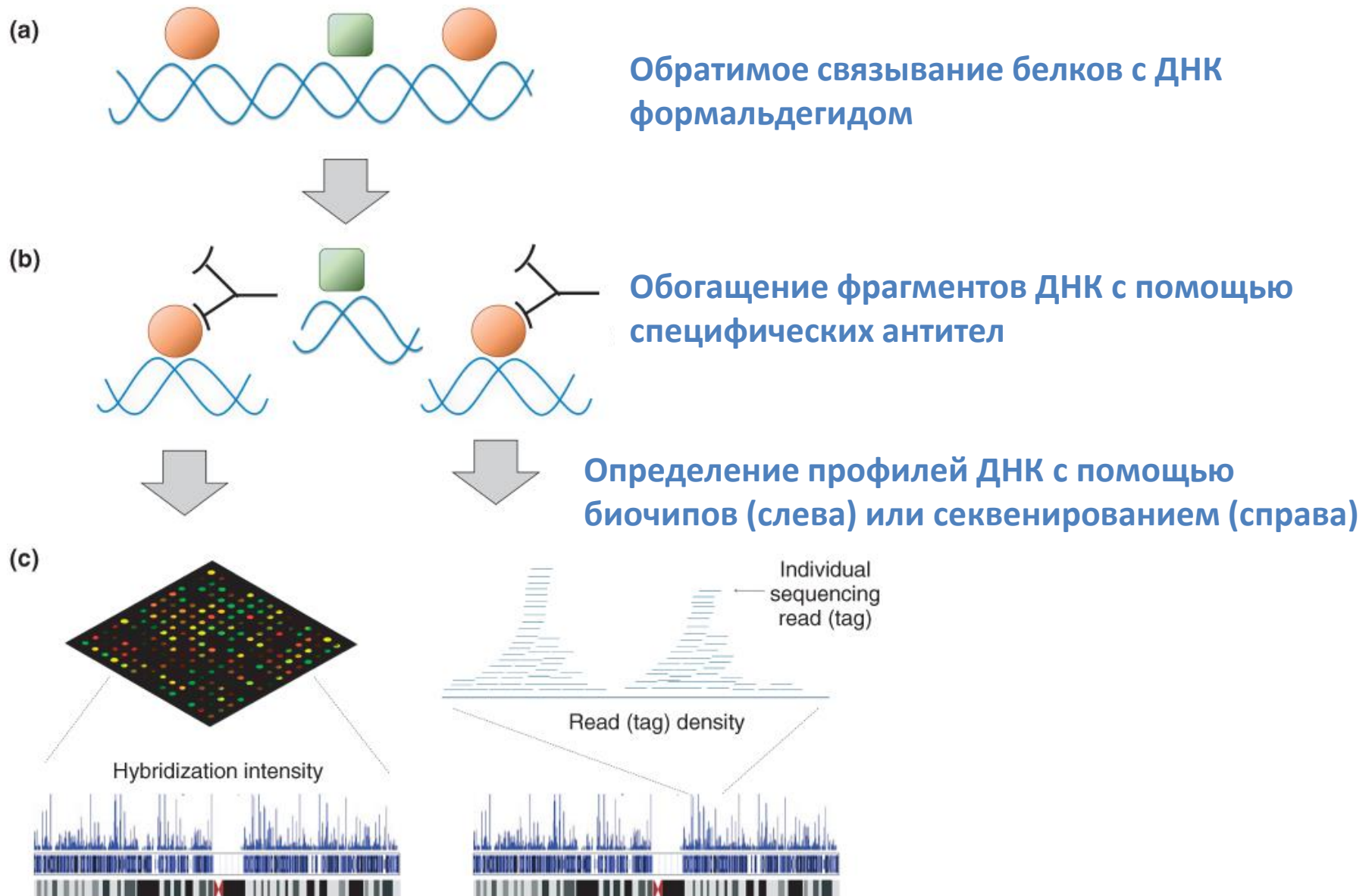


Пропуск экзона

Пропуск экзона - Exon skipping



Иммунопреципитация хроматина: исследование на биочипах (ChIP-chip) и секвенированием ДНК (ChIP-seq)



ДНК-полиморфизмы – основа генетической индивидуальности человека

- Полиморфизмы – это мутации с частотой $>1\%$
- **SNP** – (single nucleotide polymorphisms) полиморфизмы по отдельным нуклеотидам. обнаружено в геноме человека – $>15\,000\,000$ **SNV** – single nucleotide variations, $>1\,000\,000$ коротких делеций и вставок (**indels**). 20 0000 крупных перестроек хромосом.
- Геномы двух людей различаются по $\sim 3\,500\,000$ SNV, (1 SNP/180 п.н., исследовано 1000 человек). 200 000 – 500 000 редких SNV, характерных для данной семьи или клана. Клановая геномика.
- **CNV** – copy number variation (различия по числу копий участков генома)

Три способа получения микроматриц на твердой подложке. 1. Синтез *in situ*.

- ❖ 1. Твердофазный синтез в пятнах (SPOT-synthesis) (низкая плотность - 25 пятен/см²);
- ❖ 2. Параллельный синтез с использованием фотолитографической маски и чувствительных к свету защитных групп (1991 г) (размер пятен – 50 × 50 μm);
- ❖ 3. Цифровые микрозеркальные матрицы (digital micromirror array) (1999 г) (76 000 элементов, размер пятна – 16 μm²)

Три способа получения микроматриц на твердой подложке

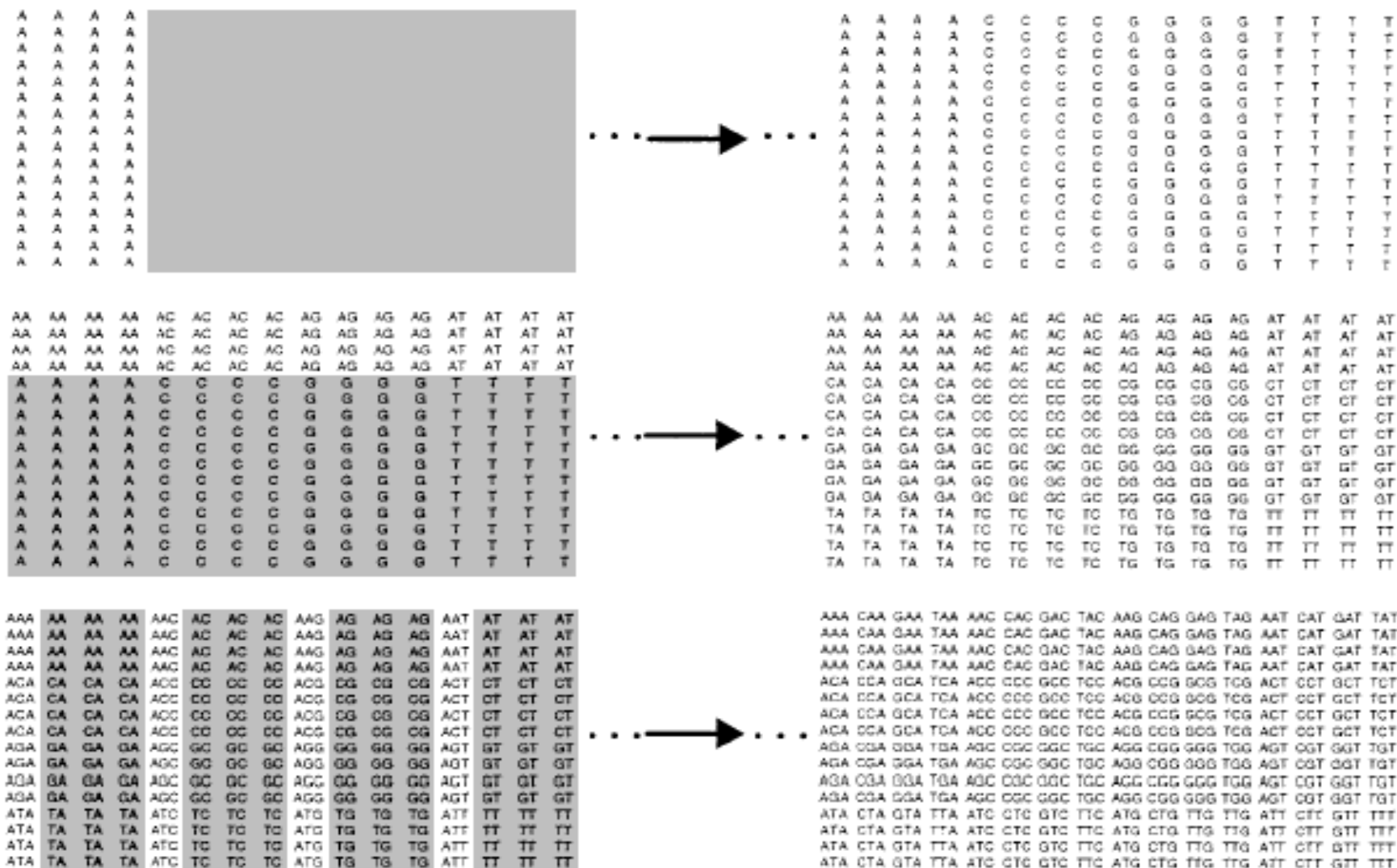
2. Химическое лигирование с помощью ковалентных связей

Альдегидные группы на поверхности стекла реагируют с первичными аминами белков с образованием Шиффовых оснований. Пятна 350 мкм с расстоянием 10 мкм между ними –

3. Нековалентное связывание с носителем

Простая сорбция как в иммуноферментных методах на поверхность аминосилана, нейлоновые и нитроцеллюлозные фильтры, трехмерные пятна в гелях; нанесение биотинилированных молекул на поверхность со стрептавидином (500 элементов в микроматрице)

Комбинаторный синтез олигонуклеотидной матрицы с использованием фотолитографической маски



За $4 \times 3 = 12$ шагов синтезированы всевозможные тринуклеотиды (81), выход 95%