

ГЕНОМ ПРО- И ЭУКАРИОТ

Лекция №3 – Методы исследования ДНК

Новосибирск 2008

ДНК

Выделение ДНК
Использование ДНК
Методы исследования ДНК



Выделение ДНК

ДНК может быть выделена из различного материала: свежего, замороженного, сушеного, фиксированного и т.д. В каждом случае подбирается соответствующий метод. Методы выделения ДНК могут значительно отличаться деталями, однако любой из них включает три стадии:

1. Гомогенизация
2. Обработка детергентом (лизис)
3. Очистка ДНК



Гомогенизация



Лизис при помощи детергентов,
чаще всего - SDS



Очистка ДНК



Использование ДНК

Молекулярно биологические исследования

Филогенетика и генеалогия

Клинические исследования

Генетическая инженерия

Криминалистика – судебно-медицинская экспертиза

Нанотехнологии – ДНК-компьютер



Методы анализа ДНК

Физико-химические методы

Цитологические методы

Биохимические и молекулярно биологические методы

Биоинформатические методы

Комплексные методы



Физико-химические методы

Рентгеновская кристаллография

Спектрофотометрия

Проточная цитометрия

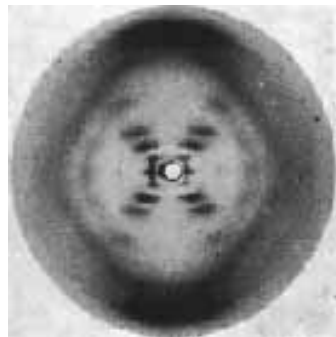
Центрифугирование в градиенте плотности

Электрофорез

Кристаллография - Дифракционная рентгенография

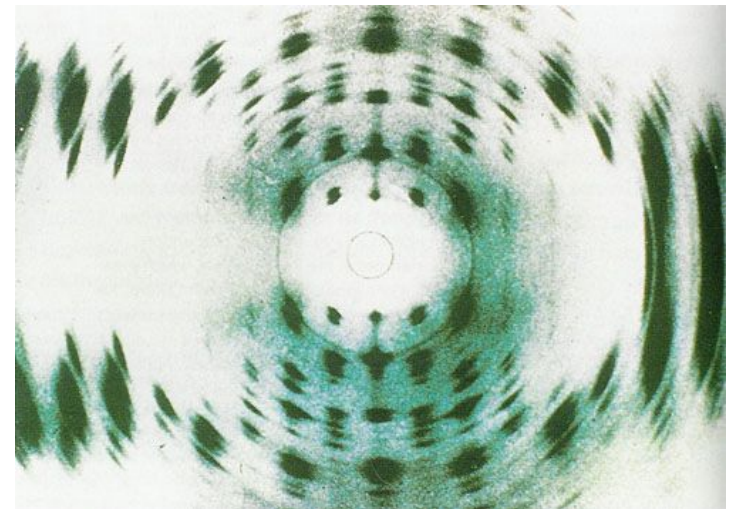
При облучении кристалла сфокусированным рентгеновским лучом на выходе получается рассеянный в результате дифракции луч с выраженными пиками яркости. По углам отклонения пиков яркости от направления исходного луча можно с большой точностью рассчитать расстояния между атомами кристаллической решетки. Этот метод называется **дифракционной рентгенографией**.

Дифракционная рентгенография — один из основных методов, используемых для расшифровки структуры биологических молекул.



Фотография 51

Рентгенограмма волокон натриевой соли тимусной ДНК в В-форме, полученная Розалин Франклин в 1952. Эта рентгенограмма послужила главным толчком к открытию двуспиральности ДНК Франклин и построению модели структуры ДНК Уотсоном и Криком.

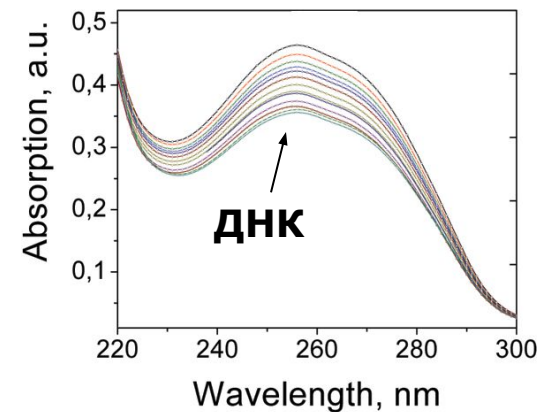
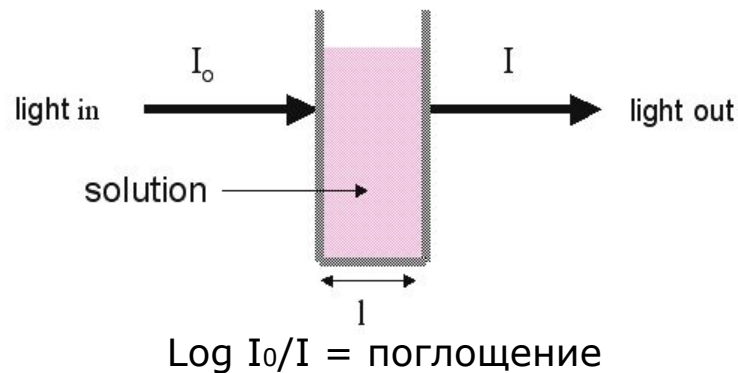


Дифракционная рентгенограмма молекулы ДНК

Поскольку ДНК имеет двуспиральную структуру - наблюдаются повторяющиеся дифракционные пики

Спектрофотометрия ДНК

Спектрофотометрия (абсорбционная) — физико-химический метод исследования растворов и твердых веществ, основанный на изучении спектров поглощения в ультрафиолетовой (200—400 нм), видимой (400—760 нм) и инфракрасной (>760 нм) областях спектра. Основная зависимость, изучаемая в спектрофотометрии — зависимость интенсивности поглощения падающего света от длины волны.



Спектрофотометрия ДНК используется в основном для определения концентрации ДНК и ее чистоты. ДНК поглощает при длине волны 260 нм. В основе современных методов секвенирования также лежит спектрофотометрия.

1 O.D. при длине волны 260 нм для двухцепочечной ДНК = 50 нг/мкл ДНК

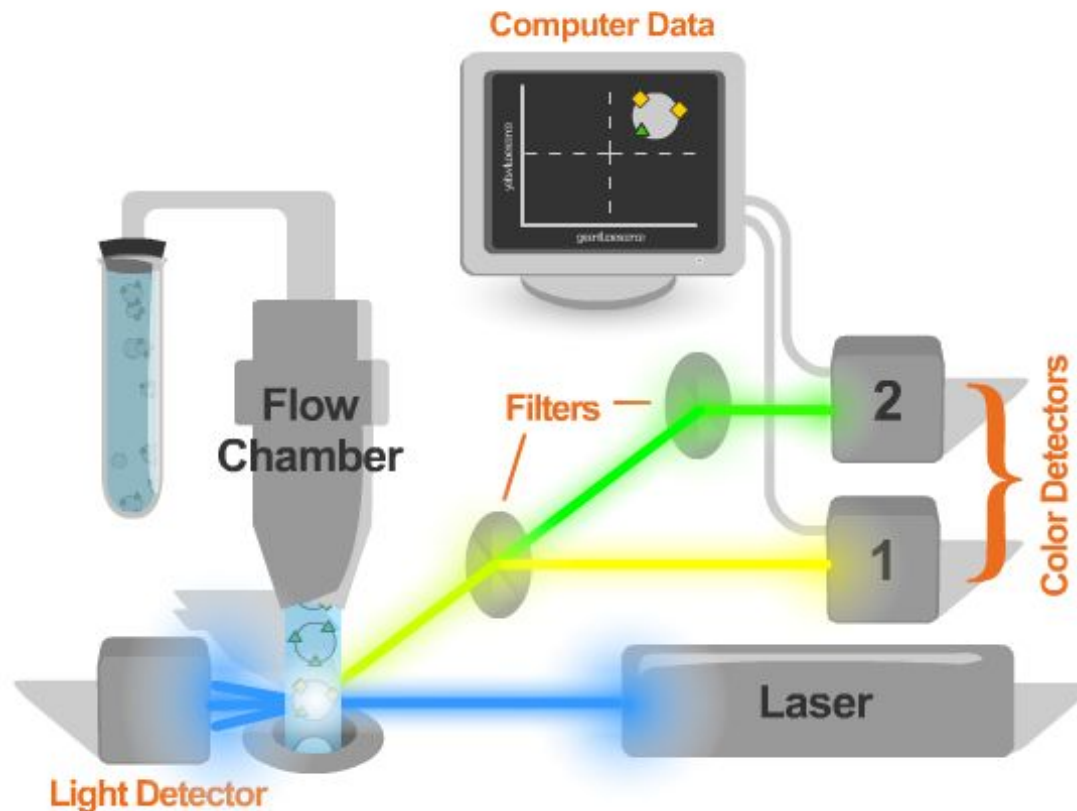
1 O.D. при длине волны 260 нм для одноцепочечной ДНК = 20-33 нг/мкл ДНК

1 O.D. при длине волны 260 нм для РНК = 40 нг/мкл РНК

Белки поглощают при длине волны 280 нм. Отношение OD_{260}/OD_{280} чистой ДНК и РНК = 1.8-2.0. При наличии примесей белков или фенола отношение OD_{260}/OD_{280} будет значительно ниже 1.8-2.0

Проточная цитометрия ДНК

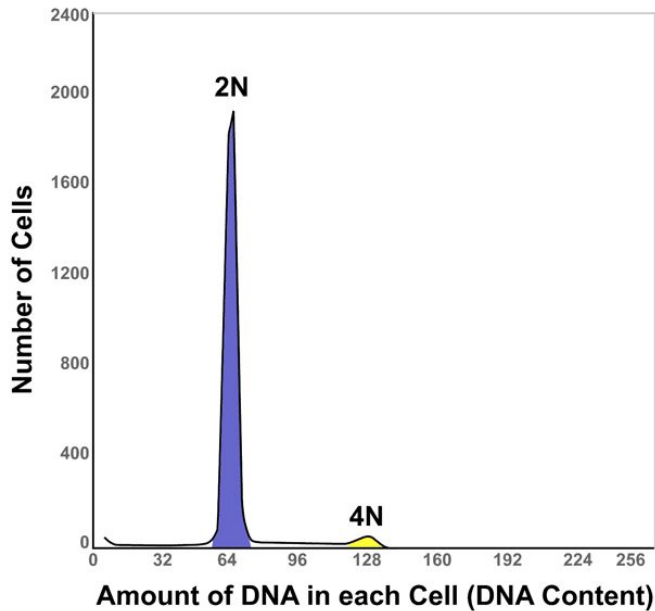
Проточная цитометрия – метод, позволяющий проводить подсчет, сортировку, фракционирование и оптический анализ микроскопических частиц в потоке жидкости. Проточная цитометрия широко используется в цитологии, иммунологии, микробиологии.



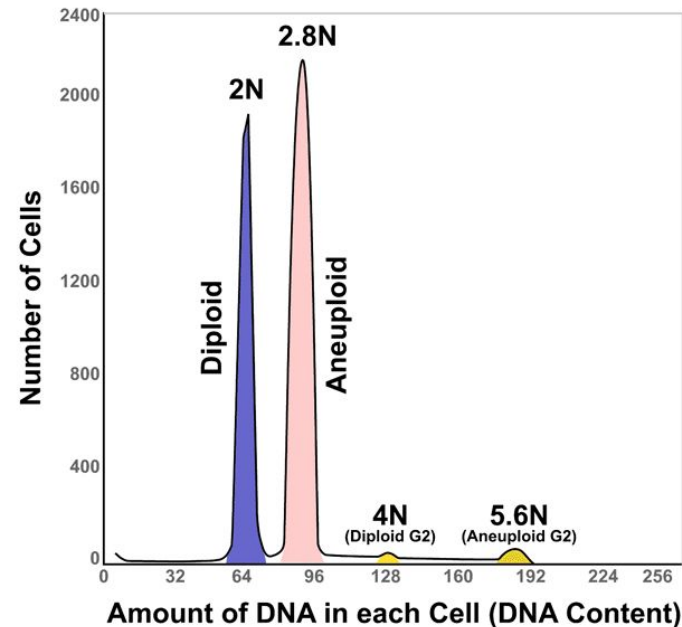
Общая схема устройства сканирующего проточного цитометра

Проточная цитометрия ДНК

В исследованиях ДНК проточная цитометрия используется в основном для определения размера генома и ploidy (в частности, в клинических тестах).



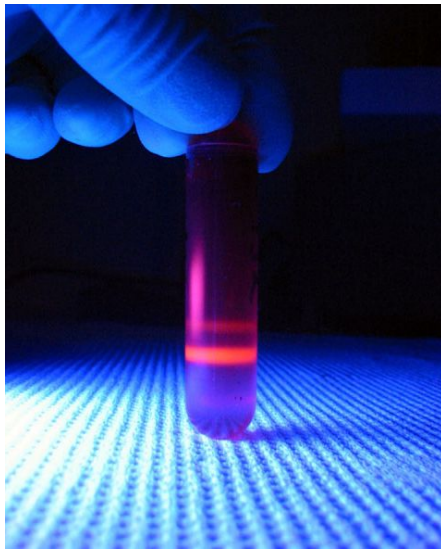
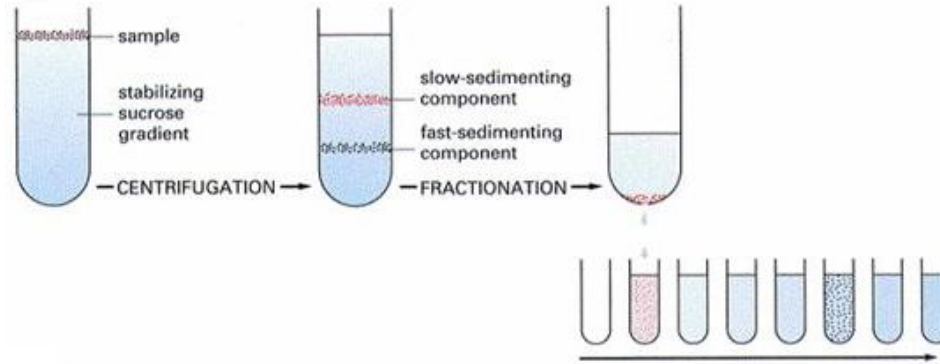
Типичная гистограмма биопсии клеток пищевода. Большинство представлены в виде диплоидных клеток, около 3.4% клеток – тетраплоиды.



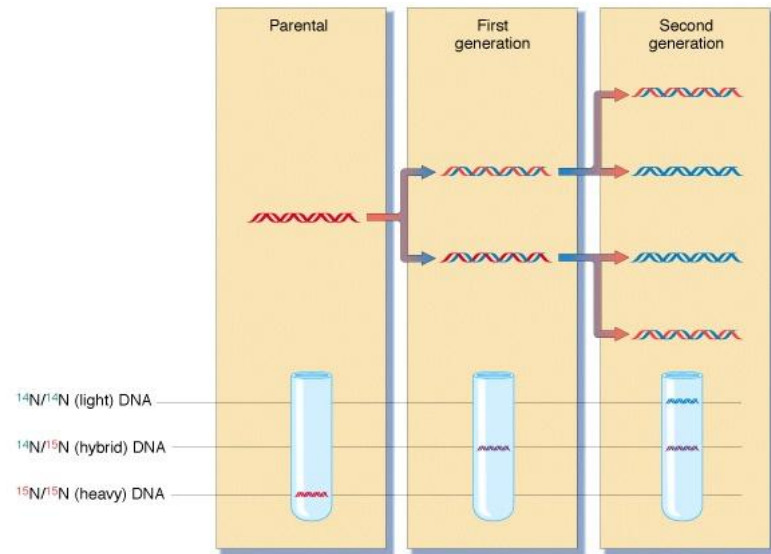
Исследование ткани пищевода после биопсии – большое количество анеуплоидных клеток свидетельствует о высоком риске возникновения дисплазии или рака.

Центрифугирование в градиенте плотности

Градиентное центрифугирование, как и проточная цитометрия, позволяет проводить фракционирование микроскопических частиц и молекул ДНК.



Центрифугирование в градиенте плотности CsCl

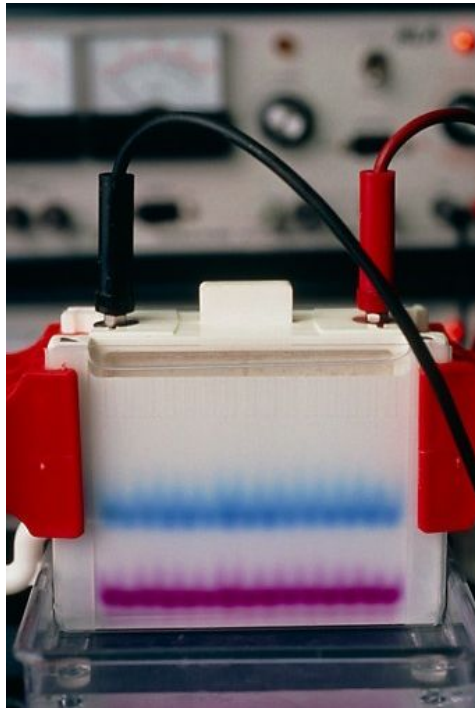


В знаменитом опыте, использованном для доказательства полуконсервативности репликации ДНК, было использовано центрифугирование в градиенте плотности CsCl

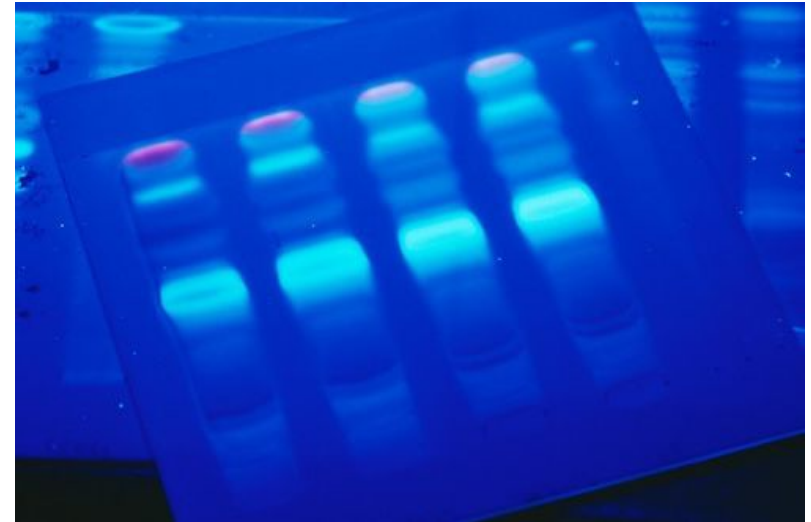
Зональный электрофорез ДНК

Электрофорез - это один из видов направленных движений заряженных частиц коллоидных систем в жидкой среде под действием внешнего электрического поля.

Наиболее широкое распространение нашли электрофоретические методы с использованием инертных носителей (бумаги, гелей и др.), получившие общее название **зонального электрофореза**, т. к. фракции разделяемых веществ образуют в толще носителя отдельные, несмешивающиеся зоны.



Вертикальный электрофорез в агарозном геле.



Электрофорез ДНК в агарозном геле.



Цитологические методы

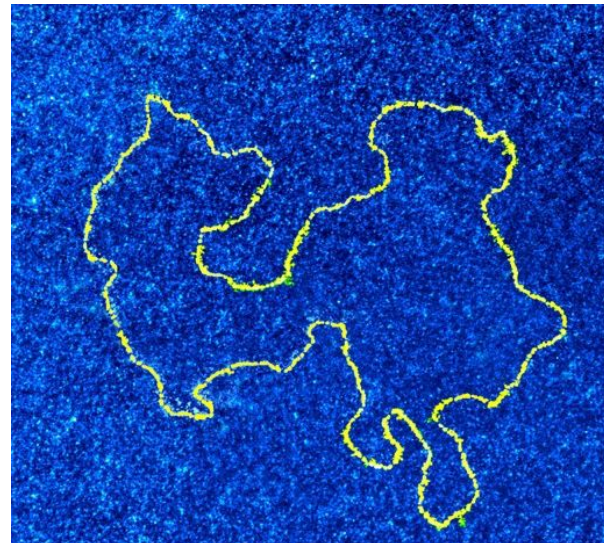
Световая микроскопия
Электронная микроскопия
Гибридизация *in situ*

Цитологические методы

Политенные хромосомы видны в световой микроскоп



Современная электронная микроскопия дает возможности "разглядеть" макромолекулы

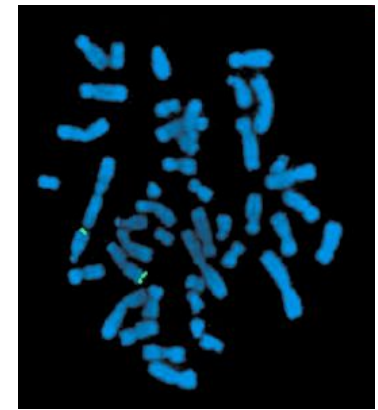
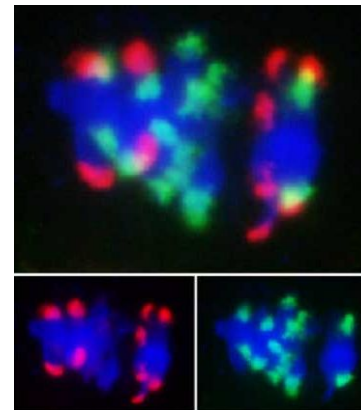
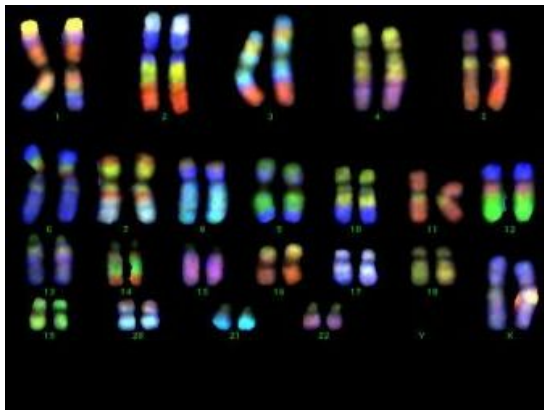


Кольцевая
бактериальная ДНК

Цитологические методы - FISH

Гибридизация *in situ* позволяет определить, в каком сегменте хромосомы расположен соответствующий маркер. Флуоресцентная гибридизация *in situ* позволяет одновременно картировать несколько различно окрашенных маркеров ДНК, а гибридизация в период интерфазы - определить порядок маркеров в отдельных участках хромосомы. С помощью этого метода удается надежно выявить хромосомные аномалии.

Препараты фиксированных хромосом гибридизуют (инкубируют при повышенной температуре с последующим охлаждением) с исследуемыми последовательностями нуклеотидов, мечеными радиоактивной, флуоресцентной или иной меткой. После отмытия несвязавшейся метки оставшиеся меченые молекулы нуклеиновых кислот оказываются ассоциированными с участками хромосом, содержащими последовательности, комплементарные исследуемым меченым последовательностям нуклеотидов. Полученные гибриды анализируют с помощью микроскопа либо непосредственно, либо после автордиографии. Для этой группы методов характерна более высокая разрешающая способность, чем для гибридизации соматических клеток, поскольку они позволяют локализовать изучаемые последовательности нуклеотидов на хромосомах.





Биохимические и молекулярно биологические методы

Рестрикция

Клонирование

Полимеразная цепная реакция

Секвенирование

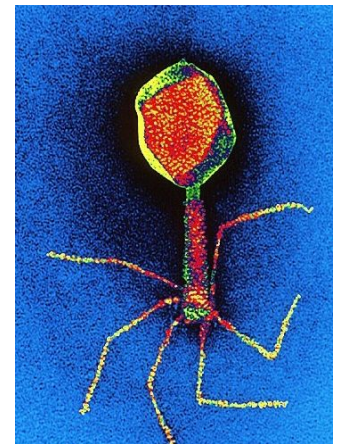
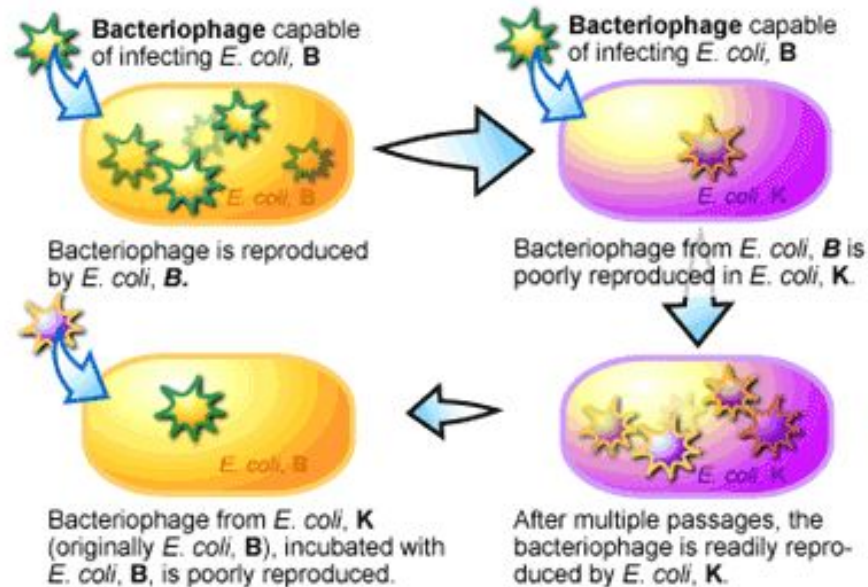
Гибридизация

Обратная транскрипция

Рестрикция

Рестрикция – процесс расщепления чужеродной молекулы ДНК под действием специфических бактериальных ферментов – эндонуклеаз рестрикции или рестриктаз. Термин «рестрикция» (т.е. ограничение) указывает на то, что данный процесс ограничен чужеродной молекулой, в то время как ДНК клетки-хозяина не расщепляется благодаря наличию специфических защитных механизмов.

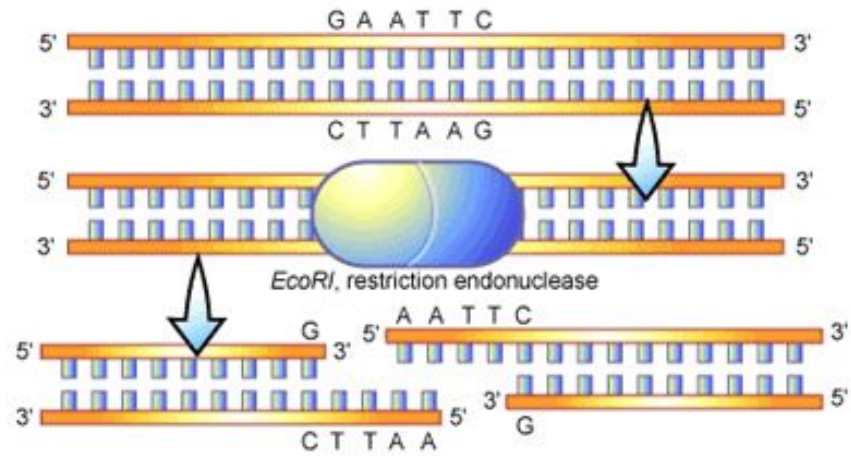
Эндонуклеазы рестрикции были обнаружены у бактерий. Рестрикция служит защитным механизмом бактерий против бактериофагов.



Бактериофаг

Бактериофаги способны заражать определенный штамм бактерий, но из-за рестрикции не способен поражать другой штамм. Однако через несколько пассажей бактериофаг может приобрести "иммунитет".

Рестрикция



Эндонуклеазы рестрикции узнают определенные сайты в последовательности ДНК – полиндромы.

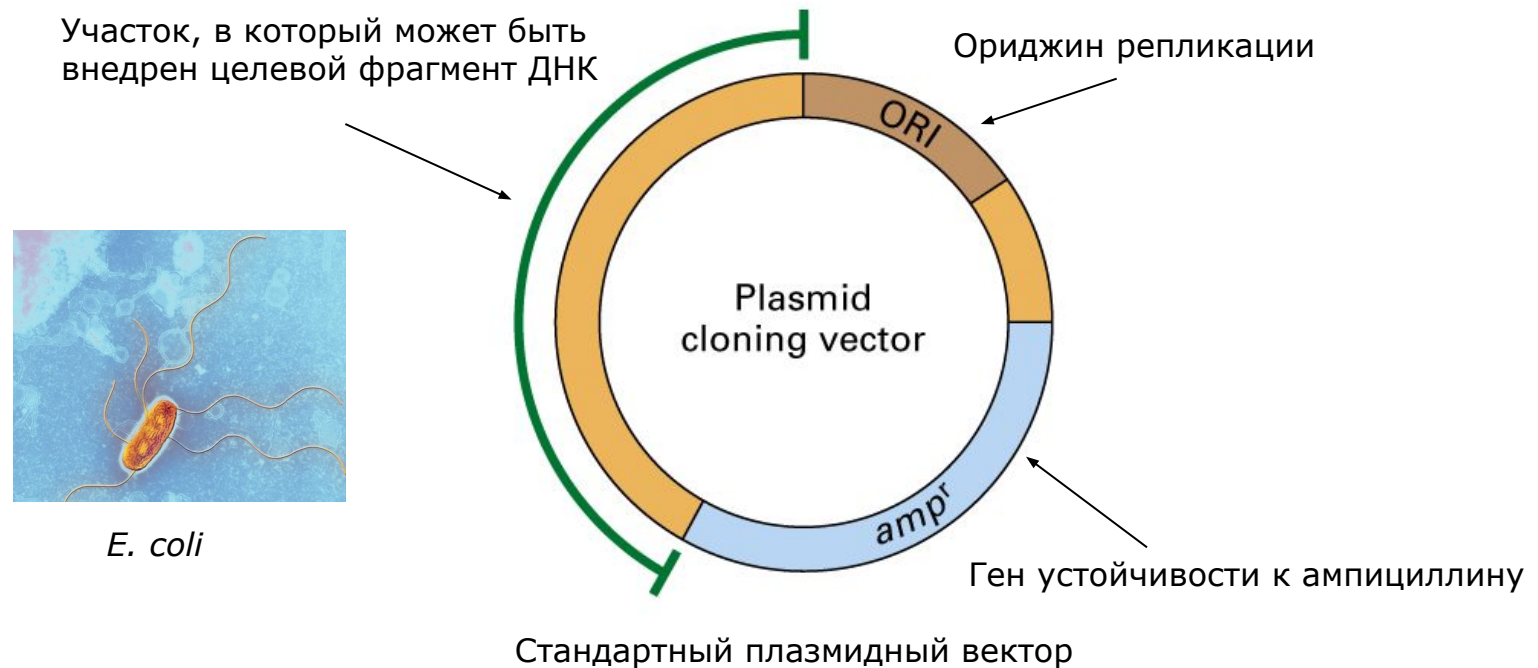
Клонирование

Клонирование – метод получения нескольких идентичных организмов путем бесполого (в том числе вегетативного) размножения. Таким способом на протяжении миллионов лет размножаются в природе многие виды растений и животных.

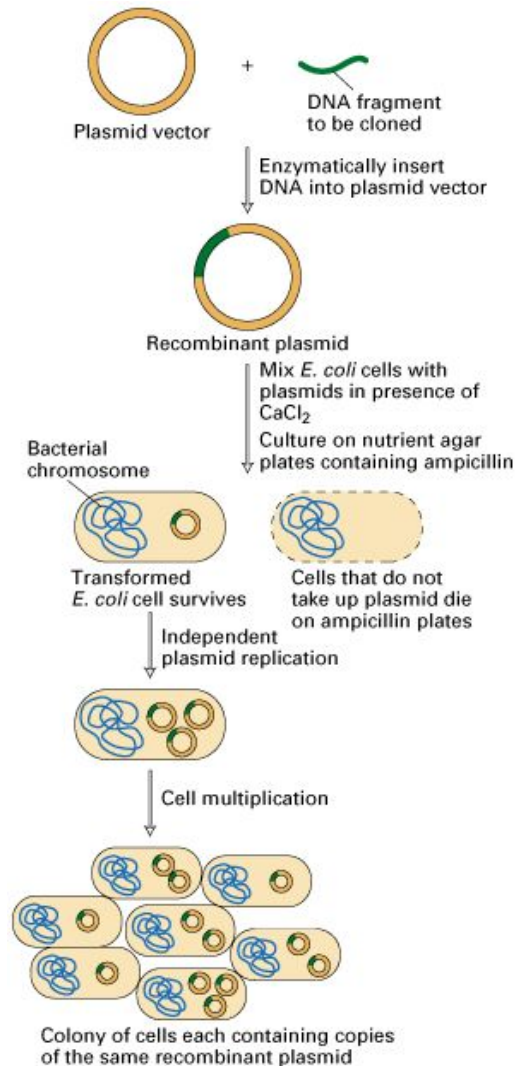
Однако сейчас термин «клонирование» обычно используется в более узком смысле и означает копирование клеток, генов, антител и даже многоклеточных организмов в лабораторных условиях.

Клонирование фрагментов ДНК в бактериальных клетках (в первую очередь – *E. coli*) один из основных методов современной генной инженерии.

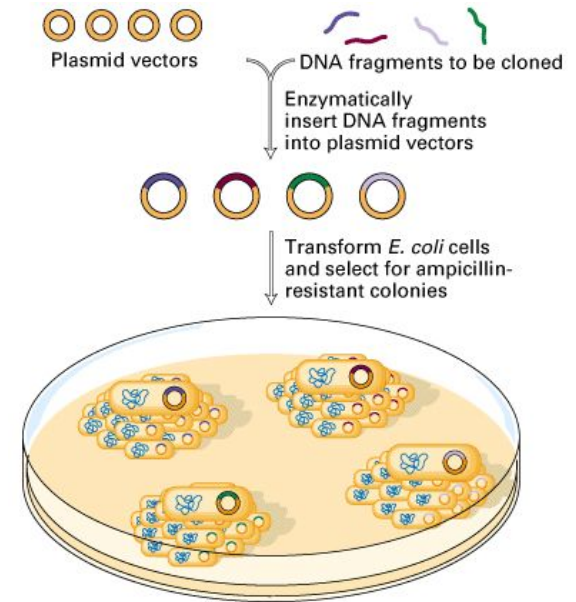
Для клонирования используют специальные векторы.



Клонирование – плазмидный вектор



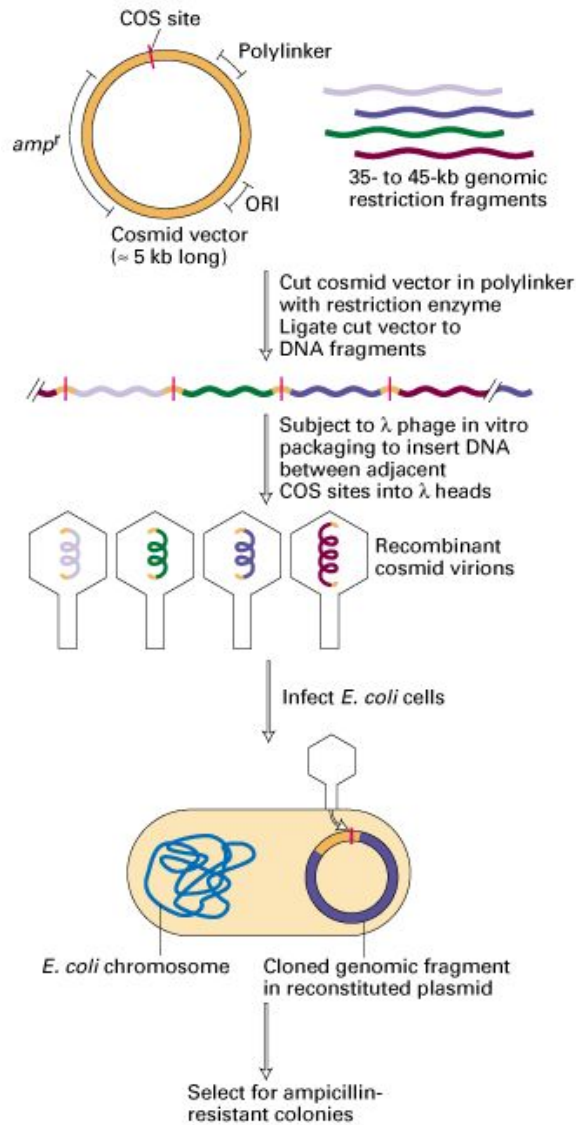
Общая схема клонирования в плазмидном векторе



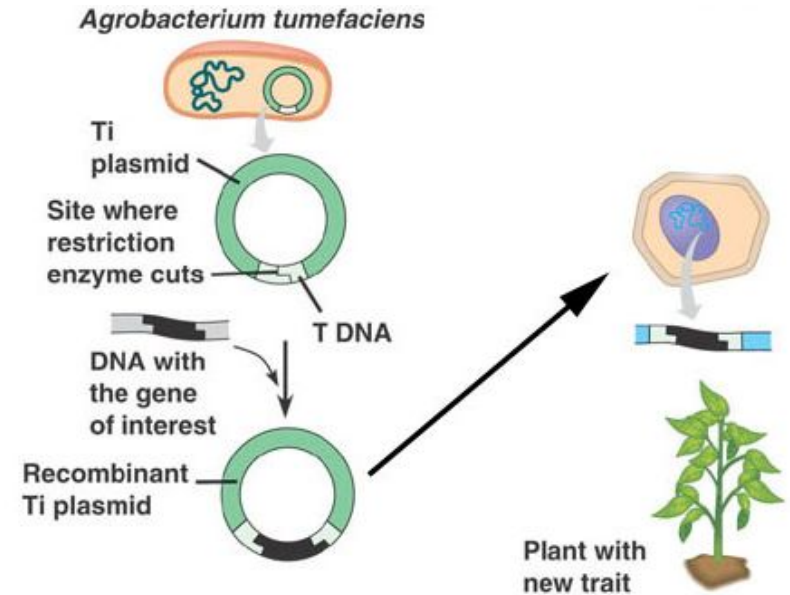
Колонии *E. coli* на селективной среде



Клонирование – другие векторы



Клонирование с использованием бактериофага



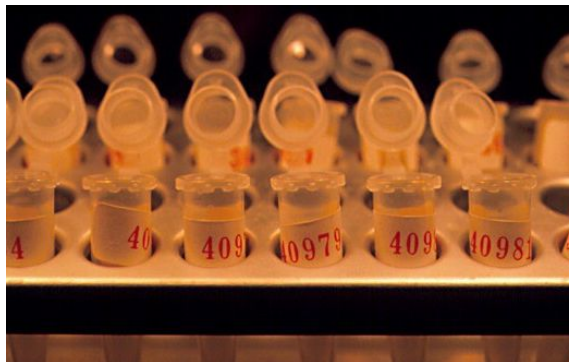
Клонирование с применением Ti плазмиды позволяет использовать один и тот же вектор для клонирования фрагментов ДНК в бактериях и получения трансгенных растений.

Полимеразная цепная реакция

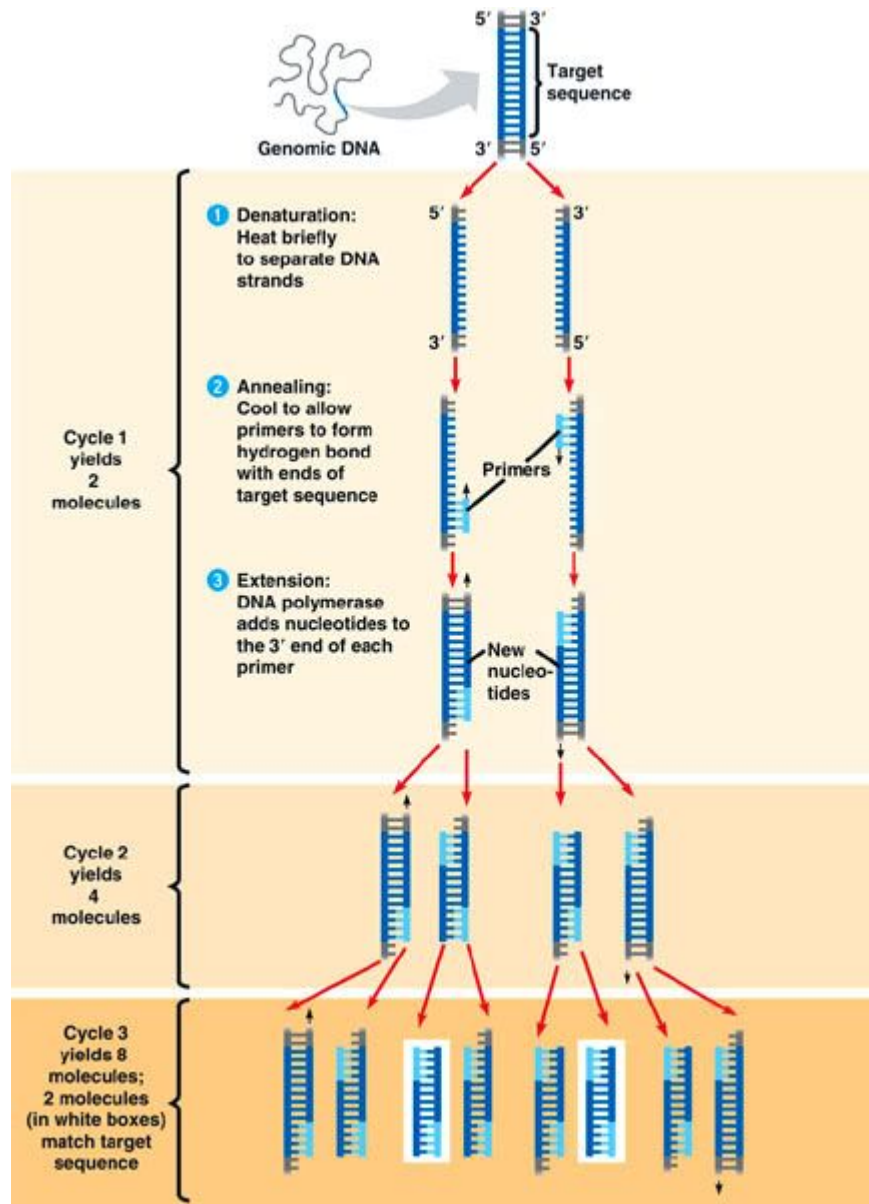
Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе).

Помимо простого увеличения числа копий ДНК (этот процесс называется амплификацией), ПЦР позволяет производить множество других манипуляций с генетическим материалом (введение мутаций, сращивание фрагментов ДНК) и широко используется в биологической и медицинской практике, например, для диагностики заболеваний (наследственных, инфекционных), для установления отцовства, для клонирования генов, выделения новых генов.

В начале 1970-х годов норвежскому ученому Къеллу Клеппе пришла в голову мысль, что можно амплифицировать ДНК с помощью пары коротких одноцепочечных молекул ДНК — синтетических праймеров. Однако в то время эта идея осталась неостребованной. Полимеразная цепная реакция была вновь открыта в 1983 году Кери Маллисом. Его целью было создание метода, который бы позволил амплифицировать ДНК в ходе многократных последовательных удвоений исходной молекулы ДНК с помощью фермента ДНК-полимеразы. Через 7 лет после опубликования этой идеи, в 1993 г., Маллис получил за неё Нобелевскую премию.



Полимеразная цепная реакция



Общая сема ПЦР

Для проведения ПЦР в простейшем случае требуются следующие компоненты:

ДНК-матрица, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать.

Два праймера, комплементарные концам требуемого фрагмента.

Термостабильная ДНК-полимераза — фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК. Полимераза для использования в ПЦР должна сохранять активность при высокой температуре длительное время, поэтому используют ферменты, выделенные из термофилов — *Thermus aquaticus* (Taq-полимераза), *Pyrococcus furiosus* (Pfu-полимераза), *Pyrococcus woesei* (Pwo-полимераза) и другие.

Дезоксинуклеотидтрифосфаты (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).

Ионы Mg^{2+} , необходимые для работы полимеразы.

Буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции — pH, ионную силу раствора. Содержит соли, бычий сывороточный альбумин.

Полимеразная цепная реакция

«Вложенная» ПЦР (Nested PCR) — применяется для уменьшения числа побочных продуктов реакции. Используют две пары праймеров и проводят две последовательные реакции. Вторая пара праймеров амплифицирует участок ДНК внутри продукта первой реакции.

«Инвертированная» ПЦР (Inverse PCR) — используется в том случае, если известен лишь небольшой участок внутри нужной последовательности. Этот метод особенно полезен, когда нужно определить соседние последовательности после вставки ДНК в геном. Для осуществления инвертированной ПЦР проводят ряд разрезов ДНК рестриктазами с последующим соединением фрагментов (лигирование). В результате известные фрагменты оказываются на обоих концах неизвестного участка, после чего можно проводить ПЦР как обычно.

ПЦР с обратной транскрипцией (Reverse Transcription PCR, RT-PCR) — используется для амплификации, выделения или идентификации известной последовательности из библиотеки РНК. Перед обычной ПЦР проводят на матрице мРНК синтез одноцепочечной молекулы ДНК с помощью ревертазы и получают одноцепочечную кДНК, которая используется в качестве матрицы для ПЦР. Этим методом часто определяют, где и когда экспрессируются данные гены.

Ассиметричная ПЦР (Asymmetric PCR) — проводится тогда, когда нужно амплифицировать преимущественно одну из цепей исходной ДНК. Используется в некоторых методиках секвенирования и гибридного анализа. ПЦР проводится как обычно, за исключением того, что один из праймеров берется в большом избытке.

Количественная ПЦР (Quantitative PCR, Q-PCR) — используется для быстрого измерения количества определенной ДНК, кДНК или РНК в пробе. Количественная ПЦР в реальном времени (Quantitative real-time PCR) — в этом методе используют флуоресцентно меченые реагенты для точного измерения количества продукта реакции по мере его накопления.

Полимеразная цепная реакция

Touchdown (Stepdown) ПЦР (Touchdown PCR) — с помощью этого метода уменьшают влияние неспецифического связывания праймеров на образование продукта. Первые циклы проводят при температуре выше температуры отжига, затем каждые несколько циклов температуру снижают. При определённой температуре система пройдёт через полосу оптимальной специфичности праймеров к ДНК.

Метод молекулярных колоний (ПЦР в геле, Colony - PCR Colony) — акриламидный гель полимеризуют со всеми компонентами ПЦР на поверхности и проводят ПЦР. В точках, содержащих анализируемую ДНК, происходит амплификация с образованием молекулярных колоний.

ПЦР длинных фрагментов (Long-range PCR) — модификация ПЦР для амплификации протяженных участков ДНК (10 тысяч оснований и больше). Используют две полимеразы, одна из которых — Taq-полимераза с высокой процессивностью (то есть, способная за один проход синтезировать длинную цепь ДНК), а вторая — ДНК полимераза с 3'-5' эндонуклеазной активностью. Вторая полимераза необходима для того, чтобы корректировать ошибки, внесенные первой.

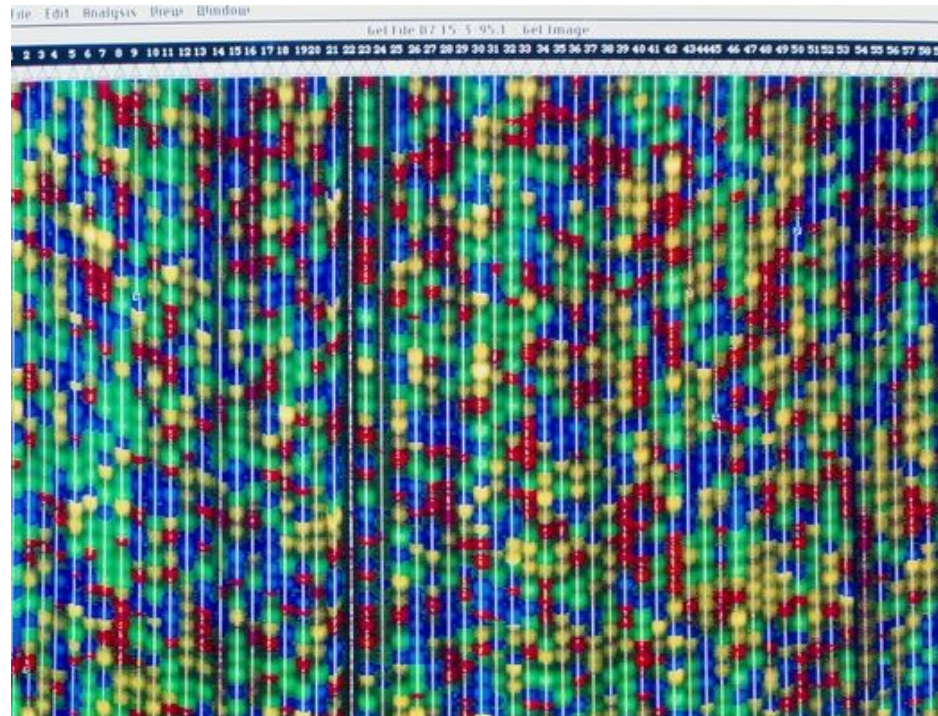
RAPD PCR (Random Amplification of Polymorphic DNA PCR, ПЦР со случайной амплификацией полиморфной ДНК) — используется тогда, когда нужно различить близкие по генетической последовательности организмы, например, разные сорта культурных растений, породы собак или близкородственные микроорганизмы. В этом методе обычно используют один праймер небольшого размера (20 — 25 п.н.). Этот праймер будет частично комплементарен случайным участкам ДНК исследуемых организмов. Подбирая условия (длину праймера, его состав, температуру и пр.), удастся добиться удовлетворительного отличия картины ПЦР для двух организмов.

И многие другие...

Секвенирование

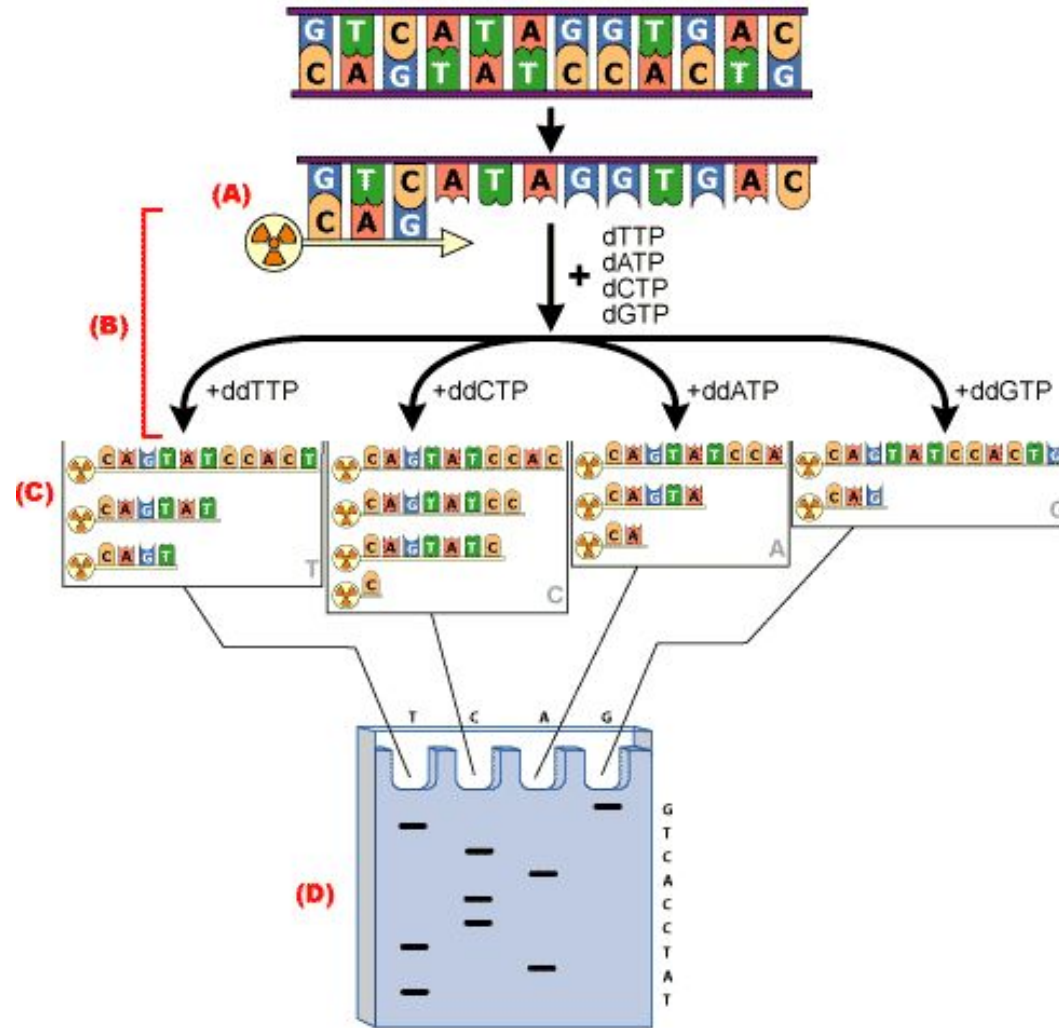
Секвенирование биополимеров (белков и нуклеиновых кислот — ДНК и РНК) — определение их первичной аминокислотной или нуклеотидной последовательности.

Для секвенирования применяются методы Эдмана, Сэнгера и другие; в настоящее время для секвенирования нуклеиновых кислот обычно применяется метод Сэнгера с дидезоксинуклеозидтрифосфатами (ddNTP). Перед собственно секвенированием с помощью ПЦР проводят амплификацию ДНК участка, последовательность которого требуется определить, или клонируют в плазмидном векторе. Это позволяет увеличить количество ДНК в образце и, таким образом, определить последовательность большей длины.



Секвенирование – по Сэнгеру

Секвенирование по Сэнгеру с меченым праймером

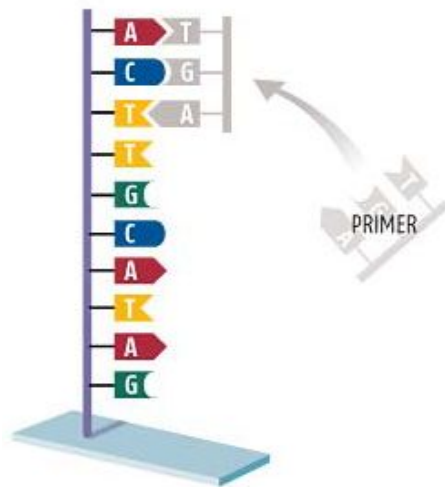


Секвенирование по Сэнгеру не единственный метод секвенирования, существующий на сегодняшний день.

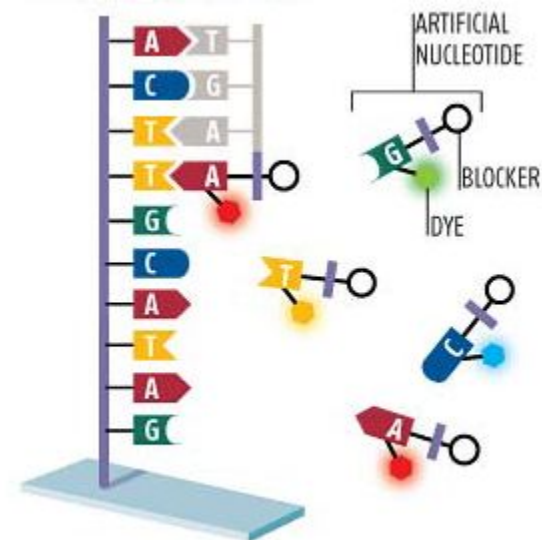
Секвенирование – letter by letter

Метод “буква за буквой” (letter by letter) позволяет осуществлять секвенирование молекул длиной до 2 Гб за один рабочий день, то есть геном человека мог бы быть секвенирован за два неполных рабочих дня, а не за 12 лет.

1. Одноцепочечная молекула ДНК иммобилизуется на чипе, в раствор добавляется праймер.

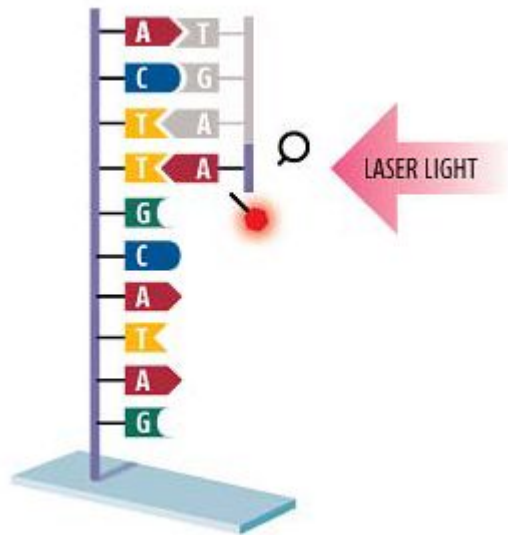


2. Запускается полимеразная реакция. В качестве субстрата для реакции используются синтетические дезоксинуклеотиды, которые помечены флуоресцирующей группой и блокером. Блокер не позволяет проводить дальнейшую полимеризацию.

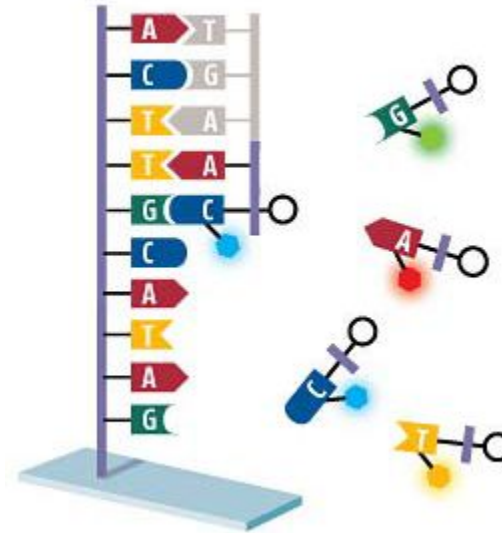


Секвенирование – letter by letter

3. Флуоресцентная метка и блокер удаляются при облучении молекулы лазером.



4. Синтез продолжается.



Единственный серьезный недостаток метод "буква за буквой" - стоимость.

Стоимость прибора составляет - \$1,350,000 USD

Стоимость реактивов для одной "реакции" - \$18,000 USD

HeliScope™ Single Molecule Sequencer

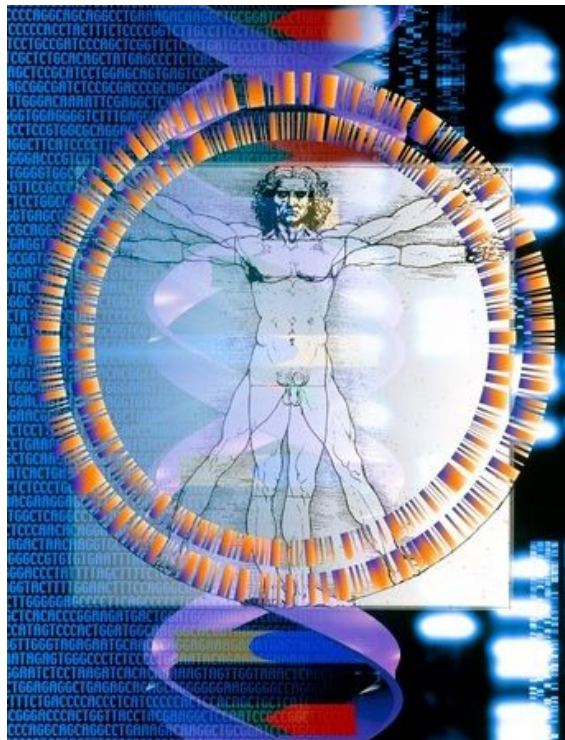


Секвенирование

Существуют и другие методы секвенирования.

Например, секвенирование при помощи электронного сканирующего микроскопа. Разрабатывается метод секвенирования при помощи нанотрубок, через которые предполагается протягивать молекулу ДНК и по разности детектируемых потенциалов устанавливать последовательность. Использование так называемых "наноножей" и др. Множество методов находятся на стадии разработки.

Предполагается, что в ближайшем будущем стоимость секвенирования целого генома человека можно будет свести до \$10,000 USD, а потом и до \$1,000 USD. Эра индивидуальных геномов не за горами.



Гибридизация

Если водный раствор ДНК нагреть до 100°C или повысить pH до 13, то ДНК диссоциирует на 2 цепи (денатурирует), так как комплементарные связи между основаниями разрушаются. В 1961 году было обнаружено, что этот процесс обратим: выдерживание ДНК при температуре 65°C вело к восстановлению структуры двойной спирали. Этот процесс называется ренатурация или гибридизация. Процессы гибридизации происходят между любыми одинарными цепями, если они комплементарны: ДНК - ДНК, РНК - РНК, ДНК - РНК.

Для теста необходимо иметь чистый одноцепочечный фрагмент ДНК, комплементарный той последовательности, которую необходимо обнаружить. Этот фрагмент получают либо клонированием, либо путем химического синтеза. Одноцепочечная ДНК, используемая в качестве индикатора, называется ДНК-зонд.

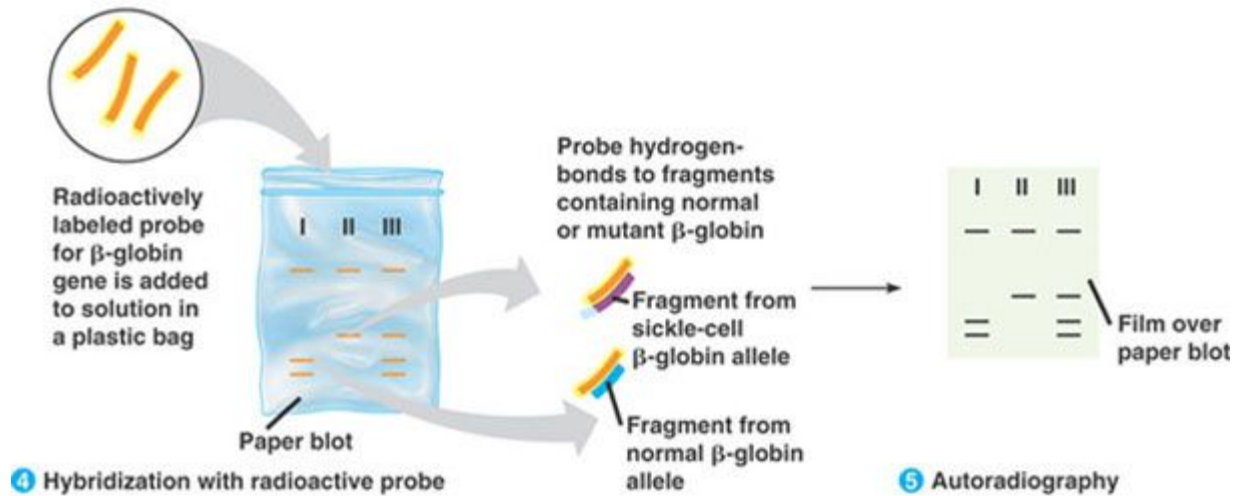
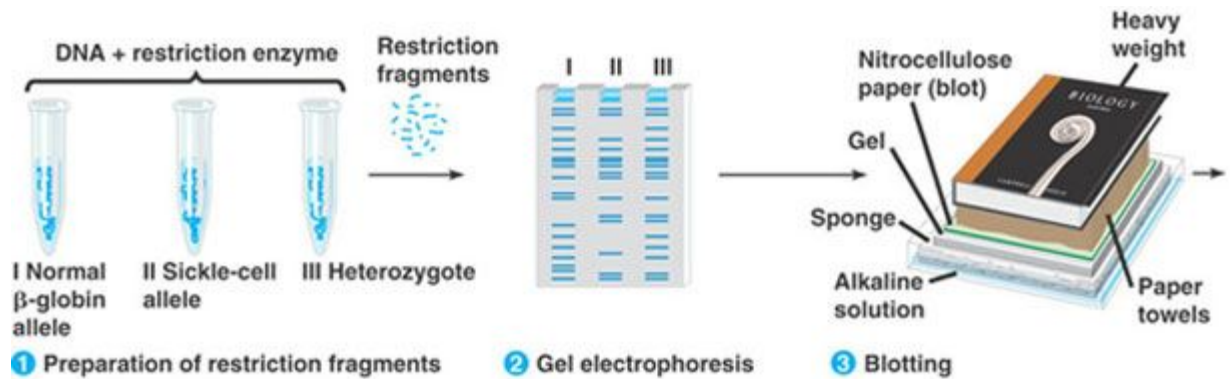
Гибридизация по Саузерну – Саузерн блоттинг

Гибридизация-скрининг – геномные библиотеки, техника микроэреев и др.

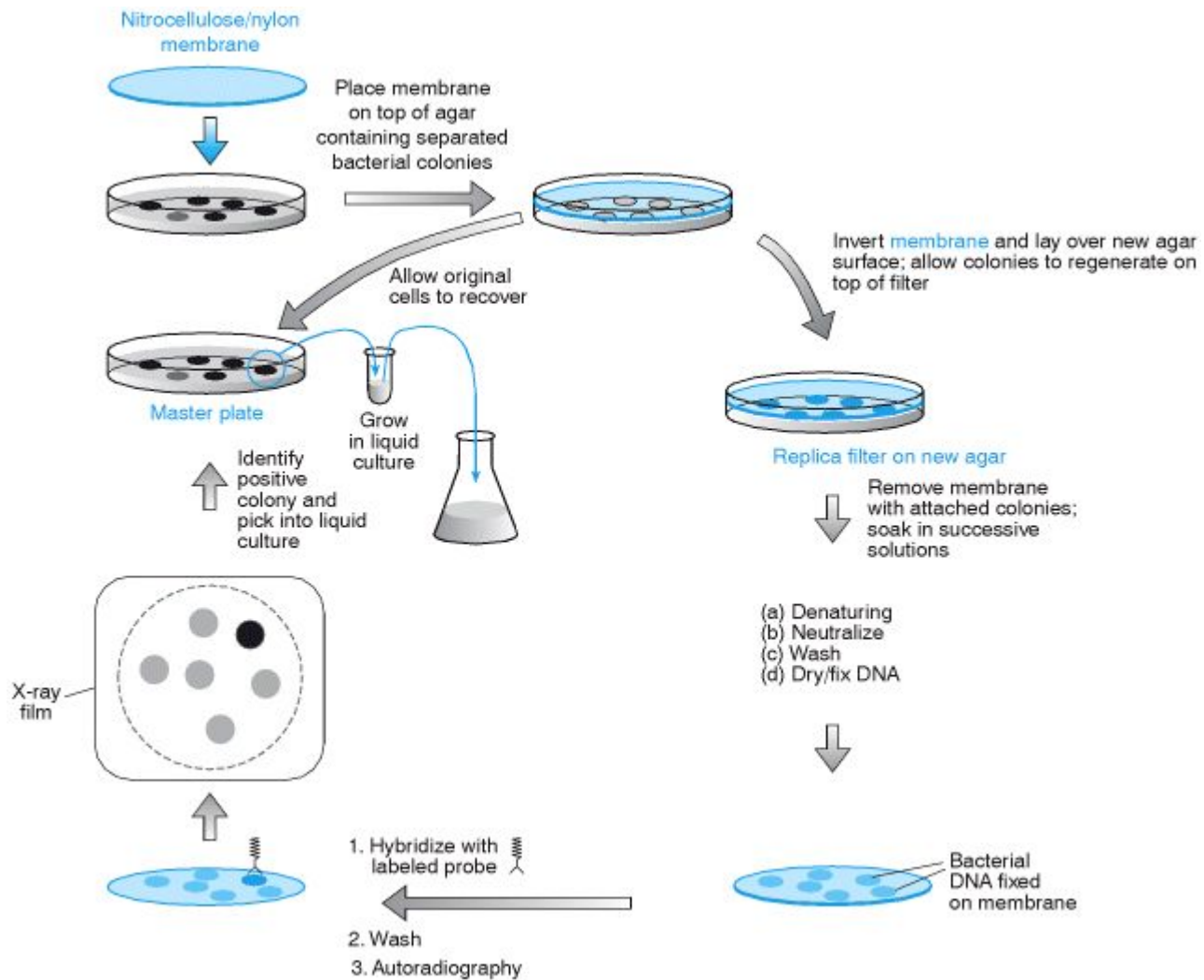
Дот гибридизация – дот блоттинг или слот блоттинг

In situ гибридизация и т.д.

Гибридизация – Саузерн блоттинг



Гибридизация – Скрининг библиотеки



Обратная транскрипция

Обратная транскриптаза (также известная как ревертаза или РНК-зависимая ДНК-полимераза) – фермент, катализирующий синтез ДНК с использованием РНК в качестве матрицы.

Обратную транскриптазу используют для получения кДНК — копии эукариотического гена, не содержащей интронов. Для этого из организма выделяют зрелую мРНК, кодирующую соответствующий генный продукт (белок, РНК) и проводят с ней в качестве матрицы обратную транскрипцию.

Полученную суммарную кДНК можно использовать в ПЦР со специфичными праймерами для получения целевого продукта, для получения библиотеки, клонирования-секвенирования и получения базы данных экспрессирующихся последовательностей – EST (expressed sequence tags), а также для исследования уровня экспрессии тех или иных генов.

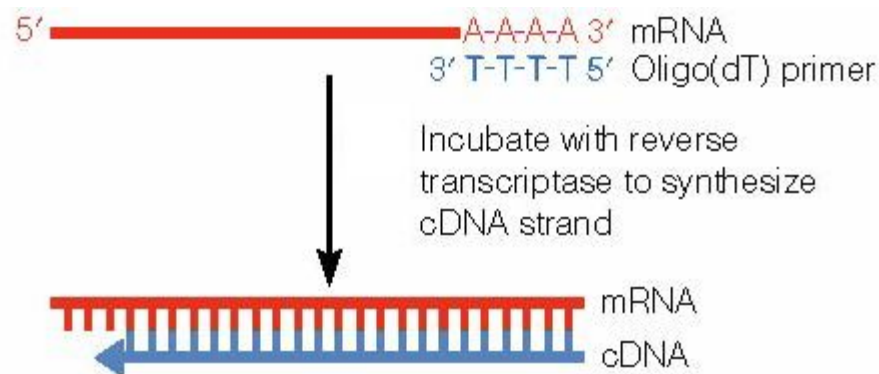
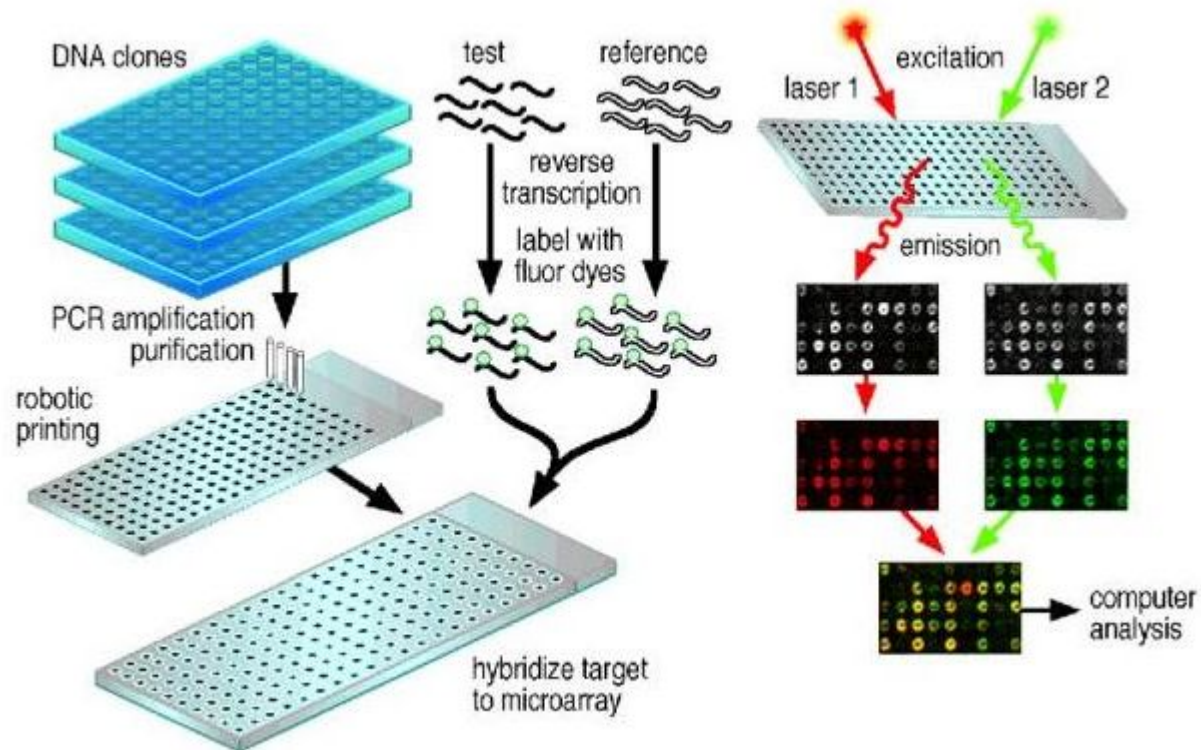


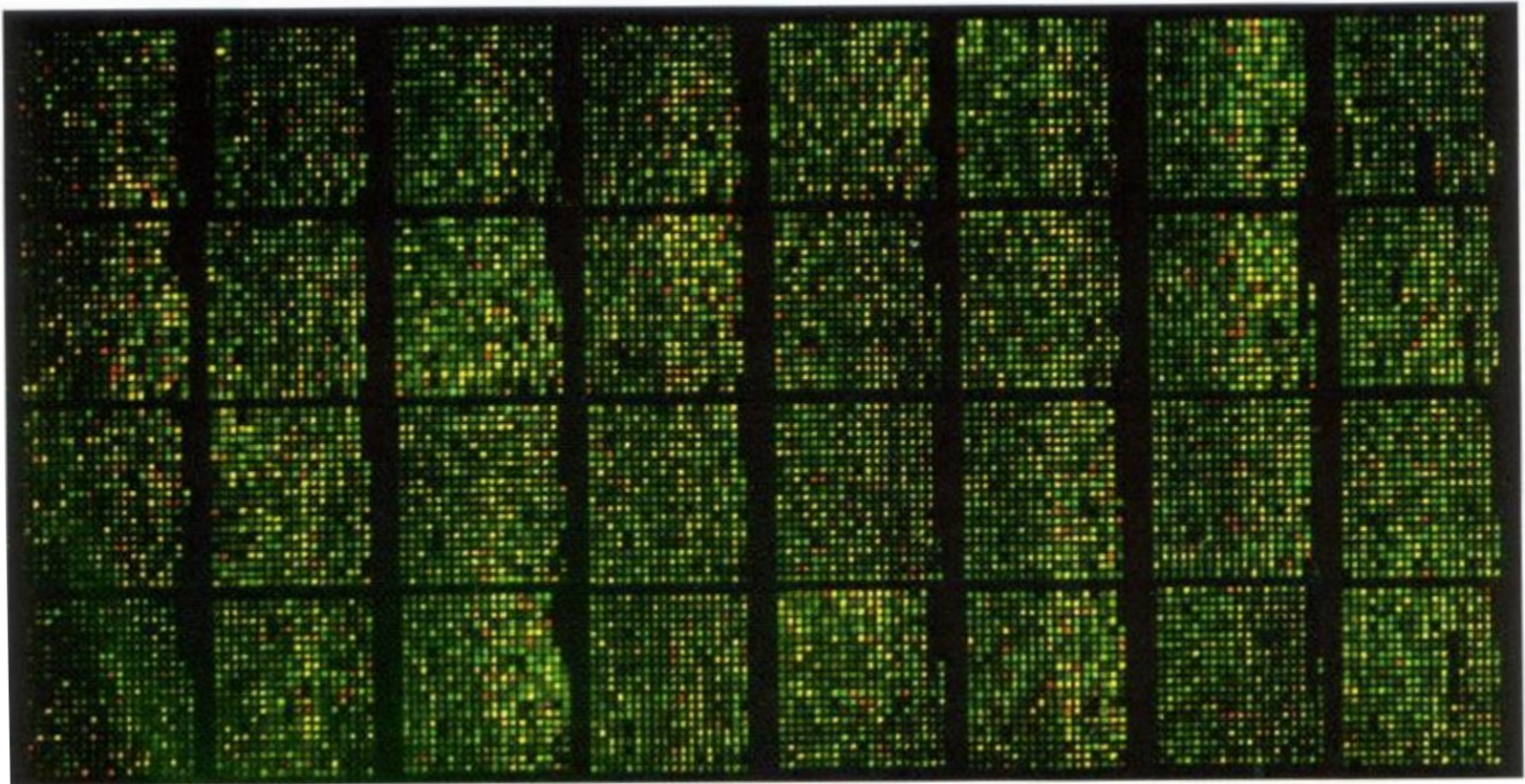
Схема обратной транскрипции с использованием олигоТ праймера

кДНК + гибридизация - биочипы

кДНК используется для техники микроэрегов или биочипов. Сравнение экспрессии генов в разных тканях (здоровых и раковых; на разных стадиях развития; и т.д.) позволяет выявлять различия в экспрессии тех или иных генов, проследить изменения профиля экспрессии генов на разных стадиях развития, выявить возможные мишени для дальнейшей разработки лекарств.



кДНК - биочипы



Результат анализа экспрессии генов в растениях, выросших в темноте и на свету, с помощью микроээрэ. Флюоресцентные зонды были приготовлены из РНК этиолированных растений (метка — Су3) и РНК зеленых листьев (метка — Су5). Зонды смешали и сгибридизовали с кДНК-микрочипом, состоящим из 11500 элементов. После гибридизации чип просканировали, поочередно используя фильтры для двух флюорофоров. Приведенная фотография — результат наложения сканов. Красные точки соответствуют генам, экспрессия которых индуцируется светом, зеленые — генам, экспрессия которых светом подавляется.

Биоинформатические методы

Объем генетической информации, накапливаемой в банках данных, увеличивается с возрастающей скоростью. Биоинформатические методы позволяют обрабатывать этот огромный массив данных, выявлять закономерности, которые не всегда можно заметить при обычном эксперименте, предсказывать функции генов и зашифрованных в них белков, строить модели взаимодействия генов в клетке, конструировать лекарства.

Использование биоинформатических методов:

Анализ последовательностей ДНК – наличие регуляторных участков, экзон-интронной структуры, поиск гомологов в базах данных, анализ особенностей структуры, нуклеотидного состава, поиск повторов и т.д.

Сборка и аннотирование геномных последовательностей, на основе имеющейся информации (чаще всего полученной экспериментально)

Анализ геномов – предсказание генов, регуляторных участков, предсказание функции генов на основе имеющейся информации о гомологах, поиск и анализ повторов и т.д.

Сравнительный анализ геномов – сравнение геномных последовательностей различных организмов, поиск гомологов, реконструкция возможных эволюционных событий.

И многое другое.

Биоинформатические методы – анализ последовательностей ДНК

Секвенирование – первый шаг на пути исследования последовательностей ДНК и их функционирования. На следующем этапе подключается исследование последовательностей при помощи компьютерных методов.

Поиск гомологов или сходных последовательностей в базах данных: Самый используемый метод для поиска сходных последовательностей в базах данных – BLAST и все возможные варианты. Практически в любой базе данных последовательностей ДНК есть возможность поиска при помощи BLAST.

NCBI Home ► Genomic Biology ► BLAST

Search

BLAST
overview
FAQs
news
manual
references
Retrieve results
Genome Project

BLAST Rat Sequences.

Blast your sequence against rat-specific sequences

Enter an accession, gi, or a sequence in FASTA format:

Or, choose a file to upload

Database: 8014 sequences

Program:

Optional parameters

Expect	Filter	Descriptions	Alignments
<input type="text" value="0.01"/>	<input type="text" value="default"/>	<input type="text" value="100"/>	<input type="text" value="100"/>

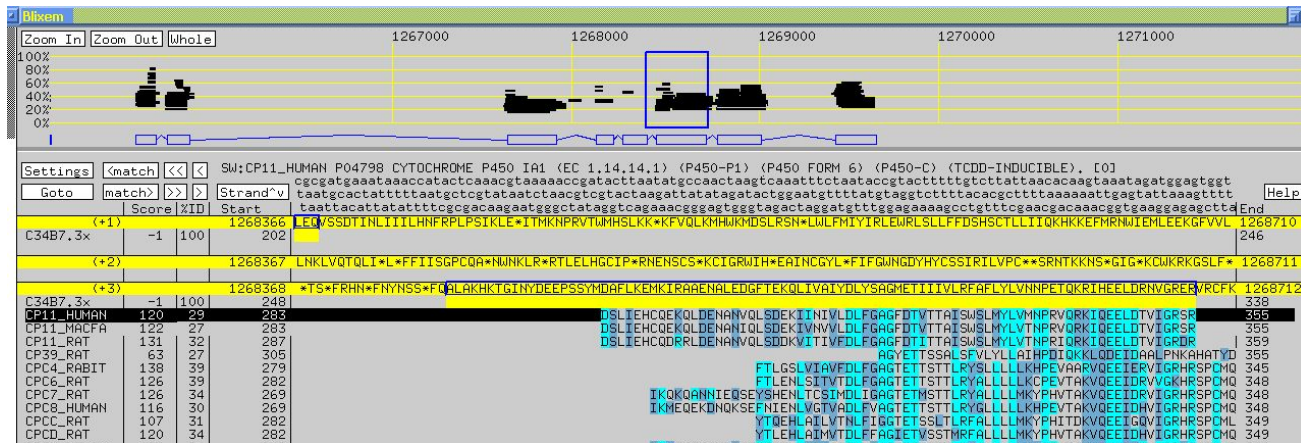
Advanced options:

Стандартное окно запроса для BLAST анализа

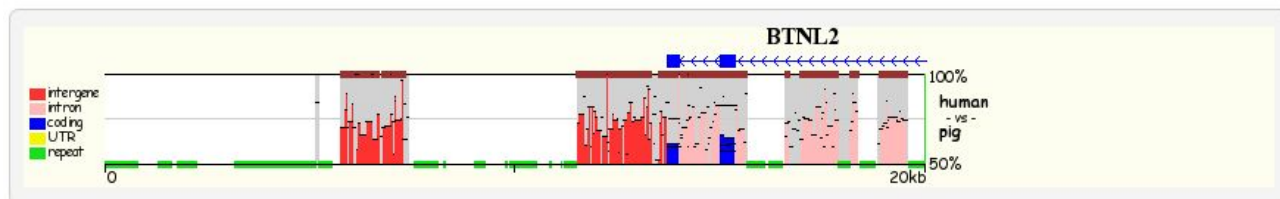
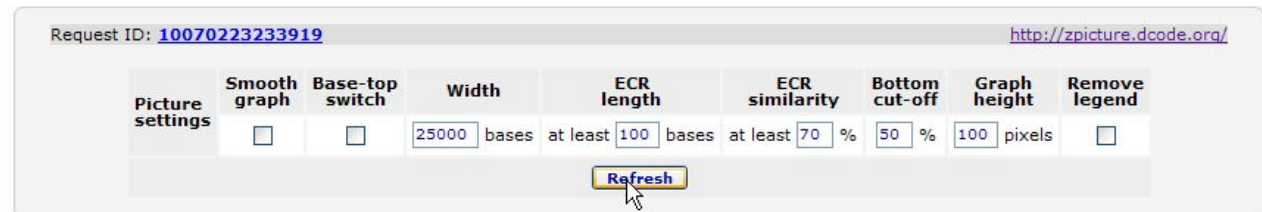
Биоинформатические методы – анализ последовательностей ДНК

Анализ наличия регуляторных участков, экзон-интронной структуры, анализ особенностей структуры ДНК, нуклеотидного состава, поиск повторов и т.д. – для всех перечисленных задач существует множество методов и компьютерных программ. Например:

Genefinder – предсказание экзон-интронной структуры

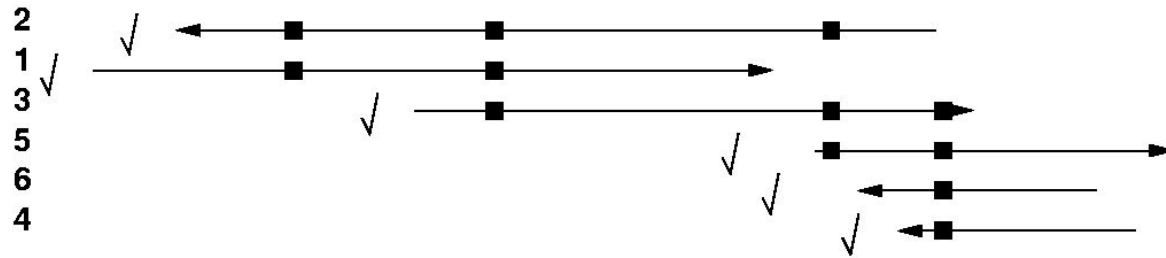


RepeatMasker – поиск повторенных последовательностей

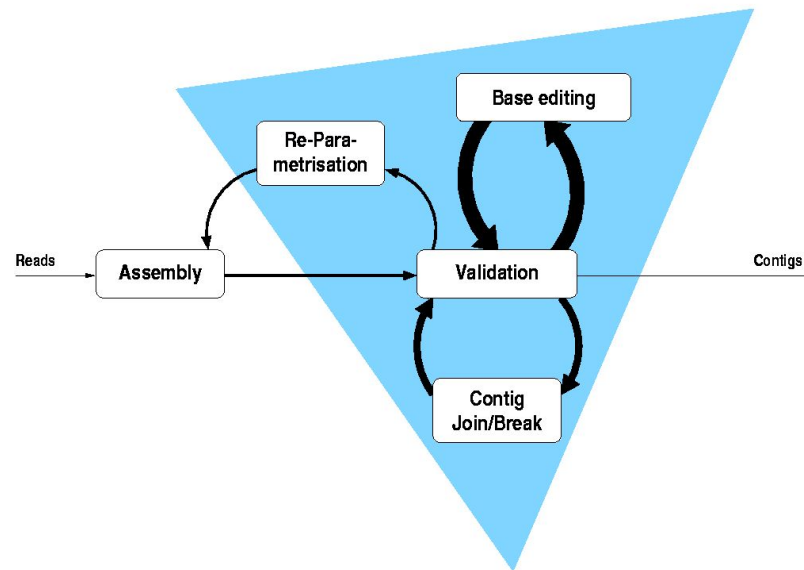


Биоинформатические методы – анализ геномов

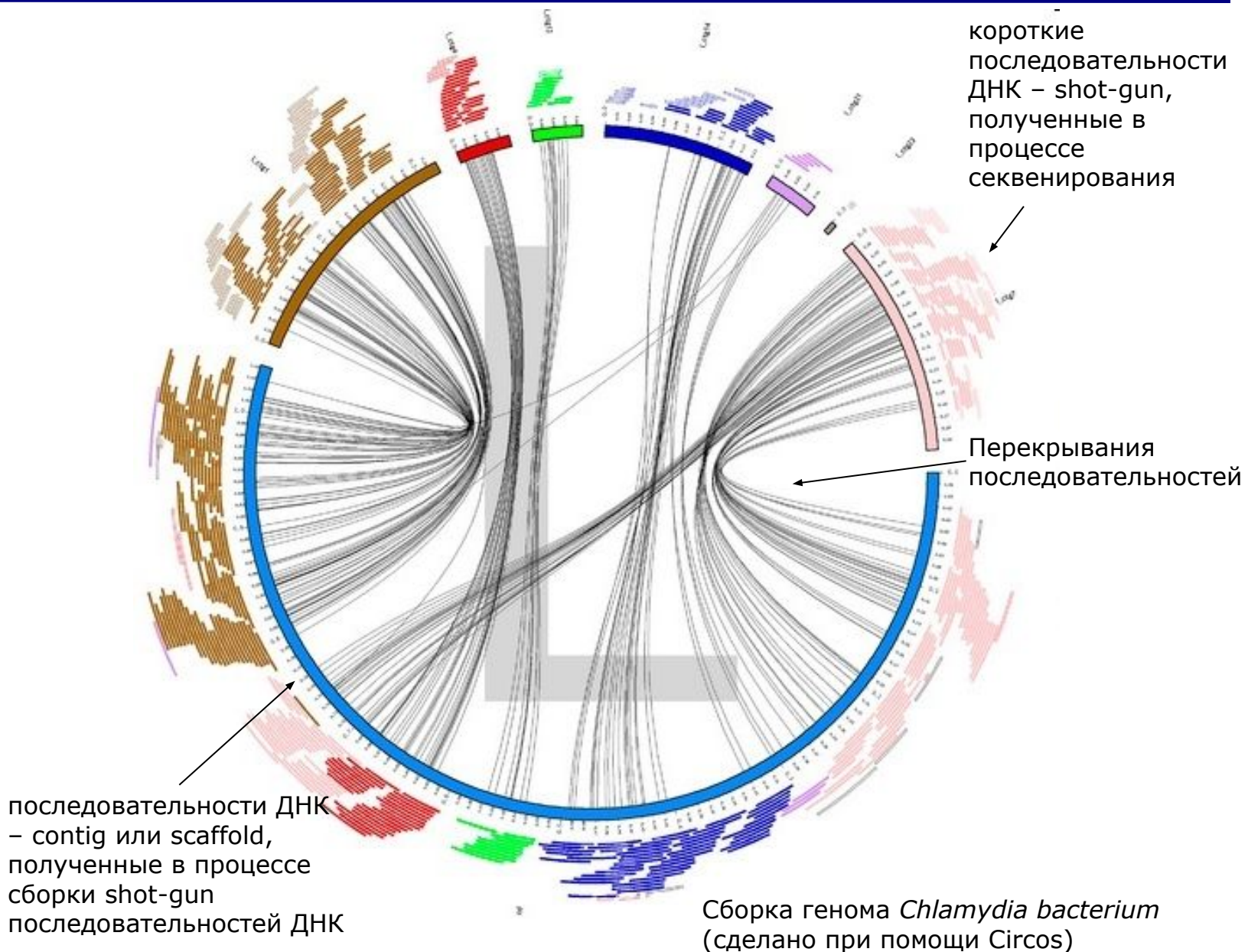
После получения пула геномных последовательностей необходимо провести сборку и аннотирование. Для сборки генома и первоначального аннотирования используются имеющиеся экспериментальные и исходные данные.



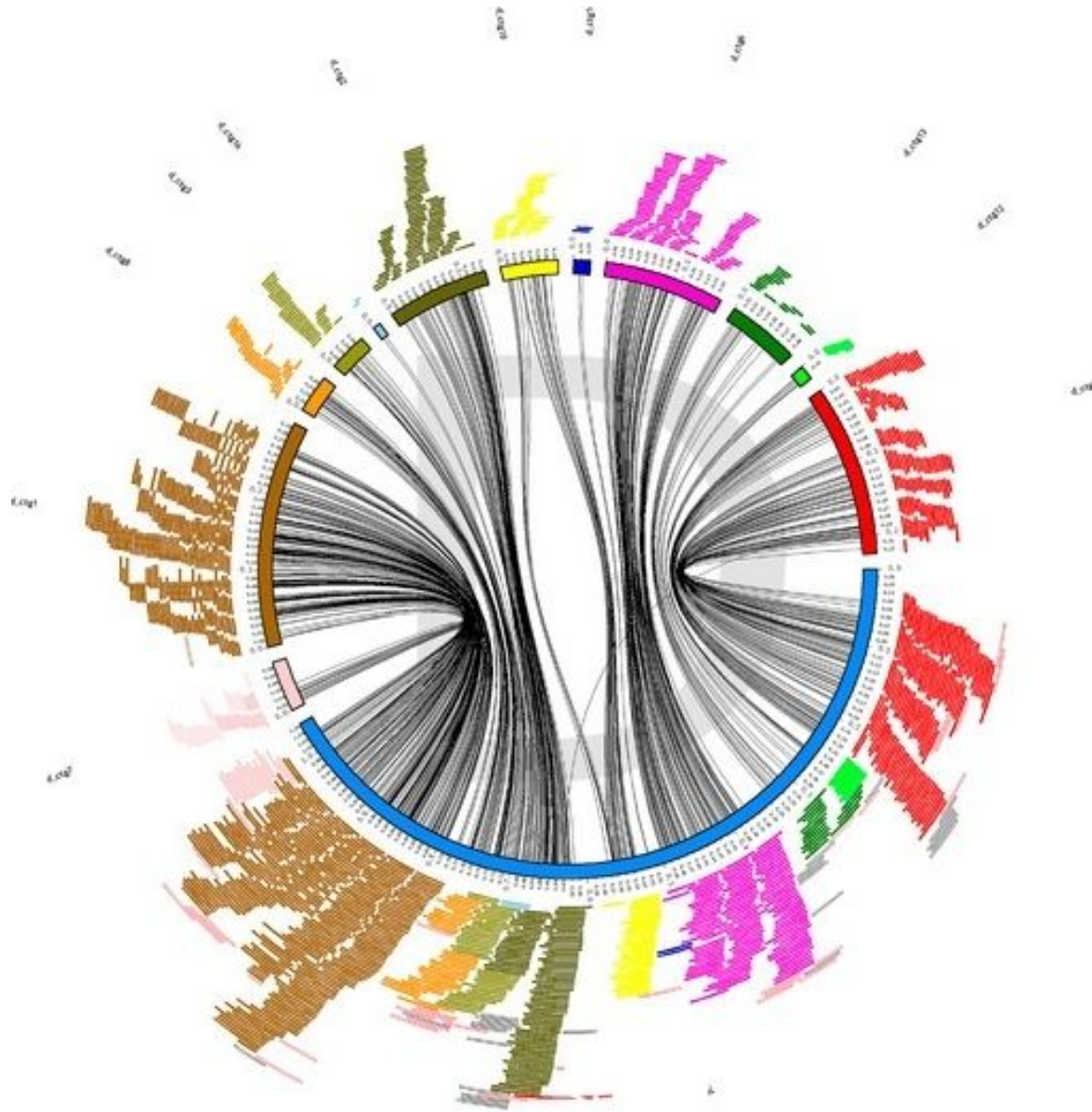
Сборка генома (общая схема)



Биоинформатические методы – сборка геномов

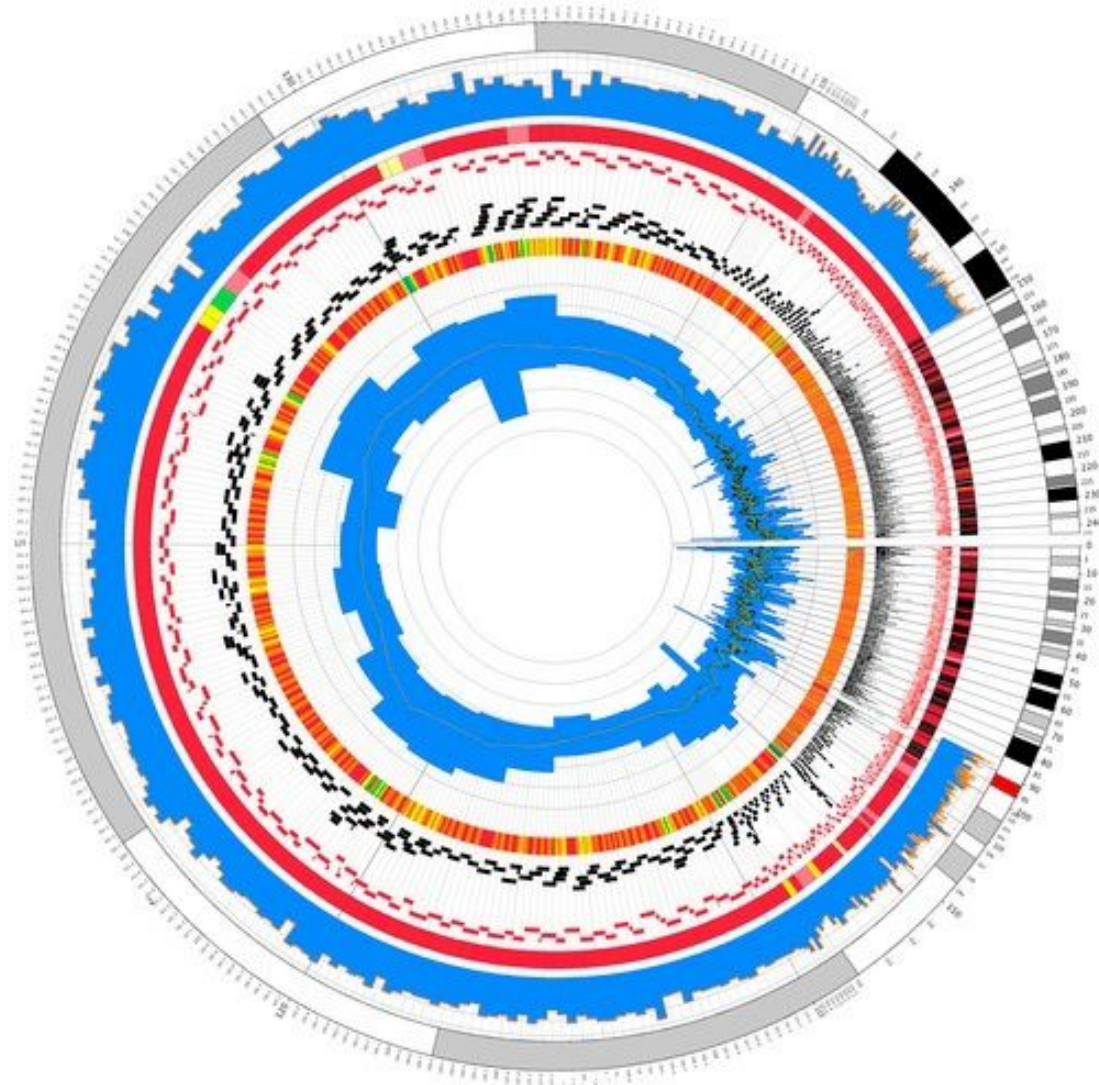


Биоинформатические методы – сборка геномов



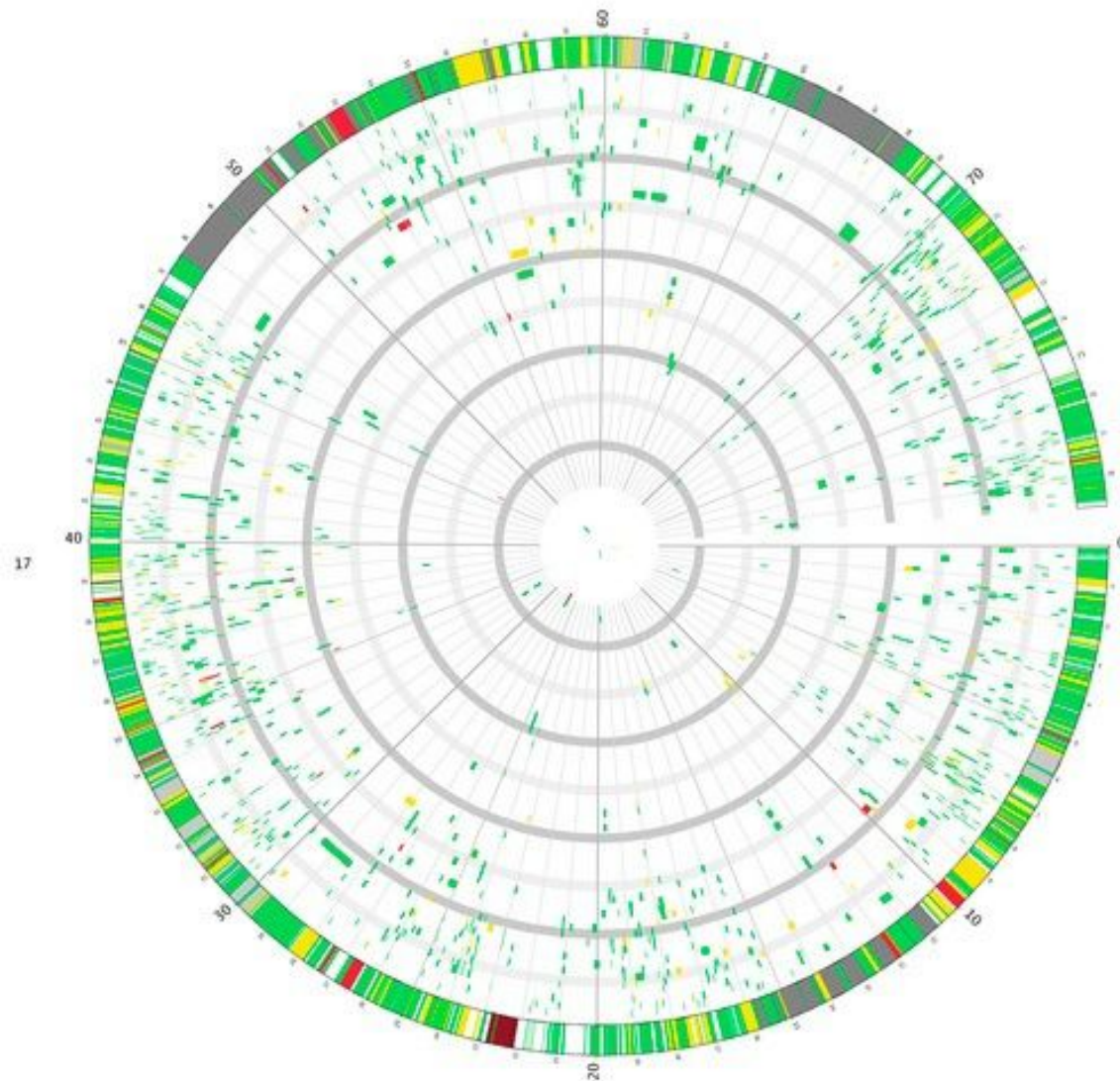
Еще одна иллюстрация процесса сборки генома *Chlamydia bacterium* (сделано при помощи Circos)

Биоинформатические методы – анализ геномов



GC-состав 17 хромосомы человека (сделано при помощи Circos)

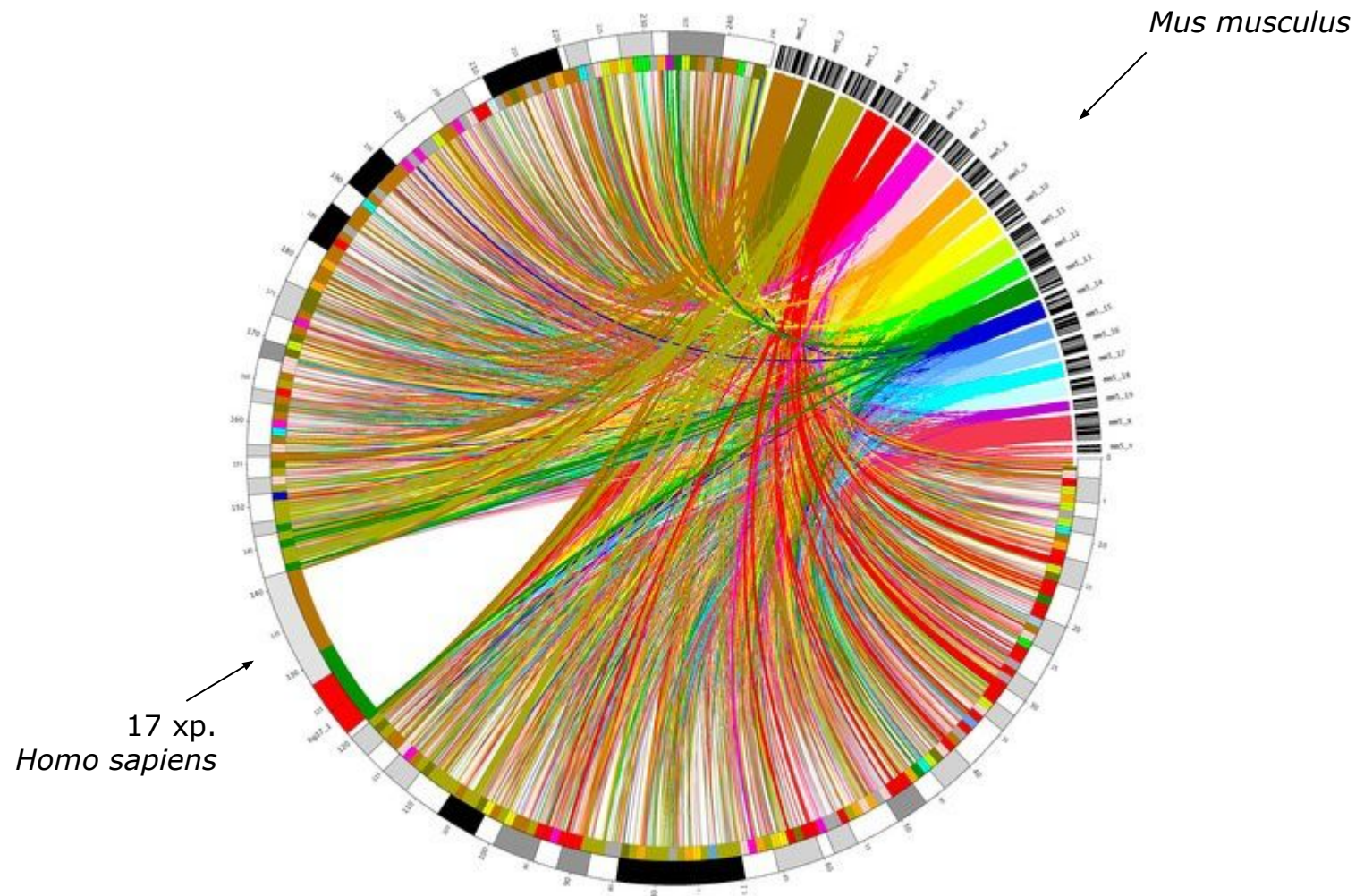
Биоинформатические методы – аннотирование геномов



Анализ геномов – 17 хромосома человека, зеленым показаны предсказанные гены, желтым – повторенные последовательности, красным – гены, нарушения которых могут вызывать рак, серым – некодирующие последовательности (сделано при помощи Circos)

Биоинформатические методы – сравнительный анализ геномов

Сравнительный анализ геномов – сравнение геномных последовательностей различных организмов, поиск гомологов, реконструкция возможных эволюционных событий.



Сравнительный анализ гомологов хромосомы 17 человека и хромосом мыши
(сделано при помощи Circos)