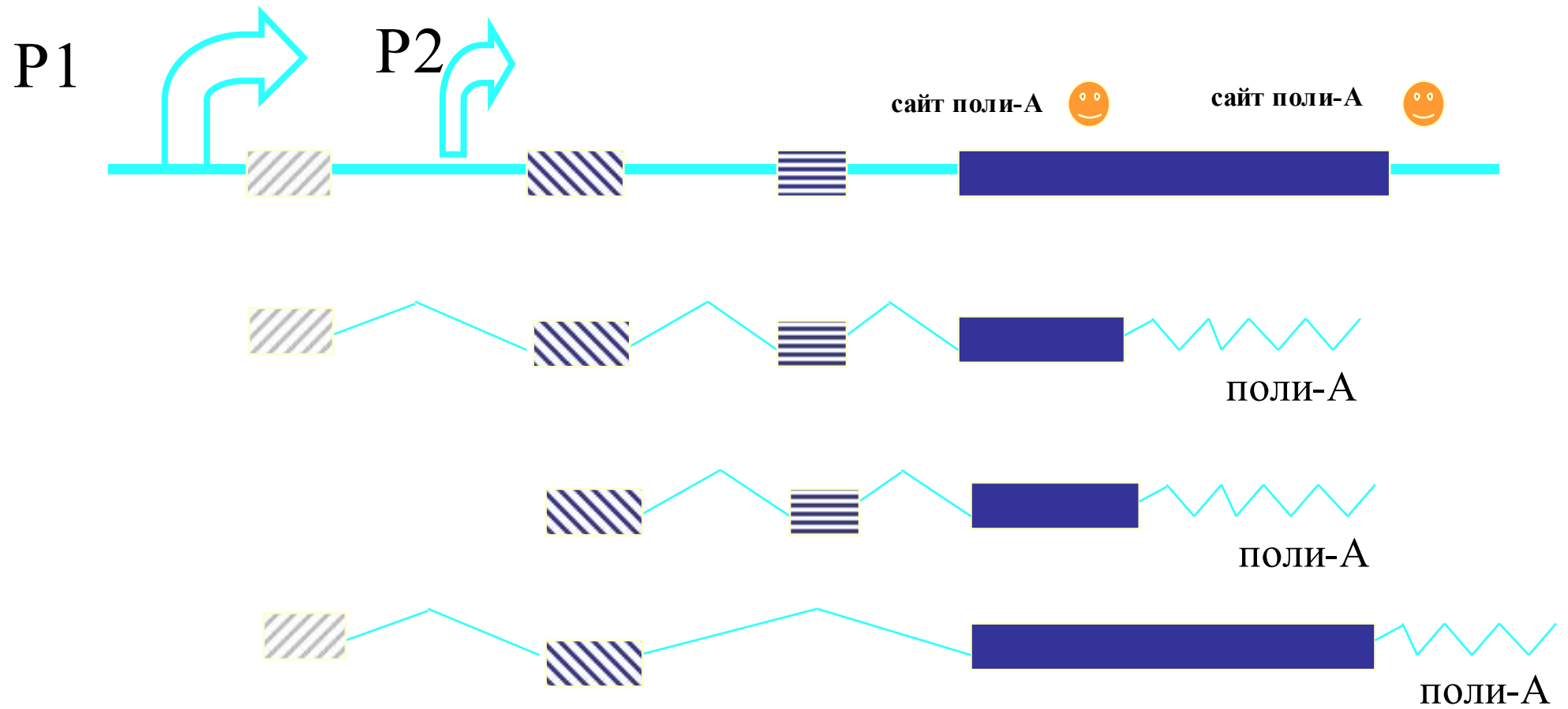


Актуальные задачи современной генетики
Методология и стратегии решения



Возможные варианты изоформ мРНК гипотетического гена



ИЗОФОРМЫ мРНК

■ Нозерн-гибридизация

позволяет определить размер изоформ мРНК, экспрессирующихся с достаточной для этого метода детекции эффективностью и, таким образом, составить список всех мажорных изоформ мРНК исследуемого гена

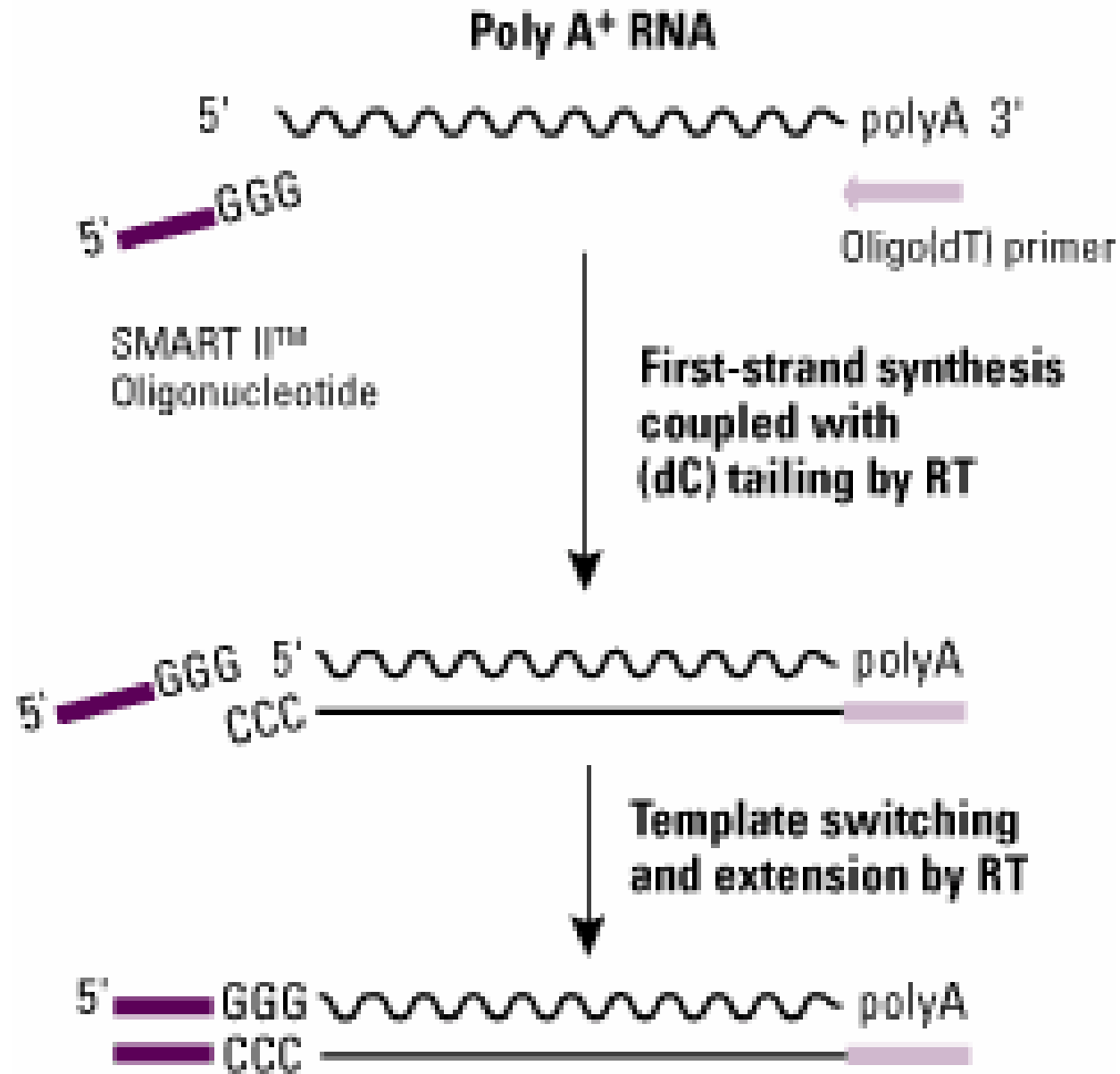
■ ОТ-ПЦР

позволяет избирательно амплифицировать относительно небольшие фрагменты РНК

■ RACE-ПЦР (rapid amplification of cDNA ends)

метод позволяет восстановить структуру полноразмерной мРНК гена по кДНК, соответствующей фрагменту этого гена.

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛНОРАЗМЕРНОЙ мРНК



РЕГУЛЯТОРНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ

стратегия репортерных систем

позволяет изучать регуляторную функцию клонированного фрагмента по изменению активности продукта репортерного гена по сравнению с контролем

гель-шифт (EMSA-electrophoretic gel mobility shift assay)

позволяет по изменению подвижности комплексов белок-ДНК по сравнению с фрагментом ДНК судить о наличии сайтов связывания транскрипционного фактора в регуляторном элементе

футпринтинг

позволяет локализовать участок ДНК, непосредственно взаимодействующий с белком, путем сравнения продуктов неполного расщепления ДНК и ДНК в комплексе с белком

БЕЛОК-БЕЛКОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ



кросс-сшивки

позволяет выявить непосредственные поверхностные контакты между белками путем ковалентной сшивки белков-соседей бифункциональными химическими агентами (диимидоэфиры)



коиммунопреципитация

создание иммунного комплекса: антитело-известный белок-неизвестный партнер позволяет выявить или подтвердить белок-белковые взаимодействия



двугибридная система

позволяет выявить белки-партнеры, недостатком метода является частое присутствие ложных сигналов, метод требует дополнительных исследований

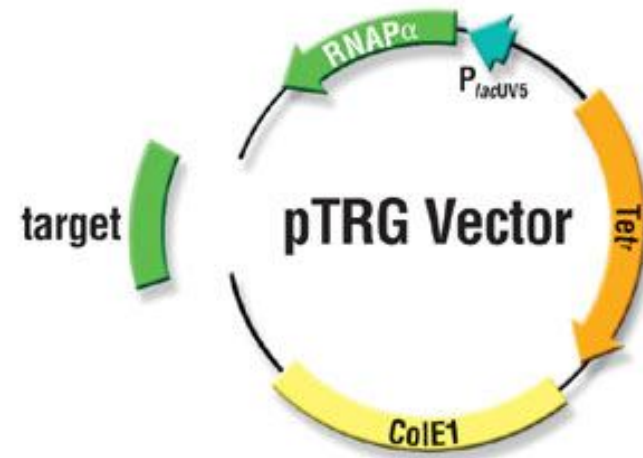
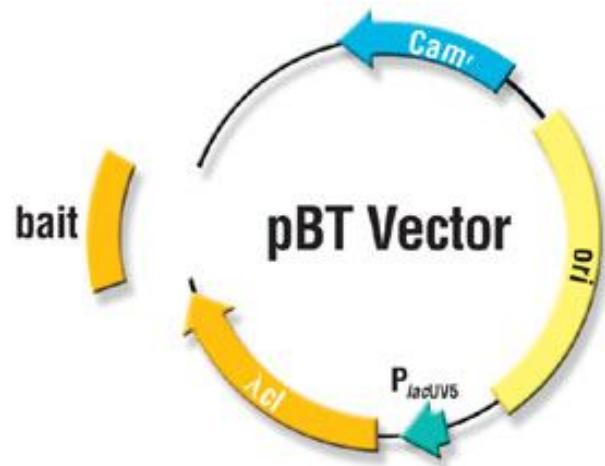


масс-спектрометрия

физический метод, позволяющий как разделять комплексы взаимодействующих белков, так и проводить их полное секвенирование

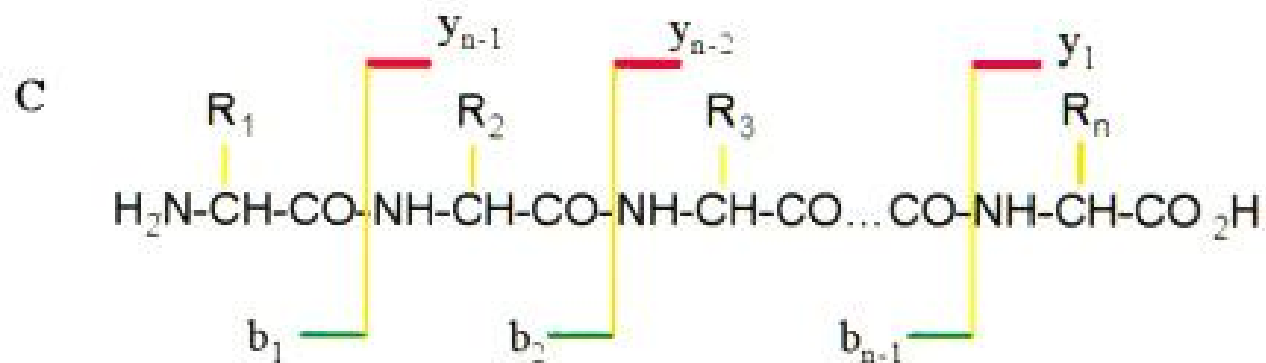
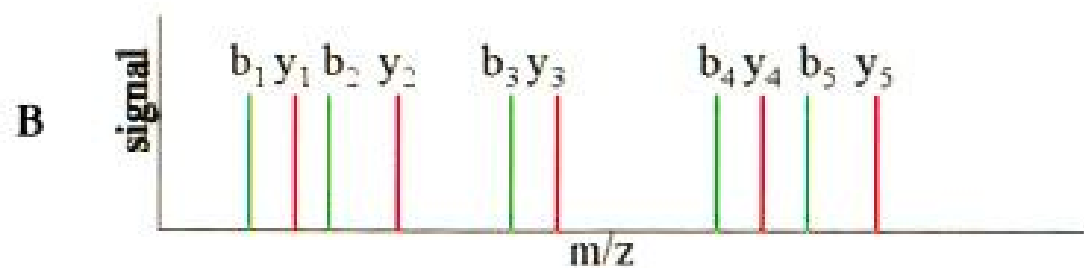
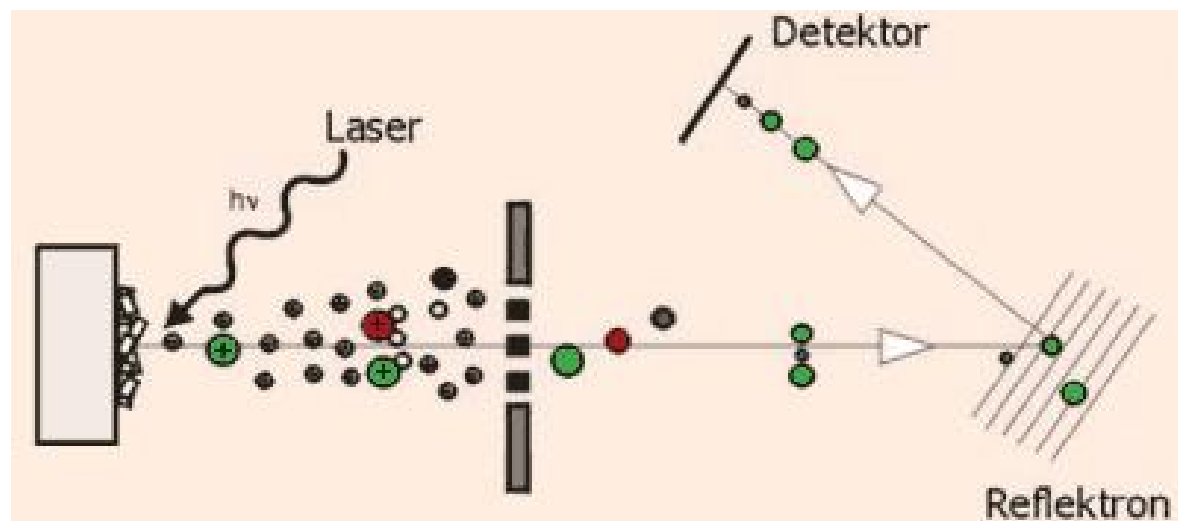
Белок-белковые взаимодействия

Бактериальная двугибридная система

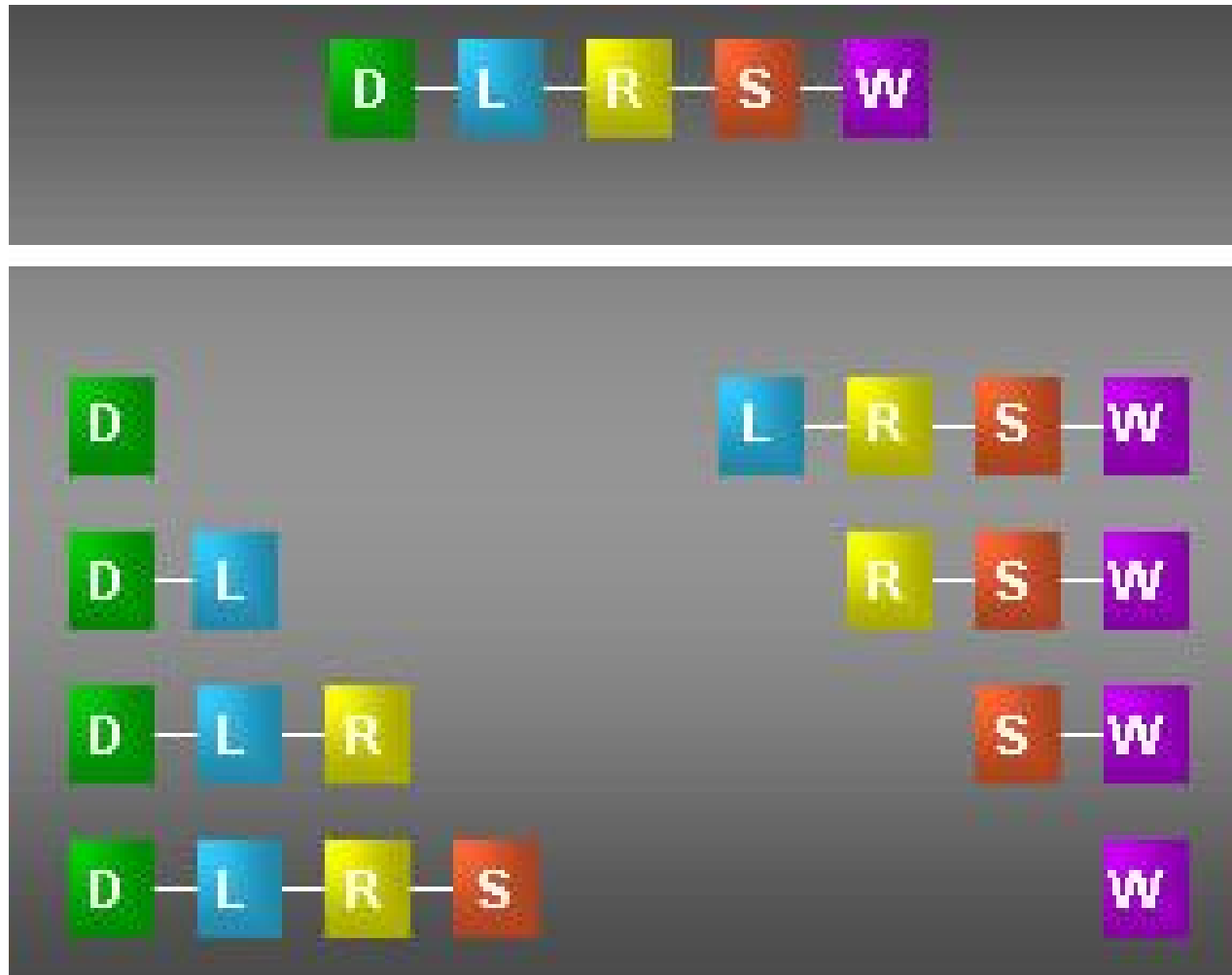


STRATAGENE COM.

ОБЩАЯ СХЕМА МАСС-СПЕКТРОМЕТРА



ПРИНЦИП АНАЛИЗА ПОЛУЧЕННОГО СПЕКТРА



N-концевые ионы

C-концевые ионы

ВЫХОДНЫЕ ДАННЫЕ МАСС-СПЕКТРА

S-P-A-F-D-S-I-M-A-E-T-L-K

(protonated mass 1410.6)

<u>mass⁺</u>	<u>b-ions</u>	<u>y-ions</u>	<u>mass⁺</u>
88.1	S	PAFDSIMAETLK	1323.6
185.2	SP	AFDSIMAETLK	1226.4
256.3	SPA	FDSIMAETLK	1155.4
403.5	SPAF	DSIMAETLK	1008.2
518.5	SPAFD	SIMAETLK	893.1
605.6	SPAFDS	IMAETLK	806.0
718.8	SPAFDSI	MAETLK	692.3
850.0	SPAFDSIM	AETLK	561.7
921.1	SPAFDSIMA	ETLK	490.6
1050.2	SPAFDSIMAE	TLK	361.5
1151.3	SPAFDSIMAET	LK	260.4
1264.4	SPAFDSIMAETL	K	147.2

АНСАМБЛИ СОГЛАСОВАННОЙ ЭКСПРЕССИИ



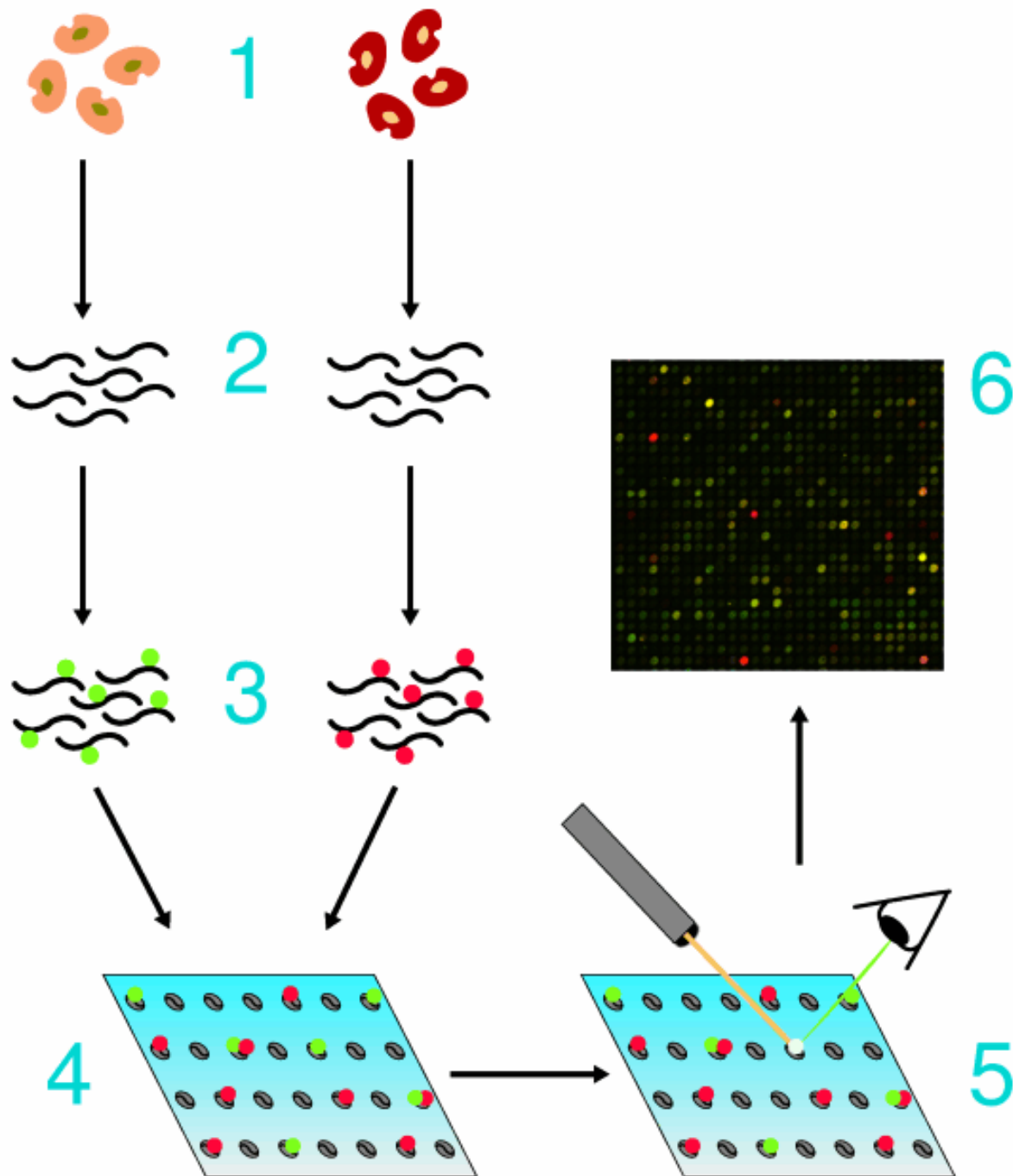
двумерный электрофорез белков в ПААГ

разделяет белки по двум основным характеристикам белковой молекулы: молекулярной массе и изоэлектрической точке



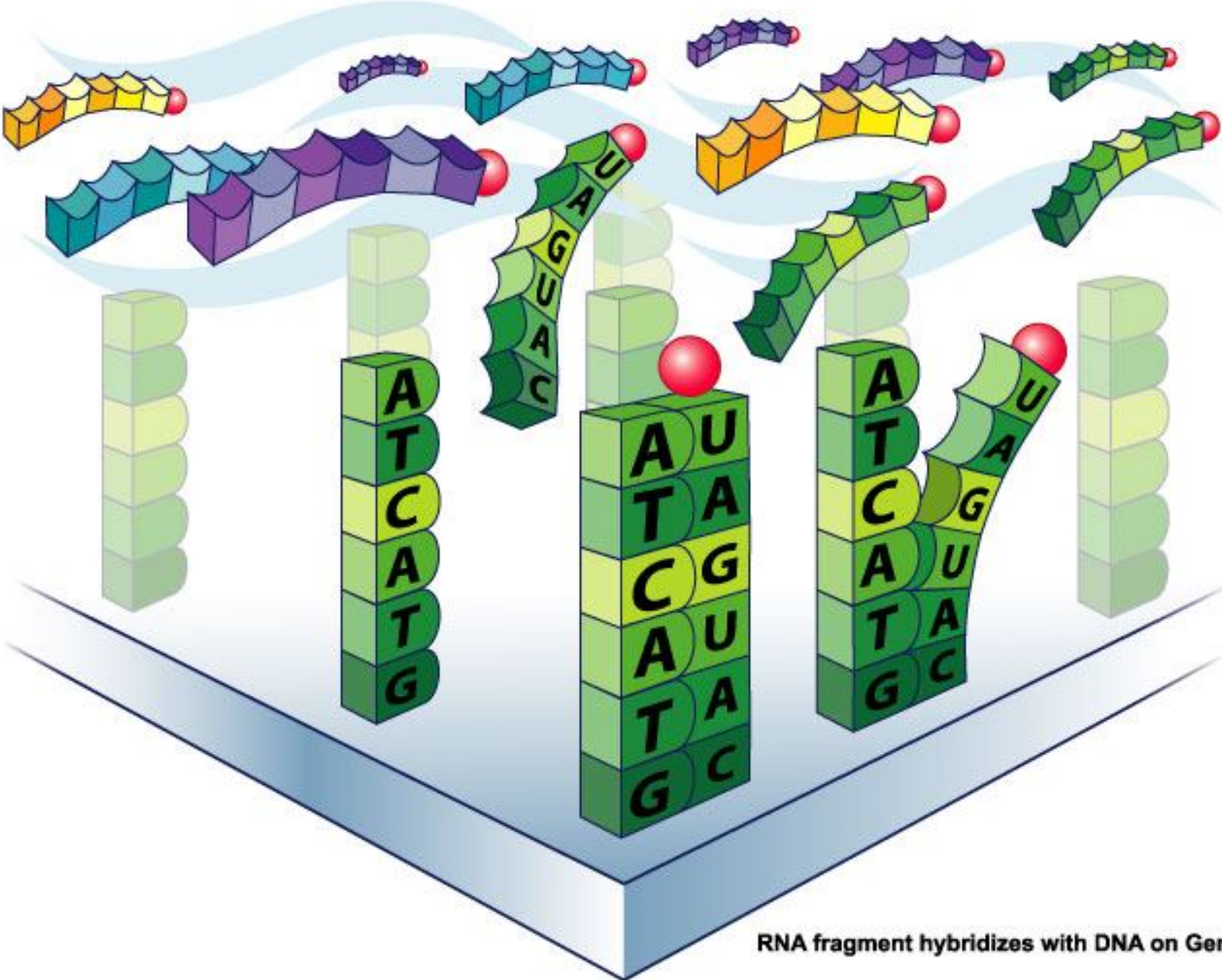
ДНК-микроррэй

дифференциальное исследование генной экспрессии на экспрессионных микрочипах (expression microarray)



1. Получение организмов с альтернативными характеристиками
2. Получение образцов РНК, и затем кДНК
3. Мечение образцов кДНК
4. Гибридизация с ДНК, фиксированной на подложке
5. Анализ

RNA fragments with fluorescent tags from sample to be tested



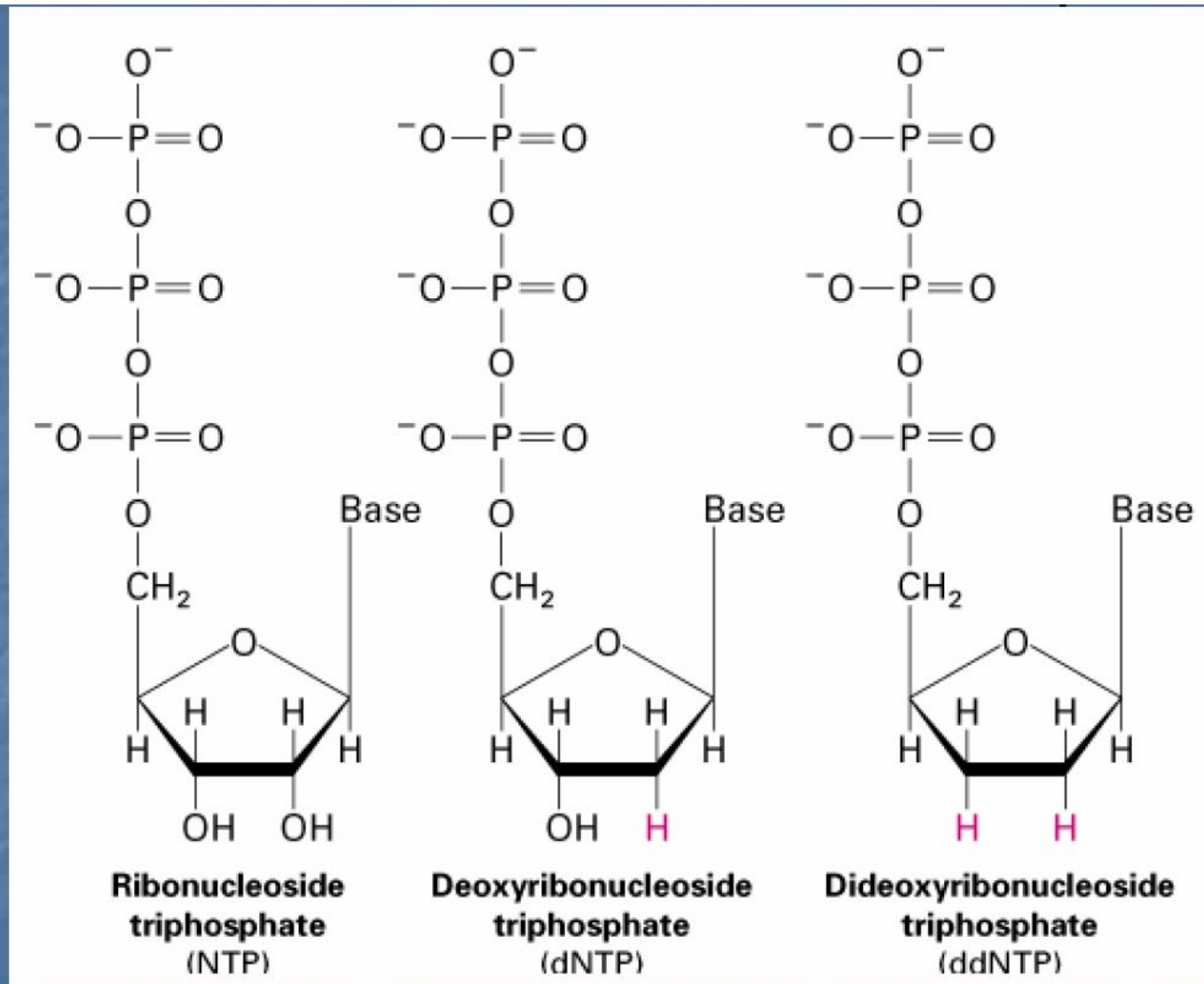
RNA fragment hybridizes with DNA on GeneChip



AFFYMETRIX Com.

Dideoxy sequencing method

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 74, 5463–5467 (1977)

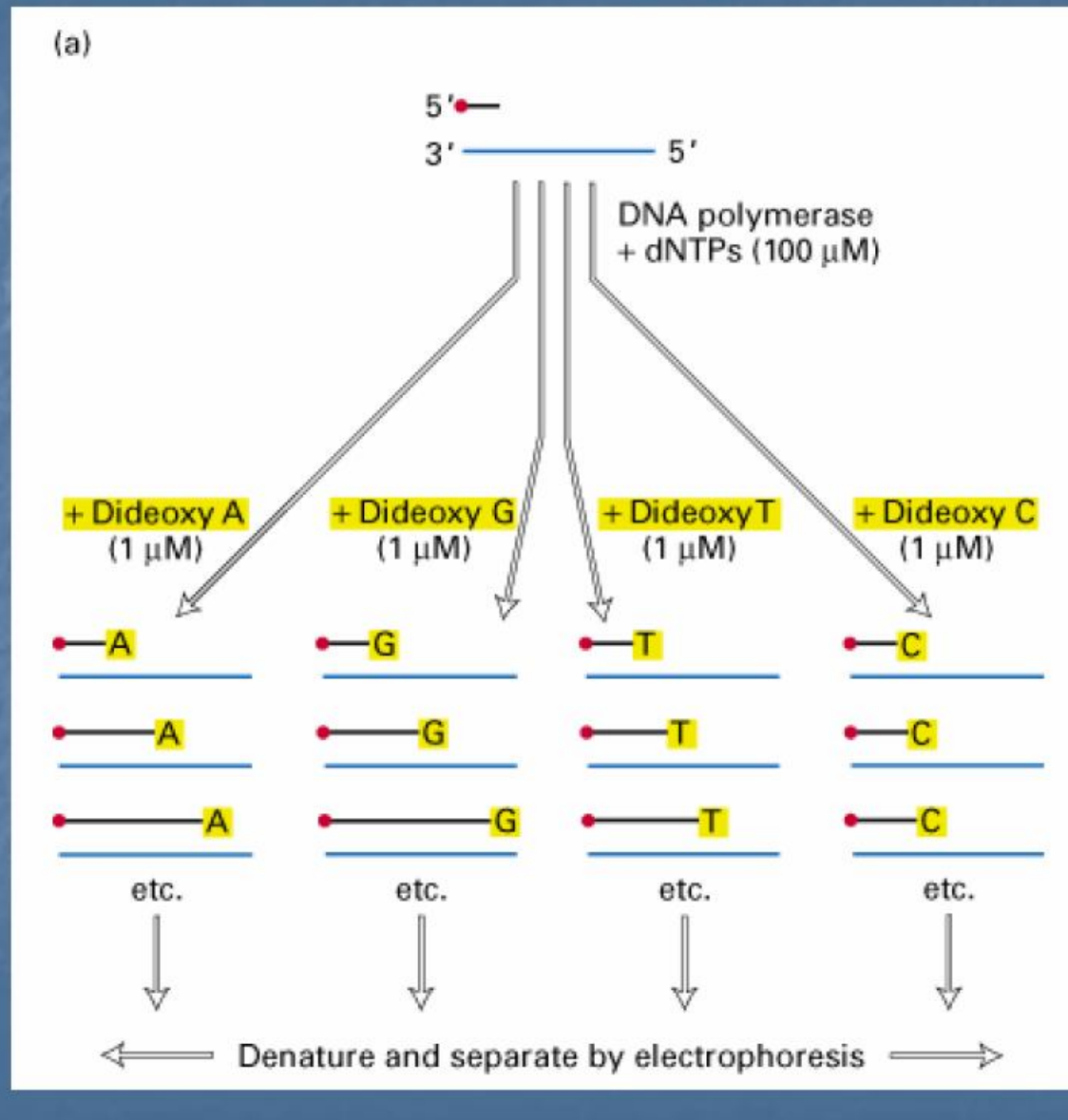


The dideoxynucleotide structure (note 3'H) is the key to dideoxy DNA sequencing

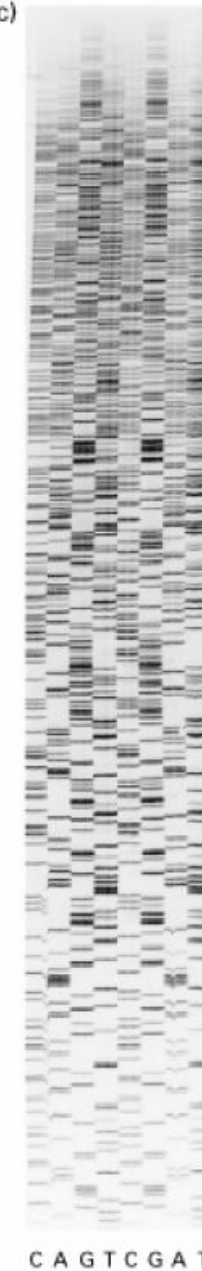
Dideoxy sequencing method

Manual sequencing using radiolabeled primer (or nucleotide)

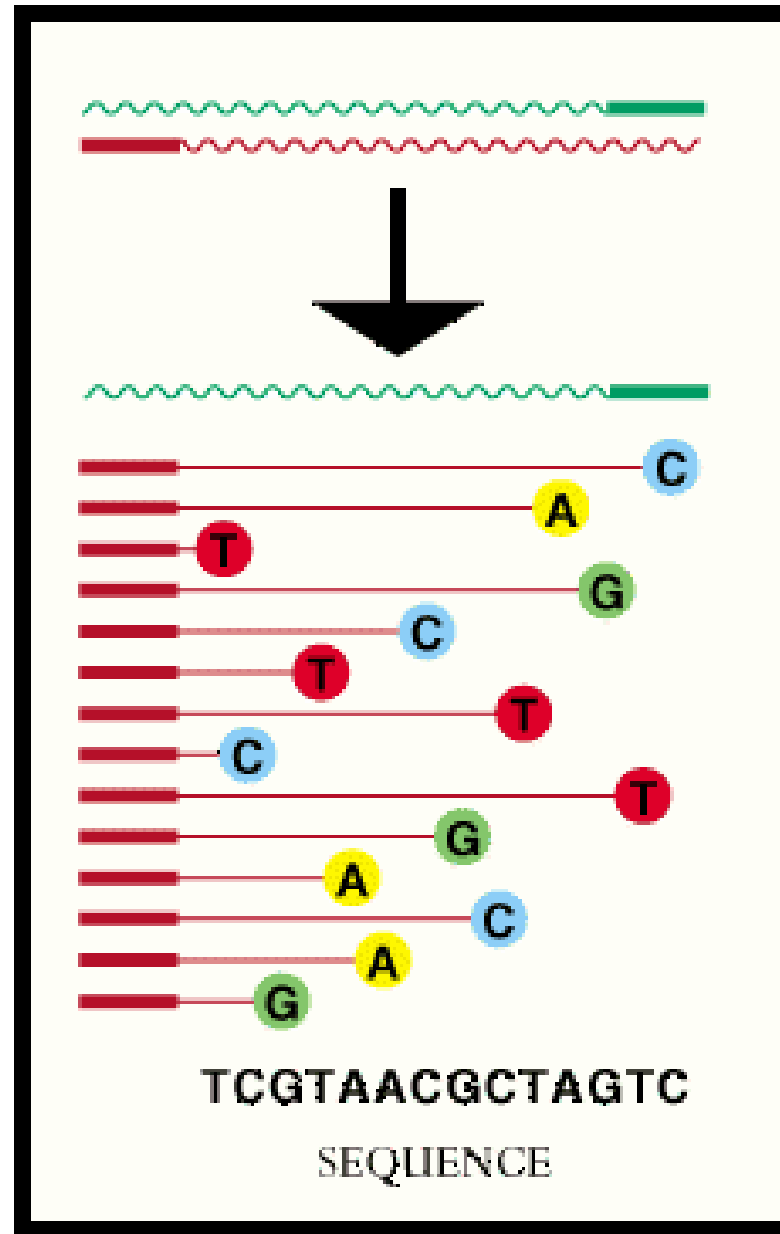
Fig. 5.14-19 DNA sequencing



(c)



Dideoxy sequencing with fluorescent dye incorporated in dideoxynucleotides

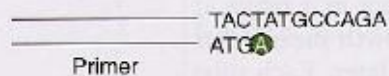


Prober, J. M. *et al.* A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* 238, 336—341 (1987)

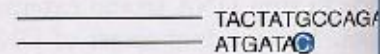
Fig. 5.14-19 Automated DNA sequencing

(a) Primer extension reactions:

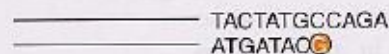
ddA reaction:



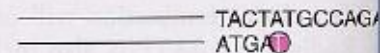
ddC reaction:



ddG reaction:

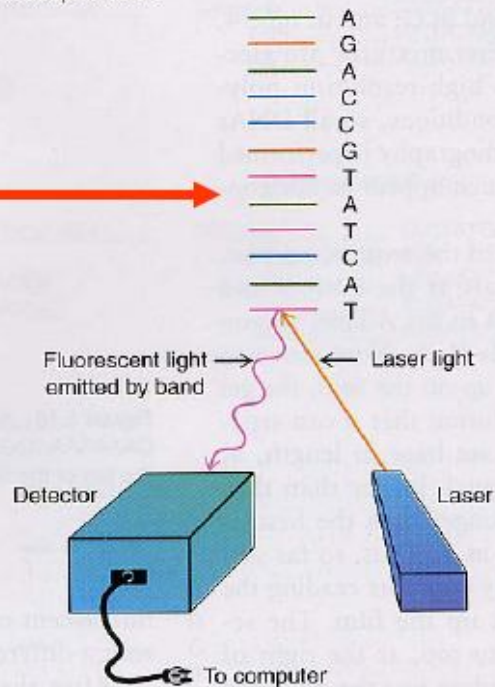


ddT reaction:

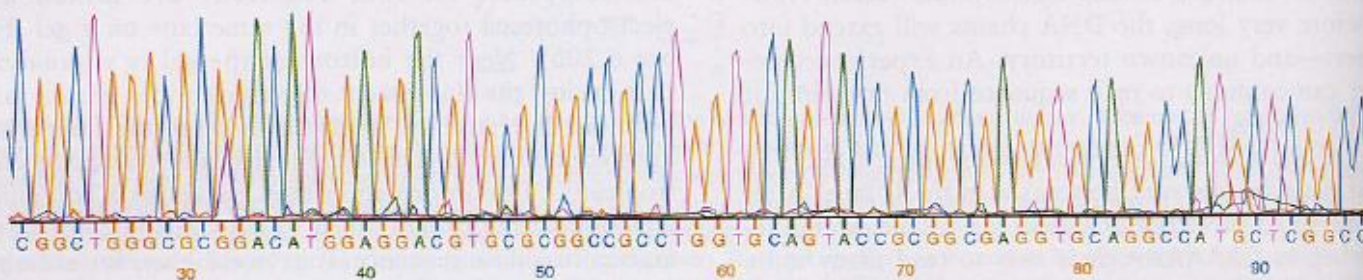


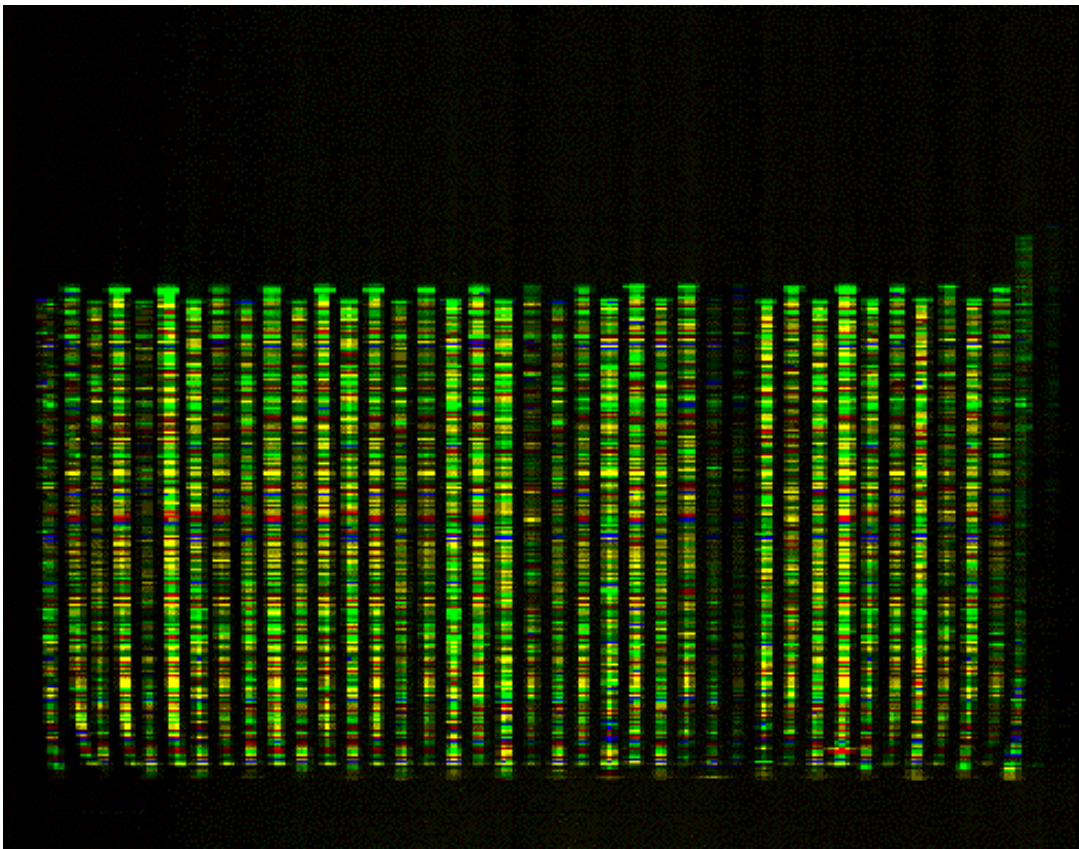
(b) Electrophoresis:

Capillary electrophoresis →

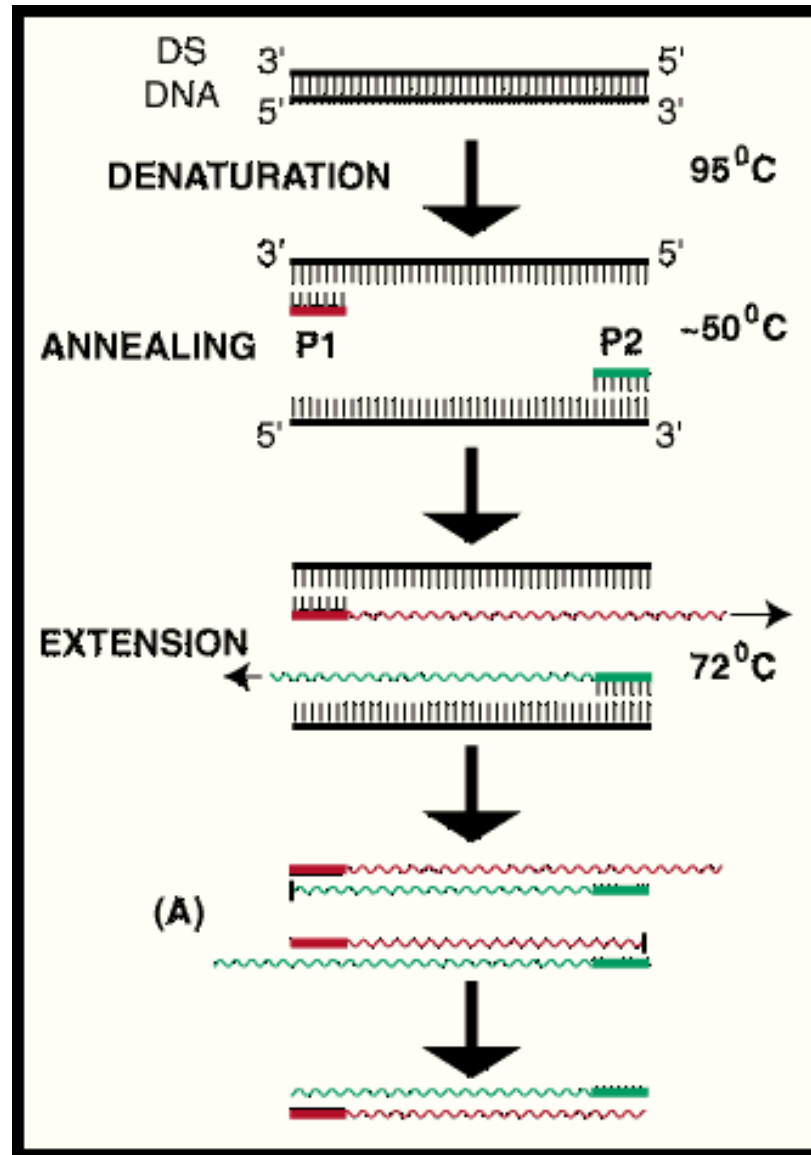


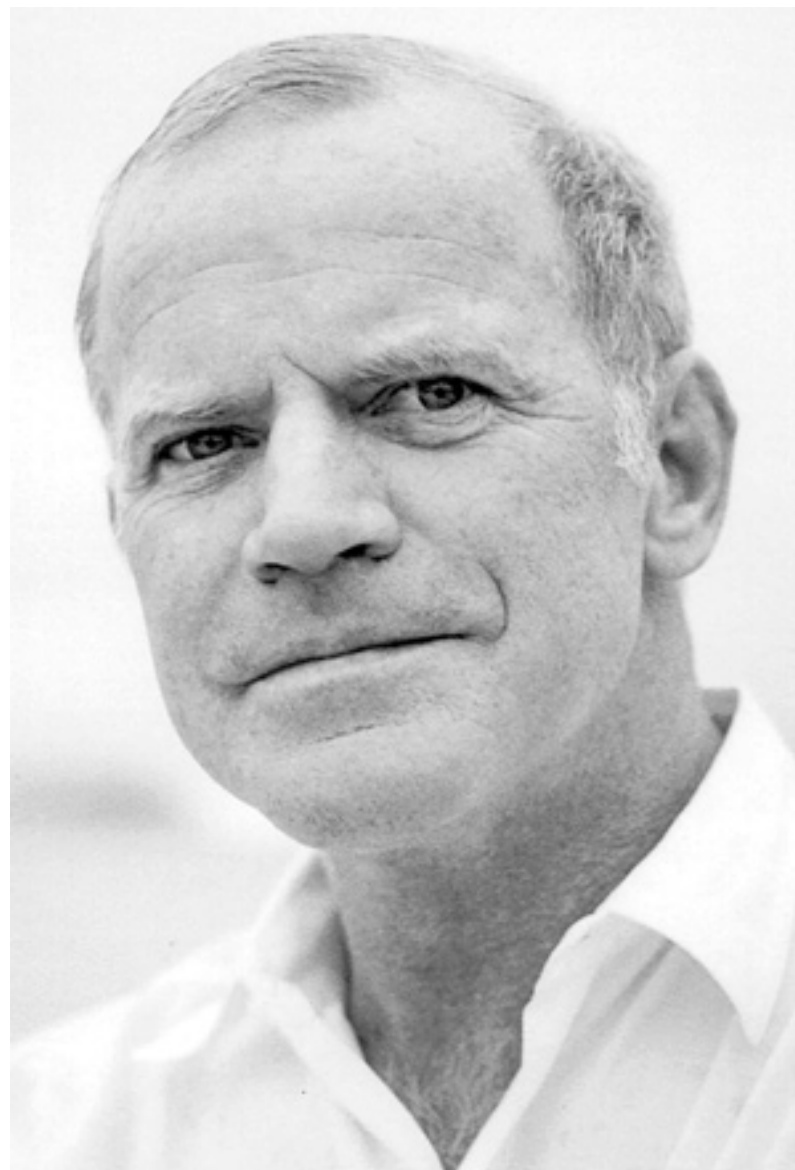
(c)





Реакция, революционизировавшая молекулярную биологию:
Polimerase (*Taq*, *Pfu*) Chain Reaction (PCR; ПЦР)
for specific DNA amplification





Кари Маллис, изобретатель ПЦР
Нобелевская премия по химии 1993 года

Развитие нового подхода к секвенированию
на основе детекции пирофосфата, высвобождаемого при синтезе
ДНК
(pyro-sequencing protocol)

Bains, W. & Smith, G. C. A novel method for nucleic acid sequence determination.
J. Theor. Biol. 135, 303–307 (1988)

Nyren, P., Pettersson, B. & Uhlen, M. Solid phase DNA minisequencing by an
enzymatic luminometric inorganic pyrophosphate detection assay.
Anal. Biochem. 208, 171–175 (1993)

Ronaghi, M. *et al.* Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release.
Anal. Biochem. 242, 84–89 (1996).

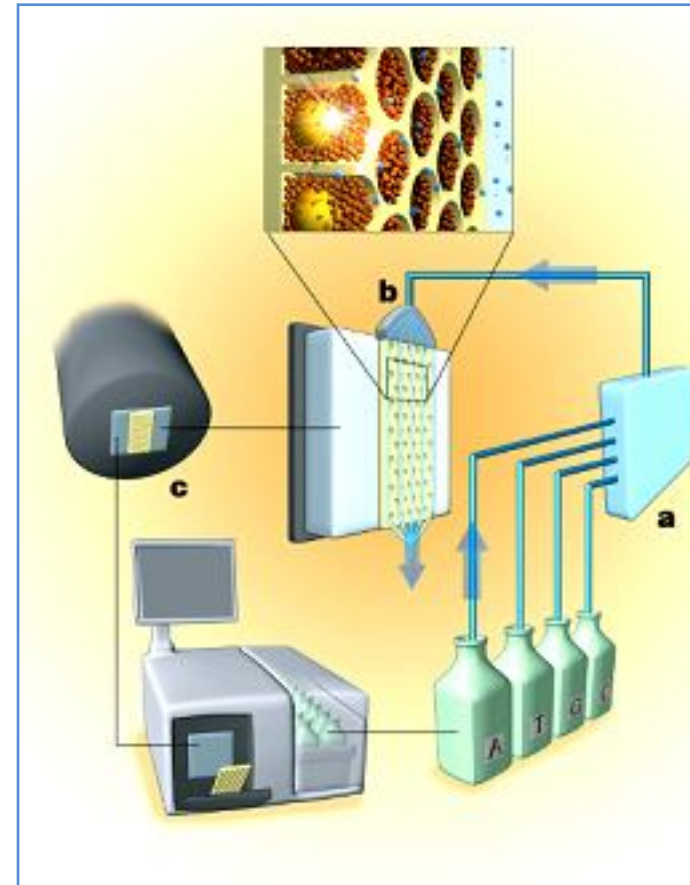
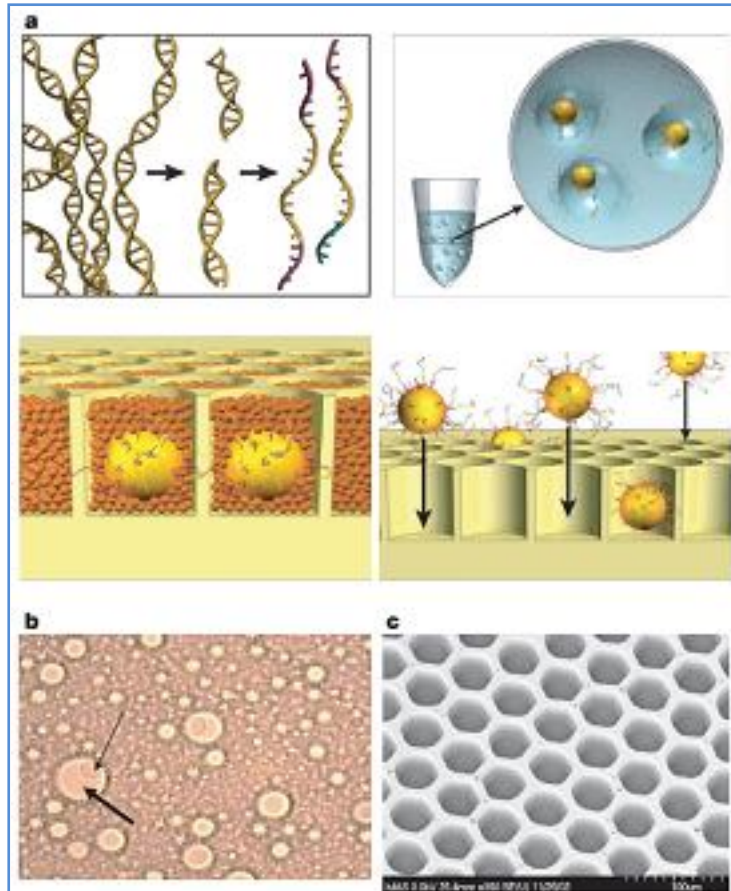
«Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors»
[Margulies¹ *et al.*, *Nature*. 2005, 437(7057):376-80]

- The apparatus uses a novel fibre-optic slide of individual wells and is able to sequence 25 million bases, at 99% or better accuracy, in one four-hour run
- To achieve an approximately 100-fold increase in throughput over current Sanger sequencing technology, we have developed an emulsion method for DNA amplification and an instrument for sequencing by synthesis using a pyro-sequencing protocol optimized for solid support and picolitre-scale volumes
- The $0,58 \times 10^6$ bases *Mycoplasma genitalium* genome, sequenced on one 60x60 mm fibre-optic slide (1.6×10^6 wells, diameter/depth – 44/50 μm) required 1.6 ml of emulsion. A human genome ($\sim 3 \times 10^9$ bases), over sampled ten times, would require approximately 3,000 ml of emulsion (1875 times more)

¹454 Life Sciences Corp.
20 Commercial Street, Branford, Connecticut 06405, USA

«Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors»

[Margulies *et al.*, *Nature*. 2005, 437(7057):376-80]



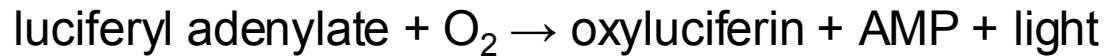
Слева схема основного опыта: **a)** *порядок змейкой* сверху слева, направо, вниз, налево – i) случайная фрагментация геномной ДНК (с помощью микрофорсунки) и сшивание концов с адаптерами (А и В, см. след. рис.) для ПЦР и секвенирования, денатурация фрагментов, ii) улавливание индивидуального одноцепочечного ДНК-фрагмента микрочастицей с ковалентно связанным праймером, комплементарным адаптеру В, и ПЦР-амплификация в каплях эмульсии в масле, iii) загрузка микрочастиц с амплифицированным матричным фрагментом ДНК в ячейки слайда из оптоволокна (6 x 6 см) и iv) загрузка в ячейки микрочастиц с адсорбированными ферментами и субстратами, необходимыми для “пирофосфатного” секвенирования; **b)** микрофотография эмульсии с каплями, свободными и содержащими микрочастицу с матричным фрагментом ДНК; **c)** сканирующая электронная микроскопия участка слайда из оптоволокна (ячейка в поперечнике 44 мкм, глубина 55 мкм, расстояние между центрами соседних ячеек 55 мкм)

Справа схема аппаратуры для секвенирования: **a)** система проточной подачи реагентов, **b)** проточная камера со вставленным в нее слайдом из оптоволокна, **c)** CCD-камера (Charge Coupled Device), сенсор изображения, интегрированная схема, включающая решетку связанных светочувствительных электрических конденсаторов, и компьютер, обеспечивающий необходимый пользовательский интерфейс и контроль аппаратуры.

«Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors»

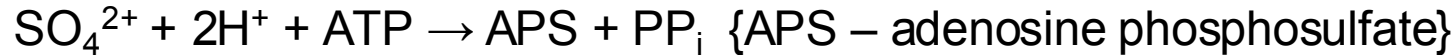
[Margulies *et al.*, *Nature*. 2005, 437(7057):376-80]

The *luciferase* reaction takes place in two steps:



The reaction is very energy efficient: nearly all of the energy input into the reaction is transformed into light. As a comparison, the incandescent light bulb loses about 90% of its energy to heat

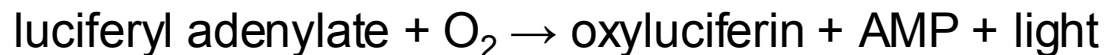
ATP sulfurylase (activation of sulfate):



“Picolitre reaction” in genome sequencing:

Content: (*ATP sulfurylase* + APS) + (*luciferase* + Luciferin) + PP_i [from sequencing reaction]

Steps:





J. D. Watson

Research team at Baylor College of Medicine has published the first complete DNA sequence and analysis of an individual human diploid genome (the person was Dr JD Watson, co-discoverer of the DNA structure).

The association of genetic variation with disease and drug response, and improvements in nucleic acid technologies, have given great optimism for the impact of 'genomic medicine'. However, the formidable size of the diploid human genome, approximately 6 gigabases, has until now prevented the routine application of sequencing methods to deciphering complete individual human genomes.

The extent to which this limitation has been overcome can be seen from the fact that the sequence was completed in only two months using massively parallel sequencing systems (454 Life Sciences) in picolitre-size reaction vessels at approximately 1/100 of the cost of traditional capillary electrophoresis methods.

Dr Watson, after consultation with a genetic counsellor, chose to make the sequence data publicly available, omitting only the Apo E gene and the neighbouring sequence associated with Alzheimer's Disease.

The sequence data have since been available online to researchers worldwide at www.jimwatsonsequence.cshl.edu

Ref. Wheeler, DA et al. *Nature* 2008 Apr 17; 452(7189): 872-6.