

Молекулярные методы анализа структурно-функциональной организации генов и геномов

(на примере высших растений)

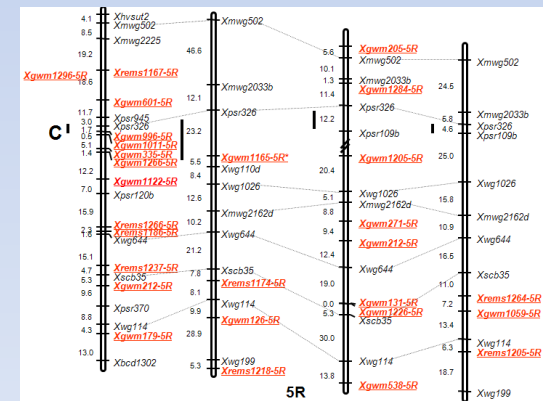
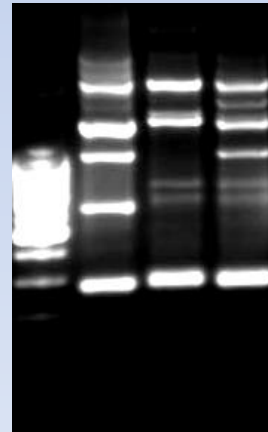
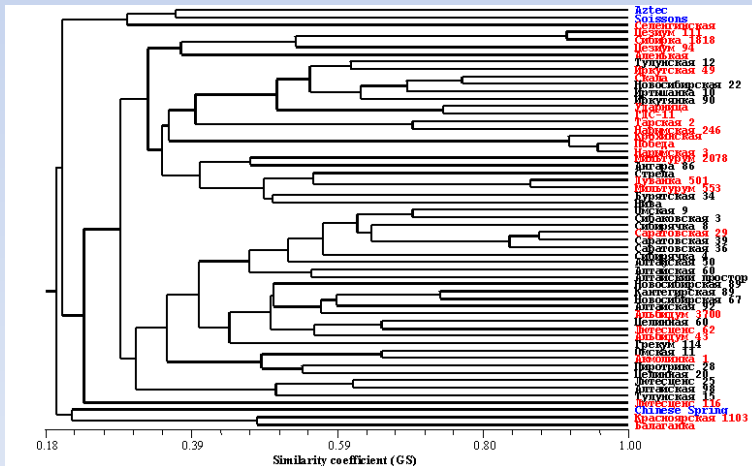
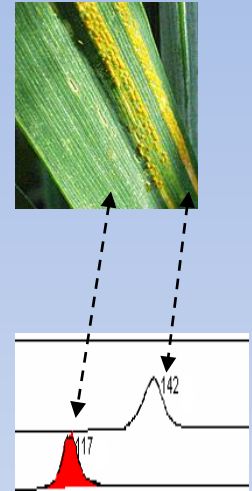
 Методы анализа полиморфизма ДНК:
основные типы ДНК-маркеров и
области их применения

 Подходы к выделению нуклеотидных
последовательностей генов и анализ
их транскрипционной активности

Анализ полиморфизма ДНК

Зачем?

- ✚ Картирование генов, хромосом и геномов
- ✚ Сравнительная генетика и геномика
- ✚ Позиционное клонирование генов
- ✚ Филогения
- ✚ Исследование генетического разнообразия
- ✚ Маркирование генов
- ✚ Селекция с помощью молекулярных маркеров
- ✚ Молекулярная паспортизация сортов/пород
- ✚ Диагностика заболеваний



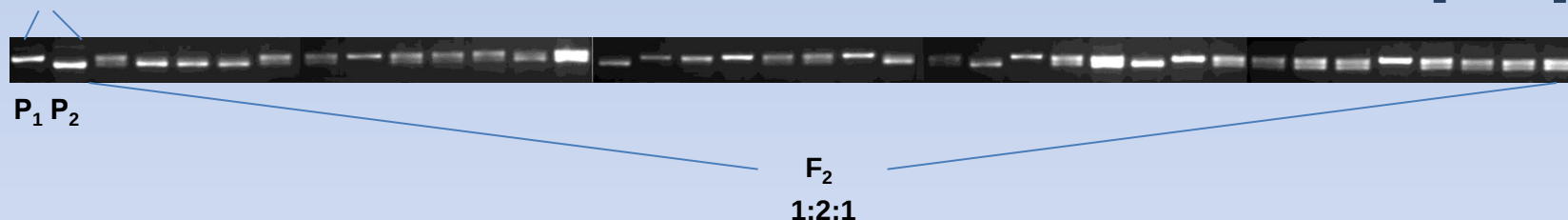
Молекулярные маркеры - генетические маркеры, анализируемые на уровне ДНК

Аллели маркерных локусов - различные формы (нуклеотидные последовательности, отличающиеся по длине и/или по нуклеотидным заменам) одного и того же **маркера**, расположенные в одинаковых участках (**локусах**) гомологичных хромосом.

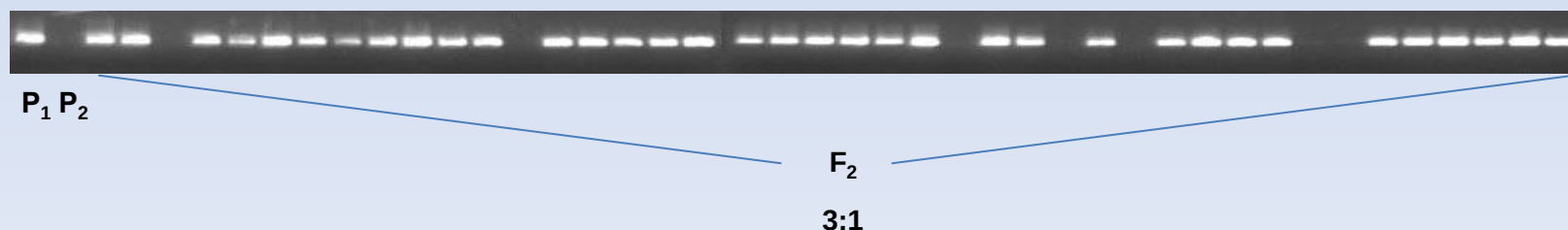
В случае, если метод анализа маркера позволяет выявлять оба аллеля, говорят о **КОДОМИНАНТНОМ** наследовании, если выявляется только один аллель - о **ДОМИНАНТНОМ** наследовании.

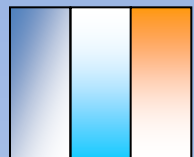
аллели

кодоминантный маркер



доминантный маркер





Блот-гибридизация

ПЦР

ДНК-чипы

Молекулярные маркеры

классы

RFLP

RAPD

STS

SSR

ISSR

IRAP

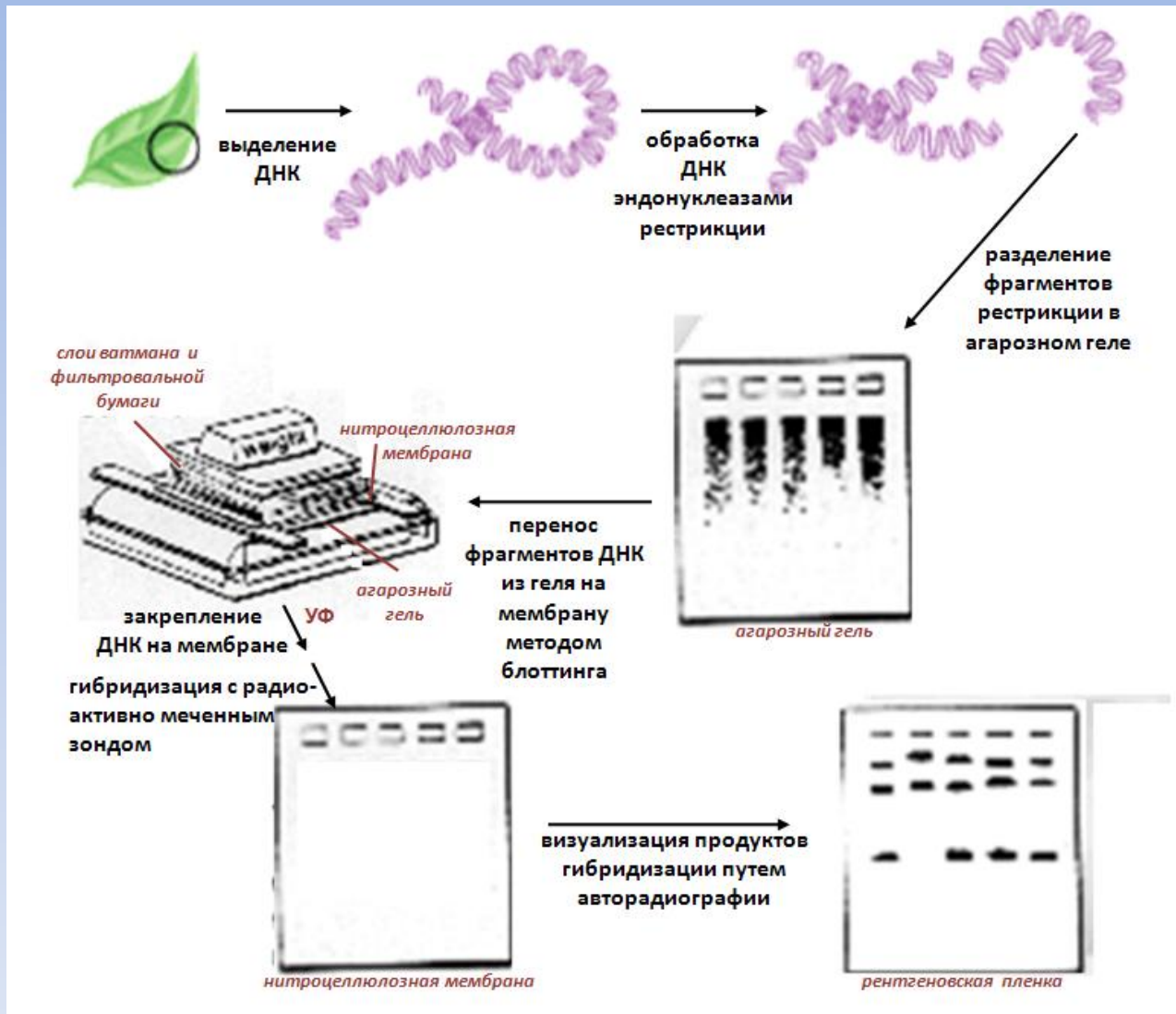
AFLP

SNP

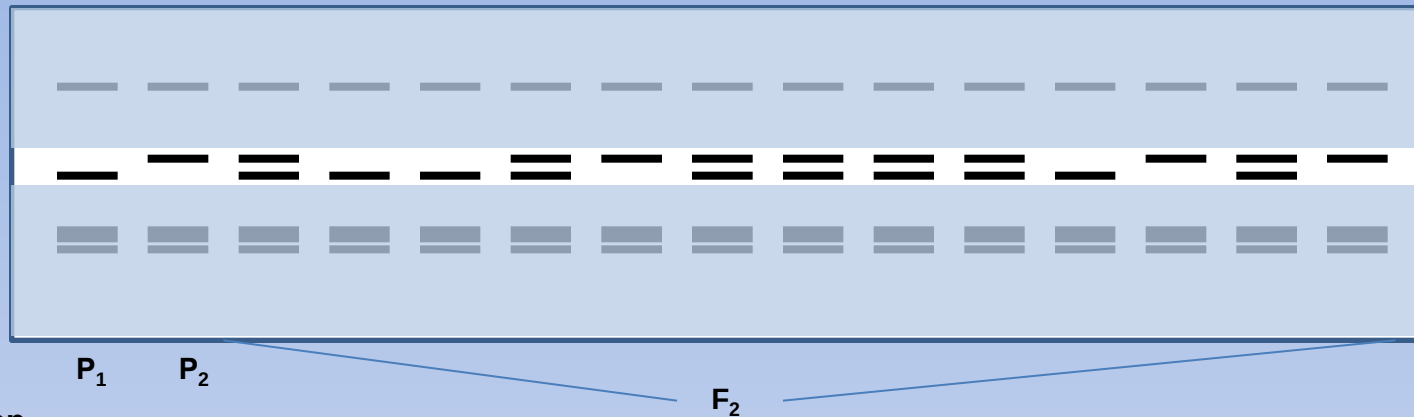
DArT



RFLP (restriction fragment length polymorphism) –
полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (Botstein et al., 1980).



Анализ полиморфизма ДНК и построение молекулярных генетических карт с помощью RFLP-метода



Первая карта сцепления, построенная для пшеницы при использовании RFLP маркеров (Liu and Tsunewaki, 1991), содержала в 1.5 раз больше локусов и была в 1.2 раза длиннее прежней классической генетической карты.

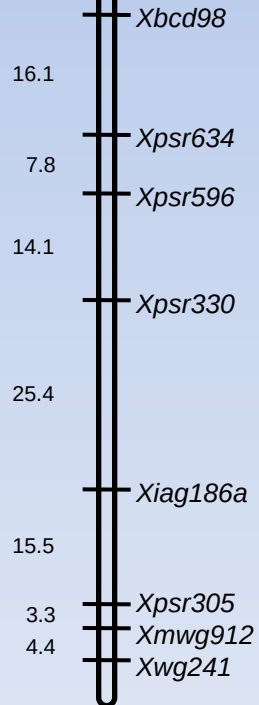
Использование RFLP:

- ✚ Составление первых молекулярных генетических карт
- ✚ Сравнительное картирование генов и геномов
- ✚ Выявление и уточнение перестроек в хромосомах у разных видов
- ✚ Выявление ортологичных локусов
- ✚ Позиционное клонирование генов

Недостатки RFLP:

- ✚ Трудоемкость, невозможность автоматизации
- ✚ Необходимость использования радиоактивной метки
- ✚ Затраты большого количества ДНК и высокие требования к ее очистке
- ✚ Невысокий уровень внутривидового полиморфизма

сМ Маркер



генетическая RFLP карта
хромосомы 1R ржи

мультилокусные

ПЦР-маркеры

монолокусные

RAPD

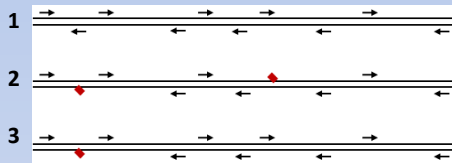
(random amplified polymorphic DNA) - случайно амплифицированная полиморфная ДНК (Welsh et al., 1990; Williams et al., 1990)



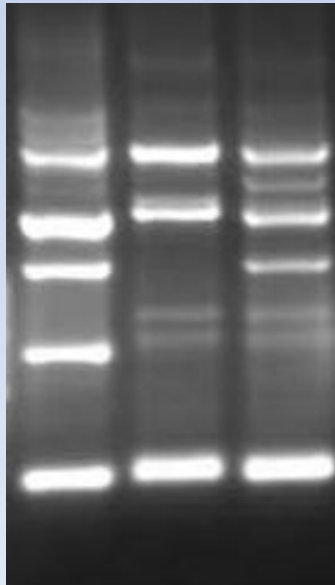
выделение ДНК



ПЦР со случайными праймерами (10-11 п.н.)



1 2 3



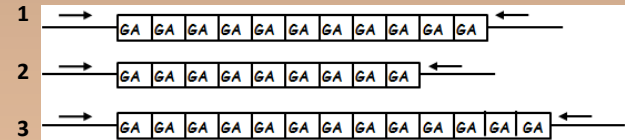
Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР в агарозном геле

Микросателлиты

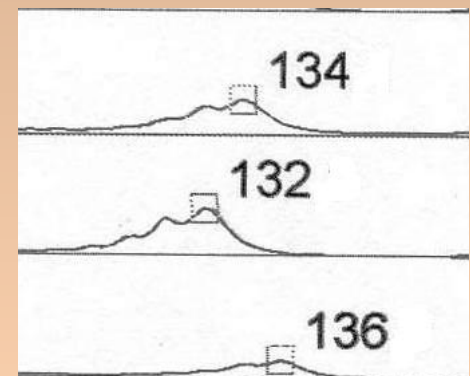
или

SSR (simple sequences repeats) - простые повторяющиеся последовательности (Tautz and Renz, 1984)

ПЦР со специфическими праймерами, подобранными к областям, фланкирующим микросателлит (ок. 20 п.н.)



1
2
3

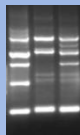


Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР в денатурирующем ПААГ

мультилокусные

молекулярные маркеры

монолокусные



RAPD

ISSR

(inter simple sequence repeats) - межмикросателлитные последовательности (Zietkiewicz et al., 1994).

IRAP

(inter-retrotransposon amplified polymorphism) - полиморфизм амплифицированных последовательностей между ретротранспозонами (Kalendar and Schulman, 2006).

AFLP

(amplified fragment length polymorphism) - полиморфизм длины амплифицированных фрагментов (Vos et al., 1995).

SSAP

(sequence-specific amplification polymorphism) - полиморфизм специфично-амплифицированных последовательностей (Waugh et al., 1997).

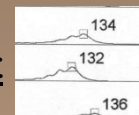
мультилокусные маркеры на основе блот-гибридизации

DArT...

- ✚ Филогенетические исследования
- ✚ Картирование генов геномов (AFLP, DArT)
- ✚ Молекулярная паспортизация сортов/пород
- ✚ Исследование генетического разнообразия

RFLP

Микросателлиты



STS

(sequences tagged site) - последовательности, характеризующие locus. (Olson et al., 1989).

SCAR

(sequence characterized amplified region) - последовательность, характеризующая амплифицированную область (Paran and Michelmore, 1993).



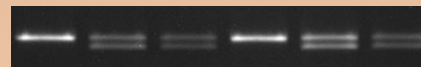
SSCP

(single strand conformation polymorphism) - полиморфизм конформации одноцепочечной ДНК. (Orita et al., 1989).



CAPS (dCAPS)

(cleaved amplified polymorphic sequences) - расщепленные амплифицированные полиморфные последовательности (Konieczny and Ausubel, 1993)



SNP...

- ✚ Картирование генов, хромосом и геномов
- ✚ Маркирование генов
- ✚ Селекция с помощью молекулярных маркеров
- ✚ Молекулярная паспортизация сортов/пород
- ✚ Диагностика заболеваний
- ✚ Исследование генетического разнообразия
- ✚ Филогенетические исследования

SNP

(single-nucleotide polymorphism) -
однонуклеотидный полиморфизм

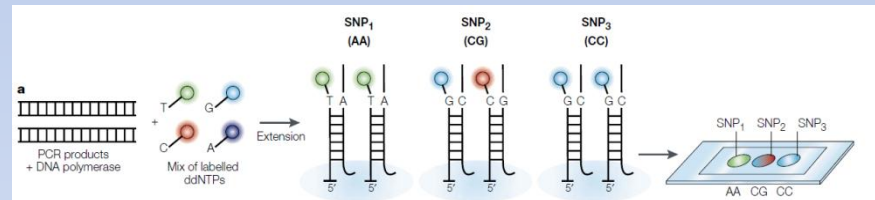
SNP - одонуклеотидная позиция в геноме, для которой в популяции встречаются различные варианты (аллели), причем частота наиболее редкого аллеля должна составлять не менее 1% (Brookes, 1999).

Не путать терминологически с
PSV - paralogous
sequence variants,
HSV - homoeologous
sequence variants

Преимущества

Высокая частота встречаемости SNP -локусов в геноме по сравнению с другими маркерными локусами (например, в геноме пшеницы SNP - 1/500, SSR - 1/10000)

Возможность полной
автоматизации



Недостатки

Низкий PIC - polymorphism information content

$$PIC_i = 1 - \sum_{j=1}^n P_{ij}^2$$

Сложно анализировать SNP в аллополиплоидных геномах

DArT

(diversity array technology) -

ДНК-чип технология для изучения разнообразия
Jaccoud et al., 2001.

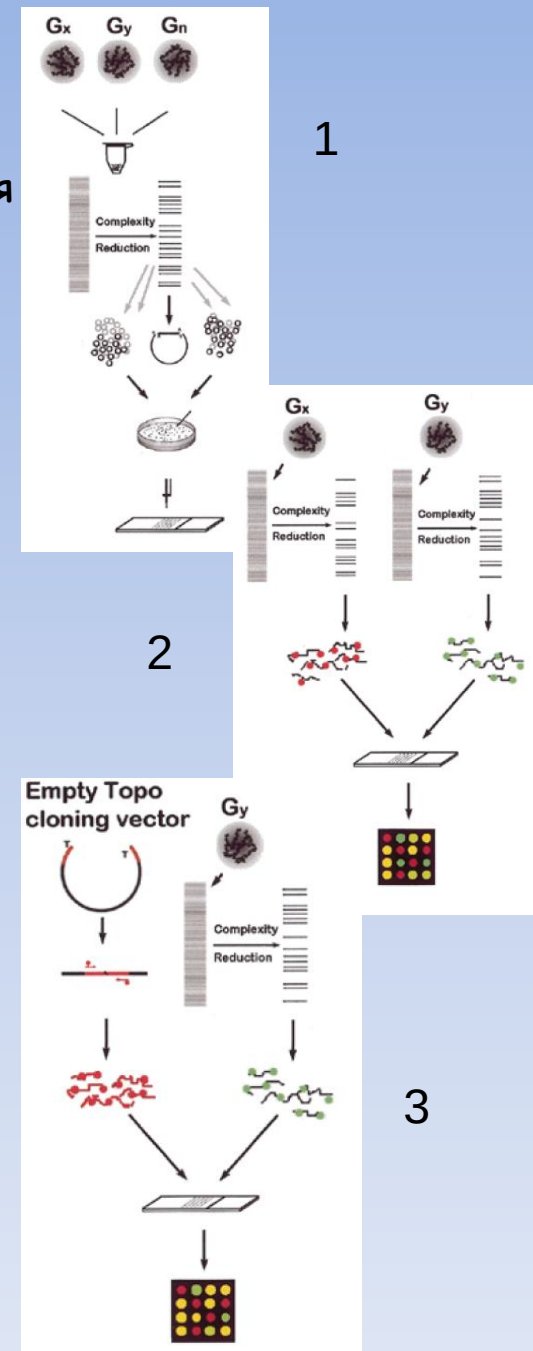
1. Создание ДНК-чипа, несущего библиотеку фрагментов геномной ДНК (0.1 - 10% генома), полученной от смеси генотипов.
2. Гибридизация меченной геномной ДНК 2-х различных образцов на данный чип - выявление полиморфных элементов.
3. Гибридизация меченной геномной ДНК изучаемого образца - генотипирование (при сравнении большого числа образцов).

Преимущества

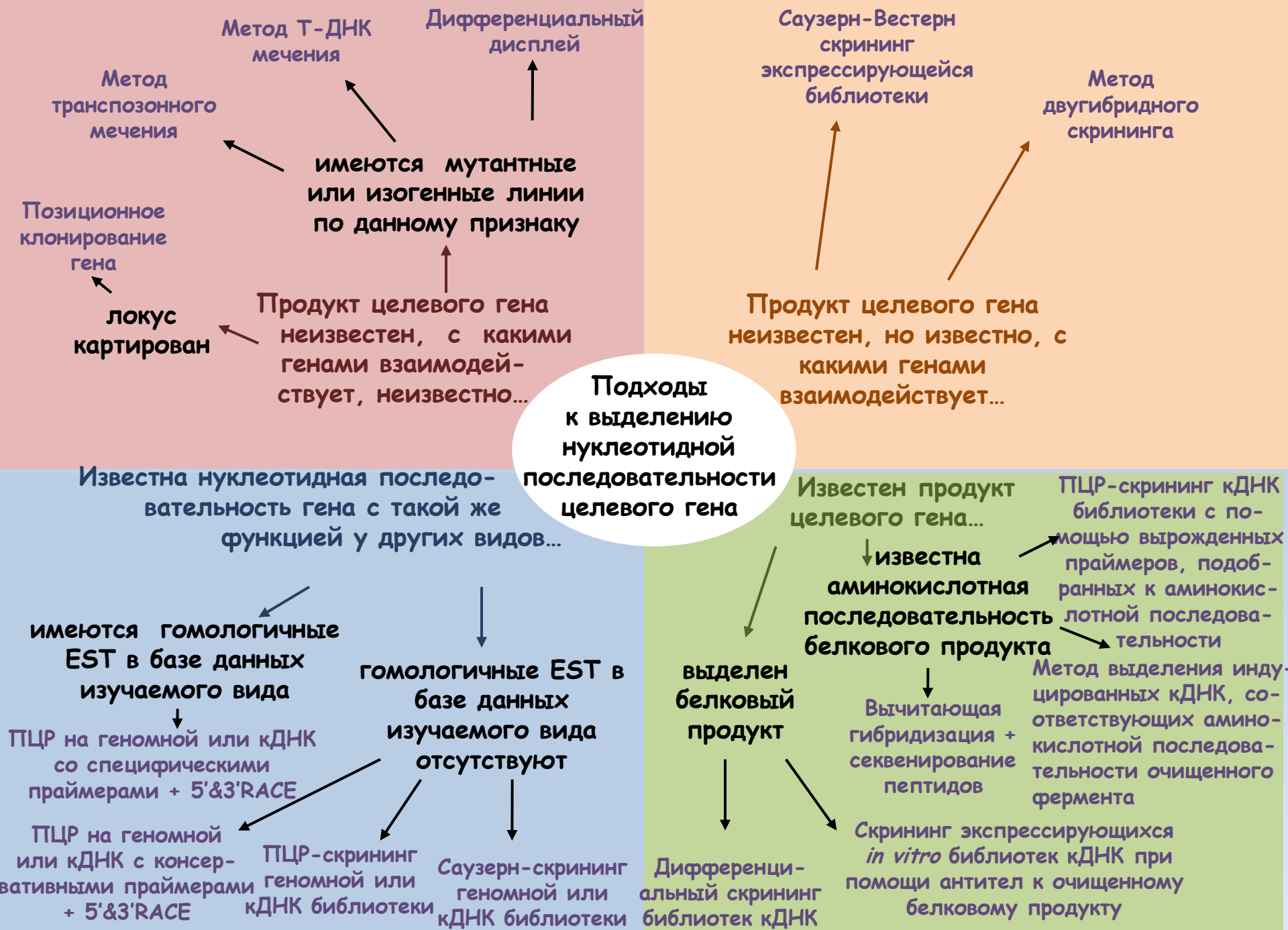
Не требуется сведений о первичной структуре ДНК
Не требуется синтез олигонуклеотидов для чипов
Возможность полной автоматизации

Недостатки

Маркеры доминантного типа

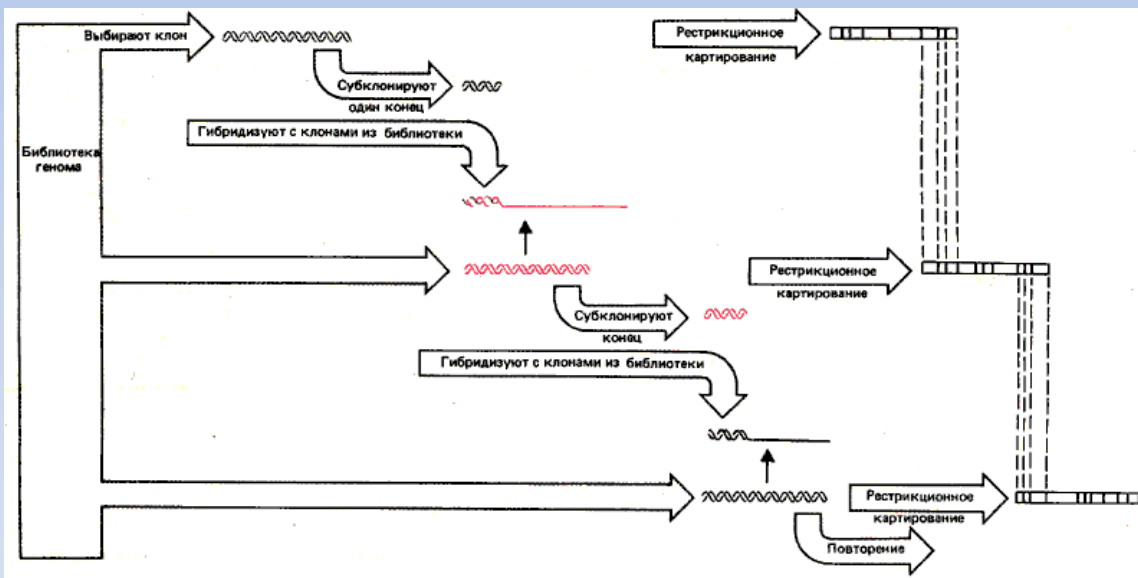
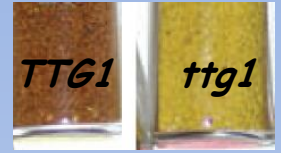


Подходы к выделению нуклеотидных последовательностей генов



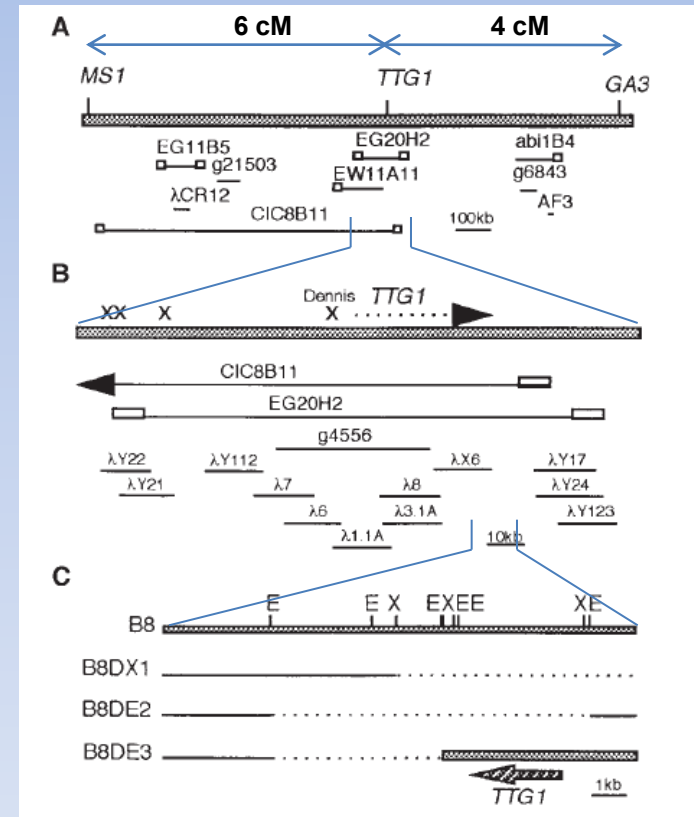
Позиционное клонирование

- Мутантная линия *ttg1* с неокрашенными семенами (Koorneeff, 1981)
- Генетическое картирование локуса *TTG1* (Koorneeff et al. 1983)
- Выделение нуклеотидной последовательности гена *TTG1* (Walker et al., 1999)



«Прогулка по хромосоме»

(осуществляется путем последовательных актов гибридизации между перекрывающимися клонами генома)



Последовательность - 5777 п.н.

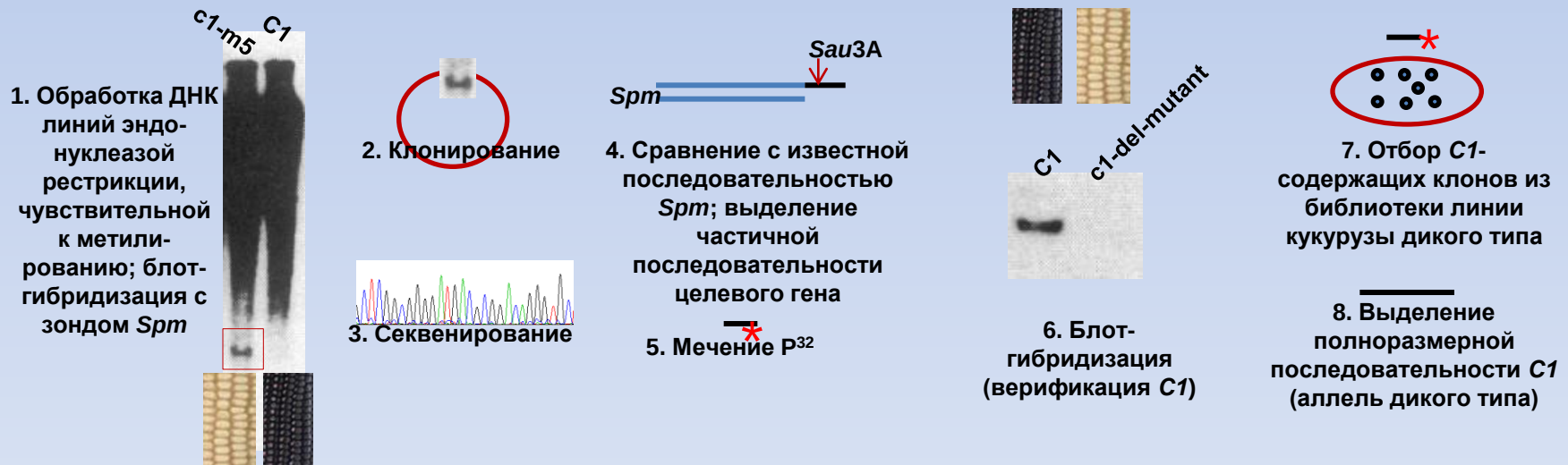
Секвенирование, аннотирование

Найден единственный ген - транскрипционный фактор WD40



Транспозонное мечение

- ген C1 кукурузы (антоциановая окраска зерна)
- Мутантная линия c1-m5 с неокрашенным зерном (со встройкой транспозона *Spm* в ген *C1*; получена Б.МакКлинток)
- Последовательности в области встраивания транспозона неометилированы...
- Выделение последовательности гена *C1* кукурузы (Cone et al., 1986):



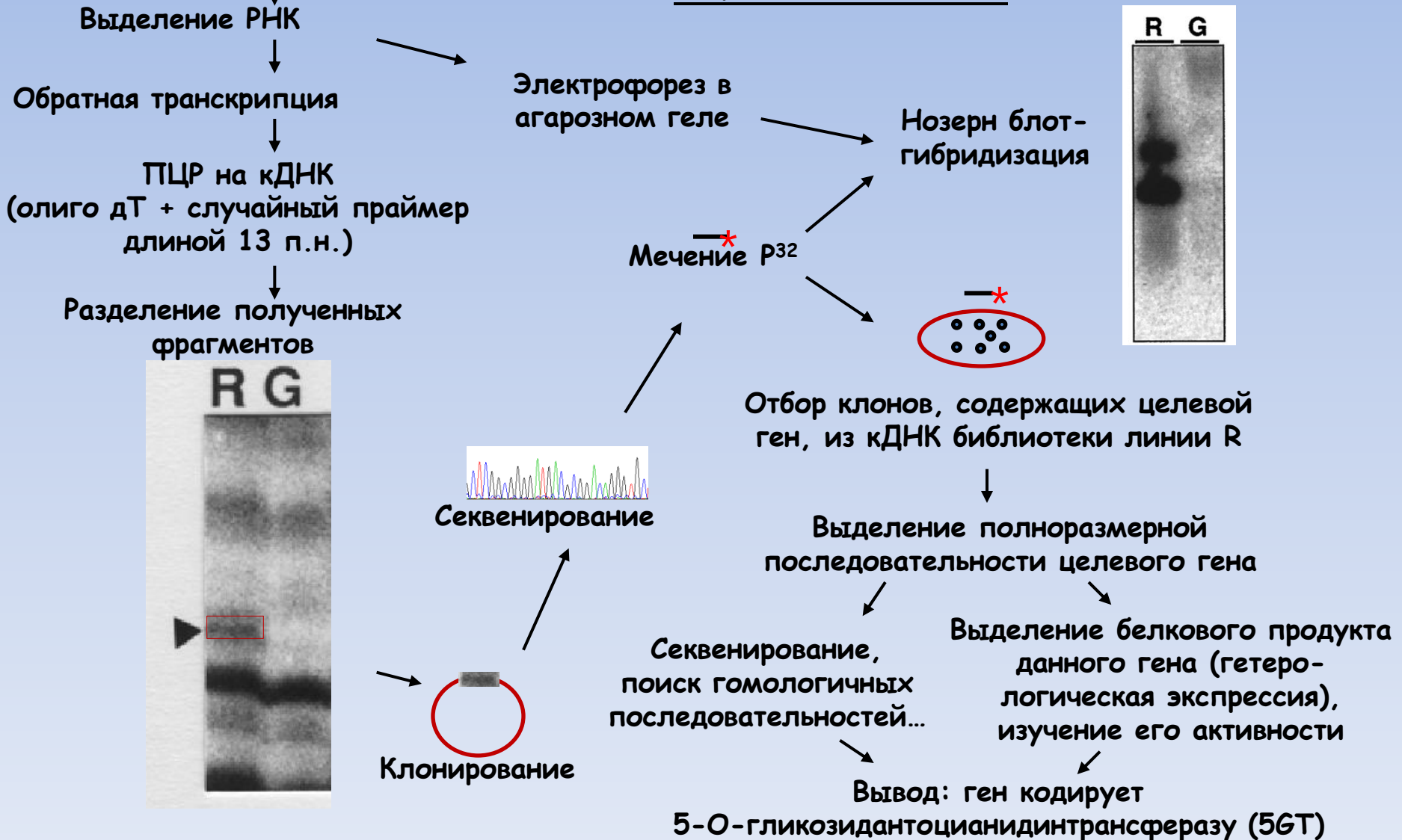
- *C1* - первый регуляторный локус растений, для которого был проведен детальный молекулярный анализ (Paz-Ares et al., 1987).

перилла



Дифференциальный дисплей

Yamazaki et al. 1999



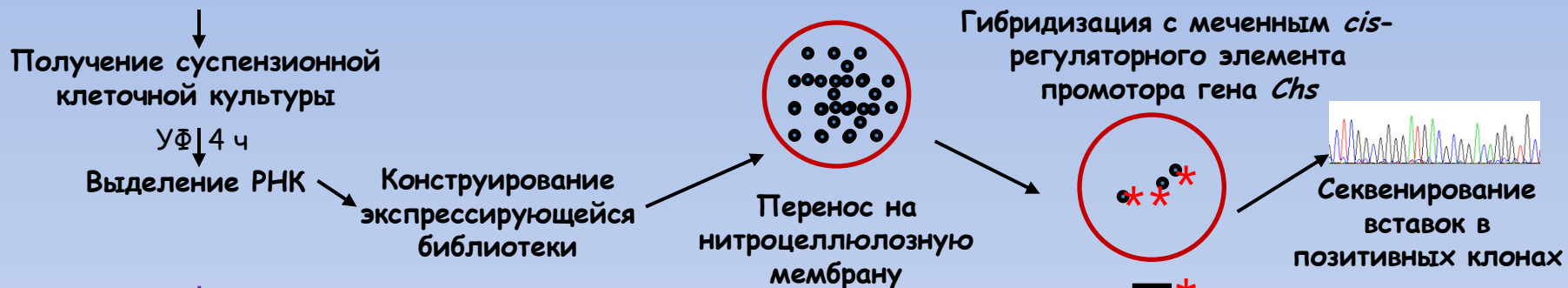
петрушка



Саузерн-Вестерн скрининг экспрессирующей библиотеки

Выделение регуляторных факторов CPRF1-3

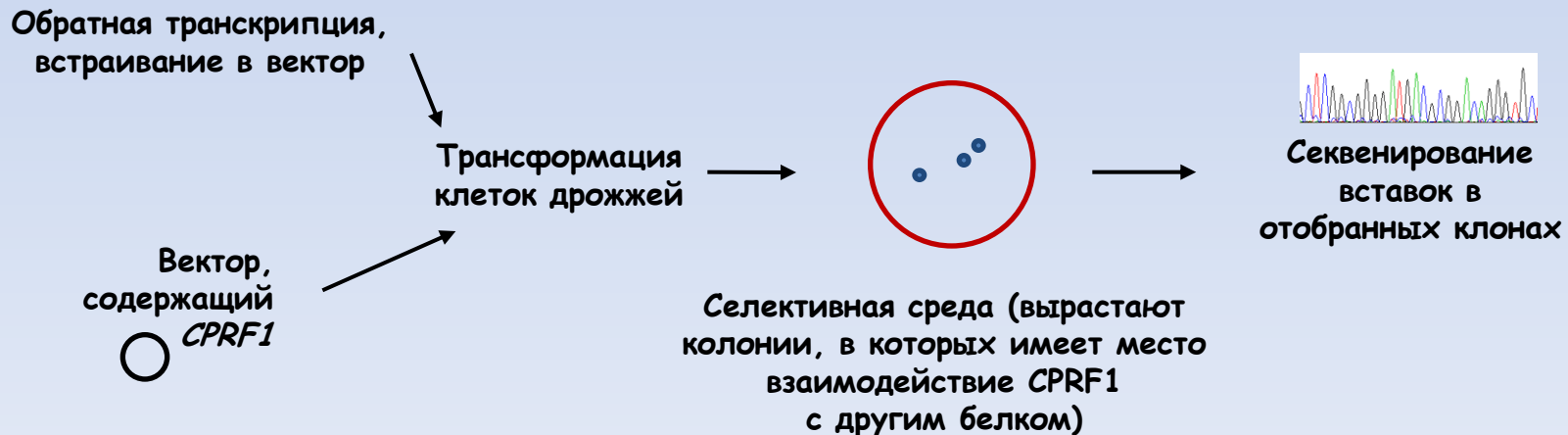
Weisshaar et al. 1991



Метод двугибридного скрининга

Выделение регуляторных факторов CPRF5-7

Rügner et al. 2001



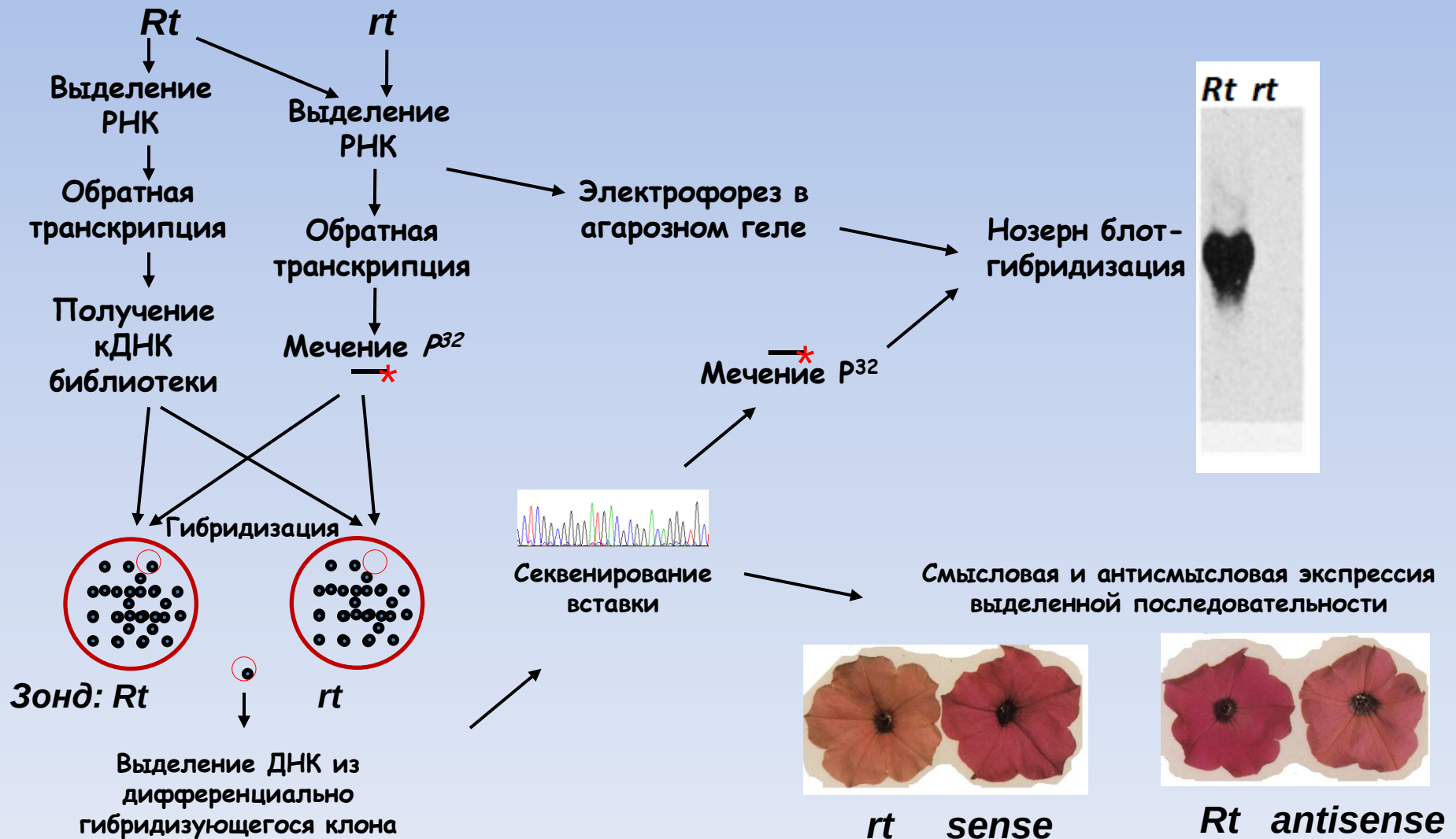
петуния



Дифференциальный скрининг библиотек кДНК

Выделение гена, кодирующего фермент 3RT

Brugliera et al. 1994



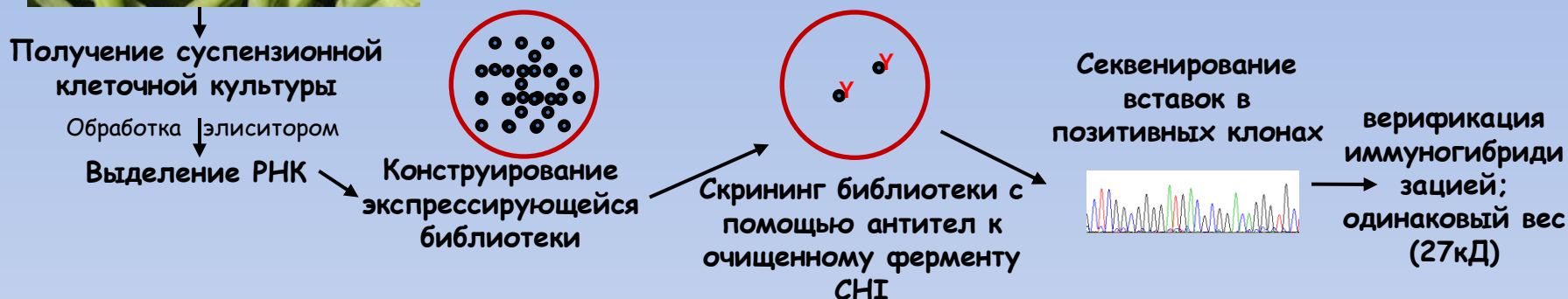
фасоль



Скрининг экспрессирующейся библиотеки с помощью антител

Выделение гена *Chi* (халконфлаванонизомеразы)

Mehdy and Lamb 1987



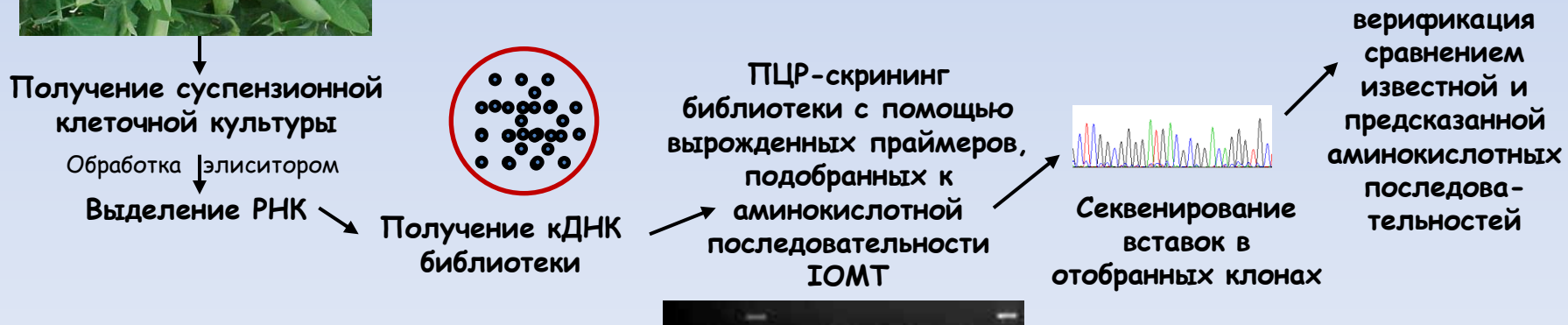
горох



ПЦР-скрининг кДНК библиотеки с помощью вырожденных праймеров

Выделение гена *Iomt* (изофлаван-О-метилтрансферазы)

He et al. 1998





Вычитающая гибридизация

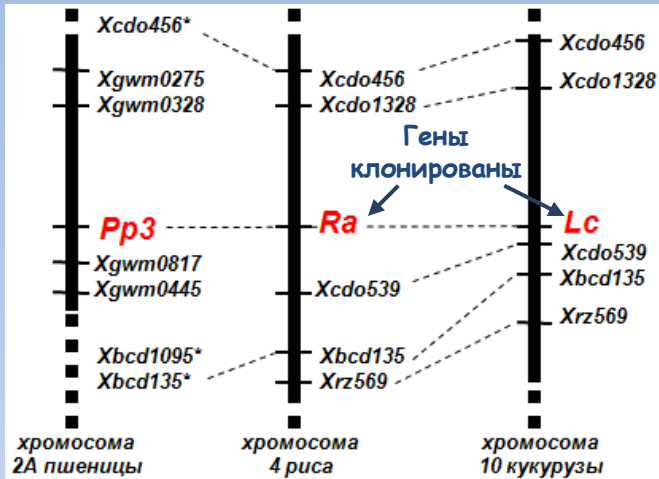
Выделение гена *Aus* (ауреузиндинсинтазы)

Nakayama et al. 2000





Антоциановая окраска семян



Выделение нуклеотидных последовательностей генов на основе гомологии

Известна нуклеотидная последовательность гена с такой же функцией (локализацией) у других видов

Поиск гомологичных EST в базе данных изучаемого вида

EST отсутствуют

EST выявлены

Выравнивание последовательностей других видов

Подбор ПЦР-праймеров к консервативным областям гена

ПЦР на геномной ДНК или кДНК
(1 копия гена!!!)

Секвенирование частичной кодирующей последовательности, верификация

ПЦР-скрининг кДНК или ВАС-библиотеки

Секвенирование позитивных клонов, верификация

Секвенирование 5' и 3' областей гена методом 5'- и 3'-RACE

Использование клона, содержащего ген другого вида

Скрининг кДНК или ВАС-библиотеки на основе гибридизации

Секвенирование позитивных клонов, верификация

Подбор праймеров для ПЦР

ПЦР на геномной ДНК или кДНК
(1 копия гена!!!)

Секвенирование частичной кодирующей последовательности, верификация

ПЦР-скрининг кДНК или ВАС-библиотеки

Секвенирование позитивных клонов, верификация

Подходы к анализу транскрипционной активности генов

Методы анализа транскрипционной активности генов

**
 Вычитающая
 гибридизация

*
 Нозерн-
 блоттинг

**
 Обратный
 нозерн-
 блоттинг

**
 Гибридизация
 НК на
 микрочипах

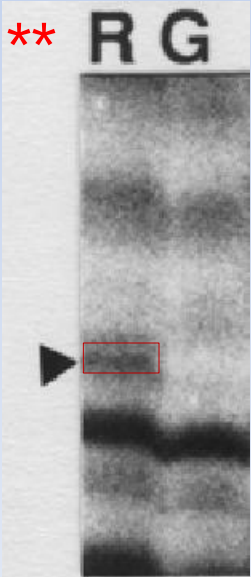
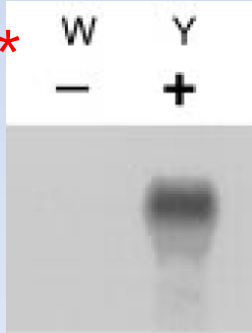
*
 ОТ-ПЦР со
 специфическими
 праймерами

*
 ОТ-ПЦР в
 реальном
 времени

**
 РНК-
 фингерпринтинг
 с помощью ПЦР

**
 Анализ
 EST

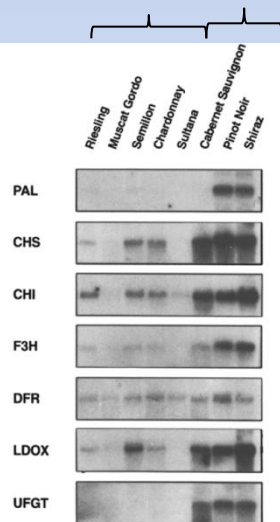
**
 SAGE



Методы, основанные на гибридизации нуклеиновых кислот

Вычитаящая
гибридизация
мРНК и
одноцепочечной
кДНК (см. выше)

Boss et al., 1996



Нозерн-блоттинг

Нозерн-
блоттинг

Выделение РНК

Фракционирование
РНК в агарозном
геле

Перенос молекул
РНК из геля на
мембрану

Гибридизация с
радиоактивно-
меченным ДНК-
зондом

Визуализация
продуктов
гибридизации
путем
автордиографии

Обратный
нозерн-блоттинг

(прототип «Microarray gene
expression profiling»)

Выделение ДНК

рестрикция

Фракционирование
фрагментов ДНК
агарозном геле

Перенос молекул
ДНК из геля на
мембрану

Гибридизация с
радиоактивно-
меченным кДНК-
зондом

Визуализация
продуктов
гибридизации
путем
автордиографии

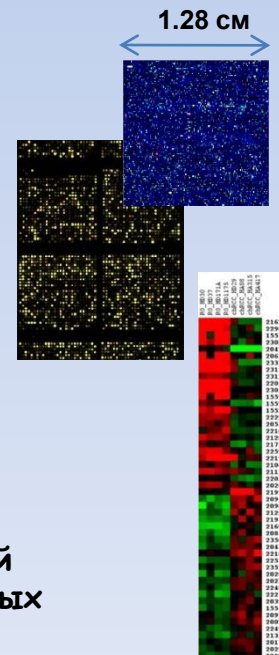
Гибридизация
НК на
микрочипах

Производство ДНК-микрочипов:
на специальном носителе в
организованном порядке
размещаются молекулы ДНК,
например, олигонуклеотиды длиной
20-25 п.н. (1 чип – десятки тысяч
олигонукл.)

Гибридизация чипа
с флуоресцентно-
меченным кДНК-
зондом

Визуализация
продуктов
гибридизации с
помощью чип-
сканера

Сравнение профилей
экспрессии, полученных
с разными зондами



Microarray gene expression profiling

Методы, основанные на ПЦР

ОТ-ПЦР со специфическими праймерами

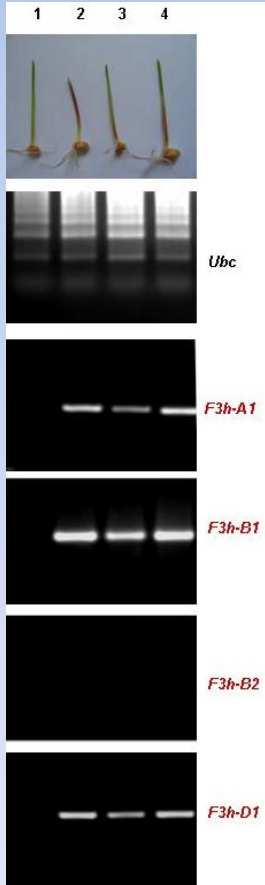
Выделение РНК

Обратная транскрипция

ПЦР на кДНК с использованием праймеров, специфичных к целевому гену

Разделение ПЦР-фрагментов в агарозном геле

Визуализация в УФ



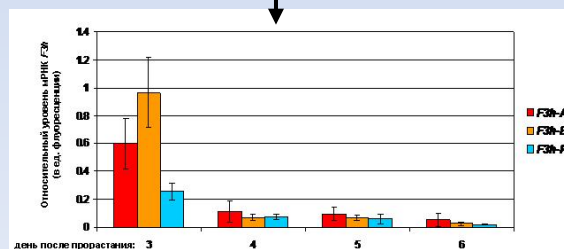
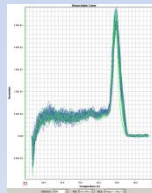
ОТ-ПЦР в реальном времени

Выделение РНК

Обратная транскрипция

ПЦР на кДНК с использованием праймеров, специфичных к целевому гену и SYBR green I, проводимая в детектирующем амплификаторе (ПЦР в реальном времени)

Оценка специфичности реакции с помощью кривых плавления



Методы РНК фингерпринтинга

Выделение РНК

Обратная транскрипция

ПЦР

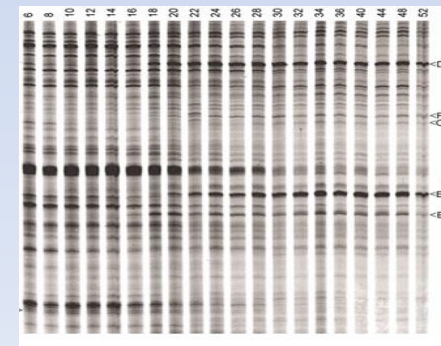
RAP-PCR

DD-PCR

cDNA-AFLP

Разделение ПЦР-фрагментов в ПААГ

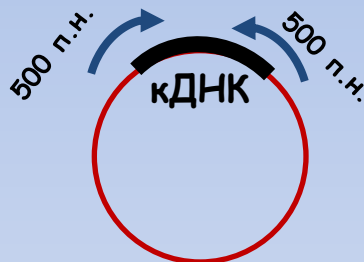
Визуализация



Методы, основанные на секвенировании

Анализ EST

(expressed sequences tags) -
экспрессирующиеся последовательности ДНК.
EST получают в результате секвенирования
концевых районов (ок. 500 п.н.) вставок
кДНК-библиотек (Adams et al., 1991)



1991 г. - начало создания
баз данных EST

27.04.2011

Homo sapiens (8315122)

Mus musculus (4853546)

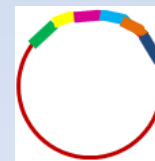
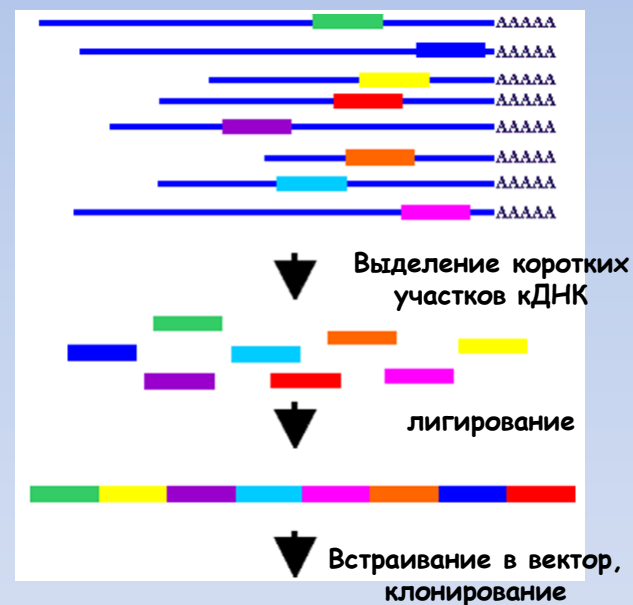
Zea mays (2019105)

Метод анализа EST:

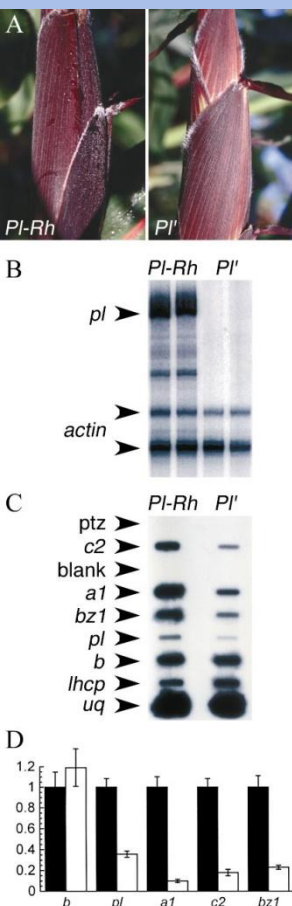
DDD *in silico* (Digital Differential Display) -
попарное сравнение разных кДНК библиотек одного
и того же вида позволяет выделять специфично
экспрессирующиеся последовательности
(тканеспецифичные или генотип-специфичные)

SAGE

(Serial analysis of gene expression) -
последовательный анализ экспрессии генов.
Экспресс метод секвенирования коротких (10-
14 п.н.) участков кДНК (Velculescu et al., 1995).



Секвенирование, *in silico* анализ,
сравнение разных кДНК библиотек...



СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!