

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Институт фундаментальной медицины и биологии

Кафедра генетики

**МОЛЕКУЛЯРНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОМА**

Учебно-методическое пособие

Казань - 2016

УДК 577.21  
ББК 28

Печатается по решению редакционно-издательского совета ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Учебно-методической комиссии Института фундаментальной медицины и биологии К(П)ФУ, протокол №3 от 26 апреля 2016

Рецензенты:

Кандидат биологических наук, доцент кафедры генетики, **Э.В.Бабынин**

**Каюмов А.Р.** Молекулярный анализ генома. Учебно-методическое пособие / А.Р. Каюмов – Казань: Казань, КФУ, 2016. -60 с.

В учебно-методическом пособии по дисциплине «Молекулярный анализ генома» приведена рабочая программа дисциплины с фондом оценочных средств, краткий конспект лекций с описанием лабораторных работ. Приводятся наиболее распространенные и общепринятые методики выделения ДНК, ее электрофоретического разделения, полимеразной цепной реакции, рестрикционного анализа, анализа методами биоинформатики.

© Каюмов А.Р., 2016  
© Казанский федеральный университет, 2016

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	5
<b>Программа дисциплины</b>	6
1. Цели освоения дисциплины	7
2. Место дисциплины в структуре основной образовательной программы высшего профессионального образования	7
3. Компетенции обучающегося, формируемые в результате освоения дисциплины/модуля	7
4. Структура и содержание дисциплины/ модуля	9
4.1. Структура и содержание аудиторной работы по дисциплине/ модулю	9
4.2. Содержание дисциплины	10
4.3. Структура и содержание самостоятельной работы дисциплины (модуля)	11
5. Образовательные технологии, включая интерактивные формы обучения	12
6. Оценочные средства для текущего контроля успеваемости, промежуточной аттестации по итогам освоения дисциплины и учебно-методическое обеспечение самостоятельной работы студентов	12
7. Литература	14
7.1. Основная литература	14
7.2. Дополнительная литература	15
7.3. Интернет-ресурсы	15
8. Материально-техническое обеспечение дисциплины(модуля)	15
<b>Конспект лекций и указания к выполнению лабораторных работ</b>	17
<b>1. Тема 1. Структурная организация генома</b>	17
1.1. Организация генома бактерий.	19
1.2. Организация генома человека.	20
1.3. Гены.	22
1.4. Умеренно- и высокоповторяющиеся последовательности ДНК.	22
1.5. Организация генома вирусов.	23
<b>2. Тема 2. Методы выделения геномной ДНК различных организмов</b>	24
2.1. Выделение геномной ДНК из клеток бактерий методом фенол-хлороформной экстракции.	25
2.2. Выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток. Классический MiniPrep [Sambrook et al., 1989].	26
2.3. Быстрое выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток для электрофоретического анализа методом фенол-	

хлороформной экстракции.	27
2.4. Выделение ДНК из клеток (фенольный метод).	27
2.5. Выделение ДНК с использованием протеиназы К.	29
2.6. Методика.	29
<b>3. Тема 3. Электрофоретическое разделение ДНК</b>	31
3.1. Принцип электрофоретического разделения нуклеиновых кислот.	32
3.2. Проведение электрофореза.	32
<b>4. Тема 4. Полимеразная цепная реакция</b>	35
4.1. Основные понятия метода ПЦР-амплификации.	36
4.2. Компоненты ПЦР.	37
<b>5. Тема 5. Рестрикционный анализ</b>	41
5.1. Рестрикционный анализ.	42
5.2. ПДРФ-анализ (RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism).	42
5.3. ПДРФ семейный генетический анализ сцепления.	44
<b>6. Тема 6. Методы секвенирования</b>	45
6.1. Принцип секвенирования ДНК по Сэнгеру.	46
6.2. Принцип секвенирования ДНК методом химической дегградации по Максаму-Гилберту.	48
6.3. Пиросеквенирование.	48
6.4. Принцип высокопроизводительного пиросеквенирования ДНК.	49
6.5. Секвенаторы второго поколения: Illumina.	50
<b>7. Тема 7. Специальные методы анализа</b>	52
7.1. Метод поверхностного-плазмонного резонанса.	53
7.2. ДНК-микроэrray, микрочип (DNA microarray, microchip).	54
7.3. Гибридизация как высокочувствительный метод выявления специфических последовательностей нуклеотидов.	55
<b>8. Тема 8. Анализ данных методами геномики и биоинформатики</b>	56
8.1. Пакет программ BLAST.	57
8.2. Программа выравнивания двух последовательностей - Align two sequences (bl2seq).	57
8.3. Поиск открытой рамки считывания (ORF).	57
8.4. Идентификация организма на основании анализа первичной нуклеотидной последовательности.	58
8.5. Построение филогенетического древа.	60

## ВВЕДЕНИЕ

Работы в области молекулярной генетики подразумевают манипуляцию фрагментами ДНК для исследования генетического аппарата организма, модификации его свойств путем введения измененной (рекомбинантной) ДНК, направленной или случайной модификации собственной ДНК организма и оценки влияния данных изменений на жизнедеятельность клетки.

В основе подходов молекулярной генетики лежат современные физико-химические и биохимические методы, направленные на выделение геномной, плазмидной, митохондриальной или пластидной ДНК, манипуляций с ней с целью модификации, расшифровки последовательности, ее анализа. Для получения геномодифицированных организмов далее проводят манипуляции по введению ДНК в живые клетки-мишени с помощью различных подходов. В результате добиваются того, что ДНК встраивается в геномную ДНК благодаря рекомбинации, трансдукции или трансфекции.

В учебно-методическое пособие включены описания и протоколы стандартных методов выделения ДНК из различных клеток, электрофоретического разделения ДНК, полимеразной цепной реакции. Приводятся наиболее распространенные и общепринятые методики, не требующие дорогостоящих или редких реактивов и материалов либо коммерческих наборов реагентов. Каждый метод содержит теоретическое описание и краткую характеристику метода, назначение этого метода, наиболее важные аспекты его практического использования, целевое назначение необходимых реактивов и оборудования, подробное последовательное описание стадий лабораторных операций.

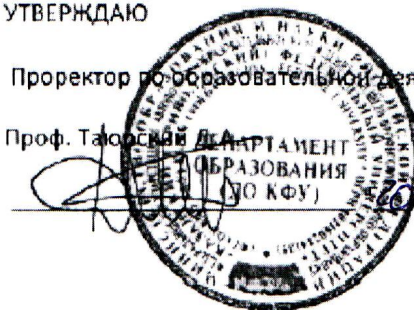
МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
Федеральное государственное автономное учреждение  
высшего профессионального образования  
"Казанский (Приволжский) федеральный университет"  
Институт фундаментальной медицины и биологии



УТВЕРЖДАЮ

Проректор по образовательной деятельности КФУ

Проф. Таирова Д.А.



09

2015 г.

подписано электронно-цифровой подписью

**Программа дисциплины**  
**Молекулярный анализ генома БЗ.ДВ.4**

Направление подготовки: 020400.62 - Биология

Профиль подготовки: Физиология человека и животных, биохимия, генетика, микробиология

Квалификация выпускника: бакалавр

Форма обучения: очное

Язык обучения: русский

Автор(ы):

Каюмов А.Р.

Рецензент(ы):

Бабынин Э.В.

**СОГЛАСОВАНО:**

Заведующий(ая) кафедрой: Ризванов А. А.

Протокол заседания кафедры No 1 от "1" 09 2015 г

Учебно-методическая комиссия Института фундаментальной медицины и биологии:

Протокол заседания УМК No 1 от "20" 09 2015 г

Регистрационный No 849420415

Казань  
2015

Программу дисциплины разработал(а)(и) доцент, к.н. Каюмов А.Р. кафедра генетики ИФМиБ отделение фундаментальной медицины, Ajrat.Kajumov@kpfu.ru.

### **1. Цели освоения дисциплины**

Целью курса является обучение студентов к самостоятельному анализу генома организма, включая а) определение порядка и видов необходимых экспериментальных исследований исходя из природы организма; б) проведения экспериментальных работ в) биоинформационный анализ полученных данных.

### **2. Место дисциплины в структуре основной образовательной программы высшего профессионального образования**

Данная учебная дисциплина включена в раздел "Б3.ДВ.4 Профессиональный" основной образовательной программы 020400.62 Биология и относится к дисциплинам по выбору.

Осваивается на 4 курсе, 7 семестр.

Программа "Молекулярная организация генома" входит в цикл Б3.ДВ.4

### **3. Компетенции обучающегося, формируемые в результате освоения дисциплины /модуля**

В результате освоения дисциплины формируются следующие компетенции:

<b>Шифр компетенции</b>	<b>Расшифровка приобретаемой компетенции</b>
ОК-6 (общекультурные компетенции)	использует в познавательной и профессиональной деятельности базовые знания в области математики и естественных наук, применяет методы математического анализа и моделирования, теоретического и экспериментального исследования
ПК-10 (профессиональные компетенции)	демонстрирует базовые представления об основах биологии человека, профилактике и охране здоровья и использует их на практике, владеет средствами самостоятельного достижения должного уровня физической подготовленности
ПК-5 (профессиональные компетенции)	применяет современные экспериментальные методы работы с биологическими объектами в полевых и лабораторных условиях, навыки работы с современной аппаратурой
ПК-6 (профессиональные компетенции)	демонстрирует базовые представления об основных закономерностях и современных достижениях генетики, о геномике, протеомике

ПК-9 (профессиональные компетенции)	демонстрирует и применяет базовые представления об основах общей, системной и прикладной экологии, принципах оптимального природопользования и охраны природы
ПК-12 (профессиональные компетенции)	знает принципы мониторинга, оценки состояния природной среды и охраны живой природы, участвует в планировании и реализации соответствующих мероприятий

В результате освоения дисциплины студент:

1. должен знать:

Особенности структурной организации геномов различных организмов (про- и эукариот, фагов и вирусов) и соответствующие им методы выделения ДНК; современные методы определения нуклеотидных последовательностей, их анализа методами рестрикции, ПЦР, плазмонного поверхностного резонанса и др.

2. должен уметь:

Выделять ДНК из разных организмов, готовить пробы и проводить реакцию ПЦР, очищать ДНК, и анализировать полученные результаты

3. должен владеть:

Методами выделения ДНК, проведения полимеразной цепной реакции, подготовки проб к секвенированию, анализа нуклеотидных последовательностей

4. должен демонстрировать способность и готовность:

Проводить анализ генома организма, включая а) определить порядок и виды необходимых экспериментальных исследований исходя из природы организма; б) самостоятельно провести весь необходимый набор экспериментальных работ и определить для каких работ целесообразнее воспользоваться услугами коммерческих фирм в) провести биоинформационный анализ полученных данных и сделать выводы, соответствующие поставленной задаче

#### **4. Структура и содержание дисциплины/ модуля**

Общая трудоемкость дисциплины составляет 4 зачетных(ые) единиц(ы) 144 часа(ов).

Форма промежуточного контроля дисциплины экзамен в 7 семестре.



Суммарно по дисциплине можно получить 100 баллов, из них текущая работа оценивается в 50 баллов, итоговая форма контроля - в 50 баллов. Минимальное количество для допуска к зачету 28 баллов.

86 баллов и более - "отлично" (отл.);

71-85 баллов - "хорошо" (хор.);

55-70 баллов - "удовлетворительно" (удов.);

54 балла и менее - "неудовлетворительно" (неуд.).

#### 4.1 Структура и содержание аудиторной работы по дисциплине/ модулю Тематический план дисциплины/модуля

N	Раздел Дисциплины/ Модуля	Се- мест р	Неде ля семе стра	Виды и часы аудиторной работы, их трудоемкость (в часах)			Текущие формы контрол я
				Лек ции	Практи ческие занятия	Лаборат орные работы	
1	Тема 1. Структурная организация генома	7	1	0	2	4	дискуссия
2	Тема 2. Методы выделения геномной ДНК различных организмов	7	2-3	0	2	6	устный опрос
3	Тема 3. Электрофоретиче ское разделение ДНК	7	4-5	0	2	4	устный опрос
4	Тема 4. Полимеразная цепная реакция, Рестрикционный анализ	7	6-7	0	2	6	устный опрос
5	Тема 5. Методы секвенирования. Пробоподготовка	7	8-9	0	2	4	устный опрос

6	Тема 6. Специальные методы анализа	7	10-11	0	4	4	устный опрос
7	Тема 7. Анализ данных методами геномики и биоинформатики	7	12-14	0	4	8	отчет
	Итого			0	18	36	

## 4.2 Содержание дисциплины

### Тема 1. Структурная организация генома

#### *практическое занятие (2 часа(ов)):*

Особенности строения генома про и эукариот, вирусов и фагов. Размеры геномов, способы упаковки ДНК. Некодирующая ДНК. Маркерные участки. Сателлитная ДНК, ДНК повторы.

#### *лабораторная работа (4 часа(ов)):*

Последовательности ДНК, используемые в качестве маркерных

### Тема 2. Методы выделения геномной ДНК различных организмов

#### *практическое занятие (2 часа(ов)):*

Принципы выделения ДНК

#### *лабораторная работа (6 часа(ов)):*

Методы выделения ДНК из различных организмов - клеточной культуры, бактерий, растений, крови, тканей. Фенол-хлороформная экстракция, смола Chelex, коммерческие наборы для выделения.

### Тема 3. Электрофоретическое разделение ДНК

#### *практическое занятие (2 часа(ов)):*

Основные принципы разделения ДНК и РНК в агарозном и полиакриламидном гелях.

#### *лабораторная работа (4 часа(ов)):*

Подбор условий и концентрации геля в зависимости от решаемой задачи. Методы окрашивания ДНК. Красители. Методы выделения ДНК из геля.

### Тема 4. Полимеразная цепная реакция, Рестрикционный анализ

#### *практическое занятие (2 часа(ов)):*

Принцип ПЦР. ПЦР в реальном времени. ПЦР с обратной транскриптазой и получение кДНК.

Очистка продуктов ПЦР. Рестрикционный анализ продуктов ПЦР и геномной ДНК.

**лабораторная работа (6 часа(ов)):**

ПЦР в реальном времени. ПЦР с обратной транскриптазой и получение кДНК. Очистка продуктов ПЦР. Рестрикционный анализ продуктов ПЦР и геномной ДНК.

**Тема 5. Методы секвенирования. Пробоподготовка**

**практическое занятие (2 часа(ов)):**

Выбор метода секвенирования.

**лабораторная работа (4 часа(ов)):**

Подготовка проб для секвенирования. Требования к чистоте препарата.

**Тема 6. Специальные методы анализа**

**практическое занятие (4 часа(ов)):**

Гибридизация по Саузерну, Иммунопреципитация хроматина (ChIP), Плазмонный поверхностный резонанс, DNA Microarray

**лабораторная работа (4 часа(ов)):**

Иммунопреципитация хроматина (ChIP),

**Тема 7. Анализ данных методами геномики и биоинформатики**

**практическое занятие (4 часа(ов)):**

Анализ данных методами геномики и биоинформатики. Выбор метода.

Глобальное и локальное выравнивание

**лабораторная работа (8 часа(ов)):**

Глобальное и локальное выравнивание. Программы BLAST и Clustal Omega

**4.3 Структура и содержание самостоятельной работы дисциплины (модуля)**

<b>N</b>	<b>Раздел Дисциплины</b>	<b>Се-местр</b>	<b>Неделя семес-тра</b>	<b>Виды самостоя-тельной работы студентов</b>	<b>Трудоем-кость (в часах)</b>	<b>Формы контроля самостоя-тельной работы</b>
1.	Тема 1. Структурная организация генома	7	1	подготовка к дискуссии	4	дискуссия
2.	Тема 2. Методы выделения геномной ДНК различных организмов	7	2-3	подготовка к устному опросу	8	устный опрос

3.	Тема 3. Электрофоретическое разделение ДНК	7	4-5	подготовка к устному опросу	8	устный опрос
4.	Тема 4. Полимеразная цепная реакция, Рестрикционный анализ	7	6-7	подготовка к устному опросу	8	устный опрос
5.	Тема 5. Методы секвенирования. Пробоподготовка	7	8-9	подготовка к устному опросу	8	устный опрос
6.	Тема 6. Специальные методы анализа	7	10-11	подготовка к устному опросу	8	устный опрос
7.	Тема 7. Анализ данных методами геномики и биоинформатики	7	12-14	подготовка к отчету	10	отчет
	Итого				54	

## **5. Образовательные технологии, включая интерактивные формы обучения**

Демонстрации видеороликов, проведение лабораторных работ, обсуждение результатов, поиск причин неудачного эксперимента

## **6. Оценочные средства для текущего контроля успеваемости, промежуточной аттестации по итогам освоения дисциплины и учебно-методическое обеспечение самостоятельной работы студентов**

### **Тема 1. Структурная организация генома**

дискуссия , вопросы:

Строение геномов бактерий, архей, эукариот, вирусов, фагов. Особенности упаковки ДНК. Молекулярные маркеры различных геномов. ДНК повторы как маркеры. Alu локусы. гены 16S и 18S рРНК. Гены домашнего хозяйства как референсные маркеры.

### **Тема 2. Методы выделения геномной ДНК различных организмов**

устный опрос , вопросы:

особенности выделения различных видов ДНК и РНК из различных организмов. общие приемы и подходы. требования к чистоте препарата.

Причины низкого выхода и качества очистки. методы очистки ДНК. Фенол-хлороформная экстракция. Ферментативные методы. Хроматографические методы.

### **Тема 3. Электрофоретическое разделение ДНК**

устный опрос , вопросы:

Общие принципы электрофоретического разделения нуклеиновых кислот. разделение в агарозном и полиакриламидном гелях. Пульс-электрофорез. Капиллярный электрофорез. Красители нуклеиновых кислот, назначение, особенности работы.

### **Тема 4. Полимеразная цепная реакция, Рестрикционный анализ**

устный опрос , вопросы:

Полимеразная цепная реакция. ПЦР с обратной транскриптазой. ПЦР в реальном времени. Используемые ферменты и их назначение. Рестриктазы, образование "тупых" и "липких" концов. Значение метилирования ДНК. Использование рестриктаз для картирования ДНК. Рестриктный анализ маркерных последовательностей.

### **Тема 5. Методы секвенирования. Пробоподготовка**

устный опрос , вопросы:

Методы секвенирования: метод Сэнгера, пиросеквенирование, shotgun секвенирование, Illumina секвенирование, высокопроизводительное секвенирование Ion-Torrent. Подготовка проб для секвенирования.

### **Тема 6. Специальные методы анализа**

устный опрос , вопросы:

Специальные методы: Гибридизация по Саузерну, Иммунопреципитация хроматина (ChIP), Плазмонный поверхностный резонанс, DNA Microarray

### **Тема 7. Анализ данных методами геномики и биоинформатики**

отчет , вопросы:

Выравнивание последовательностей, программа BLAST, построение филогении, рестрикционной карты, создание контигов после секвенирования.

### **Тема. Итоговая форма контроля**

Вопросы к экзамену:

1. Выравнивание последовательностей, программа BLAST, построение филогении.
2. особенности выделения различных видов ДНК и РНК из различных организмов.

3. методы очистки ДНК. Фенол-хлороформная экстракция. Ферментативные методы.
4. Общие принципы электрофоретического разделения нуклеиновых кислот.
5. разделение в агарозном и полиакриламидном гелях.
6. Пульс-электрофорез. Капиллярный электрофорез.
7. Красители нуклеиновых кислот, назначение, особенности работы.
8. Полимеразная цепная реакция. Используемые ферменты и их назначение.
9. ПЦР с обратной транскриптазой. ПЦР в реальном времени.
10. Рестриктазы, образование "тупых" и "липких" концов. Значение метилирования ДНК.
11. Использование рестриктаз для картирования ДНК.
12. Рестриктный анализ маркерных последовательностей.
13. Методы секвенирования: метод Сэнгера, пиросеквенирование, создание контигов после секвенирования
14. Illumina секвенирование, высокопроизводительное секвенирование Ion-Torrent. Подготовка проб для секвенирования.
16. Гибридизация по Саузерну,
17. Иммунопреципитация хроматина (ChIP),
18. Плазмонный поверхностный резонанс,
19. DNA Microarray
20. Выравнивание последовательностей, программа BLAST, построение филогении.

### 7.1. Основная литература:

- Фаллер, Д.М.** Молекулярная биология клетки : руководство для врачей / Джеральд М. Фаллер, Деннис Шилдс ; пер. с англ. под общ. ред. акад. И. Б. Збарского .— Москва : Бином-Пресс, 2012 .— 256 с.
- Спирин, А. С.** Молекулярная биология: рибосомы и биосинтез белка [текст] / А. С. Спирин. —Москва: Академия, 2011.—495 с.—
- Литвин Ф. Ф.,** Молекулярная спектроскопия: основы теории и практика: Учебное пособие / Под ред. проф. Ф.Ф. Литвина. - М.: НИЦ Инфра-М, 2013. - 263 с.: 60x88 1/16. - (Высшее образование: Бакалавриат). (обложка) ISBN 978-5-16-005727-9 URL: <http://znanium.com/catalog.php?bookinfo=352873>
- Госманов, Р.Г.** Микробиология: учебное пособие для студентов высших учебных заведений [Текст] / Р.Г. Госманов, А.К. Галиуллин, А.Х. Волков, А.И. Ибрагимова. – Санкт-Петербург: Лань, 2011. – 494 с.

### 7.2. Дополнительная литература:

- Примроуз С.,** Геномика. Роль в медицине : [учебное пособие для студентов биологических и медицинских специальностей вузов] / С. Примроуз, Р. Тваймен ; пер. с англ. О. Н. Королевой ; под ред. Е. Д. Свердлова и С. А. Лимборской .—

Москва : БИНОМ. Лаб. знаний, 2008 .— 277 с. : ил. ; 24 .— Загл. и авт. ориг.: Genomics. Applications in Human Biology / Sandy B. Primrose, Richard M. Twyman .— Библиогр. в конце гл. — Предм. указ.: с. 256-271 .— ISBN 978-5-94774-500-9, 1000.

**Шевченко В.А.**, Генетика человека : учеб. для студентов вузов / В.А. Шевченко, Н.А. Топорнина, Н.С. Стволинская .— 2-е изд., испр. и доп. — М. : ВЛАДОС, 2004 .— 239 с. : ил. ; 24 .— (Учебник для вузов) (Биология) .— Библиогр.: с. 237 (27 назв.) .— ISBN 5-691-00477-8, 30000.

**Семенов В. В.**, Генетический аппарат клетки : учебное пособие для студентов I курса медицинских вузов / Гос. образоват. учреждение высш. проф. образования "Казан. гос. мед. ун-т Федер. агентства по здравоохранению и соц. развитию" ; [сост.: проф. В. В. Семенов, В. С. Харитонов] .— Казань : Казанский государственный медицинский университет, 2010 .

**Фаллер, Д.М.** Молекулярная биология клетки [Текст] / Д.М. Фаллер, Д. Шилдс. — М., 2006.- 256С

### **7.3. Интернет-ресурсы:**

1. Европейский институт биоинформатики - <http://www.ebi.ac.uk>
2. Классическая и молекулярная биология - <http://molbiol.ru>
3. Национальный центр биотехнологической информации - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>
4. Портал методов молекулярной биологии - [http://www.protocol-online.org/prot/Molecular\\_Biology/](http://www.protocol-online.org/prot/Molecular_Biology/)
5. Портал ресурсов по протеомике - <http://www.expasy.org/>


### **8. Материально-техническое обеспечение дисциплины(модуля)**

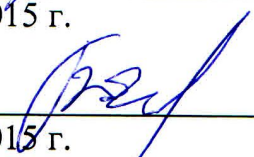
Освоение дисциплины "Молекулярный анализ генома" предполагает использование следующего материально-технического обеспечения: Мультимедийная аудитория, вместимостью более 60 человек. Мультимедийная аудитория состоит из интегрированных инженерных систем с единой системой управления, оснащенная современными средствами воспроизведения и визуализации любой видео и аудио информации, получения и передачи электронных документов. Типовая комплектация мультимедийной аудитории состоит из: мультимедийного проектора, автоматизированного проекционного экрана, акустической системы, а также интерактивной трибуны преподавателя, включающей тач-скрин монитор с диагональю не менее 22 дюймов, персональный компьютер (с техническими характеристиками не ниже Intel Core i3-2100, DDR3 4096Mb, 500Gb), конференц-микрофон, беспроводной микрофон, блок управления оборудованием, интерфейсы подключения: USB, audio, HDMI. Интерактивная трибуна преподавателя является ключевым элементом управления, объединяющим все устройства в единую систему, и служит

полноценным рабочим местом преподавателя. Преподаватель имеет возможность легко управлять всей системой, не отходя от трибуны, что позволяет проводить лекции, практические занятия, презентации, вебинары, конференции и другие виды аудиторной нагрузки обучающихся в удобной и доступной для них форме с применением современных интерактивных средств обучения, в том числе с использованием в процессе обучения всех корпоративных ресурсов. Мультимедийная аудитория также оснащена широкополосным доступом в сеть интернет. Компьютерное оборудование имеет соответствующее лицензионное программное обеспечение.

Специализированные помещения и лаборатории кафедры. Лаборатория молекулярной биологии, микроскопы.

Программа составлена в соответствии с требованиями ФГОС ВПО и учебным планом по направлению 020400.62 "Биология" и профилю подготовки Физиология человека и животных, биохимия, генетика, микробиология.

Автор(ы):  
Каюмов А.Р.   
" 1 " 09 2015 г.

Рецензент(ы):  
Бабынин Э.В.   
" 1 " 09 2015 г.



## Конспект лекций и указания к выполнению лабораторных работ

### Тема 1. Структурная организация генома

#### Лекция 1. Структурная организация генома

**Аннотация.** Рассматриваются вопросы особенности строения генома про и эукариот, вирусов и фагов. Размеры геномов, способы упаковки ДНК.

Некодирующая ДНК. Маркерные участки. Сателлитная ДНК, ДНК повторы

**Ключевые слова.** Геном, прокариоты, эукариоты, вирусы, упаковка ДНК, маркерные последовательности

#### Методические рекомендации по изучению темы

1. Тема содержит лекционную часть в виде презентации и текстовых пояснений, где даются общие представления по теме;
2. В ходе выполнения лабораторной работы обучающиеся приобретают навыки работы данными методами, интерпретации полученных результатов;
3. В качестве самостоятельной работы и проверки усвоения темы предлагается изучение интернет ресурсов.

#### Рекомендуемые информационные ресурсы:

[http://www.bio.bsu.by/genetics/files/human\\_genetics\\_grinev\\_konspekt.pdf](http://www.bio.bsu.by/genetics/files/human_genetics_grinev_konspekt.pdf)

<http://www.nsu.ru/education/biology/genetics/glava6.pdf>

[http://afonin-59-bio.narod.ru/2\\_hereditiy/2\\_hereditiy\\_individual/her\\_ind\\_10.htm](http://afonin-59-bio.narod.ru/2_hereditiy/2_hereditiy_individual/her_ind_10.htm)

#### Глоссарий

**G1.** Период клеточного цикла между последним митозом и началом репликации ДНК.

**G2.** Период клеточного цикла после окончания репликации ДНК и до начала следующего митоза.

**Аденозинтрифосфат (АТФ).** Рибонуклеозид-5-трифосфат, участвующий в энергетическом цикле клетки в качестве донора фосфатной группы.

**Бактериофаги (фаги).** Вирусы, инфицирующие бактерии.

**Вектор.** Автономно реплицирующаяся в клетке-хозяине молекула ДНК, к которой можно присоединить фрагмент ДНК, чтобы обеспечить его репликацию; например, плазида или ДНК умеренного фага.

**Вирион .** Вирусная частица.

**Вирус.** Самореплицирующийся инфекционный комплекс нуклеиновой кислоты и белка, содержащий ДНК- или РНК-хромосому и требующий для своей репликации интактную клетку-хозяина.

**Ген.** Участок хромосомы, который кодирует одну или несколько полипептидных цепей или молекулу РНК.

**Генетическая информация.** Наследственная информация, содержащаяся в нуклеотидной последовательности хромосомной ДНК или РНК.

**Генетический код.** Набор кодовых слов (триплетов) в ДНК кодирующих аминокислоты белков.

генов термин означает включение транскрипции в результате взаимодействия индуктора с регуляторным белком.

**Генотип.** Совокупность генов организма.

**Гистоны.** Эволюционно консервативные белки эукариот, связывающие ДНК; участвуют в формировании нуклеосомы, основной структурной единицы хроматина.

**Двойная спираль.** Спираль, образованная двумя комплементарными антипараллельными цепями ДНК или РНК.

**Интрон.** Вставочная последовательность в гене; она транскрибируется, но вырезается до процесса трансляции.

**Кодирующая цепь.** Цепь ДНК, последовательность которой идентична иРНК. кольцу.

**Митоз.** Репликация хромосом в соматических клетках эукариот.

**Мутаген.** Химический агент, способный вызывать изменения в гене, т.е. мутацию.

**Мутация.** Наследуемое изменение в хромосоме.

**Нуклеиновые кислоты.** Природные полинуклеотиды, в которых нуклеотидные остатки соединены между собой в определенной последовательности фосфодиэфирными связями.

**Нуклеосома.** Основная структурная единица хроматина, состоящая из ~200 нуклеотидных пар ДНК и октамера гистоновых белков.

**Оперон.** Единица генетической экспрессии, состоящая из одного или нескольких связанных между собой генов, а также из промотора и оператора, которые регулируют их транскрипцию.

**Плазмида.** Внехромосомная независимо реплицирующаяся небольшая кольцевая молекула ДНК.

**Рамка считывания.** Один из трех возможных способов считывания нуклеотидной последовательности в виде последовательного ряда триплетов.

**Рекомбинантная ДНК.** ДНК, образованная в результате соединения генов в новой комбинации.

**Ретровирус.** РНК-содержащий вирус, в состав которого входит

**Сайт-специфическая рекомбинация.** Происходит между двумя определенными (не обязательно гомологичными) последовательностями, например, наблюдается при интеграции и

**Сателлитная ДНК.** Высокоповторяющиеся нетранслируемые участки ДНК в эукариотических клетках.

**Сплайсинг.** Процесс удаления интронов и объединения экзонов в иРНК.

**Топоизомеразы.** Ферменты, способные осуществлять положительное или отрицательное сверхскручивание колец двухцепочечной ДНК.

**Хроматин.** Нитевидный комплекс ДНК, гистонов и других белков, составляющий основу эукариотических хромосом.

**Хромосома.** Одна большая молекула ДНК, содержащая ряд генов и выполняющая функцию хранения и передачи генетической информации.

**Эукариоты.** Организмы, клетки которых содержат окруженное мембраной ядро с множественными хромосомами и внутриклеточные органеллы.

**Ядро.** Органелла эукариотической клетки, окруженная мембраной и содержащая хромосомы.

### **Вопросы для изучения:**

1. Организация генома бактерий
2. Организация генома человека
3. Гены
4. Умеренно- и высокоповторяющиеся последовательности ДНК
5. Организация генома вирусов

Геном – полная генетическая система клетки (совокупность всей ДНК клетки), определяющая характер онтогенетического развития организма и наследственную передачу в ряду поколений всех его структурных и функциональных признаков. Этот термин был впервые введен Г. Винклером в 1920 г. У бактерий – это геномная ДНК плюс плазмидная ДНК. У эукариот – хромосомальная ДНК плюс митохондриальная ДНК, и ДНК пластид у растений. У вирусов – геном может быть представлен как ДНК, так и РНК.

### **Организация генома бактерий**

Под понятием генома у бактерий обычно подразумевается хромосома, образующая в бактериальной клетке особую органеллу — нуклеоид. Помимо хромосомы в генофонд, которым фактически располагает клетка, входит и внехромосомная ДНК, т.е. гены, находящиеся на плазидах. Присутствие в бактериальной клетке плазмид в принципе считается необязательным, хотя для таких видов как клубеньковые, молочнокислые, патогенные и многие другие бактерии именно плазмидные гены определяют их способность к пребыванию в соответствующих экологических нишах. Наличие плазмид, в конечном счете, важно и для понимания динамики изменения собственно генома, т.е. хромосомы бактерии в процессе эволюции.

У грамотрицательных бактерий, подобных *E.coli*, нуклеоид прикреплен к оболочке клетки в одной из зон контактирования цитоплазматической мембраны, пептидогликанового каркаса и наружной мембраны; причем область прикрепления хромосомы к мембране соответствует началу ее репликации — *oriC*.

Для экспрессии генов важное значение имеет то, что ДНК нуклеоида находится в состоянии так называемой отрицательной сверхскрученности. Это означает, что на уровне третичной структуры ДНК образует супервитки, причем в противоположном направлении по отношению к двойной спирали, закрученной вправо. Один супервиток образуется на каждые 200 пар оснований, а в масштабе целой хромосомы образуются отдельные домены, или петли, в которых сверхскручивание происходит независимо.

Во многих работах показано, что состояние сверхскрученности облегчает плавление ДНК при инициации транскрипции и тем самым способствует экспрессии генов; состояние отрицательной сверхскрученности ДНК в нуклеоиде обязано действию фермента ДНК-гиразы.

В культуре клеток *E.coli*, делящихся со скоростью 30 мин, на один нуклеоид образуется около 120 доменов отрицательной сверхскрученности или  $43 \pm 10$  доменов на геном. Отсюда на домен в среднем приходится  $\sim 100$  тысяч нуклеотидных пар (тпн), что на карте *E.coli* соответствует сегменту хромосомы протяженностью  $\sim 2$  мин. Таков может быть размер гипотетической области, в которой экспрессия генов зависит от состояния сверхспирализации ДНК.

### **Организация генома человека**

Геном человека, равно также как и геном любого другого вида животных, состоит из двух геномов – сложного ядерного генома и менее сложно организованного генома митохондрий. Ядерный геном человека содержит огромный объем генетической информации – около 3000 мегабаз (Мб), – часть из которой кодирует первичную структуру белков, синтезируемых на свободных цитоплазматических или мембраносвязанных рибосомах.

Митохондриальный геном имеет относительно небольшой размер – около 16,6 килобаз (Кб), – и кодирует все митохондриальные рибосомальные и транспортные РНК, а так же часть белков, которые необходимы для нормального функционирования митохондрий.

Более детальный анализ геномной ДНК, проведенный с помощью методов генетического и физического картирования, показал, что лишь около 30% ядерного генома организовано в гены и геноподобные последовательности, остальные же 70% составляют внегенную (или экстрагенную) ДНК. В свою очередь последняя примерно на 80% состоит из уникальной и низкоповторяющейся ДНК и на 20% – из умеренно- и высокоповторяющихся последовательностей. Фракция умеренно- и высокоповторяющейся ДНК включает тандемные или кластеризованные повторы и диспергированные

генетические элементы. Что касается генов и геноподобной ДНК, то эта фракция лишь на 10% является кодирующей, а остальные 90% состоят из псевдогенов, генных фрагментов, интронов и других геноподобных нетранслируемых последовательностей.

Следовательно, из всего объема геномной ДНК только 3% несет информацию о первичной структуре клеточных белков, рибосомальных, транспортных и других видах РНК, а 97% такой информации не содержит. Закономерно возникает вопрос: зачем клетке такое огромное количество "избыточной" ДНК, не несущей ни какой информационной нагрузки? Окончательного ответа на этот вопрос пока не существует, хотя и высказано ряд предположений.

В молекуле ДНК митохондрий принято различать тяжелую *H*-цепь и легкую *L*-цепь. Обе эти цепи на 44% обогащены гуанином и цитозином, причем в *H*-цепи преобладает гуанин, а в *L*-цепи - цитозин. Кроме того, на одном участке к двухцепочечной кольцевой молекуле митохондриальной ДНК комплементарно присоединен небольшой фрагмент ДНК размером 7S (так называемая *D*-петля), благодаря чему она становится трехцепочечной.

В отличие от ядерной ДНК в митохондриальной ДНК обе цепи являются смысловыми и содержат 37 генов: 28 генов локализовано в *H*-цепи и 9 генов – в *L*-цепи. Тяжелая цепь митохондриальной ДНК кодирует две рибосомальные РНК (16S и 23S), 14 транспортных РНК, шесть субъединиц НАДН-дегидрогеназы (субъединицы 1-4, 4L и 5), три субъединицы цитохром *c*-оксидазы (субъединицы 1-3), субъединицы 6 и 89 АТФ-азного комплекса и одну субъединицу убихинон-цитохром *c*-редуктазы (цитохрома *b*). Легкая цепь содержит гены 8 транспортных РНК и один белок-кодирующий ген – ген субъединицы 6 НАДН-дегидрогеназы.

Митохондриальный генетический код обладает несколькими особенностями, которые отличают его от ядерного.

Первая такая особенность была обнаружена в 1979 году, когда было установлено, что в митохондриях нарушается универсальность генетического кода. Так, в митохондриях человека кодон АУА кодирует аминокислоту метионин вместо изолейцина в стандартном коде. Кодоны АГА и АГГ, в стандартном коде кодирующие аргинин, являются стоп-кодонами, а кодон УГА, в стандартном коде являющийся стоп-кодоном, кодирует триптофан. Кроме того, несколько митохондриальных генов (например, ген, кодирующий субъединицу 6 АТФ-азы) вообще не имеют стоп-кодонов, а терминирующий кодон УАА вставляется в соответствующую РНК только на этапе сплайсинга.

Другая необычная черта митохондриального генетического кода – особенность узнавания кодонов транспортными РНК. Для цитоплазматических рибосом необходимо не менее 32 различных транспортных РНК, чтобы распознать все смысловые кодоны. Восемь же митохондриальных тРНК

человека способны распознать по семейству из четырех кодонов, которые различаются между собой только по третьему основанию. Остальные четырнадцать митохондриальных тРНК имеют антикодоны, распознающие пары кодонов, которые идентичны между собой по первым двум основаниям, а в качестве третьего имеют либо пурин, либо пиримидин.

### **Гены**

Формальная (классическая) генетика определяет ген как структурно-функциональную единицу наследственной информации, которая занимает определенное положение (локус) на хромосоме и мутационные изменения которой приводят к изменению фенотипа.

Это определение не лишено недостатков, поскольку не учитывает ряд особенностей структурно-функциональной организации генов.

Так, разные мутации одного и того же гена могут приводить не только к одинаковому изменению фенотипа, но и к совершенно разным изменениям, вплоть до комплементарных.

Кроме того, установлено, что одна и та же последовательность ДНК благодаря альтернативному сплайсингу может кодировать несколько различных белков, а в крупных интронах ряда генов обнаружены смысловые последовательности других генов, считываемые в противоположном направлении. Более того, транскрипционные единицы генома могут перекрываться за счет наличия разных промоторов.

Наконец, благодаря соматической рекомбинации структура транскрибируемых последовательностей некоторых генов может быть различной в разных клонах клеток одного и того же клеточного типа (как, например, в случае с геном антигенспецифического рецептора Т-клеток).

Уточненное определение понятия "ген" дает нам молекулярная биология. В молекулярной биологии ген – это ассоциированный с регуляторными последовательностями фрагмент ДНК, соответствующий определенной единице транскрипции.

Кодирующая область большинства транскрипционных единиц генома человека имеет прерывистое или мозаичное строение: кодирующие последовательности, или экзоны, разделены между собой вставочными некодирующими последовательностями, или интронами.

### **Умеренно- и высокоповторяющиеся последовательности ДНК**

Ядерный геном человека, подобно геномам других многоклеточных эукариот, примерно на 15% состоит из умеренно- и высокоповторяющихся последовательностей ДНК. Некоторые авторы, учитывая характер организации таких структур генома, первый класс именуют тандемно повторяющейся ДНК, а второй класс – диспергированными повторами.

В зависимости от размера "коровой" единицы, а также протяженности кластера, образованного этими единицами, всю тандемно повторяющуюся ДНК

делят на три подкласса: сателлитную, минисателлитную и микросателлитную ДНК. В свою очередь первые два подкласса ДНК, сателлитная и минисателлитная, включают несколько семейств.

Класс диспергированных повторяющихся последовательностей ДНК представлен рассеянными по геному протяженными повторами, которые не организованы в кластеры (за редким исключением).

Длина повторяющихся единиц этого класса варьирует и лежит в основе деления всего класса на подклассы, главными из которых являются два: короткие ядерные элементы, или подкласс *SINEs* (от англ. short interspersed nuclear elements) и длинные ядерные элементы, или под-класс *LINEs* (от англ. long interspersed nuclear elements).

### **Организация генома вирусов**

Вирусная нуклеиновая кислота представлена только одной нуклеиновой кислотой (ДНК или РНК). Каждая из них является геномом. В разных по величине вирионах в геноме насчитывают от нескольких до многих десятков генов. Геномные нуклеиновые кислоты вирусов отличаются большим разнообразием структуры и формы.

Геном вируса является гаплоидным (греч. *Haploos*, одиночный и *eidos*, вид), т. е. представлен одним набором генов. Частично диплоидны (греч. *Diploos*, двойной) ДНК-содержащие вирусы, в ДНК которых встречаются повторяющиеся нуклеотидные последовательности. Полностью диплоидны ретровирусы, геном которых представлен двумя идентичными молекулами РНК.

Вирусные ДНК по структуре могут быть: 1) цельными одноцепочечными; 2) двухцепочечными; 2) с «разрыв-дефектом» в одной цепи. По форме молекула ДНК может быть: 1) линейной, 2) кольцевой (циркулярно-замкнутой), 3) ковалентно-сцепленные суперспирализованные (например, у паповавирусов). В вирусной ДНК на концах молекулы имеются прямые или инвертированные (развёрнутые на 180°) повторяющиеся нуклеотидные последовательности. Их наличие обеспечивает способность молекулы ДНК замыкаться в кольцо. Молекулярная масса вирусных ДНК в 10–100 раз меньше массы бактериальных ДНК.

Вирусные РНК различаются в еще большей степени. Молекулы РНК по структуре могут быть:

1) одно- и двухцепочечные (диплоидный геном); 2) цельные (сплошные) и фрагментированные (сегментированные) на 2–3 ... 8–12 сегментов.

Наличие сегментов ведёт к увеличению кодирующей ёмкости генома.

По форме РНК различают: 1) линейные, 2) кольцевые.

## **Тема 2. Методы выделения геномной ДНК различных организмов**

### **Лекция 2. Методы выделения геномной ДНК различных организмов**

**Аннотация.** Рассматриваются методы выделения ДНК из различных организмов - клеточной культуры, бактерий, растений, крови, тканей. Фенол-хлороформная экстракция, смола Chelex, коммерческие наборы для выделения.  
**Ключевые слова.** Выделение ДНК, фенол-хлороформная экстракция, очистка ДНК

#### **Методические рекомендации по изучению темы**

1. Тема содержит лекционную часть в виде презентации и текстовых пояснений, где даются общие представления по теме;
2. В ходе выполнения лабораторной работы обучающиеся приобретают навыки работы данными методами, интерпретации полученных результатов;
3. В качестве самостоятельной работы и проверки усвоения темы предлагается изучение интернет ресурсов.

#### **Рекомендуемые информационные ресурсы:**

[http://labx.narod.ru/documents/vydelenie\\_dnk\\_iz\\_kletok\\_phenol\\_metod.html](http://labx.narod.ru/documents/vydelenie_dnk_iz_kletok_phenol_metod.html)

[http://labx.narod.ru/documents/vydelenie\\_dnk\\_iz\\_kul\\_tury\\_kletok\\_\\_vysokosolevoj.html](http://labx.narod.ru/documents/vydelenie_dnk_iz_kul_tury_kletok__vysokosolevoj.html)

[http://labx.narod.ru/documents/dna\\_vydelenie.html](http://labx.narod.ru/documents/dna_vydelenie.html)

[http://molbiol.ru/protocol/04\\_01.html](http://molbiol.ru/protocol/04_01.html)

#### **Глоссарий**

**Гетерохроматин.** Генетически неактивные участки хромосом; постоянно находятся в конденсированном состоянии.

**Гистоны.** Эволюционно консервативные белки эукариот, связывающие ДНК; участвуют в формировании нуклеосомы, основной структурной единицы хроматина.

**Двойная спираль.** Спираль, образованная двумя комплементарными антипараллельными цепями ДНК или РНК.

**Ренатурация.** Реассоциация денатурированных комплементарных цепей ДНК с образованием двухцепочечной молекулы.

**Хроматин.** Нитевидный комплекс ДНК, гистонов и других белков, составляющий основу эукариотических хромосом.

**Хромосома.** Одна большая молекула ДНК, содержащая ряд генов и выполняющая функцию хранения и передачи генетической информации.

**Эукариоты.** Организмы, клетки которых содержат окруженное мембраной ядро с множественными хромосомами и внутриклеточные органеллы.

**Ядро.** Органелла эукариотической клетки, окруженная мембраной и содержащая хромосомы.



### **Вопросы для изучения:**

1. Выделение геномной ДНК из клеток бактерий методом фенол-хлороформной экстракции
2. Выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток. Классический MiniPrep
3. Быстрое выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток для электрофоретического анализа методом фенол-хлороформной экстракции.
4. Выделение ДНК из клеток (фенольный метод)
5. Выделение ДНК с использованием протеиназы К

### **1. Выделение геномной ДНК из клеток бактерий методом фенол-хлороформной экстракции**

1. Культуру растить ночь на богатой среде (LB, питательный бульон БТН или МПБ) с качанием, 5 мл в пробирке.
2. Осадить клетки из 5 мл культуры в эппендорф: 1.5 мл культуры перенести в эппендорф, центрифугировать 1-2 мин при 13000 об/мин, надосадочную жидкость вылить, снова добавить 1.5 мл культуры и центрифугировать. Удалить дозатором всю надосадочную жидкость.
3. Ресуспендировать клетки в 500 мкл 10 mM Трис HCl pH 8.0.  
Для грам-положительных бактерий:  
3.1. Внести 25-50 мкл лизоцима с концентрацией 20 мг/мл, инкубировать 20 мин при 37°C, лучше с качанием, суспензия должна стать более прозрачной и коричневее.  
В случае лактобацилл внести 100 мкл лизоцима с концентрацией 20 мг/мл, инкубировать 1-2 часа при 37°C.
4. Вносить порциями 10 мкл 10% SDS, осторожно помешать переворачиванием до прозрачности смеси и получения вязкой субстанции (SDS разрушает клетки и ДНК оказывается в растворе, делая его вязким и тягучим). Если раствор не стал вязким – значит клетки не разрушились и дальше продолжать не имеет смысла.  
**С ЭТОГО МОМЕНТА ВСЕ ДЕЛАТЬ В ПЕРЧАТКАХ И ПОД ТЯГОЙ**
5. Внести 500 мкл смеси фенола и хлороформа (1:1) и интенсивно потрясти, чтобы раствор стал как молоко.
6. Центрифугировать 10 мин на максимальной скорости
7. Перенести верхнюю фазу 450 мкл (НЕ ТРОГАЯ БЕЛЫЙ ПРОМЕЖУТОЧНЫЙ СЛОЙ) в 1 мл изопропанола. НЕ СМЕШИВАТЬ.
8. Осторожно намотать ДНК (которая будет выглядеть как вата) на кончик на 200 мкл или зубочистку или стеклянную палочку. Если ДНК выпало мало, осторожно перемешать содержимое эппендорфа и повторить наматывание ДНК.

9. Опустить наконечник/палочку с ДНК в раствор 96% этанола, и потом опустить в эппендорф с 200-400 мкл деионизованной воды для растворения ДНК.

Для приготовления водного раствора фенола кристаллический фенол залить за сутки до работы 2-3 кратным объемом 1М раствора Трис- HCl pH 8.0.

## **2. Выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток. Классический MiniPrep [Sambrook *et al.*, 1989].**

1. Культуру растить ночь на богатой среде (LB, питательный бульон БТН или МПБ) с качанием, 3 мл в пробирке.

2. Осадить клетки из 3 мл культуры в эппендорф: 1.5 мл культуры перенести в эппендорф, центрифугировать 1-2 мин при 13000 об/мин, надосадочную жидкость вылить, снова добавить 1.5 мл культуры и центрифугировать. Удалить дозатором всю надосадочную жидкость.

3. Клетки ресуспендировать в 200 мкл раствора I (50 mM глюкозы, 10 mM ЭДТА, 25 mM трис-HCl, pH 8.0, RNКаза A).

Для *B.subtilis*:

3.1. Внести 10-20 мкл лизоцима с концентрацией 20 мг/мл, инкубировать 20 мин при 37°C, лучше с качанием, суспензия должна стать более прозрачной и коричневее.

4. Клетки перенести в ледяную баню и внести 400 мкл свежеприготовленного раствора II (0.2 н NaOH и 1% SDS). Осторожно перемешать переворачиванием по получения прозрачного вязкого раствора. На данной стадии происходит лизис клеток, и геномная ДНК оказывается в растворе в расплетенном виде, что и обуславливает вязкость раствора. На данном этапе важно не повредить ее интенсивным встряхиванием.

5. Добавить 300 мкл охлажденного раствора 3 М ацетата калия (29 г ацетата калия, 11 мл ледяной уксусной кислоты и 60 мл воды), осторожно перемешать переворачиванием и инкубировать при температуре -20°C в течение 20-30 мин. На данной стадии происходит смена pH раствора в кислую область и геномная ДНК выпадает в осадок в виде белых хлопьев. Плазмидная ДНК ввиду своего малого размера в осадок не выпадает.

6. Смесь центрифугировать на холоду при 12 тыс. об/мин в течение 15 мин для удаления преципитированной геномной ДНК. Иногда полезно разбить стадию на 2: центрифугировать 5 мин, затем пробы заново осторожно перемешать для полного смешения растворов, затем центрифугировать 10 мин.

7. Супернатант перенести в чистый эппендорф (лучше дозатором). Проследить чтобы не было белых хлопьев – остатков геномной ДНК. Добавить 600 мкл изопропанола, перемешать и центрифугировать в течение 10 мин при 12 тыс. об/мин.

8. Супернатант вылить. Осадок промыть 96% этанолом (500 мкл внести в эппендорф и затем вылить), высушить при 65<sup>0</sup>С в твердотельном термостате и ресуспендировать в 20 мкл деионизованной воды.

### **3. Быстрое выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток для электрофоретического анализа методом фенол-хлороформной экстракции.**

Метод подходит для быстрой оценки наличия плазмиды, ее размера по сравнению с исходным вектором. Качество ДНК достаточно для электрофоретического анализа, но не более того. Удобно использовать для скрининга колоний. Недостаток – необходимость работать с фенолом (необходим вытяжной шкаф), а также в геле видны рибосомальные РНК, поэтому необходимы отрицательный и положительный контроли.

1. Культуру растить ночь на богатой среде (LB, питательный бульон БТН или МПБ) с качанием, 1-3 мл в пробирке.

2. Осадить клетки в эппендорф: 0.5 мл культуры перенести в эппендорф, центрифугировать 1-2 мин при 13000 об/мин. Удалить надосадочную жидкость, оставив 50-100 мкл.

Для *B.subtilis*:

2.1. Внести 5 мкл лизоцима с концентрацией 20 мг/мл, инкубировать 20 мин при 37<sup>0</sup>С, лучше с качанием, суспензия должна стать более прозрачной и коричневее.

3. Внести 10 мкл 10-кратного буфера для внесения (1 мл 2х-кратный TBE или TAE буфера, 200 мкл 10% SDS, 600 мкл глицерина, 200 мкл воды, крупинка бромфенолового синего). Клетки ресуспендировать дозатором или на вортексе в остатках супернатанта.

**С ЭТОГО МОМЕНТА ВСЕ ДЕЛАТЬ В ПЕРЧАТКАХ И ПОД ТЯГОЙ**

4. Внести 50 мкл смеси фенола и хлороформа (1:1) и интенсивно потрясти, чтобы раствор стал как молоко.

5. Центрифугировать 5 мин на максимальной скорости.

6. 10 мкл верхней фазы 450 мкл (НЕ ТРОГАЯ БЕЛЫЙ ПРОМЕЖУТОЧНЫЙ СЛОЙ) использовать для электрофореза.

### **4. Выделение ДНК из клеток (фенольный метод)**

#### **Приготовление сахарозного буфера**

Для приготовления 1 л сахарозного буфера брали: 109,5 г сахарозы, 10 мл тритон X-100, 5мл MgCl<sub>2</sub> (1M), 10 мл Tris-HCl (1M pH 7,6), 1мл ZnSO<sub>4</sub> 1M, 0,4 мл EDTA 0,5M, 10 мл PMSF 0,1M и добавляли дистиллированную воду до 1 л. Хранят в холодильнике при +4<sup>0</sup>С.

#### **Приготовление буфера для протеиназы К**

Для приготовления 100 мл раствора брали: 1мл трис-HCl (1M, pH 10,5), 200 мкл 0,5 М Ш2-ЭДТА (pH 8,0), 15 мл NaCl (1M) доводили объем до 100 мл. Готовый раствор хранят в холодильнике при 4С.

В чистые полипропиленовые пробирки типа Eppendorf объемом 1,5 мл вносили примерно 500 мкл суспензии лимфоцитов и 1 мл денатурирующего раствора холодного сахарозного буфера содержащего:

32М сахарозы, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,01 М Tris-HCl (pH 7,6), 0,1М ZnSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 2мМ EDTA, 1мМ PMSF, 1% тритон X-100 и держали 10 мин при комнатной температуре.

Добавление сахарозного буфера приводит к лизису эритроцитов и клеточной мембраны лимфоцитов, при этом ядерная мембрана остается интактной.

2. Образец центрифугировали при 3000 об/мин, при 4°C в течение 15 мин.

Сливали супернатант и ресуспензировали ядерный осадок в 400 мкл буфера для протеиназы К и добавляли 20 мкл 10% SDS до конечной концентрации 0,5%.

При добавлении SDS происходит лизис ядерной мембраны, ДНК выходит из ядра, и можно визуально наблюдать увеличение вязкости раствора.

После 5 мин инкубации добавляли 5 мкл маточного раствора протеиназы К с концентрацией 20 мг/мл (конечная концентрация — 250 мкг/мл).

Инкубировали с протеиназой К в течение 12 ч при 37°C, либо — 3 ч при 55°C.

По окончании инкубации добавляли 400 мкл забуференного фенола (Sambrook et al., 1989), осторожно перемешивали в течение 10 мин и центрифугировали 5 мин при 5000 об/мин.

После разделения фаз ДНК находится в верхней водной фазе, РНК — в фенольной фазе, белки — в интерфазе.

Верхнюю водную фазу перенесли в другую чистую пробирку и добавили 400 мкл смеси

фенол:хлороформ (1:1).

Перемешивали в течение 5 мин и центрифугировали 5 мин при 5000 об/мин.

Вторично верхнюю водную фазу перенесли в другую пробирку и добавили 400 мкл хлороформа.

Образец перемешивали в течение 5 мин и центрифугировали 5 мин при 5000 об/мин.

Третий раз верхнюю водную фазу перенесли в чистую пробирку, и к раствору ДНК добавили последовательно 40 мкл 3 М ацетата Na (1/10 объема) и 800 мкл охлажденного 96% этанола (2 объема).

Осторожно перемешивали, наблюдая преципитацию ДНК.

Образец центрифугировали при 12000 об/мин в течение 10 мин.

Промыли осадок 1 мл 70% этанола для удаления соли, используемой при переосаждении ДНК.

Образец повторно центрифугировали при 12000 об/мин в течение 5 мин.

Осадок высушивали при комнатной температуре до исчезновения запаха спирта и растворяли ДНК в TE-буфере (в течение ночи).

Концентрация и чистота выделенной ДНК оцениваются при измерении оптической плотности (ОП) полученного раствора. Измеряют поглощение образца при 260 и 280 нм по сравнению с поглощением ТЕ-буфера. Для хорошо выделенного образца ДНК отношение ОП(260)/ ОП(280) должно быть не менее 1.8. Оптическая плотность раствора геномной ДНК с концентрацией 1 мг/мл соответствует ОП(260)=20 оптическим единицам (о.е.). Образцы выделенной ДНК хранили в виде раствора в ТЕ-буфере при низкой температуре (—20°C).

## **5. Выделение ДНК с использованием протеиназы К**

### **Материалы**

#### **1. Протеиназа К**

Растворяют лиофилизированную протеиназу К в стерильной дистиллированной воде в концентрации 20 мг/мл, разливают на аликвоты и хранят при —20 0С.

#### **2. Насыщенный буфером фенол**

В большинстве случаев фенол высокой степени чистоты можно использовать без дополнительной перегонки.

Расплавляют фенол при 65С в присутствии равного объема 0,5 М трис-НСI, рН 8,0, содержащего 0,2% 8-гидроксихинолин и 0,2% 2-меркаптоэтанол (2-МЭ).

Когда фенол полностью расплавится, тщательно перемешивают смесь, отбирают водную фазу и дважды экстрагируют фенол 0,1 М трис-НСI, рН 8,0, содержащим 0,2% 2-МЭ. После последней экстракции водную фазу не удаляют, а оставляют ее в сосуде с фенолом. В таком виде насыщенный фенол может храниться при 4 °с до 1 мес

3. Смесь хлороформ: изоамиловый спирт (24:1, о/о)

4. Буфер ТЭ: 10 мМ трис-НСI, 1 мМ ЭДТА, рН 8,0

### **Методика**

1. Готовят образцы.

2. Добавляют к каждому образцу по 50 мкл раствора протеиназы К (20 мг/мл) и тщательно перемешивают.

3. добавляют к каждому образцу по 250 мкл раствора саркозила, тщательно и осторожно перемешивают.

4. Центрифугируют образцы при 3500 в течение 30 с.

5. Инкубируют образцы при 50 0С в течение 5 ч. Для удобства инкубацию можно проводить в течение ночи (до 16 ч).

6. добавляют к каждому образцу по 10 мл насыщенного буфером фенола, тщательно перемешивают до образования гомогенной эмульсии.

7. Продолжают экстракцию перемешиванием при комнатной температуре в течение 5 мин.

8. Центрифугируют при 3500 в течение 1 мин.

9. Добавляют 10 мл смеси хлороформ: изоамиловый спирт и продолжают экстракцию в течение 5 мин.
10. Разделяют водную и органическую фазы центрифугированием при 3500 в течение 6 мин при комнатной температуре.
11. Переносят вязкую водную фазу в новую пробирку при помощи пипетки с широким отверстием и повторяют экстракцию смесью хлороформ: изоамиловый спирт один или два раза (пока интерфаза не станет чистой).
12. Добавляют к водной фазе два объема этанола, тщательно и осторожно перемешивают. Сразу после перемешивания образуется осадок ДНК.
13. Собирают осадок ДНК центрифугированием при 3500 в течение 5 мин.
14. Отбирают супернатант и промывают ДНК 20 мл 70% спирта.
15. Промывают ДНК 1 мл 70% спирта и переносят ДНК в микроцентрифужную пробирку.
16. Осаждают ДНК центрифугированием при 3500 в течение 1 мин и отбирают супернатант.
17. Высушивают ДНК под вакуумом в течение 2,5 мин.
18. Растворяют ДНК в ТЭ до концентрации около 1 мг/мл

### **Тема 3. Электрофоретическое разделение ДНК**

#### **Лекция 3. Электрофоретическое разделение ДНК**

**Аннотация.** Рассматриваются основные принципы разделения ДНК и РНК в агарозном и полиакриламидном гелях. Подбор условий и концентрации геля в зависимости от решаемой задачи. Методы окрашивания ДНК. Красители. Методы выделения ДНК из геля.

**Ключевые слова.** Электрофорез, агароза, этидий бромистый

#### **Методические рекомендации по изучению темы**

1. Тема содержит лекционную часть в виде презентации и текстовых пояснений, где даются общие представления по теме;
2. В ходе выполнения лабораторной работы обучающиеся приобретают навыки работы данными методами, интерпретации полученных результатов;
3. В качестве самостоятельной работы и проверки усвоения темы предлагается изучение интернет ресурсов.

#### **Рекомендуемые информационные ресурсы:**

[http://labx.narod.ru/documents/gel\\_electrophoresis\\_dna.html](http://labx.narod.ru/documents/gel_electrophoresis_dna.html)

[http://ru.wikipedia.org/wiki/Электрофорез\\_ДНК](http://ru.wikipedia.org/wiki/Электрофорез_ДНК)

[http://ru.wikipedia.org/wiki/Бромистый\\_этидий](http://ru.wikipedia.org/wiki/Бромистый_этидий)

[http://www.labx.narod.ru/documents/gel\\_electrophoresis\\_dna.html](http://www.labx.narod.ru/documents/gel_electrophoresis_dna.html)

[http://molbiol.edu.ru/protocol/07\\_01.html](http://molbiol.edu.ru/protocol/07_01.html)

<http://biohack.ru/?cat=8>

<http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/gel/>

<http://www.dnalc.org/resources/animations/gelectrophoresis.html>

<http://beadle.rutgers.edu/MBB/315/Lec/Figs/AgaroseGelTutorial.pdf>

<http://arbl.cvmb.colostate.edu/hbooks/genetics/biotech/gels/principles.html>

<http://www.molecularstation.com/agarose-gel-electrophoresis/>

#### **Глоссарий**

**Водородная связь.** Сравнительно слабое электростатическое притяжение между электроотрицательным атомом и атомом водорода, ковалентно связанным с другим электроотрицательным атомом.

**Плазмида.** Внехромосомная независимо реплицирующаяся небольшая кольцевая молекула ДНК.

#### **Вопросы для изучения:**

1. Принцип электрофоретического разделения нуклеиновых кислот
2. Проведение электрофореза

## **Принцип электрофоретического разделения нуклеиновых кислот**

Электрофорез – метод разделения макромолекул, различающихся по таким параметрам, как

- размеры (или молекулярная масса),
- пространственная конфигурация,
- вторичная структура
- электрический заряд.

Находящиеся в буферном растворе макромолекулы обладают некоторым суммарным электрическим зарядом, величина и знак которого зависит от рН среды. Через этот раствор пропускают электрический ток, и формируется электрическое поле. Под действием поля макромолекулы в соответствии со своим суммарным зарядом мигрируют в направлении катода или анода. В зависимости от величины заряда и размеров молекулы приобретают различные скорости. Постепенно исходный препарат, состоящий из различных молекул, разделяется на зоны одинаковых молекул, мигрирующих с одинаковой скоростью.

Рабочий канал заполняют гелем, влияющим на электрофоретическую миграцию молекул. Фракционируемые молекулы сталкиваются с нитями полимера, что снижает скорость движения молекул. Препятствия для миграции становятся особенно серьезными, если средний размер пространственных ячеек геля оказывается соизмерим с размерами макромолекул. В этом случае решающее влияние на электрофоретическую подвижность различных макромолекул и степень разделения оказывает соотношение их линейных размеров. В настоящее время используют ПААГ и агарозный гель. Варьируя концентрацию полимера, можно получать гели с очень широким диапазоном размеров пор.

К образцам обычно добавляют низкомолекулярный кислый краситель (например, динитрофенол, бромфеноловый синий), чтобы визуализировать ход электрофореза в процессе. Краситель также необходим для того, чтобы определить, когда стоит остановить процесс.

После разделения (иногда краситель вносят в расплавленную агарозу) фрагменты ДНК разной длины визуализируют при помощи флюоресцентных красителей, специфично взаимодействующих с ДНК, например, агарозные гели обычно красят бромистым этидием, который интеркалирует между азотистыми основаниями дуплекса и флюоресцирует в УФ-лучах.

### **Проведение электрофореза**

Для электрофореза используются 2 буфера – ТАЕ (Tris-Acetate-EDTA) и ТВЕ (Tris-Borate-EDTA)



Буферы делаются в концентрированном виде, для работы их разбавляют до 1х концентрации.

В одном и том же буфере можно проводить около 10-20 разделений.

Гель готовится в том же 1х буфере, который будет использоваться:

I. 10хТВЕ-буфер ПРОПИСЬ:

pH~8.3;(храниться при NT в чистой посуде)

Состав на 1 литр:

Трис	107.8 г
Борная кислота	55.0 г
ЭДТА 0.5М pH8.0	20.0 мл
Вода деионизованная	до 1 л (~862 мл)

II. 50хТАЕ-буфер ПРОПИСЬ:

1х pH ~7.6;(храниться при NT в чистой посуде)

Состав на 1 литр:

Трис	242.2 г
Уксусная кислота	90.0 мл
ЭДТА 0.5М pH8.0	18.6 г
Вода деионизованная	до 1 л (~733 мл)

1.Готовят 1 х ТВЕ в объеме, достаточном для заполнения камеры для электрофореза (300-500 мл для мини геля) и приготовления геля (30 мл)

2.Добавляют к 1 х ТВЕ агарозу в количестве, необходимом для получения 0,8—1.5% раствора, и нагревают в микроволновой печи до полного расплавления агарозы. Концентрацию агарозы подбирают в зависимости от размеров разделяемых фрагментов (6-10 т.п.н – 0.8%, 1-5 т.п.н. – 1%, 0.5-2 т.п.н. – 1.2%, 0.1-1 т.п.н – 1.5-2%)

3. Охлаждают смесь до +/- 50 °С

4.Теплую агарозу выливают в кювету для геля и равномерно распределяют ее по кювете. Вертикально вставляют гребенку так, чтобы ее зубцы не доставали до дна примерно 1-0,5 мм. Иногда для окрашивания в агарозу можно сразу внести красители – Midory Green, Gel Red, которые не являются токсичными. Этидиум бромид является сильным мутагеном и поэтому рекомендуется окрашивать им гель в отдельной ванне.

5.Оставляют кювету с агарозным гелем на 30 мин (до застывания), затем помешают в электрофорезную камеру с буфером и осторожно удаляют гребенку.

6.Буфер должен покрывать гель полностью, но не выше чем на 1-2 мм. Чем выше слой буфера над гелем, тем дольше проходит электрофорез.

7.Подготавливают к электрофорезу образцы исследуемой и маркерной ДНК, для чего смешивают их с буфером для нанесения (5:1, о/о). Рекомендуется

использовать маркерные фрагменты, длина которых примерно равна длине исследуемой ДНК.

8. Осторожно вносят в лунки исследуемую и маркерную ДНК. для повышения точности определения размера маркерную ДНК наносят по обе стороны от исследуемой.

9. Проводят электрофорез при градиенте напряженности 1—3 В на 1 см геля.

Большое значение имеет напряжение электрического поля, с увеличением которого понижается эффективность разделения. Для достижения максимальной эффективности разделения фрагментов ДНК напряженность не должна превышать 5 вольт на сантиметр геля (Girvitz et.al., 1990).

В состав геля входят: 1X TAE (pH 8,1), агароза, бромистый этидий. В зависимости от процентности геля добавляется разное количество его компонентов. Процентность геля выбирается в зависимости от длины разгоняемых в нем фрагментов ДНК. Для анализа фрагментов гена 18S рРНК (длина около 600 п.н.) оптимально подходит 2% агарозный гель.

## **Тема 4. Полимеразная цепная реакция**

### **Лекция 4. Полимеразная цепная реакция**

**Аннотация.** Рассматривается принцип ПЦР. ПЦР в реальном времени. ПЦР с обратной транскриптазой и получение кДНК.

**Ключевые слова.**

### **Методические рекомендации по изучению темы**

1. Тема содержит лекционную часть в виде презентации и текстовых пояснений, где даются общие представления по теме;
2. В ходе выполнения лабораторной работы обучающиеся приобретают навыки работы данными методами, интерпретации полученных результатов;
3. В качестве самостоятельной работы и проверки усвоения темы предлагается изучение интернет ресурсов.

### **Рекомендуемые информационные ресурсы:**

[http://molbiol.ru/protocol/12\\_01.html](http://molbiol.ru/protocol/12_01.html)

### **Глоссарий**

**Вектор.** Автономно реплицирующаяся в клетке-хозяине молекула ДНК, к которой можно присоединить фрагмент ДНК, чтобы обеспечить его репликацию; например, плаزمиды или ДНК умеренного фага.

**Ген.** Участок хромосомы, который кодирует одну или несколько полипептидных цепей или молекулу РНК.

**Генетическая информация.** Наследственная информация, содержащаяся в нуклеотидной последовательности хромосомной ДНК или РНК.

**Генетический код.** Набор кодовых слов (триплетов) в ДНК кодирующих аминокислоты белков.

генов термин означает включение транскрипции в результате взаимодействия индуктора с регуляторным белком.

**Дезоксирибонуклеотиды.** Нуклеотиды, содержащие в качестве пентозного компонента 2'-дезоксид-Д-рибозу.

**ДНК-полимераза.** Фермент, который катализирует протекающую в присутствии матрицы реакцию синтеза ДНК из предшественников - дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатов.

**Матрица.** Макромолекулярный шаблон для синтеза информационной макромолекулы. Матричная РНК (мРНК или иРНК). Класс молекул РНК, каждая из которых комплементарна одной цепи клеточной ДНК и служит для переноса генетической информации от хромосомы к рибосомам.

**Обратная транскриптаза.** Синтезируемая ретровирусами РНКзависимая ДНК-полимераза, способная катализировать синтез ДНК, комплементарной РНК.

**Обратная транскрипция.** Синтез ДНК на матрице РНК; осуществляется ферментом обратной транскриптазой.

**Плавление ДНК.** Денатурация ДНК.

**Праймер.** Короткая последовательность (часто это РНК), комплементарно взаимодействующая с одной из цепей ДНК; образует свободный 3'-ОН-конец, используя который ДНК-полимераза начинает синтез дезоксирибонуклеотидной цепи.

**ПЦР — полимеразная цепная реакция,** ферментативная реакция репликации молекул ДНК *in vitro*, катализируемая термостабильной ДНК-полимеразой. Реакция, разработанная в 1983 г. Кэри Муллисом (Kary Mullis), ныне широко применяется во всех сферах современной молекулярной биологии. Реакция состоит из повторяющихся циклов, в течение которых происходит ступенчатая смена температуры реакционной смеси, что управляет стадиями реакции. Сначала фрагменты двуцепочечной ДНК-матрицы разделяются (стадия денатурации) при высокой температуре (94° С). Затем температура понижается до 55–65° С и каждый одноцепочечный фрагмент гибридизуется с комплементарным олигонуклеотидом-затравкой (стадия «отжига» затравки). Далее температура повышается вновь до 72° С (температурный оптимум термостабильной ДНК-полимеразы), и фермент достраивает затравку до конца, создавая полноценную двуцепочечную копию молекулы ДНК-матрицы (стадия синтеза). Поскольку по окончании цикла из каждой молекулы ДНК образуется две (обе цепи идут в дело) и количество молекул растет в геометрической прогрессии, реакция называется цепной. При помощи ПЦР можно из одной молекулы ДНК-матрицы получить достаточно большое количество вещества. разрезов в двухцепочечных молекулах ДНК.

### **Вопросы для изучения:**

1. Основные понятия метода пцр-амплификации
2. Компоненты ПЦР

#### **1. Основные понятия метода пцр-амплификации**

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – метод амплификации *in vitro*, с помощью которого за короткое время можно выделить и размножить определенную последовательность ДНК в количестве, превышающем исходное в сотни тысяч раз (Mullis, Faloona, 1987). Суть метода – многократное копирование (амплификация) в пробирке определенных участков ДНК в процессе повторяющихся температурных циклов. На каждом цикле амплификации синтезированные ранее фрагменты вновь копируются ферментом ДНК-полимеразой, и происходит многократное увеличение количества специфических фрагментов ДНК (Болдырева, 2005).

Области применения ПЦР: высокоэффективное клонирование геномных

последовательностей (Scharf et al., 1986), прямое секвенирование митохондриальной и геномной ДНК (Wong et al., 1987), анализ вариаций нуклеотидных последовательностей и выявление возбудителей заболеваний (Kwok et al., 1987).

Для проведения полимеразной цепной реакции необходимо наличие в реакционной смеси ряда компонентов (Саики и др., 1990):

*Два праймера* – искусственно синтезированные олигонуклеотиды, размером от 15 до 30 п.н., комплементарные соответствующим участкам ДНК-мишени.

Требования к нуклеотидной последовательности праймера:

1. Отсутствие внутренней вторичной структуры;
2. Сбалансированный состав нуклеотидов Г/Ц, А/Т и равномерное распределение Г/Ц, А/Т по всей последовательности;
3. Отсутствие комплементарности между 3'-концами для предотвращения образования димеров праймеров.

Оптимальная концентрация праймеров 0,1-0,5 мкМ. Более высокая концентрация праймеров может приводить к неспецифическому отжигу праймера и накоплению неспецифических продуктов ПЦР-амплификации.

#### **Компоненты ПЦР:**

*Термостабильная ДНК-полимераза (Taq-полимераза)*. Общее свойство ДНК-полимераз – способность вести матричный синтез нуклеиновых кислот в направлении 5'→3'. Большинство ДНК-полимераз обладают также 3'→5' экзонуклеазной (корректирующей) активностью, предназначенной для удаления ошибочно присоединенных нуклеотидов. Обычно для проведения реакции достаточно 0,5–2,5 единиц термостабильной полимеразы из *Thermus aquaticus* (Taq-полимеразы). Иногда увеличение концентрации фермента приводит к уменьшению специфичности.

*Смесь 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов (дНТФ – дАТФ, дГТФ, дЦТФ и дТТФ)* – используются Taq-полимеразой для синтеза второй цепи ДНК. Несбалансированная смесь дНТФ (концентрация всех дНТФ не одинакова) уменьшает точность работы ДНК-полимеразы. Высокие концентрации дНТФ уменьшают концентрацию свободных ионов  $Mg^{2+}$ , что сказывается на активности ДНК-полимеразы и снижению температуры отжига праймеров.

*Буфер* – смесь катионов и анионов в определенной концентрации, обеспечивающих оптимальные условия для реакции: стабильное значение рН и ионную силу раствора.

*Анализируемый образец* – подготовленный к внесению в реакционную смесь препарат, который содержит искомую ДНК, служащую мишенью для последующей ПЦР-амплификации.

*Ионы  $Mg^{2+}$*  – необходимы для работы Taq-полимеразы. Диапазон рабочих концентраций: 0,5–5,0 мМ (10 мМ – ингибирует ДНК-полимеразу на 40-50%).

Увеличение концентрации  $Mg^{2+}$  оказывает очень сильное влияние на специфичность и эффективность полимеразной цепной реакции: увеличивается выход ПЦР-продуктов, но снижается специфичность гибридизации праймеров. Оптимальная концентрация  $Mg^{2+}$  зависит от нуклеотидной последовательности ДНК-матрицы и праймеров.  $Mg^{2+}$  образует комплексы с дНТФ – именно эти комплексы являются субстратом для *Taq*-полимеразы. С  $Mg^{2+}$  стехиометрически связываются дНТФ, РРi (свободный пирофосфат), ЭДТА,  $PO_4$ . Повышение концентрации  $Mg^{2+}$  вызывает повышение температуры плавления ДНК, что приводит к уменьшению точности гибридизации праймеров.

**Циклический температурный режим** – это ряд событий, обеспечиваемых определенными температурными параметрами, в процессе реакции ПЦР-амплификации в анализируемом образце с искомой ДНК. Каждый цикл амплификации состоит из трех этапов (Рыбчин, 2002):

1. *Денатурация*. Реакционную смесь нагревают до  $95^{\circ}C$ , в результате чего двухцепочечные молекулы ДНК расплетаются (денатурируются, плавятся) с образованием двух одноцепочечных молекул.

2. *Отжиг (присоединение, гибридизация праймеров)*. Праймеры присоединяются к одноцепочечной ДНК-мишени. Присоединение прямого и обратного праймеров происходит комплементарно к соответствующим последовательностям на противоположных цепях ДНК на границах целевого специфического участка. Для каждой пары праймеров существует своя температура отжига, значения которой обычно располагаются в интервале  $50-65^{\circ}C$ . Время отжига 20-60 сек.

3. *Элонгация (синтез ДНК)*. Комплементарное достраивание цепей ДНК происходит от 5'-конца к 3'-концу цепи в противоположных направлениях. Праймеры служат затравками для инициации синтеза ДНК. Материалом для синтеза новых цепей ДНК служат добавляемые в раствор 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфаты. На этом этапе температуру в реакционной смеси доводят до оптимума работы *Taq*-полимеразы  $72^{\circ}C$ .

Время элонгации выбирают в зависимости от длины амплифицируемого фрагмента ДНК и скорости работы (эффективности) ДНК-полимеразы. Обычно расчёт времени элонгации проводят по формуле  $T$  (элонгация) = 1 минута  $\times$  N (т.п.н. ДНК).

Температурный цикл амплификации многократно повторяется (25 и более раз). На каждом цикле количество синтезированных копий фрагмента ДНК удваивается. Результатом циклического процесса является экспоненциальное увеличение количества специфических фрагментов ДНК. Однако на практике эффективность ПЦР-амплификации ниже теоретического максимума за счёт амплификации неспецифических фрагментов ДНК и истощении компонентов реакции (Mullis, Faloona, 1987).

*Завершающая достройка*. Обычно, после последнего цикла ПЦР-

амплификации, реакционную смесь инкубируют дополнительно в течении 5-15 мин при 72°C для достройки частично синтезированных продуктов ПЦР (Саики и др., 1990).

**"Горячий старт"** (от англ. "hot-start") – это подход, применяемый для уменьшения риска образования неспецифических продуктов реакции ПЦР-амплификации. Его суть состоит в предотвращении возможности начала реакции до момента достижения в пробирке условий, обеспечивающих специфический отжиг праймеров (Щелкунов, 2004).

В зависимости от ГЦ-состава и размера, праймеры имеют определенную температуру плавления, при которой образование водородных связей нестабильно. Если температура системы превышает температуру плавления, праймер не в состоянии удерживаться на цепи ДНК и денатурирует. При соблюдении оптимальных условий, то есть температуры отжига, близкой к температуре плавления, праймер образует двухцепочечную молекулу только при условии его полной комплементарности и, таким образом, обеспечивает специфичность реакции. Один из вариантов реализации "горячего старта" – внесение пробирок в лунки термоциклера во время этапа первичной денатурации (Саики и др., 1990).

В этом случае, даже если неспецифический отжиг произошел до начала температурного циклирования, элонгации не происходит, а при нагревании комплексы праймер-ДНК денатурируют, поэтому неспецифические продукты не образуются. В дальнейшем температура в пробирке не опускается ниже температуры плавления, что обеспечивает образование специфического продукта амплификации (Щелкунов, 2004).

**Положительный контроль** позволяет удостовериться, что все компоненты, входящие в состав реакционной смеси, обеспечивают нормальное прохождение реакции. Для этого используют препарат ДНК, содержащий сайты для отжига праймеров: например, ДНК искомого организма или клонированные специфические участки его генома.

**Контаминация** – попадание из внешней среды в реакционную смесь специфических и неспецифических молекул ДНК, способных служить мишенями в реакции амплификации и давать ложноположительные или ложноотрицательные результаты.

**Отрицательные контроли** проводят, чтобы удостовериться в отсутствии контаминации в каждой серии экспериментов. В качестве отрицательных контролей рекомендуется использовать бидистиллированную воду (или Milli Q H<sub>2</sub>O) вместо анализируемого образца.

Для разрушения чужеродной ДНК в реакционной смеси пробирку с реакционной смесью (без ДНК матрицы) подвергают воздействию ультрафиолетовой радиации в течение 10 мин.

Источниками заноса в реакционную смесь посторонней матрицы могут

выступать:

- Лабораторное оборудование и пипетки, на которых могут оставаться следы случайной ДНК, оставшиеся после её выделения этим оборудованием;
- Перекрестная контаминация между образцами;
- Продукты предыдущей ПЦР.

Чтобы исключить контаминацию и уменьшить число ложноположительных результатов следуйте следующим правилам, принятым в лабораториях, где проводят ПЦР:

- Разделите рабочие места, где Вы готовите матрицу для ПЦР, непосредственно проводите ПЦР и делаете анализ продуктов ПЦР.
- Смешивайте смеси для ПЦР в ламинарном шкафу или изолированном боксе, оборудованном УФ лампой. Там же держите микроцентрифугу, перчатки и другое необходимое для ПЦР оборудование, которое будет использовано только для ПЦР.
- Используйте специальные наконечники для пипеток с пористым фильтром и набор пипеток, который будет использоваться только для ПЦР.
- Используйте стерильные материалы и только новые перчатки, когда Вы готовите постановку ПЦР.
- Для подготовки ПЦР и матрицы для ПЦР используйте новые, ни разу неиспользованные, материалы (пластик, наконечники). Никогда не пользуйтесь мытыми и бывшими в употреблении материалами.
- Если реактивами для постановки ПЦР пользуются несколько человек, разделите исходные реактивы по аликвотам для каждого пользователя.



## **Тема 5. Рестрикционный анализ**

### **Лекция 5. Рестрикционный анализ**

**Аннотация.** Рассматривается рестрикционный анализ продуктов ПЦР и геномной ДНК. ПДРФ анализ

**Ключевые слова.** Рестриктазы, рестрикционные эндонуклеазы, ферменты рестрикции (restriction enzymes, restriction endonuclease), нуклеазы, ПДРФ анализ

### **Методические рекомендации по изучению темы**

1. Тема содержит лекционную часть в виде презентации и текстовых пояснений, где даются общие представления по теме;
2. В ходе выполнения лабораторной работы обучающиеся приобретают навыки работы данными методами, интерпретации полученных результатов;
3. В качестве самостоятельной работы и проверки усвоения темы предлагается изучение интернет ресурсов.

### **Рекомендуемые информационные ресурсы:**

<http://russia.sibenzyme.com/products/restrictases>

[http://russia.sibenzyme.com/products/m2\\_type](http://russia.sibenzyme.com/products/m2_type)

<http://www.thermoscientificbio.com/restriction-and-modifying-enzymes/restriction-enzymes/fastdigest>

<http://www.dnalc.org/view/15488-Restriction-digest-3D-animation-with-no-audio.html>

<http://www.dnalc.org/view/15917-Cutting-and-pasting-DNA.html>

[http://ru.wikipedia.org/wiki/Полиморфизм\\_длин\\_рестрикционных\\_фрагментов](http://ru.wikipedia.org/wiki/Полиморфизм_длин_рестрикционных_фрагментов)

[http://medbiol.ru/medbiol/slov\\_sverd/00002695.htm](http://medbiol.ru/medbiol/slov_sverd/00002695.htm)

### **Глоссарий**

**Липкие» концы.** Самокомплементарные одноцепочечные участки ДНК, выступающие на противоположных концах двухцепочечной молекулы; возникают в результате ступенчатых

**Рестриктирующие эндонуклеазы.** Эндодезоксирибонуклеазы, узнающие специфическую нуклеотидную последовательность и вызывающие расщепление обеих цепей ДНК в сайтах, которые определяются нуклеотидными последовательностями, обладающими симметрией второго порядка относительно центра. Эти ферменты являются важным инструментом генетической инженерии.

**Экзонуклеаза.** Фермент, гидролизующий только концевую фосфодиэфирную связь нуклеиновой кислоты.

**Эндонуклеаза.** Фермент, способный гидролизовать внутренние фосфодиэфирные связи в нуклеиновых кислотах.

**Вопросы для изучения:**

1. Рестрикционный анализ
2. ПДРФ-анализ (RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism) метод
3. ПДРФ семейный генетический анализ сцепления

**Рестрикционный анализ**

Рестриктазы, рестрикционные эндонуклеазы, ферменты рестрикции (restriction enzymes, restriction endonuclease) [лат. restrictio — ограничение] — большая группа бактериальных ферментов (нуклеаз), катализирующих в присутствии АТФ разрыв двуцепочечных ДНК после распознавания ими специфической нуклеотидной последовательности.

Рестриктазы – это эндонуклеазы, узнающие определенные последовательности (сайты рестрикции) в двуцепочечной ДНК и гидролизующие ДНК внутри сайтов или вблизи них.

Известно не менее 1 тысячи рестриктаз. Выделяют 3 типа рестриктаз: *I тип* и *III тип* – молекула белка, несущая на своей цепи две активности, рестриктазную и модифицирующую. Для рестрикции необходима энергия АТФ. *II тип* – 2 белка: рестриктаза и модифицирующий фермент. АТФ для рестрикции не требуется.

Также рестриктазы типа 1 разрезают ДНК неспецифически на расстоянии более чем 1000 п.н. от распознаваемой ими нуклеотидной последовательности и обладают как рестриктазной, так и метилирующей активностями (напр., EcoK и EcoB). Рестриктазы типа 2 осуществляют расщепление на или вблизи короткой, часто симметричной, распознаваемой нуклеотидной последовательности, состоящей из 4—8 н. (напр., GGATCC для рестриктазы BamHI). Рестриктазы типа 3 катализируют расщепление на расстоянии 24—26 п.н. от короткой асимметричной распознаваемой нуклеотидной последовательности.

У бактерий известно уже около 500 Р., которые распознают и разрезают свыше 100 различных нуклеотидных последовательностей (сайтов) ДНК.

Р. предохраняют бактериальные клетки от проникновения в них чужеродных ДНК (напр., вирусных); они широко используются при определении первичной структуры ДНК, для картирования генов и в генной инженерии, для создания и клонирования гибридных молекул ДНК.

**ПДРФ-анализ (RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism)**

Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ, Restriction fragment length polymorphism, RFLP) — это способ исследования геномной ДНК, путем разрезания ДНК с помощью эндонуклеаз рестрикции и

дальнейшего анализа размеров образующихся фрагментов (рестриктов) путем гель-электрофореза (ДНК электрофореза).

При использовании данного исследования получают различные результаты от различных образцов, и при помощи ПДРФ можно идентифицировать некоторые различия в последовательности нуклеотидов ДНК, в случае, когда они располагаются в сайте рестрикции.

В виду того, что технологии секвенирования ДНК могут охарактеризовать ДНК очень точно, ПДРФ был разработан как первый и дешевый метод для массового применения. Анализ разнообразия ПДРФ является важным инструментом в картировании генома, локализации генов, ответственных за генетические заболевания, определения риска заболевания, получения генетических отпечатков и определения родства.

Наличие сайтов рестрикции в геномной ДНК и их взаимное расположение однозначно определяются последовательностью нуклеотидов исследуемой ДНК, поскольку сам сайт рестрикции - не что иное, как строго определенная последовательность нуклеотидов ДНК, узнаваемая и расщепляемая рестриктазами. Следовательно, любая мутация, изменяющая последовательность нуклеотидов сайта рестрикции, уничтожает этот сайт. Полное расщепление анализируемой геномной ДНК отдельными рестриктазами приводит к образованию определенного набора фрагментов ДНК, число и размеры которых соответствуют расположению сайтов рестрикции.

Гибридизация по Саузерну позволяет определять размеры и взаимное расположение рестрикционных фрагментов ДНК после их электрофоретического разделения.

Мутационная изменчивость в сайтах рестрикции может быть легко обнаружена по изменению длины рестрикционных фрагментов ДНК, гибридизующихся со специфическими ДНК-зондами. При наличии мутации в одном из сайтов рестрикции этот сайт остается нерасщепленным после завершения рестрикции, что приводит к слиянию соседних рестрикционных фрагментов ДНК, разделяемых мутантным сайтом, и образованию фрагмента ДНК большего размера. В результате длина рестрикционных фрагментов ДНК, содержащих мутантные сайты, становится полиморфной, что выявляется при сравнении ДНК из разных источников методом ПДРФ.

Анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов включает следующие этапы: выделение геномной ДНК, ее рестрикцию специфической эндонуклеазой, электрофоретическое разделение образующихся фрагментов ДНК и идентификацию фрагментов ДНК, содержащих полиморфный сайт рестрикции, путем блот-гибридизации по Саузерну.

При отсутствии рестрикции в полиморфном сайте на электрофореграммах или радиоавтографах (в зависимости от типа мечения ДНК-зонда) будет выявляться один крупный фрагмент, соответствующий по длине

последовательности ДНК между двумя соседними константными сайтами рестрикции для той же эндонуклеазы. При наличии рестрикции в полиморфном локусе на электрофореграмме будет присутствовать меньший по размерам фрагмент, равный расстоянию между полиморфным сайтом рестрикции и одним из ближайших константных сайтов рестрикции.

Метод ПДРФ широко используется в генетических исследованиях популяций, поскольку наличие в геноме исследуемого организма рестриционного фрагмента ДНК определенной длины является прекрасным генетическим маркером и одновременно фенотипическим признаком, тесно связанным с генотипом организма. Это позволяет следить за распространением такого маркера в популяциях, передачей его от родителей к потомству при скрещиваниях и использовать для построения генетических карт исследуемых организмов классические генетические методы.

### **ПДРФ семейный генетический анализ сцепления**

Эта группа методов используется в медицинской генетике для выявления связи (сцепления) между симптомами заболевания, вызываемого мутацией в неизвестном гене, и другими генетическими маркерами. В данном случае в качестве одного из генетических маркеров выступают сами симптомы заболевания. В геноме человека обнаружено большое количество полиморфизмов, в том числе ПДРФ.

ПДРФ распределены более или менее равномерно в геноме человека на расстоянии около 5-10 сМ друг от друга. Чем ближе индивидуальные полиморфные локусы расположены к гену, ответственному за заболевание, тем меньше вероятность их разделения при рекомбинации в мейозе и тем чаще они будут встречаться вместе у больного индивидуума и вместе передаваться от родителей потомству.

Клонировав протяженный участок генома, включающий соответствующий полиморфный маркер (его отбор из клонотеки геномной ДНК проводят с помощью зонда), можно одновременно вместе с ним с большой вероятностью выделить ген, вызывающий наследственное заболевание. Такие подходы были применены для проведения семейного анализа и выделения соответствующих генов при мышечной дистрофии Дюшенна, кистозном фиброзе почек (муковисцидозе) и миотонической дистрофии.

Информативность отдельных ПДРФ генома человека зависит от уровня их гетерозиготности в исследуемой популяции. Мерой информативности ПДРФ как генетического маркера по предложению Д. Ботштейна и соавторов (1980 г.) принято считать значение содержания полиморфной информации PIC (polymorphism information content).

## **Тема 6. Методы секвенирования**

### **Лекция 6. Методы секвенирования**

**Аннотация.** Рассматриваются методы секвенирования: метод Сэнгера, пиросеквенирование, shotgun секвенирование, Illumina секвенирование, высокопроизводительное секвенирование Ion-Torrent. Подготовка проб для секвенирования.

**Ключевые слова.** Секвенирование по Сэнгеру, Полупроводниковое секвенирование, пиросеквенирование

### **Методические рекомендации по изучению темы**

1. Тема содержит лекционную часть в виде презентации и текстовых пояснений, где даются общие представления по теме;
2. В ходе выполнения лабораторной работы обучающиеся приобретают навыки работы данными методами, интерпретации полученных результатов;
3. В качестве самостоятельной работы и проверки усвоения темы предлагается изучение интернет ресурсов.

### **Рекомендуемые информационные ресурсы:**

[http://molbiol.ru/protocol/13\\_03.html](http://molbiol.ru/protocol/13_03.html)

<http://www.chem.msu.su/rus/teaching/kolman/256.htm>

[http://www.biotechnolog.ru/ge/ge6\\_1.htm](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge6_1.htm)

<http://bioinformatics.ru/Misc/genseq-roadmap.html>

<http://molbiol.ru/bio/001/001.html>

<http://www.ramld.ru/userfiles/file/Kazan2011/mironovkazan.pdf>

[https://readtiger.com/wkr/ru/Методы\\_секвенирования\\_нового\\_поколения](https://readtiger.com/wkr/ru/Методы_секвенирования_нового_поколения)

<http://molbiol.ru/forums/index.php?act=Attach&type=post&id=146459>

### **Глоссарий**

**Библиотека генов.** Неупорядоченный набор фрагментов ДНК, содержащий всю генетическую информацию данного вида.

**Гибридизация.** Процесс взаимодействия комплементарных цепей РНК и ДНК, образующих двухцепочечный гибрид РНК ДНК.

**Денатурация ДНК или РНК.** Переход этих молекул из двухцепочечной формы в одноцепочечную; разделение цепей наиболее часто достигается нагреванием.

**ДНК-полимераза.** Фермент, который катализирует протекающую в присутствии матрицы реакцию синтеза ДНК из предшественников - дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатов.

**кДНК (комплементарная ДНК).** ДНК синтезируемая обычно с помощью обратной транскриптазы и комплементарная данной мРНК; используется для клонирования ДНК.

**Обратная транскриптаза.** Синтезируемая ретровирусами РНКзависимая ДНК-полимераза, способная катализировать синтез ДНК, комплементарной РНК.

**Обратная транскрипция.** Синтез ДНК на матрице РНК; осуществляется ферментом обратной транскриптазой.

**Плавление ДНК.** Денатурация ДНК.

**Прибор с зарядовой связью (CCD-сенсор)** — предназначен для преобразования энергии электромагнитного излучения оптического диапазона в электрическую. Он обладает высокой чувствительностью, разрешающей способностью и быстродействием. Используется в качестве фотоприемника в видеокамерах, цифровых фотоаппаратах, сканерах и т. д. Конструктивно имеет матричное (многоплощадочное) исполнение, включающее от одной до нескольких линеек фоточувствительных микроповерхностей.

**Фредерик Сэнгер**, род. 18 апреля 1918 г., OM, CH, CBE, FRS — английский биохимик и корифей молекулярной биологии, дважды лауреат Нобелевской премии по химии: за определение аминокислотной последовательности инсулина (1955 г.) и за разработку метода секвенирования ДНК (1980 г.). Говорят, необычайно скромный и обаятельный человек.

### **Вопросы для изучения:**

1. Принцип секвенирования ДНК по Сэгнеру
2. Принцип секвенирования ДНК методом химической дегградации по Максаму-Гилберту
3. Пиросеквенирование
4. Принцип высокопроизводительного пиросеквенирования ДНК
5. Секвенаторы второго поколения: Illumina

### ***1. Принцип секвенирования ДНК по Сэнгеру***

В основе метода секвенирования ДНК, разработанного Сэнгером и соавт. [Sanger et al., 1977a], называемого также методом секвенирования путем терминации цепи, лежал принцип ферментативного построения комплементарной цепи ДНК по существующей одноцепочечной матрице при происходящем в разных местах цепи ДНК ингибировании ее дальнейшего роста.

Ключевым моментом этого процесса являлась терминация построения комплементарной цепи ДНК, происходящая при включении ДНК-полимеразой модифицированных аналогов природных субстратов диде-зоксирибонуклеотид трифосфатов, являющихся известными ингибиторами ДНК-полимеразы, как было ранее показано в случае с ддТТФ [Atkinson et al., 1969].

Такое терминирование происходило одновременно как бы в двух режимах - заданном и случайном. Заданность определялась тем, что в одной отдельной

пробирке наряду со всеми четырьмя дНТФ (один из которых был радиоактивно меченым) присутствовал только один какой-нибудь конкретный ддНТФ, случайность же происходила от того, что включение данного ддНМФ в растущую цепь ДНК было произвольным, но, естественно, с учетом принципа комплементарности. То есть происходила некая конкуренция между дНТФ и ддНТФ при их выборе ДНК полимеразой.

Другим ключевым моментом являлся гетерогенный размер полученных фрагментов ДНК. Их гетерогенность определялась тем, что все 3'-концы фрагментов вновь синтезируемой цепи ДНК во всех четырех реакционных пробирках были терминированы соответствующими ддНМФ и, таким образом, представляли собой полный набор всех возможных длин в пределах секвенируемого участка, построенного ДНК-полимеразой.

Продукты реакций терминирования подвергались денатурации и уже одноцепочечные меченые фрагменты, имевшие гомогенный 5'-конец и гетерогенные 3'-концы, разделялись по длине высоковольтным электрофорезом высокого разрешения в полиакриламидном геле, позволяющим разделять фрагменты ДНК, отличающиеся всего на один нуклеотид, в четырех соседних дорожках, соответствующих специфическим терминирующим реакциям, например в последовательности Т, С, G, А.

По завершению электрофореза гель экспонировался на рентгеновскую пленку и по прошествии некоторого времени (обычно от одних до двух суток) с проявленной пленки можно было "читать" последовательность нуклеотидов секвенируемого участка ДНК, начиная с нижней части геля и последовательно поднимаясь вверх по этим четырем дорожкам, соответствующим одному фрагменту ДНК.

Сэнгеровские ряды очень хороши: получают ряды длиной около тысячи нуклеотидов, причём качество начинает заметно падать только после 700-800 нуклеотидов.

Сам процесс секвенирования по Сэнгеру предопределяет и эффект падения качества (труднее отличить молекулу массой 700 от молекулы массой 701, чем массу 5 от массы 6), и другой неприятный эффект – если в геноме встречается длинная последовательность из одной и той же буквы (...AAAAAAAAA...), трудно бывает точно определить, какой она длины – все промежуточные массы попадут в одну и ту же пробирку, некоторые из них могут не встретиться, некоторые — слиться друг с другом и т.д.

Но всё же сэнгеровское секвенирование даёт отличные результаты с достаточно длинными рядами, которые потом относительно легко собирать.

Именно при помощи сэнгеровского секвенирования был впервые расшифрован геном человека. Секвенирование по Сэнгеру применяется и сегодня, но его всё активнее вытесняют другие методы, и применяется оно всё реже.

## ***II. Принцип секвенирования ДНК методом химической дегградации по Максаму-Гилберту***

В основе метода секвенирования ДНК путем химической дегградации лежит ограниченное расщепление меченого фрагмента ДНК под действием специфических реагентов. Условием проведения секвенирования этим методом является наличие фрагмента ДНК, меченого только по одному концу. Разделение продуктов дегградации по размеру с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, способного разделять фрагменты ДНК, различающиеся между собой по длине всего на один нуклеотид в широком диапазоне. Определить нуклеотидную последовательность секвенированного участка ДНК позволяет последующая радиоавтография геля.

Сначала проводится ограниченная модификация определенных нуклеотидов под действием различных химических агентов. Концентрация агента и продолжительность его воздействия на молекулы ДНК подбирается с расчетом, чтобы в каждой молекуле произошла модификация только одного нуклеотида, а поскольку в реакционной смеси присутствует огромное количество таких молекул, то, согласно теории вероятности, все основания данного типа в секвенируемом фрагменте ДНК окажутся модифицированными.

Следующие этапы удаления модифицированных оснований и р-элиминации обоих фосфатов, окружающих дезоксирибозу, и разрыва цепи должны проходить уже количественно. Отдельные реакции ограниченной модификации и количественного расщепления проводят для каждого типа нуклеотидов или их комбинации.

Таким образом, в результате четырех (или иногда трех, пяти или даже шести) типов реакций образуется смесь олигонуклеотидных молекул, которые различаются по размеру на один нуклеотид и несут на одном из концов метку, обычно радиоактивную.

## ***III. Пиросеквенирование***

Это метод секвенирования ДНК (определение последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК), основанный на принципе «секвенирование путем синтеза». При включении нуклеотида происходит детекция высвобождающихся пирофосфатов.

Матрица одноцепочечной ДНК гибридизуется с праймером и инкубируется с ферментами ДНК-полимеразой, АТФ-сульфурилазой, люциферазой и апиразой, а также с субстратами аденозин-5'-фосфосульфатами (APS) и люциферинном.

Добавление одного из четырёх дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP) (в случае dATP добавляют dATP $\alpha$ S, который не является субстратом для люциферазы) инициирует следующий этап. ДНК-полимераза включает



правильный комплементарный дезоксинуклеотид в цепочку. При этом стехиометрически высвобождается пирофосфат (PPi).

Фермент АТФ-сульфурилаза количественно превращает PPi в аденозинтрифосфат (АТФ) в присутствии аденозин-5'-фосфосульфата. АТФ выступает «топливом» для фермента люциферазы, которая превращает люциферин в оксилуциферин, при этом высвобождается видимый свет, интенсивность которого пропорциональна количеству образовавшегося АТФ. Свет образуется в реакции, катализируемой люциферазой, регистрируется камерой и далее анализируется специальной компьютерной программой.

Невключённые нуклеотиды и АТФ подвергаются деградации ферментом апиразой, и реакция начинается с новым нуклеотидом.

Лимитирующим фактором является длина последовательности нуклеотидов, которая составляет около 300—500 нуклеотидов, что короче, чем 800—1000 нуклеотидов, достижимые методом обрыва цепи (например, метод Сэнгера). Такие ограничения могут затруднять секвенирование геномов, в частности, богатых повторенными последовательностями нуклеотидов.

### ***Принцип высокопроизводительного пиросеквенирования ДНК***

Весь геном, все его молекулы ДНК, случайным образом фрагментируются на кусочки по 300—500 пар оснований.

Затем комплементарные цепи фрагмента разделяются, к каждой цепи фрагментов пришивается одинаковый для всех олигонуклеотид-«адаптер», который позволяет отдельным цепям налипать на пластиковые бусинки. (Последовательность этого олигонуклеотида позволяет позднее в процессе секвенирования распознавать ДНК-матрицу.)

При этом смесь разъединённых на комплементарные цепи фрагментов разбавляют таким образом, что каждая бусинка получает лишь по одной (!) индивидуальной цепи.

Каждая бусинка оказывается заключённой в капельку, окружённую маслом и содержащую смесь для осуществления полимеразной цепной реакции (ПЦР), которая и проходит отдельно в каждой капельке эмульсии (так называемая эмульсионная ПЦР, эПЦР).

Это приводит к «клональной амплификации» цепей ДНК, а говоря по-русски, к тому, что на поверхности бусинки удерживается уже не одна, а около 10 млн. копий («клонов») уникальной ДНК-матрицы.

Далее эмульсия разрушается, вновь двуцепочечные фрагменты ДНК (образовавшиеся в ходе ПЦР) разделяются, и бусинки, несущие одноцепочечные копии ДНК-матрицы, помещаются в лунки «предметного стекла» — слайда особой конструкции. Каждая лунка такого слайда образует отдельный пиколитровый «реактор», в котором и будет происходить реакция секвенирования.

Каждый слайд несёт около 1,6 миллионов лунок, в каждую из которых попадает одна (!) бусинка с ДНК-матрицей. Слайд помещается в проточную камеру таким образом, что над отверстиями лунок создаётся канал высотой 300 мкм, по которому в лунки поступают необходимые реактивы.

Доставляемые в проточную камеру реактивы текут в слое, перпендикулярном оси лунок. Такая конфигурация позволяет одновременно осуществлять реакции на бусинках, несущих ДНК-матрицы, внутри отдельных лунок.

Добавление и удаление реагентов и продуктов реакции происходит за счёт конвекционного и диффузионного переноса. Временные рамки диффузии между потоком и лунками составляют порядка 10 секунд и зависят от высоты проточной камеры и глубины лунок.

### ***Секвенаторы второго поколения: Illumina***

1. Копии ДНК разрезаются в случайных местах на большое число небольших участков.

2. К каждому участку с двух сторон добавляют специальные адаптеры – заранее известные небольшие последовательности нуклеотидов.

3. Затем полученная смесь помещается на специально подготовленную подложку, из которой в виде решётки «растут» участки ДНК, комплементарные адаптерам. Таким образом, они способны «привязать» снабжённые адаптерами участки ДНК к этим местам. Кроме того, адаптеры также содержат праймеры, участки, к которым может присоединиться ДНК-полимераза, которая осуществляет репликацию ДНК.

4. На шаге 3 разные участки ДНК случайным образом «присасываются» к разным местам в решётке. Теперь мы многократно клонируем каждый участок вокруг своего места, получая тем самым целые «кластеры». Этот процесс известен как *bridge amplification*, потому что ДНК привязывается к подложке сразу двумя концами; о том, что это означает для биоинформатики, мы поговорим в следующем разделе.

5. Участки ДНК денатурируют (разрушают водородные связи) – в результате из узлов решётки на подложке «растут» разные участки ДНК, состоящие из одной нити.

6. Подложка помещается в раствор, содержащий ДНК-полимеразу и специально помеченные нуклеотиды, которые сразу же заканчивают процесс репликации (если помните, в сэнгеровском секвенировании такие тоже применялись). Они присоединяются к ДНК, по одному к каждому участку. Соответственно, к каждому участку присоединяется та «буква», с комплементарной к которой он начинается.

7. Затем «лишние» нуклеотиды смывают, а метки оставшихся считывают; в технологии Illumina это флуоресцентные метки, которые можно заставить

светиться разным цветом и фотографировать. Именно на этом шаге мы и узнаём, с какой буквы начинается каждый «кластер участков» ДНК.

8. После этого с уже связанных нуклеотидов химически «срезается» радикал, который мешал дальнейшей надстройке молекулы ДНК. Теперь можно вернуться на шаг 6 и повторить процесс, читая на втором цикле вторые буквы в каждой последовательности, и так далее.

В результате на каждом цикле мы прочитываем одновременно очень большое число нуклеотидов из разных последовательностей. Но за это приходится платить тем, что участки ДНК, которые мы можем прочесть, оказываются гораздо короче, чем в случае секвенирования по Сэнгеру – риды Illumina обычно получают длиной около 100 нуклеотидов.

## **Тема 7. Специальные методы анализа**

### **Лекция 7. Специальные методы анализа**

**Аннотация.** Рассматриваются специальные методы: Гибридизация по Саузерну, Иммунопреципитация хроматина (ChIP), Плазмонный поверхностный резонанс, DNA Microarray

**Ключевые слова.**

#### **Методические рекомендации по изучению темы**

1. Тема содержит лекционную часть в виде презентации и текстовых пояснений, где даются общие представления по теме;
2. В ходе выполнения лабораторной работы обучающиеся приобретают навыки работы данными методами, интерпретации полученных результатов;
3. В качестве самостоятельной работы и проверки усвоения темы предлагается изучение интернет ресурсов.

#### **Рекомендуемые информационные ресурсы:**

[http://www.biotechnolog.ru/ge/ge7\\_1.htm](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge7_1.htm)

[http://medbiol.ru/medbiol/slov\\_sverd/00013165.htm](http://medbiol.ru/medbiol/slov_sverd/00013165.htm)

#### **Глоссарий**

**Гибридизация.** Процесс взаимодействия комплементарных цепей РНК и ДНК, образующих двухцепочечный гибрид РНК ДНК.

**Двойная спираль.** Спираль, образованная двумя комплементарными антипараллельными цепями ДНК или РНК.

**ДНК-микрочип (DNA microarray)** — небольшая поверхность, на которую с большой плотностью в определенном порядке нанесены фрагменты одноцепочечной синтетической ДНК с известной последовательностью. Эти фрагменты выступают в роли зондов, с которыми гибридизуются (образуют двухцепочечные молекулы) комплементарные им цепи ДНК из исследуемого образца, обычно меченные флуоресцентным красителем. Чем больше в образце молекул ДНК с определенной последовательностью, тем большее их количество свяжется с комплементарным зондом, и тем сильнее будет сигнал в точке микрочипа, куда был «посажен» соответствующий зонд. После гибридизации поверхность микрочипа сканируется, и в результате каждой последовательности ДНК ставится в соответствие тот или иной уровень сигнала, пропорциональный числу молекул ДНК с данной последовательностью, присутствующих в смеси. Технология ДНК-микрочипов находит самые разнообразные применения в современной биологии и медицине для анализа сложных смесей ДНК — например, совокупности всех транскриптов (матричных РНК) в клетке.

**Микрофлюидика** — междисциплинарная область исследований, возникшая в начале 80-х годов на пересечении физики, химии, биологии и микротехники. Изучает поведение микро- и нанолитровых объёмов жидкостей, пространственно ограниченных до субмиллиметровых размеров. При таких условиях жидкости обладают рядом интересных свойств. В системе начинают доминировать такие факторы, как сила поверхностного натяжения, диссипация энергии, сопротивление жидкости. Практически исчезает турбулентный ток (остаётся только ламинарный), и поэтому смешивание двух жидкостей затруднено и происходит преимущественно за счёт диффузии. Прикладная микрофлюидика занимается конструированием различных устройств — от струйных принтеров до высокоэффективных жидкостных хроматографов и «лабораторий на микрочипах».

**Химерная ДНК.** Рекомбинантная ДНК, содержащая гены из двух разных видов организмов

#### **Вопросы для изучения:**

1. Метод поверхностного-плазмонного резонанса
2. Гибридизация как высокочувствительный метод выявления специфических последовательностей нуклеотидов
3. ДНК-микроррэй, микрочип (DNA microarray, microchip)

#### **Метод поверхностного-плазмонного резонанса**

SPR-диагностика (от Surface plasmon resonance) — метод определения констант связывания макромолекул, основанный на явлении поверхностного плазмонного резонанса.

Электроны на поверхности золотых частиц коллективно осциллируют в ответ на облучение светом с определённой длиной волны. При этом в спектре отражённого света появляются пики, которых не было в спектре возбуждающего света.

Если на поверхности наночастицы иммобилизован белок, который может поглощать свет, и его частота поглощения перекрывается с частотой плазмонного резонанса, то в пике рассеяния появляется провал в той области спектра, где поглощает белок.

Метод SPR-диагностики основан на сравнении спектров рассеяния наночастиц и наночастиц иммобилизованным белком. Этот эффект, возникая на поверхности металлической пленки, распространяется вглубь раствора, затухая экспоненциально как функция расстояния.

Взаимодействия между молекулами изменяют затухающую волну, что приводит к изменению характеристик поверхностного плазмона, которые

выражаются в изменении резонансного угла и показателя преломления в поверхностном слое. По изменению показателя преломления судят о взаимодействии биомолекул.

Этот метод позволяет наблюдать за реакцией в реальном времени.

В настоящее время явление поверхностного плазмонного резонанса широко применяется при создании химических и биологических сенсоров (биосенсоров). При контакте с биообъектами (ДНК, вирусы, антитела) плазмонные эффекты позволяют более чем на порядок увеличить интенсивность сигналов флуоресценции, т. е. значительно расширяют возможности обнаружения, идентификации и диагностики биологических объектов.

### ***ДНК-микроэrray, микрочип (DNA microarray, microchip)***

ДНК-микроэrray, микрочип (DNA microarray, microchip): плоская небольшая поверхность с нанесенными на нее в определенные позиции микроточками, содержащими олигонуклеотиды или кДНК, каждый из которых представляет определенный ген или не генный участок генома. Используется для гибридизации со смесями фрагментов ДНК или РНК.

Те компоненты смесей, которые комплементарны нанесенным на микроэrray точкам, образуют с ними комплементарные комплексы. Если компоненты смеси мечены флуоресцентным красителем, то соответствующие точки окрашиваются флуоресцентно и могут быть идентифицированы с помощью флуоресцентного микроскопа.

Используются для сравнительного анализа геномов, и для выявления РНК, содержащихся в различных клетках. Представляют собой мощное средство сравнительного анализа, в котором одновременно анализируются тысячи образцов.

Фиксированные на поверхности соединения называют пробами. Находят применение во многих областях биологии и медицины, таких как анализ патологически измененных тканей, например, раковых опухолей, сравнение генов, экспрессирующихся на разных стадиях развития и т.д. [ Свердлов Е.Д. 2009 ].

Технология микрочипов берет начало от Саузерн блоттинга — методики, в которой фрагментированную ДНК переносят на субстрат и затем вносят зонд с известным геном или участком гена.

Использование набора различных ДНК в чипах для определения паттернов экспрессии генов было впервые описано в 1987 году и ДНК-чипы использовали для определения особенностей регуляции экспрессии генов интерферонами [1].

Ранние ДНК-микрочипы были сделаны путем раскапывания микроколичеств кДНК на фильтровальную бумагу. Использование миниатюрных чипов для определения особенностей экспрессии генов было

осуществлено в 1995 году[2] и полный эукариотический геном (*Saccharomyces cerevisiae*) был размещен на микрочипе в 1997 году.[3]

### ***Гибридизация как высокочувствительный метод выявления специфических последовательностей нуклеотидов***

Саузерн блоттинг (Southern blot) — метод, применяемый в молекулярной биологии для выявления определенной последовательности ДНК в образце. Метод Саузерн блоттинга сочетает электрофорез в агарозном геле для фракционирования ДНК с методами переноса разделенной по длине ДНК на мембранный фильтр для гибридизации. Метод называется по имени изобретателя, английского биолога, Эдвина Саузерна.[1]

Если водный раствор ДНК нагреть до 100°C и 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 хотим обнаружить. Этот фрагмент получают либо клонированием, либо путем химического синтеза. Одноцепочечная ДНК, используемая в качестве индикатора, называется ДНК-зонд. Она может содержать от 15 до 1000 нуклеотидов.

ДНК-зонды применяются в различных целях. Гибридизация ДНК-зонда с РНК, выделенной из анализируемой клетки, может выявить наличие или отсутствие экспрессии гена. Если гибридизации не происходит, значит ген молчит, не работает. ДНК-зонды также позволяют проводить диагностику наследственных болезней.

В большинстве случаев мутации, ведущие к наследственным болезням, рецессивны, то есть болезнь развивается, если человек получает дефектные гены от обоих родителей. Аномальные эмбрионы лучше выявлять до рождения.

Например, для серповидноклеточной анемии в мутантном гене, кодирующем бета-цепь гемоглобина, последовательность ГАГ заменена на ГТГ. В этом случае синтезируют олигонуклеотид длиной около 20 оснований, метят радиоактивной меткой. Из эмбриональных клеток, содержащихся в амниотической жидкости, выделяют ДНК и используют ее для гибридизации. Если эмбрион дефектен, то тест будет положительным.

## **Тема 8. Анализ данных методами геномики и биоинформатики**

### **Лекция 8. Анализ данных методами геномики и биоинформатики**

**Аннотация.** Рассматриваются вопросы биоинформационного анализа данных.

Выравнивание последовательностей, программа BLAST, построение филогении, рестрикционной карты, создание контигов после секвенирования

**Ключевые слова.** BLAST, Clustal, выравнивание, филогения, бутстреп поддержка

### **Методические рекомендации по изучению темы**

1. Тема содержит лекционную часть в виде презентации и текстовых пояснений, где даются общие представления по теме;
2. В ходе выполнения лабораторной работы обучающиеся приобретают навыки работы данными методами, интерпретации полученных результатов;
3. В качестве самостоятельной работы и проверки усвоения темы предлагается изучение интернет ресурсов.

### **Рекомендуемые информационные ресурсы:**

<http://www.expasy.org/>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

### **Глоссарий**

**Бутстреп-анализ (bootstrap analysis)** — один из методов нумерической филогении, предусматривающий многократное случайное перераспределение исследуемых данных (random resampling): в результате их анализа получается некоторое количество сгенерированных деревьев, на основе которых строится дерево согласованное с количественной оценкой (бутстреп-поддержкой) надёжности каждой выделенной группы.

**Вес (weight)** — филогенетическая значимость признака или сходства единичного.

**Выравнивание последовательности (sequence alignment)** — установление гомологии позиционной между сайтами двух или более нуклеотидных последовательностей.

**Гомология (homology)** — общее понятие, обозначающее соответствие структур вследствие их единства по происхождению или по принадлежности к одному архетипу.

**Группа филогенетическая (phylogenetic group)** — Г., соответствующая определённому фрагменту филогенеза (дерева филогенетического); обычно трактуется как Г. монофилетическая.

**Дерево филогенетическое (phylogenetic tree)** — форма представления филогенеза и структуры отношений филогенетических.



### **Вопросы для изучения:**

1. Пакет программ BLAST
2. Программа выравнивания двух последовательностей - Align two sequences (bl2seq).
3. Поиск открытой рамки считывания (ORF).
4. Идентификация организма на основании анализа первичной нуклеотидной последовательности
5. Построение филогенетического дерева

### **Пакет программ BLAST**

Пакет программ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) предназначен для работы с нуклеотидными и аминокислотными последовательностями, их сравнения и выравнивания. Под выравниванием понимают следующее представление двух гомологичных последовательностей. Одна располагается под другой таким образом, чтобы как можно больше одинаковых нуклеотидных или аминокислотных остатков, имеющих одинаковую координату, находились строго друг под другом. Совпадающие остатки соединены между собой вертикальными штрихами. Координата нуклеотидного остатка – это его порядковый номер от начала цепи. Отношение количества совпавших нуклеотидов к несовпавшим составляет процент гомологии. Например, 73% гомологии – это когда из 100 остатков в двух последовательностях 73 остатка оказываются одинаковыми.

Очень часто наблюдается такая ситуация, когда в одном из гомологичных генов произошла мутация со сдвигом рамки считывания (Frame Shift Mutation), то есть добавился или выпал один или несколько нуклеотидов. При этом одна цепь сдвинется, и гомология изменится, как правило в сторону уменьшения. Чтобы исключить эту ошибку, программа может внести пробел в одну из последовательностей.

### **Программа выравнивания двух последовательностей - Align two sequences (bl2seq).**

Данная программа предназначена для сравнения и выравнивания двух последовательностей, как нуклеотидных, так аминокислотных. Выбор типа последовательности осуществляется в меню Program в левом верхнем углу. Blastn предназначена для выравнивания генов, blastp – для работы с белками.

### **Поиск открытой рамки считывания (ORF).**

Анализ ДНК как правило начинают с поиска открытой рамки считывания. Открытая рамка считывания (ORF – open reading frame) – это определенная последовательность ДНК, потенциально способная кодировать индивидуальную белковую молекулу.

Поиск ORF можно проводить с использованием как молекулярно-биологического софта (например, применяя программы CLONE или VECTOR NTI), так и нескольких on-line программ. Одной из них является программа ORF FINDER, расположенная на сервере NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf>.

### **Идентификация организма на основании анализа первичной нуклеотидной последовательности**

Идентификацию организмов на основании анализа первичной нуклеотидной последовательности обычно проводят в базе данных GenBank/EMBL/DDBJ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) с помощью множественного выравнивания в программе BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

BLAST (англ. *Basic Local Alignment Search Tool*) – алгоритм, позволяющий проводить сравнение первичных нуклеотидных и белковых последовательностей. Компьютерные программы на основе алгоритма BLAST позволяют проводить поиск гомологов белков или нуклеиновых кислот, для которых известна первичная структура (последовательность) или её фрагмент, в соответствующих базах данных (Altschul et al., 1990).

Существует 3 основных подхода для анализа биологических последовательностей:

*Анализ нуклеотидных последовательностей.* Набор алгоритмов, позволяющих работать с последовательностями нуклеотидов ДНК или РНК. Blastn («Nucleotide BLAST») позволяет сравнивать нуклеотидные последовательности с различными базами данных и осуществлять поиск гомологичных последовательностей. Анализ с помощью blastn занимает больше времени по сравнению с другими алгоритмами, но позволяет проводить сравнение последовательностей с низкой гомологией. Megablast предназначен для быстрого сравнения близкородственных нуклеотидных последовательностей с идентичностью более 95%. Программа объединяет многочисленные нуклеотидные последовательности в единую последовательность и затем проводит поиск баз данных BLAST. Затем megablast проводит обработку полученных данных для сравнения индивидуальных последовательностей и статистической обработки. Программа discontinuous megablast позволяет игнорировать некоторые нуклеотиды в последовательности, допуская некоторые несоответствия, и предназначена для сравнения дивергировавших последовательностей, обладающих незначительным сходством, например, при межвидовом сравнении.

*Анализ белковых последовательностей.* Набор алгоритмов, позволяющих работать с аминокислотными последовательностями белков. Стандартный Blastp («Protein BLAST») позволяет проводить сравнение аминокислотных последовательностей с различными базами данных и осуществлять поиск

гомологичных последовательностей. Как и другие программы семейства Blast, Blastp находит локальные гомологичные участки. С помощью данного алгоритма можно идентифицировать аминокислотные последовательности и находить гомологи в базах данных белковых последовательностей. Алгоритм psi-blast («Position-Specific Iterated BLAST») является наиболее чувствительным алгоритмом анализа белковых последовательностей, что делает его полезным для нахождения дальних родственных белков или новых членов семейств белков – дивергировавших последовательностей, обладающих незначительным сходством. Данный алгоритм обычно применяют, когда стандартный алгоритм Blastp не находит гомологичных последовательностей или выдаёт ссылки на гипотетические белки («hypothetical protein») или формулировки схожести с определёнными последовательностями («similar to...»). Phi-blast («Pattern-Hit Initiated BLAST») предназначен для поиска белков, которые содержат заданный пользователем шаблон (паттерн), и одновременно содержат последовательности, гомологичные запросу пользователя, в непосредственной близости от заданного шаблона. Это двойное требование призвано сократить количество хитов в базах данных, которые содержат шаблон, но, скорее всего, не имеют истинной гомологии с анализируемой последовательностью. Алгоритм cdart («Protein homology by domain architecture») исследует структуру доменов белков. Он позволяет анализировать доменную структуру всех белков в базе данных theprotein nr и проводит поиск белков, содержащих схожие консервативные домены.

*Анализ транслированных последовательностей.* Специальные программы позволяют транслировать нуклеотидные последовательности в аминокислотные. Blastx («Translated query vs protein database») сначала проводит трансляцию нуклеотидных последовательностей в аминокислотные последовательности, а затем проводит поиск гомологичных последовательностей в базах данных белков. Blastx проводит трансляцию и анализ всех 6 рамок считывания нуклеотидной последовательности. Это позволяет эффективно проводить анализ неизвестных последовательностей, или последовательностей, содержащих ошибки секвенирования, которые могли бы привести к сдвигу рамок считывания или другим ошибкам трансляции. Таким образом, алгоритм часто используют для анализа de novo секвенированных нуклеотидных последовательностей и для анализа EST-последовательностей («Expressed Sequence Tags»). Этот алгоритм является более чувствительным по сравнению со стандартным нуклеотидным Blast поскольку сравнение выполняется на уровне белковых последовательностей. С другой стороны, алгоритм tblastn («Protein query vs translated database») наоборот позволяет проводить поиск белковых последовательностей в неаннотированных базах данных нуклеотидных последовательностей. Анализ также проводится во всех 6 рамках считывания и особенно полезен для поиска гомологичных белков в

базах данных EST и HTG (Draft Genome Records – черновые варианты геномов). И, наконец, алгоритм tblastx («Translated query vs translated database») полезен для идентификации новых генов в нуклеотидных последовательностях, потенциально содержащих неточности. Алгоритм транслирует нуклеотидные последовательности во всех 6 рамках считывания и проводит сравнение с результатами трансляции по 6 рамкам считывания баз данных нуклеотидных последовательностей.

Для определения степени и значимости сходства изучаемой последовательности с последовательностями из базы данных BLAST вычисляет такие показатели как **Max ident** (максимальная идентичность), **Query coverage** (область перекрытия запроса) и **величину E** (expected value, E-value) для каждой пары последовательностей. Величина E (E-value) показывает достоверность данного выравнивания (чем ниже значение E, тем достовернее выравнивание).

#### **Построение филогенетического древа**

Для построения филогенетического древа необходимо сначала составить выборку анализируемых последовательностей и провести их множественное выравнивание. Далее с помощью специальных программ строится древо, и результаты представляются в виде графической информации.

Для построения филогенетического древа составляется выборка нуклеотидных последовательностей в формате FASTA.

При выборе последовательностей из базы данных необходимо:

- 1) придерживаться небольшой выборки (< 50 последовательностей)
- 2) избегать фрагментов, ксенологов, рекомбинантных последовательностей, тандемных повторов (многократно повторяющихся последовательностей).