

БИОИНЖЕНЕРИЯ

№ 7



20 лет назад потерял руку. Врач посоветовал биоинженерию. Рука выросла за 3 года. Чтобы проверить, действительно ли ДНК помогла или я такой регенерирующий, я похитил трёх жителей нашего города, отрубил одному руку, второму - ногу, а третьему - голову. И начал кормить их ДНК. С третьим возникли проблемы, потому что орального отверстия не было.

Сергей Л., Малые Вяземы.

ПЫТЛИВЫЙ УМ – ДЛЯ БИОИНЖЕНЕРА ПЕРВОЕ ДЕЛО!

Секвенирование

Сегодня, ребята, у нас будет переходная лекция! Мы переходим из одной биоинженерной эпохи в другую.

Первая биоинженерная эпоха: работа с генами

Что научились делать биоинженеры за время первой эпохи?

- «вынимать» ДНК из клетки – **выделение и очистка нуклеиновых кислот**,
- видеть ДНК глазами – **электрофорез**,
- «вынимать» нужные участки из ДНК - **рестрикция**,
- соединять несколько участков ДНК в один - **лигирование, клонирование**,
- «засовывать» ДНК в клетку - **трансформация**,
- многократно увеличивать количество нужного участка ДНК - **ПЦР**,
- определять нуклеотидную последовательность нужного участка ДНК – **секвенирование**.

Вторая биоинженерная эпоха: работа с геномами

(продолжается по настоящее время)

Что к сегодняшнему дню научились делать биоинженеры за время второй эпохи?

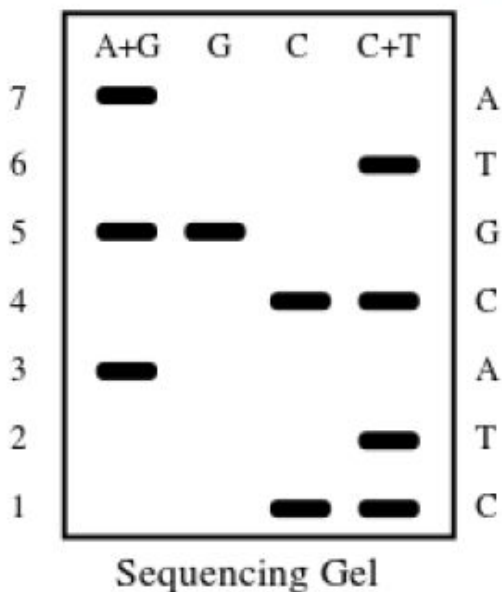
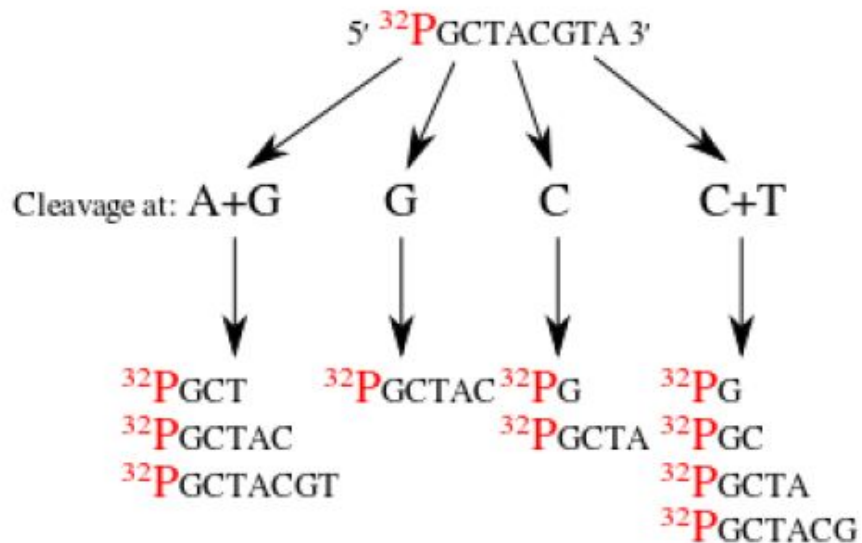
- определять нуклеотидную последовательность целых геномов – **высокопроизводительное секвенирование**,
- вносить изменения в гены прямо в живой клетке, на уровне целого генома – **редактирование генома**.

Мало, скажете вы? Да ничего подобного, это просто-таки революция в науке. На следующих лекциях поймете, почему.

Ну а пока останемся на время в первой эпохе и поговорим о секвенировании генов, а не геномов.

Секвенирование по Максому-Гилберту

Первый метод определения последовательности нуклеотидов ДНК, 1970-е годы



Под действием различных химических агентов ДНК можно расщепить по G, A/G, C и C/T.

Образец нужно разделить на 4 части и подвергнуть каждую из частей действию только одного агента.

Концентрации химических агентов подбираются так, чтобы каждая реакция приводила только к одному разрыву цепочки ДНК.

ДНК должна быть мечена по одному концу.

Продукты реакции наносятся на ПААГ, гель подвергается автордиографии.

Как пометить радиоактивностью двуцепочечную ДНК?

Выступающий 5'-конец – можно пометить ДНК-полимеразой, добавив меченные нуклеотиды (матричный синтез).

Выступающий 3'-конец – можно пометить терминальной трансферазой, опять же в присутствии меченных нуклеотидов (нематричный синтез).

Тупые концы – тоже годится терминальная трансфераза.

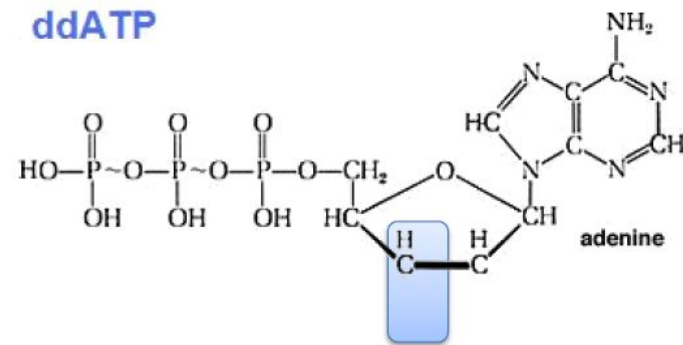
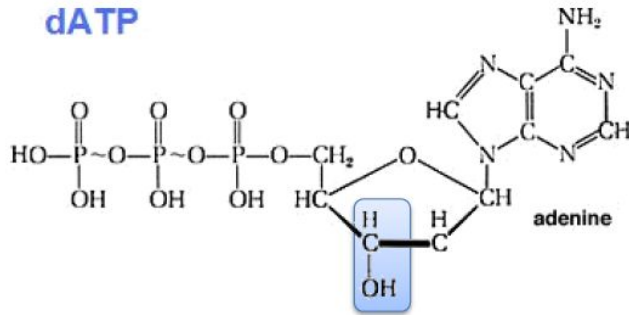
Проблему мечения обоих концов ДНК обычно решали рестрикцией:



Метод Сэнгера

Появился в конце 1970-х годов и мгновенно вытеснил метод Максама-Гилберта.

Основа данного метода – дидезоксинуклеотиды.

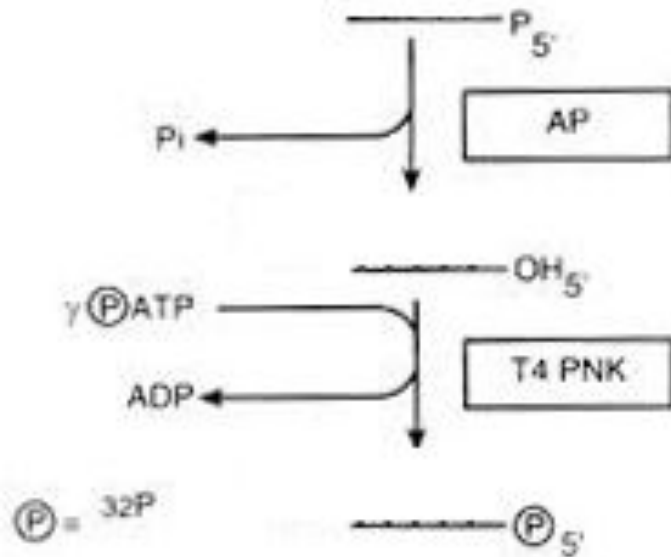


Если дидезоксинуклеотидтрифосфат (ddNTP) включился в цепочку ДНК в ходе матричного синтеза, этот самый синтез на нем и закончится – у ddNTP нет 3'-концевой гидроксильной группы, необходимой для формирования фосфодиэфирной связи в ходе полимеризации ДНК.

Если организовать достройку второй цепи ДНК с меченого праймера в присутствии полного набора dNTPs и одного ddNTP с правильно подобранной концентрацией, вы получите набор меченных фрагментов ДНК, заканчивающихся на все имевшиеся в матричной цепи нуклеотиды, комплементарные данному ddNTP.

Пометить олигонуклеотид – ваще не вопрос, пацаны!

1. Обработайте олигонуклеотид щелочной фосфатазой (AP). Она откусит пирофосфат у 5'-концевого нуклеотида.



2. Обработайте дефосфорилированный олигонуклеотид T4-полинуклеотидкиназой (T4 PNK) в присутствии меченного по гамма-положению дАТФ. Меченный фосфат перейдет на 5'-конец олигонуклеотида.

3. Очистите олигонуклеотид от низкомолекулярных соединений, содержащих метку (продукты деградации, сам дАТФ).

4. ...

5. PROFIT!!!

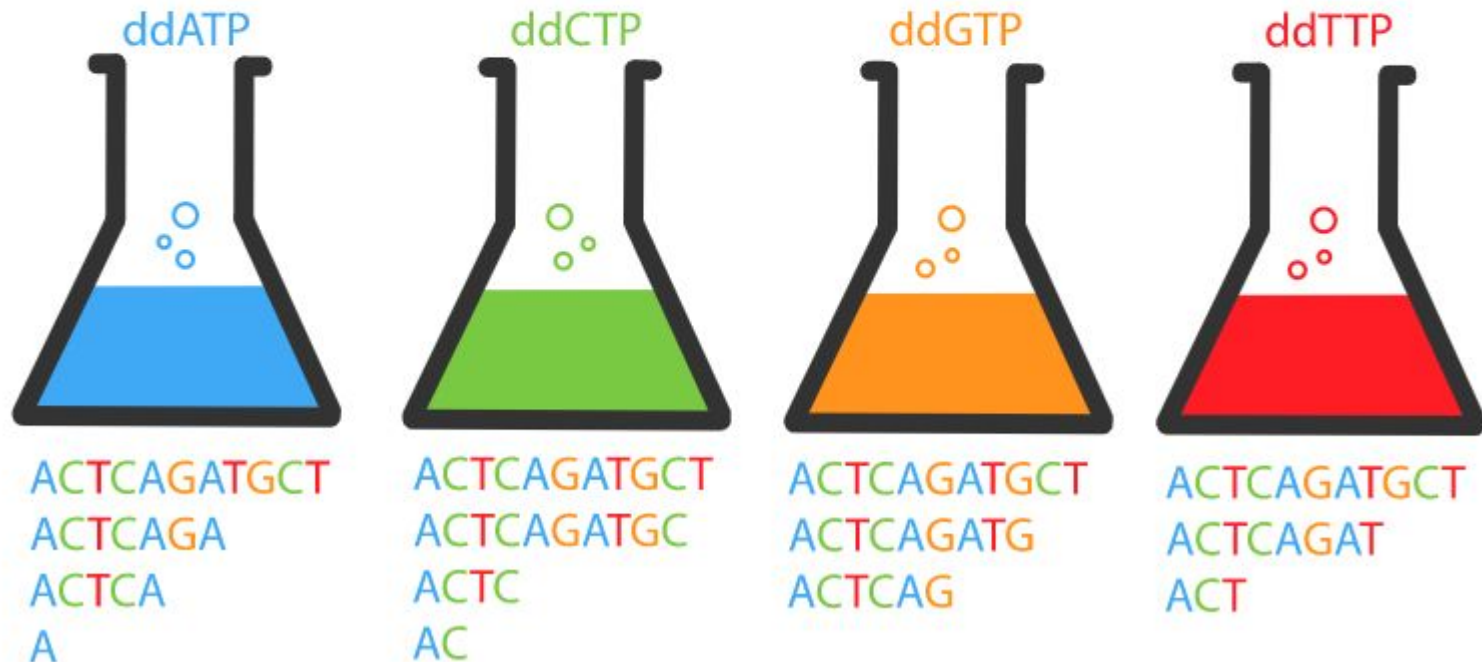
Метод Сэнгера

dATP + dCTP + dGTP + dTTP

DNA Polymerase

Template DNA

Primer меченный!!!



Проведите 4 независимых реакции удлинения праймера с каждым из ddNTP, нанесите результат на ПААГ, радиоавтографируйте гель и...

Сравнение методов секвенирования по Максаму-Гилберту и по Сэнгеру

Параметр	Простота внесения метки	Простота метода в целом	Дешевизна	Возможность секвенса совершенно неизвестных молекул	Возможность секвенса сложных вторичных структур ДНК	Возможность автоматизации
Максам-Гилберт	Нет	Нет	Не очень	Да	Да	Практически нет
Сэнгер	Да	Да	Да	Нет	Не очень	Легко!

Неудивительно, что метод Максама-Гилберта был очень быстро вытеснен методом Сэнгера. Максам-Гилберт остался только лишь для тех случаев, когда ДНК-полимераза, используемая в процессе по Сэнгеру, не могла пройти сложные вторичные структуры ДНК (псевдоузлы и т.п.).

А теперь прошу обратить внимание на столбец «возможность автоматизации».

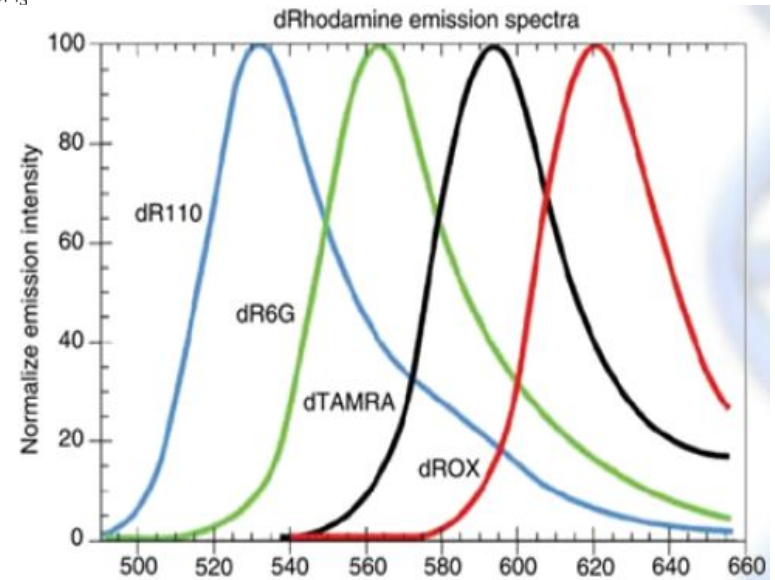
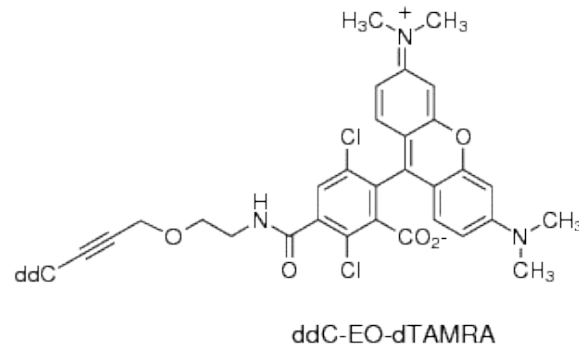
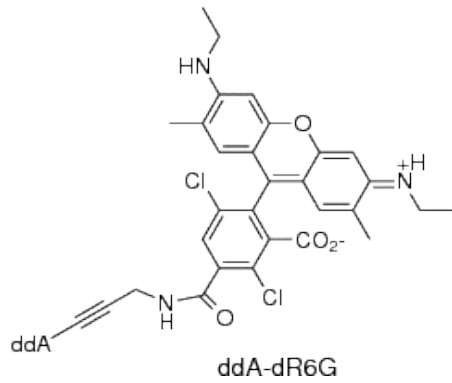
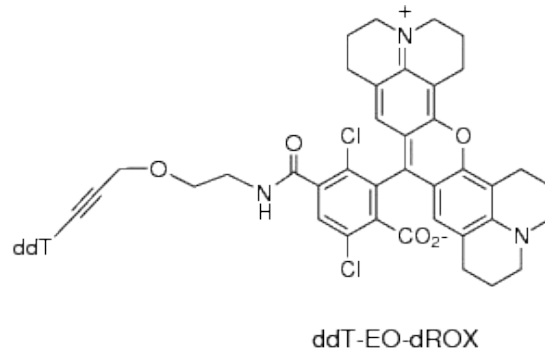
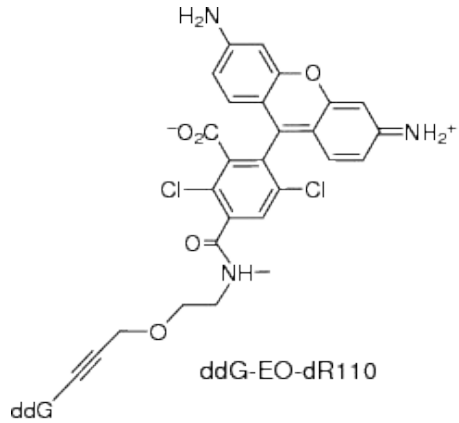
Автоматические секвенаторы, использующие метод Сэнгера



-Четыре разных флюоресцентных красителя => одна реакция в одной пробирке

-Капиллярный электрофорез => более 1000 нуклеотидов за одно прочтение

Набор флюоресцентных красителей BigDye для мечения ddNTPs



Автоматический секвенатор дает на выходе набор пиков и сам же пишет соответствующую нуклеотидную последовательность.
Очень удобно!



Секвенирование по Сэнгеру применяется до сих пор для решения всех задач, не связанных с анализами геномного уровня.

И мы наконец переходим во вторую биоинженерную эпоху!

Высокопроизводительное секвенирование (секвенирование следующего поколения, Next Generation Sequencing, NGS)

Общее название нескольких методов секвенирования, объединенных следующими свойствами (в сравнении с методом Сэнгера):

- Упрощение приборной базы (для конечного пользователя, если говорить о принципах работы – то, безусловно, усложнение)
- Удешевление процесса,
- Увеличение эффективности чтения ДНК (возможность читать более длинные фрагменты или же читать ДНК быстрее),
- Более высокая степень автоматизации процесса.

Пиросеквенирование (Sequencing By Synthesis)

Метод основан на детекции пирофосфата, высвобождающегося при присоединении каждого нового нуклеотида к растущей цепи ДНК в ходе ПЦР.

Длина одного рида: до 500 нуклеотидов, в современных приборах чаще до 100.

Используется, в основном, для ресеквенирования, то есть для повторного секвенирования геномов, прочтенных другими методами. Помимо этого, применяется для генотипирования и для определения статуса метилирования ДНК.

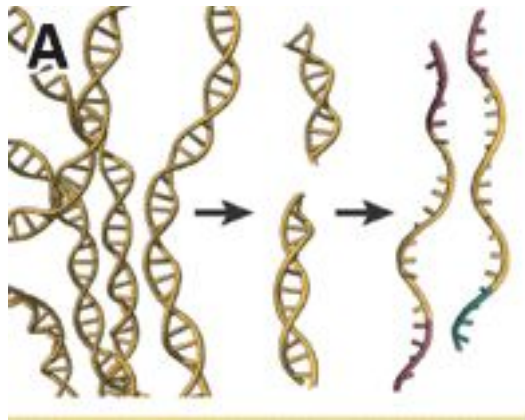
Являлось первой по времени технологией NGS, первоначально использовалось и для первичного секвенирования. По сравнению с методом Сэнгера (поскольку тогда сравнивать больше было не с чем) метод был фееричен.

Основное достоинство: высокая точность.

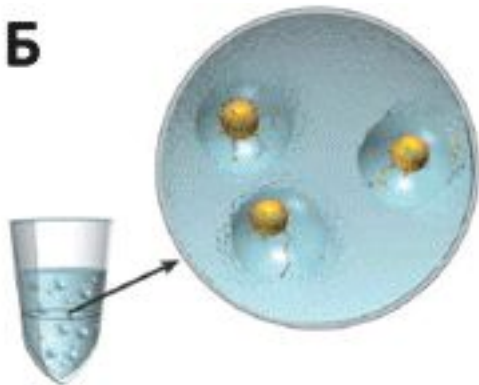
Основной недостаток: высокая длительность анализа по сравнению с другими технологиями NGS.

Первый прибор: компания 454 Life Sciences, 2005 год.

Пиросеквенирование



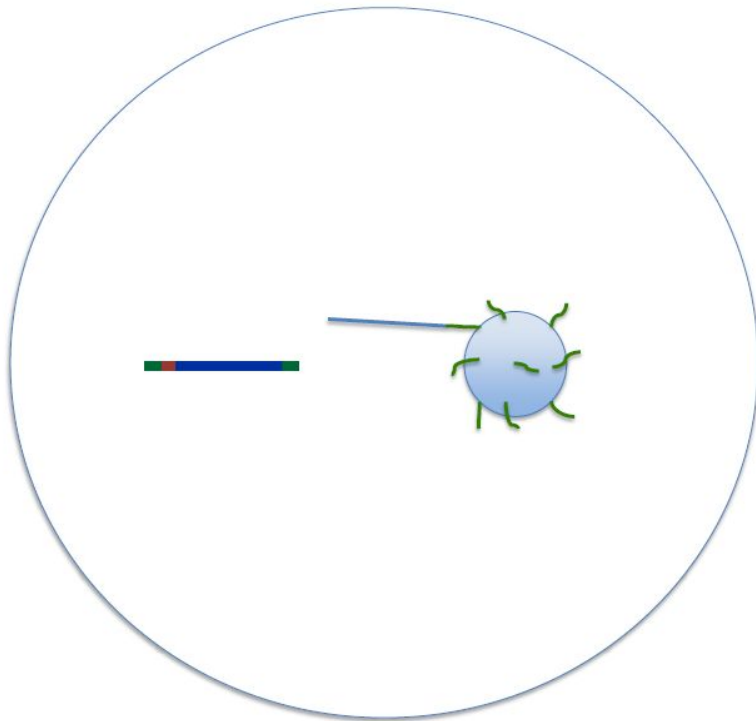
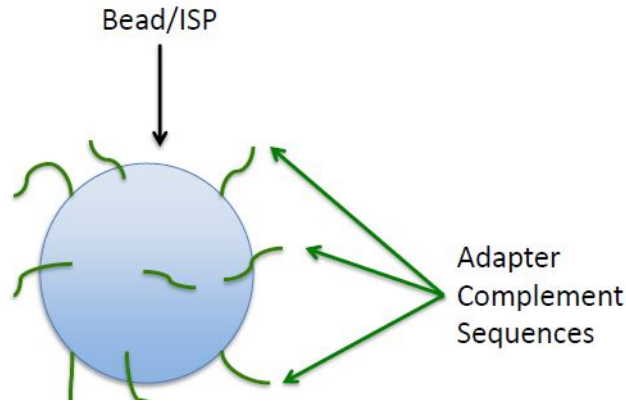
ДНК фрагментируется, к фрагментам пришиваются олигонуклеотиды-«адаптеры»; полученные двуцепочечные молекулы ДНК разделяются на две комплементарные цепи.



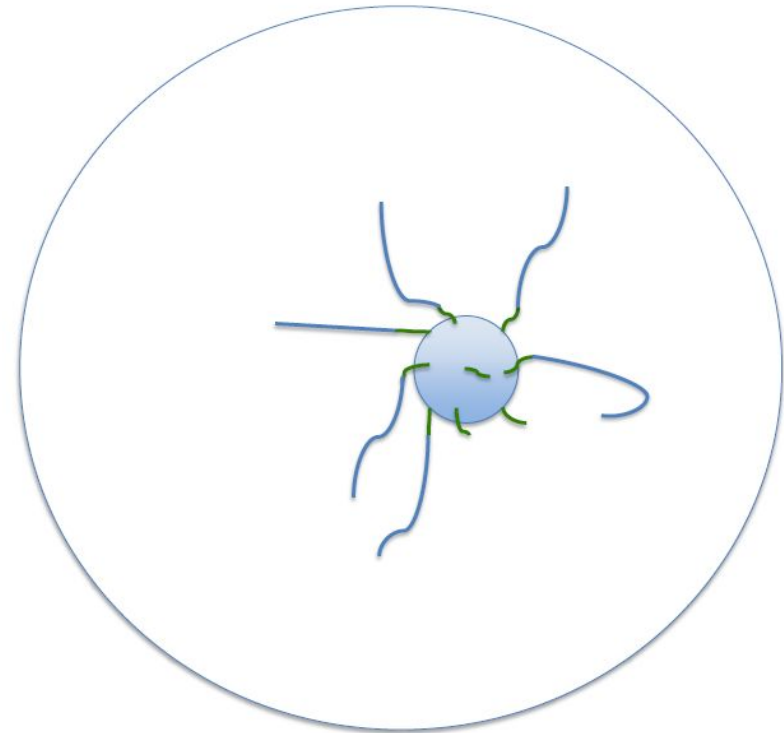
Одноцепочечные молекулы ДНК прикрепляются к бусинкам в условиях, стимулирующих попадание лишь одной молекулы на бусинку. Отдельные бусинки заключаются в капли реакционной смеси, окруженные маслом. Количество молекул на бусинке увеличивается в миллионы раз в результате эмульсионной полимеразной цепной реакции (эПЦР).

Пиросеквенирование. Схема эПЦР.

Бусинка покрыта адаптерными олигонуклеотидами.

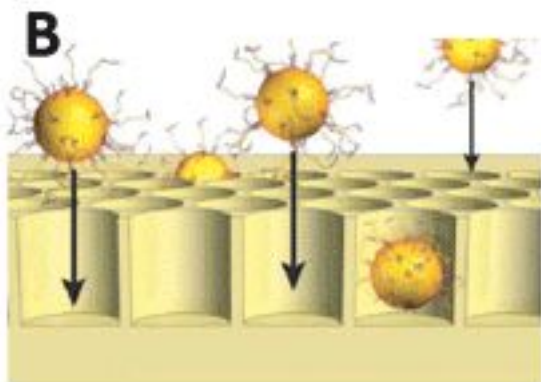


В каплю попадает один фрагмент ДНК...

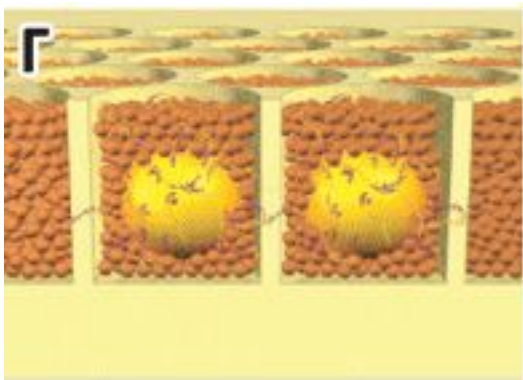


и амплифицируется!

Пиросеквенирование

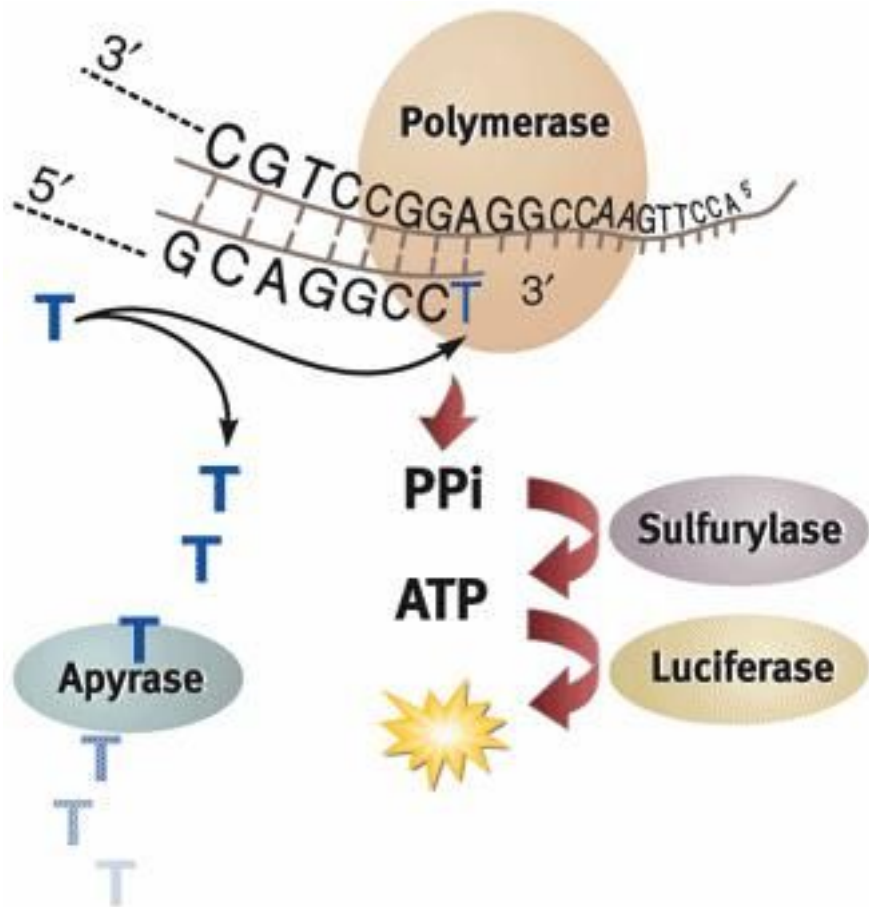


Эмульсия разбивается, и цепи ДНК-фрагментов, образовавшиеся в результате эПЦР, разделяются. Бусинки, несущие на своей поверхности миллионы одноцепочечных копий первоначального фрагмента ДНК, помещаются в лунки опико-волоконного слайда, по одной в каждую лунку.



В каждую лунку добавляются бусинки поменьше, несущие на своей поверхности ферменты и другие молекулы, необходимые для пиросеквенирования.

Пиросеквенирование



ДНК-полимераза катализирует добавление dNTP к праймеру для секвенирования, если он комплементарен к последовательности матрицы ДНК. Каждое присоединение к цепи сопровождается выделением пирофосфата (PPi) в количестве, эквивалентном количеству встроившихся нуклеотидов.

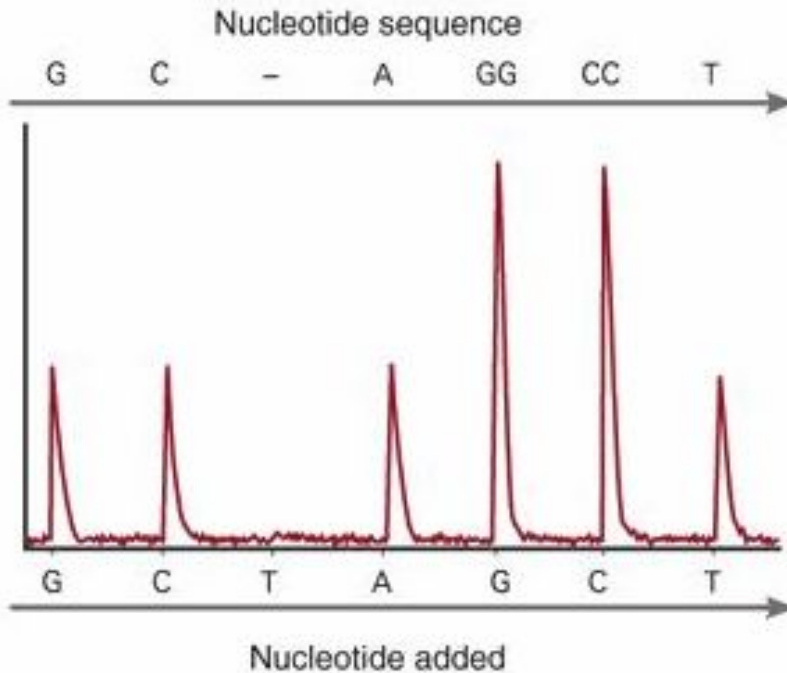
АТФ-сульфурилаза превращает пирофосфат в АТФ в присутствии аденозин-5'-фосфосульфата.

Люцифераза запускает АТФ-опосредованную реакцию окисления люциферина в оксильюциферин, в результате чего происходит образование видимого света в количестве, пропорциональном количеству АТФ.

В течение всей реакции **апираза** деградирует невстроившиеся нуклеотиды и избыток АТФ. После завершения деградации нуклеотидов, невстроившихся в цепь ДНК, добавляется новый нуклеотид.

Добавление нуклеотидов осуществляется последовательно.

Результат пиросеквенирования



Отсутствие пика – что-то пошло не так.

Пик в два раза выше обычного – два одинаковых нуклеотида подряд.

Отсюда вытекает еще один существенный недостаток данной технологии: неспособность определять последовательности, состоящие из много раз повторенных одинаковых нуклеотидов (гомоолигомерные участки ДНК). Таких участков в геномах полно.

Ионное полупроводниковое секвенирование (ion semiconductor sequencing)

В целом, этот метод тоже можно назвать Sequencing by Synthesis. Его принцип очень похож на принцип пиросеквенирования, только детектируется не свет, а протоны, то есть изменение pH.

Длина одного рида: до 400 нуклеотидов, в современных приборах чаще до 200.

Используется для всех возможных задач NGS, но только если геном не очень большой. На большие геномы метода не хватает.

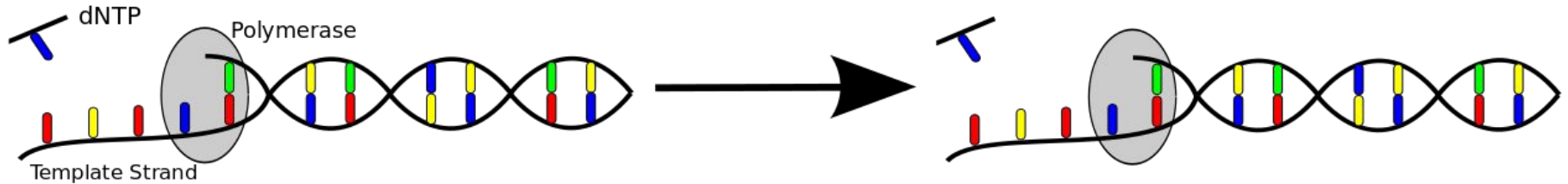
Основное достоинство: относительно низкая цена, быстрота.

Основной недостаток: невысокая точность прочтения гомополимерных участков, невысокая производительность.

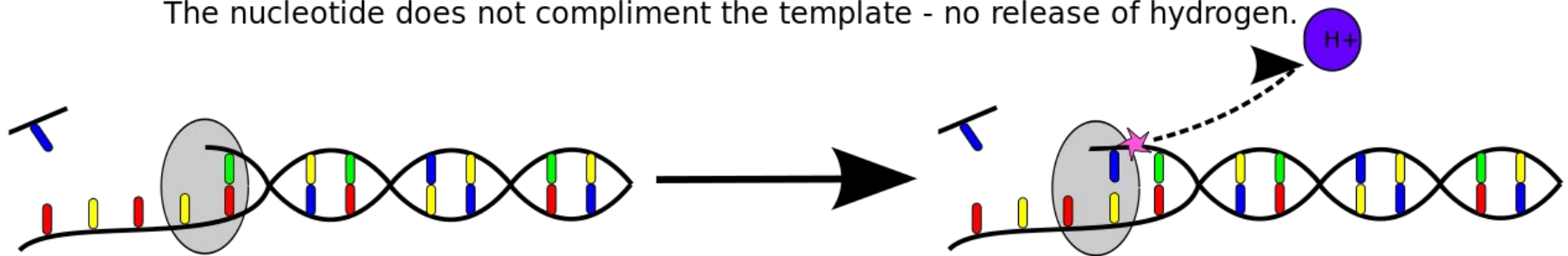
Первый прибор: компания Ion Torrent Systems, 2010 год.

Ионное полупроводниковое секвенирование

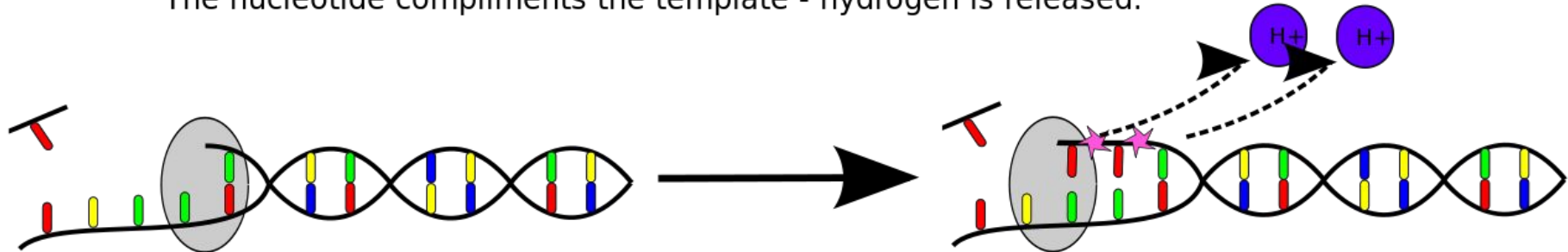
В ячейку на каждом этапе синтеза добавляются разные dNTP по очереди. Когда какой-то нуклеотид присоединился – выделяется протон, который тут же регистрируется сверхчувствительным детектором.



The nucleotide does not compliment the template - no release of hydrogen.



The nucleotide compliments the template - hydrogen is released.



The nucleotide compliments several bases in a row - multiple hydrogen ions are released.

Циклическое лигазное секвенирование (Sequencing By Ligation)

Метод основан на детекции флюорофора при лигировании олигонуклеотида к секвенируемой цепи ДНК.

Длина одного рида: до 75 нуклеотидов.

Широко использовался для всех задач, связанных с секвенированием. В настоящее время (с 2016 года) поддержка технологии основными игроками на рынке прекращена, то есть технология не выдержала конкуренции.

Основное достоинство: высокая точность.

Основной недостаток: слишком короткие риды.

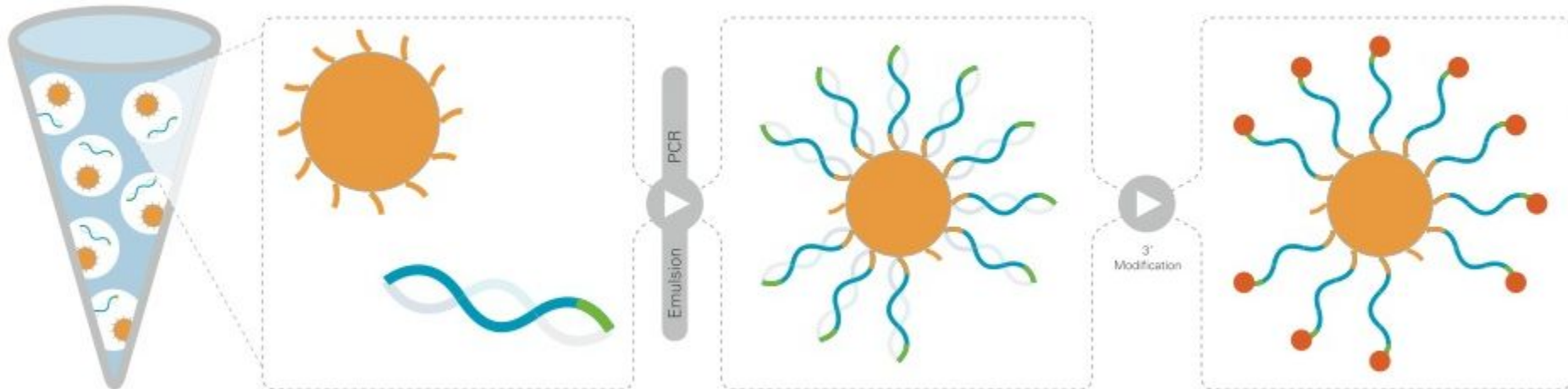
Первый прибор: SOLiD от компании Applied Biosystems, 2006 год.

Циклическое лигазное секвенирование

Первые этапы технологии аналогичны таковым для пиросеквенирования:

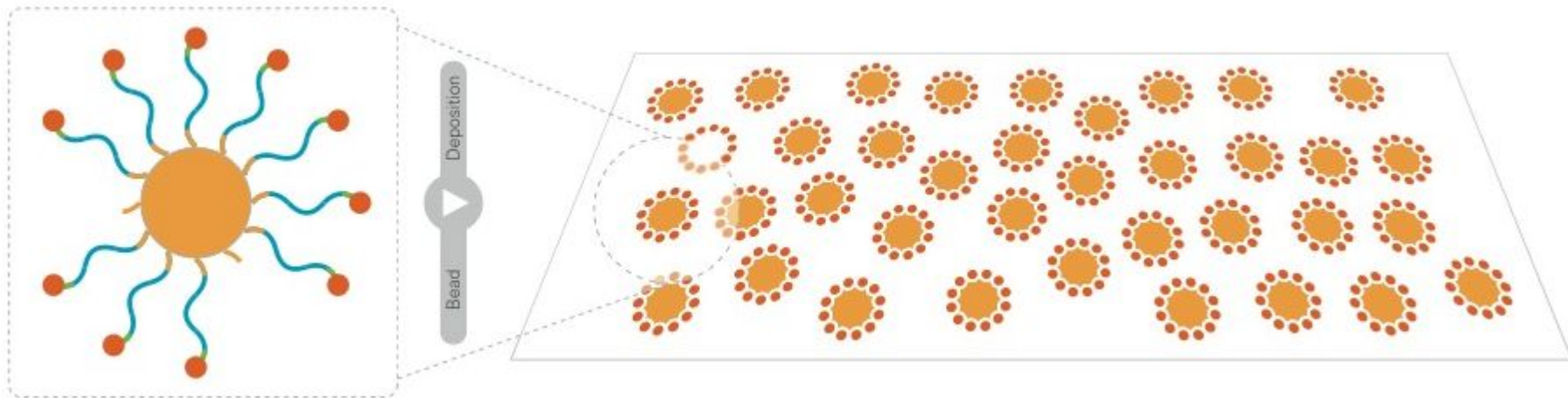
1. Фрагментация ДНК
2. Пришивание адаптеров
3. Распределение фрагментов ДНК по магнитным бусинам
4. Эмульсионная ПЦР

По окончании эПЦР все 3'-концы амплифицированных фрагментов ДНК специальным образом модифицируются...



Циклическое лигазное секвенирование

... и посредством этой модификации закрепляются в проточных ячейках.



В ячейки сначала добавляется обычный олигонуклеотид, комплементарный адаптеру, который использовался для эПЦР. После этого добавляется смесь хитрых олигонуклеотидов, меченных четырьмя разными флюорофорами, длиной 8 нуклеотидов каждый:

X-Y-n-n-n-Z-Z-Z-флюорофор

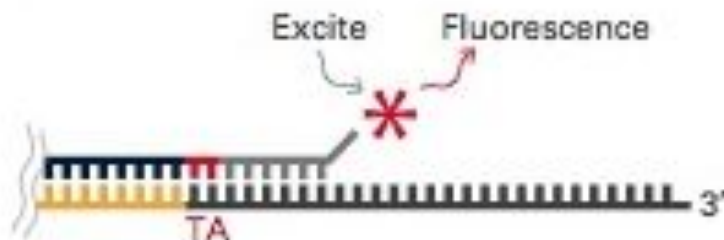
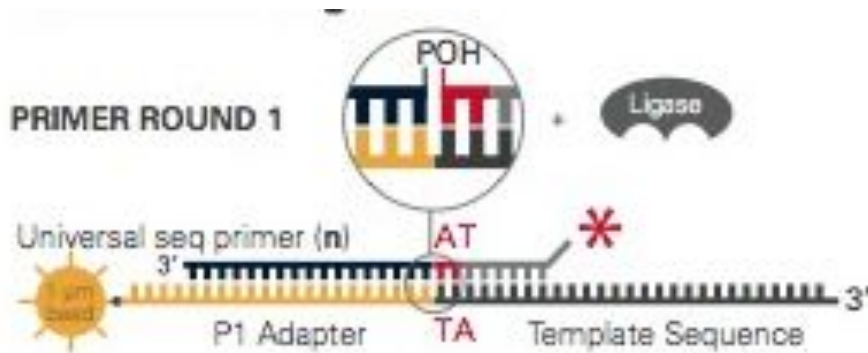
X, Y – два каких-то конкретных нуклеотида,

n – вырожденный нуклеотид (любой из четырех),

Z – некое производное нуклеотида, которое не может никуда отщепиться (что это такое именно – производители не раскрывают, скорее всего инозин).

Циклическое лигазное секвенирование

Х-У-п-п-п-Z-Z-Z-флюорофор



Универсальный олигонуклеотид отжигается на секвенируемую ДНК.

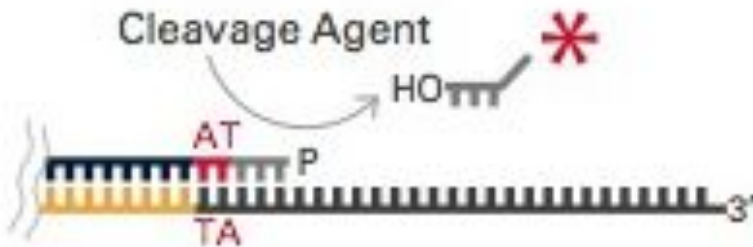
Среди хитрых нуклеотидов предпочтительно будут отжигаться те, которые максимально комплементарны секвенируемой ДНК, то есть те, у которых Х и У комплементарны двум нуклеотидам ДНК, следующим сразу после адаптера. Напоминаю: нуклеотиды п вырожденные, они в любом случае отождутся.

Добавьте ДНК-лигазу – и она сошьет связавшийся с ДНК хитрый олиг с универсальным.

Отмойте все, что не связалось и не лигировалось, и детектируйте флюоресценцию.

Циклическое лигазное секвенирование

Х-У-n-n-n-Z-Z-Z-флюорофор



Итак, Х-У-n-n-n у вас теперь лигированы к универсальному олигонуклеотиду и находятся в составе дуплекса с секвенируемой ДНК. Для Z-Z-Z второе неверно – они висят наружу, так как изначально не могли никуда отжечься.

Добавьте специальное «режущее вещество», и оно (1) отрежет Z-Z-Z вместе с флюорофором и (2) оставит 5'-концевой фосфат на части олигонуклеотида в составе дуплекса.

«Режущее вещество» производителями не раскрывается, скорее всего – соль серебра.

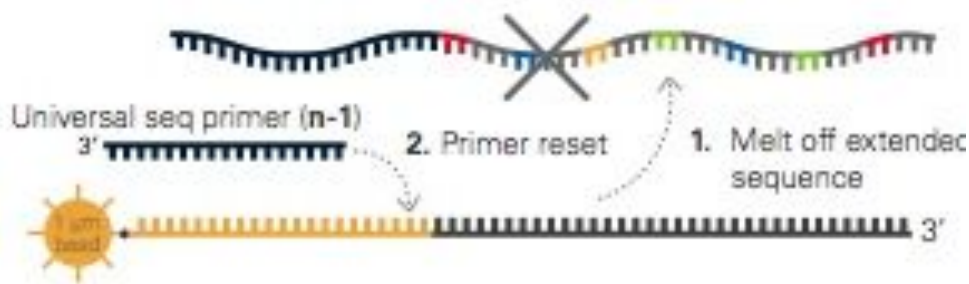
Ligation cycle 1 2 3 4 5 6 7 ... (n cycles)



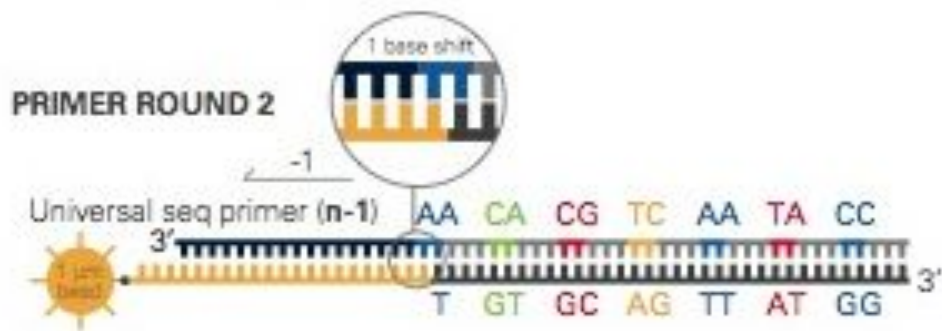
Повторите всю процедуру сначала!

В результате вы будете знать каждые два нуклеотида из пяти, то есть нуклеотиды в положениях 1, 2, 6, 7, 11, 12 и т.д.

Циклическое лигазное секвенирование

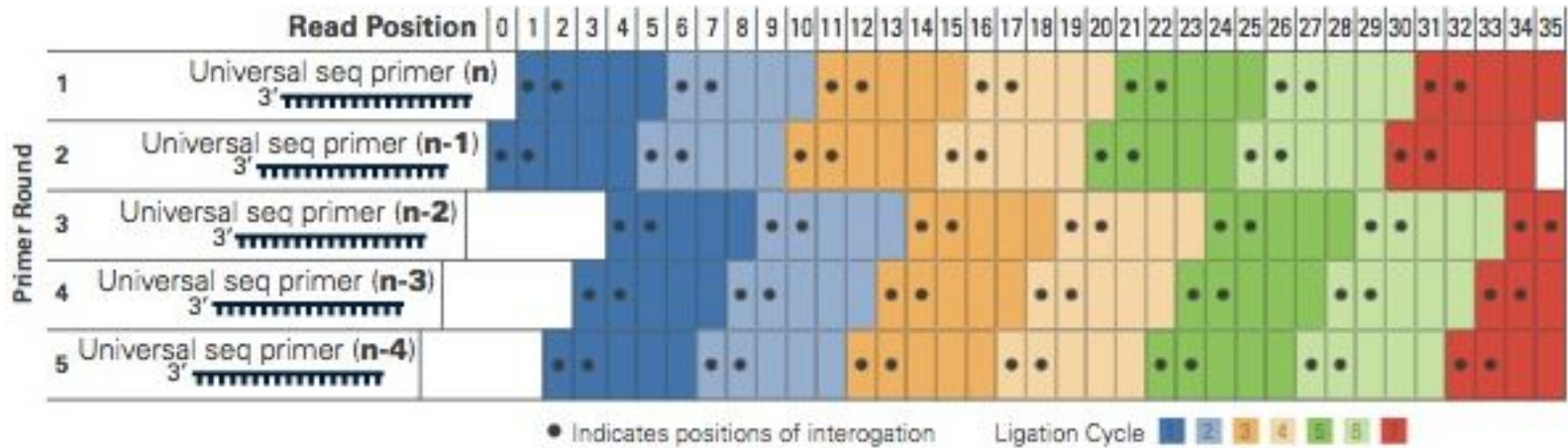


Когда вы дошли до конца секвенируемой молекулы, уберите с нее все, что там отождилось и лигировалось, а затем отождите на нее новый универсальный праймер. Если принять положение, на котором кончался предыдущий, за n , то новый должен кончатся на $n-1$, то есть быть на один нуклеотид ближе к 5'-концу секвенируемой молекулы.



Повторите все сначала – и у вас определятся уже другие пары нуклеотидов! Для предыдущего универсального олига на первом шаге определялись нуклеотиды $n+1$ и $n+2$, а для этого – n и $n+1$.

Циклическое лигазное секвенирование



В результате этой невероятно красивой по своей идее процедуры у вас за несколько циклов лигирования получается информация о каждом нуклеotide, причем ДВАЖДЫ!

Но только это еще не конец. Самых внимательных из вас могло смутить вот что:

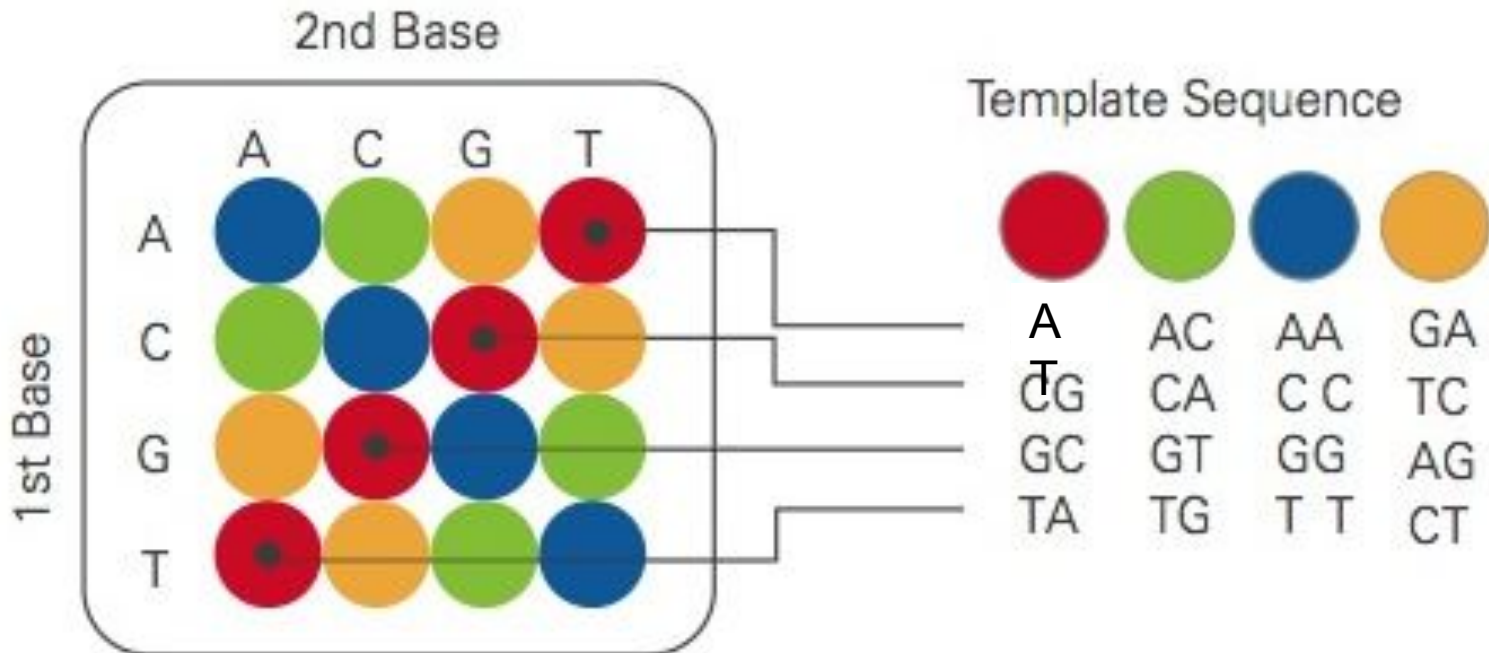
«... смесь хитрых олигонуклеотидов, меченных четырьмя разными флюорофорами, длиной 8 нуклеотидов каждый...»

Ну-ка, ребятки, кому кажется, что здесь что-то не так?

Циклическое лигазное секвенирование

Флюорофоров-то четыре! А разных динуклеотидов может быть 16! То есть выходит, что каждый флюорофор соответствует четырем динуклеотидам! Здесь же нет однозначного соответствия!

Какое тут вообще к свиням секвенирование?!



Циклическое лигазное секвенирование

Секвенирование очень даже хорошее!

Вы же знаете нуклеотид в положении $n-1$! Это же последний нуклеотид универсального олига! И при этом вы его отсеквенировали в составе пары $n-1/n$, и эта пара дала вам, допустим, зеленый цвет. И вы знаете, что $n-1$ – это **G**. Значит, n – это **T**! А пара $n/n+1$ дала вам желтый цвет. Значит, $n+1$ – это **A**!

И так далее.

