

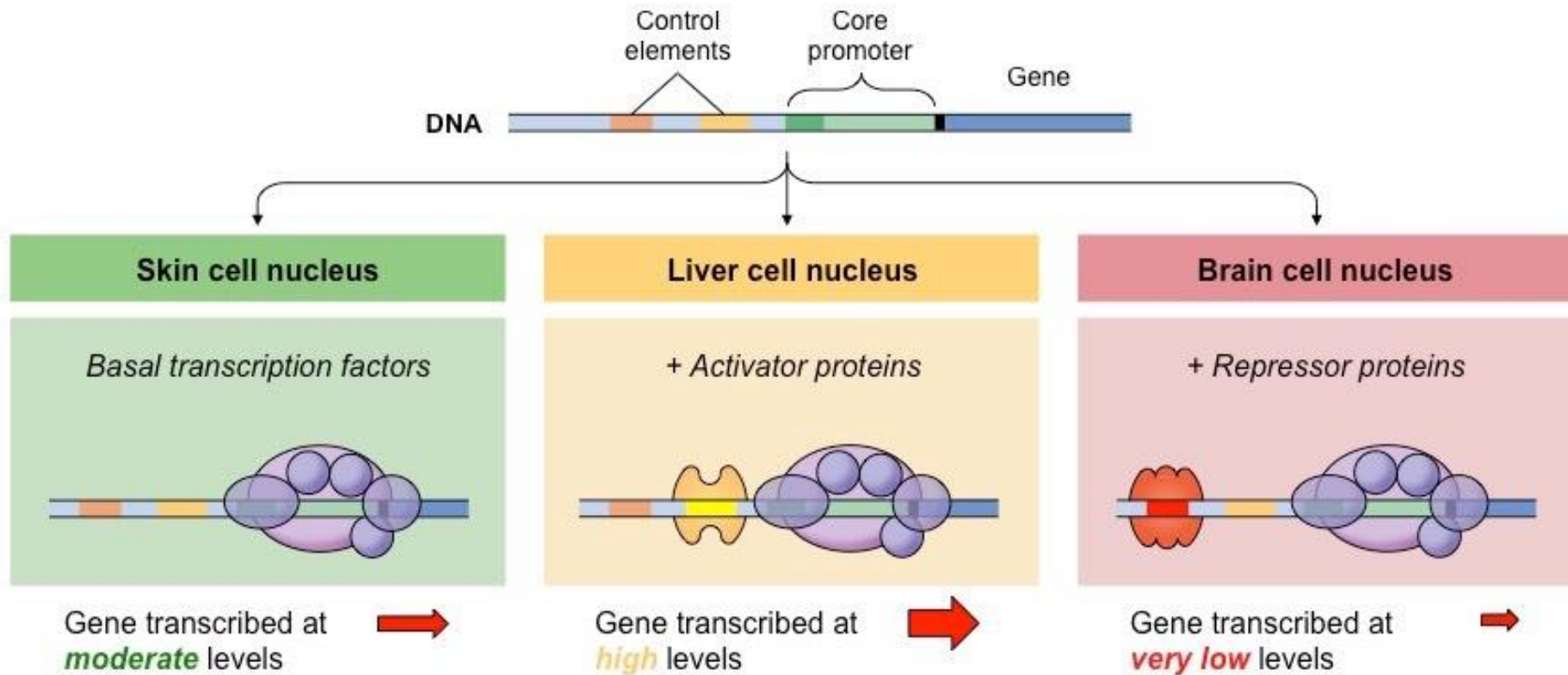
# БИОИНЖЕНЕРИЯ

№



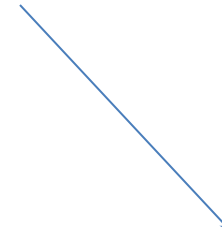
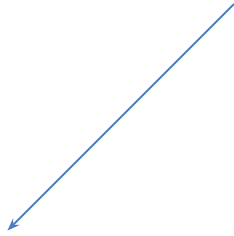
Неконтролируемое размножение генно-модифицированных деревьев – эпический провал биоинженеров.

# Методы анализа экспрессии генов (в том числе, дифференциальной)



Дифференциальная экспрессия генов – важнейший процесс для развития и нормального существования любого многоклеточного организма. Да и одноклеточного тоже – при помощи ДЭГ они приспосабливаются к меняющимся условиям среды.

# Как можно измерить экспрессию генов?



По количеству РНК

По количеству белка



**Какой подход вам нравится больше?**

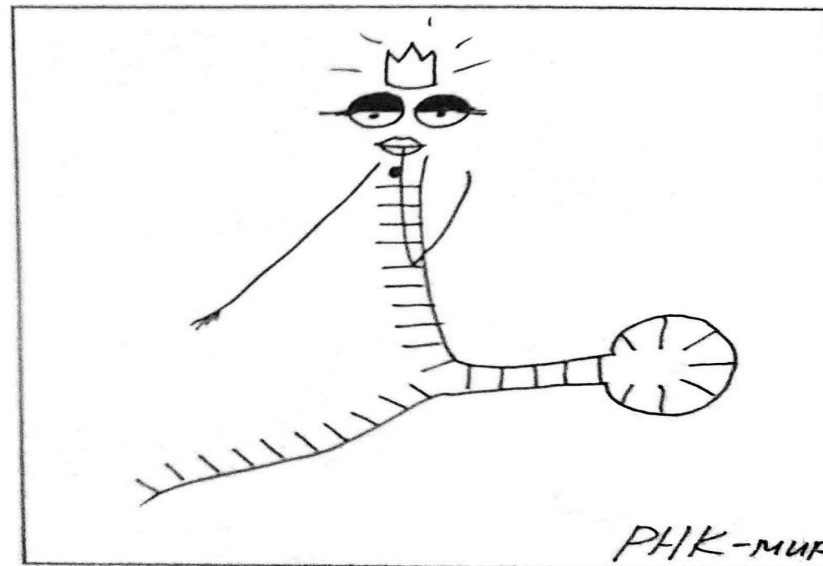
С одной стороны, по белку судить корректней – это же финальный продукт экспрессии генов.

Но возникает вопрос: как посчитать количество белка? Ответ на него очень простой: практически никак.

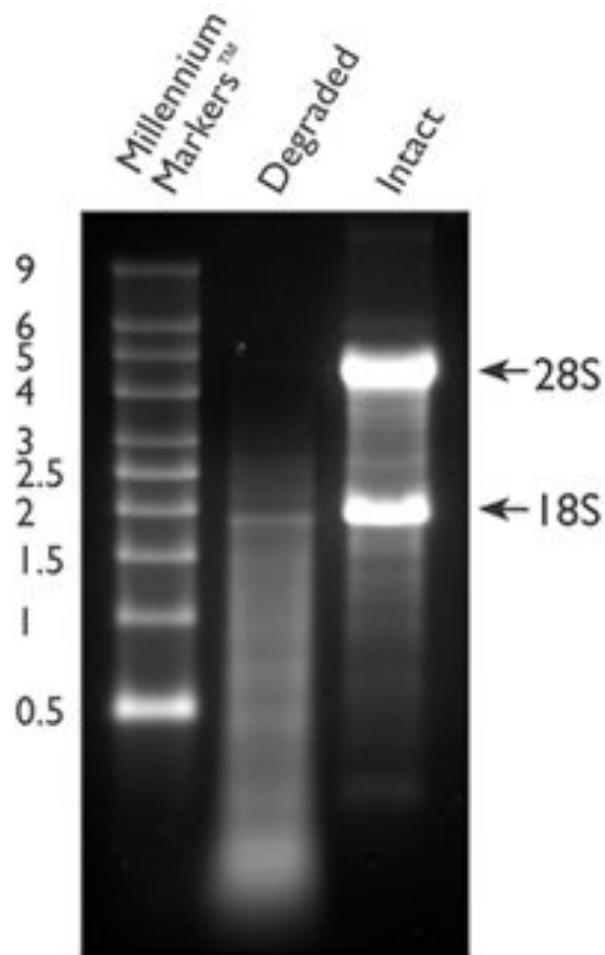
Есть метод Вестерн-блот гибридизации, основанный на использовании специфических антител, но этот метод не совсем количественный.

Есть винтажные способы точного подсчета количества белка, но они очень трудоемкие.

**Так что все считают по РНК.**



С РНК самой по себе дело иметь непросто: она не очень стабильная, и выделить ее из клетки в большом количестве нельзя.

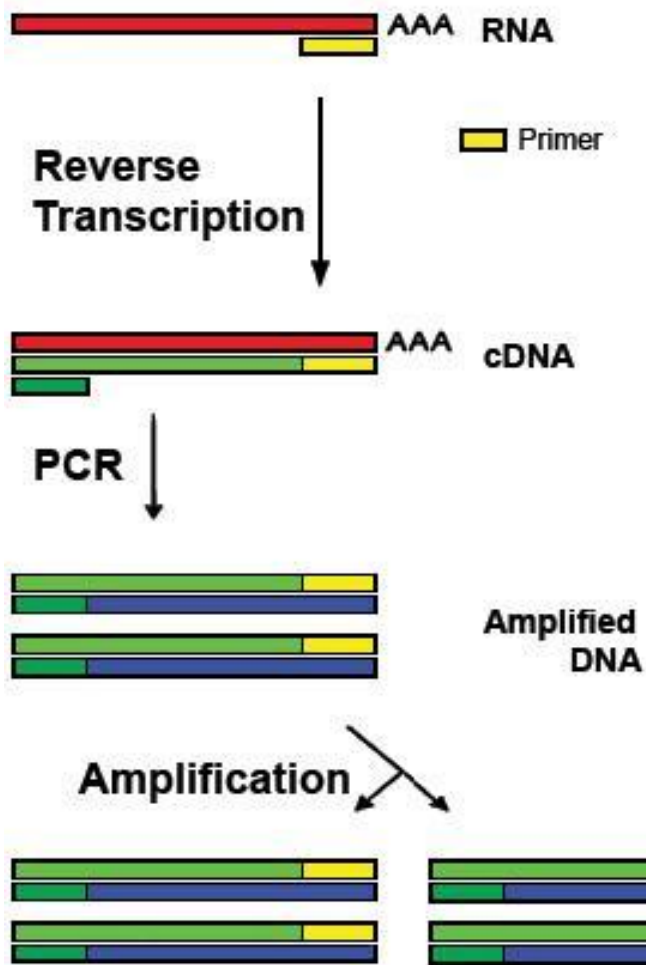


Вас же интересует в основном мРНК.  
А в клетке подавляющее большинство РНК – это рибосомные РНК.

Здесь на помощь биоинженерам приходит  
**обратная транскрипция!**

# ПЦР с обратной транскрипцией (RT-PCR)

Используется для получения кДНК (комплементарная ДНК, cDNA), то есть ДНК, являющейся точной копией зрелой мРНК. Часто это бывает необходимо, чтобы избежать проблем, связанных с процессингом РНК (сплайсинг и т.п.).



**ПОМНИШЬ ЭТУ СХЕМУ?!**



# ПРОБЛЕМЫ СИНТЕЗА СУММАРНОЙ кДНК

- Для выделения полиА+ фракции нужно значительное количество РНК (>100 мкг).
- Популяция кДНК обеднена 5'-последовательностями - обратная транскриптаза часто не доводит синтез до конца.
- На 5'-конце первой цепи кДНК нет последовательности, к которой можно было бы подобрать универсальный праймер для амплификации.

Так не годится, нужно что-то придумать!

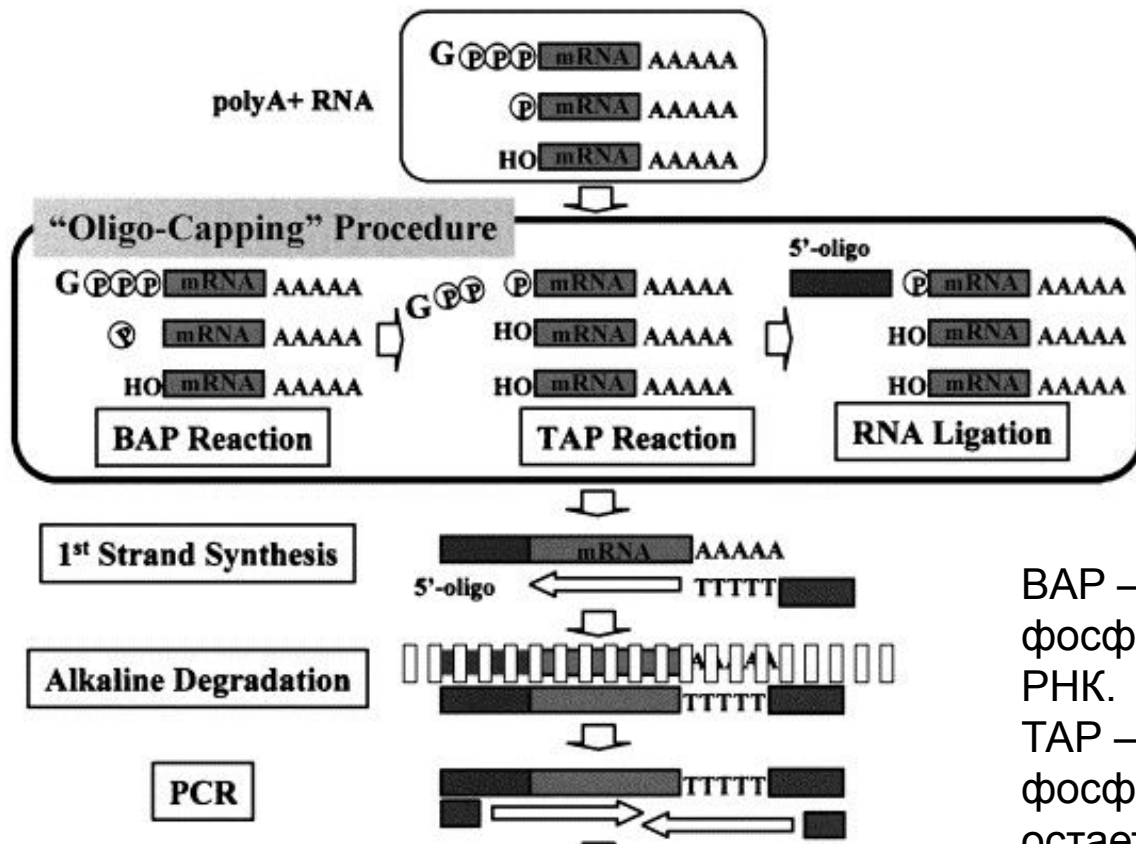






# Метод «oligo-capping» решает проблему 5'-концевых последовательностей кДНК

Изначально в смеси есть разные РНК, но только полноразмерные мРНК содержат кэп-структуру.

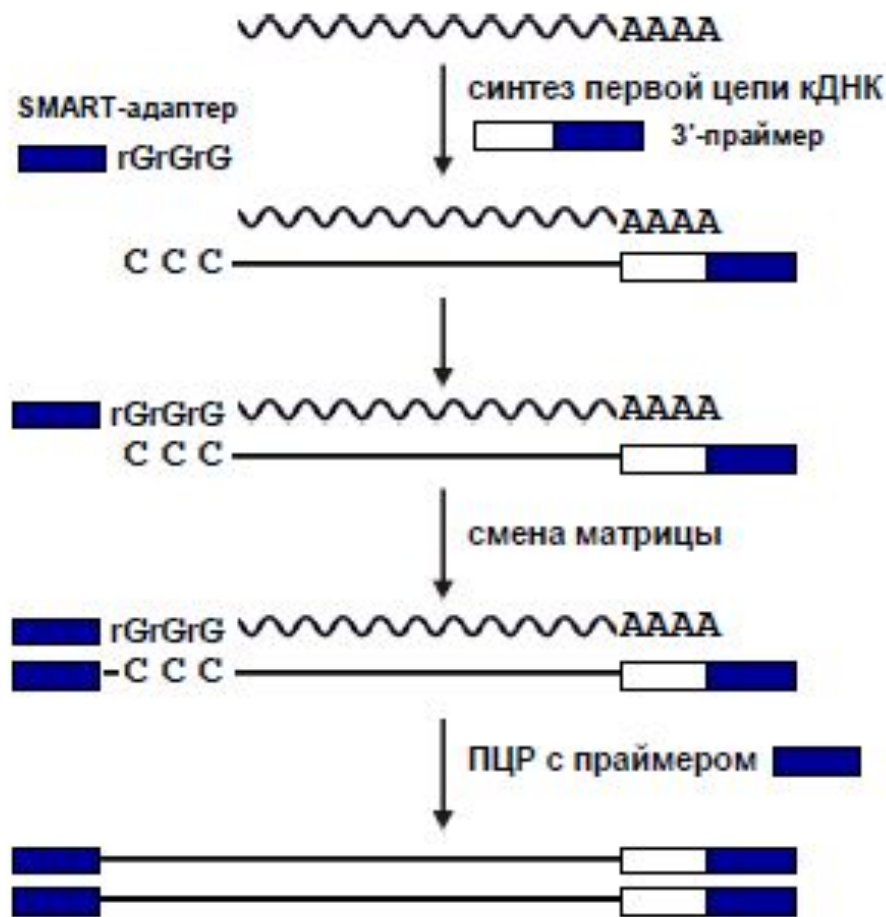


BAP – бактериальная щелочная фосфатаза, убирает фосфат с 5'-конца РНК.

TAP – вирусная кислая пирофосфатаза, отрезает кэп-структуру, остается фосфат.

5'-адапторный праймер может лигироваться только с РНК, у которых на 5'-конце есть фосфат, то есть с теми, которые были кэпированы, то есть с полноразмерными мРНК!

# Метод SMART решает все проблемы!



Используется вирусная обратная транскриптаза, которая всегда навешивает несколько дополнительных нуклеотидов на 3'-конец после окончания матрицы (чаще всего С).

Используются два адапторных праймера – один с олигоТ, другой с олигорибоG (адапторные последовательности разные!)

...кроме проблемы «обрывочных» мРНК с неправильным 5'-концом. Эта проблема сейчас решается качественным и аккуратным выделением мРНК, при котором они не рвутся.

Хорошо. Выделили мРНК, амплифицировали кДНК.  
А мы вроде как собирались экспрессию генов смотреть.



Этот человек как бы спрашивает нас:

**Как считать-то  
будем?**

# EST (Expressed Sequence Tags)

Метод массово использовался для анализа экспрессии генов до начала эпохи NGS.

1. Подготовьте библиотеку кДНК, клонируйте ее в вектор
2. Отсеквенируйте всю библиотеку, но каждый клон прочтите только один раз с какого-нибудь из концов.
3. У вас получится набор ридов длиной 100-800 нуклеотидов каждый. Каждый такой рид и есть EST, и он представляет собой часть последовательности какой-то мРНК.
4. Проведите анализ результатов 😊. Как именно – объяснять не буду, это сложно и к биоинженерии отношение имеет косвенное\*.

Пока было известно мало полных геномов, метод EST позволял быстро и достоверно получать информацию о ранее неизвестных белковых генах.

Этим, в сущности, он и был силен. Сейчас он используется редко, только если люди работают с экзотическими организмами с неизвестным геномом и у них не хватает денег на полногеномное секвенирование.

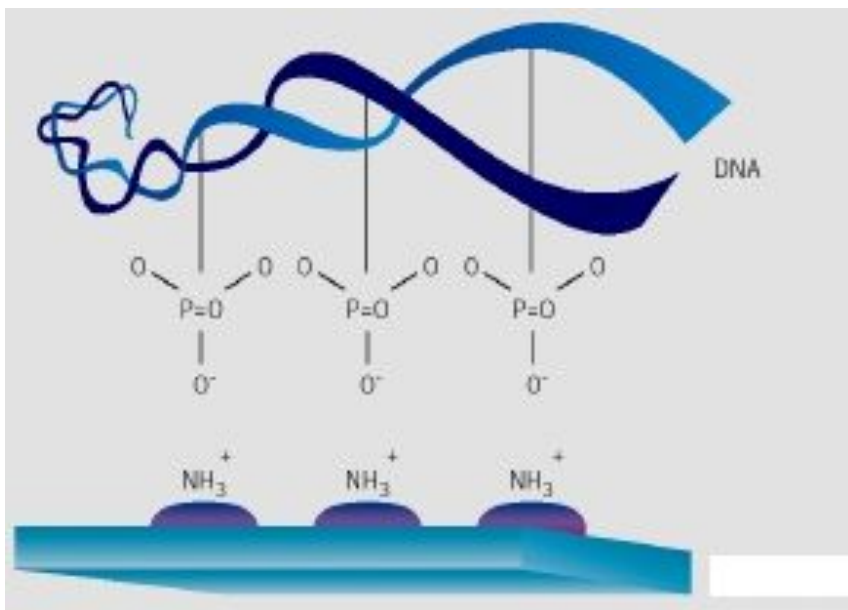
Про современный анализ экспрессии генов при помощи NGS я расскажу как-нибудь потом, при случае.

\*На самом деле, я и сам до конца не понимаю, как их анализируют.

# Два методологических подхода к оценке дифференциальной экспрессии генов, которых мы еще не знаем

## 1. Радиоактивность

А) Связывание кДНК со специальными мембранами (нитроцеллюлоза, нейлон)



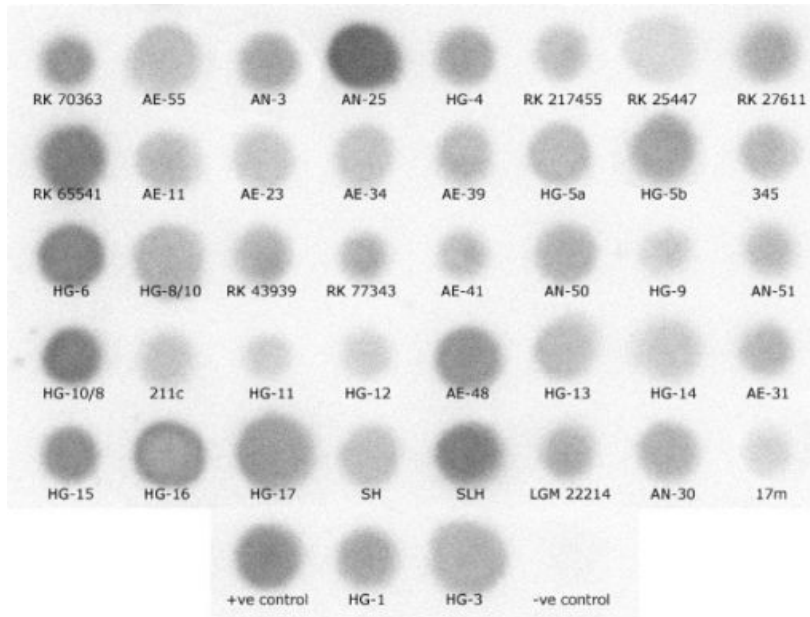
Первичное связывание происходит электростатически.

Затем специальной обработкой (УФ-свет, нагревание) можно превратить электростатические связи в ковалентные (**cross-linking**).

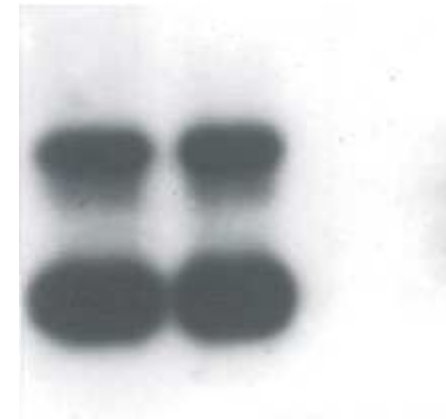
# 1. Радиоактивность

Б) Гибридизация ДНК на мембране с радиоактивно мечеными олигонуклеотидами по принципу комплементарности.

## Саузерн-блот гибридизация (ДНК-ДНК)



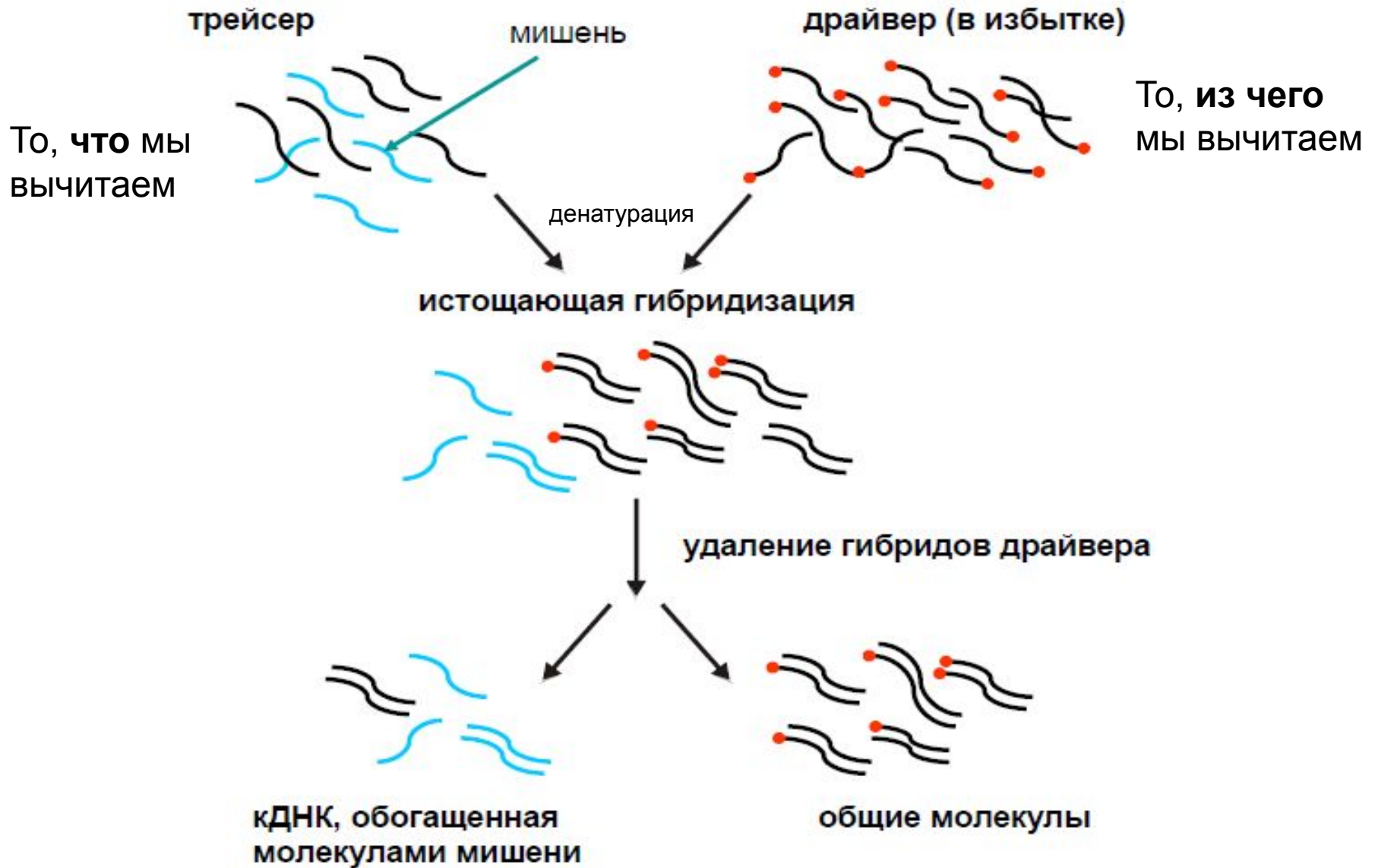
«Дот»-вариант  
(образцы капаются на мембрану,  
фиксируются, и мембрана  
инкубируется с раствором меченного  
зонда).



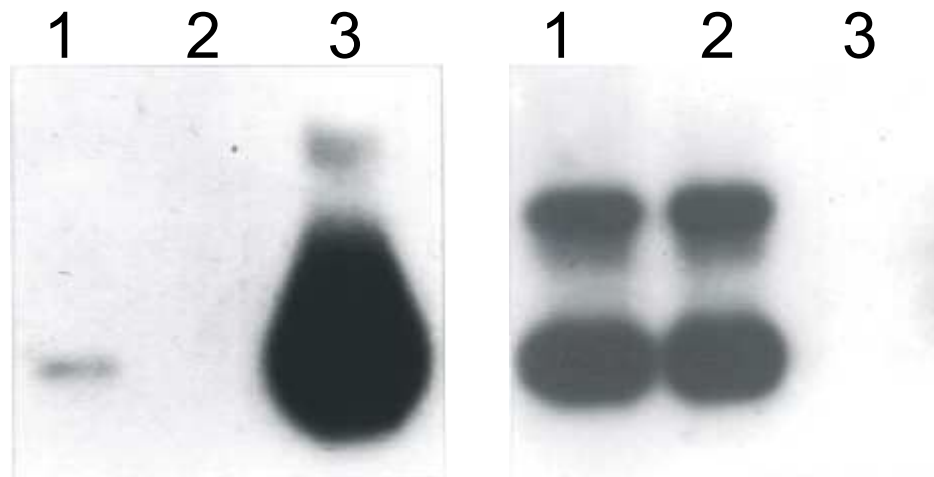
Вариант с электрофорезом (ДНК  
сначала разделяется в геле, затем  
переносится с геля на мембрану под  
действием тока, а уж потом  
мембрана инкубируется с раствором  
меченного зонда).



# Вычитающая гибридизация



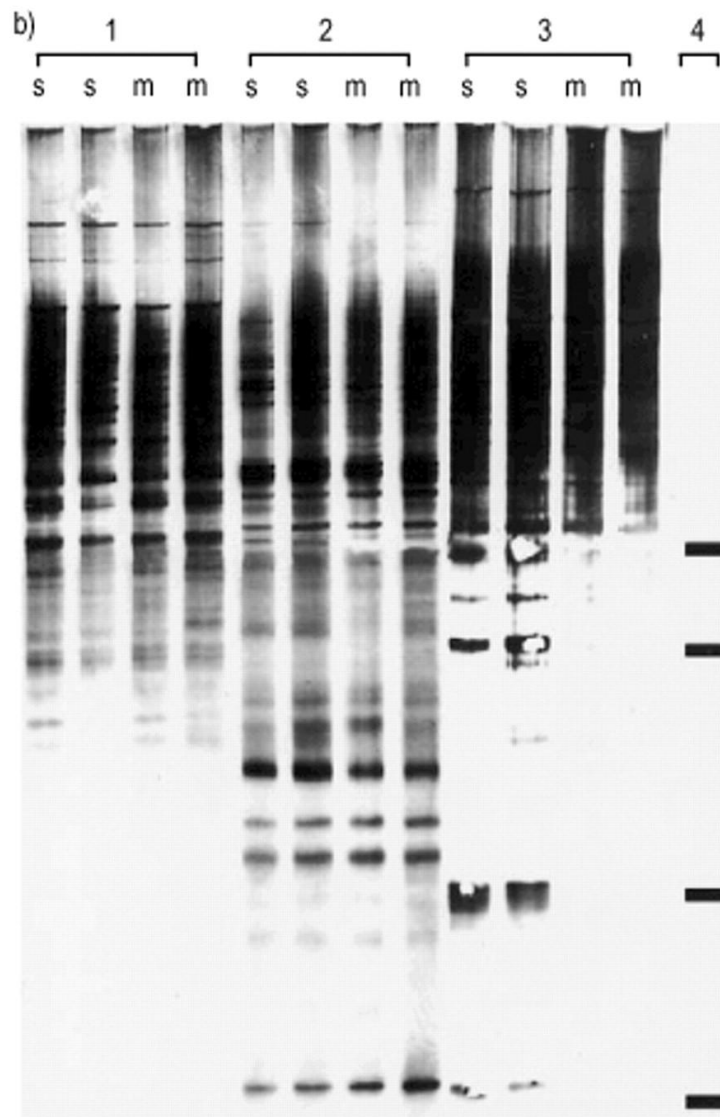
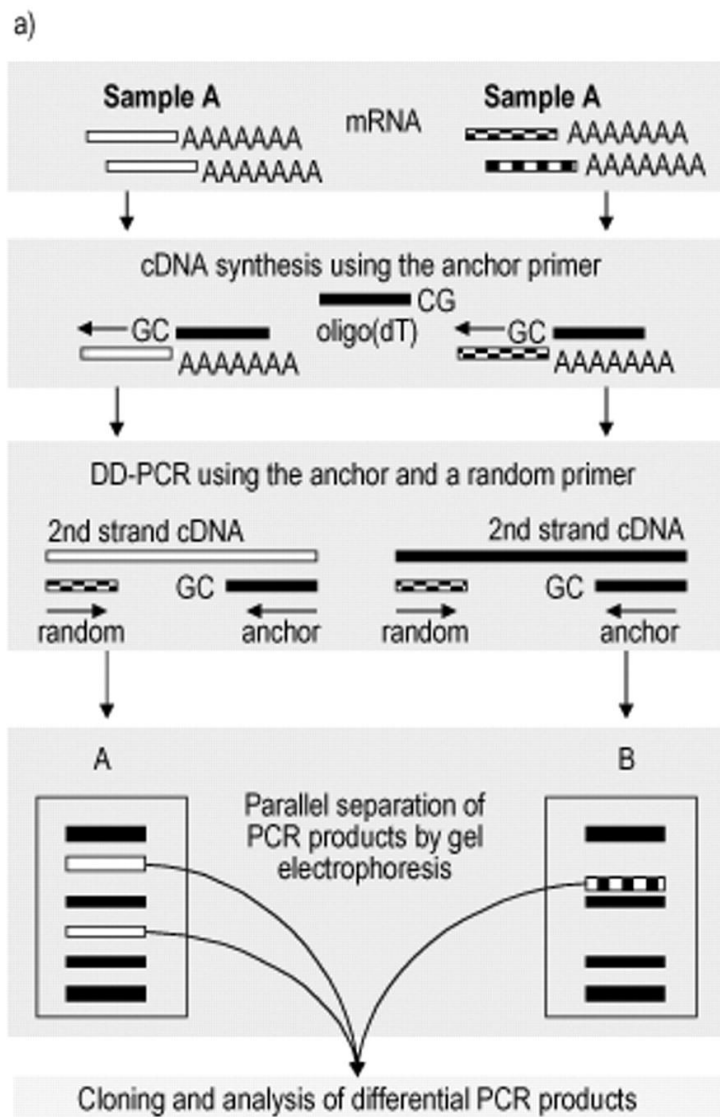
Вот такие замечательные результаты можно получать при помощи вычитающей гибридизации!



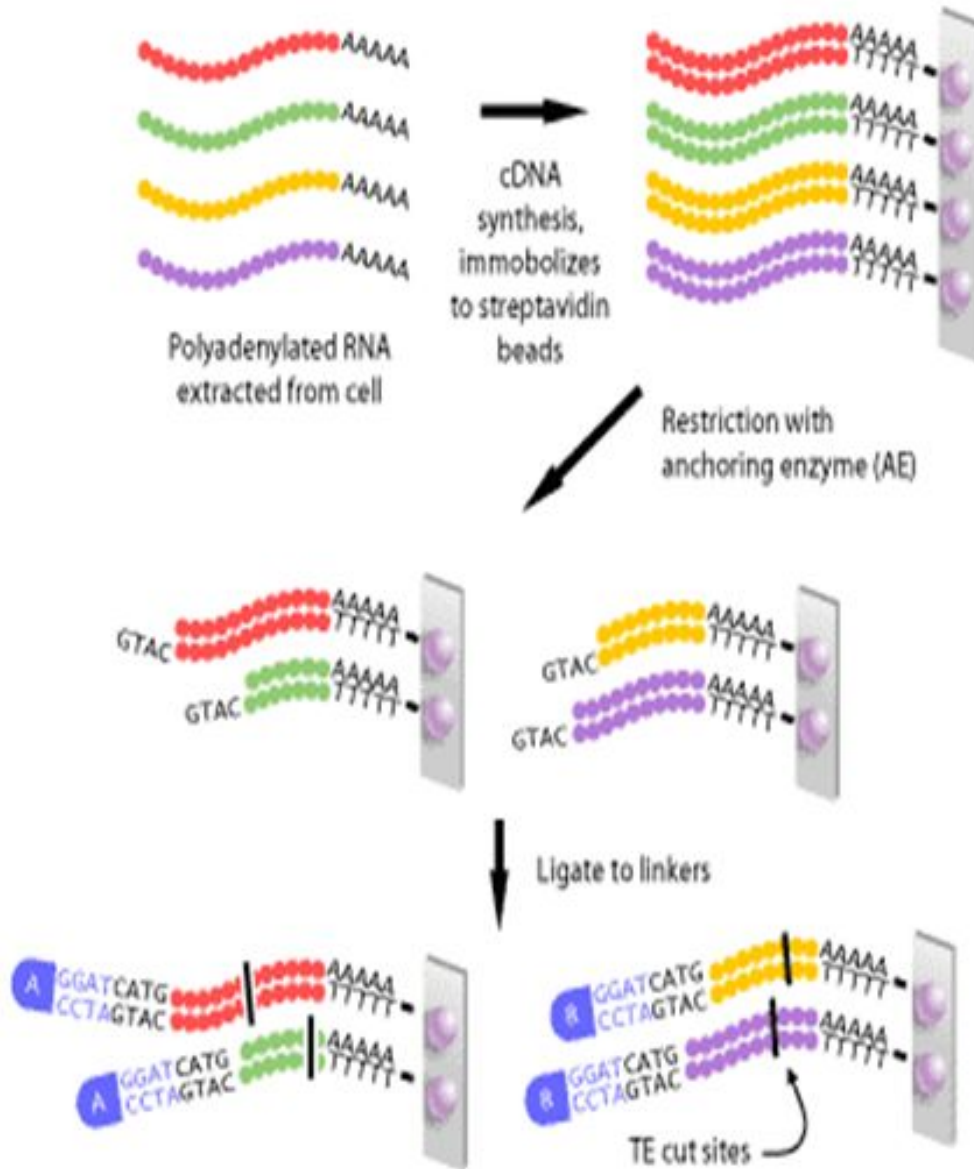
$$3 = 1 - 2$$

# Дифференциальный дисплей

позволяет сравнивать два препарата мРНК на геле

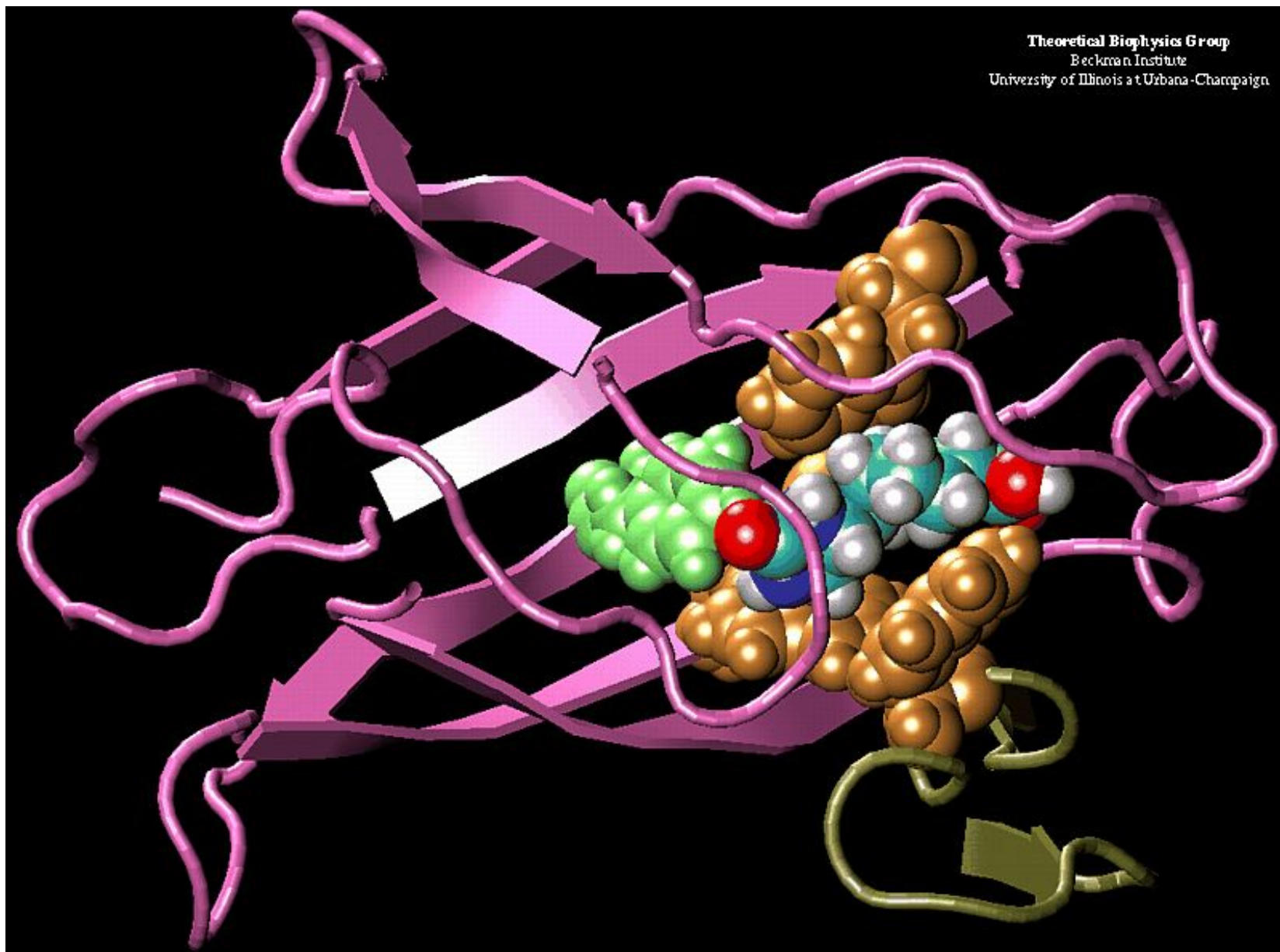


# SAGE (Serial Analysis of Gene Expression)



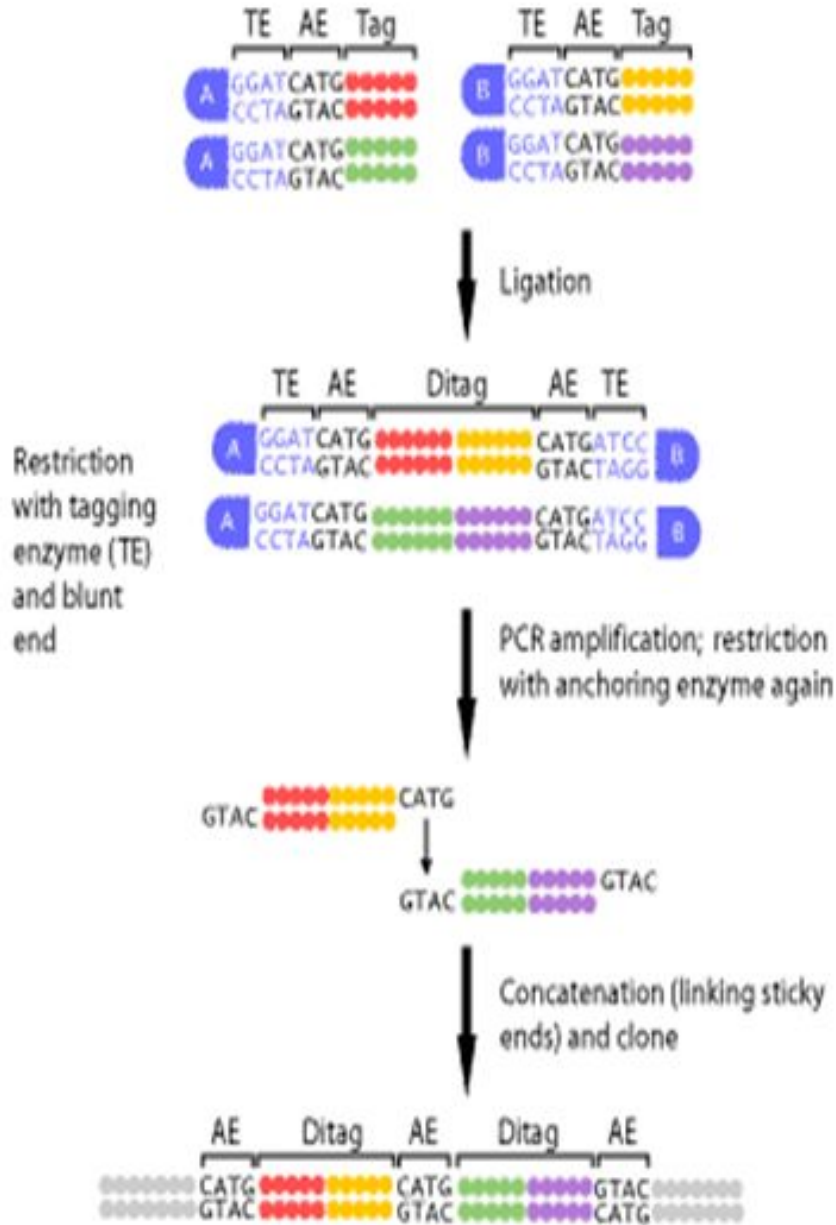
1. Выделите мРНК.
2. Возьмите биотинилированный олигоТ-праймер и пришейте его к стрептавидин-сефарозе.
3. Синтезируйте кДНК.
4. Проведите рестрикцию часто щепящей рестриктазой. Она называется Anchoring Enzyme (AE), чаще всего используют NlaIII.
5. Разделите стрептавидин-сефарозу на две равные части.
6. Проведите дизайн двух адаптеров: они должны содержать сайт рестрикции для фермента, который режет на удалении 14-15 нуклеотидов от участка узнавания. Эту рестриктазу называют Tagging Enzyme (TE), чаще всего используется VmsF1.
7. Лигируйте адаптеры к тем кускам дуплекса ДНК-РНК, которые остались висеть на сефарозе.

Прочное связывание стрептавидина с биотином (1:4) очень широко используется в молекулярной биологии





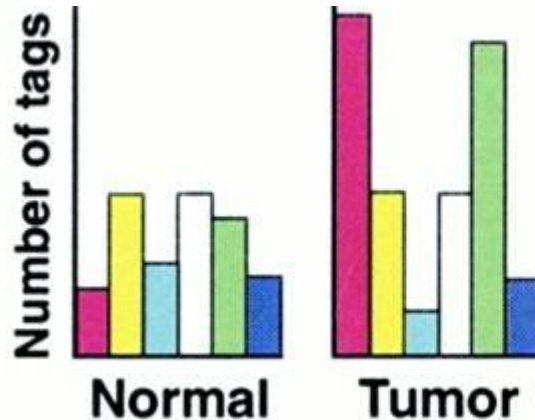
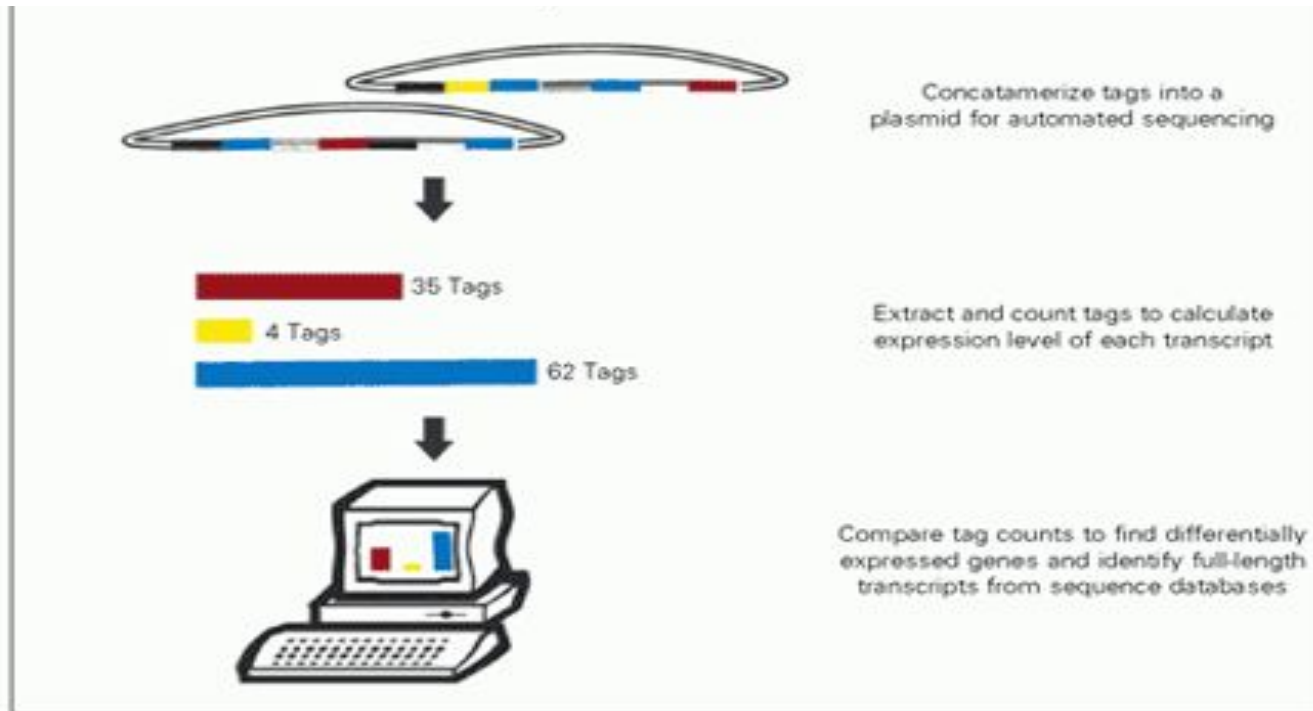
# SAGE (Serial Analysis of Gene Expression)



7. Проведите рестрикцию ферментом TE. Продукты рестрикции (а) не будут прикреплены к стрептавидину, (б) будут содержать сайт для фермента AE и (в) будут содержать по 14-15 нуклеотидов исходной кДНК.
8. Достройте липкие концы при помощи ДНК-полимеразы.
9. Смешайте два препарата вместе и проведите тотальное лигирование продуктов рестрикции. кДНК-участки будут лигироваться друг с другом, образуя так называемые дитаги.
10. Амплифицируйте продукты лигирования, проведите рестрикцию ферментом AE.
11. У вас получатся ПЦР-продукты с липкими концами. Залигируйте их друг с другом снова, получатся гораздо более длинные молекулы, называемые конкатемерами. Клонируйте их и секвенируйте!



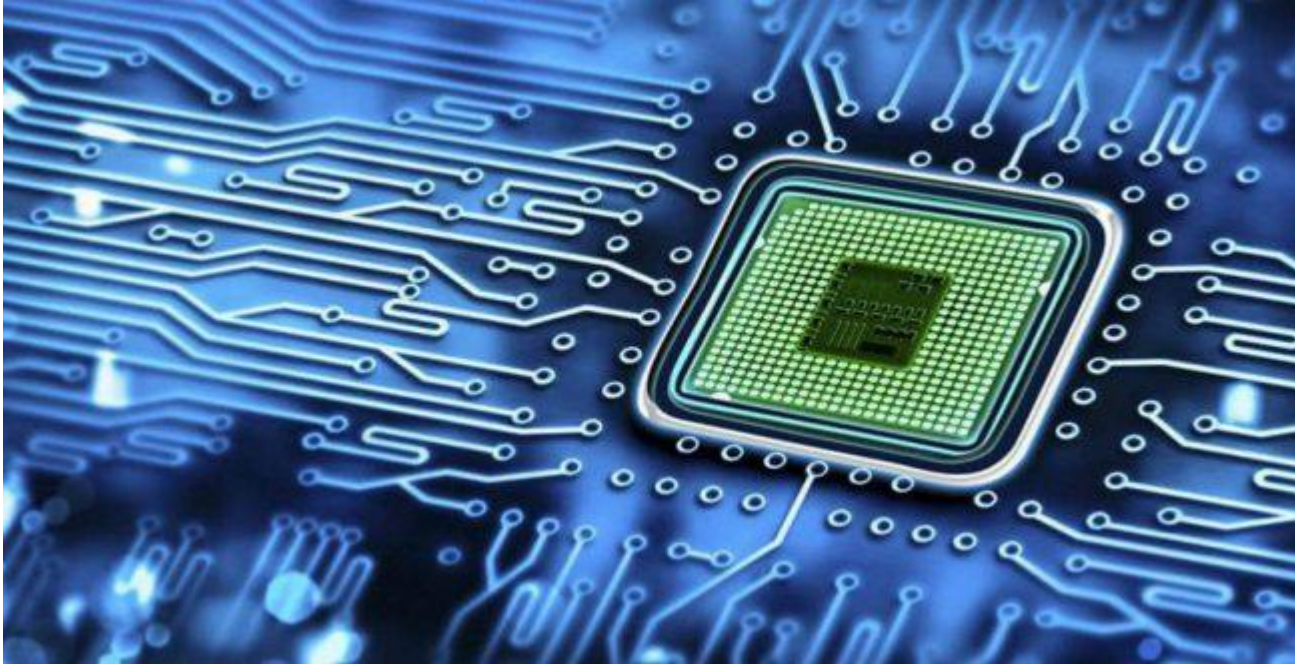
Результат секвенирования не только идентифицирует мРНК, но и покажет, сколько ее было в исходном образце!



**Sequence analysis,  
database search**

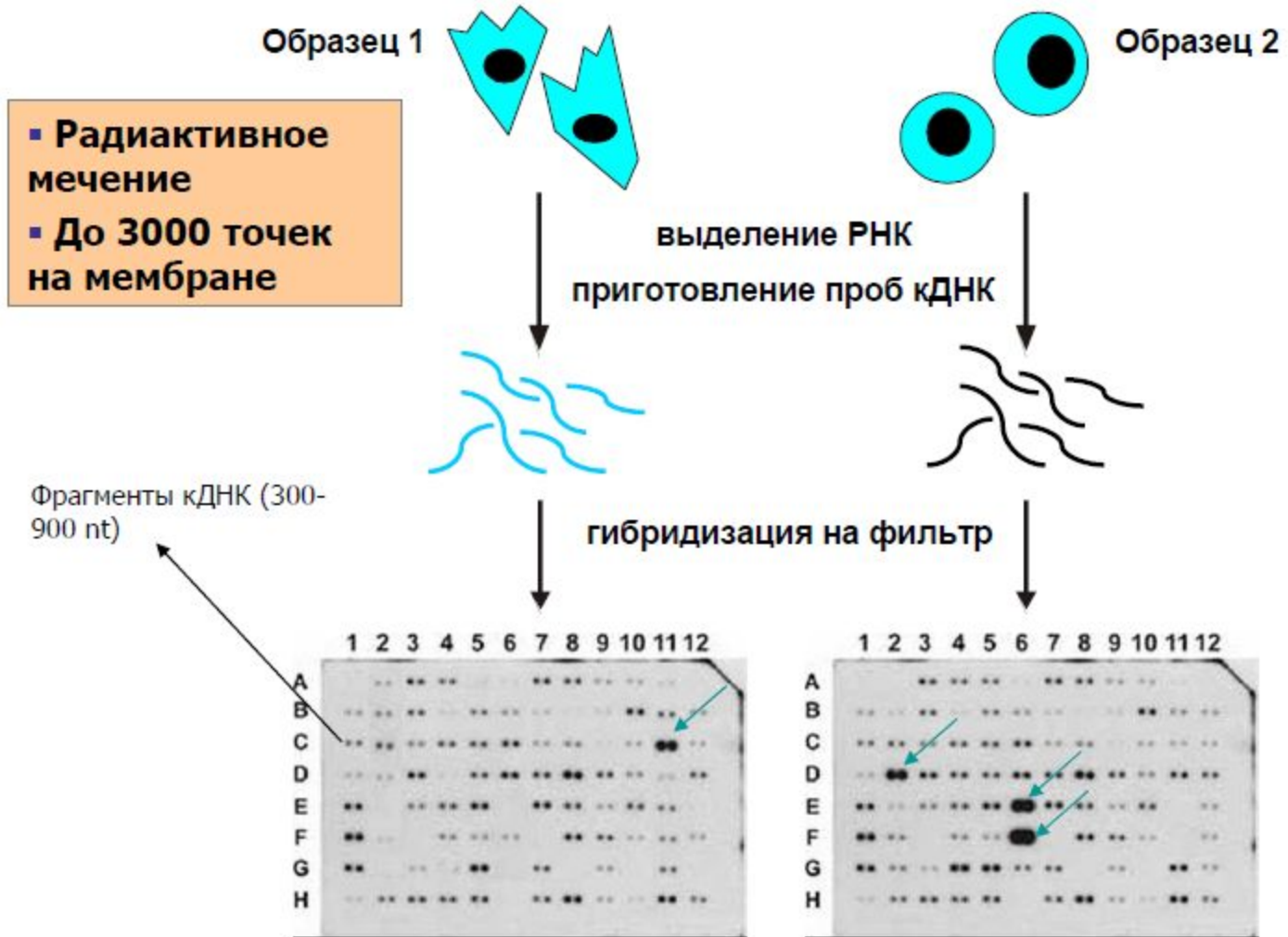
# Технологии ДНК-чипов

Микрочип – это, как вы знаете, компьютерная микросхема.



А ДНК-чип – это некая совокупность ячеек, в каждой из которых имеется какая-либо ДНК. С этой ДНК может гибридизоваться ДНК из анализируемых образцов. Это, в свою очередь, дает вам информацию о том, какие ДНК находятся в вашем образце.

# DNA Macroarray (ДНК-матрица)

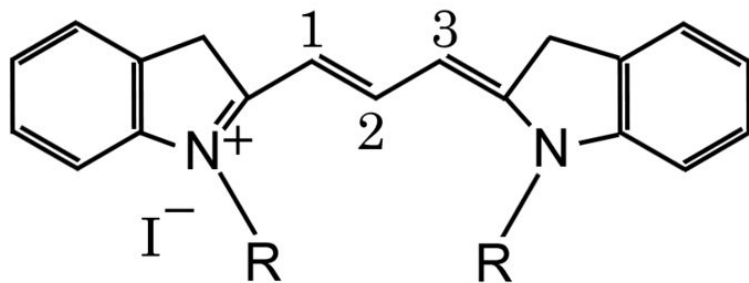


Да это же Саузерн-блот гибридизация!

# Два методологических подхода к оценке дифференциальной экспрессии генов,

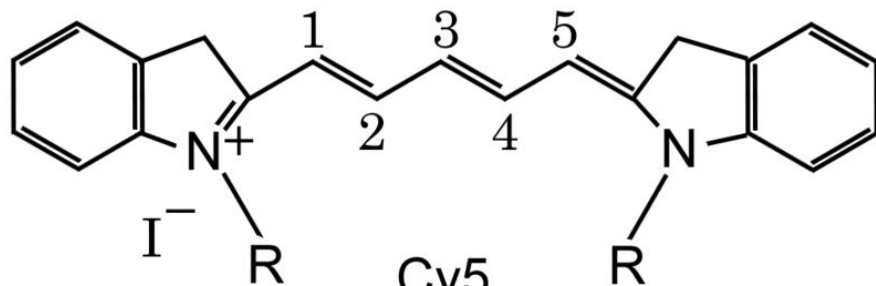
которых мы еще не знаем

## 2. Флюоресценция



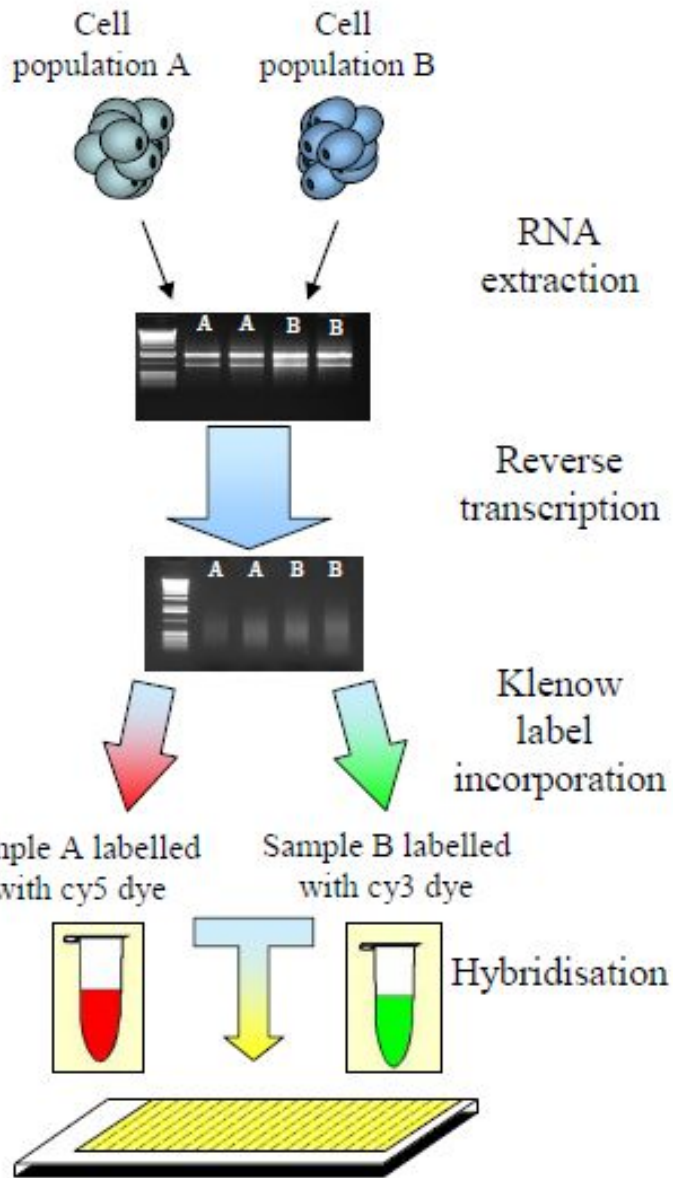
Cy3

Пометьте какой-нибудь нуклеотид этими молекулами и встройте в ДНК – вот и вся недолга!



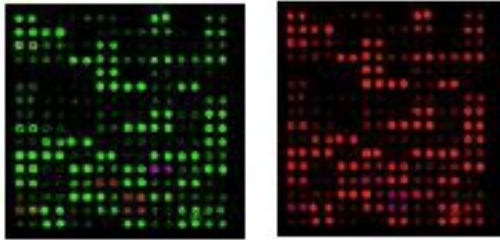
Cy5

# Принцип технологии DNA-microarrays

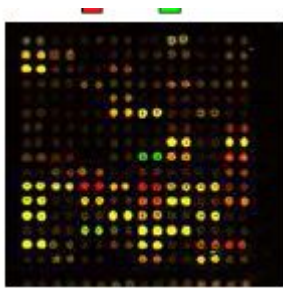


1. Выделите РНК откуда вам хочется.
2. Проведите обратную транскрипцию.
3. Включите меченные Cy3 или Cy5 нуклеотиды в состав кДНК при помощи ДНК-полимеразы
4. Нанесите аликвоты вашего образца в лунки микрочипов. Если у вас хороший детектор – нанесите оба образца на один чип.

# Принцип технологии DNA-microarrays



5. Сканируйте красный и зеленый сигналы.



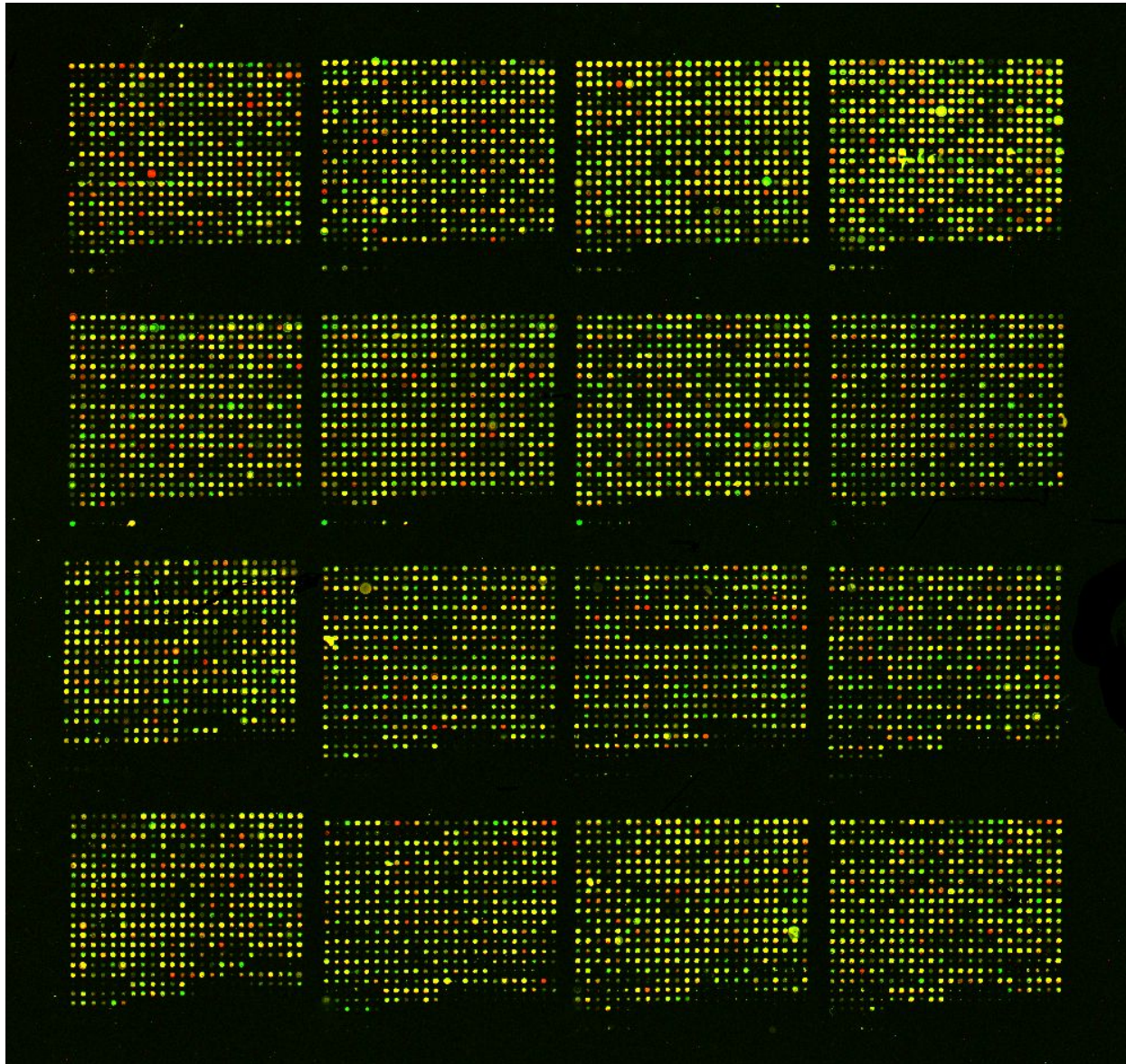
6. Наложите их друг на друга.

A screenshot of a data analysis software interface. It displays a table with multiple columns and rows of data, likely representing the results of the DNA microarray analysis. The table has a header row and several data rows, with columns for gene identifiers and signal intensity values.

7. Посчитайте!



# Анализ экспрессии дрожжевых генов в зависимости от типа питания (аэробное / анаэробное)



# Анализ результатов использования ДНК-чипов



Cy3	Cy5	$\frac{Cy5}{Cy3}$	$\log_2 \left( \frac{Cy5}{Cy3} \right)$	
200	10000	50.00	5.64	■
4800	4800	1.00	0.00	■
9000	300	0.03	-4.91	■

Наложите друг на друга картинки с Cy3 и Cy5.

Посчитайте количество красных и зеленых пикселей в пятнах.

Разделите одно на другое, отложите в логарифмической шкале и сравнивайте!

В стандартной технологии ДНК-чипов в качестве находящегося на чипе материала могут использоваться:

- Фрагменты кДНК,
- ПЦР-продукты,
- Олигонуклеотиды.



До 10 тысяч точек на одном чипе.

Однако все они наносятся на чип и химически закрепляются там уже после того, как они были синтезированы.

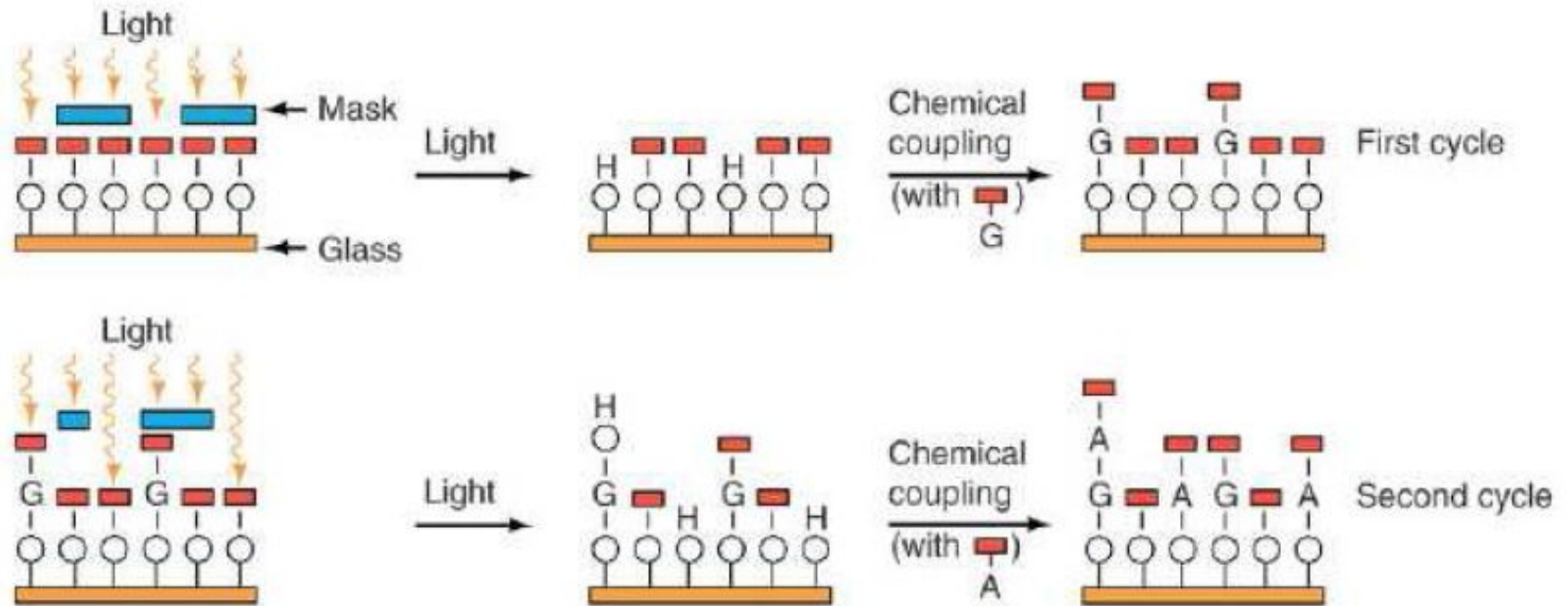
**Технология Affymetrix подразумевает синтез олигонуклеотидов прямо на твердой поверхности (стекле).**



До 500 тысяч точек на одном чипе.



# Как олигонуклеотиды синтезируются на стекле?



Изначально на стекло нанесены «точки связывания», и они закрыты «масками». Вторые «маски» светочувствительны и могут избирательно закрывать определенные «точки связывания». Под действием света вторые «маски» уходят, но защищают собой первые. Там, где вторых «масок» не было, уходят первые «маски», и эти места становятся доступны для связывания нуклеотидов.

# Сравнение различных методов анализа экспрессии генов

	Комплек- сность	Количес- твенност ь	Чувстви- тельность	Способнос- ть выявить новые гены	Цена	Возможност ь автоматиза- ции
Дифференци- альный дисплей	-	-	-	-	+	-
EST	-	+	-	+	+	-
SAGE	+	+	+	+	-	-
Микрочипы	+	+	+	-	--	+

**Выбирайте, кому что нравится!**