



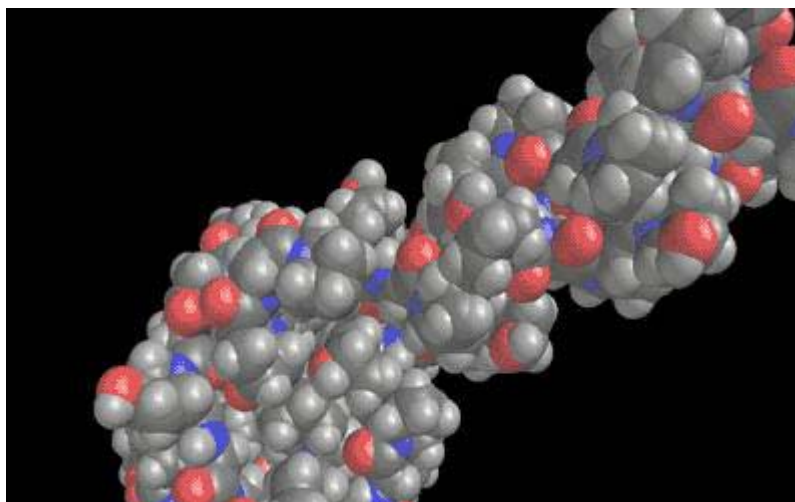
**Проект Bioversity International/UNEP-GEF  
«In situ/On farm сохранение и использование  
агробιοразнообразия (плодовые культуры и их  
дикие сородичи) в Центральной Азии»**



**Центр Геномных технологий  
Института генетики и экспериментальной биологии растений  
Академии Наук Республики Узбекистан**



**РЕГИОНАЛЬНЫЙ ТРЕНИНГ ЦЕНТР ПО  
МОЛЕКУЛЯРНЫМ МАРКЕРАМ**



## **УЧЕБНЫЕ МАТЕРИАЛЫ**

**по использованию молекулярных маркеров в оценке  
разнообразия генетических ресурсов растений**

**г. Ташкент, Узбекистан  
2009**

*В данной публикации изложены учебные материалы, разработанные в рамках регионального проекта «In situ/On farm сохранение и использование агробιοразнообразия (плодовые культуры и их дикие сородичи) в Центральной Азии». Проект осуществляется в пяти странах – Казахстан, Кыргызстан, Таджикистан, Туркменистан, Узбекистан и координируется Bioversity International при финансовой поддержке Глобального Экологического Фонда (GEF) и технической поддержке Программы Организации Объединенных Наций по Окружающей Среде (UNEP).*

Настоящие учебные материалы составлены под редакцией д.с/х.н. профессора Кайимова А.К. и д.б.н. Абдурахманова И.Ю. научными сотрудниками Центра Геномных технологий Института генетики и экспериментальной биологии растений Академии Наук Республики Узбекистан в качестве учебного пособия при изучении применения молекулярных маркеров в исследованиях биологического разнообразия генетических ресурсов растений.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение .....	4
Основы молекулярной генетики (Турдикулова Ш.У.).....	5
Транскрипция, трансляция и биосинтез белка (Турдикулова Ш.У) .....	13
Роль молекулярной генетики в изучении биологических систем: оценка межвидового разнообразия сельскохозяйственных культур с использованием технологии молекулярных маркеров (Абдуллаев А.А.).....	20
Введение в молекулярную генетику и ее методологию (Абдуллаев А.А.) .....	44
Секвенирование ДНК, анализ нуклеотидных последовательностей (Абдуллаев А.А.) .....	86
Охрана труда и техника безопасности в научных лабораториях Центра геномных технологий (Мавлянов Г.Т.).....	122
Качественный и количественный анализ ДНК и РНК. Спектрофотометрический анализ (Мавлянов Г.Т.) .....	132
Практическое занятие по подготовке биологического материала, выделению ДНК из клеток бактерий и выделению ДНК из растений (Эгамбердиев Ш.Ш.).....	135
Методы выделения ДНК из биологических материалов (Шерматов Ш.Е.) .....	138
Принципы электрофореза (Адилова А.Т.).....	142
Биоинформатика и компьютерные программы для анализа геномного материала (основы). Статистический анализ. Генетическое расстояние, сцепление генов QTL анализ. LD (linkage disequilibrium) анализ. Биоинформатические Интернет ресурсы (Абдурахманов И.Ю.).....	146

## ВВЕДЕНИЕ

Если XX век учёными был признан как век «высоких технологий», то XXI век мировое сообщество признало веком молекулярной биологии. Открытие двойной спирали ДНК было одним из наиболее волнующих событий в молекулярной биологии.

Не менее важные события предшествовали открытию двойной спирали ДНК:

1881 Edward Zacharias доказал, что в нуклеине присутствуют хромосомы.

1899 Richard Altmann переименовал нуклеин в нуклеиновую кислоту (так же открыл – митохондрии).

1900 определена химическая структура 20 основных аминокислот.

1902 - Emil Hermann Fischer получил Нобелевскую премию: аминокислоты соединяются и формируют белки.

1911 – Thomas Hunt Morgan открыл гены в хромосомах, являющиеся дискретными единицами наследственности.

1911 Pheobus Aaron Theodore Levene изучил ДНК и РНК.

1950 – Mahlon Bush Hoagland впервые определил, что аминокислоты не сразу формируют белок, а вначале присоединяются к РНК (тРНК) комплиментарной рибосоме.

1952 – Alfred Hershey и Martha Chase- генетическая информация о белках находится в ДНК.

И, наконец, 1952-1953 James D. Watson и Francis H. C. Crick открыли двойную спираль ДНК.

Впоследствии это открытие легло в основу теоретической и практической молекулярной биологии, в том числе в основу исследований биоразнообразия генетических ресурсов растений. Тот факт, что генетическое разнообразие связано с изменчивостью в последовательности ДНК, количестве ДНК в одной клетке, или количестве и структуре хромосом в современной науке не вызывает сомнений. Генетическое разнообразие является результатом отбора, мутации, миграции, генетического дрейфа и/или рекомбинации генов. Все эти явления вызывают изменения в частоте генов и аллелей, и приводят к эволюции популяций.

Для эффективного сохранения и использования генетических ресурсов растений требуется тщательная оценка генетической изменчивости, которой они обладают. Генетическую изменчивость можно измерить на двух уровнях: фенотипа – сочетания индивидуальных признаков, определяющихся генотипом и его взаимодействием с окружающей средой и генотипа – специфической генетической структуры организма. Генетические маркеры определяют характеристики фенотипа и/или генотипа особи.

Молекулярные маркеры применяются при изучении внутривидового и межвидового генетического разнообразия, исследовании меж- и внутривидовой генетической структуры, филогенетический и эволюционный анализ, выявление групп сцепления и создание генетических карт, изучении количественных признаков и их картирование, в маркер-ассоциированной селекции (МАС), паспортизации или ДНК-баркодинге (видов, сортов, линий), идентификации личности.



# ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ<sup>1</sup>

*Турдикулова Ш.У.*

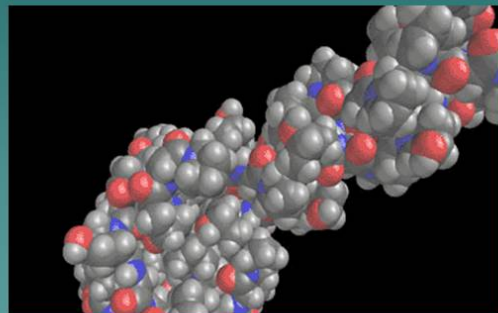
д.б.н., ведущий научный сотрудник  
Центра Геномных Технологий ИГиЭБР АН РУз

## Транскрипция, трансляция и биосинтез белка

### От гена к белку

Структура белка:

- ◆ Первичная
- ◆ Вторичная
- ◆ Третичная
- ◆ четвертичная



Информация о структуре белка  
записана в ДНК

---

<sup>1</sup> С теоретическим материалом данной секции можно ознакомиться на сайте [www.in.situ.uz](http://www.in.situ.uz)

## Генетический код

- ◆ Последовательность из трех нуклеотидов, соответствующая одной аминокислоте, называется кодоном.

64 – кодона

61 – соответствует 20 аминокислотам

3 – стоп кодона

## Генетический код

Генетический код

		ВТОРАЯ БУКВА				
		У	Ц	А	Г	
ПЕРВАЯ БУКВА	У	УУУ <i>Phe</i>	УЦУ <i>Ser</i>	УАУ <i>Tyr</i>	УГУ <i>Cys</i>	У
		УУЦ <i>Phe</i>	УПЦ <i>Ser</i>	УАЦ <i>Tyr</i>	УГЦ <i>Cys</i>	Ц
		УУА <i>Leu</i>	УЦА <i>Ser</i>	УАА <i>Stop</i>	УГА <i>Stop</i>	А
		УУГ <i>Leu</i>	УЦГ <i>Ser</i>	УАГ <i>Stop</i>	УГГ <i>Trp</i>	Г
	Ц	ЦУУ <i>Leu</i>	ЦЦУ <i>Pro</i>	ЦАУ <i>His</i>	ЦГУ <i>Arg</i>	У
		ЦУЦ <i>Leu</i>	ЦЦЦ <i>Pro</i>	ЦАЦ <i>His</i>	ЦГЦ <i>Arg</i>	Ц
		ЦУА <i>Leu</i>	ЦЦА <i>Pro</i>	ЦАА <i>Gln</i>	ЦГА <i>Arg</i>	А
		ЦУГ <i>Leu</i>	ЦЦГ <i>Pro</i>	ЦАГ <i>Gln</i>	ЦГГ <i>Arg</i>	Г
	А	АУУ <i>Ile</i>	АЦУ <i>Thr</i>	ААУ <i>Asp</i>	АГУ <i>Ser</i>	У
		АУЦ <i>Ile</i>	АЦЦ <i>Thr</i>	ААЦ <i>Asp</i>	АГЦ <i>Ser</i>	Ц
		АУА <i>Ile</i>	АЦА <i>Thr</i>	ААА <i>Lys</i>	АГА <i>Arg</i>	А
		АУГ <i>Met</i>	АЦГ <i>Thr</i>	ААГ <i>Lys</i>	АГГ <i>Arg</i>	Г
	Г	ГУУ <i>Val</i>	ГЦУ <i>Ala</i>	ГАУ <i>Asp</i>	ГГУ <i>Gly</i>	У
		ГУЦ <i>Val</i>	ГЦЦ <i>Ala</i>	ГАЦ <i>Asp</i>	ГГЦ <i>Gly</i>	Ц
		ГУА <i>Val</i>	ГЦА <i>Ala</i>	ГАА <i>Glu</i>	ГГА <i>Gly</i>	А
		ГУГ <i>Val</i>	ГЦГ <i>Ala</i>	ГАГ <i>Glu</i>	ГГГ <i>Gly</i>	Г

ТРЕТЬЯ БУКВА

# Рамки считывания

для последовательности

ACGACGACGACGACGACG

возможны три рамки считывания:

ACG ACG ACG ACG ACG ACG  
CGA CGA CGA CGA CGA CGA  
GAC GAC GAC GAC GAC GAC

Thr Thr Thr Thr Thr Thr

Arg Arg Arg Arg Arg Arg

Asp Asp Asp Asp Asp Asp

# Типы генных мутаций

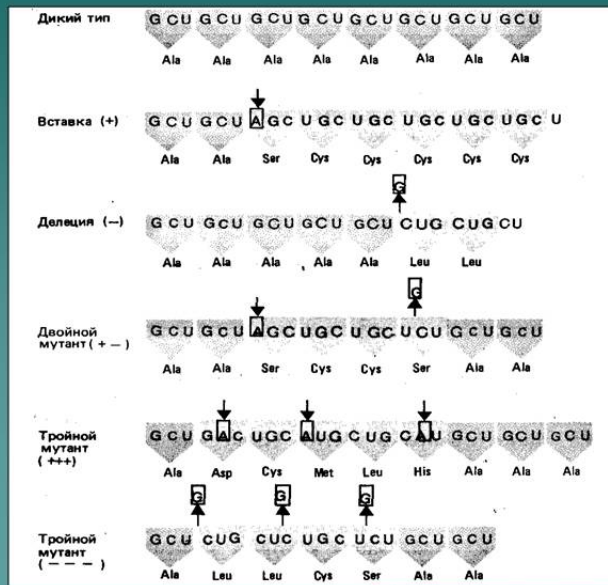
◆ Однонуклеотидные замены

◆ Делеция – выпадение нуклеотида

◆ Инсерция – вставка лишнего нуклеотида

Сдвиг  
рамки  
считы  
вания

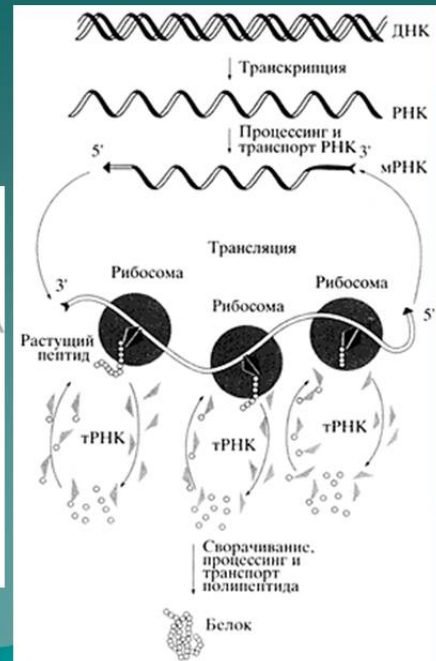
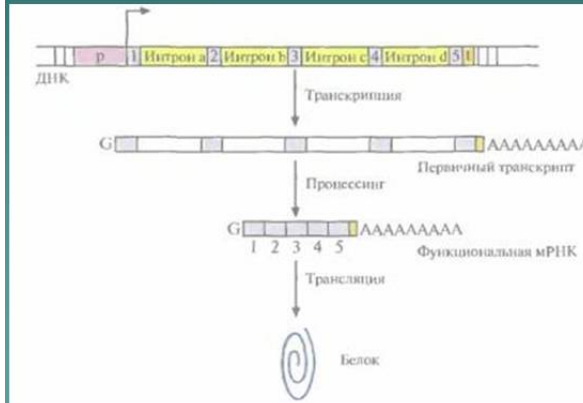
# Мутации со сдвигом рамки считывания



## Общая схема биосинтеза белка

- ◆ Транскрипция - процесс копирования генетической информации с ДНК на РНК
- ◆ Процессинг – сплайсинг
- ◆ Трансляция
- ◆ Транспортировка

# Общая схема биосинтеза белка



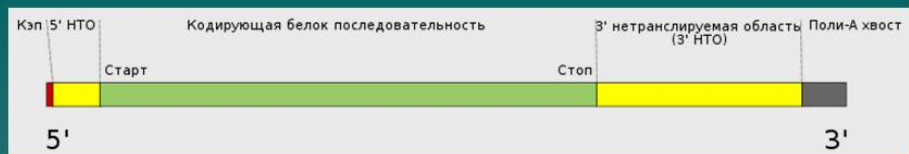
## РНК

РНК — это линейная полинуклеотидная молекула, отличающаяся от ДНК в двух отношениях. Во-первых, моносахаридом в РНК является рибоза, содержащая не одну, а две гидроксильные группы; они связаны с 2'- и 3'-атомами углерода. Во-вторых, одним из четырех оснований в РНК является урацил (U), занимающий место тимина. Большинство молекул РНК одноцепочечные, хотя часто в них имеются взаимнокомплементарные участки

три основных типа РНК:

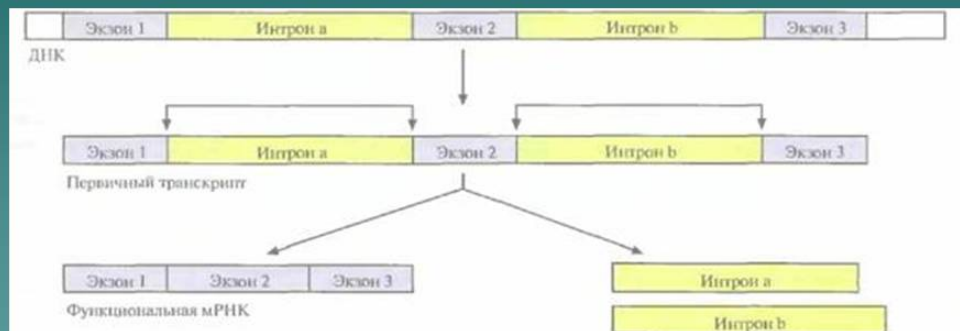
- ◆ информационная (мРНК)
- ◆ рибосомная (рРНК)
- ◆ транспортная (тРНК)



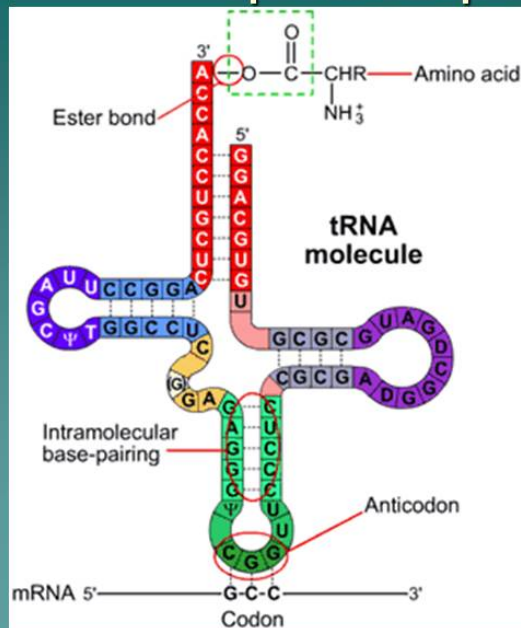


- ◆ **5' кэп (или кап)** (от **англ. cap** — шапочка) — это модифицированный **гуанидиновый нуклеотид**, который добавляется на **5' (передний)** конец незрелой мРНК.
- ◆ Кодирующие области состоят из **кодонов** — следующих непосредственно друг за другом последовательностей из трёх нуклеотидов, каждая из которых соответствует в **генетическом коде** определённой аминокислоте или началу и концу синтеза белка. Кодирующие области начинаются со **старт-кодона** и заканчиваются одним из трёх **стоп-кодонов**.
- ◆ **Нетранслируемые области** — участки РНК, расположенные до **старт-кодона** и после **стоп-кодона**, которые не кодируют белок. Они называются **5'-нетранслируемая область** и **3'-нетранслируемая область**, соответственно.
- ◆ **3' полиадениновый хвост** - Длинная (часто несколько сотен нуклеотидов) последовательность адениновых оснований, которая присутствует на **3' «хвосте»** мРНК **эукариот**, синтезируется ферментом полиаденилат-полимеразой. У высших эукариот поли-А-хвост добавляется к транскрибированной РНК, которая содержит специфическую последовательность, AAUAAA.

## м-РНК



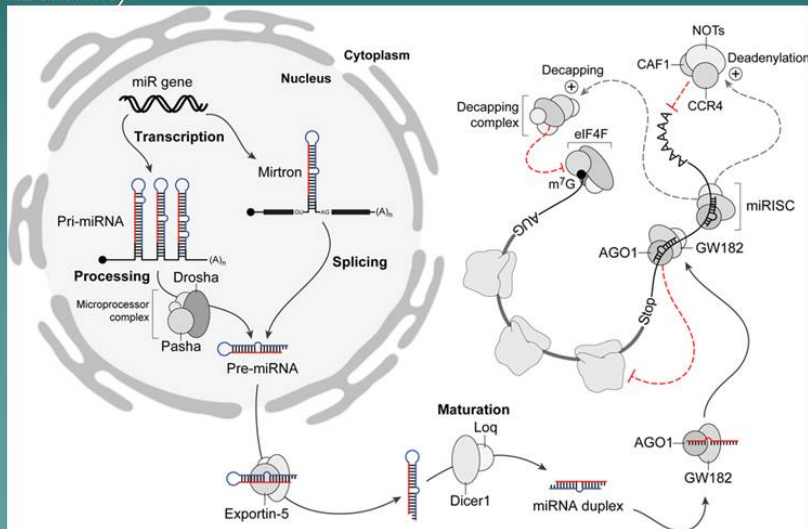
# Транспортная РНК



РНК, функцией которой является транспортировка аминокислот к месту синтеза белка.

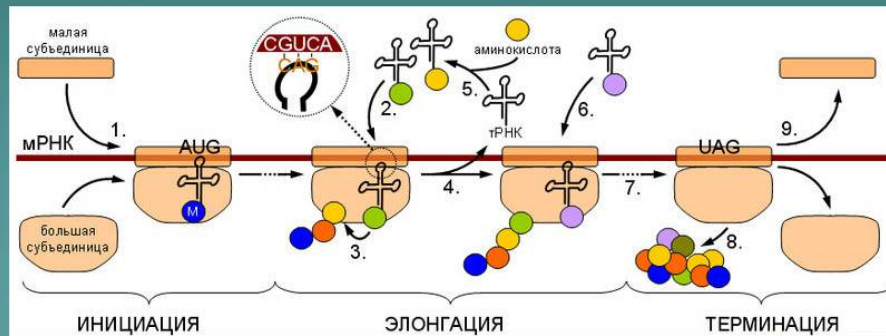
# Микро-РНК

МикроРНК (*microRNA*, *miRNA*) — класс некодирующих РНК, которые имеют длину около 22 нуклеотидов. Эти РНК играют важную роль в регуляции трансляции и деградации мРНК. Регуляция осуществляется путем комплементарного связывания микроРНК с частично комплементарными сайтами в нетранслируемых участках (UTRs) мРНК (мишенями).



# Трансляция

**Трансляцией** называют осуществляемый рибосомой синтез белка из аминокислот на матрице информационной (или матричной) РНК (иРНК или мРНК). Трансляция является финальной стадией реализации генетической информации.



# Структура белка

- ◆ **Первичная** - последовательность аминокислот в полипептидной цепи
- ◆ **Вторичная структура** — локальное упорядочивание фрагмента полипептидной цепи, стабилизированное водородными связями и гидрофобными взаимодействиями
- ◆ **Третичная структура** — пространственное строение полипептидной цепи; взаимное расположение элементов вторичной структуры, стабилизированное различными типами взаимодействий:
  - ковалентные связи (между двумя остатками цистеина — дисульфидные мостики);
  - ионные связи между противоположно заряженными боковыми группами аминокислотных остатков;
  - водородные связи;
  - гидрофильно-гидрофобные взаимодействия.
- ◆ **Четверичная структура**
  - взаимное расположение нескольких полипептидных цепей в составе единого белкового комплекса

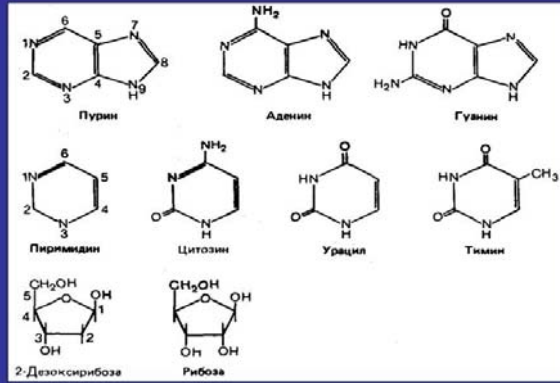


## ТРАНСКРИПЦИЯ, ТРАНСЛЯЦИЯ И БИОСИНТЕЗ БЕЛКА

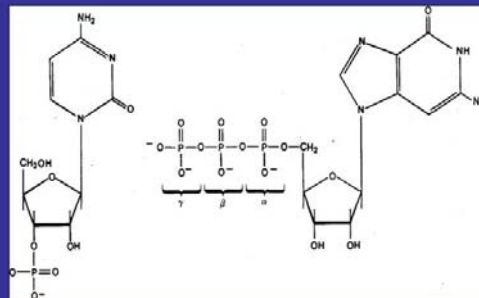
*Турдикулова Ш.У.*

д.б.н., ведущий научный сотрудник  
Центра Геномных Технологий ИГиЭБР АН РУз

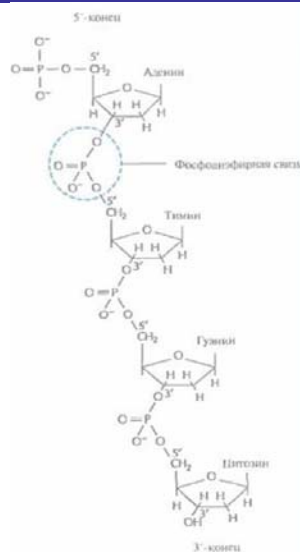




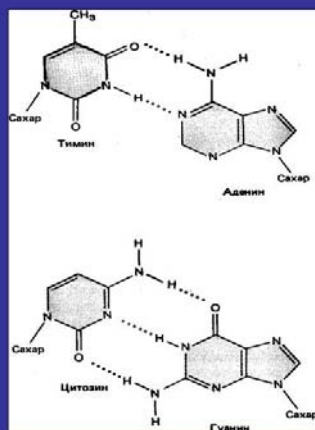
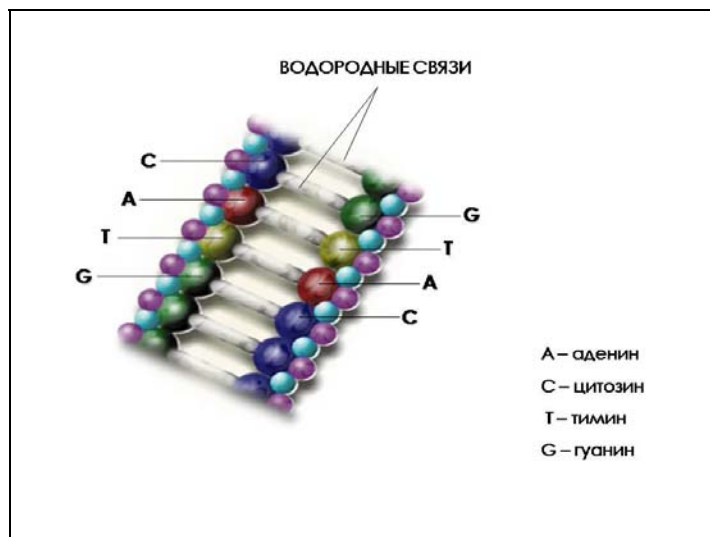
Азотистые основания делятся на два типа: пиримидиновые и пуриновые основания, называемые для краткости **пиримидины** и **пурины**. Пиримидины состоят из шестичленного кольца, а у пуринов по два конденсированных кольца: одно -пятичленное и второе-шестичленное.



Нуклеиновые кислоты состоят из последовательности химически связанных **нуклеотидов**. Каждый нуклеотид содержит гетероциклическое кольцо из атомов углерода и азота (**азотистое основание**), пятиуглеродное **сахарное кольцо (пентозу)** и **фосфатную группу**.



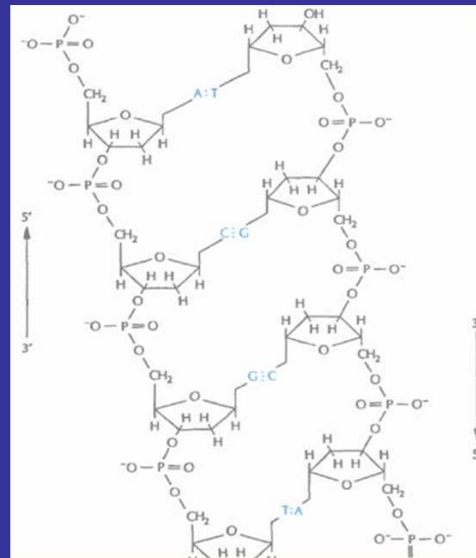
Полинуклеотидная цепь состоит из ряда (5'-3')-сахарофосфатных связей, образующих остов молекулы, к которому присоединяются азотистые основания. атом в 5'-положении одного пентозного кольца соединен с атомом в 3'-положении следующего пентозного кольца через фосфатную группу. Принято говорить, что сахарофосфатный остов состоит из (5'-3')-связей. Концевой нуклеотид на одном конце цепи имеет свободную 5'-группу, на другом конце- свободную 3'-группу. Последовательности нуклеиновых кислот принято писать именно в таком направлении: от 5'-конца к 3'-концу.



Уотсон и Крик предположили, что две полинуклеотидные цепи в ДНК не связаны ковалентно, а соединяются водородными связями, возникающими между азотистыми основаниями. На рисунке показано, что в своей обычной форме G может образовывать водородную связь специфически только с C, тогда как A специфически соединяется только с T.

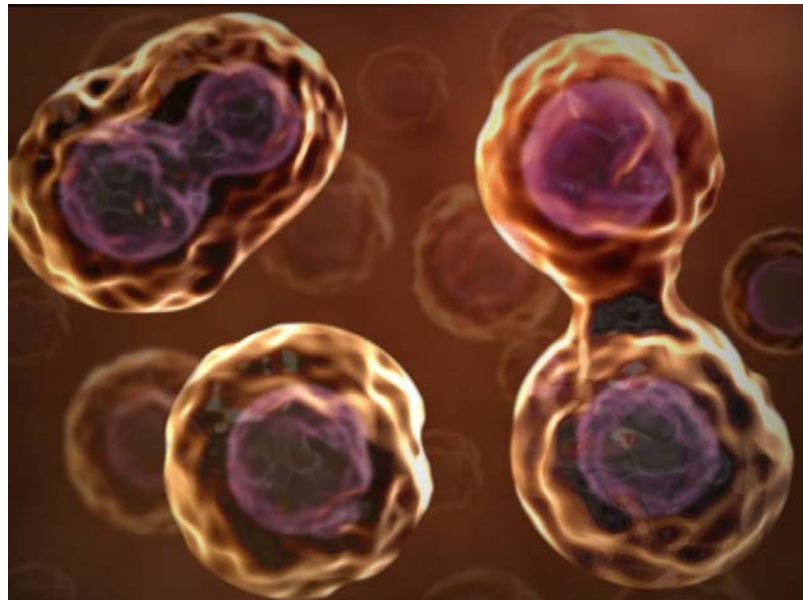
## КОМПЛЕМЕНТАРНОСТЬ

A T T C G G A T C G G A T T C C G  
 | | | | | | | | | | | | | | | |  
 T A A G C C T A G C C T A A G G C



5--TAGGCAT-3'  
3'-ATCCGTA-5'.

Цепи ДНК  
антипараллельны



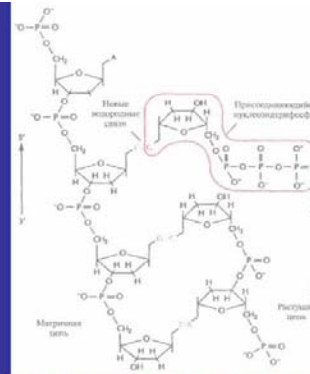
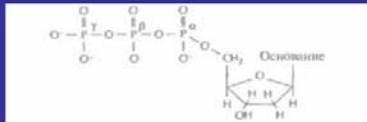
### Компоненты репликационного механизма

- Хеликаза – расплетает две комплементарные цепи ДНК
- SSB белок – препятствует реанилингу цепей ДНК
- Праймаза - синтезирует короткий олигонуклеотид – праймер (РНКовый)
- ДНК полимеразы – синтезируют комплементарную цепь ДНК на матрице одноцепочечной ДНК
- Sliding clamp - белок скользящей застёжки удерживает ДНК-полимеразу на матрице ДНК
- РНК-аза H – удаляет РНКовый праймер
- Лигаза – восстанавливает фосфодиэфирные связи между соседними нуклеотидами



# РЕПЛИКАЦИЯ

дезоксирибонуклеозид-5'- трифосфат

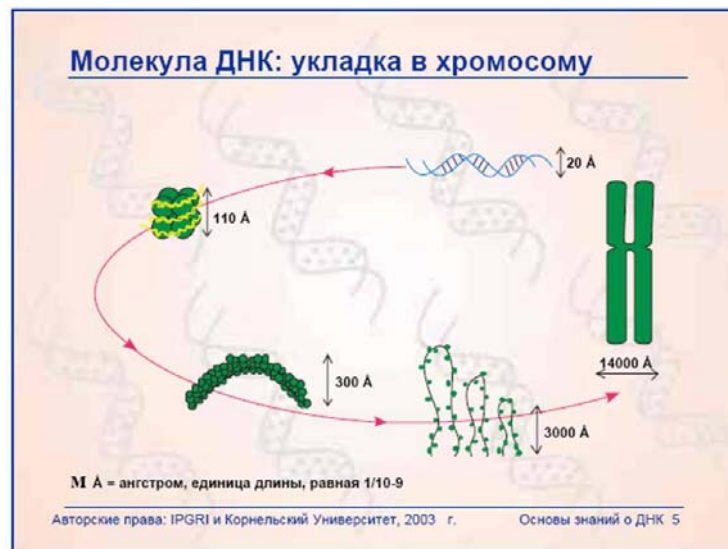


Согласно модели Уотсона—Крика, каждая цепь ДНК служит матрицей при синтезе новой комплементарной цепи, а последовательность оснований в синтезируемой (растущей) цепи задается последовательностью комплементарных оснований цепи-матрицы. Каждая мономерная единица, присоединяющаяся к растущей цепи, находится в форме дезоксирибонуклеозид-5'- трифосфата; фосфатная группа, связанная с 5'-углеродным атомом дезоксирибозы, обозначается буквой  $\alpha$ , к ней присоединены  $\beta$ -фосфат и далее —  $\gamma$ -фосфат. В ходе репликации  $\beta$ - и  $\gamma$ -фосфатные группы отщепляются в виде пирофосфата, а  $\alpha$ -фосфатная группа связывается с 3'-ОН-группой последнего нуклеотида растущей цепи

## Типы ДНК

- Геномная
- Плазмидная
- Цитоплазматическая
  - Митохондриальная
  - Хлоропластная
- Вирусная
- Фаговая

## Молекула ДНК: укладка в хромосому



## Молекулярная структура гена

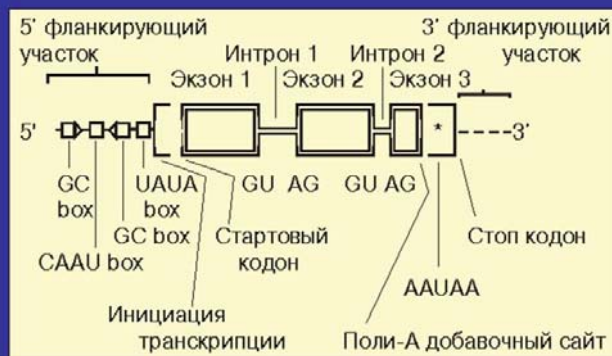
Традиционно, под геном в молекулярной биологии понимают участок ДНК кодирующий либо [белок](#), либо [молекулу РНК](#). Исследования последних лет заставили расширить этот список за счет [регуляторных генов](#) и возможно появление и других групп. И молекулярно биологическое определение гена тоже изменилось: ген - это ограниченный участок геномной ДНК (или РНК для некоторых вирусов) отвечающий за определенную и специфическую функцию.

Регуляторные гены как правило не транскрибируются. Белок-кодирующие и РНК-кодирующие транскрибируются и часто объединяются под названием "структурные гены".

## ГЕН

- фрагмент нуклеиновой кислоты, в последовательности нуклеотидов которой закодирована информация о последовательности нуклеотидов в другой нуклеиновой кислоте или аминокислотной последовательности в белке.
- наследуемая часть [генома](#), оказывающая влияние на какой-либо фенотипический признак. Эта формулировка по смыслу близка к [классическому определению](#) "один ген - один признак".
- С молекулярной точки зрения ген представляет собой специфическую нуклеотидную последовательность, транскрибируемую в РНК.

## Схема эукариотического гена



## ДНК-эукариот можно разделить на различные типы или классы:

- Однокопийные гены кодирования протеинов
- ДНК, представленная во множестве копий:
  - Последовательности с известной функцией
    - Кодирующие
    - Некодирующие
  - Последовательности с неизвестной функцией
    - Повторы (одиночные или в тандеме)
    - Транспозоны
- Промежуточная ДНК
  - В промежуточной ДНК можно обнаружить множество повторов. Они состоят из таких же последовательностей, которые обнаруживаются на многих участках, в особенности, в центромерах и теломерах. Повторы различны по размеру, количеству и степени распространения по геному, и это делает их очень подходящими для того, чтобы их можно было рассматривать в качестве молекулярных маркеров.

# РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ В ИЗУЧЕНИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ: Оценка межвидового разнообразия сельскохозяйственных культур с использованием технологии молекулярных маркеров.

*Абдуллаев А.А.*

к.б.н., старший научный сотрудник  
Центра Геномных Технологий ИГиЭБР АН РУз



**Оценка биоразнообразия сельхозкультур при помощи молекулярных маркеров.**

Докладчик: к.б.н. Абдуллаев А.А.  
Институт генетики и ЭБР АН РУз



## Генетическое разнообразие

- Генетическое разнообразие связано с изменчивостью в:
  - последовательности ДНК,
  - количестве ДНК в одной клетке, или
  - количестве и структуре хромосом.
- Генетическое разнообразие является результатом отбора, мутации, миграции, генетического дрейфа и/или рекомбинации генов. Все эти явления вызывают изменения в частоте генов и аллелей, и приводят к эволюции популяций





## Генетические ресурсы растений

---

- Генетические ресурсы растений включают в себя существующее генетическое разнообразие, представляющую собой потенциальную ценность для будущего всего человечества.
  
- Генетические ресурсы растений включают в себя:
  - Дикорастущие виды растений
  - Дикорастущих сородичей культурных растений
  - Традиционные и/или стародавние сорта
  - Районированные сорта, гибриды или селекционные линии
  
- Генетические ресурсы растений необходимо сохранять для их возможного использования в будущем

3

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Измерение генетической изменчивости

---

- Для эффективного сохранения и использования генетических ресурсов растений требуется тщательная оценка генетической изменчивости, которой они обладают.
  
- Генетическую изменчивость можно измерить на двух уровнях:
  - Фенотипа – сочетания индивидуальных признаков, определяющихся генотипом и его взаимодействием с окружающей средой
  - Генотипа – специфической генетической структуры организма

4

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Генетические маркеры: описание

- Генетические маркеры определяют характеристики фенотипа и/или генотипа особи
  
- Их наследование можно проследить через поколения

5

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Генетические маркеры: типы

- Морфологические признаки
  
- Молекулярные маркеры:
  1. Белковые (биохимические) маркеры
  2. ДНК маркеры

6

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Морфологические признаки

- **Преимущества:**
  - Легко доступны
  - Обычно требуется только простое оборудование
  - Являются наиболее прямым измерением фенотипа
- **Недостатки:**
  - Необходимость специальных знаний о культуре и/или виде
  - Подвержены воздействию окружающей среды
  - Ограниченность в количестве

7

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Белковые (биохимические) маркеры

- Основаны на свойстве перемещения протеинов, что позволяет выделять их посредством электрофореза.
- Обнаруживаются посредством специальных гистохимических анализов
- **Преимущества:**
  - Требуют относительно простое оборудование
  - Являются надежным дополнением к морфологической оценке изменчивости
- **Недостатки:**
  - Подвержены влиянию окружающей среды
  - Ограниченность в количестве

8

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## ДНК (молекулярные) маркеры

---

- Полиморфизмы, обнаруженные в последовательности ДНК ядра и органелл
- Преимущества:
  - Не подвержены воздействиям окружающей среды
  - Потенциально не ограничены в количестве
  - Объективно измеряют величину изменчивости
  -
- Основным недостатком является необходимость в использовании технически более сложного оборудования.

9

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



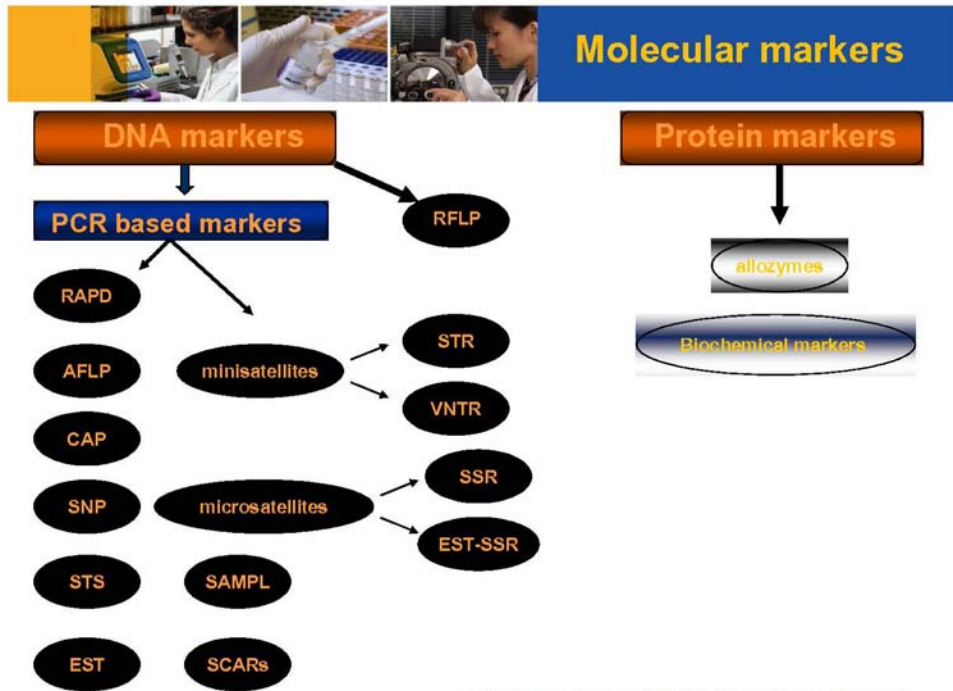
## ДНК маркеры: требования

---

- Полиморфность
- Воспроизводимость
- Кодоминантность
- Равномерное распределение по геному
- Высокая чувствительность
- Не подверженность влиянию окружающей среды
- Нейтральность
- Недорогие
- Простота определения

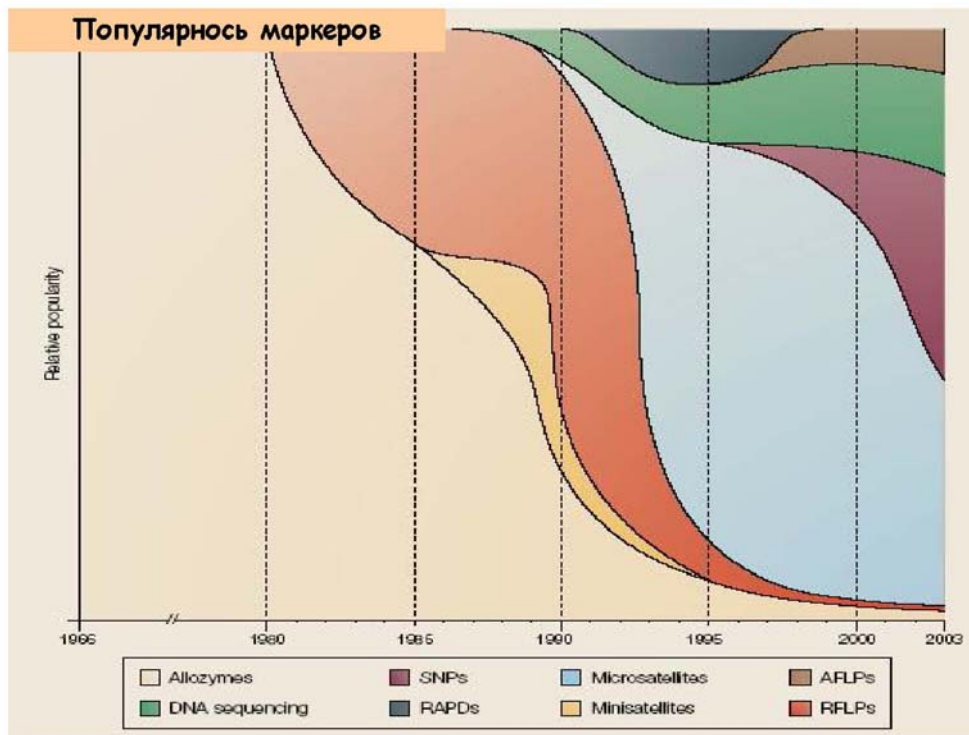
10

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



11

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий







## Применение молекулярных маркеров

- Изучение внутривидового и межвидового генетического разнообразия
- Исследование меж- и внутрипопуляционной генетической структуры
- Филогенетический и эволюционный анализ
- Выявление групп сцепления и создание генетических карт
- Изучение количественных признаков и их картирование
- Маркер-ассоциированная селекция (МАС)
- Паспортизация или ДНК-баркодинг (видов, сортов, линий)
- Идентификация личности

13

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Полиморфизм ДНК

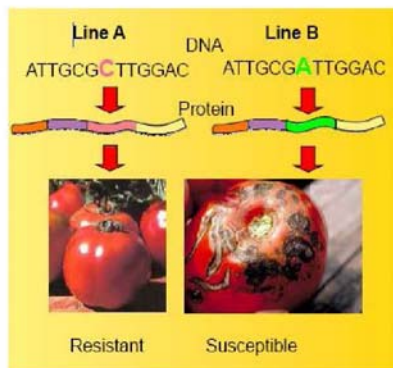
- В результате различных событий получаются различные варианты, более или менее сложные, в последовательности ДНК. Такие варианты обычно описывают как полиморфизм.
- Полиморфизм транслируется в различия генотипов – как это видно из различных профилей полос, обнаруживаемых при использовании соответствующих методов, а возможно, и фенотипов.
- Несколько событий могут вызвать полиморфизм:
  - Точковые мутации
  - Вставки или делеции
  - Перестройки

14

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Полиморфизм ассоциированный с фенотипом



Изменения могут затрагивать кодирующий регион  
 Регуляторную область  
 Не кодирующий регион  
 Изменения одного или нескольких нуклеотидов  
 Больших фрагментов ДНК  
 Хромосомные перестройки

**КАК ВЫЯВИТЬ ПОЛИМОРФИЗМЫ  
 СВЯЗАННЫЕ С ПРИЗНАКОМ?**

**КАК ПЕРЕНЕСТИ ПОЛЕЗНЫЙ ПРИЗНАК  
 И ЗАКРЕПИТЬ ЕГО?**

15

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



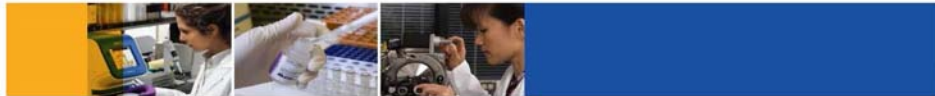
- Цели:**
1. Получение сортов сельскохозяйственных культур с ценными агрономическими признаками (урожайность, скороспелость, резистентность и т.д.)
  2. Маркер-ассоциированная селекция
  3. Сохранение биоразнообразия сельхозкультур и их диких сородичей как источник полезных генов

**Проблемы:**

1. Получение сортов традиционными методами селекции занимает в среднем от 10 до 15 лет
2. Большинство признаков являются количественными

16

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



### Задачи:

- Выявление регионов генома ассоциированных с проявлением интересующих признаков при помощи ДНК маркеров
- Локализация генов
- Клонирование генов и определение их нуклеотидной последовательности
- Функциональный анализ генов
- Интродукция полезных генов в элитные сорта растений

17

© 2009 Институт Генетики и ЗБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



### RFLP - Полиморфизм Длин Рестрикционных Фрагментов

На основе ПЦР:

Не требуется  
предварительной информации  
о геноме

RAPD - Произвольно-амплифицированная Полиморфная ДНК  
AFLP - Полиморфизм Длины Амплифицированного Фрагмента

Требуется  
предварительная информация  
о геноме

**SSR/STR** - Простые Повторяющиеся Последовательности/Короткие  
тандемные повторы

*SSCP* - Конформационный полиморфизм одноцепочечной ДНК

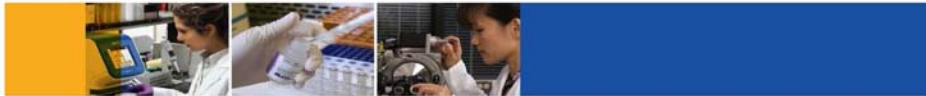
*CAPs* - Расщепленная Полиморфная Амплифицированная Последовательность

*SNP* - Полиморфизм Единичного Нуклеотида

18

© 2009 Институт Генетики и ЗБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий





## Локусы количественных признаков (QTL)

1. QTL – регион ДНК, где находится ген влияющий на проявление признака
2. Количественный признак можно измерить (высота растения, урожайность и т.д.)
3. Контролируется обычно более, чем одним геном
4. Может изменяться под влиянием внешних факторов
5. Изучают с помощью:
  - ДНК маркеров
  - Большой выборки популяции
  - Статистических и биоинформатических программ

19

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## **Пример: выявление локусов количественных признаков при помощи ДНК маркеров**

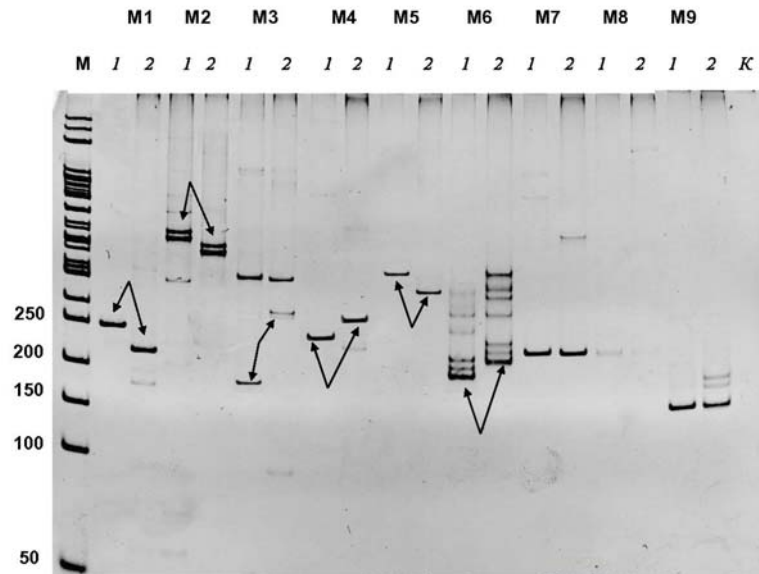
### Основные этапы:

- Отбор исходных родительских растений контрастных по интересующему признаку (скороспелый/позднеспелый,...)
- Получение гибридной популяции
- Фенотипическое описание F2 популяции
- Генотипирование родительских растений и потомства при помощи ДНК маркеров
- Выявление ассоциаций «маркер-признак»
- Статистическая обработка данных

20

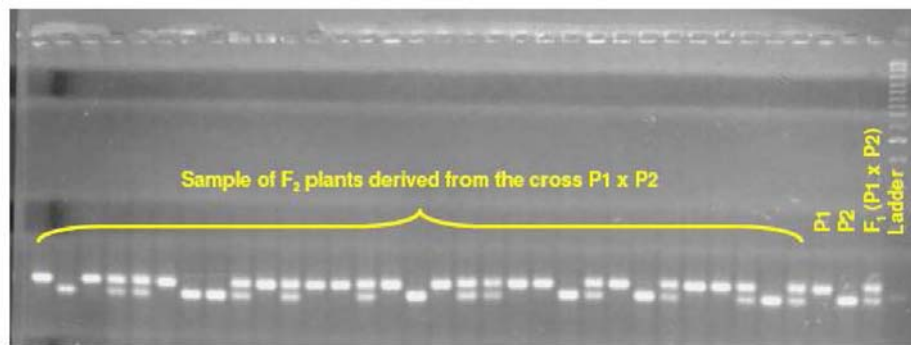
© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий

## Полиморфизм микросателлитных маркеров среди родительских растений



22

## Генотипирование популяции при помощи полиморфных маркеров

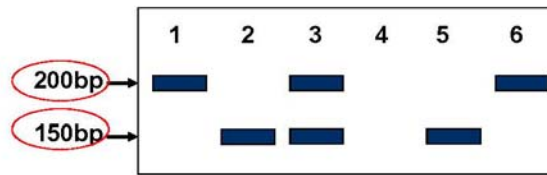


23

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



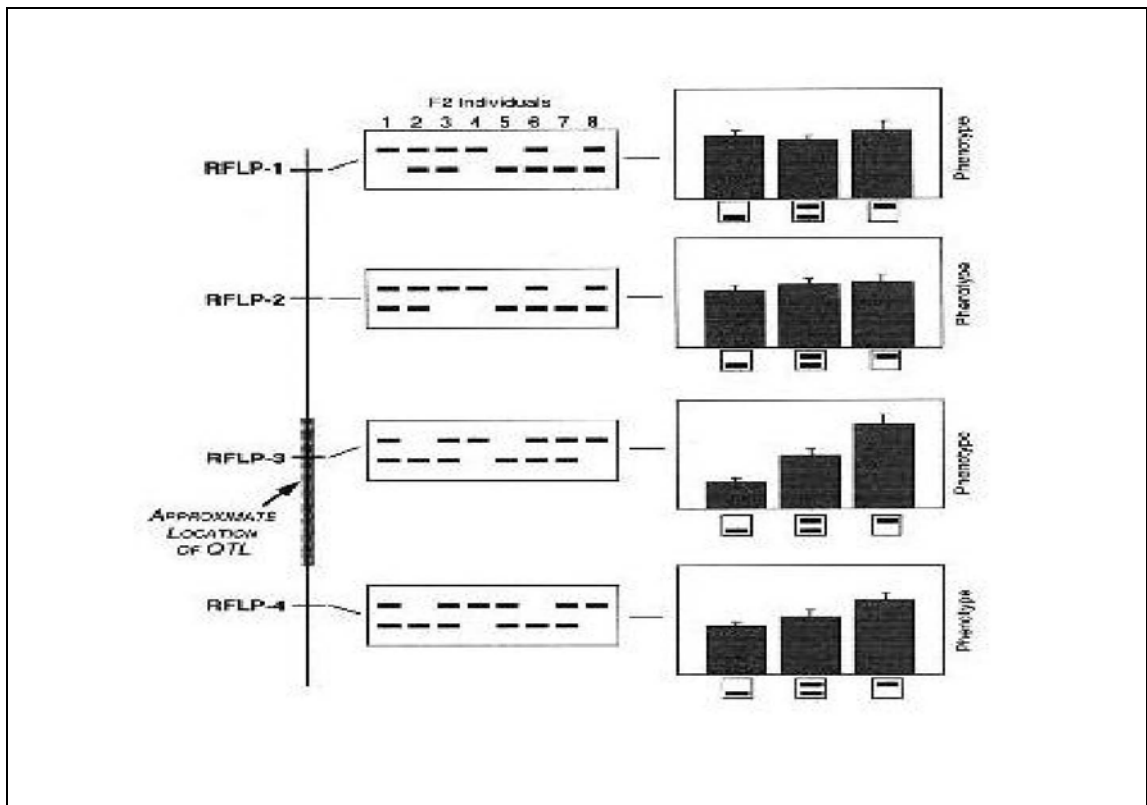
## Генотипирование и преобразование данных



	BNL1064_150	BNL1064_200
1	0	1
2	1	0
3	1	1
4	2	2
5	1	0
6	0	1

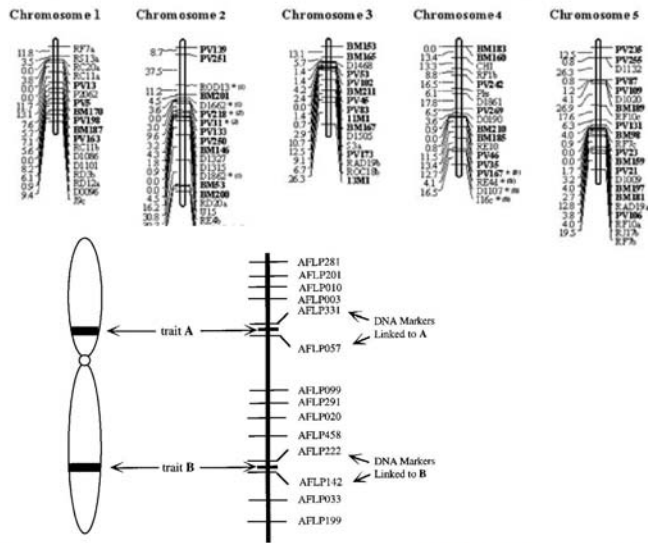
24

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



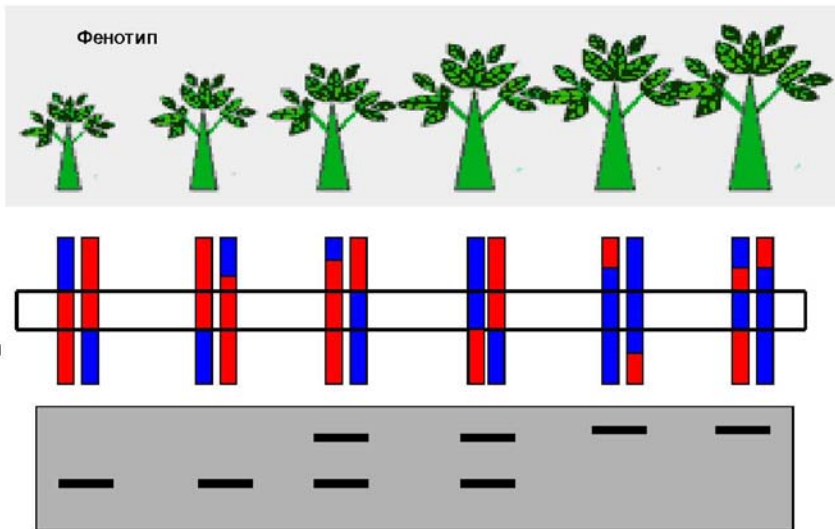


## Определение сцепления маркеров и признака



26

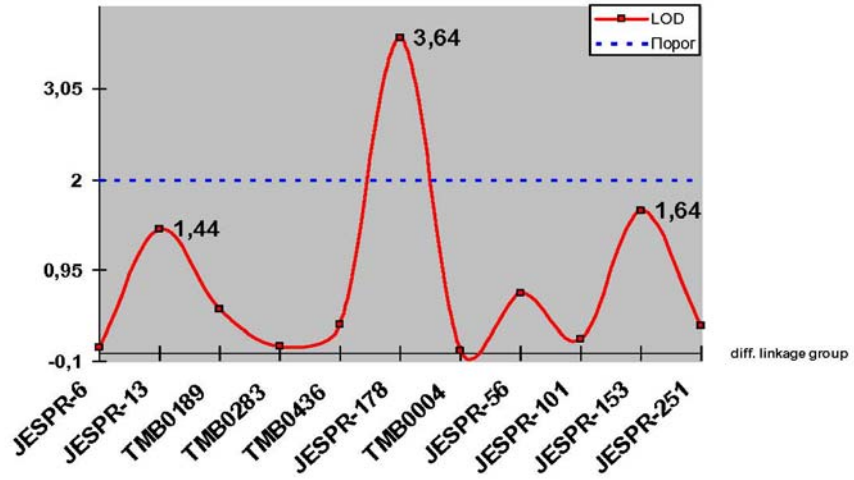
© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



27

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий

## Интервал картирование

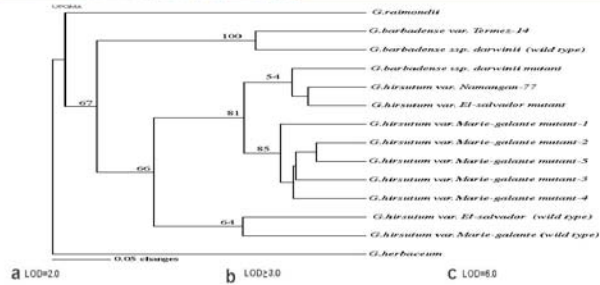


28

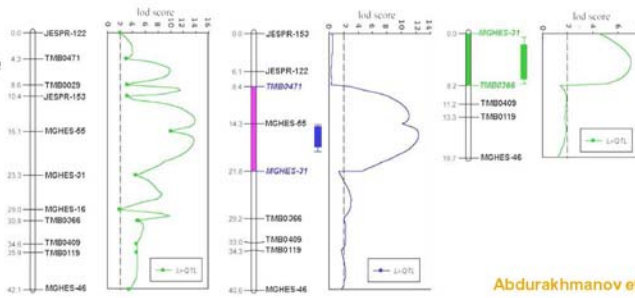
© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Филогения



## QTL-картирование



Abdurakhmanov et al., 2006

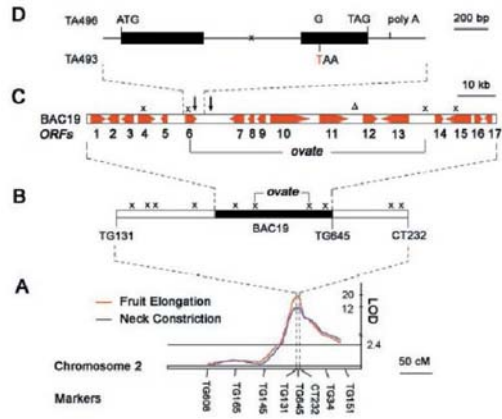
29

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий





## Молекулярное клонирование



Liu. et al. (2002)

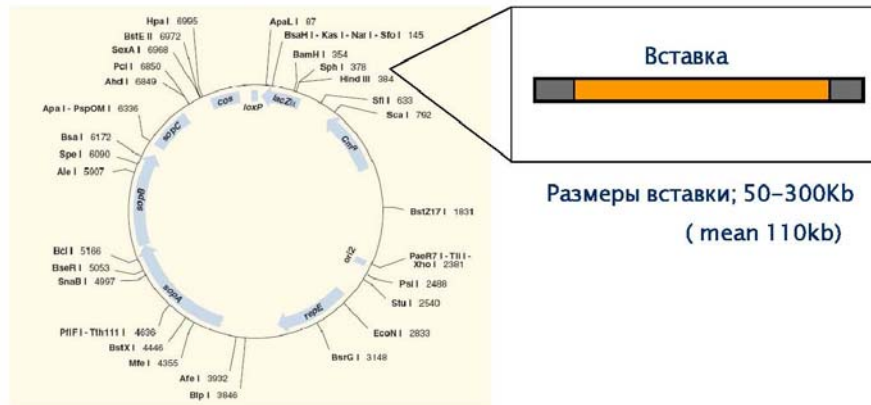
30

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Создание ВАС библиотек

### • ВАС вектор



31

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Биоинформатические программы для изучения комплексных признаков

**AMOVA**  
**Gmendel**  
**JoinMap**  
**Mapmaker/QTL**  
**MapQTL**  
**Map Manager**  
**QTL Cafй**  
**QTL Cartographer**

Analysis of Molecular Variance, Laurent Excoffier, U Geneva  
Jim Holloway & Steve J Knapp, (1992) *J Heredity* 81: 407.  
Van Ooijen & Roeland E. Voorrips, (1993) *Plant J* 3: 739-744.  
Lander *et al.* (1987) *Genomics* 1: 174-181.  
Van Ooijen, *Plant Genome IV* 1996.  
Manly, (1993) *Mammalian Genome* 4: 303-313  
G.G.Seaton, U Birmingham, UK  
Chris Basten *et al.*, Program in Statistical Genetics, Dep. of Statistics, NC St U.

- Карты генетического сцепления
- Картирование локусов полигенных количественных признаков в скрещиваниях F2 и BC1, рекомбинантно-инбредных линиях (RIL)
- Непараметрическое картирование
- Интервал картирование
- Аддитивные и доминантные эффекты, эпистаз, плейотропия, множественные аллели, плоидность, связь гена и окружающей среды

32

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Микросателлиты, SNP, RFLP, AFLP, RAPD, EST (примеры)

**Виноград:** Устойчивость к патогенным грибам (Salakhutdinov *et al.*, Deutsches Weinbaujahrbuch. -2003.- S. 53-64; Fischer *et al.*, 20041. *Theoretical Applied Genetics* -2004.-N108.-p.501 - 515 )

**Какао:** Урожайность, калорийность и устойчивость к патогенам (Clement *et al.* *Genome/Gйnome*.- 2003.-N46(2).-p.204-212)

**Картофель:** Содержание фруктозы и сахарозы, локализованные на всех хромосомах (Menendez *et al.*, 2002).

**Кукруза:** урожайность, генетическое родство инбредных линий (Smith, *Maydica* 2000, 45:235-241; Pejlic, *Theor App Genet* 1998, 97:1248- 1255)

**Пшеница:** Устойчивость к септориозу, ржавчине (Beat Keller *et al.*, *Plant and Animal Genome* 2004.-p.334-35)

**Рис:** Засухоустойчивость и др. (Price *et al.* *Plant Molecular Biology* -2002.-N48.-p. 683-695; Brondani *et al.* *Theoretical Applied Genetics*, 2002.-N104 (6-7).p.1192-1203)

**Соя:** Содержание протеинов и масла, время созревания и высота растения (Zhang *et al.*, 2004. *Theoretical Applied Genetics*. 2004.-N108(6).p.1131-1139).

**Томат:** Скороспелость, грушевидность (Liu. *et al.* 2002.PNAS 99(20): 13302-13306; Doganlar *et al.*, 2000*Theor. Appl.Genet.*- 2000.- N100.- p249-255 )

**Хлопчатник:** Естественная ранняя листопадность, прочность волокна (Abdurakhmonov I, Abdullaev A. A. . *Journal of Heredity*//2005 – 96(6) 644-653. Guo *et al.*, 2003. *Crop Science*. -2003.-N43.- p.2252-2256)

33

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



34

## Simple Sequence Repeat Marker Associated with a Natural Leaf Defoliation Trait in Tetraploid Cotton

A. ABDULLAEV, I. Y. ABDURAKHMONOV, S. SAHA, Z. T. BURIEV, D. ARIJANOV, Z. KURBAZOV, G. T. MUKLONOV, S. M. RIZAEVA, U. K. RIZOV, J. N. JENKINS, A. ABDULLAEV, AND A. ABDUKARIMOV

Laboratory of Genetic Engineering and Biotechnology, Institute of Genetics and Plant Experimental Biology, Academy of Sciences of Uzbekistan, Yulgori Yul, Qibray Region, Tashkent District, 702151 Uzbekistan (Abdullayev, Abdullayev, Buriev, Arijanov, Kurbafov, Muklonov, Rizayeva, Abdullayev, Abdullayev, Abdullayev); USDA-ARS, Crop Science Research Laboratory, Genetics and Precision Agriculture Research Unit, P. O. Box 5367, 8120 Highway 12E, Mississippi State, MS 39762 (Saha and Jenkins); and Department of Biology, 103 Hardin Hall, West Virginia State University, Institute, WV 26112 (Rizov)

Address correspondence to I. Y. Abdurakhmonov at the address above, or e-mail: abdurakhmonov@genet.uz

### Abstract

Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaf defoliation has a significant ecological and economical impact on cotton production. Thus the utilization of a natural leaf defoliation trait, which exists in wild diploid cotton species, in the development of tetraploid cotton will not only be cost-effective, but will also facilitate production of very high grade fiber. The primary goal of our research was to tag the trait associated with natural leaf defoliation using microsatellite markers in 13 tetraploid cottons. The  $F_2$  population developed from reciprocal crosses between the two parental cotton lines—AN-Rosewood 2 ( $2n = 52$ , a late leaf defoliation type) and Lonsdale Bally ( $2n = 52$ , a naturally early leaf defoliation type)—demonstrated that the naturally early leaf defoliation trait has heritability values of 0.74 and 0.84 in the reciprocal  $F_2$  population. The observed phenotypic segregation difference in reciprocal crosses suggested a major cytoplasmic effect in the phenotypic expression of the naturally early leaf defoliation trait. Results from the Kosambi-Wallis (KW) complement test revealed that JESPR13 (SCW = 43.77), JESPR13 (SCW = 3.97), and JESPR179 (SCW = 13.45) simple sequence repeat (SSR) markers are significantly associated with natural leaf defoliation in the mapping population having stable estimates at empirically obtained critical thresholds ( $P < 0.0001$ ). JESPR179 revealed the highest estimates ( $P < 0.0001$ ) for association with the natural leaf defoliation trait, exceeding maximum empirical threshold values. JESPR179 was assigned to the short arm of chromosome 18, suggesting indirectly that genes associated with natural leaf defoliation might be located on this chromosome. This microsatellite marker may have the potential for use to introgress the naturally early leaf defoliation quantitative trait loci (QTL) from the donor line, Lonsdale Bally to commercial varieties of cotton through marker-assisted selection programs.

In cotton (*Gossypium hirsutum* L.), leaf defoliation is one of the important components of worldwide cotton management for producing cotton fiber with superior quality. Defoliation enhances and speeds boll opening, accelerates the harvesting time, improves fiber grades, and often reduces field size. Proper timing of defoliation is challenging, as reduced field and fiber quality may be caused by defoliation at the incorrect time. Improper use of defoliating agents and time of crop removal significantly affect fiber length, length uniformity, and fiber strength (Janson et al. 2002). The harmful effects of premature defoliation on wild and fiber quality have also been studied (Shaner and Baskin 1994). Thus determination of the proper defoliation time for each environment is very important. In addition, defoliating chemicals are very costly and can be harmful to the environment through accumulation of chemicals in the soil and pollution of drinking water. One of the approaches to overcome these challenges in cotton defoliation is the development of naturally early leaf defoliation cotton varieties through introgression of the trait from certain diploid *Gossypium* species. Several wild diploid cotton species have the naturally early leaf defoliation trait (e.g., *Gossypium darwinii*, *Gossypium arboreum*, *Gossypium hirsutum*, and *Gossypium leucomiscum* leaves close to the time of boll opening [Frywall 1976]). Cotton is the primary economic monocult in Uzbekistan. The development of natural leaf defoliation varieties is one

444

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АН РУз, Центр Геномных Технологий



## ARTICLE IN PRESS

YGENO-08016; No. of pages: 10; 4C; 3, 5, 6

Genomics xxx(2008) xxx-xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Genomics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ygeno



## Molecular diversity and association mapping of fiber quality traits in exotic *G. hirsutum* L. germplasm

I.Y. Abdurakhmonov<sup>a,\*</sup>, R.J. Kohel<sup>b,1</sup>, J.Z. Yu<sup>b,1</sup>, A.E. Pepper<sup>c,2</sup>, A.A. Abdullaev<sup>a</sup>, F.N. Kushanov<sup>a</sup>, I.B. Salakhutdinov<sup>a</sup>, Z.T. Buriev<sup>a</sup>, S. Saha<sup>d,3</sup>, B.E. Scheffler<sup>c</sup>, J.N. Jenkins<sup>d</sup>, A. Abdulkarimov<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Center of Genomic Technologies, Institute of Genetics and Plant Experimental Biology, Academy of Sciences of Uzbekistan, Yulgori Yul, Qibray region Tashkent district, 702151, Uzbekistan

<sup>b</sup> USDA-ARS, Crop Germplasm Research Unit, 2801 175th Road College Station, TX 77845, USA

<sup>c</sup> Department of Biology, Texas A&M University, College Station, Texas 77843, USA

<sup>d</sup> USDA-ARS, Crop Science Research Laboratory, Genetics and Precision Agriculture, P. O. Box 5367, 8120 Highway 12E, Mississippi State, MS 39762, USA

\* USDA-ARS, 141 Experiment Station Road, Stoneville, MS 38776, USA

### ARTICLE INFO

Article history:  
Received 29 January 2008  
Accepted 29 July 2008  
Available online xxx

Keywords:  
Cotton germplasm  
Genetic diversity

35

### ABSTRACT

The narrow genetic base of cultivated cotton germplasm is hindering the cotton productivity worldwide. Although potential genetic diversity exists in *Gossypium* genus, it is largely 'underutilized' due to photoperiodism and the lack of innovative tools to overcome such challenges. The application of linkage disequilibrium (LD)-based association mapping is an alternative powerful molecular tool to dissect and exploit the natural genetic diversity conserved within cotton germplasm collections, greatly accelerating still 'beginning' cotton marker-assisted selection (MAS) programs. However, the extent of genome-wide linkage disequilibrium (LD) has not been determined in cotton. We report the extent of genome-wide LD and

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АН РУз, Центр Геномных Технологий





Молекулярный анализ проведён на **288** образцах хлопчатника

Экзотические разновидности	208
Мексика	25
Африка	53
Контроль (TM1 и 3-79)	2

**Маркеры - 125 SSR**

Немеченые 95

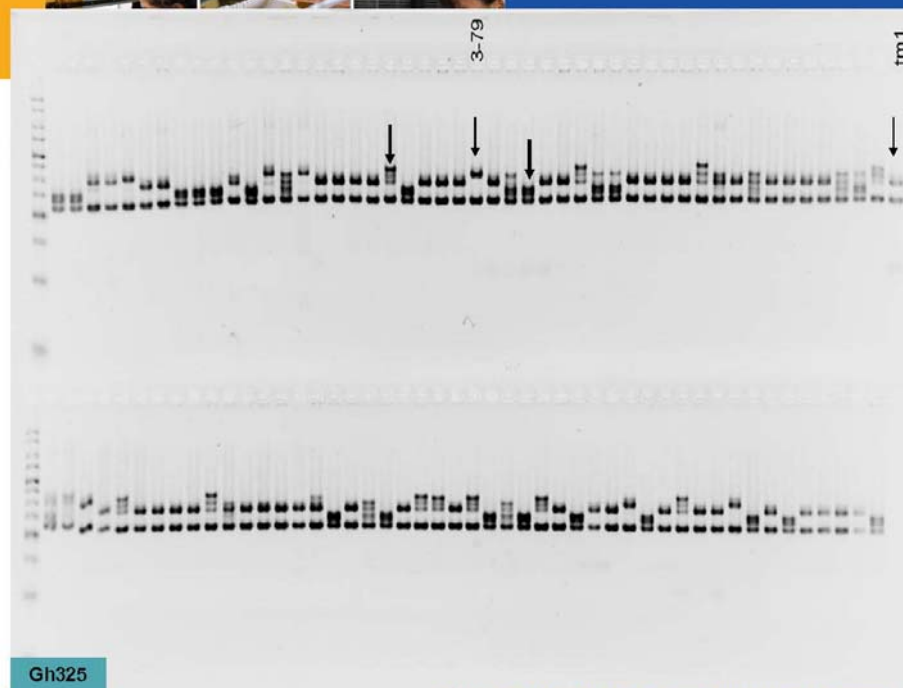
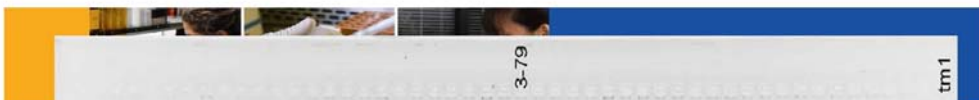
BNL 10  
GH 33  
NAU 9  
TMB 43

Меченые 30

BNL 12  
CIRAD 18

36

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий

GeneMapper Project: CIR19and212 Wild 123

File Edit Analysis View Tools Help

Table Setting: RIL

Genotypes

Sample Name	Panel	Marker	Allele 1	Allele 2	Allele 3	Allele 4	Size 1	Size 2	Size 3	Size 4	QQ
1 778	CIR19and212	CIR 19	173	178			172.11	178.57			●
2 778	CIR19and212	CIR 212	142	142	159	?	140.17	142.21	158.21	168.2	●
3 779	CIR19and212	CIR 19	?	167	167	173	161.08	165.31	167.65	172.13	●
4 779	CIR19and212	CIR 212	142	159	?	?	140.14	158.24	168.18	172.46	●
5 781	CIR19and212	CIR 19	167	173	178		167.95	172.12	178.48		●
6 781	CIR19and212	CIR 212	142	159	?	?	140.14	158.15	167.87	172.28	●
7 796	CIR19and212	CIR 18	167	173	178		164.47	172.16	178.68		●
8 796	CIR19and212	CIR 212	?	142	?	?	131.77	140.23	168.31	172.57	●
9 103	CIR19and212	CIR 19	?	?	167	173	158.17	161.14	167.77	172.05	●
10 103	CIR19and212	CIR 212	142	159	?	?	140.39	157.86	168.1	172.38	●
11 106	CIR19and212	CIR 19	?	?	167	173	129.22	158.36	167.77	172.02	●
12 106	CIR19and212	CIR 212	142	159	?	?	140.14	158.02	172.43	178.84	●
13 111	CIR19and212	CIR 19	?	?	?	167	127.18	155.13	160.41	167.85	●
14 111	CIR19and212	CIR 212	142	159	159	?	140.19	158.0	160.24	168.18	●
15 117	CIR19and212	CIR 19	?	167	173	178	158.24	167.84	172.03	178.5	●
16 117	CIR19and212	CIR 212	142	159	?	?	140.24	157.92	168.17	172.45	●
17 123	CIR19and212	CIR 18	?	?	173	178	127.11	168.16	172.07	178.59	●
18 123	CIR19and212	CIR 212	142	159	?	?	140.27	158.25	168.21	172.66	●
19 98	CIR19and212	CIR 19	?	167	173	178	133.95	167.75	172.06	178.44	●
20 98	CIR19and212	CIR 212	?	142	159	?	134.26	140.06	158.02	168.0	●
21 240	CIR19and212	CIR 19	167	173	178		168.05	172.23	178.7		●
22 240	CIR19and212	CIR 212	142	159	?	?	140.34	158.44	168.13	178.78	●
23 483	CIR19and212	CIR 19	?	167	173	178	155.59	165.16	172.19	178.71	●
24 483	CIR19and212	CIR 212	142	159	?	?	140.25	158.3	168.27	172.51	●
25 487	CIR19and212	CIR 18	?	?	?	?	125.23	128.48	155.66	158.36	●
26 487	CIR19and212	CIR 212	?	142	159	?	127.8	140.3	158.05	168.46	●
27 506	CIR19and212	CIR 19	?	167	173	178	158.36	168.14	172.32	178.7	●
28 506	CIR19and212	CIR 212	142	159	?	?	140.31	158.13	168.22	172.66	●

Progress Status ...

GeneMapper 3.0

GeneMapper Project: CIR19and212 Wild 123

File Edit Analysis View Tools Help

Table Setting: RIL

Project

Name	Analysis Method	Panel	Size Standard	Run Name	Run Date & Time	REF	SGI	SFNF	MNF	SNF	OS	SQ	UD
1	SSR fragment analysis	CIR19and212 Wild 123	GS400HD	Run_demo	2005-08-18 16:58			■	■	■	▲	●	
2	SSR fragment analysis	CIR19and212 Wild 123	GS400HD	Run_demo	2005-08-18 16:58			■	■	■	▲	●	
3	SSR fragment analysis	CIR19and212 Wild 123	GS400HD	Run_demo	2005-08-18 16:58			■	■	■	▲	●	
4	SSR fragment analysis	CIR19and212 Wild 123	GS400HD	Run_demo	2005-08-18 16:58			■	■	■	▲	●	
5	SSR fragment analysis	CIR19and212 Wild 123	GS400HD	Run_demo	2005-08-18 16:58			■	■	■	▲	●	
6	SSR fragment analysis	CIR19and212 Wild 123	GS400HD	Run_demo	2005-08-18 16:58			■	■	■	▲	●	
7	SSR fragment analysis	CIR19and212 Wild 123	GS400HD	Run_demo	2005-08-18 16:58			■	■	■	▲	●	
8	SSR fragment analysis	CIR19and212 Wild 123	GS400HD	Run_demo	2005-08-18 16:58			■	■	■	▲	●	
9	SSR fragment analysis	CIR19and212 Wild 123	GS400HD	Run_demo	2005-08-18 16:58			■	■	■	▲	●	
10	SSR fragment analysis	CIR19and212 Wild 123	GS400HD	Run_demo	2005-08-18 16:58			■	■	■	▲	●	
11	SSR fragment analysis	CIR19and212 Wild 123	GS400HD	Run_demo	2005-08-18 16:58			■	■	■	▲	●	
12	SSR fragment analysis	CIR19and212 Wild 123	GS400HD	Run_demo	2005-08-18 16:58			■	■	■	▲	●	
13	SSR fragment analysis	CIR19and212 Wild 123	GS400HD	Run_demo	2005-08-18 16:58			■	■	■	▲	●	
14	SSR fragment analysis	CIR19and212 Wild 123	GS400HD	Run_demo	2005-08-18 16:58			■	■	■	▲	●	
15	SSR fragment analysis	CIR19and212 Wild 123	GS400HD	Run_demo	2005-08-18 16:58			■	■	■	▲	●	
16	SSR fragment analysis	CIR19and212 Wild 123	GS400HD	Run_demo	2005-08-18 16:58			■	■	■	▲	●	
17	SSR fragment analysis	CIR19and212 Wild 123	GS400HD	Run_demo	2005-08-22 11:08			■	■	■	▲	●	
18	SSR fragment analysis	CIR19and212 Wild 123	GS400HD	Run_demo	2005-08-22 11:08			■	■	■	▲	●	
19	SSR fragment analysis	CIR19and212 Wild 123	GS400HD	Run_demo	2005-08-22 11:08			■	■	■	▲	●	
20	SSR fragment analysis	CIR19and212 Wild 123	GS400HD	Run_demo	2005-08-22 11:08			■	■	■	▲	●	
21	SSR fragment analysis	CIR19and212 Wild 123	GS400HD	Run_demo	2005-08-22 11:08			■	■	■	▲	●	
22	SSR fragment analysis	CIR19and212 Wild 123	GS400HD	Run_demo	2005-08-22 11:08			■	■	■	▲	●	
23	SSR fragment analysis	CIR19and212 Wild 123	GS400HD	Run_demo	2005-08-22 11:08			■	■	■	▲	●	
24	SSR fragment analysis	CIR19and212 Wild 123	GS400HD	Run_demo	2005-08-22 11:08			■	■	■	▲	●	
25	SSR fragment analysis	CIR19and212 Wild 123	GS400HD	Run_demo	2005-08-22 11:08			■	■	■	▲	●	
26	SSR fragment analysis	CIR19and212 Wild 123	GS400HD	Run_demo	2005-08-22 11:08			■	■	■	▲	●	
27	SSR fragment analysis	CIR19and212 Wild 123	GS400HD	Run_demo	2005-08-22 11:08			■	■	■	▲	●	
28	SSR fragment analysis	CIR19and212 Wild 123	GS400HD	Run_demo	2005-08-22 11:08			■	■	■	▲	●	
29	SSR fragment analysis	CIR19and212 Wild 123	GS400HD	Run_demo	2005-08-22 11:08			■	■	■	▲	●	

Progress Status ...



40

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий

Microsoft Excel - Markers62

Введите вопрос

Англ

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1		BNL1030_240	BNL1030_260	BNL1030_260	BNL1030_275	BNL1030_265	Gh302_260	Gh302_275	Gh302_300	Gh325_110	Gh325_125	Gh325_135	Gh325
2	002_1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0
3	003_2	2	2	2	2	2	0	1	0	1	1	0	0
4	004_3	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0
5	005_4	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0
6	006_5	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0
7	007_6	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1
8	008_7	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1
9	009_8	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0
10	010_9	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0
11	011_10	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0
12	012_11	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1
13	013_12	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0
14	014_13	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
15	015_14	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1
16	016_15	0	1	0	1	0	2	2	2	1	0	0	0
17	017_16	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1
18	018_17	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1
19	019_18	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1
20	020_19	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1
21	021_20	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1
22	022_21	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0
23	023_28	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1
24	024_30	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1
25	025_33	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1
26	026_3-79	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0
27	027_35	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1
28	028_38	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0
29	029_40	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0
30	030_47	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1
31	031_48	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1
32	032_49	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1
33	033_52	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0
34	034_53	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0
35	035_55	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1

Готово

nyok

Microsoft... DATA report... Microsoft... EN

19:09



## Результаты

### Выявлена значительная корреляция среди различных параметров волокна

Table 2  
Correlation of fiber quality traits from Mexican environment

TRAITS	MIC	UHM	UI	STR	ELO	RD
MIC	1					
UHM	-0.49****	1				
UI	-0.09	0.44****	1			
STR	-0.32****	0.69****	0.29****	1		
ELO	-0.02	-0.11	0.09	-0.29****	1	
RD	0.09	0.28****	0.22**	0.32****	-0.03	1

MIC—Micronaire; UHM—fiber length; UI—uniformity; STR—fiber strength; ELO—elongation; RD—reflectance. \*\*, \*\*\*\*,  $p \leq 0.01, 0.001$ , respectively.

42

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Результаты

### Summary of SSR polymorphisms

Accession panels	No. of taxa	No. of polymorphic SSRs				Polymorphic Information Content (PIC)	
		Overall (%)	Unique (%)	Rare (%)	Average allele/locus	Range	Average
Exotic panel	287*	373	3	49	4	0.007–0.38	0.122
Exotic landraces only	208**	370	3	43	4	0.01–0.38	0.134
Mexican and African variety group	78**	161	0.6	36	2	0.02–0.37	0.160

\* panel included *G. hirsutum* (TM-1) and *G. barbadense* (3–79) controls.

\*\* panel included only *G. hirsutum* (TM-1) control.

182 SSR (~49%) аллели были редкими и представлены 5% образцов коллекции. Остальные 181 (48%) аллели SSR, были высокополиморфны

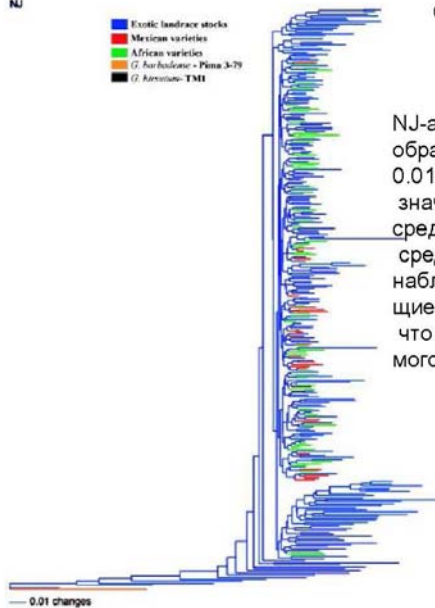
43

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий





- NJ
- Exotic landrace stocks
  - Mexican varieties
  - African varieties
  - *G. hirsutum* - Pima 3-79
  - *G. hirsutum* - TMI



## Филогенетический анализ коллекции гермплазмы Узбекистана

NJ-анализ выявил генетическое расстояние (GD) среди образцов *G. hirsutum*, которое в целом варьировало 0.01–0.50, со средним значением 0.13, что указывает на значительное генетическое разнообразие. Общее ГР среди экзотических образцов составило 0.02–0.50, со средним значением 0.26. Наименьшие расстояния наблюдались среди образцов коллекции представляющие Мексиканскую и Африканскую группы (0.07–0.08), что указывает на узкую генетическую базу культивируемого хлопчатника в этих двух различных экотипах.

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Интернет ресурсы по молекулярному изучению геномов растений

<http://plantgenomics.tigr.org>

<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/plant.repeats>





46

Институт Генетики и ЭБР АНУЗ, Центр Геномных Технологий



## Выводы

- Определение стратегий для лучшего сохранения и использования требует оценки изменчивости, происходящей в генетических ресурсах
- Величину генетического разнообразия можно измерить посредством использования генетических маркеров – морфологических, биохимических и молекулярных
- Ни один из маркеров не отвечает всем желательным характеристикам
- Выбор метода зависит от характера рассматриваемого биологического аспекта

Спасибо за внимание!



48

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



Marker type	Mode of inheritance		Level of genetic variability	Function
	Mode of transmission	Mode of gene action		
<i>AFLP® fingerprint</i>	biparental nuclear, many loci, unknown no. alleles per locus	dominance at some loci, co-dominance at others	hypervariable, i.e. each individual has unique banding pattern	unknown
<i>Nuclear microsatellites</i>	biparental nuclear, few loci, many alleles per locus	co-dominance, with exception of null alleles at some loci	large variation within populations, low differentiation between populations	non-coding, may contribute to genome stability
<i>Chloroplast microsatellites</i>	uniparental (maternal in angiosperms, paternal in conifers), pseudo-haploid, single locus, many alleles per locus	each cytotype is expressed	low variation within populations, large differentiation between populations	non-coding
<i>Mitochondrial intron marker</i>	uniparental (maternal), pseudo-haploid, single locus, many alleles per locus	each cytotype is expressed	low variation within populations, large differentiation between regions	non-coding
<i>ITS of ribosomal DNA</i>	biparental nuclear, several loci, several alleles per locus	co-dominance	high variability, even within a single individual	non-coding
<i>cDNA markers</i>	biparental nuclear, one to a few loci, few alleles per locus	co-dominance	low variation within populations, low differentiation between populations	functional differences possible between alleles of a locus
<i>Isoenzymes (for comparison)</i>	biparental nuclear, 1-5 loci, 1-7 alleles per locus	co-dominance, with exception of null alleles at some loci	low to medium variation within populations, low differentiation between populations	functional differences possible between alleles of a locus

49

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий

# ВВЕДЕНИЕ В МОЛЕКУЛЯРНУЮ ГЕНЕТИКУ И ЕЕ МЕТОДОЛОГИЮ

*Абдуллаев А.А.*

к.б.н., старший научный сотрудник  
Центра Геномных Технологий ИГиЭБР



**Введение в молекулярную генетику и методологию.**

Докладчик: к.б.н.Абдуллаев А.А.

Институт генетики и ЭБР АН Рuz, Центр геномных технологий



1859	Charles Darwin	публикация «О происхождении видов» принципы расщепления и независимого наследования признаков
1865	Gregor Mendel	
1869	Friedrich Miescher	открытие ДНК
1900	H. de Vries, C.Correns, E. von Tschermak	перевоткрытие законов Менделя
1902	Archibald Garrod	о генетической природе заболеваний человека
1902	Walter Sutton, Theodor Boveri	предложили хромосомную теорию
1910-1916	Thomas Hunt Morgan, C. Bridges	гены расположены на хромосомах
1913	A.H. Sturtevant	сконструировал первую генетическую карту
1927	H.J. Muller	индуцировал мутации рентгеновскими лучами
1931	H.Creighton, Barbara McClintock	физические доказательства рекомбинации
1941	G. Beadle, E.L. Tatum	гипотеза один ген – один фермент
1944	O. Avery, C. McLeod, M.McCarty	ДНК – носитель генетической информации
1953	James Watson, Francis Crick	расшифровка структуры ДНК
1958	M. Meselson, F.Stahl	доказательства полуконсервативной репликации ДНК
1961	S.Brenner, F.Jacob, M.Meselson	открытие мРНК, теория оперона
1966	M.Nirenberg, G.Khorana	завершение расшифровки генетического кода
1970	Hamilton Smith	открытие ферментов – рестриктаз
1972	Paul Berg	первая рекомбинантная ДНК in vitro
1972	Gobind Khorana	синтез полноразмерного гена тРНК
1973	H.Boyer, S.Cohen	первое применение плазмид для клонирования ДНК
1977	W. Gilbert and F. Sanger	метод секвенирования ДНК
1977	F.Sanger, P.Sharp, R. Roberts и др.	открытие интронов
1988	Kary Mullis	разработка метода ПЦР
1995	C.Venter, H.Smith	секвенирование первых геномов: <i>Haemophilus influenzae</i> и <i>Mycoplasma genitalium</i>
1997	F. Blattner, T. Honuchi и др.	секвенирование генома <i>Escherichia coli</i>
1997	Ian Wilmut и др.	клонировали овечку Долли из клеток молочной железы
2001	C.Venter, F.Collins и др.	расшифрован геном человека





## Как возникла молекулярная биология?

- Микроскопия зародилась в 1665 г.
- Robert Hooke (1635-1703) выявил, что организмы состоят из клеток
- Matthias Schleiden (1804-1881) и Theodor Schwann (1810-1882) продолжили изучение клеток 1830-х г.



• Robert Hooke



• Matthias Schleiden



• Theodor Schwann

3

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Основные события молекулярной биологии в 1800 - 1870

- **1865** Gregor Mendel открыл основные правила наследования признаков у гороха
  - Каждый организм имеет две альтернативные наследственные единицы определяющие признак (**доминантный признак** v.s. **рецессивный признак**)
- **1869** Johann Friedrich Miescher Открыл ДНК (вещество ядра) и назвал ее нуклеином



Mendel: Отец генетики



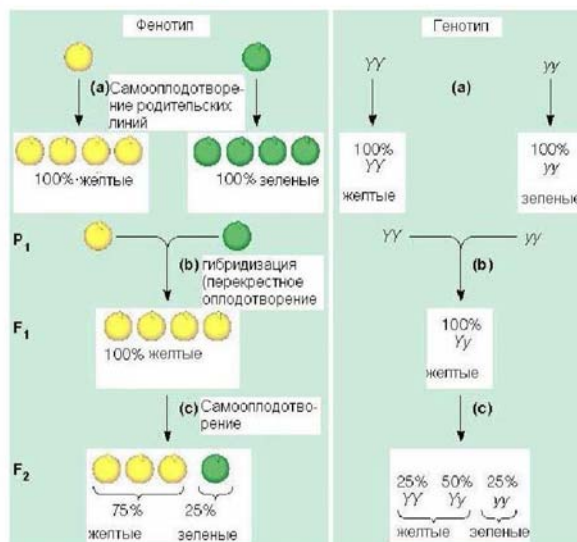
Johann Miescher

4

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Эксперимент Менделя



5

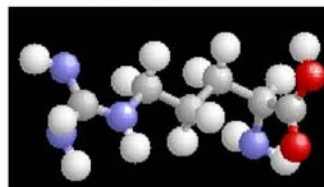
Copyright © 2005 Pearson Education, Inc. publishing as Benjamin Cummings

еномных Технологий



## Основные события молекулярной биологии в 1880 - 1900

- **1881** Edward Zacharias доказал, что в нуклеине присутствуют хромосомы
- **1899** Richard Altmann переименовал нуклеин в нуклеиновую кислоту (так же открыл – митохондрии)
- К **1900**, определена химическая структура 20 основных аминокислот



6

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий





## Основные события молекулярной биологии в 1900-1911

- **1902** - Emil Hermann Fischer получил Нобелевскую премию: аминокислоты соединяются и формируют белки
- **1911** – Thomas Hunt Morgan открыл гены в хромосомах, являющиеся дискретными единицами наследственности
- **1911** Pheobus Aaron Theodore Levene изучил ДНК и РНК



Emil Fischer



Thomas Morgan

7

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Основные события молекулярной биологии в 1940 - 1950

- **1941** – George Beadle and Edward Tatum – гены кодируют белки
- **1950** – Edwin Chargaff обнаружил, что цитозин комплементарен гуанину, а аденин тимину



George Beadle



Edward Tatum



Edwin Chargaff

8

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Основные события молекулярной биологии в 1950 - 1952

- **1950** – Mahlon Bush Hoagland впервые определил, что аминокислоты не сразу формируют белок, а вначале присоединяются к РНК (тРНК) комплиментарной рибосоме
- **1952** – Alfred Hershey и Martha Chase - генетическая информация о белках находится в ДНК



Mahlon Hoagland



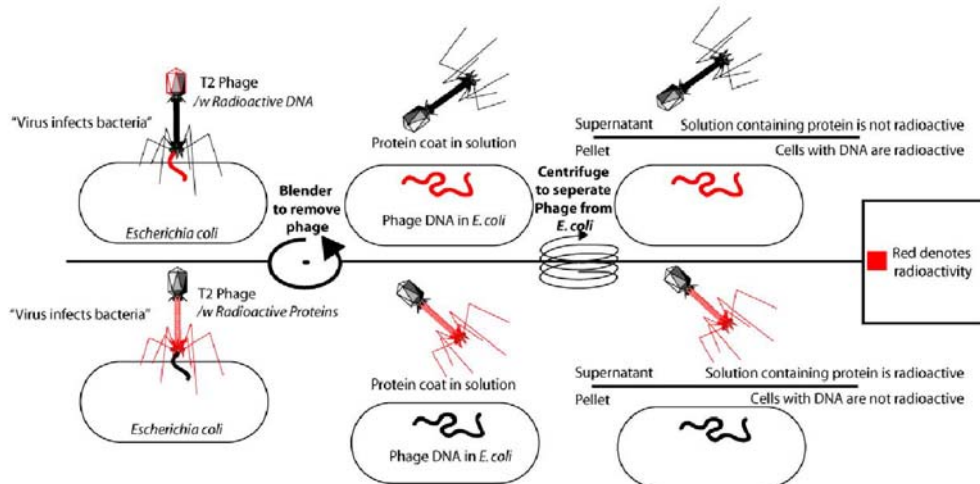
Hershey Chase Experiment

9

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Эксперимент Херши и Чейз



10

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Основные события молекулярной биологии в 1952 - 1969

- **1952-1953** James D. Watson и Francis H. C. Crick открыли двойную спираль ДНК
- **1953** Rosalind Franklin  
Изучение ДНК при помощи рентгеновского излучения, ее работа подтвердила теорию Крика и Уотсона
- **1966.** Marshall Nirenberg, Har Khorana и Severo Ochoa  
Расшифровка генетического кода



James Watson and Francis Crick



Rosalind Franklin

11

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Основные события молекулярной биологии в 1970

- **1970** - Howard M. Temin и David L. Baltimore – открыли обратную транскриптазу
- **1970** - Daniel Nathans, Werner Arber и Hamilton Smith. – открыли первый фермент рестрикции (эндонуклеаза)



Howard Martin Temin



David L. Baltimore



Werner Arber



Daniel Nathans



Hamilton O. Smith

12

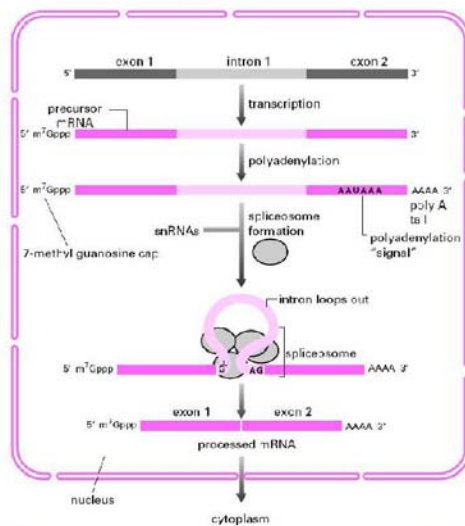
© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



- **1972. Paul Berg** Соединил ДНК двух различных организмов, таким образом создав первую в мире рекомбинантную ДНК
- **1973. Stanley Cohen и Herbert Boyer** впервые получили организм содержащий рекомбинантную ДНК с использованием технологии разработанной **Paul Berg**



## 1977 год



Richard J. Roberts (1943– ),  
(Courtesy of Richard J. Roberts.)



Philip A. Sharp (1944– ),  
(Courtesy of Dr. Philip A. Sharp.)

**Открытие интронов: P.Sharp и R.Roberts**  
1977 г. (Нобелевская премия 1993 г.)





## 1983-85 год

- 1983 – Barbara McClintock Нобелевская премия за открытие транспозонов



- 1983 Cary Miullis - ПЦР



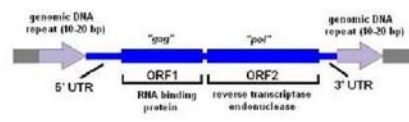
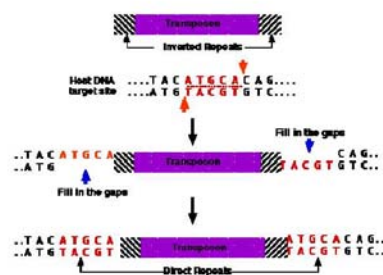
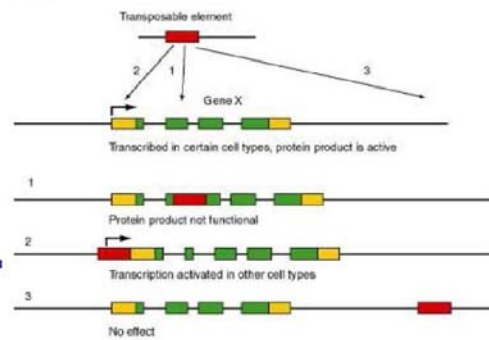
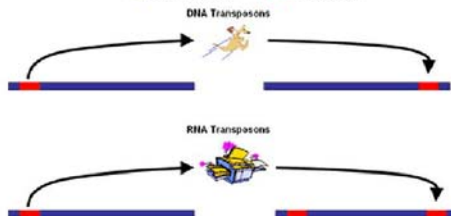
15

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## DNA vs RNA Transposons

■ Genomic DNA ■ Transposon



16

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий





## Основные события молекулярной биологии в 1986 - 1995

- **1986** Leroy Hood: механизм автоматического секвенирования
- **1986** Human Genome – Проект «Геном человека»
- **1995** Созданы карты среднего разрешения хромосом 3, 11, 12, 22 (These maps provide the locations of “markers” on each chromosome to make locating genes easier)



Leroy Hood



17

© 2009 Институт Генетики и ЗБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Основные события молекулярной биологии в 1995-1996

- **1995** John Craig Venter: первый просеквенировал бактериальный геном (*Haemophilus influenzae* и *Mycoplasma genitalium*.)
- **1995** Первые роботизированные автоматические флуоресцентные секвенаторы
- **1996** Прочитан первый эукариотический геном



John Craig Venter

18

© 2009 Институт Генетики и ЗБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Основные события молекулярной биологии в 1997 - 2000

- 1997 просеквенирована *E. Coli*
- 1998 PerkinElmer, Inc.. 96-капиллярный секвенатор
- 1998 Полный сиквенс круглого червя (*C. elegans*)
- 1999 Полностью прочитана хромосома (22) человека
- 1999 – Открыт механизм РНК интерференции
- 2000 – Геном растения (*Arabidopsis thaliana*)

19

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Основные события молекулярной биологии в 2000-2001

- 2000 Геном *Drosophila melanogaster*
- 2001 Международный проект «Геном человека» опубликовал первый черновой вариант генома



20

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Основные события молекулярной биологии в 2003- 2008

- 2003 Завершен «Геном человека», прочитан геном мыши
- April 2004 Геном крысы



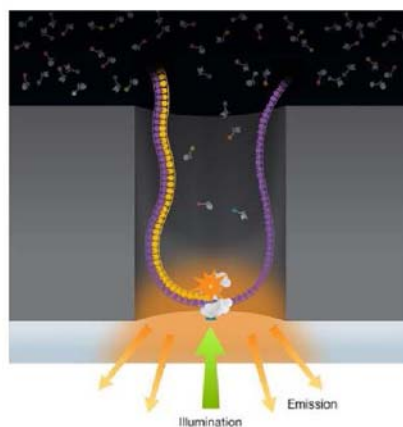
21

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## 2009

### Новейший метод секвенирования в реальном времени



22

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Методы

- Выделение ДНК
- Выделение РНК
- Выделение белков
- Получение кДНК
- Изучение генома
- Анализ экспрессии генов
- Анализ экспрессии белков
- Клонирование генов
- Спектрофотометрия
- Электрофорез
- Капиллярный электрофорез
- ПЦР
- ПЦР в реальном времени
- Рестрикционный анализ
- Фрагментный анализ
- Гибридизации (Саузерн, Нозерн, Вестерн, Истерн)

...

23

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Выделение ДНК. Важность экстракции для анализа

- Чистота образца ДНК оказывает решающее влияние на качество конечного результата
  - Высокое качество образца ДНК обеспечит получение более достоверных и сбалансированных результатов независимо от используемого метода анализа
  - Устранение ингибиторов обеспечивает успешность проведения амплификации
- Правильно разработанный протокол экстракции должен обеспечить высокое качество и максимально возможный выход образца ДНК с учётом объёма образца (индивидуально для каждой лаборатории)
- Тип образца может повлиять на выбор метода экстракции
- Все методы экстракции перед использованием необходимо должным образом оптимизировать и проверить
  - Некоторые методы экстракции при неправильном использовании могут вызывать ингибирование
  - При неправильном использовании любого метода экстракции может получиться ДНК недостаточно высокого качества

24

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий





## Методы выделения ДНК

- Органический метод
- В градиенте CsCl
- Щелочной лизис
- Смола Chelex
- Анионный обмен
- Силикатные методы
- Магнитные шарики
- Бумажные фильтры FTA®

25

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Органическая экстракция Характеристики метода

- Принцип действия
  - Смесь фенола с хлороформом – наиболее широко используемый органический метод, в котором белки отделяются от ДНК
- Стандартный протокол
  - Лизис клеток с использованием соответствующего лизирующего раствора (например, SDS и EDTA)
  - Расщепление белка с помощью фермента протеиназы K
  - Раствор фенола в хлороформе, используемый для отделения ДНК от белков и других компонентов клетки
    - ДНК фракционируется в водную фазу
    - Белки и органические остатки клетки фракционируются в органическую фазу
  - Производится очистка образца ДНК с использованием соответствующего метода осаждения (например, изопропанолом с последующей промывкой этанолом) или устройства фильтрации (Centricon или Microcon)

26

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий





- 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 поддерживает pH раствора на уровне, где ДНК остаётся стабильной
- SDS разрушает клеточную стенку и ядерную мембрану, позволяя ДНК перейти в раствор (SDS также денатурирует и раскрывает белки делая их более чувствительными для расщепления)

27

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



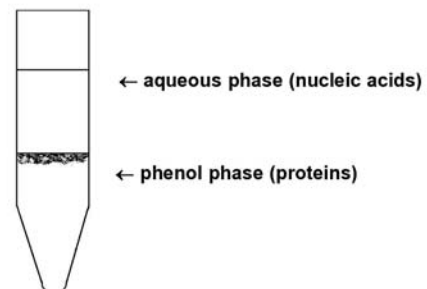
## Выделение ДНК

### Стандартная процедура

- Гомогенизация
- Лизирование клеток: 0.5% SDS + proteinase K (60° 1 час - несколько часов)
- Фенольная экстракция (pH 8.0, 5мин – несколько часов)
- Плавное перемешивание
- Осаждение 96% этанолом или изопропанолом
- Обработка RNКазой и протеиназой K
- Повторение процедуры

### Фенольная экстракция

- Добавлять в одинаковом объеме
- Отбор водной фазы
- Опционально: chloroform/isoamyl alcohol



Выход 100нг – 5мкг

28

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Выделение геномной ДНК НМВ

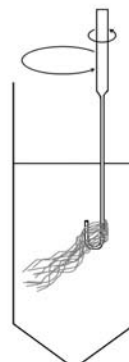
### Стандартная процедура (как на предыдущем слайде)

Используем больше исходного материала, пробирки большей емкости (Векман 45мл), напольная центрифуга, осаждение при -20 (1час-неск.часов)

Хранение: В этаноле, ТЕ буфере, сухом состоянии, Комн. Температура, +4, -20С

### EtOH осаждение

- 2-2.5 объема EtOH, -20°
- NaOAc, pH 5-5.5
- Центрифугирование или вылавливание



29

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Органическая экстракция Преимущества

- Общепринятый метод очистки с использованием раствора фенола в хлороформе
- Выделение образца ДНК с высоким уровнем качества и молекулярным весом
- Пригодность для различных субстратов
- Эффективность даже при использовании сложных типов образцов
  - например, старого или разрушенного костного материала
- Получение стабильных экстрактов, которые можно хранить в замороженном виде длительное время

30

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Органическая экстракция Проблемы

- Необходимость использования опасных реагентов
  - Необходимость специализированного обращения и утилизации
  - Невозможность использования в некоторых лабораториях из-за особых требований к охране здоровья и технике безопасности
- Длительность и трудоёмкость
- Низкий уровень выхода из очень малых образцов
  - Метод требует удаления водной фазы, которая может содержать ДНК, что при ограниченном объёме образца является более значимой потерей
- Возможная необходимость в большом количестве сменяемых пробирок
  - Опасность контаминации
- Сложность автоматизации

31

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



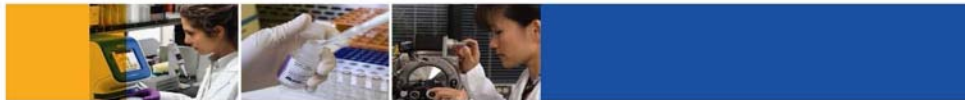
## Выделение РНК (особенности)

**Ингибиторы РНК (РНказы)!**  
**Вода обработанная DEPC**  
**Выделение в присутствии солей гуанидина**  
**Выделение фенолом при pH 5-6 (pH 8 для ДНК)**  
**Обработка ДНКазой, свободной от РНКаз**  
**Опционально: селективное осаждение**  
**различных форм MW (rRNA, mRNA) с LiCl или**  
**oligo-dT колонки**  
**Хранение при -80C**



32

с Технологий



## Адсорбционные методы

Нуклеиновые кислоты селективно адсорбируются на силике, смоле или мембране в присутствии хаотропных агентов или солей

- Плазмиды
- гДНК
- Фрагменты после электрофореза
- ПЦР продукты

### Минипрепаративное выделение плазмид

1. Растворить бактерии в щелочном растворе
2. Нейтрализовать ацетатом натрия
3. Центрифугировать, удалить осадок
4. Смешать супернатант со смолой + chaotropic agent
5. Промыть
6. Элюировать ДНК низкосолевым буфером

33

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий

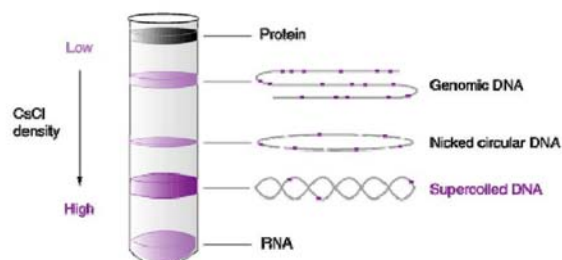
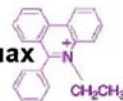


## Разделение нуклеиновых кислот в градиенте плотности CsCl

Применяют для:

- Выделение в больших объемах
- Высокой чистоты
- Сателлитной ДНК
- РНК фракции
- Плазмидной ДНК

Ethidium Bromide



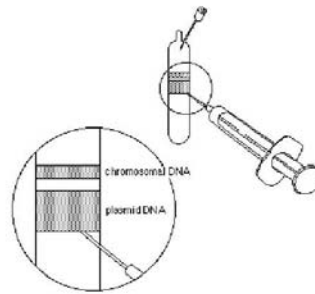
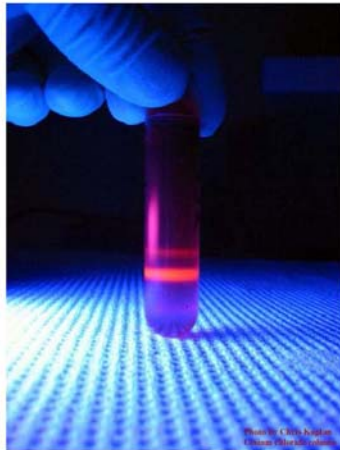
34

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий





## Разделение нуклеиновых кислот в градиенте плотности CsCl



Градиент CsCl

35

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Гибридизация по Саузерну (Southern Blot)

- Southern blot позволяет определить молекулярный вес рестриктоного фрагмента и определить его относительное количество в образцах
- Определить копийность интересующего фрагмента
- Генетический профиль образца
- Выявить различия в рестрикционном профиле образцов
- Подтвердить перенос генетического материала в геном образца

36

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Используемые материалы

### Зонды

- **Зонд - нуклеиновая кислота**
  - Метят каким либо маркером позволяющим идентифицировать или проводить количественное определение
  - Гибридуется с другой нк по принципу комплиментарности
- **Тип меток:**
  - Радиоактивные ( $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ )
  - Флуоресцентные (TAMRA, FAM, VIC...)
    - FISH
    - RT-PCR
  - Биотинилированные (avidin-streptavidin)

37

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Поверхность для гибридизации

- **Фильтрующая мембрана: ДНК и РНК связываются с поверхностью мембраны, самогибридизации не происходит**
- **Связавшаяся НК способны гибридизоваться с зондом.**
- **Фильтрующая мембрана используется для:**
  - Southern Blots
  - Dot/Slot Blots
  - Northern Blots
- **In-silica гибридизация (стеклянная поверхность)**
  - in situ (ткань)
  - Хромосомная (FISH)
  - Микроэрепей

38

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



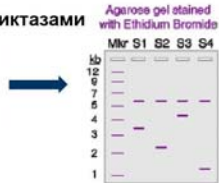
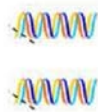
## Southern Blots

- Southern blotting перенос денатурированной ДНК из агарозного геля на фильтрующую мембрану для последующей гибридизации с зондом
- ДНК разделяется на фрагменты
- Процедура:
  - Рестрикция (фрагментирование ДНК)
  - Разделение фрагментов по размерам в агарозном геле
  - Т.к. только одноцепочечные фрагменты связываются с мембраной, то ДНК должна быть денатурирована (NaOH)
  - Перенос на фильтр (капиллярное течение)
  - Гибридизация с зондом
  - Визуализация

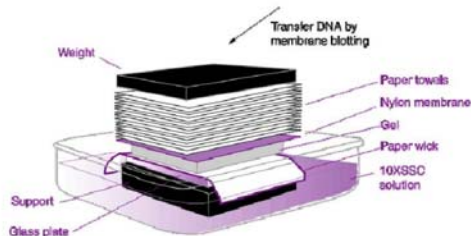
39

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий

Разрезаем рестриктазами

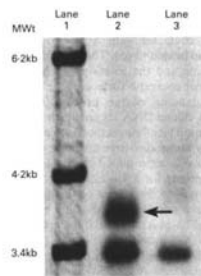


Soak gel in NaOH



Cross-link DNA to the membrane using UV light

Hybridize membrane with denatured <sup>32</sup>P-DNA probe



40

- Приготовление 20X SSC:
  - 3M NaCl: 175.3 g
  - 0.15M Na Citrate: 88.2 g
  - dH2O: 800 ml
  - pH до 7.0 с HCl (0.1-0.5 mL)

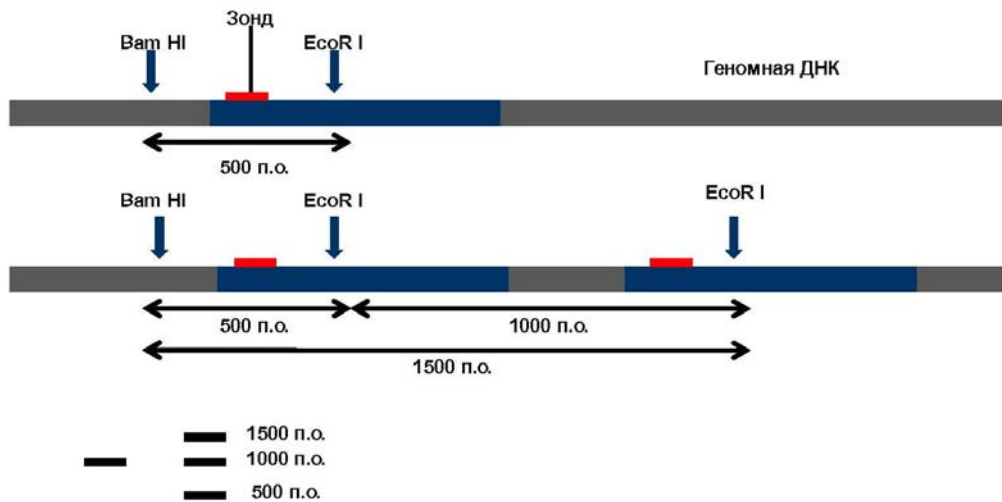


Autoradiograph of washed filter

Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Определение копийности вставки (RFLP + Southern)

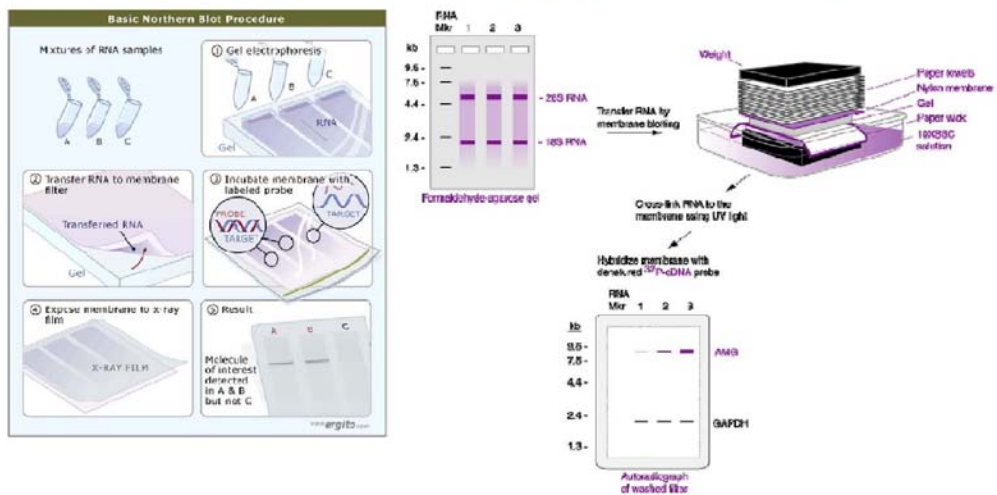


41

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Гибридизация по Нозерну (Northern Blot)



42

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий

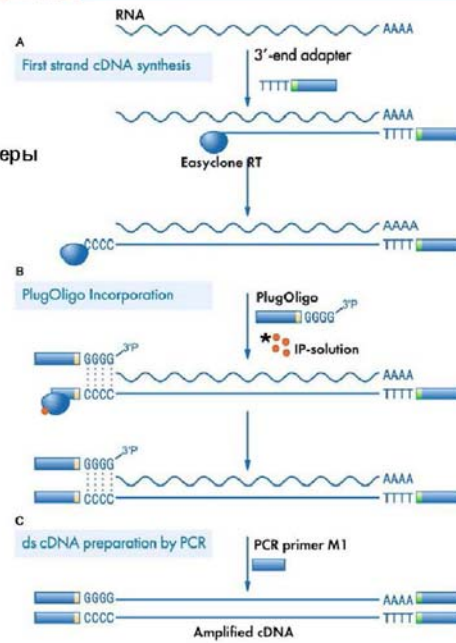




## Получение кДНК

РНК  
Олиго dT с адаптером или случайные гексамеры  
Ревертаза (со свойствами терминальной трансферазы избирательно присоединяющей G)  
dNTP

РНКаза H  
Олиго dG с адаптером  
Праймеры специфичные адаптерам  
ДНК полимерза

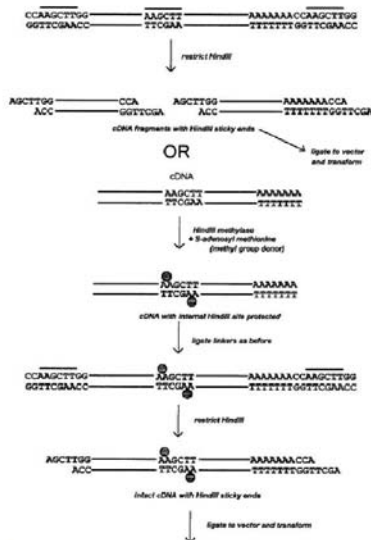


43



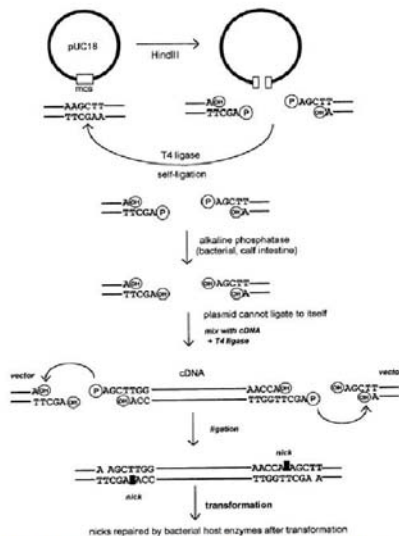
## Клонирование ДНК

[24] But what if the cDNA has a restriction site for the enzyme used to cut the linkers?



44

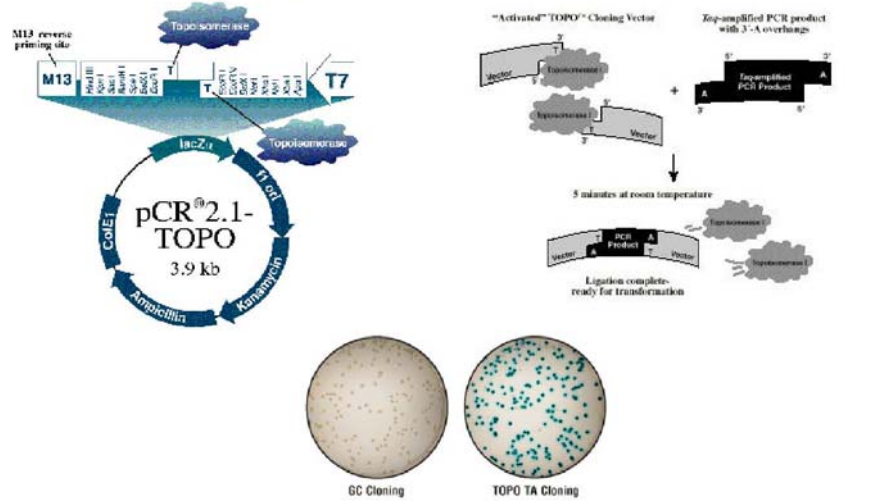
Phosphatase treatment of restricted plasmids prevent self-ligation



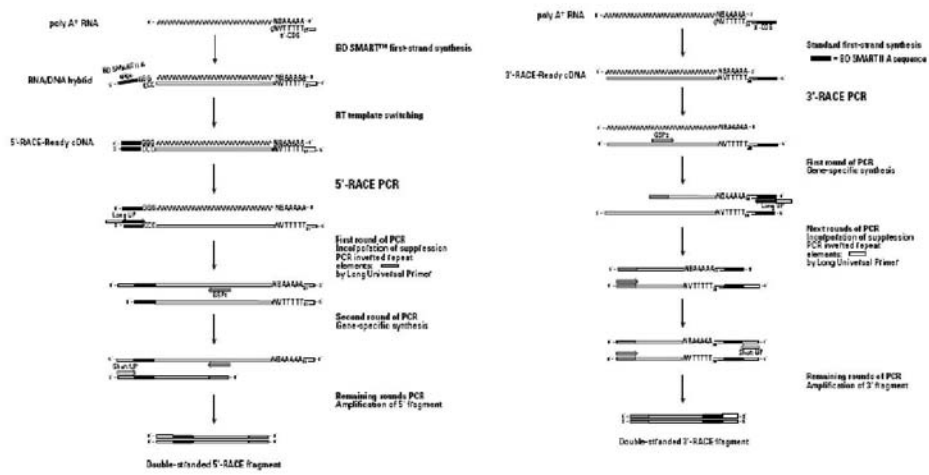
© 2009 институт геномики и эволюции РАН, Центр геномных технологий

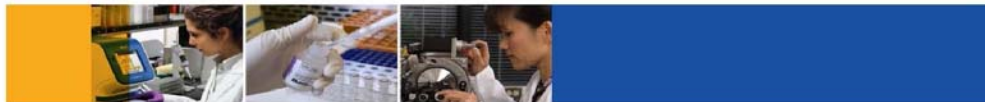


## Система клонирования ТОРО-ТА



## RACE 5' и 3' - амплификация концов кДНК





**Сравнение кДНК для поиска дифференциально экспрессируемых генов**

47

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий

III



**Для поиска дифференциально представленных молекул применяют методы вычитающей гибридизации**



48

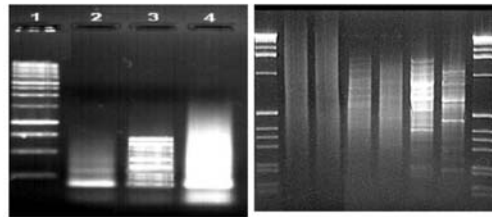
© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Вычитающая гибридизация



- Амплификации после SSH подвержены только молекулы с разными адаптерами



© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Микроээрэй

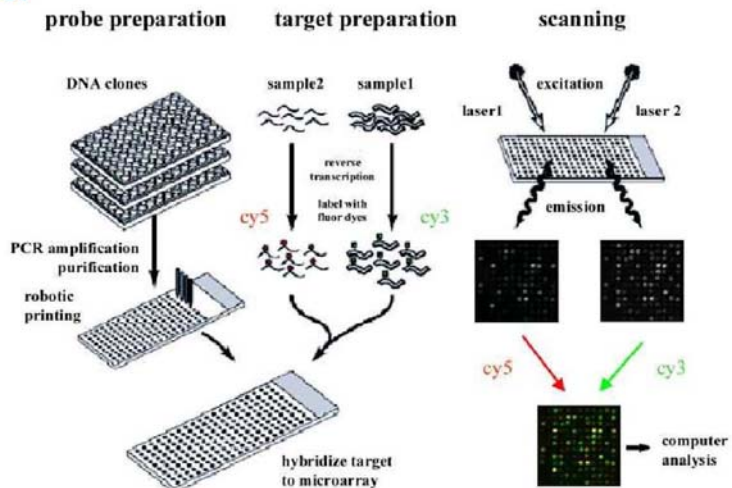
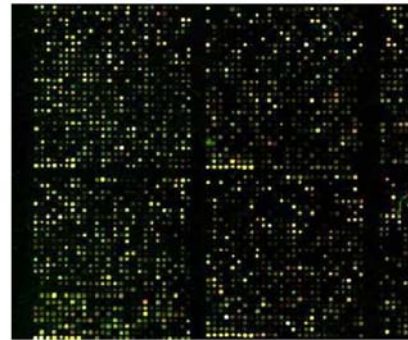
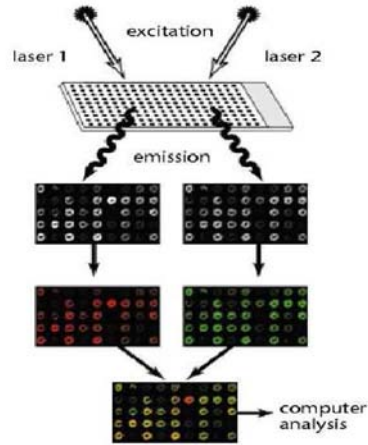


Fig. 1. cDNA microarray scheme. Green spots are transcripts overexpressed in sample #1, red spots are overexpressed in sample #2, and yellow spots are expressed equally in both samples. Modified from Duggan et al. (1999) *Nature Genetics* 21(1) pp10-14

50

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий





Sample Array Data

51

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## РНК-интерференция (RNAi)

- Известна как посттранскрипционное умалчивание гена
- Двухцепочечные РНК вносятся в клетку
  - Комплиментарна мРНК гена
  - Искусственно
  - Продуцируется самой клеткой

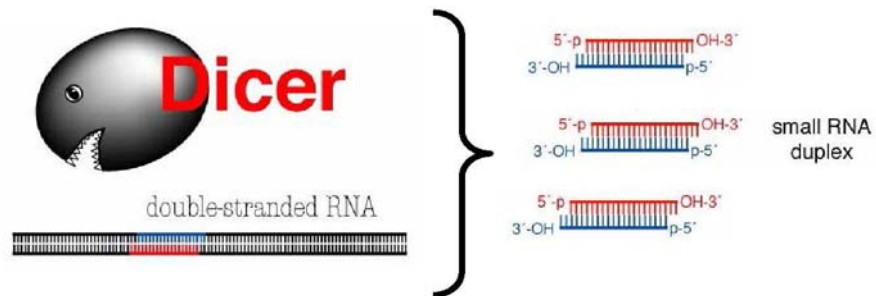
52

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## РНК-интерференция (RNAi)(2)

- дцРНК разрезается на сегмент размером 21-23 нт ("small interfering RNAs", or siRNAs) ферментом Дайсер



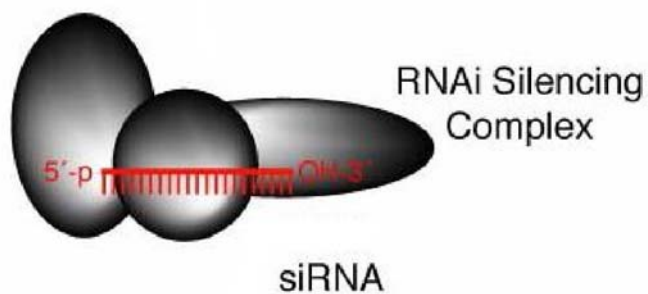
53

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## РНК-интерференция (RNAi)(3)

- siRNAs соединяется с РНК индуцирующим комплексом - RNA-induced silencing complex (RISC)



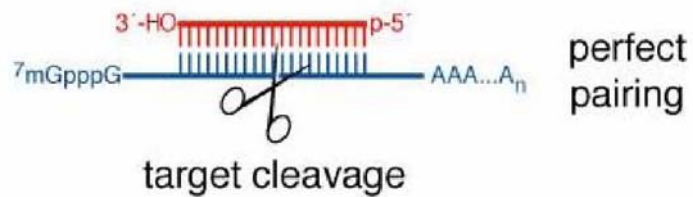
54

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## РНК-интерференция (RNAi)(4)

- RISC направляет siRNA, к комплиментарному участку мРНК-мишени и разрушает её.



55

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## РНК-интерференция – для чего?

- Изучение функции гена
  - Нокаут или ингибирование гена
  - Выживет ли организм?
  - Какие фенотипические проявления это вызовет?
- Терапевтический эффект
  - Лечение рака

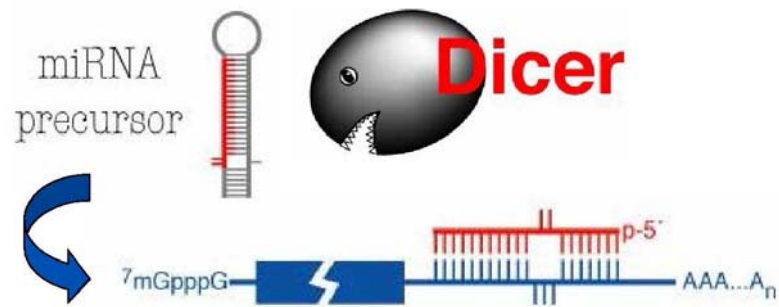
56

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## micro RNA (miRNA)

- Gene expression regulation
- Created by similar process to siRNA
- Generally prevents binding of ribosome



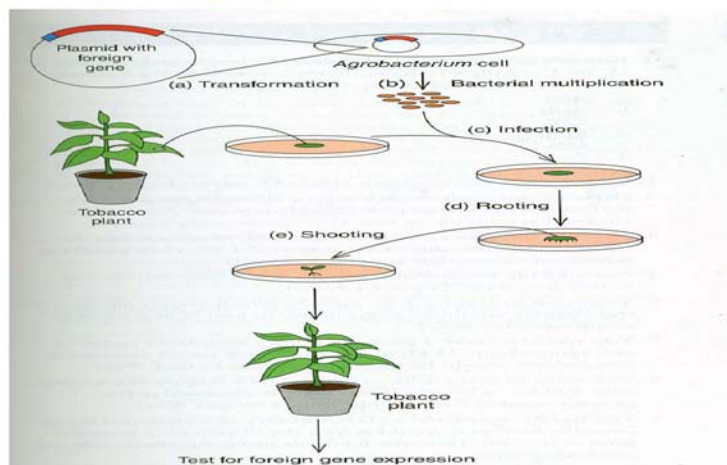
57

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий





## Использование Т-ДНК для трансформации растений



58

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Платформа клонирования

- Рестриктазы/лигазы
- Методы на основе ПЦР
- Технология Gateway (сайт специфическая рекомбинация)

59

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Трансформационная кассета



### Содержит:

1. Ген интереса
  - Кодирующий регион и контрольные элементы
2. Селективный маркер
  - Позволяет отличать трансформированные растения
3. Встраиваемая последовательность
  - При помощи участка ДНК *Agrobacterium*

60

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Внесение гена или получение трансгенного организма

### Этапы

1. Выделение РНК и обратная транскрипция
2. Создание библиотек кДНК
3. Клонирование кДНК интересующего гена
4. Создание трансформационной кассеты
5. Создание плазмидного вектора для клонирования
6. Трансформация бактерии (обычно *E.coli*)
7. Проверка плазмиды (рестрикция, ПЦР, секвенс)
8. Трансформация *Agrobacterium* и проверка
9. Трансформация растения
10. Получение и отбор трансформантов
11. Оценка трансформантов

61

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Вектор для трансформации

Требования:

- Точка начала репликации
- Селективный бактериальный маркер
- Генная конструкция
- Т-ДНК с фланкирующими границами
- Прочие гены *Agrobacterium*

62

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



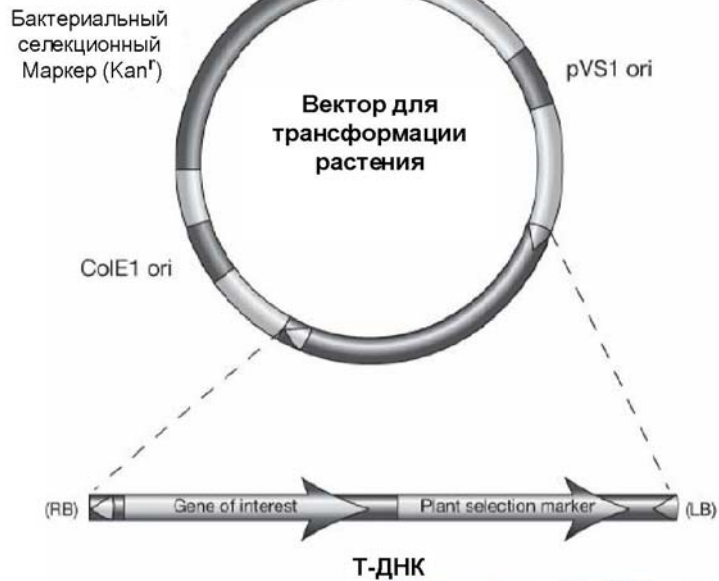
**Vir** гены,  
функция переноса

**ori** – точка начала  
репликации



63

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий

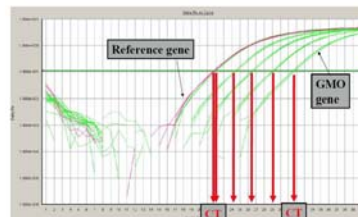
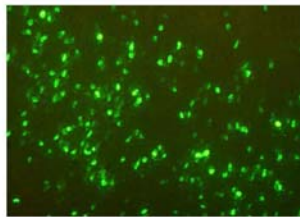


64

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



1. Визуализация экспрессии в клетках ткани (GFP)
2. Наличие и копияность вставки – Southern blot, Real Time PCR
3. Экспрессия гена – Northern blot, Real time PCR
4. Экспрессия белка – Western blot



65

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий





## Следующее тестирование в поле

Устойчивость к гербициду



Нетрансгенные

Трансгенные

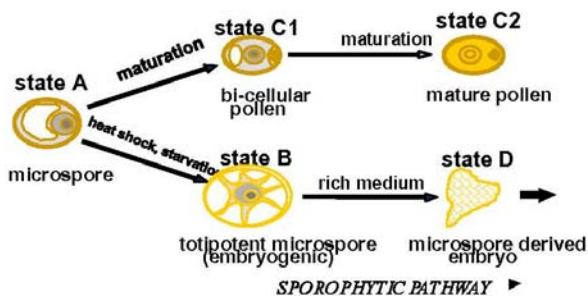
66

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



- Пролиндегидрогеназа – фермент участвующий в деградации пролина, вовлечен в процессы развития растений и их ответа на стрессовые факторы
  - Пролин – осмолит, осмопротектор

Выделено два гена кодирующие пролиндегидрогеназу из табака (*Nicotiana tabacum*): *NtPDH1* и *NtPDH2* в результате скрининга генов экспрессирующихся в микроспорах табака в ответ на стресс



Анализ экспрессии показал, что два гена имеют различный профиль экспрессии

67

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



Organism: *N. tabacum* cv. SR1

Isolation: Through Suppression Subtractive Hybridization (SSH) between unicellular and stressed (totipotent) microspore stages of development. Initially cloned in pBK-CMV as EcoRI/XhoI fragment:

265bp

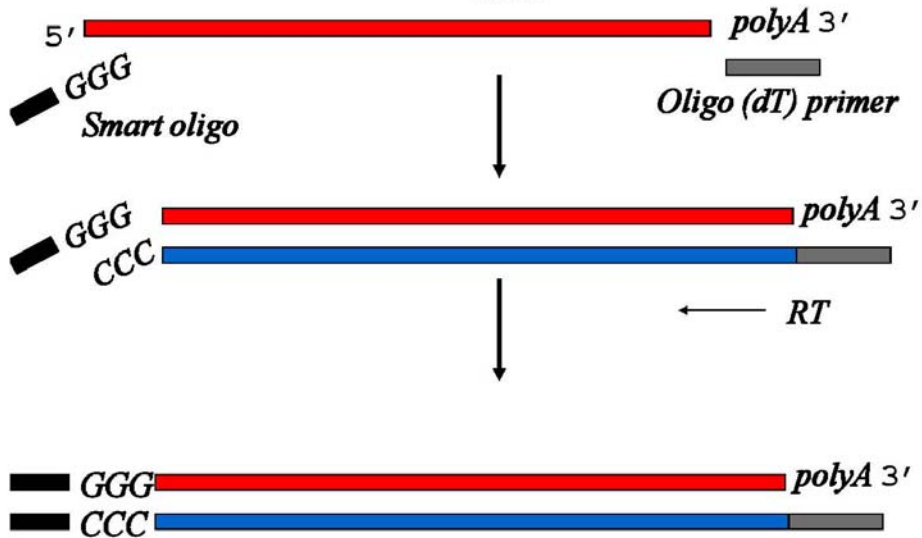
1 gaattcatat tgacaatgga agtctatatt agtaagtaag aataagecag  
 gaaccatccc  
 61 ccaactactg taaataattc aatggcgtgg cagaaatgat ctgcatcagg caaacctatct  
 121 ggtaaaaatg cacaaggggc atattccact thtagtatct tttccctat gcgatttita  
 181 ggtctattat attgtagcac ctttgttata ttggtttcg tattagaaat ggaaaaaagg  
 241 tacccaaagt ggagccgaaa tgttg-poly(A)

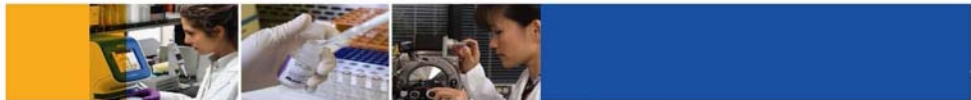
Expression pattern:

Reverse Northern: Showed to be specifically expressed in totipotent microspores comparing with unicellular cells

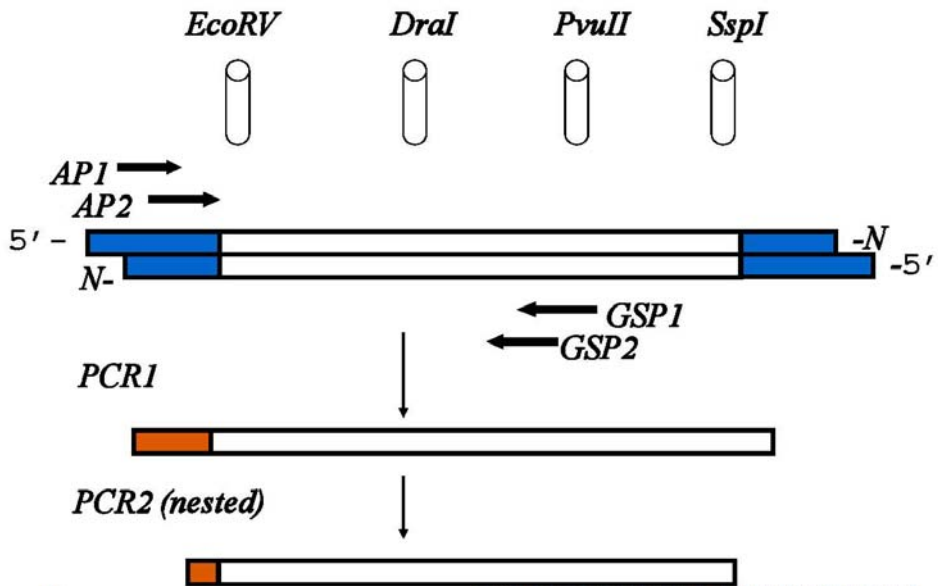
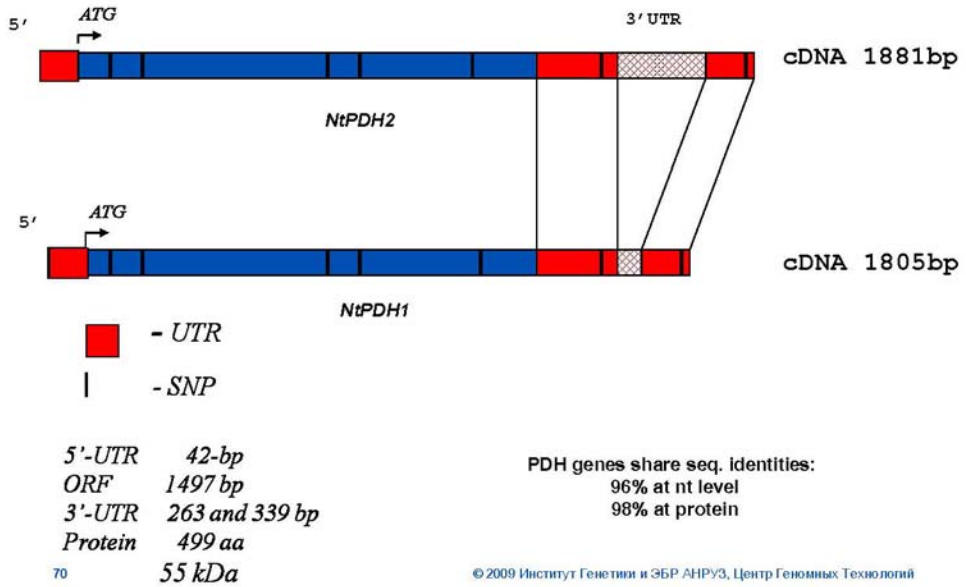


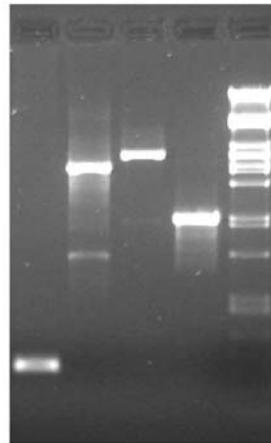
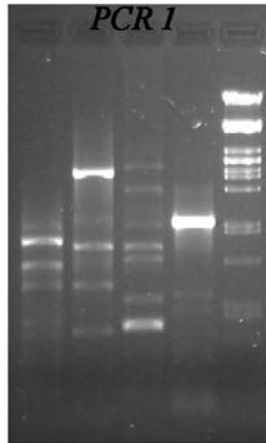
RNA





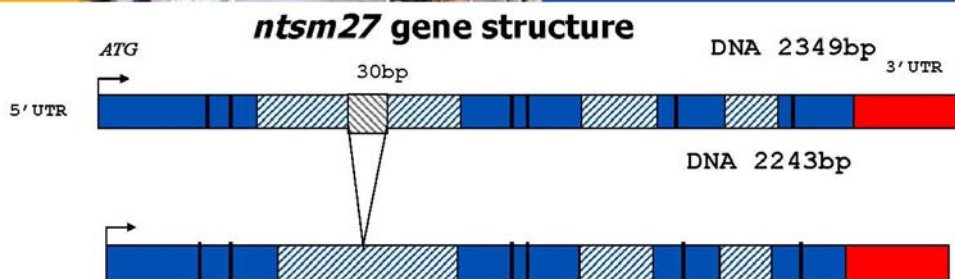
### NtPDH's cDNA structure





72

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



- UTR
- SNP
- INTRON

Comparison of the genomic with the cDNA sequences (data not shown) disclosed three introns at similar positions as displayed for *Medicago sativa* and *A. thaliana* PDHs (Miller et al. 2005).

73

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий





**Main Similarities Found:** The search has been done using Advanced BLAST programs, general site - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/index.html/>

Acc.No	length	Description	E-value	degree of homology/percentage
<b>Genomic (blastn-nr)</b> (bp)				
>gi 3421786 ref NM_123232.1	1431	<i>Arabidopsis thaliana</i> proline oxidase, mitochondrial precursor -like protein, predicted mRNA	0.009	61 (83%)
<b>Protein (blastx)</b> (aa)				
>gi 817344 dbj BAA11682.1	499	(D83025) proline oxidase precursor [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	e-1.33	247 (62%)
>gi 0140631 gb AA_G13467.1 ACD26738_4	475	(ACD26738) putative proline oxidase [ <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	9e-63	232 (44%)
>gi 9924111 ref WP_037419.2	600	(NM_016335) proline dehydrogenase (oxidase) 1; proline oxidase 2; p53 induced protein; p53-induced gene 6 [ <i>Danio rerio</i> ]	2e-33	131 (35%)
>gi 6649587 gb AA_P21467.1 U80020_1	593	(U80020) brain and kidney proline oxidase 2 [ <i>Mus musculus</i> ]	1e-34	131 (35%)

AtPDH is represented by two isoforms

74

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



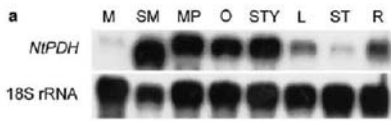
141-486aa PDH domain

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

75



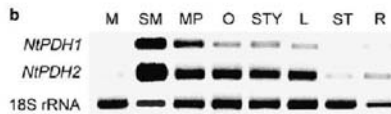
## N. blot & RT-PCR



Both genes were expressed weakly in vegetative organs, i.e., leaves, stems and roots, whereas strong expression was observed in male and female reproductive tissues, including pollen, ovaries, and styles and Stigmas (a)

No expression was detected in microspores (data not shown), but a slight signal was observed if the sample included some bicellular pollen (a)

Transcript levels of *NtPDH* were generally found to decline in mature vegetative tissues compared to younger stages (data not shown)



18S ribosomal RNA co-amplified as an internal standard

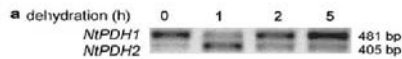
*NtPDH1* transcript levels were significantly lower than those of *NtPDH2* in all organs and tissues of adult tobacco plants except mature pollen in which both genes were expressed similarly (b). *NtPDH2* expression was strongest in both male and female reproductive tissues (b)

76

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий

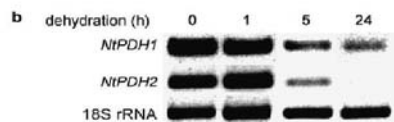


## *NtPDH1* and *NtPDH2* respond differently to dehydration



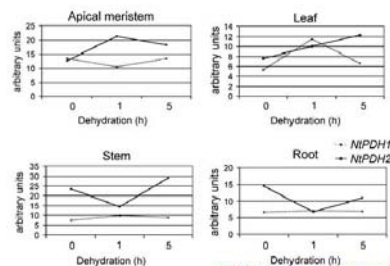
### withdrawal of water for 2–3 weeks

Both *NtPDH* genes were expressed in untreated seedlings, and transcript levels of *NtPDH1* were higher than that of *NtPDH2* (a,b)



Despite strong upregulation of *NtPDH2* in seedlings dehydrated for 1 h, downregulation to almost undetectable levels occurred within 5 h, similar to the expression pattern of *AtPDH1(a,b)*

### Regulation of *NtPDH1* and *NtPDH2* in different organs of dehydrated in vitro-grown tobacco plants



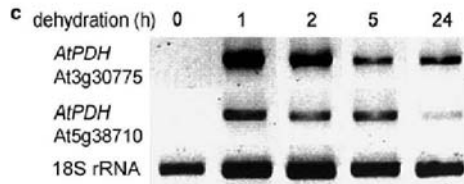
ImageQuant software

77

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



**The transcriptional regulation of the two *AtPDH* isoforms (*At3g30775* and *At5g38710*) was also investigated in 3-week-old *Arabidopsis* plantlets**

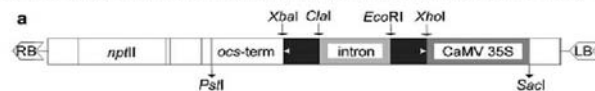


Unlike in tobacco, no *AtPDH* transcripts were found in whole control *Arabidopsis* plantlets prior to the stress treatment  
 Both genes were strongly upregulated after 1 h of dehydration, but not differentially regulated as in tobacco.  
 Expression of either gene gradually decreased during prolonged dehydration but was still detectable at different levels after 24 h



**Seed formation and germination are affected in *NtPDH* RNAi lines**

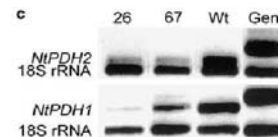
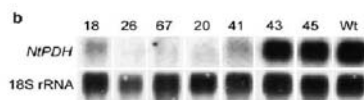
A construct (p35S-*NtPDH2*-RNAi) bearing two copies of the 3-265-bp of *NtPDH2* (a), was transformed into tobacco  
 The nucleotide sequence identity between *NtPDH1* and *NtPDH2* in this region is 69%.



As male and female reproductive tissues of unstressed wild-type plants were characterized by strong hybridization signals on Northern blots, pollen, styles and stigmas were chosen to assess the suppression of *NtPDH* gene

**72 RNAi lines generated**

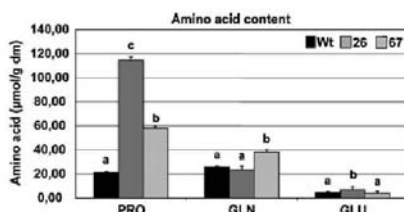
Hybridizing membranes carrying RNA isolated from styles and stigmas revealed a substantial reduction of *NtPDH* expression in 35 ransgenic lines, with different efficiency of the RNAi action





The defects in seed formation, germination and seedling development were clearly associated with the downregulation of both *NtPDH* genes.

Germination of seeds collected from these lines after self-fertilization was delayed and asynchronous, and occurred sporadically over 3 weeks. In contrast, almost all seeds from wild-type plants germinated in a synchronized manner within a few days



Inhibition of proline catabolism by RNAi was expected to lead to proline accumulation and simultaneous changes in related amino acids.

Concentrations of free amino acids in wild-type and the *NtPDH* transgenic lines following rehydration of dehydrated plants. The levels of free proline (*PRO*), free glutamine (*GLN*), and free glutamate (*GLU*) in the leaves of lines 26 and 67 are shown in comparison to the wild-type (wt).

Proline catabolism is highly activated when dehydrated plants are rehydrated (Nakashima et al. 1998). In order to evaluate whether the reduced proline catabolism leads to increased proline contents upon rehydration, transgenic and wild-type plants were dehydrated for 12 h on dry Whatman paper and subsequently rehydrated in distilled water for 12 h before collecting leaves.

However, glutamine and glutamic acid levels were not clearly correlated with enhanced proline accumulation in the transgenic plants. This finding underlines that proline as a terminal product has less impact on amino acid metabolism the *PDH* genes of both tobacco and *Arabidopsis* were expressed after 24 h of dehydration.

80

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



- *NtPDH1* – стабильно низкий уровень экспрессии после 24 часов дегидратации
- *NtPDH2* – очень высокий в течении 1 часа после стресса, далее резкое падение экспрессии до не детектируемого уровня
- Оба гена очень важны на ранних стадиях развития растения
- Выключение экспрессии этих генов приводит к нарушению формирования зародышей и их последующей гибели

81

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий





Planta  
DOI 10.1007/s00425-006-0429-3

ORIGINAL ARTICLE

## Two tobacco proline dehydrogenases are differentially regulated and play a role in early plant development

Alexandra Ribarits · Alisher Abdullaev ·  
Alisher Tashpulatov · Andreas Richter ·  
Erwin Heberle-Bors · Alisher Touraev

Received: 21 June 2006 / Accepted: 10 October 2006  
© Springer-Verlag 2006

**Abstract** Proline dehydrogenase is the rate-limiting enzyme in proline degradation and serves important functions in the stress responses and development of plants. We isolated two tobacco proline dehydrogenases, *NiPDH1* and *NiPDH2*, in the course of screening

the CaMV 35S promoter led to increased proline contents, decreased seed set, delayed seed germination and retarded seedling development pointing towards an important function of at least one of the two *NiPDH* genes during plant reproductive development.

82

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



# СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ

83

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий

# СЕКВЕНИРОВАНИЕ ДНК, АНАЛИЗ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

*Абдуллаев А.А.*

к.б.н., старший научный сотрудник  
Центра Геномных Технологий ИГиЭБР



**Секвенирование. История. Методы. Оборудование.**

Докладчик: к.б.н. Абдуллаев А.А.

Институт генетики и ЭБР АН РУз



## **История**

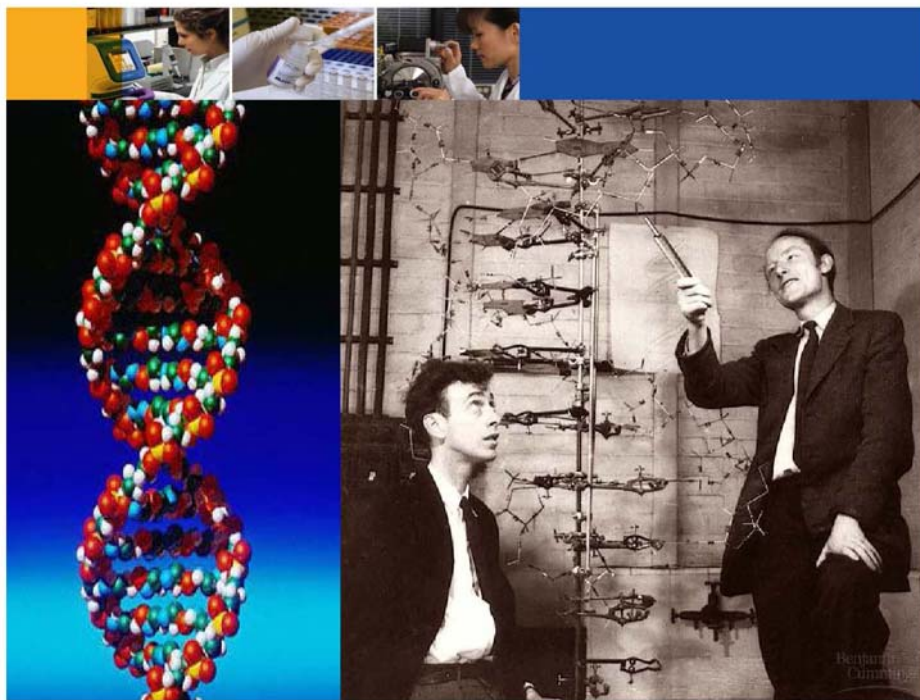
- 1953 г. – Френсис Крик и Джеймс Уотсон открыли двойную спираль ДНК
- 1970 г. – Даниель Натанс и Гамильтон Смит – открыли ферменты рестрикции
- 1977 г. - Вальтер Гилберт и Аллен Максам – секвенирование ДНК при помощи химического расщепления
- 1977 г. – Фред Сэнгер – секвенирование ДНК при помощи ди-деокситерминирующих нуклеотидов
- 1985 г. Кэри Мюллис – ПЦР
- 1986 г. – Лерой Худ – автоматическое секвенирование



- 1972 г - был прочтен ген белка оболочки РНК-вируса, бактериофага MS2, изученный в лаборатории Валтера Файерса.
- 1977 г. – Ф. Сэнгер определил полную последовательность бактериофага ОХ174.
- 1984 г. - Определена последовательность генома HIV-1 (ВИЧ) компанией Chiron Corp.
- 1995 г. – Расшифрован геном живого организма гемофильной палочки (*Haemophilus influenzae*)
- 1996 г. - бактерия *E. Coli* и дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*.
- 1998 г. – впервые многоклеточный организм - круглый червь (*C. elegans*).
- 1999 г. – плодовая мушка (*Drosophila melanogaster*).
- 2000 г. – впервые прочтен геном растения (*Arabidopsis thaliana*).
- 2001 г. – Расшифрован геном человека .
- ...
- 2008 г. – геном сои (*Glycine max*)

3

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий





## История Секвенирования ДНК

**Метод Сэнгера (1977):**

меченные ддНТФ  
терминирующие  
копирование ДНК.

**Метод Гилберта (1973):**

химический метод  
разрезания ДНК в  
специфических местах  
(G, G+A, T+C, C).



Оба метода генерируют  
меченные фрагменты  
различной длины, а  
затем разделяются  
электрофорезом .



5

© 2009 Институт Генетики и ЗБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Метод Максама-Гилберта – химическое расщепление

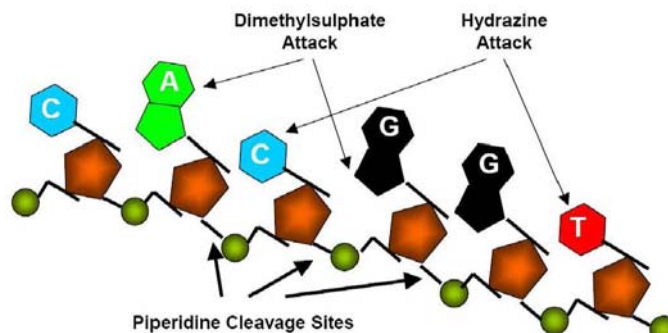
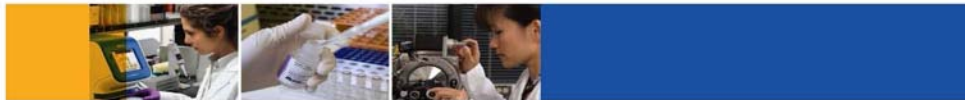


Figure 1. Chemical targets in the Maxam-Gilbert DNA sequencing strategy. Dimethylsulphate or hydrazine will attack the purine or pyrimidine rings respectively and piperidine will cleave the phosphate bond at the 3' carbon.

6

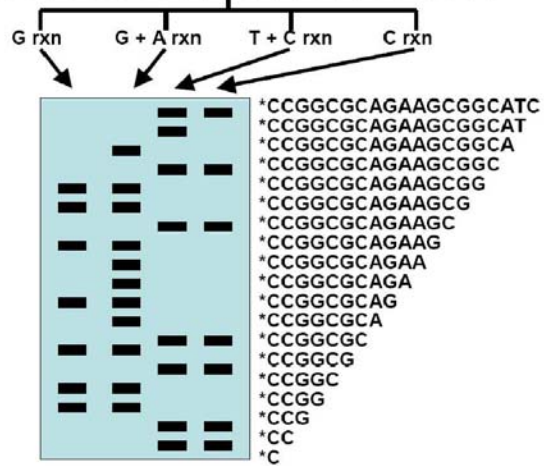
© 2009 Институт Генетики и ЗБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий





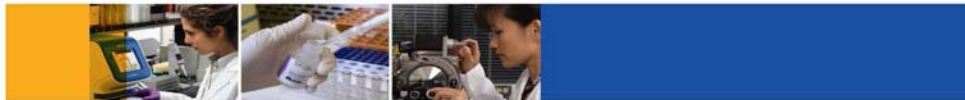
### Метод Максама-Гилберта – химическое расщепление

5' \*pCpCpGpGpCpGpCpGpCpAрGpAрAрGpCpGpGpCpAрTрCpAрGpCpAрA 3'

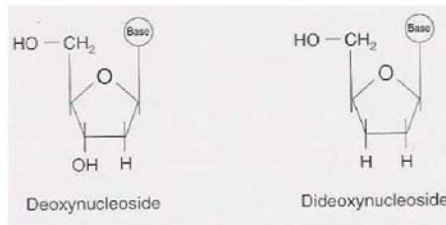
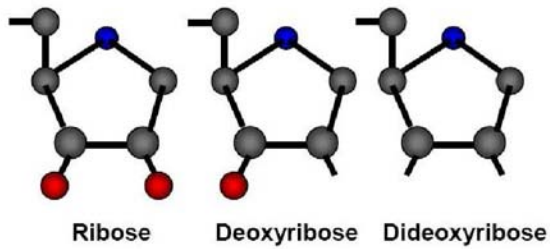


7

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



### Метод Сэнгера



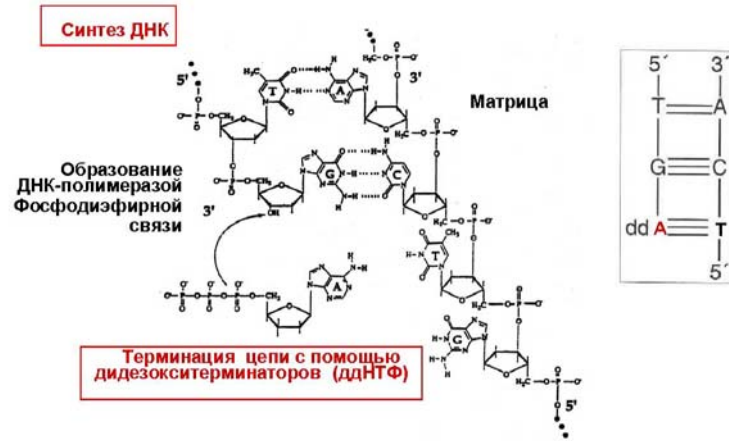
8

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



# Секвенирование

## Секвенирование ДНК методом по Сэнгеру

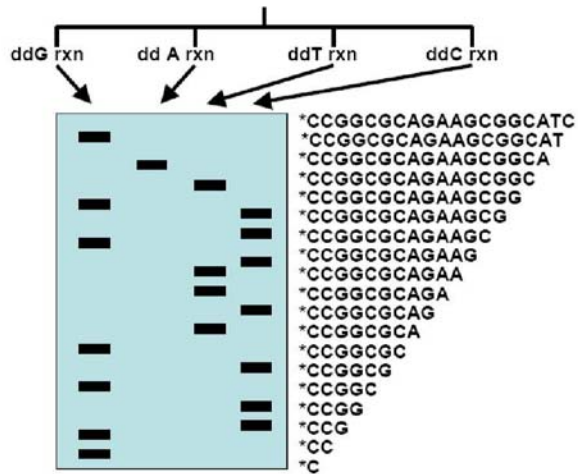


9

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



5' pCpCpGpGpCpCpGpCpApGpApGpCpGpGpCpApTpCpApGpCpApApA 3'

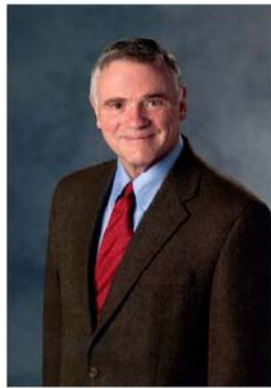


10

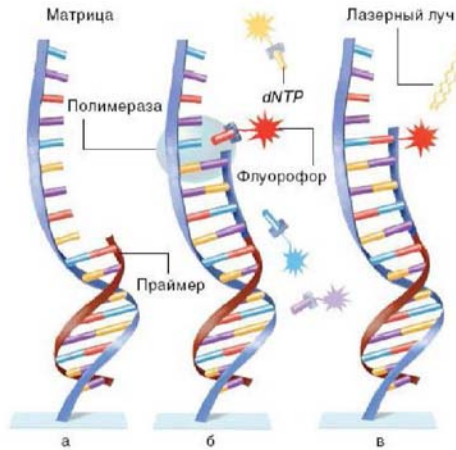
© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Автоматическое секвенирование по Сэнгеру



Leroy Hood

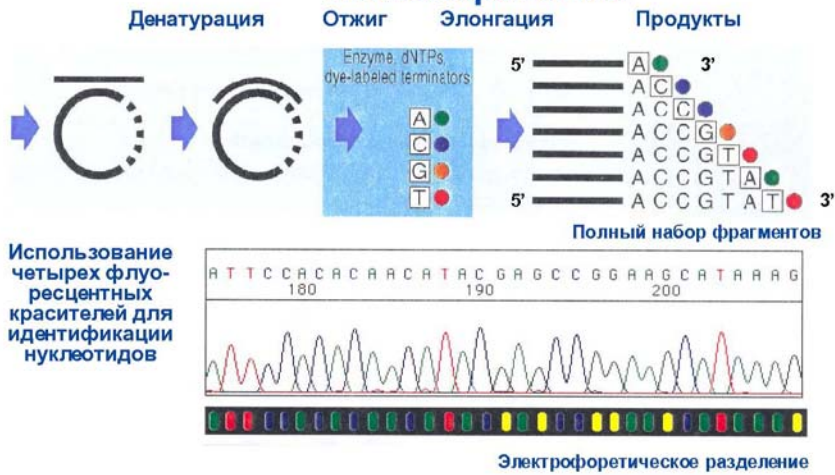


11

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Многоцветная флуоресценция при секвенировании

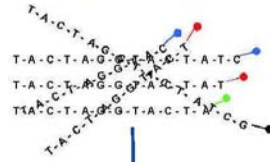


12

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Реакция секвенирования: Разделение одноцепочечных фрагментов ДНК



T-A-C-T- A-G-G-T-A-C-T- A-T-C-G  
 T-A-C-T- A-G-G-T-A-C-T- A-T-C  
 T-A-C-T- A-G-G-T-A-C-T- A-T  
 T-A-C-T- A-G-G-T-A-C-T- A  
 T-A-C-T- A-G-G-T-A-C-T  
 T-A-C-T- A-G-G-T-A-C

### Электрофорез

- Разделяющая среда : гель или полимер
- Разделение в зависимости от размера фрагмента ДНК
- Разрешение – 1 нуклеотид

13

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий

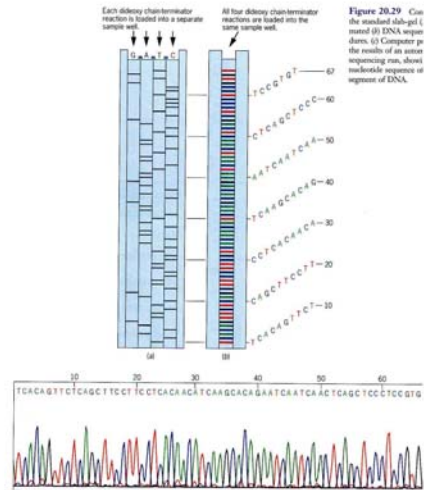
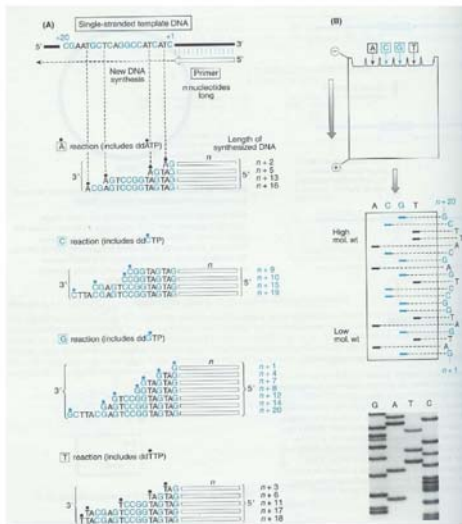
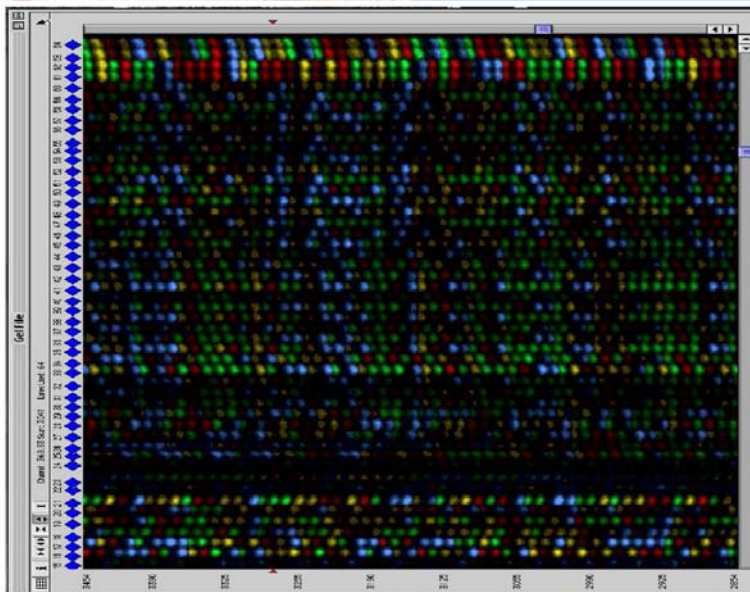
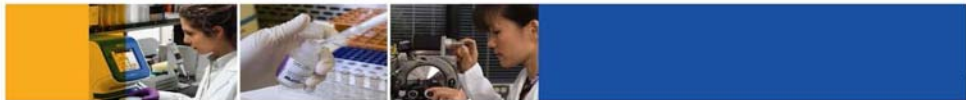


Figure 20.29 Use the standard dideoxynucleotide (ddNTP) sequencing method to determine the nucleotide sequence of a DNA segment. (A) Computer printout of the results of an autoradiography run, showing nucleotide sequence of segments of DNA.

14

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



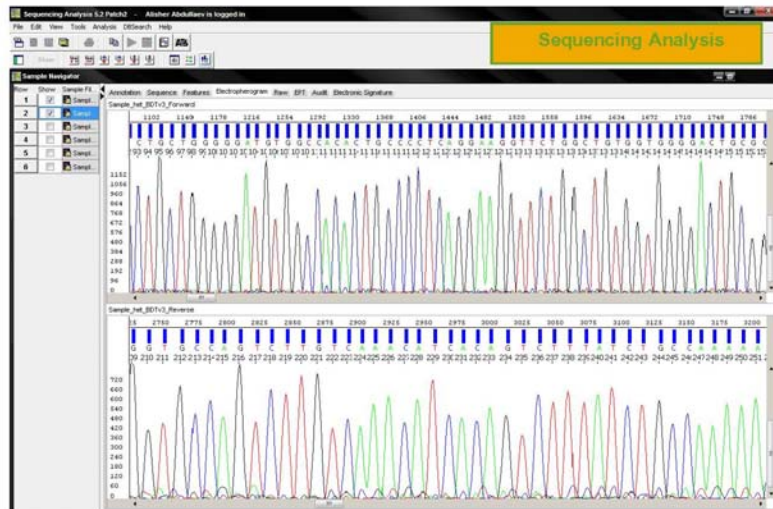


15

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий

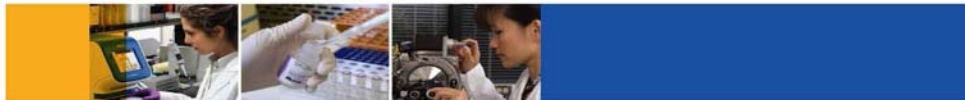


## Анализ результатов секвенирования



16

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Этапы

- Определение интересующего региона
- Проведение стандартной ПЦР (амплификация региона)
- Очистка продукта ПЦР



•Клонирование ПЦР продукта  
•Выделение плазмидной ДНК

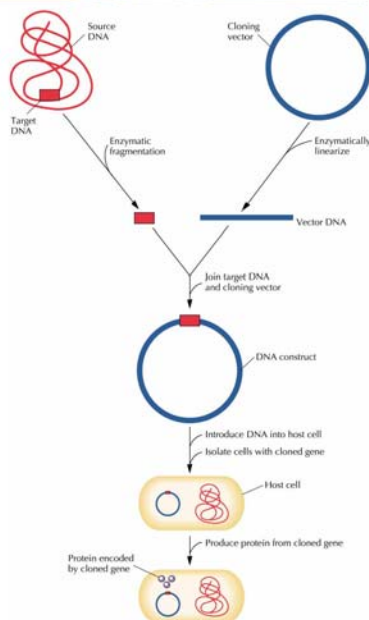
- Сиквенсная реакция
- Очистка продуктов сиквенса
- Электрофорез
- Анализ и расшифровка результатов

17

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Клонирование интересующего фрагмента



© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Плазмиды

### Подготовка матрицы для сиквенса

- Щелочной лизис РНКаза и осаждение ПЭГом
- В градиенте CsCl
- Коммерческие наборы
  - QIAGEN plasmid kits (mini, midi, maxi)
  - Gentra Systems PureGene kit
- Note:
  - избегайте перегрузки колонок
  - необходимо включить (дополнительно) этап обессаливания

19

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## ПЦР продукт

### Подготовка матрицы для сиквенса

- Удаление остатков ПЦР реакции:
  - Прямые – избежание множественных последовательностей
  - dNTPs - для сохранения оптимального соотношения dNTPs / ddNTPs
  - Соли – предотвратить ингибирование полимеразы
  - Неспецифичные ПЦР продукты – артефакты секвенирования



20

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Очистка агарозным гелем

Можно использовать для ПЦР продуктов вне зависимости от качества

### Преимущество:

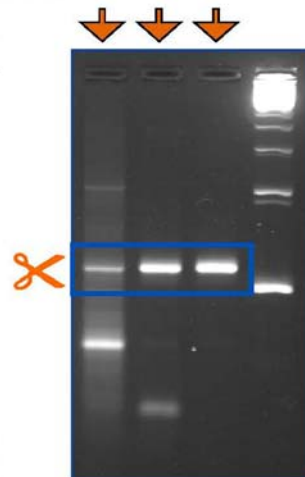
– Удаление неспецифических ПЦР продуктов и праймер-димеров

### Недостатки:

- Низкий выход
- Время
- UV вносит разрывы в цепь ДНК

→ Вырезать фрагмент и использовать

- Qiaquick (QIAGEN)
- MinElute (QIAGEN)



21

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Очистка через колонки

Может быть использована если побочные продукты < 100 bp (eg. праймер-димеры)

### Преимущества:

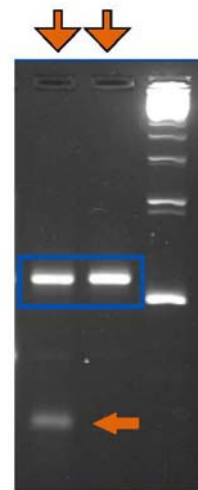
- Быстро и легко
- Репродуцируемость

### Недостатки:

- дорого
- не удаляет неспецифические ПЦР продукты  $\geq$  100bp

→ Очистка через гель: QIAquick® (QIAGEN)

→ Ультрафильтрация: Centricon-100, Microcon (Millipore)



22

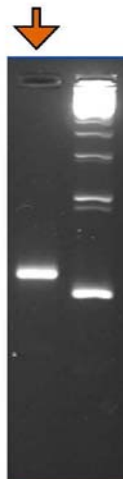
© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий





## Прямое секвенирование

- Может быть использовано только с единичным ПЦР продуктом
  - ПЦР проведена с минимальной концентрацией праймеров и dNTPs ( $\leq 0.2 \mu\text{M}$  and  $\leq 100 \mu\text{M}$ , соответственно)
  - Аликвота ПЦР разводится (от 1/5 до 1/10 раз)
- **Перимущества**
    - Быстро и недорого
    - Высокий выход
    - Автоматизация
    - Высокая производительность с использованием микроплашек
  - **Недостатки**
    - Требуется оптимизации
    - Не удаляет неспецифичные ПЦР продукты и праймеры



23

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Качество ДНК матрицы

### Избегайте:

- Белки, детергенты, геномная ДНК
  - Сокращают срок службы капилляра
- Грязная и смешанная матрица
  - Сокращение длины прочтения
  - Приводит к сокращению срока службы капилляра
  - Плохие данные
- Соли, буферы содержащие ЭДТА
  - Ингибирует ДНК полимеразу
  - Избирательно инъецируются в капилляр

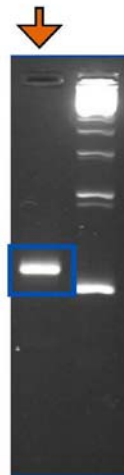
24

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Ферментативная очистка

- Может быть использована если имеется специфичный ПЦР продукт
- Экзонуклеаза I (Eco I) расщепляет одноцепочечную ДНК (праймеры)
- Щелочные фосфатазы (SAP / CIP) дефосфорилируют dNTPs  
Werle, E., et al. 1994, Nucl. Ac. Res. 22 4354; Hanke and Wink, 1994, Biotech. 17 858.]
- Преимущества:
  - Быстро и легко :
    - Обработка ферментом при 37 °С в течение 15мин.
    - Инактивация фермента при 80 °С в течение 15мин.
    - Проводится прямо в термоциклере после ПЦР
  - Дёшево,высокий выход, можно автоматизировать
  - Высокая производительность с использованием микроплашек
- Недостатки
  - не удаляет неспецифичные ПЦР продукты и праймеры



25

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Компоненты реакции

- dNTP – dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- ddNTP в каждой реакции (отдельно или вместе при автоматическом секвенировании)
- ДНК полимераза (Taq)
- один праймер
- ДНК матрица
- Метка (радиоактивная или нерадиоактивная уже прикреплена к ddNTP)
- Реакционный буфер (200 mM Tris-HCl pH 9 , 5 mM MgCl<sub>2</sub>)

26

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Соотношение dNTPs/ddNTPs

При секвенировании:

ddATP	dATP	ddATP	dTTP
ddGTP	ddGTP	dGTP	dATP
ddCTP	ddCTP	dCTP	dCTP
ddTTP	ddTTP	dTTP	dGTP
ddATP	ddATP	ddCTP	dCTP
ddGTP	dGTP	ddTTP	dGTP

Соотношение dNTPs / ddNTPs			
0	низкое	∞	высокое
Удлинение на 1 нуклеотид	В основном короткие фрагменты		Более длинные фрагменты
			Отсутствие сигнала

→ Различные наборы для различных методов секвенирования

27

Note: Важно избавиться от остаточных dNTP при секвенировании ПЦР



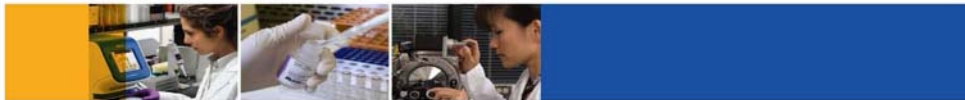
## Наборы BigDye® Terminator

Сравнение

	Version 1.1	Version 3.1
Dyes	Original BigDye kit → {BD} / BDTv1 DyeSet/Primer file → v1.1-specific matrix or spectral calibration	BigDye kit with improved incorporation by enzyme → {BDv3} / BDTv3 DyeSet/Primer file → v3.1-specific matrix or spectral calibration
dNTPs/ddNTPs Ratio	"original"	optimized for long reads
Enzyme	heat-stable, optimized for difficult sequences	
Buffer	5 x BigDye sequencing buffer, included in kit	

28

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## BigDye® Terminator Kits - Применение

Задачи	V3.1	V1.1
<i>de novo</i> секвенирование	+	✍
Ресеквенирование	+	✍
Секвенирование сложной ДНК	+	+
Длинное секвенирование	+	✍
Различные матрицы (plasmids, BACs, и cosmids)	+	✍
Определение смешанных осн	+	✍
Короткие ПЦР продукты products using rapid electrophoresis run modules	✍	+

+ Рекомендовано ✍ допустимо

- **v3.1 большинство задач**

- *De-novo* секвенирование
- Ресеквенирование

- **v1.1 особые задачи**

- Секвенирование коротких ПЦР фрагментов
- Точное определение последовательности от праймера

Подробная Информация в Product Bulletin  
„BigDye Terminator v3.1 и v1.1 Cycle Sequencing Kits“

29

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Реакция секвенирования

Стандартный протокол

	Образец	Контроль
<b>Ready Reaction Mix</b>	8 µL	8 µL
<b>DNA Template</b>	x µL	
PCR Product (1 - 50 ng)		
Plasmid (150 - 300 ng)		
Контрольная ДНК (плазмида pGEM) (0.2 µg/µl)		0.75 – 1.5 µL
<b>Primer 3,2 – 5 pmoles</b>	y µL	
Control Primer (0.8 pmol/ µl )		4 µL
<b>H<sub>2</sub>O (fresh MilliQ water or HPLC-grade)</b>	z µL	6.5 - 7.25 µL
<b>Final volume</b>	20 µL	20 µL

30

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий





## Реакция секвенирования

Протокол термоциклирования

Начальная денатурация : 1 мин. - 96°C

Денатурация : 10 сек. - 96°C

Отжиг : 5 сек. - 50°C

Элонгация : 4 мин. - 60°C

} Циклы (x25)

GeneAmp® PCR Instrument systems 2400, 2700, 2720, 9600, 9700 (Emulation Mode),  
9800 : 1°C / s

- избежать гибридизации ниже чем 50°C
- Если Tm праймера >60°C, этап гибридизации пропускаем (96°C 10 sec, 60°C 4 min)
- увеличить кол-во циклов если сигнал слабый или мало матрицы
- Большие матрицы ДНК: ВАС, космиды, бактериальная геномная ДНК:
  - 95°C - 5 min
  - 95°C/30sec – 50-55°C/10sec - 60°C/4min 50 cycles

31

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Генетические анализаторы

### ABI PRISM® 3130 и 3130xl



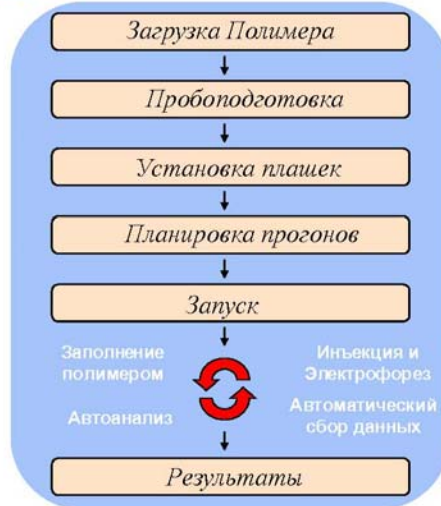
Принцип „Автоматического Секвенатора“  
Названия частей и расходных материалов

32

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Этапы работы



33

© 2009 Институт Генетики и ЗБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## 3130 Описание частей инструмента



34

© 2009 Институт Генетики и ЗБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## 3130 Особенности и преимущества



### Программа Data Collection v3.0

Модули для 3130 POP-7™ Polymer

- Простые и понятные визарды для запуска обслуживания инструмента
- Детектирование искрения
- Поддержка ОС Windows® XP



### Программы для анализа данных

- Seqscape v2.5 - (KB™ basecaller calibration for 3130 Series Systems)
- Seqscape v2.5 - (KB™ basecaller calibration for 3130 Series Systems)
- GeneMapper® Software v3.7-3130 Series support, LOH and AFLP® Kit support
- GeneMapper® ID Software v3.2- 3130 Series support and Yfiler™ support



### 3130 POP-7™ Polymer

Данные высокого качества с более длинным прочтением последовательностей, быстрыми прогонами, что значительно сокращает время проведения анализа.

- Стандартизован под все платформы
- Один полимер для Секвенирования и Фрагментного Анализа
- Enables SNPlex System on 3130xl Genetic Analyzer

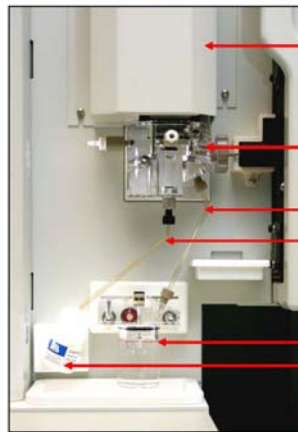
35

© 2009 Институт Генетики и ЗБР АНПУЗ, Центр Геномных Технологий



## Обзор деталей инструмента

Система доставки полимера снабжена насосом



Защитный кожух

Интегрированный поршень насоса

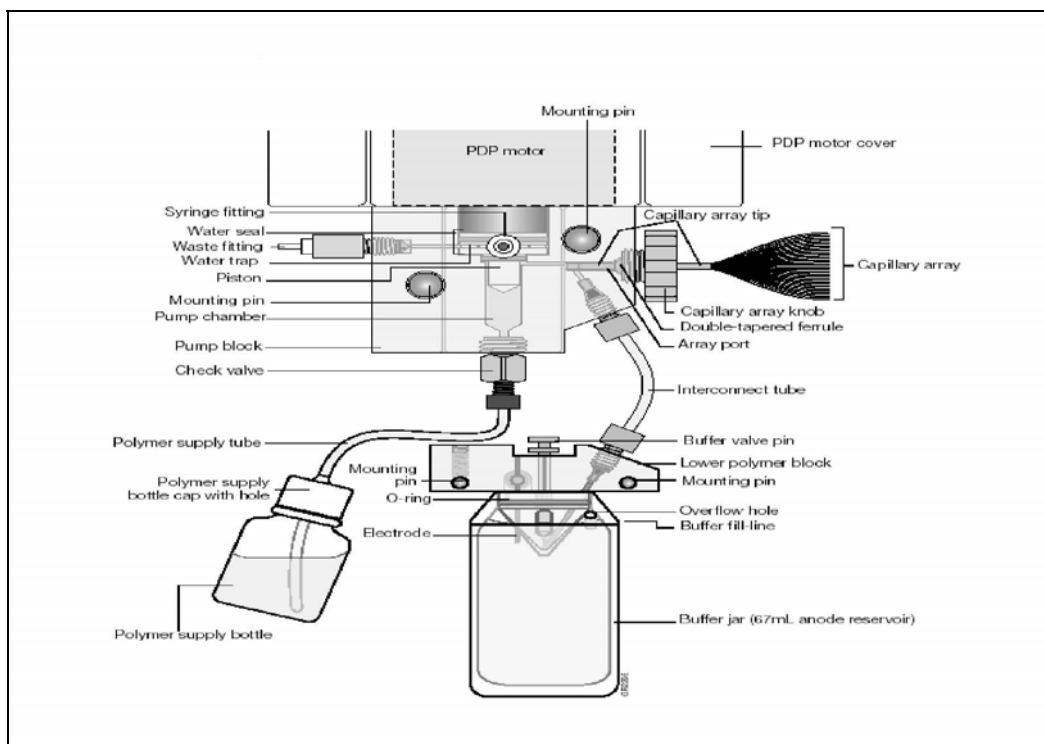
Прозрачные трубки большого диаметра

Ёмкость для буфера на 16 мл

Бутыл с полимером на 7 мл

36

© 2009 Институт Генетики и ЗБР АНПУЗ, Центр Геномных Технологий



## Полимеры

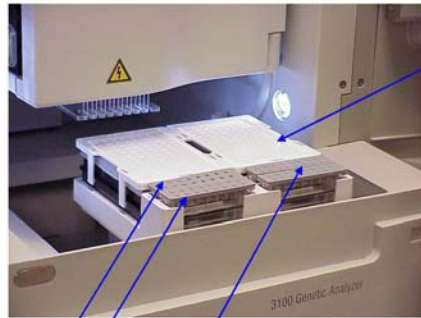
- Flowable polymers dynamically coat capillary preventing bulk fluid flow
- Polymer bottles come in a 7-mL bottle for 3130/3130xl
  - 3130 POP-7™ Polymer (p/n 4352759)
  - 3130 POP-4™ Polymer (p/n 4316355)
  - 3130 POP-6™ Polymer (p/n 4352757)
  - CAP™ Polymer (p/n 4340379)
- Хранить в холодильнике
- Довести до комнатной температуры перед применением
- Срок годности 3 мес.
- Не использовать по истечении срока годности
- Не смешивать полимеры с разными номерами лотов







**Автоматизатор**



Слив  
1X буфер

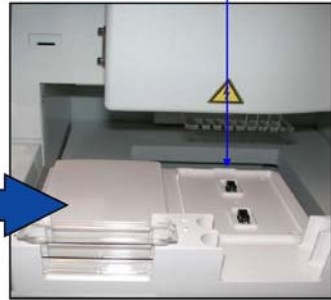
Вода



ABI PRISM® 3130x/ Genetic Analyzer:  
2 x 96 or 384 samples

3130 Genetic Analyzer:  
1 x 96 or 384 samples

Сенсоры детекции плашек  
96 или 384



39

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



**Компановка плашки на 96-лунок (384)**



Плашка

Фиксатор плашки



Септа

Подставка

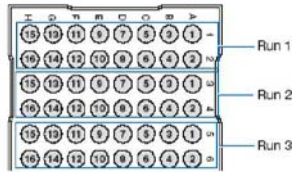
40

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий

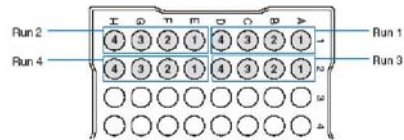


## 96-Well Plate Mapping

3130xl Instrument



3130 Instrument



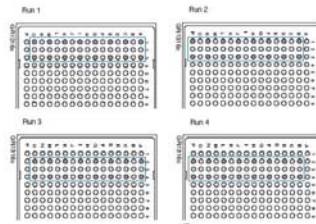
41

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий

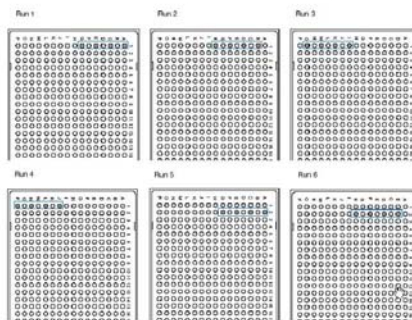


## 384-Well Plate Mapping

3130xl Instrument



3130 Instrument



42

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий

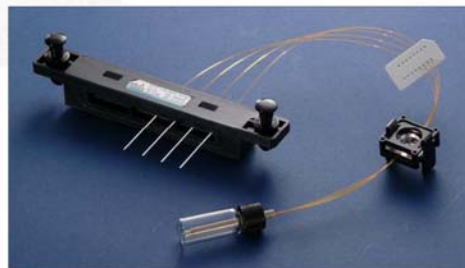


## Капилляры

Длина:  
 - 22 cm  
 - 36 cm  
 - 50 cm  
 - 80 cm



- 50  $\mu$ m ID  
 - 100 прогонов



43

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Комбинации капилляров и полимеров для секвенирования

Type of Run	Capillary Length (cm)	Polymer Type	Module	Run Time (min)	24 hr Throughput (number of samples)		KB™ Basecaller QV <sub>20</sub> LOR <sup>a</sup> b
					3130 Genetic Analyzer	3130x Genetic Analyzer	
Ultra rapid	36	POP-4	UltraSeq36_POP4	40	144	576	400
		POP-7	UltraSeq36_POP7	35	164	656	500
Rapid	36	POP-6	RapidSeq36_POP6	60	96	384	500
		POP-7	RapidSeq36_POP7		96	384	600
Fast	50	POP-7	FastSeq50_POP7	60	96	384	700
Standard	50	POP-4	StdSeq50_POP4	100	56	224	600
		POP-6	StdSeq50_POP6	150	36	144	600
		POP-7	StdSeq50_POP7	120	48	192	850
Long read	80	POP-4	LongSeq80_POP4	210	24	96	700
		POP-7	LongSeq80_POP7	170	32	128	950

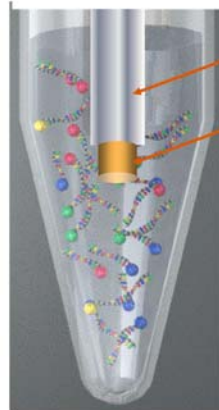
a. Length of Read (LOR) is the usable range of high-quality or high-accuracy bases determined by Quality Values (QV) generated by KB Basecaller v1.2. The LOR is determined by using a sliding window of 20 bases, which has an average QV > 20.  
 b. 98.5% basecalling accuracy, less than 2% Ns.

44

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Электрокинетическая инъекция



Электрод (Катод)

Капилляр

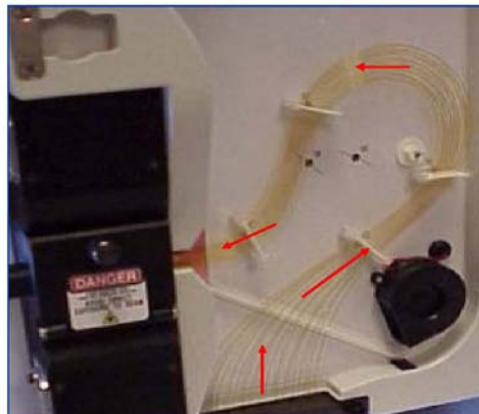
- Капилляр и электрод погружаются в образец
- Подается ток на определенное время
- Отрицательно заряженные молекулы ДНК входят в капилляр и мигрируют к положительно заряженному электроду (анод) на другом конце капилляра
- Капилляр перемещается в буфер для проведения электрофореза

45

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Капиллярный электрофорез



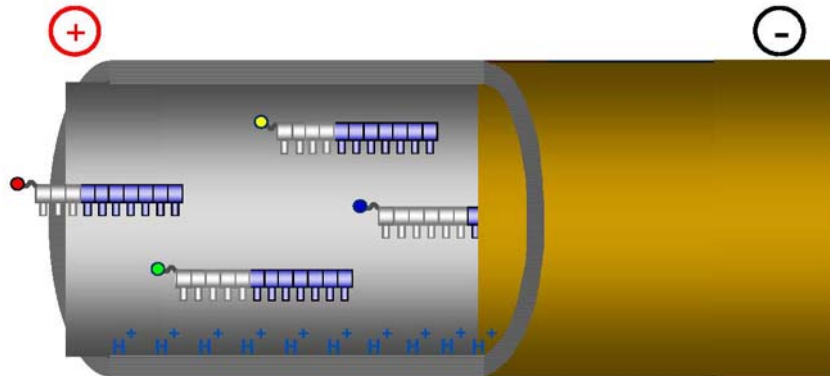
46

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий





## Принцип капиллярного электрофореза

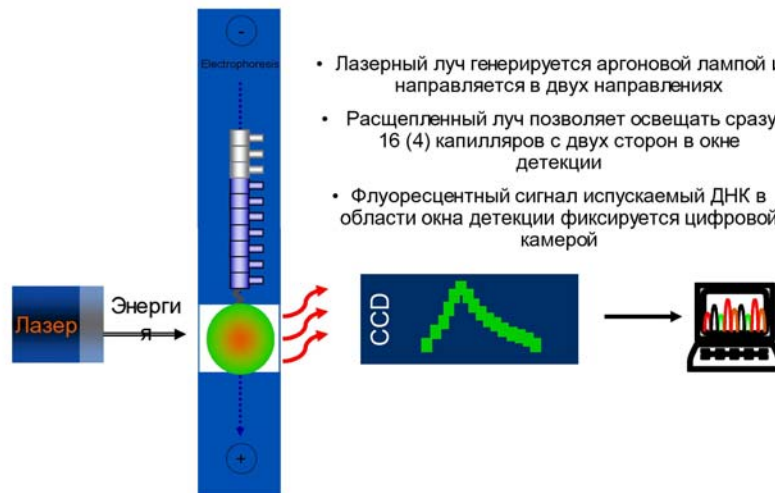


47

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Детектирование флуоресцентного сигнала



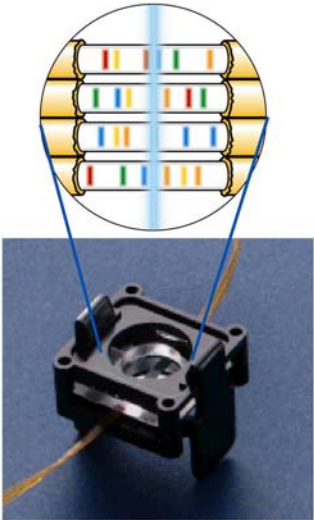
- Лазерный луч генерируется аргоновой лампой и направляется в двух направлениях
- Расщепленный луч позволяет освещать сразу 16 (4) капилляров с двух сторон в окне детекции
- Флуоресцентный сигнал испускаемый ДНК в области окна детекции фиксируется цифровой камерой

48

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



### Капилляр: Окно детекции

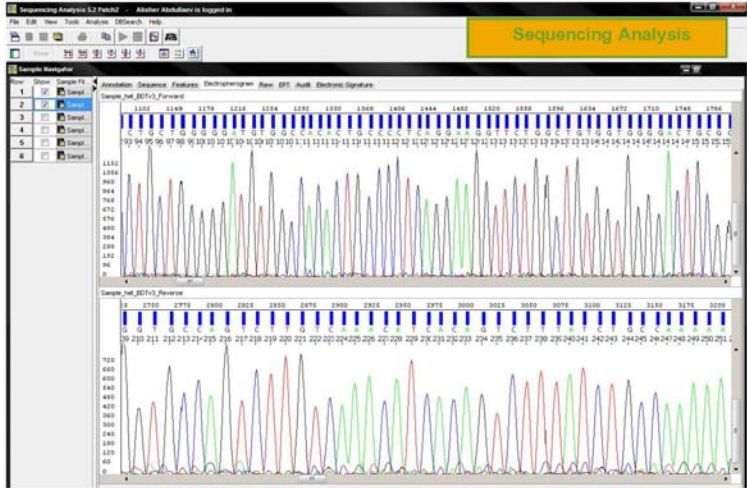


49

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



### Анализ результатов секвенирования

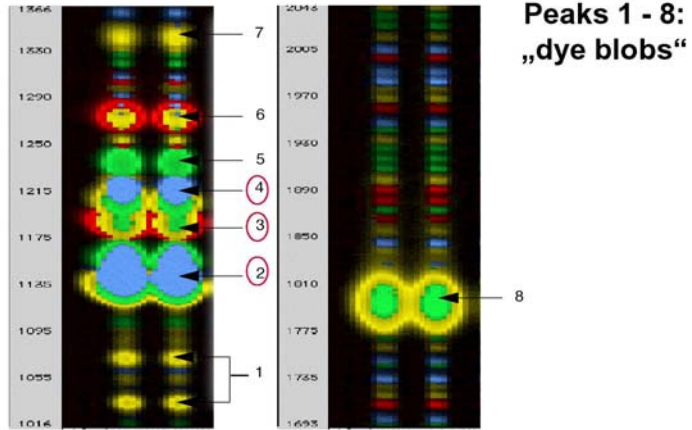


50

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Несвязавшиеся BigDye® Terminator Dyes "dye blobs" in gel image / array view

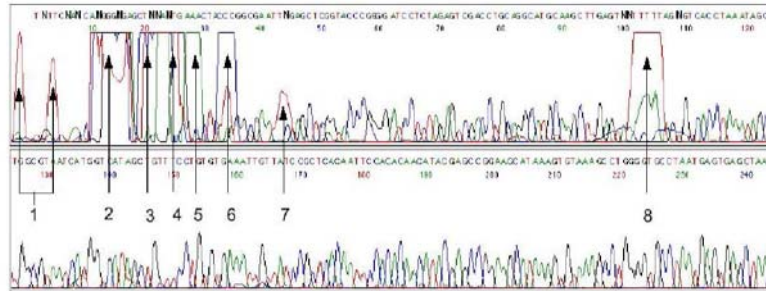


51

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Несвязавшиеся BigDye® Terminator Dyes "dye blobs" in analyzed data



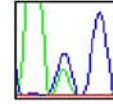
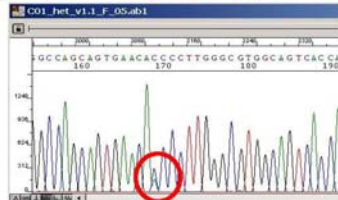
52

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий

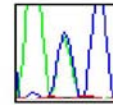
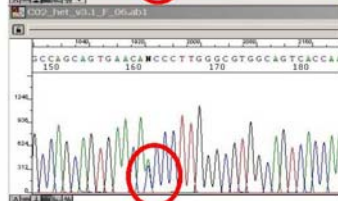


## Наборы BigDye® Terminator Пример результата: Детекция гетерозиготы

v1.1



v3.1



Note: Более однородный профиль пиков и идентификация смешанных пиков у 3.1

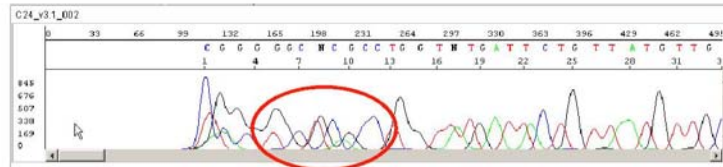
53

© 2009 Институт Генетики и ЗБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



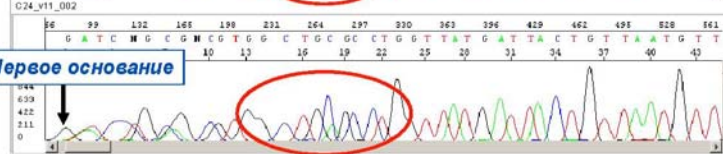
## BigDye® Terminator Kits Пример результата: начало последовательности

v3.1



v1.1

Первое основание



Если необходимо определение первых нуклеотидов или гетерозиготы в пределах 50 п.о., рекомендован набор BigDye® Terminator v1.1.

54

© 2009 Институт Генетики и ЗБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий

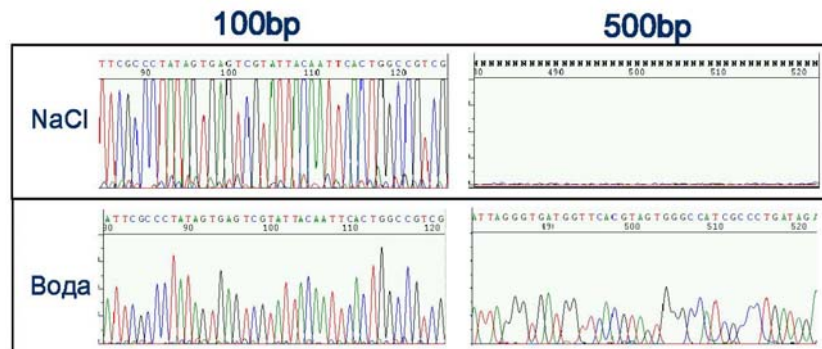




## Качество ДНК матрицы

Влияние солей на эффективность полимеразы

### Сравнение контроля рGEM® в присутствии 40mM NaCl или воды



55

© 2009 Институт Генетики и ЗБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Выявление и устранение неисправностей

### Частые проблемы

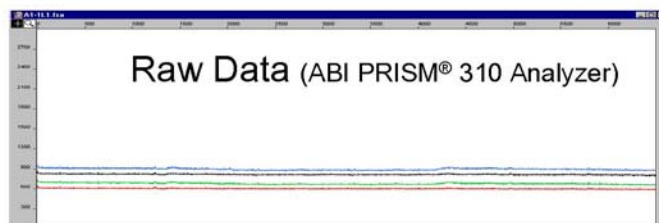
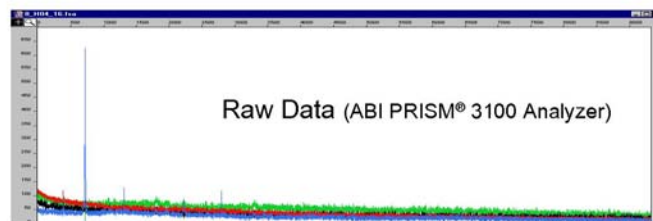
- 1) Отсутствие данных/сигналов
- 2) Кантаминция
- 3) Потеря разрешения
- 4) Присутствие двух матриц (после первого ПЦР остался второй праймер)
- 5) Неспецифические сигналы
- 6) Сложные последовательности (GC – регионы, гомополимеры)

56

© 2009 Институт Генетики и ЗБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## 1) Отсутствие данных/сигналов



57

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



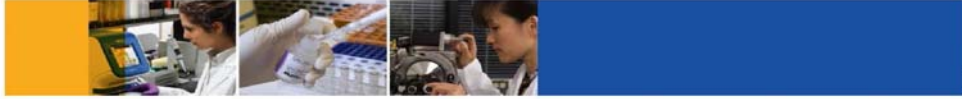
## 1) Нет данных/сигналов

### Возможные причины:

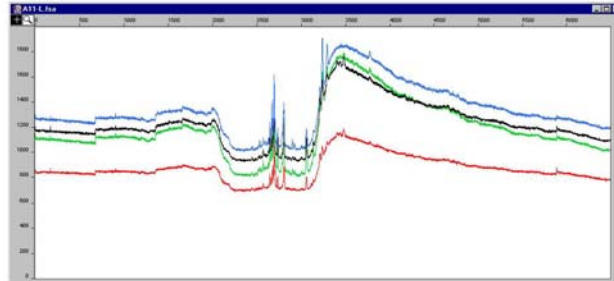
- Проблема инъекции
  - Пузырек в пробирке с образцом
  - Нет тока между капилляром и электродом (пузырек в электрофорезной системе)
  - Объем образца в пробирке слишком мал
  - Образец ( и размерный стандарт ) не добавлен
  - Не оптимальная калибровка автодозатора (310 instrument)
  - Забитый капилляр
- Проблема детекции
  - Лазер потерял интенсивность
  - Не оптимальная пространственная калибровка

58

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## 2) Контаминация



- Флуоресцентная контаминация
  - образец
  - блок, шприц

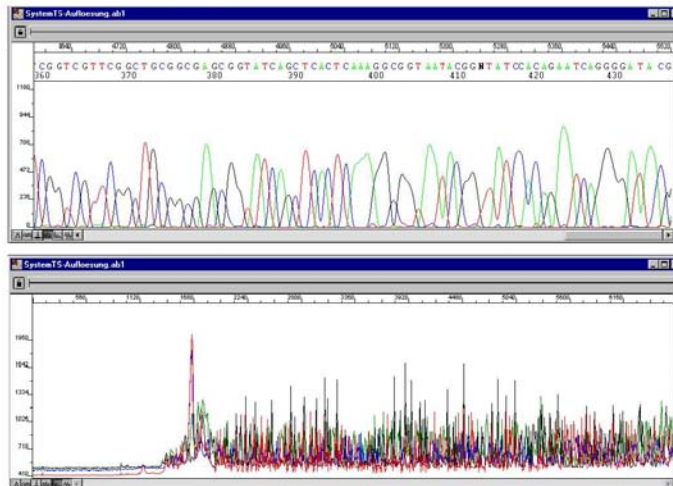
59

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## 3) Потеря разрешения

- Старый капилляр

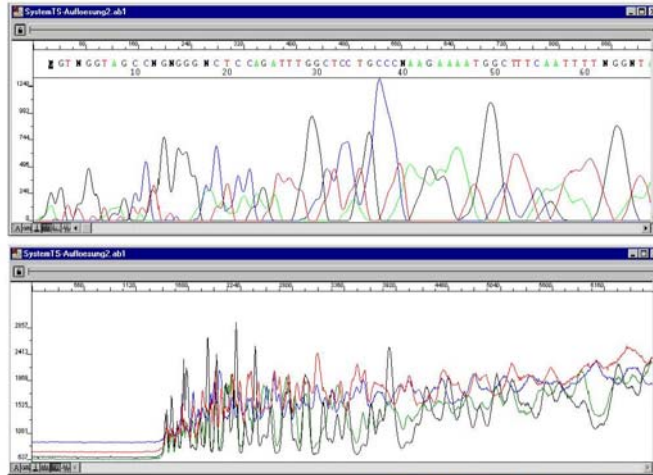


60

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



### 3) Потеря разрешения



61

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



### Потеря разрешения

Возможные причины:

- Старый капилляр
- Неполная смена полимера от прогона к прогону
- Старый полимер

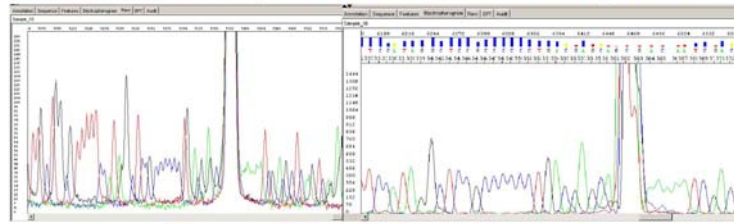
62

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий





## 5) Неспецифичные сигналы: Импульсы



Импульсы в обработанных и исходных данных:

- импульс = одиночный (высокий) по 4 или 5 красителям
- почистите шприц и блок

Совет:

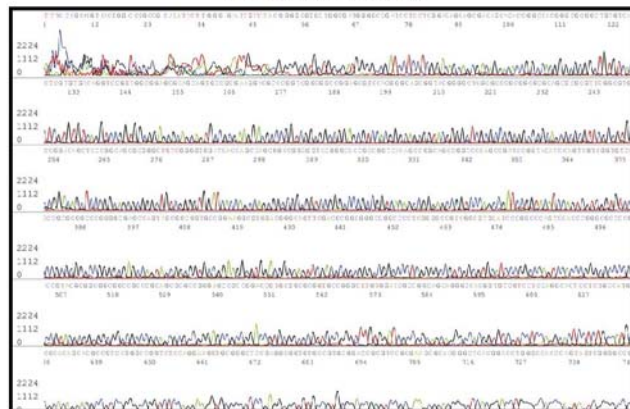
- Используйте свежий, комнатной температуры полимер (без кристаллов);
- если не прошли, то замените капилляр

63

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## GC motif BigDye® Terminator v3.1 0.5 ul RR mix in 10 ul reaction



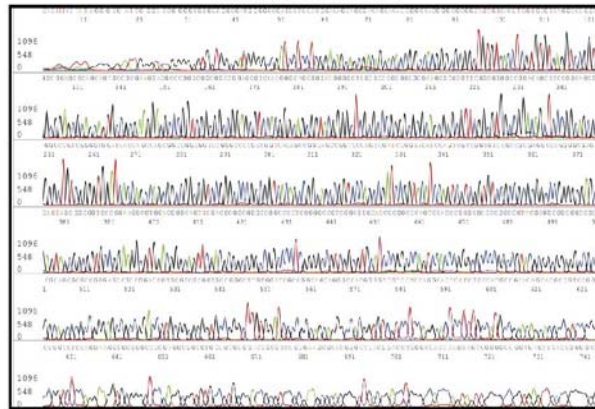
Слабый сигнал, необходимо увеличить Ready reaction mix

64

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



**GC motif**  
**BigDye® Terminator v3.1**  
 4 ul RR mix in 10 ul reaction



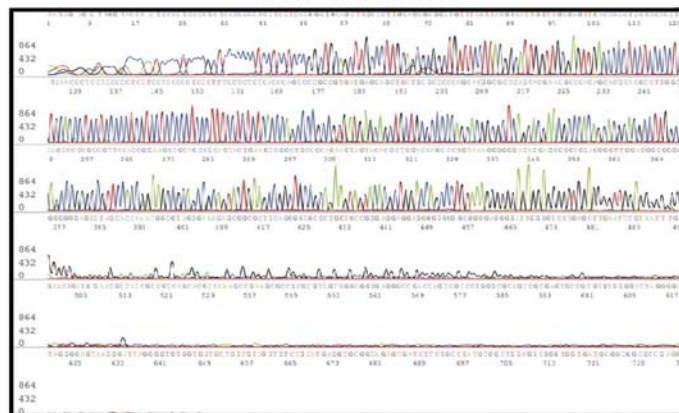
Кол-во реакционной смеси добавлено согласно протоколу

65

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



**G motif**  
**BigDye® Terminator v3.1**  
 4 ul RR mix in 10 ul reaction



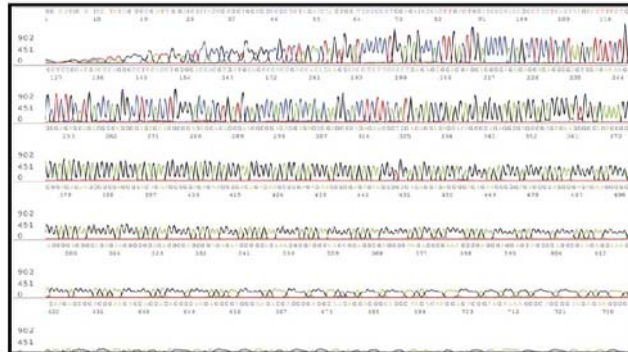
G-массив , проблема прочтения повторов G после 370 нуклеотида

66

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



**G motif**  
**BigDye® Terminator v3.1/dGTP BigDye® Terminator v3 BLEND**  
 4 ul RR mix in 10 ul reaction



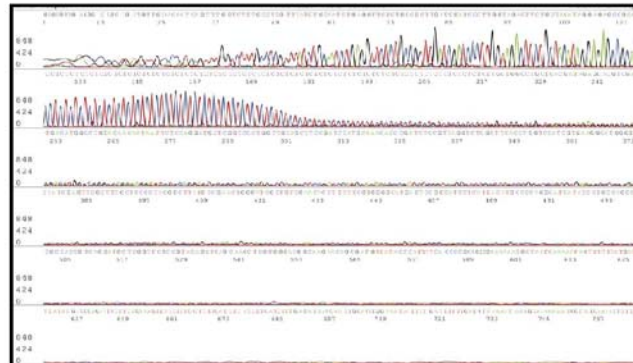
**Изменение реакционной смеси**  
 1/2X разведение BigDye® Terminator v3.1/dGTP BigDye® Terminator v3.0

67

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



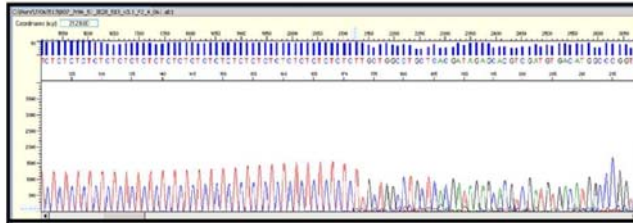
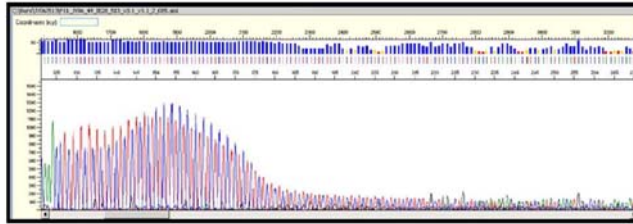
**~100 Base CT Repeat**  
**BigDye® Terminator v3.1**  
 4 ul RR mix in 10 ul reaction



**СТ повторы не читаются при стандартной реакции**

68

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



Проблему чтения сложных регионов можно преодолеть изменив место посадки праймера

69

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНР/УЗ, Центр Геномных Технологий



Sequence Context	Recommendation
polyA and poly C	BigDye® Terminator v3.1
poly T	ABI PRISM® dRhodamine Terminator , F3
poly G	BigDye® Terminator v3.1 and primer design
A T and AC rich	BigDye® Terminator v3.1
GA repeats	BigDye® Terminator v3.1/dGTP BigDye® Terminator v3.0 BLEND
GA rich	dGTP BigDye® Terminator v3.0, BigDye® Terminator v3.1/dGTP BigDye® Terminator v3.0 BLEND
GT rich/repeats	BigDye® Terminator v3.1/dGTP BigDye® Terminator v3.0 BLEND
CT repeats	F2, F3
CT rich	BigDye® Terminator v3.1
GC rich	BigDye® Terminator v3.1
GC repeats (CGG, GGC)	F2, F3
hairpin	BigDye® Terminator v3.1, primer design
secondary sequence	modify cycling conditions

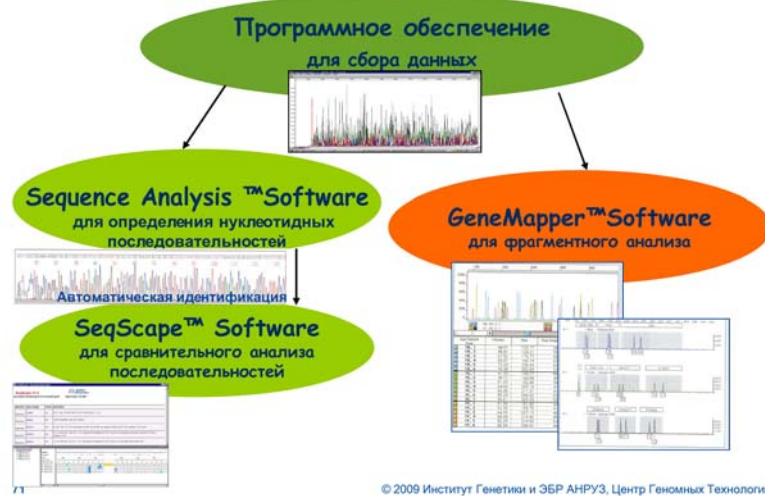
70

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНР/УЗ, Центр Геномных Технологий





## Компьютерный анализ



# СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ

## **ОХРАНА ТРУДА И ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ В НАУЧНЫХ ЛАБОРАТОРИЯХ ЦЕНТРА ГЕНОМНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ**

*Мавлянов Г.Т.*

к.б.н., ведущий научный сотрудник  
Центра Геномных Технологий ИГиЭБР

**Виды инструктажа.**

**Регистрационные журналы**

**Оказание первой помощи**

**Правила, способы и средства тушения пожаров**

**Работа с органическими растворителями**

**Работа с щелочными металлами**

**Работа с ртутью**

**Техника безопасности в химической лаборатории**

**Химический взрыв**

**Физический взрыв**

**Пожар**

**Термические ожоги**

**Химические ожоги**

**Отравление**

**О возмещении трудящимся в случае профессиональных заболеваний  
(пересмотренная в 1934 году)**

**Презентация «Техника безопасности в научных лабораториях Центра  
Геномных Технологий»**

Культура охраны труда и система охраны труда формируются на предприятиях уже в течение нескольких десятилетий, и они постоянно совершенствуются, модернизируются. Огромное значение уделяется в первую очередь профессиональной подготовке персонала, который эксплуатирует оборудование, качеству и надежности самого оборудования. Оно в обязательном порядке систематически проверяется и испытывается. Проводится целый комплекс мероприятий, обеспечивающих его безопасное функционирование. Таким образом, безопасность на предприятии обеспечивает и защиту окружающей среды.

Актуальность же данного мероприятия продиктована тем, что они направлены, прежде всего, на предупреждение случаев производственного травматизма специалистов. А между тем вопрос охраны труда имеет большое не только социальное, но и экономическое значение. Так, аналитиками было подсчитано, что ежегодно во всем мире от несчастных случаев на производстве и профессиональных заболеваний погибает около 2,2 миллиона человек. Приблизительно 270 миллионов человек получают серьезные травмы и еще 160 миллионов работников страдают кратковременными и длительными профессиональными заболеваниями. По оценкам Международной организации труда, членом которой является и Узбекистан, общие потери от этих несчастных случаев и проблем, связанных со здоровьем, составляют примерно 4% мирового валового внутреннего продукта.

Большую роль в формировании нового подхода к охране труда и технике безопасности призван сыграть и недавно вступивший в силу Закон «Об обязательном государственном социальном страховании от несчастных случаев на производстве и профессиональных заболеваний». Надо отметить тот факт, что охрана труда всегда была частью государственной политики. Практически сразу после обретения независимости – в

1993 году был принят Закон «Об охране труда», в котором важнейшим принципом был признан приоритет жизни и здоровья работника по отношению к результатам производственной деятельности предприятия. Новый закон, направленный в первую очередь на усиление социальной защиты работающих граждан, еще более усиливает мотивацию, как работодателей, так и работников к соблюдению правил по технике безопасности и, несомненно, будет способствовать снижению уровня производственного травматизма и профессиональных заболеваний.

### **Виды инструктажа.**

Вводный инструктаж проводится со всеми вновь принимаемыми на работу независимо от их образования, стажа работы по данной профессии или должности, а также с командированными работниками, учащимися, студентами, прибывшими на производственное обучение или практику.

Первичный инструктаж на рабочем месте должен проводиться со всеми вновь принятыми на работу работниками, переводимыми из одного подразделения юридического лица в другое, командированными, учащимися и студентами, а также с работниками, которым поручается выполнение новой для них работы. Данный вид инструктажа проводится с каждым работником индивидуально с демонстрацией безопасных приемов труда.

Повторный инструктаж проводится с целью проверки и повышения уровня знаний работником правил и инструкций по охране труда индивидуально или с группой работников одной профессии или группы по программе инструктажа на рабочем месте.

### **Регистрационные журналы**

Проведение соответствующего вида инструктажа, проверки знаний и правил охраны труда и получения работником допуска к самостоятельной работе, руководитель, проводивший инструктаж, отмечает в журнале регистрации инструктажа на рабочем месте и (или) в личной карточке работника дату проведения инструктажа, фиксирует оценку знаний с обязательной подписью инструктируемого работника и инструктирующего. При регистрации проведения внепланового инструктажа необходимо также указать причину его проведения. Проведение целевого инструктажа с работниками, которым предстоит проведение работ по наряду-допуску, разрешению и т. п., подлежит фиксации непосредственно в наряде-допуске или в ином документе, служащем разрешением на производство данных работ.

### **Особенности профиля лабораторий биотехнологии**

Лаборатория профиля генетической инженерии и биотехнологии сочетает условия, характерные для химической, физической и биологической исследовательской лабораторий. Следовательно, правила сочетают соответствующие профильные инструкции. Работа в химической лаборатории всегда сопряжена с определенным риском. Но при грамотной и осторожной работе этот риск сводится к минимуму, ведь большинство пожаров, отравлений, ожогов и травм происходит исключительно по причине пренебрежения правилами техники безопасности или просто незнанию их.

#### **Оказание первой помощи**

- **Остановка сердца или дыхания**
- **Термические ожоги**
- **Ожоги кислотами и щелочами**
- **Поражения электрическим током**
- **Попадание агрессивных веществ в глаза**
- **Кровотечения**

#### **Правила, способы и средства тушения пожаров**

- Углекислотные огнетушители
  - Правила тушения пожаров водой
  - Правила тушения пожаров песком
  - Тушение горячей одежды на человеке
  - Возгорания в вытяжном шкафу
- Работа с органическими растворителями**
- Источники опасности
  - Работа с легковоспламеняющимися жидкостями
    - Учет утяжеления воздуха
    - Проведение процессов, связанных с нагреванием ЛВЖ
    - Хранение и проливы ЛВЖ
    - Предотвращение возможности воспламенения ЛВЖ

**Работа с щелочными металлами**

- Источники опасности
  - Литий
  - Натрий
  - Калий
- Уничтожение остатков щелочных металлов
- Очистка щелочных металлов от оксидных пленок
- Абсолютирование органических растворителей
- Тушение горящих щелочных металлов

**Работа с ртутью**

- Источники опасности при работе с ртутью.
- Действие ртути на организм человека.
- Обнаружение паров ртути.
- Механические методы демеркуризации.
- Химические методы демеркуризации.

**Техника безопасности в химической лаборатории**

Жизнь и здоровье практикующего химика во многом зависит от правил, которые просто необходимо соблюдать в лаборатории. Но часто некоторые правила техники безопасности не объясняются, а просто принимаются на веру. Эта страница дает перечень ситуаций, с объяснением причин, которые могут возникнуть в химической лаборатории.

**Химический взрыв.**

Химический взрыв - взрыв, возникающий за счет протекания химической реакции веществ или разложения вещества. Обычно характеризуется значительной разрушительной мощностью и поражающей способностью. Может приводить к пожару в лаборатории.

Ситуации, которые могут привести к химическому взрыву:

1. Смешивание перекиси водорода с альдегидами и кетонами в присутствии даже микропримесей кислот приводит к образованию высокочувствительных перекисей. Попытка перегонки такого раствора и иногда и удар колбы об стол может привести к взрыву.

2. При хранении простых эфиров в них накапливаются перекисные соединения обладающие взрывчатыми свойствами (особенно опасны эфиры имеющие атом водорода в альфа-положении). Перегонка таких эфиров может привести к взрыву. Перед перегонкой обязательна проверка на перекиси и их разрушение.

3. Сушка любых галогеналканов (в том числе и фреонов) натрием может привести к взрыву. Состав взрывчатых веществ не известен, но иногда взрыв происходит после некоторого индукционного периода.



4. Работа с хлорной кислотой в присутствии органических веществ должна вестись с осторожностью, так как многие смеси с хлорной кислотой и органические перхлораты взрывчаты. Смешивание хлорной кислоты с диметилсульфоксидом дает немедленный взрыв.

5. Многие забывают, что при смешивании перманганата калия с концентрированной серной кислотой образуется семиокись марганца, которая взрывает при нагревании или соприкосновении с органическими веществами.

6. Смеси любых восстанавливающих веществ с сухими окислителями, такими как перманганат калия, хлораты, перхлораты, броматы, иодаты, периодаты потенциально взрывоопасны и обращаться с ними нужно с осторожностью

7. Смешивание тетранитрометана с органическими веществами дает очень чувствительные смеси.

8. Работа со взрывчатыми веществами.

9. Хранение вместе растворов аммиака и иода, может привести к образованию на сосудах черного осадка чрезвычайно чувствительного взрывчатого иодистого азота.

10. Длительное хранение аммиачных растворов солей серебра может привести к выпадению очень взрывчатого (даже под слоем воды) черного осадка нитрида серебра.

11. Хранение кислот в металлических емкостях или пролив их на металлические поверхности приводит к выделению водорода. В замкнутом объеме может накопиться взрывоопасная концентрация. Аналогично опасно хранить щелочи рядом с металлами амфотерного характера (алюминий, цинк).

12. Смешивание пероксидных соединений с солями переходных металлов может спровоцировать взрыв из-за каталитического ускорения разложения перекисей.

13. Смешивание солей аммония и гидразина с солями, содержащими анион-окислитель. При этом могут образовываться сильновзрывчатые соли (к ним например относятся, хлорат и перманганат аммония, нитрат, хлорат, перхлорат гидразина и т.д.).

14. Растворы азидов и пикратов с тяжелыми металлами могут дать очень чувствительные к удару и трению соли. Также не допускается слив солей азидов в канализацию, вследствие возможности образования в трубах азиды железа.

#### **Физический взрыв.**

Физический взрыв - взрыв, возникающий за счет быстрого разрушения емкостей или из-за быстрого выделения тепла в какой-либо точке. Обычно (но не всегда) имеет меньшую мощность, чем химический и меньшие разрушительные последствия.

Ситуации, которые могут привести к физическому взрыву:

Кипячение реакционной смеси или реакции с выделением газа в герметичной системе. Эта ситуация возникает когда процесс проводится в намеренно замкнутой системе или когда происходит забивание/закорковывание отводных трубок.

2. Приливание легкокипящей жидкости в систему с температурой выше ее точки кипения. При этом жидкость моментально превращается в пар и установку может разорвать давлением паров.

3. Работа со сжиженными газами в полностью герметичной системе не рассчитанной на высокое давление.

4. Работа с солями плутония должна проводиться так, чтоб не произошло накопление критической массы (500 г) в любой емкости.

#### **Пожар.**

Пожар - неконтролируемое возгорание в лаборатории. Может привести к полному уничтожению всей лаборатории.

Ситуации, которые могут привести к пожару:

1. Термическое лопание колбы с легко воспламеняющимися жидкостями. Для локализации очага пожара рекомендуется под установку с колбой заранее помещать металлический поддон с загнутыми краями.

2. Смешивание веществ дающих экзотермическую реакцию с воспламеняющимися материалами. Были случаи возгорания смесей сульфата меди с железом и опилками, негашеной извести с опилками или углем и т.д.

3. Работа с очень легко воспламеняющимися жидкостями (диэтиловый эфир, сероуглерод) и горючими газами если в помещении находятся источники с открытым пламенем или сильно нагретые предметы. Есть также мнение, что работа с эфиром на открытом пламени более безопасна, вследствие того, что нет риска образования больших объемов паровоздушной смеси.

4. Работа с щелочными, щелочноземельными металлами, их гидридами, ацетиленидами, а также с металлорганическими веществами содержащими щелочные, щелочноземельные металлы, алюминий должна проводиться в отсутствии влаги.

#### **Термические ожоги.**

Термический ожог - воздействие на кожу сильно нагретых материалов.

Ситуации, которые могут привести к термическому ожогу:

1. Работа с нагревательными приборами. Следует помнить старое правило: "горячая пробирка выглядит также как и холодная".

#### **Химические ожоги.**

Химический ожог - воздействие на кожу едких веществ с возникновением очага поражения.

Ситуации, которые могут привести к химическому ожогу:

1. Работа с едкими веществами (сильными и слабыми кислотами и щелочами, раздражающими веществами).

#### **Отравление.**

Отравление - попадание в организм токсичного вещества.

Ситуации, которые могут привести к отравлению:

1. Потребление пищи в лаборатории. Уже много пострадавших.

2. Со всеми новыми веществами следует обращаться очень осторожно, так как они могут оказаться неожиданно сильнотоксичными.

3. Работа с высокотоксичными веществами требует внимательности и осторожности.

4. Растворение брома в ацетоне или других кетонах. Реакция протекает очень активно после индукционного периода и приводит к сильно раздражающим (слезоточивым) бромкетонам.

5. Следует помнить, что растворение активных металлов (в том числе и цинка) в достаточно концентрированной серной кислоте часто происходит с выделением сероводорода. Растворение любых металлов в азотной кислоте происходит с выделением окислов азота.

Случаи профессиональных заболеваний и потери здоровья на производстве регулируются соответствующими законами. Государства-члены международной организации труда придерживаются конвенции:

### **О возмещении трудящимся в случае профессиональных заболеваний (пересмотренная в 1934 году)**

#### ***Конвенция международная организация труда***

21 июня 1934 г. N 42 (ТП 97-3)

#### ***О безопасности при использовании химических веществ на производстве.***

*Конвенция международная организация труда* 25 июня 1990 г. N 170, некоторые извлечения:

***Раздел v. обязанности трудящихся.***

**Статья 17**

1. Трудящиеся сотрудничают по возможности самым тесным образом со своими предпринимателями в выполнении предпринимателями своих обязанностей и следуют всем процедурам и практическим правилам, касающимся безопасности труда при использовании химических веществ на производстве.

2. Трудящиеся принимают все разумные меры к тому, чтобы полностью исключить или свести до минимума риск, грозящий им самим и другим лицам, в связи с использованием химических веществ на производстве.

***Раздел VI. ПРАВА ТРУДЯЩИХСЯ И ИХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ***

**Статья 18**

1. Трудящиеся имеют право покинуть место, ставшее опасным в результате использования химических веществ, если они имеют достаточно веские основания считать, что их безопасность или здоровье подвергаются непосредственной и серьезной угрозе, и немедленно информируют об этом своего непосредственного руководителя.

2. Трудящиеся, которые покинули опасное место в соответствии с положениями предыдущего пункта или осуществляют любое из прав, указанных в настоящей Конвенции, защищены от ненадлежащих последствий.

3. Заинтересованные трудящиеся и их представители имеют право на: а) информацию об основном характере используемых на производстве химических веществ, об опасных свойствах таких химических веществ, о мерах предосторожности, на обучение и профессиональную подготовку; б) информацию, содержащуюся на этикетках и маркировках; в) доступ к картам данных по безопасности химических веществ; г) любую иную информацию, наличие которой предусматривается настоящей Конвенцией. 4. Если раскрытие основного характера одного из веществ в составе химической смеси конкуренту может нанести ущерб деловой стороне деятельности предпринимателя, то предприниматель может, предоставляя информацию, требуемую согласно вышеуказанному пункту 3, защищать такую информацию средствами, утвержденными компетентным органом согласно подпункту "b" пункта 2 статьи 1.

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ  
в научных лабораториях Центра Геномных  
Технологий

Ведущий научный сотрудник, канд.хим.наук  
Гафур Турдалиевич МАВЛОНОВ



## ПРАВА И ОБЯЗАННОСТИ СОТРУДНИКОВ

**КОНВЕНЦИЯ МЕЖДУНАРОДНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ТРУДА**

25.09.1990/N 170

**Раздел V. ОБЯЗАННОСТИ**

1. ...следуют всем процедурам и правилам безопасности труда.
2. ...принимают все меры, исключаящие риск, грозящий им самим и другим лицам.

**Раздел VI. ПРАВА**

1. ...имеют право покинуть ставшее опасным для здоровья рабочее место, и немедленно информируют руководителя.
3. ...имеют право на:
  - a) информацию о характере используемых на вредных веществ и о мерах предосторожности.
  - b) информацию, содержащуюся на этикетках и маркировках;
  - c) доступ к картам данных по безопасности химических веществ;
4. Если организация имеет НоуХау по пункту 3 информация предоставляется с сохранением секретов.

**ФАКТОРЫ РИСКА В ЛАБОРАТОРИИ БИОТЕХНОЛОГИИ**



## УРОВНИ БИОБЕЗОПАСНОСТИ ЛАБОРАТОРИЙ

**BSL1** Известные возбудители с миним. риском для персонала и окружающей среды (непатогенные *E.coli* ...)

**BSL2** Возбудители болезней средней тяжести с риском для персонала и окружающей среды (вирусы гриппа, энцефалита ...)

**BSL3** Экзотические биоагенты, имеющие летальный исход для персонала и окружающей среды (возбудители тифа, туберкулоза ...)

**BSL4** Опасные и экзотические биоагенты, имеющие фатальный исход для персонала и окружающей среды для которых **НЕТ ВАКЦИНЫ** (возбудители геморрагической лихорадки...)

## BSL 4 level laboratory



СБОР И НЕЙТРАЛИЗАЦИЯ БИОКОНТАМИНАНТОВ



# КАЧЕСТВЕННЫЙ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ДНК И РНК. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

*Мавлянов Г.Т.*

к.б.н., ведущий научный сотрудник  
Центра Геномных Технологий ИГиЭБР

Г.Т. Мавлянов

ЦГТ ИГенЭБР АН РУз

УФ анализ ДНК/РНК

## КАЧЕСТВЕННЫЙ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ДНК и РНК. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

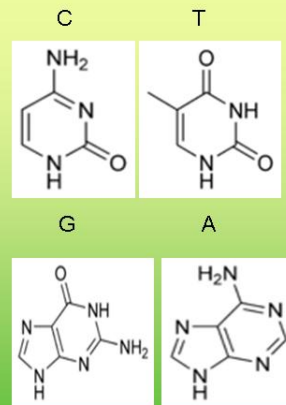
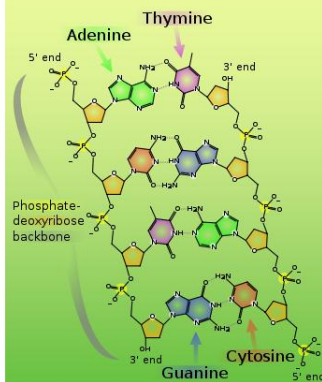
Ведущий научный сотрудник, канд.хим.наук  
Гафур Турдалиевич МАВЛОНОВ

Г.Т. Мавлянов

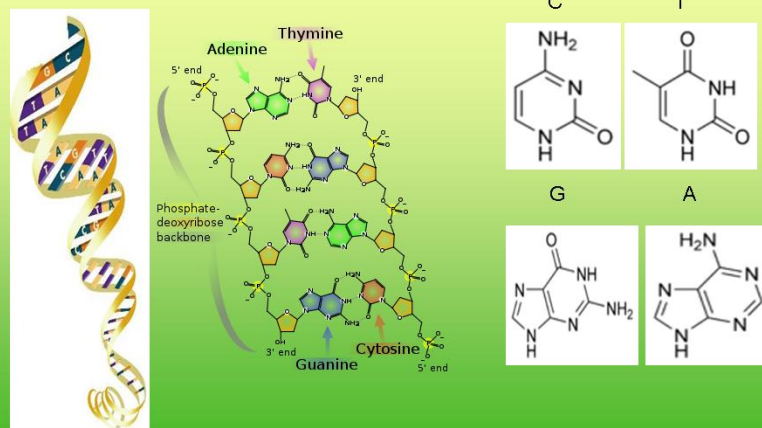
ЦГТ ИГенЭБР АН РУз

УФ анализ ДНК/РНК

### СТРУКТУРА ДНК



## СТРУКТУРА ДНК

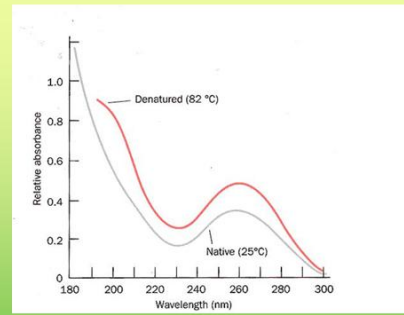
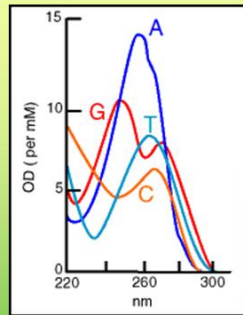


## Виды ультрафиолетового излучения

Наименование	Аббревиатура	Длина волны, нм	Энергия фотона, эВ
Ближний	NUV	400 — 300	3.10 — 4.13
Средний	MUV	300 — 200	4.13 — 6.20
Дальний	FUV	200 — 122	6.20 — 10.2
Экстремальный	EUV, XUV	121 — 10	10.2 — 124
Вакуумный	VUV	200 — 10	6.20 — 124



## УФ СПЕКТРЫ АО и ДНК



-C=C-	185 - 200
-C=C-C=C	200 - 230
-C=C-C=C-C=C-	260 - 280
Ar	

УФ СПЕКТР ДНК/РНК  
КАЧЕСТВЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

$$A_{260}/A_{280} = 1.6 - 2.0$$

$$A_{260}/A_{230} = 1.6 - 2.0$$

УФ СПЕКТР ДНК/РНК  
КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

$$\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = (A_{260}) \times (\text{DF}) \times (50)/(\text{L cm})$$

$$\text{RNA } (\mu\text{g/ml}) = (A_{260}) \times (\text{DF}) \times (40)/(\text{L cm})$$



# Практическое занятие ПО ПОДГОТОВКЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА, ВЫДЕЛЕНИЮ ДНК ИЗ КЛЕТОК БАКТЕРИЙ И ВЫДЕЛЕНИЮ ДНК ИЗ РАСТЕНИЙ

*Эгамбердиев Ш.Ш.*

младший научный сотрудник  
Центра Геномных Технологий ИГиЭБР

## 1. Вступление (выбор объекта)

Нуклеиновые кислоты, как известно, имеются в каждой клетке, а значит, выделить ДНК можно из любой ткани, даже из костей животных, чешуи рыб или древесины, где клеток не так много по сравнению с объёмом внеклеточного вещества. Во всех тканях организма как животного, так и растения, ДНК, как правило, одинакова. Отличаются эти ткани тем, что в одних из них помимо вещества наследственности больше почти ничего нет (молоки селёдки), а в других, таких, как костная ткань, содержание ДНК относительно невелико. Кроме того, существуют ткани, в клетках которых имеется удвоенный набор хромосом (к тетраплоидным относятся, в частности, клетки печени), а потому и ДНК в них в два раза больше, чем во всех остальных. В семенах растений относительное содержание ДНК выше, чем в стебле, а из молодых растущих побегов ДНК можно выделить существенно больше, чем из такого же по объёму куса одревесневшего ствола. Если перед исследователем не стоит какой-то специальной задачи, он старается выбрать для работы ткань, в которой мало межклеточного вещества и много самих клеток. Причём желательно, чтобы ткань легко распадалась на эти составляющие, а клетки не были перегружены белками (как мышечные), липидами (как жировые) или полисахаридами (как клетки мозга).

## 2. Дробление ткани на клетки

В результате механического разрушения ткань, из которой мы собираемся выделить ДНК, распадается на отдельные клетки: чтобы механически разорвать связи между ними требуется, как правило, гораздо меньше усилий, чем для того, чтобы повредить саму клетку. Поскольку при нижеприведённом способе выделения ДНК требуются неповреждённые клетки, лучше использовать свежемороженый материал при условии, что продукт не размораживали в процессе хранения.

## 3. Высвобождение макромолекул

Что касается фильтрации, то она нужна для того, чтобы механически удалить из клеточной суспензии всевозможные примеси, в том числе, крупные куски ткани, так как химические вещества, которыми обрабатывается материал при выделении ДНК, не проникают глубоко внутрь таких конгломератов. Обработать полученные клетки следует, в первую очередь, лизирующим буфером для того, чтобы растворить оболочку мембраны как самой клетки, так и её ядра, а именно 2 X СТАВ буфером при инкубировании в течение 45 минут при 65°C. В результате такой обработки всё клеточное содержимое выделяется наружу и оказывается в растворе, который делается при этом очень вязким, тягучим и существенно более прозрачным, чем была клеточная суспензия. Изменение консистенции раствора — верный знак того, что лизис прошёл успешно.

## 4. Освобождение от белков

Затем в пробирку с лизатом добавляется смесь хлороформ-изоамиловый спирт для очистки от белков. Как известно, белки образуют наиболее прочные связи с ДНК.

Существуют методики, когда белки удаляют из раствора в несколько этапов. Например, часть из них легко денатурирует и выпадает в осадок при добавлении концентрированных растворов солей. В наших условиях при выделении ДНК из растений мы освобождаемся от белков, помещая пробирки на несколько минут в центрифугу. После этого все более или менее крупные клеточные обломки, денатурированные белки и другие примеси оказываются на дне, образуя очень плотный осадок. Надосадочную жидкость (супернатант) следует перелить в другую пробирку, содержащую в основном нуклеиновые кислоты — ДНК и РНК. В лабораторных условиях ненужные фрагменты удаляют тщательно перемешивая раствор с фенолом и/или хлороформом. Органические растворители, способные забирать белки „на себя“, тяжелее воды, а потому при последующем расслоении смеси в центрифуге они остаются в центральной части. После центрифугирования на дне пробирки оказываются хлороформ с растворёнными в нём белками, а в верхней части — водная фаза, содержащая ДНК. Водную фазу собирают в отдельную пробирку и далее продолжают работать с чистым раствором.

### **5 Преципитация, или осаждение ДНК**

Далее проводится процесс избавления от жидкости в составе супернатанта. В результате получаем чистый осадок, который обрабатывается High Salt буфером с РНКазой. Этот этап необходим в молекулярной генетике. После очищения ДНК ее используют для клонирования, ПЦР реакций и т.д. ДНК должна быть достаточно чистой и не иметь примесей рибонуклеиновой кислоты. Таким образом, данный этап направлен на очистку от РНК.

### **6. Осаждение ДНК из раствора**

При добавлении изопропанола или 96% этанола, ДНК переходит в кристаллическое состояние. Отчасти именно по этой причине наливать спирт в пробирку с ДНК-содержащей смесью следует осторожно и желателно помещать все в холодильник на -20°C. В таких условиях процесс осаждения ДНК будет максимально быстрым и иметь максимальный выход.

### **7. Растворение ДНК**

От спирта мы избавляемся путем центрифугирования, промываем ДНК 70% спиртом от различных солей, которые могли остаться после выделения и использования некоторых буферов. Подсушив осадок растворяем его в ТЕ буфере. Именно в нем, а не в воде, т.к в воде могут быть нуклеазы. Эти ферменты могут повредить а то вовсе уничтожить ДНК. ДНК готова и теперь её можно использовать для дальнейшим исследований.

## **МЕТОДИКА ВЫДЕЛЕНИЯ**

- 0.2 г. листьев помещаются в предварительно простерилизованные и охлажденные ступки, добавляется жидкий азот и растирается до гомогенного состояния.

- К гомогенату добавляется 2 мл подогретого до 65°C 2хСТАБ (100мМ Трис, 20мМ ЭДТА, 2% СТАБ, рН 8.0) буфера и смесь перемешивается стерильным шпателем.

- 700 мкл суспензии переносится дозатором с обрезанным кончиком в стерильную 2 мл пробирку.

- Пробирки с образцами инкубируются 45 минут в термостате при 65°C и при этом перемешиваются каждые 15 минут. После инкубации к образцам добавляются равный объем (700 мкл) смеси хлороформ-изоамиловый спирт в соотношении 24:1. (стадии с применением хлороформа проводятся в вытяжном шкафу).

- Тщательно перемешивается содержимое пробирок на Вортексе и центрифугируется в центрифуге 5 минут при 10 000 об./мин.

- Осторожно отбираются 600 мкл верхней фазы (не захватывая интерфазу) и переносятся в чистую 2 мл пробирку.

- Вносятся 0,1 объем (60 мкл) горячего 10хСТАБ/NaCl (0.7М NaCl, 10% СТАБ) буфера и раствор тщательно перемешивается.

- Добавляется в равном объеме (660 мкл) смесь хлороформ-изоамиловый спирт (24:1) и перемешивается содержимое пробирок на Вортексе.
- Центрифугируется 5 минут при 10 000 об./мин., осторожно отбирается верхняя фаза (500 мкл) и переносится в новую пробирку.
- Добавляется равный объем (500 мкл) СТАБ-буфера для осаждения (50мМ Трис, 10мМ ЭДТА, 1% СТАБ, рН 8.0), перемешивается 5 минут и инкубируется при 65°C 30 минут.
- ДНК осаждается в центрифуге 10 минут при 12.000 об./мин., осторожно сливается водная фаза.
- К осажденной ДНК добавляется высокосолевой буфер ТЕ (1М NaCl 10мМ Трис, 0.1М ЭДТА, рН8.0) в количестве 500 мкл и тщательно перемешивается на термомиксере до ее полного растворения.
- К растворенной ДНК добавляется 0.6 объема изопропилового спирта, осторожно перемешивается 1-2 минуты и оставляется в морозильнике при -20°C на 1 час или на ночь.
- ДНК осаждается центрифугированием в течение 10 минут (12 000 об./мин) при температуре +4°C, изопропанол осторожно сливается.
- Осажденная ДНК дважды промывается 70% этанолом в объеме 1 мл и центрифугируется 5 минут при 12 000 об./минут, спирт аккуратно отбирается.
- Осадок сушится в вакуумном концентраторе при температуре +37°C в течение 10-15 минут до полного испарения остатков спирта.
- Высушенная ДНК растворяется в 100 мкл ТЕ буфера (10мМ Трис рН 8.0, 1мМ ЭДТА рН 8.0) или в 10мМ Трис рН 8.0. При сушке осадка ДНК необходимо не допускать, чтобы осадок высох полностью, так как это приводит к затруднению растворения в ТЕ-буфере.
- Образцы ДНК хранятся при -20°C.

# МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

*Шерматов Ш.Э.*

к.б.н., старший научный сотрудник  
Центра Геномных Технологий ИГиЭБР



**Методы выделения ДНК могут различаться в зависимости от:**

1. Источника
2. Возраста
3. Размера биоматериала
4. Состояния материала: свежий или храненный (замороженный, эксгумированный, древний)

Все эти факторы требуют определенной оптимизации для каждого образца.

**Вне зависимости от метода все они имеют несколько общих этапов:**

1. Разрушение клеток: перемалывание, ультразвуковая обработка
2. Удаление липидов и белков
3. Преципитация ДНК холодным спиртом



### Основные методы выделения ДНК

#### 1. Феноль-хлороформный метод

Старый, но очень эффективный метод. Отрицательный момент: используемые растворы вредны для здоровья и качество ДНК иногда не позволяет проводить ПЦР, секвенирование.

#### 2. СТАВ

Очень эффективен для растений. Практически можно выделить со всех видов растений.

#### 3. Готовые коммерческие наборы

Различные колонки, наборы на основе магнитных частиц и т.д.  
Положительный момент: качественная ДНК с хорошим выходом,  
Отрицательный момент: цена

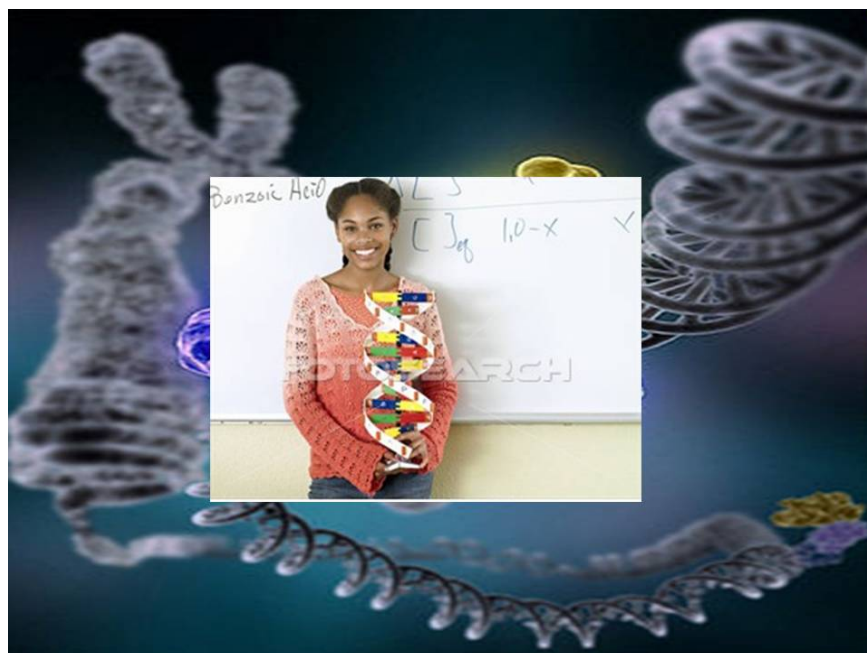
### Особенности выделения ДНК из растений

Работа по выделению ДНК из растений имеют некоторые сложности:  
-клеточная оболочка более плотная  
-присутствуют в большом количестве полисахариды и полифенольные соединения

Поэтому для растений очень хорошо подходит метод с использованием СТАВ. Использование жидкого азота позволяет разрушить клеточную оболочку. Использование хлороформ:изоамилового спирта (24:1) и СТАВ с высокой концентрацией солей позволяет удалять полисахариды и полифенольные соединения.

**Оборудование и другие необходимые материалы для выделения ДНК**

1. Пипетки
2. Центрифуга
3. Водяная баня
4. Пробирки
5. Наконечники
6. Пестики и ступки
7. Морозильник
8. Миксер
9. Штативы для пробирок
10. Вытяжной шкаф



## ПРИНЦИПЫ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

*Адылова А.Т.*

ведущий научный сотрудник  
Центра Геномных Технологий ИГиЭБР

Биологические макромолекулы - белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды – находятся в растворе в виде частиц, которые по своим размерам соответствуют коллоидным частицам. Они несут определенный электрический заряд благодаря наличию групп, способных к электролитической диссоциации. Так, в случае нуклеиновых кислот заряд их определяется диссоциацией фосфатных групп, поэтому ДНК в нейтральных и щелочных средах заряжены отрицательно.

Под действием электрического поля заряженные частицы перемещаются к катоду или аноду в зависимости от знака их суммарного заряда. Такое явление носит название электрофореза. Скорость движения частиц (см/с) при напряжении электрического поля 1В/см называется электрофоретической подвижностью. Она имеет размерность  $\text{см}^2 \text{с}^{-1} \text{В}^{-1}$ , а знак совпадает со знаком суммарного заряда.

Различия в подвижности частиц служат основой для разделения смесей веществ в аналитических или препаративных целях. Определение электрофоретической подвижности используется также для характеристики веществ.

Во время электрофореза скорость миграции анализируемых частиц определяется путем наблюдения за перемещением красителя.

Приборы всех типов электрофореза состоят из двух электродных сосудов и устройства для поддержания поддерживающей основы (бумаги, крахмала, агарозного или акриламидного геля) в определенном положении между сосудами. В качестве электродов обычно применяют платиновую проволоку

### **Электрофорез ДНК в агарозном геле**

Электрофорез в агарозном геле – стандартный метод, используемый для разделения, идентификации и очистки фрагментов ДНК.

Имеющийся в продаже агар выделяют из клеточных мембран различных водорослей. Он содержит, по крайней мере, два полисахарида, а именно агарозу и агаропектин, которые можно легко отделить друг от друга после ацетилирования. Агароза растворяется в водных растворах при нагревании в кипящей водяной бане (либо в микроволновой печи), причем раствор остается жидким при снижении температуре примерно до 40°C, а затем вязкость его резко возрастает и при 38°C он застывает. После этого агар можно снова растворить путем нагревания. Сам по себе агар является дешевым и нетоксичным материалом. Агарозный гель механически прочен. В форме геля агар содержит поры различных размеров, причем средний радиус пор зависит от его концентрации. При разделении в агарозном геле как ДНК, так и РНК, используется эффект молекулярного сита. Он позволяет разделить анализируемые полинуклеотиды не только в соответствии с их молекулярной массой, но есть также возможность выяснить, состоит ли данная молекула из одной или двух полинуклеотидных цепей, а в случае ДНК- определить, какую форму имеет молекула - линейную или кольцевую. При разделении в геле можно прямо следить за положением ДНК, так как полосы ДНК в геле можно окрашивать флуоресцирующим и интеркалирующим в ДНК красителем – бромистым этидием в низкой концентрации.

В настоящее время чаще всего используют агарозные гели в виде горизонтальных пластинок. Эта система имеет, по крайней мере, четыре преимущества:

- 1) можно применять низкие концентрации агарозы в связи с тем, что весь гель поддерживается снизу;
- 2) можно готовить гели в виде пластинок самых разных размеров;
- 3) хранение и разливка гелей, а также последующие манипуляции с ними достаточно просты;
- 4) для постановки электрофореза в гелях можно применять недорогие (самодельные) аппараты.

Таким образом, благодаря доступности реагентов, сравнительной простоте и не дороговизне оборудования, возможности получить достаточно большую информацию даже из небольшого количества неочищенного материала, метод электрофореза ДНК в горизонтальных пластинках агарозного геля находит все более широкое применение в молекулярной генетике и в других областях биохимии.

Скорость миграции ДНК через агарозный гель при электрофорезе определяется следующими главными параметрами:

- а). **Размер молекул ДНК:** скорость перемещения двуцепочечной ДНК в геле обратно пропорционально логарифму их молекулярных масс;
- б). **Концентрация агарозы.** Применяя гели разных концентраций можно разделить большой набор фрагментов ДНК, различающихся по размеру:

Количество агарозы	Область эффективного в геле, % разделения ДНК, kb
0,6	20 -1
0,7	10 -0,8
0,9	7 - 0,5
1,5	4- 0,2
2	3 - 0,1

в) **Напряженность электрического поля.** При низких напряжениях скорость перемещения фрагментов линейной ДНК пропорциональна приложенному напряжению. Однако с увеличением напряженности электрического поля подвижность фрагментов ДНК с высокой молекулярной массой дифференциально возрастает и эффективность разделения ДНК в агарозном геле снижается. Хорошее разделение фрагментов происходит при напряженности, не превышающей 5 В/см.

г). **Температура.** Обычно электрофорез ведут при комнатной температуре, но с гелями менее 0,5% агарозы лучше работать при 40С.

#### **Приготовление агарозных гелей**

1. Рассчитанное количество порошка агарозы добавляется в отмеренный объем электрофорезного буфера. Для приготовления 100 мл 0,9% агарозного геля нужно взвесить 9 г агарозы.

2. Взвесь нагревается в микроволновой печи до тех пор, пока агароза не растворится.

3. Раствор остужается до 50оС и, если особо не обговаривается, к нему добавляется 5 мкл бромистого этидия.

Стоковый водный раствор бромистого этидия в концентрации 1мг/мл готовится заранее и хранится в светонепроницаемом сосуде при 4°С.

В присутствии бромистого этидия электрофоретическая подвижность линейной двуцепочечной ДНК снижается примерно на 15%, но зато при этом появляется возможность наблюдать за процессом разделения непосредственно под источником УФ-излучения во время или в конце разделения.

В случае необходимости электрофорез ДНК проводят в отсутствие бромистого этидия, т.е. заранее не вводя краситель в гель. В этом случае ДНК окрашивают данным

красителем уже после завершения разделения, помещая пластинку агарозного геля в воду, содержащую бромистый этидий.

Надо помнить, что бромистый этидий – сильный мутаген и все манипуляции с гелями и растворами, содержащими этот краситель, необходимо проводить в перчатках.

4. Теплый раствор агарозы выливается в специальную форму (фирменную или самодельную), в гель немедленно с одного края формы вставляется гребенка таким способом, чтобы после удаления гребенки из затвердевшего геля в нем от зубцов гребенки образовались лунки - кармашки, куда в последующем будут вноситься пробы ДНК. Необходимо, чтобы между дном лунки и основанием геля оставался слой агарозы толщиной 0,5 -1,0 мм, т.е. чтобы дном лунки служил агарозный гель.

5. После того, как гель полностью затвердеет (через 20-30 мин при комнатной температуре), гребенка осторожно удаляется и гель переносится в электрофорезную камеру.

6. В электрофорезную камеру наливается достаточное количество электрофорезного буфера, так, чтобы гель был закрыт слоем буфера толщиной 1мм.

Для электрофореза обычно применяют буферы, содержащие трис-ацетат, трис-борат или трис-фосфат в концентрации 50 мМ и имеющие рН 7,5 – 7,8. Чаще всего их готовят в виде концентрированных (5х-, 10х-кратных) растворов и хранят при комнатной температуре.

В нашем центре при электрофорезе больше практикуется трис-боратный буфер, содержащий ЭДТА (ТВЕ). Он имеет высокую буферную емкость и обеспечивает хорошее разделение фрагментов ДНК. Для приготовления 1 л концентрированного (5х-кратного) ТВЕ требуется 54 г триса, 27,5 г борной кислоты, 20 мл 0,5 М ЭДТА.

7. Аликвоту ДНК смешивают с буфером для нанесения, содержащим краситель (бромфеноловый синий и/или ксилолцианол) и один из трех веществ (глицерин, сахароза или фикол), взятых в больших концентрациях. Это делается с тем, чтобы увеличить плотность алиquotы ДНК так, чтобы пробы ДНК при внесении в лунку геля оказывались под электрофорезным буфером. Смесь (ДНК+буфер для нанесения) осторожно вливают в лунку геля с помощью автоматической микропипетки.

По завершению всех этих манипуляций электрофорезная камера подключается к источнику постоянного тока. Надо помнить, что молекулы ДНК несут отрицательный заряд и в электрическом поле они перемещаются в сторону анода. Положение агарозной пластинки на платформе электрофорезной камеры должно быть таково, чтобы обеспечить миграцию красителя и ДНК по гелю к краю, противоположную положению лунок.

Обычно буфер для нанесения проб готовят в виде раствора 6-10- кратной концентрации. В нашем центре практикуется буфер для нанесения следующего состава: 0,25% бромфенолового синего, 0,25% ксилолцианола, 30% глицерина в H<sub>2</sub>O. Это стоковый (6-кратный) буфер для нанесения. Пробы ДНК с буфером для нанесения мы обычно смешиваем в соотношении 5 мкл ДНК: 1 мкл буфера.

Максимальное количество ДНК, которое можно внести в лунку, зависит от числа фрагментов в пробе и их размеров. Минимальное количество ДНК, которое можно обнаружить визуально, согласно Маниатису с соавт. (1984), составляет 2 нг при ширине полосы 0,5 см (обычная ширина лунки)

При анализе простого набора молекул ДНК в 0,5-см лунку обычно вносят 200-500 нг ДНК в объеме 5-10 мкл. При внесении больших количеств ДНК и в больших объемах разрешающая способность электрофореза может снизиться – полоса ДНК окажется расплывчатой и будет иметь шлейф.

8. Продолжительность электрофореза ДНК может быть разной, определяется конкретно поставленной задачей, но, как правило, его прекращают, как только бромфеноловым синим, пройдя весь агарозный гель, достигает его края.



9. Пластинку агарозного геля осторожно вынимают из электрофорезной камеры и просматривают над (под) источником УФ-излучения. Бывает, что интенсивность флуоресценции ДНК очень низкая и полосы ДНК на геле плохо просматриваются. Это может быть вызвано очень маленькой концентрацией ДНК, флуоресцирующего красителя - бромистого этидия или того и другого вместе. В таких ситуациях можно попробовать дополнительно покрасить гель, поместив его в воду, содержащую бромистый этидий, на 20-30 мин при комнатной температуре.

Таким образом, наиболее удобный метод визуализации ДНК в агарозных гелях – это окрашивание ее флуоресцирующим красителем бромистым этидием. Молекула этого вещества содержит плоскую группу, которая интеркалирует между соседними основаниями ДНК. В результате такой интеркаляции краситель связывается с ДНК, что сопровождается увеличением интенсивности флуоресценции. УФ-излучение, поглощаемое ДНК в области 260 нм и передаваемое на краситель, испускается затем в красно-оранжевой области видимого спектра (590 нм).

Визуализация полос ДНК в нашем центре производится с помощью прибора Alpha Imager T<sup>M</sup>3400.

# БИОИНФОРМАТИКА И КОМПЬЮТЕРНЫЕ ПРОГРАММЫ ДЛЯ АНАЛИЗА ГЕНОМНОГО МАТЕРИАЛА (ОСНОВЫ). СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ. ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАССТОЯНИЕ, СЦЕПЛЕНИЕ ГЕНОВ QTL АНАЛИЗ. LD (LINKAGE DISEQUILIBRIUM) АНАЛИЗ. БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЕ ИНТЕРНЕТ РЕСУРСЫ

*Абдурахмонов И.Ю.*

д.б.н., ведущий научный сотрудник  
Центра Геномных Технологий ИГиЭБР

## Биоинформатика (вычислительная биология) и статистическая геномика

Автор: Иброхим Абдурахмонов



### Хронологический график технологии полеводства

2000 до н.э.	Культивация
19 в. н.э.	Селекционное скрещивание
Начало 20 в. н.э.	Культивирование клеток
Середина 20 в. н.э.	Мутагенез и селекция
1930-е	Соматональная изменчивость
1940-е	«Спасение» гибридных зародышей
1950-е	Полиэмбриогенез
1970-е	Культура пыльников
1980	Рекомбинантная ДНК
1980-е	Отбор с помощью маркеров
1990-е	Геномика
2000	Биоинформатика

## ЧТО ТАКОЕ БИОИНФОРМАТИКА?

- Биоинформатика - это дисциплина, для которой используются компьютеры для хранения, выборки, обработки и распространения информации, связанной с такими биологическими макромолекулами как РНК, ДНК и белки
- Вычислительная биология охватывает все сферы биологии, для которых необходимы вычисления
- Ее цель - лучше понять принцип действия живой клетки и способы ее функционирования на молекулярном уровне

## ГДЕ НЕОБХОДИМО ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ?

- **1. Развитие вычислительных аппаратов и баз данных**
  1. программное обеспечение для анализа последовательностей
  2. сравнение последовательностей из разных организмов, поиск в базе данных последовательностей,
  3. определение мотивов и закономерностей, обнаружение генов и меток,
  4. реконструкция эволюционных связей, геном
  5. синтез и сравнение
  6. программное обеспечение для структурного анализа
  7. структурный анализ, сравнение белков и нуклеиновых кислот,
  8. классификация и прогнозирование
  9. программное обеспечение для функционального анализа
  10. профилирование экспрессии генов, белок-белковое взаимодействие
  11. прогноз, прогнозирование субклеточной локализации белка,
  12. реконструкция метаболического маршрута
  13. создание и курирование биологической базы данных

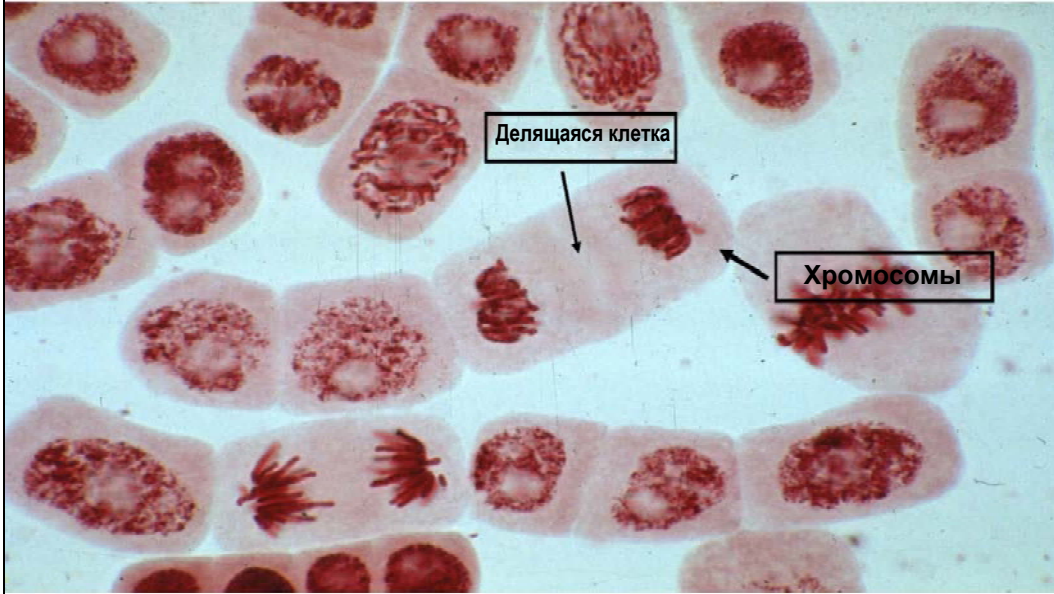
## ГДЕ НЕОБХОДИМО ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ?

- ◎ **2. Биологические знания общего характера для понимания биологических систем**
- 1. часто выявляются новые проблемы, для анализа которых необходимо программное обеспечение
- 2. биоинформатика крайне необходима для научных исследований в сфере фундаментальной геномной и молекулярной биологии
- 3. Значительное воздействие в области биотехнологий и медико-биологической науки
- 4. дизайн лекарственных веществ на основе знаний
- 5. трехмерная структура позволяет осуществлять дизайн подходящих лигандов
- 6. Сократить время и расходы на разработку лекарственных средств
- 7. анализ ДНК в целях судебной экспертизы
- 8. байесовская статистика и методы на основе вероятности
- 9. индивидуальный медицинский уход
- 10. аграрные биотехнологии
- 11. базы данных геномов растений
- 12. профили экспрессии генов
- 13. новые сорта культур

## СОСТАВНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ

- ◎ **Навыки работы на компьютере**
- ◎ **Знание биологии**
- ◎ **ВЛАДЕНИЕ АНГЛИЙСКИМ ЯЗЫКОМ!!!!!!**

ИСТОЧНИК ИНФОРМАЦИИ ДЛЯ БИОИНФОРМАТИКИ



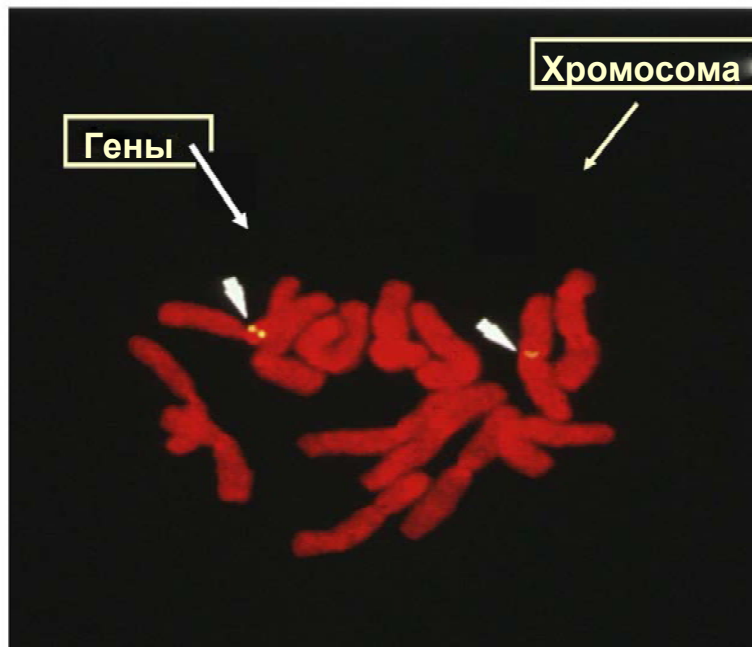
Делящаяся клетка

Хромосомы

ЭТО ГЕНОМ

ИСТОЧНИК ИНФОРМАЦИИ ДЛЯ БИОИНФОРМАТИКИ

ГЕНОМ? ГЕНОМИКА?



Гены

Хромосома



**ГЕНОМ= ОГРОМНАЯ НЕВИДИМАЯ МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИБЛИОТЕКА с структурированным каталогом**

...СТGACСТААТGССGТА...



1700 книг



1700 книг

**Гибридизация или перекрестное скрещивание пшеницы**



1700 книг

X



1700 книг



1700 книг

Произвольное расположение информации и от каждого родителя

Нет контроля над тем, какие из книг располагаются рядом друг с другом

( или 1,7 млн. страниц) ( или 1,7 млн. страниц) ( или 1,7 млн. страниц)

## Оглавление в книге генов пшеницы

...СТGАССТААТGССGТА...



Используй-  
зуется для  
селекции  
при помощи  
маркеров

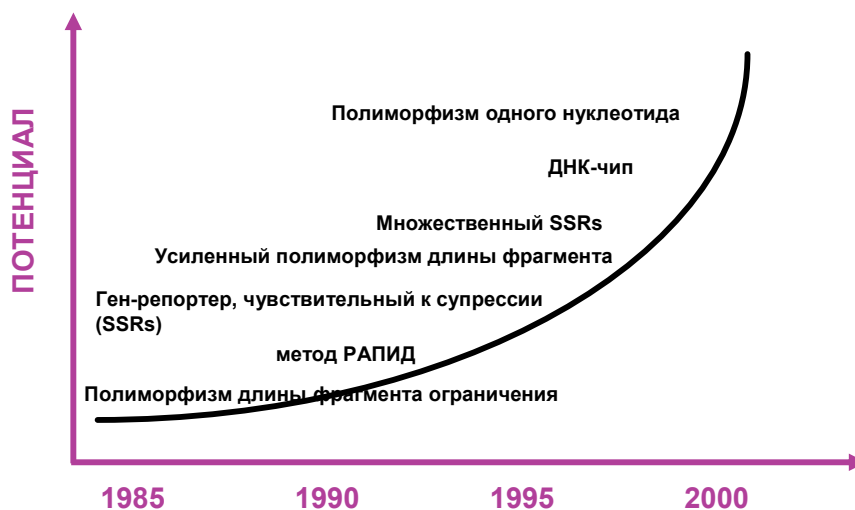
**ГЕНОМИКА**

1700 книг  
(или 1,7 млн. страниц)

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ

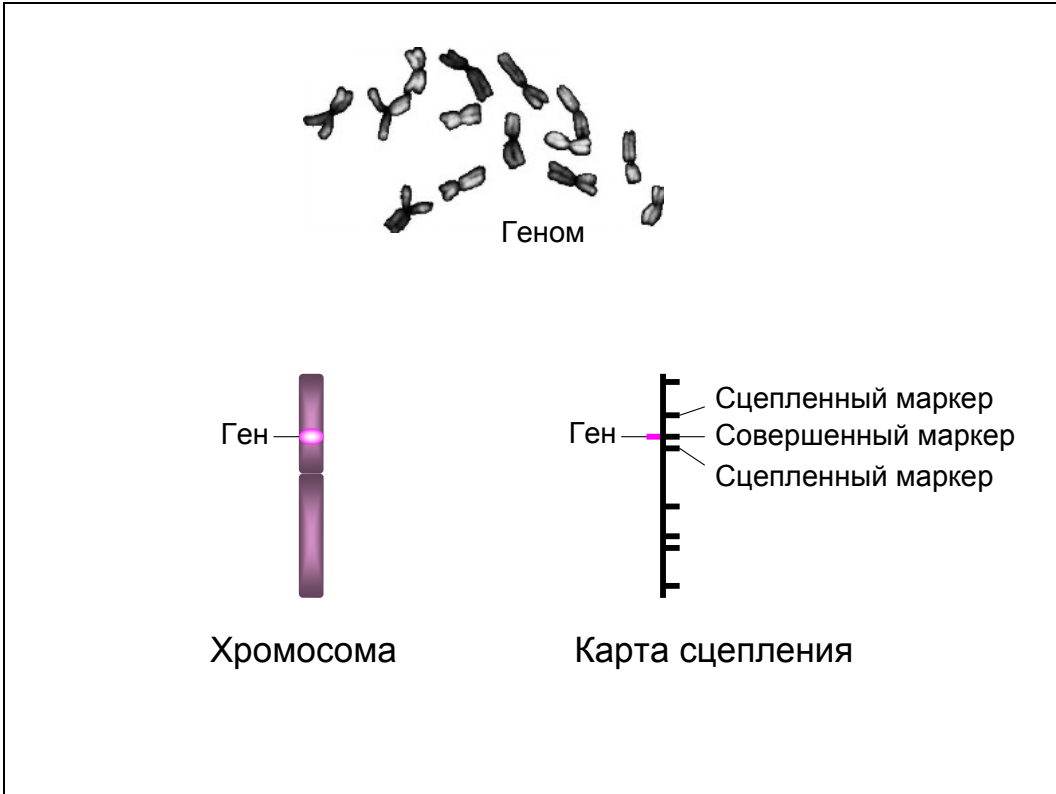
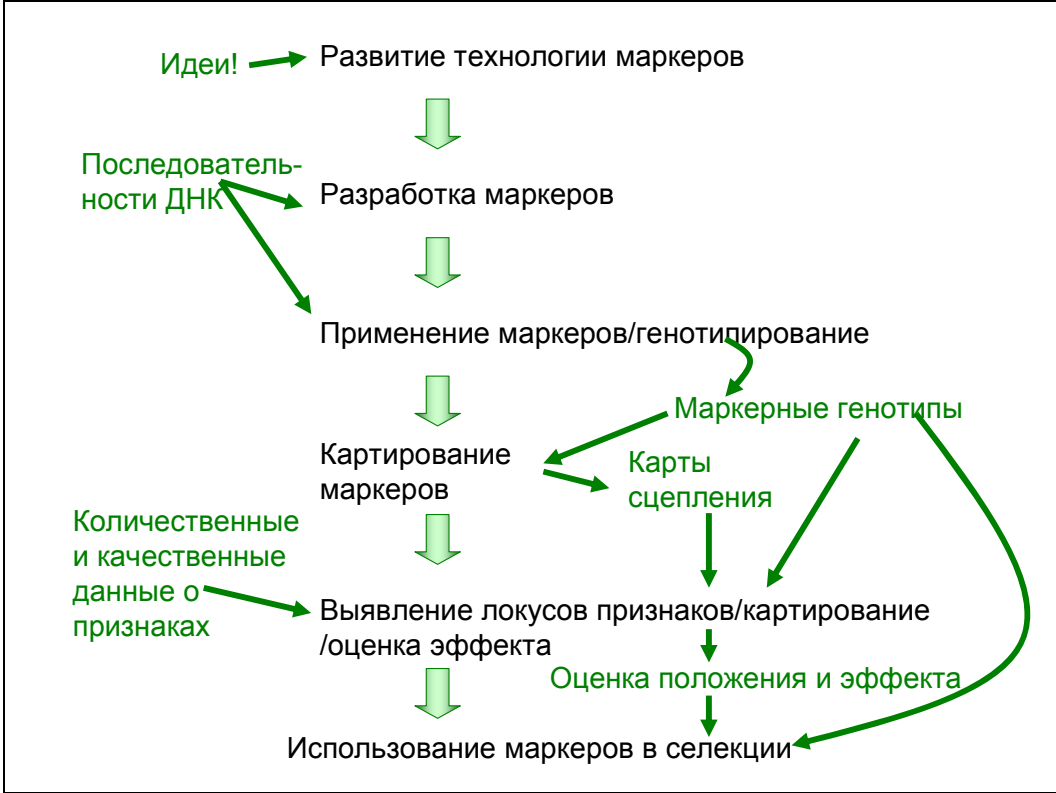
- На основе изменчивости в последовательности ДНК
  - Точечная мутация
  - Вставка / удаление
  - Перестройка
- Имеется в большом количестве
- Не поддается воздействию внешней среды
- Можно оценивать по шкале на любом этапе развития
- Обычно нейтральный
- Нет межлокусного взаимодействия

## ДОСТИЖЕНИЯ В МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРАХ...



## ПРИМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ

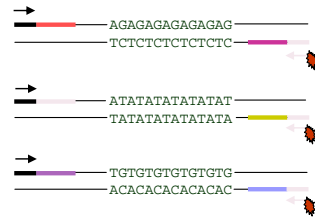
- **Генетическое разнообразие и ДНК-генотипоскопия**
  - Связи между гермоплазмами
  - Генетическое расстояние в сравнении с гетерозисом
  - Сортная чистота и идентификация
  - Филогенетические связи
- **Наследственность и картирование**
  - Просто унаследованные признаки
  - Количественные признаки (разрез в локус количественного признака (ЛКП))
- **В качестве инструментов селекции: Селекция с использованием маркеров**
  - Простые признаки: конверсия линий (более быстрое возвратное скрещивание)
  - Передача множественных геномных сегментов (ЛКП)
  - Пирамидирование генов
  - Интрогрессия признаков из экзотической гермоплазмы
  - Отбор и работа с рецессивными аллелями
  - Ранний отбор
- **Идентификация и выделение генов на основе маркеров**



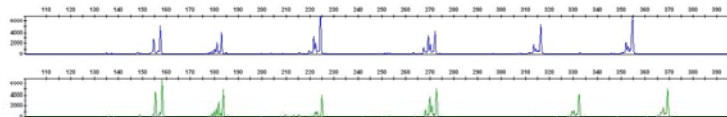
## Молекулярная информация (для мультиплексированных SSR маркеров)

### Информация о последовательности:

- повторение простых последовательностей
- последовательность затравок



### Информация о длине фрагмента



### Шкала маркеров генотипа

- название аллелей (на основе длины фрагмента)
- аллелей origin of alleles

157	183	224	273	317	355
157	183	224	273	333	370

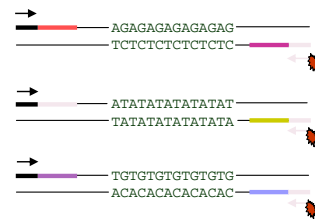
A	A	A	A	B	B
A	A	A	A	A	A

1	1	1	1	2	2
1	1	1	1	1	1

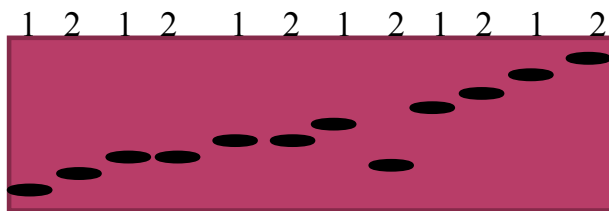
## Молекулярная информация (для мультиплексированных SSR маркеров)

### Информация о последовательности:

- повторение простых последовательностей
- последовательность затравок



### Информация о длине фрагмента



### Шкала маркеров генотипа

- название аллелей (на основе длины фрагмента)
- шкала, указывающая родительский источник аллелей

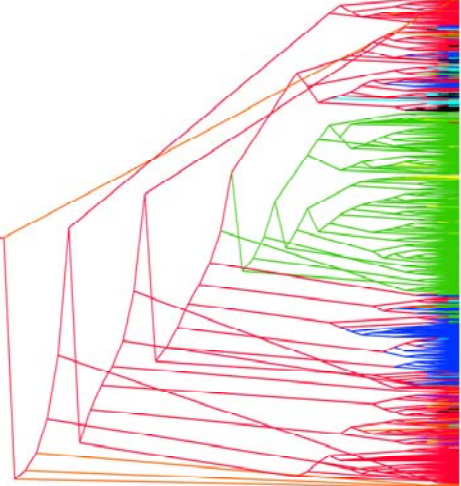
157	183	224	273	317	355
160	183	224	160	333	370

A	A	A	A	B	B
B	A	A	B	A	A

1	1	1	1	2	2
2	1	1	2	1	1



# ФИЛОГЕНОМИКА И ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ



**PAUP\*** Синауэр Ассошиэйтс, Издательство Инк. Саундерленд, Массачусетс

О программе PAUP  
Знать

Версии  

- Macintosh
- UNIX/VMS
- DOS
- Windows

Поддержка  

- Часто задаваемые вопросы
- Технический обмен
- Скачать
- Исходные проблемы
- Список почтовых рассылки

Программа PAUP\*  
Версия 4

... инструменты для выведения и интерпретации филогенетических деревьев

Анализ

- Молекулярная последовательность
- Морфологические данные
- Другие виды данных

Применение

- Максимальная вероятность
- Парсимония
- Дистанционные методы

Пользователи Mac, использующие более современные Mac на основе Intel должны следовать инструкции на [www.paup.csit.fsu.edu](http://www.paup.csit.fsu.edu), чтобы получить версию PAUP\*, которая будет работать на данной платформе

Бета 10 – это самый последний выпуск программы. Назовите [csit](mailto:csit@fsu.edu), чтобы получить обновление.

Известно о нескольких проблемах, связанных с бета 10. Мы планируем выпустить обновление, чтобы решить эти проблемы в скором времени. Что касается перечня проблем и возможных их решений – нажмите [csit](mailto:csit@fsu.edu)

Список электронной рассылки raupinfo был перемещен. Чтобы посмотреть подписаны ли Вы на рассылку или изменить личные настройки прочтите по ссылке [raupinfo\\_email@at](mailto:raupinfo_email@at) на веб-сайт.

[Другие новости](#)

Широко используемое программное обеспечение: PAUP (филогенетический анализ на основе парсимонии)

(<http://paup.csit.fsu.edu>)  
PHYLOCOCO (MAC)

# ФОРМАТ ДАННЫХ СВЯЗУЮЩЕГО ЗВЕНА

```

#NEXUS
[Link: genoplom-complete set with 10 accession and 205SR marker loci, filtered for no polymorphic]
begin taxa;
  dimensions ntax=10;
  kind=char;
  GB
  GT
  TMI
  U11
  U12
  U13
  U14
  U15
  U16
  U17
  U18
  U19
  U110
  :
  :
end;
begin characters;
  dimensions nchar=20;
  format missing = 0 symbols = "12";
  matrix
  GB      1      1      2      1      1      2      1      1      1      1
          1      1      2      1      2      1      1      1      2      2
  GT      1      1      1      1      1      1      1      1      1      1
          1      1      1      2      1      1      1      1      2      1
  TMI     1      2      1      1      1      1      1      1      1      1
          2      2      1      1      1      1      1      1      2      1
  U11     1      1      1      1      1      1      1      1      2      1
          1      2      1      1      1      1      1      2      1      1
  U12     1      1      1      1      1      1      2      1      1      1
          1      2      1      1      1      1      2      1      1      1
  U13     1      1      1      1      1      1      1      1      1      1
          2      2      1      1      1      1      1      1      2      1
  U14     1      0      0      0      0      0      0      0      0      0
          0      2      1      1      1      0      0      0      0      1
  U15     1      1      2      1      1      1      2      1      1      1
          1      2      1      1      1      1      2      1      1      1
  U16     1      1      1      1      1      1      1      1      1      1
          2      2      1      1      1      1      1      1      2      1
  U17     1      0      0      0      0      0      0      0      0      0
          0      0      0      0      0      0      0      0      0      1
  U18     1      1      1      1      1      1      2      1      1      1
          1      2      1      1      1      1      1      2      1      1
  U19     1      0      0      0      0      0      0      0      0      0
          0      2      1      1      1      0      0      0      0      1
  U110    1      1      1      1      1      1      1      1      1      1
          2      2      1      1      1      1      2      1      1      1
  U1100   1
          2
  U11000  1;
end;
begin assumptions;
  options datatype = oad;
end;
  
```

**Создание карты сцеплений**

<http://www.kyazma.nl/index.php/mc.JoinMap/>

**СЛОЖНЫЕ РОДОСЛОВНЫЕ  
И  
КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ПРИЗНАКИ**

## КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ ПРИЗНАК

Биологический признак, который скорее показывает непрерывную изменчивость, чем подпадание под четкие категории

**Локус количественного признака (ЛКП)** - Генетический локус, который ассоциируется с изменчивостью в таком количественном признаке

### Информация о признаке

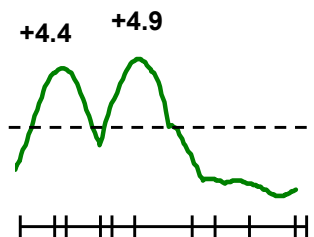
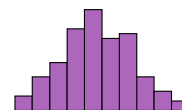
#### Качественные наблюдения

(например, устойчивость в сравнении с подверженностью; твердый в сравнении с мягким)



#### Количественные наблюдения

(например, выход зерна, устойчивость к стрессу, качество зерна, степень тяжести заболевания)

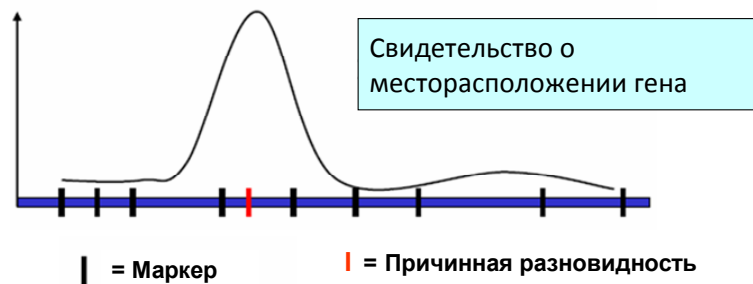


#### Информация о карте

- Кодовое обозначение хромосомы
- Название маркера и гена
- Расстояние по карте
- Тестовая статистика по количественным признакам
- Пороговые величины значимости
- Оценка расположения ЛКП
- Оценка воздействия ЛКП

## КОНЦЕПЦИЯ КАРТИРОВАНИЯ

Определение генетической разновидности, объясняющей подверженность к заболеваниям или значимости признака

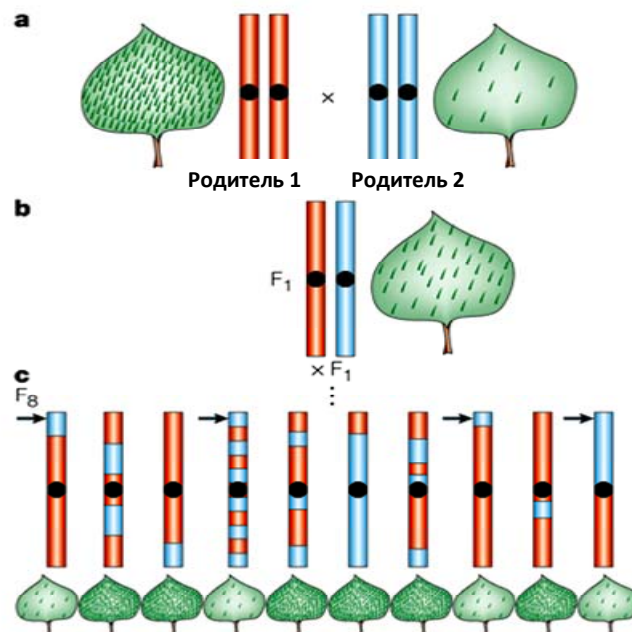


## ПОДХОДЫ К КАРТИРОВАНИЮ

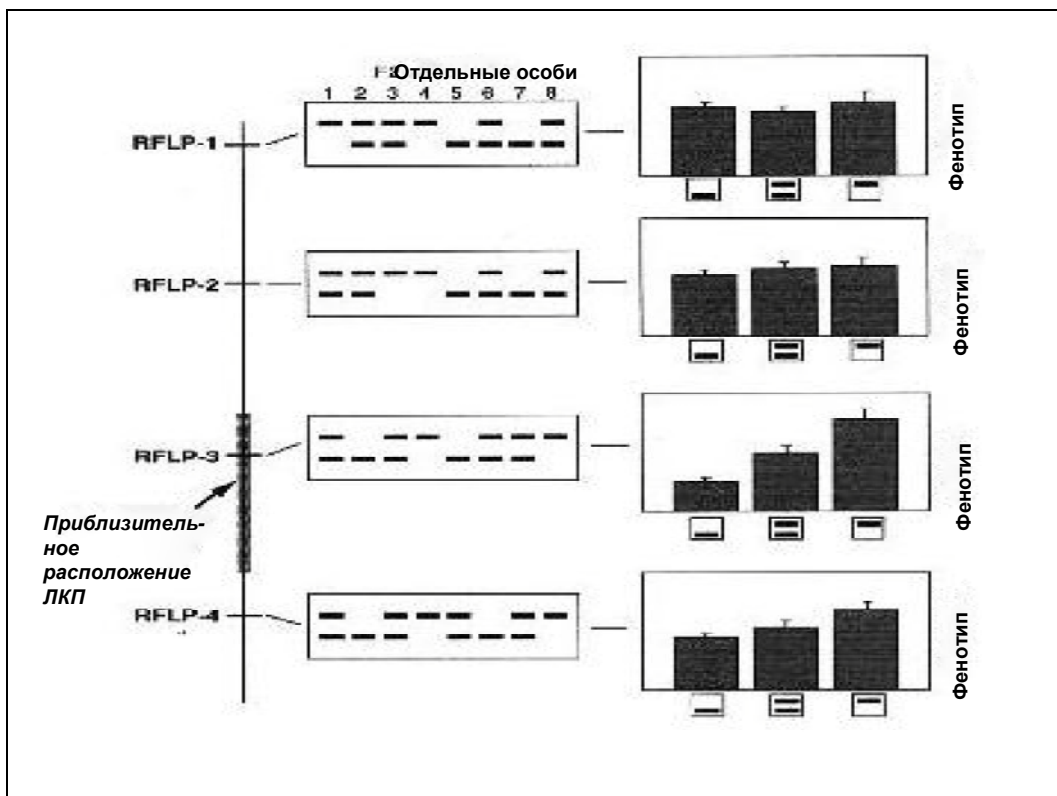
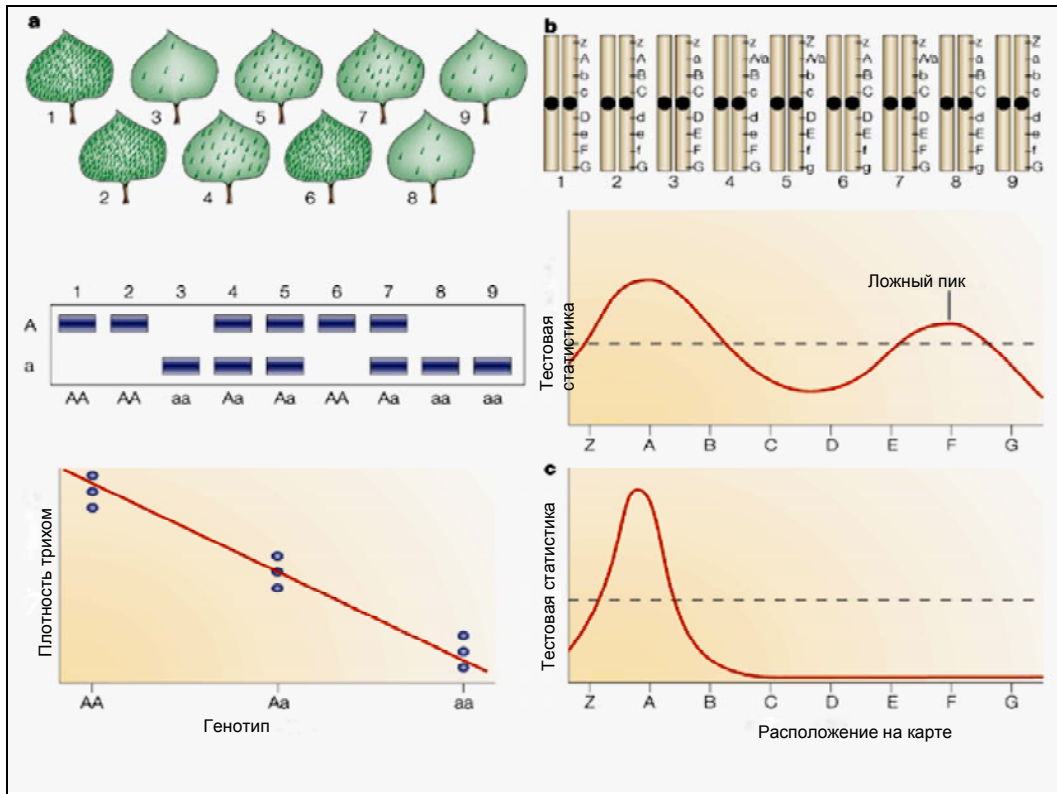
1. Исследование «гена-кандидата»
  - Ассоциация
  - Подходы к изменению последовательности
2. Исследование в масштабе генома
  - Анализ сцеплений
  - Исследование ассоциаций в масштабе генома (неравновесие по сцеплению, картирование неравновесия по сцеплению)

## КАРТИРОВАНИЕ СЦЕПЛЕНИЙ

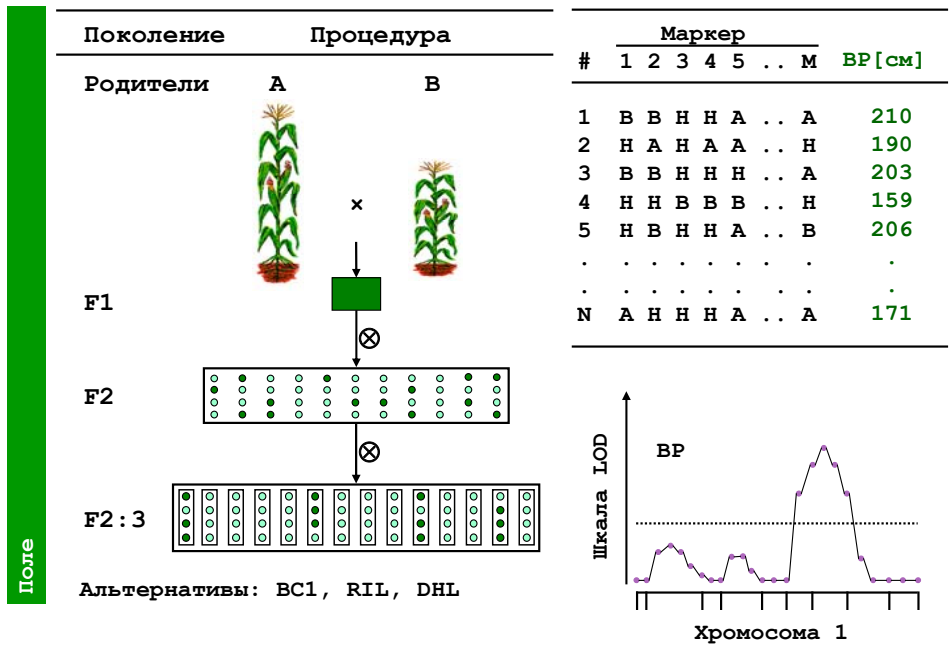
- Найдите маркерные аллели, которые связаны с фенотипом в пределах родословной
- Можно соединить разные аллели с признаком в разных родословных



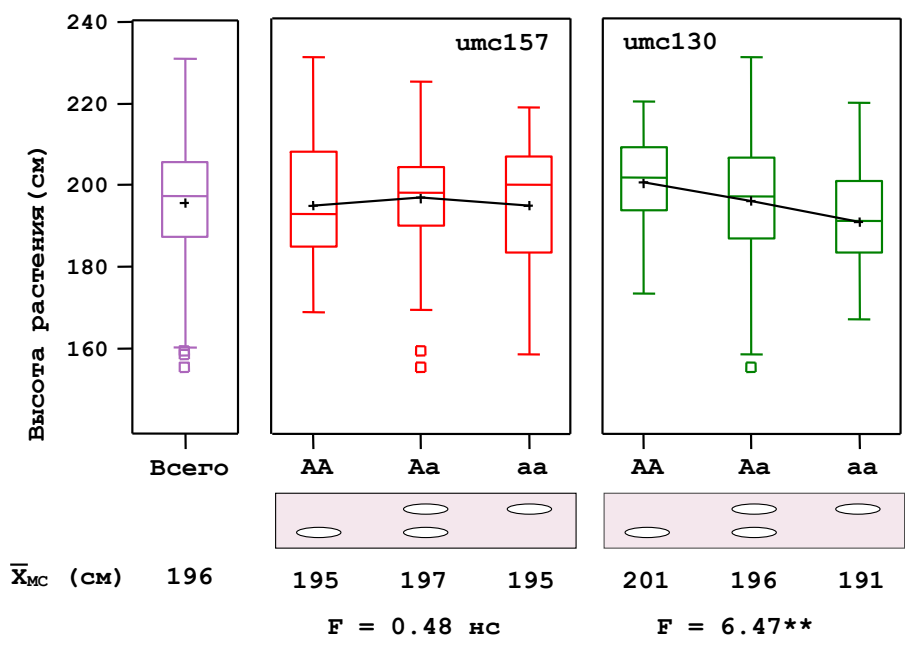




# Анализ ЛКП: Понятие



# Анализ ЛКП: Анализ единого маркера



## КАРТИРОВАНИЕ АССОЦИАЦИЙ

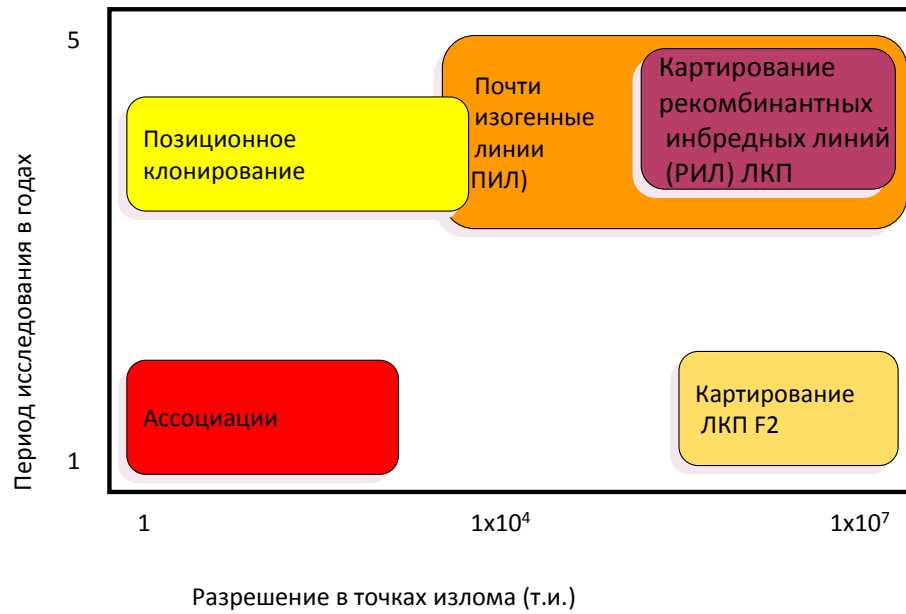
- Маркерные аллели соотносятся с признаком на уровне популяций
- Можно обнаружить ассоциацию, рассмотрев несвязанные особи из одной популяции
- Не обязательно означает, что маркеры сцеплены (близко расположены к) с генами, влияющими на признак.

## СЦЕПЛЕНИЕ В СРАВНЕНИИ С АССОЦИАЦИЕЙ

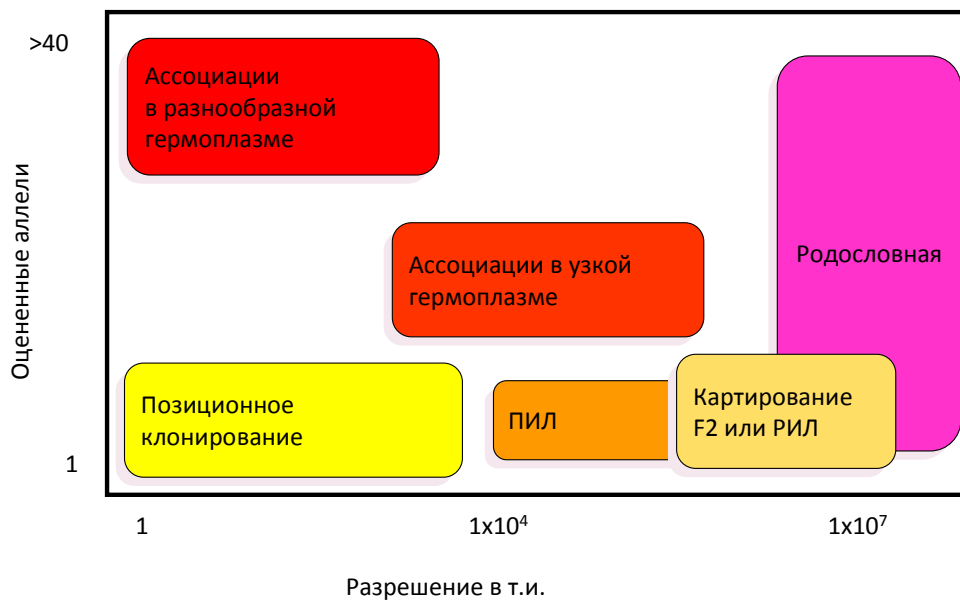
Потенциальные преимущества	Сцепление	Ассоциация
Не требуется предварительной информации о функции гена	+	+
Локализация в небольшом геномном участке	-	+
Не подвержен воздействию стратификации	+	-/+
Достаточно потенциала для обнаружения общих аллелей с умеренным воздействием (частота более редкого (минорного) аллеля (MAFs)>5%)	-/+	+
Способность обнаружить редкий аллель (MAFs<1%)	+	-
Имеются инструменты для анализа	+	+/-

Hirschhorn & Daly, Nature Rev. Genet. 2005

## РАЗДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ПРИЗНАКА: ВРЕМЯ В СРАВНЕНИИ С РАЗРЕШЕНИЕМ





## РАЗРЕШЕНИЕ ПРОТИВ ДИАПАЗОНА АЛЛЕЛЕЙ



# ПРОВЕРКА АССОЦИАЦИЙ

- Оценка ассоциации нуклеотидных полиморфизмов с фенотипом
- Естественные популяции
- Применение расширенной рекомбинации

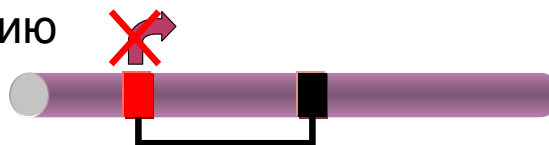
A	C	G	A	G	1,3м	
A	C	G	A	T	1,4м	
A	T	A	A	G	1,5м	
C	T	A	G	T	1,8м	
A	T	G	G	T	2,0м	
A	T	G	G	G	2,0м	

Ассоциации могут получиться из

## 1. Локуса, обуславливающего фенотип



## 2. Локуса, обуславливающего фенотип, который находится в неравновесии по сцеплению



Сцеплен и в большой степени коррелирован



# НЕРАВНОВЕСИЕ ПО СЦЕПЛЕНИЮ

- Неслучайная ассоциация между аллелями в разных локусах. Локусы находятся в НС, если аллели присутствуют на гаплотипах разных пропорций, чем, как предполагается, основаны на частоте аллелей
- Два аллеля, расположенные в НС, встречающиеся вместе чаще, чем предполагается в случайном порядке

## НЕРАВНОВЕСИЕ ПО СЦЕПЛЕНИЮ

Нет рекомбинации Точки излома рекомбинации



		Локус А	
		A	a
Локус В	B	6	0
	b	0	6

$|D'| = 1$   
 $r^2 = 1$

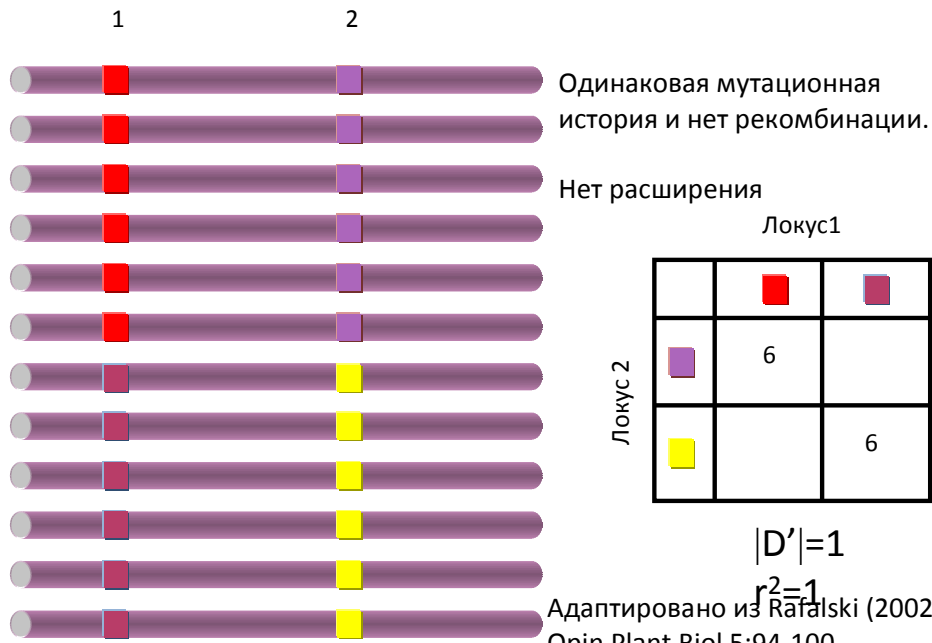
		Локус А	
		A	a
Локус В	B	6	0
	b	3	3

$|D'| = 1$   
 $r^2 = 0.33$

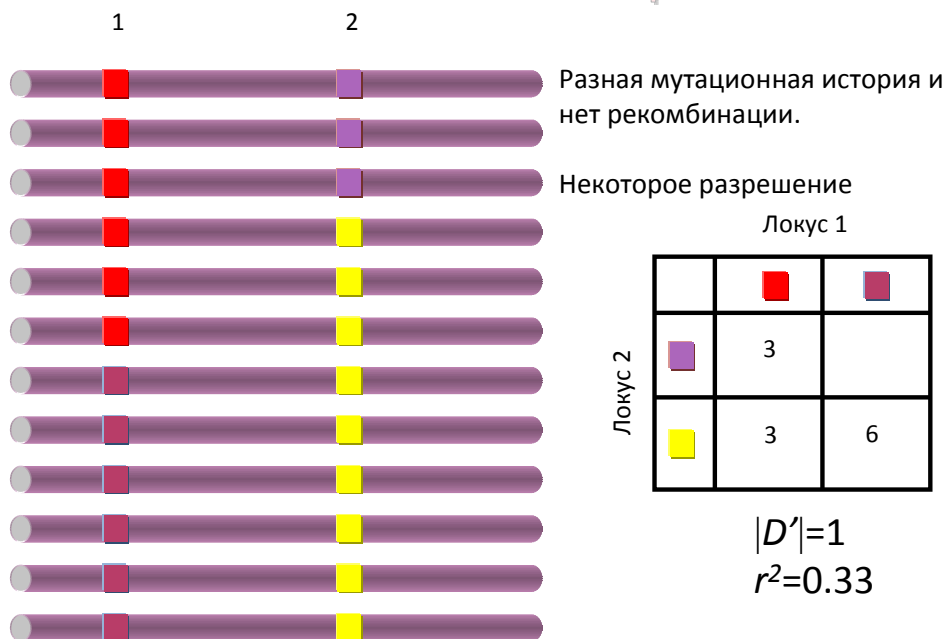
		Локус А	
		A	a
Локус В	B	3	3
	b	3	3

$|D'| = 0$   
 $r^2 = 0$

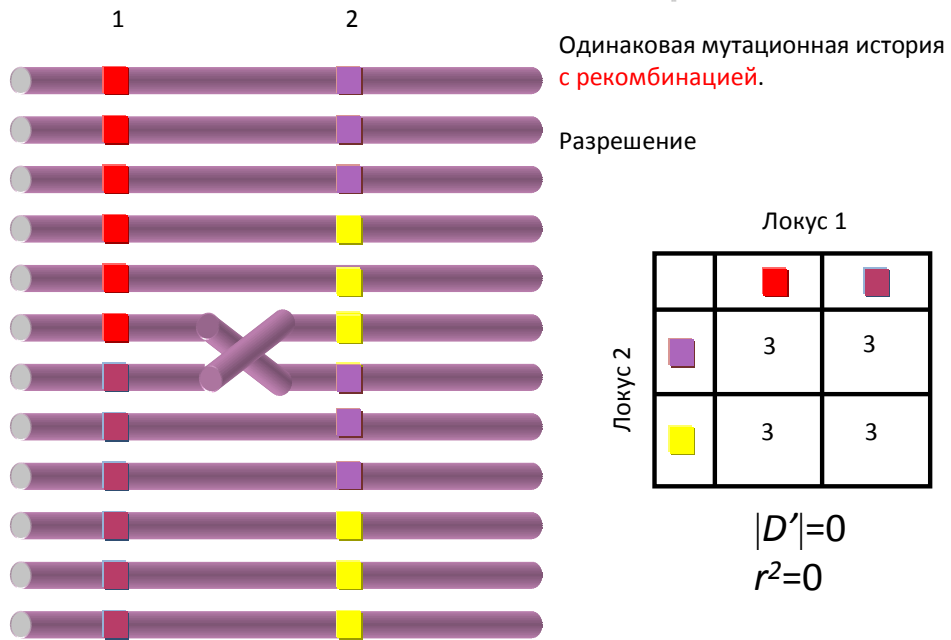
## ПОЛНОЕ НЕРАВНОВЕСИЕ ПО СЦЕПЛЕНИЮ



## ПОЛНОЕ НЕРАВНОВЕСИЕ ПО СЦЕПЛЕНИЮ

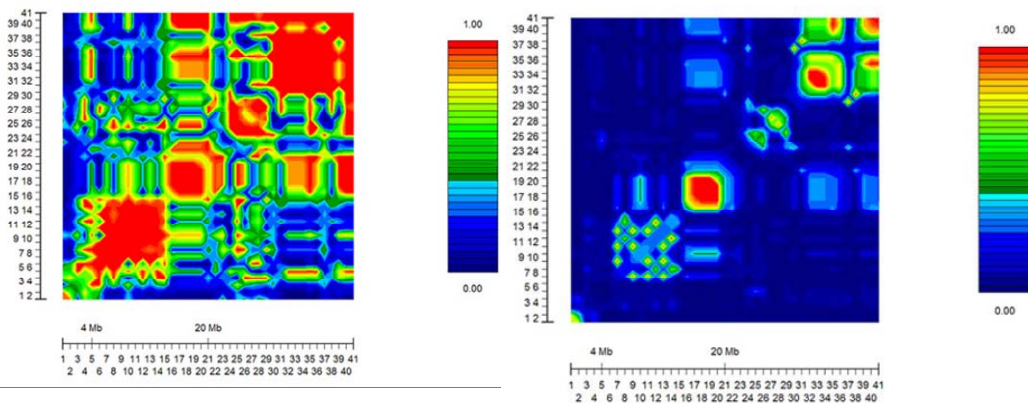


# ПОЛНОЕ НЕРАВНОВЕСИЕ ПО СЦЕПЛЕНИЮ



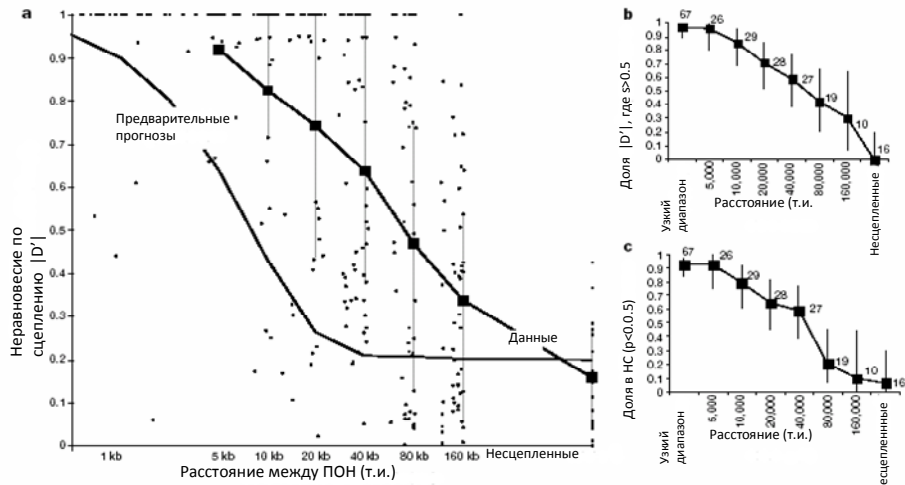
# ЗОЛОТОЙ ДИСПЛЕЙ

Попарно  $|D'|$  и  $r^2$  по 45 ПОН в одном сцепленном участке



<http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/gold/download/>

## Распад неравновесия по сцеплению



**Рис. 1** НС против физического расстояния между ПОН. По каждому расстоянию между основными ПОН (Таблица 1), мы выбираем ПОН с самым большим числом копий минорных аллелей для сравнения с ПОН на других расстояниях. При данном расстоянии, все сравнения независимы. а. Средние значения ID' по каждому пространственному разрыву ('Данные': пунктирная линия отмечает 25- и 75- процентные линии), в сравнении с прогнозом 2 на основе симуляций (см. Методы). Значения ID' для более коротких физических расстояний были рассчитаны в пределах отрезков непрерывно построенных последовательностей ДНК, содержащие как минимум два ПОН, и выбираются два наименее минорных аллеля.

Сравнения несцепленные маркеры можно получить путем сравнения ПОН в отсеке 40 т.п.н. в каждом ряду Таблицы 1 тех, которые находятся в следующем ряду. б. с. Доля значений ID' больше 0.5 (б) и соотношения значительных ( $P < 0.05$ ) ассоциаций (с) между двумя ПОН, разделенных данным расстоянием (как оценивается при помощи критерием отношения правдоподобия). Столбики указывают 95% интервалы центрального condence. Показано количество точек начала отсчета.

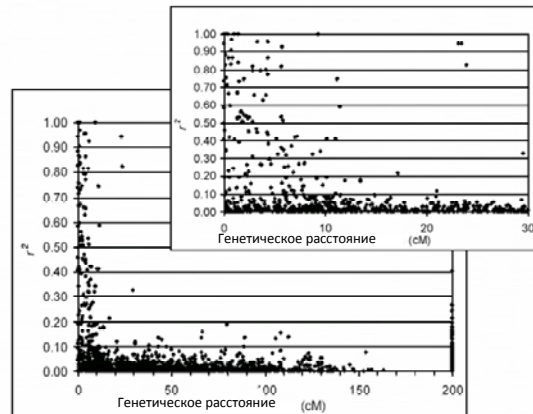
200

© 2001 Macmillan Magazines Ltd

NATURE | VOL 411 | 10 MAY 2001 | www.nature.com

### Арабидопсис

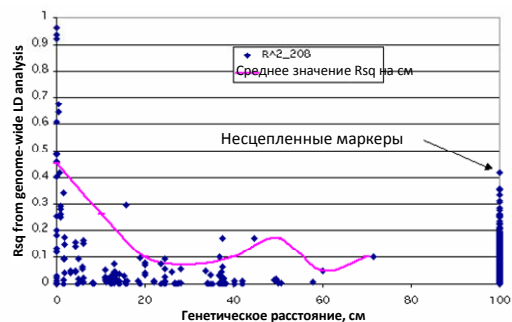
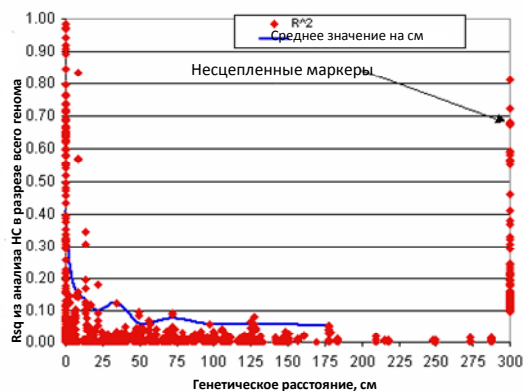
#### Регион FRI



### Ячмень

Значения  $R_{sq}$  пар SSR представлены на графике для сравнения с имеющейся картой

Чтобы понять распад НС, мы построили график значений  $R_{sq}$  в расстоянии в сравнении с расстоянием на карте  
Сорт



На основе этих графиков:

Распад НС происходит в пределах 50 см, при  $R^2 < 0.1$  на панели сортообразца  
Мы наблюдали значительный распад НС в пределах 30 см, при  $R^2 < 0.1$ , на панели экзотического образца  
Распад в масштабе генома наблюдался в пределах 20 см, при  $R^2 < 0.2$  как в сортообразце, так и экзотическом образце, что предполагает общие размеры блоков НС в хлопке.

## ИЗМЕНЧИВОСТЬ НС В РАЗРЕЗЕ ГЕНОМА

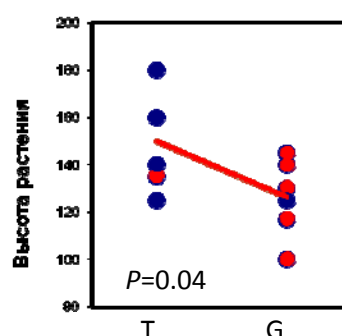
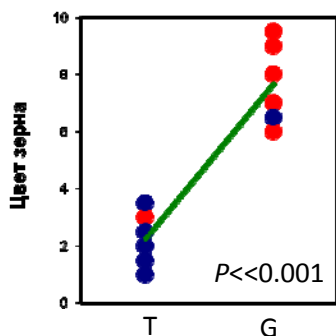
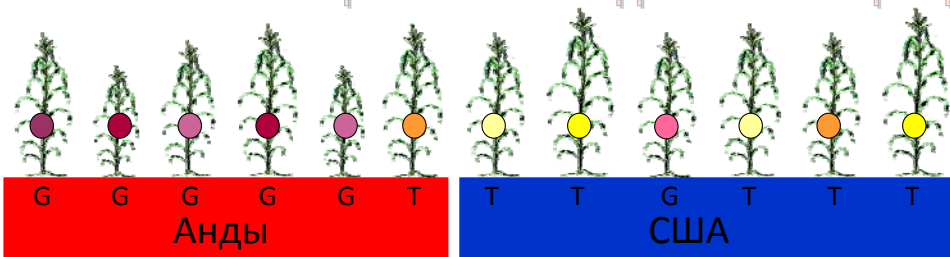
- Степень НС высоко изменчива в разрезе генома
- Еще нет полного понимания определяющих факторов НС.
- Факторы, которые предположительно влияют на НС
  - Дрейф генов
  - Рост популяции
  - Примешивание или миграция
  - Отбор
  - Изменчивые нормы рекомбинации



## АЛЛЕЛЬНЫЕ АССОЦИАЦИИ

- Прямая ассоциация
  - Рассматриваемый аллель сам участвует в фенотипе
- Косвенная ассоциация
  - Сам аллель не участвует, но при помощи НС с функциональным вариантом
- Мнимая ассоциация
  - Факторы смешения (например, стратификация популяции)

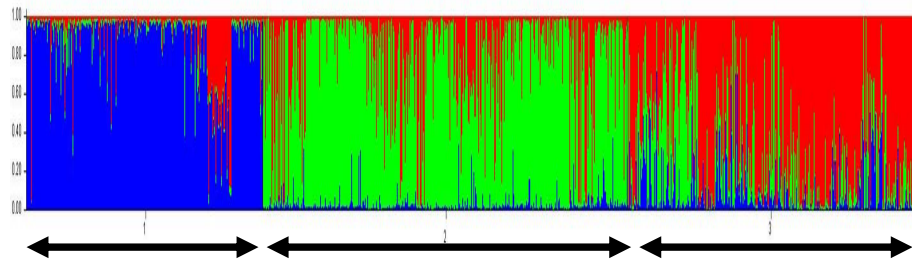
## СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИИ МОЖЕТ СОЗДАВАТЬ АССОЦИАЦИИ



Эти нефункциональные ассоциации могут учитываться путем оценки структуры популяции с использованием произвольных маркеров.

## РАБОТА СО СТРУКТУРОЙ ПОПУЛЯЦИИ

- ◉ Структурная ассоциация (Pritchard et al., 2000)
  - Обнаружение структуры из набора несцепленных маркеров, т.е. назначить вероятность родословной из  $k$  популяций каждой особи, а затем вести их контроль.

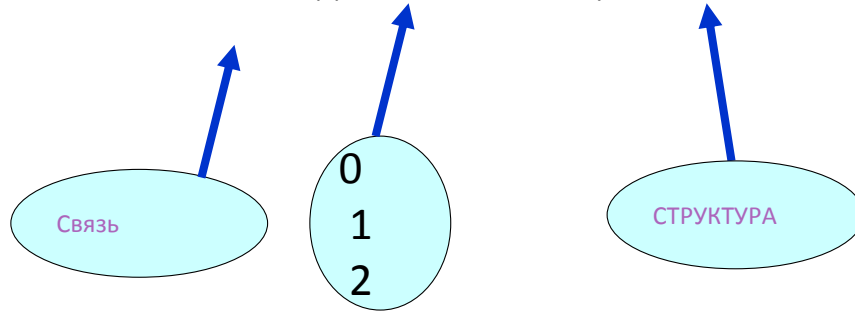


## МЕТОДЫ

- ◉ Комбинированное сцепление и НС
- ◉ Обобщенные одномерные модели
- ◉ Смешанная модель (Yu et al. 2006)
- ◉ Байесовский подход

# СМЕШАННАЯ МОДЕЛЬ (YU ET AL. 2006)

Фенотип = Постоянный коэффициент + ПОН + Популяция + Полиген



Смешанная модель SAS (Гаэль Прессуар)

## Structure

The program *structure* is a free software package for using multi locus genotype data to investigate population structure. Its uses include inferring the presence of distinct populations, assigning individuals to populations, studying hybrid zones, identifying migrants and admixed individuals, and estimating population allele frequencies in situations where many individuals are migrants or admixed. It can be applied to most of the commonly-used genetic markers, including SNPs, microsatellites, RFLPs and AFLPs.

**Download** [Structure 2.3.1](#)  
**Download** [Structure 2.3.2 \(Beta version\)](#)

**What to cite:** The basic algorithm was described by Pritchard, Stephens & Donnelly (2000). Extensions to the method were published by Falush, Stephens and Pritchard (2003) and (2007) and by Hubisz, Falush, Stephens and Pritchard (2009).

**Contributors:** [Daniel Falush](#), [Melissa Hubisz](#), [Matthew Stephens](#), [Jonathan Pritchard](#), [Peter Donnelly](#), [William Wen](#), [Mike Tremis](#).

**Questions and Discussion:** We have now started a [Google Groups](#) forum devoted to Structure. This replaces the [Genetic Software Forum](#) which is no longer active.

**Plotting programs and other resources:** [CLUMPP](#) and [distruct](#) from [Noah Rosenberg's](#) lab can automatically sort the cluster labels and produce nice graphical displays of *structure* results. Other plots are produced directly by the software package itself. A free publicly available cluster has kindly been made available for running computationally intensive *structure* jobs by [CBSU at Cornell](#). Xavier Dedeo's program [xmf2struct](#) converts files in [extended Multi-Fasta \(XMFA\)](#) format into Structure input format.

**Sample data sets:** [available here](#)

TASSSEL: <http://www.maizegenetics.net>  
 STRUCTURE: <http://pritch.bsd.uchicago.edu/software.html>  
 SPAGEDI: <http://ebe.ulb.ac.be/ebe/Software.html>

