

# БИОИНЖЕНЕРИЯ

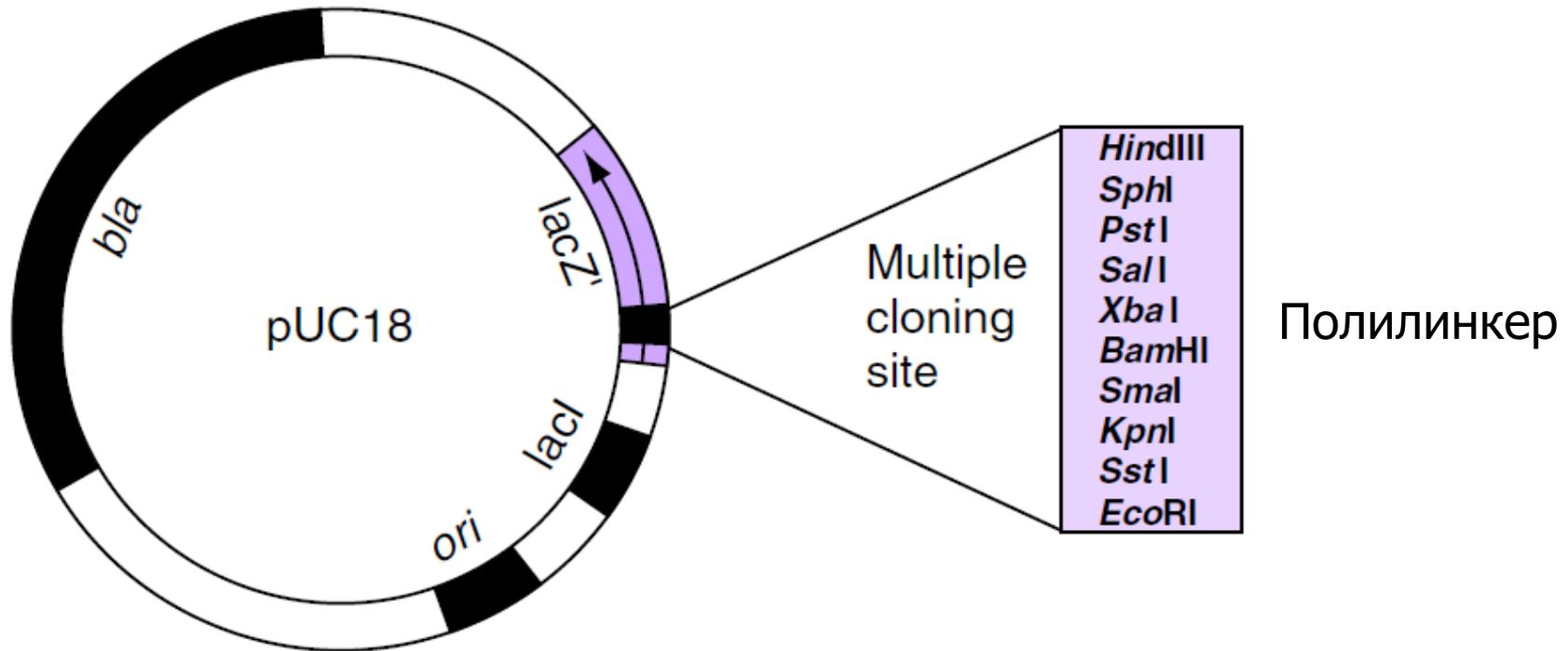
Сергей Лукьянов

Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемакина и Ю.А. Овчинникова РАН

Лекция 2

**Гибридизация ДНК и зонды, вектора на основе бактериофага  $\lambda$ , искусственные хромосомы дрожжей и бактерий (YACs and BACs), создание и анализ геномных библиотек, секвенирование ДНК по Сенгеру.**

# Плазмидный вектор pUC18



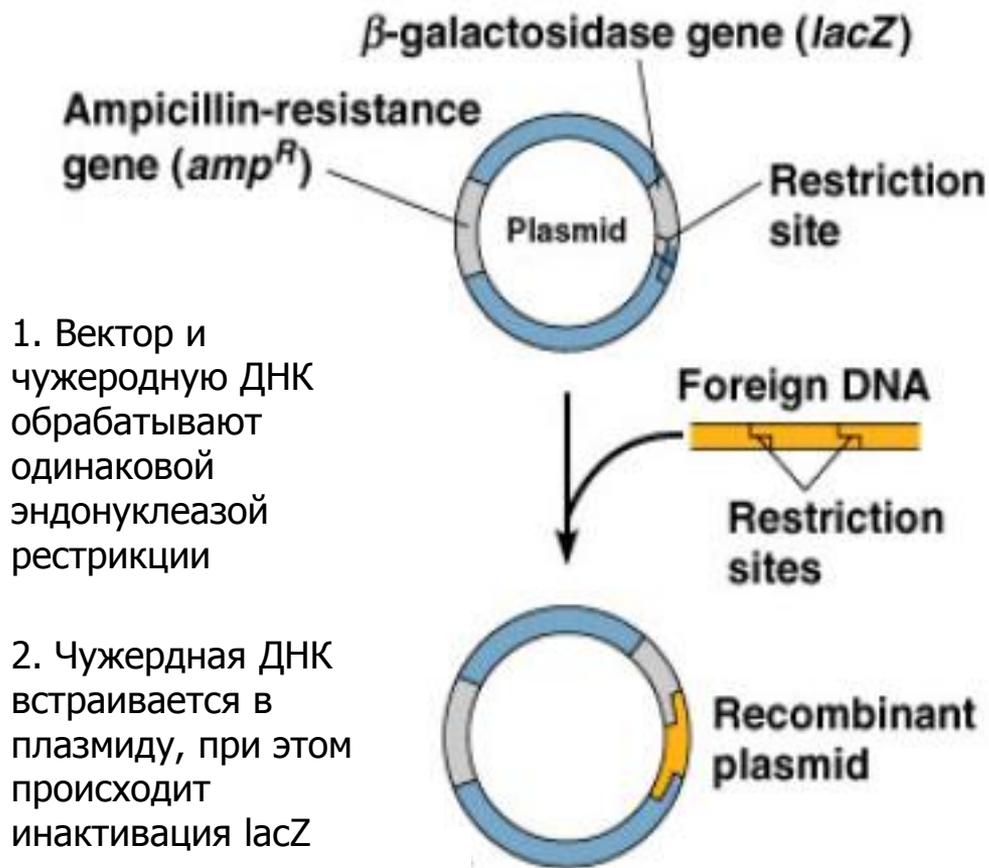
*bla* – Ген β-лактамазы, селектируемый маркер (устойчивость ампициллину)

*ori* – Точка начала репликации (origin)

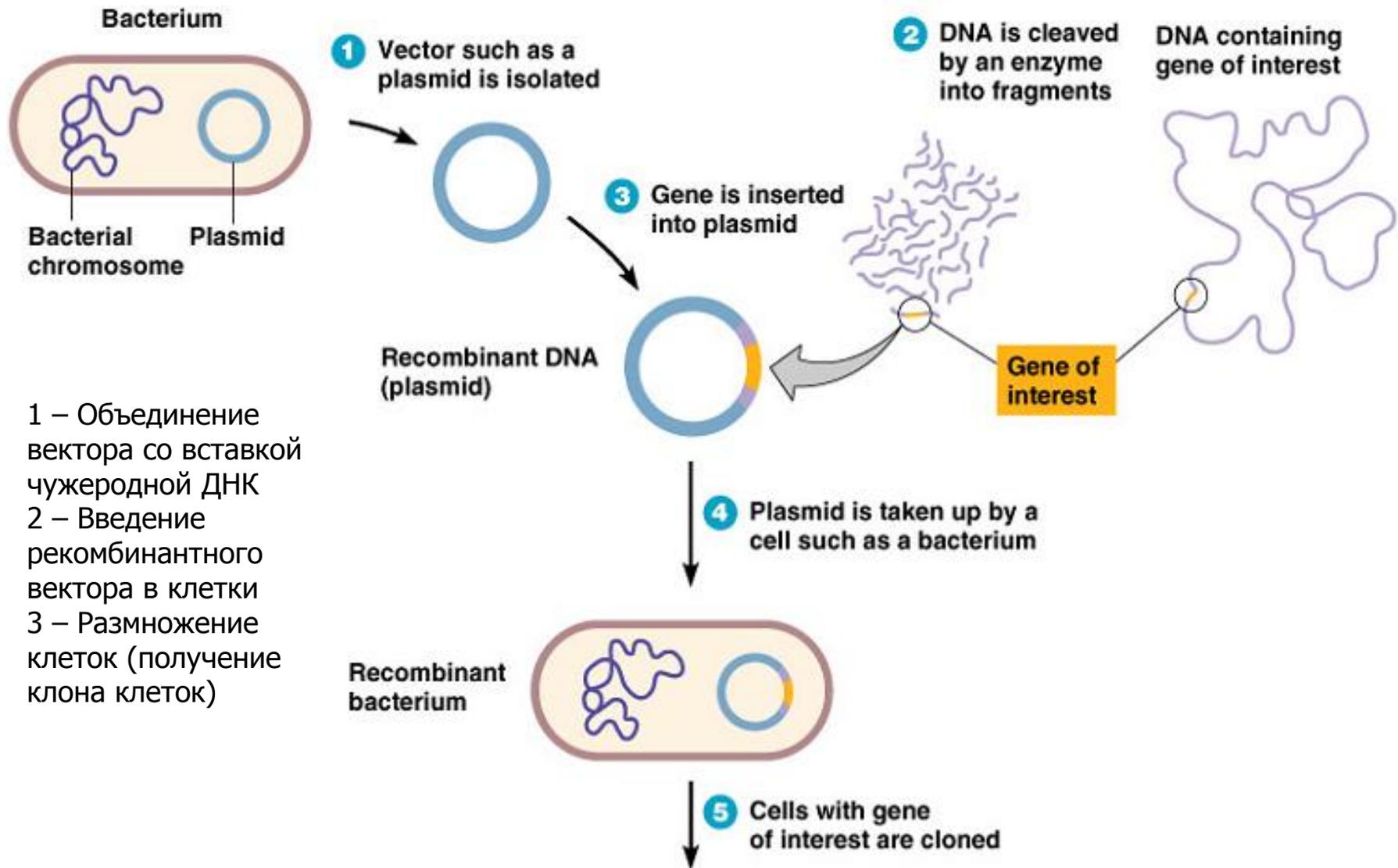
*lacZ'* – N-концевая часть гена β-галактозидазы (кодирует 146 из 1021 АК-остатков), селектируемый маркер (хромогенный субстрат X-Gal)

*lacI* – Ген Lac-репрессора (Индуктор – IPTG)

# Бело-голубая селекция



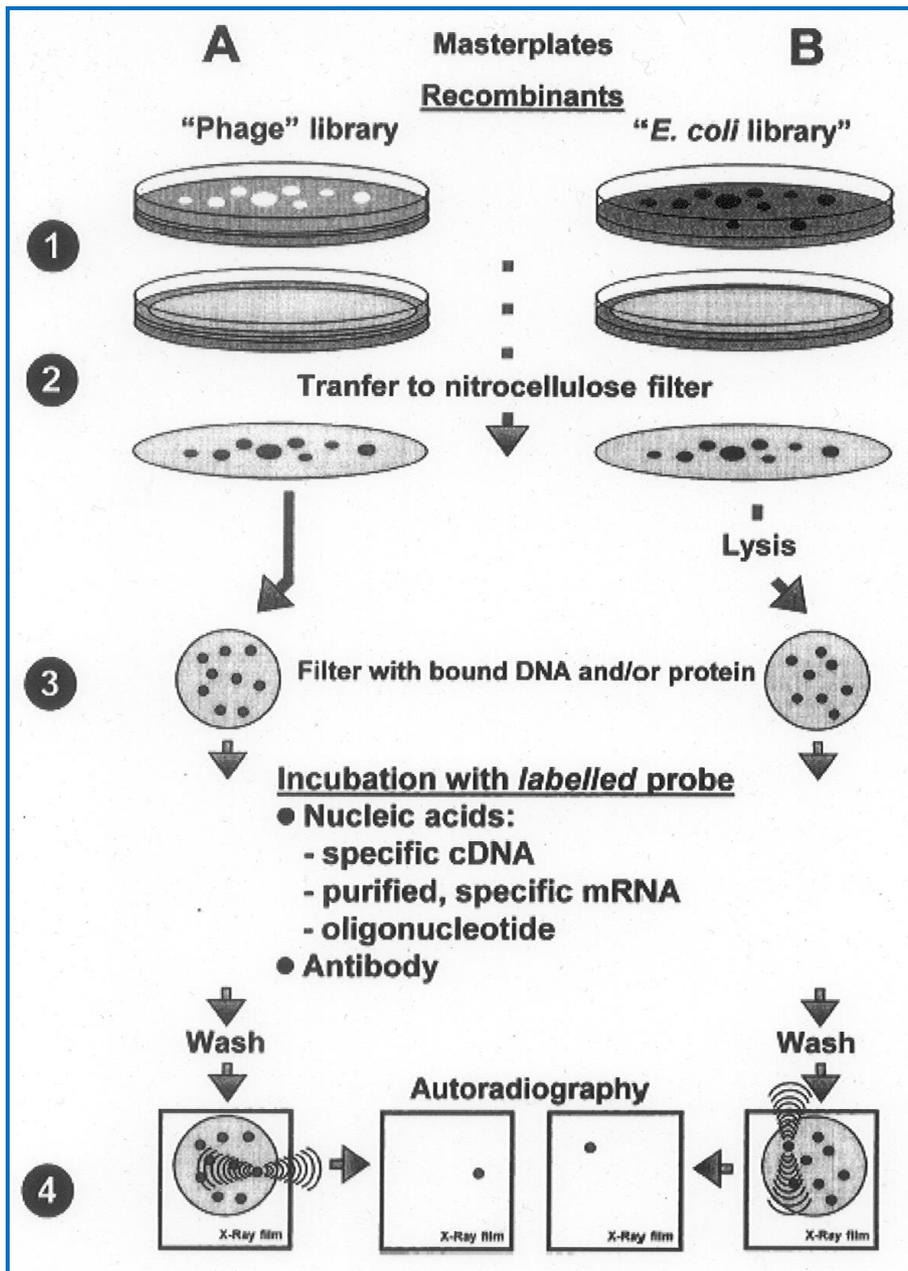
# Молекулярное клонирование



- 1 – Объединение вектора со вставкой чужеродной ДНК
- 2 – Введение рекомбинантного вектора в клетки
- 3 – Размножение клеток (получение клона клеток)



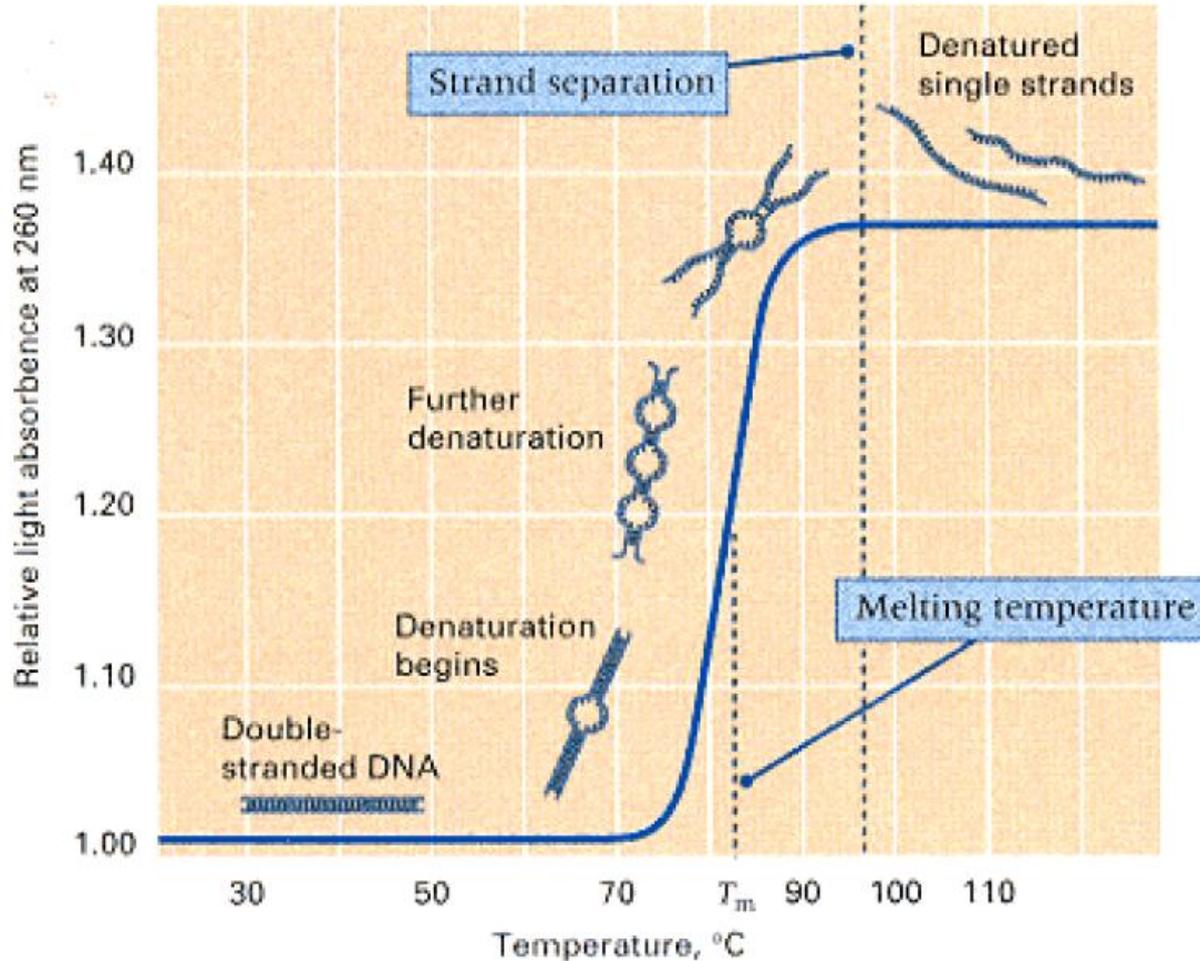
Для выявления фрагмента в тестируемом образце ДНК используют пробу (зонд) – несущий метку фрагмент(ы) нуклеиновой кислоты, способный к гибридизации с целевой нуклеиновой кислотой



Отбор нужных клонов из фаговых и бактериальных библиотек

Часть каждой бактериальной колонии или фаговой бляшки переносят на мембрану, ДНК денатурируют и гибридизуют с меченым ДНК зондом

# Плавление (денатурация) ДНК

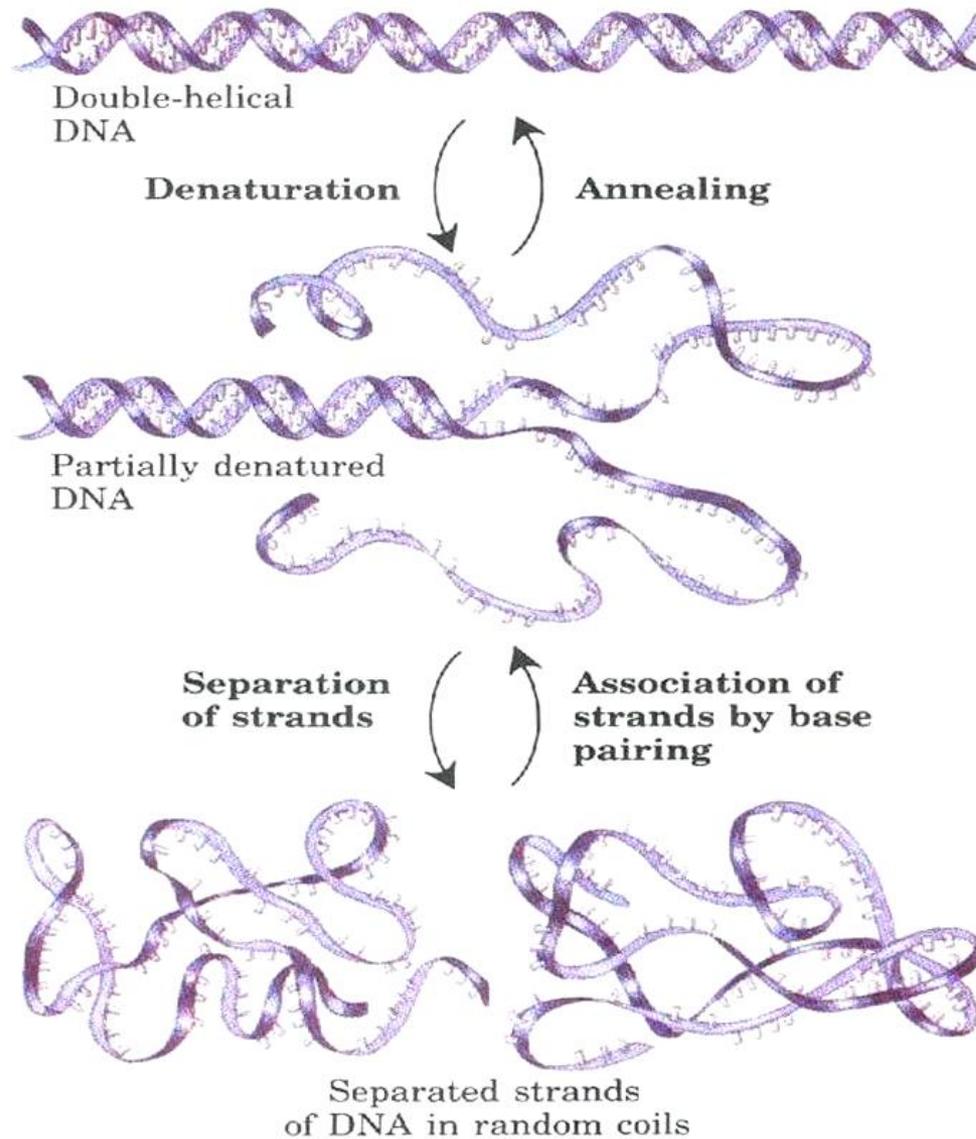


**Температура плавления ДНК ( $T_m$ )** – это температура, при которой цепи ДНК диссоциированы наполовину

**Факторы, влияющие на  $T_m$ :**

- pH
- Ионная сила
- Органические растворители
- **Наличие неспаренных оснований:** 1% неспаренных оснований снижает  $T_m$  на 1°C

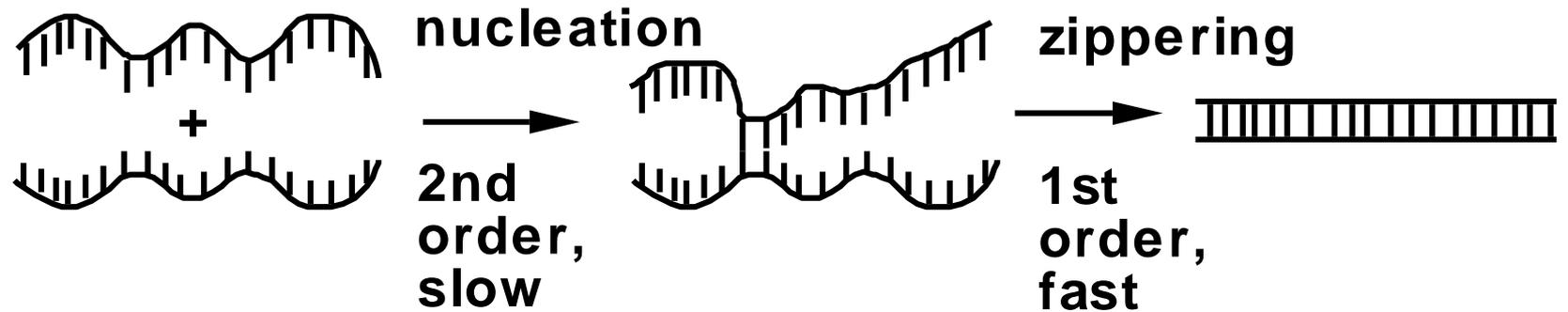
# Денатурация и гибридизация (реассоциация) ДНК



# Гибридизация нуклеиновых кислот

- Нуклеиновые кислоты способны к реассоциации. Одноцепочечная ДНК может гибридизоваться как с ДНК, так и с РНК
- Гибридизация специфична. Гибридизуются молекулы, обладающие комплементарностью. Некомплементарные молекулы не гибридизуются.
- Гибридизация комплементарных молекул происходит в сложных смесях нуклеиновых кислот
- Варьируя условия (строгость) гибридизации можно гибридизовать молекулы, обладающие полной или не полной комплементарностью

# Реассоциации нуклеиновых кислот – реакция второго порядка



**Denatured DNA  
(two single  
strands)**

**A short duplex  
forms at a region  
of complementarity.**

**Renatured  
DNA  
(two strands in  
duplex)**

# Факторы влияющие на скорость гибридизации

## Внешние

**Температура:** Оптимальная скорость гибридизации достигается при температуре на 25°C ниже, чем  $T_m$ .

**Ионная сила:** При  $<0.1$  М NaCl увеличение ионной силы в два раза приводит к 5-10 кратному увеличению скорости гибридизации. При  $>1.2$  М NaCl, изменение ионной силы не влияет на скорость гибридизации. Стандартные условия – 0,18-0,9 М NaCl. **В дистилляте ДНК плавится при комнатной температуре!**

**Вещества, дестабилизирующие двойную спираль ДНК** (формамид): уменьшение  $T_m$  и оптимальной скорости гибридизации (50% формамид замедляет гибридизацию в 2-3 раза; 80% => в 4 раза).

## Акселераторы, увеличивающие концентрацию ДНК:

- В системе фенол:вода происходит 10000-кратное увеличение скорости гибридизации за счет концентрации ДНК в интерфазе между фенолом и водой.
- Добавление полимеров так же приводит к увеличению концентрации ДНК в растворе: в присутствии 10% декстрансульфата (или 10% PEG) скорость гибридизации возрастает приблизительно в 10 раз (но возрастают вязкость и фон).

## Концентрация ДНК

### Зависящие от природы ДНК

#### Длина гибридов

#### GC состав

**Процент идентичности гибридизуемых ДНК:**  $T_m(\text{DNA:DNA})$  падает на 1-1.5°C при увеличении количества некомплементарных оснований на 1%.

#### Сложность ДНК

# Температура гибридизации для ДНК фрагментов

## **фрагменты ДНК > 100 bp**

$$T_m = 81.5 + 16.6 (\log M) + 0.41 (\%G+C) - 0.61(\%form) - 500/L - \% \text{ mismatch}$$

M = molarity of monovalent cation

form = formamide

L = length of hybrid

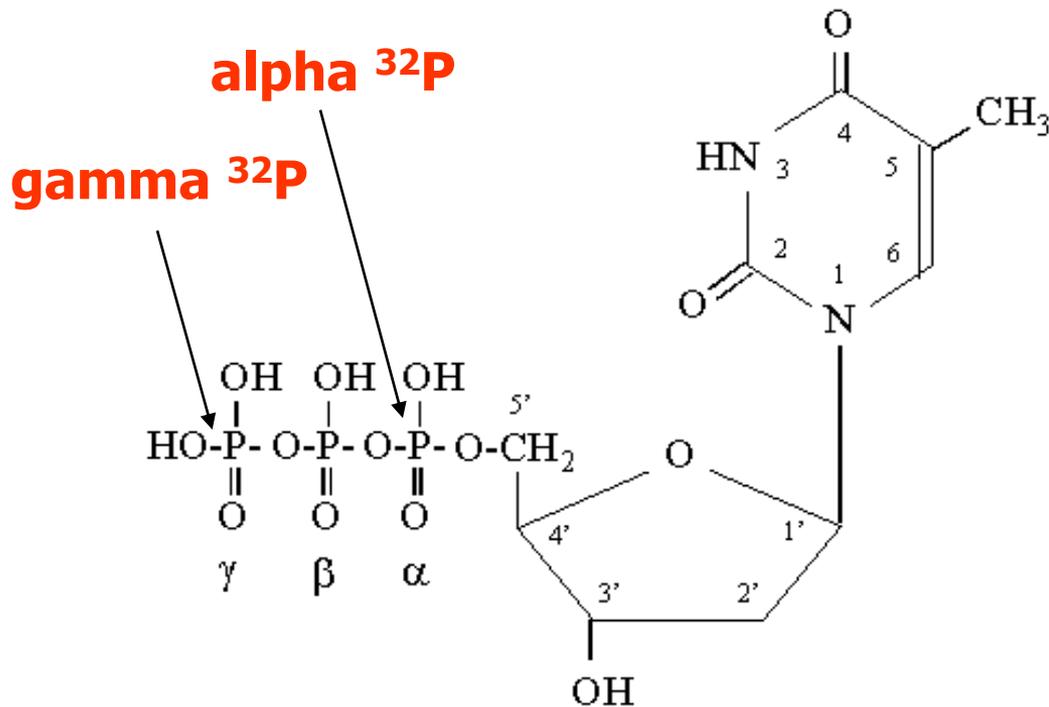
**Т гибридизации:  $T_m - 25^\circ\text{C}$**

## **Фрагменты ДНК < 50 bp**

$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$$

**Т гибридизации:  $T_m - 5^\circ\text{C}$**

# Использование изотопов для мечения нуклеотидов



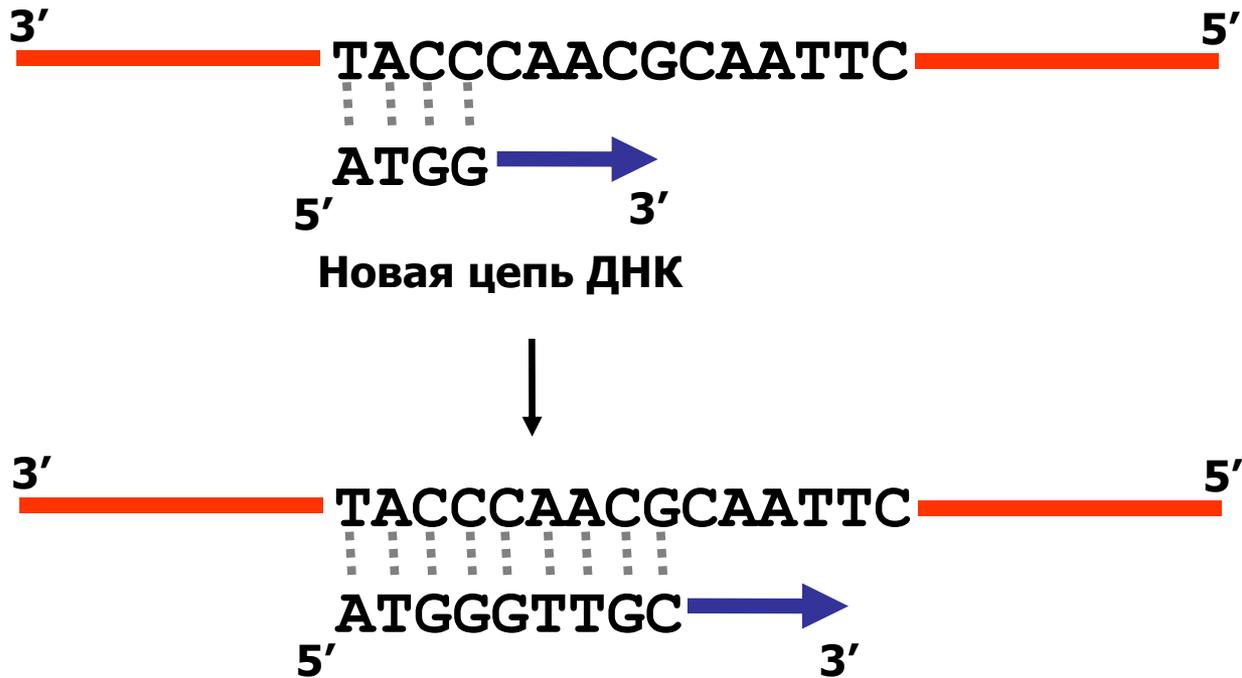
2'-deoxy Thymidine triphosphate  
(nucleotide)

## Время полураспада

- <sup>32</sup>P : t<sub>1/2</sub> = 14.3 дня
- <sup>33</sup>P : t<sub>1/2</sub> = 25.4 дня
- <sup>35</sup>S : t<sub>1/2</sub> = 87.4 дней
- <sup>3</sup>H : t<sub>1/2</sub> = 12.4 года

Детекция –  
радиоавтограф на  
рентгеновской пленке

# ДНК-полимераза: 5'->3'-полимеразная активность



- Удлинение цепи происходит путем добавления нуклеотидов к 3'-концу новой цепи ДНК по принципу комплементарности
- ДНК полимераза нуждается в затравке – праймере для инициации синтеза
- Последовательность праймера определяет место с которого начинается синтез новой цепи ДНК

# Приготовление пробы (амплификация со случайного праймера)

## Фрагмент Кленова:

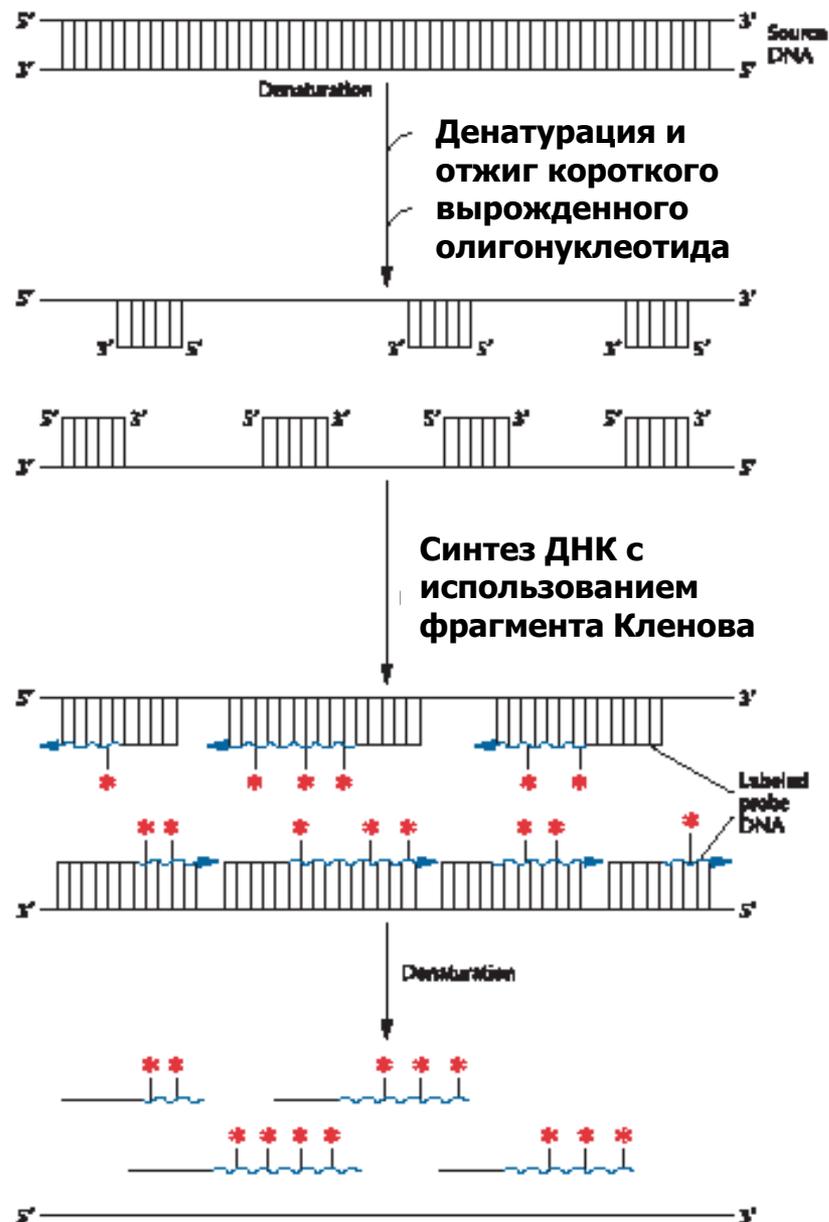
Модифицированный фрагмент ДНК-  
полимеразы I

мол. масса 76 кДа

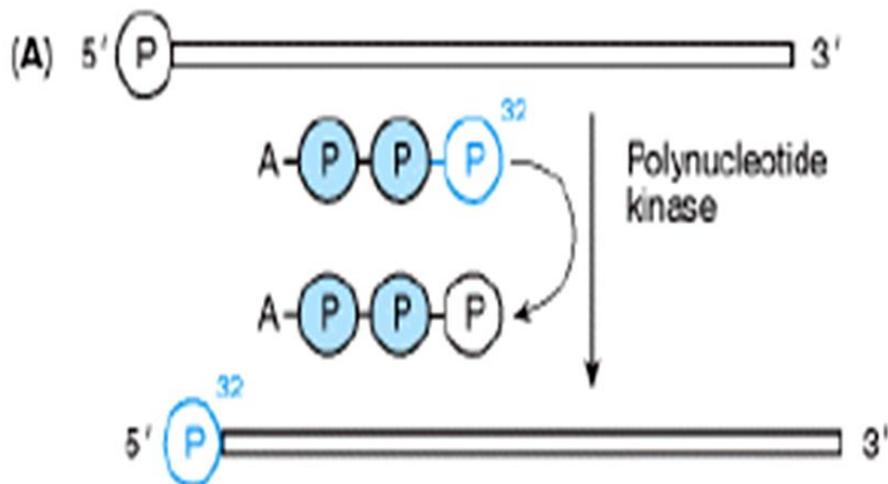
отсутствует

KlenovEco- отсутствует 3'-5' и  
5'->3'-экзонуклеазная активность

Изотермическая амплификация  
ДНК пробы путем вытеснения цепи!



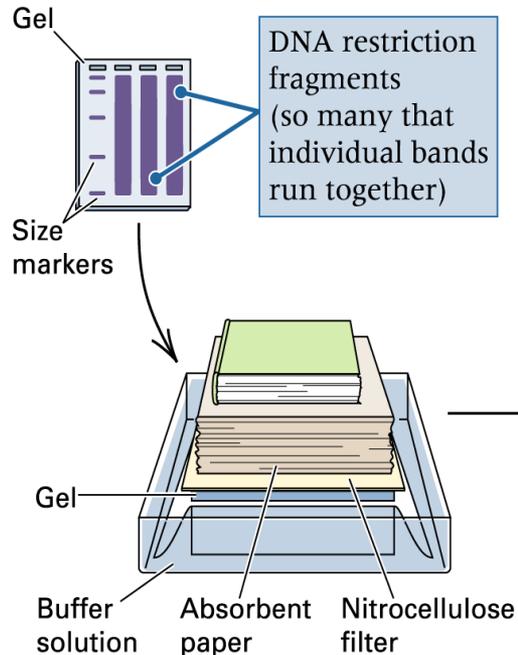
# Приготовление олигонуклеотидной пробы (мечение 5'-концов, гамма P32)



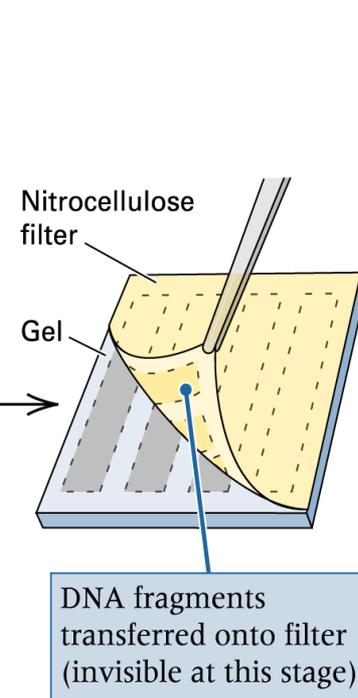
**Мечение синтетического олигонуклеотида с помощью полинуклеотидкиназы бактериофага T4**

# Southern Blot Analysis

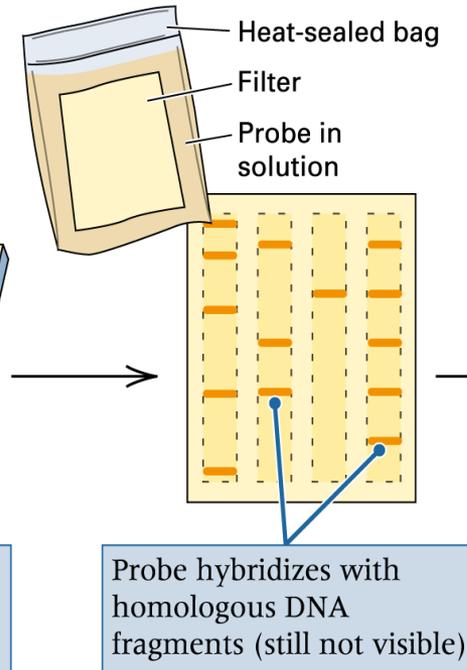
(A) DNA is cleaved; electrophoresis is used to separate DNA.



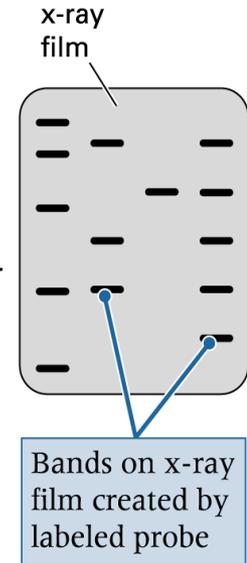
(B) DNA fragments are blotted onto nitrocellulose filter.



(C) Filter is exposed to radioactive probe.



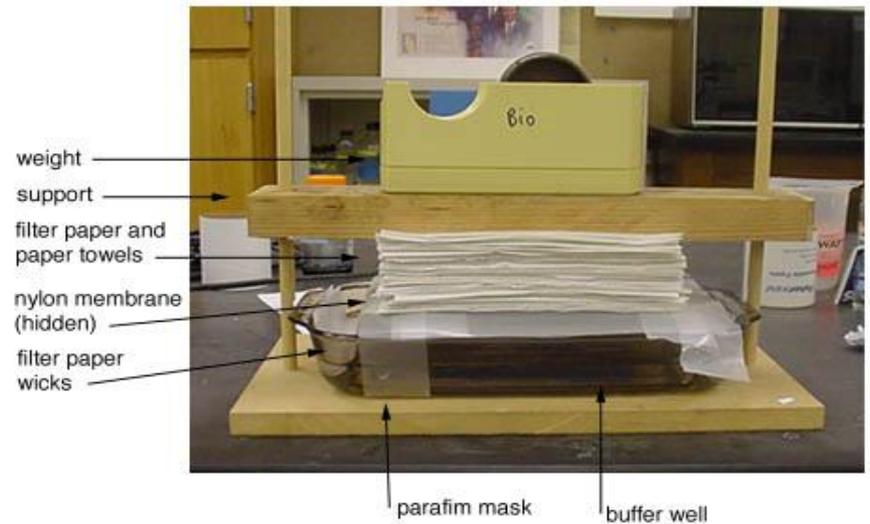
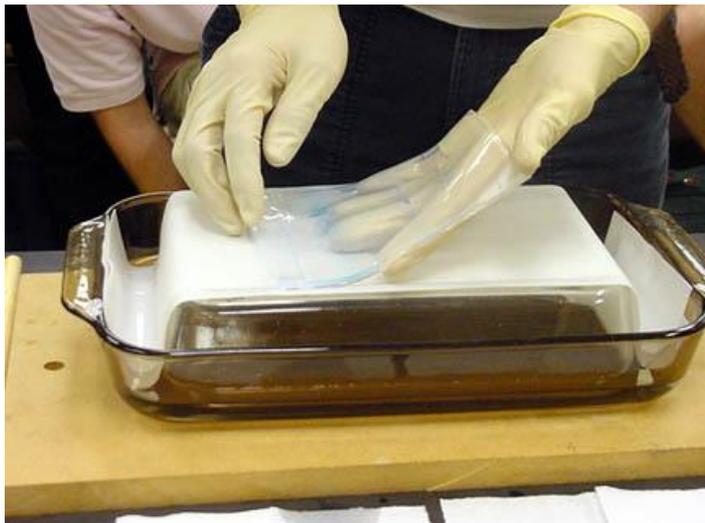
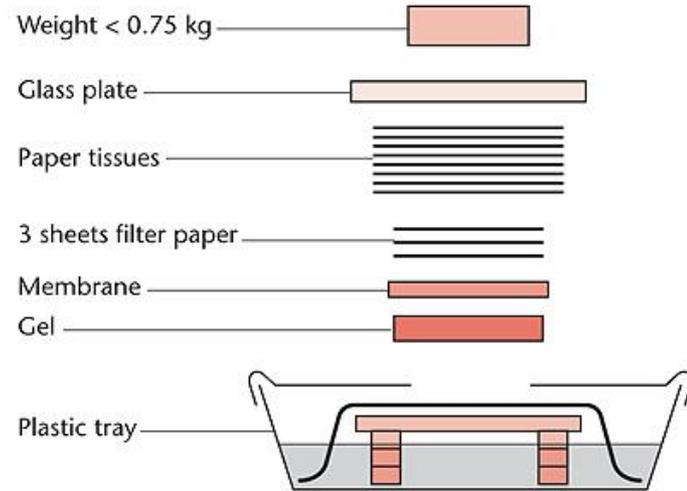
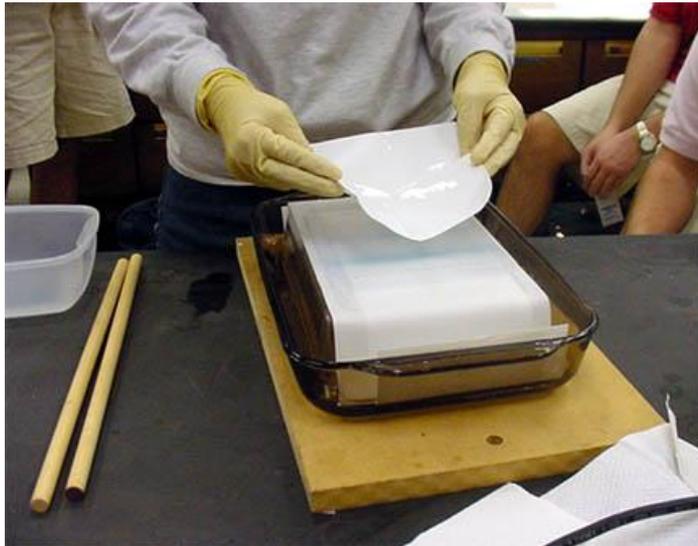
(D) Filter is exposed to photographic film; film is developed.



Specific DNA fragments are identified by hybridization with a probe = a radioactive known fragment of DNA or RNA

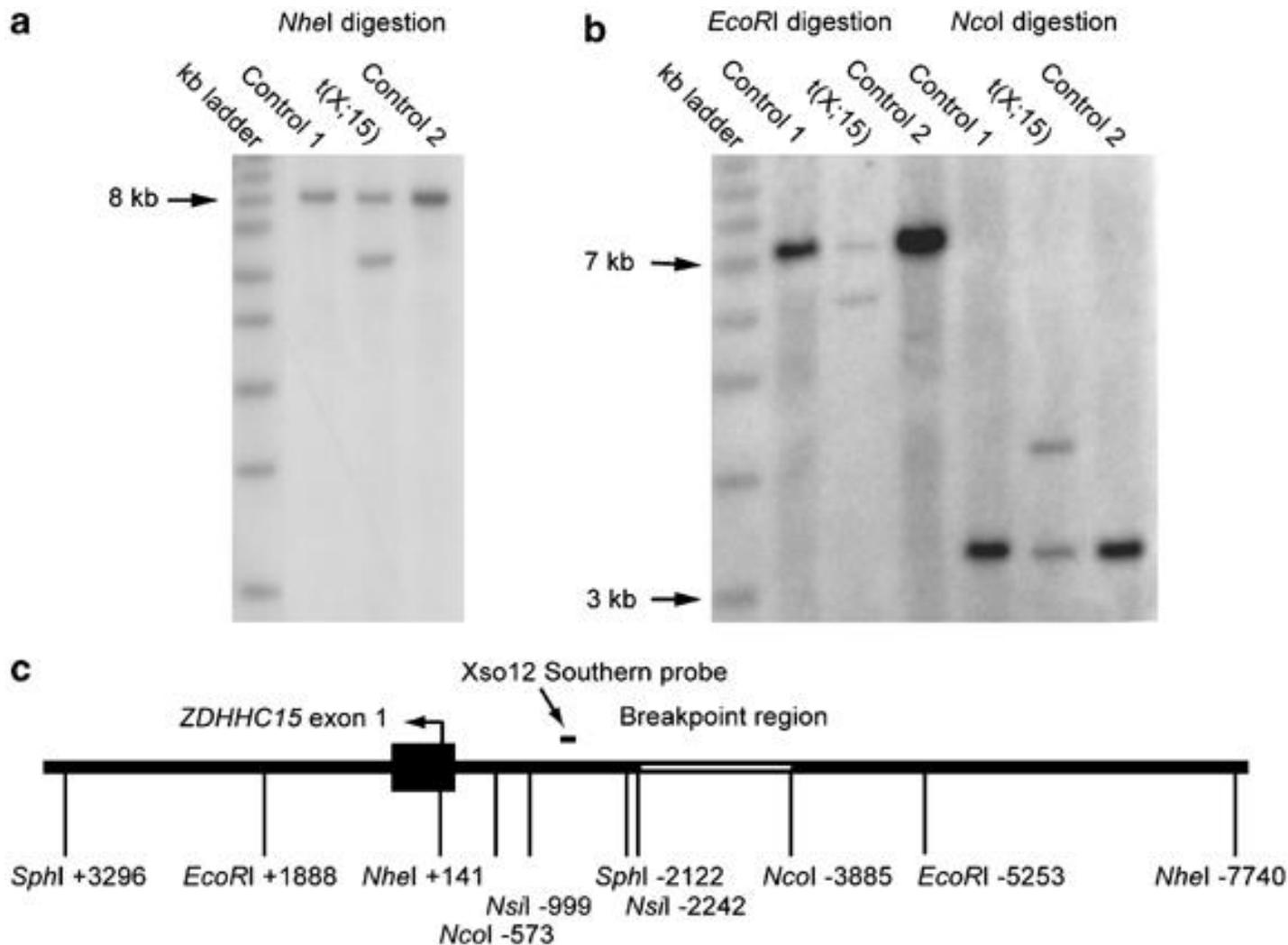
Southern blot analysis is used to detect very small amounts of DNA or to identify a particular DNA band by DNA-DNA or DNA-RNA hybridization

# Саузерн блот: перенос ДНК на фильтр



# Southern Blot Analysis

Mapping of the

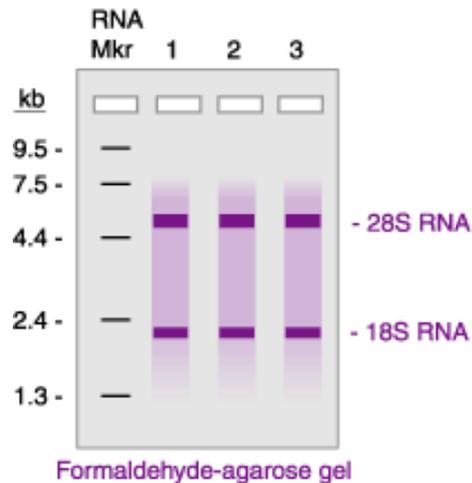


t

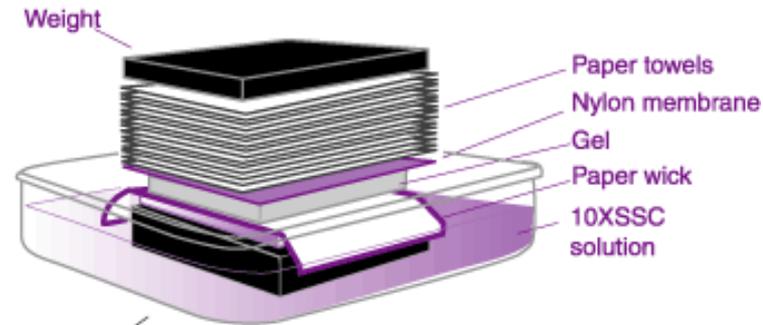
w

.

# Northern Blot Analysis

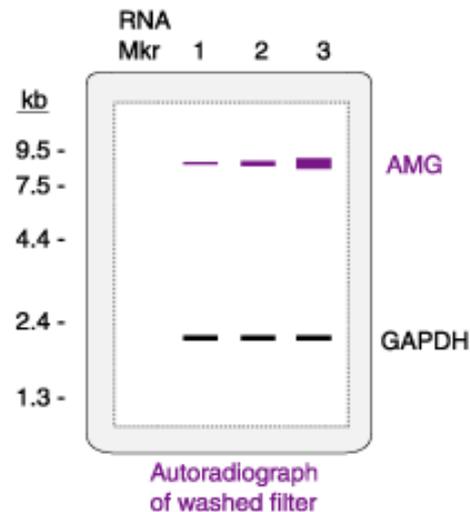


Transfer RNA by membrane blotting



Cross-link RNA to the membrane using UV light

Hybridize membrane with denatured  $^{32}\text{P}$ -cDNA probe

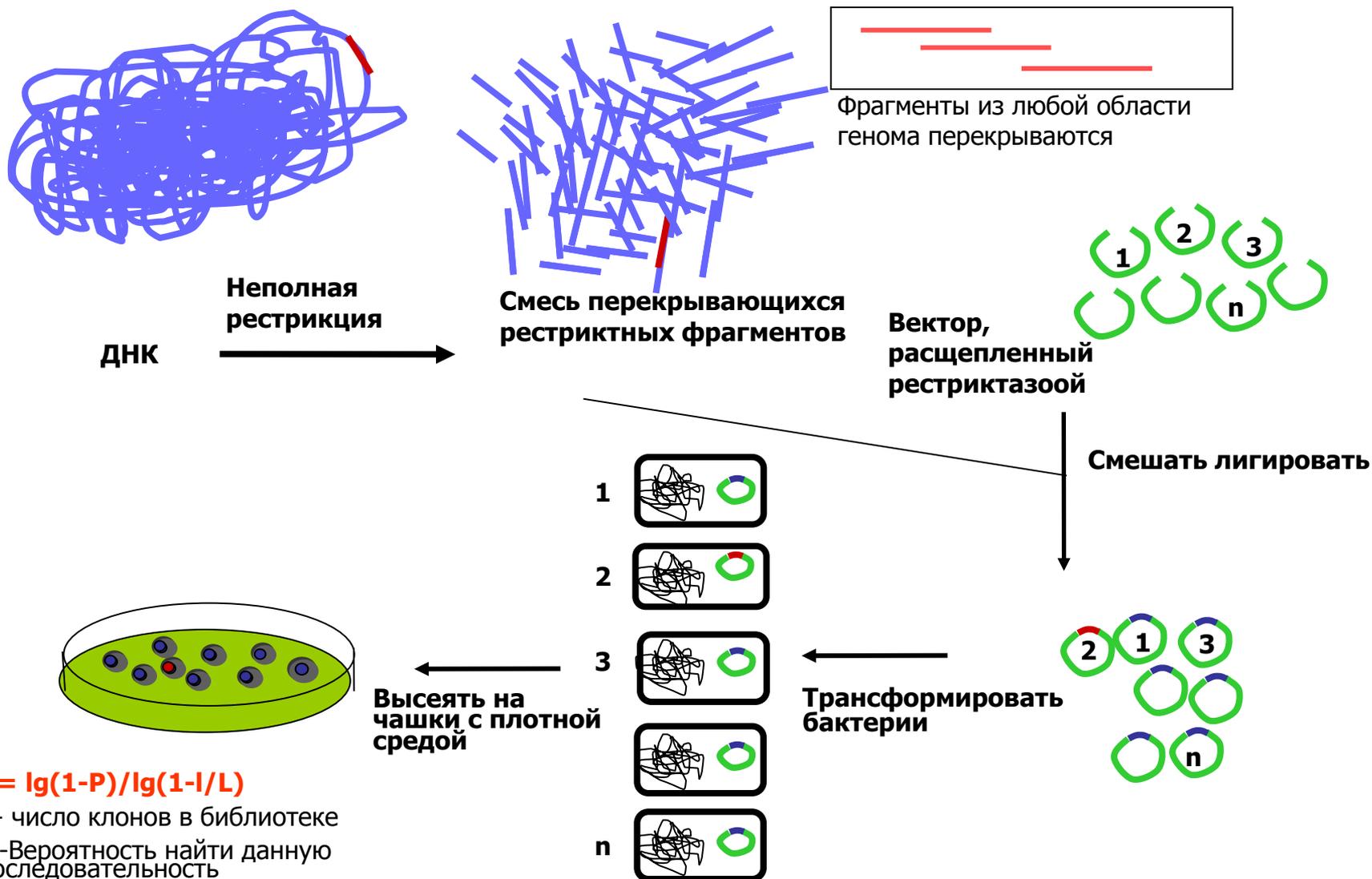


Specific RNAs are identified by hybridization with a probe = a radioactive fragment of DNA

Northern blot analysis is used to check the amounts of RNA in sample(s) or to identify a particular RNA band by DNA-RNA hybridization



# Приготовление геномной библиотеки



$$N = \lg(1-P) / \lg(1-I/L)$$

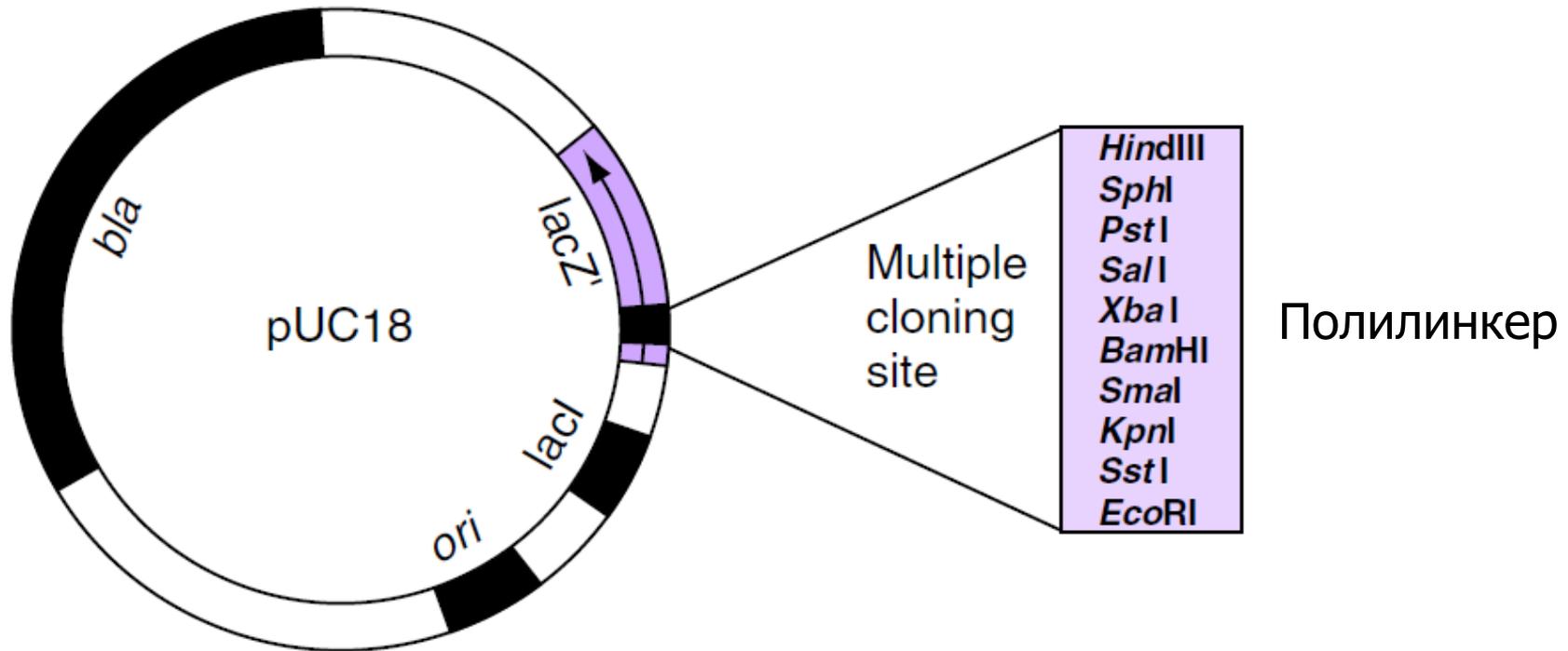
N - число клонов в библиотеке

P - Вероятность найти данную последовательность

I - длина фрагмента вставки

L - полная длина генома

# Плазмидный вектор pUC18



*bla* – Ген  $\beta$ -лактамазы, селектируемый маркер (устойчивость ампициллину)

*ori* – Точка начала репликации (origin)

*lacZ'* – N-концевая часть гена  $\beta$ -галактозидазы (кодирует 146 из 1021 АК-остатков), селектируемый маркер (хромогенный субстрат X-Gal)

*lacI* – Ген Lac-репрессора (Индуктор – IPTG)

# Основной недостаток бактериальных плазмид – небольшой размер вставки (до 5 kb)

$$N = [\ln (1-P)]/[\ln (1-f)]$$

$P$  – probability of complete coverage

$N$  – number of individual clones required

$f$  – proportion of genome in average fragment

For the human genome and a standard plasmid

$P$  – 99% or 0.99 confidence

$f$  –

$$5 \text{ kb}/4,400,000 \text{ kb} = 1.14 \times 10^{-6}$$

$$N = [\ln .01]/[\ln 0.99999886]$$

$$= -4.6/-1.14 \times 10^{-7}$$

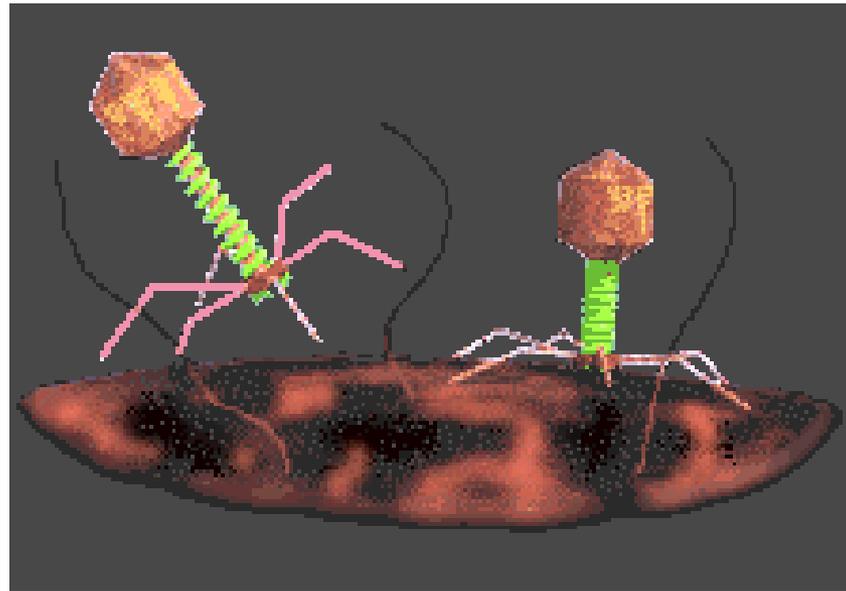
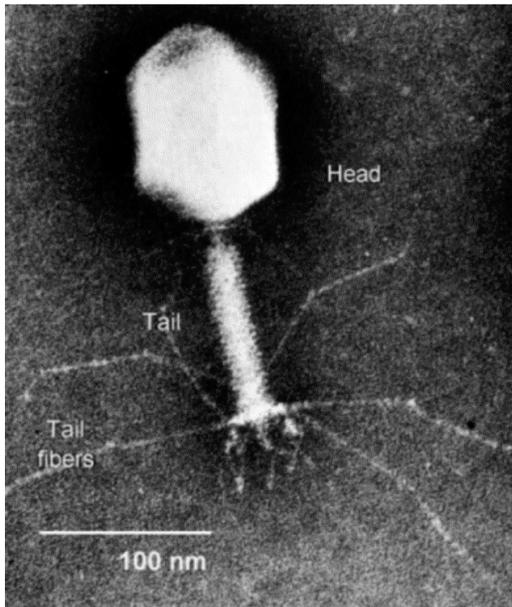
$$= \mathbf{40,350,877 \text{ individual clones}}$$

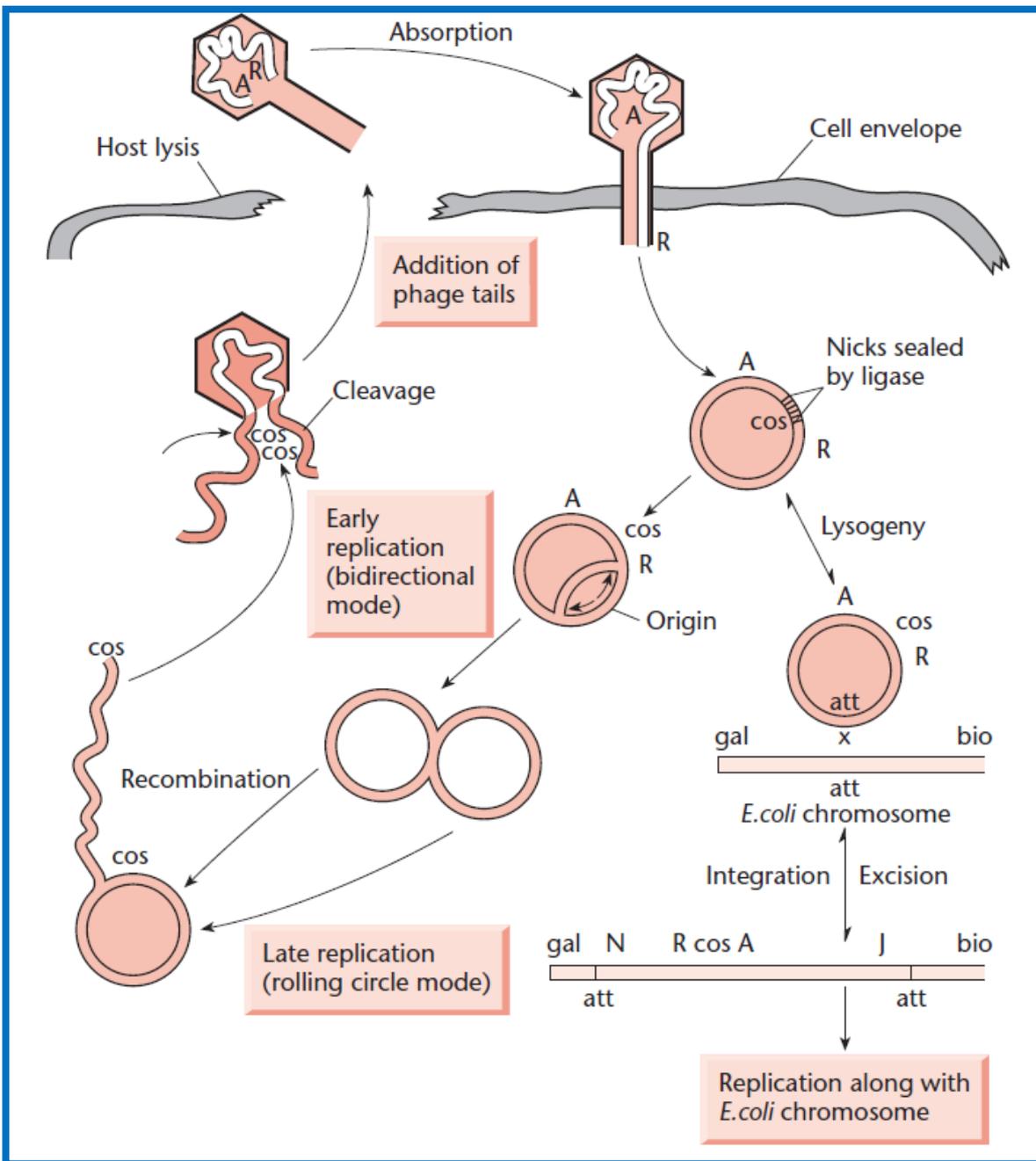


Векторы на основе хромосомы фага  $\lambda$

# Бактериофаги

- Природные переносчики бактериальной ДНК из клетки в клетку
- Эффективно заражают бактериальные клетки
- Не способны размножиться вне бактерий
- Для клонирования вставок размером 23-35 kb
- ДНК упаковывается в фаговую оболочку *in vitro*





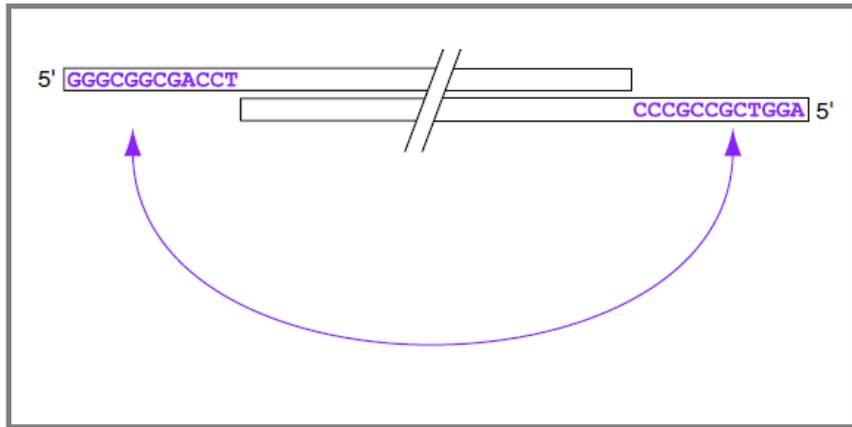
# Жизненный цикл фага λ

Два пути развития бактериофага:

1. **Лизогенный:**  
интеграция в хромосому хозяина
2. **Литический:**
  - а) Двухсторонняя  $\theta$ -репликация;
  - б) Катящееся кольцо

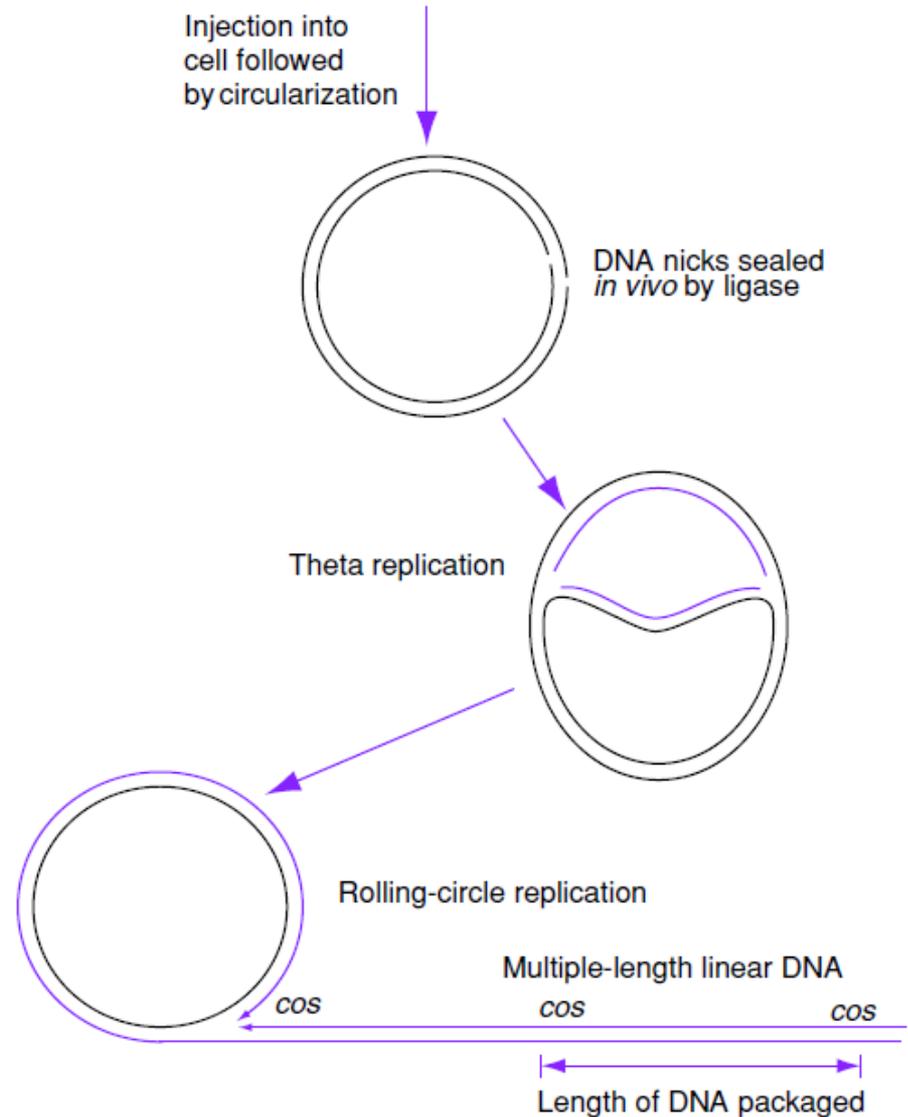
Фазмиды (phasmid - фаговые плазмиды)  
Содержат *att-сайт*, что позволяет встраиваться в геном фага λ

# Репликация ДНК фага λ

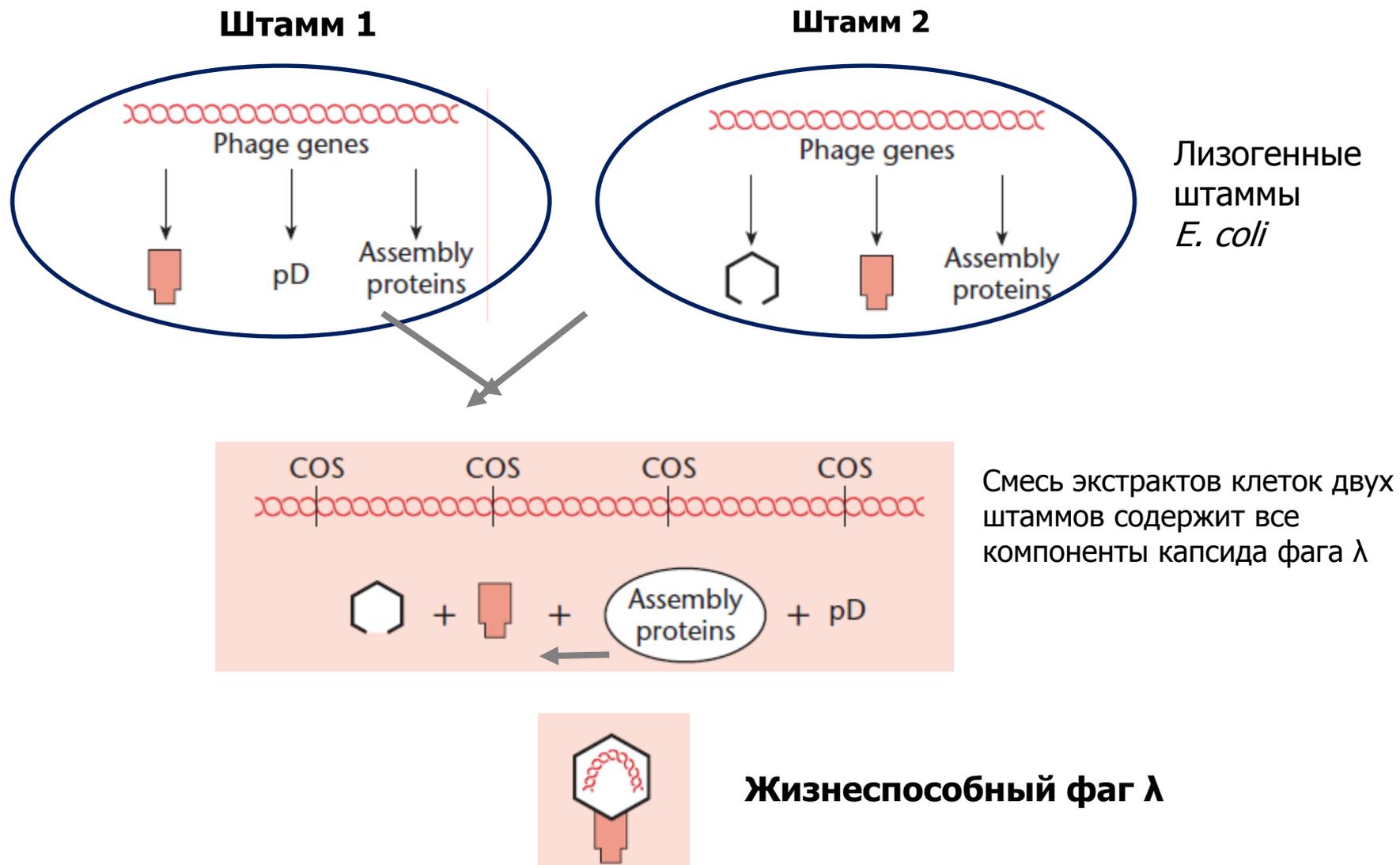


*cos*-сайты ДНК фага λ (cohesive sites), 12 п.н.

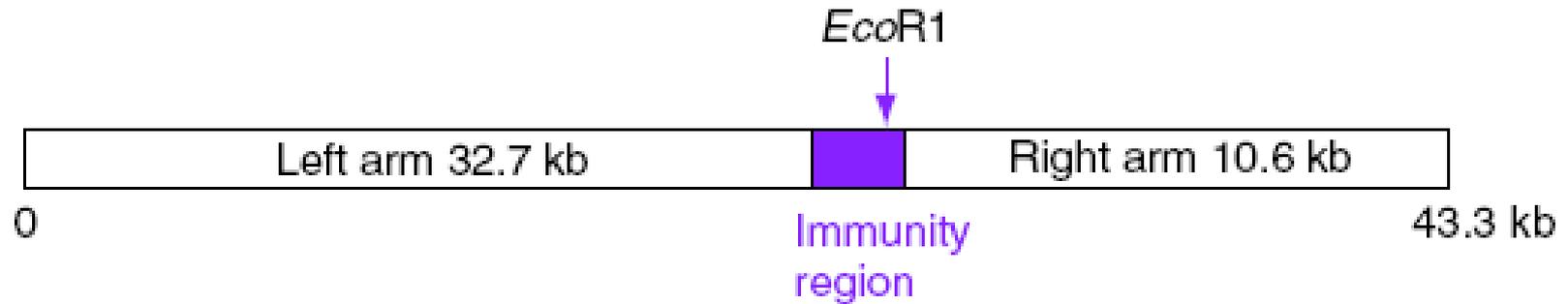
Linear DNA, with sticky ends, in phage particle



# Упаковка ДНК фага $\lambda$ *in vitro*

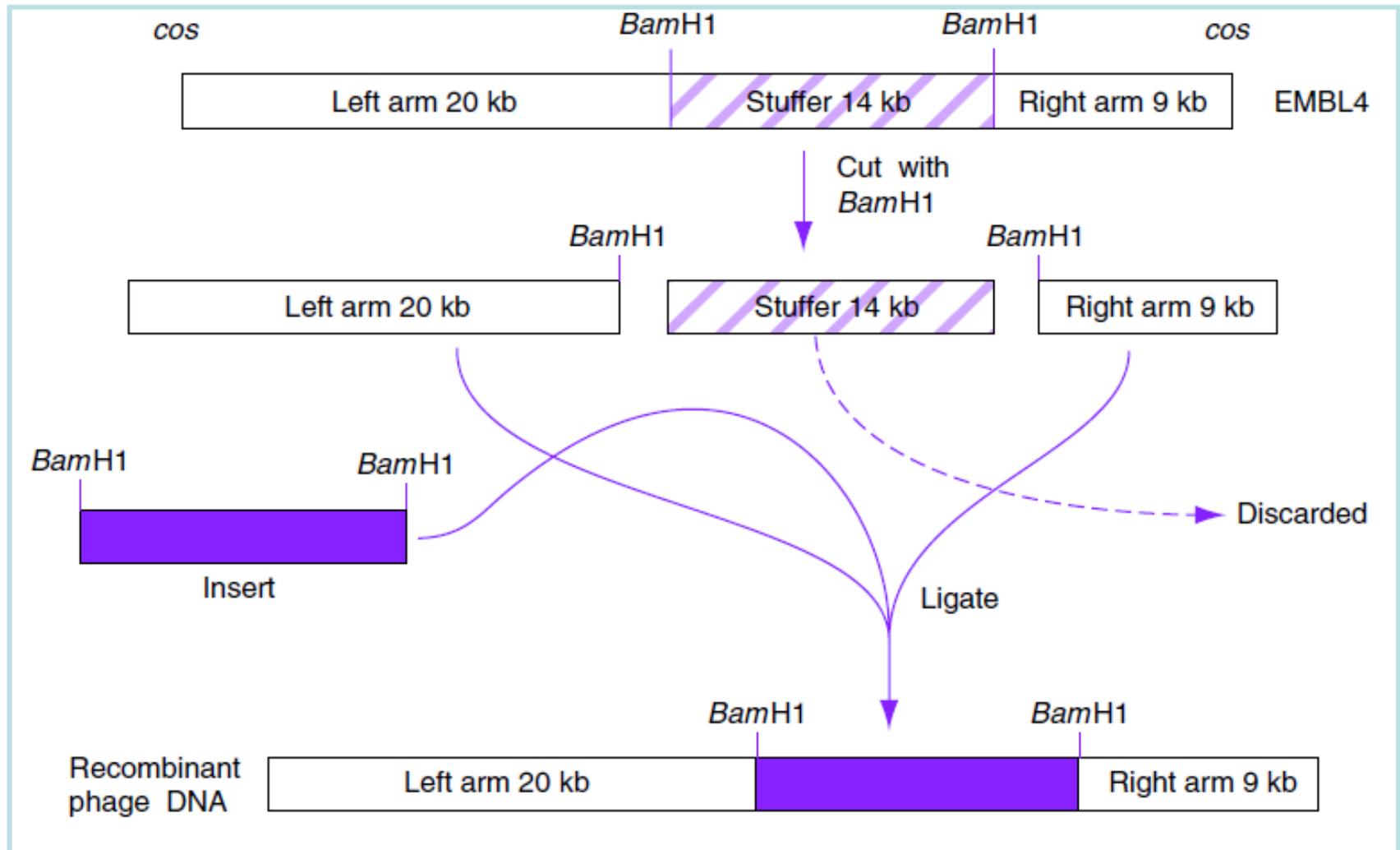


# Инсерционный вектор лямбда gt10



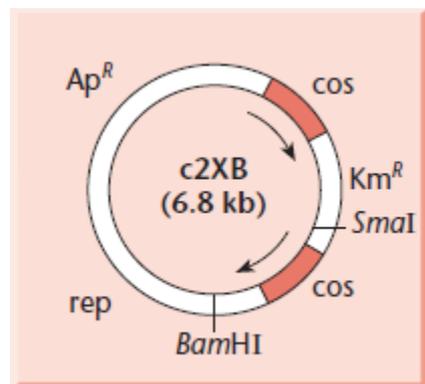
Вставка чужеродной ДНК до 7.6 т.п.о. по *EcoRI*-сайту

# Использование вектора лямбда EMBL4 с замещением внутренней области



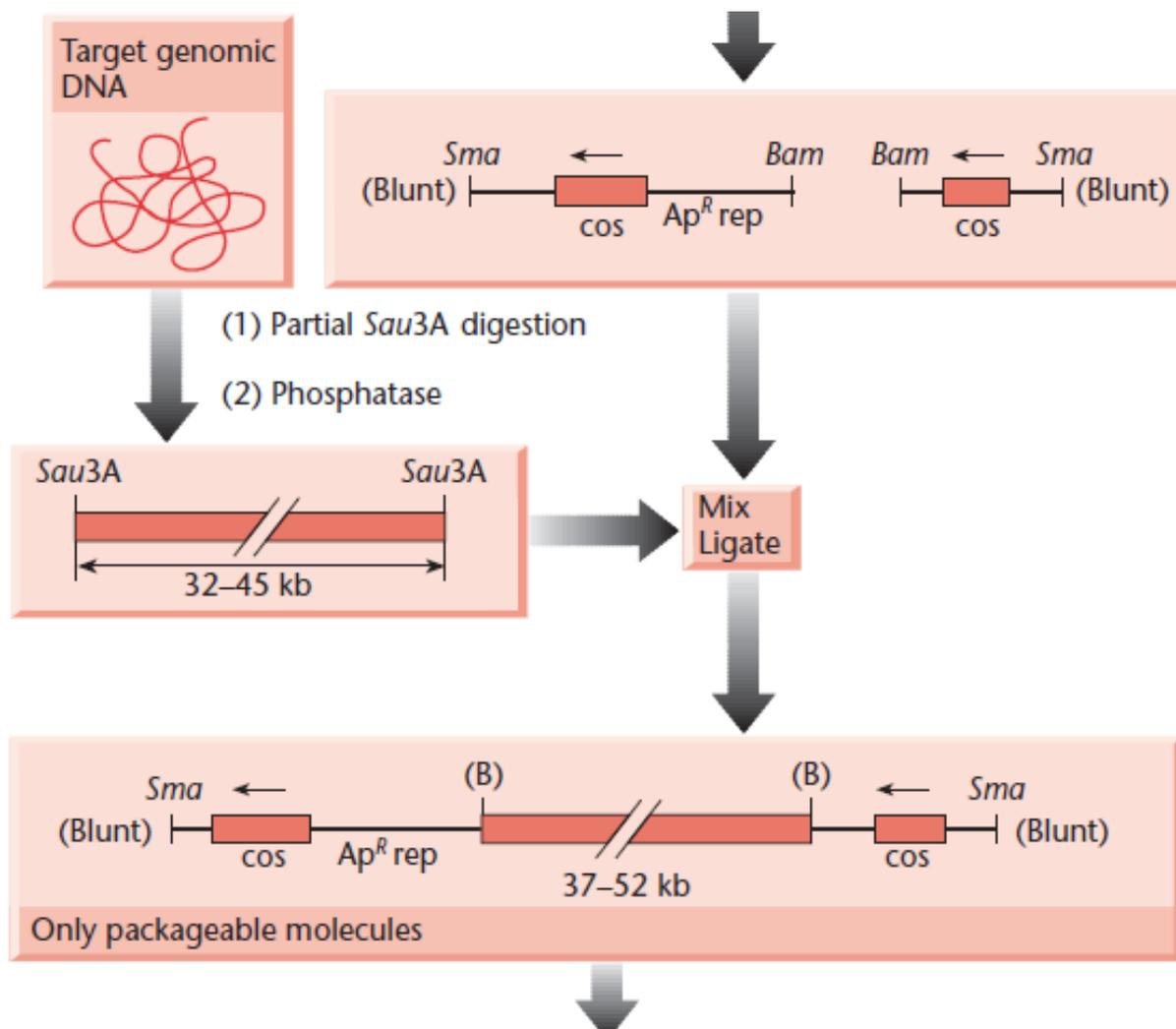
# Космида - плазмида, несущая cos участки ДНК фага лямбда

Эффективность ниже,  
размер вставки больше (40-50 kb)

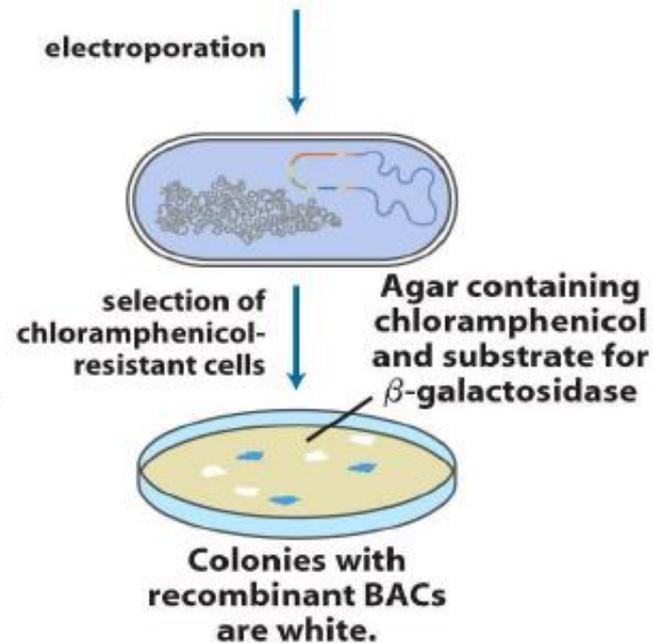
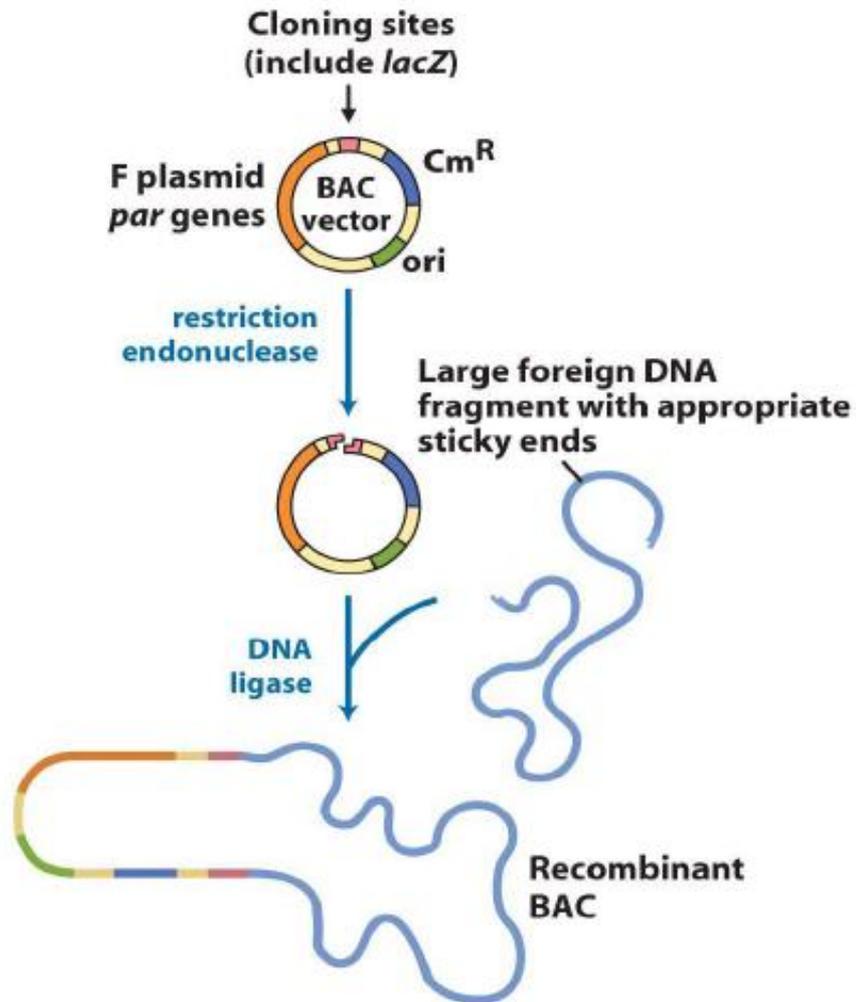


**Космида c2XB**

Наличие cos (cohesive ends) сайтов необходимое и достаточное условие для упаковка ДНК в фаговые частицы.



# Бактериальные искусственные хромосомы



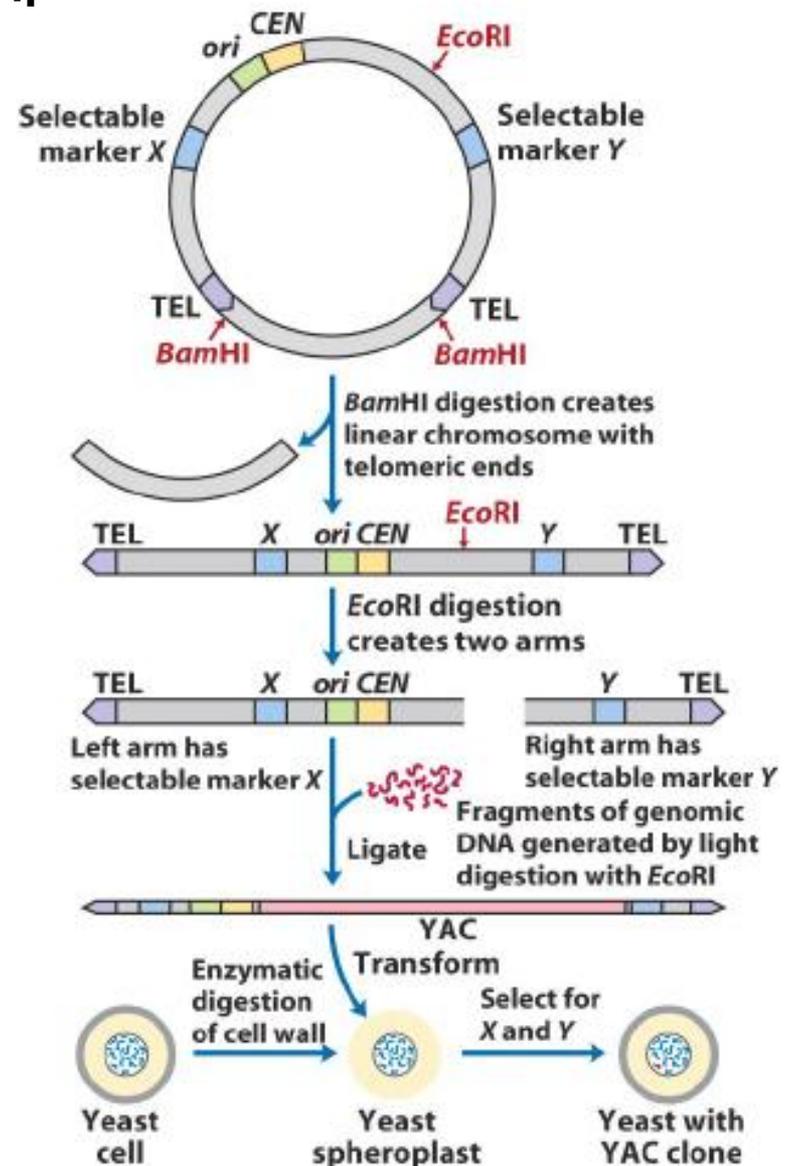
## Bacterial Artificial Chromosomes (BAC)

- Размер вектора 100 to 300 Kb
- Содержит селективные маркеры и ORI
- Средний размер вставки  $\sim$ 100 KB
- Внедряется в клетку электропорацией

# Искусственные хромосомы дрожжей

Yeast Artificial Chromosomes (YAC)

- Размер вставки 300 to 500 Kb
- Содержит селективные маркеры и ARS (autonomous replicating sequence)
- Содержит центромерную последовательность, обеспечивающую правильную сегрегацию хромосом в митозе (CEN)
- Содержит теломерные последовательности



For the human genome and a standard plasmid

P – 99% or 0.99 confidence

f – 500 kb/4,400,000 kb =  $1.14 \times 10^{-4}$

$$N = [\ln .01] / [\ln 0.999886]$$

$$= -4.6 / -1.14 \times 10^{-4}$$

**= 40,350 individual clones**

# Емкости векторов разных классов

<b>Вектор</b>	<b>Емкость (т.п.н.)</b>	<b>Применение</b>
<b>Плазмиды</b>	<b>15</b>	<b>Библиотеки кДНК</b>
<b>Бактериофаг лямбда</b>	<b>25</b>	<b>Геномные библиотеки Библиотеки кДНК</b>
<b>Космиды</b>	<b>30-45</b>	<b>Геномные библиотеки</b>
<b>РАС</b>	<b>70-90</b>	<b>Геномные библиотеки</b>
<b>ВАС</b>	<b>100-500</b>	<b>Геномные библиотеки</b>
<b>УАС</b>	<b>250-2000</b>	<b>Геномные библиотеки</b>

# Репрезентативность библиотеки

Вероятность, с которой в ней представлена любая последовательность генома или его исследуемой части

**Размер библиотеки, в которой любая часть генома представлена с вероятностью 99%**

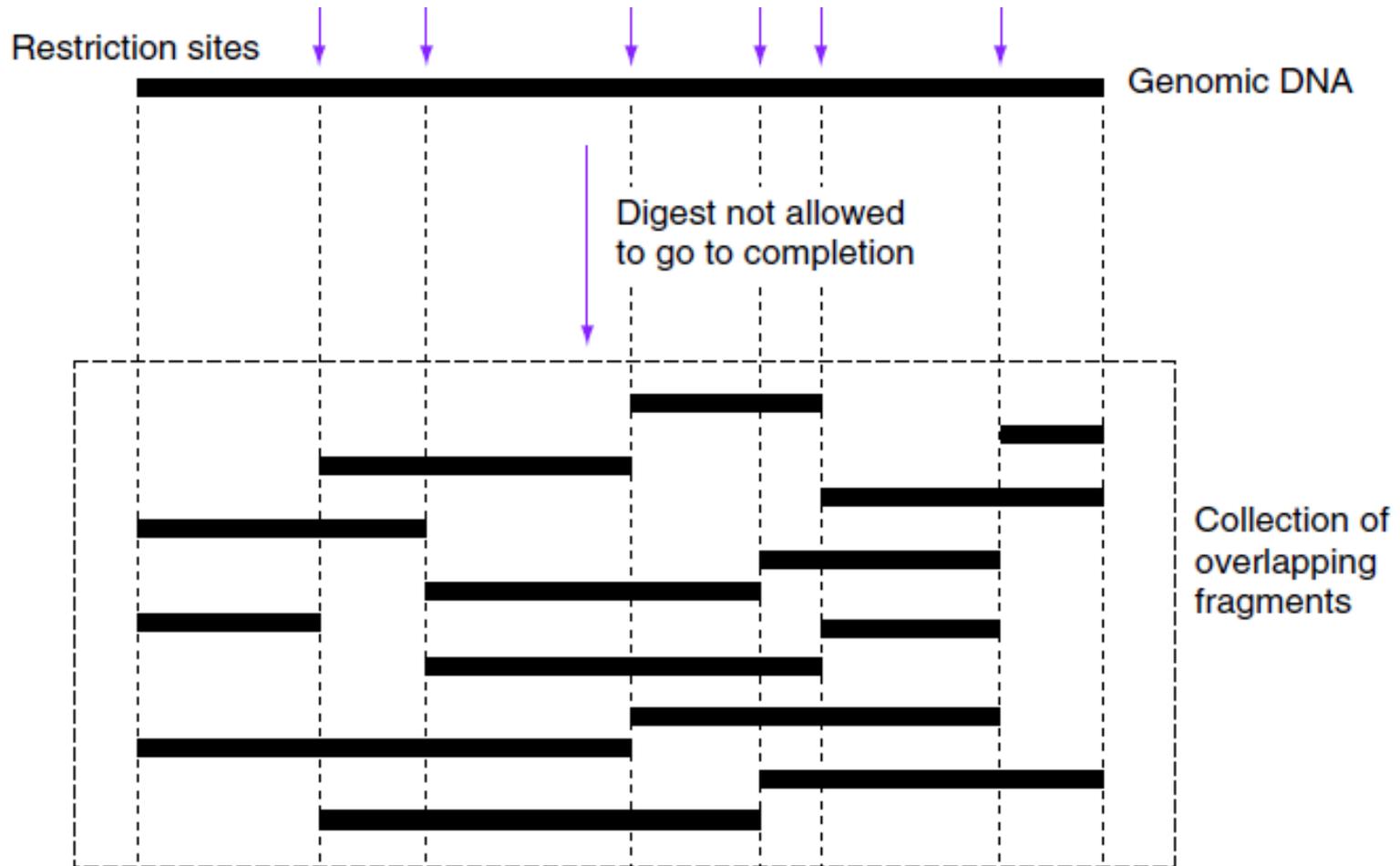
Вектор	Размер вставки (т.п.н.)	Размер библиотеки ( $\times 10^3$ клонов)	
		Бактерии	Животные
Плазмиды	4	4,6	3500
Фаг $\lambda$	18	1,0	770
Космиды	40	0,458	350
ВАС	300	0,059	46

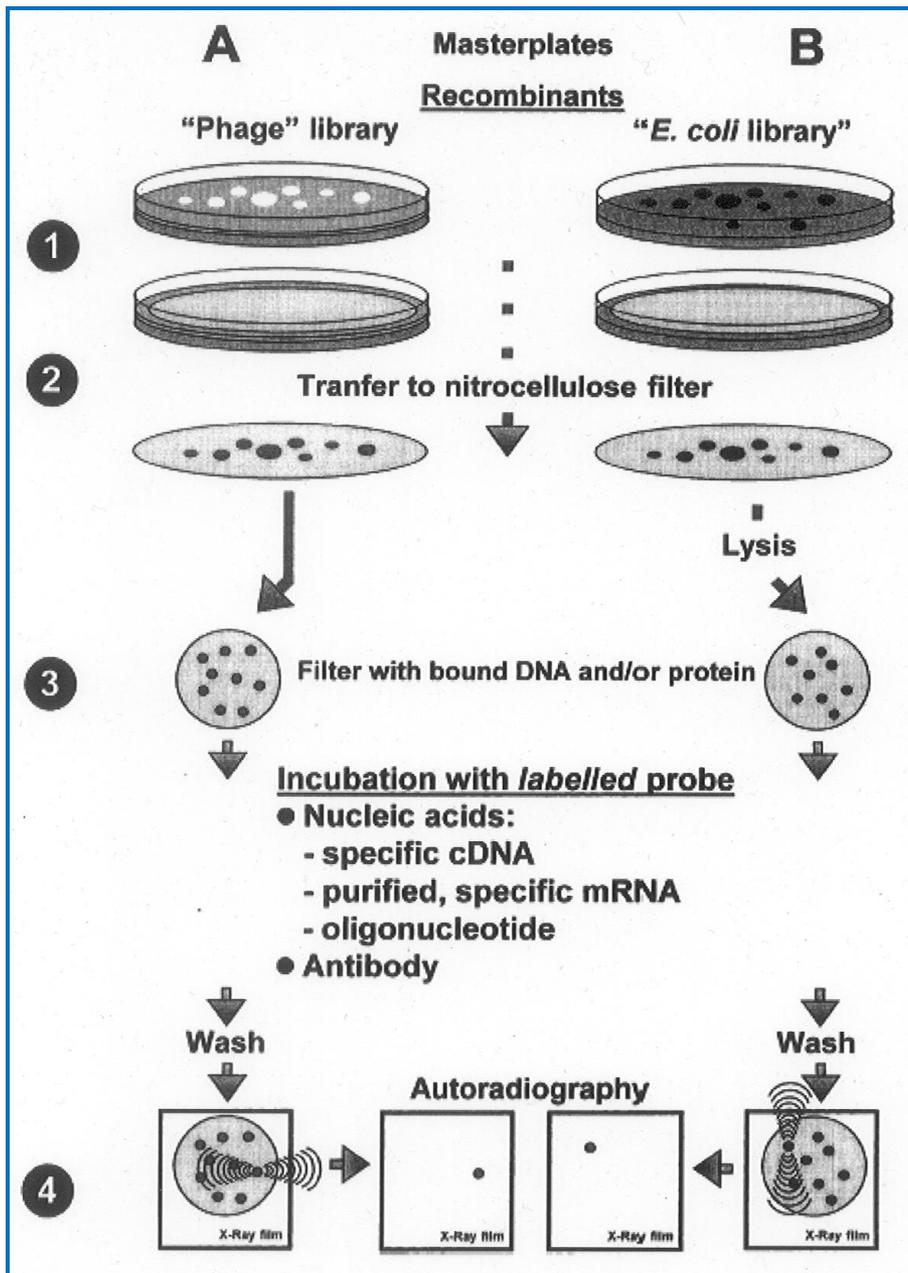
**Размеры генома:**

**Бактерии –  $\sim 4 \times 10^6$  п.н.**

**Животные –  $\sim 3 \times 10^9$  п.н.**

# Частичное (неполное) расщепление ДНК рестриктазами



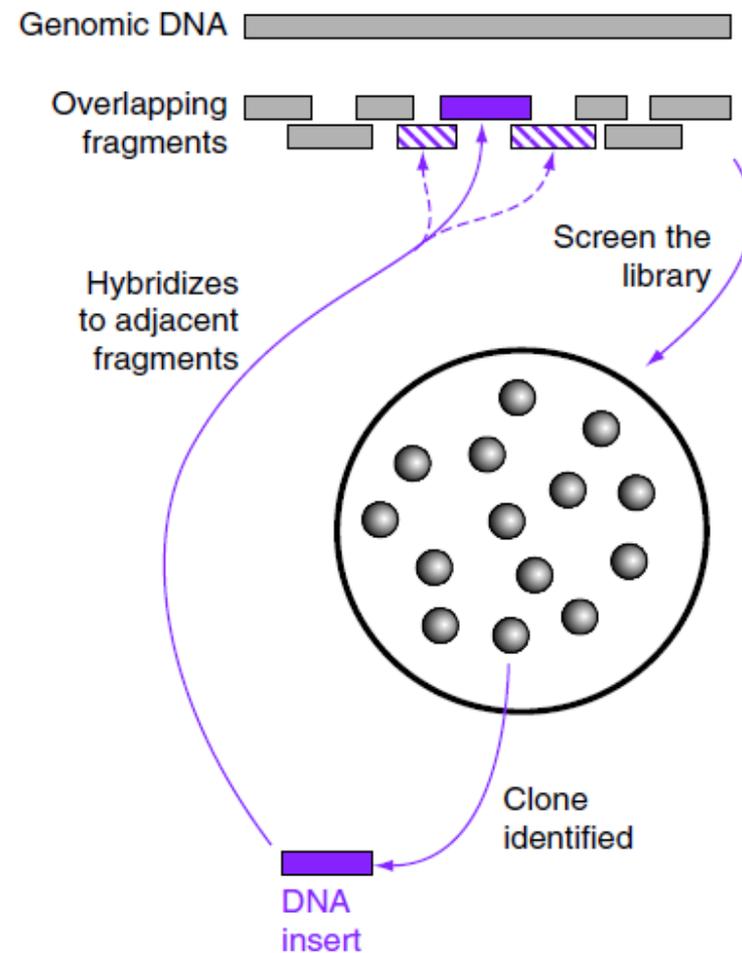
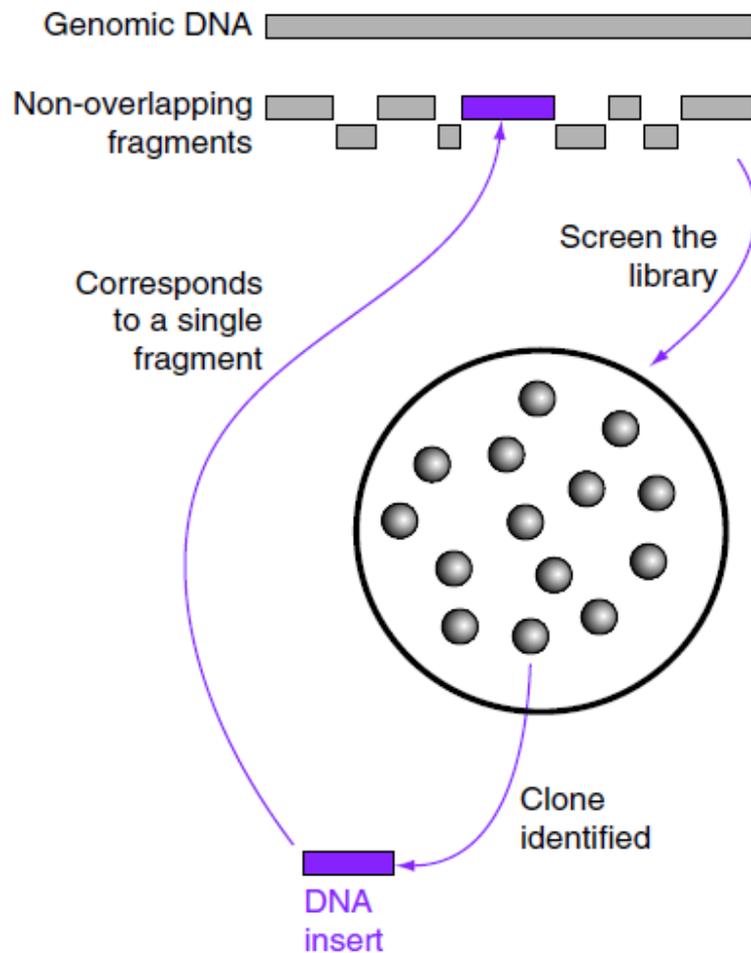


Отбор нужных клонов из фаговых и бактериальных библиотек

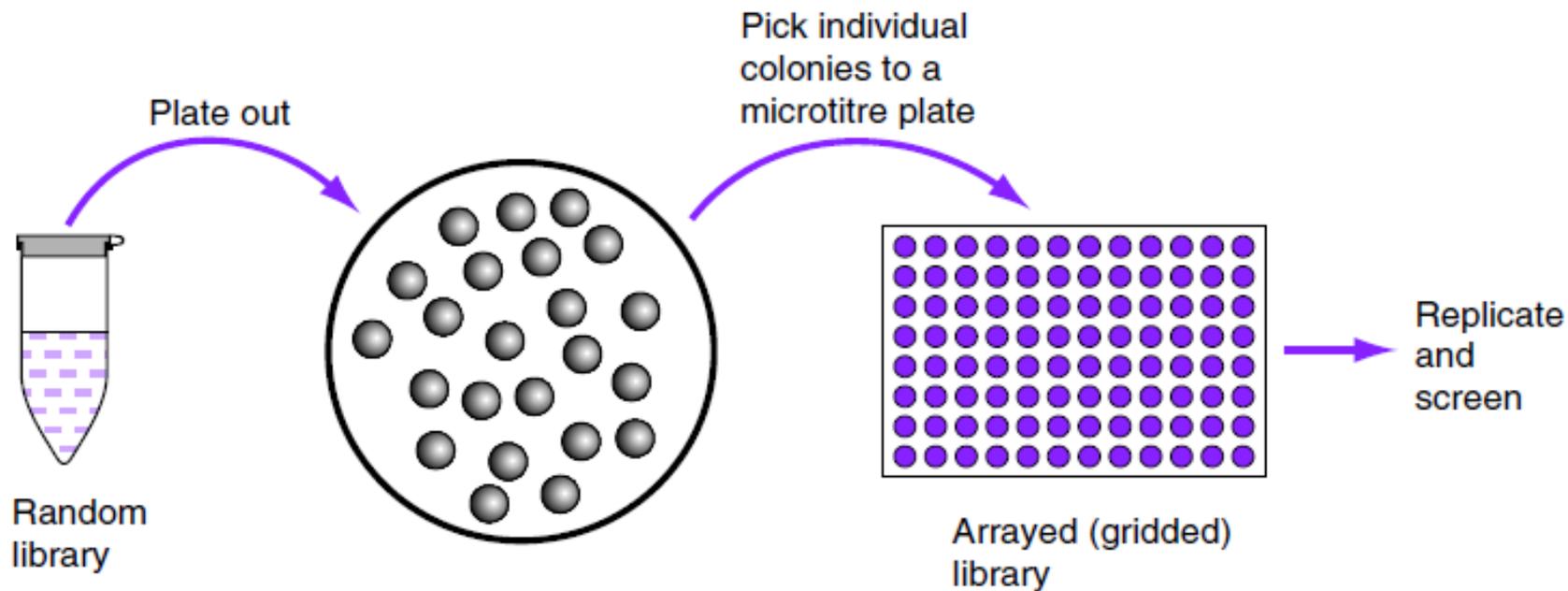
Часть каждой бактериальной колонии или фаговой бляшки переносят на мембрану, ДНК денатурируют и гибридизуют с меченым олигонуклеотидным зондом

Отбор с помощью ПЦР

# Геномные библиотеки, построенные из неперекрывающихся и перекрывающихся фрагментов ДНК

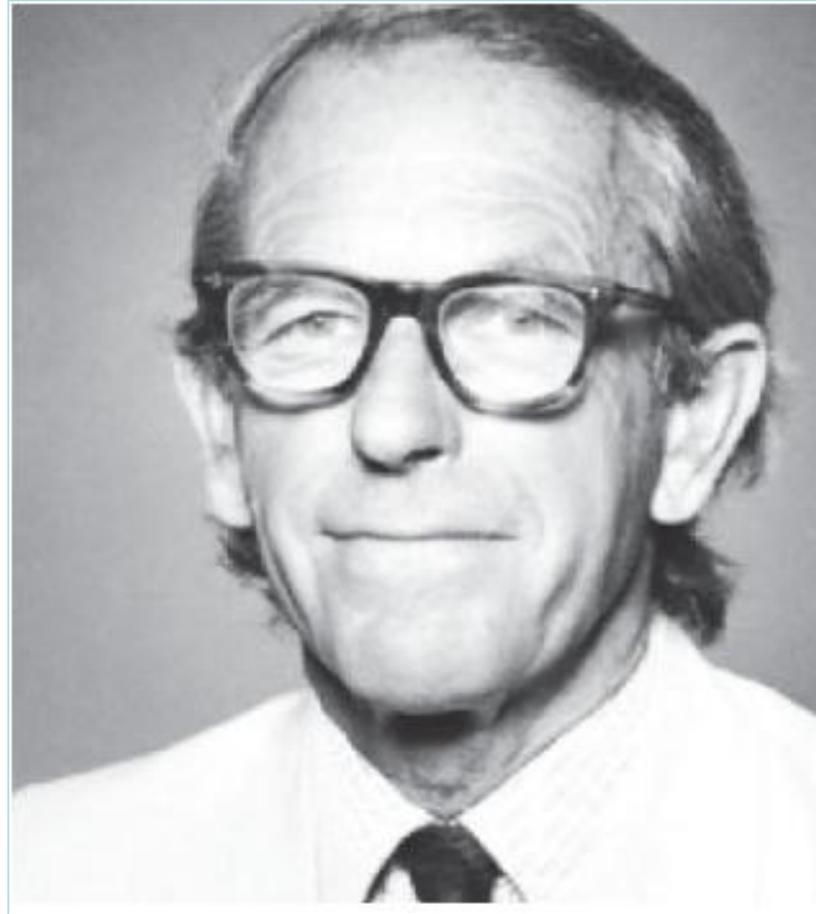


# Упорядоченные библиотеки: матрицы случайных клонов



**После посева на чашки Петри индивидуальные колонии бактерий выращивают в виде матрицы на твердой питательной среде или в 96-луночных планшетах**

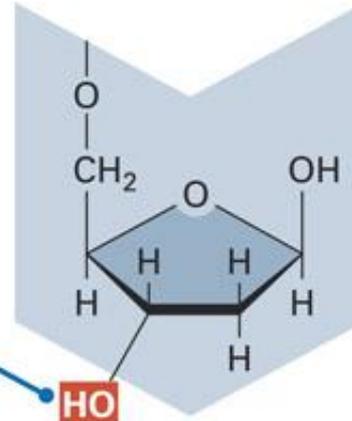
# Секвенирование ДНК по методу Сэнгера



**Frederick Sanger**

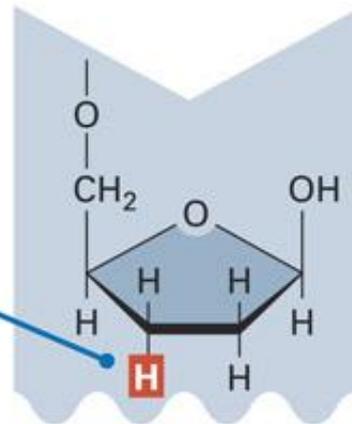
# Дидезоксинуклеотиды

3'-OH in normal DNA allows elongation.



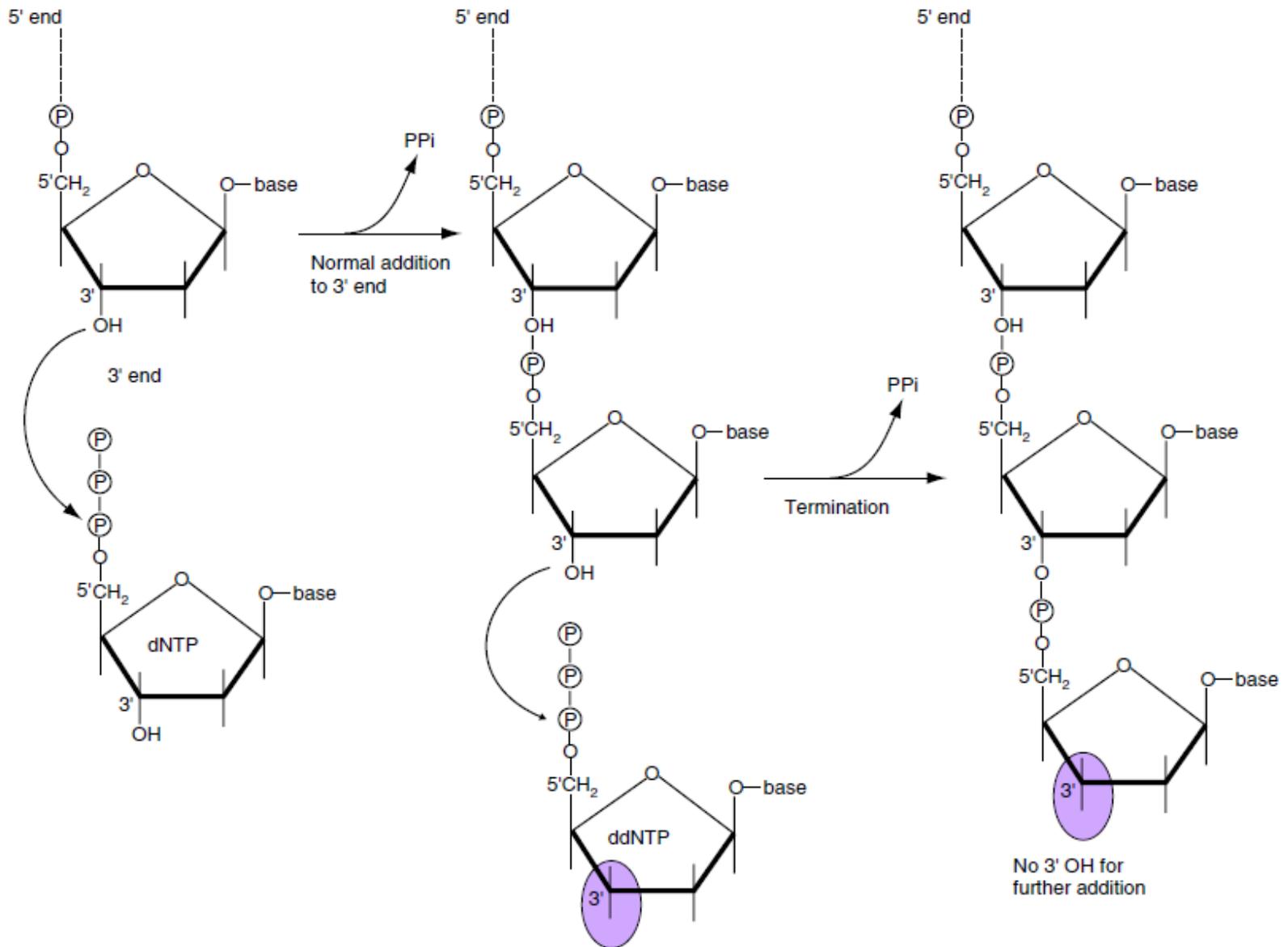
**Deoxyribose**

A DNA strand terminating in a dideoxynucleotide cannot be elongated because a 3'-OH is necessary for polymerization.

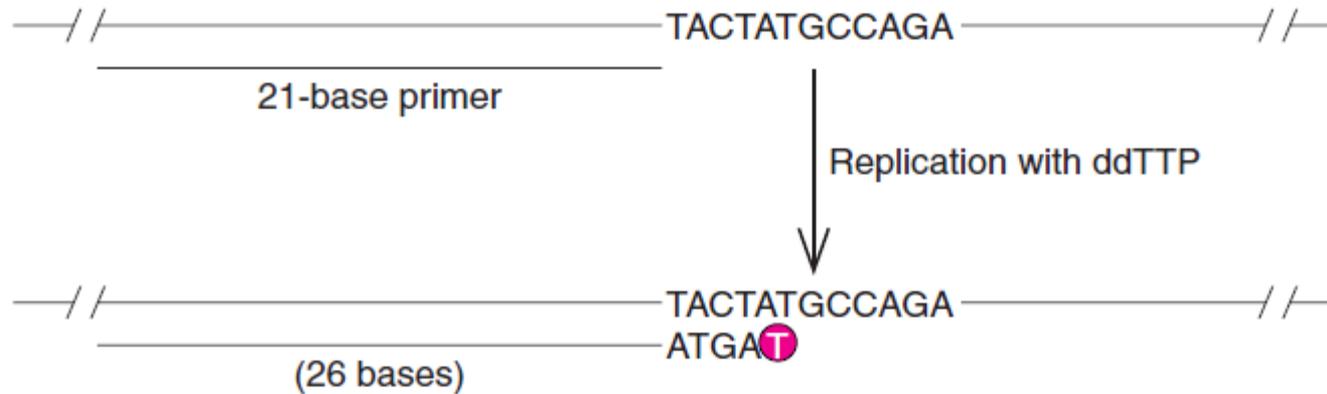


**Dideoxyribose**

# Терминация синтеза ДНК под действием ddNTP



(a) Primer extension reaction:

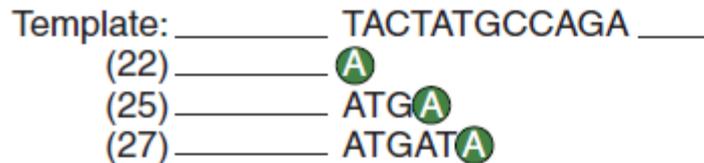


**Ферменты**

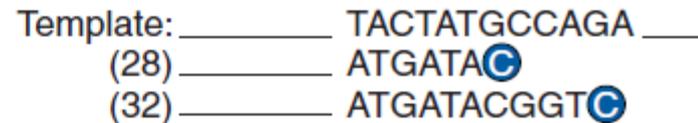
- ДНК полимеразы I
- Секвенза – ДНК полимеразы со сниженной 3'->5'-эндонуклеазной активностью и повышенной процессивностью

(b) Products of the four reactions:

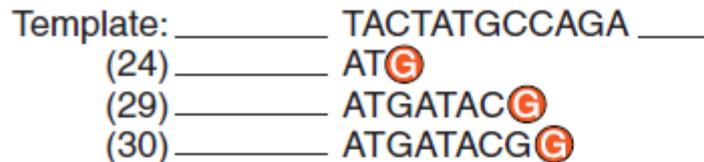
Products of ddA rxn



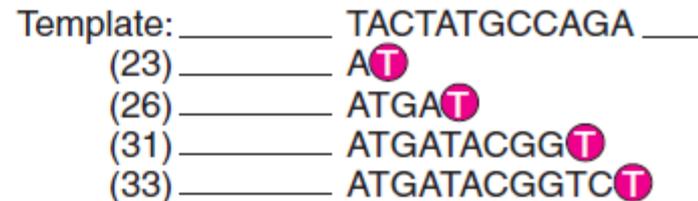
Products of ddC rxn



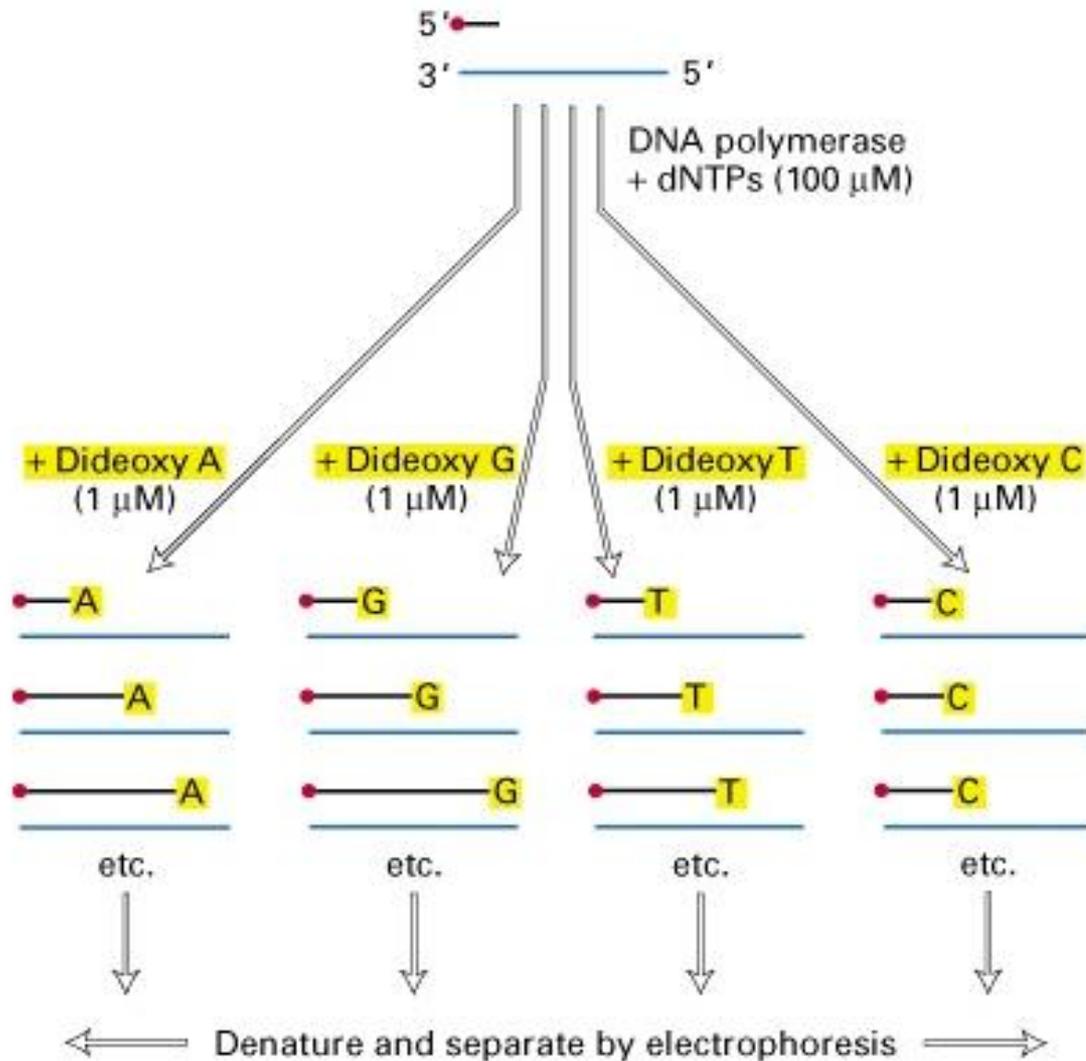
Products of ddG rxn



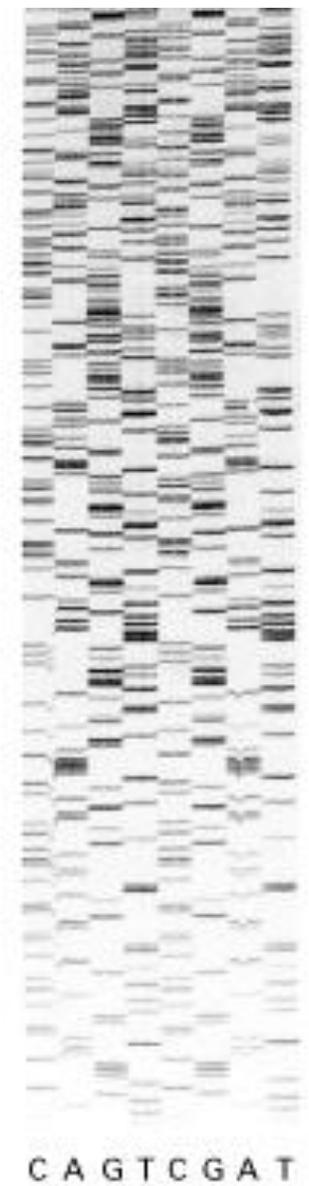
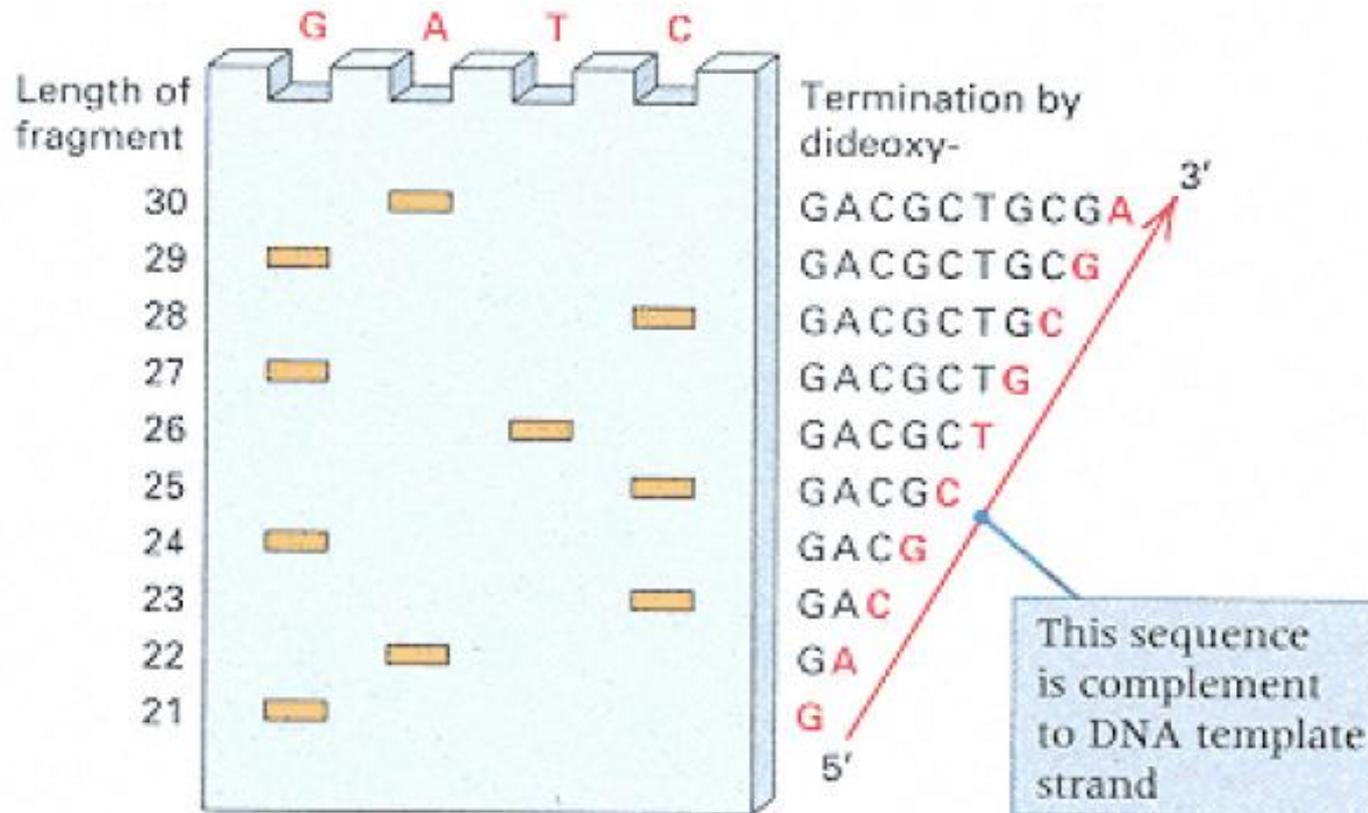
Products of ddT rxn



# Секвенирование ДНК по методу Сэнгера

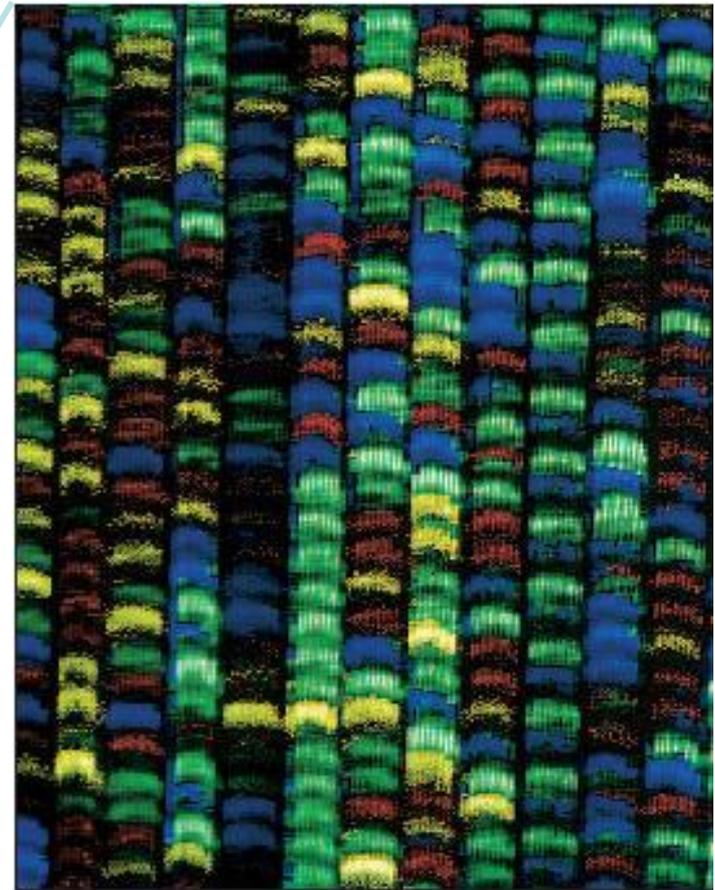
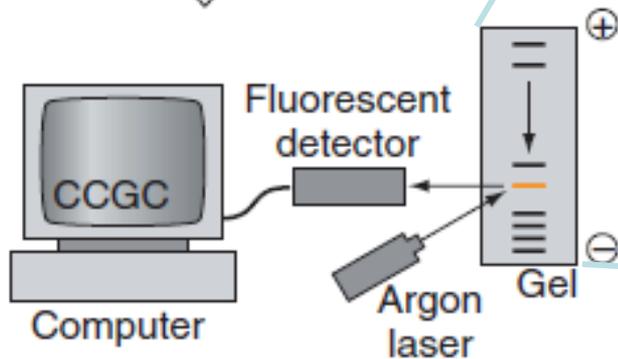
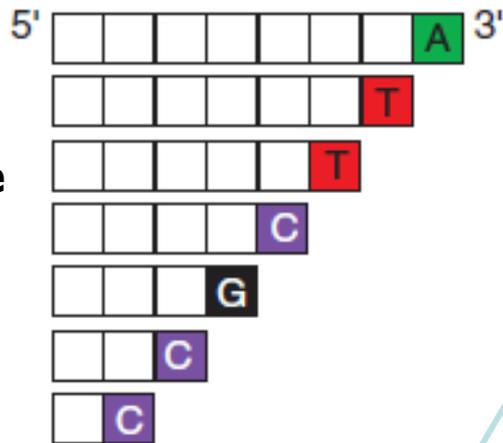


# Гель-электрофорез в ПААГ полученных фрагментов



# Секвенирование ДНК по методу Сэнгера на автоматическом секвенаторе

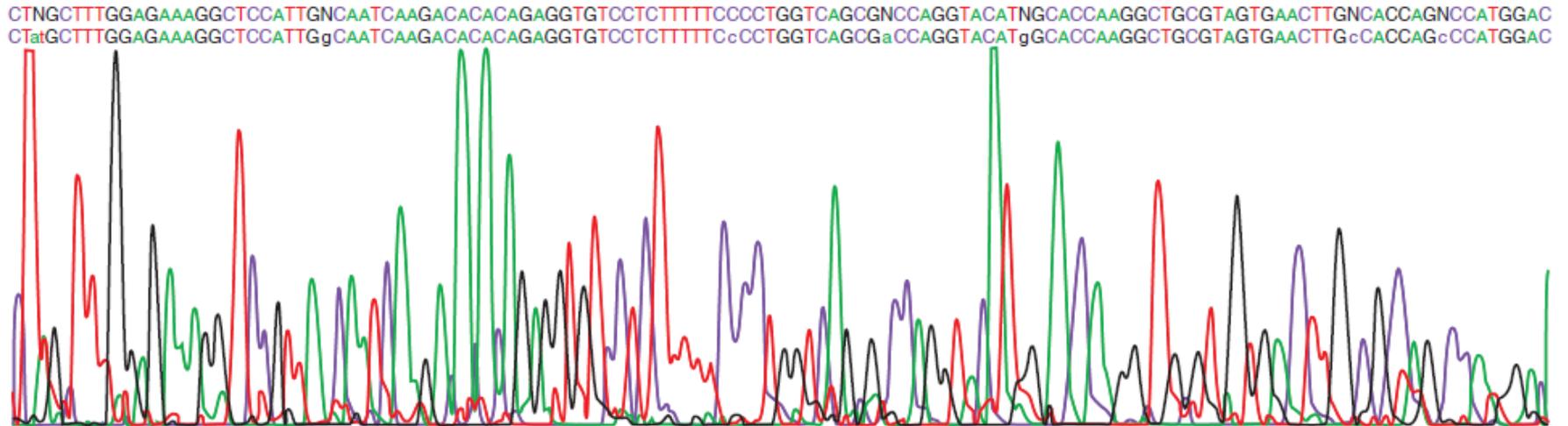
Фрагменты ДНК, меченые ddNTPs



Электрофорез в ПААГ

В одной пробирке присутствуют все 4 ddNTPs, меченые флуоресцентными красками

# Результат секвенирования ДНК по методу Сэнгера на автоматическом секвенаторе

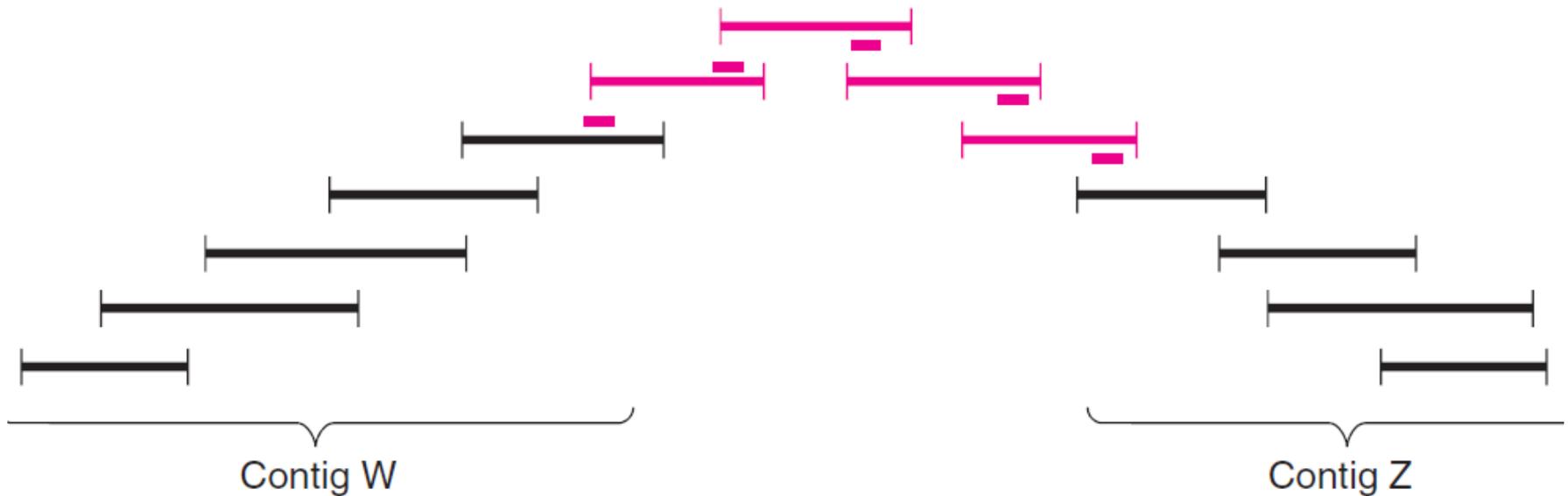


**Компьютерная запись флуорограммы одной из дорожек ПААГ геля или одного капилляра.**

Верхняя строчка - последовательность нуклеотидов, полученная автоматически

N – неуверенно распознанный нуклеотид (уточняется вручную – вторая строка сверху)

# Заполнение пробела между двумя контигами хромосомной ДНК

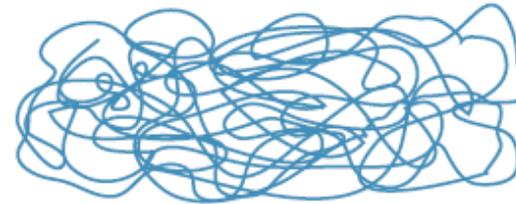


## Прогулка по хромосоме:

- Олигонуклеотидные зонды к известным концевым последовательностям индивидуальных клонов
- Переход к неизвестной соседней последовательности

# Стратегия секвенирования больших геномов методом shotgun

**Геномная ДНК**



**ВАС-библиотека**



**Упорядоченные клоны, объединенные в протяженные контиги: выбирается наиболее короткий путь секвенирования**



**ВАС-клон, выбранный для секвенирования**



**Клоны, фрагменты ВАС, секвенируемые методом shotgun**



**Объединение клонов по перекрытию**

CGTAAATGGGCTGATCATGCTTAAA  
TGATCATGCTTAAACCCTGTGCATCCTACTG...

**Собранная последовательность**

:CGTAAATGGGCTGATCATGCTTAAACCCTGTGCATCCTACTG...



## Центр по секвенированию геномов животных по методу Сэнгера

**Одна машина может  
анализировать 96 образцов  
одновременно (96 капилляров),  
750 п.н. за один прогон, 6  
прогонов в день.**

**Итого:**

**одна машина может определять  
~345 600 п.н. в один день**

# Секвенатор нового поколения, основанный на параллельном секвенировании ДНК



**По производительности и заменяет несколько сотен секвенаторов, основанных на методе Сэнгера**

**Applied Biosystem**