

Молекулярная генетика и геномика

Лекция 8

Плавление и гибридизация ДНК.

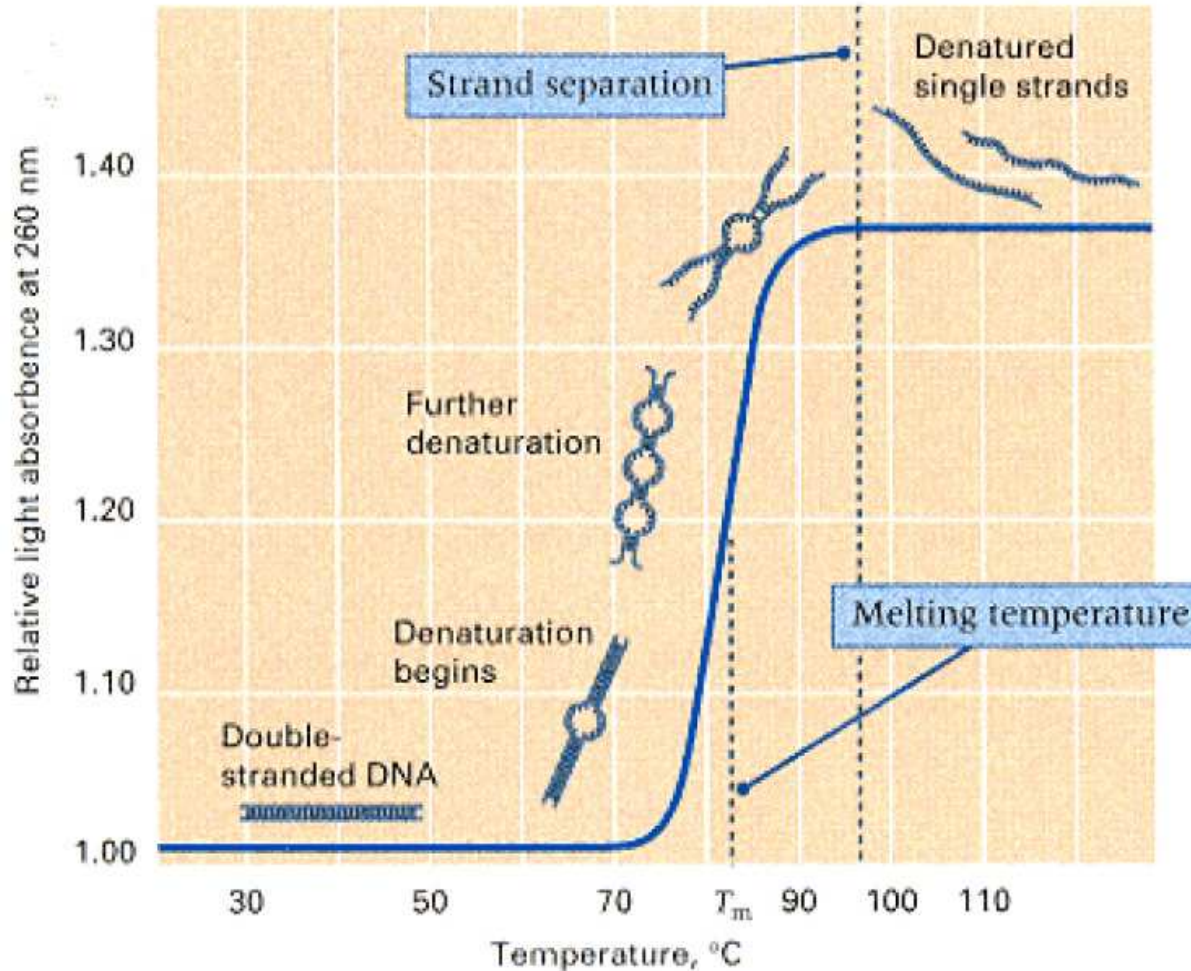
Сергей Лукьянов

Институт биоорганической химии имени академиков

М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

НОРМАЛИЗАЦИЯ образцов ДНК

Плавление (денатурация) ДНК



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

Факторы, влияющие на T_m :

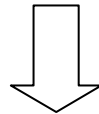
- pH
- Ионная сила
- Органические растворители
- Наличие неспаренных оснований: 1% неспаренных оснований снижает T_m на 1°C

Реассоциации нуклеиновых кислот – реакция второго порядка

C = концентрация одноцепочечной (ss) ДНК во время t (моль нуклеотидов/литр).

Скорость уменьшения C в ходе гибридизации описывается формулой для реакций второго порядка:

$$\frac{-dC}{dt} = kC^2 \quad \text{or} \quad \frac{dC}{C^2} = -kdt$$



$$\boxed{\frac{C}{C_0} = \frac{1}{1 + kC_0 t}}$$

Время полуреассоциации обратно пропорционально константе скорости

$$\frac{C}{C_0} = \frac{1}{1 + kC_0t}$$

C = концентрация одноцепочечной (ss) ДНК во время t (моль нуклеотидов/литр).

Время полуренатурации

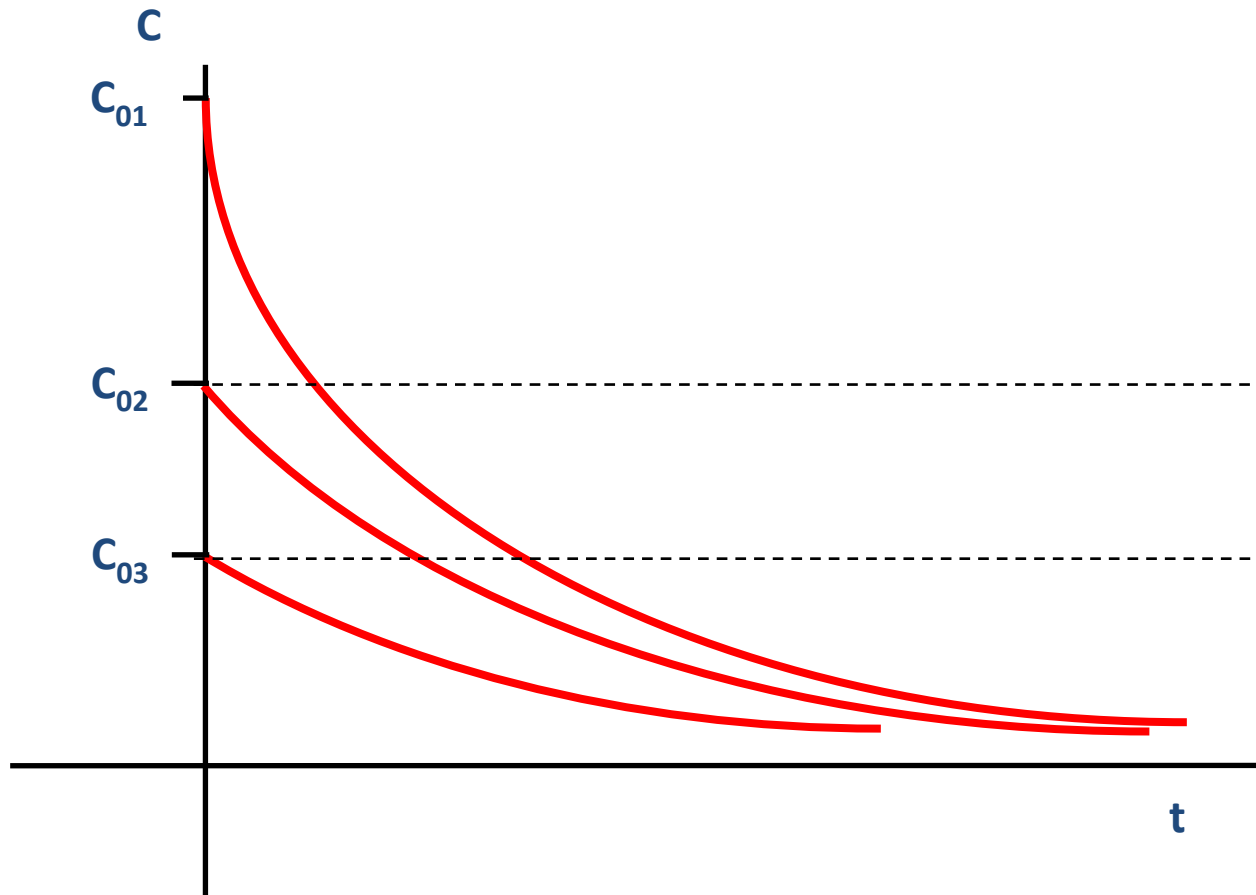
$$\frac{C}{C_0} = 0.5, \text{ and } t = t_{1/2}$$

$$C_0 t_{1/2} = \frac{1}{k}$$

k литры*(моль нт)⁻¹ сек⁻¹

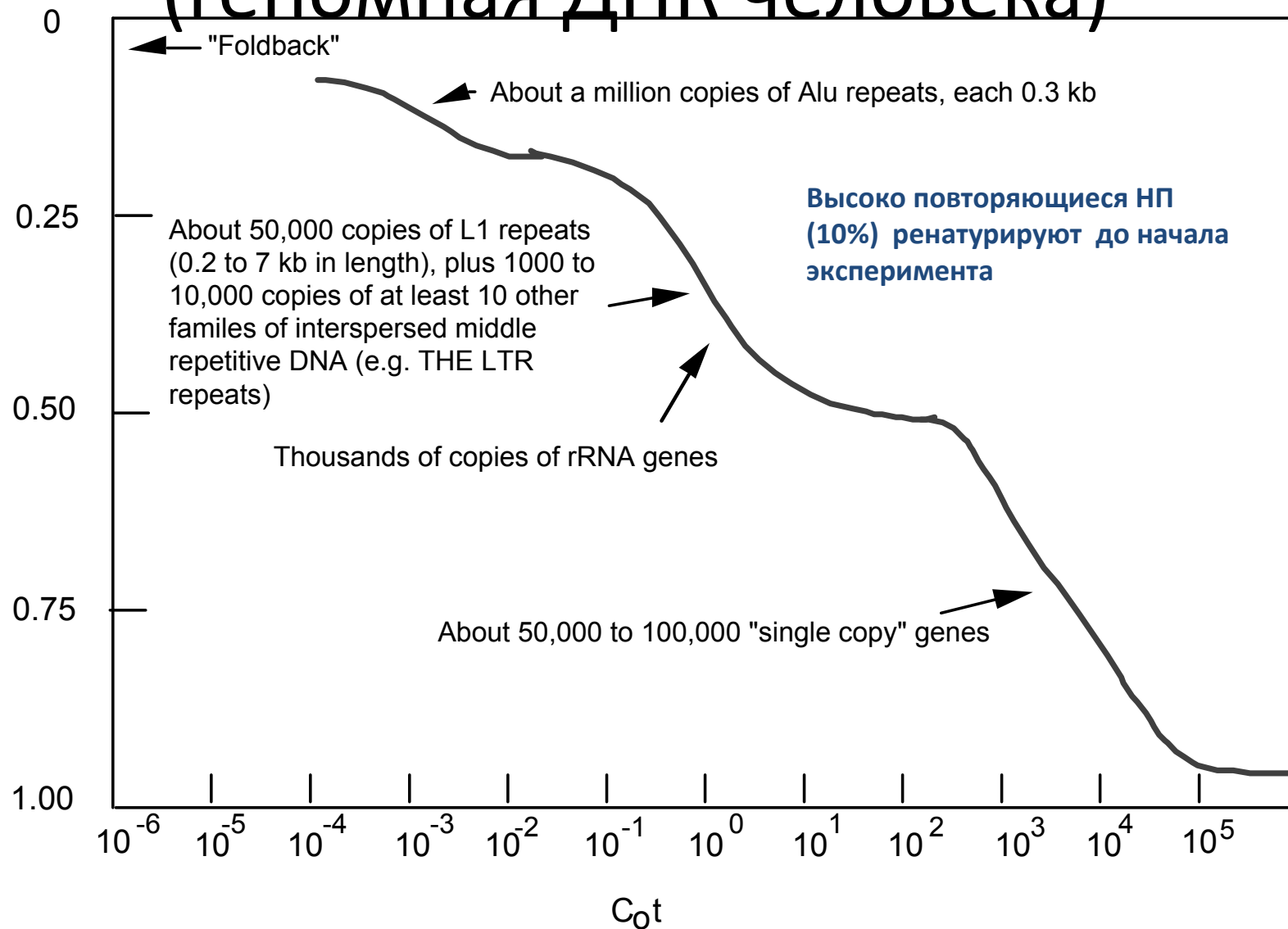
$$t_{1/2} = \frac{1}{kC_0}$$

Реассоциация индивидуальной последовательности ДНК

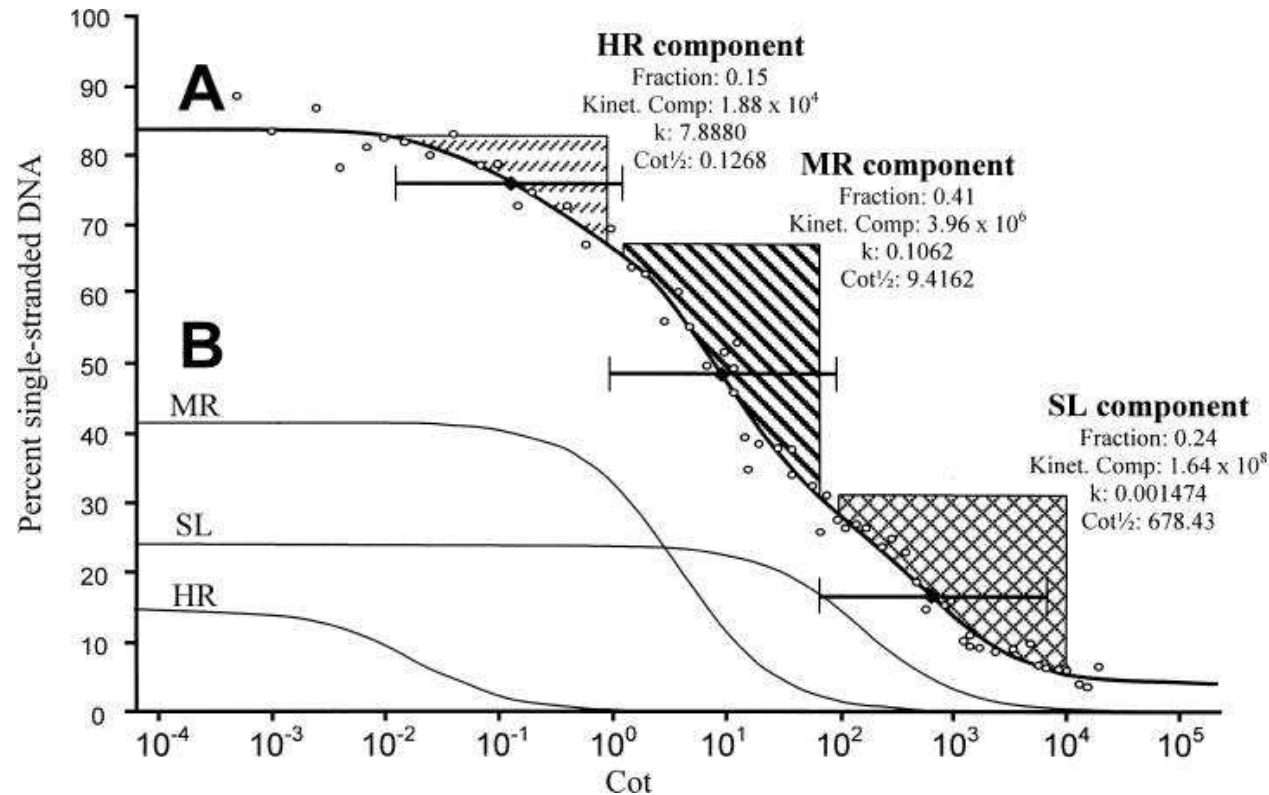


C_0 - концентрация ДНК (нуклеотиды моль/л), t - время (сек)

Типы ДНК в каждом кинетическом компоненте кривой реассоциации (геномная ДНК человека)



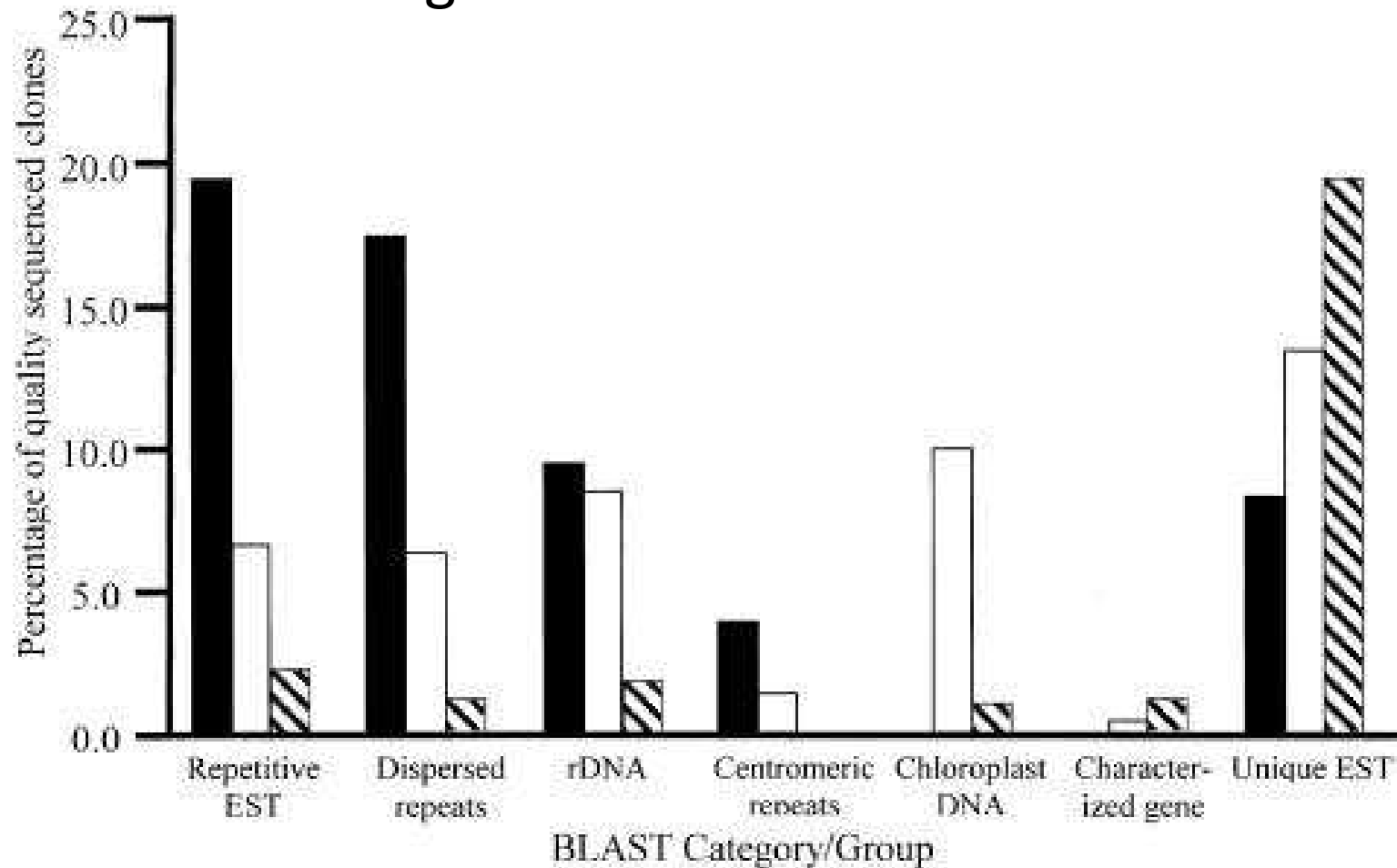
High Cot selected libraries



The curve consists of highly repetitive (HR), moderately repetitive (MR), and single/low-copy (SL) components characterized by fast, intermediate, and slow reassociation, respectively. For each component, the following values have been placed to the right of the component's general location: Fraction=the proportion of the genome found in that component, Kinet. Comp. (kinetic complexity)=the length in nucleotide pairs of the longest nonrepeating sequence calculated from the Cot data, k=the observed reassociation rate in $M^{-1} \cdot s^{-1}$, and Cot $\frac{1}{2}$ = the value on the abscissa of the complete Cot curve at which half the DNA in the component has reassociated. Black diamonds mark the positions on the complete Cot curve of the Cot $\frac{1}{2}$ values for HR, MR, and SL components.

- DNA ears sheared to an average size of 1.0 to 2.0 kb
- Sheared DNA is denatured and then renatured to a Cot value of 800
- Unrenatured DNA is purified over a HAP column
- ssDNA converted to dsDNA
- dsDNA size selected to 1.2 to 2.0 kb

High Cot selected libraries

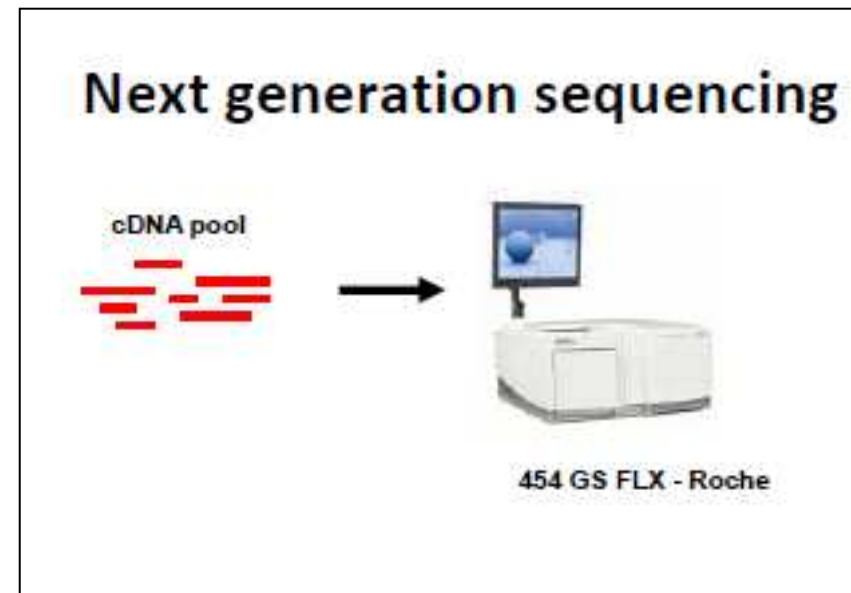
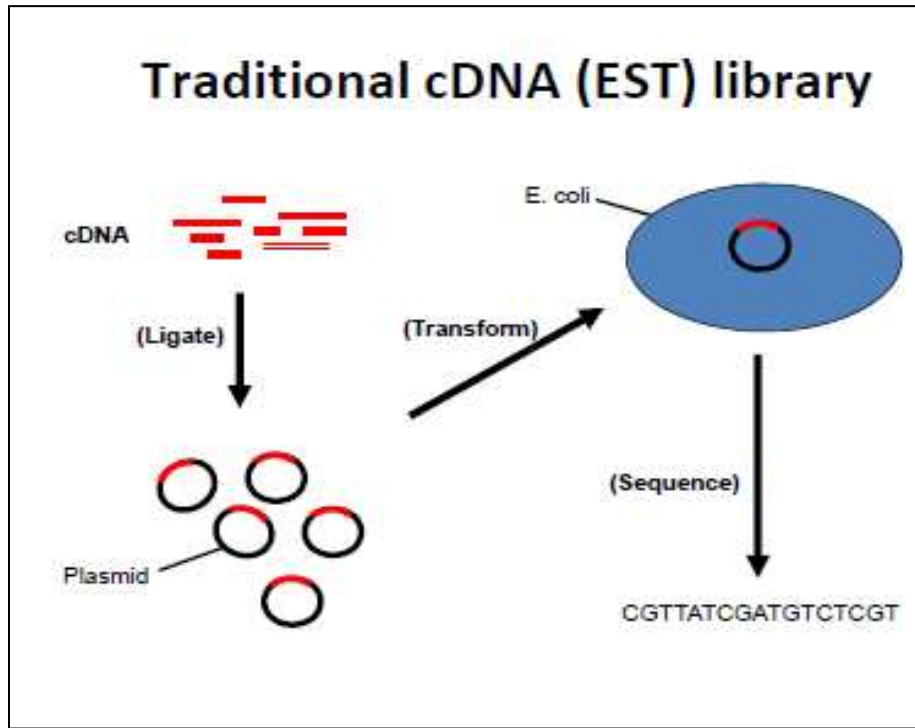


Sequence composition of different Cot libraries. Black bars represent HRCot clones, white bars represent MRCot clones, and diagonally striped bars represent SLCot clones. The BLAST group “Dispersed repeat sequences” is composed of the Retroelement, MITE, and Other dispersed repeat BLAST categories

Секвенирование транскриптомов

- Относительная простота осложняется
 1. Огромной разницей в уровне экспрессии
 2. Трудности с выявлением полноразмерных генов
 3. Альтернативный сплайсинг – множественность форм мРНК одного гена
 4. Наличием множества высоко-гомологичных генных семейств – невозможность строить элаймент на Solexa and Solid слишком короткий прогон

Анализ транскриптома

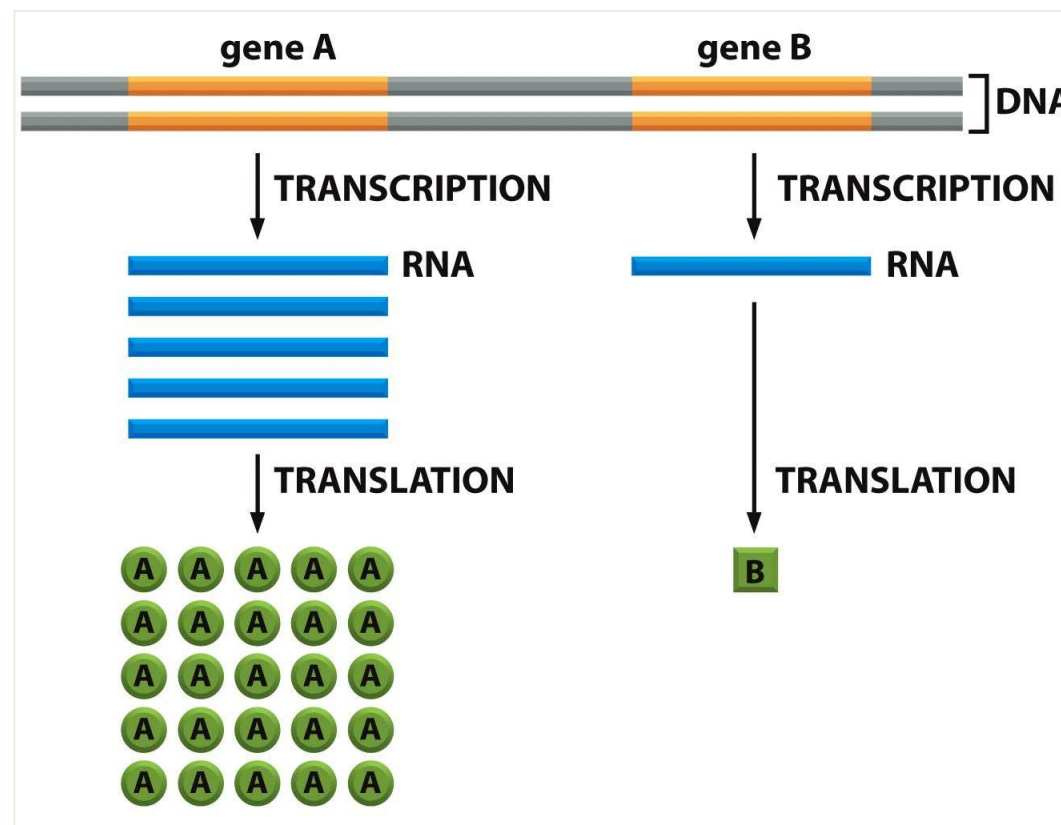


Сиквенируется образец кДНК минуя стадию клонирования

Уровень экспрессии генов в клетке варьирует в широких пределах

20 000 – 50 000 мРНК на клетку:

- 20% - 10-20 высокопредставленных генов (тысячи копий на клетку)
- 40-60% - сотни среднепредставленных генов (100-500 копий)
- 20-40% - тысячи редких генов (<10 копий на клетку).



Нормализация кДНК - выравнивание концентраций всех представленных в образце последовательностей) приводит к существенному повышению эффективности секвенирования транскриптома

Стратегия нормализации кДНК



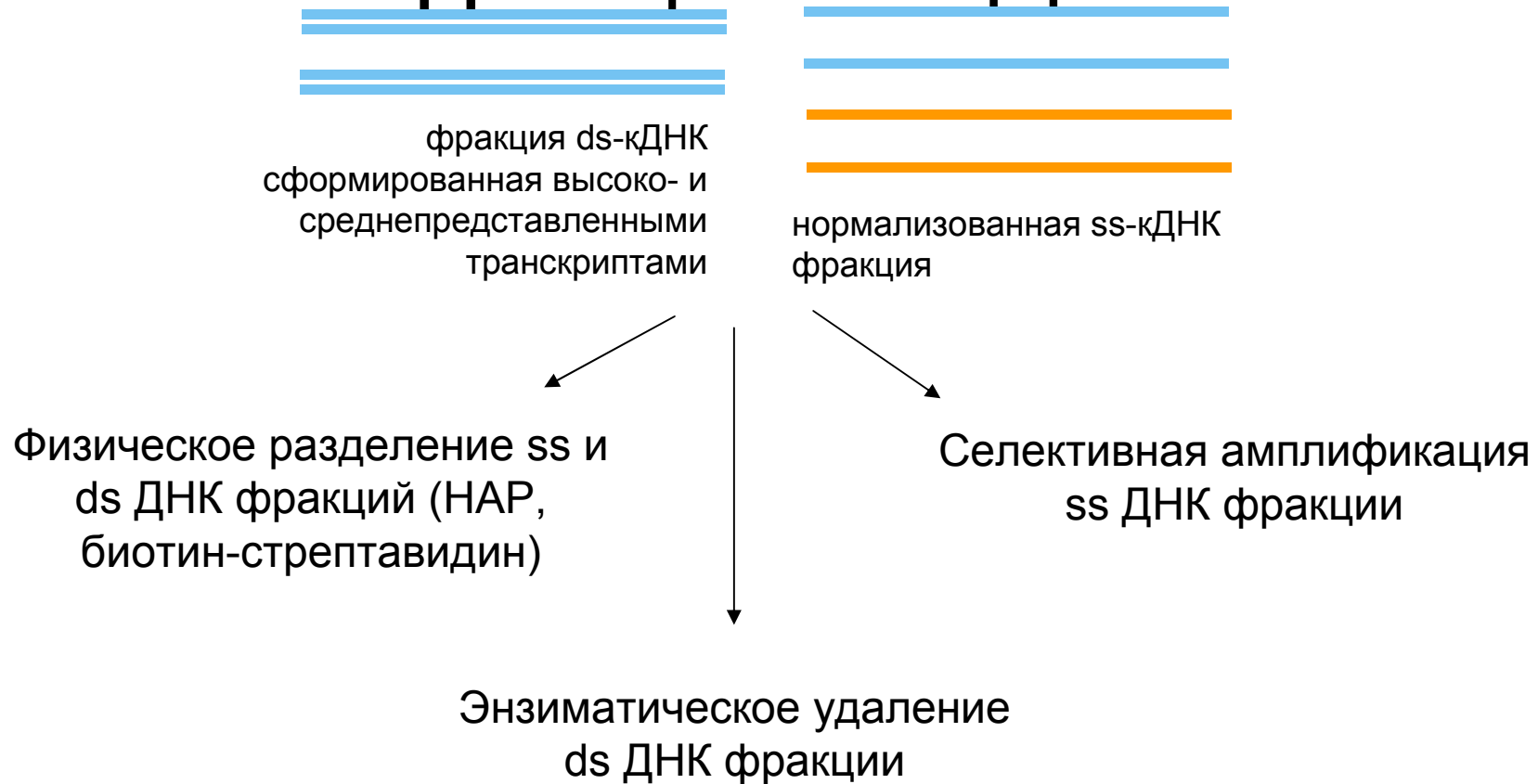
Реассоциации нуклеиновых кислот – реакция второго порядка

Скорость уменьшения концентрации одноцепочечной ДНК (С) в ходе гибридизации за время t описывается формулой :

$$-\frac{dC}{dt} = kC^2$$

(моль нуклеотидов/литр)

Выделение нормализованной фракции ss-кДНК

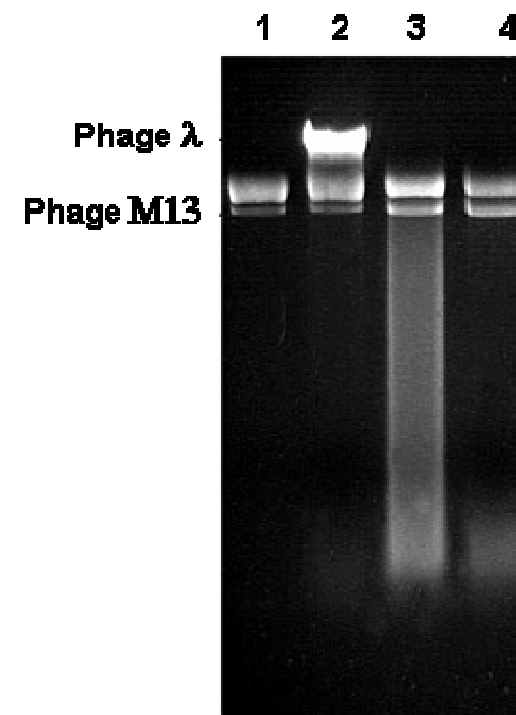


Дуплекс-специфическая нуклеаза (ДСН) краба – новый инструмент для выделения ss-ДНК из сложной смеси нуклеиновых кислот



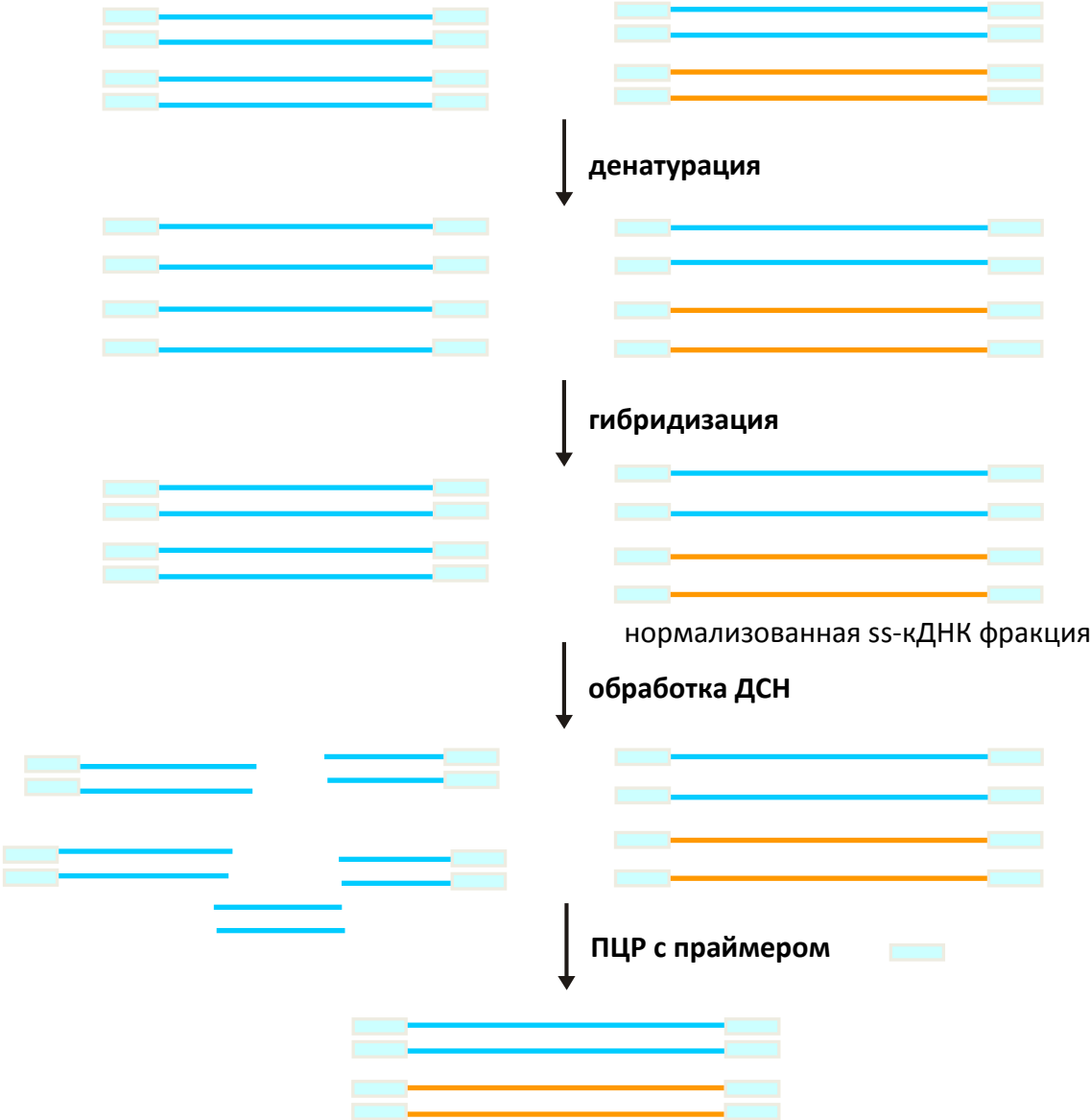
Свойства нуклеазы краба

- Mg^{2+} -зависимая
- Термостабильная
- Специфична к двухцепочечной ДНК

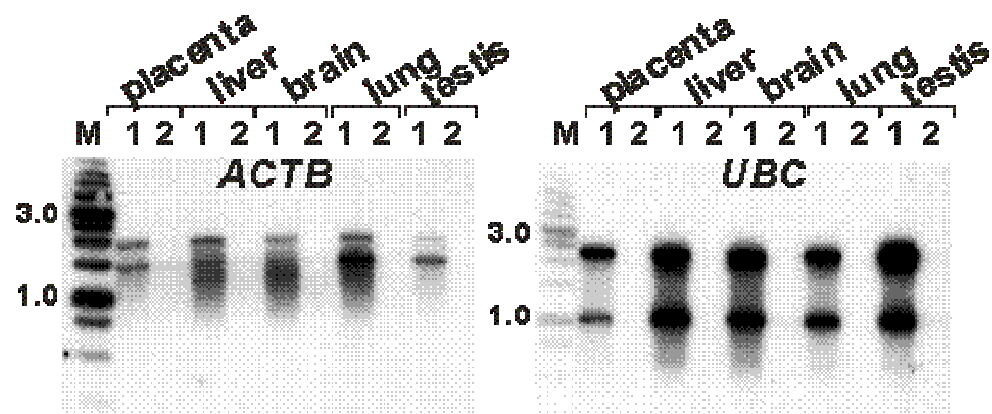
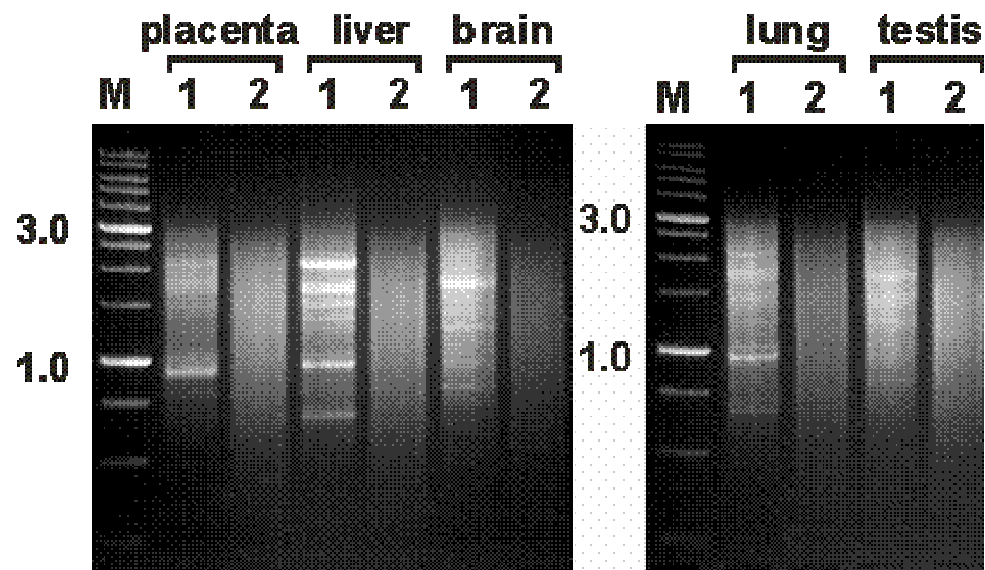


ДСН - гидролиз ss-ДНК фага М13 и ds-ДНК фага лямбда. 1, 2 – отрицательные контроли, инкубация без нуклеазы: 1 – ДНК фага М13, 2 – смесь ДНК фагов М13 и лямбда. 3; 4 – инкубация смеси ДНК фагов в присутствии ДСН при 70°C в течение 1.5 мин (дорожка 3) и 5 мин (4).

Нормализации SMART кДНК с использованием ДСН



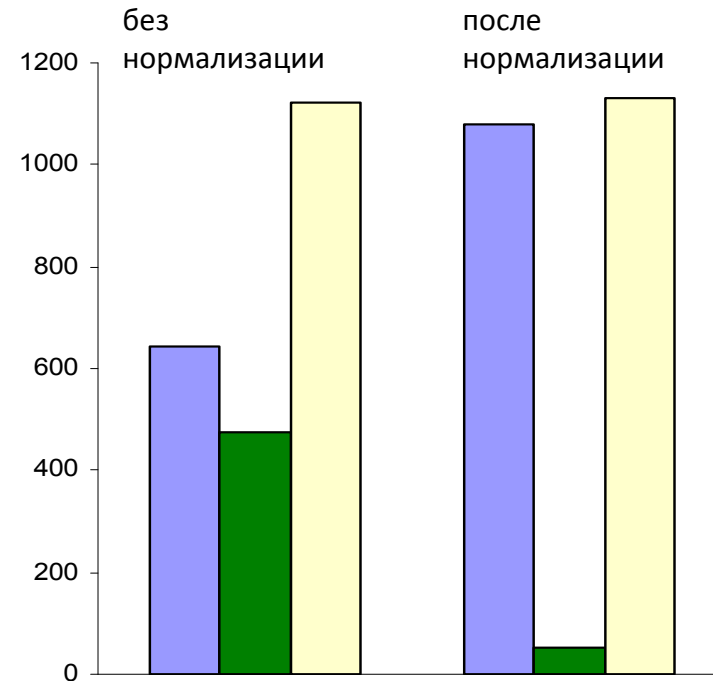
Результат ДСН-нормализации кДНК



Анализ изменения концентрации мажорных транскриптов после нормализации кДНК тканей человека. А. Результат гель-электрофореза ненормализованных (1) и нормализованных (2) образцов кДНК. Б. – Псевдо-НОзерн блот этих образцов с фрагментами генов бета-актина (ACTB) и убикутина (UBC).

Нормализация кДНК – эффективный путь повысить эффективность секвенирования транскриптома

- Выравнивание концентрации транскриптов в популяции кДНК
- Уменьшение концентрации высокопредставленных транскриптов
- Увеличение вероятности найти редкий ген



Эффективность секвенирования стандартных и нормализованных библиотек из нейронов *Aplysia*: голубые столбцы – уникальные последовательности; зеленые – повторяющиеся, желтые – все последовательности.