



Молекулярная генетика и геномика

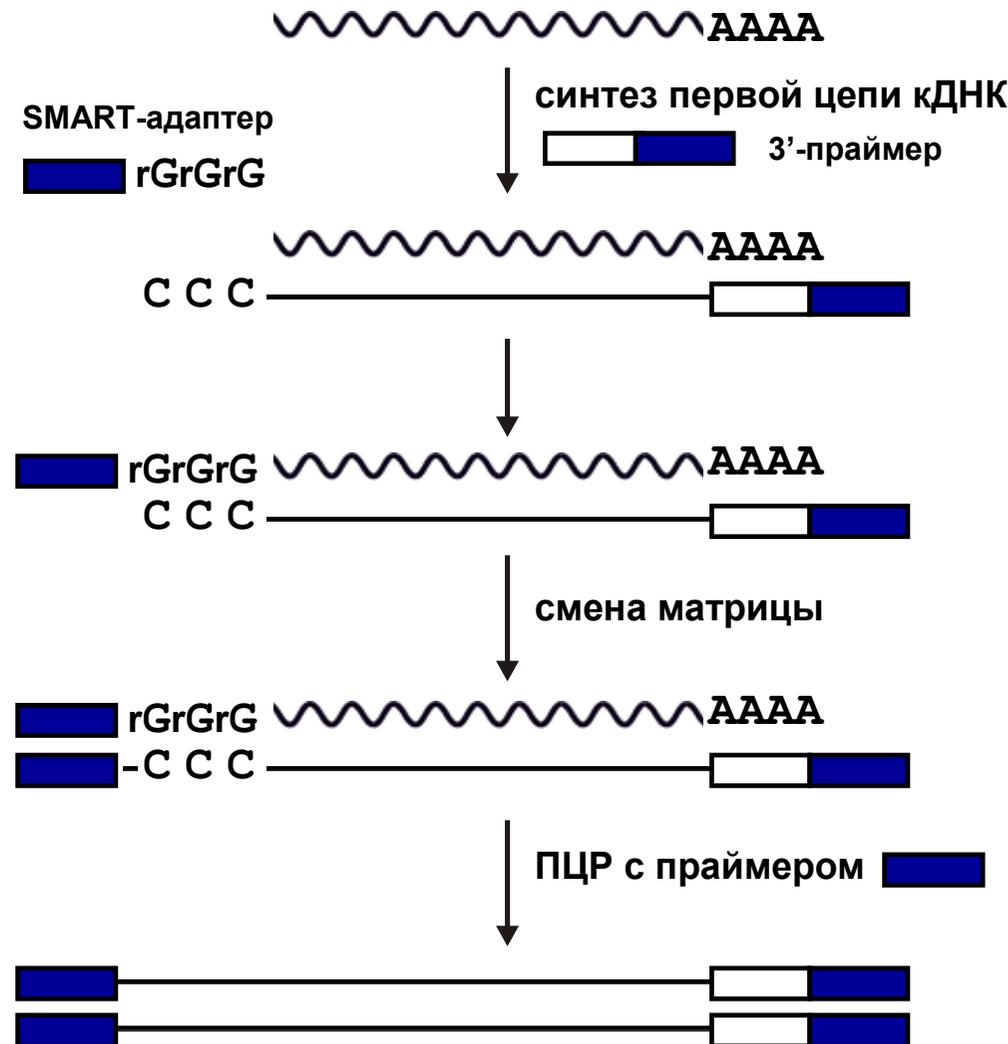
Лекция 5

RACE, Дифференциальная экспрессия генов 1 - Чипы

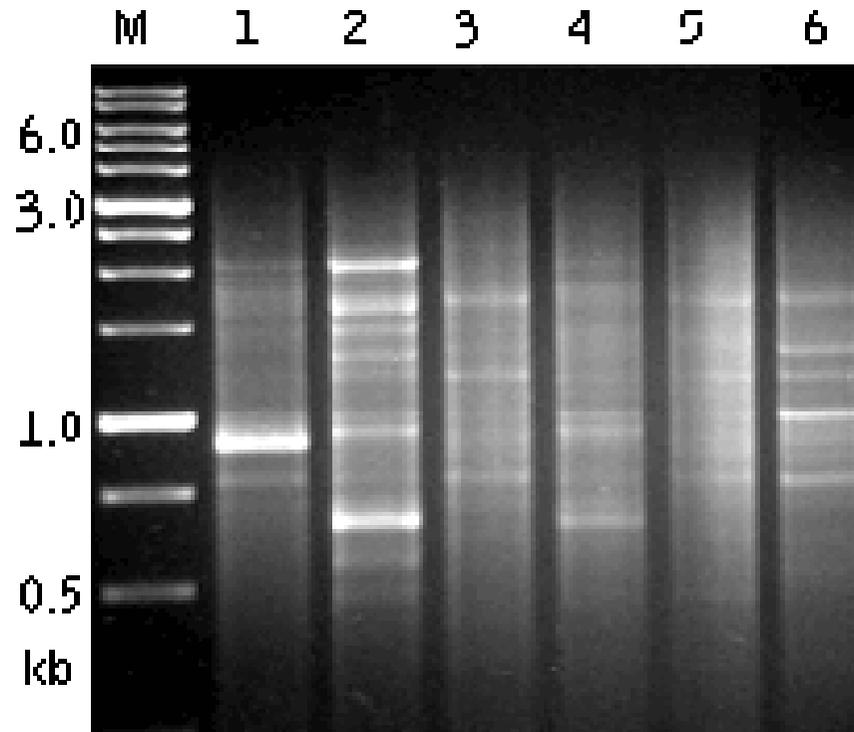
Сергей Лукьянов

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

Схема приготовления кДНК по технологии SMART- наиболее простой и эффективной технологии амплификации кДНК



Образцы кДНК, приготовленные методом SMART



ds cDNA synthesized on the basis of total RNA from different human tissues

: M, 1-kb DNA size markers (SibEnzyme); lane 1 - placenta; lane 2 - fetal liver; lane 3 - brain; lane 4 - fetal lung; lane 5 - testis; lane 6 - small intestine.

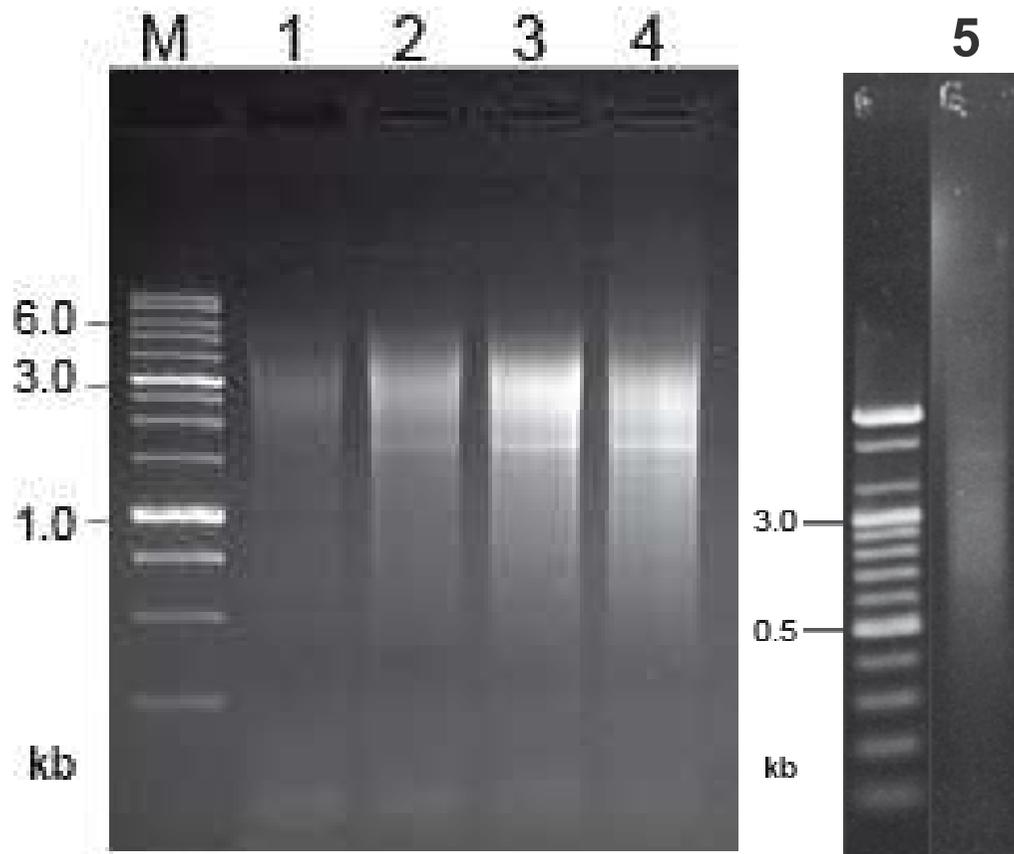
Амплификация образцов кДНК

Отсутствие изменений в концентрации продукта ПЦР при добавлении циклов указывает на то, что реакция вышла на плато. Оптимальное для амплификации образца количество циклов должно быть на 2-3 цикла меньше, чем то, которое необходимо для выхода реакции на плато.

Общая интенсивность шмера должна соответствовать той, которую имеют образцы кДНК на дорожках 2-3 (сравнение относительно интенсивности маркера).

Если интенсивность шмера не нарастает с увеличением циклов ПЦР и смещена к лунке (дорожка 4), значит, образец кДНК подвергся избыточной амплификации.

Если интенсивность шмера существенно ниже (например, как на дорожке 1), значит, количество циклов ПЦР было недостаточно для амплификации этого образца.



Отсутствие ярких полос и шмер, начинающийся от лунки, – свидетельство чрезмерного числа циклов ПЦР (дорожка 4) или слишком длинной элонгации в ходе ПЦР (дорожка 5)

Формула ПЦР – принцип для расчета **репрезентативности** библиотек кДНК, полученных с использованием ПЦР

1 молекула → **40** циклов ПЦР

1 000 молекул → **30** циклов ПЦР

(1 pg) 10^6 молекул → **20** циклов ПЦР

(1 ng) 10^9 молекул → **10** циклов ПЦР

1 молекула ДНК размером 1 т.п.о. имеет массу порядка 10^{-18} г.

$$N = 2^{(40-n)}$$

N – количество молекул ДНК-матрицы;
n – количество циклов ПЦР, которое потребовалось для амплификации ДНК с концентрацией 5-10 мкг/мкл

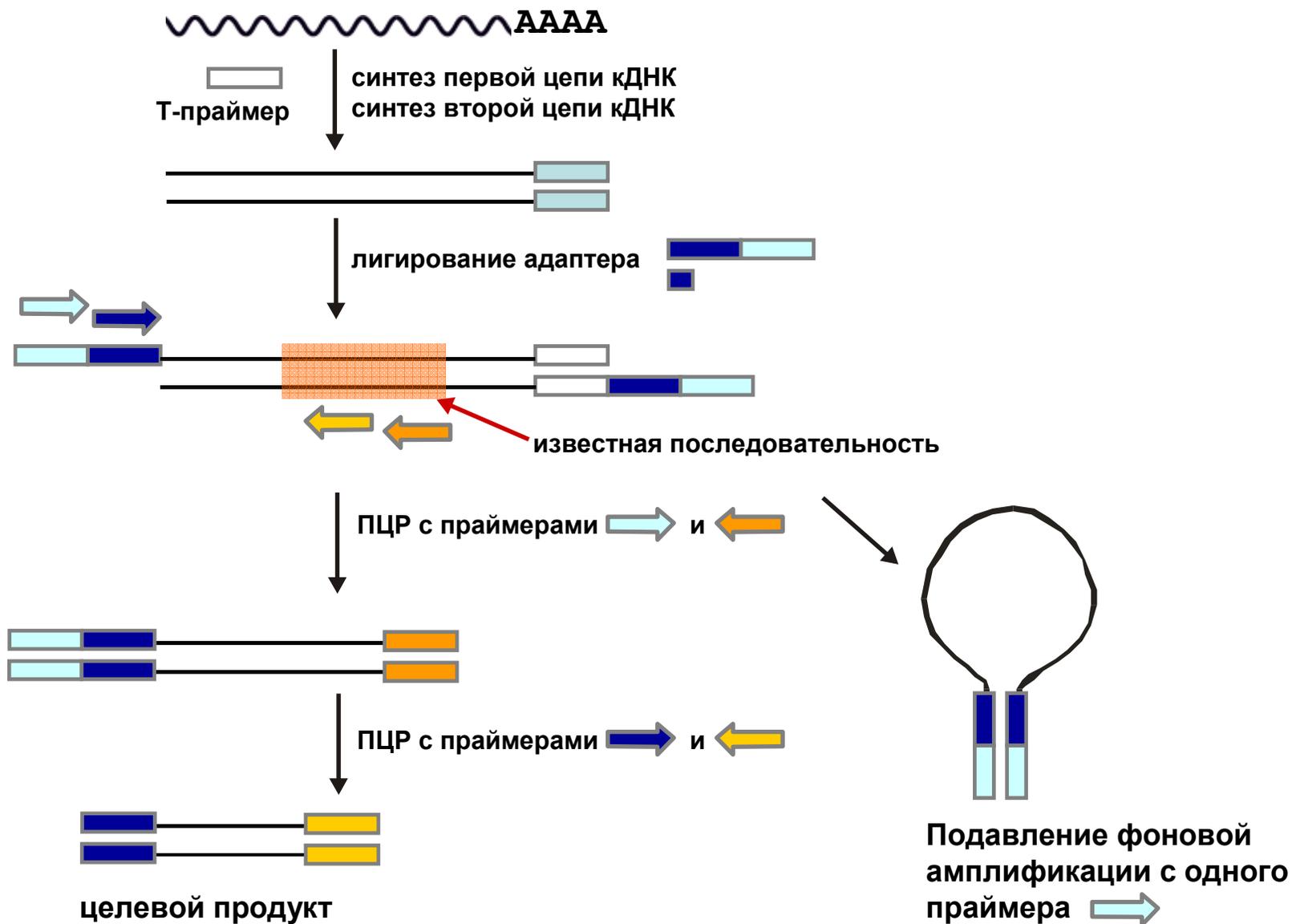
Если для амплификации образца потребовалось **27** циклов ПЦР, следовательно, изначально в образце было примерно 10^4 молекул ДНК.



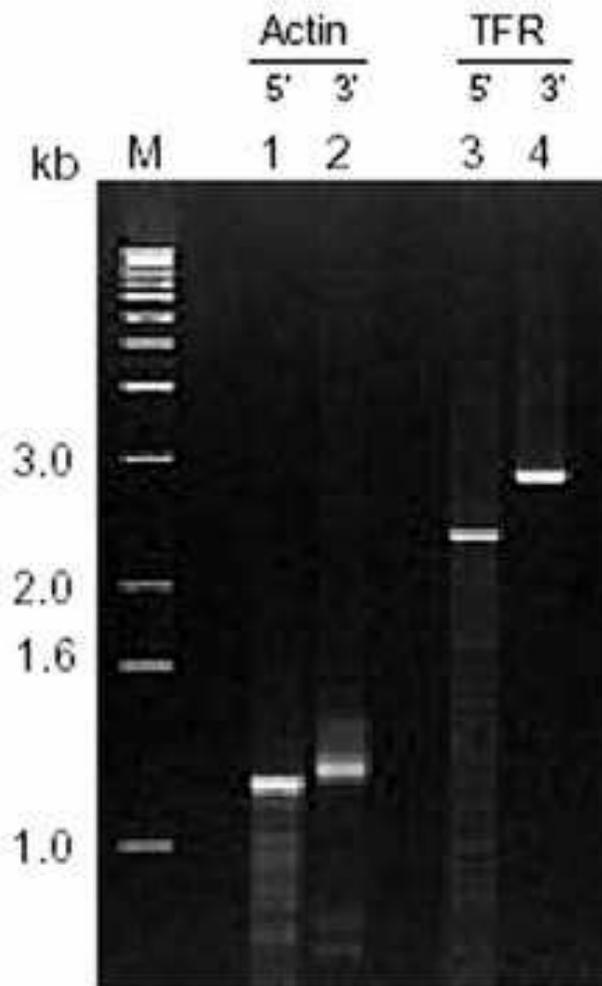
КЛОНИРОВАНИЕ ПОЛНОРАЗМЕРНЫХ кДНК

- Выделение кодирующей последовательности путем скрининга библиотек кДНК часто позволяет выявить лишь частичную последовательность транскрипта
- Клонирование кДНК на основе известной белковой последовательности (или гомологичных последовательностей) с использованием вырожденных праймеров позволяет выявить лишь ограниченный фрагмент кДНК

RACE (Rapid Amplification of CDNA Ends) методом Marathon

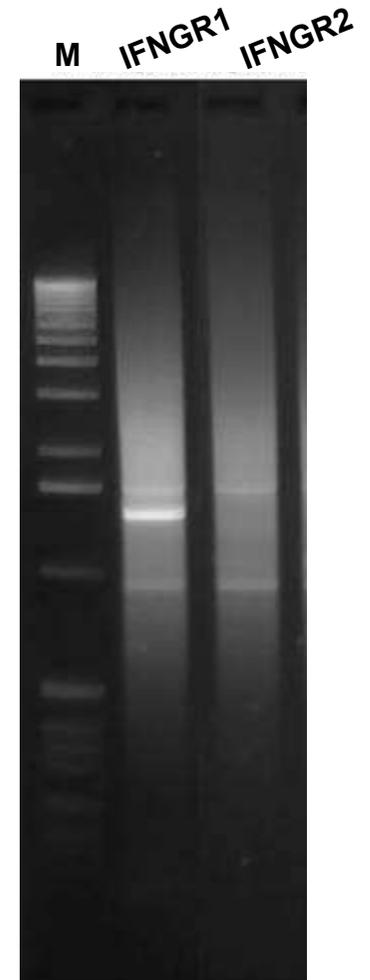
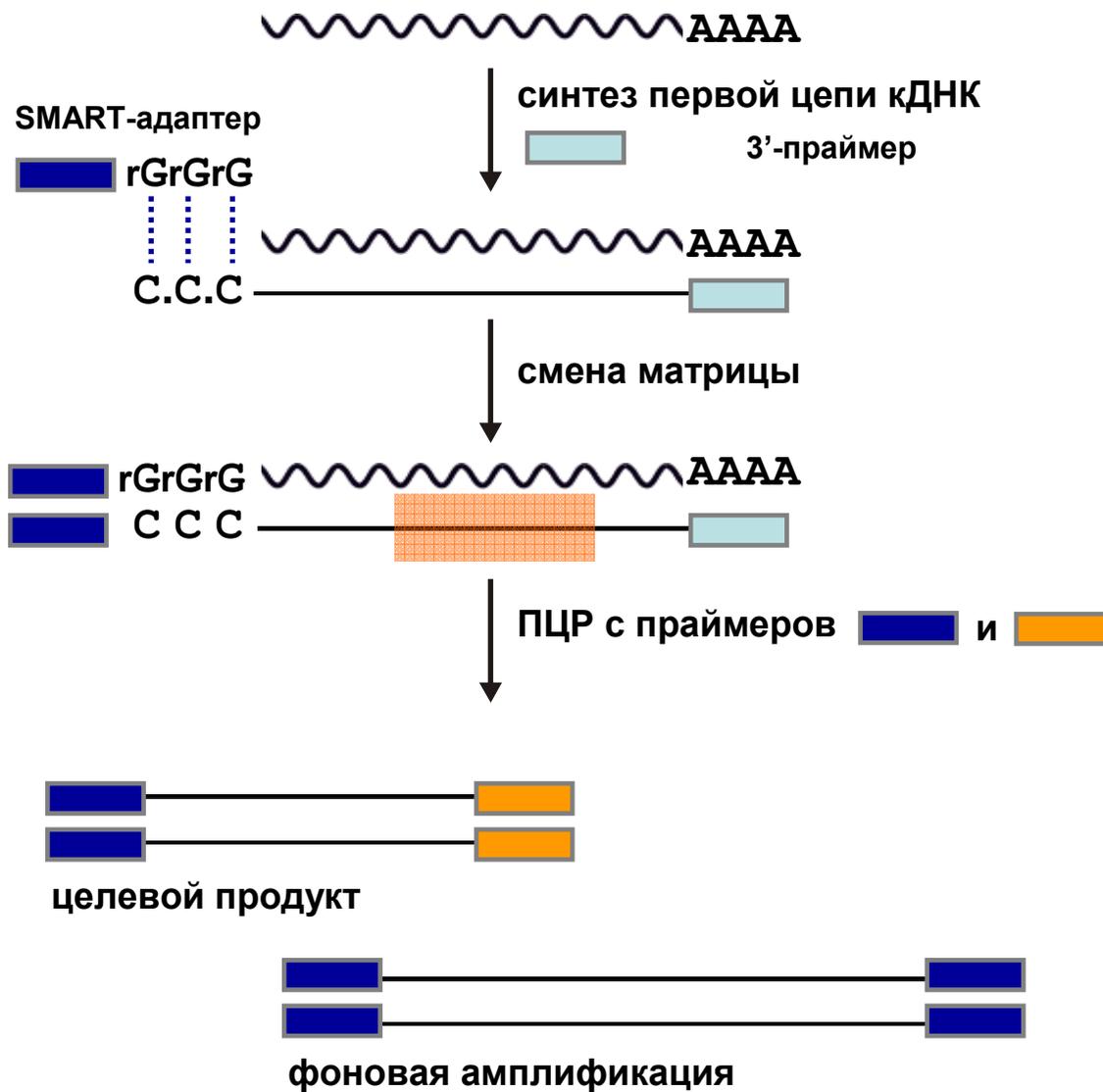


Результат 5'- и 3'- RACE с использованием Marathon кДНК матрицы генов актина и трансферринового рецептора



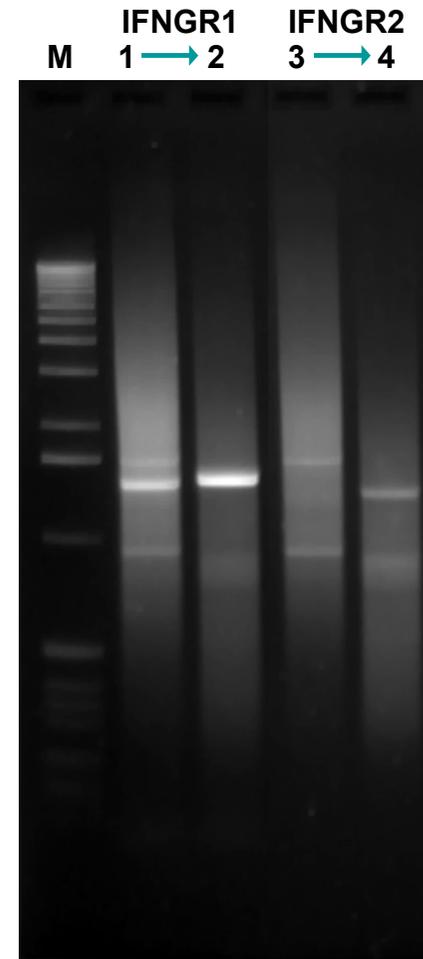
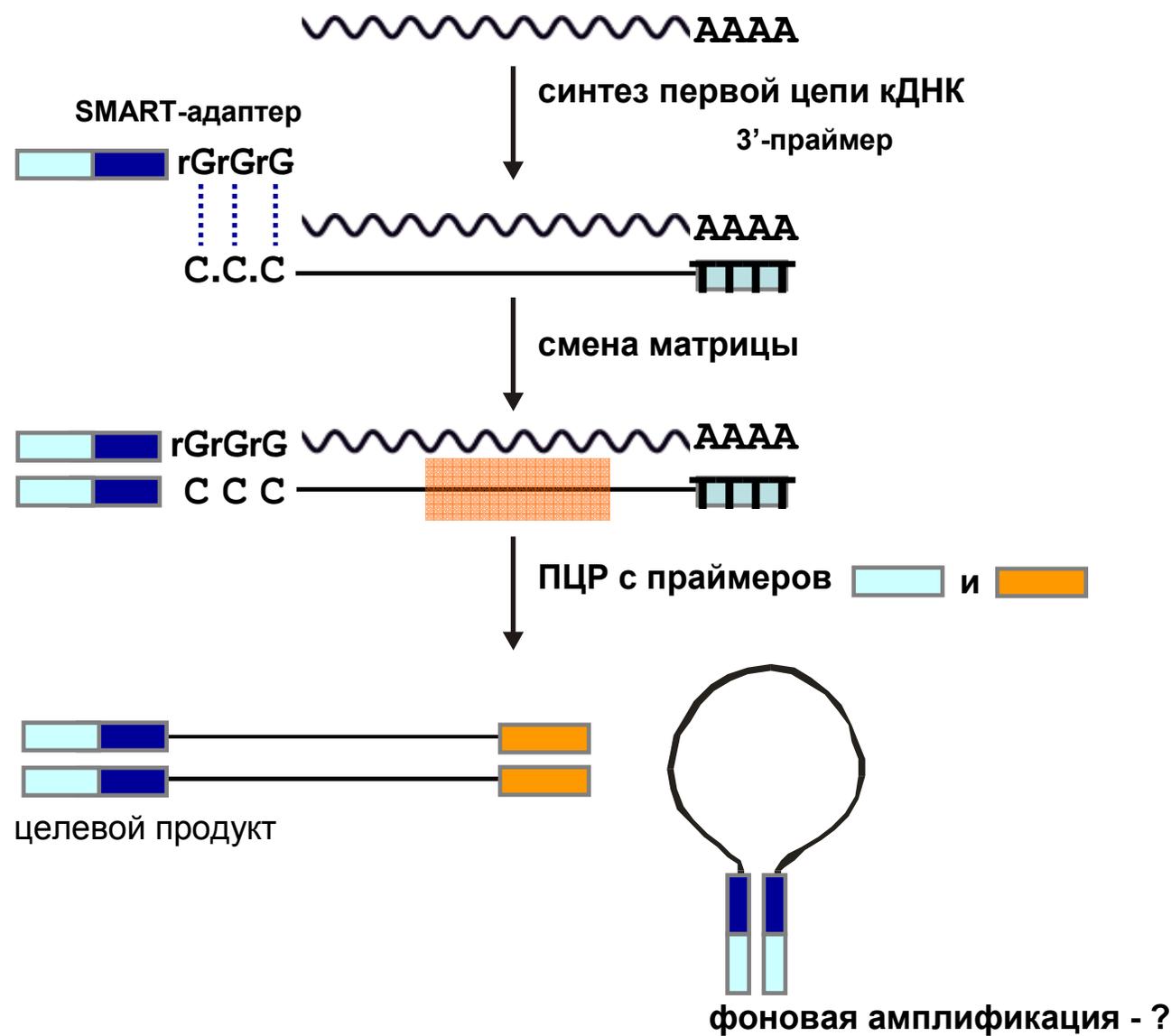
Аmplицированный продукт был получен в ходе “long and accurate” ПЦР с использованием внешнего супрессионного праймера и ген-специфических праймеров. В качестве матрицы использовалась кДНК человека, приготовленная методом Marathon. М - маркер (1 kb ladder).

5'-RACE по технологии SMART



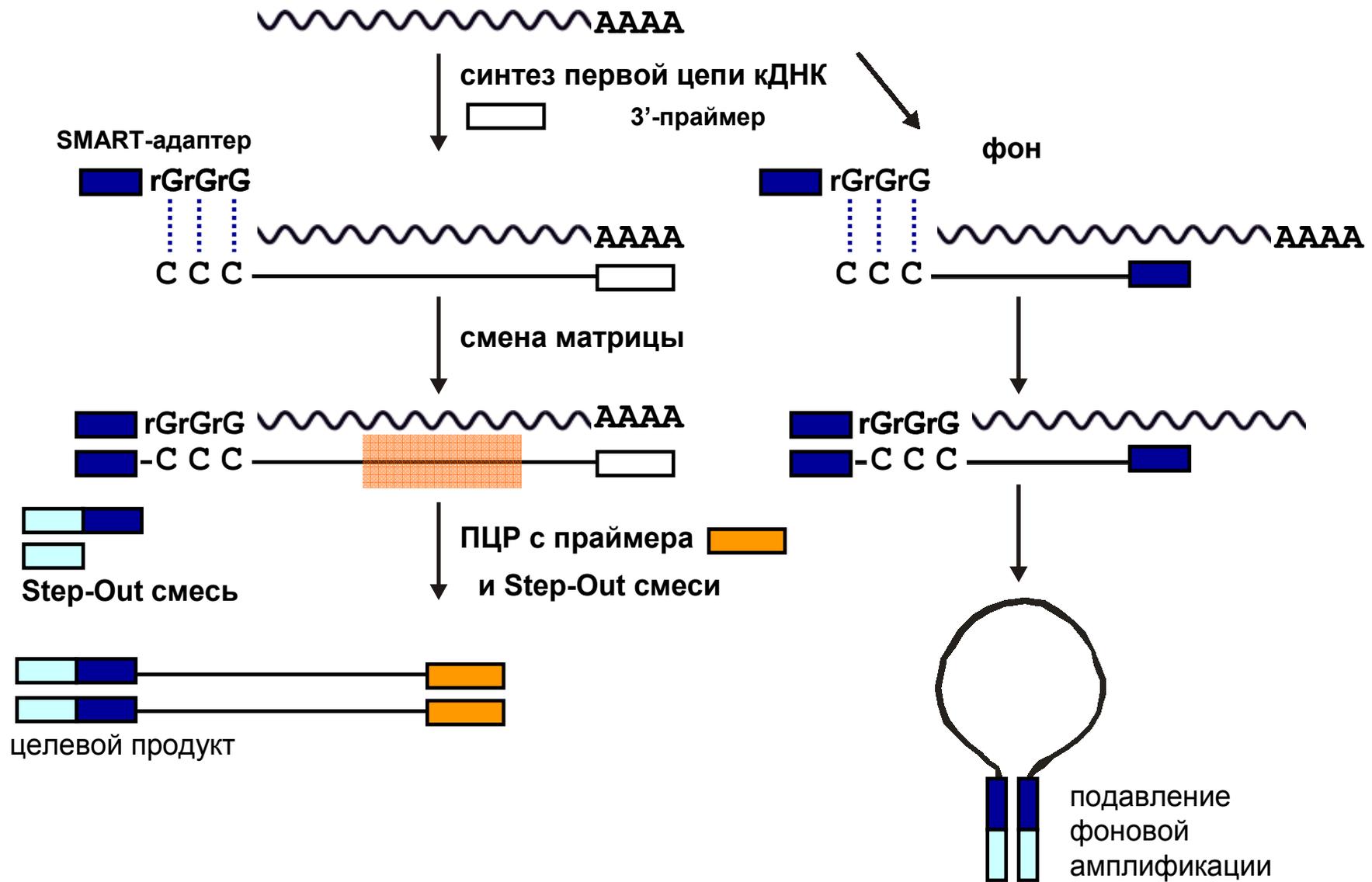
Результат RACE с использованием SMART кДНК

RACE по технологии SMART+ССП-эффект

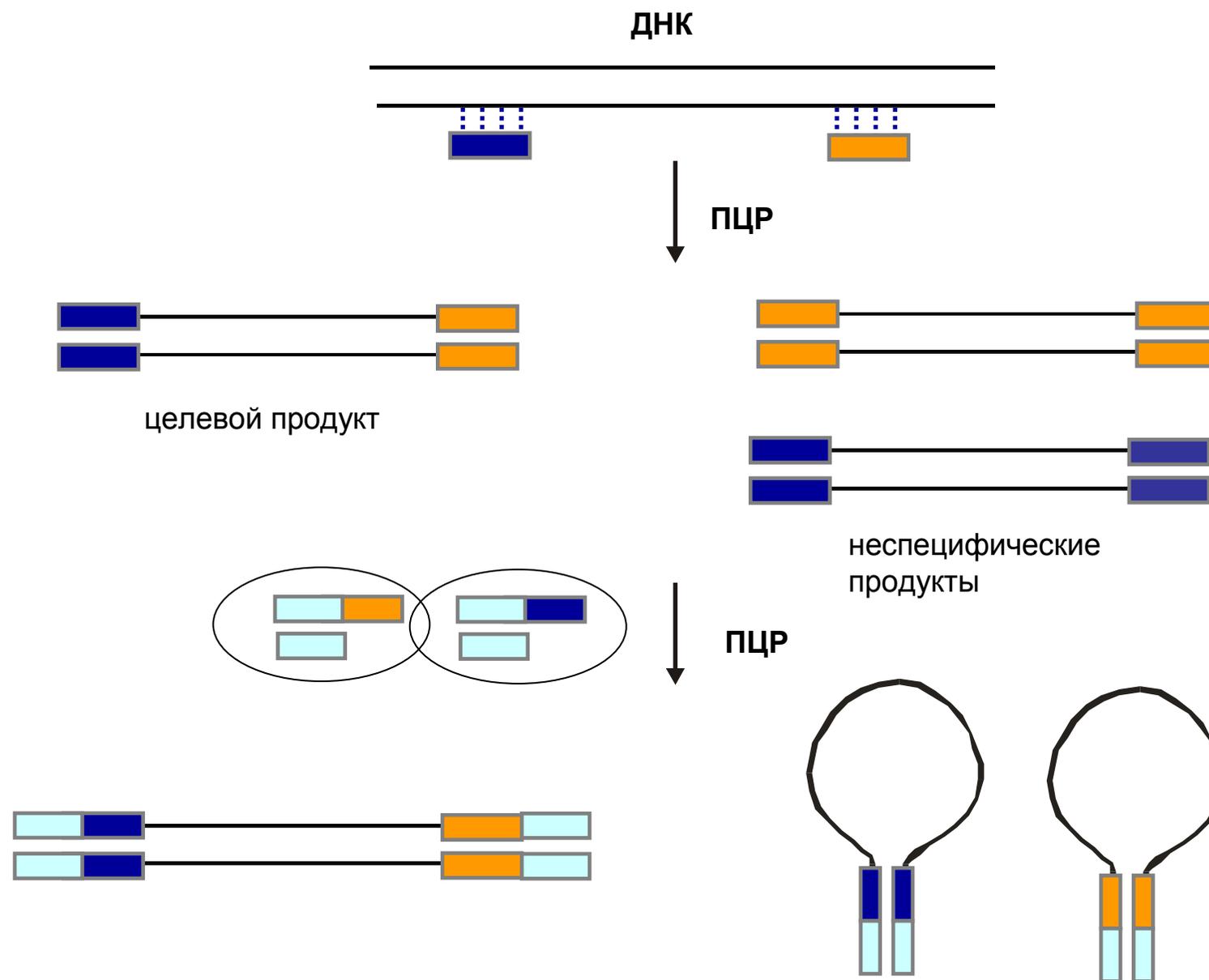


Результат RACE с использованием SMART кДНК -2

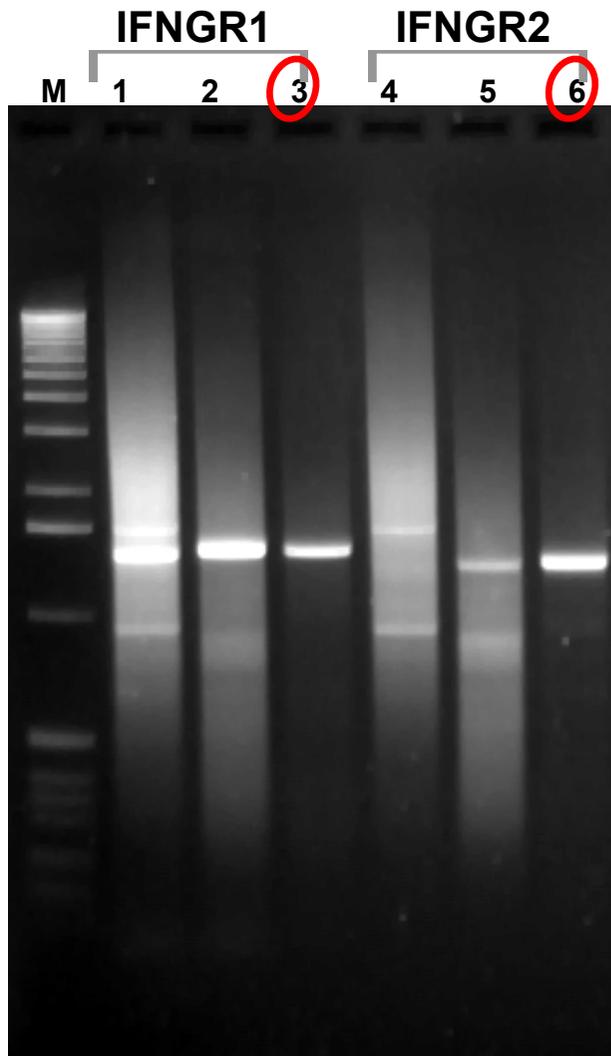
5'-RACE по технологии SMART+Step-Out PCR



Step-Out PCR

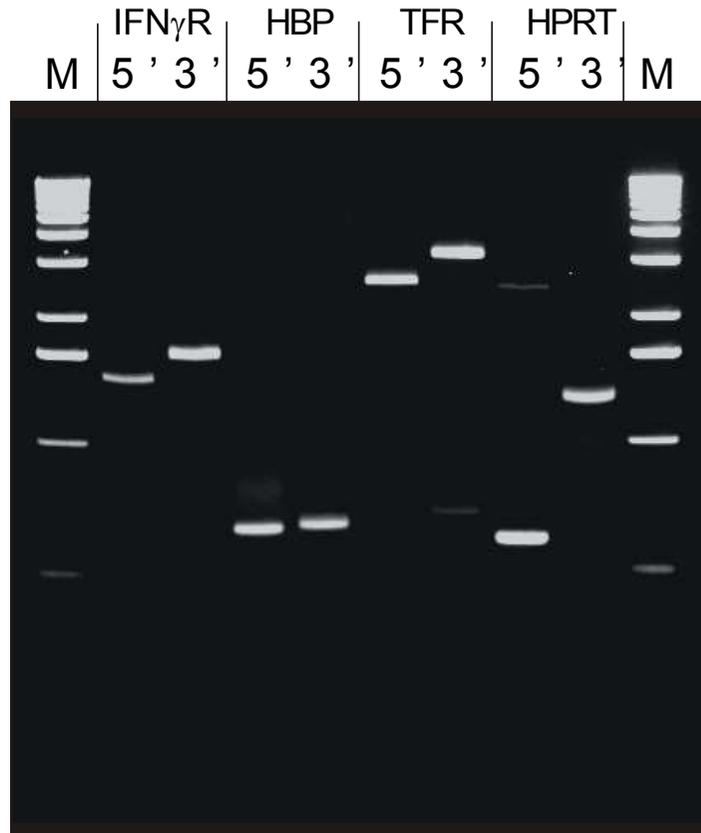


Подавление фоновой амплификации при Step-Out RACE



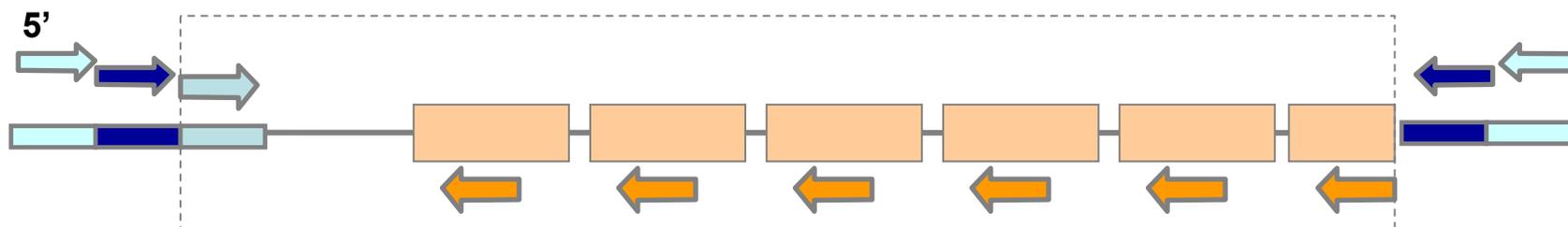
5'-RACE с использованием короткого адаптера (1, 4); длинного адаптера (2, 3) и Step-Out смеси (3, 6)

Результаты 5'- и 3'- RACE для ряда генов человека с использованием суммарной РНК в качестве матрицы



IFN γ R - рецептор интерферона гамма, IFNGR1;
HBP - 23 kD протеин;
TFR - трансферинный рецептор
HPRT - гипоксантин-гуанин-фосфорибозил
трансфераза

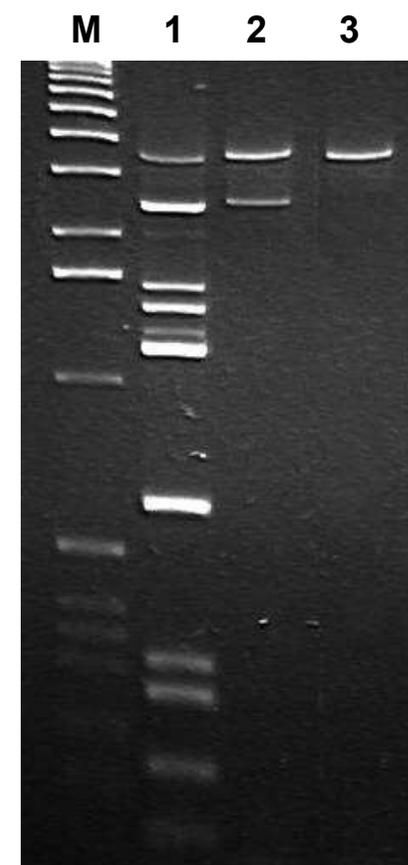
Регуляция длины продукта RACE



адаптер `5'-GTAATACGACTCACTATAGGGCACGGTTGCACGACGGCCCGGGCTGGT-3'`
`3'-CCCGACCA-5'`

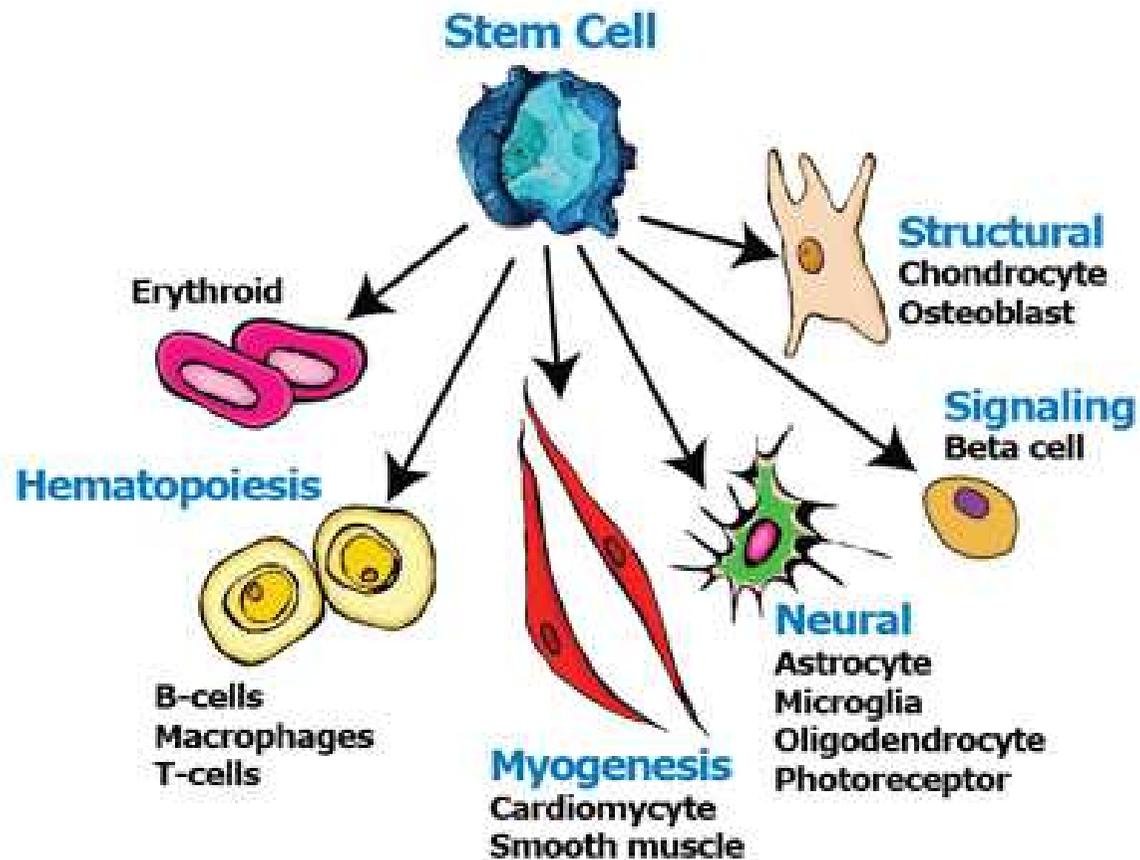
внешний праймер `5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'`

внутренний праймер `5'-ACGGTTGCACGACGGCCCGGGCTGGT-3'`



К продукту 5' Step-Out RACE гена *gtLec1* с ген-специфического праймера и Step-Out смеси (дорожка 1) был лигирован супрессионный адаптер и полученный образец был использован для ПЦР амплификации с праймером, соответствующем внутренней (дорожка 2) или внешней (дорожка 3) части адаптера.

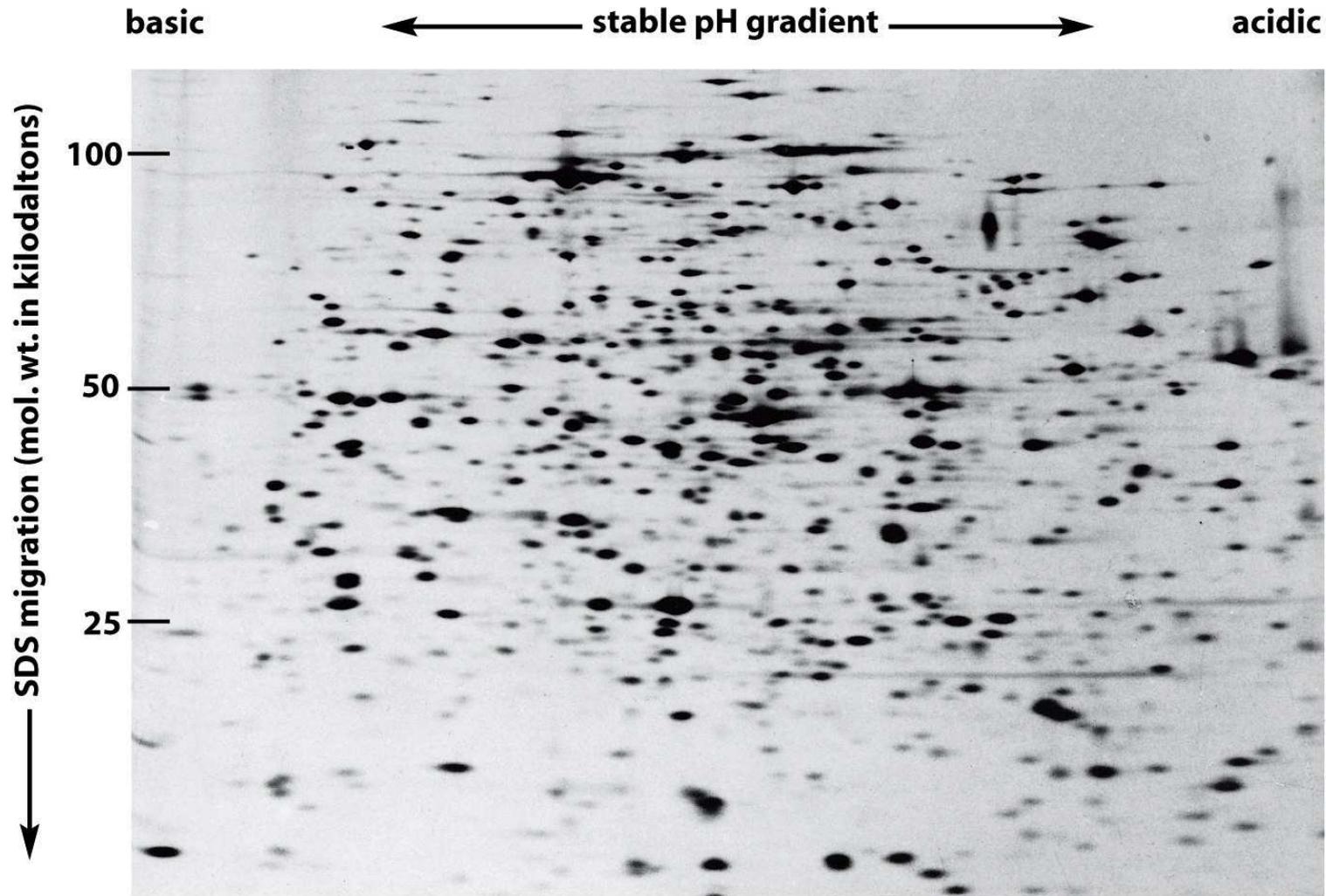
Дифференциальная экспрессия генов



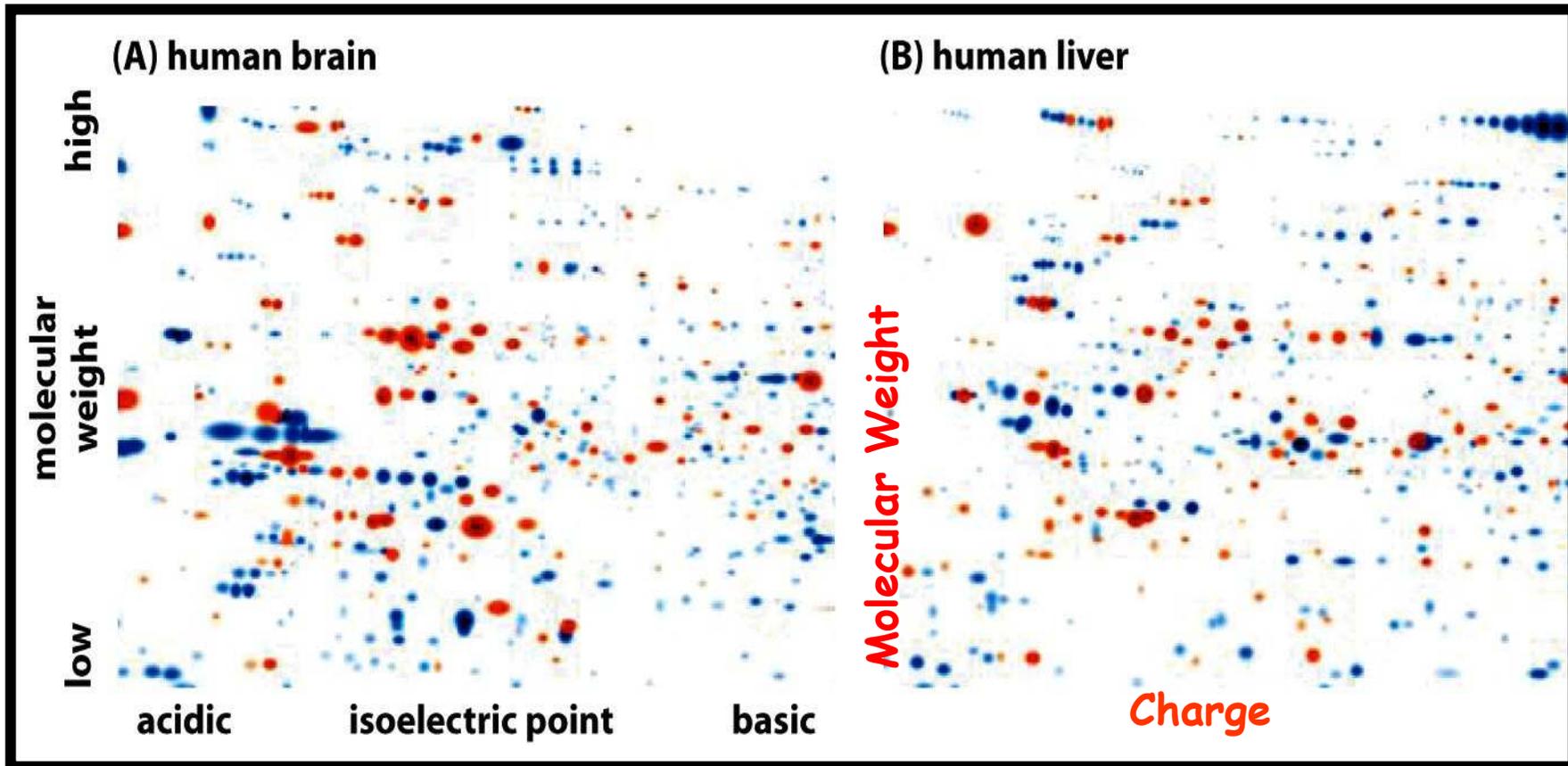


2-D гель-электрофорез белков

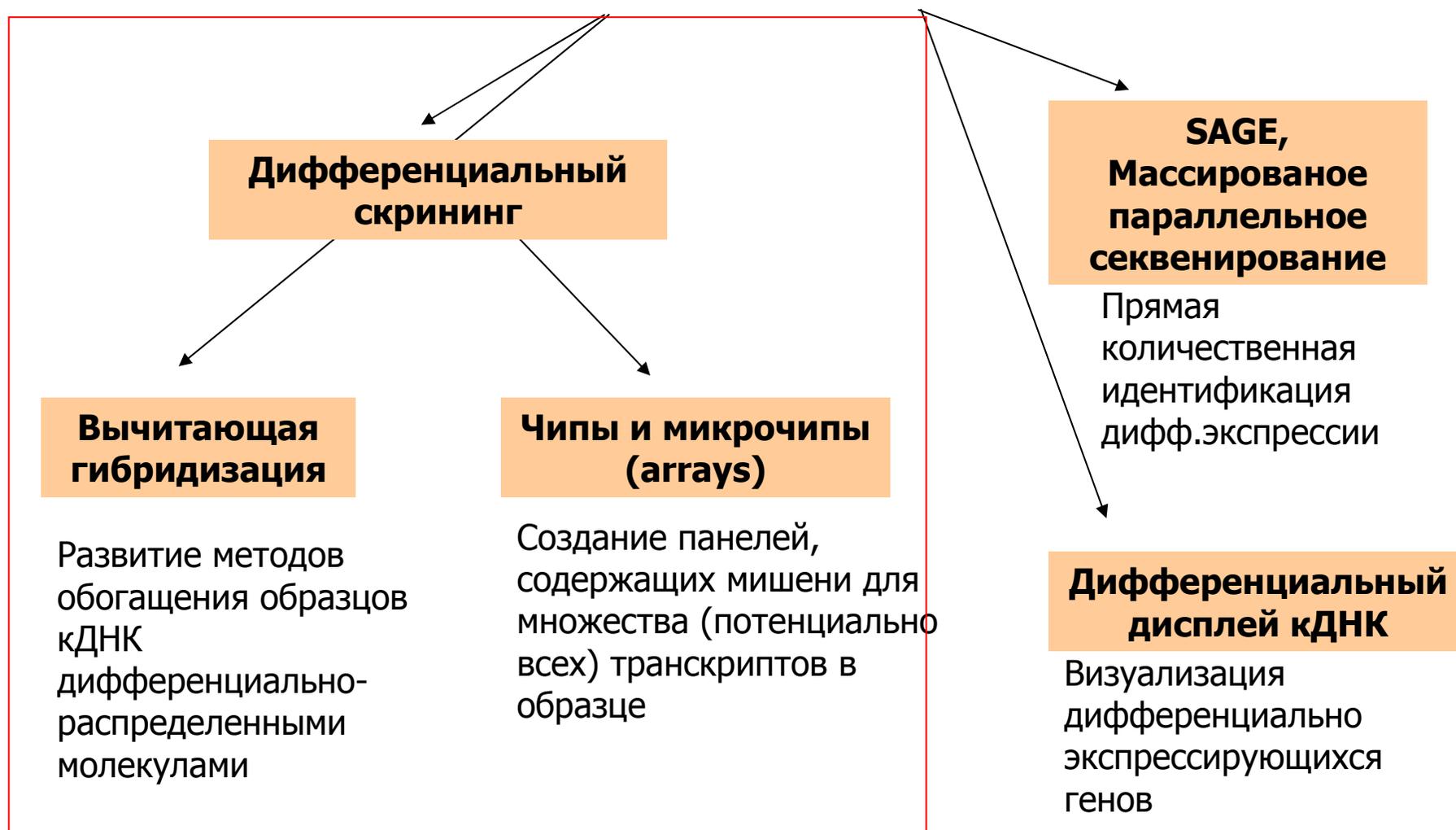
Two-Dimensional Protein Gel Electrophoresis



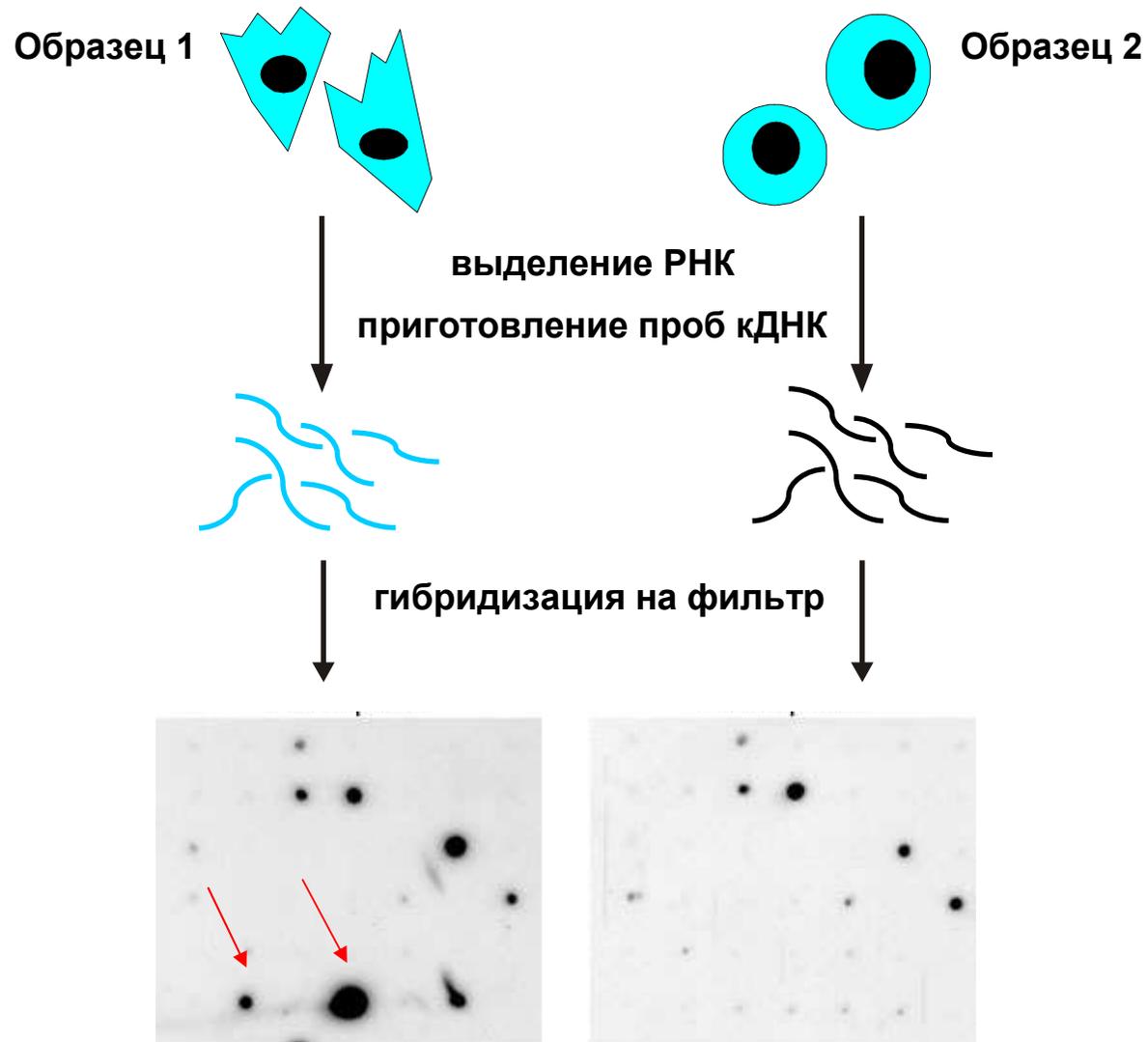
2-D Protein Gel Electrophoresis Demonstrates Differential Gene Activity in Animal Organs



Поиск и исследование дифференциально экспрессирующихся генов на уровне мРНК



Дифференциальный скрининг



анализ дифференциально экспрессирующихся генов

Экспрессия гена *Vg1*
в вегетативной
области ооцита
Xenopus laevis (иРНК)

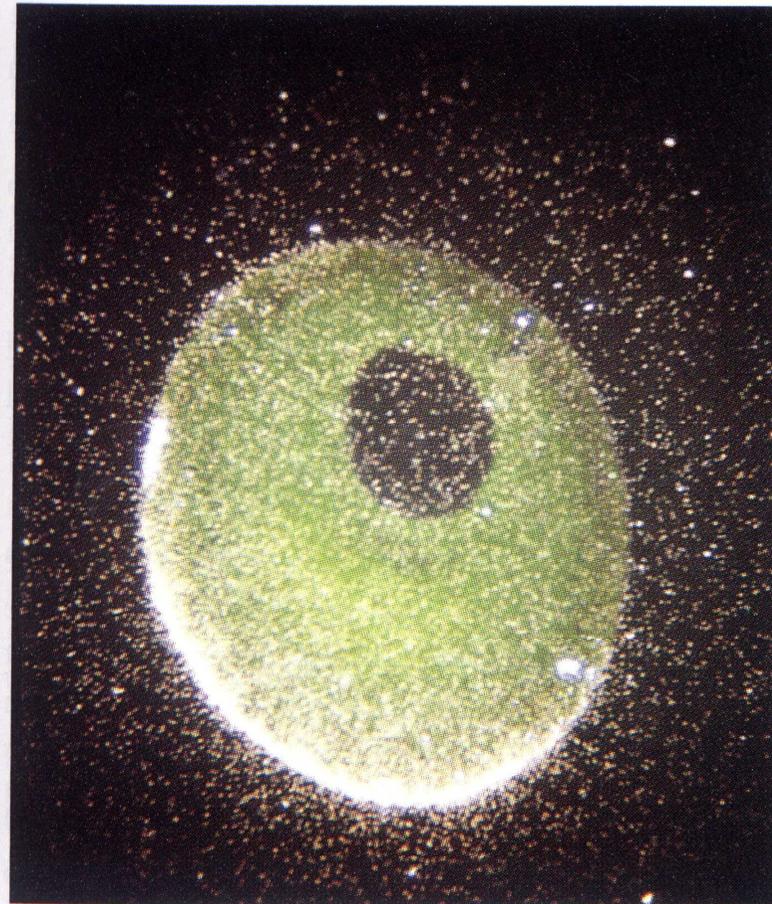


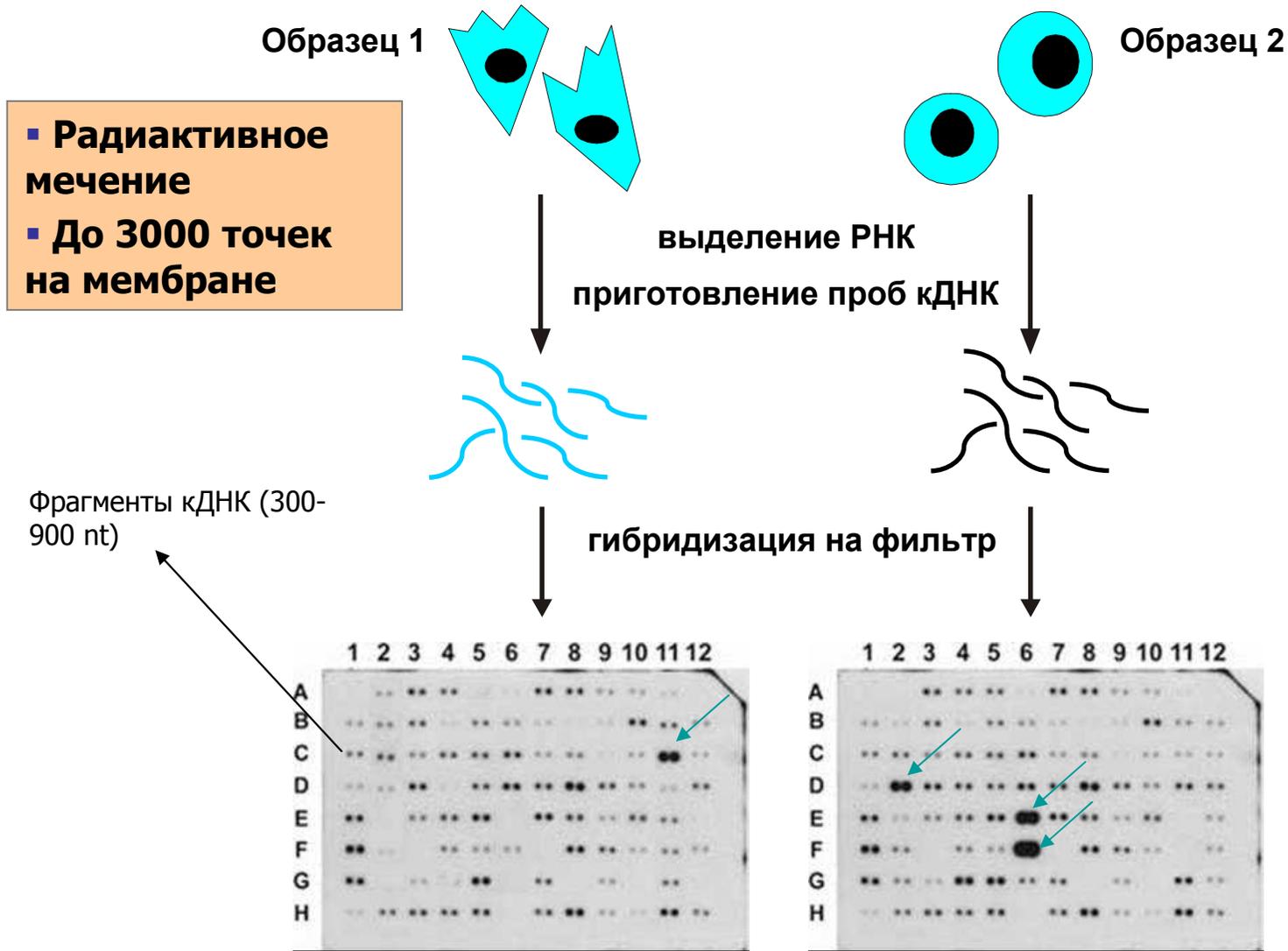
Figure 5.33

Localization of *Vg1* mRNA to the vegetal portion of the *Xenopus* oocyte. the white crescent at the bottom of the egg represents the tethered *Vg1* message. The black area is the haploid nucleus of the oocyte. At fertilization, the *Vg1* message is translated into an inactive protein. Moreover, if that protein is processed to its active form, it can deliver a TGF- β signal of the kind required for organizer formation. (Photograph courtesy of D. Melton.)



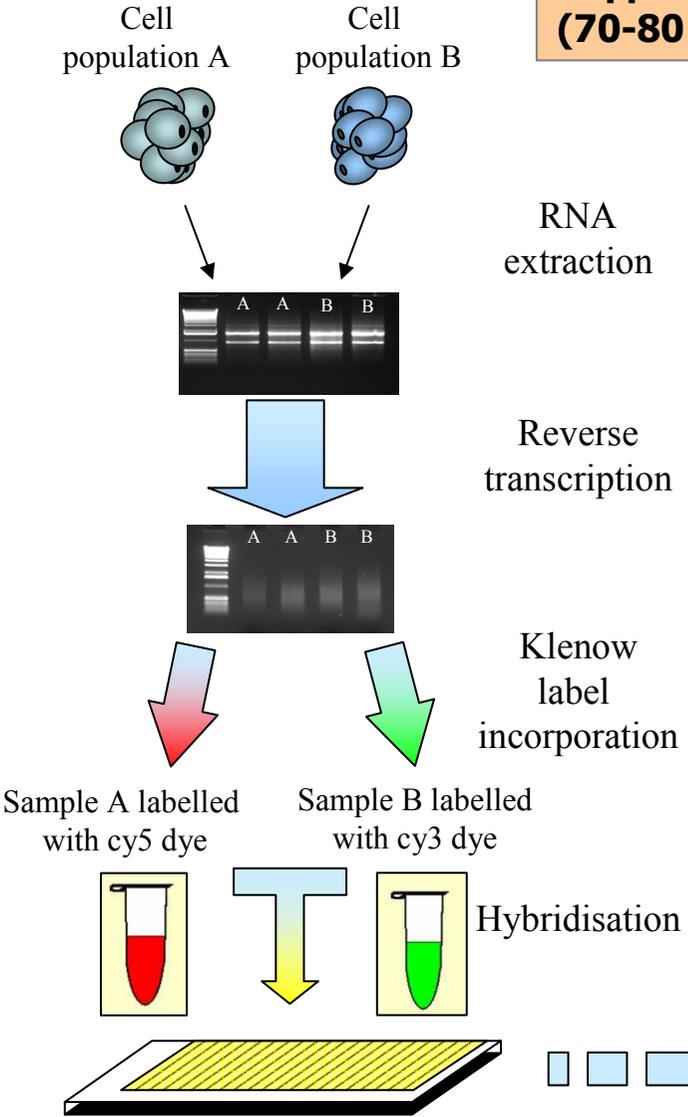
Чипы и микрочипы

Macroarrays

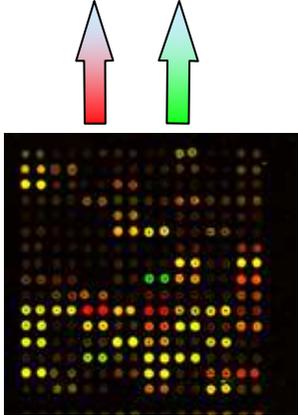


Microarrays

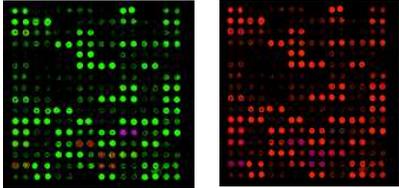
- Флуоресцентное мечение
- До 10000 точек на стекле
- кДНК или олигонуклеотиды (70-80 nt)



Quantify pixel intensities.



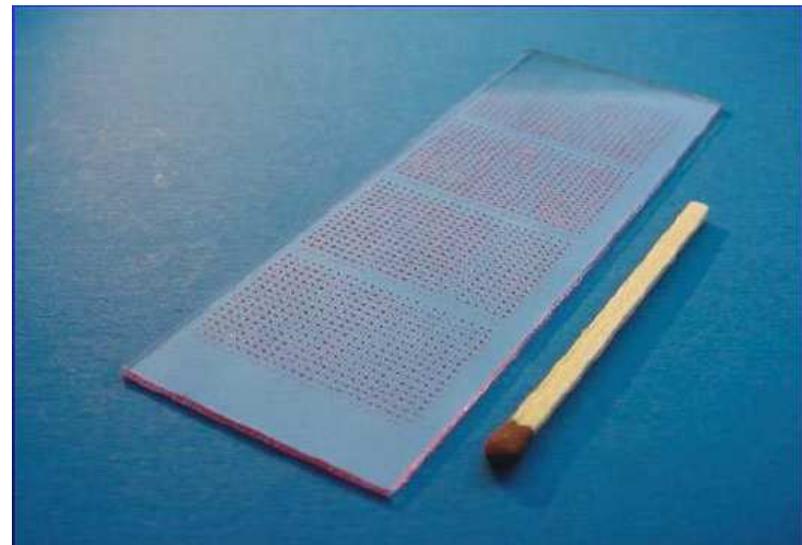
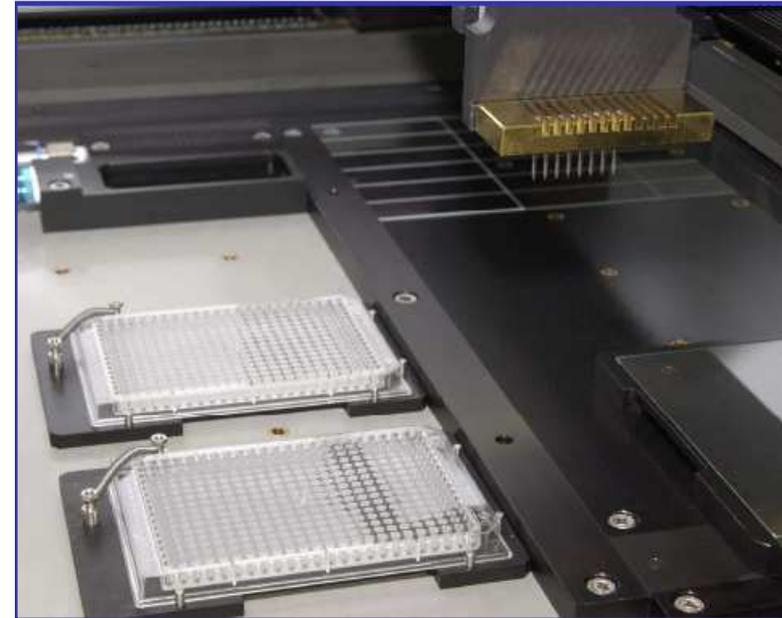
“Overlay images”



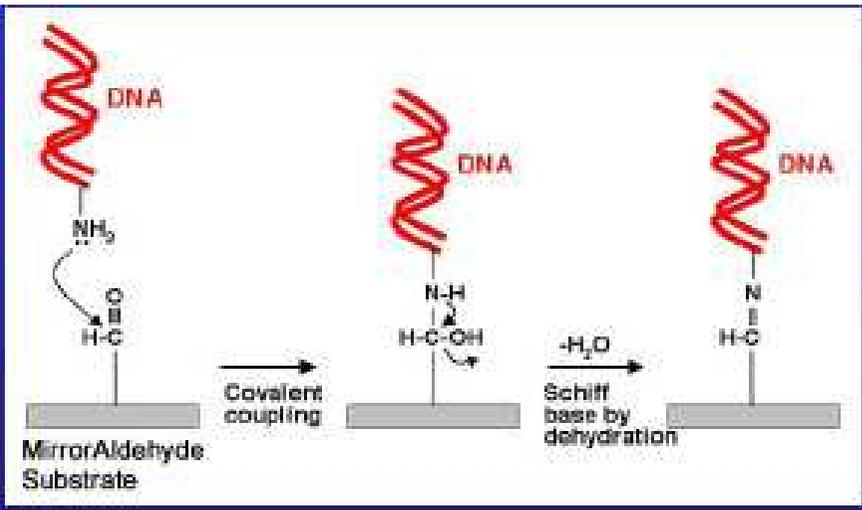
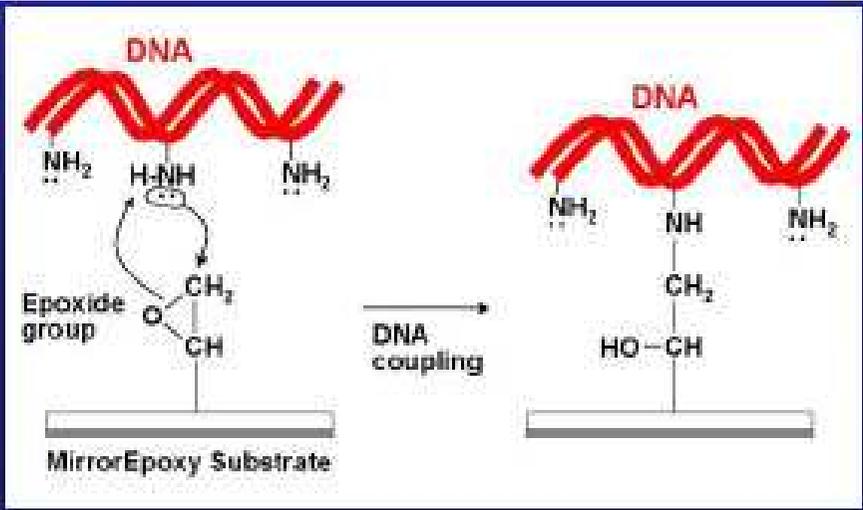
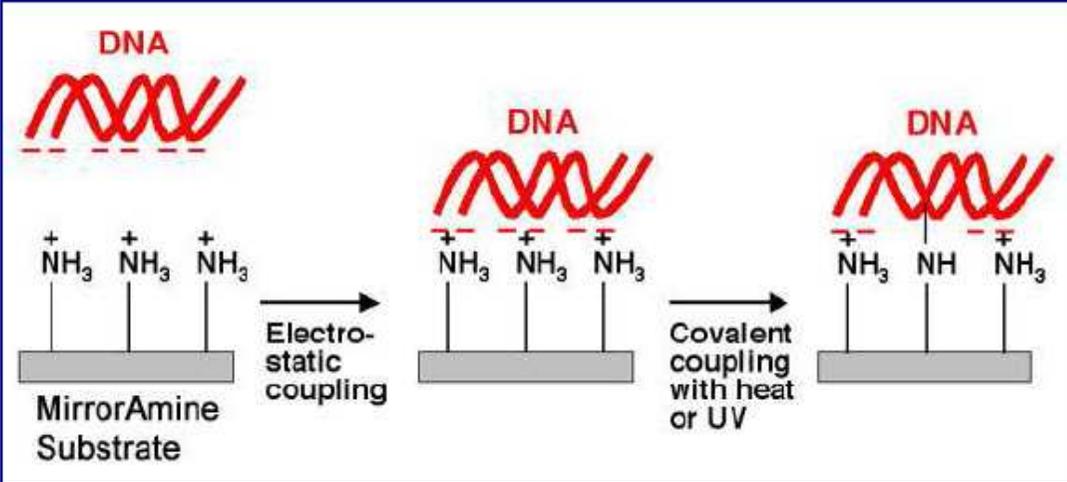
Scan cy5 channel

Scan cy3 channel

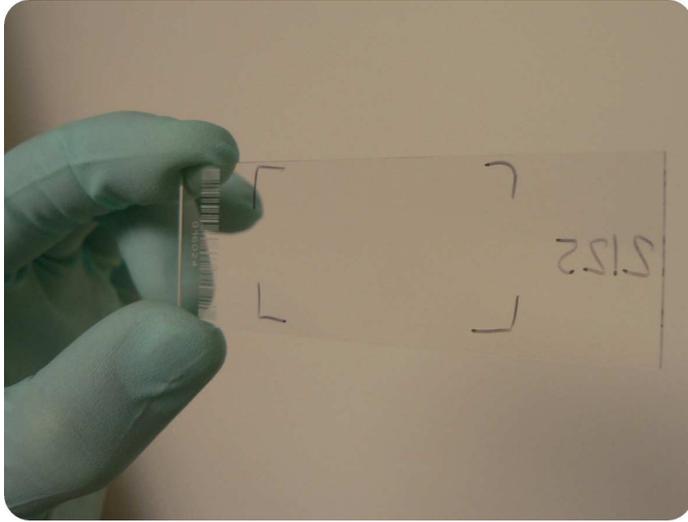
Microarrays preparation



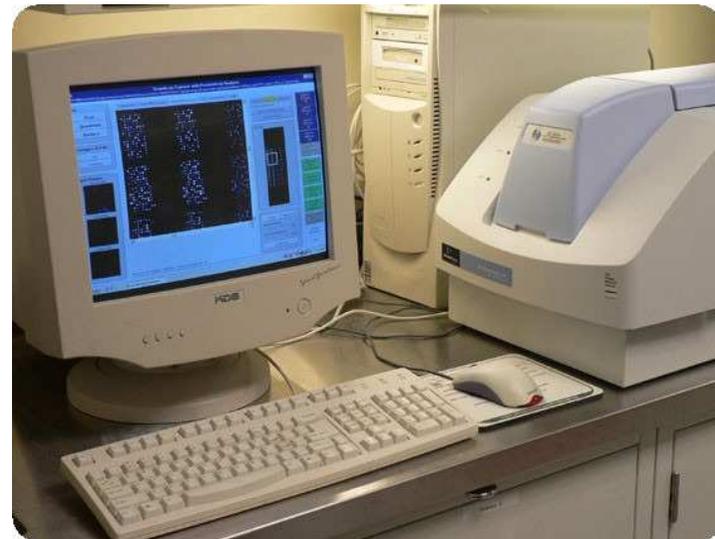
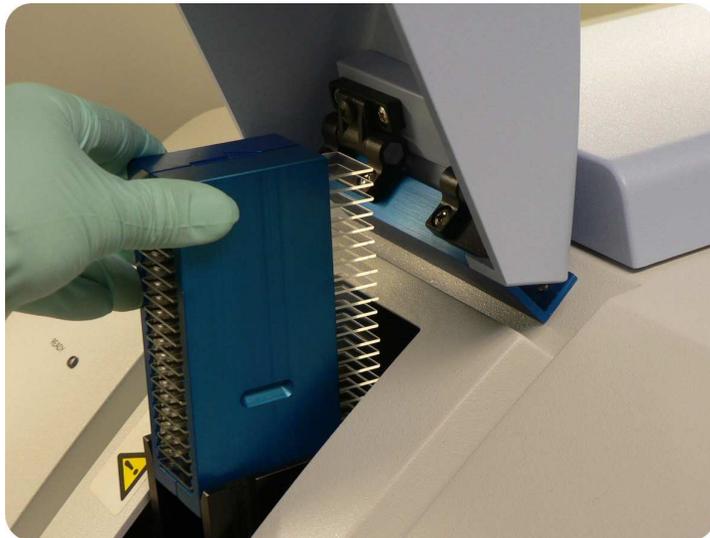
Microarray preparation



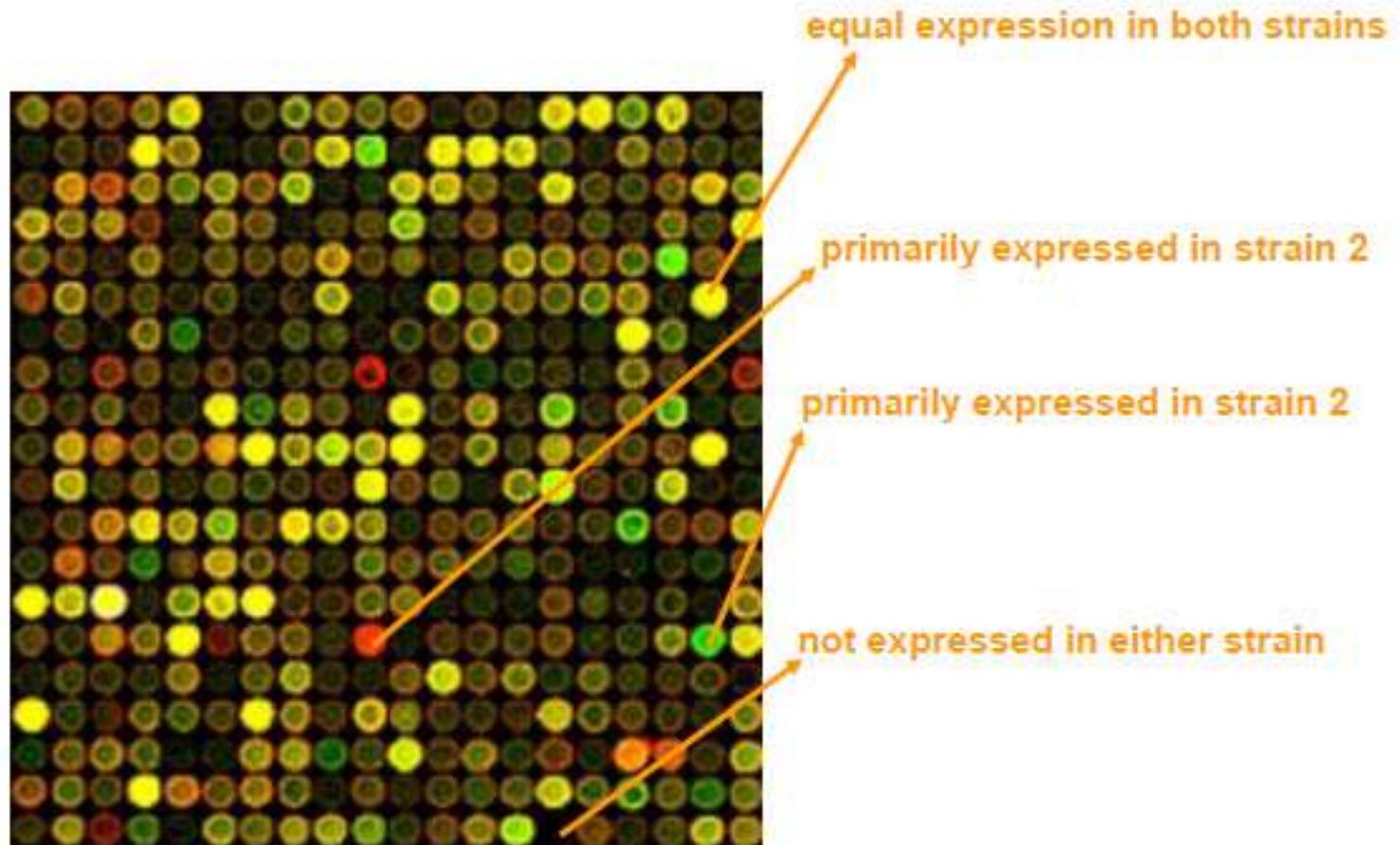
Slide processing



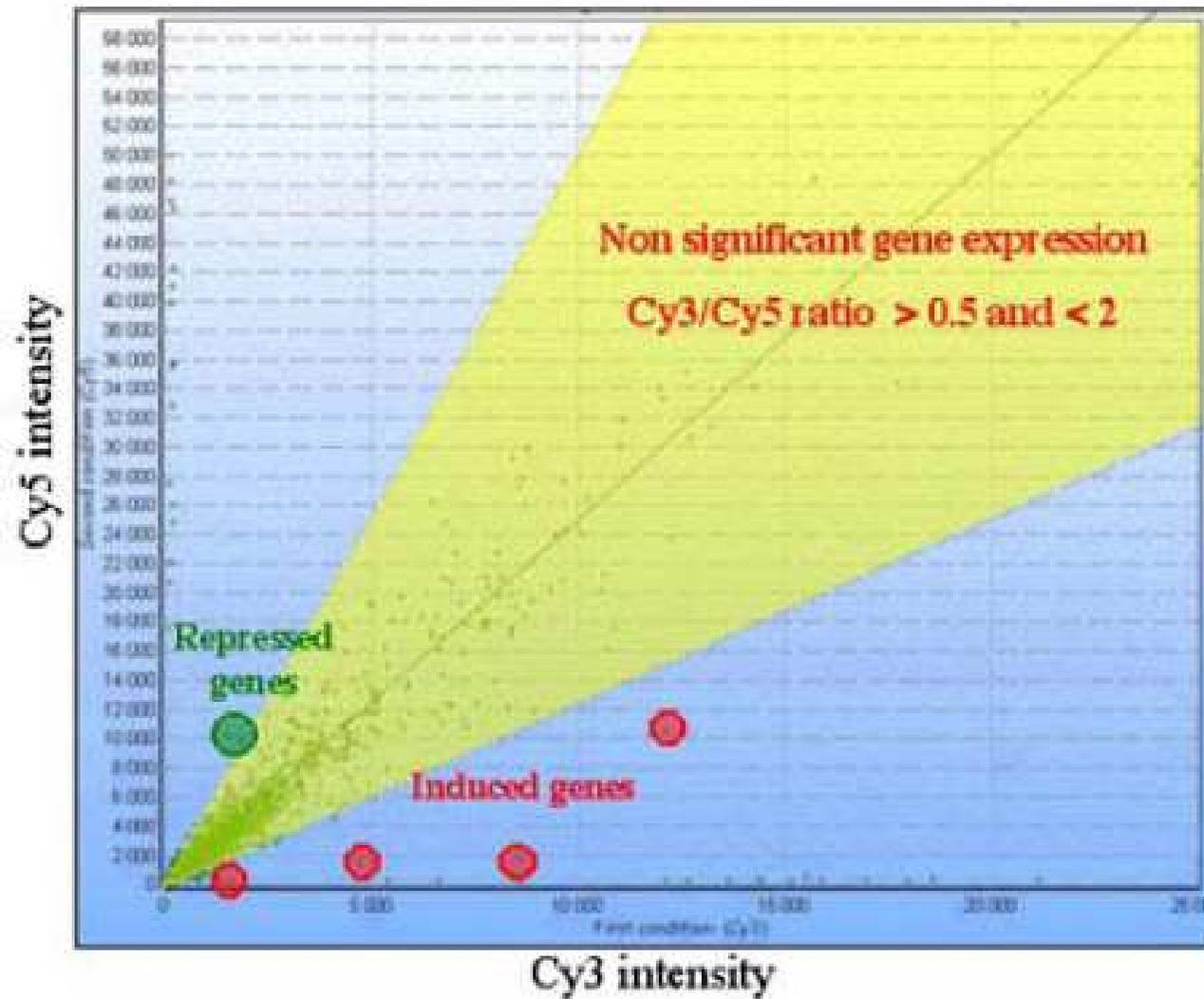
Slide scanning



Анализ данных



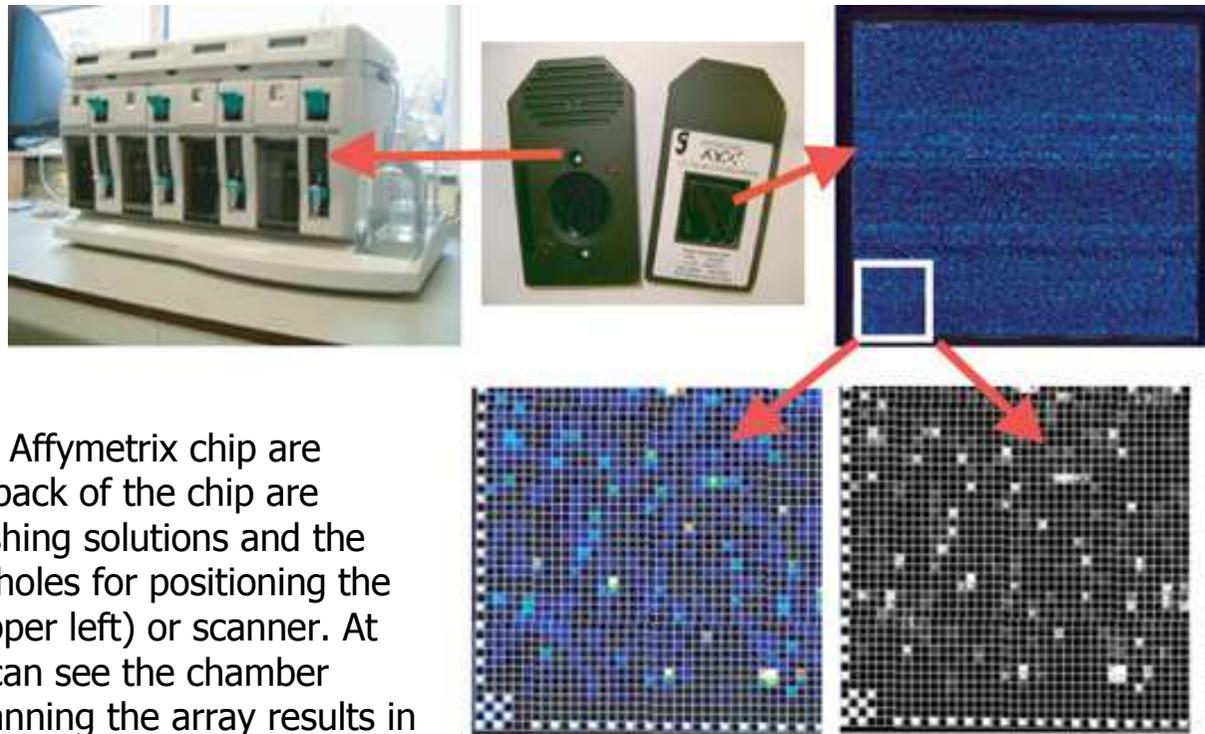
Анализ результатов



Affymetrix chips



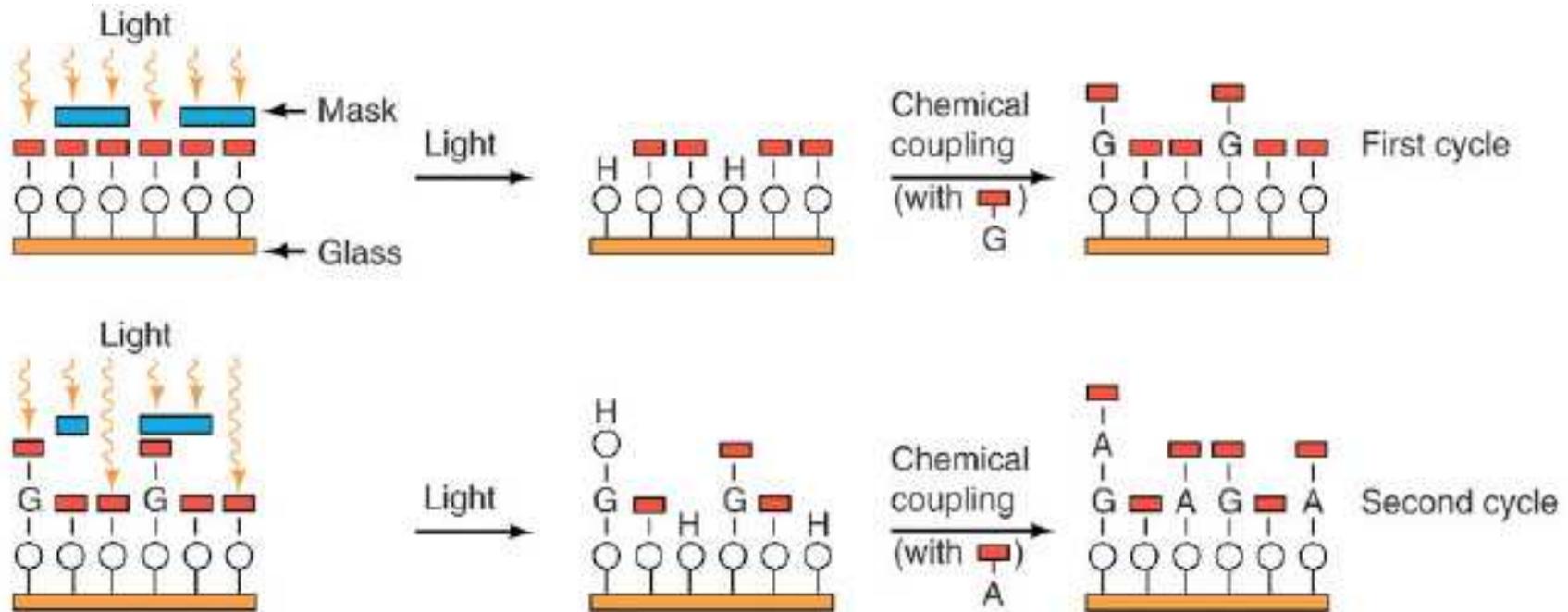
- **Флуоресцентное мечение**
- **До 500000 точек на силиконе**
- **Олигонуклеотиды (20 nt)**



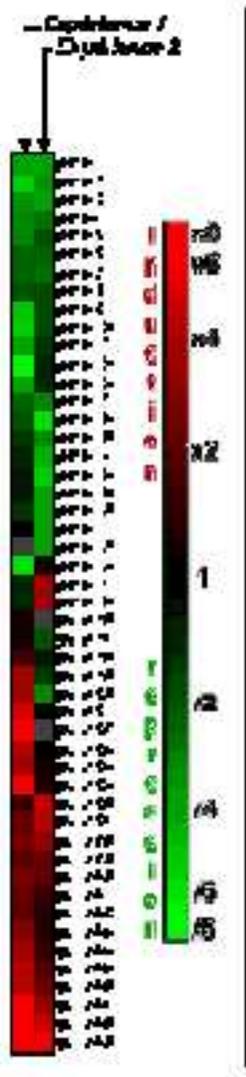
The back and front sides of an Affymetrix chip are shown (upper middle). At the back of the chip are white holes for adding the washing solutions and the hybridisation solution and red holes for positioning the chip in the washing station (upper left) or scanner. At the front side of the chip you can see the chamber where the array is located. Scanning the array results in an image with hybridisation intensities (upper right). The intensities can be shown using artificial colours (lower left) or grey values (lower right). In the gridding step a grid is placed over the array, using the probes at the borders of the array to position it.

Oligonucleotide synthesis

Nucleotides are deposited one at a time at addresses activated by light shining through a pattern of holes in a mask. Each nucleotide carries a blocking group that prevents further polymerization unless activated by light.



Получение кластеров дифференциальных генов

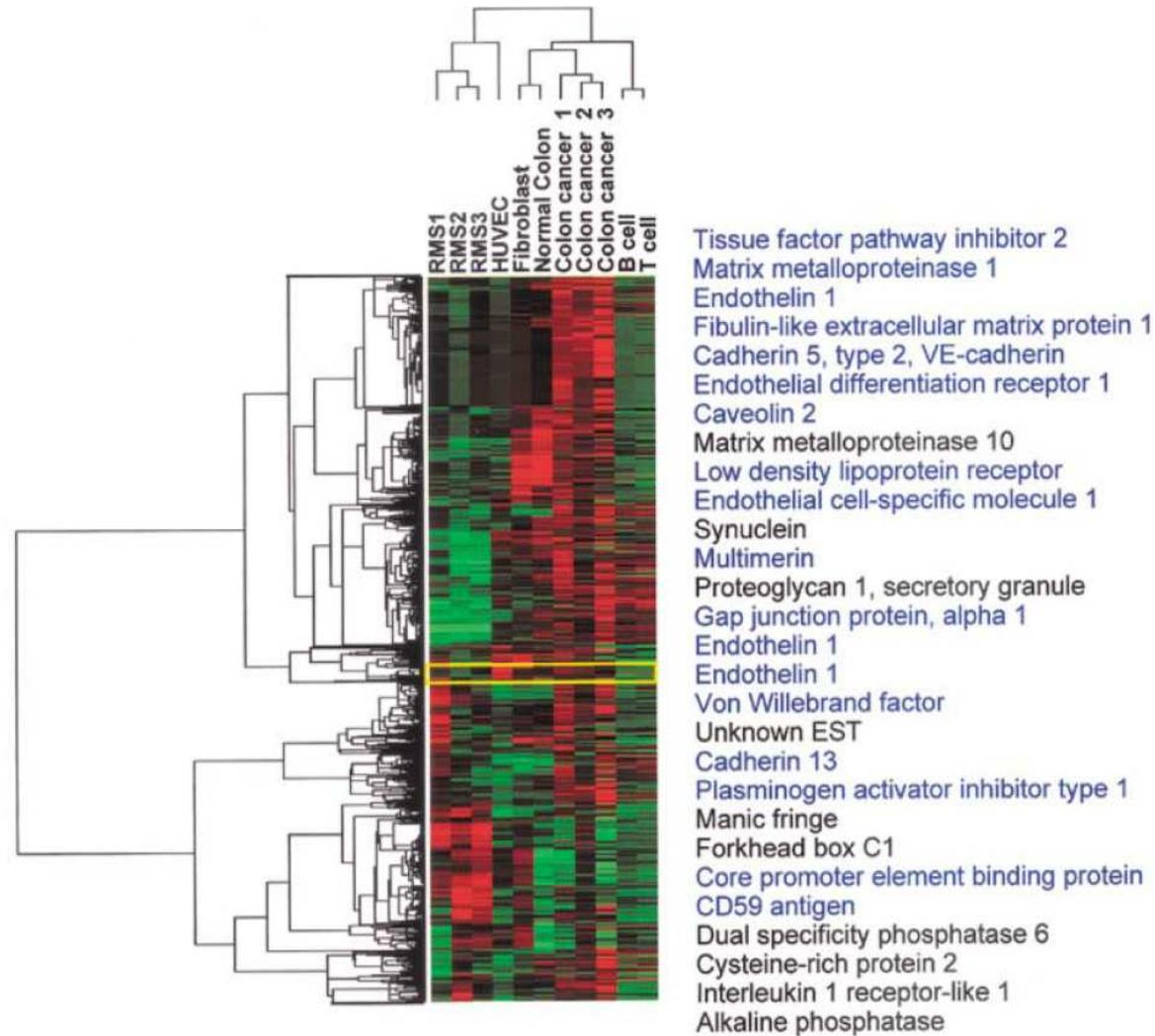


grouping by similar induction factors – is that sensible?

Исследование транскрипции с помощью биочипов: молекулярный фенотип клеток



**Транскрипция 4132
 генов в клетках
 разных типов у
 человека.
 Выделены клетки
 эндотелия**



Some advantages of Affymetrix arrays

- High precision because of:
 - careful probe design
 - up to 20 probes per gene
 - up to 20 mismatch probes
- Very precise measurements
- Very high density (500,000 elements / array)

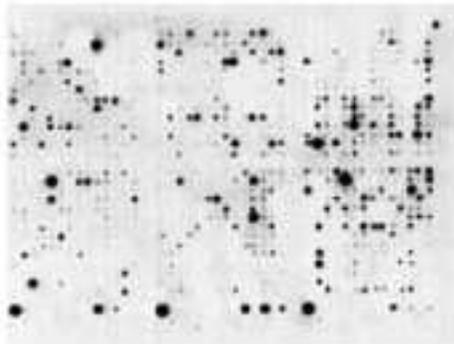


Some disadvantages of Affymetrix arrays

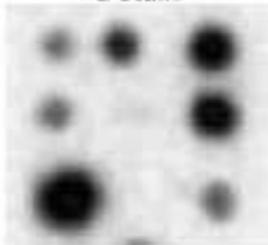
- Inflexible: each set of new arrays requires a new production process.
- More expensive than spotted arrays.
- Proprietary technology
 - only one manufacturer of readers, etc.
- Dependencies of results on method of analysis.

Platforms and Formats - Summary

**high density filters
(macroarrays)**



Detail:



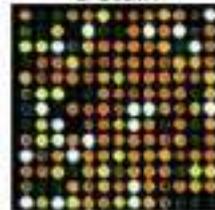
Size: 12cm x 8cm

- 2400 clones by membrane
- radioactive labelling
- 1 experimental condition by membrane

**glass slides
(microarrays)**



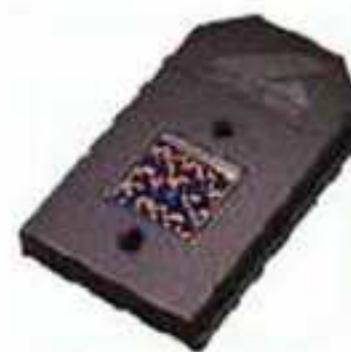
Detail:



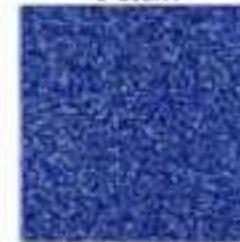
Size: 5,4cm x 0,9cm

- 10000 clones by slide
- fluorescent labelling
- 2 experimental conditions by slide

**oligonucleotide
chips**



Detail:



Size: 1,28cm x 1,28cm

- 300000 oligonucleotides by slide
- fluorescent labelling
- 1 experimental condition by slide



DNA Microarray Applications

- Quantitative Gene Expression
- Mutation detection
- Genotyping / Mapping
- Library screening prior to DNA sequencing
- Disease Profiling
- Patient monitoring



Общие преимущества и недостатки технологии микрочипов

Advantages:

- Rapid
- Method and data analysis well described and supported
- Convenient for directed and focussed studies

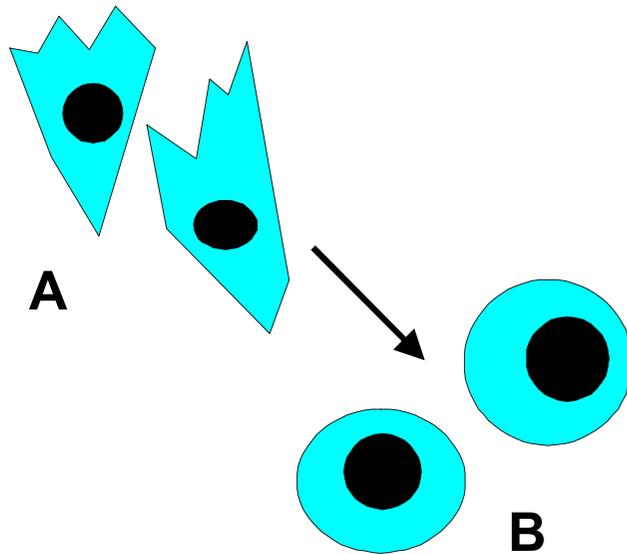
Disadvantages:

- Restricted to known genomes
- Difficult to correlate with absolute transcript number
- Sensitive to alternative splicing ambiguities
- High range of variations in gene expression from one cDNA sample to another
- Limited sensitivity

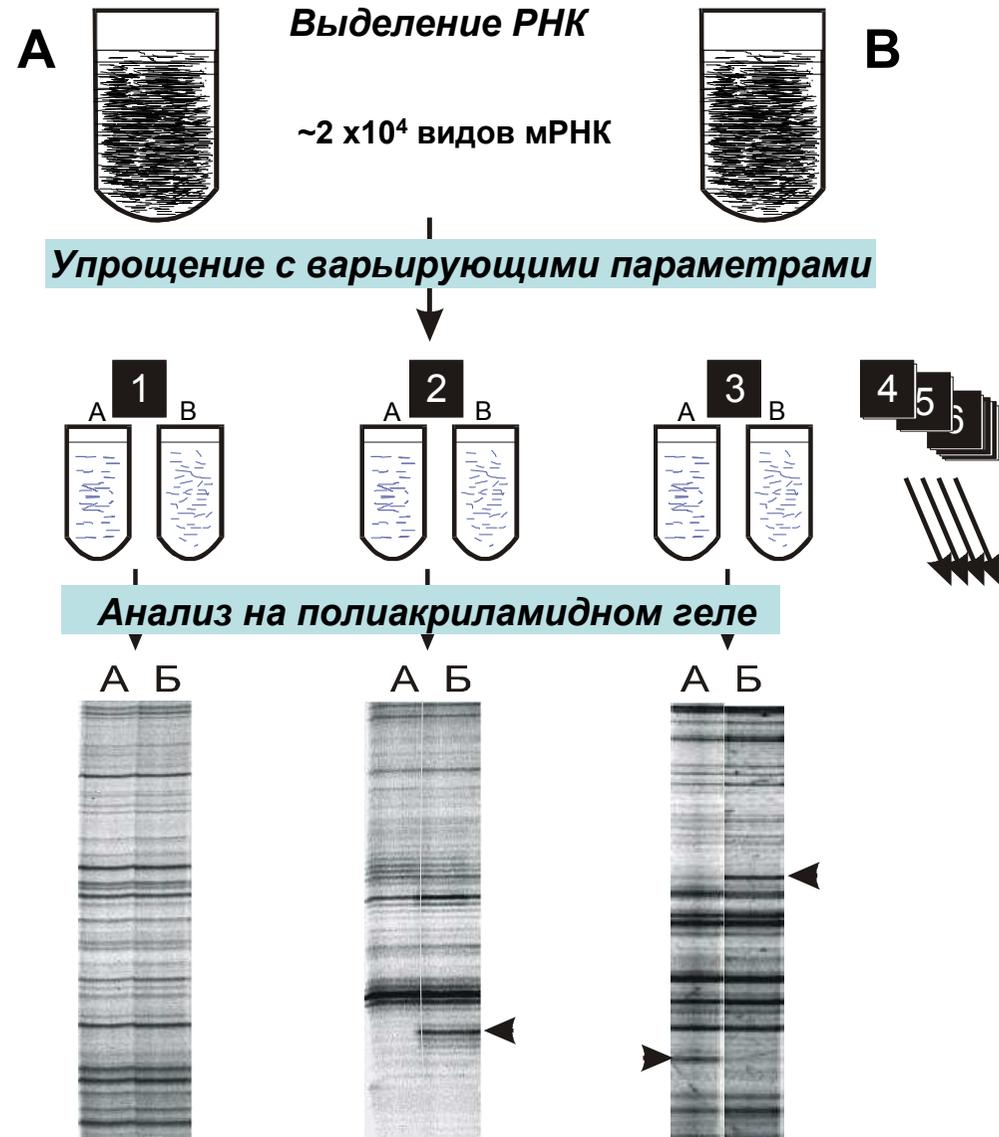


Дифференциальный дисплей

Стратегия дифференциального дисплея



Раковая трансформация



Классический дифференциальный дисплей

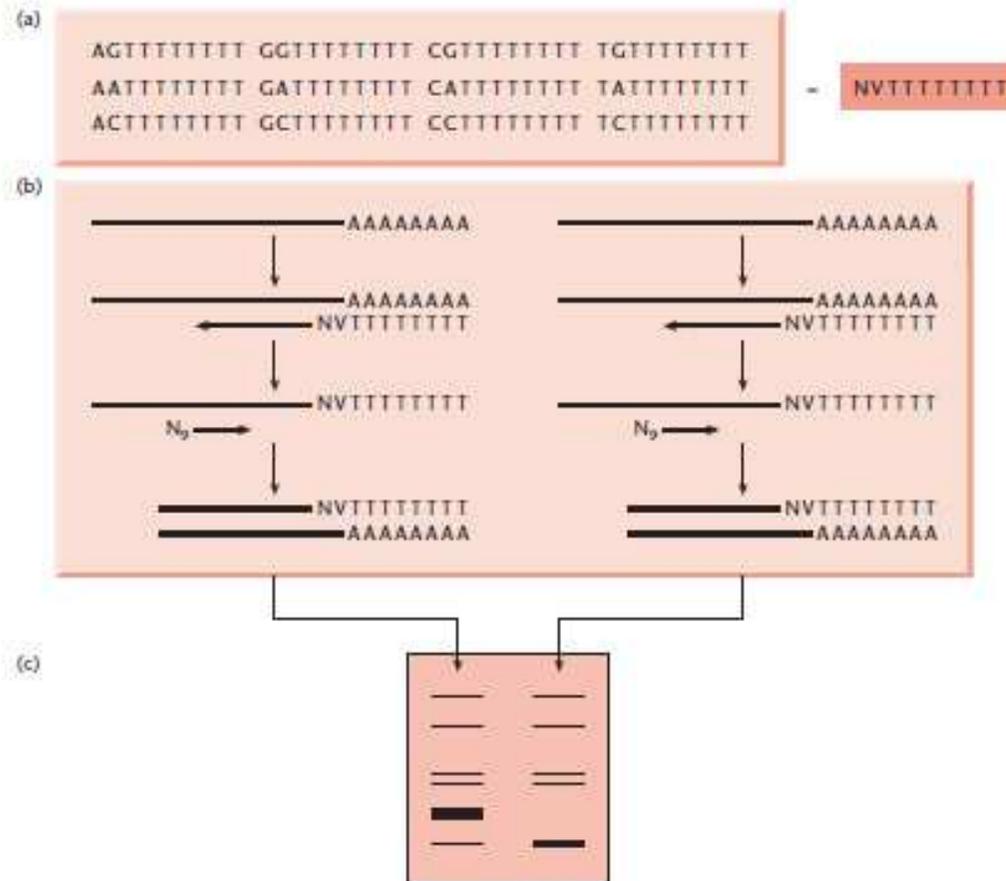
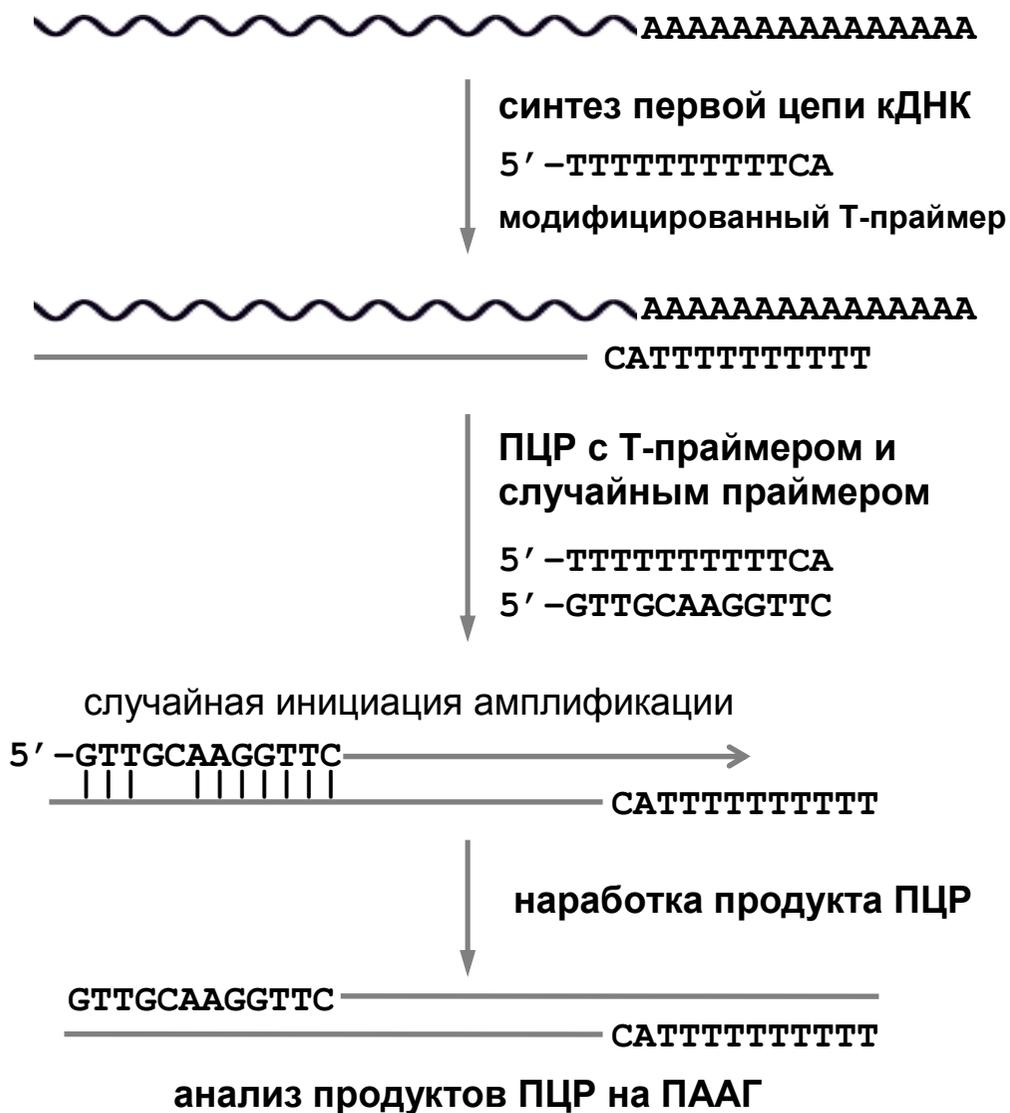
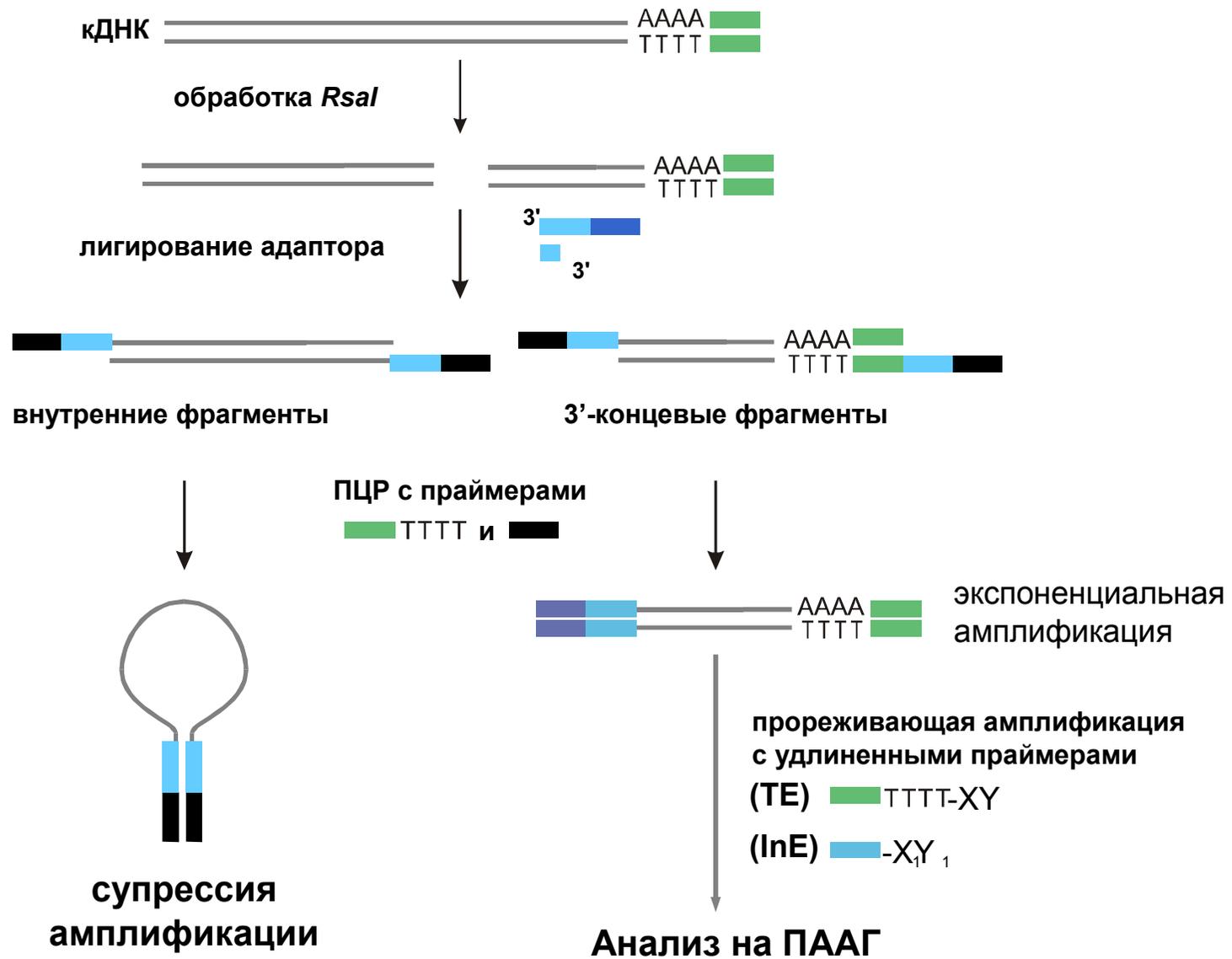


Fig. 6.17 Summary of the differential mRNA display technique, after Liang and Pardee (1992). (a) A set of 12 oligo(dT) primers is synthesized, each with a different two-base extension; the generic designation for this primer set is NVTTTTTTTT, where N is any nucleotide and V is any nucleotide except T. (b) Messenger RNA from two sources is then converted into cDNA using these primers, generating 12 non-overlapping pools of first strand cDNA molecules for each source. The PCR is then carried out using the appropriate oligo(dT) primer and a set of arbitrary 9-mers (N_9), which may anneal anywhere within the cDNA sequence. This facilitates the amplification of pools of cDNA fragments, essentially the same as expressed sequence tags (ESTs). (c) Pools of PCR products, derived from alternative mRNA sources but amplified with the same pair of primers, are then compared side by side on a sequencing gel. Bands present in one lane but absent from the other are likely to represent differentially-expressed genes. The corresponding bands can be excised from the sequencing gel and the PCR products subcloned, allowing sequence annotation and expression analysis, e.g. by northern blot or *in situ* hybridization, to confirm differential expression.

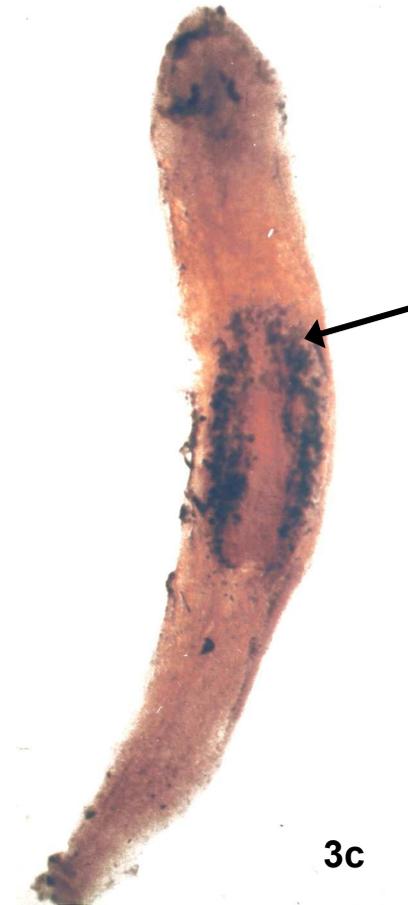
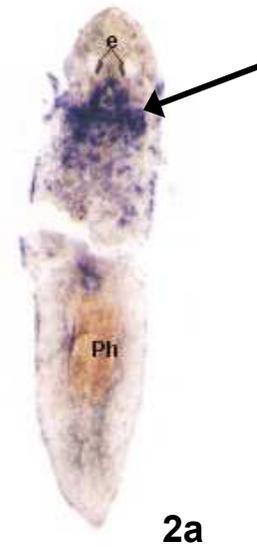
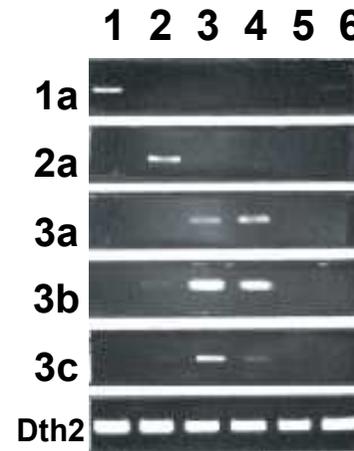
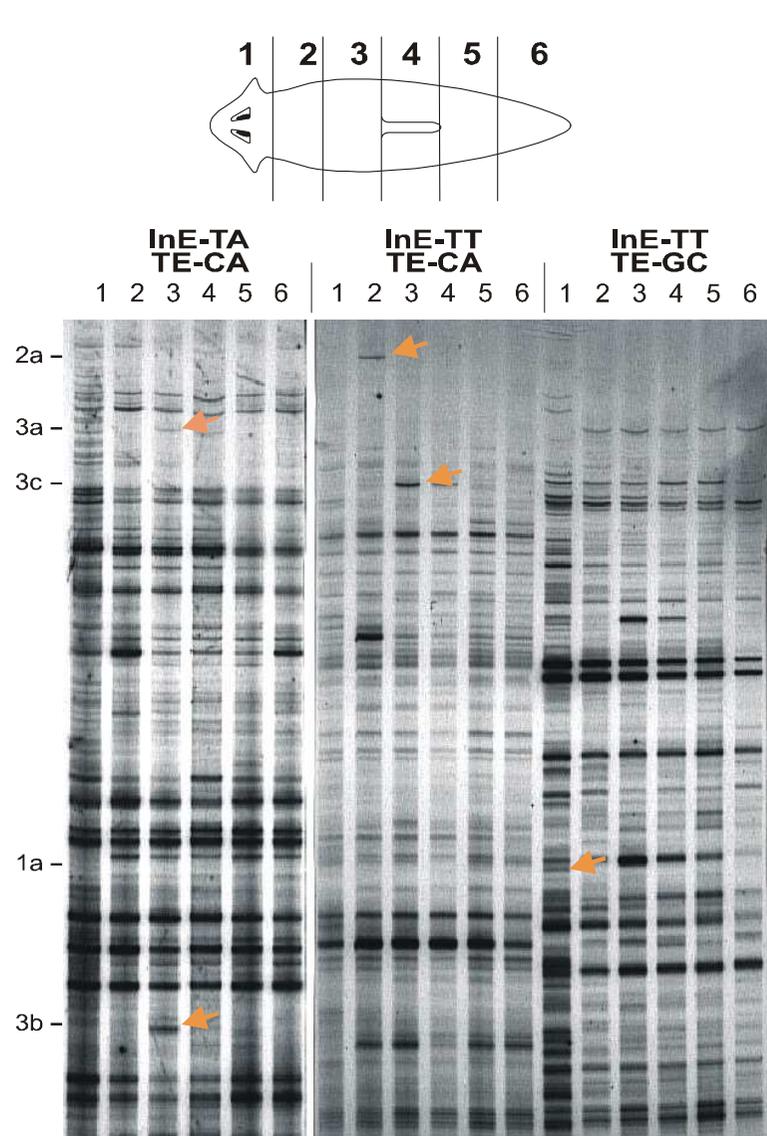
Классический дифференциальный дисплей



Упорядоченный дифференциальный дисплей (УДД)



Использование УДД для поиска маркеров различных регионов тела планарии



2a

3c