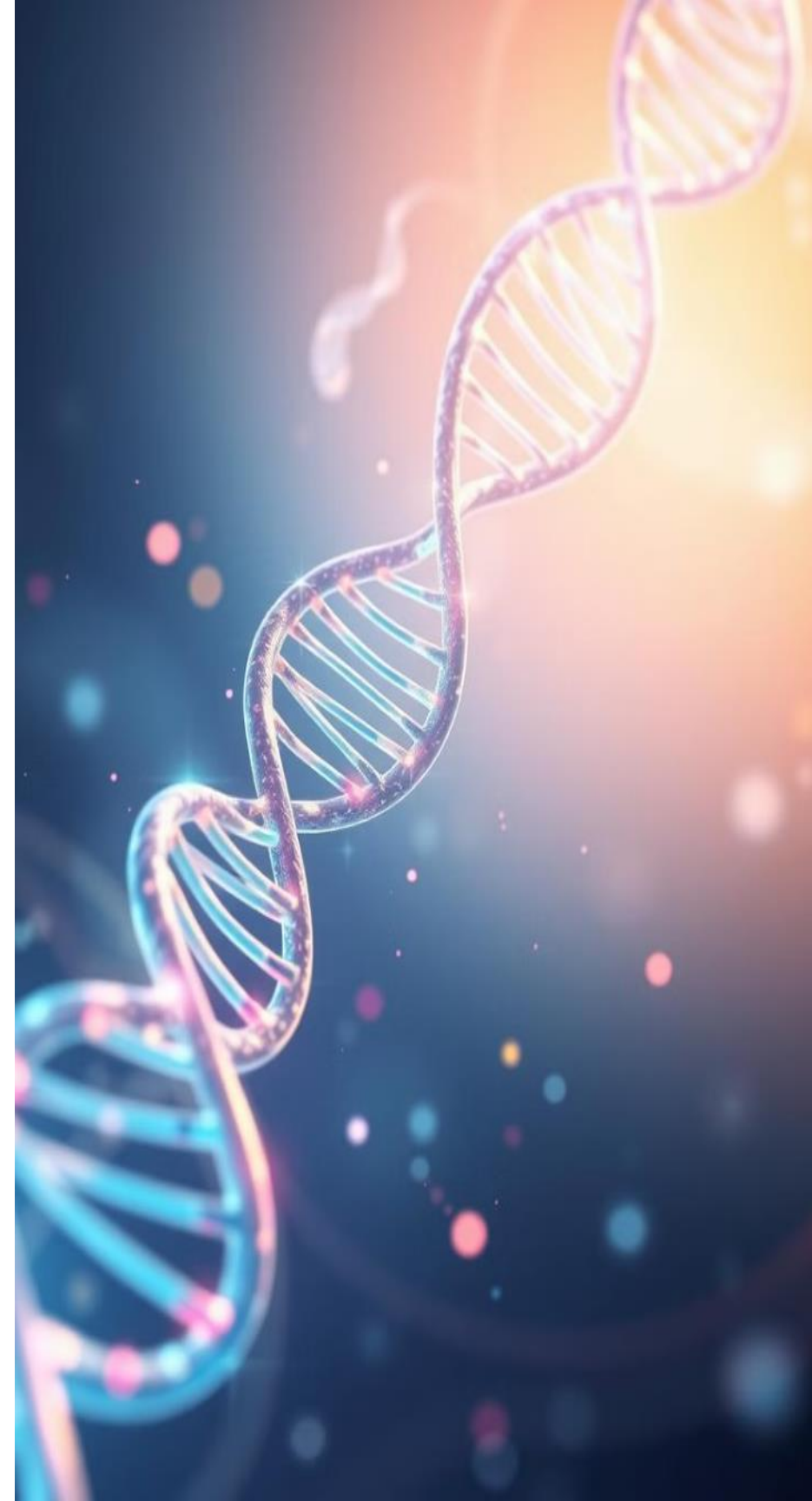


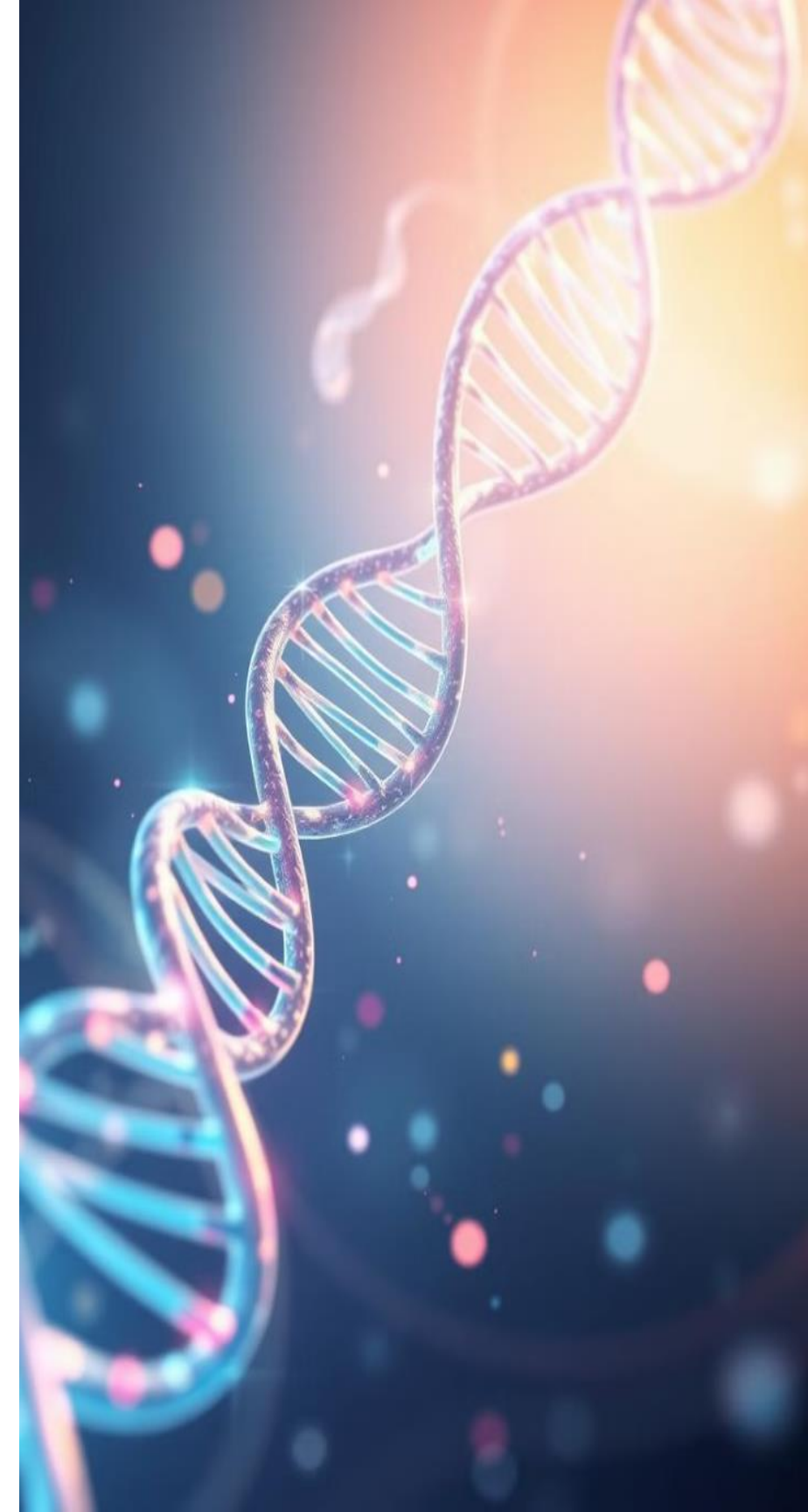
Картування геному Рестрикційний аналіз Блотинг та гібридизація нуклеїнових кислот

Проф. Весніна Л.Е.



Картування геному — процес визначення розташування генів і інших генетичних маркерів на хромосомах

- є ключовим інструментом для розуміння організації та функції геному, вивчення спадкових захворювань та розробки нових методів лікування
- Картування геному є багатогранною галуззю, яка охоплює методи та підходи, що дозволяють досліджувати складний генетичний код живих організмів



Методи картування геному

1 Генетичне картування

- метод використовує частоту рекомбінації між генами для визначення відстані між ними. Чим частіше відбувається рекомбінація, тим далі знаходяться гени. Для цього дослідники вивчають спадкування генетичних маркерів у нащадків.

3 Комбіноване картування

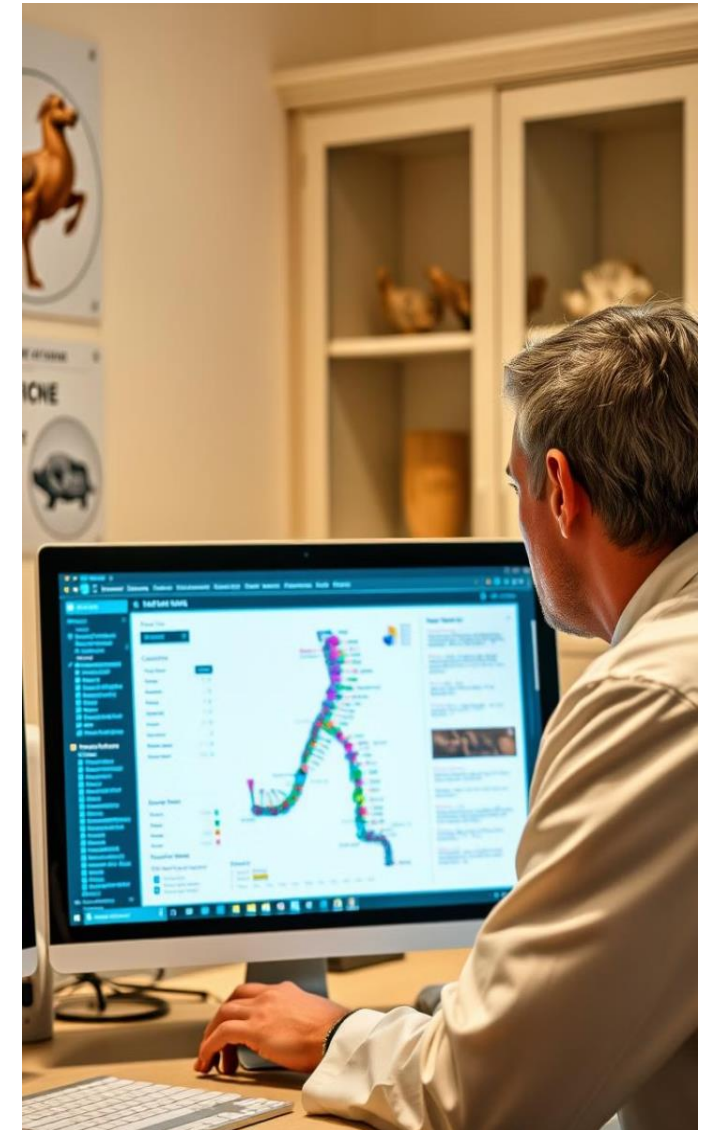
- метод поєднує генетичні та фізичні підходи для отримання більш точної карти геному. Це дозволяє з'єднати генетичні карти з фізичними картами, що покращує розуміння організації геному.

2 Фізичне картування

- метод полягає в безпосередньому визначенні фізичної відстані між генами, використовуючи різні технології, такі як клонування, секвенування ДНК та хромосомне мікромасиво.

4 Секвенування наступного покоління (NGS)

- потужний метод дозволяє швидко і точно секвенувати великі обсяги ДНК, що значно спрощує та прискорює процес картування геному.



Класифікація методів картування геному

Генетичні Карти

Генетичні карти показують відносне розташування генів на хромосомах, вимірюючи частоту рекомбінації між ними. Цей метод використовує частоту перехрестів, яка залежить від відстані між генами.

Фізичні Карти

Фізичні карти показують точне розташування генів і інших генетичних маркерів на хромосомах, вимірюючи фактичну відстань між ними в кількості пар основ.



Генетичні карти

Генетичні карти відображають відносне розташування генів на хромосомах, визначаючи їх спадкування. Їх основою є частота рекомбінації між генами. Чим частіше відбувається рекомбінація, тим далі знаходяться гени один від одного. Це дозволяє дослідникам встановити порядок генів на хромосомах та оцінити їх відстань.

Перевага

Відносно недорогий метод

Дозволяє вивчати великі ділянки геному

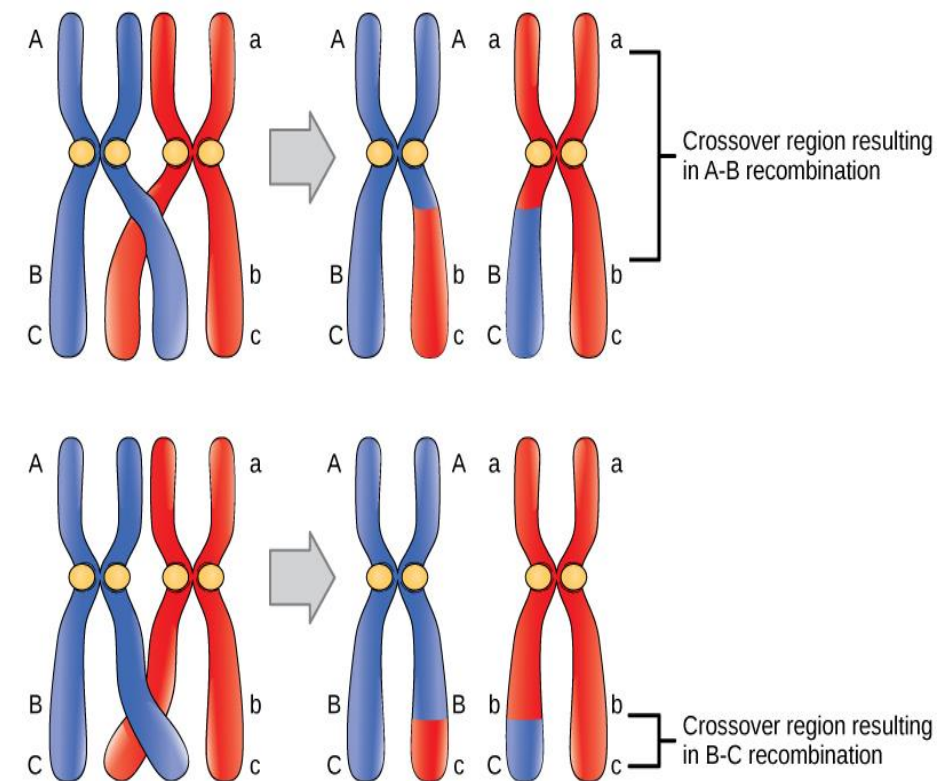
Може бути використаний для вивчення спадкових захворювань

Недоліки

Низька роздільна здатність

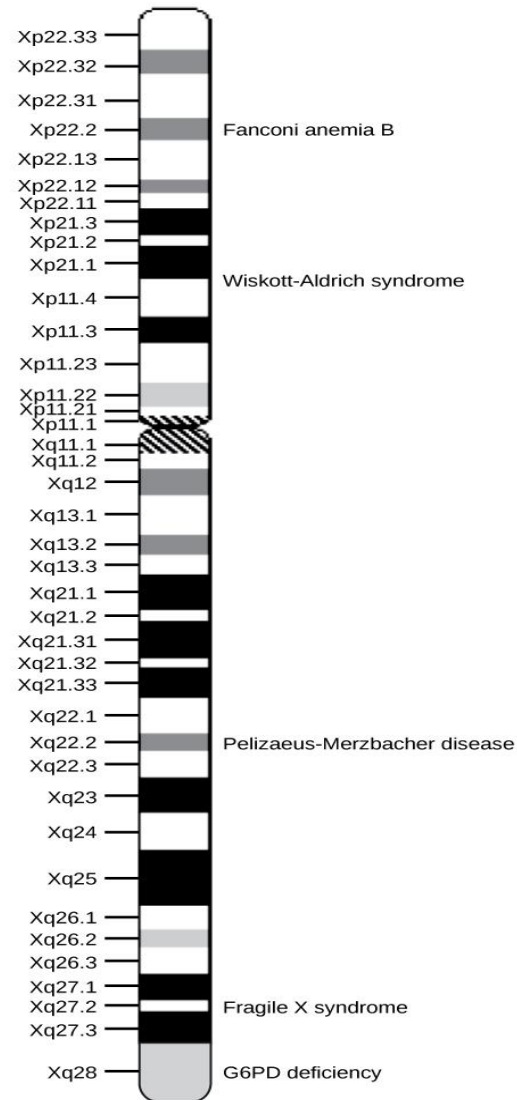
Не дає точного уявлення про фізичну відстань між генами

Не дозволяє ідентифікувати гени, які не рекомбінують



Фізичні карти

Фізичні карти надають точне уявлення про фізичну відстань між генами та іншими генетичними маркерами. Вони будуються за допомогою різних методів, таких як клонування, секвенування ДНК та хромосомне мікромасиво, гібридизація *in situ*. Ці методи дозволяють дослідникам визначити точне розташування генів на хромосомах, а також виявити структуру ДНК, такі як повтори та інверсії.



Клонування

Цей метод передбачає створення копій фрагментів ДНК та їх аналіз для визначення розташування генів.

Секвенування ДНК

Цей метод дозволяє визначити послідовність нуклеотидів у фрагментах ДНК та встановити їх розташування на хромосомах.

Хромосомне мікромасиво

Цей метод дозволяє вивчати тисячі ДНК-маркерів одночасно, що дозволяє створити детальну картину геному.

Порівняння генетичних та фізичних карт

Генетична карта

Визначає відносне розташування генів на хромосомах на основі частоти рекомбінації.

- Вимірюється в сантиморганах (сМ)
- Низька роздільна здатність
- Не надає інформації про фізичну відстань

Фізична карта

Визначає точне розташування генів на хромосомах на основі фізичного аналізу ДНК.

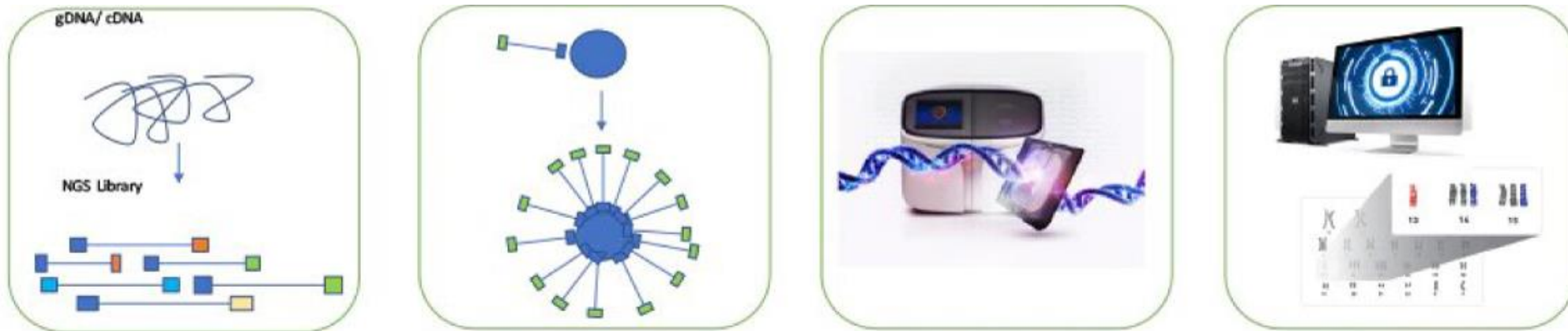
- Вимірюється в парах основ (bp)
- Висока роздільна здатність
- Надає інформацію про фізичну відстань

Порівняння генетичних та фізичних карт

Характеристика	Генетична карта	Фізична карта
Метод	Частота рекомбінації	Пряма візуалізація ДНК
Точність	Відносна	Абсолютна
Одиниці виміру	Сантиморгани (сМ)	Пари основ (п.о.)
Застосування	Визначення відносного розташування генів	Ідентифікація генів, визначення точної відстані між генами



СЕКВЕНУВАННЯ НОВОГО ПОКОЛІННЯ (NGS)



Крок 1. Створення бібліотек

Бібліотеки для секвенування створюються з ДНК (або кДНК) відповідних зразків, яка перетворюється на відносно короткі дволанцюгові фрагменти (100–800 п.н.).

Отримані фрагменти ДНК з'єднують із специфічними для технології послідовностями адаптерів, утворюючи бібліотеку фрагментів.

Ці адаптери мають унікальний молекулярний «штрих-код», тому кожен зразок може бути позначений унікальною послідовністю ДНК. Це дозволяє одночасно змішувати та секвенувати декілька зразків. Цей підхід, званий «мультиплексуванням», значно економить час і гроші під час проведення досліджень із використанням секвенування

СЕКВЕНУВАННЯ НОВОГО ПОКОЛІННЯ (NGS)

Крок 2. Клональна ампліфікація

Перед секвенуванням бібліотеку ДНК необхідно прикріпити до твердої поверхні і ампліфікувати клонально, щоб збільшити сигнал, який повинен бути виявлений від кожної мішені під час секвенування. При цьому кожна унікальна молекула ДНК у бібліотеці зв'язується з поверхнею кульки або проточного осередку та ампліфікується за допомогою ПЛР для створення набору ідентичних клонів.

Крок 3. Секвенування

Далі створені бібліотеки ДНК секвенуються під час використання геномних секвенаторів. Хоча кожна технологія NGS унікальна, більшість із них використовують «секвенування шляхом синтезу», зчитуючи окремі підстави в міру їхнього додавання вздовж полімеризованого ланцюга. Це цикл із загальними етапами: синтез основи ДНК на одноланцюговій ДНК з подальшим виявленням вбудованої основи та подальшим видаленням реагентів для перезапуску циклу. На кожному з циклів прилад фіксує наявність (літера приєдналася) або відсутність (не приєдналася) зміни рН, знаючи який із чотирьох нуклеотидів був у складі реагентів на цьому циклі.

Крок 4. Аналіз даних

Кожен етап NGS генерує великі обсяги складних даних, що складаються з коротких зчитувань ДНК. Незалежно від наявності власних алгоритмів та інструментів аналізу даних, технологічні платформи використовують схожі «конвеєри» аналізу та використовують загальні метрики для оцінки якості наборів даних NGS



Переваги та недоліки різних методів картування

1

Генетичне картування

Відносно недороге, дозволяє вивчати великі ділянки геному, але низька роздільна здатність, не надає інформації про фізичну відстань, не дозволяє ідентифікувати гени, які не рекомбінують.

2

Фізичне картування

Висока роздільна здатність, надає точне уявлення про фізичну відстань між генами, але дорожче, складніше у виконанні, може бути незручним для дослідження великих ділянок геному.

3

Секвенування нового покоління (NGS)

Швидке, точне, дозволяє секвенувати великі обсяги ДНК, але висока вартість, вимагає значних обчислювальних ресурсів, складне в аналізі даних.

Картування геному людини

Картування геному людини є надзвичайно складним завданням, яке вимагає величезних зусиль та ресурсів. Проект "Геном людини", запущений у 1990 році, мав на меті повністю секвенувати людський геном. Завершення цього проекту стало величезним досягненням, що відкрило нові можливості для вивчення генетики людини та розробки нових методів лікування

1

Секвенування

Перший етап картування геному людини включав секвенування мільйонів фрагментів ДНК, що утворюють геном

2

Складання

Після секвенування фрагменти ДНК збирали разом, формуючи повну послідовність геному

3

Анотація

На завершальному етапі дослідники ідентифікували гени, регуляторні елементи та інші генетичні елементи в послідовності геному



Застосування картування геному в медицині



1

Діагностика захворювань

Картування геному дозволяє ідентифікувати гені, пов'язані з різними захворюваннями, що допомагає у ранній діагностиці та розробці ефективних методів лікування

2

Розробка ліків

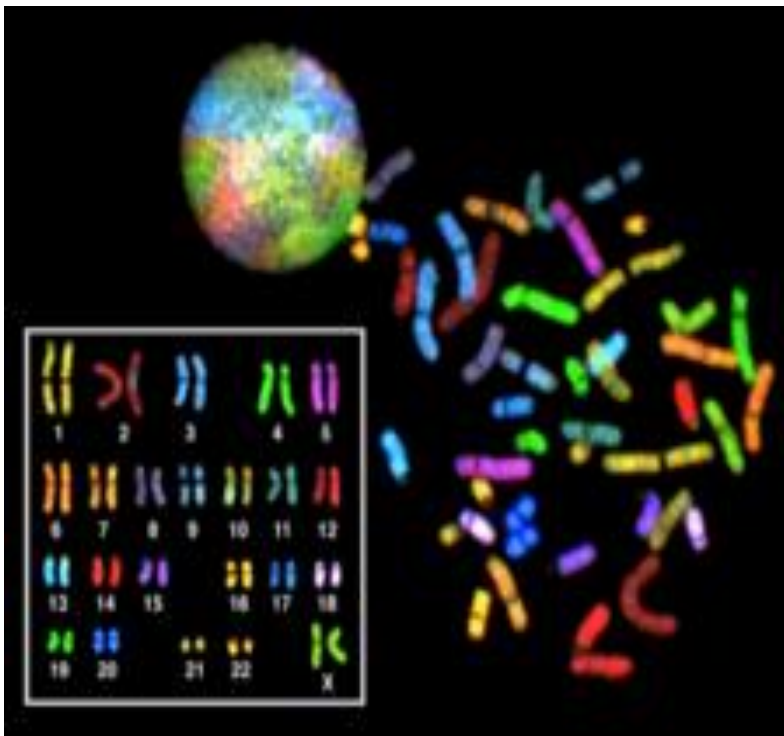
Розуміння функцій генів та їх взаємодій допомагає у розробці нових лікарських препаратів, які спрямовані на конкретні гени та мішені, пов'язані із захворюваннями

3

Персоналізована медицина

Картування генома дозволяє отримати інформацію про генетичну схильність до захворювань і розробити індивідуальні схеми лікування, враховуючи індивідуальні генетичні особливості пацієнта

Ідентифікація фрагментів ДНК і РНК методами гібридизації



1

Принцип гібридизації

Гібридизація - це процес об'єднання двох комплементарних одноланцюгових молекул нуклеїнових кислот (ДНК або РНК) в одну дволанцюгову молекулу.

2

ДНК-зонди

ДНК-зонди - короткі одноланцюгові молекули ДНК, які мають певну послідовність нуклеотидів. Вони використовують як інструменти для виявлення комплементарних послідовностей у ДНК або РНК.

3

Виявлення

Зонд з'єднується з комплементарною послідовністю в зразку ДНК або РНК, що дозволяє ідентифікувати цю послідовність

Рестрикційний Аналіз

1 Принцип

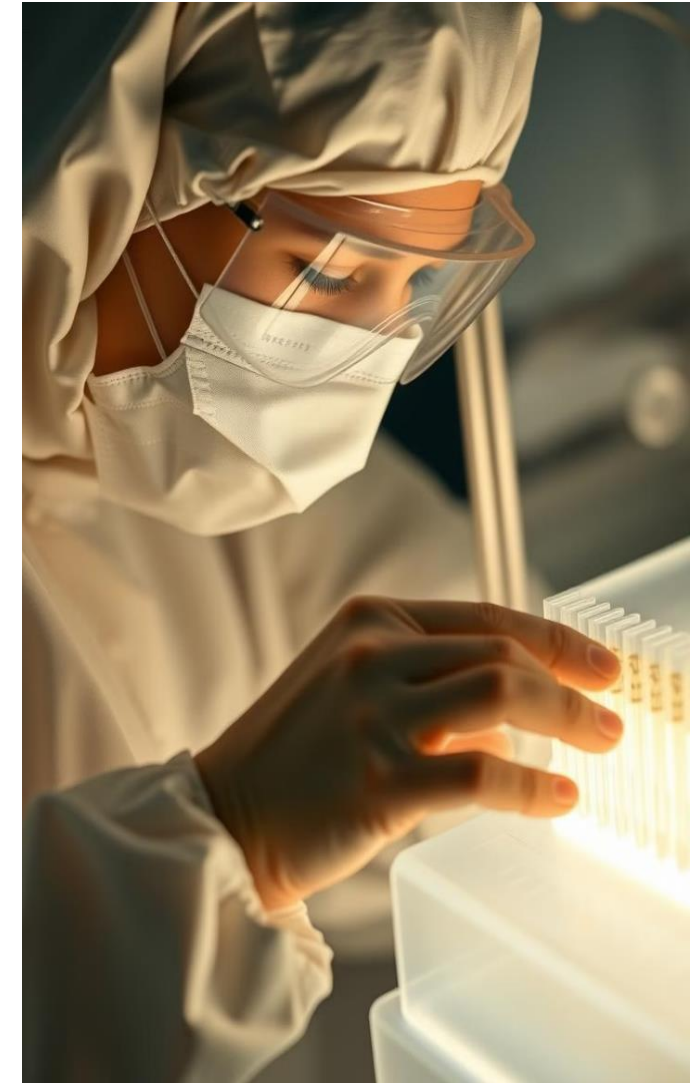
Рестрикційний аналіз - це метод, який дозволяє розрізати ДНК на фрагменти за допомогою ферментів, які називаються рестриктазами. Кожна рестриктаза розпізнає певну послідовність нуклеотидів, яка називається сайтом розпізнавання.

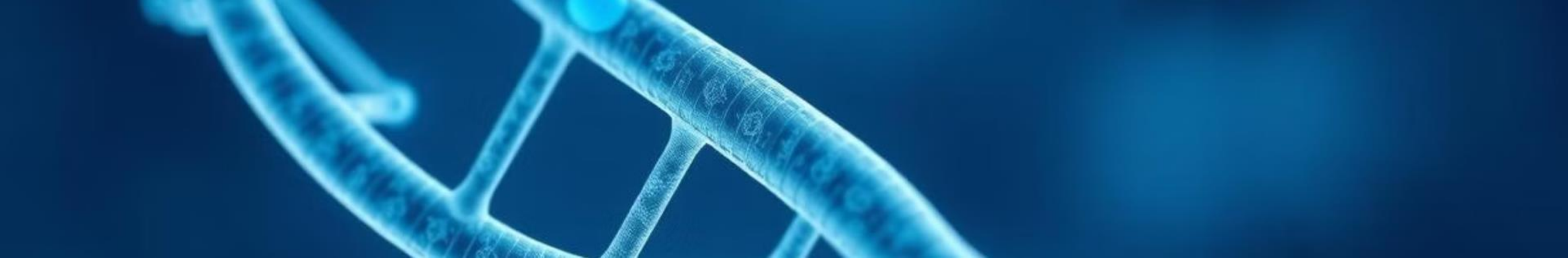
3 Результати

У результаті електрофорезу утворюється візерунок смуг, який відображає розміри фрагментів ДНК. Цей візерунок використовується для аналізу геному і для ідентифікації різних генетичних варіантів.

2 Методика

Рестрикційна ДНК розрізається рестриктазами, отримуючи фрагменти різної довжини. Отримані фрагменти потім відокремлюються за допомогою електрофорезу в агарозному гелі.





Вибір рестриктаз і інтерпретування результатів

Вибір рестриктаз

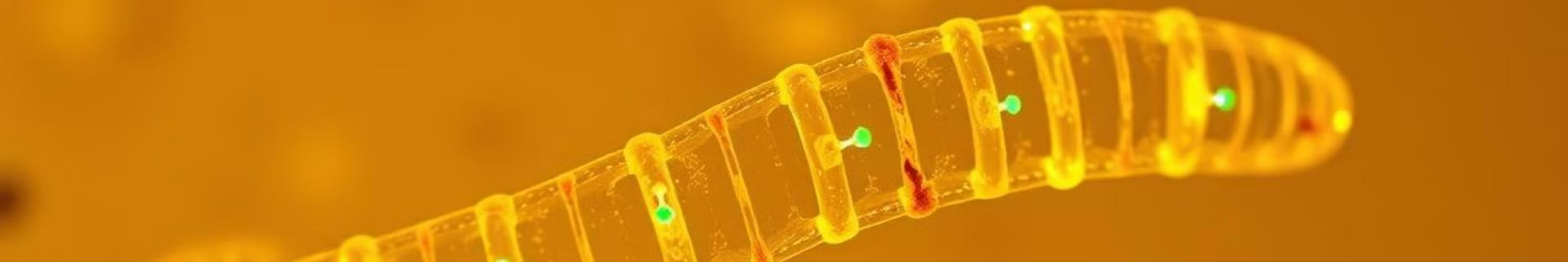
Вибір рестриктаз залежить від дослідницького завдання. Для отримання потрібних фрагментів ДНК потрібно вибрати ферменти, що розпізнають певні сайти розпізнавання

Аналіз результатів

Інтерпретація результатів рестрикційного аналізу полягає в аналізі візерунку смуг на гелі. Це дозволяє оцінити розміри фрагментів ДНК, виявити мутації або поліморфізми в геномі

Рестрикційні карти

За допомогою рестрикційного аналізу можна побудувати рестрикційні карти, які показують розташування сайтів розпізнавання рестриктаз на ДНК



Флуоресцентна гібридизація in situ (FISH)

Особливості ДНК-Зондів

ДНК-зонд для FISH містить флуоресцентну мітку, яка дозволяє візуалізувати гібридизацію під мікроскопом.

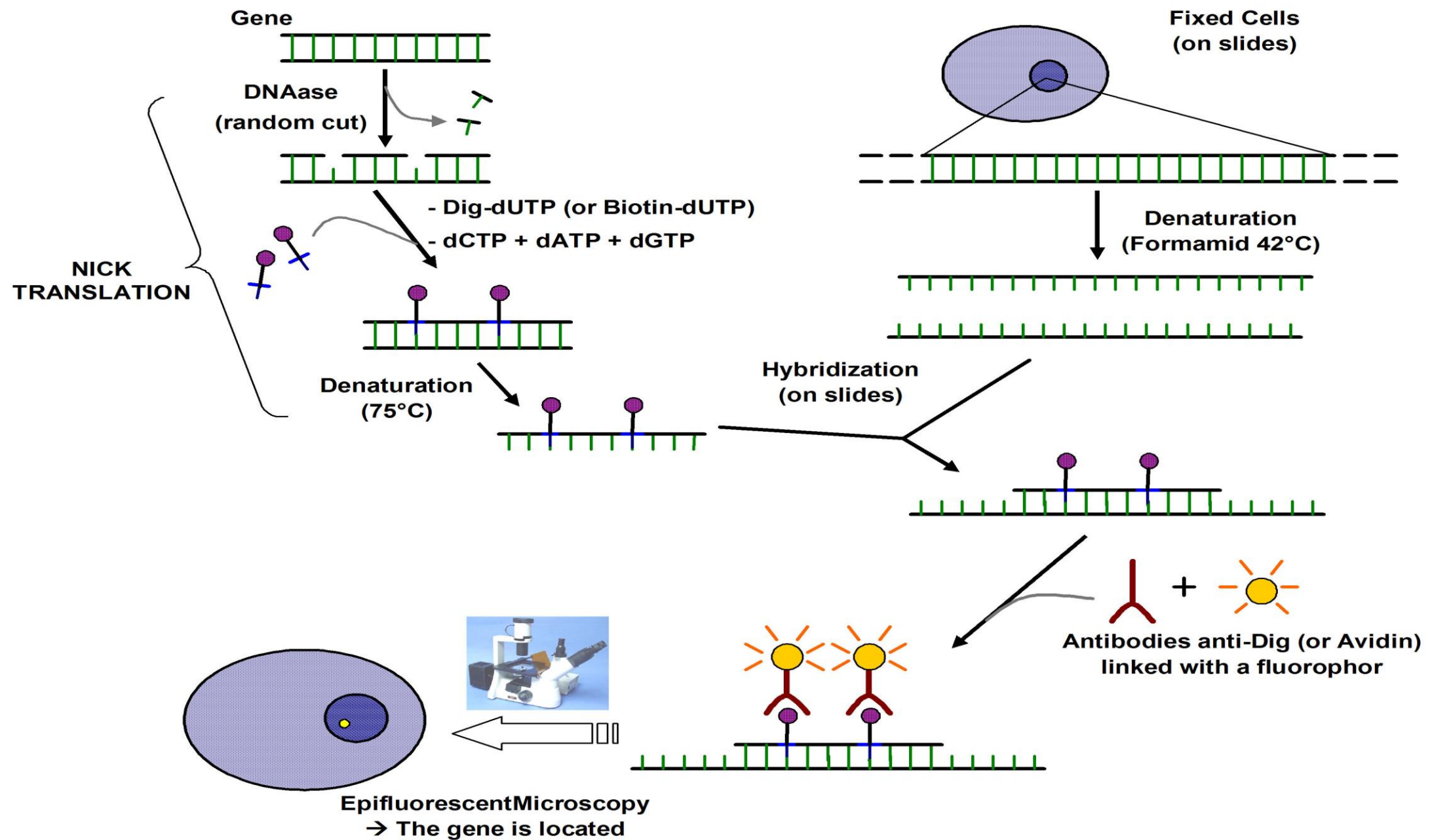
Процедура Гібридизації

FISH здійснюється шляхом гібридизації ДНК-зондів з хромосомами або іншими генетичними структурами в клітинах. Гібридизовані зонди виявляються під флуоресцентним мікроскопом.

Значення Методу

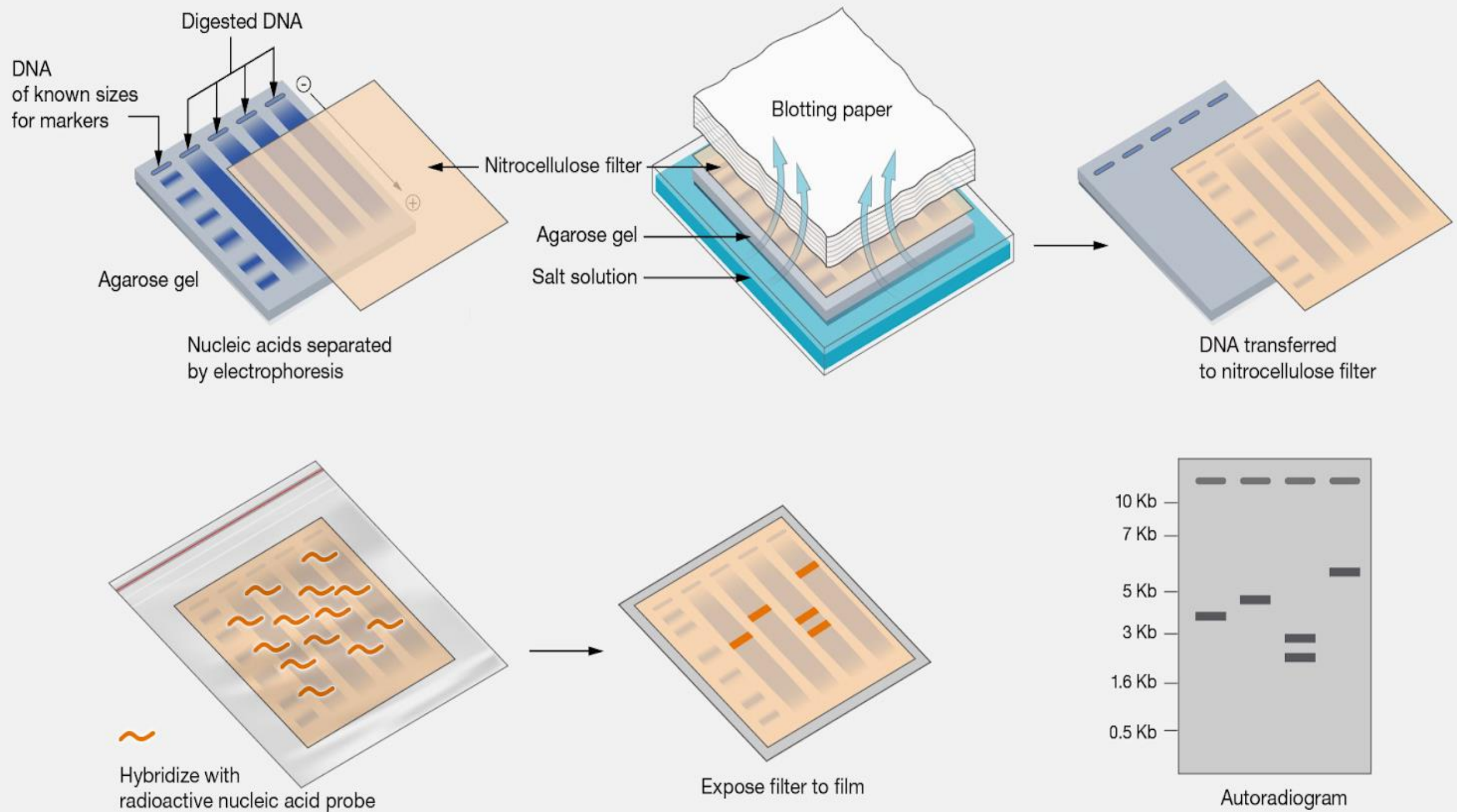
FISH дозволяє візуалізувати розташування специфічних генетичних послідовностей у клітинах. Це дозволяє визначати хромосомні аномалії, вивчати організацію генома та проводити діагностику генетичних захворювань.

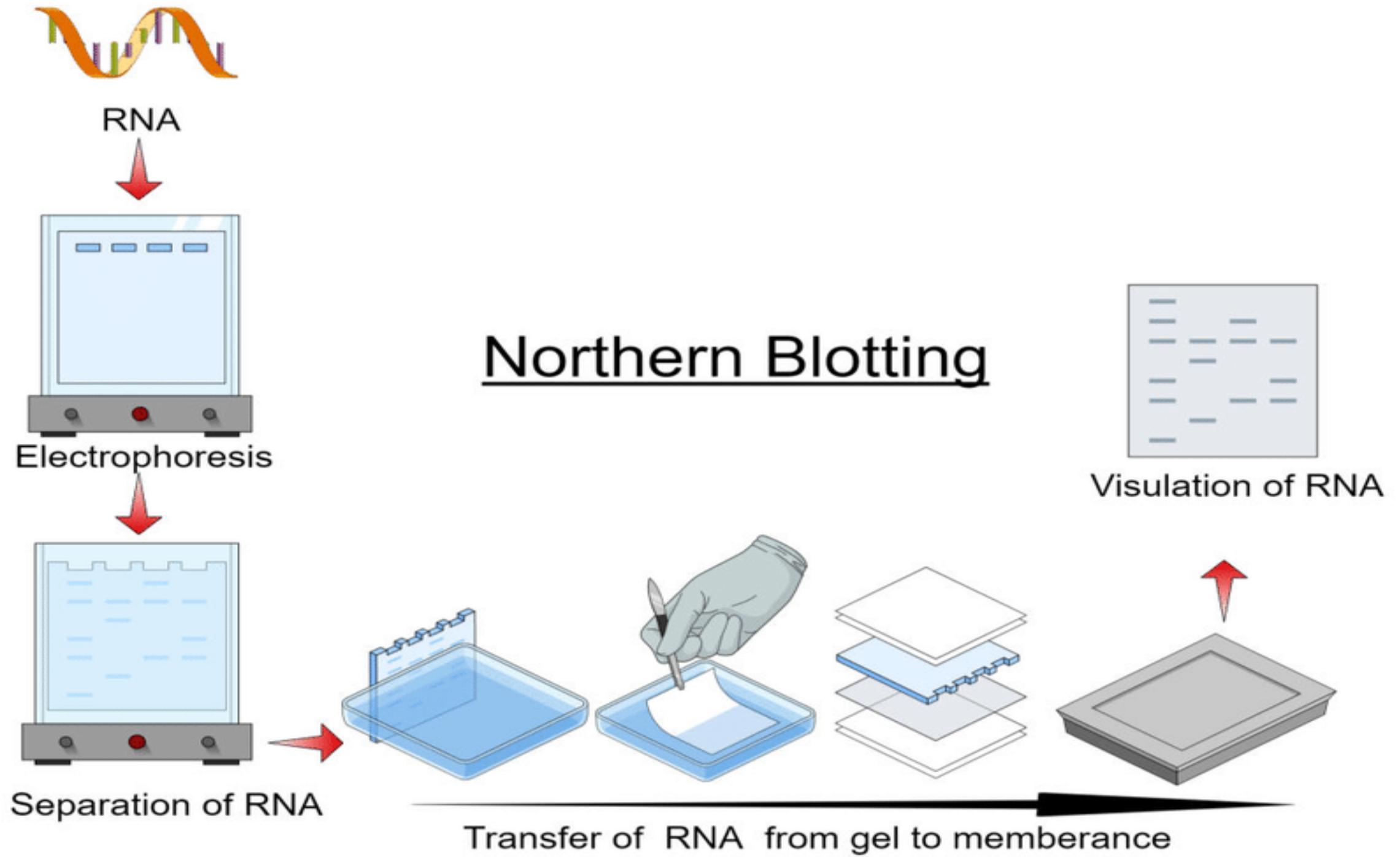
FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)

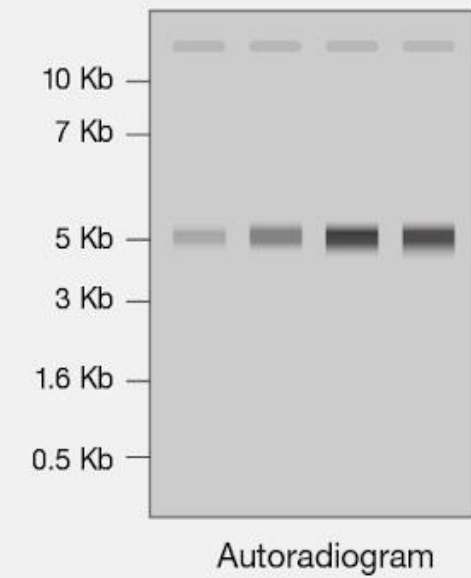
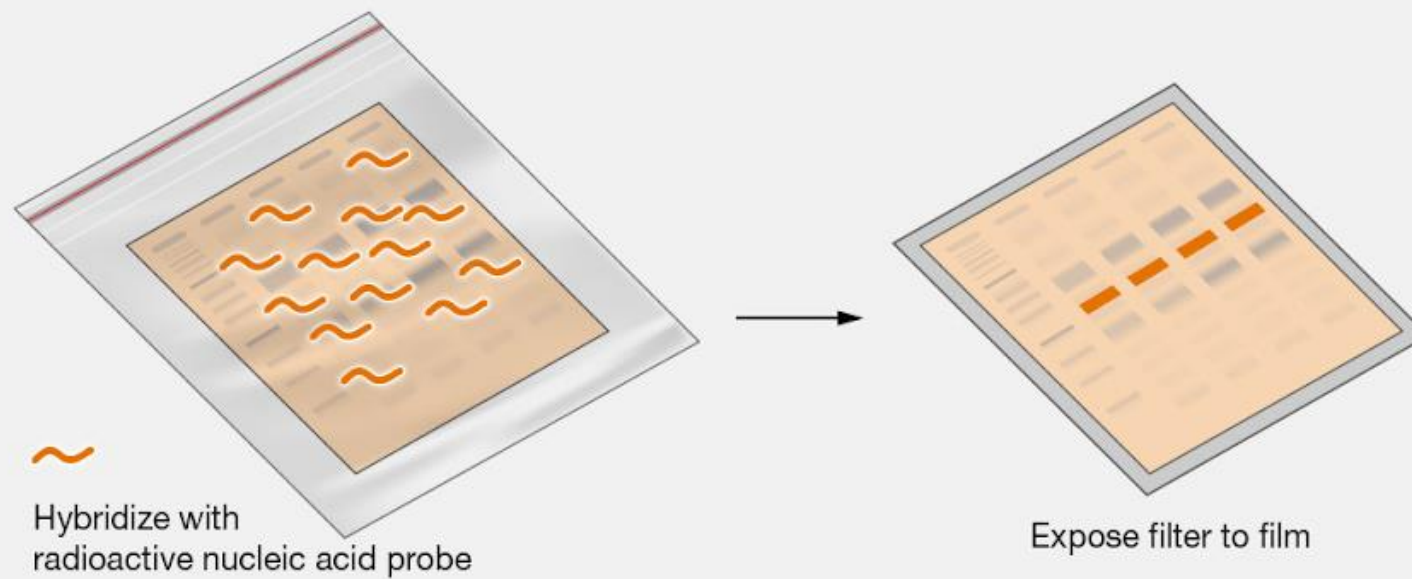
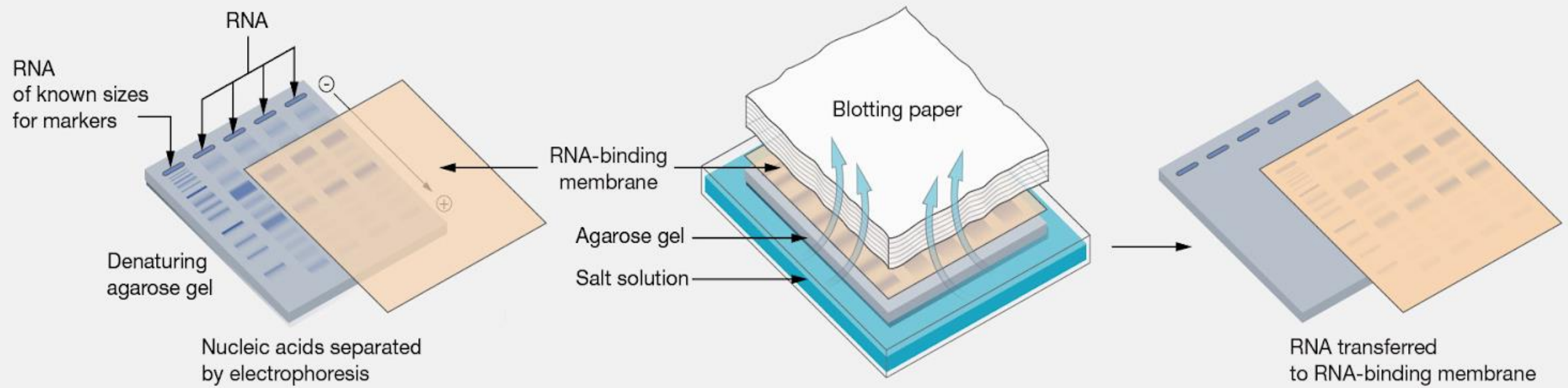


Саузерн-, Нозерн- та Вестерн-блотинг

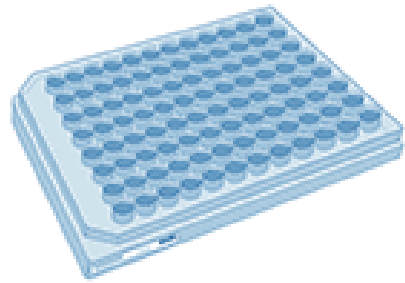
Метод	Об'єкт Дослідження	Застосування
Саузерн-блотинг	ДНК	Ідентифікація специфічних генів, аналіз поліморфізму ДНК, дослідження мутацій.
Нозерн-блотинг	РНК	Вивчення експресії генів, аналіз структури РНК, дослідження вірусів.
Вестерн-блотинг	Білки	Виявлення і кількісне визначення специфічних білків, дослідження білкових взаємодій, аналіз активності ферментів.





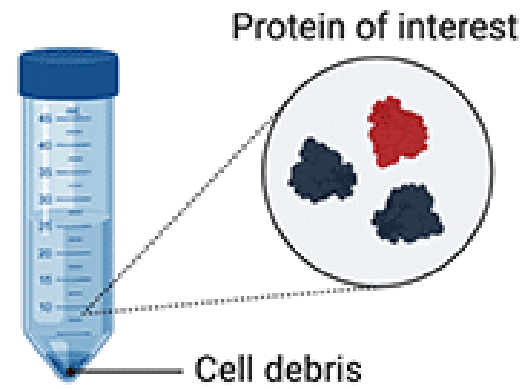


1 Cell collection

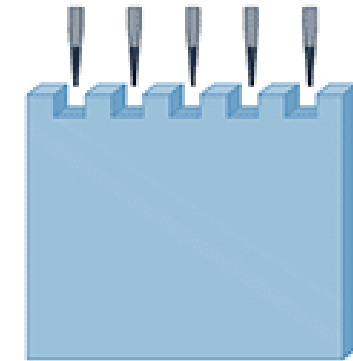


Lysis

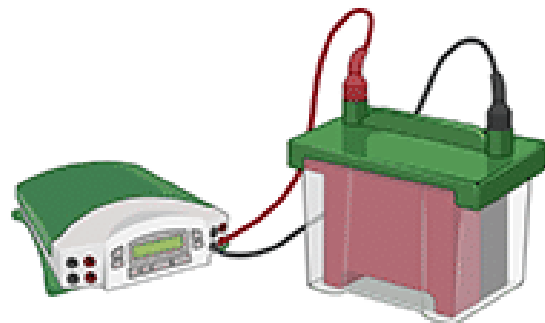
2 Cell lysis



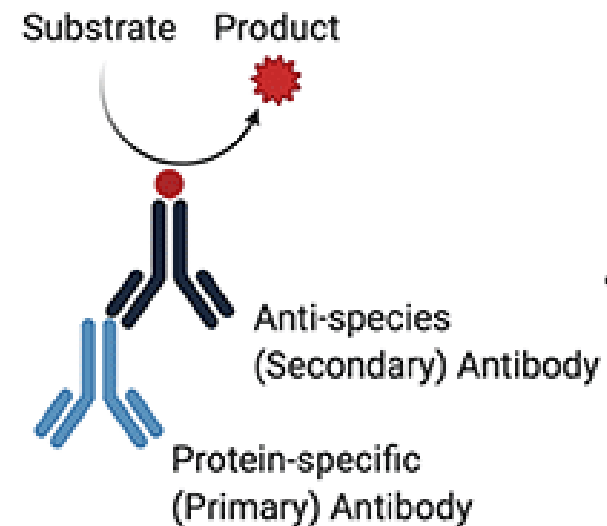
3 SDS-PAGE



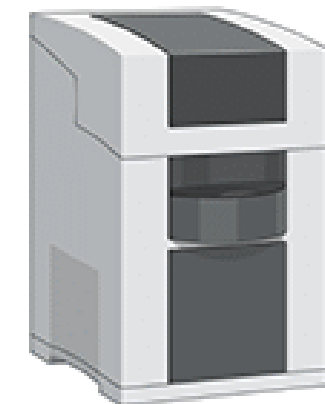
4 Electrotransfer



5 Antibody probing



6 Readout



Секвенування ChIP

(ChIP — імунопреципітація хроматину, **ChIP-seq**) — метод, який використовується для аналізу взаємодії білка з ДНК.

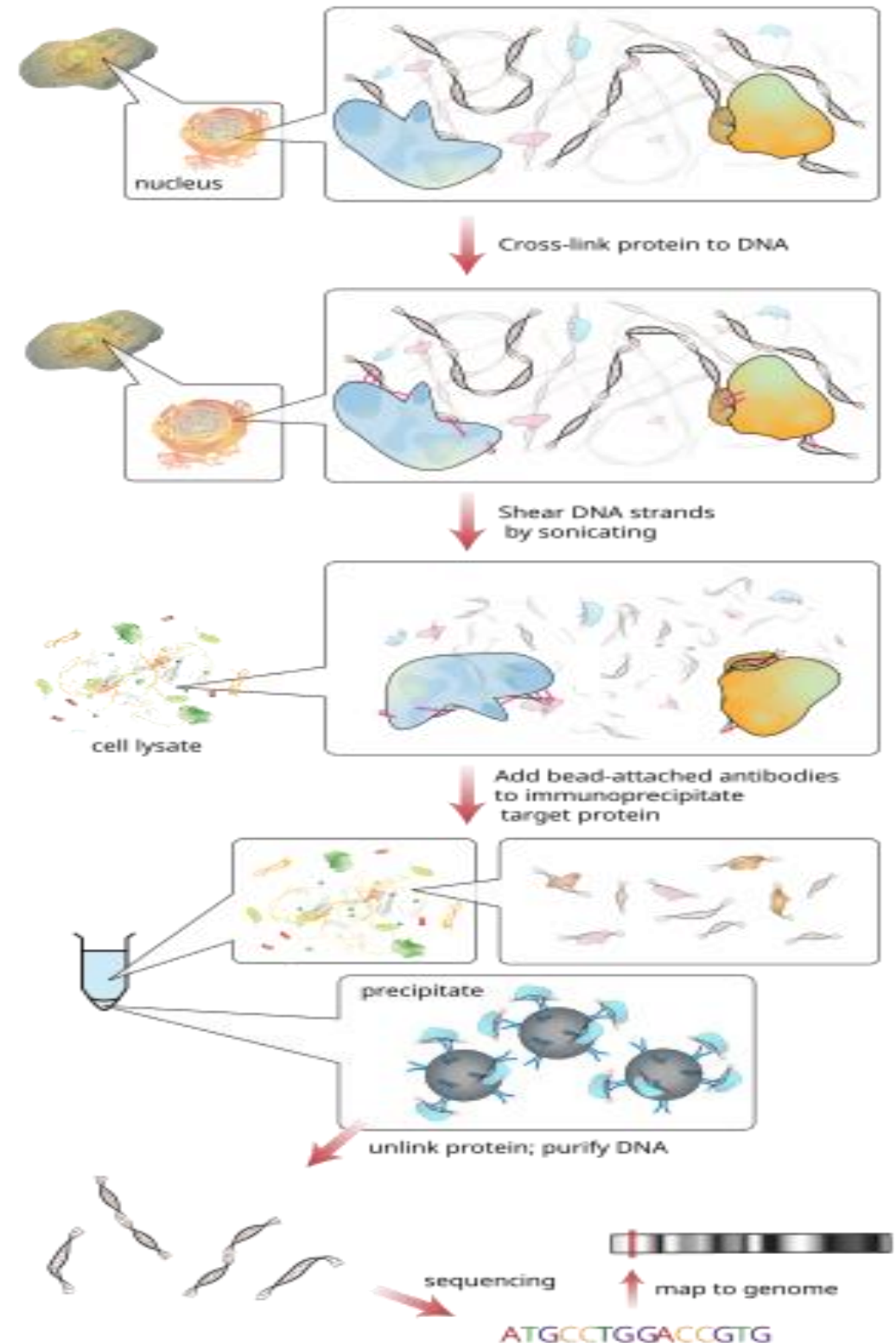
ChIP-seq поєднує імунопреципітацію хроматину (ChIP)

із масивним паралельним секвенуванням ДНК для ідентифікації сайтів зв'язування ДНК-асоційованих білків.

Його можна використовувати для точного відображення глобальних сайтів зв'язування будь-якого цікавого білка.

Раніше ChIP-on-chip був найпоширенішим методом,

який використовувався для вивчення цих зв'язків між білками та ДНК



Застосування методів картування геному та гібридизації



1

Генетичне картування

Генетичне картування використовується для визначення розташування генів та інших генетичних маркерів, що допомагає в дослідженні генетичних захворювань та селекції.

2

Фізичне картування

Фізичне картування застосовується для точного визначення позицій генів на хромосомах, що дозволяє розробляти методи діагностики та терапії генетичних хвороб.

3

Гібридизація

Методи гібридизації, такі як FISH, застосовуються для діагностики хромосомних аномалій, дослідження експресії генів, виявлення вірусних інфекцій та інших молекулярно-генетичних досліджень.

Дякую за увагу!