




Полимеразная цепная реакция с
возможностью детекции продукта в
реальном времени (RT-PCR).

Секвенирование по Сенгеру





Ключевые методы
молекулярной биологии.
Полимеразная цепная реакция

Велегжанинов И.О.

Полимеразная цепная реакция

Метод ферментативной наработки *in vitro* определённых, сравнительно коротких (до нескольких тысяч пар нуклеотидов), двуцепочечных фрагментов ДНК (Ребриков Д. В. и др., 2009).

В основе реакции лежит механизм репликации молекул ДНК ферментом ДНК-полимеразой.

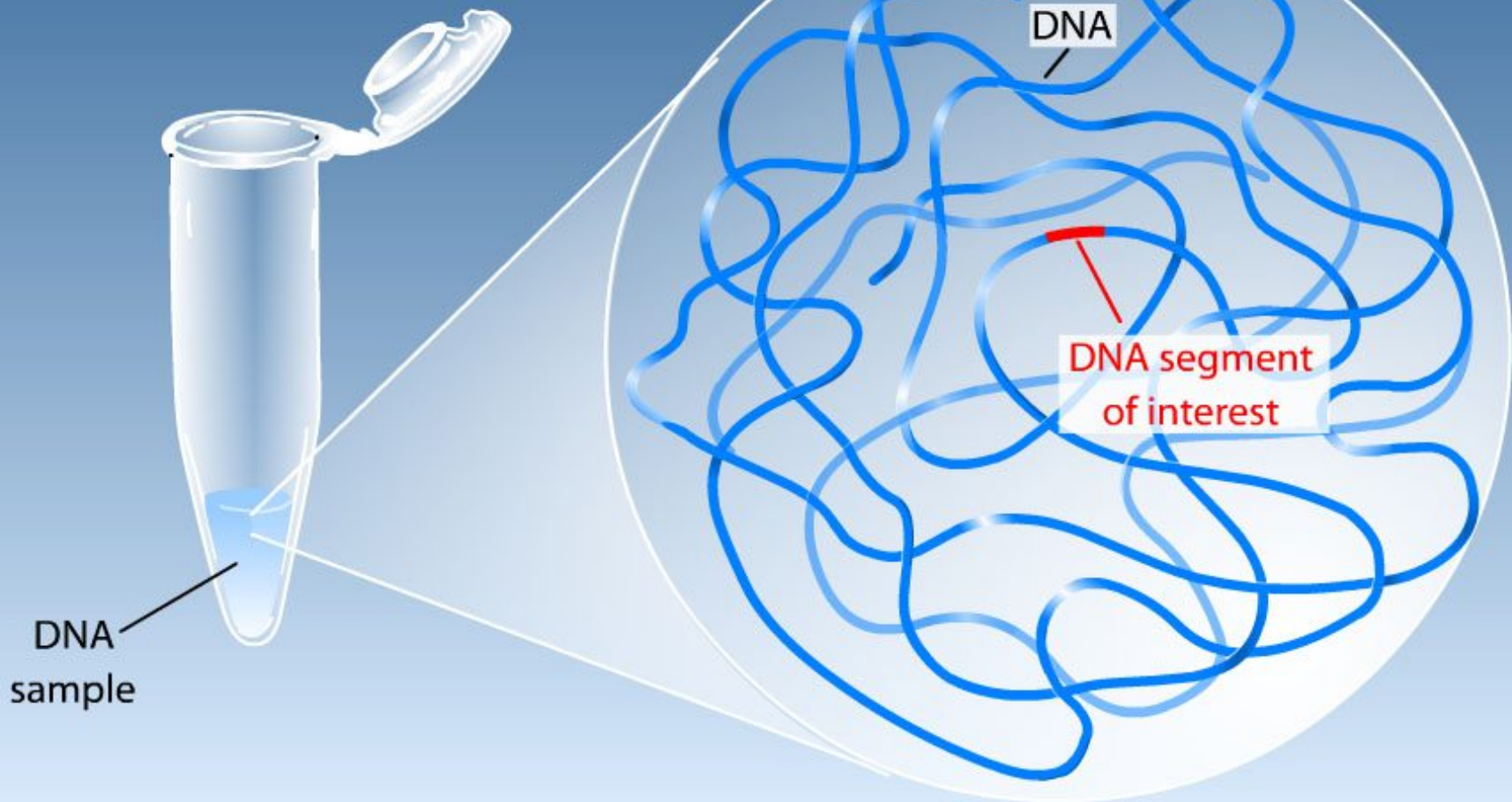
Изобретение ПЦР



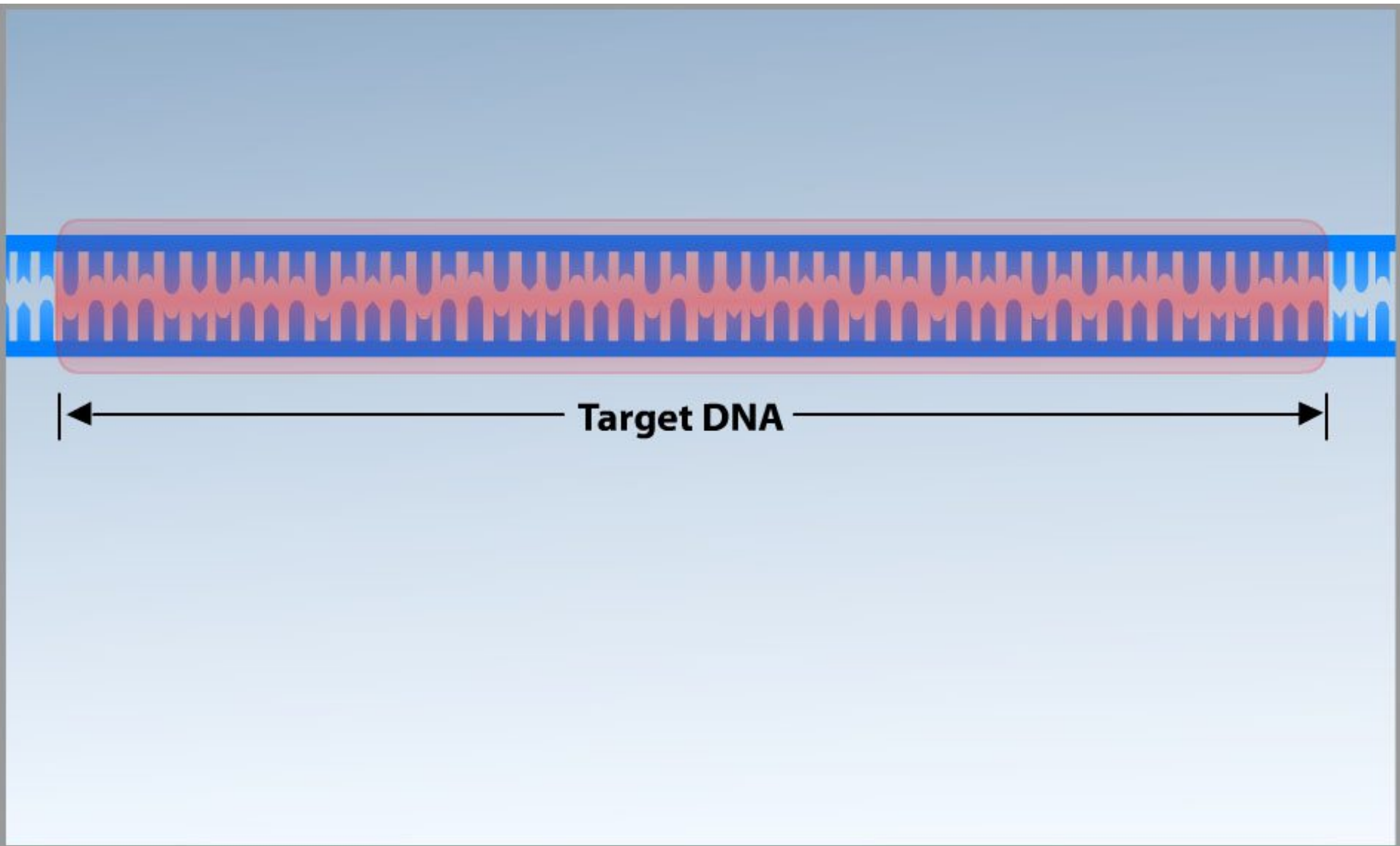
Kary Mullis, Лауреат
Нобелевской
премии 1993 г. по химии

В 1983 г. химик
компании Cetus, **Кэри
Маллис**, оптимизируя
метод олигомерной
рестрикции для
идентификации
точечных мутаций в
ДНК, придумал как
многократно
увеличить количество
копий определённого
участка ДНК.

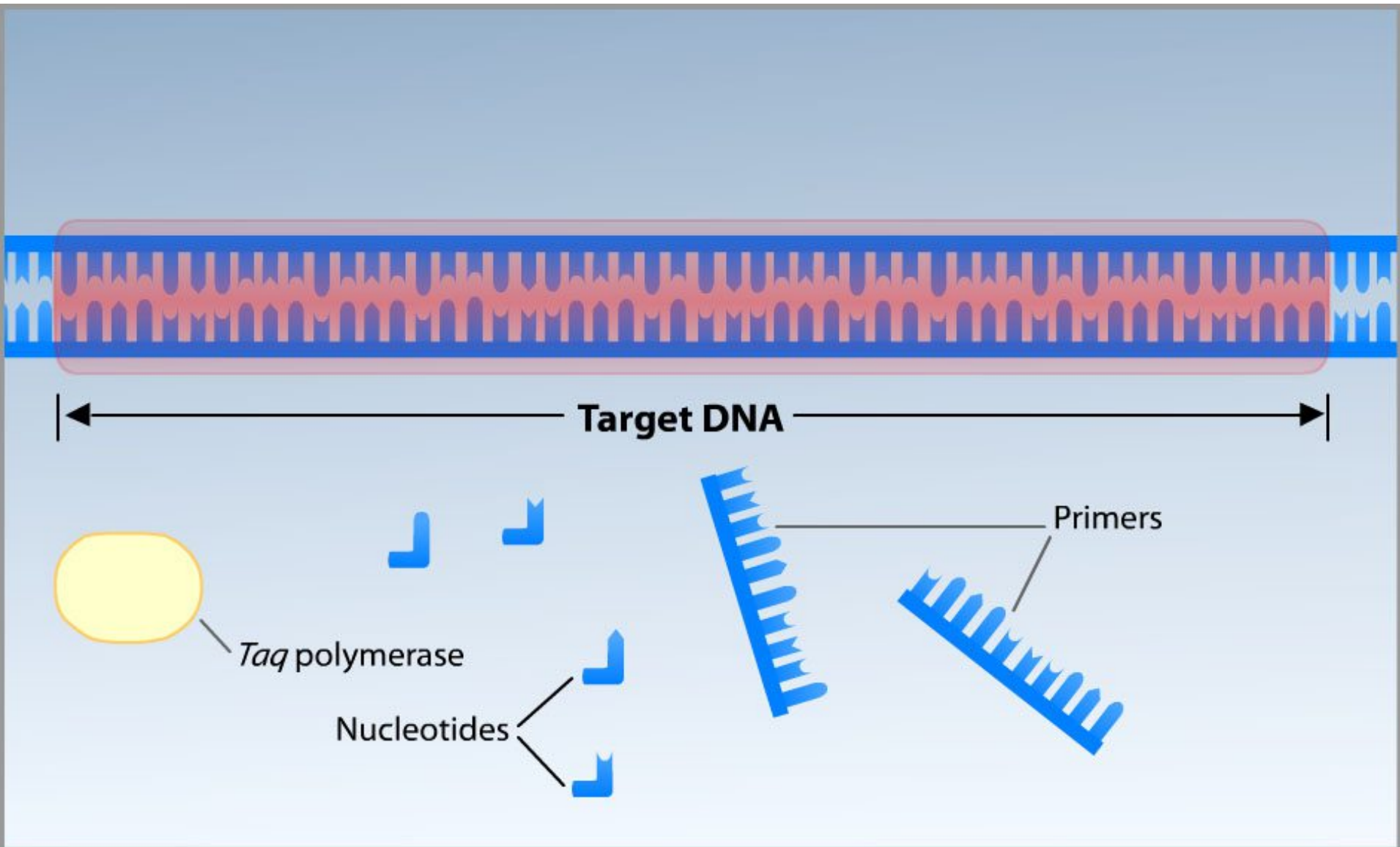
Polymerase Chain Reaction (PCR)



Кадр анимированной схемы, размещённой по адресу:
<http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/content/pcr.html>



Кадр анимированной схемы, размещённой по адресу:
<http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/content/pcr.html>

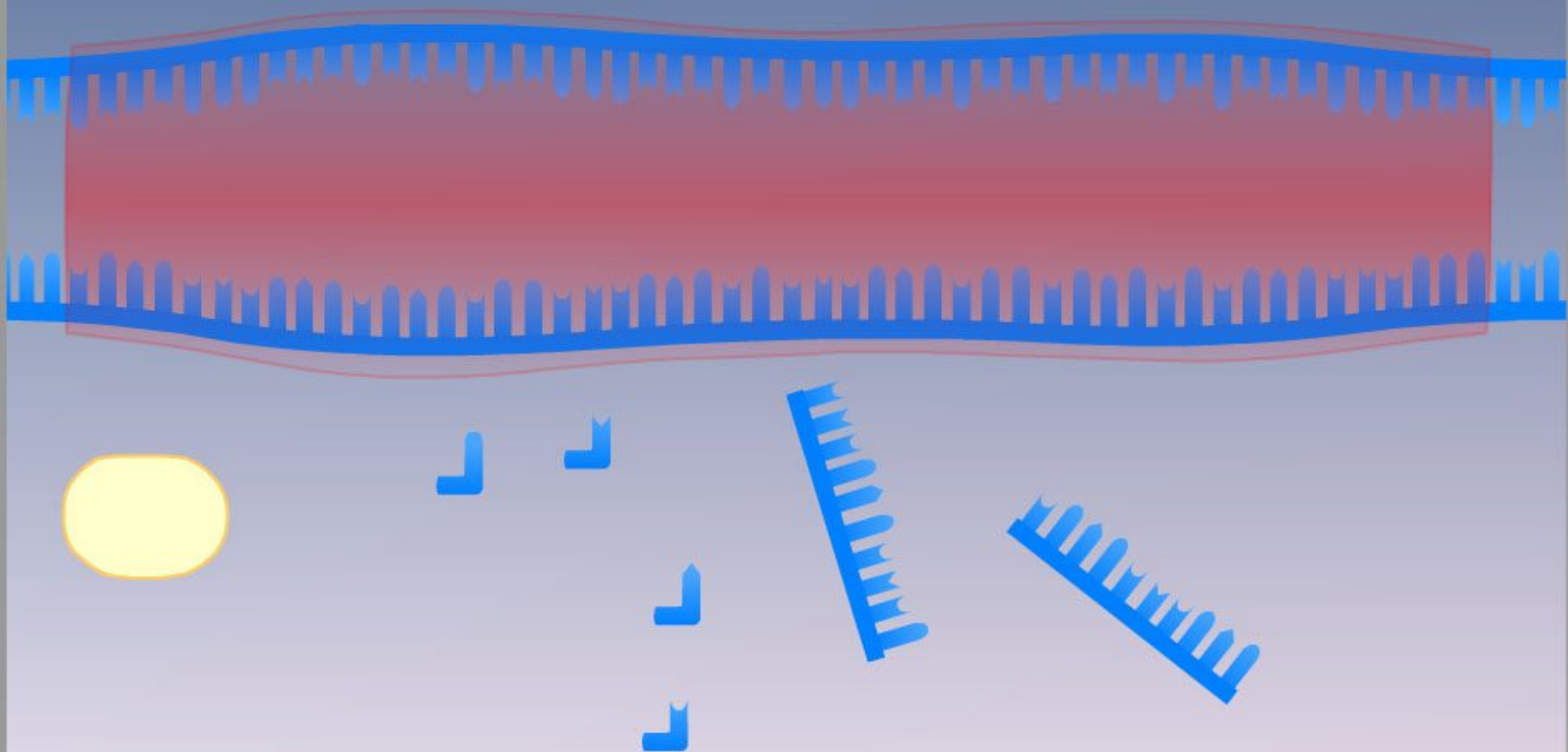


Кадр анимированной схемы, размещённой по адресу:
<http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/content/pcr.html>

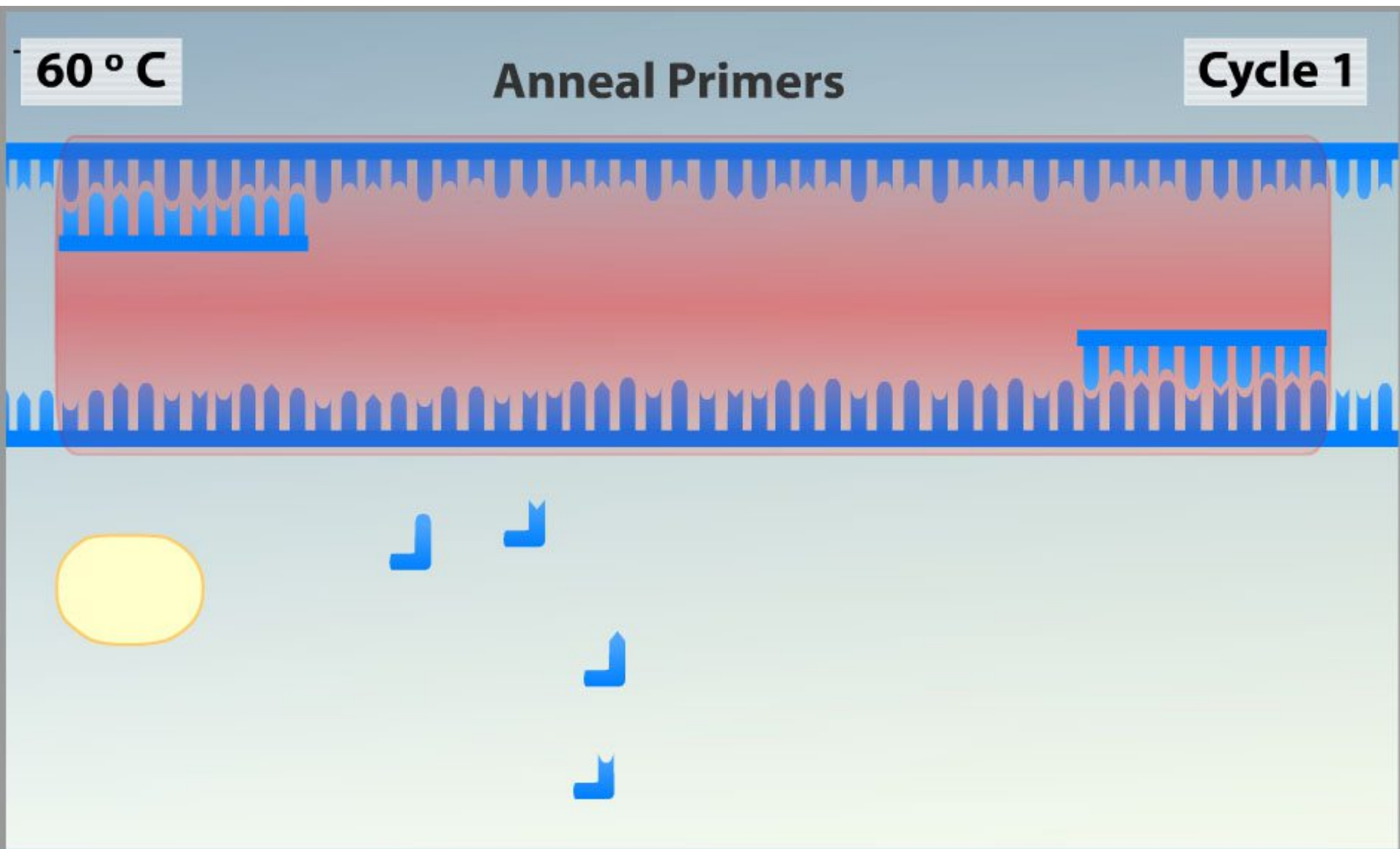
95 ° C

Denature DNA

Cycle 1



Кадр анимированной схемы, размещённой по адресу:
<http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/content/pcr.html>

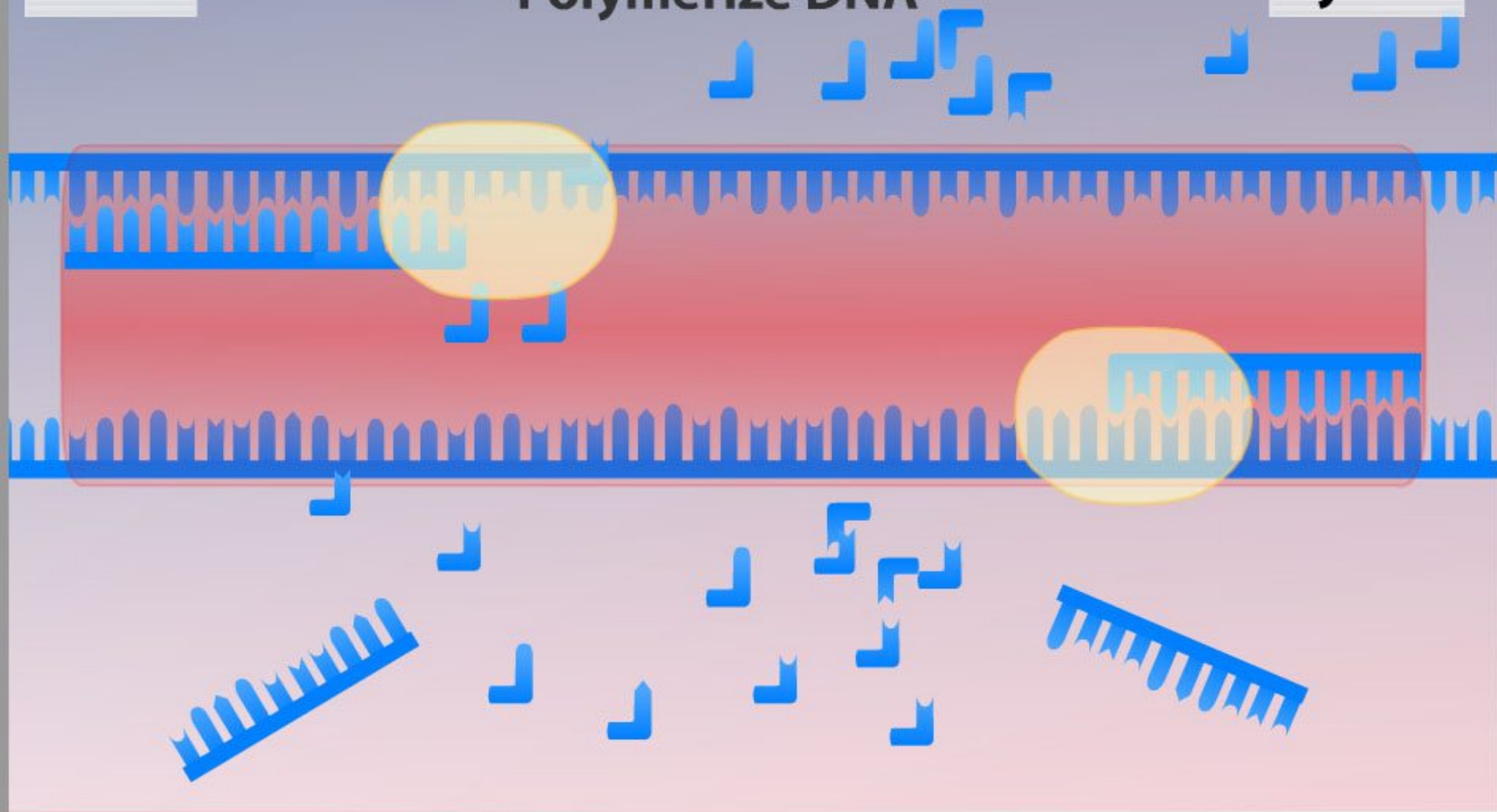


Кадр анимированной схемы, размещённой по адресу:
<http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/content/pcr.html>

72 °C

Polymerize DNA

Cycle 1

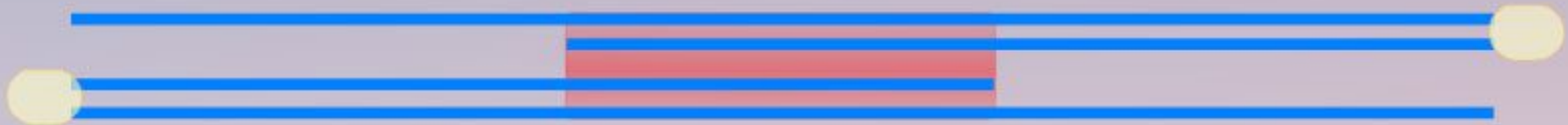


Кадр анимированной схемы, размещённой по адресу:
<http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/content/pcr.html>

72 °C

2 Copies of Target DNA

Cycle 1



Кадр анимированной схемы, размещённой по адресу:
<http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/content/pcr.html>

95 ° C

Denature DNA

Cycle 2



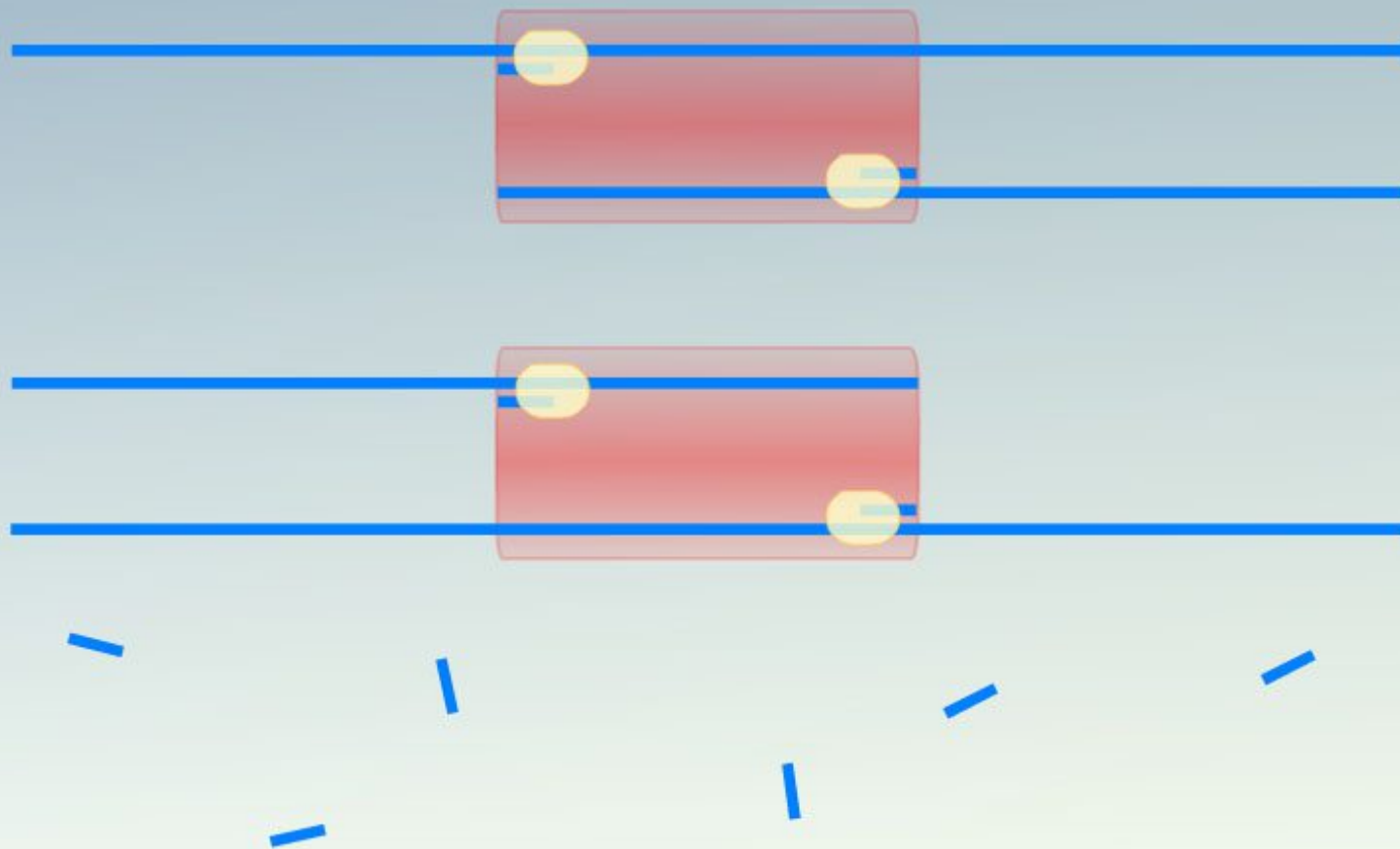
Primers

Кадр анимированной схемы, размещённой по адресу:
<http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/content/pcr.html>

60 °C

Anneal Primers

Cycle 2

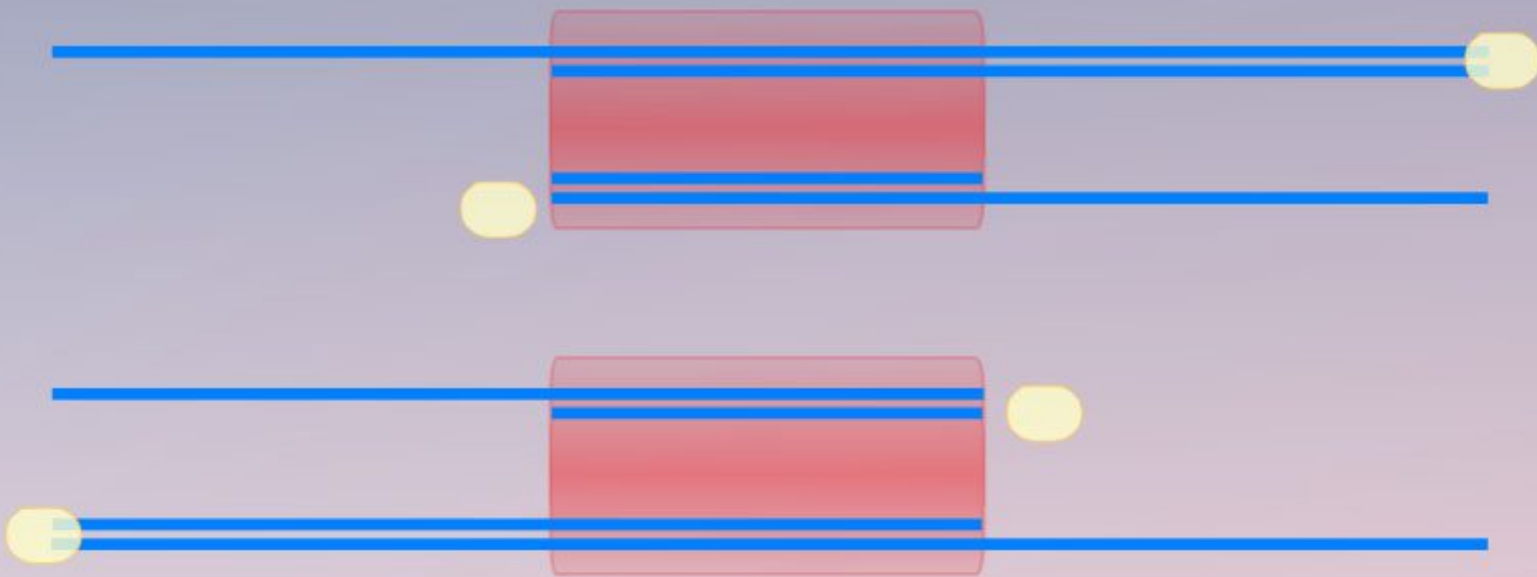


Кадр анимированной схемы, размещённой по адресу:
<http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/content/pcr.html>

72 °C

Polymerize DNA

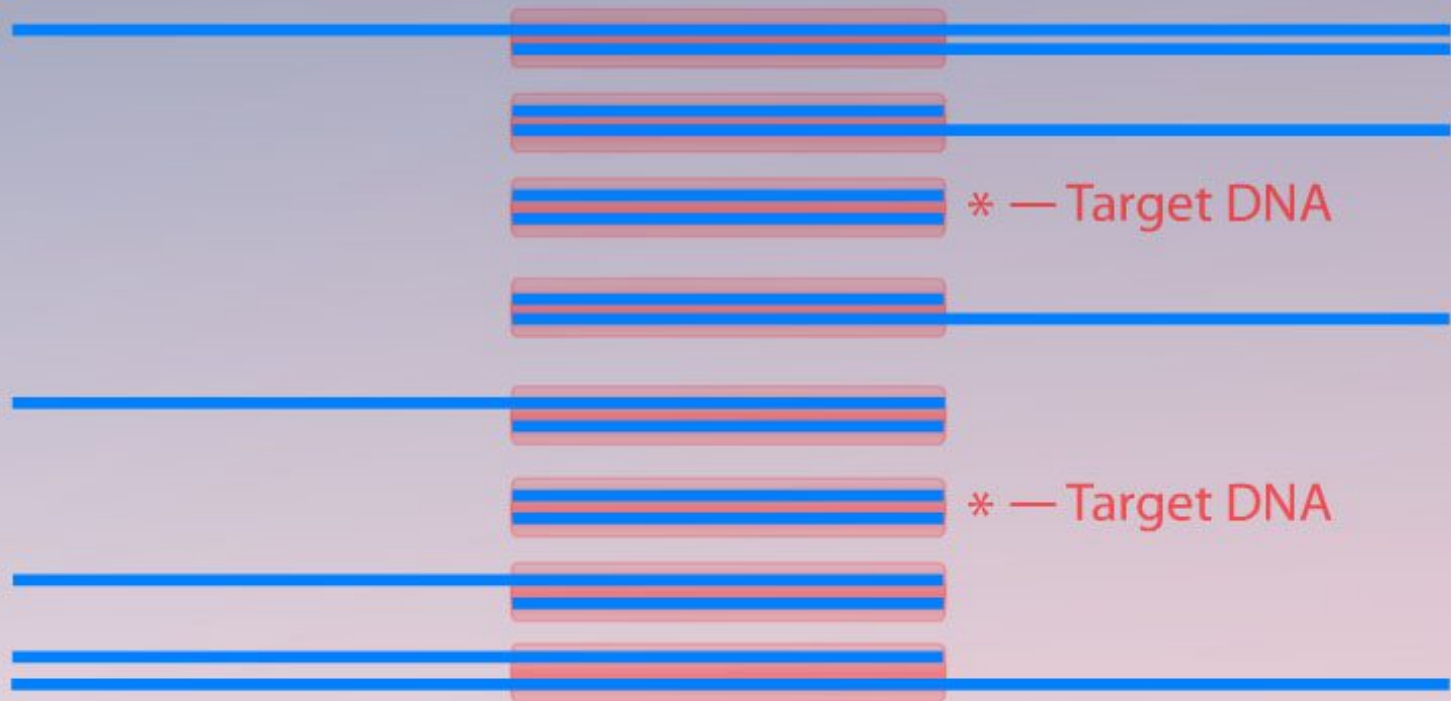
Cycle 2



Кадр анимированной схемы, размещённой по адресу:
<http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/content/pcr.html>

8 Copies of Target DNA

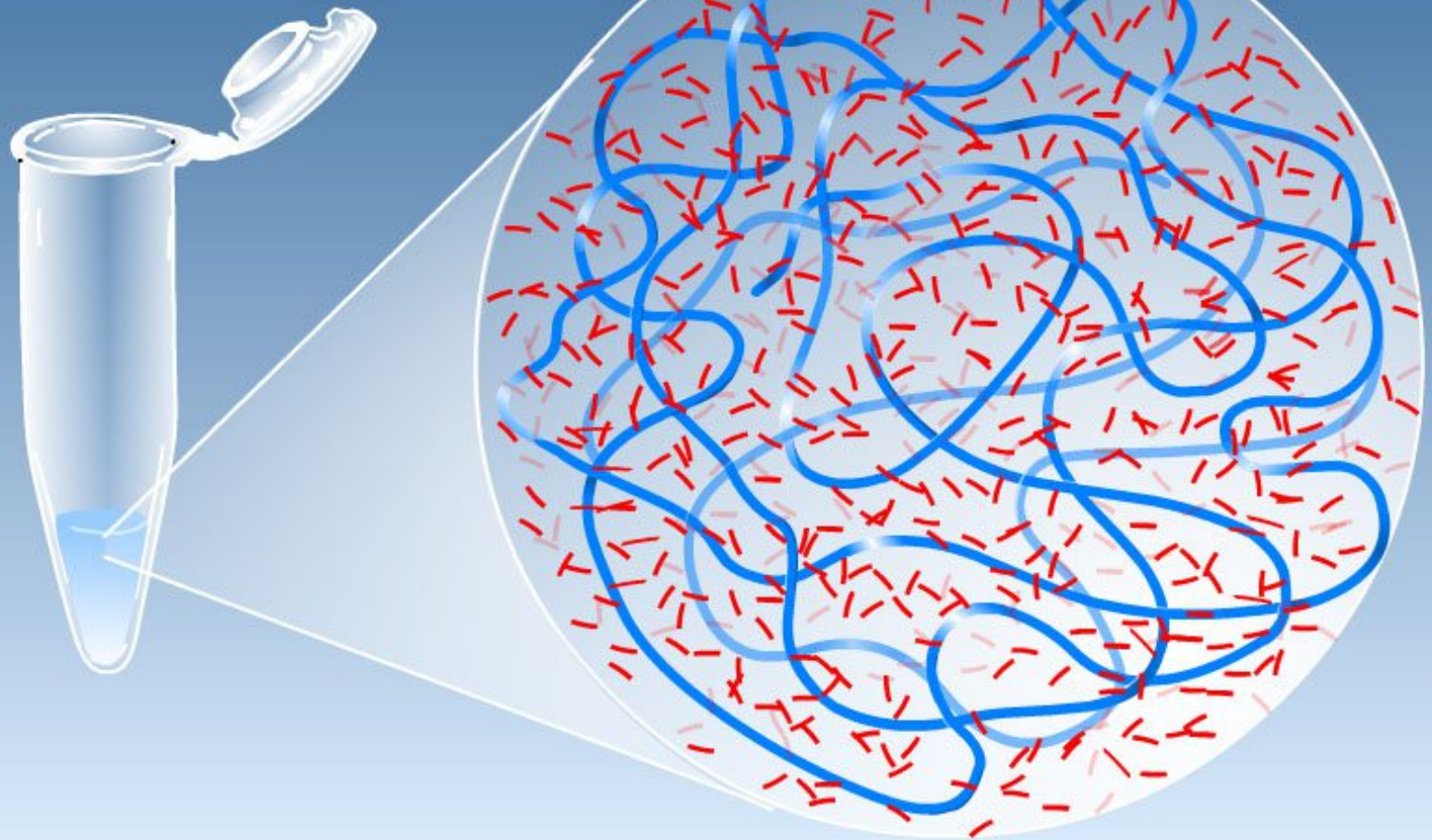
Cycle 3



Кадр анимированной схемы, размещённой по адресу:
<http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/content/pcr.html>

33,554,432 Copies of Target DNA

Cycle 25



Кадр анимированной схемы, размещённой по адресу:
<http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/content/pcr.html>

Состав реакционной смеси

Исследуемая ДНК

ДНК-зависимая-ДНК-
полимераза

Дезоксирибонуклеотидтрифосфаты (dNTP)

ДНК-затравки (праймеры)

Буферный раствор с $MgCl_2$

Интеркалирующих
краситель (обычно SYBR
Green)
или

Флуоресцентно меченные
ДНК-зонды

93-96
1-10 мин

«Горячий старт» -
активация
полимеразы,
размешивание
компонентов

93-96
5-15 с

Разрушение
водородных связей
между цепями ДНК
(денатурация)

40-75
30 с

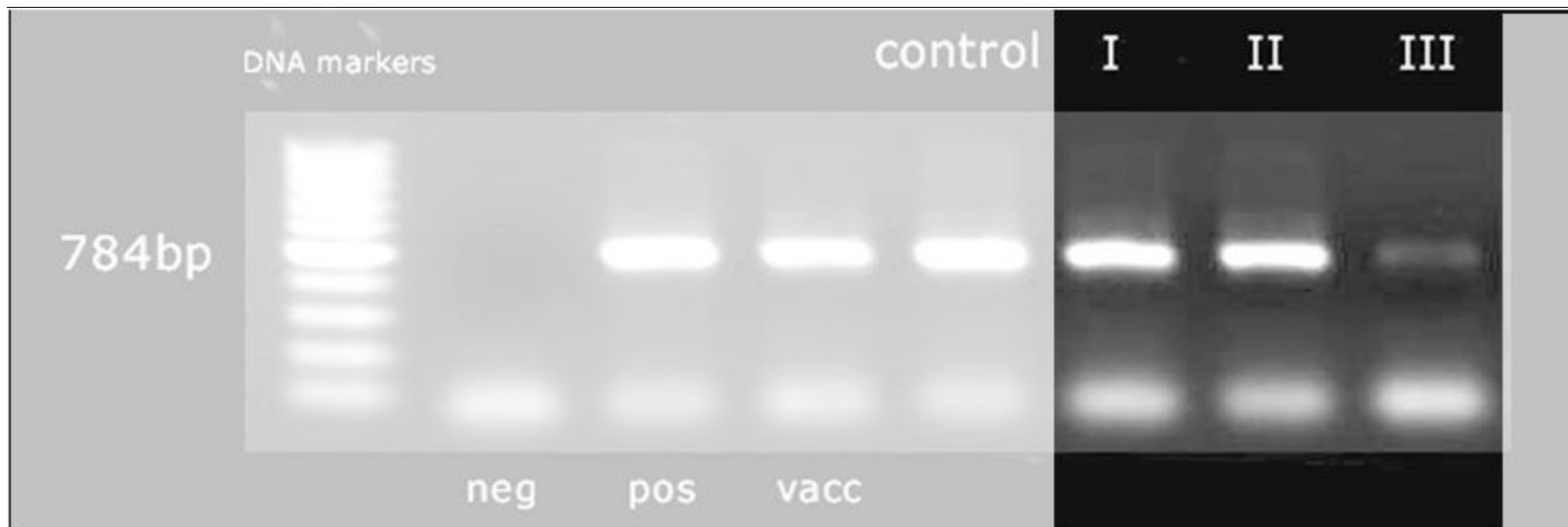
Гибридизация
праймеров на ДНК
(отжиг
праймеров)

60-75
0-15 с

Синтез
комплементарных
цепей ДНК
(элонгация)

«Классический» ПЦР

Детекция продукта по окончанию реакции



Ornithobacterium rhinotracheale в мясе курицы при различных методах лечения. Взято с <http://vettorg.net/magazines/3/2007/130/668/>



Analysis of Relative Gene Expression in Real-Time Quantitative PCR and

Kenneth J. Livak* and Thomas D. Schmittgen†

*Applied Biosystems, Foster City, California 94404; and †Washington State University, Pullman, Washington 99164

The two most commonly used methods to analyze data from real-time, quantitative PCR experiments are absolute quantification and relative quantification. Absolute quantification determines the input copy number, usually by relating the PCR product to a standard curve. Relative quantification relates the PCR product of the target transcript in a treatment group to that of the same target transcript in a control group, such as an untreated control. The $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method is a convenient way to analyze the relative changes in gene expression from real-time quantitative PCR experiments. The purpose of this report is to present the derivation, assumptions, and applications of the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. In addition, we present the derivation and applications of two variations of the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method that are useful in the analysis of real-time, quantitative PCR data.

Elsevier Science (USA)

Key Words: reverse transcription polymerase chain reaction; quantitative polymerase chain reaction; relative quantification; real-time polymerase chain reaction; Taq Man.

Reverse transcription combined with the polymerase chain reaction (RT-PCR) has proven to be a useful method to quantify gene expression (1-3). Real-time PCR technology has been adapted to

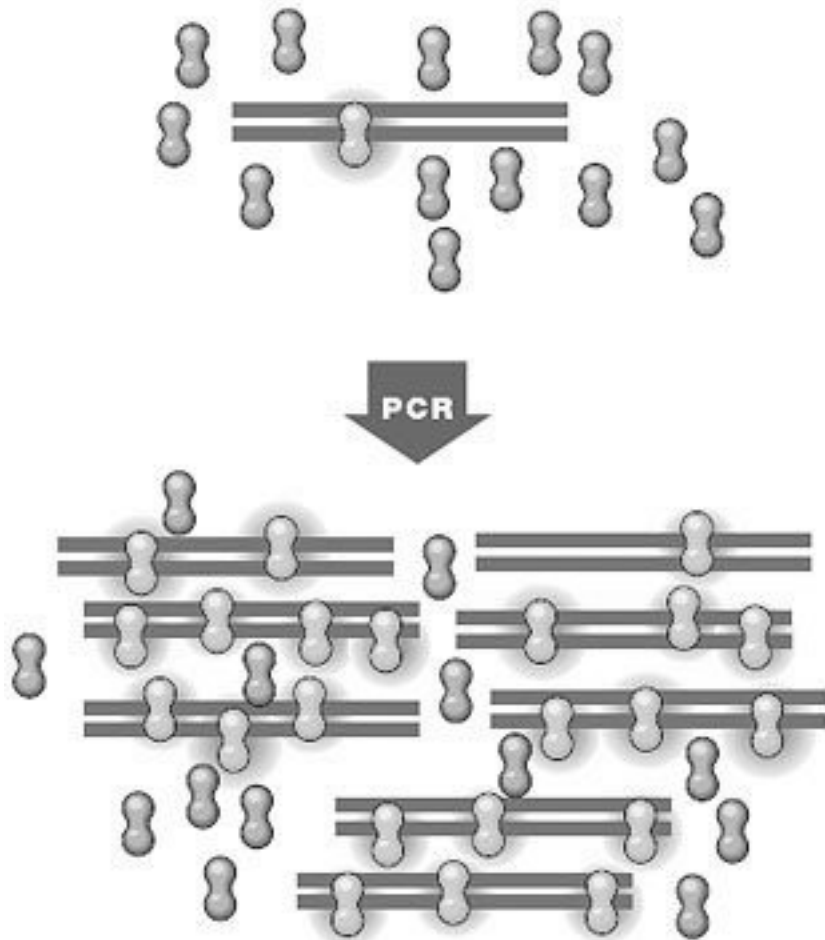
ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ



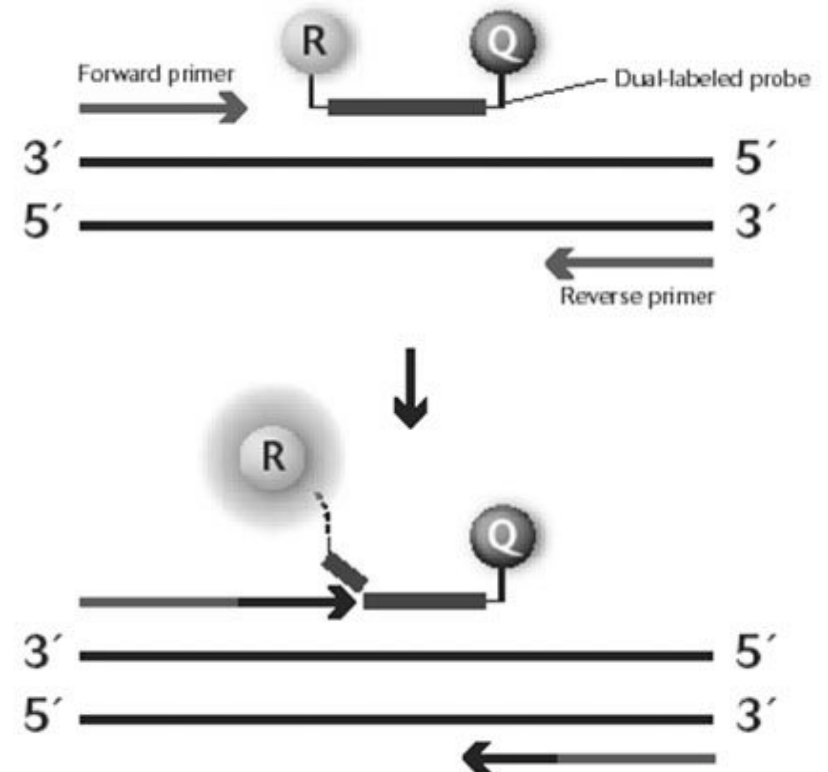
ор
ци

ПЦР «в реальном времени»

SYBR Green

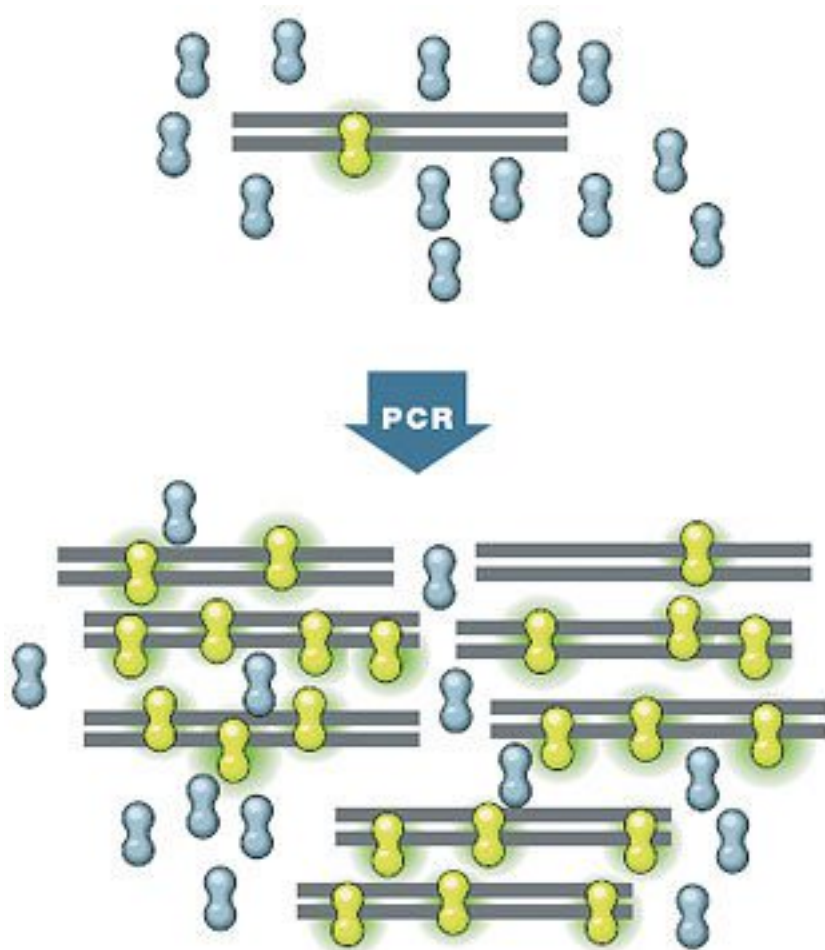


TaqMan

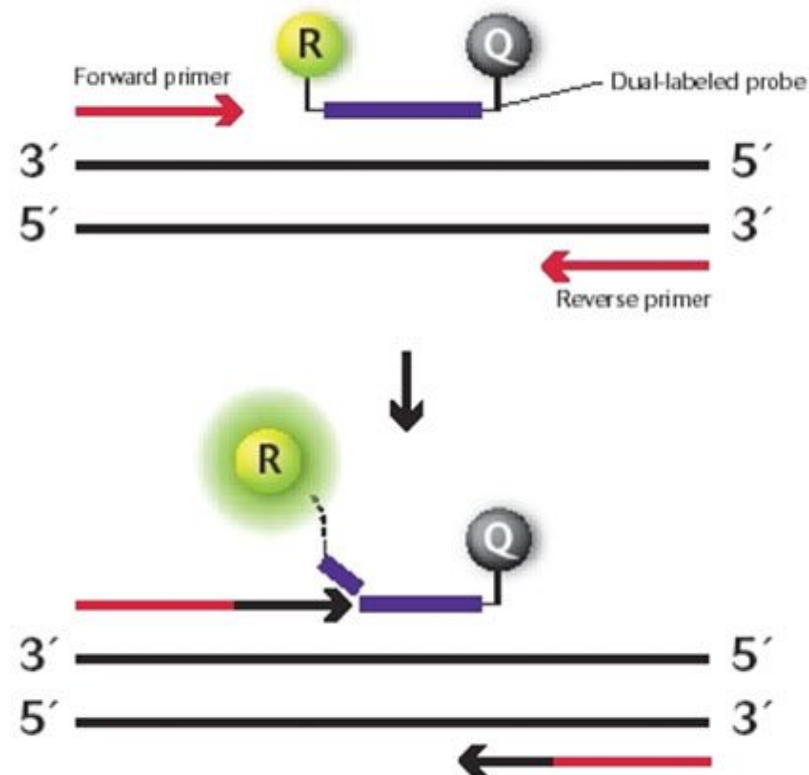


ПЦР «в реальном времени»

SYBR Green

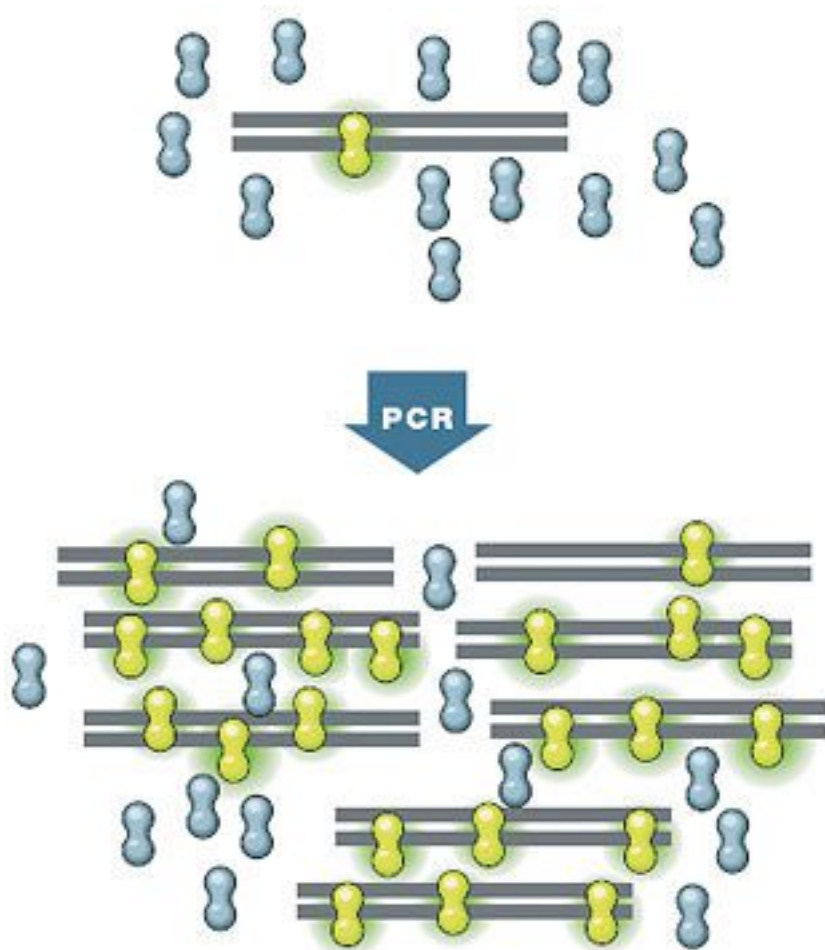


TaqMan

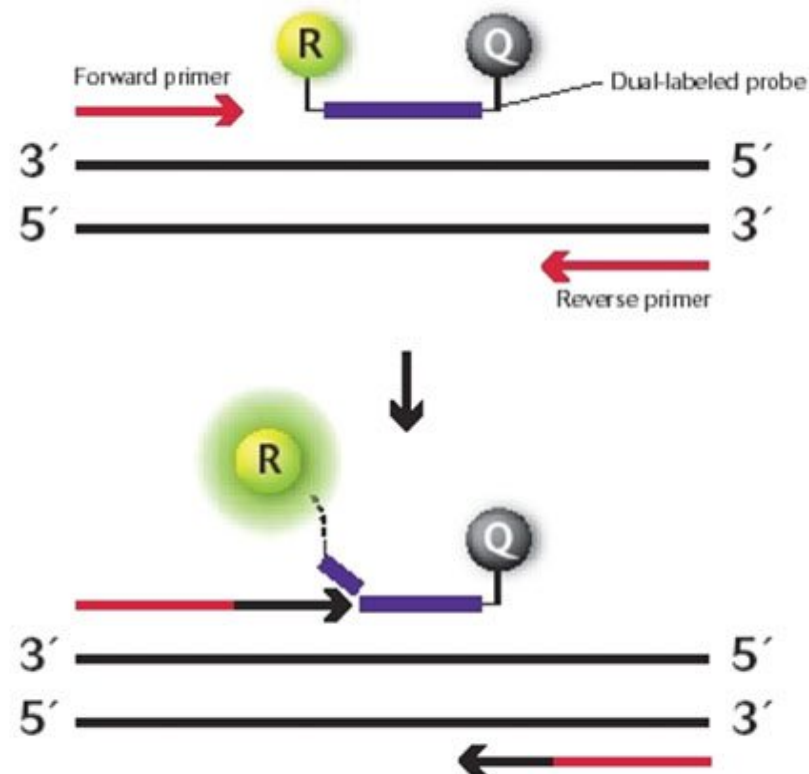


ПЦР «в реальном времени»

SYBR Green



TaqMan

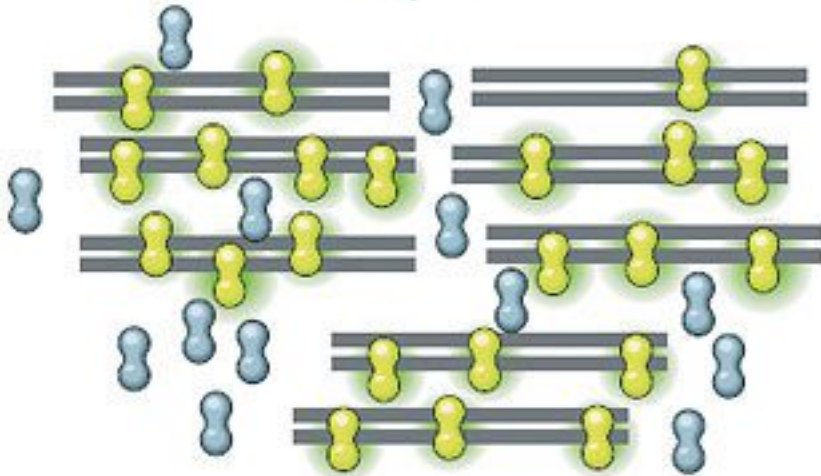


ПЦР «в реальном времени»

SYBR Green

Относительная простота
дизайна праймеров

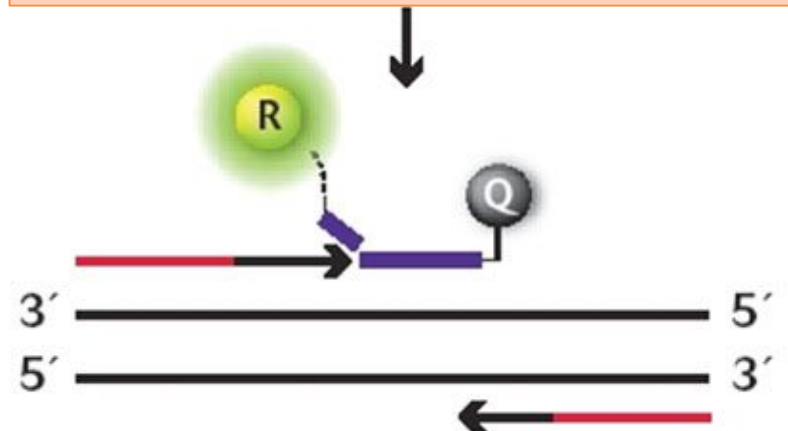
Относительная дешевизна



TaqMan

Высокая специфичность
детекции

Возможность проведения
мультиплексного анализа:
До 5 целевых генов в одной
пробирке!



Прикладное применение ПЦР

- Анализ содержания ГМО в продуктах питания
- Установление отцовства
- Криминалистика
 - «Генетические отпечатки пальцев»
- В медицине
 - Диагностика наследственных заболеваний
 - Диагностика инфекционных заболеваний
 - Контроль эффективности лечения
 - Персонализированная медицина

Применение в научных исследованиях

- Анализ экспрессии генов и miRNA
- Анализ уровня метилирования ДНК
- Филогенетические исследования
- Анализ SNP
- Амплификации ДНК как этап секвенирования
- Амплификация ДНК для генно-инженерных манипуляций

Применение в научных исследованиях

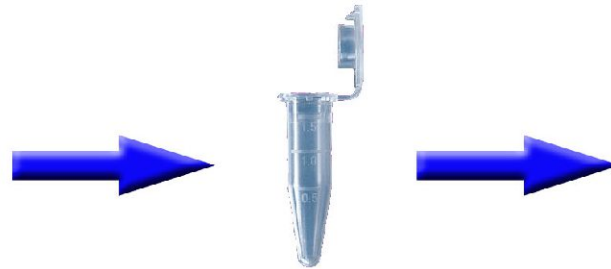
- Анализ экспрессии генов и miRNA

- Анализ количества мРНК гена (qRT-PCR)

- Анализ экспрессии микроРНК

- Технология «ПЦР-чип»

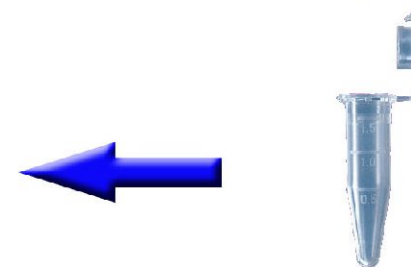
Анализ количества мРНК гена (qRT-PCR)



Тотальная РНК



Обратная транскрипция



Комплицментарная ДНК (сDNA)



Количественный ПЦР

Анализ количества мРНК гена (qRT-PCR)

oligo dT primer



specific primer



random primer



Анализ количества мРНК гена (qRT-PCR)

NCBI Resources How To velloio My NCBI Sign Out

PubMed.gov
US National Library of Medicine
National Institutes of Health

PubMed rt pcr Search

RSS Save search Limits Advanced Help

Display Settings: Summary, 20 per page, Sorted by Recently Added Send to: Filter your results:

Results: 1 to 20 of 178864 << First < Prev Page 1 of 8944 Next > Last >>

All (178864)
Free Full Text (63864)
Review (2106)
Manage Filters

Related searches

- real time rt pcr
- quantitative rt pcr
- mna rt pcr
- cell rt pcr
- rt pcr data

Titles with your search terms

- A new mathematical model for relative quantification [Nucleic Acids Res. 2001]
- Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR [Genome Biol. 2002]
- Real-time quantification of microRNAs by stem-loop [Nucleic Acids Res. 2005]

[miR-21 inhibitor sensitizes human OSCC cells to cisplatin.](#)

1. Wang W, Songlin P, Sun Y, Zhang B, Jinhui W.
Mol Biol Rep. 2012 Jan 15. [Epub ahead of print]
PMID: 22249446 [PubMed - as supplied by publisher]
[Related citations](#)

[Eosinophils from patients with type 1 diabetes mellitus express high level of myeloid alpha-defensins and myeloperoxidase.](#)

2. Neuwirth A, Dobeš J, Oujezdská J, Ballek O, Benešová M, Sumník Z, Včeláková J, Koloušková S, Obermannová B, Kolář M, Stechová K, Filipp D.
Cell Immunol. 2012 Jan 2. [Epub ahead of print]
PMID: 22248881 [PubMed - as supplied by publisher]
[Related citations](#)

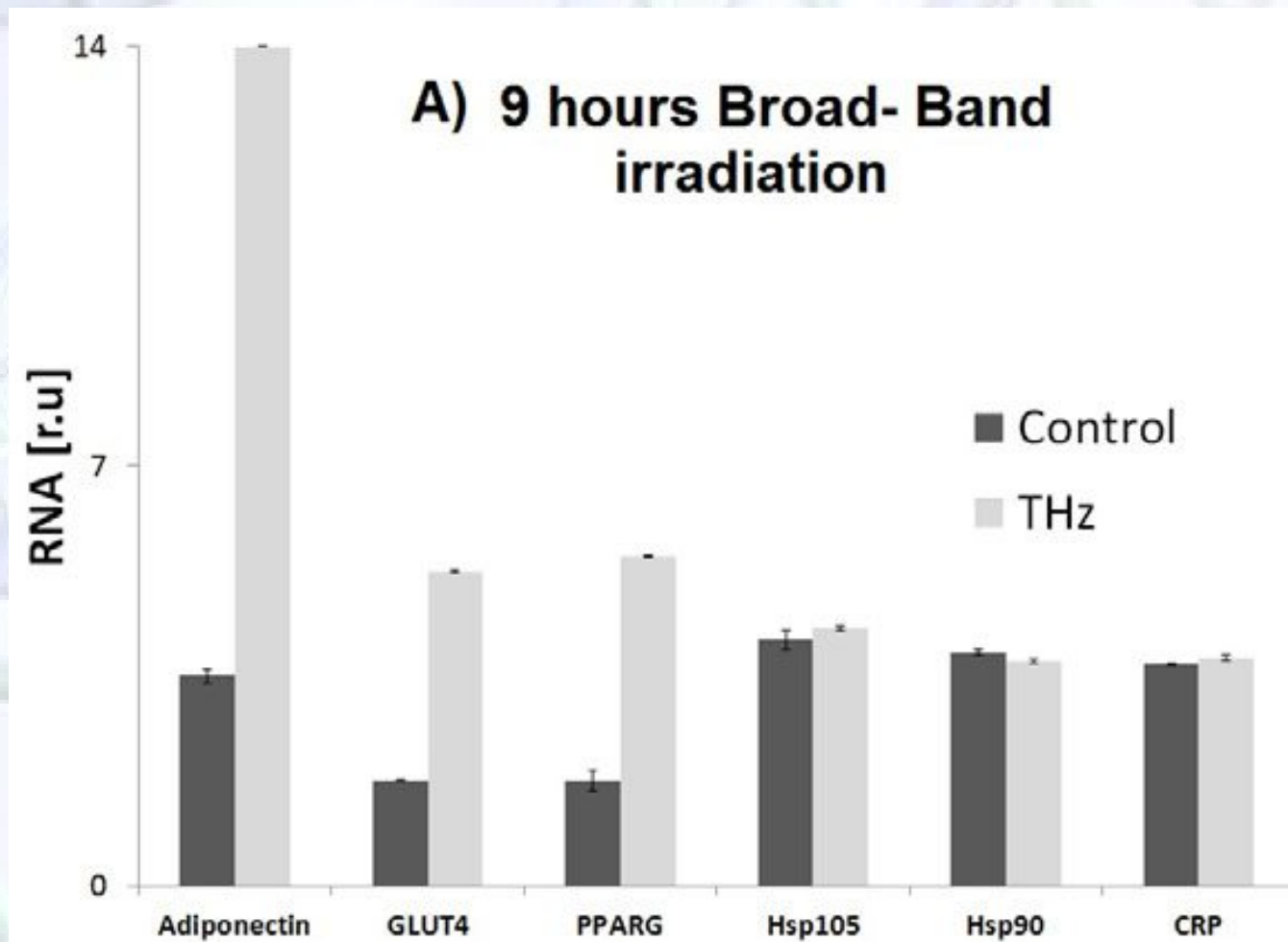
[Detection of hepatitis C virus subtypes 6a, 6n, 6w and mixed infections using a modified multiplex real-time polymerase chain reaction protocol.](#)

3. Lee YM, Chen YJ, Lee CM, Kuo LH, Wong WW, Arthur Chen YM.
J Formos Med Assoc. 2011 Dec;110(12):762-7. Epub 2011 Dec 23.
PMID: 22248830 [PubMed - in process]
[Related citations](#)

Анализ количества мРНК гена (qRT-PCR)

- Изучение механизмов реакции организмов на воздействие внешних факторов (радиобиология, факториальная экология, токсикология, и. т. д.)

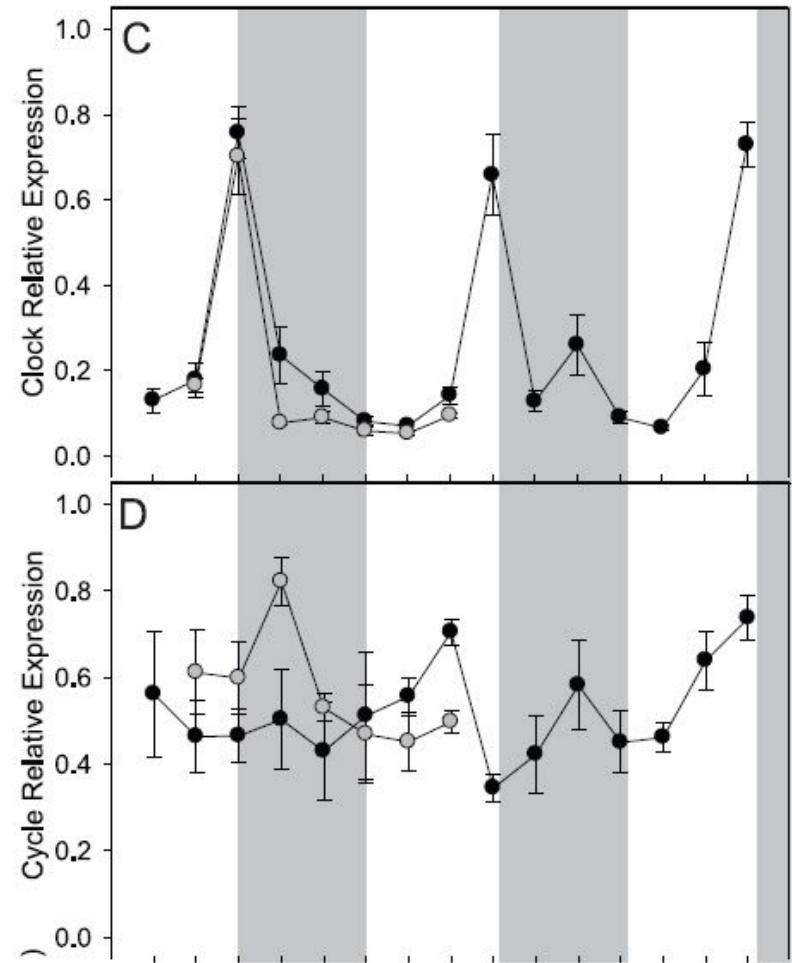
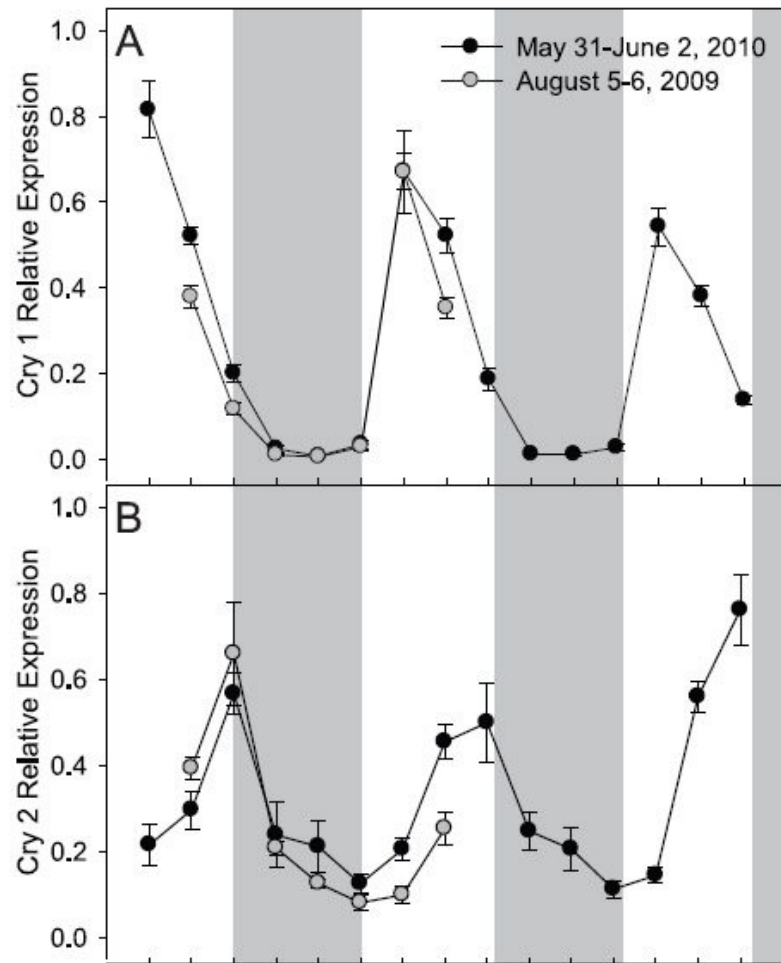
Нетермический эффект терагерцового излучения на экспрессию генов мышинных стволовых клеток (Alexandrov et al., 2011)



Анализ количества мРНК гена (qRT-PCR)

- Изучение механизмов реакции организмов на воздействие внешних факторов (радиобиология, факториальная экология, токсикология, и. т. д.)
- Изучение механизмов морфогенеза, старения, естественных ритмов и прочих физиологических процессов

Дневные ритмы изменения экспрессии генов *Cry 1*, *Cry 2*, *Clock* и *Cycle* у мандрепоровых полипов (Hoadley et al., 2011)



Анализ количества мРНК гена (qRT-PCR)

- Изучение механизмов реакции организмов на воздействие внешних факторов (радиобиология, факториальная экология, токсикология, и. т. д.)
 - Изучение механизмов морфогенеза, старения и естественных ритмов и прочих физиологических процессов
 - Верификация выключения/снижения активности гена в мутантных организмах. Анализ эффективности генетических конструкций сверхактивации определённых генов. Анализ эффективности фармакологической модификации активности определённых генов.

Increase of *Drosophila melanogaster* lifespan due to *D-GADD45* overexpression in the nervous system

E. N. Plyusnina · M. V. Shaposhnikov ·
A. A. Moskalev

Received: 30 August 2010 / Accepted: 29 November 2010 / Published online: 9 December 2010
© Springer Science+Business Media B.V. 2010

Abstract The GADD45 protein family plays an important role in stress signaling and participates in the integration of cellular response to environmental and physiological factors. GADD45 proteins are involved in

Introduction

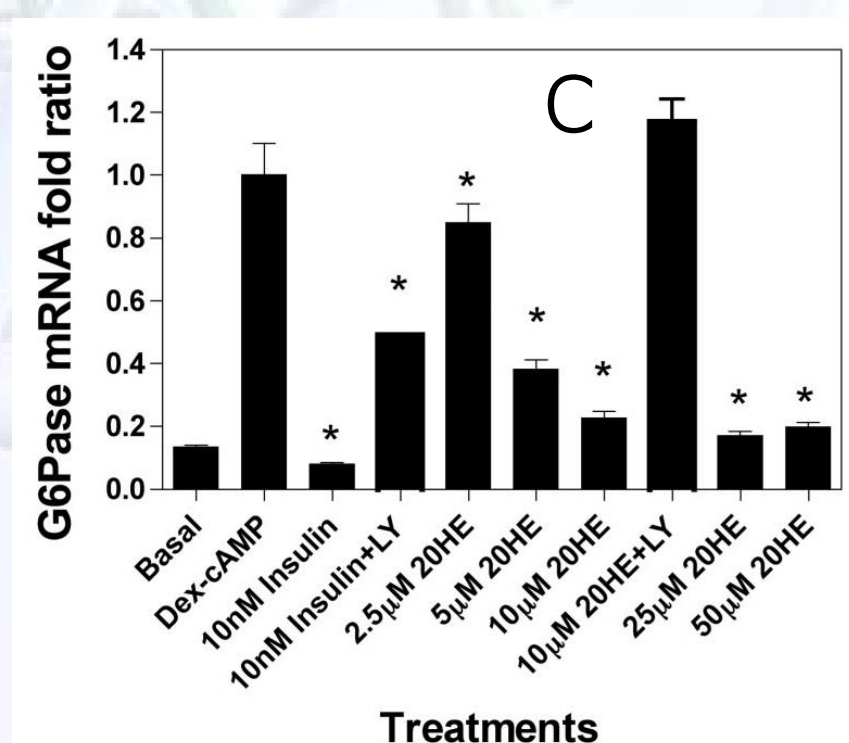
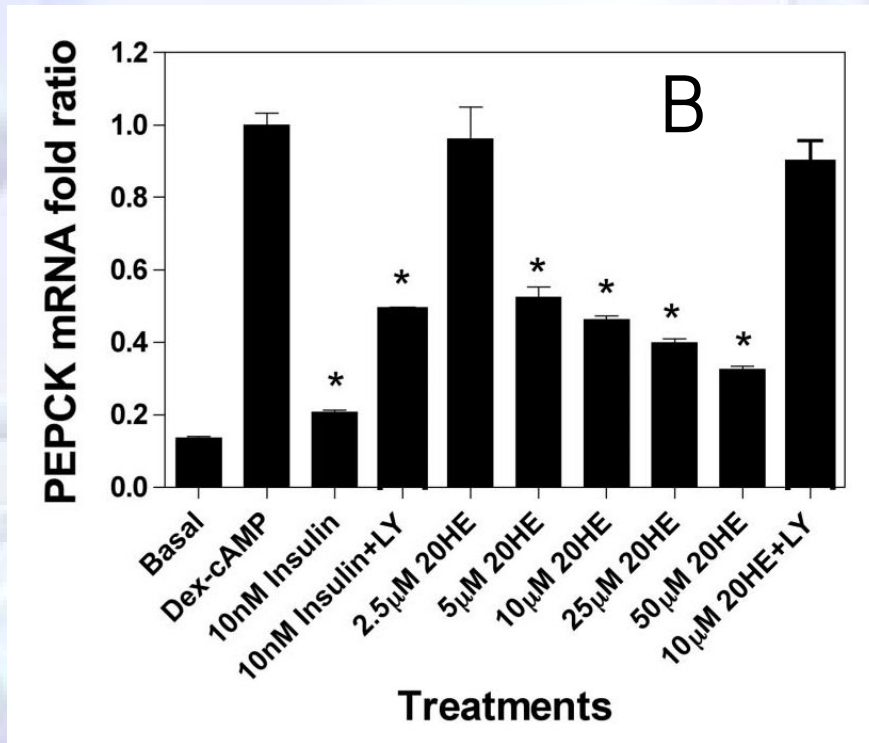
The ability of the cell and organism to respond adequately to stress is important requirement for a long

Дрозофилы, в нервной ткани которых сверхэкспрессирован ген *D-GADD45* имеют увеличенную продолжительность жизни. Наличие сверхэкспрессии было верифицировано с помощью qRT-PCR.

Анализ количества мРНК гена (qRT-PCR)

- Изучение механизмов реакции организмов на воздействие внешних факторов (радиобиология, факториальная экология, токсикология, и. т. д.)
 - Изучение механизмов морфогенеза, старения и естественных ритмов и прочих физиологических процессов
 - Верификация выключения/снижения активности гена в мутантных организмах. Анализ эффективности генетических конструкций сверхактивации определённых генов. Анализ эффективности фармакологической модификации активности определённых генов.
 - Изучение механизмов воздействия биологически активных веществ

Действие 20-гидроксиэкдизона на метаболизм глюкозы в H4IIE клетках
(Kizelsztein et al., 2009)



...dose-dependent inhibition of Dex-cAMP stimulated expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) (B) and glucose-6-phosphatase (G6Pase) (C) gluconeogenic enzymes...

Анализ количества мРНК гена (qRT-PCR)

- Изучение механизмов реакции организмов на воздействие внешних факторов (радиобиология, факториальная экология, токсикология, и. т. д.)
 - Изучение механизмов морфогенеза, старения и естественных ритмов и прочих физиологических процессов
 - Верификация выключения/снижения активности гена в мутантных организмах. Анализ эффективности генетических конструкций сверхактивации определённых генов. Анализ эффективности фармакологической модификации активности определённых генов.
 - Изучение механизмов воздействия биологически активных веществ

Применение в научных исследованиях

- Анализ экспрессии генов и

miRNA

- Анализ количества мРНК гена (qRT-PCR)
- Анализ экспрессии микроРНК
- Технология «ПЦР-чип»

Анализ экспрессии микроРНК

Некодирующие
РНК размером
~22 оснований

В человеческих
клетках
обнаружено
более 400
мкРНК

Ими
регулируется
экспрессия
около 1/3 части
генов

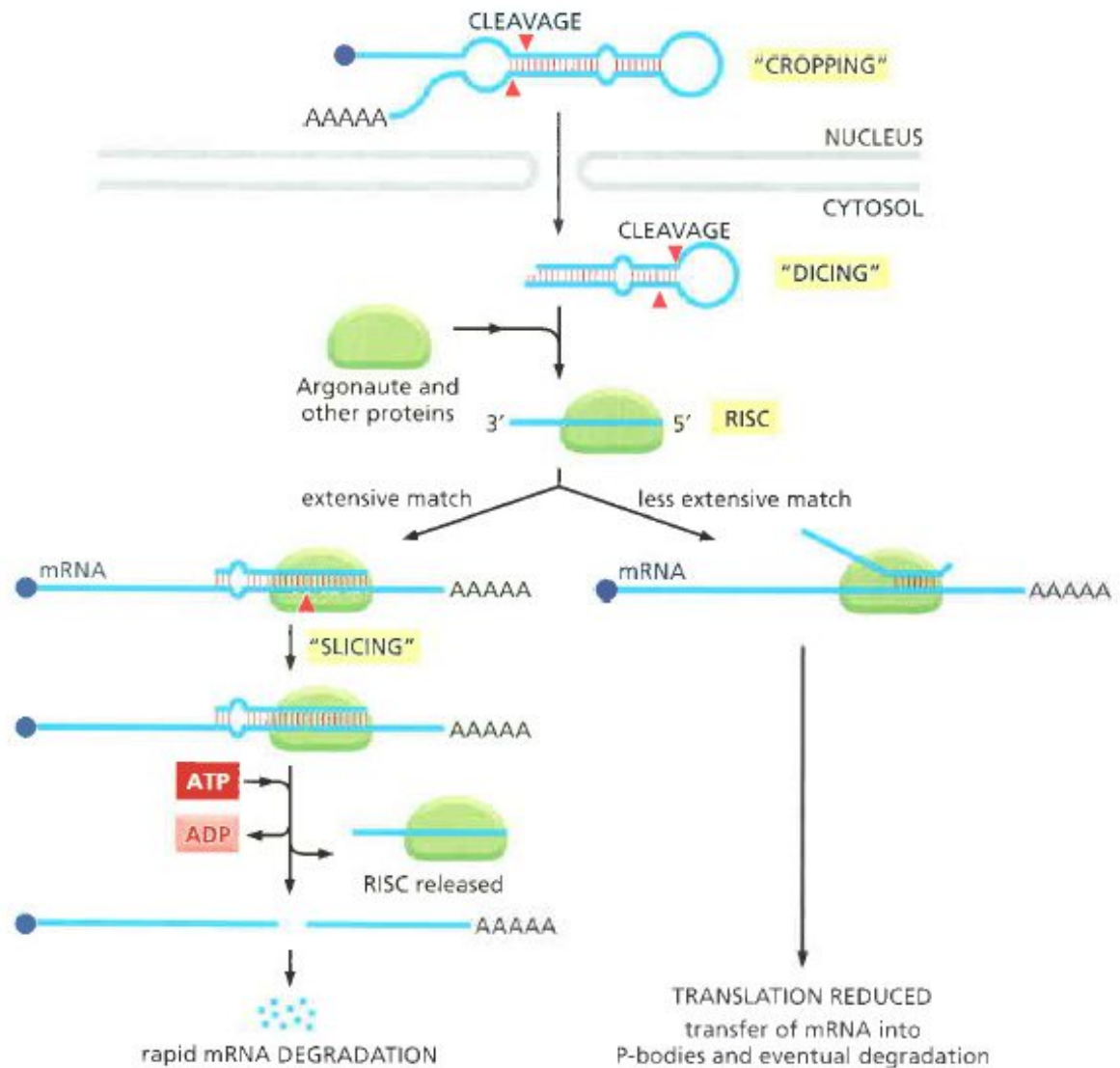


Схема из Alberts et al.,
2008

5' ————— 3' miRNA



5' ————— AAAA(A)_n 3' Polyadenylation



5' [miRNA sequence] 3' ← N V TTTT AAAA(A)_n 3' 5'
Oligo-dT primer with universal tag

Reverse transcription using miScript HiSpec Buffer



5' [miRNA sequence] 3' ← N V TTTT AAAA(A)_n 3' 5' cDNA



3' [miScript Primer Assay] N V TTTT [miScript Primer Assay] 5'
miScript Primer Assay

1st PCR cycle



miScript Primer Assay (forward primer)
3' [miScript Primer Assay] 5'
miScript Universal Primer (reverse primer)
5' [miScript Universal Primer] 3'

Subsequent PCR cycles

Схема из руководства к системе miScript[®] miRNA PCR Array (QIAGEN)

<http://www.sabiosciences.com/Manual/1069>

Применение анализа экспрессии микроРНК

- Эпигенетика
- Онкология
- Радиобиология
- Биология развития
-

NCBI Resources How To vello My NCBI Sign Out

PubMed.gov
US National Library of Medicine
National Institutes of Health

PubMed miRNA Search

RSS Save search Limits Advanced Help

Display Settings: Summary, 20 per page, Sorted by Recently Added Send to: Filter your results:

Results: 1 to 20 of 14237 << First < Prev Page 1 of 712 Next > Last >>

[Induction of ZEB by inactivation of RB is a key determinant of the mesenchymal phenotype of breast cancer.](#)

1. Arima Y, Hayashi H, Sasaki M, Hosonaga M, Goto TM, Chiyoda T, Kuninaka S, Shibata T, Ohata H, Nakagama H, Taya Y, Saya H.
J Biol Chem. 2012 Jan 19. [Epub ahead of print]
PMID: 22262832 [PubMed - as supplied by publisher]
[Related citations](#)

All (14237)
[Free Full Text \(6421\)](#)
[Review \(2641\)](#)
[Manage Filters](#)

Related searches
mirna review

Применение в научных исследованиях

- Анализ экспрессии генов и miRNA

- Анализ количества мРНК гена (qRT-PCR)

- Анализ экспрессии микроРНК

- Технология «ПЦР-чип»

Технология «ПЦР-чип»

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
B	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
C	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
D	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
E	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
F	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
G	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
H	HK1	HK2	HK3	HK4	HK5	GDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

Анализ
экспрессии
84 генов за
один раз

Housekeeping
genes

Genomic
DNA
control

Reverse
transcription
controls

Positive
PCR controls

Схема организации реакций в ПЦР-чипе фирмы QIGEN, рисунок из руководства к продукту

Expression Profile of Apoptosis Related Genes and Radio-sensitivity of Prostate Cancer Cells

Zhenhua HE^{1,2}, Ye ZHANG^{3,4*}, Satish K. MEHTA^{4,5}, Duane L. PIERSON⁴,
Honglu WU⁴ and Larry H. ROHDE²

Prostate cancer cells/X-rays/Monensin/Apoptosis/Gene expression.

Radio-resistant or recurrent prostate cancer represents a serious health risk for approximately 20%–30% of patients treated with primary radiation therapy for clinically localized prostate cancer. In the present study, we investigated the expression profiles of 84 genes involved in various apoptosis pathways in two prostate cancer cell lines LNCaP (P53+ and AR+) and PC3 (P53– and AR–). We also studied the effect of monensin, an apoptosis inducing reagent, in X-ray-induced cell killing. Comparison of gene expressions between unirradiated LNCaP and PC3 cells revealed distinguished gene expression patterns. The data showed a significantly higher expression level of genes involved in the caspase/card family and the TNF ligand/receptor family in PC3 cells, whereas, LNCaP cells exhibited higher expressions in the p53 related genes. At 2 and 4 hrs post a 10 Gy X-ray exposure, changes of gene expressions were detected in a significant fraction of the genes in LNCaP cells, but no significant changes were found in PC3 cells. There was no significant apoptosis-inducing effect of X-rays (up to 10 Gy) in both cell lines; however, monensin was shown to be effective in inducing apoptosis in LNCaP, but not in PC3 cells. In addition, the effect of combined treatment of monensin and X-rays in LNCaP cells appeared to be synergistic. Our results suggest that monensin may be effective for both cancer cell killing and radiosensitizing, and the different expression profiles in apoptosis related genes in cancer cells may be correlated with their sensitivity to apoptosis inducing reagents.

Технология «ПЦР-чип»

Анализ
экспрессии
84 видов
miRNA за
один раз

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
B	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
C	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
D	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
E	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
F	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
G	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
H	Ce	Ce	SN1	SN2	SN3	SN4	SN5	SN6	miRTC	miRTC	PPC	PPC

C. elegans
miR-39 miScript
Primer Assay

snoRNA/snRNA
miScript
PCR Controls

Reverse
transcription
control

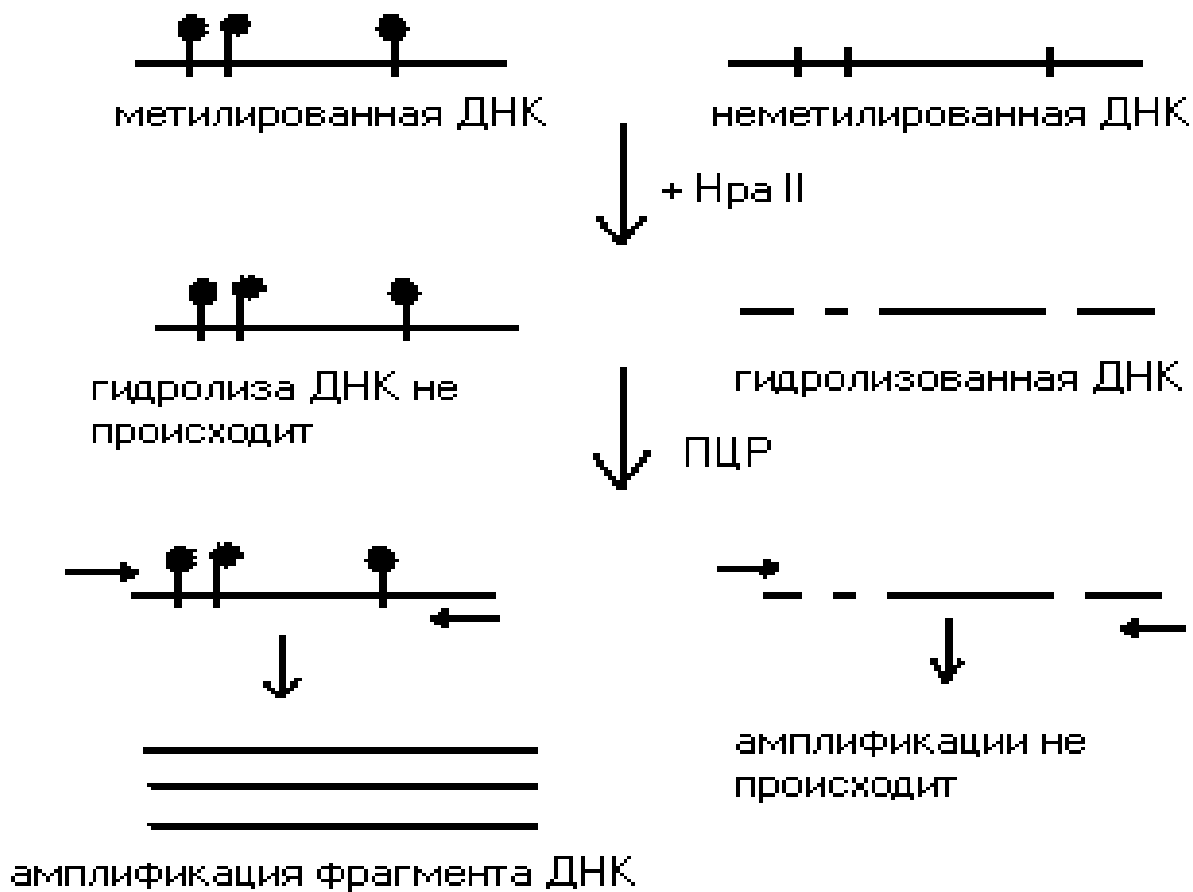
Positive
PCR
control

Схема организации реакций в ПЦР-чипе фирмы QIGEN, рисунок из руководства к продукту

Применение в научных исследованиях

- Анализ экспрессии генов и miRNA
- Анализ уровня метилирования ДНК
- Филогенетические исследования
- Гиперметилирование промотора гена – это один из вариантов сайленсинга (выключения) активности гена.
- Метилирование/деметилирование ДНК является одним из механизмов регуляции экспрессии генов в процессе роста и дифференцировки клеток, клеточном старении и ответе на стрессы и другие внешние воздействия. Гиперметилирование опухолевых супрессоров может служить одной из стадий малигнизации клетки

Применение в научных исследованиях



NotI
EagI
SacII
HpaII
MspI

Бисульфитная модификация
ДНК

ACTTCGTAAGGGGCCT[•]CGTA



NaHSO₃

AUTTUGTAAGGGGUUT^{CH₃}CGTA

Применение в научных исследованиях

- Анализ уровня метилирования ДНК
 - Метил-чувствительная ПЦР
 - Метил-специфичная ПЦР
 - Технология «ПЦР-чип» для анализа метилирования промоторов генов
 - Анализ кривой плавления ДНК, обработанной бисульфитом Na (MS-HRM)
 - Секвенирование ДНК, обработанной бисульфитом Na

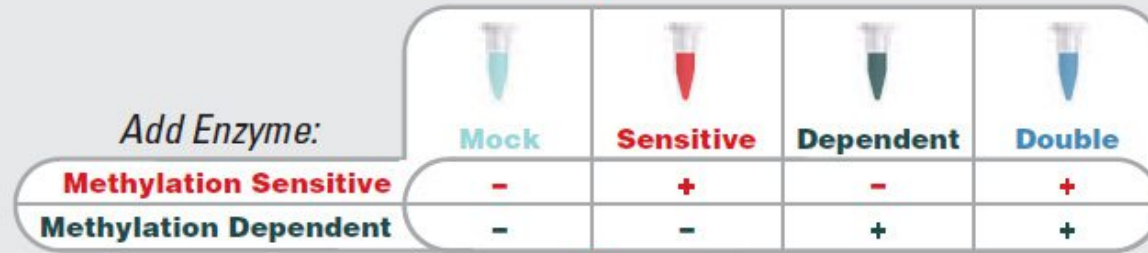
1. DNA Digestion.



Mix DNA +
Digestion Buffer



Split into 4 Fractions



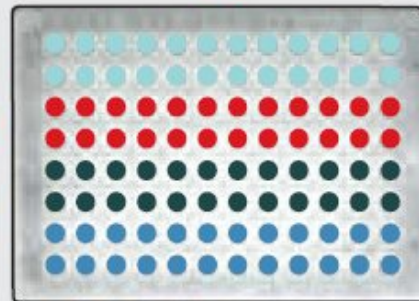
37°C (6 hr - overnight)

2. Real-Time PCR.

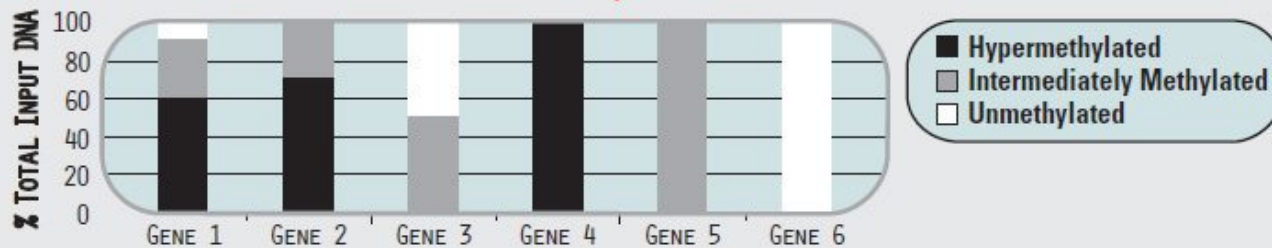


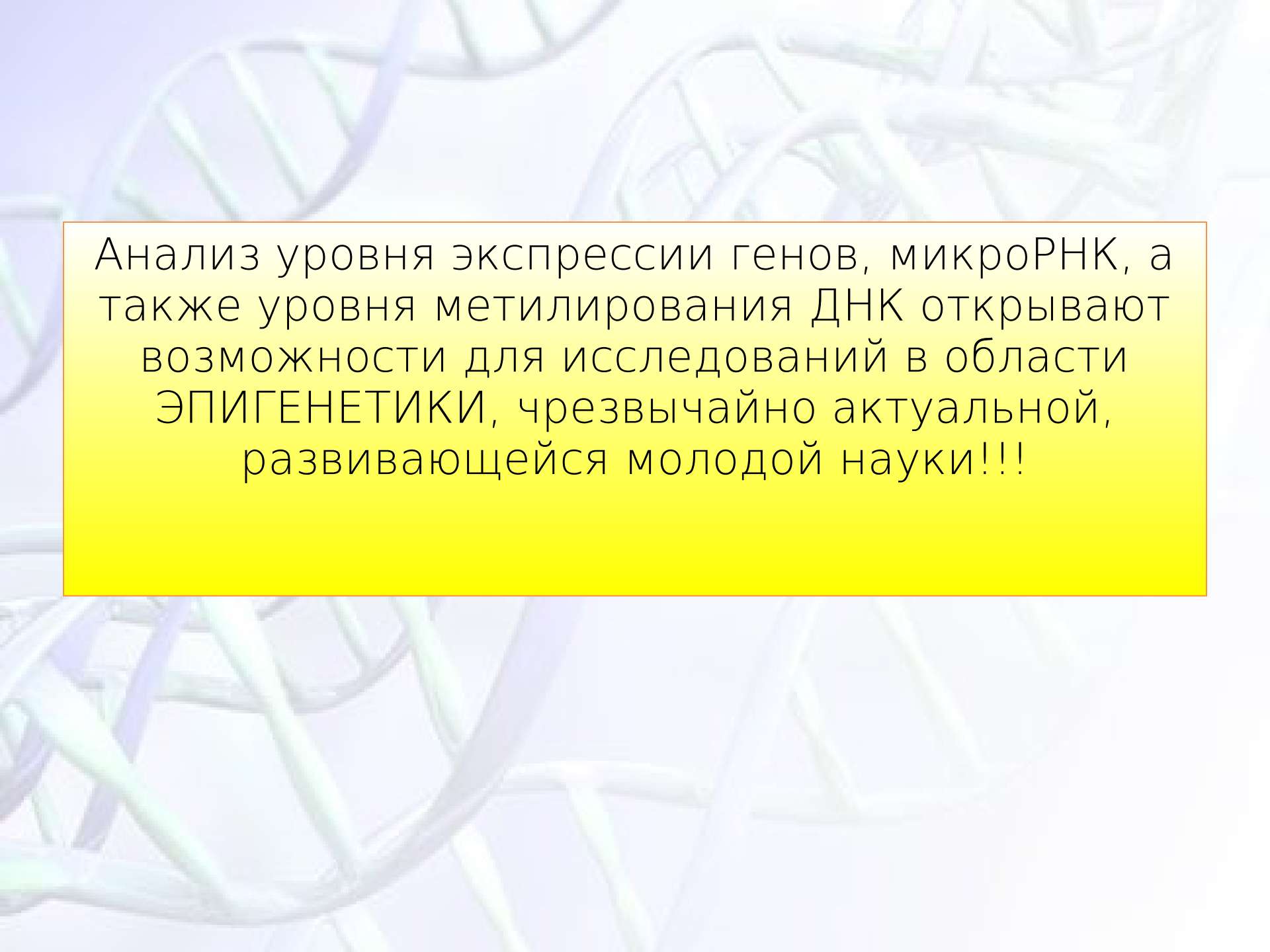
RT² SYBR[®] Green qPCR Master Mix

Mock
Sensitive
Dependent
Double



3. Data Analysis.





Анализ уровня экспрессии генов, микроРНК, а также уровня метилирования ДНК открывают возможности для исследований в области ЭПИГЕНЕТИКИ, чрезвычайно актуальной, развивающейся молодой науки!!!

Применение в научных исследованиях

- Анализ экспрессии генов и miRNA
- Анализ уровня метилирования ДНК
- Филогенетические исследования
- Анализ SNP
- Амплификации ДНК как этап секвенирования
- Амплификация ДНК для генно-инженерных манипуляций

Применение в научных исследованиях

- **Филогенетические**

исследования

- Мультилокусные ПЦР

- RAPD-PCR
- Inter-SINE-PCR
- ISSR-PCR

- Монолокусный ПЦР

- Анализ длины микросателлитных повторов
- Анализ наличия отсутствия SINE повторов

Пример использования RAPD-PCR для анализа различных биотипов Табачной белокрылки (*Bemisia tabaci*)

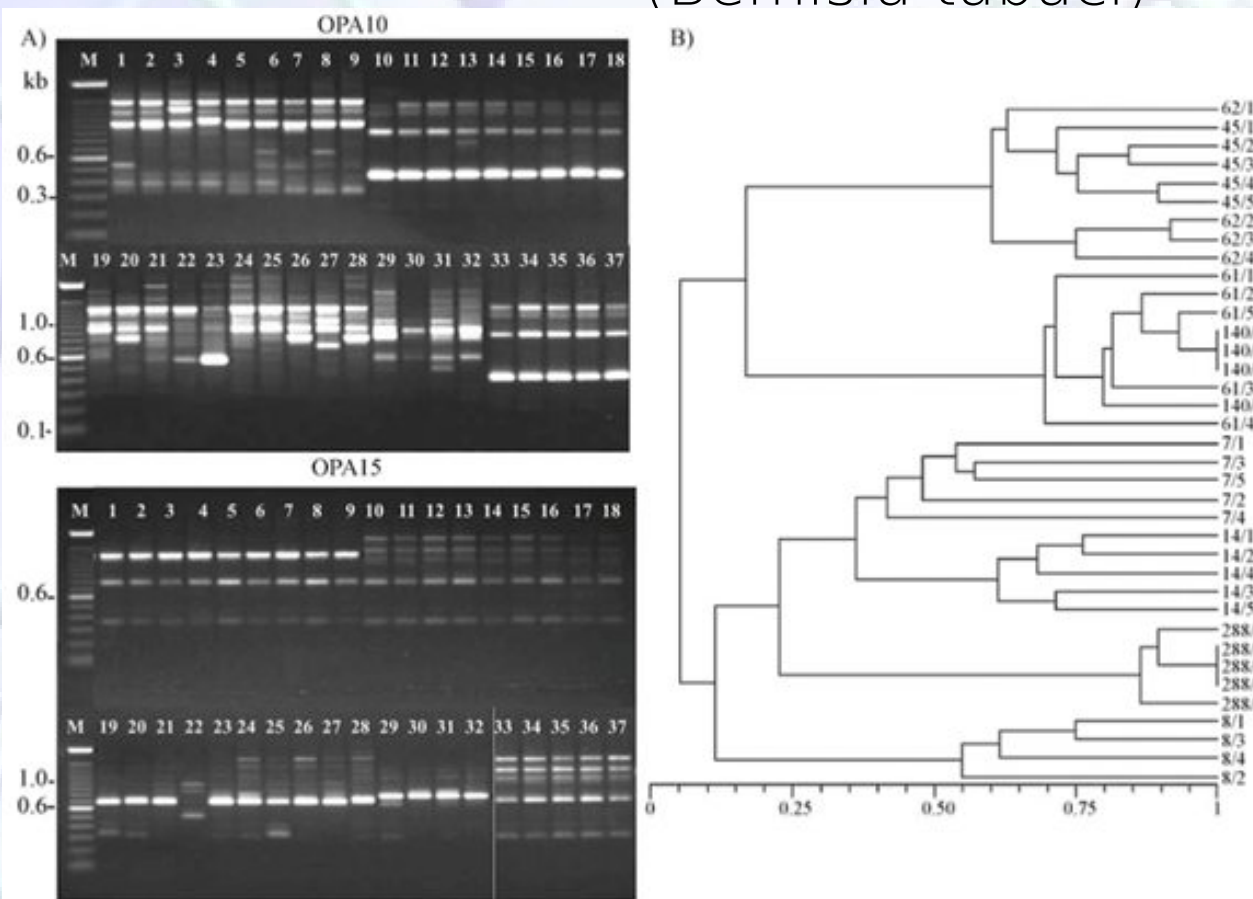


Figure 1 - A) RAPD amplicons produced by the OPA10 and OPA15 primers with DNA from different *Bemisia tabaci* biotypes. Numbers are: 1-4, A biotype (USA); 5-9, BR biotype (Brazil); 10-14, B biotype collected from melon (USA); 15-18, B biotype from soybean (Brazil); 19-23, Q biotype (Morocco); 24-28, Q biotype (Spain); 29-32, Cassava biotype (Nigeria); 33-37, B biotype collected from tomato (Brazil). M, ladder 100 bp. **B)** Dendrogram showing the similarity among the populations of the *B. tabaci* complex biotypes, constructed with RAPD data and obtained by a Jaccard's coefficient using UPGMA and NTSYS.

Результат ПЦР с двумя произвольными десятичленными праймерами

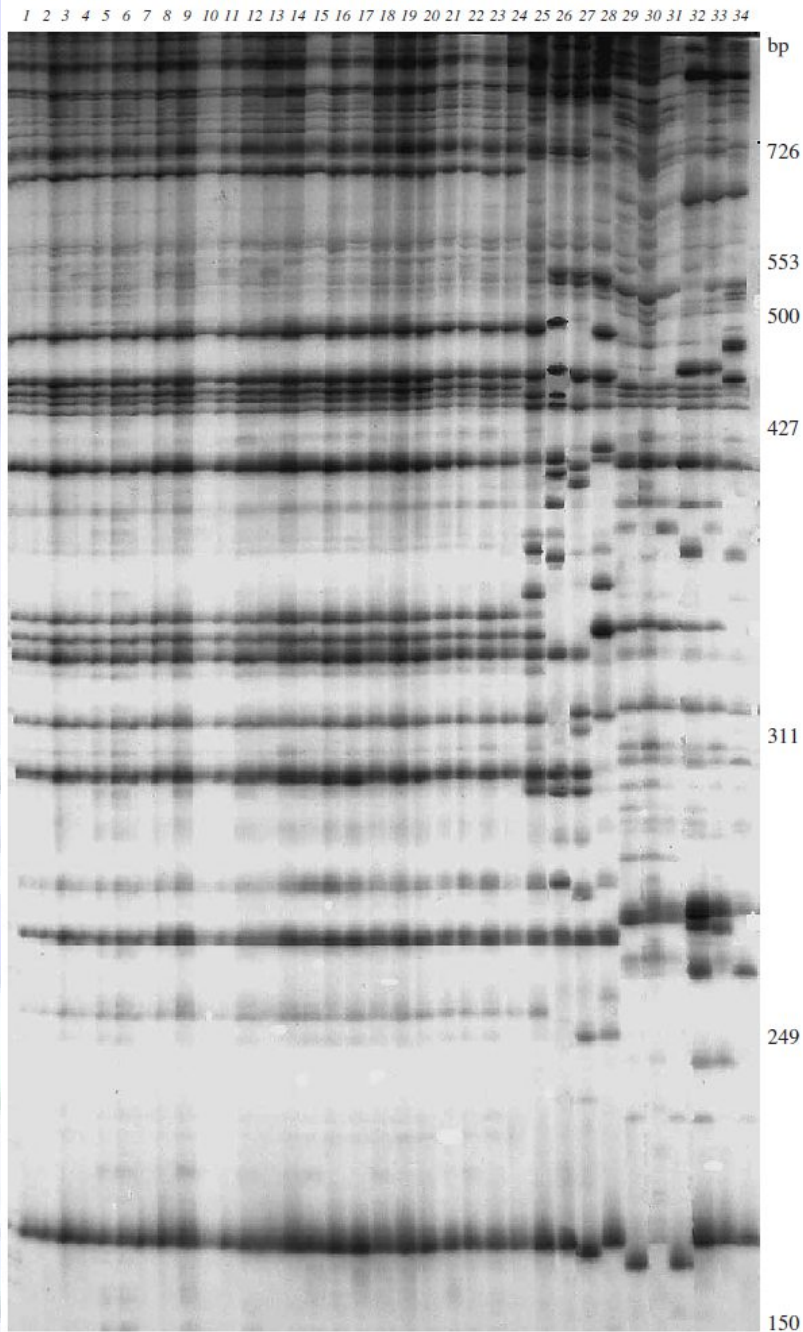
Применение в научных исследованиях

- Филогенетические исследования
 - Мультилокусные ПЦР
 - RAPD-PCR
 - Inter-SINE-PCR
 - ISSR-PCR
 - Монолокусный ПЦР
 - Анализ длины микросателлитных повторов
 - Анализ наличия отсутствия SINE повторов

Analysis of DNA of Higher Primates Using Inter-SINE PCR

(Ryabigina et al., 2008)

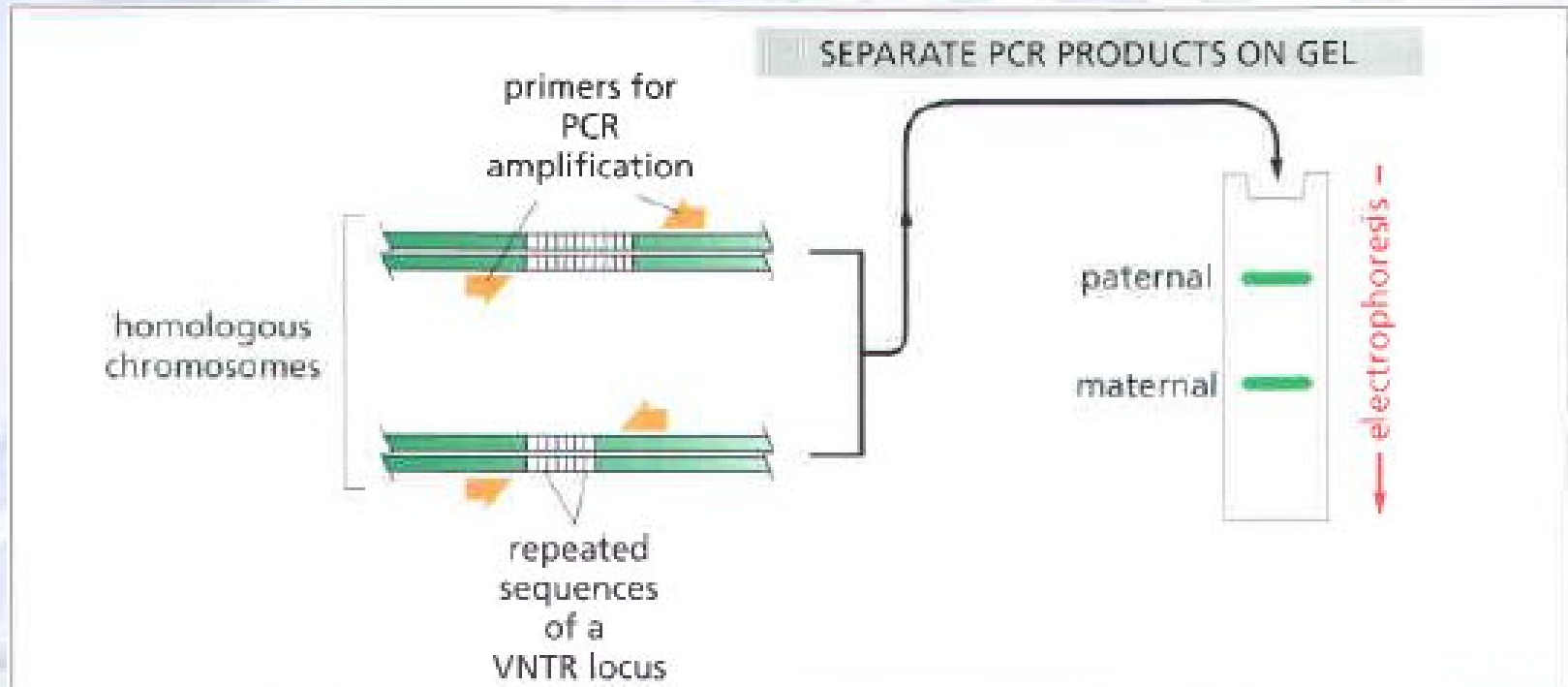
Fig. 1. Inter-MIR PCR of human and ape DNA samples. *Homo sapiens*: (1 to 24); Apes: common chimpanzee, *Pan troglodytes*, (25); gorilla, *Gorilla gorilla*, (26); Bornean orangutan, *Pongo pygmaeus*, (27); white-handed gibbon, *Hylobates lar*, (28); lion-tailed macaque, *Macaca silenus*, (29); stump-tailed macaque, *Macaca arctoides*, (30); rhesus monkey, *Macaca mulatta*, (31); olive baboon, *Papio Anubis*, (32); hamadryas baboon, *Papio hamadryas*, (33); and green monkey, *Chlorocebus aethiops*, (34). Denatured DNA fragments were separated by means of electrophoresis in polyacrylamide gel with urea. The sizes of molecular size markers (DNA of FKh 174, digested with *Hin* fl) are shown to the right of electrophoregram.



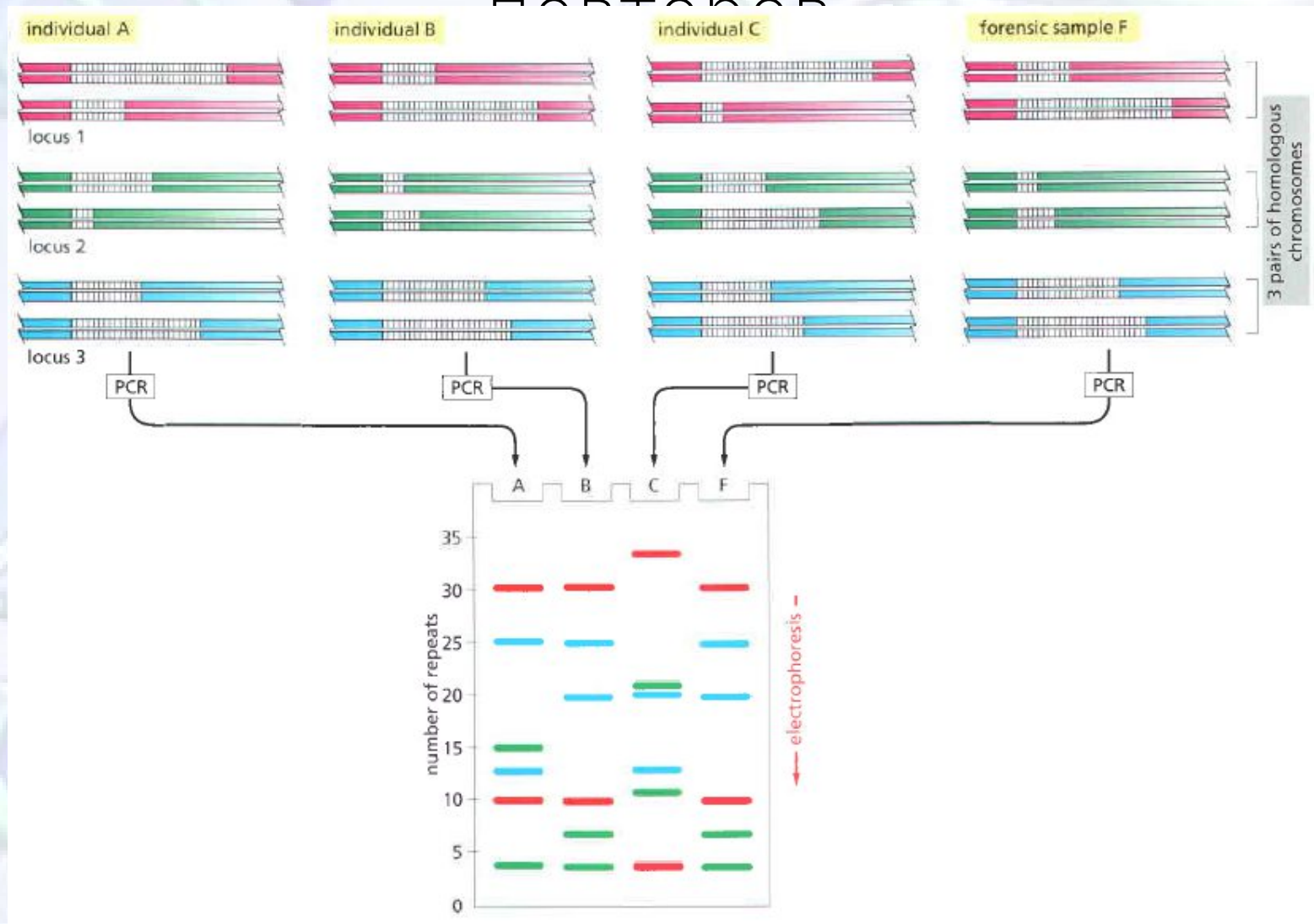
Применение в научных исследованиях

- **Филогенетические исследования**
 - Мультилокусные ПЦР
 - RAPD-PCR
 - Inter-SINE-PCR
 - ISSR-PCR (inter-microsatellite-PCR)
 - Монолокусный ПЦР
 - Анализ длины микросателлитных повторов
 - Анализ наличия отсутствия SINE повторов

Анализ длины микросателлитных повторов



Анализ длины микросателлитных



Применение в научных исследованиях

- Филогенетические исследования
 - Мультилокусные ПЦР
 - RAPD-PCR
 - Inter-SINE-PCR
 - ISSR-PCR (inter-microsatellite-PCR)
 - Монолокусный ПЦР
 - Анализ длины микросателлитных повторов
 - Анализ наличия отсутствия SINE повторов

УДК 599.113

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ И СОВРЕМЕННАЯ ФИЛОГЕНЕТИКА МЛЕКОПИТАЮЩИХ

© 2004 г. А. А. Банникова

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,
кафедра зоологии позвоночных
119992 Москва, Ленинские горы
e-mail: grechko@genome.eimb.relarn.ru
Поступила в редакцию 23.06.2003 г.*

Памяти Б.М. Медникова

В обзоре разбираются основные молекулярные маркеры, используемые в филогенетических реконструкциях млекопитающих, - митохондриальные и ядерные гены, сателлитная ДНК, короткие и длинные ретропозоны. Рассмотрены проблемы филогенетических реконструкций по генным последовательностям - выбор гена и внешней группы, сдвиг нуклеотидного и аминокислотного состава, эффект притяжения длинных ветвей, размер выборки и длина последовательности. Значительная часть обзора посвящена разбору методов мультилокусного анализа ДНК (RAPD, RFLP, IS-PCR, ISSR-PCR, AFLP). Обсуждаются их достоинства и недостатки, приводятся примеры удачного и неудачного применения на разных таксономических уровнях. Обсуждены возможные причины несоответствия молекулярно-филогенетических реконструкций между собой и морфологическим гипотезам. Кратко рассмотрены новейшие представления о макрофилогении плацентарных млекопитающих, основанные на молекулярно-генетических данных. Показана высокая надежность предложенных молекулярными филогенетиками гипотез о делении плацентарных на Afrotheria (включая Afrosoricida) и Laurasiatheria, монофилии клад Euarchontoglires и Cetartiodactyla. Сделан вывод, что тщательный анализ соответствий и противоречий между разными данными и поиск конгруэнтных заключений, сделанных по разным признакам, - это наиболее продуктивный путь развития филогенетики.

Моле кул ярно-генетический анализ стал сегодня почти необходимой частью любого филогенетического таксономического исследования. Число работ, основанных на полных последовательностях индивидуальных генов или их участках, на сравнении более или менее протяженных повторяющихся последовательностей или на интегральной оценке общего сходства геномной ДНК, растет как снежный ком. В распоряжении геносистематиков теперь есть подходы, позволяющие вести исследования на самых разных уровнях - от индивидов и популяций до отрядов и надотрядных категорий. Эти подходы можно условно подразде-

ем и распространением в геномах отдельных генетических элементов и семейств повторов.

3. Сопоставление протяженных анонимных участков генома с неизвестными функциями и часто неясной локализацией путем сканирования мутаций по всему геному - разные варианты ПЦР, ПДРФ (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов), молекулярная ДНК x ДНК-гибридизация. Эта группа методов дает общую оценку молекулярно-генетического сходства видов.

Реконструкции, проведенные на основании разных молекулярных данных, далеко не всегда согласуются не только с "морфологическими", но

Применение в научных исследованиях

- Анализ экспрессии генов и miRNA
- Анализ уровня метилирования ДНК
- Филогенетические исследования
- Анализ SNP
- Амплификации ДНК как этап секвенирования
- Амплификация ДНК для генно-инженерных манипуляций

SNPs (Single Nucleotide Polymorphism)

Однонуклеотидные позиции в геномной ДНК, для которых в популяции имеются различные варианты последовательностей (аллели) с частотой редкого аллеля не менее 1%

- В среднем на 1000 оснований человеческого генома – 1 SNP
- SNP – это наиболее частая причина существования нескольких аллелей одного гена

SNPs (Single Nucleotide Polymorphism)

- Анализ SNP

- РТ-ПЦР с аллельспецифичными праймерами
- РТ-ПЦР с аллельспецифичными пробами (зондами)
- Анализ кривой плавления ДНК-дуплексов

Применение в научных исследованиях

- Анализ экспрессии генов и miRNA
- Анализ уровня метилирования ДНК
- Филогенетические исследования
- Анализ SNP
- Амплификации ДНК как этап секвенирования
- Амплификация ДНК для генно-инженерных манипуляций

Постгеномная Эра

- 26 июня 2000 года было объявлено о расшифровке генома человека
- На данный момент известны геномы множества организмов
- Геном человека, других организмов, последовательности отдельных генов находятся в свободном доступе в интернете
- Коммерческий синтез олигонуклеотидов качественен, быстр и доступен по цене

Всё это предоставляет современным исследователям

огромное, неизведанное поле для творчества,

базовыми инструментами в котором являются

ПЦР и секвенирование, в различных модификациях

Контроль качества ПЦР

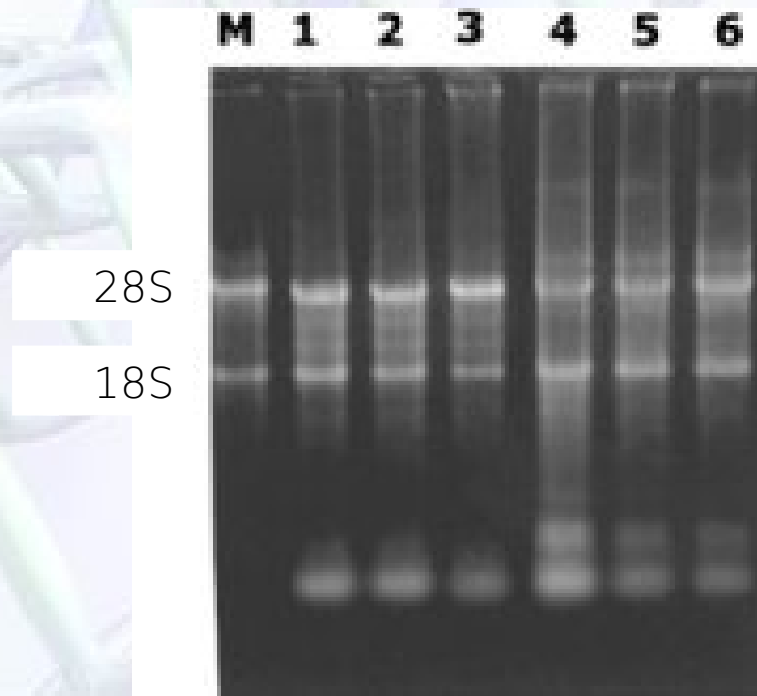
- Проверка соответствия праймеров рекомендуемым параметрам, при их дизайне
- Подбор стабильного референсного гена
- Контроль качества и количества выделенной нуклеиновой кислоты
- Контроль эффективности обратной транскрипции
- Контроль наличия геномной ДНК в РНК-пробе
- Отрицательный контроль (загрязнение растворов)
- Контроль параметров E и α
- Оценка специфичности ПЦР анализом кривой плавления продукта реакции
- Калибровка инструмента, при необходимости нормализация по ROX

Рекомендуемые параметры праймеров

- Длина 18-22 осн.
- Температура плавления 52-60°C
- Содержание GC: 40-60%
- Вторичные структуры:
 - _ Шпильки: $\Delta G > -2$ ккал/моль на 3'-конце и $\Delta G > -3$ ккал/моль - внутренние
 - _ Гомодимеры: $\Delta G > -5$ ккал/моль
 - _ Гетеродимеры: $\Delta G > -5$ ккал/моль
- Повторы:
 - _ не более 4 динуклеотидных повтора
 - _ Не более 4 одинаковых нуклеотидов подряд
- Повторы:
- Минимум G/C на 3' конце праймеров (не более трех из пяти последних нуклеотидов)
- Отсутствие кросс-гомологичности к другим последовательностям в геноме объекта (проверяется в системе BLAST).

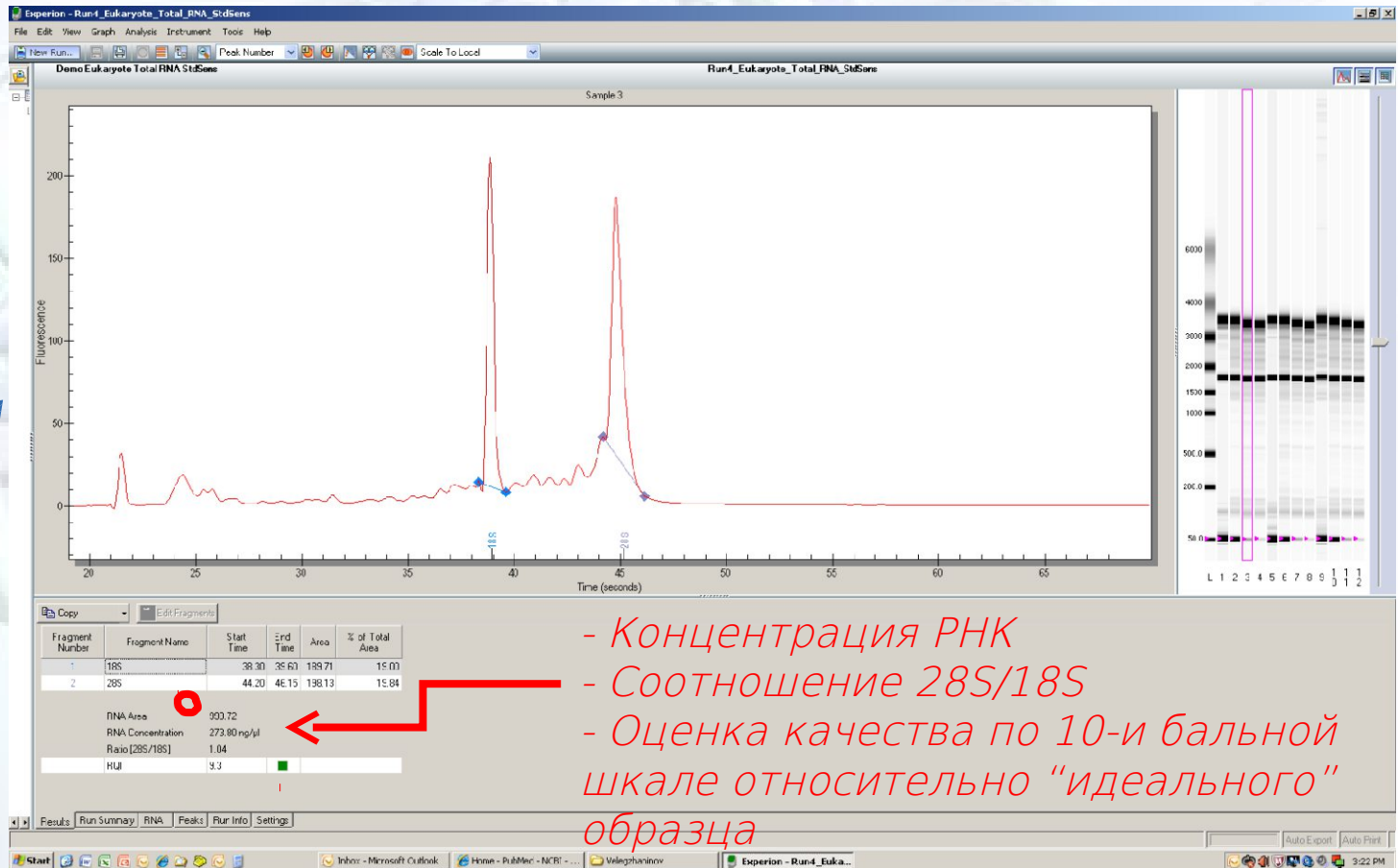
Контроль качества выделенной РНК

- Основной критерий – при элеткрофорезе должны быть чётко различимы 18S и 28S субъединицы рибосомальной РНК!



Контроль качества выделенной РНК

- Значительно более точная, воспроизводимая и простая оценка качества и количества РНК возможна с помощью систем капиллярного электрофореза



Контроль эффективности обратной транскрипции



Контроль качества ПЦР

- Проверка соответствия праймеров рекомендуемым параметрам, при их дизайне
- Подбор стабильного референсного гена
- Контроль качества и количества выделенной нуклеиновой кислоты
- Контроль эффективности обратной транскрипции
- Контроль наличия геномной ДНК в РНК-пробе
- Отрицательный контроль (загрязнение растворов)
- Контроль параметров E и α
- Оценка специфичности ПЦР анализом кривой плавления продукта реакции
- Калибровка инструмента, при необходимости нормализация по ROX

Различия в коэффициентах α

$$F = \alpha N$$

α – это коэффициент пропорциональности между накоплением молекул продукта реакции (N) и увеличением флюоресценции

(Ребриков Д. В. и др. 2009)

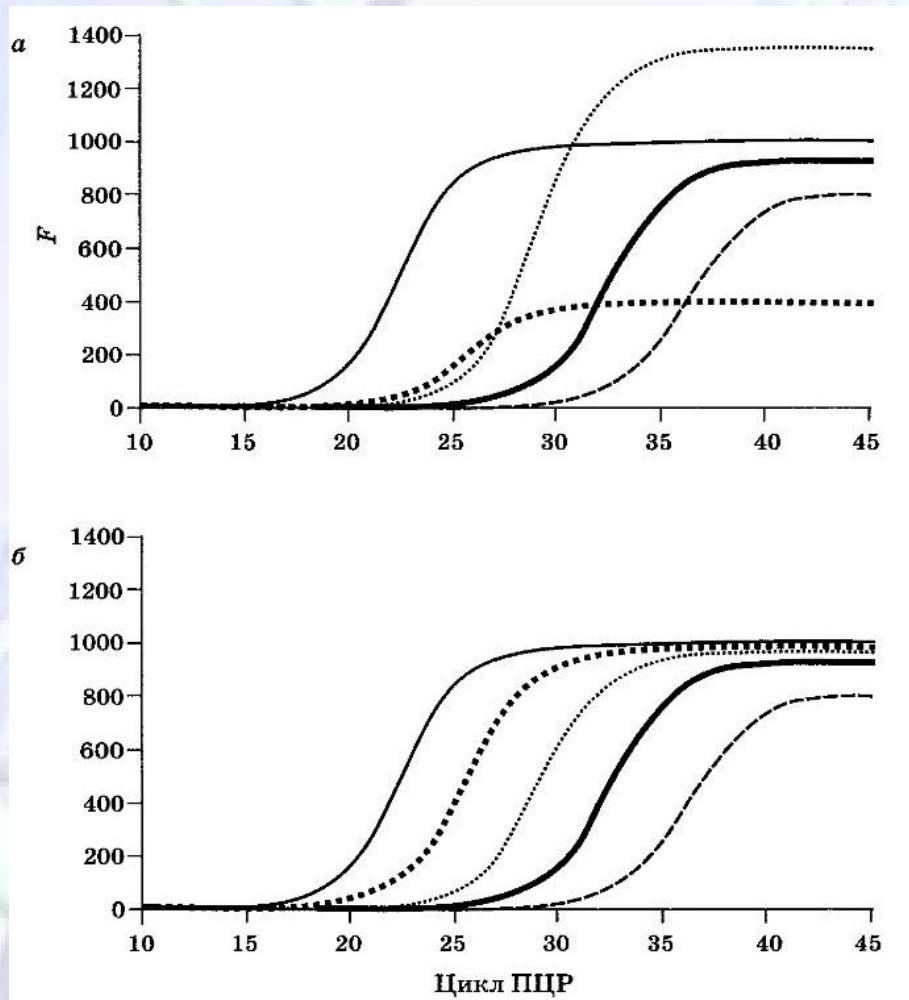


Рис. 7.10. Пример графиков накопления ДНК до (а) и после (б) нормировки коэффициентов α .

Переменная и постоянная фоновая флюоресценция



Эффективность реакции

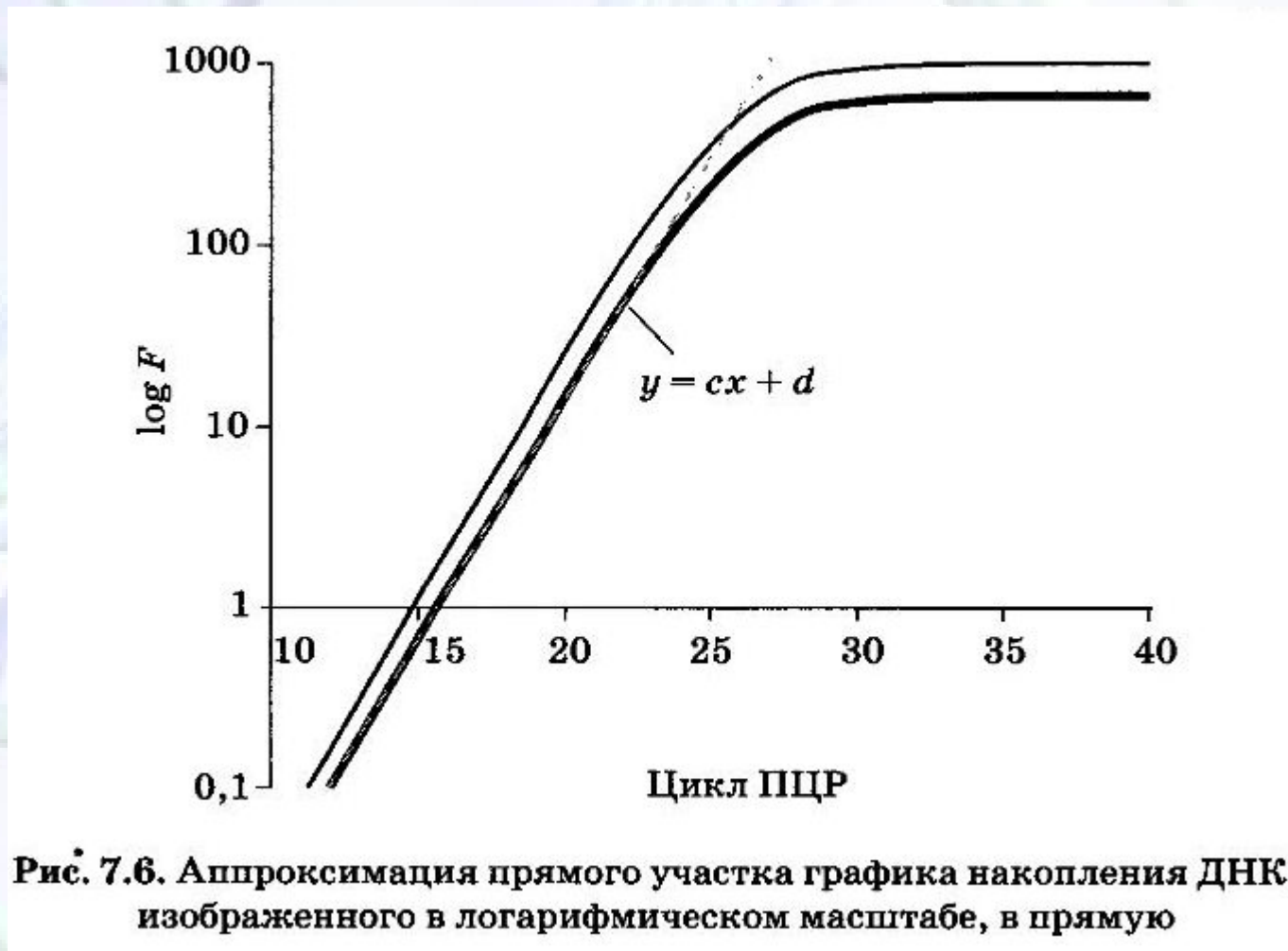


Рис. 7.6. Аппроксимация прямого участка графика накопления ДНК, изображенного в логарифмическом масштабе, в прямую

Оценка специфичности ПЦР анализом кривой плавления продукта реакции

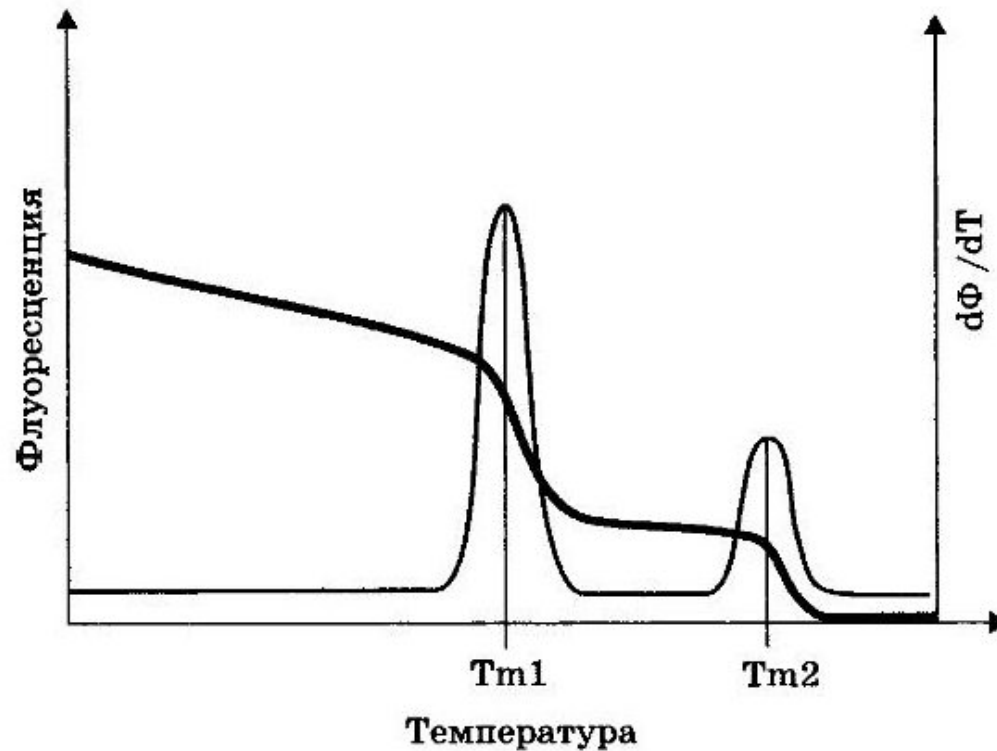
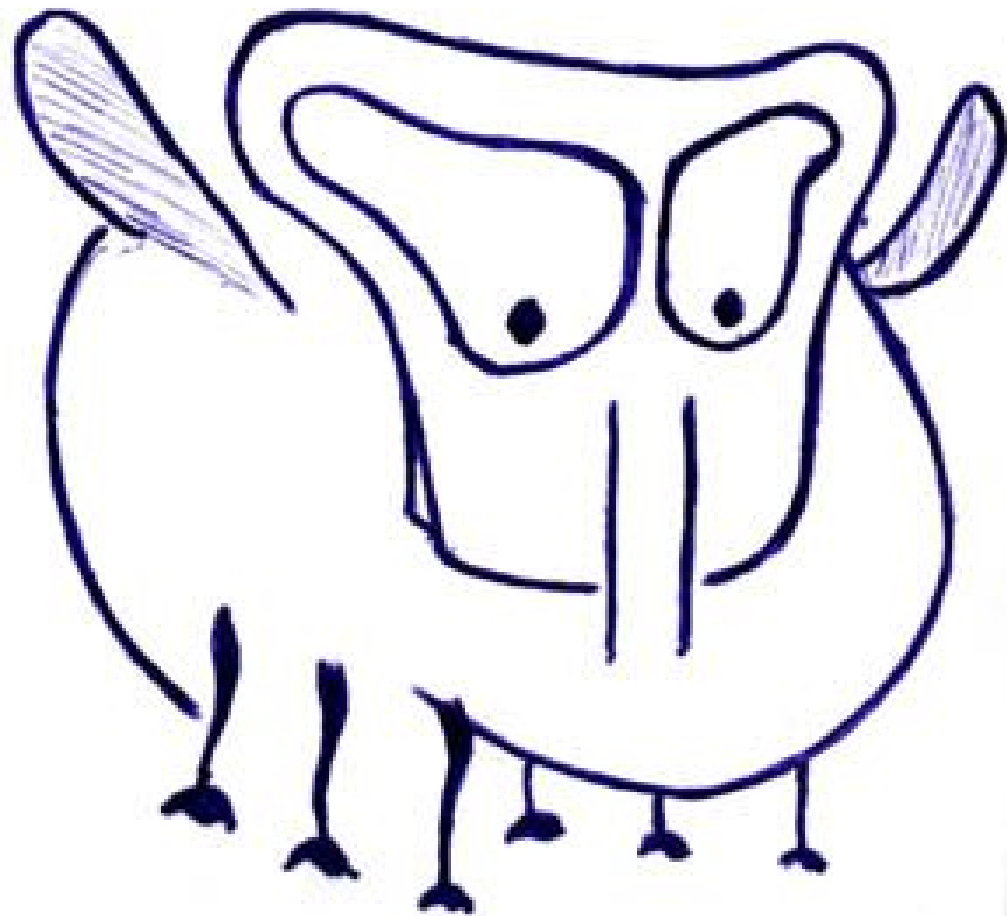


Рис. 4.4. Пример кривой плавления продуктов ПЦР (сплошная линия). Тонкой линией показан график первой производной. Значения максимумов первых производных обычно принимают за температуру плавления ампликонов (T_{m1} и T_{m2})



СПАСИБО ЗА
ВНИМАНИЕ!

Картина ручкой «Мух» неизвестного гения из
интернета