Молекулярная генетика

- Молекулярная генетика - подраздел генетики, который изучает структуру и функционирование генов на молекулярном уровне.
- Молекулярная биология - современная ветвь биологии, посвященная объяснению биологических явлений в молекулярных терминах. Молекулярные биологи часто используют методы физической химии для исследования генетических проблем".
- Основным объектом молекулярной генетики является геном.
- В молекулярной генетике под термином «геном» понимают содержание ДНК в гаплоидном наборе хромосом (1С) или диплоидном наборе (2С). Общее содержание ДНК в геноме (размер генома) принято измерять в тысячах пар нуклеотидов (т.п.н.), пикограммах (1 пг= 10^{-9} мг) и в дальтонах.
- Основная функция генома - обеспечить жизнедеятельность клеток, тканей и органов и передать информацию о наследственных свойствах организма следующему поколению.

История вопроса

- 1941. Публикуется первая работа по биохимической генетике Neurospora. Это знаменитая работа Бидла и Татума “Генетический контроль биохимических реакций”. Первая связка генетики с биохимией. В этом же году появляется работа все того же знаменитого в будущем философа Джона Бернала, посвященная рентгеноструктурному анализу вируса табачной мозаики.
- 1944. Появляется эпохальная работа T. Avery, C. Macleod и M. McCarty, посвященная исследованию химической природы вещества , передающего наследственные признаки. Демонстрируется трансформация Pneumococcus с помощью дезоксирибонуклеиновой кислоты.
- 1945 Луриа, публикует знаменитую работу, описывающую мутации у бактериофагов. Генетика получает мощную модель для исследований на молекулярном уровне.
- 1949. Показано, что серповидноклеточная анемия представляет собой молекулярную болезнь, приводящую к изменению гемоглобина. Это уже работа другого гиганта - Лайнуса Полинга.

История вопроса

1950. Появляется статья Чаргаффа по нуклеотидному составу ДНК.

- 1951. Барбара Макклинток публикует первые обширные данные, доказывающие существование прыгающих генетических элементов у кукурузы. Данные, потрясшие генетику.
- 1953. Знаменитая статья Уотсона и Крика в “Nature” о двойной спирали ДНК.
- 1961. Теория оперона и контроля экспрессии генов, предсказывающая необходимость существования нестабильных РНК как промежуточных звеньев в цепи событий, которые начинаются на гене и приводят к синтезу белка.
- 1976. Первое клонирование cDNA. Генная инженерия начинает работать на науку - клонирован кДНК гена бета-глобина кролика. Это работа Тома Маниатиса - одного из авторов широко известного руководства по клонированию. В этом же году методы рекомбинантных ДНК впервые использованы для пренатальной диагностики наследственного заболевания - альфа-талассемии.

История вопроса

- 1977. Опубликованы быстрые методы определения длинных последовательностей ДНК. Это работы У. Гилберта с А. Максамом и Ф. Сэнгера с соавторами. Появилось реальное средство анализа структуры генов, как основы для понимания их функций. Обнаружено, что гены у аденовируса имеют мозаичную экзон-интронную структуру. Впоследствии окажется, что это общее свойство эукариотических генов.
- 1978. Эукариотические гены заработали в бактериях и синтезировали кодируемый ими белок: это был проинсулин.
- 1981. Появляется первая трансгенная мышь. В пронуклеус оплодотворенного одноклеточного эмбриона микроинъекцией введен ген тимидинкиназы вируса простого герпеса и показано, что этот ген работает в соматических клетках мыши.
- 1985. Появляется статья, описывающая еще одну революционизирующую технологию - полимеразную цепную реакцию, ПЦР(PCR).
- 1987. Появляются дрожжевые искусственные хромосомы YAC (Yeast Artificial Chromosomes).

Методы молекулярной генетики

Молекулярная генетика - подраздел генетики, который изучает структуру и функционирование генов на молекулярном уровне.

Методы молекулярной генетики направлены на определение структуры генома, функций отдельных элементов и механизмов их функционирования.

Методы молекулярной генетики пересекается с методами генетики, молекулярной биологии и другими.

При изучении структуры генома основной целью является определение положения генов (физическое и генетическое картирование), их структуры.

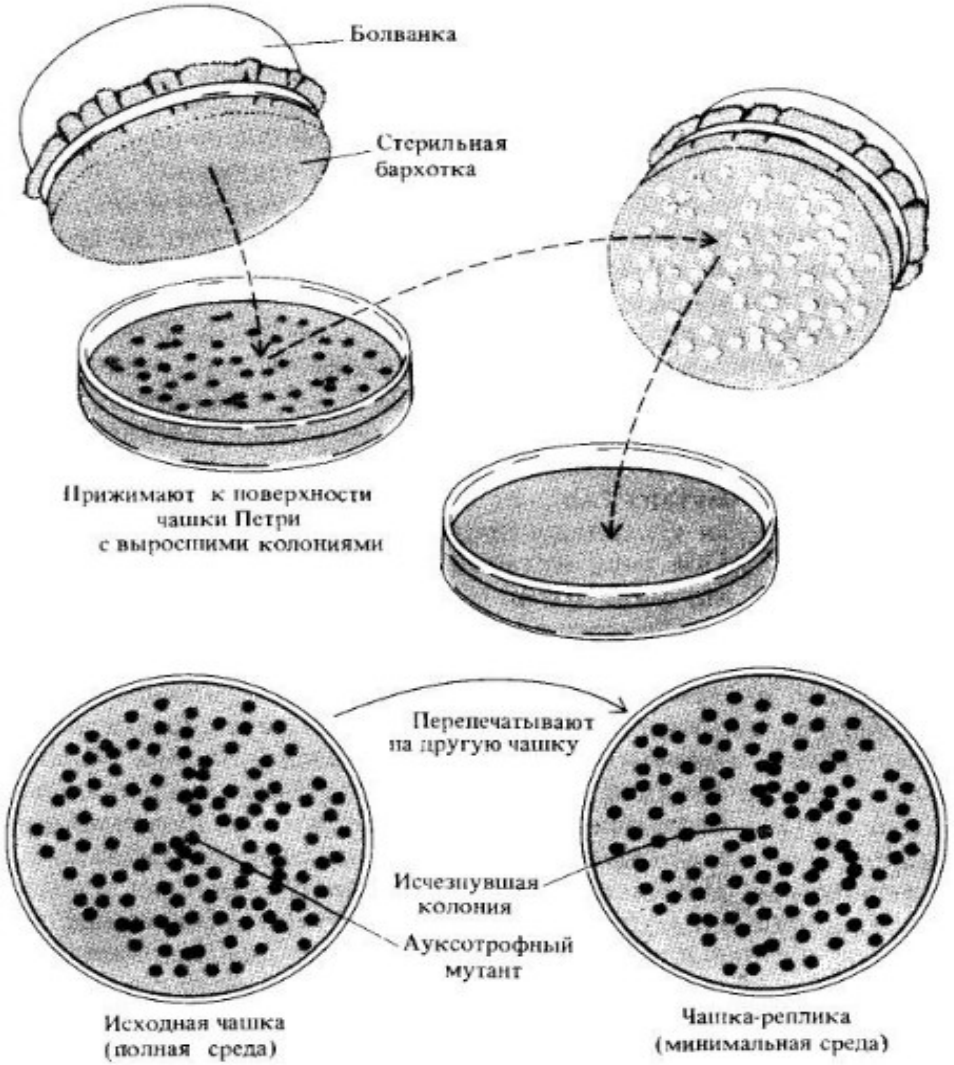
При исследовании функционирования генома используются методы позволяющие выявлять регуляторные элементы, их структуру, транс-элементы с ними связывающиеся и механизмы взаимодействия.

Генетическое картирование генома прокариот

- Штаммы дикого типа прототрофны: они способны синтезировать любые сложные органические молекулы, необходимые для их метаболизма и роста.
- Многие мутации, нарушающие экспрессию необходимых биосинтетических функций, называются условно летальными, поскольку бактерии с такими мутациями могут существовать только при добавлении в среду необходимых органических молекул.
- Такие мутанты называются ауксотрофами.
- Фенотип ауксотрофных бактерий обозначают латинскими буквами, указывающими соединение, которое необходимо добавлять в среду для их нормального роста. Например, Met^-, Thi^- и Pur^- обозначают, соответственно, мутантные штаммы, нуждающиеся в метионине, тиамине и пурине; соответствующие прототрофные фенотипы (дикий тип) обозначаются символами Met+, Thi+ и Pur+.

- Температурочувствительные мутации широко используются и в генетике бактерий. Необходимые для нормального существования (существенные) гены, которые невозможно выявить посредством ауксотрофных мутаций, обычно могут быть идентифицированы с помощью температурочувствительных мутаций.
- Примерами жизненноважных функций могут служить функции, связанные с синтезом белков или нуклеиновых кислот из молекул-предшественников- аминокислот или нуклеотидов.
- Существуют также мутации бактерий, вызывающие устойчивость к определенным бактериофагам или антибиотикам.
- Мутантные штаммы легко получить при действии на бактерии дикого типа мутагенных факторов, например, рентгеновских или ультрафиолетовых лучей, или химических мутагенов.
- Все эти мутантные штаммы могут использоваться при определении групп сцепления, так как мутации — генетические маркеры.

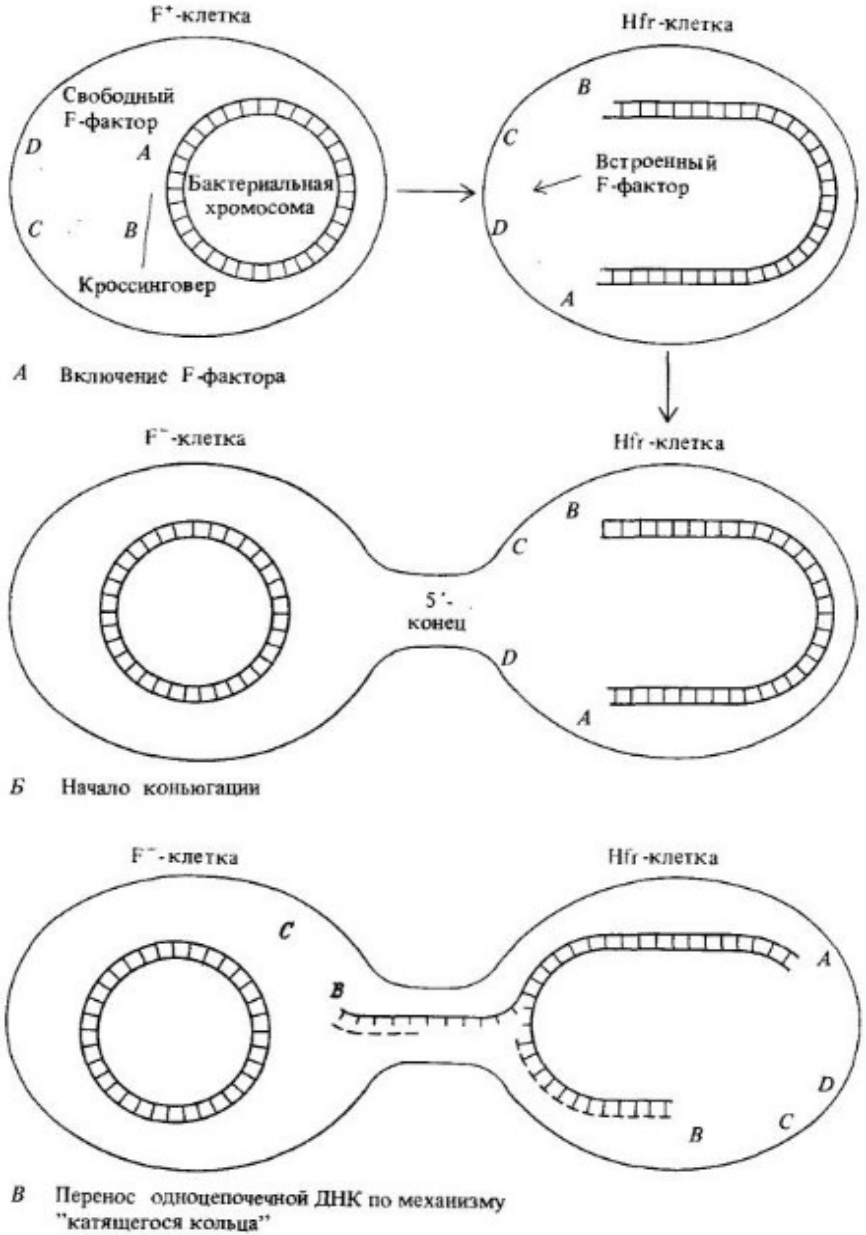
Схема выявления ауксотрофных мутантов



Метод перепечатывания колоний, при котором бактерии быстро переносят с одной питательной среды на другую. На рисунке схематически изображена последовательность операций, позволяющая идентифицировать ауксотрофные мутанты, способные к росту на исходной обогащенной среде, но не образующие колоний на новой (минимальной) среде.

Генетическое картирование прокариот

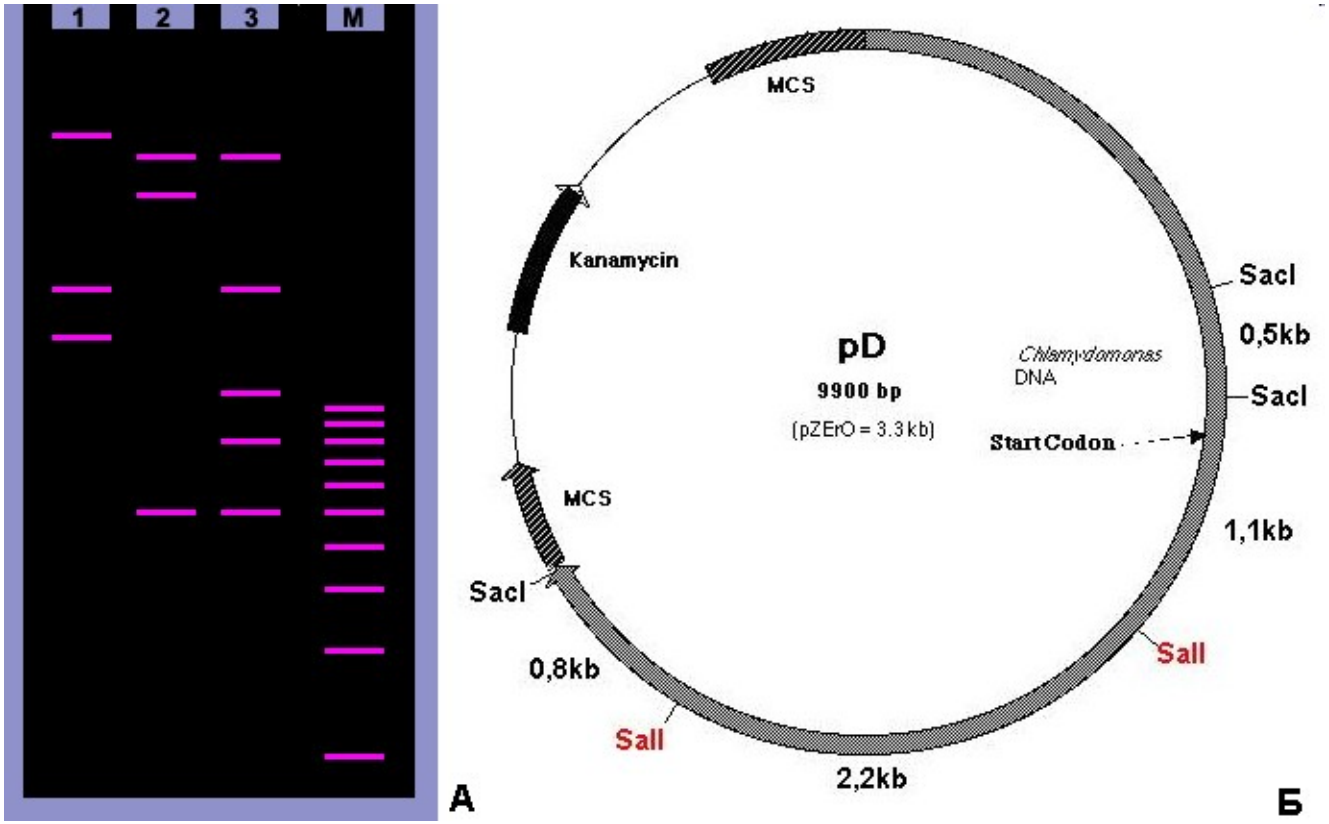
- F-фактор обладает поразительной способностью определять пол, казалось бы, бесполых бактерий.
- Его существование было обнаружено генетиками, когда они пытались определить, происходят ли скрещивания между различными линиями E. coli. Для этого исследовали возможность генетической рекомбинации между различными мутантными штаммами. Множественные ауксотрофы бактерий, полученные посредством нескольких последовательных этапов мутагенеза и селекции, смешивали и смесь высевали на минимальную среду. Появление колоний должно было свидетельствовать о возникновении рекомбинантов дикого типа.
- Репликация ДНК F-фактора приводит к переносу копии F-фактора в F ~ - клетки, превращая их в F+ -клетки.



Мобилизация бактериальной хромосомы при включении F-фактора в клетке Hfr. При конъюгации репликация хромосомы начинается с встроенного F-фактора. Отрезок F-фактора входит 5'-концом в F -клетку и увлекает за собой ДНК Hfr-клетки. Если конъюгацию прервать до того, как в клетку перейдет вся Hfr-хромосома, то клетка-реципиент сохранит F -тип

Физическое картирование генома прокариот

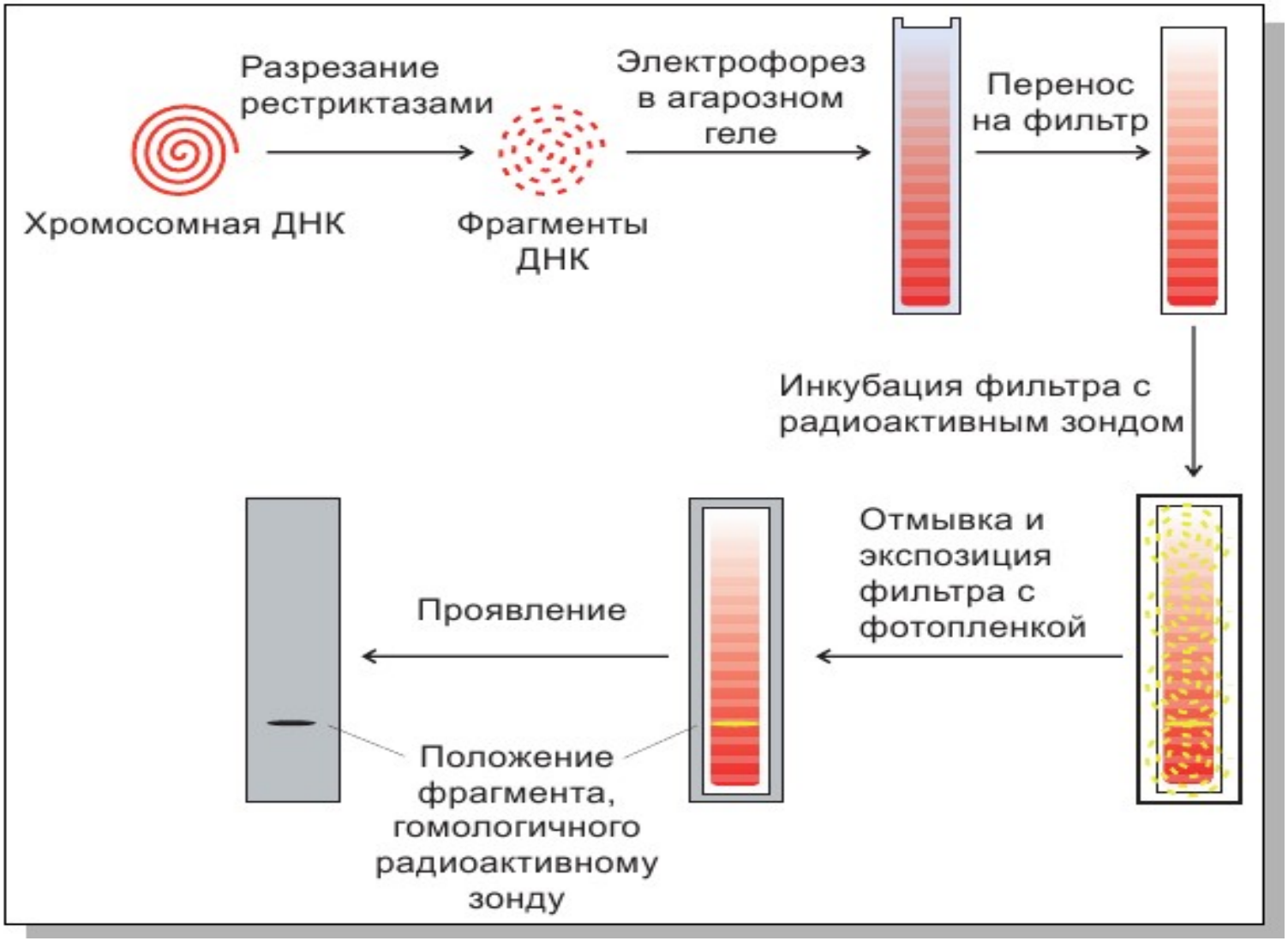
- Физическое картирование обеспечивается в основном методом рестрикционного картирования, которое часто сочетается с методом саузерн-блот гибридизации.
- Метод рестрикционного анализа заключается в следующем:
- Выделяется чистая геномная (хромосомная) ДНК бактерии и обрабатывается эндонуклеазами рестрикции по отдельности каждой, по-парно, по несколько в различных сочетаниях.
- Длины полученных рестриктных фрагментов анализируются с помощью гель-электрофореза.
- Методом перебора с учетом всех вариантов фрагментов распределяем сайты распознавания эндонуклеазами рестрикции на молекуле ДНК.
- Каждый процесс индивидуален.



А- гель-электрофорез продуктов рестрикции плазмиды pD. 1 — рестриктаза SalI, 2 — рестриктаза SacI, 3 — рестриктаза SalI/SacI, M — маркер.

Б — карта ристкции (физическая карта) плазмиды pD.

Схема саузерн-блот гибридизации



Физическое картирование у эукариот

- Физизическое картирование гена – это идентификация его последовательности и ее положения в геноме (хромосома, плечо, диск).
- Лучше всего разобраться как происходит это исследование на определенном примере, например гене mdm, сейчас уже известно что именно нарушения этого гена являются причиной мышечной дистрофии Дюшенна.
- Мышечную дистрофию Дюшенна французский врач, имя которого носит заболевание, описал в 1868 году, хотя еще раньше она была описана другим, английским, врачом Эдуардом Мерионом. Это крайне тяжелое наследственное, т. е. передающееся из поколения в поколение , заболевание. Болеют практически только мужчины, и в среднем один из 3500 - 4000 мальчиков рождается больным.
- Раз болезнь передается по наследству, значит она связана с поврежденным геном - это тривиальный вывод. Второй тоже тривиальный вывод заключается в том, что этот ген должен находиться на Х-хромосоме.

- Итак, наш ген картирован на Х-хромосоме. Наличие транслокации позволяет предположить, что он располагается в плече р21, но хотелось бы получить сам ген.
- Вспомним о транслокации у женщин, страдающих дистрофией Дюшенна. В одном из случаев это была транслокация материала Х-хромосомы на аутосому 21. При этом разрыв аутосомы произошел где-то в том районе, где располагаются гены 28S рибосомной РНК.
- Здесь помогает САУЗЕРН БЛОТ ГИБРИДИЗАЦИЯ. По английски это пишется так: Southern blot hybridization.
- Прежде чем говорить о Саузерн блот-гибридизации необходимо выяснить прицип еще одного метода – рестрикционное картирование. Реастрикционные эндонуклеазы способны разрезать молекулу ДНК в строго определенных участках ДНК это «палиндромы» определенной последовательности.

- При полном расщеплении должна образоваться несколько фрагментов. При случайном неполном расщеплении могут образовываться все возможные варианты разрывов, дающие фрагменты разной длины. Эти фрагменты ДНК имеют разные длины. Отделим каким либо способом фракцию фрагментов с более или менее одинаковыми длинами l , и обозначим полную длину генома L. Тогда каждый фрагмент из этой фракции представляет собой l/L долю генома. Какие то из этих фрагментов содержат нужную нам последовательность. Зададимся простенькой вероятностной задачей. Сколько таких фрагментов нужно взять, чтобы с вероятностью P среди них оказался хотя бы один,содержащий нужную нам последовательность. Вы,конечно, легко решите эту задачу и получите число N фрагментов, определяемое формулой (1).

$$N = \ln(1 - P)/ \ln(1-l/L)$$

- Чем больше длина l, тем меньше фрагментов нужно перебрать, чтобы найти среди них желаемый. Чем больше размер генома L, тем больше фрагментов нужно перебирать

- Воспользовавшись ДНК из локуса 28S РНК, как зондом для Саузерн блот-гибридизации, сравним размеры рестрикционных фрагментов у здоровых и больных женщин в этой области.
- Оказывается у больных длины фрагментов изменены. Точка разрыва хромосомы 21 при транслокации оказалаь прямо рядом с локусом 28S РНК.
- Следовательно, теперь можно говорить, что интересующий участок Х-хромосомы действительно оказался прямо рядом с этим локусом хромосомы 21.
- Теперь его можно попробовать выделить с помощью того же зонда. Опять существует несколько стандартных подходов, которые можно использовать для выделения.
- В исходной работе был использован один из вариантов парасексуальной генетики.Были использованы соматические клеточные гибриды.

Соматические клеточные гибриды.

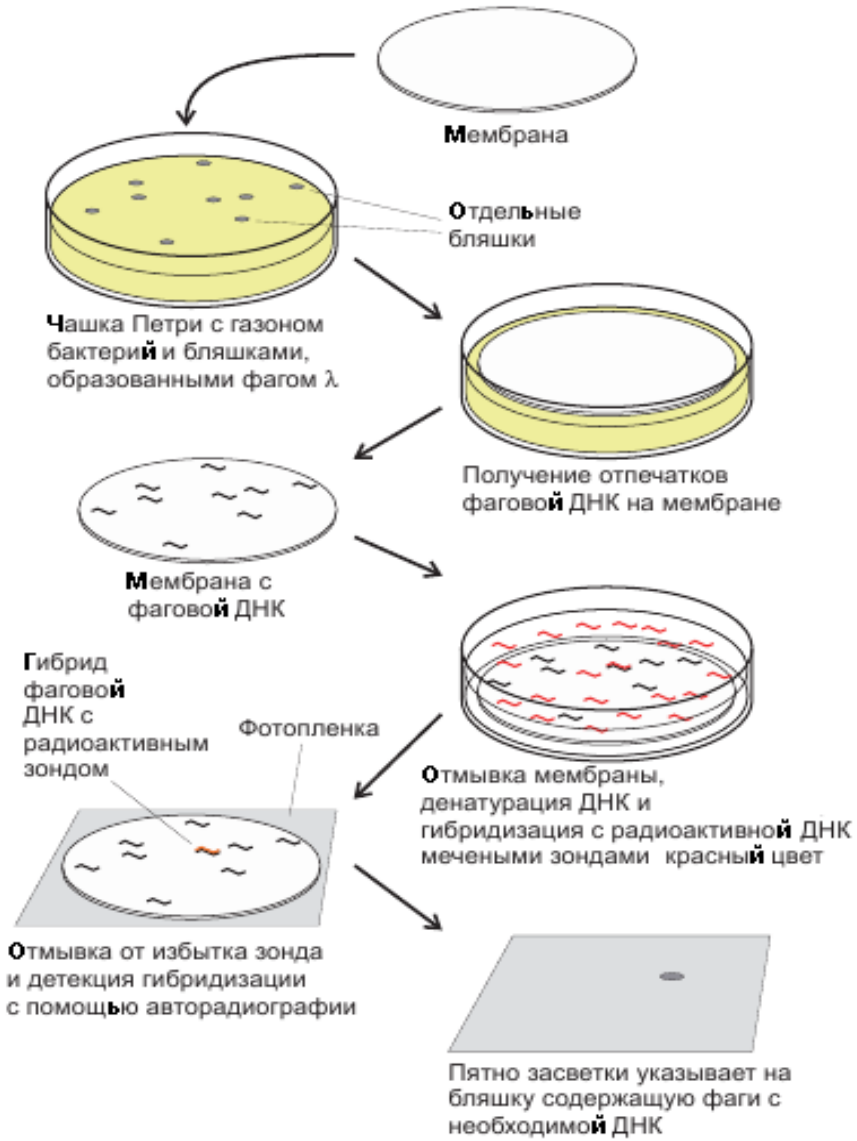
- 30 тому назад было показано, что можно слить две соматические клетки, так что образуется гибрид - гетерокарион, гибридная клетка, содержащая два ядра, от каждой из исходных клеток по одному. Некоторые из гетерокарионов способны к митотическим делениям.
- В процессе этих делений происходят потери хромосом из гибридной клетки, и в конечном счете образуется более или менее стабильная клеточная линия, в ядре которой остается вполне определенный набор хромосом от одной и другой исходных клеток.
- Можно получить гибрид мыши и человека или хомяка и человека, не прибегая к половым контактам, парасексуально. Оказывается почему то, что в гибридах человека и грызуна теряются только человеческие хромосомы и в конце концов остается полный набор хромосом грызуна и одна или несколько человеческих.
- Можно получить множество охарактеризованных гибридных клеточных линий, в каждой из которых оказываются вполне определенные хромосомы человека. Коллекции таких линий называют ПАНЕЛЯМИ.

- Воспользовавшись этим орудием, "загибридизуем" клетки женщины, страдающей дистрофией и имеющей транслокацию X;21, которую только что обсуждали, с клетками грызуна..
- Получим линию клеток, содержащих полный набор хромосом грызуна и транслоцированную хромосому. Таким образом эта хромосома отделена от других человеческих хромосом и перенесена в другое окружение. От нового хомячьего окружения ее легче отделить, чем от прежнего, человеческого. Но снова проблема. Как отделять, что делать, даже если отделили? Ведь на хромосоме много тысяч генов, а нам нужен только один. Снова нужно иметь подходящий метод поиска этой иголки в стоге сена. Такую возможность обеспечивают банки генов.
- Давайте возьмем всю смесь полученных равнодлинных фрагментов и лигируем ее с вектором. Для простоты возьмем в качестве вектора бактериальную плазмиду, например pBR322. Расщепим ее рестриктазой BamH1. В бактерию 1 попал рекомбинант с фрагментом 1, в бактерию 2 попал рекомбинант 2, в бактерию n - рекомбинант n. В результате заменили смесь фрагментов совершенно эквивалентной смесью бактерий и теперь можем перебирать не фрагменты, а бактерии, содержащие рекомбинантные ДНК. Кстати, такие бактерии тоже называют РЕКОМБИНАНТНЫМИ. В них увековечены наши фрагменты

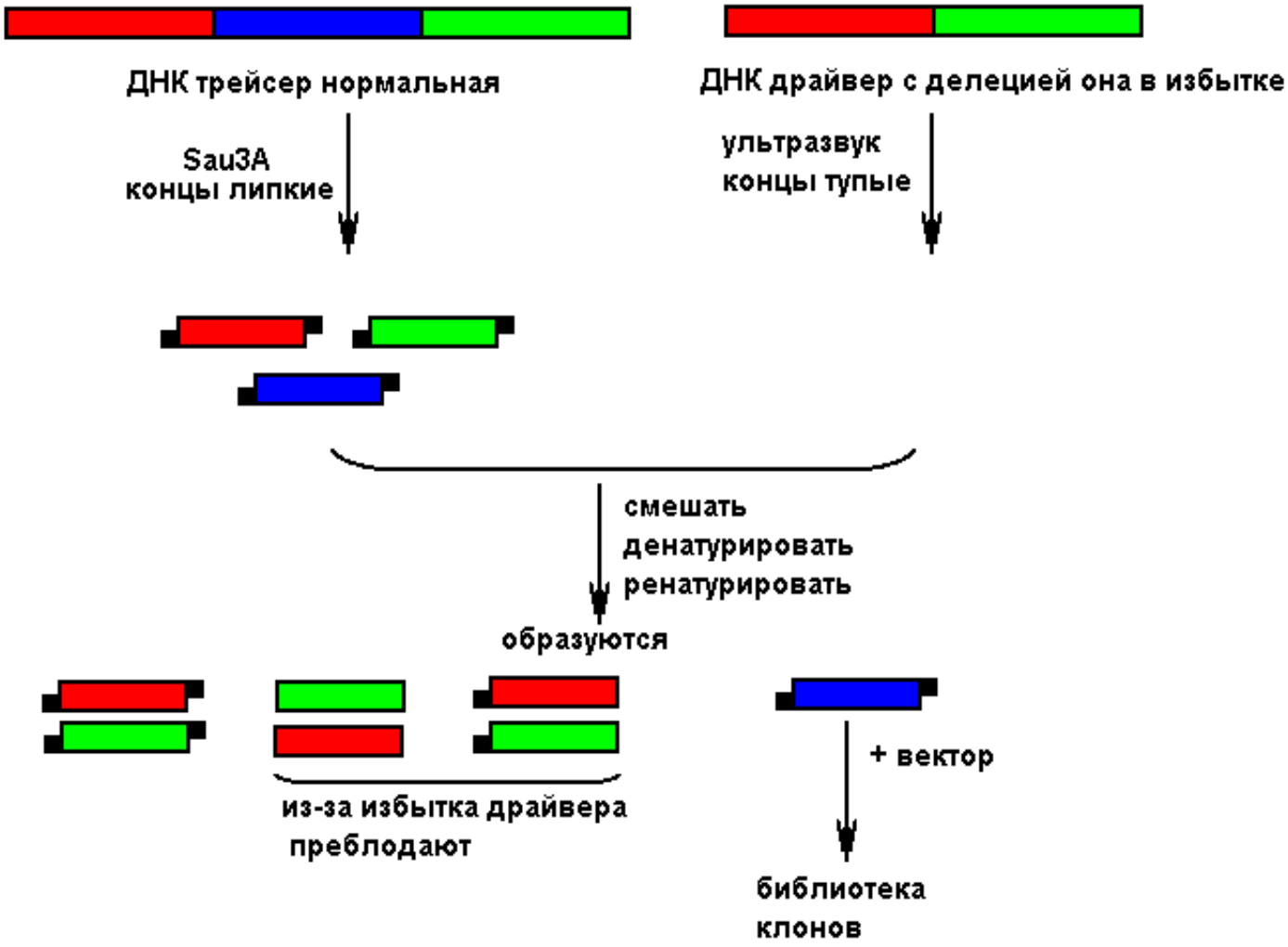
Максимальные размеры вставок, воспринимаемых различными типами векторов

Тип вектора	Клетка-хозяин	Р азмер вставки килобазы
Бактериальные плазмиды	бактерии	10
Бактериофаг лямбда	бактерии	20
Космиды	бактерии	40
Бактериофаг P1 и векторы PAC	бактерии	100
Искусственные дрожжевые хромосомы (YAC)	дрожжи	1000
Бактериальные искусственные хромосомы (BAC)	бактерии	100 - 300
Искуственные хромосомы млекопитающих(MAC)	клетки_млекопитающих	>1000

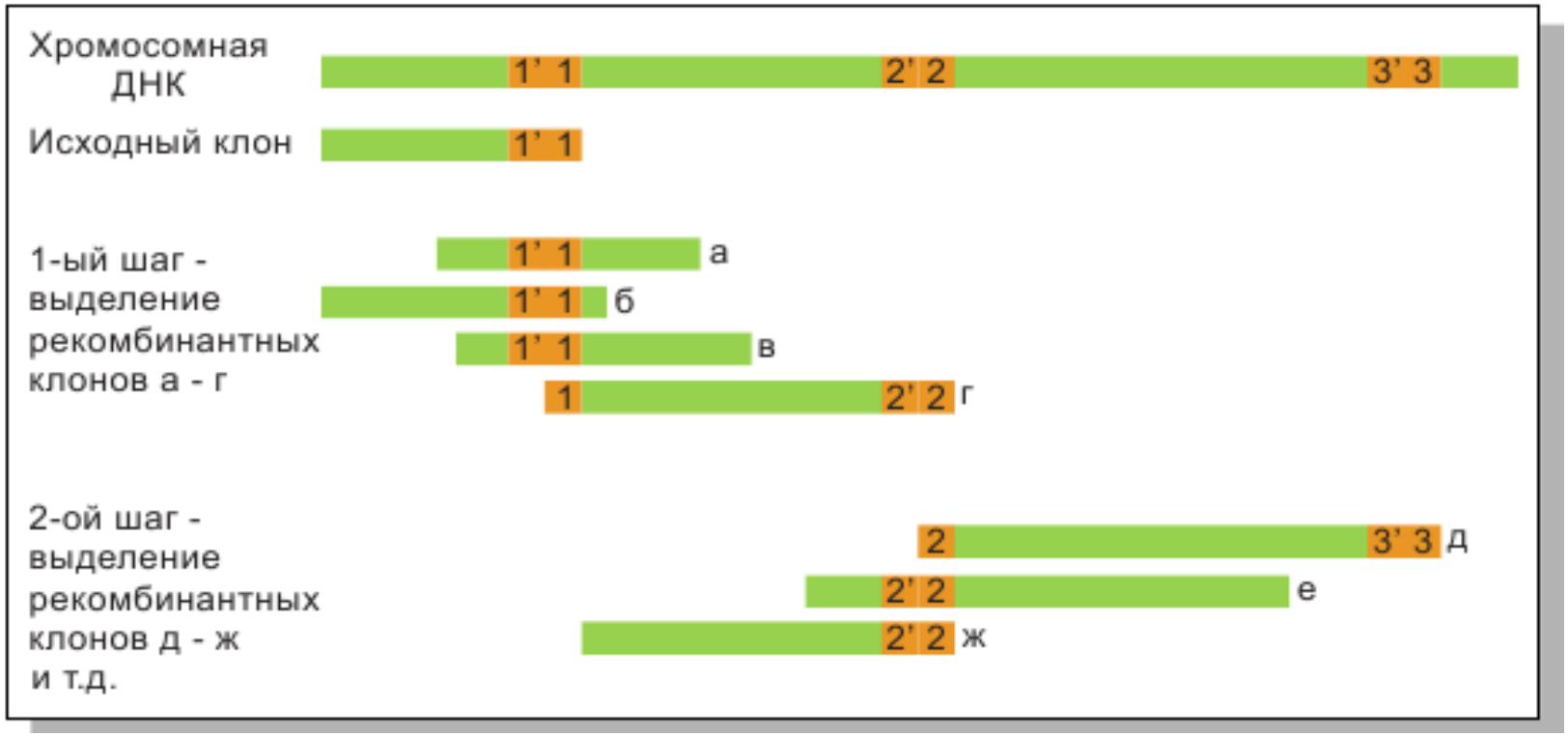
Скрининг библиотек генов



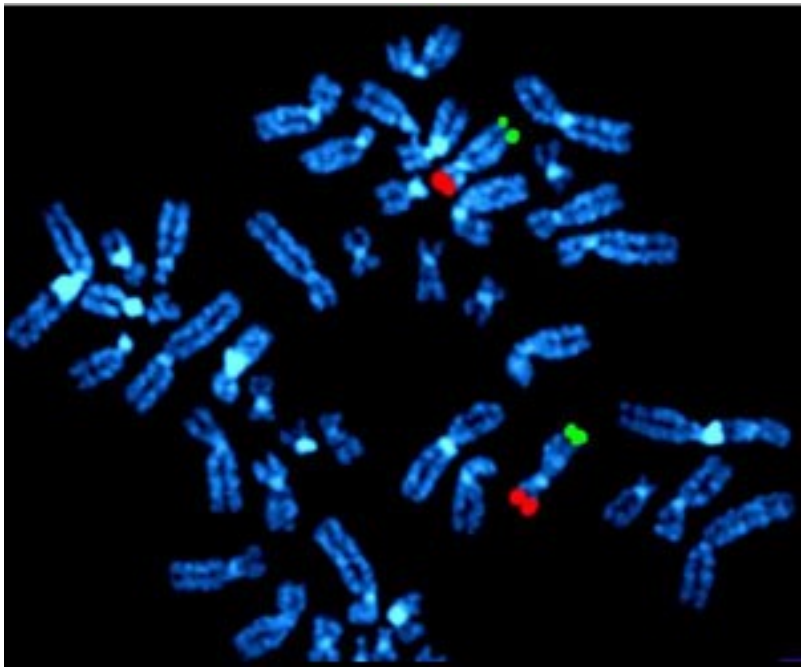
Вычитающая гибридизация



Прогулка по хромосоме.



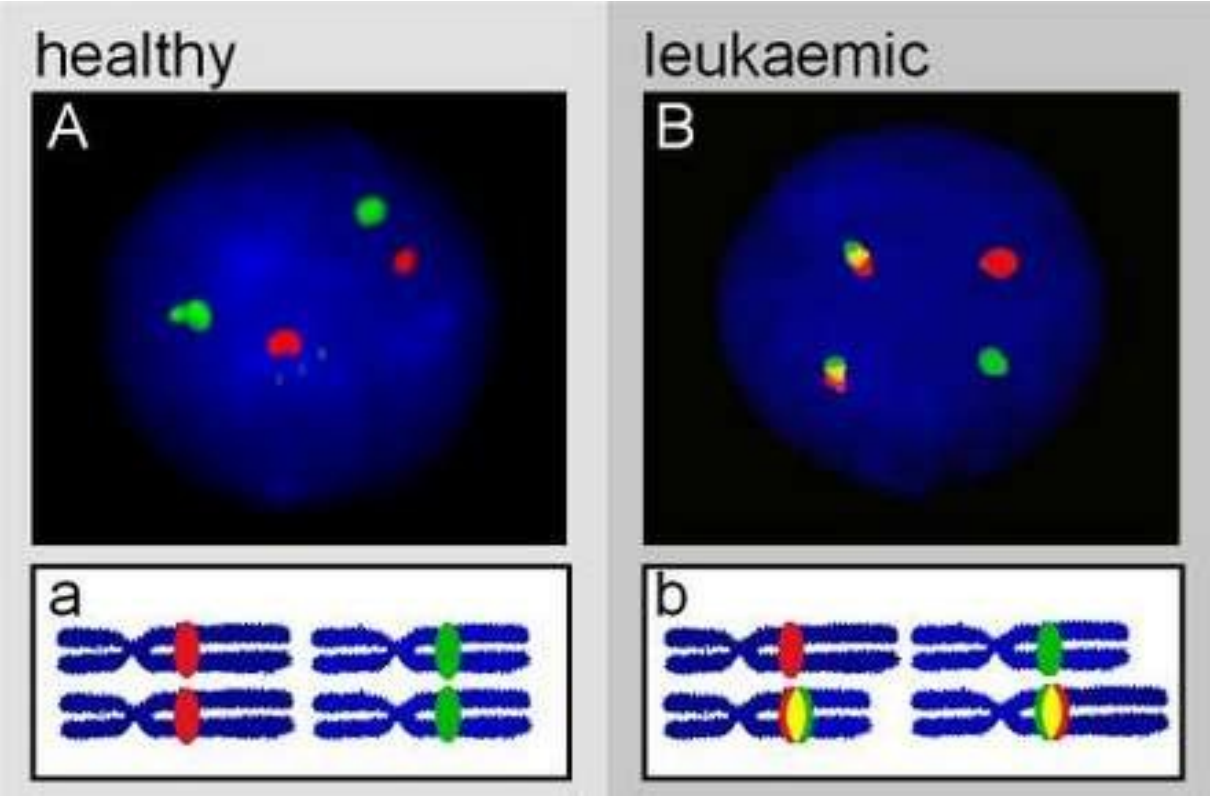
FISH- флюоресцентная in situ гибридизация.



гибридизация идет с целой хромосомой и можно определить не только хромосому и плечо, но и полосу, где располагается ген.

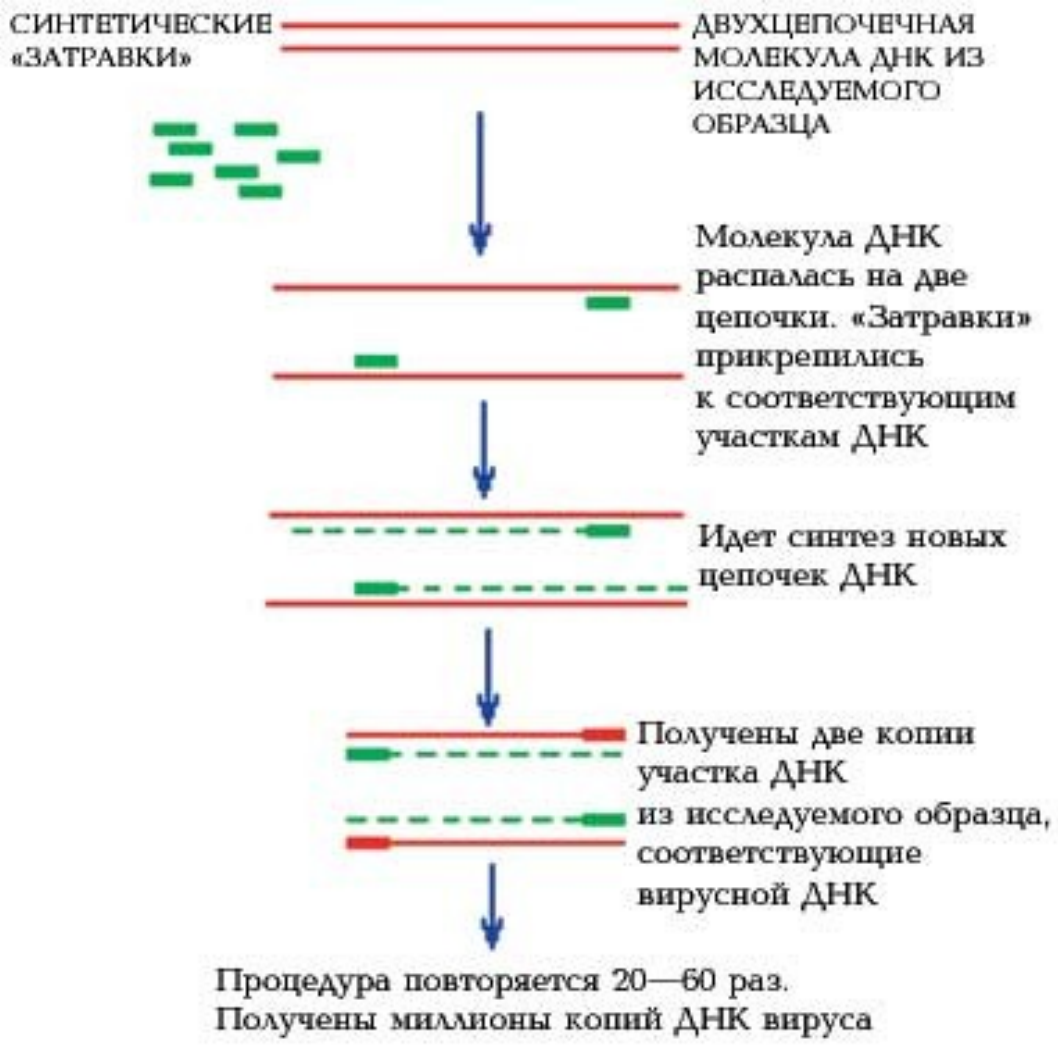
Флюоресцентная: в данном случае используется определенный зонд, благо их научились получать десятками методов, самые банальные ПЦР и искуственный синтез, но этот зонд метится не радиоактивными изотопами что «опасно», и усложняет процесс, а флюоресцирующими агентами, кроме того в радиоактивном мечении окраска одна черно-белая а в флюоресценции можно раскрасить во все цвета радуги (7 цветов спектра). А значит зондов может быть несколько.

FISH- флюоресцентная in situ гибридизация.

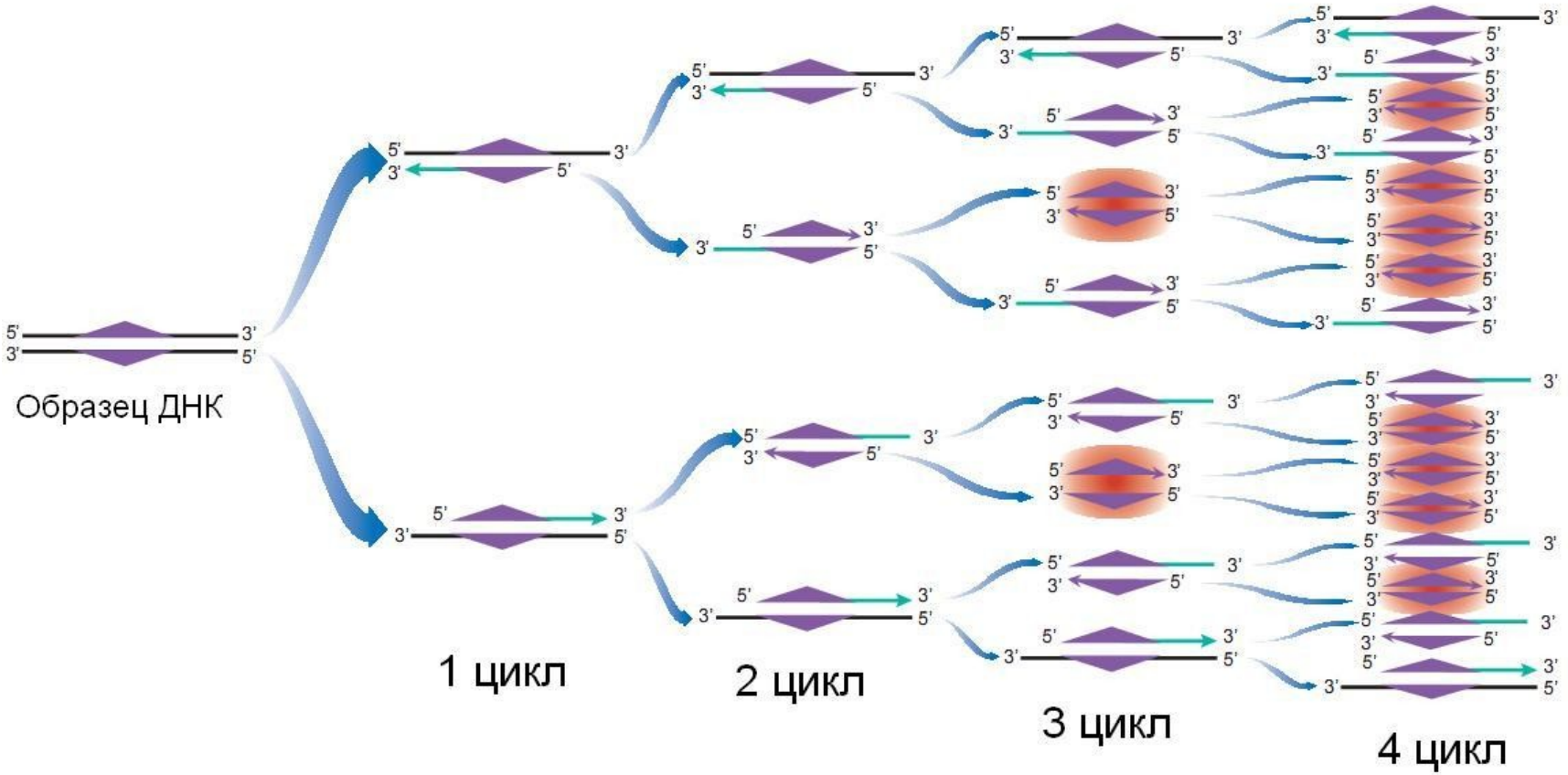


- FISH может использоваться как для хромосомных препаратов так и для интерфазных хромосом.
- С помощью FISH можно выявлять делеции, дупликации, транслокации.

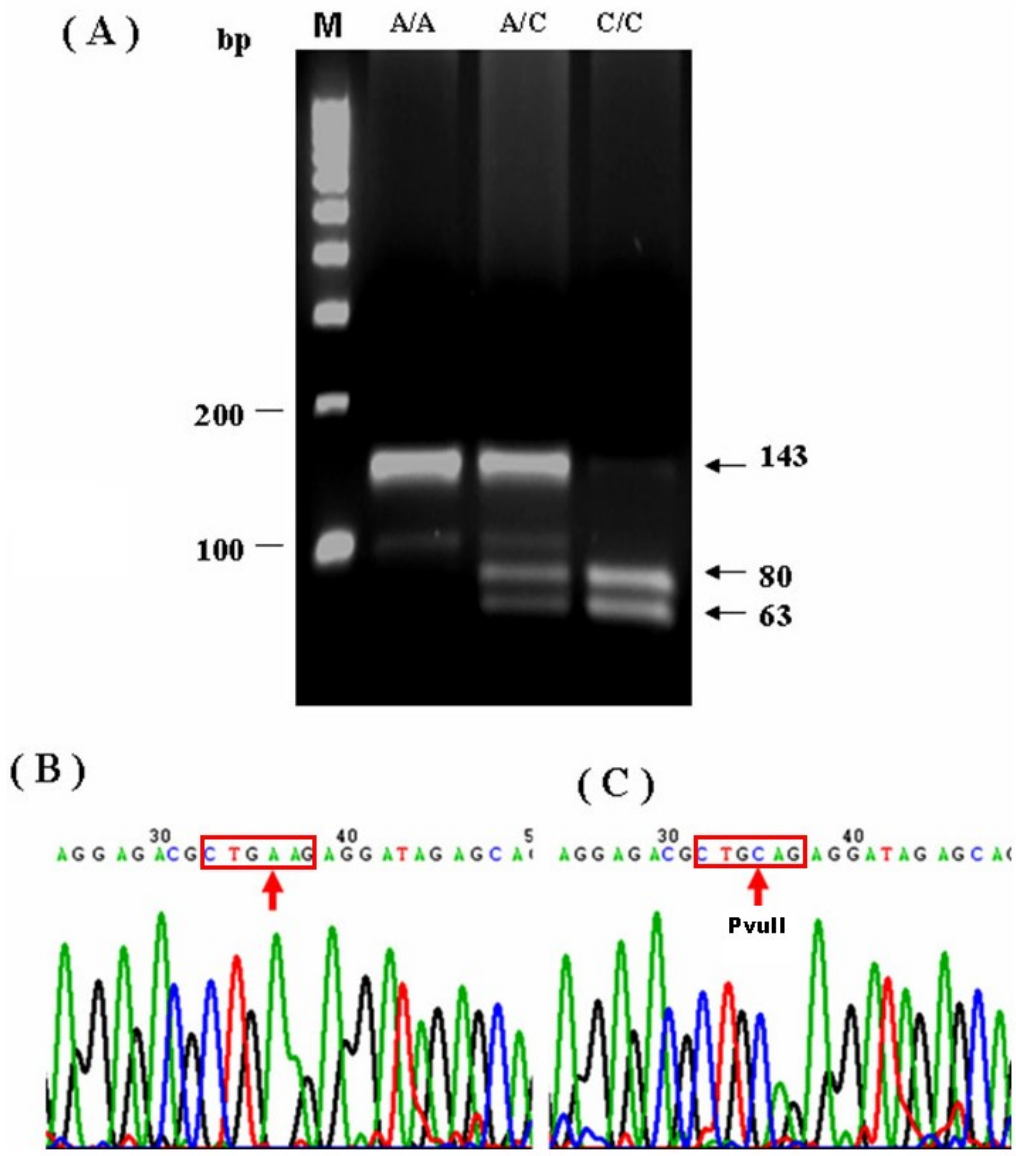
Схема одного цикла ПЦР



Результат нескольких циклов

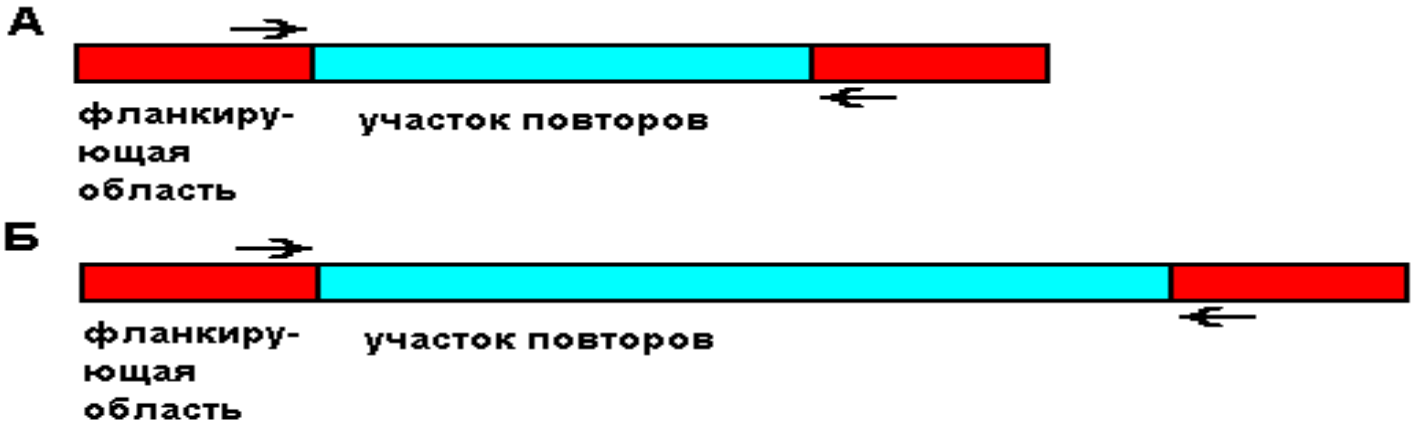


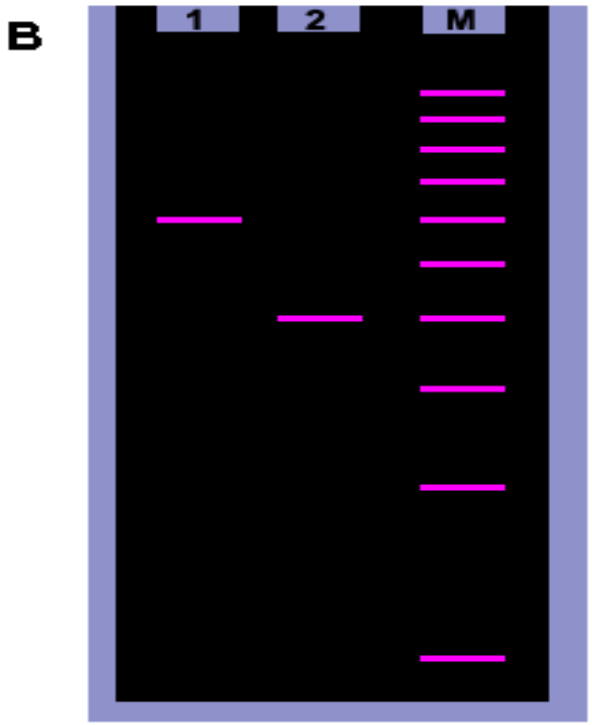
ПЦР-ПДРФ



- Аминокислотная замена — результат нуклеотидной.
- Нуклеотид мог входить в состав сайта рестрикции.
- Замена — потеря сайта, фермент не работает.
- Замена нуклеотида — появление сайта, фермент работает.
- Метод работает не всегда.

VNTR-PCR



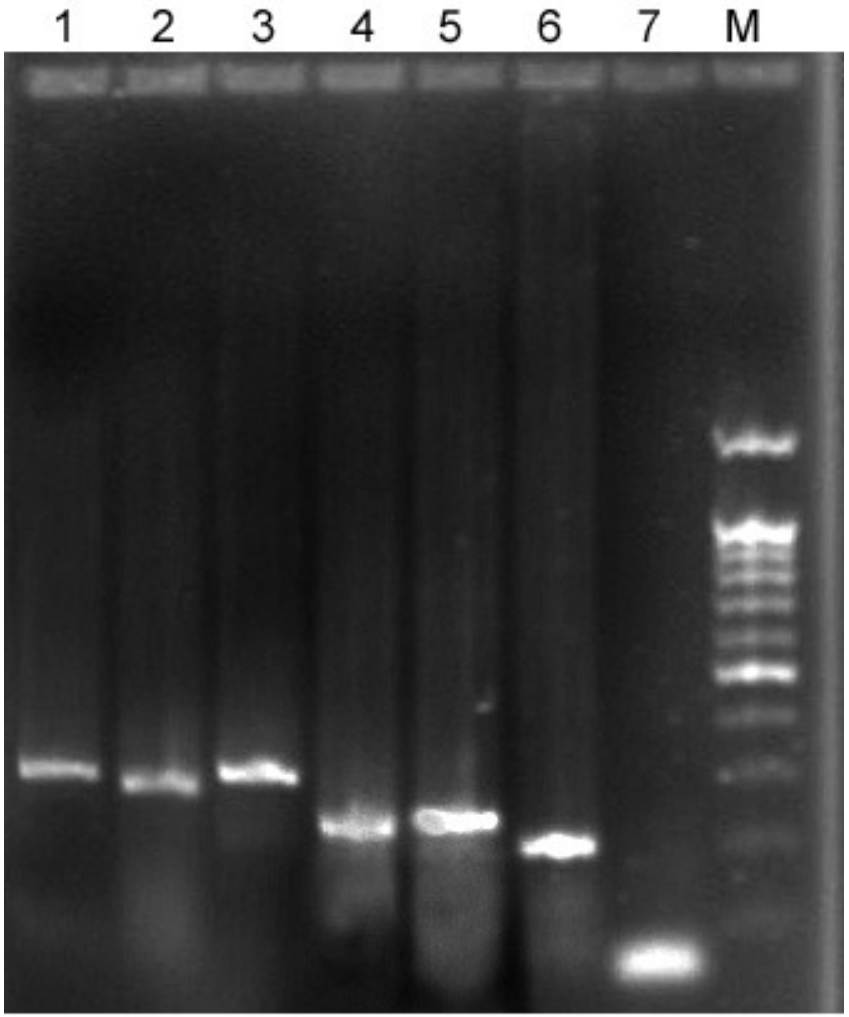


А — участок ДНК штамма 1.

Б — участок ДНК штамма 2.

В — гель-электрофорез результатов ПЦР этих штаммов.

VNTR-PCR



Гель-электрофорез в 1,5% агарозном геле ПЦР-продуктов, полученных в результате VNTR-анализа гена *spa* для 6 изолятов S.aureus
Дорожка 1 – штамм YE7521
Дорожка 2 – изолят B
Дорожка 3 – изолят C
Дорожка 4 – штамм RN2606
Дорожка 5 – штамм KO77-1
Дорожка 6 – изолят A
Дорожка 7 – отрицательный контроль
Дорожка 8 - маркер молекулярной массы 100 bp + 1,5 kb (SybEnzyme)

spa – ген, кодирующий белок клеточной стенки или капсулы бактерий, связывающий IgG, блокируя их иммунологическое действие

Схема ОТ-ПЦР

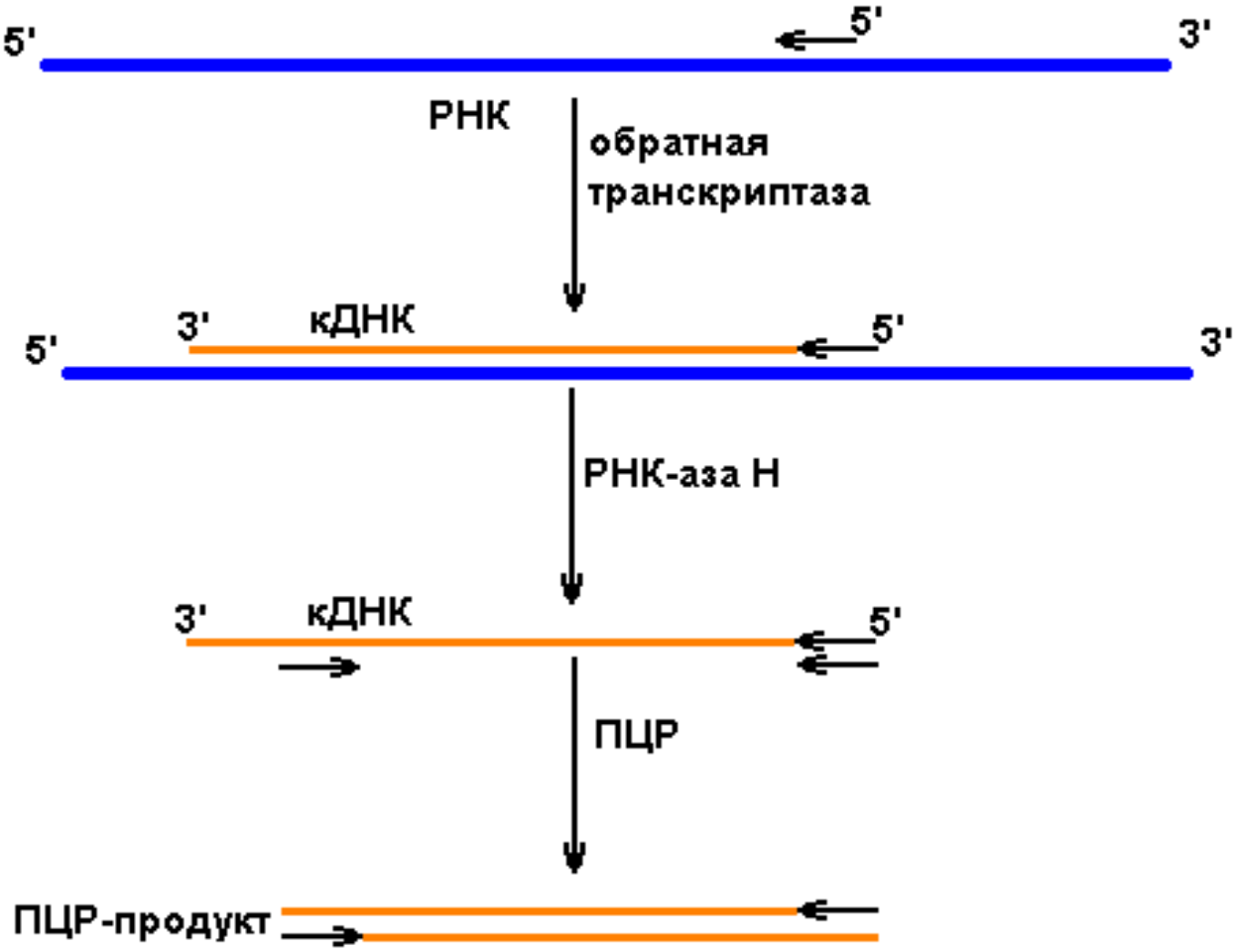

5'
5'
3'
РНК
обратная
транскриптаза
3'
кДНК
5'
5'
3'
РНК-аза Н
3'
кДНК
5'
ПЦР
ПЦР-продукт

Схема стандартного 3'-RACE

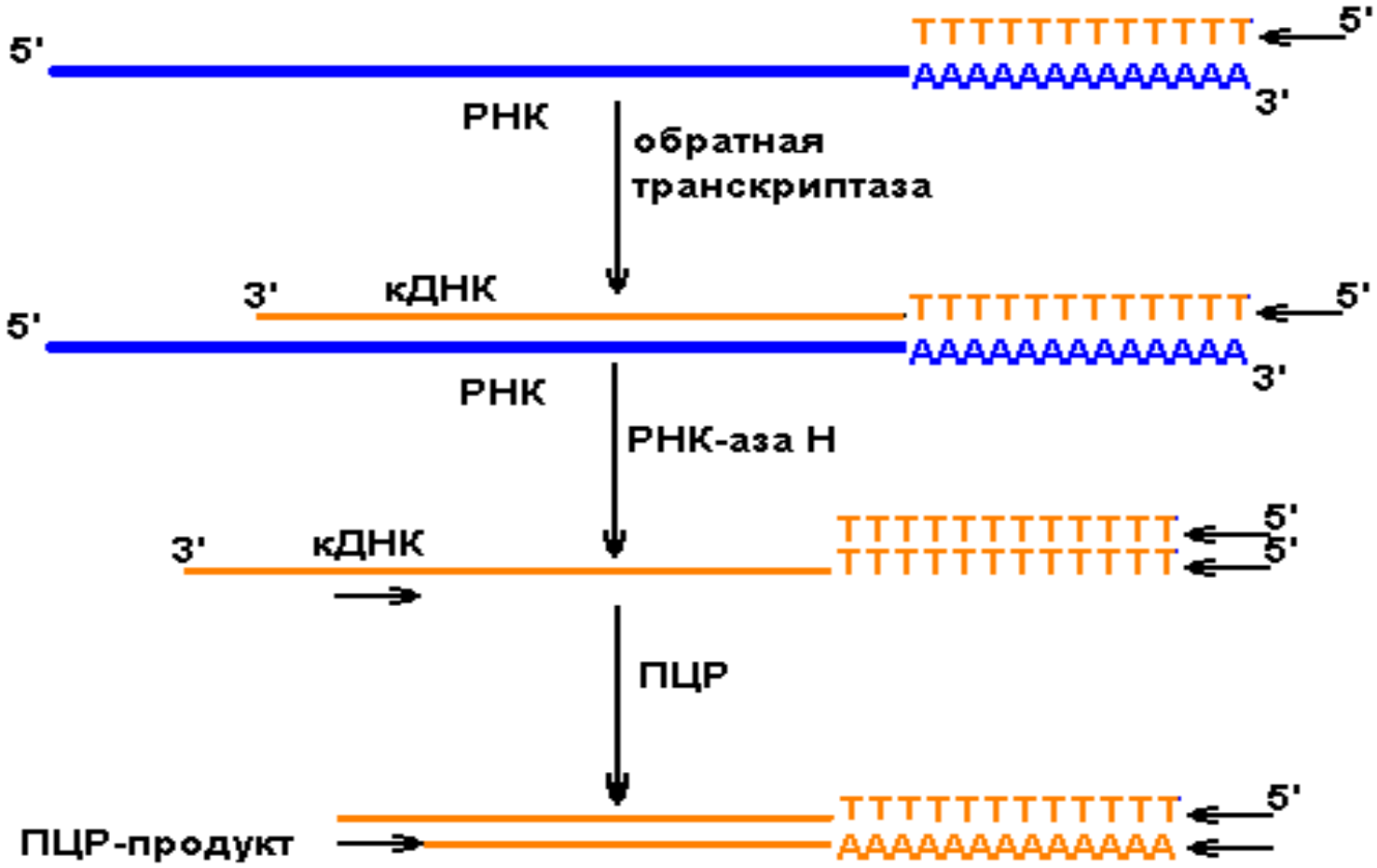


Схема модифицированного 3'-RACE

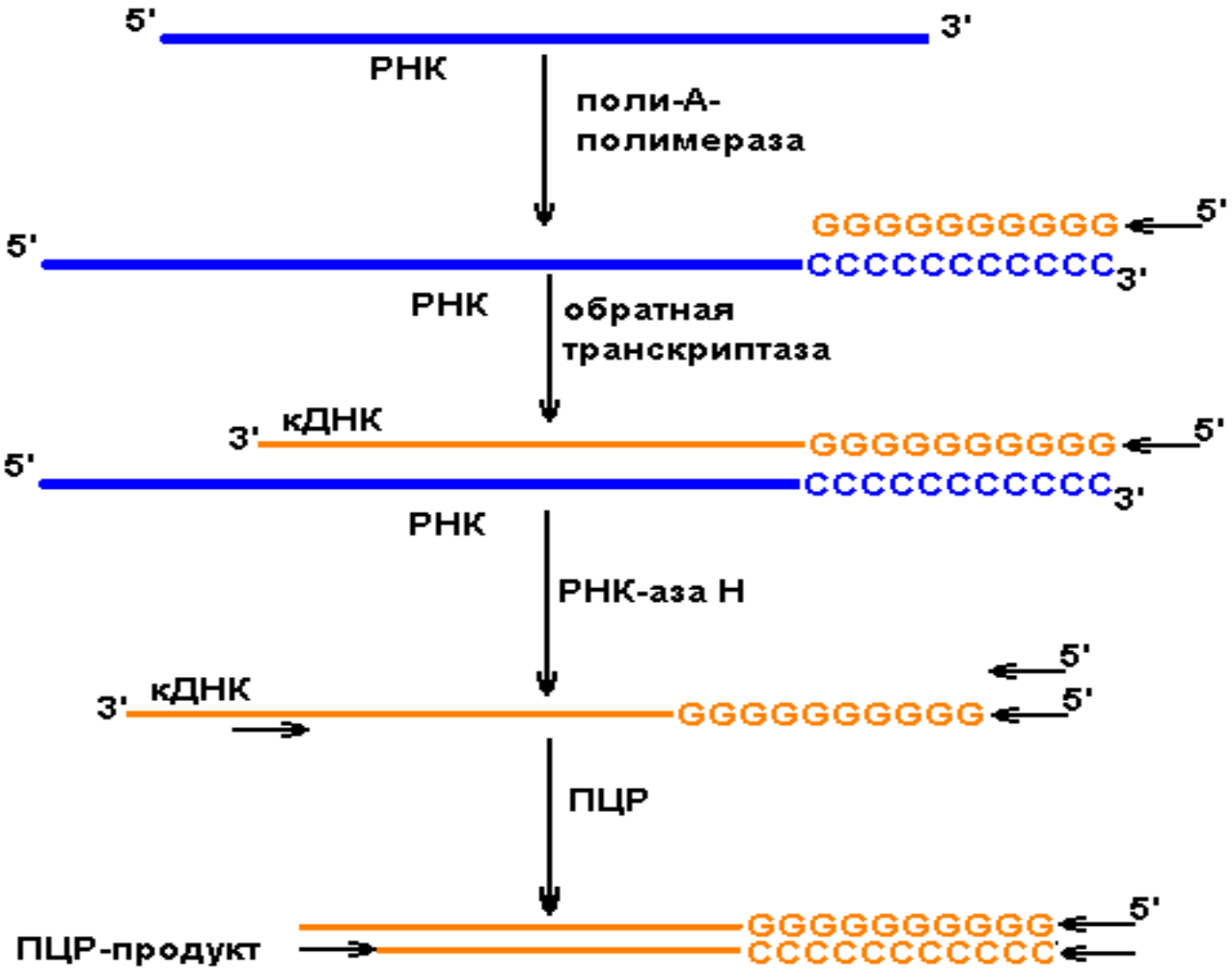
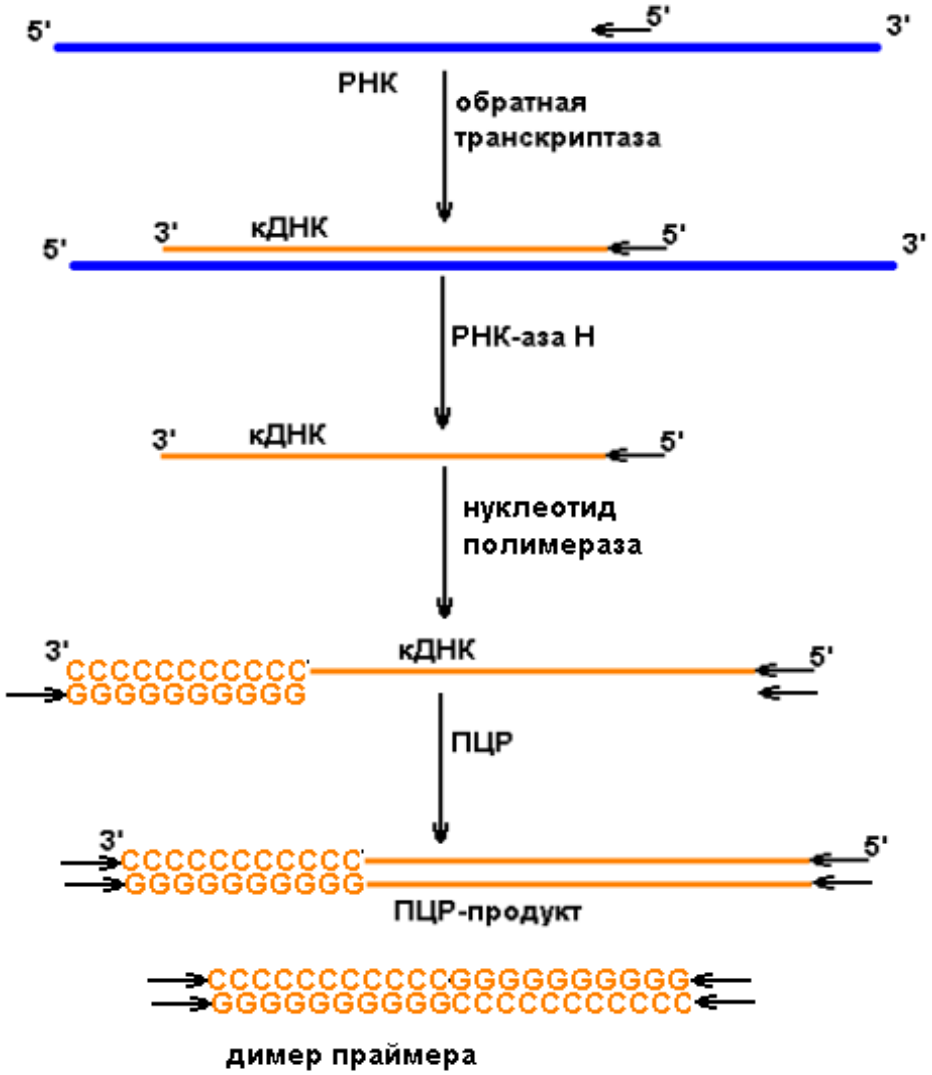


Схема стандартного 5'-RACE

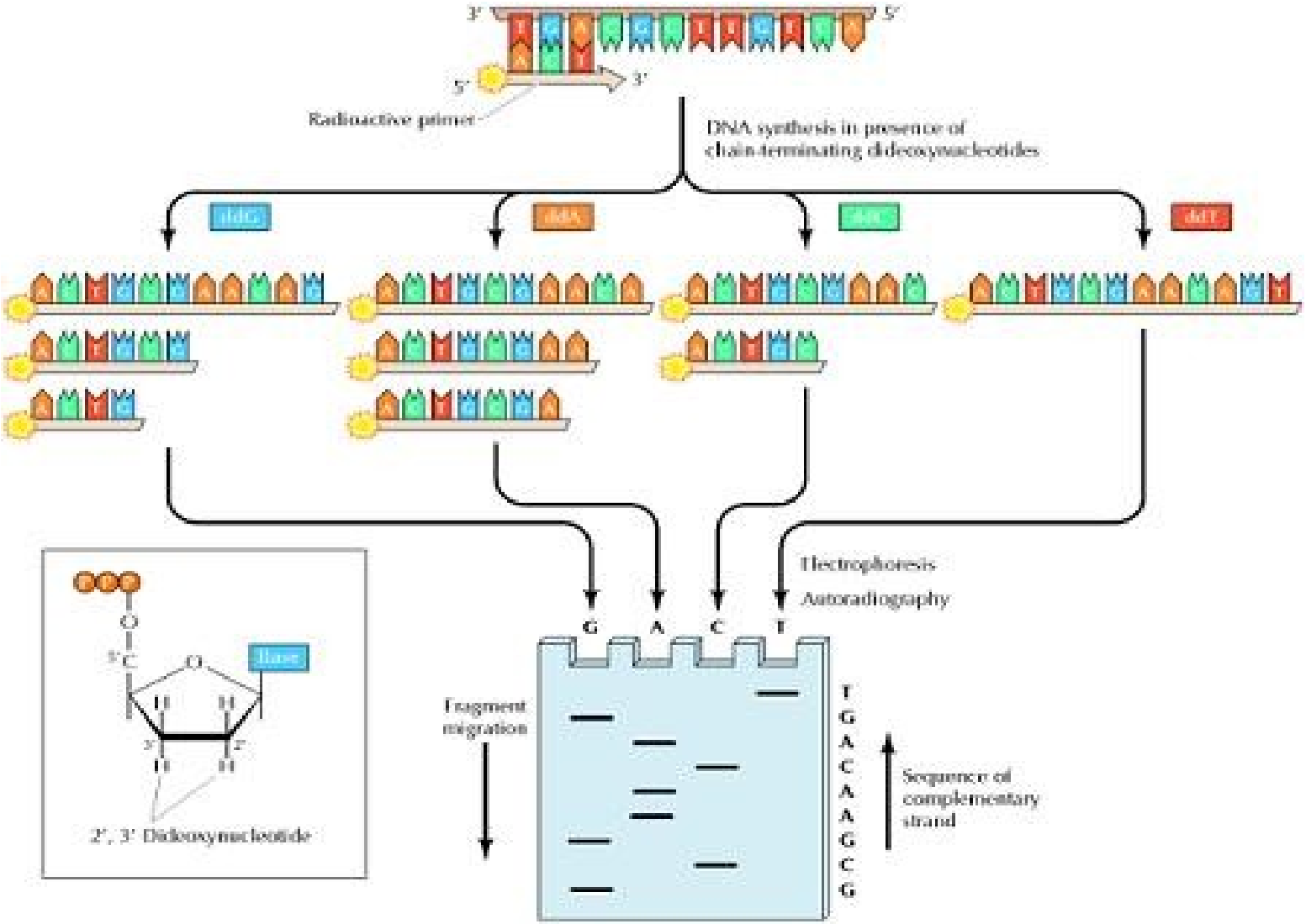


- При использовании данной схемы, получить продукт сложно, но существует модификация.

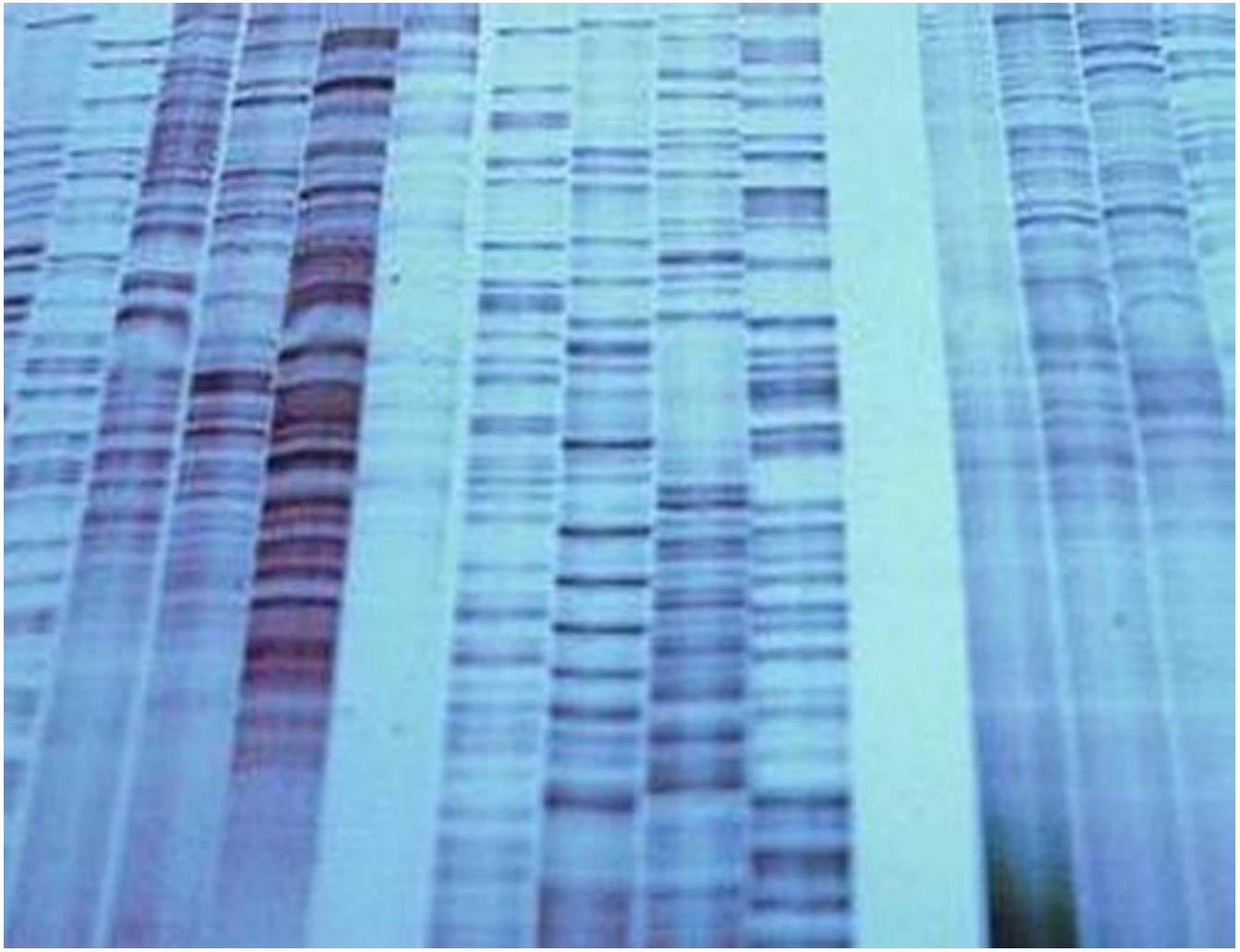
  При модификации 3'-конца кДНК используются меченные нуклеотиды, затем меченные фрагменты разделяются с помощью гель-электрофореза, результаты ОТ, выделяют из геля и ПЦР ставится уже с ними.

- Отделение продуктов ОТ от праймеров можно сделать и другими способами.

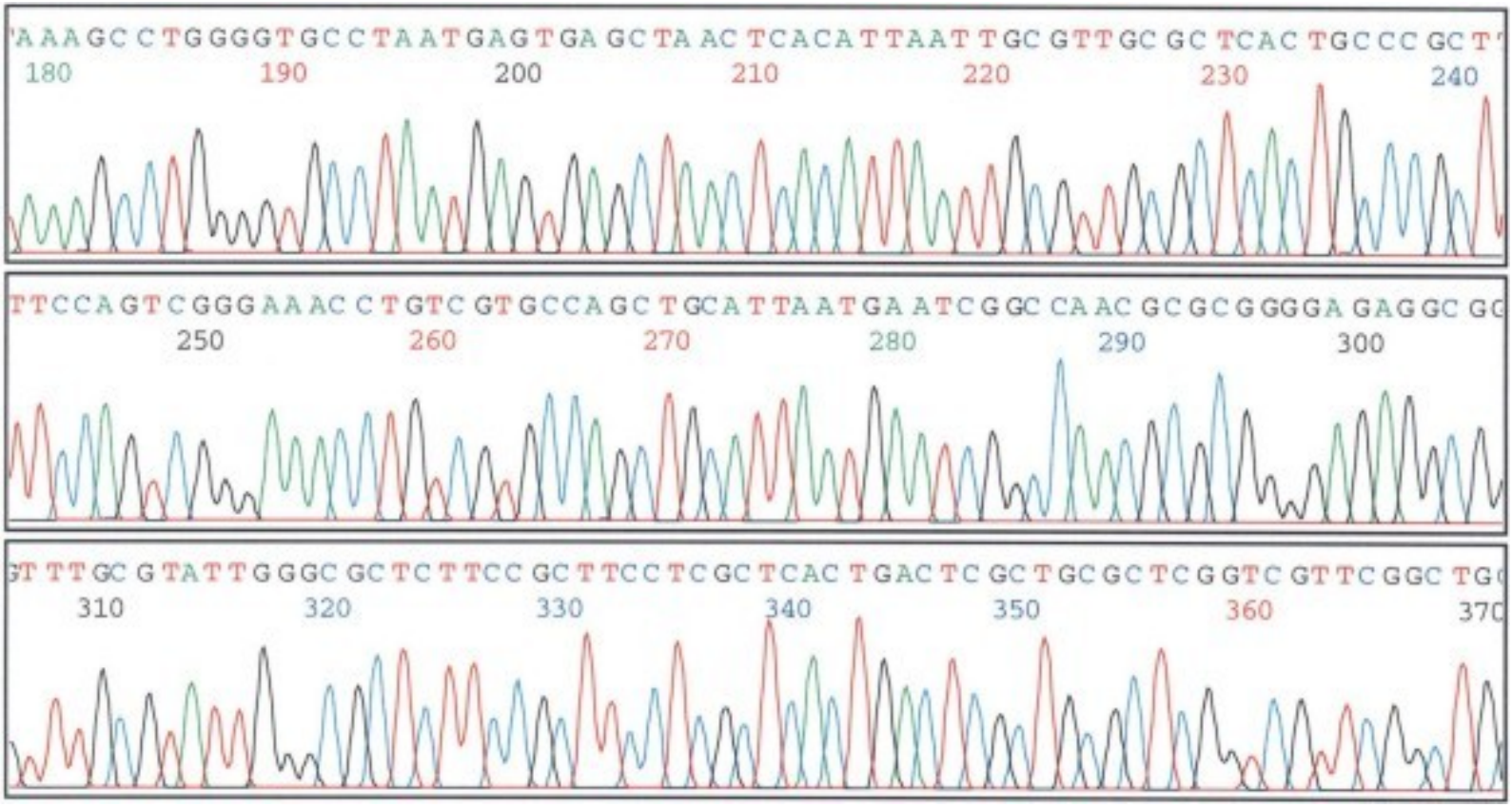
Схема секвенирования по Сенгеру



Результат секвенирования в ручную



Результат секвенирования в в автоматическом режиме



Методы определения функций

- Методы определения функций различных структур генома весьма разнообразны.
- К ним относятся многие методы молекулярной биологии и физической химии.
- Методы можно разделить на группу методов определяющих функциональную нагрузку структур ДНК и группу методов позволяющих определить белки и другие транс-элементы взаимодействующие с ДНК.
- К первой группе можно отнести:
- Встройка маркерных генов под последовательности которые возможно являются регуляторными.
- Встройка интересующих последовательностей а участки отвечающие за гетерохроматизацию
- Получение нуль мутантов.

Схема определения промоторов в митохондриях кинетопластид

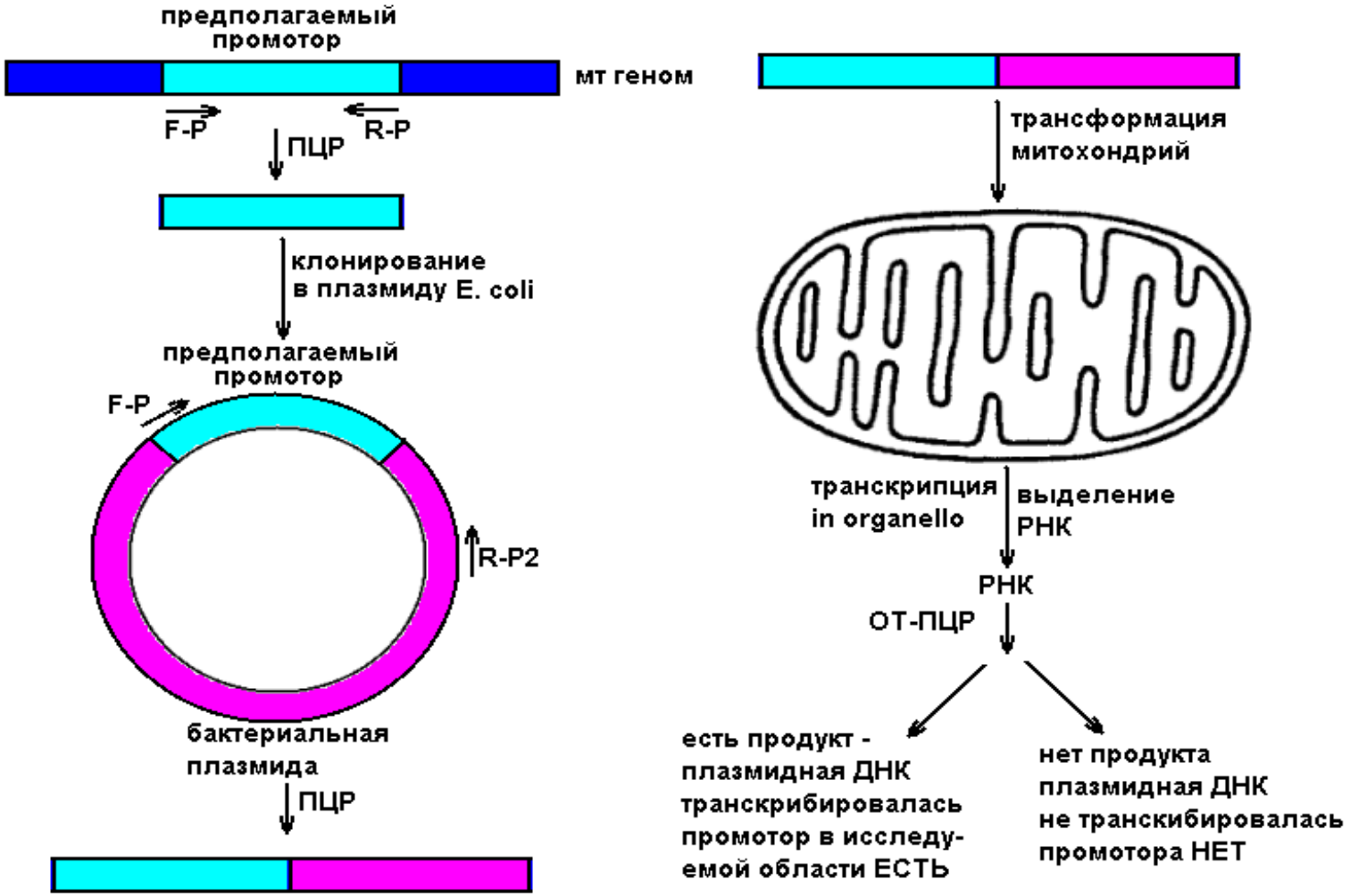
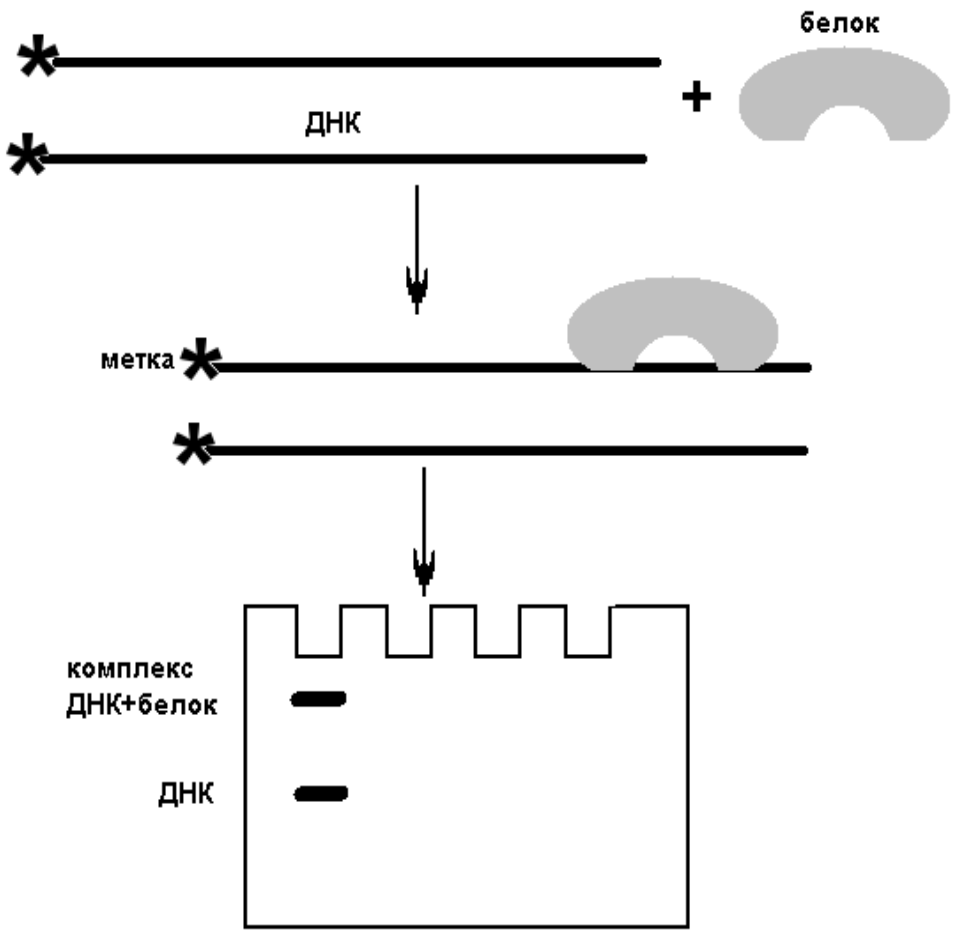
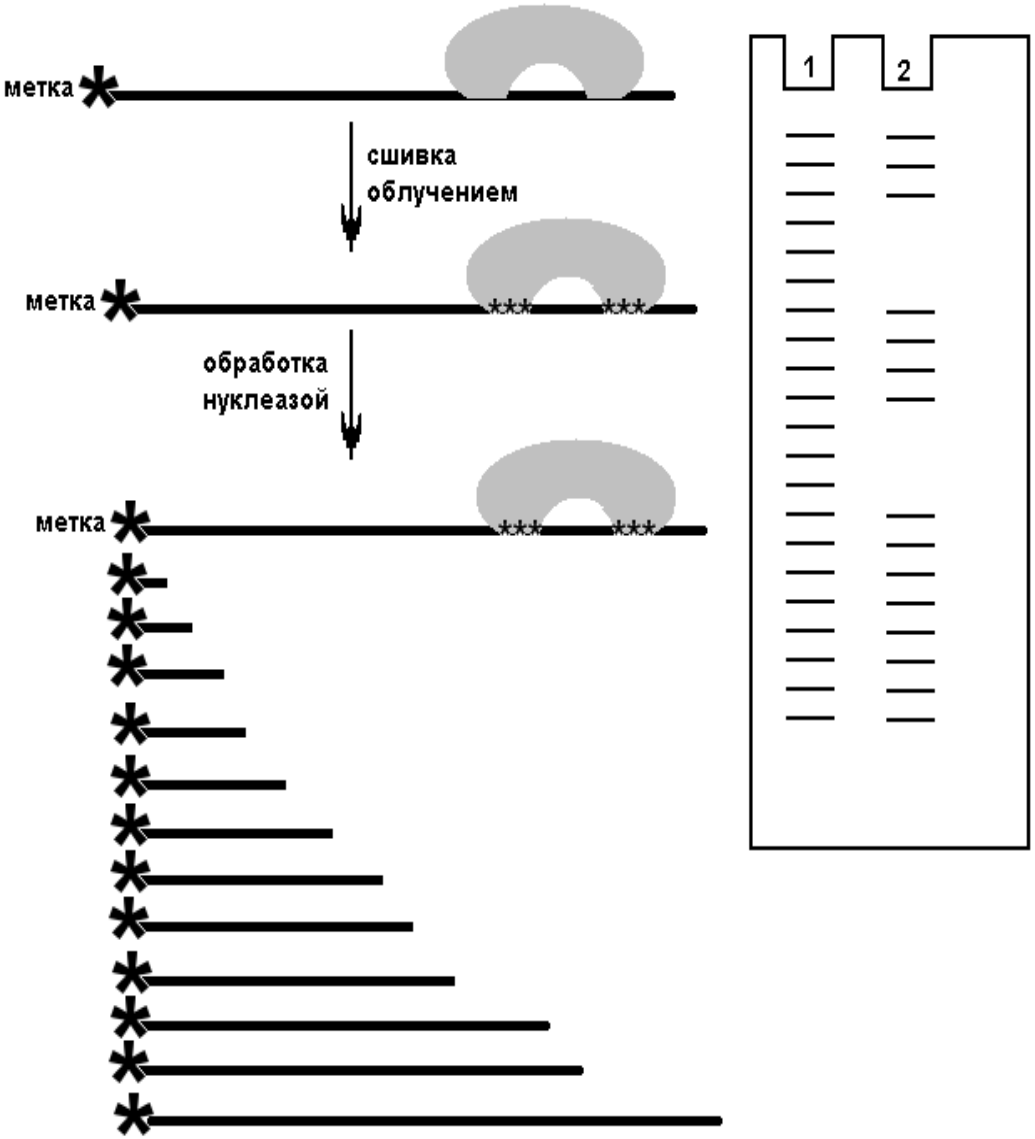


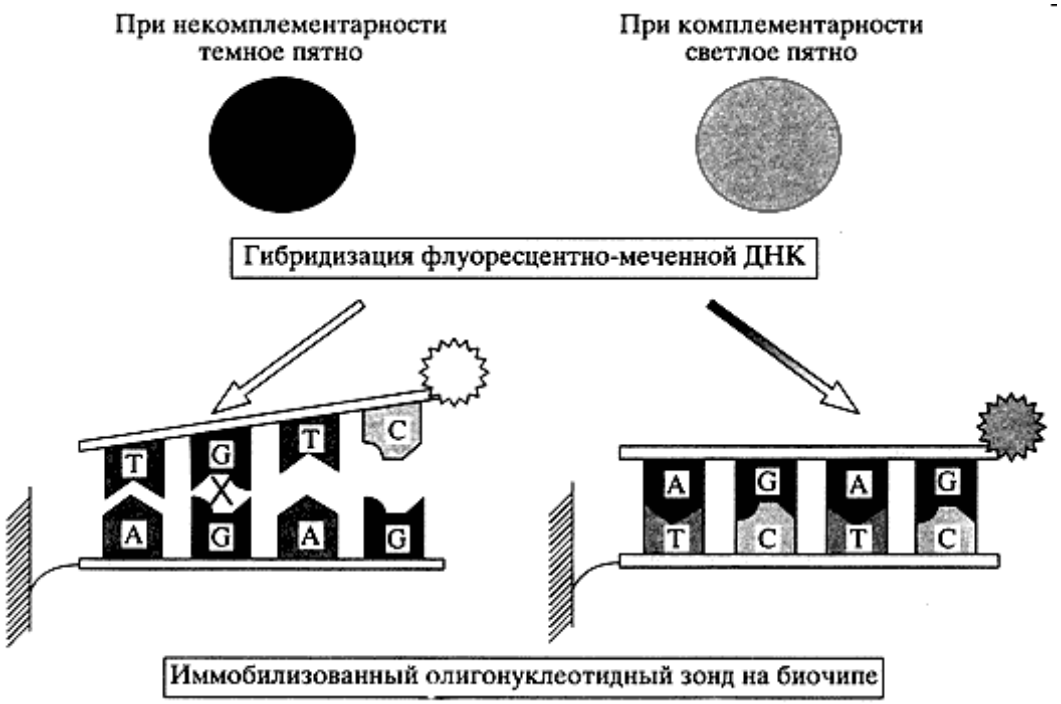
Схема метода фут-принта



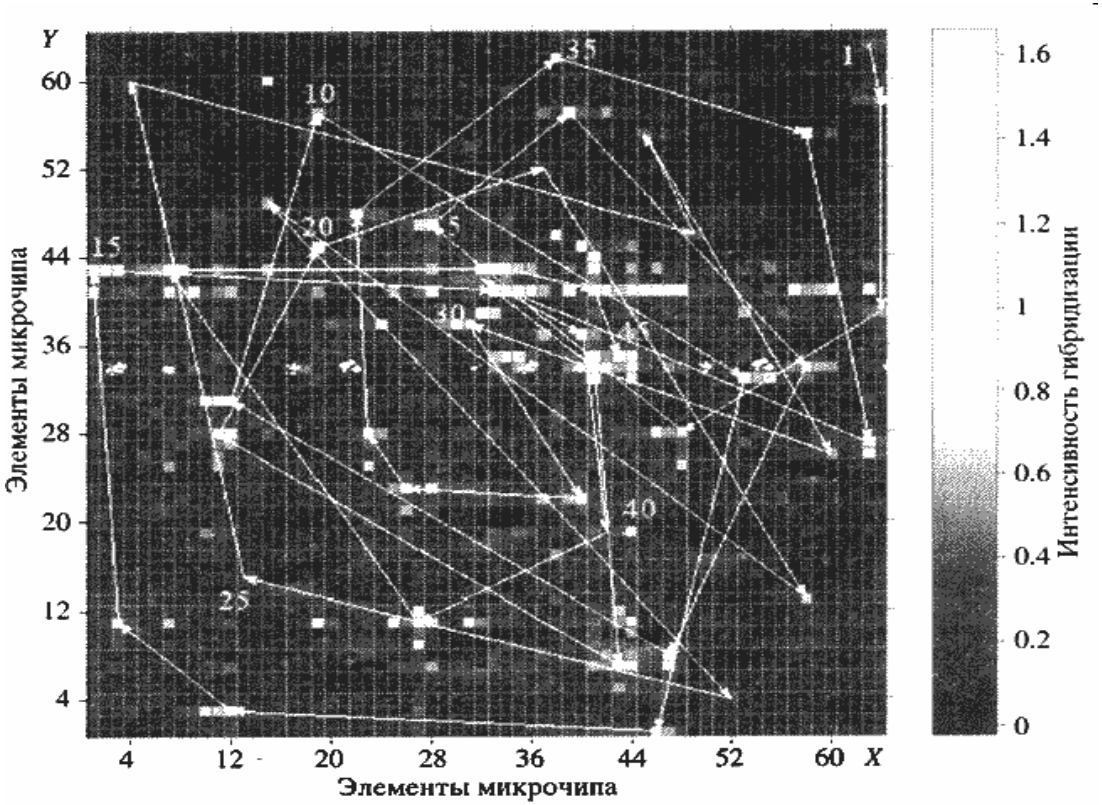
- Метод позволяет определить точную последовательность нуклеотидов и их положение, с которыми взаимодействует белок.
- Метод состоит из двух этапов.
- Первый называется задержка в геле.
- Комплекс ДНК+белок выделяется из геля и используется в дальнейшем процессе.



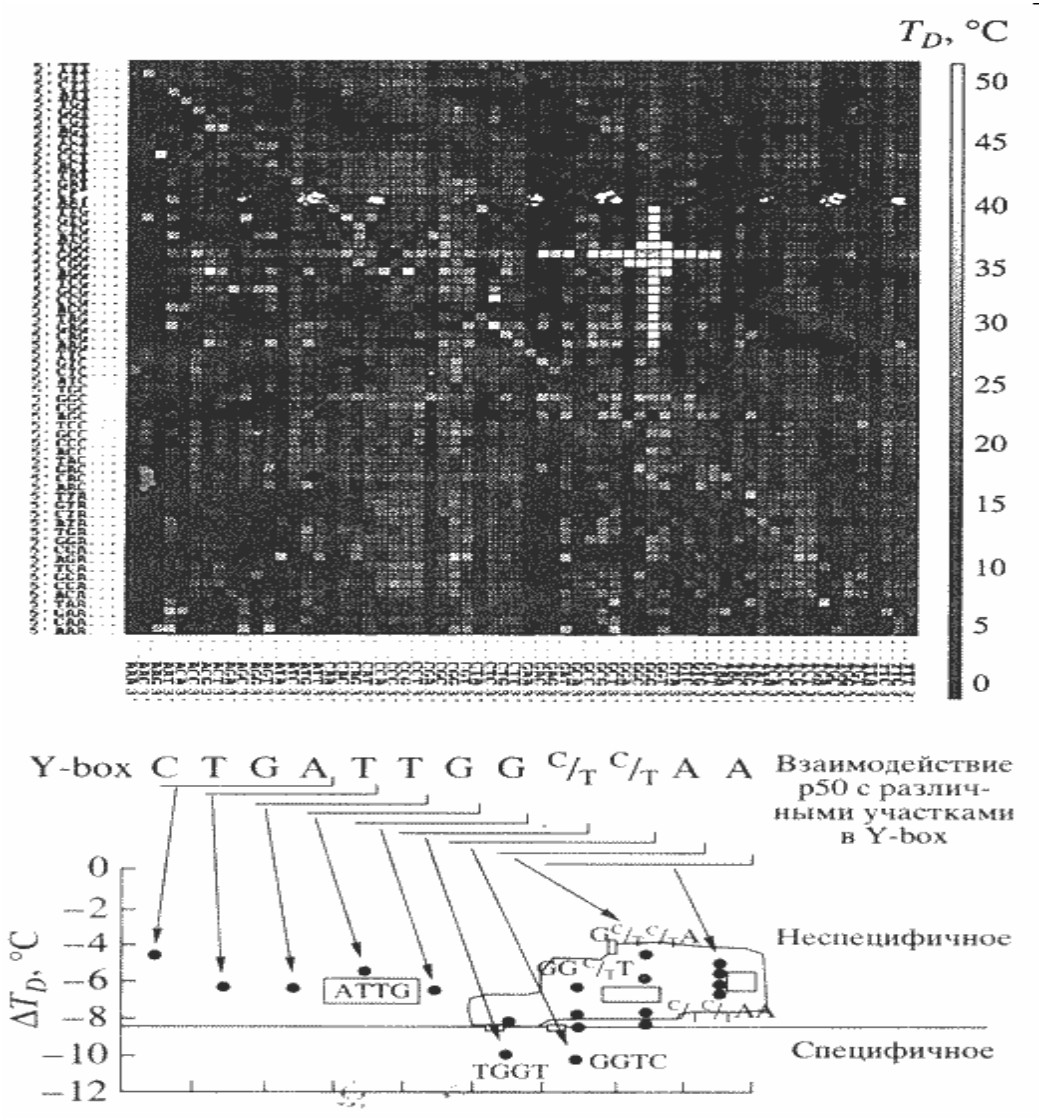
- Дорожка 1 — результат разрезания чистой ДНК.
- Дорожка 2 — результат разрезания комплекса ДНК+белок.
- Фрагменты закрытые белком не режутся.
- Зная последовательность и длину фрагмента можно определить нуклеотиды взаимодействующие с ДНК



Олигонуклеотид фиксирован на одном из элементов биочипа и избирательно связывает из многих флуоресцентно меченых фрагментов ДНК только комплементарный. В результате только этот элемент начинает светиться. Это происходит благодаря высоко-специфичным взаимодействиям комплементарных пар нуклеотидов **A** с **T** и **G** с **C**. Присутствие некомплементарной пары, например **G-G**, предотвращает взаимодействие и оставляет элемент микрочипа темным



Секвенирование фрагмента ДНК гибридизацией с полным олигонуклеотидным микрочипом, содержащим все 4096 6-меров 6-меры микрочипа, образующие при гибридизации с флуоресцентно меченым фрагментом ДНК совершенные дуплексы, интенсивно светятся. Такие соседствующие 6-меры перекрываются на пять нуклеотидов; это перекрывание позволяет однозначно восстановить нуклеотидную последовательность ДНК



Идентификация узнавания белком P50 специфичных участков в ДНК

Флуоресцентно окрашенный белок P50 связывается с полным 6-мерным олигонуклеотидным микрочипом. Проводиться измерение флуоресценции белка на каждом элементе биочипа в градиенте повышающейся температуры и TD -температур плавления комплексов белка с олигонуклеотидами. Олигонуклеотиды микрочипа, проявляющие наибольшую температурную стабильность в комплексе с ДНК, локализованные в светлом кресте и содержащие тетрануклеотидные последовательности **TGGT** и **GGTC**, демонстрируют также и наибольшую специфичность связывания