

ГОСУДАРСТВЕННАЯ БЮДЖЕТНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ МОРДОВИЯ
«РЕСПУБЛИКАНСКИЙ ЦЕНТР ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ ДЕТЕЙ»

РЕКОМЕНДОВАНО
Педагогическим советом
ГБОДОРМ «РЦДОД»
Протокол № 1
от «29» августа 2025 г.

УТВЕРЖДАЮ
Директор ГБОДОРМ «РЦДОД»

ГБОДОРМ "РЕСПУБЛИКАНСКИЙ ЦЕНТР
ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ ДЕТЕЙ",
Врио директора 29.08.2025 14:50 (MSK), Простая

Дополнительная общеобразовательная
(общеразвивающая) программа
**«Геномика. Научно-исследовательские
прикладные задачи»**

Направленность: естественнонаучная
Уровень программы: углубленный
Возраст обучающихся: 15-17 лет
Срок реализации программы: 1 год
Форма обучения: очная
Язык обучения: русский

Автор-составитель:
Сидоров Денис Иванович,
педагог дополнительного образования

Саранск, 2025

Структура программы

1. Пояснительная записка программы	3
2. Цели и задачи программы	8
3. Учебный план программы	10
4. Содержание учебного плана программы	11
5. Календарный учебный график программы	43
6. Планирование результата освоение образовательной программы	76
7. Оценочные материалы программы	81
8. Формы обучения, методы, приемы и педагогические технологии	86
9. Методическое обеспечение программы	87
10. Материально - техническое оснащение программы	87
11. Список используемой литературы	89

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

Дополнительного общеобразовательная (общеразвивающая) программа «Геномика. Научно-исследовательские прикладные задачи» направлена на расширение и углубление биологических знаний через исследовательскую деятельность обучающихся.

Геномика-это направление молекулярной биологии исследующее структуру и функцию нуклеотидных последовательностей геномов живых

организмов в широком смысле: структурная геномика - последовательность нуклеотидов, наличия их модификаций, взаимодействий с белками, функциональная геномика - реализация генетической информации, систематическая геномика - использование последовательностей специфических участков ДНК для уточнения систематического положения живых организмов.

Направленность программы - естественнонаучная.

Направление - молекулярная биология.

Уровень - углубленный.

Актуальность программы обусловлена тем, что геномика является одной из наиболее стремительно развивающихся областей биологии, открывающей новые горизонты знания, что дает возможности для совершенствования и создания принципиально новых методов и технологий. Достижения в этой области научных знаний позволили осуществить настоящий прорыв в молекулярной и клеточной биотехнологии, перевернув представление человека о сущности процессов реализации генетической информации и передачи наследственного материала дочерним клеткам или потомкам и вооружив его инструментами для направленного изменения генома и протеома и управления их функционированием.

Развитие высокопроизводительных технологий получения биологических данных создало новую ситуацию в молекулярной и клеточной биологии, онкологии, биологии развития, микробиологии. Компьютерные методы анализа стали интегральной частью биологических исследований на всех стадиях – от планирования до обработки и интерпретации результатов. Разработка новых подходов к анализу и интеграции разнородных данных, поиск в них новых биологических явлений, их эволюционное понимание является одной из самых актуальных задач современной биологии.

Данная программа разработана с целью развития у обучающихся навыков научно-исследовательской, инженерно-практической проектной работы с использованием достижений современной геномики.

Новизна и отличительные особенности программы

Освоение программы позволит повысить интерес обучающихся к изучению предметов инженерно-биологического профиля через освоение междисциплинарных дисциплин, не рассматриваемых в базовом школьном курсе (молекулярная биология, биоинформатика, биотехнология, биохимия и т.д.), а также через введение учебно-исследовательской и проектно-исследовательской деятельности в рамках этих дисциплин. В процессе проведения занятий, учащиеся получают передовые знания в области геномики и инженерных направлений науки и техники, практические навыки работы на различных видах современного научного лабораторного оборудования.

Программа с одной стороны решает задачи популяризации науки среди учащихся, с другой, показывает возможность реализации полного цикла исследований, от кейсов по проекту до представления работ на конференциях и конкурсах различных уровней. В основе обучения лежит метод управления проектами – Scrum (Джефф Сазерленд и Кен Швабер), ТРИЗ- технологии (Г.С. Альтшуллер).

Цель программы: вовлечение обучающихся в проектную деятельность, разработка научно-исследовательских и инженерных проектов.

Задачи программы

Обучающие:

- ознакомление с методами сбора информации, а также с инструментами ее анализа;
- приобретение и углубление знаний основ проектирования и управления проектами;
- обучение проведению исследований, презентаций и междисциплинарной коммуникации;

- знакомство с Hard-компетенциями (проведение естественнонаучного исследования в области молекулярной биологии), позволяющими применять теоретические знания на практике в соответствии с современным уровнем развития технологий;

- изучить базовые понятия: геном, нуклеотиды, нуклеиновые кислоты, амплификация, секвенирование, полиморфизм, рестрикция;

- сформировать навыки работы с амплификатором, различными типами центрифуг, выделения нуклеиновых кислот из про- и эукариотических клеток, проведения рестрикции и электрофореза ДНК;

- развить практические навыки по работе с высокотехнологичным оборудованием молекулярно-генетических лабораторий (таких как амплификатор, нанофотометр, флуориметр);

- формирование навыков технического и инженерного творчества.

Развивающие:

- развитие творческих способностей и креативного мышления;

- формирование интереса к основам изобретательской деятельности;

- развитие системного мышления и комплексного подхода к решению задач в рамках проектной деятельности;

- развитие Soft-компетенций, необходимых для успешной работы вне зависимости от выбранной профессии;

- способствовать развитию памяти, внимания, технического и естественно-научного мышления, изобретательности;

- способствовать развитию алгоритмического мышления;

- способствовать формированию интереса к естественно-научным знаниям;

- способствовать формированию умения практического применения полученных знаний;

- сформировать умение выступать публично с докладами, презентациями и т. п.

- сформировать умение критически относиться к полученному результату и его интерпретации.

Воспитательные:

- формирование проектного мировоззрения и творческого мышления;
- воспитание собственной позиции по отношению к деятельности и умение сопоставлять её с другими позициями в конструктивном диалоге;
- воспитывать аккуратность и дисциплинированность при выполнении работы;
- способствовать формированию опыта совместного и индивидуального творчества при выполнении командных заданий;
- формировать чувство коллективизма и взаимопомощи.

Функциональное предназначение программы: проектная.

Форма организации: групповая.

Возраст обучающихся 15-17 лет.

Объём и сроки освоения программы

Срок реализации программы - 1 год.

Продолжительность реализации всей программы - 144 часа.

Режим занятий

При определении режима занятий учтены санитарно-эпидемиологические требования к организациям дополнительного образования детей. Занятия проводятся 2 раза в неделю по 2 часа (продолжительность учебного часа 45 минут).

Структура каждого занятия зависит от конкретной темы и решаемых задач.

В случае возникновения форс мажорных обстоятельств программа может быть реализована с применением электронного обучения и дистанционных образовательных технологий.

В теоретической части программы следует предусмотреть семинары-дискуссии по различным темам (влияние генетически-модифицированных

организмов на живые системы, использование технологии CRISPR/Cas в живых организмах и т.д.).

В процессе занятий используются компьютерные технологии при применении биоинформатических подходов к изучению молекулярной биологии и геномики.

Большое внимание уделяется безопасным приемам работы в научно-исследовательской лаборатории, правильной организации рабочего места и оборудования.

Программа предусматривает экскурсии, просмотр видеофильмов для более углубленного изучения учебного материала.

Формы обучения: в процессе обучения используются различные формы занятий: практические занятия; различные виды лекций (информационные, проблемные, лекция-визуализация), развивающие игры, конкурсы, соревнования, использование медиаресурсов, энциклопедий, электронных библиотек и интернет.

Принципы обучения:

- объективности, научности (предлагаемое содержание обучения основано на положениях, соответствующих фактам и выражает состояние современных наук. Приобщаясь к элементам научного поиска, исследовательским методам, обучаемые овладевают умением отличать истинные положения от ложных);

- связи теории с практикой (проверка теоретических положений с помощью надежного критерия практики);

- последовательности, систематичности (предлагаемое содержание обучения построено в строгой логической последовательности. Изучаемый материал четко спланирован и делится на законченные разделы, модули);

- наглядности, разнообразия методов (для повышения эффективности обучения используются всевозможные средства наглядности, опираясь на

привлечение всех имеющихся у человека органов чувств к восприятию учебного материала);

- активности обучаемых (содержание обучения ориентировано на высокую активность обоих участников образовательного процесса. Активность обучаемых проявляется в усвоении содержания и целей обучения, планировании и организации своей работы, в проверке ее результатов).

Методы обучения:

По источнику изложения учебного материала:

- словесные (устное изложение, рассказ, объяснение, беседа, лекция, инструктаж);

- наглядные (показ видео и мультимедийных материалов, модели);

- практические (освоение инженерно-молекулярных методик конструирования рекомбинантных молекул ДНК биологических систем).

По характеру учебно-познавательной деятельности:

- объяснительно-иллюстративный - обучающиеся воспринимают полученные знания и усваивают готовую информацию;

- репродуктивный - обучающиеся воспроизводят полученные знания и освоенные способы деятельности;

- частично-поисковый - участие обучающихся в коллективном поиске, решение поставленной задачи;

- исследовательский - самостоятельная творческая работа обучающихся.

Условия эффективности реализации образовательной программы и отслеживание результатов деятельности

Определение учебных результатов ребенка по дополнительной образовательной программе происходит на основании таких показателей (оцениваемых параметров), как:

- теоретическая подготовка ребенка (теоретические знания по программе, владение специальной терминологией). Критерии - соответствие

теоретических знаний ребенка программным требованиям и осмысленность и правильность использования специальной терминологии;

- практическая подготовка ребенка (практические умения и навыки, предусмотренные программой, владение специальным оборудованием, творческие навыки). Критерии - соответствие практических умений и навыков программным требованиям, отсутствие затруднений в использовании специального оборудования, креативность в выполнении практических заданий;

- общеучебные умения и навыки ребенка (интеллектуальные умения: умение подбирать и анализировать литературу, пользоваться компьютерными источниками информации, осуществлять учебно-исследовательскую деятельность; коммуникативные умения: умения слушать и слышать педагога, выступать перед аудиторией, вести полемику, участвовать в дискуссии; учебно-организационные умения и навыки: умение организовать свое место, соблюдать в процессе деятельности правила безопасности, аккуратно выполнять работу). Критерии – самостоятельность в подборе и анализе литературы, пользовании компьютером, исследовательской работе, в построении дискуссионного выступления; адекватность восприятия информации, идущей от педагога, свобода владения и подачи обучающимися подготовленной информации, способность самостоятельно готовить свое рабочее место, соответствие реальных навыков соблюдения правил безопасности программным требованиям, аккуратность и ответственность в работе.

Отслеживать динамику личностного развития детей, занимающихся в системе дополнительного образования, предлагается по трем направлениям:

- организационно-волевые качества (терпение, воля, самоконтроль),
- ориентационные свойства личности (самооценка, интерес к занятиям в детском объединении),
- поведенческие характеристики (конфликтность, тип сотрудничества).

Критериями в данном случае выступают: способность переносить известные нагрузки в течение определенного времени, преодолевать трудности, активно побуждать себя к практическим действиям, умение контролировать свои поступки, способность оценивать себя адекватно, осознанное участие ребенка в освоении программы, способность занять определенную позицию в конфликтной ситуации, умение воспринимать общие дела как свои собственные.

Календарно-тематический план программы

№ п/п	Раздел/Темы	Всего	Теория	Практик а	Планируе мая дата	Фактическ ая дата	Формы аттестации (контроля
1	Раздел 1. Биоинформатический анализ геномов Вводное занятие. Правила работы в научно-исследовательской лаборатории. Инструктаж по ТБ	2	2	-	2.09		Опрос, наблюдение
2	Анализ нуклеотидной последовательности с помощью генетических баз данных	6	2	4	5.09 9.09 12.09		Опрос, наблюдение
3	Структурно - функциональный анализ генов	8	2	6	16.09 19.09 23.09 26.09		Опрос, наблюдение
4	Раздел 2. ПДРФ-анализ	2	2	-	30.09		Опрос, наблюдение
5	Выделение геномной ДНК объекта исследования	4	-	4	3.10 7.10		Проверка журналов лабораторных исследований
6	Спектрофотометрический анализ чистоты и концентрации выделенной ДНК	4	-	4	10.10 14.10		Проверка журналов лабораторных исследований
7	Амплификация интересующего фрагмента ДНК	4	-	4	17.10 21.10		Проверка журналов лабораторных исследований
8	Рестрикция продуктов ПЦР	4	-	4	24.10		Проверка

					28.10		журналов лабора- торных исследо- ваний
9	Электрофорез в агарозном геле	6	-	6	31.10 7.11 11.11		Проверка журналов лабора- торных исследо- ваний
10	Визуализация и интерпретация результатов эксперимента	4	-	4	14.11 18.11		Опрос, наблюде- ние
11	Раздел 3. Полиморфизм генов	2	2	-	21.11		Опрос, наблюде- ние
12	Дизайн праймеров для ПЦР	4	-	4	25.11 28.11		Проверка журналов лабора- торных исследо- ваний
13	Постановка реакции ПЦР в реальном времени	6	2	4	2.12 5.12 9.12		Проверка журналов лабора- торных исследо- ваний
14	Анализ ПЦР-РВ	4	-	4	12.12 16.12		Опрос, наблюде- ние
15	Раздел 4. Методы сравнительной геномики	2	2	-	19.12		Опрос, наблюде- ние
16	Определение гомологии генов с помощью программного пакета Blast	6	2	4	23.12 26.12 9.01		Опрос, наблюде- ние
17	Поиск взаимосвязанных белков методами сравнительной геномики	4	-	4	13.01 16.01		Опрос, наблюде- ние
18	Методы филогенетического анализа	6	2	4	20.01 23.01		Проверка журналов

					27.01		лабораторных исследований
19	Построение филогенетического древа	4	-	4	30.01 3.02		Проверка журналов лабораторных исследований
20	Раздел 5. RAPD- и ISSR-анализ	2	2	-	6.02		Проверка журналов лабораторных исследований
21	Выделение геномной ДНК	4	-	4	10.02 13.02		Проверка журналов лабораторных исследований
22	Постановка ПЦР с помощью ISSR праймеров	4	-	4	17.02 20.02		Проверка журналов лабораторных исследований
23	Горизонтальный электрофорез	6	-	6	27.02 2.03 5.03		Проверка журналов лабораторных исследований
24	Качественная и количественная оценка степени полиморфизма	4	-	4	12.03 16.03		Проверка журналов лабораторных исследований
25	Построение дендрограммы по ISSR-спектрам	2	-	2	19.03		Проверка журналов лабора-

							торных исследований
26	Раздел 6. Проведение генно-инженерных работ in silico	2	2	-	23.03		Опрос, наблюдение
27	Моделирование процедуры клонирования	4	-	4	26.03 30.03		Проверка журналов лабораторных исследований
28	Дизайн праймеров	2	-	2	2.04		Опрос, наблюдение
29	Анализ функциональных последовательностей в геноме	6	-	6	6.04 9.04		Проверка журналов лабораторных исследований
30	Раздел 7. Итоговый проект Формулирование цели. Наличие значимой в исследовательском, творческом плане проблемы, требующей интегрированного знания, исследовательского поиска для её решения	4	-	4	13.04 16.04		Опрос, наблюдение
31	Разработка или выбор путей выполнения проекта	4		4	20.04 23.04		Опрос, наблюдение
32	Работа над проектом	12		12	27.04 30.04 4.05 7.05 11.05 14.05		Проверка журналов лабораторных исследований
33	Оформление результатов проекта	4		4	18.05 21.05		Проверка журналов лабораторных исследований

34	Обсуждение результатов работы	2	2		25.05 28.05		Демонстрация и обсуждение проектов
	ВСЕГО:	144	24	120			

СОДЕРЖАНИЕ ПРОГРАММЫ

Раздел 1. Биоинформатический анализ геномов

Целью данных занятий является знакомство с информационными ресурсами, программными обеспечениями, которые используются для работы с ДНК.

Информация о генах и геномах различных организмов хранится в специализированных базах данных. Биомедицинские базы данных созданы Национальным Центром Биотехнологической Информации (GenBank), являющегося частью Международного нуклеотидного банка данных, Европейским Институтом Биоинформатики (EMBL) и Японским Национальным Институтом Генетики и Центром Биологической Информации (DDBJ).

В специализированных базах данных - IMAGE (Integrated Analysis of Genomes and their Expression), CGAP (Cancer Genome Anatomy Project) содержится информация обо всех последовательностях генов человека, а также имеются клоны, содержащие эти гены. База данных dbESTEST содержит EST (expressed sequence tag) последовательности человека. Большое количество EST последовательностей идентифицировано институтом геномных исследований (TIGR, Institute for Genomic Research). Американская коллекция тканевых культур располагает индивидуальными человеческими и мышинными TIGR клонами, включая клоны с открытыми рамками считывания нуклеотидной последовательности. Genome Systems

(Сент. Луис, США) и Research Genetics (США, Хантсвил) используют IMAGE клоны в производстве своих чипов.

Раздел 2. ПДРФ-анализ

Выделение геномной ДНК из животной клетки

Процедура выделения ДНК из клеток и тканей часто является исходным (основным) этапом в исследовании живого организма на молекулярном уровне. От ДНК напрямую или через белки-ферменты зависят все биосинтезы и катаболизм клетки. Клетку необходимо разрушить тем или иным способом, а хромосомную ДНК очистить от других клеточных компонентов. Прежде всего, нужно отделить ДНК от белков, входящих в состав нуклеопротеидных комплексов хроматина. При этом важно защитить ДНК от действия нуклеаз и максимально сохранить ее целостность, поскольку длинные линейные молекулы ДНК при их изоляции из клетки неизбежно фрагментируются.

Методы выделения ДНК обычно включают следующие этапы:

- 1) лизис клеток (или разрушение физическим, механическим способом);
- 2) ферментативное разрушение белков протеиназами и/или депротеинизацию клеточного лизата с помощью фенола и хлороформа;
- 3) центрифугирование для удаления денатурированных белков и фрагментов клеточных органелл. Затем ДНК осаждают из раствора этанолом и после центрифугирования растворяют осадок в буферном растворе. Вместе с ДНК частично выделяется и РНК, от которой избавляются с помощью фермента РНКазы.

Для лизиса клеток и денатурации белков часто используется детергент додецилсульфат натрия и хаотропный агент гуанидинизотиоцианат. Ряд современных методов предусматривает сорбцию ДНК на гранулах силикагеля в присутствии хаотропных веществ, центрифугирование и последующую элюцию ДНК с гранул в раствор. Некоторые фирмы продают наборы реактивов для выделения ДНК с использованием магнитных частиц,

покрытых силикой SiO₂. Некоторые коммерческие наборы предусматривают сорбцию ДНК на мембранах или ионообменных сорбентах. Фенол-хлороформный метод экстракции ДНК считается стандартным.

Главные задачи этого занятия: познакомиться с методами выделения ДНК, обобщить общий принцип выделения нуклеиновых кислот.

Количественное определение выделенной ДНК спектрофотометрическим способом

Количественное определение выделенной ДНК спектрофотометрическим способом. Анализ степени чистоты выделенной ДНК.

Определить концентрацию ДНК, а также степень её чистоты, можно с помощью спектрофотометра. Для этого измеряют оптическую плотность раствора ДНК при длине волны 260 нм. Одна (каждая) оптическая единица соответствует концентрации ДНК в 50 мкг/мл. Для расчёта можно воспользоваться калькулятором на интернет-ресурсе MOLBIOL.RU (<http://www.molbiol.ru>) или других подобных порталах.

Спектрофотометрия (абсорбционная) – физико-химический метод исследования растворов и твёрдых веществ, основанный на изучении спектров поглощения в ультрафиолетовой (200–400 нм), видимой (400–760 нм) и инфракрасной (>760 нм) областях спектра. Основная зависимость, изучаемая в спектрофотометрии – зависимость интенсивности поглощения падающего света от длины волны λ . В соответствии с законом Бугера–Ламберта–Бера оптическая плотность раствора прямо пропорциональна концентрации поглощающего вещества. Нуклеиновые кислоты (НК) поглощают УФ излучение в области 240–290 нм с максимумом при 260 нм. Хромофорами служат азотистые основания НК, особенно пиримидиновые. Пиримидины поглощают УФ свет примерно в 10–20 раз интенсивнее, чем хромофоры белковых молекул – триптофан, тирозин и фенилаланин.

Для оценки чистоты препарата ДНК, свободного от РНК, проводят измерения оптической плотности раствора при длинах волн 260, 280 и 235

нм, т.е. на максимумах поглощения растворов ДНК, белков и полисахаридов, соответственно. Значение соотношения $A_{260}/280$ для чистой ДНК должно быть больше 1,8, значение $A_{260}/235$ должно быть больше, чем 2,2. Загрязнение полисахаридами характерно, главным образом, для препаратов растительной ДНК. В состав лигнина, в отличие от других углеводов, входят ароматические группировки атомов, и поэтому лигнин поглощает УФ излучение.

Амплификация интересующего фрагмента ДНК

Демонстрация видеоматериала по проведению ПЦР.

Декомпозиция на наблюдаемые явления: раствор ДНК, температура реакции, время реакции.

Поиск возможных ответов в методической литературе и интернете.

Обсуждение в группе.

Проведение полимеразно-цепной реакции. На данном этапе рекомендуется вспомнить о соблюдении стерильности.

ПЦР – это ферментативное копирование определенного фрагмента ДНК *in vitro* с помощью ДНК-полимеразы, т.е. селективная амплификация ДНК. Границы фрагмента задают нуклеотидными последовательностями праймеров, поэтому копированию подвергается только определённый ген (ДНК-мишень), а не вся ДНК как при репликации *in vivo*. Основоположителем метода считается Кэрри Муллис.

ПЦР включает три циклически повторяющиеся стадии:

1) денатурацию ДНК – расплетение двойной спирали и расхождение полинуклеотидных цепей;

2) отжиг праймеров – гибридизацию праймеров и одноцепочечной

ДНК-мишени с образованием двухцепочечных комплексов «праймер-матрица», необходимых для инициации синтеза ДНК из мономеров – дезоксирибонуклеозидтрифосфатов;

3) полимеризацию – достраивание (удлинение, элонгацию) комплементарных цепей ДНК ферментом ДНК-полимеразой в направлении $5' \rightarrow 3'$ начиная от $3'$ -ОН концов присоединённых праймеров. Т.е. матричный синтез ДНК (нем. *matrize*, от латинского *matrix* – матка, источник, начало).

Многократное (циклическое) повторение этих трёх стадий приводит к экспоненциальному обогащению реакционной смеси молекулами ДНК-мишени, поскольку в каждом новом цикле в качестве матрицы выступает не только исходная ДНК, но и вся ДНК, синтезированная в предыдущих циклах. Поэтому реакция относится к цепным. Теоретически за N циклов может получиться $2N$ молекул ДНК-мишени. Протекание ПЦР, т.е. переход от стадии к стадии и от цикла к циклу, регулируется изменением температуры.

Температура денатурации ДНК. Для любой высокомолекулярной геномной ДНК обычно задают 95°C . Для продуктов амплификации, а тем более комплексов «праймер-матрица» эта температура ниже.

Температура отжига праймера – температура, при которой возможно связывание праймерного олигонуклеотида с одноцепочечной ДНК-матрицей при охлаждении реакционной смеси, следующем за стадией денатурации. Для каждого конкретного праймера она рассчитывается отдельно и лежит в пределах $50\text{--}65^\circ\text{C}$. Это переменная температура.

Температура элонгации зависит от типа используемого фермента. Для ферментативной активности ДНК-полимеразы *Taq* из термофильной бактерии *Thermus aquaticus* температурный оптимум составляет 72°C .

Коммерческие фирмы продают наборы реагентов для проведения ПЦР, где все компоненты реакции, за исключением праймеров и матрицы, уже смешаны в нужных концентрациях и расфасованы в тонкостенные пробирки. В том числе добавлен и фермент, индуцируемый нагревом и потому неактивный. Задача исследователя состоит в том, чтобы добавить в пробирку ДНК-матрицу и специфичные праймеры в нужном количестве, поставить пробирку в амплификатор и задать нужный режим.

Рестрикция продуктов ПЦР

Хромосомная ДНК эукариот в сравнении с плазмидной, фаговой или митохондриальной содержит очень большое количество сайтов рестрикции. Кроме того, она всегда фрагментируется случайным образом при выделении, ее препараты труднее очистить от белков, полисахаридов и других веществ. Помимо этого, степень ее метилирования может сильно варьироваться, что оказывает сильное влияние на работу эндонуклеаз.

Обычно берут 3–5-кратный избыток фермента на 1 мкг ДНК и проводят рестрикцию в течение 2–6 ч или оставляют реакцию на ночь. 10 мкг ДНК большинства высших растений соответствует 106–107 геномам. Концентрацию ДНК в растворе можно определить либо путем сравнения с известным стандартом при электрофорезе в агарозном геле, либо путем измерения оптической плотности разведенной аликвоты раствора ДНК.

При обработке геномной ДНК рестриктазами, узнающими палиндромы из шести нуклеотидов (*EcoRI*, *BamHI*, *PstI* и другие распространенные рестриктазы), образуются рестрикты размером от десятков нуклеотидов до 20–30 kb. Таким образом, при полном рестрикционном гидролизе ДНК эукариот получается огромное число рестриктов, десятки и сотни тысяч. При электрофорезе подвергшаяся частичному или глубокому расщеплению геномная ДНК дает шлейф из фрагментов разного размера. Визуализировать нужный фрагмент возможно только с помощью блот-переноса ДНК на нитроцеллюлозный или нейлоновый фильтр и гибридизации ДНК по Саузерну с радиоактивно- или флуоресцентно-меченым зондом.

Так называемые «мелкощепящие» рестриктазы, узнающие палиндромы из 4 нуклеотидов (*SauIIA* и др.), порежут геномную ДНК на более мелкие фрагменты и в большем количестве. Для эффективного разделения высоко- или низкомолекулярных фрагментов ДНК используют разные гели.

Анализ специфических участков ДНК с помощью геле-электрофореза

Проведение горизонтального и вертикального электрофореза. Приготовление агарозного геля и заливка камер. Условия постановки гелевого электрофореза. Подбор концентрации агарозы в зависимости от размеров анализируемых фрагментов ДНК. Маркеры размеров ДНК. Визуализации ДНК в ультрафиолете. Протоколирование результатов электрофореза.

Электрофорез – это электрокинетическое явление перемещения частиц дисперсной фазы (коллоидных растворов) в жидкой среде под действием электрического поля. Впервые это явление было открыто профессорами Московского университета П.А. Страховым и Ф.Ф. Рейссом в 1809 году.

Электрофорез в агарозном геле является стандартным методом для разделения, идентификации и очистки интактных молекул ДНК и их фрагментов (высокомолекулярная хромосомная ДНК всегда фрагментируется при изоляции из клетки). Агароза – фракция природного полисахарида агара.

ДНК – это слабая кислота, поэтому она движется к аноду («+») за счёт отрицательно заряженных фосфатных групп. За движением ДНК (РНК) в пластине геля можно следить, так как полосы окрашенной флуоресцентными красителями ДНК, формируемые молекулами одного размера при продвижении через поры геля, видны в УФ свете. Для окрашивания ДНК применяют краситель бромистый этидий EtBr ($\lambda_{\text{max}} = 590 \text{ нм}$). Молекулы EtBr интеркалируют в молекулы ДНК, т.е. встраиваются между соседними парами нуклеотидов. Интенсивность флуоресценции связанного EtBr в 20 раз выше, чем свободного. Такая окраска обеспечивает высокую чувствительность: от 10 нг ДНК можно увидеть в виде полосы оранжевого цвета. Применяют и другие красители, в частности SYBR Green ($\lambda_{\text{max}} = 497 \text{ нм}$). Длина волны прибора для визуализации ДНК УФ-трансillюминатора – 305–320 нм.

Скорость движения ДНК (РНК) через поры агарозного геля при электрофорезе определяется размером молекул и их конформацией.

Молекулы линейной двухцепочечной ДНК перемещаются в толще геля со скоростями обратно пропорциональными десятичному логарифму их молекулярных масс. Впереди мигрируют низкомолекулярные фрагменты, крупные молекулы движутся медленнее из-за большего сопротивления. Из нативных молекул НК быстрее всего движется тРНК размером 70–90 нуклеотидов и 5S рРНК размером 120 нуклеотидов. Наиболее крупные фрагменты геномной (хромосомной, ядерной) ДНК могут достигать размеров 100000 п.н. Для определения размера фрагментов используют маркеры молекулярного веса (DNA Ladder), которые наносят в соседние лунки геля.

Визуализация результатов электрофореза. Вынуть гель из формы и перенести его на стекло УФ-трансиллюминатора. С гелем агарозы следует работать в перчатках. Бромистый этидий является сильным мутагеном. Включить трансиллюминатор и проанализировать результаты анализа (визуальную детекцию проводить только с защитным экраном, либо в очках, не пропускающих УФ излучение). Фрагменты анализируемой ДНК проявляются в виде светящихся оранжево-красных полос под УФ-излучением с длиной волны 310 нм.

Раздел 3. Полиморфизм генов

ПЦР в реальном времени - метод позволяет регистрировать накопление ДНК ПЦР в реальном времени с использованием флуоресценции и количественно оценить ДНК в образце. Для этой цели применяют флуоресцентные метки (флуорофоры) двух видов:

1) ***Интеркалирующие флуорофоры*** - соединения, которые встраиваются в любые двуцепочечные молекулы нуклеиновой кислоты и повышают интенсивность флуоресценции. Примерами таких красителей может служить SYBR Green или SYBR Gold. Интеркалирующие красители широко используются в научных исследованиях, однако обладают

существенным ограничением, поскольку регистрируют все двуцепочечные ДНК, включая неспецифичные продукты реакции.

2) **Флуорофоры для меченья олигонуклеотидов** - это соединения, интенсивность флуоресценции которых не зависит от связывания с ДНК и регулируется так называемыми гасителями (темновыми или флуоресцирующими).

Олигонуклеотиды меченные парой флуорофор-гаситель, используют в качестве праймеров или зондов (пробы) для гибридизации со специфическим участком молекулы ДНК. К настоящему времени разработано множество вариантов структуры меченных парой флуорофор - гаситель олигонуклеотидов. Ниже приведены наиболее часто используемые зонды.

Линейные разрушаемые зонды (TaqMan) - представляют собой олигонуклеотид (25–30 н.о.), в котором 5'-концевой нуклеотид содержит флуорофор, а 3'-концевой нуклеотид - гаситель. В растворе и при отжиге на ДНК такой зонд не флуоресцирует, за счет гасителя. Во время элонгации ДНК полимеразы, обладающей 5'-3'-экзонуклеазной активностью, гидролизует зонд на нуклеотиды. В результате этого флуорофор и гаситель попадают в раствор, где вероятность нахождения этих веществ рядом будет небольшой, и флуоресценция восстановится. Накопление флуоресценции детектируется прибором при каждом цикле ПЦР. В одной реакции можно использовать несколько зондов, у которых флуорофоры имеют разные спектры испускания.

«Молекулярные маячки» (beacons) - зонд представляет собой небольшую одноцепочечную молекулу ДНК, которая в свободном состоянии способна образовывать пространственную структуру - шпильку. На одном конце олигонуклеотида располагают флуорофор, а на втором – гаситель. Последовательность зонда комплементарна ДНК-мишени, которую нужно детектировать. В такой структуре молекулы зонда, находясь в растворе, не флуоресцируют. При отжиге олигонуклеотида на молекуле ДНК мишени,

происходит пространственное разнесение флуорофора от гасителя и восстановление флуоресценции.

Примыкающие пробы (Light cycler) - в этом варианте используют два зонда, которые связывают ДНК-мишень на небольшом расстоянии друг от друга. 5'-конец одного зонда и 3'-конец второго содержат флуорофор-донор и флуорофор-акцептор, соответственно. При их близком расположении флуорофор-донор поглощает свет определенной длины волны и переносит энергию на флуорофор-акцептор, по флуоресценции которого детектируют продукты амплификации. Применение примыкающих проб также позволяет использовать несколько флуорофоров, с разными спектрами испускания и детектировать в одной пробирке сигнал от разных молекул ДНК.

Анализ данных ПЦР в реальном времени позволяет судить как о присутствии или отсутствии искомой НК, так и оценить ее изначальное количество, за счет регистрации накопления продуктов амплификации в течение всей реакции. Количество исследуемой НК выражают в абсолютных или относительных значениях. Определение абсолютных значений применяют для расчета количества копий НК в пробирке. Для этого необходим внешний контроль с известной концентрацией НК-мишени. Относительные количества определяют для ответа на вопрос: во сколько раз концентрация НК в одном образце больше (или меньше) чем в другом? Для коррекции массы образца, числа клеток, сохранности и количества общей НК проводят нормировку (выравнивание) результатов. Нормировку проводят по числу клеток, по суммарной ДНК, РНК, рибосомальной РНК и др. В исследованиях по определению уровня представленности транскриптов наибольшее распространение получило использование так называемых генов «домашнего хозяйства» (housekeeping genes). Они экспрессируются на постоянном уровне и слабо реагируют на внешние воздействия, поскольку необходимы для поддержания важнейших жизненных функций клетки. При

выборе гена домашнего хозяйства, следует учитывать, что уровень их экспрессии может меняться в разных типах клеток.

Расчеты результатов ПЦР в реальном времени достаточно сложны и проводятся в автоматическом режиме с использованием компьютерных программ. Одной из программ для расчета относительного количества ДНК-мишени, находящейся в свободном доступе в сети Интернет, является REST2009. Расчеты основаны на связи интенсивности флуоресцентного сигнала с концентрацией ДНК в пробирке. Сравнивают число циклов амплификации, необходимых для нарастания сигнала флуоресценции в образцах до одной и той же величины. Теоретически концентрация ампликонов при многократном повторении цикла должна возрастать экспоненциально и описывается формулой:

$$C_n = C_0 \times 2^n$$

C_0 - исходное количество ДНК-мишени, C_n - концентрация ампликонов после n циклов.

На практике, синтез ампликонов постепенно замедляется по мере истощения компонентов реакционной смеси. Накопление ДНК в ходе ПЦР описывают кривой (рис. 4) и делят на четыре стадии: линейная фоновая фаза, стадия раннего экспоненциального роста количества ампликона, стадия линейного логарифмического роста, стадия выхода на плато.

На стадии раннего экспоненциального роста эффективность амплификации максимальна в сравнении с другими стадиями. Накопление ДНК в ходе ПЦР описывается формулой:

$$C_n = C_0 \times (1 + E)^n$$

C_n – количество продуктов реакции на цикле n ; C_0 - изначальное количество исследуемой ДНК на первом цикле; E - эффективность амплификации. Значение E находится в пределах от 0 до 1, что соответствует удвоению исходного количества ДНК за цикл, а при $E = 0$ образование продукта не происходит

Для сравнения данных между образцами используют один из двух методов. В первом, для расчета величины n используют значение порогового цикла (C_t – от англ. threshold cycle) – точки пересечения кривой накопления флуоресценции и одинаковой для всех образцов пороговой линии. Значение C_t определяется автоматически программным обеспечением к прибору или задается вручную в пределах стадии раннего экспоненциального роста накопления флуоресценции. Во втором, используют метод прямого сравнения графиков. Для определения величины n на кривой находят точку, положение которой отражает форму кривой (C_p – от англ. crossing point). Обычно рассчитывают максимумы первой и второй производных графиков накопления флуоресценции. Значение эффективности амплификации подбирается эмпирически путем последовательных разбавлений образца.

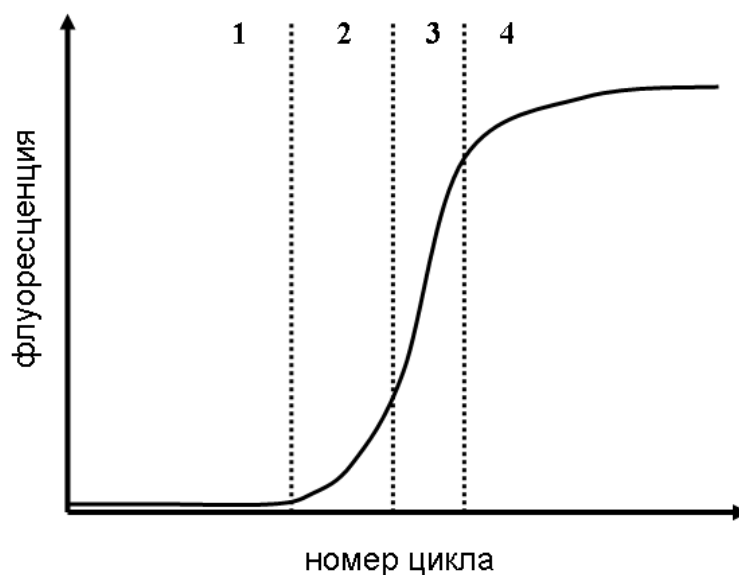


Рисунок - Зависимость флуоресценции от номера цикла

1 – Линейная фоновая фаза. 2 – Ранний экспоненциальный рост. 3 – Линейный логарифмический рост. 4 – Плато

ПЦР в реальном времени обладает рядом преимуществ, за счет которых с его помощью, например, выявляют и идентифицируют полиморфные локусы HLA, проводят мониторинг посттрансплантационных взаимодействий, генотируют (выявляют аллели), проводят

количественный микросателлитный анализ и пренатальную диагностику генетических заболеваний и т.д.

Раздел 4. Методы сравнительной геномики

В связи со спецификой молекулярной генетики как отрасли генетических знаний способы применения достижений информационных технологий различны. Условно их можно разделить на две группы. К первой относится использование различного рода специальных поисковых систем (PubMed, NCBI и др.) Ко второй группе принадлежат прикладные программы, которыми пользуется исследователь при своих экспериментах (BLAST, OligoCalc и др.).

С момента открытия генетического кода биологические исследования претерпели изменения в способе его осуществления. До начала двадцатого века биология фокусировалась на процессах живых организмов и почти всегда включала эксперименты в лабораториях. Рост молекулярной биологии в течение двадцатого столетия переместил исследования в пробирку, где биологические системы могли быть тщательно изучены. Затем, начиная с 1970-х годов, ученые начали исследовать данные ДНК и последовательности белка с экспоненциальной скоростью. Фактически, у исследователей в настоящее время приблизительно 97 миллиардов оснований секвенированы и более 93 миллионов записей последовательностей нуклеотидов. Удивительно, что данные этих последовательностей удваиваются каждые 18 месяцев.

По мере того, как в конце двадцатого столетия росли базы данных о генах и белковых последовательностях, ученые обратились к компьютерам, чтобы помочь проанализировать этот богатый и постоянно растущий объем данных. Сегодня одним из наиболее распространенных инструментов, используемых для изучения ДНК и белковых последовательностей, является базовый инструмент поиска локального выравнивания, также известный как

BLAST. BLAST-это компьютерный алгоритм, который доступен для использования в Интернете на веб-сайте Национального центра биотехнологической информации (NCBI), а также во многих других сайтах. BLAST может быстро выравнивать и сравнить последовательность ДНК запроса с базой данных последовательностей, что делает ее важнейшим инструментом в продолжающихся исследованиях геномики. В последние годы параллельная разработка крупномасштабных проектов секвенирования и биоинформационных инструментов, таких как BLAST, позволила ученым изучить генетический план жизни многих видов, а также помогла связать биологию и информатику в области созревания биоинформатики.

BLAST – это статистически ориентированный метод поиска, который находит области сходства между вашими запросами и последовательностями базы данных и производит выравнивание по горизонтали этих регионов. Внутри этих выровненных областей сумма значений матрицы скрининга их составляющих пар символов выше некоторого уровня, который вы ожидаете совершить случайно.

Ожидание последовательности-это вероятность того, что текущий поиск найдет последовательность с таким же хорошим счетом по отдельности.

Каждая выровненная пара сегментов имеет нормализованный балл, выраженный в битах, который позволяет оценить величину пространства поиска, которое вам нужно было бы просмотреть, прежде чем вы ожидаете, что оценка HSP будет такой же хорошей или лучшей, чем эта. Если бит равен 30, вам нужно будет в среднем оценивать около 1 миллиарда пар независимых сегментов, чтобы найти оценку этого случая. Каждый дополнительный бит удваивает размер пространства поиска. Эта битовая оценка представляет собой вероятность; Один над двумя, поднятый до этой степени – вероятность находок такого сегмента случайно. Бит-оценки

представляют собой уровень вероятности для сравнения последовательностей, который не зависит от размера поиска.

Размер поискового пространства пропорционален произведению длины последовательности запросов, умноженной на сумму длин последовательностей в базе данных. Этот продукт, называемый N в публикациях Альтшула, умножается на коэффициент K , чтобы получить размер поискового пространства. При поиске белковых баз данных с белковыми запросами K составляет около 0,13. BLAST использует оценки K , полученные до того, как они запускаются методом случайного моделирования.

Существует вероятность, связанная с каждым парным сравнением в списке и с каждым выравниванием пары сегментов. Число, показанное в списке-это вероятность того, что вы будете наблюдать оценку или группу баллов настолько же высоко, как наблюдаемый балл, просто случайно, когда вы выполняете поиск по базе данных такого размера.

Идеальный поиск мог бы найти варианты, которые идут от крайне маловероятных к тем, чьи лучшие баллы должны были произойти случайно.

Если вы укажете `ungapped alignments` для BLAST, в вашем выводе под заголовком N . появится третий столбец данных. Число в этом столбце указывает, сколько HSP было вовлечено в вычисление статистики для последовательности. Если число больше 1, оценки нескольких HSP объединяются для получения результата.

BLAST принимает любое количество последовательностей белка или нуклеиновой кислоты в качестве входных данных. Набор поиска — это специально форматированная база данных.

Функция BLAST зависит от того, являются ли ваши входные последовательности белками или нуклеотидами.

PSIBLAST итеративно ищет одну или несколько баз данных белка для последовательностей, сходных с одной или несколькими последовательностями запросов белка. PSIBLAST похож на BLAST, за исключением того, что он использует матрицы оценки положения, полученные во время поиска.

NetBLAST ищет последовательности, похожие на последовательность запросов. Запрос и поиск базы данных могут быть либо пептидом, либо нуклеиновой кислотой в любой комбинации. NetBLAST может искать только базы данных, хранящиеся в национальном центре биотехнологической информации (NCBI)

GCGToBLAST объединяет любой набор GCG-последовательностей в базу данных, которую вы можете искать с помощью BLAST.

FastA делает поиск Пирсона и Липмана для сходства между последовательностью запросов и группой последовательностей одного и того же типа (нуклеиновая кислота или белок). Для поиска нуклеотидов FastA может быть более чувствительным, чем BLAST.

TFastA делает поиск Пирсона и Липмана сходства между последовательностью белковых запросов и любой группой нуклеотидных последовательностей. TFastA переводит нуклеотидные последовательности во все шесть рамок считывания перед выполнением сравнения.

FastX делает поиск Пирсона и Липмана сходства между нуклеотидной последовательностью запросов и группой белковых последовательностей с учетом сдвига кадров. FastX переводит обе нити нуклеиновой последовательности перед выполнением сравнения.

TFastX делает поиск Пирсона и Липмана сходства между последовательностью белковых запросов и любой группой нуклеотидных последовательностей с учетом сдвига кадров.

SSearch делает строгий поиск Smith-Waterman для сходства между последовательностью запросов и группой последовательностей того же типа (нуклеиновая кислота или белок). Это может быть наиболее чувствительный метод, доступный для поиска сходства. По сравнению с BLAST и FastA это может быть очень медленно.

FrameSearch исследует группу белковых последовательностей для сходства с одной или несколькими последовательностями нуклеотидных запросов или ищет группу нуклеотидных последовательностей для сходства с одной или несколькими последовательностями запросов белка. Для каждого сравнения последовательностей программа находит оптимальное выравнивание между белковой последовательностью и всеми возможными кодонами на каждой цепи нуклеотидной последовательности. Оптимальные выравнивания могут включать сдвиги рамки считывания.

WordSearch идентифицирует последовательности в базе данных, которые используют большое количество общих слов в том же регистре, что и ваша последовательность запросов.

ProfileSearch и MotifSearch используют профиль (полученный из набора согласованных последовательностей) вместо последовательности запросов для поиска коллекции последовательностей.

HmmerSearch использует скрытую модель Маркова в качестве запроса для поиска в базе данных последовательности, чтобы найти последовательности, подобные семейству, из которого был создан профиль HMM. Профиль HMM можно создать с помощью HmmerBuild.

FindPatterns использует шаблон, описываемый регулярным выражением, для поиска коллекции последовательностей. Motifs ищет мотивы последовательности, просматривая белки для шаблонов, определенных в словаре PROSITE сайтов и шаблонов протеина. Мотивы могут отображать отрывок из текущей литературы по каждому из найденных мотивов.

Из-за того, как BLAST должен оценивать определенные статистические параметры, количество матриц подсчета, доступных для использования с BLAST, ограничено.

Выравнивание по Gapped не является вариантом при запуске TBLASTX.

Можно выбрать несколько последовательностей запросов, любая из которых может быть либо нуклеиновой кислотой, либо белком. Вы также можете выбрать несколько баз данных для поиска, однако каждый из них должен быть одного типа.

Если вы использовали GCGToBLAST для создания баз данных BLAST из любого источника, отличного от базы данных в формате GCG (например, из произвольных файлов последовательности, файла MSF или RSF и т. Д.), То вывод списка файлов BLAST не будет файлом функционального списка. Если вы хотите в полной мере использовать выход файла списка BLAST, убедитесь, что вы создаете базы данных BLAST из базы данных в формате GCG. Вы можете использовать DataSet для создания таких баз данных из любого набора последовательностей в формате GCG.

BLAST может выполнять поиск только специально сжатой формы данных. Поэтому вы можете искать только те базы данных, которые доступны в этой форме, и вы должны искать их целиком. Если вы хотите ограничить поиск определенным набором последовательностей, используйте программу GCGToBLAST для создания специально сжатой базы данных, состоящей только из этих последовательностей.

Построение филогенетического дерева

Реконструкция филогенетического дерева видов – одна из основных проблем эволюционной биологии (теории эволюции). Поскольку палеонтологическая летопись часто бывает неполна и противоречива, это невозможно сделать без применения молекулярных методов. При этом современные последовательности биополимеров используются, в рамках той

или иной модели молекулярной эволюции, для построения дерева генов. Однако более или менее реалистические эволюционные модели приводят к непреодолимым вычислительным сложностям, и поэтому приходится применять приближенные методы. Обзор методов построения деревьев генов. Для построения филогенетического дерева можно использовать различные белки и соответствующие им последовательности ДНК. Практика показывает, что очень часто эти деревья могут различную структуру. Поэтому возникает задача построения “консенсусного” дерева видов, наилучшим образом согласованного с данными деревьями генов. Однако даже в отсутствие ошибок, связанных с выбором неадекватной модели молекулярной эволюции, дерево генов не тождественно дереву видов. Причинами этого являются дубликации генов, потери генов и горизонтальный перенос. Действительно, если в предковом виде происходит дубликация гена, изменения в каждой из копий происходят независимо от другой, и обе копии наследуются потомками. В результате дубликации гена в предковом виде два вида могут нести гены a_1 и a_2 , которые дивергировали еще до расщепления видов, вследствие чего различия между генами a_1 и a_2 из одного генома превышают различия между ортологичными генами, например типа a_1 , из разных геномов. Если теперь в каких-либо потомках произойдет потеря гена, точнее, какой-то одной из двух копий гена, скажем a_1 , то сравнение единственного оставшегося представителя семейства a_2 из этого генома с выборкой генов типа a_1 из других геномов приведет к искажению топологии дерева “видов”.

На первом этапе обычно решается задача сравнительного анализа древовидной генетической и видовой структур – находится наименьшее число (или стоимость) элементарных операций (имеющих разумную биологическую интерпретацию), наиболее экономно переводящих дерево генов в дерево видов. Этот метод основан на естественном предположении, что дерево генов, наименее отличающееся от дерева видов, вместе с набором

биологически значащих операций, переводящих одно в другое, наиболее объективным образом отражает эволюцию генов. Таким образом, при выводе филогенетического дерева мы отдаем предпочтение тому дереву, для которого стоимость операций перевода всех деревьев генов минимальна. Предполагается, что это позволит включить в “консенсусное” дерево правильно установленные узлы, тогда как те узлы частных деревьев по отдельным генам, которые недостоверны и ошибочно отражают филогению видов, будут отброшены. Также будут рассмотрены алгоритмы, нахождения дерева видов, минимально расходящегося с данным набором деревьев генов.

Раздел 5. RAPD- и ISSR-анализ

В геномах растений и животных количество микросателлитных повторов очень велико, что делает ISSR-метод (Inter-Simple Sequences Repeat) очень эффективным и удобным в генетическом анализе (Zietkiewicz et al., 1994). Микросателлитные последовательности окружают многие гены и могут быть использованы как якорные последовательности к этим генам. Этот метод начал развиваться в 1994 г., а к настоящему времени получил широкое распространение, особенно в исследованиях генофондов различных видов растений, для картирования геномов и маркирования агрономически важных признаков (Глазко, 1999; Manninen et al, 2000; Irzykowska et al., 2002).

Основой ISSR-метода или анализа полиморфных участков ДНК между микросателлитами, является ПЦР с одним или несколькими праймерами длиной в 15–24 нуклеотида, но праймеры состоят из tandemных коротких 2–4 нуклеотидных повторов, например 5'- CACACACACACACACAG, и одного селективного нуклеотида на 3'-конце праймера (Kalendar et al., 1999). Такие праймеры амплифицируют фрагменты ДНК, которые находятся между двумя достаточно близко расположенными микросателлитными повторами.

Продукты ISSR амплификации содержат на флангах инвертированную микросателлитную последовательность праймера. По сравнению с RAPD-методом увеличивается точность отжига и уменьшается его «случайность», или анонимность. Как и RAPD, ISSR не требует предварительного клонирования и секвенирования фрагментов для подбора праймеров. Метод воспроизводим в строгих условиях реакции. Необходимо подбирать последовательность ISSR-праймеров более строго (табл.4) и использовать в анализе только «яркие» продукты ISSR амплификации.

Таблица 4
ISSR-праймеры

Для двух-нуклеотидного микросателлитного повтора
(CT)_n :5'(CT) ₁₀ G,5'(CT) ₁₀ T,5'(CT) ₁₀ A
(CA)_n :5'(CA) ₁₀ G,5'(CA) ₁₀ T,5'(CA) ₁₀ A
(TG)_n :5'(TG) ₁₀ G,5'(TG) ₁₀ C,5'(TG) ₁₀ A
(AG)_n :5'(AG) ₁₀ G,5'(AG) ₁₀ C,5'(AG) ₁₀ T
(AC)_n :5'(AC) ₁₀ G,5'(AC) ₁₀ C,5'(AC) ₁₀ T
Для трех-нуклеотидного микросателлитного повтора
(CTC)_n :5'(CTC) ₆ G,5'(CTC) ₆ T,5'(CTC) ₆ A
(GTG)_n :5'(GTG) ₆ G,5'(GTG) ₆ T,5'(GTG) ₆ A
(CAC)_n :5'(CAC) ₆ G,5'(CAC) ₆ T,5'(CAC) ₆ A
(ACC)_n :5'(ACC) ₆ G,5'(ACC) ₆ T,5'(ACC) ₆ C
(TCG)_n :5'(TCG) ₆ G,5'(TCG) ₆ C,5'(TCG) ₆ A

Проблема «сильных» и «слабых» ампликонов остается, так же как и в RAPD, но уже в меньшей степени. В большинстве случаев, праймеры длиной 20 нуклеотидов с единичным селективным нуклеотидом, дают до 20 ампликонов, которые легко разделяются с помощью электрофореза с агарозном геле.

Материалы и оборудование:

1. Набор реактивов для выделения ДНК на 50 проб;
2. Taq-полимераза (200 ед. акт.);
3. ISSR-праймеры (не менее 3 шт.);

4. Микропробирки для ПЦР на 0.6 мл – 200 шт.; микропробирки на 1.5 мл – 100 шт.; наконечники для пипеток – 500 шт.;

5. Агароза (Biotechnology grade) – 25 г.

Перечень используемого оборудования представлен в задаче 1.1. (RAPD-анализ). выделение ДНК, постановка ПЦР и электрофорез проводится студентами, как описано в задаче 1.1.

Ход работы:

1. Выделение геномной ДНК из проростков растений.

2. Постановка ПЦР с помощью ISSR (M1, M2, M6, M7, M8, M9, M10, M12) праймеров.

3. Проведение количественной оценки степени полиморфизма и определение уровня дивергенции между популяциями исследуемых видов растений с помощью компьютерной программы «Treeson» (версия 1.3 b) (Van de Peer, 1994).

4. Построение дендрограммы по ISSR-спектрам, отражающей степень родства исследуемых популяций растений.

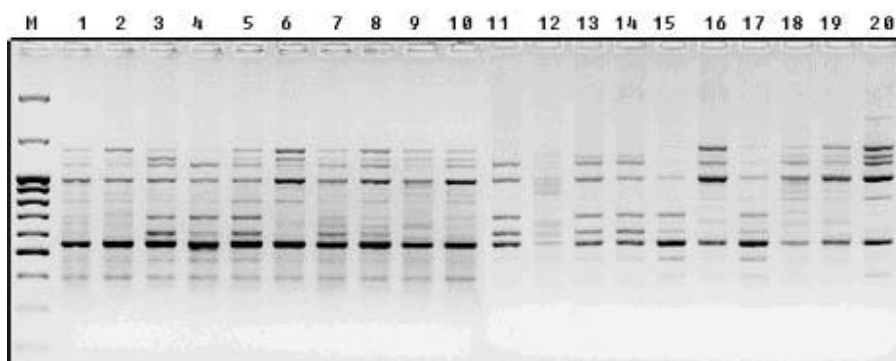


Рис.4. ISSR-спектр наперстянки крупноцветковой *Digitalis grandiflora* Mill., полученный при амплификации ДНК с праймером M12

Качественная и количественная оценка полиморфизма ДНК растений с использованием ISSR-метода

Результаты ПЦР анализа необходимо записать в виде матрицы бинарных признаков, в которой наличие или отсутствие одинаковых по

размеру фрагментов в ISSR-спектрах (рис.4) рассматривается соответственно как состояние 1 или 0 (при этом следует учитывать только воспроизводимые в повторных экспериментах фрагменты). Вот пример такой записи матрицы бинарных признаков:

***Digitalis grandiflora* Mill. Ценопопуляция №1.**

11111111101111110111111110011111110111101111111111111110111111
1111101011111111011111111

Ценопопуляция №2.

111110111011111101001111111111111111010110111111111110111111
1111101011111011111110111

Ценопопуляция №3.

111110111011101101111110100111111101101111111111111110111111
1111101011111111111110111

В первой строке необходимо отметить количество бинарных признаков (в нашем примере). Далее следует указать название исходного генотипа (Вид №1), а в следующей строке – бинарные признаки для этого образца, то же самое повторить для следующих популяций. Файл нужно сохранить в Блокноте с расширением *.seq.

Работа с программой Treeson (версия 1.3 b)

Цель: компьютерный анализ полиморфизма ДНК, освоение операций при построении дендрограмм.

Программа «Treeson» разработана для операционной системы Microsoft Windows. Для использования этой программы в других операционных системах, таких как Linux, FreeBSD, Mac OS X и Solaris, необходимо установить дополнительно специальные программы (прил.1).

Построение матрицы генетических различий

1. Открыть программу «Treeson».
2. <Distance estimation>.
3. <Start Distance estimation>.

4. Открыть папку с исходным файлом.
5. В типе файлов <files type> указать <All Files > open файл (Digital-is.seq.).
6. В <Sequence Type> выбрать <RFLP/AFLP/RAPD data>(рис.5).

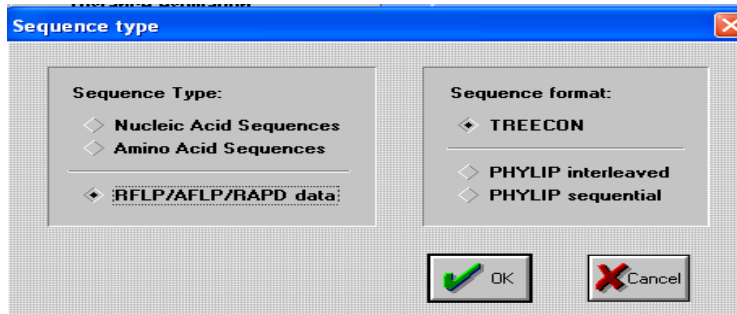


Рис.5 Выбор команды в окне программы

7. В <Sequence format> выбрать < Treecon>.
8. Когда откроется окно с названием всех исследуемых генотипов (в данном случае 14 генотипов) выделить с помощью <Select all> все генотипы <OK>(рис.6).

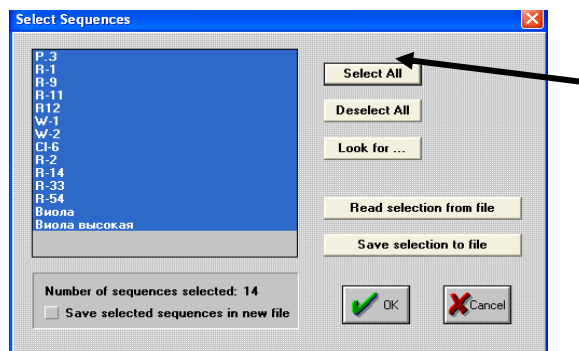
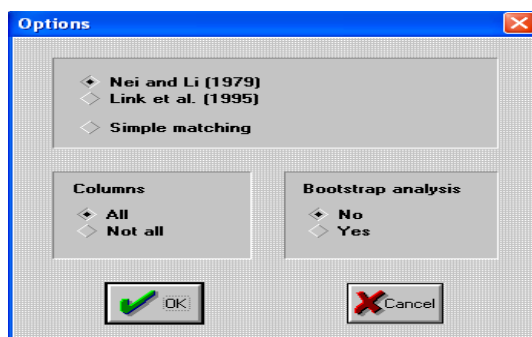


Рис.6. Выделение генотипов в окне программы

9. В следующем окне (Options) выбрать < Nei and Li> (рис.7).
В разделе <Columns>, выбрать <All>, а в <Bootstrap analysis> – <No>, <OK>.
10. В окне <Finished> выбрать <OK>.

В папке <Programs> получаем два файла, которые лучше перенести в



отдельную папку и сохранить:

1) **species.dat.**, который можно открыть в блокноте и в котором по порядку представлены названия исследуемых генотипов в матрице генетических различий (%).

Рис.7. Выбор необходимых команд для расчета матриц генетических различий

2). **mat.out.** – матрица генетических различий, в которой по горизонтали и по вертикали представлены исследуемые генотипы.

На пересечении вертикали и горизонтали можно найти степень генетических различий (%) между исследуемыми образцами (рис.8).

Tree construction							
10 0 0 2 0							
(10f8.3)							
6.338 0.000							
4.167 5.714 0.000							
2.778 5.000 3.521 0.000							
6.294 11.511 7.092 6.383 0.000							
3.448 6.383 0.699 2.797 6.338 0.000							
5.965 4.693 1.779 5.338 8.961 2.473 0.000							
6.944 11.429 6.338 7.042 1.418 5.594 8.185							
0.000	4.795 7.746 5.556 5.556 6.294 4.828 6.667						
6.250	0.000	5.882 9.609 6.667 7.368 7.420 5.923 7.801					
7.368	1.730	0.000					

Рис.8. Матрица генетических различий (представлен фрагмент матрицы) (Кокаева и др., 2006)

С помощью компьютерной программы «**Treecon 1.3b**» на основе составленных матриц рассчитывается матрица генетических различий. Расчет по программе «**Treecon 1.3b**» проводится по формуле:

$$Gd(xy) = \frac{1 - 2 N_{xy}}{N_x + N_y};$$

где $Gd(xy)$ – генетические расстояния по Ней и Ли, N_{xy} – число фрагментов, общих для обоих спектров, N_x – число фрагментов присутствующих в спектре “х”, но отсутствующих в спектре “у”, N_y – число фрагментов, присутствующих в спектре “у”, но отсутствующие в спектре “х” (Nei and Li, 1979).

Построение дендрограммы

На основании полученной матрицы по ISSR-спектрам невзвешенным парно-групповым методом (UPGMA) или методом ближайшего связывания (NJ) строится дендрограмма, отражающая степень родства исследуемых образцов. Для построения дендрограммы используется компьютерная программа «**Treecon 1.3 b**» с применением 100 реплик Bootstrap (Van de Peer et al., 1994).

Порядок операций при построении дендрограммы

1. В окне (Options) выбрать <Nei and Li>. В разделе <Columns> выбрать <All>, а в <Bootstrap analysis> – <Yes>.
2. <Bootstraps sample>, значение 100, <OK>.
3. В окне <Finished> выбрать <OK>.
4. Для построения укорененного дерева в окне <Treecon> (версия 1.3 b), <Inter tree topology>, <Neighbor-joining>, в разделе <Bootstrap analysis>, <Yes>.
5. Затем выбрать <Root unrooted trees>, далее <Start rooting unrooted trees>, <Single sequence (forced)>, <Bootstrap analysis>, <Yes>. В качестве корня выбрать базовую популяцию, <Finished>, <OK>.(рис.9).

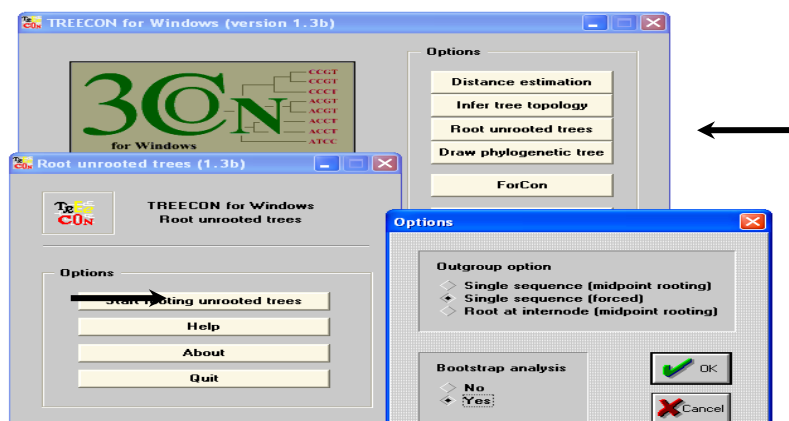


Рис.9. Выбор команд для построения укорененного дерева

6. В окне <Treecone> (версия 1.3 b), выбрать<Draw phylogenetic tree>, в строке меню <file>, <open>, < (new) tree>.

7. Чтобы построить шкалу на дендрограмме, необходимо в строке меню выбрать <Show>, <Distance Scale> и далее один из видов предлагаемых шкал (рис.10).

8. Чтобы определить значение бутстрепа на дендрограмме, необходимо в строке меню выбрать <Show>, <Bootstrap values>. Значение более 50 считается достоверным.

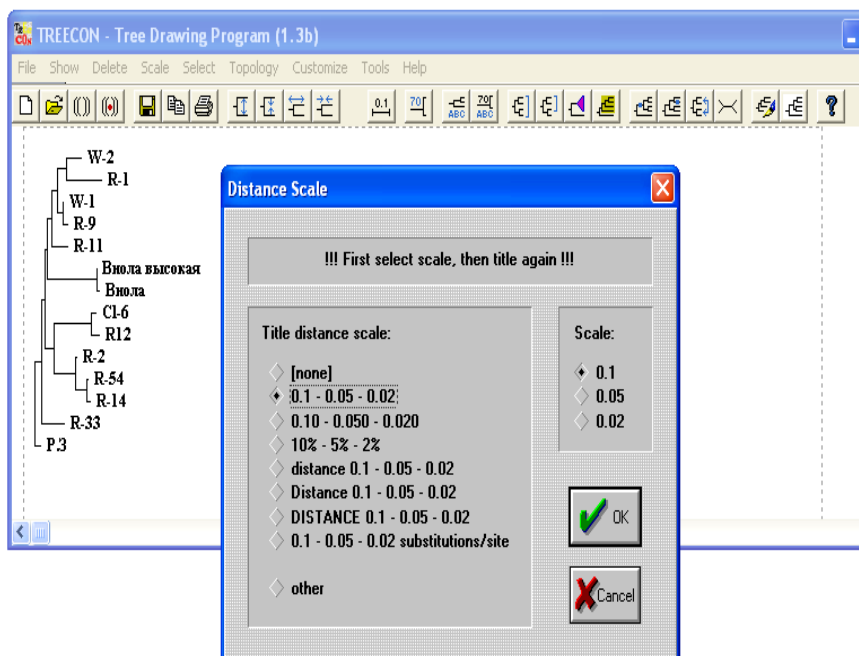


Рис.10. Выбор команд для построения дендрограммы

Раздел 6. Проведение генно-инженерных работ *in silico*

Целью данной работы является умение правильно подбирать праймеры для постановки ПЦР и анализ информационных ресурсов, программных обеспечений, которые используются для работы с ДНК, а также планирование научно-исследовательского исследования *in silico*.

Подбор праймеров

При выборе праймеров руководствуются следующими требованиями:

- в праймере содержание оснований Г и Ц должно находиться в пределах 40-60 %;
- основания Г и Ц должны быть равномерно распределены по всей длине праймера;
- наличие на 3'-конце праймера Г или Ц увеличивает эффективность ПЦР;
- для предотвращения ошибочного спаривания праймера с ГЦ-богатыми участками ДНК на 3'-конце праймера не должно находиться более 3 оснований Г или Ц;
- праймеры не должны формировать стабильных дуплексов сами на себя или друг с другом;
- участки отжига должны быть уникальными, т.е. праймеры во избежание синтеза неспецифических продуктов не должны иметь длинных комплементарных участков вне специфических мест отжига;
- оба праймера должны иметь близкую температуры плавления (T_m) в пределах 55-60°C.

Примечания:

На практике избежать образования димеров удастся далеко не всегда. Однако работать имеет смысл лишь с теми парами праймеров, для которых программа по дизайну праймеров димеров не выявляет. В противном случае,

димеры будут образовываться со столь высокой эффективностью, что работать с реакцией будет невозможно.

Чем меньше размер продукта, тем точнее уровень репортерной флуоресценции отражает его количество. Однако опыт показывает, что при размере продукта до 200 нп точность вполне приемлема. В то же время, при длине продукта 180-200 нп температура его плавления обычно на несколько градусов выше температуры плавления димеров праймеров, что позволяет избирательно детектировать флуоресценцию от продукта - при температурах, когда димеры уже расплавлены (подробнее см. ниже). Поэтому мы обычно работаем с ампликонами именно такой длины.

Рекомендуется сразу же заказать как минимум 2 пары праймеров и затем выбрать из них лучшую.

Рекомендуемые программы для выбора праймеров:

Очень хорошие праймеры подбирает программа Primer Express (Applied Biosystems), если задавать температуру плавления 58-60°C. Однако эта программа задает очень высокие критерии поиска, в результате чего она часто не может подобрать ни одной пары к заданной последовательности.

Хорошие результаты получаются также с праймерами, подобранными с помощью Vector NTI. Однако работать имеет смысл только с праймерами, которым программа присваивает максимальный рейтинг (при стандартных условиях поиска он равен 171).

Выбор праймеров существенно облегчается при использовании специальных компьютерных программ типа Oligo или Primer, хотя в ряде случаев температуру отжига праймеров приходится корректировать эмпирическим путем.

Для ориентировочного подсчета температуры плавления используют формулу:

$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C),$$

где А, Т, G, C – количество соответствующих нуклеотидов в праймере.

Для олигонуклеотидов длиной 14-70 оснований используют формулу:

$$T_m = 81,5 + 16,6 (\lg M) + 0,41 (\% \Gamma + \% \text{Ц}) - (600/L),$$

где M - ионная сила раствора (в моль/л), L – длина олигонуклеотида.

Информационные ресурсы

Информация о генах и геномах различных организмов хранится в специализированных базах данных. Биомедицинские базы данных созданы Национальным Центром Биотехнологической Информации (GenBank), являющегося частью Международного нуклеотидного банка данных, Европейским Институтом Биоинформатики (EMBL) и Японским Национальным Институтом Генетики и Центром Биологической Информации (DDBJ).

В специализированных базах данных - IMAGE (Integrated Analysis of Genomes and their Expression), CGAP (Cancer Genome Anatomy Project) содержится информация обо всех последовательностях генов человека, а также имеются клоны, содержащие эти гены. База данных dbESTEST содержит EST (expressed sequence tag) последовательности человека. Большое количество EST последовательностей идентифицировано институтом геномных исследований (TIGR, Institute for Genomic Research). Американская коллекция тканевых культур располагает индивидуальными человеческими и мышинными TIGR клонами, включая клоны с открытыми рамками считывания нуклеотидной последовательности. Genome Systems (Сент. Луис, США) и Research Genetics (США, Хантсвил) используют IMAGE клоны в производстве своих чипов.

Раздел 7. Итоговый проект

Анализ и оценка проблемы. Постановка целей и задач проекта. Формирование концепции. Сбор и анализ информации. Выбор методов исследования. Разработка плана проекта. Реализация. Оформление. Экспертная оценка. Защита.

Планируемые результаты

Знает:

- проблемы стабильности генетического материала, типах структурных повреждений в ДНК и РНК;
- роль биоинформатики в современной молекулярной генетике и базах данных по молекулярной биологии и генетике, методам информационного анализа последовательностей нуклеиновых кислот.

Умеет:

- проводить и анализировать молекулярно-генетический эксперимент;
- использовать достижения молекулярной генетики в решении задач медицины, экологии и биотехнологии, а также применять полученные знания в дальнейшей практической деятельности.

Владеет:

- алгоритмами сравнения и анализа нуклеотидных последовательностей.

МЕТОДИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ

- Наглядные изобразительные пособия: модели, плакаты, таблицы, видеофильмы.
- Компьютерный класс.
- Средства мультимедиа.
- Специализированная лаборатория, оснащенная современными приборами: CO₂ –инкубатор, ламинарный бокс для проведения полимеразно-цепной реакции, цифровые микроскопы, флуоресцентный микроскоп, бидистиллятор, камера специализированная цифровая, магнитная мешалка с нагревом, амплификатор с тремя независимыми нагревательными блоками, камера для горизонтального электрофореза, камера для вертикального электрофореза, термостат для малых объемов проб, система для

визуализации и документирования результатов электрофореза, трансиллюминатор, центрифуги на различные объемы проб.

Наглядные средства и оснащение кабинета

Занятия должны проводиться в хорошо освещенном, проветриваемом помещении, иметь удобные столы, у каждого должно быть постоянное рабочее место, необходимый материал и инструменты для работы. Необходимо наличие лабораторных столов со сливными раковинами, состоящих из химически стойких керамогранитных плит, а также вытяжного шкафа с ламинарным потоком воздуха.

Список источников

1. Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика (в 3-х томах), М.: Книга по Требованию, 2012.
2. Жимулев И. Ф. Общая и молекулярная генетика: учеб. пособие для студ. ун-тов, обуч. по напр. 510600 "Биология и биол. спец. / Жимулев, Игорь Федорович; отв. ред. Е. С. Беляева, А. П. Акифьева. - Изд. 4-е, стер. - Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2007. - 480 с.
3. Никольский В. И. Генетика : учеб. пособие для студ. вузов, обуч. по спец. "Биология" / Никольский, Владимир Иванович. - М.: Академия, 2010. - 250 с.
4. Никольский В. И. Практические занятия по генетике: учеб. пособие для студ. вузов, обуч. по спец. "Биология" / Никольский, Владимир Иванович. - М.: Академия, 2012. - 224 с.
5. Асанов А.Ю., Демикова Н.С., Голимбет В.Е. Основы генетики. - М. : Академия, 2012. - 356 с.
6. Терри А. Браун. Геномы. – М.: Институт компьютерных исследований, 2011. – 944 с.
7. Эпигенетика. Под ред. С. Дэвид Эллис, Томас Дженювейн, Дэнни Рейнберг. – М: Техносфера, 2013. – 496 с.

8. Сергей Разин, Андрей Быстрицкий. Хроматин: упакованный геном. – М: Бином. Лаборатория знаний, 2013. – 192 с.
9. Дмитрий Коростин, Екатерина Шубина, Валерий Ильинский. NGS. Высокопроизводительное секвенирование. – М: Бином. Лаборатория знаний, 2015. – 232 с.
10. Герман Саматов, Дмитрий Трофимов, П. Семенов, А. Савилова, И. Кофиади, Д. Абрамов. ПЦР в реальном времени. М: Бином. Лаборатория знаний, 2015. – 224 с.
11. Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии. Под ред. Кейт Уилсон, Джон Уолкер. М: Бином. Лаборатория знаний, 2015. – 852 с.
12. Артур М. Леск. Введение в биоинформатику. М: Бином. Лаборатория знаний, 2013. – 320 с.
13. Бернхард Хаубольд, Томас Вие. Введение в вычислительную биологию. Эволюционный подход. М: Регулярная и хаотическая динамика, 2011. – 456 с.
14. Р. Дурбин, Ш. Эдди, А. Крөг, Г. Митчисон. Анализ биологических последовательностей. М: Регулярная и хаотическая динамика, 2006. – 480 с.
15. Марк Бородовский, Светлана Екишева. Задачи и решения по анализу биологических последовательностей. М: Регулярная и хаотическая динамика, 2008. – 440 с.
16. Рольф Шмид. Наглядная биотехнология и генетическая инженерия. М: Бином. Лаборатория знаний, 2014. – 328 с.
17. Джеральд М. Фаллер, Деннис Шилдс. Молекулярная биология клетки. М: Бином. Лаборатория знаний, 2011. – 256 с.
18. Николай Мушкамбаров. Молекулярная биология. М: Медицинское информационное агентство, 2007. 536 с.
19. Н.Н. Мушкамбаров, С.Л. Кузнецов. Молекулярная биология. Введение в молекулярную цитологию и гистологию. 2016.

20. Бенджамин Льюин. Гены. М: Бином. Лаборатория знаний, 2011. – 896 с.
21. Несса Кэри. Мусорная ДНК. Путешествие в темную материю генома. М: Бином. Лаборатория знаний, 2016. – 336 с.
22. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. М: Мир, 2002. – 589 с.
23. Нуклеиновые кислоты. От А до Я. Под ред. Сабина Мюллер. М: Бином. Лаборатория знаний, 2013. – 424 с.
24. Вадим Левитин. Удивительная генетика. Энас-книга, 2016. – 256 с.
25. Щелкунов С. Н. Генетическая инженерия. - 2-е изд., испр. и доп. - Новосибирск: Сибирское университетское изд-во, 2004. - 496 с.
26. Великов В.А. Молекулярная биология. Практическое руководство: Учеб. пособие для студ. биол. фак. и фак. нано- и биомед. технол. – Саратов: Издательство «Саратовский источник», 2013. – 84 с.: ил.
27. Патрушев Л.И. Искусственные генетические системы — М.: Наука, 2005 — В 2 т.
28. Ермилова Е.В. Количественный анализ экспрессии генов : учебное пособие. - СПб. : ТЕССА, 2010. - 104 с.
29. Паун Г. ДНК-компьютер: новая парадигма вычислений / Паун, Георг, Розенберг, Гжегорж, Саломая, Арто ; пер. с англ. Д. С. Ананичева [и др.] под ред. М. В. Волкова. - М. : Мир, 2004. - 528 с.
30. Агол В.И., Богданов А.А., Гвоздев В.А. и др.; под ред. А.С. Спирина. Молекулярная биология: Структура и биосинтез нуклеиновых кислот. М., Высшая школа, 1990, 352 с.
31. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки. М., Мир, 1994, том 1, том 2.

Интернет – ресурсы, базы данных, информационно-справочные и поисковые системы

www.ncbi.nlm.nih.gov/ - Национальный центр биотехнологической информации США. NCBI предоставляет информацию о базах данных белковых доменов, ДНК (GenBank) и РНК, базах данных статей научной литературы (PubMed) и таксономичной информации (TaxBrowser), обеспечивает поиск данных о конкретном биологическом виде (Тахоному). Также содержит различные стандартные программы биоинформатики (BLAST).

<http://www.viniti.msk.su/> - Всероссийский Институт Научной и Технической Информации (ВИНИТИ РАН)

www.swissprot.com – свободный доступ к международной базе данных по первичным и 3D структурам ферментов

www.bioinformatix.ru - портал по биоинформатике, имейджингу и биософту

<http://www.bdbiosciences.com/pharmingen/protocols/>

<http://www.protocol->

[online.org/prot/Cell Biology/Cell Culture/Cell Preparation Isolation/](http://www.protocol-online.org/prot/Cell_Biology/Cell_Culture/Cell_Preparation_Isolation/)

<http://stemcells.atcc.org/technicalInfo/protocols.cfm>

<http://www.stemcell.com/technical/manuals.asp>

<http://www.invitrogen.com/content.cfm?pageid=102&tclid=1&CFID=9852147&CFTOKEN=39795457>

<http://www.bdbiosciences.com/pharmingen/protocols/>

http://www.ihcworld.com/protocol_database.htm

<http://imgen.bcm.tmc.edu/molgen/labs/bradley/protocol.htm>

<http://baygenomics.ucsf.edu/protocols/>

http://pingu.salk.edu/~sefton/Hyper_protocols/TableOfContentsTC.html

<http://www.cellbio.com/protocols.html>

<http://www.hyclone.com/library/basicprotocols.htm>

<http://homepages.gac.edu/~cellab/index-1.html>

<http://www.ebioscience.com/ebioscience/bestprotocols.asp>

<http://www.bioprotocol.com/protocolstools/index.jhtml>

<http://www.research.umbc.edu/~jwolf/method2.htm>

<http://wheat.pw.usda.gov/~lazo/methods/>

<http://www.qbmcellscience.com/protocols/>

<http://www.tissuedissociation.com/>

<http://www.cellgro.com/tech/>

<http://www.biowww.net/index.php/article/articleview/131/1/0>