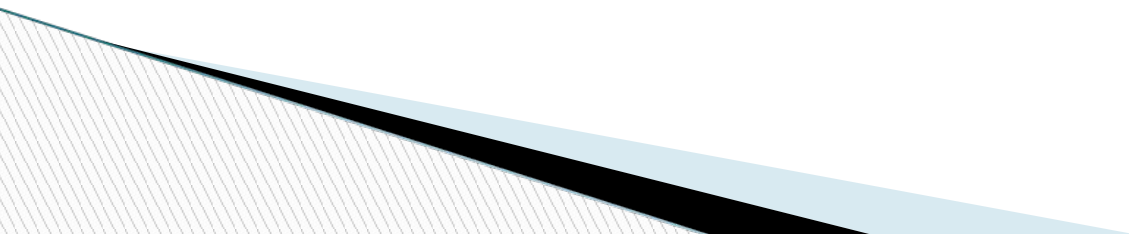
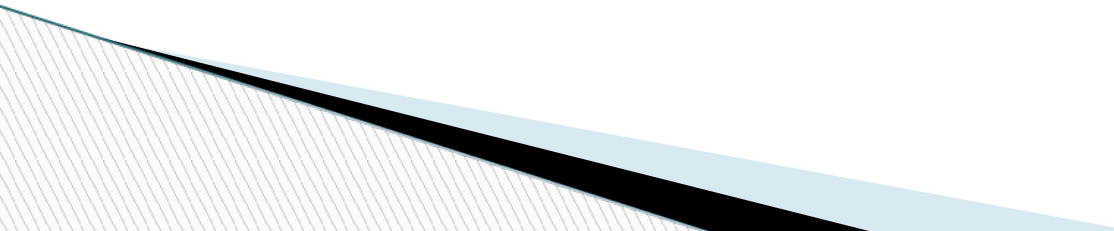


Секвенирование



План:

1. Принципы секвенирования
 2. Секвенаторы третьего поколения
 3. Геном, геномика
 4. Современное положение секвенирования
 5. Базы данных секвенирования и их применение
- 

СЕКВЕНИРОВАНИЕ

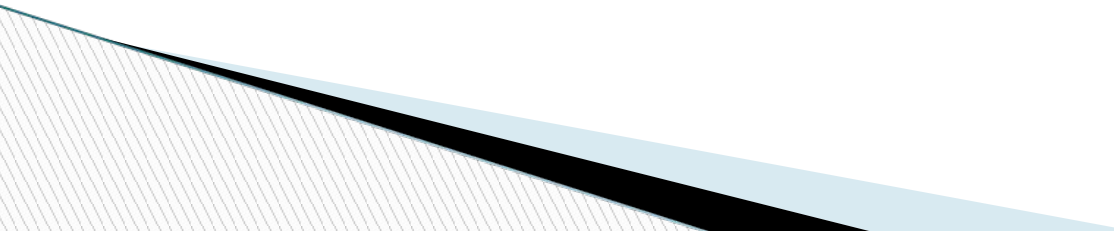
Секвенирование — это определение нуклеотидной последовательности ДНК.

СЕКВЕНИРОВАНИЕ

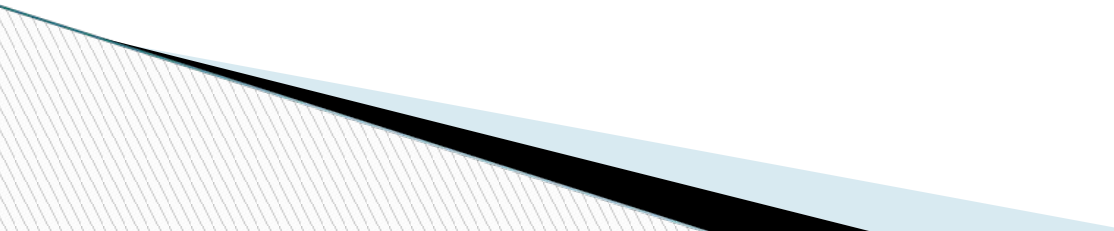
Для секвенирования ДНК в настоящее время используют дидезоксинуклеотидный метод, или метод «обрыва цепи»

Метод разработан Ф. Сенгером в **1977** году.

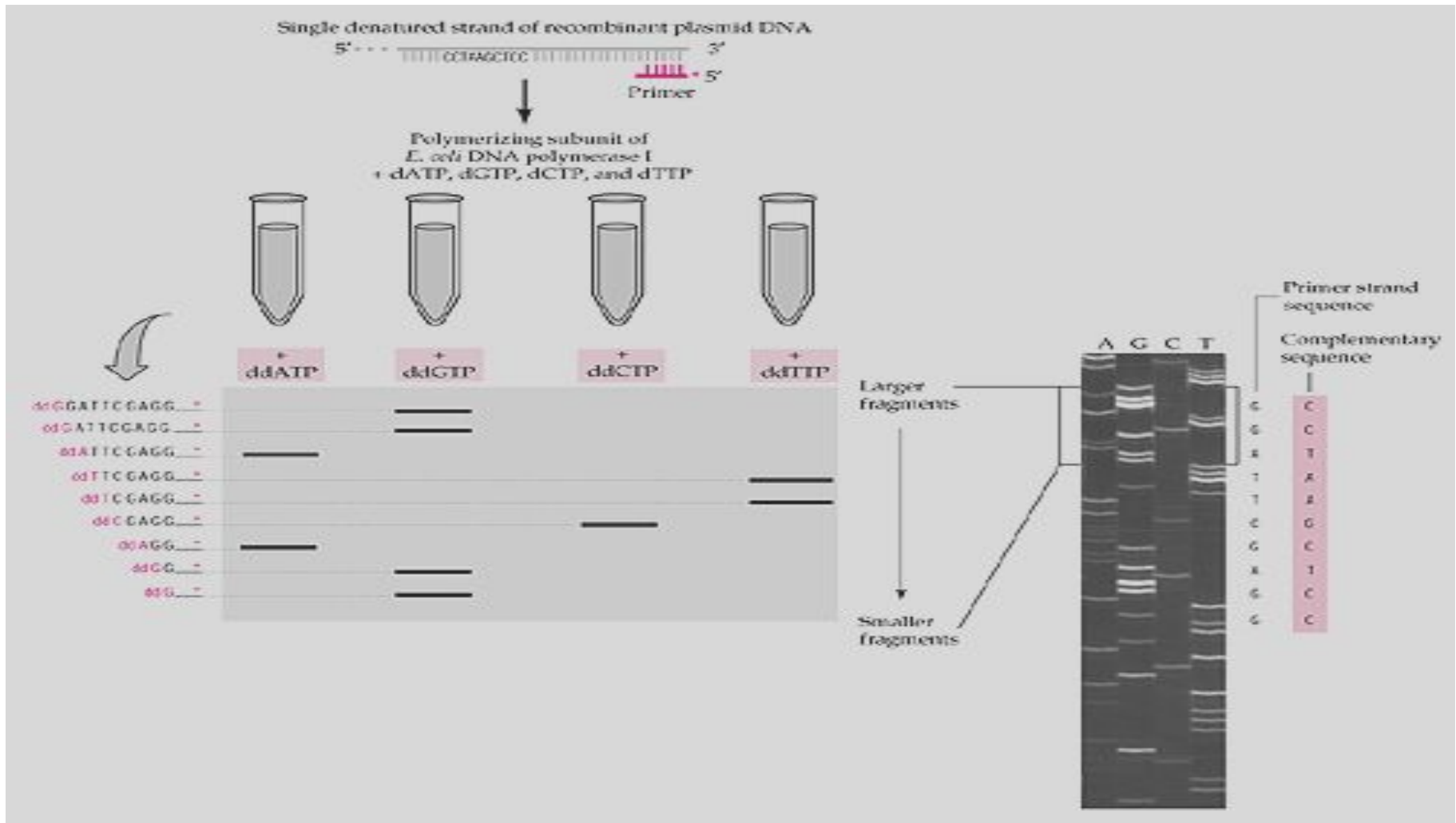
В **1980** году американцам Ф.Сенгеру и У.Гилберту была присуждена половина Нобелевской премии «за вклад в определение последовательности оснований в нуклеиновых кислотах».



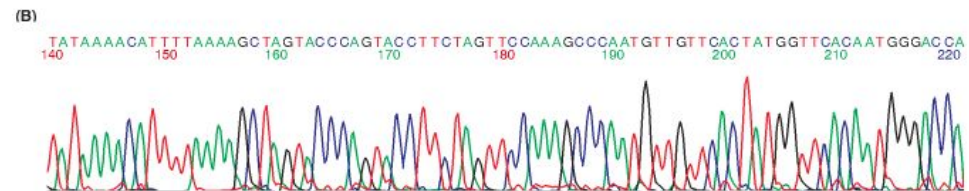
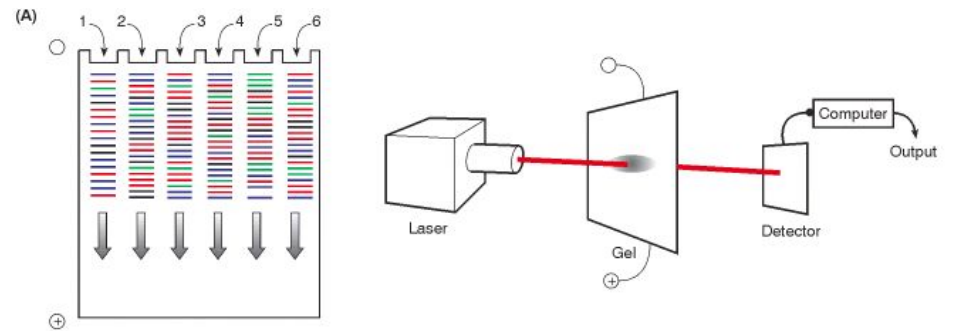
СЕКВЕНИРОВАНИЕ

1. ДНК
 2. Праймер
 3. Нуклеотиды + один флуоресцентно меченый **дидезокси**
 4. ДНК полимераза
- 

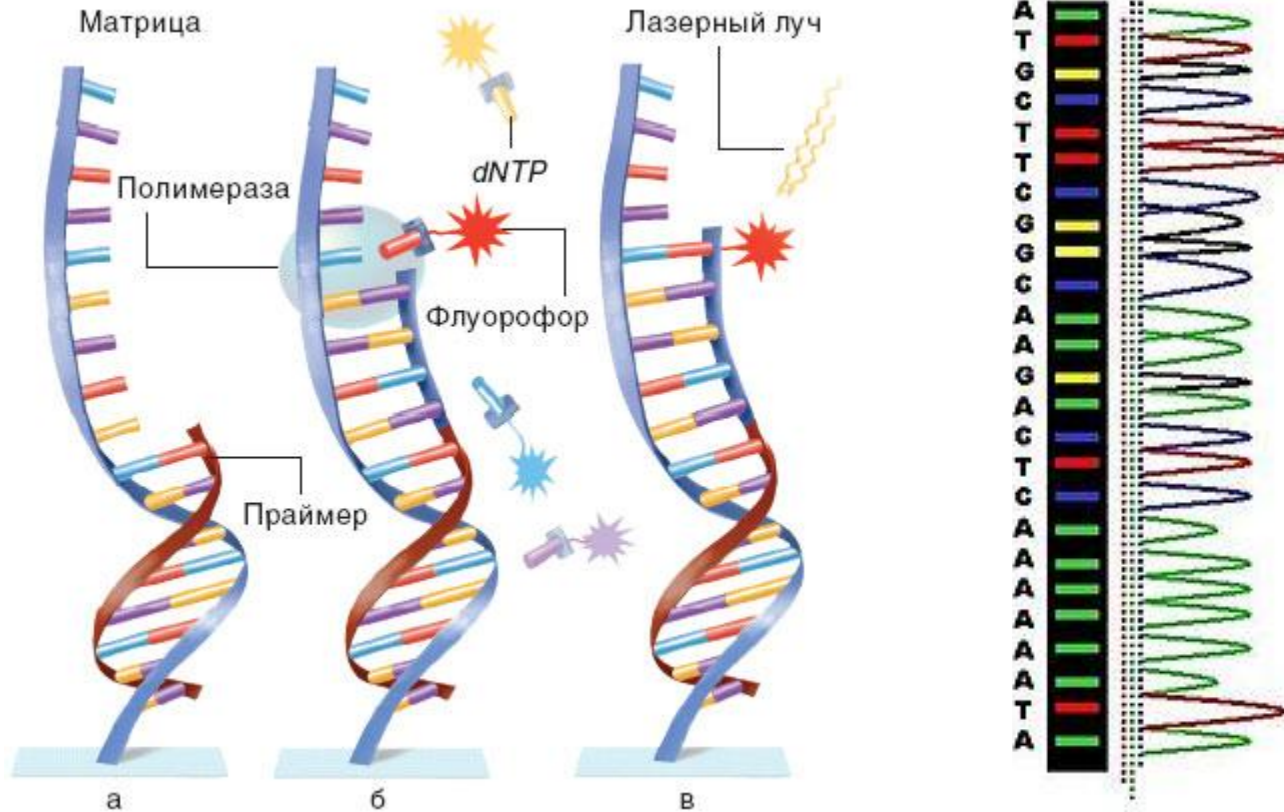
СЕКВЕНИРОВАНИЕ ПО МЕТОДУ Сенгера



СЕКВЕНИРОВАНИЕ



СЕКВЕНИРОВАНИЕ

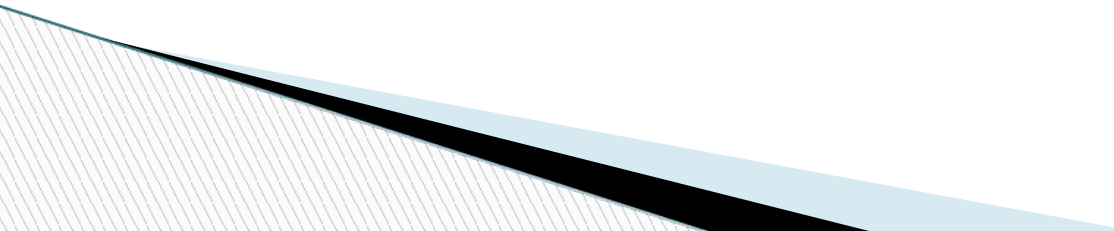


МОДИФИКАЦИИ МЕТОДА СЕКВЕНИРОВАНИЯ ??????

Если у вас 50 000 или 1 000 000/ 1 000 000 000 образцов ДНК?

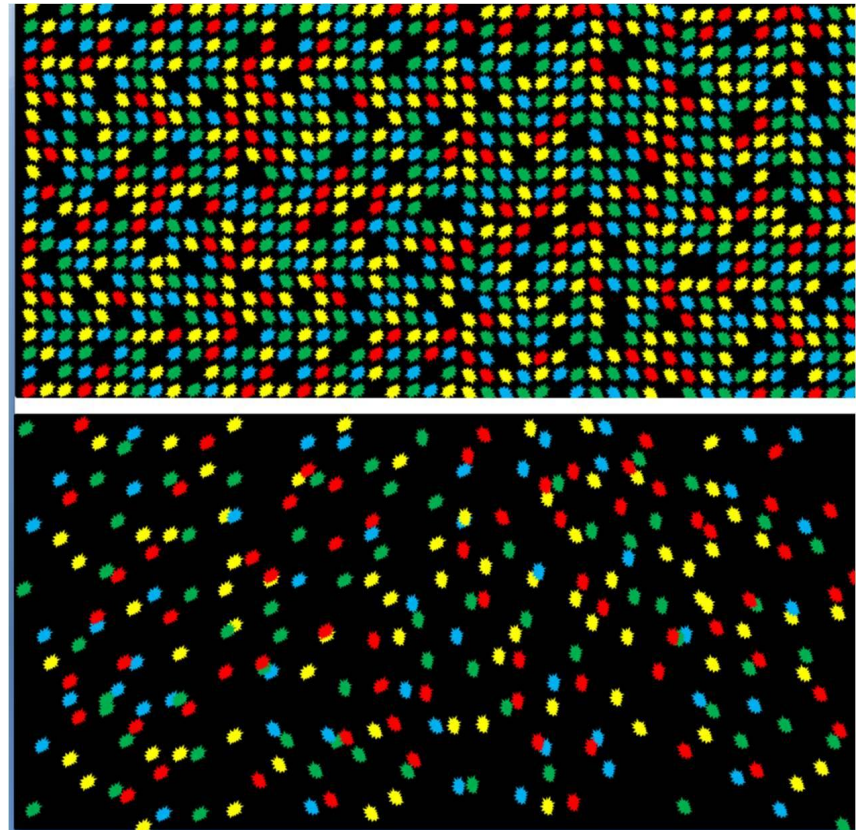
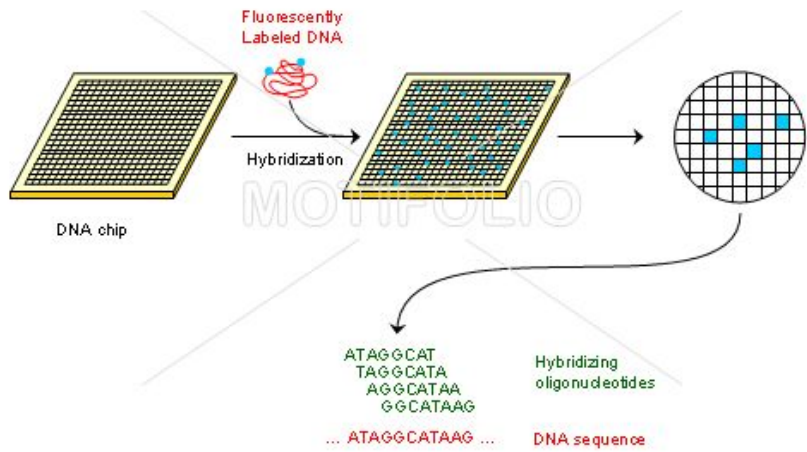
Например: ищите полиморфизные мутации при раке легкого

План:

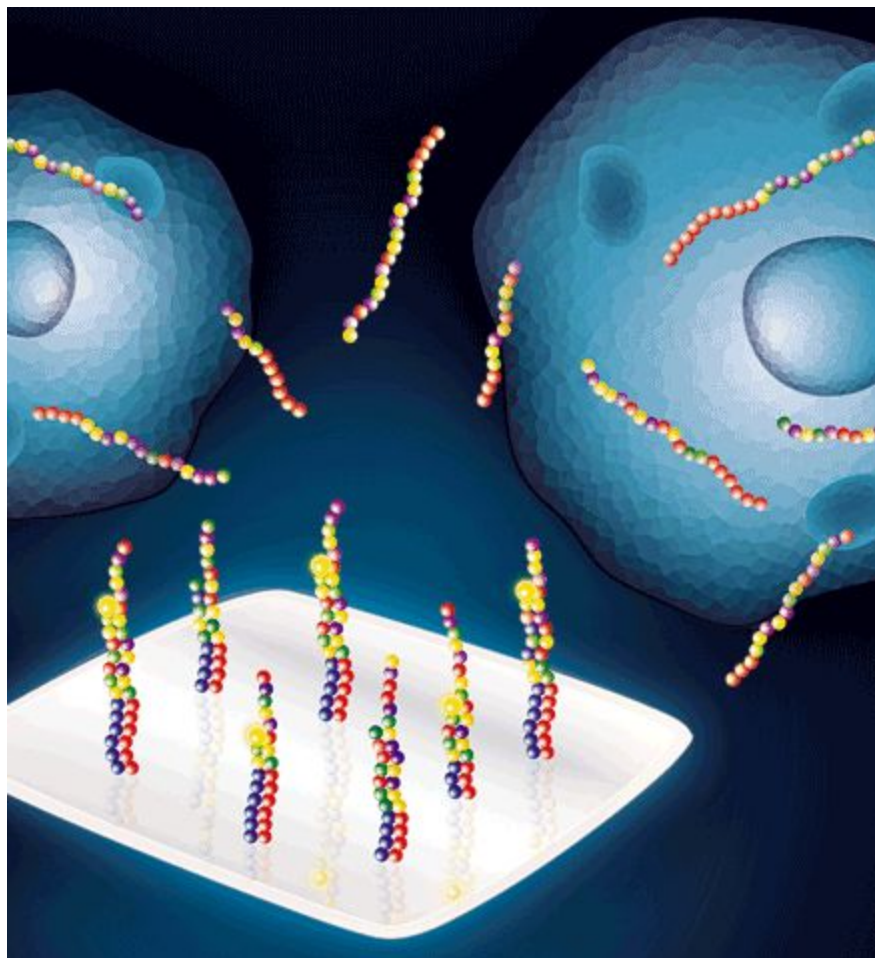
1. Принципы секвенирования
 - 2. Секвенаторы третьего поколения**
 3. Геном, геномика
 4. Современное положение секвенирования
 5. Базы данных секвенирования и их применение
- 

Технология чипов

A way of using chip technology in DNA sequencing



Технология чипов



Технология чипов

Massively Parallel Signature Sequencing (MPSS)

Polony
sequencing

SOLiD sequencing

454 pyrosequencing

Microscopy-based techniques

Microfluidic Sanger s
equencing

Illumina (Solexa)
sequencing

Sequencing with mass spectrometry

**RNAP
sequencing**

Sequencing by hybridization

***In vitro virus high-throughput
sequencing***

Ion semiconductor sequencing

DNA nanoball sequencing

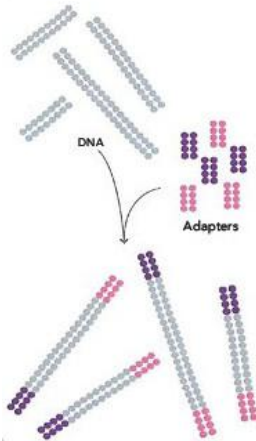
Heliscope single molecule sequencing

Nanopore DNA sequencing

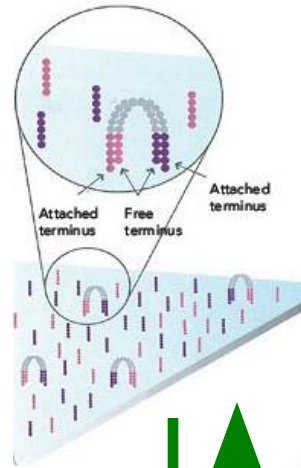
Single molecule real time (SMRT) sequencing

Секвенирование Illumina: принцип метода

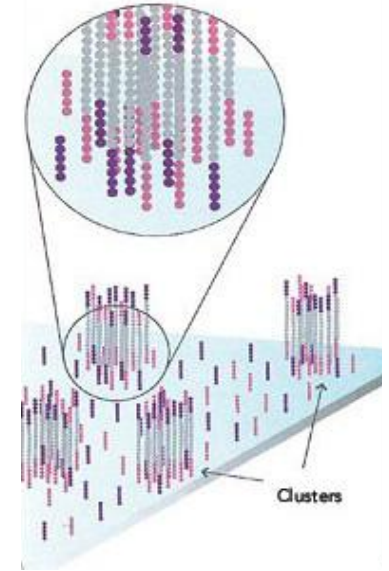
1. ДНК фрагментируют и присоединяют к фрагментам адаптеры



3. Через ячейку пропускают реагенты для достраивания второй цепи ДНК

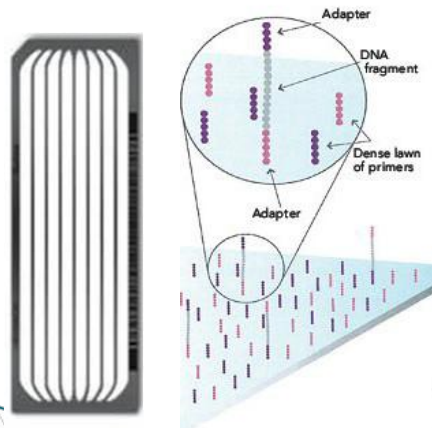


Стадии 3-4 повторяются 30-35 раз

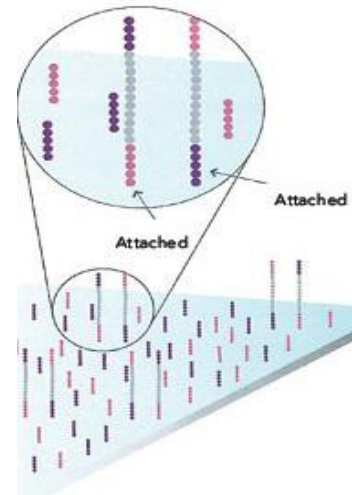


6. Каждый фрагмент оказывается окружен группой идентичных молекул («кластеры»).

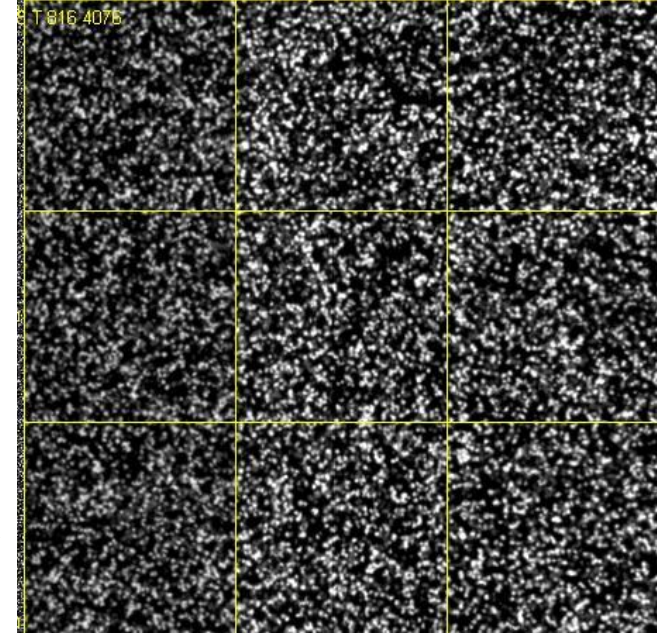
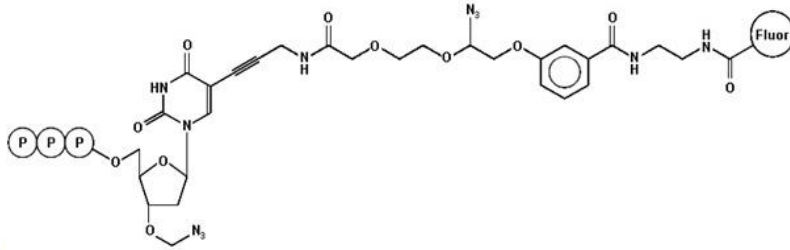
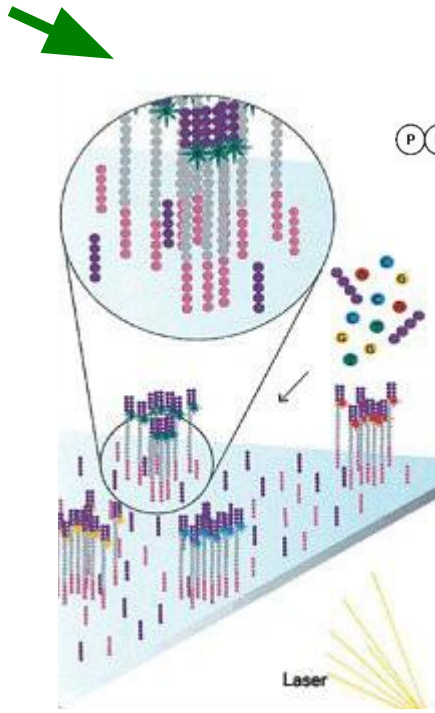
2. ДНК пропускают через каналы ячейки, покрытые праймерами, комплементарными концам адаптеров



4. Двухцепочечные фрагменты денатурируют



Секвенирование Illumina - принцип метода



7. Через ячейку пропускают реагенты (флуоресцентно меченые терминированные dNTP и полимеразу)

10. Повторение 7-9 нужное число раз (50-300). Число циклов соответствует длине чтения.

8. На ячейку светят лазером и проводят съемку.

9. Через ячейку пропускают реагенты, отщепляющие флуорофор и терминатор

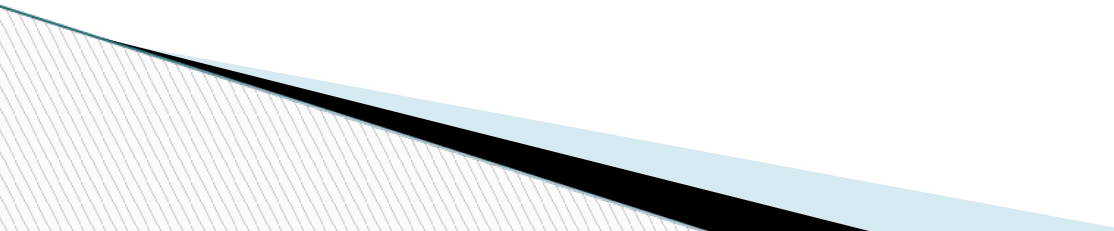
Illumina (Solexa) sequencing

Illumina sequencing.mp4

Helicos High Speed Gene Sequencing.mp4

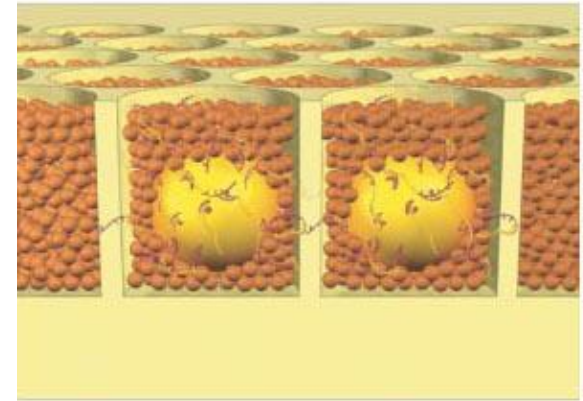
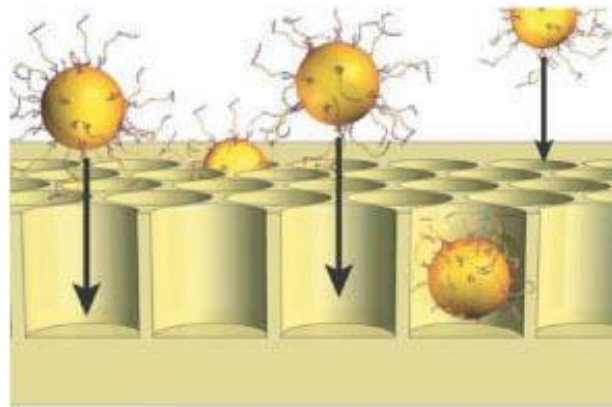
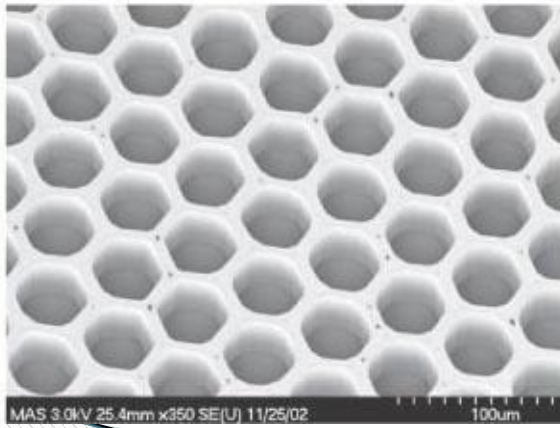
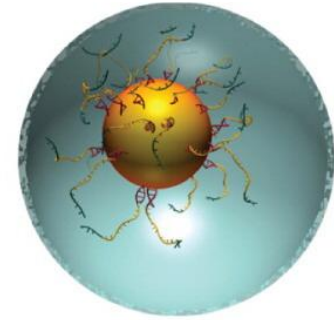
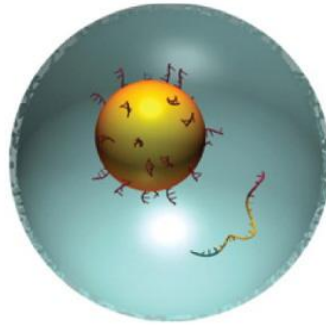
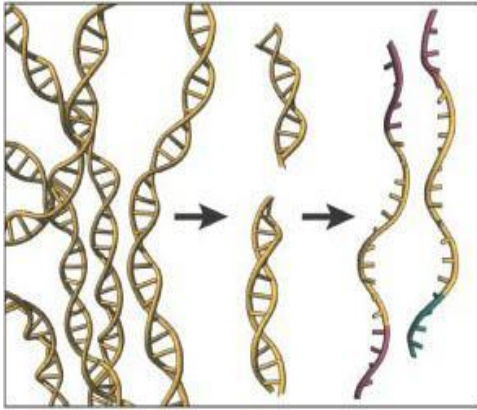
Illumina (Solexa) sequencing

Примеры результатов использования метода:

1. Обнаружены точковые мутации при раке легкого (в сравнении со здоровыми)
 2. Обнаружено свыше 50 000 новых полиморфизмных мутаций
 3. Просеквенировано 615 образцов ДНК больных неврологических заболеваний
 4. Просеквенировано ДНК 50 случаев детского рака.....
- 

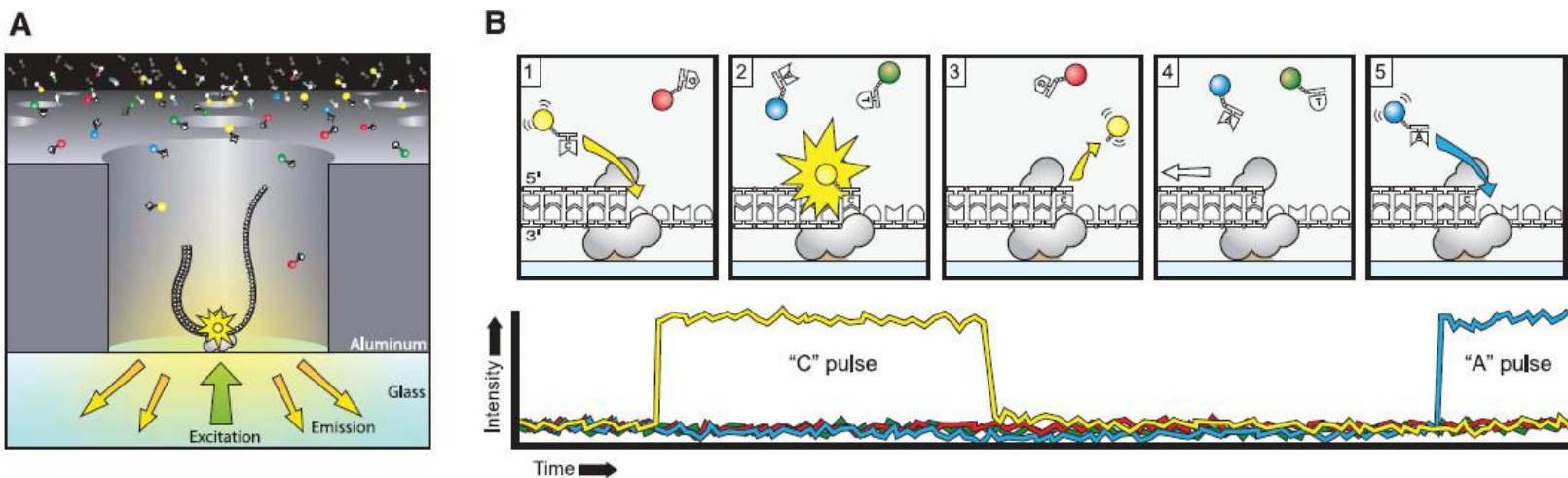
Высокопроизводительное пиросеквенирование (454)

Самая первая из технологий NGS

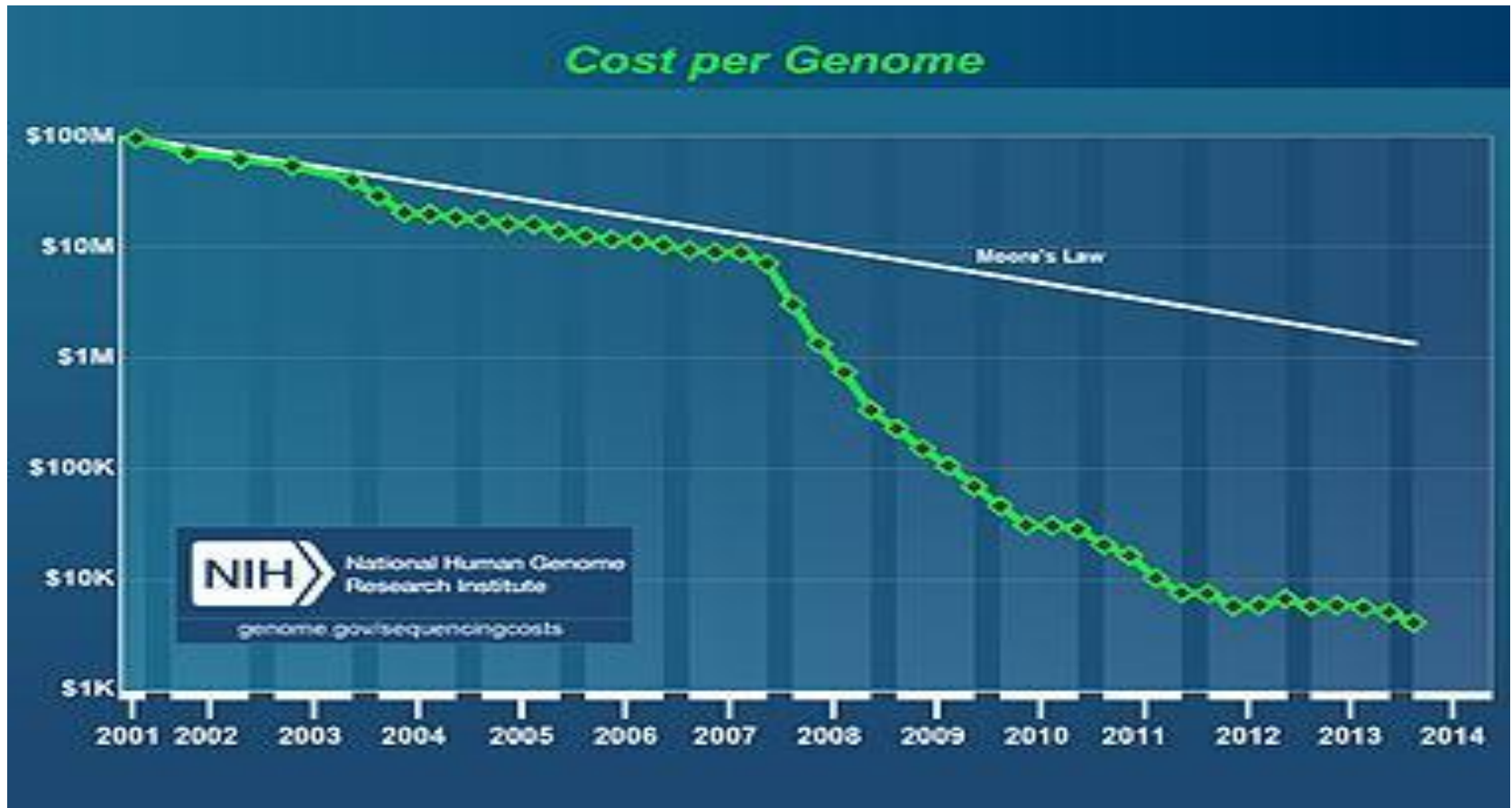


Секвенирование единичных молекул.

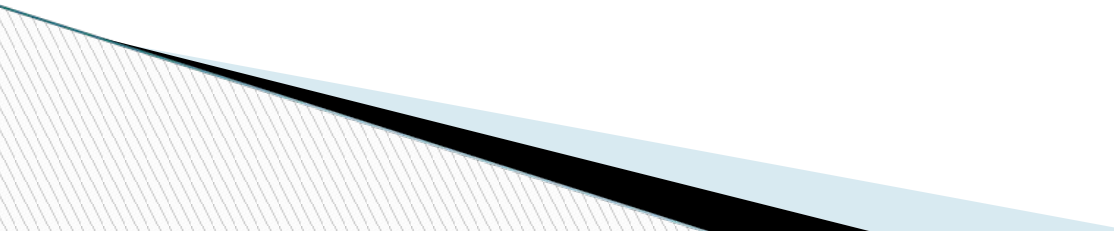
Pacific Biosciences



Стоимость полногеномного секвенирования.



План:

1. Принципы секвенирования
 2. Секвенаторы третьего поколения
 - 3. Геном, геномика**
 4. Современное положение секвенирования
 5. Базы данных секвенирования и их применение
- 

Геном, геномика

- ▣ **Геном** — совокупность наследственного материала, заключенного в клетке организма.
- ▣ Термин «геном» был предложен немецким ботаником **Гансом Винклером** в 1920 году (*Hans Karl Albert Winkler*, 1877 —1945).

Исследования ДНК особенно
интенсивно
пошли со времени установления
принципов её построения.

- Появилось много различных
методических подходов:
***специфическая фрагментация
(рестриктазы), электрофорез и
идентификация фрагментов,
применение радиоактивных и
флюоресцентных меток,
получение большого количества
копий (полимеразы).***

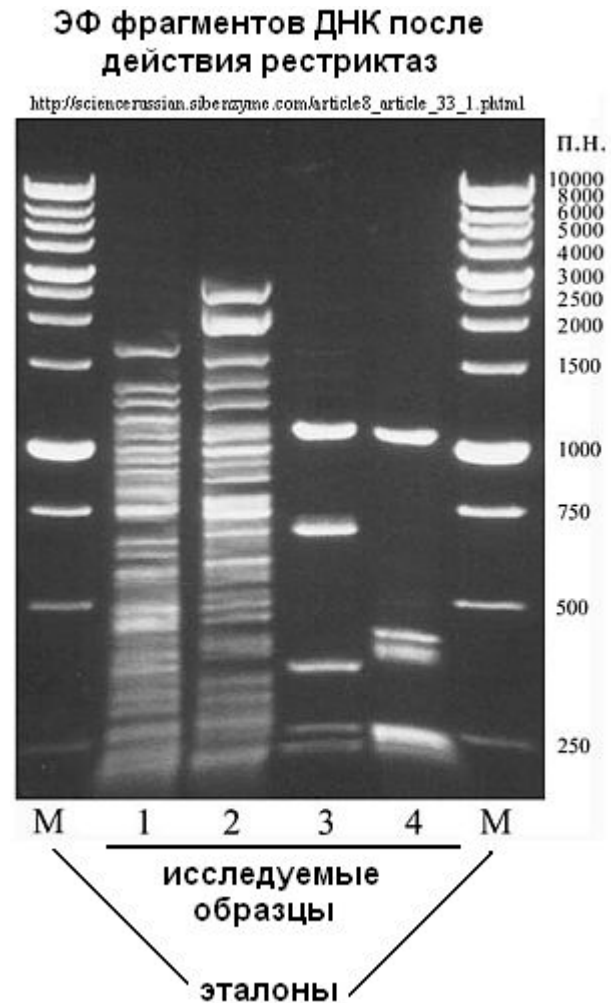


Дж. Уотсон и Ф. Крик
1953 г

Рестриктазы – бактериальные ферменты, расщепляющие чужеродные ДНК в определённых последовательностях нуклеотидов.

Сочетание всё совершенствующихся методов исследования с компьютерной обработкой данных значительно снижало временные и финансовые затраты на расшифровку геномов различных объектов:

годы → месяцы → дни



Начали возникать проекты по секвенированию (установление последовательности) геномов отдельных видов живых организмов.

- Первым, в 1977 году, был полностью секвенирован геном бактериофага Ф-Х174 (5 368 нп). Затем последовали и другие объекты...



- 1980—1990 годы: постепенно, в молекулярной биологии выделился раздел, изучающий геном и гены = **геномика** (установление структуры и выяснение механизма функционирования генома в живых системах)
- К этому времени были изучены фрагменты ДНК человека, накопилось много сведений о наследственных заболеваниях в мировом сознании (прежде всего в медицинских кругах) зрела мысль о необходимости скорейшего исследования генома человека.

В 1988 г. на базе Национального
Института
Здравоохранения США стартовал проект
программы «Геном человека».



Затем он стал **международным**, к которому
присоединились ведущие лаборатории многих
стран, главным образом:

Великобритании

Франции



Германии



Японии



России



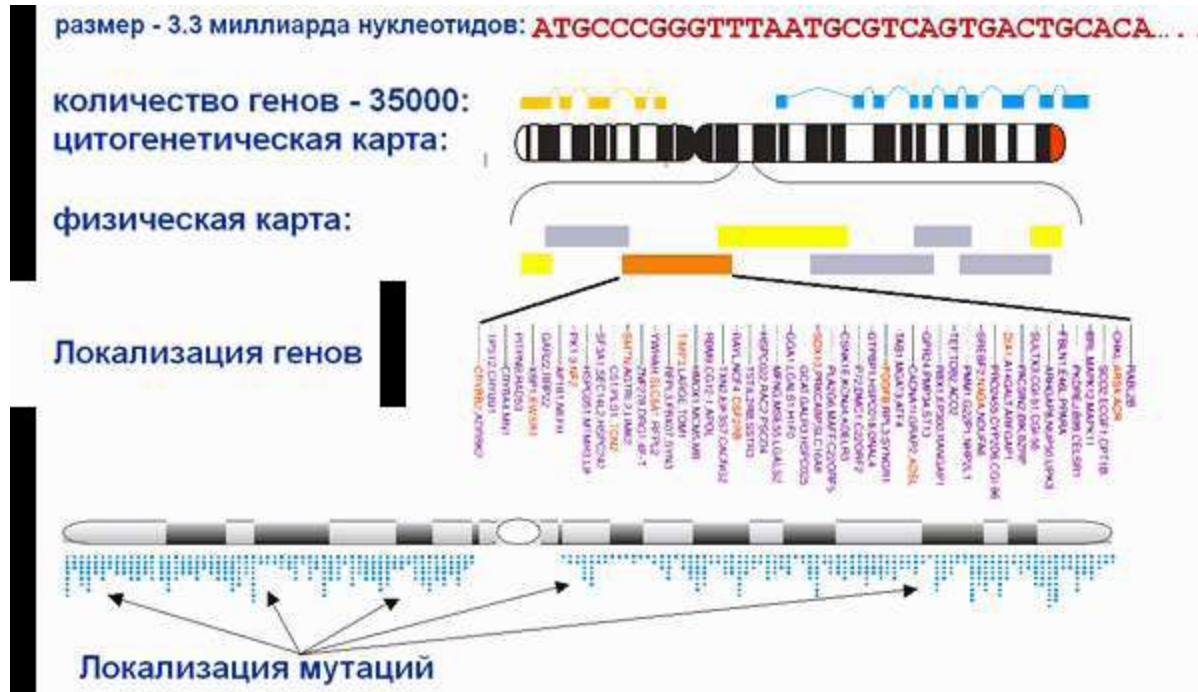
В 2003 г. проект был успешно завершён.

Геном человека



- 23 пары хромосом у человека, в сумме 46 хромосом
- 2 метра ДНК
- 3 миллиарда нуклеотидов
- Приблизительно 30 000 генов кодирующих белки

Проект «геном человека»



выявлено не менее 1.5 миллиона мутаций, по которым геномы людей отличаются друг от друга

Проект «геном человека»

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ГЕНОМИКА

В ГЕНОМЕ ЧЕЛОВЕКА есть ГЕНЫ:

- = ОБЩИЕ ДЛЯ ПРО- и ЭУКАРИОТ – 21%;**
- = ОБЩИЕ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ и др. ЭУКАРИОТ – 32%;**
- = ОБЩИЕ ДЛЯ ПОЗВОНОЧНЫХ и др. ЖИВОТНЫХ – 24%;**
- = ОБЩИЕ ДЛЯ ПОЗВОНОЧНЫХ – 22%;**
- = ОБЩИЕ ДЛЯ ПРИМАТОВ – 90-99%;**

http://pwpt.ru/presentation/biologiya/genom_cheloveka/

Что дала геномика?

- ✚ огромный объем информации по первичным структурам ДНК.
- ✚ понимание молекулярных механизмов заболеваний;
- ✚ новые подходы в создании лекарств, новые диагностические тесты, генная терапия;
- ✚ трансгенные животные и растения.
- ✚ недостаток геномики –

Мы знаем весь геном, но не знаем, что реально экспрессируется и что реально работает в клетке

План:

1. Принципы секвенирования
2. Секвенаторы третьего поколения
3. Геном, геномика
- 4. Современное положение секвенирования**
5. Базы данных секвенирования и их применение

ПЕРВЫЕ ЛЮДИ С ИНДИВИДУАЛЬНЫМИ ПРОЧИТАННЫМИ ГЕНОМАМИ



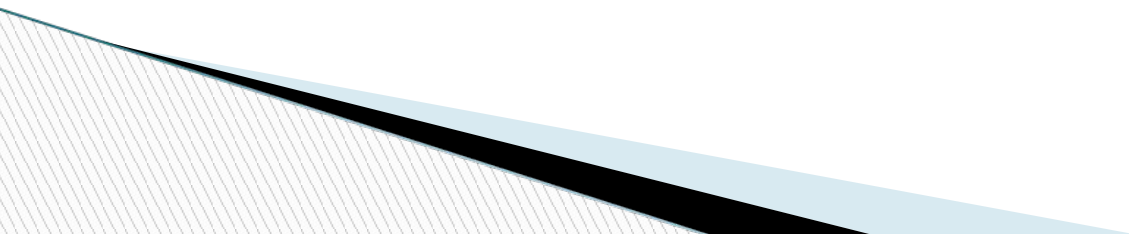
Джеймс Уотсон

Крейг Вентер
Биолог, генетик,
предприниматель

Геномные базы данных

- Людей
- Животных
- Растений
- Бактерий

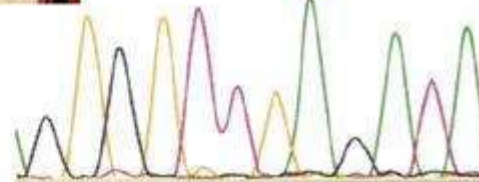
Наша геномная эра является свидетелем взрыва объема биологической информации доступной из-за гигантским достижениям в области молекулярной биологии и геномики



автоматическая расшифровка нуклеотидных последовательностей -> ИНФОРМАЦИОННЫЙ ВЗРЫВ



Фабрика автоматического секвенирования (расшифровки) ДНК



... . GGTTCAATAAATTTGGATCGTACTTATGGTTAATGC.

План:

1. Принципы секвенирования

2. Секвенаторы третьего поколения

3. Геном, геномика

4. Современное положение секвенирования

5. Базы данных секвенирования и их применение

- Одним из механизмов генетического разнообразия является изменение «буквы» генетического кода (*СНП - сингулярный нуклеотидный полиморфизм; SNP - single nucleotide polymorphism*).
- Полагают, что у человека СНП встречается с частотой 0,1%, т.е. конкретный человек отличается от других одним нуклеотидом на каждую тысячу нуклеотидов.

Для SNPs существует большое количество баз данных



dbSNP
SNPedia
GWAS Central
International HapMap
Project
MirSNP

Большинство генов в каждом организме представлено двумя аллелями, один из которых унаследован от отца, а другой - от матери. Если оба аллеля идентичны, то организм считается гомозиготным, если разные - гетерозиготным .

Некоторые заболевания:

- SNP могут быть причиной наследственных заболеваний:

ГЕН	МУТАЦИЯ/ ПОЛИМОРФ ИЗМ	ПЕРВИННЫЙ ДЕФЕКТ	ЧАСТОТА В ПОПУЛЯЦИИ	ЗАБОЛЕВАНИЕ
ГЕНЫ «ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ»				
GSTM1	del	Нарушение фазы 2 де токсикации	40 % 0/0	Рак легких, хрон. бронхит, эндометриоз
NAT-2		Нарушение фазы 2 де токсикации	50 %	Рак молочной железы
mEPHX	exon 3 T-C Tyr.-Hist.	Нарушение фазы 1 де токсикации	6%	Хрон. обстр. пневм., эмфизема, астма
P450 1A1 (CYP1A1)	exon 7 A-G Ile-Val	Нарушение фазы 1 де токсикации	7% 27%	Рак легких
ГЕНЫ- ТРИГГЕРЫ МУЛЬТИФАКТОРИАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ				
MTHFR	677 C-T (A-V)	Гомоцистеинемия	5% M/M 57% M/+	ДЗНТ, КБС, атеросклероз
VDR-3	exon 9 T-C (I-I)	Уменьшение mRNA	16% B/B	Остеопороз
ACE	del 287 bp Alu intr.16	Повышение активности фермента	30%	Инфаркт миокарда
ApoE	E2,E3,E4 15% T-C Cod.112;158	Гиперлиппротеинемия	15% E2/E2	Атеросклероз
CC16	A38G	Нарушение функции се- креторного белка CC16	10% A/A	Астма
TGF-alfa	полиморфизмы BamH1 ex.VI-A1,A2 Taq1 intr.V-C1, C2	Нарушения смыкания небных полостей		Врожд. уродства лицевого черепа
«ПОЛЕЗНЫЕ» ПОЛИМОРФИЗМЫ				
CCR-5	del 32 bp	Отсутствие хемокинового рецептора лимфоцитов	26% del/ +1% del/del	Устойчивость к СПИДу

Некоторые заболевания:

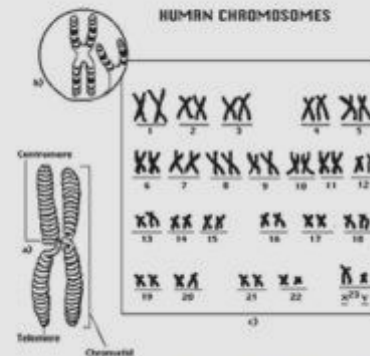
- SNP используют как маркеры наследственных заболеваний:

Таблица 8.6. Наиболее частые болезни с наследственной предрасположенностью

Группы и нозологические формы	Распространенность на 1000 человек (в соответствующей возрастной группе)
Врожденные пороки развития:	
расщелина губы и неба	1 - 2
спинномозговая грыжа	1
стеноз привратника	0,5 - 3
анэнцефалия и черепно-мозговая грыжа	1
вывих бедра	2 - 5
косолопость	5
Психические и нервные болезни:	
шизофрения	10 - 20
эпилепсия	8 - 10
маниакально-депрессивный психоз	2 - 5
рассеянный склероз	0,02 - 0,7
Соматические болезни среднего возраста	
псориаз	10 - 20
бронхиальная астма	2 - 5
язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки	20 - 50
коронарная болезнь сердца	50 - 100
гипертоническая болезнь	100 - 200
диабет	10 - 20

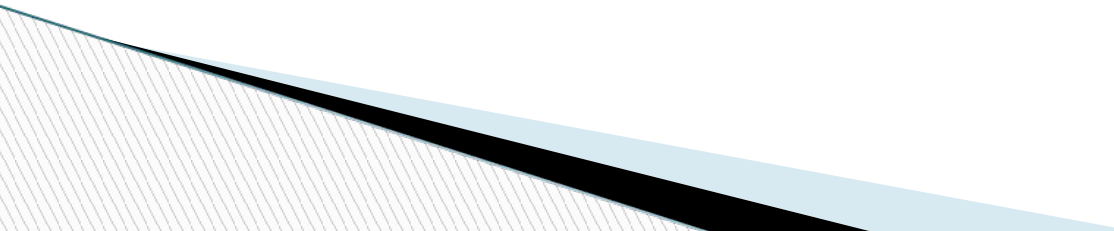
Где сейчас используют генетическое тестирование

- ◆ Наследственные заболевания (свыше 200):
 - Фенилкетонурия
 - Муковисцидоз
 - Миодистрофия Дюшенна/Беккера
 - Хорея Гентингтона
 - Гемофилия А, В
 - Болезнь Вильсона-Коновалова
 - и др. ...
- ◆ Personal LifeStyle (персональный стиль жизни, предиктивная медицина)
- ◆ Фармакогенетика (персональная медицина)
- ◆ ДНК-паспортизация (криминалистика и отцовство)
- ◆ Планирование качеств ребенка (пол ребенка)



http://www.ebi.ac.uk/2can/bioinformatics/bioinf_realworld_1.html

Молекулярная медицина:

1. Поиск мишеней для конструирования лекарственных молекул
 2. Персонализированная медицина
 3. Профилактическая медицина
 4. Генная терапия
- 

Молекулярная медицина

1. Персонализированная медицина

<http://www.ornl.gov/hgmis/medicine/pharma.html>

2. Профилактическая медицина

<http://www.ornl.gov/hgmis/medicine/genetest.html>

3. Генная терапия

<http://www.ornl.gov/hgmis/publicat/hgn/v10n1/15wilson.html>

<http://www.fda.gov/fdac/features/2000/gene.html>

<http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>

http://cis.nci.nih.gov/fact/7_18.htm

<http://www.ornl.gov/hgmis/medicine/tnty.html>

<http://www.faseb.org/opar/newsletter/jun98/junx5.html>



Археогенетика

- анализ ДНК, полученной из археологических останков (древней ДНК, англ. *aDNA*);
- анализ ДНК современных популяций (людей, домашних растений и животных) с целью изучения человеческого прошлого и генетического наследия взаимодействия человека с биосферой;

Период полураспада ДНК – 521 год

**ДНК полностью теряет читабельность через 1,5 миллиона лет
(в вечной мерзлоте и пещерах – дольше) (оставшиеся короткие
фрагменты нечитабельны)**

Кости полностью разрушаются через 6,8 миллиона лет

ДНК неардентальца просеквенирована на 60%

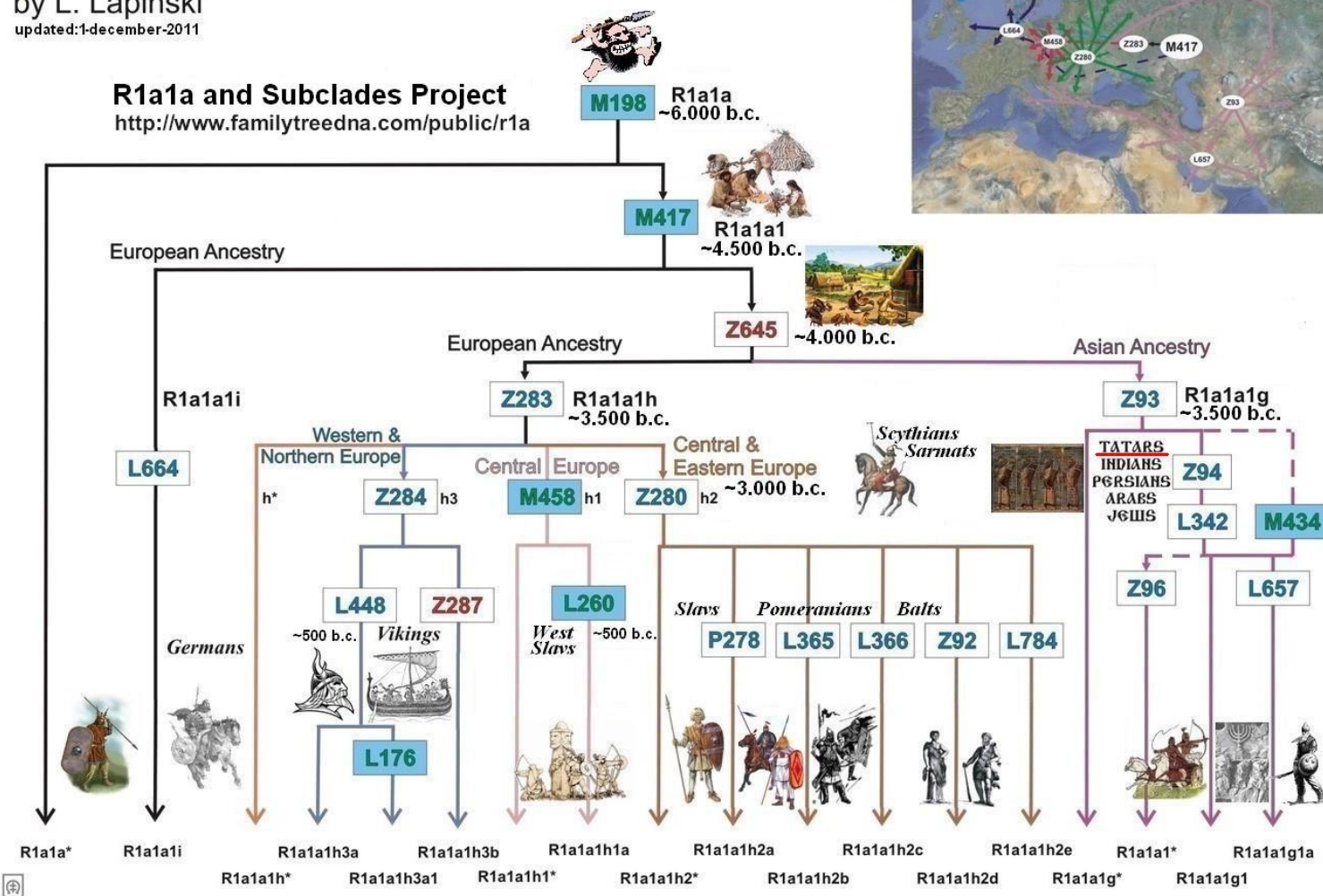
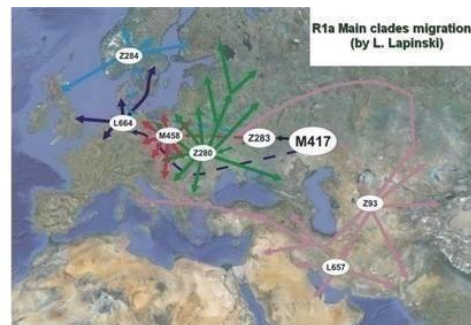
Переселение народов (теории миграции)

R1a official Clades (by SNP)

by L. Lapinski

updated: 1-december-2011

R1a1a and Subclades Project
<http://www.familytreedna.com/public/r1a>



Анализ ДНК азиатских народов

Китайские ученые просеквенировали ДНК Чингисхана в 2011 году



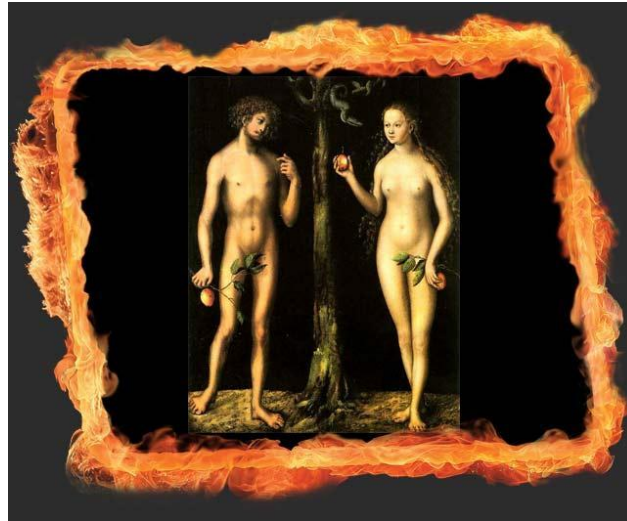
Анализ Y-хромосом

(Официально: 3 жены = 8 сыновей и 5 дочерей)

Каждый 12 монголец ♂ – потомок Чингисхана

(казахи ♂ – каждый сотый; калмыки, буряты...)

Прородители людей (Адам и Ева)



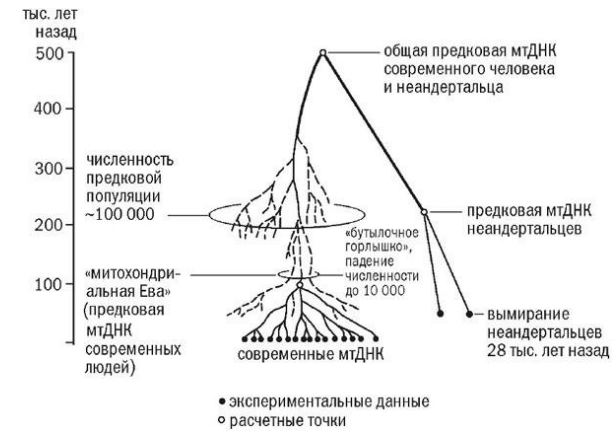
Анализ Y-хромосом



Адам



Ева



Анализ ДНК митохондрий

Ñíçääà èñéóññòàâíäÿ ÁÍÊ !!!mp4

