



Л е к ц и я № 9

Omic's технологии

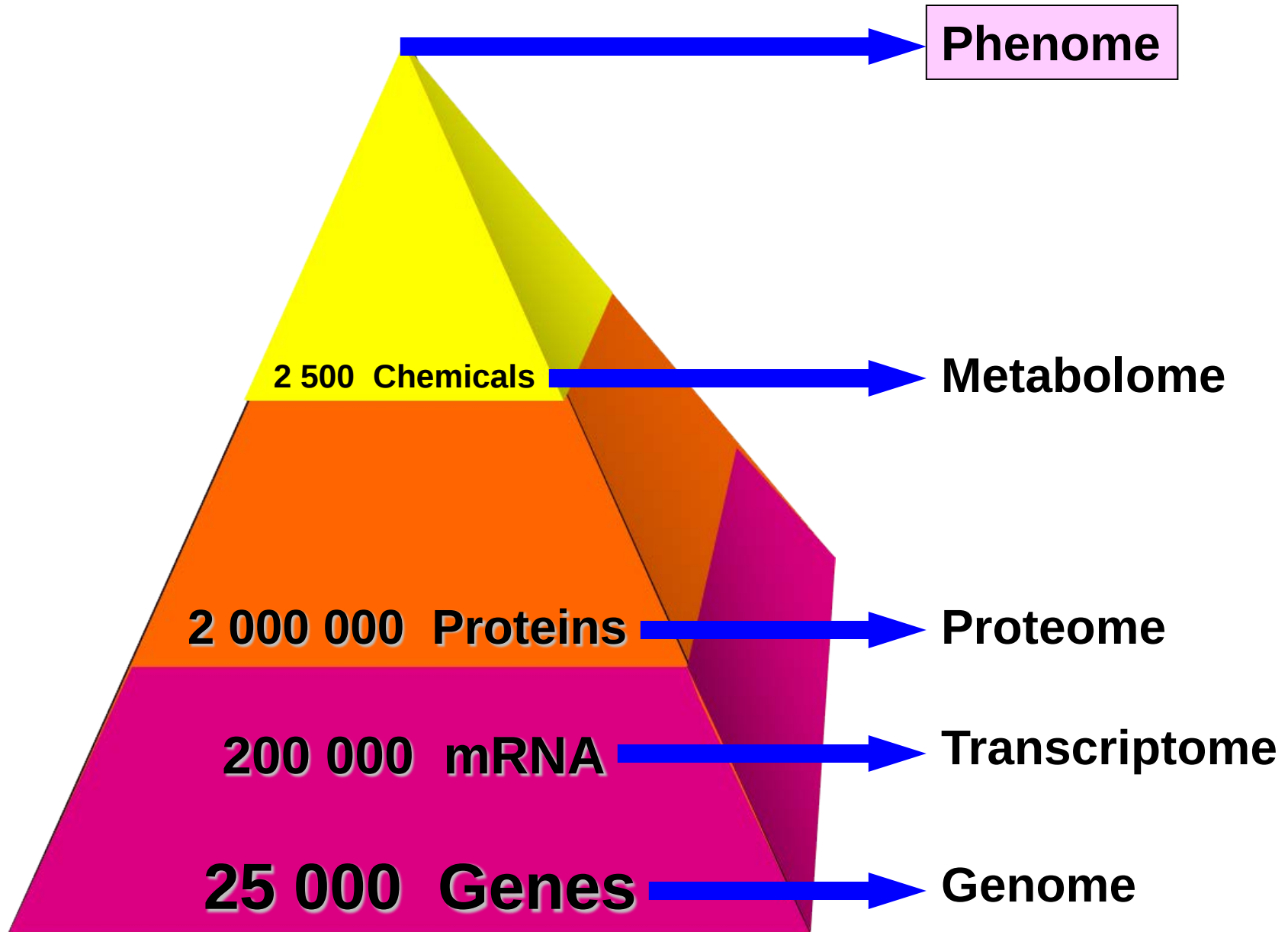
**Разработал профессор П. М. Васильев
Кафедра фармакологии и биоинформатики**

**Для студентов, обучающихся по направлению 06.03.01 «Биология»
профили Биохимия, Генетика
при изучении дисциплины «Биоинформатика»**

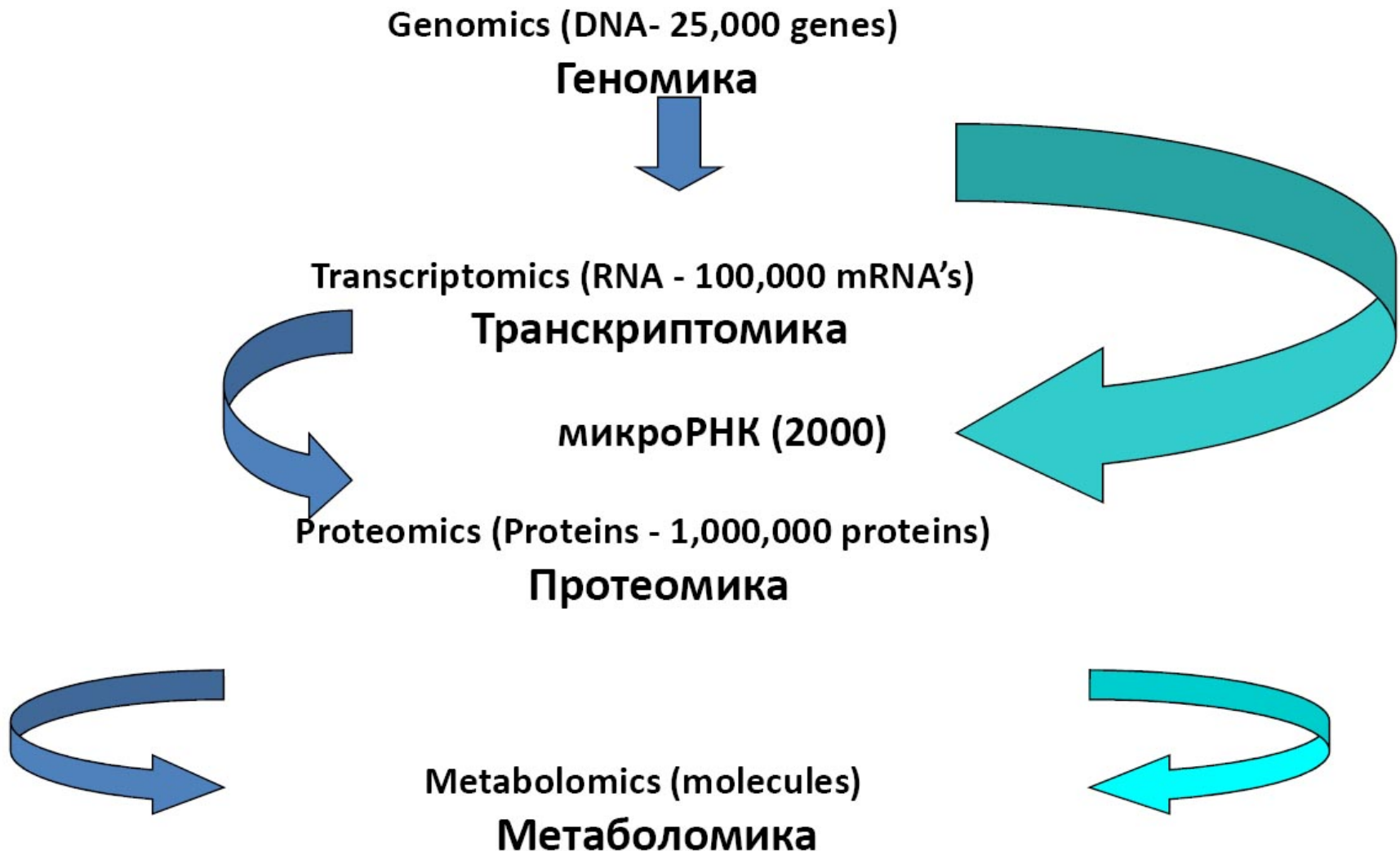
П л а н л е к ц и и

- Omic's технологии в клинической практике
- Секвенирование
- Биочипы
- Гель-электрофорез
- Высокоэффективная жидкостная
хроматография
- Масс-спектрометрия

“Om's” иерархия живых систем



Иерархия Omic's технологий



Omic's экспериментальные методы

- **Геномика**
 - **Высокоскоростное секвенирование ДНК (HT-DNA sequencing)**
- **Обнаружение мутаций**
 - **Метод однонуклеотидного полиморфизма (SNP)**
- **Транскриптомика**
 - **Измерение генной транскрипции (Gene/Transcript measurement)**
 - **Серийный анализ экспрессии генов (SAGE)**
 - **Генные чипы**
 - **Микрочипы (Microarrays)**
- **Протеомика**
 - **Масс-спектрометрия (MS)**
 - **2D-гель электрофорез (2D-PAGE)**
 - **Белковые чипы**
 - **Двугибридный анализ (Yeast-2-hybrid)**
 - **Рентгеноструктурный анализ (X-ray)**
 - **Ядерный магнитный резонанс (NMR)**
- **Метаболомика**
 - **Ядерный магнитный резонанс**
 - **Рентгеноструктурный анализ**
 - **Капиллярный электрофорез**

Стоимость секвенирования

Cost per Genome

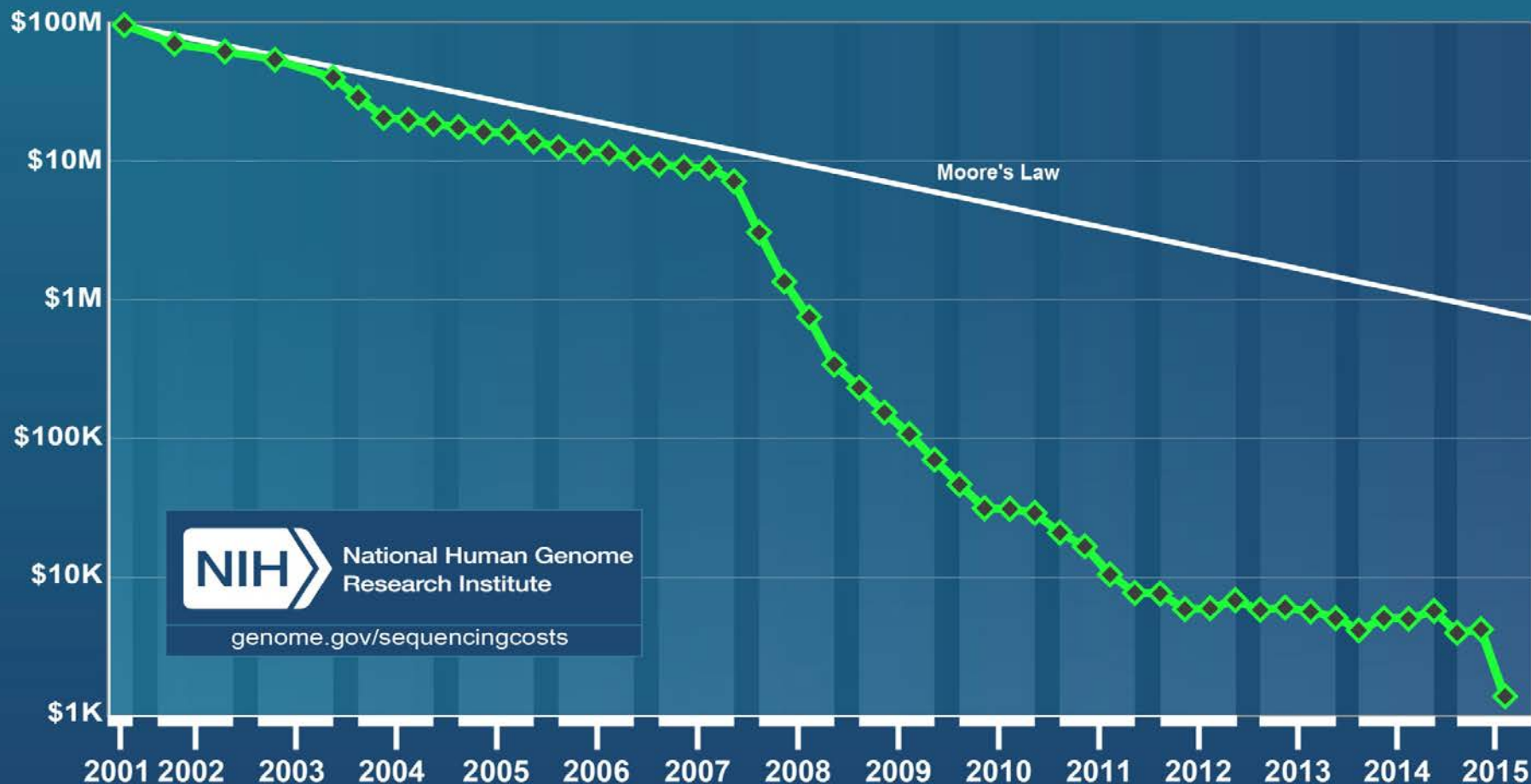
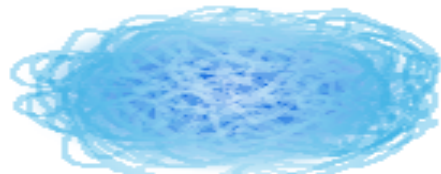


Схема секвенирования

Human Genome Sequencing

Generating a Reference Genome Sequence (e.g., Human Genome Project)



Genomic DNA

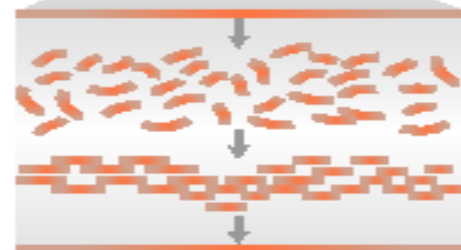
Break genome into large fragments and insert into clones



Order clones



Break individual clones into small pieces



Generate thousands of sequence reads and assemble sequence of clone

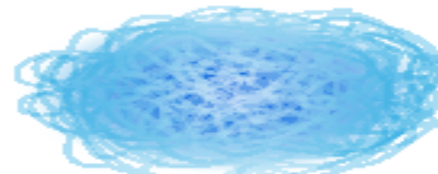


Assemble sequences of overlapping clones to establish reference sequence



Reference Sequence

Generating a Person's Genome Sequence (e.g., Circa ~2016)



Genomic DNA

Break genome into small pieces

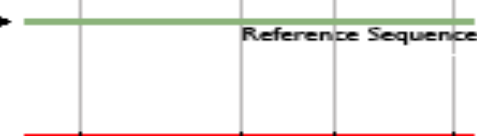


...TATGCGATGCGTATTTTCGTAAA...

Generate millions of sequence reads



Align sequence reads to established reference sequence



Reference Sequence

Deduce starting sequence and identify differences from reference sequence

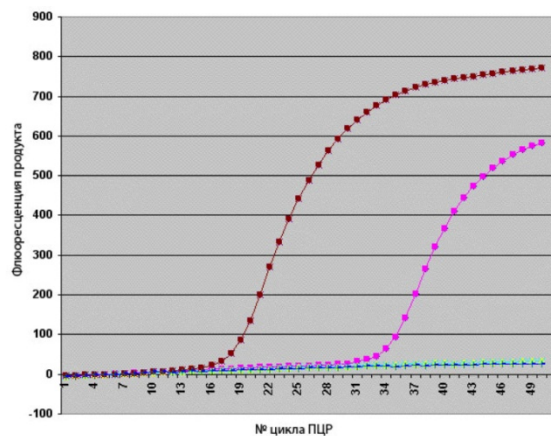
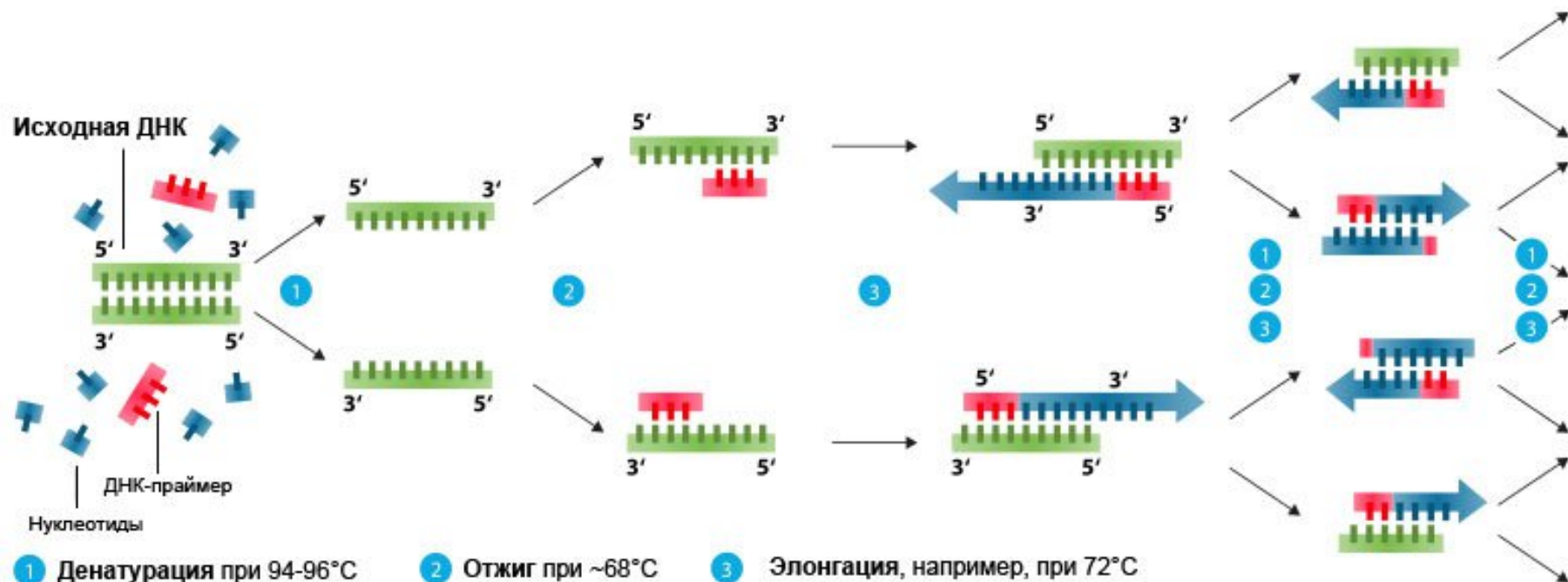
Амплификационные технологии

Полимеразная цепная реакция
Нобелевская премия 1993 г.

Компоненты ПЦР

- ДНК-матрица
- Праймеры – олигонуклеотиды длиной 18-30 нп, комплементарные противоположным концам разных цепей ДНК-матрицы
- дНТФ – дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
- ДНК-полимераза (Taq, Tth)

Схема ПЦР

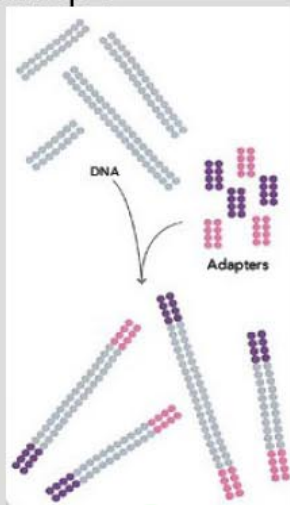


Виды ПЦР

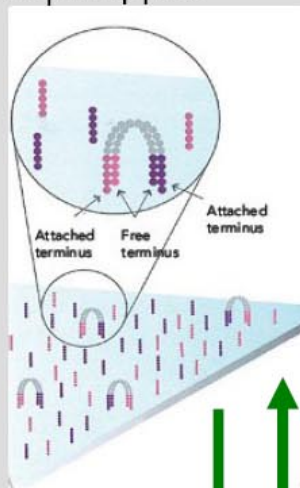
- Количественная ПЦР (ПЦР в реальном времени, real-time PCR)
- ПЦР in situ – ПЦР непосредственно в клетках, результаты видны под микроскопом
- ПЦР с обратной транскрипцией – используется при секвенировании РНК
- Мультипраймерная ПЦР – одновременная амплификация двух и более ДНК

Секвенирование Illumina - принцип метода

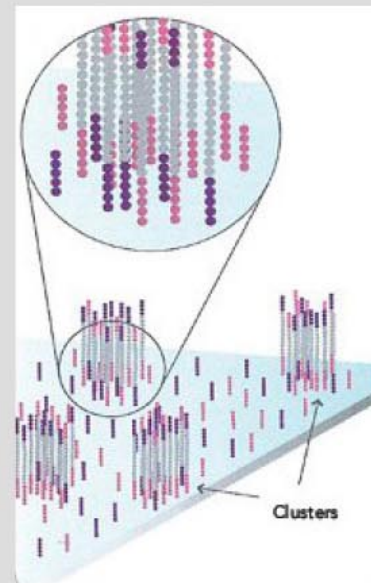
1. ДНК фрагментируют и лигируют к фрагментам адаптеры



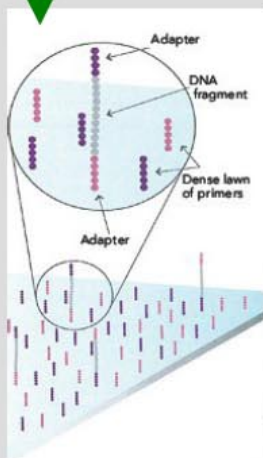
3. Через ячейку пропускают реагенты для достраивания второй цепи ДНК



Стадии 3-4 повторяются 30-35 раз

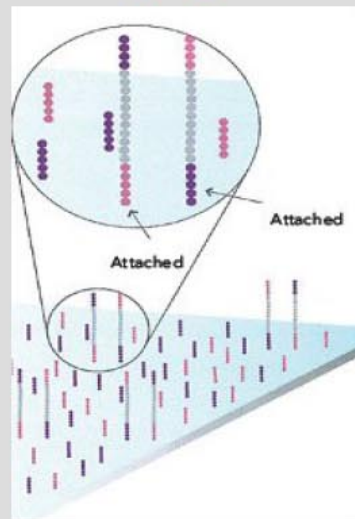


6. Каждый фрагмент оказывается окружен группой идентичных молекул («кластеры»).

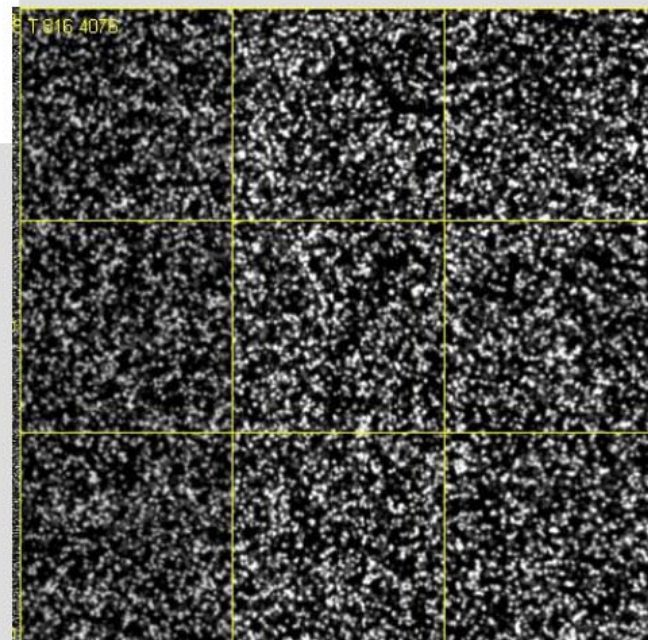
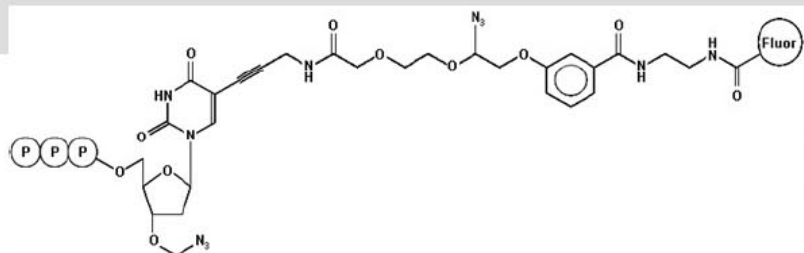
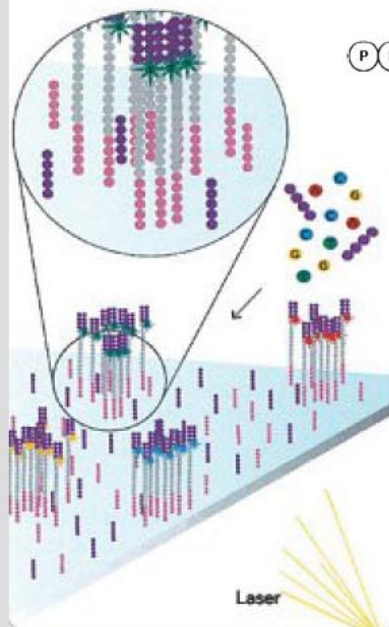


2. ДНК пропускают через каналы ячейки, покрытые праймерами, комплементарными концам адаптеров

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

Анализ экспрессии miRNA

- Микро-РНК – класс РНК длиной ~22 нп.
- Регулируют трансляцию и деградацию мРНК.

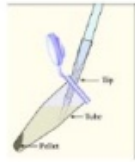
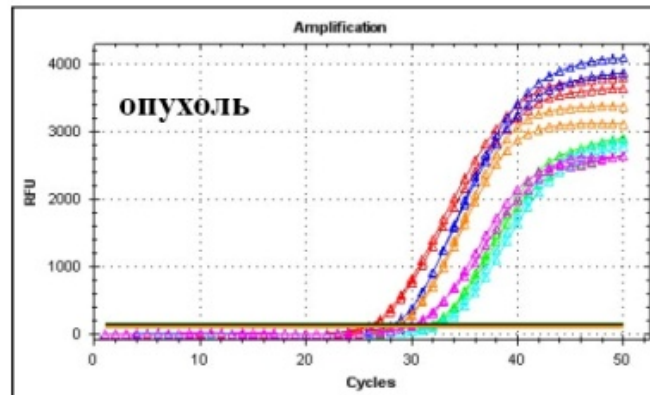
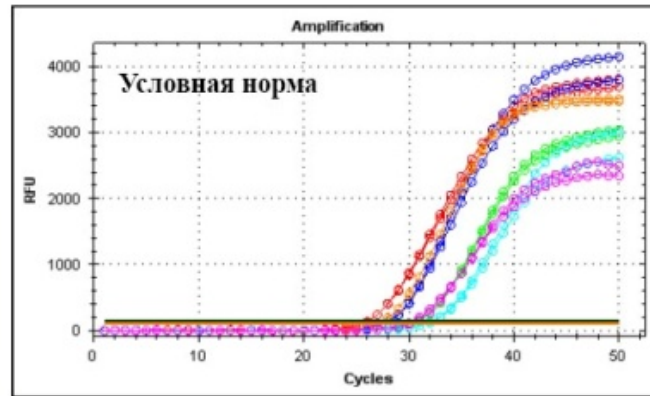
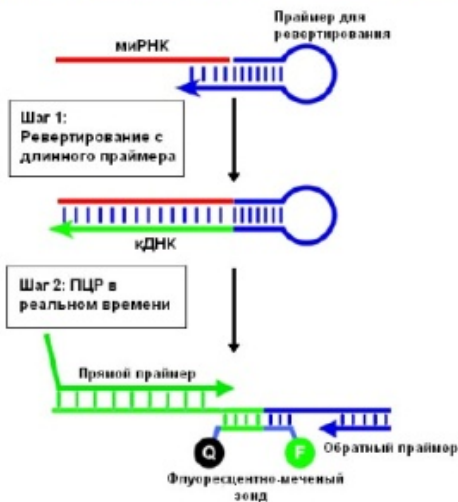
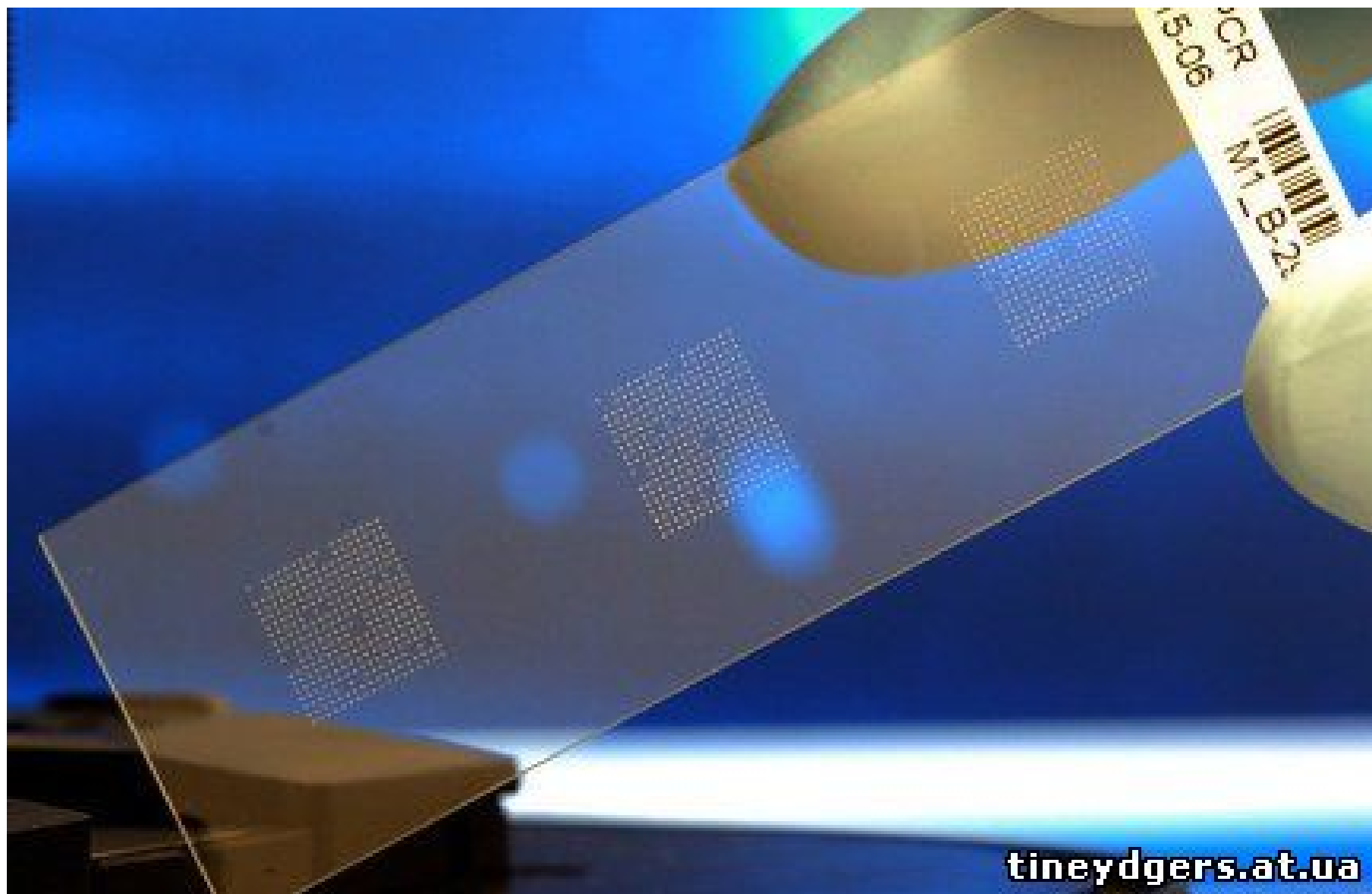


Схема детекции миРНК с помощью обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени



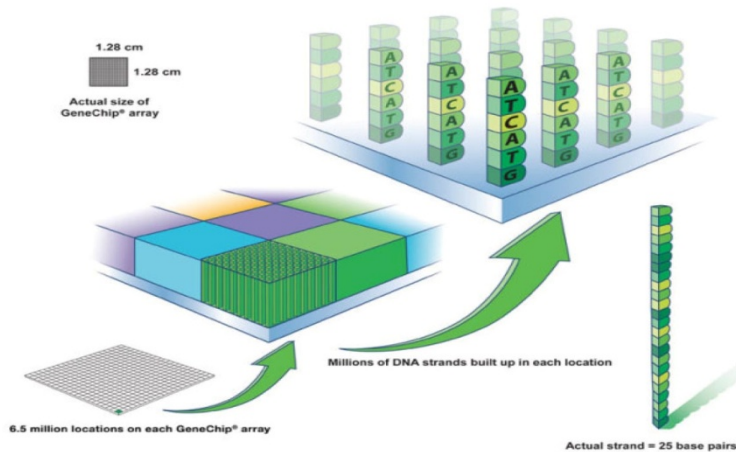
Биочипы



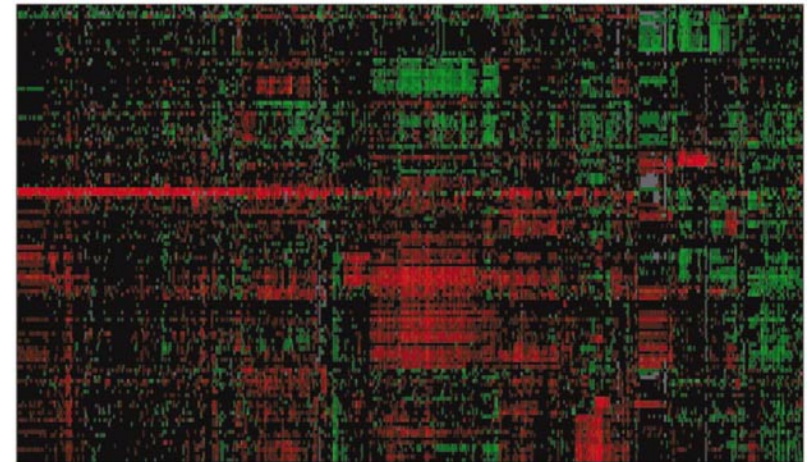
Биочип

Пластинка-носитель, на которой в определенном порядке расположены ячейки с различными иммобилизованными в них одноцепочечными олигонуклеотидами или олигопептидами, каждый из которых способен избирательно связывать определенное вещество, содержащееся в сложной смеси в анализируемом растворе

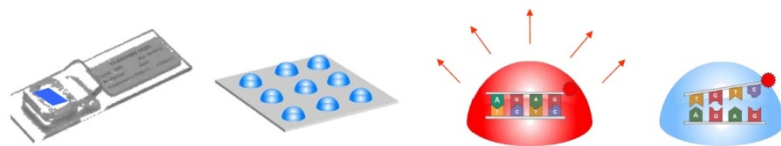
Типы биочипов



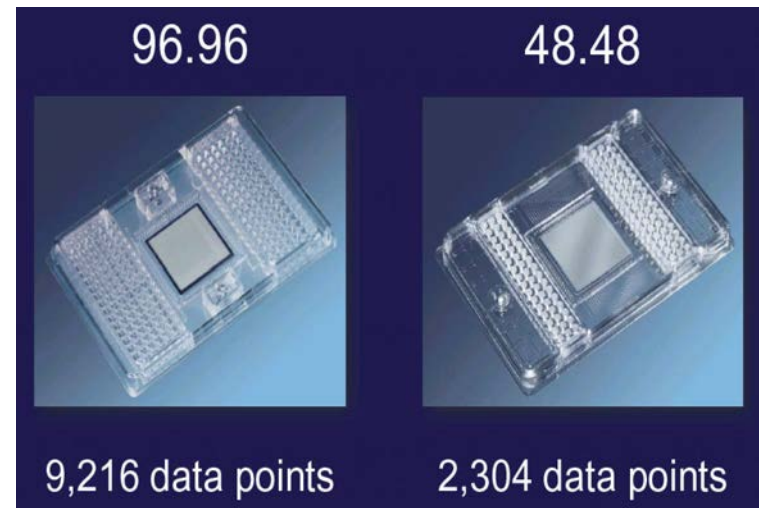
Матричные ДНК-чипы



Экспрессионные

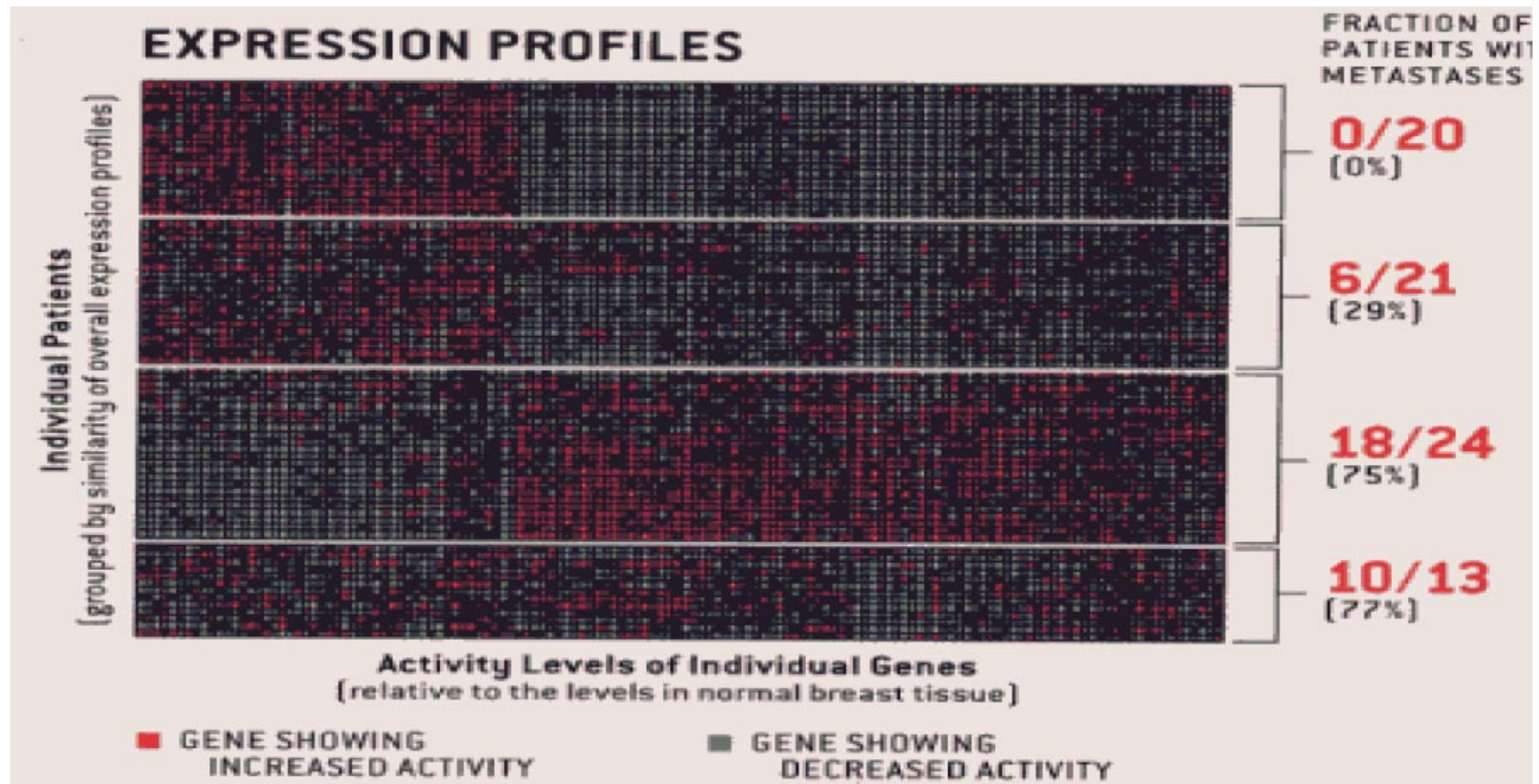


Гидрогелевые



Микрофлюидомные

Экспрессионные биочипы

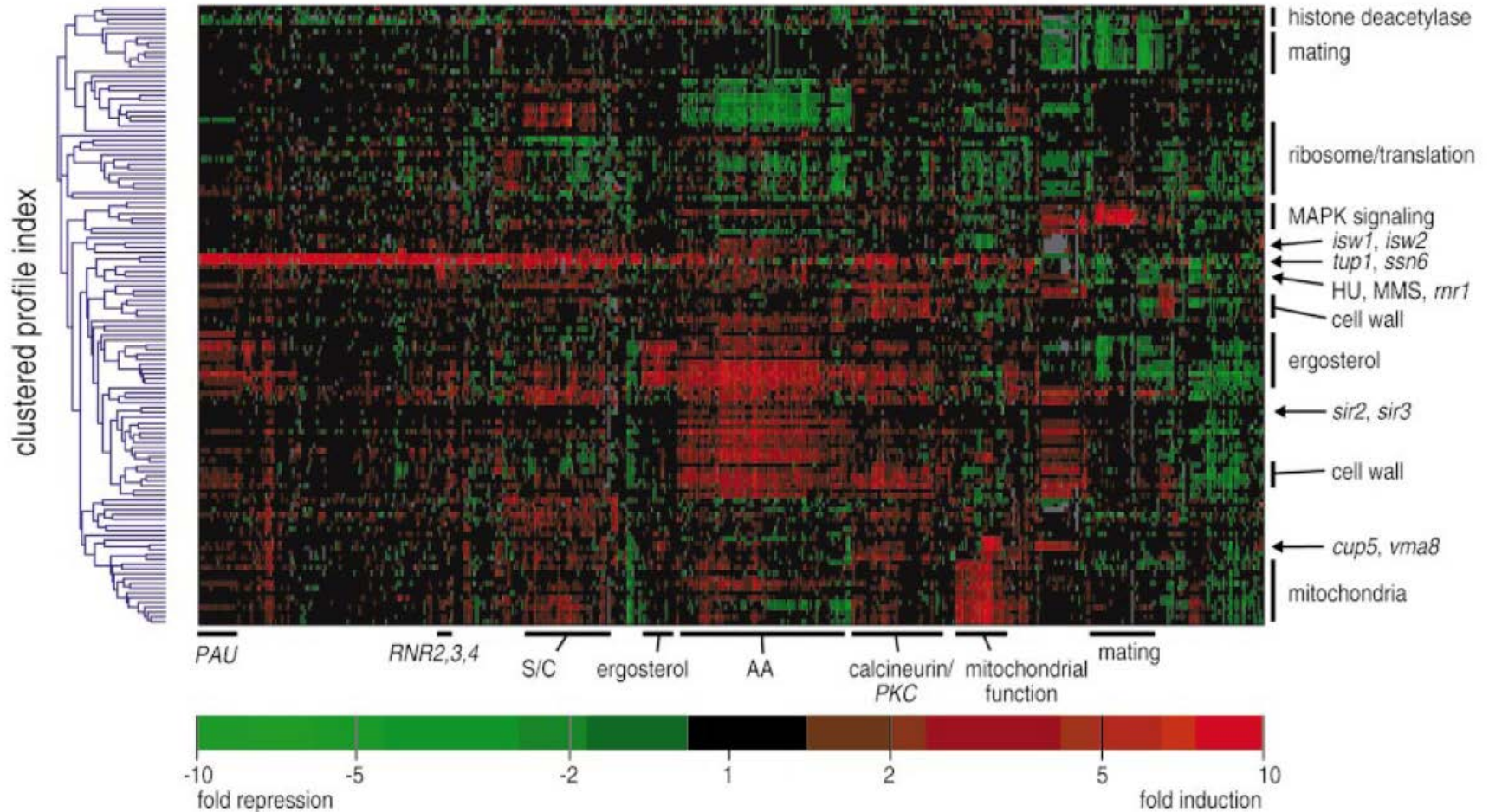


- **Экспрессия** гена в образце больше стандарта.
- **Экспрессия** гена в образце меньше стандарта.
- **Экспрессия** гена в образце равна стандарту.

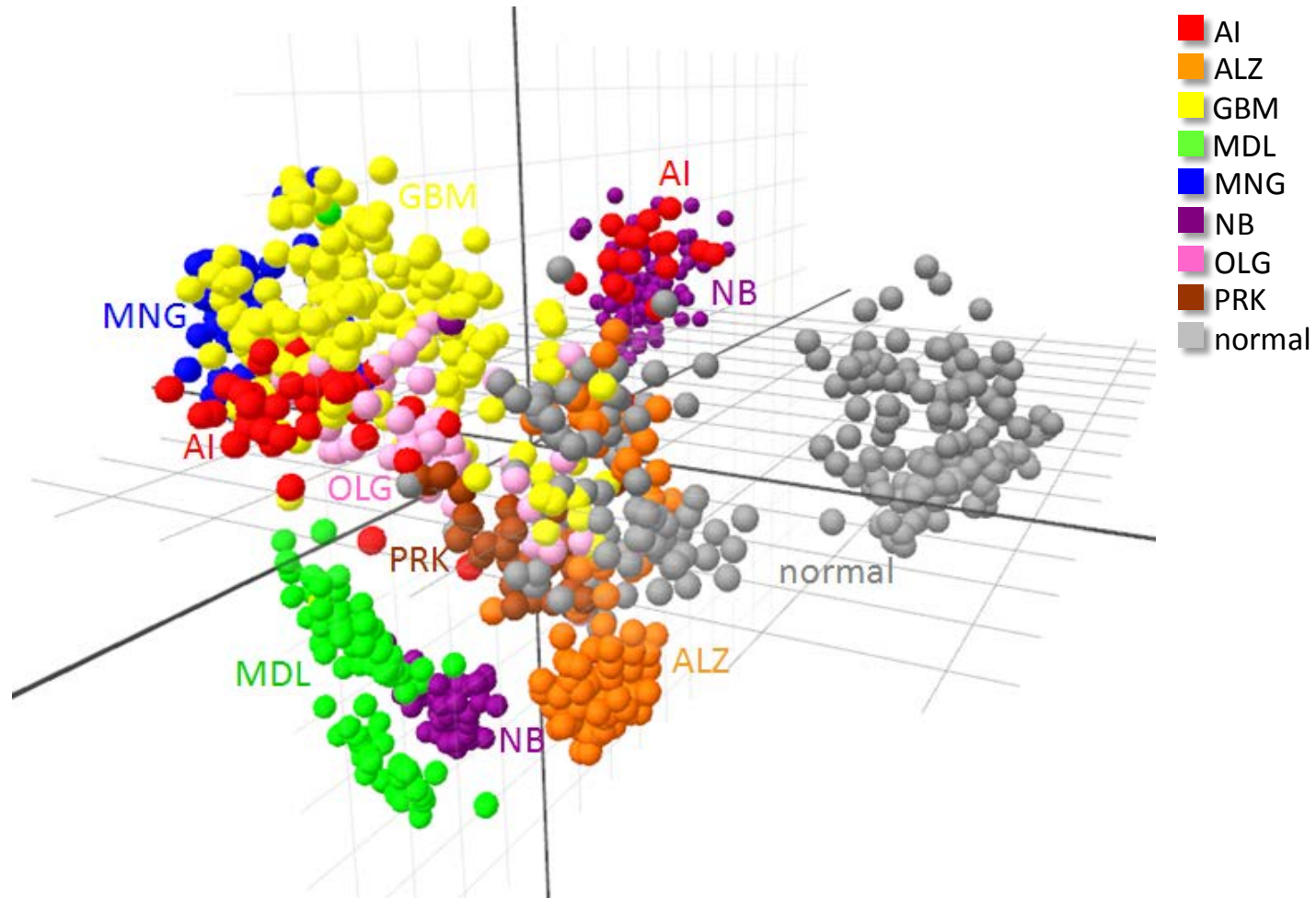
Экспрессионные ДНК-чипы

B.

clustered transcript response index

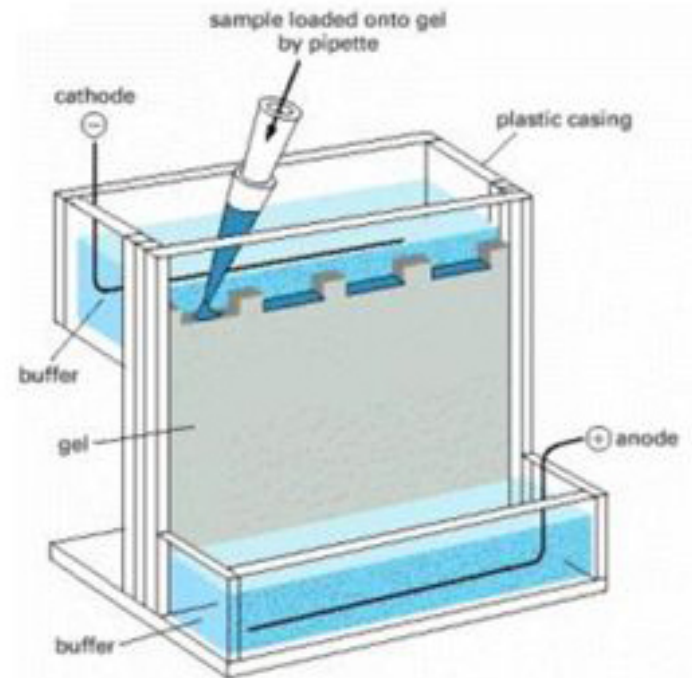
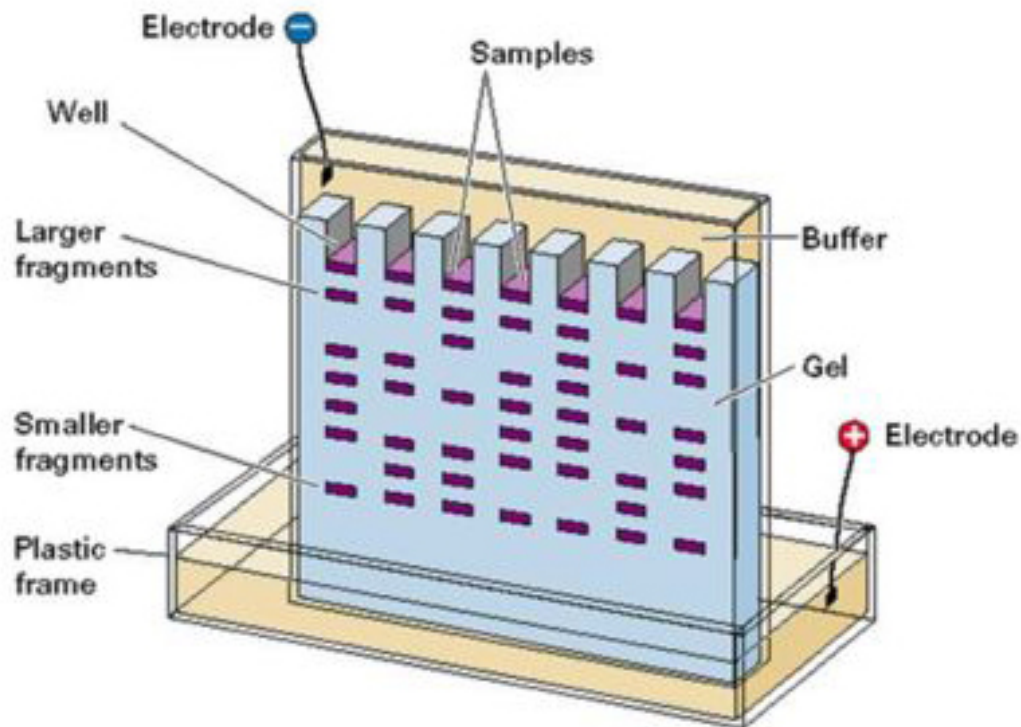


Анализ транскриптом, измененных в результате заболеваний мозга

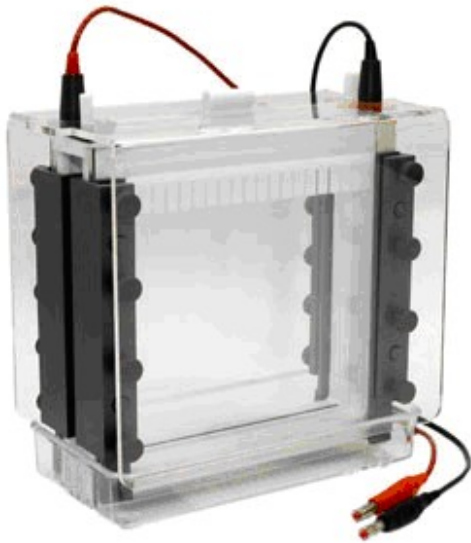


Многомерное шкалирование данных анализа
на микрочипах парной коэкспрессии генов

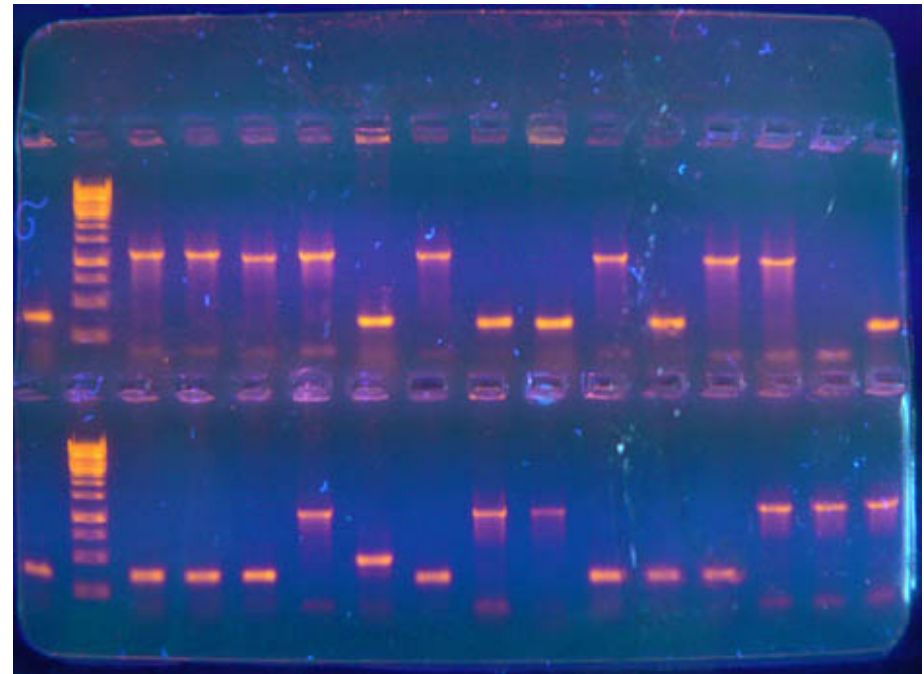
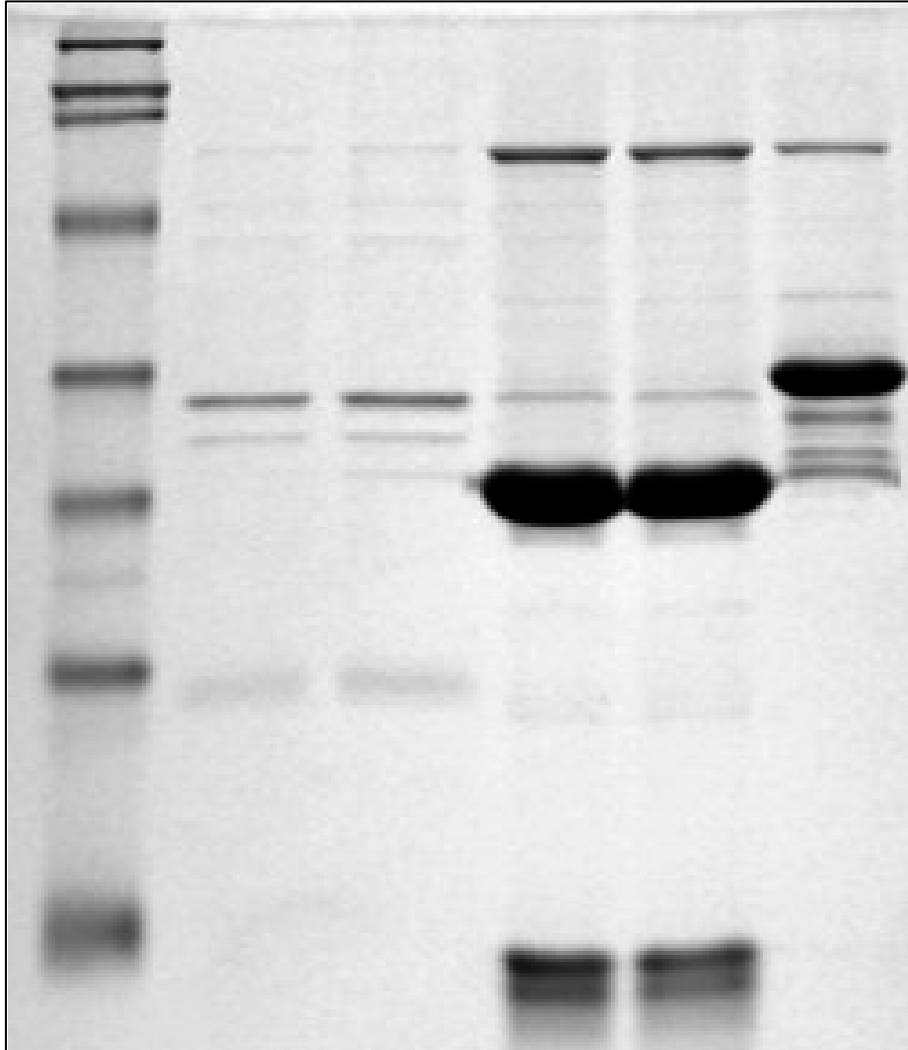
Гель-электрофорез



Приборы для гель-электрофореза

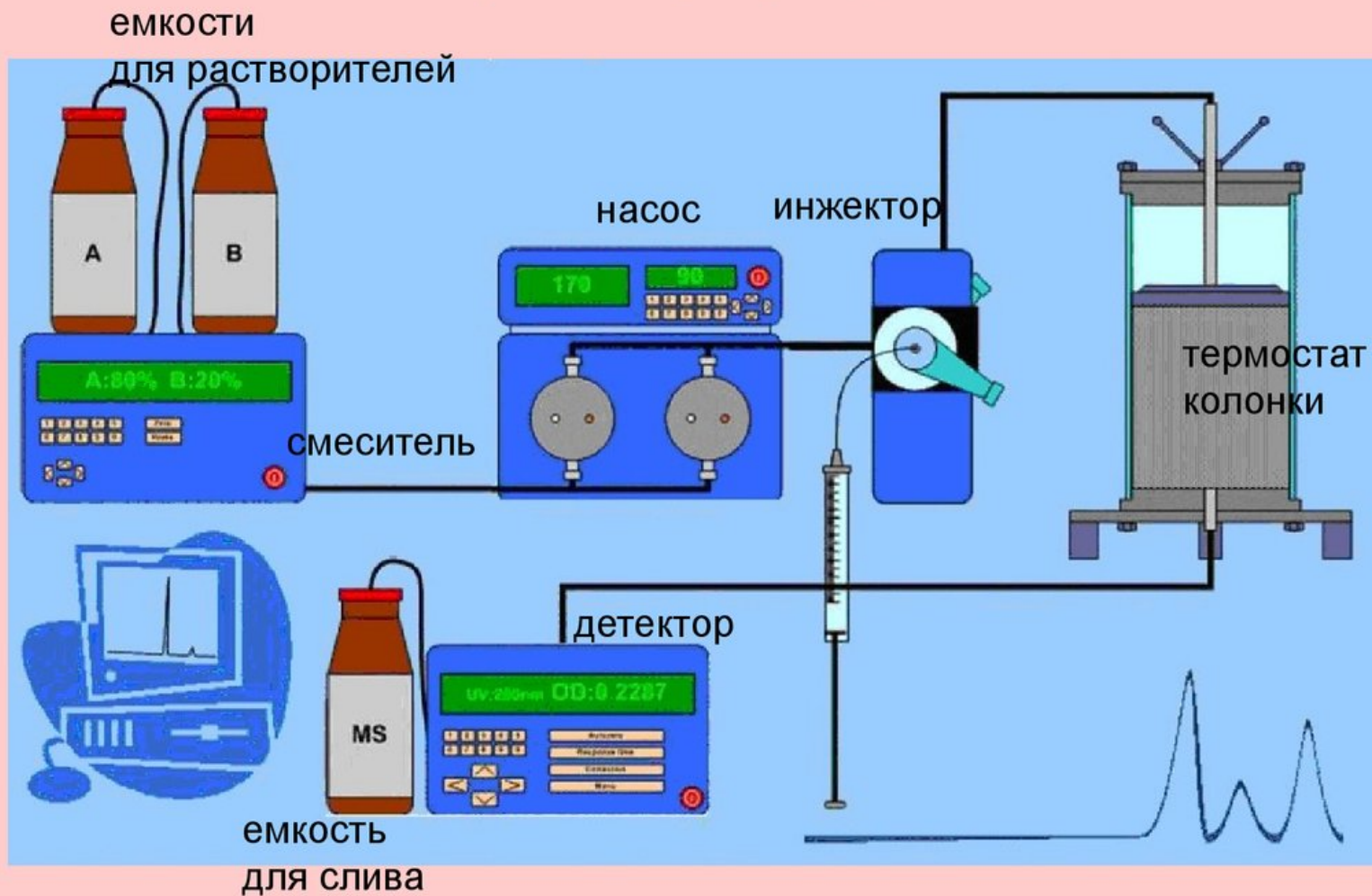


Гель-электрофореграммы

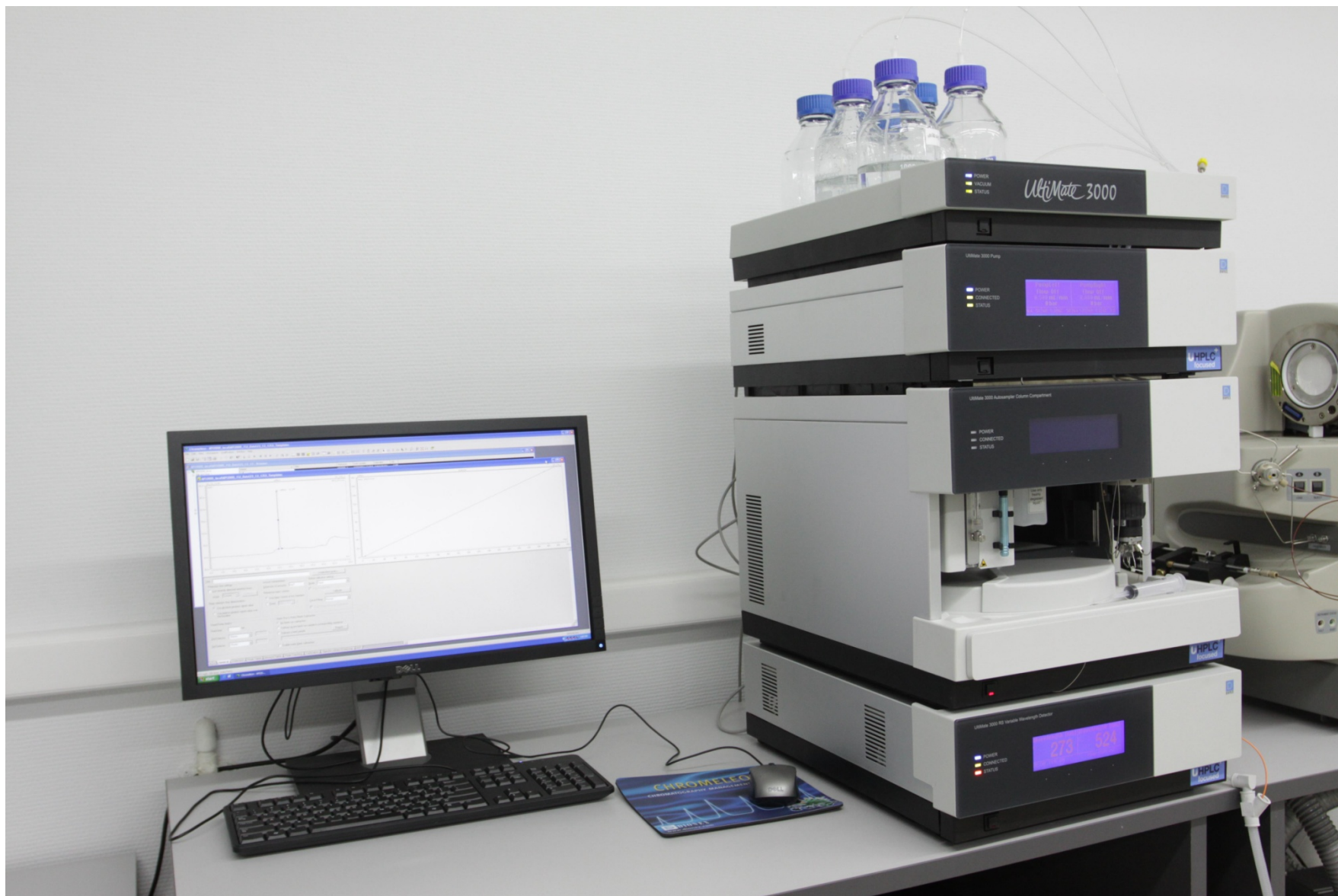


ВЭЖХ

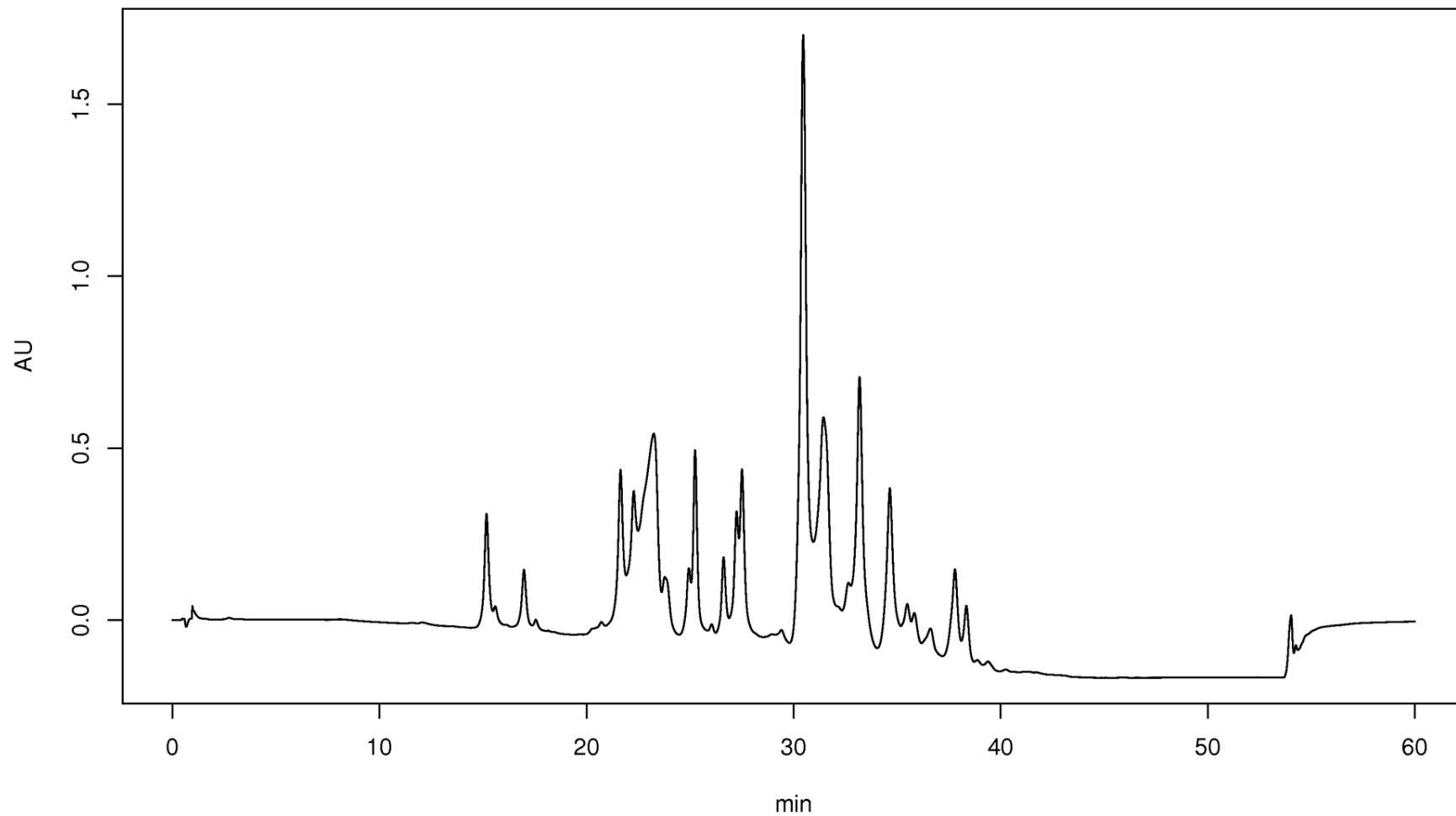
Схема хроматографов для ВЭЖХ



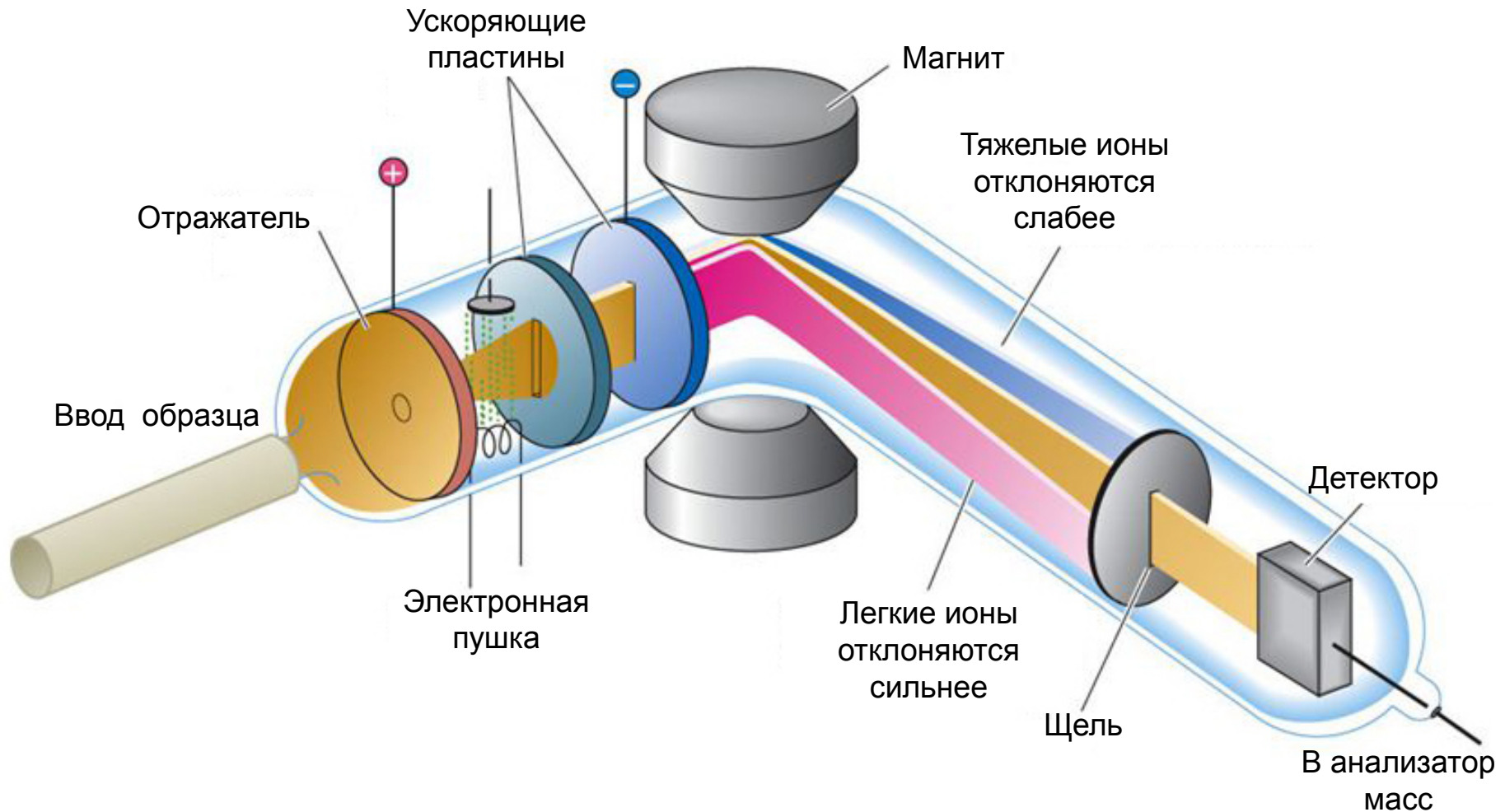
ВЭЖ хроматограф



ВЭЖ хроматограмма



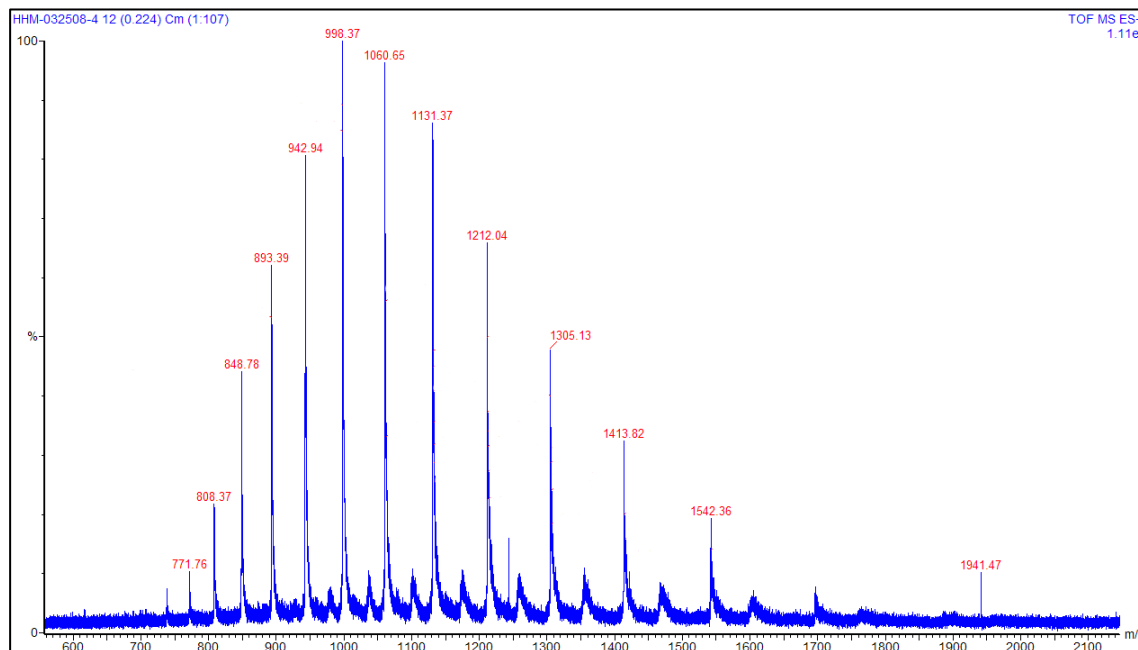
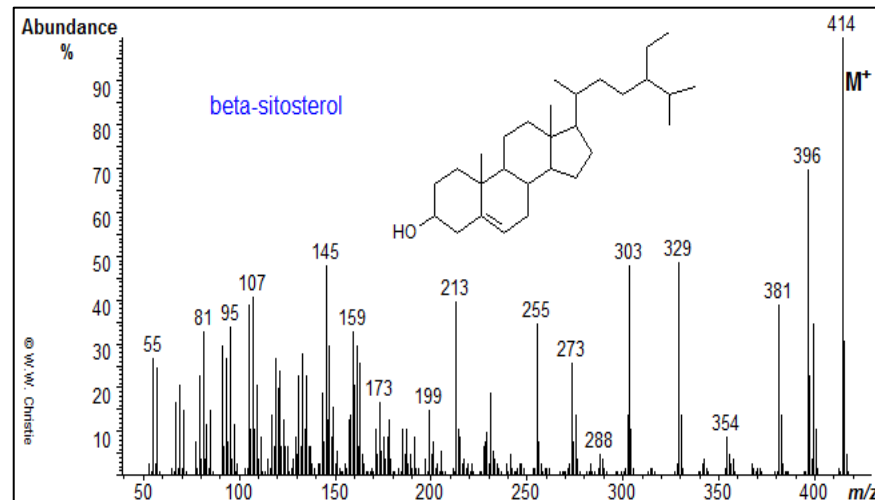
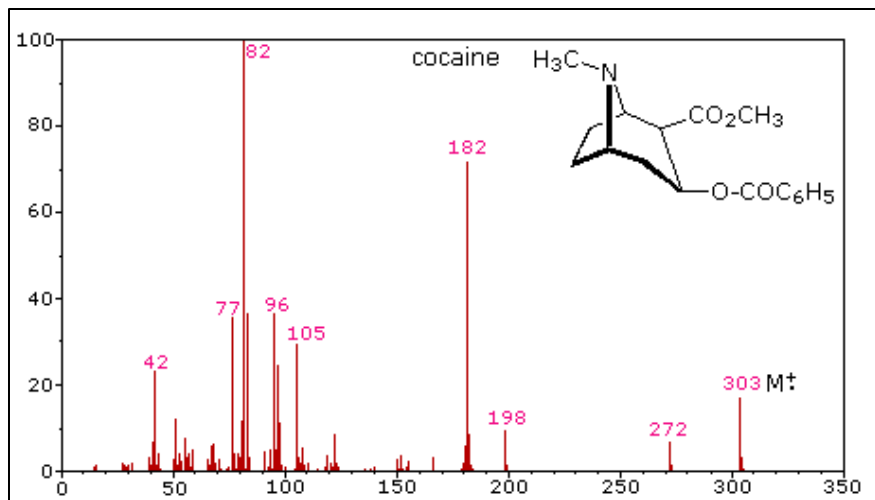
Масс-спектрометрия



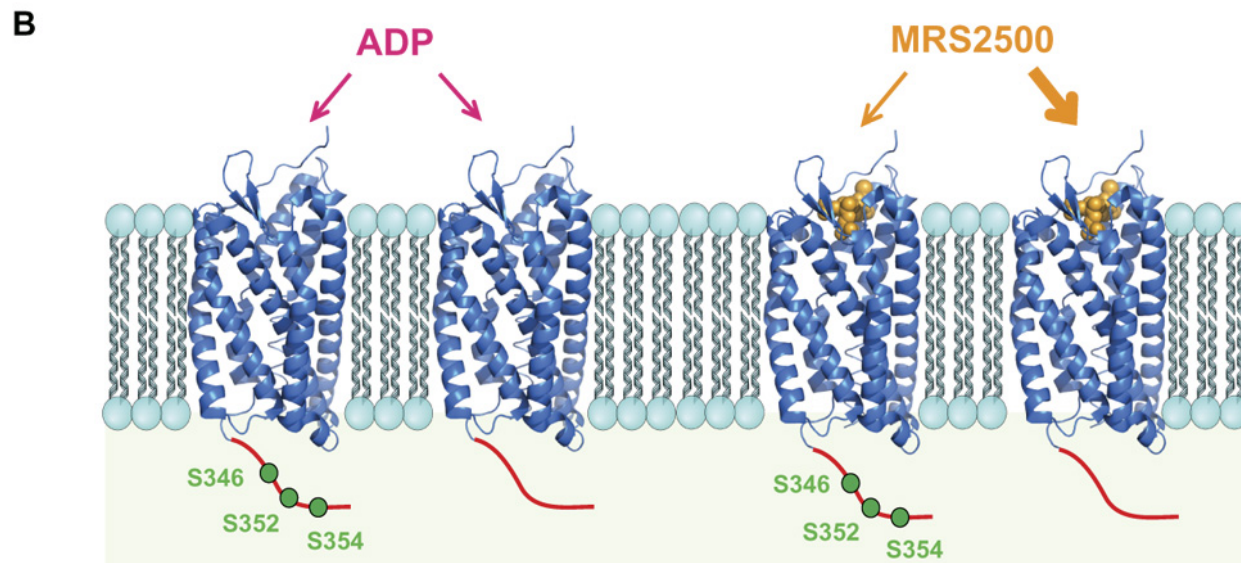
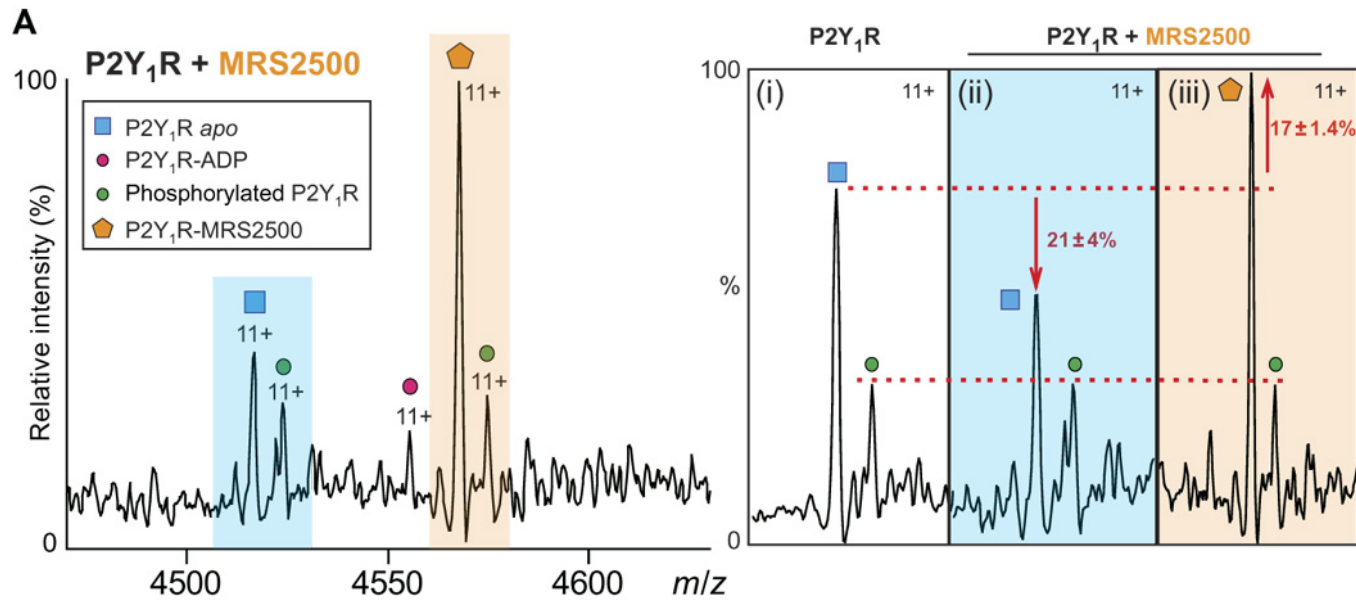
Масс-спектрометр



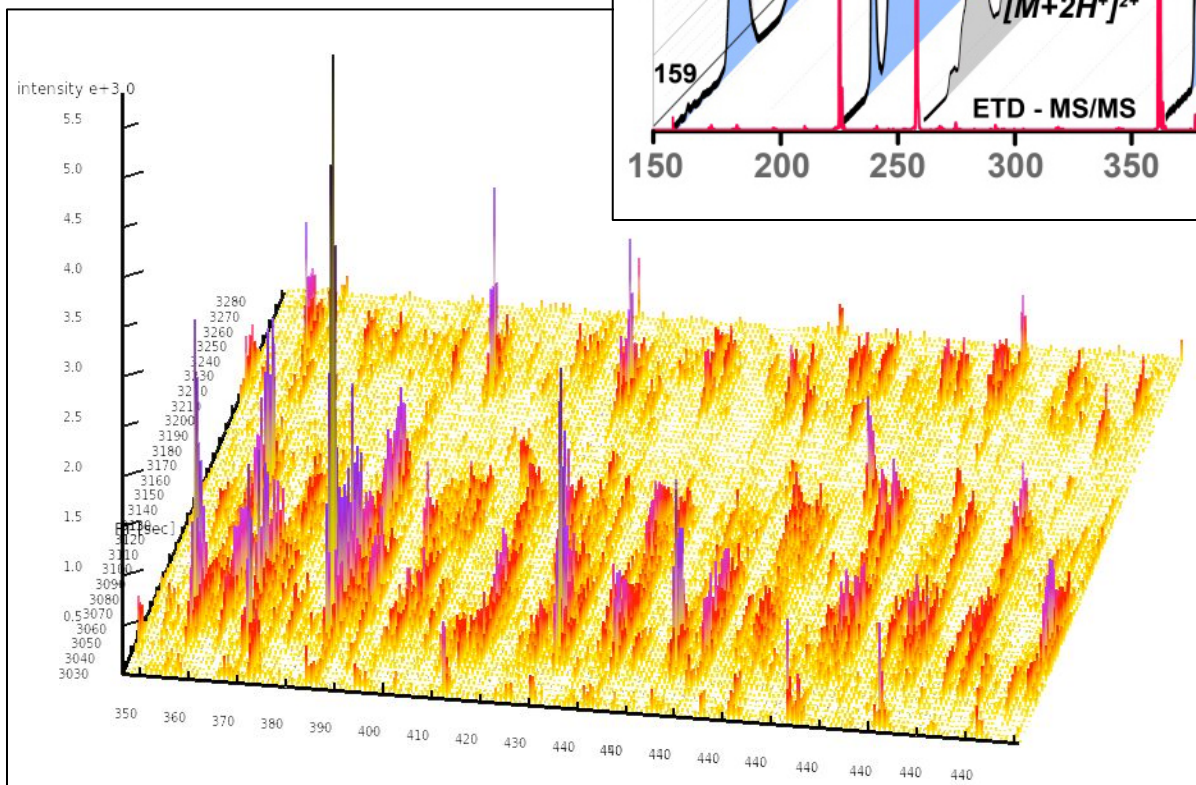
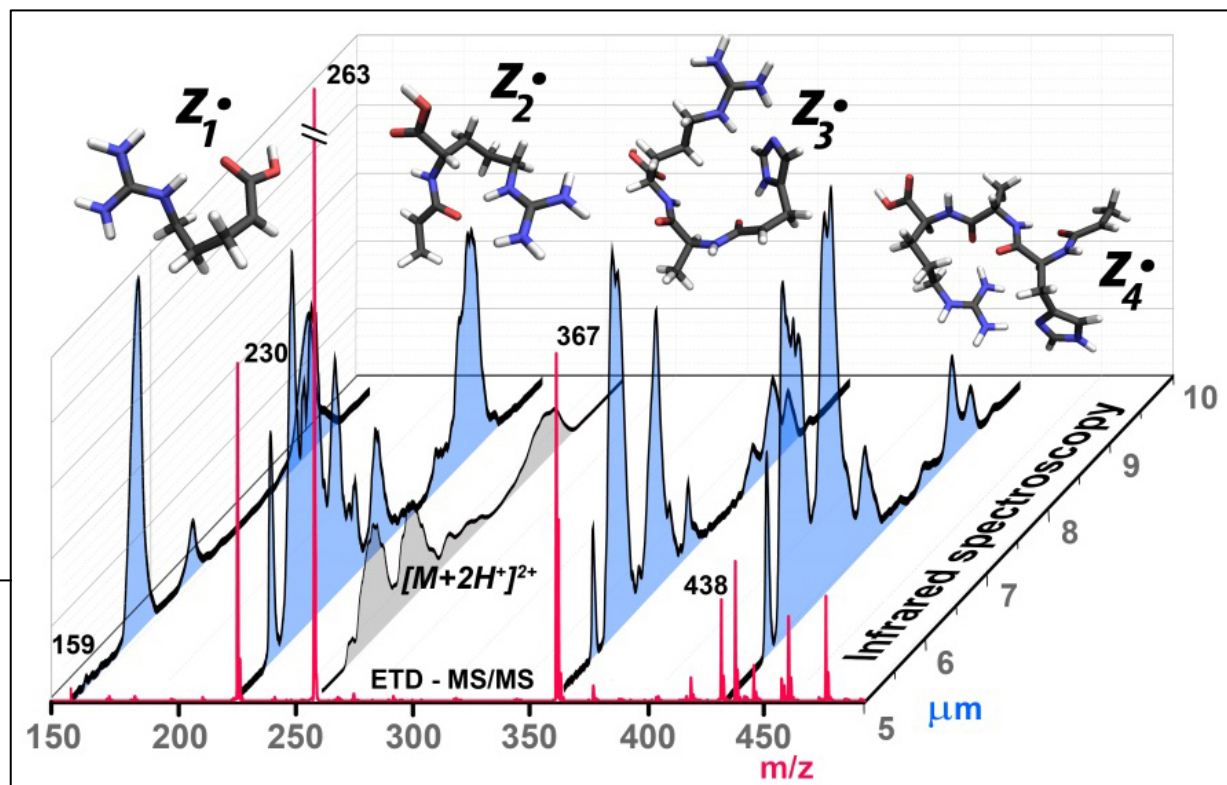
Масс-спектры



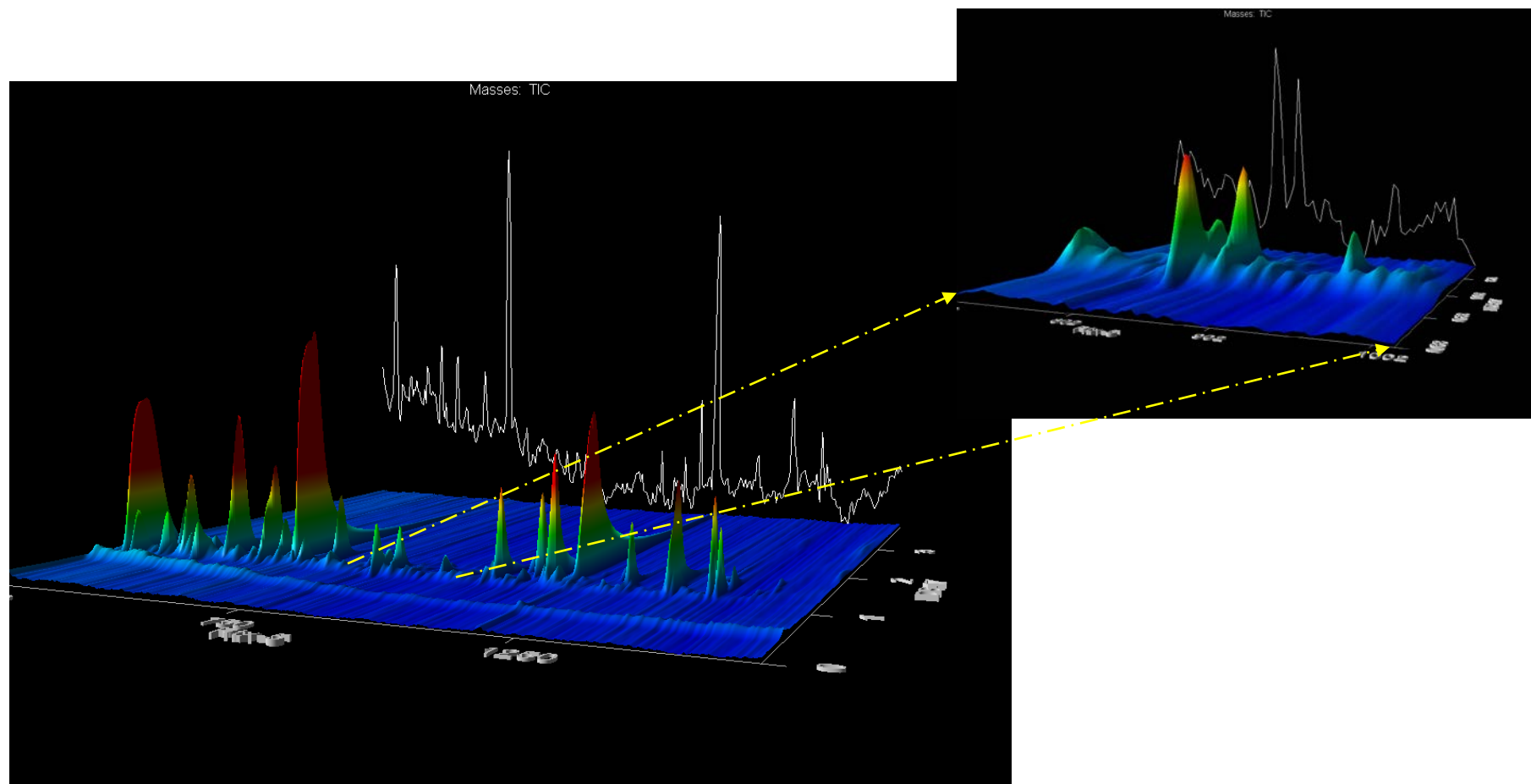
Масс-спектр взаимодействия лиганд-белок



Масс-ИК спектры



Анализ метаболитов сыворотки крови



Гель-электрофорез, жидкостная хроматография,
масс-спектрометрия

To be continued ...

