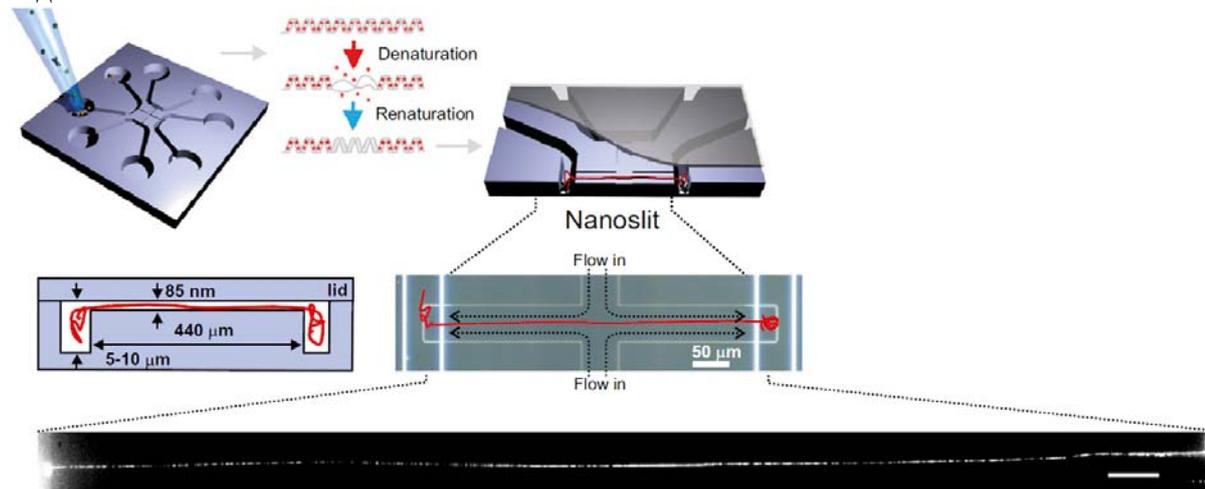


## Задача 8. ДНК: точки и тире. 10 баллов.

Множество ученых занимаются созданием новых способов определения последовательности ДНК. Геном человека давно расшифрован, но для медицинских (и других) целей важно быстро и дешево определять последовательность ДНК для очень малых количеств образца (например, расшифровать последовательность ДНК из одной клетки). Интересный способ определения последовательности ДНК, а также наличия мутаций в ней, придумали датские ученые и их коллеги из других стран. Хромосомы выделяют из клетки и помещают в специальную ячейку, представляющую собой систему микро- и наноразмерных каналов. Потоком жидкости молекулы ДНК направляются к системе нанощелей (nanoslits), в которых молекула ДНК вытягивается во всю длину, расправляется и так же потоком жидкости удерживается на месте. Концы такой вытянутой двойной спирали остаются в виде свернутых «клубочков» по краям щели. Перед внесением ДНК в ячейку ее окрашивают специальными интеркалирующими флуоресцентными красителями, которые удерживаются между нитями ДНК (между азотистыми основаниями) в двойной спирали. Далее ячейку нагревают, и отдельные участки ДНК «плаваются» (денатурируют), нити ДНК отделяются одна от другой и молекулы флуоресцентного красителя «вываливаются» из молекулы ДНК. Затем температуру снижают, и молекула ДНК ренатурирует, т.е. приобретает исходную двунитевую структуру, однако теперь в ней есть участки, которые не содержат флуоресцентного красителя. После этого снимают изображение такой полностью вытянутой в длину молекулы ДНК при помощи обычного флуоресцентного микроскопа и получают «пунктирную» линию, имеющую светлые участки (там, где молекулы флуоресцентного красителя встроены в двунитевую спираль и дают флуоресцентный сигнал) и темные (там, где ДНК «расплавилась» при нагревании и потеряла флуоресцентную краску). Назовем эту картинку картой денатурации ДНК, ее также можно образно назвать «штрих-кодом».

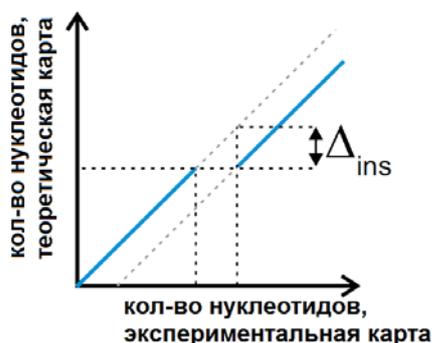


Для получения лучшего разрешения такую картинку снимают на видео и усредняют во времени. При необходимости можно сместить участок ДНК, попадающий в нанощель – для этого надо потоком жидкости «развернуть» клубочек на одном из концов молекулы и протащить его дальше через щель. После того, как необходимые данные получены, молекулу ДНК можно «выдуть» потоком жидкости из ячейки и использовать для дальнейших исследований. При необходимости определить наличие мутаций в структуре ДНК полученную карту денатурации ДНК с гипотетическими мутациями сравнивают с теоретической, рассчитанной для уже известной последовательности той же ДНК без мутаций.

Вопросы:

1. Какие способы определения последовательности ДНК Вы знаете? Объясните вкратце, как они работают? 1 балл.
2. Как Вы думаете, какие предварительные процедуры обработки необходимы на этапе от экстракции хромосом из клетки до получения флуоресцентной карты денатурации ДНК? 1 балл.
3. Какими характеристиками (свойствами) должен обладать флуоресцентный краситель? 1 балл.
4. Как отличаются светлые и темные участки ДНК (окрашенные и неокрашенные) по составу? Какие участки будут оставаться окрашенными? Почему? 1 балл.  
Какое разрешение (по количеству нуклеотидов) будет иметь этот метод: какой минимальный размер мутации может быть определен? Какую длину нуклеотидной последовательности можно проанализировать при помощи ячейки, приведенной на рисунке (длина нанощели 440 нм)? 1 балл.
5. Почему необходимо, чтобы ДНК ренатурировала (восстановила свою структуру после плавления) перед тем, как регистрировать карту денатурации? 1 балл.

При определении наличия мутаций в фрагменте ДНК сравнивают теоретически построенную карту денатурации для фрагмента без мутаций и полученную в результате эксперимента для фрагмента с мутациями. Для этого определяют положение на той и другой карте, где паттерн свечения совпадает максимально (т.е. светлые точки на экспериментальной карте – светлые и на теоретической). Если в экспериментальном образце ДНК имеется мутация – вставка фрагмента ДНК (инсерция), то на графике положения максимального совпадения паттернов свечения можно видеть следующую картину:



6. Как будет выглядеть подобная зависимость для случая делеции? Для случая инверсии? 2 балла.
7. Как можно использовать молекулы ДНК, которые в неизменном виде эвакуируются из ячейки после регистрации карты денатурации ДНК? 1 балл.
8. Какие преимущества и недостатки Вы можете предположить у такого метода анализа последовательности ДНК? 1 балл.

Ответ.

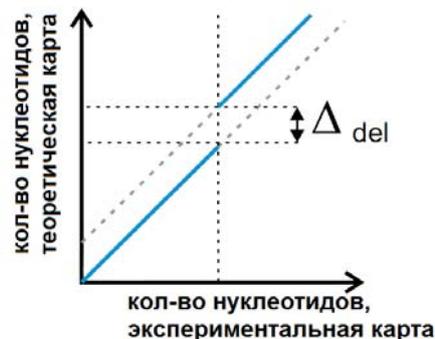
Задача создана по мотивам статьи: Integrated view of genome structure and sequence of a single DNA molecule in a nanofluidic device. / Marie, Rodolphe ; Pedersen, Jonas Nyvold; L. V. Bauer, David ; Rasmussen, Kristian Hagsted; Yusuf, Mohammed; Volpi, Emanuela ; Flyvbjerg, Henrik; Kristensen, Anders; U. Mirb, Kalim.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 110, No. 13, 2013, p. 4893-4898.

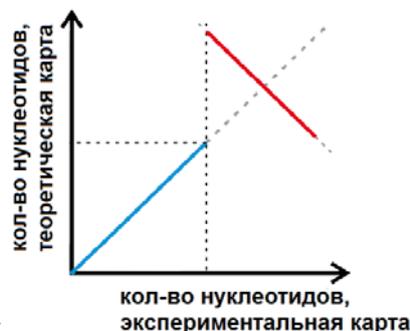
1. Секвенирование: метод химической дегградации, метод обрыва цепи – в обоих случаях образуется набор фрагментов разной длины, с присутствием меченых нуклеотидов на конце. Потом их разделяют с помощью электрофореза. Перед секвенированием

необходимо провести амплификацию методом ПЦР. Определяется последовательность нуклеотидов в сегментах до 100-1000 п.н. Метод FISH-гибридизации – определение положения определенных фрагментов ДНК в хромосомах или интерфазных ядрах. Используются флуоресцентно-меченые фрагменты ДНК. Это уже совершенно другой масштаб, уровень целой хромосомы.

2. Выделение хромосом из клетки, окрашивание флуоресцентным красителем, разрушение структуры хромосомы (протеолиз), денатурация, ренатурация (ну и позиционирование нити ДНК в нанощели).
3. Интеркалирующие красители как правило имеют плоскую гетероциклическую структуру, чтобы встраиваться между азотистыми основаниями. Должны давать интенсивную флуоресценцию, а еще лучше – более интенсивный сигнал в связанном с ДНК виде, чем в свободной форме. Не связываться ковалентно с ДНК, чтобы мог отсоединиться при денатурации, не связываться специфично с определенными участками (необходимо для данного метода), не вызывать изменений длины ДНК при встраивании.
4. При термической денатурации ДНК (плавлении) в первую очередь плавятся участки, в которых содержится больше пар АТ, чем ГЦ (т.к. АТ соединяются 2 связями, ГЦ – 3). Т.о. светлые участки – богаты ГЦ парами оснований.
5. Разрешение метода в основном будет определяться разрешением флуоресцентного микроскопа, используемого для регистрации карты плавления ДНК, а она в свою очередь определяется длиной волны флуоресценции (или более сложно:  $0.6 \cdot \lambda / NA$ , где  $\lambda$  – длина волны света флуоресценции,  $NA$  – числовая апертура объектива). Т.е. приблизительно 300 нм. Расстояние между нуклеотидами в цепочке – 0.3 нм (справочные данные), т.о. максимальное разрешение – 1 kb (1 тысяча оснований), это соответствует данным, приведенным в статье. Длина нуклеотидной последовательности, которую можно определить в ячейке – примерно 1.5 Mb (1500000 пар оснований).
6. Ренатурация необходима, т.к. в денатурированном виде участки ДНК меняют свою длину.
7. Зависимость следующая:



Делеция:



Инверсия:

Важно иметь в виду, что точечные мутации таким образом определить нельзя, только начиная с тысяч п.н.

8. Проанализированную нить ДНК можно затем амплифицировать и провести как обычное секвенирование, чтобы определить нуклеотидную последовательность, так и использовать в FISH-гибридизации для определения локализации фрагмента в хромосомах.
9. Данный метод заполняет пробел между секвенированием, которое может определять последовательность на небольших участках, геномными и клеточными методами исследования ДНК (локализация в хромосомах). Т.о. можно оптимизировать исследования, выбирая для более подробного анализа только интересующие фрагменты больших молекул ДНК. Можно относительно быстро выявлять мутации, имеющие соответствующие размеры (от тысяч до миллионов оснований). Недостатки – такой метод не дает непосредственно нуклеотидной последовательности.