



**Проект Bioversity International/UNEP-GEF  
«In situ/On farm сохранение и использование  
агробиоразнообразия (плодовые культуры и их  
дикие сородичи) в Центральной Азии»**



**Региональный Тренинг по использованию  
молекулярных маркеров в оценке разнообразия  
генетических ресурсов растений**

**23-27 ноября 2009 г.**

**Региональный Тренинг Центр по Молекулярным Маркерам,  
Центр Геномных технологий  
Института генетики и экспериментальной биологии растений  
Академии Наук Республики Узбекистан**

**г. Ташкент, Узбекистан  
2009**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ .....	3
Приложение 1. Список участников .....	9
Приложение 2. Программа семинара .....	13
Приложение 3. Основы молекулярной генетики .....	18
Приложение 4. Транскрипция, трансляция и биосинтез белка.....	26
Приложение 5. Роль молекулярной генетики в изучении биологических систем: оценка межвидового разнообразия сельскохозяйственных культур с использованием технологии молекулярных маркеров .....	33
Приложение 6. Введение в молекулярную генетику и ее методологию .....	57
Приложение 7. Секвенирование ДНК, анализ нуклеотидных последовательностей .....	100
Приложение 8. Охрана труда и техники безопасности в научных лабораториях Центра геномных технологий.....	137
Приложение 9. Качественный и количественный анализы ДНК и РНК. Спектрометрический анализ .....	147
Приложение 10. Практические занятия по подготовке биологического материала .....	150
Приложение 11. Методы выделения ДНК из биологического материала .....	153
Приложение 12. Принципы электрофореза .....	157
Приложение 13. Биоинформатика и компьютерные программы для анализа геномного материала (основы). Статистический анализ. Генетическое расстояние, сцепление генов QTL анализ. LD анализ. Биоинформатические интернет ресурсы.....	161
Приложение 14. Результаты оценки тренинг-курса .....	189

## КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ

Тренинг по применению молекулярных маркеров в оценке биоразнообразия генетических ресурсов растений состоялся с 23 по 27 ноября 2009 года в Региональном Тренинг центре по молекулярным маркерам, организованном на базе Центра Геномных технологий Института генетики и экспериментальной биологии растений Академии наук Республики Узбекистан.

Центр Геномных технологий является одним из ведущих лабораторий не только в Республики Узбекистан, но и в Центральной Азии. Здесь проводятся работы на молекулярно-генетическом уровне по изучению возможности применения генетических ресурсов в улучшении хозяйственно-ценных свойств основных сельскохозяйственных культур Республики Узбекистан. Руководителем Центра является молодой доктор биологических наук Абдурахманов Ибрагим Юлчиевич. Под руководством Абдурахманова И.Ю. и при содействии Регионального и Национального отделов реализации проекта Bioversity International/UNEP-GEF "*In situ/On farm* сохранение и использование агробiorазнообразия (плодовые культуры и их дикие сородичи) в Центральной Азии" был проведён региональный тренинг по применению молекулярных маркеров в исследованиях биоразнообразия генетических ресурсов растений.

В семинаре приняли участие 12 представителей стран Центральной Азии, участвующих в реализации проекта: Казахстан (3 человека), Кыргызстан (3 человека), Таджикистан (2 человека), Туркменистан (1 человек) и Узбекистан (2 человека). Список участников, инструкторов и организаторов тренинг семинара представлен в Приложении 1 данного документа.

Тренинг проходил в течение 5 дней. Программа тренинга представлена в Приложении 2.

### **Первый день тренинга, 23 ноября 2009 г.**

Первый и второй день тренинг проводился в Институте генетики и экспериментальной биологии растений Академии Наук Республики Узбекистан. С приветственным словом выступил и.о. директора, кандидат биологических наук Бабоев Саидмурад Кимсанбаевич. Он кратко информировал участников о деятельности института и его вкладе в реализацию проекта "*In situ/On farm* сохранение и использование агробiorазнообразия (плодовые культуры и их дикие сородичи) в Центральной Азии".

Далее с приветственным словом выступила Региональный Координатор проекта Bioversity International/UNEP-GEF "*In situ/On farm* сохранение и использование агробiorазнообразия (плодовые культуры и их дикие сородичи) в Центральной Азии" Турдиева Мухаббат Кузиевна. Она отметила важность проведения подобных тренингов и поприветствовала участников, инструкторов и организаторов тренинга.

С приветственным словом выступил руководитель Центра геномных технологий Института генетики и экспериментальной биологии растений Академии Наук Республики Узбекистан, куратор Регионального Тренинг центра по применению молекулярных маркеров в оценке биоразнообразия ГРР доктор биологических наук Абдурахманов Ибрагим Юлчиевич. Он кратко рассказал участникам тренинга о деятельности центра, об основных направлениях работ, проводимых в центре, и пожелал всем успехов в работе тренинга, выразив надежду, что знания, которые будут получены, могут быть применены в дальнейшем слушателями и на практике.

Далее доктор биологических наук Турдикулова Шахло Уткуровна, ведущий научный сотрудник Центра Геномных Технологий Института генетики и экспериментальной биологии растений Академии наук Республики Узбекистан, прочитала лекции на тему «Основы молекулярной генетики» (Приложение 3), в которых были охвачены основные моменты молекулярной биологии и биохимии – информация, которая необходима для дальнейшего понимания практических и теоретических лекций. Доктор Турдикулова представила презентации, посвященные структуре ДНК, истории открытия дезоксирибонуклеиновой кислоты. Принципы комплементарности пуриновых и пиримидиновых оснований были закреплены при помощи тестовых заданий. Доктор Турдикулова указала на то, что одним из обязательных требований к генетическому материалу состоит в том, что он должен быть способен к точному самовоспроизведению при каждом клеточном делении. По этому поводу в конце своей статьи Уотсон и Крик сделали классический вывод: «Нельзя не заметить, что постулированное нами специфическое взаимодействие непосредственно предполагает возможность копирования генетического материала».

Шахло Уткуровна продемонстрировала учебный фильм о репликации ДНК. Далее курс лекций был посвящен геному. Традиционно, под геном в молекулярной биологии понимают участок ДНК, кодирующий либо белок, либо молекулу РНК. Исследования последних лет заставили расширить этот список за счет регуляторных генов и, возможно, появления и других групп. Молекулярно-биологическое определение гена тоже изменилось: ген - это ограниченный участок геномной ДНК (или РНК для некоторых вирусов), отвечающий за определенную и специфическую функцию. Доктор Турдикулова отметила, что особенностью эукариотического гена является его мозаичное строение. Это делает процесс сплайсинга (или созревания) для мРНК необходимым. В процессе созревания удаляются интроны из мРНК и она определенным образом модифицируется.

Следующая тема лекций была посвящена транскрипции, трансляции и биосинтезу белка (Приложение 4). С открытием генетической роли ДНК была заложена основа концепции о том, что наследуется генетическая информация. Критическое значение при этом имеет тот факт, что структура ДНК не зависит от последовательности пар оснований. Таким образом, последовательность оснований в полинуклеотидной цепи имеет важное значение не для самой структуры ДНК. Представление о том, что каждый белок состоит из постоянного числа определенных аминокислот, возникло в 50-х годах на основе работы Сэнгера (Sanger) по расшифровке структуры инсулина. Взаимоотношения между последовательностью гена и последовательностью белка устанавливаются с помощью генетического кода. Общий принцип организации белковой молекулы заключается в том, что структуры высшего порядка определяются непосредственно структурой низшего порядка. Это означает, что в первичной последовательности аминокислот заложена информация, необходимая для образования правильной конформации белка. Если генетический код читается как серия триплетов, белок синтезируется последовательно с одного конца до другого. Впервые это продемонстрировал Динцис (Dintzis), исследуя белок эритроцитов-гемоглобин.

Доктор Турдикулова посвятила следующую часть лекций теме «Синтез белка». Тот факт, что синтез белка происходит в рибосомах, впервые был установлен в опытах с введением крысам меченых аминокислот. Доктор Турдикулова рассказала об экспериментах по исследованию процесса синтеза белка. Кратко было рассказано о структуре белка, а также продемонстрирован видеофильм (учебная анимация) по трансляции белка и по структуре белка.

**Второй день тренинга, 24 ноября 2009 г.**

Второй день тренинга также был проведён в конференц-зале Института генетики и экспериментальной биологии растений Академии Наук РУз.

Первая лекция была посвящена роли молекулярной генетики в изучении биологических системы, а именно, оценке межвидового разнообразия сельскохозяйственных культур с использованием технологии молекулярных маркеров (Приложение 5). Лекция была представлена старшим научным сотрудником центра геномных технологий Института генетики и экспериментальной биологии растений Абдуллаевым Алишером Абдумавляновичем.

Алишер Абдумавлянович в своей лекции указал на то, что генетическое разнообразие связано с изменчивостью в:

- последовательности ДНК,
- количестве ДНК в одной клетке, или
- количестве и структуре хромосом.

Кроме того, генетическое разнообразие является результатом отбора, мутации, миграции, генетического дрейфа и/или рекомбинации генов. Все эти явления вызывают изменения в частоте генов и аллелей, и приводят к эволюции популяций. Генетическое разнообразие связано с изменчивостью в:

- последовательности ДНК,
- количестве ДНК в одной клетке, или
- количестве и структуре хромосом.

Для эффективного сохранения и использования генетических ресурсов растений требуется тщательная оценка генетической изменчивости, которой они обладают. Генетическую изменчивость можно измерить на двух уровнях: фенотипа – сочетания индивидуальных признаков, определяющихся генотипом и его взаимодействием с окружающей средой, и генотипа – специфической генетической структуры организма.

Генетические маркеры определяют характеристики фенотипа и/или генотипа особи. Их наследование можно проследить через поколения. Генетические маркеры – это морфологические признаки, молекулярные маркеры - белковые (биохимические) маркеры, ДНК маркеры. Применение молекулярных маркеров следующее: изучение внутривидового и межвидового генетического разнообразия, исследование меж- и внутрипопуляционной генетической структуры, филогенетический и эволюционный анализ.

Следующая лекция Абдуллаева Алишера Абдумавляновича называлась «Введение в молекулярную генетику и её методологию» (Приложение 6). Алишер Абдумавлянович начал с перечисления основных событий в молекулярной биологии. Без прошлого нет будущего. Настоящее и будущее молекулярной биологии основывается на великих открытиях: в 1865 Gregor Mendel открыл основные правила наследования признаков у гороха. Каждый организм имеет две альтернативные наследственные единицы определяющие признак (доминантный признак v.s. рецессивный признак). 1902 - Emil Hermann Fischer получил Нобелевскую премию: аминокислоты соединяются и формируют белки. 1911 – Thomas Hunt Morgan открыл гены в хромосомах, являющиеся дискретными единицами наследственности. 1911 Pheobus Aaron Theodore Levene изучил ДНК и РНК, в 1952 – Alfred Hershey и Martha Chase генетическая информация о белках находится в ДНК, 2001 Международный проект «Геном человека» опубликовал первый черновой вариант генома, 2003 Завершен «Геном человека», прочитан геном мыши, 2009-новейший метод секвенирования в реальном времени. Далее Алишер



Абдумавлянович кратко резюмировал существующие методы молекулярной биологии и их роль в исследованиях биоразнообразия ГРР.

Третья лекция была посвящена методу секвенирования ДНК и анализу нуклеотидных последовательностей. Лекция включила в себя такие подтемы, как история секвенирования, методы секвенирования, оборудование, особенности секвенирования оптимизация и выявление проблем (Приложение 7).

В первую очередь, Алишер Абдумавлянович остановился на истории развития и становления метода секвенирования нуклеотидной последовательности дезоксирибонуклеиновой кислоты. Он указал на то, что история секвенирования насчитывает множество открытий и множество талантливых учёных, внесших свой вклад: 1953 г. – Френсис Крик и Джеймс Уотсон открыли двойную спираль ДНК, 1970 г. – Даниель Натанс и Гамильтон Смит открыли ферменты рестрикции, 1977 г. - Вальтер Гилберт и Аллен Максам – секвенирование ДНК при помощи химического расщепления, 1977 г. – Фред Сэнгер – секвенирование ДНК при помощи ди-деокситерминирующих нуклеотидов, 1985 г. Кэри Мюллис – ПЦР, 1986 г. – Лерой Худ – автоматическое секвенирование и так далее. Основным принципом реакции секвенирования является разделение одноцепочечной ДНК. Анализ результатов секвенирования проводится в несколько этапов: Определение интересующего региона, проведение стандартной ПЦР (амплификация региона), очистка продукта ПЦР.

Сиквесная реакция состоит из очистки продуктов сиквенса, электрофореза, анализа и расшифровки результатов. Очистку продуктов сиквенса можно производить на агарозном геле, а также через колонки с адсорбентом. Прямое секвенирование может быть использовано только с единичным ПЦР продуктом

- ПЦР проведена с минимальной концентрацией праймеров и dNTPs ( $0.2 \mu\text{M}$  и  $100 \mu\text{M}$ , соответственно).
- Аликвота ПЦР разводится (от 1/5 до 1/10 раз)

Алишер Абдумавлянович также кратко остановился на описании генетического анализатора ABI PRISM® 3130 и 3130xl.

### **Третий день тренинга, 25 ноября 2009 г.**

С 25 по 27 ноября тренинг проводился в самом тренинг центре геномных технологий Института генетики и экспериментальной биологии растений Академии наук Республики Узбекистан.

В первый день участники тренинга ознакомились с лабораториями центра, учёными-исследователями, ведущими работы в различных направлениях молекулярной биологии и генетики растений, а также с инструкторами, которые будут продолжать тренинг.

Первая лекция была проведена ведущим научным сотрудником центра геномных технологий Мавляновым Гафуром Турдиевичем. Его лекция была посвящена технике безопасности в лабораториях Центра геномных технологий. Так как несколько занятий тренинга планировалось посвятить лабораторным занятиям и практической работе, эта лекция ознакомила участников тренинга с правилами поведения в лабораториях и подготовила к выполнению некоторых практических работ в условиях лаборатории (Приложение 8).

Далее старший научный сотрудник центра геномных технологий, кандидат биологических наук Буриев Забардаст Таджибаевич провёл практическое занятие по методу секвенирования, к которому участники тренинга были подготовлены Абдуллаевым Алишером Абдумавляновичем.

Младший научный сотрудник Центра геномных технологий Эгамбердиев Шароф Шухратович, а также старший научный сотрудник Центра Шерматов Шухрат Эргашевич на практике продемонстрировали методы подготовки биологического материала для дальнейшего его использования в исследованиях (Приложение 10). Участникам тренинга представилась возможность самостоятельно подготовить материал для дальнейшего его использования при выделении ДНК, а также для проведения секвенирования дидоксирибонуклеионовой кислоты.

В этот же день старший научный сотрудник Центра Шерматов Шухрат Эргашевич прочёл лекции, посвящённые методам выделения ДНК из биологического материала (Приложение 9), которые явились теоретическим подкреплением практических работ, проведённых в этот день.

#### **Четвёртый день тренинга, 26 ноября 2009 г.**

Работа четвёртого дня тренинга началась с лекции старшего научного сотрудника, доктора биологических наук Одиловой Азоды Тишабаевны о принципах проведения электрофореза ДНК в агарозном геле (Приложение 12). Теоретическое введение предшествовало практическому занятию по выделению ДНК. Она проинформировала о том, что биологические макромолекулы - белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды – находятся в растворе в виде частиц, которые по своим размерам соответствуют коллоидным частицам. Они несут определённый электрический заряд благодаря наличию групп, способных к электролитической диссоциации. Так, в случае нуклеиновых кислот заряд их определяется диссоциацией фосфатных групп, поэтому ДНК в нейтральных и щелочных средах заряжены отрицательно. Различия в подвижности частиц служат основой для разделения смесей веществ в аналитических или препаративных целях. Определение электрофоретической подвижности используется также для характеристики веществ. Электрофорез в агарозном геле – стандартный метод, используемый для разделения, идентификации и очистки фрагментов ДНК.

Азода Тишабаевна отметила, что благодаря доступности реагентов, сравнительной простоте и не дороговизне оборудования, возможности получить достаточно большую информацию даже из небольшого количества неочищенного материала, метод электрофореза ДНК в горизонтальных пластинках агарозного геля находит все более широкое применение в молекулярной генетике и в других областях биохимии.

Далее участники тренинга имели возможность наблюдать за проведением электрофореза ДНК, в процессе подготовки которого они сами принимали участие.

Далее старший научный сотрудник Центра геномных технологий Абдуллаев Алишер Абдумавлянович прочитал лекции, посвящённые ПЦР анализу. Он затронул историю открытия и разработки метода ПЦР, рассказал об оборудовании, которое применяется для проведения ПЦР анализа, кратко остановился на компонентах реакции, условиях термоциклирования и особенностях дизайна праймеров. Особенное внимание было уделено возможностям по оптимизации реакции, выявлению и устранению проблем, которые при этом могут возникнуть. Практические работы по ПЦР реакции были проведены младшим научным сотрудником центра геномных технологий Эгамбердиевым Шарофом Шухратовичем и старшим научным сотрудником Центра Шерматовым Шухратом Эргашевичем.

#### **Пятый день тренинга, 27 ноября 2009 г.**

Последний день начался с практического занятия, который проводили младший научный сотрудник центра геномных технологий Эгамбердиев Шароф Шухратович и старший научный

сотрудник Центра Шерматов Шухрат Эргашевич. Практическая работа была посвящена анализу ПЦР продуктов. Изложение практической занятий приведено в Приложении 11.

Далее страший научный сотрудник Центра Абдуллаев Алишер Абдумавлянович прочитал лекции по применению ДНК маркеров для изучения геномов. Он остановился подробнее на типах маркеров (RFLP, AFLP, RADP, SSR, EST и т.д.) и их получении.

Руководитель Центра геномных технологий Абдурахманов Ибрагим Юлчиевич ознакомил участников тренинга с биоинформатикой и компьютерными программами, применяемыми для анализа геномного материала. Кроме того, он остановился на принципах статистического анализа. Ибрагим Юлчиевич рассказал о понятиях генетическое расстояние, сцепление генов QTL анализ и принципах LD (Linkage disequilibrium) анализа. Он указал на возможность применения биоинформатических Интернет ресурсов в исследованиях ГРР.

Ибрагим Юлчиевич, прежде всего, ознакомил с термином «биоинформатика». Он указал на то, что биоинформатика является дисциплиной, которая включает в себя введение информации в электронный формат, её хранение и использование в исследованиях таких макромолекул, как ДНК и РНК, а также белки. Эта дисциплина будет способствовать пониманию молекулярного механизма функционирования этих макромолекул.

Он отметил, что существенно важным для учёного, который хочет овладеть биоинформатикой, является его умение работать на компьютере, биологические знания и владение английским языком.

Ибрагим Юлчиевич остановился на основных событиях молекулярной биологии, а именно, на применении молекулярных маркеров в исследованиях биоразнообразия ГРР. Он остановился на примере применения молекулярного баркодера для проведения картирования генома и его паспортизации. Презентация И.Ю. Абдурахманова «Биоинформатика и компьютерные программы для анализа геномного материала (Основы). Статистический анализ. Генетическое расстояние, сцепление генов qtl анализ. LD (linkage disequilibrium) анализ. Биоинформатические интернет ресурсы» приложена в Приложении 13

После окончания лекции доктор Абдурахманов поблагодарил участников тренинга за внимание и выразил свою надежду на то, что знания, опыт и умения, которые старались передать участникам тренинга, будут им полезны в будущем и будут способствовать развитию биологической науки в их странах на пользу соотечественников и на пользу всего мирового сообщества.

Участники тренинга поблагодарили инструкторов и организаторов тренинга и отметили хороший уровень его проведения.

По результатам тренинга была проведена оценка, которая выявила слабые и сильные стороны проведённого тренинга. Все участники отметили высокий уровень подготовки специалистов как в теоретической, так и практической областях молекулярной биологии. Было отмечено, что все лабораторные работы проводились на оборудовании самого высокого класса. Однако, были выявлены и слабые стороны тренинга, а именно, не правильное распределение времени на теоретические занятия и практические работы. Участники тренинга предложили проведение теоретических занятий в промежутках времени между практическими, так как практические работы требуют некоторого времени. Анализ результатов оценки проведения тренинга представлена в Приложении 14.

После тренинга всем участникам были вручены сертификаты об успешном прохождении курса по применению молекулярных маркеров в оценке биоразнообразия ГРР, которые были вручены Региональным Координатором проекта Турдиевой Мухаббат Кузиевной и Национальным Координатором проекта Кайимовым Абдихалил Каюмовичем.



Проект Bioversity International/UNEP-GEF

“*In situ*/On farm сохранение и использование агробиоразнообразия  
(плодовые культуры и их дикие сородичи) в Центральной Азии”

РЕГИОНАЛЬНЫЙ ТРЕНИНГ

ОБНАВЛЕНИЮ ТЕХНОЛОГИИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ В ОЦЕНКЕ РАЗНООБРАЗИЯ  
ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ РАСТЕНИЙ

23-27 ноября 2009 г.  
г. Ташкент, Узбекистан

СПИСОК УЧАСТНИКОВ

Место работы	Должность	Адрес	Контактные адреса
Центр Геномных Технологий Института генетики и экспериментальной биологии растений Академии наук Республики Узбекистан	Руководитель ЦГТ ИГиЭБР АН РУз, ведущий научный сотрудник	111126, Узбекистан Ташкентский р-н, Ташкентская обл., п. Юкори Юз	Тел.: +99871-2642223 / 2621832 Факс: +99871-2642230 E-mail: <a href="mailto:ibrokhim_a@yahoo.com">ibrokhim_a@yahoo.com</a>
Центр Геномных Технологий Института генетики и экспериментальной биологии растений Академии наук Республики Узбекистан	Ведущий научный сотрудник.	111126, Узбекистан Ташкентский р-н, Ташкентская обл., п. Юкори Юз	Тел.: +99871-2642223/ 2629965 Факс: +99871-2642230 E-mail: <a href="mailto:inst@gen.org.uz">inst@gen.org.uz</a>
Центр Геномных Технологий Института генетики и экспериментальной биологии растений Академии наук Республики Узбекистан	Ведущий научный сотрудник.	111126, Узбекистан Ташкентский р-н, Ташкентская обл., п. Юкори Юз	Тел.: +99871-2642223/ 2629965 Факс: +99871-2642230 +99897- 3370637 (моб) E-mail: <a href="mailto:shahlo_ut@yahoo.com">shahlo_ut@yahoo.com</a>
Центр Геномных Технологий	Заведующий	111126, Узбекистан	Тел: +99871-2690097

Место работы	Должность	Адрес	Контактные адреса
Института генетики и экспериментальной биологии растений Академии наук Республики Узбекистан	лабораторией гермоплазмы хлопчатника, старший научный сотрудник.	Ташкентский р-н, Ташкентская обл., п. Юкори Юз	+99897-159-09-83 (моб.) Fax: +99871-264-22-30 E-mail: <a href="mailto:abdullaev_alisher@yahoo.com">abdullaev_alisher@yahoo.com</a>
Центр Геномных Технологий Института генетики и экспериментальной биологии растений Академии наук Республики Узбекистан	Старший научный сотрудник.	111126, Узбекистан Ташкентский р-н, Ташкентская обл., п. Юкори Юз	Тел.: +99871-2642223 / 2642390 Факс: +99871-2642230 E-mail: <a href="mailto:inst@gen.org.uz">inst@gen.org.uz</a>
Центр Геномных Технологий Института генетики и экспериментальной биологии растений Академии наук Республики Узбекистан	Старший научный сотрудник.	111126, Узбекистан Ташкентский р-н, Ташкентская обл., п. Юкори Юз	Тел.: +99871-2642223 / 2642390 Факс: +99871-2642230 E-mail: <a href="mailto:inst@gen.org.uz">inst@gen.org.uz</a>
Центр Геномных Технологий Института генетики и экспериментальной биологии растений Академии наук Республики Узбекистан	Научный сотрудник.	111126, Узбекистан Ташкентский р-н, Ташкентская обл., п. Юкори Юз	Тел.: +99871-2642223 / 2642390 Факс: +99871-2642230 E-mail: <a href="mailto:inst@gen.org.uz">inst@gen.org.uz</a>
Центр Геномных Технологий Института генетики и экспериментальной биологии растений Академии наук Республики Узбекистан	Младший научный сотрудник.	111126, Узбекистан Ташкентский р-н, Ташкентская обл., п. Юкори Юз	Тел.: +99871-2642223 / 2642390 Факс: +99871-2642230 E-mail: <a href="mailto:inst@gen.org.uz">inst@gen.org.uz</a>
Казахский Научно-исследовательский институт плодоводства и виноградарства	Заведующий лабораторией биотехнологии	Казахстан, г. Алматы, ул. Гагарина, 238А	Тел: +8727-2498821 (служ) Тел.: +8701-7763568 (моб) E-mail: <a href="mailto:dolgikhsvet@mail.ru">dolgikhsvet@mail.ru</a>
Институт биологии и биотехнологии растений	Научный сотрудник лаборатории криосохранения	Казахстан, г. Алматы, ул. Тимирязева, 45	Тел.: +8702-4523731 (моб) Тел: +8702-3947268 (служ) E-mail:

Место работы	Должность	Адрес	Контактные адреса
	гермоплазмы		<a href="mailto:moldir_18_88@mail.ru">moldir_18_88@mail.ru</a>
Институт биологии и биотехнологии растений	Младший научный сотрудник	Казахстан, г. Алматы, ул. Тимирязева, 45	Тел.: +8727-3947268 (служ) E-mail: <a href="mailto:karla_78@mail.ru">karla_78@mail.ru</a>
Кыргызский Аграрный Университет им. К.И. Скрябина	Старший преподаватель кафедры лесоводства	720005 Кыргызстан г. Бишкек ул. Медерова, 6	Тел.: + 996312-547894 Тел.: 0543 078819 (моб) Тел.: 0777 200728 (моб)
Институт биотехнологии растений Национальной Академии Наук Республики Кыргызстан.	Младший научный сотрудник лаборатории биотехнологии растений и грибов	720071 Кыргызстан г. Бишкек пр. Чуй, 265 а	Тел.: 0555609 908 (моб) E-mail <a href="mailto:mambetov84@list.ru">mambetov84@list.ru</a>
Институт Леса им. П.А. Ганна Национальной Академии Наук Республики Кыргызстан.	Младший научный сотрудник лаборатории лесной экологии	Кыргызстан, г. Бишкек Карагачевая роща, 15	Тел. : + 999312-326753
Национальный Республиканский Центр генетических ресурсов Таджикской Академии Сельскохозяйственных Наук	Старший научный сотрудник	Таджикистан, г. Душанбе, ул. Н. Карабоева, д. 72/1, кв. 15.	Тел.: +99291-8358335 (моб)
Института садоводства и овощеводства Таджикской Академии Сельскохозяйственных Наук	Аспирант отдела питомниководства	Таджикистан, г. Душанбе, ул. Мирали 1, д. 4, кв.4.	Тел.: +99290-1105010 (моб)
Национальный институт пустынь, растительного и животного мира	Научный сотрудник отдела лесов и пастбищ	Туркменистан, г. Ашгабат, ул. Битарап, 15	Тел.: +99312-352158 Факс: +99312-353716
Институт генетики и экспериментальной биологии растений Академии Наук Республики Узбекистан	Заведующий лабораторией экологической генетики	Ташкентская область, Ташкентский район, ул. Б. Ойметова, д. 6А	Тел.99871-2642223 (служ)

Место работы	Должность	Адрес	Контактные адреса
Институт генетики и экспериментальной биологии растений Академии Наук Республики Узбекистан	Младший научный сотрудник	Ташкентская область, Кибрайский район, пос. Юкори – Юз, дом 7.. кв. 5.	Тел.: +99890-4006689 (моб)
Bioversity International	Региональный Координатор	Bioversity International-CWANA sub-regional office in Central Asia P.O. Box 4564 Tashkent 100000	Тел: +99871-2372171 Факс: +99871-1207120 E-mail: <a href="mailto:m.turdieva@cgiar.org">m.turdieva@cgiar.org</a>
Институт генетики и экспериментальной биологии растений Академии Наук Республики Узбекистан	Исполняющий обязанности директора	111126, Узбекистан Ташкентский р-н, Ташкентская обл., п. Юкори Юз	Тел.: +99871-2642223/ 2642390 Факс: +99871-2642230 E-mail: <a href="mailto:inst@gen.org.uz">inst@gen.org.uz</a>
Проект Bioversity International/UNEP-GEF “ <i>In situ</i> /On farm сохранение и использование агробιοразнообразия (плодовые культуры и их дикие сородичи) в Центральной Азии”	Национальный Координатор проекта	111126, Узбекистан Ташкентский р-н, Ташкентская обл., п. Юкори Юз	Тел.:+99890-7271506 (моб.) +99871-2257250 E-mail: <a href="mailto:abd_uzbek@mail.ru">abd_uzbek@mail.ru</a>
Институт генетики и экспериментальной биологии растений Академии Наук Республики Узбекистан	Руководитель по мониторингу Международных грантов	111126, Узбекистан Ташкентский р-н, Ташкентская обл., п. Юкори Юз	Тел.: +99871-2642223/ 2642390 +99890-4574621 (моб.) Факс: +99871-2642230 E-mail: <a href="mailto:inst@gen.org.uz">inst@gen.org.uz</a>



Проект Bioversity International/UNEP-GEF  
 “In situ/On farm сохранение и использование агробιοразнообразия  
 (плодовые культуры и их дикие сородичи) в Центральной Азии”

РЕГИОНАЛЬНЫЙ ТРЕНИНГ

ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ТЕХНОЛОГИИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ В ОЦЕНКЕ  
 РАЗНООБРАЗИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ РАСТЕНИЙ

23-27 ноября 2009 г  
 г. Ташкент, Узбекистан

ПРОГРАММА ТРЕНИНГА

Дата и время	Тема	Ф.И.О. инструктора
<b>23 НОЯБРЯ 2009 г.</b>		
9.00-9.15	<b>Приветственное слово и открытие тренинга</b> <b>С.К. Бобоев</b> , и.о. генерального директора Института генетики и экспериментальной биологии растений Академии Наук Республики Узбекистан (ИГиЭБР АН РУз) <b>М.К. Турдиева</b> , Региональный координатор проекта	
9.15-10.00	<b>Представление инструкторов и слушателей.</b> <b>Ознакомление с целями тренинга.</b> Ознакомление с Центром геномных технологий Института генетики и экспериментальной биологии растений Академии Наук Республики Узбекистан	<b>Абдурахмонов И.Ю.</b> , д.б.н., ведущий научный Центра Геномных Технологий ИГиЭБР
10.00-12.00	<b>Лекция «Основы молекулярной генетики»:</b> - Структура ДНК - Принцип комплиментарности - Репликация - Молекулярная структура гена.	<b>Турдикулова Ш.У.</b> , д.б.н., ведущий научный сотрудник Центра Геномных Технологий ИГиЭБР
12.00-13.00	Продолжение <b>лекции «Основы молекулярной генетики»:</b> - Структура ДНК - Принцип комплементарности - Репликация - Молекулярная структура гена.	<b>Турдикулова Ш.У</b> д.б.н., ведущий научный сотрудник Центра Геномных Технологий ИГиЭБР
13.00-14.00	<i>Обед</i>	
13.00-14.00	Продолжение <b>лекции «Основы молекулярной генетики»:</b>	<b>Турдикулова Ш.У.</b> , д.б.н.,

Дата и время	Тема	Ф.И.О. инструктора
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Структура ДНК</li> <li>- Принцип комплементарности</li> <li>- Репликация</li> <li>- Молекулярная структура гена.</li> </ul>	ведущий научный сотрудник Центра Геномных Технологий ИГиЭБР
14.00-18.00	<p><b>Лекция</b> «Транскрипция, трансляция и биосинтез белка»</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- От гена к белку</li> <li>- Генетический код</li> </ul> <p>Синтез белка</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- РНК – виды РНК</li> <li>- матричная РНК</li> <li>- транспортная РНК</li> <li>- трансляция</li> </ul> <p>Структура белка</p>	<b>Турдикулова Ш.У.,</b> д.б.н., ведущий научный сотрудник Центра Геномных Технологий ИГиЭБР
<b>24 НОЯБРЯ 2009 г.</b>		
9.00-11.00	<p><b>Лекция</b> «Роль молекулярной генетики в изучении биологических систем: Оценка межвидового разнообразия сельскохозяйственных культур с использованием технологии молекулярных маркеров»</p>	<b>Абдуллаев А.А.,</b> к.б.н., старший научный сотрудник Центра Геномных Технологий ИГиЭБР
11.00-13.00	<p><b>Лекция</b> «Введение в молекулярную генетику и ее методологию»</p>	<b>Абдуллаев А.А.,</b> к.б.н., старший научный сотрудник Центра Геномных Технологий ИГиЭБР
13.00-14.00	<i>Обед</i>	
14.00-18.00	<p><b>Лекция</b> «Секвенирование ДНК, анализ нуклеотидных последовательностей»:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- История</li> <li>- Методы секвенирования</li> <li>- Оборудование</li> <li>- Особенности секвенирования, оптимизация, выявление проблем.</li> </ul>	<b>Абдуллаев А.А.,</b> к.б.н., старший научный сотрудник Центра Геномных Технологий ИГиЭБР
<b>25 НОЯБРЯ 2009 г.</b>		
9.00-10.00	Техника безопасности в лабораториях Центра геномных технологий	<b>Мавлянов Г.Т.,</b> к.б.н., ведущий научный сотрудник Центра Геномных Технологий ИГиЭБР
10.00-13.00	<b>Практические занятия</b> по секвенированию	<b>Буриев З.Т.,</b> к.б.н., старший научный

Дата и время	Тема	Ф.И.О. инструктора
		сотрудник Центра Геномных Технологий ИГиЭБР <b>Абдуллаев А.А.</b> , к.б.н., старший научный сотрудник Центра Геномных Технологий ИГиЭБР
13.00-14.00	<i>Обед</i>	
14.00 – 16.00	<b>Практические занятия</b> по подготовке биологического материала, выделению ДНК из клеток бактерий и выделению ДНК из растений	<b>Эгамбердиев Ш.Ш.</b> , младший научный сотрудник Центра Геномных Технологий ИГиЭБР <b>Шерматов Ш.Э.</b> , к.б.н., старший научный сотрудник Центра Геномных Технологий ИГиЭБР
16.00-18.00	<b>Лекция</b> «Методы выделения ДНК из биологических материалов».	<b>Шерматов Ш.Э.</b> , к.б.н., старший научный сотрудник Центра Геномных Технологий ИГиЭБР
<b>26 НОЯБРЯ 2009 г.</b>		
9.00-11.00	<b>Лекция</b> «Анализ ДНК (качественный и количественный). Спектрофотометрический анализ»	<b>Одилова А.Т.</b> , д.б.н. научный сотрудник Центра Геномных Технологий ИГиЭБР
11.00-13.00	<b>Практические занятия</b> по электрофоретическому анализу выделенной ДНК в агарозном геле	<b>Одилова А.Т.</b> , научный сотрудник Центра Геномных Технологий ИГиЭБР
13.00-14.00	<i>Обед</i>	

Дата и время	Тема	Ф.И.О. инструктора
14.00-16.00	<b>Лекция «Теоретические основы метода ПЦР анализа»:</b> - История ПЦР - Оборудование - Компоненты реакции - Условия термоциклирования - Особенности дизайна праймеров - Оптимизация реакции, выявление и устранение проблем	<b>Абдуллаев А.А.</b> , к.б.н., старший научный сотрудник Центра Геномных Технологий ИГиЭБР
16.00-18.00	<b>Практические занятия</b> по постановке ПЦР на выделенной ДНК	<b>Эгамбердиев Ш.Ш.</b> , младший научный сотрудник Центра Геномных Технологий ИГиЭБР <b>Шерматов Ш.Э.</b> , к.б.н., старший научный сотрудник Центра Геномных Технологий ИГиЭБР
<b>27 НОЯБРЯ 2009 г.</b>		
9.00-11.00	<b>Практические занятия</b> по анализу ПЦР продуктов	<b>Эгамбердиев Ш.Ш.</b> , младший научный сотрудник Центра Геномных Технологий ИГиЭБР <b>Шерматов Ш.</b> , к.б.н., старший научный сотрудник Центра Геномных Технологий ИГиЭБР
11.00-13.00	<b>Лекция «ДНК маркеры для изучения геномов. Типы молекулярных маркеров (RFLP, AFLP, RADP, SSR, EST и т.д.). Получение молекулярных маркеров»</b>	<b>Абдуллаев А.А.</b> , к.б.н., старший научный сотрудник Центра Геномных Технологий ИГиЭБР
13.00-14.00	<i>Обед</i>	
14.00-16.00	<b>Лекция «Биоинформатика и компьютерные программы для анализа геномного материала (основы). Статистический анализ. Генетическое расстояние, сцепление генов QTL анализ</b>	<b>Абдурахманов И.Ю.</b> , д.б.н., ведущий научный сотрудник Центра Геномных Технологий ИГиЭБР



Дата и время	Тема	Ф.И.О. инструктора
	LD (Linkage disequilibrium) анализ Биоинформатические Интернет ресурсы»	
16.00-18.00	Заключительное обсуждение и оценка тренинга	<b>Все инструктора тренинга</b>
18.00-19.00	Вручение сертификатов Торжественный ужин	

## ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ

*Турдикулова Ш.У.*

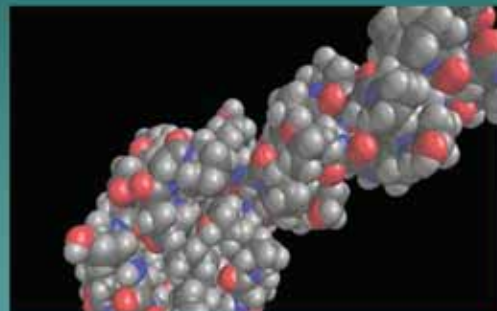
д.б.н., ведущий научный сотрудник  
Центра Геномных Технологий ИГиЭБР АН РУз

### Транскрипция, трансляция и биосинтез белка

### От гена к белку

Структура белка:

- ◆ Первичная
- ◆ Вторичная
- ◆ Третичная
- ◆ четвертичная



Информация о структуре белка  
записана в ДНК

## Генетический код

- ◆ Последовательность из трех нуклеотидов, соответствующая одной аминокислоте, называется кодоном.

64 – кодона

61 – соответствует 20 аминокислотам

3 – стоп кодона

## Генетический код

Генетический код

		ВТОРАЯ БУКВА				
		У	Ц	А	Г	
ПЕРВАЯ БУКВА	У	УУУ <i>Phe</i>	УЦУ <i>Ser</i>	УАУ <i>Tyr</i>	УГУ <i>Cys</i>	У
		УУЦ <i>Phe</i>	УУЦ <i>Ser</i>	УАЦ <i>Tyr</i>	УГЦ <i>Cys</i>	Ц
		УУА <i>Leu</i>	УЦА <i>Ser</i>	УАА <i>Stop</i>	УГА <i>Stop</i>	А
		УУГ <i>Leu</i>	УЦГ <i>Ser</i>	УАГ <i>Stop</i>	УГГ <i>Trp</i>	Г
	Ц	ЦУУ <i>Leu</i>	ЦЦУ <i>Pro</i>	ЦАУ <i>His</i>	ЦГУ <i>Arg</i>	У
		ЦУЦ <i>Leu</i>	ЦЦЦ <i>Pro</i>	ЦАЦ <i>His</i>	ЦГЦ <i>Arg</i>	Ц
		ЦУА <i>Leu</i>	ЦЦА <i>Pro</i>	ЦАА <i>Gln</i>	ЦГА <i>Arg</i>	А
		ЦУГ <i>Leu</i>	ЦЦГ <i>Pro</i>	ЦАГ <i>Gln</i>	ЦГГ <i>Arg</i>	Г
	А	АУУ <i>Ile</i>	АЦУ <i>Thr</i>	ААУ <i>Asp</i>	АГУ <i>Ser</i>	У
		АУЦ <i>Ile</i>	АЦЦ <i>Thr</i>	ААЦ <i>Asp</i>	АГЦ <i>Ser</i>	Ц
		АУА <i>Ile</i>	АЦА <i>Thr</i>	ААА <i>Lys</i>	АГА <i>Arg</i>	А
		АУГ <i>Met</i>	АЦГ <i>Thr</i>	ААГ <i>Lys</i>	АГГ <i>Arg</i>	Г
	Г	ГУУ <i>Val</i>	ГЦУ <i>Ala</i>	ГАУ <i>Asp</i>	ГГУ <i>Gly</i>	У
		ГУЦ <i>Val</i>	ГЦЦ <i>Ala</i>	ГАЦ <i>Asp</i>	ГГЦ <i>Gly</i>	Ц
		ГУА <i>Val</i>	ГЦА <i>Ala</i>	ГАА <i>Glu</i>	ГГА <i>Gly</i>	А
		ГУГ <i>Val</i>	ГЦГ <i>Ala</i>	ГАГ <i>Glu</i>	ГГГ <i>Gly</i>	Г

# Рамки считывания

для последовательности

ACGACGACGACGACGACG

возможны три рамки считывания:

ACG ACG ACG ACG ACG ACG  
CGA CGA CGA CGA CGA CGA  
GAC GAC GAC GAC GAC GAC

Thr Thr Thr Thr Thr Thr

Arg Arg Arg Arg Arg Arg

Asp Asp Asp Asp Asp Asp

# Типы генных мутаций

◆ Однонуклеотидные замены

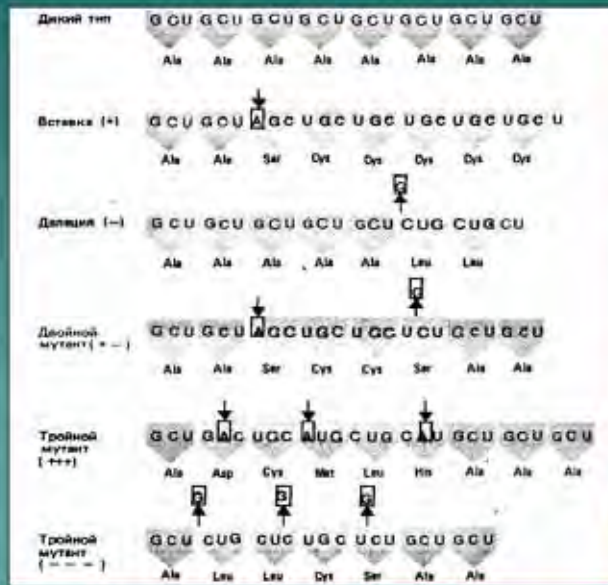
◆ Делеция – выпадение нуклеотида

◆ Инсерция – вставка лишнего нуклеотида

Сдвиг  
рамки  
считывания



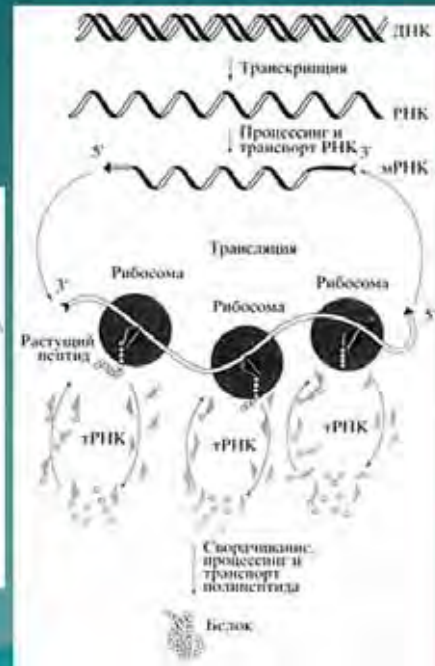
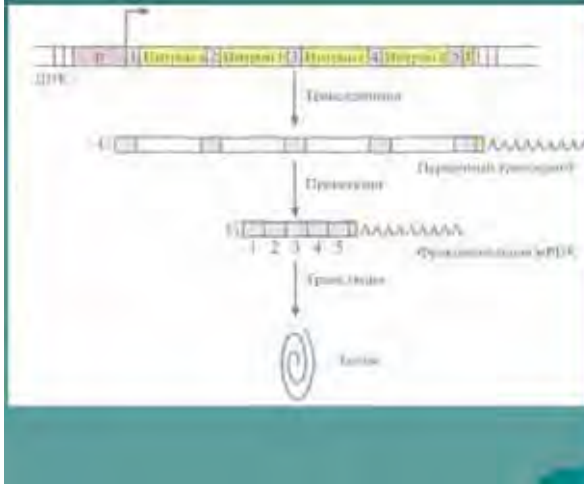
## Мутации со сдвигом рамки считывания



## Общая схема биосинтеза белка

- ◆ Транскрипция - процесс копирования генетической информации с ДНК на РНК
- ◆ Процессинг – сплайсинг
- ◆ Трансляция
- ◆ Транспортировка

# Общая схема биосинтеза белка

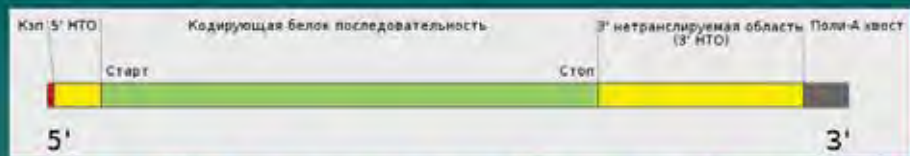


## РНК

РНК — это линейная полинуклеотидная молекула, отличающаяся от ДНК в двух отношениях. Во-первых, моносахаридом в РНК является рибоза, содержащая не одну, а две гидроксильные группы; они связаны с 2'- и 3'-атомами углерода. Во-вторых, одним из четырех оснований в РНК является урацил (U), занимающий место тимина. Большинство молекул РНК одноцепочечные, хотя часто в них имеются взаимнокомплементарные участки

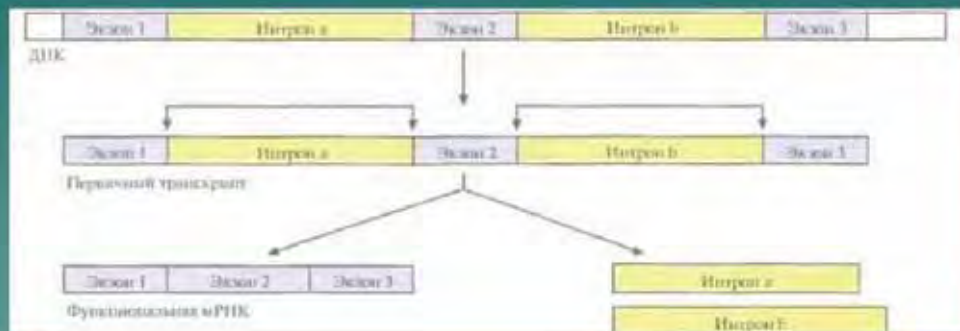
три основных типа РНК:

- ◆ информационная (мРНК)
- ◆ рибосомная (рРНК)
- ◆ транспортная (тРНК)



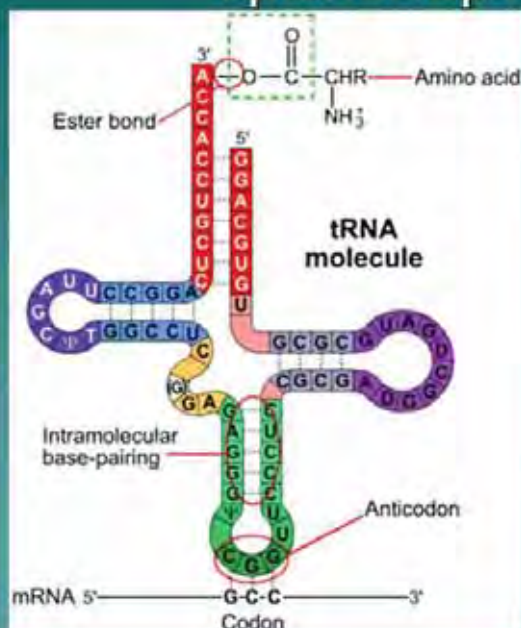
- ♦ 5' кап (или *кап*) (от *англ. cap* — шапочка) — это модифицированный **гуанидиновый нуклеотид**, который добавляется на 5' (*передний*) конец незрелой мРНК.
- ♦ Кодирующие области состоят из **кодонов** — следующих непосредственно друг за другом последовательностей из трёх нуклеотидов, каждая из которых соответствует в **генетическом коде** определенной аминокислоте или началу и концу синтеза белка. Кодирующие области начинаются со **старт-кодона** и заканчиваются одним из трёх **стоп-кодонов**.
- ♦ Нетранслируемые области — участки РНК, расположенные до **старт-кодона** и после **стоп-кодона**, которые не кодируют белок. Они называются 5'-нетранслируемая область и 3'-нетранслируемая область, соответственно.
- ♦ **3' полиадениновый хвост** - Длинная (часто несколько сотен нуклеотидов) последовательность адениновых оснований, которая присутствует на 3' «хвосте» мРНК **эукариот**, синтезируется ферментом полиаденилат-полимеразой. У высших эукариот поли-А-хвост добавляется к транскрибированной РНК, которая содержит специфическую последовательность, AAUAAA.

## м-РНК





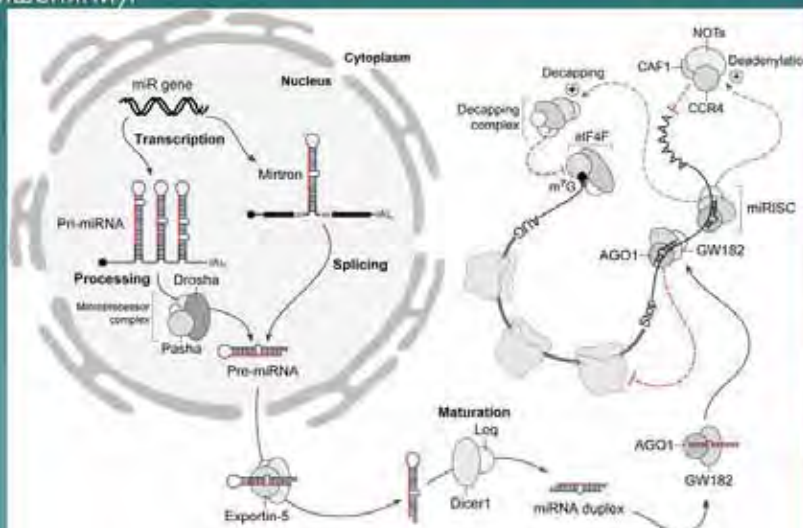
# Транспортная РНК



РНК, функцией которой является транспортировка **аминокислот** к месту **синтеза белка**.

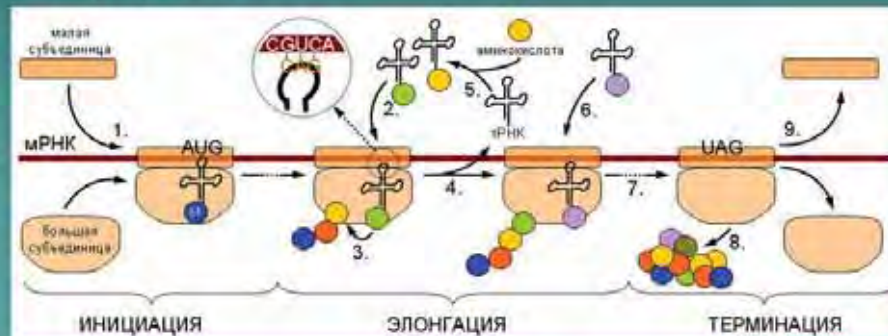
# Микро-РНК

МикроРНК (**microRNA, miRNA**) — класс **некодирующих РНК**, которые имеют длину около 22 **нуклеотидов**. Эти РНК играют важную роль в регуляции **трансляции** и **деградации мРНК**. Регуляция осуществляется путем **комплементарного** связывания микроРНК с частично комплементарными сайтами в нетранслируемых участках (UTRs) мРНК (мишенями).



# Трансляция

**Трансляцией** называют осуществляемый рибосомой синтез белка из аминокислот на матрице информационной (или матричной) РНК (иРНК или мРНК). Трансляция является финальной стадией реализации генетической информации.



# Структура белка

- ◆ **Первичная** – последовательность аминокислот в полипептидной цепи
- ◆ **Вторичная структура** — локальное упорядочивание фрагмента полипептидной цепи, стабилизированное водородными связями и гидрофобными взаимодействиями
- ◆ **Третичная структура** — пространственное строение полипептидной цепи; взаимное расположение элементов вторичной структуры, стабилизированное различными типами взаимодействий:
  - ковалентные связи (между двумя остатками цистеина — дисульфидные мостики);
  - ионные связи между противоположно заряженными боковыми группами аминокислотных остатков;
  - водородные связи;
  - гидрофильно-гидрофобные взаимодействия.
- ◆ **Четверичная структура**
  - взаимное расположение нескольких полипептидных цепей в составе единого белкового комплекса

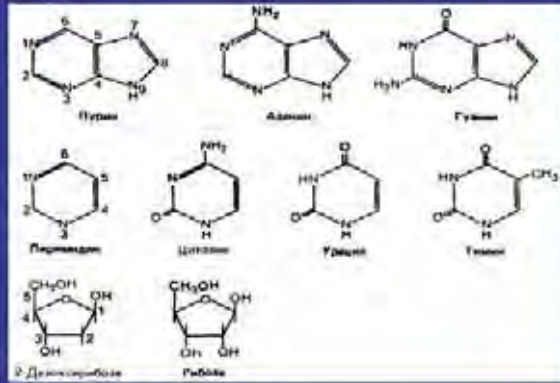
ТРАНСКРИПЦИЯ, ТРАНСЛЯЦИЯ И БИОСИНТЕЗ БЕЛКА

*Турдикулова Ш.У.*

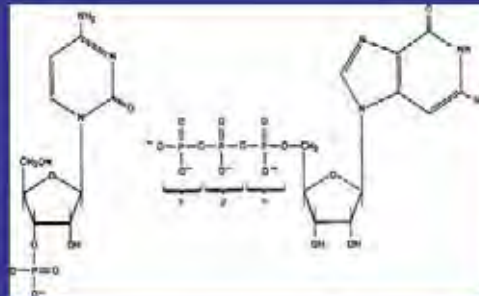
д.б.н., ведущий научный сотрудник  
Центра Геномных Технологий ИГиЭБР АН РУз



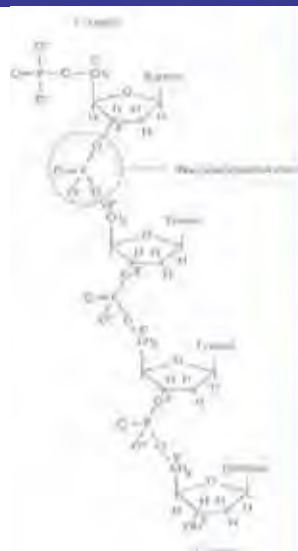




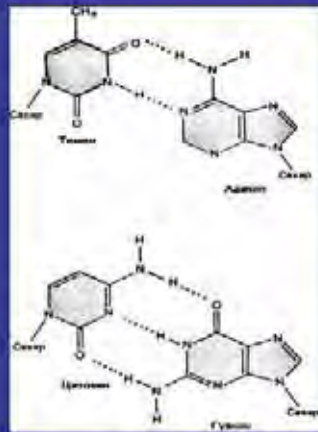
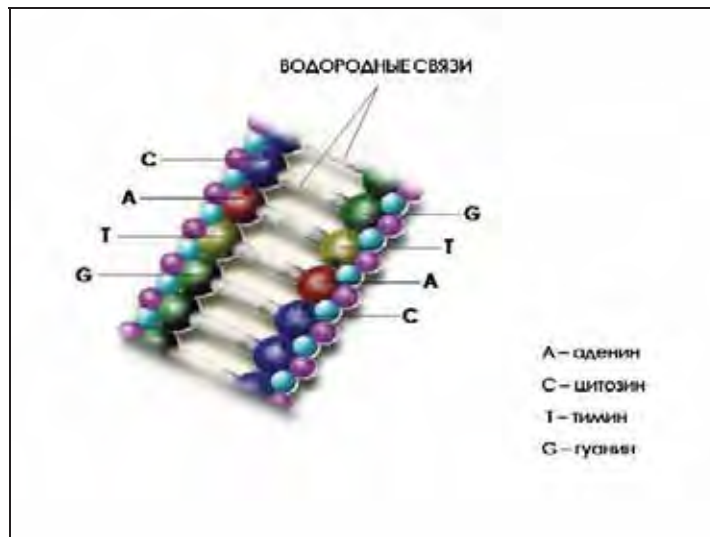
Азотистые основания делятся на два типа: пиримидиновые и пуриновые основания, называемые для краткости **пиримидины** и **пурины**. Пиримидины состоят из шестичленного кольца, а у пуринов по два конденсированных кольца: одно -пятичленное и второе -шестишленное



Нуклеиновые кислоты состоят из последовательности химически связанных **нуклеотидов**. Каждый нуклеотид содержит гетероциклическое кольцо из атомов углерода и азота (**азотистое основание**), пятиуглеродное **сахарное кольцо (пентозу)** и **фосфатную группу**



Полинуклеотидная цепь состоит из ряда (5'-3')-сахарофосфатных связей, образующих остов молекулы, к которому присоединяются азотистые основания, атом в 5'-положении одного пентозного кольца соединен с атомом в 3'-положении следующего пентозного кольца через фосфатную группу. Принято говорить, что сахарофосфатный остов состоит из (5'-3')-связей. Концевой нуклеотид на одном конце цепи имеет свободную 5'-группу, на другом конце - свободную 3'-группу. Последовательности нуклеиновых кислот принято писать именно в таком направлении, от 5'-конца к 3'-концу.



Уотсон и Крик предположили, что две полинуклеотидные цепи в ДНК не связаны ковалентно, а соединяются водородными связями, возникающими между азотистыми основаниями. На рисунке показано, что в своей обычной форме С может образовывать водородную связь специфически только с Г, тогда как А специфически соединяется только с Т.

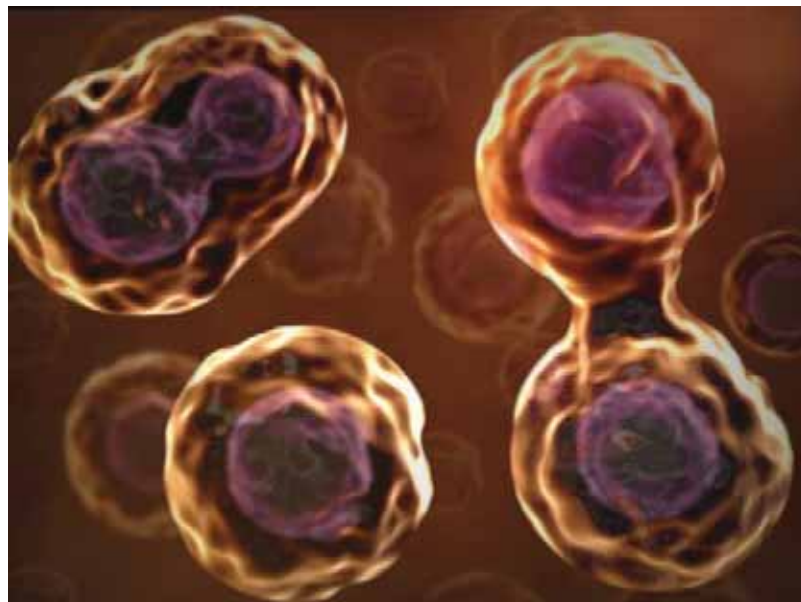
## КОМПЛЕМЕНТАРНОСТЬ

A T T C G G A T C G G A T T C C G  
 | | | | | | | | | | | | | | | |  
 T A A G C C T A G C C T A A G G C



5--TAGGCAT-3'  
3'-ATCCGTA-5'

Цели ДНК  
антипараллельны

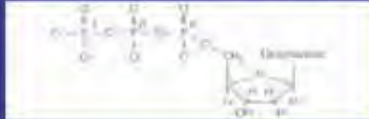


### Компоненты репликационного механизма

- Хеликаза – расплетает две комплементарные цепи ДНК
- SSB белок – препятствует реанилингу цепей ДНК
- Праймаза - синтезирует короткий олигонуклеотид – праймер (РНКовый)
- ДНК полимеразы – синтезируют комплементарную цепь ДНК на матрице одноцепочечной ДНК
- Sliding clamp - белок скользящей застёжки удерживает ДНК-полимеразу на матрице ДНК
- РНК-аза H – удаляет РНКовый праймер
- Лигаза – восстанавливает фосфодиэфирные связи между соседними нуклеотидами

# РЕПЛИКАЦИЯ

дезоксирибонуклеозид-5'- трифосфат

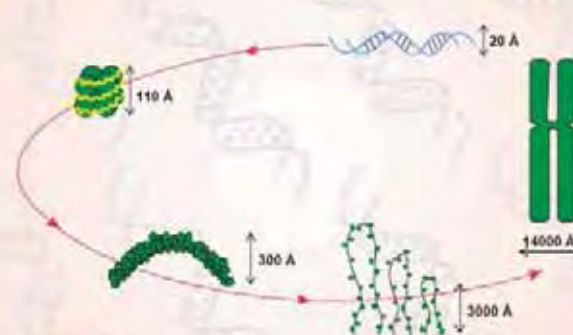


Согласно модели Уотсона—Крика, каждая цепь ДНК служит матрицей при синтезе новой комплементарной цепи, а последовательность оснований в синтезируемой (растущей) цепи задается последовательностью комплементарных оснований цепи-матрицы. Каждая мономерная единица, присоединяющаяся к растущей цепи, находится в форме дезоксирибонуклеозид-5'- трифосфата; фосфатная группа, связанная с 5'-углеродным атомом дезоксирибозы, обозначается буквой  $\alpha$ , к ней присоединены  $\beta$ -фосфат и далее —  $\gamma$ -фосфат. В ходе репликации  $\beta$ - и  $\gamma$ -фосфатные группы отщепляются в виде пирозфосфата, а  $\alpha$ -фосфатная группа связывается с 3'-ОН-группой последнего нуклеотида растущей цепи.

## Типы ДНК

- Геномная
- Плазмидная
- Цитоплазматическая
  - Митохондриальная
  - Хлоропластная
- Вирусная
- Фаговая

## Молекула ДНК: укладка в хромосому



1 М Å = ангстрем, единица длины, равная 1/10 нм

Авторские права: ИРЭГи и Корнельский Университет, 2003 г.

Основы знаний о ДНК. 5



## Молекулярная структура гена

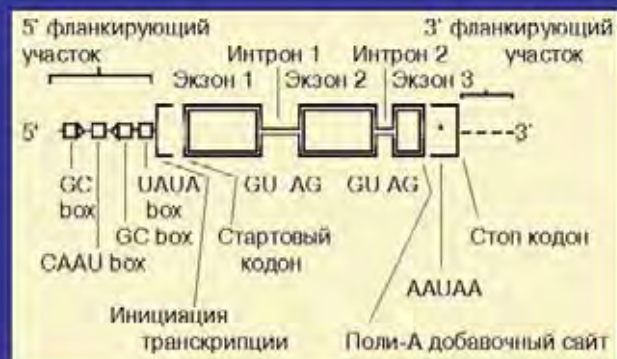
Традиционно, под геном в молекулярной биологии понимают участок ДНК кодирующий либо [белок](#), либо [молекулу РНК](#). Исследования последних лет заставили расширить этот список за счет [регуляторных генов](#) и возможно появление и других групп. И молекулярно биологическое определение гена тоже изменилось: ген - это ограниченный участок геномной ДНК (или РНК для некоторых вирусов) отвечающий за определенную и специфическую функцию.

Регуляторные гены как правило не транскрибируются. Белок-кодирующие и РНК-кодирующие транскрибируются и часто объединяются под названием "структурные гены".

## ГЕН

- фрагмент нуклеиновой кислоты, в последовательности нуклеотидов которой закодирована информация о последовательности нуклеотидов в другой нуклеиновой кислоте или аминокислотной последовательности в белке.
- наследуемая часть [генома](#), оказывающая влияние на какой-либо фенотипический признак. Эта формулировка по смыслу близка к [классическому определению](#): "один ген - один признак".
- С молекулярной точки зрения ген представляет собой специфическую нуклеотидную последовательность, транскрибируемую в РНК.

## Схема эукариотического гена



## ДНК-эукариот можно разделить на различные типы или классы:

- Однокопийные гены кодирования протеинов
- ДНК, представленная во множестве копий
- Последовательности с известной функцией
  - Кодирующие
  - Некодирующие
- Последовательности с неизвестной функцией
- Повторы (одиночные или в тандеме)
- Транспозоны

- Промежуточная ДНК

В промежуточной ДНК можно обнаружить множество повторов. Они состоят из таких же последовательностей, которые обнаруживаются на многих участках, в особенности, в центромерах и теломерах. Повторы различны по размеру, количеству и степени распространения по геному, и это делает их очень подходящими для того, чтобы их можно было рассматривать в качестве молекулярных маркеров.



**РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ В ИЗУЧЕНИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ: Оценка межвидового разнообразия сельскохозяйственных культур с использованием технологии молекулярных маркеров.**

*Абдуллаев А.А.*

к.б.н., старший научный сотрудник  
Центра Геномных Технологий ИГиЭБР АН РУз



### Генетическое разнообразие

- Генетическое разнообразие связано с изменчивостью в:
  - последовательности ДНК,
  - количестве ДНК в одной клетке, или
  - количестве и структуре хромосом.
- Генетическое разнообразие является результатом отбора, мутации, миграции, генетического дрейфа и/или рекомбинации генов. Все эти явления вызывают изменения в частоте генов и аллелей, и приводят к эволюции популяций

4

ИГиЭБР АН РУз, ул. Ташкентская 4, 100125, Ташкент, Узбекистан



## Генетические ресурсы растений

- Генетические ресурсы растений включают в себя существующее генетическое разнообразие, представляющую собой потенциальную ценность для будущего всего человечества.
- Генетические ресурсы растений включают в себя:
  - Дикорастущие виды растений
  - Дикорастущих сородичей культурных растений
  - Традиционные и/или стародавние сорта
  - Районированные сорта, гибриды или селекционные линии
- Генетические ресурсы растений необходимо сохранять для их возможного использования в будущем

© 2009 Институт Генетики и ЭБР «ИГЭС, Центр Генетика Технологии»



## Измерение генетической изменчивости

- Для эффективного сохранения и использования генетических ресурсов растений требуется тщательная оценка генетической изменчивости, которой они обладают.
- Генетическую изменчивость можно измерить на двух уровнях:
  - Фенотипа – сочетания индивидуальных признаков, определяющихся генотипом и его взаимодействием с окружающей средой
  - Генотипа – специфической генетической структуры организма

© 2009 Институт Генетики и ЭБР «ИГЭС, Центр Генетика Технологии»



## Генетические маркеры: описание

---

- Генетические маркеры определяют характеристики фенотипа и/или генотипа особи
  
- Их наследование можно проследить через поколения



## Генетические маркеры: типы

---

- Морфологические признаки
  
- Молекулярные маркеры:
  1. Белковые (биохимические) маркеры
  2. ДНК маркеры



## Морфологические признаки

- **Преимущества:**
  - Легко доступны
  - Обычно требуется только простое оборудование
  - Являются наиболее прямым измерением фенотипа
- **Недостатки:**
  - Необходимость специальных знаний о культуре и/или виде
  - Подвержены воздействию окружающей среды
  - Ограниченность в количестве

7

© 2009 Институт Генетики и ЭМБ/ РАН/СЗ, Центр Генетики Гусокина



## Белковые (биохимические) маркеры

- Основаны на свойстве перемещения протеинов, что позволяет выделять их посредством электрофореза.
- Обнаруживаются посредством специальных гистохимических анализов
- **Преимущества:**
  - Требуют относительно простое оборудование
  - Являются надежным дополнением к морфологической оценке изменчивости
- **Недостатки:**
  - Подвержены влиянию окружающей среды
  - Ограниченность в количестве

8

© 2009 Институт Генетики и ЭМБ/ РАН/СЗ, Центр Генетики Гусокина





## ДНК (молекулярные) маркеры

- Полиморфизмы, обнаруженные в последовательности ДНК ядра и органелл
- Преимущества:
  - Не подвержены воздействиям окружающей среды
  - Потенциально не ограничены в количестве
  - Объективно измеряют величину изменчивости
  -
- Основным недостатком является необходимость в использовании технически более сложного оборудования.

9

© 2009 Институт Геномики и СБП АН РБ, Центр Геномных Технологий

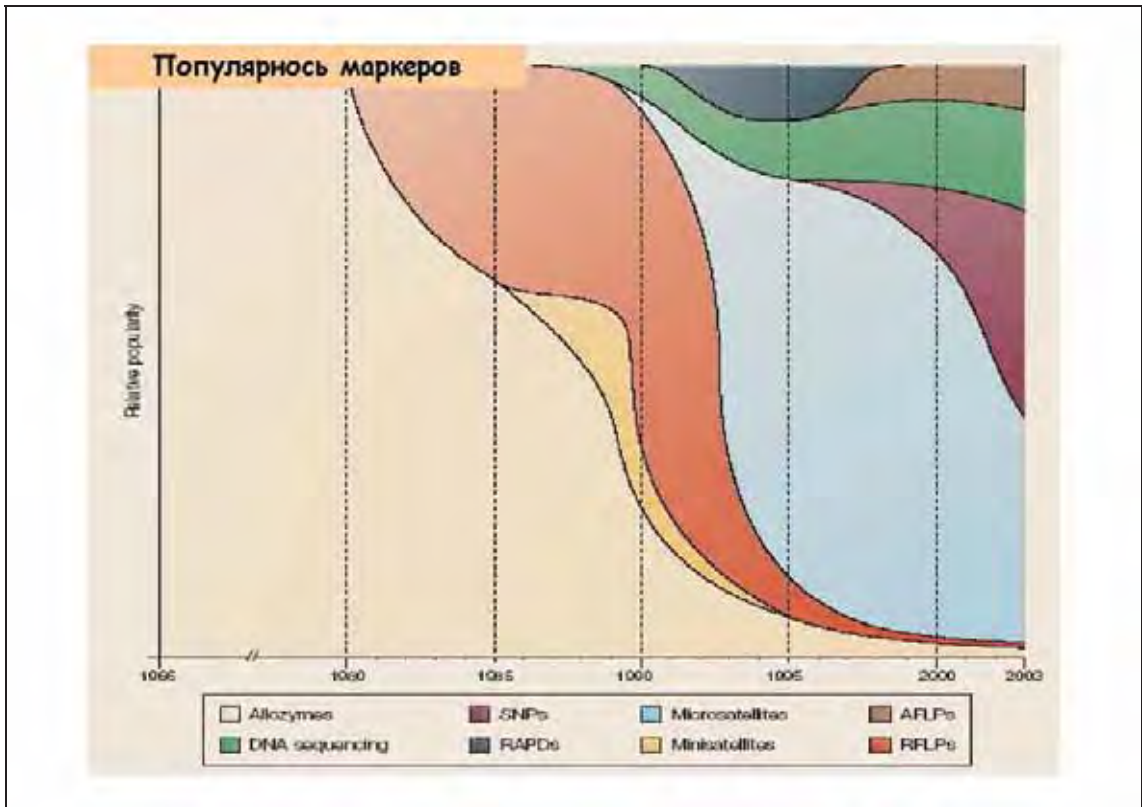
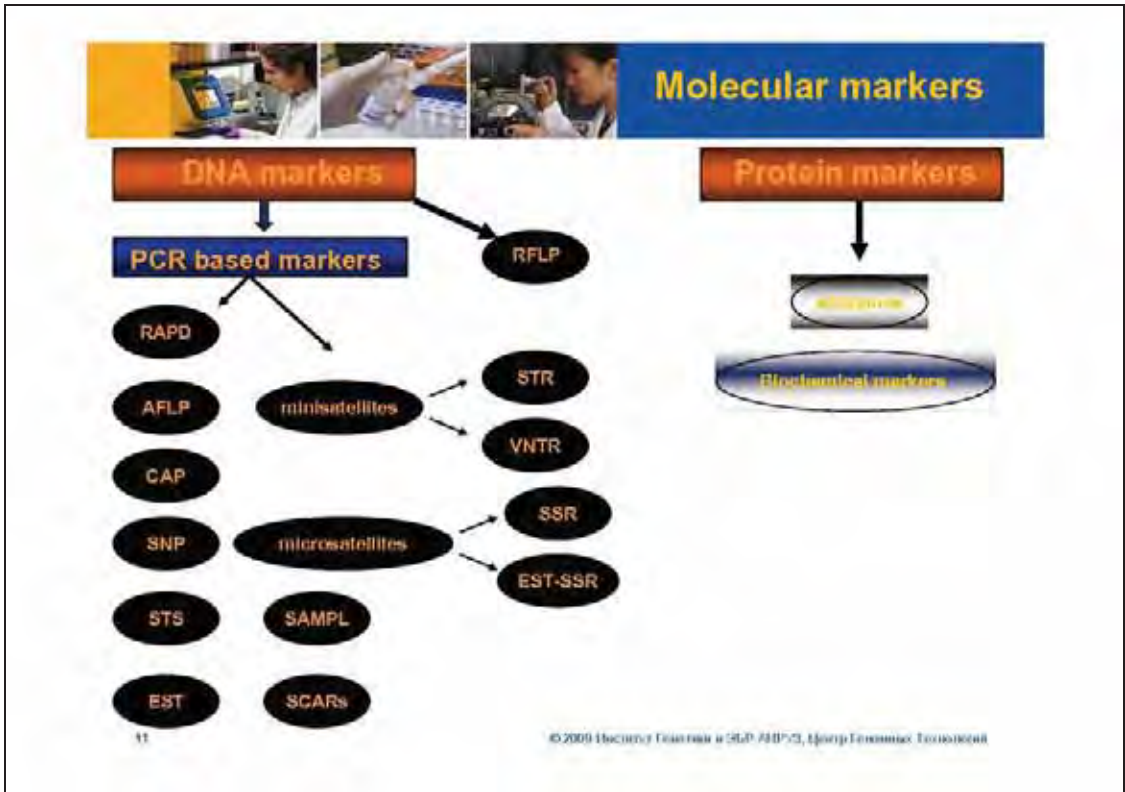


## ДНК маркеры: требования

- Полиморфность
- Воспроизводимость
- Кодоминантность
- Равномерное распределение по геному
- Высокая чувствительность
- Не подверженность влиянию окружающей среды
- Нейтральность
- Недорогие
- Простота определения

10

© 2009 Институт Геномики и СБП АН РБ, Центр Геномных Технологий







## Применение молекулярных маркеров

- Изучение внутривидового и межвидового генетического разнообразия
- Исследование меж- и внутрипопуляционной генетической структуры
- Филогенетический и эволюционный анализ
- Выявление групп сцепления и создание генетических карт
- Изучение количественных признаков и их картирование
- Маркер-ассоциированная селекция (МАС)
- Паспортизация или ДНК-баркодинг (видов, сортов, линий)
- Идентификация личности

13

© 2009 Институт Геноетики и МПФ МГУ, Центр Современной Технологии



## Полиморфизм ДНК

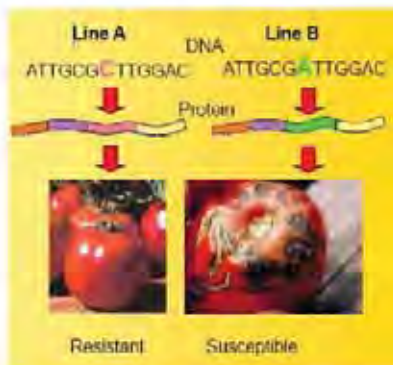
- В результате различных событий получаются различные варианты, более или менее сложные, в последовательности ДНК. Такие варианты обычно описывают как полиморфизм.
- Полиморфизм транслируется в различия генотипов – как это видно из различных профилей полос, обнаруживаемых при использовании соответствующих методов, а возможно, и фенотипов.
- Несколько событий могут вызвать полиморфизм:
  - Точковые мутации
  - Вставки или делеции
  - Перестройки

14

© 2009 Институт Геноетики и МПФ МГУ, Центр Современной Технологии



## Полиморфизм ассоциированный с фенотипом



Изменения могут затрагивать кодирующий регион  
Регуляторную область  
Не кодирующий регион  
Изменения одного или нескольких нуклеотидов  
Больших фрагментов ДНК  
Хромосомные перестройки

**КАК ВЫЯВИТЬ ПОЛИМОРФИЗМЫ  
СВЯЗАННЫЕ С ПРИЗНАКОМ?**

**КАК ПЕРЕНЕСТИ ПОЛЕЗНЫЙ ПРИЗНАК  
И ЗАКРЕПИТЬ ЕГО?**

15

© 2009 Институт Геномики и СДП РАН/СЗ, Центр Геномных Технологий



- Цели:**
1. Получение сортов сельскохозяйственных культур с ценными агрономическими признаками (урожайность, скороспелость, резистентность и т.д.)
  2. Маркер-ассоциированная селекция
  3. Сохранение биоразнообразия сельхозкультур и их диких сородичей как источник полезных генов

**Проблемы:**

1. Получение сортов традиционными методами селекции занимает в среднем от 10 до 15 лет
2. Большинство признаков являются количественными

16

© 2009 Институт Геномики и СДП РАН/СЗ, Центр Геномных Технологий



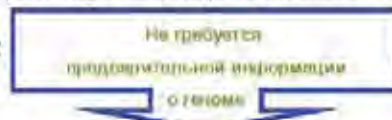
**Задачи:**

- Выявление регионов генома ассоциированных с проявлением интересующих признаков при помощи ДНК маркеров
- Локализация генов
- Клонирование генов и определение их нуклеотидной последовательности
- Функциональный анализ генов
- Интродукция полезных генов в элитные сорта растений

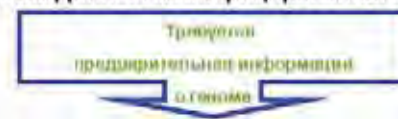


**RFLP - Полиморфизм Длин Рестрикционных Фрагментов**

На основе ПЦР:



RAPD - Произвольно-амплифицированная Полиморфная ДНК  
 AFLP - Полиморфизм Длины Амплифицированного Фрагмента



**SSR/STR - Простые Повторяющиеся Последовательности/Короткие тандемные повторы**

*SSCP - Конформационный полиморфизм одноцепочечной ДНК*

*CAPs - Расщепленная Полиморфная Амплифицированная Последовательность*

*SNP - Полиморфизм Единичного Нуклеотида*





## Локусы количественных признаков (QTL)

1. QTL – регион ДНК, где находится ген влияющий на проявление признака
2. Количественный признак можно измерить (высота растения, урожайность и т.д.)
3. Контролируется обычно более, чем одним геном
4. Может изменяться под влиянием внешних факторов
5. Изучают с помощью:
  - ДНК маркеров
  - Большой выборки популяции
  - Статистических и биоинформатических программ

19

© 2009 Институт Генетики и Эволюции РАН, Центр Генетики, Тель-Авив



## **Пример: выявление локусов количественных признаков при помощи ДНК маркеров**

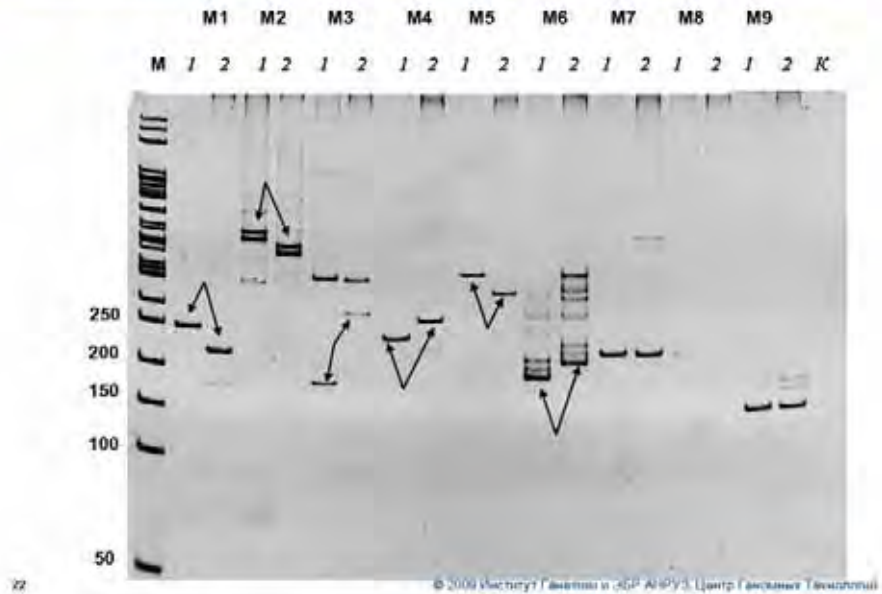
### Основные этапы:

- Отбор исходных родительских растений контрастных по интересующему признаку (скороспелый/позднеспелый,...)
- Получение гибридной популяции
- Фенотипическое описание F2 популяции
- Генотипирование родительских растений и потомства при помощи ДНК маркеров
- Выявление ассоциаций «маркер-признак»
- Статистическая обработка данных

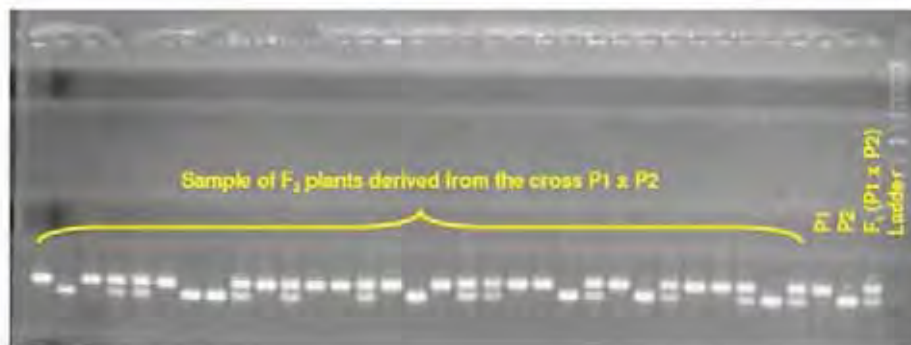
20

© 2009 Институт Генетики и Эволюции РАН, Центр Генетики, Тель-Авив

## Полиморфизм микросателлитных маркеров среди родительских растений

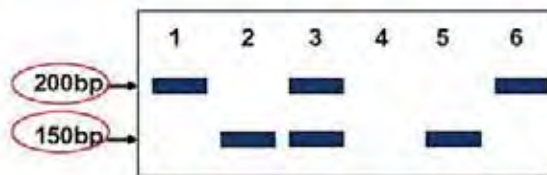


## Генотипирование популяции при помощи полиморфных маркеров





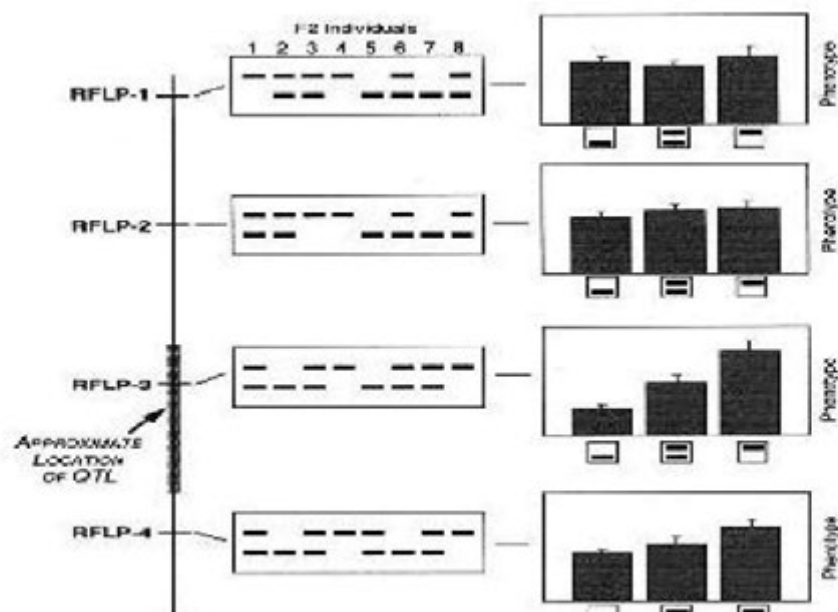
## Генотипирование и преобразование данных



	BNL1064_150	BNL1064_200
1	0	1
2	1	0
3	1	1
4	2	2
5	1	0
6	0	1

24

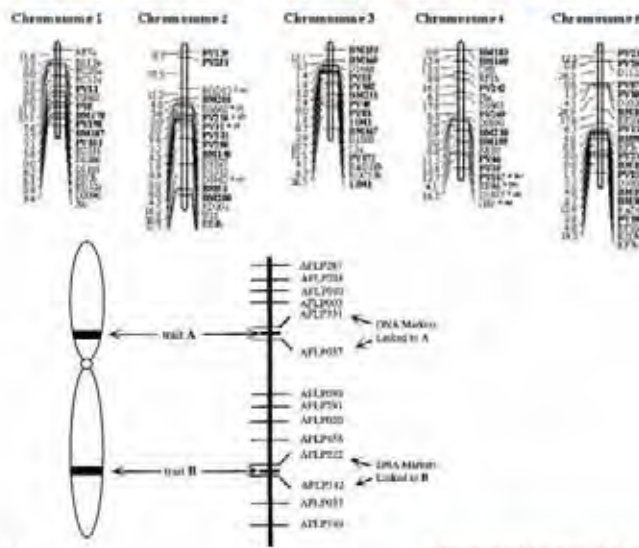
© 2009 Институт Генома и ЭБР-РНП/3, Центр Геномных Технологий





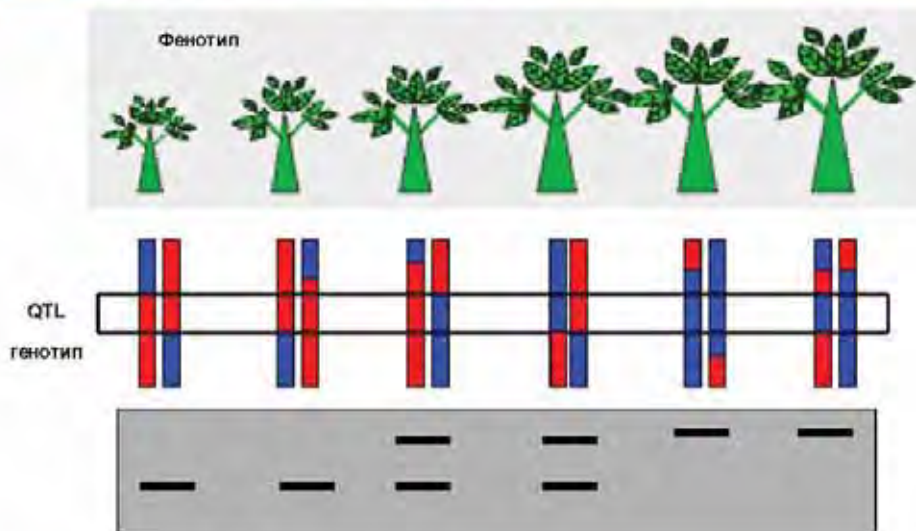


## Определение сцепления маркеров и признака



26

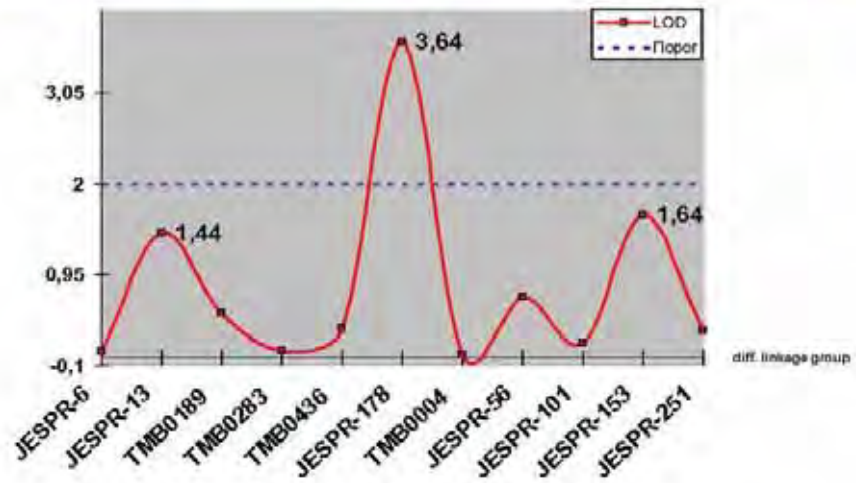
© 2000 Институт Генетики и СБР АН РУС, Центр Генетических Технологий



27

© 2000 Институт Генетики и СБР АН РУС, Центр Генетических Технологий

## Интервал картирование

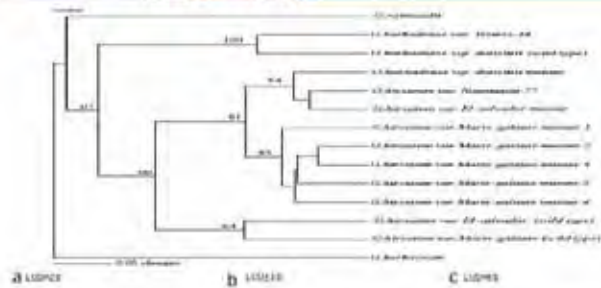


18

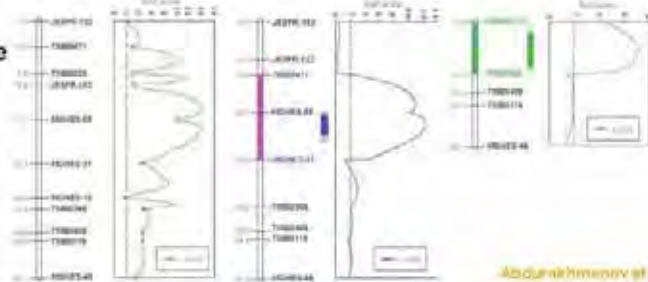
© 2009 Институт Генетики и СОР АН РБ, Центр Геномных Технологий



## Филогения



## QTL-картирование



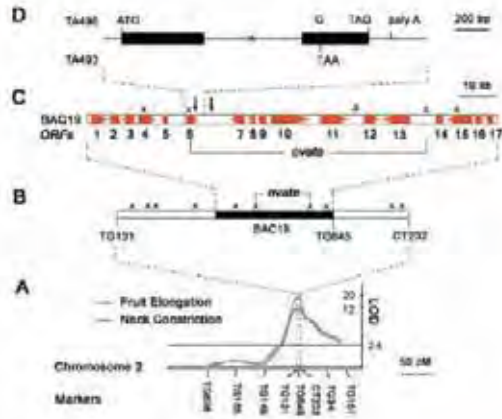
Abdulkhmedov et al. 2009

20

© 2009 Институт Генетики и СОР АН РБ, Центр Геномных Технологий



## Молекулярное клонирование



Liu, et al. (2002)

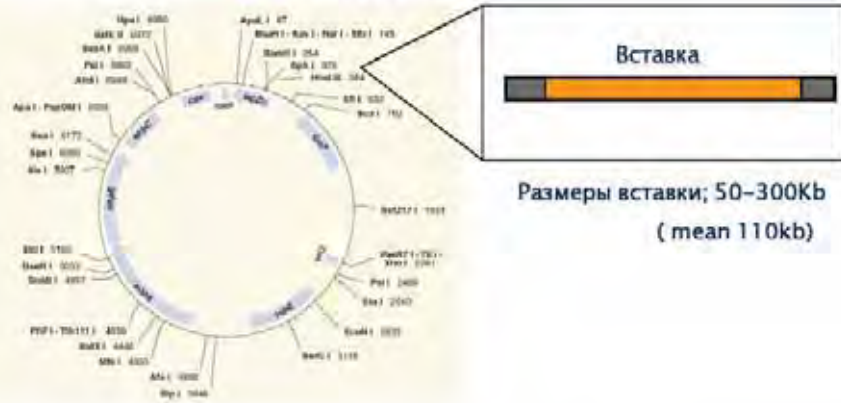
30

© 2009 Институт Генетики и ЗЕР АНР УЗ, Центр Генетичеcких Технологий



## Создание ВАС библиотек

### • ВАС вектор



Размеры вставки; 50-300Кб  
( mean 110kb)

31

© 2009 Институт Генетики и ЗЕР АНР УЗ, Центр Генетичеcких Технологий





## Биоинформатические программы для изучения комплексных признаков

<b>AMOVA</b>	Analysis of Molecular Variance, Laurent Excoffier, U Geneva
<b>Gmendel</b>	Jim Holloway & Steve J Knapp, (1992) <i>J Heredity</i> 81: 407.
<b>JoinMap</b>	Van Ooijen & Roeland E. Voorrips, (1993) <i>Plant J</i> 3: 739-744.
<b>Mapmaker/QTL</b>	Lander et al. (1987) <i>Genomics</i> 1: 174-181.
<b>MapQTL</b>	Van Ooijen, <i>Plant Genome IV</i> 1996.
<b>Map Manager</b>	Manly, (1993) <i>Mammalian Genome</i> 4: 303-313
<b>QTL Café</b>	G.G.Seaton, U Birmingham, UK
<b>QTL Cartographer</b>	Chris Basten et al., Program in Statistical Genetics, Dep. of Statistics, NC St U.

- Карты генетического сцепления
- Картирование локусов полигенных количественных признаков в скрещиваниях F2 и BC1, рекомбинантно-инбредных линиях (RIL)
- Непараметрическое картирование
- Интервал картирование
- Аддитивные и доминантные эффекты, эпистаз, плейотропия, множественные аллели, плоидность, связь гена и окружающей среды

22

© 2000 Институт Генетики и СЕБ/ИРП/Центр Генетичеких Технологий



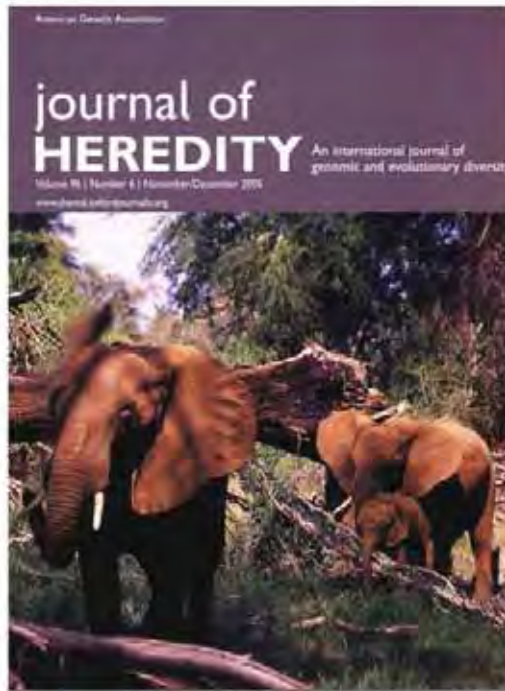
## Микросателлиты, SNP, RFLP, AFLP, RAPD, EST (примеры)

- Виноград:** Устойчивость к патогенным грибам (Salakhutdinov et al., *Deutsches Weinbaujahrbuch*. -2003.- S. 53-64; Fischer et al., 2004). *Theoretical Applied Genetics* -2004.-N108.-p.501 - 515 )
- Кансас:** Урожайность, калорийность и устойчивость к патогенам (Clement et al. *Genome/Génome*.- 2003.-N46(2).-p.204-212)
- Картофель:** Содержание фруктозы и сахарозы, локализованные на всех хромосомах (Menendez et al., 2002).
- Кукуруза:** урожайность, генетическое родство инбредных линий (Smith, *Maydica* 2000, 45:235-241; Pejic, *Theor App Genet* 1998, 97: 1248- 1255)
- Пшеница:** Устойчивость к септориозу, ржавчине (Beat Keller et al., *Plant and Animal Genome* 2004.-p.334-35)
- Рис:** Засухоустойчивость и др. (Price et al. *Plant Molecular Biology* -2002.-N46.-p. 683-695; Brondani et al. *Theoretical Applied Genetics*, 2002.-N104 (6-7).p.1192-1203)
- Соя:** Содержание протеинов и масла, время созревания и высота растения (Zhang et al., 2004. *Theoretical Applied Genetics*, 2004.-N108(6).p.1131-1139).
- Томат:** Скороспелость, грушевидность (Liu. et al. 2002.*PNAS* 99(20): 13302-13306; Doganlar et al., 2000*Theor. Appl.Genet.*- 2000.- N100.- p249-255 )
- Хлопчатник:** Естественная ранняя листопадность, прочность волокна (Abdurakhmonov I, Abdullaev A. A. . *Journal of Heredity* //2005 – 96(6) 644-653. Guo et al., 2003. *Crop Science*. -2003.-N43.- p.2252-2256)

22

© 2000 Институт Генетики и СЕБ/ИРП/Центр Генетичеких Технологий





**Simple Sequence Repeat Marker Associated with a Natural Leaf Defoliation Trait in Tetraploid Cotton**

W. Abdurakhmonov<sup>1,3,4</sup>, E. Sait<sup>3,4</sup>, T. Batu<sup>3,4</sup>, Q. Abdurajitov<sup>2</sup>, M. Abduraimov<sup>1,2</sup>, U. T. Islamov<sup>1,2</sup>, M. Abuzov<sup>1</sup>, K. Khamitov<sup>1,3,4</sup>, V. Saitov<sup>4</sup>, A. Abduraimov<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetic Engineering and Biotechnology, Institute of Agricultural Biotechnology Research, Faculty of Life Sciences, Gansu University, Lanzhou, China; <sup>2</sup>Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Life Sciences, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang, P.R. China; <sup>3</sup>Department of Cotton Production, Faculty of Life Sciences, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang, P.R. China; <sup>4</sup>Department of Genetic Engineering and Biotechnology, Xinjiang Institute of Cotton Research, Urumqi, Xinjiang, P.R. China

**Abstract**

Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) is a major cash crop worldwide. Leaf defoliation is an important natural trait for cotton production, as it reduces the need for defoliant application. The objective of this study was to identify simple sequence repeat (SSR) markers associated with natural leaf defoliation in tetraploid cotton. A total of 1,500 SSR markers were screened in a population of 120 tetraploid cotton plants. One SSR marker, *GhSSR108*, was found to be significantly associated with natural leaf defoliation. This marker was mapped to chromosome 15A and was found to be closely linked to the *GhWIP1* gene, which encodes a protein with a conserved domain of a WRKY transcription factor. This study identifies a natural leaf defoliation trait in tetraploid cotton and provides a useful marker for breeding programs.



ARTICLE IN PRESS

YGEN-08030; NO. of pages: 12; 4C; 3, 2, 0

Contents lists available at ScienceDirect

Genomics

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/yngen

**Molecular diversity and association mapping of fiber quality traits in exotic *G. hirsutum* L. germplasm**

L.Y. Abdurakhmonov<sup>a,b</sup>, R.J. Kohel<sup>b,1</sup>, J.Z. Yu<sup>b,c,1</sup>, A.E. Pepper<sup>b,c,2</sup>, A.A. Abdullaev<sup>a</sup>, F.N. Kufhanov<sup>a</sup>, I.B. Salakhutdinov<sup>a</sup>, Z.T. Buriev<sup>a</sup>, S. Saha<sup>b,c,3</sup>, B.E. Scheffler<sup>a</sup>, J.N. Jenkins<sup>a</sup>, A. Abduraimov<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Center of Genetic Technologies, Faculty of Genetics and Plant Breeding, Institute of Agricultural Biotechnology, Faculty of Life Sciences, Gansu University, Lanzhou 730021, China  
<sup>b</sup> USDA-ARS, Crop Genetics Research Unit, 1801 East South College Station, TX 77843, USA  
<sup>c</sup> Department of Biology, Texas A&M University, College Station, Texas 77704, USA

<sup>1</sup> USDA-ARS, Long Service Research Laboratory, University of Florida, Gainesville, FL 32610, USA; <sup>2</sup> USDA-ARS, Plant Breeding and Genetics Laboratory, USDA, ARS, Beltsville, MD 20715, USA  
<sup>3</sup> USDA-ARS, 147 Fayetteville Street, Raleigh, NC 27615, USA

**ARTICLE INFO**

Article history:  
Received 19 January 2009  
Accepted 29 July 2009  
Available online xxxx

Keywords:  
Cotton germplasm  
Genetic diversity

**ABSTRACT**

The natural genetic diversity of cultivated cotton (*Gossypium hirsutum* L.) is largely underestimated due to gene introgression and the lack of descriptive tools to assess such challenges. The application of linkage disequilibrium (LD)-based association mapping is an alternative potential molecular tool to assess and explore the natural genetic diversity (NGD) within cotton germplasm collections. In this study, we investigated the genetic diversity and LD patterns within a panel of diverse exotic *G. hirsutum* L. germplasm. The analysis of genome-wide LD patterns in the tetraploid cotton genome indicates that the natural genetic diversity is high and that the LD patterns are highly variable across the genome.



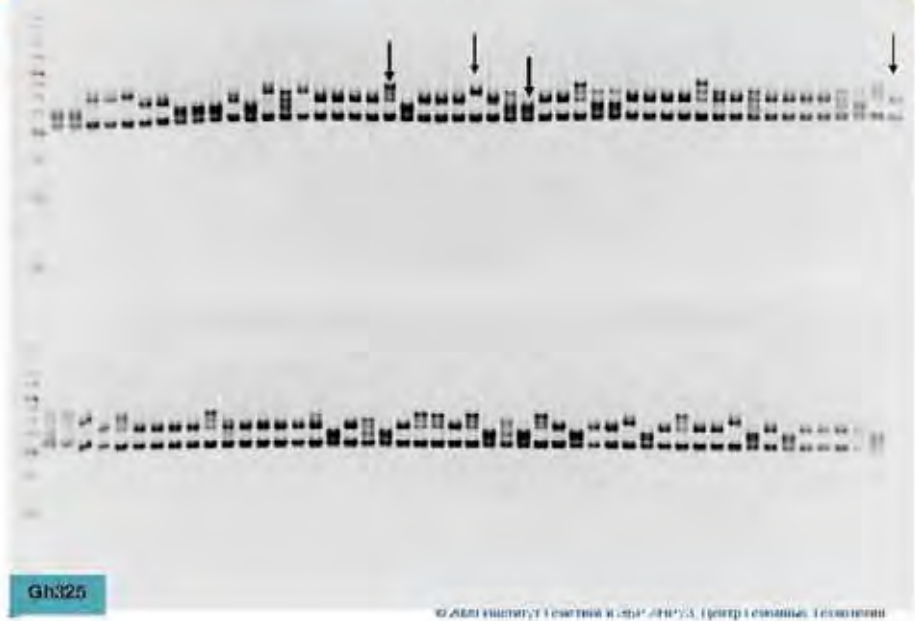
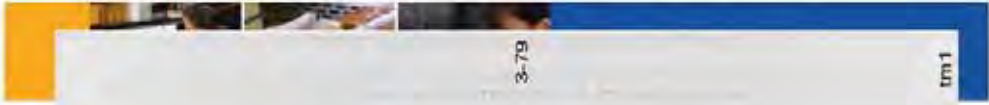
Молекулярный анализ проведён на **288** образцах хлопчатника

Экзотические разновидности	208
Мексика	25
Африка	53
Контроль (TM1 и 3-79)	2



36

© 2000 Институт Геноетики и Селекции РИС, Центр Геномных Технологий



© 2000 Институт Геноетики и Селекции РИС, Центр Геномных Технологий

GenMapper Project: CR19and212 W4 173

File Edit Analysis View Tools Help

Table Setting

Columns: 14 columns

Sample	ReadID	Panel	Marker	Allele 1	Allele 2	Allele 3	Allele 4	Size 1	Size 2	Size 3	Size 4	QC
1	776	CR19and212	CR 19	173	176			172.11	176.57			
2	778	CR19and212	CR 212	142	142	150		140.17	142.21	156.21	166.2	
3	779	CR19and212	CR 19	173	167	167	172	167.08	166.21	167.55	172.73	
4	779	CR19and212	CR 212	142	150			140.14	156.24	156.16	172.40	
5	781	CR19and212	CR 19	167	173	176		167.05	172.12	176.46		
6	781	CR19and212	CR 212	142	150			140.14	156.15	167.67	172.26	
7	796	CR19and212	CR 19	167	173	176		166.47	172.16	176.66		
8	796	CR19and212	CR 212	142	150			131.27	140.23	156.21	172.57	
9	103	CR19and212	CR 19	173	167	172		166.17	161.14	167.77	172.05	
10	103	CR19and212	CR 212	142	150			140.26	151.66	166.1	172.26	
11	106	CR19and212	CR 19	173	167	172		166.22	166.26	167.77	172.02	
12	106	CR19and212	CR 212	142	150			140.14	156.02	172.43	176.69	
13	141	CR19and212	CR 19	173	167	172		167.16	165.17	166.41	167.65	
14	141	CR19and212	CR 212	142	150	155		140.18	156.0	156.24	166.16	
15	147	CR19and212	CR 19	167	173	176		166.24	167.64	172.63	176.5	
16	147	CR19and212	CR 212	142	150			140.24	167.62	166.17	172.48	
17	123	CR19and212	CR 19	173	167	172		166.11	166.16	172.67	176.54	
18	123	CR19and212	CR 212	142	150			140.27	156.25	166.21	172.66	
19	30	CR19and212	CR 19	167	173	176		167.05	167.15	172.60	176.44	
20	30	CR19and212	CR 212	142	150			154.26	146.09	156.63	166.0	
21	246	CR19and212	CR 19	167	173	176		166.05	172.23	176.7		
22	246	CR19and212	CR 212	142	150			140.24	156.44	156.12	176.70	
23	493	CR19and212	CR 19	167	173	176		166.09	166.16	172.19	176.71	
24	493	CR19and212	CR 212	142	150			140.25	156.3	156.27	172.63	
25	467	CR19and212	CR 19	167	173	176		166.23	166.48	166.56	166.36	
26	467	CR19and212	CR 212	142	150			127.0	140.3	156.05	166.48	
27	506	CR19and212	CR 19	167	173	176		166.26	166.14	172.32	176.7	
28	506	CR19and212	CR 212	142	150			140.21	156.13	166.22	172.66	

Process Status

GenMapper 3.0

GenMapper Project: CR19and212 W4 173

File Edit Analysis View Tools Help

Table Setting

Columns: 14 columns

Name	Analysis Method	Panel	Size Standard	Run Name	Run Date & Time	RS	GS	STR	MF	SP	DS	SD	MD
1	CR19and212	CR19and212 W4 173	05400HD	Run_demo	2005-08-14 16:59								
2	CR19and212	CR19and212 W4 173	05400HD	Run_demo	2005-08-16 16:58								
3	CR19and212	CR19and212 W4 173	05400HD	Run_demo	2005-08-16 16:58								
4	CR19and212	CR19and212 W4 173	05400HD	Run_demo	2005-08-16 16:58								
5	CR19and212	CR19and212 W4 173	05400HD	Run_demo	2005-08-16 16:58								
6	CR19and212	CR19and212 W4 173	05400HD	Run_demo	2005-08-16 16:58								
7	CR19and212	CR19and212 W4 173	05400HD	Run_demo	2005-08-16 16:58								
8	CR19and212	CR19and212 W4 173	05400HD	Run_demo	2005-08-16 16:58								
9	CR19and212	CR19and212 W4 173	05400HD	Run_demo	2005-08-16 16:58								
10	CR19and212	CR19and212 W4 173	05400HD	Run_demo	2005-08-16 16:58								
11	CR19and212	CR19and212 W4 173	05400HD	Run_demo	2005-08-16 16:58								
12	CR19and212	CR19and212 W4 173	05400HD	Run_demo	2005-08-16 16:58								
13	CR19and212	CR19and212 W4 173	05400HD	Run_demo	2005-08-16 16:58								
14	CR19and212	CR19and212 W4 173	05400HD	Run_demo	2005-08-16 16:58								
15	CR19and212	CR19and212 W4 173	05400HD	Run_demo	2005-08-16 16:58								
16	CR19and212	CR19and212 W4 173	05400HD	Run_demo	2005-08-16 16:58								
17	CR19and212	CR19and212 W4 173	05400HD	Run_demo	2005-08-22 11:08								
18	CR19and212	CR19and212 W4 173	05400HD	Run_demo	2005-08-22 11:08								
19	CR19and212	CR19and212 W4 173	05400HD	Run_demo	2005-08-22 11:08								
20	CR19and212	CR19and212 W4 173	05400HD	Run_demo	2005-08-22 11:08								
21	CR19and212	CR19and212 W4 173	05400HD	Run_demo	2005-08-22 11:08								
22	CR19and212	CR19and212 W4 173	05400HD	Run_demo	2005-08-22 11:08								
23	CR19and212	CR19and212 W4 173	05400HD	Run_demo	2005-08-22 11:08								
24	CR19and212	CR19and212 W4 173	05400HD	Run_demo	2005-08-22 11:08								
25	CR19and212	CR19and212 W4 173	05400HD	Run_demo	2005-08-22 11:08								
26	CR19and212	CR19and212 W4 173	05400HD	Run_demo	2005-08-22 11:08								
27	CR19and212	CR19and212 W4 173	05400HD	Run_demo	2005-08-22 11:08								
28	CR19and212	CR19and212 W4 173	05400HD	Run_demo	2005-08-22 11:08								

Process Status





40

© 2000 University of Tennessee at Chattanooga. All Rights Reserved.

Microsoft Excel - Markers47

File Edit Format Tools Data Window Help

1440

2200

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
38	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
39	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
41	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
42	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
43	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
44	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
45	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
46	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
47	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
49	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
51	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
52	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
53	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
54	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
55	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
56	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
57	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
58	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
59	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
61	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
62	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
63	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
64	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
65	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
66	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
67	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
68	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
69	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
70	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
71	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
73	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
74	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
75	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
76	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
77	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
78	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
79	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
81	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
82	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
83	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
84	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
85	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
86	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
87	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
88	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
89	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
90	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
91	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
92	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
93	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
94	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
95	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
96	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
97	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
98	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
99	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Microsoft Word [Sheet1] - [Markers47] [4]

Taskbar: My Computer, Recycle Bin, Internet Explorer, Microsoft Word [Markers47], Taskbar, Start





## Результаты

### Выявлена значительная корреляция среди различных параметров волокна

Table 2  
Correlation of fiber quality traits from Mexican environment

TRAITS	MIC	UHM	UI	STR	ELO	RD
MIC	1					
UHM	-0.49****	1				
UI	-0.09	0.44****	1			
STR	-0.32****	0.69****	0.29****	1		
ELO	-0.02	-0.11	0.09	-0.29****	1	
RD	-0.09	0.28****	0.22**	0.32****	-0.03	1

MIC—Micronaire; UHM—fiber length; UI—uniformity; STR—fiber strength; ELO—elongation; RD—reflectance. \*\*, \*\*\*\*,  $p \leq 0.01, 0.001$ , respectively.

42

© 2009 International Cotton Advisory Committee, Центр Генетика и Эволюция



## Результаты

### Summary of SSR polymorphisms

Accession panels	No. of taxa	No. of polymorphic SSRs				Polymorphic Information Content (PIC)	
		Overall (%)	Unique (%)	Rare (%)	Average allele/locus	Range	Average
Exotic panel	287*	373	3	49	4	0.007–0.38	0.122
Exotic landraces only	208**	370	3	43	4	0.01–0.38	0.134
Mexican and African variety group	78**	161	0.6	36	2	0.02–0.37	0.160

\* panel included *G. hirsutum* (TM-1) and *G. barbadense* (3–79) controls.

\*\* panel included only *G. hirsutum* (TM-1) control.

182 SSR (~49%) аллели были редкими и представлены 5% образцов коллекции. Остальные 161 (48%) аллели SSR, были высокополиморфны

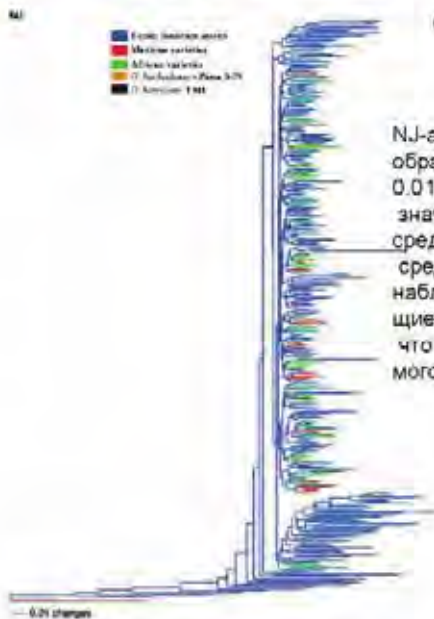
43

© 2009 International Cotton Advisory Committee, Центр Генетика и Эволюция



### Филогенетический анализ коллекции гермплазмы Узбекистана

NJ-анализ выявил генетическое расстояние (GD) среди образцов *G. hirsutum*, которое в целом варьировало 0.01–0.50, со средним значением 0.13, что указывает на значительное генетическое разнообразие. Общее ГР среди экзотических образцов составило 0.02–0.50, со средним значением 0.26. Наименьшие расстояния наблюдались среди образцов коллекции представляющие Мексиканскую и Африканскую группы (0.07–0.08), что указывает на узкую генетическую базу культивируемого хлопчатника в этих двух различных экотипах.



© 2009 Институт Генетики и ЗЕР АН РУз, Центр Геномных Технологий



### Интернет ресурсы по молекулярному изучению геномов растений

<http://plantgenomics.tigr.org>

<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/plant.repeats>



40



## Выводы

- Определение стратегий для лучшего сохранения и использования требует оценки изменчивости, происходящей в генетических ресурсах
- Величину генетического разнообразия можно измерить посредством использования генетических маркеров – морфологических, биохимических и молекулярных
- Ни один из маркеров не отвечает всем желательным характеристикам
- Выбор метода зависит от характера рассматриваемого биологического аспекта

41

Институт Генетики и ДБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



Спасибо за внимание!



40

© 2000 Институт Генетики и ЦМД РАН, Центр Генетика Технологии



Marker type	Mode of inheritance		Level of genetic variability	Function
	Mode of transmission	Mode of gene action		
<i>AFLP fingerprint</i>	biparental nuclear, many loci, unknown no. alleles per locus	dominance at some loci, co-dominance at others	hypervariable, i.e. each individual has unique banding pattern	unknown
<i>Nuclear microsatellites</i>	biparental nuclear, few loci, many alleles per locus	co-dominance, with exception of null alleles at some loci	large variation within populations, low differentiation between populations	non-coding, may contribute to genome stability
<i>Chloroplast microsatellites</i>	uniparental (maternal in angiosperms, paternal in conifers), pseudo-haploid, single locus, many alleles per locus	each cytotype is expressed	low variation within populations, large differentiation between populations	non-coding
<i>Mitochondrial intron marker</i>	uniparental (maternal), pseudo-haploid, single locus, many alleles per locus	each cytotype is expressed	low variation within populations, large differentiation between regions	non-coding
<i>ITS of ribosomal DNA</i>	biparental nuclear, several loci, several alleles per locus	co-dominance	high variability, even within a single individual	non-coding
<i>cDNA markers</i>	biparental nuclear, one to a few loci, few alleles per locus	co-dominance	low variation within populations, low differentiation between populations	functional differences possible between alleles of a locus
<i>Isoczymes (for comparison)</i>	biparental nuclear, 1-5 loci, 1-7 alleles per locus	co-dominance, with exception of null alleles at some loci	low to medium variation within populations, low differentiation between populations	functional differences possible between alleles of a locus

40

© 2000 Институт Генетики и ЦМД РАН, Центр Генетика Технологии



ВВЕДЕНИЕ В МОЛЕКУЛЯРНУЮ ГЕНЕТИКУ И ЕЕ МЕТОДОЛОГИЮ.

*Абдуллаев А.А.*

к.б.н., старший научный сотрудник  
Центра Геномных Технологий ИГиЭБР





## ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ РАЗВИТИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

1859	Charles Darwin	публикация «О происхождении видов»
1885	Gregor Mendel	принципы расщепления и независимого наследования признаков
1889	Friedrich Miescher	открытие ДНК
1900	H. de Vries, C. Correns, E. von Tschermak	перезакрытие законов Менделя
1902	Archibald Garrod	о генетической природе заболеваний человека
1902	Walter Sutton, Theodor Boveri	предложили хромосомную теорию
1910-1916	Thomas Hunt Morgan, C. Bridges	гены расположены на хромосомах
1913	A.H. Sturtevant	сконструировал первую генетическую карту
1927	H.J. Muller	индуцировал мутации рентгеновыми лучами
1931	H. Creighton, Barbara McClintock	физическое доказательство рекомбинации
1941	G. Beadle, E.L. Tatum	гипотеза один ген – один фермент
1944	O. Avery, C. McCleod, M. McCarty	ДНК – носитель генетической информации
1953	James Watson, Francis Crick	расшифровка структуры ДНК
1958	M. Meselson, F. Stahl	доказательства полуконсервативной репликации ДНК
1961	S. Brenner, F. Jacob, M. Meselson	открытие мРНК, теория оперона
1966	M. Nirenberg, G. Khorana	завершение расшифровки генетического кода
1970	Hamilton Smith	открытие ферментов – рестриктаз
1972	Paul Berg	первые рекомбинантные ДНК <i>in vitro</i>
1972	Gobind Khorana	синтез полноразмерного гена тРНК
1973	H. Boyer, S. Cohen	первое применение плазмид для клонирования ДНК
1977	W. Gilbert and F. Sanger	метод секвенирования ДНК
1977	F. Sanger, P. Sharp, R. Roberts и др.	открытие виронов
1988	Kary Mullis	разработка метода ПЦР
1995	C. Venter, H. Smith	секвенирование первых геномов: <i>Neisseria meningitidis</i> и <i>Mycobacterium genitalium</i>
1997	F. Blattner, I. Horuchi и др.	секвенирование генома <i>Escherichia coli</i>
1997	Jan Witout и др.	клонировали овечку Долли из клеток молочной железы
2001	C. Venter, F. Collins и др.	расшифровка генома человека



## Как возникла молекулярная биология?

- Микроскопия зародилась в 1665 г.
- Robert Hooke (1635-1703) выявил, что организмы состоят из клеток
- Matthias Schleiden (1804-1881) и Theodor Schwann (1810-1882) продолжили изучение клеток 1830-х г.



• Robert Hooke



• Matthias Schleiden



• Theodor Schwann

© 2009 Институт Генетики и ЗЕР АНРУЗ, Центр Генетика Тельави



## Основные события молекулярной биологии в 1800 - 1870

- **1865** Gregor Mendel открыл основные правила наследования признаков у гороха
  - Каждый организм имеет две альтернативные наследственные единицы определяющие признак (доминантный признак v.s. рецессивный признак)
- **1869** Johann Friedrich Miescher Открыл ДНК (вещество ядра) и назвал ее нуклеином



Mendel: Отец генетики

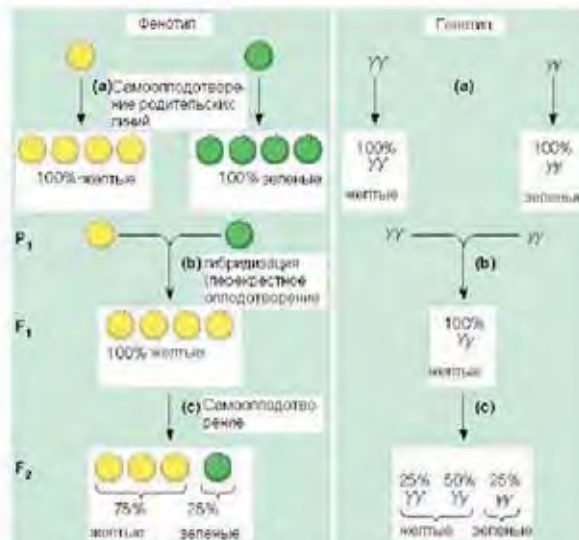


Johann Miescher

© 2009 Институт Генетики и ЗЕР АНРУЗ, Центр Генетика Тельави



## Эксперимент Менделя



5

Copyright © 2005 Pearson Education, Inc. publishing as Benjamin Cummings

Биология. Технологии



## Основные события молекулярной биологии в 1880 - 1900

- **1881** Edward Zacharias доказал, что в нуклеине присутствуют хромосомы
- **1899** Richard Altmann переименовал нуклеин в нуклеиновую кислоту (так же открыл – митохондрии)
- К **1900**, определена химическая структура 20 основных аминокислот



6

© 2009 Издательство Гелиос и СОУ-ИИТЭО, Центр Гелиос-Технологии





## Основные события молекулярной биологии в 1900-1911

- **1902** - Emil Hermann Fischer получил Нобелевскую премию: аминокислоты соединяются и формируют белки
- **1911** – Thomas Hunt Morgan открыл гены в хромосомах, являющиеся дискретными единицами наследственности
- **1911** Pheobus Aaron Theodore Levene изучил ДНК и РНК



Emil Fischer



Thomas Morgan

7

© 2009 Институт Генетики и ЦБП АН РБ/СЗ, Центр Геномных Технологий



## Основные события молекулярной биологии в 1940 - 1950

- **1941** – George Beadle and Edward Tatum – гены кодируют белки
- **1950** – Edwin Chargaff обнаружил, что цитозин комплементарен гуанину, а аденин тимину



George Beadle



Edward Tatum



Edwin Chargaff

8

© 2009 Институт Генетики и ЦБП АН РБ/СЗ, Центр Геномных Технологий



## Основные события молекулярной биологии в 1950 - 1952

- **1950** – Mahlon Bush Hoagland впервые определил, что аминокислоты не сразу формируют белок, а вначале присоединяются к РНК (тРНК) комплиментарной рибосоме
- **1952** – Alfred Hershey и Martha Chase - генетическая информация о белках находится в ДНК



Mahlon Hoagland



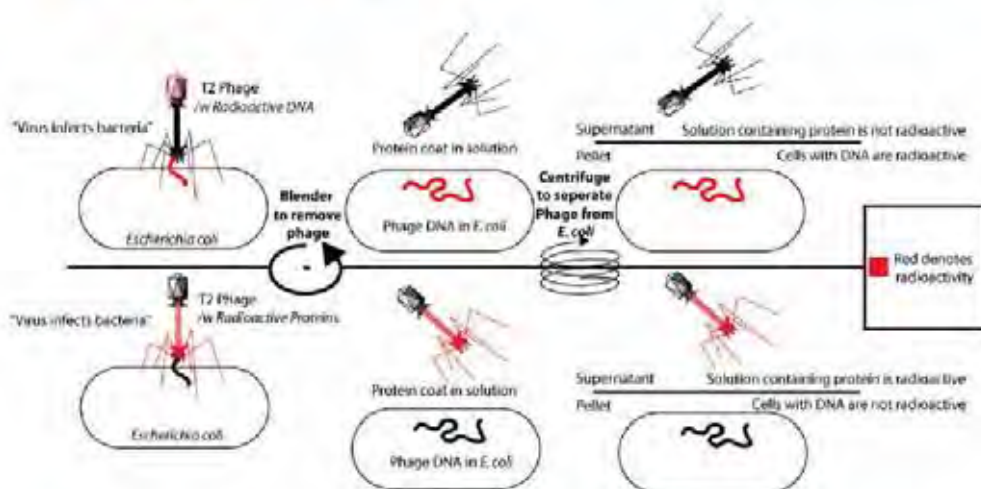
Hershey Chase Experiment

9

© 2009 Институт Генетики и ЗБР АНРФ, Центр Геномных Технологий



## Эксперимент Херши и Чейз



10

© 2009 Институт Генетики и ЗБР АНРФ, Центр Геномных Технологий



## Основные события молекулярной биологии в 1952 - 1969

- **1952-1953** James D. Watson и Francis H. C. Crick открыли двойную спираль ДНК
- **1953** Rosalind Franklin  
Изучение ДНК при помощи рентгеновского излучения, ее работа подтвердила теорию Крика и Уотсона
- **1966.** Marshall Nirenberg, Har Khorana и Severo Ochoa  
Расшифровка генетического кода



James Watson and Francis Crick



Rosalind Franklin

11

© 2009 Институт Генетики и ЗВР РАН, Центр Геномных Технологий



## Основные события молекулярной биологии в 1970

- **1970** - Howard M. Temin и David L. Baltimore – открыли обратную транскриптазу
- **1970** - Daniel Nathans, Werner Arber и Hamilton Smith. – открыли первый фермент рестрикции (эндонуклеаза)



Howard Martin Temin



David L. Baltimore



Werner Arber



Daniel Nathans



Hamilton O. Smith

12

© 2009 Институт Генетики и ЗВР РАН, Центр Геномных Технологий





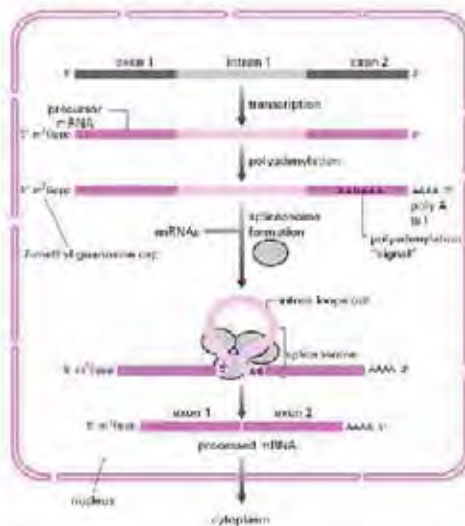
- **1972. Paul Berg** Соединил ДНК двух различных организмов, таким образом создав первую в мире рекомбинантную ДНК
- **1973. Stanley Cohen и Herbert Boyer** впервые получили организм содержащий рекомбинантную ДНК с использованием технологии разработанной **Paul Berg**

13

© 2009 Институт Генетики и СБП/ИГЭС, Центр Генетика Технологии



## 1977 год



Richard J. Roberts (1942– )  
Courtesy of Richard J. Roberts



Philip A. Sharp (1944– )  
Courtesy of Leslie A. Sharp

**Открытие интронов: P.Sharp и R.Roberts**  
**1977 г. (Нобелевская премия 1993 г.)**

14

© 2009 Институт Генетики и СБП/ИГЭС, Центр Генетика Технологии





## 1983-85 год

- 1983 – Barbara McClintock Нобелевская премия за открытие транспозонов



- 1983 Cary Mullis - ПЦР

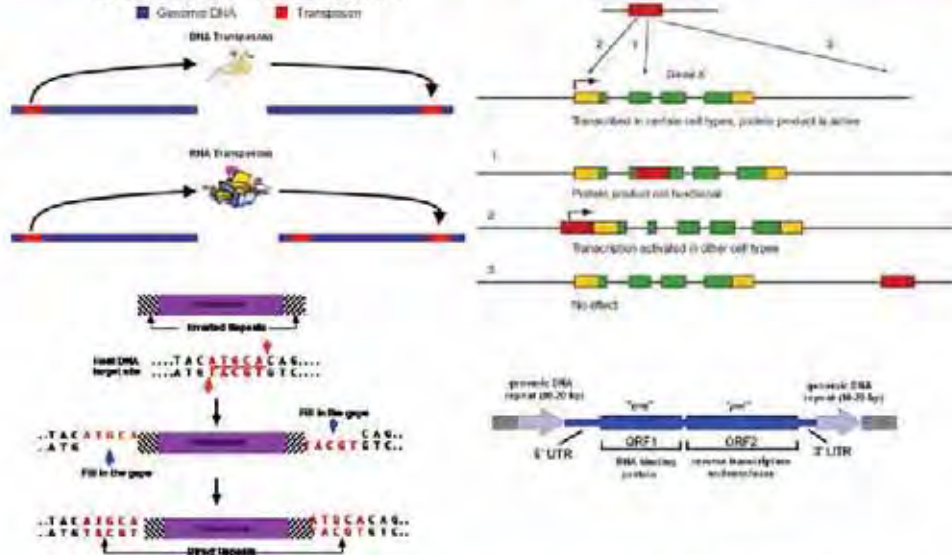


15

© 2009 Институт Генетики и ДБП /ИГП/С, Центр Геномных Технологий



## DNA vs RNA Transposons



16

© 2009 Институт Генетики и ДБП /ИГП/С, Центр Геномных Технологий

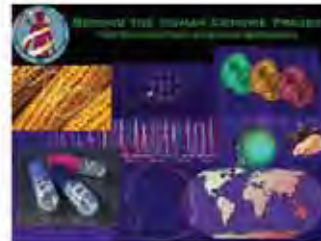


## Основные события молекулярной биологии в 1986 - 1995

- **1986** Leroy Hood: механизм автоматического секвенирования
- **1986** Human Genome – Проект «Геном человека»
- **1995** Созданы карты среднего разрешения хромосом 3, 11, 12, 22 (These maps provide the locations of "markers" on each chromosome to make locating genes easier)



Leroy Hood



17

© 2009 Институт Генетики и ЗБР АНРФ, Центр Геномных Технологий



## Основные события молекулярной биологии в 1995-1996

- **1995** John Craig Venter: первый просеквенировал бактериальный геном (*Haemophilus influenzae* и *Mycoplasma genitalium*.)
- **1995** Первые роботизированные автоматические флуоресцентные секвенаторы
- **1996** Прочитан первый эукариотический геном



John Craig Venter

18

© 2009 Институт Генетики и ЗБР АНРФ, Центр Геномных Технологий



## Основные события молекулярной биологии в 1997 - 2000

- 1997 просеквенирована *E. Coli*
- 1998 PerkinElmer, Inc.. 96-капиллярный секвенатор
- 1998 Полный сиквенс круглого червя (*C. elegans*)
- 1999 Полностью прочитана хромосома (22) человека
- 1999 – Открыт механизм РНК интерференции
- 2000 – Геном растения (*Arabidopsis thaliana*)

18

© 2009 Институт Генетики в СБП АНРФ, Центр Геномных Технологий



## Основные события молекулярной биологии в 2000-2001

- 2000 Геном *Drosophila melanogaster*
- 2001 Международный проект «Геном человека» опубликовал первый черновой вариант генома



20

© 2009 Институт Генетики в СБП АНРФ, Центр Геномных Технологий





## Основные события молекулярной биологии в 2003- 2008

- 2003 Завершен «Геном человека», прочитан геном мыши
- April 2004 Геном крысы



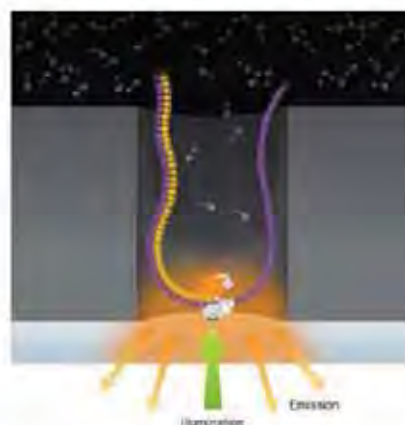
21

© 2008 Институт Генетики и ДРП РАН/УС, Центр Генетика Технологии



### 2009

## Новейший метод секвенирования в реальном времени



22

© 2008 Институт Генетики и ДРП РАН/УС, Центр Генетика Технологии





## Методы

- Выделение ДНК
- Выделение РНК
- Выделение белков
- Получение кДНК
- Изучение генома
- Анализ экспрессии генов
- Анализ экспрессии белков
- Клонирование генов
- Спектрофотометрия
- Электрофорез
- Капиллярный электрофорез
- ПЦР
- ПЦР в реальном времени
- Рестрикционный анализ
- Фрагментный анализ
- Гибридизации (Саузерн, Нозерн, Вестерн, Истерн)

...



## Выделение ДНК. Важность экстракции для анализа

- Чистота образца ДНК оказывает решающее влияние на качество конечного результата
  - Высокое качество образца ДНК обеспечит получение более достоверных и сбалансированных результатов независимо от используемого метода анализа
  - Устранение ингибиторов обеспечивает успешность проведения амплификации
- Правильно разработанный протокол экстракции должен обеспечить высокое качество и максимально возможный выход образца ДНК с учётом объёма образца (индивидуально для каждой лаборатории)
- Тип образца может повлиять на выбор метода экстракции
- Все методы экстракции перед использованием необходимо должным образом оптимизировать и проверить
  - Некоторые методы экстракции при неправильном использовании могут вызывать ингибирование
  - При неправильном использовании любого метода экстракции может получиться ДНК недостаточно высокого качества



## Методы выделения ДНК

- Органический метод
- В градиенте CsCl
- Щелочной лизис
- Смола Chelex
- Анионный обмен
- Силикатные методы
- Магнитные шарики
- Бумажные фильтры FTA®

25

© 2000 Институт Генетики и СБП РАН/УС, Центр Генетика Технологии



## Органическая экстракция Характеристики метода

- Принцип действия
  - Смесь фенола с хлороформом – наиболее широко используемый органический метод, в котором белки отделяются от ДНК
- Стандартный протокол
  - Лизис клеток с использованием соответствующего лизирующего раствора (например, SDS и EDTA)
  - Расщепление белка с помощью фермента протеиназы K
  - Раствор фенола в хлороформе, используемый для отделения ДНК от белков и других компонентов клетки
    - ДНК фракционируется в водную фазу
    - Белки и органические остатки клетки фракционируются в органическую фазу
  - Производится очистка образца ДНК с использованием соответствующего метода осаждения (например, изопропанолом с последующей промывкой этанолом) или устройства фильтрации (Centricon или Microcon)

26

© 2000 Институт Генетики и СБП РАН/УС, Центр Генетика Технологии



- 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 поддерживает pH раствора на уровне, где ДНК остаётся стабильной
- SDS разрушает клеточную стенку и ядерную мембрану, позволяя ДНК перейти в раствор (SDS также денатурирует и раскрывает белки делая их более чувствительными для расщепления)



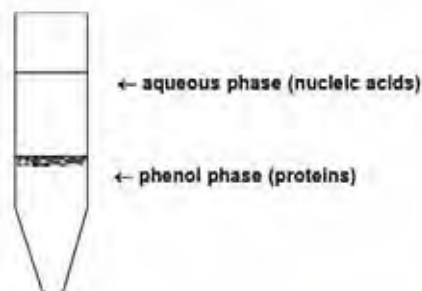
## Выделение ДНК

### Стандартная процедура

- Гомогенизация
- Лизирование клеток: 0.5% SDS + proteinase K (60° 1час - несколько часов)
- Фенольная экстракция (pH 8.0, 5мин - несколько часов)
- Плавное перемешивание
- Осаждение 96% этанолом или изопропанолом
- Обработка RNКазой и протеиназой K
- Повторение процедуры

### Фенольная экстракция

- Добавлять в одинаковом объеме
- Отбор водной фазы
- Опционально: chloroform/isoamyl alcohol



Выход 100мг – 5мкг





## Выделение геномной ДНК НМВ

### Стандартная процедура (как на предыдущем слайде)

Используем больше исходного материала, пробирки большей емкости (Векман 45мл), напольная центрифуга, осаждение при -20 (1час-неск.часов)

Хранение: В этаноле, ТЕ буфере, сухом состоянии, Комн. Температура, +4, -20С

### EtOH осаждение

- 2-2.5 объема EtOH, -20°
- NaOAc, pH 5-5.5
- Центрифугирование или вылавливание



29

© 2003 Институт Генетики и ЗЕР АНРФУЗ, Центр Генетич. Технологии



## Органическая экстракция Преимущества

- Общепринятый метод очистки с использованием раствора фенола в хлороформе
- Выделение образца ДНК с высоким уровнем качества и молекулярным весом
- Пригодность для различных субстратов
- Эффективность даже при использовании сложных типов образцов
  - например, старого или разрушенного костного материала
- Получение стабильных экстрактов, которые можно хранить в замороженном виде длительное время

30

© 2003 Институт Генетики и ЗЕР АНРФУЗ, Центр Генетич. Технологии





## Органическая экстракция Проблемы

- Необходимость использования опасных реагентов
  - Необходимость специализированного обращения и утилизации
  - Невозможность использования в некоторых лабораториях из-за особых требований к охране здоровья и технике безопасности
- Длительность и трудоёмкость
- Низкий уровень выхода из очень малых образцов
  - Метод требует удаления водной фазы, которая может содержать ДНК, что при ограниченном объёме образца является более значимой потерей
- Возможная необходимость в большом количестве сменяемых пробирок
  - Опасность контаминации
- Сложность автоматизации

33

©2000 Институт Систем в ЖР-АИИ/С, Центр Генетики и Эволюции



## Выделение РНК (особенности)

**Ингибиторы РНК (РНКазы)!**  
**Вода обработанная DEPC**  
**Выделение в присутствии солей гуанидина**  
**Выделение фенолом при pH 5-6 (pH 8 для ДНК)**  
**Обработка ДНКазой, свободной от РНКаз**  
**Опционально: селективное осаждение**  
**различных форм MW (rRNA, mRNA) с LiCl или**  
**oligo-dT колонки**  
**Хранение при -80C**



34

© 2000 (www.illumina.com)



## Адсорбционные методы

Нуклеиновые кислоты селективно адсорбируются на силике, смоле или мембране в присутствии хаотропных агентов или солей

- Плазмиды
- гДНК
- Фрагменты после электрофореза
- ПЦР продукты

### Минипрепаративное выделение плазмид

1. Растворить бактерии в щелочном растворе
2. Нейтрализовать ацетатом натрия
3. Центрифугировать, удалить осадок
4. Смешать супернатант со смолой + chaotropic agent
5. Промыть
6. Элюировать ДНК низкосолевым буфером

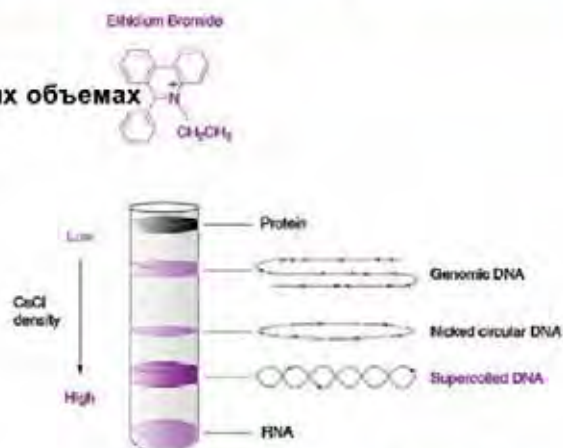
© 2009 Институт Генетики и СДП АН РБ, Центр Генетических Технологий



## Разделение нуклеиновых кислот в градиенте плотности CsCl

Применяют для:

- Выделение в больших объемах
- Высокой чистоты
- Сателлитной ДНК
- РНК фракции
- Плазмидной ДНК

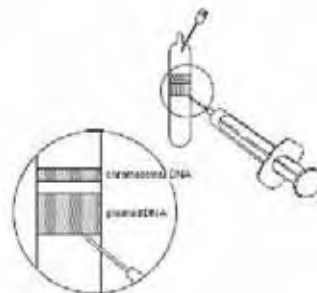
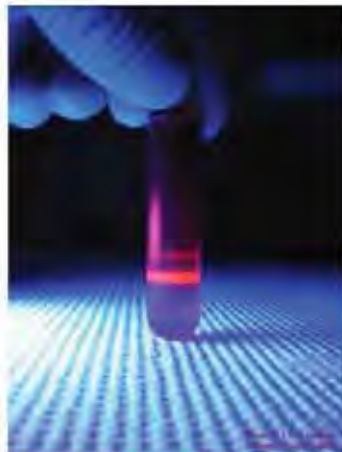


54

© 2009 Институт Генетики и СДП АН РБ, Центр Генетических Технологий



## Разделение нуклеиновых кислот в градиенте плотности CsCl



Градиент CsCl

35

© 2000 Институт Генетики и РБП АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



## Гибридизация по Саузерну (Southern Blot)

- Southern blot позволяет определить молекулярный вес рестриктоного фрагмента и определить его относительное количество в образцах
- Определить копийность интересующего фрагмента
- Генетический профиль образца
- Выявить различия в рестрикционном профиле образцов
- Подтвердить перенос генетического материала в геном образца

36

© 2000 Институт Генетики и РБП АНРУЗ, Центр Геномных Технологий





## Используемые материалы

### Зонды

- **Зонд** - нуклеиновая кислота
  - Метят каким либо маркером позволяющим идентифицировать или проводить количественное определение
  - Гибридуется с другой нк по принципу комплиментарности
- Тип меток:
  - Радиоактивные ( $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ )
  - Флуоресцентные (TAMRA, FAM, VIC...)
    - FISH
    - RT-PCR
  - Биотинилированные (avidin-streptavidin)

37

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АН РУС, Центр Генетика Технологии



## Поверхность для гибридизации

- Фильтрующая мембрана: ДНК и РНК связываются с поверхностью мембраны, самогибридизации не происходит
- Связавшаяся НК способны гибридизоваться с зондом.
- Фильтрующая мембрана используется для:
  - Southern Blots
  - Dot/Slot Blots
  - Northern Blots
- In-silica гибридизация (стеклянная поверхность)
  - in situ (ткань)
  - Хромосомная (FISH)
  - Микроэрепей

38

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АН РУС, Центр Генетика Технологии





## Southern Blots

- Southern blotting перенос денатурированной ДНК из агарозного геля на фильтрующую мембрану для последующей гибридизации с зондом
- ДНК разделяется на фрагменты
- Процедура:
  - Рестрикция (фрагментирование ДНК)
  - Разделение фрагментов по размерам в агарозном геле
  - Т.к. только одноцепочечные фрагменты связываются с мембраной, то ДНК должна быть денатурирована (NaOH)
  - Перенос на фильтр (капиллярное течение)
  - Гибридизация с зондом
  - Визуализация

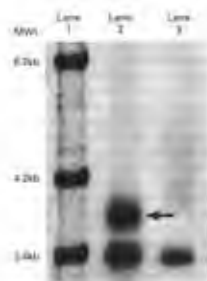
39

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРФ, Центр Генетика Технологии

Разрезаем рестриктазами



Soak gel in NaOH



Cross-link DNA to the membrane using UV light

Hybridize membrane with denatured <sup>32</sup>P-DNA probe



Autoradiograph of washed filter

Приготовление 20X SSC:

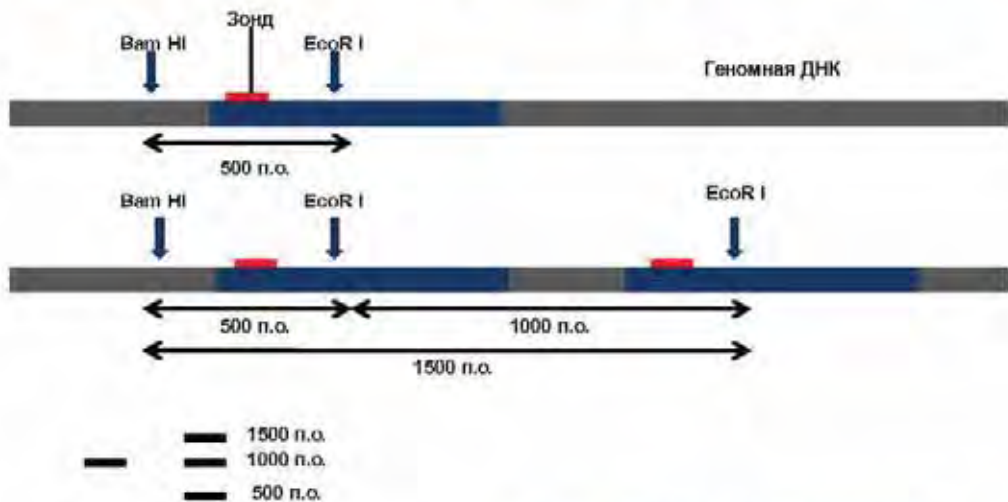
- 3M NaCl: 175.3 g
- 0.15M Na Citrate: 88.2 g
- dH2O: 800 ml
- pH до 7.0 с HCl (0.1-0.5 mL)

40

Институт Генетики и ЭБР АНРФ, Центр Генетика Технологии



## Определение копийности вставки (RFLP + Southern)

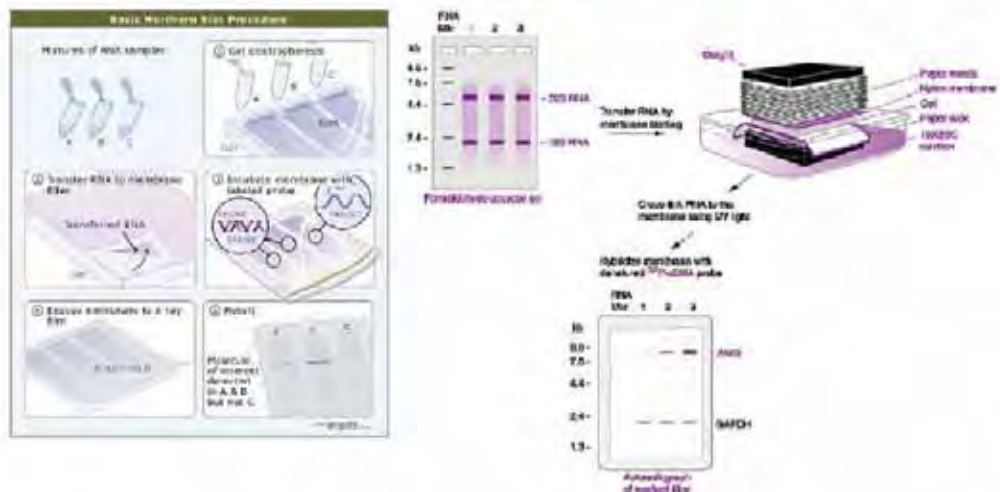


41

© 2000 Институт Гематологии и ЗБП/ИРП/С, Центр Генетика Тель-Авив



## Гибридизация по Нозерну (Northern Blot)



42

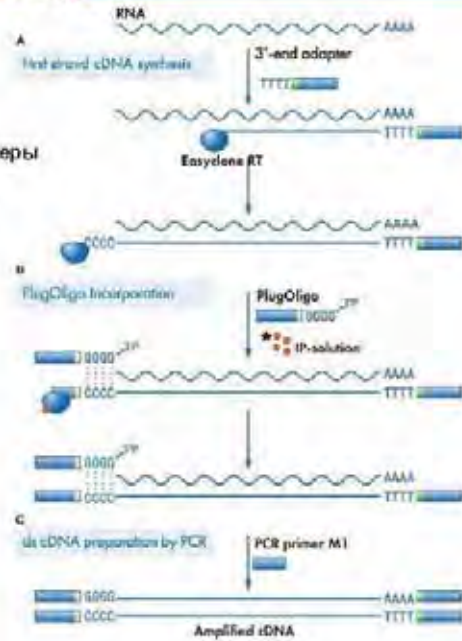
© 2000 Институт Гематологии и ЗБП/ИРП/С, Центр Генетика Тель-Авив



## Получение кДНК

**РНКаза Н**  
 Олиго dT с адаптером или случайные гексамеры  
 Ревртаза (со свойствами терминальной трансферазы избирательно присоединяющей G)  
 dNTP

**РНКаза Н**  
 Олиго dG с адаптером  
 Праймеры специфичные адаптерам  
 ДНК полимерза

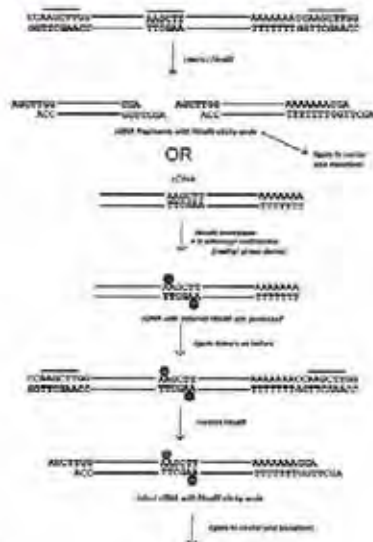


43



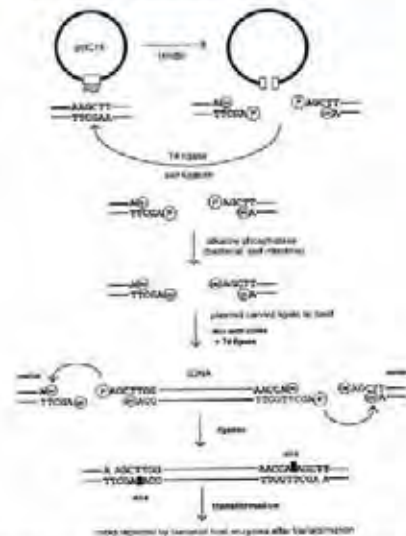
## Клонирование ДНК

(24) But what if the cDNA has a restriction site for the enzyme used to cut the linker?



44

Restriction enzymes of selected parents provide left (2000)

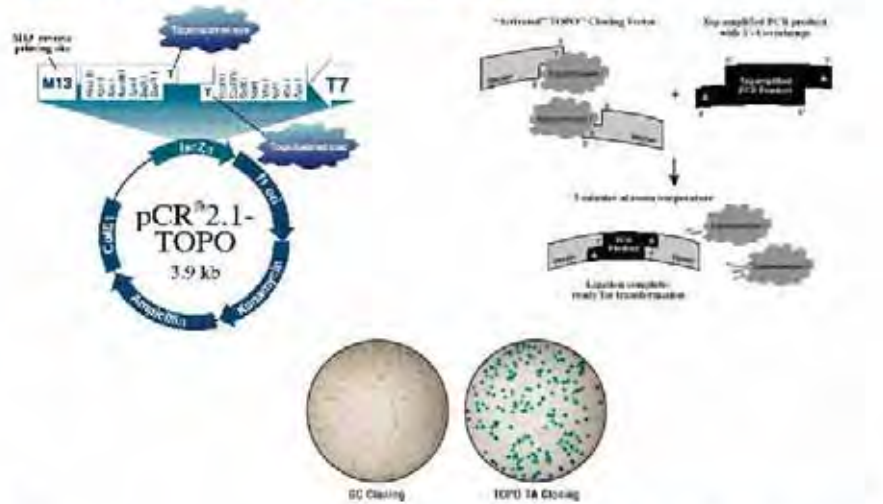


© 2005-2006 by the American Society for Microbiology, a not-for-profit corporation. All rights reserved.





## Система клонирования ТОРО-ТА

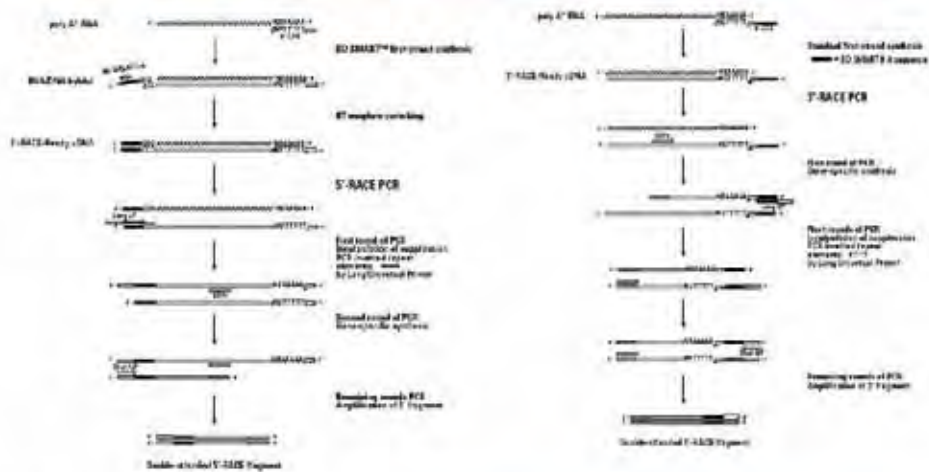


45

© 2000 Институт Генетики и ДФР АН УЗ, Центр Генетика Технологии



## RACE 5' и 3' - амплификация концов кДНК



46

© 2000 Институт Генетики и ДФР АН УЗ, Центр Генетика Технологии





### Сравнение кДНК для поиска дифференциально экспрессируемых генов



47

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРФ, Центр Геномных Технологий

III



### Для поиска дифференциально представленных молекул применяют методы вычитающей гибридизации

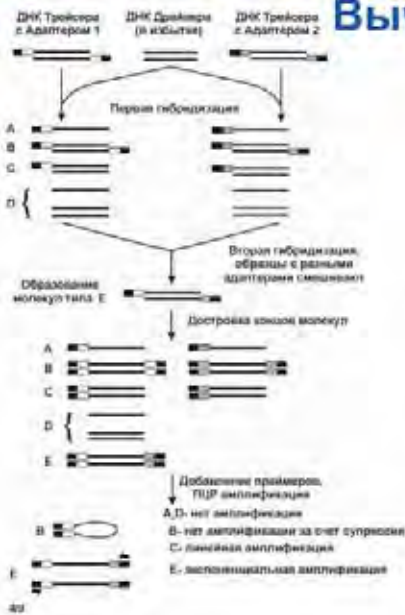


48

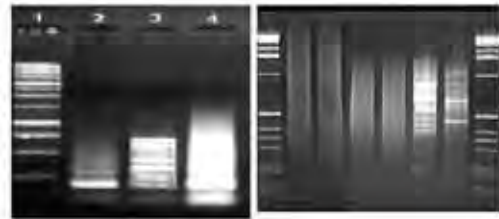
© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРФ, Центр Геномных Технологий



## Вычитающая гибридизация



- Амплификации после SSH подвержены только молекулы с разными адаптерами



© 2000 Институт Генетики и ЗБР АНРФ, Центр Геномных Технологий



## Микроэкрэй

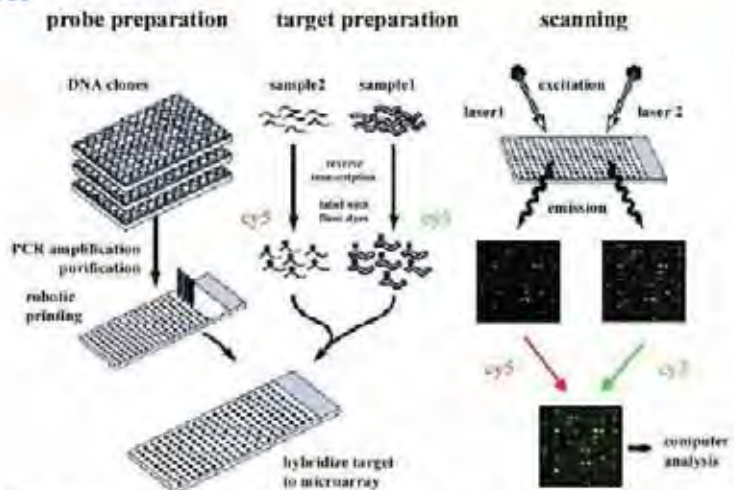


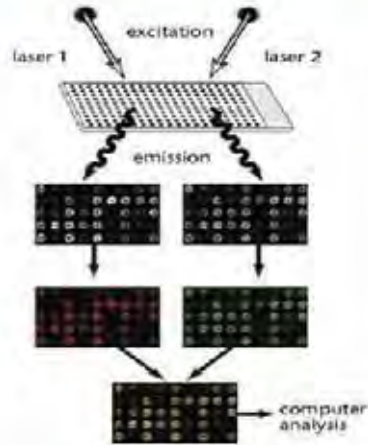
Fig. 1. cDNA microarray scheme. Green spots are transcripts overexpressed in sample #1, red spots are overexpressed in sample #2, and yellow spots are expressed equally in both samples. Modified from Duggan et al. (1999) *Nature Genetics* 21(1) pp10-14

30

© 2000 Институт Генетики и ЗБР АНРФ, Центр Геномных Технологий



## Image Collection



Sample Array Data

51

© 2000 Институт Генетики и ЦДР РАН/УС, Центр Генетика, Технологии



## РНК-интерференция (RNAi)

- Известна как посттранскрипционное умалчивание гена
- Двухцепочечные РНК вносятся в клетку
  - Комплиментарна мРНК гена
  - Искусственно
  - Продуцируется самой клеткой

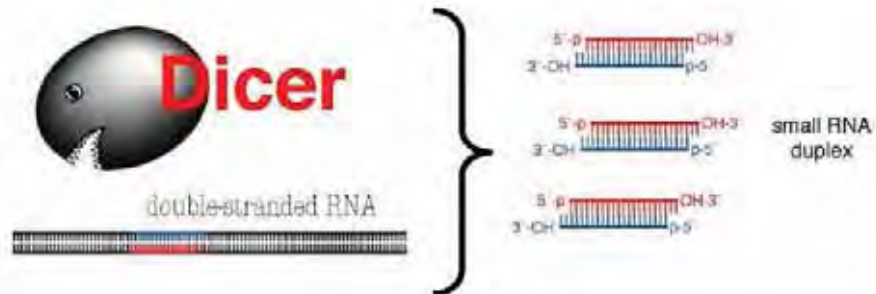
52

© 2000 Институт Генетики и ЦДР РАН/УС, Центр Генетика, Технологии



## РНК-интерференция (RNAi)(2)

- дцРНК разрезается на сегмент размером 21-23 нт ("small interfering RNAs", or siRNAs) ферментом Дайсер



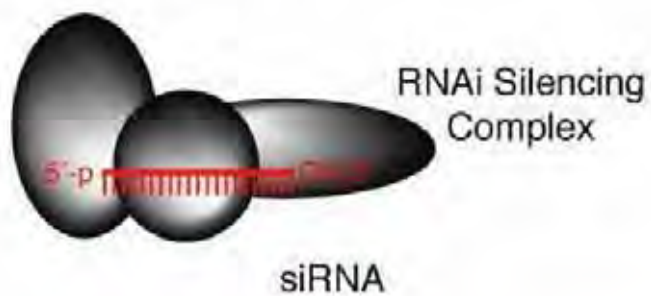
53

© 2009 Институт Генетики и ЦБП РАН/УС, Центр Генетика Технологии



## РНК-интерференция (RNAi)(3)

- siRNAs соединяется с РНК индуцирующим комплексом - RNA-induced silencing complex (RISC)



54

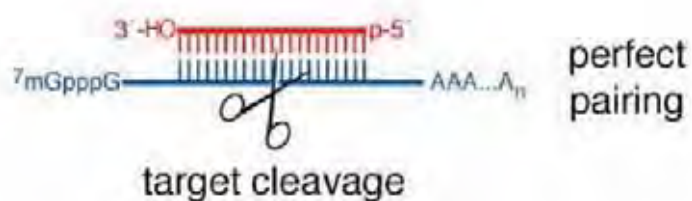
© 2009 Институт Генетики и ЦБП РАН/УС, Центр Генетика Технологии





## РНК-интерференция (RNAi)(4)

- RISC направляет siRNA, к комплиментарному участку мРНК-мишени и разрушает её.



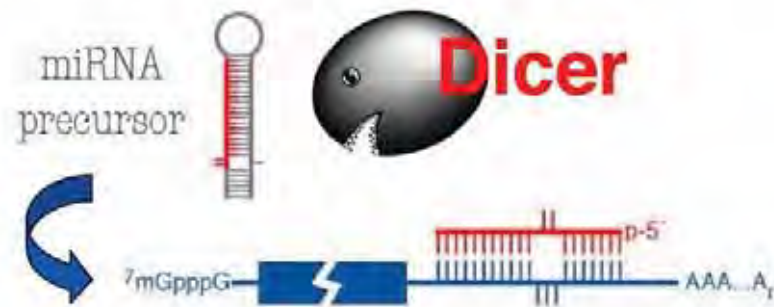
## РНК-интерференция – для чего?

- Изучение функции гена
  - Нокаут или ингибирование гена
  - Выживет ли организм?
  - Какие фенотипические проявления это вызовет?
- Терапевтический эффект
  - Лечение рака



## micro RNA (miRNA)

- Gene expression regulation
- Created by similar process to siRNA
- Generally prevents binding of ribosome

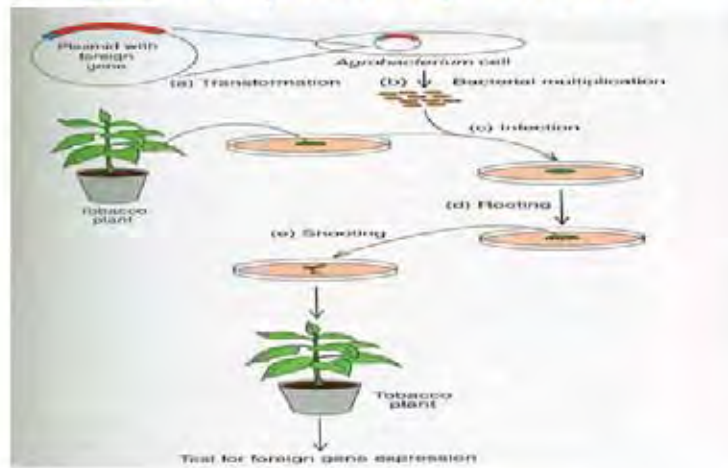


57

© 2009 Houghton Mifflin Harcourt Publishing Company, Toronto, Ontario



## Использование Т-ДНК для трансформации растений



86

© 2009 Институт Генетики в ЭБР /ИР/С, Центр Генетических Технологий



## Платформа клонирования

- Рестриктазы/лигазы
- Методы на основе ПЦР
- Технология Gateway (сайт специфическая рекомбинация)

87

© 2009 Институт Генетики в ЭБР /ИР/С, Центр Генетических Технологий



## Трансформационная кассета



### Содержит:

#### 1. Ген интереса

- Кодирующий регион и контрольные элементы

#### 2. Селективный маркер

- Позволяет отличать трансформированные растения

#### 3. Встраиваемая последовательность

- При помощи участка ДНК *Agrobacterium*

88

© 2009 Институт Генетики и СОР-ИИРС, Центр Геномных Технологий



## Внесение гена или получение трансгенного организма

### Этапы

1. Выделение РНК и обратная транскрипция
2. Создание библиотек кДНК
3. Клонирование кДНК интересующего гена
4. Создание трансформационной кассеты
5. Создание плазмидного вектора для клонирования
6. Трансформация бактерии (обычно *E.coli*)
7. Проверка плазмиды (рестрикция, ПЦР, секвенирование)
8. Трансформация *Agrobacterium* и проверка
9. Трансформация растения
10. Получение и отбор трансформантов
11. Оценка трансформантов

89

© 2009 Институт Генетики и СОР-ИИРС, Центр Геномных Технологий





## Вектор для трансформации

Требования:

- Точка начала репликации
- Селективный бактериальный маркер
- Генная конструкция
- Т-ДНК с фланкирующими границами
- Прочие гены *Agrobacterium*

10

© 2000 Институт Генетики и ЭБР/АНР/СЗ, Центр Геномных Технологий



Vir гены,  
функция переноса

ori – точка начала  
репликации

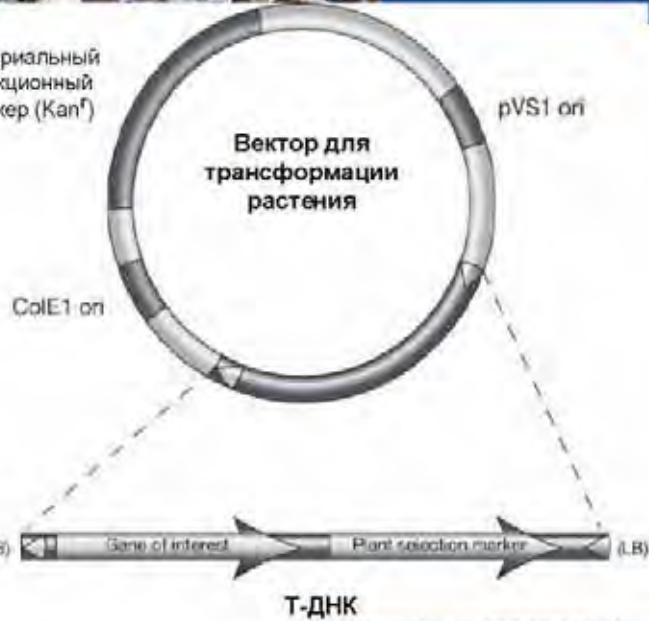


63

© 2000 Институт Генетики и ЭБР/АНР/СЗ, Центр Геномных Технологий



Бактериальный  
селекционный  
Маркер (Kan<sup>r</sup>)

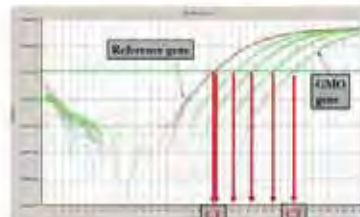
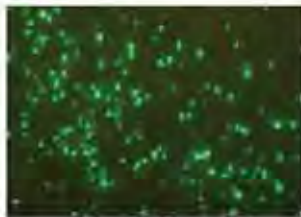


64

© 2009 Институт Генетики и ССР АН РУз, Центр Геномных Технологий



1. Визуализация экспрессии в клетках ткани (GFP)
2. Наличие и копияность вставки – Southern blot, Real Time PCR
3. Экспрессия гена – Northern blot, Real time PCR
4. Экспрессия белка – Western blot



65

© 2009 Институт Генетики и ССР АН РУз, Центр Геномных Технологий



## Следующее тестирование в поле

Устойчивость к гербициду



Нетрансгенные

↑ ↑  
Трансгенные

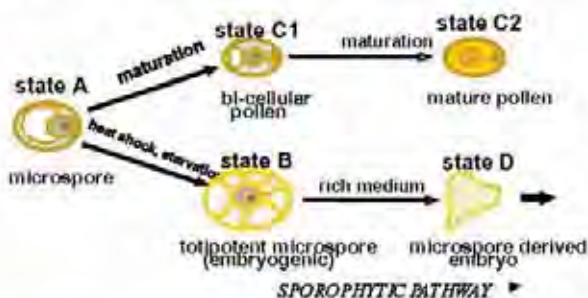
66

© 2009 Институт Генетики и ЗЕР/ИИРС, Центр Геномных Технологий



- Пролиндегидрогеназа – фермент участвующий в деградации пролина, вовлечен в процессы развития растений и их ответа на стрессовые факторы
  - Пролин – осмолит, осмопротектор

Выделено два гена кодирующие пролиндегидрогеназу из табака (*Nicotiana tabacum*): *NtPDH1* и *NtPDH2* в результате скрининга генов экспрессирующихся в микроспорах табака в ответ на стресс



Анализ экспрессии показал, что два гена имеют различный профиль экспрессии

67

© 2009 Институт Генетики и ЗЕР/ИИРС, Центр Геномных Технологий



*Organism: N. tabacum cv. SR1*

*Isolation: Through Suppression Subtractive Hybridization (SSH) between unicellular and stressed (totipotent) microspore stages of development. Initially cloned in pBK-CMV as EcoRI/XhoI fragment:*

**265bp**

**1 gaattcatat tgacnattgga agtctatatt agtaagtaag aataangcgag  
gaaccatccc**

**61 ccaactactg taantaattc atggcgctgg cagaaatgat ctggatcagg caaaccatct**

**121 gggtaaaatg cacaaggggc atattccact tgtagtatct tticcctat gcgatttita**

**181 ggctattat attgtagcac ctltgtlala ttgggttcg tattagaat ggaaaaaagg**

**241 tacccaaagt ggagccgaaa tgttg-poly(A)**

*Expression pattern:*

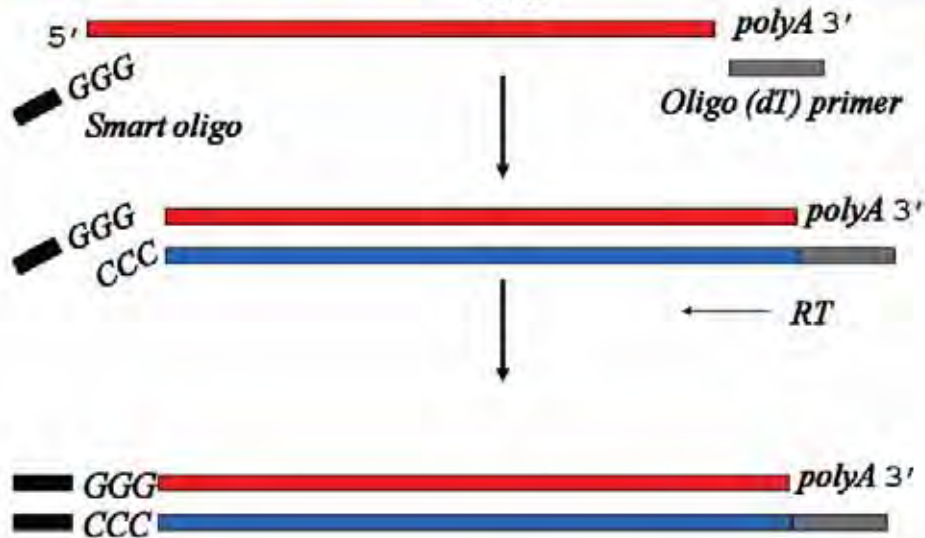
*Reverse Northern: Showed to be specifically expressed in totipotent microspores comparing with unicellular cells*

88

© 2008 University of Toronto and BCPC/BBPC, University of Toronto



**RNA**



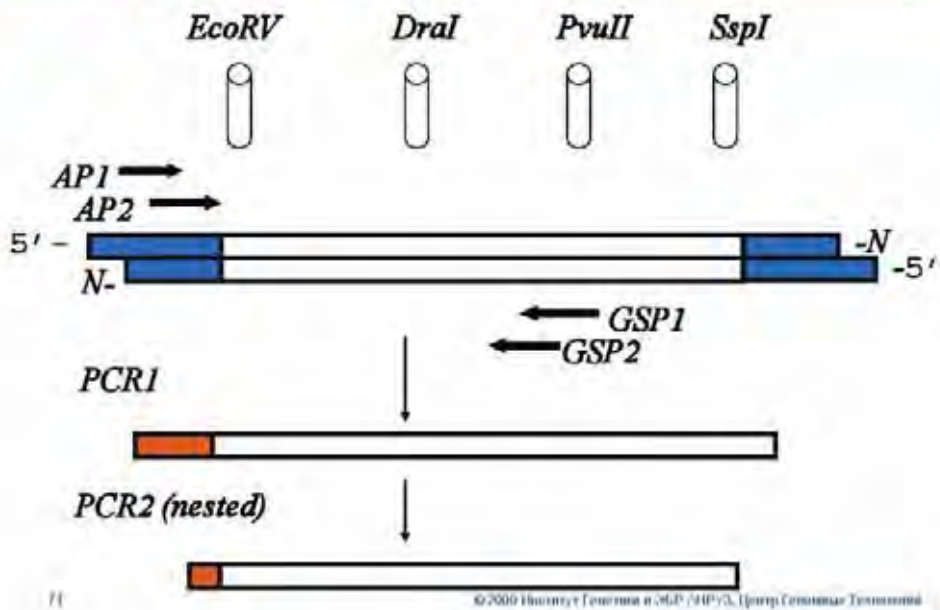
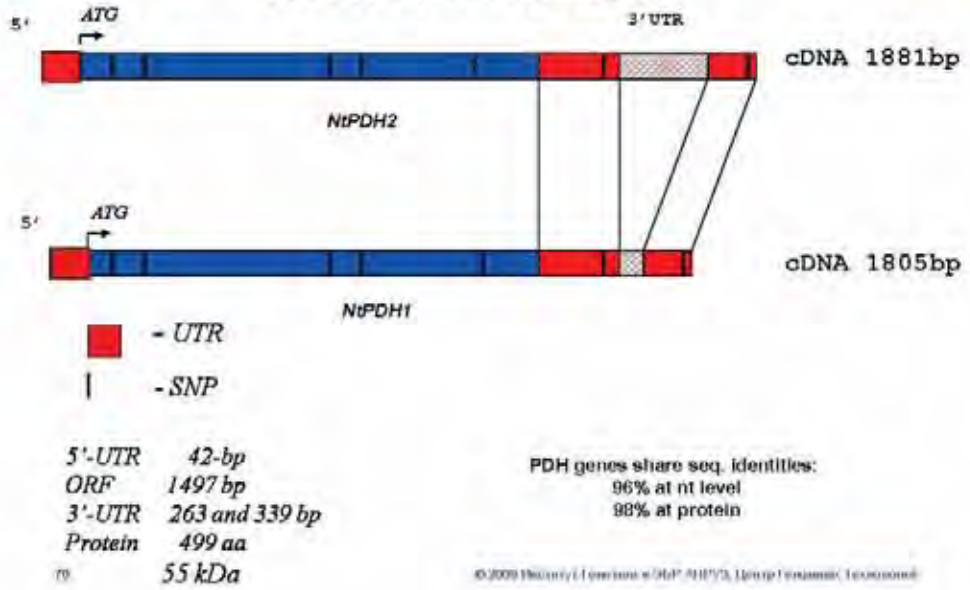
89

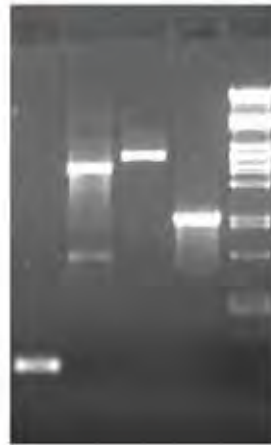
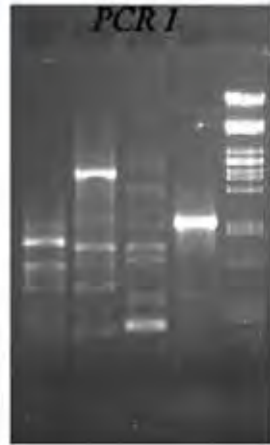
© 2008 University of Toronto and BCPC/BBPC, University of Toronto





### NtPDH's cDNA structure



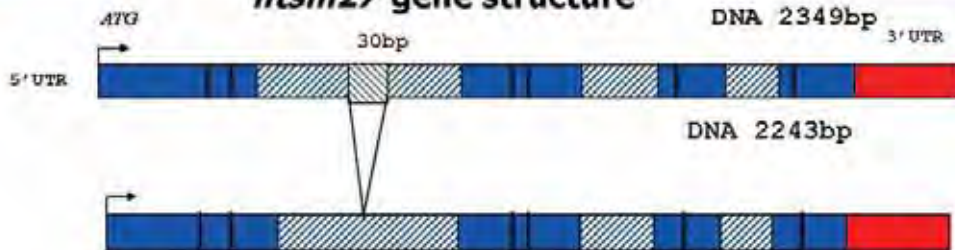


72

© 2009 University of Tennessee at Knoxville, U.S. Dept. of Homeland Security



***ntsm27* gene structure**



- UTR
- SNP
- INTRON

Comparison of the genomic with the cDNA sequences (data not shown) disclosed three introns at similar positions as displayed for *Medicago sativa* and *A. thaliana* PDHs (Miller et al. 2005).

73

© 2009 University of Tennessee at Knoxville, U.S. Dept. of Homeland Security



**Main Similarities Found:** The search has been done using Advanced BLAST programs, general site - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>

Acc.No	length	Description	E-value	degree of homology/percent age
<b>Genome (blastn)</b>	(bp)			
cg038277600/UMI_123232.1	1431	<i>Anabaena doliolum</i> protein-coding, mitochondrial precursor-like protein, predicted mRNA	1.00E-04	61 (82%)
<b>Protein (blastp)</b>	(aa)			
cg01734660/AAA11692.1	400	(DQ0023) protein-coding precursor ( <i>Anabaena doliolum</i> )	6e-133	247 (62%)
cg01740931/66AA014487.1/CD26739_2	475	(AC126733) protein-coding (Oryza sativa [ japonica subspecies indica group])	1e-63	232 (49%)
cg01892411/nc/PP_037419.2	600	(HM_016323) protein-coding (protease inhibitor 1), protein-coding 2 (p23-induced protein, p53-induced gene 8) ( <i>Drosophila melanogaster</i> )	2e-33	231 (39%)
cg01649557/gb/AA721487.1/AF0020_1	394	(U08025) brain and kidney protein-coding 2 ( <i>Mus musculus</i> )	1e-34	231 (59%)

**AIPDH is represented by two isoforms**

74

© 2005 University of Texas at Dallas, The Center for Genome Sciences and Technology



**141-486aa PDH domain**

© 2005 University of Texas at Dallas, The Center for Genome Sciences and Technology  
<http://www.hccb.utdallas.edu>

75



## N. blot & RT-PCR



Both genes were expressed weakly in vegetative organs, i.e., leaves, stems and roots, whereas strong expression was observed in male and female reproductive tissues, including pollen, ovaries, and styles and Stigmas (a)

No expression was detected in microspores (data not shown), but a slight signal was observed if the sample included some bicellular pollen (a)  
Transcript levels of *NtPDH* were generally found to decline in mature vegetative tissues compared to younger stages (data not shown)



18S ribosomal RNA co-amplified as an internal standard

*NtPDH1* transcript levels were significantly lower than those of *NtPDH2* in all organs and tissues of adult tobacco plants except mature pollen in which both genes were expressed similarly (b). *NtPDH2* expression was strongest in both male and female reproductive tissues (b)

76

© 2003 Hortic. Transact. J. Hort. Res. Soc. (2003) 27(1): 75-80



## *NtPDH1* and *NtPDH2* respond differently to dehydration



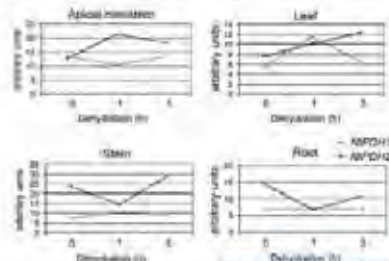
### withdrawal of water for 2-3 weeks

Both *NtPDH* genes were expressed in untreated seedlings, and transcript levels of *NtPDH1* were higher than that of *NtPDH2* (a,b)



Despite strong upregulation of *NtPDH2* in seedlings dehydrated for 1 h, downregulation to almost undetectable levels occurred within 5 h, similar to the expression pattern of *AtPDH1(a,b)*

### Regulation of *NtPDH1* and *NtPDH2* in different organs of dehydrated in vitro-grown tobacco plants



ImageQuant software

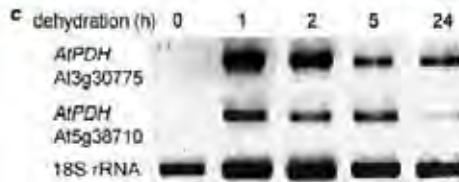
77

© 2003 Hortic. Transact. J. Hort. Res. Soc. (2003) 27(1): 75-80





The transcriptional regulation of the two *AtPDH* isoforms (*At3g30775* and *At5g38710*) was also investigated in 3-week-old *Arabidopsis* plantlets



Unlike in tobacco, no *AtPDH* transcripts were found in whole control *Arabidopsis* plantlets prior to the stress treatment

Both genes were strongly upregulated after 1 h of dehydration, but not differentially regulated as in tobacco.

Expression of either gene gradually decreased during prolonged dehydration but was still detectable at different levels after 24 h

26

© 2009 The Author(s). Journal compilation © 2009 Blackwell Publishing Ltd



Seed formation and germination are affected in *NiPDH* RNAi lines

A construct (p35S-*NiPDH2*-RNAi) bearing two copies of the 3-265-bp of *NiPDH2* (a), was transformed into tobacco

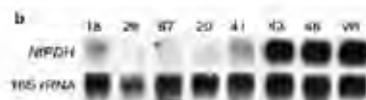
The nucleotide sequence identity between *NiPDH1* and *NiPDH2* in this region is 69%.



As male and female reproductive tissues of unstressed wild-type plants were characterized by strong hybridization signals on Northern blots, pollen, styles and stigmas were chosen to assess the suppression of *NiPDH* gene

72 RNAi lines generated

Hybridizing membranes carrying RNA isolated from styles and stigmas revealed a substantial reduction of *NiPDH* expression in 35 transgenic lines, with different efficiency of the RNAi action



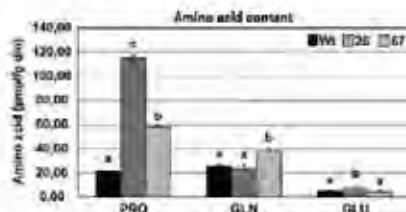
28

© 2009 The Author(s). Journal compilation © 2009 Blackwell Publishing Ltd



The defects in seed formation, germination and seedling development were clearly associated with the downregulation of both *NtPDH* genes.

Germination of seeds collected from these lines after self-fertilization was delayed and asynchronous, and occurred sporadically over 3 weeks. In contrast, almost all seeds from wild-type plants germinated in a synchronized manner within a few days.



Inhibition of proline catabolism by RNAi was expected to lead to proline accumulation and simultaneous changes in related amino acids.

Concentrations of free amino acids in wild-type and the *NtPDH* transgenic lines following rehydration of dehydrated plants. The levels of free proline (*PRO*), free glutamine (*GLN*), and free glutamate (*GLU*) in the leaves of lines 26 and 67 are shown in comparison to the wild-type (wt).

Proline catabolism is highly activated when dehydrated plants are rehydrated (Nakashima et al. 1998). In order to evaluate whether the reduced proline catabolism leads to increased proline contents upon rehydration, transgenic and wild-type plants were dehydrated for 12 h on dry What paper and subsequently rehydrated in distilled water for 12 h before collecting leaves.

However, glutamine and glutamic acid levels were not clearly correlated with enhanced proline accumulation in the transgenic plants. This finding underlines that proline as a terminal product has less impact on amino acid metabolism the *PDH* genes of both tobacco and *Arabidopsis* were expressed after 24 h of dehydration.

© 2008 Elsevier B.V. Transcriptional Regulation of Gene Expression in Tobacco



- *NtPDH1* – стабильно низкий уровень экспрессии после 24 часов дегидратации
- *NtPDH2* – очень высокий в течении 1 часа после стресса, далее резкое падение экспрессии до не детектируемого уровня
- Оба гена очень важны на ранних стадиях развития растения
- Выключение экспрессии этих генов приводит к нарушению формирования зародышей и их последующей гибели



Planta  
DOI 10.1007/s00425-006-0429-3

ORIGINAL ARTICLE

## Two tobacco proline dehydrogenases are differentially regulated and play a role in early plant development

Alexandra Ribarits · Alisher Abdullaev ·  
Alisher Tashpulatov · Andreas Richter ·  
Erwin Heberle-Bors · Alisher Turaev

Received: 21 June 2006 / Accepted: 10 October 2006  
© Springer-Verlag 2006

**Abstract** Proline dehydrogenase is the rate-limiting enzyme in proline degradation and serves important functions in the stress responses and development of plants. We isolated two tobacco proline dehydrogenases, *NiPDH1* and *NiPDH2*, in the course of screening

the CaMV 35S promoter led to increased proline contents, decreased seed set, delayed seed germination and retarded seedling development pointing towards an important function of at least one of the two *NiPDH* genes during plant reproductive development.

88

© 2006 Elsevier GmbH. Printed in Germany. ISSN 0032-0839. www.elsevier.com/locate/planta



# СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ

88

© 2006 Elsevier GmbH. Printed in Germany. ISSN 0032-0839. www.elsevier.com/locate/planta

**СЕКВЕНИРОВАНИЕ ДНК, АНАЛИЗ НУКЛЕОТИДНЫХ  
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ**

*Абдуллаев А.А.*

к.б.н., старший научный сотрудник  
Центра Геномных Технологий ИГиЭБР







## История

- 1953 г. – Френсис Крик и Джеймс Уотсон открыли двойную спираль ДНК
- 1970 г. – Даниель Натанс и Гамильтон Смит – открыли ферменты рестрикции
- 1977 г. – Вальтер Гилберт и Аллен Максам – секвенирование ДНК при помощи химического расщепления
- 1977 г. – Фред Сэнгер – секвенирование ДНК при помощи ди-деокситерминирующих нуклеотидов
- 1985 г. Кэри Мюллис – ПЦР
- 1986 г. – Лерой Худ – автоматическое секвенирование

1

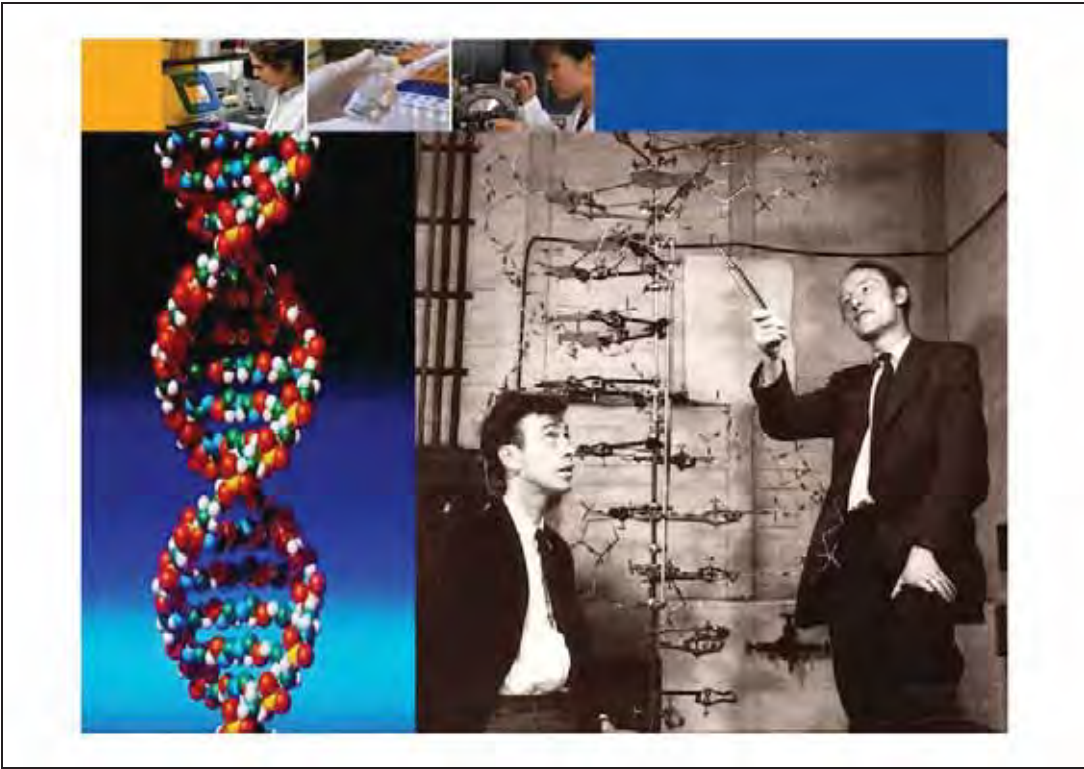
© 2008 Национальный институт геномных исследований (НИГАС) Университета Тулузы



- 1972 г. – был прочтен ген белка оболочки РНК-вируса, бактериофага MS2, изученный в лаборатории Вальтера Файера.
- 1977 г. – Ф. Сэнгер определил полную последовательность бактериофага OX174.
- 1984 г. – Определена последовательность генома HIV-1 (ВИЧ) компанией Chiron Corp.
- 1995 г. – Расшифрован геном живого организма гемофильной палочки (*Haemophilus influenzae*)
- 1996 г. – бактерия *E. Coli* и дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*.
- 1998 г. – впервые многоклеточный организм - круглый червь (*C. elegans*).
- 1999 г. – плодовая мушка (*Drosophila melanogaster*).
- 2000 г. – впервые прочтен геном растения (*Arabidopsis thaliana*).
- 2001 г. – Расшифрован геном человека .
- ...
- 2008 г. – геном сои (*Glycine max*)

2

© 2008 Национальный институт геномных исследований (НИГАС) Университета Тулузы





## История Секвенирования ДНК

**Метод Сэнгера (1977):**

меченные ддНТФ  
терминирующие  
копирование ДНК.

**Метод Гилберта (1973):**

химический метод  
разрезания ДНК в  
специфических местах  
(G, G+A, T+C, C).



Оба метода генерируют  
меченные фрагменты  
различной длины, а  
затем разделяются  
электрофорезом .



© 2000 История Тренинг в ЗЕР / ИР/С. Центр Геномные Технологии



## Метод Максама-Гилберта – химическое расщепление

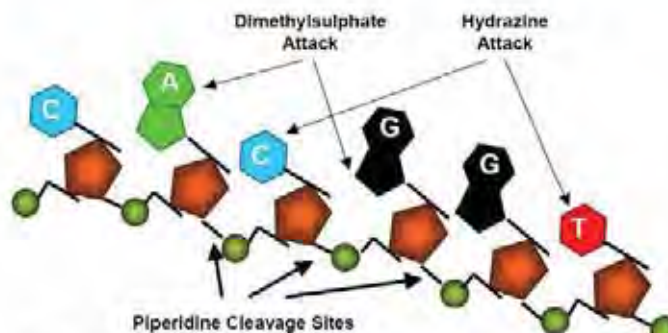


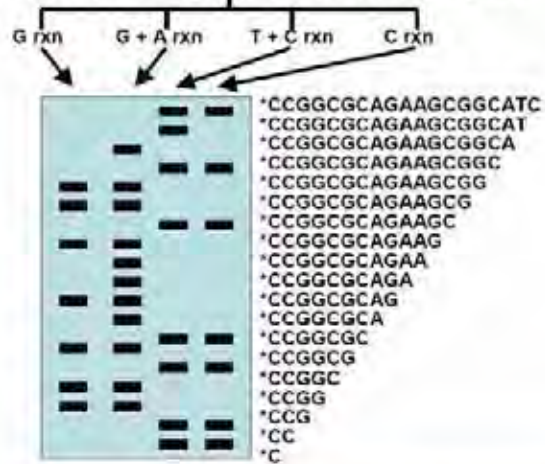
Figure 1. Chemical targets in the Maxam-Gilbert DNA sequencing strategy. Dimethylsulphate or hydrazine will attack the pyrimine or pyrimidine rings respectively and piperidine will cleave the phosphate bond at the 3' carbon.

© 2000 История Тренинг в ЗЕР / ИР/С. Центр Геномные Технологии



### Метод Максама-Гилберта – химическое расщепление

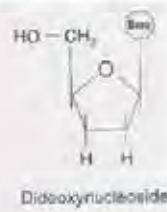
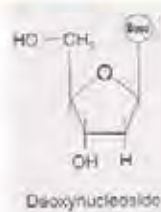
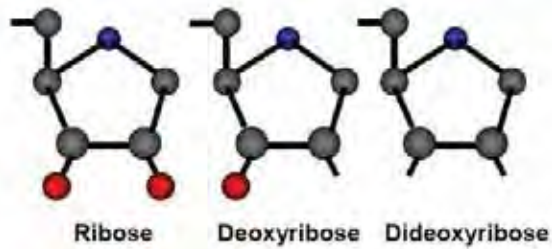
5' \*pCpCpGpGpCpGpCpGpCpArGpArArGpCpGpGpCpArTpCpArGpCpArArA 3'



© 2009 Институт Генетики и Эволюции РАН/ИГЭ, Центр Геномных Технологий



### Метод Сэнгера



© 2009 Институт Генетики и Эволюции РАН/ИГЭ, Центр Геномных Технологий





# Секвенирование

## Секвенирование ДНК методом по Сэнгеру



9

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРФ, Центр Генетиках Технологии



5' pCpCpGpGpCpGpCpApGpApApGpCpGpGpCpApTpCpApGpCpApApA 3'

ddG rxn    dd A rxn    ddT rxn    ddC rxn



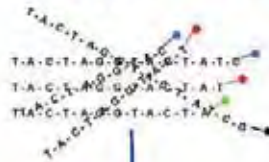
9

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРФ, Центр Генетиках Технологии





## Реакция секвенирования: Разделение одноцепочечных фрагментов ДНК

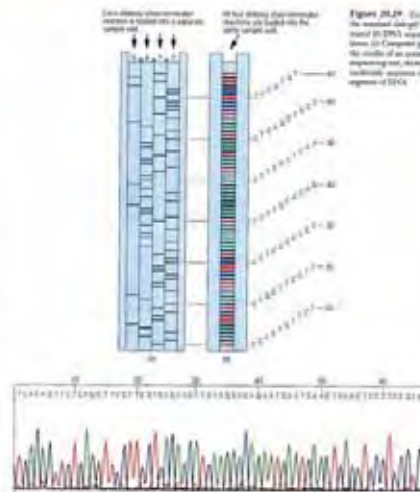
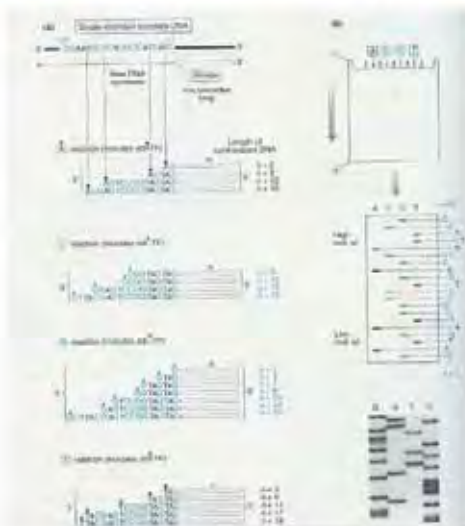


### Электрофорез

- Разделяющая среда : *гель или полимер*
- Разделение в зависимости от размера фрагмента ДНК
- Разрешение – 1 нуклеотид

13

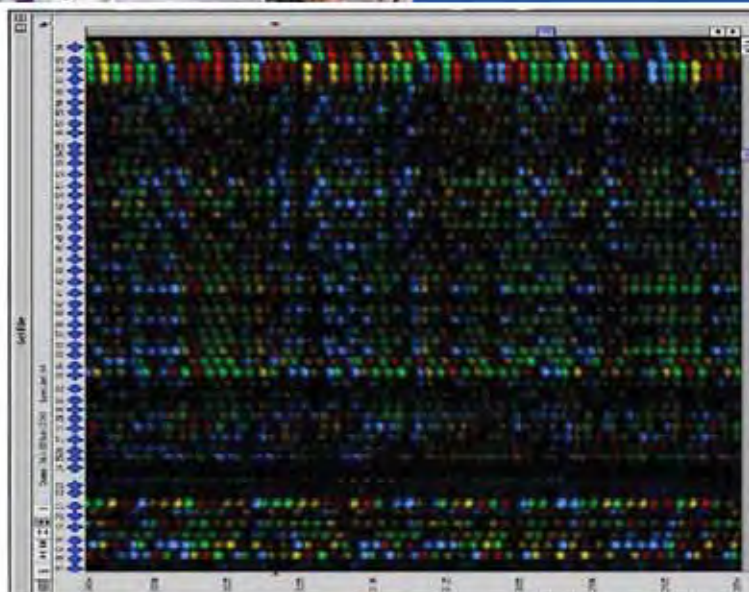
© 2009 Институт Генетики и ЗБР АН РУС, Центр Геномных Технологий



14

© 2009 Институт Генетики и ЗБР АН РУС, Центр Геномных Технологий



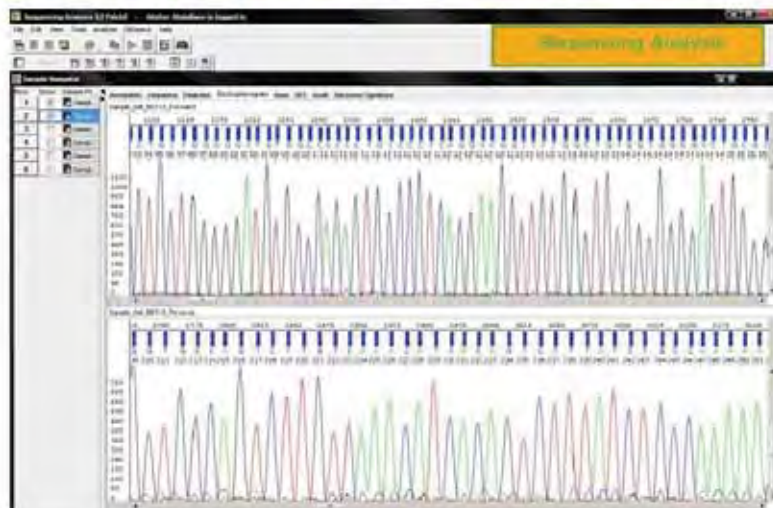


15

© 2008 Институт Генетики и ЭБР АНФУ, Центр Геномных Технологий



## Анализ результатов секвенирования



16

© 2008 Институт Генетики и ЭБР АНФУ, Центр Геномных Технологий





## Этапы

- Определение интересующего региона
- Проведение стандартной ПЦР (амплификация региона)
- Очистка продукта ПЦР

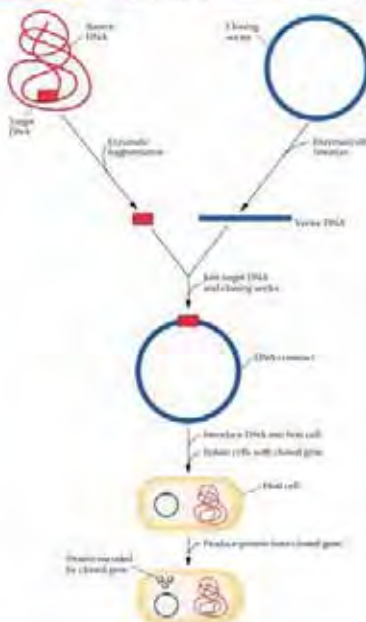


17

© 2009 Институт Генетики и ОБО АНФУБ, Центр Геномных Технологий



## Клонирование интересующего фрагмента



© 2009 Институт Генетики и ОБО АНФУБ, Центр Геномных Технологий



## Плазмиды

### Подготовка матрицы для сиквенса

- Щелочной лизис РНКазы и осаждение ПЭГом
- В градиенте CsCl
- Коммерческие наборы
  - QIAGEN plasmid kits (mini, midi, maxi)
  - Gentra Systems PureGene kit
- Note:
  - избегайте перегрузки колонок
  - необходимо включить (дополнительно) этап обессаливания

19

© 2009 Институт Генетики и ЭМР АН РБ, Центр Геномных Технологий



## ПЦР продукт

### Подготовка матрицы для сиквенса

- Удаление остатков ПЦР реакции:
  - Примеры – избежание множественных последовательностей
  - dNTPs - для сохранения оптимального соотношения dNTPs / ddNTPs
  - Соли – предотвратить ингибирование полимеразы
  - Неспецифичные ПЦР продукты – артефакты секвенирования



20

© 2009 Институт Генетики и ЭМР АН РБ, Центр Геномных Технологий



## Очистка агарозным гелем

Можно использовать для ПЦР продуктов вне зависимости от качества

### Преимущество:

- Удаление неспецифичных ПЦР продуктов и праймер-димеров

### Недостатки:

- Низкий выход
- Время
- UV вносит разрывы в цепь ДНК

→ Вырезать фрагмент и использовать

- Qiaquick (QIAGEN)
- MinElute (QIAGEN)



21

© 2000 Институт Генетики и ЭБР АНФУЗ, Центр Генетика Технологии



## Очистка через колонки

Может быть использована если побочные продукты < 100 bp (eg. праймер-димеры)

### Преимущества:

- Быстро и легко
- Репродуцируемость

### Недостатки:

- дорого
- не удаляет неспецифичные ПЦР продукты  $\geq 100$ bp

- Очистка через гель: QIAquick® (QIAGEN)
- Ультрафильтрация: Centricon-100, Microcon (Millipore)



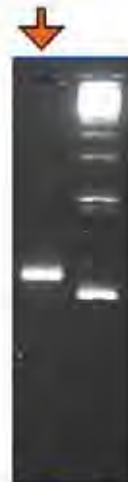
22

© 2000 Институт Генетики и ЭБР АНФУЗ, Центр Генетика Технологии



## Прямое секвенирование

- Может быть использовано только с единичным ПЦР продуктом
- ПЦР проведена с минимальной концентрацией праймеров и dNTPs ( $\leq 0.2 \mu\text{M}$  and  $\leq 100 \mu\text{M}$ , соответственно)
- Аликвота ПЦР разводится (от 1/5 до 1/10 раз)
- **Перимущества**
  - Быстро и недорого
  - Высокий выход
  - Автоматизация
  - Высокая производительность с использованием микроплашек
- **Недостатки**
  - Требуется оптимизация
  - Не удаляет неспецифичные ПЦР продукты и праймеры



23

© 2009 Институт Генетики и СБП РАН, Центр Геномных Технологий



## Качество ДНК матрицы

### Избегайте:

- Белки, детергенты, геномная ДНК
  - Сокращают срок службы капилляра
- Грязная и смешанная матрица
  - Сокращение длины прочтения
  - Приводит к сокращению срока службы капилляра
  - Плохие данные
- Соли, буферы содержащие ЭДТА
  - Ингибирует ДНК полимеразу
  - Избирательно инжецируются в капилляр

24

© 2009 Институт Генетики и СБП РАН, Центр Геномных Технологий





## Ферментативная очистка

- Может быть использована если имеется специфичный ПЦР продукт
- Экзонуклеаза I (Eco I) расщепляет одноцепочечную ДНК (праймеры)
- Щелочные фосфатазы (SAP / CIP) дефосфорилируют dNTPs  
Worle, E., et al. 1994, Nucl. Ac. Res. 22 4354; Hanke and Wink. 1994, Biotech. 17 858.
- Преимущества:
  - Быстро и легко:
    - Обработка ферментом при 37 °C в течение 15мин.
    - Инактивация фермента при 80 °C в течение 15мин.
    - Проводится прямо в термоциклере после ПЦР
  - Дешево, высокий выход, можно автоматизировать
  - Высокая производительность с использованием микроплашек
- Недостатки
  - не удаляет неспецифичные ПЦР продукты и праймеры



25

© 2004 Методы молекулярной биологии, Центр Геномных Исследований



## Компоненты реакции

- dNTP – dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- ddNTP в каждой реакции (отдельно или вместе при автоматическом секвенировании)
- ДНК полимераза (Taq)
- один праймер
- ДНК матрица
- Метка (радиоактивная или нерадиоактивная уже прикреплена к ddNTP)
- Реакционный буфер (200 mM Tris-HCl pH 9 , 5 mM MgCl<sub>2</sub>)

26

© 2004 Методы молекулярной биологии, Центр Геномных Исследований



## Соотношение dNTPs/ddNTPs

При секвенировании:

ddATP	dATP	ddATP	dTTP
ddGTP	ddGTP	dGTP	dATP
ddCTP	ddCTP	dCTP	dCTP
ddTTP	ddTTP	dTTP	dGTP
ddATP	ddATP	ddCTP	dCTP
ddGTP	dGTP	ddTTP	dGTP

0	Соотношение dNTPs / ddNTPs		
	низкое	высокое	
Удлинение на 1 нуклеотид	В основном короткие фрагменты	Более длинные фрагменты	Отсутствие сигнала

→ Различные наборы для различных методов секвенирования

27

Note: Важно избавиться от остаточных dNTP при секвенировании ПЦР



## Наборы BigDye® Terminator

Сравнение

	Version 1.1	Version 3.1
Dyes	Original BigDye kit → (BD) / BDTv1 DyeSet/Primer file → v1.1-specific matrix or spectral calibration	BigDye kit with improved Incorporation by enzyme → (BDv3) / BDTv3 DyeSet/Primer file → v3.1-specific matrix or spectral calibration
dNTPs/ddNTPs Ratio	"original"	optimized for long reads
Enzyme	heat-stable, optimized for difficult sequences	
Buffer	5 x BigDye sequencing buffer, included in kit	

28

© 2009 Институт Генетики и СЕП АИР/3, Центр Геномных Технологий



## BigDye® Terminator Kits - Применение

Задачи	V3.1	V1.1
de novo Секвенирование	+	✍
Ресеквенирование	+	✍
Секвенирование сложной ДНК	+	+
Длинное секвенирование	+	✍
Различные матрицы (plasmids, BACs, и cosmids)	+	✍
Определение смешанных осн	+	✍
Короткие ПЦР продукты using rapid electrophoresis run modules	✍	+

+ Рекомендовано ✍ Дополнительно

### • v3.1 большинство задач

- De-novo секвенирование
- Ресеквенирование

### • v1.1 особые задачи

- Секвенирование коротких ПЦР фрагментов
- Точное определение последовательности от праймера

Подробная Информация в Product Bulletin „BigDye Terminator v3.1 и v1.1 Cycle Sequencing Kits“

28

© 2009 Applied Biosystems в/ОБП «ИНТЕС», Центр Генетики, Биомолекул



## Реакция секвенирования

Стандартный протокол

	Образец	Контроль
<b>Ready Reaction Mix</b>	8 µL	8 µL
<b>DNA Template</b>	x µL	
PCR Product (1 - 50 ng)		
Plasmid (150 - 300 ng)		
Контрольная ДНК (плазмида pGEM) (0.2 µg/µl)		0.75 – 1.5 µL
<b>Primer 3,2 – 5 pmoles</b>	y µL	
<b>Control Primer (0.8 pmol/ µl )</b>		4 µL
<b>H<sub>2</sub>O (fresh MilliQ water or HPLC-grade)</b>	z µL	6.5 - 7.25 µL
<b>Final volume</b>	20 µL	20 µL

30

© 2009 Applied Biosystems в/ОБП «ИНТЕС», Центр Генетики, Биомолекул





## Реакция секвенирования

Протокол термоциклирования

Начальная денатурация : 1 мин. - 96°C

Денатурация : 10 сек. - 96°C

Отжиг : 5 сек. - 50°C

Элонгация : 4 мин. - 60°C

} Циклы (x25)

GeneAmp® PCR Instrument systems 2400, 2700, 2720, 9600, 9700 (Emulation Mode),  
9800 : 1°C / s

- избежать гибридизации ниже чем 50°C
- Если T<sub>m</sub> праймера >60°C, этап гибридизации пропускаем (96°C 10 sec, 60°C 4 min)
- увеличить кол-во циклов если сигнал слабый или мало матрицы
- Большие матрицы ДНК: ВАС, космиды, бактериальная геномная ДНК:
  - 95°C - 5 min
  - 95°C/30sec – 50-55°C/10sec - 60°C/4min 50 cycles

31

© 2000 Институт Генетики и ОБО АНРУЗ, Центр Генетических Технологий



## Генетические анализаторы

### ABI PRISM® 3130 и 3130xl



Принцип „Автоматического Секвенатора“  
Названия частей и расходных материалов

32

© 2000 Институт Генетики и ОБО АНРУЗ, Центр Генетических Технологий





## Этапы работы



33

© 2009 Институт Генетики и ЗБР АНРУЗ, Центр Генетика Ташкентский



## 3130 Описание частей инструмента



34

© 2009 Институт Генетики и ЗБР АНРУЗ, Центр Генетика Ташкентский



## 3130 Особенности и преимущества



### Программа Data Collection v3.0

Модуль для 3130 POP-7™ Polymer

- Простая и понятная визуализация для запуска обслуживания инструмента
- Детектирование экрана
- Поддержка ОС Windows XP



### Программы для анализа данных

- Sequencing Analysis v5.2 - (KB™ basecaller calibration for 3130 Series Systems)
- Seqscore v2.5 - (KB™ basecaller calibration for 3130 Series Systems)
- GeneMapper® Software v3.7 3130 Series support, LOH and AFLP® Kit support
- GeneMapper® ID Software v3.2- 3130 Series support and Yfiler™ support



### 3130 POP-7™ Polymer

- Данные высокого качества с более длинными прочтениями последовательностей, быстрыми программами, что значительно сокращает время проведения анализа.
- Стандартизован под все платформы
- Один полимер для Секвенирования и Фрагментного Анализа
- Enables SNPlex System on 3130x Genetic Analyzer

35

© 2009 Институт Генетики и ЗЕР АНРУЭ, Центр Генетич. Технологий



## Обзор деталей инструмента

Система доставки полимера снабжена насосом



Защитный кожух

Интегрированный поршень насоса

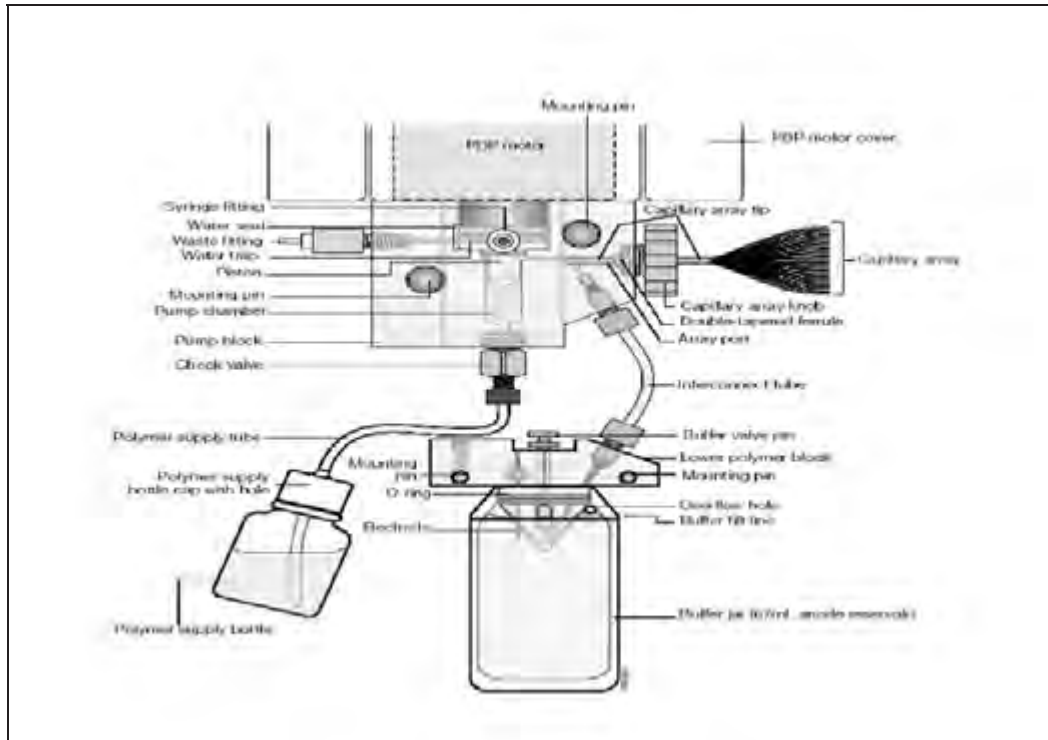
Прозрачные трубки большого диаметра

Ёмкость для буфера на 16 мл

Бутыль с полимером на 7 мл

36

© 2009 Институт Генетики и ЗЕР АНРУЭ, Центр Генетич. Технологий



## Полимеры

- Flowable polymers dynamically coat capillary preventing bulk fluid flow
- Polymer bottles come in a 7-mL bottle for 3130/3130xl
  - 3130 POP-7™ Polymer (p/n 4352759)
  - 3130 POP-4™ Polymer (p/n 4316355)
  - 3130 POP-6™ Polymer (p/n 4352757)
  - CAP™ Polymer (p/n 4340379)
- Хранить в холодильнике
- Довести до комнатной температуры перед применением
- Срок годности 3 мес.
- Не использовать по истечении срока годности
- Не смешивать полимеры с разными номерами лотов





**Автоматизатор**



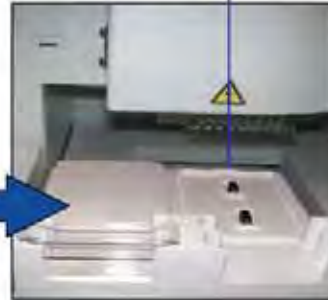
Слив  
1X буфер      Вода



ABI PRISM® 3130.x/ Genetic Analyzer:  
2 x 96 or 384 samples

3130 Genetic Analyzer:  
1 x 96 or 384 samples

Сенсоры детекции плашек  
96 или 384



39

© 2009 Институт Генетики и ЗБР АНРФУЗ, Центр Генетич. Технологий



**Компановка плашки на 96-лунок (384)**



Плашка



Септа

Подставка

40

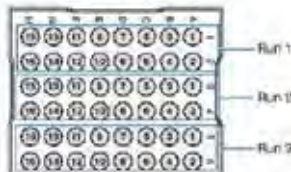
© 2009 Институт Генетики и ЗБР АНРФУЗ, Центр Генетич. Технологий





## 96-Well Plate Mapping

3130xl Instrument



3130 Instrument



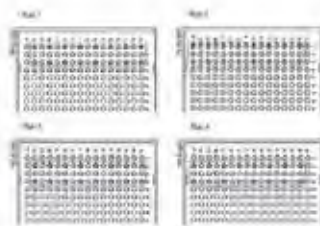
41

© 2009 Molecular Devices in 384-Well Plates, Using Existing Test Protocols

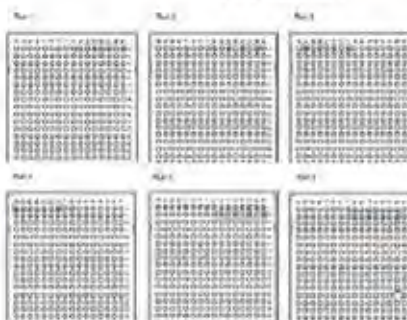


## 384-Well Plate Mapping

3130xl Instrument



3130 Instrument



42

© 2009 Molecular Devices in 384-Well Plates, Using Existing Test Protocols



## Капилляры



- 50  $\mu\text{m}$  ID  
- 100 прогонов



Длина:  
- 22 cm  
- 36 cm  
- 50 cm  
- 80 cm

43

© 2010 Институт Геномики и ДНК АН РУС, Центр Геномных Технологий



## Комбинации капилляров и полимеров для секвенирования

Type of Run	Capillary Length (cm)	Polymer Type	Module	Run Time (min)	24 hr Throughput (number of samples)		KB™ Basecaller QV <sub>20</sub> LOR <sup>a</sup> *
					3130 Genetic Analyzer	3130xl Genetic Analyzer	
Ultra rapid	36	POP-4	UltraSeq36_POP4	40	144	576	400
		POP-7	UltraSeq36_POP7	35	164	656	500
Rapid	36	POP-6	RapidSeq36_POP6	60	96	384	500
		POP-7	RapidSeq36_POP7		96	384	600
Fast	50	POP-7	FastSeq50_POP7	60	96	384	700
Standard	50	POP-4	StdSeq50_POP4	100	56	224	600
		POP-6	StdSeq50_POP6	150	36	144	600
		POP-7	StdSeq50_POP7	120	48	192	650
Long read	80	POP-4	LongSeq80_POP4	210	24	96	700
		POP-7	LongSeq80_POP7	170	32	128	950

\* Length of Read (LOR) is the usable range of high-quality or high-accuracy bases determined by Quality Values (QV) generated by KB Basecaller v1.2. The LOR is determined by using a sliding window of 20 bases, which has an average QV > 20.  
 †: 98.5% basecalling accuracy, less than 2% Ns.

44

© 2010 Институт Геномики и ДНК АН РУС, Центр Геномных Технологий



## Электрокинетическая инъекция



Электрод (Катод)

Капилляр

- Капилляр и электрод погружаются в образец
- Подаётся ток на определённое время
- Отрицательно заряженные молекулы ДНК входят в капилляр и мигрируют к положительно заряженному электроду (анод) на другом конце капилляра
- Капилляр перемещается в буфер для проведения электрофореза

46

© 2009 Институт Генетики и ЗЕР АНРФ. Центр Генетич. Технологий



## Капиллярный электрофорез

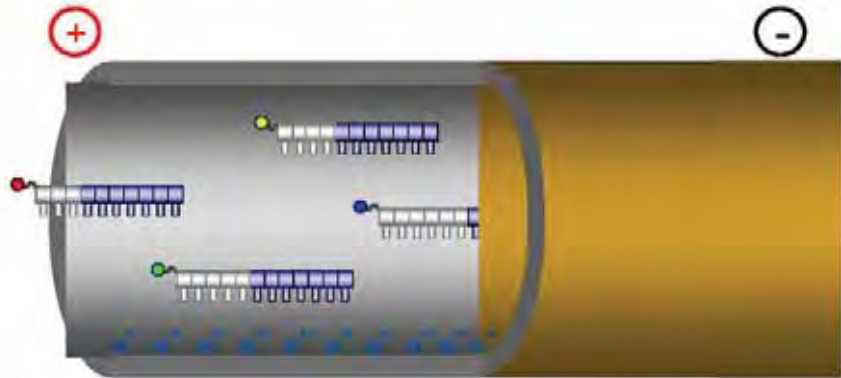


46

© 2009 Институт Генетики и ЗЕР АНРФ. Центр Генетич. Технологий



## Принцип капиллярного электрофореза

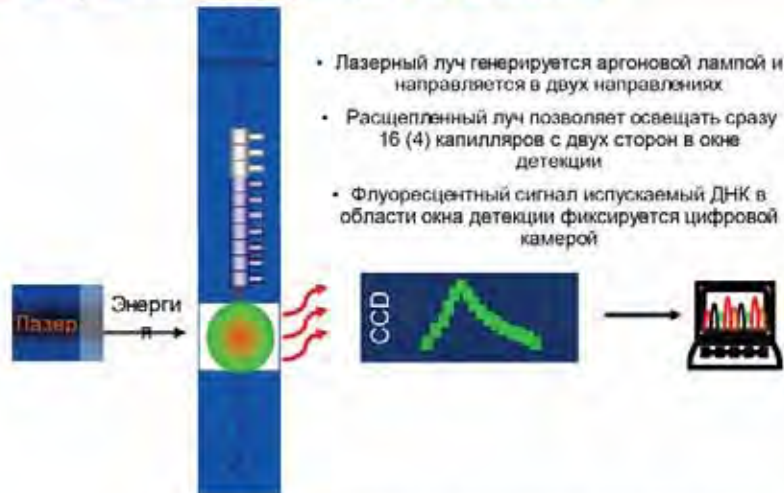


47

© 2009 Институт Генетики и ДРП АН РЭУ, Центр Геномных Технологий



## Детектирование флуоресцентного сигнала



- Лазерный луч генерируется аргоновой лампой и направляется в двух направлениях
- Расщепленный луч позволяет освещать сразу 16 (4) капилляров с двух сторон в окне детекции
- Флуоресцентный сигнал испускаемый ДНК в области окна детекции фиксируется цифровой камерой

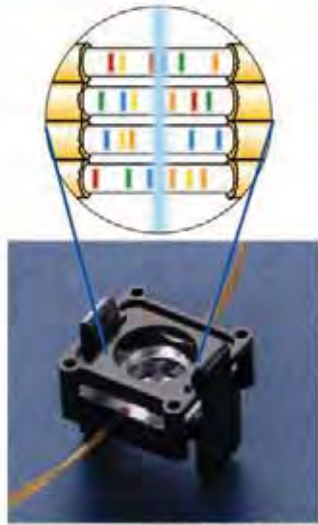
48

© 2009 Институт Генетики и ДРП АН РЭУ, Центр Геномных Технологий





### Капляр: Окно детекции

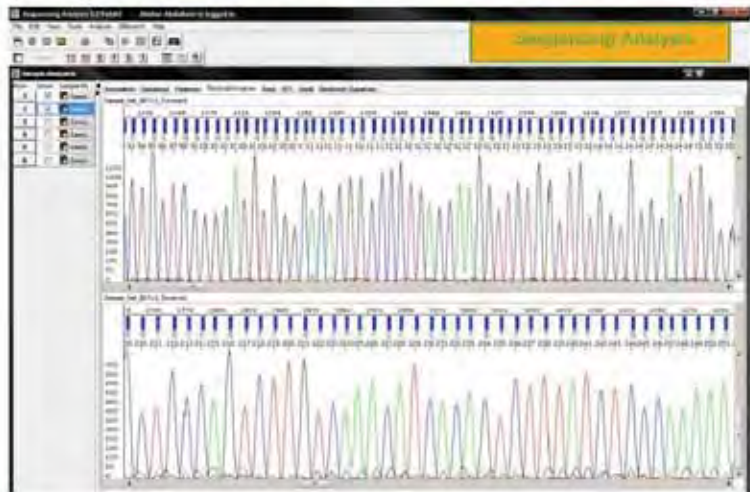


49

© 2009 Институт Генетики и ДЕР АНФУС (Центр Генетических Технологий)



### Анализ результатов секвенирования

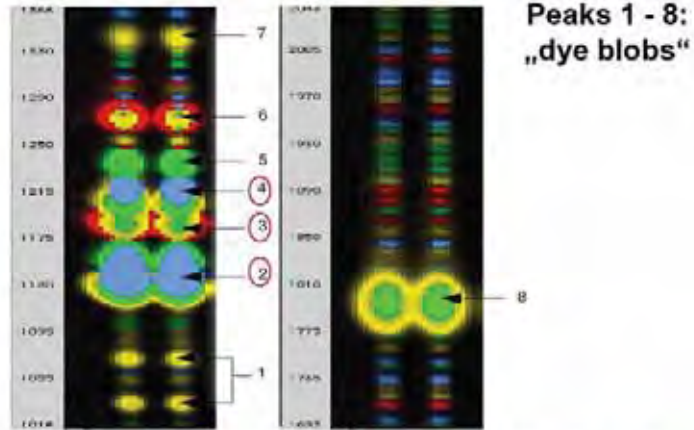


50

© 2009 Институт Генетики и ДЕР АНФУС (Центр Генетических Технологий)



**Несвязавшиеся BigDye® Terminator Dyes  
"dye blobs" in gel image / array view**

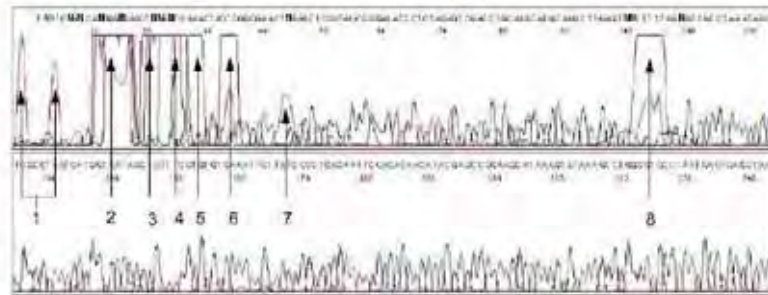


51

© 2009 Институт Генетики и ЗЕР АНФУС, Центр Геномных Технологий



**Несвязавшиеся BigDye® Terminator Dyes  
"dye blobs" in analyzed data**



**Peaks 1 - 8: „dye blobs“**

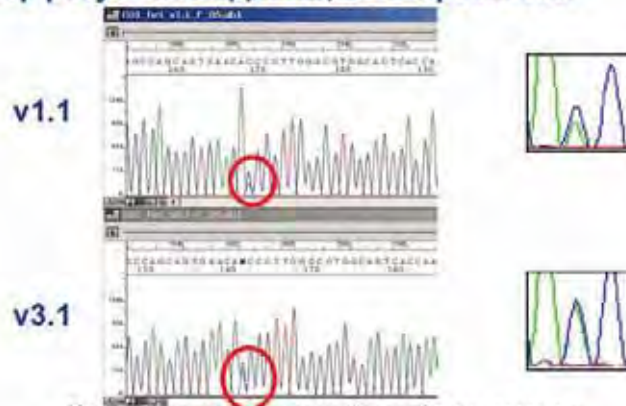
52

© 2009 Институт Генетики и ЗЕР АНФУС, Центр Геномных Технологий



## Наборы BigDye® Terminator

Пример результата: Детекция гетерозиготы



Note: Более однородный профиль пиков и идентификация смешанных пиков у 3.1

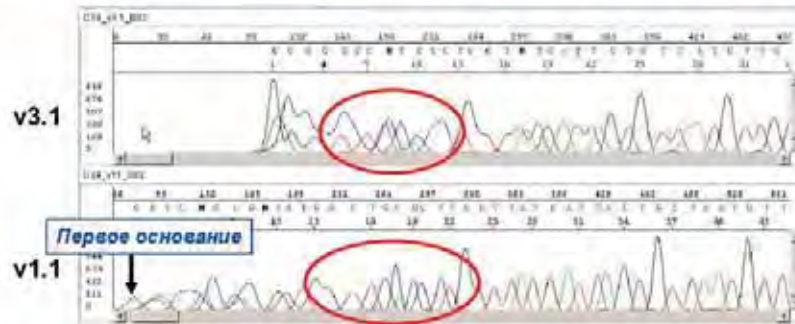
39

© 2009 Институт Генетики и ЗРП АН РУС, Центр Генетических Технологий



## BigDye® Terminator Kits

Пример результата: начало последовательности



Если необходимо определение первых нуклеотидов или гетерозигот в пределах 50 п.о., рекомендован набор BigDye® Terminator v1.1.

38

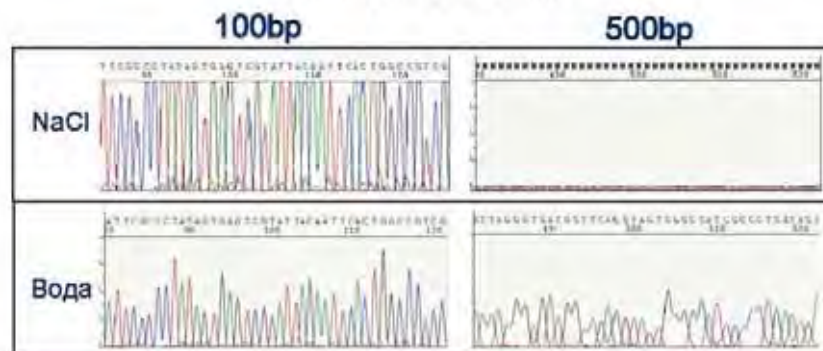
© 2009 Институт Генетики и ЗРП АН РУС, Центр Генетических Технологий



## Качество ДНК матрицы

Влияние солей на эффективность полимеразы

### Сравнение контроля рGEM® в присутствии 40mM NaCl или воды



35

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРФУЭ, Центр Геномных Технологий



## Выявление и устранение неисправностей

### Частые проблемы

- || Отсутствие данных/сигналов
- || Контаминция
- || Потеря разрешения
- ✗ Присутствие двух матриц (после первого ПЦР остался второй праймер)
- || Неспецифические сигналы
- || Сложные последовательности (GC – регионы, гомополимеры)

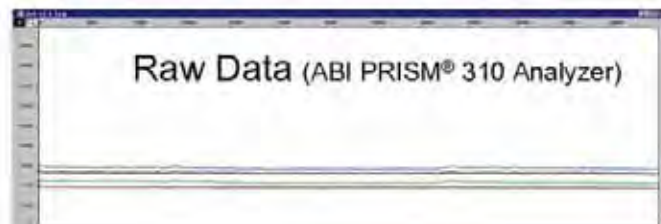
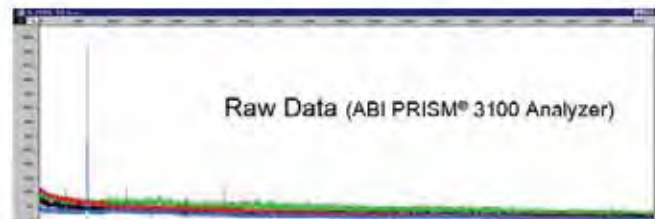
36

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРФУЭ, Центр Геномных Технологий





## 1) Отсутствие данных/сигналов



67

© 2009 Институт Генетики и ЗЕР-АНРФУЗ, Центр Генетика Технологии



## 1) Нет данных/сигналов

### Возможные причины:

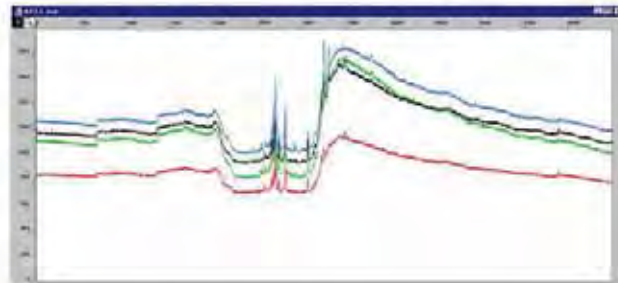
- Проблема инъекции
  - Пузырек в пробирке с образцом
  - Нет тока между капилляром и электродом (пузырек в электрофорезной системе)
  - Объем образца в пробирке слишком мал
  - Образец ( и размерный стандарт ) не добавлен
  - Не оптимальная калибровка автодозатора (310 Instrument)
  - Забитый капилляр
- Проблема детекции
  - Лазер потерял интенсивность
  - Не оптимальная пространственная калибровка

68

© 2009 Институт Генетики и ЗЕР-АНРФУЗ, Центр Генетика Технологии



## 2) Контаминация



- Флуоресцентная контаминация
  - образец
  - блок, шприц

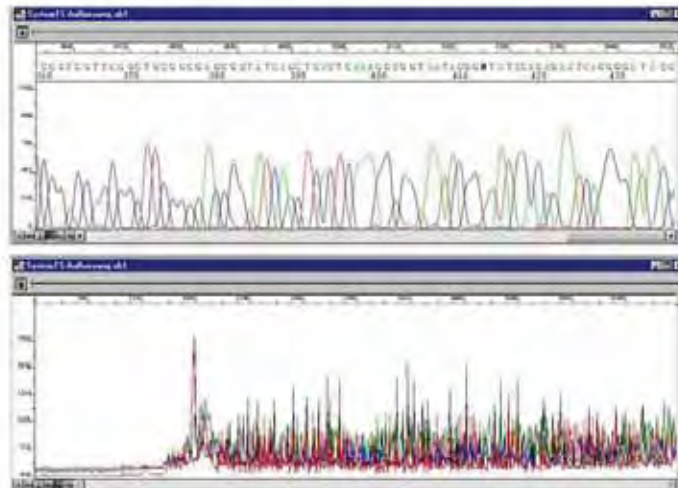
59

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНФУС, Центр Геномных Технологий



## 3) Потеря разрешения

- Старый капилляр

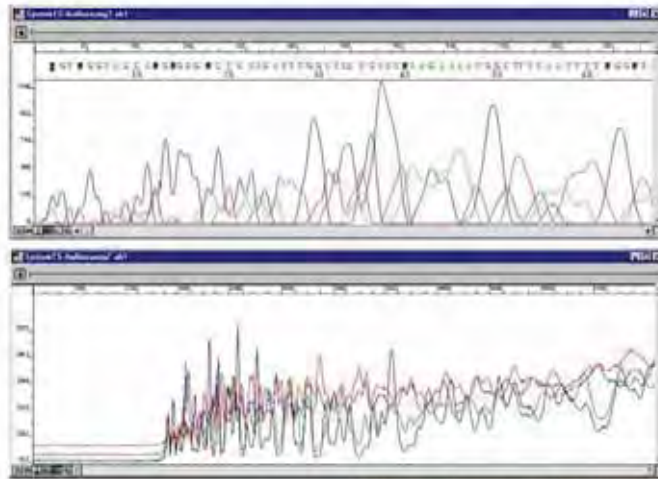


60

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНФУС, Центр Геномных Технологий



### 3) Потеря разрешения



81

© 2009 Институт Генетики и ЗСР АН РУС, Центр Геномных Технологий



### Потеря разрешения

Возможные причины:

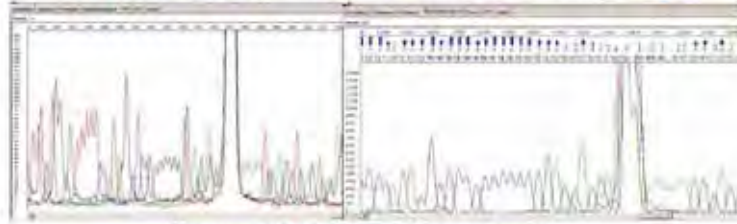
- Старый капилляр
- Неполная смена полимера от прогона к прогону
- Старый полимер

82

© 2009 Институт Генетики и ЗСР АН РУС, Центр Геномных Технологий



## 5) Неспецифичные сигналы: Импульсы



Импульсы в обработанных и исходных данных:

- импульс = одиночный (высокий) пик 4 или 5 красителям
- почистите шприц и блок

Совет:

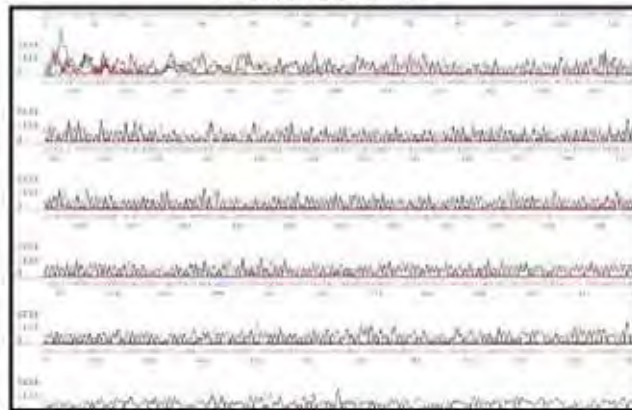
- Используйте свежий, комнатной температуры полимер (без кристаллов);
- если не прошли, то замените капилляр

63

© 2009 Институт Генетики и СГР АНРФУ, Центр Генетических Технологий



## GC motif BigDye® Terminator v3.1 0.5 ul RR mix in 10 ul reaction



Слабый сигнал, необходимо увеличить Ready reaction mix

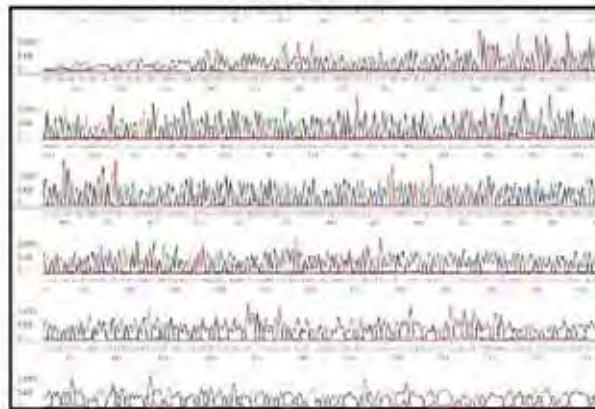
64

© 2009 Институт Генетики и СГР АНРФУ, Центр Генетических Технологий





**GC motif**  
**BigDye® Terminator v3.1**  
4 ul RR mix in 10 ul reaction



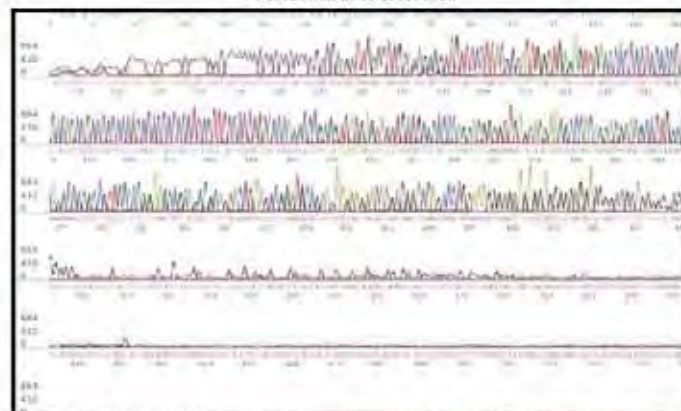
Кол-во реакционной смеси добавлено согласно протоколу

88

© 2000 Институт Генетики и СБР / ИГиС, Центр Геномных Технологий



**G motif**  
**BigDye® Terminator v3.1**  
4 ul RR mix in 10 ul reaction



G-массив , проблема прочтения повторов G после 370 нуклеотида

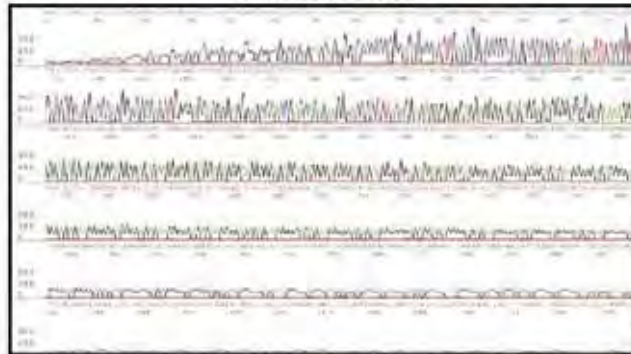
88

© 2000 Институт Генетики и СБР / ИГиС, Центр Геномных Технологий



### G motif

BigDye® Terminator v3.1/dGTP BigDye® Terminator v3 BLEND  
4 ul RR mix in 10 ul reaction



Изменение реакционной смеси  
1/2X разведение BigDye® Terminator v3.1/dGTP BigDye® Terminator v3.0

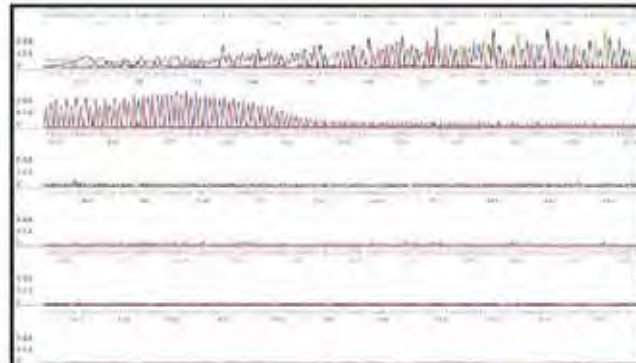
87

© 2009 Институт Генетики и ЗВР / ИГиЗ, Центр Семейных Тестов



### ~100 Base CT Repeat

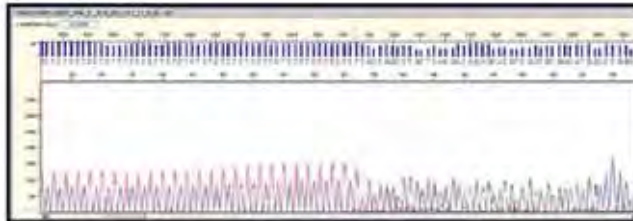
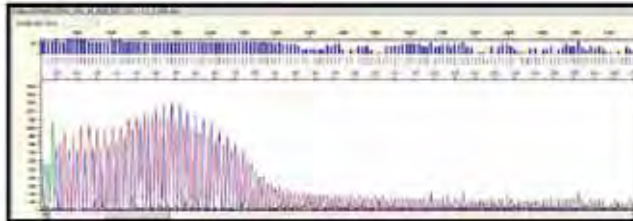
BigDye® Terminator v3.1  
4 ul RR mix in 10 ul reaction



CT повторы не читаются при стандартной реакции

88

© 2009 Институт Генетики и ЗВР / ИГиЗ, Центр Семейных Тестов



Проблему чтения сложных регионов можно преодолеть изменив место посадки праймера

88

© 2009 Институт Генетики и ЭМР/МФЧБ, Центр Геномных Технологий



Sequence Context	Recommendation
poly A and poly C	BigDye® Terminator v3.1
poly T	ABI PRISM® 3100/3100XL Terminator / F1
poly G	BigDye® Terminator v3.1 and primer design
A1 and AC din	BigDye® Terminator v3.1
GA repeats	BigDye® Terminator v3.1, BigDye® Terminator v3.0 BLEND
GA din	BigDye® Terminator v3.0, BigDye® Terminator v3.1, BigDye® Terminator v3.0 BLEND
GT din	BigDye® Terminator v3.1, BigDye® Terminator v3.0 BLEND
CT repeats	F2, F3
CT din	BigDye® Terminator v3.1
QC din	BigDye® Terminator v3.1
CC repeats, CG, GGC	F2, F3
hairpin	BigDye® Terminator v3.1, primer design
secondary sequence	modify cycling conditions

89

© 2009 Институт Генетики и ЭМР/МФЧБ, Центр Геномных Технологий



## Компьютерный анализ



# СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ



**ОХРАНА ТРУДА И ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ В НАУЧНЫХ ЛАБОРАТОРИЯХ  
ЦЕНТРА ГЕНОМНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ**

*Мавлянов Г.Т.*

к.б.н., ведущий научный сотрудник  
Центра Геномных Технологий ИГиЭБР

**Виды инструктажа.**

**Регистрационные журналы**

**Оказание первой помощи**

**Правила, способы и средства тушения пожаров**

**Работа с органическими растворителями**

**Работа с щелочными металлами**

**Работа с ртутью**

**Техника безопасности в химической лаборатории**

**Химический взрыв**

**Физический взрыв**

**Пожар**

**Термические ожоги**

**Химические ожоги**

**Отравление**

**О возмещении трудящимся в случае профессиональных заболеваний  
(пересмотренная в 1934 году)**

**Презентация «Техника безопасности в научных лабораториях Центра  
Геномных Технологий»**

Культура охраны труда и система охраны труда формируются на предприятиях уже в течение нескольких десятилетий, и они постоянно совершенствуются, модернизируются. Огромное значение уделяется в первую очередь профессиональной подготовке персонала, который эксплуатирует оборудование, качеству и надежности самого оборудования. Оно в обязательном порядке систематически проверяется и испытывается. Проводится целый комплекс мероприятий, обеспечивающих его безопасное функционирование. Таким образом, безопасность на предприятии обеспечивает и защиту окружающей среды.

Актуальность же данного мероприятия продиктована тем, что они направлены, прежде всего, на предупреждение случаев производственного травматизма специалистов. А между тем вопрос охраны труда имеет большое не только социальное, но и экономическое значение. Так, аналитиками было подсчитано, что ежегодно во всем мире от несчастных случаев на производстве и профессиональных заболеваний погибает около 2,2 миллиона человек. Приблизительно 270 миллионов человек получают серьезные травмы и еще 160 миллионов работников страдают кратковременными и длительными профессиональными заболеваниями. По оценкам Международной организации труда, членом которой является и Узбекистан, общие потери от этих несчастных случаев и

проблем, связанных со здоровьем, составляют примерно 4% мирового валового внутреннего продукта.

Большую роль в формировании нового подхода к охране труда и технике безопасности призван сыграть и недавно вступивший в силу Закон «Об обязательном государственном социальном страховании от несчастных случаев на производстве и профессиональных заболеваний». Надо отметить тот факт, что охрана труда всегда была частью государственной политики. Практически сразу после обретения независимости – в 1993 году был принят Закон «Об охране труда», в котором важнейшим принципом был признан приоритет жизни и здоровья работника по отношению к результатам производственной деятельности предприятия. Новый закон, направленный в первую очередь на усиление социальной защиты работающих граждан, еще более усиливает мотивацию, как работодателей, так и работников к соблюдению правил по технике безопасности и, несомненно, будет способствовать снижению уровня производственного травматизма и профессиональных заболеваний.

#### **Виды инструктажа.**

Вводный инструктаж проводится со всеми вновь принимаемыми на работу независимо от их образования, стажа работы по данной профессии или должности, а также с командированными работниками, учащимися, студентами, прибывшими на производственное обучение или практику.

Первичный инструктаж на рабочем месте должен проводиться со всеми вновь принятыми на работу работниками, переводимыми из одного подразделения юридического лица в другое, командированными, учащимися и студентами, а также с работниками, которым поручается выполнение новой для них работы. Данный вид инструктажа проводится с каждым работником индивидуально с демонстрацией безопасных приемов труда.

Повторный инструктаж проводится с целью проверки и повышения уровня знаний работником правил и инструкций по охране труда индивидуально или с группой работников одной профессии или группы по программе инструктажа на рабочем месте.

#### **Регистрационные журналы**

Проведение соответствующего вида инструктажа, проверки знаний и правил охраны труда и получения работником допуска к самостоятельной работе, руководитель, проводивший инструктаж, отмечает в журнале регистрации инструктажа на рабочем месте и (или) в личной карточке работника дату проведения инструктажа, фиксирует оценку знаний с обязательной подписью инструктируемого работника и инструктирующего. При регистрации проведения внепланового инструктажа необходимо также указать причину его проведения. Проведение целевого инструктажа с работниками, которым предстоит проведение работ по наряду-допуску, разрешению и т. п., подлежит фиксации непосредственно в наряде-допуске или в ином документе, служащем разрешением на производство данных работ.

#### **Особенности профиля лабораторий биотехнологии**

Лаборатория профиля генетической инженерии и биотехнологии сочетает условия, характерные для химической, физической и биологической исследовательской лабораторий. Следовательно, правила сочетают соответствующие профильные инструкции. Работа в химической лаборатории всегда сопряжена с определенным

риском. Но при грамотной и осторожной работе этот риск сводится к минимуму, ведь большинство пожаров, отравлений, ожогов и травм происходит исключительно по причине пренебрежения правилами техники безопасности или просто незнанию их.

#### Оказание первой помощи

- Остановка сердца или дыхания
- Термические ожоги
- Ожоги кислотами и щелочами
- Поражения электрическим током
- Попадание агрессивных веществ в глаза
- Кровотечения

#### Правила, способы и средства тушения пожаров

- Углекислотные огнетушители
- Правила тушения пожаров водой
- Правила тушения пожаров песком
- Тушение горячей одежды на человеке
- Возгорания в вытяжном шкафу

#### Работа с органическими растворителями

- Источники опасности
- Работа с легковоспламеняющимися жидкостями
  - Учет утяжеления воздуха
  - Проведение процессов, связанных с нагреванием ЛВЖ
  - Хранение и проливы ЛВЖ
  - Предотвращение возможности воспламенения ЛВЖ

#### Работа с щелочными металлами

- Источники опасности
  - Литий
  - Натрий
  - Калий
- Уничтожение остатков щелочных металлов
- Очистка щелочных металлов от оксидных пленок
- Абсолютирование органических растворителей
- Тушение горящих щелочных металлов

#### Работа с ртутью

- Источники опасности при работе с ртутью.
- Действие ртути на организм человека.
- Обнаружение паров ртути.
- Механические методы демеркуризации.
- Химические методы демеркуризации.

#### **Техника безопасности в химической лаборатории**

Жизнь и здоровье практикующего химика во многом зависит от правил, которые просто необходимо соблюдать в лаборатории. Но часто некоторые правила техники безопасности не объясняются, а просто принимаются на веру. Эта страница дает перечень ситуаций, с объяснением причин, которые могут возникнуть в химической лаборатории.

### **Химический взрыв.**

Химический взрыв - взрыв, возникающий за счет протекания химической реакции веществ или разложения вещества. Обычно характеризуется значительной разрушительной мощностью и поражающей способностью. Может приводить к пожару в лаборатории.

Ситуации, которые могут привести к химическому взрыву:

1. Смешивание перекиси водорода с альдегидами и кетонами в присутствии даже микропримесей кислот приводит к образованию высокочувствительных перекисей. Попытка перегонки такого раствора и иногда и удар колбы об стол может привести к взрыву.

2. При хранении простых эфиров в них накапливаются перекисные соединения обладающие взрывчатыми свойствами (особенно опасны эфиры имеющие атом водорода в альфа-положении). Перегонка таких эфиров может привести к взрыву. Перед перегонкой обязательна проверка на перекиси и их разрушение.

3. Сушка любых галогеналканов (в том числе и фреонов) натрием может привести к взрыву. Состав взрывчатых веществ не известен, но иногда взрыв происходит после некоторого индукционного периода.

4. Работа с хлорной кислотой в присутствии органических веществ должна вестись с осторожностью, так как многие смеси с хлорной кислотой и органические перхлораты взрывчаты. Смешивание хлорной кислоты с диметилсульфоксидом дает немедленный взрыв.

5. Многие забывают, что при смешивании перманганата калия с концентрированной серной кислотой образуется семиокись марганца, которая взрывает при нагревании или соприкосновении с органическими веществами.

6. Смеси любых восстанавливающих веществ с сухими окислителями, такими как перманганат калия, хлораты, перхлораты, броматы, иодаты, периодаты потенциально взрывоопасны и обращаясь с ними нужно с осторожностью

7. Смешивание тетранитрометана с органическими веществами дает очень чувствительные смеси.

8. Работа со взрывчатыми веществами.

9. Хранение вместе растворов аммиака и иода, может привести к образованию на сосудах черного осадка чрезвычайно чувствительного взрывчатого иодистого азота.

10. Длительное хранение аммиачных растворов солей серебра может привести к выпадению очень взрывчатого (даже под слоем воды) черного осадка нитрида серебра.

11. Хранение кислот в металлических емкостях или пролив их на металлические поверхности приводит к выделению водорода. В замкнутом объеме может накопиться взрывоопасная концентрация. Аналогично опасно хранить щелочи рядом с металлами амфотерного характера (алюминий, цинк).

12. Смешивание пероксидных соединений с солями переходных металлов может спровоцировать взрыв из-за каталитического ускорения разложения перекисей.

13. Смешивание солей аммония и гидразина с солями, содержащими анион-окислитель. При этом могут образовываться сильновзрывчатые соли (к ним например относятся, хлорат и перманганат аммония, нитрат, хлорат, перхлорат гидразина и т.д.).

14. Растворы азидов и пикратов с тяжелыми металлами могут дать очень чувствительные к удару и трению соли. Также не допускается слив солей азидов в канализацию, вследствие возможности образования в трубах азида железа.



### **Физический взрыв.**

Физический взрыв - взрыв, возникающий за счет быстрого разрушения емкостей или из-за быстрого выделения тепла в какой-либо точке. Обычно (но не всегда) имеет меньшую мощность, чем химический и меньшие разрушительные последствия.

Ситуации, которые могут привести к физическому взрыву:

Кипячение реакционной смеси или реакции с выделением газа в герметичной системе. Эта ситуация возникает когда процесс проводится в намеренно замкнутой системе или когда происходит забивание/закоксовывание отводных трубок.

2. Приливание легкокипящей жидкости в систему с температурой выше ее точки кипения. При этом жидкость моментально превращается в пар и установку может разорвать давлением паров.

3. Работа со сжиженными газами в полностью герметичной системе не рассчитанной на высокое давление.

4. Работа с солями плутония должна проводиться так, чтоб не произошло накопление критической массы (500 г) в любой емкости.

### **Пожар.**

Пожар - неконтролируемое возгорание в лаборатории. Может привести к полному уничтожению всей лаборатории.

Ситуации, которые могут привести к пожару:

1. Термическое лопание колбы с легковоспламеняющимися жидкостями. Для локализации очага пожара рекомендуется под установку с колбой заранее помещать металлический поддон с загнутыми краями.

2. Смешивание веществ дающих экзотермическую реакцию с воспламеняющимися материалами. Были случаи возгорания смесей сульфата меди с железом и опилками, негашенной извести с опилками или углем и т.д.

3. Работа с очень легковоспламеняющимися жидкостями (диэтиловый эфир, сероуглерод) и горючими газами если в помещении находятся источники с открытым пламенем или сильнонагретые предметы. Есть также мнение, что работа с эфиром на открытом пламени более безопасна, вследствие того, что нет риска образования больших объемов паровоздушной смеси.

4. Работа с щелочными, щелочноземельными металлами, их гидридами, ацетиленидами, а также с металлоорганическими веществами содержащими щелочные, щелочноземельные металлы, алюминий должна проводиться в отсутствии влаги.

### **Термические ожоги.**

Термический ожог - воздействие на кожу сильнонагретых материалов.

Ситуации, которые могут привести к термическому ожогу:

1. Работа с нагревательными приборами. Следует помнить старое правило: "горячая пробирка выглядит также как и холодная".

### **Химические ожоги.**

Химический ожог - воздействие на кожу едких веществ с возникновением очага поражения.

Ситуации, которые могут привести к химическому ожогу:

1. Работа с едкими веществами (сильными и слабыми кислотами и щелочами, раздражающими веществами).

### **Отравление.**

Отравление - попадание в организм токсичного вещества.

Ситуации, которые могут привести к отравлению:

1. Потребление пищи в лаборатории. Уже много пострадавших.
  2. Со всеми новыми веществами следует обращаться очень осторожно, так как они могут оказаться неожиданно сильнотоксичными.
  3. Работа с высокотоксичными веществами требует внимательности и осторожности.
  4. Растворение брома в ацетоне или других кетонах. Реакция протекает очень активно после индукционного периода и приводит к сильно раздражающим (слезоточивым) бромкетонам.
  5. Следует помнить, что растворение активных металлов (в том числе и цинка) в достаточно концентрированной серной кислоте часто происходит с выделением сероводорода. Растворение любых металлов в азотной кислоте происходит с выделением окислов азота.
- Случаи профессиональных заболеваний и потери здоровья на производстве регулируются соответствующими законами. Государства-члены международной организации труда придерживаются конвенции:

**О возмещении трудящимся в случае профессиональных заболеваний  
(пересмотренная в 1934 году)**

*Конвенция о международной организации труда*

21 июня 1934 г. N 42 (ТП 97-3)

*О безопасности при использовании химических веществ на производстве.*

*Конвенция о международной организации труда* от 25 июня 1990 г. N 170, некоторые извлечения:

*Раздел v. обязанности трудящихся.*

*Статья 17*

1. Трудящиеся сотрудничают по возможности самым тесным образом со своими предпринимателями в выполнении предпринимателями своих обязанностей и следуют всем процедурам и практическим правилам, касающимся безопасности труда при использовании химических веществ на производстве.

2. Трудящиеся принимают все разумные меры к тому, чтобы полностью исключить или свести до минимума риск, грозящий им самим и другим лицам, в связи с использованием химических веществ на производстве.

***Раздел VI. ПРАВА ТРУДЯЩИХСЯ И ИХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ***

*Статья 18*

1. Трудящиеся имеют право покинуть место, ставшее опасным в результате использования химических веществ, если они имеют достаточно веские основания считать, что их безопасность или здоровье подвергаются непосредственной и серьезной угрозе, и немедленно информируют об этом своего непосредственного руководителя.

2. Трудящиеся, которые покинули опасное место в соответствии с положениями предыдущего пункта или осуществляют любое из прав, указанных в настоящей Конвенции, защищены от ненадлежащих последствий.

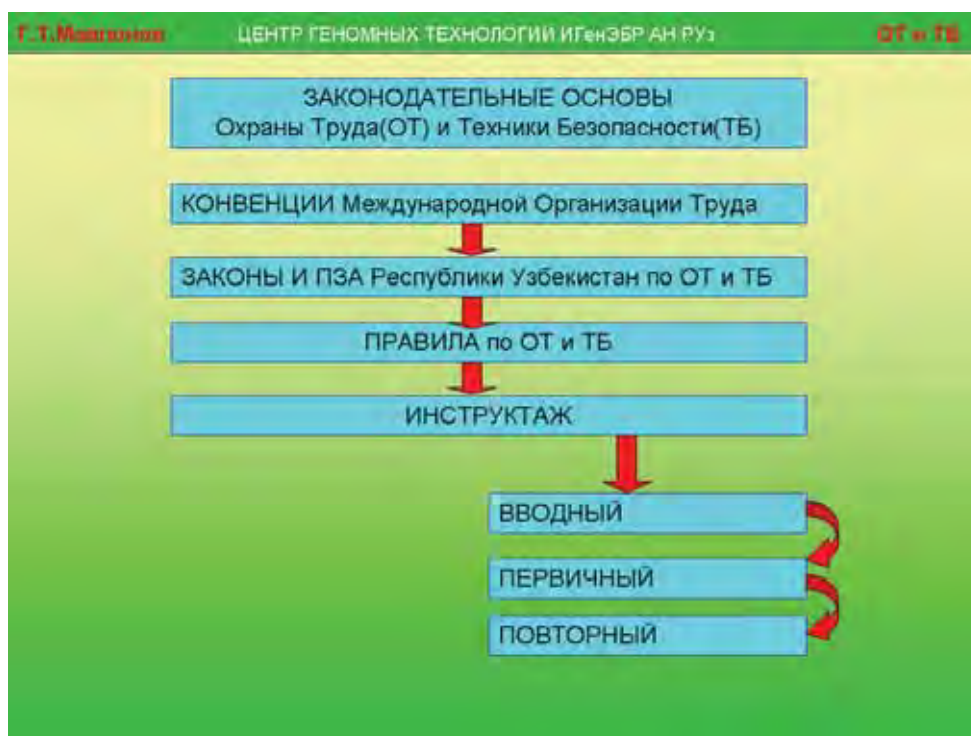
3. Заинтересованные трудящиеся и их представители имеют право на: а) информацию об основном характере используемых на производстве химических веществ, об опасных свойствах таких химических веществ, о мерах предосторожности, на обучение

и профессиональную подготовку; b) информацию, содержащуюся на этикетках и маркировках; c) доступ к картам данных по безопасности химических веществ; d) любую иную информацию, наличие которой предусматривается настоящей Конвенцией. 4. Если раскрытие основного характера одного из веществ в составе химической смеси конкуренту может нанести ущерб деловой стороне деятельности предпринимателя, то предприниматель может, предоставляя информацию, требуемую согласно вышеуказанному пункту 3, защищать такую информацию средствами, утвержденными компетентным органом согласно подпункту "b" пункта 2 статьи 1.

Г.Т.Мавлонов      ЦЕНТР ГЕНОМНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ГЕНЭБР АН РУз

**ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ**  
в научных лабораториях Центра Геномных Технологий

Ведущий научный сотрудник, канд.хим.наук  
Гафур Турдапиевич МАВЛОНОВ



## ПРАВА И ОБЯЗАННОСТИ СОТРУДНИКОВ

**КОНВЕНЦИЯ МЕЖДУНАРОДНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ТРУДА**  
25.09.1990/Л 170**Раздел V. ОБЯЗАННОСТИ**

1. ... следуют всем процедурам и правилам безопасности труда.
2. ... принимают все меры, исключаящие риск, грозящий им самим и другим лицам.

**Раздел VI. ПРАВА**

1. ... имеют право покинуть ставшее опасным для здоровья рабочее место, и немедленно информируют руководителя.
3. ... имеют право на:
  - a) информацию о характере используемых на вредных вещества и о мерах предосторожности;
  - b) информацию, содержащуюся на этикетках и маркировках;
  - c) доступ к картам данных по безопасности химических веществ;
4. Если организация имеет НоуХау по пункту 3 информация предоставляется с сохранением секретов.

## ФАКТОРЫ РИСКА В ЛАБОРАТОРИИ БИОТЕХНОЛОГИИ





## УРОВНИ БИОБЕЗОПАСНОСТИ ЛАБОРАТОРИЙ

**BSL1** Известные возбудители с миним. риском для персонала и окружающей среды (непатогенные *E. coli* ...)

**BSL2** Возбудители болезней средней тяжести с риском для персонала и окружающей среды (вирусы гриппа, энцефалита ...)

**BSL3** Экзотические биоагенты, имеющие летальный исход для персонала и окружающей среды (возбудители тифа, туберкулоза ...)

**BSL4** Опасные и экзотические биоагенты, имеющие фатальный исход для персонала и окружающей среды для которых **НЕТ ВАКЦИНЫ** (возбудители геморрагической лихорадки ...)

## BSL 4 level laboratory



СБОР И НЕЙТРАЛИЗАЦИЯ БИОКОНТАМИНАНТОВ



КАЧЕСТВЕННЫЙ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ДНК И РНК.  
СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Мавлянов Г.Т.

к.б.н., ведущий научный сотрудник  
Центра Геномных Технологий ИГиЭБР


Г.Т. Мавлянов ЦГТ ИГиЭБР АН РУз УФ анализ ДНК/РНК

КАЧЕСТВЕННЫЙ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ  
ДНК и РНК  
СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Ведущий научный сотрудник, канд. хим. наук  
Гафур Турдалиевич МАВЛОНОВ

Г.Т. Мавлянов ЦГТ ИГиЭБР АН РУз УФ анализ ДНК/РНК

СТРУКТУРА ДНК



C T  
G A

## СТРУКТУРА ДНК



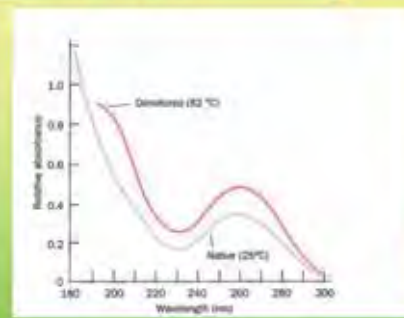
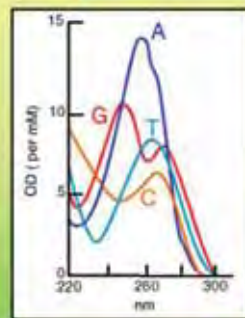
## Виды ультрафиолетового излучения

Наименование	Аббревиатура	Длина волны, нм	Энергия фотона, эВ
Ближний	NUV	400 — 300	3.10 — 4.13
Средний	MUV	300 — 200	4.13 — 6.20
Дальний	FUV	200 — 122	6.20 — 10.2
Экстремальный	EUV, XUV	121 — 10	10.2 — 124
Вакуумный	VUV	200 — 10	6.20 — 124





## УФ СПЕКТРЫ АО и ДНК



-C=C-	185 - 200
-C=C-C=C	200 - 230
-C=C-C=C-C=C-	260 - 280
Ar	

УФ СПЕКТР ДНК/РНК  
КАЧЕСТВЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

$$A_{260}/A_{280} = 1.6 - 2.0$$

$$A_{260}/A_{230} = 1.6 - 2.0$$

УФ СПЕКТР ДНК/РНК  
КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

$$\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = (A_{260}) \times (\text{DF}) \times (50)/(\text{L cm})$$

$$\text{RNA } (\mu\text{g/ml}) = (A_{260}) \times (\text{DF}) \times (40)/(\text{L cm})$$

### Практическое занятие ПО ПОДГОТОВКЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА, ВЫДЕЛЕНИЮ ДНК ИЗ КЛЕТОК БАКТЕРИЙ И ВЫДЕЛЕНИЮ ДНК ИЗ РАСТЕНИЙ

*Эгамбердиев Ш.Ш.*

младший научный сотрудник  
Центра Геномных Технологий ИГиЭБР

#### 1. Вступление (выбор объекта)

Нуклеиновые кислоты, как известно, имеются в каждой клетке, а значит, выделить ДНК можно из любой ткани, даже из костей животных, чешуи рыб или древесины, где клеток не так много по сравнению с объёмом внеклеточного вещества. Во всех тканях организма как животного, так и растения, ДНК, как правило, одинакова. Отличаются эти ткани тем, что в одних из них помимо вещества наследственности больше почти ничего нет (молоки селёдки), а в других, таких, как костная ткань, содержание ДНК относительно невелико. Кроме того, существуют ткани, в клетках которых имеется удвоенный набор хромосом (к тетраплоидным относятся, в частности, клетки печени), а потому и ДНК в них в два раза больше, чем во всех остальных. В семенах растений относительное содержание ДНК выше, чем в стебле, а из молодых растущих побегов ДНК можно выделить существенно больше, чем из такого же по объёму куска одревесневшего ствола. Если перед исследователем не стоит какой-то специальной задачи, он старается выбрать для работы ткань, в которой мало межклеточного вещества и много самих клеток. Причём желательно, чтобы ткань легко распадалась на эти составляющие, а клетки не были перегружены белками (как мышечные), липидами (как жировые) или полисахаридами (как клетки мозга).

#### 2. Дробление ткани на клетки

В результате механического разрушения ткань, из которой мы собираемся выделить ДНК, распадается на отдельные клетки: чтобы механически разорвать связи между ними требуется, как правило, гораздо меньше усилий, чем для того, чтобы повредить саму клетку. Поскольку при нижеприведённом способе выделения ДНК требуются неповреждённые клетки, лучше использовать свежемороженый материал при условии, что продукт не размораживали в процессе хранения.

#### 3. Высвобождение макромолекул

Что касается фильтрации, то она нужна для того, чтобы механически удалить из клеточной суспензии всевозможные примеси, в том числе, крупные куски ткани, так как химические вещества, которыми обрабатывается материал при выделении ДНК, не проникают глубоко внутрь таких конгломератов. Обработать полученные клетки следует, в первую очередь, лизирующим буфером для того, чтобы растворить оболочку мембраны как самой клетки, так и её ядра, а именно 2 X СТАВ буфером при инкубировании в течение 45 минут при 65°C. В результате такой обработки всё клеточное содержимое выделяется наружу и оказывается в растворе, который делается при этом очень вязким, тягучим и существенно более прозрачным, чем была клеточная суспензия. Изменение консистенции раствора — верный знак того, что лизис прошёл успешно.

#### **4. Освобождение от белков**

Затем в пробирку с лизатом добавляется смесь хлороформ-изоамиловый спирт для очистки от белков. Как известно, белки образуют наиболее прочные связи с ДНК. Существуют методики, когда белки удаляют из раствора в несколько этапов. Например, часть из них легко денатурирует и выпадает в осадок при добавлении концентрированных растворов солей. В наших условиях при выделении ДНК из растений мы освобождаемся от белков, помещая пробирки на несколько минут в центрифугу. После этого все более или менее крупные клеточные обломки, денатурированные белки и другие примеси оказываются на дне, образуя очень плотный осадок. Надосадочную жидкость (супернатант) следует перелить в другую пробирку, содержащую в основном нуклеиновые кислоты — ДНК и РНК. В лабораторных условиях ненужные фрагменты удаляют тщательно перемешивая раствор с фенолом и/или хлороформом. Органические растворители, способные забирать белки „на себя“, тяжелее воды, а потому при последующем расслоении смеси в центрифуге они остаются в центральной части. После центрифугирования на дне пробирки оказываются хлороформ с растворёнными в нём белками, а в верхней части — водная фаза, содержащая ДНК. Водную фазу собирают в отдельную пробирку и далее продолжают работать с чистым раствором.

#### **5 Преципитация, или осаждение ДНК**

Далее проводится процесс избавления от жидкости в составе супернатанта. В результате получаем чистый осадок, который обрабатывается High Salt буфером с РНКазой. Этот этап необходим в молекулярной генетике. После очищения ДНК ее используют для клонирования, ПЦР реакций и т.д. ДНК должна быть достаточно чистой и не иметь примесей рибонуклеиновой кислоты. Таким образом, данный этап направлен на очистку от РНК.

#### **6. Осаждение ДНК из раствора**

При добавлении изопропанола или 96% этанола, ДНК переходит в кристаллическое состояние. Отчасти именно по этой причине наливать спирт в пробирку с ДНК-содержащей смесью следует осторожно и желателно помещать все в холодильник на -20°C. В таких условиях процесс осаждения ДНК будет максимально быстрым и иметь максимальный выход.

#### **7. Растворение ДНК**

От спирта мы избавляемся путем центрифугирования, промываем ДНК 70% спиртом от различных солей, которые могли остаться после выделения и использования некоторых буферов. Подсушив осадок растворяем его в ТЕ буфере. Именно в нем, а не в воде, т.к в воде могут быть нуклеазы. Эти ферменты могут повредить а то вовсе уничтожить ДНК. ДНК готова и теперь её можно использовать для дальнейшим исследований.

### **МЕТОДИКА ВЫДЕЛЕНИЯ**

- 0.2 г. листьев помещаются в предварительно простерилизованные и охлажденные ступки, добавляется жидкий азот и растирается до гомогенного состояния.
- К гомогенату добавляется 2 мл подогретого до 65°C 2хСТАБ (100мМ Трис, 20мМ ЭДТА, 2% СТАБ, рН 8.0) буфера и смесь перемешивается стерильным шпателем.
- 700 мкл суспензии переносится дозатором с обрезанным кончиком в стерильную 2 мл пробирку.
- Пробирки с образцами инкубируются 45 минут в термостате при 65°C и при этом перемешиваются каждые 15 минут. После инкубации к образцам добавляются равный

объем (700 мкл) смеси хлороформ-изоамиловый спирт в соотношении 24:1. (стадии с применением хлороформа проводятся в вытяжном шкафу).

- Тщательно перемешивается содержимое пробирок на Вортексе и центрифугируется в центрифуге 5 минут при 10 000 об./мин.

- Осторожно отбираются 600 мкл верхней фазы (не захватывая интерфазу) и переносятся в чистую 2 мл пробирку.

- Вносятся 0,1 объем (60 мкл) горячего 10xСТАБ/NaCl (0.7M NaCl, 10% СТАБ) буфера и раствор тщательно перемешивается.

- Добавляется в равном объеме (660 мкл) смесь хлороформ-изоамиловый спирт (24:1) и перемешивается содержимое пробирок на Вортексе.

- Центрифугируется 5 минут при 10 000 об./мин., осторожно отбирается верхняя фаза (500 мкл) и переносится в новую пробирку.

- Добавляется равный объем (500 мкл) СТАБ-буфера для осаждения (50мМ Трис, 10мМ ЭДТА, 1% СТАБ, рН 8.0), перемешивается 5 минут и инкубируется при 65°C 30 минут.

- ДНК осаждается в центрифуге 10 минут при 12.000 об./мин., осторожно сливается водная фаза.

- К осажденной ДНК добавляется высокосолевым буфер ТЕ (1M NaCl 10мМ Трис, 0.1M ЭДТА, рН8.0) в количестве 500 мкл и тщательно перемешивается на термомиксере до ее полного растворения.

- К растворенной ДНК добавляется 0.6 объема изопропилового спирта, осторожно перемешивается 1-2 минуты и оставляется в морозильнике при -20°C на 1 час или на ночь.

- ДНК осаждается центрифугированием в течение 10 минут (12 000 об./мин) при температуре +4°C, изопропанол осторожно сливается.

- Осажденная ДНК дважды промывается 70% этанолом в объеме 1 мл и центрифугируется 5 минут при 12 000 об./минут, спирт аккуратно отбирается.

- Осадок сушится в вакуумном концентраторе при температуре +37°C в течение 10-15 минут до полного испарения остатков спирта.

- Высушенная ДНК растворяется в 100 мкл ТЕ буфера (10мМ Трис рН 8.0, 1мМ ЭДТА рН 8.0) или в 10мМ Трис рН 8.0. При сушке осадка ДНК необходимо не допускать, чтобы осадок высох полностью, так как это приводит к затруднению растворения в ТЕ-буфере.

- Образцы ДНК хранятся при -20°C.



## МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

*Шерматов Ш.Э.*

к.б.н., старший научный сотрудник  
Центра Геномных Технологий ИГиЭБР



**Методы выделения ДНК могут различаться в зависимости от:**

1. Источника
2. Возраста
3. Размера биоматериала
4. Состояния материала: свежий или храненный (замороженный, эксгумированный, древний)

Все эти факторы требуют определенной оптимизации для каждого образца.

**Вне зависимости от метода все они имеют несколько общих этапов:**

1. Разрушение клеток: перемалывание, ультразвуковая обработка
2. Удаление липидов и белков
3. Преципитация ДНК холодным спиртом

### Основные методы выделения ДНК

#### 1. Феноль-хлороформный метод

Старый, но очень эффективный метод. Отрицательный момент: используемые растворы вредны для здоровья и качество ДНК иногда не позволяет проводить ПЦР, секвенирование.

#### 2. СТАВ

Очень эффективен для растений. Практически можно выделить со всех видов растений.

#### 3. Готовые коммерческие наборы

Различные колонки, наборы на основе магнитных частиц и т.д.

Положительный момент: качественная ДНК с хорошим выходом,

Отрицательный момент: цена

### Особенности выделения ДНК из растений

Работа по выделению ДНК из растений имеют некоторые сложности:

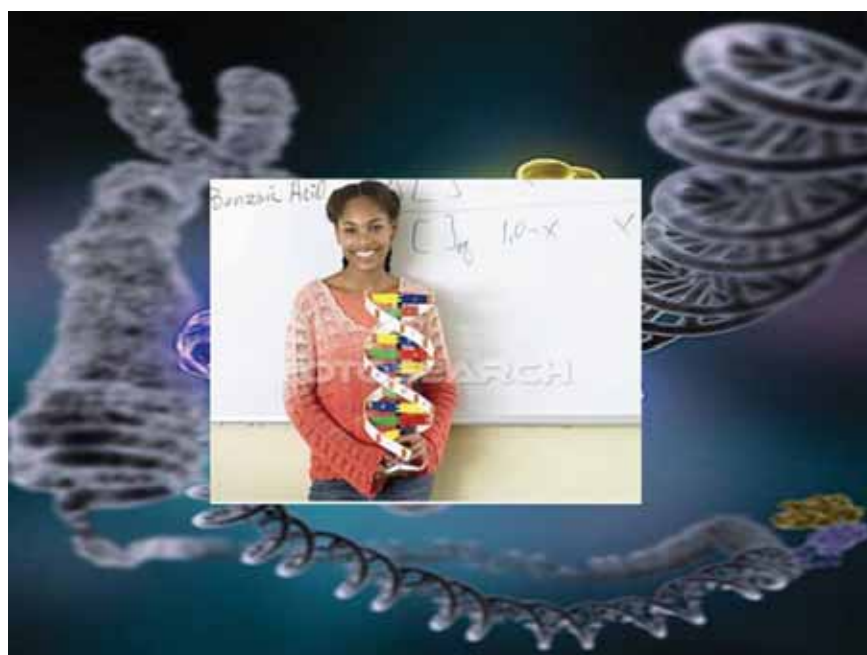
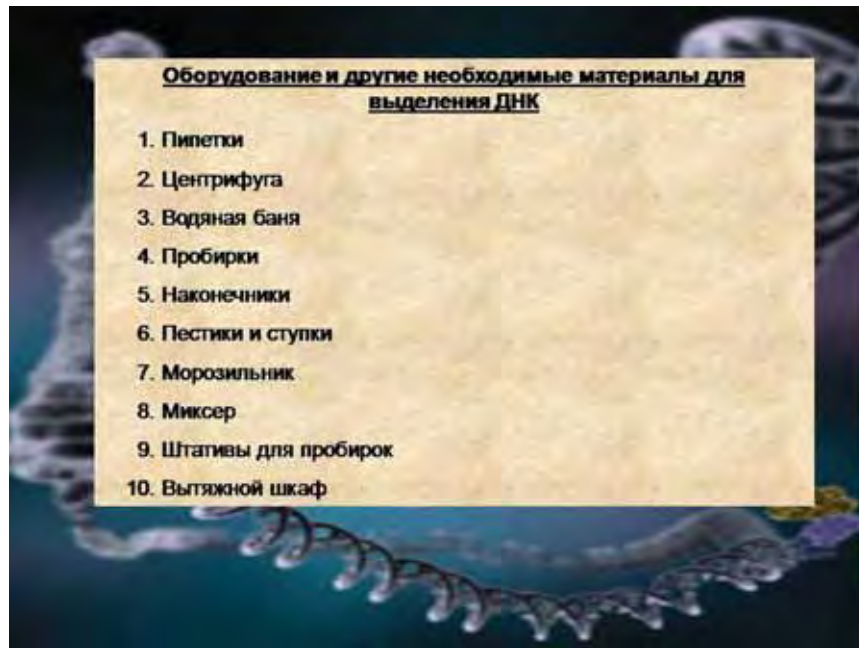
- клеточная оболочка более плотная
- присутствуют в большом количестве полисахариды и полифенольные соединения

Поэтому для растений очень хорошо подходит метод с использованием

СТАВ. Использование жидкого азота позволяет разрушить клеточную оболочку. Использование хлороформ:изоамилового спирта (24:1) и

СТАВ с высокой концентрацией солей позволяет удалять полисахариды и полифенольные соединения.







## ПРИНЦИПЫ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

*Адылова А.Т.*

ведущий научный сотрудник  
Центра Геномных Технологий ИГиЭБР

Биологические макромолекулы - белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды – находятся в растворе в виде частиц, которые по своим размерам соответствуют коллоидным частицам. Они несут определенный электрический заряд благодаря наличию групп, способных к электролитической диссоциации. Так, в случае нуклеиновых кислот заряд их определяется диссоциацией фосфатных групп, поэтому ДНК в нейтральных и щелочных средах заряжены отрицательно.

Под действием электрического поля заряженные частицы перемещаются к катоду или аноду в зависимости от знака их суммарного заряда. Такое явление носит название электрофореза. Скорость движения частиц (см/с) при напряжении электрического поля 1В/см называется электрофоретической подвижностью. Она имеет размерность см<sup>2</sup> с<sup>-1</sup> в<sup>-1</sup>, а знак совпадает со знаком суммарного заряда.

Различия в подвижности частиц служат основой для разделения смесей веществ в аналитических или препаративных целях. Определение электрофоретической подвижности используется также для характеристики веществ.

Во время электрофореза скорость миграции анализируемых частиц определяется путем наблюдения за перемещением красителя.

Приборы всех типов электрофореза состоят из двух электродных сосудов и устройства для поддержания поддерживающей основы (бумаги, крахмала, агарозного или акриламидного геля) в определенном положении между сосудами. В качестве электродов обычно применяют платиновую проволоку

### **Электрофорез ДНК в агарозном геле**

Электрофорез в агарозном геле – стандартный метод, используемый для разделения, идентификации и очистки фрагментов ДНК.

Имеющийся в продаже агар выделяют из клеточных мембран различных водорослей. Он содержит, по крайней мере, два полисахарида, а именно агарозу и агаропектин, которые можно легко отделить друг от друга после ацетилирования. Агароза растворяется в водных растворах при нагревании в кипящей водяной бане (либо в микроволновой печи), причем раствор остается жидким при снижении температуре примерно до 40°C, а затем вязкость его резко возрастает и при 38°C он застывает. После этого агар можно снова растворить путем нагревания. Сам по себе агар является дешевым и нетоксичным материалом. Агарозный гель механически прочен. В форме геля агар содержит поры различных размеров, причем средний радиус пор зависит от его концентрации. При разделении в агарозном геле как ДНК, так и РНК, используется эффект молекулярного сита. Он позволяет разделить анализируемые полинуклеотиды не только в соответствии с их молекулярной массой, но есть также возможность выяснить, состоит ли данная молекула из одной или двух полинуклеотидных цепей, а в случае ДНК-определить, какую форму имеет молекула - линейную или кольцевую. При разделении в

геле можно прямо следить за положением ДНК, так как полосы ДНК в геле можно окрашивать флуоресцирующим и интеркалирующим в ДНК красителем – бромистым этидием в низкой концентрации.

В настоящее время чаще всего используют агарозные гели в виде горизонтальных пластинок. Эта система имеет, по крайней мере, четыре преимущества:

- 1) можно применять низкие концентрации агарозы в связи с тем, что весь гель поддерживается снизу;
- 2) можно готовить гели в виде пластинок самых разных размеров;
- 3) хранение и разливка гелей, а также последующие манипуляции с ними достаточно просты;
- 4) для постановки электрофореза в гелях можно применять недорогие (самодельные) аппараты.

Таким образом, благодаря доступности реагентов, сравнительной простоте и не дороговизне оборудования, возможности получить достаточно большую информацию даже из небольшого количества неочищенного материала, метод электрофореза ДНК в горизонтальных пластинках агарозного геля находит все более широкое применение в молекулярной генетике и в других областях биохимии.

Скорость миграции ДНК через агарозный гель при электрофорезе определяется следующими главными параметрами:

- а). **Размер молекул ДНК:** скорость перемещения двуцепочечной ДНК в геле обратно пропорционально логарифму их молекулярных масс;
- б). **Концентрация агарозы.** Применяя гели разных концентраций можно разделить большой набор фрагментов ДНК, различающихся по размеру:

Количество агарозы	Область эффективного в геле, % разделения ДНК, kb
0,6	20 -1
0,7	10 -0,8
0,9	7 – 0,5
1,5	4- 0,2
2	3 – 0,1

в) **Напряженность электрического поля.** При низких напряжениях скорость перемещения фрагментов линейной ДНК пропорциональна приложенному напряжению. Однако с увеличением напряженности электрического поля подвижность фрагментов ДНК с высокой молекулярной массой дифференциально возрастает и эффективность разделения ДНК в агарозном геле снижается. Хорошее разделение фрагментов происходит при напряженности, не превышающей 5 В/см.

г). **Температура.** Обычно электрофорез ведут при комнатной температуре, но с гелями менее 0,5% агарозы лучше работать при 40С.

#### **Приготовление агарозных гелей**

1. Рассчитанное количество порошка агарозы добавляется в отмеренный объем электрофорезного буфера. Для приготовления 100 мл 0,9% агарозного геля нужно взвесить 9 г агарозы.

2. Взвесь нагревается в микроволновой печи до тех пор, пока агароза не растворится.

3. Раствор остужается до 50оС и, если особо не обговаривается, к нему добавляется 5 мкл бромистого этидия.

Стоковый водный раствор бромистого этидия в концентрации 1мг/мл готовится заранее и хранится в светонепроницаемом сосуде при 4°С.

В присутствии бромистого этидия электрофоретическая подвижность линейной двуцепочечной ДНК снижается примерно на 15%, но зато при этом появляется возможность наблюдать за процессом разделения непосредственно под источником УФ-излучения во время или в конце разделения.

В случае необходимости электрофорез ДНК проводят в отсутствие бромистого этидия, т.е. заранее не вводя краситель в гель. В этом случае ДНК окрашивают данным красителем уже после завершения разделения, помещая пластинку агарозного геля в воду, содержащую бромистый этидий.

Надо помнить, что бромистый этидий – сильный мутаген и все манипуляции с гелями и растворами, содержащими этот краситель, необходимо проводить в перчатках.

4. Теплый раствор агарозы выливается в специальную форму (фирменную или самодельную), в гель немедленно с одного края формы вставляется гребенка таким способом, чтобы после удаления гребенки из затвердевшего геля в нем от зубцов гребенки образовались лунки - кармашки, куда в последующем будут вноситься пробы ДНК. Необходимо, чтобы между дном лунки и основанием геля оставался слой агарозы толщиной 0,5 -1,0 мм, т.е. чтобы дном лунки служил агарозный гель.

5. После того, как гель полностью затвердеет (через 20-30 мин при комнатной температуре), гребенка осторожно удаляется и гель переносится в электрофорезную камеру.

6. В электрофорезную камеру наливается достаточное количество электрофорезного буфера, так, чтобы гель был закрыт слоем буфера толщиной 1мм.

Для электрофореза обычно применяют буферы, содержащие трис-ацетат, трис-борат или трис-фосфат в концентрации 50 мМ и имеющие рН 7,5 – 7,8. Чаще всего их готовят в виде концентрированных (5х-, 10х-кратных) растворов и хранят при комнатной температуре.

В нашем центре при электрофорезе больше практикуется трис-боратный буфер, содержащий ЭДТА (ТВЕ). Он имеет высокую буферную емкость и обеспечивает хорошее разделение фрагментов ДНК. Для приготовления 1 л концентрированного (5х-кратного) ТВЕ требуется 54 г триса, 27,5 г борной кислоты, 20 мл 0,5 М ЭДТА.

7. Аликвоту ДНК смешивают с буфером для нанесения, содержащим краситель (бромфеноловый синий и/или ксилолцианол) и один из трех веществ (глицерин, сахароза или фикол), взятых в больших концентрациях. Это делается с тем, чтобы увеличить плотность алиquotы ДНК так, чтобы пробы ДНК при внесении в лунку геля оказывались под электрофорезным буфером. Смесь (ДНК+буфер для нанесения) осторожно вливают в лунку геля с помощью автоматической микропипетки.

По завершению всех этих манипуляций электрофорезная камера подключается к источнику постоянного тока. Надо помнить, что молекулы ДНК несут отрицательный заряд и в электрическом поле они перемещаются в сторону анода. Положение агарозной пластинки на платформе электрофорезной камеры должно быть таково, чтобы обеспечить миграцию красителя и ДНК по гелю к краю, противоположную положению лунок.

Обычно буфер для нанесения проб готовят в виде раствора 6-10- кратной концентрации. В нашем центре практикуется буфер для нанесения следующего состава: 0,25% бромфенолового синего, 0,25% ксилолцианола, 30% глицерина в H<sub>2</sub>O. Это стоковый

(6-кратный) буфер для нанесения. Пробы ДНК с буфером для нанесения мы обычно смешиваем в соотношении 5 мкл ДНК: 1 мкл буфера.

Максимальное количество ДНК, которое можно внести в лунку, зависит от числа фрагментов в пробе и их размеров. Минимальное количество ДНК, которое можно обнаружить визуально, согласно Маниатису с соавт. (1984), составляет 2 нг при ширине полосы 0,5 см (обычная ширина лунки)

При анализе простого набора молекул ДНК в 0,5-см лунку обычно вносят 200-500 нг ДНК в объеме 5-10 мкл. При внесении больших количеств ДНК и в больших объемах разрешающая способность электрофореза может снизиться – полоса ДНК окажется расплывчатой и будет иметь шлейф.

8. Продолжительность электрофореза ДНК может быть разной, определяется конкретно поставленной задачей, но, как правило, его прекращают, как только бромфеноловым синий, пройдя весь агарозный гель, достигает его края.

9. Пластинку агарозного геля осторожно вынимают из электрофорезной камеры и просматривают над (под) источником УФ-излучения. Бывает, что интенсивность флуоресценции ДНК очень низкая и полосы ДНК на геле плохо просматриваются. Это может быть вызвано очень маленькой концентрацией ДНК, флуоресцирующего красителя - бромистого этидия или того и другого вместе. В таких ситуациях можно попробовать дополнительно покрасить гель, поместив его в воду, содержащую бромистый этидий, на 20-30 мин при комнатной температуре.

Таким образом, наиболее удобный метод визуализации ДНК в агарозных гелях – это окрашивание ее флуоресцирующим красителем бромистым этидием. Молекула этого вещества содержит плоскую группу, которая интеркалирует между соседними основаниями ДНК. В результате такой интеркаляции краситель связывается с ДНК, что сопровождается увеличением интенсивности флуоресценции. УФ-излучение, поглощаемое ДНК в области 260 нм и передаваемое на краситель, испускается затем в красно-оранжевой области видимого спектра (590 нм).

Визуализация полос ДНК в нашем центре производится с помощью прибора Alpha Imager T<sup>M</sup>3400.



**БИОИНФОРМАТИКА И КОМПЬЮТЕРНЫЕ ПРОГРАММЫ ДЛЯ АНАЛИЗА  
ГЕНОМНОГО МАТЕРИАЛА (ОСНОВЫ). СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ.  
ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАССТОЯНИЕ, СЦЕПЛЕНИЕ ГЕНОВ QTL АНАЛИЗ. LD (LINKAGE  
DISEQUILIBRIUM) АНАЛИЗ. БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЕ ИНТЕРНЕТ РЕСУРСЫ**

*Абдурахмонов И.Ю.*

д.б.н., ведущий научный сотрудник  
Центра Геномных Технологий ИГиЭБР

**Биоинформатика (вычислительная  
биология) и статистическая геномика**

Автор: Иброхим Абдурахмонов



**Хронологический график  
технологии полеводства**

2000 до н.э.	↓	Культивация
19 в. н.э.		Селекционное скрещивание
Начало 20 в.		Культивирование клеток
н.э.		Мутагенез и селекция
Середина 20		Соматональная
в. н.э.		изменчивость
1930-е		«Спасение» гибридных
1940-е		зародышей
		Полиэмбриогенез
1950-е		Культура пыльников
1970-е		Рекомбинантная ДНК
1980		Отбор с помощью маркеров
1980-е		Геномика
1990-е		Биоинформатика
2000		

## ЧТО ТАКОЕ БИОИНФОРМАТИКА?

- Биоинформатика - это дисциплина, для которой используются компьютеры для хранения, выборки, обработки и распространения информации, связанной с такими биологическими макромолекулами как РНК, ДНК и белки
- Вычислительная биология охватывает все сферы биологии, для которых необходимы вычисления
- Ее цель - лучше понять принцип действия живой клетки и способы ее функционирования на молекулярном уровне

## ГДЕ НЕОБХОДИМО ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ?

- **1. Развитие вычислительных аппаратов и баз данных**
  1. программное обеспечение для анализа последовательностей
  2. сравнение последовательностей из разных организмов, поиск в базе данных последовательностей,
  3. определение мотивов и закономерностей, обнаружение генов и меток,
  4. реконструкция эволюционных связей, геном
  5. синтез и сравнение
  6. программное обеспечение для структурного анализа
  7. структурный анализ, сравнение белков и нуклеиновых кислот,
  8. классификация и прогнозирование
  9. программное обеспечение для функционального анализа
  10. профилирование экспрессии генов, белок-белковое взаимодействие
  11. прогноз, прогнозирование субклеточной локализации белка,
  12. реконструкция метаболического маршрута
  13. создание и курирование биологической базы данных

## ГДЕ НЕОБХОДИМО ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ?

- ◎ **2. Биологические знания общего характера для понимания биологических систем**
- 1. часто выявляются новые проблемы, для анализа которых необходимо программное обеспечение
- 2. биоинформатика крайне необходима для научных исследований в сфере фундаментальной геномной и молекулярной биологии
- 3. Значительное воздействие в области биотехнологий и медико-биологической науки
- 4. дизайн лекарственных веществ на основе знаний
- 5. трехмерная структура позволяет осуществлять дизайн подходящих лигандов
- 6. Сократить время и расходы на разработку лекарственных средств
- 7. анализ ДНК в целях судебной экспертизы
- 8. байесовская статистика и методы на основе вероятности
- 9. индивидуальный медицинский уход
- 10. аграрные биотехнологии
- 11. базы данных геномов растений
- 12. профили экспрессии генов
- 13. новые сорта культур

## СОСТАВНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ

- ◎ **Навыки работы на компьютере**
- ◎ **Знание биологии**
- ◎ **ВЛАДЕНИЕ АНГЛИЙСКИМ ЯЗЫКОМ!!!!!!**

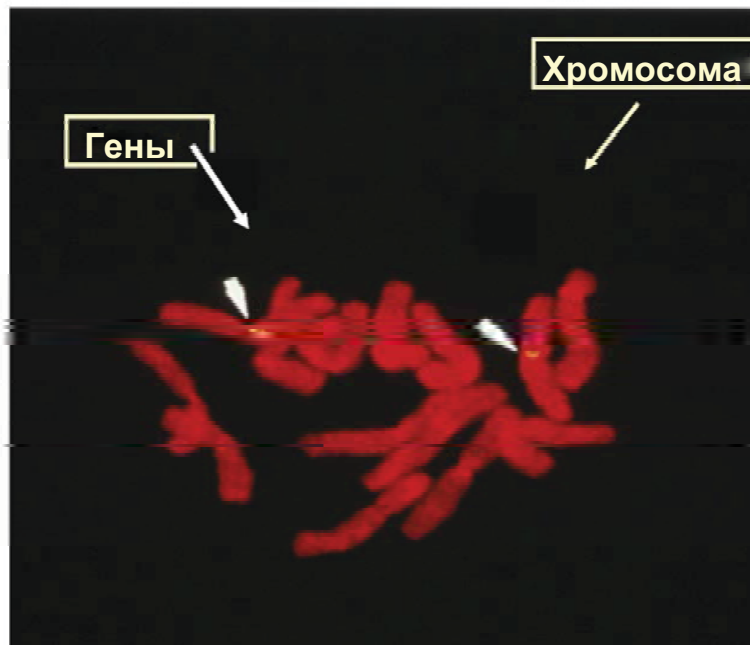
ИСТОЧНИК ИНФОРМАЦИИ ДЛЯ БИОИНФОРМАТИКИ



ЭТО ГЕНОМ

ИСТОЧНИК ИНФОРМАЦИИ ДЛЯ БИОИНФОРМАТИКИ

ГЕНОМ? ГЕНОМИКА?



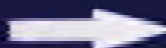


**ГЕНОМ= ОГРОМНАЯ НЕВИДИМАЯ МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИБЛИОТЕКА с структурированным каталогом**

...СТGACСТААТGССGТА...

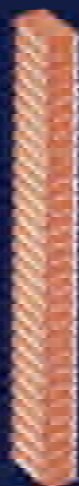


1700 книг



1700 книг

**Гибридизация или перекрестное скрещивание пшеницы**

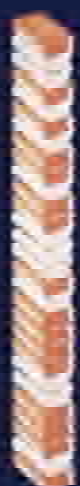


1700 книг

X



1700 книг



1700 книг

Произвольное расположение информации и от каждого родителя

Нет контроля над тем, какие из книг располагаются рядом друг с другом

( или 1,7 млн. страниц) ( или 1,7 млн. страниц) ( или 1,7 млн. страниц)

## Оглавление в книге генов пшеницы

...СТGАССТААТGССGТА...



Используй-  
зуется для  
селекции  
при помощи  
маркеров

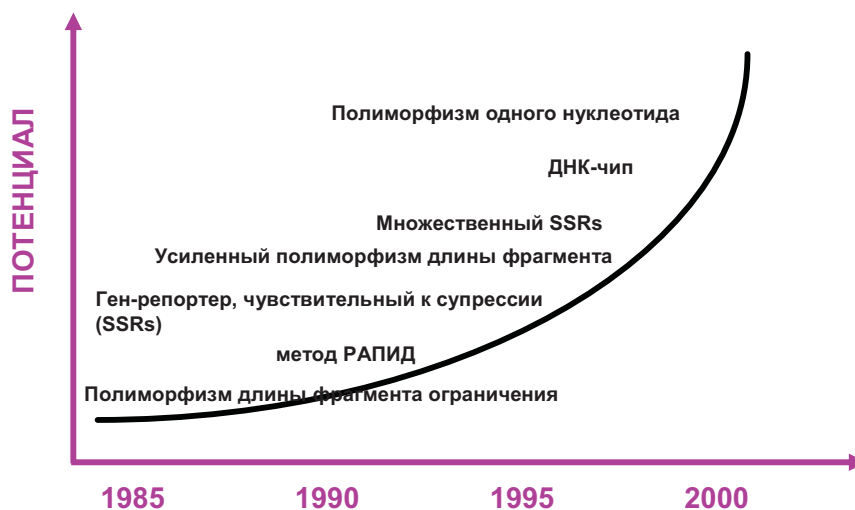
**ГЕНОМИКА**

1700 книг  
(или 1,7 млн. страниц)

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ

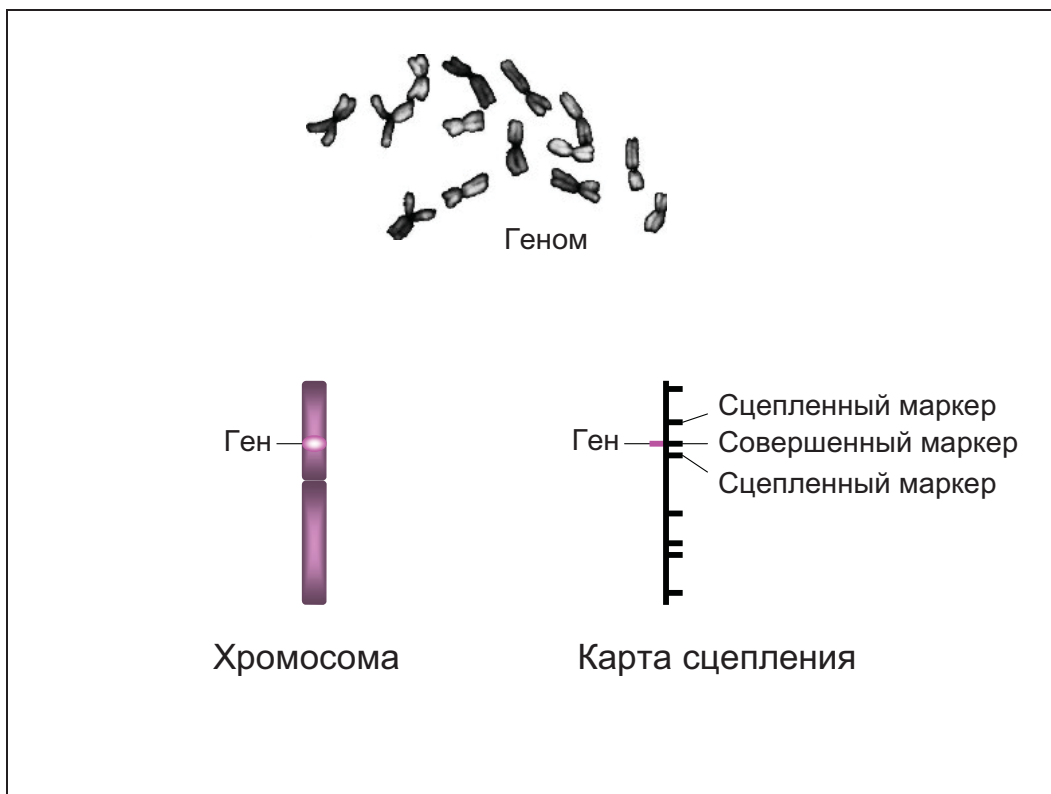
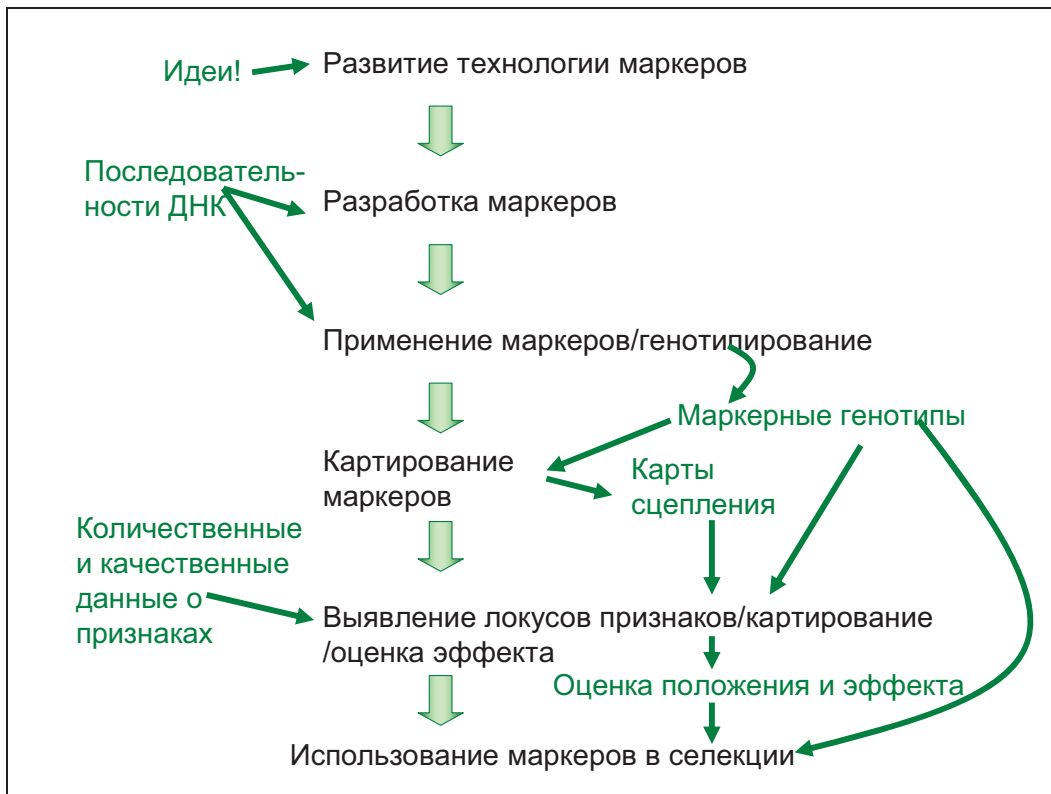
- На основе изменчивости в последовательности ДНК
  - Точечная мутация
  - Вставка / удаление
  - Перестройка
- Имеется в большом количестве
- Не поддается воздействию внешней среды
- Можно оценивать по шкале на любом этапе развития
- Обычно нейтральный
- Нет межлокусного взаимодействия

## ДОСТИЖЕНИЯ В МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРАХ...



## ПРИМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ

- Генетическое разнообразие и ДНК-генотипоскопия
  - Связи между гермоплазмами
  - Генетическое расстояние в сравнении с гетерозисом
  - Сортная чистота и идентификация
  - Филогенетические связи
- Наследственность и картирование
  - Просто унаследованные признаки
  - Количественные признаки (разрез в локус количественного признака (ЛКП))
- В качестве инструментов селекции: Селекция с использованием маркеров
  - Простые признаки: конверсия линий (более быстрое возвратное скрещивание)
  - Передача множественных геномных сегментов (ЛКП)
  - Пирамидирование генов
  - Интрогрессия признаков из экзотической гермоплазмы
  - Отбор и работа с рецессивными аллелями
  - Ранний отбор
- Идентификация и выделение генов на основе маркеров

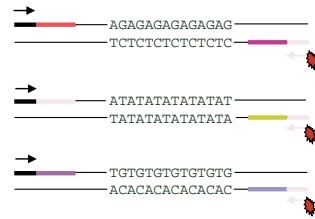




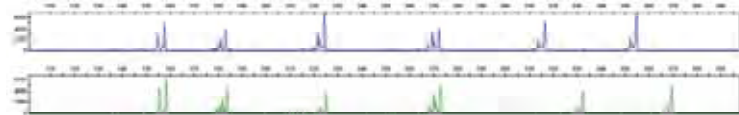
## Молекулярная информация (для мультиплексированных SSR маркеров)

### Информация о последовательности:

- повторение простых последовательностей
- последовательность затравок



### Информация о длине фрагмента



### Шкала маркеров генотипа

- название аллелей (на основе длины фрагмента)
- аллелей origin of alleles

157	183	224	273	317	355
157	183	224	273	333	370

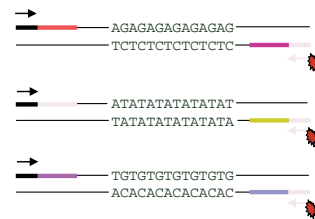
A	A	A	A	B	B
A	A	A	A	A	A

1	1	1	1	2	2
1	1	1	1	1	1

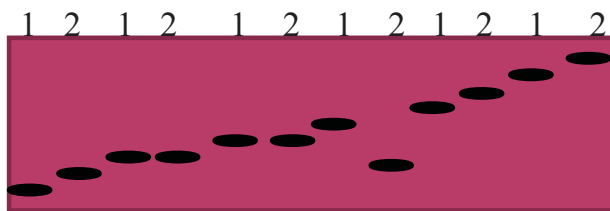
## Молекулярная информация (для мультиплексированных SSR маркеров)

### Информация о последовательности:

- повторение простых последовательностей
- последовательность затравок



### Информация о длине фрагмента



### Шкала маркеров генотипа

- название аллелей (на основе длины фрагмента)
- шкала, указывающая родительский источник аллелей

157	183	224	273	317	355
160	183	224	160	333	370

A	A	A	A	B	B
B	A	A	B	A	A

1	1	1	1	2	2
2	1	1	2	1	1

# ФИЛОГЕНОМИКА И ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ

Синаур Ассошиэйтс, Издательство Инж. Сандерленд, Массачусетс

Программа PAUP\*  
Версия 4

... инструменты для выведения и интерпретации филогенетических деревьев

Анализ

- Молекулярная последовательность
- Морфологические данные
- Другие виды данных

Применение

- Максимальная вероятность
- Парсимония
- Дистанционные методы

Пользователи Mac, использующие более современные Mac на основе Intel должны следовать инструкции на [www.sinaur.com](http://www.sinaur.com), чтобы получить версию PAUP\*, которая будет работать на данной платформе

Бета 10 – это самый последний выпуск программы. Нажмите [сюда](#), чтобы получить обновление

Известно о нескольких проблемах, связанных с бета 10. Мы планируем выпустить обновление, чтобы решить эти проблемы в скором времени. Что касается перечня проблем и возможных их решений – нажмите [сюда](#)

Список электронной рассылки raripho был перемещен. Чтобы посмотреть подписаны ли Вы на рассылку или изменить личные настройки пройдите по ссылке [paupinfo\\_email@at](mailto:paupinfo_email@at) на веб-сайт.

[Другие новости](#)

Широко используемое программное обеспечение: PAUP (филогенетический анализ на основе парсимонии)

(<http://paup.csit.fsu.edu>)  
PHYLOCOCCO (MAC)

# ФОРМАТ ДАННЫХ СВЯЗУЮЩЕГО ЗВЕНА

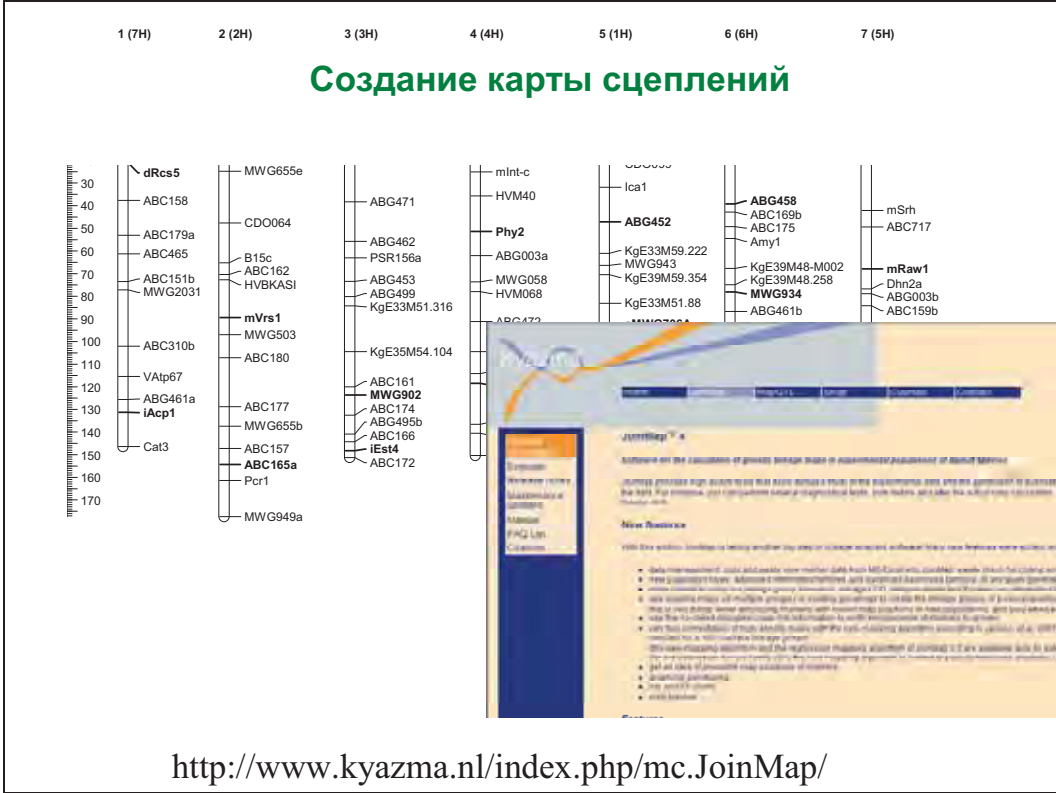
```

#NEXUS
[Link: gapfill-combust set with 10 accession and 20SSR marker loci, filtered for no polymorphic]
begin taxa;
  dimensions ntax=10;
  linkblock;
end;

begin characters;
  dimensions nchar=20;
  format missing = 0 symbols = "12";
end;

matrix
  1 1 2 1 2 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
  1 1 2 1 2 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
  1 1 1 2 1 2 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
  1 1 1 1 2 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
  1 1 1 1 1 1 2 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
  1 1 1 1 1 1 1 2 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
  1 1 1 1 1 1 1 1 2 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
  1 1 1 1 1 1 1 1 1 2 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
  1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 2 1 1 1 1 1 1 1 1 1
  1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 2 1 1 1 1 1 1 1 1
  1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 2 1 1 1 1 1 1 1
  1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 2 1 1 1 1 1 1
  1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 2 1 1 1 1 1
  1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 2 1 1 1 1
  1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 2 1 1 1
  1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 2 1 1
  1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 2 1
  1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 2
end;

begin assumptions;
  options datatype = ord;
end;
    
```



**СЛОЖНЫЕ РОДОСЛОВНЫЕ**  
**И**  
**КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ПРИЗНАКИ**

## КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ ПРИЗНАК

Биологический признак, который скорее показывает непрерывную изменчивость, чем подпадание под четкие категории

**Локус количественного признака (ЛКП)** - Генетический локус, который ассоциируется с изменчивостью в таком количественном признаке

### Информация о признаке

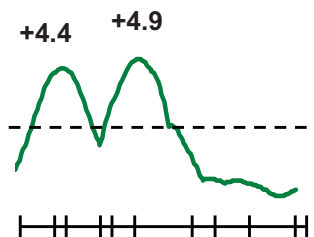
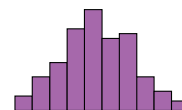
#### Качественные наблюдения

(например, устойчивость в сравнении с подверженностью; твердый в сравнении с мягким)



#### Количественные наблюдения

(например, выход зерна, устойчивость к стрессу, качество зерна, степень тяжести заболевания)



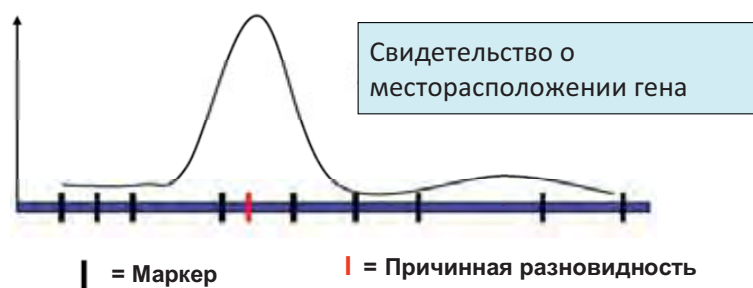
#### Информация о карте

- Кодовое обозначение хромосомы
- Название маркера и гена
- Расстояние по карте
- Тестовая статистика по количественным признакам
- Пороговые величины значимости
- Оценка расположения ЛКП
- Оценка воздействия ЛКП



## КОНЦЕПЦИЯ КАРТИРОВАНИЯ

Определение генетической разновидности, объясняющей подверженность к заболеваниям или значимости признака

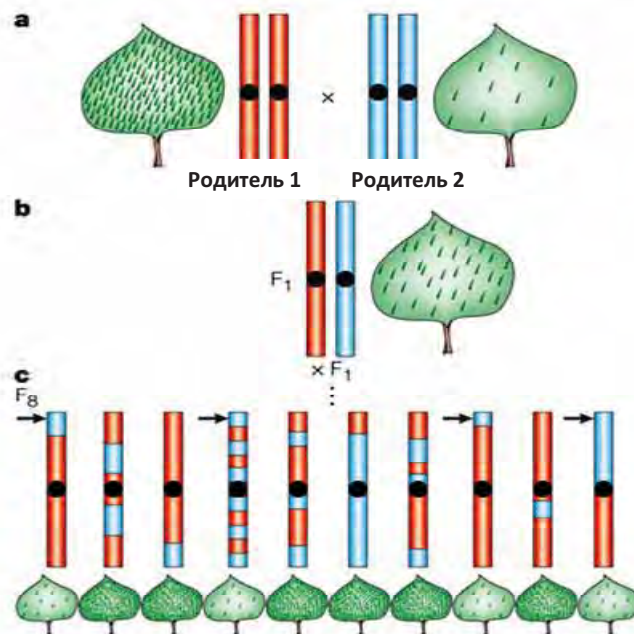


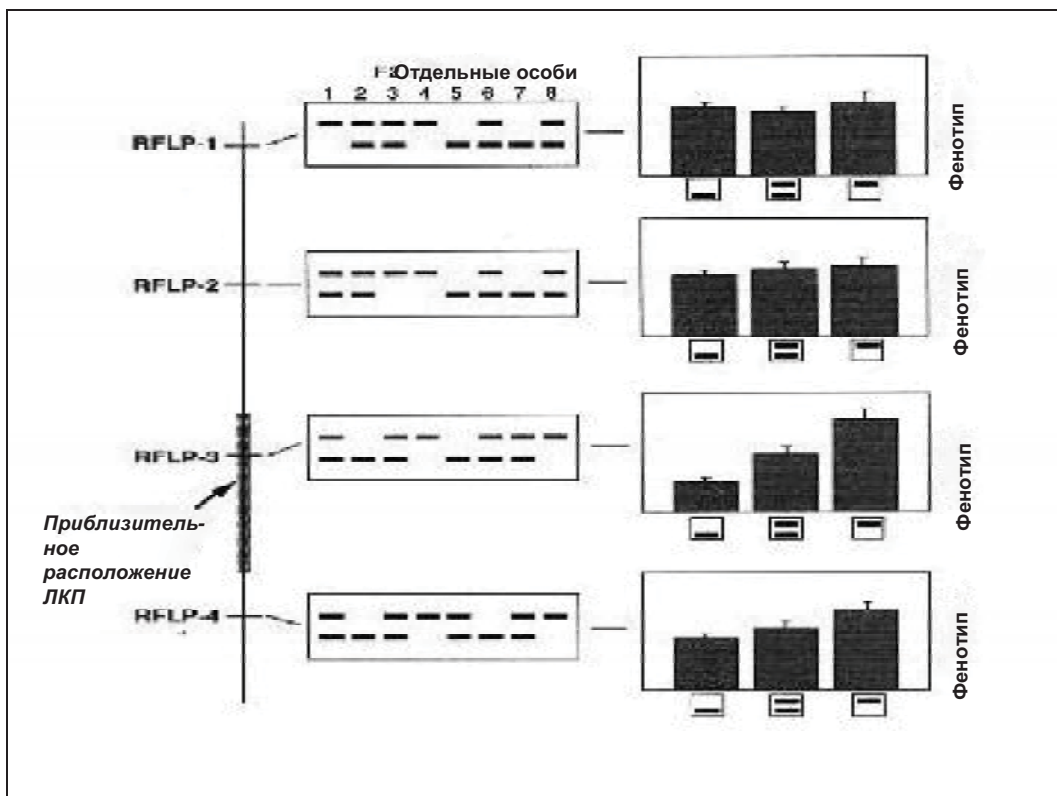
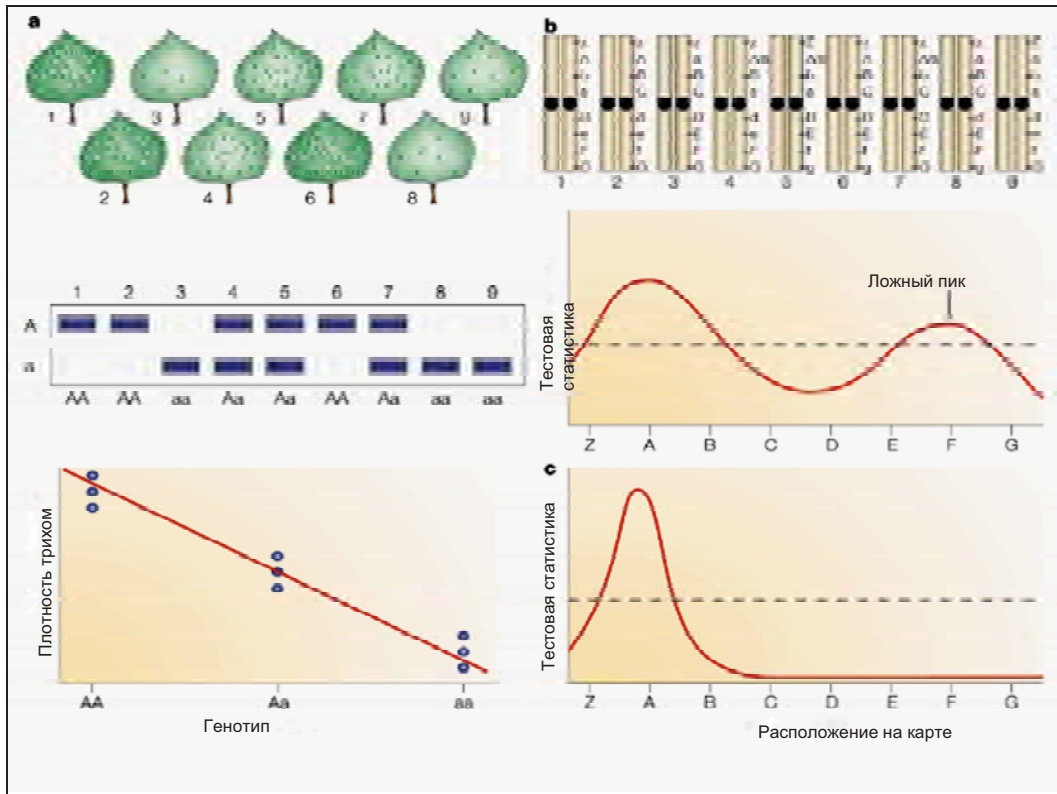
## ПОДХОДЫ К КАРТИРОВАНИЮ

1. Исследование «гена-кандидата»
  - Ассоциация
  - Подходы к изменению последовательности
2. Исследование в масштабе генома
  - Анализ сцеплений
  - Исследование ассоциаций в масштабе генома (неравновесие по сцеплению, картирование неравновесия по сцеплению)

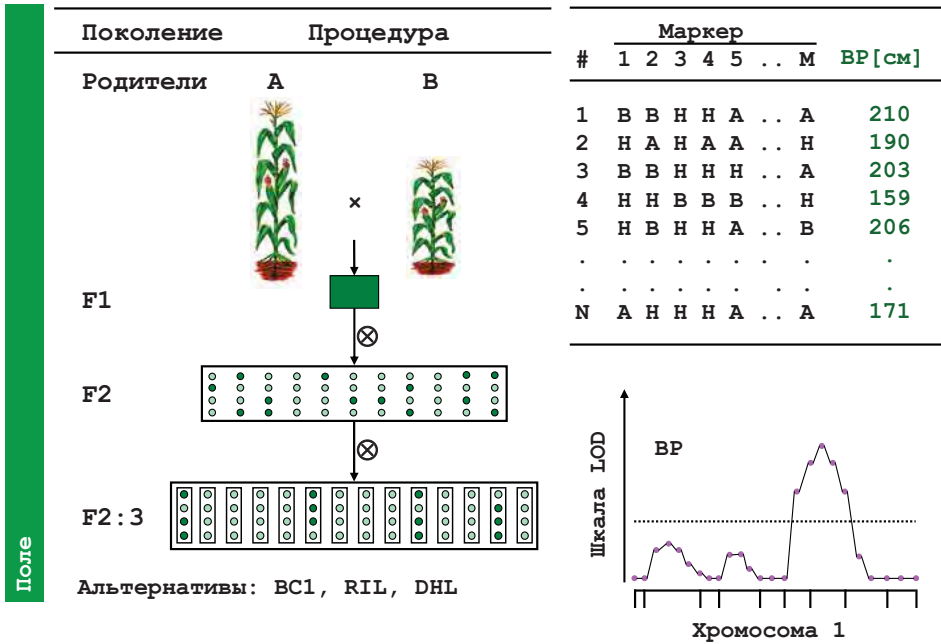
## КАРТИРОВАНИЕ СЦЕПЛЕНИЙ

- Найдите маркерные аллели, которые связаны с фенотипом в пределах родословной
- Можно соединить разные аллели с признаком в разных родословных

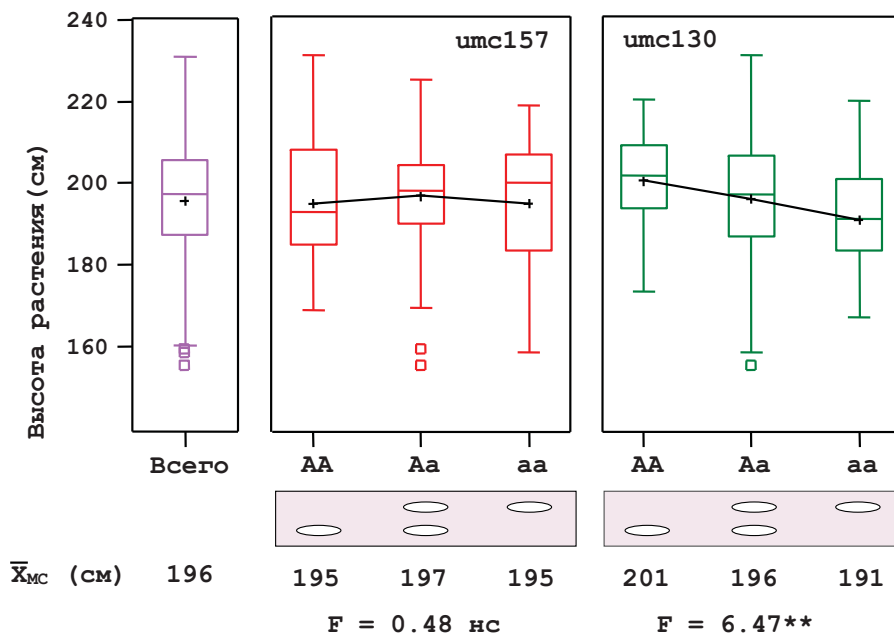




# Анализ ЛКП: Понятие



# Анализ ЛКП: Анализ единого маркера





## КАРТИРОВАНИЕ АССОЦИАЦИЙ

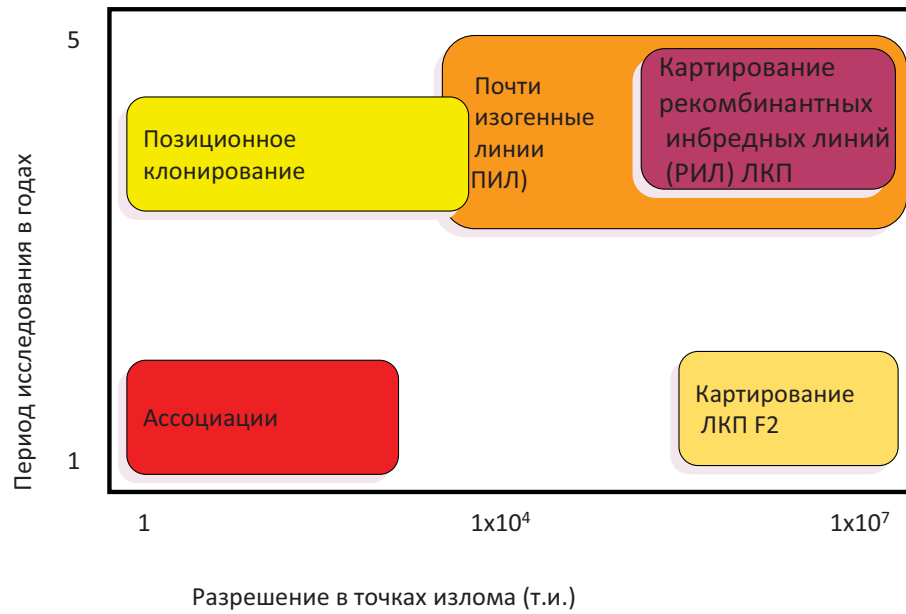
- Маркерные аллели соотносятся с признаком на уровне популяций
- Можно обнаружить ассоциацию, рассмотрев несвязанные особи из одной популяции
- Не обязательно означает, что маркеры сцеплены (близко расположены к) с генами, влияющими на признак.

## СЦЕПЛЕНИЕ В СРАВНЕНИИ С АССОЦИАЦИЕЙ

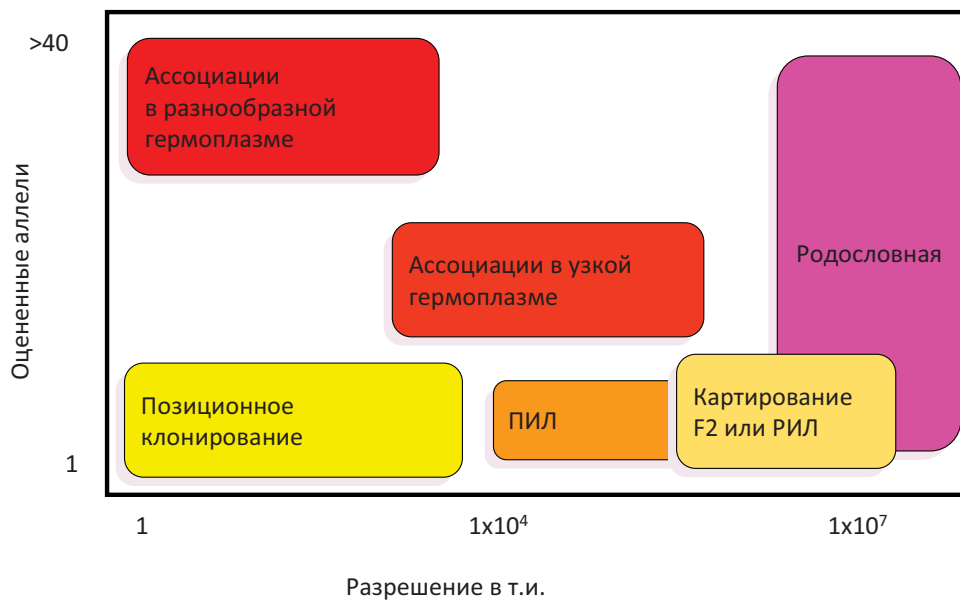
Потенциальные преимущества	Сцепление	Ассоциация
Не требуется предварительной информации о функции гена	+	+
Локализация в небольшом геномном участке	-	+
Не подвержен воздействию стратификации	+	-/+
Достаточно потенциала для обнаружения общих аллелей с умеренным воздействием (частота более редкого (минорного) аллеля (MAFs)>5%)	-/+	+
Способность обнаружить редкий аллель (MAFs<1%)	+	-
Имеются инструменты для анализа	+	+/-

Hirschhorn & Daly, Nature Rev. Genet. 2005

## РАЗДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ПРИЗНАКА: ВРЕМЯ В СРАВНЕНИИ С РАЗРЕШЕНИЕМ





## РАЗРЕШЕНИЕ ПРОТИВ ДИАПАЗОНА АЛЛЕЛЕЙ



# ПРОВЕРКА АССОЦИАЦИЙ

- Оценка ассоциации нуклеотидных полиморфизмов с фенотипом
- Естественные популяции
- Применение расширенной рекомбинации

A	C	G	A	G	1,3м	
A	C	G	A	T	1,4м	
A	T	A	A	G	1,5м	
C	T	A	G	T	1,8м	
A	T	G	G	T	2,0м	
A	T	G	G	G	2,0м	

Ассоциации могут получиться из

## 1. Локуса, обуславливающего фенотип



## 2. Локуса, обуславливающего фенотип, который находится в неравновесии по сцеплению



Сцеплен и в большой степени коррелирован

# НЕРАВНОВЕСИЕ ПО СЦЕПЛЕНИЮ

- Неслучайная ассоциация между аллелями в разных локусах. Локусы находятся в НС, если аллели присутствуют на гаплотипах разных пропорций, чем, как предполагается, основаны на частоте аллелей
- Два аллеля, расположенные в НС, встречающиеся вместе чаще, чем предполагается в случайном порядке

## НЕРАВНОВЕСИЕ ПО СЦЕПЛЕНИЮ

Нет рекомбинации | | | | | Точки излома рекомбинации



Локус А

	A	a	
Локус В	B	6	0
	b	0	6

$|D| = 1$   
 $r^2 = 1$

Локус А

	A	a	
Локус В	B	6	0
	b	3	3

$|D| = 1$   
 $r^2 = 0.33$

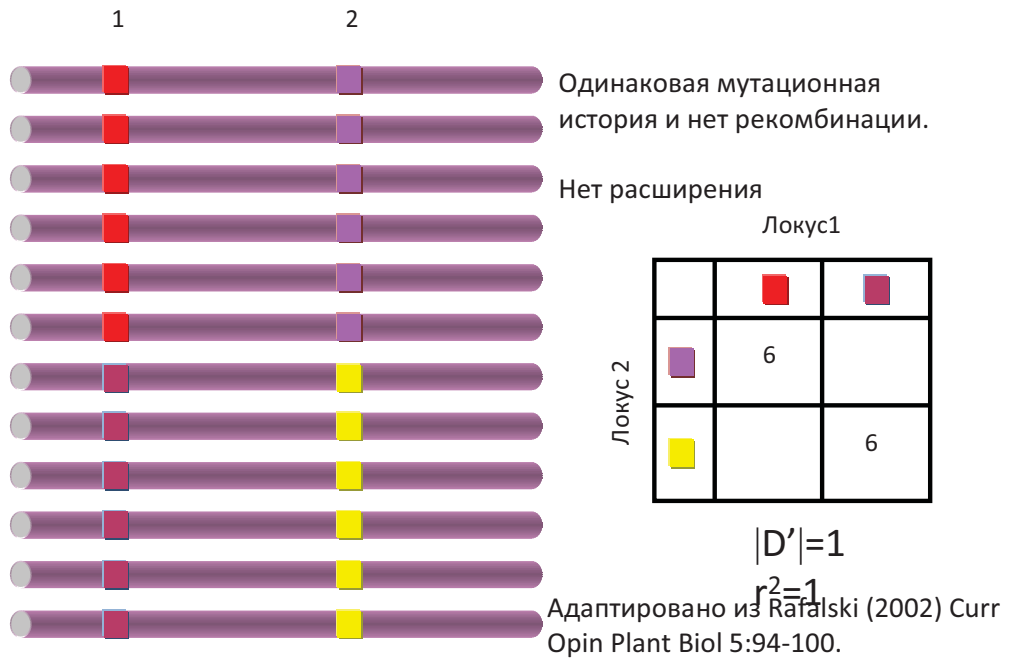
Локус А

	A	a	
Локус В	B	3	3
	b	3	3

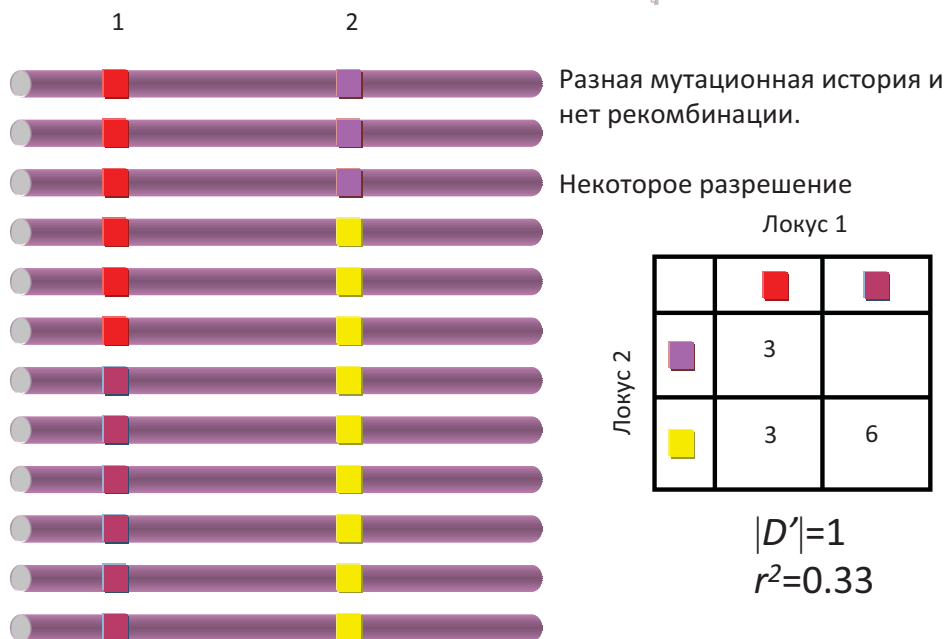
$|D| = 0$   
 $r^2 = 0$



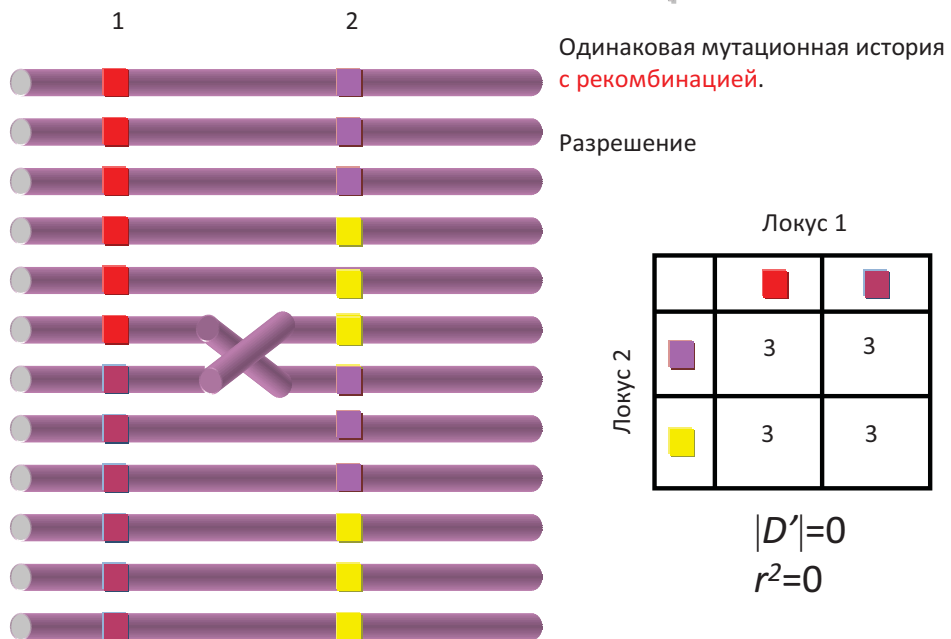
## ПОЛНОЕ НЕРАВНОВЕСИЕ ПО СЦЕПЛЕНИЮ



## ПОЛНОЕ НЕРАВНОВЕСИЕ ПО СЦЕПЛЕНИЮ

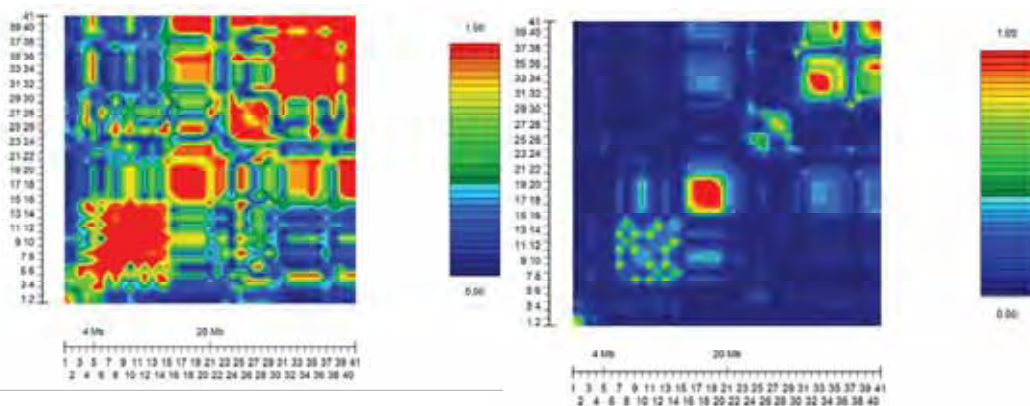


# ПОЛНОЕ НЕРАВНОВЕСИЕ ПО СЦЕПЛЕНИЮ



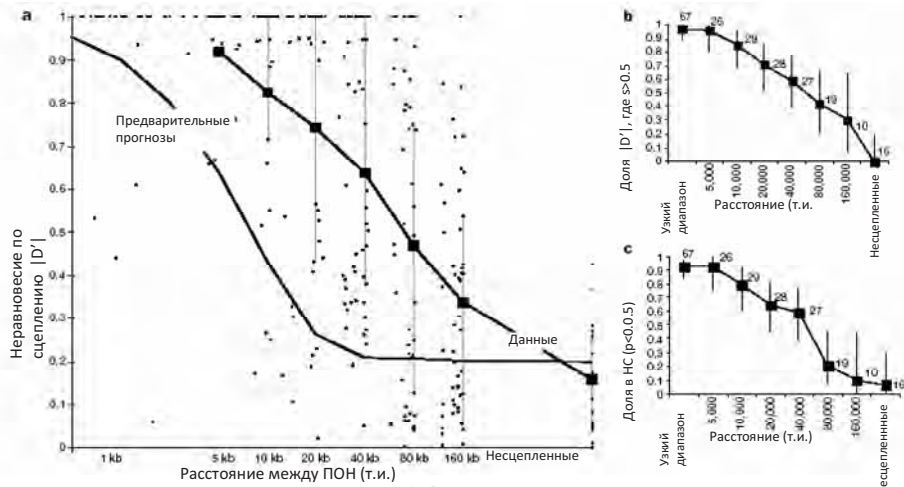
# ЗОЛОТОЙ ДИСПЛЕЙ

Попарно  $|D'|$  и  $r^2$  по 45 ПОН в одном сцепленном участке



<http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/gold/download/>

## Распад неравновесия по сцеплению



**Рис. 1** НС против физического расстояния между ПОН. По каждому расстоянию между основными ПОН (Таблица 1), мы выбираем ПОН с самым большим числом копий минорных аллелей для сравнения с ПОН на других расстояниях. При данном расстоянии, все сравнения независимы. а. Средние значения ID' по каждому пространственному разрыву ('Данные': пунктирная линия отмечает 25- и 75- процентные линии), в сравнении с прогнозом 2 на основе симуляций (см. Методы). Значения ID' для более коротких физических расстояний были рассчитаны в пределах отрезков непрерывно построенных последовательностей ДНК, содержащие как минимум два ПОН, и выбираются два наименее минорных аллеля.

Сравнения несцепленные маркеры можно получить путем сравнения ПОН в отрезке 40 т.п.н. в каждом ряду Таблицы 1 тех, которые находятся в следующем ряду. б. с. Доля значений ID' больше 0.5 (б) и соотношения значительных ( $P < 0.05$ ) ассоциаций (с) между двумя ПОН, разделенных данным расстоянием (как оценивается при помощи критерием отношения правдоподобия). Столбики указывают 95% интервалы центрального condence. Показано количество точек начала отсчета.

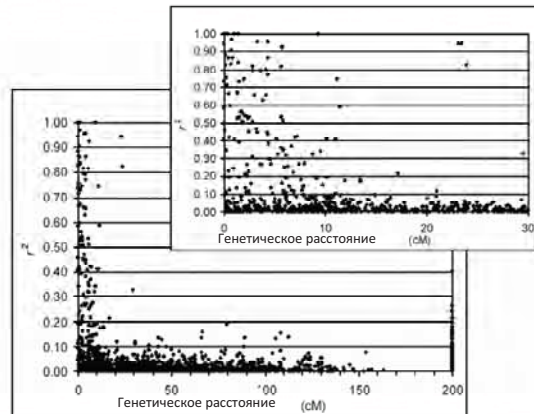
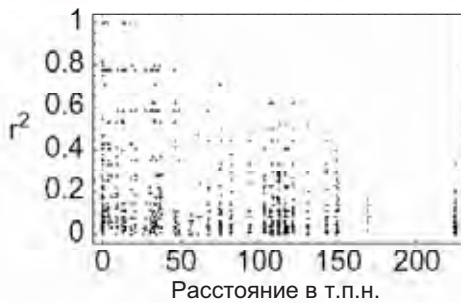
200

© 2001 Macmillan Magazines Ltd

NATURE | VOL 411 | 10 MAY 2001 | www.nature.com

### Арабидопсис

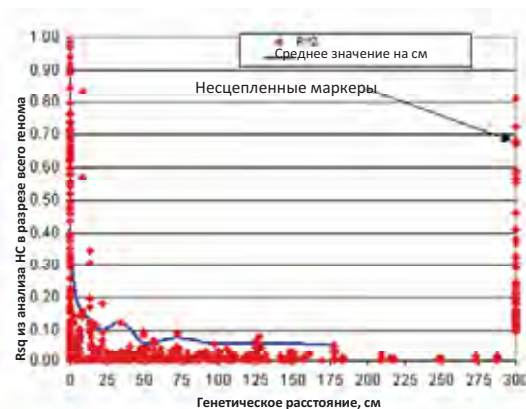
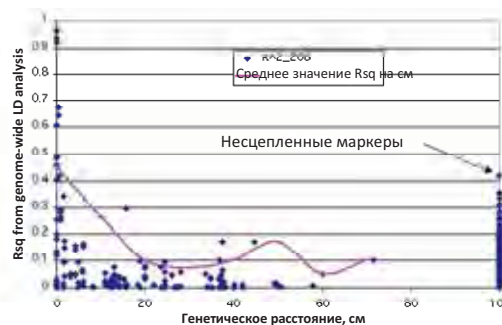
#### Регион FRI



### Ячмень

Значения  $R_{sq}$  пар SSR представлены на графике для сравнения с имеющейся картой

Чтобы понять распад НС, мы построили график значений  $R_{sq}$  в расстоянии в сравнении с расстоянием на карте  
Сорт



На основе этих графиков:  
Распад НС происходит в пределах 50 см, при  $R^2 < 0.1$  на панели сортообразца  
Мы наблюдали значительный распад НС в пределах 30 см, при  $R^2 < 0.1$ , на панели экзотического образца  
Распад в масштабе генома наблюдался в пределах 20 см, при  $R^2 < 0.2$  как в сортообразце, так и экзотическом образце, что предполагает общие размеры блоков НС в хлопке.

## ИЗМЕНЧИВОСТЬ НС В РАЗРЕЗЕ ГЕНОМА

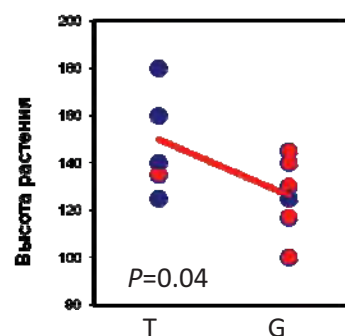
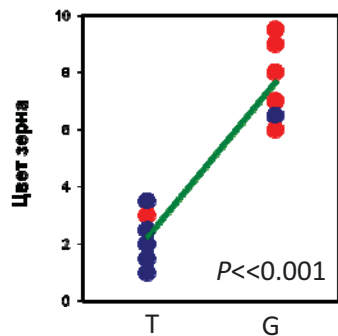
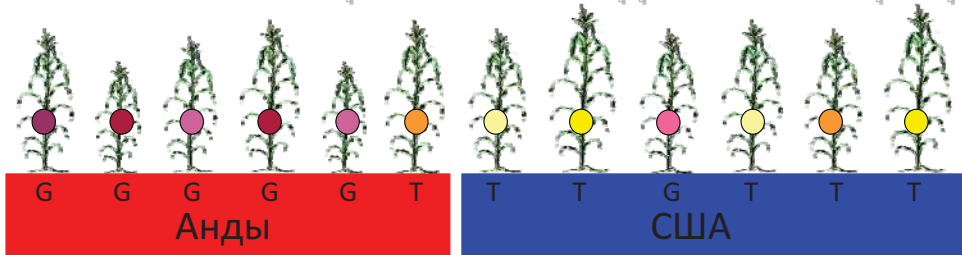
- Степень НС высоко изменчива в разрезе генома
- Еще нет полного понимания определяющих факторов НС.
- Факторы, которые предположительно влияют на НС
  - Дрейф генов
  - Рост популяции
  - Примешивание или миграция
  - Отбор
  - Изменчивые нормы рекомбинации



## АЛЛЕЛЬНЫЕ АССОЦИАЦИИ

- Прямая ассоциация
  - Рассматриваемый аллель сам участвует в фенотипе
- Косвенная ассоциация
  - Сам аллель не участвует, но при помощи НС с функциональным вариантом
- Мнимая ассоциация
  - Факторы смешения (например, стратификация популяции)

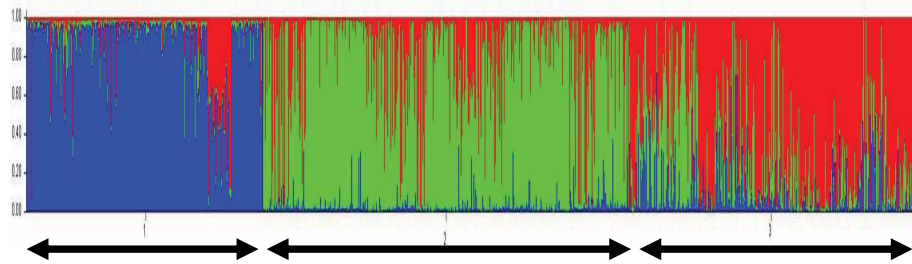
## СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИИ МОЖЕТ СОЗДАВАТЬ АССОЦИАЦИИ



Эти нефункциональные ассоциации могут учитываться путем оценки структуры популяции с использованием произвольных маркеров.

## РАБОТА СО СТРУКТУРОЙ ПОПУЛЯЦИИ

- Структурная ассоциация (Pritchard et al., 2000)
  - Обнаружение структуры из набора несцепленных маркеров, т.е. назначить вероятность родословной из  $k$  популяций каждой особи, а затем вести их контроль.

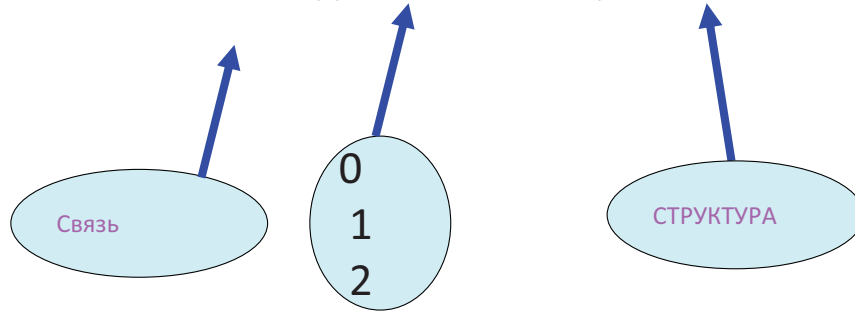


## МЕТОДЫ

- Комбинированное сцепление и НС
- Обобщенные одномерные модели
- Смешанная модель (Yu et al. 2006)
- Байесовский подход

# СМЕШАННАЯ МОДЕЛЬ (YU ET AL. 2006)

Фенотип = Постоянный коэффициент + ПОН + Популяция + Полиген



Смешанная модель SAS (Гаэль Прессуар)

**Buckler Lab for Maize Genetics and Diversity**  
A USDA-ARS Lab with Cornell Institute for Genomic Diversity

Home: **TASSEL**

Download: [Tassel \(version 2.1.0\) \(Linux\)](#), [Tassel \(version 2.1.0\) \(Mac\)](#), [Tassel \(version 2.1.0\) \(Windows\)](#)

**Evolutionary Biology & Ecology**

Software

**SPAGEDI**

The software is a program for high-resolution population structure analysis. It is designed to analyze genetic data from a large number of individuals and to identify clusters of individuals that are genetically similar. It is based on the principle of maximum likelihood and uses a Bayesian approach to estimate the parameters of the model. It is available for Linux, Mac OS X, and Windows.

Home: **Structure**

The program **structure** is a free software package for using multi-locus genotype data to investigate population structure. Its uses include inferring the presence of distinct populations, assigning individuals to populations, studying hybrid zones, identifying migrants and admixed individuals, and estimating population allele frequencies in situations where many individuals are migrants or admixed. It can be applied to most of the commonly-used genetic markers, including SNPs, microsatellites, RFLPs and AFLPs.

Download: [Structure 2.3.1](#), [Structure 2.3.2 \(beta version\)](#)

**What to cite:** The basic algorithm was described by Pritchard, Stephens & Donnelly (2000). Extensions to the method were published by Faloutsos, Stephens and Pritchard (2003) and (2007) and by Huber, Faloutsos, Stephens and Pritchard (2009).

**Contributors:** Daniel Faloutsos, Melissa Huber, Mathieu Stephens, Jonathan Pritchard, Peter Donnelly, William Sun, Mike Tenen

**Questions and Discussion:** We have now started a [Google Group](#) forum devoted to **Structure**. This replaces the [Structure Software Forum](#) which is no longer active.

**Plotting programs and other resources:** [C2.3.1PP](#) and [plots](#) from [Nikhil Bhandari's](#) lab can automatically sort the cluster labels and produce nice graphical displays of structure results. Other plots are produced directly by the software package itself. A free publicly available cluster has kindly been made available for running computationally intensive structure jobs by [CBSU at Cornell](#). Xavier Didot's program [snf2struct](#) converts files in [extended Multi-Fasta \(XMFA\)](#) format into Structure input format.

Sample data sets: [available here](#)

TASSEL: <http://www.maizegenetics.net>  
 STRUCTURE: <http://pritch.bsd.uchicago.edu/software.html>  
 SPAGEDI: <http://ebe.ulb.ac.be/ebe/Software.html>





Результаты оценки тренинг-курса

<b>Название курса:</b> Использование молекулярных маркеров в оценке разнообразия генетических ресурсов растений
<b>Дата:</b> 23-27 ноября 2009 года.
<b>Место проведения:</b> Ташкент, Узбекистан
<b>Организаторы:</b> Региональный Тренинг Центр по Молекулярным Маркерам Центра Геномных технологий Института Генетики и экспериментальной биологии растений Академии Наук Республики Узбекистан, Национальный отдел реализации проекта.

	<b>Балл</b> 1 = очень низкий и т.д. 2 = низкий 3 = удовлетворительный 4= хороший/высокий 5 = очень хороший/ очень высокий и т.д.
<b>А. Общая оценка курса (тренинга)</b>	
1. Полное удовлетворение курсом (тренингом)	Оценили в 4 балла 7 участников, в 5 баллов 4 участника.
2. Соответствие содержания курса с моими потребностями	Оценили в 3 балла 1 участник, в 4 балла 6 участников, в 5 баллов 4 участника.
3. Качество и эффективность проведения курса	Оценили в 3 балла 1 участник, в 4 балла 3 участника, в 5 баллов 7 участников.
4. Знания и опыт, полученные во время курса	Оценили в 3 балла 1 участник, в 4 балла 4 участника, в 5 баллов 6 участников.
5. Насколько хорошо курс отразил свои задачи?	Оценили в 4 балла 6 участников, в 5 баллов 5 участников.
<b>Комментарии:</b> Комментарий не было.	
<b>В. Оценка содержания курса и методов обучения</b>	

1. Продолжительность курса/тренинга	Оценили в 3 балла 3 участника, в 4 балла 4 участника, в 5 баллов 4 участника. (1=очень долгий/короткий 5=точный)
2. Содержание упражнений относительно к времени	Оценили в 3 балла 4 участника, в 4 балла 3 участника, в 5 баллов 4 участника. (1=очень много/мало 5=точно)
3. Качество и эффективность методов теоретического преподавания (лекции)	Оценили в 3 балла 5 участников, в 5 баллов 6 участников.
4. Качество и эффективность практических занятий и полевых упражнений	Оценили в 3 балла 1 участник, в 4 балла 2 участника, в 5 баллов 8 участников.
5. Баланс между теорией (лекцией) и практической работой	Оценили в 2 балла 1 участник, в 3 балла 1 участник, в 4 балла 2 участника, в 5 баллов 7 участников. (1=низкий 5=точный)
6. Качество и количество раздаточных материалов представленных во время курса	Оценили в 3 балла 1 участник, в 4 балла 3 участника, в 5 баллов 7 участников.

#### **Комментарии:**

- Продолжительность курса не достаточна для полного освоения материала.
- Хотелось бы, чтобы практическим занятиям уделялось больше времени.
- Неделя-это маленький срок для освоения курса молекулярной биологии.
- Хотелось бы больше практики и желательно, чтобы половина дня было посвящено практике и половина дня – лекции.

#### **С. Оценка управления и логистики курса**

1. Доступ к оборудованию во время курса (такие как ЛСД проекторы, компьютеры, лабораторные средства и.т.п.)	Оценили в 4 балл 2 участника, в 5 баллов 9 участников.
2. Время и качество информации, полученное до начало курса	Оценили в 2 балла 2 участника, в 3 балла 2 участника, в 4 балла 2 участника, в 5 баллов 5 участников.
3. Питание и проживание	Оценили в 4 балла 2 участника, в 5 баллов 9 участников.
4. Организация прибытия и убытия участников	Оценили в 3 баллов 1 участник, в 4 баллов 3 участника, в 5 баллов 7 участников.
5. Решение финансовых вопросов	Оценили в 3 балла 1 участник, в 4 балла 4 участника, в 5 баллов 6

участников.

**Комментарии:**

- Было бы желательным обеспечение доступа к информации (литературе), которая нужна в течение тренинга.

**D. Прочие**

1. Количество участников	Оценили в 4 балла 2 участника, в 5 баллов - 9 участников. (1= очень мало/много 5 = точно)
2. Активное участие в процессе обучения	Оценили в 4 балла 2 участника, в 5 баллов - 9 участников.
3. Взаимодействие с другими участниками	Оценили в 4 балла 2 участника, в 5 баллов - 9 участников.
4. Взаимодействие с лекторами (инструкторами)	Оценил в 3 балла 1 участник, в 4 балла - 2 участника, и в 5 баллов - 8 участников.

**Комментарии:**

- Хотелось больше участвовать в лабораторных занятиях и работать своими руками.
- Группа из 12-15 человек –идеальна для тренинга такого типа.

**E. Сильные, слабые стороны тренинга и предложения**

**Что мне понравился на этом тренинге:**

- Очень хорошие теоретические курсы.
- Качество и уровень лекторов и участников.
- Практические занятия.
- Отличные молодые специалисты с большим опытом работы.
- Высокая квалификация преподавателей, т.е. глубокое знание как теоретической, так и практической молекулярной генетики, своевременная и качественная связь подаваемых теоретических подходов (знаний) с практическими занятиями. Доступное представление сложных сторон по выявлению и использованию молекулярных маркеров. Выполнение самими слушателями всех намеченных анализов с использованием реагентов и оборудования, которые любезно были представлены со стороны инструкторов. Постоянная готовность инструкторов к консультациям. Слабые стороны не отмечены.
- Оперный театр и сам город.
- Лаборатории оснащены современным оборудованием. Для каждого процесса отдельная лаборатория. Понравились и лекторы и организаторы.
- Современные данные и хорошая теоретическая база. Использование в процессе обучения современного оборудования.
- Использование теоретических знаний и методических подходов было на

высоком мировом уровне.

Что меньше всего было уместным или не понравился мне:

- Продолжительность курса. Хотелось бы, чтобы больше времени уделялось практическим занятиям.
- Недостаточность времени для освоения основных методов молекулярной биологии. Построение графика лекций немного сумбурно. Непригодность лекционных залов для проведения полноценных занятий.
- Желательно проведение теоретической и практической части курса в одном здании.
- Негативных сторон тренинга не выявлено.
- Много свободного времени в процессе практических занятий.

**Пожалуйста, дайте хотя бы одно предложение о том, как улучшить этот курс.**

- Половину дня желательно посвятить теоретическим лекциям и вторую половину - практике. После объяснения темы – сразу же практические занятия. Желательно подготовить более удобную аудиторию для проведения лекционных занятий.
- Так как биоинформатика является основой анализа полученных результатов и их интерпретации, хотелось бы, чтобы этой части курса уделялось больше внимания, для того, чтобы слушатели по Интернету могли найти специальные программы и могли ознакомиться с ними, а также попробовали обрабатывать свои результаты при помощи этих программ и при помощи квалифицированных инструкторов.
- Увеличить время тренинга. Увеличить время лабораторных занятий. Подготовить хорошую аудиторию для проведения лекционных занятий.
- Разделить участников тренинга по уровню подготовленности в данной области и, соответственно, для более продвинутых – увеличит время практических занятий. Например, дать возможность поставить опыт на секвинаторе и обработать полученную информацию.
- Включить в тренинг практические занятия по обработке полученных экспериментальных данных при помощи компьютерных статистических программ. Это очень важно!!!

**Любые другие комментарии.**

- Мне очень понравился город Ташкент. Человеческий фактор. Нас очень тепло приняли. Всем преподавателям спасибо.
- В целом, тренинг очень понравился благодаря дружелюбным и профессиональным преподавателям, организаторам, да и просто тем людям, с которыми приходилось встречаться. Ташкент – очень красивый и тёплый город. Очень хотелось бы вновь посетить вас.
- Курсы были очень короткими. Хотелось бы, чтобы практическим занятиям уделялось больше времени.



- Хотелось бы, чтобы Центр геномных технологий поддерживал научную связь со всеми участниками курса (через электронную почту или другими средствами), создал банк их данных для того, чтобы поддерживать перспективные научные отношения ( в виде межгосударственных научных проектов в пределах Центральноазиатского региона). Большое спасибо за организацию тренинг курса Региональному и Национальному Координаторам проекта и всем организаторам.
- Хотелось бы, чтобы тренинг проводился летом или весной.
- Хотелось бы приехать ещё раз и получить больше практики.