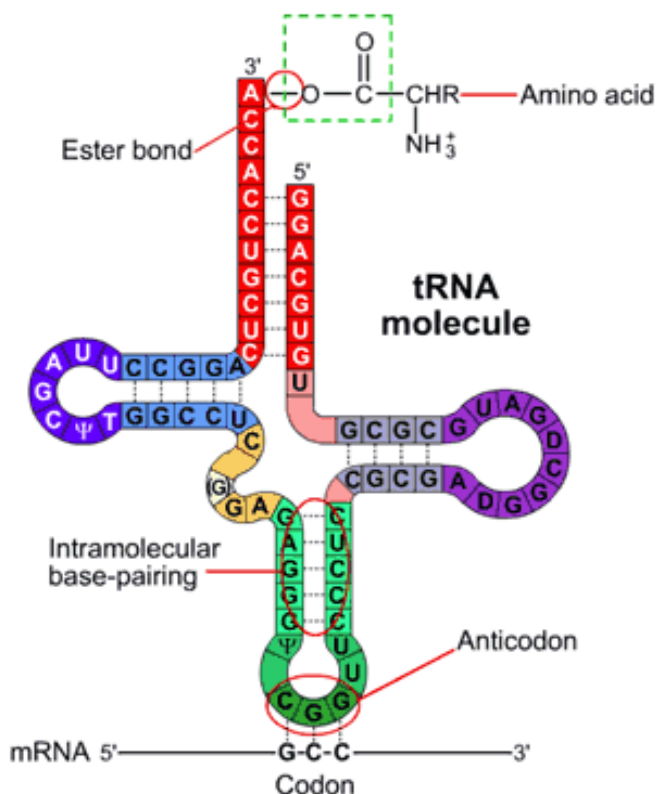




Проект Bioversity International/UNEP-GEF
«*In situ*/On farm сохранение и использование
агробиоразнообразия (плодовые культуры и
дикие плодовые виды) в Центральной Азии»



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



Региональный Тренинг по использованию
технологии молекулярных маркеров в оценке
разнообразия генетических ресурсов растений
13-17 августа 2010 г.

г. Ташкент, Узбекистан
2010

ОГЛАВЛЕНИЕ:

Краткое изложение	2
Приложение 1 Список участников	9
Приложение 2 Программа	14
Приложение 3 Основы молекулярной генетики <i>Салахутдинов И.Б., Центра Геномных Технологий ИГиЭБР АН РУз</i>	18
Приложение 4 Генетический код, транскрипция, трансляция и биосинтез белка, <i>Одылова А.Т., Центра Геномных Технологий ИГиЭБР АН РУз</i>	36
Приложение 5 Роль молекулярной генетики в изучении биологических систем <i>Абдуллаев А.А., Центра Геномных Технологий ИГиЭБР АН РУз</i>	55
Приложение 6 Введение в молекулярную генетику и ее методологию <i>Абдуллаев А.А., Центра Геномных Технологий ИГиЭБР</i>	79
Приложение 7 Секвенирование ДНК, анализ нуклеотидных последовательностей <i>Абдуллаев А.А., Центра Геномных Технологий ИГиЭБР</i>	121
Приложение 8 Охрана труда и техника безопасности в научных лабораториях Центра Геномных Технологий <i>Мавлянов Г.Т., Центра Геномных Технологий ИГиЭБР</i>	157
Приложение 9 Качественный и количественный анализ ДНК и РНК. Спектрофотометрический анализ <i>Мавлянов Г.Т., Центра Геномных Технологий ИГиЭБР</i>	167
Приложение 10 Практическое занятие по подготовке биологического материала, выделению ДНК из клеток бактерий и выделению ДНК из растений, <i>Эгамбердиев Ш.Ш., Центра Геномных Технологий ИГиЭБР</i>	170
Приложение 11 Методы выделения ДНК из биологических материалов <i>Шерматов Ш.Э., Центра Геномных Технологий ИГиЭБР</i>	173
Приложение 12 Теоретические основы метода ПЦР анализа <i>Абдуллаев А.А., Центра Геномных Технологий ИГиЭБР</i>	177
Приложение 13 Принципы электрофореза <i>Кушанов Ф.Н., Центра Геномных Технологий ИГиЭБР</i>	196
Приложение 14 Биоинформатика и компьютерные программы для анализа геномного материала (основы). Статистический анализ. Генетическое расстояние, сцепление генов qtl анализ ld (linkage disequilibrium) анализ. Биоинформатические интернет ресурсы <i>Абдурахмонов И.Ю., Центра Геномных Технологий ИГиЭБР</i>	200
Приложение 15 Форма оценки тренинг курса	228

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

РЕГИОНАЛЬНЫЙ ТРЕНИНГ СЕМИНАР ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ТЕХНОЛОГИИ
МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ В ОЦЕНКЕ РАЗНООБРАЗИЯ
ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ РАСТЕНИЙ

9-13 августа 2010 г.
г. Ташкент, Узбекистан

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ

Тренинг по применению молекулярных маркеров в оценке биоразнообразия генетических ресурсов растений состоялся с 9 по 13 августа 2009 года в тренинг центре по молекулярным маркерам, организованном на базе Центра Геномных технологий Института генетики и экспериментальной биологии растений Академии наук Республики Узбекистан.

Центр геномных технологий был создан на базе лаборатории биотехнологии Института генетики и экспериментальной биологии растений Академии Наук Республики Узбекистан. В Центре проводятся исследования мирового уровня. Впервые в мире с использованием у хлопчатника метода «неравновесного сцепления» идентифицированы маркеры, сцепленные с качеством и выходом волокна. Созданы молекулярно-генетические паспорта сортов и линий хлопчатника узбекской коллекции гермплазмы хлопчатника. Впервые в Узбекистане созданы трансгенные растения хлопчатника с нокаутом генов фитохромов. Нужно отметить, что основной средний возраст сотрудников Центра– 27 лет. «Омолождение» кадрового состава Центра есть результат планомерной работы по привлечению отечественных и зарубежных грантов, модернизации оборудования и модернизации научных направлений Центра. За последние годы Центр оборудован парком современных приборов и комплектующих.

Сотрудники Центра разработали программу обучения по применению технологии молекулярных маркеров в исследованиях разнообразия генетических ресурсов растений. Сотрудники Центра приняли представителей стран Центральной Азии и приложили свои усилия для успешного проведения тренинга. На тренинге приняли участие 7 представителей стран Центральной Азии, участвующих в реализации проекта: Казахстан (1 человек), Таджикистан (2 человека), Туркменистан (1 человек) и Узбекистан (3 человека). Список участников, инструкторов и организаторов представлен в Приложении 1 данного протокола. Тренинг проходил в течение 5 дней. Программа тренинга представлена в Приложении 2.

Первый день тренинга, 9 августа 2010 г.

Первый день тренинга был начат приветственным словом и.о. директора Института д.б.н. Усманова Рустам Махмудовича. Он поприветствовал всех участников тренинга и выразил свою надежду в том, что тренинг будет полезен всем участникам, а навыки и знания, которые они получают в ходе тренинга, будут полезны в будущем. Кроме того, Рустам

Махмудович кратко информировал о деятельности института и его вкладе в реализацию проекта “*In situ/On farm* сохранение и использование агробιοразнообразия (плодовые культуры и дикие плодовые виды) в Центральной Азии”.

Далее с приветственным словом выступила Региональный Координатор проекта Bioversity International/UNEP-GEF “*In situ/On farm* сохранение и использование агробιοразнообразия (плодовые культуры и дикие плодовые виды) 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, ответственный за тренинг центр 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 и на практике.

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.

Далее научный сотрудник Центра Геномных Технологий Института генетики и экспериментальной биологии растений Академии наук Республики Узбекистан Салахутдинов Ильхом Бахтиярович, прочитал лекции на тему «Основы молекулярной генетики», в которых были охвачены основные моменты молекулярной биологии и биохимии – информация, которая необходима для дальнейшего понимания практических и теоретических лекций. Ильхом Бахтиярович при помощи программы Power point презентовал лекции, посвящённые структуре ДНК, истории открытия дезоксирибонуклеиновой кислоты. Ильхом Бахтиярович указал 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».

Далее курс лекций был посвящён 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. Презентация И.Б. Салахутдинова представлена в Приложении 3.

Следующая тема лекций была посвящена транскрипции, трансляции и биосинтезу белка. Лекция была подготовлена и преподнесена слушателям доктором биологических наук, ведущим научным сотрудником Центра геномных технологий Одыловой Азодой Тешабаевной. 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. Об этом рассказала и продемонстрировала при помощи программы Power Point Азода Тишабаевна Одылова.

Доктор Одылова 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 Одылова рассказала об экспериментах по исследованию процесса синтеза белка. Кратко было рассказано о структуре белка. На этом первый день тренинга был завершён. Полный текст доклада и презентация А.Т. Одыловой представлены в Приложении 5.

Второй день тренинга, 10 августа 2010 г.

Первая лекция была посвящена роли молекулярной генетики в изучении биологических систем, а именно, оценке межвидового разнообразия сельскохозяйственных культур с использованием технологии молекулярных маркеров. Лекция была представлена страшим 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». 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 ГРП. Презентация А.А. Абдуллаева представлена в Приложении 6.

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.

В первую очередь, Алишер Абдумавлянович остановился на истории развития и становления метода секвенирования нуклеотидной последовательности дизоксинуклеиновой 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 µM и £ 100 µM, соответственно).
- Аликвота ПЦР разводится (от 1/5 до 1/10 раз)

Алишер Абдумавлянович также кратко остановился на описании генетического анализатора ABI PRISM® 3130 и3130xl. Презентация А.А. Абдуллаева по методам секвенирования ДНК и анализам нуклеотидных последовательностей представлена в Приложении 7.

Третий день тренинга, 11 августа 2010 г.

Первая лекция была проведена ведущим научным сотрудником центра геномных технологий Мавляновым Гафуром Турдиевичем (Приложение 8). 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. Г.Т. Мавлянов также представил презентацию по Качественному и количественному анализу ДНК и РНК и по Спектрофотометрическому анализу (Приложение 9).

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 дизоксирибонуклеионовой кислоты.

В этот же день старший научный сотрудник Центра Шерматов Шухрат Эргашевич прочёл лекции, посвящённые методам выделения ДНК из биологического материала, которые явились теоретическим подкреплением практических работ, проведённых в этот день (Приложение 11)..

Четвёртый день тренинга, 12 августа 2010 г.

Работа четвёртого дня тренинга началась с лекции ведущего научного сотрудника, кандидата химических наук Мавлянова Гафура Турдиевича о принципах проведения электрофореза ДНК в агарозном геле. Теоретическое введение предшествовало практическому занятию по выделению ДНК. Он говорил о том, что 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. 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.

Гафур Турдиевич отметил, 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 старший научный сотрудник Центра геномных технологий Абдуллаев Алишер Абдумавлянович прочитал лекции, посвящённые ПЦР анализу (Приложение 12). 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. Особое 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.

Далее участники тренинга имели возможность наблюдать за проведением электрофореза ДНК, в процессе подготовки которого они сами принимали участие. В этом им помог старший научный сотрудник Центра геномных технологий, кандидат биологических наук Кушанов Ф.Н. (Приложение 13)

Пятый день тренинга, 13 августа 2010 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.

Далее старший 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 (Приложение 14). 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. 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. Бланк формы оценки результатов проведения тренинга, а также заполненная форма представлены в Приложении 15 протокола.

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.

**РЕГИОНАЛЬНЫЙ ТРЕНИНГ СЕМИНАР
ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ТЕХНОЛОГИИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ В ОЦЕНКЕ РАЗНООБРАЗИЯ
ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ РАСТЕНИЙ**

9-13 августа 2010 г.
г. Ташкент, Узбекистан

СПИСОК УЧАСТНИКОВ

№	Ф.И.О.	Страна	Место работы	Должность	Адрес	Контактные адреса
ИНСТРУКТОРА						
	Абдурахмонов Ибрагим Юлчиевич	Узбекистан	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: ibrokhim_a@yahoo.com
	Мавлянов Гафур Турдиевич	Узбекистан	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: inst@gen.org.uz
	Абдуллаев Алишер Абдумавлянович	Узбекистан	Центр Геномных Технологий Института генетики и экспериментальной биологии растений Академии наук Республики Узбекистан	Заведующий лабораторией гермоплазмы хлопчатника, старший научный сотрудник.	111126, Узбекистан Ташкентский р-н, Ташкентская обл., п. Юкори Юз	Тел: (99871) 2690097 (99897) 159-09-83 (моб.) Fax: (998712) 64-22-30 E-mail: abdullaev_alisher@yahoo.com

№	Ф.И.О.	Страна	Место работы	Должность	Адрес	Контактные адреса
	Буриев Забардаст Таджибаевич	Узбекистан	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: inst@gen.org.uz
	Шерматов Шухрат Эргашевич	Узбекистан	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: inst@gen.org.uz
	Одылова Азода Тишабаевна	Узбекистан	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 / 2642390 Факс: +99871-2642230 E-mail: inst@gen.org.uz
	Салахутдинов Ильхом Бахтиярович	Узбекистан	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: inst@gen.org.uz
	Эгамбердиев Шароф Шухратович	Узбекистан	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: inst@gen.org.uz
	Кушанов Ф.Н.	Узбекистан	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: inst@gen.org.uz

№	Ф.И.О.	Страна	Место работы	Должность	Адрес	Контактные адреса
ОРГАНИЗАТОРЫ						
	Турдиева Мухаббат Кузиевна	Узбекистан	Проект Bioversity International/UNEP-GEF “ <i>In situ/On farm</i> сохранение и использование агробιοразнообразия (плодовые культуры и дикие плодовые виды) в Центральной Азии”	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: m.turdieva@cgiar.org
	Усманов Рустам Махмудович	Узбекистан	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: inst@gen.org.uz
	Кайимов Абдихалил Кайимович	Узбекистан	Проект Bioversity International/UNEP-GEF “ <i>In situ/On farm</i> сохранение и использование агробιοразнообразия (плодовые культуры и дикие плодовые виды) в Центральной Азии”	Национальный Координатор проекта	111126, Узбекистан Ташкентский р-н, Ташкентская обл., п. Юкори Юз	Тел.:+99890-7271506 (моб.) +99871-2257250 E-mail: abd_uzbek@mail.ru
	Хегай Евгения Викторовна	Узбекистан	Институт генетики и экспериментальной биологии растений Академии Наук Республики Узбекистан	Руководитель информационно-аналитического отдела.	111126, Узбекистан Ташкентский р-н, Ташкентская обл., п. Юкори Юз	Тел.: +99871-2642223 / 2642390 +99890-4574621 (моб.) Факс: +99871-2642230 E-mail: inst@gen.org.uz
	Мустафина Феруза Усмановна	Узбекистан	International/UNEP-GEF “ <i>In situ/On farm</i> сохранение и использование агробιοразнообразия	Помощник Национального Координатора проекта	111126, Узбекистан Ташкентский р-н, Ташкентская обл., п. Юкори Юз	Тел.: +99890-3296553 E-mail: mustafinaferuza@yaahoo.com

№	Ф.И.О.	Страна	Место работы	Должность	Адрес	Контактные адреса
			(плодовые культуры и дикие плодовые виды) в Центральной Азии” (компонент Узбекистан)			
СЛУШАТЕЛИ						
	Волков Дмитрий Владимирович	Казахстан	Институт биологии и биотехнологии растений Министерства образования и науки Республики Казахстан.	Младший научный сотрудник	Казахстан г. Алматы, ул. Тимирязева, д.45	Тел.: +8 727 3947562 +7 777 2777470 (моб.) Факс: +727 3947562 gen_dana@mail.ru Spiritdem@mail.ru
	Кариев Бахромжон Баходурович	Таджикиста н	Согдийский филиал Института садоводства и овощеводства Таджикской Академии Сельскохозяйственных наук.	Старший лаборант отдела плододства	Согдийская область, Б.Гафуровский район, Джамоат Овчи-Калача, ул.Кирова 20.	Тел.: +99298 5000048
	Сакоев Саймидин Зайнидинович	Таджикиста н	Институт садоводства и овощеводства Таджикской Академии Сельскохозяйственных наук.	Младший научный сотрудник отдела плододства.	Гиссарский район, сельсовет Дурбат, ул. Дурбад	Тел.: +99293 5208656 E-mail: saimiddin@mail.ru
	Атаев Азат Чарьевич	Туркмениста н	Института пустынь, растительного и животного мира	Старший научный сотрудник	Туркменистан, г.Ашгабат, ул. Битараплык Туркменистан,15.	Тел.: +99312352851.
	Баротова Нигора Рамазановна	Узбекистан	Институт генетики и экспериментальной биологии растений Академии Наук Республики Узбекистан.	Младший научный сотрудник лаборатории частной и	111126, Узбекистан Ташкентский р-н, Ташкентская обл., п. Юкори Юз	Тел.: +99897 1039365 (моб.). +99871 2611893 (дом.) E-mail: nigosha80@mail.ru

№	Ф.И.О.	Страна	Место работы	Должность	Адрес	Контактные адреса
				прикладной генетики.		
	Матниязова Хилола Худайбергеновна	Узбекистан	Институт генетики и экспериментальной биологии растений Академии Наук Республики Узбекистан.	Младший научный сотрудник лаборатории экологической генетики.	111126, Узбекистан Ташкентский р-н, Ташкентская обл., п. Юкори Юз	Тел.: +99897 45605679 E-mail: Matniyazova@mail.ru
	Муталова Мамура Каримжановна	Узбекистан	Институт генетики и экспериментальной биологии растений Академии Наук Республики Узбекистан.	Младший научный сотрудник лаборатории семеноводства и семеноведения.	111126, Узбекистан Ташкентский р-н, Ташкентская обл., п. Юкори Юз	Тел.: +99897 4560679 (моб.). E-mail: Mutalova79@mail.ru

РЕГИОНАЛЬНЫЙ ТРЕНИНГ
ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ТЕХНОЛОГИИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ В
ОЦЕНКЕ РАЗНООБРАЗИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ РАСТЕНИЙ

9-13 августа 2010 г.
г. Ташкент, Узбекистан

ПРОГРАММА

Дата и время	Тема	Ф.И.О. инструктора
<i>9 августа 2010 г.</i>		
9.00-9.15	Приветственное слово и открытие семинара Р.М.Усманов , и.о. директора Института генетики и экспериментальной биологии растений Академии Наук Республики Узбекистан (ИГиЭБР АН РУз) А.К. Кайимов , Национальный Координатор проекта М.К. Турдиева , Региональный Координатор проекта.	
9.15-10.00	Представление инструкторов и слушателей. Ознакомление с целями тренинг тренинга. Ознакомление с Центром геномных технологий Института генетики и экспериментальной биологии растений Академии Наук Республики Узбекистан	Абдурахмонов И.Ю. , д.б.н., ведущий научный Центра Геномных Технологий ИГиЭБР
10.00-12.00	Лекция «Основы молекулярной генетики»: - Структура ДНК - Принцип комплементарности - Репликация - Молекулярная структура гена.	Салахутдинов И.Б. , научный сотрудник Центра Геномных Технологий ИГиЭБР
12.00-13.00	Продолжение лекции «Основы молекулярной генетики»: - Структура ДНК - Принцип комплементарности - Репликация - Молекулярная структура гена.	Салахутдинов И.Б. , научный сотрудник Центра Геномных Технологий ИГиЭБР
13.00-14.00	<i>Обед</i>	
13.00-14.00	Продолжение лекции «Основы молекулярной генетики»: - Структура ДНК - Принцип комплементарности - Репликация - Молекулярная структура гена.	Салахутдинов И.Б. , научный сотрудник Центра Геномных Технологий ИГиЭБР
14.00-18.00	Лекция «Генетический код, транскрипция, трансляция и биосинтез белка» - От гена к белку	Адылова О.Т. д.б.н., ведущий научный сотрудник

Дата и время	Тема	Ф.И.О. инструктора
	<ul style="list-style-type: none"> - Генетический код Синтез белка - РНК – виды РНК - матричная РНК - транспортная РНК - трансляция Структура белка 	Центра Геномных Технологий ИГиЭБР
10 августа 2010 г.		
9.00-11.00	Лекция «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
11.00-13.00	Лекция «Введение в молекулярную генетику и ее методологию»	Абдуллаев А.А., к.б.н., старший научный сотрудник Центра Геномных Технологий ИГиЭБР
13.00-14.00	<i>Обед</i>	
14.00-18.00	Лекция «Секвенирование ДНК, анализ нуклеотидных последовательностей»: <ul style="list-style-type: none"> - История - Методы секвенирования - Оборудование - Особенности секвенирования, оптимизация, выявление проблем. 	Абдуллаев А.А., к.б.н., старший научный сотрудник Центра Геномных Технологий ИГиЭБР
11 августа 2010 г.		
9.00-10.00	Техника безопасности в лабораториях Центра геномных технологий.	Мавлянов Г.Т., к.б.н., ведущий научный сотрудник Центра Геномных Технологий ИГиЭБР
10.00-13.00	Практические занятия по секвенированию	Буриев З.Т., к.б.н., старший научный сотрудник Центра Геномных Технологий ИГиЭБР Абдуллаев А.А., к.б.н., старший научный сотрудник Центра Геномных Технологий ИГиЭБР
13.00-14.00	<i>Обед</i>	
14.00-16.00	Практические занятия по подготовке биологического материала, выделению ДНК	Эгамбердиев Ш.Ш., младший научный сотрудник

Дата и время	Тема	Ф.И.О. инструктора
	из клеток бактерий и выделению ДНК из растений	Центра Геномных Технологий ИГиЭБР Шерматов Ш.Э., к.б.н., старший научный сотрудник Центра Геномных Технологий ИГиЭБР
16.00-18.00	Лекция «Методы выделения ДНК из биологических материалов».	Шерматов Ш.Э., к.б.н., старший научный сотрудник Центра Геномных Технологий ИГиЭБР
12 августа 2010 Г.		
9.00-11.00	Лекция «Анализ ДНК (качественный и количественный). Спектрофотометрический анализ»	Мавлонов Г.Т., к.х.н. ведущий научный сотрудник Центра Геномных Технологий ИГиЭБР
11.00-13.00	Практические занятия по электрофоретическому анализу выделенной ДНК в агарозном геле	Кушанов Ф.Н., К.б.н. Старший научный сотрудник Центра Геномных Технологий ИГиЭБР
13.00-14.00	<i>Обед</i>	
14.00-16.00	Лекция «Теоретические основы метода ПЦР анализа»: - История ПЦР - Оборудование - Компоненты реакции - Условия термоциклирования - Особенности дизайна праймеров - Оптимизация реакции, выявление и устранение проблем	Абдуллаев А.А., к.б.н., старший научный сотрудник Центра Геномных Технологий ИГиЭБР
16.00-18.00	Практические занятия по постановке ПЦР на выделенной ДНК	Эгамбердиев Ш.Ш., младший научный сотрудник Центра Геномных Технологий ИГиЭБР Шерматов Ш.Э., к.б.н., старший научный сотрудник Центра Геномных Технологий ИГиЭБР
13 августа 2010 г.		
9.00-11.00	Практические занятия по анализу ПЦР продуктов	Эгамбердиев Ш.Ш., младший научный сотрудник

Дата и время	Тема	Ф.И.О. инструктора
		<p>Центра Геномных Технологий ИГиЭБР</p> <p>Шерматов Ш., к.б.н., старший научный сотрудник Центра Геномных Технологий ИГиЭБР</p>
11.00-13.00	<p>Лекция «ДНК маркеры для изучения геномов. Типы молекулярных маркеров (RFLP, AFLP, RADP, SSR, EST и т.д.). Получение молекулярных маркеров»</p>	<p>Абдуллаев А.А., к.б.н., старший научный сотрудник Центра Геномных Технологий ИГиЭБР</p>
13.00-14.00	<i>Обед</i>	
14.00-16.00	<p>Лекция «Биоинформатика и компьютерные программы для анализа геномного материала (основы). Статистический анализ. Генетическое расстояние, сцепление генов QTL анализ LD (Linkage disequilibrium) анализ Биоинформатические Интернет ресурсы»</p>	<p>Абдурахманов И.Ю., д.б.н., ведущий научный сотрудник Центра Геномных Технологий ИГиЭБР</p>
16.00-18.00	Заключительное обсуждение и оценка тренинга	Все инструктора тренинга
18.00-19.00	Вручение сертификатов Торжественный ужин	

Основы молекулярной генетики
Салахутдинов И.Б.,
Центра Геномных Технологий ИГиЭБР АН РУз



История ДНК

- **Открытие двойной спирали ДНК**
 - А. **Фредерик Гриффит** – Установил, что факторы болезнетворных бактерий могут трансформировать безвредные бактерии в смертельные. (1928)
 - В. **Розалинд Франклин** – впервые получила рентгеновский снимок ДНК. (1952)
 - С. **Уотсон и Крик** – описали структуру молекулы ДНК. (1953)



Основы молекулярной генетики

Структура ДНК



Структура ДНК

Снимок ДНК сделанный Розалинд Франклин



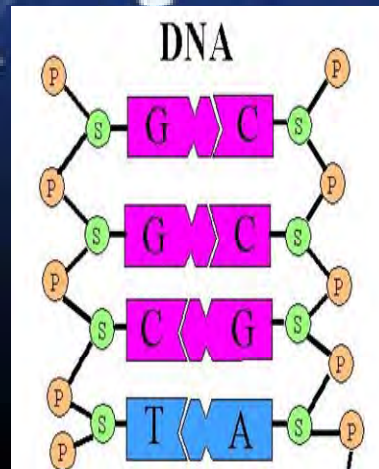
Структура ДНК была открыта Джэймсом Уотсоном и Фрэнсисом Криком в 1953 году



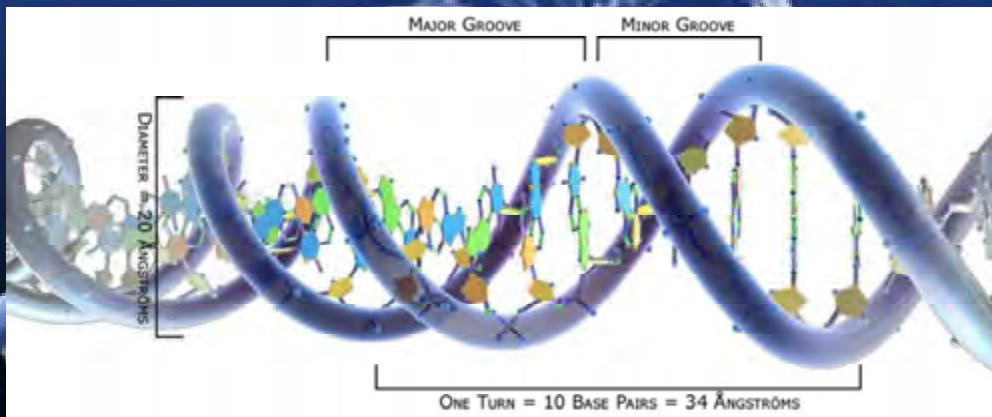
Они
полиде
общей о

Структура ДНК

- ДНК - Дезоксирибонуклеиновая Кислота
- ДНК- биополимер, состоящий из 2-х полинуклеотидных цепей, соединенных друг с другом и образующие структуру называемую двойной спиралью
- Каждый нуклеотид состоит из сахара (дезоксирибозы), фосфатной группы и азотистого основания



Структура ДНК



Структура ДНК

purine

adenine (A)
DNA/RNA

guanine (G)
DNA/RNA

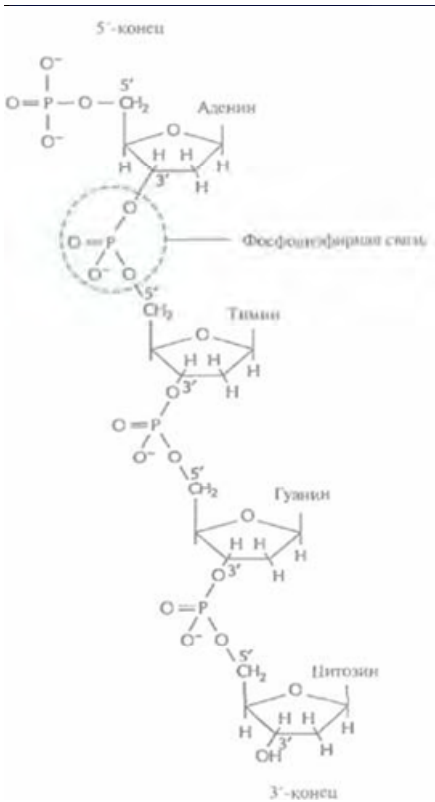
pyrimidine

cytosine (C)
DNA/RNA

thymine (T)
DNA

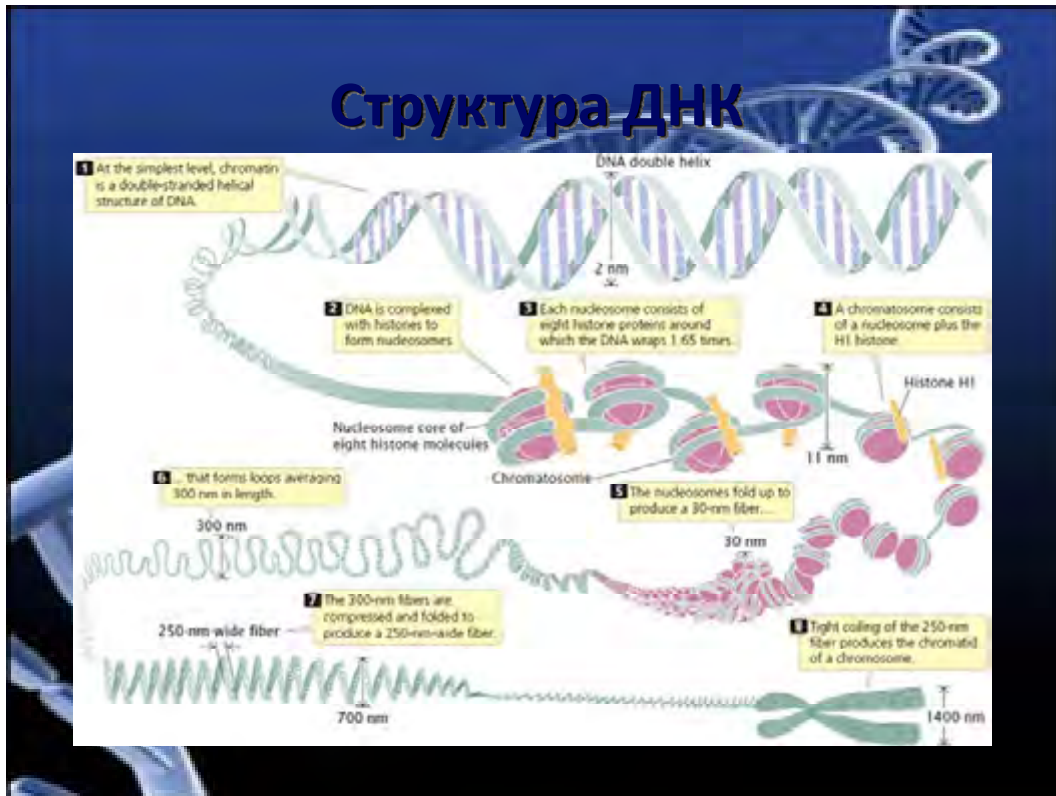
uracil (U)
RNA

Азотистые основания делятся на два типа: пиримидиновые и пуриновые основания. Пиримидиновые основания состоят из одного кольца, а пуриновые — из двух. Пиримидиновые основания образуются в результате конденсации двух аминных кислот.



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.

Структура ДНК

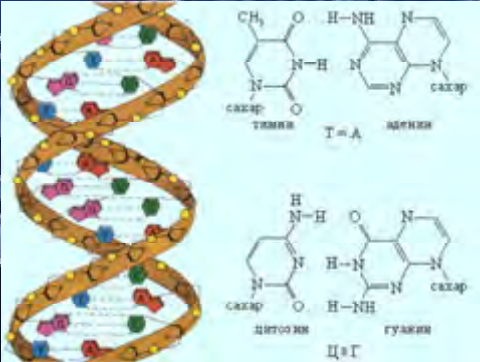


Комплицментарность

- **Комплицментарность** - пространственная взаимодополняемость молекул или их частей, приводящая к образованию водородных связей.
- Комплицментарные структуры подходят друг к другу как «ключ с замком»

$$(A+T)+(G+C)=100\%$$

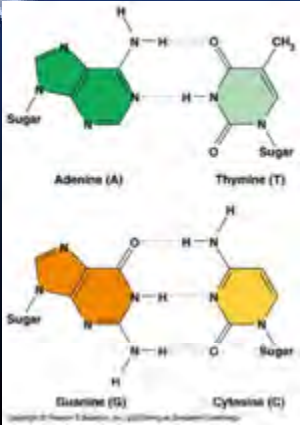
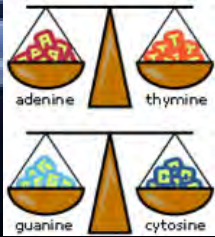
Комплементарность



Уотсон и Крик предположили, что молекула ДНК имеет ковалентные связи между азотистыми основаниями, которые могут быть специфичными.

“Chargoff’s rule”

$$A = T \text{ \& \ } C = G$$



"Chargoff's rule"
 $A = T \text{ \& \ } C = G$

The image illustrates Chargaff's rule, which states that in DNA, the amount of adenine (A) is equal to the amount of thymine (T), and the amount of guanine (G) is equal to the amount of cytosine (C). This is shown by a diagram of two pairs of balance scales. The first pair shows adenine (red) and thymine (orange) in equal amounts. The second pair shows guanine (blue) and cytosine (green) in equal amounts. To the right, chemical structures of the four nitrogenous bases are shown, highlighting the hydrogen bonding between complementary bases: Adenine (A) and Thymine (T) form two hydrogen bonds, while Guanine (G) and Cytosine (C) form three hydrogen bonds.

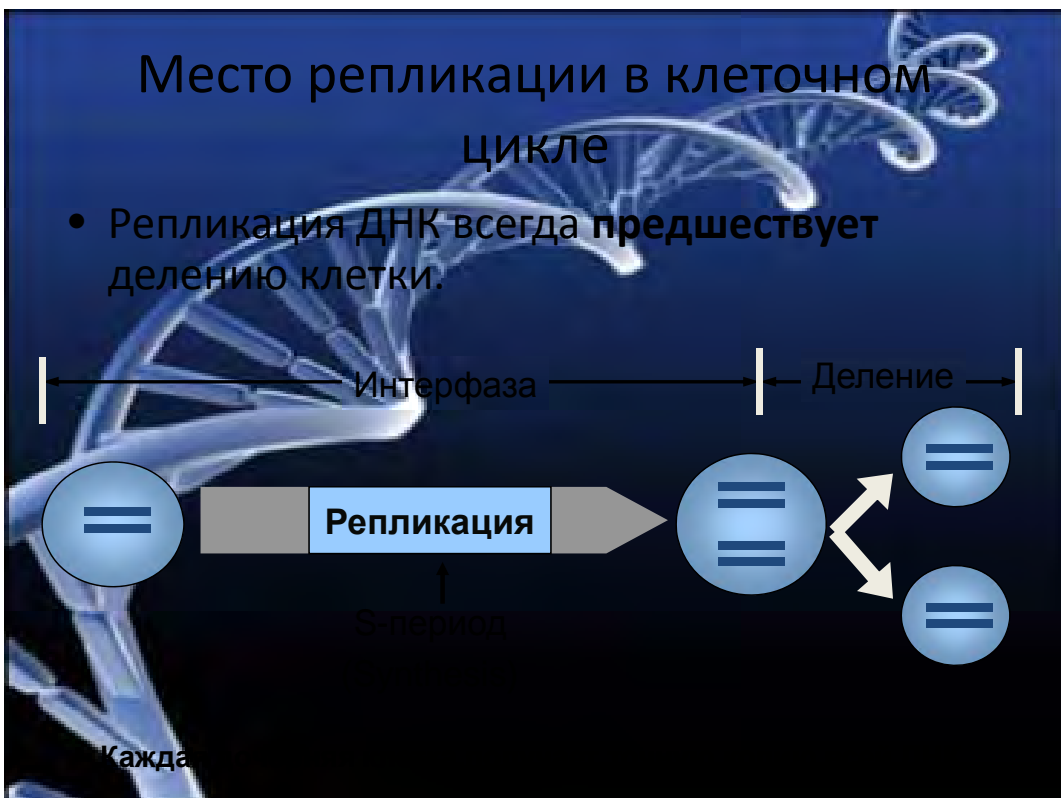
Репликация ДНК



- Универсальный биологический процесс передачи генетической информации в поколениях клеток и организмов, благодаря созданию точных копий ДНК.
- ДНК – единственная молекула клетки, способная к самоудвоению.

Место репликации в клеточном цикле

- Репликация ДНК всегда **предшествует** делению клетки.

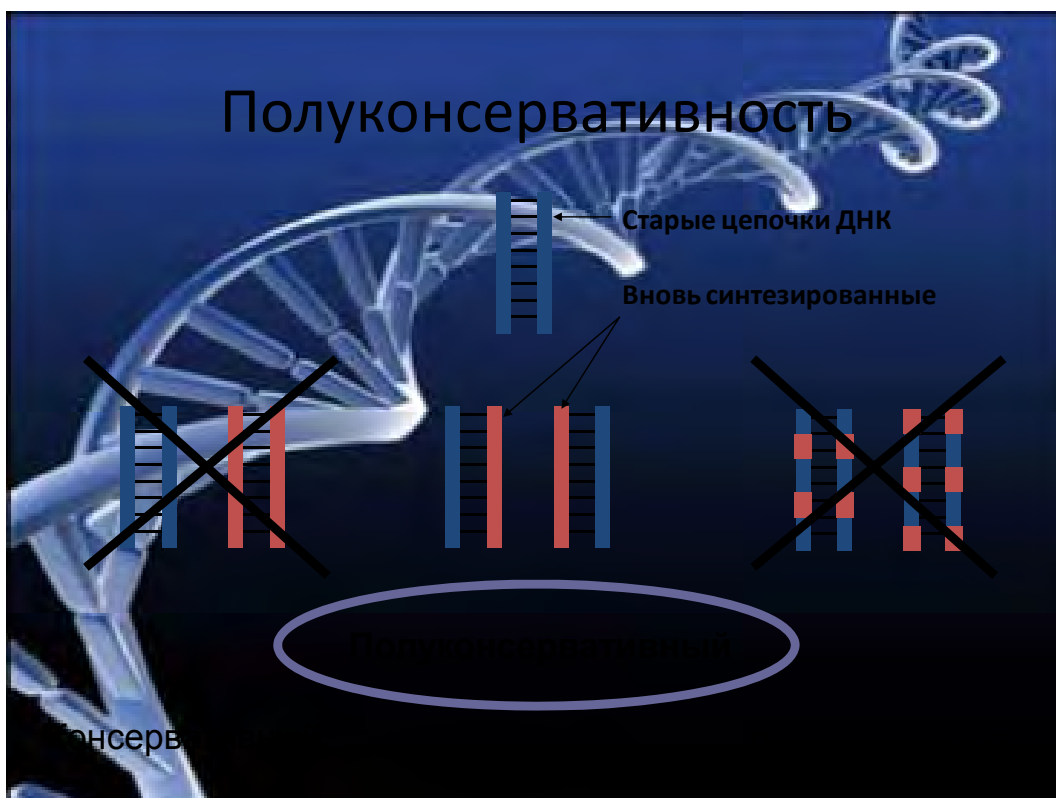


Каждый цикл

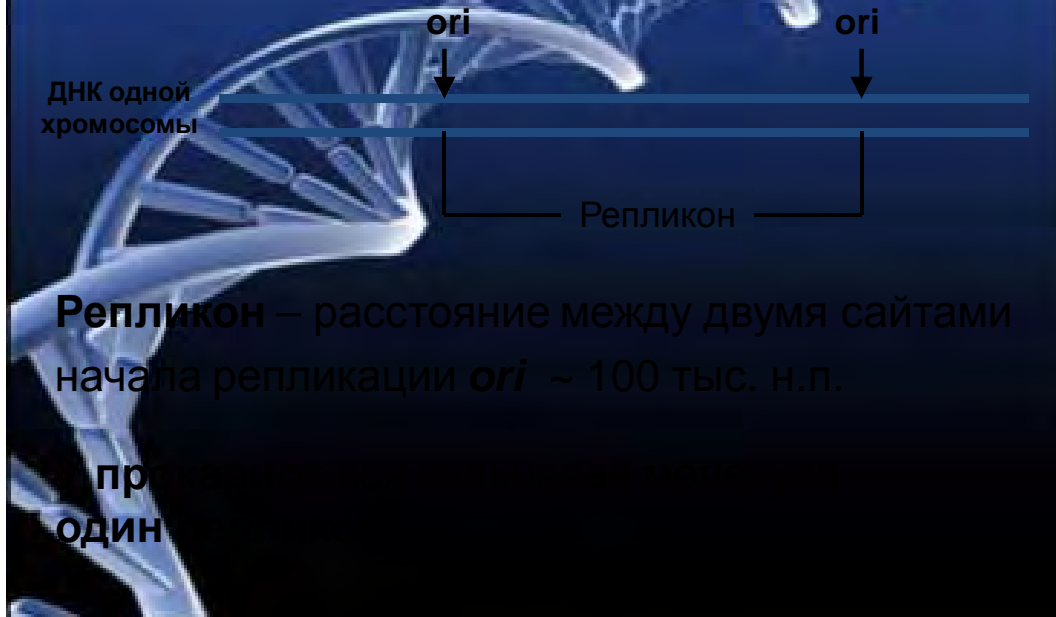
Принципы репликации

1. Комплементарность
2. Антипараллельность
3. Полуконсервативность
4. Униполярность
5. Прерывистость
6. Потребность в затрате

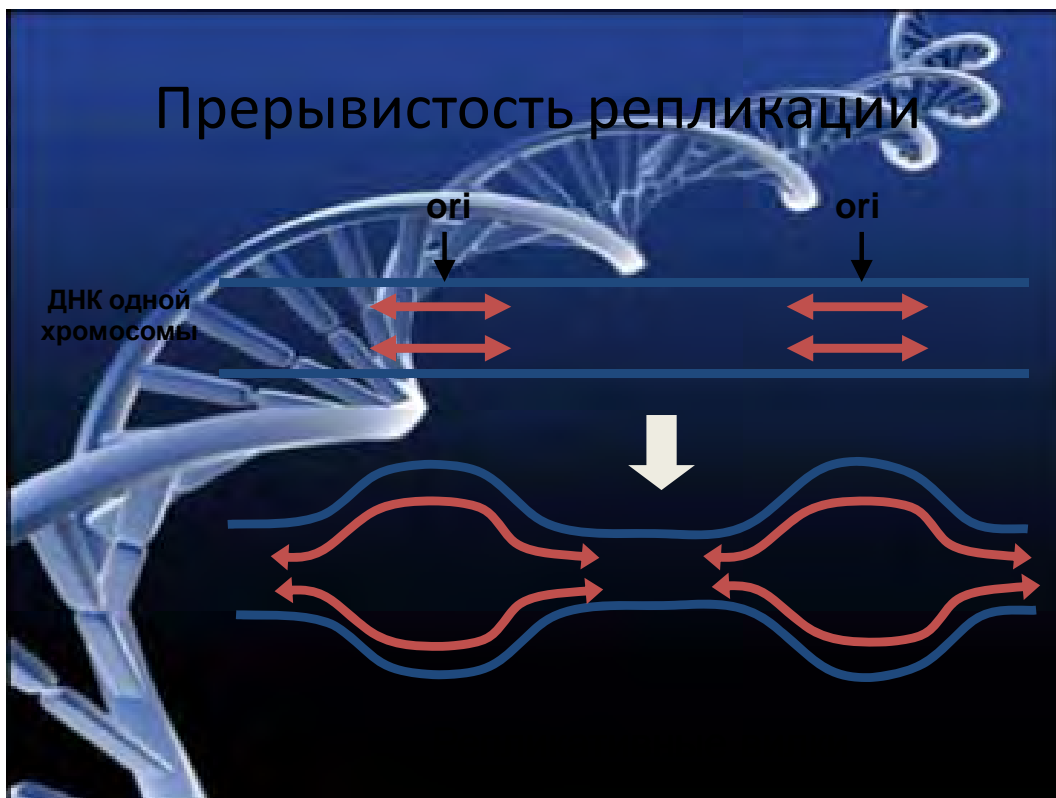
Полуконсервативность

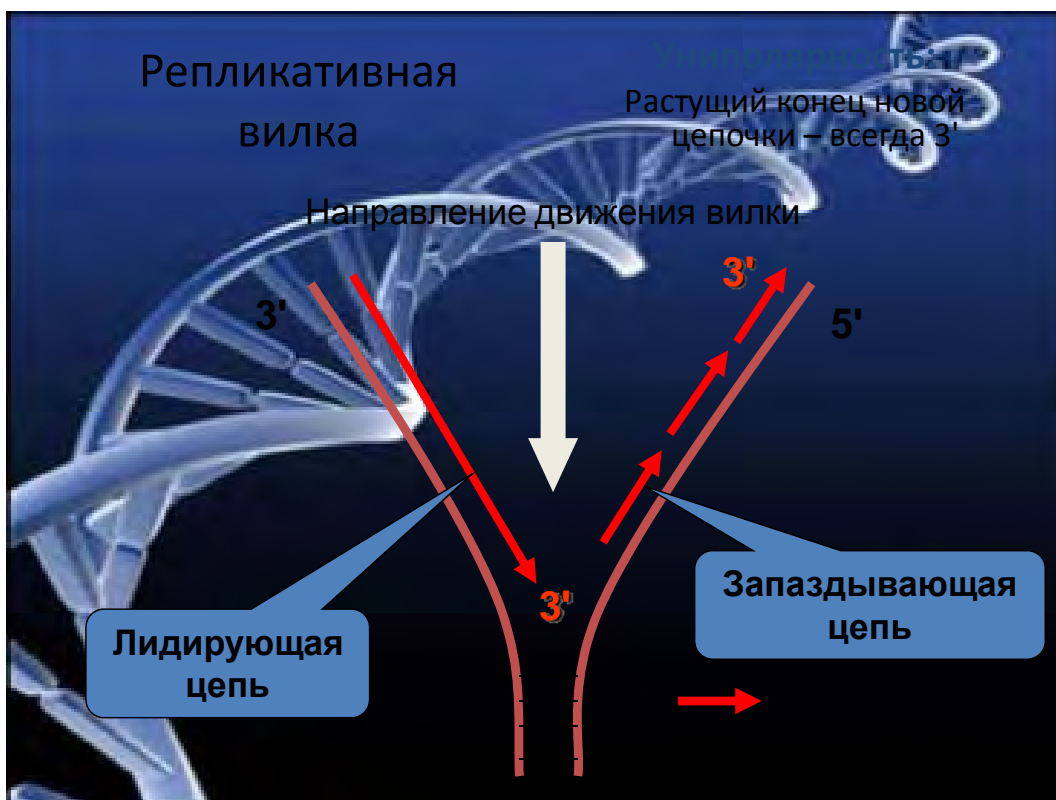


Прерывистость репликации



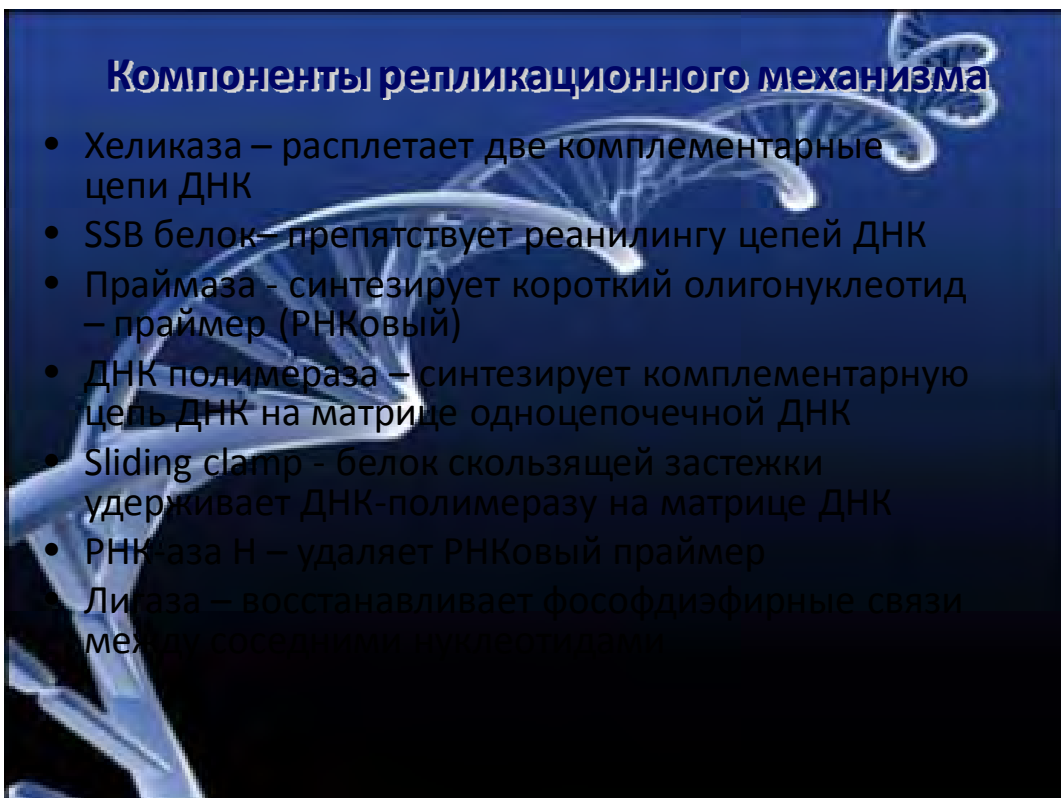
Прерывистость репликации





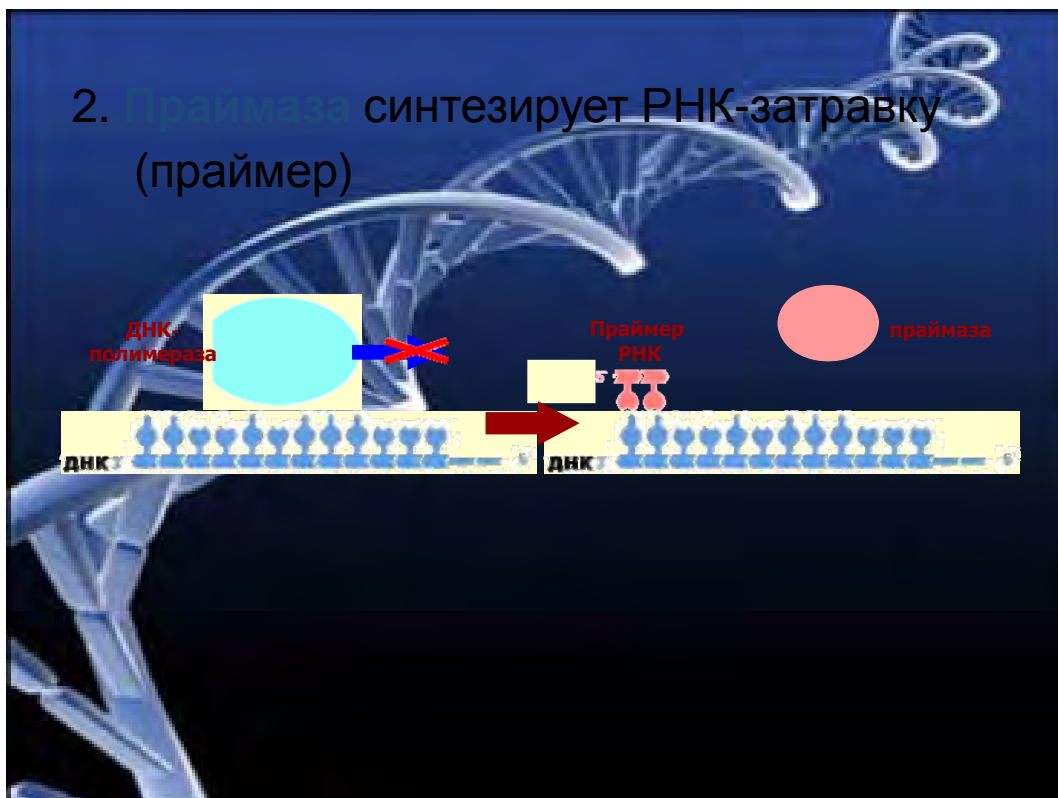
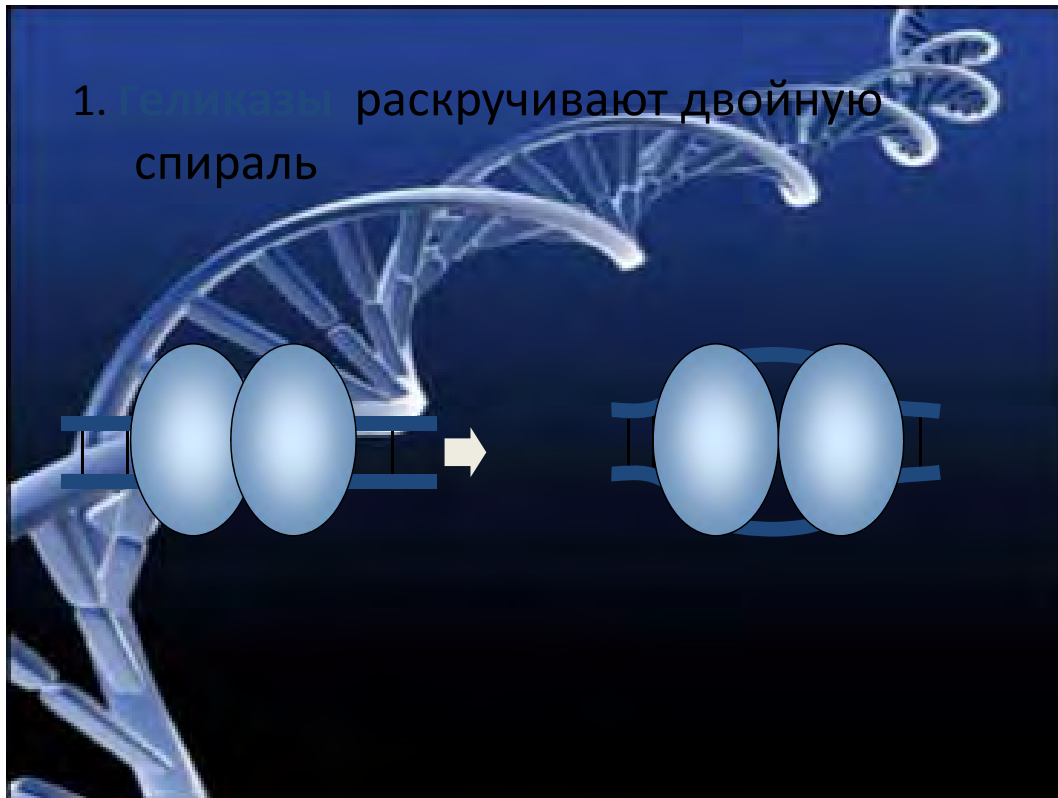


Молекулярная машина репликации



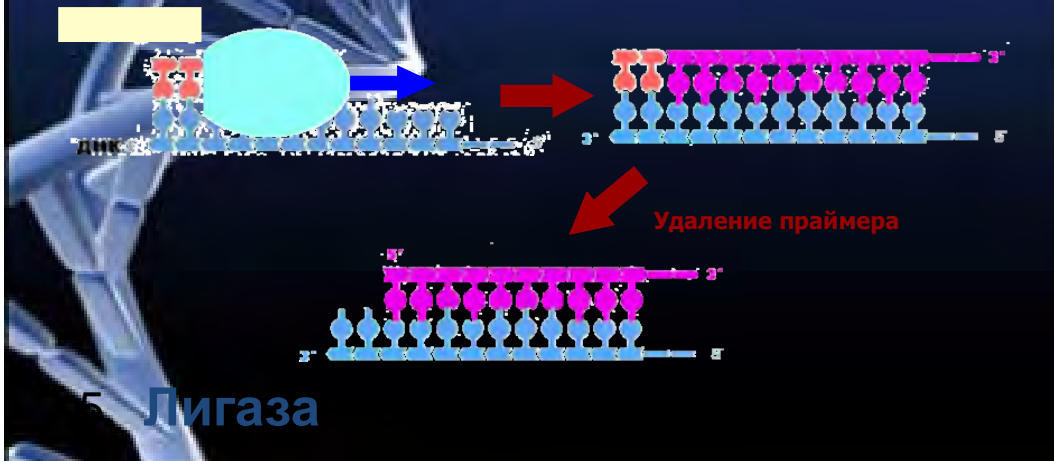
Компоненты репликационного механизма

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

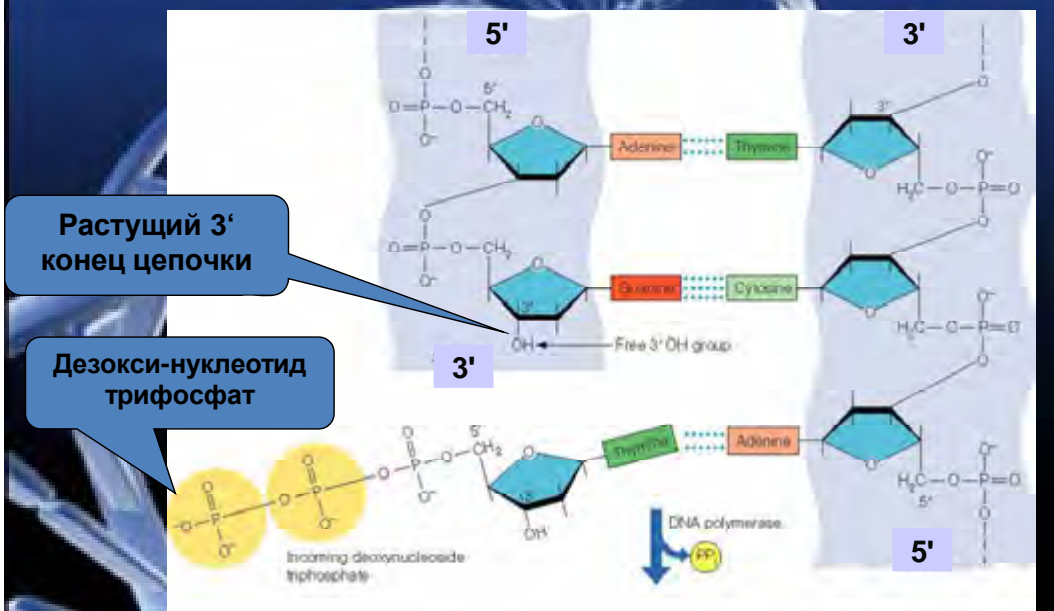


3. ДНК-полимераза III синтезирует новую цепь ДНК

4. ДНК-полимераза I удаляет праймер и заделывает брешь



ДНК-полимераза использует нуклеотиды в виде 5' трифосфатов



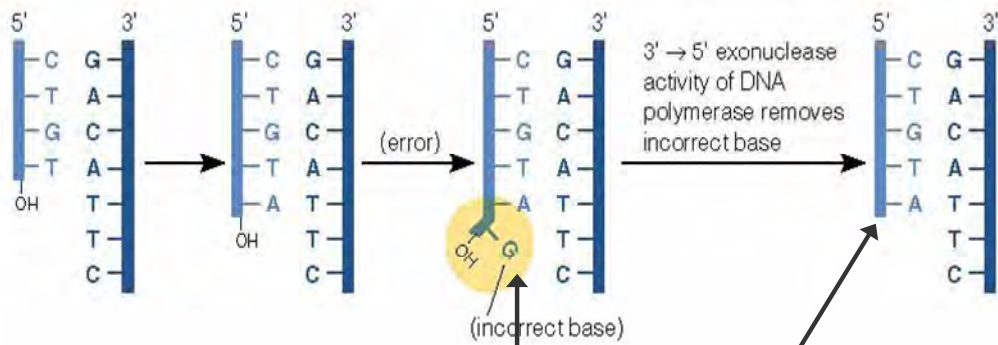
Свойства ДНК-полимеразы

1. Присоединяет по одному нуклеотиду с 3' конца растущей цепочки.
2. Требуется для начала работы спаренного 3' конца.
3. Отщепляет один нуклеотид назад, если он не спарен – т.е. исправляет свои ошибки.

3'

Логически связанные свойства!

ДНК-полимераза исправляет ошибки




Если новый нуклеотид не спарен – фермент не может двигаться дальше

Скорость репликации ДНК



- У прокариот – 1000 нуклеотидов /сек
- У эукариот – 100 нуклеотидов /сек
(медленнее, потому что ДНК сложно упакована – нуклеосомы и другие уровни упаковки)

Выводы по репликации ДНК



- В результате репликации каждая дочерняя клетка получает **точную копию всей ДНК** содержащейся в материнской клетке.
- **ДНК всех клеток одного организма – одинаковая**, как по количеству молекул, т.е. хромосом, так и по их нуклеотидному составу.

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.

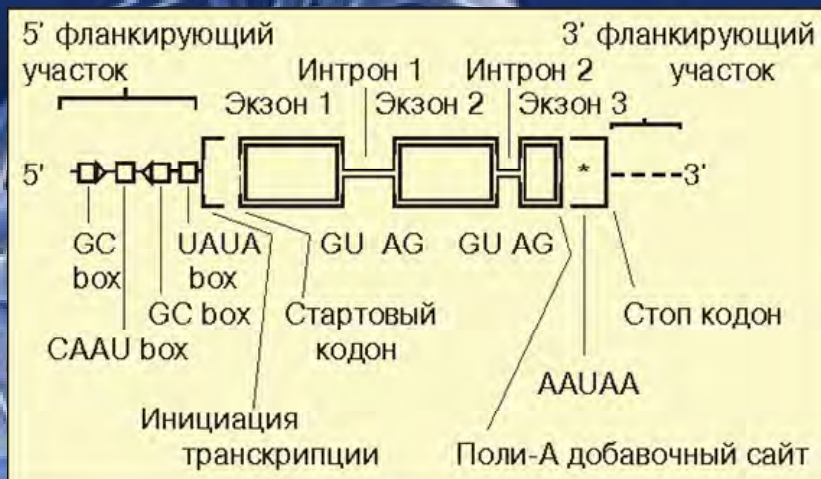
Регуляторные гены как правило не транскрибируются. Белок-кодирующие и РНК-кодирующие транскрибируются и часто объединяются под названием "структурные гены".

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 (одинокные 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 полезными для того, чтобы исследовать эволюцию и расселение.

Генетический код, транскрипция, трансляция и биосинтез белка*(теоретический материал)*

Одылова А.Т.,

Центра Геномных Технологий ИГиЭБР АН РУз

Фенотип любой клетки по существу определяется совокупностью структурных, каталитических, регуляторных и т.д. активностей белков, синтезируемых из аминокислот в цитоплазме. В свою очередь последовательность аминокислот каждого белка закодирована в ДНК в виде последовательностей азотистых оснований.

Взаимоотношения между последовательностью оснований гена и последовательностью белка устанавливаются с помощью генетического кода.

Конечно, кроме последовательностей, кодирующих белки, в ДНК находятся специфические участки, гены, кодирующие рибосомальные, транспортные и различные виды малых РНК. Эти РНК транскрибируются с ДНК, но не транслируются, не кодируют белки. Однако без участия этих РНК процесс белкового синтеза в клетке невозможен. Кроме того, в ДНК имеются области, выполняющие структурную функцию, и сайты, которые узнаются регуляторными молекулами. Это промоторы, энхансеры, сайленсоры, участки, узнаваемые регуляторными белками. Это области ДНК могут и не транскрибироваться, однако регулируемая экспрессия конкретного гена (участка ДНК) обеспечивается совокупной работой всех вышеперечисленных элементов генома. Общая схема биосинтеза нуклеиновых кислот и белка представлена на слайде (сл.2)

1. Генетический код

Каким образом последовательность нуклеотидов может быть представлена последовательностью аминокислот в белке? Если давать определение, что такое генетический код, то можно сказать, что генетический код – это перевод нуклеотидного текста ДНК на язык аминокислот, структурных единиц белка или способ записи информации в ДНК и принцип передачи ее на белковую структуру. История расшифровки генетического кода представляет собой цепь догадок, гипотез и открытий, связанных с именами Ф.Крика, С.Очао, Г.Кораны, М.Ниренберга, С. Бреннера.

Двадцать аминокислот, обычно обнаруживаемых в белках, соединяются вместе пептидными связями, образуясь в результате конденсации аминогруппы (NH_2) одной аминокислоты с карбоксильной группой другой. Белковую последовательность условно записывают от аминокислоты со свободной NH_2 -группой (N-конец) до аминокислоты со свободной COOH -группой (C-конец).

Любые другие аминокислоты, например, относительно редко встречающийся гидроксипролин, образуются в результате специфической модификации одной из 20 обычных протеиногенных аминокислот. Различные виды модификаций аминокислот, такие, как фосфорилирование, аденилирование, метилирование и т.д., выполняются специфическими ферментами уже в составе белковой молекулы.

Взаимоотношения между нуклеотидами и аминокислотами не могут быть 1:1., т.е. один нуклеотид кодирует, (детерминирует, определяет) 1 аминокислоту, ибо оснований всего 4, а аминокислот -20. Если бы одна аминокислота определялась бы двумя основаниями, четыре нуклеотида, группируясь по два, дали бы всего 16 сочетаний, что также недостаточно для кодирования 20 аминокислот. Таким образом, теоретически кодовое отношение должно быть не менее 3, т.е. три нуклеотида определяют одну аминокислоту. Генетический код един для всех организмов. Он содержит 64 кодона - число возможных сочетаний по три из 4 нуклеотидов. Последовательность трех нуклеотидов, определяющих 1 аминокислоту,

называется кодоном. Три кодона- UAG, UGA и UAA – не кодируют аминокислоты, их называют nonsense, бессмысленными или еще стоп кодонами. Остальные 61- это смысловые кодоны, которые соответствуют 20 различным аминокислотам (слайд 3).

Так как число кодонов превышает число аминокислот, генетический код является вырожденным. Термин вырожденный взят из теории информатики, когда одна и та же функция может определяться двумя знаками (+ и -).

Расшифровка генетического кода была значительно ускорена благодаря изящным экспериментам С.Очао и М.Ниренберга. Была выделена бактериальная полирибонуклеотидфосфорилаза, способная синтезировать полимер –полирибонуклеотид из мономеров (УДФ, ЦДФ, ГДФ и АДФ) в отсутствии матрицы. Благодаря этому ферменту ученые смогли вначале синтезировать монотонные полирибонуклеотиды, например, поли(У), поли(А), поли(Ц) или поли(Г), затем полирибонуклеотиды со случайным сочетанием нуклеотидов, например (АУГ) или (УАГ) и т.д. и, наконец, со строго определенным сочетанием нуклеотидов. Каждая из таких синтетических матриц вносилась в систему трансляции и в присутствии меченых аминокислот определялась, какая из аминокислот участвует в формировании пептидной цепочки в присутствии заданного полирибонуклеотида (слайд 4).

На этом слайде видно, что некоторые аминокислоты могут кодироваться более, чем одним триплетом, например, лейцин может кодироваться шестью триплетами, изолейцин – тремя. Для объяснения этого факта было выдвинуто ряд гипотез. Согласно одной из них для одной аминокислоты существуют несколько специфичных тРНК (названных изоакцепторными тРНК), несущих разные триплеты в своём антикодоне.

Поскольку все 64 кодона были расшифрованы в экспериментах *in vitro*, то есть вероятность того, что не все триплеты участвуют в кодировании аминокислот *in vivo*.

Но в клетке может существовать еще одна ситуация. Согласно гипотезе Крика (гипотеза «качания») для комплементарного взаимодействия между антикодоном в тРНК и кодоном в мРНК важны именно первые две буквы кода, а на спаривание третьей пары основания в системе кодон-антикодон накладываются менее жесткие ограничения.

Код при синтезе белка считывается по три нуклеотида линейно (непрерывно), начиная с фиксированной точки на одном конце гена (матрицы), и заканчивается в точке терминации на другом конце гена.

Триплетная природа генетического кода была экспериментально подтверждена в генетических экспериментах с мутантами фага Т4, у которых были утрачены или добавлены один или несколько нуклеотидов. У этого вируса известны так называемые leaky (лики)-мутанты, у которых сохраняется остаточная функция. У акридиновых мутантов, напротив, функция гена утеряна полностью. В отличие от лики-мутантов, у которых в ДНК выявлены единичные замены нуклеотидов, у акридиновых мутантов происходит инсерция (вставка) и делеция (выпадение) отдельных нуклеотидов ДНК, приводящая к «сдвигу рамки считывания» (слайд 5). Поскольку нуклеотидная последовательность в новой рамке считывания будет полностью отличаться от прежней, последовательность аминокислот в белке изменится сразу после мутировавшего участка. Функция такого белка, вероятно, пропадет совсем, что характерно для мутаций, индуцированных акридинами. В более общем виде все акридиновые мутации можно разделить на два типа, обозначив их (+) и (-). Каждый тип мутаций сам по себе вызывает сдвиг рамки считывания. Мутации со сдвигом рамки, обусловленные добавлением одного основания, относят к (+)-типу, а мутации, обусловленные выпадением одного основания, - к (-) типу. Двойные мутанты типа (++) или (--) также обладают мутантным фенотипом. Однако при сочетании мутаций (+-) или (-+) мутации супрессировали друг друга.

Таким образом, исходя из генетического кода и зная размер белка, можно, например, вычислить приблизительно и размер гена, кодирующего данный белок. Если у нас есть белок размером в 30 000 дальтон, то, приняв среднюю молекулярную массу аминокислот равной 100, можно вычислить, что данный белок состоит из (30 000:100) 300 аминокислот. Далее, поскольку одна аминокислота кодируется тремя нуклеотидами, то ген, кодирующий этот белок должен содержать в своем составе (300x3) 900 пар нуклеотидов. И обратно, если у нас на руках есть фрагмент ДНК размером в 600 нуклеотидных пар, то он потенциально может кодировать пептид-белок размером в 20 кД и состоять из 200 аминокислот.

Средний размер гена составляет примерно 600-1800 пар оснований.

2. Транскрипция РНК

Процесс биосинтеза РНК в клетке называется транскрипцией. Результатом транскрипции является образование РНК, комплементарных отдельным участкам ДНК. При этом в каждом участке РНК комплементарна только одной определенной нити ДНК. Цепь, имеющая ту же последовательность, что и мРНК (с той лишь разницей, что в ней содержится Т вместо U в РНК), иногда называют кодирующей цепью. Другая цепь, которая является матрицей для синтеза мРНК путем комплементарного спаривания оснований, оказывается антикодирующей цепью. Поскольку генетический код считывается с мРНК, его обычно записывают, используя четыре основания, присутствующие в РНК: U, C, A, G.

Процесс биосинтеза РНК осуществляется ферментами – РНК-полимеразами, которые используют ДНК в качестве матрицы. Цепь РНК растет в направлении от 5' к 3' концу по мере движения РНК полимеразы по цепи ДНК в направлении от её 3' конца к 5' концу (слайд 6). Как и репликация, рост РНК цепи происходит путем образования фосфодиэфирных связей между третьим углеродом рибозы предыдущего нуклеотида и пятым углеродом следующего нуклеотида. В итоге в ново синтезированной РНК цепи оказывается не включенной в эфирную связь пятый углерод рибозы (на данном слайде справа) с тремя остатками фосфорной кислоты, на другом конце РНК (слева) оказывается свободной, не включенной с фосфодиэфирную связь, третий углерод рибозы (3'-конец)

Как и репликация, транскрипция представляет собой матричный синтез и, состоит из четырех основных этапов: связывания РНК-полимеразы с промотором, инициации, элонгации и терминации транскрипции. Основное отличие реакции полимеризации, осуществляемой ДНК-полимеразой, заключается в том, что ДНК-полимераза неспособна самостоятельно инициировать синтез ДНК, для этого ей нужны затравки, праймеры. Что касается РНК-полимеразы, то она способна к самостоятельной инициации, которая осуществляется в определенных точках ДНК. ДНК-полимераза, помимо синтезирующей активности, обладает еще нуклеазной активностью: прежде чем сделать один шаг вперед по матрице, ДНК-полимераза делает один шаг назад, проверяя точность включения нуклеотида в растущую цепь по принципу комплементарности. Т.е. правильность включения очередного нуклеотида в ДНК-цепь проверяется дважды. Таким способом обеспечивается высокая точность репликации ДНК. РНК-полимераза не обладает таким механизмом точного «копирования-спаривания» и при синтезе РНК иногда могут возникнуть ошибки. Место инициации транскрипции определяются специальными участками ДНК, которые получили название промоторов. Терминация транскрипции также осуществляется на специальных участках ДНК, которые называются терминаторами транскрипции. Участок ДНК между промотором и терминатором называют транскриптоном. У бактерий чаще используют терминологию оперон. Процесс транскрипции регулируется разными способами, что позволяет клетке приспосабливаться к изменениям условий существования.

Процессы транскрипции и способы регуляции наиболее изучены у бактерий и бактериофагов. Есть коммерческая РНК-полимераза из *E.coli* и с ее участием можно, в

присутствии ДНК- матрицы или ядер, трифосфатов, определенных солей, в бесклеточной системе *in vitro* воспроизвести цикл реакции транскрипции и получить РНК- продукт. У бактерий РНК-полимераза состоит из двух компонентов - минимальной РНК-полимеразы, так называемого кор-фермента, состоящего, в свою очередь, из четырех субъединиц и второго компонента- сигма субъединицы. Все каталитические функции осуществляет именно кор - фермент, что касается сигма субъединицы, то ее назначение- обеспечить точное присоединение фермента к промоторному участку на ДНК. После начала синтеза РНК сигма компонент отделяется от РНК-полимеразы. У прокариот синтез рРНК, тРНК, и большинства генов, кодирующих белки, обеспечивается этой РНК-полимеразой. Т.е. у бактерий известна одна форма РНК-полимеразы

У эукариот транскрипция изучена хуже. Это связано с тем, что очищенные РНК-полимеразы эукариот не способны осуществить полный цикл транскрипции, кроме того, нужны множество дополнительных фактор транскрипции и только часть из них получена в чистом виде.

В ядрах эукариот обнаружены 3 формы РНК-полимеразы.

1.РНК-полимераза 1, локализована в ядрышках и обеспечивает синтез 18 S и 28 S РНК. При участии РНК-полимеразы 2 происходит синтез информационной, мессенджер РНК. Есть специальные ингибиторы, вводя которых в систему транскрипции, можно обеспечить преимущественный синтез того или иного вида РНК. Имеется такое вещества альфа аманитин - токсин из белой поганки. Этот токсин связывается с РНК-полимеразой 2, т.е. является ее специфическим ингибитором. В присутствии этого токсина синтез информационной РНК подавлен и транскрипция матрицы проходит с преимущественным синтезом рРНК и тРНК. Таким образом, можно отделить синтез одного вида РНК от другого. РНК-полимераза 3 участвует в синтезе тРНК и некоторых других низкомолекулярных РНК. Кроме того, в клеточных органеллах – хлоропластах, митохондриях обнаруживаются особые РНК-полимеразы, отличающиеся от вышеназванных

Виды РНК

РНК- это линейная полинуклеотидная молекула, отличающаяся от ДНК в двух отношениях. Во-первых, в молекуле РНК вместо тимина (ДНК) содержится урацил, а углеводным компонентом является рибоза (вместо дезоксирибозы у ДНК) (слайд 7). В большинстве случаев РНК- это одноцепочечная молекула, хотя она часто содержит спиральные взаимодополнительные участки, что, например, можно увидеть в структуре транспортных РНК (слайд 8). Здесь линейные участки перемежаются с регионами, имеющими форму шпильки. Эти шпильки образуются за счет изгибания цепи РНК в пространстве и, если в местах сгиба оказываются комплементарные основания, последние спариваются друг с другом.

Различают три основные типы РНК.

1.Информационные, они же мессенджер РНК или матричные РНК, обозначаемые буквами «м, и». Эта те РНК, в которой записана информация о белке, т.е. РНК, которые выйдя из ядра, поступают в цитоплазму, там на них садятся рибосомы и осуществляется синтез белка.

2.Транспортные РНК, тРНК, они доставляют (каждая свою) аминокислоты к рибосомам, где протекает цикл трансляции, т. е. биосинтеза белка.

3. Еще один тип РНК – это рибосомальные РНК, транскрибируемые с рибосомальных оперонов. Различают три вида рибосомальных РНК: у прокариот это- 16S рРНК - малой субъединицы, а также 23S и 5S рРНК- большой субъединицы. У эукариот эти РНК имеют константу седиментации 18S, а также 28S и 5,8S - соответственно.

4. Помимо этих РНК в клетках содержатся различные низкомолекулярные РНК. Они играют роль в регуляции трансляции, деградации, процессинга, регуляции продолжительности жизни мРНК и т.д. В последние годы интерес к этим микро-РНК сильно вырос.

Транскрипция РНК

На слайде 9 приведен цикл транскрипции, который в общих чертах у эукариот и бактерий сходен.

Слева на ДНК матрице указана область, которая получила название промотора, слева - терминаторные последовательности, на которых синтез РНК прекращается. Что собой представляют промоторы, как и сколько нуклеотидов образуют промотор, пока не ясно. Установлено, что у многих прокариот участки ДНК, куда садится РНК-полимераза, богаты АТ-последовательностями. Такие регионы получили название ТАТА-боксов или Прибнов-боксов. У эукариот в районе посадки РНК-полимеразы также находили определенные канонические последовательности.

На первом этапе транскрипции (связывания РНК-полимеразы с промотором) идет поиск промотора, затем посадка РНК-полимеразы на промоторный участок. Образуется так называемый «закрытый комплекс» в котором ДНК-матрица пока сохраняет двуспиральную структуру.

Предполагается, что посадка РНК-полимеразы на ДНК в промоторном участке многостадийный процесс. Фермент может присоединяться к случайным местам ДНК, затем отделяться, перемещаться по ДНК до тех пор, пока не найдет промоторный сайт. РНК-полимераза считывает информацию только с одноцепочечной ДНК, поэтому в месте посадки фермента на ДНК должно произойти раскручивание спирали на один виток. Следующим этапом является образование открытого комплекса и начало синтеза РНК. На этом стадия связывания РНК-полимеразы - с матрицей заканчивается и начинается стадия инициации транскрипции. Комплементарное копирование ДНК - матрицы с участием РНК-полимеразы начинается со стартовой точки, как правило с нуклеотида инициации -А или Г (т.е. пурина). РНК-полимераза идет по матрице ДНК и производит синтез первых РНК-продуктов. На первых порах РНК-продукт прочно связан с матрицей ДНК и РНК-полимеразой и есть вероятность того, что новосинтезированная РНК, состоящая из 2-3-4 нуклеотидов отваливается от комплекса. Такой синтез РНК называют абортивной инициацией. Тогда РНК-полимераза вновь начинает синтез РНК со стартовой точки и это продолжается до тех пор, пока не образуется РНК-продукт, содержащий от 3 до 9 нуклеотидов. Транскрибируемый комплекс стабилизируется и уже не распадается до тех пор, пока РНК-полимераза не дойдет до терминаторного участка. Примерно в это время заканчивается инициация транскрипции и начинается стадия элонгация цепи РНК. В это же самое время сигма-субъединица РНК-полимеразы отсоединяется от кор-фермента.

Следующим этапом является стадия элонгация цепи РНК, рост ее размера. По мере продвижения РНК-полимеразы по матрице сзади нее происходит восстановление двойной спирали ДНК, а впереди - расплетание. Примерно 12 нуклеотидов нити ДНК образуют гибрид с растущей цепью РНК. По мере продвижения РНК-полимеразы по матрице очередное звено растущей РНК-цепи освобождается из комплекса с матрицей и РНК-полимеразой (слайд 10).

Синтез РНК заканчивается на терминаторных участках, где готовая РНК отделяется от матрицы, с нее также отделяется минимальная РНК-полимераза, которая связавшись со своей сигма-частицей, может начать новый акт инициации.

Как происходит терминация - пока не ясно. Предполагается, что терминаторы - это ГЦ богатые участки ДНК, обладающие центральной симметрией. Синтезированный на этом

участке ДНК РНК- продукт образует шпильку, которая приводит к остановке РНК-полимеразы. Считается, что в точной терминации РНК принимают участие белковые факторы терминации (фактор терминации пи-р) и рибосомы.

Бактериальная хромосома содержит около 4000 генов, которые могут транскрибироваться как независимо друг от друга, так и координировано. При координированной транскрипции группа генов имеет один общий промотор и общий терминатор. В бактериальной клетке существует большое число промоторов, различающихся по нуклеотидной последовательности и эффективности инициации синтеза РНК. Часто их делят на сильные и слабые промоторы, которые соответственно обеспечивают сильный или слабый уровень биосинтеза. Конечно сильный или слабый – это в какой то степени понятие относительное, но все равно со слабого промотора может иницироваться синтез 1-2 цепей за период деления клетки, с сильных промоторов, например, с промоторов генов рибосомальных РНК имеет место инициация со скоростью одна инициация синтеза РНК в одну - две секунды.

Процессинг и транспорт новосинтезированной РНК

В результате транскрипции получается РНК, которая еще не готова к выполнению своих функций. Она содержит целый ряд последовательностей, которые должны быть удалены. Совокупность всех ферментативных процессов, в результате которых синтезируемая в процессе транскрипции РНК превращается в функционально полноценную РНК, называется «процессингом» РНК.

У кишечной палочки процессинг мРНК не известен, хотя рибосомальные и транспортные РНК синтезируются в виде предшественника, которые затем превращаются в зрелые РНК

В отличие от прокариот, у эукариот все РНК, в том числе иРНК, подвергаются процессингу

Предшественниками мРНК у эукариот являются высокомолекулярные гетерогенные яРНК, размер которых во многих случаях в разы отличается от размера функционально полноценного конечного продукта этой яРНК.

Основные этапы процессинга гетерогенной яРНК, т.е. предшественника мРНК, представлены на слайде 11

Сразу после начала транскрипции предшественник мРНК присоединяет к 5'-концевому звену "cap" - шапочку. Эта шапочка образовывается 7-метилгуанозином через 5'-5' связь с 5'-концевым нуклеотидом мРНК

Это так называемая стадия кеппирования гя РНК или пре-мРНК

Следующая стадия – это полиаденилирование, присоединение к 3' – концевому нуклеотиду гетерогенной РНК поли(А) –хвоста. Практически у всех исследованных мРНК, содержащих поли(А)- хвост, на расстоянии 10-25 нуклеотидов от места присоединения полиА обнаруживается консервативная последовательность ААУААА. Этой последовательности приписывают роль сигнала присоединения поли(А).

Следующим событием считается сплайсинг гетерогенной ядерной мРНК – сращивание свободных концов, образовавшихся после вырезания петли – интрона из молекулы мРНК.

Процесс сплайсинга вызван тем, что гены эукариот устроены очень сложно. Они имеют мозаичную структуру, в них кодирующие области разобцены вставками некодирующих последовательностей. Те участки ДНК, с которых информация выходит наружу в виде РНК и которые потом доходят до рибосом и транслируются, получили название экзонов. Те участки ДНК, которые транскрибируются в виде РНК, но с которых информация не

попадает в цитозоль, т.е. они не содержат информацию для синтеза конкретного белка, называются интронами, как бы названием подчеркнув, что информация с них остается внутри ядра, не выходит наружу в цитоплазму.

Итак первичный продукт транскрипции - гетерогенная ядерная РНК содержит и интроны, и экзоны. Для образования функционально полноценной молекулы из нее необходимо убрать интроны, а экзоны соединить в непрерывную кодирующую нить.

В процессинг мРНК также может входить процесс метилирования ДНК. В молекуле мРНК помимо аденина нередко встречается 6-метил аденин.

Очень немногие эукариотические структурные гены вообще не имеют интронов. Иногда сплайсинг мРНК может проходить по альтернативному варианту. Например, в одной ткани функциональная мРНК может образовываться в результате соединения всех экзонов первичного транскрипта, а в другой какой-то экзон будет вырезан вместе с фланкирующими его интронами и образуется другая функциональная мРНК. Благодаря альтернативному сплайсингу в разных тканях могут образовываться разные продукты одного и того же структурного гена (слайд 12).

Претерпевшая процессинг мРНК в виде нуклеопротеидного комплекса покидает ядро через поры в ядерной мембране и поступает в цитоплазму для трансляции. Надо отметить, что в эукариотической клетке вся РНК, за исключением транспортной, содержится в виде нуклеопротеидных комплексов с белками. Эти частицы называются информоферами- в ядре и информосомами – в цитоплазме.

Трансляция и биосинтез белка.

Биосинтез пептидной цепочки на матрице мРНК называется трансляцией, поскольку именно на этой стадии нуклеотидные триплеты дешифруются как определенные аминокислоты. Она осуществляется в цитоплазме на специальных частицах – рибосомах.

Рибосомы - это компактные рибонуклеиновые частицы, построенные из двух субчастиц. Каждая субчастица, в свою очередь, построена из нескольких белков, связанных с одной молекулой РНК. Молекулы РНК, входящие в состав рибосом, называют рибосомными РНК или сокращенно рРНК. При понижении концентрации ионов магния рибосомы диссоциируют на субчастицы. Типичная концентрация Mg^{2+} для разделения бактериальных рибосом - 1,5 мМ. Рибосомы (и их субчастицы) бактерий отличаются по размеру от цитоплазматических рибосом эукариот. Впервые это было обнаружено по различию в скорости седиментации рибосом этих двух типов. (Скорость седиментации измеряют в единицах Сведберга, сокращенно S. Чем больше масса, тем выше скорость седиментации и выше значение S. Форма частиц также влияет на скорость седиментации, так как более компактные частицы седиментируют быстрее.)

Бактериальные рибосомы обычно седиментируют при 70S, а отдельные субчастицы - при 50S и 30S. Большая субчастица имеет почти сферическую форму и по размеру примерно вдвое больше маленькой асимметричной субчастицы.

Цитоплазматические рибосомы высших эукариот больше бактериальных и обычно седиментируют при 80S. Скорость седиментации отдельных субчастиц составляет 60 и 40S. Во время синтеза белков субъединицы объединяются с образованием рибосомы.

Другие формы рибосом обнаружены в митохондриях и хлоропластах. Они широко варьируют по размеру и могут быть значительно меньше бактериальных рибосом (например, размер рибосом митохондрий человека или лягушки - 60S) или занимать промежуточное положение между бактериальными рибосомами и цитоплазматическими рибосомами эукариот. (Размер митохондриальных рибосом у грибов равен примерно 74S.)

Приведенные выше размеры рибосом можно считать «номинальными». Условно размер бактериальных рибосом обозначают «70S», а размер цитоплазматических рибосом

эукариот-«80S», однако реальная скорость седиментации рибосом обоих типов варьирует в зависимости от конкретных условий.

В активно функционирующей клетке примерно 3—5% суммарной РНК приходится на долю мРНК, 90% - на долю рРНК и 4% — на долю тРНК. мРНК может быть представлена десятками различных типов молекул, а рРНК — всего двумя типами. Более крупная рРНК образует с белками рибонуклеопротеидный комплекс, называемый большой рибосомной субъединицей, а рРНК меньшего размера комплекс, называемый малой рибосомной субъединицей.

Помимо тысяч рибосом, в клетке, активно синтезирующей белки, содержатся до 60 различных видов тРНК.

Из-за различия структур нуклеотида и аминокислоты сразу возникает вопрос: как каждый кодон подбирает свою определенную аминокислоту? Еще до того, как код был расшифрован, Крик предположил, что посредником в трансляции может служить особая молекула - «адаптор». Ею оказалась транспортная РНК, сокращенно тРНК, состоящая из 75-85 нуклеотидов..

Каждая тРНК обладает двумя необходимыми свойствами адаптора. Она способна узнавать только одну аминокислоту, с которой она ковалентно связывается, с 3'- концом тРНК (эфирная связь). Так получается аминоацил-тРНК. Это связывание осуществляется специфическими ферментами – аминоацил-тРНК синтетазами. Для каждой аминокислоты существует один фермент, который узнает все изоакцепторные тРНК, способные передавать эту аминокислоту. Этот процесс идет при участии АТФ и связь между аминокислотой и тРНК относится к типу высокоэнергетических связей (слайд 13).

Как у прокариот, так и у эукариот, синтез белка начинается с присоединения к рибосоме особой инициаторной тРНК, которая всегда несет остаток метионина. В прокариотических клетках эта первая аминокислота модифицирована, она называется формилметионином. Таким образом, первой аминокислотой, с которой начинается синтез белка в рибосомах прокариот, –это формилметионин, присоединенный к специальной тРНК- формилметиониновой тРНК. У эукариот синтез также начинается с метионина. Это не означает, что все белки - пептиды, получаемые во время трансляции, на своем N-конце должны содержать метионин. В большинстве случаев этот метионин отщепляется и первой аминокислотой в пептидной цепи оказывается следующая за метионином аминокислота.

В процессе трансляции, как и в предыдущих этапах реализации генетической информации, различают три стадии: инициация - начало биосинтеза белка, стадия элонгации – удлинение пептидной цепи и стадия терминации- когда рибосома доходит до одного из терминирующих кодонов УГА, либо УАА, либо УАГ. Инициация трансляции в про- и у эукариотических клетках имеет много общих черт.

Инициация трансляции

На этом слайде показано начало трансляции у прокариот (слайд 14)

На стадии инициации рибосома диссоциирована на субъединицы. Малая субъединица рибосом связывается с мРНК со стороны ее 5' конца и с инициаторной тРНК, несущую свой модифицированный формилметионин. В этом процессе участвует ГТФ и факторы инициации.

На чем держится это связывание, как оно происходит?

В 1974 году Шайно и Дальгарно выдвинули гипотезу, согласно которой на 5'- конце мРНК должны быть участки, которые не транслируются и с помощью которых мРНК дуплексируется по принципу комплементарности с 3'-концом 16S РНК, т.е. с РНК малой субъединицы рибосом. Такие последовательности были действительно выявлены недалеко (3-12 нуклеотида) от инициаторного кодона АУГ. Эти последовательности, комплементарные

3'-концу 16S РНК и предшествующие инициаторному кодону, называют последовательностью Шайно-Дальгарно. (на слайде она представлена как АГТА).

В основе присоединения заряженной (связанной с формилметионином) формилметиониновой тРНК с матрицей, т.е с мРНК, также лежит комплементарность кодон-антикодон. Таким образом, формируется 30S инициаторный или прединициаторный комплекс, затем к этому комплексу присоединяется большая субъединица рибосом и образуется зрелый 70S инициаторный комплекс.

У эукариот последовательность Шайно-Дальгарно, как правило, отсутствует. Но у них, как считают, «работает» «сар», который узнается одним из факторов трансляции, а малая 40S субчастица рибосом связывается непосредственно на 5'-конце мРНК и как бы «едет» по ней в 3'-направлении до тех пор, пока не встретится первый AUG –кодон, который, в большинстве случаев, и является иницирующим. Далее происходит присоединение 60S субчастицы рибосом, сборка полного инициаторного комплекса и начинается синтез полипептидной цепи.

Элонгация трансляции

Далее на слайде 15 показан этап элонгации трансляции.

Элонгация, в свою очередь, состоит из трех основных стадий: связывание аминоксил-тРНК, образование пептидной связи и транслокация. В рибосоме условно выделяют два функциональных центра. А- в который помещается каждая вновь вступающая в реакцию аминоксил тРНК и Р-центр, в котором располагается тРНК с присоединенной к ней растущей пептидной цепью. (пептидил-тРНК). Фактор элонгации EF-Tu образует комплекс с GTP, который, в свою очередь, взаимодействует с аминоксил-тРНК с образованием тройного комплекса. Комплекс связывается с рибосомой, так что аминоксил-тРНК оказывается в А-центре, и ее антикодон образует комплементарный комплекс с кодоном мРНК. При это происходит гидролиз GTP и комплекс Tu-GDP отделяется от рибосомы. В результате аминоксил-тРНК в А-центре располагается рядом с пептидил –тРНК, которая находится в Р-центре и взаимодействует с предыдущим кодоном. Фермент пептидилтрансфераза, являющийся структурной частью 50S субчастицы, переносит пептидную цепь на новую аминокислоту, в результате чего вновь вошедшая аминоксил-тРНК превращается в пептидил-тРНК, а прежняя пептидил-тРНК оказывается незаряженной.

После этого происходит транслокация: новая пептидил –тРНК перемещается в Р-центр, незаряженная тРНК отделяется от рибосомы, рибосома передвигается по мРНК на один триплет и в А-центре оказывается следующий кодон мРНК. Рибосома готова к приему следующей аминоксил-тРНК. Транслокация катализируется фактором EF-G.

Терминация трансляции

И, наконец, последняя стадия трансляция – осуществляется, когда рибосома достигает терминирующего кодона – UAA, UAG, UGA, который оказывается в А-центре. В этой ситуации к рибосоме присоединяется один из RF-факторов, в результате чего происходит гидролиз сложноэфирной связи, соединяющей полипептид и тРНК. От пептидил-тРНК отщепляется готовая белковая цепь, незаряженная тРНК покидает рибосому, и процесс трансляции завершается.

После трансляции многие полипептиды подвергаются различным модификациям. У большинства из них отщепляется N-концевой метионин, так что N-концевым остатком становится вторая аминокислота. У эукариот происходит так называемый процессинг некоторых белков, когда полипептидная цепь расщепляется в определенных сайтах с образованием более коротких белковых молекул со специфическими функциями. В некоторых случаях, особенно в эукариотических клетках, к определенным аминокислотам ферментативным путем присоединяются фосфатные группы, липиды, углеводы или другие

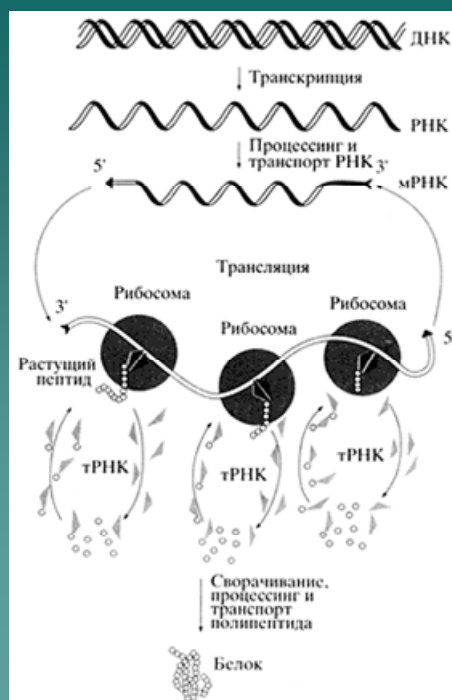
низкомолекулярные соединения. В результате этих химических модификаций образуются белки, выполняющие в клетке специфические функции.

Список использованной литературы (слайд 17)

Лекция 2

Генетический код, транскрипция, трансляция и биосинтез белка

Общая схема биосинтеза нуклеиновых кислот и белка



Генетический код

- ◆ Это- перевод нуклеотидного текста ДНК на язык аминокислот, способ записи информации в ДНК и принцип передачи ее на белковую структуру
- ◆ Последовательность из трех нуклеотидов, соответствующая одной аминокислоте, называется кодоном.

64 – кодона

61 – соответствует 20 аминокислотам, один из них AUG- старт кодон

UAG, UAA и UGA – стоп кодоны, «nonsense»

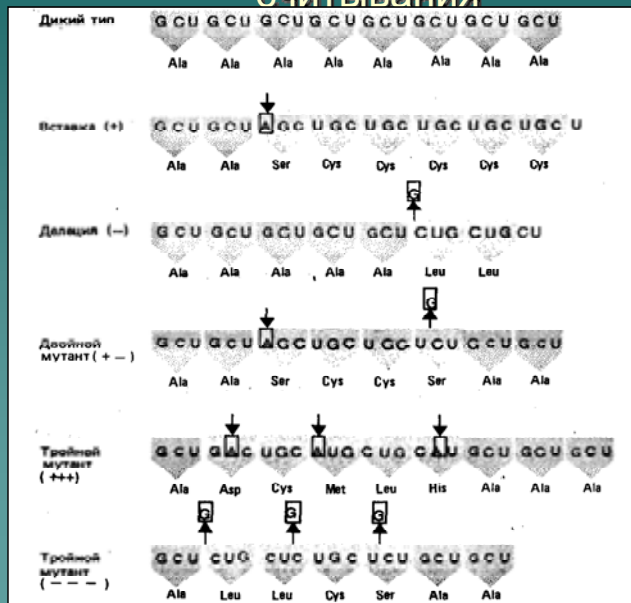
Генетический код триплетен, вырожден

Генетический код

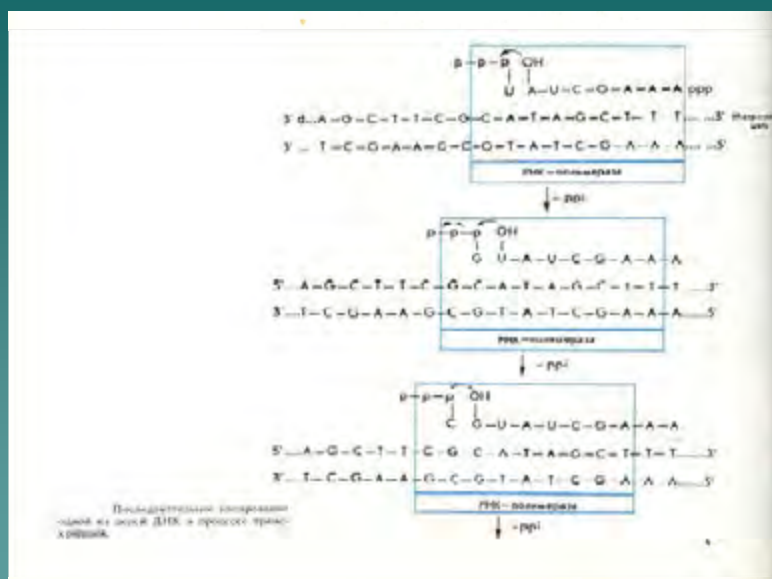
		ВТОРАЯ БУКВА					
		У	Ц	А	Г		
ПЕРВАЯ БУКВА	У	УУУ <i>Phe</i>	УЦУ <i>Ser</i>	УАУ <i>Tyr</i>	УГУ <i>Cys</i>	У	ТРЕТЬЯ БУКВА
		УУЦ <i>Phe</i>	УЦЦ <i>Ser</i>	УАЦ <i>Tyr</i>	УГЦ <i>Cys</i>	Ц	
		УУА <i>Leu</i>	УЦА <i>Ser</i>	УАА <i>Stop</i>	УГА <i>Stop</i>	А	
		УУГ <i>Leu</i>	УЦГ <i>Ser</i>	УАГ <i>Stop</i>	УГГ <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	

Последовательность кодонов читается непрерывно, начиная со стартовой точки на одном конце гена. Мутации сдвигают рамки

СЧИТЫВАНИЯ



Биосинтез РНК



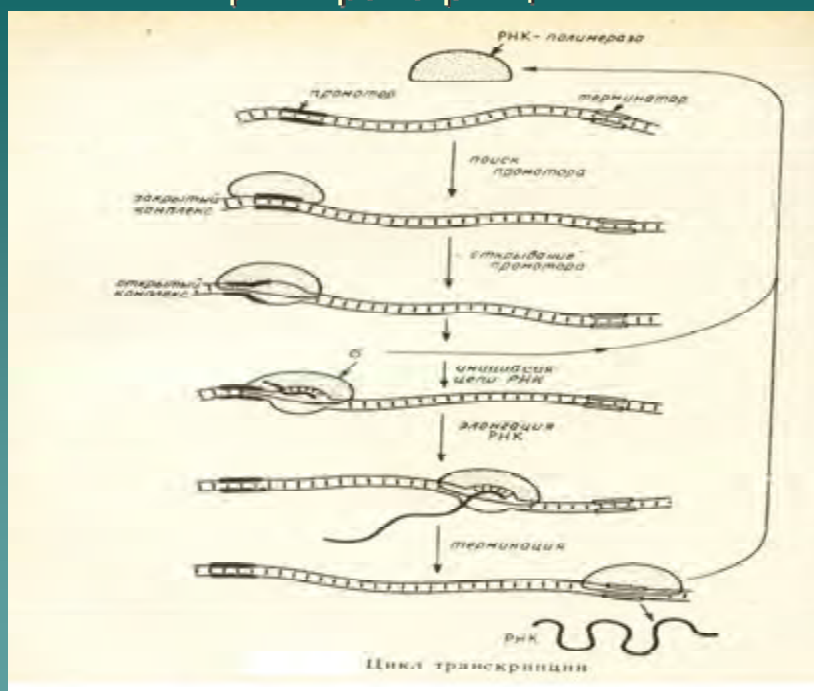
РНК

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

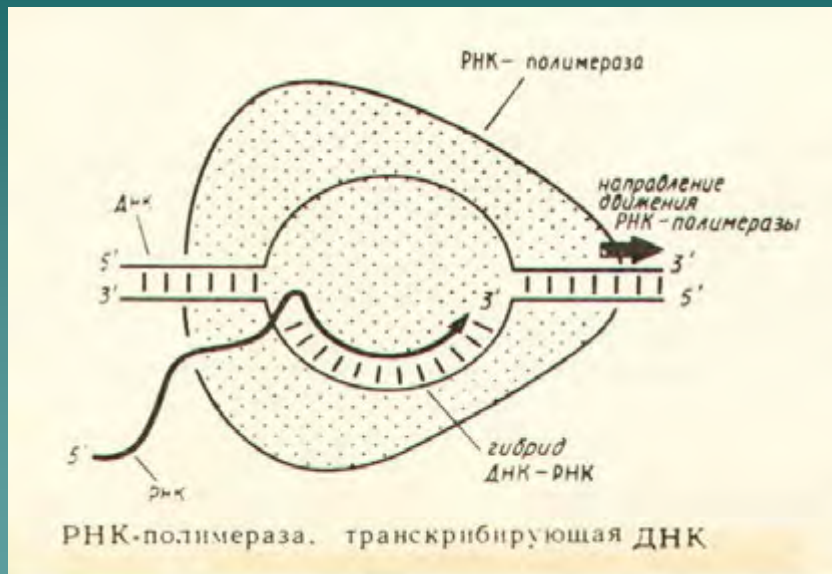
типы РНК:

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

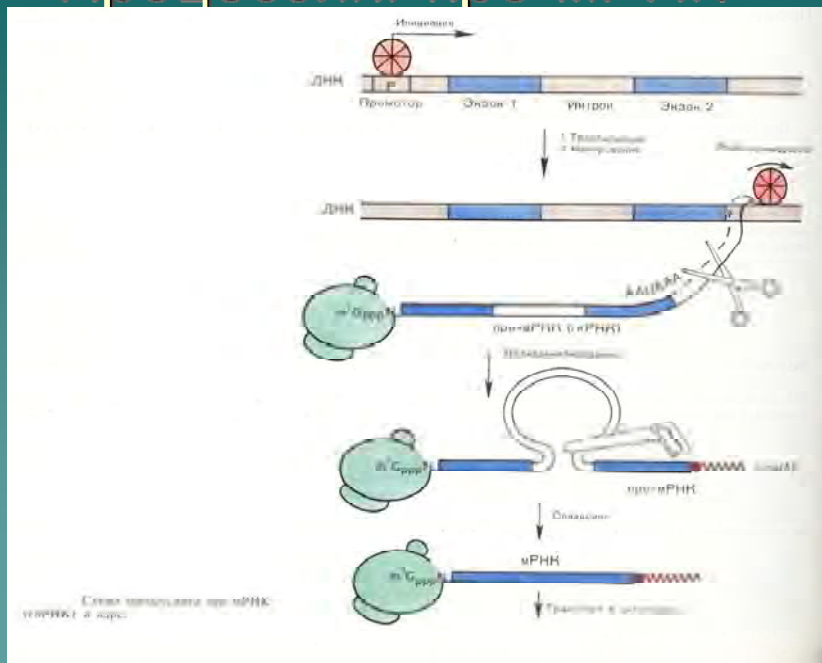
Цикл транскрипции



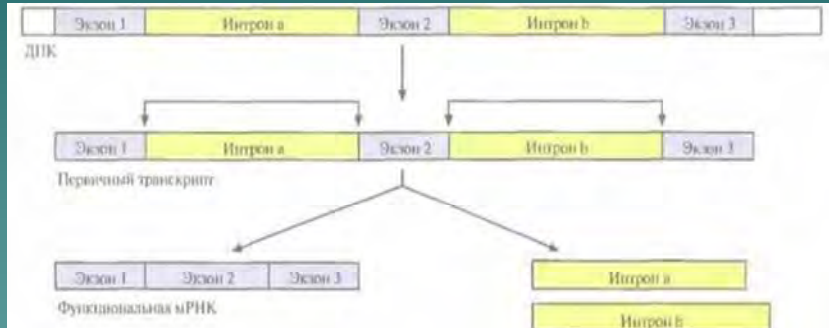
Элонгация транскрипции



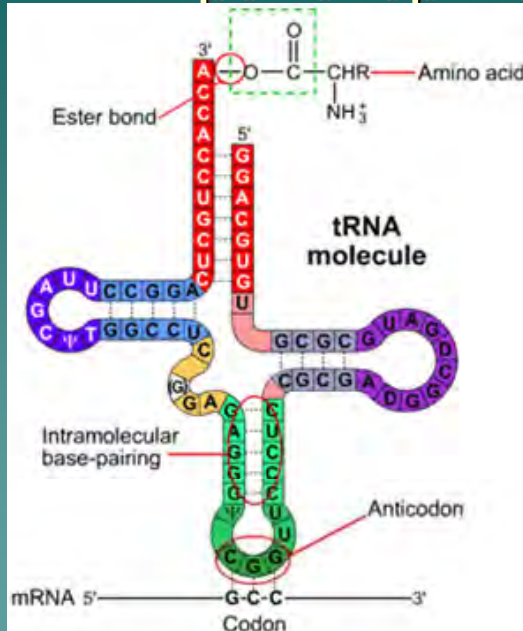
Процессинг пре-мРНК



Процессинг м-РНК

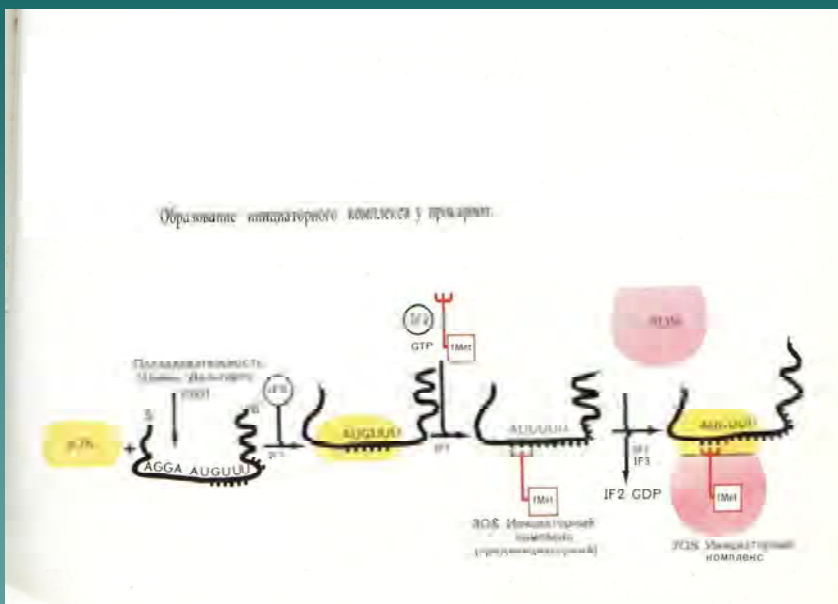


Транспортная РНК

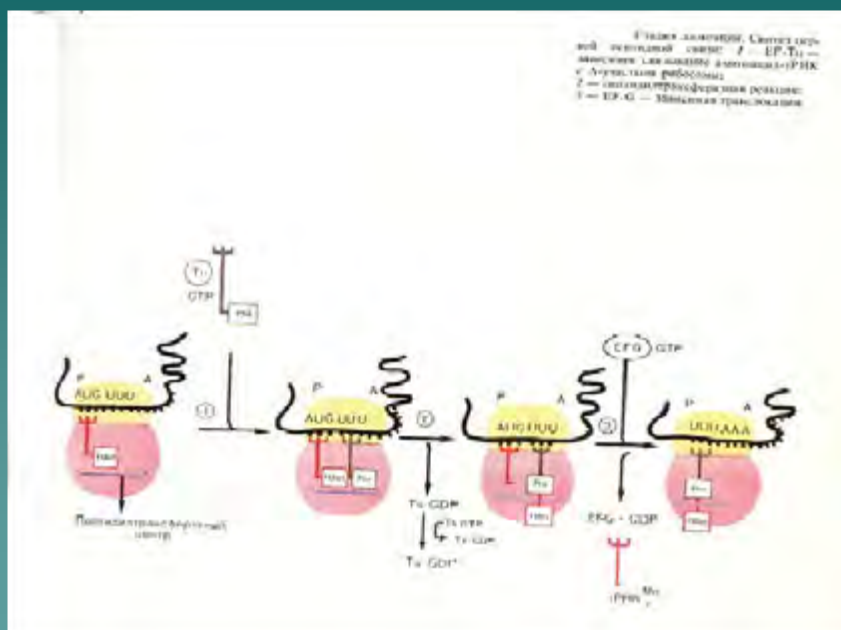


РНК, функцией которой является транспортировка аминокислот к месту синтеза белка.

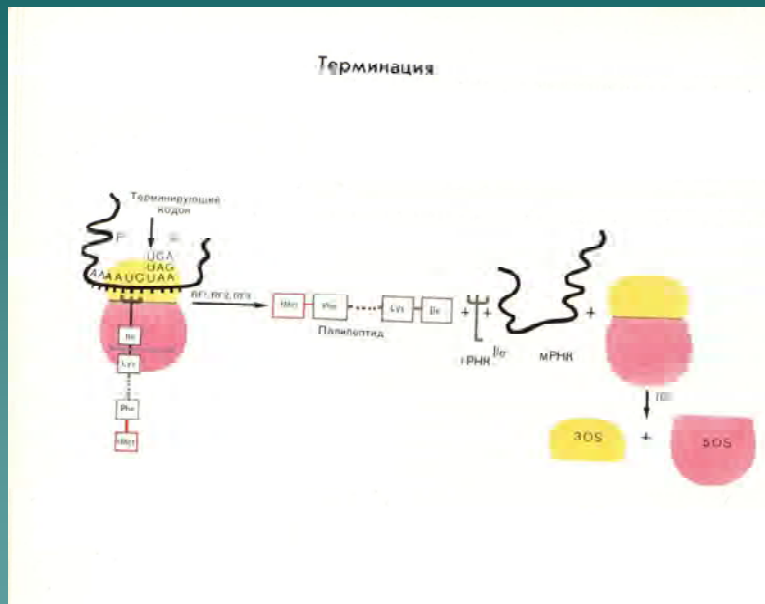
Инициация трансляции



Стадия элонгации трансляции мРНК



Терминация трансляции



Использованная литература

Дж. Уотсон. Молекулярная биология гена. Мир. Москва, 1978

Б. Льюин. Гены. Мир. Москва, 1987

Ю.А. Овчинников. Биоорганическая химия. Просвещение. Москва, 1987

В.И. Агол, А.А. Богданов и др. Под ред. А.С. Спирина. Молекулярная биология. Структура и биосинтез нуклеиновых кислот. Высшая школа. Москва, 1990

Спасибо за внимание

Роль молекулярной генетики в изучении биологических систем:
Оценка межвидового разнообразия сельскохозяйственных культур с использованием
технологии молекулярных маркеров

Абдуллаев А.А.,

Центра Геномных Технологий ИГиЭБР АН РУз



Оценка биоразнообразия сельхозкультур при помощи молекулярных маркеров.

Докладчик: к.б.н. Абдуллаев А.А.
Институт генетики и ЭБР 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



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

© 2008 Национальный институт аграрных исследований и агрогенетики, Центр Улучшения Продукции



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

© 2008 Национальный институт аграрных исследований и агрогенетики, Центр Улучшения Продукции



Генетические маркеры: описание

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

8

© 2009 Институт Генетики и Эволюции, Центр Эволюции Биологии



Генетические маркеры: типы

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

8

© 2009 Институт Генетики и Эволюции, Центр Эволюции Биологии



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

11

© 2009-2010 (сборник в 2011-2012) Центр Биологии Тюменского



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

11

© 2009-2010 (сборник в 2011-2012) Центр Биологии Тюменского



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.

↑

© УИИИТ (Иркутск) (создан в 2011-2012), Центр Биологии (Иркутск)

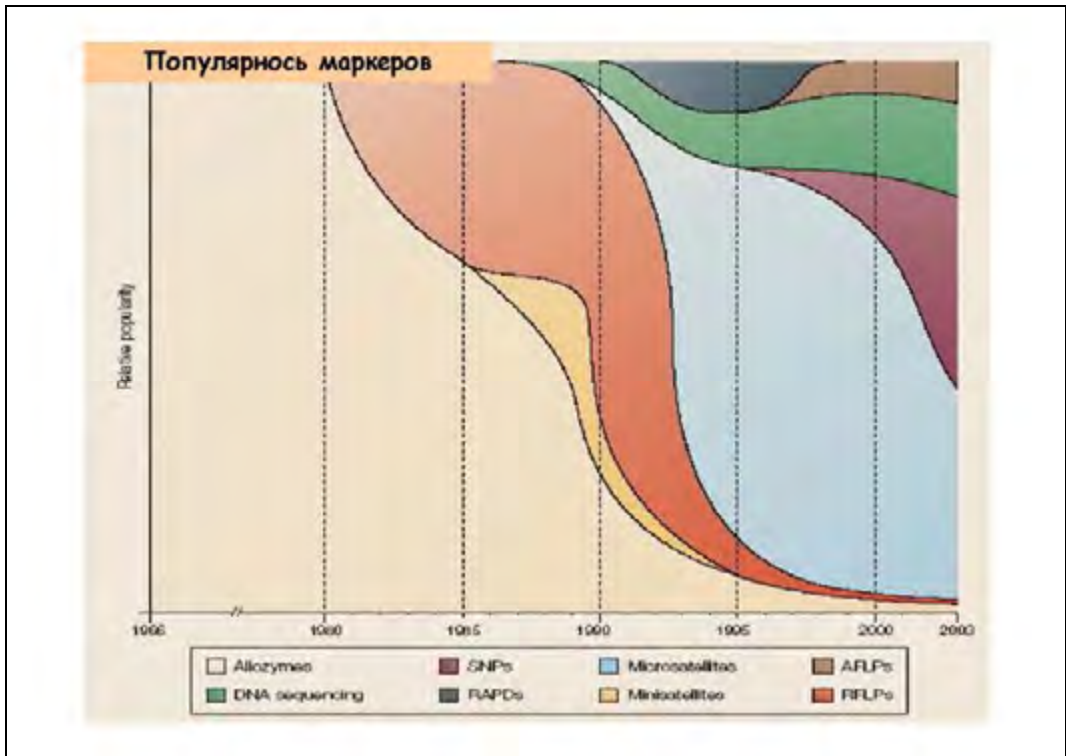
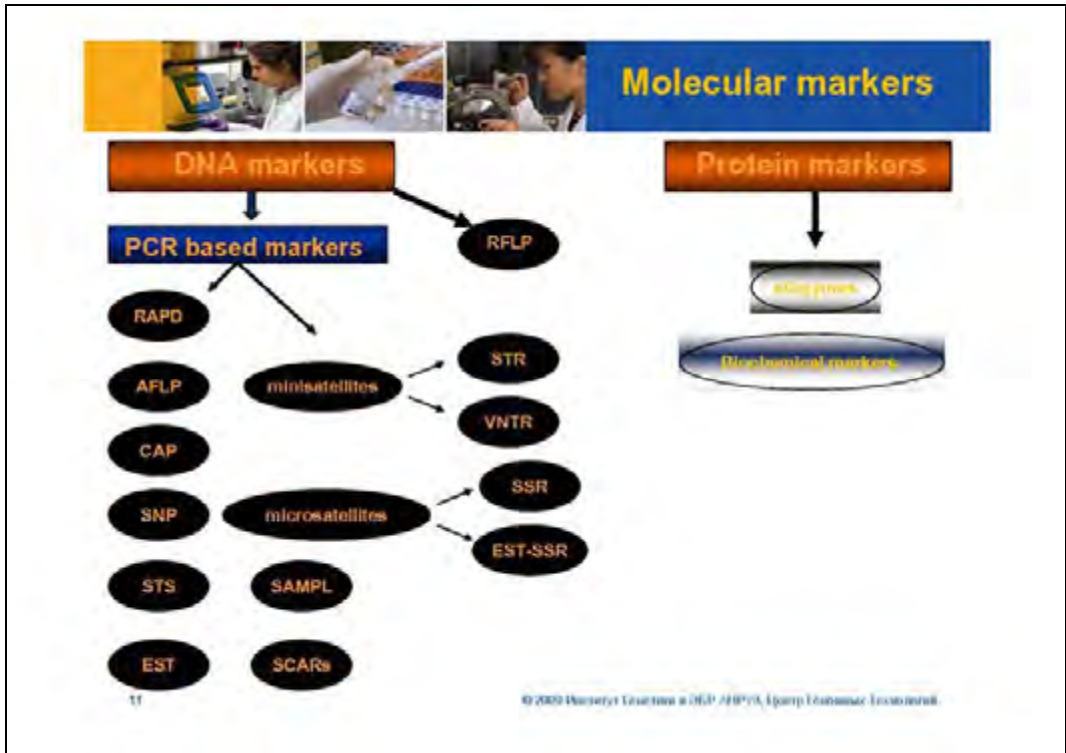


ДНК маркеры: требования

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

↑

© УИИИТ (Иркутск) (создан в 2011-2012), Центр Биологии (Иркутск)





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

19

© 2008 Институт Геномов и Клеточной Биологии, Центр Геномных Исследований



Полиморфизм ДНК

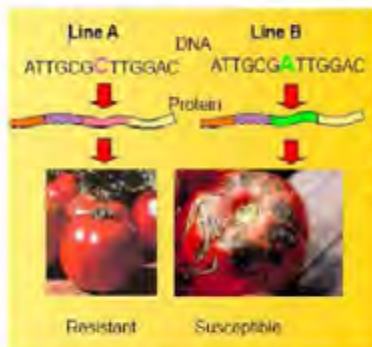
- В результате различных событий получают различные варианты, более или менее сложные, в последовательности ДНК. Такие варианты обычно описывают как полиморфизм.
- Полиморфизм транслируется в различия генотипов – как это видно из различных профилей полос, обнаруживаемых при использовании соответствующих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

20

© 2008 Институт Геномов и Клеточной Биологии, Центр Геномных Исследований



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?

88

© 2009 Институт Геномов и ГИП/ИП/И, Центр Геномные Технологии



- 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

89

© 2009 Институт Геномов и ГИП/ИП/И, Центр Геномные Технологии



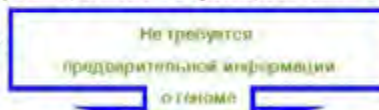
Задачи:

- > 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

11

© 2009 Национальный институт селекции и семеноводства, Центр Геномных Исследований



Пример: выявление локусов количественных признаков при помощи ДНК маркеров

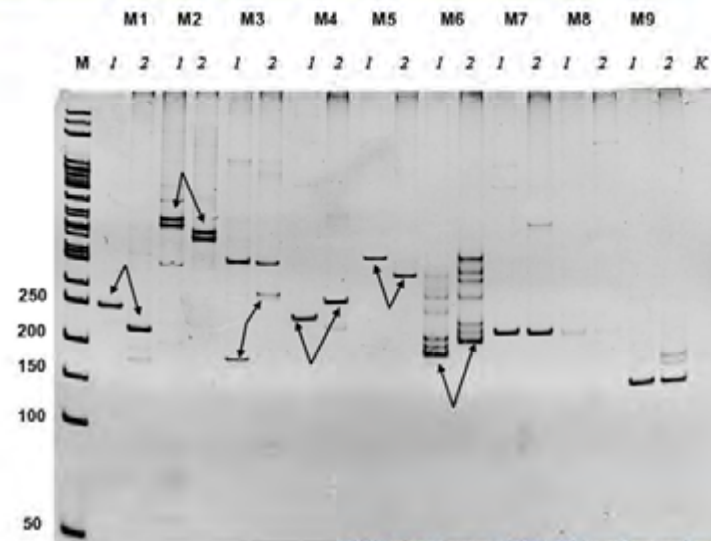
Основные этапы:

- 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

11

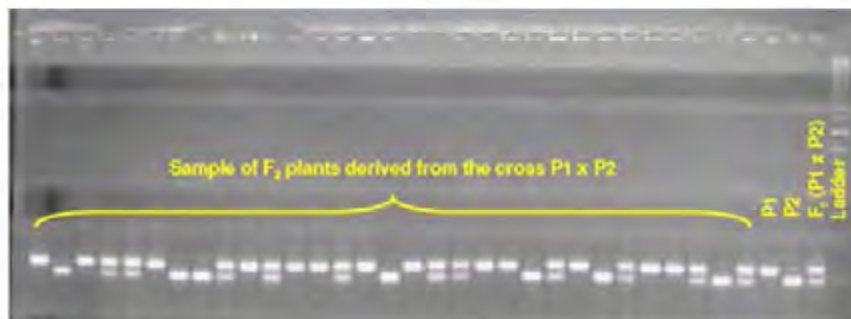
© 2009 Национальный институт селекции и семеноводства, Центр Геномных Исследований

Полиморфизм микросателлитных маркеров среди родительских растений



22

Генотипирование популяции при помощи полиморфных маркеров

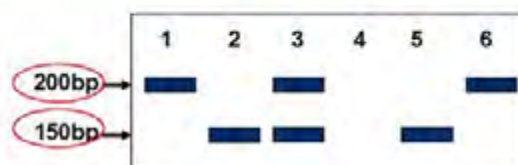


23

© 2009 Институт Генетики и СБП АН ФУС, Центр Геномных Технологий



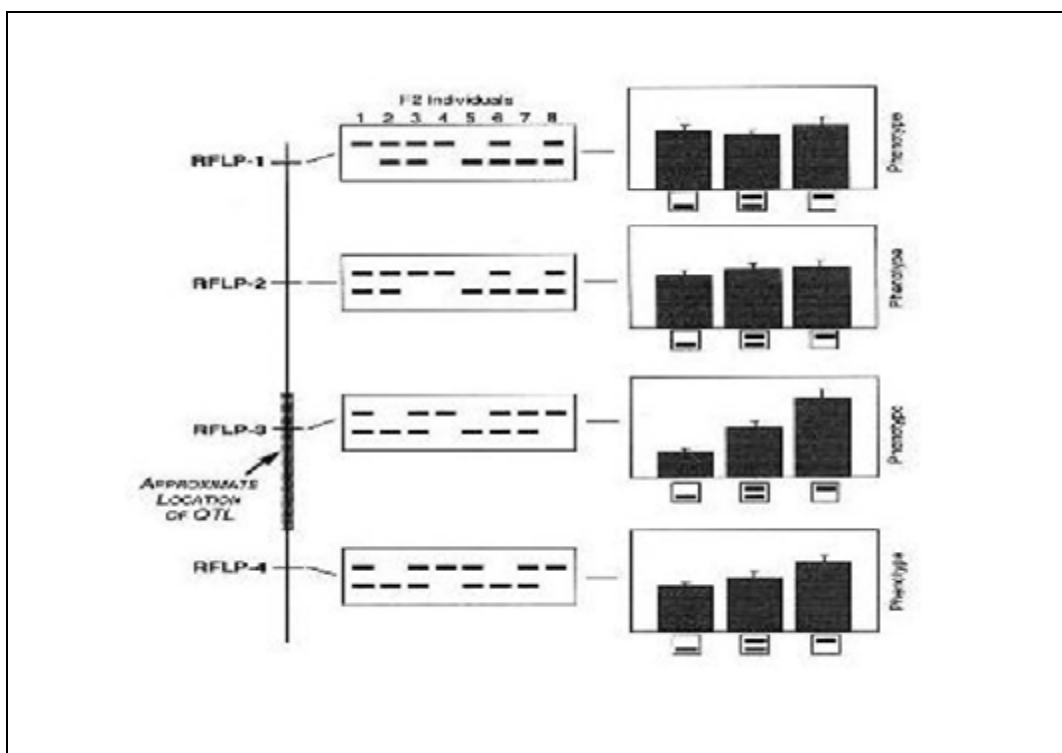
Генотипирование и преобразование данных



	ENL1064_150	ENL1064_200
1	0	1
2	1	0
3	1	1
4	2	2
5	1	0
6	0	1

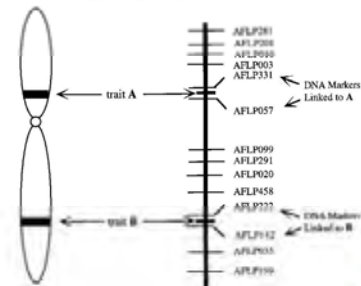
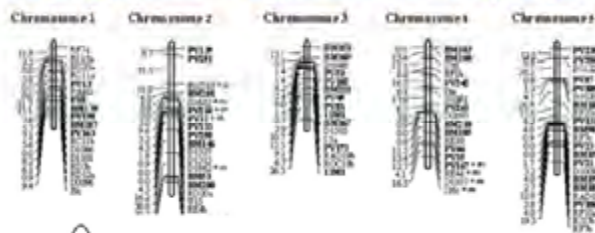
34

© 2009 Национальный исследовательский центр "Институт цитологии и генетики СО РАН"



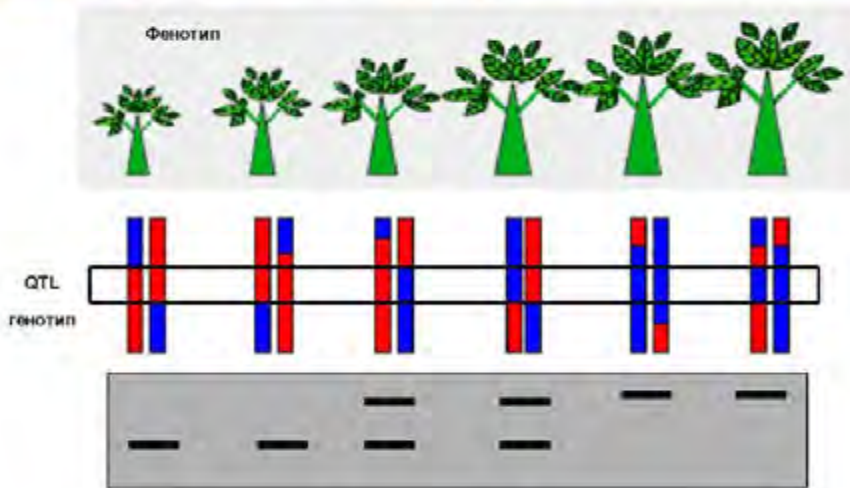


Определение сцепления маркеров и признака



26

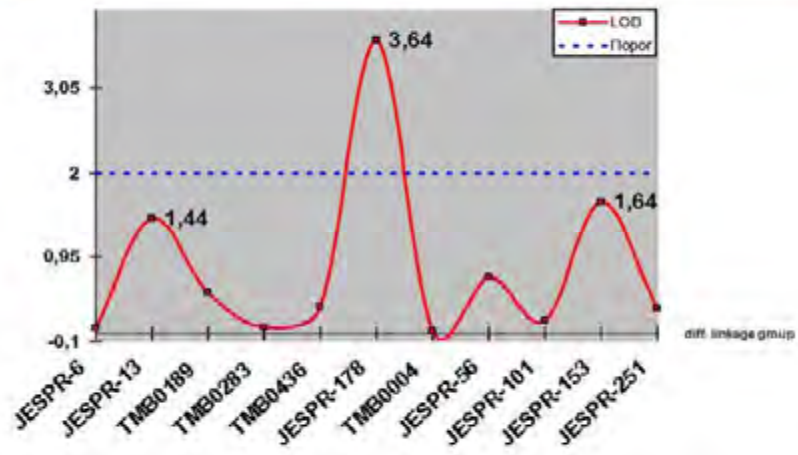
© 2009 Институт Генетики и ЗЕР АНРФ, Центр Геномных Технологий



27

© 2009 Институт Генетики и ЗЕР АНРФ, Центр Геномных Технологий

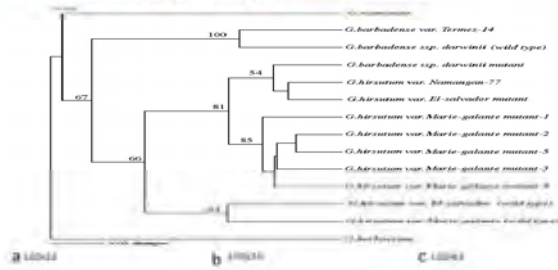
Интервал картирование



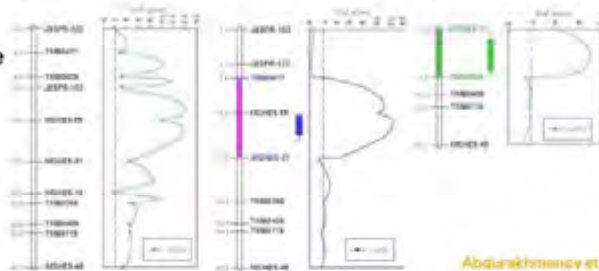
© 2009 Институт Геномики и ЗЕР АНРФ, Центр Геномных Технологий



Филогения



QTL-картирование

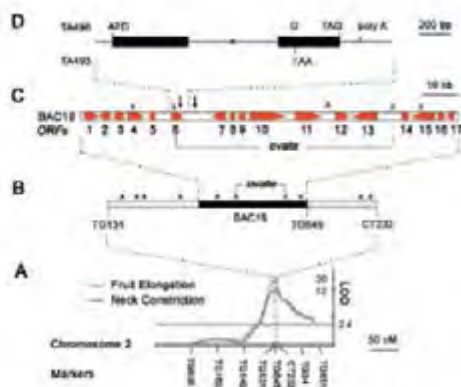


Abdurakhimov et al., 2006

© 2009 Институт Геномики и ЗЕР АНРФ, Центр Геномных Технологий



Молекулярное клонирование



Liu, et al. (2002)

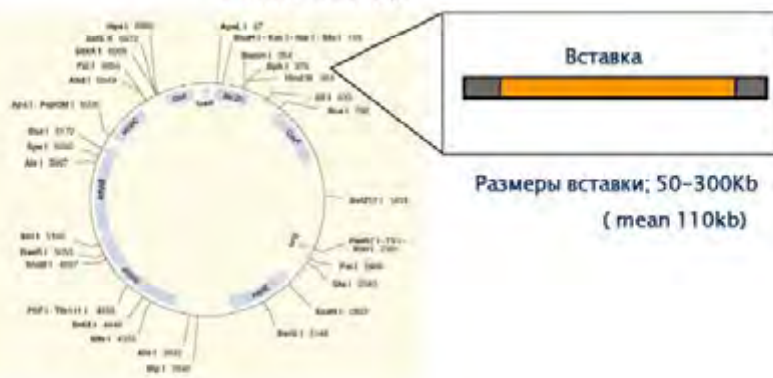
30

© 2009 Институт Генетики и (ИР) АН РУз, Центр Геномных Технологий



Создание ВАС библиотек

• ВАС вектор



31

© 2009 Институт Генетики и (ИР) АН РУз, Центр Геномных Технологий



Биоинформатические программы для изучения комплексных признаков

AMOVA	Analysis of Molecular Variance, Laurent Excoffier, U Geneva
Gmendel	Jim Holloway & Steve J Knapp, (1992) <i>J Heredity</i> 81: 407.
JoinMap	Van Ooijen & Roeland E. Voorrips, (1993) <i>Plant J</i> 3: 739-744.
Mapmaker/QTL	Lander et al. (1987) <i>Genomics</i> 1: 174-181.
MapQTL	Van Ooijen, <i>Plant Genome IV</i> 1995.
Map Manager	Manly, (1993) <i>Mammalian Genome</i> 4: 303-313
QTL Cafй	G.G.Seaton, U Birmingham, UK
QTL Cartographer	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, глейтропия, множественные аллели, плоидность, связь гены и окружающей среды

52

© 2008 Pearson Education, Inc. Все права защищены. Pearson Education, Inc.



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)
- Кажо:** Урожайность, калорийность и устойчивость к патогенам (Clement et al. *Genome/Japan*.- 2003.-N46(2).-p.204-212)
- Картофель:** Содержание фруктозы и сахарозы, локализованные на всех хромосомах (Mendez et al., 2002).
- Кукуруза:** урожайность, генетическое родство инбредных линий (Smith, *Maydica* 2000, 45:235-241; Pejic, *Theor Appl 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.-N48.-p. 683-695; Brondani et al. *Theoretical Applied Genetics*, 2002.-N104 (5-7),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)
- Хлопчаточник:** Естественная ранняя листопадность, прочность волокна (Abdurakhimov I, Abdullaev A. A., *Journal of Heredity*./2005 - 96(6) 644-653, Guo et al., 2003. *Crop Science*. -2003.-N43.- p.2252-2256)

53

© 2008 Pearson Education, Inc. Все права защищены. Pearson Education, Inc.

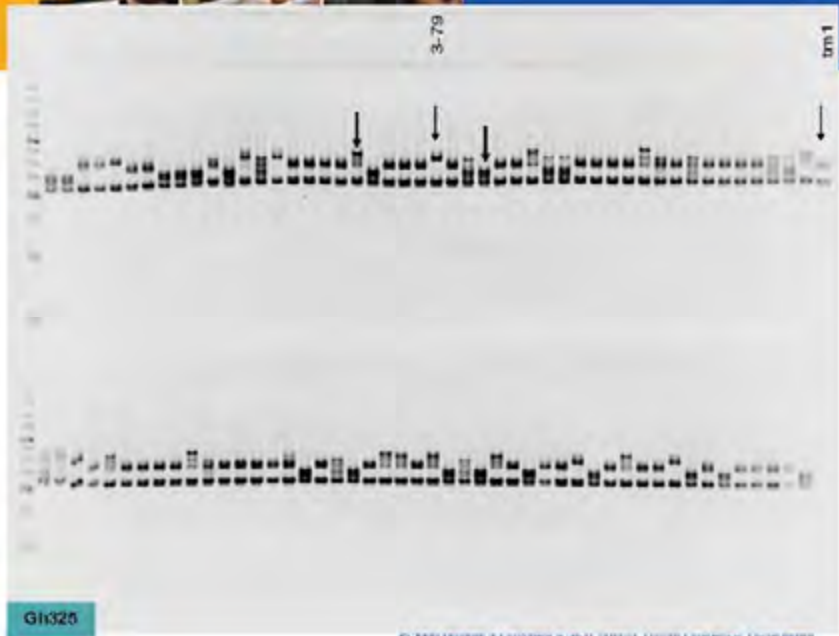
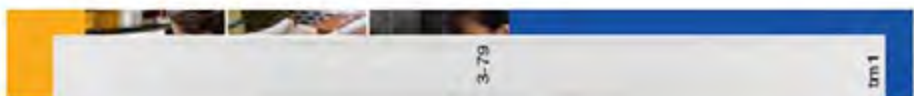


Молекулярный анализ проведён на 288 образцах хлопчатника

Экзотические разновидности	208
Мексика	25
Африка	53
Контроль (TM1и 3-79)	2



© 2009 Институт Геномики и ИДР АРГУС, Центр Геномных Технологий



© ДАР Институт Геномики и ИДР АРГУС, Центр Геномных Технологий

GenMapper Project: CR19and12 WM 123

File Edit Analysis View Tools Help

Time Settings

all Panels

GenMapper

Sample	Genotype	Barcode Name	Panel	Marker	Allele 1	Allele 2	Allele 3	Allele 4	Size 1	Size 2	Size 3	Size 4	QC
1	778	CR19and12 V CR 19	192	162	178				172.11	178.87			●●●●
2	778	CR19and12 V CR 212	192	162	159				180.17	182.21	158.21	188.2	●●●●
3	778	CR19and12 V CR 19	192	162	184				191.08	195.21	197.85	172.12	●●●●
4	778	CR19and12 V CR 212	192	159	7				140.14	158.24	168.18	172.48	●●●●
5	781	CR19and12 V CR 19	187	173	178				157.89	172.12	178.48		●●●●
6	781	CR19and12 V CR 212	183	158					140.14	158.18	167.87	172.28	●●●●
7	786	CR19and12 V CR 19	187	172	178				168.87	172.18	188.88		●●●●
8	786	CR19and12 V CR 212	172	142	7				121.27	148.28	168.21	172.57	●●●●
9	103	CR19and12 V CR 19	192	167	173				158.17	181.14	187.77	172.85	●●●●
10	103	CR19and12 V CR 212	183	158	7				140.24	157.86	168.1	172.88	●●●●
11	108	CR19and12 V CR 19	192	167	173				128.22	158.26	167.77	172.82	●●●●
12	108	CR19and12 V CR 212	183	158	7				140.14	158.87	172.43	178.84	●●●●
13	181	CR19and12 V CR 19	192	167	173				127.18	155.12	168.41	167.85	●●●●
14	181	CR19and12 V CR 212	182	158	159				140.18	158.8	168.24	168.18	●●●●
15	187	CR19and12 V CR 19	192	167	173				158.24	167.84	172.88	178.5	●●●●
16	187	CR19and12 V CR 212	182	168	5				140.24	167.83	168.17	172.48	●●●●
17	228	CR19and12 V CR 19	192	167	173				127.18	158.16	167.87	178.58	●●●●
18	323	CR19and12 V CR 212	182	158	7				140.27	158.28	168.21	172.88	●●●●
19	88	CR19and12 V CR 19	192	167	173				133.85	167.75	172.85	178.44	●●●●
20	88	CR19and12 V CR 212	192	142	158				134.28	148.85	158.87	168.8	●●●●
21	248	CR19and12 V CR 19	187	172	178				148.84	172.28	188.1		●●●●
22	288	CR19and12 V CR 212	182	158	7				148.24	158.48	168.12	178.18	●●●●
23	382	CR19and12 V CR 19	192	167	172				158.58	168.18	172.18	178.71	●●●●
24	481	CR19and12 V CR 212	182	158	7				148.24	158.3	168.27	172.51	●●●●
25	487	CR19and12 V CR 19	192	167	173				128.23	138.48	158.88	158.28	●●●●
26	587	CR19and12 V CR 212	192	162	158				127.8	188.2	158.85	188.88	●●●●
27	588	CR19and12 V CR 19	192	167	173				158.38	168.14	172.22	178.1	●●●●
28	628	CR19and12 V CR 212	182	158	7				148.21	168.13	168.22	172.88	●●●●

Previous Slide

GenMapper Project: CR19and12 WM 123

File Edit Analysis View Tools Help

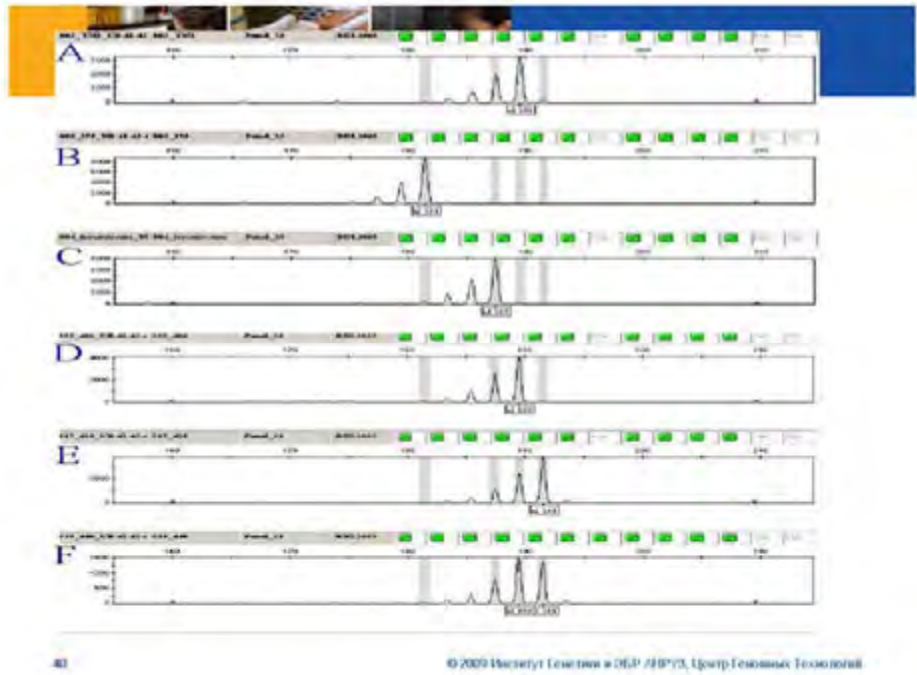
Time Settings

all Panels

GenMapper 3.0

Sample	Genotype	Barcode Name	Panel	Marker	Allele 1	Allele 2	Allele 3	Allele 4	Size 1	Size 2	Size 3	Size 4	QC
1	CR19and12 V CR 19	CR19and12 V CR 19	192	162	178				172.11	178.87			●●●●
2	CR19and12 V CR 212	CR19and12 V CR 212	192	162	159				180.17	182.21	158.21	188.2	●●●●
3	CR19and12 V CR 19	CR19and12 V CR 19	192	162	184				191.08	195.21	197.85	172.12	●●●●
4	CR19and12 V CR 212	CR19and12 V CR 212	192	159	7				140.14	158.24	168.18	172.48	●●●●
5	CR19and12 V CR 19	CR19and12 V CR 19	187	173	178				157.89	172.12	178.48		●●●●
6	CR19and12 V CR 212	CR19and12 V CR 212	183	158					140.14	158.18	167.87	172.28	●●●●
7	CR19and12 V CR 19	CR19and12 V CR 19	187	172	178				168.87	172.18	188.88		●●●●
8	CR19and12 V CR 212	CR19and12 V CR 212	172	142	7				121.27	148.28	168.21	172.57	●●●●
9	CR19and12 V CR 19	CR19and12 V CR 19	192	167	173				158.17	181.14	187.77	172.85	●●●●
10	CR19and12 V CR 212	CR19and12 V CR 212	183	158	7				140.24	157.86	168.1	172.88	●●●●
11	CR19and12 V CR 19	CR19and12 V CR 19	192	167	173				128.22	158.26	167.77	172.82	●●●●
12	CR19and12 V CR 212	CR19and12 V CR 212	183	158	7				140.14	158.87	172.43	178.84	●●●●
13	CR19and12 V CR 19	CR19and12 V CR 19	192	167	173				127.18	155.12	168.41	167.85	●●●●
14	CR19and12 V CR 212	CR19and12 V CR 212	182	158	159				140.18	158.8	168.24	168.18	●●●●
15	CR19and12 V CR 19	CR19and12 V CR 19	192	167	172				158.24	167.84	172.88	178.5	●●●●
16	CR19and12 V CR 212	CR19and12 V CR 212	182	168	5				140.24	167.83	168.17	172.48	●●●●
17	CR19and12 V CR 19	CR19and12 V CR 19	192	167	173				127.18	158.16	167.87	178.58	●●●●
18	CR19and12 V CR 212	CR19and12 V CR 212	182	158	7				140.27	158.28	168.21	172.88	●●●●
19	CR19and12 V CR 19	CR19and12 V CR 19	192	167	173				133.85	167.75	172.85	178.44	●●●●
20	CR19and12 V CR 212	CR19and12 V CR 212	192	142	158				134.28	148.85	158.87	168.8	●●●●
21	CR19and12 V CR 19	CR19and12 V CR 19	187	172	178				148.84	172.28	188.1		●●●●
22	CR19and12 V CR 212	CR19and12 V CR 212	182	158	7				148.24	158.48	168.12	178.18	●●●●
23	CR19and12 V CR 19	CR19and12 V CR 19	192	167	172				158.58	168.18	172.18	178.71	●●●●
24	CR19and12 V CR 212	CR19and12 V CR 212	182	158	7				148.24	158.3	168.27	172.51	●●●●
25	CR19and12 V CR 19	CR19and12 V CR 19	192	167	173				128.23	138.48	158.88	158.28	●●●●
26	CR19and12 V CR 212	CR19and12 V CR 212	192	162	158				127.8	188.2	158.85	188.88	●●●●
27	CR19and12 V CR 19	CR19and12 V CR 19	192	167	173				158.38	168.14	172.22	178.1	●●●●
28	CR19and12 V CR 212	CR19and12 V CR 212	182	158	7				148.21	168.13	168.22	172.88	●●●●

Previous Slide



41

© 2009 Мәсімет Төлемаєв және МДП АРП/С, Қызыл Орманға Тексерілді

Microsoft Excel - Мәрімет2

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0
3	0	2	2	2	2	2	0	1	0	1	1	0
4	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
5	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
6	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
7	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1
8	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1
9	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0
10	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0
11	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0
12	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1
13	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0
14	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
15	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1
16	0	1	0	0	1	0	2	2	2	1	0	0
17	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1
18	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1
19	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1
20	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1
21	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1
22	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0
23	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1
24	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1
25	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0
26	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0
27	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1
28	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0
29	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0
30	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1
31	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1
32	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1
33	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0
34	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0
35	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0



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.



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.

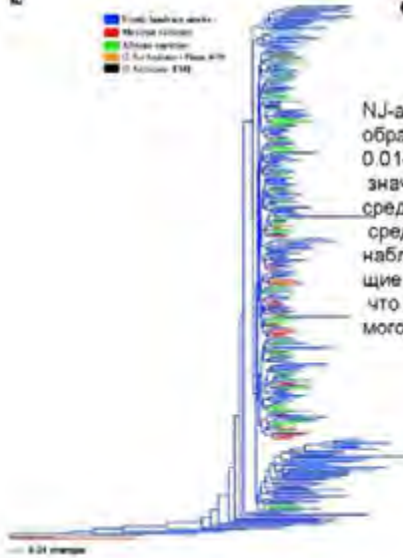
** panel included only *G. hirsutum* (TM-1) control.

182 SSR (~49%) аллели были редкими и представлены 5% образцов коллекции. Остальные 181 (48%) аллели SSR, были высокополиморфны



№2

- Индия, Индия, Индия
- Мексика, Индия
- Африка, Индия
- G. hirsutum + P. peruvianum
- G. hirsutum + P. peruvianum



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 ЗБР АН РУз, Центр Геномных Технологий



Интернет ресурсы по молекулярному изучению геномов растений

<http://plantgenomics.tigr.org>

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



Институт Генетики и ЗЕР АИРПУЗ, Центр Геномных Технологий



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

Спасибо за внимание!



40

© 2009 Институт Генетики и Эволюции РАН, СПб-ФАНС, Центр Генетики Эволюции



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, codominance at others	hypervariable, i.e. each individual has unique banding pattern	unknown
<i>Nuclear microsatellites</i>	biparental nuclear, few loci, many alleles per locus	codominance, 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	codominance	high variability, even within a single individual	non-coding
<i>cDNA markers</i>	biparental nuclear, one to a few loci, few alleles per locus	codominance	low variation within populations, low differentiation between populations	functional differences possible between alleles of a locus
<i>Isoenzymes (for comparison)</i>	biparental nuclear, 1-5 loci, 1-7 alleles per locus	codominance, 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

© 2009 Институт Генетики и Эволюции РАН, СПб-ФАНС, Центр Генетики Эволюции

Введение в молекулярную генетику и ее методологию
 Абдуллаев А.А.,
 Центра Геномных Технологий ИГиЭБР



Введение в молекулярную генетику и методологию.
 Докладчик: к.б.н.Абдуллаев А.А.

Институт генетики и ЭБР АН Руз, Центр геномных технологий

ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ РАЗВИТИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

1859	Charles Darwin	публикация «О происхождении видов»
1865	Gregor Mendel	принципы расщепления и независимого наследования признаков
1869	Friedrich Miescher	открытие ДНК
1900	H. de Vries, C. Correns, E. von Tschermak	независимое наследование признаков
1902	Archibald Garrod	генетическая природа заболеваний человека
1902	Walter Sutton, Theodor Boveri	предложили хромосомную теорию
1916-1916	Thomas Hunt Morgan, C. Bridges	гены расположены на хромосомах
1913	A.H. Sturtevant	составили первую генетическую карту
1927	H.J. Muller	индуцировал мутации рентгеновскими лучами
1931	H. Creighton, Barbara McClintock	физические доказательства 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
1960	M. Nirenberg, G. Khorana	завершение расшифровки генетического кода
1970	Hamilton Smith	открытие ферментов – рестриктаз
1972	Paul Berg	первая рекомбинантная ДНК in vitro
1972	Gobind Khorana	синтез полинуклеотида in vitro
1973	H. Boyer, S. Cohen	первое применение плазмид для клонирования ДНК
1977	W. Gilbert and F. Sanger	метод секвенирования ДНК
1977	F. Sanger, R. Sharp, R. Roberts и др.	открытие интронов
1988	Kary Mullis	разработка метода ПЦР
1995	C. Venter, H. Smith	секвенирование первых геномов: <i>Haemophilus influenzae</i> и <i>Mycobacterium genitalium</i>
1997	F. Blattner, T. Honuchi и др.	секвенирование генома <i>Escherichia coli</i>
1997	Jan Wilentz и др.	кларификация овечьей Долли из клетки молочной железы
2001	C. Venter, F. Collins и др.	расшифрован геном человека

© 2009 Издательство «Генетика» в 305-МФТИ, Центр Геномных Технологий



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 Гамельна и ИРП АН РНБ, Центр Гамельна-Тельковский



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

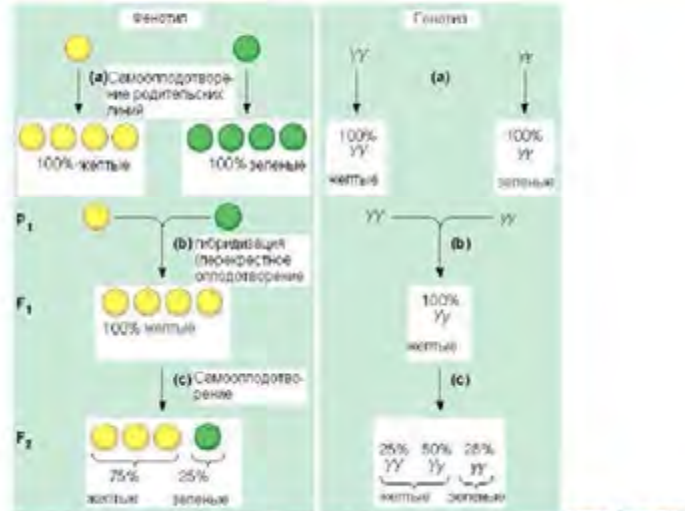


Johann Miescher

© 2009 Институт Гамельна и ИРП АН РНБ, Центр Гамельна-Тельковский



Эксперимент Менделя



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





Основные события молекулярной биологии в 1900-1911

- 1902 - Emil Hermann Fischer получил Нобелевскую премию: аминокислоты соединяются и формируют белки



Emil Fischer

- 1911 – Thomas Hunt Morgan открыл гены в хромосомах, являющиеся дискретными единицами наследственности



Thomas Morgan

- 1911 Pheobus Aaron Theodore Levene изучил ДНК и РНК

3

© 2009 Институт Генетики и ДЕР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



Основные события молекулярной биологии в 1940 - 1950

- 1941 – George Beadle and Edward Tatum – гены кодируют белки



George Beadle



Edward Tatum

- 1950 – Edwin Chargaff обнаружил, что цитозин комплементарен гуанину, а аденин тимину



Edwin Chargaff

4

© 2009 Институт Генетики и ДЕР АНРУЗ, 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

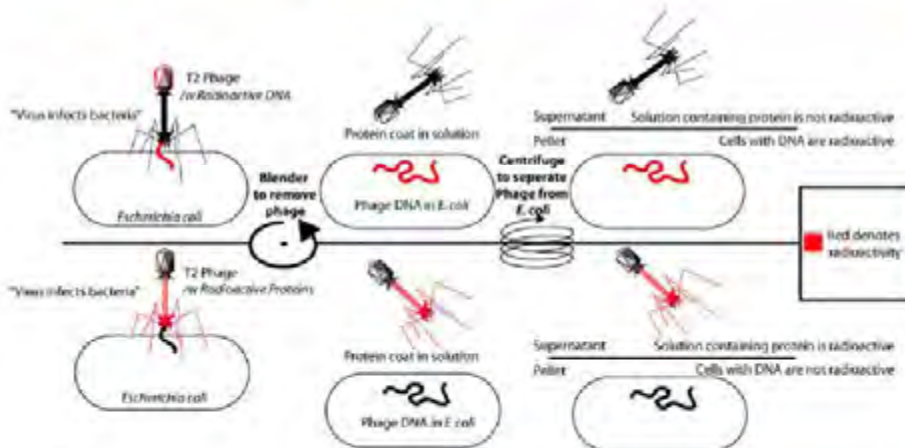


Hershey Chase Experiment

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



Эксперимент Херши и Чейз



© 2009 Институт Геномики и СБП АН РУС, 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

© 2009 Pearson Education, Inc. Все права защищены. Pearson Education, Inc.



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

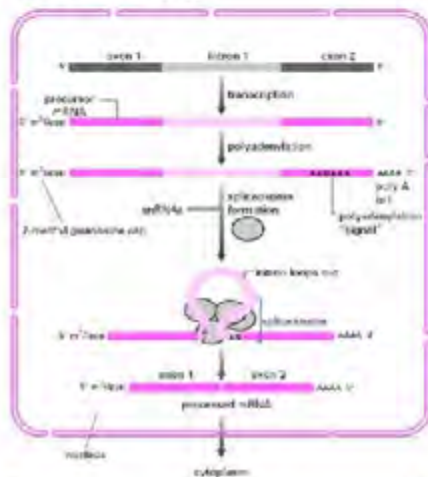
© 2009 Pearson Education, Inc. Все права защищены. Pearson Education, Inc.



- **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**



1977 год



Philip A. Sharp (1944...)
Courtesy of Dr. Philip A. Sharp



Ronald J. Roberts (1943...)
Courtesy of Ronald J. Roberts

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



1983-85 год

- 1983 – Barbara McClintock
Нобелевская премия за
открытие транспозонов



- 1983 Cary Muillis - ПЦР

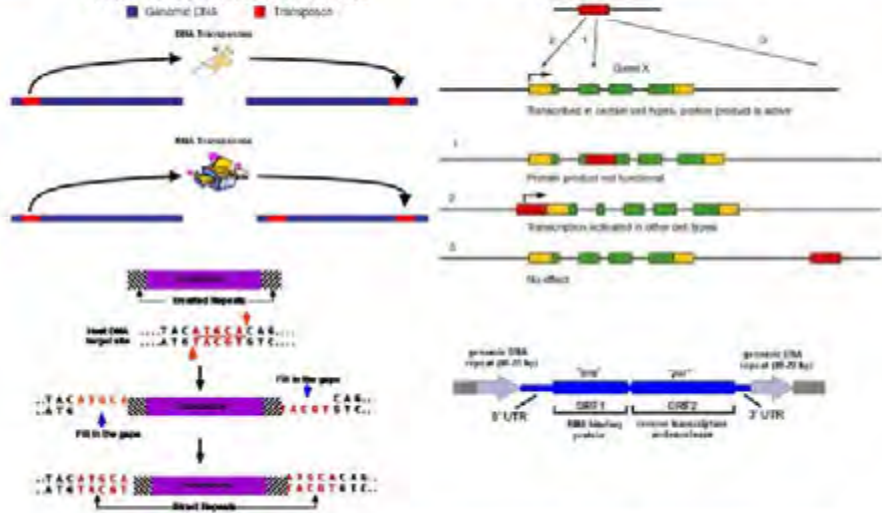


85

© 2009 Университет Томск в СОП / ИРП/С, Центр Геномных Технологий



DNA vs RNA Transposons



86

© 2009 Университет Томск в СОП / ИРП/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 ДЕР АНФУС, 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 ДЕР АНФУС, 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*)

19

© 2009 Институт Системной и Эволюционной Биологии, Центр Эволюционных 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 Системной и Эволюционной Биологии, Центр Эволюционных Технологий



Основные события молекулярной биологии в 2003- 2008

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



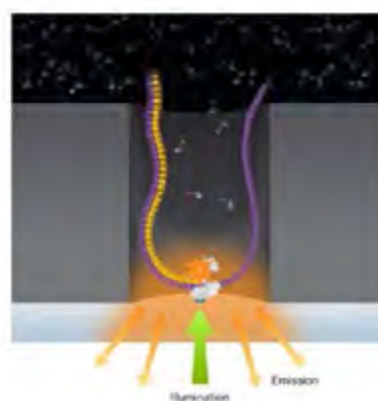
21

© 2009 Институт Генетики и СБП АН РУС, Центр Генетных Технологий



2009

Новейший метод секвенирования в реальном времени



22

© 2009 Институт Генетики и СБП АН РУС, Центр Генетных Технологий



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)

19

© 2008 МГУ имени М.В.Ломоносова. МГУ имени М.В.Ломоносова. МГУ имени М.В.Ломоносова.



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

19

© 2008 МГУ имени М.В.Ломоносова. МГУ имени М.В.Ломоносова. МГУ имени М.В.Ломоносова.



Методы выделения ДНК

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

99

© 2009 Pearson Education, Inc. Все права защищены. Pearson Education, Inc.



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)

100

© 2009 Pearson Education, Inc. Все права защищены. Pearson Education, Inc.



- 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)

25

© 2009 Институт Генетики и ДЕР АНРФ, Центр Геномных Технологий



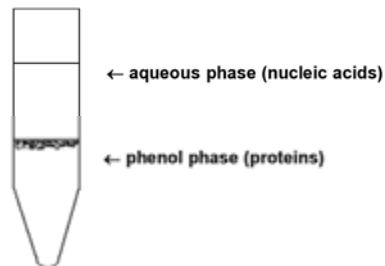
Выделение ДНК

Стандартная процедура

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

Фенольная экстракция

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



Выход 100нг – 5мкг

26

© 2009 Институт Генетики и ДЕР АНРФ, Центр Геномных Технологий



Выделение геномной ДНК НМВ

Стандартная процедура (как на предыдущем слайде)

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



28

© 2009 Институт Геномики и ЗЕР АИРГУЗ, Центр Геномных Технологий



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

29

© 2009 Институт Геномики и ЗЕР АИРГУЗ, Центр Геномных Технологий



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**

93

© 2008 Molecular Evolution & Phylogenetics Group, University of Cambridge



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



© 2008 Molecular Evolution & Phylogenetics Group, University of Cambridge



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 + хаотропic агент
5. Промыть
6. Элюировать ДНК низкосольным буфером

11

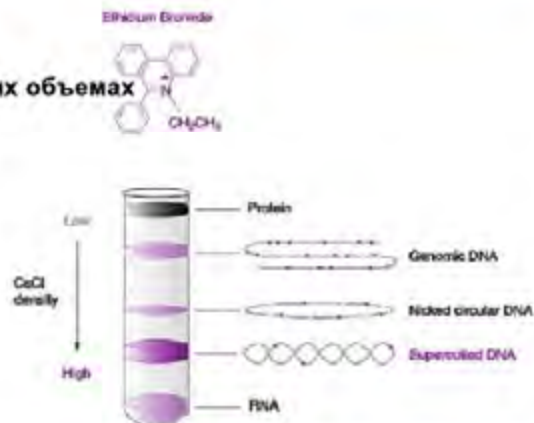
© 2009 Harsanyi Laboratory, Inc. All rights reserved. Центр Биохимии, Троицкий



Разделение нуклеиновых кислот в градиенте плотности CsCl

Применяют для:

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

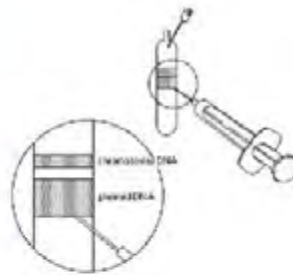
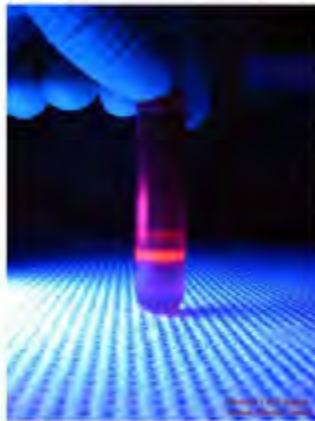


14

© 2009 Harsanyi Laboratory, Inc. All rights reserved. Центр Биохимии, Троицкий



Разделение нуклеиновых кислот в градиенте плотности CsCl



Градиент CsCl

35

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АН РУЗ, Центр Геномных Технологий



Гибридизация по Саузеру (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

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АН РУЗ, Центр Геномных Технологий



Используемые материалы

Зонды

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

37

© 2009 Университет Гамбург и ДБП АБПГЗ, Центр Генетических Исследований



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)
 - Микроэrray

38

© 2009 Университет Гамбург и ДБП АБПГЗ, Центр Генетических Исследований



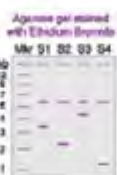
Southern Blots

- 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

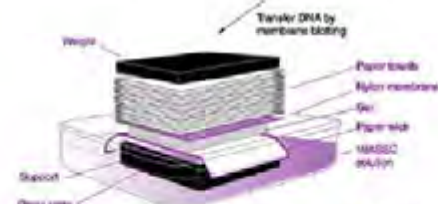
32

© 2000 Институт Генетики и БДР АМНУС, Центр Геномных Технологий

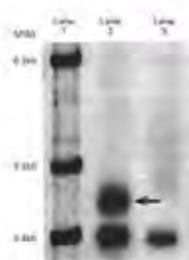
Разрезаем рестриктазами



Denat gel in NaOH



Transfer DNA by membrane blotting



Cross-link DNA to the membrane using UV light

Hybridize membrane with denatured ³²P-DNA probe



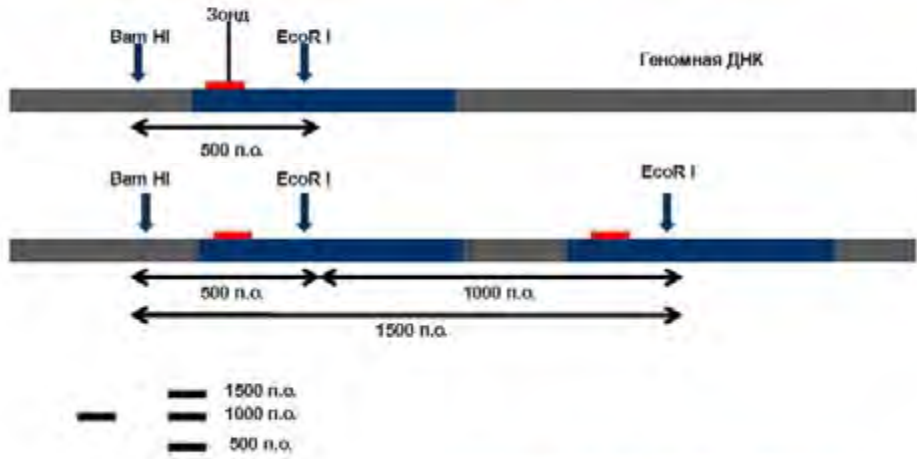
- Приготовление 20X SSC:
 - 3M NaCl: 175.3 g
 - 0.15M Na Citrate: 88.2 g
 - dH₂O: 800 ml
 - pH до 7.0 с HCl (0.1-0.5 mL)

32

Институт Генетики и БДР АМНУС, Центр Геномных Технологий



Определение копийности вставки (RFLP + Southern)

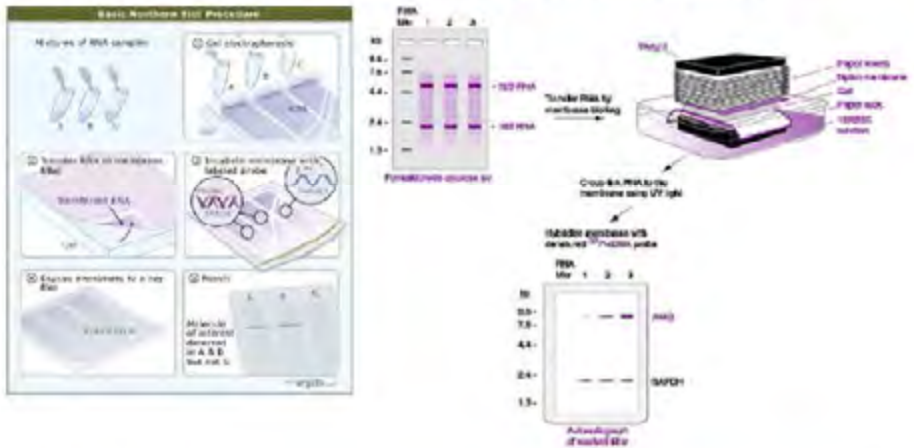


41

© 2009 Институт Генетики и Эволюции РАН, Центр Генетических Технологий



Гибридизация по Нозерну (Northern Blot)



42

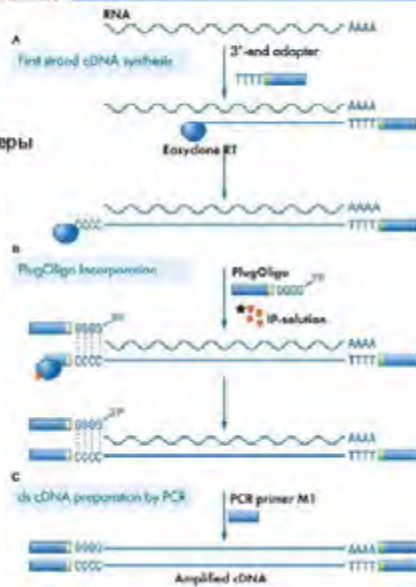
© 2009 Институт Генетики и Эволюции РАН, Центр Генетических Технологий



Получение кДНК

РНК
Олиго дТ с адаптером или случайные гексамеры
Ревертаза (со свойствами
терминальной трансферазы избирательно
присоединяющей G)
dNTP

РНКазы Н
Олиго дГ с адаптером
Праймеры специфичные адаптерам
ДНК полимерза

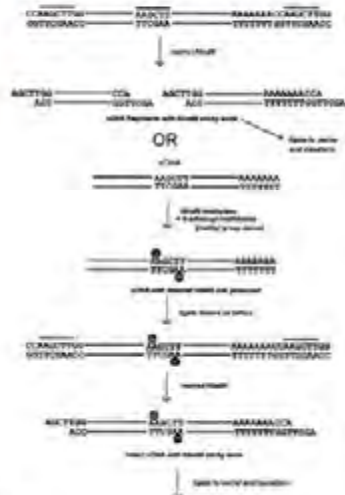


43



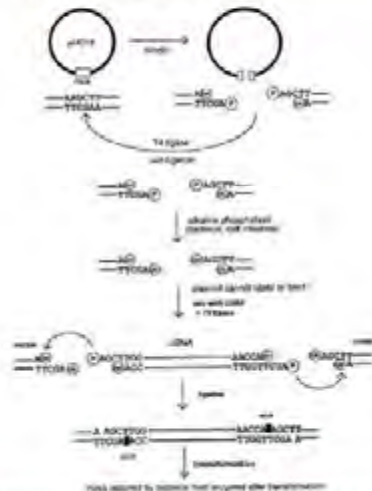
Клонирование ДНК

ДНК вектор и ДНК фрагмент имеют комплементарные концы



44

Программа treatment of recombinant plasmid with ligase



45



Сравнение кДНК для поиска дифференциально экспрессируемых генов

37

© 2009 Институт Геномы и ГЕР-АРПИС, Центр Геномные Технологии

III



Для поиска дифференциально представленных молекул применяют методы вычитающей гибридизации

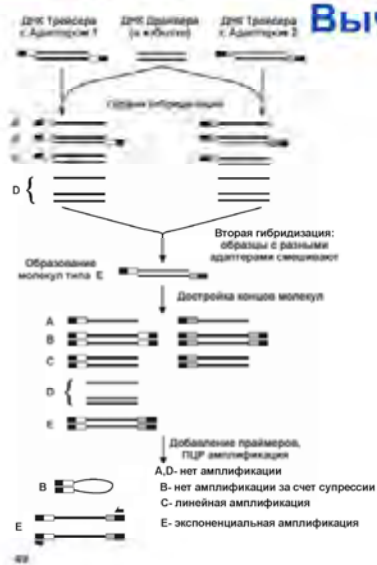


38

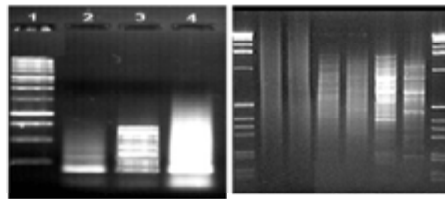
© 2009 Институт Геномы и ГЕР-АРПИС, Центр Геномные Технологии



Вычитающая гибридизация



Амплификации после SSH подвержены только молекулы с разными адаптерами



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



Микроэrray

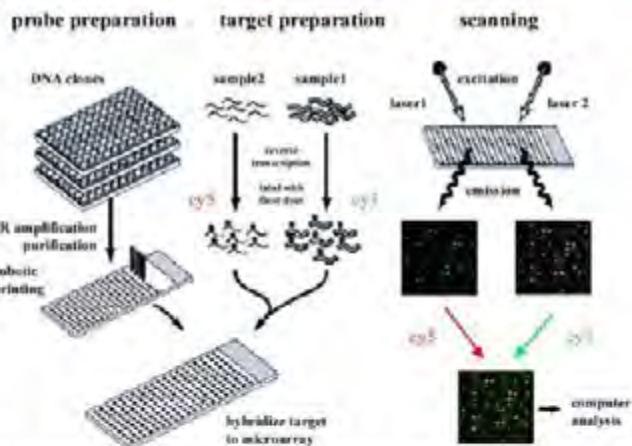
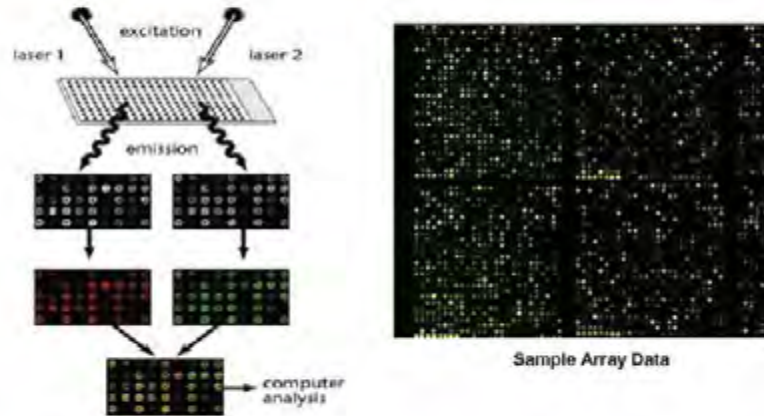


Fig. 1. cDNA microarray scheme. Green spots are transcripts overexpressed in sample #1, red spots are overexpressed in sample #2, and yellow spots are expressed equally in both samples. Modified from Duggan et al. (1999) *Nature Genetics* 2(1) pp10-14

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



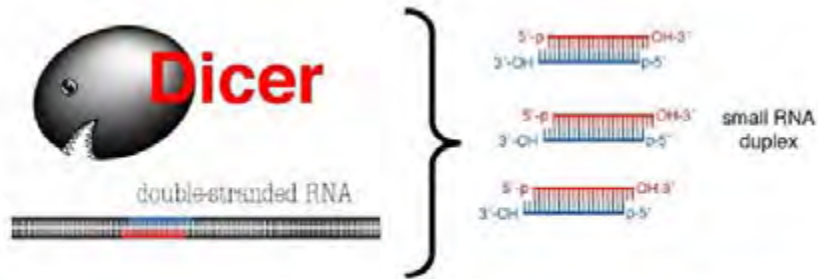
РНК-интерференция (RNAi)

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



РНК-интерференция (RNAi)(2)

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



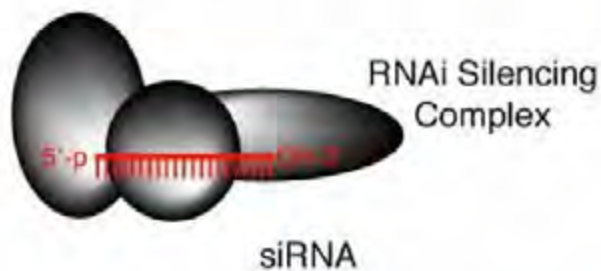
53

© 2009 Институт Генетики и ДНК АН РТ, Центр Генетических Технологий



РНК-интерференция (RNAi)(3)

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



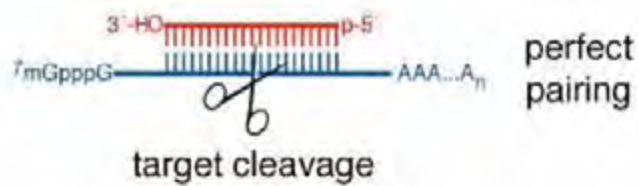
54

© 2009 Институт Генетики и ДНК АН РТ, Центр Генетических Технологий



РНК-интерференция (RNAi)(4)

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



69

© 2009 Институт Системной и Общей Биологии, Центр Эволюционных Исследований



РНК-интерференция – для чего?

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

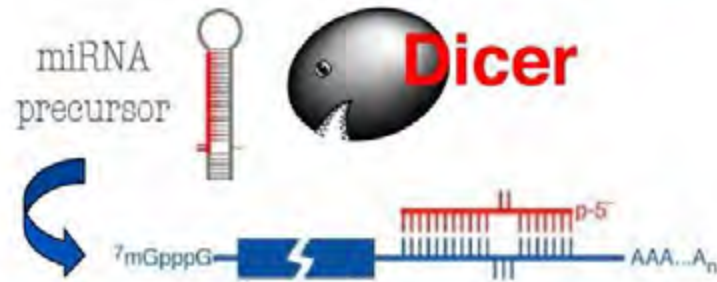
70

© 2009 Институт Системной и Общей Биологии, Центр Эволюционных Исследований



micro RNA (miRNA)

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

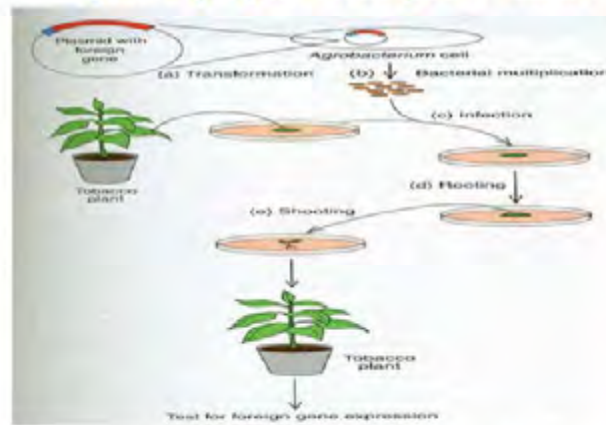


52

© 2009 Институт Генетики и ЗВР РАН/С, Центр Генетика Технологии



Использование Т-ДНК для трансформации растений



53

© 2009 Институт Генетики и ЗВР РАН/С, Центр Генетика Технологии



Платформа клонирования

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



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*



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 бактерий (обычно *E. coli*)
7. Проверка плазмиды (рестрикция, ПЦР, секвенс)
8. Трансформация *Agrobacterium* и проверка
9. Трансформация растения
10. Получение и отбор трансформантов
11. Оценка трансформантов

83

© 2009 Национальный институт биологических исследований и технологий «МГУ им. Ломоносова» Биологический институт



Вектор для трансформации

Требования:

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

84

© 2009 Национальный институт биологических исследований и технологий «МГУ им. Ломоносова» Биологический институт



Vir гены,
функция переноса

ori – точка начала
репликации



63

© 2009 Институт Генетики и Эволюции, Центр Геномных Технологий



Бактериальный
селекционный
Маркер (Kan^r)

pVS1 ori

Вектор для
трансформации
растения

ColE1 ori

(RB) ← Gene of interest → Plant selection marker → (LB)

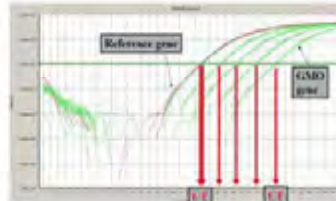
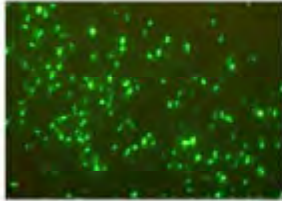
Т-ДНК

64

© 2009 Институт Генетики и Эволюции, Центр Геномных Технологий

Оценка трансформации

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



65

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

Следующее тестирование в поле

Устойчивость к гербициду



Нетрансгенные

Трансгенные

66

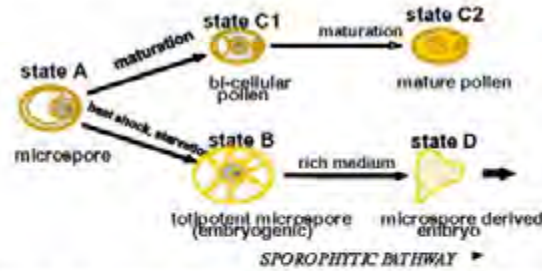
© 2009 Институт Генетики и ДБП АН РУС, Центр Геномных Технологий



- Пропиндегидрогеназа – фермент участвующий в деградации пролина, вовлечен в процессы развития растений и их ответа на стрессовые факторы

- Пролин – осмолит, осмопротектор

Выделено два гена кодирующие пропиндегидрогеназу 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

57

© 2009 University of Toronto and 2007-2009, University of Toronto



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 gaattcatal tgacaatgga agtctatatt agtaaglaag aataagcgg
gaaccatccc

61 ccaactacg taataatlc aatggcgtgg cagaaatgal ctgatcagg caaacatct

121 ggftaaaatg cacaaggggc atatccact ttagtalet tticcctat gcgatttta

181 ggctattat attgtagcac cttgtllala ttgglltcg lattagaal ggaaaaaagg

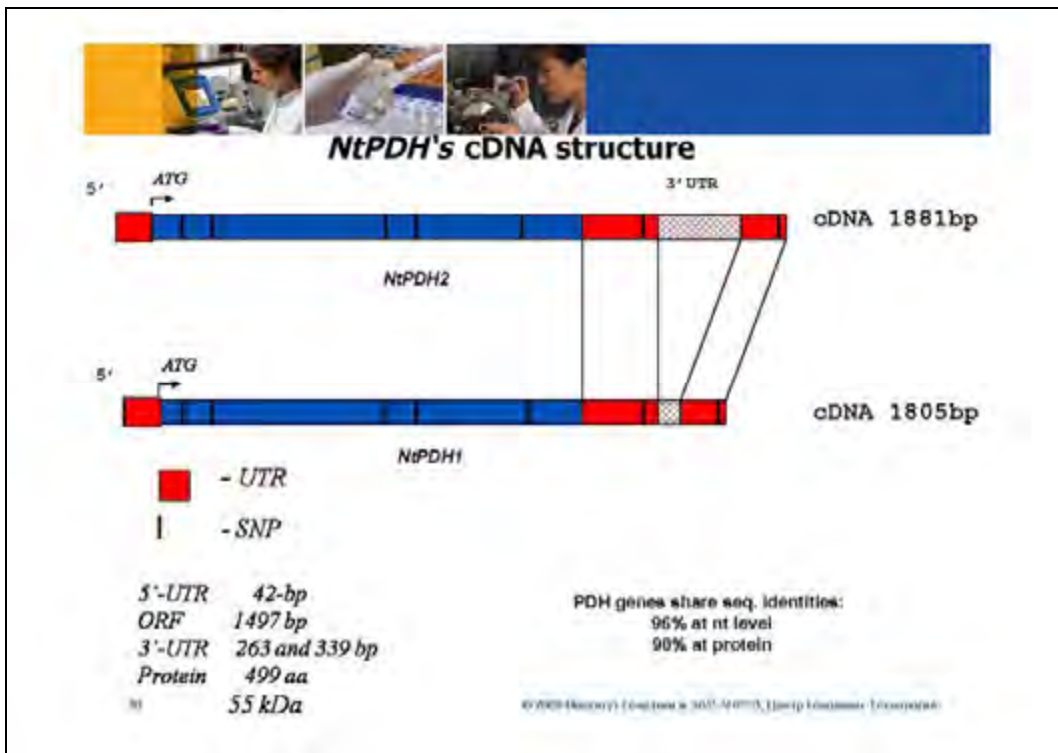
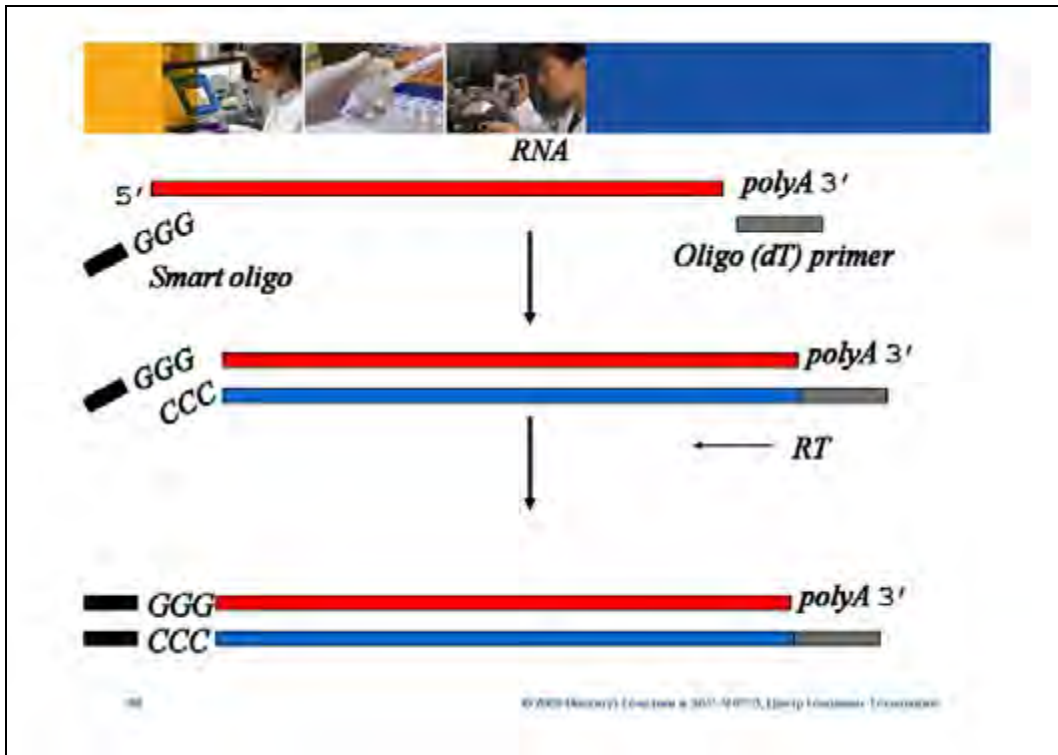
241 tacccaagt ggagccgaaa tgttg-poly(A)

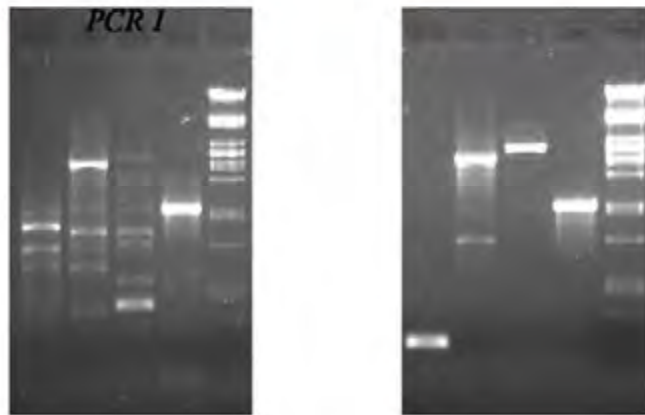
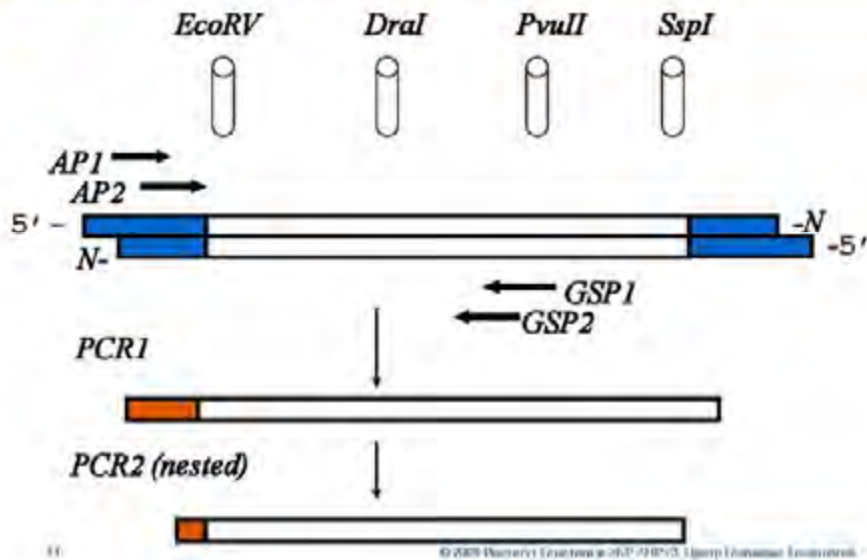
Expression pattern:

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

58

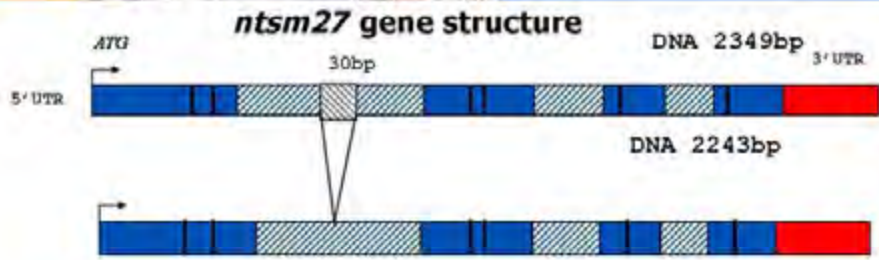
© 2009 University of Toronto and 2007-2009, University of Toronto





12

© 2009 Институт Геномики и ГЕП/ИДГ/С, Центр Геномных Исследований



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).



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

Acc.No	length	Description	E-value	degree of homology percent
Genomic (blastn)	[bp]			
cg15427.1 (CG15427.1)	1331	<i>A. thaliana</i> thylakoid protein, reaction, non-heme iron protein-like protein, plastidial, nDPA	0.009	81 (97%)
Protein (blastp)	[aa]			
gi17544380.1 (AA11692.1)	459	1100325 protein, reaction precursor [A. thaliana thylakoid]	1e-133	24% (92%)
gi1140511.1 (AA013147.1)	475	(AC120710) putative protein, reaction [Oryza sativa (Japanese culture group)]	4e-03	23% (94%)
gi19241119.1 (AF197419.1)	600	(U04_016033) protein, dehydrogenase (oxidase) L2, protein, reaction 2, pH 7 induced, protein, pH 5 induced gene 6 [Sesuvium portulacastrum]	2e-13	13% (37%)
gi19049147.1 (AA197419.1)	393	(1190020) protein and kinase, protein, reaction 2 [Oryza sativa]	1e-14	13% (38%)

AIPDH is represented by two isoforms



141-456aa PDH domain

© 2009 University of Missouri. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

18



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)

19

© 2009 University of Missouri. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>



***NIPDH1* and *NIPDH2* respond differently to dehydration**

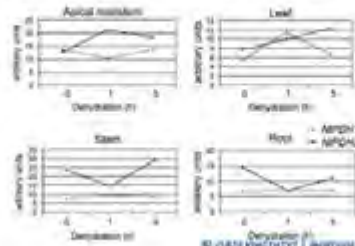


withdrawal of water for 2-3 weeks

Both *NIPDH* genes were expressed in untreated seedlings, and transcript levels of *NIPDH1* were higher than that of *NIPDH2* (a,b)

Despite strong upregulation of *NIPDH2* 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 *NIPDH1* and *NIPDH2* in different organs of dehydrated in vitro-grown tobacco plants



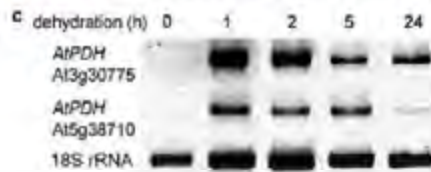
ImageQuant software

77

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved. *Arabidopsis*, *Arabidopsis*, *Arabidopsis*, *Arabidopsis*



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

78

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved. *Arabidopsis*, *Arabidopsis*, *Arabidopsis*, *Arabidopsis*



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

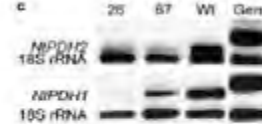
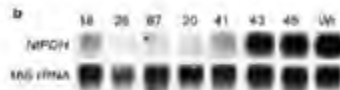
A construct (p35S-*NtPDH2*-RNAi) bearing two copies of the 3-265-bp of *NtPDH2* (a), was transformed into tobacco
The nucleotide sequence identity between *NtPDH1* and *NtPDH2* in this region is 66%.



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 *NtPDH* gene

72 RNAi lines generated

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



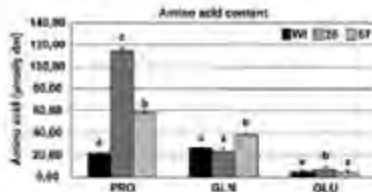
78

© 2009 University of Georgia and USDA/ARS, U.S. Department of Agriculture



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., 1996). 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 filter paper and subsequently rehydrated in distilled water for 12 h before collecting leaves.

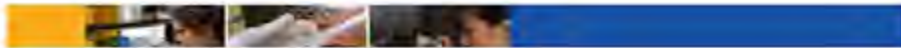
However, glutamine and glutamic acid levels were not clearly correlated with enhanced proline accumulation in the transgenic plants. This finding underlines that proline as a terminal product has less impact on amino acid metabolism the *PDH* genes of both tobacco and *Arabidopsis* were expressed after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

81

© 2009 University of Georgia and USDA/ARS, U.S. Department of Agriculture



- *NIPDH1* – стабильно низкий уровень экспрессии после 24 часов дегидратации
- *NIPDH2* – 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/s00425-006-0426-3

ORIGINAL ARTICLE

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

Alexandra Ribarits · Alisher Abdullaev ·
Alisher Tushpulatov · 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.



СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ

Секвенирование ДНК, анализ нуклеотидных последовательностей

Абдуллаев А.А.,

Центра Геномных Технологий ИГиЭБР



Секвенирование. История. Методы. Оборудование.

Докладчик: к.б.н. Абдуллаев А.А.

Институт генетики и ЭБР АН РУз



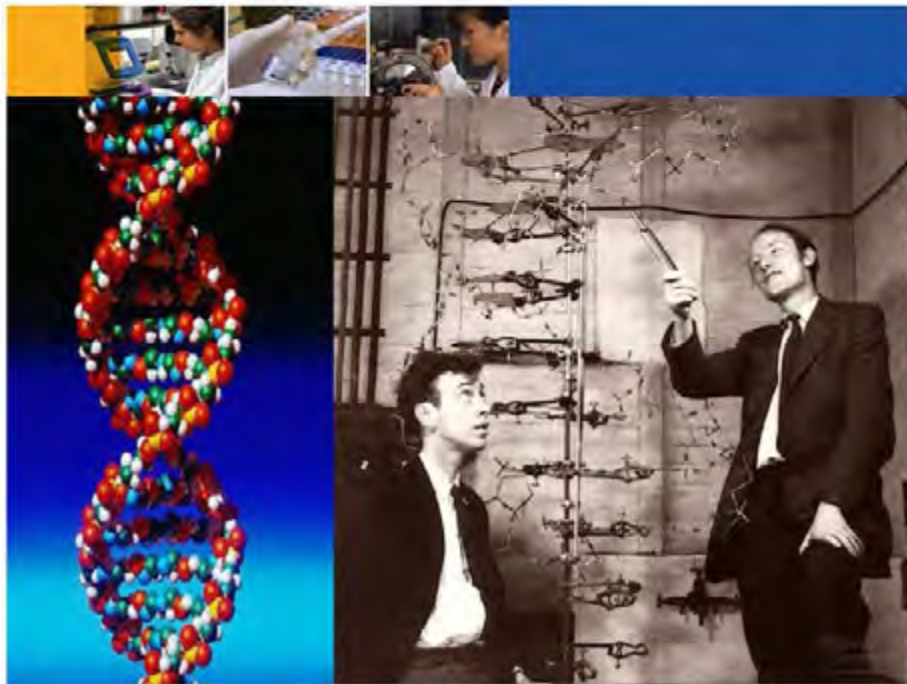
История

- 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



- 1972 г. - был прочтен ген белка оболочки РНК-вируса, бактериофага MS2, изученный в лаборатории Валтера Файерса.
- 1977 г. – Ф. Сэнгер определил полную последовательность бактериофага ОХ174.
- 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*)

© 2009 Институт Генетики и 365° АН РУЗ, Центр Научных Технологий.





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 .



8

© 2009 University of Cambridge and 2007 JRP/CS, Centre for Genome Research



Метод Максама-Гилберта – химическое расщепление

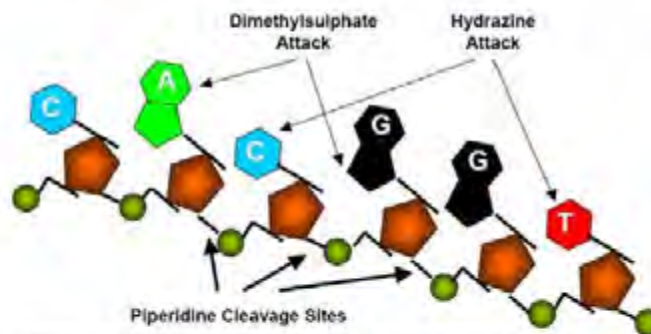


Figure 1. Chemical targets in the Maxam-Gilbert DNA sequencing strategy. Dimethylsulphate or hydrazine will attack the purine or pyrimidine rings respectively and piperidine will cleave the phosphate bond at the 3' carbon.

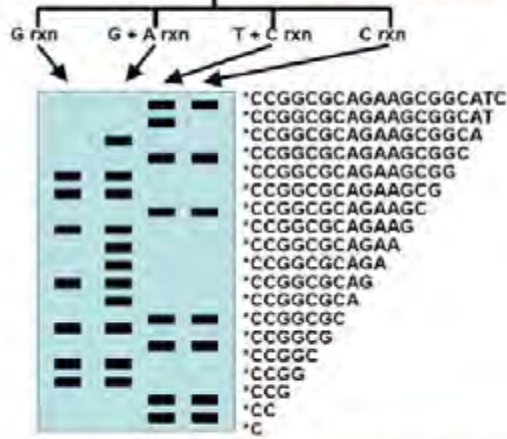
8

© 2009 University of Cambridge and 2007 JRP/CS, Centre for Genome Research



Метод Максама-Гилберта – химическое расщепление

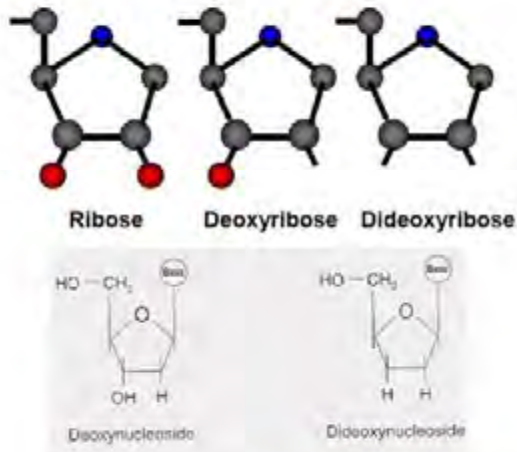
5' *pCpCpGpGpCpGpCpApGpArArGpCpGpCpApTpCpApGpCpArApA 3'



© 2009 Институт Генетики и Эволюции РАН, Центр Геномных Исследований



Метод Сэнгера



© 2009 Институт Генетики и Эволюции РАН, Центр Геномных Исследований



Секвенирование

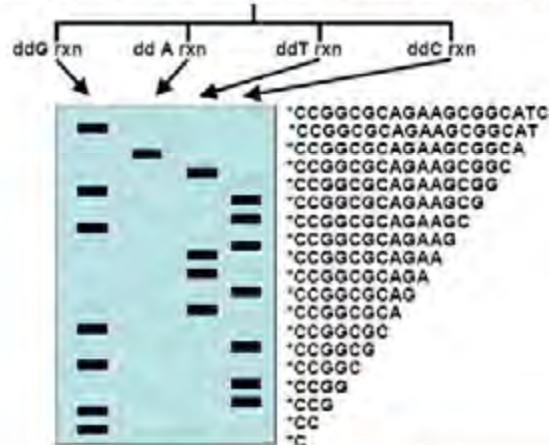
Секвенирование ДНК методом по Сэнгеру



© 2008 Институт Геномов и ИСР АИФ РАН, Центр Научных Технологий



5' pCpCpGpGpCpGpCpApGpApApGpCpGpGpCpApTpCpApGpCpApApA 3'



© 2008 Институт Геномов и ИСР АИФ РАН, Центр Научных Технологий



Автоматическое секвенирование по Сэнгеру



Leroy Hood

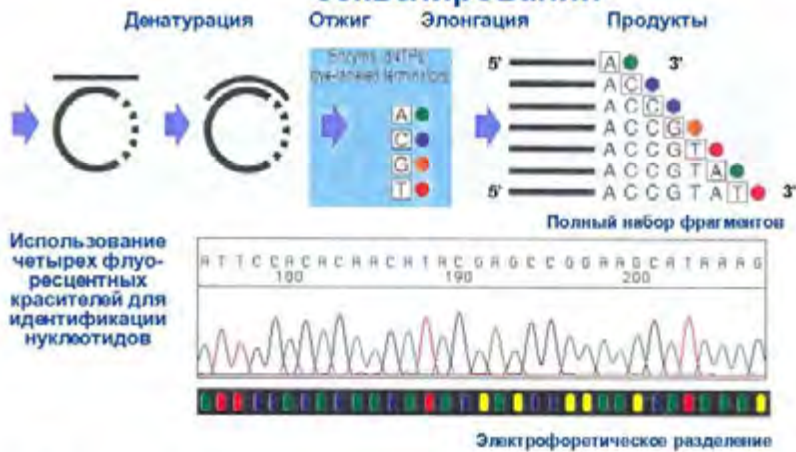


11

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



Многоцветная флуоресценция при секвенировании

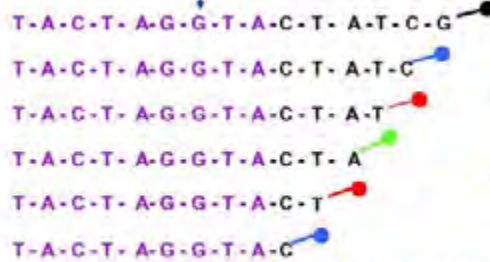


12

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



Реакция секвенирования: Разделение одноцепочечных фрагментов ДНК

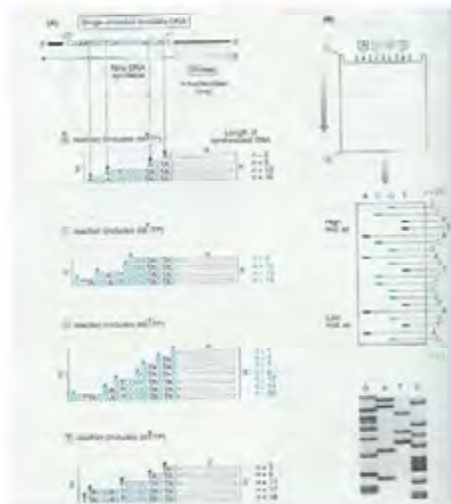


Электрофорез

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

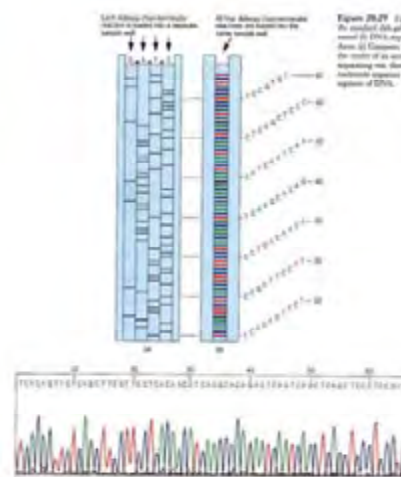
13

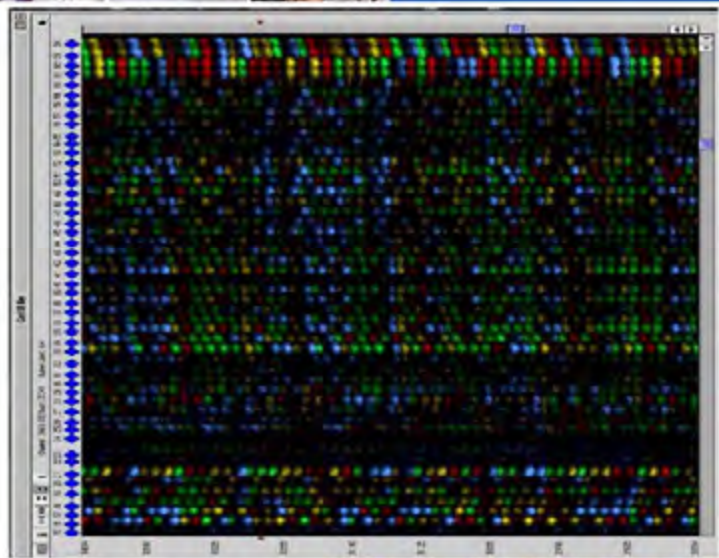
© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



14

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



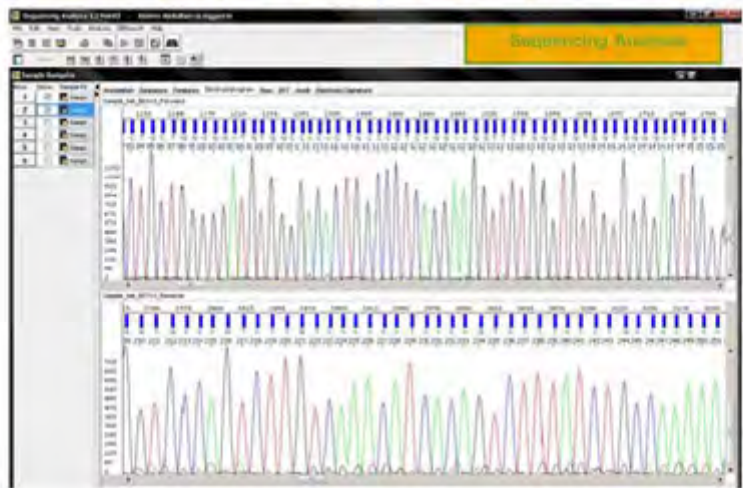


15

© 2009 Институт Генетики и ЗЕР АНФУЗ, Центр Геномных Технологий



Анализ результатов секвенирования



16

© 2009 Институт Генетики и ЗЕР АНФУЗ, Центр Геномных Технологий



Плазмиды

Подготовка матрицы для секвенса

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

20

© 2009 Институт Геномики и ГЕП/АФУС, Центр Научных Технологий



ПЦР продукт

Подготовка матрицы для секвенса

- 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 Геномики и ГЕП/АФУС, Центр Научных 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)



11

© 2009 Институт Генетики и ЭМР АНР УрО, Центр Генетика Тюменский



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 100bp

→ Очистка через гели: QIAquick® (QIAGEN)

→ Ультрафильтрация: Centricon-100, Microcon (Millipore)



22

© 2009 Институт Генетики и ЭМР АНР УрО, Центр Генетика Тюменский



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)

• Преимущества

- Быстро и недорого
- Высокий выход
- Автоматизация
- Высокая производительность с использованием микроплашек

• Недостатки

- Требует оптимизации
- Не удаляет неспецифичные ПЦР продукты и праймеры



19

© 2009 National Institutes of Health. All rights reserved. Center for Genome Sciences and Policy



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

19

© 2009 National Institutes of Health. All rights reserved. Center for Genome Sciences and Policy



Ферментативная очистка

- ▶ Может быть использована если имеется специфичный ПЦР продукт
- ▶ Экзонуклеаза I (Exo I) расщепляет одноцепочечную ДНК (праймеры)
- ▶ Щелочные фосфатазы (SAP / CIP) дефосфорилируют dNTPs
Werte, E., et al. 1994, Nucl. Ac. Res. 22 4354. Hanke and Wink, 1994, Biotech. 17 658.]
- Преимущества:
 - Быстро и легко :
 - Обработка ферментом при 37 °C в течение 15мин.
 - Инактивация фермента при 80 °C в течение 15мин.
 - Проводится прямо в термоблокере после ПЦР
 - Дёшево, высокий выход, можно автоматизировать
 - Высокая производительность с использованием микроплашек
- ▶ Недостатки
 - не удаляет неспецифичные ПЦР продукты и праймеры



11

© 2009 Институт Систем и 3D-АФТД, Центр Биомедицинских Технологий



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 MgCl₂)

12

© 2009 Институт Систем и 3D-АФТД, Центр Биомедицинских Технологий



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		высокое
	низкое	высокое	
Удлинение на 1 нуклеотид	В основном короткие фрагменты	Более длинные фрагменты	Отсутствие сигнала

→ Различные наборы для различных методов секвенирования

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	



BigDye® Terminator Kits - Применение

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

✦ Рекомендовано ✍ Довлеть-ориентально

• 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“

© 2009 Applied Biosystems, a GE Healthcare Company. All rights reserved.



Реакция секвенирования

Стандартный протокол

	Образец	Контроль
Ready Reaction Mix	8 μ L	8 μ L
DNA Template	x μ L	
PCR Product (1 - 50 ng)		
Plasmid (150 - 300 ng)		
Контрольная ДНК (плазида pGEM) (0.2 μ g/ μ l)		0.75 - 1.5 μ L
Primer 3,2 - 5 pmoles	y μ L	
Control Primer (0.8 pmol/μl)		4 μ L
H₂O (fresh MilliQ water or HPLC-grade)	z μ L	6.5 - 7.25 μ L
Final volume	20 μ L	20 μ L

10

© 2009 Applied Biosystems, a GE Healthcare Company. All rights reserved.



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 Tm 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

11

© 2009 Институт Генетики и ЗЕР АНРУС, Центр Геномных Технологий



Генетические анализаторы ABI PRISM® 3130 и 3130xl



Принцип „Автоматического Секвенатора“
 Названия частей и расходных материалов

12

© 2009 Институт Генетики и ЗЕР АНРУС, Центр Геномных Технологий



Этапы работы



33

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



3130 Описание частей инструмента



34

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



3130 Особенности и преимущества



Программа Data Collection v3.0

Модуль для 3130 POP-7™ Polymer

- Простые и понятные экраны для запуска обслуживания инструмента
- Детектирование ошибок
- 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, LGH and AFUP® Kit support
- GeneMapper® ID Software v3.2 3130 Series support and YFiler™ support



3130 POP-7™ Polymer

Данные высокого качества с более длинным прочтением последовательностей, быстрыми программами, что значительно сокращает время проведения анализа.

Стандартизован под все платформы

- Один полимер для Секвенирования и Фрагментного Анализа
- Enables SNPlex System on 3130xl Genetic Analyzer

© 2009 Институт Генетики и ТЕР АИПУЭ, Центр Геномных Технологий

35



Обзор деталей инструмента

Система доставки полимера снабжена насосом



Защитный кожух

Интегрированный поршень насоса

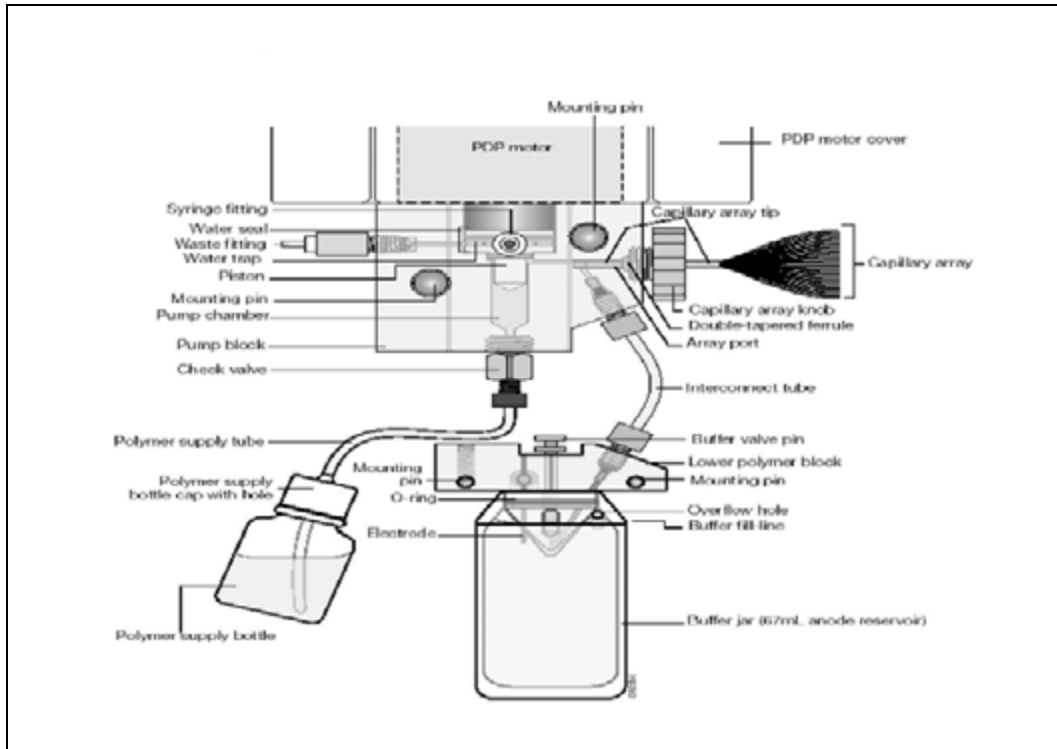
Прозрачные трубки большего диаметра

Ёмкость для буфера на 16 мл

Бутылка с полимером на 7 мл

© 2009 Институт Генетики и ТЕР АИПУЭ, Центр Геномных Технологий

36



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





Автодозатор



Слив
1X буфер

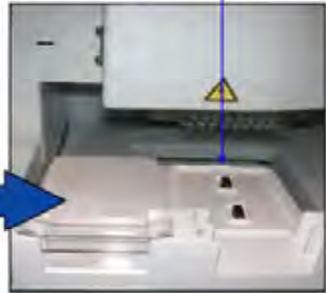
Вода



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

3130 Genetic Analyzer:
1 x 96 or 384 samples

Сенсоры детекции плашек
96 или 384



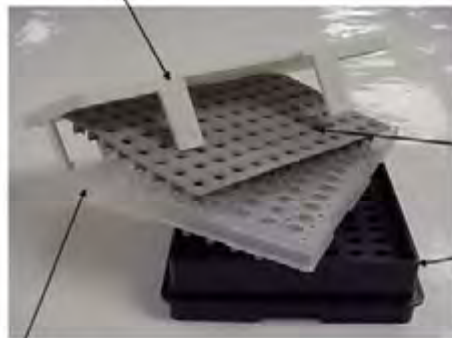
39

© 2009 Институт Генетики и ЗЕР АНРУЗ, Центр Генетичных Технологий



Компановка плашки на 96-лунок (384)

Фиксатор плашки



Плашка



Септа

Подставка

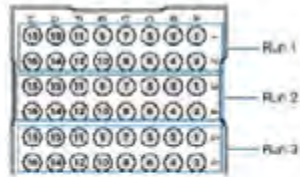
40

© 2009 Институт Генетики и ЗЕР АНРУЗ, Центр Генетичных Технологий

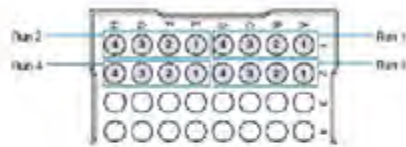


96-Well Plate Mapping

3130xi Instrument



3130 Instrument



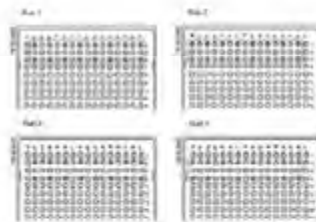
41

© 2009 Waters Corporation. All rights reserved. Waters, the Waters logo, and other marks are trademarks of Waters Corporation.

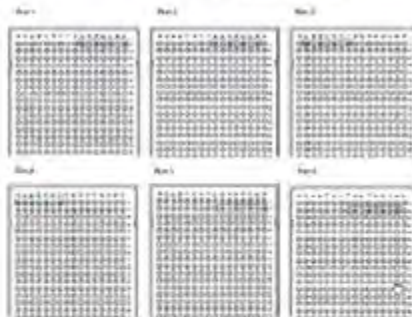


384-Well Plate Mapping

3130xi Instrument



3130 Instrument



42

© 2009 Waters Corporation. All rights reserved. Waters, the Waters logo, and other marks are trademarks of Waters Corporation.

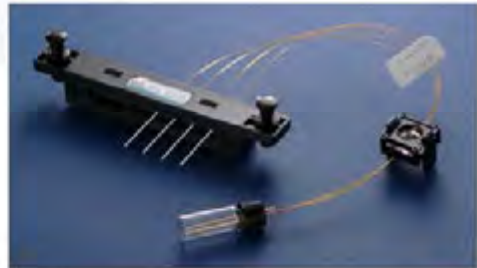


Капилляры

Длина:
- 22 см
- 36 см
- 50 см
- 80 см



- 50 µm ID
- 100 прогонов



43

© 2009 Институт Генетики и ЗБР АНРУЗ, Центр Генетных 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 ₂₀ LOR ^{a, b}
					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	60	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	850
Long read	80	POP-4	LongSeq80_POP4	210	24	96	700
		POP-7	LongSeq80_POP7	170	32	128	950

^a 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.

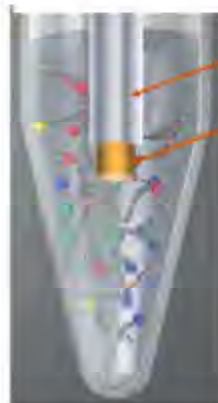
^b 98.5% basecalling accuracy, less than 2% Ns.

44

© 2009 Институт Генетики и ЗБР АНРУЗ, Центр Генетных Технологий



Электрокинетическая инъекция



Электрод (Катод)

Капилляр

- Капилляр и электрод погружаются в образец
- Подается ток на определенное 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

45

© 2009 Институт Генетики и ДБР АН РУЗ, Центр Геномных Технологий



Капиллярный электрофорез

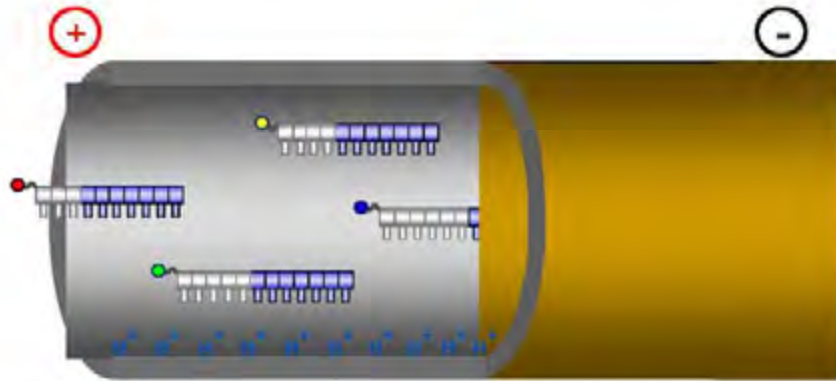


46

© 2009 Институт Генетики и ДБР АН РУЗ, Центр Геномных Технологий



Принцип капиллярного электрофореза

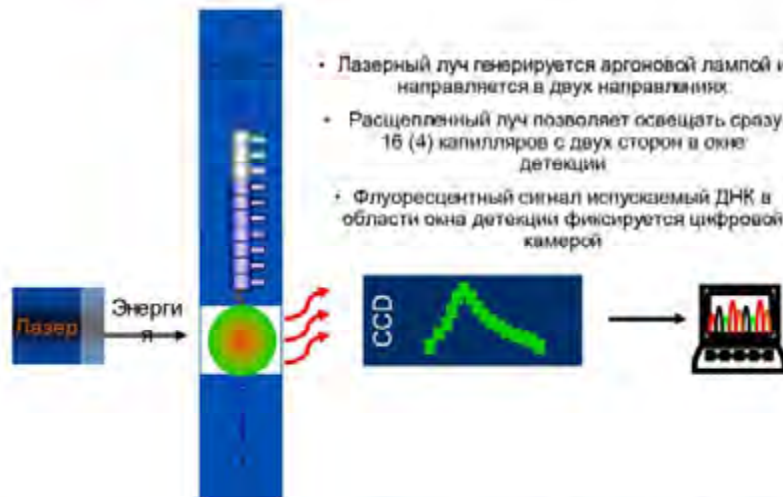


47

© 2009 Институт Генетики и ЗЕР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



Детектирование флуоресцентного сигнала



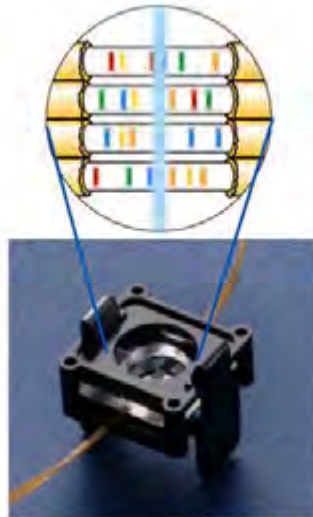
- Лазерный луч генерируется аргоновой лампой и направляется в двух направлениях.
- Расщепленный луч позволяет освещать сразу 16 (4) капилляров с двух сторон в окне детекции
- Флуоресцентный сигнал испускаемый ДНК в области окна детекции фиксируется цифровой камерой

48

© 2009 Институт Генетики и ЗЕР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



Капилляр: Окно детекции

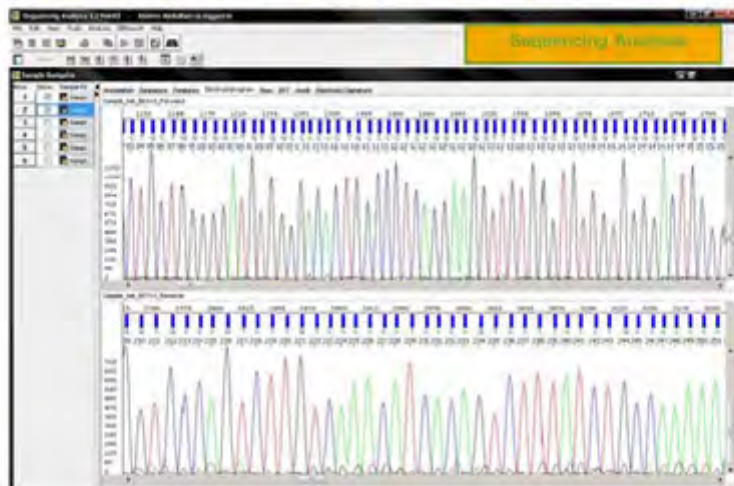


49

© 2009 Институт Генетики и ЗБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



Анализ результатов секвенирования

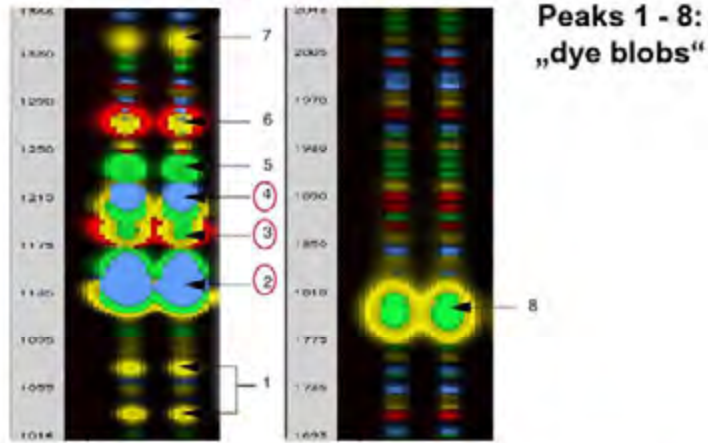


50

© 2009 Институт Генетики и ЗБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



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

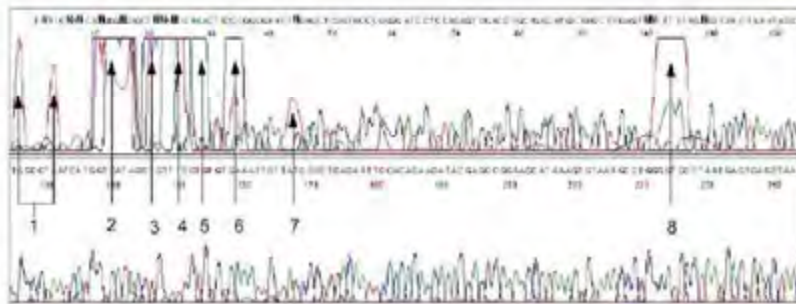


51

© 2009 Институт Генетики и СБП АИФУЗ, Центр Генетных Технологий



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



Peaks 1 - 8: „dye blobs“

52

© 2009 Институт Генетики и СБП АИФУЗ, Центр Генетных Технологий



Наборы BigDye® Terminator

Пример результата: Детекция гетерозиготы



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

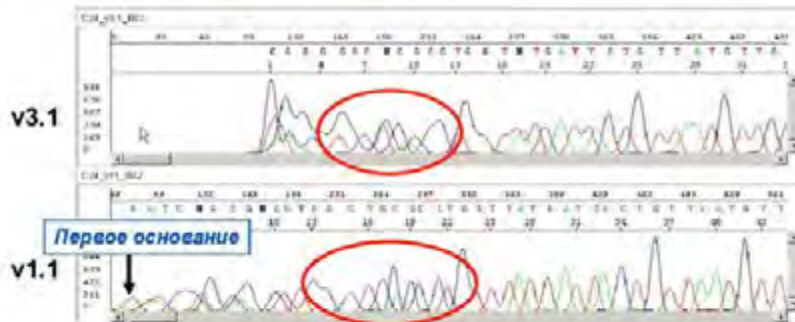
53

© 2009 Институт Генетики и ИИТ АН РУС, Центр Геномных 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.

54

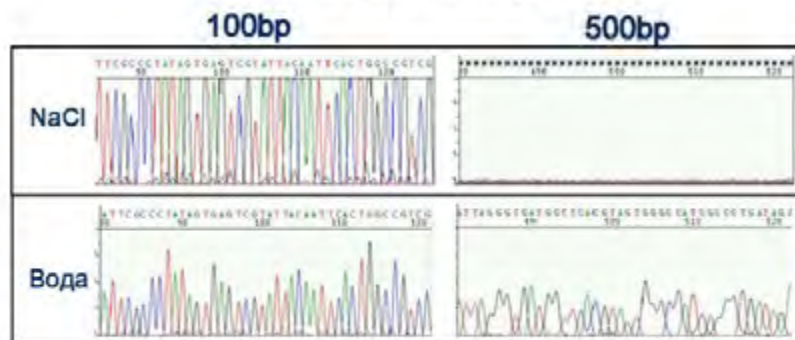
© 2009 Институт Генетики и ИИТ АН РУС, Центр Геномных Технологий



Качество ДНК матрицы

Влияние солей на эффективность полимеразы

Сравнение контроля pGEM® в присутствии 40mM NaCl или воды



55

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



Выявление и устранение неисправностей

Частые проблемы

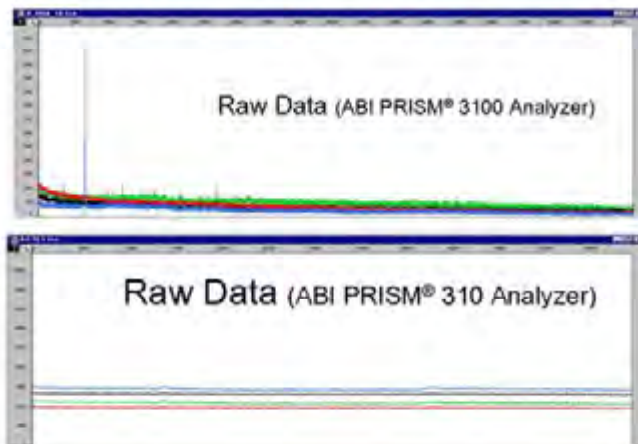
- 1) Отсутствие данных/сигналов
- 2) Кантаминция
- 3) Потеря разрешения
- 4) Присутствие двух матриц (после первого ПЦР остался второй праймер)
- 5) Неспецифические сигналы
- 6) Сложные последовательности (GC – регионы, гомополимеры)

56

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



1) Отсутствие данных/сигналов



57

© 2009 Институт Генетики и ЗБР АНФУЗ, Центр Геномных Технологий



1) Нет данных/сигналов

Возможные причины:

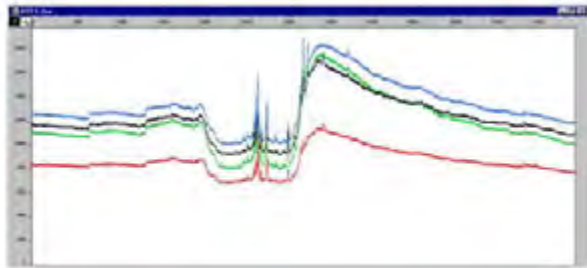
- Проблема инъекции
 - Пузырек в пробирке с образцом
 - Нет тока между капилляром и электродом (пузырек в электрофорезной системе)
 - Объем образца в пробирке слишком мал
 - Образец (и размерный стандарт) не добавлен
 - Не оптимальная калибровка автодозатора (310 instrument)
 - Збитый капилляр
- Проблема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

58

© 2009 Институт Генетики и ЗБР АНФУЗ, Центр Геномных Технологий



2) Контаминация



- Флуоресцентная контаминация
 - образец
 - блок, шприц

14

© 2009 Институт Гантели и ИБР АН РУЗ, Центр Геномных Технологий



3) Потеря разрешения

- Старый капилляр

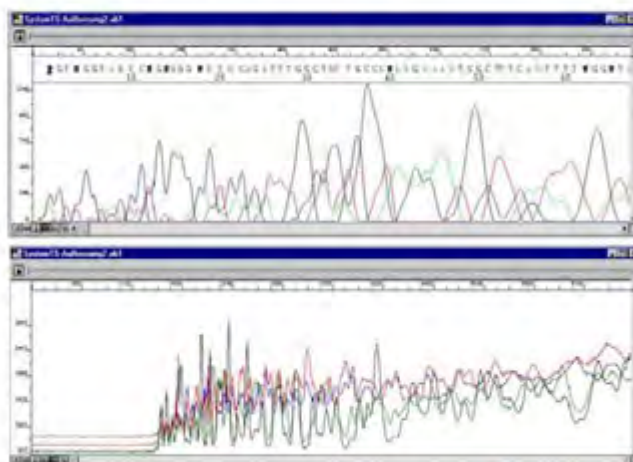


15

© 2009 Институт Гантели и ИБР АН РУЗ, Центр Геномных Технологий



3) Потеря разрешения



61

© 2009 Институт Генетики и ЗЕР АНРГУ, Центр Геномных Технологий



Потеря разрешения

Возможные причины:

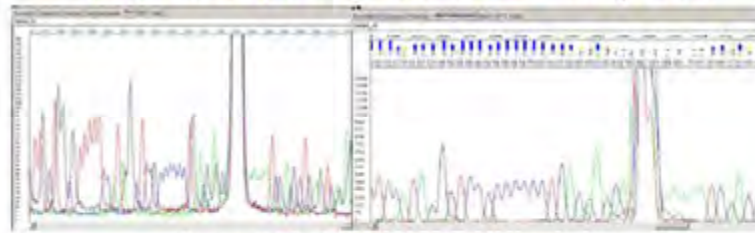
- Старый капилляр
- Неполная смена полимера от прогона к прогону
- Старый полимер

62

© 2009 Институт Генетики и ЗЕР АНРГУ, Центр Геномных Технологий



5) Неспецифичные сигналы: Импульсы



Импульсы в обработанных и исходных данных:

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

Совет:

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

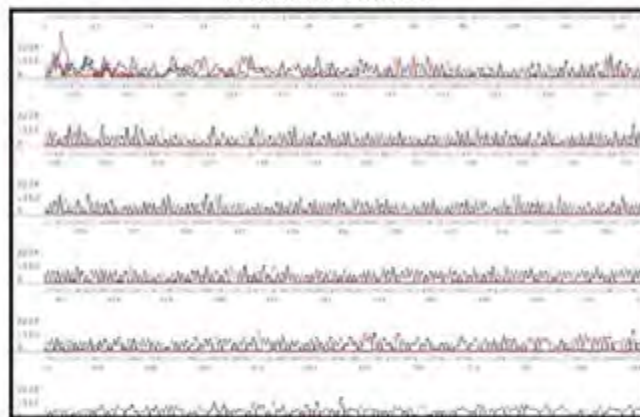
63

© 2009 Институт Генетики и ЗЕР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий.



GC motif

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



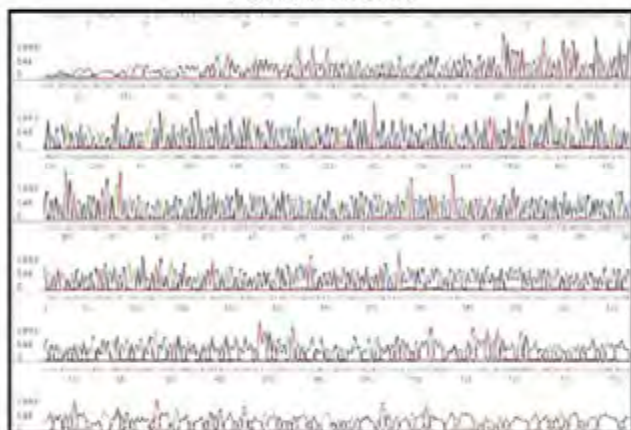
Слабый сигнал необходимо увеличить Ready reaction mix

64

© 2009 Институт Генетики и ЗЕР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий.



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



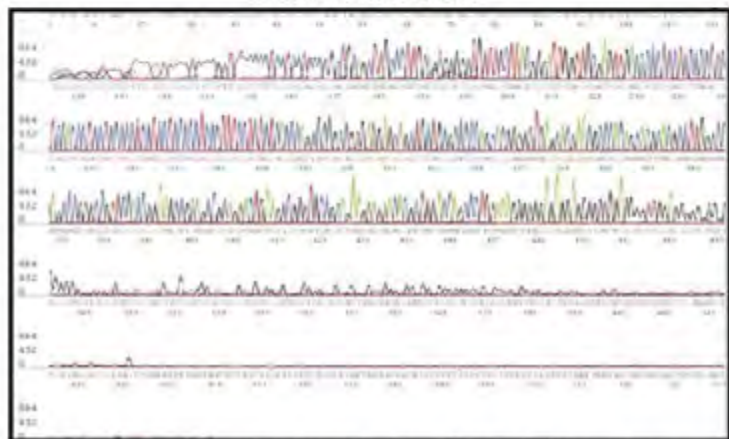
Кол-во реакционной смеси добавлено согласно протоколу

85

© 2009 Институт Генетики и ИБР АН РУС, 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

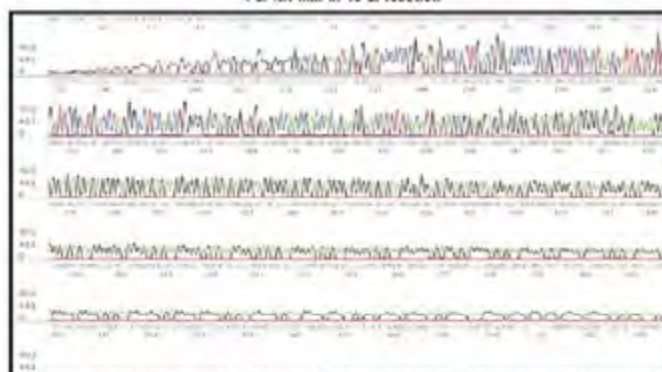
86

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



G motif

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



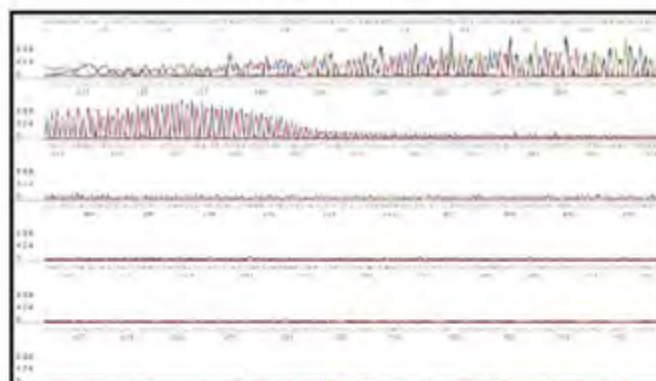
Изменение реакционной смеси
1/2X разведение BigDye® Terminator v3.1/dGTP BigDye® Terminator v3.0

67

© 2009 Институт Генетики и ЗВР АБГУС, Центр Геномных Технологий



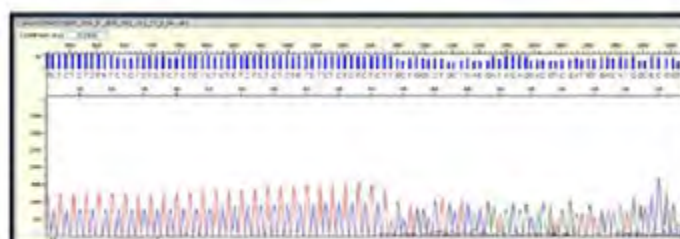
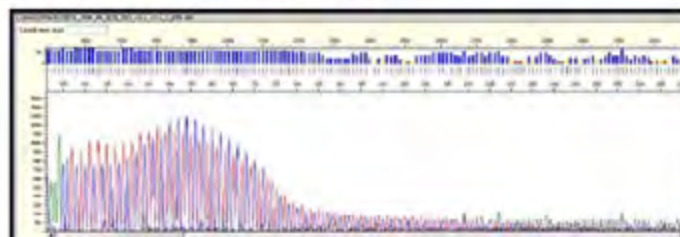
~100 Base CT Repeat
BigDye® Terminator v3.1
4 of RR mix in 10 of reaction



CT повторы не читаются при стандартной реакции

68

© 2009 Институт Генетики и ЗВР АБГУС, Центр Геномных Технологий



Проблему чтения сложных регионов можно преодолеть изменив место посадки праймера

60

© 2009 Applied Biosystems a DIBO ABQCS, Центр Генетических Технологий



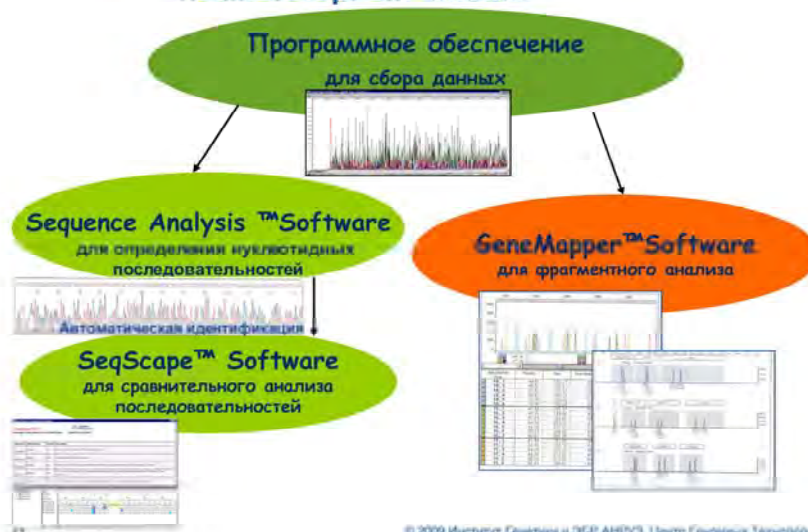
Sequence Context	Recommendation
polyA and polyC	BigDye® Terminator v3.1
polyT	ABI PRISM® 3730/3730XL Terminator, F3
polyG	BigDye® Terminator v3.1 and primer design
AT and AC rich	BigDye® Terminator v3.1
GA repeats	BigDye® Terminator v3.1/GTP BigDye® Terminator v3.0 BLEND
GA rich	v3/GTP BigDye® Terminator v3.0, BigDye® Terminator v3.1/GTP BigDye® Terminator v3.0 BLEND
GT repeats	BigDye® Terminator v3.1/GTP BigDye® Terminator v3.0 BLEND
GT rich	F3, F3
GC rich	BigDye® Terminator v3.1
GC rich	BigDye® Terminator v3.1
GC repeat (CGG, GGC)	F3, F3
hairpins	BigDye® Terminator v3.1, adjust depth
secondary structure	modify cycling conditions

70

© 2009 Applied Biosystems a DIBO ABQCS, Центр Генетических Технологий



Компьютерный анализ



СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ

Охрана труда и техника безопасности в научных лабораториях Центра Геномных Технологий

Мавлянов Г.Т.,

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 обращаются 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 азидов 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/закорковывание 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, ацетилендами, а также с металлорганическими веществами содержащими щелочные, щелочноземельные металлы, алюминий должна проводится 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 сильнораздражающим (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 международная организация труда

21 июня 1934 г. N 42 (ТП 97-3)

О безопасности при использовании химических веществ на производстве.

Конвенция международная организация труда 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; б) информацию, содержащуюся на этикетках и маркировках; в) доступ к картам данных по безопасности химических веществ; г) 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.

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ
в научных лабораториях Центра Геномных
Технологий

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



ПРАВА И ОБЯЗАННОСТИ СОТРУДНИКОВ**КОНВЕНЦИЯ МЕЖДУНАРОДНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ТРУДА
25.09.1990/N 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:
 - а) информацию о характере используемых на вредных веществ и о мерах предосторожности;
 - б) информацию, содержащуюся на этикетках и маркировках;
 - в) 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, туберкулеза ...)

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.,
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

5' end 3' end

Phosphate-deoxyribose backbone

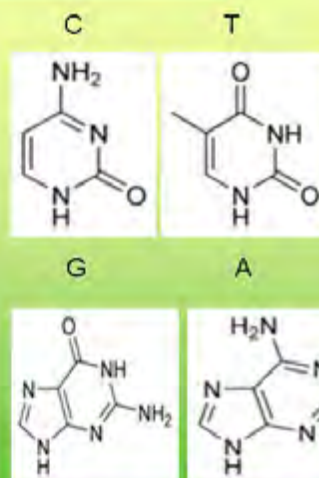
Adenine Thymine

Guanine Cytosine

C T

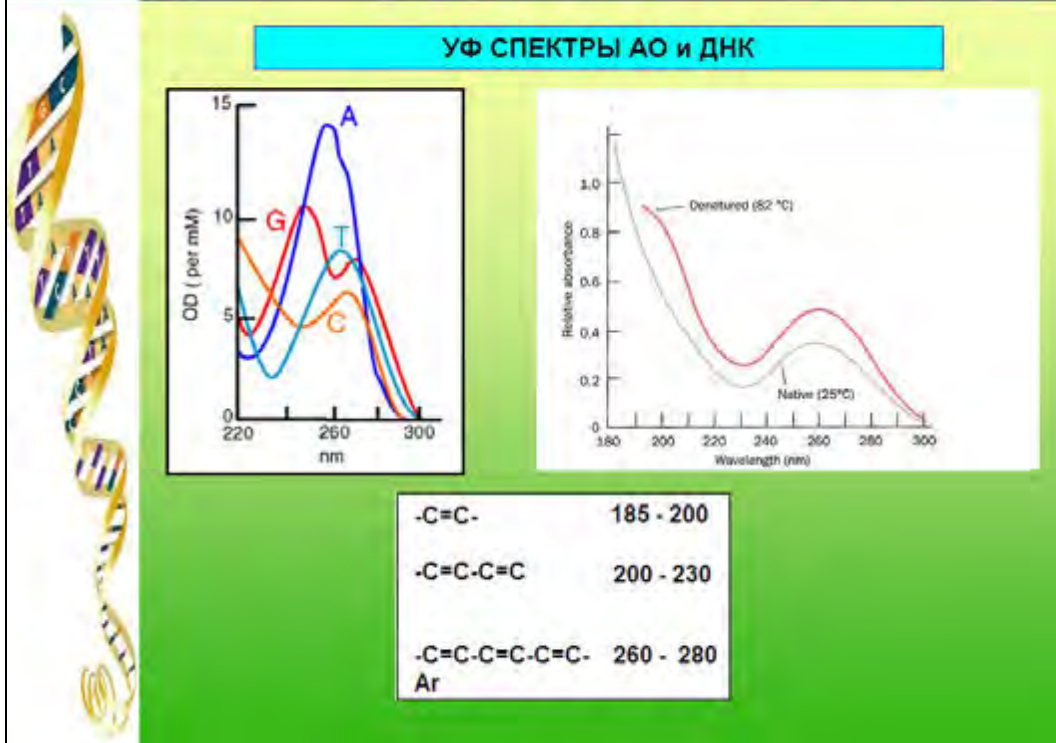
G A

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



Практическое занятие по подготовке биологического материала, выделению ДНК из клеток бактерий и выделению ДНК из растений

*Эгамбердиев Ш.Ш.,
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 желательнее 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 добавляется 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 10хСТАБ/NaCl (0.7М 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 высокосолевого буфер ТЕ (1М NaCl 10мМ Трис, 0.1М 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.,
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.

Оборудование и другие необходимые материалы для выделения ДНК

1. Пипетки
2. Центрифуга
3. Водяная баня
4. Пробирки
5. Наконечники
6. Пестики и ступки
7. Морозильник
8. Миксер
9. Штативы для пробирок
10. Вытяжной шкаф



Теоретические основы метода ПЦР анализа
Абдуллаев А.А.,
Центра Геномных Технологий ИГиЭБР



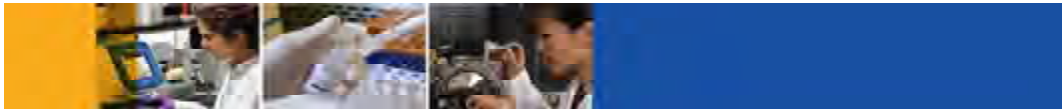
Теоретические основы метода ПЦР

Докладчик: к.б.н.Абдуллаев А.А.
Институт генетики и ЭБР АН РУз

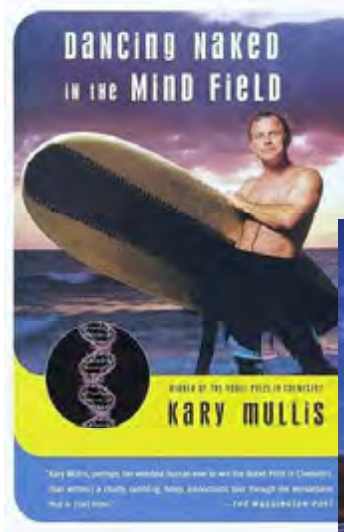


Метод ПЦР

- - История ПЦР
- - Оборудование
- - Компоненты реакции
- - Условия термоциклирования
- - Особенности дизайна праймеров
- - Оптимизация реакции, выявление и устранение проблем

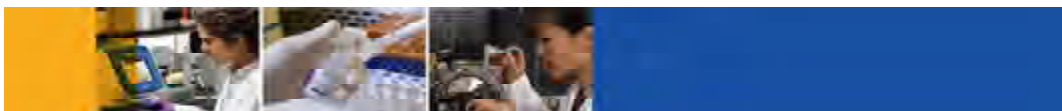


Полимеразная Цепная Реакция



3

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



История ПЦР



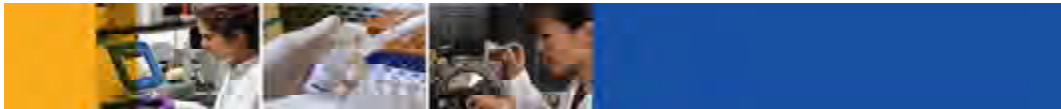
Gobind Khorana



Kary Mullis

4

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



История ПЦР

- Вначале для постройки цепи использовали **полимеразу Клёнова** (*Klenow polymerase*).
- **Фрагмент Кленова** (англ. *Klenow fragment*) — это большой белковый фрагмент, образующийся при ферментативном расщеплении **ДНК-полимеразы I** из *E. coli* протеазой. Открыта в 1970г.
- Полимераза Кленова термически нестабильна, каждый цикл приходилось добавлять снова. Максимальная длина амплифицированного фрагмента составляла всего 400 п.н.
- Имеет 5' → 3' полимеразную активность в сочетании с 3' → 5' экзонуклеазной активностью

5

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий

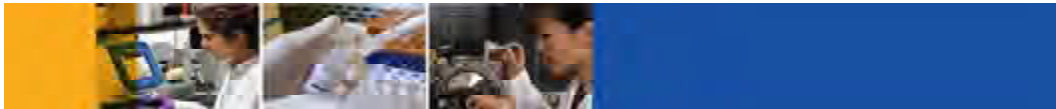


История ПЦР

- 1986г. - David Gelfand и Susanne Stoffel выделили термостабильную ДНК полимеразу (Taq) из бактерии (*Thermophilus aquaticus*) обитающей в горячих источниках.
- Taq-полимераза сохраняет свою активность при температуре от 50°C до 80°C. Период полураспада 9мин. при 97,5°C.
- Отсутствует 3' to 5' экзонуклеазная активность
- Вероятность неверной вставки основания 1 на 9,000 нуклеотидов
- Процессивность - более 2000 нуклеотидов за 1мин при 72°C
- Добавляет на 3' конец продукта один нуклеотид (в основном А)
- Журнал Science в 1989г. назвал Taq-полимеразу «Молекулой года»

6

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



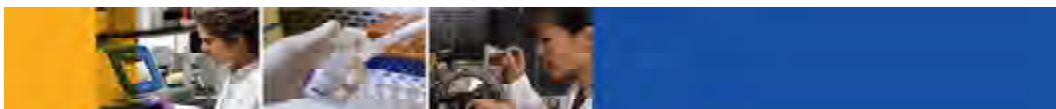
Оборудование для проведения ПЦР

- Термоциклер (ПЦР машина, ДНК амплификатор)
- Основа – термоблок на элементах Пельтье
- Управляющая электронная плата
- Вместимость от 2-х до 382 ячеек.
- Реакционный объем от 100мкл до 10мкл
- Алюминиевый блок или с золотым напылением
- Ввод информации напрямую либо с РС
- Вывод информации на табло либо на монитор РС

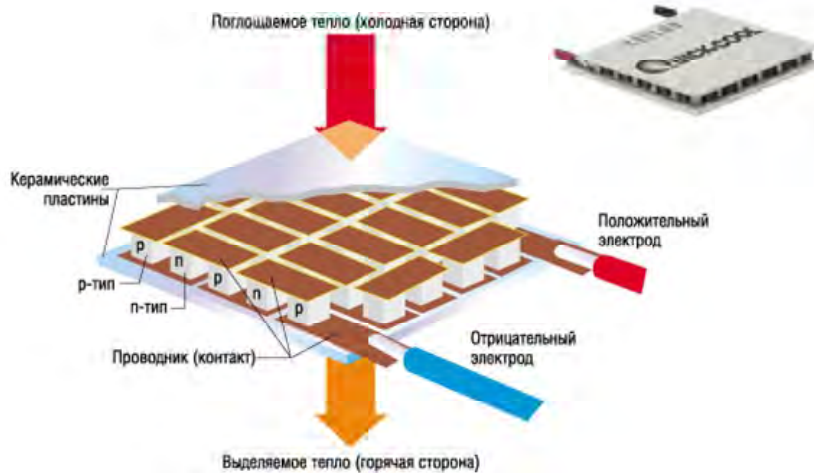


7

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий

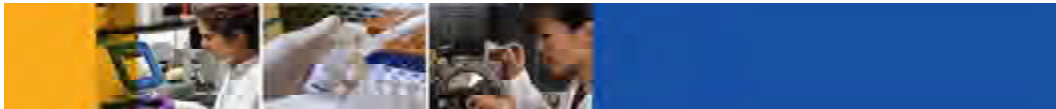


Элемент Пельтье

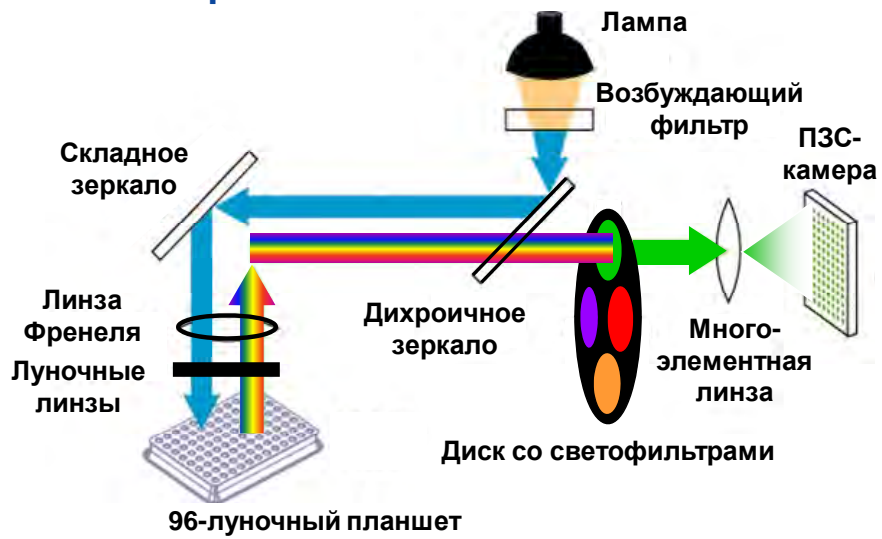


8

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



Система детекции в инструменте ПЦР в реальном времени



9

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



Оборудование (примеры)



ABI 2720



ABI 9700



Veriti



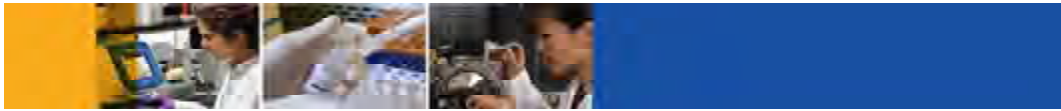
ABI 7500 – Real time PCR

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



Компоненты ПЦР (конечные концентрации)

- Буфер для проведения реакции
(10X ПЦР буфер (500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl (pH 8.3); 15 mM MgCl₂))
- Термостабильная ДНК-полимераза (1.25 U)
- Дезоксинуклеозид трифосфаты (dNTPs) 10mM каждый
- Праймеры (от 0.1 μM до 1 μM каждого)
- ДНК-матрица (1-100нг)
- Вода
- Добавки (опционально)
- Реакционный объем от 5 до 100мкл



Компоненты ПЦР

ПЦР буфер (конечная концентрация)

Стандартный буфер содержит:

1. 50 mM KCl
2. 10 mM Tris.HCl (pH 8.3)
3. 1.5mM MgCl₂

13

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий

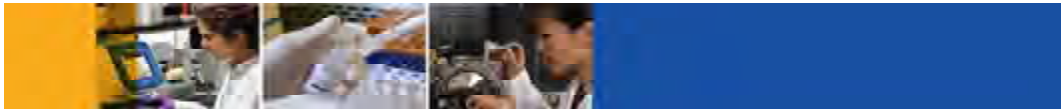


Компоненты ПЦР

- **Tris-HCl** – необходим для поддержания проведения реакции при pH 8,3
- **KCl** – для усиления амплификации фрагментов в диапазоне от 100bp до 1000bp
- Иногда рекомендуется использовать высокую концентрацию (70mM-100mM) для амплификации коротких фрагментов.
- При высокой концентрации длинные фрагменты денатурируют хуже и короткие фрагменты амплифицируются эффективней.
- Концентрация соли выше 50mM может ингибировать полимеразу

14

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



Компоненты ПЦР

- **Mg²⁺** - образует комплекс с одноцепочечной ДНК и является кофактором активности полимеразы.
- Помогает связываться праймерам с матрицей.
- Низкая Mg²⁺ концентрация приводит к отсутствию амплификации (фрагмента).
- Высокая Mg²⁺ концентрация приводит к образованию неспецифических фрагментов (продуктов ПЦР).

15

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



Компоненты ПЦР

Полимераза

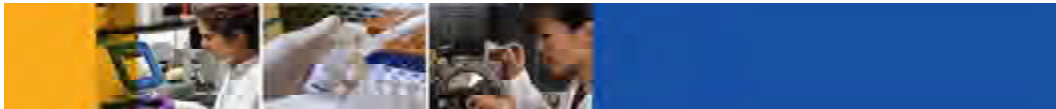
В зависимости от цели эксперимента используют различные ДНК полимеразы

- **Тaq-полимераза** обладает 5'-3'- экзо активностью, отсутствует эндонуклеазная и 3'- 5' экзо активность. Добавляет А на конце. Не обладает высокой точностью чтения. Высокая скорость постройки цепи >2000нт за 1 мин.
- **Pfu –полимераза** (*Pyrococcus furiosus*) обладает 3' - 5'экзо активностью. Обладает высокой точностью чтения (1 на 1.3млн нуклеотидов). Низкая скорость 1000нт за 2мин.

Эти две полимеразы можно объединять, чтобы постройка шла быстрее, а ошибок было меньше

● 16

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



Компоненты ПЦР

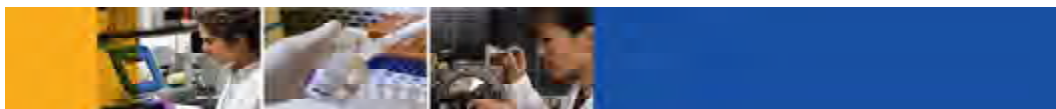
Добавки

- **DMSO** (5-10%), **глицерин** – в концентрации 2-10% позволяет лучше амплифицировать трудные матрицы (GC)
- Betaine моногидрат – трудные матрицы
- **Triton X-100, Tween 20** (0,5%) – неионные детергенты, стабилизируют ДНК полимеразу, ингибируют образование вторичных структур
- **TMAC** – в конечной конц. 15-100mM подавляет неспецифический отжиг праймеров
- **BSA** – используют при амплификации ДНК загрязненной ингибиторами, древней ДНК. Лучше чем ДМСО и глицерин.
- **2-пирролидон** - дает наибольший выход ПЦР продукта

Chakrabarti et al (Nucl. Acids Res. 2001 29: 2370-2376)

19

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



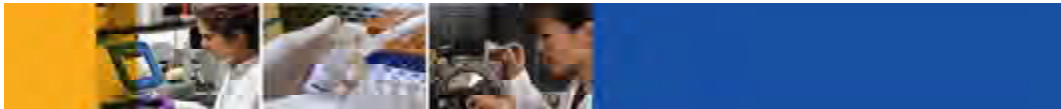
Компоненты ПЦР

Праймеры

- Фрагмент ДНК длиной от 10 до 50 нуклеотидов
- Оптимальный размер 18-25нт
- Могут содержать на 5` конце неспецифичную последовательность (адаптер, или сайт рестрикции), флуоресцентную метку .
- Температура плавления (T_m) 55°-72°C. $T_m = 4(G + C) + 2(A + T) °C$
- Температура отжига (T_a) на 5°C ниже T_m ($T_a = T_m - 5$) (оптимально 52-58)
- www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html
- T_a обоих праймеров не должна отличаться более чем на 5°C
- Должен иметь < 4 подряд идущих одинаковых нуклеотидов

20

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



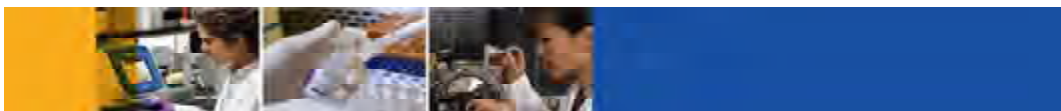
Компоненты ПЦР

Праймеры (продолжение)

- Не должен иметь повторы комплиментарные второму праймеру
- 3` праймера должен иметь до 3 GC (желательно)
- Содержание GC – 40-60%
- Проверить праймеры через BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- Для дизайна праймеров используйте специальные программы <http://molbiol-tools.ca/PCR.htm>

21

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



Праймеры Формирование структур типа шпилька, комплиментарность друг другу

```

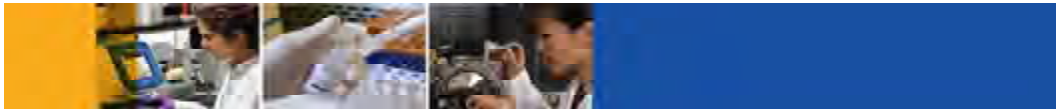
3' -GGTAAATAGATGGACATGGTGCA-5'
    |||||x|||x|||
5' -ТААССАССАТТСАТСААСС-3'

5' -ТТТАТТГАГАТАТАТТТГАСАТГСА-3'
    xx|||||x|||
3' -ССТГАССААТГТТАААСТТТАТА-5'
  
```



22

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий

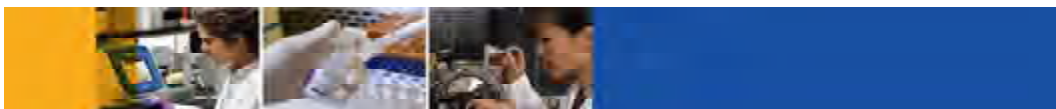


Параметры термоциклирования

- Денатурация – при нагревании водородные связи между двумя цепями ДНК разрываются, ДНК превращается в одноцепочечную и становится доступной для присоединения праймеров
- Отжиг - реакционная смесь охлаждается и праймеры связываются с комплементарными участками ДНК
- Удлинение – температура смеси поддерживается на уровне, оптимальном для эффективной работы полимеразы, происходит постройка цепи путем присоединения нуклеотидов к праймеру

23

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



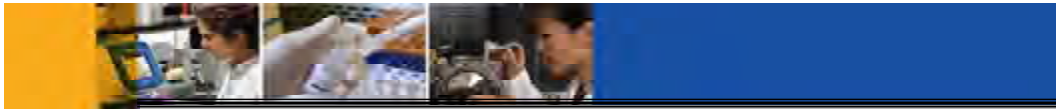
Параметры термоциклирования

Температурный режим (стандартный):

- Начальная денатурация - 95°C – 5мин.
 - Денатурация - 95°C – 1мин.
 - Отжиг - 55°C – 30сек.
 - Удлинение - 72°C – 30сек.
- } 25 – 35 циклов
- Достройка цепи - 72°C – 5мин.
 - Хранение - +4°C

24

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий

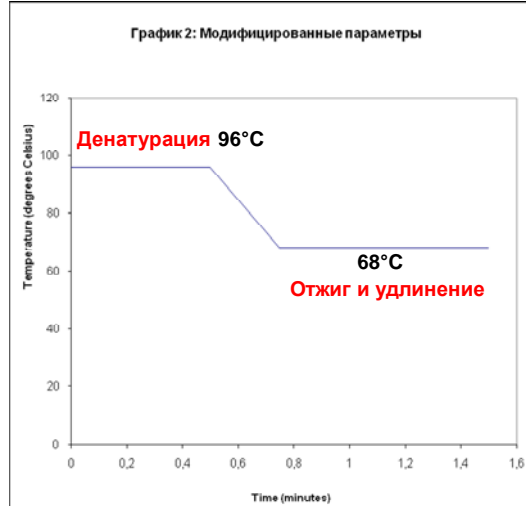


Параметры термоциклирования

Стандартный профиль ПЦР



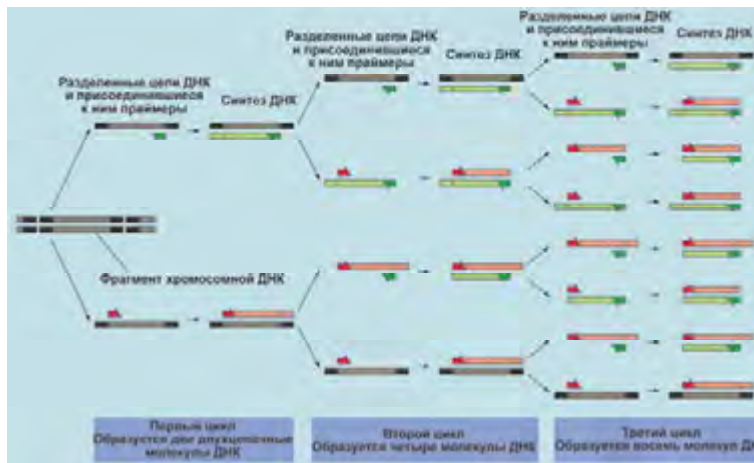
Модифицированный



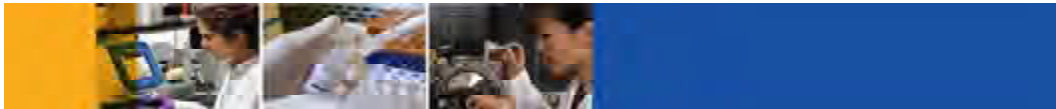
© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



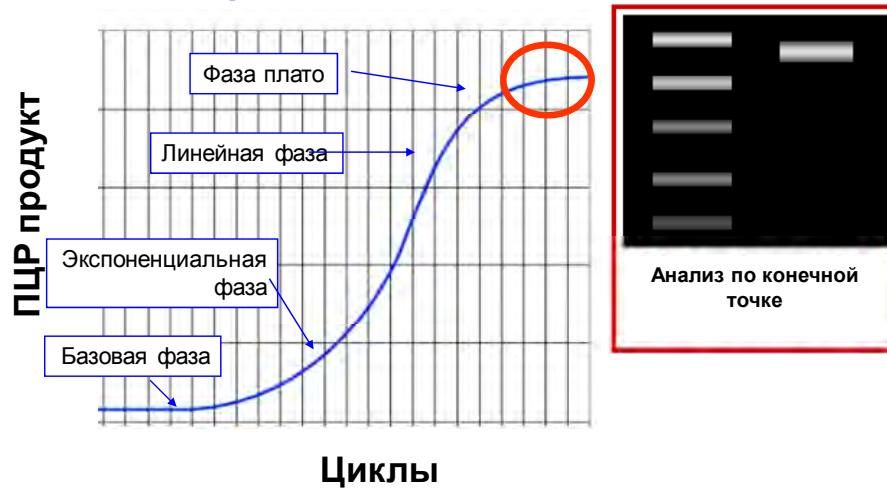
Аmplification фрагмента ДНК



Циклы	Копии
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1,024
11	2,048
12	4,096
13	8,192
14	16,384
15	32,768
16	65,536
17	131,072
18	262,144
19	524,288
20	1,048,576
21	2,097,152
22	4,194,304
23	8,388,608
24	16,777,216
25	33,554,432
26	67,108,864
27	134,217,728
28	268,435,456
29	536,870,912
30	1,073,741,824
31	2,147,483,648
32	4,294,967,296

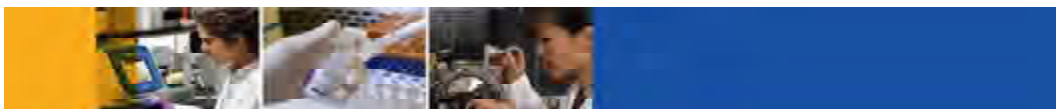


ПЦР Кривая Амплификации



27

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



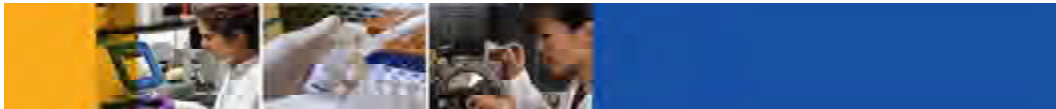
Оптимизация ПЦР

Соблюдение условий!

- Готовить аликвоты рабочих растворов
- Соблюдать условия хранения реактивов
- Не использовать просроченные реактивы
- Использовать одноразовые расходники
- Использовать стерильную деионизированную воду
- Использовать лед
- Отдельные дозаторы
- Отдельная комната
- УФ
- Добавлять полимеразу в мастер-микс последней
- Тщательно перемешать мастер-микс

28

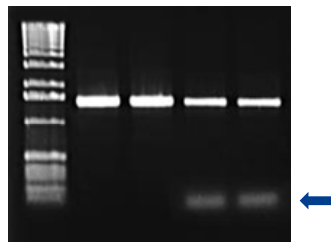
© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



Оптимизация ПЦР

Образование димеров праймеров

- Комплиментарные основания на 3` конце праймеров
- Избыток праймеров
- Снижение чувствительности ПЦР
- Снижение или отсутствие ПЦР продукта



29

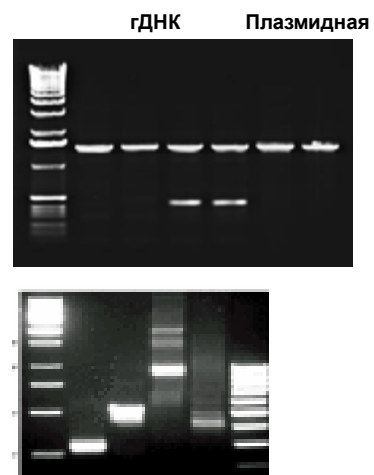
© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



Оптимизация ПЦР

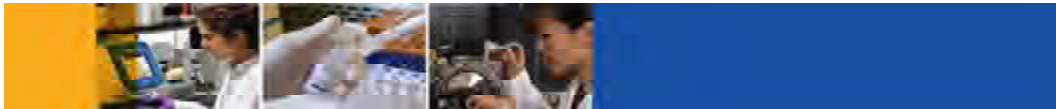
Неспецифические продукты ПЦР

- 3` конец праймера комплиментарен нескольким участкам геномной ДНК
- Проверить в BLSAT
- Подобрать другой праймер
- Изменить Ta
- Уменьшить время отжига
- Изменить конц. KCl и/или MgCl₂
- Добавить меньше полимеразы
- Touch down PCR
- На льду, полимеразу последней



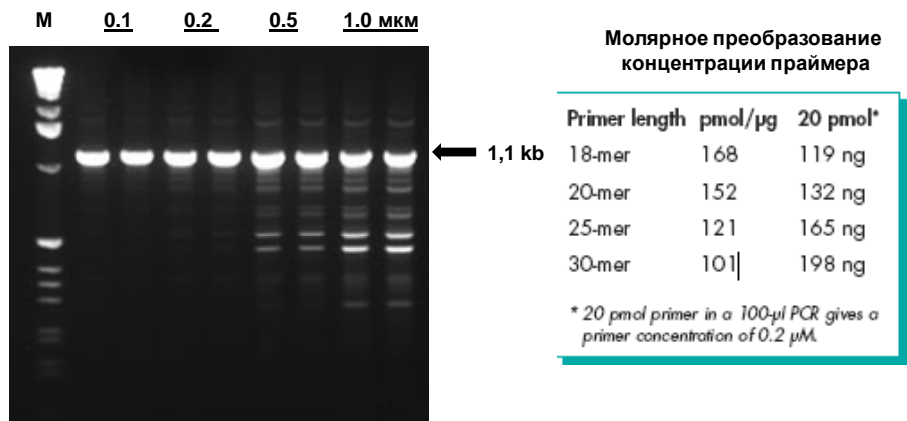
30

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



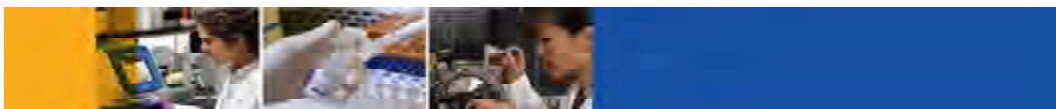
Оптимизация ПЦР

- Влияние концентрации праймера на образование неспецифических продуктов



31

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



Оптимизация ПЦР

Разведение праймеров (пример)

Seq #	Seq Name	Seq 5' to 3'	OD	pmol	Len	MW	μg	E260	Tm	Scale
0079	SAC208F	TAGGATGTTTGTCCGTGGGC	14.9	83014.69	19	5805.66	490.27	175486.3	60.16	50 pmol
0080	SAC341R	AACCCTTATGCCCTTCTCG	17.87	113200.46	19	5634.66	637.89	157850.4	60.19	50 pmol

Формула

$$X = \frac{MW/10}{(OD)(33)}$$

Пример для SAC208F

$$X = \frac{5905.88/10}{(14.9)(33)} = \frac{590.588}{491.7} = 1.20$$

Где X – фактор разведения

Для получения стокового 100 μM раствора просто делим 1000 мкл на X

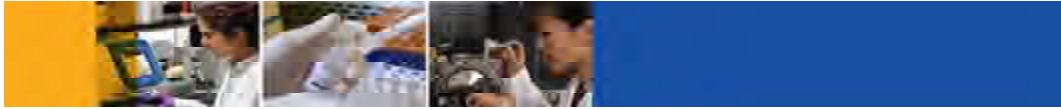
$$\frac{1000 \mu\text{l}}{1.20} = 833.3 \mu\text{L} \quad \text{Добавляем 833,3 } \mu\text{L TE бифера или воды}$$

Разводим аликвоту стокового раствора в 10 раз для получения 10 μM рабочего раствора

Конечная концентрация праймера в реакции от 0.1 μM до 1 μM

32

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



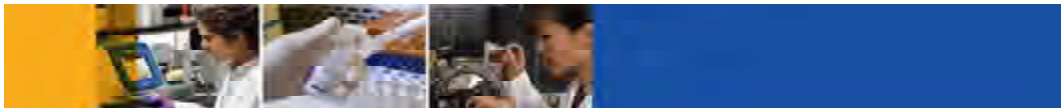
Оптимизация ПЦР

Отсутствие продукта или его малый выход

- ДНК плохого качества (контаминация, фрагментация)
- Очень мало ДНК
- Слишком много ДНК
- Проблема с одним из компонентов реакции
- Проверить ДНК, сделать разведение
- Проверить праймеры
- Проверить амплификатор
- Проверить дозатор (откалибровать)
- При постановке эксперимента, а также при решении проблем всегда ставить контроли!!!

33

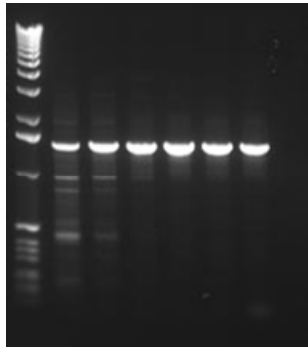
© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



Оптимизация ПЦР

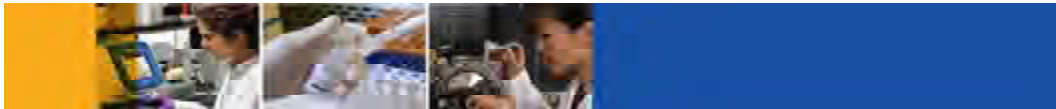
- Влияние температуры отжига на ПЦР

50 52 54 56 58 60 °C



34

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



Оптимизация ПЦР

Концентрация ДНК



35

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий



Оптимизация ПЦР

Время удлинения цепи



36

© 2009 Институт Генетики и ЭБР АНРУЗ, Центр Геномных Технологий

Спасибо за внимание!



Принципы электрофореза

Кушанов Ф.Н.,

Центра Геномных Технологий ИГиЭБР

материал представлен Одыловой А.Т.,

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 см² с⁻¹ в-1, 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 разливание 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 50°С 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 фикоил), 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 H₂O. 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.

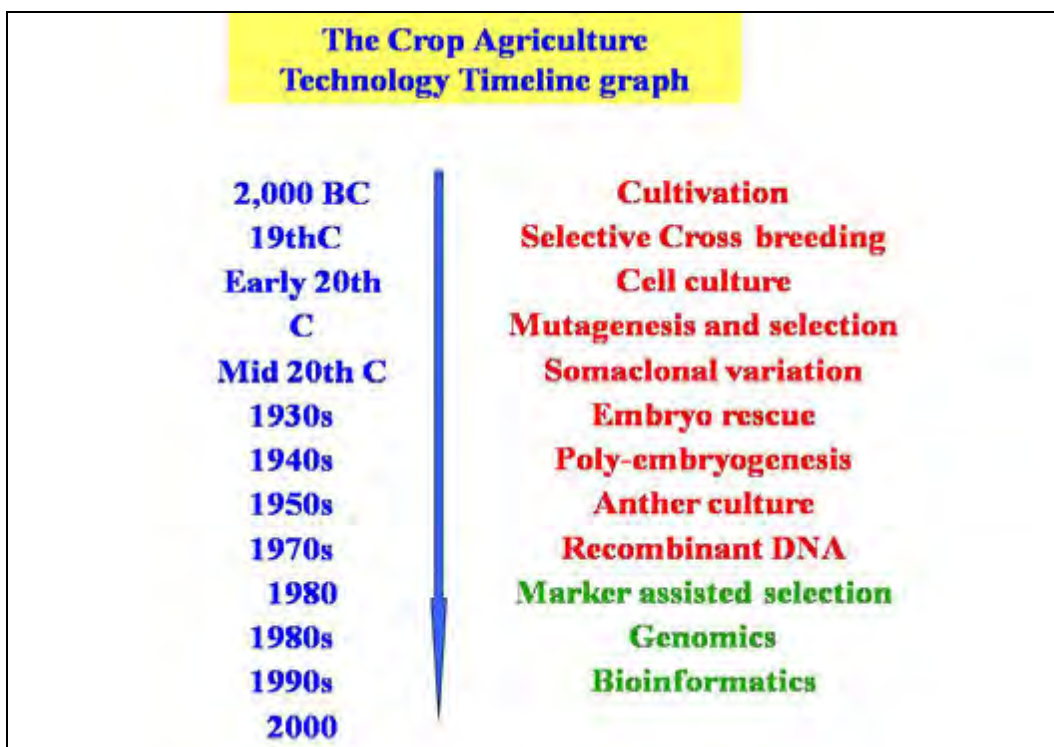
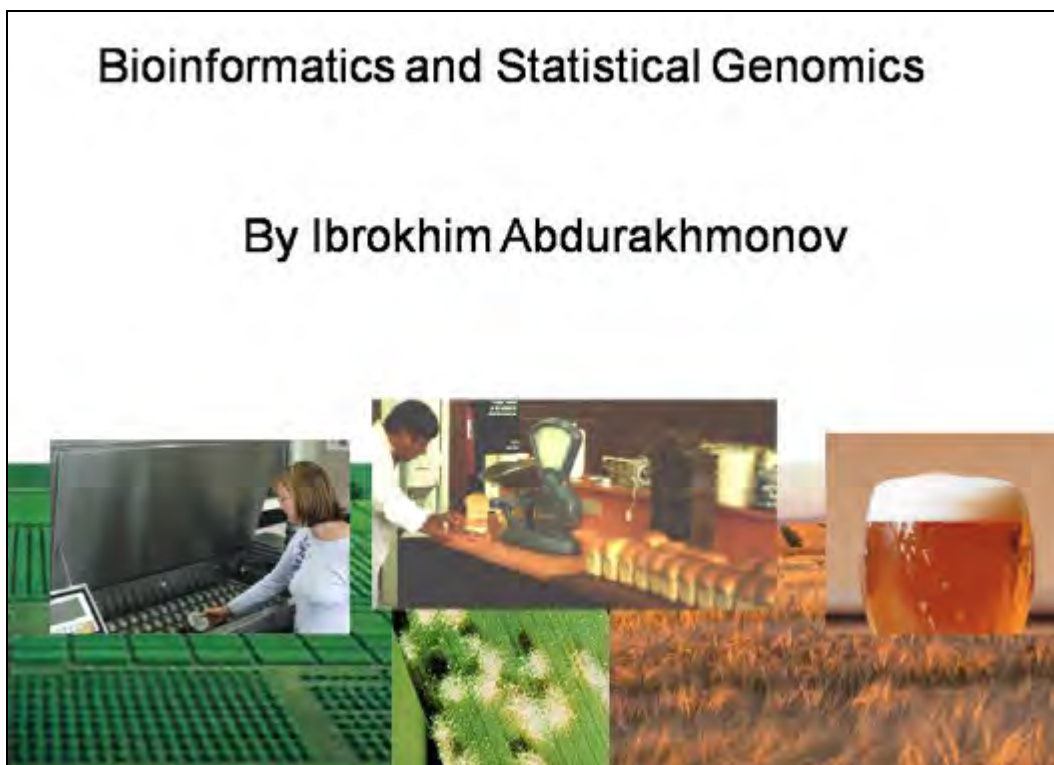
9. Пластинку агарозного геля осторожно вынимают из электрофорезной камеры и просматривают над (под) источником УФ-излучения. Бывает, что интенсивность флуоресценции ДНК очень низкая и полосы ДНК на геле плохо просматриваются. Это может быть вызвано очень маленькой концентрацией ДНК, флуоресцирующего 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^M3400.

Биоинформатика и компьютерные программы для анализа геномного материала (основы). Статистический анализ. Генетическое расстояние, сцепление генов qtl анализ Id (linkage disequilibrium) анализ. Биоинформатические интернет ресурсы

Абдурахмонов И.Ю.,
 Центра Геномных Технологий ИГиЭБР



WHAT IS BIOINFORMATICS?

- Bioinformatics is the discipline that uses computers to store, retrieve, manipulate and distribute information related to biological macromolecules such as RNA, DNA and proteins
- Computational biology encompasses all areas of biology that involve computation
- Goal is to better understand a living cell and how it functions at a molecular level

WHERE IS IT NEEDED?

- **1. Development of computational tools and databases**
 1. Software for sequence analysis
 2. Sequence alignment, sequence database searching,
 3. motif and pattern discovery, gene and promoter finding,
 4. reconstruction of evolutionary relationships, genome
 5. assembly and comparison
 6. Software for structural analysis
 7. Protein and nucleic acid structural analysis, comparison,
 8. classification and prediction
 9. Software for functional analysis
 10. Gene expression profiling, protein-protein interaction
 11. prediction, protein sub-cellular location prediction,
 12. metabolic pathway reconstruction
 13. Construction and curation of biological databases

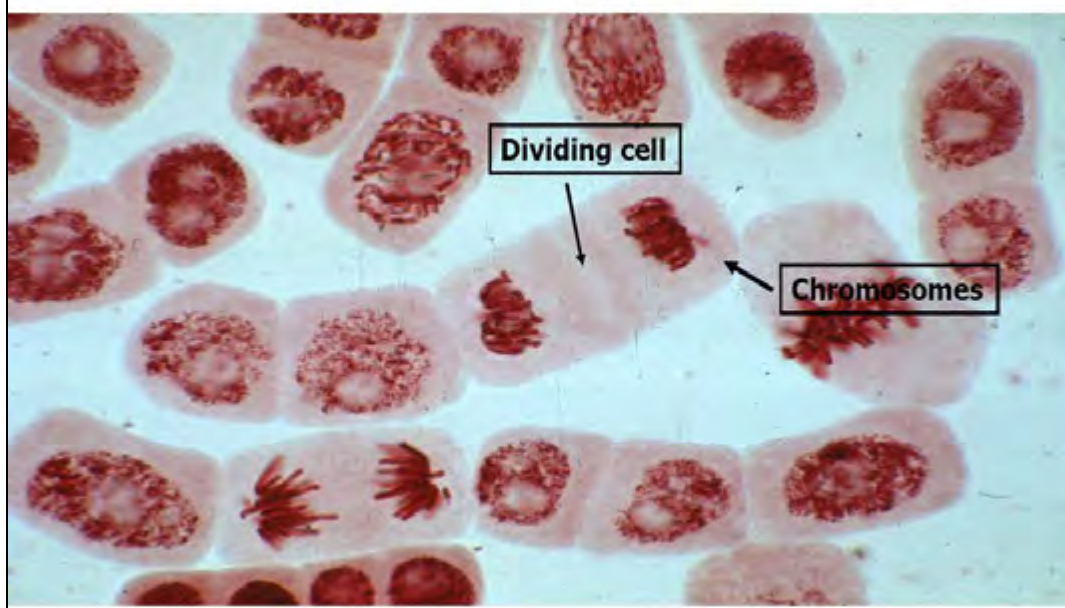
WHERE IS IT NEEDED?

- ② **2. Generate biological knowledge to better understand living systems**
 1. Often identify new problems that require new software to analyze
 2. Bioinformatics is essential for basic genomic and molecular biology research
 3. Major impact in biotechnology and biomedical sciences
 4. Knowledge-based drug design
 5. 3D structure allows design of ligands that fit
 - ⑥ Reduces time and cost to develop drugs
 7. Forensic DNA analysis
 - ⑥ Bayesian statistics and likelihood-based methods
 - ⑨ Personalised healthcare
 10. Agricultural biotechnology
 11. Plant genome databases
 12. Gene expression profiles
 13. New crop varieties

COMPONENTS

- ② **Computer Skills**
- ② **Biological Knowledge**
- ② **ENGLISH SKILLS!!!!!!!**

INFORMATION SOURCE FOR BIOINFORMATICS

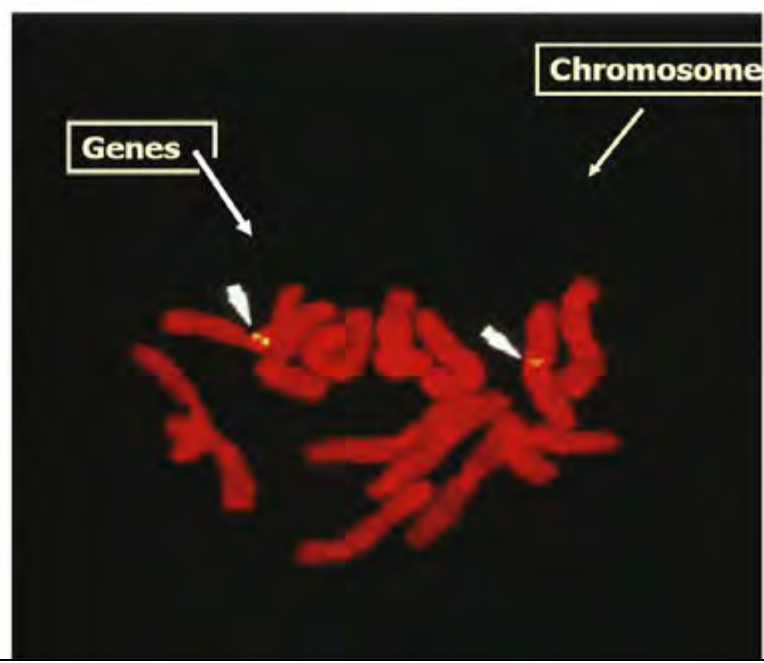


Dividing cell

Chromosomes

THAT IS GENOME

INFORMATION SOURCE FOR BIOINFORMATICS GENOME? GENOMICS?



Genes

Chromosome

GENOME=A HUGE INVISIBLE MOLECULAR BOOK LIBRARY with the structured catalogue system

Information in the wheat genome

...CTGACCTAATGCCGTA...

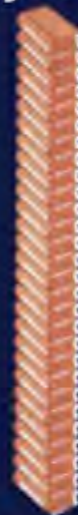


1700 books



1700 books

Hybridization or cross breeding of wheat



1700 books

(or 1.7 million pages)

of wheat

x



1700 books

(or 1.7 million pages)



1700 books

(or 1.7 million pages)

Random retention of information from each parent
No control over which books are next to each other

Table of contents for genes in wheat

...CTGACCTAATGCCGTA...



Genomics

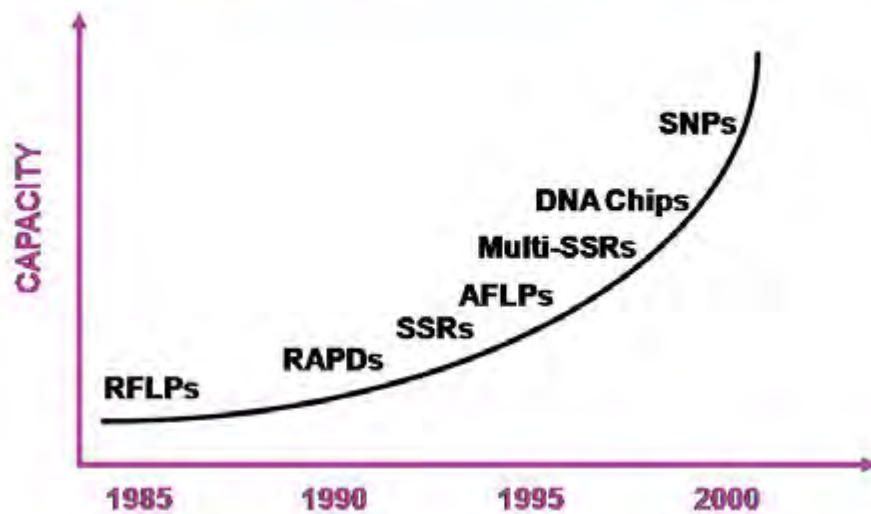
1700 books
(or 1.7 million pages)

Used for
Marker-
Assisted
Breeding

MOLECULAR MARKERS

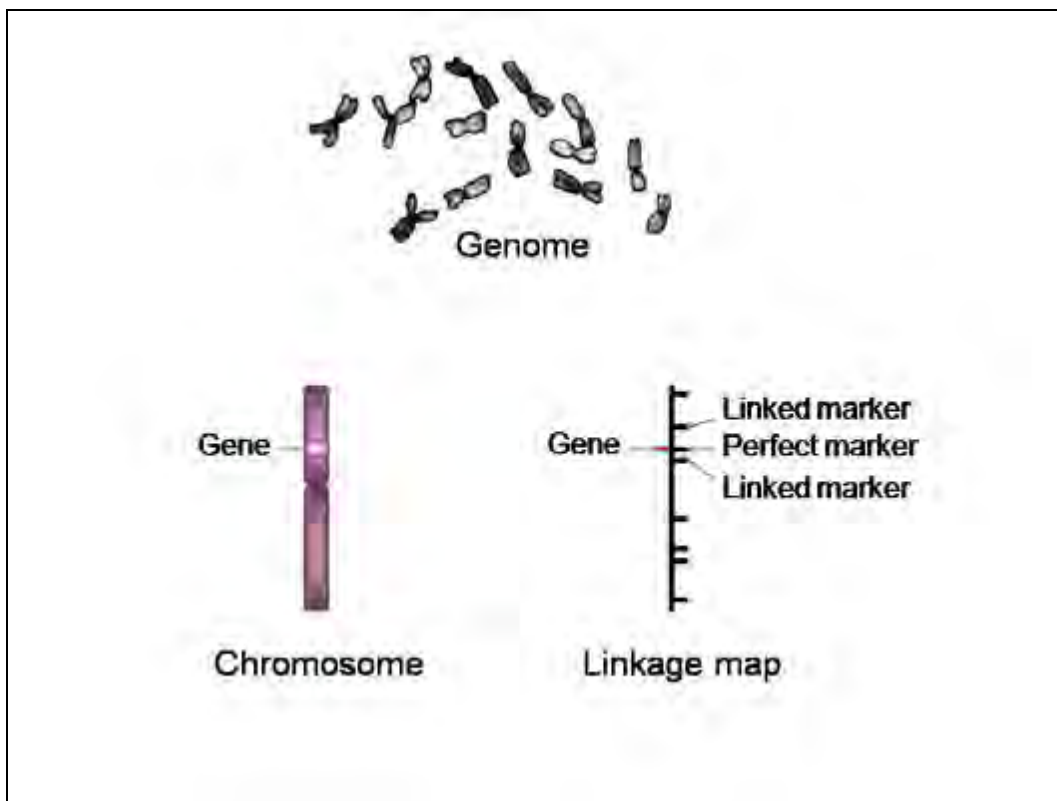
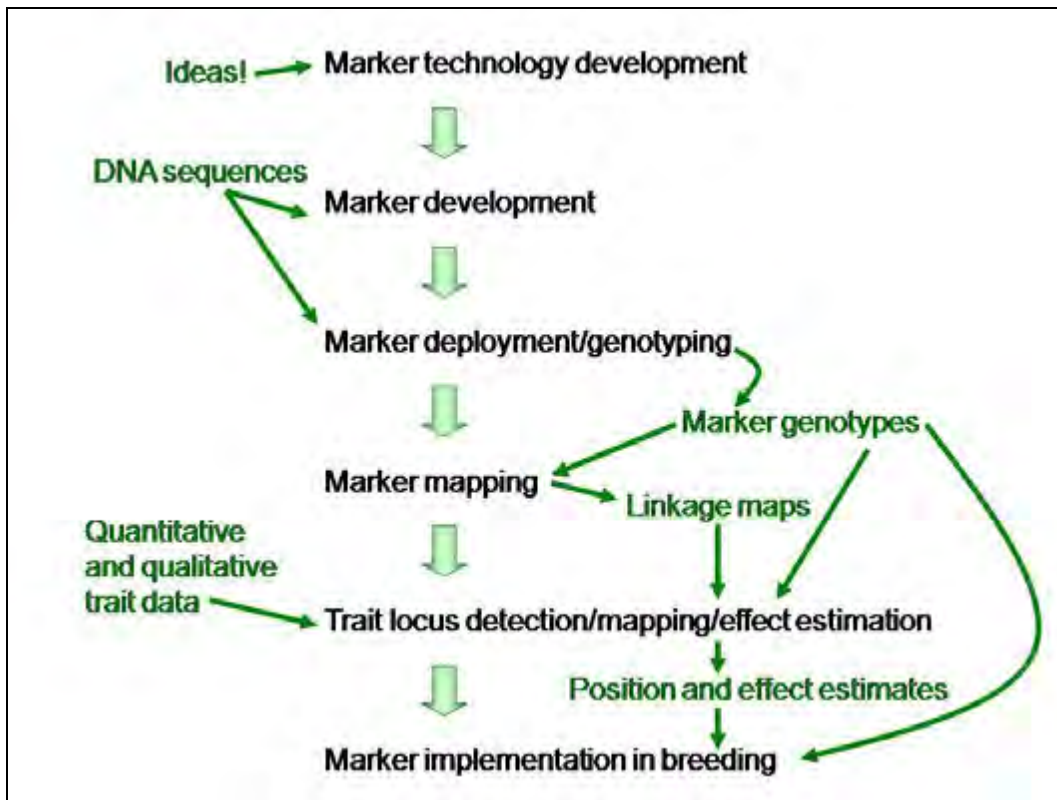
- ⊗ Based on **variation** in the DNA sequence
 - Single base mutation
 - Insertion / deletion
 - Rearrangement
- ⊗ Available in very large numbers
- ⊗ Not affected by the environment
- ⊗ Can be scored at any stage of development
- ⊗ Usually neutral
- ⊗ No interlocus interactions

ADVANCES IN MOLECULAR MARKERS . . .



APPLICATIONS OF MOLECULAR MARKERS

- **Genetic diversity and fingerprinting**
 - Relationships among germplasm
 - Genetic distances vs. heterosis
 - Varietal purity and identification
 - Phylogenetic relationships
- **Inheritance and mapping**
 - Simply inherited traits
 - Quantitative traits (dissection into QTL)
- **As selection tools: Marker-Assisted Selection**
 - Simple traits: line conversion (faster backcross)
 - Transfer of multiple genomic segments (QTL)
 - Pyramiding of genes
 - Trait introgression from exotic germplasm
 - Selection and manipulation of recessive alleles
 - Early selection
- **Marker-based gene identification and isolation**



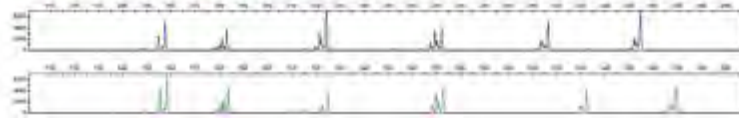
Molecular information (for multiplexed SSR markers)

Sequence information:

- simple sequence repeats
- primer sequences



Fragment length information



Marker genotype scores

- allele names (based on fragment length)
- scores indicating parental 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

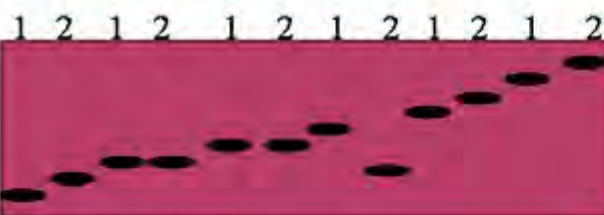
Molecular information (for multiplexed SSR markers)

Sequence information:

- simple sequence repeats
- primer sequences



Fragment length information



Marker genotype scores

- allele names (based on fragment length)
- scores indicating parental origin of alleles

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

1 (M) 2 (M) 3 (M) 4 (M) 5 (M) 6 (M) 7 (M)

A linkage map construction

The screenshot shows the JoinMap 7.1 software interface. The top part displays seven chromosomes (1-7) with various marker names and their positions. The markers are listed as follows:

- Chromosome 1: ABC158, ABC175a, ABC405, ABC151b, MWG2031, ABC310b, Vlp67, ABC401a, iAcp1, Cat3, MWG549a
- Chromosome 2: MWG655a, CS10054, B15c, ABC452, HVMKAD8, MWG703, ABC180, ABC177, MWG655b, ABC157, ABC166a, Pxt1, MWG549a
- Chromosome 3: ABC471, ABC462, P3R156a, ABC453, ABC459, Kgl:39M51.316, Kgl:39M54.104, ABC161, MWG592, ABC174, ABC156b, ABC165, E:08, ABC172
- Chromosome 4: HVM40, Ptp2, ABC1003a, MWG058, HVM004, ABC177
- Chromosome 5: kcat, ABC452, Kgl:39M5.9.222, MWG2943, Kgl:39M5.9.354, Kgl:39M5.1.88, MWG1003a
- Chromosome 6: ABC458, ABC165b, ABC175, Abv1, Kgl:39M48.4002, Kgl:39M48.258, MWG434, ABC451b, ABC165a
- Chromosome 7: m5ab, ABC217, m8awt, D962a, ABC203b, ABC150b

The software window includes a menu bar (File, Edit, Map, Options, Contact), a title bar (JoinMap 7.1), and a main text area with instructions and a 'New Features' section.

<http://www.kyazma.nl/index.php/mc.JoinMap/>

COMPLEX PEDIGREE & QUANTITATIVE TRAITS

QUANTITATIVE TRAIT

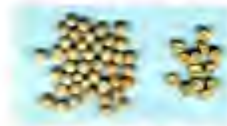
A biological trait that shows continuous variation rather than falling into distinct categories

Quantitative trait locus (QTL) - Genetic locus that is associated with variation in such quantitative trait

Trait information

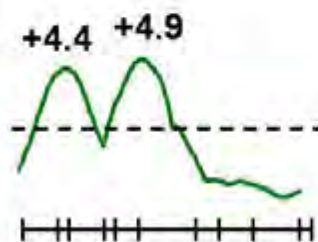
Qualitative observations

(e.g., resistant vs. susceptible; hard vs. soft)



Quantitative observations

(e.g., grain yield, stress tolerance, grain quality, disease severity)

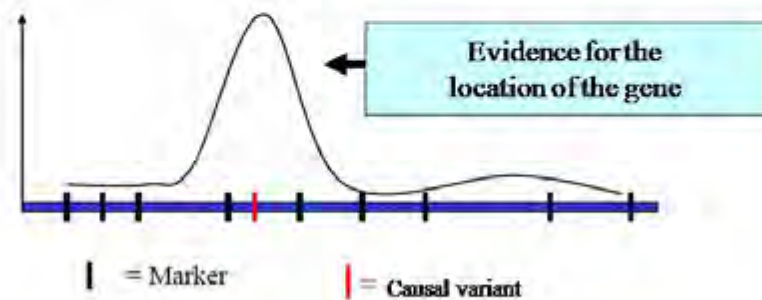


Map information

- Chromosome designators
- Marker and gene names
- Map distances
- Test statistics for quantitative traits
- Significance thresholds
- QTL position estimates
- QTL effect estimates

CONCEPT OF MAPPING

Identification of genetic variant underlying disease susceptibility or a trait value

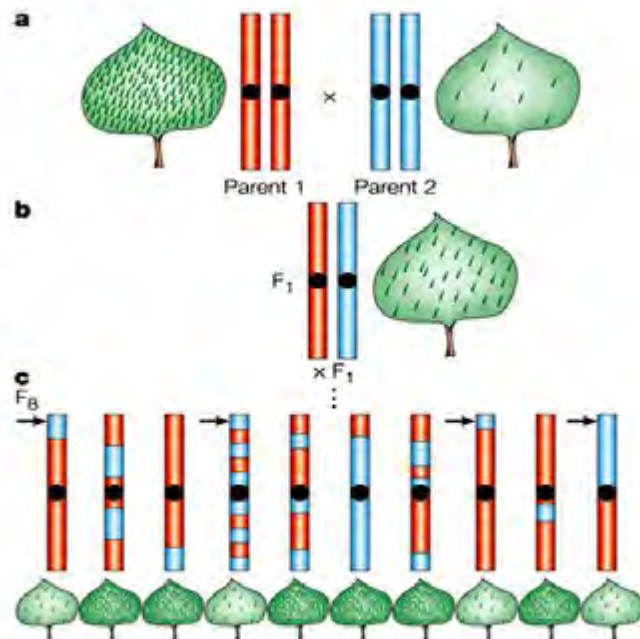


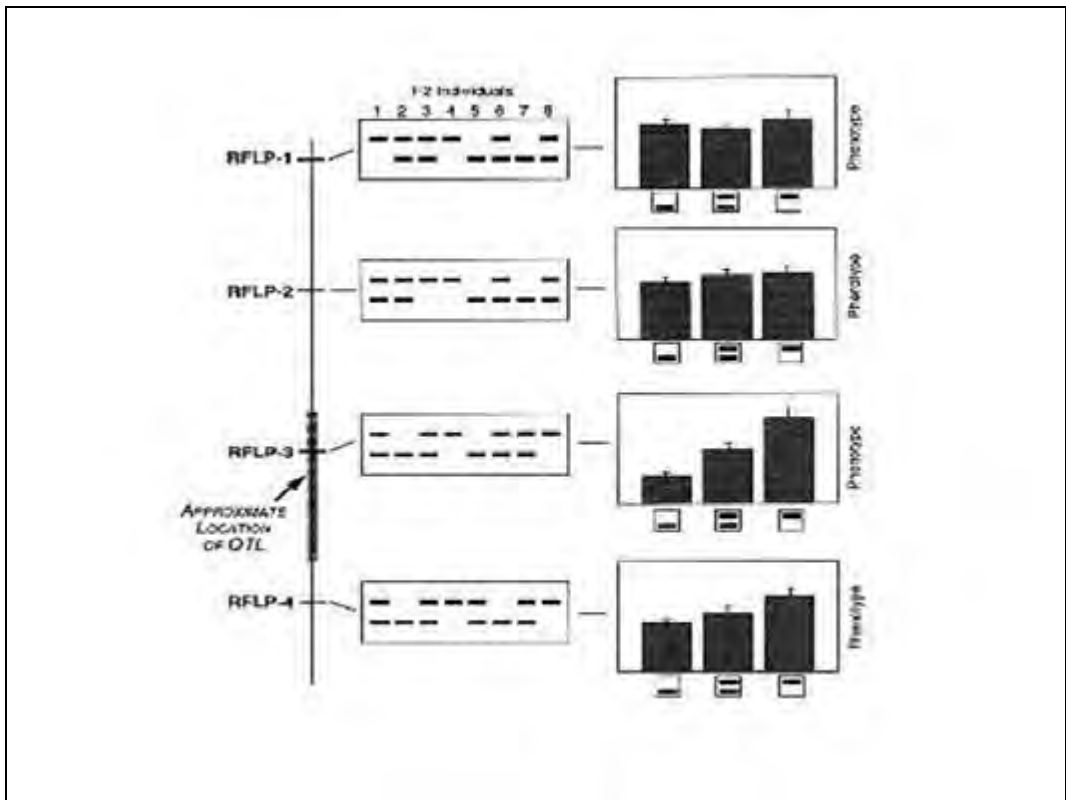
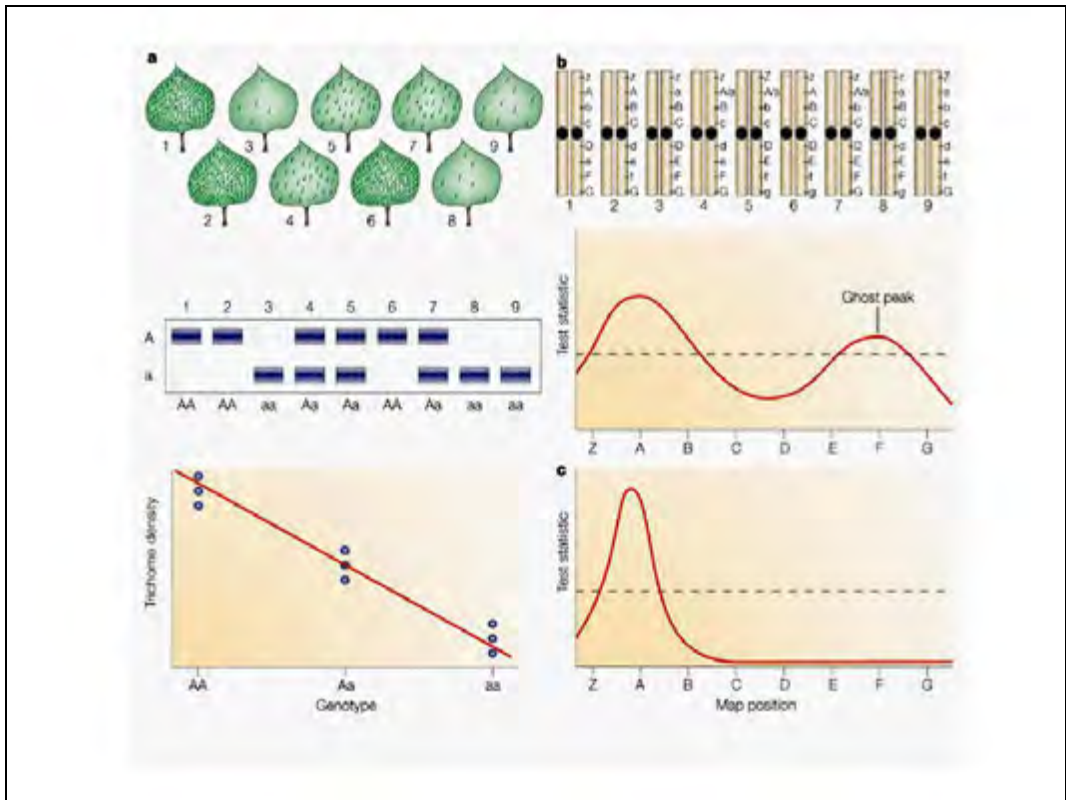
APPROACHES TO MAPPING

1. **Candidate gene studies**
 - Association
 - Resequencing approaches
2. **Genome-wide studies**
 - Linkage analysis
 - Genome-wide association studies (Linkage disequilibrium, LD mapping)

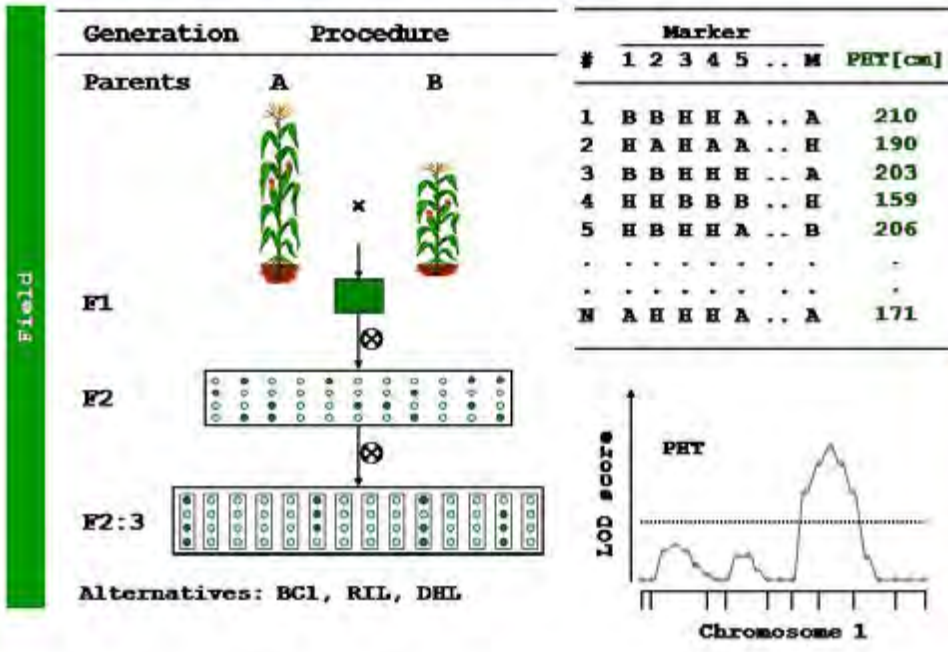
LINKAGE MAPPING

- ⊗ Look for marker alleles that are correlated with the phenotype within a pedigree
- ⊗ Different alleles can be connected with the trait in the different pedigrees





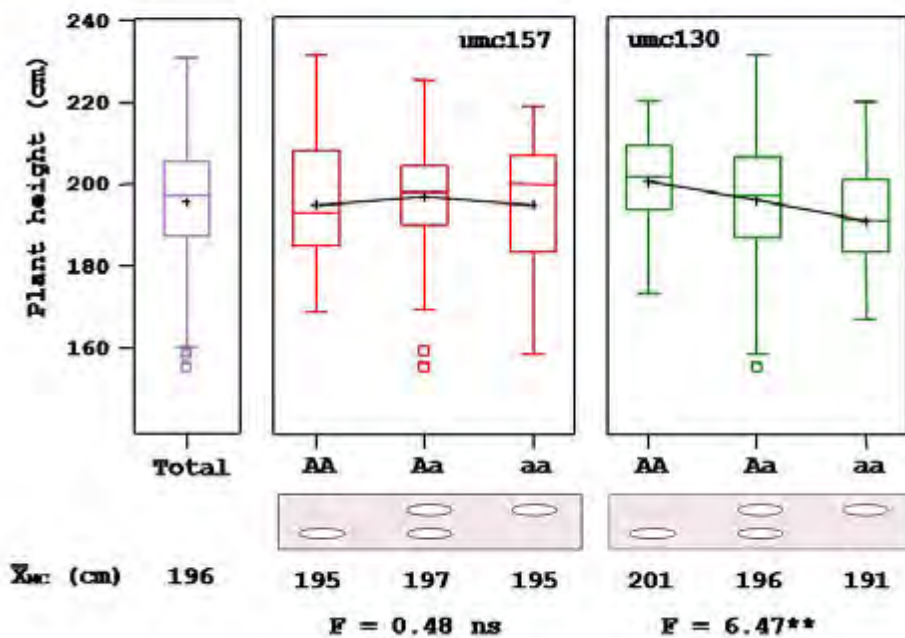
QTL Analysis: Concept



Laboratory

Office

QTL Analysis: Single Marker Analysis



ASSOCIATION MAPPING

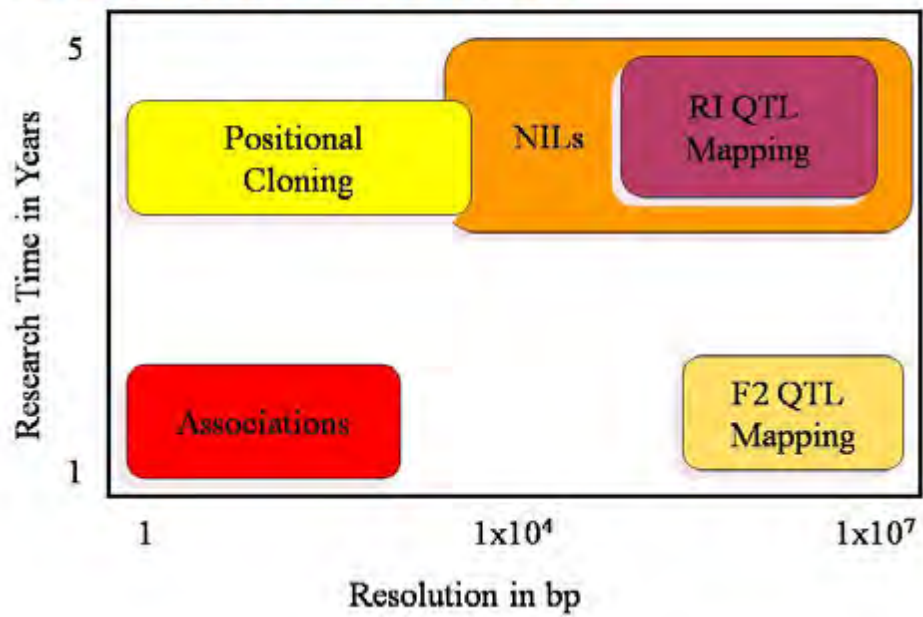
- ⊗ Marker alleles are correlated with a trait on a population level
- ⊗ Can detect association by looking at unrelated individuals from a population
- ⊗ Does not necessarily imply that markers are linked to (are close to) genes influencing the trait.

LINKAGE VS. ASSOCIATION

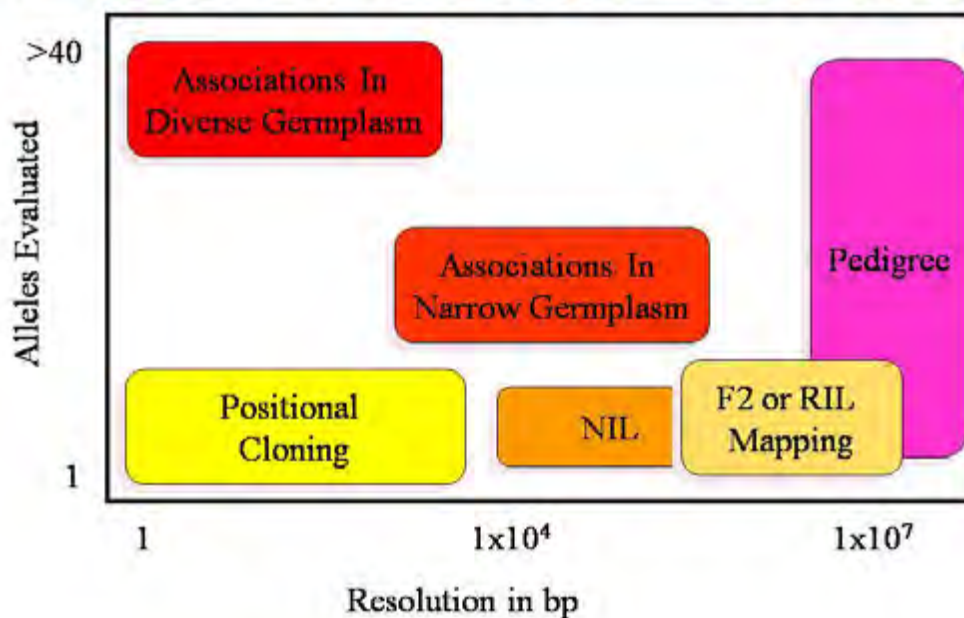
Potential Advantage	Linkage	Association
No prior information regarding gene function required	+	+
Localization to small genomic region	-	+
Not susceptible to effects of stratification	+	-/+
Sufficient power to detect common alleles of modest effect (MAFs > 5%)	-/+	+
Ability to detect rare allele (MAFs < 1%)	+	-
Tools for analysis available	+	+/-

Hirschhorn & Daly, Nature Rev. Genet. 2005

DISSECTING A QUANTITATIVE TRAIT: TIME VERSUS RESOLUTION





RESOLUTION VERSUS ALLELIC RANGE



ASSOCIATION TESTS

- ⊙ Evaluate whether nucleotide polymorphisms associate with phenotype
- ⊙ Natural populations
- ⊙ Exploit extensive recombination

A	C	G	A	G	1.3m	
A	C	G	A	T	1.4m	
A	T	A	A	G	1.5m	
C	T	A	G	T	1.8m	
A	T	G	G	T	2.0m	
A	T	G	G	G	2.0m	

Associations may result from

1. The locus is the cause of the phenotype



2. The locus is in linkage disequilibrium with the cause of the phenotype

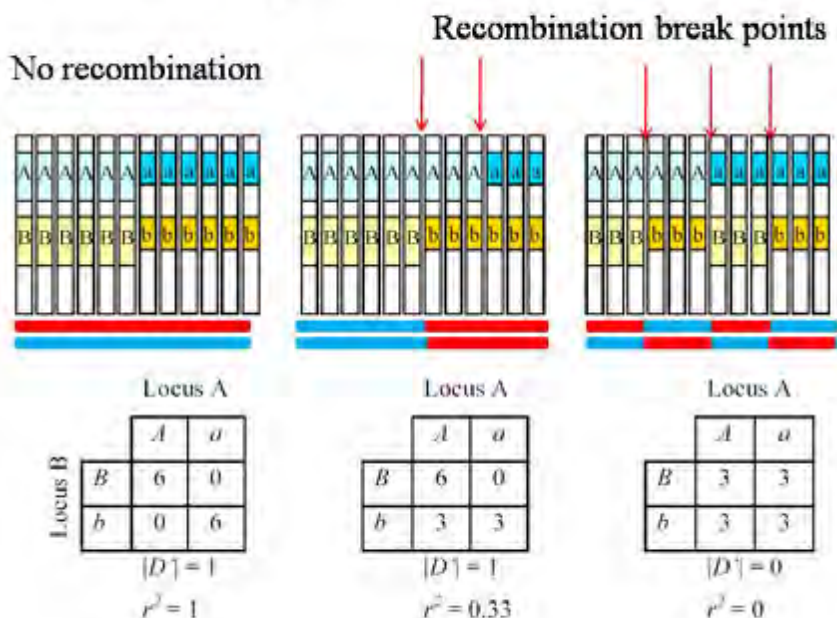


Linked and highly correlated

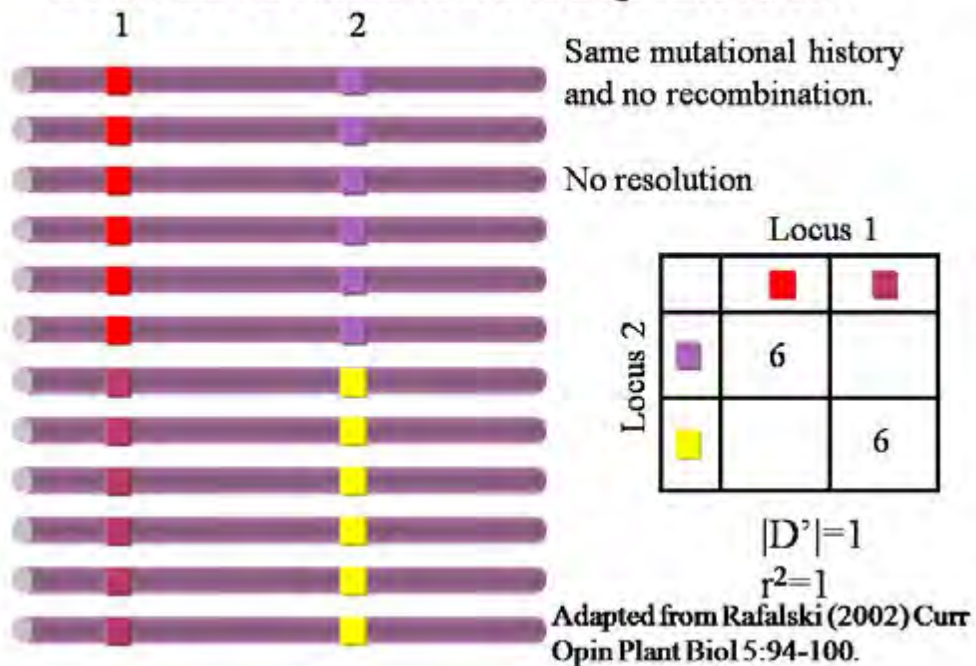
LINKAGE DISEQUILIBRIUM

- Non random association between alleles at different loci. Loci are in LD if alleles are present on haplotypes in different proportions than expected based on allele frequencies
- Two alleles that are in LD are occurring together more often than would be expected by chance

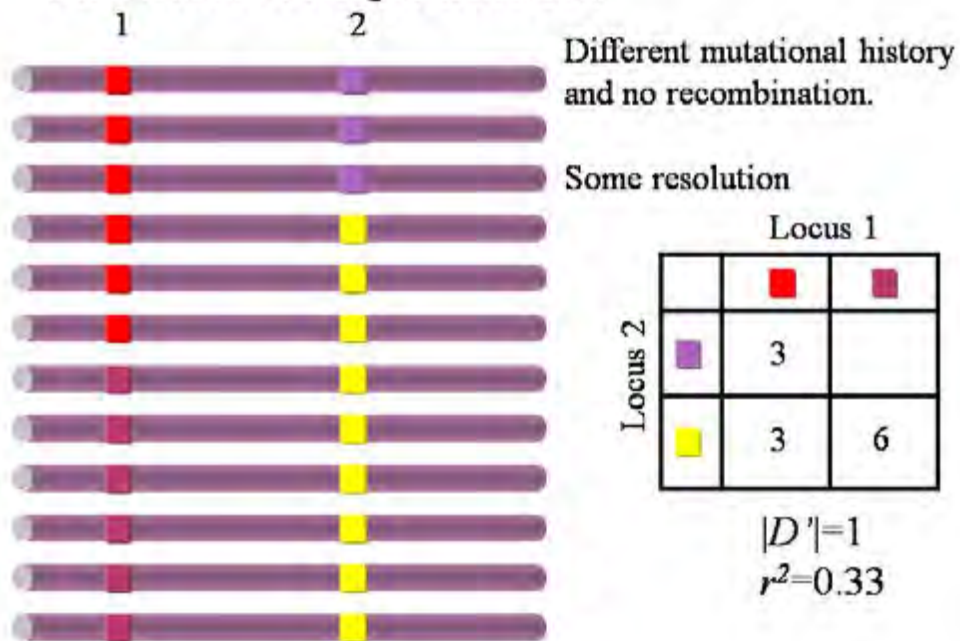
LINKAGE DISEQUILIBRIUM



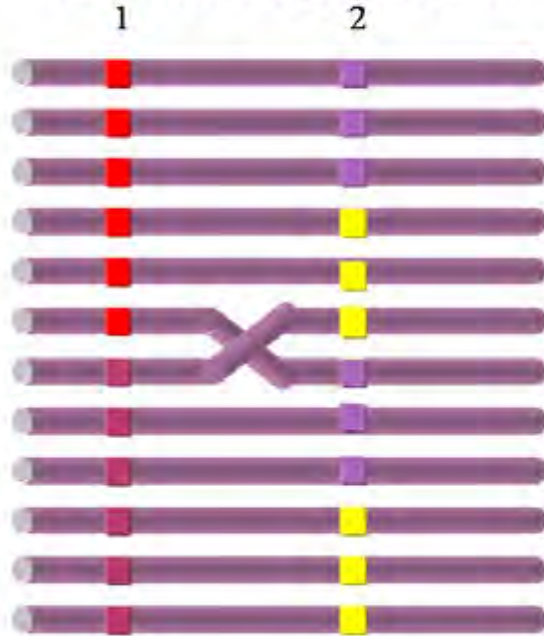
COMPLETE LINKAGE DISEQUILIBRIUM



LINKAGE DISEQUILIBRIUM



LINKAGE EQUILIBRIUM



Same mutational history
with recombination.

Resolution

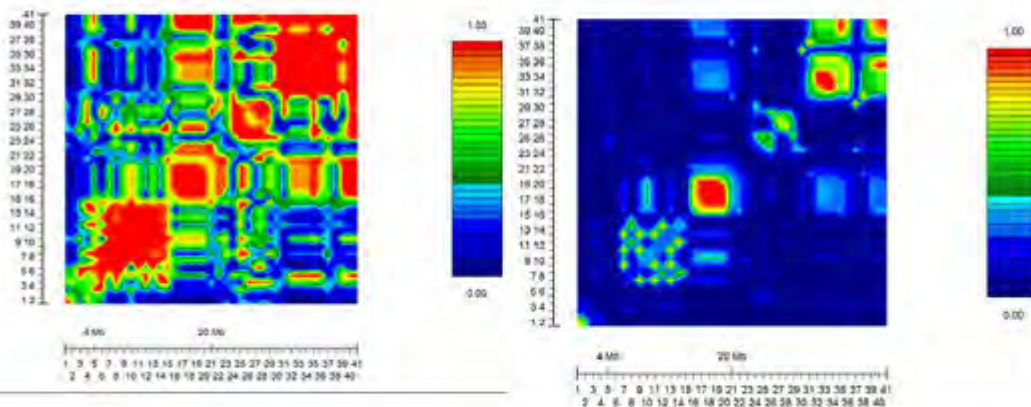
		Locus 1	
Locus 2		3	3
		3	3

$$|D'|=0$$

$$r^2=0$$

GOLD DISPLAY

Pairwise $|D'|$ and r^2 for 45 SNPs within a linked region



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

Decay of Linkage Disequilibrium

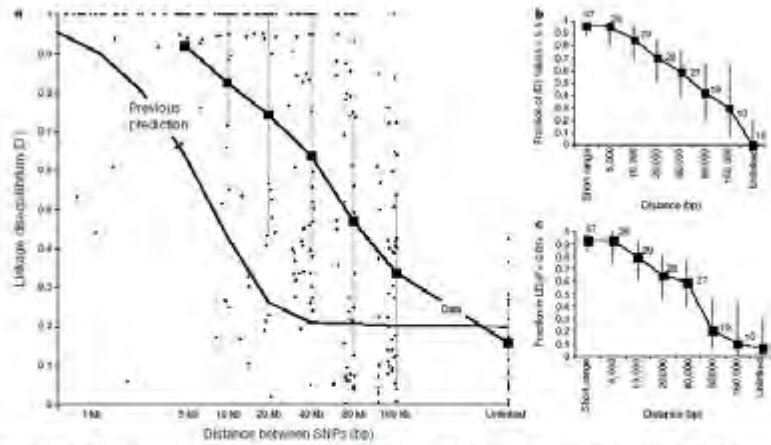


Figure 1 LD vs physical distance between SNPs. For each distance from the core SNP (Table 1), we chose the SNP with the largest number of copies of the minor allele for comparison to SNPs at other distances. At a given distance, all comparisons are independent. **a**, Average D' values for each distance separation ('Data', dotted lines indicate the 20th and 5th percentiles), compared with a prediction* based on simulation (see Methods). D' values for shorter physical distances were calculated by taking 5000 contiguous sequenced alleles of DNA containing at least two SNPs, and picking the

two with the most minor alleles. Unfilled marker comparisons are obtained by comparing SNPs in the 10–40 kb and in each row of Table 1 to those in the next row. **b**, **c**, Fraction of D' values greater than 0.5 (for **b**) and proportion of significant ($P < 0.05$) associations (**c**) between two SNPs separated by a given distance (as assessed by a likelihood ratio test). Lines indicate 95% central confidence intervals. The number of data points needed to make the calculations are shown.

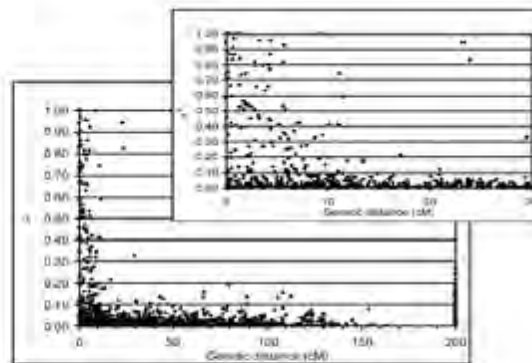
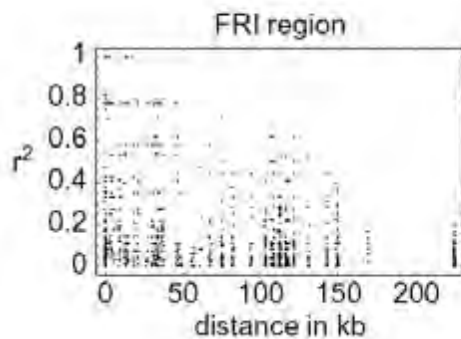
200

© 2011 Macmillan Magazines Ltd

NATURE | VOL 471 | 18 MAY 2011 | www.nature.com

11252712.1 | 88466670014

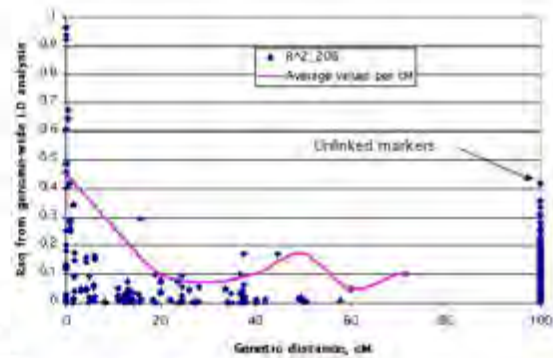
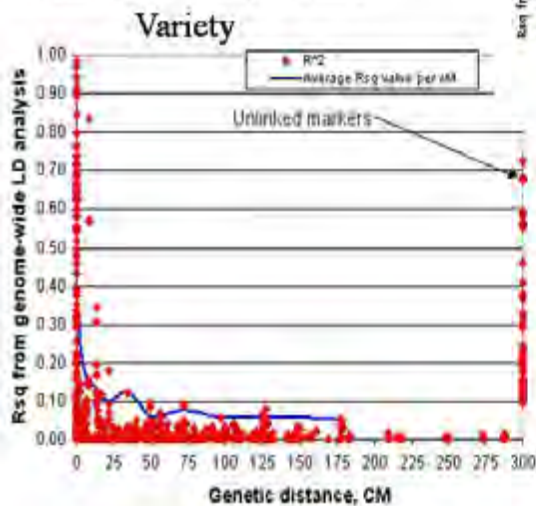
Arabidopsis



Barley

Rsq values of SSR pairs plotted against available map distance

To get idea about the LD decay we plotted the average Rsq values within Distance against map distance



Based on this plots:

LD decays within 50 cM distance

with $R^2 < 0.1$ in variety accession panel

We observed a significant LD decay within 30 cM distance with $R^2 < 0.1$ in exotic panel

Genome-wide LD decay is observed within 20 cM distance with $R^2 < 0.2$ in both variety and exotic accession, suggesting a general LD block sizes in cotton.

LD VARIATION ACROSS GENOME

- ⊗ The extent of LD is highly variable across the genome
- ⊗ The determinants of LD are not fully understood.
- ⊗ Factors that are believed to influence LD
 - Genetic drift
 - Population growth
 - Admixture or migration
 - Selection
 - Variable recombination rates

ALLELIC ASSOCIATION

⊗ Direct Association

- Allele of interest is itself involved in phenotype

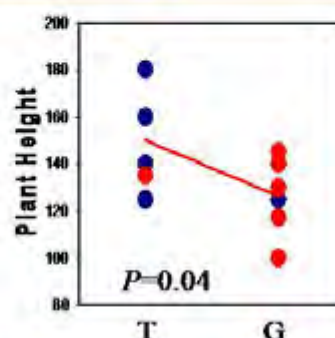
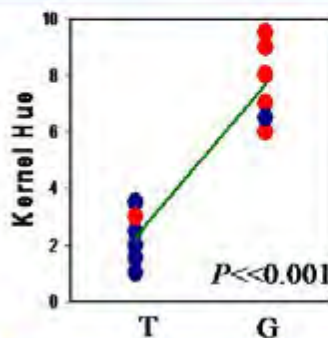
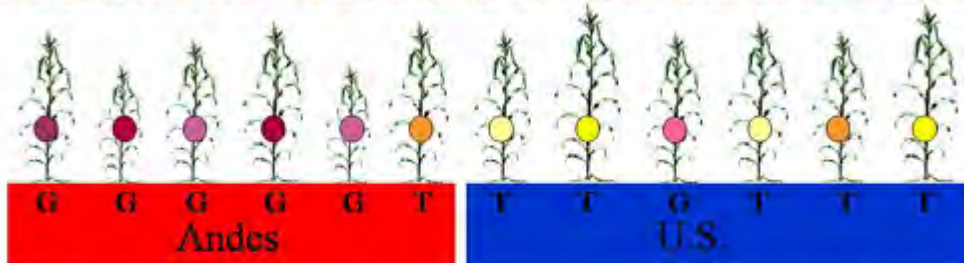
⊗ Indirect Association

- Allele itself is not involved, but due to LD with the functional variant

⊗ Spurious association

- Confounding factors (e.g., population stratification)

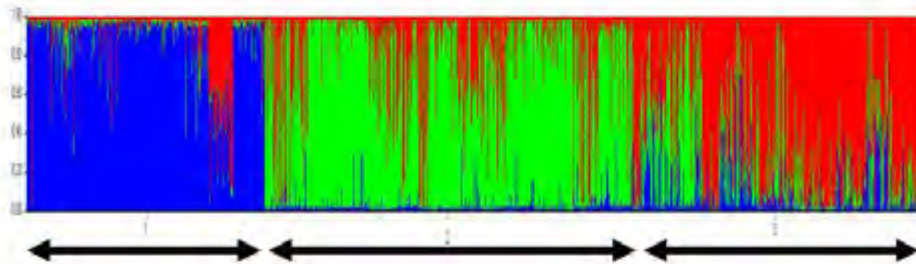
POPULATION STRUCTURE CAN PRODUCE ASSOCIATIONS



These non-functional associations can be accounted for by estimating the population structure using random markers.

DEALING WITH POPULATION STRUCTURE

- ⊗ **Structured association (Pritchard et al., 2000)**
 - Discover structure from set of unlinked markers, i.e. assign probabilities of ancestry from k populations to each individual, and then control for it.

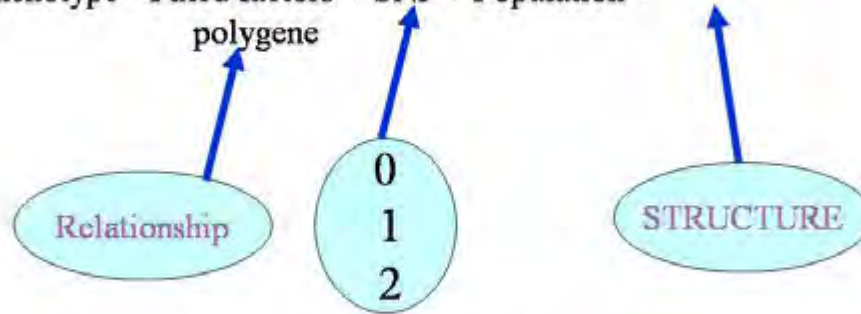


METHODS

- ⊗ Combined linkage and LD
- ⊗ Generalized linear models
- ⊗ Mixed-model (Yu et al. 2006)
- ⊗ Bayesian approach

MIXED-MODEL (YU ET AL. 2006)

Phenotype = Fixed factors + SNP + Population + polygene



SAS mixed model (Gael Pressoir)

Buckler Lab for Maize Genetics and Diversity
A USDA-ARIS Lab with Cornell's Institute for Genomic Diversity

Home | Software | Lab Members | Publications | Data | Contact Information

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, *modeling 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, AFLPs and AFLPs.

Download [Structure 2.5.1](#)
Download [Structure 2.3.2 \(beta version\)](#)

What to cite: The basic algorithm was described by Pritchard, Stephens & Donnelly (2001). Extensions to the method were published by Falak, Stephens and Pritchard (2003) and (2007) and by Habitz, Falak, Stephens and Pritchard (2008).

Contributors: Daniel Falak, Melissa Habitz, Matthew Stephens, Jonathan Pritchard, Peter Donnelly, William D. Miller, Mike Tenen.

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

Funding programs and other resources: [GLS2007](#) and [alliance](#) from [Stark Research](#)'s lab can automatically sort the cluster labels and produce nice graphical displays of ancestry results. Other plots are produced directly by the software package itself. A [free publicly available cluster lab](#) has kindly been made available for running computational-intensive *structure* jobs by [TUM](#) or [Cornell](#). Xavier Didot's program [metaconvert](#) converts files in «*Stratified Multi-Factor (SMF)*» format into *Structure* input format.

Sample data sets [available here](#).

Evolutionary Biology & Ecology

Software

TASSEL

Tassel (Version 2.1.0) (Bio Build System) (A Java Program) (Jan 11)

Download [Tassel 2.1.0](#)

Tassel (Version 2.0) (Bio Build System) (A Java Program) (Dec 10)

Download [Tassel 2.0](#)

Evolutionary Biology & Ecology

Software

TASSEL

Tassel (Version 2.1.0) (Bio Build System) (A Java Program) (Jan 11)

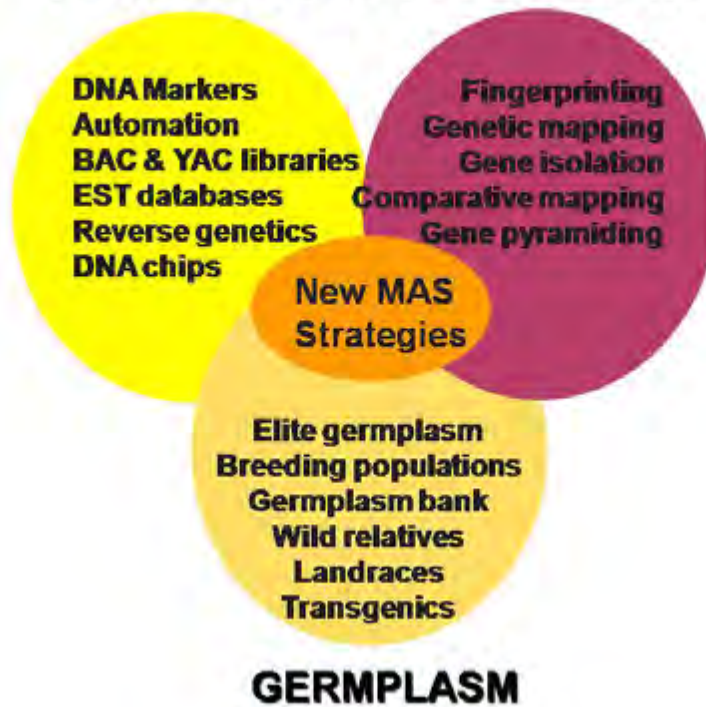
Download [Tassel 2.1.0](#)

Tassel (Version 2.0) (Bio Build System) (A Java Program) (Dec 10)

Download [Tassel 2.0](#)

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

TECHNOLOGIES APPLICATIONS

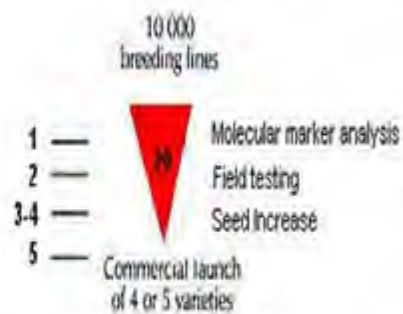


Marker-assisted selection

(a) Traditional breeding approach



(b) Molecular breeding approach



Форма оценки тренинг курса

Название курса:
Дата:
Место проведения: Ташкент, Узбекистан
Организатор:

Оценка должна проводиться в конце курса или тренинга.

Цель состоит в оценке эффективности программы и определении того, достиг ли данный курс своих целей. Оценка обеспечивает организаторов обратной связью, что является очень важным для них относительно содержанию, проведению и управлению курса. Данные оценки будут использоваться в целях улучшения курсов (тренингов) в будущем.

Мы любезно просим Вас уделить 10-15 минут времени на заполнение этой формы и отдать его организаторам курса.

Спасибо Вам за содействие!

Организаторы курса.

	Балл				
	1 = очень низкий и т.д.				
	2 = низкий				
	3 = приемлемый				
	4 = хороший/высокий				
	5 = очень хороший/ очень высокий и т.д.				
А. Общая оценка курса (тренинга)					
1. Полное удовлетворение курсом (тренингом)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Соответствие содержания курса с моими потребностями	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Качество и эффективность проведения курса	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Знания и опыт, полученные во время курса	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. Насколько хорошо курс отразил свои задачи?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Комментарии:

В. Оценка содержания курса и методов обучения

- | | | | | | |
|---|------------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 1. Продолжительность курса/тренинга | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 | <input type="checkbox"/> 3 | <input type="checkbox"/> 4 | <input type="checkbox"/> 5 |
| | (1=очень долгий/короткий 5=точный) | | | | |
| 2. Содержание упражнений относительно к времени | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 | <input type="checkbox"/> 3 | <input type="checkbox"/> 4 | <input type="checkbox"/> 5 |
| | (1=очень много/мало 5=точно) | | | | |
| 3. Качество и эффективность методов теоретического преподавания (лекции) | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 | <input type="checkbox"/> 3 | <input type="checkbox"/> 4 | <input type="checkbox"/> 5 |
| 4. Качество и эффективность практических занятий и полевых упражнений | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 | <input type="checkbox"/> 3 | <input type="checkbox"/> 4 | <input type="checkbox"/> 5 |
| 5. Баланс между теорией (лекцией) и практической работой | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 | <input type="checkbox"/> 3 | <input type="checkbox"/> 4 | <input type="checkbox"/> 5 |
| | (1=низкий 5=точный) | | | | |
| 6. Качество и количество раздаточных материалов представленных во время курса | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 | <input type="checkbox"/> 3 | <input type="checkbox"/> 4 | <input type="checkbox"/> 5 |

Комментарии:

С. Оценка управления и логистики курса

- | | | | | | |
|---|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 1. Доступ к оборудованию во время курса (такие как ЛСД проекторы, компьютеры, лабораторные средства и.т.п.) | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 | <input type="checkbox"/> 3 | <input type="checkbox"/> 4 | <input type="checkbox"/> 5 |
| 2. Время и качество информации, полученное до начала курса | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 | <input type="checkbox"/> 3 | <input type="checkbox"/> 4 | <input type="checkbox"/> 5 |
| 3. Питание и проживание | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 | <input type="checkbox"/> 3 | <input type="checkbox"/> 4 | <input type="checkbox"/> 5 |
| 4. Организация прибытия и убытия участников | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 | <input type="checkbox"/> 3 | <input type="checkbox"/> 4 | <input type="checkbox"/> 5 |
| 5. Решение финансовых вопросов | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 | <input type="checkbox"/> 3 | <input type="checkbox"/> 4 | <input type="checkbox"/> 5 |

Комментарии:

Д. Прочие

- | | | | | | |
|--------------------------|---------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 1. Количество участников | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 | <input type="checkbox"/> 3 | <input type="checkbox"/> 4 | <input type="checkbox"/> 5 |
| | (1= очень мало/много 5 = точно) | | | | |

- | | | | | | |
|---|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 2. Активное участие в процессе обучения | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3. Взаимодействие с другими участниками | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 4. Взаимодействие с лекторами (инструкторами) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

Комментарии:

Е. Сильные, слабые стороны курса и предложения

Что мне понравился на этом курсе:

Что меньше всего было уместным или не понравился мне:

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

Любые другие комментарии.

Результаты оценки тренинг-курса.

Название курса: Использование технологии молекулярных маркеров в оценке разнообразия генетических ресурсов растений
Дата: 9-13 августа 2010 года.
Место проведения: Ташкент, Узбекистан
Организаторы: Тренинг Центр по Молекулярным маркерам Центра Геномных технологий Института генетики и экспериментальной биологии растений Академии Наук Республики Узбекистан, Национальный отдел реализации проекта.

	Балл
	1=очень низкий и т.д. 2=низкий 3=приемлемый 4=хороший/высокий 5=очень хороший/ очень высокий и т.д.
А. Общая оценка курса (тренинга)	
1. Полное удовлетворение курсом (тренингом)	На 4 ответил 1 участник, на 5 ответили 6 участников.
2. Соответствие содержания курса с моими потребностями	На 4 ответили 2 участника, на 5 ответили 5 участников.
3. Качество и эффективность проведения курса	На 4 ответил 1 участник, на 5 ответили 6 участников.
4. Знания и опыт, полученные во время курса	На 4 ответил 1 участник, на 5 ответили 6 участников.
5. Насколько хорошо курс отразил свои задачи?	На 5 ответили 7 участников.
Комментарии: Курс очень хороший, квалифицированные преподаватели. Было бы хорошо удлинить курс.	
В. Оценка содержания курса и методов обучения	
1. Продолжительность курса/тренинга	На 4 ответили 2 участника, на 5 ответили 5 участников. (1=очень долгий/короткий 5=точный)
2. Содержание упражнений относительно к времени	На 4 ответил 1 участник, на 5 ответили 6 участников. (1=очень много/мало 5=точно)

3. Качество и эффективность методов теоретического преподавания (лекции)	На 4 ответили 5 участников, на 5 ответили 6 участников.
4. Качество и эффективность практических занятий и полевых упражнений	На 5 ответили 7 участников.
5. Баланс между теорией (лекцией) и практической работой	На 4 ответил 1 участник, на 5 ответили 6 участников. (1=низкий 5=точный)
6. Качество и количество раздаточных материалов представленных во время курса	На 5 ответили 7 участников.
Комментарии: нет.	
С. Оценка управления и логистики курса	
1. Доступ к оборудованию во время курса (такие как ЛСД проекторы, компьютеры, лабораторные средства и.т.п.)	На 5 ответили 7 участников.
2. Время и качество информации, полученное до начало курса	На 4 ответил 1 участник, на 5 ответили 6 участников.
3. Питание и проживание	На 4 ответил 1 участник, на 5 ответили 6 участников.
4. Организация прибытия и убытия участников	На 4 ответил 1 участник, на 5 ответили 6 участников.
5. Решение финансовых вопросов	На 4 ответил 1 участник, на 5 ответили 6 участников.
Комментарии: • Было бы желательным обеспечение доступа к информации (литературе), которая нужна в течение тренинга.	
D. Прочие	
1. Количество участников	На 2 ответил 1 участник, на 5 ответили 6 участников. (1= очень мало/много 5 = точно)
2. Активное участие в процессе обучения	На 4 ответил 1 участник, на 5 ответили 6 участников.
3. Взаимодействие с другими участниками	На 5 ответили 7 участников.
4. Взаимодействие с лекторами (инструкторами)	На 5 ответили 7 участников
Комментарии: нет	

Е. Сильные, слабые стороны курса и предложения

Что мне понравилось на этом курсе:

- Профессионализм педагогов, качество организации и подготовки проведения тренинга.
- Понравились лаборатории, оборудование, специалисты.
- Понравились лаборатории, оснащённые современным оборудованием, а также высококвалифицированные инструктора.
- Понравились лекции и практические занятия.
- Отношение инструкторов к участникам тренинга.
- Новизна тематики, квалификация инструкторов, оснащённость лабораторий и теплицы, организованность инструкторов и дружеское отношение.

Что меньше всего было уместным или не понравился мне:

Короткое время курса тренинга.

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

- Не хватает методики приготовления и использования реактивов и оборудования в учебных материалах по применению технологии молекулярных маркеров в исследованиях ГРР. Хорошо было бы представить весь учебный материал до прохождения курсов в электронном виде.
- Хотелось бы побольше практических занятий. Желательно было бы иметь теоретический материал по подготовке реактивов. Хотелось бы получить лекционный материал не в виде презентаций, а в виде текста.
- Хотелось бы, чтобы курс был отправлен заранее в электронной форме. Это дало бы возможность участникам изучить материал тренинга и не уделять много времени на теоретические занятия. Хорошо было бы проводить конкурс между номинированными на участие на тренинге для того, чтобы выявить лучших и отправлять на тренинг лучших. Это поспособствует лучшей подготовке кадров.

Любые другие комментарии.

•