

Геном растений и современные методы его идентификации

Николай Фризен

Ботанический Сад Университета Оснабрюк, Германия

friesen@biologie.uni-osnabrueck.de

ДНК - Дезоксирибонуклеиновая кислота

ДНК – макромолекула обеспечивающая хранение, передачу из поколения в поколение и реализацию генетической программы развития и функционирования живых организмов.



Способность ДНК денатурировать, ренатурировать, а также самоудваиваться, является основой практически для всех методов в молекулярной биологии

Геном растений

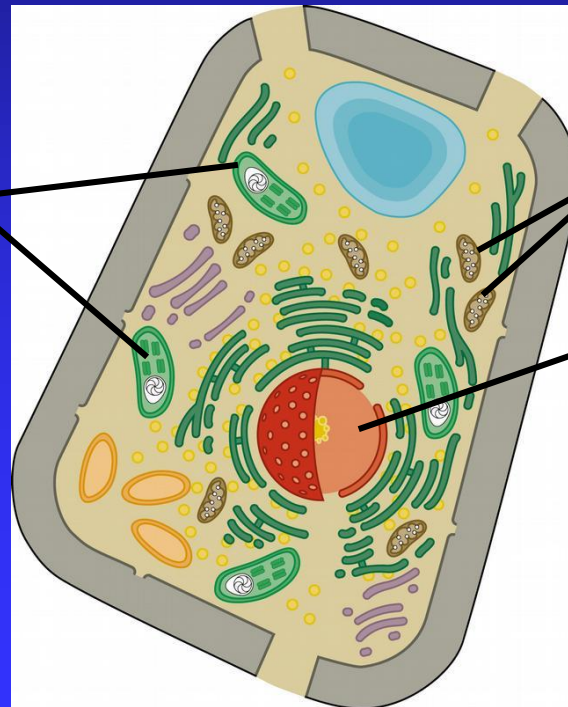
Геном растений включает в себя все типы ДНК присутствующие в организме (клетке) растений

ГЕНОМ РАСТЕНИЙ

- Ядро
- Хлоропласты
- Митохондрии



Хлоропласты



Митохондрии

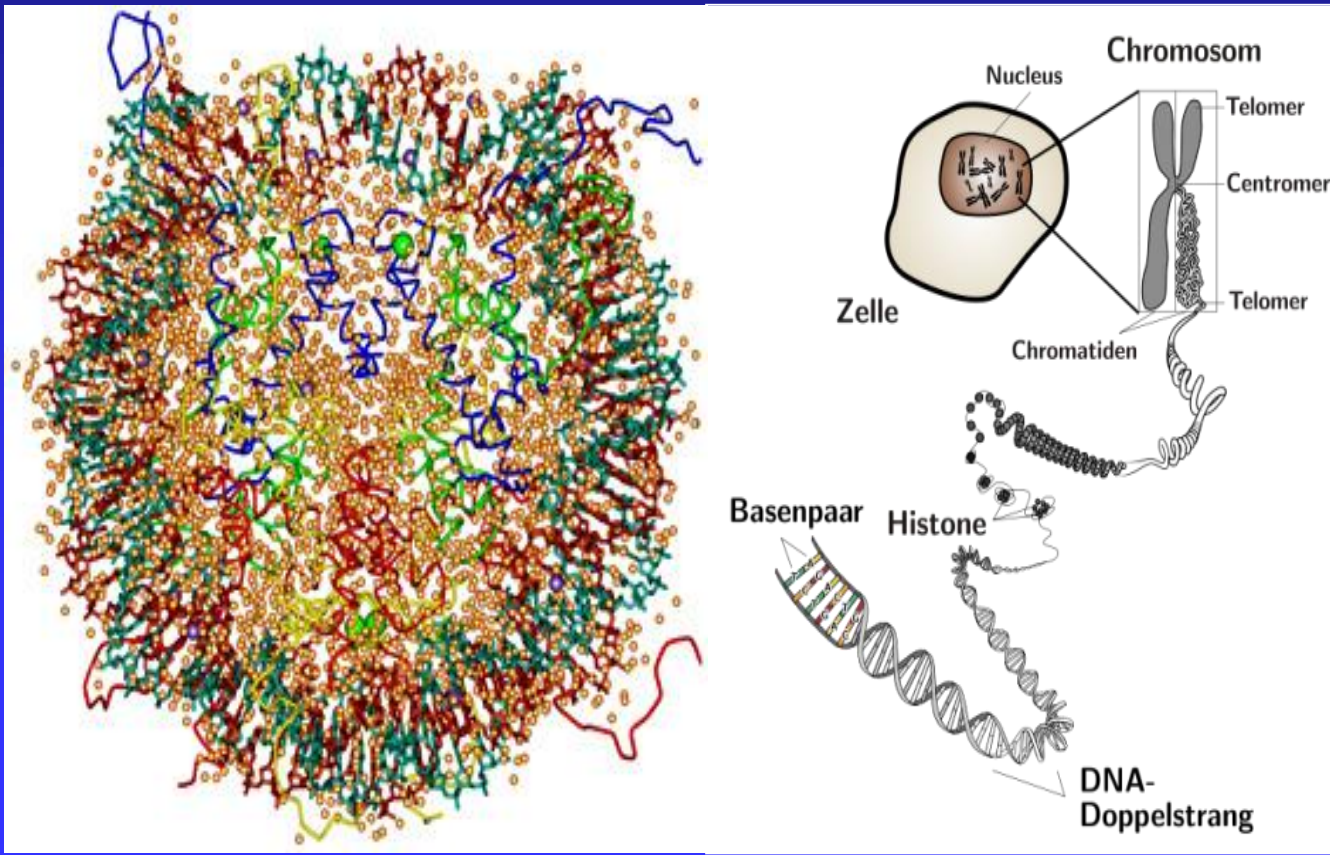
Ядро



ГЕНОМ РАСТЕНИЙ

Ядро

- самая крупная часть растительного генома
- кодирует большинство белков
- содержит большое количество повторной ДНК
(=> Большое различие в количестве ДНК между видами)
- показывает рекомбинацию и расщепление признаков по Менделю



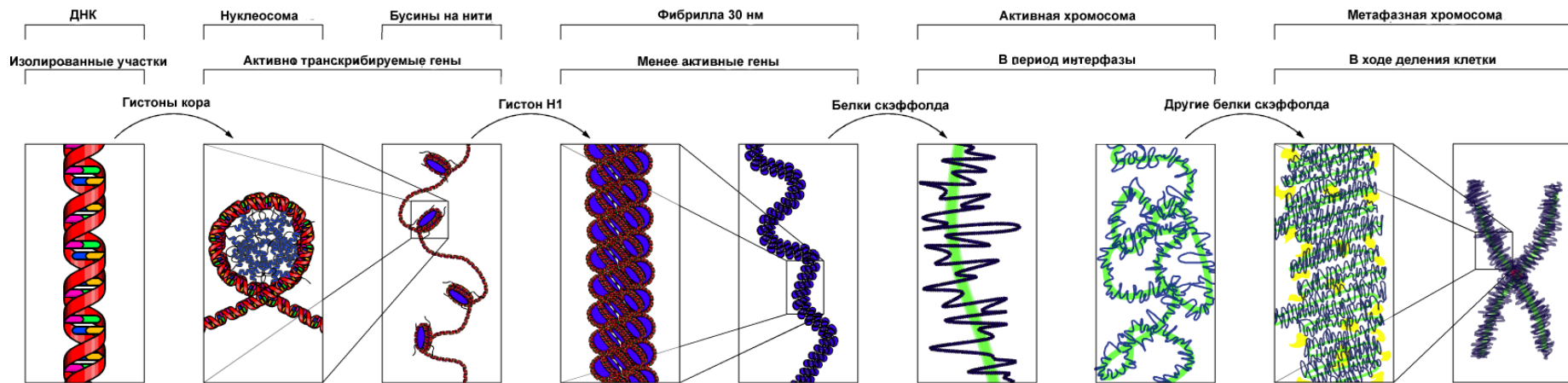
Хромосома

Молекула ДНК намотана на определенных отрезках дважды вокруг комплекса гистона, состоящего из 8 молекул (гистона Н1) для крепления - Нуклеосомы

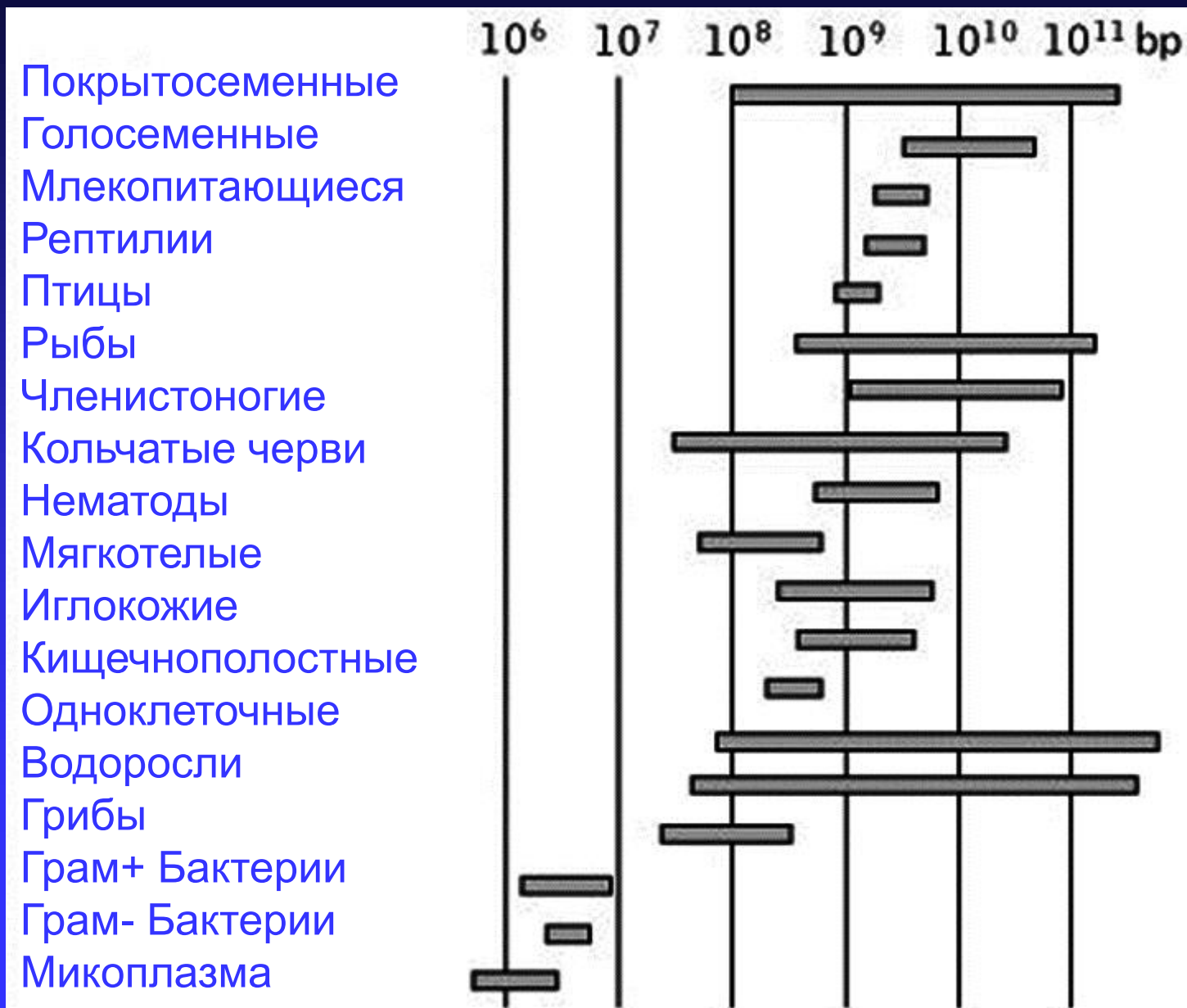
Каждая молекула ДНК образует 1 хроматиду. Две хроматиды соединенные между собой образуют хромосому.

Хромосо́мы (др.-греч. *χρῶμα* — цвет и *σῶμα* — тело) — нуклеопротеидные структуры в ядре эукариотической клетки, в которых сосредоточена бо́льшая часть наследственной информации и которые предназначены для её хранения, реализации и передачи. Хромосомы чётко различимы в световом микроскопе только в период митотического или мейотического деления клетки.
(Википедия)

Основу хромосомы составляет линейная макромолекула ДНК значительной длины. Перед митозом хромосомная ДНК спирализуется в 10^5 раз по сравнению с линейной длиной.



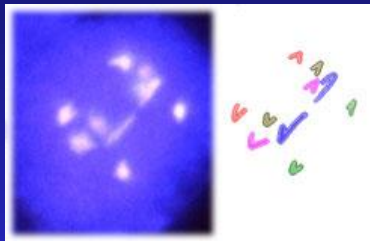
Величина ядерного генома у различных живых организмах



Величина ядерного генома у растений



Arabidopsis thaliana
 $2n=10$
115 million base pairs



Allium cepa
 $2n=16$
15300 million base pairs



Количество генов у Арабидопсиса и у Лука практически одинаковое. Различие в количестве повторной, некодирующей ДНК (микросателлиты, ретротранспозоны и т. д.)



Intercalary tandem repeats



Centromere associated tandem repeat



Telomeric and sub-telomeric repeats



Dispersed tandem repeats



Dispersed Ty-1-copia-like retroelements LTR and microsatellites

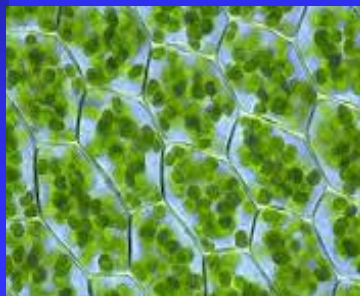


Single and low-copy sequences Including genes

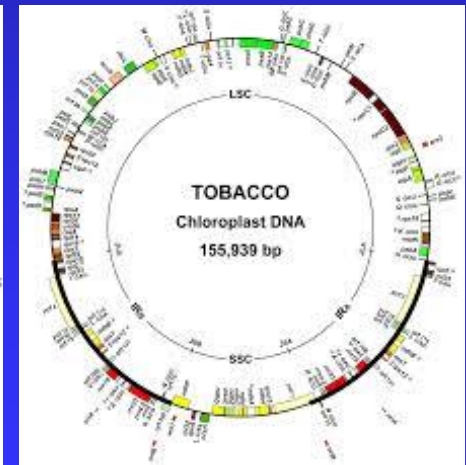
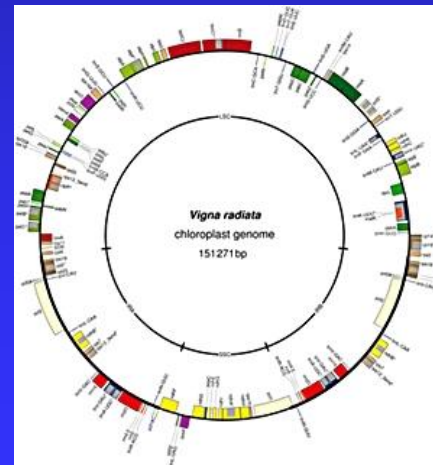
ГЕНОМ РАСТЕНИЙ

Хлоропласты

- упрощенный геном цианобактерий
- кольцевая
- от 130 до 160 кб
- стабильная структура
- эволюционирует очень медленно
- наследуется только по материнской линии, рекомбинации очень редки



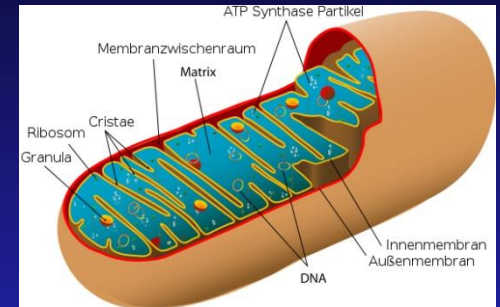
Хлоропласты



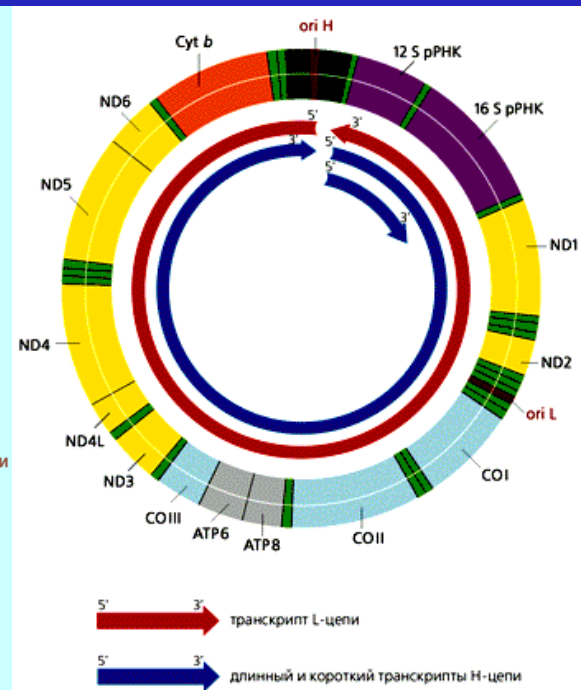
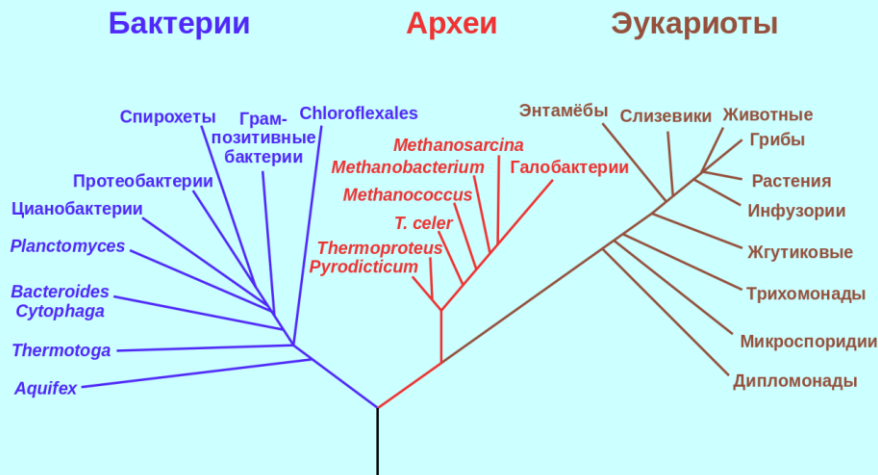
ГЕНОМ РАСТЕНИЙ

Митохондрии

- упрощенный геном бактерий
- кольцевая
- от 200 до 2000 кб
- частые рекомбинации
- структура нестабильная
- наследуется по материнской линии
- Гены эволюционируют очень медленно



Филогения живых организмов



Выделение ДНК из растений

Экстракция **чистой недеградированной ДНК** из растительных объектов остается **определяющим** первым этапом в любой сфере использования молекулярно-генетических подходов для изучения растительных организмов.

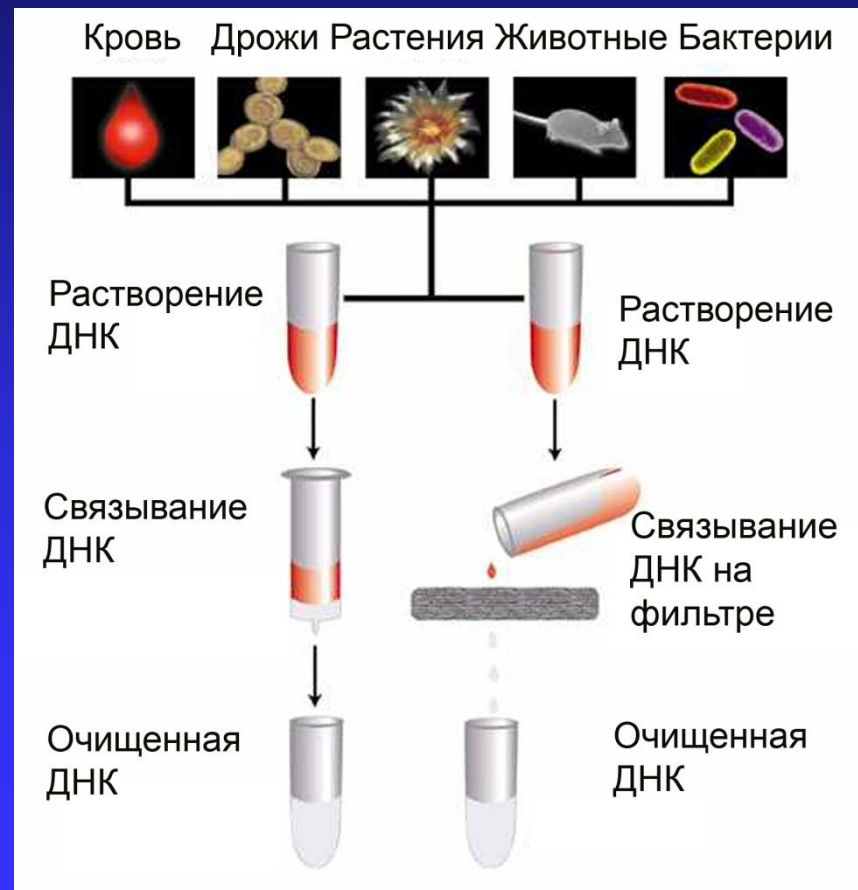
Особенности выделения ДНК из растений!

При экстракции ДНК из растительных объектов необходимо не только деактивировать клеточные ферменты, но и «удалить» запасные вещества, например, полисахариды и вторичные метаболиты, такие как алкалоиды, фенольные соединения, терпены, которые не просто мешают изолированию ДНК, но и отрицательно влияют на ее качество.



Процедура выделения ДНК включает обязательные процедуры:

- разрушение клеток;
- удаление мембранных липидов;
- удаление вторичных метаболитов и запасных веществ;
- удаление белков;
- удаление РНК;
- осаждение ДНК.



Фенол-Хлороформная экстракция ДНК

Метод Фенол-Хлороформная экстракция ДНК была опубликована в 1968 году (Kirby & Cook, 1968. Biochem. J. 104,254).

Образец подвергается лизису с SDS и после лизиса смешивается с фенолом-хлороформом, образуя при этом двухфазную смесь. ДНК осаждают из верхней фазы и осажденную ДНК растворяют водой.

ДНК получается хорошего качества и ее довольно много

НО!

Процедура довольно длинная и используемые химикаты опасны для здоровья!

Выделение ДНК с использованием СТАБ

(бромистого цетилтриметиламмония - cetyltrimethylammonium bromide)

Методика с использованием СТАБ впервые разработанная Мюррэм и Томпсоном в 1980 г. (Murray and Thompson, 1980). Этот метод хорошо подходит для выделения и очистки ДНК из растений

Лизис или растворение ДНК происходит с помощью буфера экстракции, который содержит EDTA, Tris/HCl и СТАБ.

Очистку ДНК уже можно проводить только с хлороформом, без фенола.

Выделение ДНК на основе силиконовых мембран



Колонка с
силиконовой
мембраной

ДНК адсорбируют на кремнеземе в присутствии хаотропных солевых растворов с высокой ионной силой.

Хаотропные соли денатурируют биомолекулы, нарушая оболочку гидратации вокруг них. Это позволяет положительно заряженным ионам соли образовывать мост между отрицательно заряженным диоксидом кремния и отрицательно заряженными ДНК.

ДНК промывают раствором этанола с высоким содержанием соли и потом растворяют водным раствором с низким содержанием соли.

Процедура выделения ДНК на основе силиконовых мембран очень проста и не требует опасных химикатов!

Разработано огромное количество протоколов для выделения ДНК. Коммерческими компаниями предлагаются множество КИТов для выделения ДНК из растений, основанных на силиконовых мембранах, стоимость выделения одной пробы которыми колеблется от 1 до 6 Евро



DNeasy Plant Mini Kit „Qiagen“



innuPREP Plant DNA Kit
AnalytikJena



sbeadex® plant kit



Genomic solutions



NucleoSpin® Plant II



Процедура выделения ДНК в КИТах не меняется, но меняются химические вещества, используемые для связывания ДНК на силиконовой мембране

Набор для выделения ДНК из засушенных растений и семян DiamondDNA Genomic DNA Extraction Kit for Dry Plants & Seeds



<http://diamond-dna.ru>

ABT Llc. Russia, 656049 Barnaul, Nikitina Str. 111

Из каких частей (органов) растений лучше всего выделять ДНК?



Лучше всего выделять ДНК из молодых органов растений (молодые листья, соцветия и т.д.). В них меньше всего запасных веществ и вторичных метаболитов. Но к сожалению это не всегда доступно!

Чаще всего для таксономических работ мы имеем дело со специально собранными образцами или с гербарным материалом. Кроме того растения сильно различаются по компонентному составу вторичных метаболитов. Поэтому для каждой группы растений иногда приходится модифицировать протоколы выделения ДНК (например: суккулентные растения; хвойные).

Сбор материала в поле и т.д.:

Наилучший результат при сборе материала получают при высушивании проб в силикагеле.

При работе с Гербарным материалом особо важное значение имеет, как был высушен гербарий. Чем естественней цвет растения в гербарии, тем больше вероятность в получении рабочей, мало деградированной ДНК.

Ваучер! В таксономических исследованиях к любым публикуемым последовательностям ДНК необходимо указание на Гербарный образец с которого выделена ДНК (vouchered specimen).

Выделив ДНК,
как получить информацию
записанную эволюцией в ДНК ?

Маркерные системы ДНК (Молекулярные маркеры)

Молекулярные маркеры представляют собой генетические маркеры, позволяющие анализировать организм на уровне ДНК. К ним применимы термины классической генетики, такие как локус, аллель, доминантный и кодоминантный тип наследования.

Аллели маркерных локусов представляют собой различные формы (нуклеотидные последовательности, отличающиеся по длине и/или по нуклеотидным заменам) одного и того же маркера, расположенные в одинаковых участках (локусах) гомологичных хромосом.

Если метод анализа маркера позволяет выявлять оба аллеля, говорят о кодоминантном типе наследования данного маркера, если выявляется только один аллель — о доминантном наследовании.

ДНК маркеры условно можно разделить на три группы: маркеры, основанные на блот-гибридизации, маркеры, основанные на ПЦР и маркеры, основанные на ДНК-чипах. В последующих лекциях мы рассмотрим подробнее маркеры, основанный на ПЦР.

PCR - polimerase chain reaction

Полимеразная цепная реакция - ПЦР

ПЦР очень мощный метод размножения фрагментов ДНК вне организмов (*in vitro*). С момента его открытия в 1985 году, этот метод используется сейчас практически во всех молекулярно-биологических лабораториях.

В 1985, технология полимерной цепной реакции (PCR) была введена Миллисом (Mullis) с сотрудниками.

Через 8 лет после этого за изобретение метода ПЦР Кэри Муллис получил Нобелевскую премию.



„Baby Blue“ Thermocycler, 1986.

В 1980 году Каледин с сотрудниками впервые выделили и описали свойства днк-полимеразы из термофильной бактерии *Thermus aquaticus*.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (Википедия).

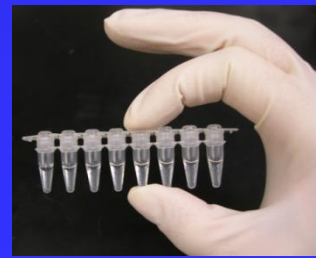
Метод основан на многократном избирательном копировании определённого участка нуклеиновой кислоты ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*).

С помощью ПЦР амплифицируются относительно короткие участки ДНК. В обычном ПЦР-процессе длина копируемых ДНК-участков составляет не более 3000 пар оснований.

С помощью смеси различных полимераз, с использованием добавок и при определённых условиях длина ПЦР-фрагмента может достигать 20—40 тысяч пар нуклеотидов.

Компоненты ПЦР

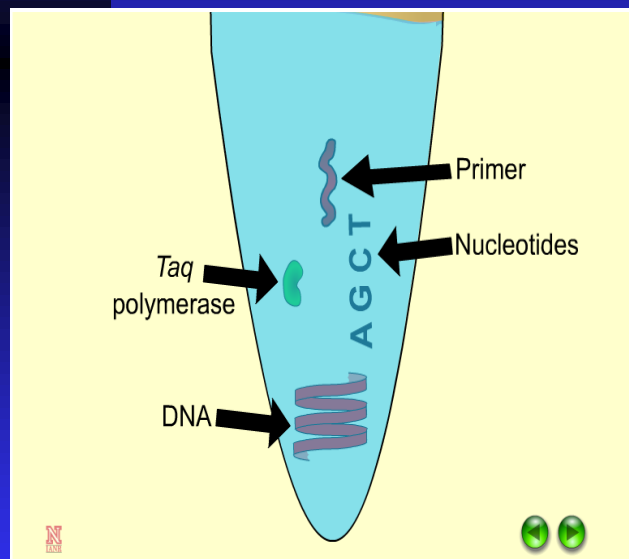
- ДНК-матрица, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать.
- Два праймера, комплементарные противоположным концам разных цепей требуемого фрагмента ДНК.
- Термостабильная ДНК-полимераза — фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК. Полимераза для использования в ПЦР должна сохранять активность при высокой температуре длительное время, поэтому используют ферменты, выделенные из термофилов — *Thermus aquaticus* (Taq-полимераза), *Pyrococcus furiosus* (Pfu-полимераза), *Pyrococcus woesei* (Pwo-полимераза) и другие.
- Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).
- Буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции — pH, ионную силу раствора. Содержит соли, бычий сывороточный альбумин. Ионы Mg^{2+} , необходимые для работы полимеразы.



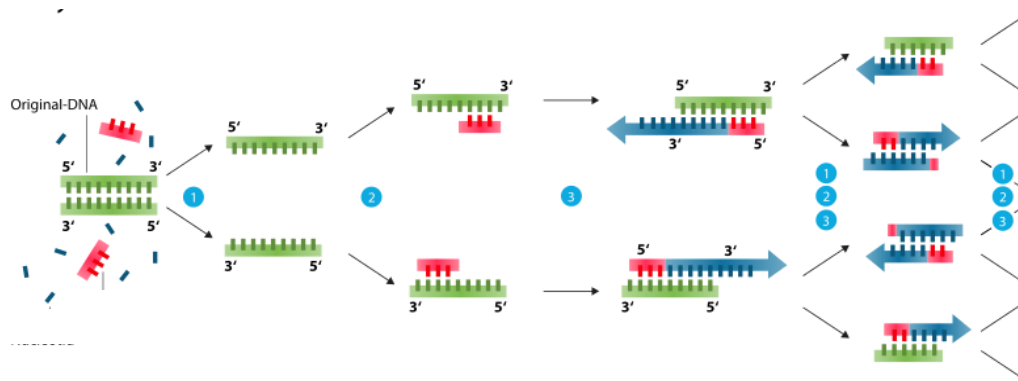
Праймеры

Это короткие синтетические олигонуклеотиды длиной 18—30 оснований. Каждый из праймеров комплементарен одной из цепей двуцепочечной матрицы и ограничивает начало и конец амплифицируемого участка.

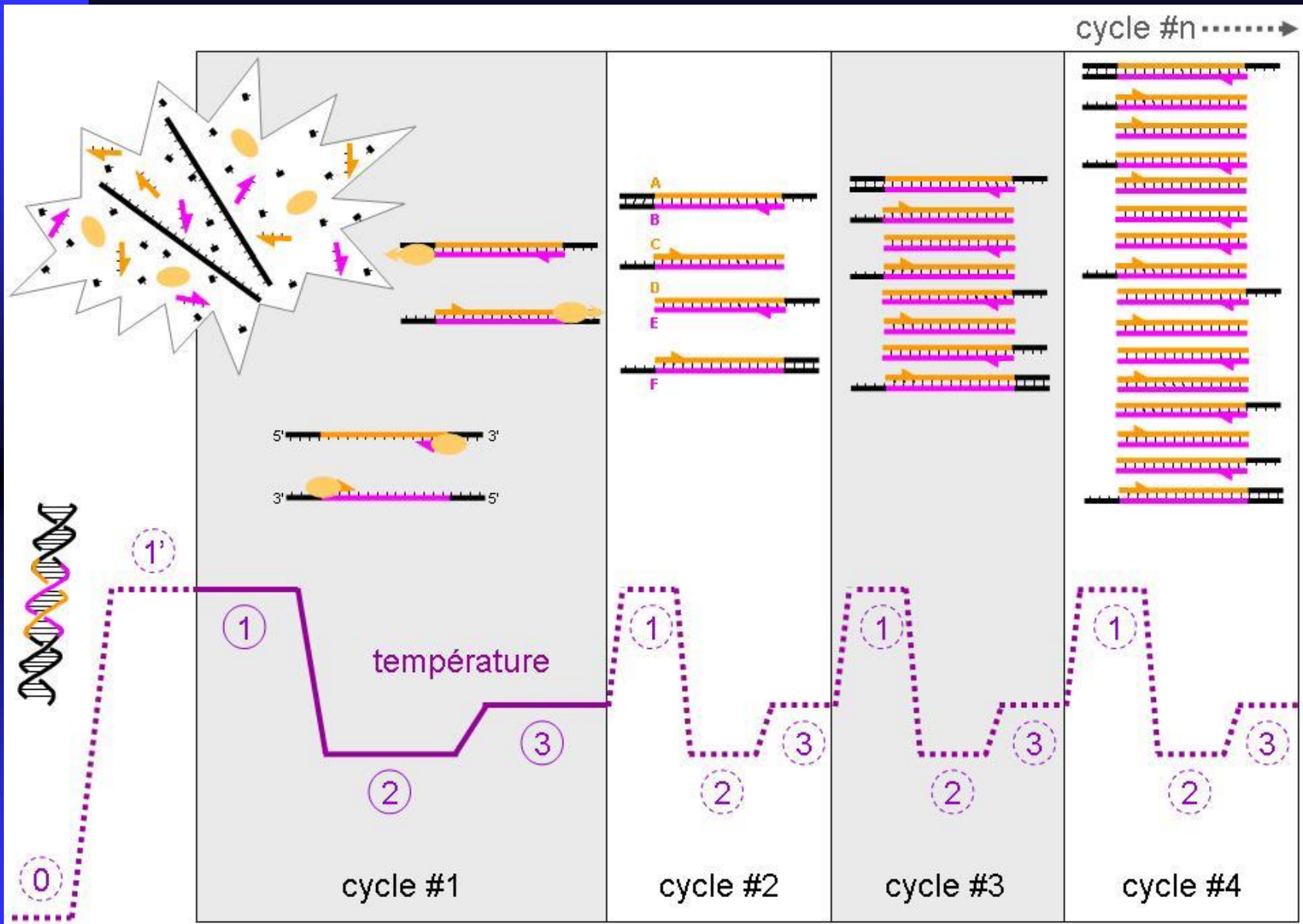
После гибридизации матрицы с праймером (отжиг), последний служит затравкой для ДНК-полимеразы при синтезе комплементарной цепи матрицы. Важнейшая характеристика праймеров — температура плавления

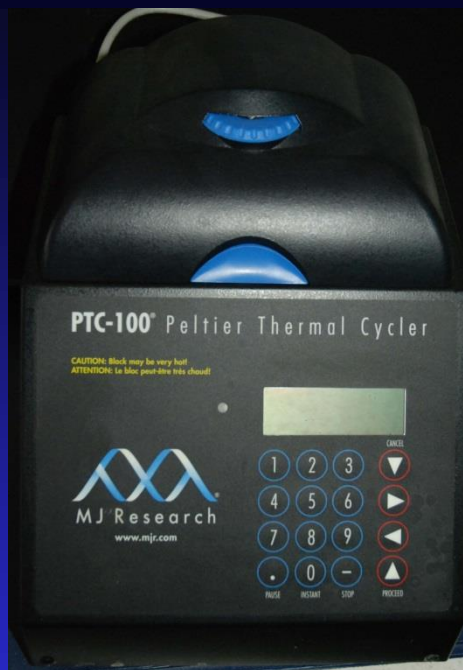


Полимеразная цепная реакция - ПЦР



- 1 Денатурация 95°C
- 2 Отжиг 52°-68° C
- 3 Элонгация 72° C





Учебный Фильм

Разновидности ПЦР

- **Вложенная ПЦР (Nested PCR)** — применяется для уменьшения числа побочных продуктов реакции. Используют две пары праймеров и проводят две последовательные реакции. Вторая пара праймеров амплифицирует участок ДНК внутри продукта первой реакции.
- **Инвертированная ПЦР (Inverse PCR)** — используется в том случае, если известен лишь небольшой участок внутри нужной последовательности. Этот метод особенно полезен, когда нужно определить соседние последовательности после вставки ДНК в геном.
- **ПЦР с обратной транскрипцией (Reverse Transcription PCR, RT-PCR)** — используется для амплификации, выделения или идентификации известной последовательности из библиотеки РНК. Перед обычной ПЦР проводят на матрице мРНК синтез одноцепочечной молекулы ДНК с помощью ревертазы и получают одноцепочечную кДНК, которая используется в качестве матрицы для ПЦР. Этим методом часто определяют, где и когда экспрессируются данные гены.
- **Количественная ПЦР (Quantitative PCR, Q-PCR) или ПЦР в реальном времени** — используется для непосредственного наблюдения за измерением количества конкретного ПЦР продукта в каждом цикле реакции.
- **ПЦР со случайной амплификацией полиморфной ДНК** — используется тогда, когда нужно различить близкие по генетической последовательности организмы. В этом случае используются более короткие праймеры с одинаковой последовательностью.
- **ПЦР длинных фрагментов (Long-range PCR)** — модификация ПЦР для амплификации протяженных участков ДНК (10 тысяч и более оснований). Используют смесь двух полимераз, одна из которых — *Taq*-полимераза, а вторая — ДНК полимераза с 3'-5' экзонуклеазной активностью, обычно это *Pfu* полимеразы.
- **И много других вариантов.....**

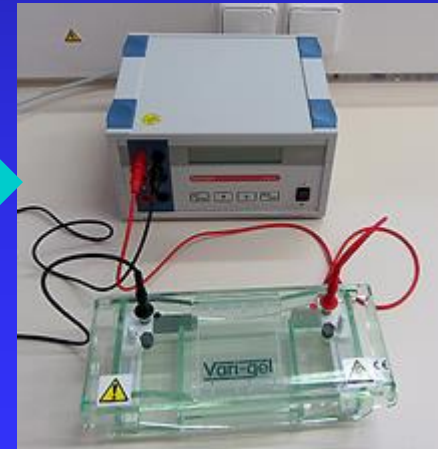
Гель Электрофорез

Электрофорез ДНК — это аналитический метод, применяемый для разделения фрагментов ДНК по размеру

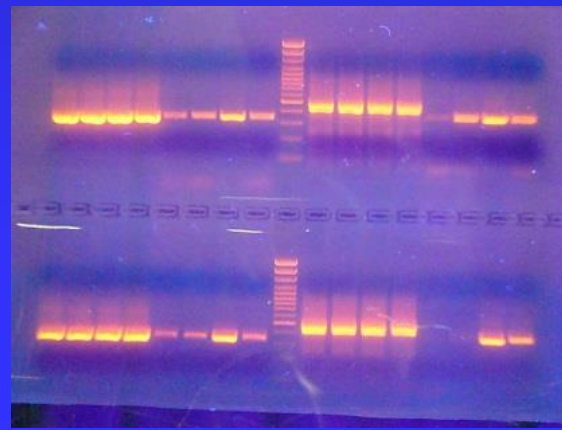
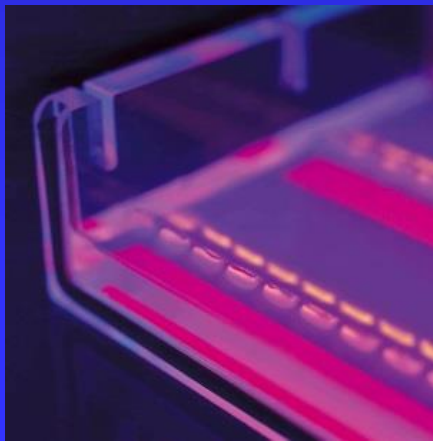
- Силы электрического поля, прикладываемого к образцам, заставляют фрагменты ДНК мигрировать через гель. Сахарофосфатный остов молекул ДНК заряжен отрицательно и поэтому цепи ДНК двигаются от катода, заряженного отрицательно, к положительному аноду. Более длинные молекулы мигрируют медленнее, так как задерживаются в геле, более короткие молекулы двигаются быстрее.
- Электрофорез проводится в камере, заполненной буферным раствором. Чаще всего используются буферы, содержащие ЭДТА, трис и борную кислоту: ТАЕ и ТВЕ. Буфер необходим для повышения ионной силы раствора, в котором будет происходить разделение молекул ДНК под действием приложенного электрического поля.
- После разделения фрагменты ДНК разной длины визуализируют при помощи флюоресцентных красителей, специфично взаимодействующих с ДНК, например, агарозные гели обычно красят бромистым этидием, который интеркалирует между азотистыми основаниями дуплекса и флюоресцирует в УФ-лучах.
- Определение размеров производят путем сравнения коммерчески доступных фрагментов ДНК (DNA ladder, «линейка»), содержащий линейные фрагменты ДНК известной длины.

Гель Электрофорез

Для электрофоретического анализа ДНК обычно используют агарозные (для относительно длинных молекул ДНК) и полиакриламидные (для высокого разрешения коротких молекул ДНК, например, в случае секвенирования) гели.

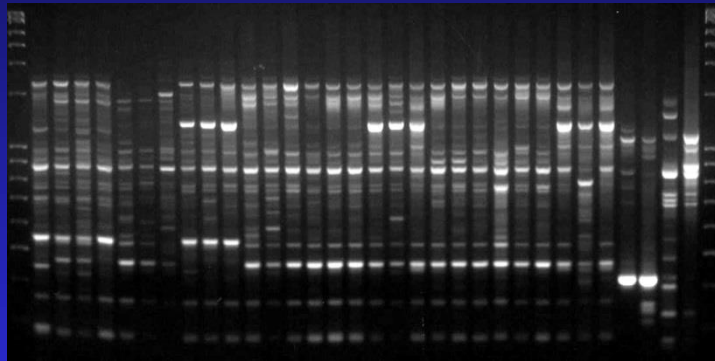


Приборы для документирования гелей

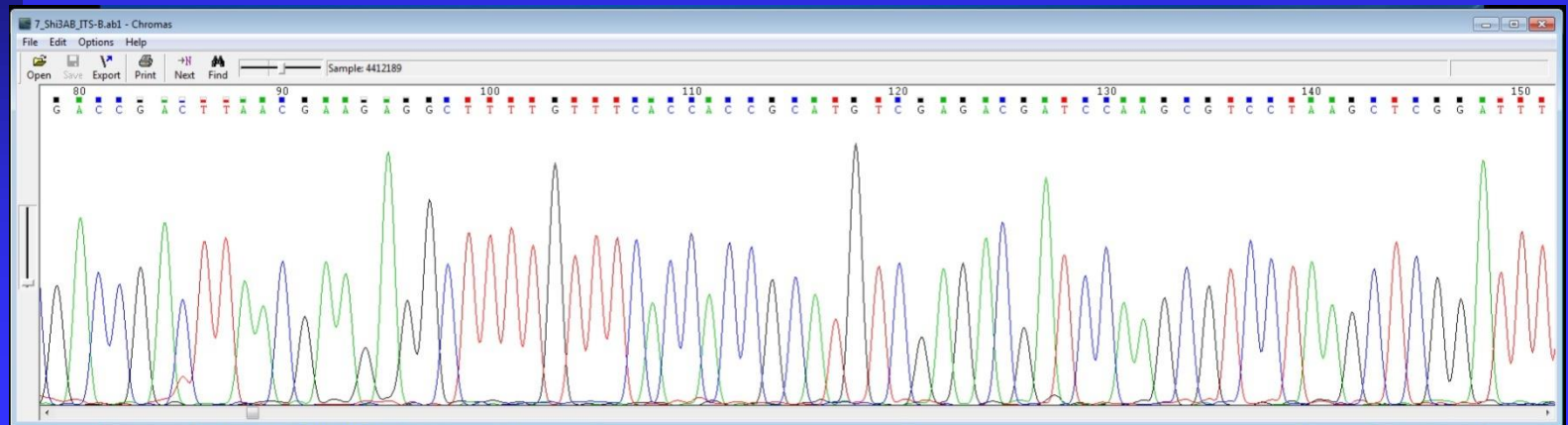


ДНК маркеры основанные на ПЦР, также условно делятся на две группы:

- Методы **фрагментного** анализа ДНК.



- Анализ последовательностей амплифицированных фрагментов ДНК (секвенирование).



◆ Методы

☞ Области применения маркерных систем /молекулярных методов/ на различных таксономических уровнях

Организм Популяция Подвид Вид Секция Род Семейство Порядок Класс

