

НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Кафедра ветеринарной генетики и биотехнологии

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В
БИОТЕХНОЛОГИИ

Методические указания к практическим занятиям

Новосибирск 2022

УДК 619:614.31

ББК 48

С28

Кафедра ветеринарной генетики и биотехнологии

Составитель: Себежко О.И., к.б.н., доц.

Рецензент: Тянь Е.А., к.б.н., доц. кафедры экологии НГАУ

Молекулярно-генетические методы в биотехнологии: метод.указания к практическим занятиям / сост. Себежко О.И.; Новосиб. гос.аграр.ун-т. Биолого-технолог.ин-т. – Новосибирск, 2022. - 42 с.

Методические рекомендации предназначены для студентов-магистров студентов Биолого-технологического факультета по направлению подготовки 19.04.01 – Биотехнология».

Изложены основные вопросы курса «Молекулярно-генетические методы в биотехнологии» к практическим занятиям. Приведены темы для выступлений.

©Новосибирский государственный аграрный университет, 2022

ВВЕДЕНИЕ

Биотехнология — это использование организма, компонента организма, биологической системы или продуктов их жизнедеятельности для производства других продуктов или новых процессов.

Молекулярно-генетические исследования играют огромную роль при изучении организма. Они позволяют выявить нарушения в генах, другими словами – мутацию. Важнейшим достоинством метода диагностики является минимальная степень медицинского вмешательства, поскольку исследование проводят *in vitro*. Метод успешно применяют даже для диагностики заболеваний у эмбрионов, а также у ослабленных и тяжелобольных пациентов.

Дисциплина включает современные данные о направлениях, принципах и подходах современных молекулярно-генетических исследованиях в областях биотехнологии, а также их применениях. В курсе предусматриваются практические занятия, закрепляющие теоретические знания в процессе научно-исследовательской работы. Дисциплина ориентирована на более глубокое понимание и изучение общебиологических закономерностей.

Целью методических указаний по изучению курса «Молекулярно-генетические методы в биотехнологии» является обеспечение эффективности работы студентов-магистров на практических занятиях.

Задача курса учебной дисциплины «Молекулярно-генетические методы в биотехнологии» – дать знания по данной дисциплине и обеспечить формирование у студентов-магистров представлений о молекулярно-генетических методах исследований, используемых на сегодняшний день в практической деятельности специалиста.

В результате изучения дисциплины студенты-магистры приобретают знания и умения в данной области и могут применять их на практике.

Раздел 1. Молекулярно – генетические методы диагностики

Тема 1.1. Научные основы молекулярно – генетических методов исследований

Содержание темы:

Молекулярно-генетические методы являются неотъемлемой частью многих современных медико-биологических исследований. Среди них наибольшую распространенность получили технологии, основанные на использовании полимеразной цепной реакции. Данный подход воспроизводит естественный механизм репликации нуклеиновых кислот *in vitro*, ограниченный интересующим исследователя участком генома. ПЦР позволяет быстро и с высокой специфичностью амплифицировать фрагмент генома любого биологического объекта. Это определяет широкие возможности ПЦР-диагностики: от выявления возбудителей инфекционных заболеваний до установления генетических причин наследственных и мультифакториальных болезней животных в ветеринарно-санитарной экспертизе.

Разработка молекулярно-генетических методов, используемых в ветеринарно-биологических исследованиях основана на следующих основных принципах:

Комплементарность нуклеотидных оснований: аденин всегда гибридизуется с гуанином, а тимин с цитозином.

При нагревании происходит разъединение цепей ДНК (денатурация), т.е. нормальная двухцепочечная спираль ДНК расщепляется на две одноцепочечные.

При охлаждении (ренатурации) происходит восстановление двухцепочечной структуры в соответствии с правилом комплементарности нуклеотидов;

Расщепление молекулы ДНК может быть достигнуто с помощью специальных бактериальных ферментов – эндонуклеаз, рестрицирующих молекулу ДНК в местах со строго определенной для каждой эндонуклеазы последовательностью нуклеотидов.

Фрагменты ДНК в акриламидном или агарозном гелях легко разделяются под действием электрического тока; положение фрагментов ДНК при электрофорезе определяется размерами ДНК фрагментов.

В клетках нуклеиновые кислоты связаны с белками, образуя нуклеопротеиды. Выделение нуклеиновых кислот сводится преимущественно к очистке их от белков. Для этого препараты, содержащие нуклеиновые кислоты, обрабатывают ПАВ и экстрагируют белки фенолом. Последующая очистка и фракционирование нуклеиновых кислот проводятся с помощью ультрацентрифугирования, различных видов жидкостной хроматографии и гель-электрофореза. Для получения индивидуальных нуклеиновых кислот обычно используют различные варианты последнего метода.

Современные методы химического синтеза нуклеиновых кислот позволяют получать крупные фрагменты ДНК, в т.ч. целые гены. Методические основы химически - ферментативных методов синтеза ДНК разработаны Х. Кораной. Они включают: 1) химический синтез комплементарных, взаимоперекрывающихся олигонуклеотидов, из которых затем в результате комплементационных взаимодействий выстраиваются дуплексы - фрагменты молекулы синтезируемой ДНК с несовпадающими разрывами в обеих цепях; 2) соединение (лигирование) таких олигонуклеотидов в составе дуплекса с помощью фермента Т4 ДНКлигазы. Сборку протяженных ДНК из синтетически однотяжевых олигонуклеотидов проводят в несколько этапов. Сначала собирают небольшие дуплексы с "липкими" концами (одно-тяжевыми комплементарными участками), из которых затем последовательно формируют более протяженные структуры. Таким образом, могут быть получены искусственные фрагменты ДНК большой длины и с любой нуклеотидной последовательностью. С помощью генетической инженерии возможно клонирование (получение в индивидуальном виде и размножение) искусственной ДНК.

Метод радиоактивного мечения требует введения экспериментальным животным в область клеточных тел определенных нервных путей радиоактивных предшественников. Так, после инъекции в глаз можно следить за меткой по мере ее прохождения по зрительному пути. Более полная информация может быть получена путем определения распределения радиоактивной метки в зависимости от времени в разрезанном на равные сегменты нерве. Такие определения можно проводить в сочетании с лигатурой или с исследованиями цитоплазмы нервных окончаний при использовании субклеточного фракционирования для их выделения в виде синапсом.

Вопросы для самоподготовки:

1. Научные принципы, на которых базируются молекулярно-генетические методы.
2. Основные направления и методы получения фрагментов нуклеиновых кислот.
3. Молекулярные конструкции на основе молекул нуклеиновых кислот.
4. Способы разрушения тканей и клеток.
5. Методы выявления ДНК
6. Основные направления и методы получения фрагментов ДНК.
7. Полиморфные сайты рестрикции. ПДРФ-анализ.
8. Системы детекции.
9. Использование электрофоретических методов для анализа чистоты и изучения физико-химических характеристик биомолекул.
10. Электрофоретические методы. Электрофорез в гелях.
11. Электрофорез в присутствии ДДС-Na. Изоэлектрическое

фокусирование.

12. Двумерный электрофорез. Капиллярный электрофорез
13. Радиоактивные системы мечения.
14. Нерадиоизотопные метки.
15. Генная диагностика. ДНК диагностика заболеваний.
16. Перечислите отличия ДНК-диагностики от традиционных бактериологических методов исследования пищевого сырья и продуктов.

Тема 1.2. Гибридизационные молекулярно-генетические методы

Содержание темы:

Гибридизация ДНК, гибридизация нуклеиновых кислот — соединение *in vitro* комплементарных одноцепочечных нуклеиновых кислот в одну молекулу. При полной комплементарности объединение происходит легко и быстро, а в случае частичной некомплементарности слияние цепочек замедляется, что позволяет оценить степень комплементарности. Возможна гибридизация ДНК-ДНК и ДНК-РНК.

Зонды на основе нуклеиновых кислот — это небольшие сегменты однонитевой нуклеиновой кислоты, которая может быть использована для определения специфических генетических последовательностей в пробах. Зонды (пробы) могут быть разработаны для последовательностей ДНК или РНК. Привлекательность использования генных зондов в определении микроорганизмов заключается в том, что зонд, состоящий из последовательности лишь 20 нуклеотидов, уникален и может быть использован для точного определения микроорганизма.

Метод ДНК-зондов позволяет обнаруживать нуклеиновые кислоты (в том числе и вирусные) в любых материалах, включая патологический материал от больных животных. Он основан на способности одноцепочечных молекул нуклеиновых кислот соединяться в двухцепочечные, если они взаимно комплементарны. Каждая молекула нуклеиновой кислоты представляет собой цепь нуклеотидов, связанных фосфодиэфирными связями. Любой же нуклеотид можно рассматривать как структуру, состоящую из трех частей:

- фосфорной кислоты (H_3PO_4);
 - сахара (рибозы или дезоксирибозы);
 - азотистого основания (аденин, гуанин, цитозин, тимин или урацил);
- В зависимости от вида входящего в состав нуклеотидов сахара нуклеиновые кислоты делятся на дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) и рибонуклеиновую кислоту (РНК).

Саузерн-блоттинг (Southern-blotting) — обнаружение специфических нуклеотидных последовательностей путем переноса электрофоретически разделенных фрагментов ДНК из агарозного геля на нитроцеллюлозный (бумажный) фильтр за счет капиллярного эффекта

(blotting – «промокание») и гибридизации с меченым ДНК- или РНК-зондом, комплементарным искомой последовательности.

Нозерн-блоттинг - это метод, разработанный для обнаружения определенной последовательности РНК или последовательности мРНК в образце для изучения экспрессии генов.

Вестерн - блот (иногда называемый иммуноблот белок), или вестерн - блоттинг , является широко используемым аналитическим методом в области молекулярной биологии и иммуногенетики для определения специфических белков в образце гомогената ткани или экстракта. Метод вестерн-блоттинга использует три элемента для достижения своей задачи отделения определенного белка от комплекса: разделение по размеру, перенос белка на твердую основу и маркировку целевого белка с использованием первичного и вторичного антитела для визуализации. Создается синтетическое антитело или антитело животного происхождения (известное как первичное антитело), которое распознает и связывается с конкретным целевым белком. Мембрана для электрофореза промывается раствором, содержащим первичное антитело, перед тем, как смыть избыток антител. Добавляется вторичное антитело, которое распознает первичное антитело и связывается с ним. Вторичное антитело визуализируется с помощью различных методов, таких как окрашивание, иммунофлуоресценция и радиоактивность, что позволяет косвенно определять конкретный целевой белок.

Геномная дактилоскопия, или ДНК-дактилоскопия, — система научных методов биологической идентификации индивидуумов (организмов) на основе уникальности последовательности нуклеотидов ДНК каждого живого существа (за исключением однояйцевых близнецов), своеобразного «генетического отпечатка», остающегося индивидуальным и неизменным на протяжении всей жизни индивидуума (организма).

Метод «ДНК – отпечатков» - метод создания генетических «отпечатков пальцев», основанный на анализе полиморфизма ДНК. Геномная ДНК расщепляется эндонуклеазами рестрикции, затем образующиеся фрагменты разделяются при помощи электрофореза в геле и переносятся на нитроцеллюлозные фильтры.

Технология микрочипов – это принципиально новый уровень лабораторных исследований, так как она позволяет проводить одновременное тестирование тысяч образцов. Тысячи молекул ДНК или белков помещаются на стеклянные пластинки для создания ДНК- и белковых чипов соответственно. В последних разработках стеклянные пластинки заменяются особым образом изготовленными стеклянными шариками. ДНК-микрочипы необходимы для практического использования информации, полученной в результате секвенирования геномов живых организмов. Известные последовательности генов и геномные карты значат не так уж много до тех пор, пока не определены

функции входящих в их состав генов. Без белковых микрочипов эта работа является настолько же трудоемкой, какой была расшифровка геномов до появления современных секвенаторов. Белковые микрочипы

Переход от ДНК-микрочипов к белковым микрочипам выглядит вполне логичным шагом, однако его осуществление достаточно проблематично. Структура и функции белковых молекул намного сложнее, чем у молекул ДНК. К тому же белки намного менее стабильны. Каждый тип клеток содержит тысячи различных белков, некоторые из которых обладают уникальными, характерными только для определенного типа клеток, функциями. Кроме того, белковый состав клетки меняется в зависимости от состояния здоровья, возраста и влияния окружающей среды.

Белковые микрочипы будут использоваться для:

- обнаружения белковых биомаркеров, характерных для различных заболеваний и даже разных их стадий;
- оценки потенциальной эффективности и токсичности препаратов в доклинических испытаниях;
- измерения различий в синтезе белков различными типами клеток, клетками, находящимися на разных стадиях развития, а также здоровыми и патологически измененными клетками;
- изучения взаимосвязи между структурой и функциями белков;
- оценки различий в экспрессии белков с целью выявления мишеней для новых лекарственных препаратов;
- изучения взаимодействий между белками и другими молекулами.

Фундаментальный принцип, лежащий в основе технологии микрочипов, вдохновил исследователей на создание большого количества устройств для решения широкого спектра научных задач и создания новых продуктов.

Тканевые микрочипы, позволяющие проводить анализ тысяч образцов тканей на одном предметном стекле, используются для определения содержания белков в здоровых и патологически измененных тканях и оценки потенциальных мишеней для лекарственных препаратов. Образцы ткани мозга, размещенные на предметных стеклах, позволяют исследователям измерять изменение электрической активности нервных клеток при различных воздействиях.

Клеточные микрочипы позволяют избежать проблемы нестабильности белков в белковых микрочипах и производить более точный анализ взаимодействий белков внутри клетки.

Микрочипы на основе малых молекул позволяют фармакологическим компаниям производить одновременный скрининг тысяч потенциальных лекарственных средств.

Вопросы для самоподготовки:

1. Гибридизация Скрининг с помощью гибридизации.
2. Зонды на основе нуклеиновых кислот. Гибридизация с ДНК-

зондами.

3. Видоспецифические зонды для идентификации ДНК растений и животных

4. Блот-гибридизация по Саузерну, гибридизация *in situ*

5. Применение блот-гибридизации для изучения болезней животных.

6. Саузерн-блоттинг. Нозерн- и вестернблоттинг.

7. Геномная дактилоскопия. Метод «ДНК-отпечатков».

8. Молекулярное сканирование известных мутаций.

9. Что такое биосенсоры?

Какие соединения являются биоматериалом для получения биосенсоров?

11. Расскажите о принципах конструирования биосенсоров.

Какие типы биосенсоров наиболее широко применяются в биотехнологии?

Какие виды микроорганизмов используются для создания биосенсоров?

Что такое биочип и для чего он предназначен?

Перечислите и охарактеризуйте разновидности биочипов.

Тема 1.3. Методы молекулярно – генетической диагностики на основе амплификации

Содержание темы:

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – метод получения множества копий целевого гена или любого другого участка молекулы ДНК, основанный на механизме естественной репликации ДНК в живых организмах.

Метод ПЦР базируется на идее многократного избирательного копирования (амплификации или размножения) заданного участка ДНК при помощи ДНК-полимеразы в условиях *in vitro* для получения достаточно большого количества копий этого участка, которые могут быть выявлены обычными методами детекции или подвергнуты иным, предусмотренным дизайном эксперимента, манипуляциям.

При этом происходит копирование только строго определенного участка ДНК, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце. ПЦР состоит из многократно повторяющихся циклов (25-35), каждый из которых включает три этапа: денатурация (расплетение, плавление) двухцепочечных фрагментов ДНК, “отжиг” (присоединение, гибридизация) праймеров к матрице и полимеризация (удлинение праймеров, элонгация).

Программа амплификации. Предварительный нагрев обеспечивает полную денатурацию матрицы, а также инактивацию каких-либо посторонних белков (например, протеаз или нуклеаз), присутствующих в пробе. Начальная денатурация проводится при температуре от +92о С до +96о С на протяжении 0,5-10 мин. Температура и продолжительность

этого этапа во многом определяется характеристиками матрицы. Если матрица примерно на 50% состоит из GC нуклеотидов, то для ее полной денатурации достаточно 1-3 мин. при +95о С. Однако, если она обогащена GC нуклеотидами, то для ее полной денатурации может понадобиться более продолжительное время (до 10 мин.) и более высокая температура (до +96о С). При этом следует помнить, что в такой ситуации Taq ДНК-полимераза должна добавляться в реакционную смесь только после этапа предварительного нагрева (во избежание ее инактивации). Первый этап цикла: денатурация, проводится при температуре от +92о С до +95о С на протяжении 30-120 сек. Температура и время денатурации выбираются как компромисс: с одной стороны, как можно более полно денатурировать матрицу, но, с другой стороны, не сильно повредить матрицу и Taq ДНК-полимеразу. Если матрица обогащена GC нуклеотидами, то продолжительность этапа денатурации может быть увеличена до 3-4 мин. Для решения проблемы денатурации матрицы используют дополнительные компоненты (диметилсульфоксида или формамида) в реакционной смеси, снижающие температуру плавления, или же заменяют в реакционной смеси дезоксигуанозинтрифосфата на 7-деаза-дезоксигуанозинтрифосфат. Второй этап цикла: «отжиг», проводится при температуре +55- 65 о С на протяжении 10-120 сек. Целесообразно подобрать ее 59 экспериментальным путем.

Начиная с расчетной градиентно повышать или снижать температуру «отжига» на 2-5 о С. При этом следует учитывать, что чем выше температура «отжига», тем выше специфичность ПЦР. Но как только она превышает некую критическую величину (для данной пары праймеров), то выход конечного продукта начинает резко падать. Третий этап цикла: элонгация, проводится при температуре +72о С на протяжении 10-120 сек. Указанная температура соответствует температурному оптимуму Taq ДНК-полимеразы. Однако эта температура приемлема не для всех случаев. Так, при температуре +65о С синтез, осуществляемый Taq ДНК-полимеразой, существенно меньше зависит от характера матрицы, а матрицы, содержащие ~90% AT-нуклеотидов, удаётся амплифицировать, снизив температуру до +60о С (при этом скорость синтеза составляет 1 тыс. нуклеотидов в минуту). Продолжительность этапа элонгации определяется размером амплифицируемого фрагмента и скоростью работы Taq ДНКполимеразы: при температуре от +75о С до +80о С скорость ее работы равна ~150 нукл./сек., при +70о С – 60 нукл./сек., при +55о С – 24 нукл./сек., при +37о С – 1,5 нукл./сек., а при +22о С – 0,25 нукл./сек. Количество циклов. В стандартном варианте ПЦР обычно используется 25-35 циклов амплификации. Слишком большое число циклов амплификации чревато насыщением реакции, могут синтезироваться длинные продукты, а также возможно накопление одноцепочечных продуктов и синтез коротких продуктов (из-за истощения запаса нуклеотидов в реакционной смеси).

Финальная элонгация – дополнительный цикл амплификации, в котором этап элонгации удлинён до 5-15 мин.

Для повышения специфичности, чувствительности и воспроизводимости результатов используют различные модификации метода ПЦР.

ПЦР с «горячим» стартом (Hot-start PCR). Особенностью метода является предотвращение возможности начала реакции до момента достижения в пробирке условий, обеспечивающих специфический отжиг, что уменьшает риск образования неспецифических продуктов амплификации. Во время подготовки ПЦР-смеси (с момента, когда все необходимые компоненты реакции смешаны, до начала стадии денатурации) могут образоваться неспецифичные димеры праймеров-матриц и их амплификация. Данный эффект обусловлен прежде всего зависимостью температуры плавления праймера от его GC-состава и размера. При оптимизации реакции температура отжига праймера близка к температуре плавления, при этом праймер образует двухцепочечную молекулу только при условии его полной комплементарности, обеспечивая специфичность реакции. Решением этой проблемы является добавление одного из компонентов реакционной смеси (праймера, полимеразы, $MgCl_2$) только после прохождения стадии денатурации. Наряду с этим были разработаны два подхода, позволяющие ингибировать подобную неспецифическую амплификацию. Первый из них подразумевает физическое разделение компонентов реакции (например, при помощи, воска, парафина, при этом в нижней части реакционной смеси находятся праймеры, в верхней – Taq-полимераза и ДНК-мишень), пока рабочая смесь не достигнет температуры +55...+58 °C. Второй – использование модифицированных ДНК-полимераз и моноклональных антител к ним: AmpliTaq™ plus, AmpliTaq Gold™, TaqStart™ Antibody, Affinity-Immobilized Taq и т. д. – с предварительным прогревом рабочей 61 смеси при 80 °C в течение 2–10 мин для их активации. Фермент, связанный с моноклональными антителами, становится активным лишь после стадии первой денатурации, когда моноклональные антитела необратимо денатурируют и освобождают активные центры ДНК-полимеразы. Во всех перечисленных случаях, даже если неспецифический отжиг произошёл до начала температурного циклирования, элонгации не происходит, а при нагревании комплексы праймер-ДНК денатурируют, поэтому неспецифические продукты не образуются. В дальнейшем температура в пробирке не опускается ниже температуры плавления, что обеспечивает образование специфического продукта амплификации.

Touchdown ПЦР. С помощью Touchdown (Stepdown) ПЦР уменьшают влияние неспецифического связывания праймеров, приводящего к амплификации неспецифической последовательности ДНК. Температурой отжига праймеров во время цикла ПЦР определяется

специфичность их отжига. Точка плавления праймера устанавливает верхний предел температуры отжига. При температурах несколько ниже этой точки, только при наличии очень специфической последовательности, возникает спаривание между праймером и ДНК-мишенью. При более низких температурах праймеры связываются менее специфично. Неспецифическое связывание праймера приводит к неопределенным результатам ПЦР. При постановке данной реакции первые циклы проводят при температуре выше температуры отжига, затем каждые несколько циклов температуру снижают на 1–2°C. При определенной температуре система пройдет через полосу оптимальной специфичности праймеров к ДНК. Таким образом, удастся избавиться от несоответствия между рассчитанной температурой плавления 62 праймера и реальной оптимальной (для данных конкретных условий) температурой его отжига.

Мультиплексная ПЦР. Позволяет осуществлять одномоментное определение различных локусов путем использования нескольких пар праймеров, проводя амплификацию нескольких ДНКматриц, или ДНКмишеней в одной пробирке. Праймеры, используемые в «мультиплексной» ПЦР, должны иметь схожую температуру отжига и не быть комплементарными друг к другу (для предотвращения их димеризации). К недостаткам этого метода можно отнести более низкую чувствительность, а также сложность интерпретации результатов анализа. К преимуществам – возможность одновременного определения нескольких ДНК-мишеней в одной ПЦР реакции, что приводит к снижению количества манипуляций и себестоимости исследований.

Гнездовая ПЦР (Nested PCR, «вложенная» ПЦР). Используется для уменьшения числа побочных продуктов реакции, повышения чувствительности и специфичности, благодаря использованию двух пар праймеров, специфичных в отношении ДНК-мишени, и проведению двух последовательных реакции ПЦР. Вначале осуществляют амплификацию определенного фрагмента ДНК с помощью внешних праймеров, обычно в течение 15–30 циклов. Небольшое количество образовавшегося продукта амплификации в результате первого этапа без какой-либо очистки далее используют в качестве матрицы на втором этапе амплификации. Вторая пара внутренних праймеров амплифицирует участок ДНК внутри продукта первой реакции амплификации. Поскольку только у специфического продукта амплификации будут присутствовать участки для гибридизации внутренних праймеров, амплификация всех остальных, неспецифических продуктов происходить не будет. Недостатком данного метода является более высокий риск контаминации в 63 лаборатории, как следствие, получение ложноположительных результатов; более высокие трудозатраты при постановке реакции. В то же время данная реакция обладает высокой чувствительностью и специфичностью, за счет разведения образца происходит снижение

концентрации ингибиторов ПЦР при переносе ампликона из одной пробирки в другую.

Ассиметричная ПЦР (Single-sided PCR). Используется когда необходимо амплифицировать преимущественно одну из цепей исходной ДНК (в некоторых методиках секвенирования и гибридизационного анализа, ДНК-чипах, исследования полиморфизма одноцепочечных фрагментов ДНК) и наработать одноцепочечные фрагменты ДНК-мишени. ПЦР проводится как обычно, за исключением того, что один из праймеров берется или в большом избытке по сравнению со вторым праймером или используется в отсутствии второго праймера. Быстрое истощение второго праймера в процессе амплификации приводит к тому, что синтез ДНК продолжается только с одного праймера, приводя к линейному накоплению одноцепочечных продуктов амплификации.

Аллель-специфическая ПЦР. Метод аллель-специфической ПЦР используют при обнаружении мутаций в геномной ДНК, который позволяет находить небольшое число мутантных ДНК на фоне большого числа молекул дикого типа. Для детекции мутантной ДНК используют аллель-специфические праймеры, полностью комплементарные лишь мутантным последовательностям, что обеспечивает амплификацию только мутантной ДНК, а ДНК дикого типа в реакцию не вступает. Аллельные варианты различаются за счет того, что 3'-концевой нуклеотид одного из праймеров гибридизуется непосредственно с переменным нуклеотидом (позиция SNP), чем обуславливается наличие или отсутствие ПЦР. Подобный подход позволяет обнаружить несколько десятков или 64 сотен молекул мутантной ДНК на фоне десятков тысяч молекул ДНК дикого типа. Для усиления специфичности действия праймеров вблизи их 3'-концов могут быть введены некомплементарные матрице нуклеотиды. Другой тип универсальных аллельспецифических праймеров содержит 3'-концевой нуклеотид, всегда некомплементарный матрице, а мутантный нуклеотид матрицы находится в его внутренней части. В этом случае продукты амплификации отсутствуют, если в гибриде во внутреннюю часть праймера попадает любой некомплементарный мутантный нуклеотид матричной ДНК вне зависимости от его точной локализации. Такие праймеры позволяют обнаруживать любые точечные мутации в гомозиготном состоянии и у гаплоидных микроорганизмов. Для выявления гетерозиготного состояния анализируемого гена иногда используют мутантный и нормальный праймеры разных размеров, которые различаются по длине их 5'-концевых последовательностей, полностью комплементарных анализируемой ДНК. В этом случае в процессе ПЦР в реакционную смесь можно одновременно добавлять оба аллель специфических праймера: мутантный и нормальный – вместе с общим для обоих праймеров – встречным. Образовавшиеся продукты реакции, соответствующие мутантному аллелю и аллелю дикого типа, далее разделяют

электрофоретически в гелях, применяемых для секвенирования нуклеиновых кислот. При использовании аллель-специфических праймеров для обнаружения мутаций необходимо иметь в виду, что не все сочетания ошибочно спаренных с матрицей 3'-концевых нуклеотидов одинаково эффективны в блокировании ПЦР. Наименьшей способностью к элонгации праймеров с ошибочно спаренными 3'-концевыми нуклеотидами обладает так называемый фрагмент Шоффлера Taq- ДНК полимеразы, который представляет собой молекулу ДНК-полимеразы *T. aquaticus*, укороченную с Nконца. В то же время в этом методе неприменимы термостабильные ДНКполимеразы, обладающие 3'-5'-корректирующей активностью, например, Vent-полимераза. ПЦР с аллель-специфическими праймерами является простым и эффективным методом обнаружения мутаций в геномной ДНК организмов.

RAPD-ПЦР (Random Amplification of Polymorphic DNA PCR, ПЦР со случайной амплификацией полиморфной ДНК, AP-PCR, ПЦР с произвольными праймерами). В этом методе обычно используют один праймер небольшого размера (10–15 п.н.) со случайной последовательностью нуклеотидов при низкоспецифических условиях амплификации. Этот праймер будет частично комплементарен случайным участкам ДНК исследуемых организмов. Амплифицируются только регионы, фланкирующие места связывания праймера на комплементарных цепях ДНК. Таким образом, продукт амплификации будет образовываться только в том случае, если инвертированные повторяющиеся последовательности, которые содержат в себе сайт посадки такого праймера, будут располагаться в анализируемом геноме достаточно близко друг от друга, на расстоянии, допускающем эффективное прохождение полимеразной реакции. Подбирая условия (длину праймера, его состав, температуру и пр.), удастся добиться удовлетворительного отличия картины ПЦР для двух организмов. Используется как таксономический инструмент, когда нужно различить близкие по генетической последовательности организмы, например, разные породы сельскохозяйственных животных.

ПЦР длинных фрагментов (Long-range PCR, Long PCR, LPPCR), представляет собой модификацию ПЦР, предназначенную для амплификации протяженных участков ДНК (10 тыс. оснований и 66 больше). Используют смесь двух полимераз, одна из которых – Taqполимераза с высокой процессивностью (т. е. способная за один проход синтезировать длинную цепь ДНК), а вторая – ДНКполимераза с 3'-5'-эндонуклеазной «проверочной активностью» (proofreading activity). Вторая полимеразы необходима для того, чтобы корректировать ошибки, внесенные первой. Причем полимеразы, не имеющие 3'-5'-экзонуклеазной активности, является основной, а высокоточные полимеразы с корректирующей активностью присутствуют в небольших концентрациях (например, Pfu- или Deep Vent-ДНК-полимеразы). Данная

смесь полимераз позволяет преодолевать проблемы, связанные с низкой точностью синтеза ДНК Taq-полимеразой. Имеется ряд факторов, ограничивающих в обычных условиях проведение амплификации протяженных последовательностей ДНК с высокой точностью. Это депуринизация ДНК при высоких температурах, используемых для денатурации ДНК; подавление элонгации растущих цепей ДНК стабильными элементами вторичной структуры амплифицируемых одноцепочечных участков матрицы; слишком короткое время элонгации праймеров в соответствующих сегментах ПЦР; фрагментация матричной ДНК. Частично данные затруднения преодолевают путем повышения значений pH реакционной смеси при проведении реакции амплификации, что подавляет протонирование пуриновых оснований, которое само по себе ускоряет процесс депуринизации. Проблема вторичной структуры матрицы может быть решена включением в состав реакционной смеси денатурирующих агентов типа диметилсульфоксида, а третье затруднение – увеличением продолжительности элонгации праймеров при температуре + 72 °С. Образование двухцепочечных разрывов матрицы можно предотвратить, выделяя ДНК в более мягких условиях. Данный метод [67] находит применение при обнаружении крупных перестроек геномной ДНК, сопровождающихся экспансией тринуклеотидных повторов, выявления протяженных транслокаций, а также для амплификации целых генов.

ПЦР с обратной транскрипцией (Reverse Transcription PCR, RTPCR, ОТ-ПЦ) используется для амплификации, выделения или идентификации известной последовательности из рибонуклеиновой кислоты (РНК). Синтез одноцепочечной молекулы кДНК проводят на матрице мРНК с помощью фермента ревертазы (обратной транскриптазы, РНК-зависимой ДНК полимеразы), которая дальше используется в качестве матрицы для постановки классической ПЦР. Taq-полимераза неспособна осуществлять синтез однонитевой ДНК на РНК-матрице. Различаются следующие форматы постановки реакции обратной транскрипции (ОТ, RT): - отдельная реакция со случайными затравками, или Randomhexanucleotides; - отдельная (раздельная) реакция со специфическим праймером или сдвинутым вправо (двухшаговая реакция). Данный вариант реакции используется для анализа сложных смесей РНК или при необходимости транскрибирования очень длинных последовательностей; - совмещенная с ПЦР реакция с использованием одной пары праймеров (одношаговая реакция, однопробирочная реакция). В 1991 г. Т. W. Myers и D. H. Gelfand охарактеризовали термостабильный фермент – ДНК-зависимую ДНКполимеразу, выделенную из бактерии *Thermus thermophilus* (Tth-полимеразу), которая в присутствии ионов марганца (Mn^{2+}) катализирует синтез на РНК однонитевой комплементарной ДНК, проявляя при этом активность РНКзависимой ДНК-полимеразы. В присутствии ионов Mg^{2+} у нее

проявляется активность обычной ДНК-полимеразы, сравнимой с таковой у Taq-ДНКполимеразы. Благодаря этим свойствам, фермент используется для одновременного проведения обратной транскрипции и амплификации в одной пробирке, а также позволяет получать более длинные продукты амплификации. Данный метод широко используется для оценки дифференциальной экспрессии генов на уровне транскрипции.

ПЦР в реальном времени (PCR Real-Time). Метод ПЦР с детекцией продукта амплификации в режиме реального времени основан на количественной флуоресцентно-гибридизационной детекции специфических продуктов амплификации, в которой флуоресцентная репортерная молекула (интеркалирующий двухцепочечную ДНК краситель, флуорофор) используется для наблюдения за развитием реакции амплификации, а увеличение интенсивности репортерной флуоресценции прямо пропорционально увеличению количества ампликонов. Чем меньше размер продукта, тем точнее уровень репортерной флуоресценции отражает его количество. При постановке ПЦР в реальном времени флуоресценция положительных образцов увеличивается с каждым циклом амплификации, в то время как отрицательные образцы остаются на уровне базовой флуоресценции. Распознавание положительных образцов осуществляют с помощью алгоритмов компьютерной программы, которая анализирует изменения флуоресценции в каждом цикле. Точность количественного определения при постановке ПЦР в реальном времени зависит от используемых стандартов, а также от количества копий специфического фрагмента в анализируемом образце. Эффективность реакции амплификации может иметь существенные различия при использовании низкокопийных образцов. Данный метод имеет ряд несомненных преимуществ по сравнению с традиционной ПЦР. Амплификация и анализ продукта 69 амплификации осуществляется одновременно в процессе реального времени, информация о продукте накапливается во время амплификации (количественный анализ) в одной и той же пробирке и в одном и том же инструменте. Отсутствует постПЦР-обработка продуктов амплификации, отсутствует необходимость переноса образца, добавления реагентов и проведения электрофореза, как следствие, нет необходимости удалять образец из закрытых пробирок, что ведет к снижению риска контаминации продуктами амплификации (менее жесткие требования к организации ПЦР-лаборатории), обуславливая высокую производительность реакции и быстрый процесс амплификации (термоциклирования). В числе преимуществ также объективность проведенных исследований, автоматический учет результатов. Количественный анализ при ПЦР в реальном времени охватывает широкий динамический диапазон (до 10¹⁰), необходимое количество РНК в 1000 раз меньше, чем при постановке традиционной ПЦР (3 pg = 1

геномный эквивалент). Процесс детекции способен обнаружить двукратное изменение продукта, отсутствует влияние неспецифической амплификации, возможность подтверждения специфической амплификации путем анализа кинетической кривой плавления. Базовый уровень флуоресценции (base line) – это уровень флуоресценции, наблюдаемый в реакционной смеси до появления репортерного сигнала. Свободный зонд, находясь в растворе в контакте с гасителем флуоресценции, создает небольшой базальный уровень флуоресценции, который преодолевается по мере накопления свободного флуорофора в реакционной смеси. Управляющие программы современных амплификаторов, работающие в режиме реального времени, позволяют задать базовый уровень тремя путями: установки среднего значения в диапазоне циклов (average over cycle range); установки минимального значения в 70 диапазоне циклов (minimum over cycle range); тотальный минимум (minimum over all data). При этом необходимо выбрать такой путь, при котором обеспечивался бы минимальный уровень флуоресценции до появления репортерной флуоресценции, что позволяет детектировать начало экспоненциальной фазы с большой точностью. Наиболее часто базовый уровень флуоресценции выбирают как среднее значение в достаточно широком диапазоне циклов до появления репортерной флуоресценции (до начала детекции экспоненциальной фазы). Особенности выбора базовой линии зависят от типа проведения ПЦР в реальном времени. В идеальных условиях на каждом цикле цепной реакции происходит удвоение количества продукта. ПЦР в реальном времени позволяет оценивать количества субстрата при условии, что эффективность реакции и заданный уровень пороговой флуоресценции одинаковы для каждой из сравниваемых реакций. Уровень пороговой флуоресценции PC(T) (threshold) должен быть одинаков для всех сравниваемых образцов. Данная реакция занимает меньше времени, более специфична, чувствительна и воспроизводима, чем традиционная ПЦР. В то же время эта методика не идеальна для мультиплексной ПЦР, ее постановка требует довольно высоких технических навыков, высока стоимость оборудования, велик коэффициент вариаций при анализе одних и тех же проб.

Вопросы для самоподготовки:

1. Принцип метода ПЦР, теоретические основы.
2. Виды амплификаторов. Виды ДНК-полимераз. dNTP. Праймеры для ПЦР.
3. Варианты постановки ПЦР: гнездная ПЦР, ПЦР с гибридационной детекцией с использованием зондов, меченых флуоресцентной меткой.
4. ПЦР в режиме реального времени.
5. Мультиплексная ПЦР.
6. Особенности постановки ПЦР-при детекции РНК-вирусов.

7. Автоматические ПЦР-анализаторы.
8. Ошибки, возникающие на различных этапах постановки ПЦР.
9. Принцип зонирования при проведении различных этапов ПЦР.
10. Правила пробоподготовки при проведении ПЦР.
11. .Современные модификации полимеразной цепной реакции.
12. Петлевая изотермическая амплификация ДНК и РНК (LAMP и
13. Принцип методов LAMP и RT-LAMP

Тема 1.4. Современные возможности секвенирования

Содержание темы:

Секвенирование — это определение последовательности нуклеотидов в фрагменте ДНК. В результате секвенирования определяется также аминокислотная последовательность белка в соответствии с нуклеотидной последовательностью в соответствующем гене.

Классические методы секвенирования ДНК Классические методы секвенирования ДНК были разработаны в конце прошлого века.

Секвенирование методом терминации цепи с помощью капиллярного электрофореза. Для проведения секвенирования с помощью капиллярного электрофореза используют способ подготовки ДНК – «метод терминации цепи» или «дидезокси метод», разработанный в 70-х годах прошлого века F.Sanger. В 1985 г. этот метод был существенно улучшен, после того как радиоактивную метку смогли заменить светящейся флуоресцентной. Особенность метода «терминации цепи» заключается в использовании химически модифицированных дезоксирибонуклеотидов, составляющих нуклеотидную последовательность ДНК. Каждая разновидность нуклеотида «помечена» своей флуоресцентной молекулой-маркером. Когда один из таких модифицированных нуклеотидов при синтезе комплементарной цепи ДНК встраивается в нее, дальнейшая достройка этой цепи прекращается. Видоизмененные разновидности нуклеотидов присутствуют в реакционной смеси в значительно меньших количествах, чем обычные нуклеотиды. В результате получается смесь, содержащая полный набор синтезированных фрагментов ДНК, каждый из которых начинается в одном и том же месте, но заканчивается во всех возможных положениях вдоль цепи ДНК-матрицы. Автоматические секвенаторы разделяют эти фрагменты по величине, как ионы, движущиеся в электрическом поле от «минуса» к «плюсу», пропуская всю смесь через тончайшие капилляры, наполненные гелем. По мере того, как появляется очередной фрагмент, он освещается лазером, что заставляет светиться меченый нуклеотид на его конце. Таким образом, друг за другом определяются разновидности меченых нуклеотидов на концах всех фрагментов и составляется полная нуклеотидная последовательность исследуемого образца ДНК.

Данный метод позволяет за один рабочий цикл (ран) в одном капилляре с точностью до 98 % определить последовательность ДНК длиной до 1000 пар нуклеотидов (п.н.). Метод терминации цепи был использован при секвенировании первого генома человека, но при таких масштабах оказался очень дорогостоящим и медленным.

Пиросеквенирование ДНК. Метод пиросеквенирования основан на определении пирофосфата, образующегося при синтезе комплементарной цепи ДНК. В 1988 г. Е.Нуман впервые предложил использовать этот метод для секвенирования. Согласно этой технологии растворы четырех типов нуклеотидов добавляются последовательно в процессе секвенирования фрагментов ДНК и отмываются после каждой реакции. При включении очередного нуклеотида в синтезируемую комплементарную цепь на подготовленной одноцепочечной ДНК-матрице происходит детекция высвобождающегося пирофосфата путем связывания его с белком люциферазой и в итоге получением светового сигнала. В течение реакции комплементарная цепь ДНК достраивается, а последовательность нуклеотидов определяется по световым сигналам в виде пиков на пирограмме, интенсивность которых пропорциональна количеству встроенных в цепь ДНК нуклеотидов одного вида из очередной реакционной смеси. Простые химические реакции и надежная система детекции исключают необходимость использования в данном методе гелей, электрофореза и специфических флуоресцентных меток.. Однако метод не позволяет качественно определить длину секвенированных фрагментов ДНК более 200 п.н., а также точно определить в последовательности ДНК число одиночных одинаковых нуклеотидов более 6 подряд. Таким образом, метод эффективен для быстрого определения большого числа коротких последовательностей (маркерных зон) ДНК и РНК, выявления единичных мутаций нуклеотидов, повторного секвенирования и т.д. При этом значительно снижается время и стоимость исследования в сравнении с капиллярным электрофорезом.

Методы секвенирования ДНК нового поколения. Чтобы снизить стоимость процедуры секвенирования и увеличить ее производительность, в новых методах определения нуклеотидной последовательности ДНК проводится секвенирование миллионов ее фрагментов одновременно. Отличительной особенностью методов секвенирования ДНК нового поколения является их направленность на получение нуклеотидных последовательностей целых геномов различных организмов, включая человека.. Первый этап представляет собой фрагментацию длинных молекул ДНК ультразвуком или ферментативной рестрикцией до размера 50–1000 п.н. Далее следует стадия обработки концов ДНК-фрагментов, в результате которой удаляются или достраиваются выступающие концы фрагментов, а затем лигируются адаптерные олигонуклеотиды. Затем полученная библиотека

амплифицируется для увеличения представительности каждого фрагмента ДНК. Последний шаг – создание молекулярных колоний путем клональной амплификации каждого фрагмента библиотеки на твердой поверхности.. После клональной амплификации сигнал будет поступать уже от многих сотен тысяч копий одного анализируемого фрагмента ДНК.

В 2004 г. компания «454 Life Sciences» дополнила метод пиросеквенирования возможностями современных технологий. Основой модификации явилось использование эмульсионной ПЦР с одновременной параллельной подготовкой многих сотен тысяч фрагментов ДНК для их секвенирования. Длина единичного фрагмента ДНК, секвенируемого методом высокопроизводительного пиросеквенирования, достигает 1000 п.н. с точностью до 99 %.

Секвенирование на молекулярных кластерах с использованием флуоресцентно меченных предшественников. В 2005 г. компанией «Illumina» предложен метод секвенирования ДНК на молекулярных кластерах с использованием флуоресцентно меченных предшественников, реализованный. В этом методе фрагменты ДНК-матрицы фиксируют на подложке вместе с праймерами и проводят их амплификацию, в результате которой вокруг каждого исходного фиксированного фрагмента ДНК образуется около 1000 его копий. Длина единичного фрагмента ДНК, секвенируемого данным методом, достигает 300 п.н. с точностью 99 %.

В 2007 г. компанией «Applied Biosystems» была представлена платформа «SOLiD» на основе технологии циклического лигазного секвенирования. В данном методе также используют эмульсионную ПЦР, после которой каждая из микросфер содержит на своей поверхности около миллиона копий одного из исходных ДНК-фрагментов. Длина единичного фрагмента ДНК, секвенируемого методом лигирования, достигает 75 п.н. с точность до 99,99 %.

Полупроводниковое секвенирование. В 2010 г. компания «Ion Torrent» (США) (теперь входит в состав корпорации «Life Technologies») представила метод секвенирования ДНК на полупроводниковом чипе. Данный метод не требует модификации нуклеотидных оснований, хемилюминесцентных или флуоресцентных меток.. Основанный на данной технологии секвенатор «Personal Genome Machine» (PGM) за один цикл определяет до 2 млрд п.н., при этом длина единичного прочтения превышает 400 п.н. с точность 99,5 %.. Описанные системы секвенирования второго поколения значительно отличаются по производительности, стоимости и продолжительности рабочего цикла.

Методы секвенирования новейшего поколения. Методы секвенирования третьего поколения (NNGS) призваны исправить основные недостатки методов второго поколения, а именно: сложную пробоподготовку, небольшую длину единичных прочтений, потребность

в усилении сигнала от каждого из анализируемых фрагментов ДНК путем их амплификации, длительное время цикла, необходимость многочисленного повторного секвенирования.

Технология секвенирования одной молекулы. В 2008 г. компания «Helicos BioSciences» впервые продемонстрировала на своем приборе метод секвенирования нуклеотидной последовательности единичных фрагментов ДНК без их предварительной амплификации. Эта технология – «tSMS» (true Single Molecule Sequencing) обладает очень высокой чувствительностью, благодаря разработанному компанией сверхнизкому фоновому свечению поверхности подложки, реагентам для секвенирования и способу визуализации. Позволяет секвенировать фрагменты длиной до 55 п.н. и обеспечивает прочтение миллиардов нуклеотидов в сутки с точностью до 99,999 % при 20-кратном перекрывании.

Секвенирование единичных молекул в реальном времени. В 2009 г. был представлен метод секвенирования «Single Molecule RealTime» (SMRT), разработанный компанией «Pacific Biosciences». Секвенатор этой компании позволяет «читать» каждый фрагмент ДНК десятки раз, при этом консенсусная точность определения его нуклеотидной последовательности достигает 99,9 %. Технология данного метода основана на секвенировании в реальном времени одонитевых фрагментов ДНК длиной до 10000 п.н. и более с помощью ДНК-полимеразы.

Секвенирование через нанопоры. Нанопоры представляют собой nanoотверстия, которые могут быть биологическими, например порообразующий белок в мембране как липидный бислой, или твердотельными (из таких синтетических материалов, как нитрид кремния или графен). Используются 2 метода: 1) химическое секвенирование; 2) ферментативное секвенирование путем терминации цепи. По сравнению с существующими методами секвенирования использование данного метода секвенирования имеет такие преимущества, как низкая стоимость и простота использования, высокая чувствительность, высокая длина считывания (до десятков тысяч оснований), высокая портативность, быстрый анализ и отображение результатов в реальном времени. К недостаткам можно отнести такие свойства, как низкое качество считываний по сравнению с технологиями секвенирования с короткими считываниями, утрата функциональных свойств для биологических пор со временем. Также замечено многообразное влияние факторов окружающей среды на скорость считывания последовательности и на ее качество.

Секвенирование происходит в 3 этапа: выделение геномной ДНК, прочтение и создание библиотеки фрагментов; сборка; аннотация и анализ. Любой метод изучения веществ никогда не работает с одной молекулой. Для секвенирования, масс-спектрометрии и тех методов,

откуда получается большое количество данных, необходимы количества порядка 10^5 – 10^8 . Наиболее часто используемая масса для секвенса – несколько нанограмм. Сколько в нанограмме ДНК? Пусть, длина ДНК примерно 1,5 млн. нуклеотидов ($1,5 \cdot 10^6$), а масса 1 нуклеотида примерно 500 Da, тогда масса ДНК примерно равна $1,5 \cdot 10^6 \cdot 500 = 10^9$ г/моль. $(10^9)/(10^9) = 10^{-18}$ моль, $10^{-18}/10^{23} = 10^{-5}$ — цепей ДНК. Цепи фрагментируют ультразвуком, рестриктазами или любым другим способом. Главное знать размер полученных фрагментов, например, по методу дробовика (shotgun sequencing). Полученные прочитанные фрагменты надо собрать в исходную последовательность. Исходная цепь восстанавливается благодаря тому, что у фрагментов, полученных от разных цепей, есть общие перекрывающиеся части. Для начала, из этих фрагментов нужно создать библиотеку — набор из последовательностей длиной в 2–3 тыс. нуклеотидов. Для хорошего сигнала во время секвенирования, надо много одинаковой ДНК в пробирке. Копии фрагментов получают путем их клонирования.

СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Внедрение Максамом и Гилбертом метода терминации химических цепей для секвенирования ДНК в 1977 г., за которым в том же году последовал метод Сэнгера, вызвало революцию в биологии. Эти методы привели к секвенированию более крупных геномов, кульминацией которого стал проект "Геном человека". В качестве следующего шага были предприняты крупномасштабные проекты секвенирования для изучения вариации последовательности человека. Однако для проектов такого типа секвенирование по методу Sanger было слишком трудоемким, длительным и дорогостоящим. В 2004 г. Национальный исследовательский институт генома человека (NHGRI) инициировал программу снижения стоимости секвенирования всего генома до 1000 долларов США за 10 лет. Это ускорило разработку более дешевых и быстрых методов — технологии NGS, — генерирующих от тысячи до многих миллионов реакций секвенирования за цикл. Основные преимущества этих технологий NGS заключались в том, что они не требовали бактериального клонирования фрагментов ДНК и электрофоретического разделения продуктов секвенирования.

Различные технологии NGS сосуществовали в течение ряда лет; сегодня на рынке преобладает реализация NGS компании Illumina. Благодаря впечатляющему снижению цен, NGS быстро обеспечила секвенирование генома в пределах досягаемости возможностей для небольших лабораторий. Цель — геном человека менее чем за \$1000 — была достигнута несколько лет назад. Сегодня NGS стал стандартным инструментом для многих приложений в базовой биологии, а также для клинических и агрономических исследований. Хотя технологии NGS чрезвычайно производительные, у них также есть некоторые недостатки.

Одним из основных ограничений является их относительно короткая длина прочтений. Геномы часто содержат многочисленные повторяющиеся последовательности, которые длиннее, чем считывает NGS, что может привести к неправильной сборке и разрывам. В результате многие доступные геномы сильно фрагментированы на сотни или тысячи контигов. Кроме того, в то время как небольшие варианты, такие как вариации одного нуклеотида (SNV) и короткие индексы, могут быть точно обнаружены с помощью короткого считывания, большие структурные вариации (SV) сложнее обнаружить и охарактеризовать. Кроме того, короткие чтения имеют ограниченную способность связывать (даже короткие) независимые вариации на одной и той же молекуле ДНК. Вызывают трудности и области с экстремальным значением GC%, поскольку они неэффективно амплифицируются с помощью ПЦР. Поэтому, хотя методы NGS произвели революцию в биологии, возникла необходимость в разработке методов, способных лучше справляться с вышеупомянутыми проблемами. Вскоре после появления NGS появились технологии TGS. Отличительными особенностями TGS являются одномолекулярное секвенирование одной молекулы (SMS) и секвенирование в реальном времени (в отличие от NGS, где секвенирование приостанавливается после каждого добавления нуклеотидного основания).

Первая технология SMS, коммерциализированная Helicos Biosciences, напоминала секвенирование Illumina, но без амплификации. Поскольку метод был относительно медленным, дорогим и давал короткие чтения, он оказался неэффективным. Первая "истинная" технология TGS была выпущена на рынок в 2011 г. компанией Pacific Biosciences (PacBio) и получила название "одномолекулярная последовательность в реальном времени" (SMRT). В 2014 году Oxford Nanopore Technologies (ONT) ввела в действие технологию нанопорового секвенирования. Помимо отсутствия ПЦР-амплификации и процесса секвенирования в реальном времени, важной особенностью SMRT и нанопорового секвенирования является производство длинных считываний. Более того, технология нанопор может напрямую секвенировать РНК и идентифицировать модификации оснований РНК. Благодаря мобильности MinION и очень простым процедурам подготовки библиотеки образцов технология нанопор позволяет впервые выполнить высокопроизводительное секвенирование в полевых условиях и в удаленных местах. Это имеет огромное значение для обследования вспышек заболеваний в развивающихся странах.

Тем не менее остается много места для улучшений технологий секвенирования третьего поколения. Недостатком секвенирования на основе нанопор является высокая частота ошибок. С другой стороны, чтобы не отставать от технологии секвенирования на основе нанопор, для технологии PacBio будет важно увеличить общую длину считывания и

пропускную способность данного метода секвенирования. Стоит упомянуть, что различные другие компании также вкладывают средства в новые методы быстрого, экономически эффективного и портативного секвенирования, и будет интересно посмотреть, появится ли какая-либо из этих технологий в ближайшем будущем на рынке оборудования для проведения секвенирования.

Вопросы для самоподготовки:

1. Показания к проведению анализа с помощью метода секвенирования
2. Секвенирование последовательностей ДНК. Пробоподготовка.
3. Секвенирование нуклеиновых кислот. Основные принципы. Этапы.
4. Оборудование, применяемое при секвенировании.
5. «Библиотеки» ДНК.
6. Первичные данные секвенирования.
7. Точность различных методов секвенирования.
8. Полное секвенирование генома.
9. Современные модификации секвенирования. Секвенирование нового поколения (NGS– NextGenerationSequencing).
10. Новые методы секвенирования: высокопроизводительное пиросеквенирование, циклическое, лигазное и полупроводниковое секвенирование, секвенирование на молекулярных кластерах с использованием флуоресцентно меченных предшественников.
11. Новейшие методы секвенирования (Next-NextGenerationSequencing): технология секвенирования одной молекулы, секвенирование единичных молекул в реальном времени, секвенирование через нанопоры.
12. Ложноположительные и ложноотрицательные результаты при секвенировании.

Раздел 2. Видовая идентификация

Тема 2.1. Молекулярно – генетическая идентификация видового состава сырья

Содержание темы:

При идентификации сырья и продуктов животного и растительного происхождения используются различные методы: молекулярно-генетические, морфологические, органолептические, биохимические, иммунологические, физико-химические (определение йодного числа жира, показатели рефракции, реакция преципитации).

При идентификации используется определение межвидовых различий мышечной ткани животных с помощью гистологических методов, которые позволяют не только проводить идентификацию, но и определять содержание различных примесей тканей другого вида животных и растений. Получены данные по дифференциации общего белка мышц собаки, свиньи, барана, установленные путем изучения

спектра поглощения белка. Эта дифференциация объясняется различным содержанием в белках аминокислот финилаланина, триптофана и тирозина.

Гистологический микроструктурный анализ является одним из методов, с помощью которого можно проводить оценку качества сырья, используемого в перерабатывающих производствах мясного, рыбного направления; определять составные части фарша и их количественное соотношение; обнаруживать в колбасных изделиях и рубленых полуфабрикатах различные добавки; оценивать санитарные показатели используемого сырья и готовой продукции.

Электрофоретические методы позволяют проводить идентификацию по нативным и денатурированным белкам. Использование автоматизированных приборов для этих методов обеспечивает быстрое разделение белков и стандартные условия постановки реакции. Разработаны различные модификации этих методов.

Наиболее эффективным для идентификации сырья и термообработанных мясных или рыбных продуктов (мясные консервы, колбасы, сосиски) является метод электрофореза с додецилсульфатом натрия - SDS-электрофорез. Этот метод позволяет проводить идентификацию компонентов как животного, так и растительного происхождения и дает возможность обнаруживать до 0,02% фальсифицирующих примесей.

Наличие тех или иных ферментов в тканях животных является характеристикой, используемой при идентификации.

Наиболее специфичными при идентификации являются иммунологические методы (иммуноферментные, иммуноэлектрофоретические, иммунохроматографические, иммунодиффузные и др.), а также методы ДНК-диагностики.

Метод определения сырьевого состава основан на выявлении при помощи ПЦР фрагментов видоспецифичной ДНК, присутствие которых в анализируемом материале однозначно свидетельствует о наличии в нём компонентов тканей растений или животных определённого вида.

Сущность методики заключается в том, что вся ДНК, полученная в результате клеточного лизиса, связывается с сорбентом и в таком состоянии проходит стадии очистки, затем при помощи элюции переводится в раствор.

Для выявления фрагментов видоспецифичной ДНК растений и животных используют наборы реагентов для ПЦР, содержащие праймеры, специфичные к ДНК определённого вида растений или животных.

Вопросы для самоподготовки:

1. Методы определения видового происхождения мясных и растительных ингредиентов, содержащихся в кормах, пищевых продуктах, продовольственном сырье растительного, животного

происхождения.

2. Видовая идентификация на основе анализа ДНК.
3. Анализ VNTR- и STR-полиморфизма
4. Определение видовой принадлежности мясного сырья и видового состава готовой продукции методом ПЦР.
5. Экспресс-метод определения сырьевого состава для ускоренной идентификации видоспецифичной ДНК крупного рогатого скота (*Bos taurus*)
6. Экспресс-метод определения сырьевого состава для ускоренной идентификации видоспецифичной ДНК свиньи (*Sus scrofa*).
7. Экспресс-метод определения сырьевого состава для ускоренной идентификации видоспецифичной ДНК курицы (*Gallus gallus*),
8. Экспресс-метод определения сырьевого состава для ускоренной идентификации видоспецифичной ДНК сои (*Glycine max*),
9. Экспресс-метод определения сырьевого состава для ускоренной идентификации видоспецифичной ДНК кукурузы (*Zea mays*),
10. Экспресс-метод определения сырьевого состава для ускоренной идентификации видоспецифичной ДНК картофеля (*Solanum tuberosum*)
11. ГОСТ 31719-2012

Тема 2.2. Генетический баркодинг

Содержание темы:

Генетический баркодинг - метод молекулярной идентификации, который позволяет по коротким генетическим маркерам в ДНК определять принадлежность организма к определённому таксону.

В отличие от методов молекулярной филогенетики, ДНКбаркодирование используется для определения места данного организма в уже существующей классификации, а не для построения филогенетических деревьев и дополнения уже существующей классификации, поэтому вопрос об использовании баркодирования ДНК для идентификации видовой принадлежности нового организма является спорным[3]. Наиболее часто используемым локусом генетического баркодинга для животных является участок митохондриального гена цитохромоксидазы I из примерно 600 пар нуклеотидов.

Применение ДНК-баркодирования распространяется на такие задачи, как, например, идентификация растения только по его листьям (к примеру, если недоступны цветки или плоды), идентификация личинок насекомых (которые могут иметь меньше диагностических признаков, чем взрослые особи, и часто менее изучены), определение рациона питания животных по содержанию желудка или фекалиям и другое.

Локусы для ДНК-баркодинга должны:

- представлять собой не очень длинные участки ДНК;

- присутствовать у большинства представителей рассматриваемых таксонов и при этом содержать небольшое количество вариаций у представителей одного вида;

- достаточно легко секвенироваться с помощью современных технологий секвенирования без использования специфических праймеров.

Предлагаются различные локусы для разных таксонов, отбор таких локусов проводится специальными комитетами. На сегодняшний день официально используют:

- Для животных и многих других эукариот — митохондриальный ген цитохромоксидазы;

- Для растений — конкатенация генов хлоропластов *rbcL* и *matK* (но эти локусы обеспечивают низкое разрешение при идентификации наземных растений, поэтому им пытаются найти замену).

Определение птиц

В попытке найти соответствие между границами видов, определёнными при помощи традиционной систематики, и границами, выявляемыми при использовании ДНК-баркодирования, Пауль Геберт с коллегами произвели баркодирование 260 видов птиц (более трети всех гнездящихся в Северной Америке видов). В результате было обнаружено, что все последовательности гена COI между видами были различны, внутри же видов (130 видов были представлены двумя и более образцами) различия в последовательности COI отсутствовали, либо были незначительны. В среднем последовательности между видами различались на 7,93 %, а внутри вида на 0,43 %.

В четырёх случаях внутри вида наблюдалась необычно высокая разница между последовательностями локусов, что дало повод предположить наличие новых видов. Интересно, что в трёх из четырёх случаев некоторые систематики уже разбивали такой политипичный вид на два. Данные Геберта с коллегами поддерживают такое разделение, а также в целом демонстрируют эффективность использования ДНК-баркодинга для определения видовой принадлежности птиц. Авторами кроме того предложен универсальный порог, который они предлагают использовать при выделении новых видов: предлагается считать разными видами такие группы индивидов, средняя разница между последовательностями баркодинговых локусов которых десятикратно превышает среднюю внутривидовую разницу для исследуемой группы.

Другими примерами использования ДНК-баркодирования в систематике птиц могут служить исследования видов с широким ареалом и высокой внутривидовой морфологической изменчивостью, что было проделано на примере обыкновенной сипухи, а также реорганизация групп с неясными внутренними связями, как, например, семейства Тимелиевые.

Определение рыб

Fish Barcode of Life Initiative (FISH-BOL) является проектом по сбору, стандартизации и систематизации данных ДНК-баркодирования образцов рыб, для которых определена достоверная таксономическая принадлежность. Будучи запущена в 2005 году, по состоянию на 2016 год база данных содержит информацию о последовательностях локусов более чем 11000 видов рыб, что составляет около 35 % всего биологического разнообразия группы. Кроме последовательностей, в FISH-BOL содержатся фотографии и географические координаты исследованных образцов, информация о распространении видов, номенклатуре и ссылки на литературу. Таким образом, FISH-BOL дублирует и значительно дополняет информацию, имеющуюся в других источниках, таких как, например, Catalog of Fishes и FishBase.

ДНК-баркодирование всех видов рыб может быть полезно по целому ряду причин: это позволит проводить определение вида широкому кругу лиц, выявлять ранее неизвестные виды, проводить определение вида в ситуациях, когда традиционные методы неприменимы. Примером такой ситуации может быть филогенетический анализ группировки при помощи баркодирования, который может быть применён при определении вида рыбы, вызвавшей заболевание сигаутеру, по пищевым остаткам.

Одной из задач, в решении которой баркодирование ДНК может играть большую роль, является определение границ между так называемыми криптическими, или скрытыми, видами. Как правило, это комплекс морфологически неразличимых видов, разделение таких комплексов на отдельные таксоны часто представляет трудности.

Вопросы для самоподготовки:

1. Митохондриальная ДНК.
2. Понятие генетического баркодинга (DNA Barcoding)
3. Научные основы ДНК-штрихкодирования, как метода генетической идентификации видов.
4. Этапы проведения баркодинга. Используемое оборудование. Возможности. Перспективы метода.
5. ДНК-баркод. Генетические маркеры растений, животных, грибов, используемые в баркодинге.
6. Практическое применение ДНК-баркодинга в видовой идентификации.
7. Значение и возможности ДНК-баркодинга в ветеринарно-санитарной экспертизе.
8. Ограничение метода DNA Barcoding

Раздел 3. Обеспечение безопасности пищевой продукции из ГМИ

Тема 3.1. Генетически модифицированное сырьё

Содержание темы:

Получение генетически модифицированных организмов (ГМО) связано со "встраиванием" чужого гена в ДНК других растений или животных (производят транспортировку гена, т.е. трансгенизацию) с целью изменения свойств или параметров последних. В результате такой модификации происходит искусственное внедрение новых генов в геном организма.

Основные этапы создания ГМО:

1. Получение изолированного гена.
2. Введение гена в вектор для переноса в организм.
3. Перенос вектора с геном в модифицируемый организм.
4. Преобразование клеток организма.
5. Отбор генетически модифицированных организмов и устранение тех, которые не были успешно модифицированы.

Методы осуществления каждого из этих этапов составляют в совокупности методы генетической инженерии.

Процесс синтеза генов в настоящее время разработан очень хорошо и даже в значительной степени автоматизирован. Существуют специальные аппараты, снабжённые ЭВМ, в памяти которых закладывают программы синтеза различных нуклеотидных последовательностей. Такой аппарат синтезирует отрезки ДНК длиной до 100—120 азотистых оснований (олигонуклеотиды).

Чтобы встроить ген в вектор, используют ферменты — рестриктазы и лигазы. С помощью рестриктаз ген и вектор можно разрезать на кусочки. С помощью лигаз такие кусочки можно «склеивать», соединять в иной комбинации, конструируя новый ген или заключая его в вектор.

Техника введения генов в бактерии была разработана после того, как Фредерик Гриффит открыл явление бактериальной трансформации. В основе этого явления лежит примитивный половой процесс, который у бактерий сопровождается обменом небольшими фрагментами нехромосомной ДНК, плазмидами. Плазмидные технологии легли в основу введения искусственных генов в бактериальные клетки. Популярными методами введения вектора в клетку растений является использование почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens* или генной пушки. Для генетической инженерии животных используют трансфекцию, вектора, на основе ретровирусов и другие методы[32] .

Если модификации подвергаются одноклеточные организмы или культуры клеток многоклеточных, то на этом этапе начинается клонирование, то есть отбор тех организмов и их потомков (клонов), которые подверглись модификации. Когда же поставлена задача получить многоклеточные организмы, то клетки с изменённым

генотипом используют для вегетативного размножения растений или вводят в бластоцисты суррогатной матери, когда речь идёт о животных. В результате рождаются детёныши с изменённым или неизменным генотипом, среди которых отбирают и скрещивают между собой только те, которые проявляют ожидаемые изменения.

Генная инженерия используется для создания новых сортов растений, устойчивых к неблагоприятным условиям среды и вредителям, обладающих лучшими ростовыми и вкусовыми качествами.

Проходят испытания генетически модифицированные сорта лесных пород со значительным содержанием целлюлозы в древесине и быстрым ростом.

Однако некоторые компании устанавливают ограничения на использование продаваемых ими генетически модифицированных семян, запрещая высевание самостоятельно полученных семян. Для этого используются юридические ограничения типа контрактов, патентов или лицензирования семян. Также для подобных ограничений одно время прорабатывались ограничительные технологии (GURT), которые так и не использовались в коммерчески доступных ГМ-линиях. Технологии GURT либо делают стерильным выращенные семена (V-GURT), либо требуют особых химических веществ для проявления внесённого с помощью модификации свойства (T-GURT). При этом стоит отметить, что в сельском хозяйстве широко применяются гибриды F1, которые, как и ГМО-сорты, требуют ежегодной закупки семенного материала. Некоторые продукты содержат ген, приводящий к стерильности пыльцы, например, ген барназы, полученный из бактерии *Bacillus amyloliquefaciens*.

Методом генного редактирования удалось создать свиней, которые потенциально устойчивы к африканской свиной чуме. Изменение пяти «букв» в коде ДНК гена RELA у выращиваемых на фермах животных, позволило получить вариант гена, который, предположительно защищает их диких сородичей: бородавочников и кустарниковых свиней от этого заболевания.

Вопросы для самоподготовки:

9. ДНК-технологии в производстве продуктов питания.
10. Генетически модифицированные источники пищи
11. С какой целью чаще всего проводятся генетические модификации сельскохозяйственных растений?
12. Генная инженерия растений.
13. Приведите примеры приобретаемых растениями в результате трансгенеза свойств.
14. Современные технологии генной инженерии.
15. Молекулярное клонирование. Векторные системы
16. Какой метод получения трансгенных организмов чаще всего используется для получения ГМ-растений?

17. Какие виды ГМ-растений занимают в мире наибольшие посевные площади?

18. Какими возможными рисками сопровождается широкое распространение ГМО?

19. Сравните законодательное регулирование маркировки ГМИ стран ЕС, США и России.

20. Какие страны мира имеют наиболее либеральное в отношении ГМИ пищи законодательство?

Тема 3.2. Оценка безопасности и качества ГМИ

Содержание темы:

В РФ с учетом международного опыта разработан и введен в действие особый порядок оценки безопасности и качества, а также регистрации пищевой продукции, полученной из генно-модифицированных источников.

Этапы исследования пищевой безопасности предусматривают изучение пищевых и токсикологических характеристик продукции. Оценка пищевых свойств включает изучение:

- пищевой ценности нового продукта;
- нормы потребления;
- способов использования в питании;
- биодоступности;
- поступления отдельных нутриентов (если ожидаемое поступление нутриента превышает 15% от его суточной потребности);
- влияния на микрофлору кишечника (если генномодифицированный источник содержит живые организмы).

Токсикологическая характеристика обуславливает определение следующих показателей:

- токсикокинетика;
- генотоксичность;
- потенциальная аллергенность;
- потенциальная колонизация в желудочно-кишечном тракте (в случае содержания в генномодифицированном источнике живых микроорганизмов);
- результаты субхронического (90 суток) токсикологического эксперимента на лабораторных животных и исследований на добровольцах.

Медико-генетическая оценка пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников, включает:

- экспертизу структуры рекомбинантной ДНК, внедренной в растительный геном, в том числе маркерных генов и промоторов;
- оценку регуляторных последовательностей;

- определение стабильности генетически модифицированных организмов на протяжении нескольких поколений, с учетом уровня выраженности генов.

Оценка осуществляется Центром «Биоинженерия» РАН и медикогенетическим научным Центром РАМН. При проведении этих исследований возникает проблема идентификации продуктов, полученных из ГМО. Разработке и использованию методов идентификации посвящены многочисленные специальные исследования. В настоящее время существуют два основных метода, которые позволяют идентифицировать наличие даже следовых количеств генномодифицированных организмов.

Вопросы для самоподготовки:

1. Пищевая токсико-гигиеническая оценка трансгенных культур.
2. Принцип композиционной эквивалентности.
3. Исследование пищевой безопасности ГМИ.
4. Токсикологическая безопасность, в том числе генотоксичность.
5. Законодательные акты в области исследования генно-инженерно-модифицированных организмов.
6. Методики производства экспертиз (исследований) биологической безопасности генно-инженерно-модифицированных организмов, используемых для производства кормов и кормовых добавок для животных
7. Приказ Министерства сельского хозяйства Российской Федерации от 27.03.2020 г. № 160.
8. 7.Методики производства экспертиз (исследований) биологической безопасности генно-инженерно-модифицированных организмов, используемых для производства лекарственных средств для ветеринарного применения.
9. ПРИКАЗ Мин СХ РФ от 28 февраля 2020 года N 92.

Раздел 4. Молекулярно-генетический мониторинг биотехнологических процессов

Тема 4.1. Молекулярно-генетический контроль производственных биотехнологических процессов

Содержание темы:

Микроорганизмы являются постоянными «спутниками» не только человека и животных, но и высших растений. Они встречаются как на поверхности, так и внутри надземных и подземных органов растений (стеблей и листьев, семян, плодов, корней).

Бактерии, вызывающие заболевания растений, называются фитопатогенными. Они обладают различной степенью патогенности и относятся к различным родам: *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Agrobacterium*, *Pectobacterium*, *Rhizobium* и др. (таблица 1).

Заболевания растений, вызываемые бактериями, называются бактериозами, которые подразделяются на 3 группы:

- общие или сосудистые
- местные паренхиматозные
- опухоли.

При общем поражении возбудитель проникает в сосудистую систему корней, болезнь сопровождается увяданием листьев, стеблей и приводит к гибели растения.

При паренхиматозных поражениях бактерии проникают в ткани, где с помощью особых ферментов приводят к мацерации и отслаиванию тканей растения.

Опухолевые образования на растениях бывают раковые и туберкулезные. При раковых опухолях наблюдается разрастание ткани, при туберкулезных – в разрастающейся ткани образуются полости, заполненные бактериальной слизью.

Наблюдаются и смешанные типы поражения растений. В пораженных растениях нарушается нормальный ход физиологических процессов и, прежде всего, фотосинтез и дыхание. Нарушаются также углеводный и белковый обмены. Все это в конечном итоге приводит к снижению продуктивности растений и их гибели. Изменение химического состава тканей растений и снижение содержания активных веществ приводит к невозможности использования их в качестве сырья для приготовления лекарственных средств.

Растения могут поражаться не только бактериями, но и грибами, и вирусами.

К *микозам* относятся гнили, фузариозы, аскохитозы и другие болезни.

К вирусным инфекциям относятся мозаичная болезнь, карликовость, желтуха, увядание. Они могут быть локальными и системными.

Фитопатогенные вирусы вызывают более 20% болезней растений. Основные – представители семейства *Reoviridae*, родов *Phytoreovirus* и *Fujivirus*.

По способу внедрения в организм вирусные заболевания относятся к раневым инфекциям, крайним проявлением которых является некроз. Исключение – инфицирование растений-паразитов, в ткани которых вирус проникает при объединении его проводящих путей и инфицированного хозяина.

Распространение в организме происходит от клетки к клетке по плазмодесмам при участии элементов цитоскелета со скоростью 1 мм в день или медленнее. При попадании в проводящие ткани распространяются со скоростью 2,5 см в минуту. Степень генерализации процесса зависит от свойств вируса и самого растения-хозяина.

Одним из основных методов высокоспецифичной и эффективной идентификации фитопатогенов является полимеразно-цепная реакция

(ПЦР). Использование молекулярно-генетических маркеров, строго специфичных к конкретным искомым локусам, дающим один фрагмент с охарактеризованной последовательностью нуклеотидов, позволяет четко идентифицировать род, вид или штамм микроорганизма.

Метод ПЦР основан на многократном избирательном копировании определенного участка нуклеиновой кислоты ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях. При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце. В отличие от амплификации ДНК в живых организмах (репликации), с помощью ПЦР амплифицируются относительно короткие участки ДНК. В обычном ПЦР-процессе длина копируемых ДНК-участков составляет не более 3 тыс. пар оснований (3 kbp). С помощью смеси различных полимераз, с использованием добавок и при определенных условиях длина ПЦР-фрагмента может достигать 20–40 тыс. пар нуклеотидов. Реакция ПЦР проводится в программируемом термостате (амплификаторе) – приборе, в котором происходит достаточно быстро охлаждение и нагревание пробирок (обычно с точностью не менее 0,1 °С). Амплификаторы позволяют задавать сложные программы, в том числе с возможностью «горячего старта» и последующего хранения. Для ПЦР в режиме реального времени выпускают приборы, оборудованные флуоресцентным детектором. Существуют также приборы с автоматической крышкой и отделением для микропланшетов, что позволяет встраивать их в автоматизированные системы.

Вопросы для самоподготовки:

1. Фитопатогенные микроорганизмы.
2. Классические методы определения фитопатогенов
3. Фитопатогены вирусной, бактериальной, грибной природы, фитоплазмы, нематоды.
4. Генетическая характеристика фитопатогенных микроорганизмов.
5. Генетический контроль образования экзополисахаридов, регуляция синтеза.
6. Токсины микроорганизмов. Характеристика специфических и неспецифических токсинов.
7. Токсины бактерий и механизмы их действия. Генетический контроль синтеза токсинов.
8. Использование молекулярно-генетических методов для сортовой идентификации и ускоренной диагностики латентных форм фитопатогенов.
9. Молекулярно-генетическая диагностика карантинных фитопатогенов.
10. Методы молекулярно-генетической идентификации и геномного полиморфизма плодовых культур.

Тема 4.2. Генетические методы диагностики возбудителей инфекционных заболеваний у животных и в сырье животного происхождения

Содержание темы:

Основными молекулярными методами диагностики возбудителей инфекционных заболеваний является применение ДНК-зондов и полимеразная цепная реакция. Использование данных методов при выявлении возбудителей инфекционных болезней очень тесно связано с их типированием, выявлением полиморфизма генов, установлением генома патогенных штаммов, возможности клонирования генов и создания генноинженерных вакцин.

В диагностике инфекционных возбудителей животных выделяют две области применения ПЦР:

- Выявление ДНК возбудителя;
- Типирование штаммов микроорганизмов (фингерпринт).

В последние годы большое внимание уделяется разработке ПЦР-тестсистем (диагностикумов), относящихся к области инфекционных заболеваний.

Простота, высокая чувствительность, хорошая воспроизводимость быстро превратили этот метод в один из наиболее перспективных диагностических методов.

Преимуществами применения метода ПЦР в диагностике инфекционных болезней являются следующие:

1. Прямое определение наличия возбудителей инфекционных болезней. Многие традиционные методы диагностики выявляют белковые маркёры, являющиеся продуктами жизнедеятельности инфекционных агентов, что даёт лишь опосредованное свидетельство наличия инфекции. ПЦР даёт выявление специфической ДНК и прямо указывает на присутствие возбудителя инфекции.

2. Высокая чувствительность. ПЦР-методы дают возможность обнаруживать патогенные бактерии и вирусы даже в тех случаях, когда другими методами (иммунологическими, бактериологическими и др.) их выявление невозможно. Чувствительность амплифицированных тестсистем составляет около 10 клеток в пробе, достигая максимально возможных значений — 1 клетка в пробе, в то время как чувствительность иммунологических и микробиологических тестов колеблется в пределах до миллиона клеток.

3. Высокая специфичность. Абсолютная специфичность метода обусловлена тем, что в исследуемом материале выявляется уникальный, характерный только для данного вида возбудителя, фрагмент ДНК.

4. Быстрота получения продукта. За счёт автоматизации процесс амплификации занимает всего 2-3 часа, а с учётом времени, затрачиваемого на обработку проб и регистрацию результатов,

определение возбудителя обычно осуществляется в течение одного рабочего дня.

5. Работа с любым биологическим материалом. Метод ПЦР позволяет проводить определение возбудителя непосредственно в материале, полученном от больного животного (кровь, сыворотка, мазки, смывы, соскобы, слюна, мокрота, желудочный сок, биопсийный материал). Для определения не требуется культивирование возбудителя.

6. Возможность количественного учёта реакции. Метод позволяет осуществлять как качественное, так и количественное определение возбудителя. Изменение динамики числа копий возбудителя в пробе даёт возможность контролировать вирусемию или бактериемию в процессе лечения и однозначно решать вопрос об эффективности терапии.

7. Безопасность работы с исследуемым материалом, так как он может быть дезинфицирован химической и термической обработкой в момент его забора, что исключает инфицированность специалистов в процессе проведения ПЦР.

8. Одномоментность выявления различных возбудителей в одной пробе.

9. Простота исполнения за счёт полной автоматизации.

Разработка методик ПЦР и проведение испытания приборов и оборудования — это один из этапов большой работы по внедрению ПЦР-методов в практику диагностических лабораторий. В связи с возрастающим интересом к практической ПЦР-диагностике, внедрение методов ПЦР в систему государственной ветеринарной службы — дело сегодняшнего дня. Необходимо отметить, что перспективными направлениями ПЦР являются определение антибиотикорезистентности клинических штаммов возбудителей, возможность количественного учёта результатов для контроля динамики инфекционного процесса, правильного выбора тактики лечения и оценки эффективности применяемых лекарственных средств.

К настоящему времени ветеринарными специалистами уже разработаны тест-системы для диагностики методом ПЦР таких заболеваний как туберкулёз, сибирская язва, лейкоз, чума крупного рогатого скота, бешенство, ящур, бруцеллез, кампилобактериоз, листериоз, хламидиоз животных; классическая чума свиней, респираторно-репродуктивный синдром свиней, парвовирусная инфекция свиней, энцефаломиокардит свиней; сальмонеллез, стафилококкоз, микоплазмоз. болезнь Марекка, реовирусная инфекция, болезнь Гамборо, инфекционный бронхит птиц, Ньюкаслская болезнь; чума мясоедных, вирусный энтерит норки, вирусный гепатит утят.

Лейкоз крупного рогатого скота широко распространен во многих странах мира. Первичный диагноз на лейкоз крупного рогатого скота в хозяйстве ставят на основании эпизоотологических, серологических, клиникогематологических и патологоанатомических данных. В

последние годы ряд исследователей для диагностики лейкоза крупного рогатого скота предлагают полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Молекулярно-генетический метод позволяет выявить практически всех инфицированных ВЛ КРС животных и определить непосредственно вирус или провирус.

ПЦР обладает рядом преимуществ: чувствительность от 1 фрагмента нуклеиновой кислоты в образце, специфичность до 100%, быстрота проведения и возможность полной автоматизации, универсальность, возможность количественного учета и выявления инфекции на ранних сроках (первые дни жизни).

Диагностика стафилококкозов проводится комплексно, учитывают эпизоотологические, данные, клинические признаки, патологоанатомические изменения и лабораторные исследования. Возбудителями стафилококкозов животных и человека являются кокковидные, грамположительные, неподвижные, неспорообразующие бактерии, относящиеся к роду *Staphylococcus*, семейства *Micrococcaceae*. Стафилококки - обитатели кожи, слизистых оболочек. Как транзитные виды могут присутствовать в кишечном тракте. Род *Staphylococcus* содержит 28 видов. У человека стафилококковые инфекции включают более 100 нозологических форм. Основными возбудителями стафилококкозов с/х животных являются виды *S. aureus* (два подвида), *S. intermedius*, *S. hyicus* и др. *S. aureus* вызывает у многих видов животных местные воспалительные гнойные процессы на коже, фурункулы, абсцессы и т.д.; маститы крупного рогатого скота, овец, свиней, лошадей, коз, кроликов; эндометриты овец, коз, свиней, собак. К *S. aureus* наиболее чувствительны цыплята раннего возраста, у взрослых кур обуславливает поражение органов дыхания, суставов. Подвид *S. aureus anaerobiscus* вызывает у овец казеозный лимфаденит, сходный с псевдотуберкулезным. *S. intermedius* наиболее обычен как возбудитель пиодермии собак, кошек, может поражать респираторный тракт, суставы и другие ткани. *S. hyicus* вызывает экссудативный дерматит свиней, в основном поражаются поросята до 1,5- месячного возраста. У взрослых свиней может быть причиной метритов, поражений кожи. Иногда этот вид стафилококков изолируют при маститах коров. *S. gallinarum*, *S. arlettae* обитают на коже кур; *S. caprae* выделяют из молока коз; 5 *S. equorum* выделяют с кожных покровов лошадей, от кошек, *S. delphini* - от дельфинов.

Лабораторная диагностика стафилококкозов основана на выделении культур возбудителей световой микроскопией, изучении культуральноморфологических, биохимических, биологических и серологических свойств. Схема лабораторной диагностики патматериала на стафилококкоз Бактериологическое исследование. Для исследования используют патматериал. Трупы мелких животных и птиц направляют в лабораторию целиком, от трупов крупных животных берут части

паренхиматозных органов, кровь из сердца, головной мозг; прижизненно — содержимое абсцессов, истечения из шейки матки, синовиальную жидкость из пораженных суставов, молоко от маститных животных, соскобы с пораженных участков кожи. При подозрении на кормовые отравления стафилококковой этиологии направляют пробы корма. Материал берут от животных, не подвергавшихся в последние 10 дней лечению антибактериальными препаратами.

Бактериологическое исследование. Для исследования используют патматериал. Трупы мелких животных и птиц направляют в лабораторию целиком, от трупов крупных животных берут части паренхиматозных органов, кровь из сердца, головной мозг; прижизненно — содержимое абсцессов, истечения из шейки матки, синовиальную жидкость из пораженных суставов, молоко от маститных животных, соскобы с пораженных участков кожи. При подозрении на кормовые отравления стафилококковой этиологии направляют пробы корма. Материал берут от животных, не подвергавшихся в последние 10 дней лечению антибактериальными препаратами.

Микроскопическое исследование исходного материала. Из поступившего материала готовят мазки, окрашивают по Граму. Клетки стафилококков сферические, размером 0,5-1,0 мкм, грамположительные, располагаются единично, парами, в виде скоплений неправильной формы, некоторое количество клеток в мазках из тканей может быть фагоцитировано. Клетки вирулентных штаммов *S. aureus* имеют небольшую капсулу. Клетки *S. saprophyticus* располагаются в препарате в виде групп неправильной формы, а также тетрадами и пакетами.

Вопросы для самоподготовки:

1. Молекулярно-генетические технологии обнаружения микроорганизмов.
2. Молекулярно-генетические методы диагностики инфекционных болезней животных
3. ПЦР, как базовый метод диагностики возбудителей инфекционных заболеваний. Коммерческие предложения.
4. Новейшие методы молекулярно-генетической идентификации патогенов: высокопроизводительное секвенирование.
5. Молекулярно-генетический подход в диагностике заболеваний вызванных простейшими.
6. Особенности применения молекулярно-генетических методов для анализа микробных сообществ, в том числе в пищевых субстратах.
7. ДНК-диагностика в контроле элиминации инфекционных возбудителей.
8. Молекулярно-генетические исследования в биотехнологии при оценке туш и органов при заболеваниях скота и птицы.
9. Молекулярно-генетическая диагностика эмерджентных пищевых патогенов.

10. Достоинства и недостатки различных методов исследования микроорганизмов а пищевых субстратах.

Тема 4.3. Молекулярно-генетический контроль за продукцией из ГМО

Содержание темы:

Лабораторный контроль за оборотом пищевой продукции, содержащей ГМИ, в России нормируется различными методическими указаниями и ГОСТ Р 52173-2003 «Сырье и продукты пищевые. Метод идентификации генетически модифицированных источников растительного происхождения».

Пострегистрационный мониторинг включает:

- экспертизу документов на генетически модифицированное сырье и готовые продукты;
- лабораторный контроль на наличие ГМИ;
- контроль за маркировкой генетически модифицированной продукции.

Существует два метода определения генетически модифицированных источников в продукте: количественный и качественный.

Качественный анализ состоит из нескольких этапов.

1. Регистрация и первичная обработка образцов.

Зона приема, регистрации и первичной обработки образцов предназначена для регистрации поступающего в лабораторию материала, его сортировки и маркировки, хранения и обработки лизирующим буфером, а также инактивации остатков биоматериала.

2. Приготовление пробы для анализа (выделение ДНК).

С помощью специальных реагентов тест-системы (буфер для лизирующего реагента, лизирующий реагент, раствор для отмывки 1, 2 - сорбент универсальный и др.) Комплект рассчитан на выделение ДНК из 50 проб, включая контрольные образцы. После того как суспензиат будет содержать очищенную ДНК, пробы готовы к следующему этапу.

3. Проведение амплификации.

Пробы обрабатывают реагентами следующей тест-системы и помещают в амплификатор, задавая ему определенную программу. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) - процесс амплификации (умножения) *in vitro*, при котором фрагмент ДНК может быть размножен 8 до 10 раз (копий).

4. Центрифугирование проб амплифицированной ДНК.

Центрифугирование производится с помощью MiniSpin - персональной безопасной технологичной микроцентрифуги с высокими скоростными характеристиками. В результате центрифугирования выделяются целые, неповрежденные молекулы ДНК.

5. Электрофорез ПЦР-продуктов.

На данном этапе выделенную ДНК помещают на агарозный гель и проводят через него электрический ток в течение нескольких часов. В результате этого процесса ДНК разделяется на гены, которые выстраиваются друг за другом по длине гена.

Обработка результатов анализа происходит при помощи специальной программы на компьютере.

Количественный анализ также проводится в несколько этапов:

1. Регистрация и первичная обработка образцов.
2. Выделение ДНК.
3. Амплификация ДНК.
4. Добавление праймеров и меченых флуоресцирующей краской зондов.
5. Сравнение степени флуоресценции.
6. Построение калибровочных графиков.
7. Определение процентного содержания ГМИ путем сравнения значений.

Таким образом, первые три этапа аналогичны качественному методу определения ГМИ в продукте. После этих этапов проба помещается в специальный прибор – термоциклер. В термоциклере заложены стандартные величины 100%-ного содержания ГМИ в продукте.

Определение модифицированных белков. Физико-химические методы модификации. Физико-химические методы воздействия на белковые системы объединяют следующие приемы: комплексообразование с природными полимерами (белками, полисахаридами, др.), а также с мономерами (углеводами, жирами), механические воздействия разного рода, термическую обработку и др.

Физические методы воздействия также играют определенную роль в модификации свойств белковых веществ. Так, интенсивность, способ и степень помолы являются ключевыми при прочих равных условиях в формировании качества пшеничной муки. Устанавливая определенные температурные режимы, регулируют влагоудерживающую способность, нежность, сочность мясных систем. Температурой и продолжительностью обработки регулируют показатели качества молочного творога. Одновременное механическое перемешивание массы приводит к образованию «казеинового зерна», которое существенно отличается по органолептическим показателям от творога, полученного термокислотной коагуляцией, но без перемешивания.

Высокая степень измельчения мясных и рыбных фаршей, особенно на коллоидных мельницах, приводит к механической деградации саркомеров миофибрилл, следствием чего является повышение водоудерживающей способности и растворимости белков.

Частичная термическая коагуляция рыбных белков или заваривание муки, в результате чего происходит денатурация клейковинных белков,

изменяют когезию, позволяют регулировать способность к формированию и органолептические свойства систем.

Вопросы для самоподготовки:

1. 1 Методы определения и оценка ГМИ.
2. Химические методы обнаружения генетически модифицированных источников
3. Хроматографические методы определения ГМИ
4. Спектроскопические методы определения ГМИ.
5. Иммунологические методы обнаружения ГМИ. Иммуноферментный метод. Ограничения использования.
6. Определение модифицированных белков и ферментов.
7. Молекулярно-генетические методы определения трансгенной ДНК
8. Экспертиза структуры рекомбинантной ДНК, встроенной в геном, в том числе маркерных генов и промоторов.
9. Оценка регуляторных последовательностей.
10. Определение стабильности генетически модифицированных организмов на протяжении нескольких поколений с учетом экспрессии генов.
11. Организация проведения анализа образцов пищевых продуктов на присутствие генетически модифицированных организмов.
10. Использование методов ПЦР для обнаружения ГМИ.
12. Порядок забора проб для анализа ГМИ молекулярно-генетическими методами.
13. Системы качественной ПЦР.
14. Скрининговые методы идентификации трансгенов: выявление CaMV 35S промотора и nos терминатора.
15. ГМО-специфичный метод ПЦР.
16. Нормативные акты, в области ГМО. ГОСТ 34150-2017
17. Метод идентификации генно-модифицированных организмов растительного происхождения с применением биологического микрочипа.

ФГБОУ ВО НОВОСИБИРСКИЙ ГАУ

Кафедра ветеринарной генетики и биотехнологии

Темы выступлений

по дисциплине Молекулярно-генетические методы в биотехнологии

Выделение ДНК, её синтез и рестрикция. Электрофорез.

1. Ведущие методы детекции мутаций
1. Генетические автоанализаторы различных типов.
2. Современные проблемы внедрения генетических автоматических аналитических систем.
3. Перспективы получения пищевых веществ и БАВ методами биотехнологии.

4. Генетически модифицированные продукты.
5. Использование в биотехнологии рекомбинантных ДНК как научно-нового метода исследования и производства продукции сельского хозяйства.
6. Трансгенные растения. Генная инженерия и биоразнообразие.
7. Пищевые продукты и окружающая среда.
8. Безопасность и экологическая чистота.
9. Сельскохозяйственная биотехнология и «горизонтальный» перенос генов.
10. Природные механизмы ГПГ. Опасности ГПГ.
11. Эволюция. ГМ штаммы. Риски и безопасность использования микроорганизмов.
12. Продовольственная безопасность как экономико-правовая категория.
13. Федеральный закон "О качестве и безопасности пищевых продуктов".
14. Государственное регулирование и обеспечение продовольственной безопасности.
15. Медико-биологические требования к качеству продовольственного сырья и пищевых продуктов.
16. Показатели качества пищевых систем.
17. Экологические, медико-биологические, социально-экономические и технологические проблемы рационального, оптимального и функционального питания.

Критерии оценки:

- оценка «отлично» выставляется магистранту, если он раскрывает тему на 90-100%;
- оценка «хорошо» выставляется магистранту, если он раскрывает тему на 80-90%;
- оценка «удовлетворительно» выставляется магистранту, если он раскрывает тему на 70-80%.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
Раздел 1. Молекулярно – генетические методы диагностики	4
Тема 1.1. Научные основы молекулярно – генетических методов исследований	4
Тема 1.2. Гибридизационные молекулярно-генетические методы.....	6
Тема 1.3. Методы молекулярно – генетической диагностики на основе амплификации	9
Тема 1.4. Современные возможности секвенирования.....	18
Раздел 2. Видовая идентификация	24
Тема 2.1. Молекулярно – генетическая идентификация видового состава сырья.....	24
Тема 2.2. Генетический баркодинг.....	26
Раздел 3. Обеспечение безопасности пищевой продукции из ГМИ.....	29

Тема 3.1. Генетически модифицированное сырьё	29
Тема 3.2. Оценка безопасности и качества ГМИ	31
Раздел 4. Молекулярно-генетический мониторинг биотехнологических процессов	32
Тема 4.1. Молекулярно-генетический контроль производственных биотехнологических процессов	32
Тема 4.2. Генетические методы диагностики возбудителей инфекционных заболеваний у животных и в сырье животного происхождения.....	35
Тема 4.3. Молекулярно-генетический контроль за продукцией из ГМО	39
Темы выступлений	41

Составитель
Себежко Ольга Игоревна

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В
БИОТЕХНОЛОГИИ

Методические указания к практическим занятиям

В авторской редакции

Компьютерная вёрстка Себежко О.И.