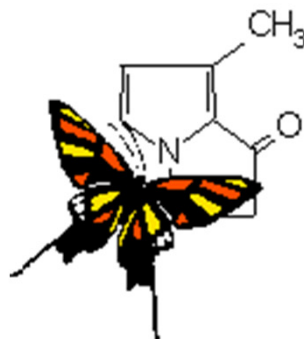


Лаборатория
НГУ-Интел



ЭПИГЕНЕТИКА

Грин Инга Ростиславовна



Мультимедийный курс для студентов – биологов Китайско-российского института.

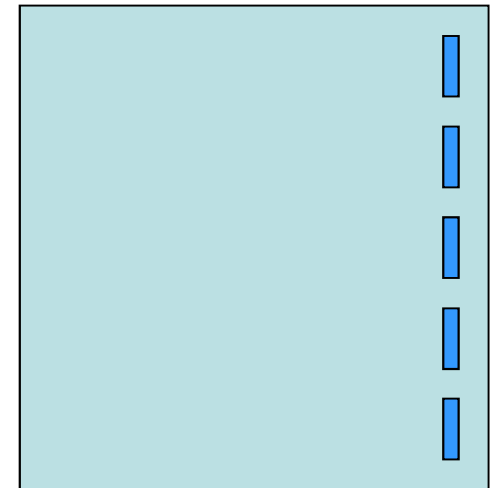
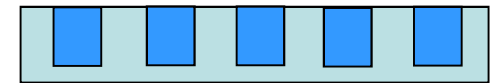
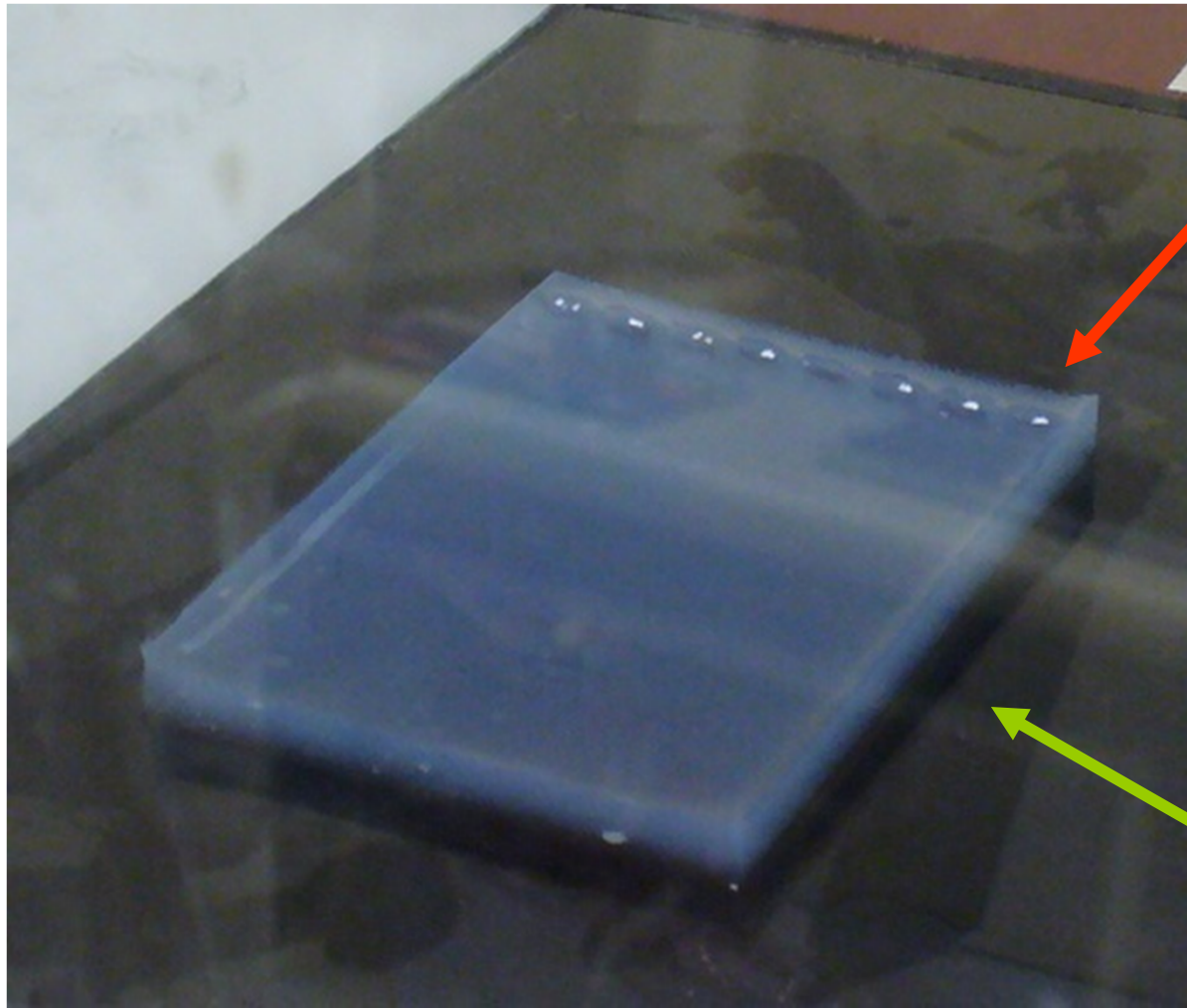
Семинар 1. Методы исследования в эпигенетике

Часть 1. Методы (方法) Молекулярной Биологии

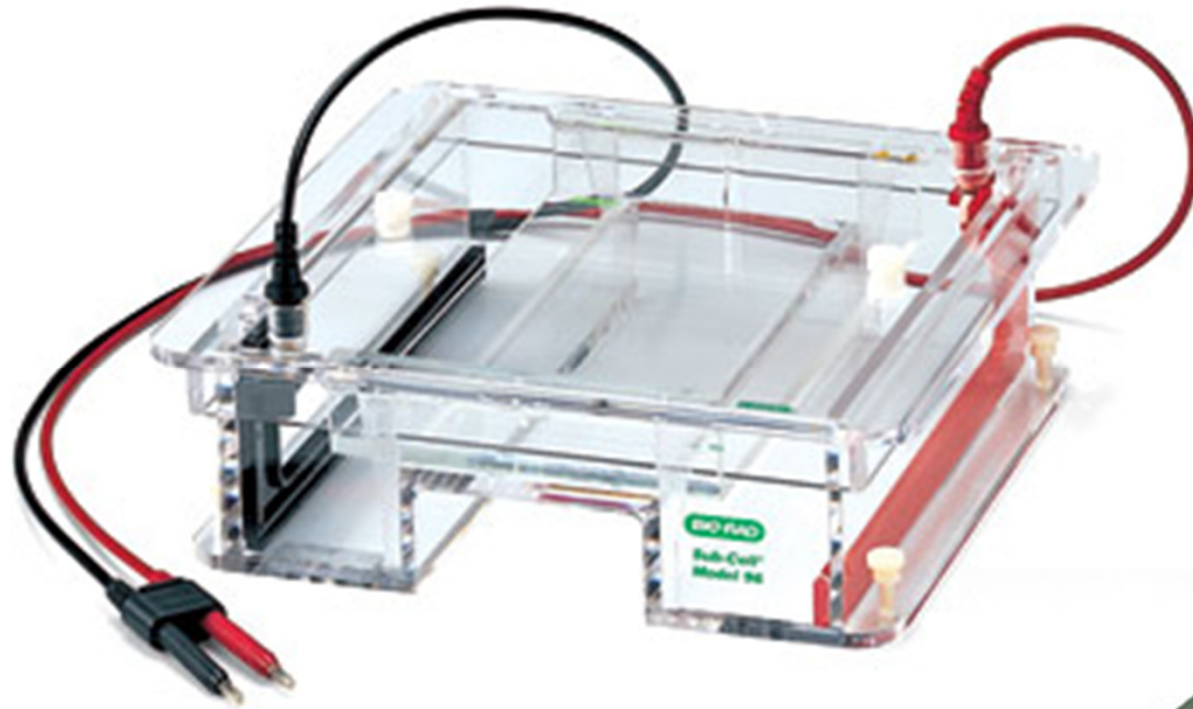
1) Агарозный Гель Электрофорез (GEF)

**Фракционирование НК по
молекулярному весу под действием
постоянного электрического тока
(电流)**

1% Агарозный гель (琼脂糖凝胶)



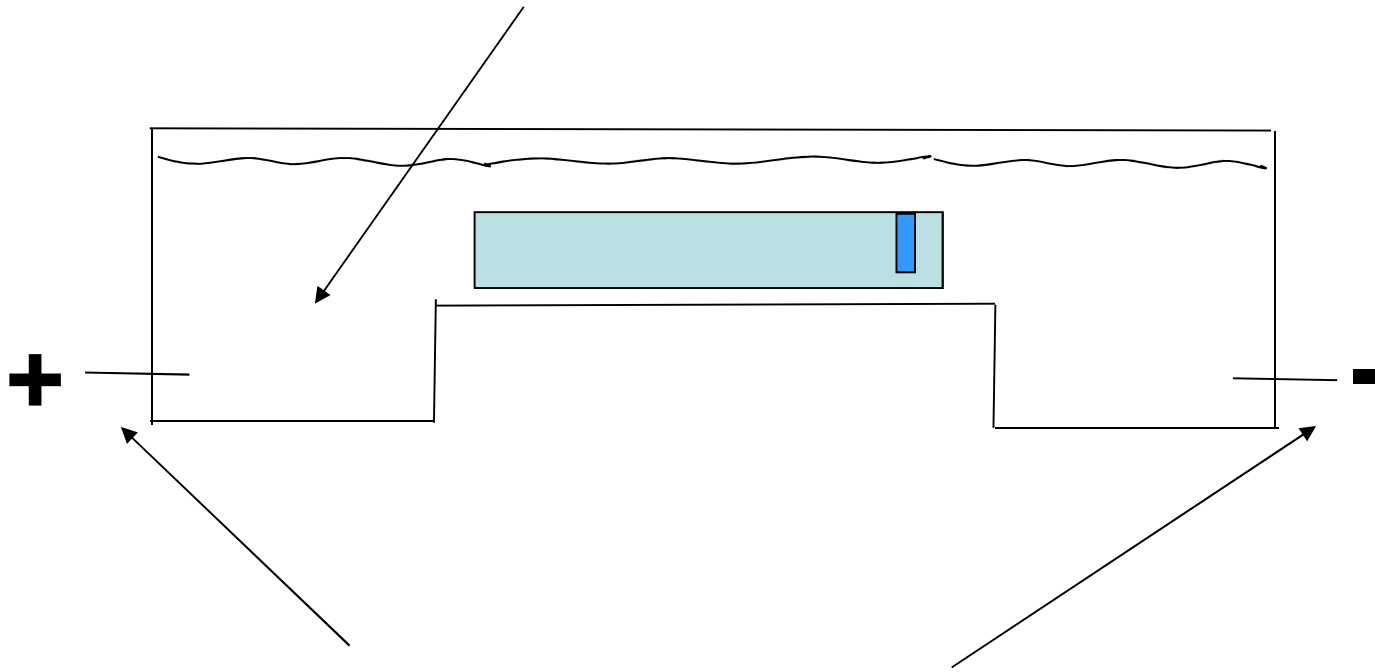
Камера для ГЭФ



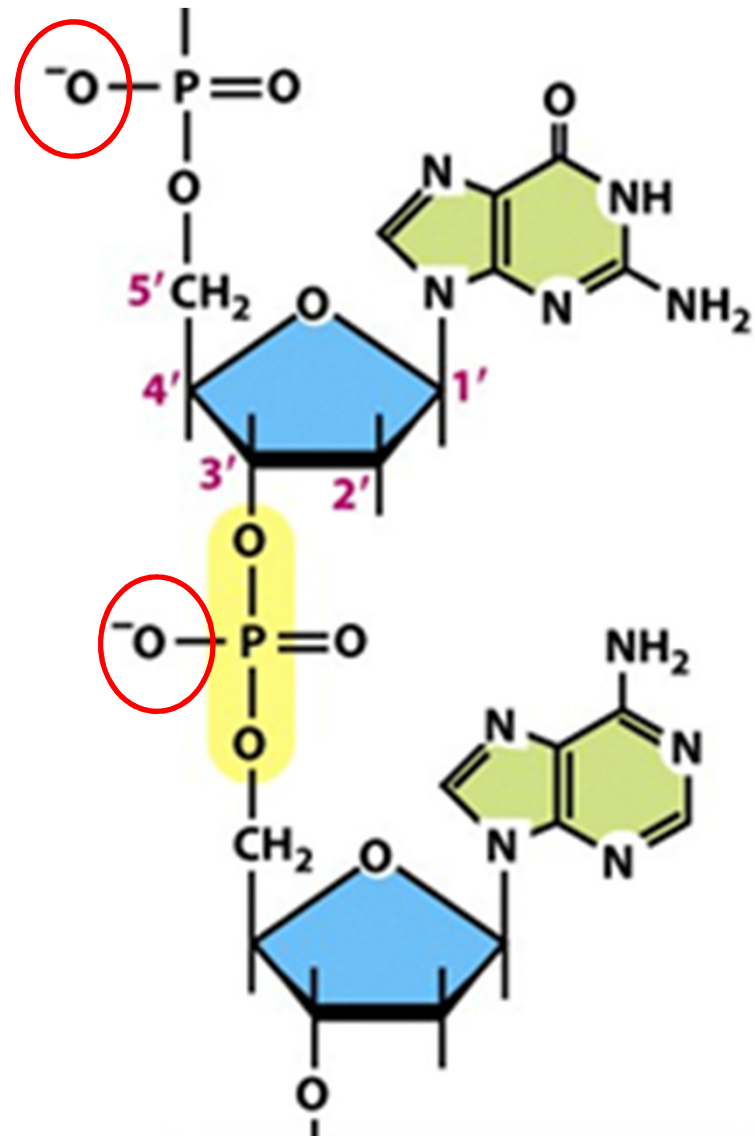
Источник тока (电流源)

Камера для ГЭФ

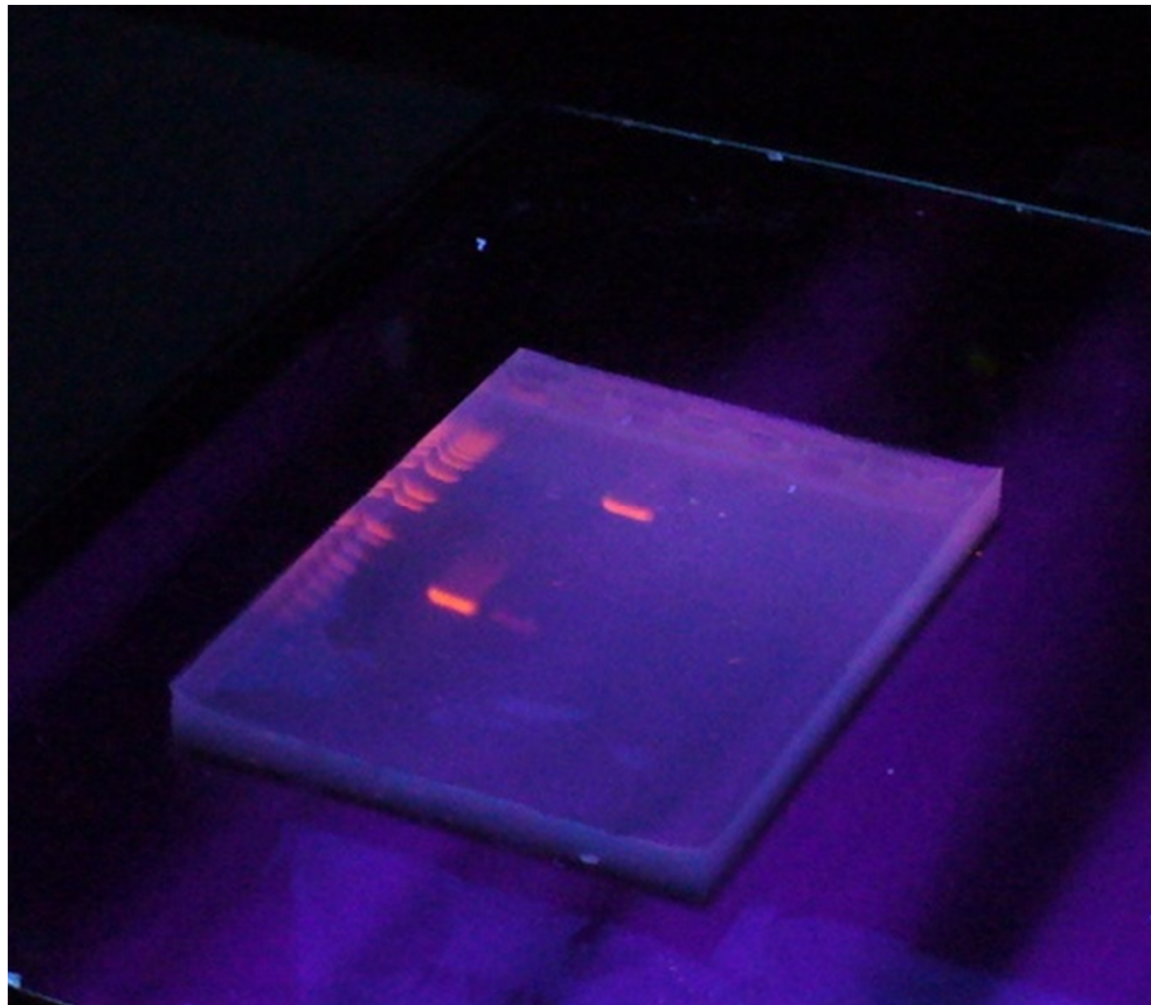
Буфер (缓冲)



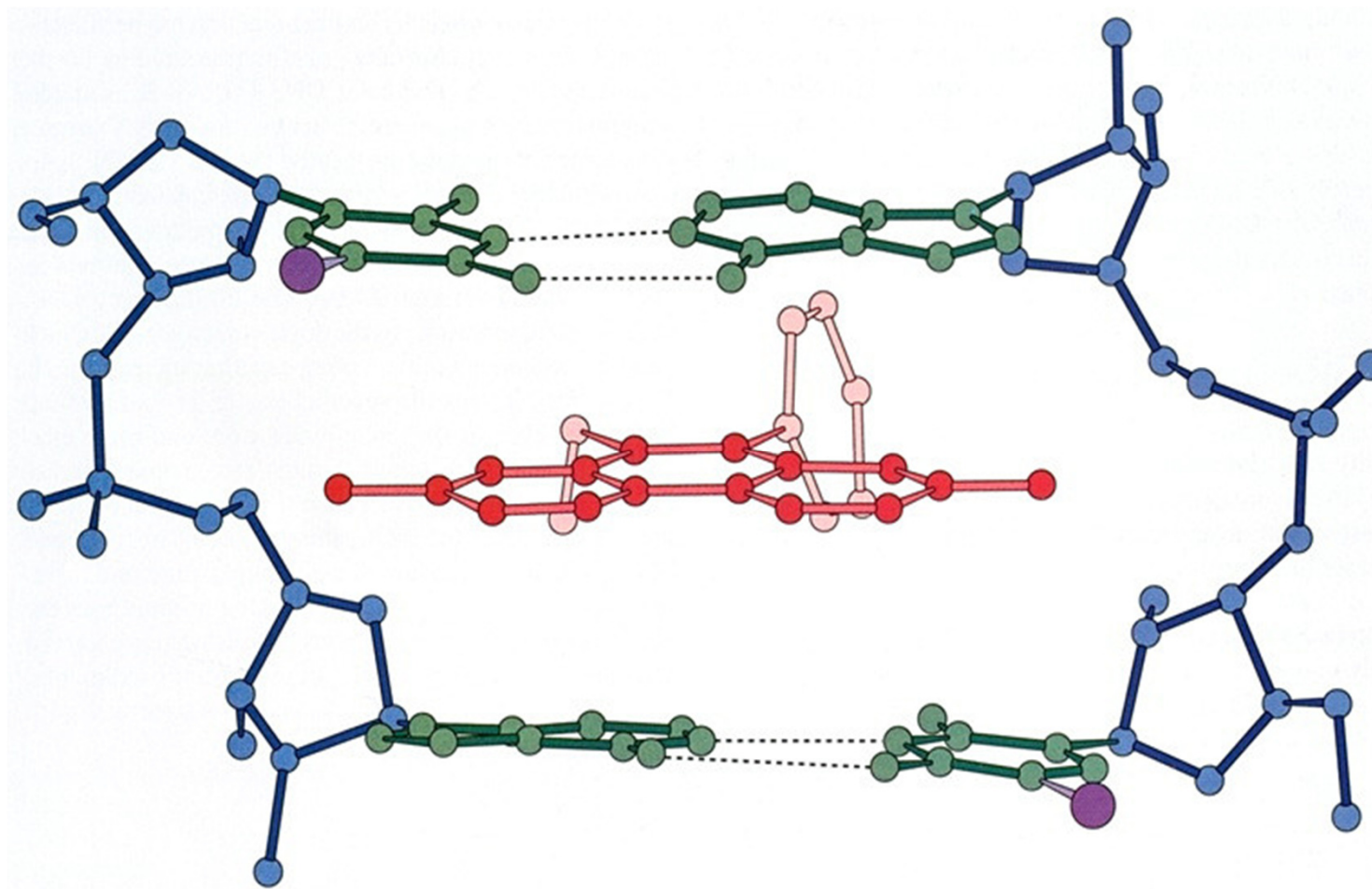
Электроды (电极)



Окраска геля бромистым этидием и флуоресценция (荧光) в UV свете



Бромистый этидий интеркалирует в ДНК



Цифровая фотография геля

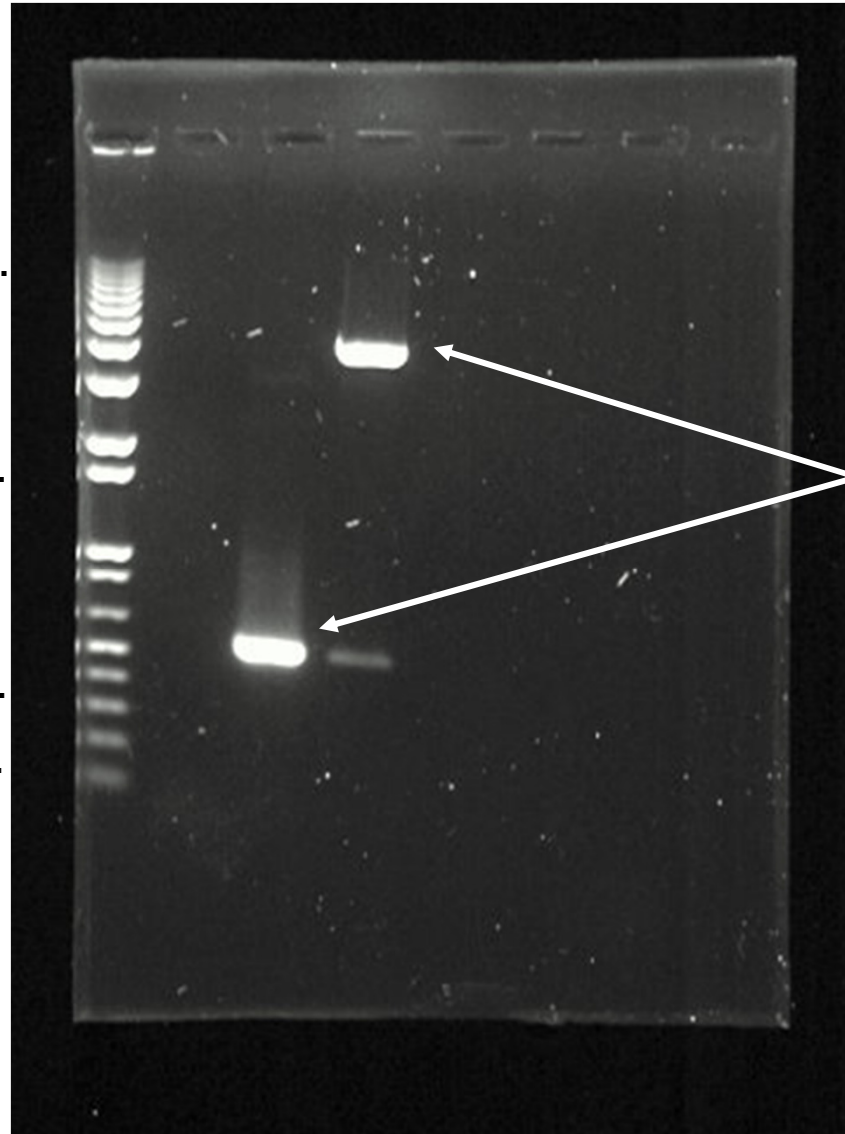
Маркер
молекулярного
веса (ДНК с
известным
размером)

10000 п.н.

2000 п.н.

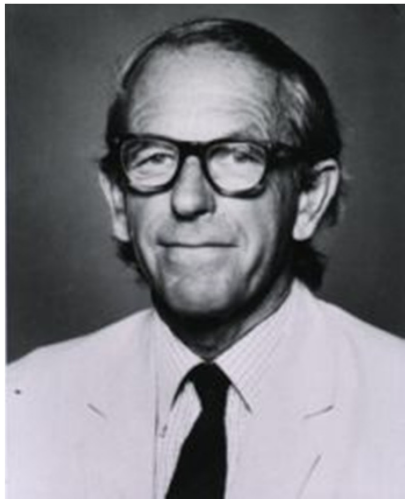
200 п.н.

100 п.н.



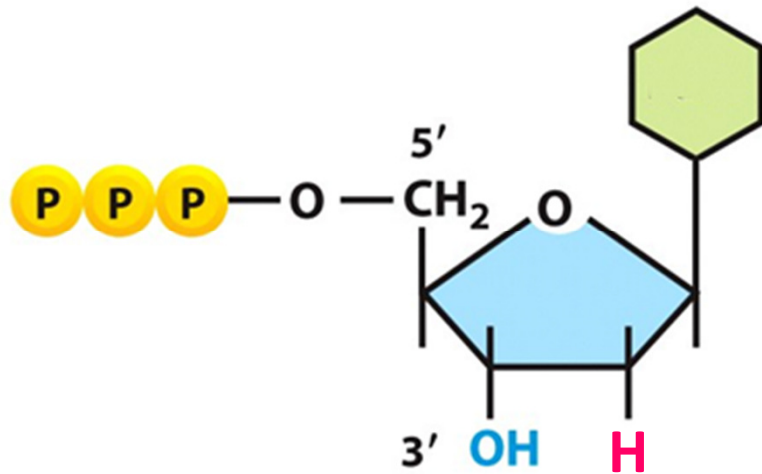
ДНК

2) Секвенирование ДНК по Сэнгеру DNA测序

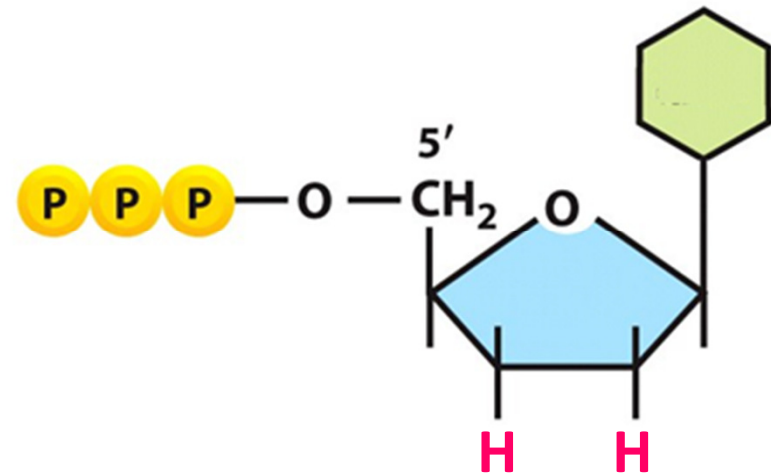


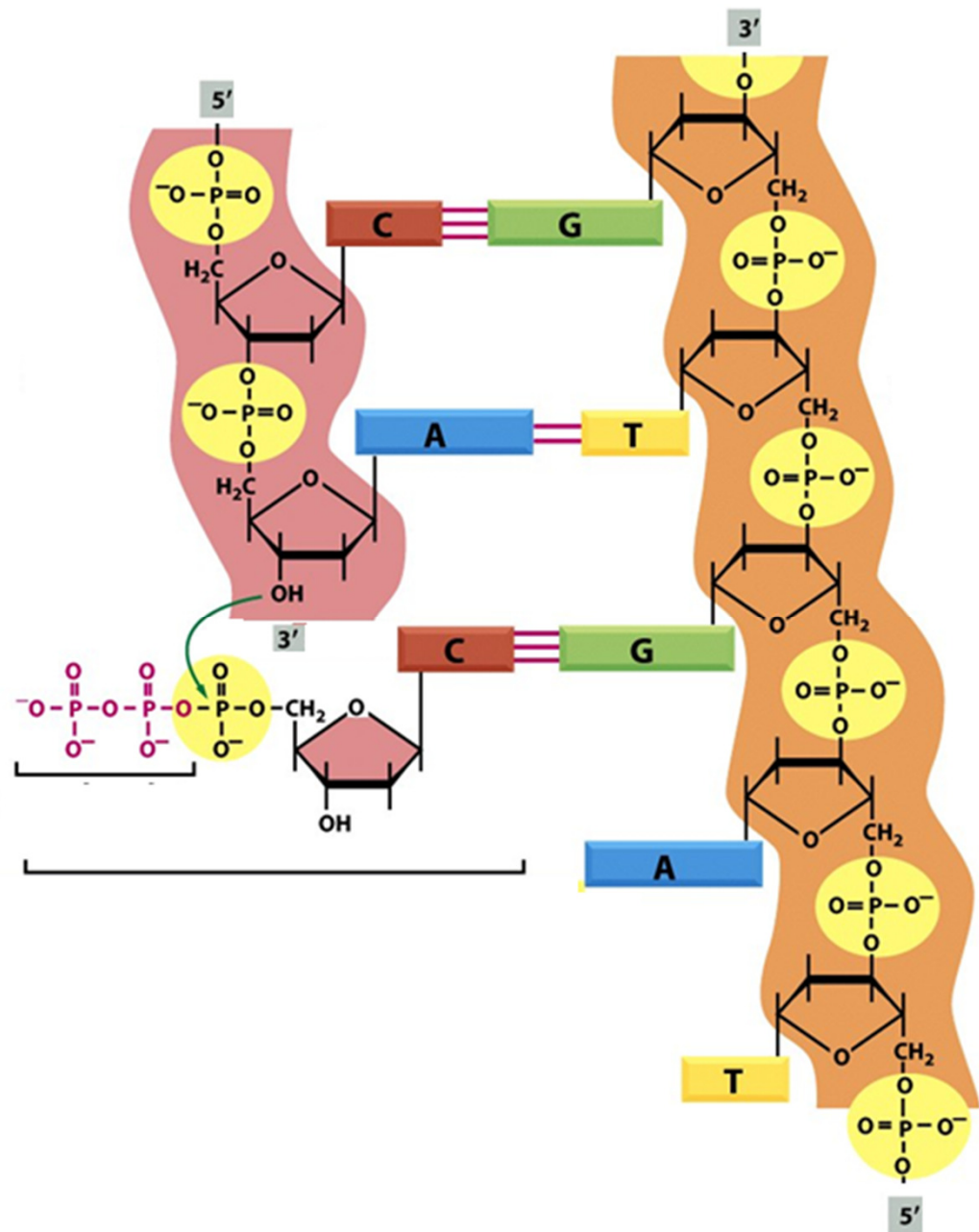
Фредерик Сэнгер
Frederick Sanger
1918-....

ДезоксиНуклеозид
Трифосфат, дНТФ



ДиДезоксиНуклеозид
Трифосфат, ддНТФ





Много (很多)

ДезоксиНуклеозид
Трифосфаты, дНТФ

Мало (小)

ДиДезоксиНуклеозид
Трифосфатов, ддНТФ



Праймер
引物

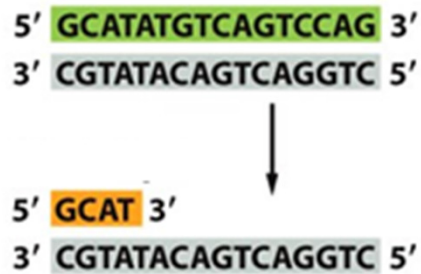


Остановка синтеза ДНК
(DNA合成停止)

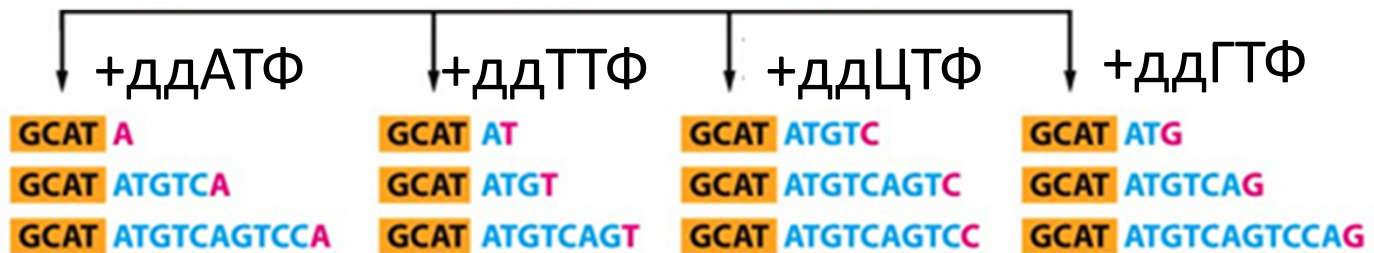


ДНК, для которой необходимо определить
последовательность
要确定的DNA序列

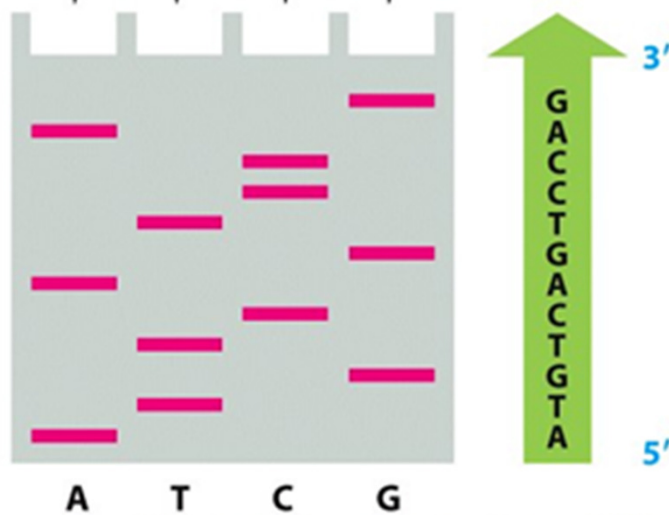
+Меченый Праймер (³²P)
 标记的引物



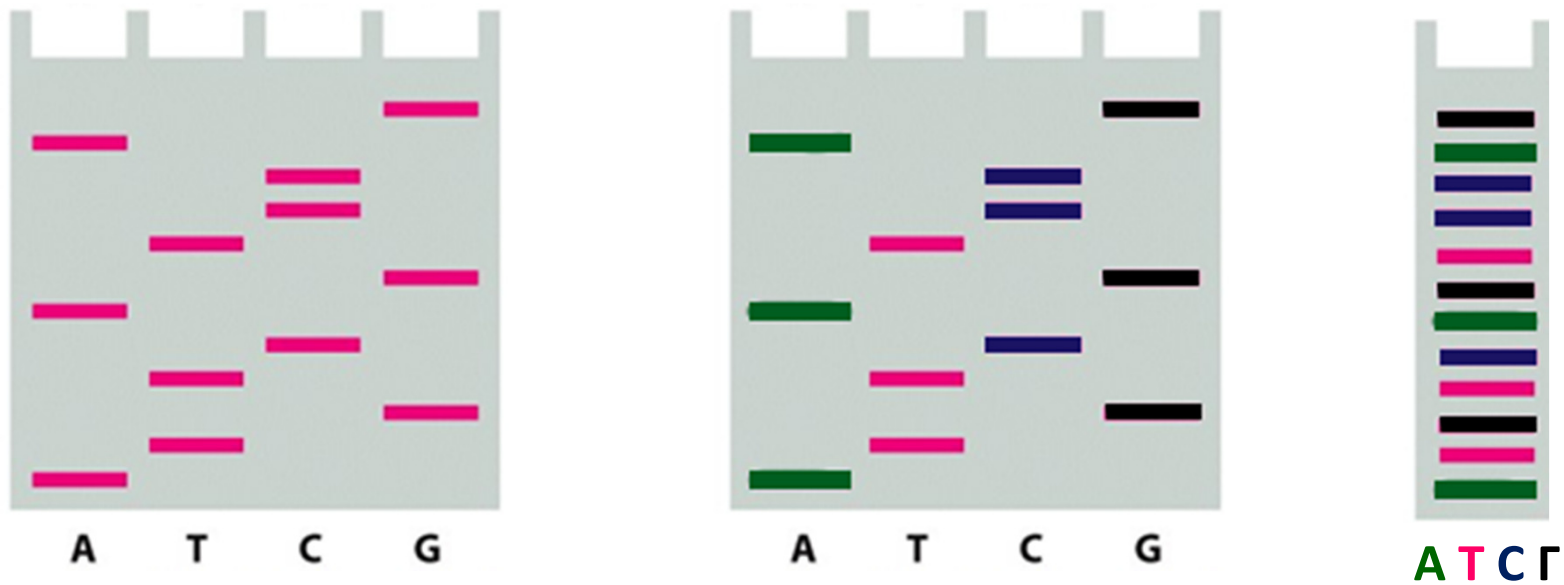
+ДНК Полимераза



ГельЭлектроФорез
 凝胶电泳



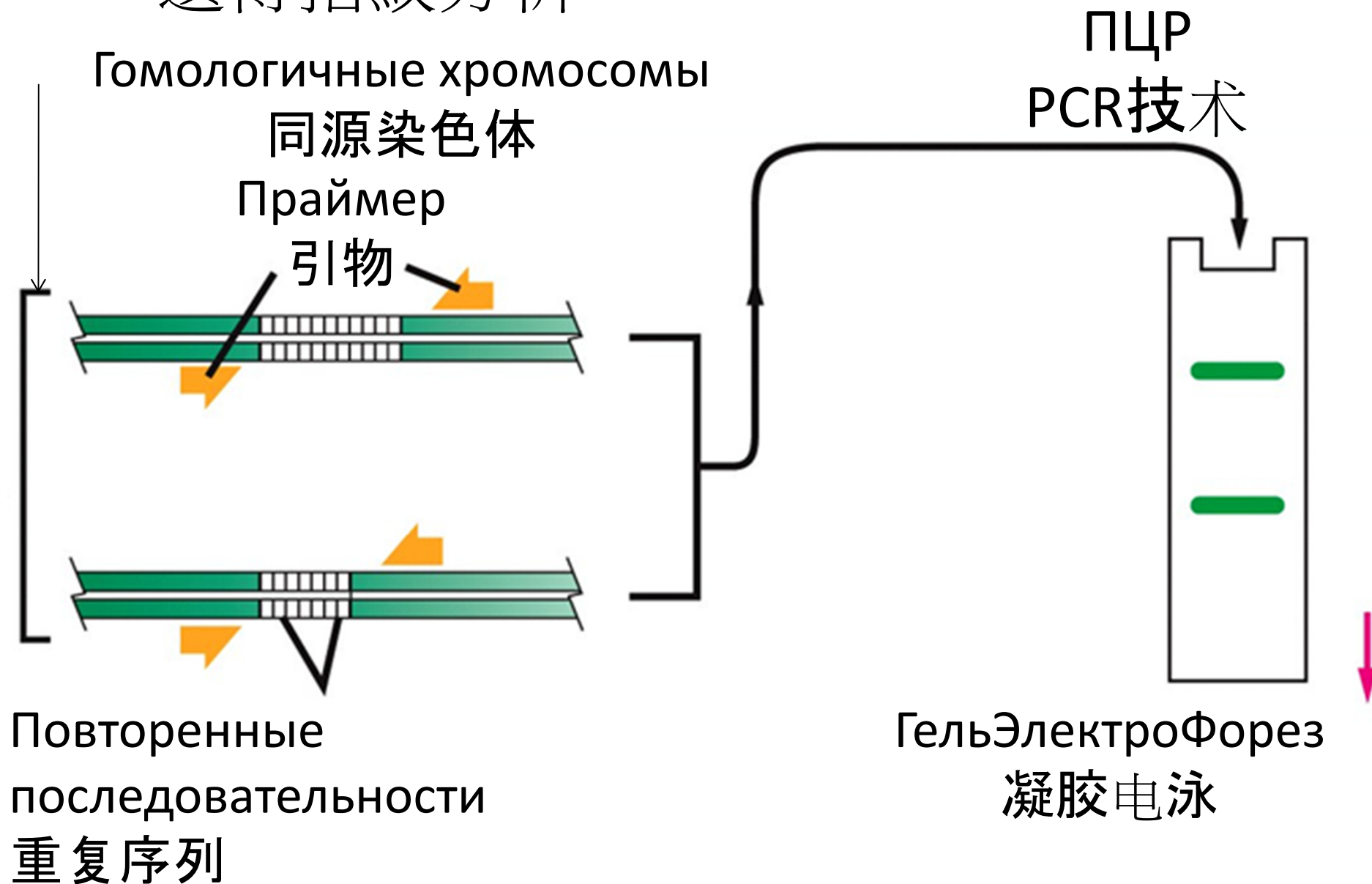
Флуоресцентная метка 荧光标记



Флуоресцентно меченые нуклеотиды

荧光标记的核苷酸

3) ДНК фингерпринтинг 遺傳指紋分析



4) ПЦР

Полимеразная Цепная Реакция

PCR技术

Тақ ДНК Полимераза
(из *Thermus aquaticus*)

ПЦР PCR技术

Денатурация ДНК
DNA变性

Синтез ДНК
DNA合成



Гибридизация
праймеров
引物杂交

+ Taq Пол
+ дГТФ, дАТФ,
+ дЦТФ, дТТФ

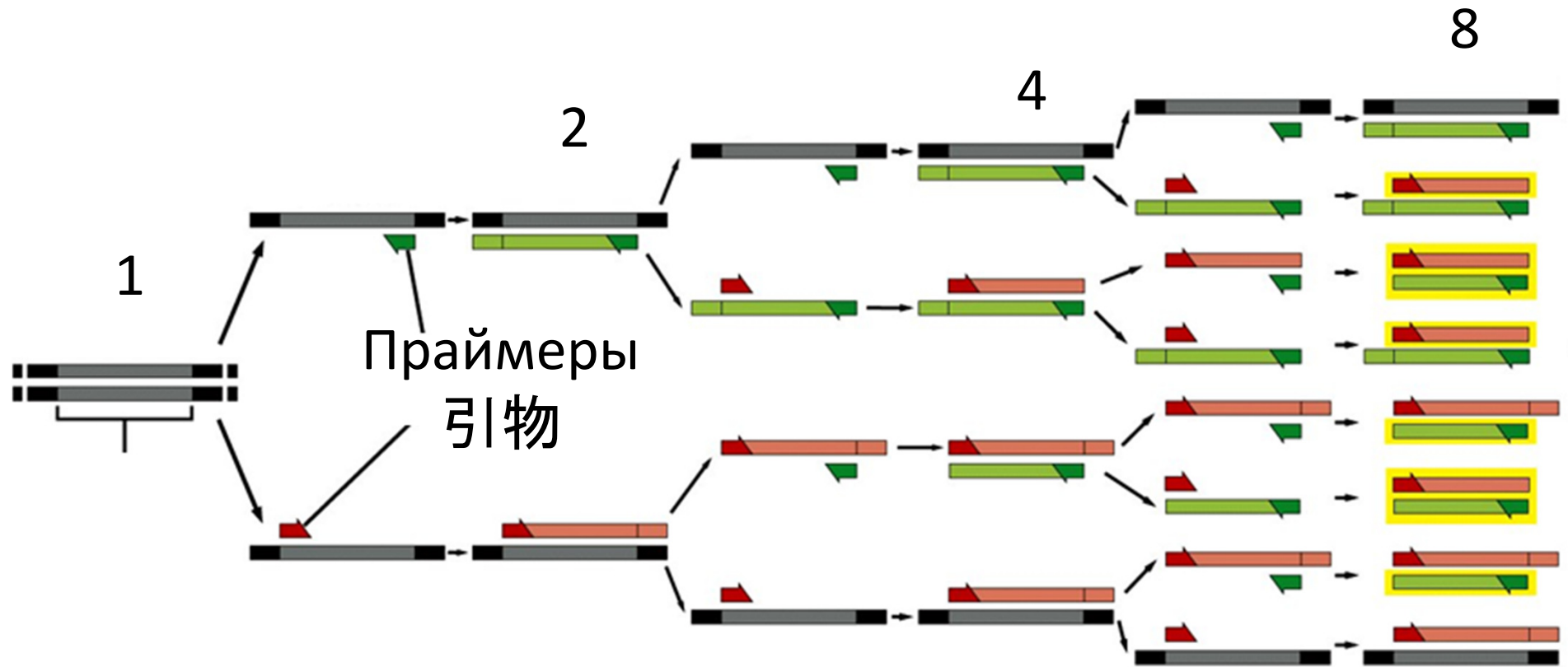
Шаг 1
步骤 1

Шаг 2
步骤 2

Шаг 3
步骤 3

Цикл 1
周期 1

ПЦР PCR技术



Цикл 1
周期 1

Цикл 2
周期 2

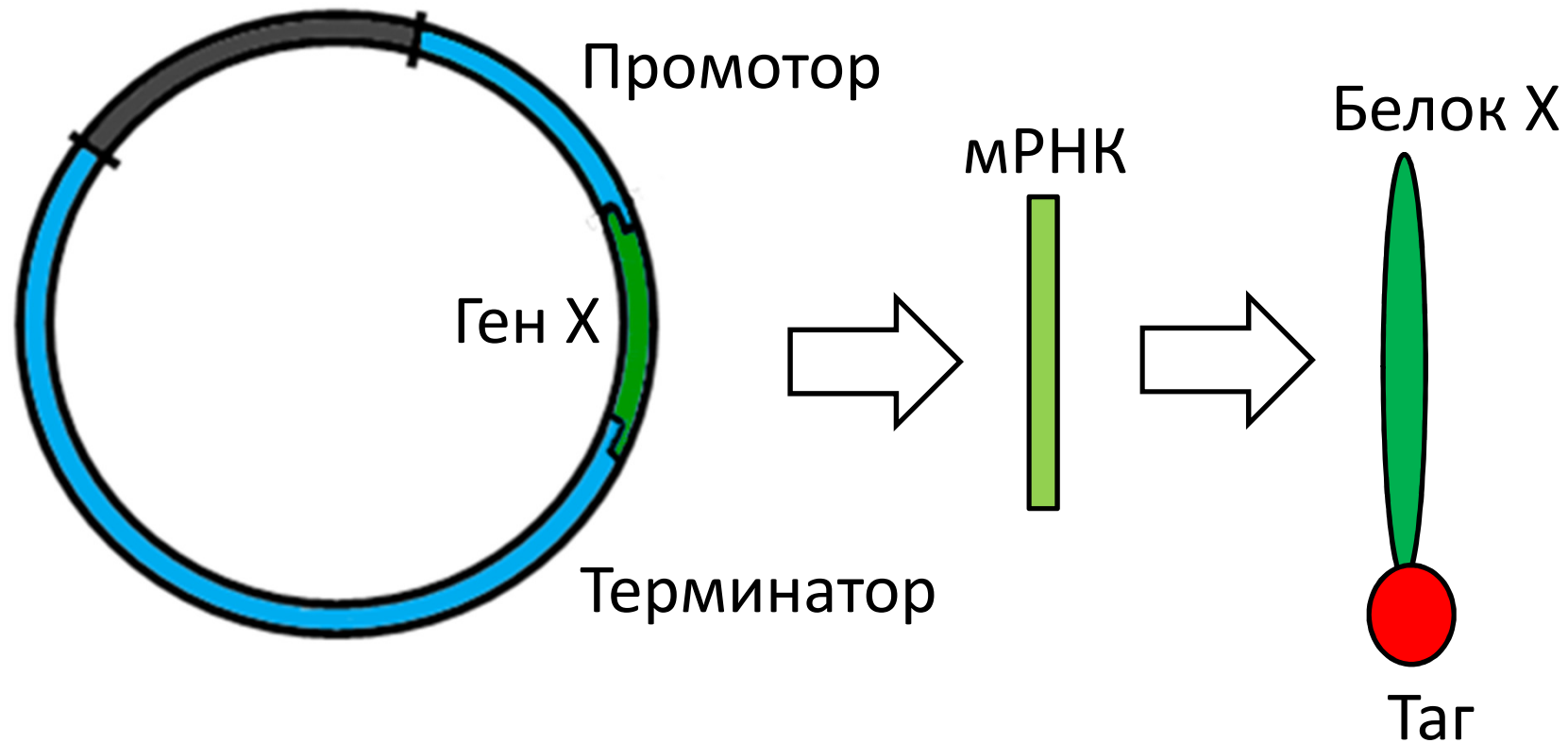
Цикл 3
周期 3

ПЦР Амплификатор PCR机

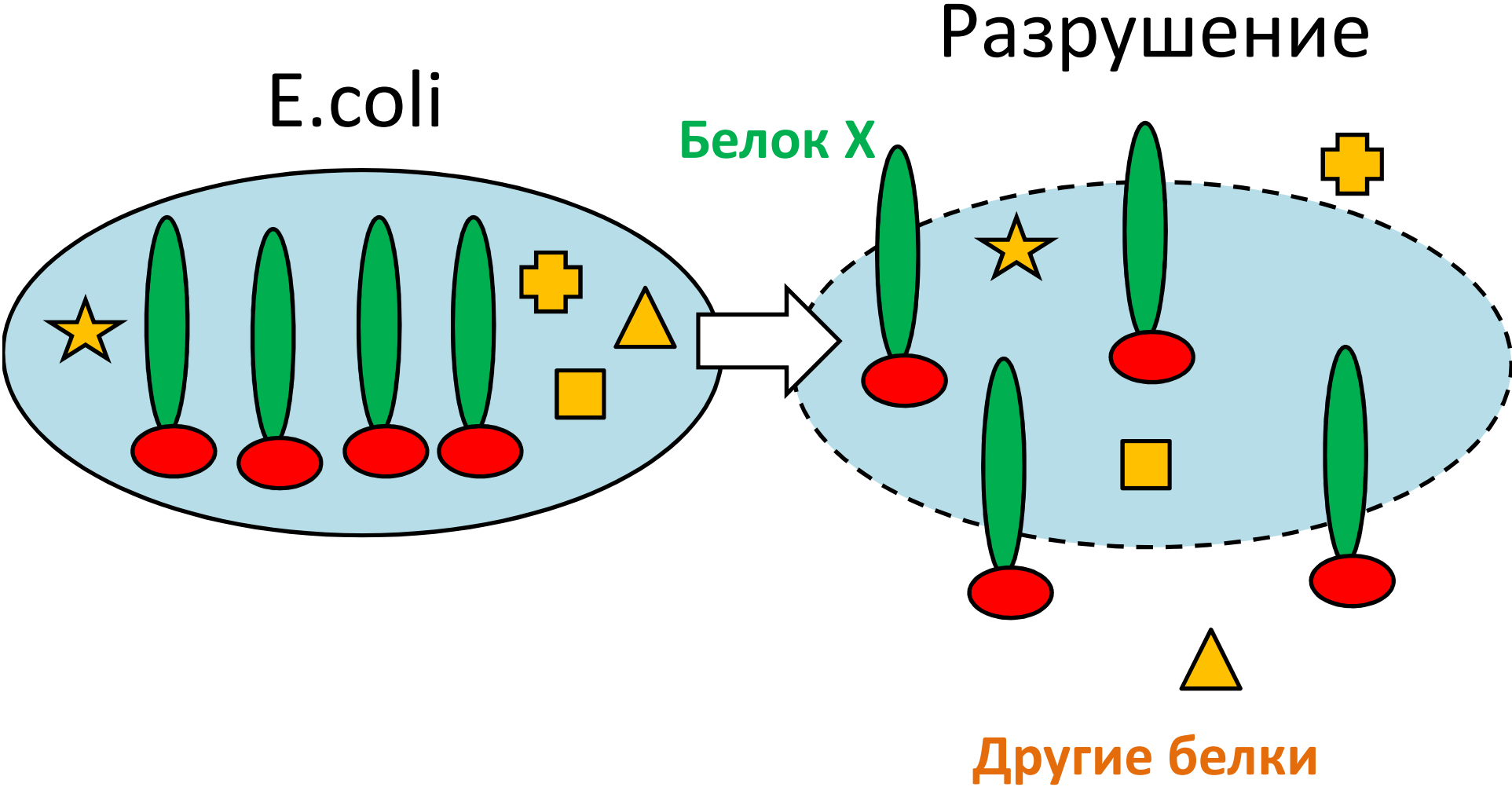


5) Антитела в Научных Исследованиях

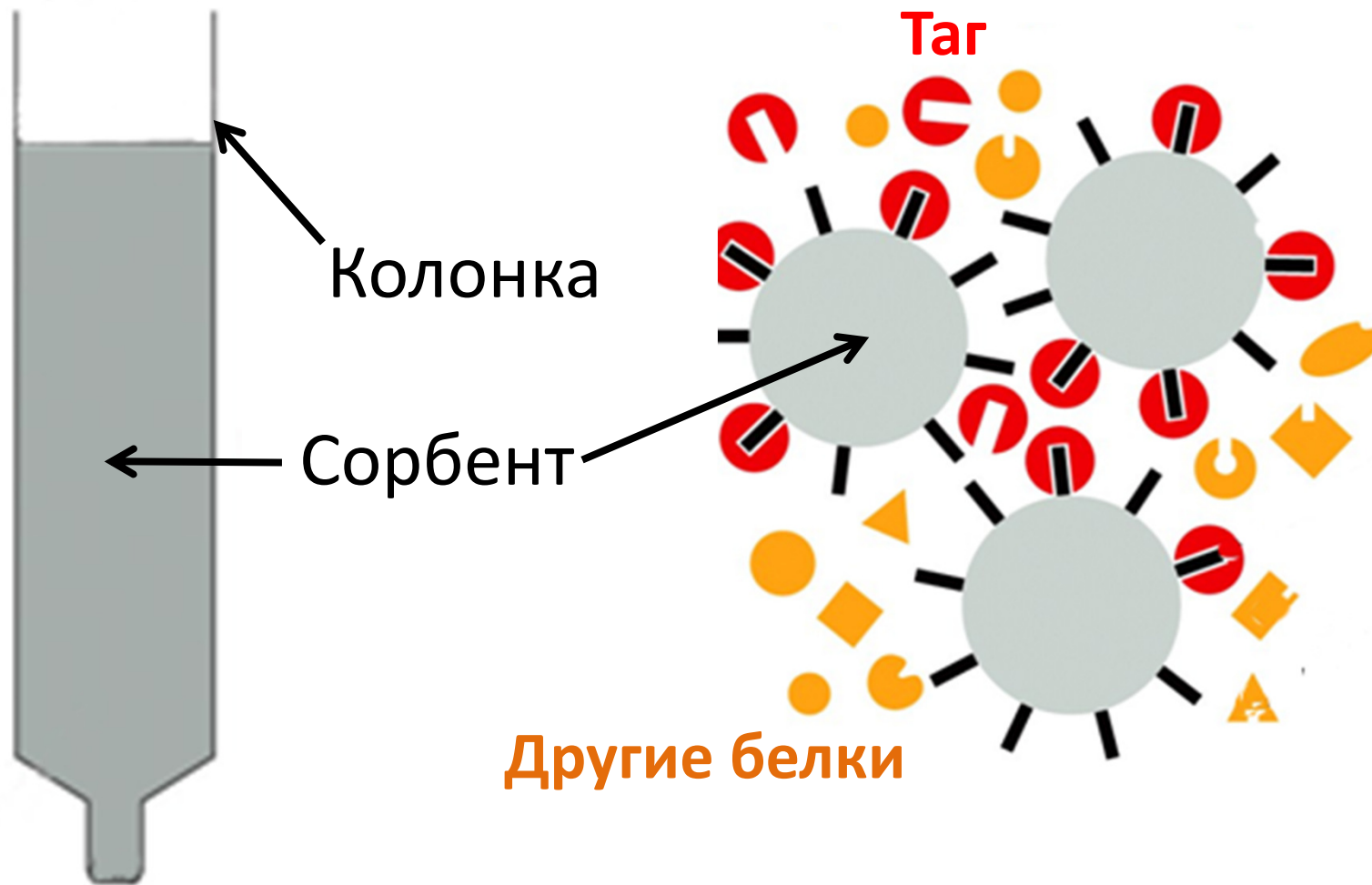
5.1. Получение химерного белка в E.coli



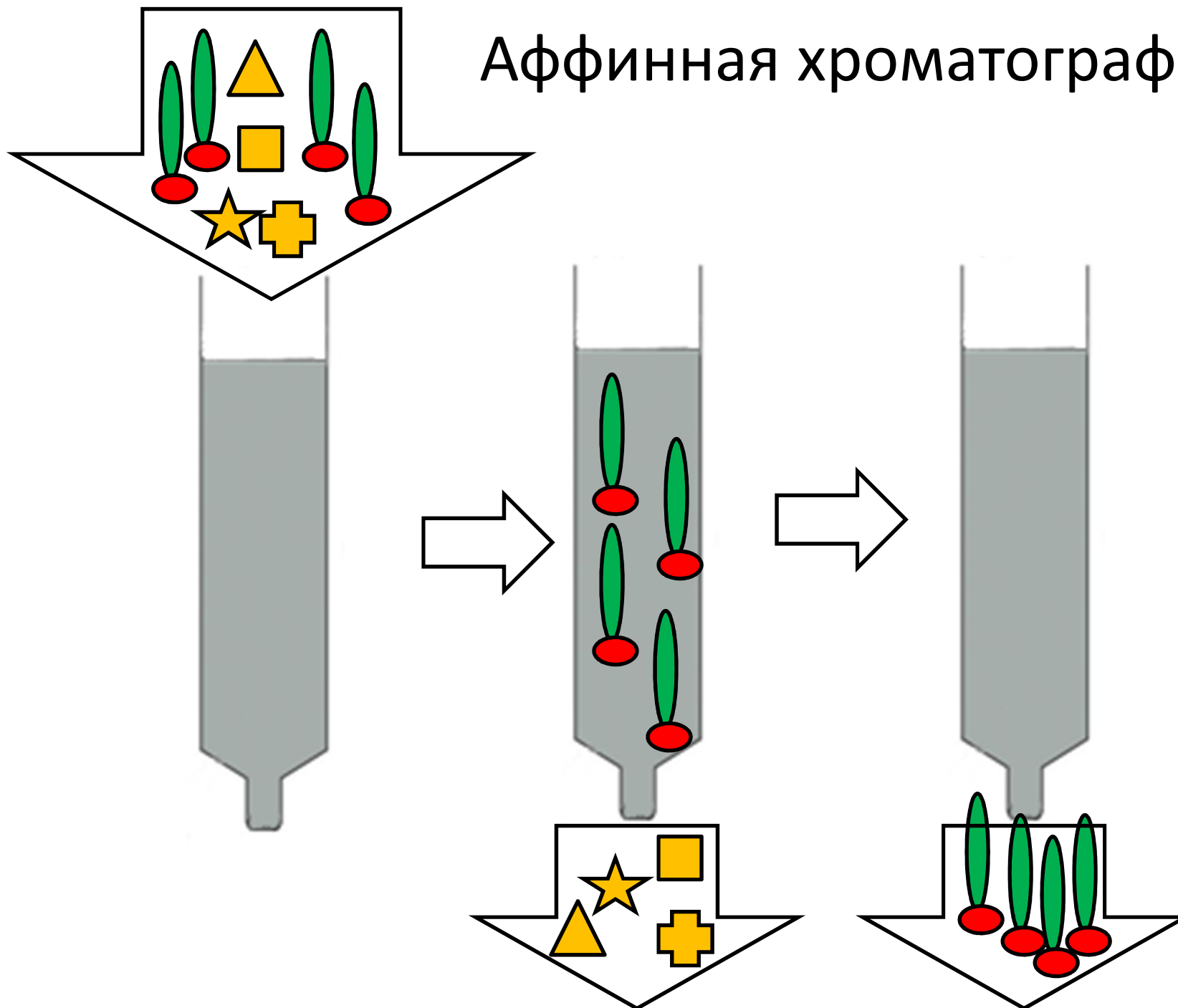
5.1. Получение химерного белка в E.coli



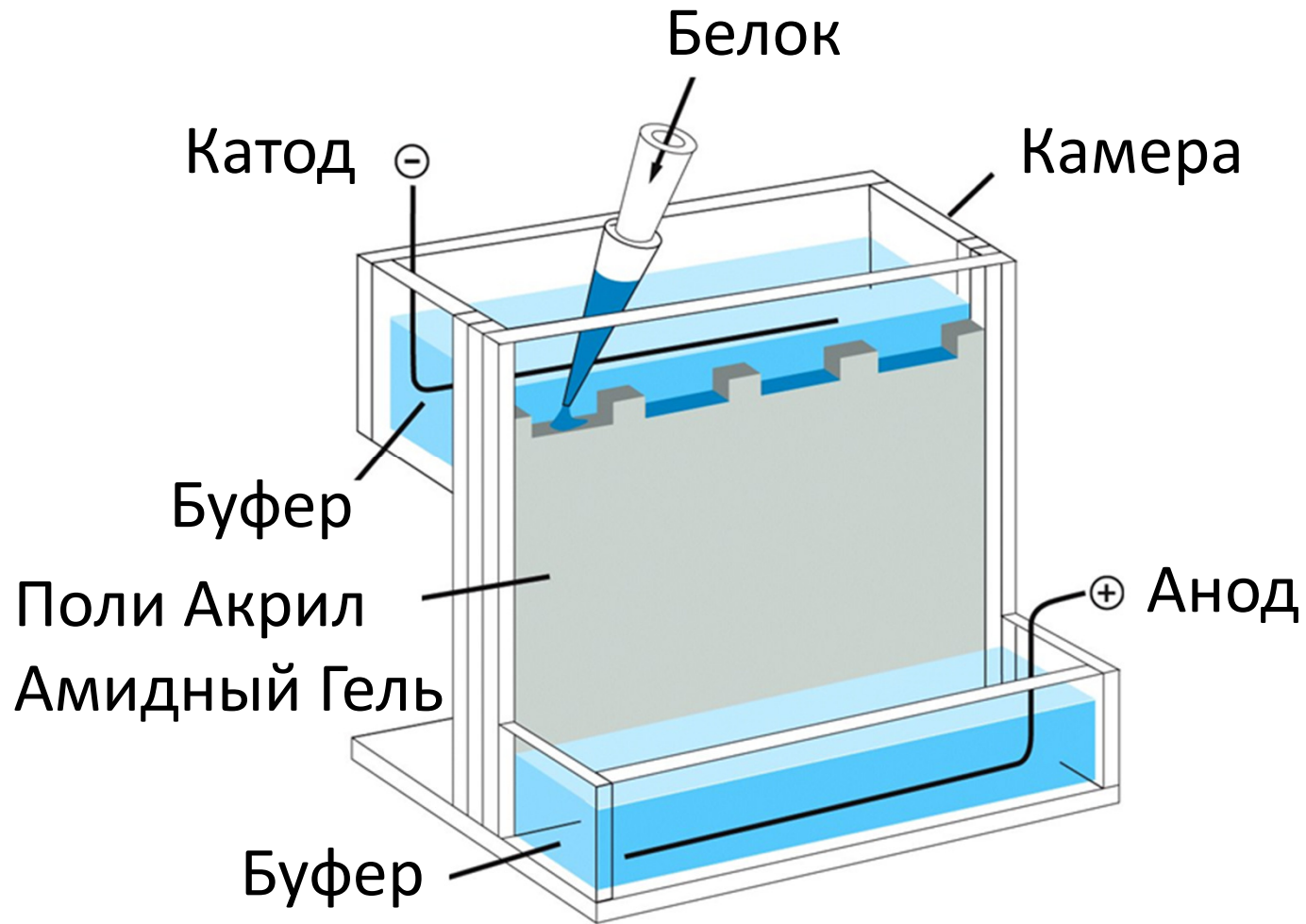
5.2. Очистка химерного белка. Аффинная хроматография.

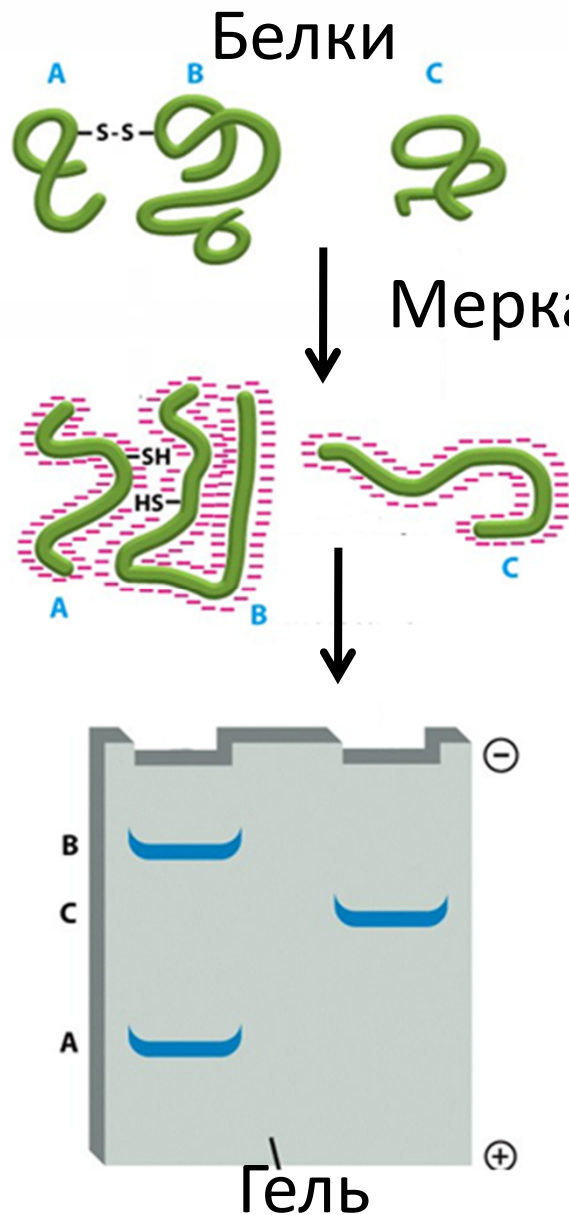


Аффинная хроматография

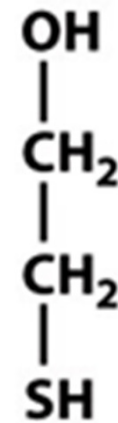


5.3. Белковый ГельЭлектрофорез

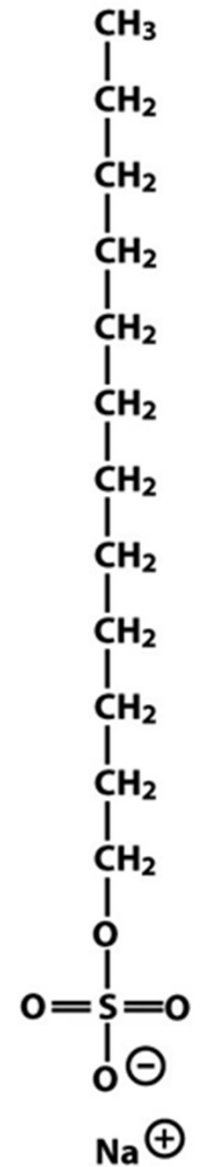




Меркаптоэтанол (SH) + ДСН (-)



Меркаптоэтанол

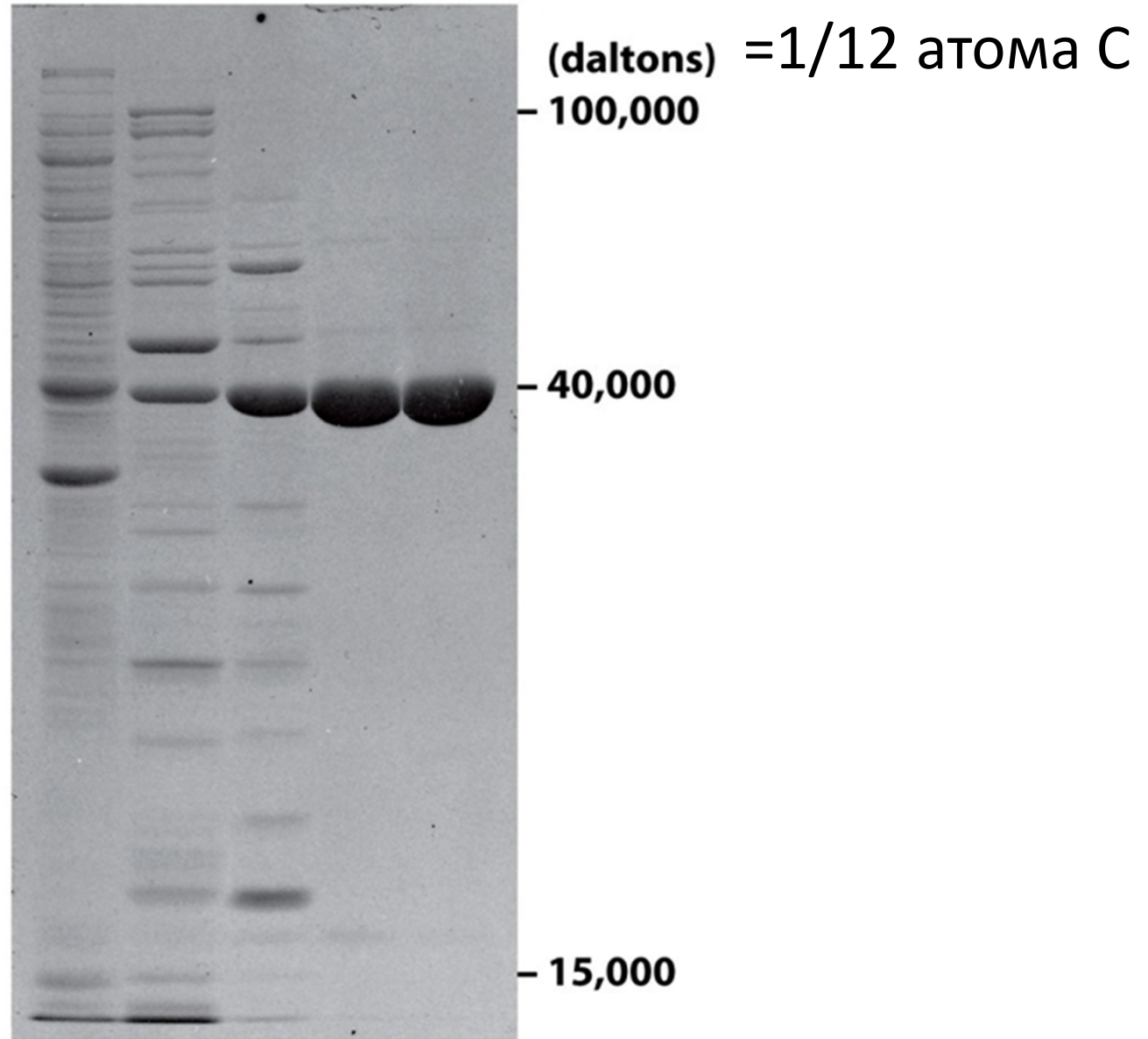


ДСН

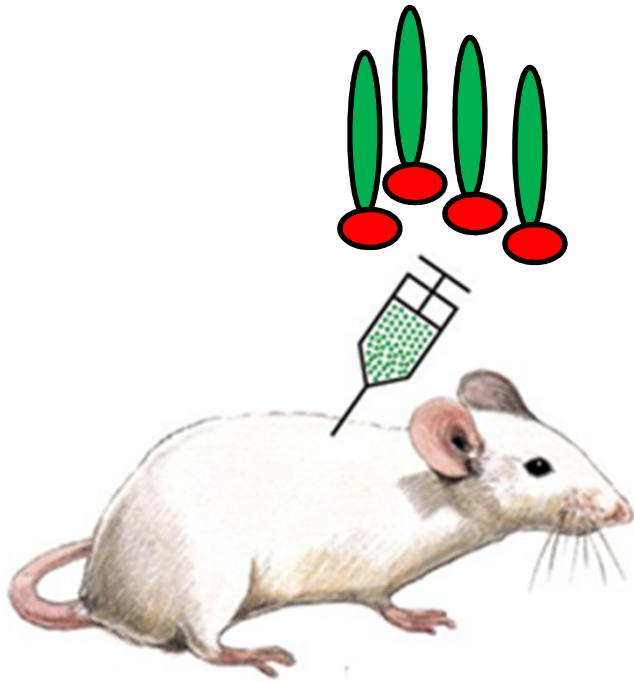
До очистки После очистки

1 2 3 4 5

 E.coli



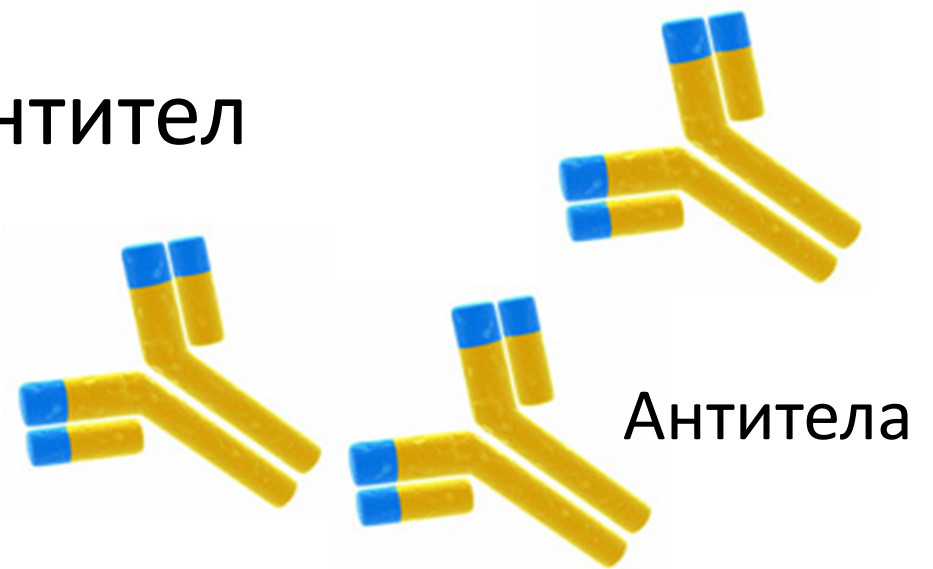
5.4. Иммунизация



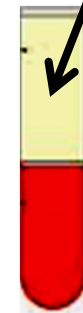
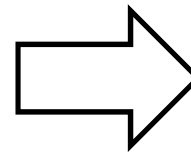
5.5. Получение Антител



Кровь



Антитела

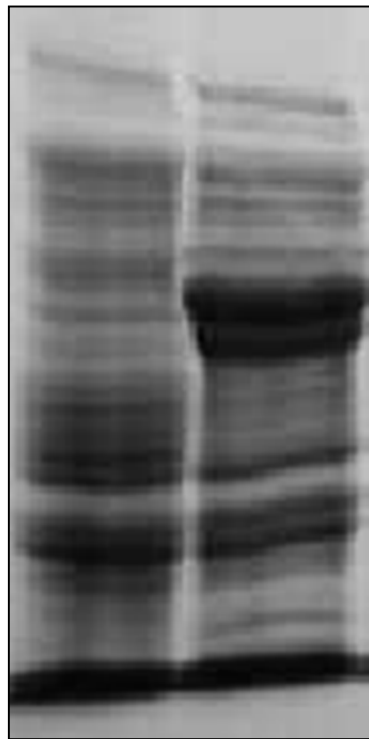


Сыворотка

Эритроциты

5.6. Вестерн Блот

 E.coli

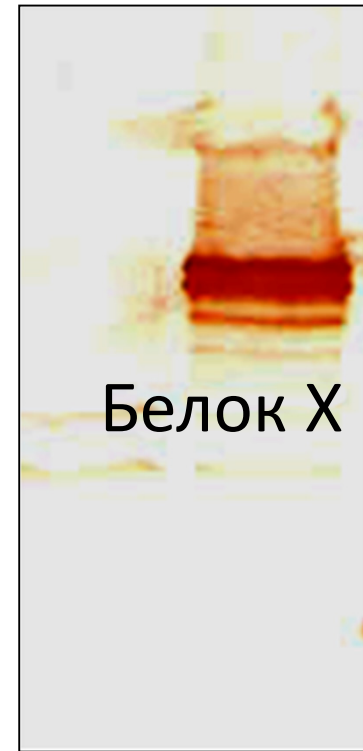
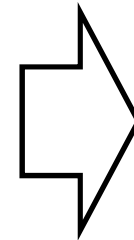
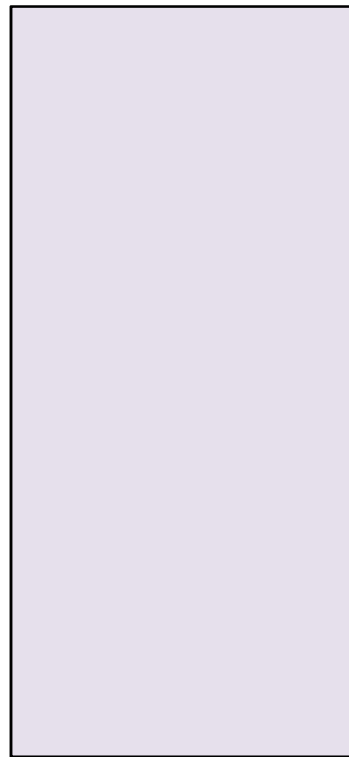
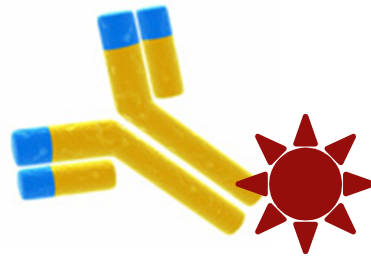


Гель

Перенос



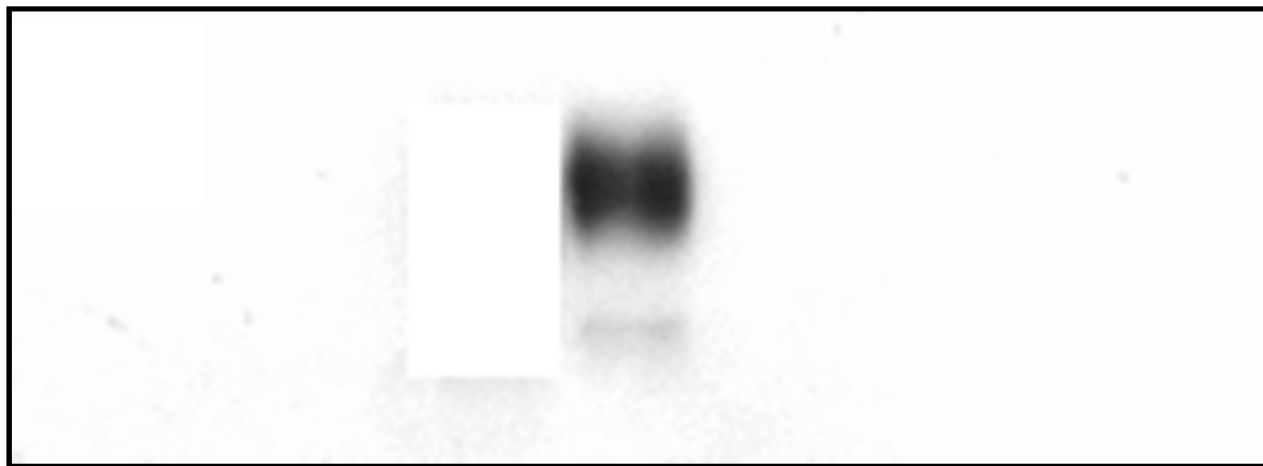
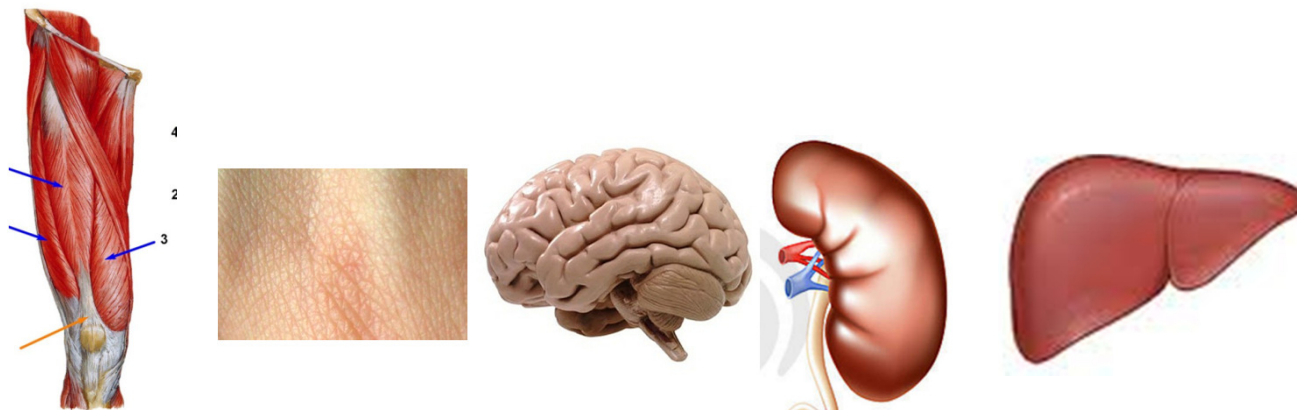
Мембрана



Белок X

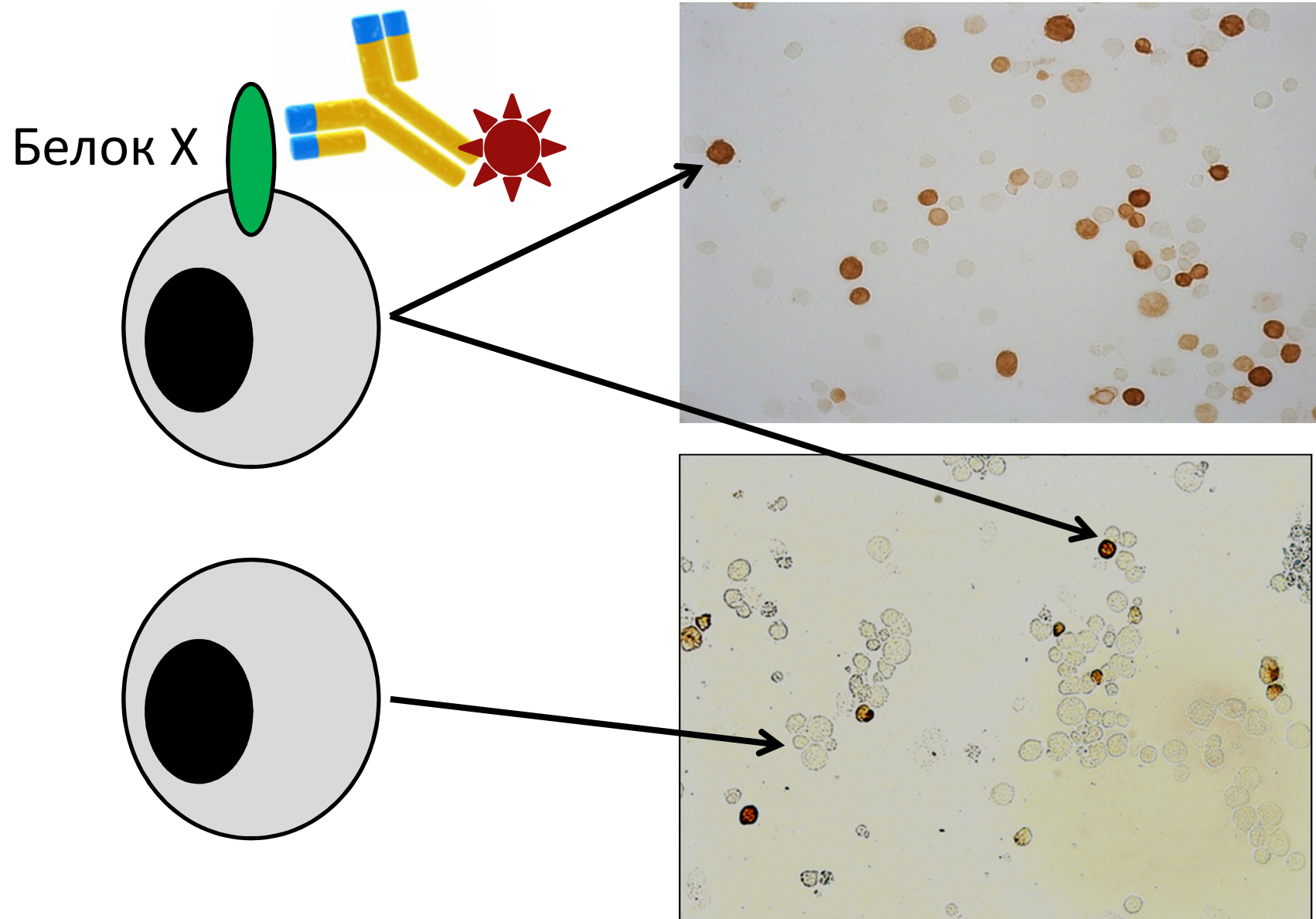


Вестерн Блот



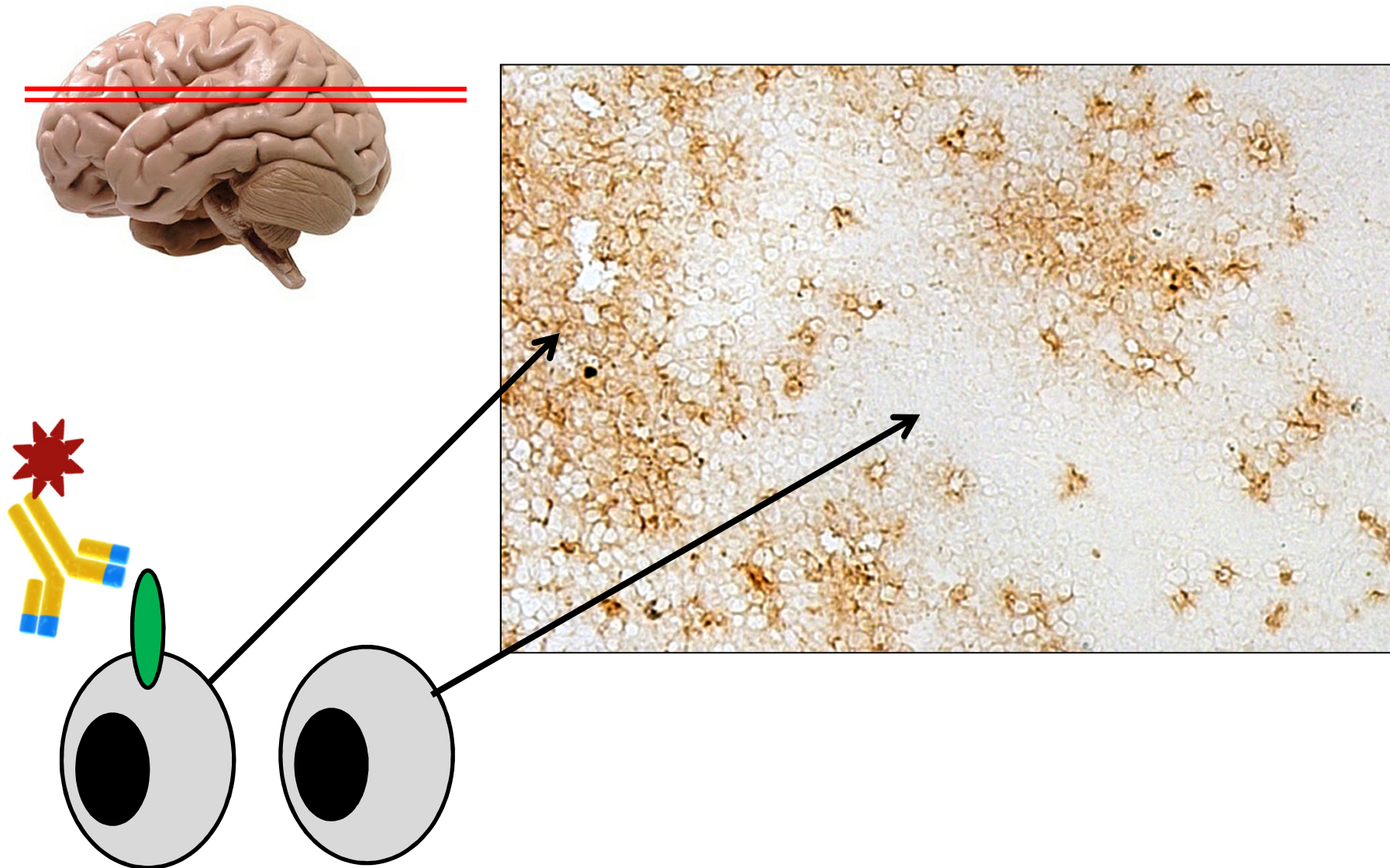
Белок X → В Головном Мозге

5.7. Иммунохимия



5.8. Иммуногистохимия

Срез – очень тонкий



Часть2. Эпигенетические методы исследования на молекулярном и внутриклеточном уровнях

Эпигенетика

ЭПИГЕНЕТИКА – наука о закономерностях наследования и изменения экспрессии генов без изменения самой последовательности ДНК.

- ❖ Молекулярный уровень
- ❖ Внутриклеточный уровень
- ❖ Организм
- ❖ Трансгенерационное наследование

Методы исследования в эпигенетике

Методы исследования на молекулярном уровне:

- ❖ Метилирование ДНК
- ❖ Модификации гистонов
- ❖ Варианты гистонов
- ❖ Некодирующие РНК

Методы исследования на молекулярном уровне

1. Использование метилчувствительных рестриктаз (Not1, Eag1, SacII, HpaI)
2. Бисульфитное секвенирование = трансформация цитозина в урацил бисульфитом Na + ПЦР+ секвенирование (BS-Seq = Bisulfite sequencing)
3. Специфические антиметилцитозиновые антитела (MeDIP = Methylated DNA immunoprecipitation)

1. Использование метилчувствительных рестриктаз

1975г Holliday and Pugh

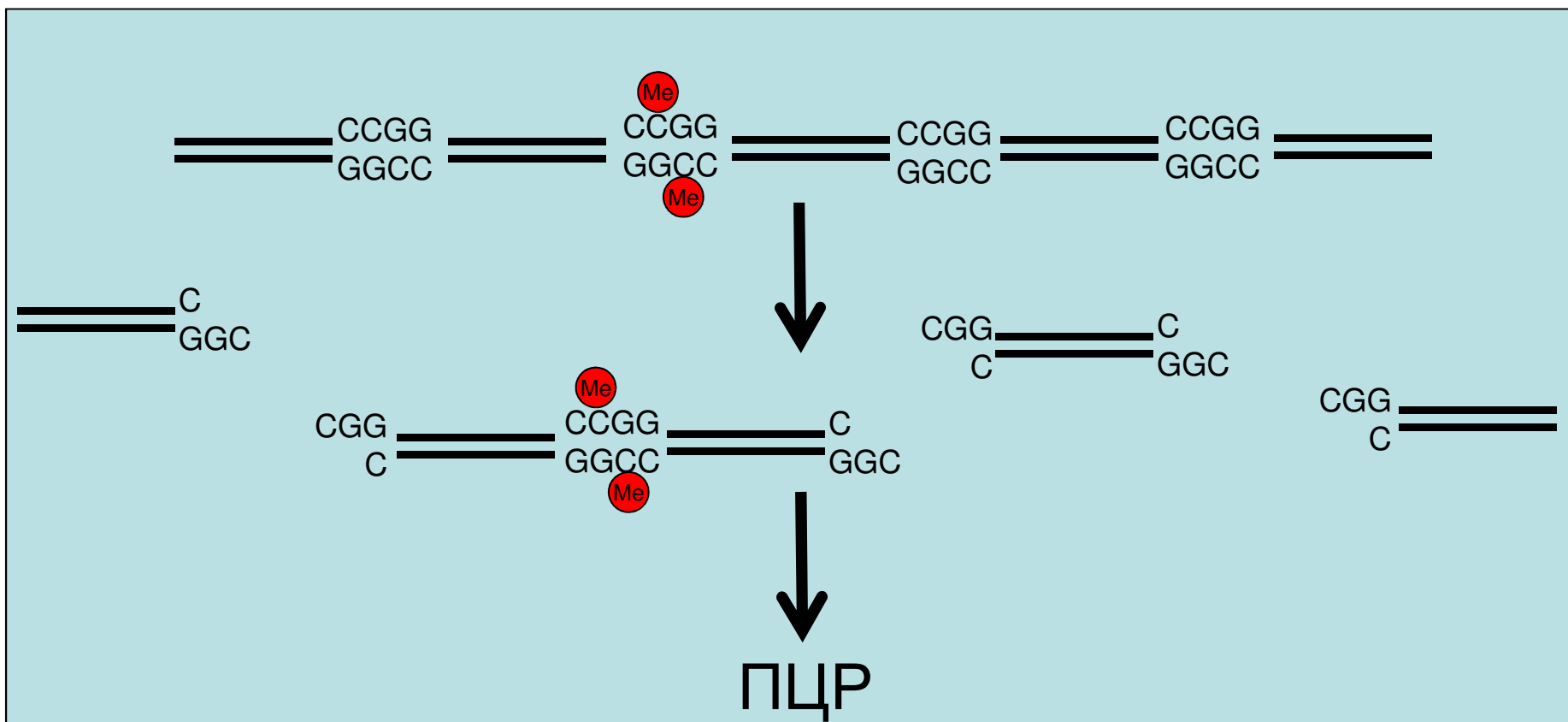
Открыли пары рестриктаз, узнающие одни и те же последовательности ДНК в метилированном и неметилированном состоянии

например: **HpaII** GCGC
MspI GC*GC

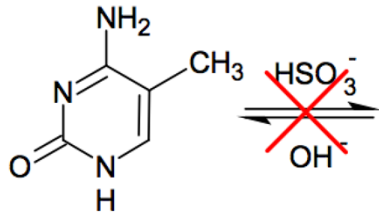
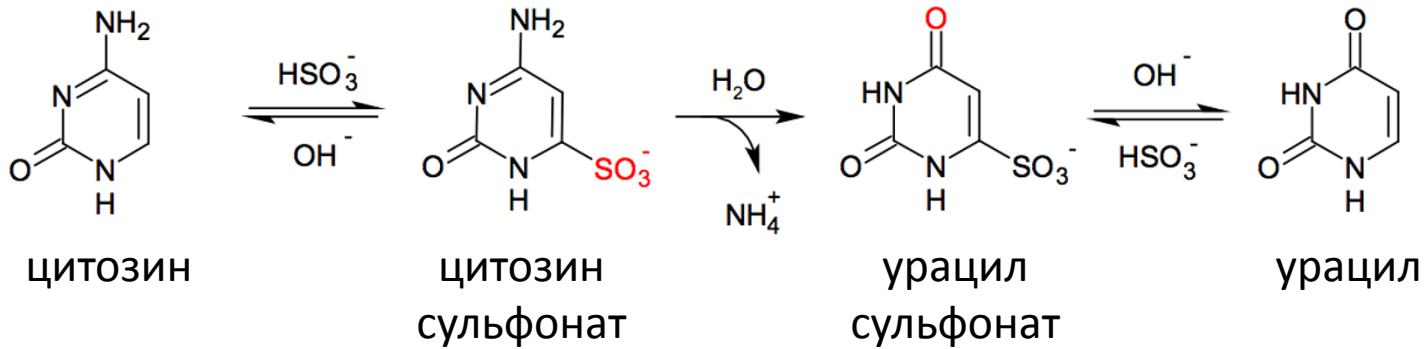
По различию в картине рестрикции можно было определить, метилирован ли участок ДНК

Картирование позиций метилирования с использованием метилчувствительных эндонуклеаз с последующим электрофорезом, Саузерн-блот гибридизацией с зондами на повторы, ПЦР и т.п.

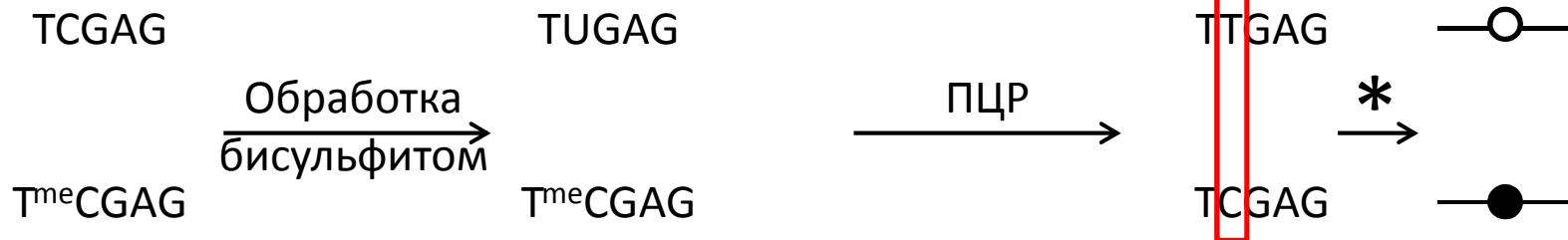
1. Использование метилчувствительных рестриктаз



2. Бисульфитное секвенирование (BS-Seq)

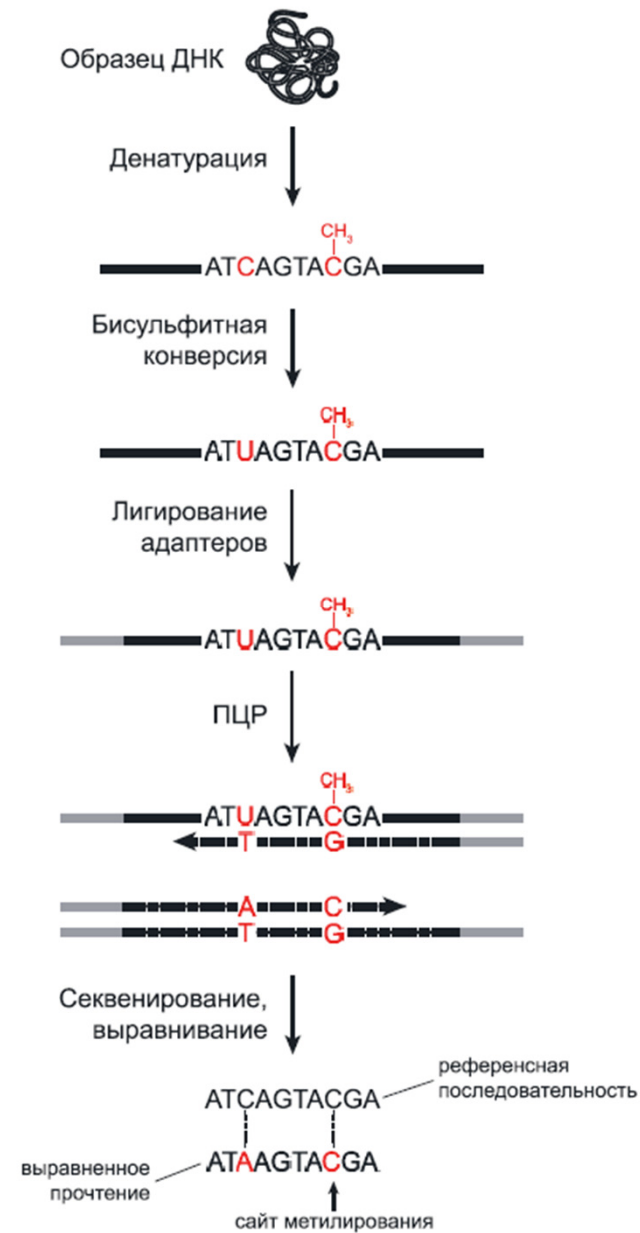


5-метилцитозин

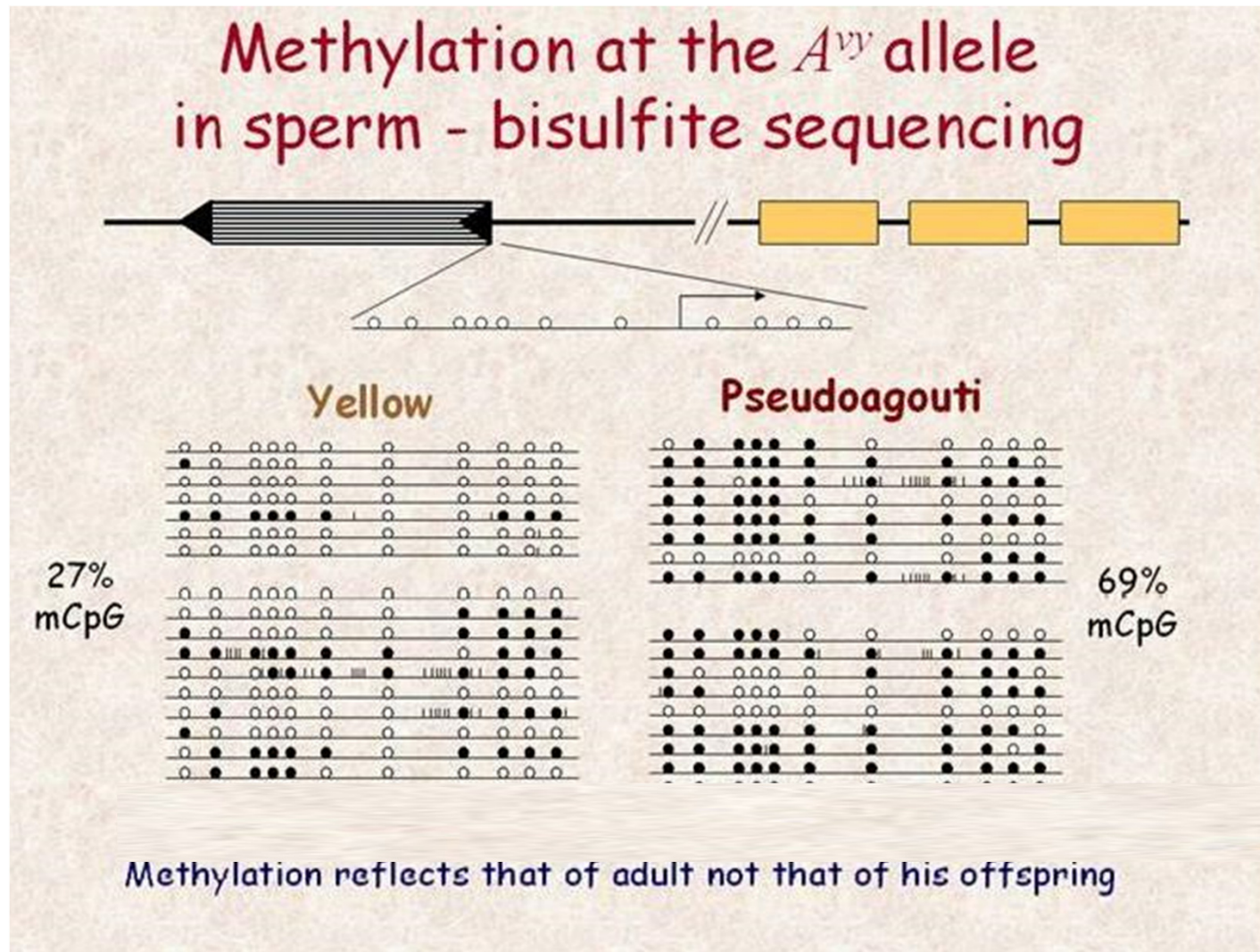


* Бисульфитное секвенирование = трансформация цитозина в урацил бисульфитом Na + ПЦР+ секвенирование (BS-Seq = Bisulfite sequencing)

2. Бисульфитное секвенирование (BS-Seq)

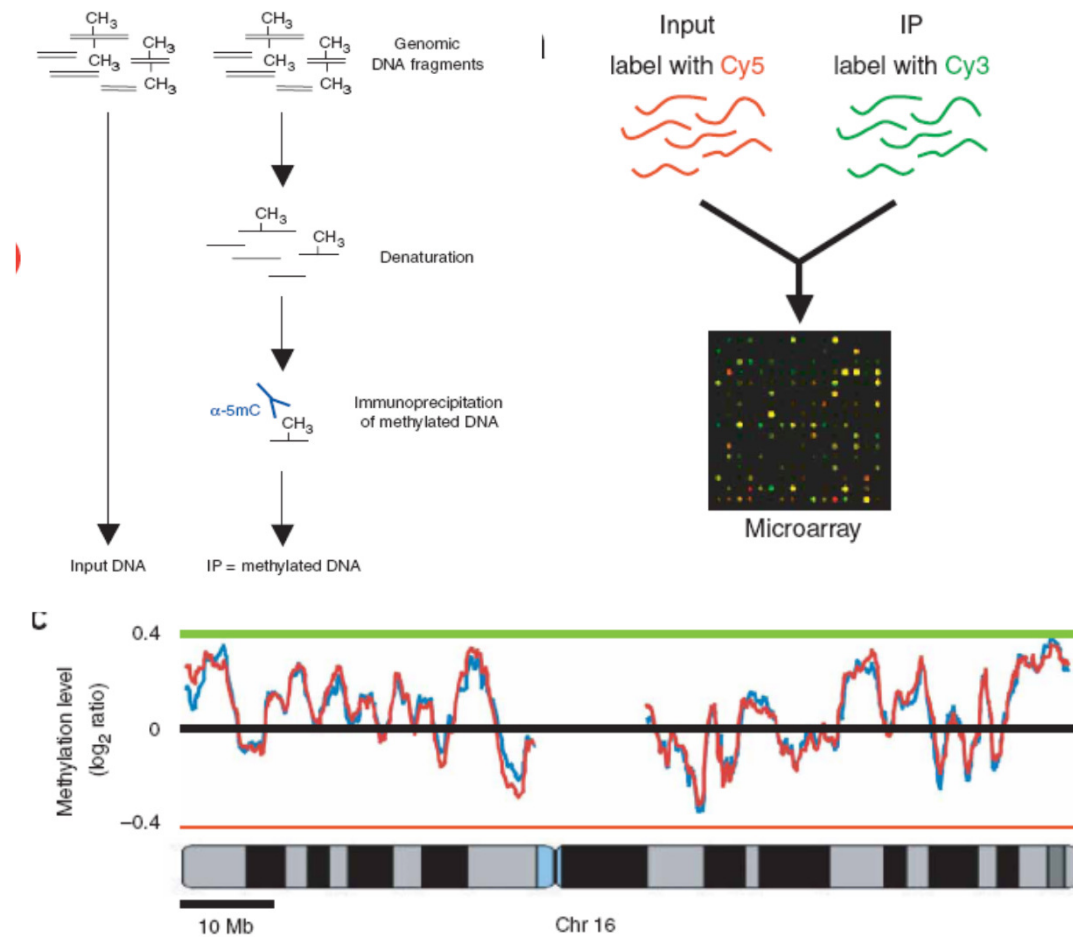


- ❖ Метод может быть использован для определения полиморфизмов в различных аллелях и определения наследования: материнская или отцовская аллели



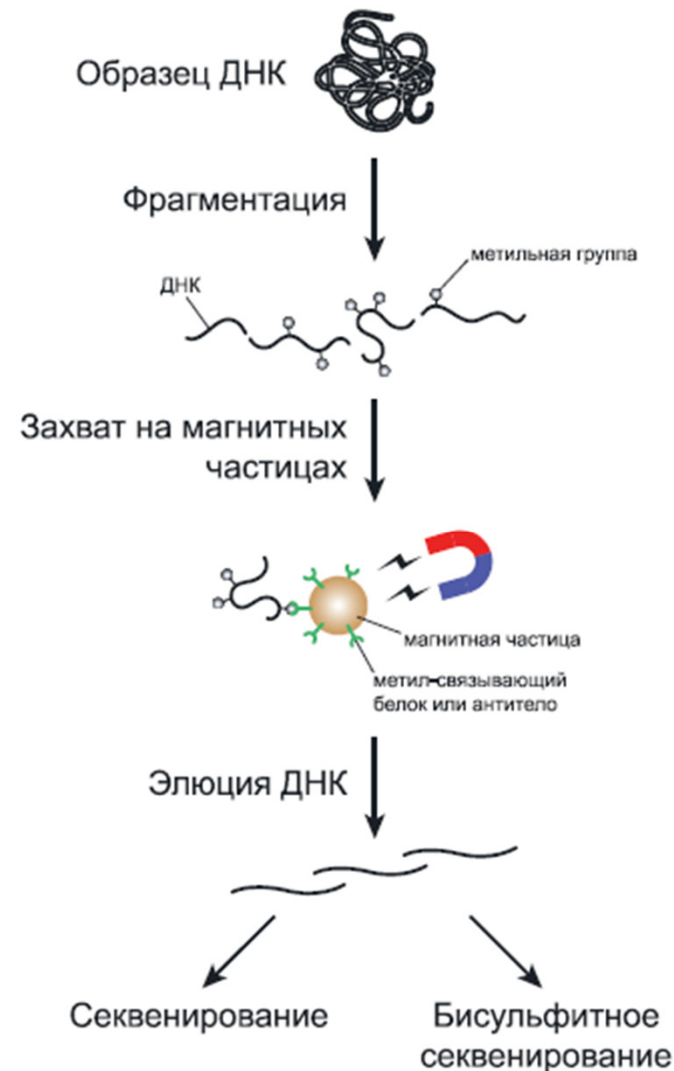
3. Специфические антиметилцитозиновые антитела (MeDIP-chip)

Используются антитела к 5-метилцитозину и гибридизация на чип (MeDIP-chip)



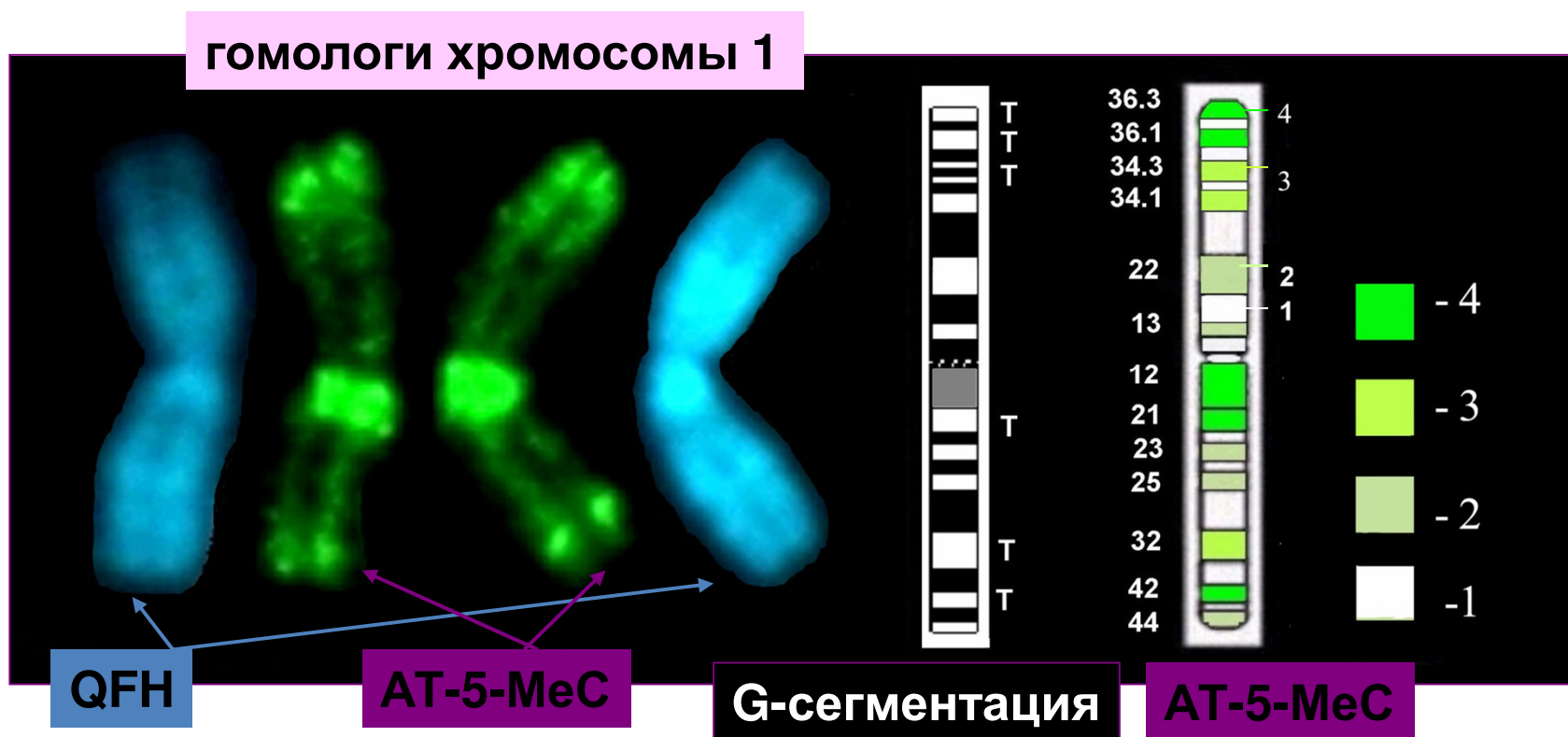
3. Специфические антиметилцитозиновые антитела (MeDIP-Seq)

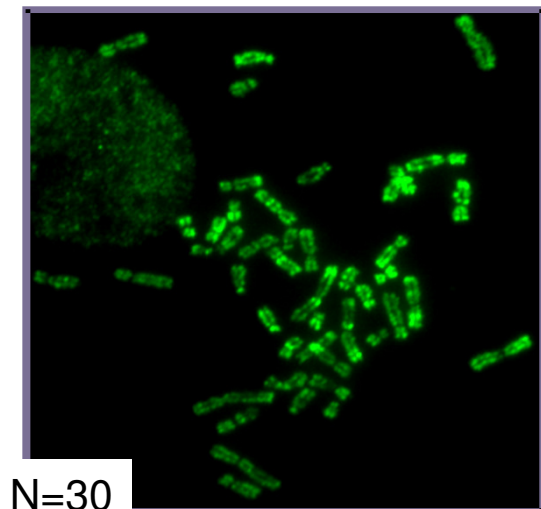
Используются антитела к 5-метилцитозину и секвенирование (MeDIP-Seq)



Локализация 5-метилцитозина на хромосоме 1.

Оценка интенсивности флуоресценции





N=30

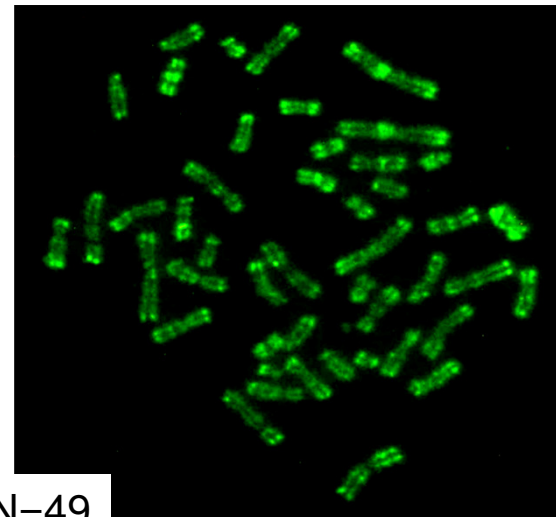
Метилирование ДНК
метафазных хромосом из
мезенхимной стволовой
клетки взрослого
индивида

лимфоцита плода
человека 22/24 недель
развития

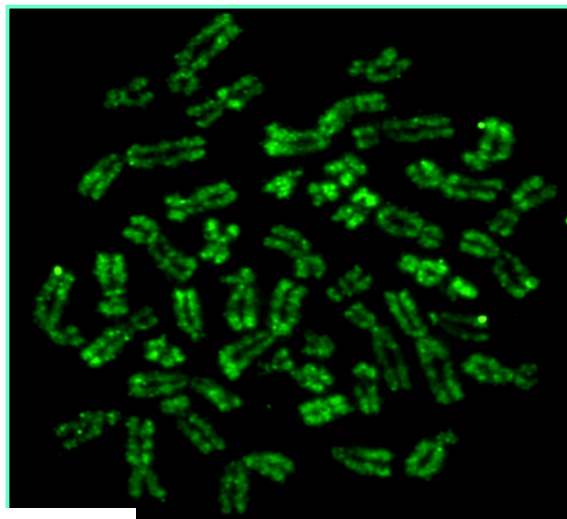
Клетки цитотрофобласта
хориона

легкого

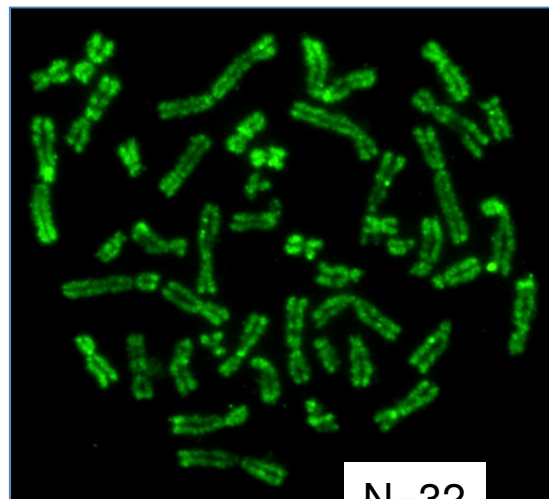
печени
эмбриона человека 5/6
недель развития



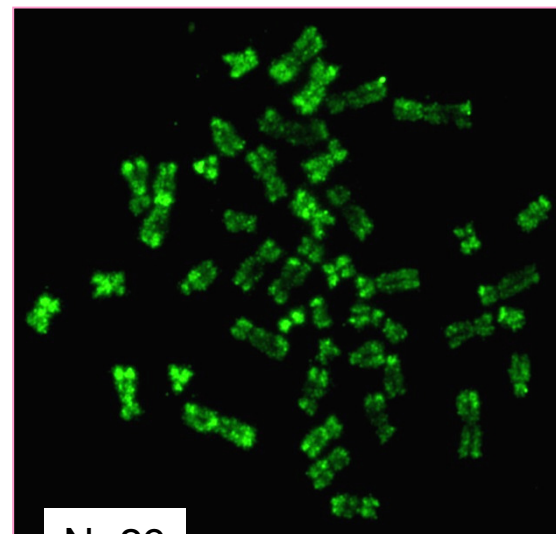
N=49



N=76

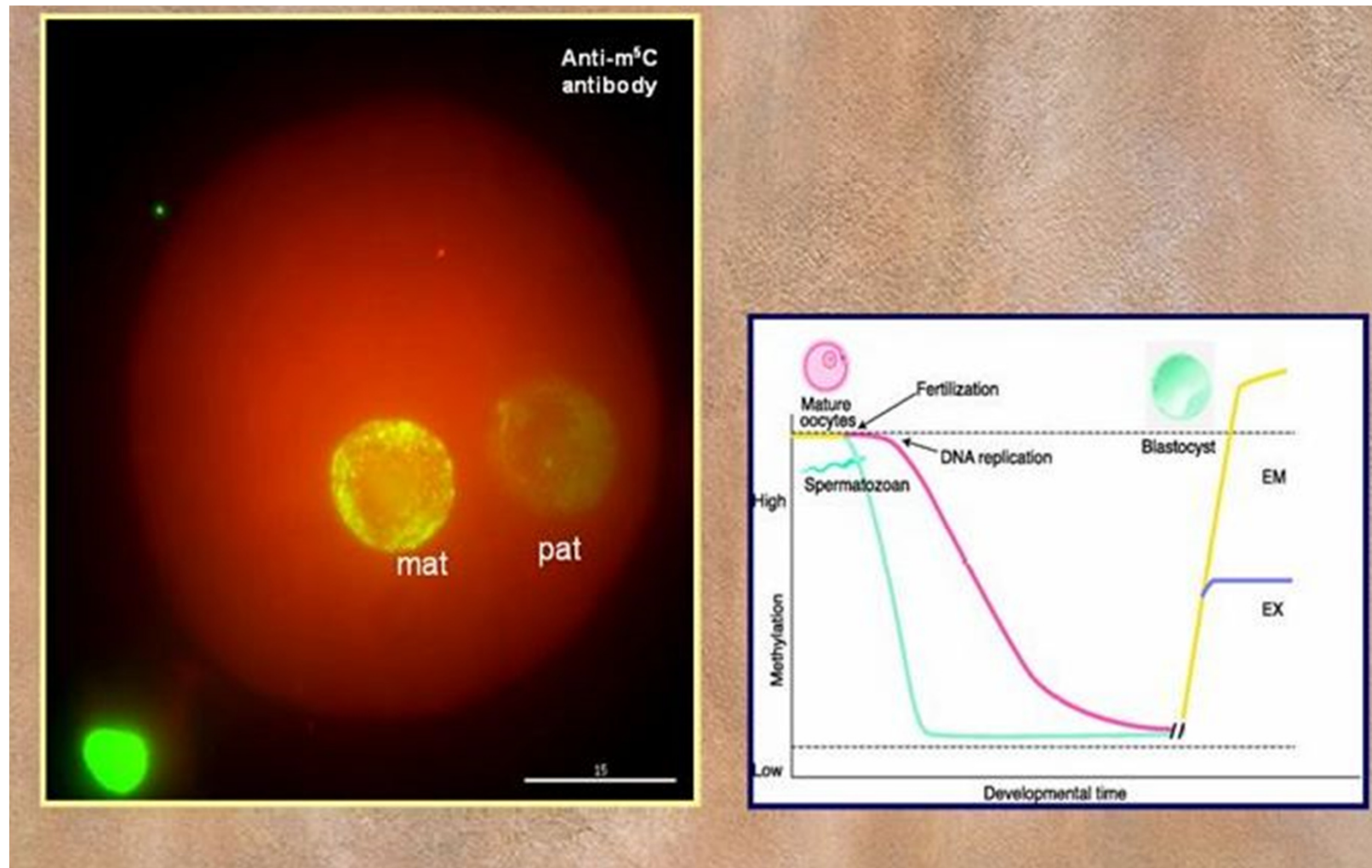


N=32



N=29

Деметилирование отцовского генома в одноклеточном эмбрионе мыши



Методы исследования в эпигенетике

Методы исследования на молекулярном уровне:

❖ Метилирование ДНК

❖ Модификации гистонов

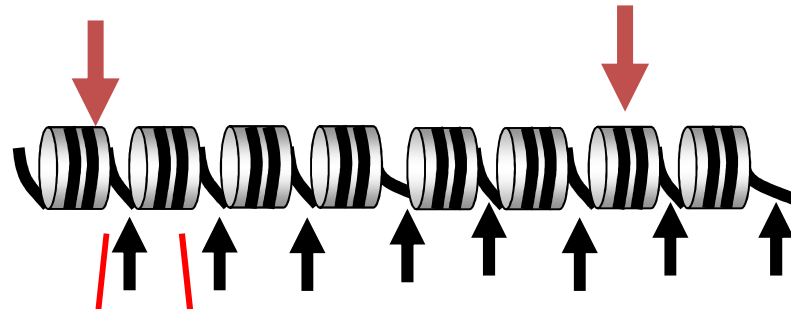
❖ Варианты гистонов

❖ Некодирующие РНК

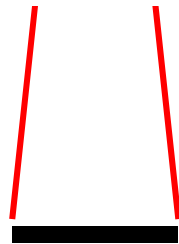
- 1) Специфичные нуклеазы (разрезают ДНК без гистонов)
- 2) Специфические антитела к хроматину
- 3) Бисульфитное секвенирование и иммунопреципитация хроматина (ChIP-BS-Seq = Chromatin Immunoprecipitation Bisulfite Sequencing)

1. Специфичные нуклеазы

Сайты рестрикции выбранной рестриктазой



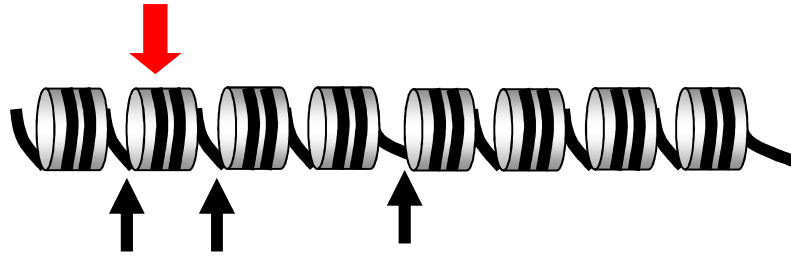
Здесь потенциально ДНК режется микрококковой нуклеазой



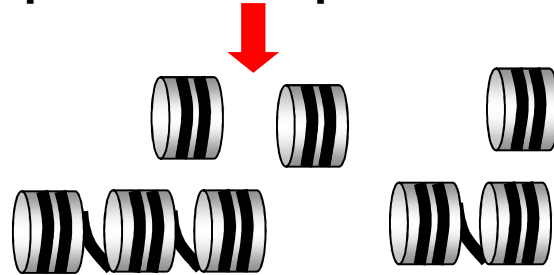
Зонд для гибридизации

Исследуем нуклеосомную укладку в выбранном участке хроматина

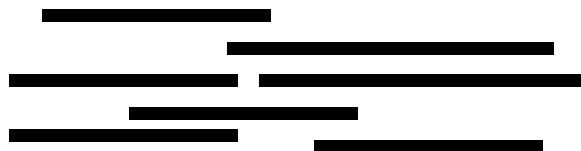
Выделение хроматина



Обработка микрококковой нуклеазой

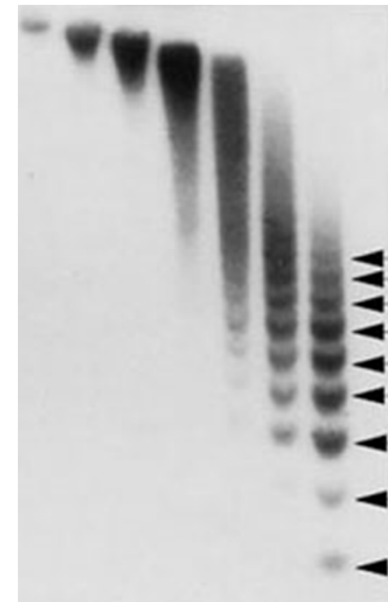


Отмывка от белков

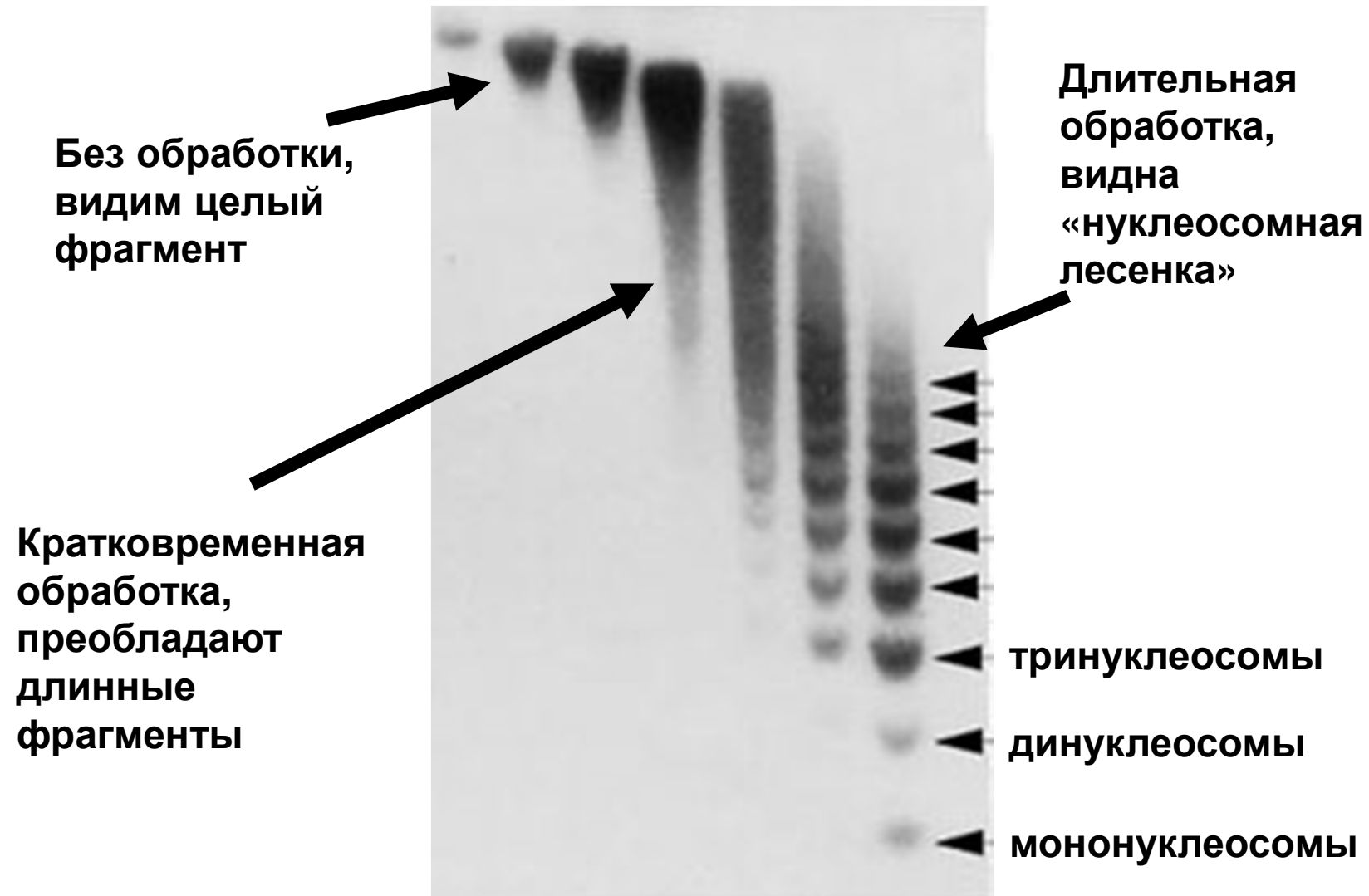


Обработка рестриктазой

Саузерн-блот гибридизация



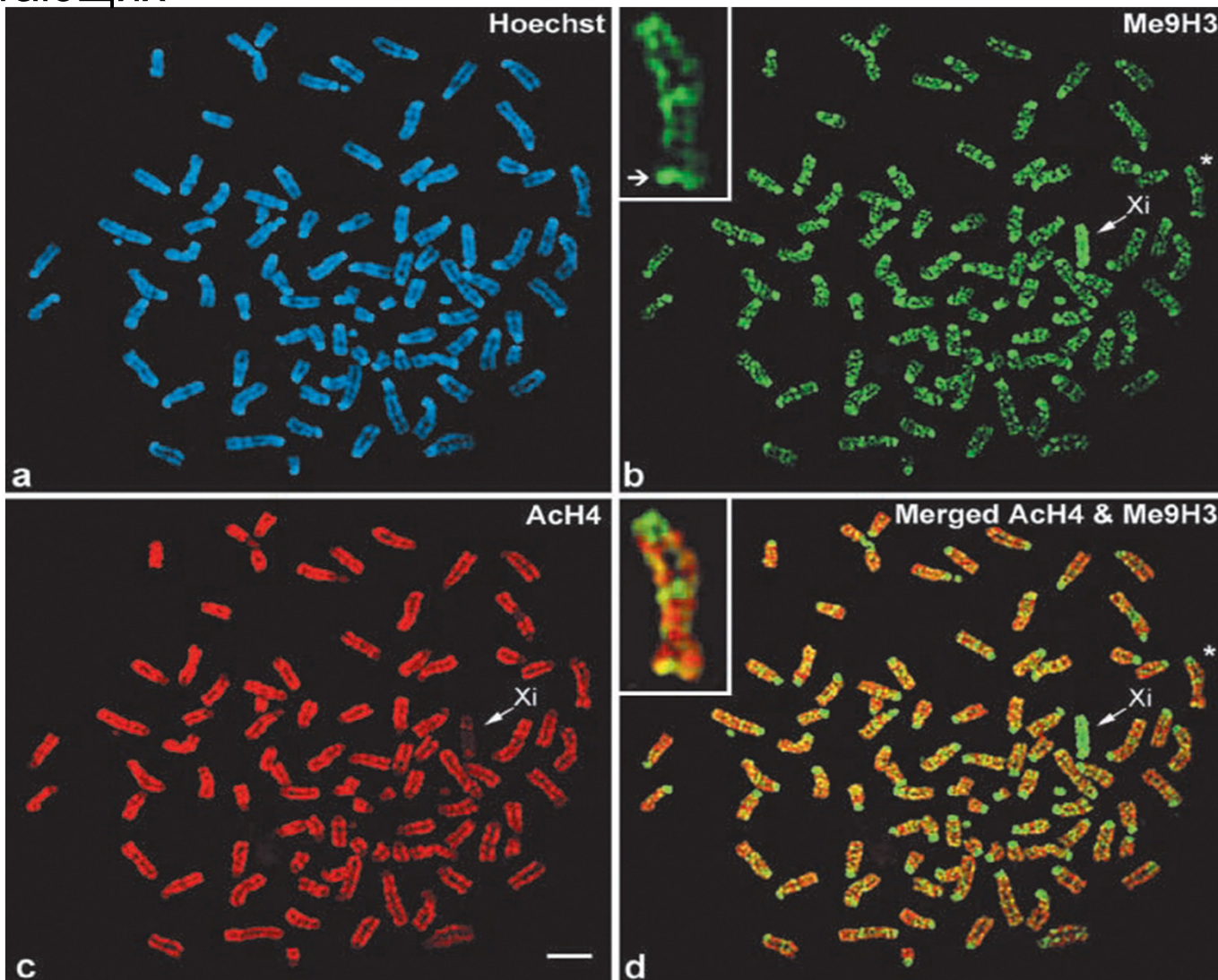
Обработка хроматина микрококковой нуклеазой



Время обработки микрококковой нуклеазой

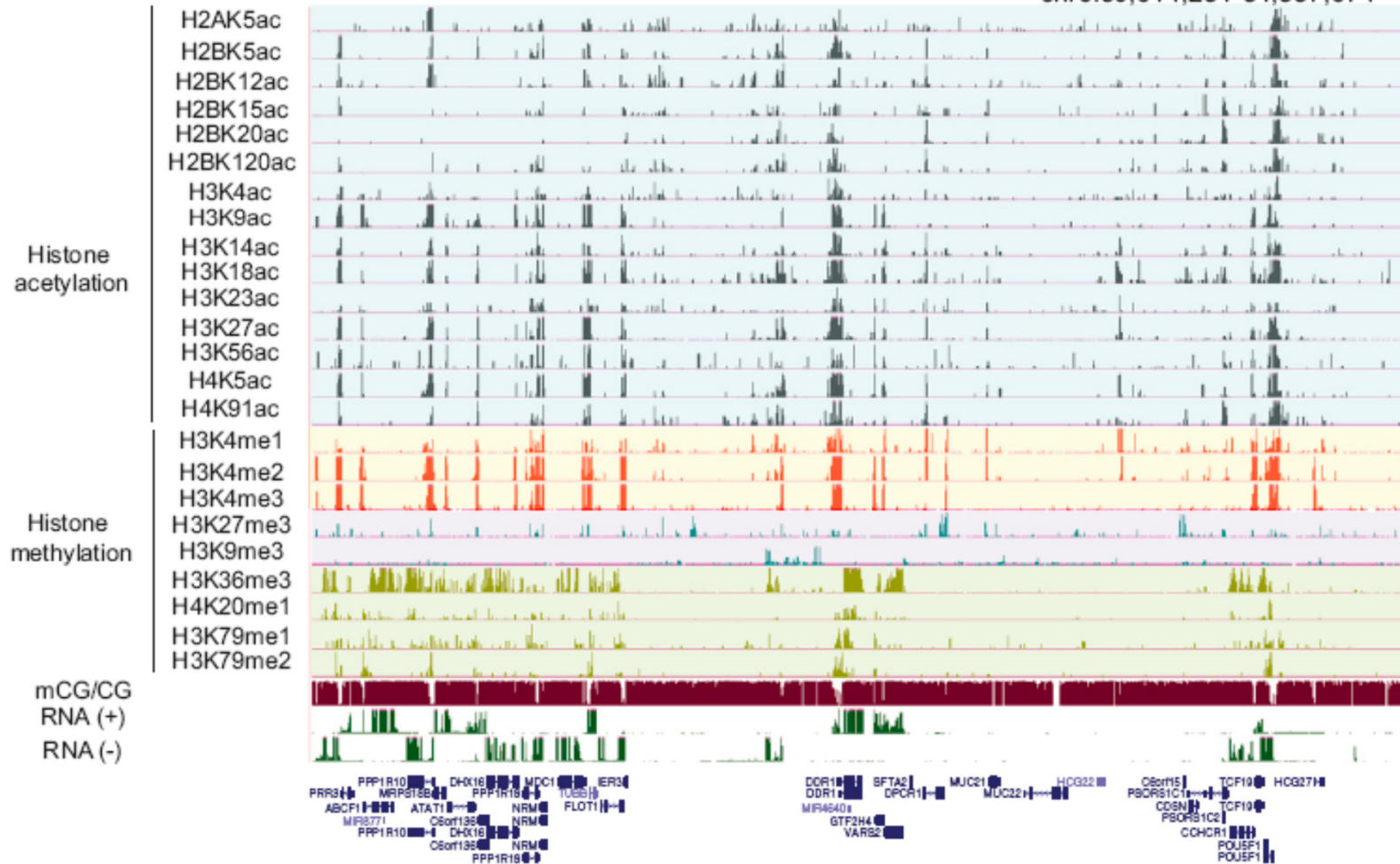
2. Специфические антитела к хроматину

Неперекрывание ацетилированной формы гистона H4 и метилированной по девятому лизину формы гистона H3 (MeH3K9) в хромосомах млекопитающих

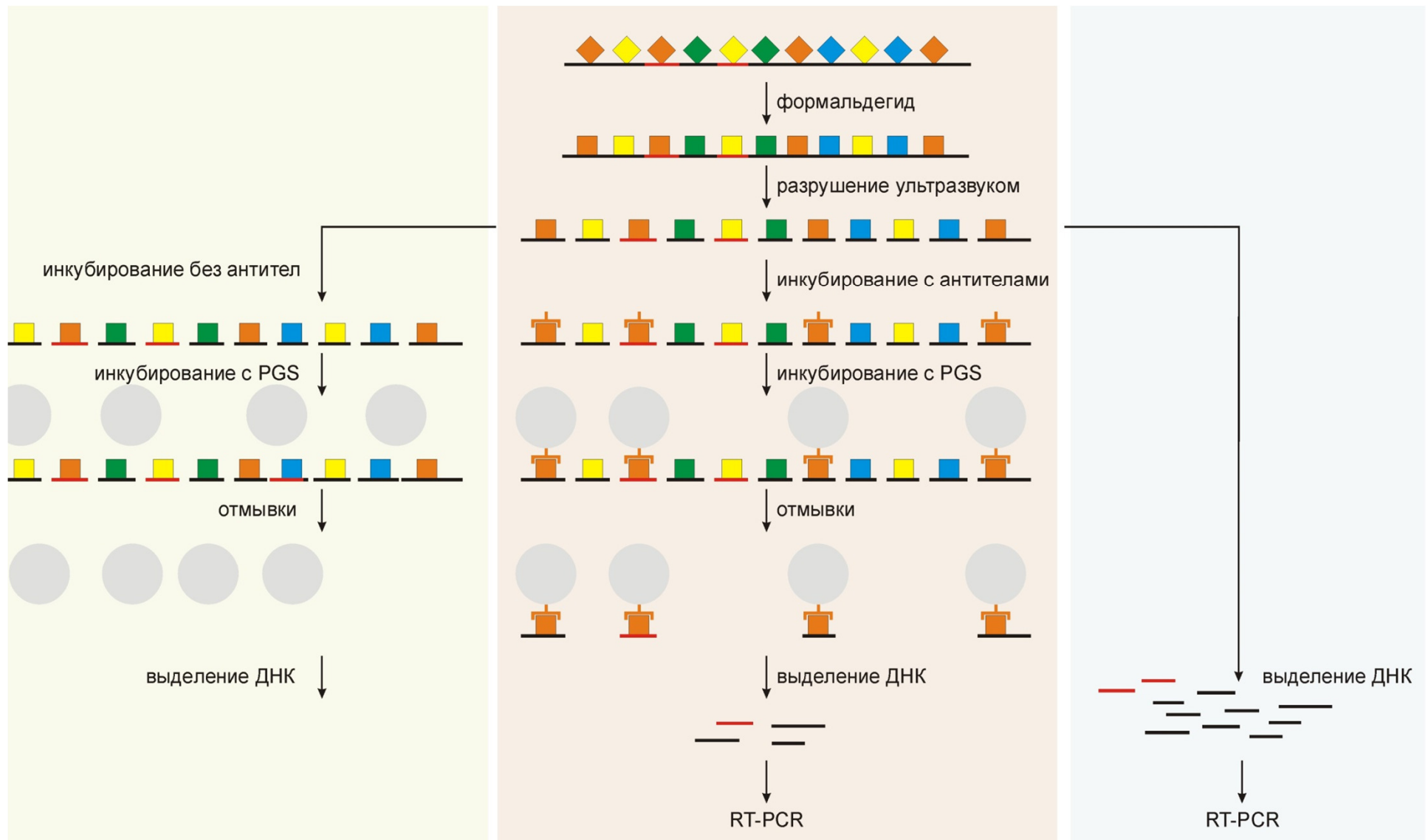


B**Epigenomic landscape in human embryonic stem cells (H1)**

chr6:30,614,231-31,337,674



3. Бисульфитное секвенирование и иммунопреципитация хроматина (ChIP-BS-Seq)



Эпигенетика

ЭПИГЕНЕТИКА – наука о закономерностях наследования и изменения экспрессии генов без изменения самой последовательности ДНК.

❖ Молекулярный уровень

❖ Внутриклеточный уровень

❖ Организм

❖ Трансгенерационное наследование

Эпигенетические
механизмы
регуляции
экспрессии генов

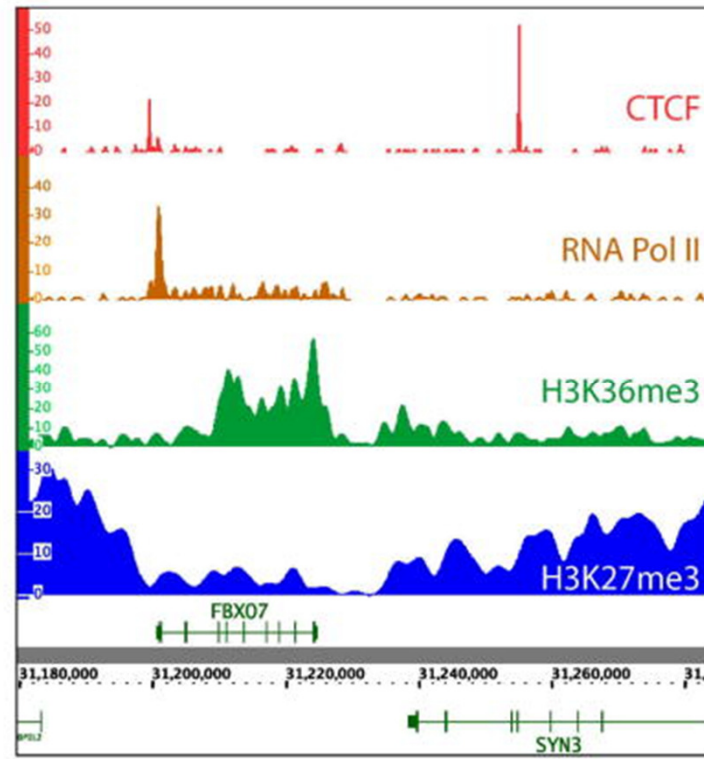
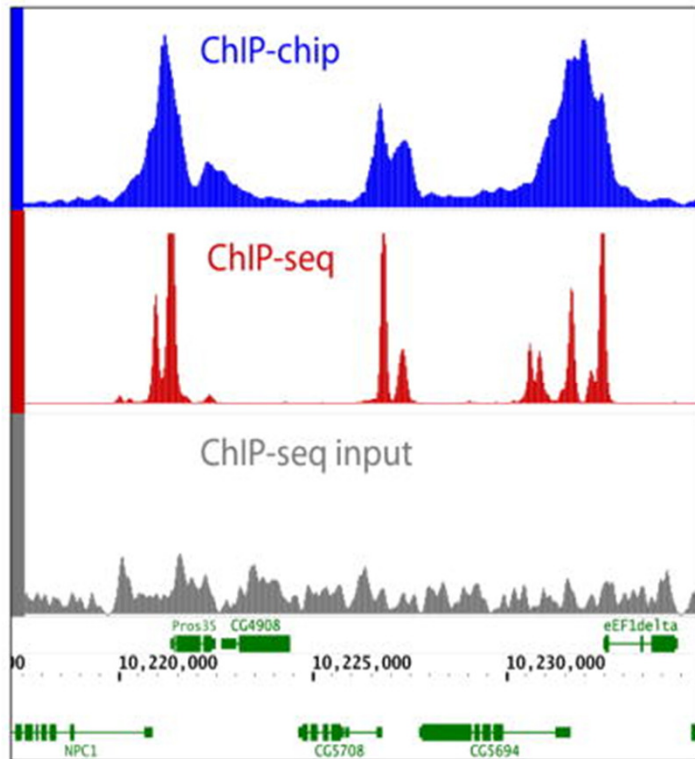
Молекулярные основы эпигенетики

Методы исследования на молекулярном уровне:

- ❖ Метилирование ДНК
- ❖ Модификации гистонов
- ❖ Варианты гистонов
- ❖ Некодирующие РНК

биоинформатика

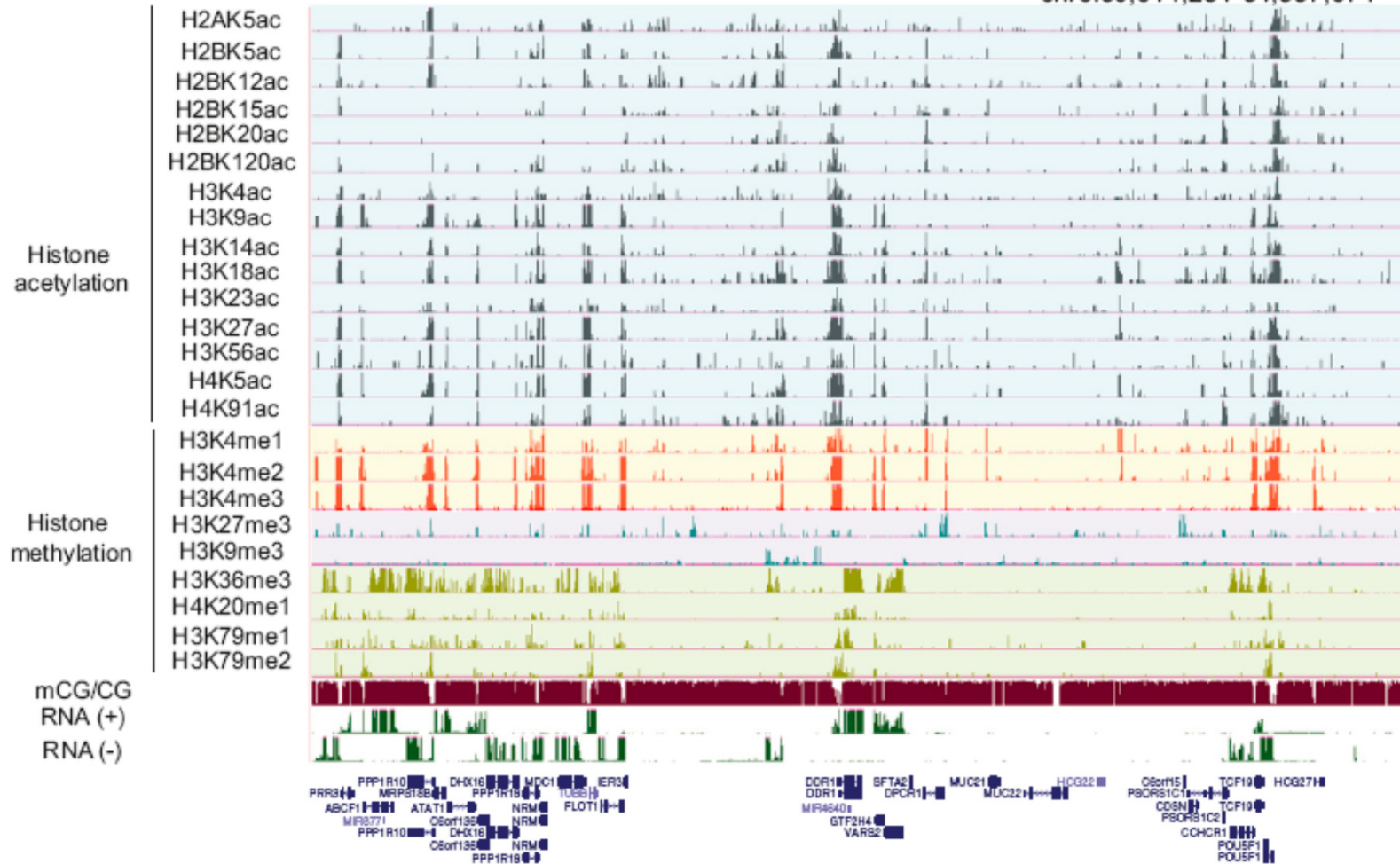
ЭПИГЕНОМ - это совокупность всех эпигенетических маркеров, обуславливающих экспрессию определенных генов в данной клетке.



Park P. J. ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology // *Nat. Rev. Genet.* 2009. Vol. 10, N 10. P. 669—680

B**Epigenomic landscape in human embryonic stem cells (H1)**

chr6:30,614,231-31,337,674



Начало 21 века

Прорыв, связанный с появлением НОВЫХ МЕТОДОВ исследования!

Секвенирование геномов

Микрочипы

Тотальное картирование экспрессии генов

Тотальное картирование белков

И др.

Наступила эпоха эпигеномики

Проект ENCODE: энциклопедия ДНК элементов (The ENCODE Project = ENCyclopedia Of DNA Elements)

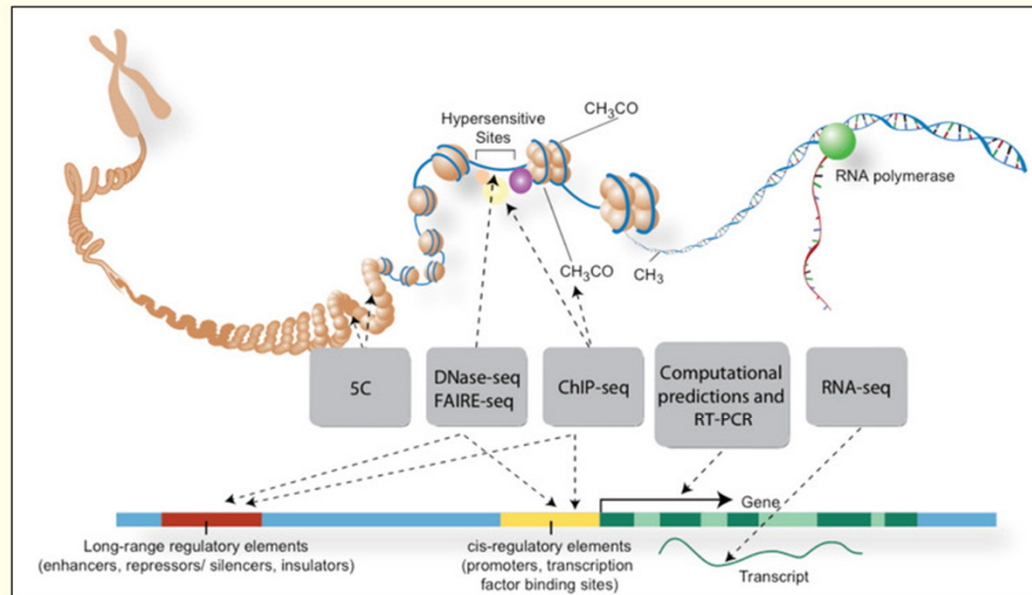


ENCODE Data Coordination Center at UCSC

[Home](#) - [Downloads](#) - [Data Policy](#) - [Help](#)

About ENCODE Data at UCSC

ENCODE investigators employ a variety of assays and methods to identify functional elements. The discovery and annotation of gene elements is accomplished primarily by sequencing RNA from genomics, integrative bioinformatic methods, and human curation. Regulatory elements are typically investigated through DNA hypersensitivity assays, assays of DNA methylation, and chromatin interactions that interact with DNA, including modified histones and transcription factors, followed by sequencing (ChIP-Seq).



Credits: Darryl Leja (NHGRI), Ian Dunham (EBI)

To access the human ENCODE data, open the [Genome Browser](#), select the February 2009 assembly (GRCh37/hg19) or the March 2006 assembly (NCBI36/hg18) of the human genome, and go to the ENCODE data can be found in the *Expression and Regulation* track groups, with a few in the *Mapping*, *Genes*, and *Variation* groups. Although most participating research groups have provided data from each research group are displayed by default. Click the hyperlinked name of a particular track to display a page containing configuration options and details about the methods used to generate the data. For more information, see the [User's Guide](#) for further information about displaying tracks and navigating in the Genome Browser.