

Слайд 2.

На прошлой лекции было дано краткое введение в биоинформатику ДНК-биочип-экспериментов. Теперь рассмотрим на конкретных примерах применение метода ДНК-биочипов в биологии.

Самые распространенные области их применения – это анализ полиморфизма, анализ экспрессии генов и сравнительный анализ геномов.

Слайд 3.

Методы анализа с помощью ДНК-биочипов полиморфизма в геномной ДНК генов, особенно их регуляторных областей, позволяют не напрямую, но опосредованно исследовать изменения в транскриптом, чему посвящена наша лекция, поэтому я вкратце опишу их.

Миллионы нуклеотидных позиций, варьируемых у разных особей (single nucleotide polymorphism – SNP), могут быть скринированы с помощью специально разработанных ДНК-биочипов. SNP-биочипы используются для исследования (1) сцепления между маркерами, (2) неравновесия по сцеплению (linkage disequilibria), (3) потери гетерозиготности (loss of heterozygosity).

На схеме представлены три экспериментальные стратегии для анализа последовательностей ДНК с помощью биочипов. Одноцветный анализ “gain-of-signal” позволяет после гибридизации с чипом, в котором для каждого SNP предусмотрены четыре различающихся по центральной варируемой позиции аллель-специфичных олигонуклеотидов, обнаруживать присутствие нового аллеля благодаря появлению нового сигнала. Двухцветный анализ “loss-of-signal” позволяет после конкурентной совместной гибридизации испытуемого и референсного образцов с SNP-биочипом с большей специфичностью обнаруживать присутствие нового аллеля. Наконец, метод минисеквенирования состоит в проведении реакции аллель-специфичного удлинения олигонуклеотида на один из четырех меченых дидезоксинуклеотидов прямо на чипе.

Слайд 4.

Рассмотрим теперь примеры анализа экспрессии генов с помощью ДНК-биочипов. Сформировалось целое направление – создание «молекулярных паспортов» каких-либо клеток или тканей, например, стволовых клеток. Пример взят из статьи: Tanaka T.S., *et al.*, 2002. Gene expression profiling of embryo-derived stem cells reveals candidate genes associated with pluripotency and lineage specificity. *Genome Res.* 12(12):1921-1928. Были взяты образцы четырех клеточных линий: ES (эмбрионально-стволовые), TS3.5 и TS6.5 (трофобласт-стволовые), MEF (мышинные эмбриональные фибробласты), и мышинный кДНК-биочип NIA 15K. На графике гены, экспрессия которых достоверно ($P < 0.05$) превышала фоновое значение, выделены цветом. Кластер-анализ методом «k-средних» дифференциально экспрессирующихся генов выявил 15 кластеров, объединяющих гены со сходным профилем экспрессии.

Слайд 5.

На этом слайде показаны результаты иерархической кластеризации 346 генов, специфично экспрессирующихся в исследованных образцах. Видно, что кластеры А и Е объединяют профили экспрессии генов, характерных для TS линии; кластер В – для MEF; кластер С – соответствует генам со слабой экспрессией; кластер D – для ES линии.

Каждому гену приписан номер принадлежности к какому-либо кластеру. Кластер 4 соответствует ES специфичным генам, 7 - TS специфичным, 14 - MEF- специфичным, 12 – общим для ES и TS клеток.

Слайд 6.

Кроме непосредственного измерения содержания транскриптов множества генов ДНК-биочип-технология позволяет исследовать зависимость транскрипции от таких фундаментальных процессов, как состояние хроматина множества генов, временем репликации этих генов, уровнем трансляции их транскриптов – и все это в масштабах всего генома.

Рассмотрим, как можно с помощью ДНК-биочипов исследовать связь между экспрессией генов и эпигенетическим состоянием геномных районов вокруг них, например, исследовать степень метилированности ДНК человека и млекопитающих.

Метилирование ДНК – один из эпигенетических механизмов. Основной мишенью для метилирования в геноме человека и млекопитающих является цитозин. Чаще всего метилирование происходит в контексте динуклеотидов CpG, хотя CpNG, CC(a/t)GG, CpA и CpT также могут быть метилированы. Так называемые «CpG-островки», как правило, охватывают промоторы и первые экзоны генов. Метилированное состояние «CpG-островков» часто ведет к подавлению экспрессии генов. Показано во многих работах, что распределение метилированных сайтов ДНК в нормальных и трансформированных клетках значительно различается – в опухолевых клетках наблюдается гипометилирование одних сайтов ДНК и гиперметилирование других.

Слайд 7.

На этом слайде показан принцип исследования связи между экспрессией генов и степенью метилированности их ДНК по материалам статьи Novik K.L., et al., 2002, Epigenomics: genome-wide study of methylation phenomena (Curr Issues Mol Biol. 4(4):111-128). Образцы из фрагментов геномной ДНК обрабатываются бисульфитом натрия, превращающего неметилированные цитозины в урацилы, затем эти образцы метятся в процессе амплификации и гибридизуются с олигонуклеотидными биочипами. Для каждого потенциального сайта метилирования разрабатывается пара олигонуклеотидов. В случае если сайт метилирован, то в анализируемой позиции образца останется цитозин, и сигнал после гибридизации будет от олигонуклеотида, содержащего в соответствующей позиции гуанозин (правая часть левого рисунка). А если сайт не метилирован, то сигнал будет от олигонуклеотида, содержащего в соответствующей позиции аденозин (левая часть левого рисунка). Если использовать двухцветную совместную гибридизацию испытываемого и референсного образцов, то анализ расположения зеленых, красных или желтых (т.е. образец представляет собой или гетерозиготу, или гетерогенную смесь клеток) сигналов на ДНК-биочипе позволит определить состояние метилированности каждого потенциального сайта метилирования ДНК каждого исследуемого гена. А сопоставление этих данных с результатами параллельного биочип-эксперимента по определению количества мРНК этих исследуемых генов в этих же образцах позволило выявить искомые корреляции между процессами метилирования ДНК генов и их уровнем транскрипции.

Слайд 8.

Рассмотрим, как можно исследовать связь между экспрессией генов и временем репликации соответствующих районов генома на примере статьи Schübeler D., et al., 2002, Genome-wide DNA replication profile for *Drosophila melanogaster*: a link between transcription and replication timing. Nature Genet. 32:438-442.

На рисунке показан профиль клеточного цикла, выявляемый после импульсного введения в клетки бром-дезокс-уридина (BrdU) и окрашивания клеток ДНК-специфическим красителем (пропидиум иодидом). Используя метод FACS (fluorescence-activated cell sorting), клетки затем сортируются по содержанию ДНК в зависимости от флуоресценции пропидиум иодида. Затем проводят иммунопреципитацию новосинтезированной ДНК антителами против BrdU, амплификацию осажденных фрагментов ДНК и введение в ампликоны флюорометки, в данном случае образцы из клеток, находящихся на стадии ранней репликации, помечены зеленым Cy3, а образцы из клеток, находящихся на стадии поздней репликации, помечены красным Cy5.

Совместная двухцветная гибридизация меченых образцов с кДНК-биочипом, содержащим 6500 генов дает возможность выявить момент репликации каждого конкретного гена. В этом эксперименте были использованы три биологические реплики, т.е. для приготовления образцов все процедуры и манипуляции с клетками и ДНК проводились независимо три раза.

Слайд 9.

После обработки данных гибридизации меченых образцов с кДНК-биочипом был получен репликационный профиль для 6500 генов из секвенированной части генома *D. melanogaster*. А сопоставление этих данных с результатами параллельного биочип-эксперимента по определению количества мРНК этих генов в этих же образцах позволило выявить корреляции между

транскрипционной активностью гена и временем его репликации: чем выше уровень транскрипции гена, тем раньше он реплицируется, и наоборот.

Слайд 10.

Рассмотрим, как можно исследовать связь между транскрипционной и трансляционной активностями генов на материале статьи Arava Y., et al., 2003, Genome-wide analysis of mRNA translation profiles in *Saccharomyces cerevisiae* (Proc Natl Acad Sc USA. 100(7):3898-3894).

Эксперимент базируется на предположении, что чем больше уровень трансляции мРНК, тем больше на ней полисом. Поэтому сначала были экспериментально получены полисомные профили с помощью седиментации мРНК в сахарозном градиенте, отбора образцов из разных фракций, экстракция и обратная транскрипция образцов мРНК, мечение образцов кДНК. Затем проводилась гибридизация образцов кДНК с ДНК-биочипами, содержащими все открытые рамки считывания *Saccharomyces cerevisiae*

Слайд 11.

Таким образом получались количественные данные о содержании отдельных разновидностей мРНК в полисомальных фракциях. Экспрессия некоторых генов была проверена на полуколичественном уровне методом нозерн-блот-гибридизации.

Слайд 12.

Следует учитывать при таком подходе, что количество рибосом на мРНК зависит от длины транскрипта, поэтому необходимо исследовать не только число, но и плотность рибосом. На рисунках показаны: гистограмма А., на которой гены сгруппированы соответственно длине их ОРС, гистограмма В. Число генов как функция плотности рибосом и график С. Плотность рибосом как функция от длины ОРС.

Слайд 13.

В последнее время к таким компонентам транскриптома как мРНК, рибосомальным, транспортным, малым ядерным и т.д. РНК, был добавлен еще один – малые интерферирующие РНК, способные подавлять экспрессии генов через взаимодействие с их мРНК по механизму или расщепления транскриптов или подавлению трансляции с них. Среди этих новых представителей транскриптома особенно интересны микроРНК (или сокращенно – миРНК), поскольку они являются эндогенными продуктами генома, т.е. генерируются посредством транскрипции, и в этом отношении миРНК-гены сходны с белок-кодирующими генами тем, что обладают дифференциальной экспрессией. Поэтому получение данных о содержании конкретных миРНК на определенной стадии или в определенной ткани необходимо для полноценного и точного знания о механизмах, определяющих количество того или иного транскрипта, являющегося мишенью для какой-либо миРНК.

С этой целью разработаны методы профилирования экспрессии миРНК-генов с помощью специализированных ДНК-биочипов. На слайде приведена в качестве примера работа Barad et al., MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: system establishment and expression profiling in human tissues. (Genome Res. 2004 Dec;14(12):2486-94), в которой описан профиль экспрессии 150 миРНК человека в пяти органах и клеточной культуре. (Шкала интенсивности представляет log2 значений интенсивности сигнала после вычитания фона и нормализации).

Слайд 14.

На следующем слайде показаны пример работы по экспериментальной аннотации человеческого генома (Shoemaker DD, et al., Experimental annotation of the human genome using microarray technology. Nature. 2001 409:922-927).

В этой работе была предпринята попытка оценки компьютерных предсказаний генов и определение полноразмерных транскриптов с помощью выявления одновременной экспрессии их экзонов. Таким способом были проанализирована экспрессия генов из 22 хромосомы (8,183 экзонов) в

69 парах экспериментальных условий. Было выявлено 572 группы корегулируемых экзонов или 572 проверенных по экспрессии гена (expression-verified genes - EVGs). Это составило 210 (85%) из 247 известных генов 22 хромосомы и 185 (57%) из 325 предсказанных генов.

Слайд 15.

На этом слайде показаны псевдоцветные изображения взвешенного по ошибкам $\log_{10}$ -отношения (красный/зеленый) экспрессии каждого из ~8000 экзонов. Можно видеть, как работает алгоритм выявления коэкспрессии экзонов и «сборка» их в ген.

Слайд 16.

Затем в этой же работе была проведена проверка полученных результатов с помощью ДНК-биочипов, содержащих 60-мерные фрагменты, перекрывающие геномные последовательности генов. С помощью этих перекрывающихся рядов проб, соответствующих обеим цепям отдельных геномных районов хромосомы 22, были уточнены границы экзонов и самих транскриптов.

Слайд 17.

В конце концов, в этой работе было проведено сканирование экзонов в масштабах всего генома: было взято 1 090 408 проб, 110 000 обратно-комплементарных проб, 50 биочипов, два экспериментальных условия (РНК из двух клеточных линий). На гистограммах показана в виде красных полос доля экспериментально (для этих условий) проверенных экзонов.

Слайд 18.

Теперь вкратце обрисуем круг области применения ДНК-биочиповых технологий исследования дифференциальной экспрессии генов в медицине.

При исследовании нормальных тканей можно составлять прогнозы, т.е. оценивать предрасположенности к тем или иным заболеваниям.

При исследовании пораженных болезнью тканей можно составлять/уточнять диагнозы, изучать течение и особенности патологии, выявлять мишени для лекарственных средств.

При исследовании тканей, подвергнутых воздействию химических соединений/лекарственных средств, получают информацию об эффективности лекарств, или о токсичности этих соединений.

Слайд 19.

Рассмотрим примеры работ по второму направлению, как наиболее представленному в литературе. Один из аспектов этого направления - молекулярная классификация злокачественных опухолей. Например, в статье Bittner M. et al., Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling (Nature. 2000, 406(6795):536-540) проведена селекция кластеров меланом с помощью двумерного кластерного анализа образцов опухолей и генов. В целях диагностики были выявлены четыре самых контрастных по экспрессии генов в кластерах и характеристические гены в них.

Слайд 20.

В приведенной работе проведена таксономия меланом на основе данных профилирования экспрессии генов с помощью кДНК-биочипа (6,971 генов). Показаны: а. Дендрограмма иерархической кластеризации 19 меланом по данным экспрессии генов; б. Трехмерный график значений MDS для 31 меланомы. Показан кластер из 19 образцов.

Слайд 21.

На этом слайде показано выявление генов, экспрессия которых позволяет различать кластеры меланом. Видны результаты MDS-анализа распределения генов по их вкладу в минимизацию объема

кластера и максимизацию межкластерной дистанции; а также выделена экспрессия 22 самых заметных генов в кластерах.

Слайд 22.

В следующей статье, посвященной молекулярной классификации злокачественных опухолей, Khan J. et al., Classification and diagnostic prediction of cancers using gene expression profiling and artificial neural networks (Nat Med. 2001 7(6):673-679), описана таксономия нейробластом (NB), рабдомиосарком (RMS), лимфом Ходжкина (NHL) и опухолей семейства Эуинга (EWS) на основе данных профилирования экспрессии генов с помощью кДНК-биочипа, включающего последовательности 3789 кДНК и 2778 EST.

Слайд 23.

Недавно появился еще один метод массового исследования соотношения транскриптов в масштабах генома. Это метод «Массовое одновременное секвенирование характерных фрагментов» Massively Parallel Signature Sequencing (MPSS).

Этот метод позволяет идентифицировать почти все ДНК-фрагменты в образце. Он продуцирует количественный профиль экспрессии генов на основе подсчета всех мРНК в образце, и эти цифровые данные удобны для создания реляционных баз данных. Он обладает высокой чувствительностью, способностью детектировать редкие транскрипты. В каждый MPSS-анализ вовлечены более миллиона транскриптов, что обеспечивает исключительный динамический диапазон: от менее чем 10 транскриптов на миллион до 50,000 транскриптов на миллион.

Еще одно важное качество этого метода – для него не нужны предварительные молекулярно-генетические знания об организме.

Слайд 24.

Рассмотрим схему выполнения этой технологии по материалам статьи: Brenner S, Johnson M, Bridgham J, et al., Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. Nat Biotechnol. 2000; 18(6):630-634..

Сначала готовят кДНК из мРНК и клонируют их в вектор, содержащий набор из 1.67×10^7 разных 32-мерных олигонуклеотидных меток. Пул кДНК матриц, представляющих $3-4 \times 10^4$ разных транскриптов, после клонирования формирует пул $5-7 \times 10^{11}$ конъюгатов.

Далее берется образец, включающий только 1% ($\sim 1.6 \times 10^5$) от общего числа меток. Каждый транскрипт, таким образом, конъюгирован с уникальной меткой. Даже единичный транскрипт представлен с вероятностью более 99%.

Образец из конъюгатов амплифицируется в ПЦР, метки делают одноцепочечными. Конъюгаты гибридизуются с популяцией микрошариков, к которым присоединены все комплименты меток. 1% микрошариков будет связан с конъюгатами. Только эти будут отсортированы с помощью FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorter).

Слайд 25.

Определение последовательности на основе лигирования с помощью тип эндонуклеазы рестрикции второго типа BbvI. Смесь адаптеров, включающих все возможные четырехбуквенные выступы, отжигается к целевой последовательности так, чтобы лигировался только тот, который имеет совершенный комплементарный выступ. Каждый из этих 256 адаптеров имеет уникальный мотив, F_n , который может быть обнаружен после лигирования.

Например, на рисунке изображена последовательность выступа матрицы, взаимодействующая с адаптером, маркированным F_{126} , что означает, что последовательность выступа матрицы "TTAC".

Следующий цикл начинается с расщепления BbvI, чтобы высвободить следующие четыре основания матрицы.

В составе кодирующих адаптеров предусмотрены декодирующие мотивы.

Слайд 26.

Использование кодирующих адаптеров, чтобы идентифицировать четыре основания в каждом цикле рестрикции-лигирования. После того как микрошарики, загруженные флуоресцентно помеченными (F) кДНК, изолированы с помощью FACS, кДНК разрезаются рестриктазой *DpnII*, чтобы высвободить четыре основания в виде выступа. Этот выступ достраивается до выступа с тремя основаниями.

Флуоресцентно помеченный (F) иницирующие адаптеры, содержащие *BbvI*-сайты, лигируются к кДНК в отдельной реакции, после чего микрошарики загружаются в специальные ячейки.

Затем кДНК разрезаются *BbvI*, кодирующие адаптеры, прогибридизовавшиеся с ними, лигируются. Шестнадцать помеченных фикоэритрином (PE) зонда по отдельности гибридизуются с декодирующими мотивами кодирующих адаптеров. После каждой гибридизации ячейка сканируется, изображение рядов микрошариков анализируется для идентификации оснований выступов.

Кодирующие адаптеры снова обрабатываются *BbvI*, который расщепляет кДНК и высвобождает четыре новых основания для следующего цикла лигирования и расщепления.

Слайд 27.

На этом слайде показано, как выглядит проточная ячейка с микрошариками и как она используется.

Слева сверху – продольный разрез ячейки. Она сделана так, чтобы удерживать плоские ряды из микрошариков. Загрузка шариков и реагентов идет через входное отверстие. Шарiki задерживаются специальным барьером, а растворы проходят насквозь. Небольшие перемещения шариков, зафиксированные сканером, учитываются при анализе изображений.

Слайд 28.

Здесь представлена общая схема устройства для проведения MPSS.

Проточная ячейка монтируется на терморегулируемом блоке Пельтье в конфокальном микроскопе, снабженном ксеноновой лампой, фильтрами и CCD-камерой.

Для сканирования изображения ряды микрошариков разделены на 18 секций с 62,000 шариков в каждой. Специальное программное обеспечение обрабатывает изображения, выделяя центр каждого микрошарика и суммируя флуоресцентный сигнал с определенных пикселей изображения.

Как правило, удается получить надежные данные о последовательности 16-20 нуклеотидов кДНК-матрицы. Далее начинается сказываться «шум» из-за ошибок рестрикции и лигирования.

Полученные 16-20-нуклеотидные мотивы потом преобразуются в сигнатуры с помощью специальных программ.

Слайд 29.

Так выглядит псевдоцветное компьютерное изображение некоторого количества микрошариков и изображения гистограмм значений флуоресцентного сигнала и расшифрованной последовательности некоего микрошарика.

Слайд 30.

В статье, впервые описывающей применение метода MPSS, приводятся также результаты сравнения данных о содержании транскриптов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, полученные этим методом и методом подсчета EST. Было просеквенировано 1,839 случайно выбранных кДНК-клона из библиотеки клеток ТНР-1.

MPSS-сигнатуры были соотнесены с EST-кластерами. На гистограмме приведены результаты обоих экспериментов: черные прямоугольники - MPSS-сигнатуры, а белые - EST-кластеры. Показаны проценты встречаемости сигнатур и кластеров от общего числа. 1% относительного содержания соответствует 2,500 сигнатурам и около 18 EST-последовательностям.

Слайд 31.

Теперь рассмотрим еще один очень важный и широко применяемый для измерения содержания транскриптов метод - ОТ-ПЦР с детекцией в реальном времени (real-time PCR).

Этот метод не относится к высокопродуктивным методам, однако его настоятельно рекомендуют использовать для подтверждения результатов вышеописанных масштабных и высокопродуктивных, но в сущности, скрининговых методов выявления кандидатов на дифференциально экспрессирующиеся гены.

Метод ОТ-ПЦР с детекцией в реальном времени обладает следующими чертами:

- Позволяет следить за приращением количества специфического продукта в каждом цикле реакции;
- Не требует выделения амплифицированных фрагментов кДНК;
- Позволяет определять относительное и абсолютное количество последовательности-мишени;
- Обладает высокой чувствительностью и расширенным динамическим диапазоном.

Слайд 32.

На этом слайде показаны некоторые наиболее часто упоминаемые приборы для проведения ОТ-ПЦР с детекцией в реальном времени:

- iCycler фирмы BioRad;
- LightCycler фирмы Roche;
- FluorTracker фирмы Stratagene;
- Семейство приборов фирмы Applied Biosystems/

Слайд 33.

Различают несколько типов ОТ-ПЦР с детекцией в реальном времени в зависимости от того, какие молекулы используются как источники флуоресценции. Ими могут быть:

- интеркалирующие флуоресцентные красители – чаще всего SYBR Green 1;
- флуоресцентные пробы/зонды – TaqMan, Molecular Beacons, LightCycler;
- флуоресцентные затравки (primers) с элементом зонда – Scorpions.

Слайд 34.

Наиболее часто встречается ОТ-ПЦР с детекцией в реальном времени с применением TaqMan-проб. Рассмотрим эту методику.

TaqMan-проба представляет собой 25-30-мерный олигонуклеотид, соответствующий какому-либо участку кДНК-мишени. На 5'-конце его расположен нуклеотид, ковалентно связанный с репортерным флуорохромом, а на 3'-конце - нуклеотид, ковалентно связанный с молекулой, способной поглощать энергию возбуждения соседнего флуорохрома, иными словами – с гасителем. Пока оба флуорохрома связаны с олигонуклеотидом, сигнал от репортерного не детектируется. Этот эффект называется флуоресцентный резонансный перенос энергии (FRET - fluorescence resonance energy transfer).

В ПЦР участвуют еще два специфически связывающихся с кДНК-мишенью олигонуклеотида в качестве праймеров для реакции полимеризации. На стадии полимеризации после отжига всех трех олигонуклеотидов фермент Taq-полимераза, обладающий 5'-экзонуклеазной активностью, «натыкается» на TaqMan-пробу и начинает отщеплять ее нуклеотиды, начиная с первого, связанного с репортерным флуорохромом. Высвободившийся из физической близости с гасителем репортерный флуорохром тут же становится способным испускать сигнал. Поскольку в процессе реакции луч лазера периодически сканирует пробирку или лунку с реакцией, появление и приращение сигнала детектируется, и эта информация обрабатывается специальным программным обеспечением.

В результате работы последнего на экран выдается график величины сигнала репортерного флуорохрома как функция от номера цикла реакции. Мы видим типичную кинетическую кривую, отражающую процесс синтеза копий кДНК-мишени. Поскольку расщепление TaqMan-пробы происходит при синтезе только в одном направлении, то кинетика отражает арифметическую прогрессию, т.е. двукратное наращивание матрицы в каждом цикле. Через какое-время реакция выходит на плато, что означает истощение какого-либо компонента реакции.

Слайд 35.

При анализе данных ОТ-ПЦР с детекцией в реальном времени с применением TaqMan-проб используют следующие понятия:

- базовая линия (baseline), линия на уровне средней величины фонового сигнала, детектируемого в течение первых 4-10 циклов;
- пороговая линия (threshold), линия на уровне точки перехода кинетической кривой в рост от базовой линии или любая произвольная линия несколько выше базовой;
- пороговый цикл (C_t), цикл при котором произошел этот переход;
- нормализованное значение сигнала (ΔR_n), значение сигнала с вычтенным значением фона.

Слайд 36.

На этом слайде показан принцип определения исходного количества кДНК-матрицы. Видно, что в реакцию добавляли десятикратные разбавления одной и той же матрицы, т.е. получали калибровочные кривые. Чем больше исходно было матрицы, тем на более раннем цикле наблюдали пороговый цикл (C_t).

Слайд 37.

Рассмотрим следующий тип проб для ОТ-ПЦР с детекцией в реальном времени – так называемые, «молекулярные маяки». Эти олигонуклеотиды организованы так, что область, комплементарная матрице-мишени, расположена в середине и окаймлена короткими инвертированными повторами, способными образовывать двухцепочечную стеблевую структуру. На 5'-конце этой конструкции так же, как и в TaqMan-пробе, расположен нуклеотид, ковалентно связанный с репортерным флуорохромом, а на 3'-конце – нуклеотид, ковалентно связанный с гасителем, т.е. используется явление FRET. Для реакции также необходимы еще два последовательность-специфических праймера.

В процессе отжига праймеров олигонуклеотид-проба расправляется, и сигнал от репортерного детектируется на этой стадии. С каждым циклом количество матрицы-мишени удваивается, соответственно удваивается и сигнал репортерного флуорохрома.

Слайд 38.

Похоже действует проба LightCycler, состоящая из двух олигонуклеотидов, отжигающихся на матрице один рядом с другим с зазором не более 5-ти нуклеотидов. Также используются два флуорохрома и явление FRET. Однако в этом случае используется не флуорохром-гаситель, а флуорохром, преобразующий энергию, получаемую от флуорохрома-донора возбуждения. А флуорохром-реципиент становится репортером. Удвоение количества матрицы-мишени также детектируется на стадии отжига олигонуклеотидов и пробы.

Слайд 39.

Еще один тип проб для ОТ-ПЦР с детекцией в реальном времени – Scorpions – также основан на явлении FRET, в чем-то похож на молекулярный маяк. Однако имеется важное отличие от предыдущих типов проб—«скорпионы» объединяют в себе и пробу с флуорохромами, и праймеры для реакции синтеза копий матрицы—мишени.

Слайд 40.

На этом слайде показан принцип действия проб—«скорпионов».

Слайд 41.

Снова возвращаемся к нашей таблице, позволяющей наглядно сравнить характеристики методов детекции и оценки количества транскриптов по четырем основным параметрам.

По каждому из требований методу поставлена условная оценка близости к идеалу. Чем больше плюсов, тем метод лучше с точки зрения возможности производить цифровую информацию, пригодную для обработки методами биоинформатики.

Восклицательные знаки в строках для количественной ОТ-ПЦР и дифференциального дисплея означает предостережение по поводу нелинейных искажений, которые ПЦР-основанные методы могут вносить в исчисление соотношений между транскриптами.

Восклицательный знак в строке для EST-метода означает предостережение по поводу искажений в исчислении соотношений между транскриптами, вносимых модификациями приготовления библиотеки клонов кДНК.

Восклицательный знак в строке для олиго/кДНК-биочипов означает, что не всегда можно извлечь данные об абсолютном содержании транскриптов, что для это необходимы особые алгоритмические приемы при анализе данных.