

**ДНК және РНК
тізбектерін талдау:
теория және әдістер**

3-Дәріс

Кіріспе:

ДНҚ және РНҚ молекулалары генетикалық ақпаратты тасымалдайды және жасушаларда әртүрлі биологиялық процестерді реттейді. ДНҚ мен РНҚ тізбектерін талдау молекулалық биология мен биоинформатиканың негізін құрайды және геномдық зерттеулерден ауруларды диагностикалауға дейін көптеген ғылыми және медициналық бағыттарда қолданылады.

1. ДНҚ және РНҚ тізбектері: негізгі түсініктер

- **ДНҚ (Дезоксирибонуклеин қышқылы):** Жасуша ядросында орналасқан, қос тізбек құрылымына ие, ұзақ мерзімді ақпарат сақтаушысы.
- **РНҚ (Рибонуклеин қышқылы):** Ақпаратты ДНҚ-дан ақуыз синтезіне тасымалдаушы және бір тізбекті құрылымы бар.
- **Нуклеотидтер:** ДНҚ мен РНҚ-ның негізгі бірліктері. Олар азотты негіздерден (А, Т, G, С — ДНҚ үшін, А, U, G, С — РНҚ үшін), қант (дезоксирибоза немесе рибоза) және фосфат тобынан тұрады.

ДНҚ және РНҚ тізбектері – бұл нуклеотидтердің ұзын реттілігі.

ДНҚ тізбегі төрт нуклеотидтен тұрады: аденин (А), тимин (Т), гуанин (G) және цитозин (С). РНҚ тізбегінде тиминнің орнына урацил (U) болады.

Мысалы:

ДНҚ тізбегі: АТСГГСТА

РНҚ тізбегі: АУСГГСУА

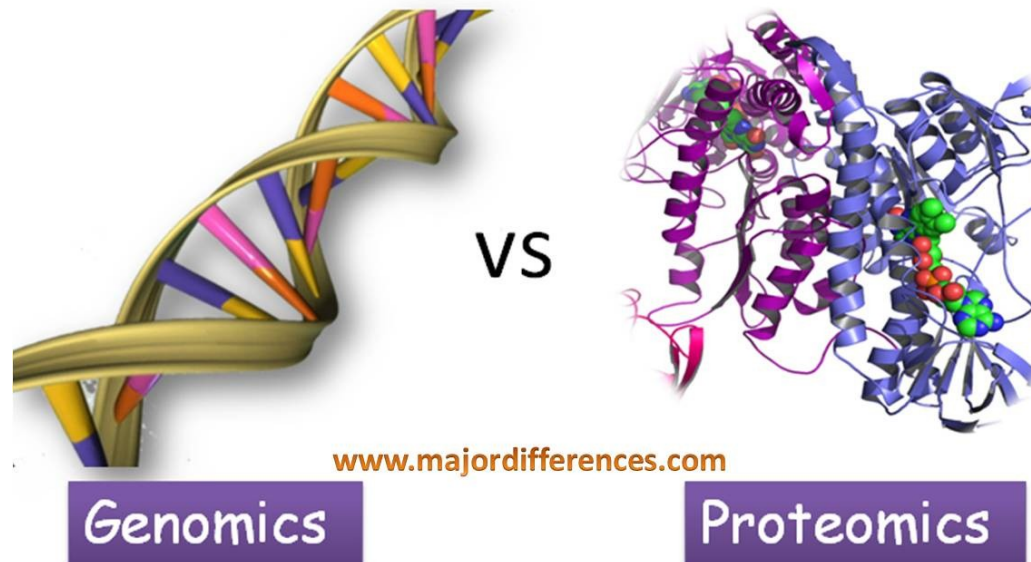
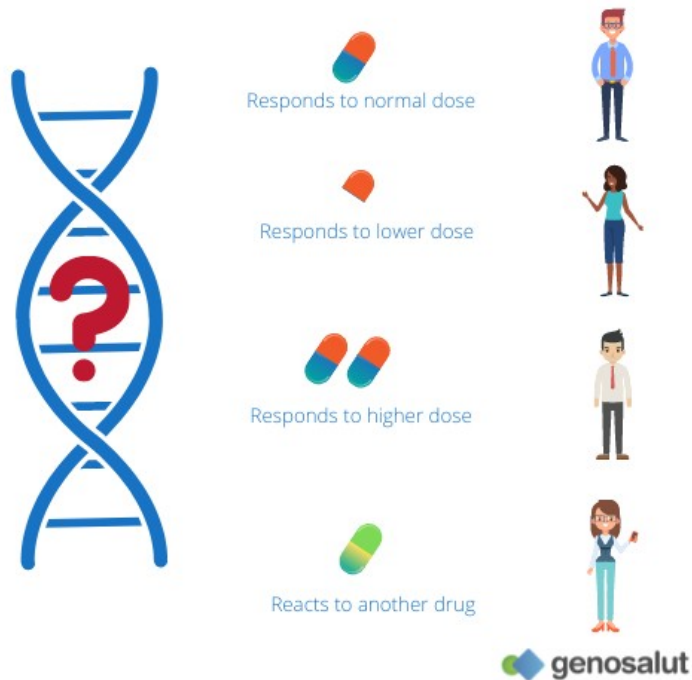
ДНҚ тізбектері генетикалық ақпаратты сақтайды, ал РНҚ бұл ақпаратты ақуыздар синтезіне жеткізеді.

РНҚ бір тізбекті, ал ДНҚ екі тізбекті спираль түрінде болады.

Тізбектерді талдаудың мақсаты мен маңыздылығы

- **Геномдық зерттеулер:** ДНҚ тізбегін талдау арқылы геномның құрылымын және функциясын зерттеу.
- **Аурулардың диагностикасы:** Мутациялар мен полиморфизмдерді анықтау.
- **Фармакогенетика:** Жеке адамға бейімделген емдеу әдістерін дамыту.

What is pharmacogenetics for?



ДНҚ мен РНҚ тізбектерін талдау әдістері

Sanger тізбектеу әдісі (Сэнгер әдісі): Алғашқы тізбектеу әдістерінің бірі. Тізбектеудің "алтын стандарты" деп саналады.

Сэнгер әдісі ДНҚ секвенирлеу әдісі болып табылады, сонымен қатар тізбекті тоқтату әдісі ретінде белгілі. Бұл реттілік әдісін алғаш рет 1977 жылы Фредерик Сэнгер ұсынды, ол үшін 1980 жылы химия бойынша Нобель сыйлығының лауреаты атанды. Бұл әдіс 40 жыл бойы ең кең таралған.

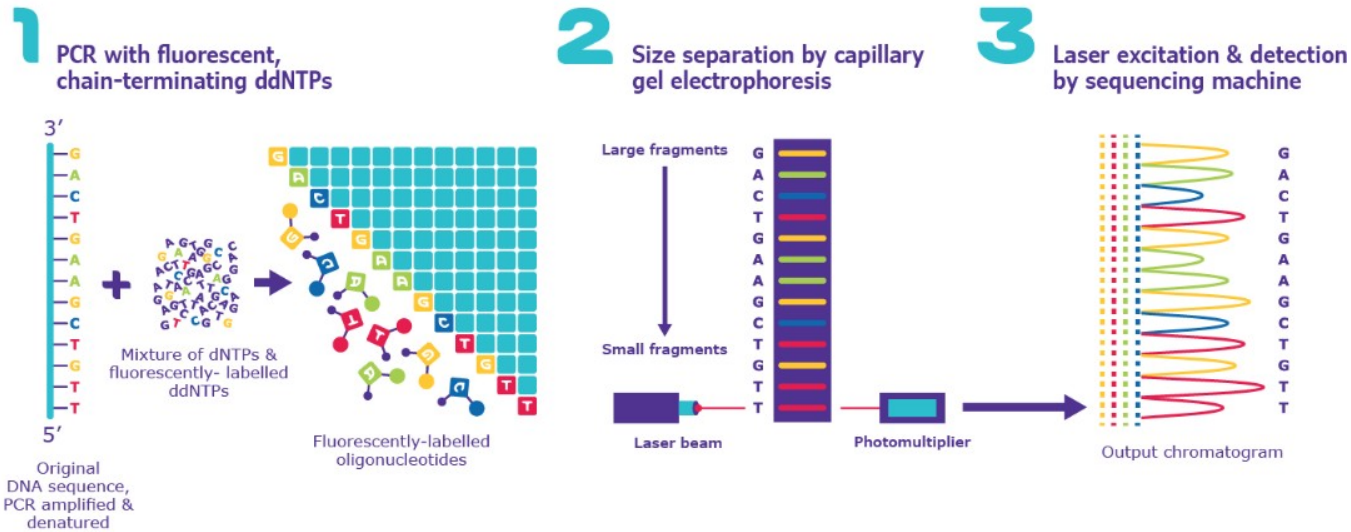
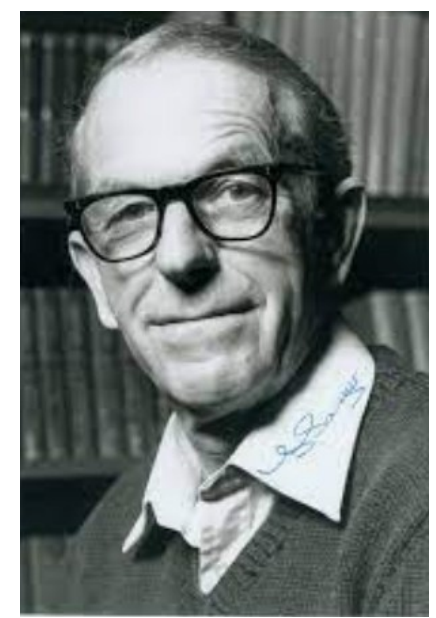


Figure 1. Three Basic Steps of Automated Sanger Sequencing.

PCR флуоресцентті таңбаланған ddNTP-лермен: ДНҚ тізбегі PCR арқылы амплификацияланып, денатурациядан кейін флуоресцентті түрде таңбаланған ddNTP-лер мен dNTP-лер қосылады. Осы арқылы әр түрлі ұзындықтағы тізбектер пайда болады.

Капиллярлы гель электрофорезі арқылы өлшеміне қарай бөлу: Тізбектердің ұзындығы бойынша үлкен фрагменттерден кіші фрагменттерге дейін бөліну процесі капиллярлы геледе жүзеге асады.

Лазерлік сәуле және детекция: Секвенирлеу құрылғысы лазер сәулесімен флуоресцентті таңбаларды қоздырады, содан кейін олар фотомультипликатор арқылы анықталады. Осы деректерді хроматограмма ретінде көрсетеді, онда әрбір негіз әртүрлі түспен бейнеленген.

Next-Generation Sequencing (NGS): Жоғары өнімділікпен үлкен көлемдегі геномдық ақпаратты жылдам талдауға мүмкіндік береді. Келесі ұрпақ секвенциясы – оның бастапқы құрылымының ресми сипаттамасын алу үшін ДНҚ мен РНҚ-ның нуклеотидтер тізбегін анықтауға арналған әдістер тобы.

Бұл суретте келесі ұрпақ секвенциясы (Next Generation Sequencing - NGS)

процесінің жұмыс ағыны көрсетілген. Ол төрт негізгі қадамнан тұрады:

1. DNA extraction (ДНҚ-ны экстракциялау):

Бұл кезеңде биологиялық үлгіден ДНҚ бөлініп алынады. ДНҚ тізбегі таза түрде ерітіндіде сақталады.

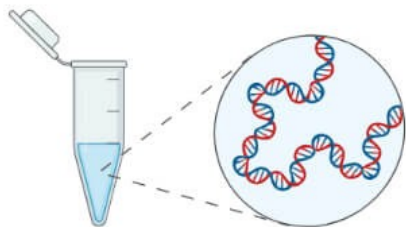
2. Library preparation (Кітапхана дайындау):

ДНҚ тізбектері фрагменттерге бөлінеді. Арнайы адаптерлер қосылып, фрагменттер кітапханаға айналдырылады, бұл секвенциялауға дайындық кезеңі.

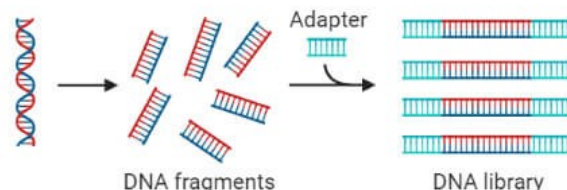
3. Sequencing (Секвенциялау):

ДНҚ фрагменттері секвенциялау құрылғысы арқылы оқылады. Әрбір нуклеотидтің реттілігі хроматограмма

Step 1:
DNA extraction

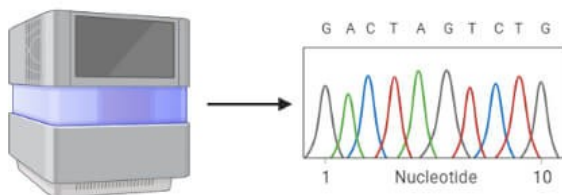


Step 2:
Library preparation

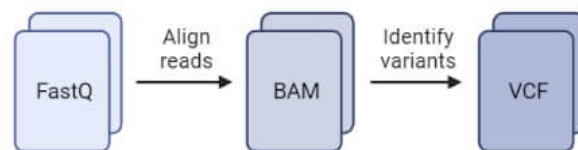


Next Generation Sequencing Workflow

Step 3:
Sequencing

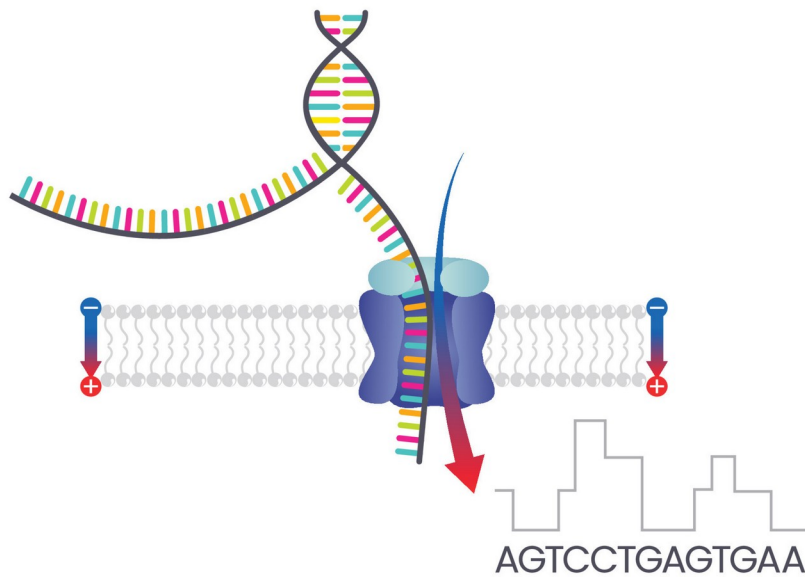


Step 4:
Analysis



Third-Generation Sequencing: Жалғыз молекулалық тізбектеуді қолдану арқылы талдау жүргізу. Бұл әдіс арқылы тізбектердің ұзындығы мен күрделілігі көбірек анықталады. Үшінші буын секвенциясы 2008 жылдан бері белсенді түрде дамып келе жатқан ұзағырақ реттілік көрсеткіштерін беретін ДНҚ секвенциясы әдістерінің класы болып табылады.

Third Generation Sequencing:
Nanopore Sequencing



Бұл суретте **Үшінші буын секвенциясы (Third Generation Sequencing)** әдісінің бір түрі, **нанопоралық секвенция (Nanopore Sequencing)** бейнеленген.

• **Нанопора арқылы ДНҚ молекуласының өтетін процесі** көрсетілген. ДНҚ молекуласы мембрана арқылы өткізілетін арнайы нанопоралық құрылғыдан өтеді.

• Әрбір нуклеотид нанопорадан өткен кезде электр өткізгіштікте өзгеріс тудырады, бұл өзгеріс сигнал ретінде тіркеледі.

• Сигналдар компьютер арқылы өңделіп, сәйкес нуклеотид реттілігі анықталады (мысалы, AGTCCTGAGTGAA).

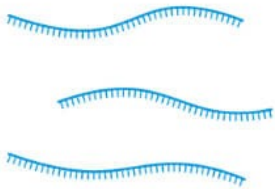
Бұл технологияның артықшылығы – ұзын ДНҚ тізбектерін тікелей, үздіксіз секвенциялауға

мүмкіндік береді және процесс жылдам, сондықтан

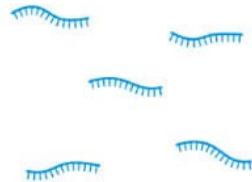
РНҚ-seq: РНҚ тізбегін талдау арқылы жасушадағы ген экспрессиясын зерттеу. РНҚ секвенциясы РНҚ молекулаларының бастапқы құрылымын анықтау әдісі болып табылады, ол транскриптомды зерттеуге арналған жоғары сезімтал және дәл құрал болып табылады. Бұл мРНҚ реттілігін де, кодталмаған РНҚ тізбегін анықтауды да қамтуы мүмкін.

RNA Sequencing

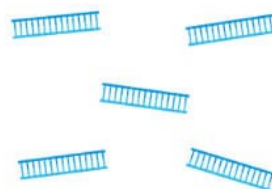
1 Isolate RNA from samples



2 Fragment RNA into short segments



3 Convert RNA fragments into cDNA



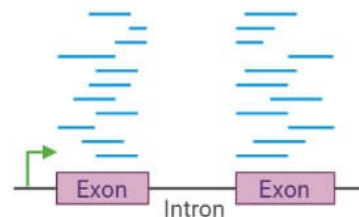
4 Ligate sequencing adapters and amplify



5 Perform NGS sequencing



6 Map sequencing reads to the transcriptome/genome



Бұл суретте **РНҚ секвенциясының (RNA-seq) негізгі қадамдары** көрсетілген:

1.РНҚ-ны үлгілерден бөліп алу: Алдымен биологиялық үлгілерден РНҚ оқшауланады. Бұл РНҚ молекуласының экспрессия деңгейін талдау үшін маңызды.

2.РНҚ-ны қысқа сегменттерге бөлу: РНҚ молекулалары қысқа фрагменттерге бөлінеді, бұл секвенциялау процессін жеңілдетеді.

3.РНҚ фрагменттерін кДНК-ға айналдыру: РНҚ фрагменттері кері транскрипция арқылы комплементарлы ДНК-ға (кДНК) айналады.

4.Секвенциялау адаптерлерін жалғап, амплификациялау: Адаптерлер жалғанып, кітапхана құрылады, содан кейін ПТР арқылы көбейтіледі.

5.NGS секвенциялау: КДНК фрагменттері жоғары өнімді келесі ұрпақ секвенциясы (NGS) технологиясы арқылы оқылады.

6.Тізбектерді транскриптом/геномға сәйкестендіру: Алынған тізбектер транскриптом немесе геномға тураланып, интрондар мен экзондардың арақатынасы анықталады.



Clustal Omega: Көп ретті тізбектерді туралауға арналған құрал. Clustal - нуклеотидтер мен аминқышқылдарының тізбегін бірнеше рет теңестіруге арналған ең көп қолданылатын компьютерлік бағдарламалардың бірі. Clustal жұптық прогрессивті туралау әдісін пайдаланады.

```
CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

AAH87634.1      HTILFLTHVISYFGCHAAAPH:EAANNVGGQLAYPQVIRTHGTL:ESVNGPKAGSGLTTTS      60
sp |P21237.1|BDNF_MOUSE      HTILFLTHVISYFGCHAAAPH:EAANNVGGQLAYPQVIRTHGTL:ESVNGPKAGSGLTTTS      60
sp |Q51578.1|BDNF_PANTR      HTILFLTHVISYFGCHAAAPH:EAANNVGGQLAYPQVIRTHGTL:ESVNGPKAGSGLT--S      58
XP_018892897.1      HTILFLTHVISYFGCHAAAPH:EAANNVGGQLAYPQVIRTHGTL:ESVNGPKAGSGLT--S      58
CAA62632.1      .....,.....,.....

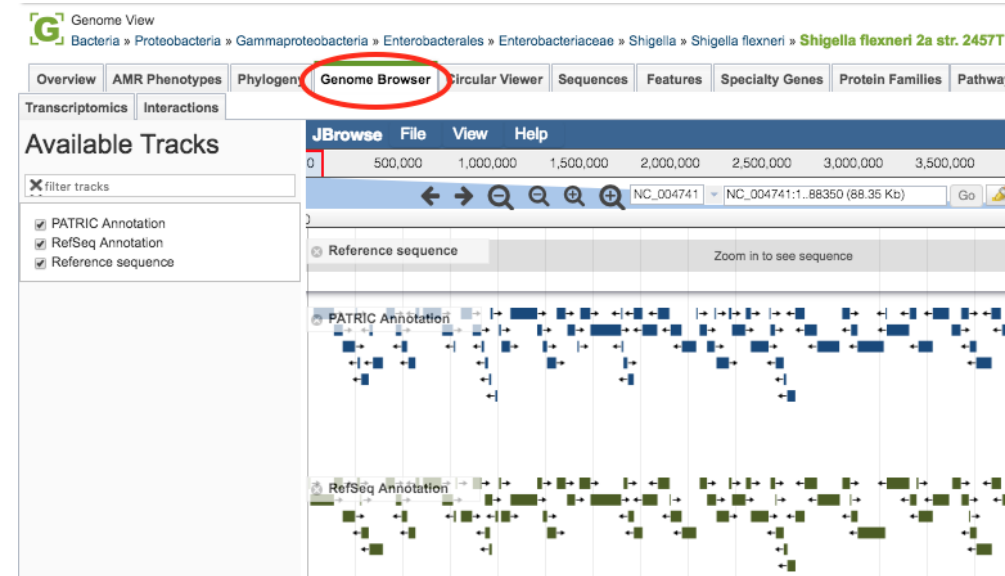
AAH87634.1      LADTFEHWIEELLEDQVVRPNEENH:DADL:YTSRVPMLSSQVPLEPPLFLLEEYNYLD      120
sp |P21237.1|BDNF_MOUSE      LADTFEHWIEELLEDQVVRPNEENH:DADL:YTSRVPMLSSQVPLEPPLFLLEEYNYLD      120
sp |Q51578.1|BDNF_PANTR      LADTFEHWIEELLEDQVVRPNEENH:DADL:YTSRVPMLSSQVPLEPPLFLLEEYNYLD      118
XP_018892897.1      LADTFEHWIEELLEDQVVRPNEENH:DADL:YTSRVPMLSSQVPLEPPLFLLEEYNYLD      118
CAA62632.1      .....

AAH87634.1      AANISMRVRRHSDPARRGEL:SVCDISI:SEHVTAADKKT:AVDFHSGGTVTVL:EKVPVSK:GQLK      180
sp |P21237.1|BDNF_MOUSE      AANISMRVRRHSDPARRGEL:SVCDISI:SEHVTAADKKT:AVDFHSGGTVTVL:EKVPVSK:GQLK      180
sp |Q51578.1|BDNF_PANTR      AANISMRVRRHSDPARRGEL:SVCDISI:SEHVTAADKKT:AVDFHSGGTVTVL:EKVPVSK:GQLK      178
XP_018892897.1      AANISMRVRRHSDPARRGEL:SVCDISI:SEHVTAADKKT:AVDFHSGGTVTVL:EKVPVSK:GQLK      178
CAA62632.1      AANISMRVRRHSDPARRGEL:SVCDISI:SEHVTAADKKT:AVDFHSGGTVTVL:EKVPVSK:GQLK      178

AAH87634.1      QYFYET:CNPHGYT:K:EGCRGIDK:RHNSQCRIT:QSVVRL:THDSK:RI:GHR:FR:IDT:SCV      240
sp |P21237.1|BDNF_MOUSE      QYFYET:CNPHGYT:K:EGCRGIDK:RHNSQCRIT:QSVVRL:THDSK:RI:GHR:FR:IDT:SCV      240
sp |Q51578.1|BDNF_PANTR      QYFYET:CNPHGYT:K:EGCRGIDK:RHNSQCRIT:QSVVRL:THDSK:RI:GHR:FR:IDT:SCV      238
XP_018892897.1      QYFYET:CNPHGYT:K:EGCRGIDK:RHNSQCRIT:QSVVRL:THDSK:RI:GHR:FR:IDT:SCV      238
CAA62632.1      .....

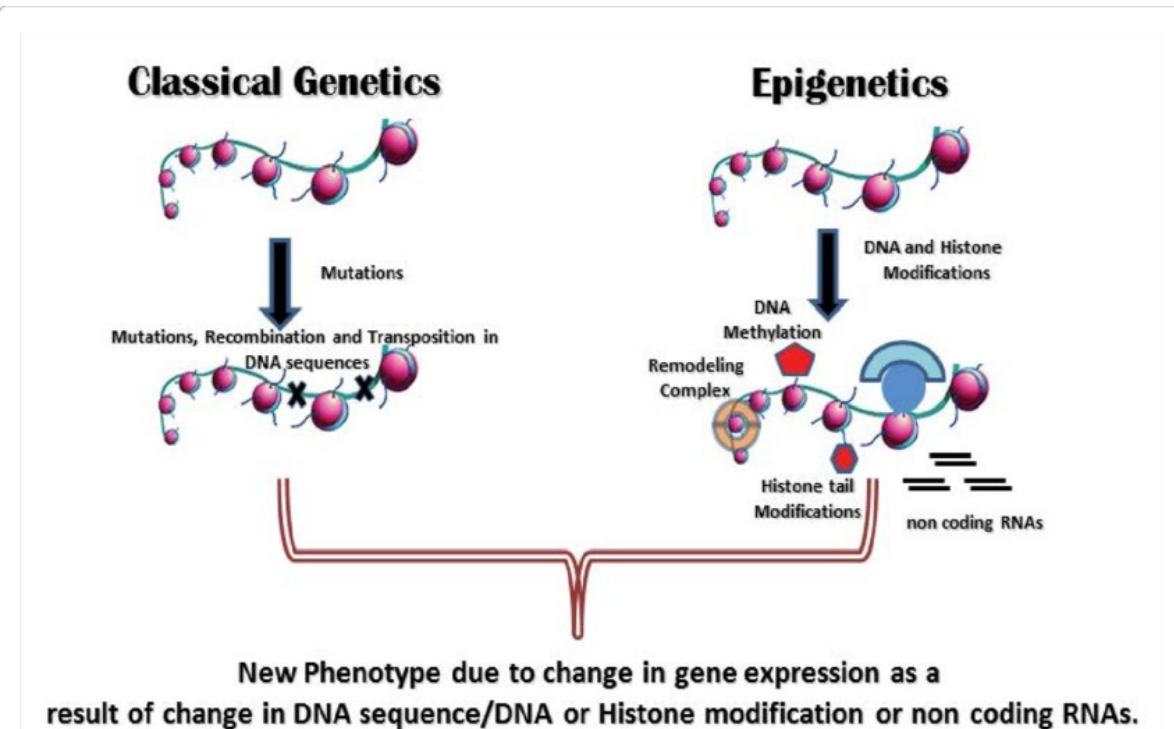
AAH87634.1      CTLT:EKGR      249
sp |P21237.1|BDNF_MOUSE      CTLT:EKGR      249
sp |Q51578.1|BDNF_PANTR      CTLT:EKGR      247
XP_018892897.1      CTLT:EKGR      247
CAA62632.1      CTLT:EKGR      247
.....
```

Genome Browser: Геномдық мәліметтерді визуализациялауға арналған интернеттегі қосымша. Геном браузері геномды зерттеудің маңызды құралы болып табылады. Биоинформатикада геномдық браузер геномдық деректерге арналған биологиялық деректер базасынан ақпаратты көрсетуге арналған графикалық интерфейс болып табылады. Бұл генетикалық деректерді графикалық түрде көрсететін бағдарламалық құрал.



Мәліметтерді талдау және интерпретация

Мутациялар: Нуклеотидтік тізбектердегі өзгерістерді табу және олардың фенотипке әсерін зерттеу. **Мутациялар** — нуклеотидтік тізбектердегі өзгерістер, яғни ДНҚ немесе РНҚ құрылымындағы кез келген ауытқу немесе өзгеріс. Мутациялар бірнеше түрге бөлінеді: **нүктелік мутациялар, делеция** (бір немесе бірнеше нуклеотидтің жоғалуы), **инсерция** (қосымша нуклеотидтердің енгізілуі) және **хромосомалық қайта құрулар**. Бұл өзгерістер ақуыздар мен гендердің қызметін өзгертуі немесе бұзуы мүмкін, бұл өз кезегінде **фенотипке** әсер етіп, аурулар мен биологиялық өзгерістерді тудыруы мүмкін. Мутацияларды зерттеу арқылы генетикалық аурулардың механизмдерін түсіну мүмкін.



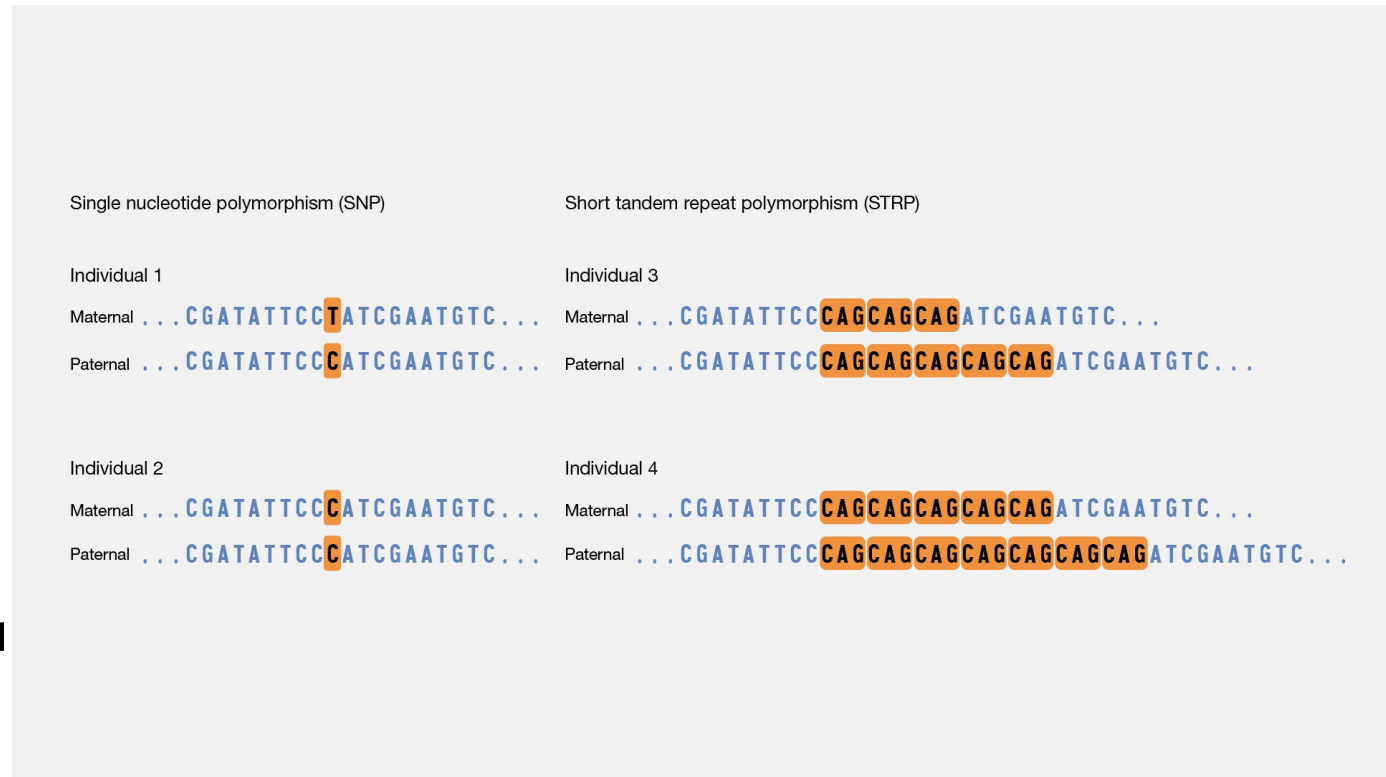
Бұл суретте **классикалық генетика** мен **эпигенетика** арасындағы айырмашылық көрсетілген:

Классикалық генетика: ДНҚ тізбегіндегі мутациялар, рекомбинация және транспозициялар жаңа фенотиптердің пайда болуына алып келеді.

Эпигенетика: Ген экспрессиясын ДНҚ метиляциясы, гистон модификациясы және кодталмайтын РНҚ реттейді. Бұл өзгерістер ДНҚ тізбегіне әсер етпейді, бірақ гендердің белсенділігін реттей отырып, жаңа фенотиптерге ықпал етеді.

Полиморфизмдер: Жеке тұлғалардың арасында кездесетін ДНҚ тізбегіндегі табиғи өзгерістер.

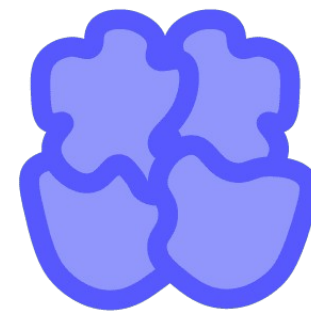
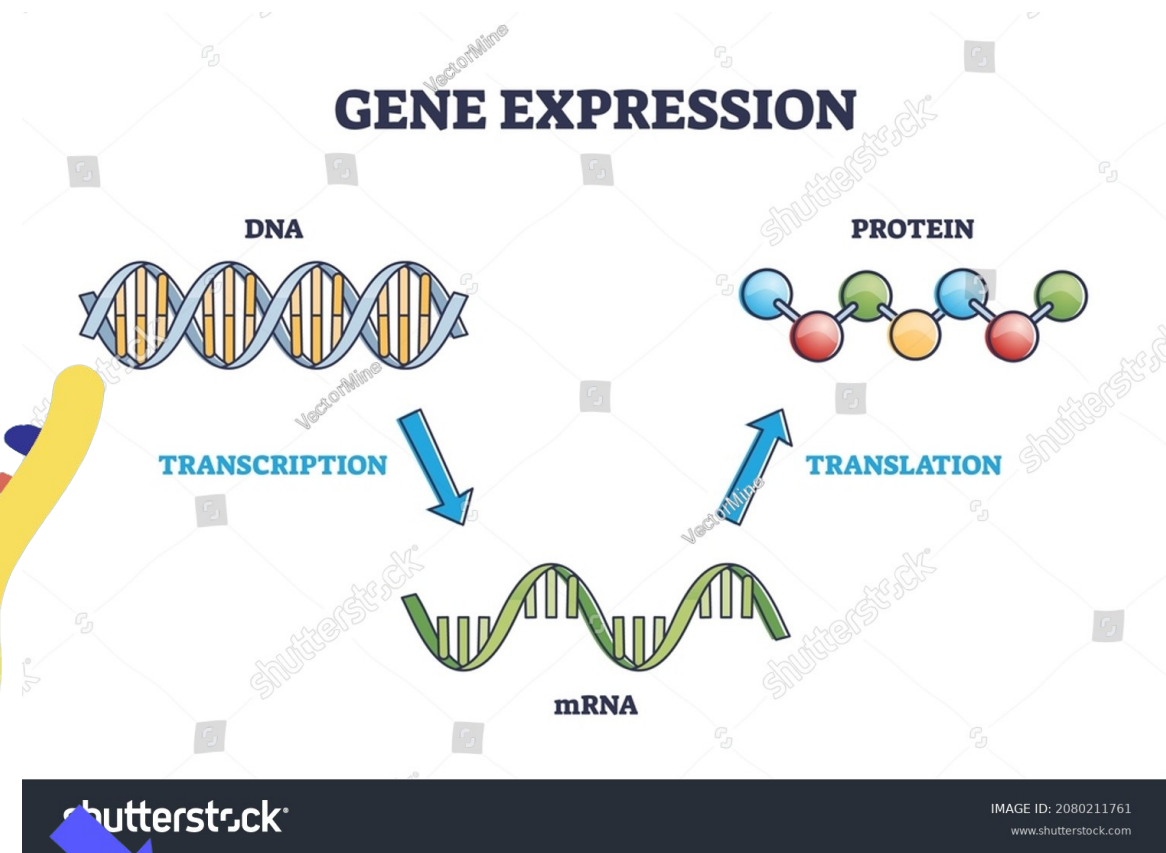
Полиморфизмдер — бұл ДНҚ тізбегіндегі табиғи өзгерістер, олар жеке тұлғалардың арасында кездеседі. Полиморфизмдер генетикалық өзгергіштіктің негізгі көзі болып табылады және көбінесе бір нуклеотидтің өзгеруі (бір нуклеотидтік полиморфизм, SNP) ретінде көрінеді. Бұл өзгерістер фенотиптік айырмашылықтарға, мысалы, сыртқы белгілерге, ауруларға немесе дәрілік заттарға реакцияларға әсер етуі мүмкін. Полиморфизмдер эволюция мен популяциялық генетикада маңызды рөл атқарады, өйткені олар түрлердің бейімделуіне ықпал етеді.



Бұл суретте екі негізгі полиморфизм түрі бейнеленген:

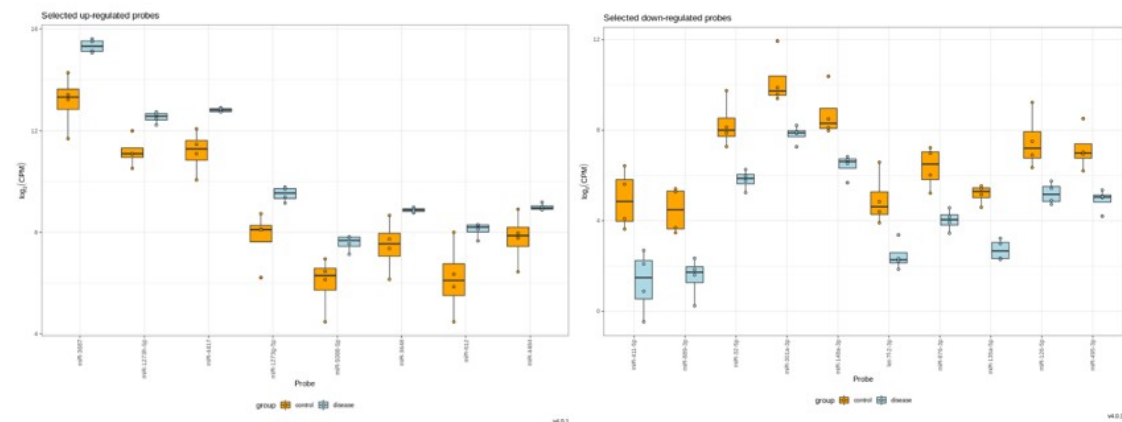
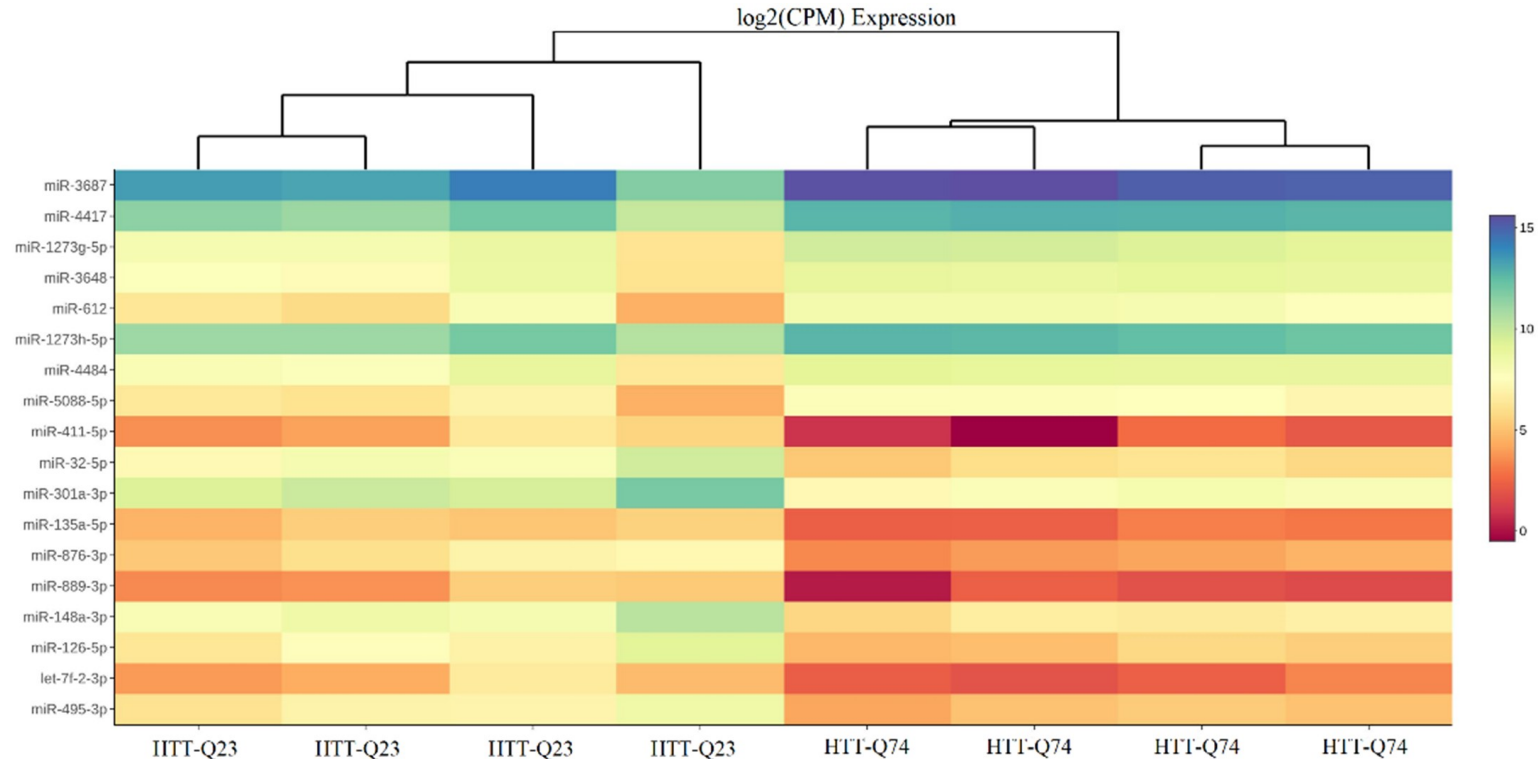
- 1. Нүктелік полиморфизм (SNP):** Бір нуклеотидтегі өзгерістер жеке тұлғалар арасында кездеседі. Мысалы, бір адамда «Т» болса, екінші адамда «С» болуы мүмкін.
- 2. Қысқа тандемді қайталану полиморфизмі (STRP):** Бұл жерде белгілі бір нуклеотидтік реттілік бірнеше рет қайталанса, басқасында бұл қайталану саны өзгеруі мүмкін.

Экспрессияның өзгерістері: РНҚ тізбегін талдау арқылы гендердің қаншалықты белсенді екенін анықтау. Ген экспрессиясының өзгерістері – бұл гендердің белсенділік деңгейінің өзгеруі. Ген экспрессиясын РНҚ секвенциясы арқылы талдау (RNA-seq) арқылы гендердің қаншалықты транскрипцияланатынын және олардың мРНҚ молекулаларына айналу жылдамдығын анықтауға болады. Ген экспрессиясының өзгерістері әртүрлі жағдайларға байланысты болуы мүмкін, мысалы, қоршаған орта факторлары, аурулар немесе жасушалық стресс. Бұл әдіс жасушалардағы генетикалық ақпараттың қалай жүзеге асырылатынын зерттеу үшін маңызды.



микроРНК молекулаларының экспрессиялары

Бұл суретте **жылу картасы** (heatmap) арқылы әртүрлі микроРНК (miRNA) экспрессия деңгейлері көрсетілген. Экспрессия мәндері **log₂(CPM)** (Counts Per Million) шкаласы бойынша нормаланған. Түстер шкаласы микроРНК-ның экспрессия деңгейлерін көрсетеді: қызыл түстер жоғары экспрессияны, ал көк-жасыл түстер төмен экспрессияны білдіреді. Әр түрлі үлгілерде (мысалы, IIT-Q23 және HTT-Q74) экспрессия деңгейлері салыстырылып, микроРНК экспрессиясының фенотиптік немесе аурулық жағдайлармен қалай байланысты екенін талдау үшін пайдаланылуы мүмкін.



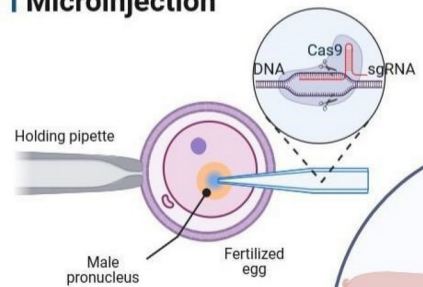
Differential Expression Results of miRNAs. (A) Heat map of the top 18 miRNAs that were differentially expressed in HTT-Q74 and IIT-Q23 cell lines. (B) Up- and down regulation of miRNAs expression in disease (HTT-Q74) compared with the control (IIT-Q23).



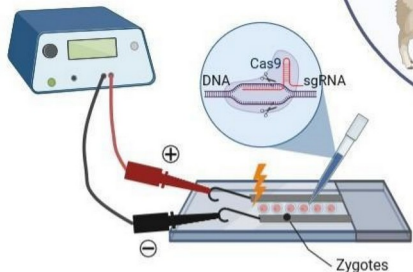
ДНҚ және РНҚ тізбектерін талдау қолдану салалары

- **Медициналық генетика:** Тұқым қуалайтын ауруларды диагностикалау. **Медициналық генетика** — бұл генетикалық ақпарат негізінде тұқым қуалайтын ауруларды диагностикалау және зерттеу саласы. Генетикалық аурулар мутациялардан немесе ДНҚ тізбегіндегі өзгерістерден туындауы мүмкін, ал оларды анықтау арқылы аурудың даму қаупін бағалауға және ерте диагностика жүргізуге болады. Мысалы, **ДНҚ талдау** арқылы муковисцидоз, Даун синдромы, туа біткен жүрек аурулары сияқты тұқым қуалайтын ауруларды анықтау мүмкін. Бұл сала болашақта генетикалық терапияны дамытуға ықпал етеді.

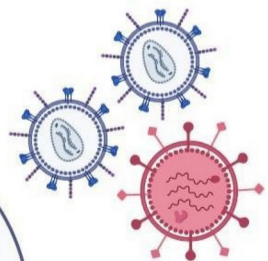
Microinjection



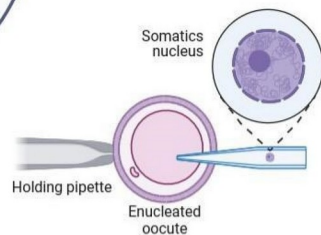
Electroporation



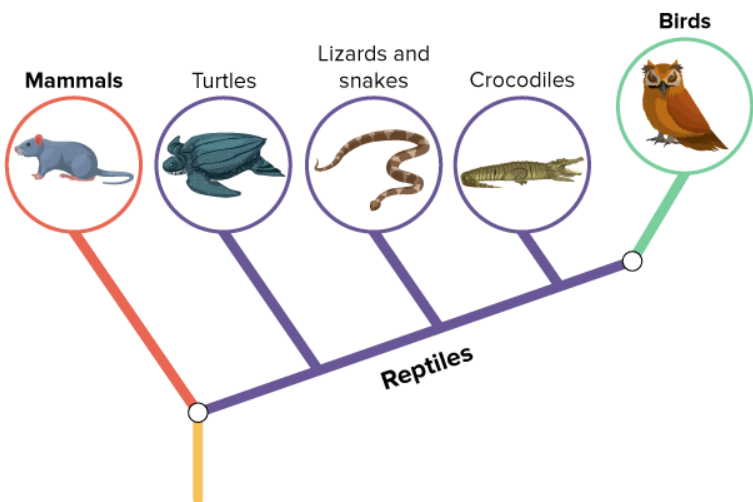
Lenti- and retroviruses



Nuclear transfer



Created in BioRender.com bio



- **Ауыл шаруашылығы:** Өсімдіктер мен жануарлардың геномдарын жақсарту. Генетикалық талдау және генетикалық модификация арқылы өсімдіктер мен жануарлардың геномдарын жақсарту өнімділікті арттыруға, ауруларға төзімділікті күшейтуге және қоршаған орта жағдайларына бейімделуге мүмкіндік береді. Бұл әдістер ауыл шаруашылығында өнімділікті арттыру мен сапаны жақсартуға бағытталған.

- **Эволюциялық биология:** Түрлердің эволюциялық байланыстарын зерттеу. Түрлердің генетикалық байланыстарын зерттеу эволюцияның қалай дамығанын түсінуге көмектеседі. ДНҚ тізбектерін салыстыру арқылы түрлердің ортақ ата-тегін, бейімделуін және эволюциялық тарихын зерттеуге болады.

0.2 0.15 0.1 0.05 0 x100 Mya

0 10000 20000

number of orthogroups

b species specific in all species other

Қорытынды

ДНК және РНК тізбектерін талдау — заманауи биологиядағы ең маңызды зерттеу әдістерінің бірі. Бұл талдау геномдық құрылымдарды, генетикалық өзгерістерді анықтауға және ауруларды диагностикалауға мүмкіндік береді. Әдістерге Sanger секвенциясы, NGS және нанопоралық секвенция жатады. Сонымен қатар, биоинформатикалық құралдар (BLAST, RNA-seq) ген экспрессиясын, мутацияларды және полиморфизмдерді зерттеуге мүмкіндік береді. ДНК мен РНК-ның талдауы арқылы биологиялық процестер мен аурулардың молекулалық механизмдерін түсіну жақсарады.