

Genomika

(A genom, génállomány vizsgálata)

- Mutációk (SNP-k) és vizsgálatuk egyszerű módszerekkel
- DNS szekvenálási eljárások
- DNS ujjlenyomat (VNTR)
- DNS chipek statikus és dinamikus információk vizsgálata

I. Mutációk

Mutáció típusai:

(okok: mutagén kémiai anyagok, nagy energiájú sugárzás)

- Inzerció
- Deléció
- Szubsztitúció: pontmutációk (Single Nucleotid Polymorphism, SNP)

➤ Spontán mutációk:

-Replikációs hiba

-Tautoméria pl. A

-Depurináció A vagy G bázis vesztés

-Deamináció C → U, C^m → T

-Pyr → Pyr, Pur → Pur, Pyr → Pur, Pur → Pyr

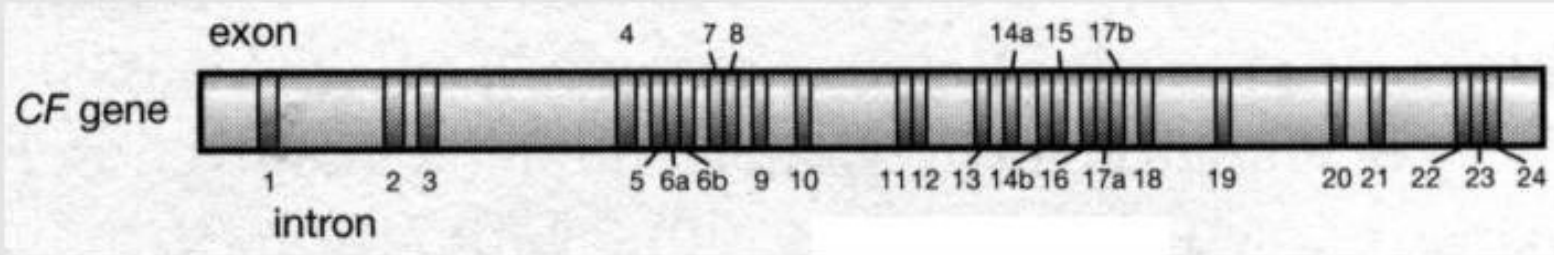
➤ Indukált mutációk

- kémiai anyagok, vagy biológiai körülmények (stressz)

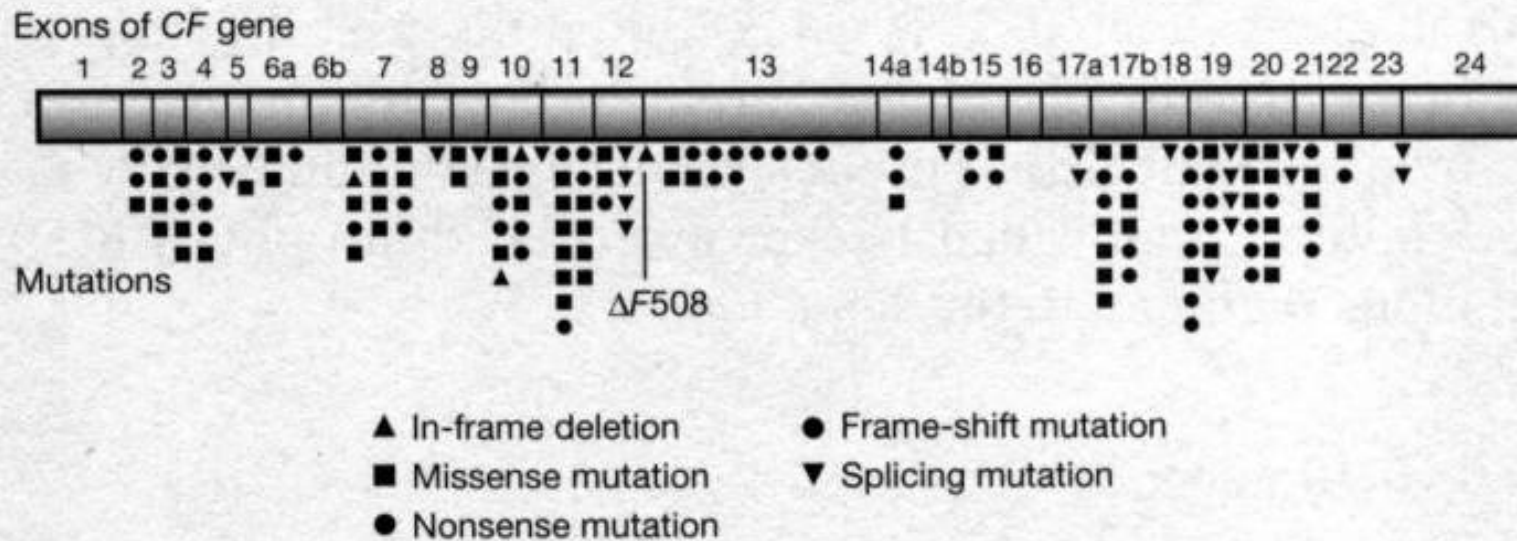
- mutagenézis (mutánsok előállítása a cél, pl. polimeráz enzim hibarátájának emelése mondjuk Mg-ion szint változtatással)

I. Mutációk

CFTR gene

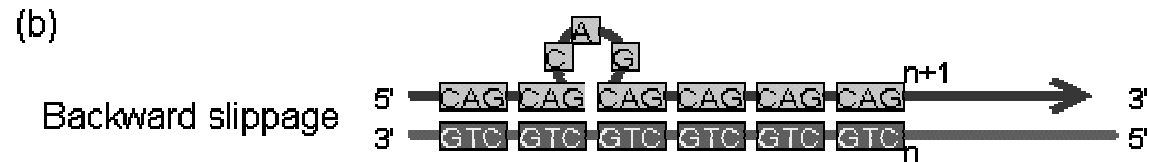


Spectrum of mutations that affect its function



I. Mutációk

Replikációs hiba



Second replication



Inzerció mutáns



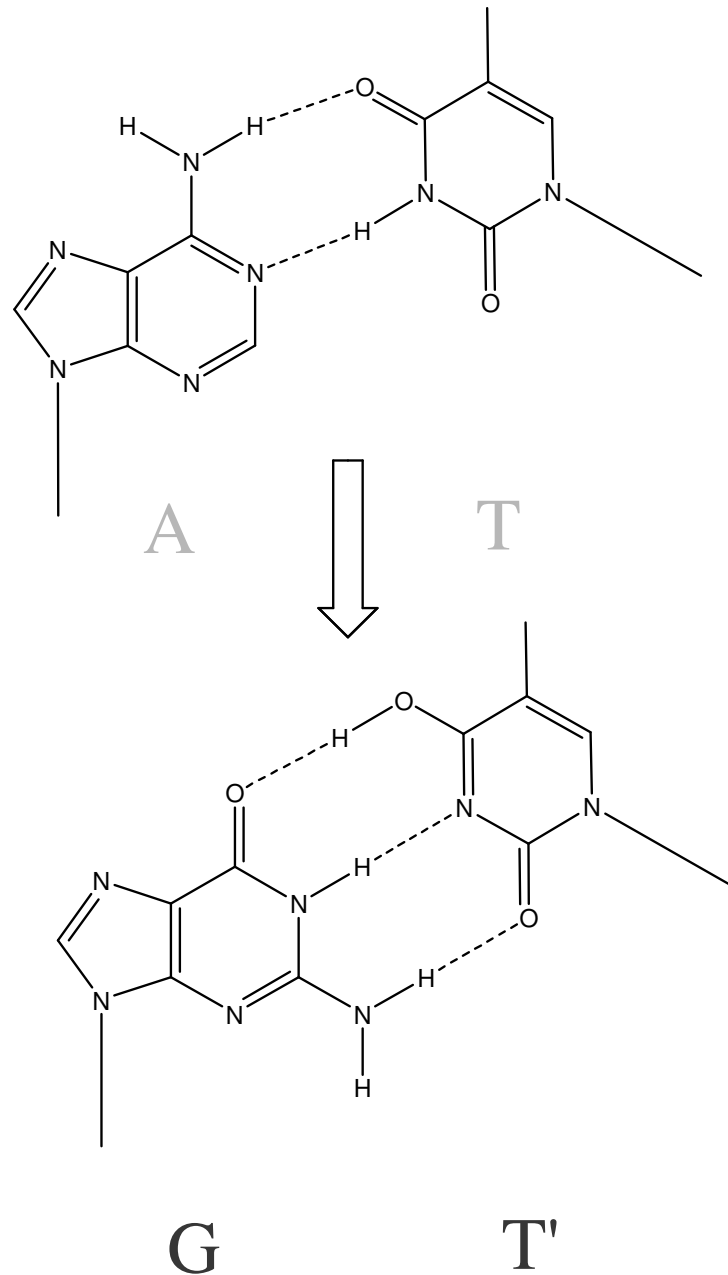
Second replication



Deléció mutáns

I. Mutációk

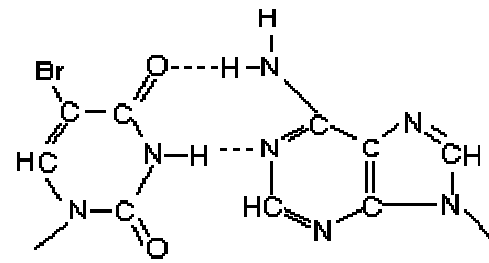
Tautoméria



A → G csere

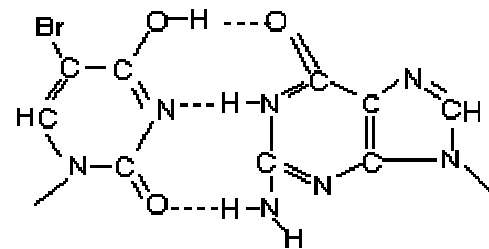
I. Mutációk

Kémiai anyagok



5-Bromouracil
keto form (BU_k)

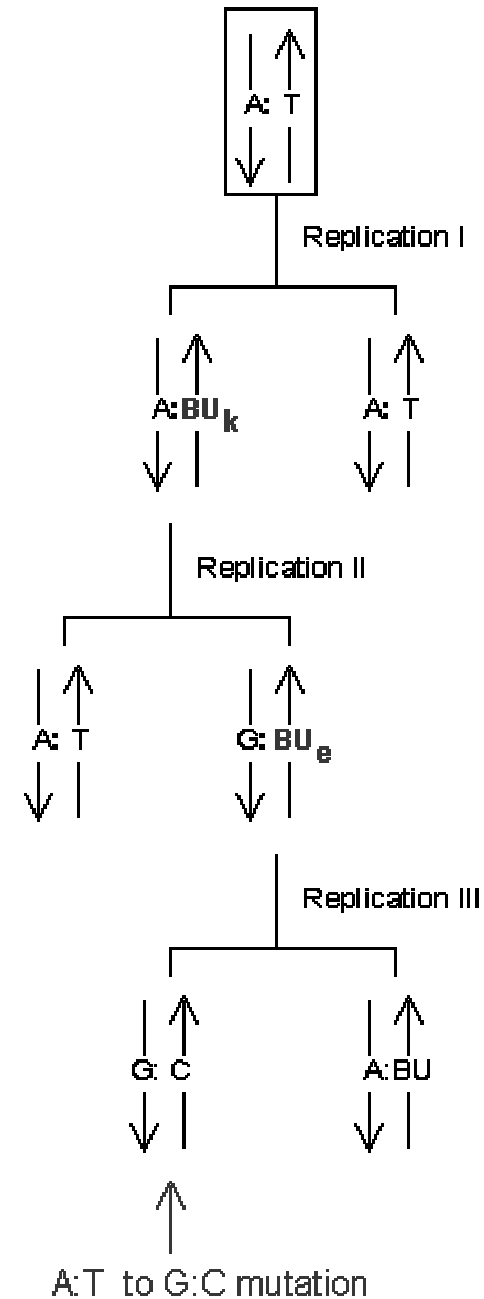
Adenine



5-Bromouracil
enol form (BU_e)

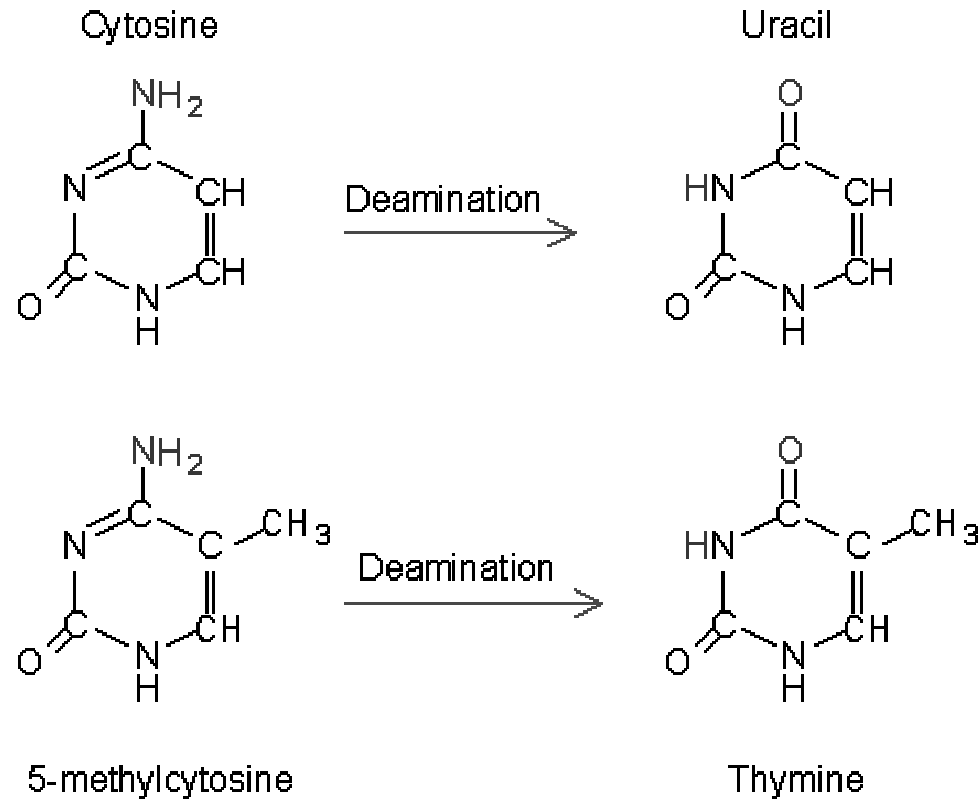
Guanine

A → G cseré



I. Mutációk

Dezaminálás



C → U csere

C → T csere

I. Mutációk

Mutáció típusai funkció szerint:

Csendes mutáció (silent mutation): ha a triplet változik, de a kódolt AS nem

Valódi mutáció (missense mutation): ha megváltozik a kódolt AS

Értelmetlen mutáció (nonsense mutation): stop jelet kapunk, azaz rövidül a fehérje

SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

(kb. Minden 1000. bázisnál 1 mutáció)

		2nd base in codon				
		U	C	A	G	
1st base in codon	U	Phe Phe Leu Leu	Ser Ser Ser Ser	Tyr Tyr STOP STOP	Cys Cys STOP Trp	3rd base in codon
	C	Leu Leu Leu Leu	Pro Pro Pro Pro	His His Gln Gln	Arg Arg Arg Arg	U C A G
	A	Ile Ile Ile Met	Thr Thr Thr Thr	Asn Asn Lys Lys	Ser Ser Arg Arg	U C A G
	G	Val Val Val Val	Ala Ala Ala Ala	Asp Asp Glu Glu	Gly Gly Gly Gly	U C A G

Mutációk hatása, szerepe:

- + / -
- adaptív/direkt mutáció stressz hatására igen nagy arányú mutáns (esély a túlélésre)

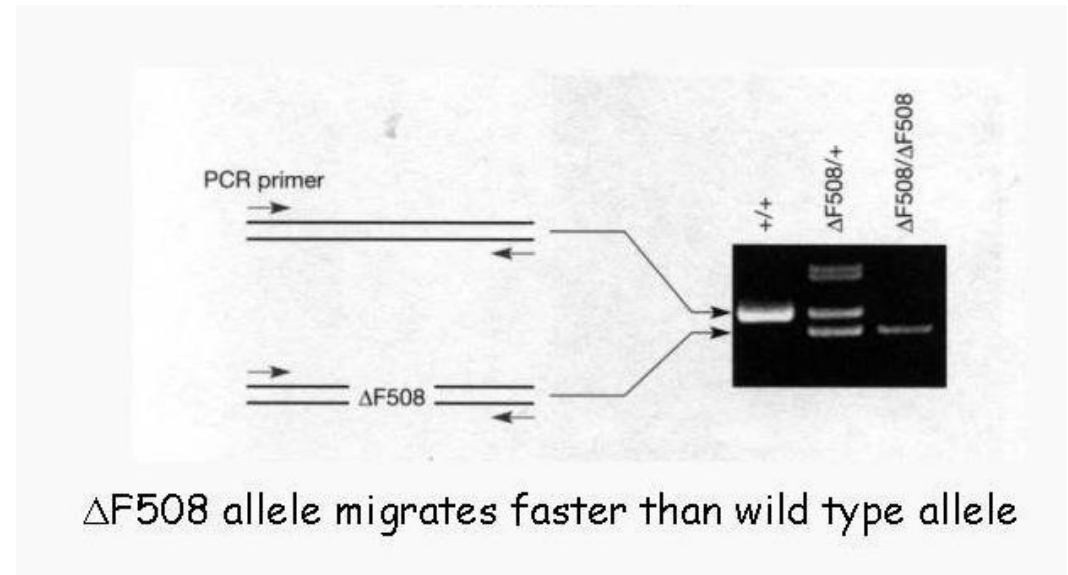
Mutációk vizsgálata

(Az adott mutáció típusától függ a vizsgálat eszköze.)

1. Gélelektroforézis (DNS)

Ha nagy a különbség az oligonukleotid méretében.

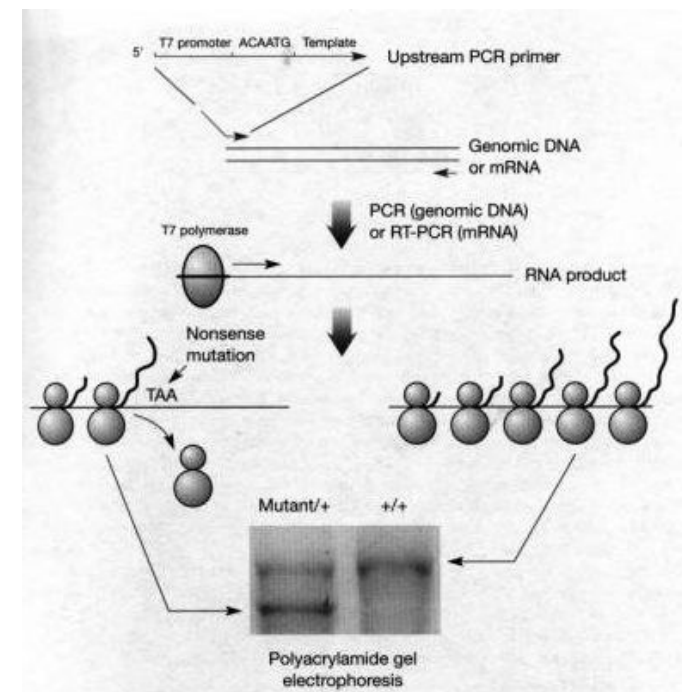
(vad \Leftrightarrow mutáns)



2. Gélelektroforézis (fehérje)

Ha nagy a különbség a képződő fehérje méretében. (pl. stop codon megjelenése)

(vad \Leftrightarrow mutáns)



Mutációk vizsgálata

3. ASO (Allele Specific Oligonucleotide Probe) + Gélelektroforézis (DNS)

Allélspecifikus oligonukleotid próbával PCR.

Csak ott lesz termék, ahol hibridizál a primer.

Egyszerre több mutáció is vizsgálható több primerrel.

4. RFLP Restriktions fragmens

hossz polimorfizmus

Restriktions enzim hasítóhely megjelenése

vagy eltűnésének detektálása.

PCR-t követő enzimes hasítás, majd gélelfő

Some mutations create or destroy a restriction site

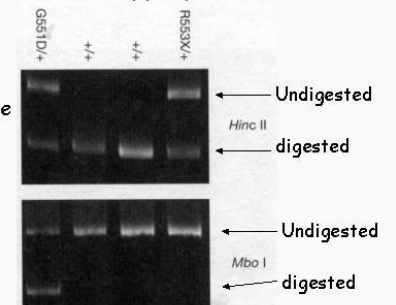
CFTR G551D and R553X mutations can be detected by digesting the PCR fragment with the appropriate restriction enzyme

CFTR G551D

*Hinc*II site changed to *Mbo*I site

R553X

*Hinc*II site destroyed



Mutációk vizsgálata

4. RFLP (folyt.)

Variant 1
*Eco*RI does not cut

GCCGCATTCTA
CGGCGTAAGAT

Variant 2
*Eco*RI does cut

GCCG↓AATTCTA
CGGCT↑TAAGAT



Uncut



} Cut



1

2-1

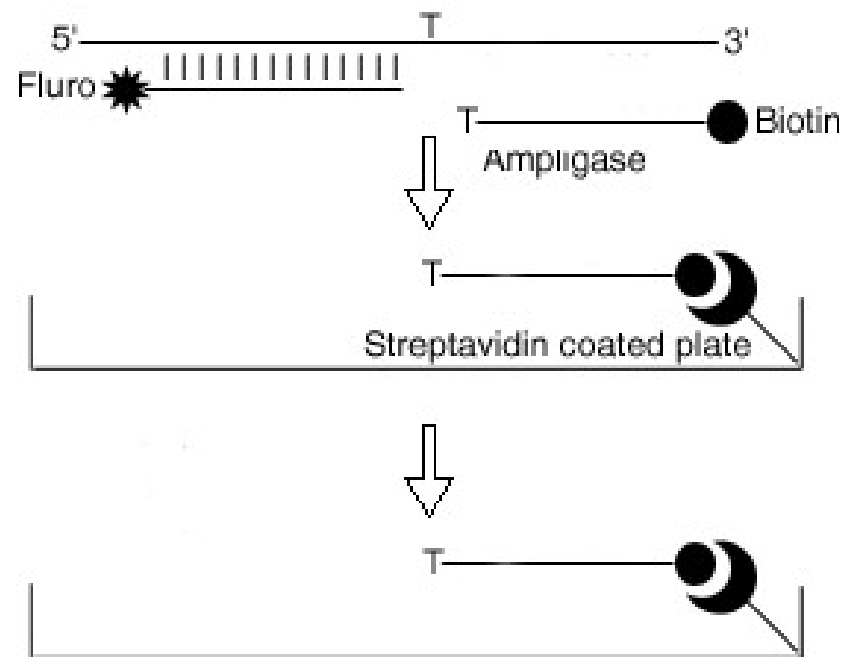
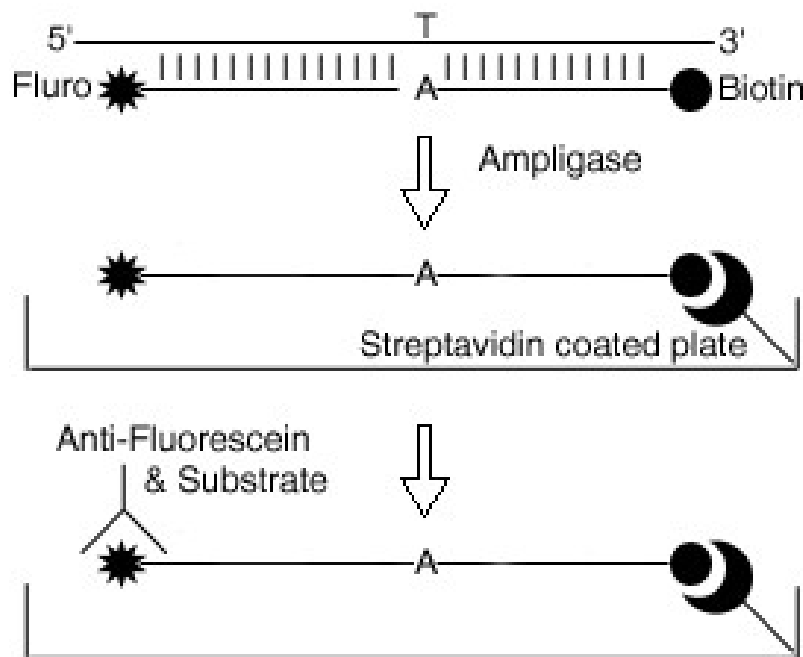
2

Phenotype

Mutációk vizsgálata

5. OLA (Oligonucleotide Ligation Assay)

A 3' végre igen érzékeny a ligáció folyamata. Ha itt hiba van, nincs ligáció. Azaz ha nem megfelelő a szekvencia a 3' végen, akkor nincs jel. Úgy tervezik meg az assay-t, hogy hiba esetén adjon pozitív jelet.



Mutációk vizsgálata

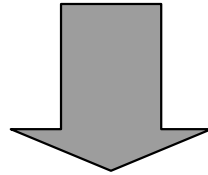
6. Egyéb módszerek

- MS alapú módszerekkel kombinált analízis
- DNS chipek
- Végső megoldás: DNS szekvenálás

II. DNS szekvenálás

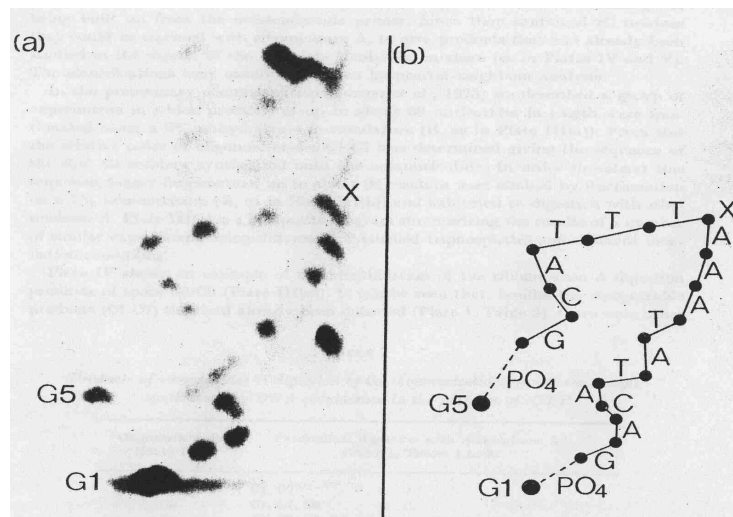
1. Sanger első módszere (+/- módszer?) (rNTP beépítés és kémiai/enzimes degradáció) 1974.

- Enzimes degradáció, papírkromatográfia majd elektroforézis merőlegesen



jellegzetes mintázat, amiből a szekvencia körülményesen, de kikövetkeztethető (ujjlenyomat)

{ A mai proteomikai “peptide mapping” őse (emésztés majd 2D gélelfő → MALDI v. LC MS) Fehérjéknél (pl. inzulin) AS sorrend meghatározásra használta először → kémiai Nobel díj 1958. }

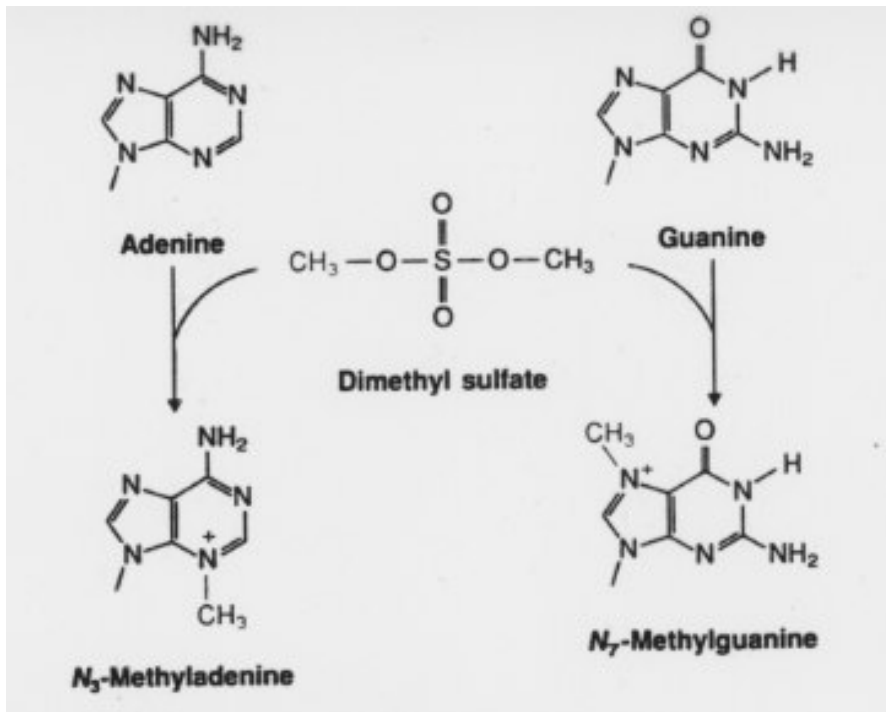


II. DNS szekvenálás

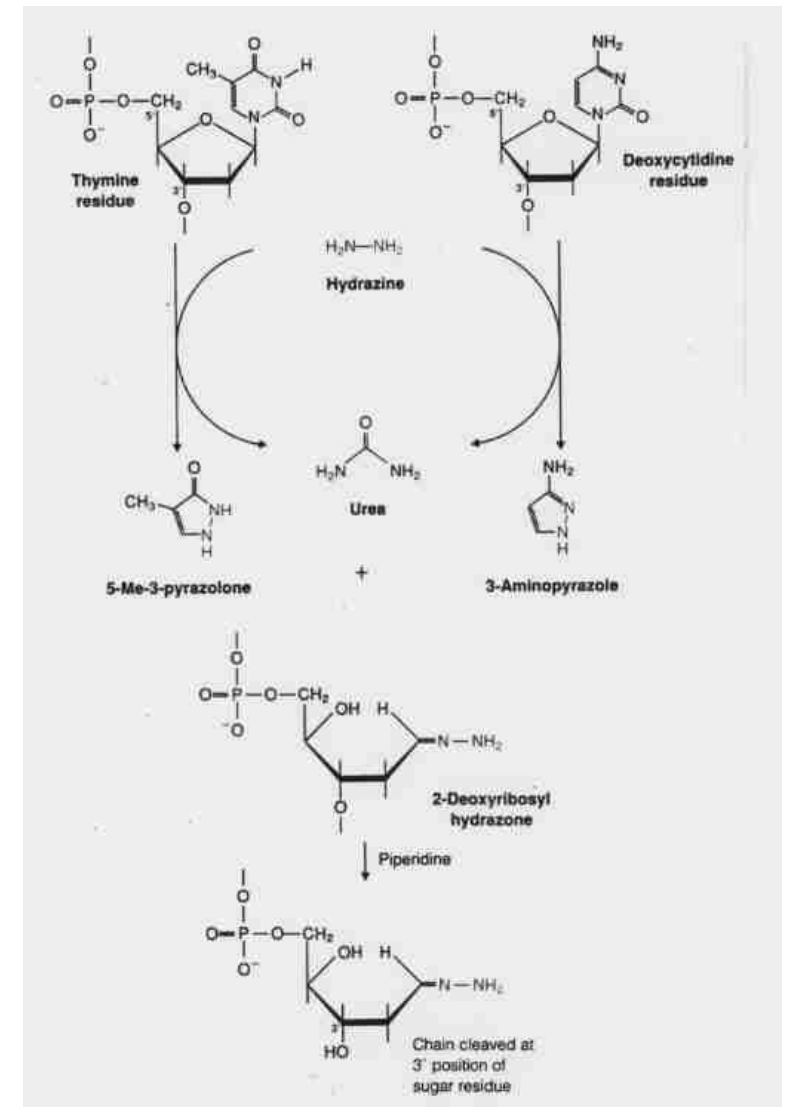
2. Maxam-Gilbert módszer (részleges kémiai degradáció) 1977.

- Kémiai degradációs módszer (specifikus hasítások a különböző bázisoknál)
- Különbségtétel valahogy a két-két bázis között (reaktivitásbeli különbségek kihasználása)

Purin bázisok



Pyrimidin bázisok

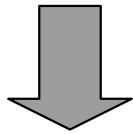


II. DNS szekvenálás

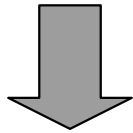
2. Maxam-Gilbert módszer (részleges kémiai degradáció) 1977.

Purin bázisok

- Metilezés dimetil szulfáttal
(G 5x gyorsabban metileződik, mint A)



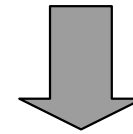
- Instabil glikozidkötés miatt a nukleobázis melegítésre lehasad semleges pH-n
(0.5M HCl, 0°C szinte csak A depurinálódik)



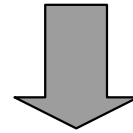
- lúgos hidrolízis (0.1M NaOH)
elhasítja a láncot a hiányzó nukleobázisnál

Pirimidin bázisok

- Reakció hidrazinnal (C, T is reagál)
(de 2M NaCl-ban csak a C!)



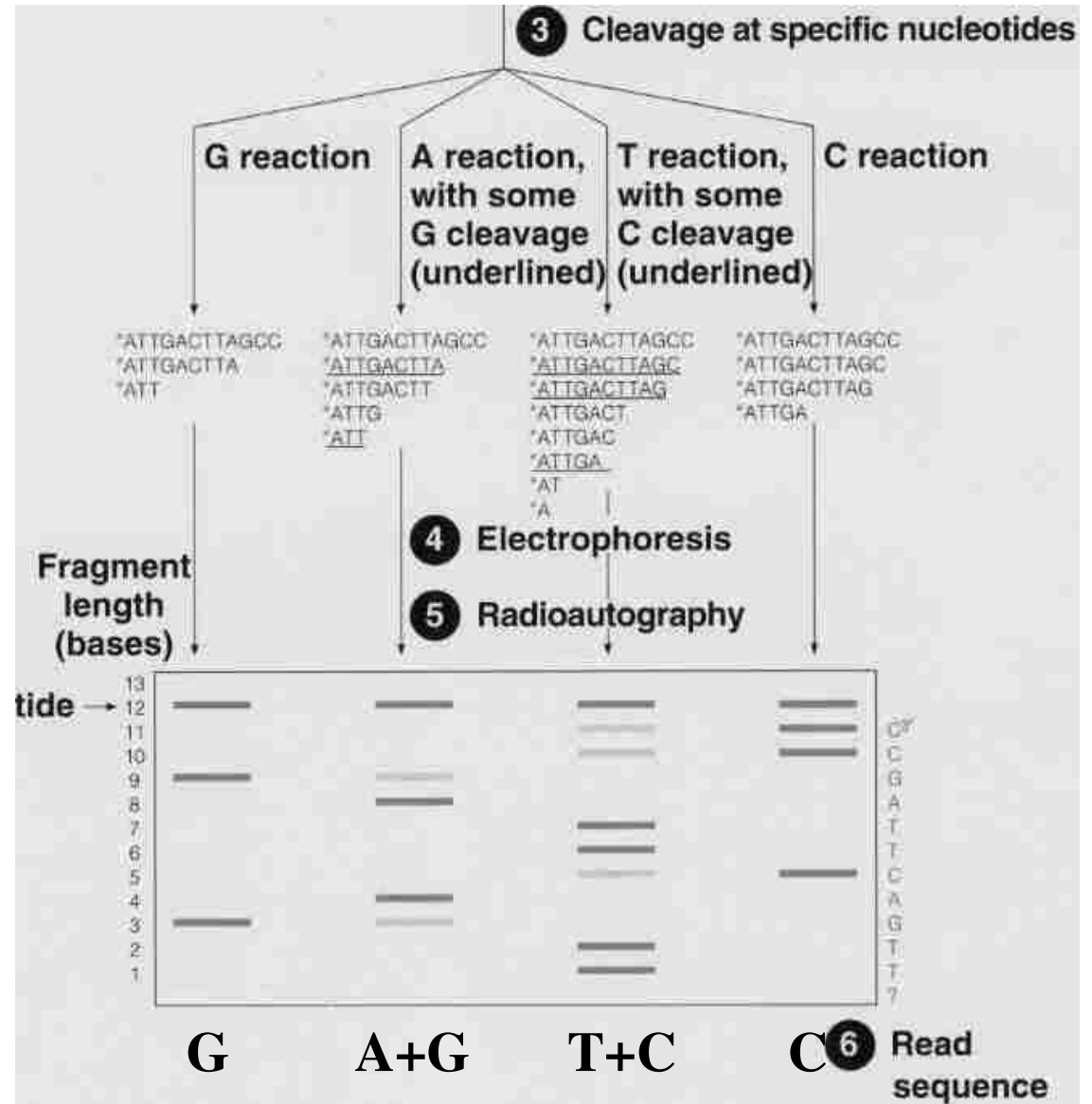
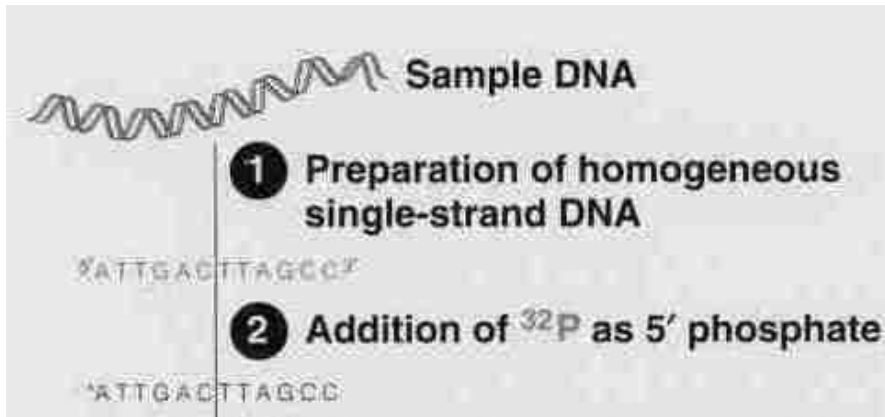
- Nukleobázis elimináció
+ hidrazon képződés a cukorból



- lúgos hidrolízis (0.5M piperidin)
elhasítja a láncot a hiányzó nukleobázisnál (foszfát β -elimináció)

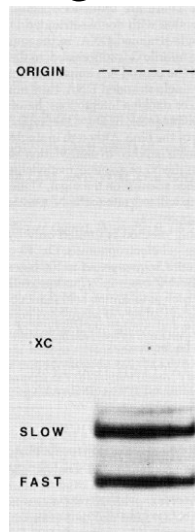
II. DNS szekvenálás

2. Maxam-Gilbert módszer (részleges kémiai degradáció) 1977.



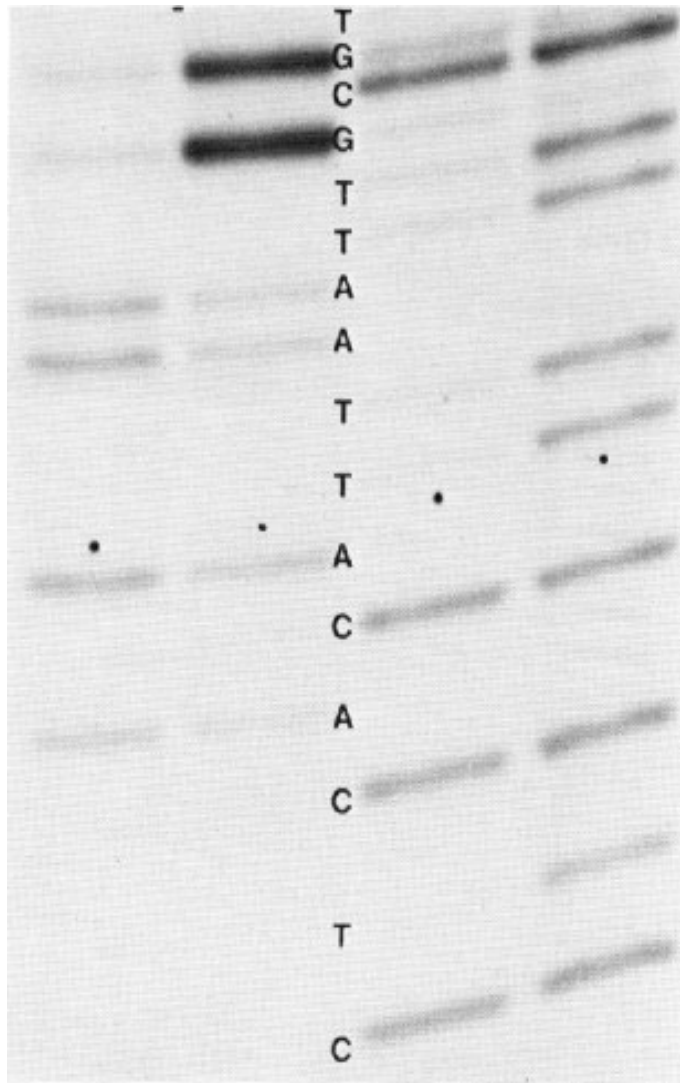
- ssDNS szeparálás, majd enzimes radioaktív jelölés az egyik végen

- mindkét vég jelölése, majd enzimes hasítás, szeparálás



II. DNS szekvenálás

2. Maxam-Gilbert módszer (részleges kémiai degradáció) 1977.



A>G G>A C C+T

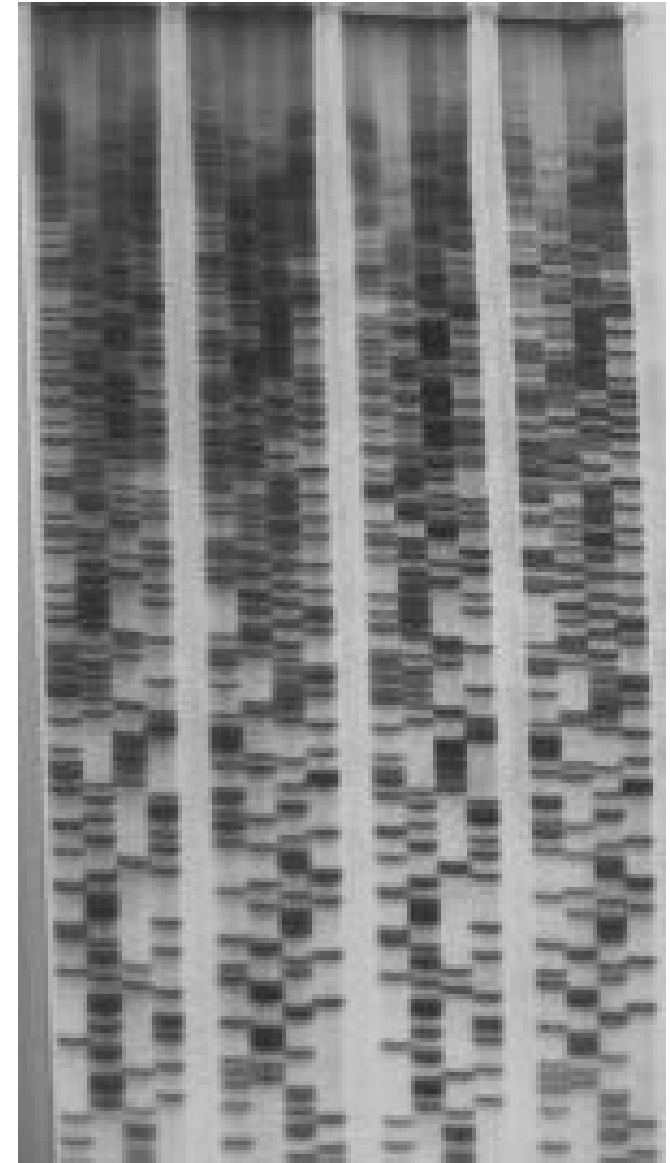
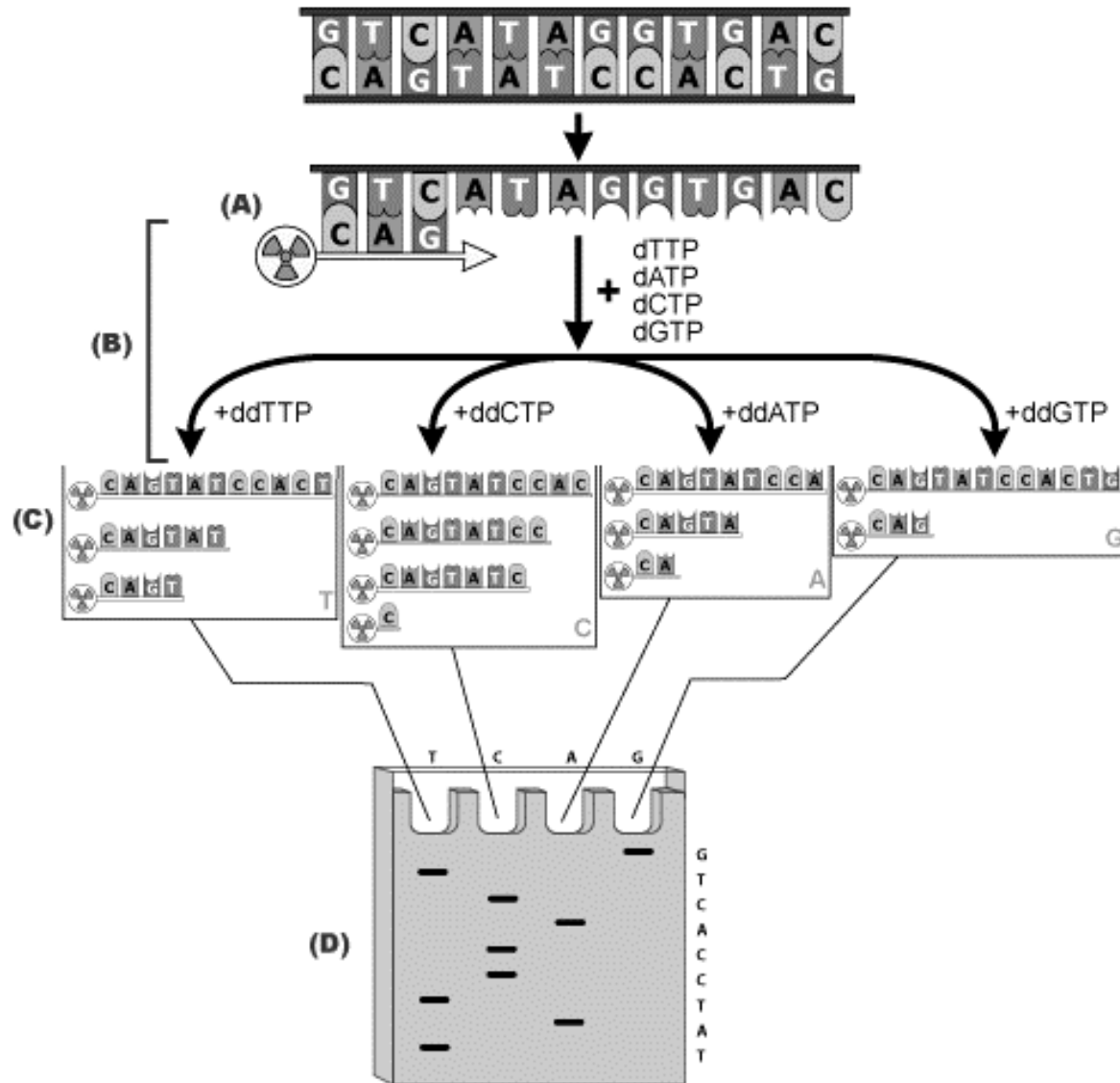
Elektroferogramok



II. DNS szekvenálás

3. Sanger módszer (terminációs módszer) 1977.

Eredeti változat, radioaktív jelölés



II. DNS szekvenálás

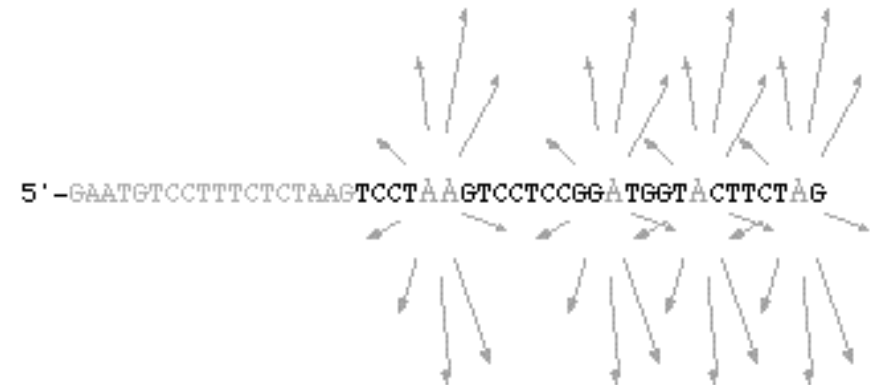
3. Sanger módszer (terminációs módszer) 1977.

Eredeti változat, radioaktív jelölés

Radioaktív jelölés lehet

P^{32} az 5'-végen

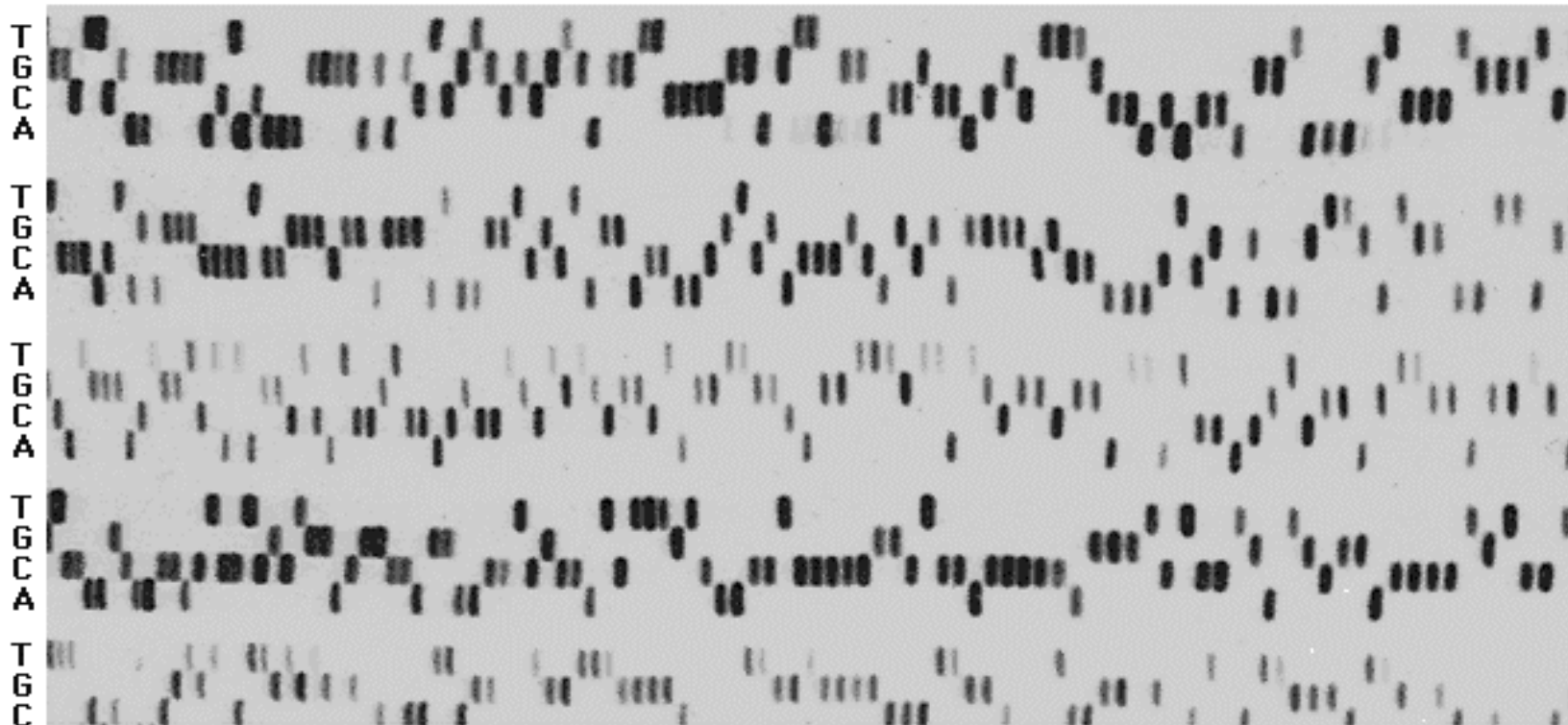
S^{35} a láncban (α - S^{35} dATP)



II. DNS szekvenálás

4. Sanger módszer (terminációs módszer) 1986. Smith és mtsai második változat, fluoreszcens primerjelölés

Ugyanaz a módszer, de a primer végén fluoreszcens festék a P³² helyett.
Elvileg egy festéssel nem sok különbség lenne:

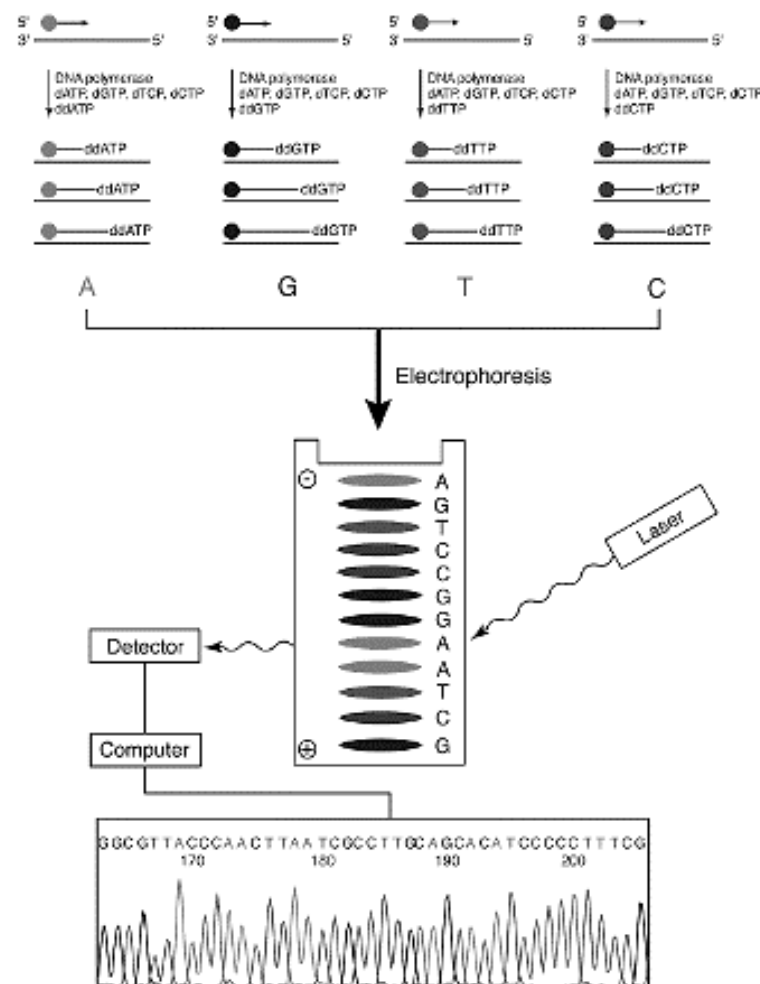
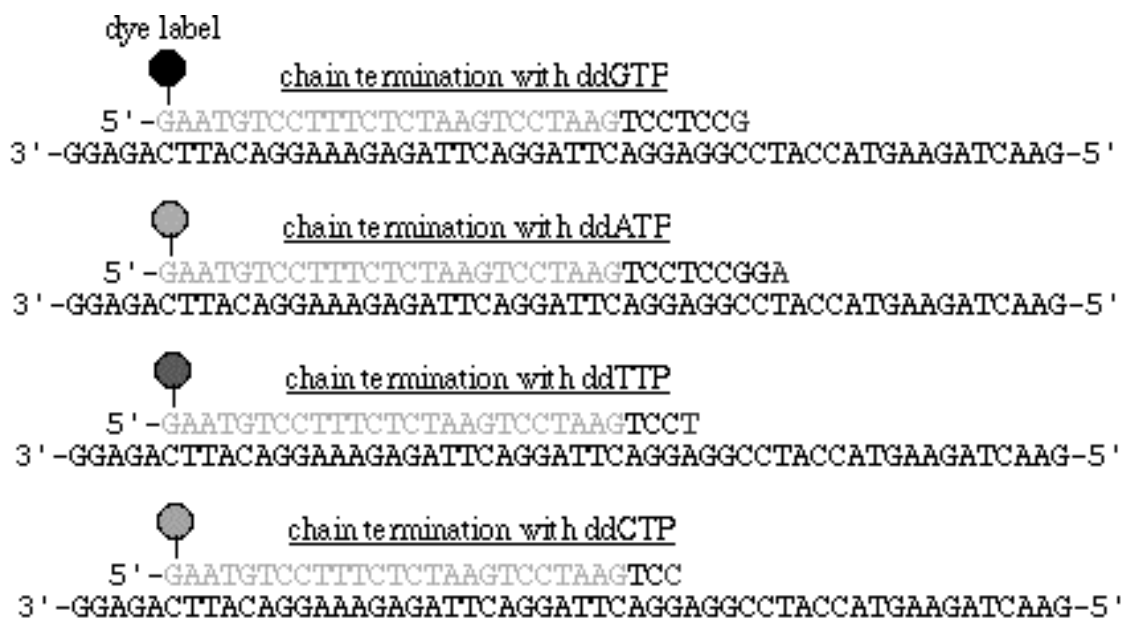


II. DNS szekvenálás

4. Sanger módszer (terminációs módszer) 1986. Smith és mtsai második változat, fluoreszcens primerjelölés

De négy különböző festék már jelentős fejlődést hoz!

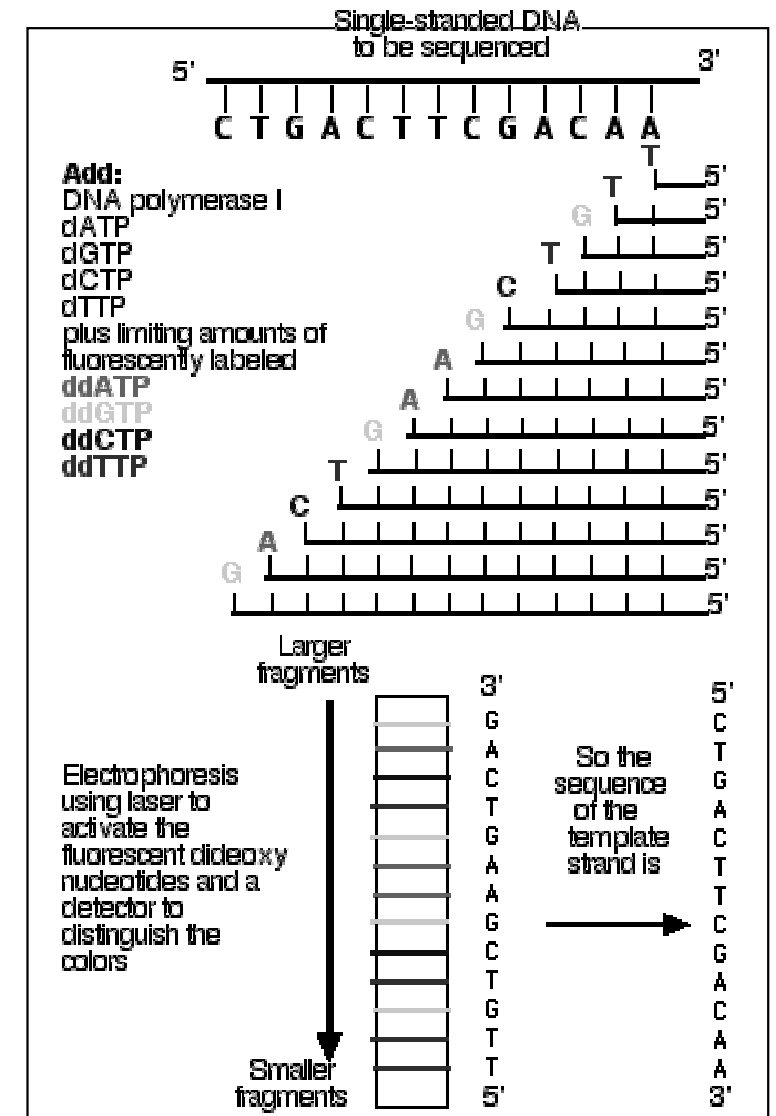
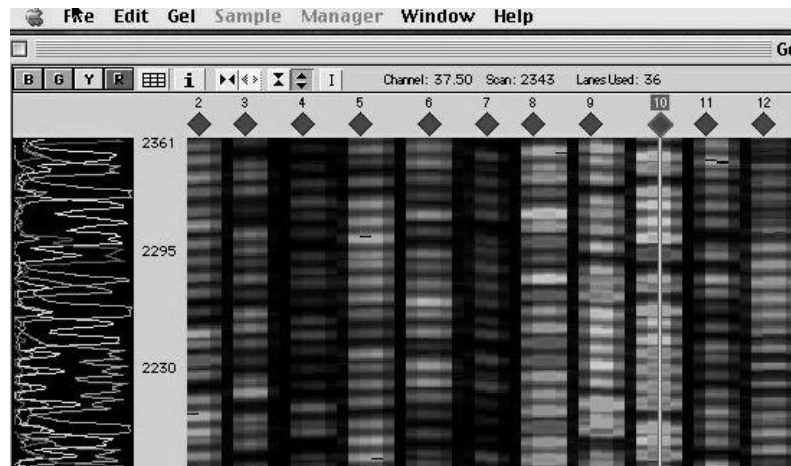
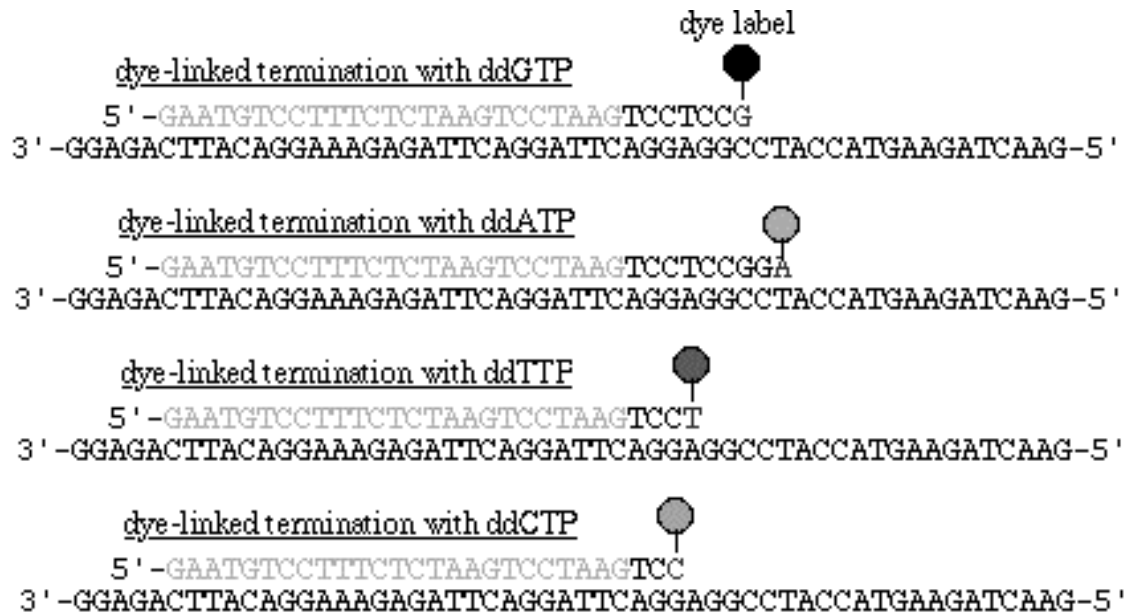
Fluoreszcens jelölés a primeren. \longrightarrow 4 cső reakció, de 1 sávban futás.



II. DNS szekvenálás

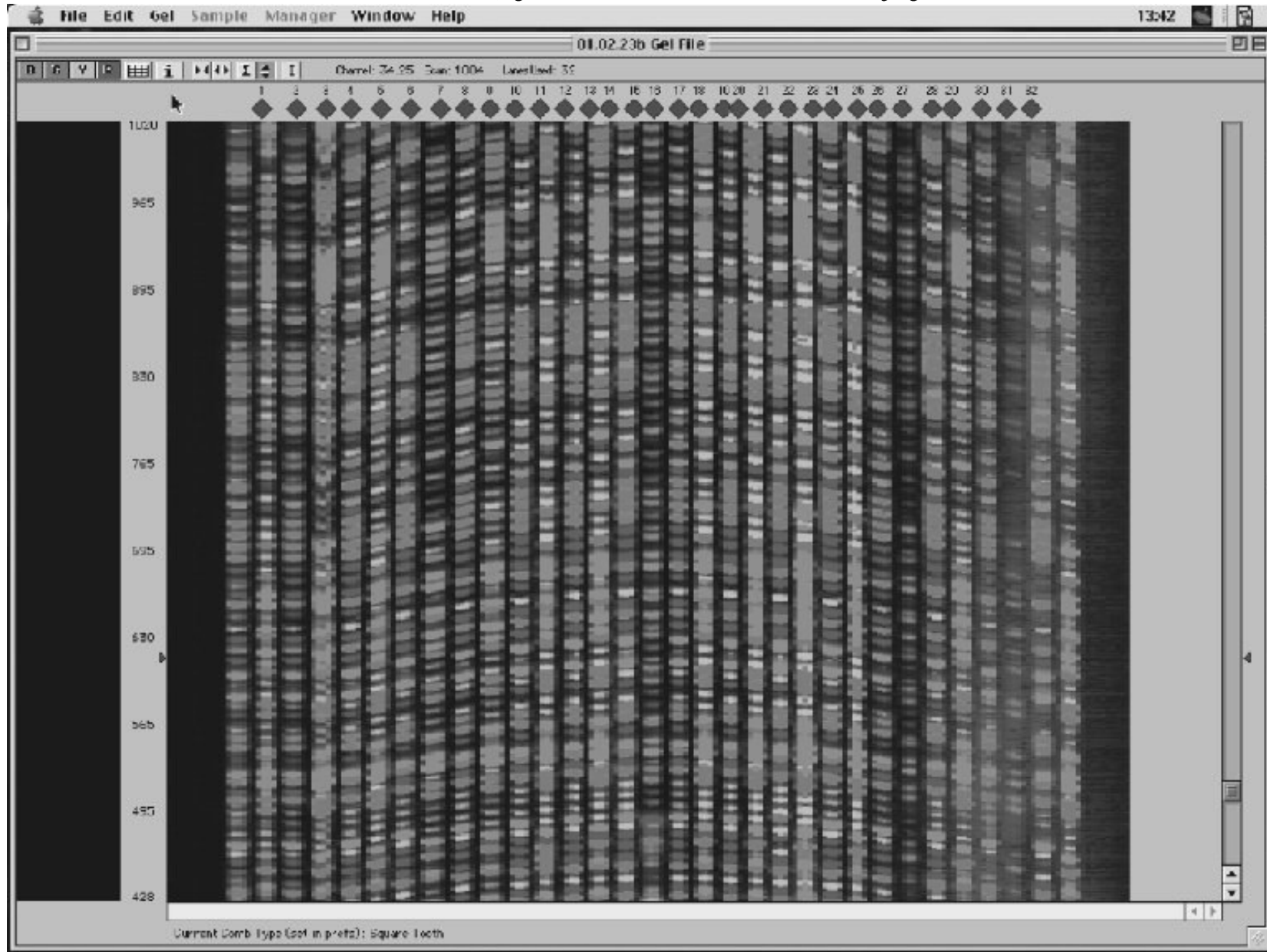
5. Sanger módszer (terminációs módszer) 1987. Prober és mtsai harmadik változat, fluoreszcens dideoxy festékek

Fluoreszcens jelölés a ddNTP-n. \longrightarrow 1 cső reakció és 1 sávban futás.



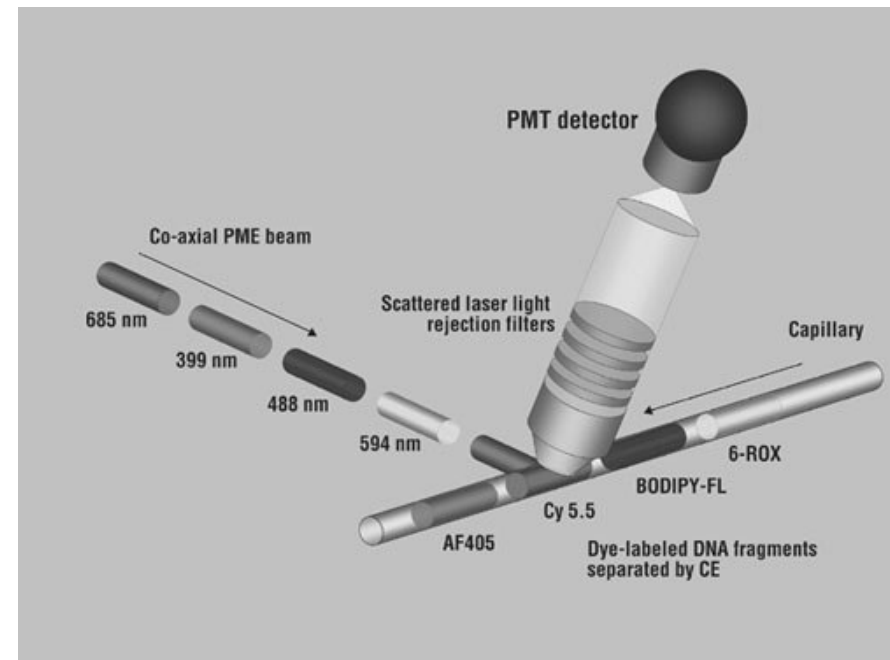
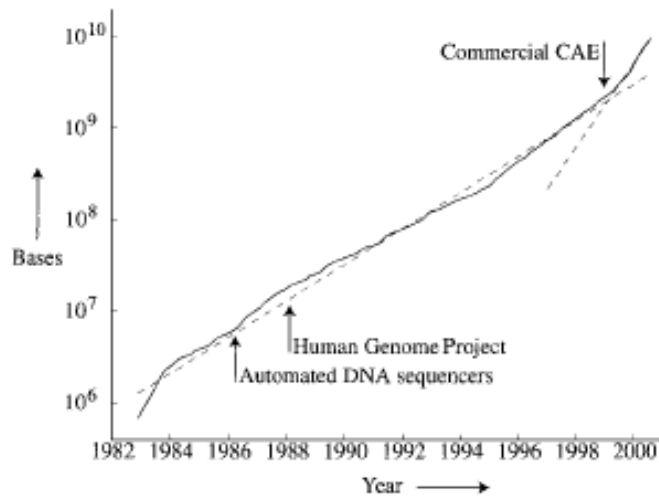
II. DNS szekvenálás

5. Sanger módszer (terminációs módszer) 1987. Prober és mtsai harmadik változat, fluoreszcens dideoxy festékek



II. DNS szekvenálás

6. Sanger módszer (terminációs módszer) negyedik változat, fluoreszcens jelölés, CE használata



84-99 2 évenként duplázás, 99 (CE+robotizálás+bioinformatika)-tól kb. 6 hónap
Aprónak látszó technikai fejlesztések (küvetta méretének csökkentése FACSból, kapilláris vastagságának csökkentése nagyobb hűtés, nagyobb feszültség gyorsabb analízis, keresztköttött mátrix helyett lineáris akrilamid gél, emelt hőmérséklet 60 C, Array típusu 96 well plate CE szekvenáló, flow sheet 'küvetta' lézer besugárzás egyszerre, és detektálás merőlegesen CCD kamerával ABI 3700 készülék)

II. DNS szekvenálás

7. DNS szekvenálás és egyszerűbb analízis tömegspektrometriával

- Előnye lenne, hogy gyorsabb lehet, mint a géles vagy CE (órák helyett percek)
- Jelenleg még nem tökéletes egyik ilyen módszer sem
- Kb. 100 bázisig használhatók a különféle MS módszerek
- a leglágyabb ionizációs módszerek jöhetnek szóba (ESI, MALDI-TOF)

II. DNS szekvenálás

7. DNS szekvenálás és egyszerűbb analízis tömegspektrometriával

DNS összehasonlítás MS-sel

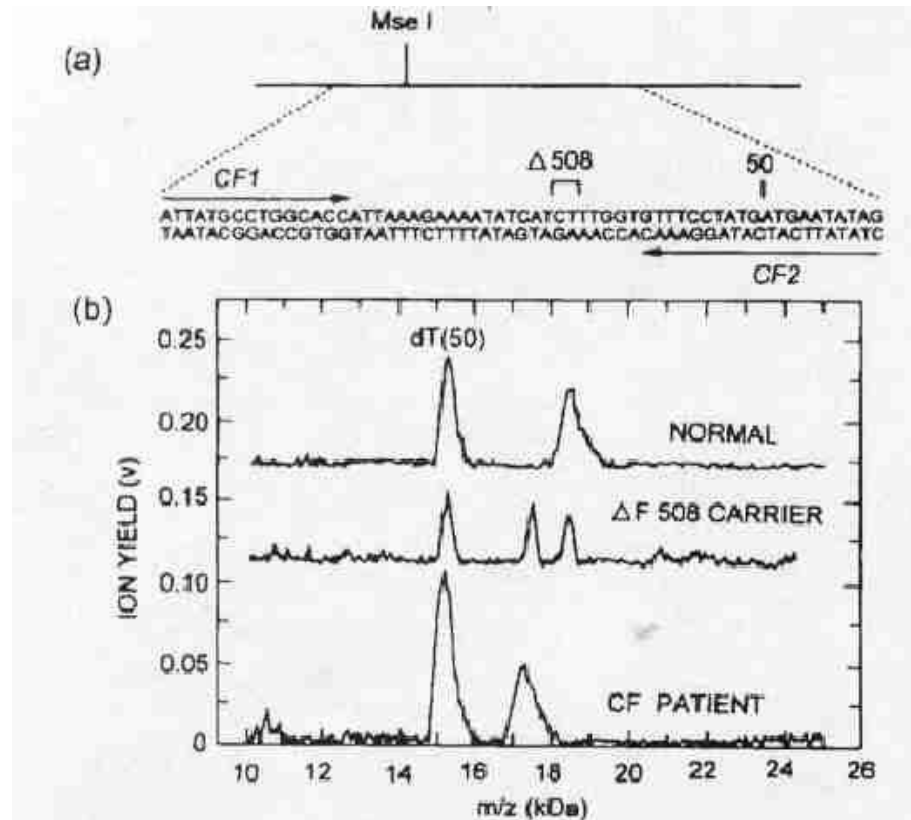


Figure 12. MALDI mass spectra of oligonucleotides obtained from PCR amplification of sections of human DNA from three patients. The top trace was obtained from a normal patient, the center trace was obtained from the DNA of a cystic fibrosis carrier (heterozygous in the cystic fibrosis gene) and the lower trace was obtained from a cystic fibrosis patient (homozygous in the cystic fibrosis gene). (From Ref. 74).

II. DNS szekvenálás

7. DNS szekvenálás és egyszerűbb analízis tömegspektrometriával

I. módszer: Sanger reakcióelegyből MS

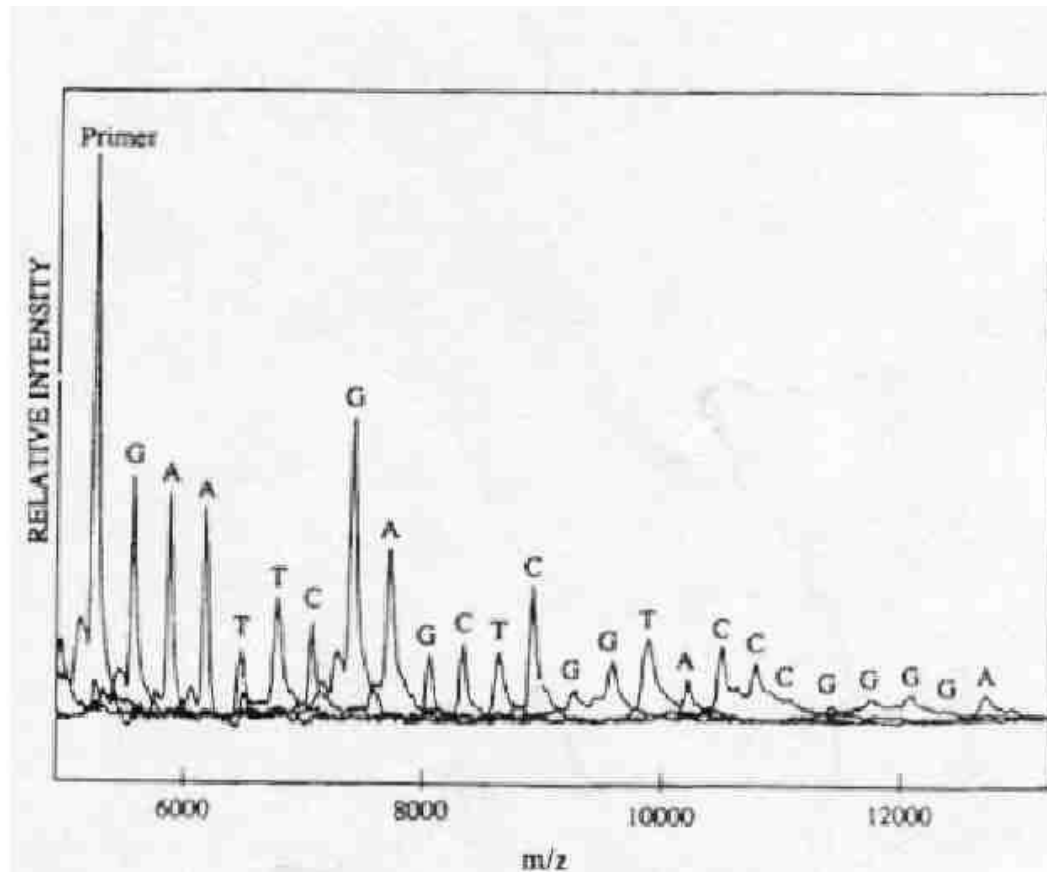


Figure 11. Mock MALDI sequencing of a DNA 40-mer. A mixture of synthetic oligonucleotides was used to represent the products of a Sanger sequencing reaction. The four mass spectra from the sequencing solutions are overlaid (From Ref. 72).

II. DNS szekvenálás

7. DNS szekvenálás és egyszerűbb analízis tömegspektrometriával

II. módszer: DNS létra módszer

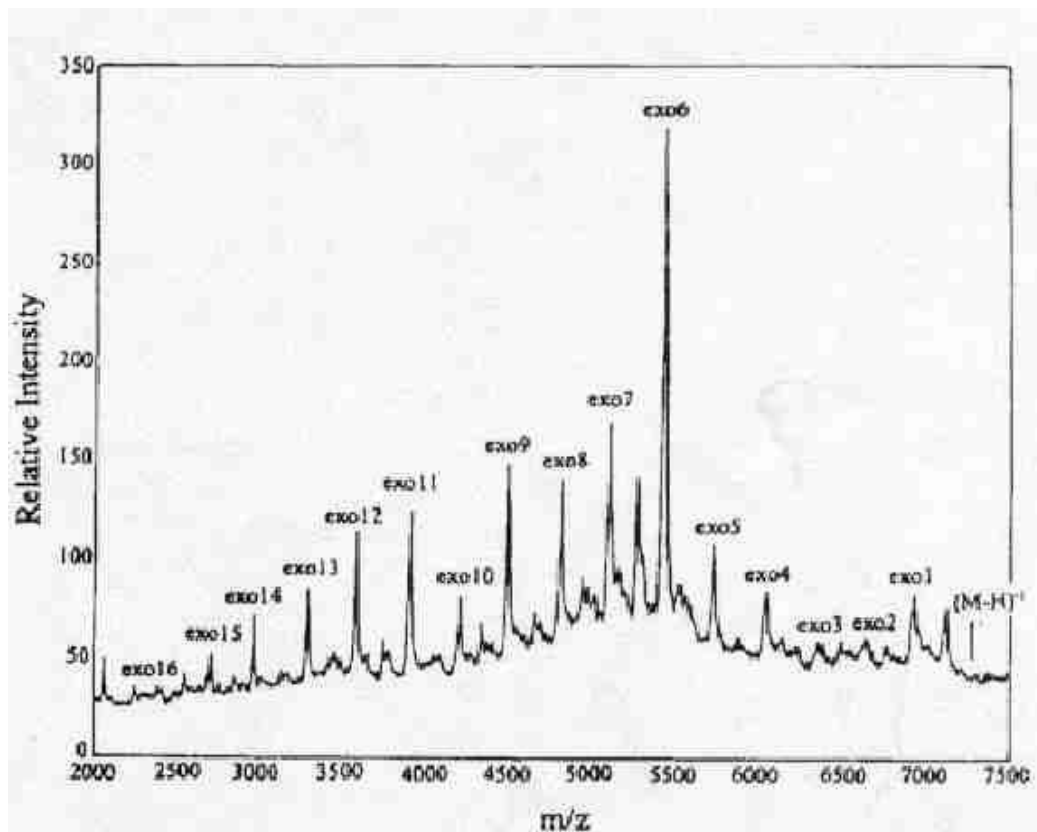


Figure 13. MALDI mass spectrum of a 24-base oligonucleotide after 50 min of digestion in calf spleen phosphodiesterase. The products of the sequencing ladder are labelled exo1 through exo16.

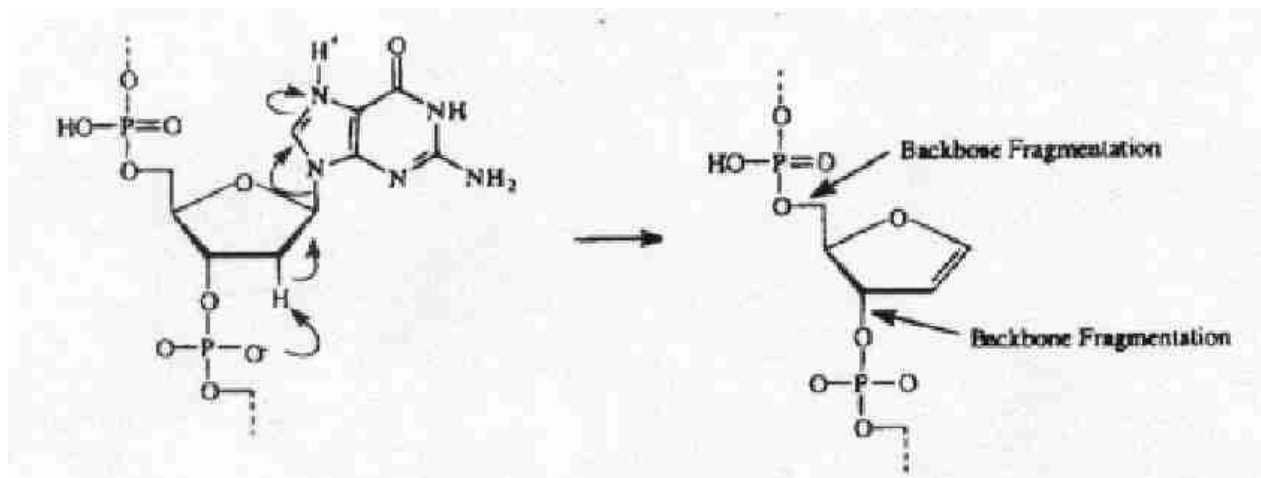
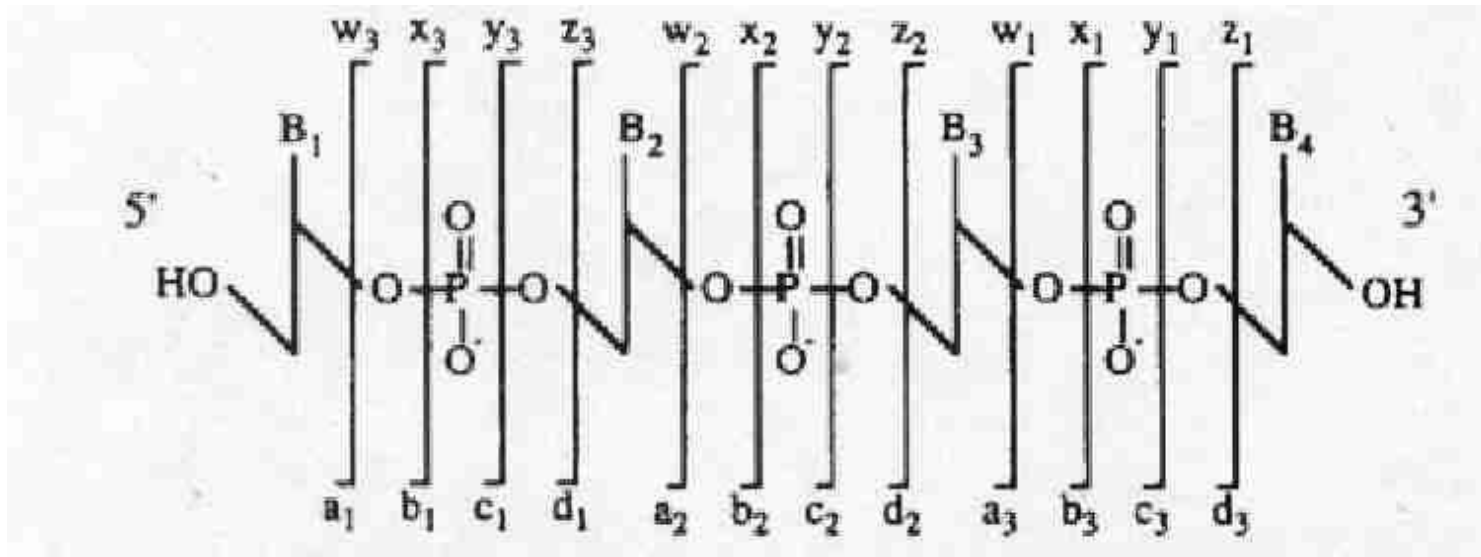
A DNS részleges emésztéséből származó keverék vizsgálata. A csúcsok távolságából Lehet számolni az aktuális bázist.

II. DNS szekvenálás

7. DNS szekvenálás és egyszerűbb analízis tömegspektrometriával

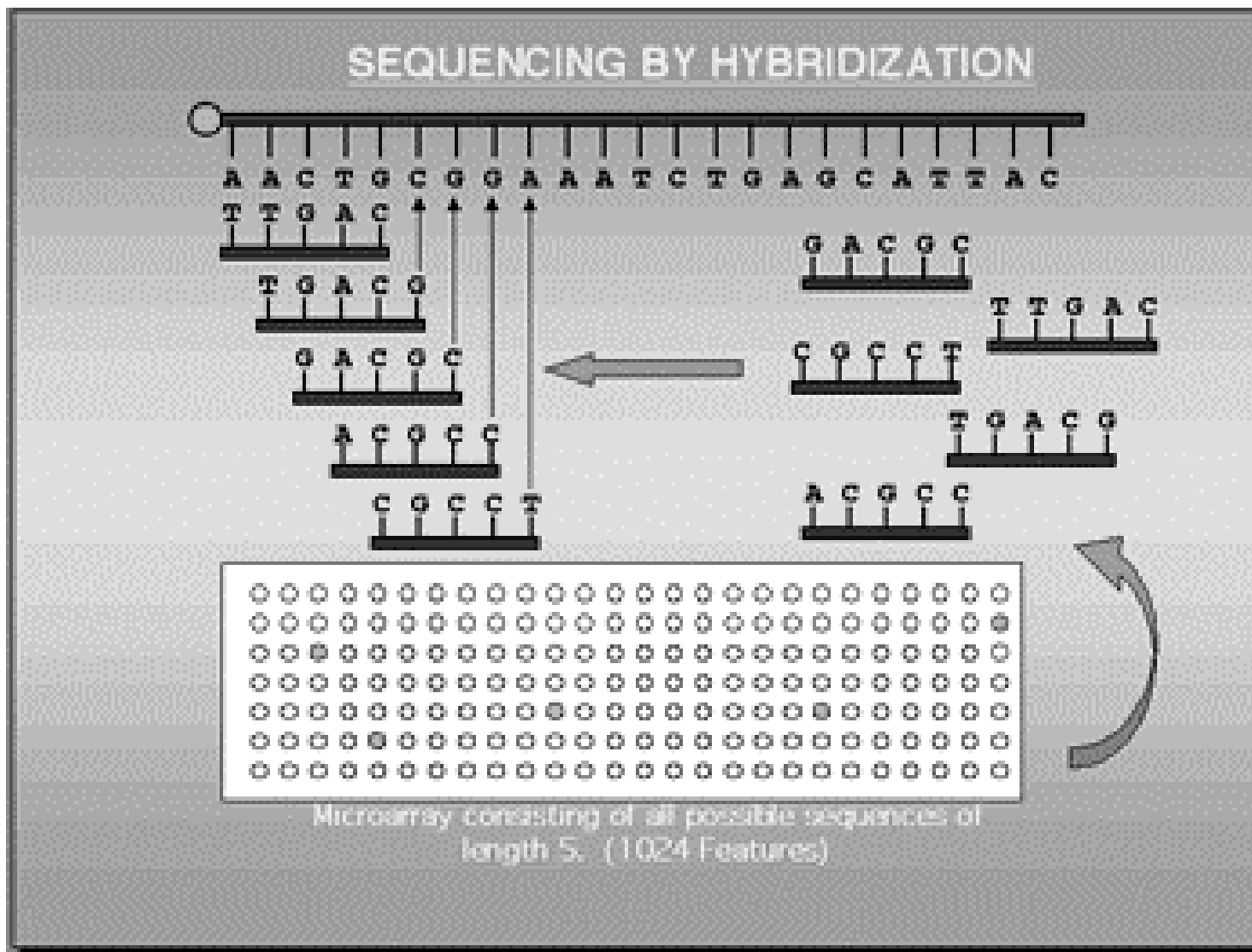
III. módszer: gáz fázisú fragmentáció (MS/MS mint peptideknél)

Csak rövid DNS-ekre használható.



II. DNS szekvenálás

8. DNS szekvenálás DNS chipekkel

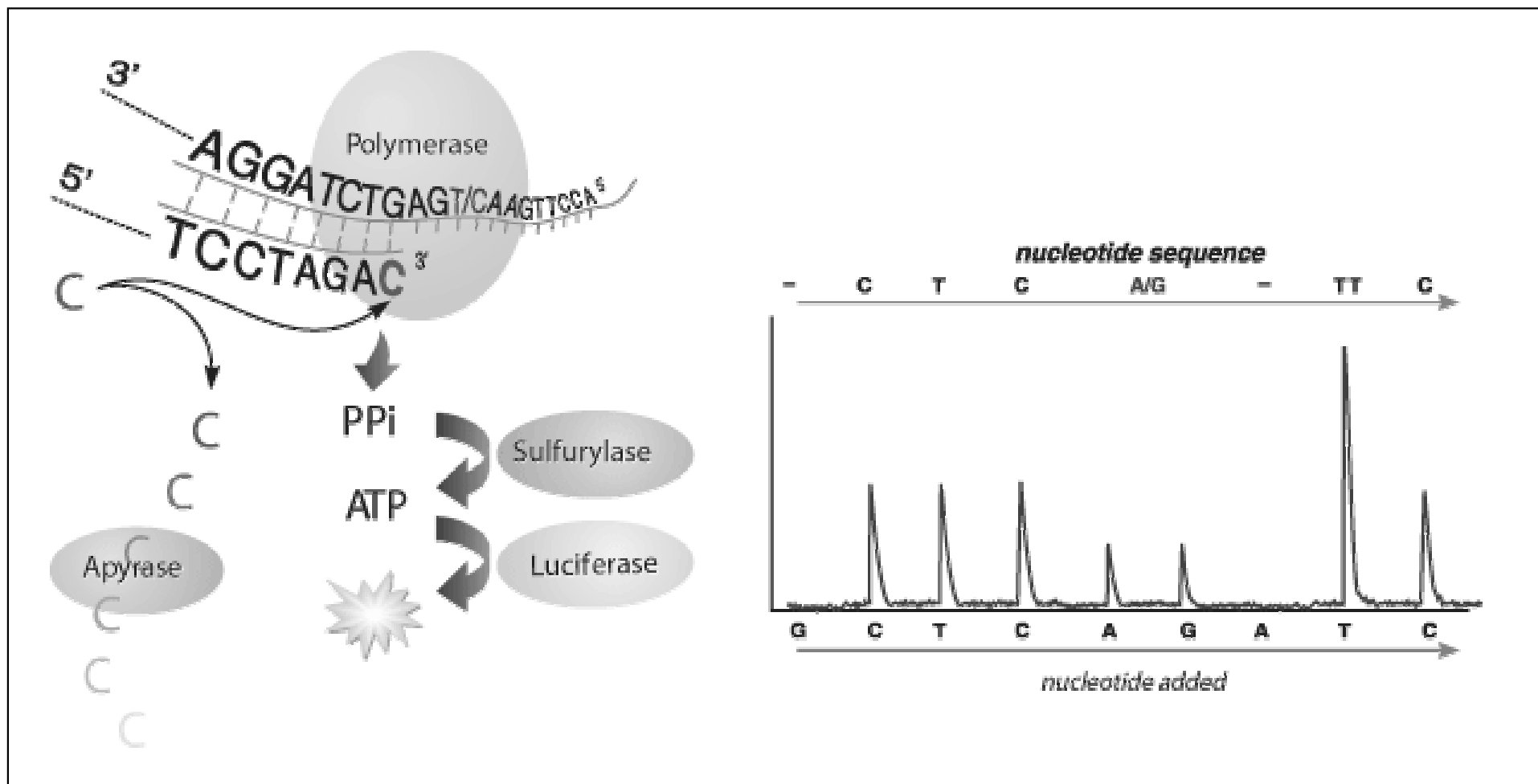


Hátrány: hibridizációs különbségek és ismétlődések gondjai!

II. DNS szekvenálás

9. Piroszekvenálás (pirofoszfátképződés mérése)

Inkább szekvencia megerősítés és mutációanalízis.



Előnyök: gyors, olcsó, kvantitatív információk, CpG metiláció vizsgálat
Hátrányok: kis hosszúság: 40-70bp(2004), 300-500 (2007)

II. DNS szekvenálás

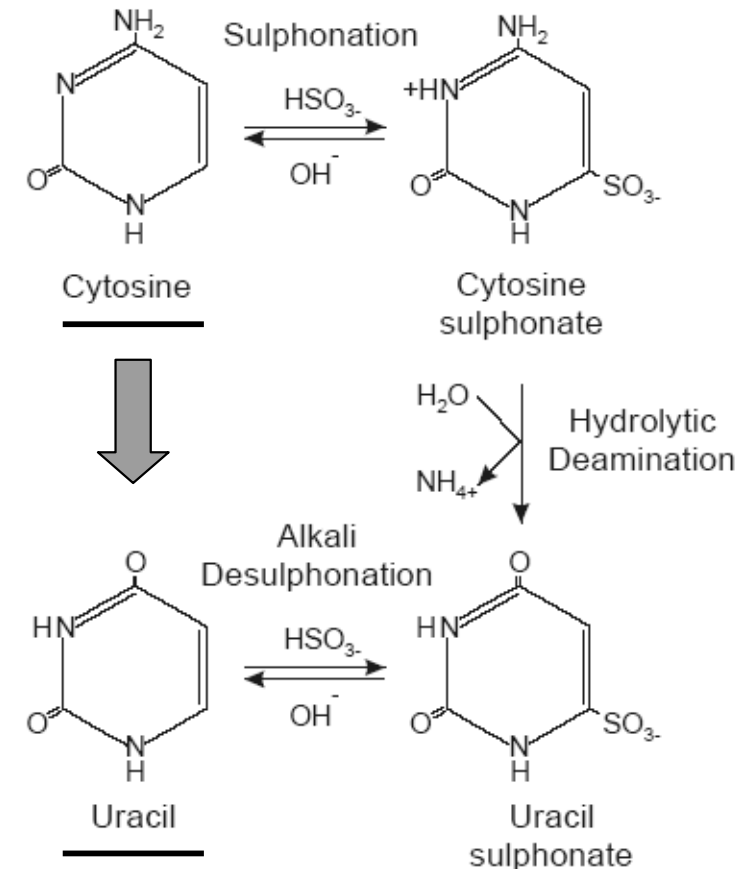
9. Piroszekvenálás II. $mCpG$ DNS metilációk vizsgálata



Szerepe valószínűleg a génszabályozás.

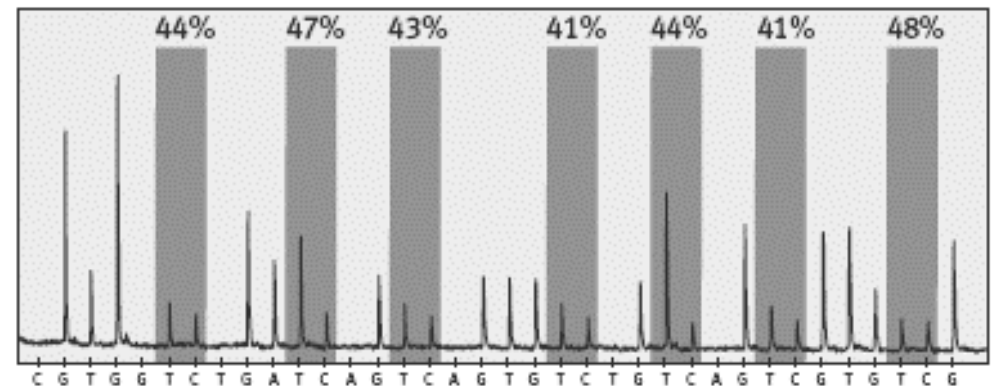
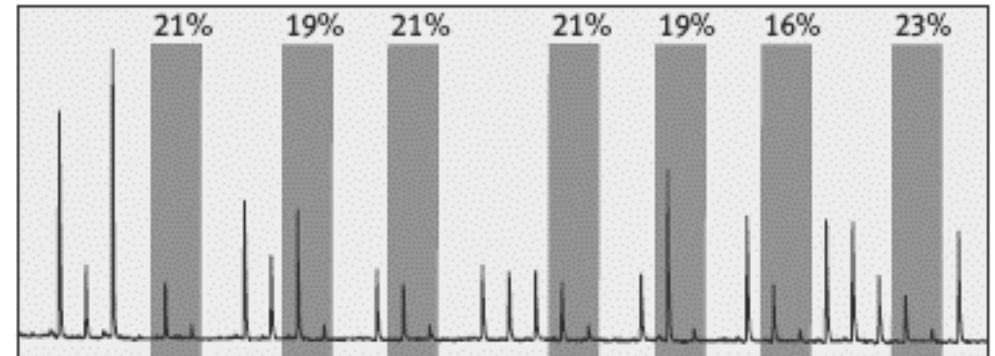
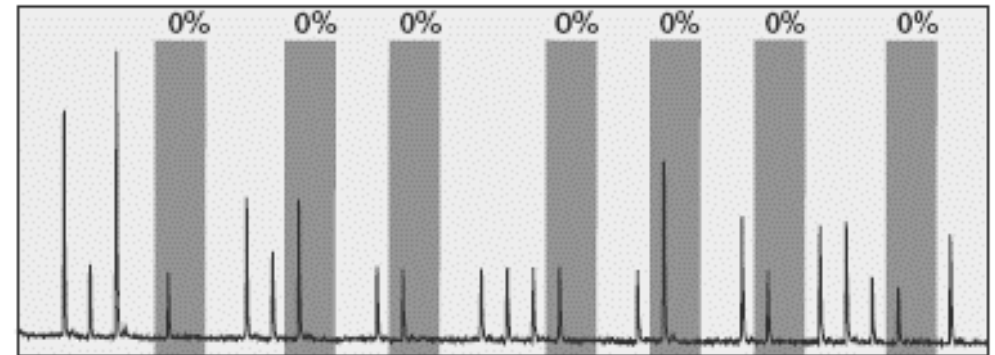
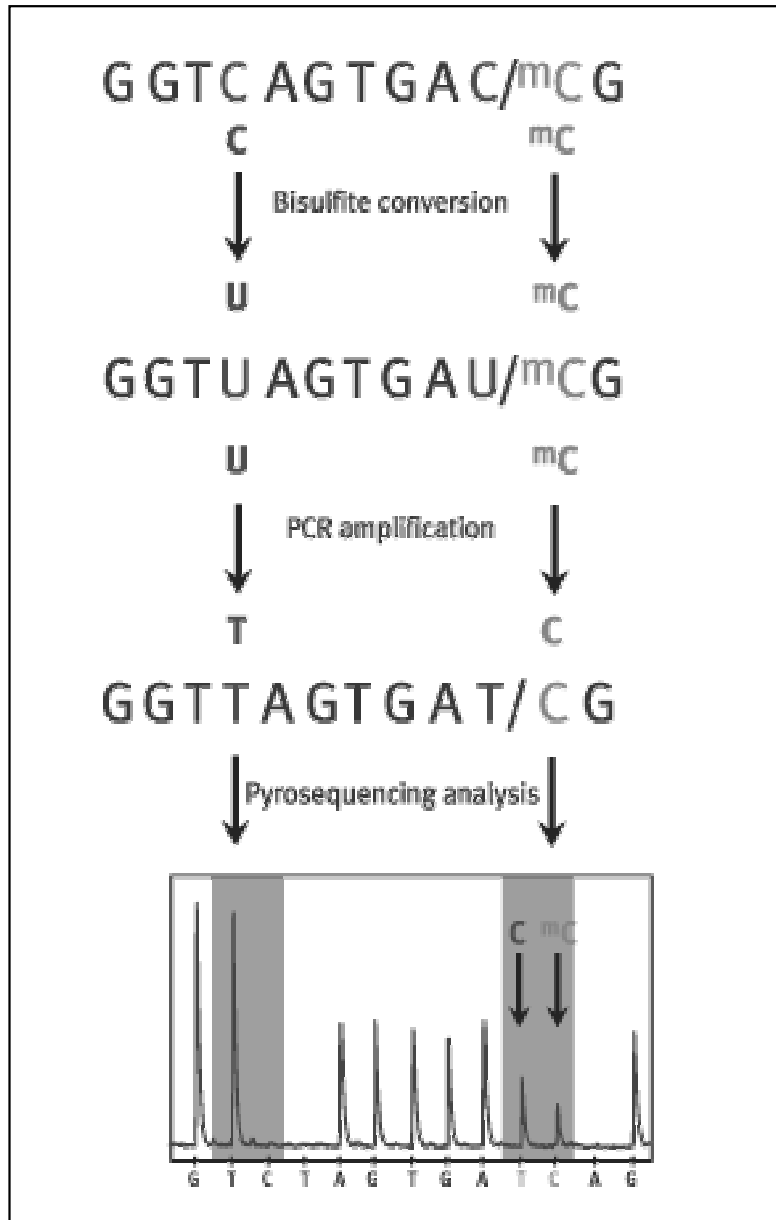
Metilációk vizsgálata:

- metilációs helyek $mCpG$
- metiláció foka
(mennyiségi információ)
- jelenlegi egyedüli módszer a biszulfid módszer és ezt könnyű kvantitálni piroszekvenálással

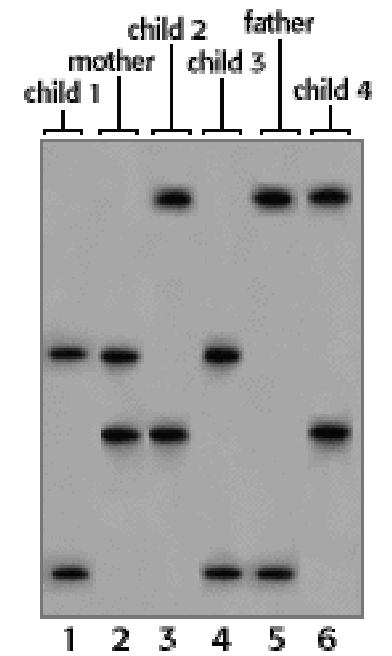
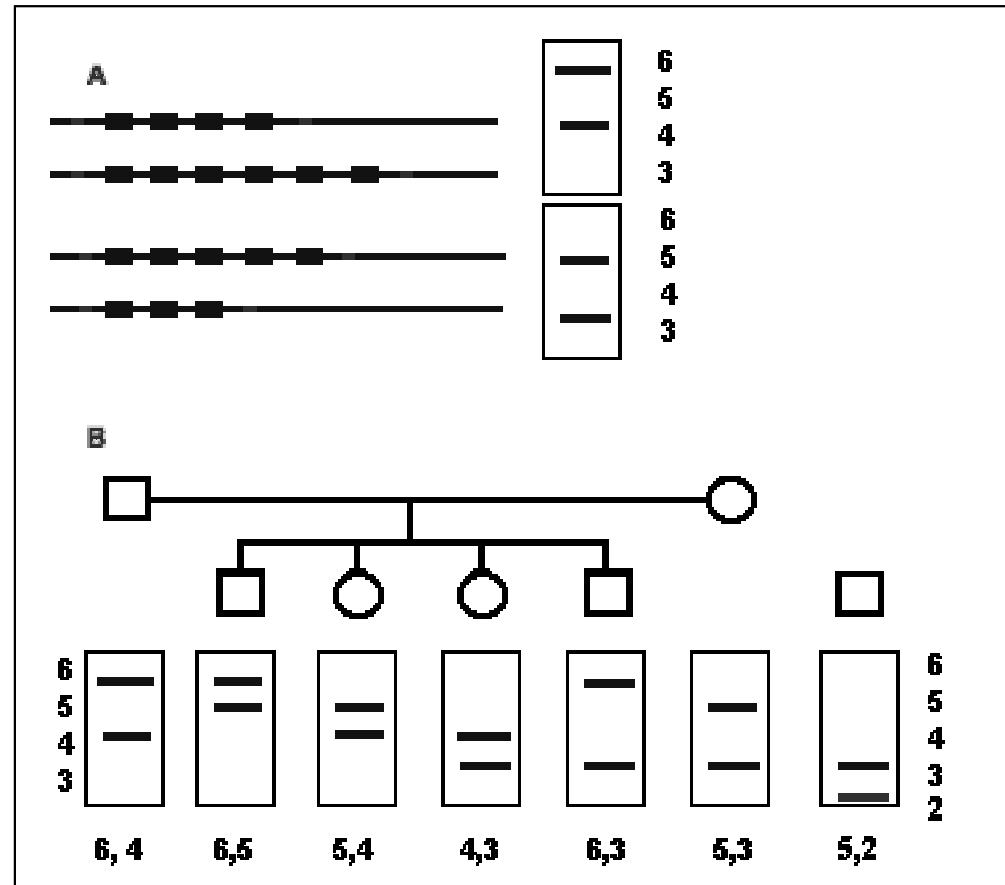


II. DNS szekvenálás

9. Piroszekvenálás II. ^mCpG DNS metilációk vizsgálata



III. DNS ujlenyomat



III. DNS ujjlenyomat

