



# Изучение дублицированных генов в *Schizophyllum commune*

**Участники проекта:** Буянова С., Дмитриев В., Кашина Т., Коломер М., Кольцова А., Максимова Е., Русина П., Пурвиньш Я., Смолер М., Шарипова Р., Юдаева Е.

**Руководители:** Баранова М., Канет-Понс Дж., Маркелова Н., Швырева У., Меер М., Тутукина М., Кондрашов Ф.

## Введение

Дубликация генов – один из основных механизмов эволюции. Появление дополнительной копии гена ослабляет отбор, позволяя одной из копий меняться. Это может привести к возникновению новой функции, что делает дубликации, особенно, недавние, интересным объектом исследований.



Для их изучения необходимы сведения о полиморфизмах - вариациях в геномах отдельных индивидуумов одного вида. Для получения количества данных, достаточного для анализа, необходимо, чтобы геномы индивидуумов отличались друг от друга в большом количестве позиций. Это означает, что геном этого вида должен быть полиморфен. Одним из таких является геном гриба базидиомицета *Schizophyllum commune*. В качестве объекта исследования мы взяли 13 индивидуумов этого вида, для которых были доступны предварительные сборки геномов, а также образцы для выделения ДНК.

## Цели

- Проверить качество сборки уже имеющихся геномов грибов *Schizophyllum commune* в местах предполагаемых дубликаций
- Изучить эволюцию недавно дублицированных генов.

## Методы

### Экспериментальные:

- Выделение ДНК (Метод СТАВ);
- ПЦР (HS Taq ДНК полимераза, Evrogen);
- количественная ПЦР в реальном времени (Sybr Green I HS mix);
- измерение концентрации ДНК при помощи: Nanodrop и Qubit;
- электрофорез в агарозном геле (0,8%-2% агарозы, Sybr safe);
- очистка ампликонов из ПЦР-смеси и агарозного геля (Cleanup, Евrogen).

### Биоинформатические:

- Расчеты на сервере [ma.fbb.msu.ru](http://ma.fbb.msu.ru);
- оценка качества ридов с использованием программы FastQC;
- исключение фрагментов ридов с низким качеством при помощи программы Trimmomatic;
- выравнивание полученных ридов на последовательность генома при использовании Bowtie2;
- конвертирование файлов формата ASCII в бинарный формат с помощью утилиты Samtools;
- визуализация выравнивания в программе IGV.

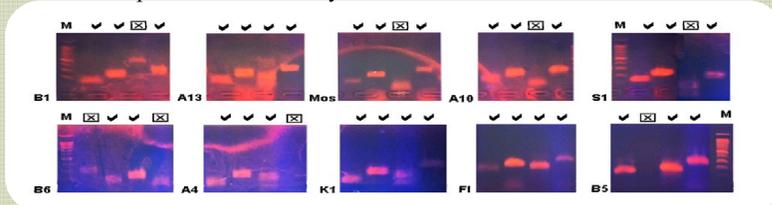
## Результаты



### Выделение ДНК и её анализ при помощи ПЦР в реальном времени

Была выделена ДНК из 10 грибов вида *Schizophyllum commune*. Полученные концентрации ДНК варьировали от 30 до 700 нг/мкл.

Анализ одного из дублицированных генов с помощью количественной ПЦР в реальном времени. Для ряда геномов, включая S1, K1, B6 и A10 было подтверждено наличие дубликаций.



	A		B	
A4	25,0	26,2	27,3	31,0
A10	27,3	25,2	25,9	23,8
A13	26,9	26,7	27,5	27,3
B1	27,1	26,8	29,8	26,6
B5	26,7	-	26,3	28,2
B6	26,1	24,8	24,5	27,9
F1	30,8	28,0	28,3	30,0
Mos	30,4	28,1	25,8	28,2
K1	23,8	23,6	22,9	26,7
S1	23,8	23,9	23,1	24,5

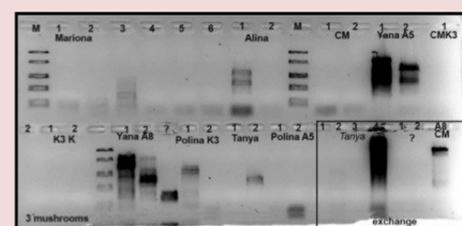
Номера циклов количественной ПЦР в реальном времени, на которых появлялись сигналы

### Амплификация отдельных генов

Каждая копия исследуемых генов была амплифицирована независимо и со специально подобранной парой праймеров:



Продукты ПЦР были проанализированы с помощью электрофореза в агарозном геле. В большинстве случаев ожидаемые продукты ПЦР не были обнаружены. Получившиеся продукты для каждого гриба были сгруппированы таким образом, что копия А каждого гена была отделена от копии В. Такой подход позволяет отследить полиморфизмы каждой копии. Образцы были очищены и отсеквенированы с помощью Illumina MiSeq с длиной рида 200 нуклеотидов.

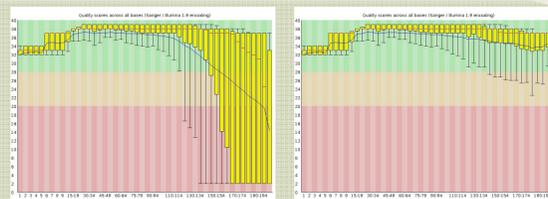


Анализ ампликонов методом электрофореза в агарозном геле

### Анализ результатов секвенирования

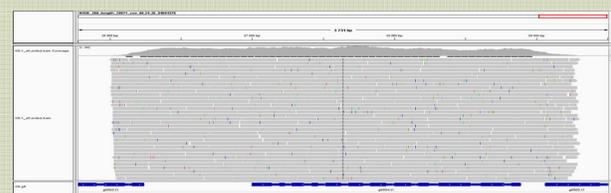
Полученные после секвенирования объемы данных настолько велики, что для их обработки необходим мощный сервер. Мы использовали сервер [ma.fbb.msu.ru](http://ma.fbb.msu.ru) с помощью утилит FAR и RuTTY.

Сырые (непосредственно полученные после секвенирования) риды содержат нуклеотиды низкого качества. Поэтому первым этапом обработки было их удаление.



Качество «сырых» ридов и ридов после обработки

Для проверки того, правильные ли участки геномов были амплифицированы, обработанные риды были выровнены на геномы соответствующих индивидуумов. Оказалось, что лишь небольшая часть ридов (< 5%) соответствует ожидаемому геному.



Выравнивание ридов на участок генома одного из индивидуумов

## Выводы

- Проанализировав геномы *Schizophyllum commune*, мы пришли к выводу, что нельзя использовать полногеномную сборку данного гриба для изучения дубликаций.
- Методом количественной ПЦР в реальном времени в части геномов было подтверждено наличие дублицированных генов.

## Благодарности

- Авторы выражают благодарность
- Фонду «Династия» и Plan National за финансовую поддержку
  - Институту Биофизики Клетки РАН за терпение
  - Марии Логачёвой за неоценимую помощь