

Введение в транскриптомный анализ

Анастасия Жарикова

29 ноября 2022

azharikova89@gmail.com

Задача

Секвенировать транскриптом

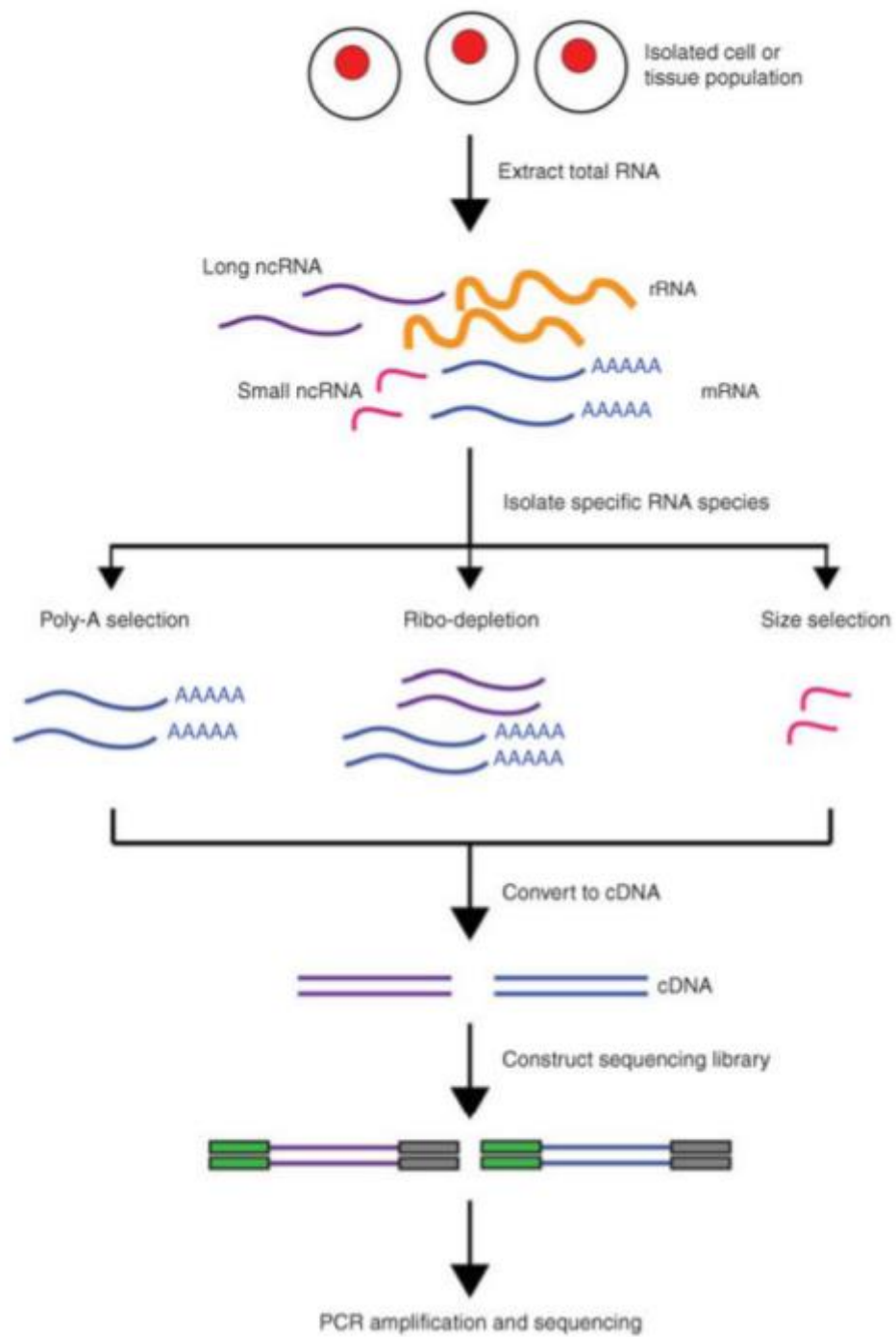
Типы РНК в клетке

- **Тотальная РНК**
- **полиА**
- **Без фракции рРНК**
- **По размеру:**
 - Малые РНК:
 - микроРНК
 - малые ядерные РНК
 - малые ядрышковые РНК
 - малые интерферирующие РНК
 - пиРНК
 - «Длинные» РНК:
 - мРНК
 - длинные некодирующие РНК
- **По внутриклеточной локализации:**
 - Ядерные
 - Цитоплазматические
- ...

Процесс

1. Подготовка нужной фракции РНК
2. Проверка качества РНК
3. Обратная транскрипция => кДНК
4. Фрагментация (~ 200-300 нк)
5. Секвенирование (чем глубже, тем лучше)

Технические реплики – повторный анализ одного и того же образца
Биологические реплики – повторное взятие образца и анализ



Цепь-специфичные библиотеки

При секвенировании сохраняем информацию о том, с какой цепи ДНК шла транскрипция

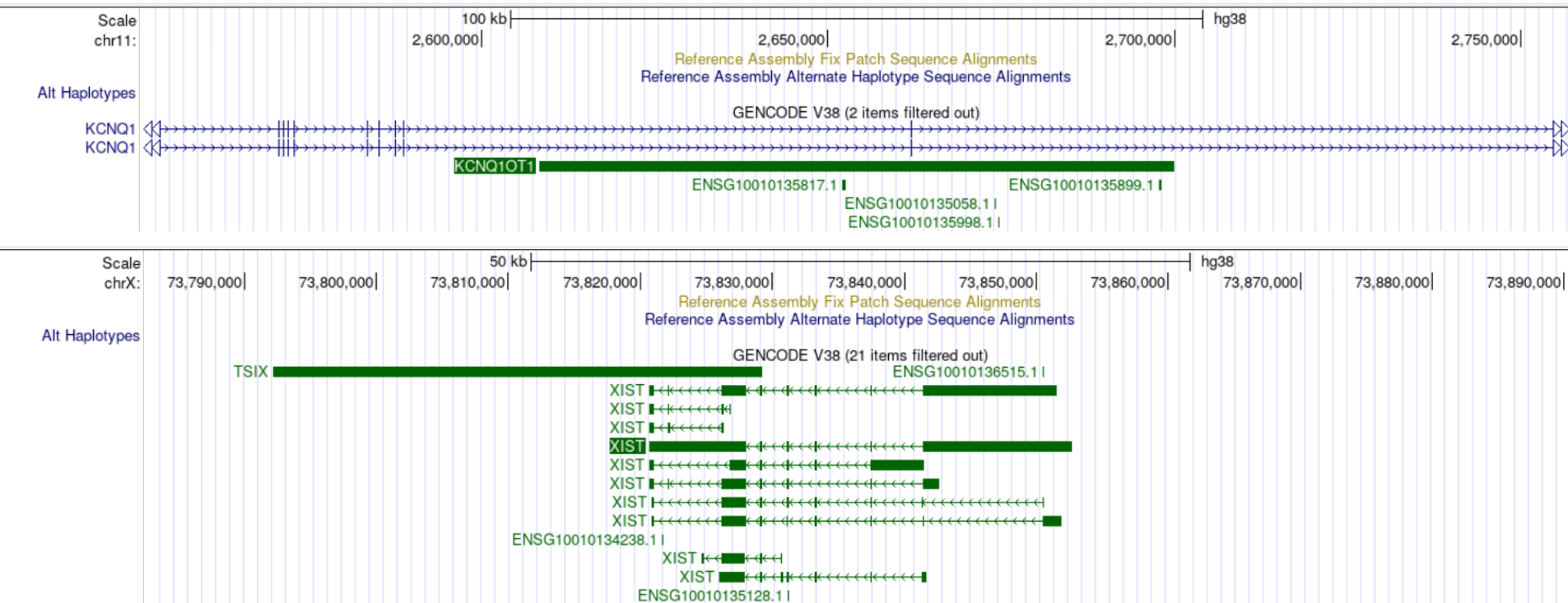
ЗАЧЕМ?

Цепь-специфичные библиотеки

При секвенировании сохраняем информацию о том, с какой цепи ДНК шла транскрипция

ЗАЧЕМ?

МУЛЬТИК

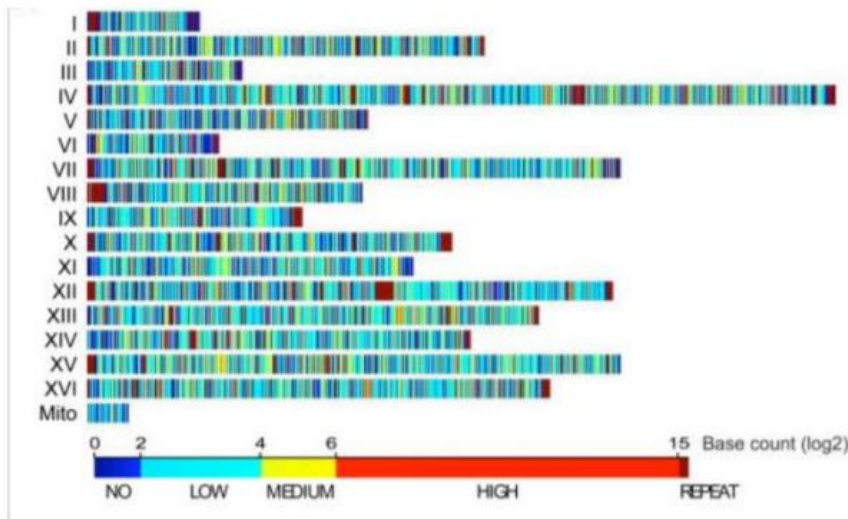


Задачи

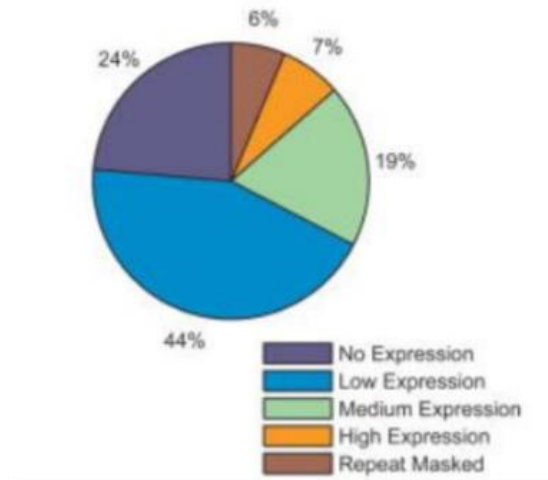
1. Определение концентрации РНК
2. Сравнение уровня экспрессии одного гена в разных образцах
3. Выявление однонуклеотидных полиморфизмов
4. Детекция мест сплайсинга, а также исследование альтернативного сплайсинга
5. Поиск некодирующих РНК
6. Редактирование РНК
7. Анализ транскриптомов единичной клетки

Анализ транскриптомов

Первые работы по секвенированию транскриптомов появились в 2008 году

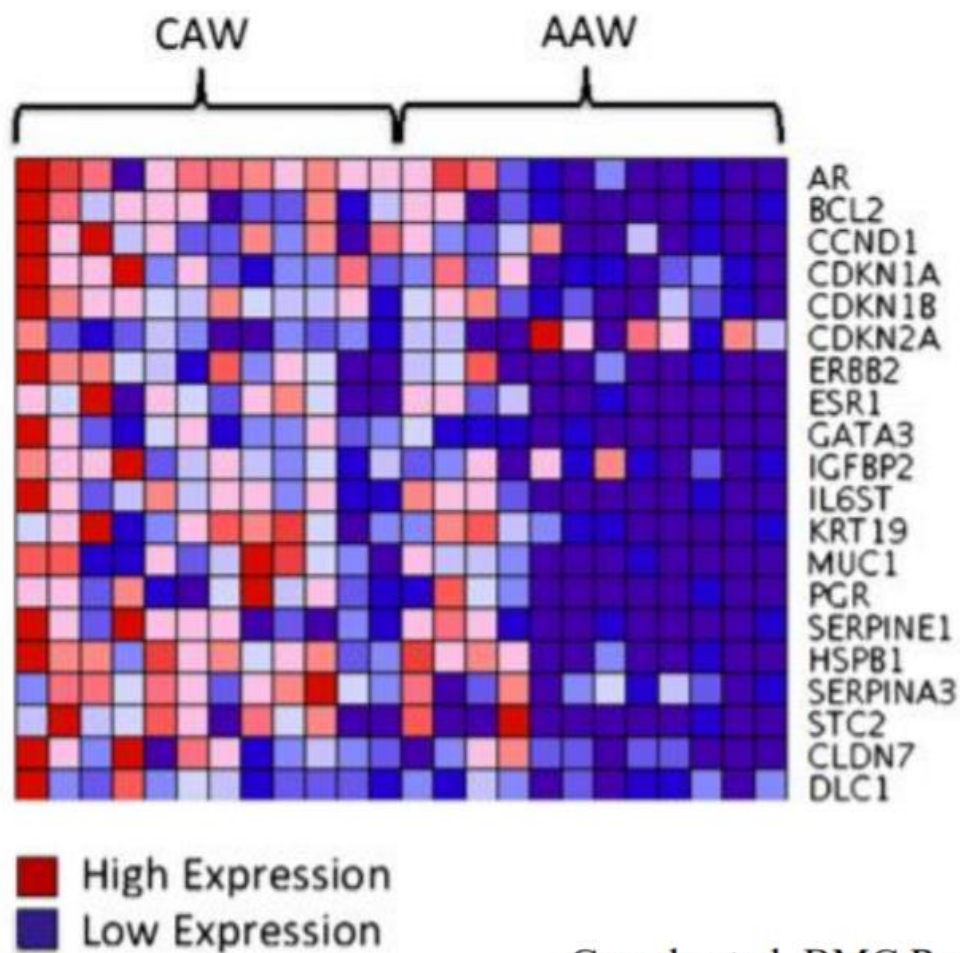


дрожжи



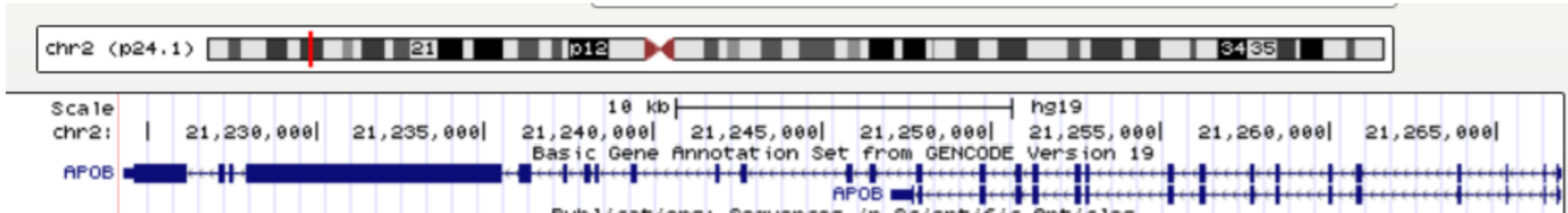
Science. 2008 Jun 6; 320(5881): 1344–1349.

Дифференциальная экспрессия



Grunda et al. BMC Research Notes 2012, 5:248

Альтернативный сплайсинг

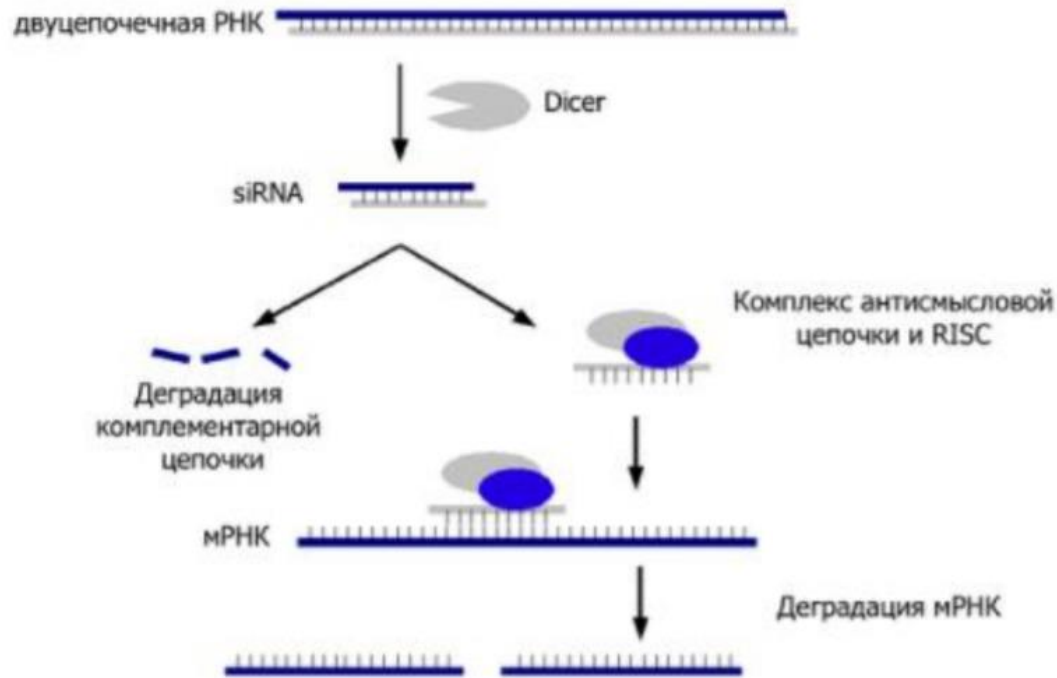


АпоВ-100 – длинный транскрипт – синтезируется в печени.

АпоВ-48 – короткий транскрипт – синтезируется в кишечнике.

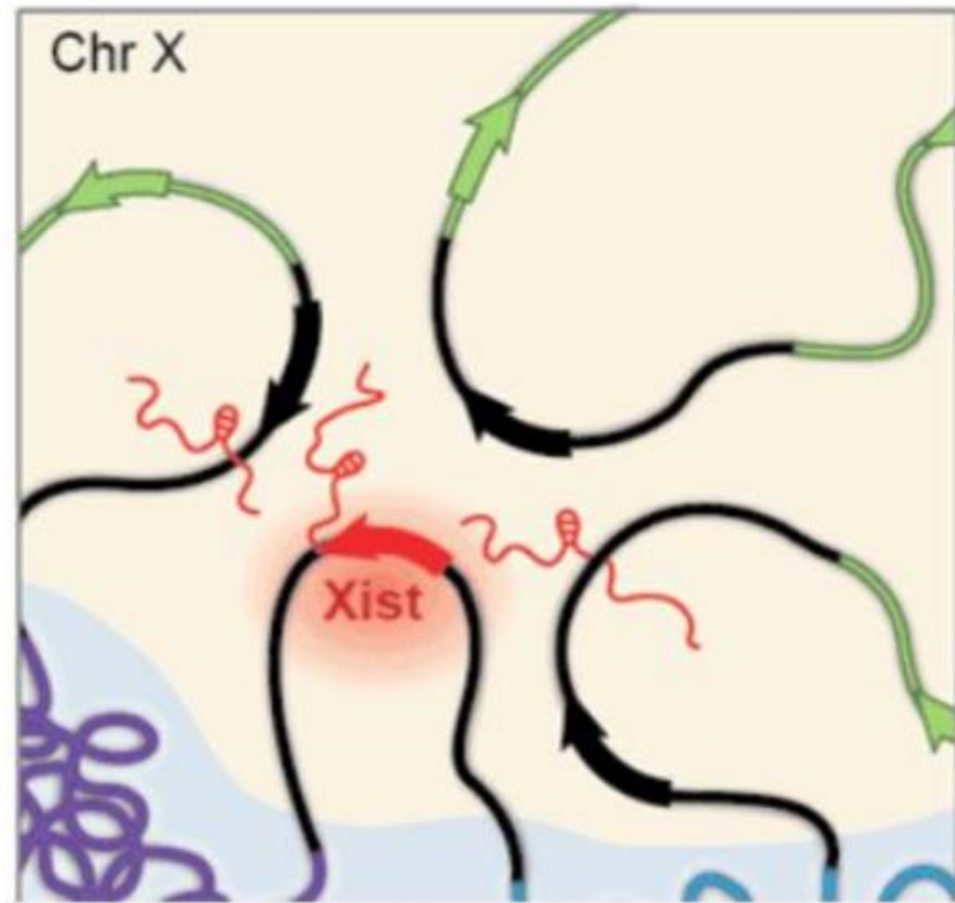
Синтезирующиеся белки входят в состав разных групп липопротеинов, которые в последующем идут каждый своим путем метаболизма

Некодирующие РНК

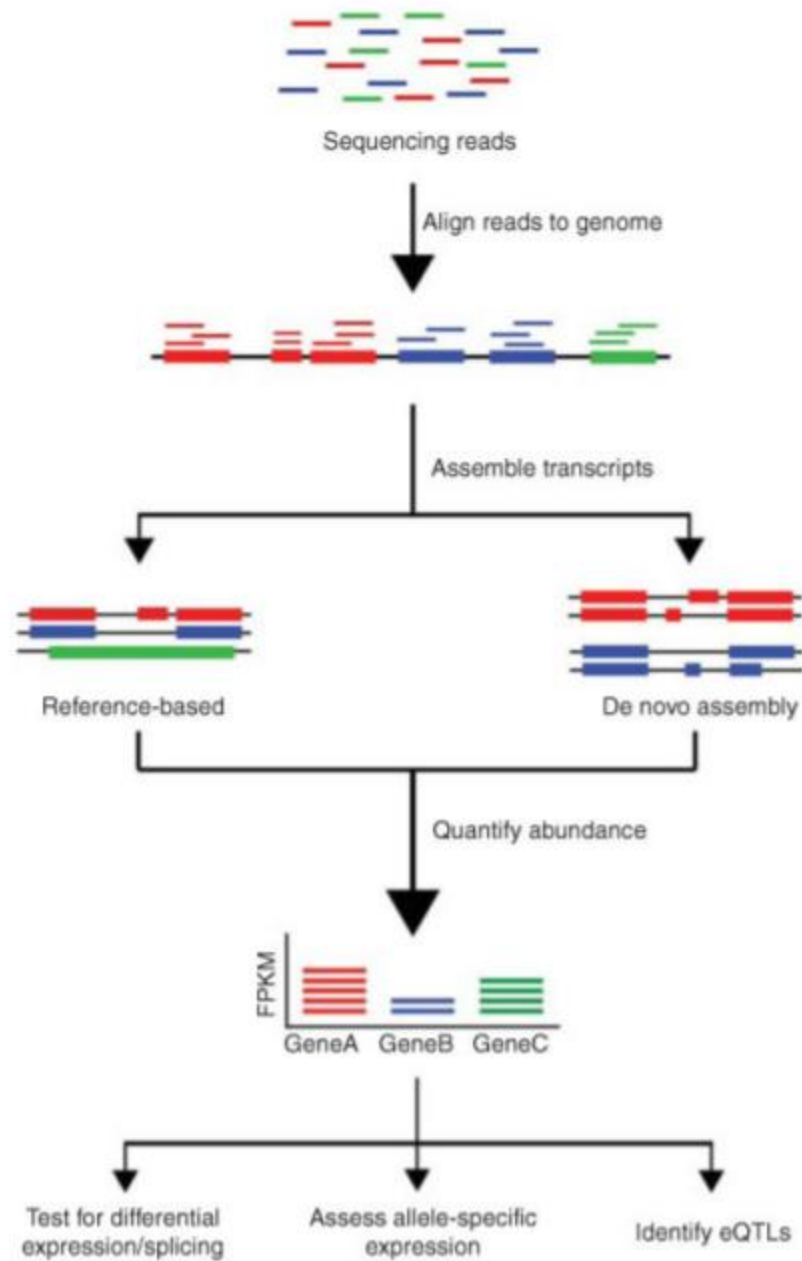


За открытие механизма РНК-интерференции в 2006 году присуждена Нобелевская премия по медицине

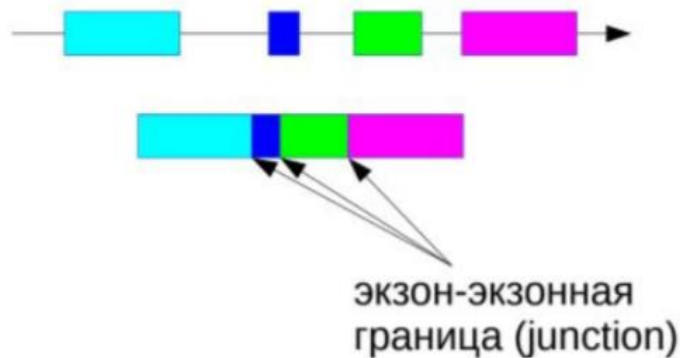
Некодирующие РНК



Science, 2013



Картирование

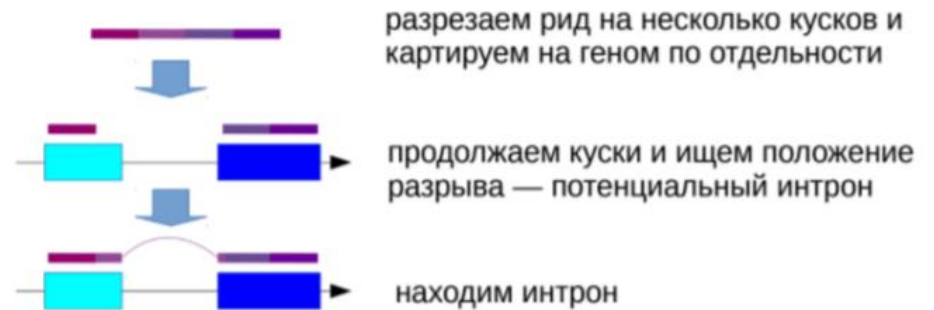


Использование аннотации:

- Только аннотированные экзон-экзонные границы
- Все возможные экзон-экзонные границы



Предсказание аннотации из данных:

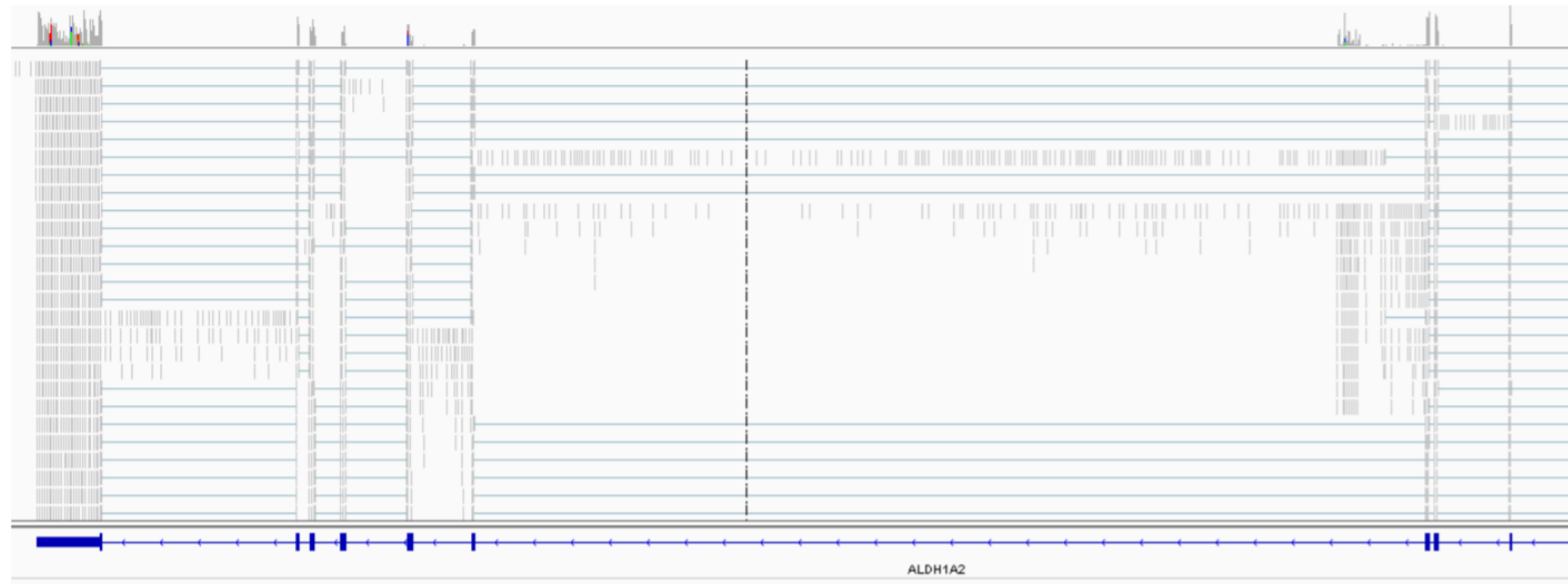


Индексирование генома

1. Аналогично задаче картирования экзомного секвенирования
2. Индексирование с учетом разметки (.gtf)
 - Экстракция из аннотации экзонов
 - Экстракция из аннотации сайтов сплайсинга
 - Индексирование с использованием списка экзонов и сайтов сплайсинга

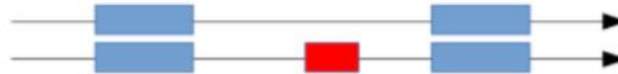
hisat2

IGV

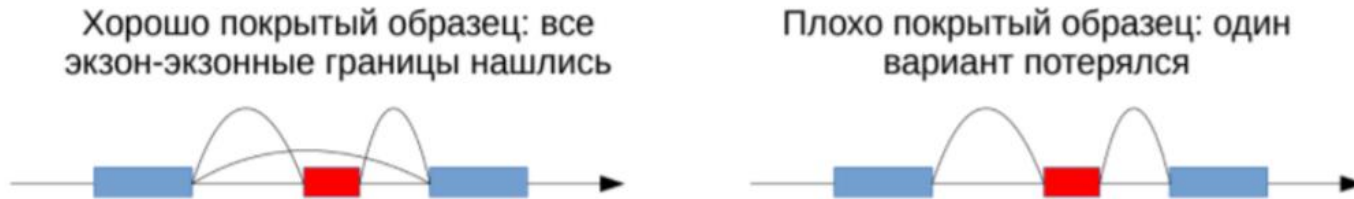


Глубина покрытия важна

В клетке присутствуют 2 варианта транскриптов одного гена:



Секвенировали два образца: один получился с хорошим покрытием, другой – с плохим
Видим:



Дифференциальный альтернативный сплайсинг?
Дифференциальная экспрессия?

Нужно нормировать на размер библиотеки и оценивать нормировочные коэффициенты!

