

Жоспар

I. Кіріспе

II. Негізгі бөлім

Трансгендік ағзалар, фармацевтияда және медицинада қолданылуы

Молекулалық-биологиялық зерттеу әдістері және олардың медицина үшін маңызы

Молекулалық-генетикалық әдістер (ДНҚ технологиялар)

ДНҚ-диагностикасының тура және көлденең әдістері

Қорытынды

Пайдаланылған әдебиеттер

Трансгендік ағзалар, фармацевтикада және медицинада қолданылуы

Кез-келген ауруларды тиімді емдеу үшін оларды дұрыс анықтау (диагностика) қажет. Соңғы уақытқа, яғни ХХ ғасырдың 40-50 жылдарына дейін адам ауруларын анықтауда (диагностика) клиникалық анықтау (диагностика) шешуші рөл атқарып келді. Себебі, тұқым қуалайтын патологиялардың көпшілігі ерекше фенотип күйінде байқалып, клиникалық зерттеулер нәтижесінде оларды оп-оңай анықтауға мүмкін болды. Дегенмен, тұқым қуалаушылық аурулардың кең көлемді полиморфизмі, олардың фенотиптерінің болуы, әртүрлі аурулар симптомдарының ұқсас болып келуі (тұқым-қуалайтын және тұқым қуаламайтын), гетерозиготалы тасымалдаушыларды анықтау қажеттілігі т.б. клиникалық анықтаумен қатар лабораториялық анықтау (диагностика) әдістерін қолдануды талап етуде.

Тұқым қуалайтын ауруларды лабораториялық әдістер арқылы анықтау (диагностика) осыдан 100 жыл бұрын қолданыла бастады, бірақ ХХ ғ. 50-жылдарына дейін бұл әдістер сирек және кейбір ауруларды анықтау (диагностика) үшін ғана қолданылып келді. Бұл әдістерді алғашқылардың бірі болып ХХ ғасырдың басында А. Гэррод қолданған, яғни ол адамның алкаптоурия ауруының себебі— заттар алмасуында ферменттік реакциялардың бұзылуы екендігін көрсетті.

Адам ауруларын анықтауда (диагностика) лабораториялық әдістерді кең көлемде қолдану ХХ ғ. 50 жылдарынан кейін ғана жүзеге асты. Бұл тек қана лабораториялық анықтау (диагностика) әдістерінің жетістіктеріне ғана байланысты емес, сол сияқты осы кезде ғалымдардың тұқым қуалайтын патологияларға деген қызығушылығының өсуіне де байланысты болды.

Сонымен, адам генетикасы және медициналық генетика, қазіргі кезде көптеген лабораториялық зерттеу әдістерін (биохимиялық, иммунологиялық, молекулалық биологиялық) қолданады.

Тұқым қуалаушылық ауруларды лабораториялық әдістер арқылы анықтау (диагностика) аурудың 3 кезеңінің бірін идентификациялауға бағытталады. Біріншіден тұқым қуалайтын патология себебін анықтау, яғни нақтылы мутацияларды (гендік, хромосомалық, геномдық) анықтау. Бұған цитогенетикалық не молекулалық-генетикалық әдістер арқылы қол жеткізуге болады.

Екіншіден — лабораториялық әдістер (биохимиялық, иммунологиялық) геннің алғашқы өнімін (ақуыз) зерттеуге мүмкіндік береді.

Үшіншіден-мутацияның патологиялық әрекеті негізінде түзілетін арнайы метаболиттерді анықтауға мүмкіндік береді.

Молекулалық-биологиялық зерттеу әдістері және олардың медицина үшін маңызы

Цитогенетикалық әдістердің мәні-микроскоп арқылы адам хромосомаларын зерттеу болып табылады. Бұл әдіс ХІХ ғ. аяғынан қолданылып келеді.

Цитогенетикалық әдістер арқылы-хромосома санының не жеке хромосомалардың құрылымын жарық микроскоп арқылы зерттейді.

Цитогенетикалық зерттеулер объекті бөлінуші (митоз, мейоз) не интерфазалық жасушалар болып табылады.

Молекулалық — цитогенетикалық әдістер-хромосомларды зерттеудегі жаңа әдіс болып саналады, оны-флюоресцентті будандастыру (габридтеу) (FISH) деп атайды. Бұл әдіс бірнеше сатылардан тұрады:

- 1) Алғаш зерттелінетін хромосомамен не оның бір учаскесімен будандасатын ДНҚ-зонд дайындалады. ДНҚ-зонд-биотин не дигоксигенин жалғанған ДНҚ-ның бір тізбегі болып табылады.
- 2) Микроскопиялық препараттағы хромосома ДНҚ-сын сілті ерітіндісімен өндеп, оны денатурациялайды, яғни ДНҚ жіпшелері арасындағы сутектік байланыстарды үзеді де ДНҚ жіпшелерін бір-бірінен ажырастырады.
- 3) Препаратқа ДНҚ-зондты енгізеді. Осы кезде ДНҚ-зонд нуклеотидтері зерттелетін хромосоманың ДНҚ тізбегіндегі нуклеотидтермен комплиментарлық байланысады, яғни ДНҚ ренатурацияланады.
- 4) Осыдан кейін препараттағы биотин не дигоксигенинді олармен таңдамалы қосылатын затпен (биотин үшін-стрептовидин, дигоксигенин үшін-антидигоксигенин) әрекеттестіреді, содан кейін бұл заттарға 1-2 кезеңмен флюоросцентті бояуларды (қызыл түсті бояу-родамин, жасыл түсті-изотиоцианат флюоресцин) қосады.
- 5) Люминесцентті микроскоп арқылы боялмаған хромосомалар арасынан боялған хромосомаларды айқын көріп, бақылауға, өрі қарай зерттеуге болады.

FISH әдісі арқылы геннің орналасу орнын анықтаудан бастап бірнеше хромосомралық күрделі қайтақұрылымдарды ажыратуға мүмкін болады.

FISH әдісі анеуплоидияларды анықтау үшін де қолданылады.

Молекулалық-генетикалық әдістер (ДНҚ технологиялар)

Молекулалық-генегакалық әдістер зертгелінетін ДНҚ молекуласының нақтылы учаскесінің (аллель, ген) құрылымының ерекшеліктерін анықтауға бағытталған зерттеу әдістері болып табылады. Бұл әдістер ДНҚ және РНҚ молекулаларын тәжірибелік зерттеулерге негізделінеді. Қазіргі кезде молекулалық биология, генетика жетістіктері, адам геномын зерттеулер, молекулалық-генетикалық әдістерін медицина практикасында кеңінен қолдануға мүмкіңік туғызды.

Молекулалық-генетикалық әдістерінің негізгі кезеңдері мен нұсқаларының сипаттамасы келтірілген:

- 1) **ДНҚ (РНҚ) үлгісін** алу-жасушадағы ДНҚ-молекуласын бөліп алу не полимеразалық тізбектік реакция (ПТР) арқылы жинақтау.

ДНҚ молекуласын кез-келген ядролы жасушалардан бөліп алуға болады. Ол ағзаның біртұтас геномы болғандықтан оны геномдық ДНҚ деп атайды.

Әдетте, ДНҚ молекуласын лейкоцитгерден, хорион жасушаларынан, амнион сұйықтығының жасушаларынан, фибробласт культурасынан бөліп алады. Бір рет талдау жасау үшін бірнеше нанограммнан бірнеше микрограммға дейін ДНҚ қажет. Бұл үшін 20-40 мг. хорион, 1 мл қан, 5-10 мг қолдан өсірілген жасушалар қажет. Ауруларды дұрыс анықтау (диагностика), не гетерозиготалық күйін анықтау, үшін геномның кішкентай фрагментін зерттеудің өзі жеткілікті, тек осындай фрагменттерді жеткідікті мөлшерде көшірмелеп көбейту (амплификация) қажет. Бұрын бұл проблеманы шешу әжептеуір қиын болатын, яғни ол бірнеше саты арқылы жүргізілетін: рекомбинантты плазмида құрастыру оны бактерия жасушасына енгізу бактерияны көбейту ДНҚ фрагменттерін бөліп алу. Қазіргі кезде қажетті ДНҚ фрагменттерін жинақтау лолимеразалық **тізбекті реакциялар (ПТР)** арқылы жеп-жеңіл жүзеге асады. Бұл реакцияны 1983 ж. америкалық зерттеушісі К.Мюллис ашқан және оның ашылуы тұқым қуалаушылық ауруларды молекулалық-генетикалық зерттеулер арқылы анықтауда, адам геномын зерттеуде, революция жасады десе болады.

2) **Полимеразалық тізбекті реакциялар (ПТР)** - ДНҚ-ны амплификациялау, яғни көшірмелеп көбейту больш табылады. Бірнеше сағат ішінде ДНҚ-ның кез-келген бөлшектерін (бір генге дейін) миллиондаған дана күйінде көбейтуге мүмкіндік береді. ПТР жүргізу үшін көбейтілетін ДНҚ фрагментінің нуклеотидтер бірізділігін күні бұрын білу қажет.

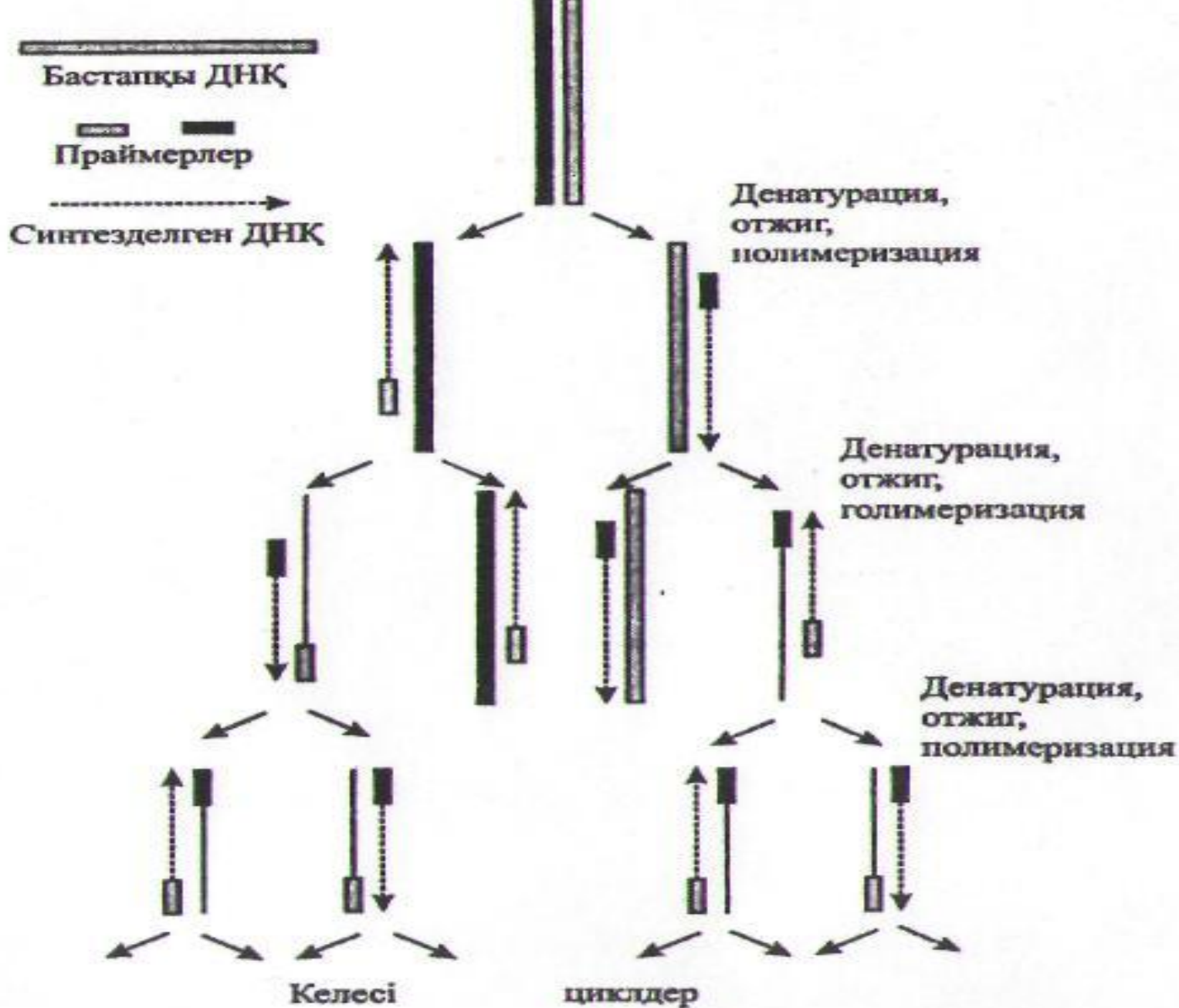
Зерттелетін ДНҚ учаскесінің 5'және 31 ұштарының нуклеотидтер бірізділігіне сәйкес 20-30 нуклеотидтен тұратын екі олигонуклеотидтік праймерлер (РНҚ -ұйытқы) синтезделінеді.

ДНҚ фрагментін амгошфикациялау үдерісі қайталанатын циклдардан тұрады. Әр бір цикл 3 сатыға бөлінеді:

- 1) Жылылықпен эсер етіп (94°) ДНҚ молекуласын жеке-жеке тізбектерге ыдырату (денатурациялау);
 - 2) бір тізбекті ДНҚ-ның негіздеріне комплиментарлы праймерлерді байланыстыру (отжиг) (37-68°);
 - 3) ДНҚ полимераза ферментінің қатынасуымен жаңа ДНҚ тізбегін синтездеу (72°) (1-сурет).
- 3) ДНҚ молекуласын фрагменттерге бөлшектеу (рестрикциялау)-рестриктазалар (бактерия эңдонуклеазасы) арқылы ДНҚ молекуласын ұзынды-қысқалы бөлшектерге (фрагмент) кесу. Рестриктазалар қос тізбекті ДНҚ молекуласының 4-6 нж нуклеотидтер бірізділігін танып кеседі де, фрагменттерге белшектейді.

Геномдық ДНҚ-молекуласын рестриктазалармен әрекеттестірсек ол ұзыңығы түрліше болып келетін бірнеше фрагменттерге кесіледі.

ДНҚ фрагменттерінің электрофорезі-рестриктазалар арқылы кесілген фрагменттер агрозды не полиакриламидті гель бетінде өлшемдеріне қарай түрліше таралып үлестіріледі, яғни молекула массасы үлкен фрагменттер баяу қозғалса, молекула массасы кіші -жеңіл фрагменттер тез қозғалады. Электрофорез аяқталған соң ДНҚ фрагменттері гель бетінде әртүрлі орындарда орналасады.



Полимеразалық тізбектік реакция. (Бочковтан, 2006)

ПТР-дан кейін ДНҚ фрагменттерін **визуальды** зерттейді, ол үшін агроздық гелде электрофорез жүргізеді. Содан кейін гельді этидий бромидімен өндейді. Этидий бромиді ДНҚ-мен байланысып, гель бетін ультракүлгін сәулесімен сәулелегенде, спектрдің қызыл учаскесінде жарқырау байқалады. Сол жарқыраулар зерттеуге қажет ДНҚ фрагменттері болып табылады.

Адам геномы өте үлкен болғандықтан (3,2 миллиард нуклеотидтер жұбы, яғни 190 см.) рестрикция нәтижесінде көптеген рестрикция фрагменттері түзіледі және электрофорезден кейін оларды этидий бромидімен бояғанда ультракүлгін спектрінде ДНҚ фракцияларының бәрі біркелкі боялады. Сондықтан, ДНҚ-ның ерекше фрагменттерін бөліп алып **зерттеу Саузеннің блот-гибридтеу** (будандастыру) әдісі арқылы жүргізіледі. Бұл әдіс төмендегі кезеңдерден тұрады (2-сурет):



- 1) Электрофорезден кейін гельді сілтілі ерітіндіге енгізеді, бұл кезде қос тізбекті **ДНҚ** молекуласы біртізбекті болып ыдырайды (яғни тізбектер арасыңағы сутектік байланыс үзіледі);
- 2) ДНҚ фрагменттерін буферлік ерітінді көмегімен нитроцеллюлозалы не нейтронды фильтрге ауыстыру. Ол үшін гель бетін фильтрмен және бір бума фильтрлеуші қағаздармен жабады. Капиллярлық эффект нәтижесінде гель бетіне перпендикуляр буферлік ерітінді ағыны пайда болады. Гельден бөлініп шыққан ДНҚ фрагменттерінің бәрі фильтрде ұсталынып қалады. ДНҚ фрагменттерінің фильтрде орналасу реті олардың гелдегі орналасуына дәлме-дәл болады.
- 3) Қажет фрагменттерді визуальды табу үшін (фильтрде ұсталынып қалған ДНҚ фрагменттері көзге көрінбейді) ДНҚ фрагменттерін радионуклид не флюоресценттік таңбамен таңбаланған синтетикалық олигонуклеотидтік зоңц бірізділігімен гибридтейді (будандастырады). Әрбір зоңц 16-30 жүп негіздерден тұрады. Зонд нуклеотидтерінің бірізділігі зерттелуші геномдық ДНҚ фрагментімен толық не ішінара комплиментарлы болуы қажет.
- 4) таңбаланған зонды бар ерітіндімен фильтрді әрекеттестіргенде ДНҚ фрагменттерімен ДНҚ-зонд тізбектері комплиментарлы гибридтелінеді (будандасады). Радиоактивтік таңбамен таңбаланған будан учаскелерін рентгенмен зерттегенде (ауторадиография) зерттелуші ДНҚ фрагменттері айқын байқалады.

ДНҚ-диагностикасының тура және көлденең әдістері

ДНҚ-диагностика әдістерін ауру диагнозын растау үшін, ауру симптомдары клиникалық байқалғанға дейін, туылғанға дейін құрсақтағы бала ауруларын анықтау үшін жүргізеді. Моногендік тұқым қуалайтын аурулардың **тура және көлденең ДНҚ-диагностика** деп аталатын әдістері белгілі.

Тура ДНҚ-диагностика әдістерін ауру гені клонданған, оның экзон-интрондық құрылысы белгілі болған жағдайларда жүргізеді. Тура ДНҚ-диагностика әдістерінде ген мутациялары зерттелінеді. Егер ауру гені клонданбаған болса, не ауру генетикалық гетерогенді күйде болатын болса, тура ДНҚ-диагностика әдістерін қолдануға болмайды. Бұл жағдайларда **көлденең ДНҚ-диагностика** әдістері қолданылады.

Мутацияларды диагностикалаудың тура әдістері. Қазіргі кезде ДНҚ-диагностикасының 2 әдісі қолданылады: **белгілі мутацияларды детекциялау әдістері; мутациялық скрининг әдістері.**

Белгілі мутацияларды детекциялау әдістері. Егер мутациялар белгілі болса, онда оларды фермент-рестриктазалар арқылы кесіп рестрикциялық талдау не ДНҚ-гибридизация (будандастыру) арқылы табуға болады.

Рестрикциялық талдау-мутацияларды тікелей детекциялаудың қарапайым әдісі болып табылады. Бұл кезде рестрикциялық эндонуклеазалар (бактерия ферменттері) арқылы қостізбекті ДНҚ молекуласын 4-8 нуклеотидтер аралығында кеседі. Мутантты ДНҚ -молекуласын осылайша кескенде ұзындығы қалыпты жағдайдағышан ерекше фрагменттер пайда болады, оларды электрофореграмма арқылы оп-оңай табуға болады.

Аллельспецификалық ПТР-нүктелі мутацияларды (шағын делекциялар, инсерциялар) табу үшін жүргізіледі. ПТР-ДНҚ молекуласының кез-келген бірізділігін миллиондаған рет көбейтуге мүмкіндік береді, содан кейін сол көбейтілген учаскелердегі мутацияларды табу үшін оларды талдап зерттейді.

Мутациялық скрининг әдістері. Егер мутация сипаты белгісіз, бірақ аурудың клиникалық көрінісі қандай гендә мутация пайда болғанын болжамдауға мүмкіндік беретін болса, онда мутациялық скрининг әдістерін қолданады.

Олардың түрлері:

- 1) Саузерннің блот—гибридизация әдісі арқылы қайтақұрылымдарды талдау;
 - 2) бір-тізбекті ДНҚ молекуласының конформация полиморфизмін талдау;
 - 3) денатурант градиентінде қос тізбекті ДНҚ электрофорезі;
- 4) гетеродуплексті талдау т.б. (Мутацияларды талдаудың ақырғы кезеңі-оларды секвендеу болып табылады, яғни электрофорезде аномальды қозғалатын ДНҚ фрагментінің нуклеотидтер бірізділігін анықтау. Осы фрагменттің нуклеотидтер бірізділігін қалыпты фрагментпен салыстырады да, патологиялық сипатын анықтайды.
- Секвендеу әдісі арқылы кез-келген мутация типтерін анықтауға болады.
- Секвендеу күні бұрын бөлініп алынған, клоңқанған, тестіленген ДНҚ молекуласын не оның бір фрагментін молекулалық талдаудың ең соңғы кезеңі болып табылады.
- Секвендеу-ДНҚ молекуласының не оның бір фрагментінің нуклеотидтік бірізділігін анықтау болып табылады.
- Секвендеудің екі әдісі белгілі: Максам-Гилберт әдісі және Сангер әдісі.
- Максам-Гильберт әдісі-химиялық жолмен ДНҚ молекуласын бір-бірлеп нуклеотидтерге ыдыратуға негізделген. Бұл өте ұзаққа созылатын және қымбат әдіс.
- Сангер әдісі-қарапайым және арзан, сондықтан оны жиі қолданады. Бұл әдіс зерттелуші ДНҚ тізбегінің синтезін белгілі бір азоттық негізге жеткенде дидезоксинуклеотидті енгізу арқылы тоқтатуға негізделінеді.
- Дидезоксинуклеотидтің қант қалдығы сақинасында гидроксиль тобы болмайды, сондықтан ол келесі нуклеотидпен фосфодиэфирлік байланыс қалыптастыра алмайды.
- Секвендеу үшін-секвендеуші праймер, төрт түрлі дезоксинуклеотидтер -дАТФ, дЦТФ, дГТФ, дТТФ жиынтығы құйылған 4 пробирка, олардың біреуінде ютоппен таңбаланған дидезоксинуклеотидтер (ддАТФ, ддЦТФ, ддГТФ, ддТТФ) жиынтығы болуы қажет және ДНҚ-полимераза қажет.
- Бұл әдіс бірнеше кезендерді қамтиды:
- 1) зерттелетін ДНҚ фрагментін праймермен гибридтеу;
 - 2) ферменттік ДНҚ синтезі;
- 3) синтезделген өнімді формамидпен денатурациялау нәтижесінде ұзындығы әртүрлі болатын олигонуклеотидтік бірізділік пайда болады;
- 4) 4 жолақты полиакриламидтік гельде электрофарез жүргізу;
 - 5) зерттеу нәтижелерін радиоавтоірафта талдау.
- Көптеген радиоавтографтарда 250-350 нж. сай келетін 250-350 жолақтарды ажыратуға болады.
- Осылайша, синтезделген фрагменттер өлшеміне қарай дезоксинуклеотидтердің орналасу орындарын және ДНҚ молекуласын-дағы нуклеотидтер ретін анықтауға болады.

Пайдаланылған әдебиеттер

Сәтбай Әбилаев., «Молекулалық
биология және генетика» Шымкент.,
2008ж

Иванов В.И. Генетика, М, 2003ж

Мушкамбаров Н.Н., Молекулярная
биология, М, 2003ж.