

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

Выполнил: студент 2 курса

Группы СТО17/201-3

Прохорова к.с.

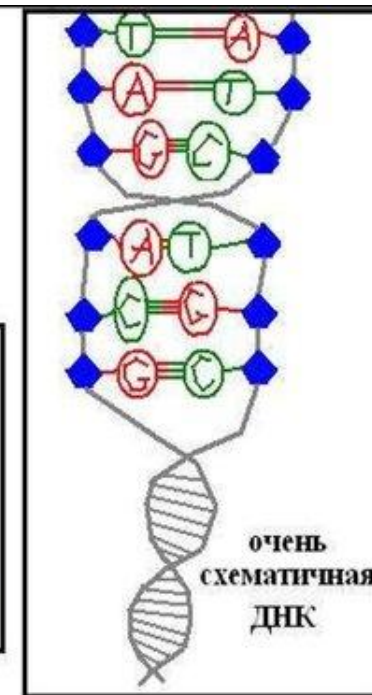
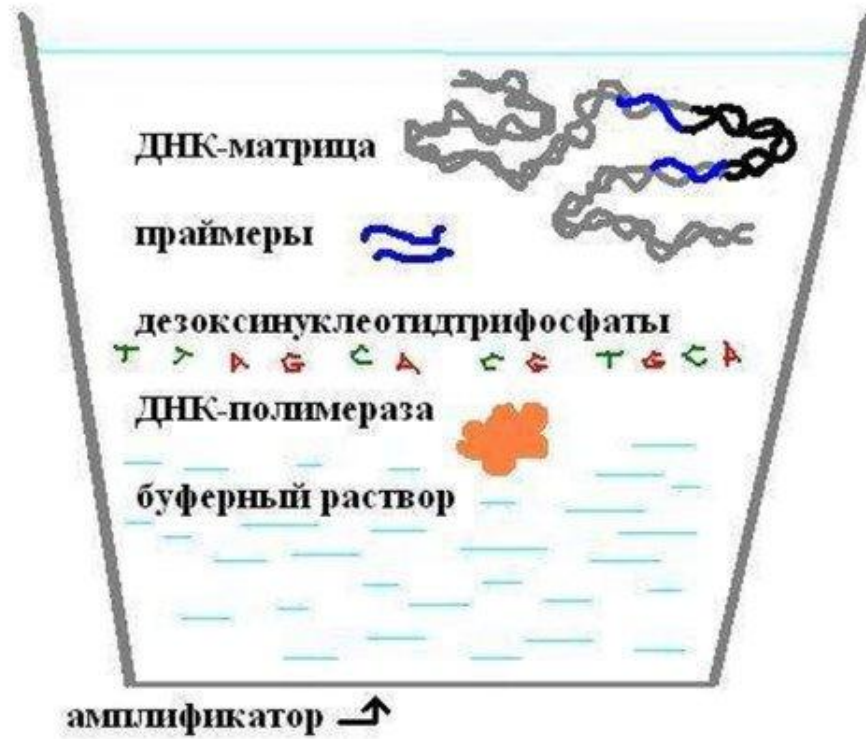
Метод ПЦР позволяет тестировать состояния генов у отдельных индивидуумов. Его суть заключается в избирательном копировании *in vitro* небольшого фрагмента гена, в котором предположительно может быть локализована мутация, с использованием в качестве матрицы *геномной ДНК* обследуемого. Небольшие размеры копируемого (или амплифицируемого) фрагмента гена в сочетании с их огромным числом позволяют в дальнейшем использовать очень простые методы для анализа этого участка ДНК, выявления его особенностей у обследуемого пациента. Главными из этих методов являются электрофорез *амплифицированной ДНК*, ее окрашивание, разрезание специфическими ферментами – *рестриктазами*, и определение нуклеотидной последовательности этого фрагмента - секвенирование.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) или специфическая амплификация ДНК это избирательный синтез *in vitro* большого количества копий (порядка миллиона) небольшого фрагмента ДНК размером, обычно, в сотни нуклеотидов по матричной молекуле ДНК. Для проведения ПЦР необходимо искусственно синтезировать небольшие однонитевые молекулы ДНК размером от 15 до 30 нуклеотидов, комплементарные концам амплифицируемого фрагмента ДНК. Эти молекулы носят название *праймеры*. Они служат «затравкой» для синтеза ДНК и потому определяют его специфичность. ПЦР проводится в специальных одноразовых пробирках в очень небольшом объеме, не превышающем, обычно, 50 мкл. В этот объем определенного буфера добавляют матричную ДНК (ДНК обследуемого), два типа искусственно синтезированных на коммерческой основе праймеров, фермент комплементарного синтеза ДНК – термофильную ДНК-полимеразу, выделенную из термофильных бактерий и потому способную выдерживать высокие температуры, и 4 типа дезокситрифосфатов (dNTP), которые служат в качестве строительного материала для синтеза ДНК.

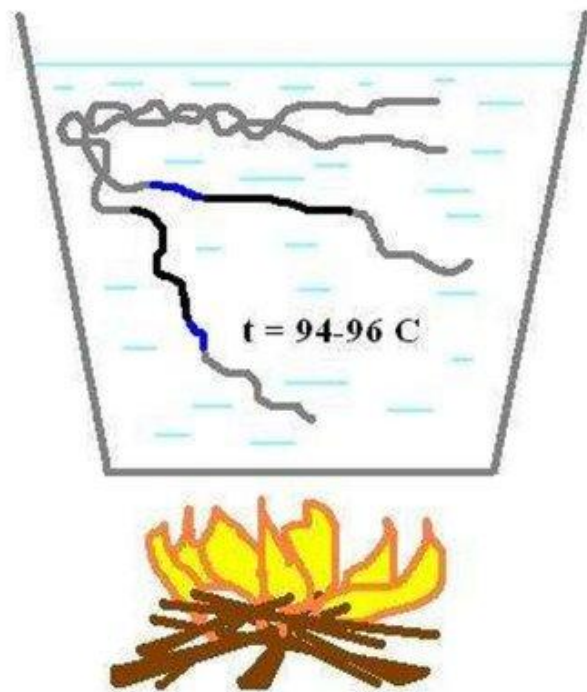
Компоненты реакции

- Для проведения ПЦР в простейшем случае требуются следующие компоненты:
- *ДНК-матрица*, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать.
- Два праймера, комплементарные противоположным концам разных цепей требуемого фрагмента ДНК.
- Термостабильная ДНК-полимераза — фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК. Полимераза для использования в ПЦР должна сохранять активность при высокой температуре длительное время, поэтому используют ферменты, выделенные из термофилов — *Thermus aquaticus* (Taq-полимераза), *Pyrococcus furiosus* (Pfu-полимераза), *Pyrococcus woesei* (Pwo-полимераза) и другие.
- Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).
- Ионы Mg^{2+} , необходимые для работы полимеразы.
- Буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции — pH, ионную силу раствора. Содержит соли, бычий сывороточный альбумин.

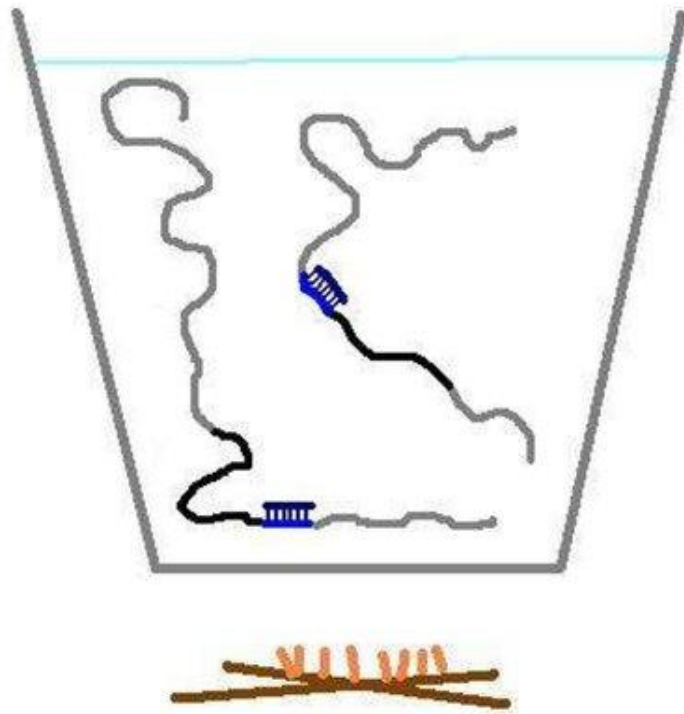


- Для того, чтобы выявить и размножить в имеющейся пробе именно ту последовательность ДНК, которая необходима, нужно знать нуклеотидные последовательности ее концов, для того, чтобы создать к ним комплементарные короткие (18-30 нуклеотидов) фрагменты - праймеры. На рисунке эти известные концы последовательности отмечены синим, а черным - тот фрагмент ДНК, который нужен.

Первая стадия - денатурация



Двухцепочечную ДНК-матрицу нагревают до 94—96 °С (или до 98 °С, если используется особенно термостабильная полимераза) на 0,5—2 мин., чтобы цепи ДНК разошлись.

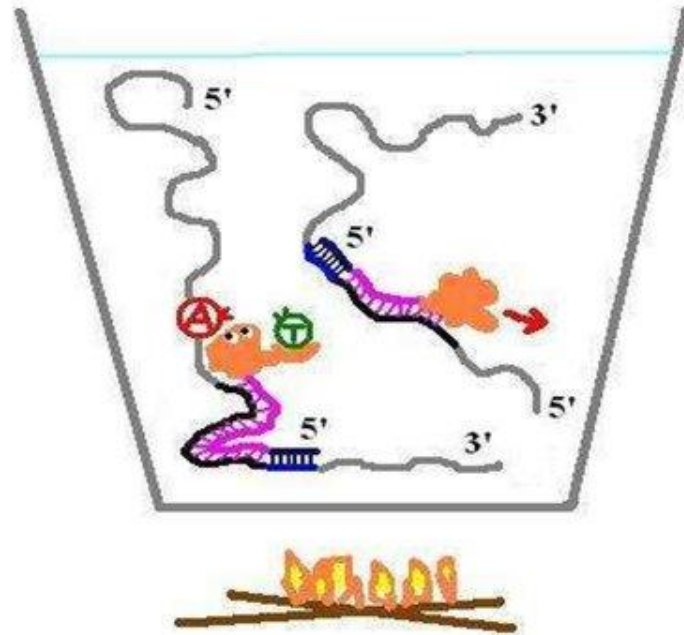


Вторая стадия - **ОТЖИГ.**

Температуру снижают, и праймеры соединяются. Когда цепи разошлись, температуру понижают, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей с комплементарными им участками ДНК. Эта стадия называется *отжигом*. Температура отжига зависит от состава праймеров и обычно выбирается на 4—5°C ниже их температуры плавления. Время стадии — 0,5—2 мин. Неправильный выбор температуры отжига приводит либо к плохому связыванию праймеров с матрицей (при завышенной температуре), либо к связыванию в неверном месте и появлению неспецифических продуктов (при заниженной температуре).

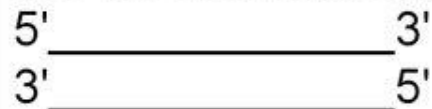
Главный элемент PCR - это многократный тепловой цикл, при котором образец ДНК подвергается воздействию трёх различных температур.

Третья стадия - элонгация

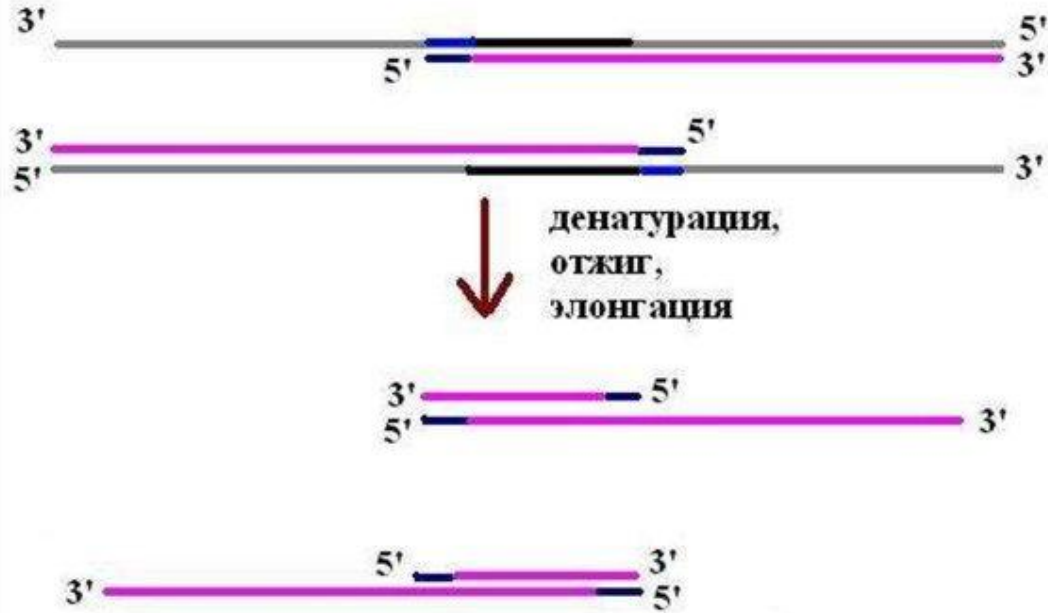


Часто используемые
полимеразы Taq и Pfu
наиболее активны при 72
°C

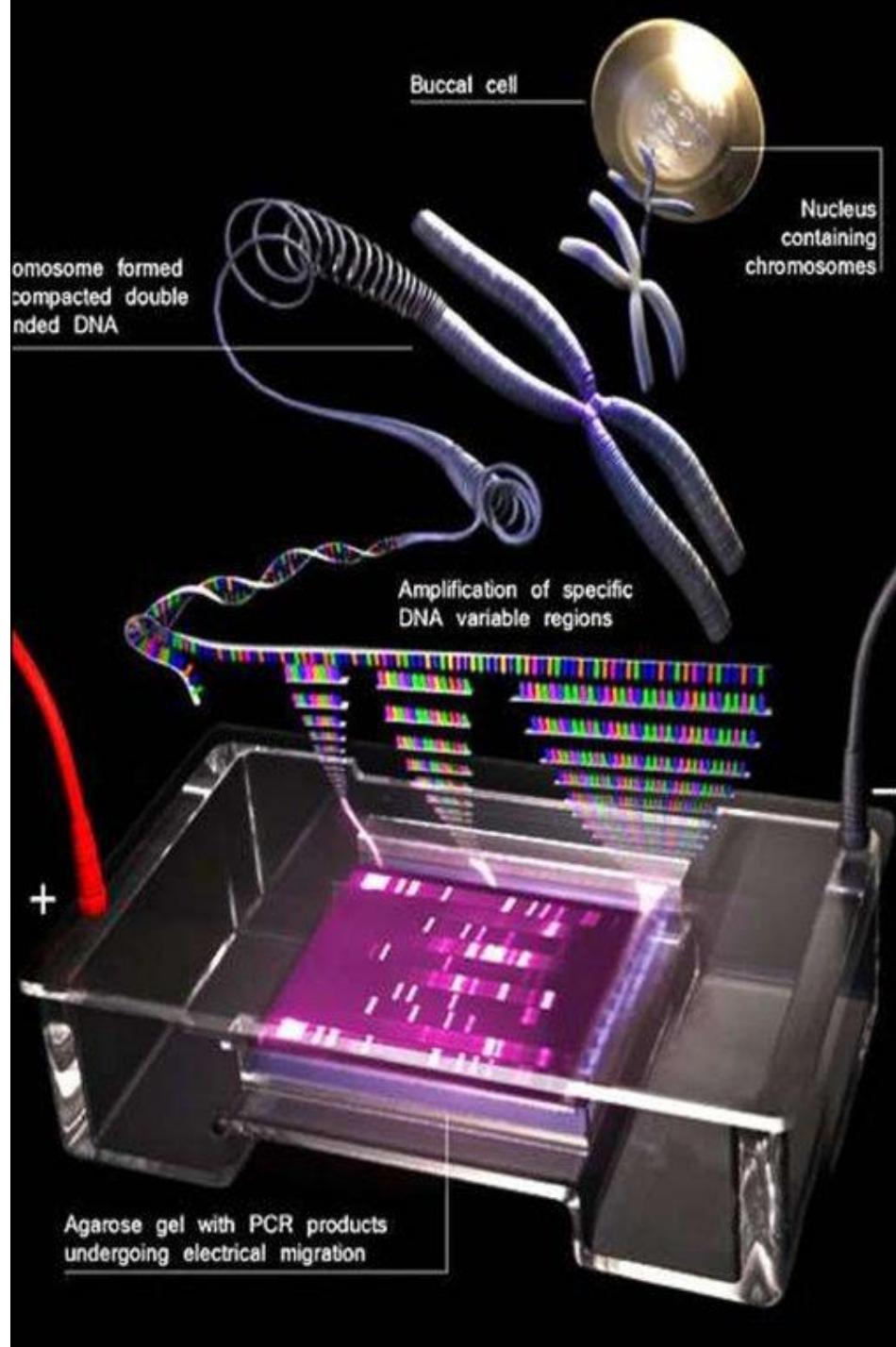
Полимераза - это фермент, умеющий достраивать вторую цепь ДНК. Для того, чтобы начать это делать, ей нужен кусочек, где ДНК уже двуцепочечная, в этом качестве и выступает место взаимодействия ДНК с праймером. Полимераза всегда достраивает цепь от 5' к 3'-концу (эти названия связаны с ориентацией сахара дезоксирибозы в цепи; в обычной двуцепочечной ДНК цепи направлены противоположно друг другу:



- Теперь в растворе есть четыре слишком длинных цепи ДНК. Две - те, которые были, и две построенные по праймерам. Но если повторить процесс ещё раз, то получится следующая картина:



Если изначальные цепи ДНК можно было считать условно бесконечными в обе стороны, то нити, полученные в первом цикле, бесконечны в одну сторону, а со второй ограничены праймером. Когда такие цепи будут взаимодействовать со вторым праймером, будут получаться кусочки, ограниченные с двух сторон. Всего в ПЦР проводят несколько десятков циклов, поэтому абсолютное большинство продукта реакции будет представлять собой короткие нужные последовательности, с которыми уже можно будет производить различные манипуляции, в простейшем случае - разгонять на хроматографе и сравнивать полученные полосы с теми, которые должны были бы получиться, если бы была уреаплазма или кто-то другой.



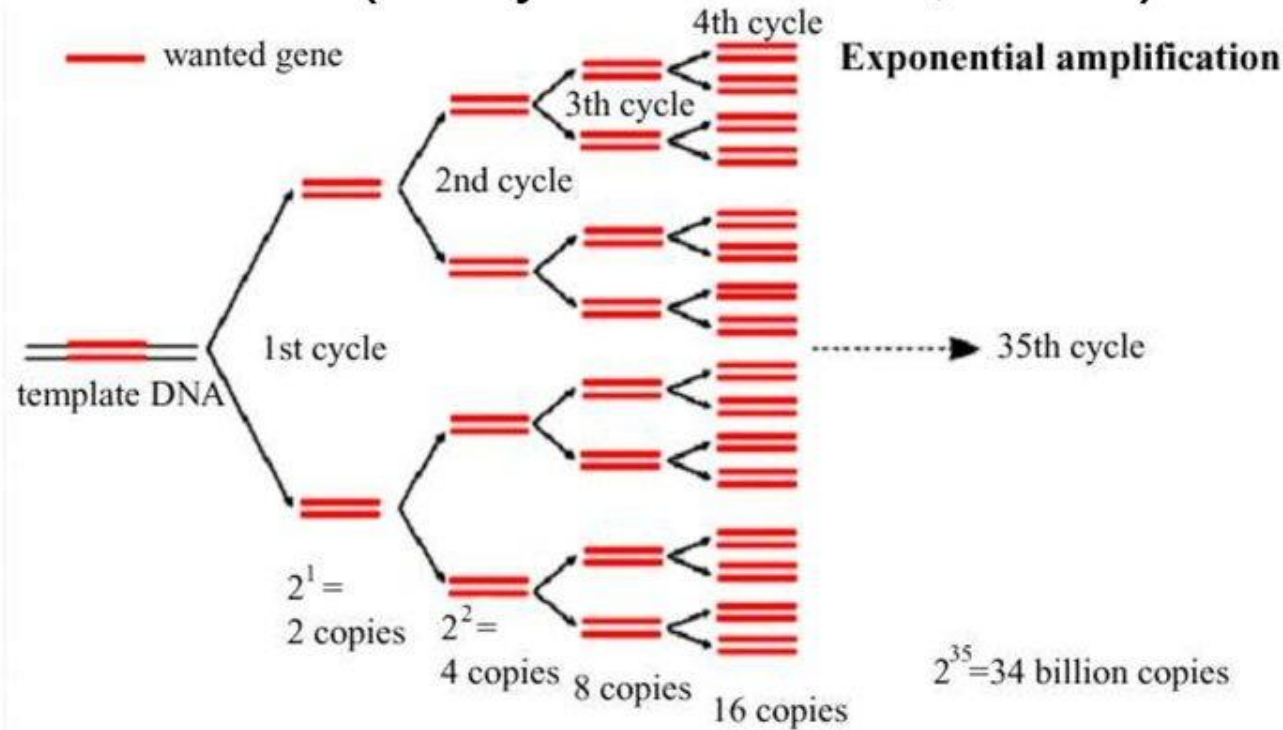
Четвертая стадия

- детекция.

- В начале у нас был раствор с небольшим количеством длинных, полноценных клеточных молекул ДНК.
- В конце ПЦР мы имеем раствор с огромным количеством размноженных нужных участков, кусочков ДНК
- Раствор наносят на гель, к гелю прикладывают напряжение. За часок-другой кусочки молекул ДНК (они имеют заряд) перемещаются в геле на расстояние, пропорциональное их массе.
- Гель кладут под ультрафиолет и масса одинаковых кусочков ДНК начинает светиться в том месте геля, где собралась.
- Если собралась — значит в ДНК был участок, соответствующий праймеру, нужный «ген». Если ничего не светится, мутная полоска без четкого участка — значит, нужного участка в ДНК нет.

Схема удвоения фрагментов ДНК в ПЦР

(Andy Vierstraete, 2001)



Для процесса амплификации необходимо, чтобы структура праймеров была идентична (комплементарна) участку исходной ДНК. Если этого не происходит (отсутствует специфическая ДНК), то удвоения ДНК не происходит. Если в растворе не окажется ни одной молекулы ДНК с участком, комплементарным внесенным праймерам, то реакция ПЦР не пойдет, даже несмотря на то, что в растворе будет плавать миллион других молекул ДНК. Этим и обусловлена высокая специфичность метода ПЦР.

Преимущества метода ПЦР

- 1. Универсальность.** При помощи ПЦР можно определять ДНК в любых биологических образцах. Причем это в равной степени относится как к ДНК микроорганизмов, так и к ДНК человека.
- 2. Высокая специфичность.** Специфичность определяется тем, что в ПЦР определяется уникальный участок гена, характерный только для данного возбудителя. Для повышения специфичности возможно определять несколько разных генов одного микроба. Так, например, для определения *Ureaplasma urealyticum* можно выявлять как ген 16S-RNA, так и ген уреазы. А для идентификации *Chlamydia trachomatis*, помимо определения хромосомальной ДНК и ДНК криптической плазмиды стало возможным выявлять рибосомальную РНК (NASBA). Это значительно повышает достоверность исследования.
- 3. Высокая чувствительность.** Полимеразная цепная реакция способна выявлять единичные копии ДНК. В среднем порог чувствительности большинства современных тест-систем составляет от 10 до 100 копий ДНК. Это значительно превышает чувствительность культуральных методов исследования.
- 4. Малый объем биологического материала.** Проведение анализа возможно в минимальном объеме пробы (до нескольких микролитров), что крайне важно в педиатрии, неонатологии, неврологии, судебной медицине.
- 5. Возможность диагностики не только острых, но и латентных инфекций.** Особенно эффективен метод ПЦР для диагностики трудно культивируемых, некультивируемых и персистирующих форм микроорганизмов, с которыми часто приходится сталкиваться при латентных и хронических инфекциях.

Недостатки метода ПЦР

- 1. Амплифицируется ДНК как живого, так и погибшего микроорганизма.** Это налагает определенные требования при использовании ПЦР для контроля эффективности лечения. В общем случае подобный контроль должен проводиться спустя промежуток времени, в течение которого происходит полная элиминация возбудителя. Однако, метод [NASBA](#) выявляет РНК только живых микроорганизмов и позволяет избежать этих ограничений.
- 2. Высокая чувствительность.** Ряд микроорганизмов (условно - патогенная флора, УПФ) в норме может существовать у человека в малом количестве. При помощи метода ПЦР определяются даже самые малые количества УПФ, даже при отсутствии патологии. Однако эта проблема решена с появлением метода количественного определения ДНК (Real-time PCR).
- 3. Различия при использовании разных тест систем.** Как говорилось выше, для амплификации можно использовать различные участки генома возбудителя. Однако в случае различных мутации микроорганизмов возможно изменение или утрата генов. Это приводит к разным результатам при использовании тест систем разных производителей.

Некоторые разновидности ПЦР

- 1. «Вложенная» ПЦР (Nested PCR) - есть вторая пара праймеров, которая амплифицирует кусочек полученного кусочка.
- 2. «Инвертированная» ПЦР (Inverse PCR) - перед проведением ПЦР с помощью серии ферментативных реакций как бы приклеивают известные фрагменты на концы неизвестного, чтобы можно было его амплифицировать.
- 3. ПЦР с обратной транскрипцией (Reverse Transcription PCR, RT-PCR) - берется РНК (молекула, которая является промежуточным этапом между ДНК и белками в живой клетке), а из нее с помощью фермента обратной транскриптазы получают ДНК, с которой уже проводят ПЦР. Это удобно, например, для того, чтобы выявить, какие именно гены в данной клетке экспрессируются.
- 4. Ассиметричная ПЦР (Assymetric PCR) - если нужны продукты амплификации преимущественно одной из двух цепей ДНК. Добавляют неравное количество праймеров.
- 5. Количественная ПЦР в реальном времени (Quantitative real-time PCR) - используются флуоресцентно меченые реагенты, и специальный прибор рассматривает пробирку, в которой идет реакция, и сообщает: "готово столько-то продукта! а теперь уже вдвое больше!"
- 6. ПЦР длинных фрагментов (Long-range PCR) - чтобы амплифицировать длинный (больше 10 тысяч пар оснований) фрагмент, используют ПЦР с двумя полимеразы: одна из них, Taq-полимераза, может синтезировать длинную цепь, а вторая, ДНК-полимераза с 3'5'-экзонуклеазной активностью, может исправить ошибки, допущенные первой.
- 7. Multiplex PCR - добавляют несколько пар праймеров и одновременно амплифицируют несколько фрагментов.

Электрофорез ДНК

Электрофорез ДНК принципиально не отличается от белкового электрофореза. Амплифицированную ДНК наносят на полиакриломидный или агарозный гель и включают ток. При этом начинается продвижение ДНК в геле от минуса к плюсу, и скорость этого продвижения зависит от длины молекулы и ее конфигурации. Через определенное время молекулы ДНК одинаковой длины сконцентрируются в узких зонах. Количество копий синтезированных в процессе проведения ПЦР ДНК, обычно, бывает достаточным для ее визуализации при использовании рутинного метода окрашивания ДНК этидиумом бромидом. При добавлении этого красителя к гелю полосы ДНК высвечиваются красным цветом при просмотре геля под ультрафиолетовой лампой.

Молекулярная диагностика точковых мутаций миссенс- или нонсенс-типа более сложна, так как длина амплифицированного фрагмента при этом не меняется. Наиболее распространенным методом диагностики таких мутаций является метод *рестрикционного анализа*. Этот метод может быть использован только в тех случаях, когда мутации случайным образом изменяют последовательности, специфичные для узнавания рестриктазами - эндонуклеазами, катализирующими разрезание двунитевых последовательностей ДНК в местах локализации этих специфических сайтов. При наличии в норме сайта рестрикции произойдет разрезание амплифицированного фрагмента и на электрофореграмме будет две полосы, соответствующие фрагментам ДНК, суммарная длина которых равна величине исходного амплифицированного фрагмента. Исчезновение сайта рестрикции в результате мутации приведет к тому, что у мутантных гомозигот разрезания амплифицированного фрагмента не произойдет и на электрофореграмме будет одна полоса, причем характер ее расположения будет аналогичен тому, который можно наблюдать после электрофореза до рестрикции. У гетерозигот выявятся все три полосы, одна из которых соответствует неразрезанному амплифицированному фрагменту, а две – продуктам рестрикции. В настоящее время идентифицировано более 500 различных рестриктаз, и для каждого из этих ферментов существует свой сайт узнавания.

Универсальным методом диагностики точковых мутаций является метод *аллель-специфических олигонуклеотидов (АСО)*. Этот метод основан на гибридизации амплифицированных ДНК со специфическими олигонуклеотидными ДНК-зондами. Он более трудоемок, так как требует синтеза и специфического мечения ДНК-зондов. Однако этот метод поддается автоматизации, и на его базе разрабатываются технологии, позволяющие одновременно тестировать десятки или даже сотни мутаций. При этом используются микрочиповые технологии, то есть меченные олигонуклеотиды в микроколичестве наносятся на твердые носители (чипы), а затем проводится их гибридизация с исследуемыми образцами ДНК.

Сходная технология – *«микроэррей»* – используется для анализа экспрессионного профиля генов, то есть множества генов, избирательно экспрессирующихся в специфических тканях или клетках, у пациентов с определенными патологическими состояниями, различающихся по возрасту, этнической принадлежности и другим параметрам. Техника *«микроэррей»* позволяет одновременно анализировать экспрессию десятков тысяч генов.

Секвенирование ДНК является самым объективным методом регистрации мутаций, при котором точно идентифицируется молекулярный характер повреждения. Однако в клинической практике этот метод используются редко в виду его трудоемкости и высокой стоимости.

Экспресс-методы — это быстрые предварительные методы изучения генетики человека. Они часто используются для исследования больших контингентов людей с целью выявления наследственной патологии как скрининг-методы, применяемые при проведении просеивающих программ. Например, скрининг новорожденных на фенилкетонурию, гипотиреоз, беременных на альфа-фетопротеин, при помощи которого можно пренатально определить у плода некоторые пороки развития (например, анэнцефалию, открытые формы спинномозговых грыж, синдром Дауна).

К этим методам предъявляются определенные требования:

- 1) метод должен быть диагностически значимым, то есть положительные и отрицательные результаты должны соответствовать наличию или отсутствию заболевания;
- 2) метод должен быть надежным: один и тот же образец при независимой двукратной проверке должен одинаково оцениваться;
- 3) исследованию должен подвергаться легкодоступный материал (кровь, моча) в малых количествах (например, пятна капиллярной крови, высушенной на фильтровальной бумаге);
- 4) метод должен быть приемлемым для обследуемых, исполнителей и врачей;
- 5) метод должен быть экономичным.