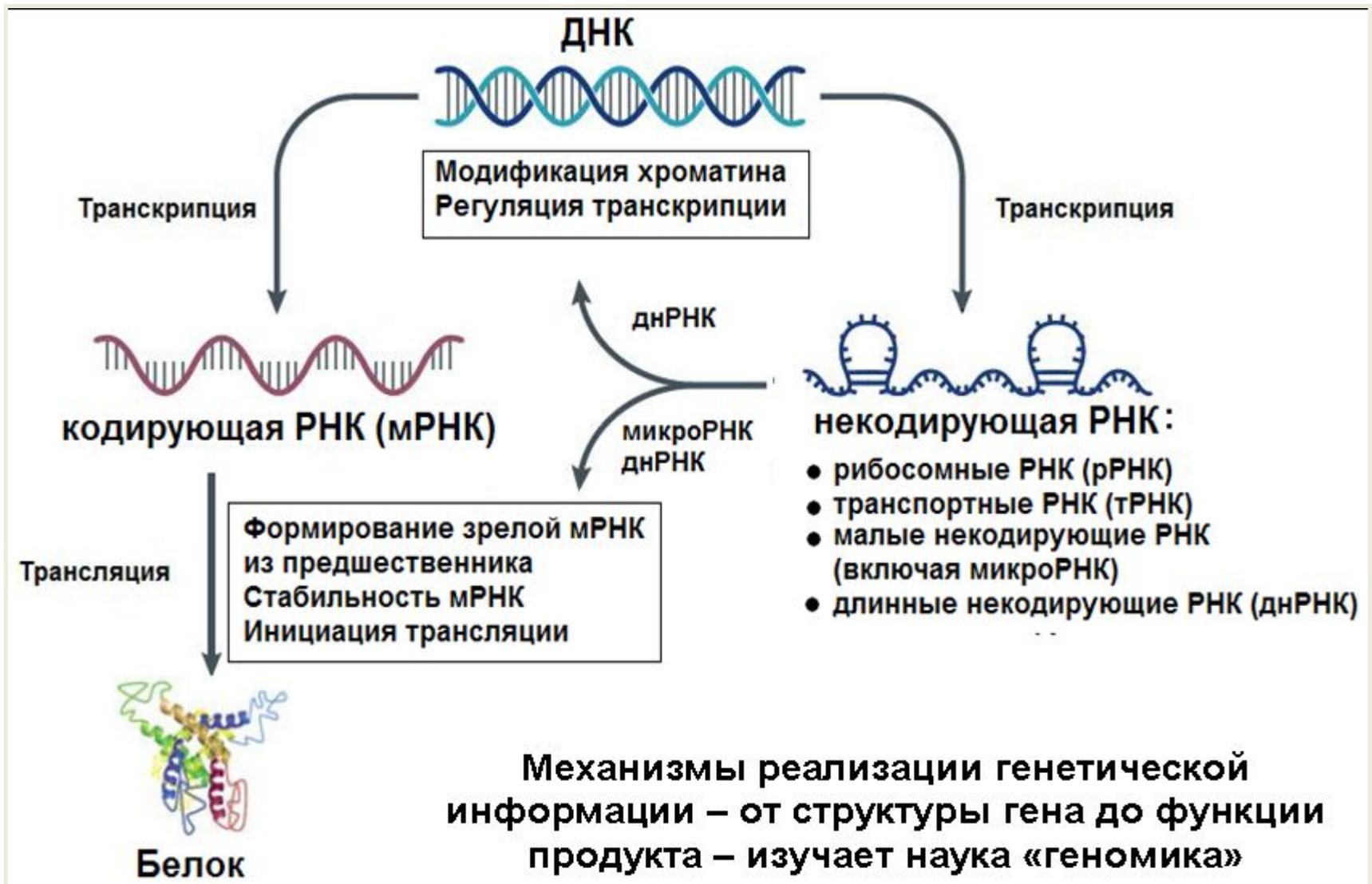


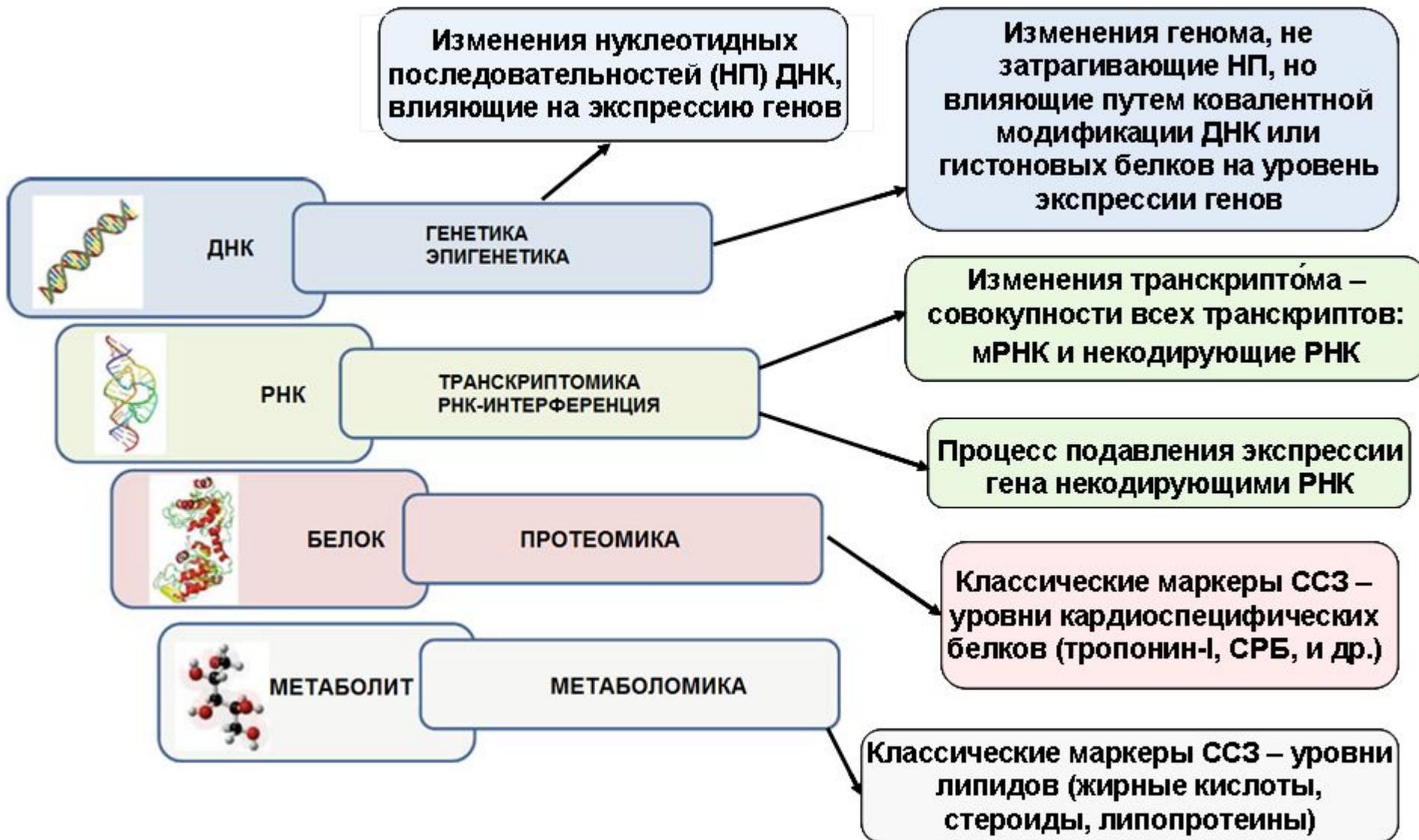
Медицинская биотехнология  
6 курс

Изучение роли генетических  
составляющих в этиологии и  
патогенезе заболеваний человека

# Современное представление «центральной догмы» молекулярной биологии



# Уровни геномных исследований



- Препрасположенност человета к тем или иным заболеланиям генетически детерминирована.
- Выделяют собственно наследственные болезни, включающие хромосомные и генные заболелания, и болезни с наследственной предрасположенностью - мультифакториальные заболелания.
- Хромосомные болезни вызваны нарушением числа или структуры хромосом.
- Генные болезни обусловлены наличием мутаций в генах. Моногенные болезни возникают из-за мутаций в одном гене.
- **Мультифакториальные заболелания** обусловлены как наследственными факторами, так и, в значительной степени, факторами внешней среды.
  - Связаны с действием многих генов, поэтому их называют полигенными заболеланиями.
  - Количество генов, формирующих наследственную предрасположенност к заболеланию, может быть достаточно велико.

# Моногенные и полигенные заболевания

- **Моногенные заболевания**
  - Мутации могут захватывать один или оба аллеля.
  - Наследуются в соответствии с законами Менделя (аутосомное или сцепленное с X-хромосомой наследование).
- **Полигенные заболевания**
  - Обусловлены наследственными факторами и факторами внешней среды
  - Связаны с действием многих генов.
  - Не наследуются по менделевскому типу.

## Примеры моногенных заболеваний сердечно-сосудистой системы

Заболевание	Генетическая основа
<b>Заболевания, сопровождающиеся повышением уровня ЛПНП</b>	
Семейная гиперхолестеринемия	Мутации <i>LDLR</i>
Семейный дефект аполипопротеина В-100	Мутации <i>APOB</i>
Ситостеролемиа	Мутации <i>ABCG5, ABCG8</i> (стеролин-1 и-2)
<b>Заболевания, сопровождающиеся изменением артериального давления</b>	
Семейный гиперальдостеронизм типа I	Образование химерного гена <i>CYP11B1/CYP11B2</i>
Дефицит альдостеронсинтазы	Мутации гена альдостеронсинтазы
Врожденная гиперплазия коры надпочечников вследствие недостаточности 21-гидроксилазы	Мутации в <i>CYP21A2</i>
Синдром кажущегося избытка минералкортикоидов	Мутации в <i>HSD11B2</i>
Синдром Лиддля	Мутации в генах субъединиц $\beta$ или $\gamma$ ENaC
<b>Заболевания, сопровождающиеся нарушениями ритма</b>	
Синдромы удлиненного/укороченного интервала QT	Мутации <i>KCNQ1 (KVLQT1), KCNH2, SCN5A, ANKB, KCNE1, KCNE2, KCNJ2, KCNH2</i>
Катехоламинергическая желудочковая тахикардия	Мутации <i>CASQ2</i>
Семейные формы фибрилляции предсердий и желудочков	Мутации <i>KCNQ1</i> и <i>SCN5A</i>
Семейные формы синдрома слабости синусового узла	Мутации <i>SCN5A</i>
Синдром Бругада (различные типы)	Мутации <i>SCN5A, GPD1L, CACNA1C, CACNB2, KCNE3, KCND3, SCN1B</i>
Аритмогенная правожелудочковая дисплазия/кардиомиопатия (различные типы)	Мутации в областях 14q23,1q42,14q12-q22,2q32,3p23,10p14,10q22,6p24,12p11,18q12,17q21 и др.
Синдром Вольфа-Паркинсона-Уайта	Мутации <i>PRKAG2</i>
<b>Кардиомиопатии</b>	
Семейные гипертрофические и дилатационные кардиомиопатии	Мутации <i>CAV3, SLC25A4, MYH7, MYLK2, TNNI3, LMNA, MYBPC3</i> и др.
<b>Заболевания, приводящие к патологии строения сердца и сосудов</b>	
Синдром Марфана	Мутации <i>FBN1</i>
Синдром Элерса-Данлоса тип IV	Мутации <i>COL3A1</i>
Синдром Вильямса	Делеция 7q11.23

# Распространенность полигенных заболеваний

- Частота наследственных заболеваний составляет 1,5%.
  - На долю хромосомных болезней приходится 0,5%.
  - На долю моногенных заболеваний приходится до 1%.
- **К мультифакториальным относятся большинство наиболее распространенных болезней человека:**
  - язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, бронхиальная астма, сахарный диабет, шизофрения, эпилепсия, ишемическая болезнь сердца и многие другие.
- Заболевания, вызываемые внешним воздействием, например, инфекционные, также имеют генетическую составляющую.
  - Индивидуальная чувствительность к внешним неблагоприятным воздействиям может быть генетически детерминирована.

# Генетический полиморфизм:

- **Генетический полиморфизм** - это сосуществование в пределах популяции двух или нескольких различных наследственных форм, находящихся в динамическом равновесии в течение нескольких поколений.
- **Аллели** - различные варианты одного и того же гена, расположенные в одинаковых участках (локусах) гомологичных хромосом.
- Гены, которые представлены в популяции несколькими вариантами, называют **полиморфными**.
- **Генотип** - совокупность генов данного организма.
  - При исследовании генетической предрасположенности к заболеваниям под генотипом часто понимают комбинацию аллелей (пару аллелей), которые индивид имеет в исследуемом районе генома
- **Частота генотипа** (Genotype frequency) - доля особей, имеющих определенный генотип, среди всех особей популяции.
- **Частота аллеля** (Allele frequency) - доля конкретного аллеля среди всех имеющихся в популяции аллелей данного гена.
  - Аллель с меньшей частотой называется **минорный аллель**
- Частота генотипа, или аллеля, выражается либо в процентах, либо в долях единицы (если общее количество генотипов или аллелей популяции принимается за 100% или 1 соответственно).
- Обычно локус определяется как полиморфный, если частота минорного аллеля (MAF - Minor allele frequency) больше 0.01
- **Частота носительства аллеля** (Allele carriage frequency) – доля лиц, несущих определенный аллель (сумма частот гомозигот и гетерозигот по данному аллелю).

# Соотношение Харди — Вайнберга

- В популяции частоты генов и генотипов остаются постоянными от поколения к поколению.
- Закон Харди-Вайнберга действует в идеальной популяции
  - со случайным скрещиванием,
  - имеющей бесконечную численность,
  - изолированной от притока мигрантов,
  - в которой темпы мутирования генов пренебрежимо малы
  - в которой отсутствует отбор,
  - в которой частоты аллелей аутосомного гена одинаковы для самок и самцов и не меняются из поколения в поколение.

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1,$$

где  $p$  – частота одного аллеля,  $q$  – частота другого аллеля,  
 $p^2$  – доля гомозигот по одному аллелю,  $q^2$  – доля гомозигот по другому аллелю,  $2pq$  – доля гетерозигот

# Мутация или полиморфизм?

- **Мутация** - наследуемое изменение в нуклеотидной последовательности нуклеиновой кислоты, ответственной за хранение и передачу генетической информации организма.
- Чем мутация отличается от аллельного полиморфизма?
  - С точки зрения химии ничем.
- Часто встречающиеся в популяциях варианты генов, не приводящие к заметным нарушениям функций, обычно рассматриваются как нейтральные мутации или полиморфизмы (Пример: группы крови).
- Аллельный полиморфизм часто называют мутацией.
  - Лейденская мутация – аллельный полиморфизм G1691A в гене *FV* (фактор свертываемости крови 5). Этот полиморфизм ассоциирован с тромбозами, с невынашиванием беременности, с увеличением продолжительности жизни.
- Обычно понятие «мутация» используют для изменений в ДНК, приводящих к серьезным последствиям для здоровья и встречающихся в популяции очень редко.

# Причины генетического полиморфизма

- Генетический полиморфизм может быть обусловлен:
  - заменой нуклеотидов,
  - дупликацией,
  - вставками,
  - делециями,
  - нуклетидными повторами.
- Большую долю в генетический полиморфизм вносят **замены одного нуклеотида на другой и изменения числа повторяющихся фрагментов ДНК**, которые осуществляются во всех структурных элементах генома: экзонах, интронах, регуляторных участках и т. д.
- Масштабы генетического полиморфизма у человека таковы, что между последовательностями ДНК двух людей, если только они не однойцевые близнецы, существуют миллионы различий.
- Эти различия подразделяют на четыре основные категории:
  - фенотипически не выраженные (например, полиморфные участки ДНК, используемые для идентификации личности молекулярно-генетическими методами);
  - вызывающие фенотипические различия (например, в цвете волос или росте), но не предрасположенность к заболеванию;
  - играющие основную роль в развитии заболевания (например, при моногенных болезнях).
  - **играющие некоторую роль в патогенезе заболевания (например, при полигенных болезнях);**

# Влияние различных факторов на развитие полигенных заболеваний



- Наличие генов предрасположенности к заболеванию не означает, что данное патологическое состояние обязательно разовьется.
- Здоровье определяется не только набором генов, но и их взаимодействием с факторами внешней среды, а также с эпигенетическими факторами.

# Участие факторов внешней среды в развитии полигенных заболеваний

- Факторы внешней среды делятся на:
  - биологические
    - нерациональное питание и дисбаланс питательных компонентов, нерегулярный сон, различные инфекции, гормональный дисбаланс и др.;
  - химические
    - загрязнение атмосферы, воды, сигаретный дым, выхлопные газы и др.;
  - психологические
  - физические
    - электромагнитное излучение, компьютер, мобильный и радиотелефоны, СВЧ-печь, телевизор и другая бытовая техника и др.
- Факторы внешней среды могут быть модифицируемые и немодифицируемые.
  - Модифицируемые факторы (курение, образ жизни и др.) поддаются коррекции и представляет наибольший интерес для профилактики заболевания.
  - Немодифицируемые факторы (возраст, пол, этническая принадлежность) коррекции не поддаются, однако их используют для оценки и прогноза индивидуального, группового и популяционного риска развития заболевания.

# Основные факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний

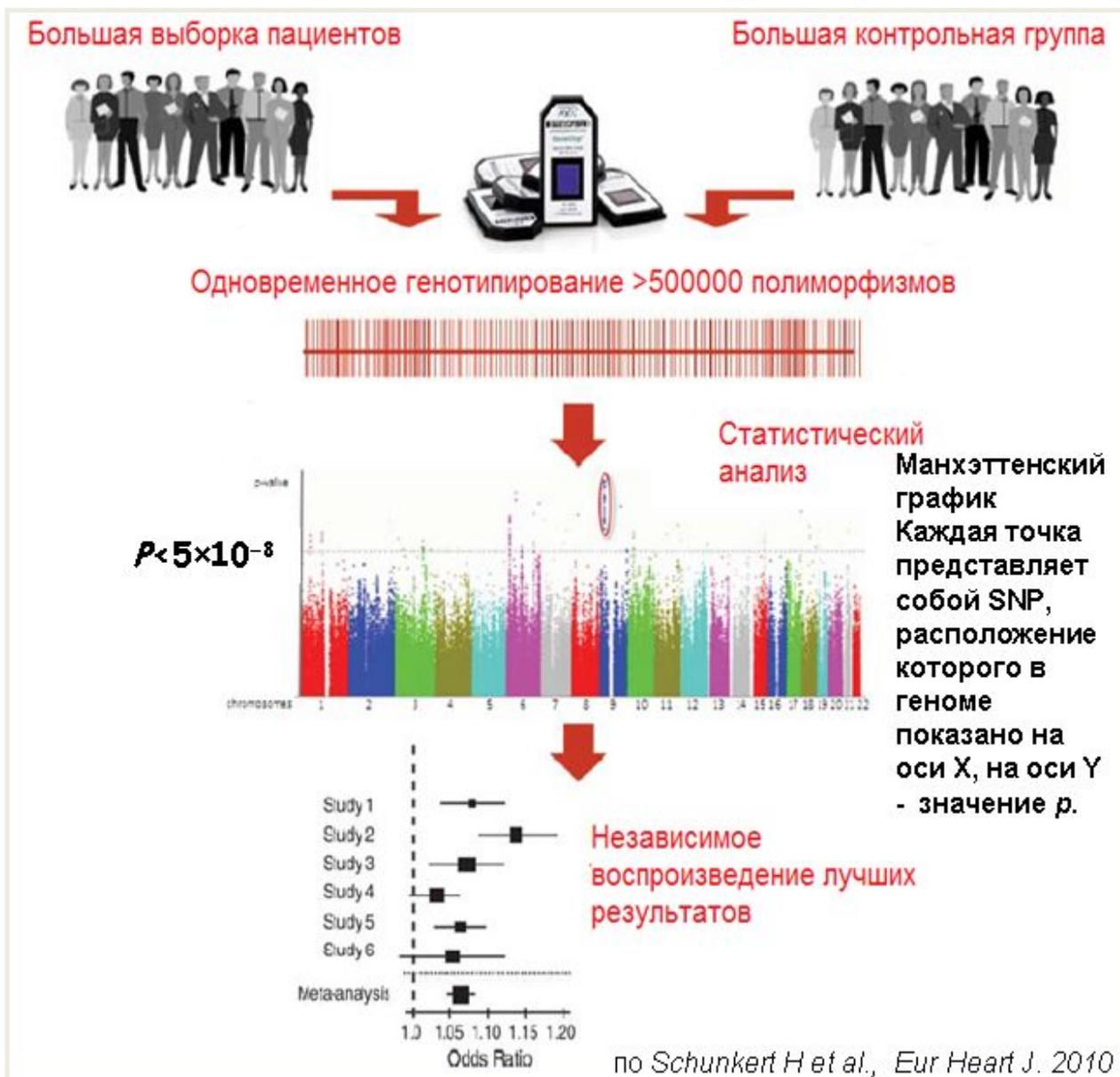
- Немодифицируемые
  - наследственность
  - пол и возраст
    - мужчины старше 45 лет,
    - женщины старше 55 лет;
- Модифицируемые
  - нарушения липидного обмена;
  - курение;
  - артериальная гипертензия;
  - сахарный диабет;
  - ожирение абдоминального типа;
  - стресс.

# Стратегические этапы исследования генетической предрасположенности к полигенным заболеваниям

- Анализ ассоциации заболевания с полиморфными вариантами отдельных генов-кандидатов:
  - отдельные однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), иногда делеции и микросателлитные повторы
  - случай – контроль: обычно сотни больных и индивидов контрольной группы.
- Полный геномный поиск сцепления областей генома с заболеванием:
  - сотни микросателлитных маркеров
  - тысячи семей.
- Полный геномный поиск ассоциации областей генома с заболеванием (GWAS - genome wide association studies):
  - сотни тысяч и миллионы SNPs
  - тысячи больных и индивидов контрольной группы.

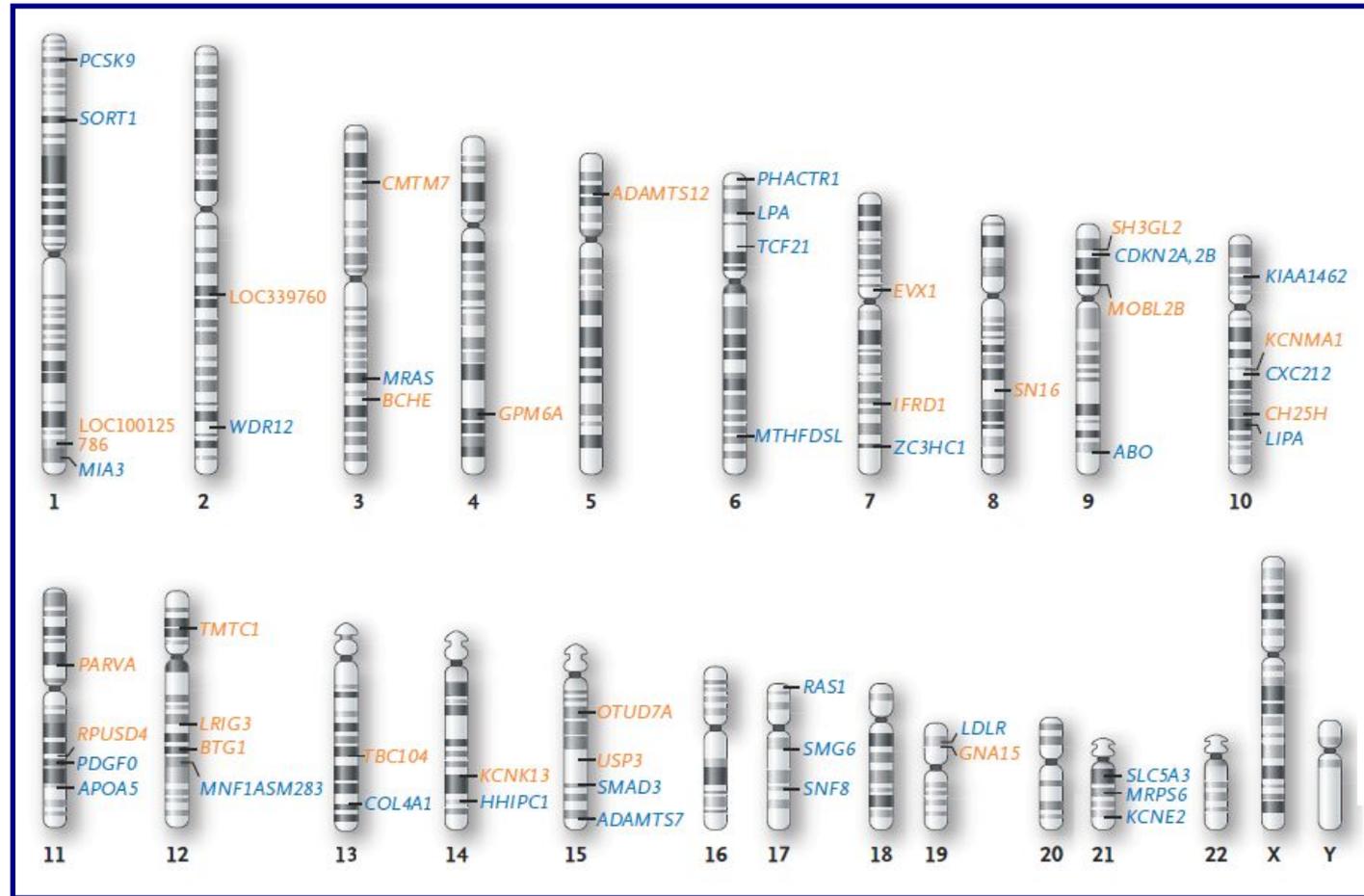
# Полный геномный поиск ассоциации областей генома с заболеванием (GWAS)

- Группы более 1000 человек.
- Пациенты и контр. группа совпадают по полу, возрасту и этнической принадлежности.
- Генотипирование с использованием микрочипов. Платформы Affimetrix и Illumina
- Для всех индивидуумов производится генотипирование для большинства известных SNP. Далее, для каждого SNP проверяется, насколько значимы различия в распределении частот аллелей между исследуемой и контрольной группой.



# Пример использования полногеномного поиска ассоциации областей генома с заболеванием

**Генетические маркеры предрасположенности к инфаркту миокарда и сердечной недостаточности, выявленные с помощью GWAS**



**СИНИМ** обозначены маркеры генетической предрасположенности к инфаркту миокарда, **оранжевым** – к сердечной недостаточности

(по O'Donnell CJ & Nabel EG. *N Engl J Med.* 2011)

# Локусы, ассоциированные с ишемической болезнью сердца и с инфарктом миокарда

- Идентифицировано более 50 локусов, ассоциированные с ишемической болезнью сердца (ИБС) и с инфарктом миокарда (ИМ)
- Лишь незначительная часть локусов, ассоциированных с этими заболеваниями, затрагивает традиционные факторы риска.
  - Таким образом, большинство обнаруженных локусов влияют на риск развития заболевания через неизвестные пока механизмы.
- Практически все идентифицированные в настоящее время аллели риска являются относительно частыми.
  - Например, у европейца вероятность нести один или два аллеля риска в области 9p21.3 составляет 50%.
  - Фактически все люди несут то или иное число аллелей риска от различных генов.

# Проблема «потерянной» наследуемости»

- Проект «Геном человека» (The Human Genome Project, HGP) начался в 1990 году, под руководством Джеймса Уотсона под эгидой Национальной организации здравоохранения США.
- Проект вселял надежду, что будут определены генетические варианты, ответственные за возникновение того или иного заболевания.
- Однако, несмотря на огромный прогресс в исследовании генетической предрасположенности к различным заболеваниям, использование мощных современных подходов (таких как GWAS), отдельные генетические вариации не могут на данном этапе полностью объяснить наследственную компоненту многих признаков.

**Возникает проблема «потерянной наследуемости»**

- «Потерянная наследуемость» – невозможность на данном этапе исследований объяснить часть наследуемости болезней, поведения и других признаков.

# Что такое наследуемость

- **Наследуемость** (heritability) - доля фенотипической изменчивости в популяции, обусловленная генетической изменчивостью (для определённого качественного или количественного признака).
- Для количественного выражения наследуемости используют **коэффициент наследуемости ( $h^2$ )**, который вычисляется по формуле:

$$h^2 = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_G^2 + \sigma_E^2}$$

Где  $\sigma_G^2$  – показатель генотипической изменчивости,

$\sigma_E^2$  – показатель модификационной (обусловленной влиянием среды) изменчивости.

Т.е. для количественной характеристики наследуемости используется величина дисперсии признака.

- Чем выше  $h^2$ , тем больший вклад в изменчивость признака вносят генетические различия.
  - $h^2 = 0$ , если гены никак не влияют на фенотипическую изменчивость,
  - $h^2 = 1$ , если фенотипическая изменчивость полностью генетически детерминирована.

# Трудности в оценке наследуемости

- Для родственников часто общими являются не только гены, но и факторы окружающей среды. Таким образом, корреляция между родственниками может отражать не только генетическую составляющую какого-либо признака.
- Коэффициент наследуемости не показывает механизм наследования признака: количество задействованных локусов или характер взаимодействия различных аллелей в локусах.
- Коэффициент наследуемости используется для характеристики популяции, а не для конкретного индивида.
- Коэффициент наследуемости не отражает различия между группами, например, этносами.

## **Генотип ≠ фенотип**

**Зная генотип, нельзя однозначно предсказать фенотип, и наоборот.**

**Фенотип - следствие взаимодействий генотипа и среды.  
Чем большим количеством генов определяется признак, тем больше вклад факторов среды в его изменчивость.**

# Гетерогенность полигенных заболеваний

## Генетическая и клиническая гетерогенность

- Полигенные заболевания часто генетически гетерогенны, причем разные генетические факторы могут определять как различающуюся, так и сходную фенотипическую (клиническую) картину.

## Этнические различия

- Вследствие межпопуляционных различий в частотах аллелей значимость влияния отдельных генов на предрасположенность к заболеванию варьирует в разных этнических группах.
  - Поэтому необходимо соблюдать принцип этнической гомогенности изучаемых групп больных и контролей.

## Гендерные различия

- В ряде случаев имеются гендерные различия в генетической предрасположенности к заболеванию.

# Совместное действие генов при полигенных заболеваниях

- Почти каждая болезнь зависит от многих генов.
- Почти каждый ген может принимать участие в развитии сразу нескольких заболеваний.
- Вклад отдельных генов может быть неравноценным, от относительно сильного эффекта («главный ген») до слабого.
  - Полиморфные участки отдельных генов могут вносить малый вклад в развитие заболевания.
    - Такие слабые ассоциации трудно идентифицировать.
    - Для их детекции требуются гигантские объемы выборок.
- Аллель одного гена может вовсе не проявлять своего действия в отсутствие аллеля другого гена, находящегося с ним в эпистатическом (нелинейном) взаимодействии.
  - В связи с этим возникает необходимость поиска композитных маркеров, т.е. сочетаний аллелей и генотипов полиморфных участков различных генов, ассоциированных с развитием заболевания.

# Другие возможные источники «потерянной наследуемости»

- Фенотип - продукт взаимодействий множества генов не только друг с другом, но и со средой. Причем эти взаимодействия могут быть как однонаправленными, так и разнонаправленными.
  - Взаимодействия Ген x Окружающая среда и Ген x Ген (эпистаз) не оцениваются в GWAS.
  - Количество этих взаимосвязей практически не поддается учету.
- Плохая воспроизводимость результатов GWAS.
- Эпигенетические факторы.
- Мало внимания уделяется роли митохондриального генома.
- Проблема подбора контрольных групп.
- **Оценка наследуемости признака может быть изначально завышена**
  - Семейные методы анализа могут отражать не только генетические, но и другие общие факторы, влияние которых трудно вычлениить.

# Этапы развития методик работы с ДНК

- 1869 Мишер выделяет ДНК из белых клеток крови
- 1944 Эвери доказывает, что ДНК является носителем генетической информации
- 1953 Уотсон и Крик открывают структуру ДНК (двойная спираль)
- 1955 Корнберг открывает ДНК-полимеразу
- 1961 Мармур и Доти открывают ренатурацию ДНК
- 1962 Арбер получает первые доказательства существования рестриктаз
- 1966 Ниренберг, Холлии Корана расшифровывают генетический код
- 1967 Геллерт открывает ДНК-лигазу
- 1972 Прочтён первый ген –ген белка оболочки бактериофага MS2
- 1972-1973 Ряд лабораторий развивают технологию клонирования ДНК
- 1975 Саузерн разрабатывает технологию переноса ДНК на фильтр с гибридизацией
- 1975-1977 Сэнгери Баррел, а также Максам и Гилберт разрабатывают технологии секвенирования ДНК
- 1981-1982 Пальмитери Бринстерполучают трансгенную мышь, Спрэдлинги Рубин получают трансгенную дрозофилу
- 1982 Основана база последовательностей ДНК -GenBank

# Методики работы с ДНК

- 1.Выделение
- 2.Электрофорез
- 3.Рестрикция
- 4.Лигирование
- 5.Гибридизация
- 6.Полимеразная цепная реакция
- 7.Секвенирование
- 8.ДНК-микрочипы

Из какого материала приходится выделять ДНК и РНК при проведении биомедицинских исследований?

### **Клеточные «суспензии»**

*Ликвор, плазма крови, смывы с бронхов и т.п.* – наиболее удобный материал с точки зрения сложности этапов выделения, включающих лизис клеток, очистку от белков и клеточных фрагментов, отмывку от низкомолекулярных примесей спиртовыми растворами и концентрирование.

*Цельная кровь* – сначала необходимо провести гемолиз и избавиться от высвободившегося содержимого эритроцитов.

*Соскоб буккального эпителия, соскобы из уретры* – при выделении нуклеиновых кислот сначала необходимо лизировать образец специальными муколитиками или удлинить первый этап лизиса с детергентами.

*Осадки мочи* – могут быть, фактически, суспензиями клеток, а могут содержать значительное количество слизи и/или пигментов, солей; необходимо индивидуально оценивать целесообразность того или иного метода выделения.

Из какого материала приходится выделять ДНК и РНК при проведении биомедицинских исследований?

### **Структурированная ткань**

*Замороженные образцы от макро препарата* – операционного материала. Наиболее удобный материал для выделения больших количеств ДНК и РНК высокого качества, но предварительно требует гомогенизации и лизиса с протеиназой К.

*Биоптаты* – без гомогенизации, только с протеиназой К, но гораздо меньший выход НК по сравнению с операционным материалом.

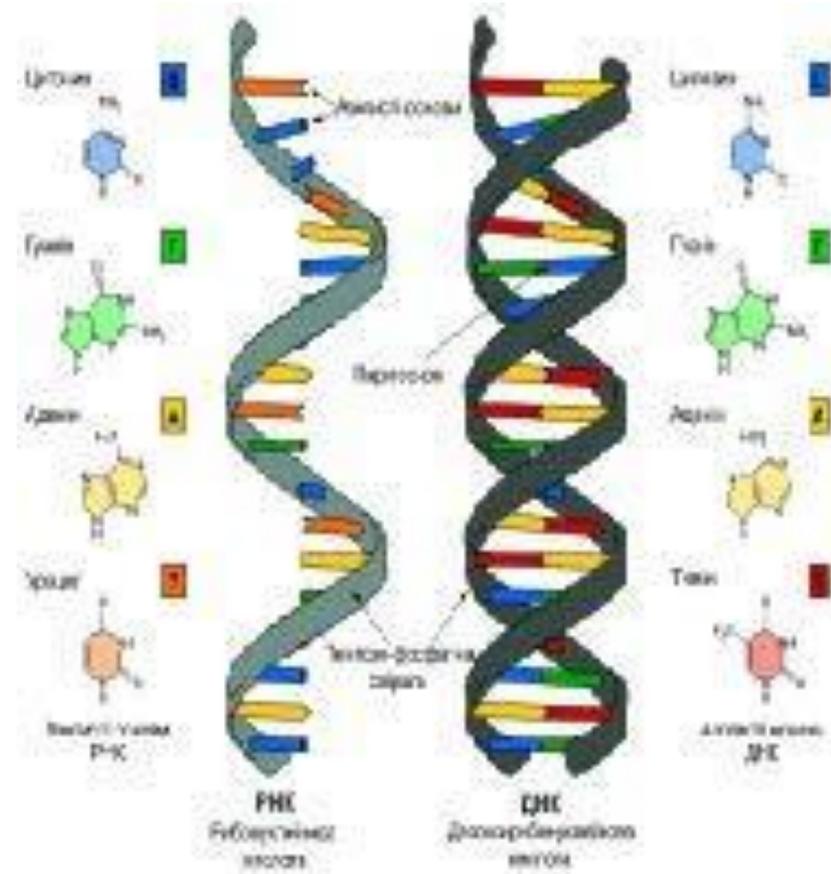
*Архивные образцы в парафиновых блоках* – необходима депарафинизация (желателен этап с восстановлением химических связей, нарушенных формальдегидом при фиксации ткани), подсушка, затем лизис с протеиназой. Как правило, хорошо отобранный и аннотированный материал, но может быть со значительной фрагментацией и деградацией НК (особенно РНК).

# Выход ДНК из разных источников

Цельная кровь (1 мл)	20-50 мкг
Лейкоциты (из 1 мл цельной крови)	50-200 мкг
Сыворотка, плазма крови (0,5 мл)	0.3-3 мкг
Сухая кровь (пятно 0,5-1см)	0.04-0.7 мкг
Слюна (1 мл)	5-15 мкг
Буккальный эпителий (1 мг)	1-10 мкг
Кости, зубы (500 мг)	30-50 мкг
Косный мозг	100-500 мкг
Волосные фолликулы	0.1-0.2 мкг
Бактериальная культура (100 мл)	350-1000 мкг (плазмидной ДНК)

# Стабильность нуклеиновых кислот при выделении из клеток

В целом, РНК менее стабильная молекула, чем ДНК. Наличие дополнительной ОН-группы в рибозе и меньшее по сравнению с ДНК содержание стабилизированных спиральных участков делает молекулы РНК более химически реакционноспособными. При действии кислот и, особенно, щелочей рибозный каркас РНК легче гидролизуется, и азотистые основания отщепляются легче. В связи с этим при работе с РНК рекомендуют соблюдать правила, защищающие ее от грубых внешних воздействий и попадания нуклеаз:



- использование перчаток, наконечников с фильтрами, RNase-free пластика
- ограничить количество замораживаний-оттаиваний,
- ограничить время пребывания раствора РНК на столе в тепле и на солнечном свете,
- добавлять в буферы или соответствующие реакционные смеси ингибиторы РНКаз

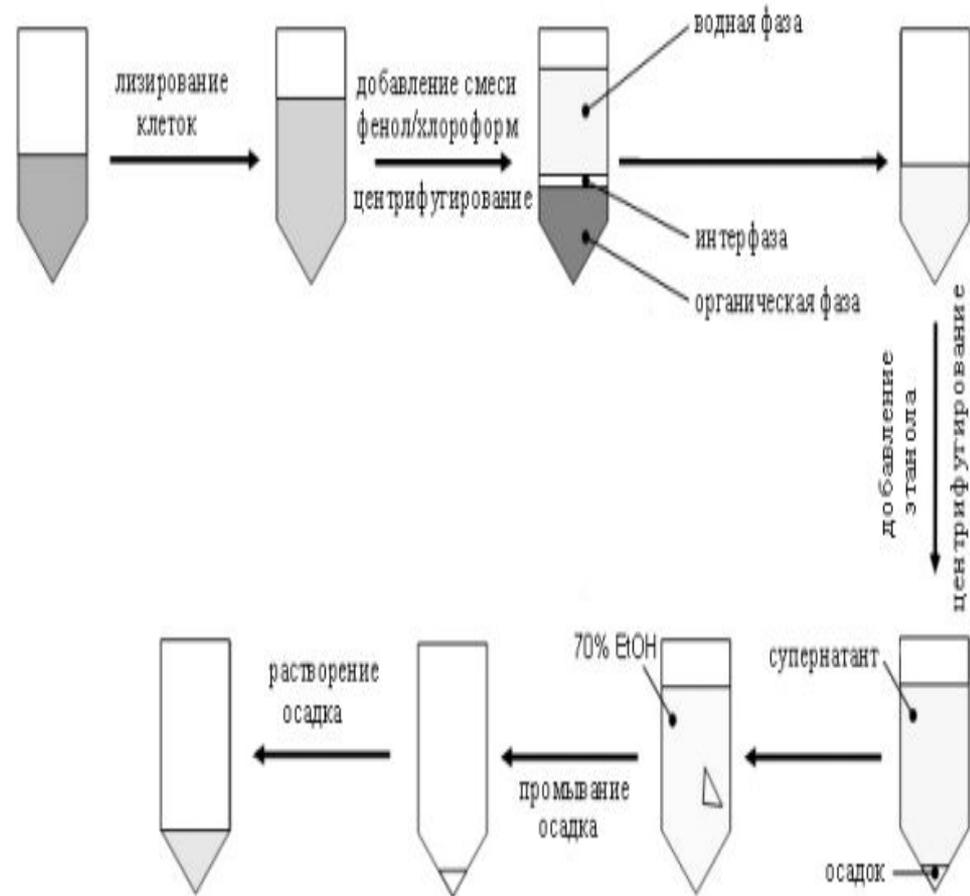
# Экспресс-методы выделения нуклеиновых кислот

- Образец биоматериала инкубируется с лизирующим буфером при высокой температуре (порядка 90-95°С), в процессе чего происходит деструкция клеточных мембран, вирусных оболочек и других биополимерных комплексов и высвобождение НК. При последующем центрифугировании нерастворимые компоненты осаждаются на дне пробирки, а супернатант (надосадочная жидкость) содержит НК. Может быть добавлен сорбент для связывания клеточных фрагментов с белковых комплексов, который после центрифугирования увлекает с собой посторонние примеси в осадок.
- Преимущество—быстрота метода (час).
- Недостаток — низкое качество выделенного препарата НК—загрязнение продуктами лизиса клеток (белками и липидами)—можно поставить ПЦР несколько раз, затем под действием высвободившихся нуклеаз ДНК и РНК будут деградированы. Кроме того, многие примеси являются ингибиторами полимераз, поэтому такие образцы могут быть непригодны для анализа с уже отработанными на чистых препаратах условиями ПЦР, ОТ, или требовать применения специальных дорогостоящих смесей полимераз.



# Метод фенол-хлороформной экстракции

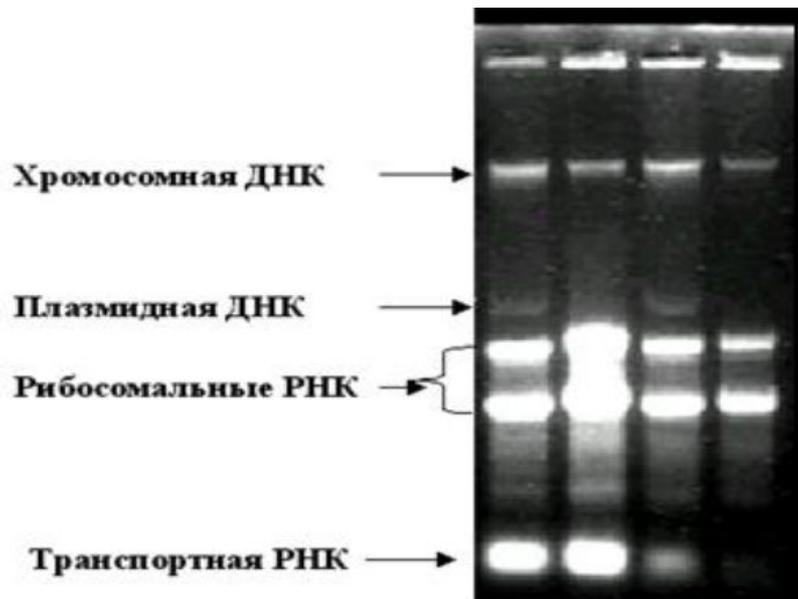
- Принцип метода основан на том, что НК является полярной молекулой и не растворяется в органических растворителях. Смесь фенола с хлороформом не смешивается с водой. При добавлении к лизату смеси фенола с хлороформом и интенсивном перемешивании, присутствующие в растворе белки денатурируют, а гидрофобные примеси (липиды, жиры и др.) растворяются хлороформом. Последующее центрифугирование приводит к разделению на водную (верхнюю) и органическую (нижнюю) фазы. НК находится в водной фазе, а денатурированные белки формируют кольцо на границе раздела фаз или растворяются в нижней фазе.



# Оценка качества и количества ДНК

## • Электрофорез

При этом для более точного определения количества нуклеиновой кислоты используют стандартное разведение контрольного образца. После проведения электрофореза концентрацию препарата нуклеиновой кислоты оценивают по яркости свечения полосы ультрафиолетовом свете по сравнению с флуоресценцией контрольного образца.



## • Спектрофотометрия

$$C \cdot [\mu\text{g/ml}] = A_{260} \times K$$

$$K (\text{dsDNA}) = 50$$

$$K (\text{ssDNA}) = 37$$

$$K (\text{ssRNA}) = 40$$

$$A_{260}/A_{280} = 1,8-1,9 \text{ — чистая ДНК}$$

## • Флуорометрия

При использовании флуориметра Qubit измеряется свечение от разных флуорофоров, каждый из которых специфично связывается с ДНК, РНК или белками. Это более точное измерение, чем на спектрофотометре (но более дорогостоящее — необходимо периодически делать стандартные разведения).

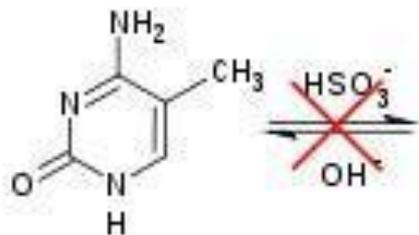
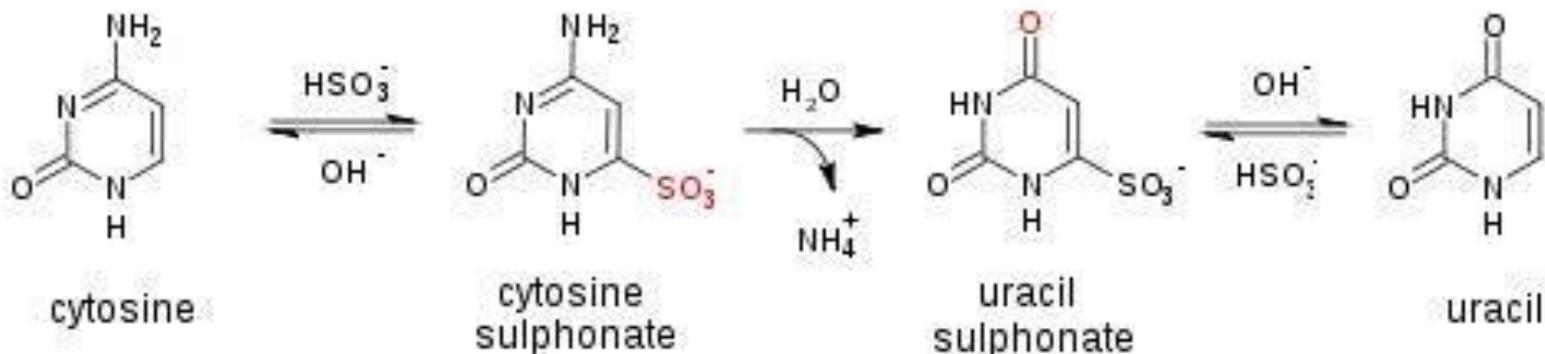


# Дополнительная обработка образцов нуклеиновых кислот ферментами нуклеинового обмена

- Если нужно получить ДНК без примеси РНК, то обрабатывают образец РНКазой N.
- Если нужно получить РНК без примеси ДНК (что бывает гораздо чаще, например, при исследовании экспрессии генов), то обрабатывают образец ДНКазой I.
- В некоторых экспериментах нужно обработать геномную ДНК рестриктазами (например, частощепящими рестриктазами для гибридизации по Саузерну). В частности, метилчувствительными рестриктазами HhaI или HpaII перед постановкой метилчувствительной ПЦР.

# Дополнительная пробоподготовка: бисульфитная конверсия

Перед проведением метилспецифичной ПЦР или бисульфитного секвенирования необходимо провести обработку ДНК бисульфитом натрия и щелочью, чтобы неметилированные цитозины перевести в урацил (метилированные цитозины останутся интактными). Это позволит в дальнейшем дискриминировать метилированные и неметилированные аллели с помощью праймеров



5-methylcytosine

# Дополнительная пробоподготовка: обратная транскрипция

Как правило, полимеразы, используемые в ПЦР, нуждаются в матрице ДНК. Поэтому для анализа, например, экспрессии генов необходимо синтезировать кДНК на имеющейся в образце РНК. Эта реакция называется обратной транскрипцией (ОТ) и осуществляется РНК-зависимыми ДНК-полимеразами. Для них тоже необходимы праймеры, в зависимости от схемы эксперимента для ОТ используют разные типы олигонуклеотидов:

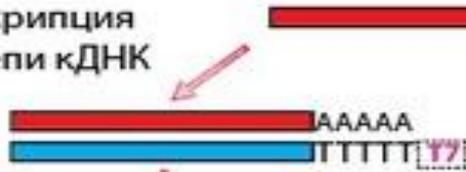


\*основные варианты ОТ выделены желтым

# Обратная транскрипция с олиго-dT-праймерами

поли-А РНК с олиго dT-праймером

обратная транскрипция  
синтез первой цепи кДНК



poly-A tailing  
лигирование поли-А



обработка РНКазой



синтез второй цепи кДНК  
ДНК-полимераза



обратная транскрипция  
синтез первой цепи кДНК



отжиг праймеров на  
липкий 5'-конец кДНК



template switching  
продолжается синтез кДНК



обработка РНКазой



синтез второй цепи кДНК  
ДНК-полимераза



■ - РНК

■ - ДНК

□ - агент присутствует в  
некоторых протоколах

Код - код образца (barcode)

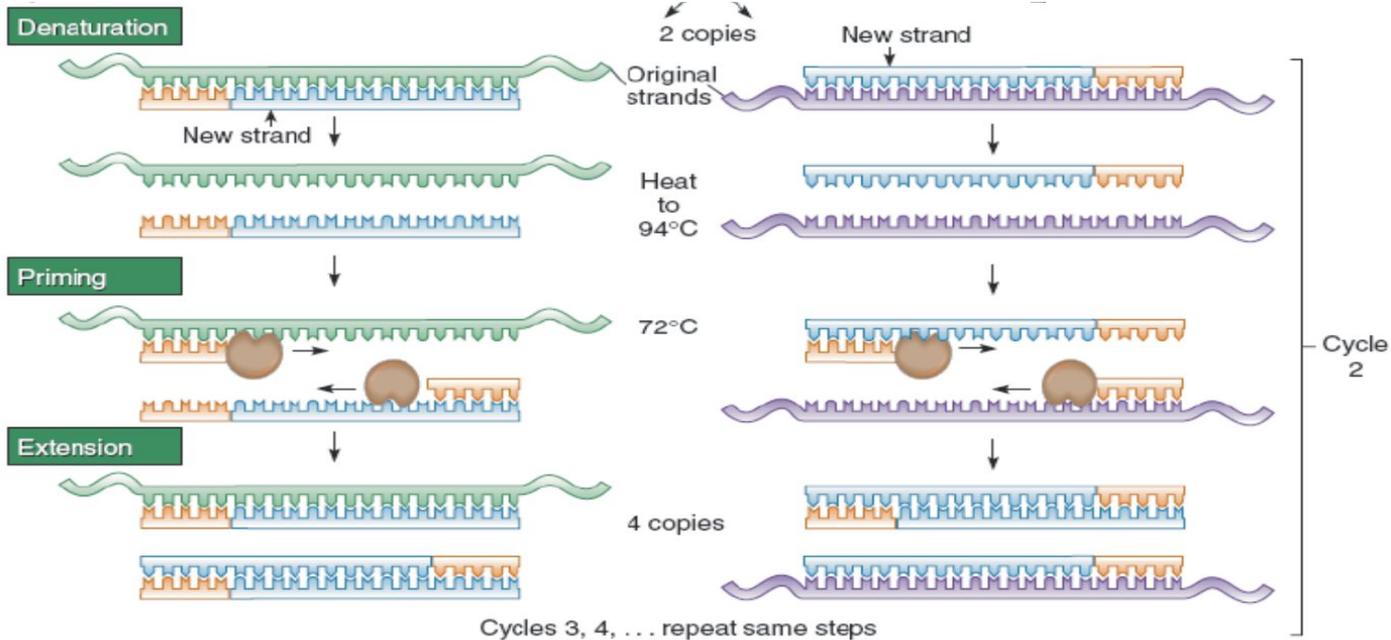
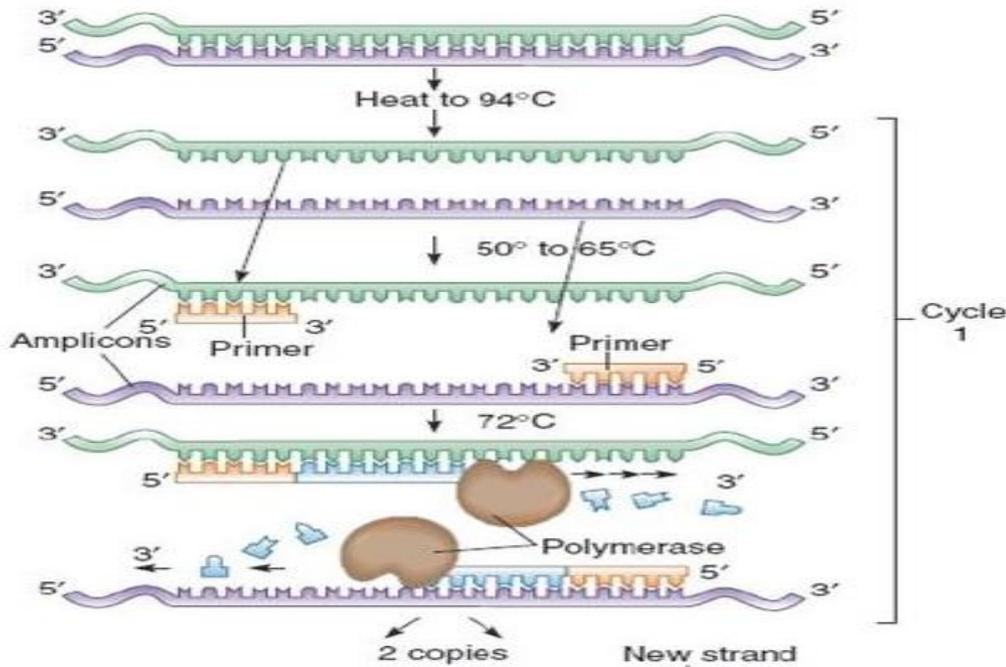
Y7 - праймер для T7 полимеразы

ПЦР

транскрипция

*in vitro*

# Метод ПЦР



# ПЦР –это качественный или количественный анализ?

Если оценивать по конечной точке - качественный

$$N_n = N_0 2^n, \text{ где:}$$

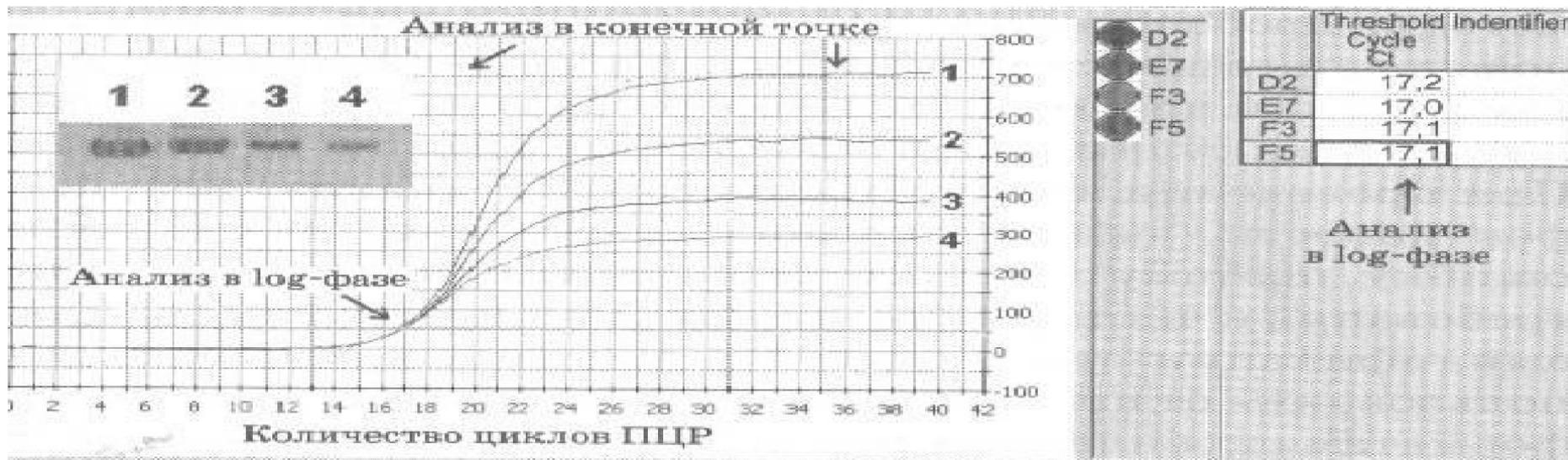
$n$  – номер цикла реакции,  $N_0$  – количество целевых молекул в начале реакции,  $N_n$  – количество продуктов реакции на цикле  $n$  и 2 – эффективность ПЦР.

Эффективность ПЦР, как правило, не бывает строго равна 2 и меняется на протяжении ПЦР, особенно в конце реакции, когда возникает конкуренция между процессами отжига праймеров и реассоциации ампликонов, или заканчивается один из компонентов ПЦР.

С учетом эффективности как переменной величины, количество нарабатываемой ДНК будет равно:

$$N_n = N_0 E^n, \text{ где } E \text{ – эффективность ПЦР.}$$

$E$  – это число, показывающее, во сколько раз за один цикл реакции изменится количество фрагментов ДНК. Даже небольшие изменения  $E$  ведут к существенным различиям в получаемых в ходе эксперимента результатах ПЦР. Так, отличие  $E$  на 0.15 к 30-му циклу ПЦР дает разницу в количестве продукта в 10 раз.



# ПЦР –это качественный или количественный анализ?

Если измерять концентрации продуктов в log-фазе -количественный

$N_n = N_0 E^n$ , тогда:

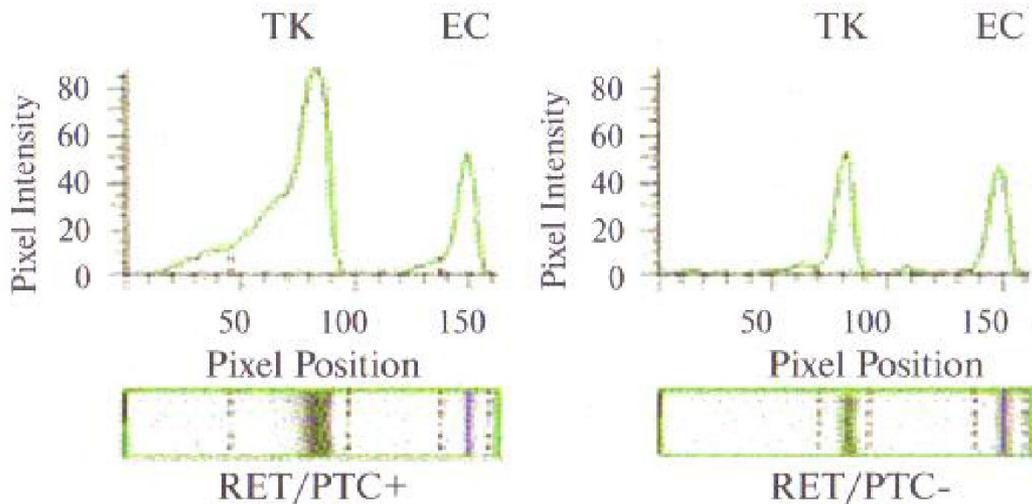
$N1_n / N2_n = (N1_0 / N2_0) (E1 / E2)^n$  – отношение количества ПЦР-продуктов при одновременной амплификации 2 локусов. Если  $n$  относится к экспоненциальной фазе, то:  $E1 = E2 \approx 2$ , следовательно:

$N1_n / N2_n = N1_0 / N2_0$

При денситометрии в геле  $N1 = a1S1$ ,  $N2 = a2S2$ , где  $a1$  и  $a2$  –коэффициенты пропорциональности. Если  $a$  одинаковы по анализируемой площади геля и для всех нанесенных образцов, то:  $N1_n / N2_n = S1 / S2 = N1_0 / N2_0$

Трудности:

- надо точно знать, на каком цикле остановить реакцию (ПЦР-продукта уже достаточно для определения в геле, но еще идет экспоненциальная фаза)
- в лунки геля должно быть нанесено оптимальное количество ПЦР-продукта
- окраска геля должна быть равномерной по всей площади измерения



Сравнительный анализ экспрессии EC-иTK- доменов, кодируемых геном *RET*, с помощью мультиплексной ПЦР при папиллярной карциноме щитовидной железы. Программа TotalLabv.1.10.

# Программируемые термоциклеры

Что важно учитывать при выборе:

1. Формат (стандартные 0,2 мл, или 0,1 мл, или 0,5 мл в Терцике)
2. Возможность работы с индивидуальными пробирками, стрипами, плашками.
3. Наличие нескольких независимых программируемых модулей, что особенно востребовано в научных лабораториях.

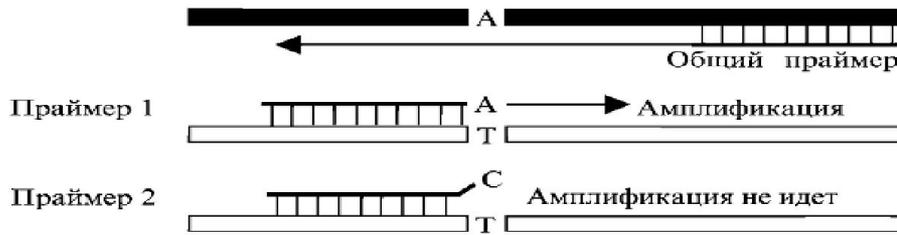


# Мультиплексная ПЦР

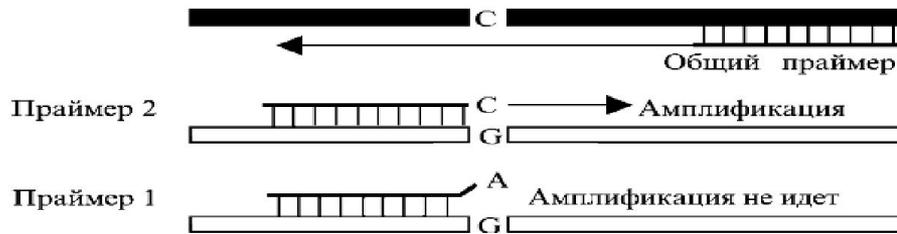
1. При увеличении количества локусов в мультиплексной ПЦР, практически, экспоненциально растут затраты времени на отработку условий.
2. Необходимо подбирать праймеры с, примерно, одинаковой температурой отжига. Желательно также проверять праймеры на образование дуплексов между разными парами.
3. При электрофоретической детекции обеспечить разницу между соседними по длине ПЦР-продуктами, хотя бы в несколько десятков п.н. Если используют меченые праймеры с разными флуорофорами и затем продукты мультиплексной ПЦР детектируют на секвенаторе в режиме фрагментного анализа, то можно располагать их ближе по длине, они даже могут перекрываться, но в этом случае возникают ограничения по сбалансированности высоты пиков и др.

# Аллель-специфичная ПЦР

Нормальная ДНК



Мутантная ДНК

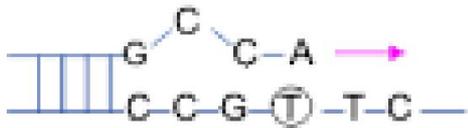


Основная проблема АС-ПЦР – это неспецифический синтез с частично комплементарного праймера.

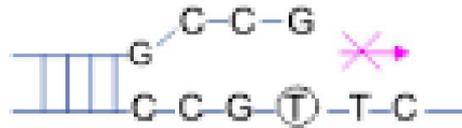
Решения: вводить неспаренные основания недалеко от **3'**-конца праймера, использовать **LNA**, блокирующие олиги на другой аллель, долго отрабатывать условия.

праймер 1

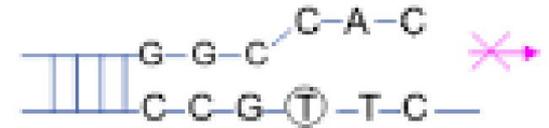
мутация



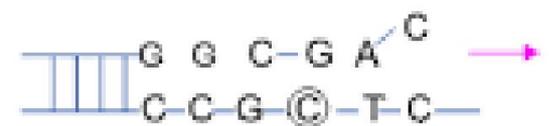
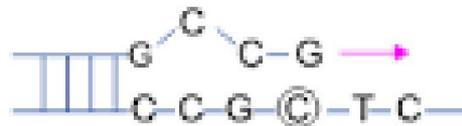
праймер 2



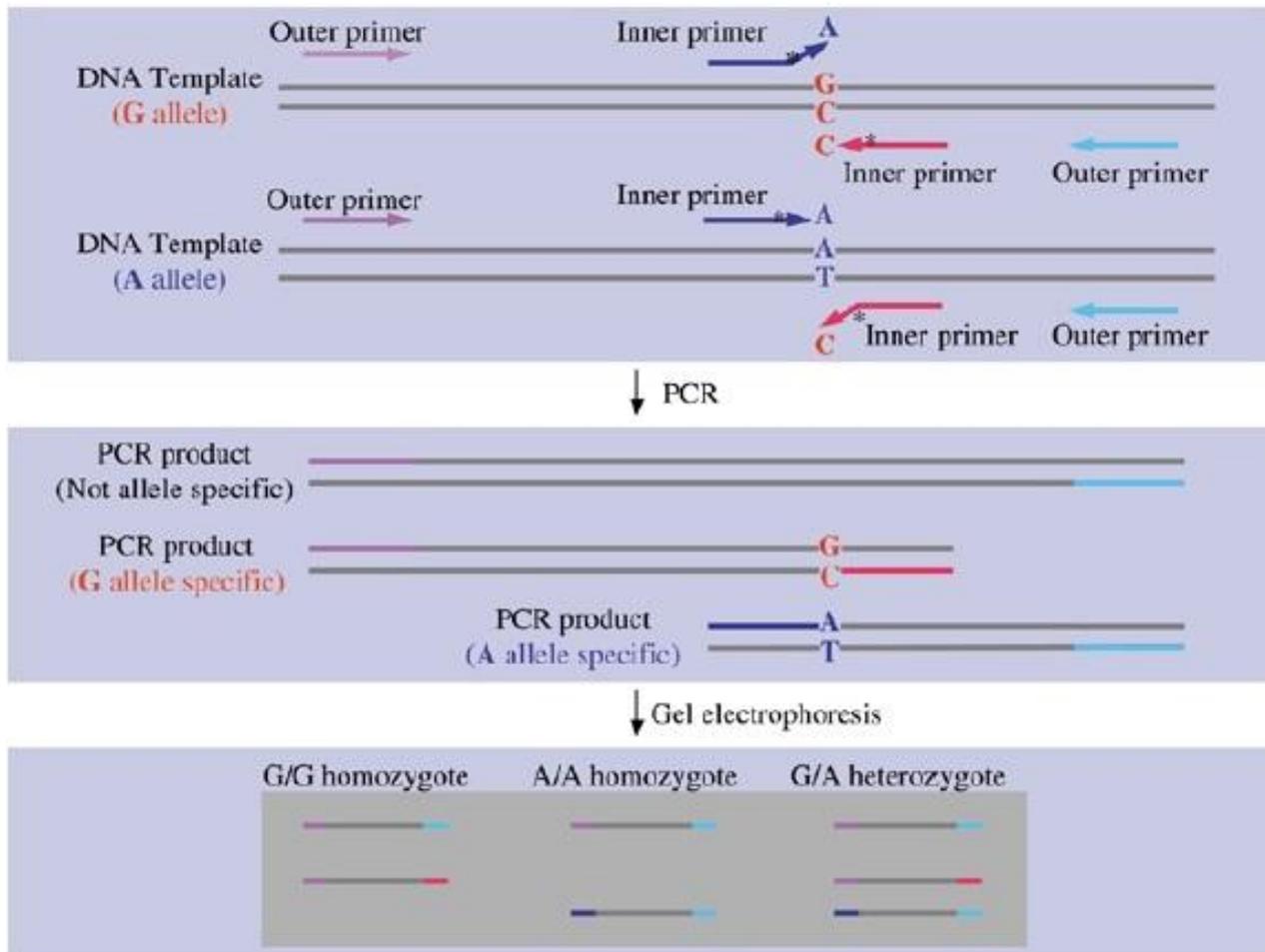
праймер 3



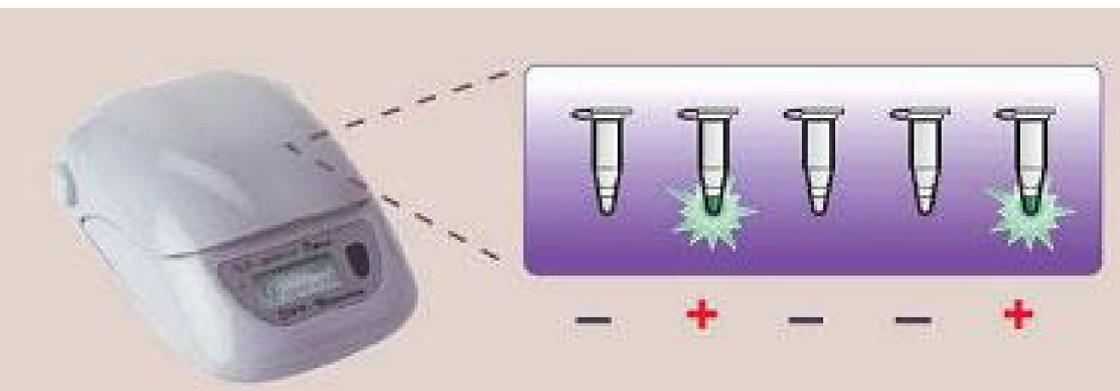
дикий тип



# Тетра-праймерная ПЦР (ARMS-PCR - amplification refractory mutation system polymerase chain reaction)



# Способы визуализации ПЦР «по конечной точке»



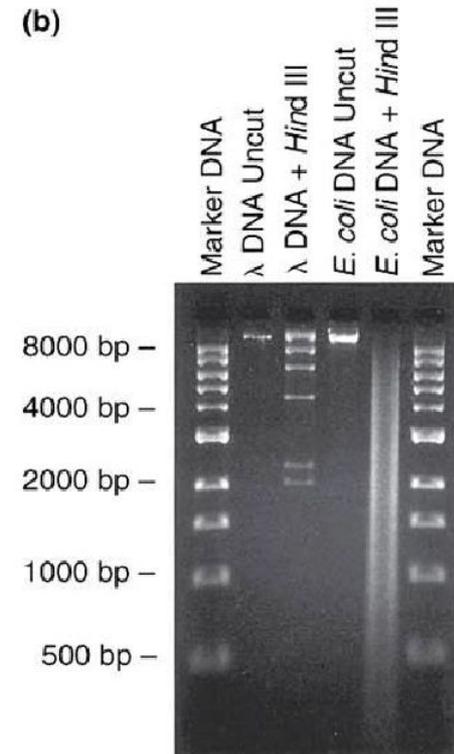
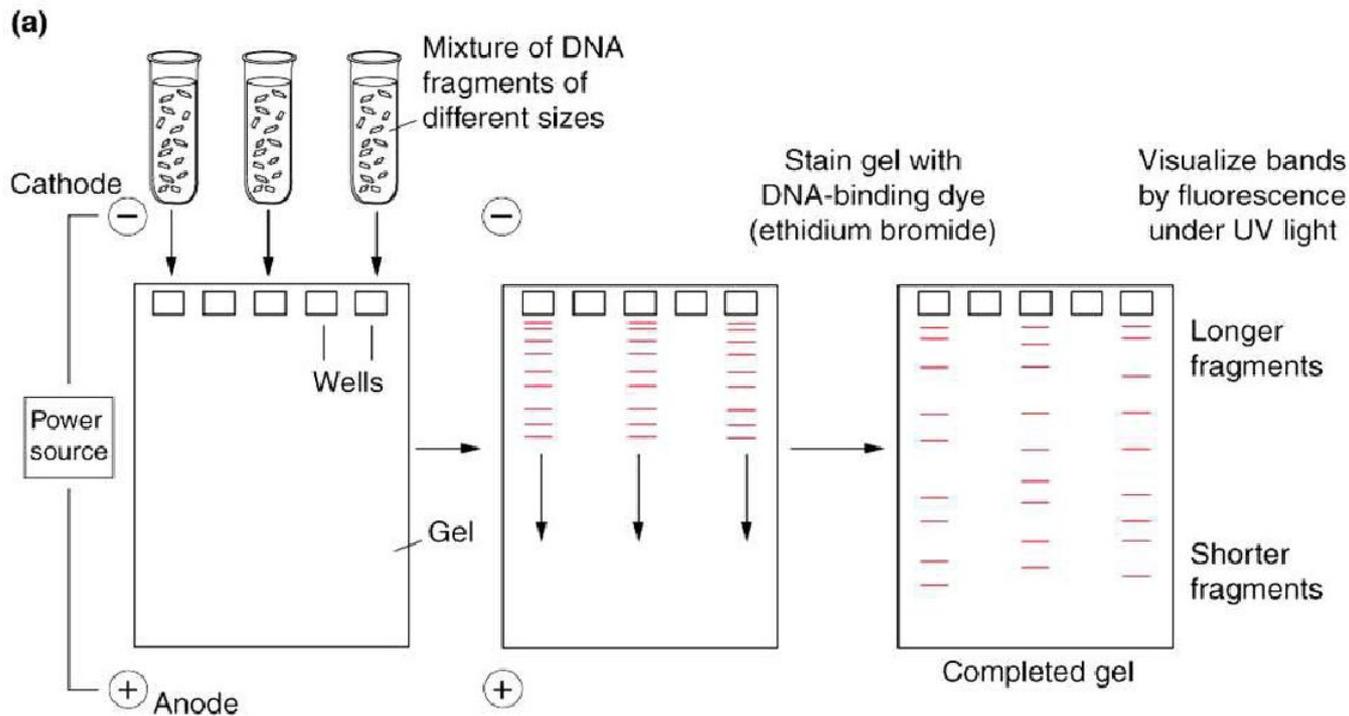
Детекция по конечной точке:

**1. FLASH**

**2. Электрофорез в геле**

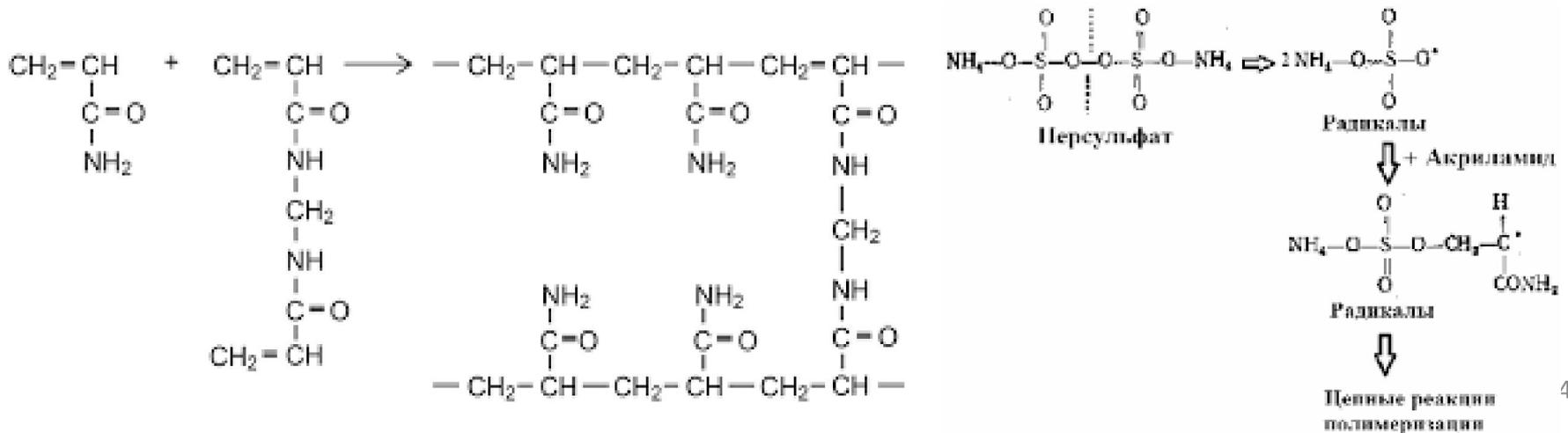
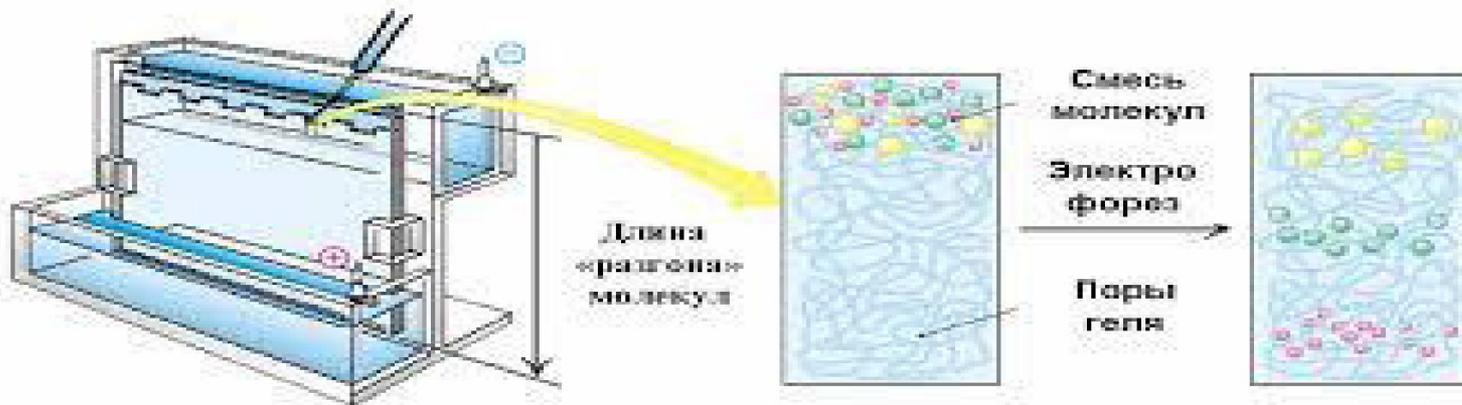
# Электрофорез в агарозном геле

Гель формируется за счет нековалентных связей. Имеет относительно низкую разрешающую способность. Раньше широко использовался в диагностических лабораториях. Сейчас, в основном, его используют для препаративного электрофореза.



# Электрофорез в полиакриламидном геле

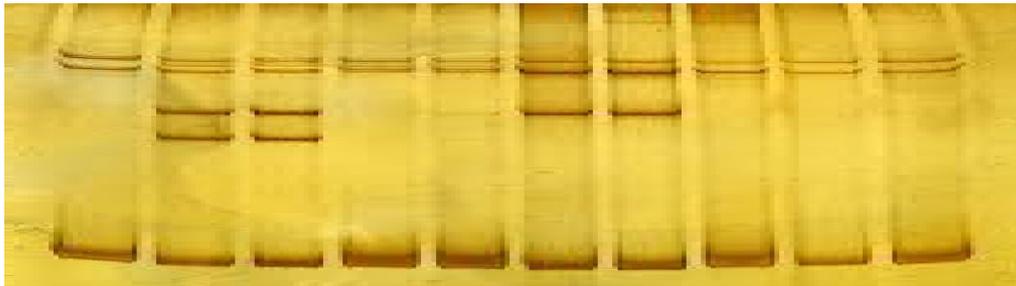
Большая разрешающая способность. Часто используют в молекулярно-генетической диагностике. Красить лучше нитратом серебра (наиболее чувствительная окраска).



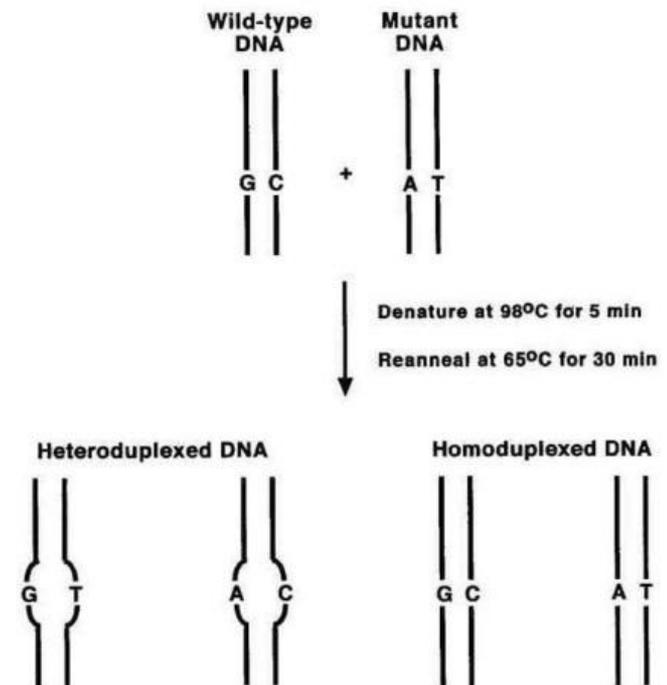
# Гетеродуплексный анализ

Метод основан на том, что при ренатурации смеси нормальных и мутантных аллелей наряду с нормальными мутантными гомодуплексами образуются гетеродуплексы между нормальной и мутантной цепочками ДНК с выпетливаниями между ними. Они отличаются по подвижности при электрофорезе от гомодуплексов. Применяются для:

1. Скрининга образцов на наличие делеций/инсерций



2. Генотипирования по известным аллелям



# SSCP-анализ

SSCP—Single Strand Conformation Polymorphism.

Метод основывается на различной подвижности однонитевых ДНК-структур в неденатурирующем полиакриламидном геле, зависящей от их первичной нуклеотидной последовательности. Применяется для скрининга наличия мутаций (полиморфизмов).

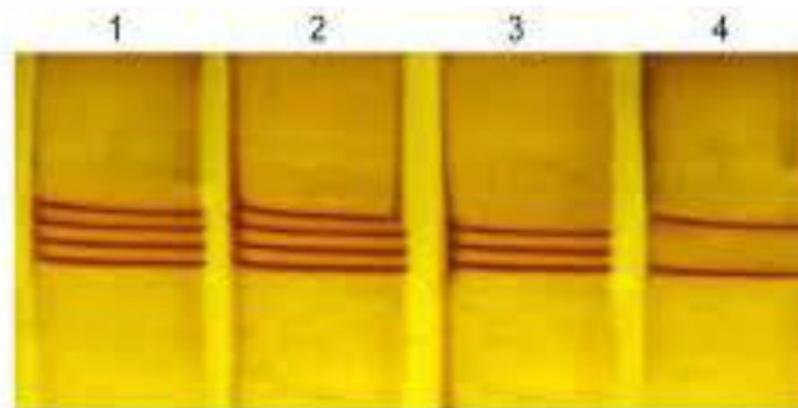
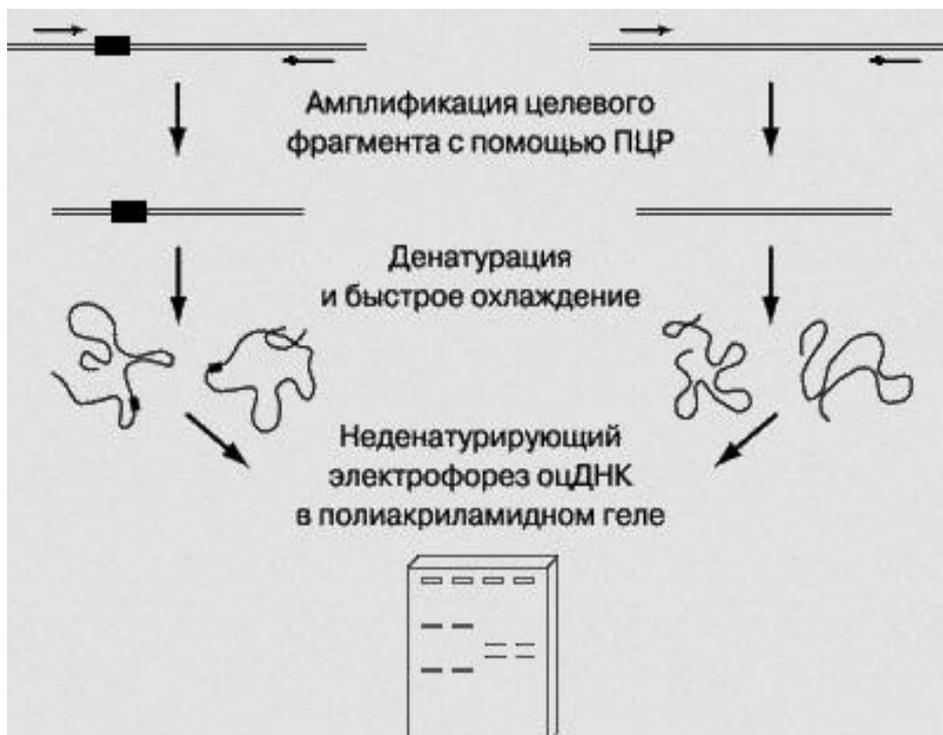


Figure 2 PCR-SSCP analysis of the CYP2D6\*10.

**Notes:** The two, three, and four bands in each lane represent the homozygous wild-type (C/C), homozygous (T/T), and heterozygous (C/T) alleles of the CYP2D6\*10, respectively; Lanes 1 and 2 represent the heterozygous C/T genotype (four fragments), lane 3 represents the homozygous T/T genotype (three fragments), while lane 4 represents the wild-type C/C genotype (two fragments).

**Abbreviation:** PCR-SSCP, polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism.

Недостаток – нельзя определить новую мутацию без последующего секвенирования.

# Эндонуклеазы рестрикции класса II (рестриктазы)

- Узнают специфические последовательности – сайты рестрикции
- Активны в виде димеров в присутствии ионов  $Mg^{2+}$

Номенклатура рестриктаз класса II:

HaeI, HaeII, HaeIII – *Haemophilus aegypticus*, открыты в указанной последовательности

Hinc и Hind – *Haemophilus influenzae*, штаммы с и d

## Субстратная специфичность рестриктаз класса II

Палиндромные сайты

мелкощепящие: *Bgl*I (GGCC), крупнощепящие: *Eco*RI (GAATTC), *Not*I (GCGGCCGC)

Частично вырожденные сайты

*Hinc*II (GT $\color{red}{Y}$ RAC, Y = p $\color{red}{Y}$ rimidine, R = pu $\color{red}{R}$ ine),

Разорванные сайты

*Bgl*I (GCC $\color{red}{N}_5$ GGC, N = a $\color{red}{N}$ y)

Квазисимметричные сайты

*Btr*I ( $\color{red}{C}$ AC↓GTC, класс IIQ)

Двойные сайты:

*Sfi*I ( $\color{red}{GGCCN}_5$   $\color{red}{GGCC}$ )

Разрезание со смещением - класс IIS

(*Foc*I GGATGN $_{9,13}$   $\color{red}{S}$ hifted cleavage) Последовательности липких концов уникальны

Изменение субстратной специфичности в неоптимальных условиях

*Eco*RI - GAATTC, *Eco*RI\* - AATT ( $Mg^{2+}$ , органические растворители)

# Изомеры рестриктаз

## Изошизомеры

Рестриктазы разных видов бактерий, узнающие одинаковые сайты рестрикции и одинаково их расщепляющие.

*Метилчувствительные рестриктазы:*

*HpaII* и *MspI* (CCGG) – первый не расщепляет ДНК, если хотя бы один из остатков С метилирован;

N-метилирование остатков А – *Sau3A* (и GATC и G<sup>Me</sup>ATC), *DpnI* (только G<sup>Me</sup>ATC), *MboI* (только GATC)

## Гетерошизомеры

Узнают одинаковые сайты рестрикции, но по-разному их расщепляют (*KpnI* - G↓GTACC, *Asp7181* - GGTA↓C)

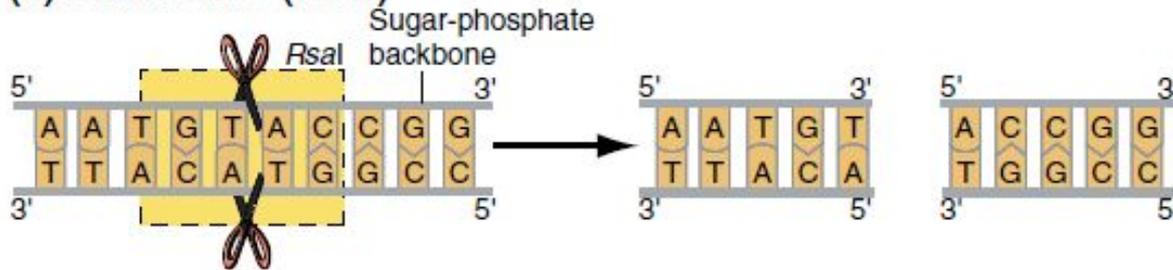
## Изокаудомеры

Узнают разные сайты рестрикции, но создают одинаковые липкие концы.  
Лигирование с потерей сайта рестрикции

*NotI* GC\*GGCC GC    *Bsp120I* G\*GGCC C                      *BamHI/BclI/BglIII/BstYI/DpnII*

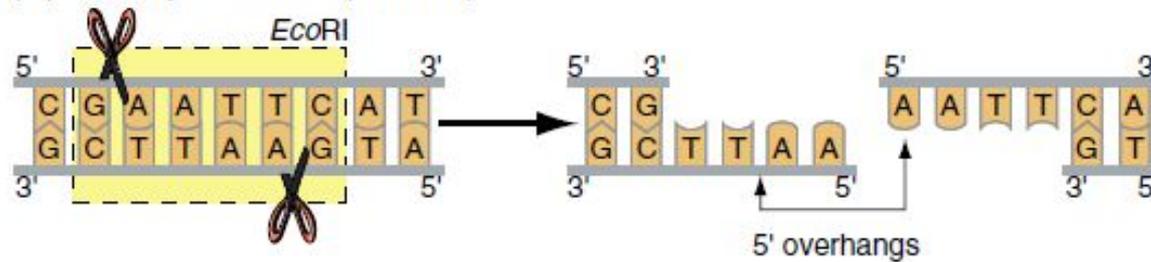
# Формы разрывов ДНК, образующихся под действием рестриктаз класса II

(a) Blunt ends (*RsaI*)



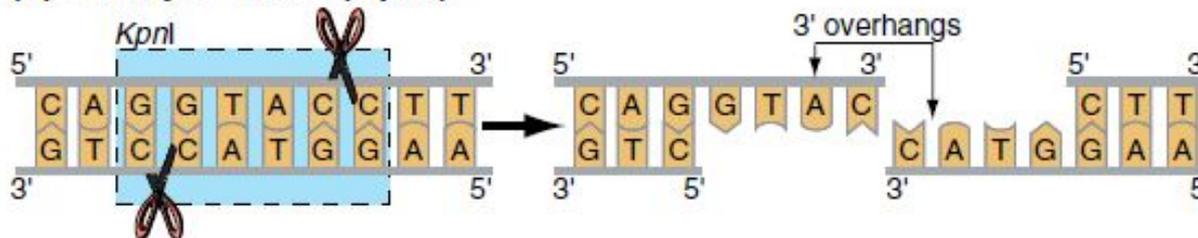
«Тупые» концы

(b) Sticky 5' ends (*EcoRI*)



5'-выступающие

(c) Sticky 3' ends (*KpnI*)



3'-выступающие

# ПЦР-ПДРФ и COBRA

ПДРФ-анализ (RFLP -Restriction Fragment Length Polymorphism)

Combined Bisulfite Restriction Analysis (or COBRA)

EcoR I G↓AATTC  
CTTAA↓G

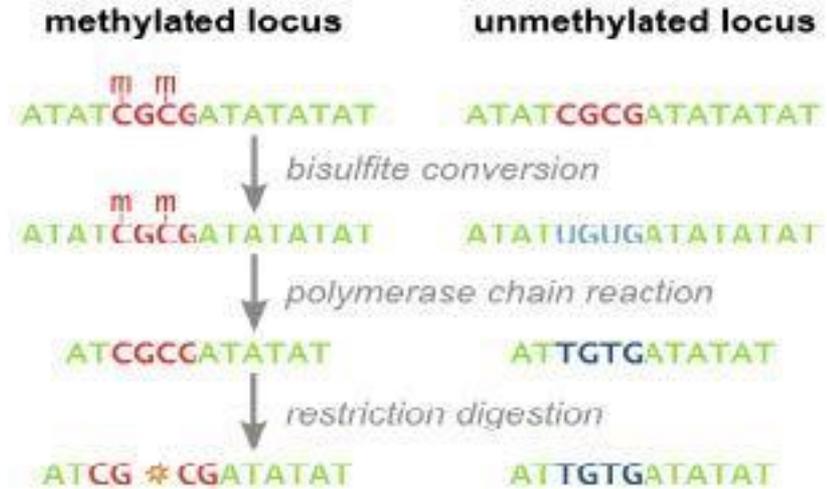
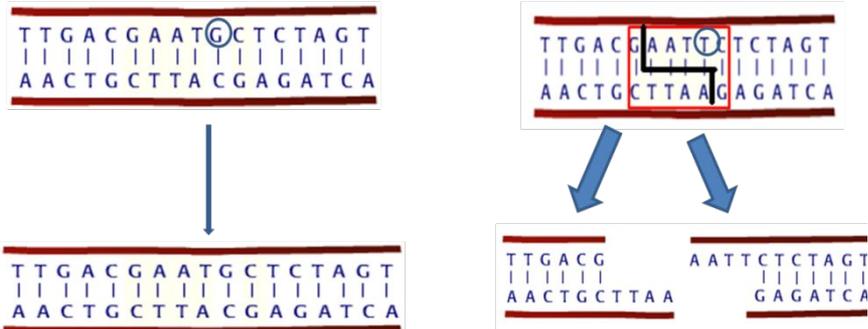
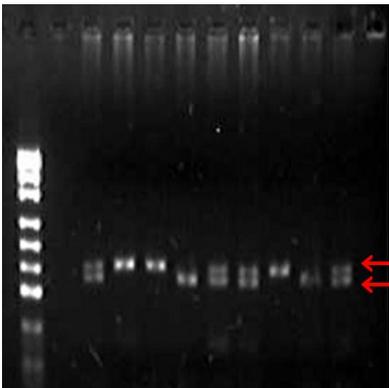
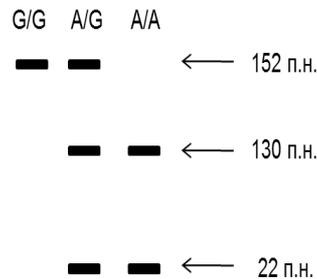
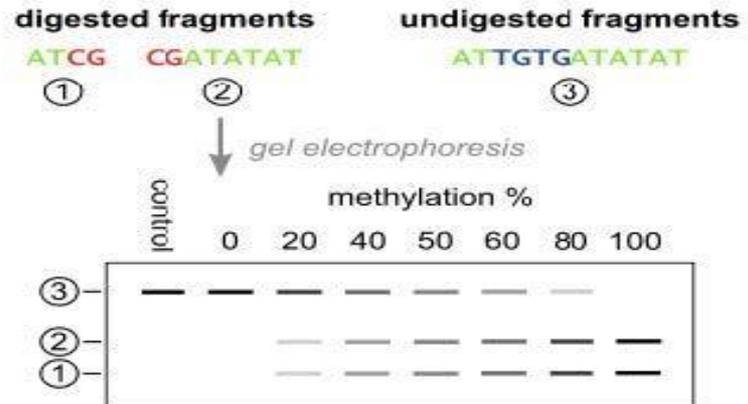


Схема рестрикции:



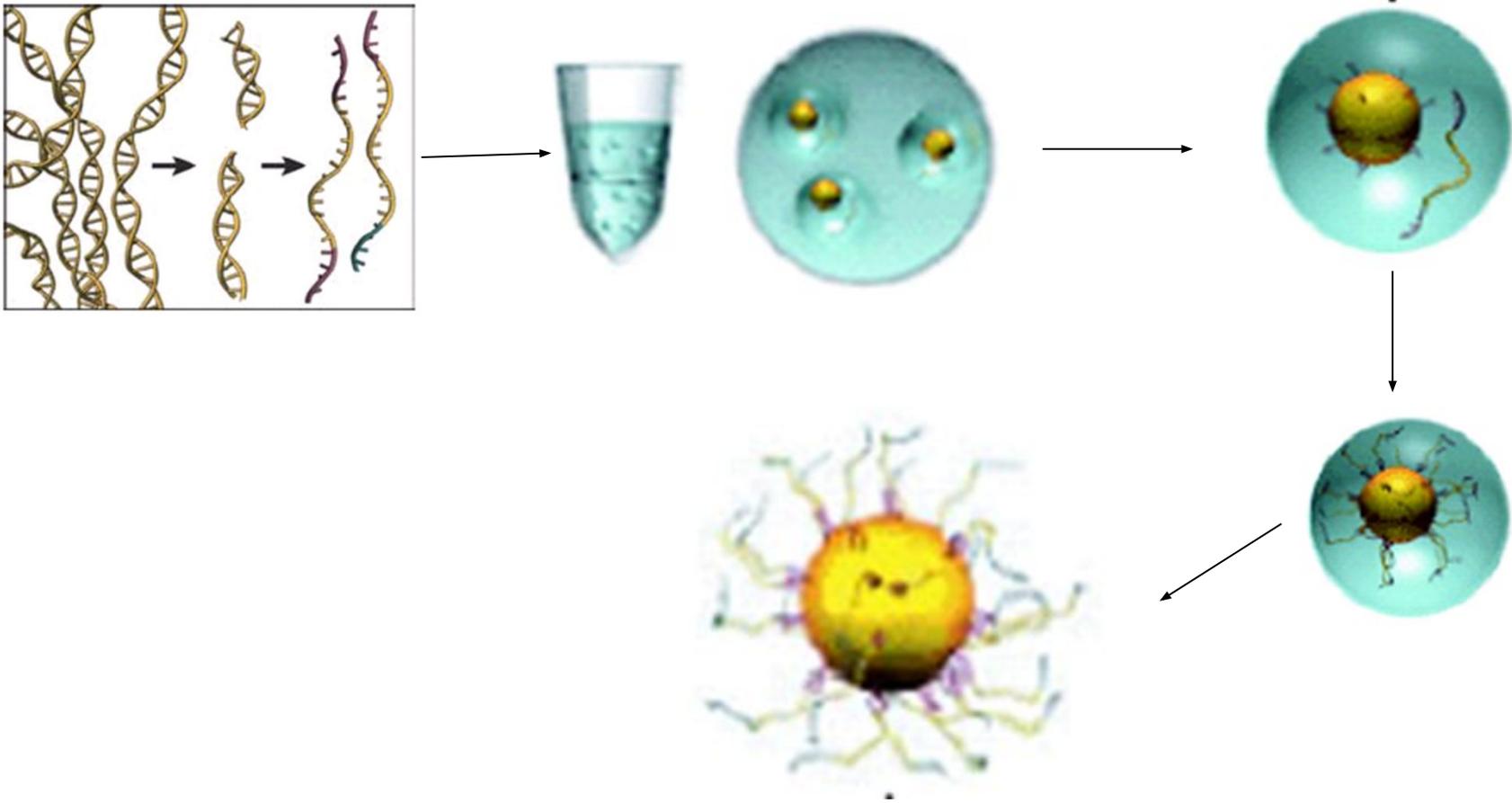
152 п.н.  
130 п.н.



# Эмульсионная ПЦР

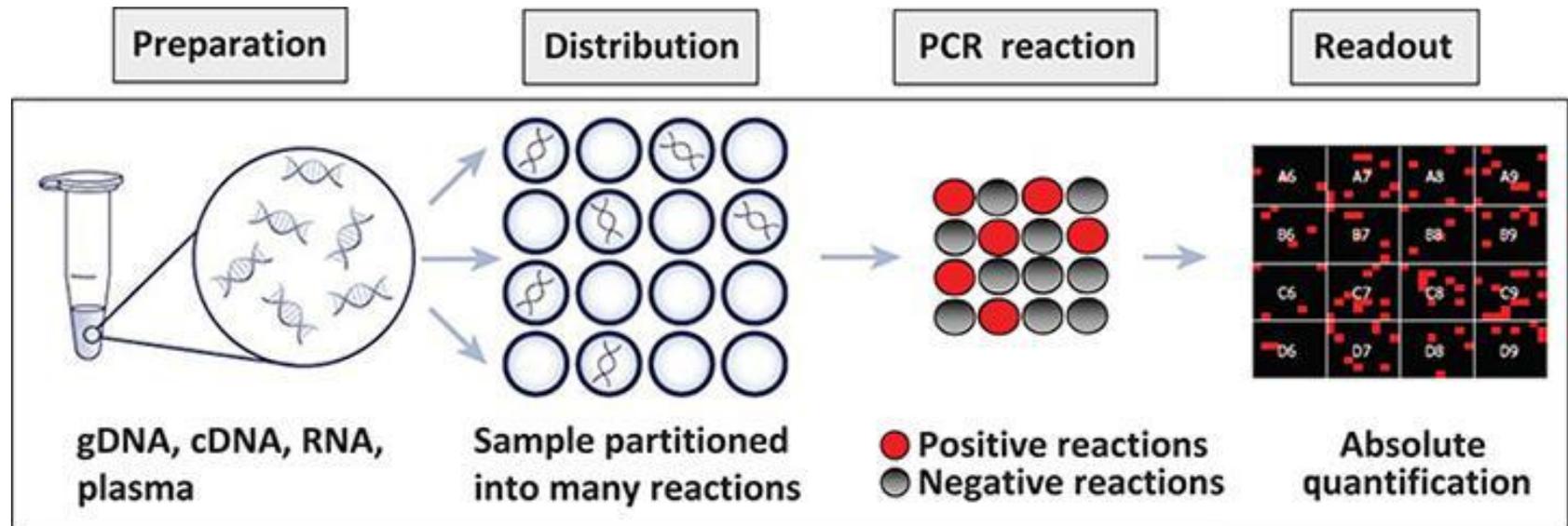
Фрагменты ДНК пришиваются к магнитным шарикам таким образом, чтобы на каждый шарик приходился только один фрагмент, и амплифицируются в эмульсионной ПЦР.

Каждый шарик в конце ПЦР несет 10 млн. копий уникального фрагмента ДНК



# Digital PCR

- Позволяет определять абсолютное количество копий ДНК-мишени в образце.
- Обладает высокой чувствительностью и специфичностью.
- Проводится множество параллельных реакций на малом количестве материала каждая.
- Для коррекции искажений, возникающих в результате возможного попадания в лунку более 1 молекулы ДНК применяется поправка, учитывающая распределение Пуассона.



# Digital PCR (2)

## Решаемые задачи:

- **Количественная оценка биомаркеров рака.** Мутации, ассоциированные с онкологией, часто не удается детектировать из-за их низкой концентрации по сравнению с фоновой ДНК дикого типа в том же образце.
- **пригодна для абсолютного измерения ДНК.**
- **Точная количественная оценка вирусной нагрузки.**
- **Определение количества копий гена (CNV).**
- **Валидация и количественная оценка библиотек NGS.**  
Используя технологии цифровой ПЦР, можно качественно и количественно оценить созданную библиотеку для наиболее эффективного использования секвенаторов.
- **Анализ экспрессии генов.** Капельная цифровая ПЦР позволяет количественно определить уровень экспрессии гена: возможна оценка минимального 10% изменения экспрессии, в том числе и при низких концентрациях.
- **Стандартизация экспериментов и сравнение результатов, полученных в разных лабораториях.**