

# **Молекулярно-генетические методы диагностики в практике врача**

**Кафедра онкологии и гематологии ПФ РНИМУ им Н.И.Пирогова**

**Электив «Значение исследований крови в клинической практике»**

**д.м.н., профессор С.И.Куцев**

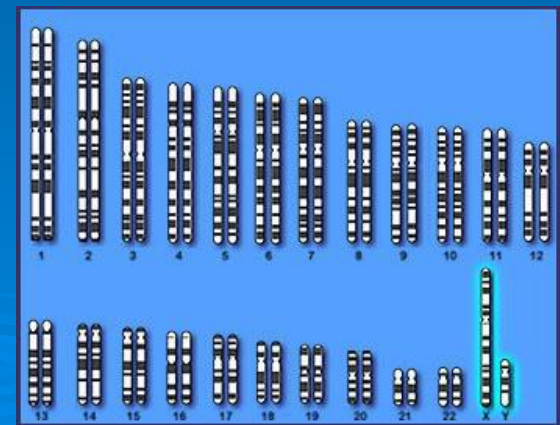
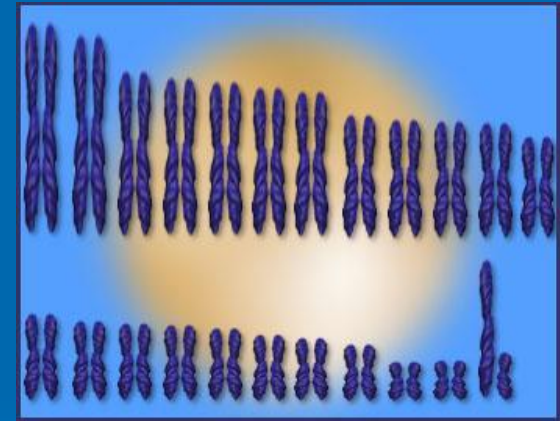
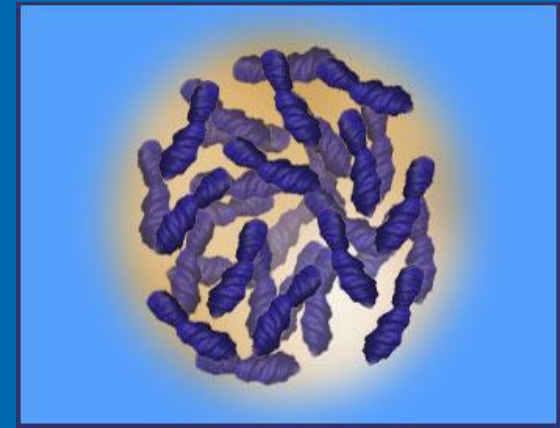
**д.м.н., профессор С.А.Румянцев**

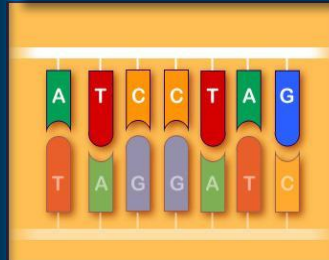
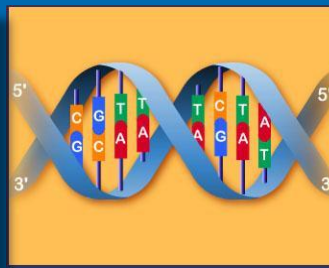
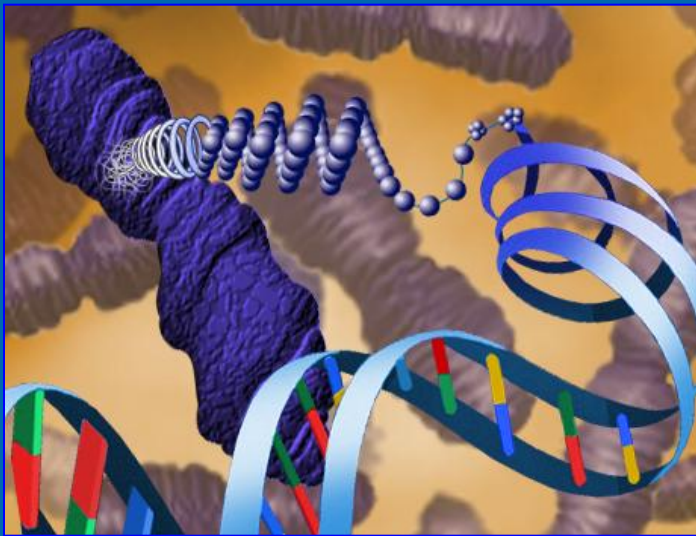
□ В ядре каждой соматической клетки организма человека содержится 46 хромосом (44 аутосомы и 2 половые) или 23 пары (22 пары аутосом и 1 пара половых) – диплоидный набор.

□ В половых клетках – 23 хромосомы – гаплоидный набор

□ Во всех парах хромосом одна получена от отца, вторая – от матери. Хромосомы одной пары называются гомологами или гомологичными хромосомами.

Набор хромосом индивидуума – кариотип.



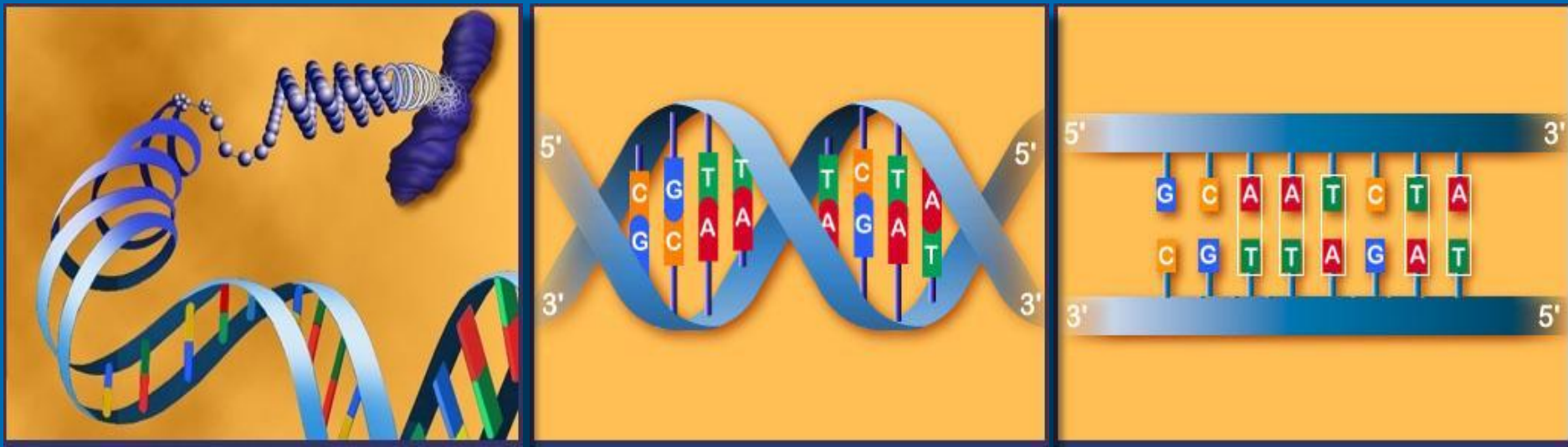


# Строение хромосом

- **Материал, из которого построены хромосомы – хроматин – представляет собой комплекс ДНК и белков, основные из них - пять гистоновых белков Н1, Н2А, Н2В, Н3 и Н4**

**Сложная многоуровневая структура:**

**Функция этой структуры заключается в такой упаковке ДНК чтобы она поместилась в ядре. Т.к. длина Геномной ДНК (в виде двунитевой спирали) около 2 метров.**



## □ 1. Молекула ДНК

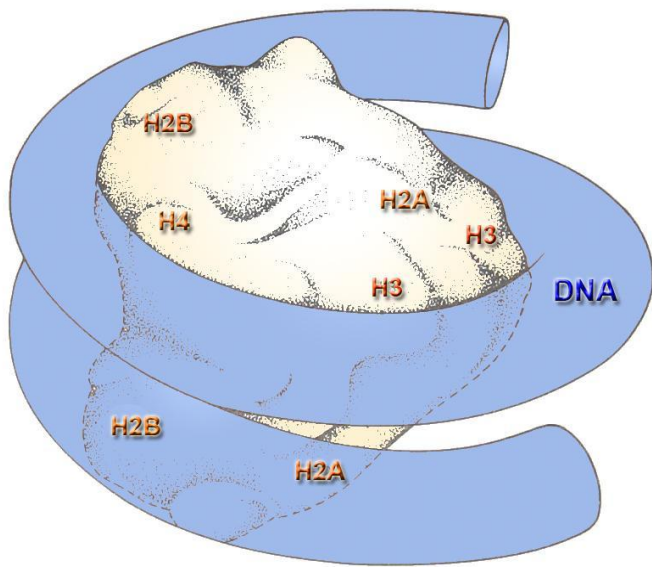
- элементарная структурная ед. ДНК (мономер) – нуклеотид – состав азотистое основание [пурины: аденин (А), гуанин (Г) и пиримидины: цитозин (Ц), тимин (Т)]; сахар [дезоксирибоза]; фосфат. Т.о. ДНК – последовательность нуклеотидов

Обычно находится в форме двойной спирали: две полинуклеотидные цепи обвивающиеся одна вокруг другой имеют антинаправленную ориентацию.

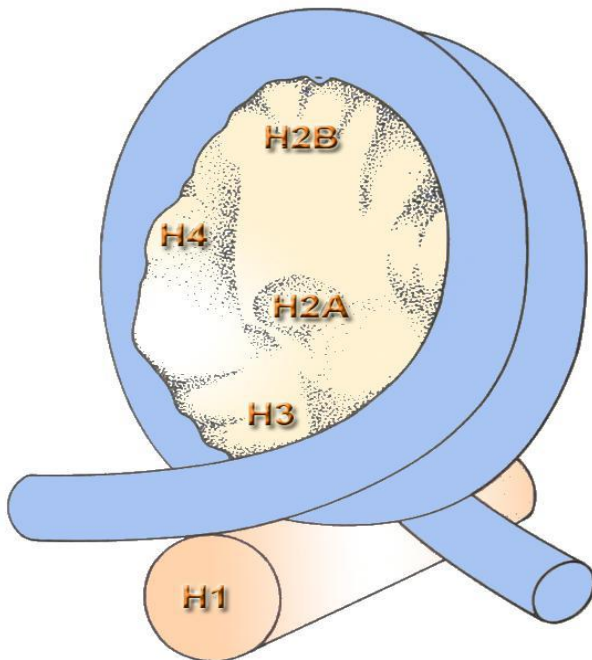
Дезоксирибозофосфатный остов, от него внутрь спирали, друг навстречу другу направлены азотистые основания

Диаметр молекулы около 2 нм

## Строение хромосом



- 2. Через определенные промежутки ДНК обвивается  $1\frac{3}{4}$  раза (145 п.о.) вокруг нуклеосомного кора (кор – гистоновый октамер – гистоны H2A, H2B, H3 и H4, по два каждого вида) – формирует **сверхспираль**. Пятый гистон H1 контактирует с ДНК в местах ее входа и выхода из нуклеосомы. Т.о. в контакте с гистоновым комплексом участвует 168 п.н.



# Строение хромосом

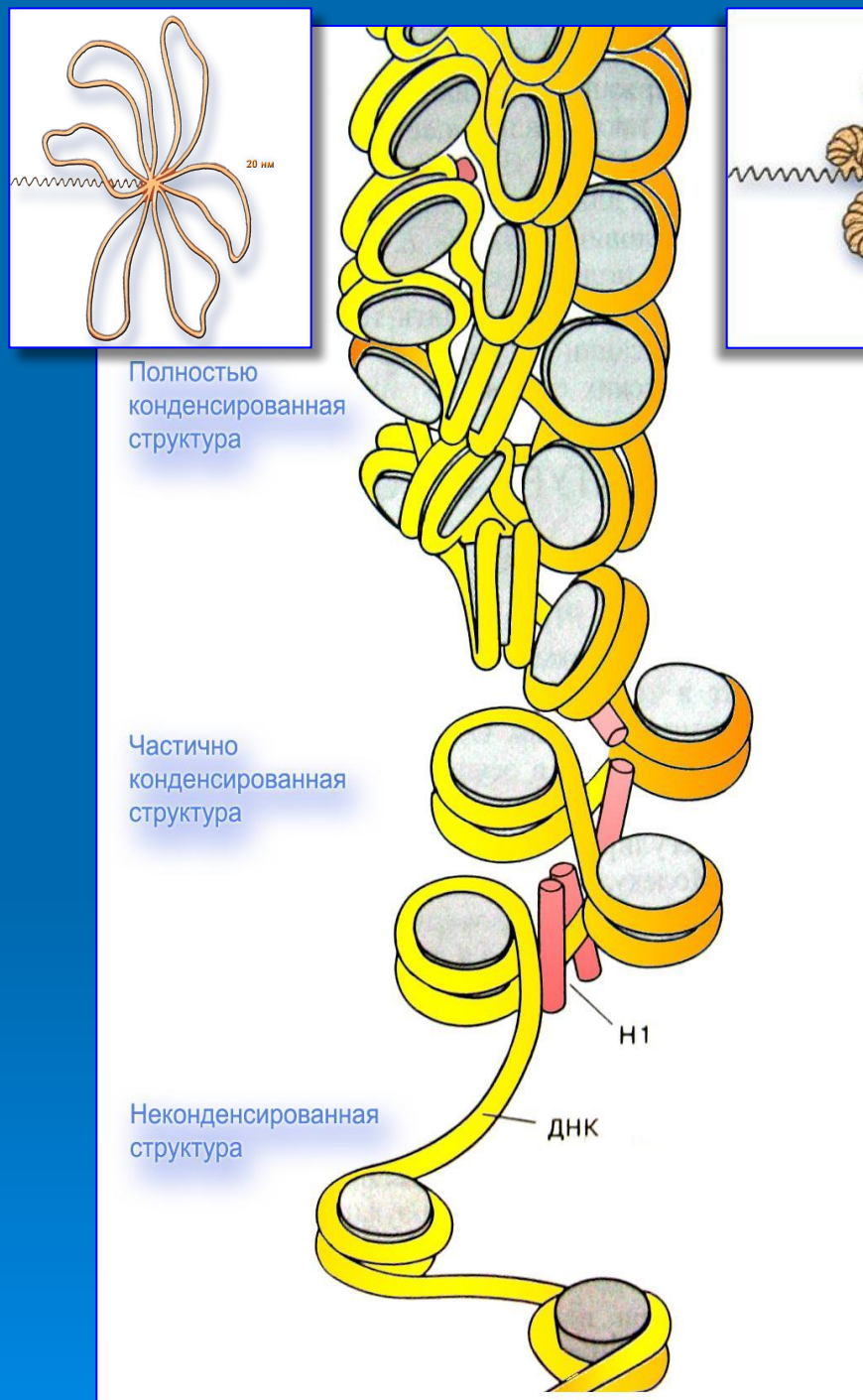
Затем следует участок свободной НК 20 – 60 п.н.

В результате образуется нуклеосомная цепь (волокно) - структура напоминающая бусы.

- 3. Нуклеосомы упаковываются бок о бок принимая вид волокна диаметром 10нм.
- 4. Цепь нуклеосом дополнительно спирализуясь формирует соленоид (1 виток – 6 нуклеосом), поперечник ~ 30нм.
- 5. Соленоиды формируют хроматиновые петли, прикрепленные к белковому каркасу.
- 6. Петли дополнительно спирализуются.

Множество хроматиновых петель формируют хроматин хромосом.

В результате такой упаковки длина молекулы ДНК уменьшается в 10000 раз

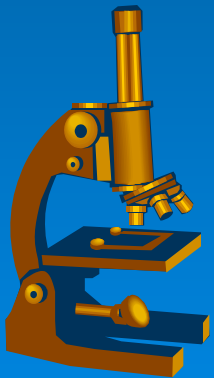


## Строение хромосом



- **Центромера** – компактный участок хромосомы, к которому при делении клетки прикрепляются волокна веретена
- **p, q-плечи**
- **Теломеры** – концевые участки линейных хромосом. Необходимы для репликации и стабильности.

Теломеры содержат большое число тандемных повторов ТАГГГ. В норме во время деления происходит уменьшение числа повторов в теломерах. Однако каждый раз они достраиваются с помощью специального фермента – *теломеразы*. Уменьшение активности этого фермента приводит к укорочению теломер и → к неспособности клеток делиться и их гибели, что сопровождается старением.



# КЛАССИФИКАЦИЯ



По соотношению длин плеч можно выделить хромосомы:

## □ Метацентрические

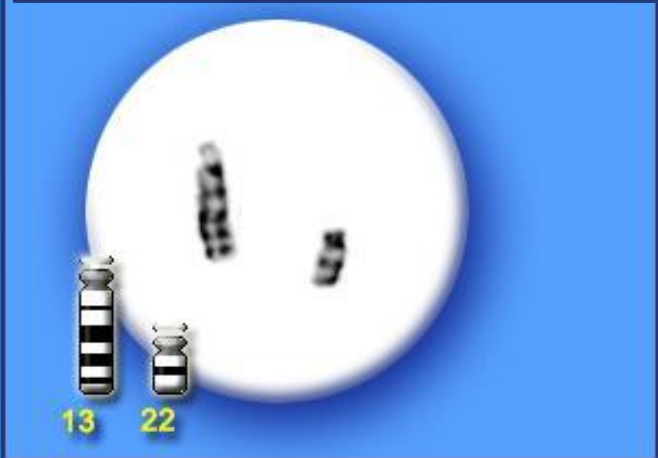
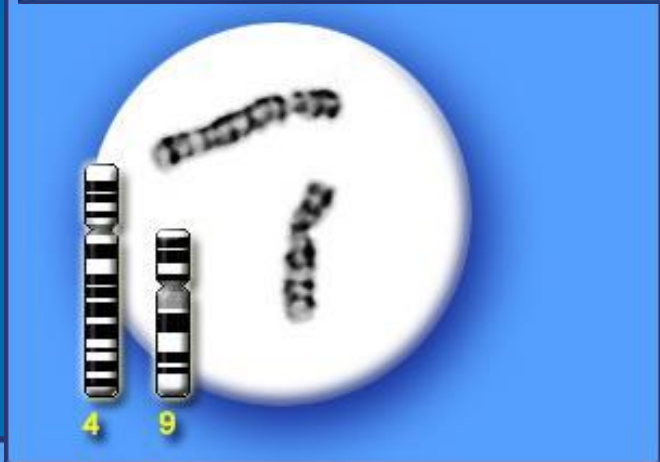
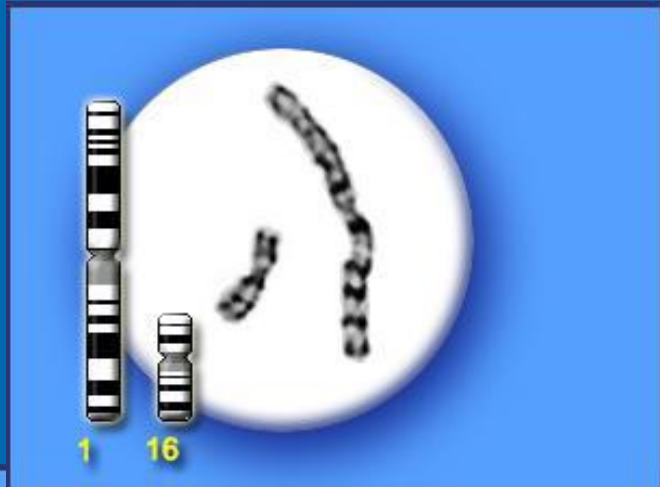
- длина  $p \approx q$

## □ Субметацентрические

-  $p$  и  $q$  плечи отличаются по длине

## □ Акроцентрические

- резкое отличие в длине  $p$  и  $q$  плеч

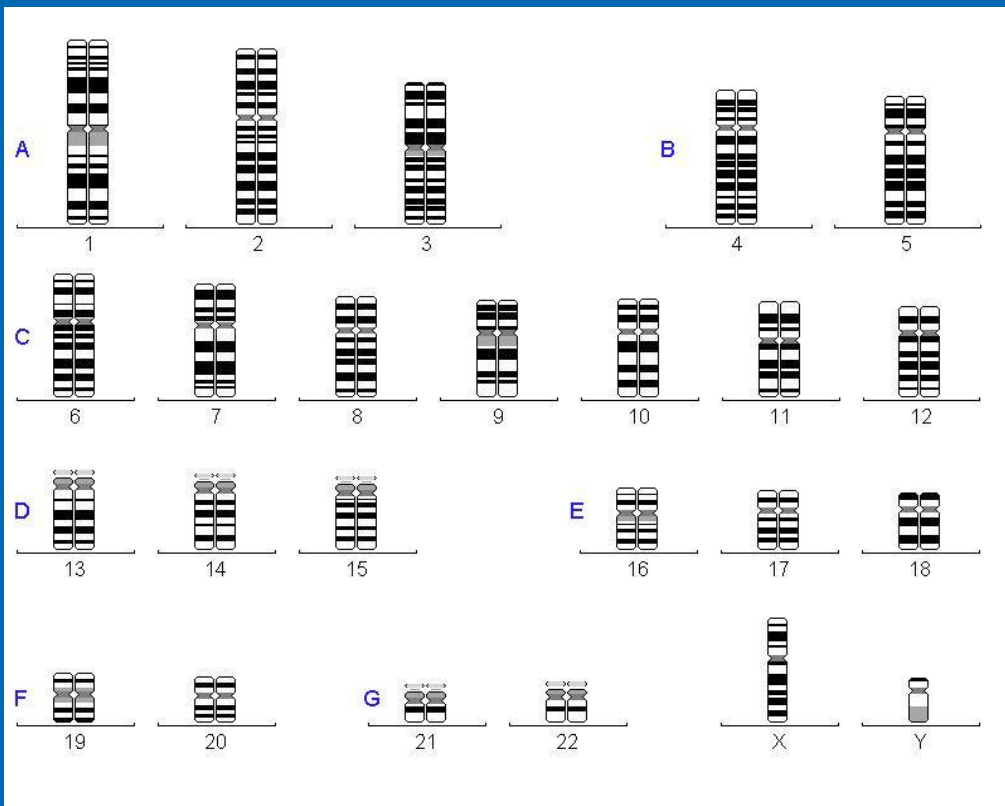




# КЛАССИФИКАЦИЯ

Все хромосомы разделены на 7 групп, которые были обозначены буквами английского алфавита от А до G.

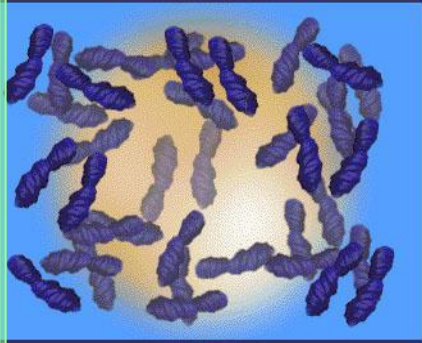
Все пары хромосом было предложено нумеровать арабскими цифрами.



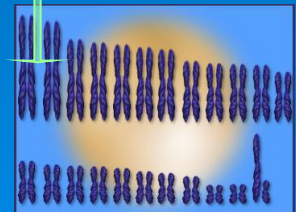
- Группа А (1-3) - самые крупные хромосомы. Хромосомы 1 и 3 -метацентрические, 2 - субметацентрическая.
- Группа В (4-5) - две пары довольно длинных субметацентрических хромосом.
- Группа С (6-12) - хромосомы средних размеров. Хромосомы 6, и 11 больше похожи на метацентрики. Хромосомы 7, 8, 9, 10 и 12 -субметацентрики. X-хромосома по размеру и морфологии сходна с хромосомами 6 и 7.
- Группа D (13-15) - акроцентрические хромосомы средних размеров.
- Группа E (16-18) - довольно короткие хромосомы. Хромосома 16 более метацентрична, часто на проксимальном конце длинного плеча имеется вторичная перетяжка.
- Группа F (19-20) - самые маленькие метацентрики.
- Группа G (21-22) - две пары самых мелких акроцентрических хромосом.
- Y-хромосома выделяется как самостоятельная.




- Лучше и удобнее всего анализировать хромосомы в те моменты клеточного цикла, когда их можно визуализировать с помощью светового микроскопа, т. е. во время деления клетки (стадии прометафазы, ранней, средней и поздней метафазы), когда происходит конденсация хромосом - они становятся видимыми и после специальной обработки и окраски доступны для анализа.



Т.о. первое главное условие цитогенетической диагностики - выявление делящихся клеток.





# ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ХРОМОСОМНЫХ ПРЕПАРАТОВ

В качестве материала для получения хромосом человека и их исследования могут быть использованы клетки любой ткани, доступной для биопсии. Чаще всего применяются:

- 1) Клетки периферической крови (лимфоциты);
- 2) Фибробласты;
- 3) Пунктат костного мозга
- 4) Клетки ворсинчатого хориона;
- 5) Пуповинная кровь плода.
- 6) Клетки амниотической жидкости;

# Основные методы приготовления хромосомных препаратов

## ЭТАПЫ:



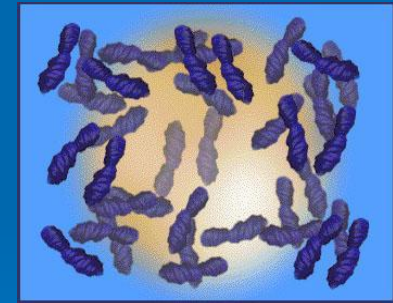
- 1) **Забор материала** – ткань, содержащая способные к делению клетки (периферическая кровь; пунктат костного мозга; фибробласты; клетки амниотической жидкости; клетки ворсинчатого хориона; пуповинная кровь плода).
- 2) **Культивирование на питательной среде**

### 3) **Остановка деления на стадии метафазы**

– добавляется колхицин

- 4) **Гипотонизация** – создание гипотонического окружения (гипотонический раствор KCl) → разрыв мембран клеток → хромосомы лежат свободно.

### 5) **Фиксация**

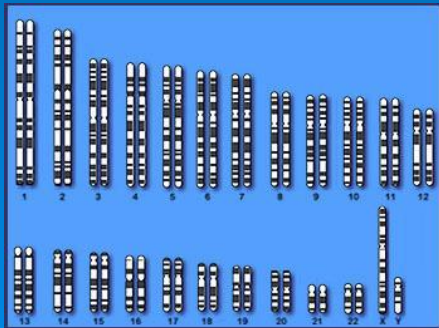


## Приготовление цитогенетических препаратов

### 7) **Окраска**

гигиеническая

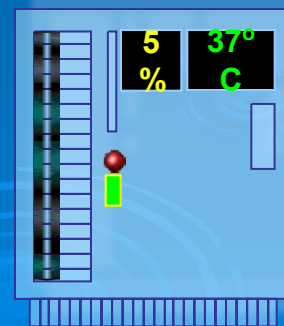
дифференциальное окрашивание (G-, R-, C-, Q-окраска)



# Культивирование клеток периферической крови, постановка культуры лимфоцитов человека.

Забор материала. Культивирование на питательной среде.

- Используются цельная периферическая кровь, взятая стерильно из локтевой вены в количестве 1-2 мл в стерильный флакон с раствором гепарина.
- Постановку культур осуществляют в специальном боксовом помещении или под ламинарным шкафом.
  - ✓ в стерильный флакон вносят 0,5 мл гепаринизированной цельной крови, 0,1-0,2 мл ФГА, после добавляют 6 мл среды 199 или Игла (предварительно в среду Игла добавляется 5 мл 3% раствора глутамина) и 1,5 мл сыворотки крупного рогатого скота или эмбриональной телячьей. Общий объем культуральной смеси, составляет 8 мл.
- Флаконы с культуральной смесью закрываются стерильными пробками и помещаются в термостат при 37°C сроком на 72 часа.



## Культивирование клеток периферической крови, постановка культуры лимфоцитов человека.

Остановка деления клеток на стадии метафазы. Гипотонизация. Фиксация.

- За 1,5-2 часа до окончания 72-часовой инкубации добавляется колхицин (колцемид), блокирующий митоз в метафазе.
- По окончании инкубации культуральную смесь из флакона центрифугируют в течение 5 минут при 1000 об/мин.
- К осадку клеток добавляют гипотонический раствор (хлористый калий или цитрат натрия) 7-9 мл
- После гипотонизации клетки переводят в осадок центрифугированием, надосадочную жидкость удаляют,
- Осадок клеток подвергают фиксации смесью метанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1.

Обычно производится 3-4 смены фиксатора, каждый раз отделяя материал от него центрифугированием при 1000 об/мин в течение 5 мин. Общая продолжительность фиксации составляет от 40 мин до 1,5 час.

- ✓ Показатель законченности фиксации - бесцветность, прозрачность последней смены фиксатора после того, как в нем ресуспендирована клеточная взвесь

# Приготовление хромосомных препаратов

Задачей процедур этого этапа является получение хорошо распластанных метафазных пластинок с сохранением целостности хромосомного набора каждой из них.

---

- Нанесение цитогенетической взвеси на стекло на хорошо вымытые, обезжиренные, охлажденные и смоченные водой предметные стекла наносят 4-5 капель цитогенетической взвеси, одна возле другой.
- Удаление избытка жидкости, высушивание стекол
- Окраска

# ОКРАСКА

## Метод сплошной окраски (RV-метод).

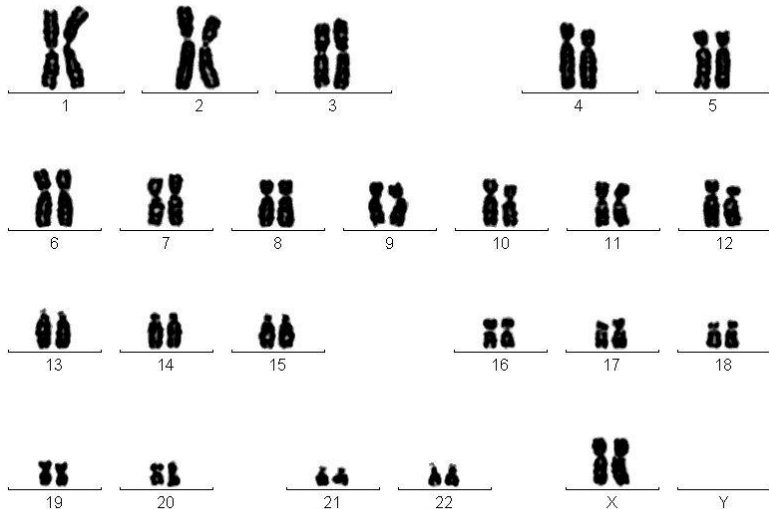
### Окраска азур-эозином:

1) Готовится 0,1% раствор эозина и 0,1% раствор азура в дистиллированной воде.

2) Для окраски готовят рабочий раствор на водопроводной воде: раствор азура - 6 частей, раствор эозина - 3 части, водопроводная вода - 9 частей.

3) Краску наливают на препараты на 3-5 минут, после чего смывают проточной водой, а препараты высушивают.

Вместо азур-эозина может быть использован краситель Романовского-Гимзы, его разводят водопроводной водой в соотношении 1: 3. Процедура окраски та же.





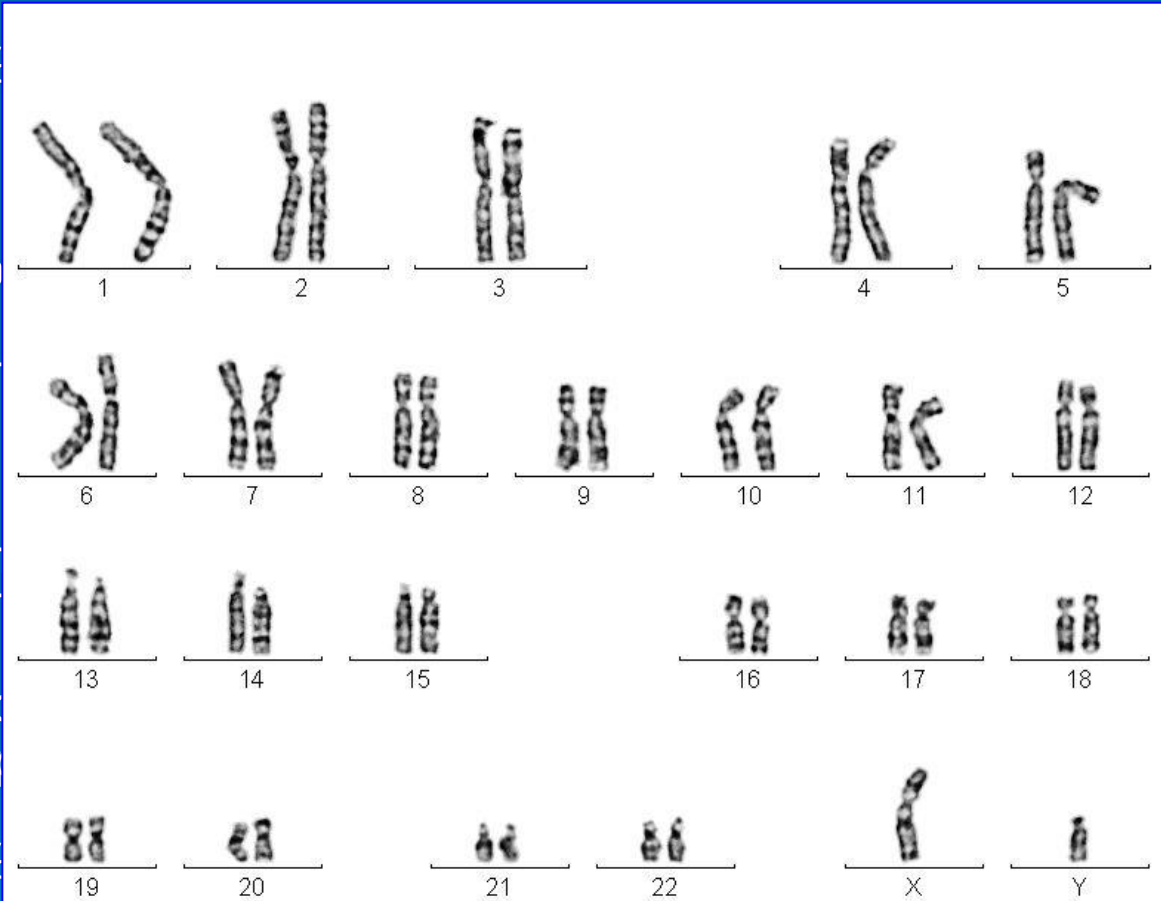
# Методы дифференциальных окрасок хромосом, выявляющих их линейную неоднородность.

## В практике широко применены следующие методы:

- метод окраски красителем Гимзы (G-band, GTG-метод окраски, с предварительной обработкой препарата трипсином);
- метод выявления гетерохроматина хромосом (C- band, CBG -метод для выявления C-гетерохроматина, с обработкой препарата гидроксидом бария);
- метод выявления сегментации хромосом, обратной G-сегментации (R-band, RHG-метод, если применяется температурная обработка препарата, RBG-метод, если применяется БДУ Гимза);
- метод окраски флуорохромами (Q- метод, QFQ- метод, если используется квинакрин или QFH- метод, если применен Хехст 33258 FISH- метод ).

## □ G-окрашивание

1. Препараты обрабатываются 0,25% р-ром трипсина
2. Промываются в 70%, 96% этаноле
3. Высушиваются
4. Окрашиваются 5% р-ром Гимза на фосфатном буфере – 10 мин.
5. Промываются и сушатся

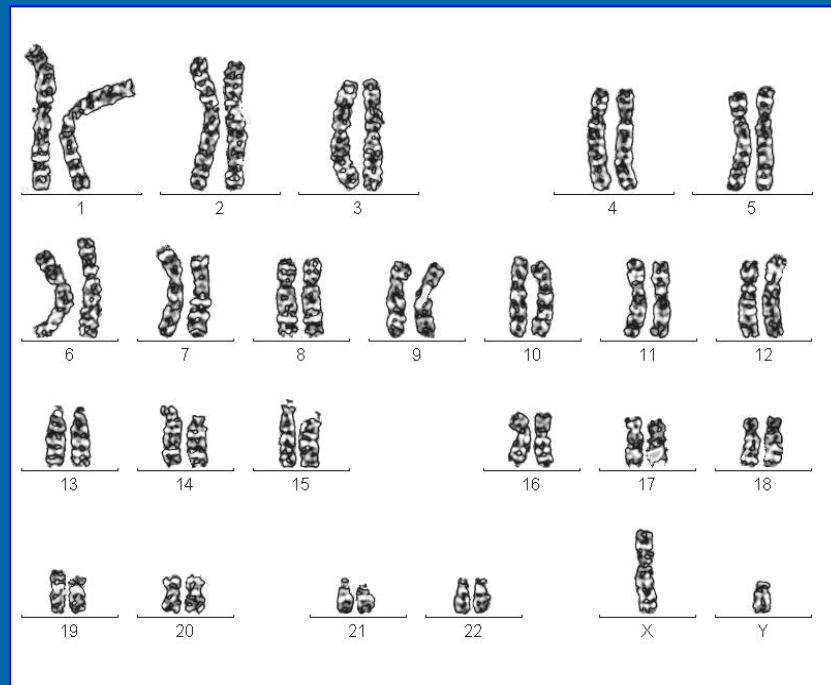


## □ C-окрашивание

1. Препараты обрабатываются насыщенным раствором гексабарбитала 20 мин.
2. Ополаскиваются проточной водой
3. Инкубируются 1,5 часа в 10xSSC при  $t=65^{\circ}\text{C}$
4. Промываются в 70%, 96% этаноле
5. Высушивают препараты
6. Окрашивание красителем Райта ~ 7 мин.

## □ R-окрашивание

1. «Состарившиеся» хромосомные препараты инкубируют при  $t=60^{\circ}\text{C}$  в насыщенном растворе гидроксида бария 3 – 5 мин.
2. Отмывают в дистилляте
3. Окрашивают р-ром красителя Гимза на фосфатном буфере при рН 6,8 в течение 10 – 20 мин.

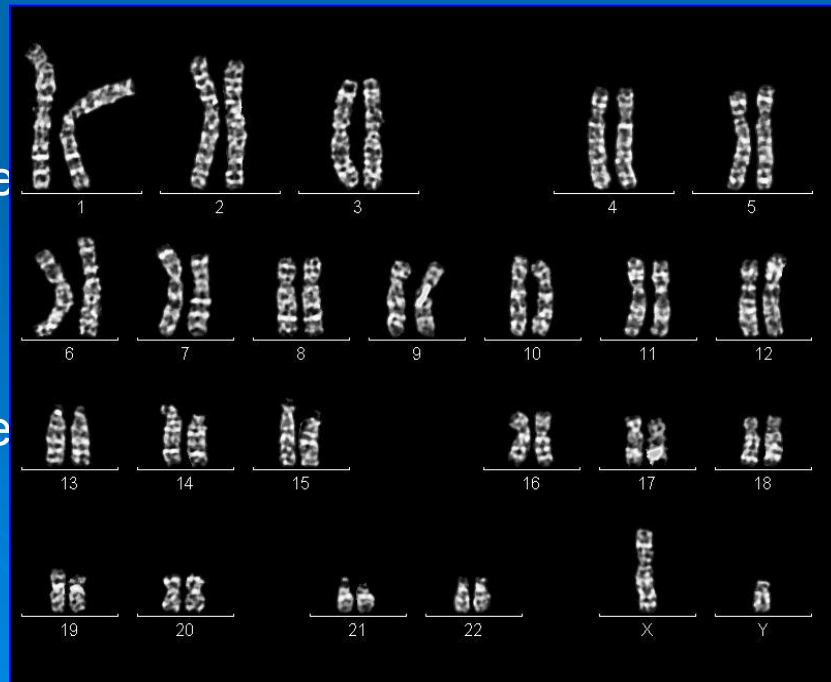


## □ Q-окрашивание

Используются флюорохромы

1. Краситель разводят в фосфатном буфере (рН 6,8) до концентрации 50 мкг/мл и наносят на препараты
2. Окрашивание 15 – 20 мин.
3. Трижды промывают в фосфатном буфере по 1 – 3 мин.

Рисунок аналогичен рисунку при G-окраске



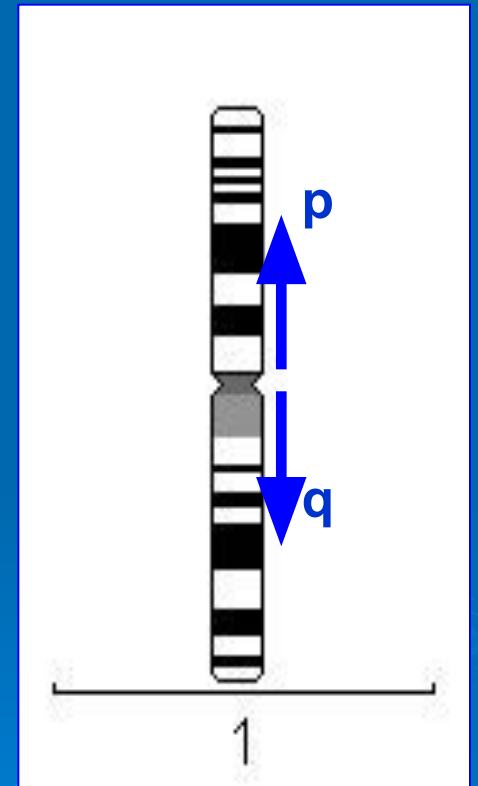
## Ряд методов окраски позволяет получить поперечную исчерченность хромосом (R-, G-, Q-band).

- Полосы размещаются по длине плеч хромосом в разных районах или участках.
- Каждая хромосома человека содержит только ей свойственную последовательность поперечных полос, что позволяет точно идентифицировать каждую хромосому (определить их количество и структурную организацию), и с более высокой точностью определить, в каком сегменте произошла перестройка.
- Сегмент в зависимости от степени конденсации – 5 -10млн. п.н.



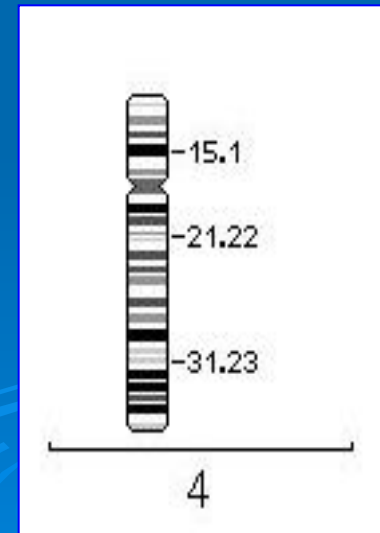
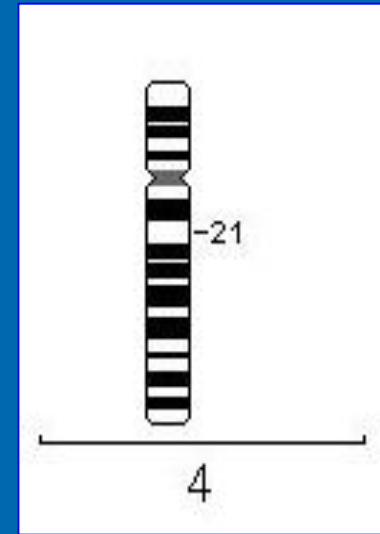
# Правила обозначения полос хромосом

- Полосы и участки нумеруются в направлении от центromеры к теломере по длине короткого и длинного плеча.
- Символы **p** и **q** используются для обозначения короткого и длинного плеча соответственно.
- Центромера обозначается как **10**, ее участок, прилежащий к короткому плечу – **p10**, к длинному – **q10**.



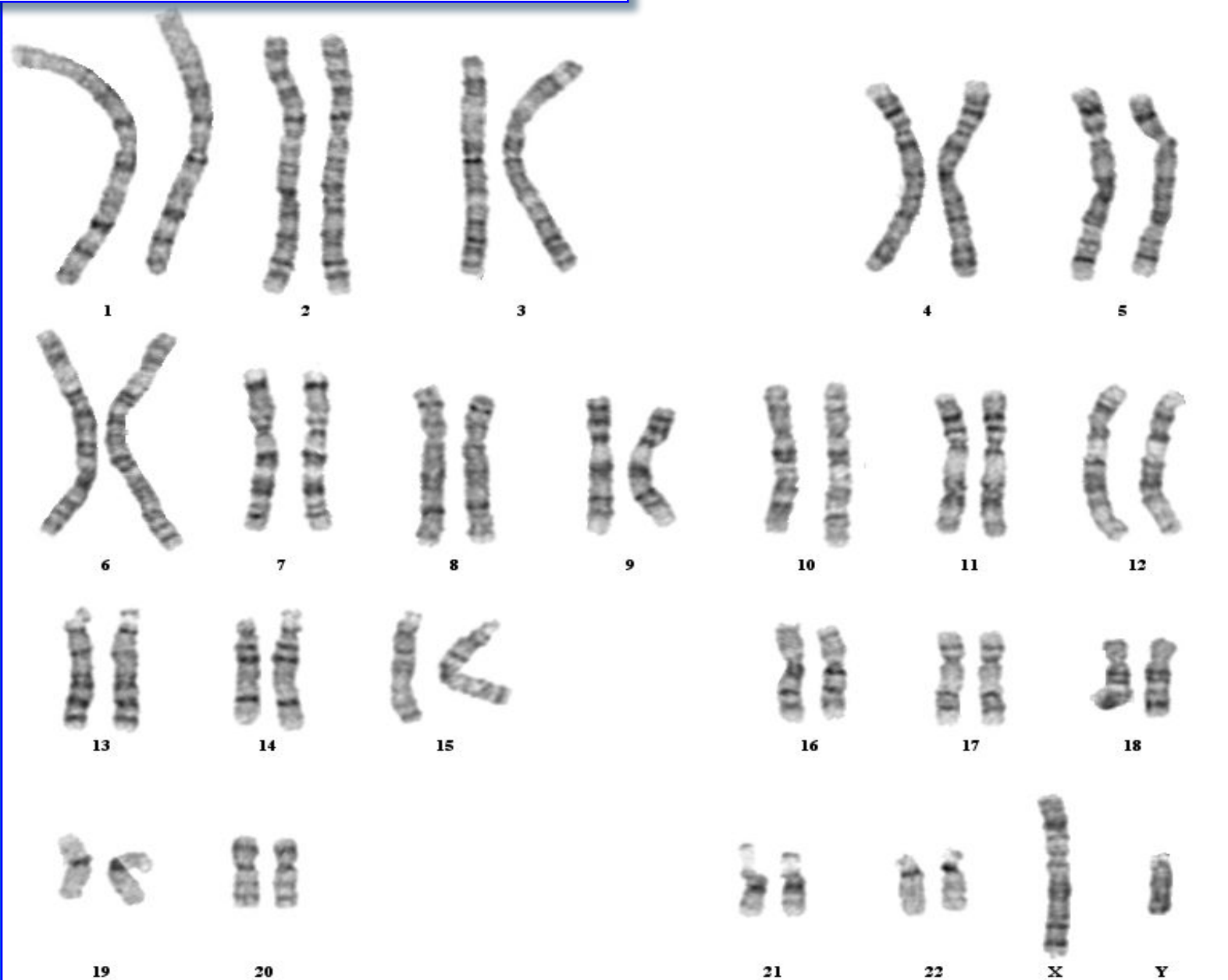
В любом обозначении хромосомы используются:

- 1) номер хромосомы,
- 2) символ плеча,
- 3) номер района (участка),
- 4) номер полосы в пределах этого района
  - Все указывается без пробелов и пунктуации.
- 5) если полоса подразделяется на субполосы то, они указываются номером после точки.
- 6) разделение субполос также нумеруется, но без пунктуации



**4q21 4p15.1 4q21.22**

# Цитогенетическое исследование [G-band]



# Основные принципы анализа хромосомных препаратов

- Цитогенетический анализ хромосом проводят на препаратах дифференциально окрашенных по длине (G-, C-, R-, Q-методами)
- В каждом случае анализируют не менее 20 метафазных пластинок
- При мозаицизме число их удваивается или применяют молекулярно-цитогенетические технологии



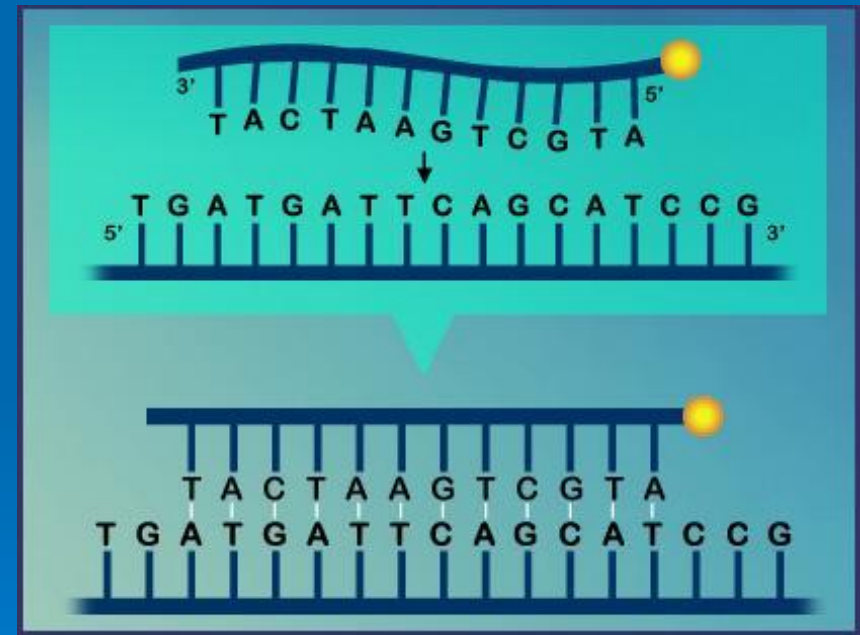
Внедрение методов дифференциальной окраски хромосом способствовало значительному прогрессу в цитогенетике человека и привело к крупным достижениям. Среди них следует отметить основные:

- 1. Установлено существование широкого генетического разнообразия хромосомных синдромов, связанных с дисбалансом хромосомного материала.
- 2. Стало возможным подразделение хромосомных синдромов соответственно типу перестройки и размеру вовлеченного в него участка индивидуальной хромосомы.
- 3. Описаны новые нозологические формы хромосомных синдромов.
- 4. Установлено явление обширного хромосомного полиморфизма по C и Q-гетерохроматину и ЯОР-хромосом.
- 5. Открыты и описаны явления хромосомной нестабильности, специфической сайт-ломкости хромосом, имеющее прогностическое и диагностическое значение в клинической онкогенетике и медико-генетическом консультировании.
- 6. Новые методы хромосомного анализа обеспечили прогресс в картировании хромосом.

# МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

- Базируется на технологии гибридизации ДНК.
- Позволяет увидеть хромосомную локализацию специфических последовательностей ДНК с помощью микроскопа.

Для изучаемой хромосомы или конкретного ее участка, исходя из специфичности оснований ДНК, готовят однонитевой участок ДНК, к которому присоединяется биотин или дигоксигенин, или же непосредственно флуорохром. Такой меченый отрезок ДНК называется зонд.



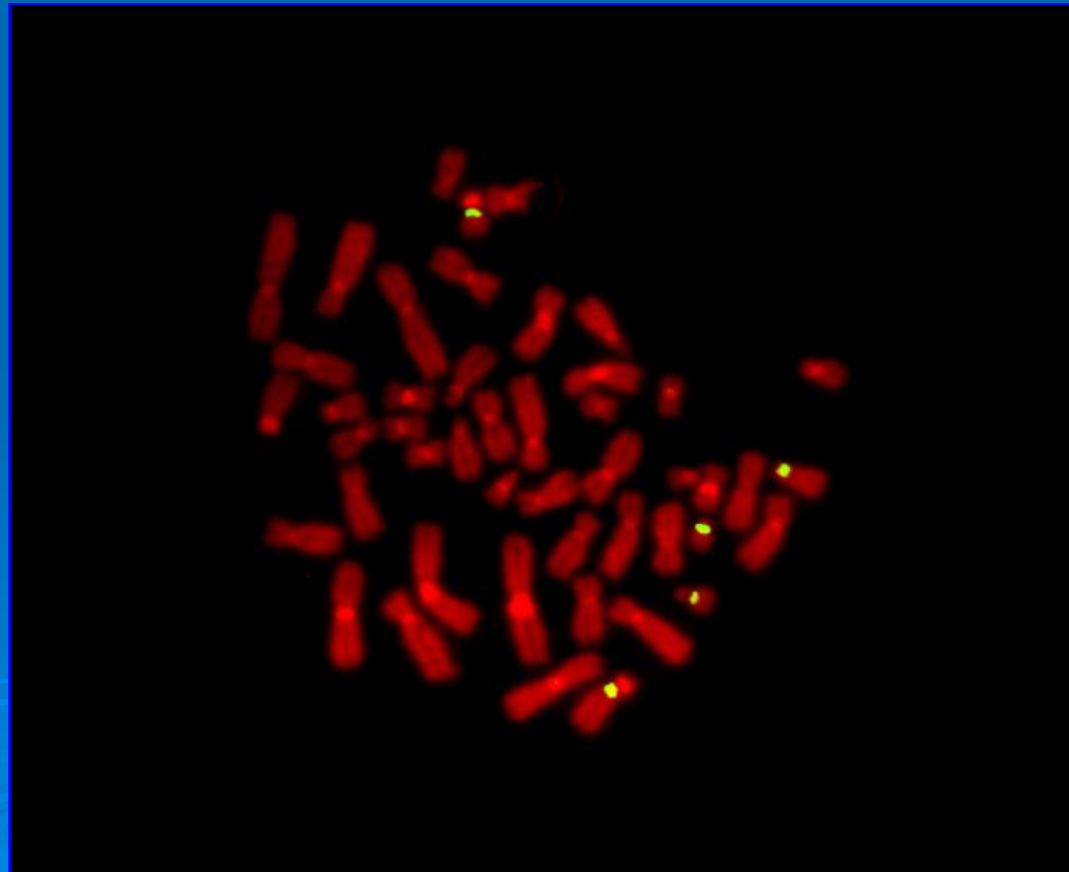
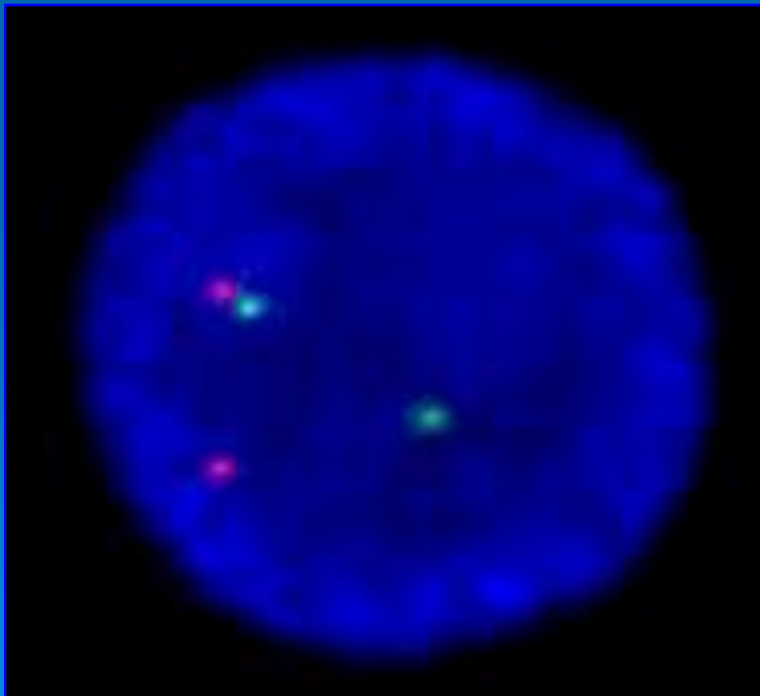
# МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

## ЭТАПЫ:

- 1) 1) – 6) Этапы аналогичны этапам цитогенетического исследования
- Денатурация образца и зонда (нагревание  $t \approx 75-95^{\circ}\text{C}$ )
- Гибридизация
- Отмывка
- Амплификация (может отсутствовать)
- Мечение зонда (может отсутствовать) и окраска фона
- Детекция

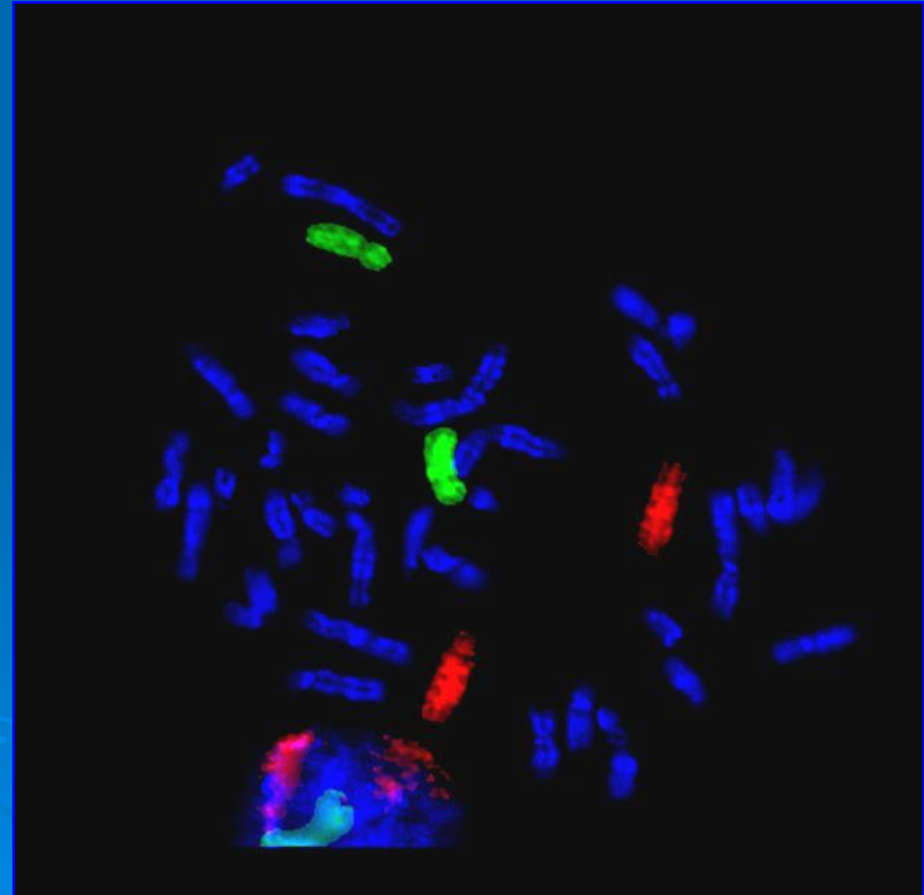
# МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

- При наличии комплементарного зонду участка последовательности ДНК – визуализация (хромосомы, ядра с флуоресцентными сигналами)
  - **флуоресцентная гибридизация in situ (FISH).**



# МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

– флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH).



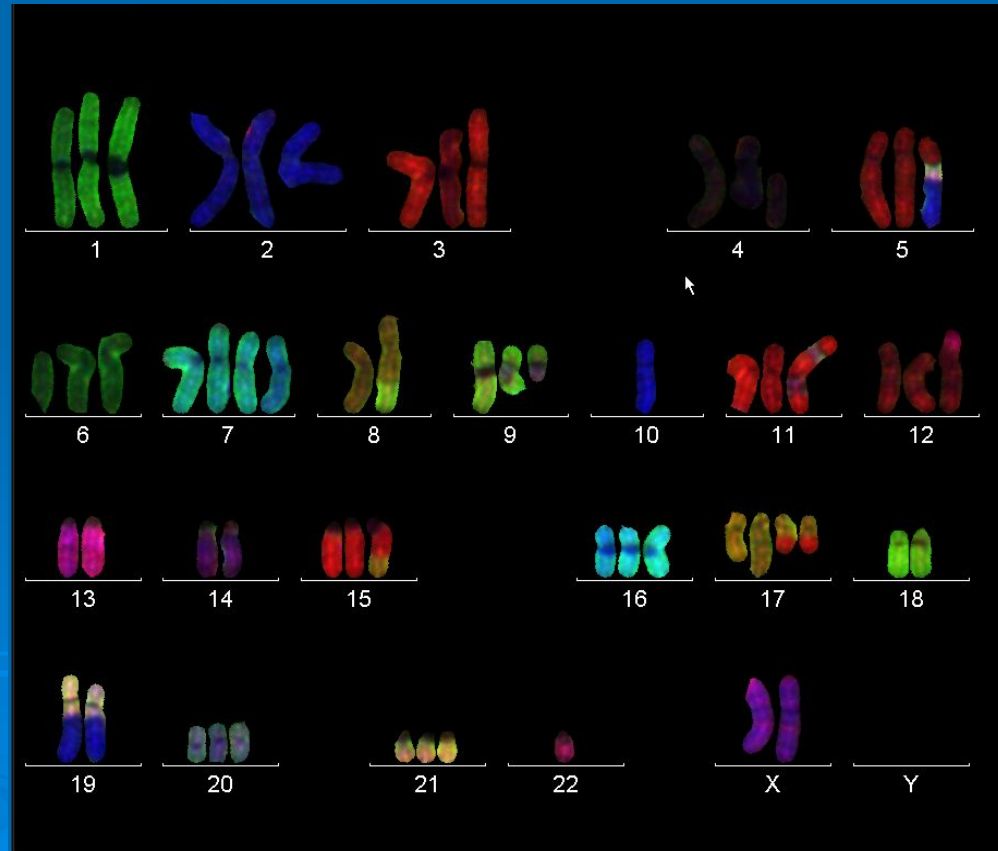
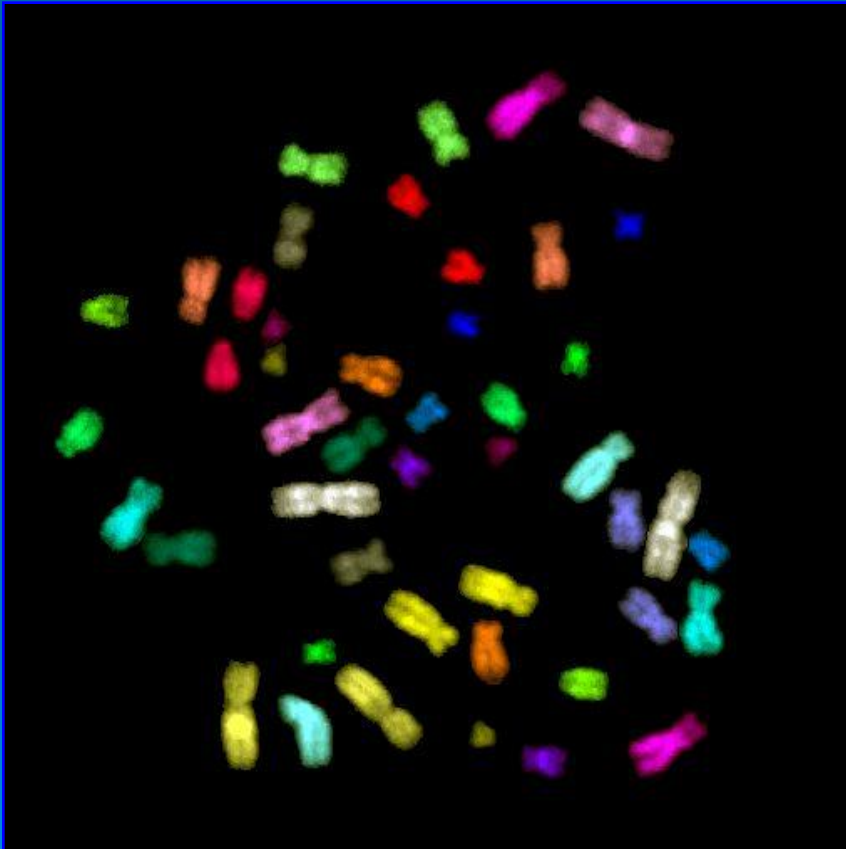
# МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Новые молекулярно-цитогенетические технологии – анализ многоцветно окрашенных хромосом – **спектральное кариотипирование (SKY)** и **мультиплексная FISH (M-FISH)**.

SKY и M-FISH обладают высокой эффективностью выявления транслокаций и других сложных aberrаций. Метод M-FISH позволяет идентифицировать многие ранее не известные перестройки хромосом, особенно их концевых регионов.

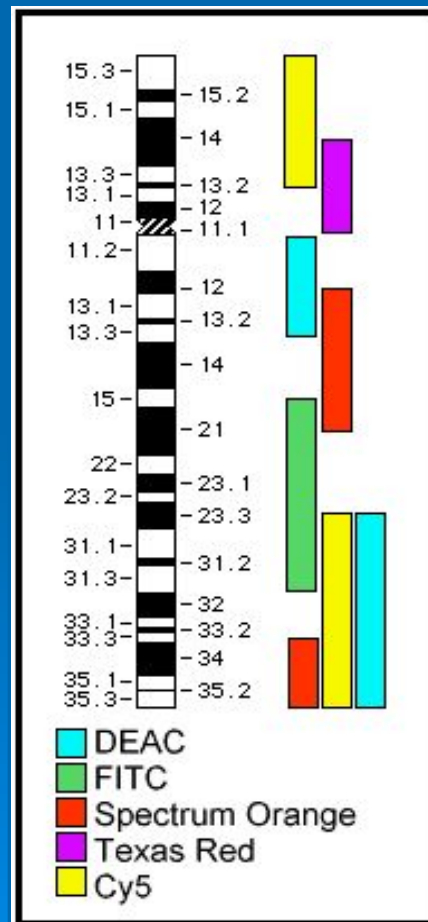
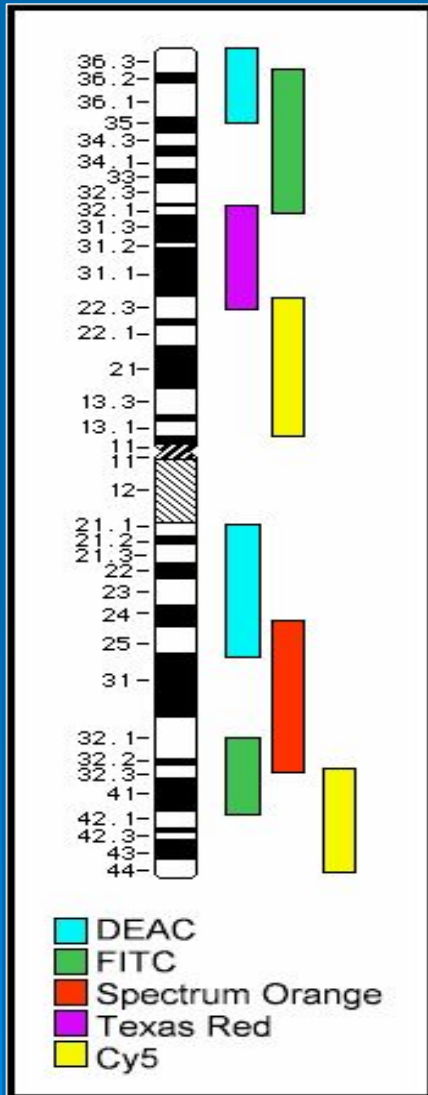
# МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

## Спектральное кариотипирование (SKY)



# МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

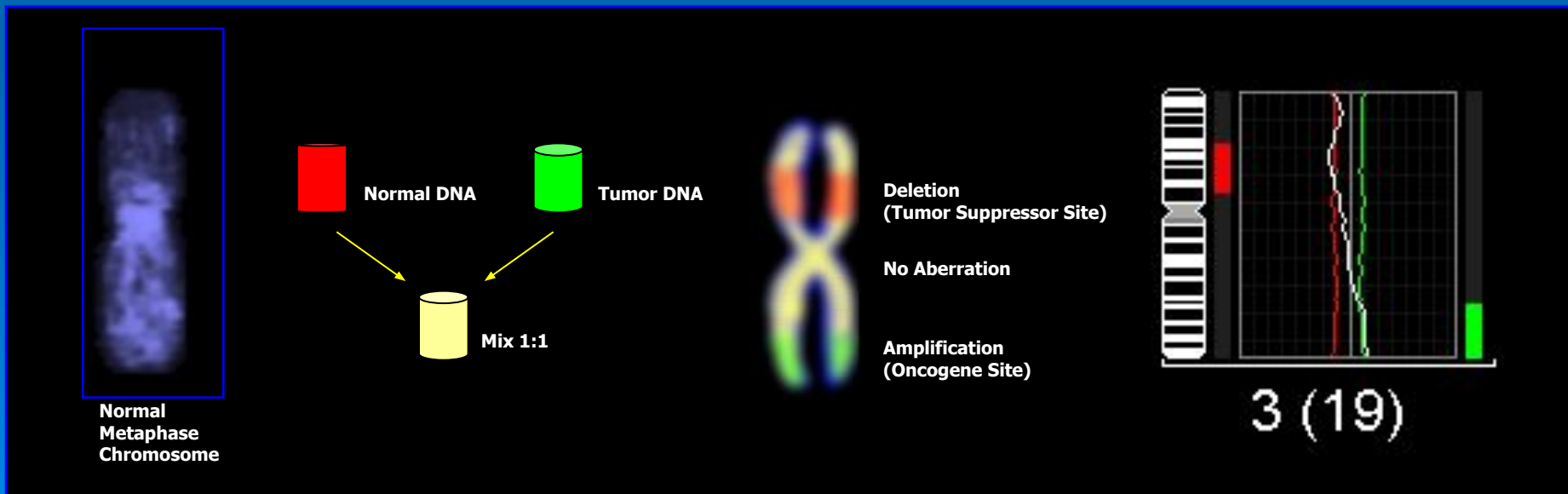
## Мультиплексная FISH (M-FISH)





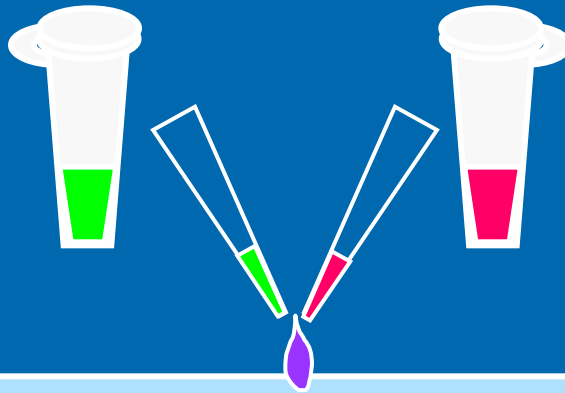
# МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

- ▣ **Сравнительная геномная гибридизация (СГН)** – техника, позволяющая широко сканировать геном на потерю или увеличение хромосомного материала без прямого осмотра хромосом. Техника СГН чаще всего используется для изучения опухолей.

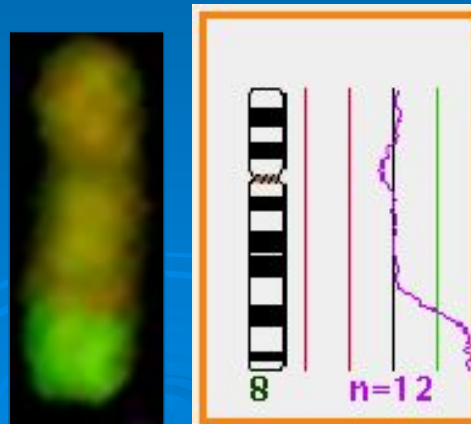


# Сравнительная геномная гибридизация (СГН)

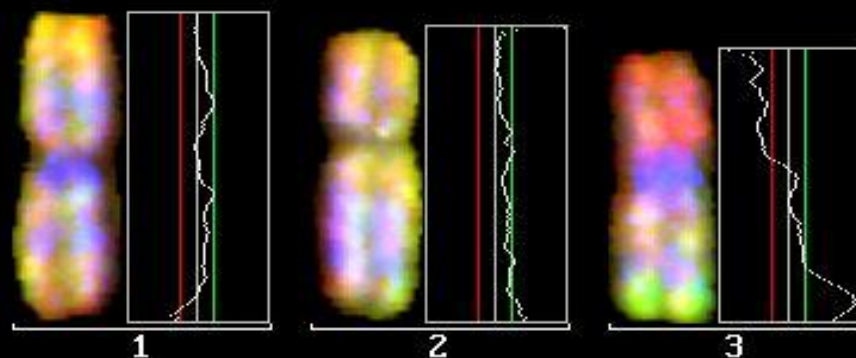
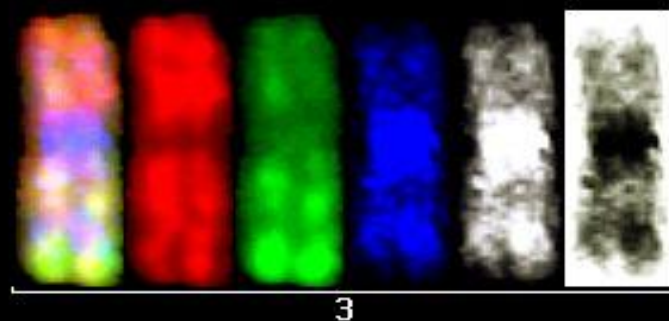
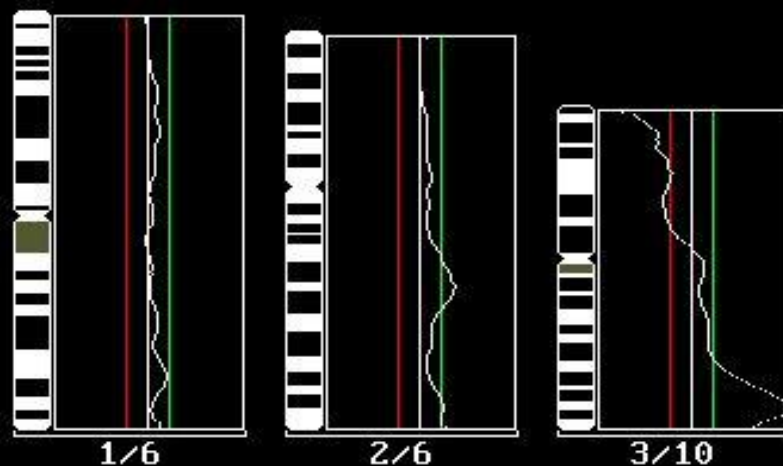
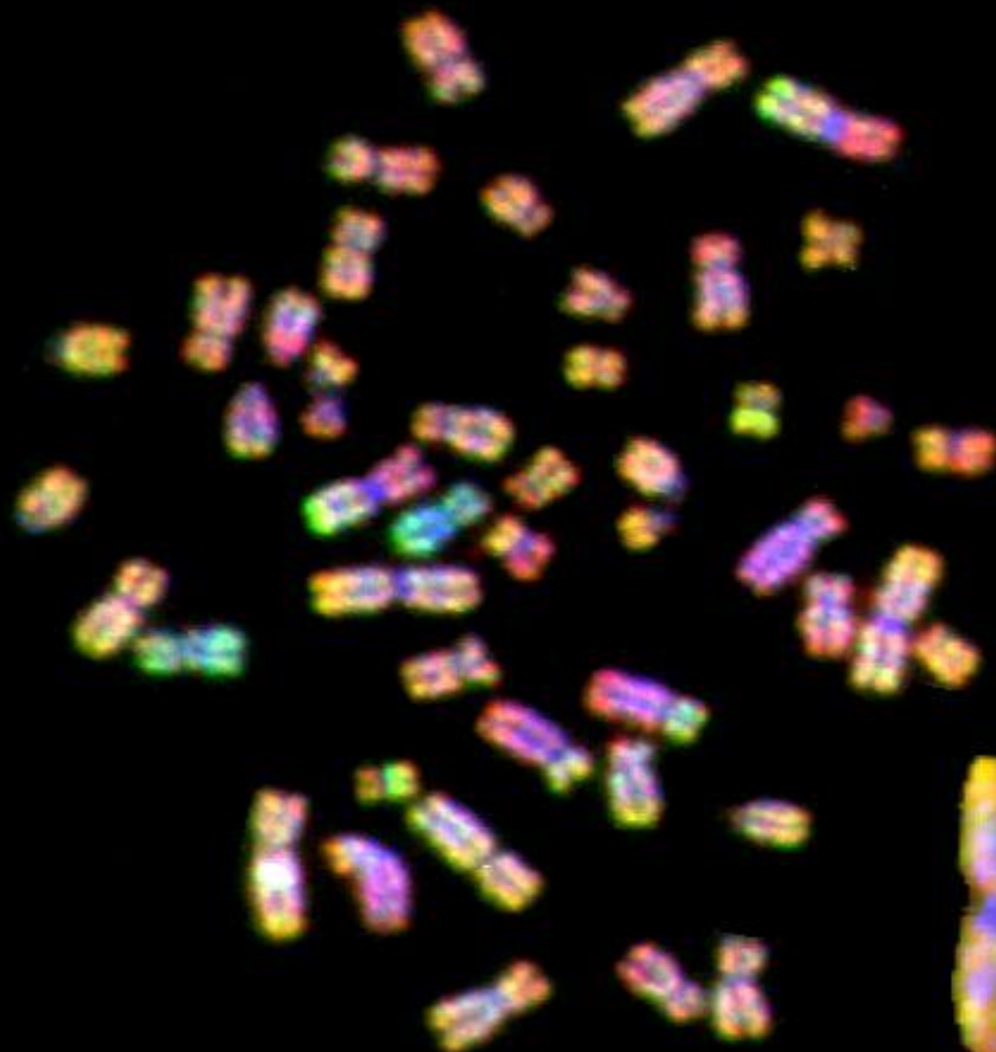
Контрольная  
геномная ДНК  
(известный  
нормальный  
кариотип)



Тестируемая  
геномная ДНК  
(неизвестный  
кариотип)



# Сравнительная геномная гибридизация (СГН)



# МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ:

## ✓ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ (ТЕХНОЛОГИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК)

- Методы клонирования ДНК

- Методы анализа первичной  
последовательности

# Клонирование ДНК

– позволяет из единичного фрагмента ДНК получить достаточно большое количество его копий, чтобы получить этот фрагмент как химически чистое вещество и проанализировать его (секвенировать или экспрессировать входящие в его состав элементы).

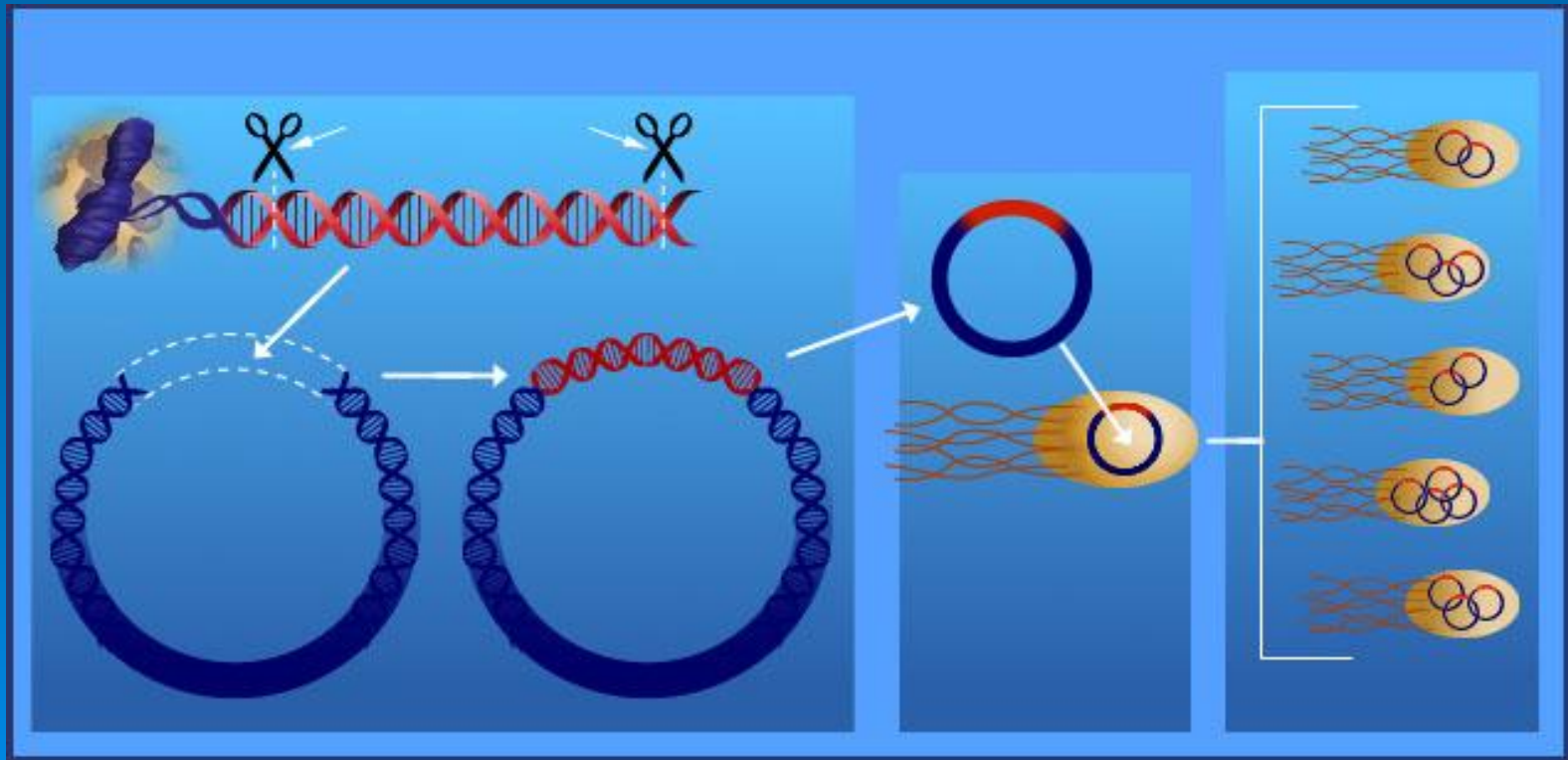
а) Клонирование ДНК *in vivo* (в клетках)

б) Клонирование вне клеток (ПЦР).

# МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ:

## □ Клонирование in vivo

- Фрагмент ДНК, вырезанный с помощью рестриктаз, соединяется с молекулой вектора с помощью ДНК-лигазы.
- Рекомбинантная ДНК вводится в бактерию.
- При каждом делении клетки синтезируются новые копии этого фрагмента ДНК.



# МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ:

## □ Клонирование вне клеток.

### Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

- Выделение ДНК
- Приготовление реакционной смеси
  - -образец ДНК (матрица)
  - -праймеры (олигонуклеотиды, комплементарные, фланкирующим интересующий участок, последовательностям ДНК)
  - -Taq-полимераза
  - -свободные нуклеотиды
  - -вода

# МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ.

## Полимеразная цепная реакция

- Амплификация → увеличение количества повторов интересующего участка. Процесс – циклическое изменение температурного режима.
  - -плавление ДНК – денатурация ДНК (нити расходятся).  $t \approx 92-94^\circ\text{C}$ .
  - -отжиг праймеров – соединение праймеров с цепочкой ДНК.
  - -элонгация – достраивание Таq-полимеразой комплементарной цепочки ДНК.  $t \approx 72^\circ\text{C}$ .

Количество циклов ~ 20–40.



# Полимеразная цепная реакция

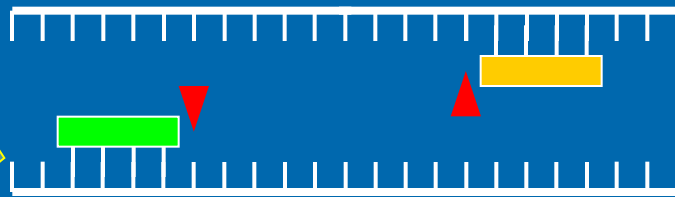
Фрагмент для размножения



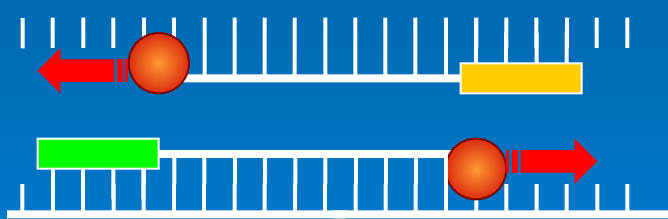
● - DNA Taq - полимераза

■ ■ - Праймеры

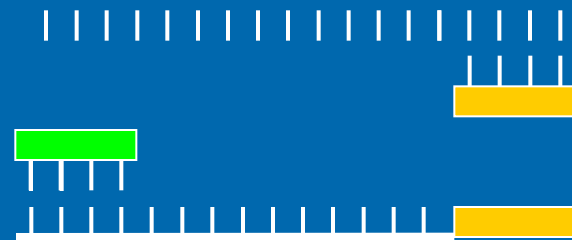
Плавление и отжиг праймеров



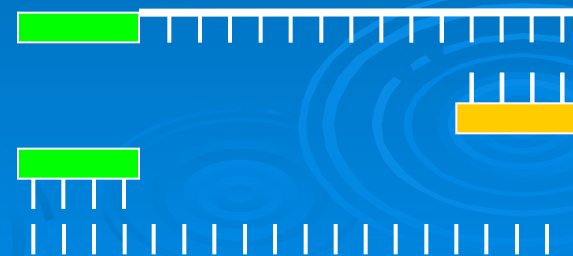
Элонгация



Цикл 2

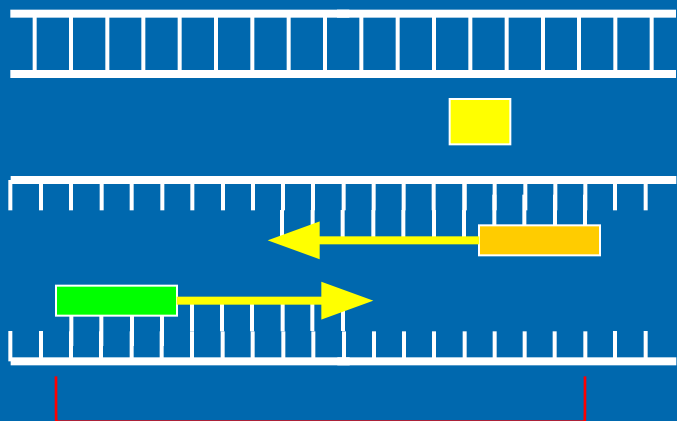


Плавление и отжиг праймеров



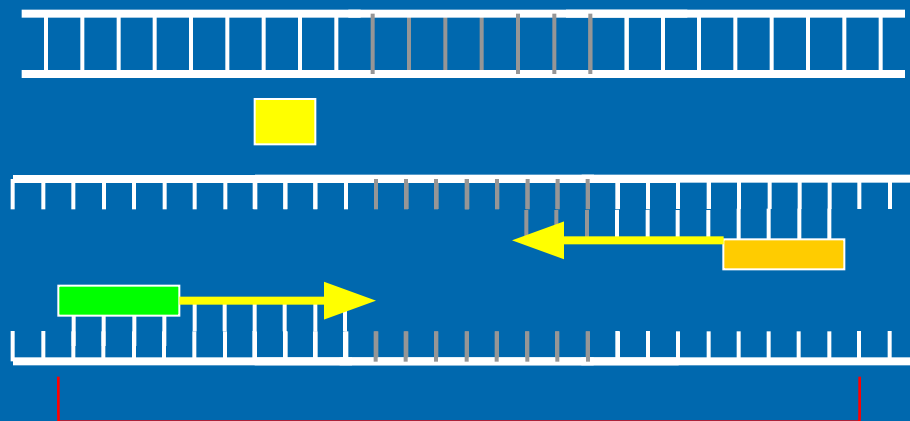
# Полимеразная цепная реакция

1



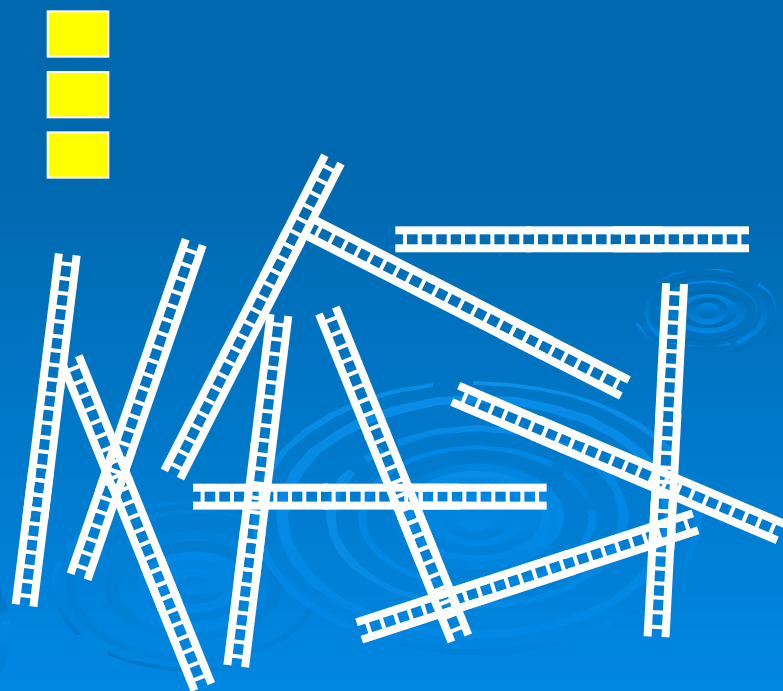
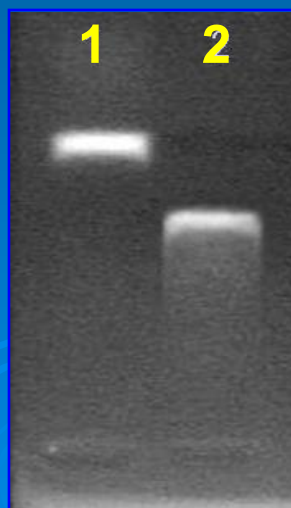
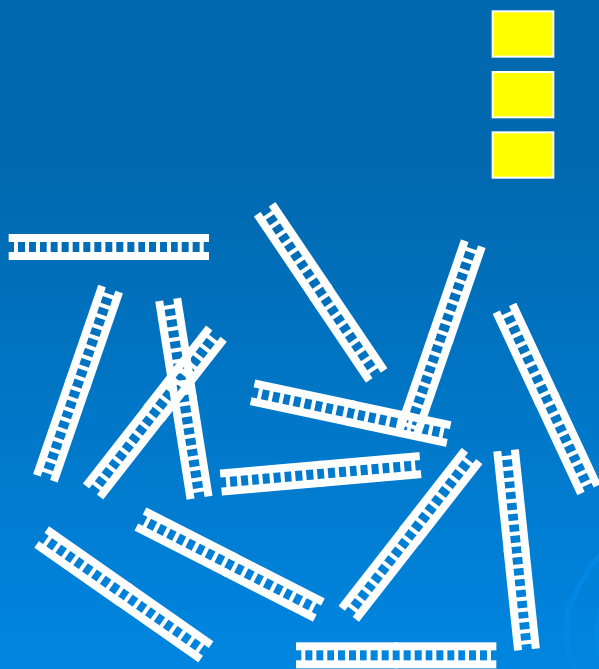
300 bp

2



500 bp

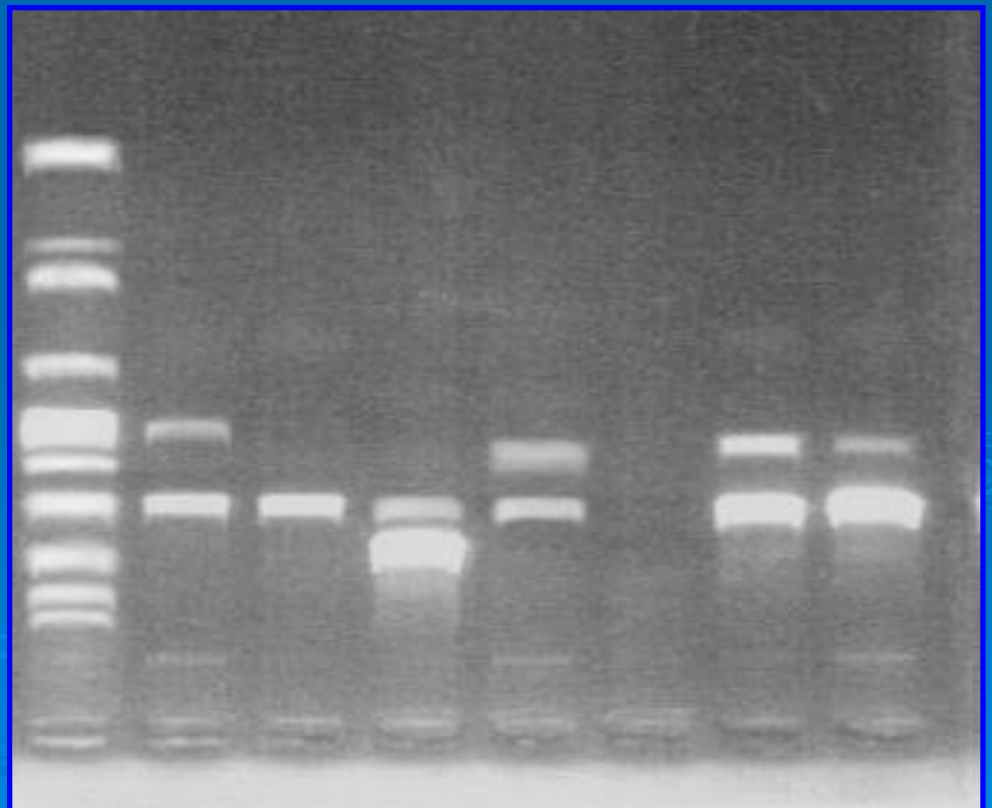
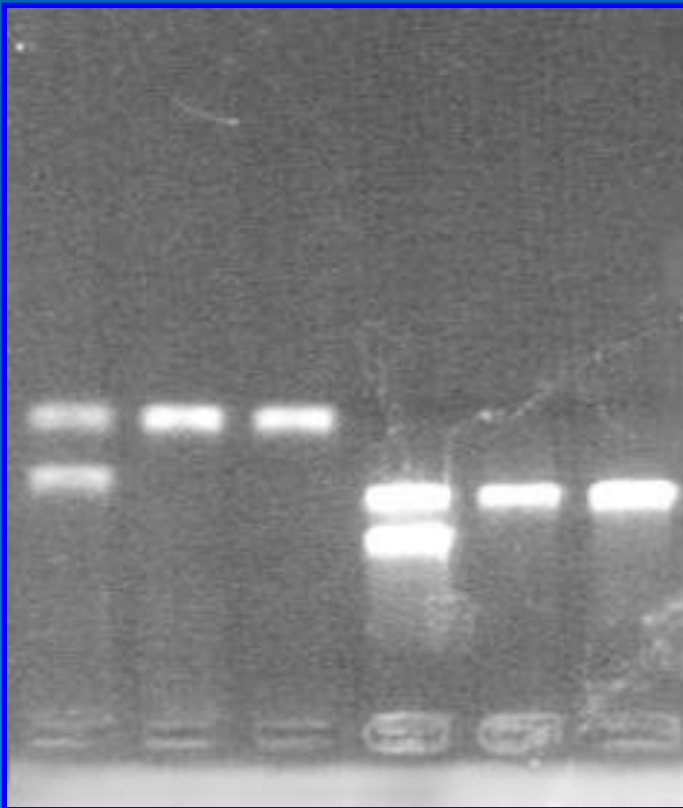
20-40 циклов



# МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ.

## Полимеразная цепная реакция

- Гель-электрофорез
- Детекция



# МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ.

## Секвенирование фрагментов ДНК

Секвенированием ДНК называют процесс определения последовательности нуклеотидов в ДНК.

### Метод секвенирования ДНК (в настоящее время)

1. Энзиматический синтез копии ДНК в присутствии реагентов, терминирующих процесс копирования на определенных нуклеотидах.
2. Образуется смесь копий исходной молекулы, различающихся по длине на один нуклеотид
3. Разделение смеси фрагментов при помощи электрофореза в полиакриламидном геле или путем капиллярного электрофореза.

# МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ.

## Секвенирование фрагментов ДНК

### Метод Сэнгера (дидезокси-метод)

- Выделение ДНК
- Приготовление реакционной смеси
  - -образец ДНК (матрица)
  - -праймер\* (олигонуклеотид, комплементарный последовательности ДНК, фланкирующей интересующий участок с одной стороны)
  - -свободные нуклеотиды (dNTP)
  - -дидезоксинуклеотиды \*(ddNTP)
  - -ДНК-полимераза
  - -ионы  $Mg^{2+}$

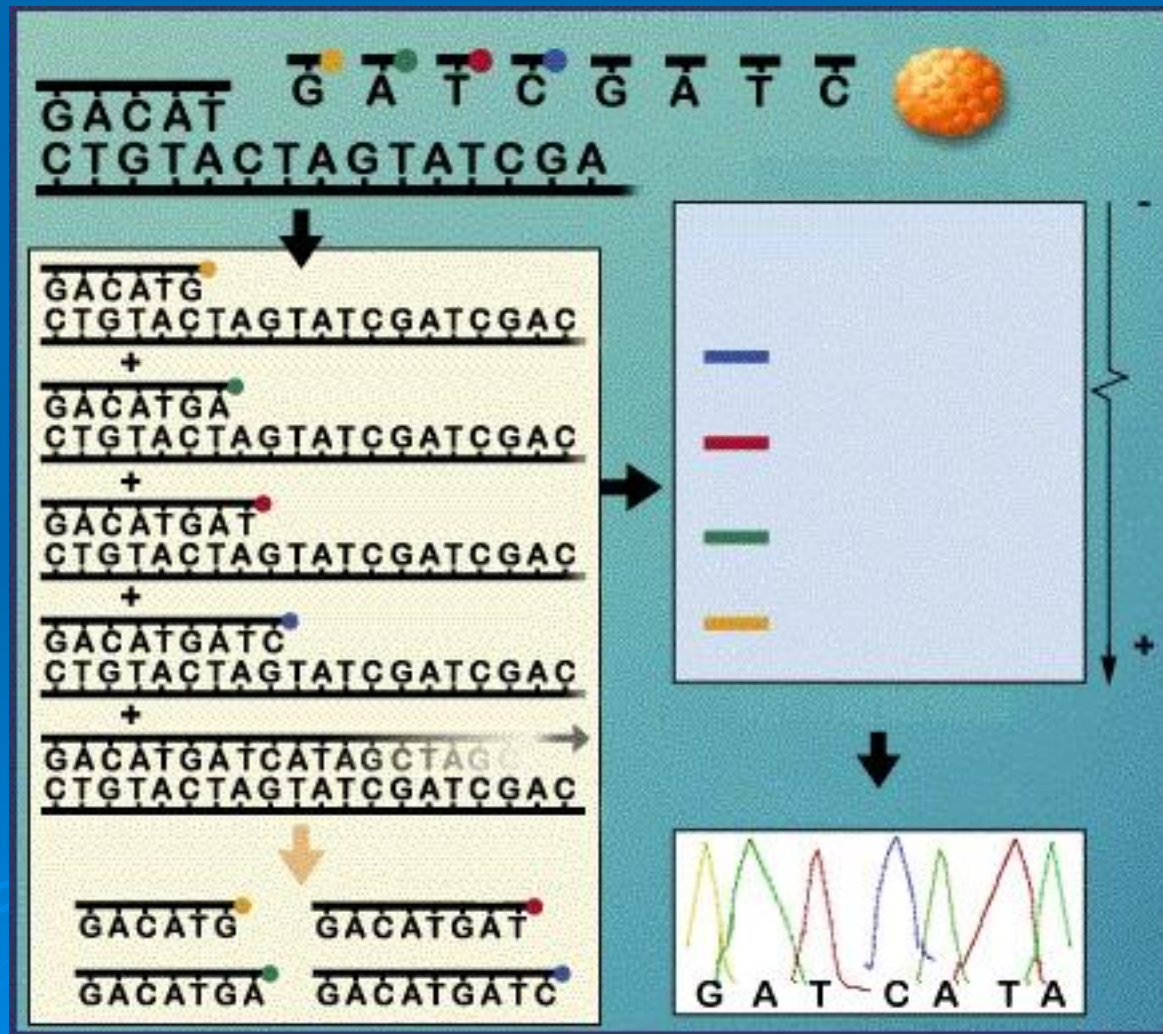
\*детекция производится по меченному праймеру или ddNTP

# МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ.

## Секвенирование фрагментов ДНК

Секвенсовая реакция (Реакция синтеза) – аналогична реакции амплификации при ПЦР.

- После плавления ДНК и отжига праймера (праймер один), начинается синтез цепи.
- Построение цепи может в случайном порядке прерываться при присоединении ddNTP вместо dNTP.



# МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ.

## Секвенирование фрагментов ДНК

- Образуется большое количество синтезированных последовательностей, разной длины. Их можно распределить на 4 группы, по терминальному ddNTP. Фрагменты одной, какой-либо, длины оканчиваются одинаковыми ddNTP

