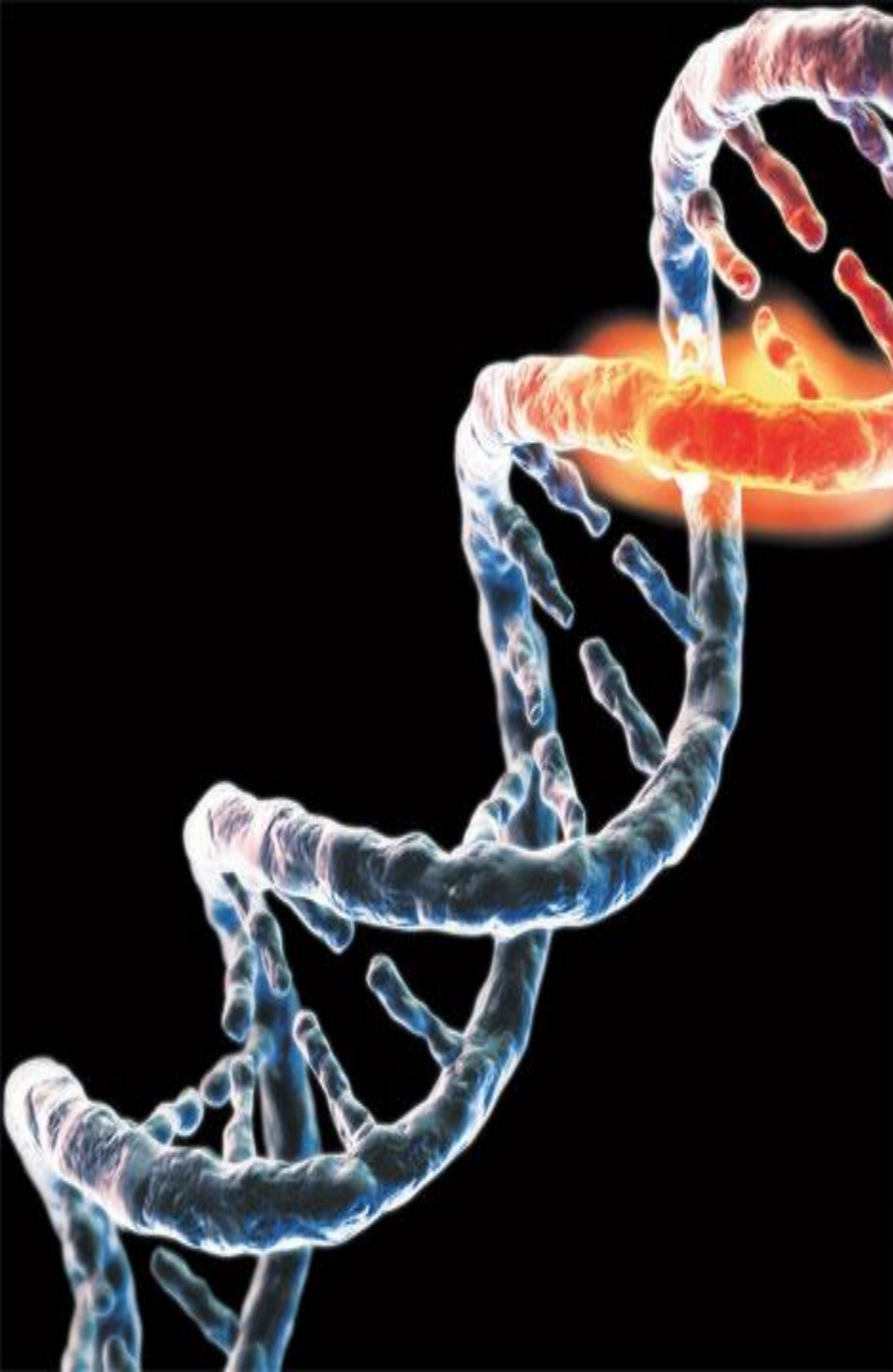


# Молекулярно- биологические методы диагностики

СПбГУ, 2015г.  
к.б.н. Орлова О.Г.

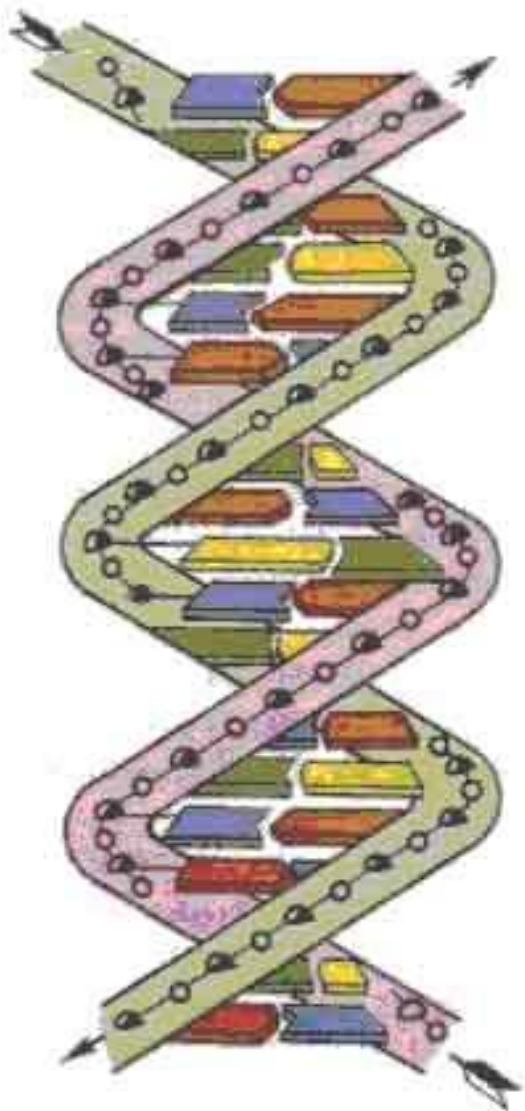


**Участок  
двойной  
спирали  
молекулы  
ДНК**

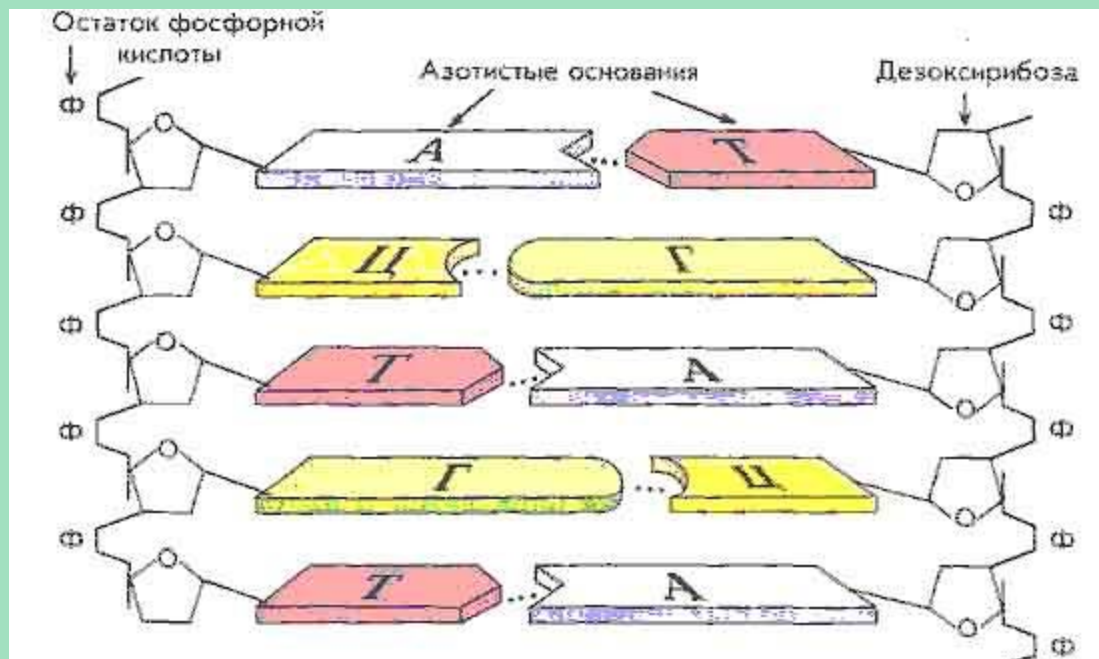
# Нобелевские лауреаты 1962 г. Френсис Крик и Джеймс Уотсон



# Схематичное строение молекулы ДНК. Многоточием обозначены водородные связи

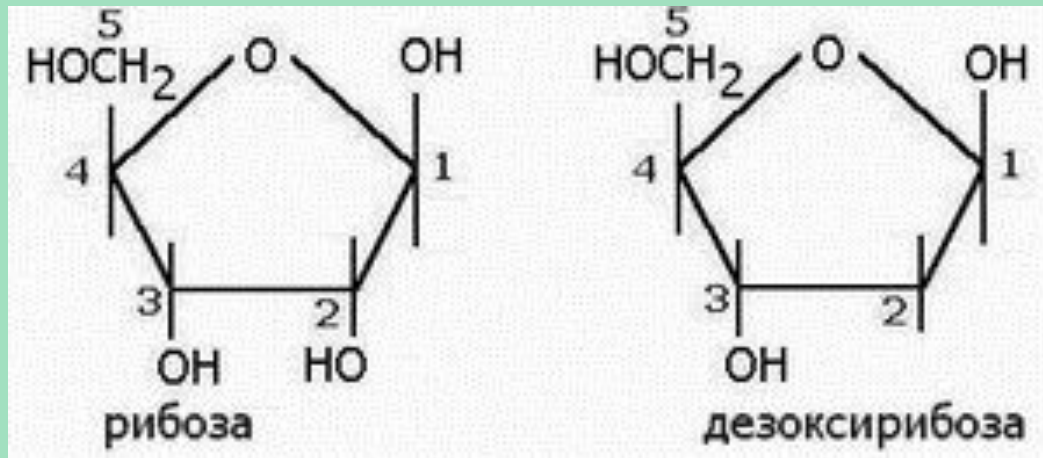


- Остаток дезоксирибозы
- Остаток фосфорной кислоты

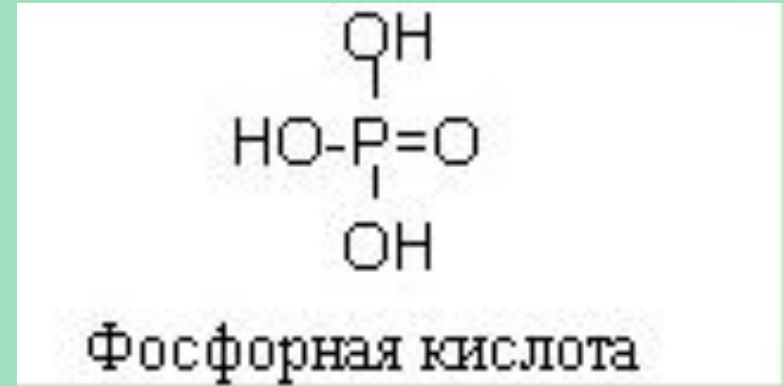


# Строение нуклеотида:

## 1. Строение моносахаридов:



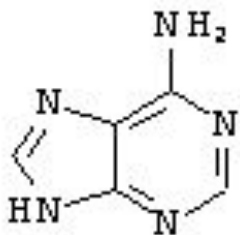
## 2. Фосфорная кислота



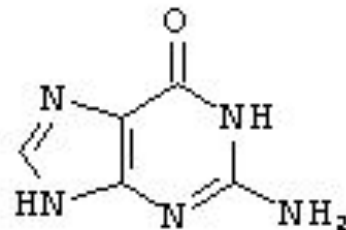
## 3. Азотистые основания:

### Строение пуриновых оснований:

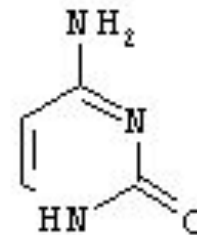
### Строение пиримидиновых оснований:



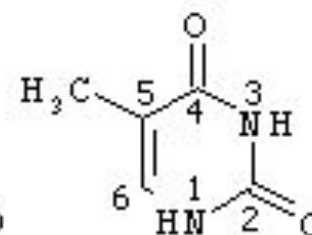
аденин



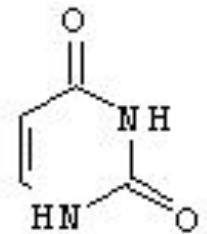
гуанин



цитозин



тимин



урацил

Одинаковые компоненты	Отличающиеся компоненты	
АДЕНИН ГУАНИН ЦИТОЗИН	ДНК	РНК
	ДЕЗОКСИРИБОЗА ТИМИН	РИБОЗА УРАЦИЛ

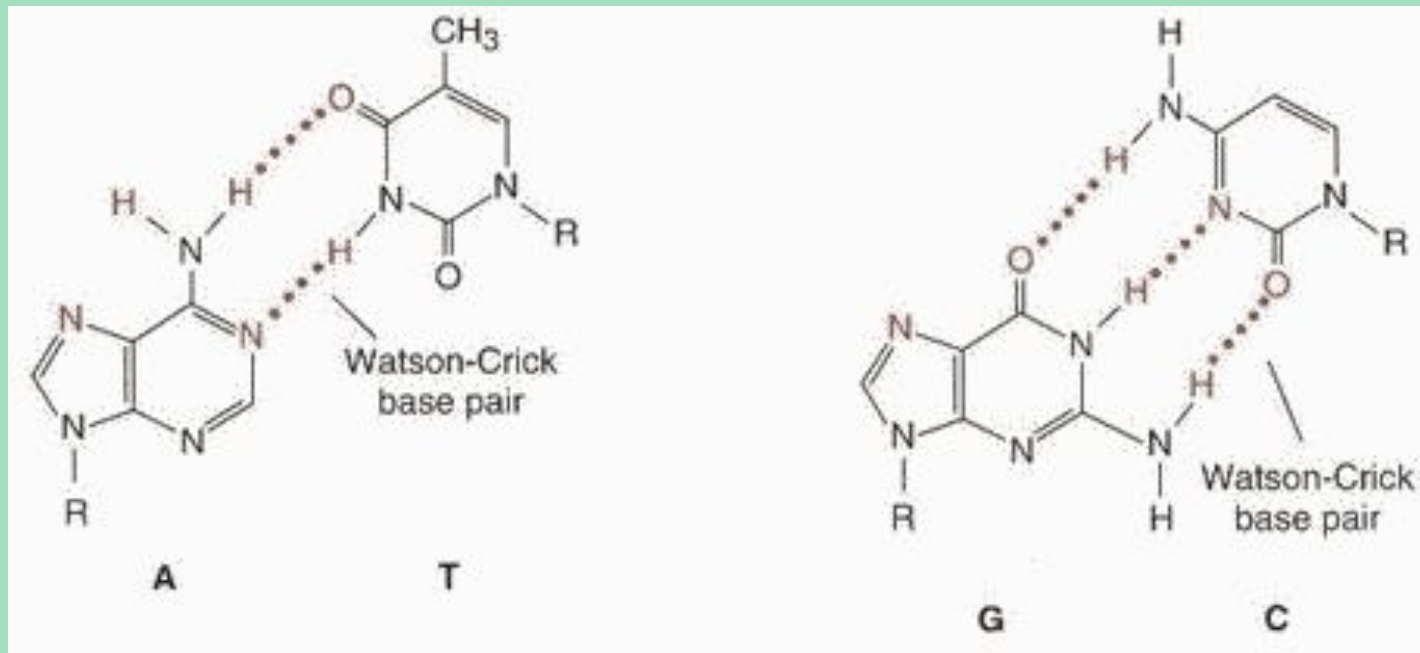
## КОМПЛЕМЕНТАРНОСТЬ –

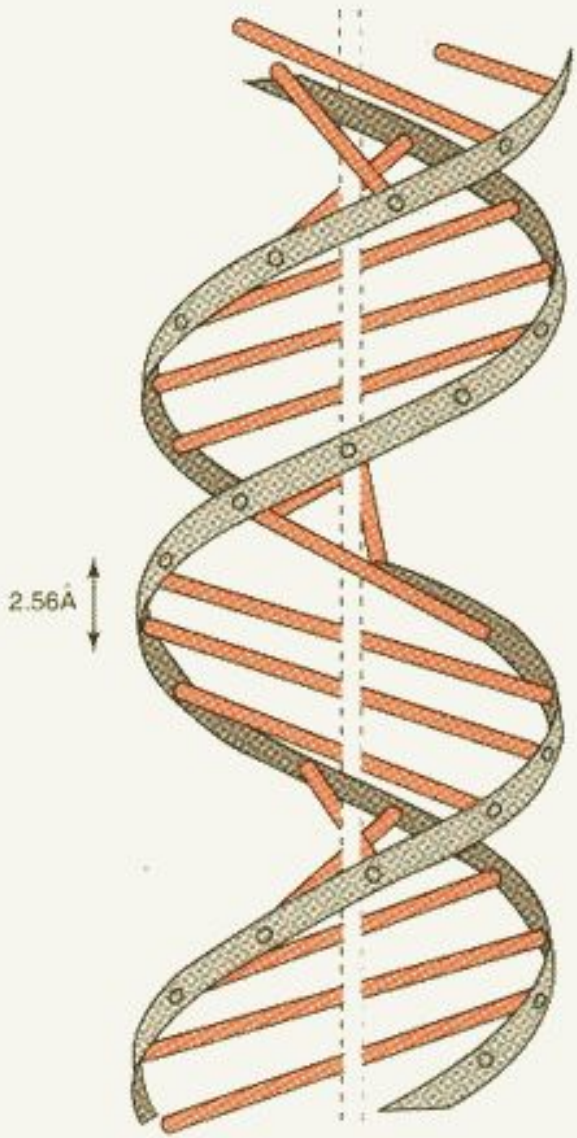
последовательность нуклеотидов в одной цепи автоматически определяет строго соответствующую ей последовательность нуклеотидов в КОМПЛЕМЕНТАРНОЙ ей цепи.

Так, азотистое основание Аденин (А) всегда взаимодействует только с комплементарным ему азотистым основанием Тимин (Т) в молекулах ДНК.

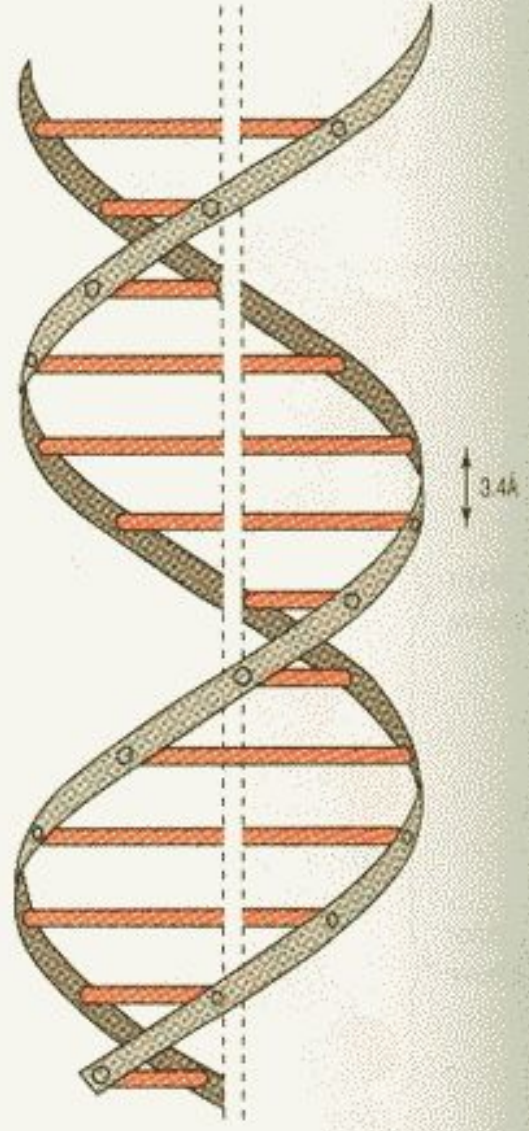
Одновременно азотистые основания Гуанин (Г) одной цепи взаимодействует только с комплементарными им азотистыми основаниями Цитозин (Ц) другой цепи ДНК (или Урацил (У) в РНК). Комплементарность

оснований обеспечивается системой водородных связей.





A-form

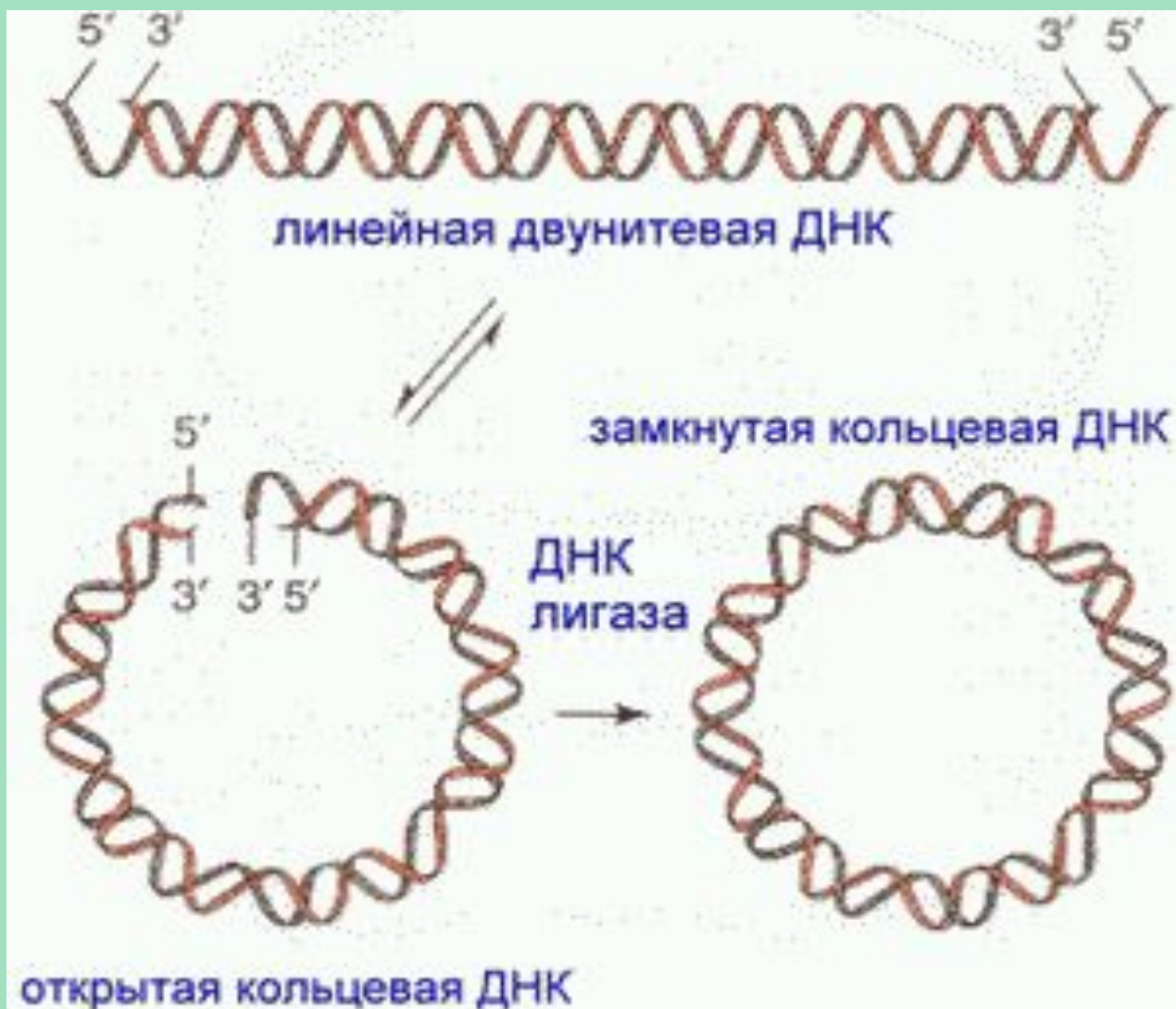


B-form

**вторичная структура ДНК**



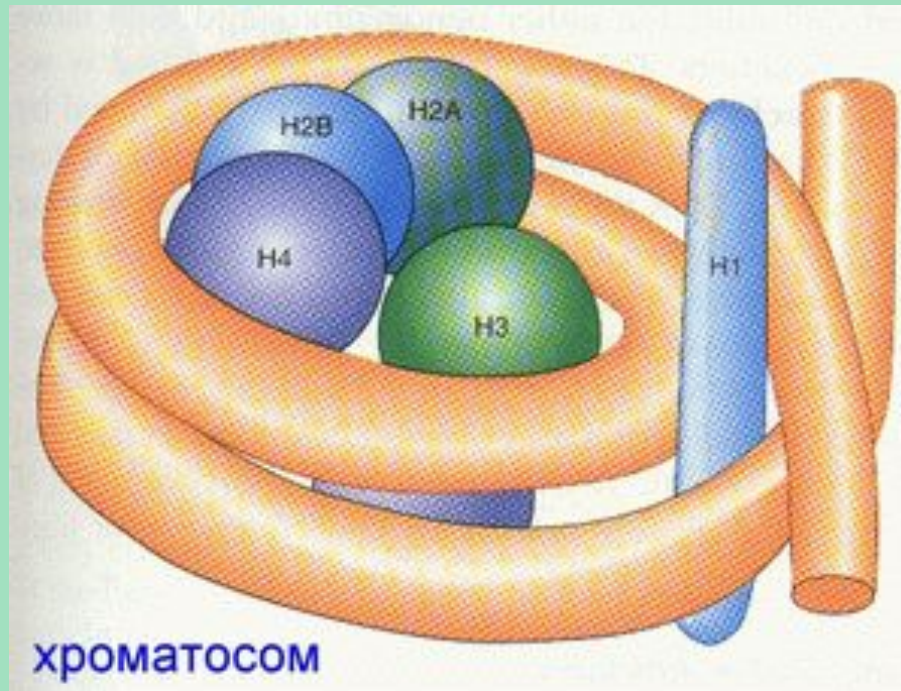
# ТРЕТИЧНАЯ СТРУКТУРА ДНК



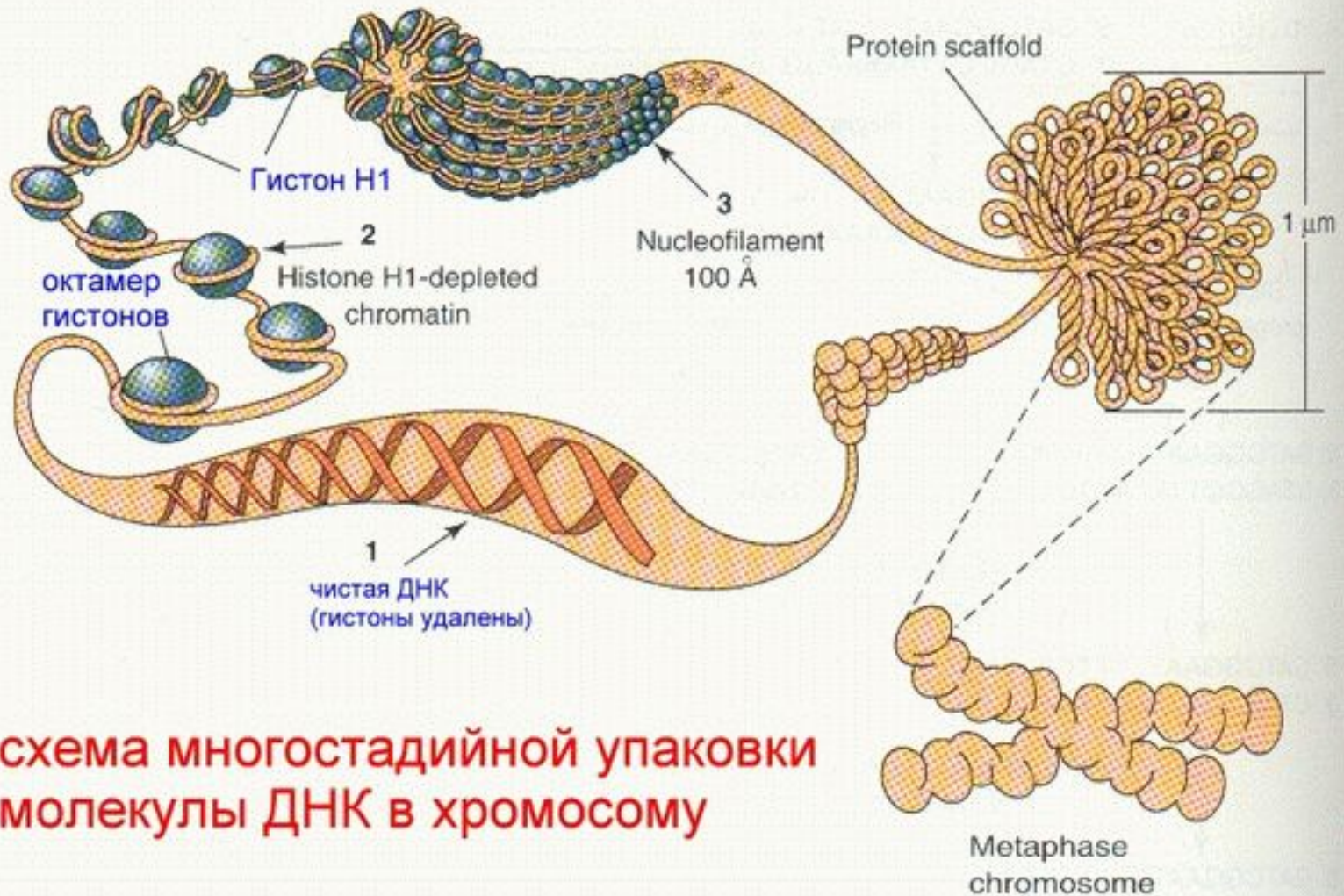
# ХРОМАТОСОМ:

**Нуклеосомный кор** содержит октамер гистонов (2 х (H2a+H2b+H3+H4)).

Нуклеосомный кор образуется при оборачивании октамера гистонов двунитевой спирализованной ДНК на 1,5 оборота, отдельно включается дополнительный белок- гистон H1.



**Хроматосомы** напоминают нанизанные на нитку бусины. Следующий этап- сворачивание в спираль очень длинной последовательности “бус”. Эта спираль, в свою очередь, претерпевает сворачивание в двухжильные канаты, из которых образуются гроздья, являющиеся небольшой частью хромосомы:



**схема многостадийной упаковки молекулы ДНК в хромосому**

# Молекулярно-биологические методы диагностики :

- ◆ Гибридизация ДНК
- ◆ Секвенирование ДНК
- ◆ Лигазная цепная реакция
- ◆ Полимеразная цепная реакция

# Гибридизация ДНК

## Метод Эдвина М. Саузерна и Р. Дэйвиса 1975г.

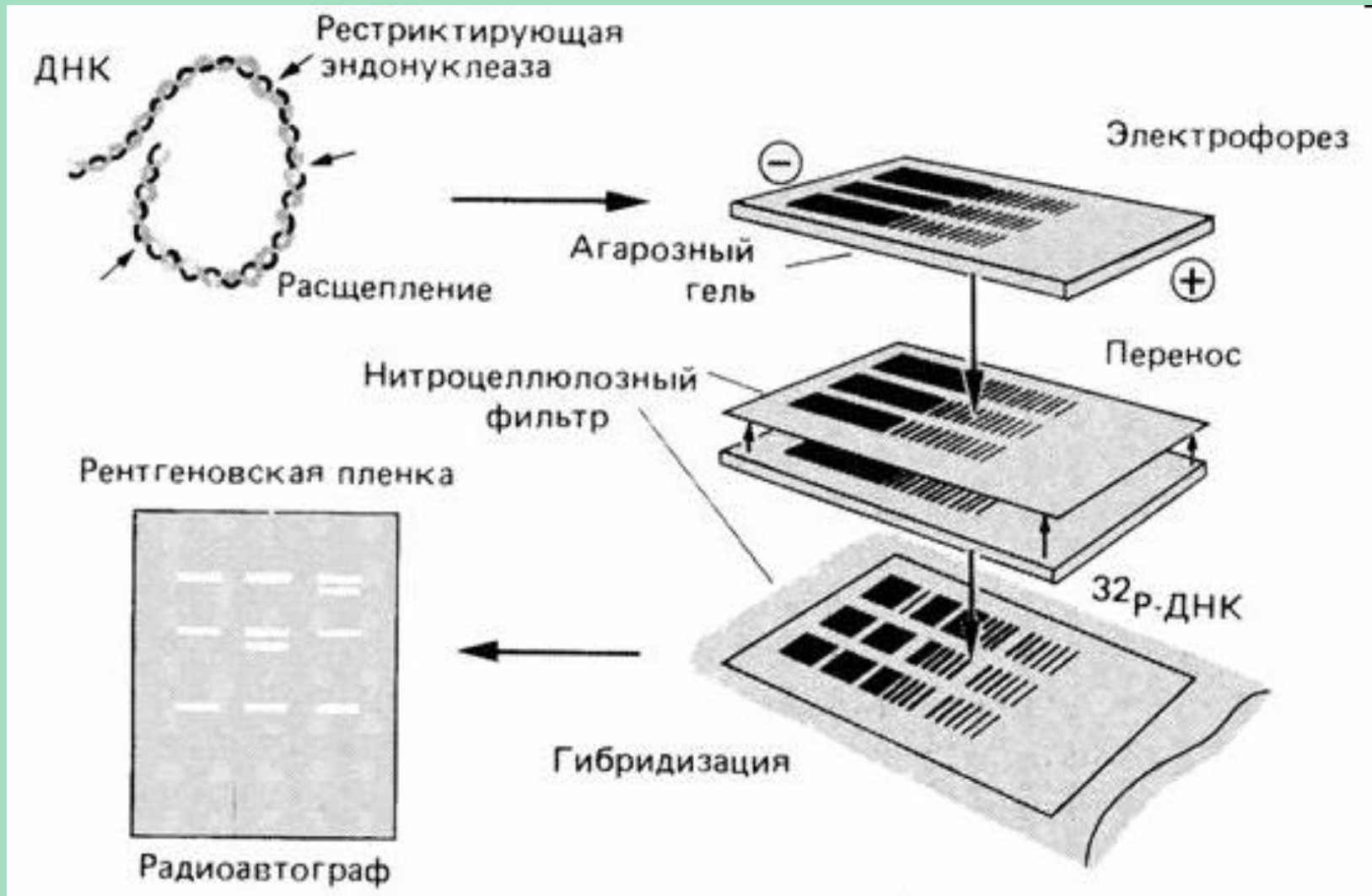
- ◆ Southern – южный блоттинг (ДНК)
- ◆ Northern – северный блоттинг (РНК)
- ◆ Western – западный блоттинг (белок)
- ◆ Eastern – вакантно (углеводы и липиды)

blotting – букв. "промокание"

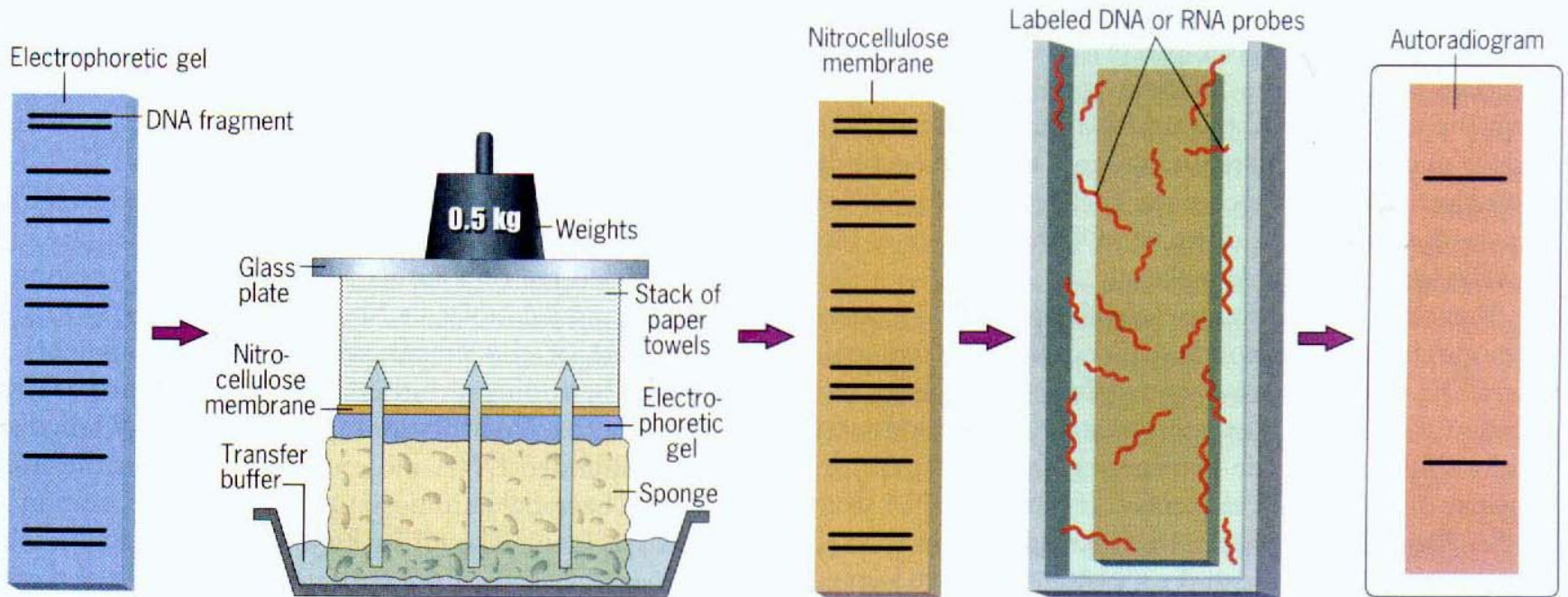


Sir Edwin Southern (born 1938)

# Блоттинг ДНК по Саузерну (1975г)



# Блоттинг ДНК по Саузерну



Electrophoretic gel containing fractionated DNA fragments. The DNA is made single-stranded (denatured) by alkali treatment.


Blotting procedure for transfer of DNA from gel to nitrocellulose membrane.

Nitrocellulose membrane with adsorbed DNA fragments following heat treatment that fixes the DNA to the membrane.

Incubate membrane with labeled DNA or RNA probes to allow hybridization, then wash and prepare autoradiogram.


Autoradiogram showing location of DNA fragments complementary to labeled probe.

# Использование метода гибридизации

- ◆ комплексная диагностика инфекционных заболеваний,
  - ◆ наследственные дефекты,
  - ◆ установления экспрессии тех или иных генов (в этом случае идет гибридизация с мРНК), то есть отслеживания нарушений обмена веществ.
  
  - ◆ Недостаток – дорогостоящее оборудование.
- 




# Секвенирование

- ◆ Метод расшифровки нуклеотидной последовательности нуклеиновых кислот (Секвенирование ДНК по Сэнгеру)
  - ◆ Метод расшифровки аминокислотной последовательности в белках
  - ◆ Для диагностики не используется
- 

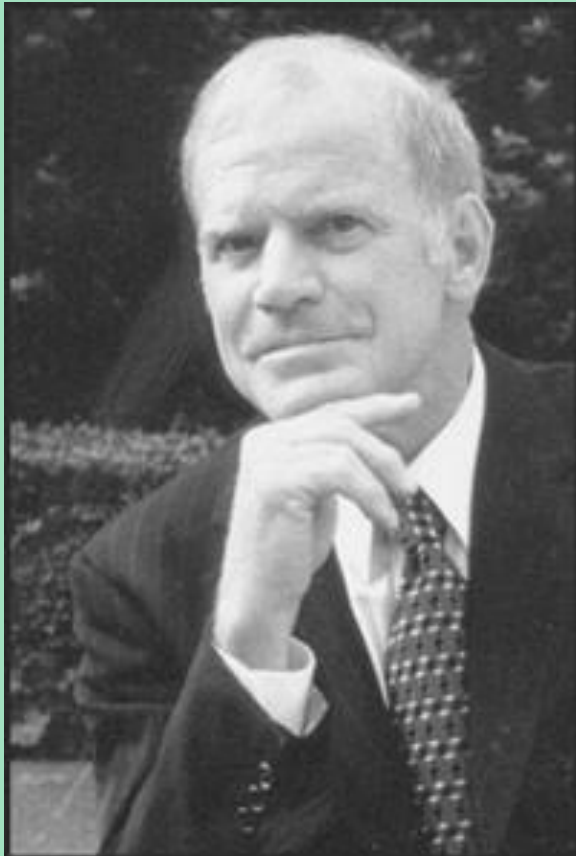
# Лигазная цепная реакция (ЛЦР, LCR - ligase chain reaction)

- ◆ В основе метода лежит способность специфического фермента ДНК-зависимой ДНК-лигазы сшивать (лигировать) цепь ДНК в присутствии АТФ и ионов  $Mg^{2+}$  при наличии разрыва фосфодиэфирной связи.
- ◆ Wu и Wallace в 1989г.

# Использование

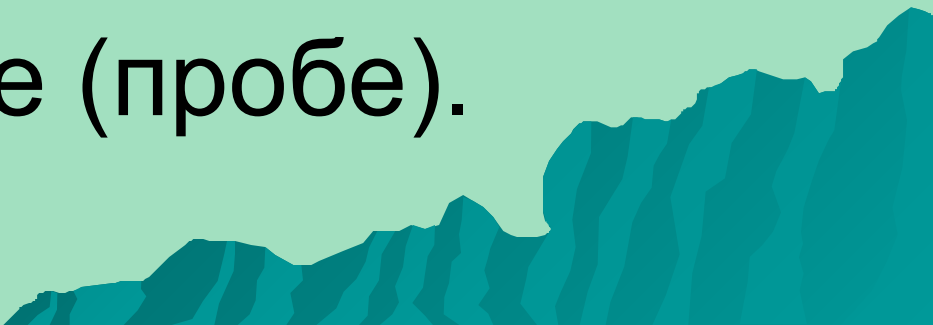
- ◆ Инфекции урогенитального тракта
  - ◆ *Chlamydia trachomatis*,
  - ◆ *Mycobacterium tuberculosis*
  - ◆ Различные вирусные инфекции
- 

# Kary Mullis 1983г. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)



1993г. – Нобелевская премия

**Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) в биологическом материале (пробе).**



# Направления генодиагностики (ПЦР):

- ◆ Медицинская диагностика (инфекционные заболевания, санитарно-показательные микроорганизмы в пищевых продуктах)
- ◆ Диагностика генетических и онкозаболеваний
- ◆ Судебная медицина и криминология (идентификация личности, установление отцовства)

# Локализация возбудителей

*ПЦР – прямой метод диагностики. Недоступность возбудителя ограничивает его диагностические возможности.*

- Нижние и верхние отделы мочеполовой системы (мазки, соскобы, моча, сперма, секрет простаты, биоптаты)
- Желудочно-кишечный тракт (биоптаты, желудочный сок, фекалии)
- Респираторный тракт (мазки, смывы, мокрота, БАЛ, плевральный выпот)
- Нервная система (СМЖ)
- Внутренние органы – печень, селезенка, лимфоузлы (кровь, биоптаты)



# Локализация возбудителей и диагностическое значение ПЦР

- ◆ Цитомегаловирус - (кровь, клетки крови, биоптаты, СМЖ, соскобы, слюна, грудное молоко)
- ◆ *Helicobacter pylori* (биоптаты ЖКТ, зубной налет, фекалии)
- ◆ Папилломавирусы человека (эпителий слизистой, биоптаты слизистой)
- ◆ Трихомонады, гонококки, хламидии, гарднереллы, кандиды (соскоб УГТ, осадок мочи)
- ◆ Токсоплазма гондии (ликвор, кровь, АЖ)
- ◆ Шигеллы, салмонеллы (фекалии)
- ◆ Энтеровирусы (ликвор, фекалии, сточные воды)



# Экстракция нуклеиновых КИСЛОТ



# ПЦР: компоненты реакции

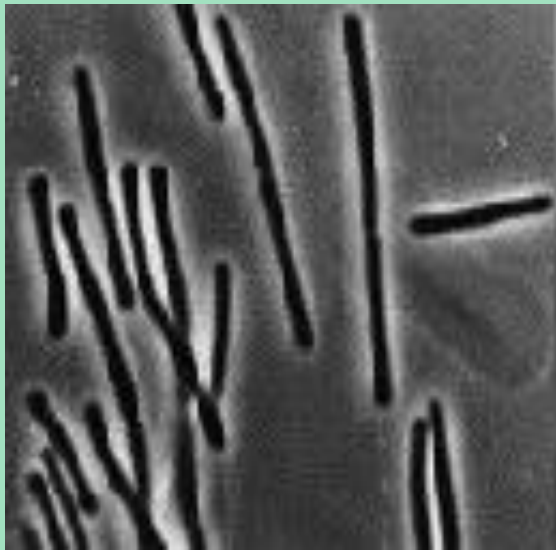
- ◆ **ДНК-матрица**, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать.
- ◆ **Два праймера**, комплементарные концам требуемого фрагмента.
- ◆ **Термостабильная ДНК-полимераза** — фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК. Полимераза для использования в ПЦР должна сохранять 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.
- ◆ **Дезоксинуклеотидтрифосфаты** (смесь четырех дНТФ, являющихся материалом для синтеза новых комплементарных цепей ДНК: dATP, dGTP, dCTP, dTTP).
- ◆ **Ионы Mg<sup>2+</sup>**, необходимые для работы полимеразы.
- ◆ **Буферный раствор**, обеспечивающий необходимые условия реакции — pH, ионную силу раствора. Содержит соли, бычий сывороточный альбумин.
- ◆ **Минеральное масло** – предохраняет от испарения и разбрызгивания.

# ПЦР: компоненты реакции



Размер праймеров – 18-30 оснований

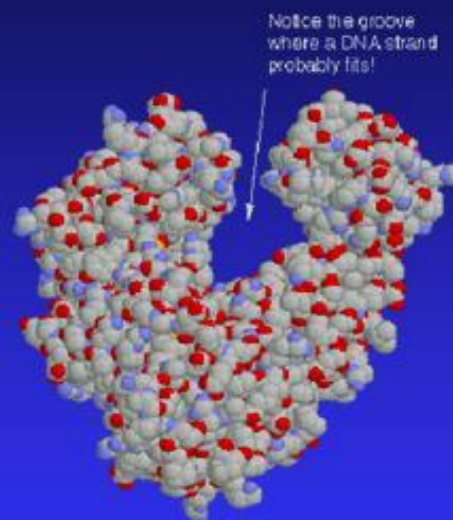
Открытие термостабильной ДНК-зависимой ДНК-полимеразы (Тақ-полимеразы) из термофильных бактерий *Thermus aquaticus* 1989г.



Скорость работы – 150 основ в секунду

# Ферменты

## *Taq*-полимераза



3-D модель *Taq*-полимеразы

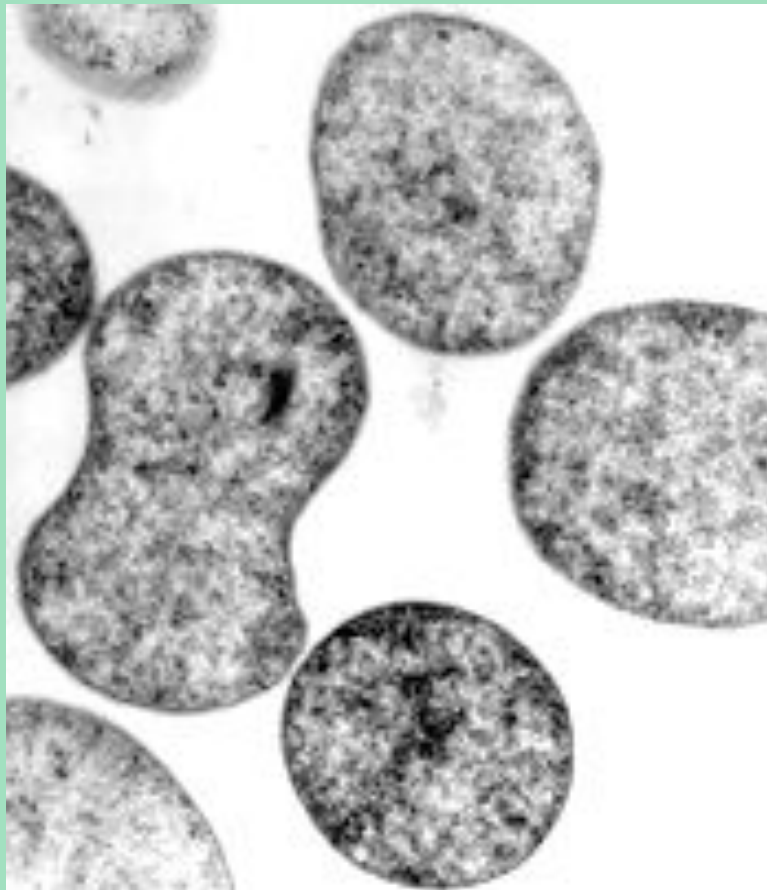
“+”

термостабильна

“-”

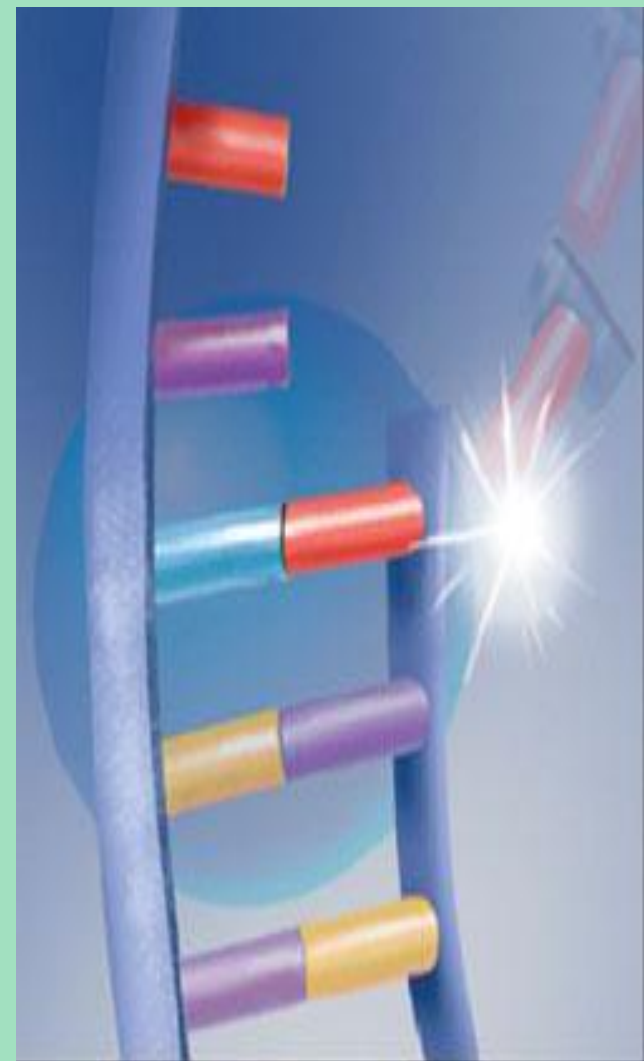
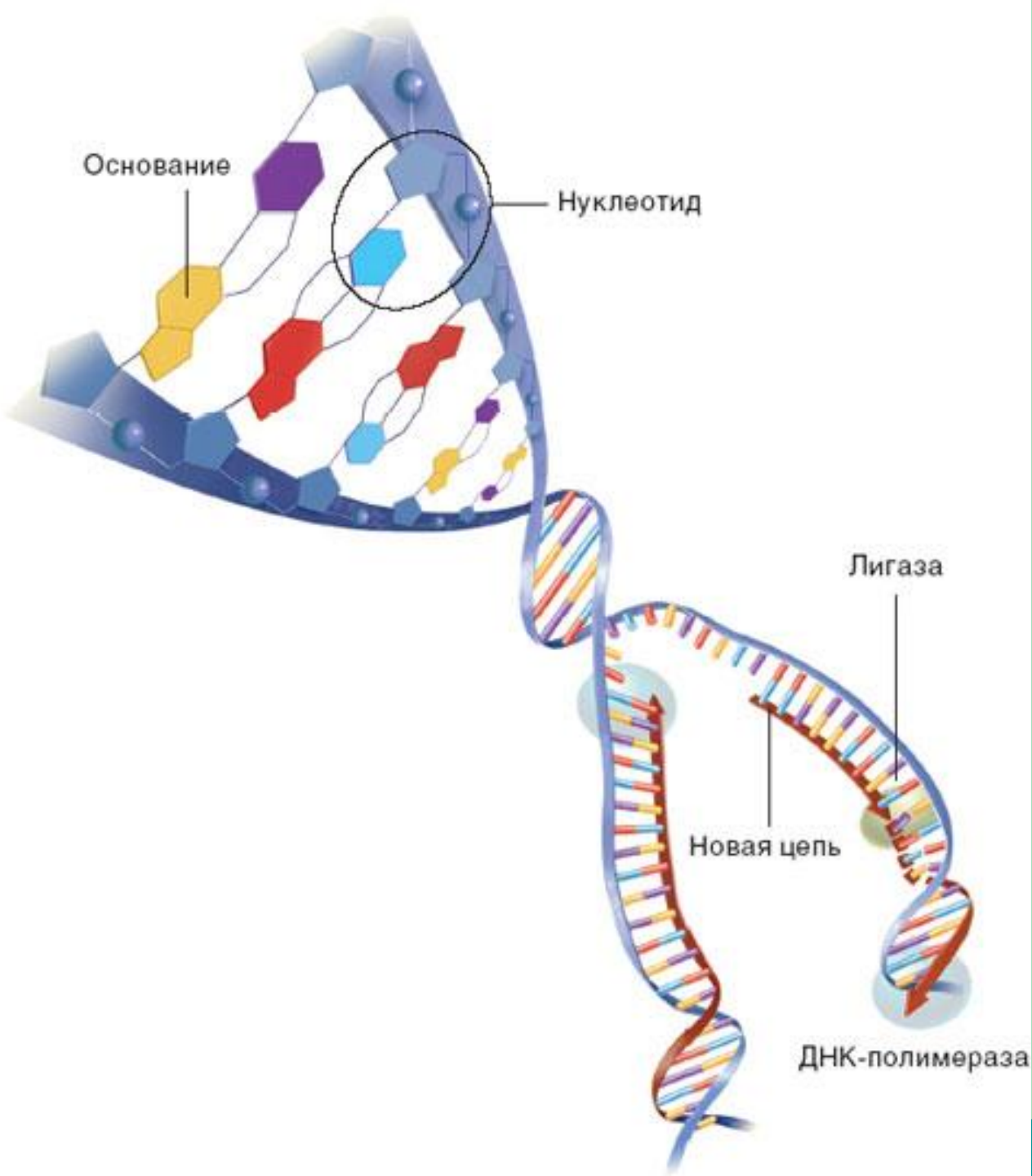
не обладает 3'-5' экзонуклеазной активностью

Представитель домена архей - *Pyrococcus furiosus*. Анаэроб, обитает в термальных источниках с температурой воды 70°C. Источник Pfu-полимеразы.



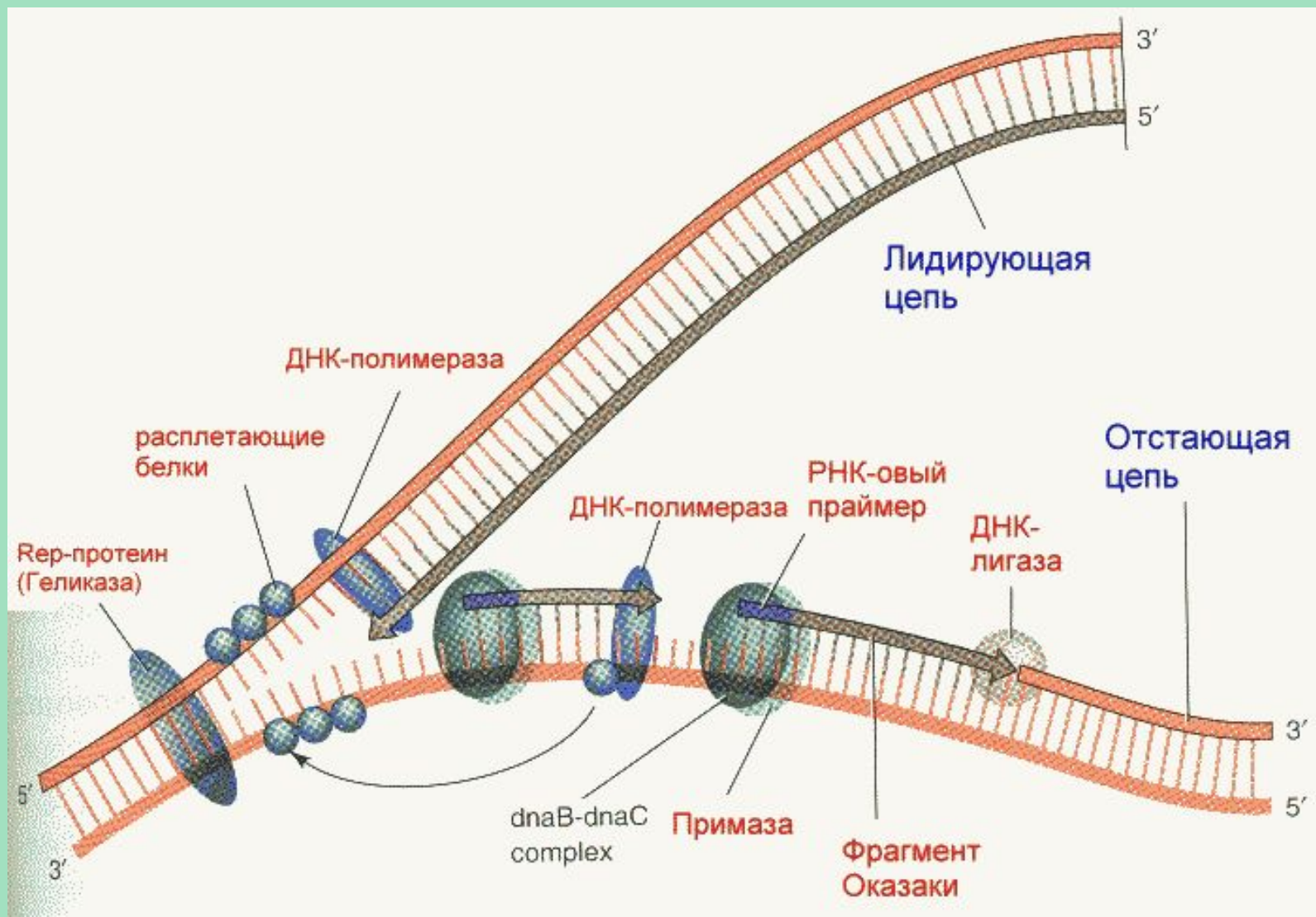
Представитель домена архей - ***Pyrococcus woesei***. Анаэроб, обитает в термальных источниках с температурой воды 90°C. Источник Рwo-полимеразы.







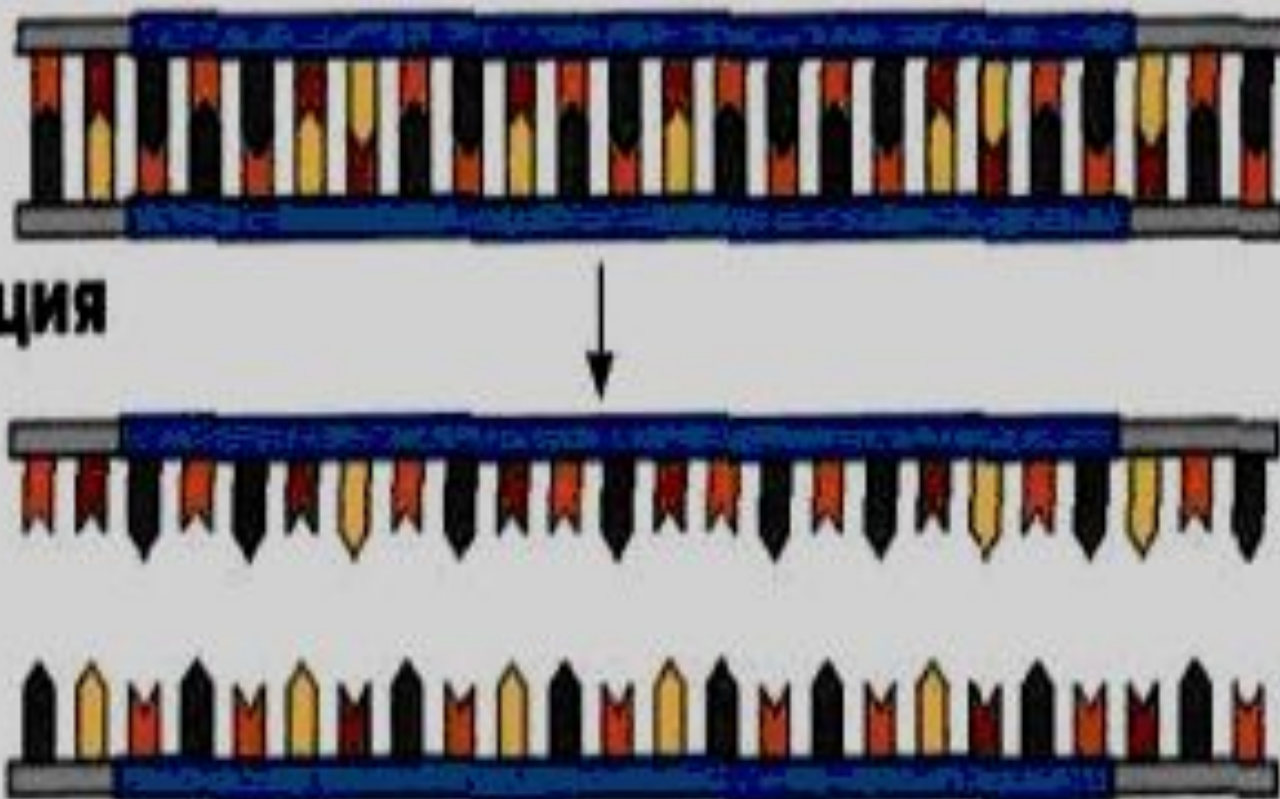
# Транскрипция ДНК



# 1-й этап реакции ПЦР (цикл амплификации)

## 1-ый цикл амплификации

1-ый этап  
**Денатурация**  
**93-95°C**



0,5 – 2 мин

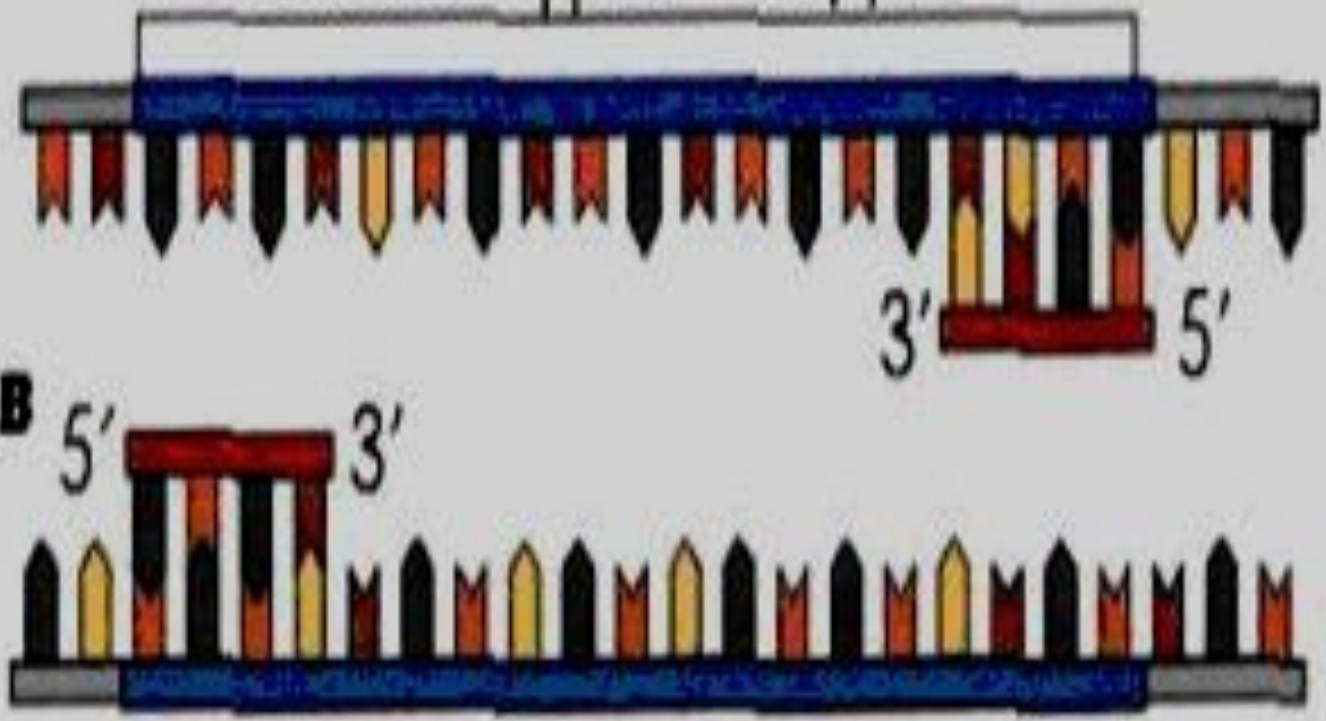
Искомый фрагмент ДНК

2-ый этап

**Отжиг**

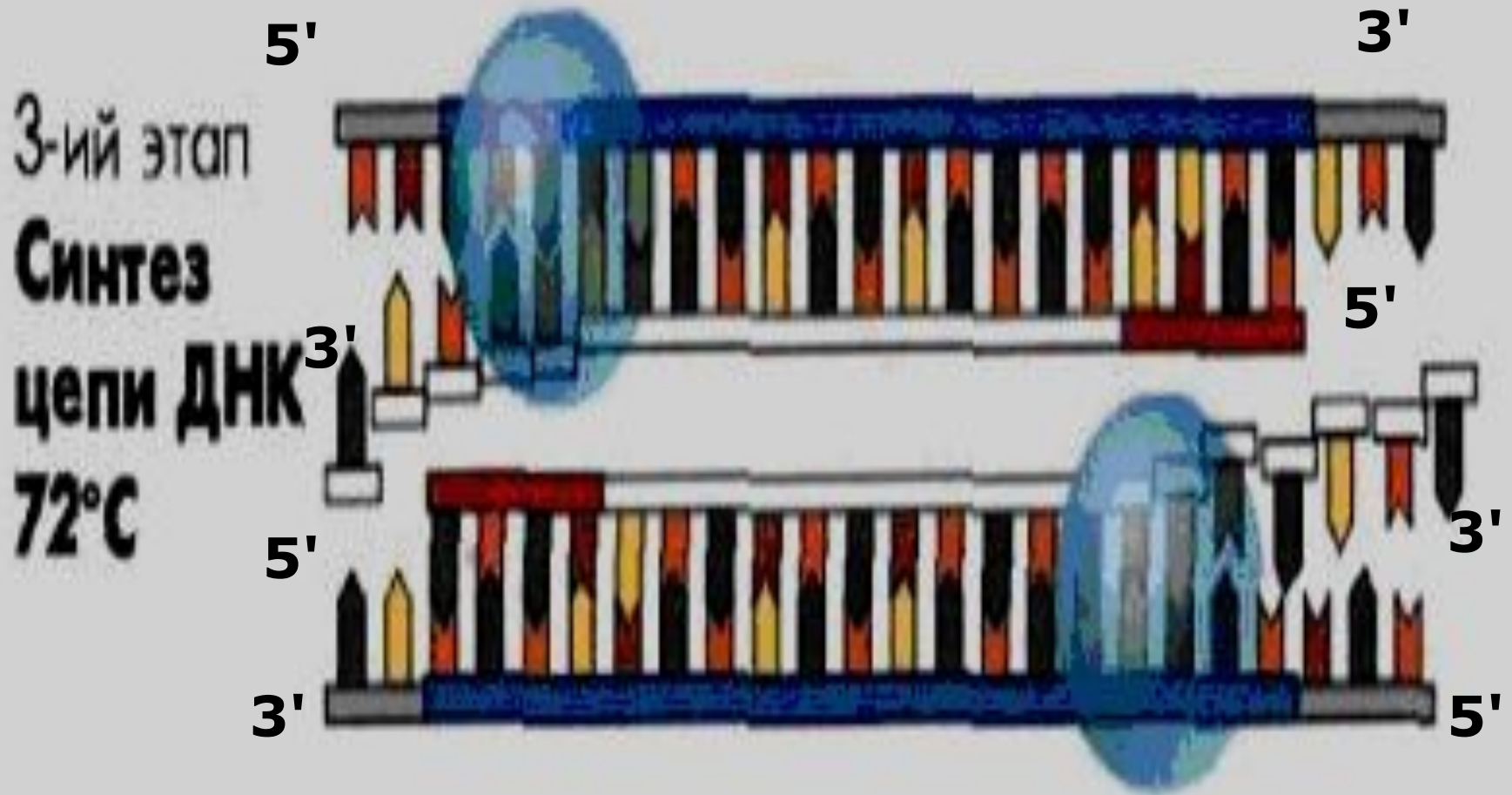
**праймеров**

**50-65°C**



0,5 – 2 мин

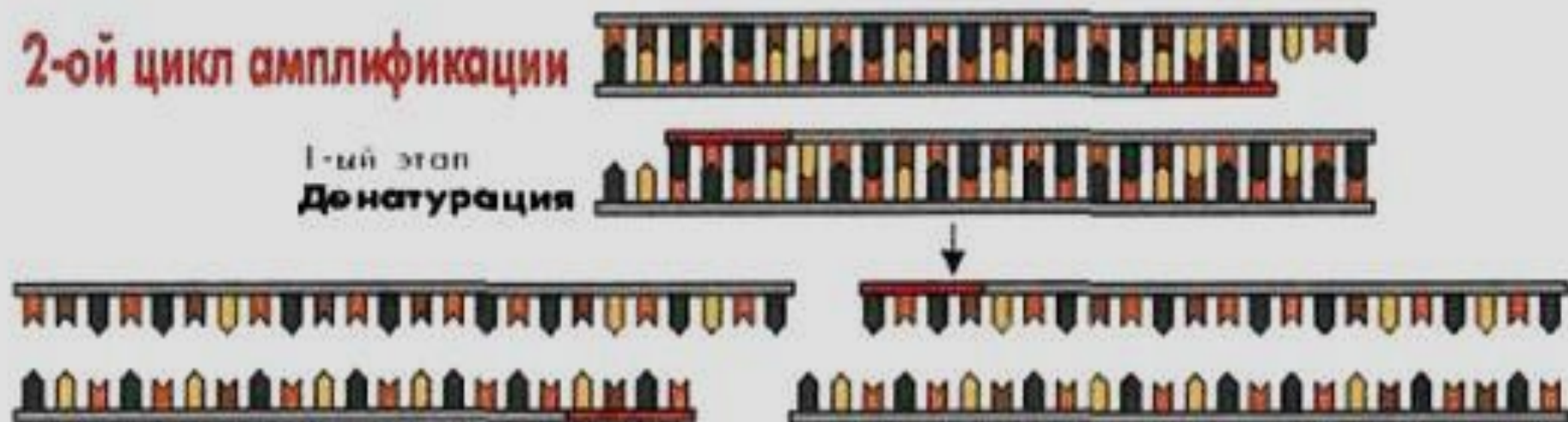
Размер цепи - 3000 пар оснований



1 минута - 1000 пар оснований

## 2-ой цикл амплификации

1-ый этап  
**Денатурация**



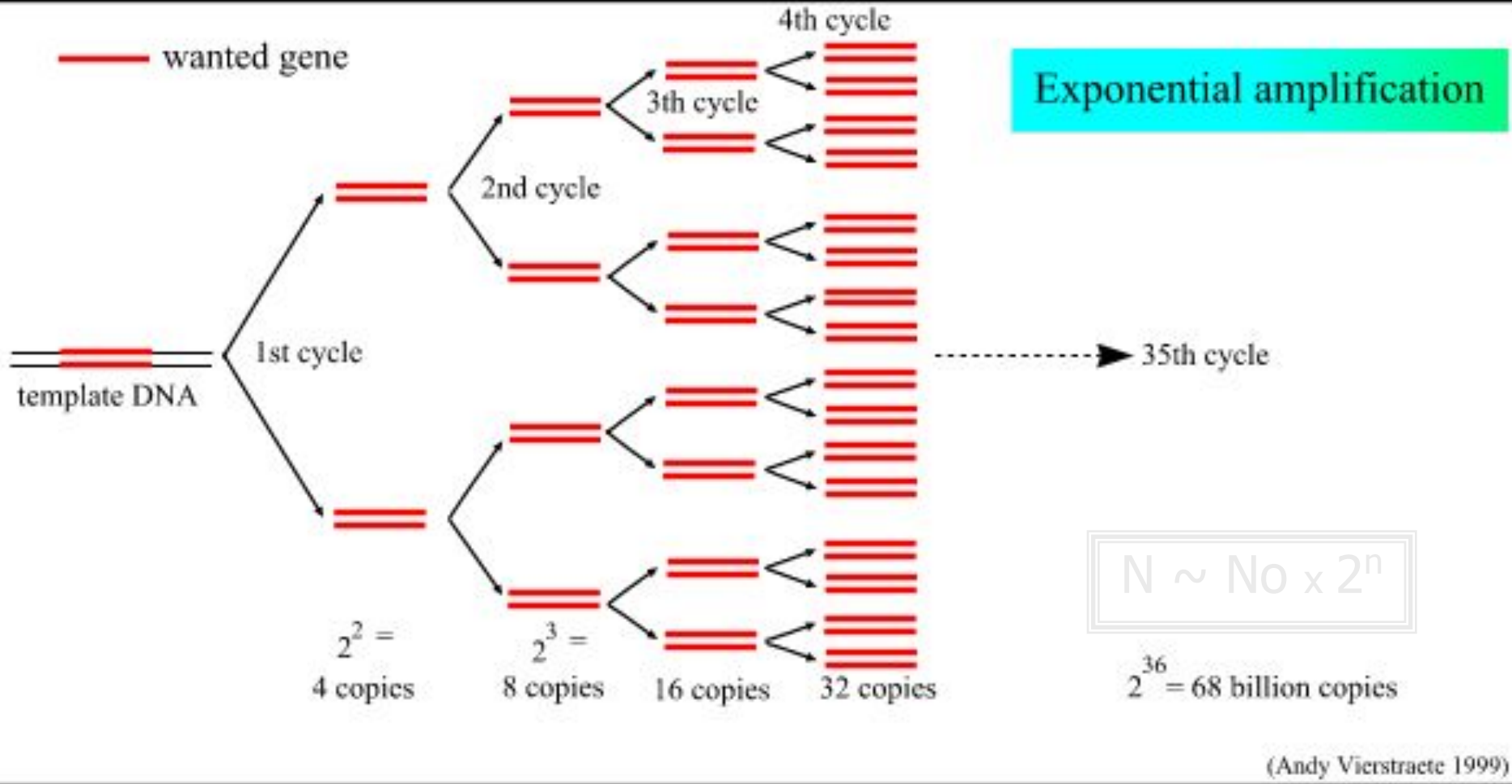
2-ый этап  
**Отжиг праймеров**



3-ий этап  
**Синтез цепи ДНК**



# Кинетика ПЦР



$N$  – количество специфических продуктов реакции амплификации;  
 $N_0$  – начальное количество ДНК-мишеней;  
 $n$  – число циклов амплификации

# Приборы для проведения ПЦР Амплификатор



# Настольная центрифуга (скорость 14 500 об/мин)





Термостат - предназначен для термостатирования микропробирок



# Настольный ПЦР - бокс



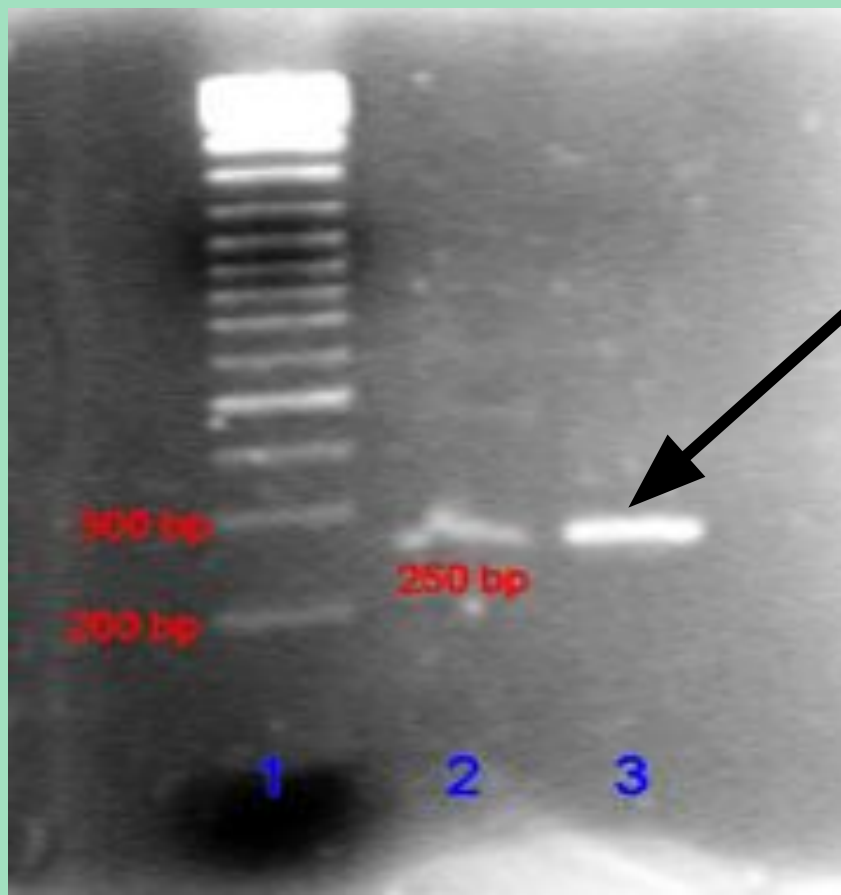
# Камера для горизонтального электрофореза S-2N



**Флуориметр для детекции результатов ПЦР, позволяющий получить результат, не открывая пробирки, что значительно снижает риск контаминации**

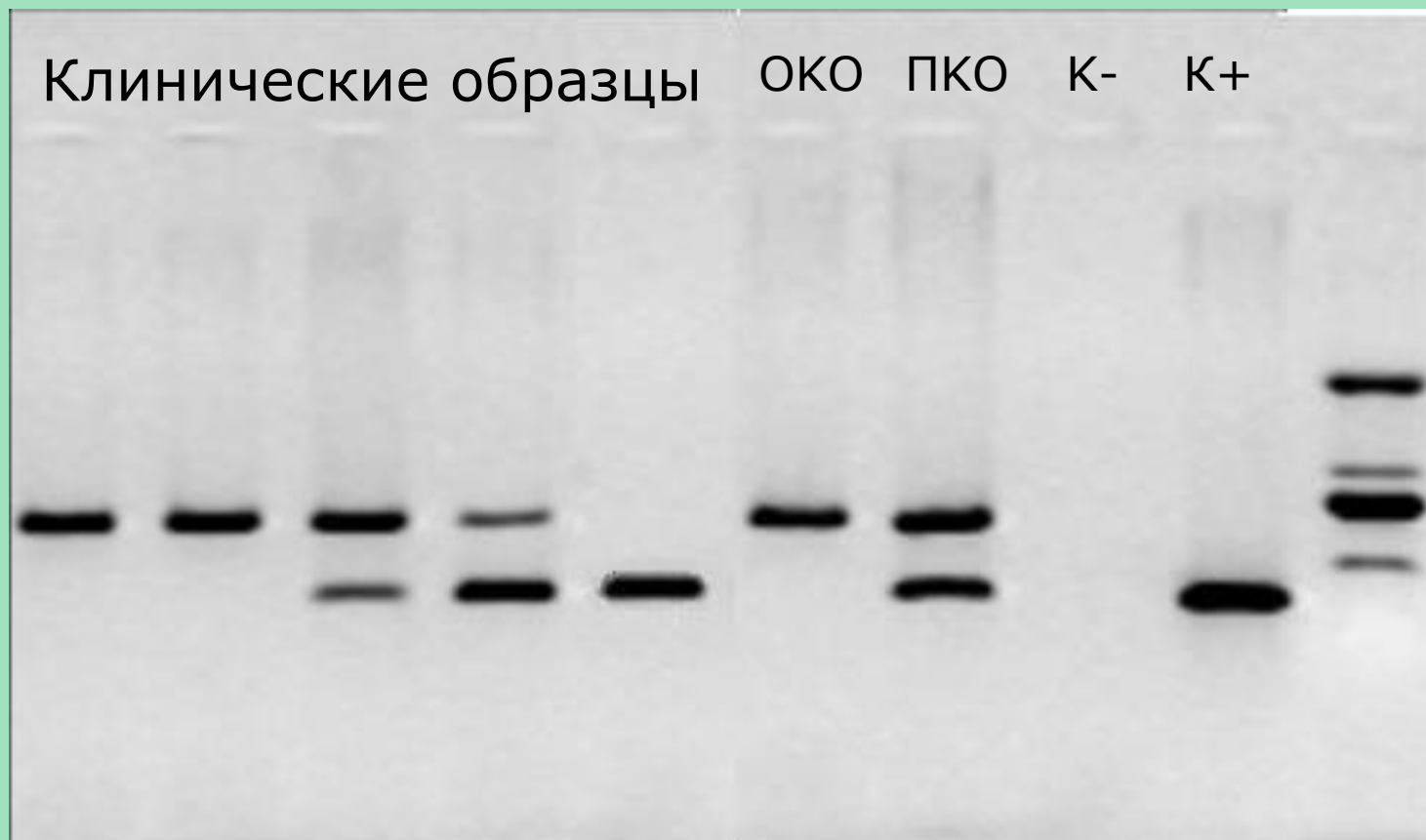


Фотография геля, содержащего маркерную ДНК (1) и продукты ПЦР-реакции (2,3). Цифрами показана длина фрагментов ДНК в парах нуклеотидов

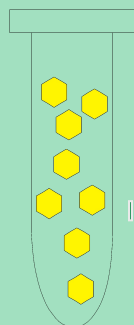


Светящийся в УФ  
лучах (290-330 нм)  
бромистый  
этидий

# Электрофореграмма



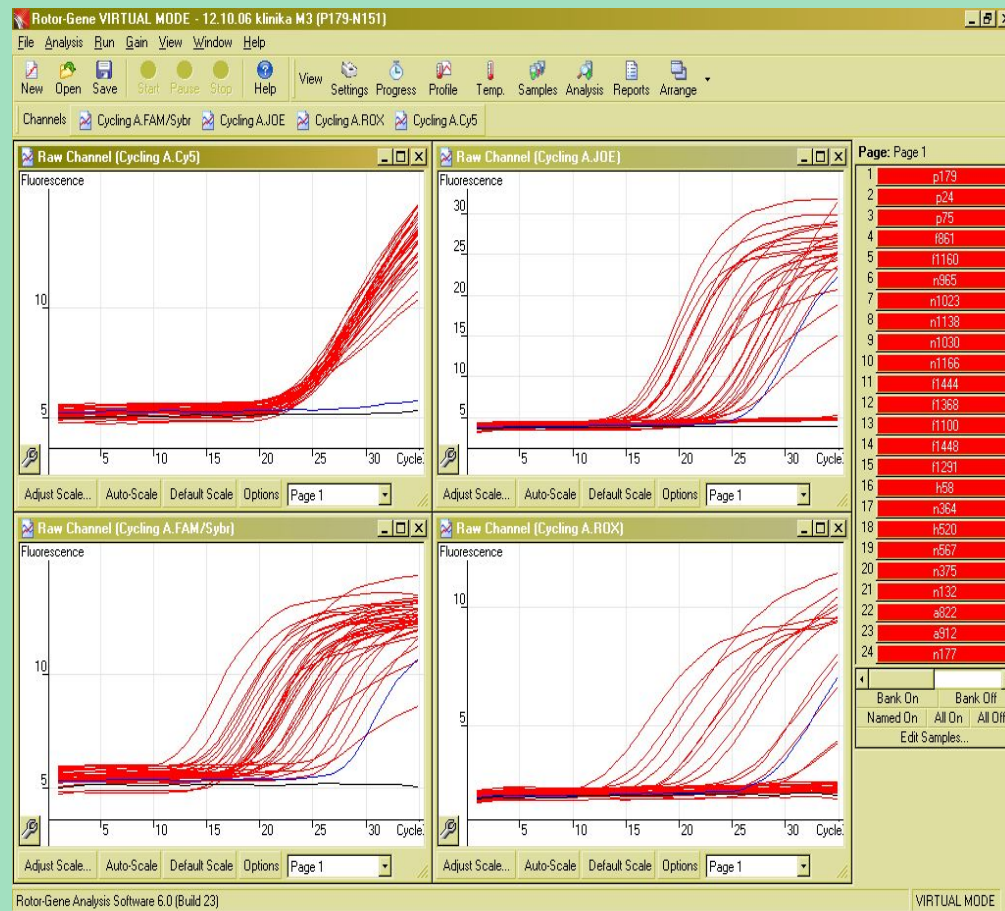
# Детекция результатов ПЦР с помощью аппарата Real-Time



Выделение ДНК

Амплификация

Детекция



# Ошибки, встречающиеся при проведении ПЦР-диагностики

- ◆ Контаминация пробы на стадии отбора материала
- ◆ Загрязнение пробы примесями, ингибирующими ПЦР
- ◆ Отбор материала выполнен неадекватно, в пробе отсутствуют клеточные структуры.
- ◆ Разрушение ДНК при транспортировке и хранении пробы
- ◆ Потери ДНК во время пробоподготовки
- ◆ Контаминация в отдельных пробах
- ◆ Тотальная контаминация



# Достоинства ПЦР – анализа:


- ◆ Высокая скорость
- ◆ Высокая производительность
- ◆ Высокая чувствительность и специфичность
- ◆ Эффективность в отношении диагностики медленно растущих и некультивируемых микроорганизмов

# Недостатки ПЦР – анализа:

- ◆ Узкая направленность (нужно предполагать возбудителя).
- ◆ Проблема контаминации – строгий режим постановки.
- ◆ Наличие ингибиторов (гепарин при анализе крови).
- ◆ Не всегда подходит для контроля после лечения (Обнаруживают как живых, так и умерших м/о), не раньше, чем через 1 месяц.

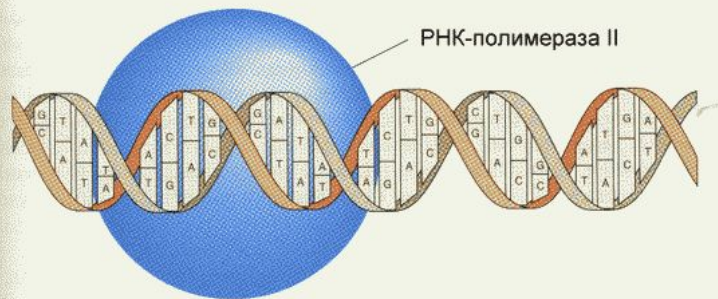
# Описанные ингибиторы ПЦР

Wilson IG., 1997., AEM., vol.63., p.3741

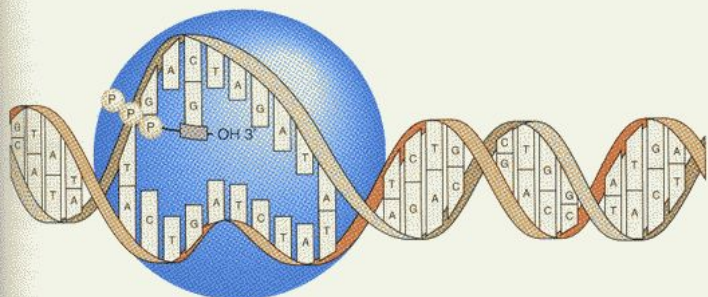
- ◆ Гемоглобин
  - ◆ Гепарин
  - ◆ Иммуноглобулины
  - ◆ Биллирубин и желчные кислоты
  - ◆ Слизь (мукополисахариды)
  - ◆ Высокомолекулярная геномная ДНК
  - ◆ Гормоны
  - ◆ Ферменты
  - ◆ Ионы металлов ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ )
  - ◆ Соли
  - ◆ Продукты жизнедеятельности микрофлоры
- 

*Спасибо за внимание!*

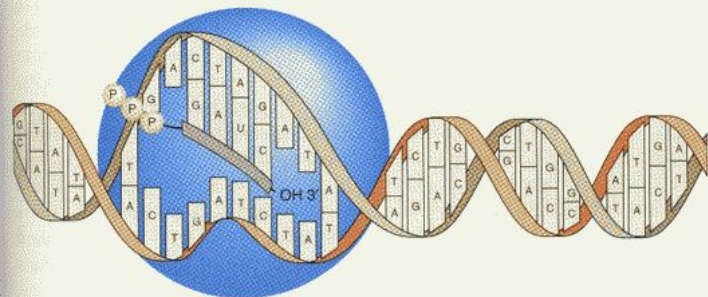




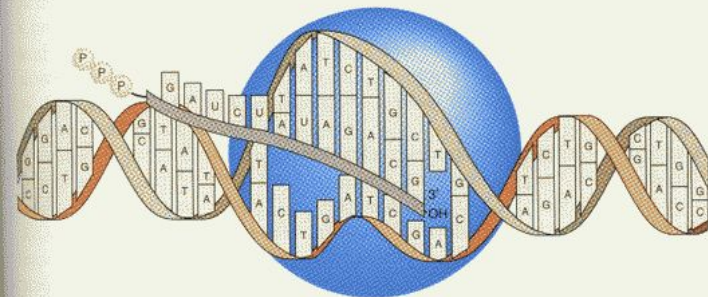
(a)



(b)



(c)



(d)

транскрипция

# Молекула ДНК. Строение нуклеотида.

