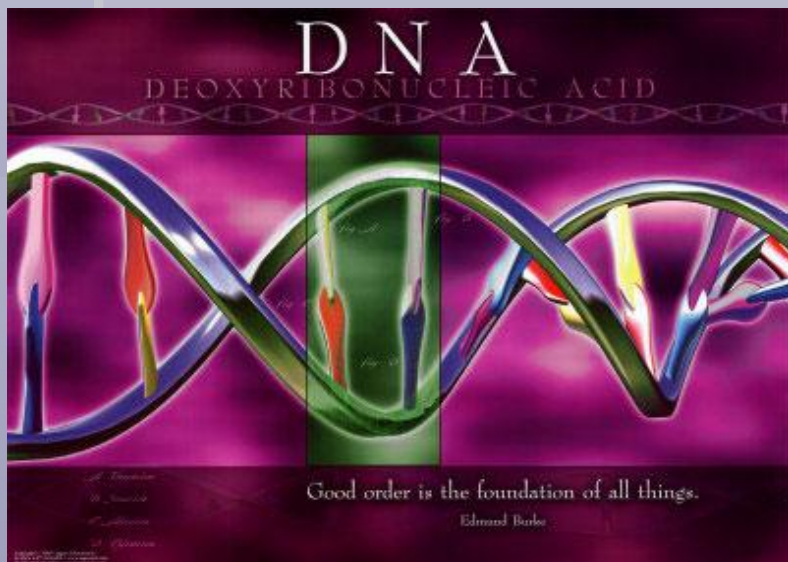




Кафедра: Клинико-диагностическая лаборатория

Тема: Основные методы молекулярно-генетических исследований. Молекулярно-генетические методы в основе предиктивной медицины.



*Выполнил: Ордабек.Е
Факультет: Педиатрия
Топ: 603-1
Проверила: Есбаева.К.У*

Молекулярно-генетические методы - большая и разнообразная группа методов, предназначенная для выявления вариаций в структуре участка ДНК (аллеля, гена, региона хромосомы) вплоть до расшифровки первичной последовательности нуклеотидов.

В основе этих методов лежат генно-инженерные манипуляции с ДНК и РНК.

Вариации в последовательности ДНК в геноме довольно условно принято делить на **мутации** и **полиморфизм**.

Под **мутацией** понимают все изменения, которое возникает в структуре ДНК спонтанно или редко, вне зависимости от места их локализации и влияния на фенотип.

Полиморфизм, согласно классическому определению, - это наличие нескольких (более 1) наследственных вариантов ДНК, самый редкий из которых встречается с частотой, превышающей частоту обратного мутирования.

Случайные мутации происходят постоянно, и поэтому на практике, полиморфизмами считают те из мутаций, которые произошли давно и поэтому встречаются чаще, чем у 1% организмов в данной популяции.

Полиморфизм ДНК. Основные типы генетических маркеров

По отношению к полиморфизму часто используют термин **генетический маркер**. Под маркером понимают любой участок ДНК, наследование, структуру или вариабельность которого можно проследить.

Minisatellite: Tandem repeats of sequences that vary from 14 to 100 base pairs in length.

TACGATATCGGACCAATCGATCGGACCAATCGATCGGACCAATCGTAGGT

TACGATATCGGACCAATCGATCGGACCAATCGTAGGT

Polymorphism: variable number of repeats.

Microsatellite: Short sequence of tandem repeats, eg. CA repeats.

ATGCCATAGCACACACACACATTAGT

ATGCCATAGCACACACACACACATTAGT

Polymorphism: variable number of CA repeats.

SNP: Single nucleotide polymorphism.

ATGTACCAAGT

ATGTACAAGT

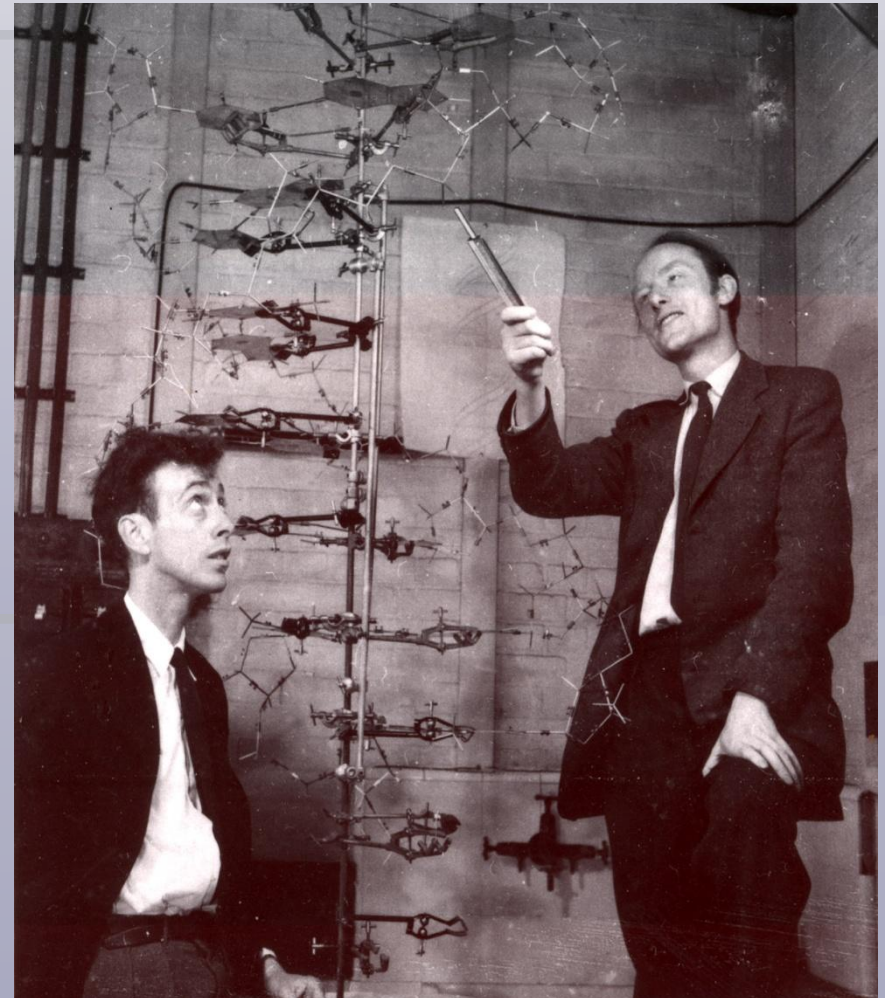
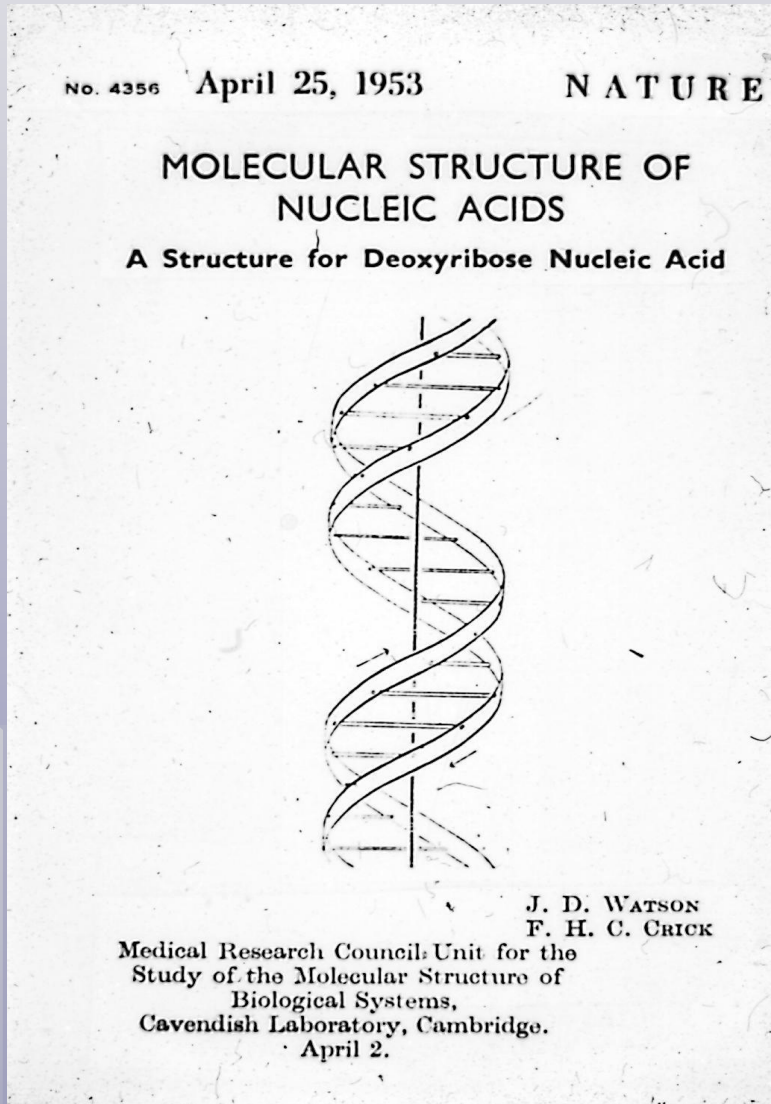
Polymorphism: single base substitution (eg. C → A)



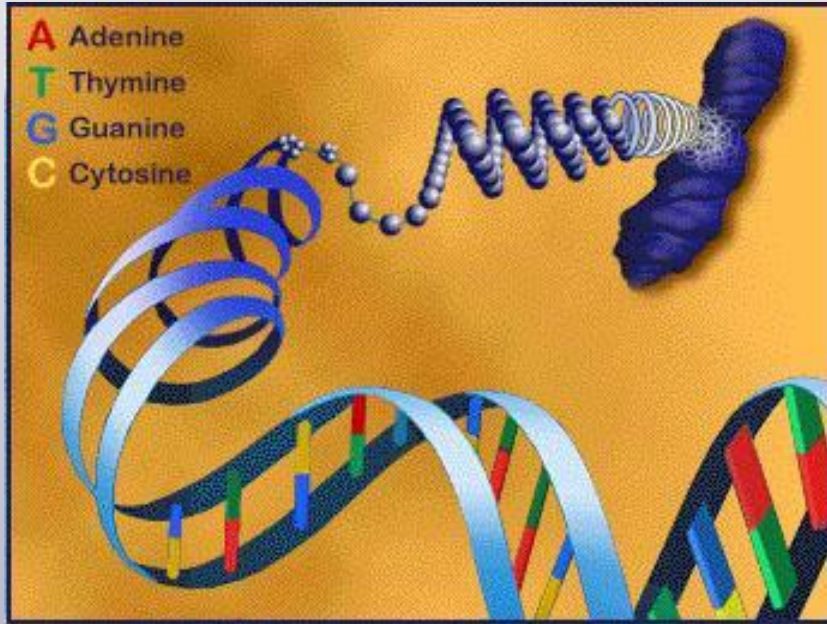
SwTeam.info

Crazy.Word.Ru

Молекулярные основы ДНК-диагностики



Структура молекулы ДНК



Азотистое основание: A, T, G, C, (U)

Углевод: Рибоза (РНК), дезоксирибоза (ДНК)

Нуклеозид: А.О. + остаток сахара

Нуклеотид: Нуклеозид + ост. фосфорной к-ты

А.О.

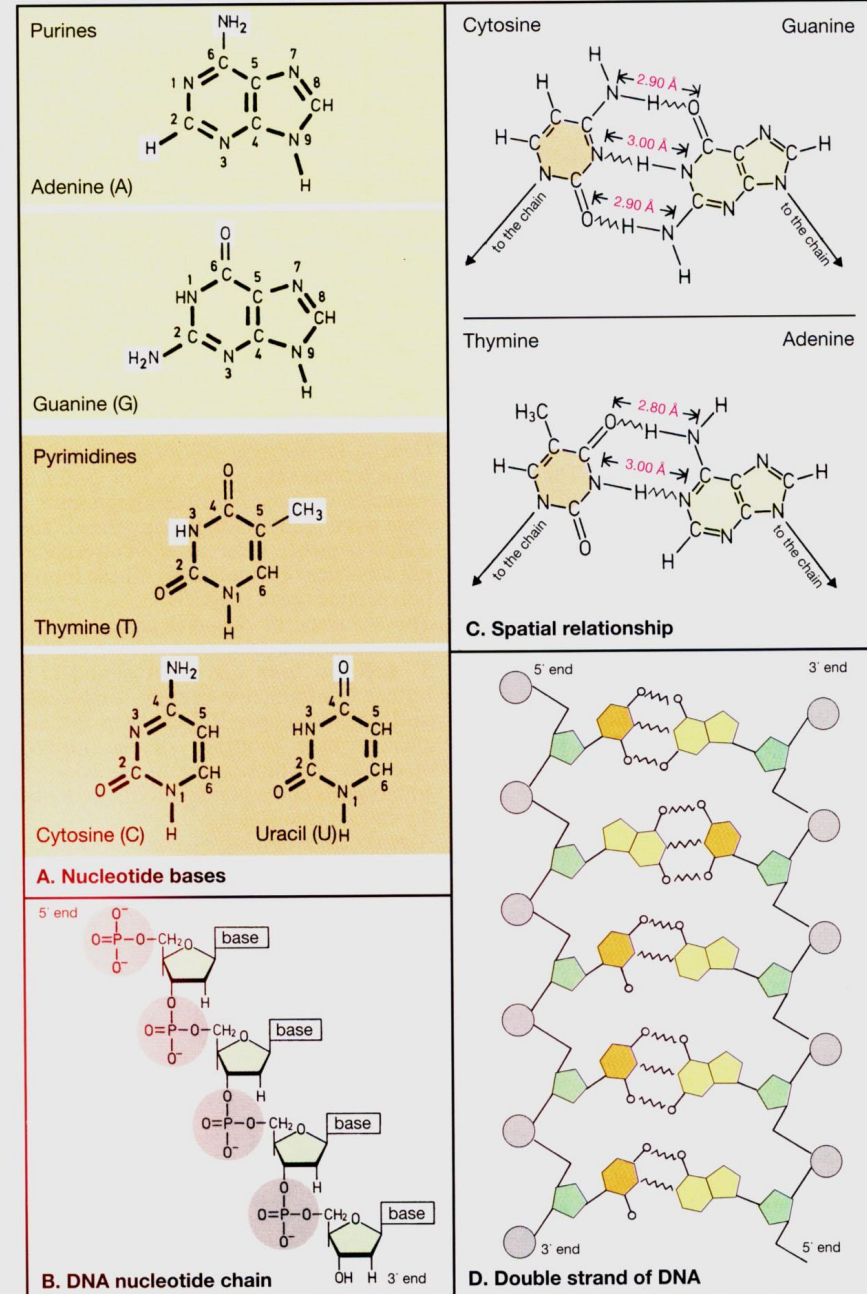
Аденин (A)
 Гуанин (G)
 Цитозин (C)
 Тимин (T)
 Урацил (U)

Нуклеозид

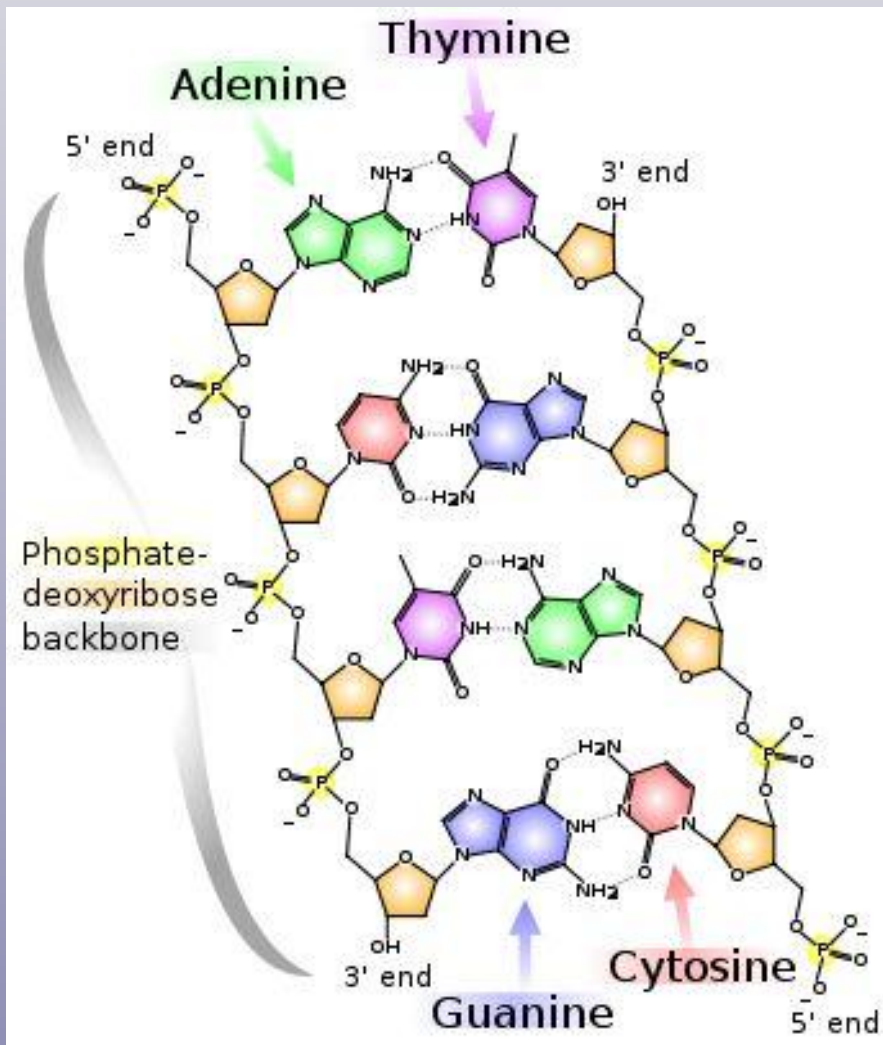
Аденозин
 Гуанозин
 Цитидин
 Тимидин
 Уридин

Нуклеотид

Адениловая к-та (AMP, dAMP)
 Гуаниловая к-та (GMP, dGMP)
 Цитидилоая к-та (CMP, dCMP)
 Тимидиловая к-та (TMP, dTMP)
 Уридиловая к-та (UMP)



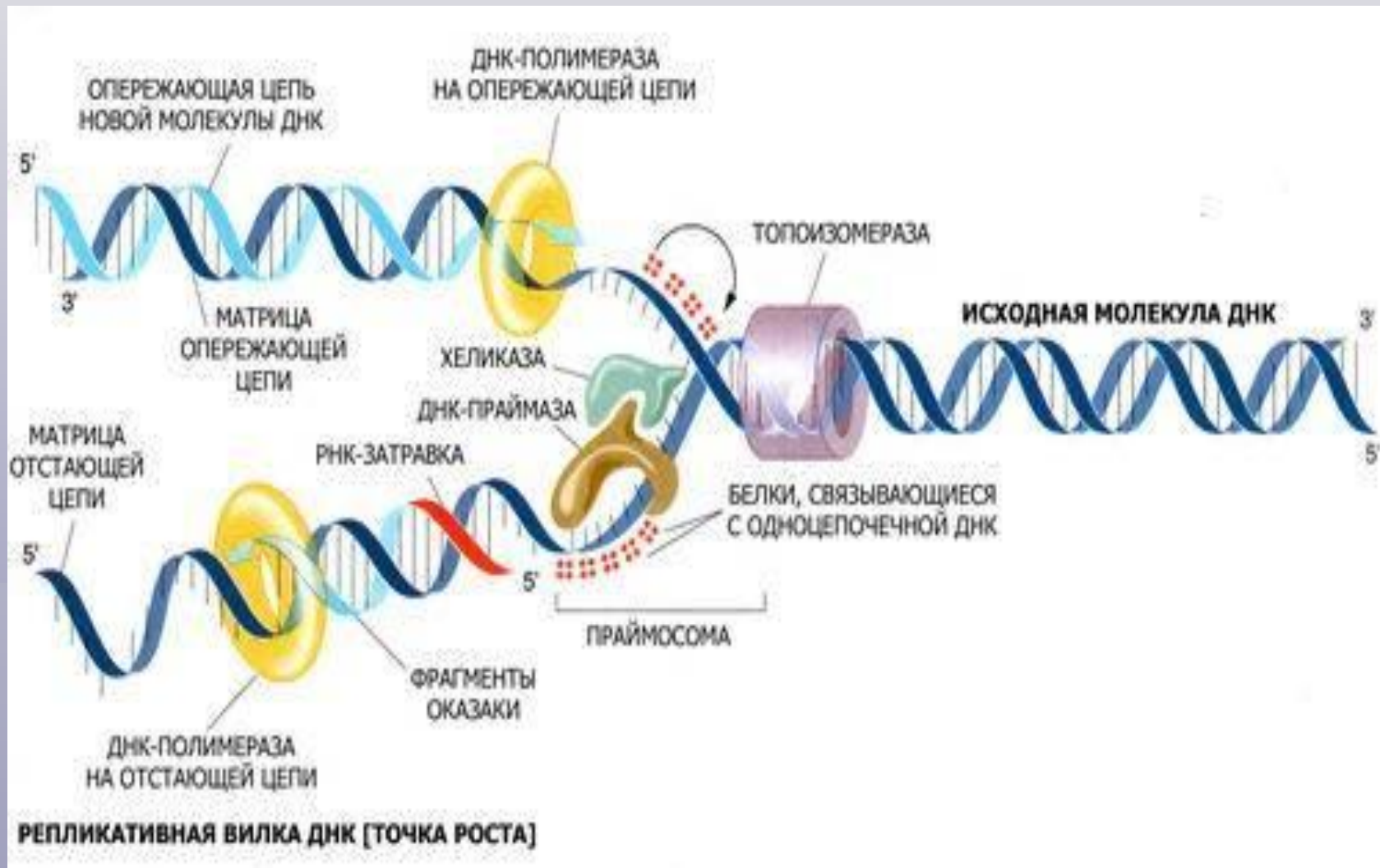
ДНК – самая сложная структура в живых организмах !



Между собой соседние нуклеотиды соединены в цепи фосфодиэфирной связью, образованной 3'-гидроксильной (3'-ОН) и 5'-фосфатной группами (5'-РО₃).

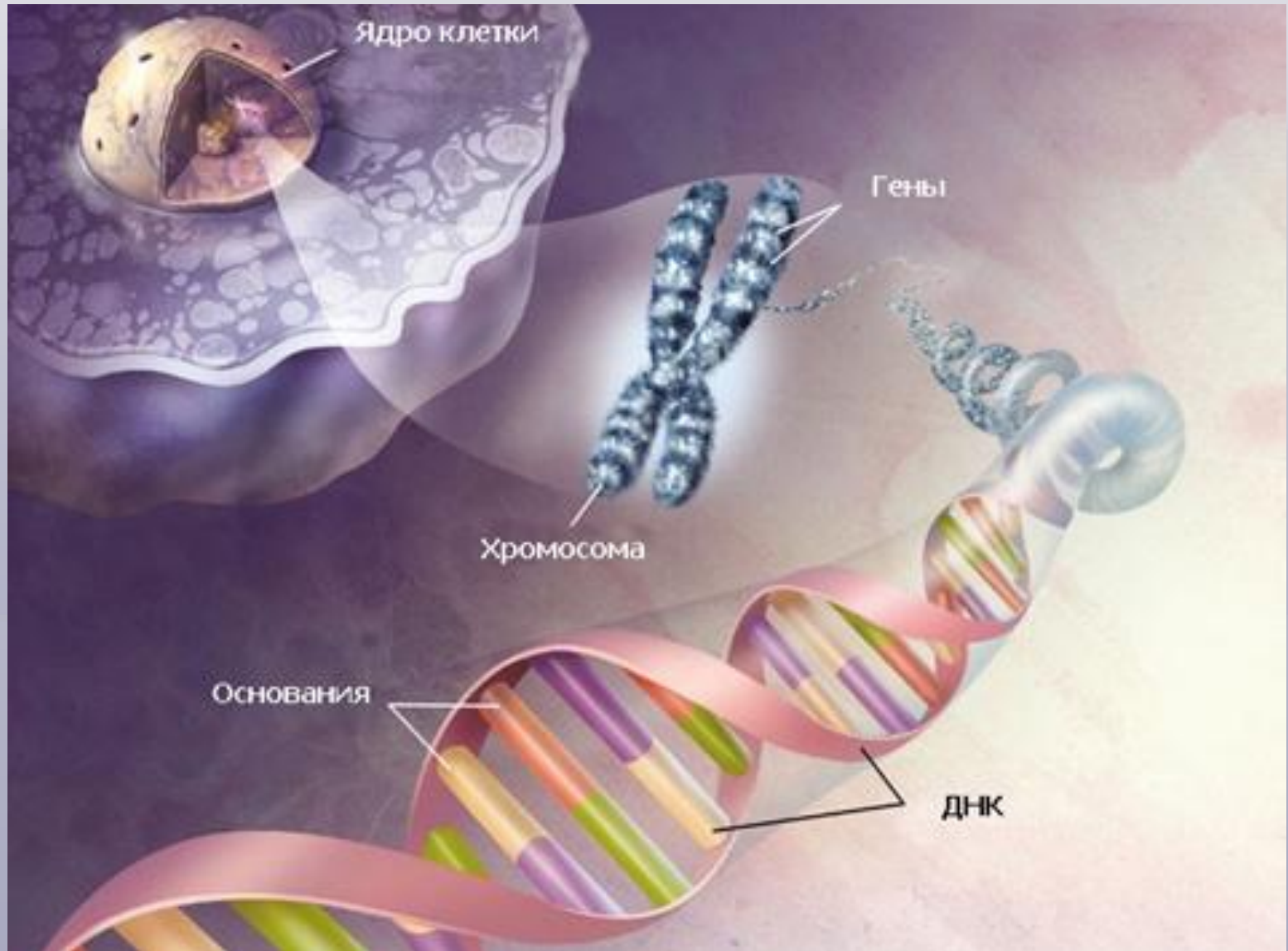
Это свойство обуславливает наличие полярности в ДНК, т.е. противоположной направленности, а именно 5'- и 3'-концов: 5'-концу одной нити соответствует 3'-конец второй нити.

Репликация ДНК



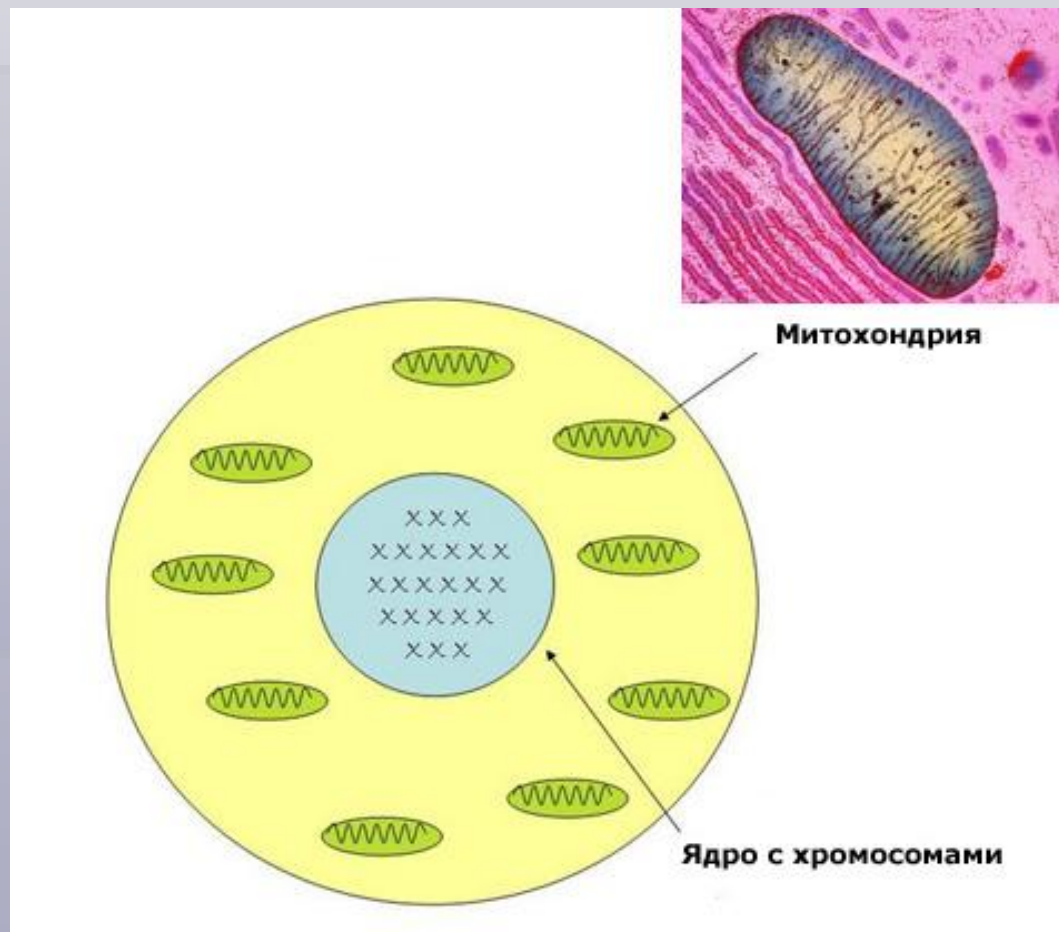
Геном

-вся совокупность генетического материала



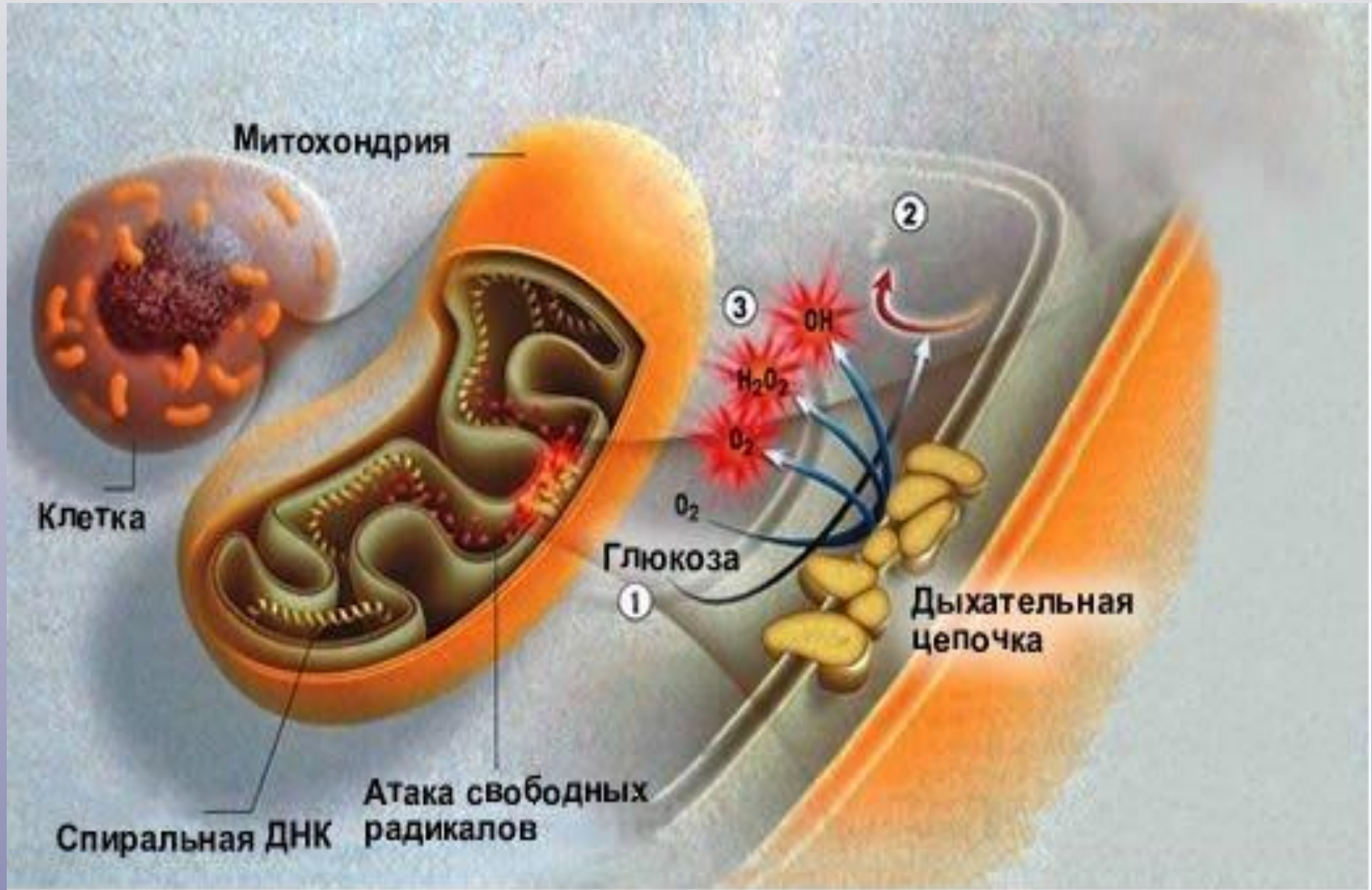
Геном

ядерная ДНК + митохондриальная ДНК

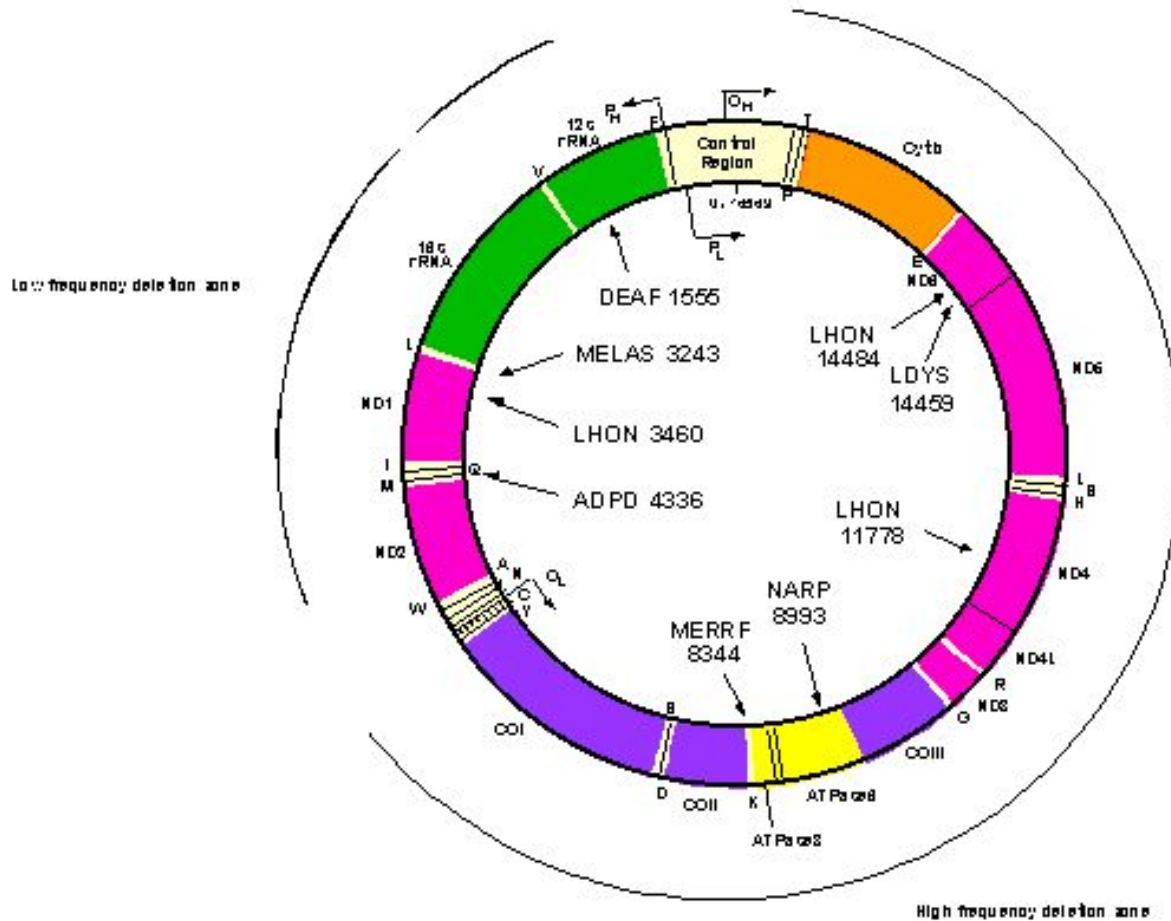


У человека составляет примерно 3 млрд пар нуклеотидов

Строение митохондрии.



Митохондриальная ДНК



Мутации

Изменения числа хромосом
(перестройки генома)

Полипloidия

Кратное увеличение основного
(гаплоидного) числа хромосом

Гаплоидия

Анеуплоидия

Потеря или добавление одной
или нескольких хромосом

Уменьшение диплоидного набора
хромосом в 2 раза

Изменения структуры хромосом
(хромосомные aberrации)

Нехватки
(делеции)

Потеря какого-либо участка
хромосомы

Дупликации

Удвоение какого-либо участка
хромосомы

Инверсии

Поворот какого-либо участка
хромосомы на 180°

Транслокации

Обмен участками между
двумя нехомологичными хромосомами

Изменения структуры гена
(генные мутации)

Изменение порядка
вания нуклеотидов

Вставка нуклеотидов

Удвоение нуклеотидов

Потеря нуклеотидов

Мутации

Мутация - любое изменение последовательности ДНК

1. Мутации возникают скачкообразно, без переходов. Альтернативны состояния
2. Образовавшиеся новые формы константны
3. Мутация является качественным изменением
4. Мутации разнонаправленны («полезные» и «вредные»)
5. Одни и те же мутации могут возникать повторно

Классификация мутаций (Инге-Вечтомов, 1989)

По характеру изменения генома

- Геномные - изменения числа наборов хромосом
- Хромосомные - изменения структуры хромосом (хромосомные перестройки)
- Генные - локальные изменения последовательности ДНК

По характеру изменения фенотипа

- Летальные
- Морфологические
- Физиологические
- Биохимические
- Поведенческие

По проявлению в гетерозиготе

- Доминантные
- Рецессивные

По условиям возникновения

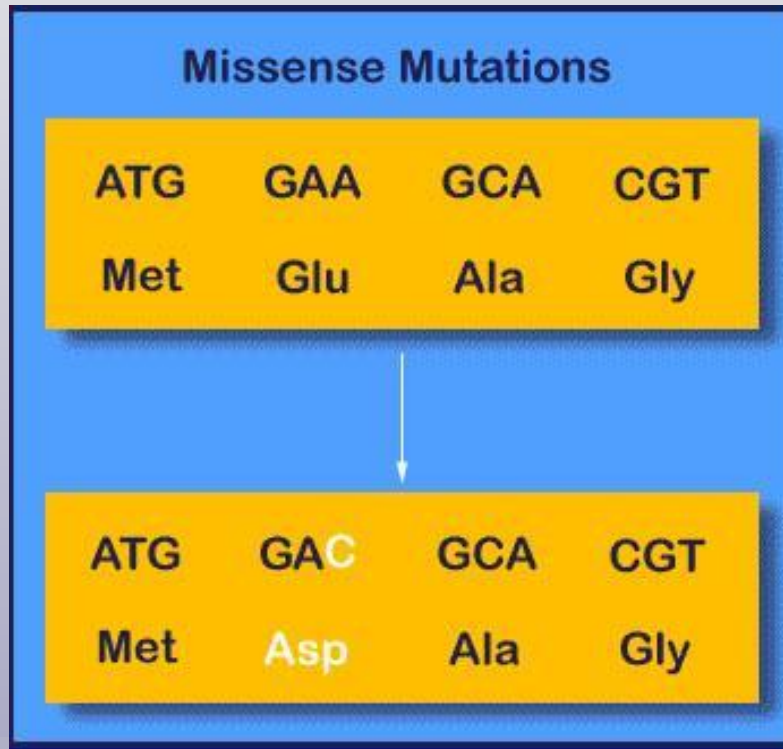
- Спонтанные
- Индуцированные

По возможности наследования

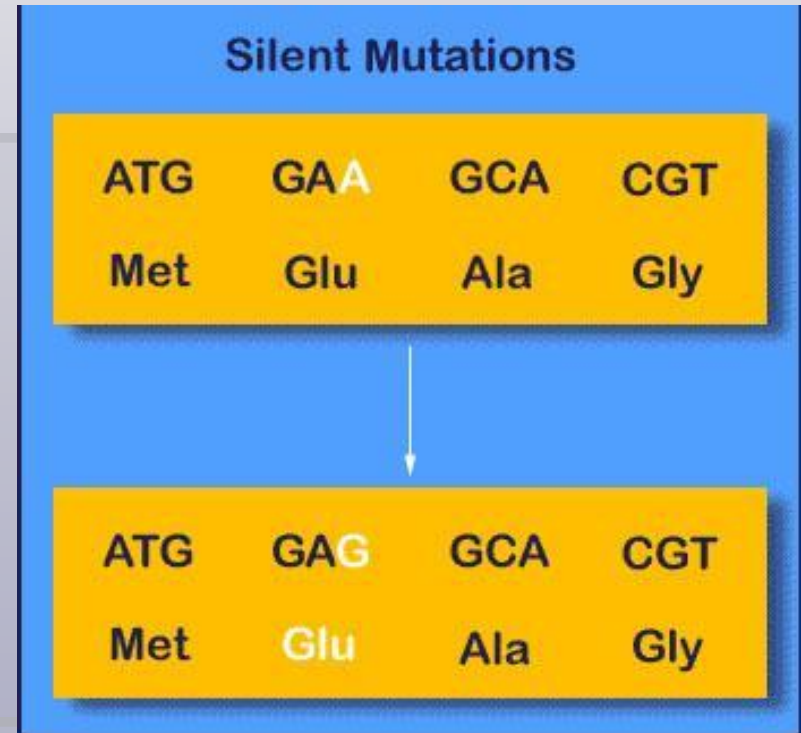
- В генеративных тканях (в половых клетках)
- Соматические (в соматических клетках)

Точечные мутации - замены одного нуклеотида

Точечные мутации в кодирующей части гена



Миссенс-мутация - замена аминокислотного остатка в белке



Молчащая замена - не приводит к замене а/к

Nonsense Mutations

ATG	GAA	GCA	CGT
Met	Glu	Ala	Gly



ATG	TAA	GCA	CGT
Met	STOP		

Нонсенс-мутация - замена аминокислотного кодона на стоп-кодон

Frameshift Mutation

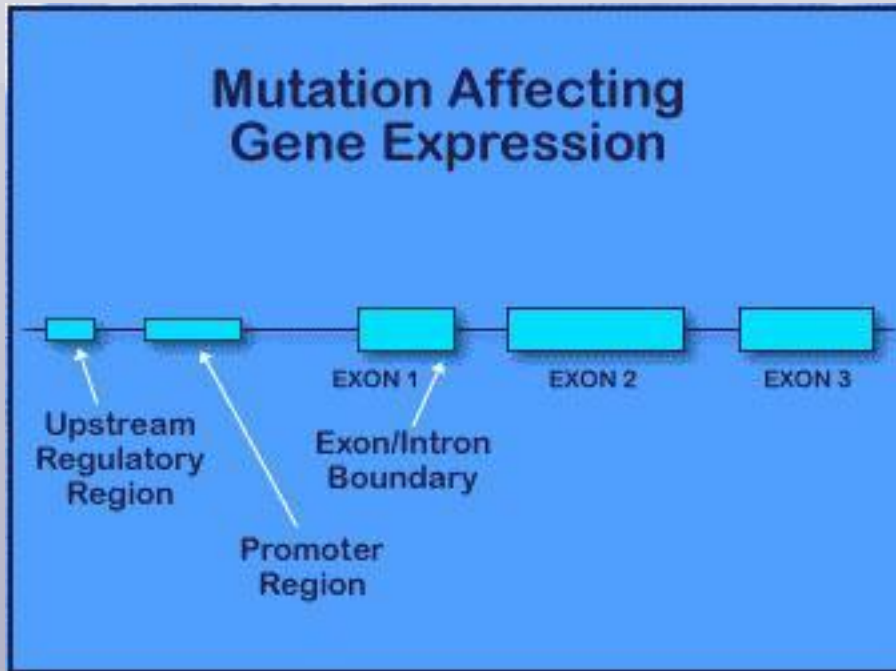
ATG	GAA	GCA	CGT
Met	Glu	Ala	Gly



ATG	AAG	CAC	GT
Met	Lys	His	

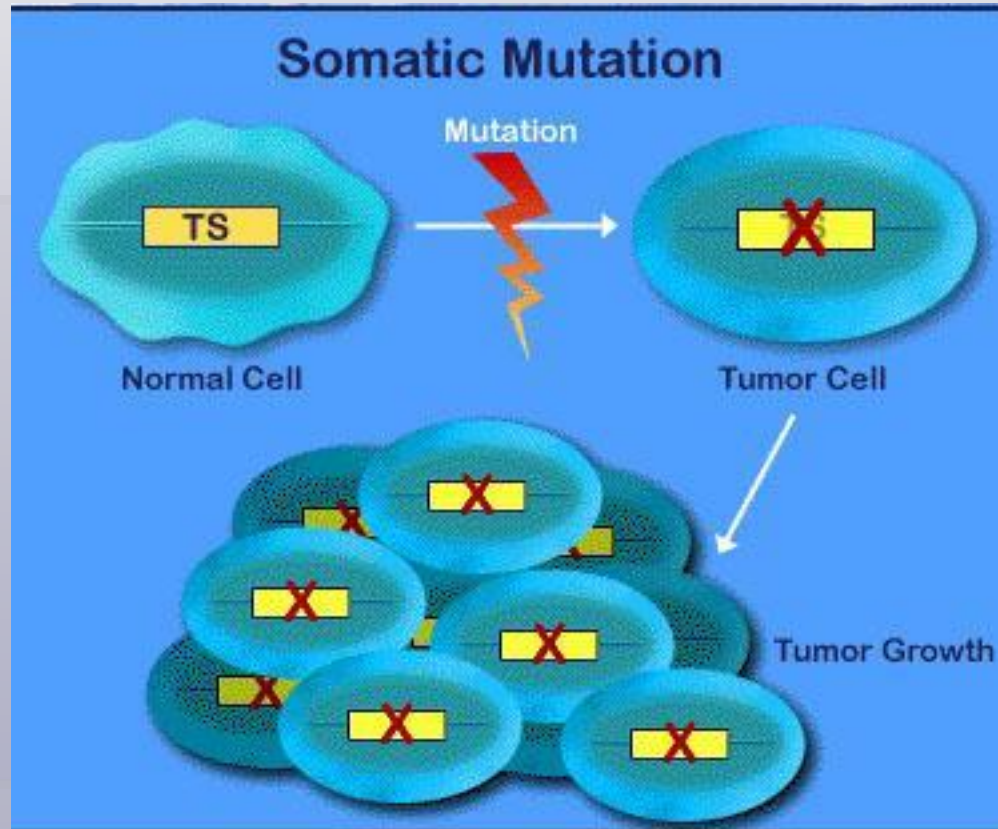
Мутация сдвига рамки считывания (фреймшифт) - изменение последовательности а/к

Мутации в регуляторных областях гена приводят к изменению уровня его экспрессии



Мутации в сайтах сплайсинга приводят к изменению структуры мРНК и белка

Соматические мутации



Соматические мутации в гена-супрессорах опухолей - причина раковых заболеваний

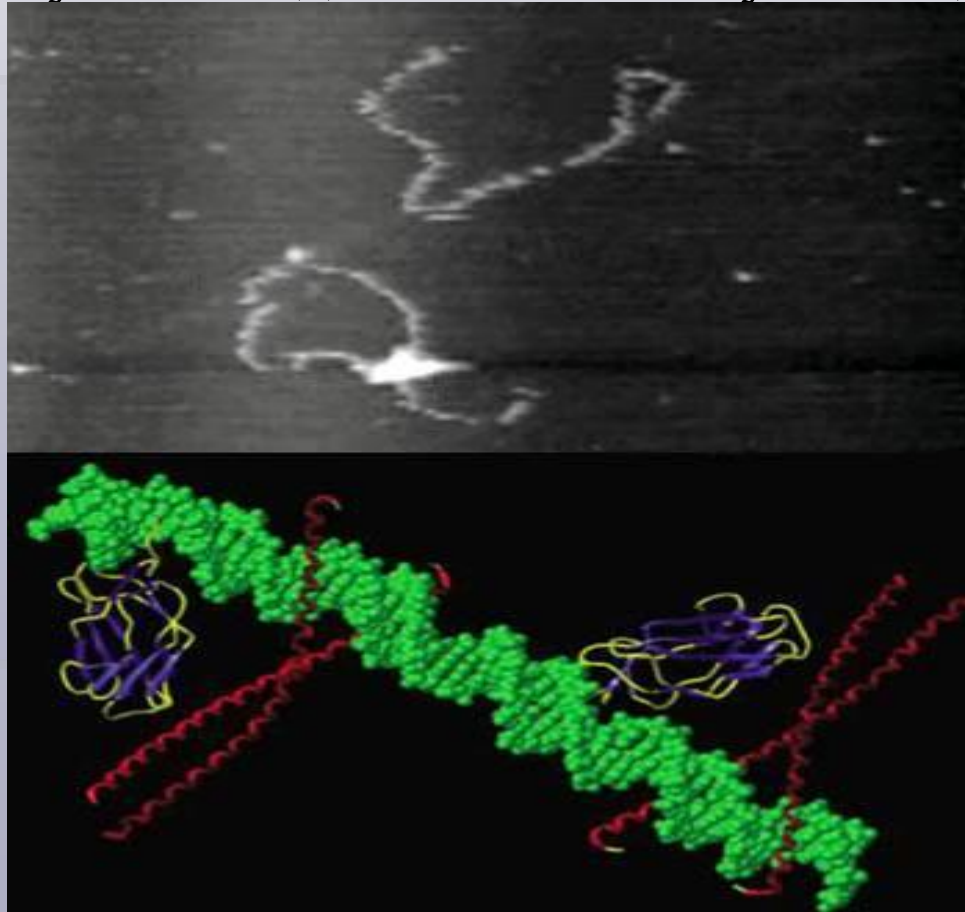
Основные принципы, на которых базируются молекулярно-генетические методы диагностики

1. Комплементарность нуклеотидных оснований – аденин всегда гибридизируется с гуанином, цитозин с тимином
2. При нагревании происходит разъединение цепей ДНК (денатурация), то есть нормальная двухцепочечная ДНК расщепляется на две одноцепочечные.
3. При охлаждении (ренатурации) происходит восстановление двуцепочечной структуры в соответствии с правилом комплементарности нуклеотидов.
4. Расщепление молекулы ДНК может быть достигнуто с помощью специальных бактериальных ферментов – эндонуклеаз, рестрицирующих молекулу ДНК в местах со строго определённой для каждой эндонуклеазы последовательностью нуклеотидов.
5. Фрагменты ДНК в акриламидном или агарозном гелях легко разделяются под действием электрического тока; положение фрагментов ДНК при электрофорезе определяется размерами ДНК фрагментов.

Рестриктазы

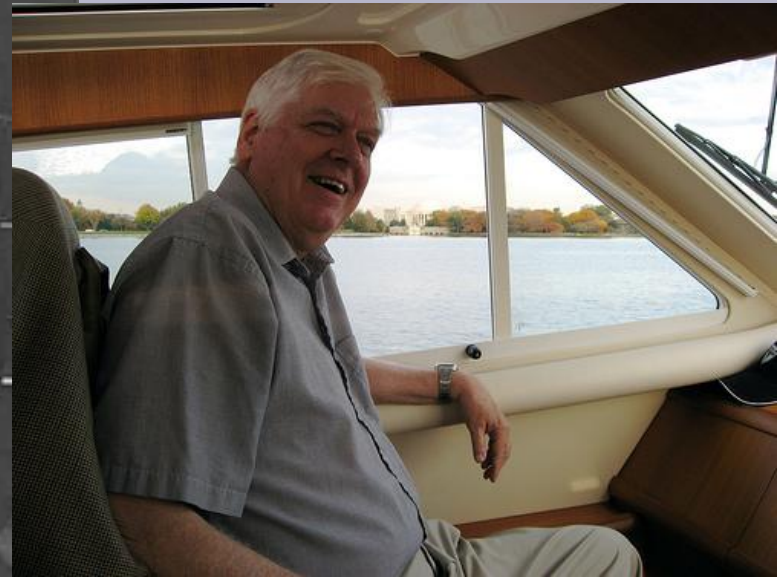
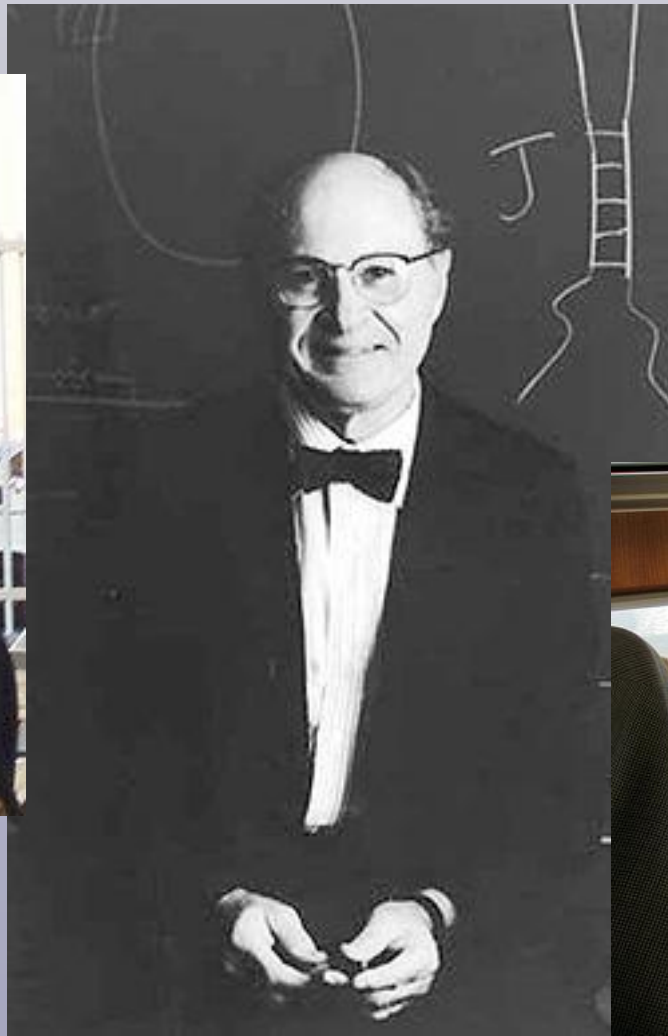
- Рестриктазы - бактериальные ферменты, которые узнают специфические последовательности из 4-8 нуклеотидов в двухцепочечной молекуле ДНК и разделяют её на фрагменты в местах локализации этих последовательности, называемых *сайтами рестрикции*.
- Количество образующихся рестрикционных фрагментов ДНК определяется частотой встречаемости сайтов рестрикции.
- Размер (длина) образующихся рестрикционных сайтов определяется характером распространения сайтов по длине исходной ДНК. Чем чаще расположены сайты рестрикции, тем короче фрагменты.
- Сайты рестрикции м.б. использованы в качестве генетических маркёров ДНК.
- Рестрикционные фрагменты м.б. упорядочены по длине путём электрофореза в агарозном или полиакриламидном геле.

Сейчас известно более 500 различных типов бактериальных рестриктаз, и каждый из этих ферментов узнаёт свою специфическую последовательность нуклеотидов.



Первая рестриктаза была выделена в 1970 г. Гамильтоном Смитом из штамма *Haemophilus influenzae*. Она была обозначена HindIII.

В 1978 г. Даниел Натанс, Вернер Арбер и Гамильтон Смит получили Нобелевскую премию по физиологии и медицине «открытие ферментов рестрикации и методов их использования для изысканий в молекулярной генетике».





Базовые методы идентификации мутаций

1. Блот-гибридизация
 2. ПЦР
-

Блот-гибридизация по Саузерну (Саузерн-блоттинг)

Блоттинг - перенос молекул ДНК из геля на другой носитель (нитроцеллюлозу)

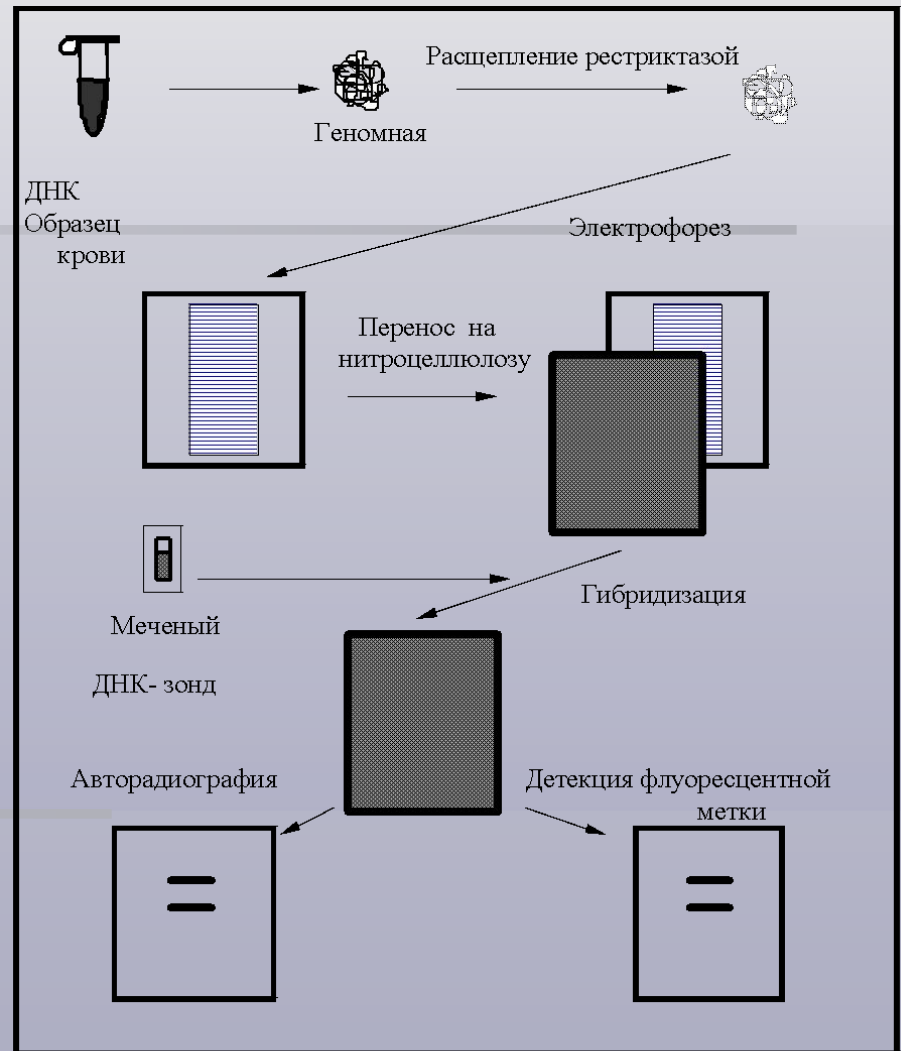
Гибридизация - формирование 2-цепочечных молекул ДНК из 1-цепочечных молекул ДНК-матрицы и ДНК-зонда

Эдмунд Саузерн, 1975

Нозерн-блоттинг - перенос РНК

Вестерн-блоттинг - перенос белков

ДНК-зонд - одноцепочечная молекула ДНК или РНК, соответствующая известному гену (участку генома) и несущая метку (радиоактивную, флуоресцентную, иммунологическую)



Литература

- 1. Жимулев И.Ф. Общая и молекулярная генетика. – Новосибирск : Издательство Новосибирского университета, 2002, 2003. – 458 с.
- 2. Петухов В.Л. Генетика / В. Л. Петухов, С.Ж. Стамбеков, О.С. Короткевич: Учебник - Новосибирск, 2007. – 616 с.