

# ЛЕКЦИЯ 5

## МЕТОДЫ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ ЧЕЛОВЕКА

# ***Молекулярно-генетические методы***

позволяют установить диагноз  
носительства определенного аллеля  
(в том числе мутантного) на уровне  
кодировочного домена в ДНК,  
даже при отсутствии продукта  
экспрессии гена;  
определить гомозиготное  
или  
гетерозиготное состояние гена.

# **Методы генетического анализа:**

- *Метод ДНК-гибридизации с использованием меченых зондов;*
- *метод флуоресцентной гибридизации in situ FISH-метод (fluorescence in situ hybridization);*
- *метод специфической рестрикции ДНК, который носит название блот-гибридизации (блоттинг) по Саузерну;*
- *метод определения полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ);*
- *метод амплификации ДНК (ПЦР).*

- Суть этих методов заключается в использовании специфичности работы ферментов, которые разрезают нуклеиновые кислоты;
- Принципе *комплементарности нуклеотидных последовательностей* и выборочного размножения (репликация, амплификация) двуспиральных районов ДНК, способности достраивать отсутствующие районы этих структур в условиях пробирки, а не клетки или организма.
- Именно эти методы позволяют решить проблемы *пренатальной, доимплантационной* и даже *преконцепционной диагностики; спорного отцовства* или *личности преступника*.

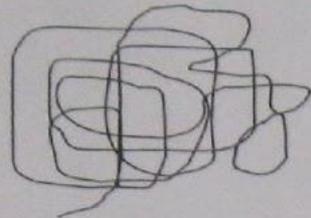
# 1. Метод ДНК-гибридизации с использованием меченых зондов

- Метод основан на универсальном свойстве нуклеиновых кислот образовывать двойные нити, которые, соединяясь между собой по комплементарным нуклеотидам, образуют классические пары: **аденин-тимин (АТ) и гуанин-цитозин (ГЦ)**.
- Если хорошо известна первичная структура нормального (дикого) и мутантного аллелей искомого гена, то для **детекции повреждения** выделяют ДНК из доступных клеток пробанда, режут ее на мелкие фрагменты, осаждают ДНК (на носителе и добавляют к ней искусственно синтезированные разные олигонуклеотиды, комплементарные нормальному либо мутантному гену.
- Как правило, эти олигонуклеотиды состоят из **18-20 последовательностей**, метятся чаще всего радиоактивным изотопом и называются зондом. Зонды специфически соединяются либо с нормальным, либо с мутантным геном, и патология выявляется путем обнаружения радиоактивных импульсов после отмывания соответствующего образца, т.е. зонд остается на образце только в случае его соответствия гену в ДНК пробандов.
- Этот метод широко применяется в практике здравоохранения зарубежных стран. Для его использования необходимо большое количество ДНК (1 мкг), которое можно выделить из 100 тысяч клеток человека. Этот подход наиболее точный, его можно использовать для тестирования различных генных мутаций.
- В настоящее время с помощью данного метода проводится диагностика **талассемий, фенилкетонурии, недостаточности а-антитрипсина и других заболеваний**.

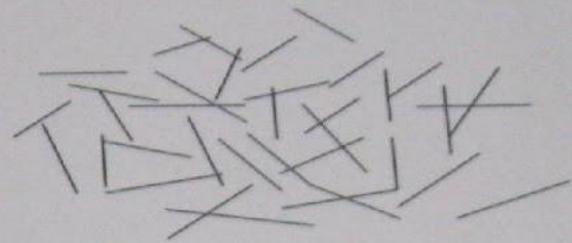
## 2. Метод специфической рестрикции ДНК, который носит название блот-гибридизации (блоттинг) по Саузерну

- Необходимым этапом в молекулярно-генетической диагностике является **рестрикция ДНК на фрагменты**. Этот процесс осуществляется **рестриктазами**, относящимися к группе бактериальных эндонуклеаз.
- В генетике человека используется несколько десятков различных рестриктаз. Основным свойством **рестриктазы** является узнавание специфического для нее места в последовательности нуклеотидов и способности разрезать нить ДНК в этом локусе на 4-6 пар оснований.
- При обработке геномной ДНК **рестриктазой** получается закономерный для данного фермента набор различной длины. Если повреждение гена (мутация) изменит какой-нибудь из этих локусов, это повлечет за собой изменение числа и размеров гибридизируемых с меченым зондом фрагментов.
- Примерно 50% **нуклеотидных замен** приводит к изменению места **рестрикции**, благодаря чему и возможна прямая **детекция** мутаций на основе **рестриктного анализа**.
- Эта методика применяется для диагностики серповидноклеточной анемии, талассемий, умственной отсталости с ломкой X-хромосомой, фенилкетонурии, миопатии Дюшена и других заболеваний.

# ГИБРИДАЦИИ ПО САУЗЕРНУ

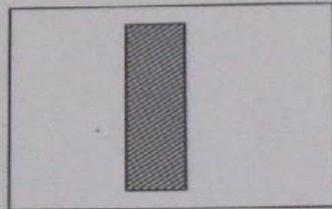


ГЕНОМНАЯ ДНК

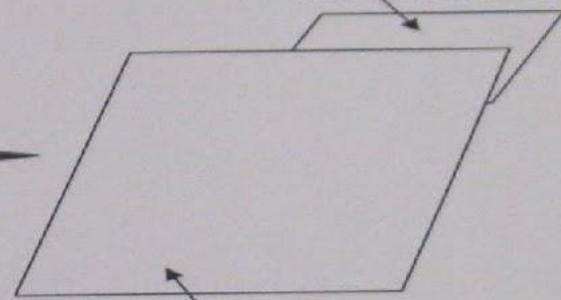


$10^6$  ФРАГМЕНТЫ ДНК

NC-ФИЛЬТР

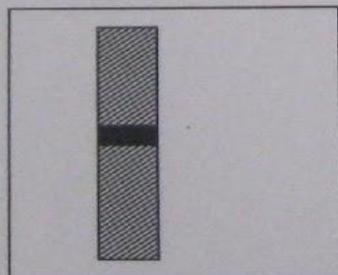


ЭЛЕКТРОФОРЕЗ  
В АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ

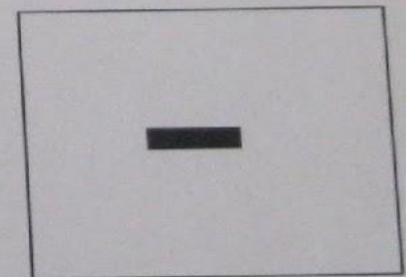


ГЕЛЬ

ПЕРЕНОС ДНК НА NC-  
ФИЛЬТР ПУТЕМ ДИФфуЗИИ

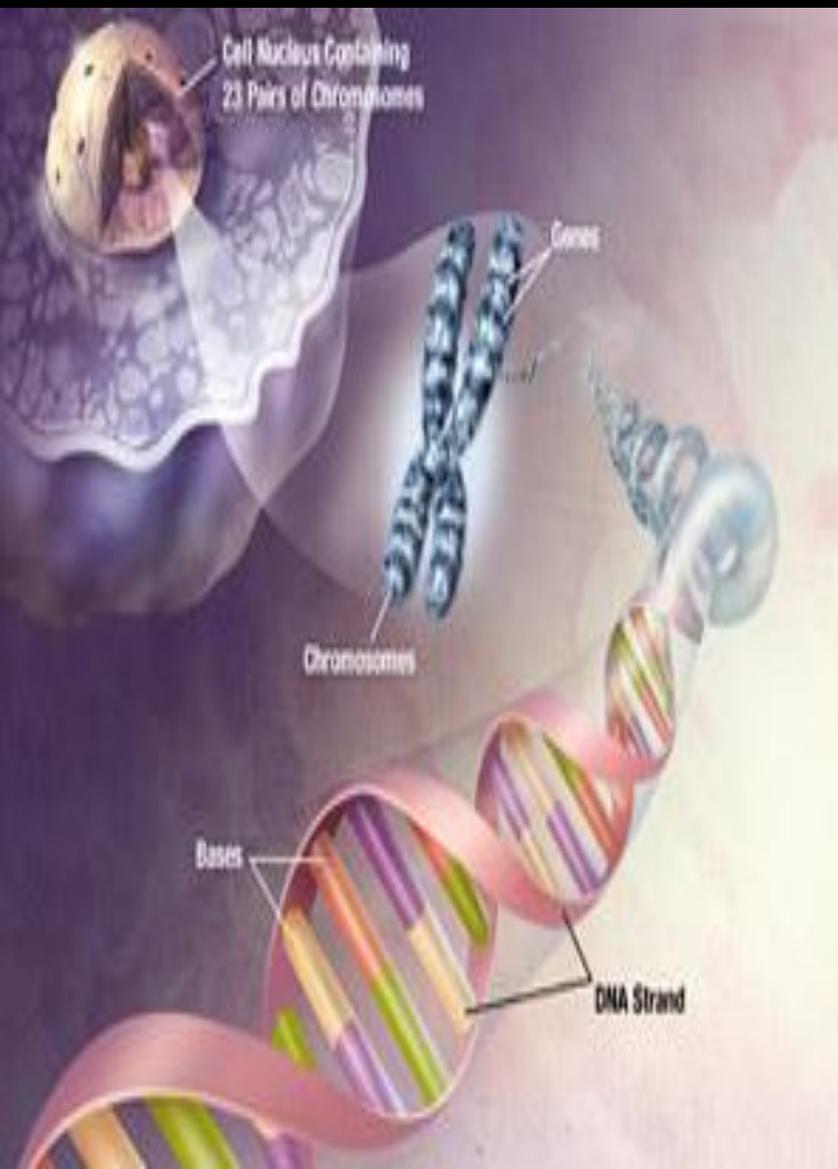


ОТМЫВКА  
АВТОРАДИОГРАФИЯ



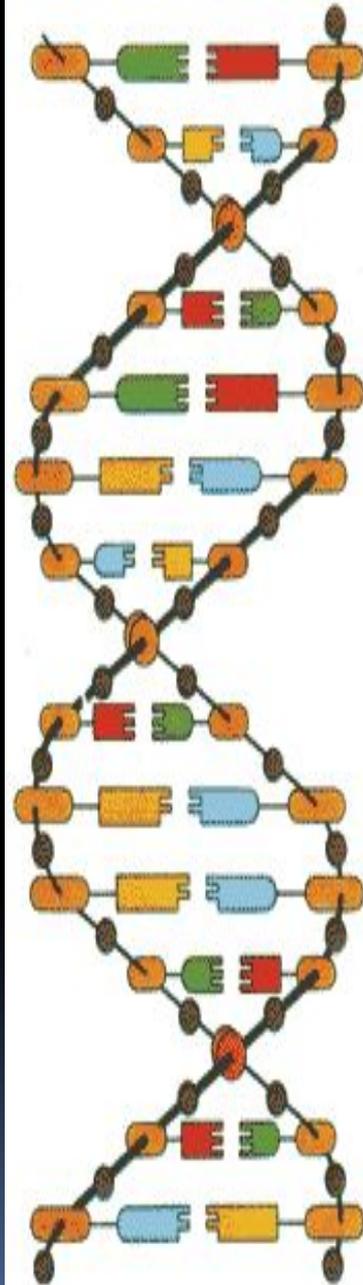
ГИБРИДИЗАЦИЯ.  
ФИЛЬТР ИНКУБИРОВАН С ДНК,  
МЕЧЕННОЙ  $^{32}P$

### 3. Метод флуоресцентной гибридизации *in situ* - FISH-метод



- Молекулярно-генетическая диагностика - современное направление в клинической генетике, **цель которой** - разработка и применение **новых высокоэффективных методов анализа наследственно обусловленной патологии и, прежде всего, хромосомных болезней.**
- Это стало возможным в результате разработки и внедрения в клиническую цитогенетику комплекса новых технологий **ДНК**-диагностики: гибридизации **нуклеиновых кислот** *in situ* и компьютерных систем для анализа **хромосом.**

- ДНК-диагностика основана на использовании технологии рекомбинантных молекул ДНК и приготовления специальных ДНК-зондов для выявления и молекулярного анализа генетических дефектов.



- **FISH-метод** позволяет выявлять индивидуальные хромосомы и их отдельные участки на **метафазных пластинках** (хромосомы в состоянии максимальной конденсации и визуализации);
- В **интерфазных ядрах** (неконденсированные хромосомы, без четкой морфологической структуры) на основе особенностей их молекулярно-генетического строения.
- Метод включает применение специально подготовленных **(флуоресцирующих)** ДНК-проб для выявления генетических дефектов на хромосомном уровне и проведение молекулярно-цитогенетической диагностики с использованием современной флуоресцентной микроскопии.

- ✓ Метод флуоресцентной гибридизации ***in situ*** был разработан благодаря успехам молекулярной генетики человека и является принципиально новым, удобным и безопасным.
- ✓ ***FISH-метод*** не требует высокого уровня цитогенетика, позволяет определить самые сложные хромосомные аномалии, а использование современного мультимедийного оборудования еще больше упрощает процесс диагностики.
- ✓ Границы применения ***метода FISH*** невероятно широкие: от локализации конкретного гена до расшифровки сложных перестроек между несколькими хромосомами.
- ✓ Он позволяет выявить происхождение aberrантных хромосом, а также ***микрочромосомные аномалии***, которые недоступны для методов дифференциального окрашивания.
- ✓ Существенным преимуществом FISH метода является использование интерфазных ядер для диагностики патологий.
- ✓ В зависимости от целей, можно применять различные варианты флуоресцентной гибридизации, что позволяет максимально достоверно достичь необходимого результата.
- ✓ Еще одной важной чертой является то, что одну клетку (метафазную пластинку или интерфазное ядро) можно многократно метить, проводя отмывку после каждого нанесения зонда, что в десятки раз увеличивает количество определяемых последовательностей в работе всего с одной клеткой.

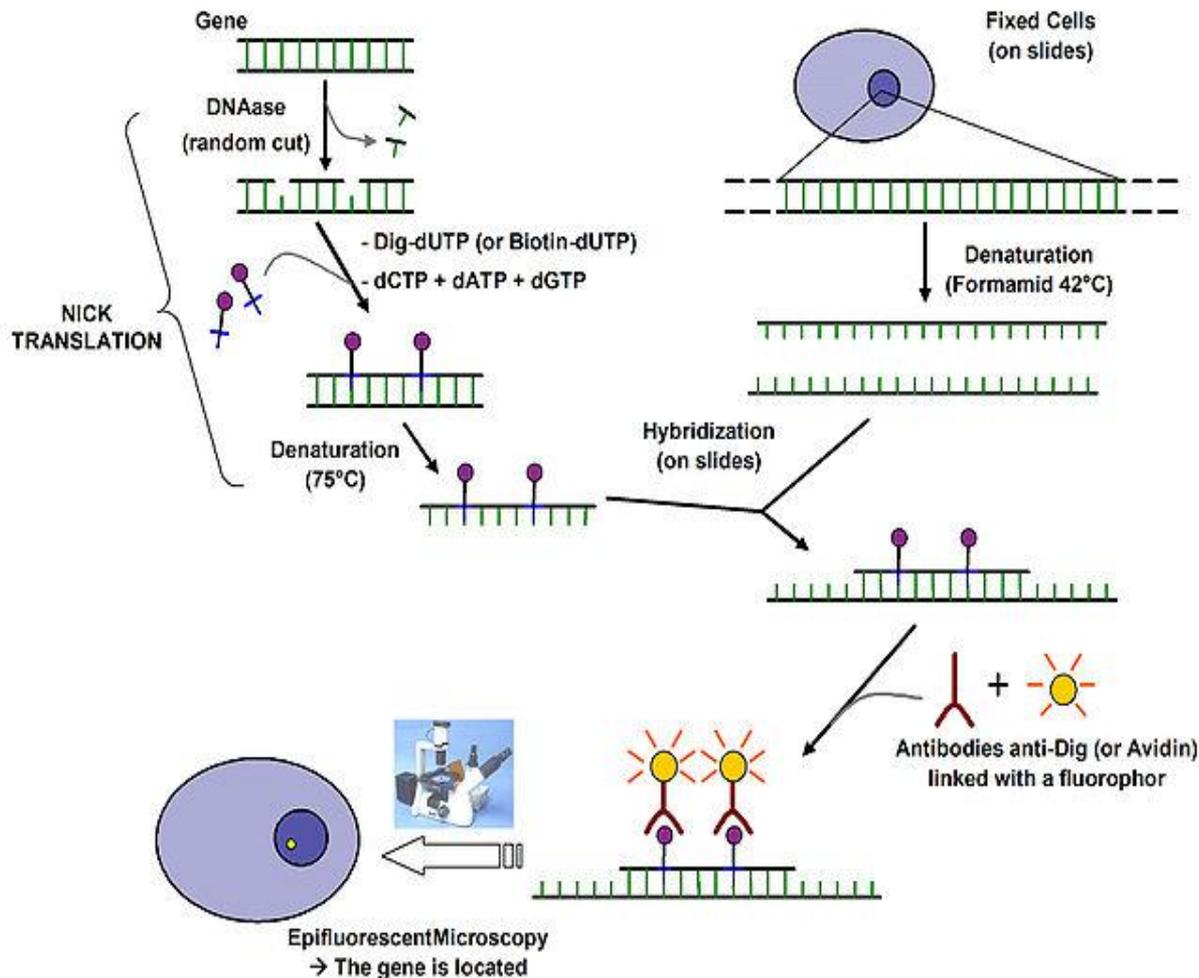
# Применение FISH метода

**Молекулярно-цитогенетическая диагностика с использованием FISH метода применяется в различных разделах медицинской генетики:**

- ✓ для определения численных и структурных хромосомных аномалий в клинической цитогенетике;
- ✓ для идентификации маркерных (мини-, дополнительных) хромосом;
- ✓ для определения анеуплоидий в неделящихся пренатальных и постнатальных интерфазных клетках;
- ✓ для определения различных специфических и неспецифических хромосомных аномалий в онкоцитогенетике;
- ✓ для анализа хромосомных аномалий в клинической цитогенетике (изохромосомы, сбалансированные хромосомные аномалии при различных клинических картинах синдрома и т.д.).

# Этапы FISH - метода

## FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)



Суть метода заключается в приготовлении коротких последовательностей ДНК, называемых **зондами**, которые являются комплементарными по отношению к последовательностям ДНК, представляющим объект изучения.

Зонды гибридизуются (связываются) с комплементарными участками ДНК и благодаря тому, что они помечены **флуоресцентной меткой**, позволяют видеть локализацию интересующих генов в составе ДНК или хромосом.

# Разновидности FISH

## Интерфазная цитогенетика:

- Флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH).

Комбинация FISH с другими методами:

- цитология + FISH;
- гистология + FISH;
- иммунофенотипирование + FISH (FICTION);

## Метафазная цитогенетика:

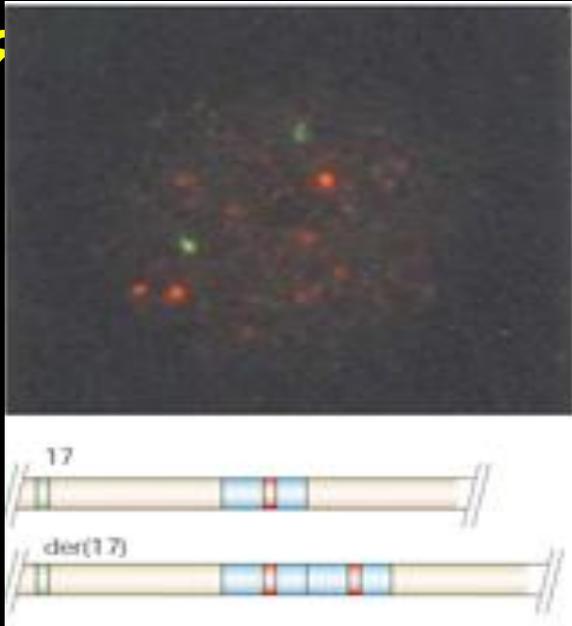
- Сплошное окрашивание хромосом (Whole painting).
- Сравнительная геномная гибридизация (CGH).
- Кариотипирование с переменной цвета (ССК).

## Многоцветное кариотипирование:

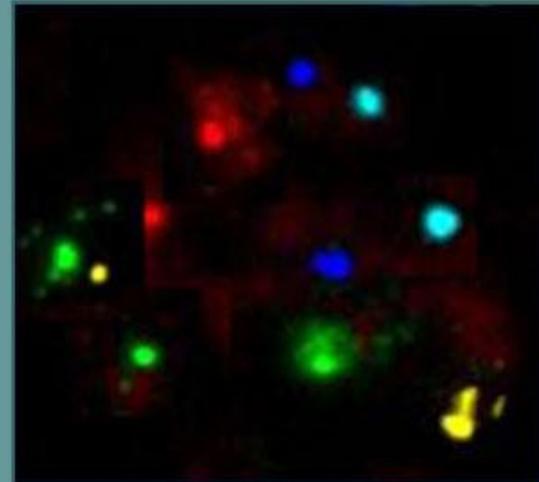
- COBRA FISH
- Спекральное кариотипирование (SKY);
- многоцветная FISH (M - FISH, M - BAND).

3D FISH

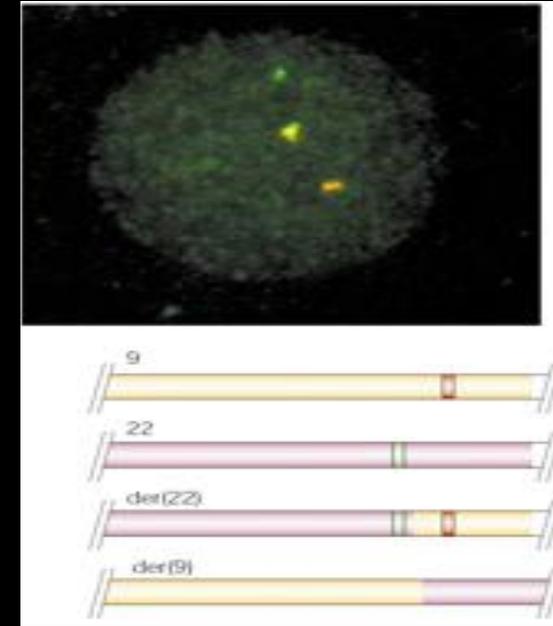
# Использование FISH в интерфазных



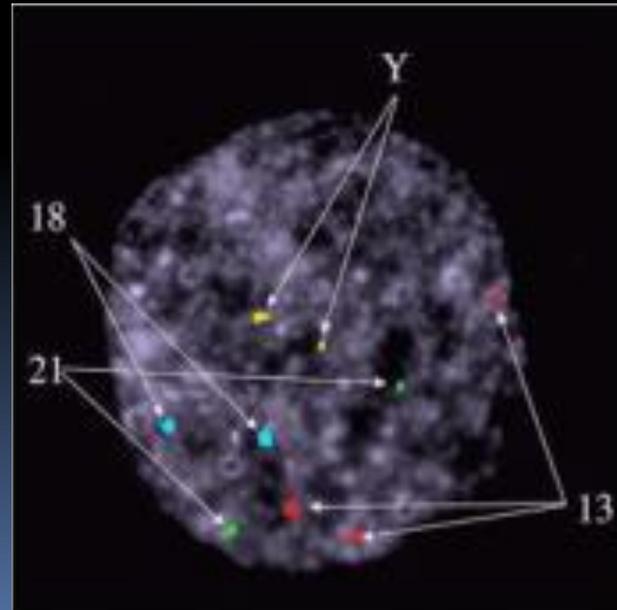
Trisomy 21



13 = Red 16 = Aqua 18 = Blue 21 = Green 22 = Yellow

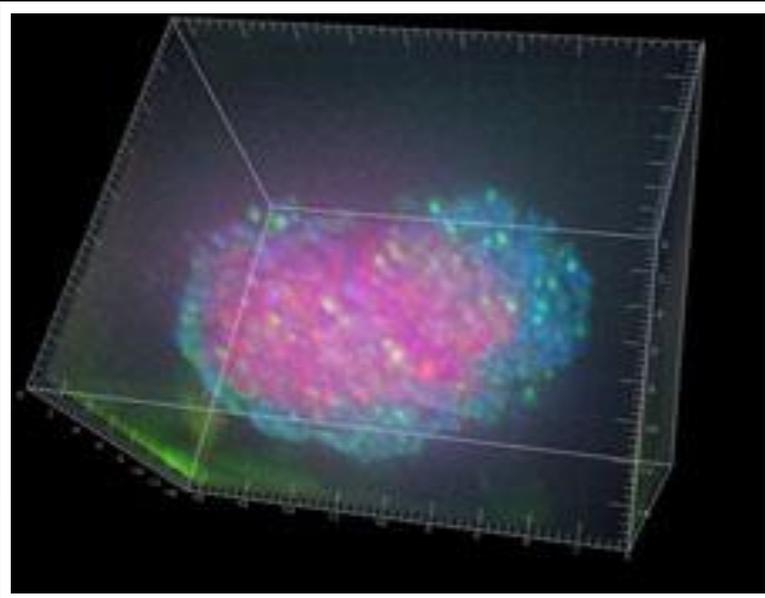
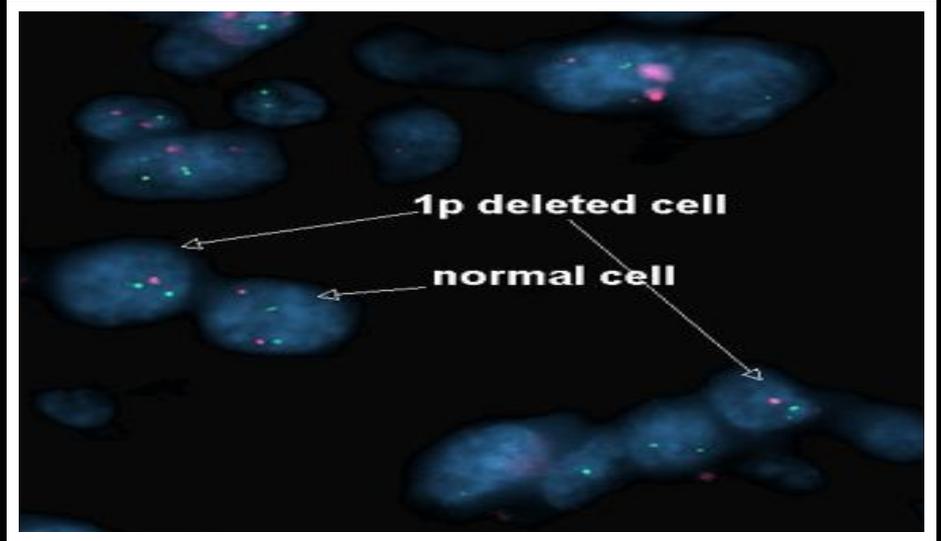
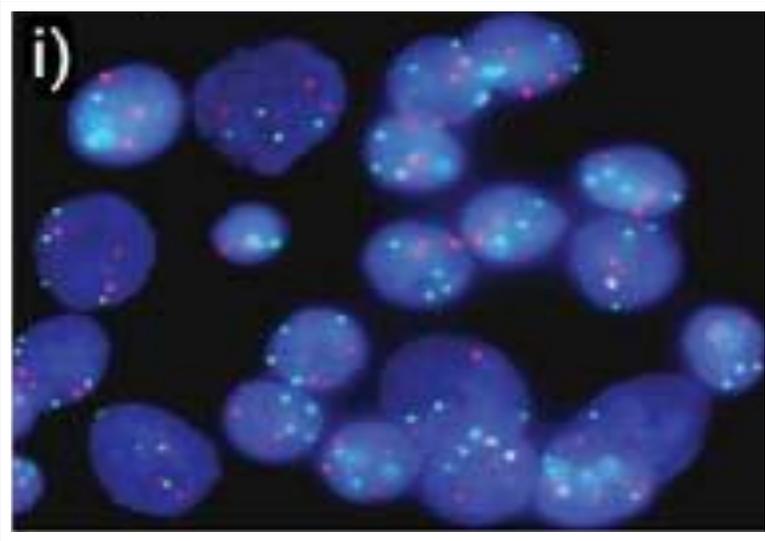


- Используя FISH можно определить аномалии в интерфазном ядре. Дупликация небольшого участка хромосомы 17, которая приводит к синдрому Шарко-Мари-Тус, которая представлена в виде
- 3-х красных сигналов, вместо двух. Зелеными отмечены последовательности, не вовлеченные в дупликацию



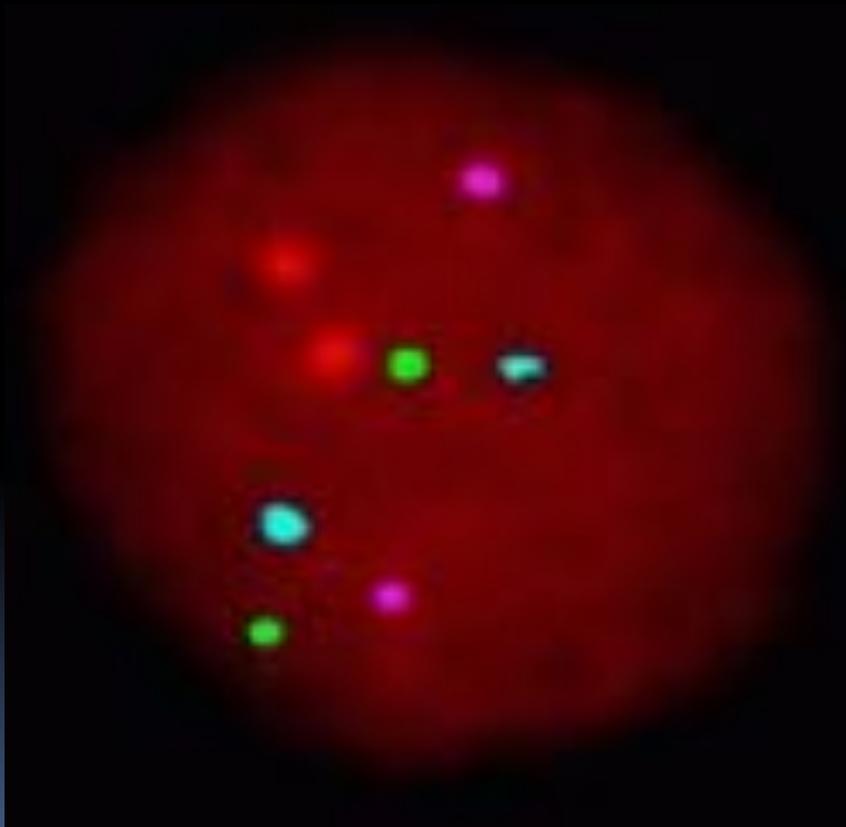
Транслокация, которая создает спайку между BCR (хромосома 22) и ABL (хромосома 9) генами на Филадельфийской хромосоме, видима благодаря близкому расположению зеленого и желтого сигналов (b). На схемах указаны нормальные и aberrантные хромосомы.

# Метод интерфазной FISH



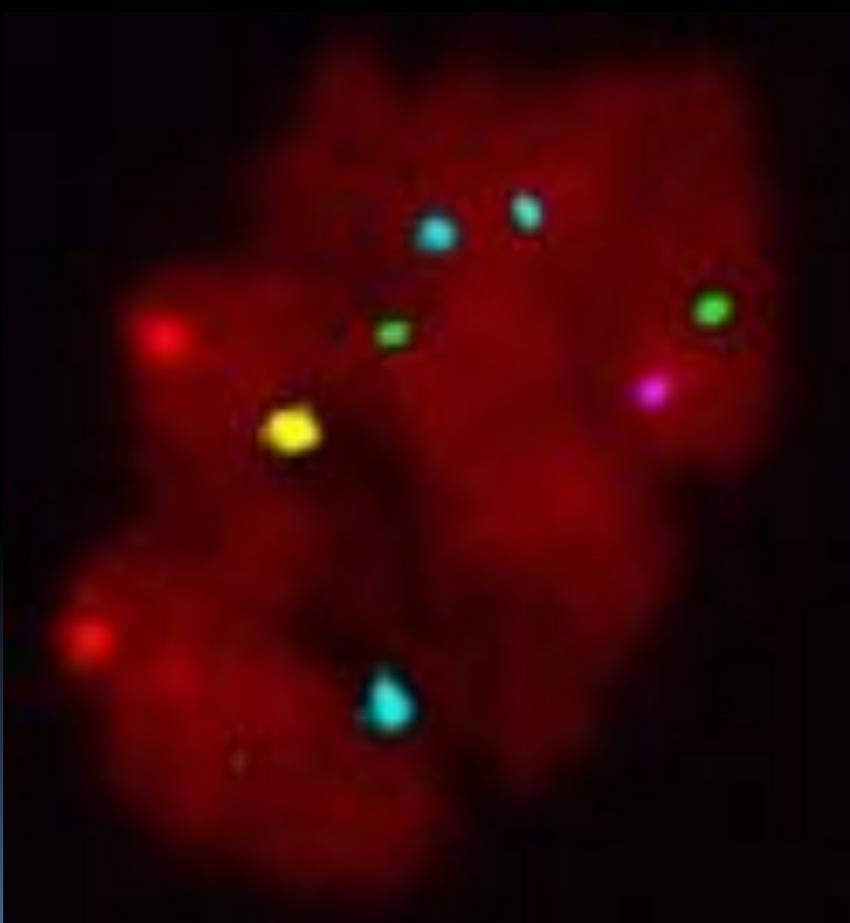
**3-D FISH**

# Нормальный женский кариотип (интерфазные ядра)



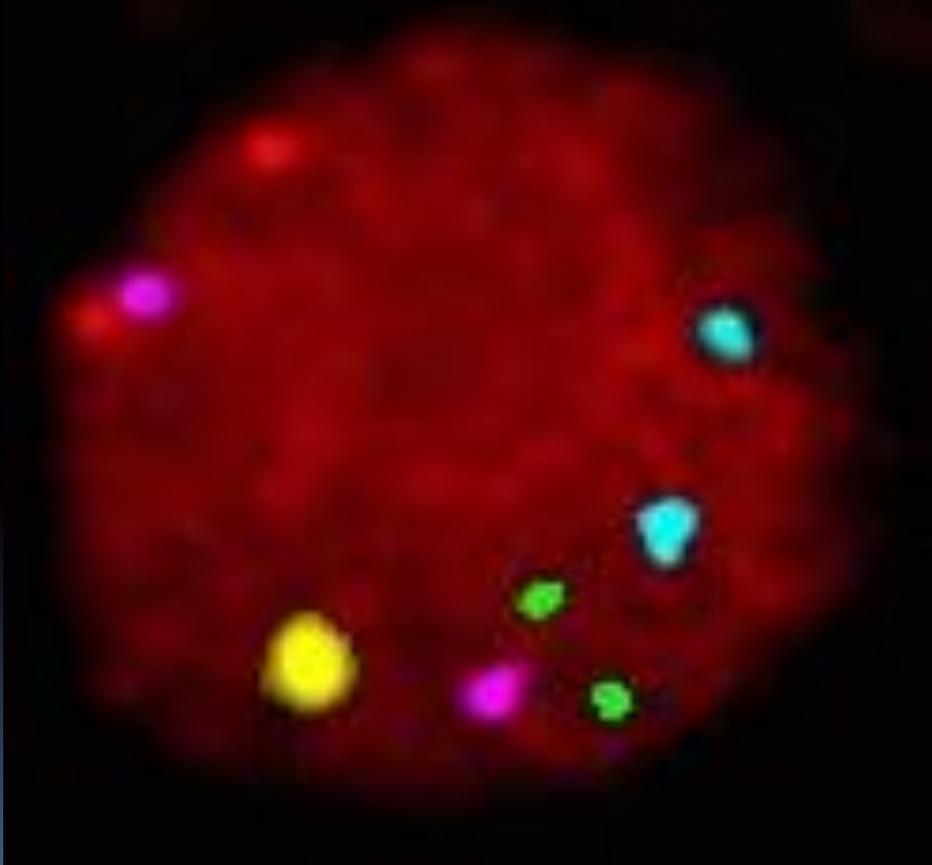
- две хромосомы 13 обозначены красным цветом,
- две хромосомы 18 окрашены голубым цветом,
- две хромосомы 21 обозначены зеленым цветом,
- две X-хромосомы лиловым цветом.

# Трисомия по 18 хромосоме (интерфазные ядра)



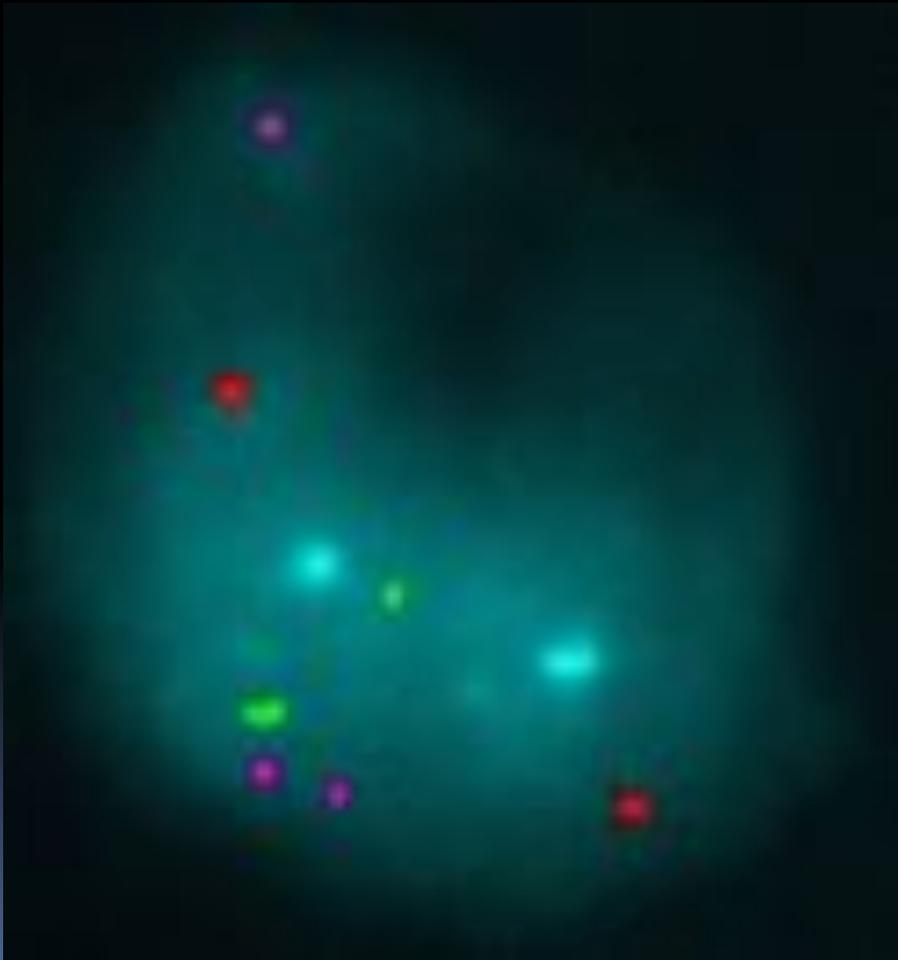
- две 13 хромосомы, обозначены красным цветом,
- три 18 хромосомы, обозначены голубым цветом (с-м Эдвардса),
- две хромосомы 21, обозначены зеленым цветом,
- X-хромосома окрашена лиловым,
- Y-хромосома окрашена желтым.

# Кариотип больного с синдромом Клайнфельтера (интерфазные ядра)



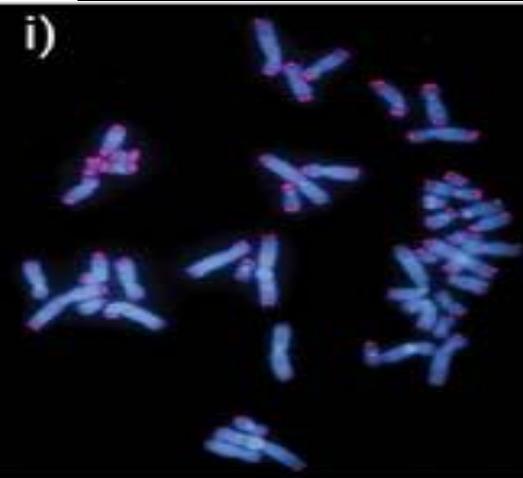
- две хромосомы 13 обозначены красным цветом,
- две хромосомы 18 окрашены голубым цветом,
- две хромосомы 21 окрашены зеленым цветом,
- две X-хромосомы - лиловым цветом (моносомия или полисомия X),
- Y-хромосома желтым цветом.

# Кариотип с трисомией по X-хромосоме (интерфазные ядра)

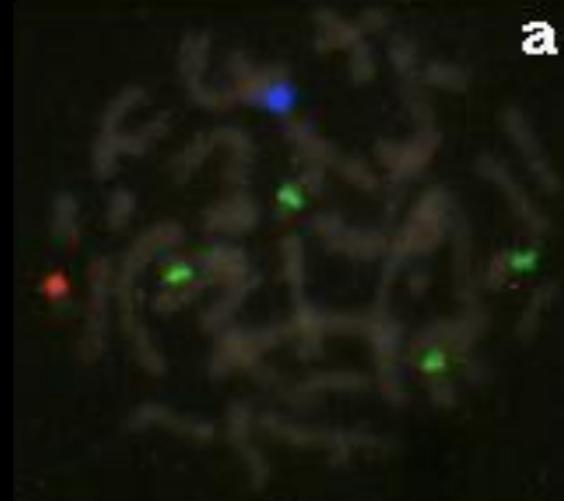


- две хромосомы 13 окрашены красным цветом,
- две хромосомы 18 обозначенные голубым цветом,
- две хромосомы 21 обозначены зеленым цветом,
- три X- хромосомы окрашены лиловым цветом.

# FISH на метафазных пластинках



Определение теломерных районов

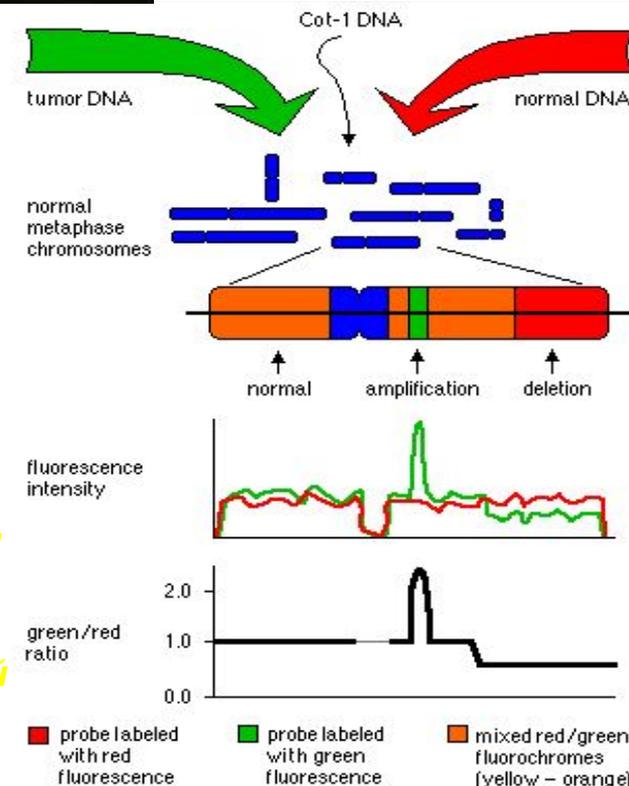


Использование векторов и плазмид позволяет визуализировать любую последовательность на хромосоме

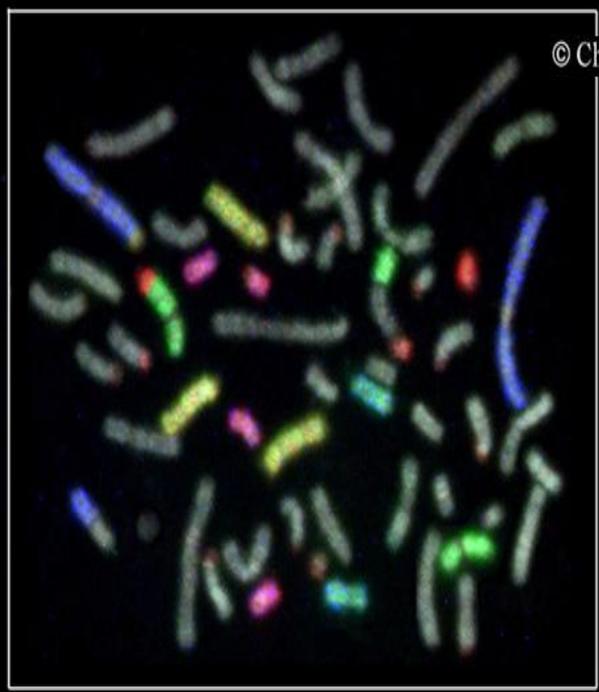
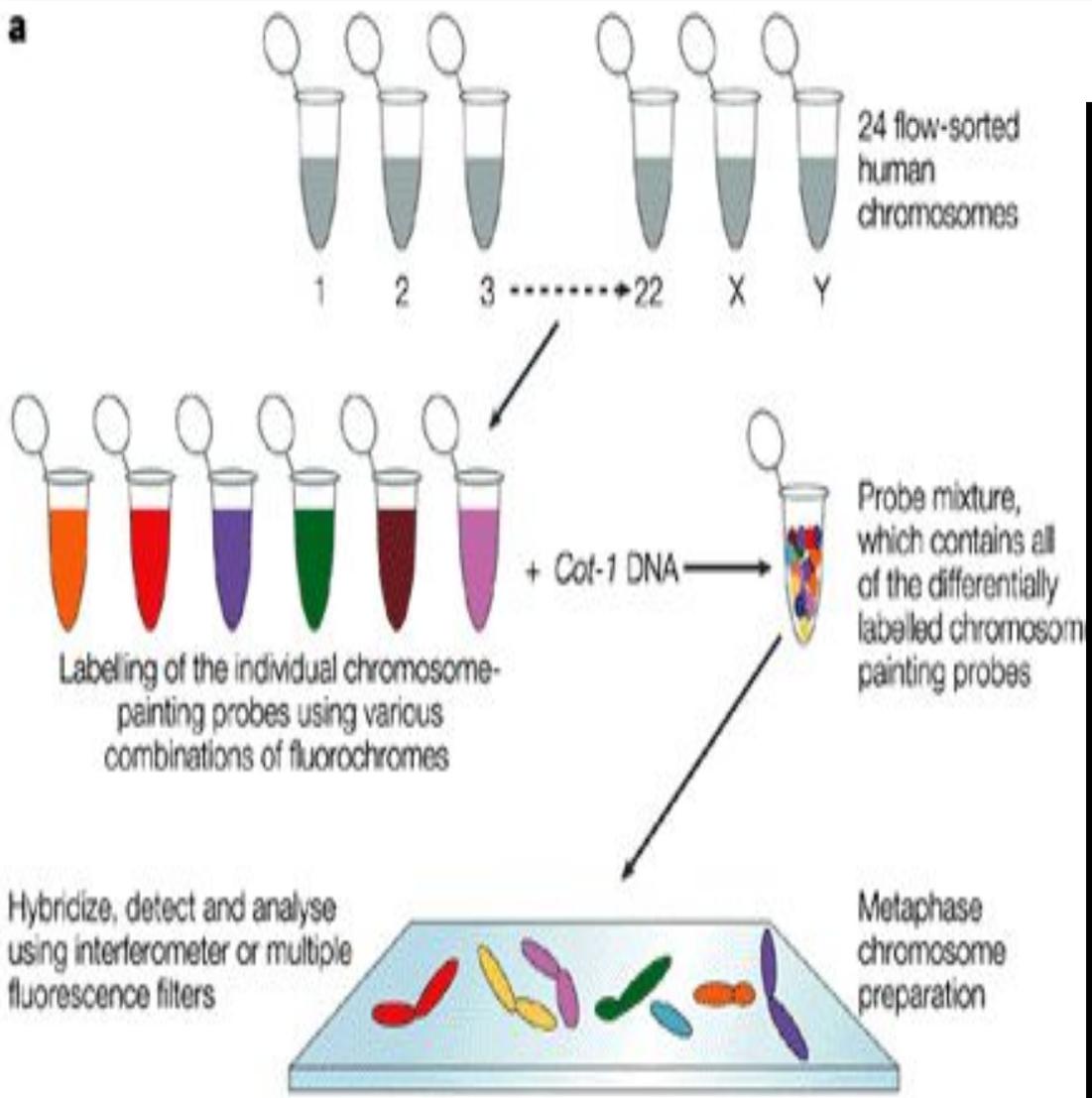
Метод сравнительной геномной гибридизации



Сравнительная геномная гибридизация. Опухолевая ДНК (маркированная зеленым флуорохромом) и нормальная ДНК (маркированная красным) гибридизируется на нормальные метафазы человека. Участки ДНК, амплифицированные, являются зелеными; участки ДНК потерянные, кажутся красными. Желтые участки указывают на одинаковое количество опухолевой и нормальной ДНК.



# Мультицветное цитогенетическое окрашивание



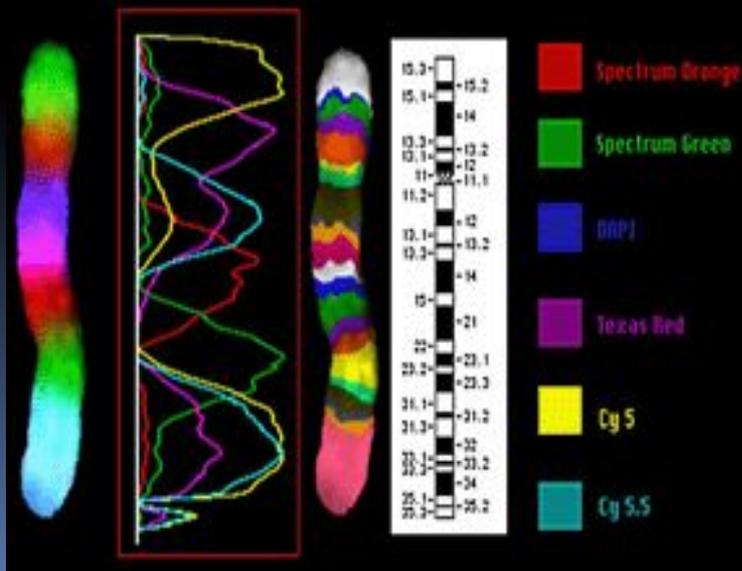
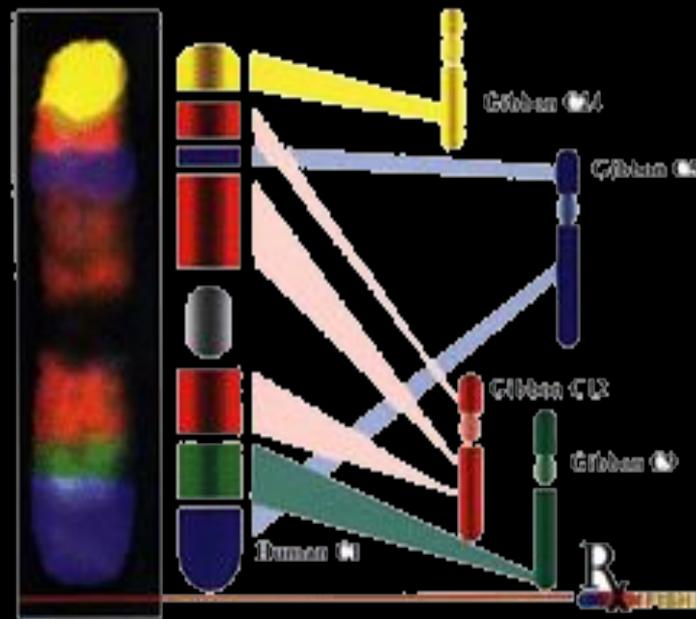
© Chrombios

Chromosome	color 1	color 2	color 3	resulting color
22	Red			Red
9		Green		Green
1			Blue	Blue
8	Red	Green		Yellow
17		Green	Blue	Cyan
19	Red		Blue	Magenta
—	Red	Green		



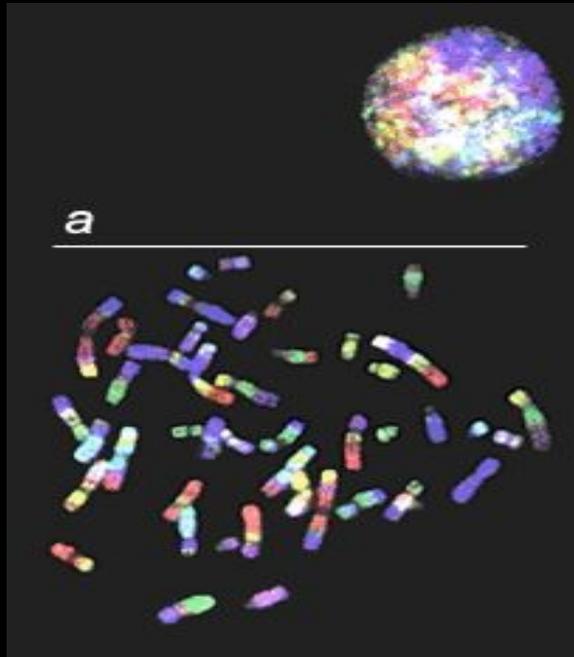
# Многоцветный бэндинг хромосом

- Метод многоцветного бэндинга хромосом (RxFISH) основан на межвидовой *in situ* гибридизации.
- Позволяет непосредственно выявлять часть внутривидовых перестроек, осуществляя анализ всего генома человека в одном эксперименте.
- ДНК - зонды, используемые в RxFISH, помечены комбинацией 3-х флуорохромов, что обеспечивает 7 псевдоцветов. Они специфично окрашивают отдельные районы хромосом, создавая их цветную исчерченность.



Многоцветный бэндинг хромосом (МСВ) предназначен для проведения детального анализа отдельной хромосомы. Район - специфичные ДНК - пробы метят различными флуорохромами или комбинациями флуорохромов. В результате чего позволяет цветная исчерченность каждой хромосомы.

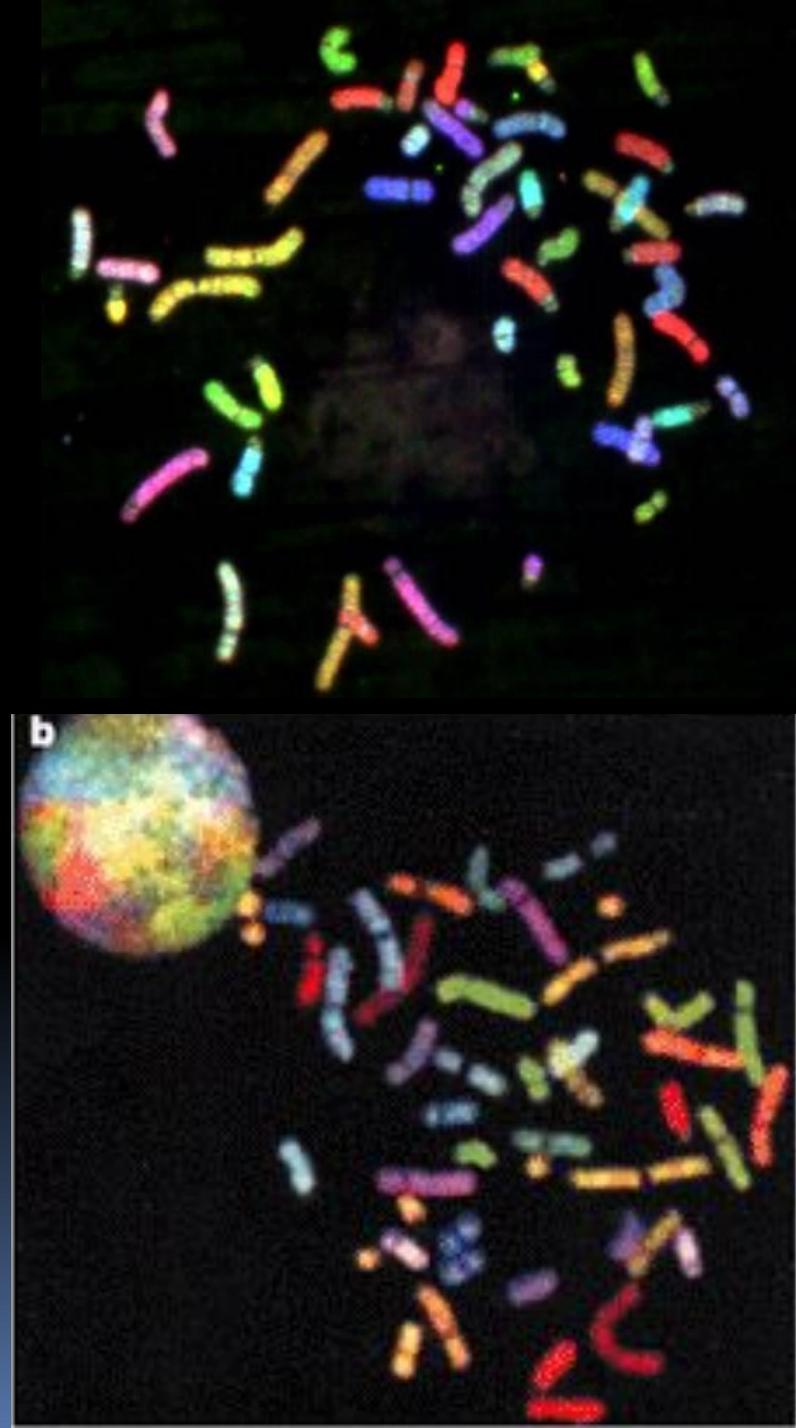
# Примеры многоцветного кариотипирования



*spectral  
karyotyping -  
SKY*

*Цветная  
исчерченность  
хромосом  
человека  
при RxFISH*

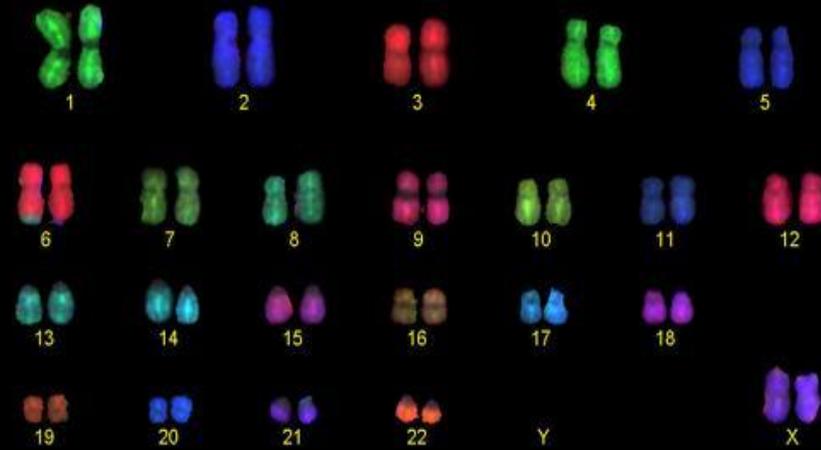
*Пример 24  
цветной M-FISH  
человека, с  
изображением  
метафазной  
пластинки и  
интерфазного  
ядра*



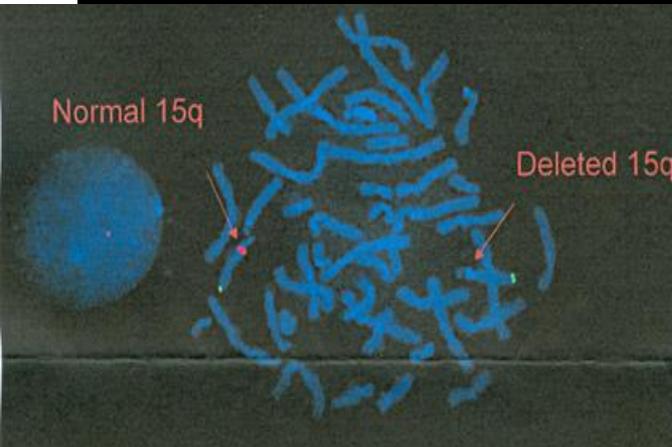
**Синдром Вольфа-Хиршорна, характеризуется делецией участка 4 хромосомы (4p 16.3)**



**COBRA FISH позволяет выявить несбалансированные транслокации, как, например между 6 и 13 хромосомами.**

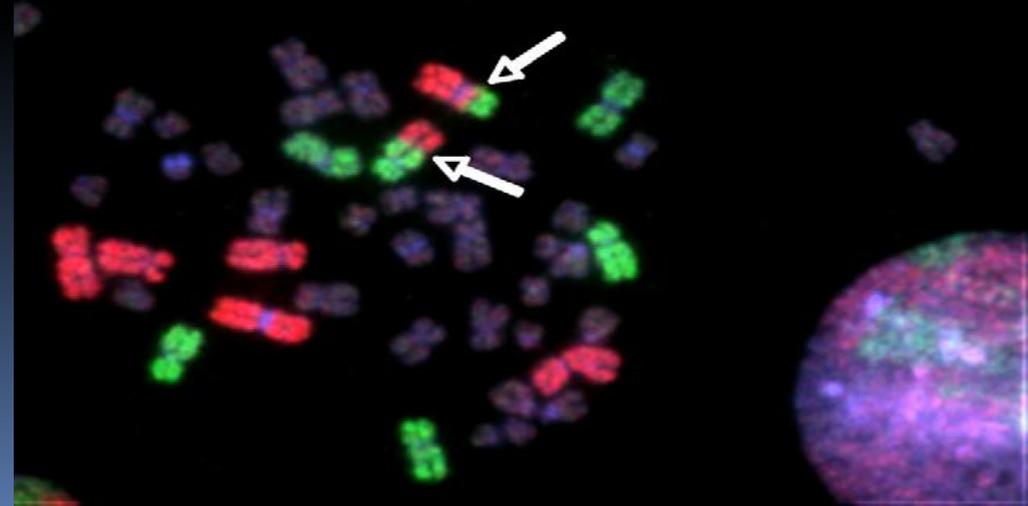
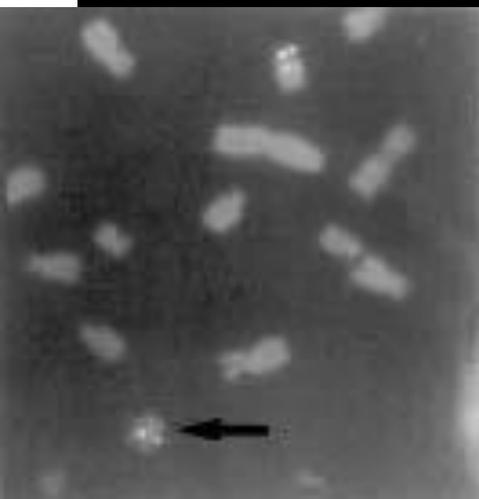


**Синдром Ангельмана, характеризуется интерстициальной делецией в 15 хромосоме**



**Клетка человека с реципрокной транслокацией (указана стрелками) Хромосомы 1, 2 и 4 отмечены красным, а хромосомы 3, 5 и 6 отмечены зеленым**

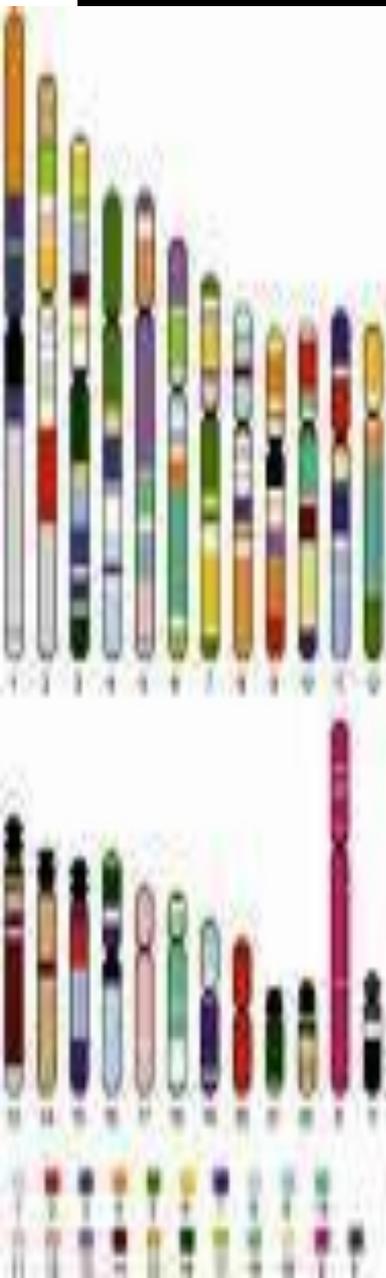
**Синдром Смит-Магентис. FISH исследование с использованием специфических 17p11.2 зондов обнаруживает делецию по 17 хромосоме (указана стрелкой).**



# Кариотипирование (G-бэндинг) с помощью системы BandView



- **SkyView - метод анализа и автоматической классификации хромосом по их спектру.**
- **Метафазные хромосомы окрашиваются пятью специфическими пробами ДНК, каждая из которых включает флуорохром.**
- **После такой обработки каждая из 24 хромосом человека приобретает уникальные флуоресцентные свойства, создаваемые комбинацией до 5 разных сигналов.**



- **Таким образом, методика FISH с использованием локус-специфичных ДНК-зондов позволяет выявлять самые сложные хромосомные перестройки, которые встречаются в кариотипе больных.**

- **Нативная РНК, обладающая вторичной структурой, не способна эффективно связываться с мембранными фильтрами, поэтому ее необходимо сначала денатурировать (перевести в полностью одноцепочечную форму) и лишь потом проводить фракционирование с помощью гель-электрофореза и перенос из агарозного геля на мембранный фильтр.**
- **Этот метод получил название Нозерн-блоттинга.**

## **Метод специфической рестрикции ДНК (блот-гибридизации (блоттинг) по Саузерну).**

- **Существует два способа переноса нуклеиновых кислот на фильтры:**
- **а) прямое нанесение растворов нуклеиновых кислот на фильтр (дот- или слот-блоты);**
- **б) перенос нуклеиновых кислот на мембранные фильтры после их фракционирования в агарозном геле (Саузерн- или Нозерн-блоты).**

- При переносе ДНК вторым способом обрабатывают препарат рестриктирующими ферментами, проводят гель-электрофорез фрагментов и переносят их из агарозного геля на мембранный фильтр за счет капиллярных сил.
- Этот метод был разработан Е. Саузерном, и получаемые с его помощью образцы получили название **Саузерн-блотов**.

- **Кинетика блот-гибридизации определяется в основном иммобилизованными на фильтре нуклеиновыми кислотами, однако на нее можно повлиять, повысив концентрацию зонда в буфере для гибридации или добавив в этот буфер анионные полимеры с большой мол. массой (типа декстрансульфата).**



**В любом случае кинетику процесса трудно предсказать, основываясь только на теоретических предпосылках, в частности потому, что невозможно точно определить концентрацию фиксированной на фильтре нуклеиновой кислоты и ее доступность для зонда.**



**Отметим лишь, что гибридизация в течение ночи (16 ч) в присутствии 10% декстрансульфата позволяет выявить уникальные гены и малые количества мРНК.**

# **Метод определения полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ) (косвенный метод)**

- **Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов, ПДРФ (restriction fragment length polymorphism, RFLP):** вариации между индивидуумами по размерам фрагментов ДНК, получаемых для одного и того же локуса при расщеплении рестрикционными ферментами.
- **Полиморфные последовательности, которые образуются в результате ПДРФ, используются в качестве маркеров на генетических картах сцепления.**

- ПДРФ обычно вызывается мутацией в участке расщепления, но может быть связан и с другими причинами - внедрением мобильного элемента между сайтами рестрикции или удлинением **микросателлита**.
- Достаточно часто нуклеотидные замены встречаются в некодирующих участках ДНК. Значительное число таких замен приводит к изменению картины рестрикции.
- Расположенный вблизи изучаемого гена или внутри него полиморфный сайт может служить маркером аллельных вариантов этого гена.

- **Метод ПДРФ** широко используется в генетических исследованиях популяций, поскольку наличие в геноме исследуемого организма рестрикционного фрагмента ДНК определенной длины является прекрасным генетическим маркером и одновременно фенотипическим признаком, тесно связанным с генотипом организма. Это позволяет следить за распространением такого маркера в популяциях, передачей его от родителей к потомству при скрещиваниях и использовать для построения генетических карт исследуемых организмов классические генетические методы.

- **ПДРФ-маркеры** благодаря их четкой принадлежности определенным генетическим локусам не уступают по информативности распространенным биохимическим маркерам и во многих случаях оказываются удобнее сложных фенотипических признаков (таких, как цвет глаз, окраска волос или шерсти, форма цветков и листьев), определяемых многими генными локусами.

# **3. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)**

- **Принцип ПЦР сформулировал**
- **Гобинд Корана в 1971 году**
- **В 1983 году Кэрри Мюллису удалось провести ПЦР**
- **В 1993 за изобретение ПЦР Кэрри Мюллису вручена Нобелевская премия по химии**

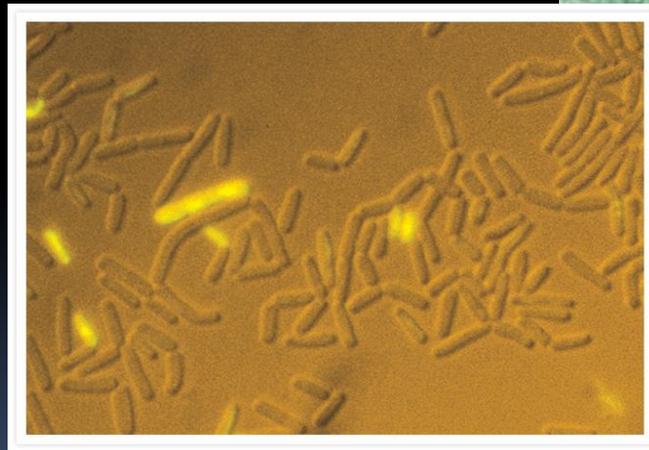
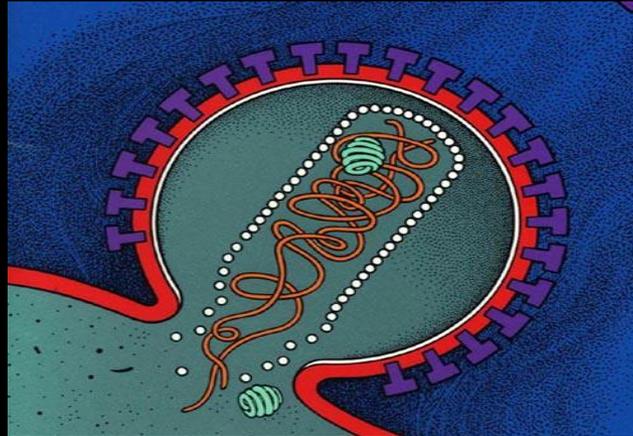




- **Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) открыл новые возможности для клинической лабораторной диагностики - детекции генетических мутаций и выявление ДНК или РНК инфекционных агентов в периферической крови, сыворотке, плазме, моче, слюне, спинномозговой жидкости, суставной жидкости, биоптатах и др.**

# Выявление патогенов

- **Инфекции крови (качественное и количественное определение)**
- **Эпидемические инфекции**
- **Исследование биоценозов и др.**



- ПЦР также используется для идентификации маркерных хромосом, которые невозможно определить обычным цитогенетическим методом, например в диагностике дисгенезии гонад.
- Метод является быстрым и надежным, может применяться для выявления всех типов мутаций, связанных с генетическими заболеваниями, например такими, как синдромы Прадера-Вилли и Ангельмана.



# Мониторинг живых систем

**ПЦР позволяет осуществлять:**

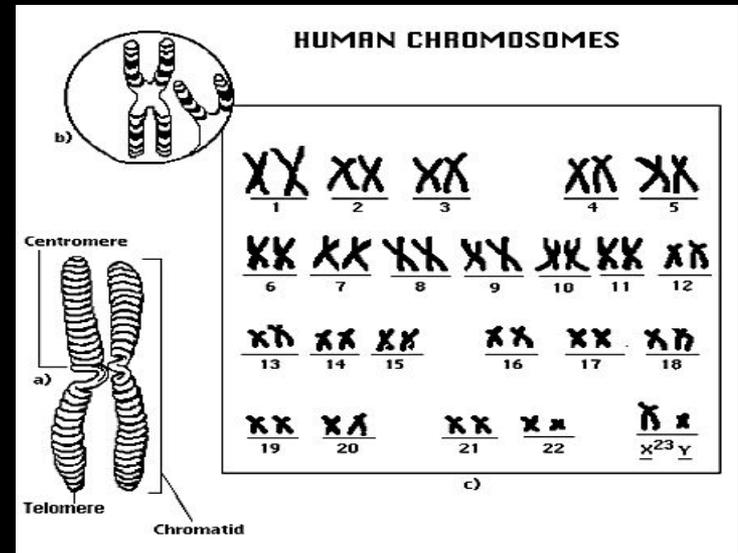
- **контроль за использованием ГМ организмов (ГМО)**
- **контроль за наличием и процентным содержанием ГМ ингредиентов (ГМИ) в пище**
- **Определение вида и индивида**



# Исследование генома

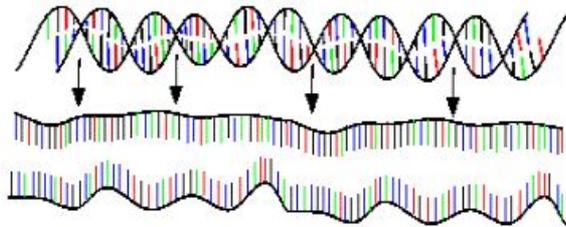
ПЦР позволяет определять вставки, делеции или однонуклеотидные замены в геномной ДНК  
Сейчас с помощью ПЦР диагностируют более 200 наследственных заболеваний, таких как:

- Фенилкетонурия
- Муковисцидоз
- Миодистрофия Дюшенна/Беккера
- Хорея Гентингтона
- Гемофилия А, В
- Болезнь Вильсона-Коновалова и др.

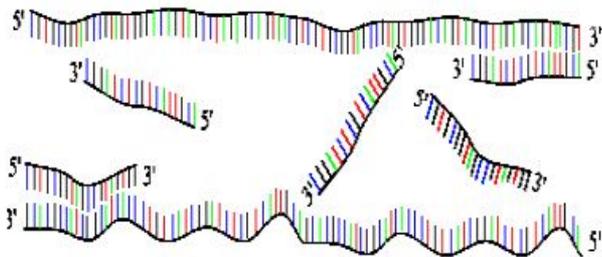


# Принцип ПЦР

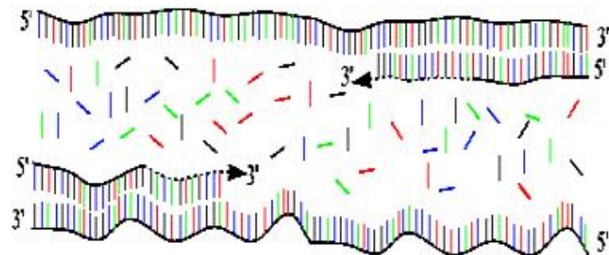
фрагмент ДНК



Этап 1: Денатурация  
1 минута 94°C

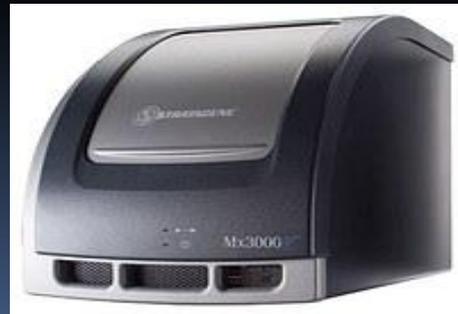
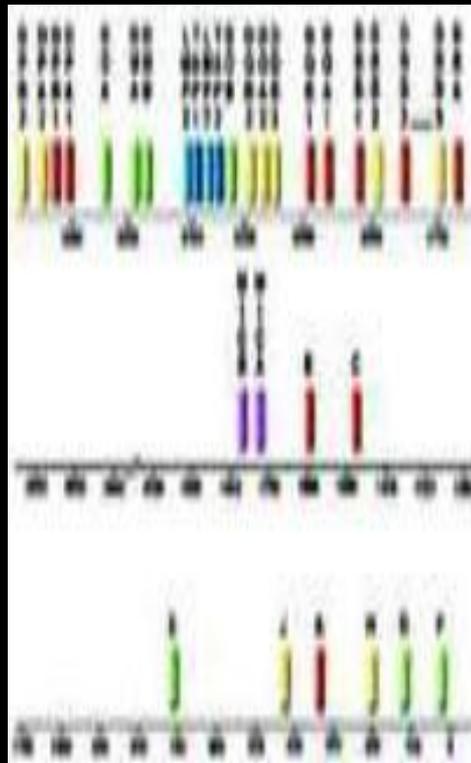


Этап 2: Отжиг праймеров  
45 секунд 54°C



Этап 3: Синтез цепи ДНК

- Метод классической ПЦР заключается в синтезе *in vitro* коротких нуклеотидных последовательностей для последующего анализа.
- Для проведения ПЦР нужны пара праймеров, комплементарных исследуемому фрагменту, и фермент ДНК-полимераза.
- В определенных условиях праймеры способны распознавать гомологичные последовательности в денатурированной ДНК, связываться с ними и служить затравкой для ферментативного синтеза копий участка изучаемого гена.
- Каждый цикл синтеза удваивает число копий фрагмента-мишени и количество продукта (амплификата) в процессе ПЦР нарастает в геометрической прогрессии.

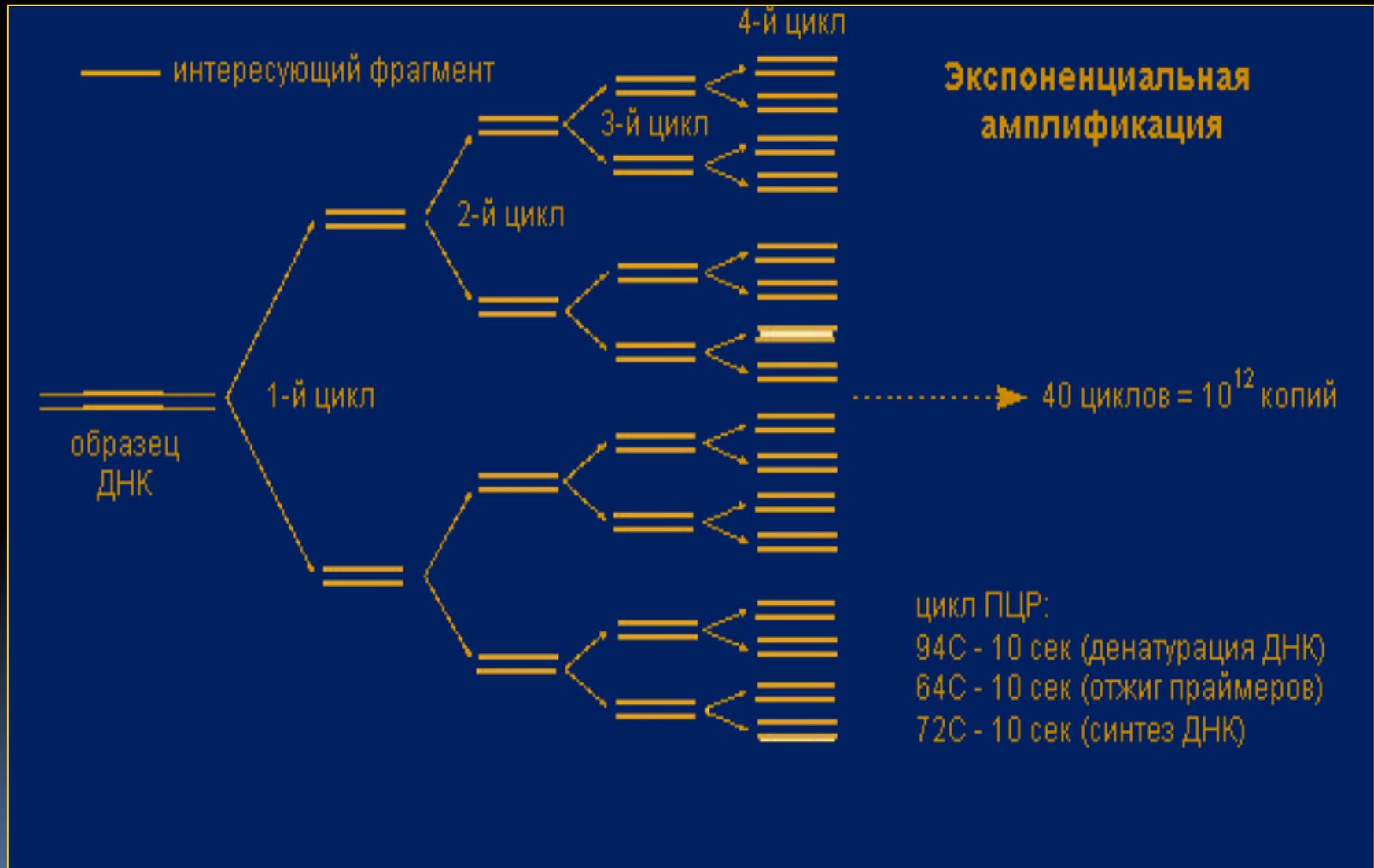


- Более современным методом является **ПЦР в реальном времени** (мониторинг и количественный анализ накопления продуктов полимеразной цепной реакции; автоматическая регистрация и интерпретация полученных результатов).
- Этот метод не требует стадии электрофореза, что позволяет снизить требования, предъявляемые к ПЦР лаборатории.
- Благодаря экономии производственных площадей, уменьшению количества персонала и востребованности количественного определения ДНК/РНК этот метод в последние годы успешно применяется в крупнейших санитарно-эпидемических, диагностических и научно-исследовательских центрах развитых стран мира, замещая ПЦР в ее сегодняшнем ("классическом") формате.

- **Этот метод не требует стадии электрофореза, что позволяет снизить требования, предъявляемые к ПЦР лаборатории.**
- **Благодаря экономии производственных площадей, уменьшению количества персонала и востребованности количественного определения ДНК/РНК ПЦР в реальном времени в последние годы успешно применяется в крупнейших санитарно-эпидемических, диагностических и научно-исследовательских центрах развитых стран мира, замещая ПЦР в ее сегодняшнем ("классическом") формате.**



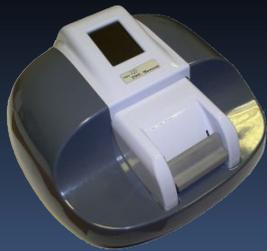
# Экспоненциальная амплификация (Andy Vierstraete, 2001)



# *Компоненты реакции*

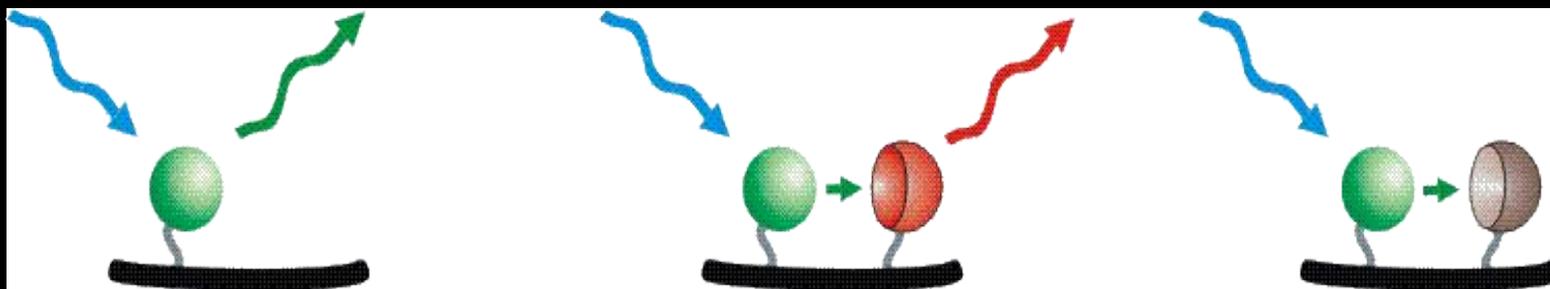
- *вода*
- *буфер*
- *dNTP*
- *праймеры*
- *полимераза*
- *зонды, интеркаляторы*
- *масло*

# Оборудование для ПЦР



# «Проявка» хода реакции

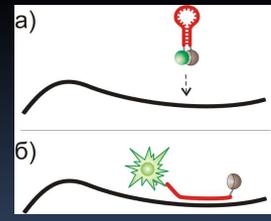
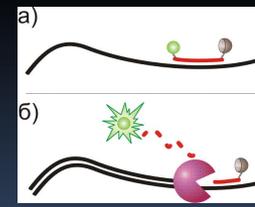
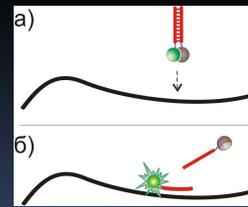
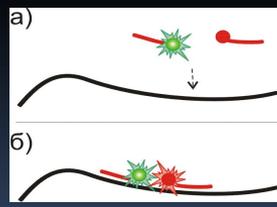
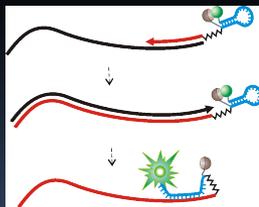
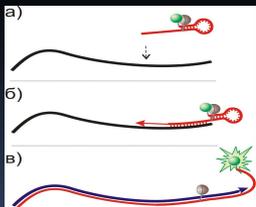
- **Флуоресцентные красители и тушение флуоресценции**



- **5'-экзонуклеазная активность Taq-полимеразы**



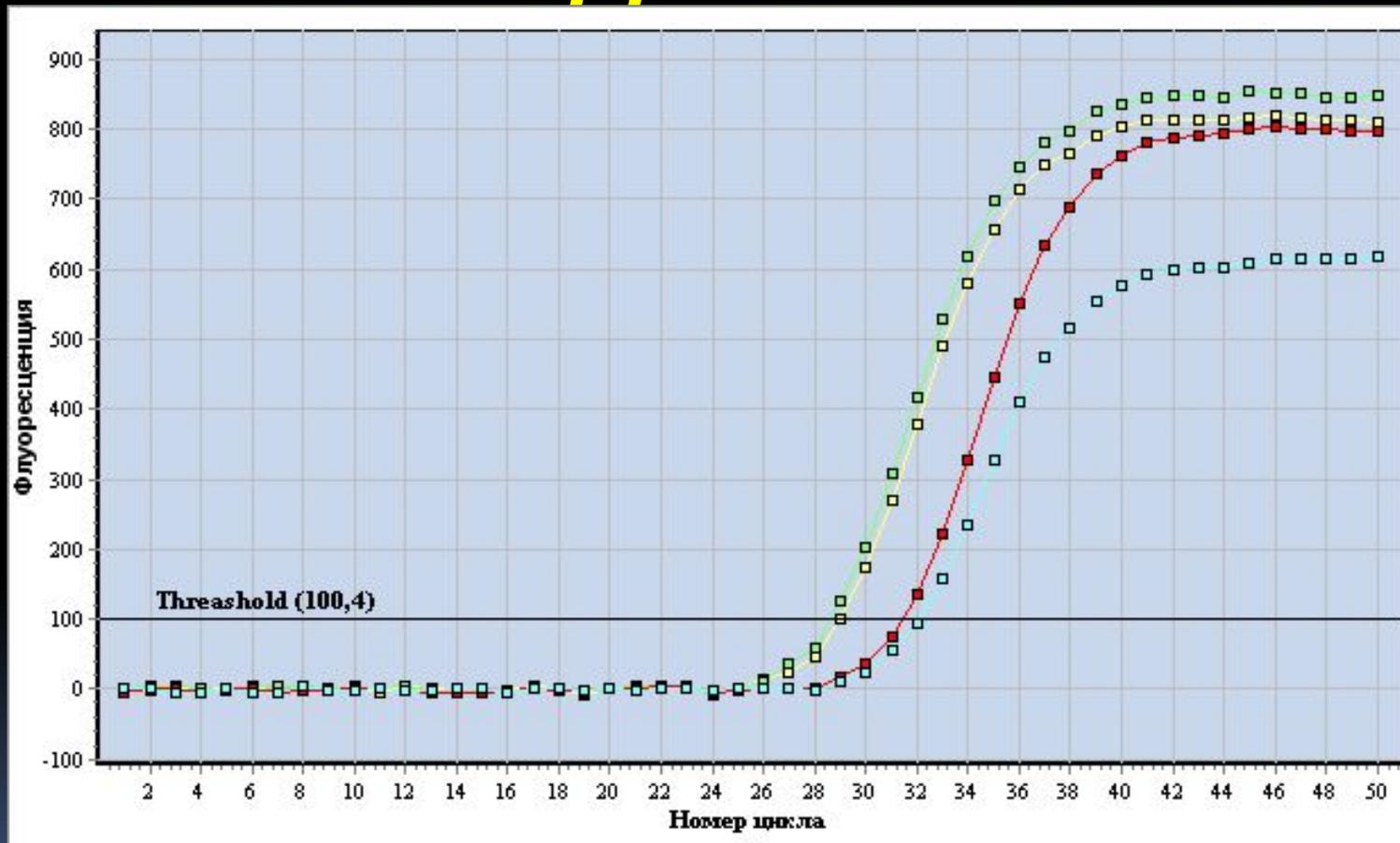
- Гибридизационные
- методы
  - Меченые
  - праймеры
    - Sunrise=
    - Amplifluor™
    - Scorpions™
- Меченые
- зонды
  - kissing probes=
  - adjacent probes
  - Complementary
  - oligos
  - TaqMan
  - Beacons



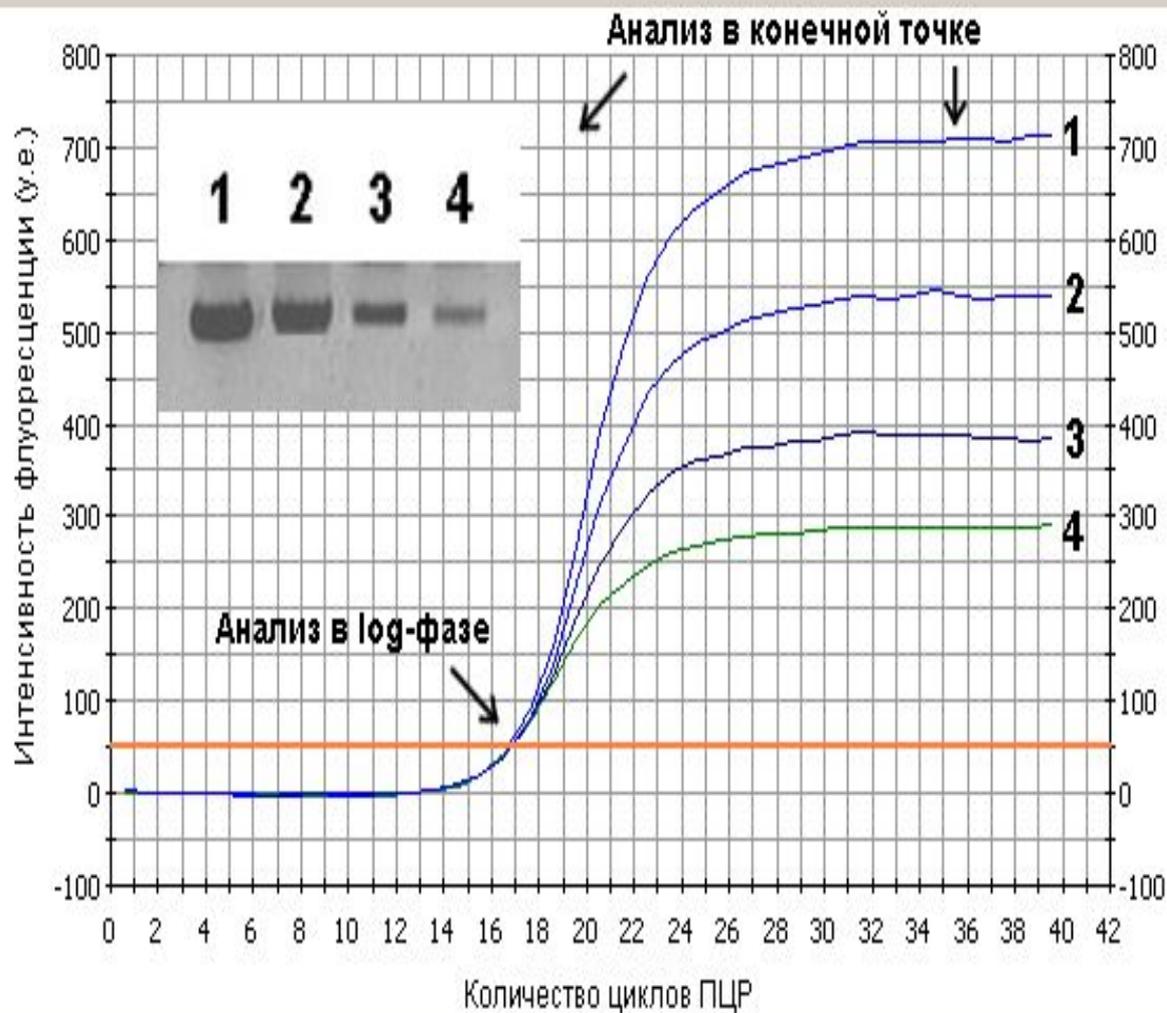
# *Разгорание пробы*

- *Принцип флуоресцентной детекции*

# Форма графиков накопления ДНК



# Результаты ПЦР на образцах с одинаковым количеством ДНК



- D2
- E7
- F3
- F5

	Threshold Cycle Ct	Identifier
D2	17,2	
E7	17,0	
F3	17,1	
F5	17,1	

↑  
Анализ в log-фазе