Современные
молекулярно-
генетические
методы

ДНК-диагностика

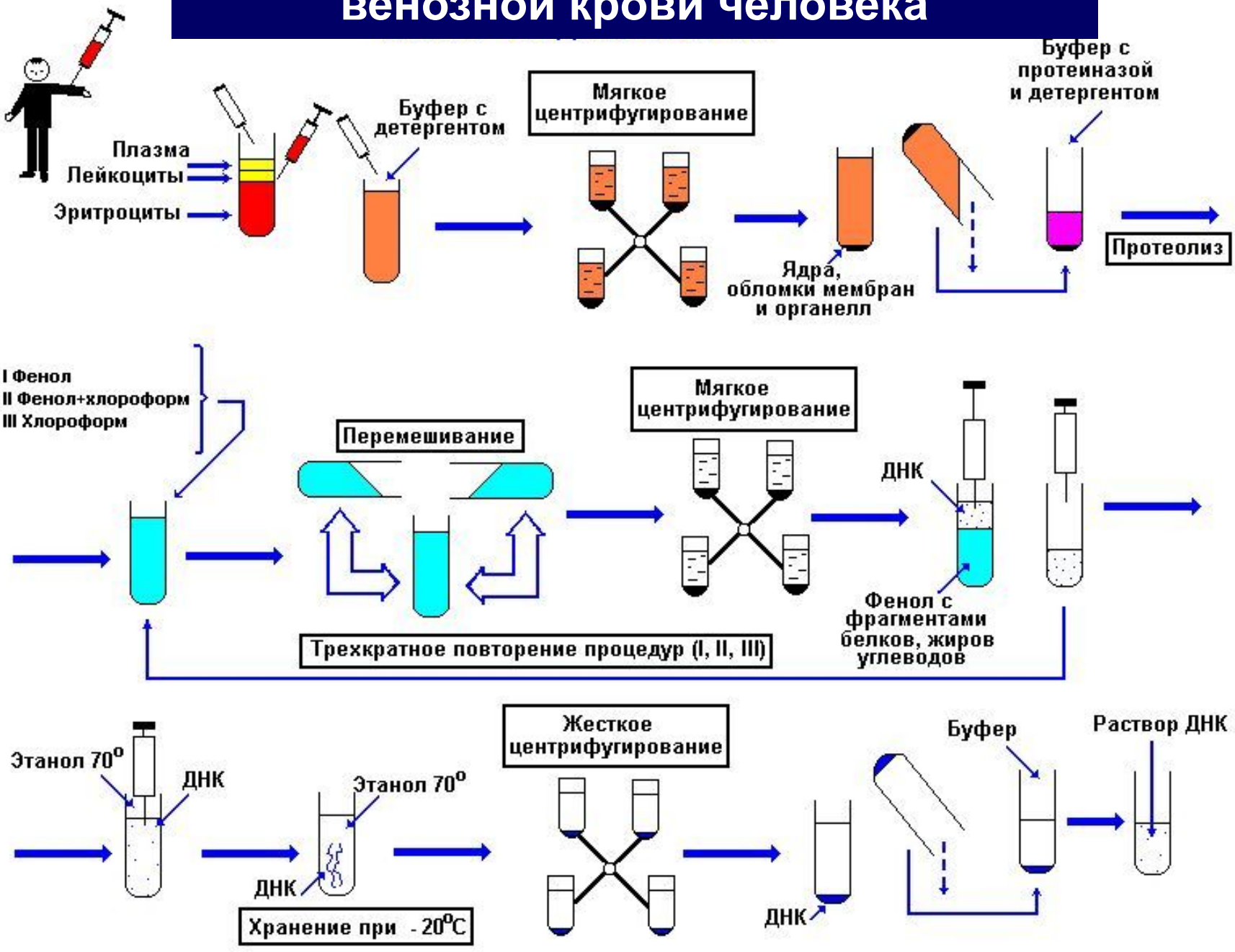
прямая

анализ мутаций в гене заболевания

косвенная

анализ полиморфных ДНК-локусов, расположенных в непосредственной близости от мутантного гена или внутри его

Схема выделения ДНК из лимфоцитов венозной крови человека



Полимеразная цепная реакция (ПЦР, PCR)

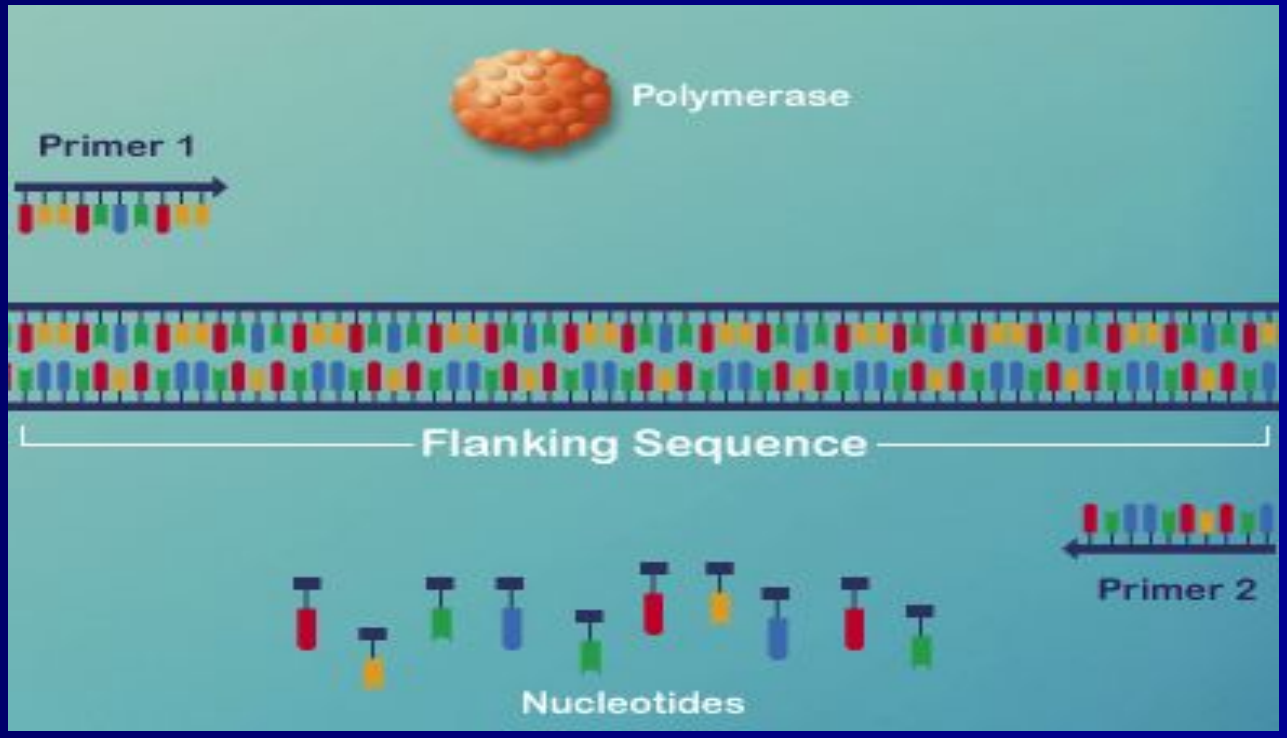
Метод ПЦР был предложен в 1983 году американским исследователем *Керри Мюллисом*.

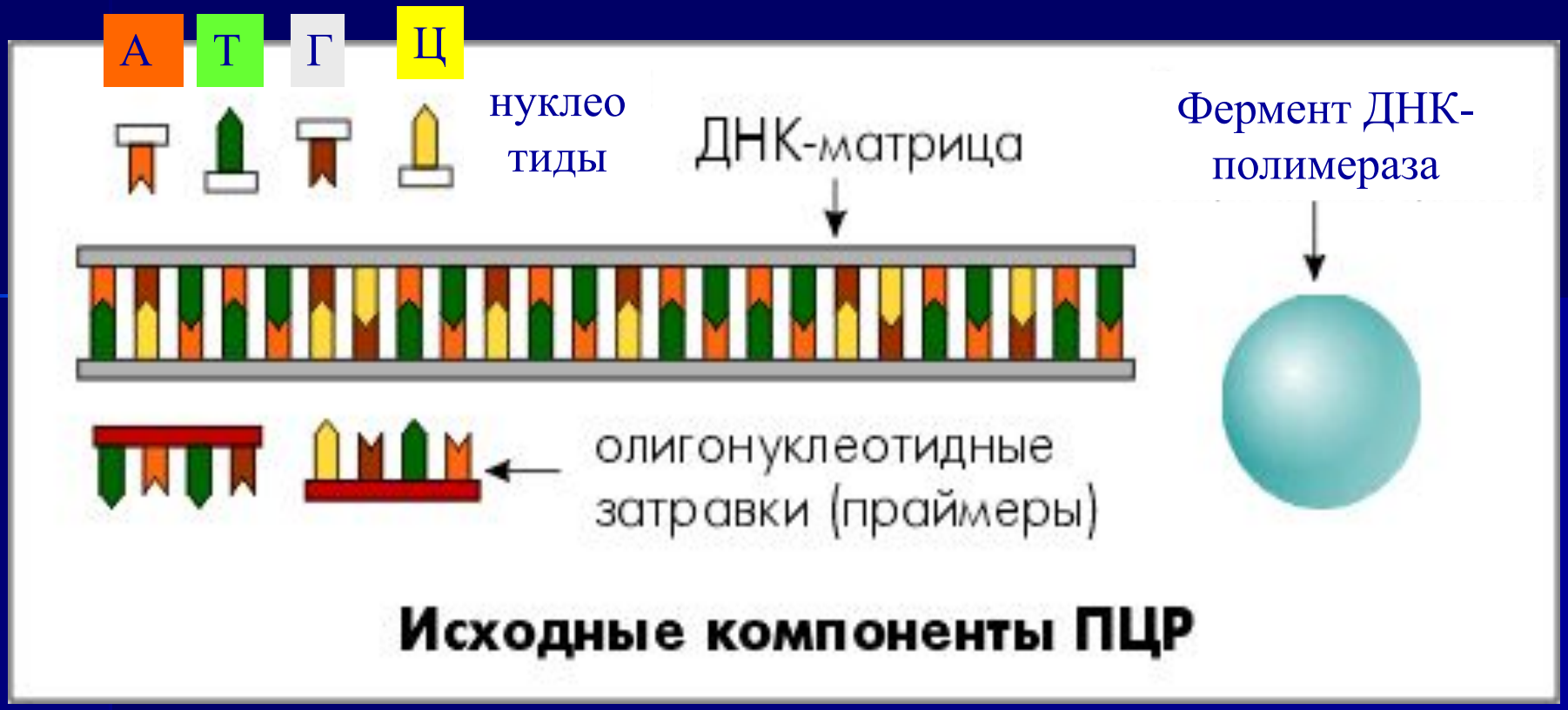
В 1993 году за открытие ПЦР К. Мюллис был удостоен Нобелевской премии

***ПЦР* – это метод амплификации ДНК in vitro, с помощью которого в течение нескольких часов можно выделить и размножить определенный участок ДНК (размером от 80 до 3000 пар нуклеотидов (пн)) в миллиарды раз**

В основе метода лежит принцип естественной репликации ДНК, включающей: расплетение двойной спирали ДНК, расхождение нитей ДНК,комплементарное достраивание обеих нитей ДНК

Для того чтобы осуществить процесс репликации в пробирке, используют два синтетических олигонуклеотида (праймера), комплементарных последовательностям ДНК на границах определяемого специфического фрагмента, и синтез цепи происходит только между ними





- **ДНК-матрица** (ДНК или ее часть, содержащая искомый специфический фрагмент)
- **Праймеры**
- **Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов**
- **Фермент Taq-полимераза**
- **Буферный раствор**

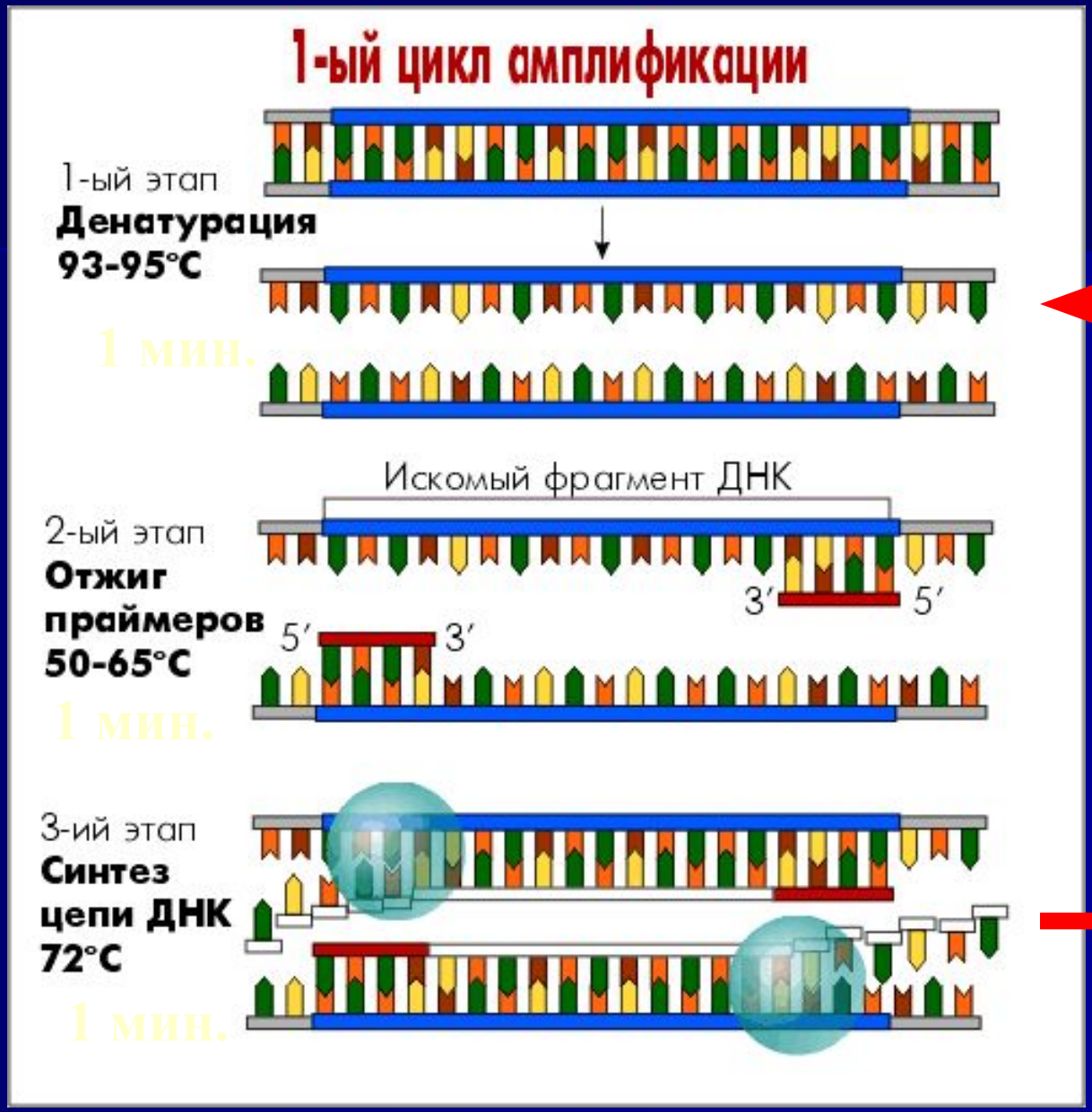
Циклический температурный режим ПЦР

Каждый цикл амплификации включает 3 этапа, протекающих в различных температурных режимах:

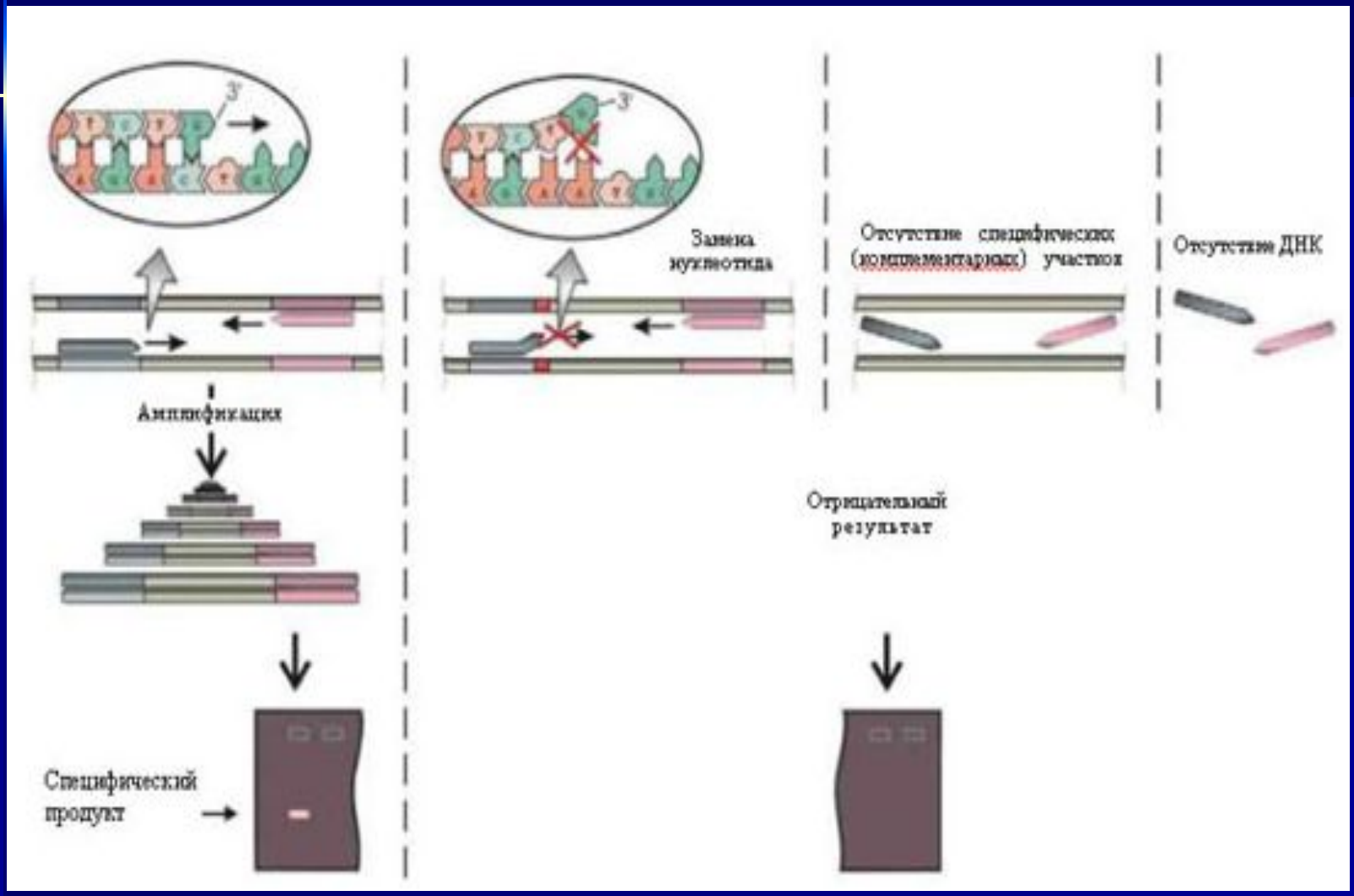
- 1 этап: Денатурация ДНК. Протекает при 93-95 о С
- 2 этап: Присоединение праймеров (отжиг) . Присоединение праймеров происходит комплементарно к соответствующим последовательностям на противоположных цепях ДНК на границах специфического участка (50-65 о С)
- 3 этап: Синтез. Комплементарное достраивание цепей ДНК происходит от 5'-конца к 3'-концу цепи в противоположных направлениях, начиная с участков присоединения праймеров. Материалом для синтеза новых цепей ДНК служат добавляемые в раствор дНТФ. Процесс синтеза катализируется ферментом термостабильной ДНК-полимеразой (Taq-полимеразой) и проходит при температуре 70-72 о С.

Для получения достаточного количества копий фрагмента ДНК амплификация включает 20-40 циклов.

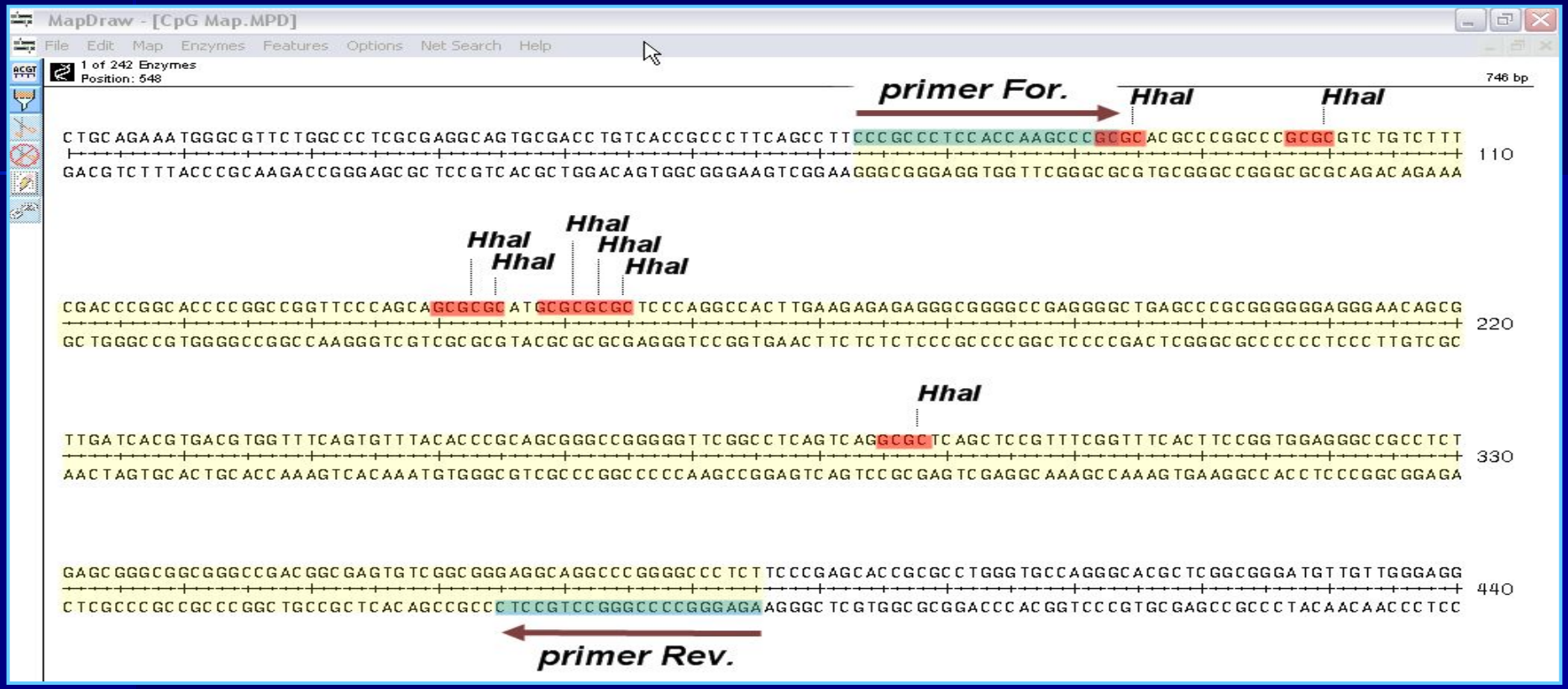
Каждый цикл амплификации включает 3 этапа, протекающие в разных температурных режимах

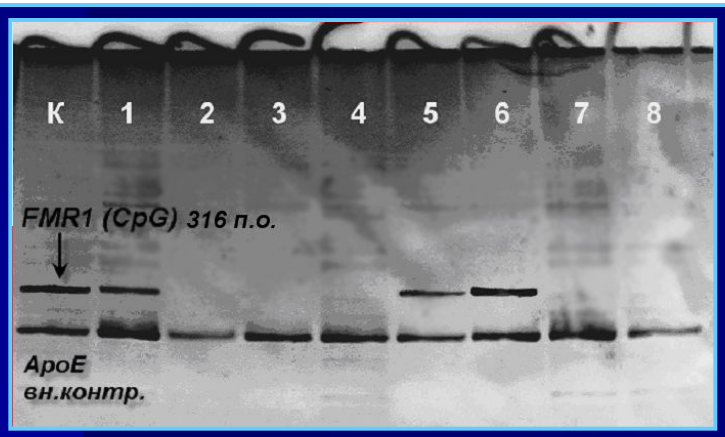


Специфичность ПЦР



Анализ метилирования CpG островка гена синдрома ломкой хромосомы X (*FMR1*)





ПЦР-тест на метилирование промоторной области гена FMR1

К - (+) контроль (здоровая женщина),

8 - (-) контроль (здоровый мужчина);

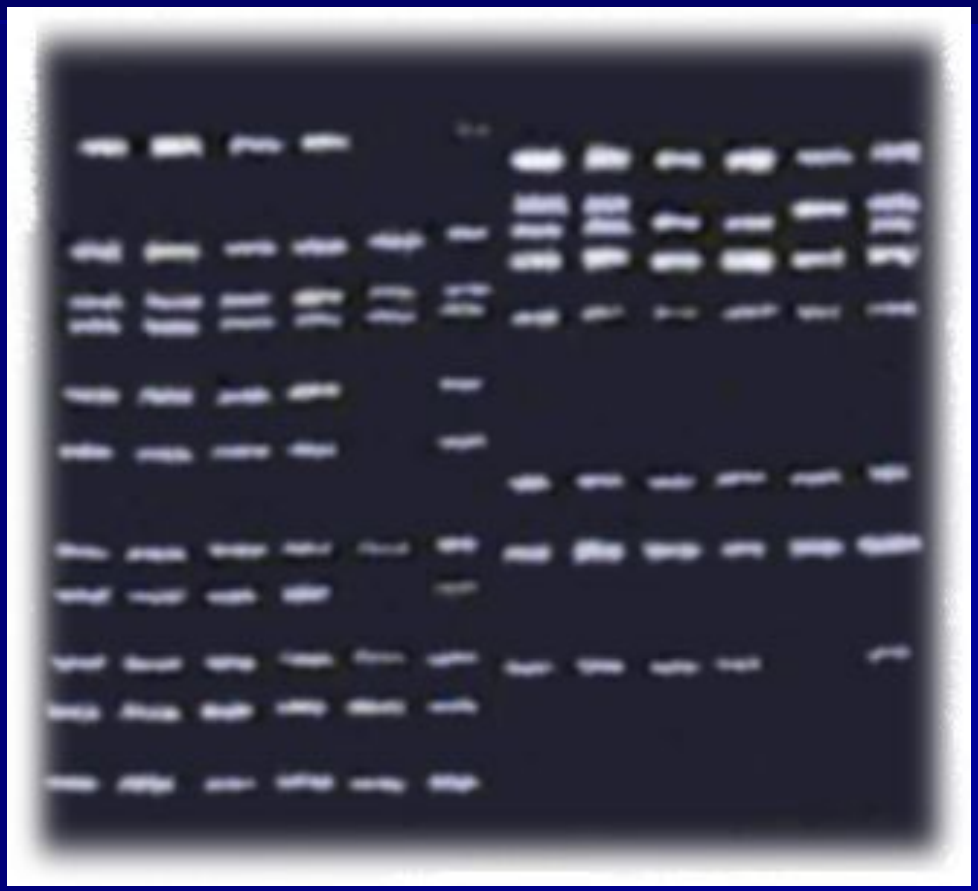
2, 3, 4 и 7 - СЛХ исключен;

1, 5 и 6 - больные СЛХ

Мультиплексная ПЦР

Анализ делеций у больных мышечной дистрофией Дюшенна:

амплификация отдельных экзонов в 5' и 3' "горячих" районах гена дистрофина



1-положительный контроль;

5-болыной с делецией 44-50 экз.;

3,4-больные с делецией 19 экз.;

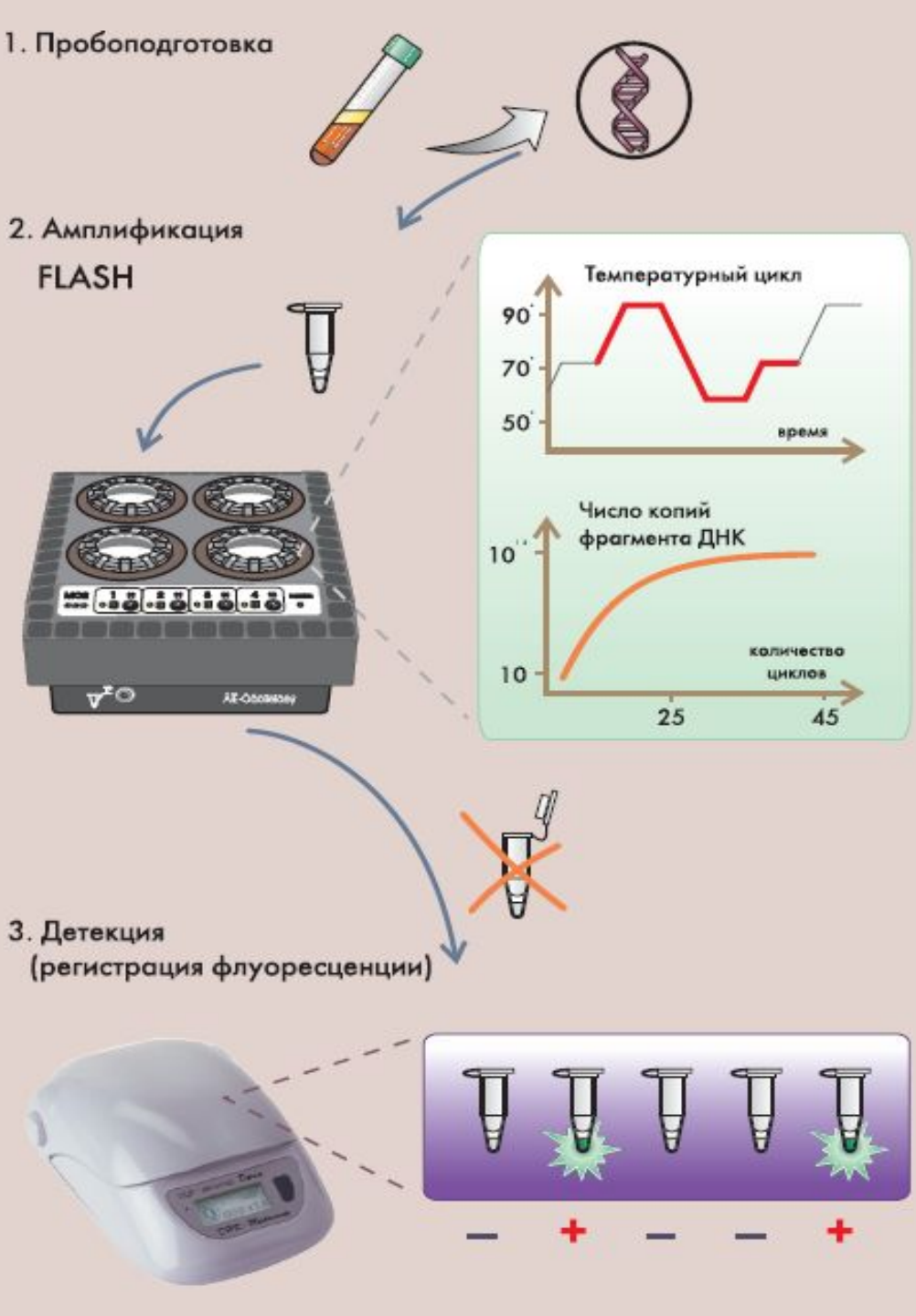
2, 6-больные, у которых делеций

Схема ПЦР с использованием метода «FLASH» -

(FLuorescent Amplification-based Specific Hybridization — специфическая флуоресцентная гибридизации в процессе амплификации)

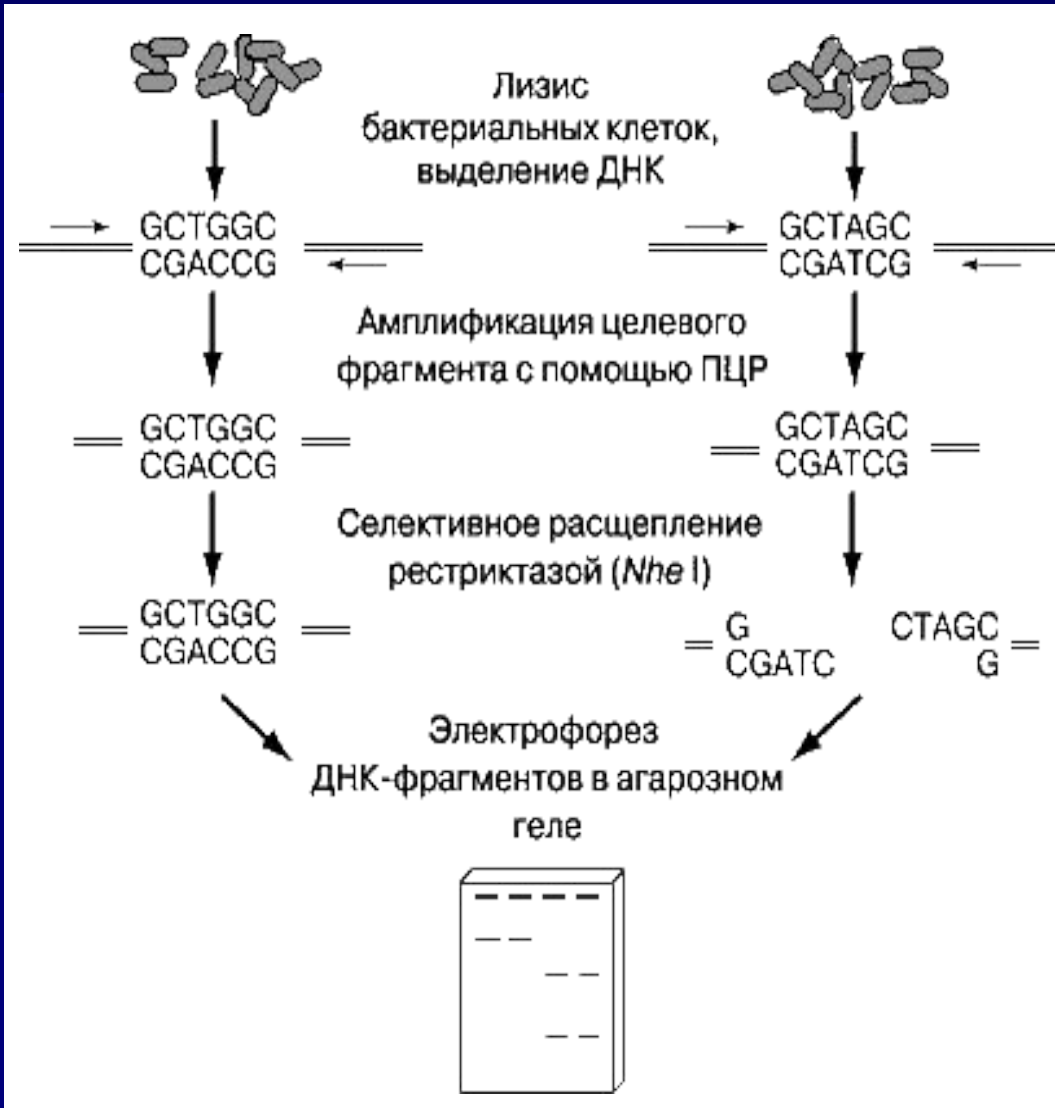
Схема ПЦР-исследования с использованием метода «FLASH» включает 3 стадии.

Первые две — пробоподготовка и амплификация — не отличаются от традиционной постановки ПЦР. Третья стадия — детекция продуктов ПЦР — принципиально другая. В случае метода «FLASH» пробирки из амплификатора переставляют в ПЦР-детектор и, не открывая их, проводят регистрацию флуоресценции



Полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ)

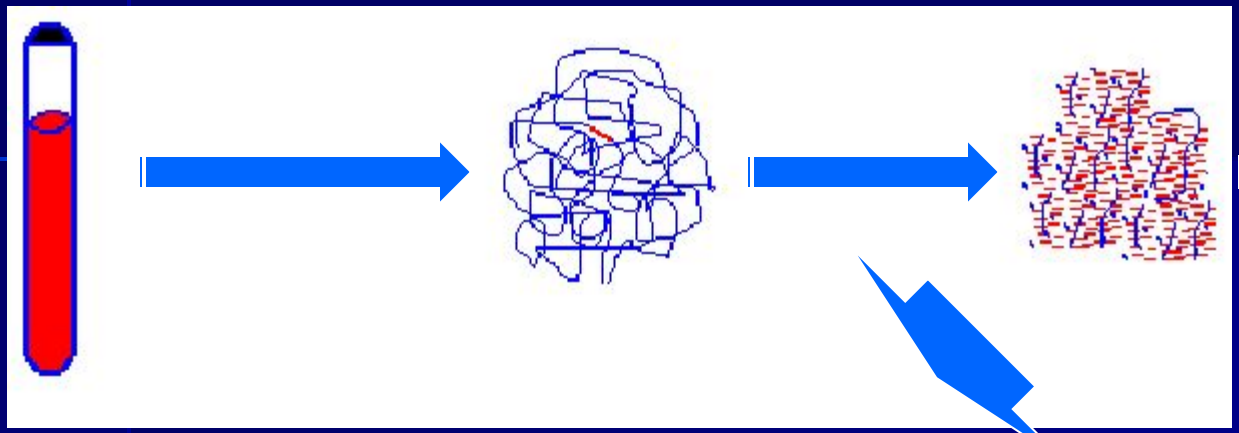
Метод ПДРФ основан на способности рестрикционных эндонуклеаз расщеплять двухцепочечную ДНК в участках с определенной нуклеотидной последовательностью – сайтах рестрикции. Изменения первичной структуры генов, связанные с исчезновением или появлением нового сайта рестрикции, могут быть обнаружены путем амплификации, расщепления с помощью соответствующих рестриктаз и электрофоретического разделения полученных фрагментов



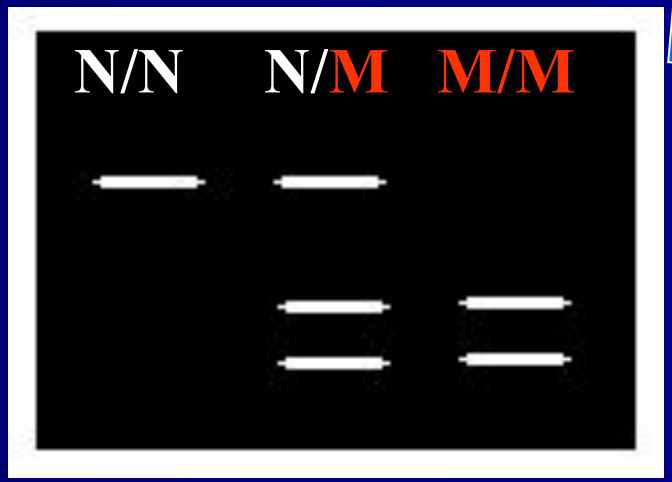
1 этап - выделение ДНК

2 этап - ПЦР

3 этап - рестрикция (расщепление ДНК эндонуклеазой)



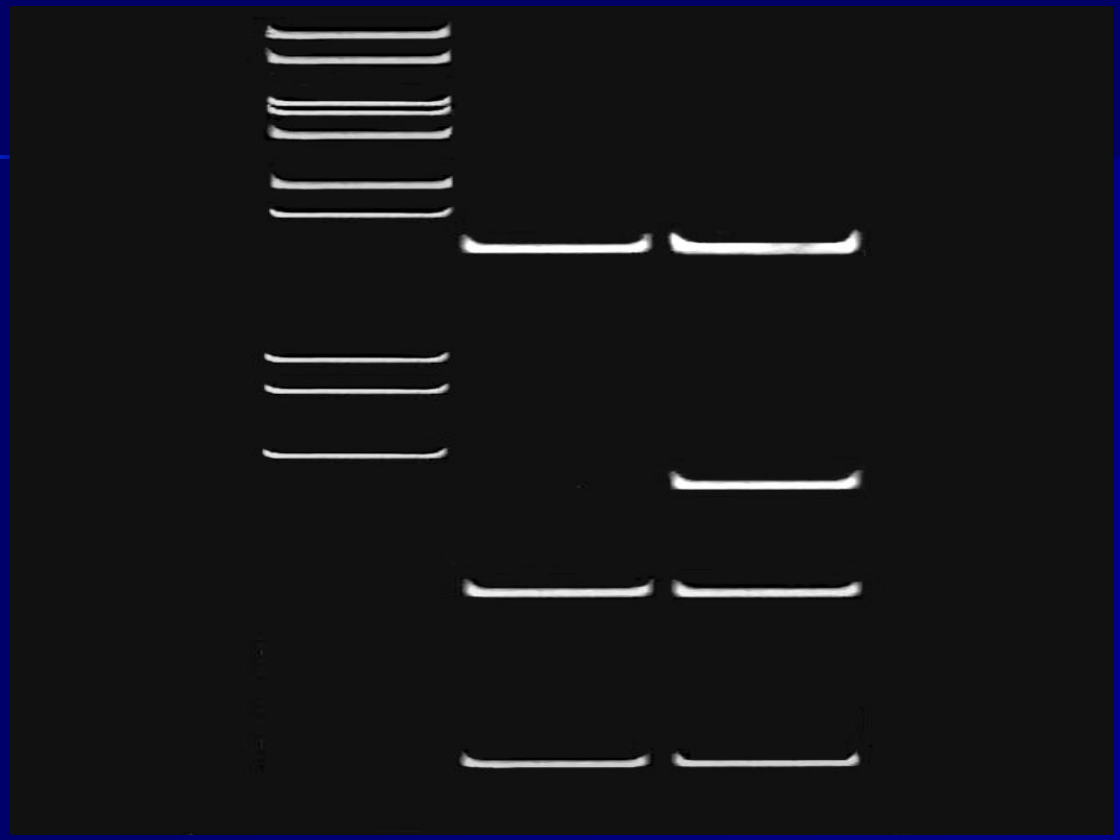
Забор крови



4 этап - электрофорез в геле и просмотр результатов

Условная схема ПЦР-ПДРФ-анализа

Рестрикционный анализ



Электрофореграмма рестрикционного анализа 14 экзона гена БВК (после рестрикции Mnl I). Дорожка 1 - маркер молекулярного веса λ/PstI, 2 - образец ДНК здорового человека, 3 - образец ДНК пациента, гетерозиготы по мутации Glu1064Lys.

ПЦР в реальном времени

- Метод ПЦР «в реальном времени» включает в себя одновременную детекцию и количественное определение (измерение непосредственно количества копий, либо измерение копий относительно внесенной ДНК или дополнительных калибровочных генов) специфической последовательности ДНК в образце.

Различные типы ПЦР «в реальном времени»

- Типы ПЦР «в реальном времени» различаются по способам генерации репортерной флуоресценции. Существует два основных способа визуализации накопления ДНК в ходе ПЦР. Оба способа основаны на использовании флуорофоров – молекул, обладающих способностью к флуоресценции

Два основных принципа:

- Применение интеркалирующих флуоресцентных агентов, флуоресценция которых значительно возрастает при связывании с двуцепочечной ДНК,
- Использование меченых флуоресцентными агентами олигонуклеотидных проб, комплементарных участку ПЦР-продукта. В качестве интеркалирующего красителя наиболее часто используют *SYBR Green*. В технологиях *TaqMan*, *Molecular Beacons* и *LightCycler* используют меченые олигонуклеотидные пробы.

Схема ПЦР «в реальном времени с использованием интеркалирующих красителей

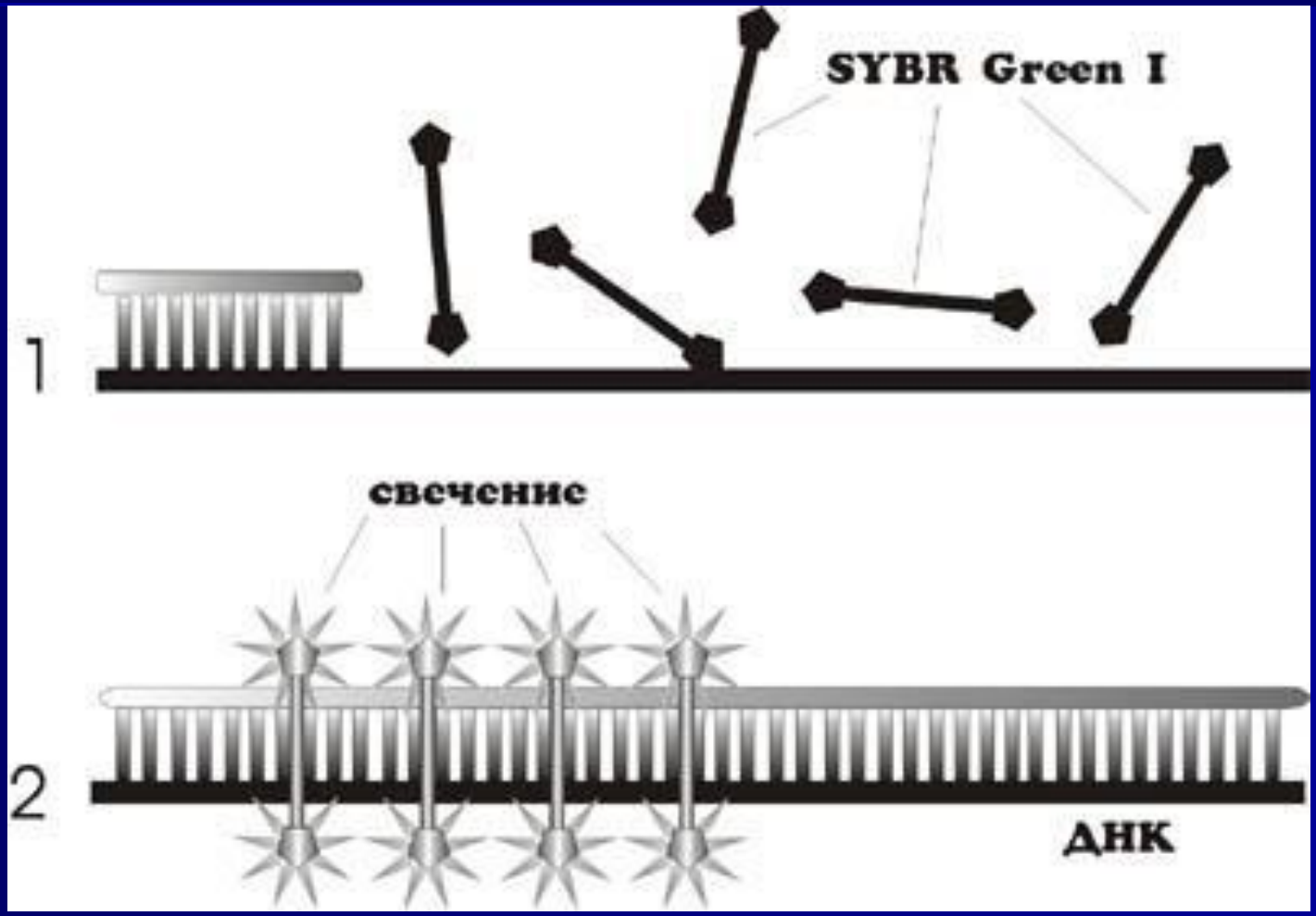
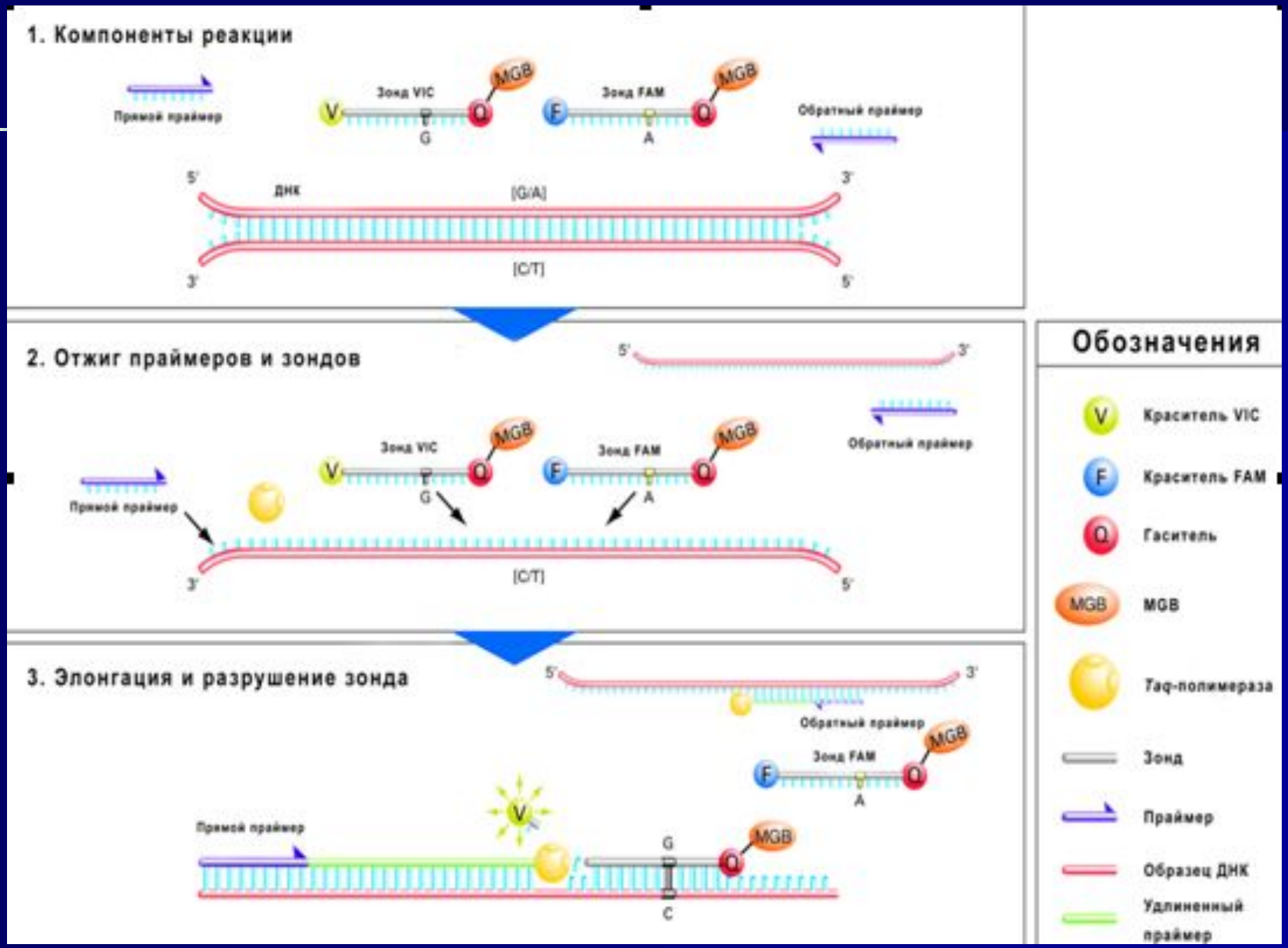
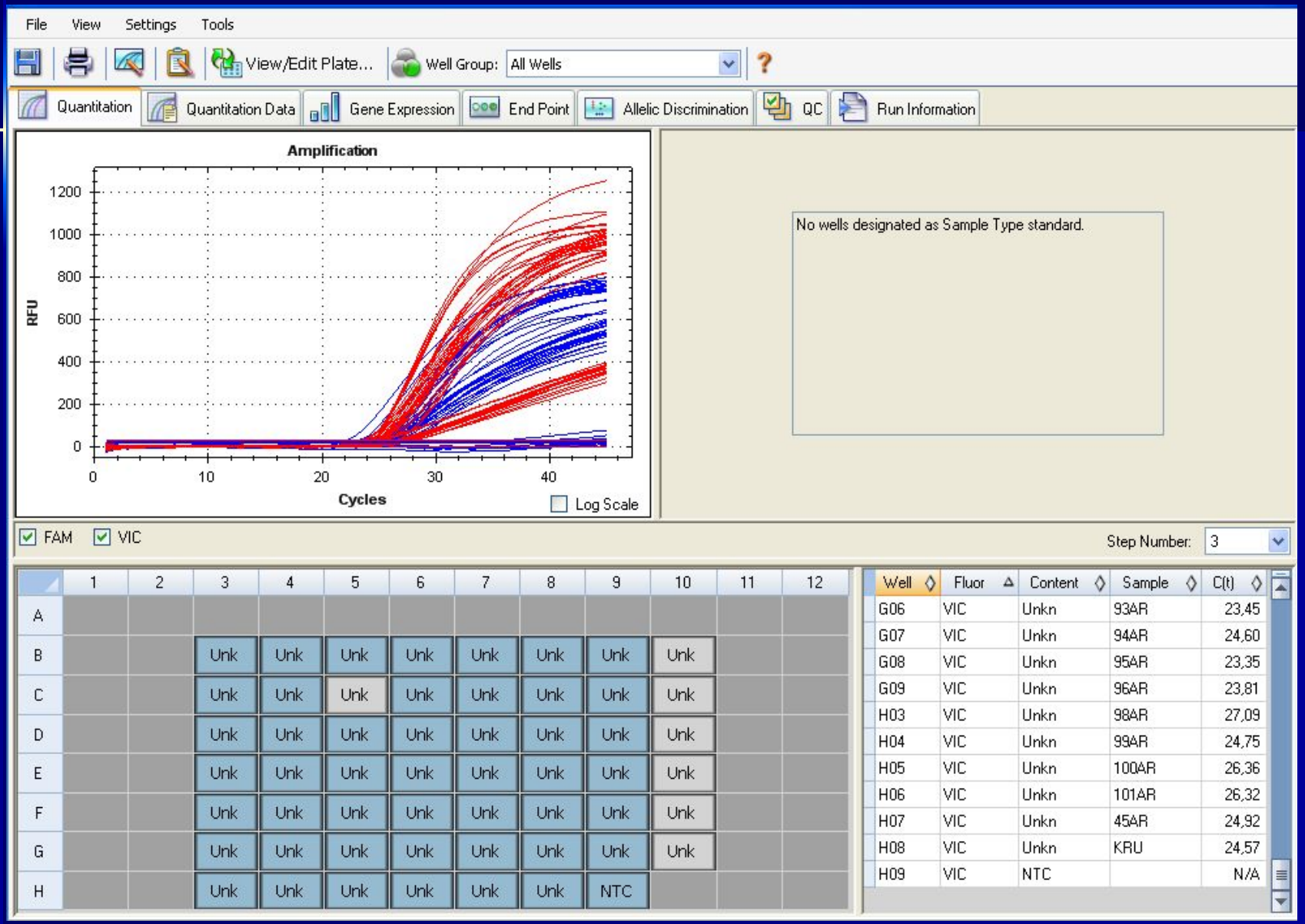


Схема ПЦР «в реальном времени с использованием TagMan-зондов

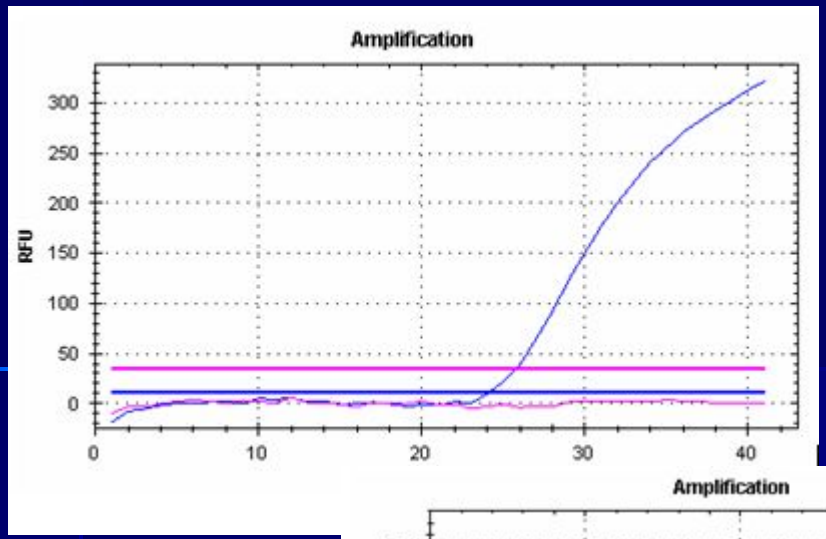


Детекция результатов реал-тайм ПЦР

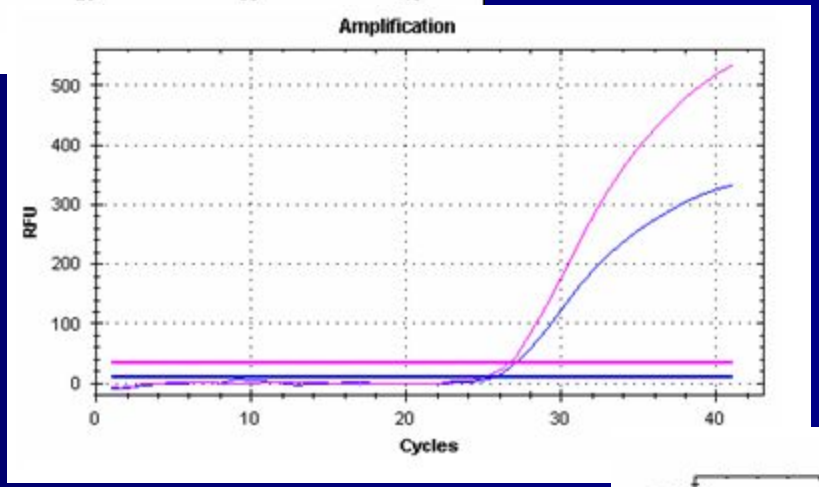


	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B			Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk		
C			Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk		
D			Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk		
E			Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk		
F			Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk		
G			Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk		
H			Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	NTC			

Well	Fluor	Content	Sample	C(t)
G06	VIC	Unkn	93AR	23,45
G07	VIC	Unkn	94AR	24,60
G08	VIC	Unkn	95AR	23,35
G09	VIC	Unkn	96AR	23,81
H03	VIC	Unkn	98AR	27,09
H04	VIC	Unkn	99AR	24,75
H05	VIC	Unkn	100AR	26,36
H06	VIC	Unkn	101AR	26,32
H07	VIC	Unkn	45AR	24,92
H08	VIC	Unkn	KRU	24,57
H09	VIC	NTC		N/A

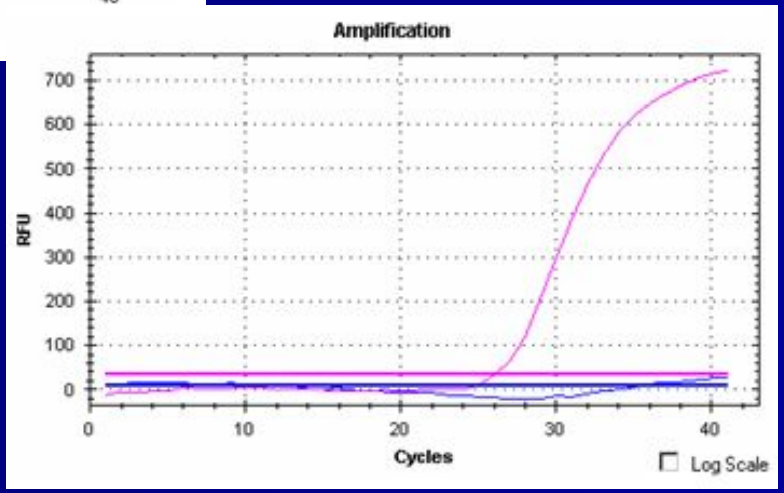


Гомозигота по аллелю, маркированному флуорофором FAM



гетерозигота

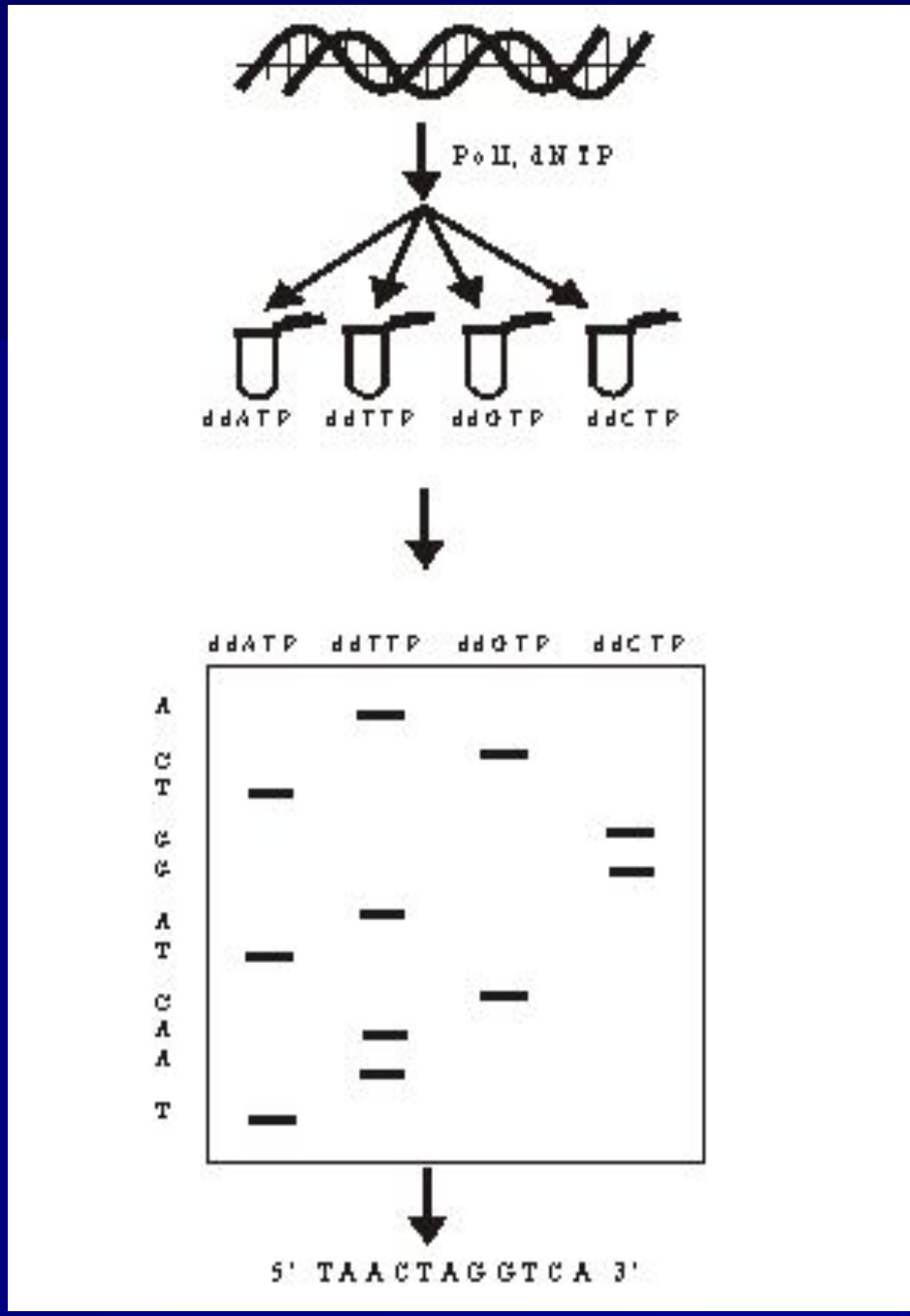
В. Гомозигота по аллелю, маркированному флуорофором VIC

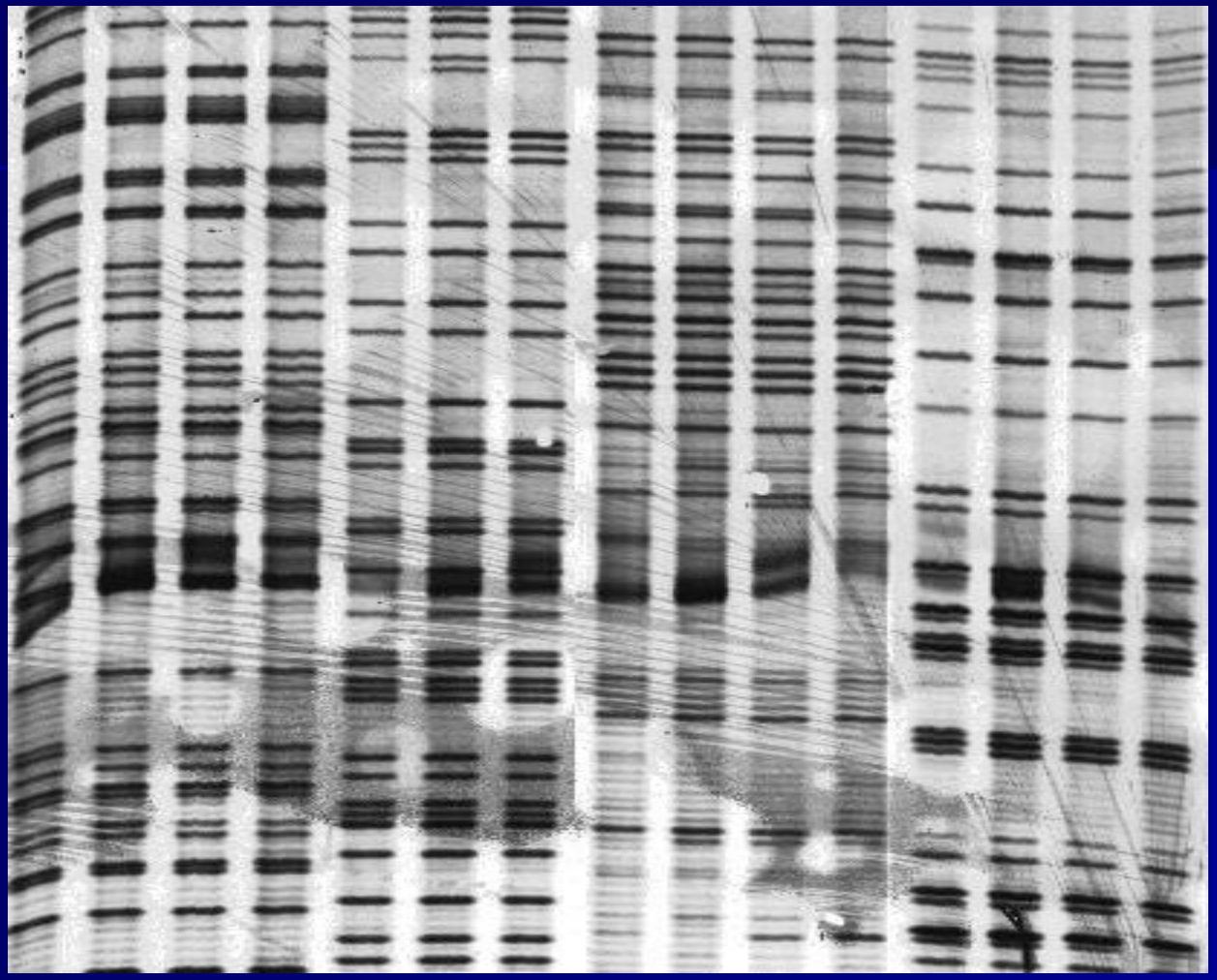


Секвенирование ДНК по Сэнгеру

В 1977 г. Ф.Сэнгер предложил способ ферментативного секвенирования, получивший название метода терминирующих аналогов трифосфатов. Этот способ, несколько модифицированный, применяется до сих пор.

В основе метода лежит ферментативное копирование с помощью ДНК полимеразы I из E.coli. Специфическая терминация синтеза обеспечивается добавлением в реакционную смесь помимо четырех типов dNTP (один из которых радиоактивно мечен по альфа положению фосфата) одного из 2',3'-дидезоксинуклеозидтрифосфатов (ddATP, ddTTP, ddCTP или ddGTP), который способен включаться в растущую цепь ДНК, но не способен обеспечивать дальнейшее копирование из-за отсутствия 3'-OH группы.





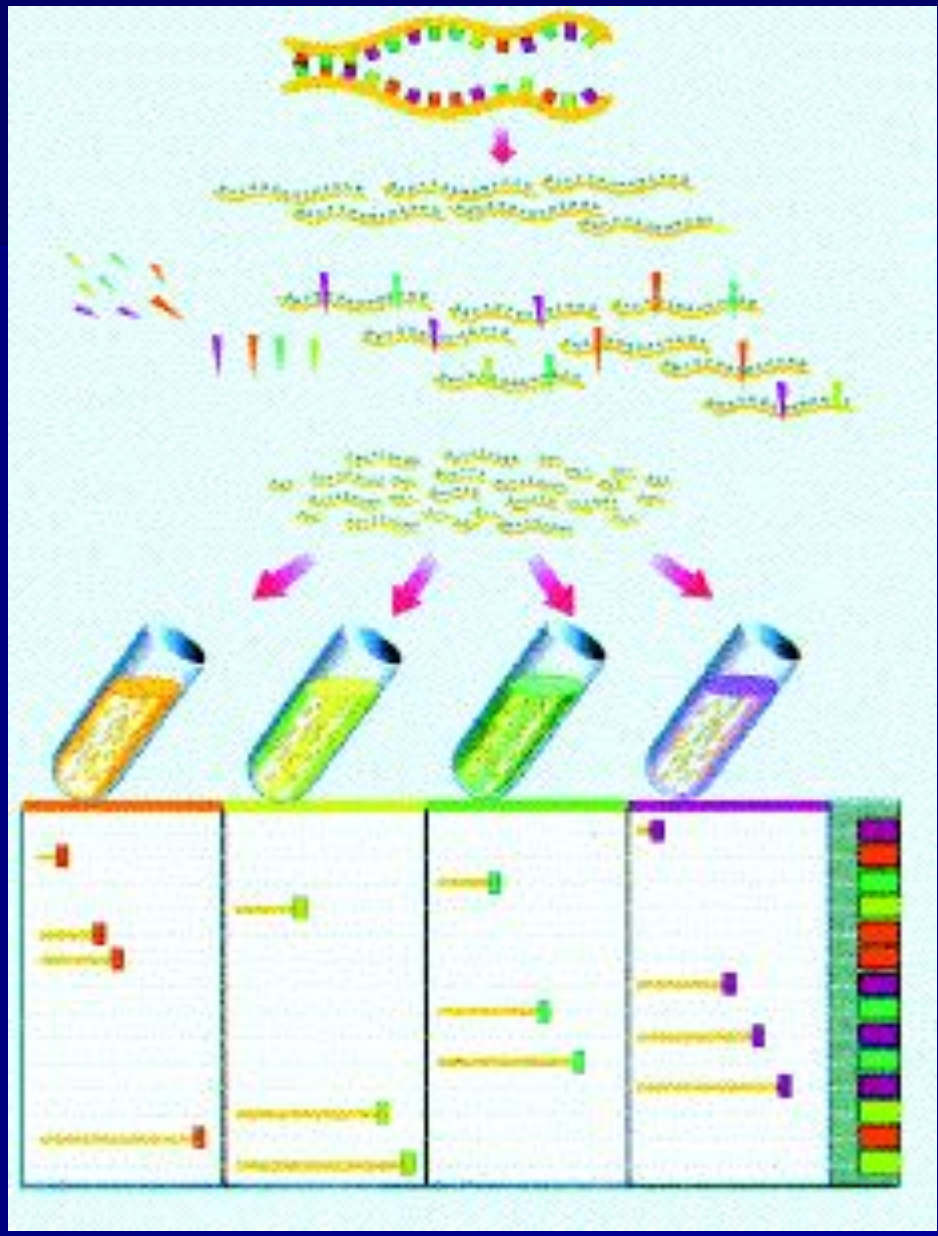
Автоматическое секвенирование ДНК

В основе автоматического секвенирования лежит метод ферментативного секвенирования с использованием терминирующих ddNTP (*). Как и классический вариант Сэнгера, автоматическое секвенирование включает две стадии:

1. проведение терминирующих реакций
2. разделение продуктов этих реакций с помощью электрофореза.

Флуоресцентную метку включают либо в праймер, либо в терминатор транскрипции. Если используется единственный краситель, то разделение продуктов сиквенсовой реакции в геле проводят на четырех разных дорожках. Использование четырех разных красок позволяет разгонять продукты реакции(й) на одной дорожке.

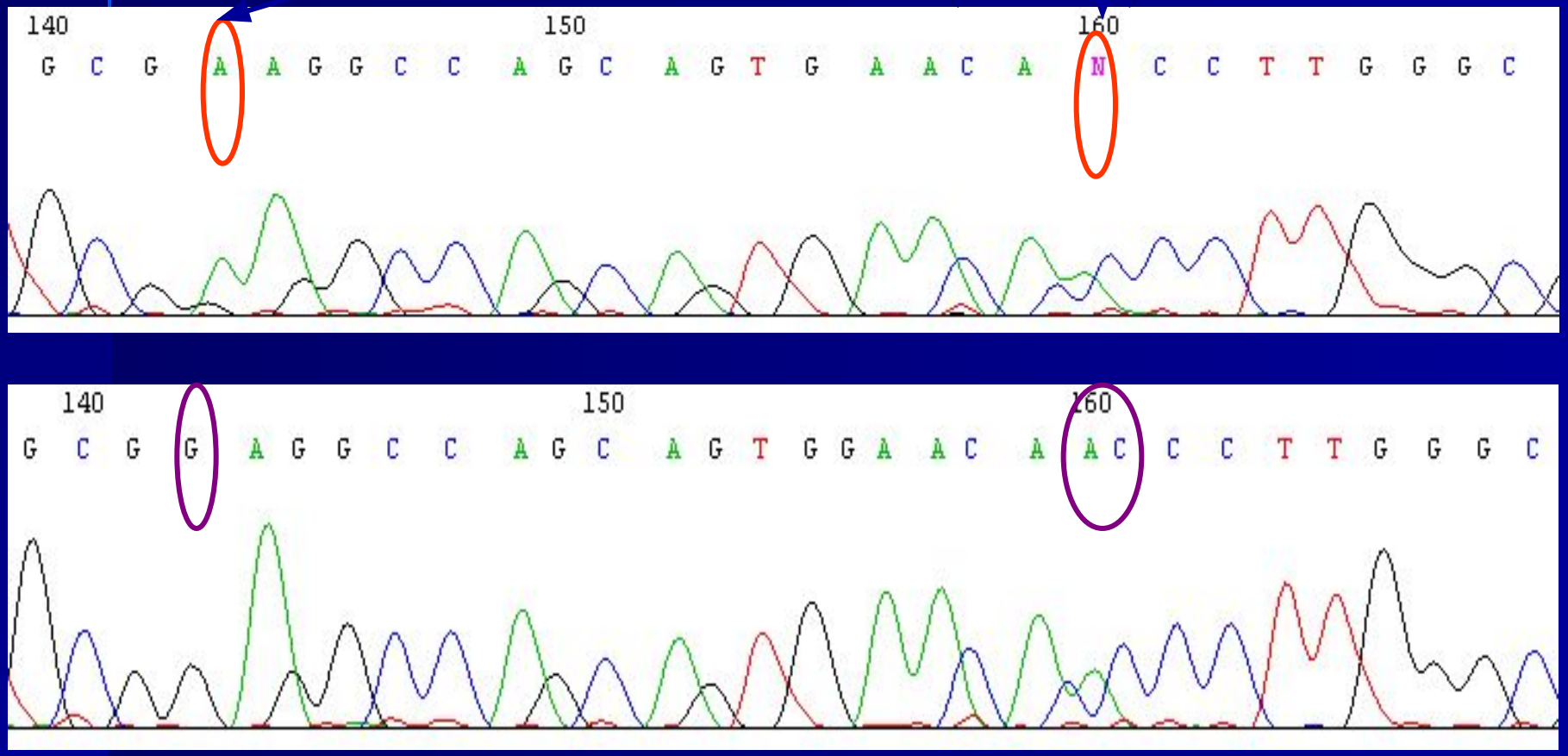
Возбуждение флуорофора происходит при прохождении меченным фрагментом ДНК зоны сканирования лазером.



Секвенирование мутаций в 14 экзоне гена БВК

Glu1064 Lys (3190G/A)

His1069Gln (3207C/A)

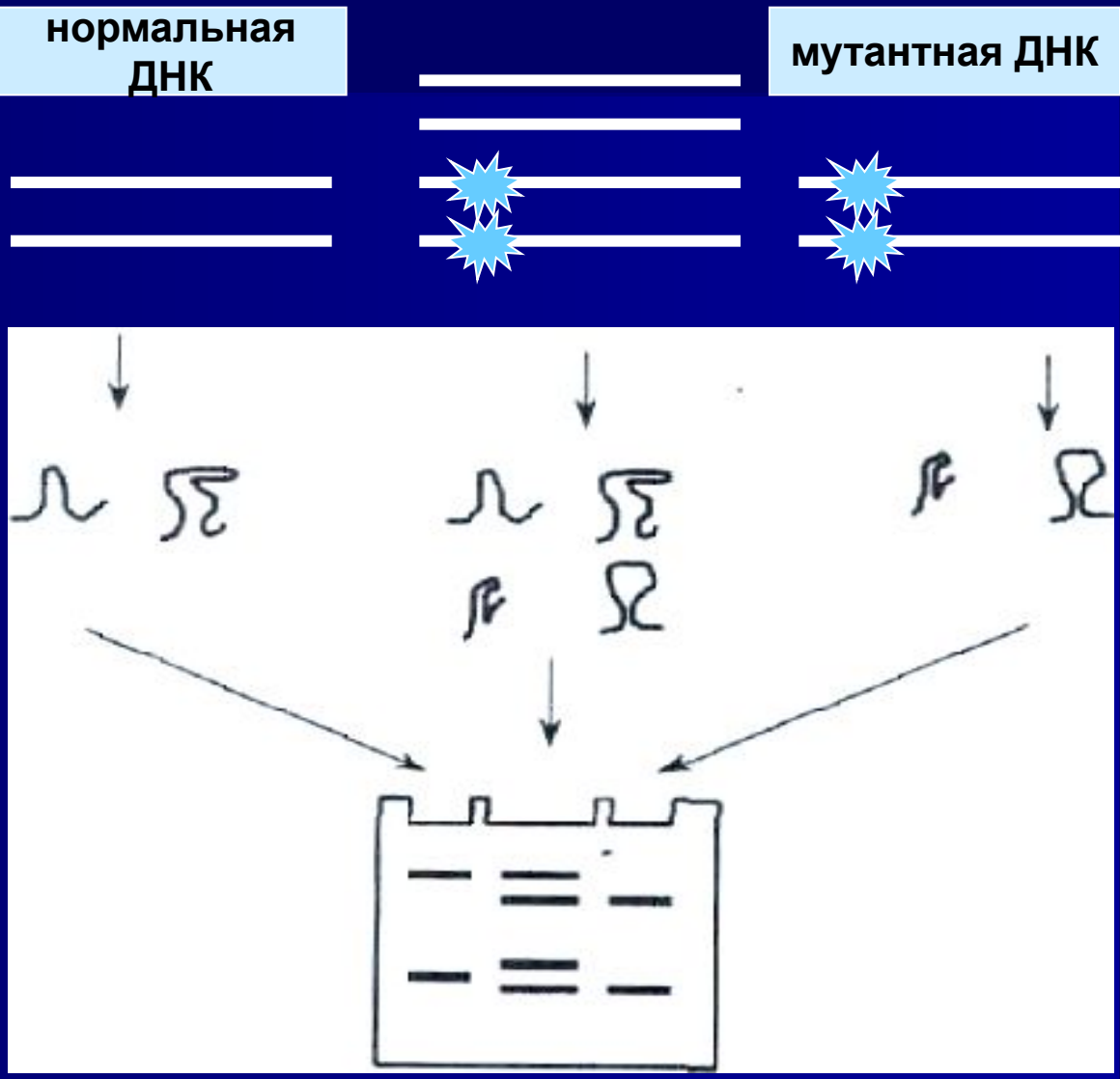


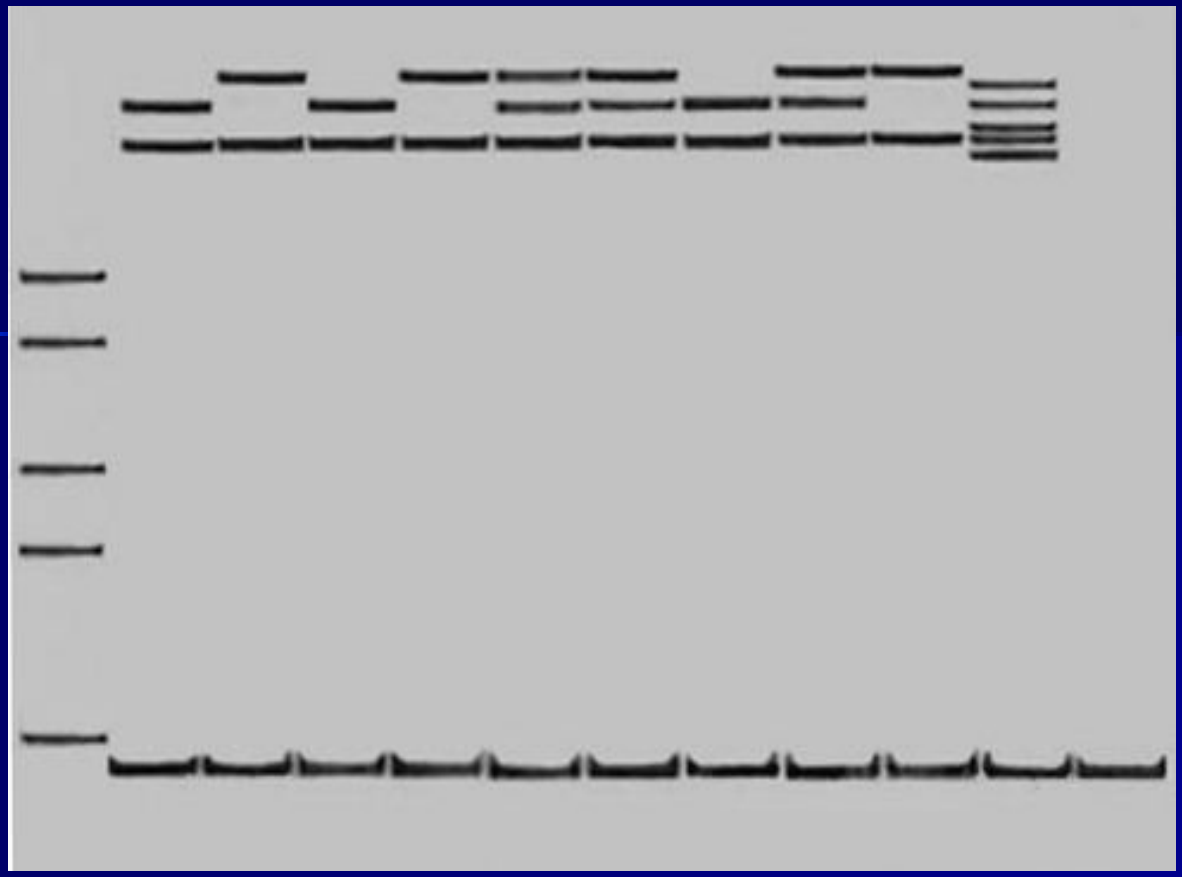
SSCP (single strand conformation polymorphism)

Метод анализа конформационного полиморфизма однонитевой ДНК, предложенный M. Orita с соавт. (1989), основан на регистрации различий в электрофоретической подвижности однонитевых фрагментов ДНК, одинаковых по величине, но различающихся вследствие нуклеотидных замен по пространственной организации молекул.

Метод включает в себя:

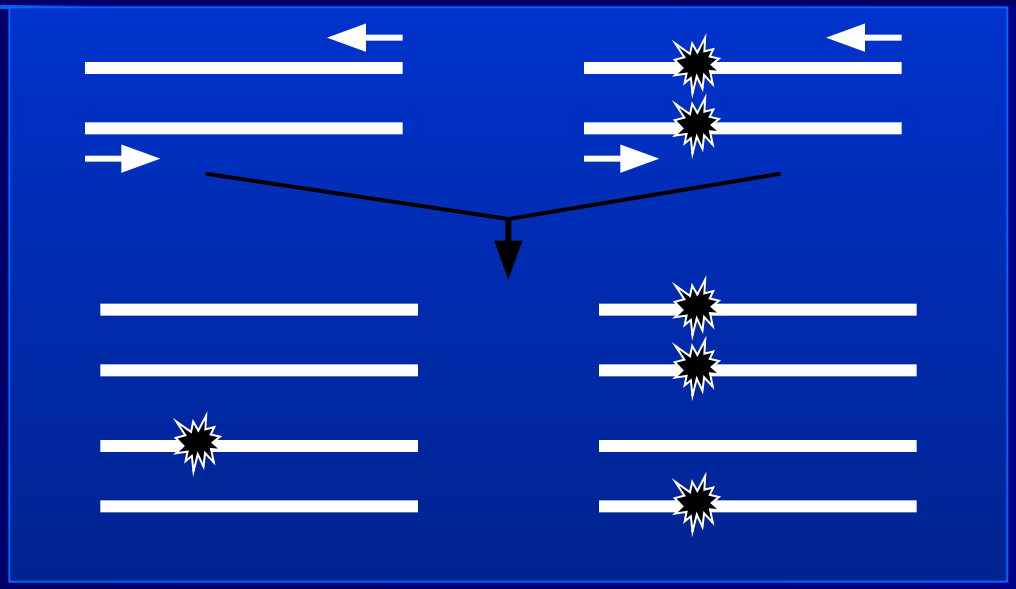
- амплификацию специфических фрагментов ДНК
- денатурацию
- электрофорез





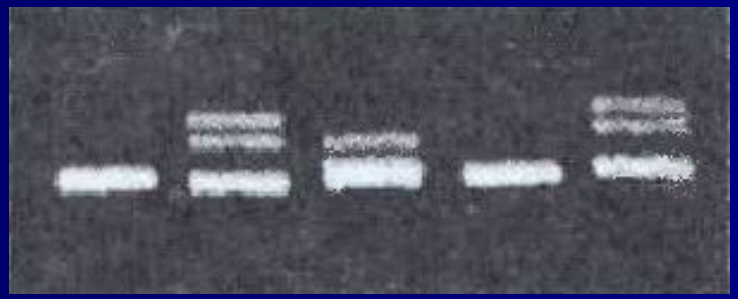
Электрофореграмма SSCP-анализа 14 экзона гена БВК. Дорожка 1 - маркер молекулярного веса pUC18/MspI, 2 - контрольный образец ДНК пациента, гомозиготы по мутации His1069Gln, 3 - образец ДНК здорового человека, 4-11 - образцы ДНК пациентов с БВК (4, 8 - гомозиготы по His1069Gln, 6, 7, 9 - гетерозиготы по His1069Gln, 11- компаунд-гетерозигота по мутациям His1069Gln и Glu1064Lys), 12 - неденатурированный образец. ОН - однонитевая ДНК, ДН -

Гетеродуплексный анализ



Смешивание
и
денатурация

Гомо- и
гетеродуплекс
ы



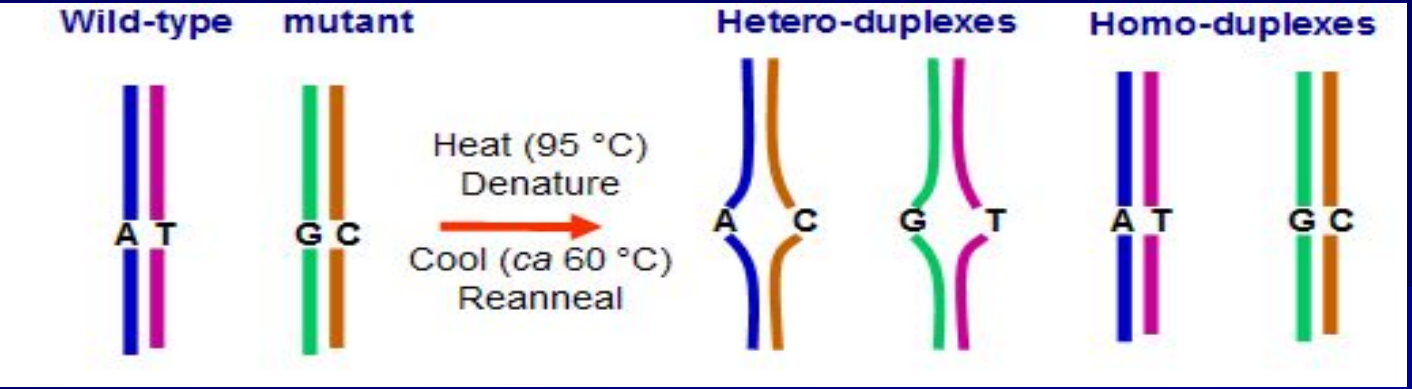
Электрофореграмма
гетеродуплексного
анализиза

DHPLC (Denaturation high performance liquid chromatography)

Метод DHPLC (денатурирующей жидкостной хроматографии высокого разрешения), предложенный еще в 1995 г. [Oefner, Underbill, 1995], позволяет в течение двух-трех минут определить однонуклеотидные замены, делеции и инсерции в амплификатах размерами до 1,5 т.п.о. При этом чувствительность и специфичность метода составляют около 95%. Метод представляет собой модифицированный вариант метода гетеродуплексного анализа с последующим автоматическим учетом результатов при помощи жидкостного хроматографа.

Метод DHPLC уже широко применяется для генотипирования путем детекции однонуклеотидных замен (SNP); при первичном анализе мутаций генов-кандидатов; при изучении молекулярных маркеров и мутаций Y-хромосомы; для картирования генов с помощью типирования SNP и EST [Xiao, Oefner, 2001].

DHPLC



Продукты ПЦР исследуемого фрагмента ДНК подвергаются частичной денатурации в растворе с контрольными образцами того же фрагмента в соотношении 1:1 путем нагревания смеси до +95 °С с последующим медленным охлаждением (ренатурацией). При отсутствии мутаций в изучаемом фрагменте формируется только один тип гомодуплексов, но при наличии мутаций формируются несколько типов гетеро- и гомодуплексов

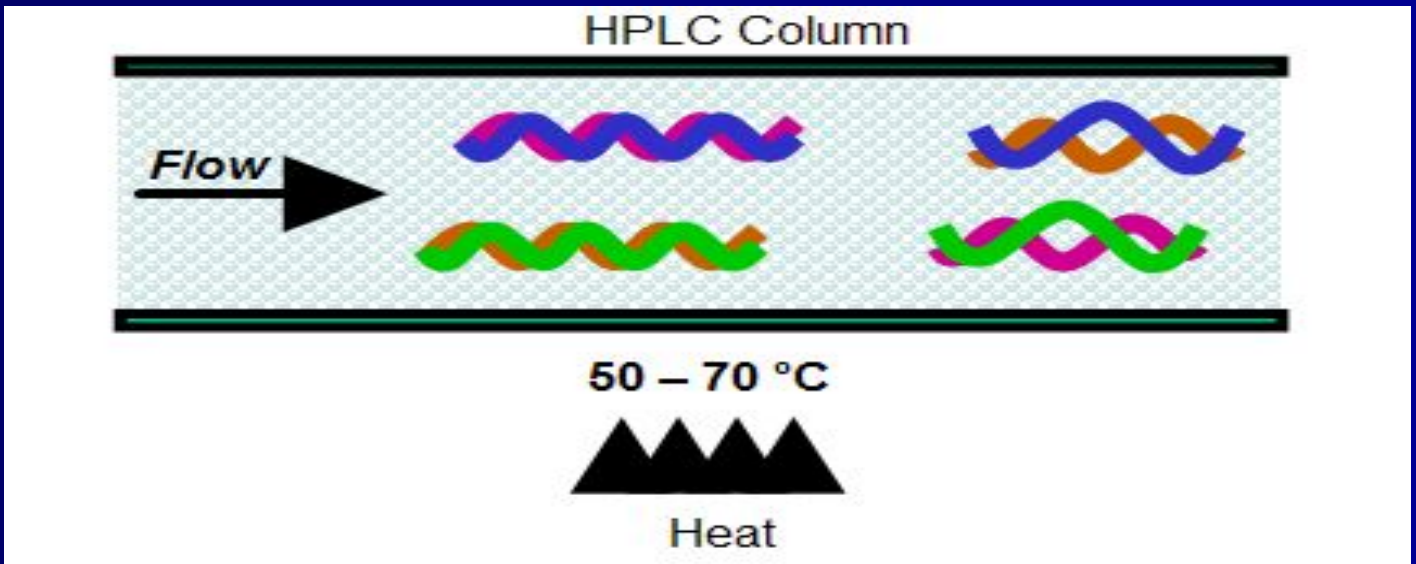
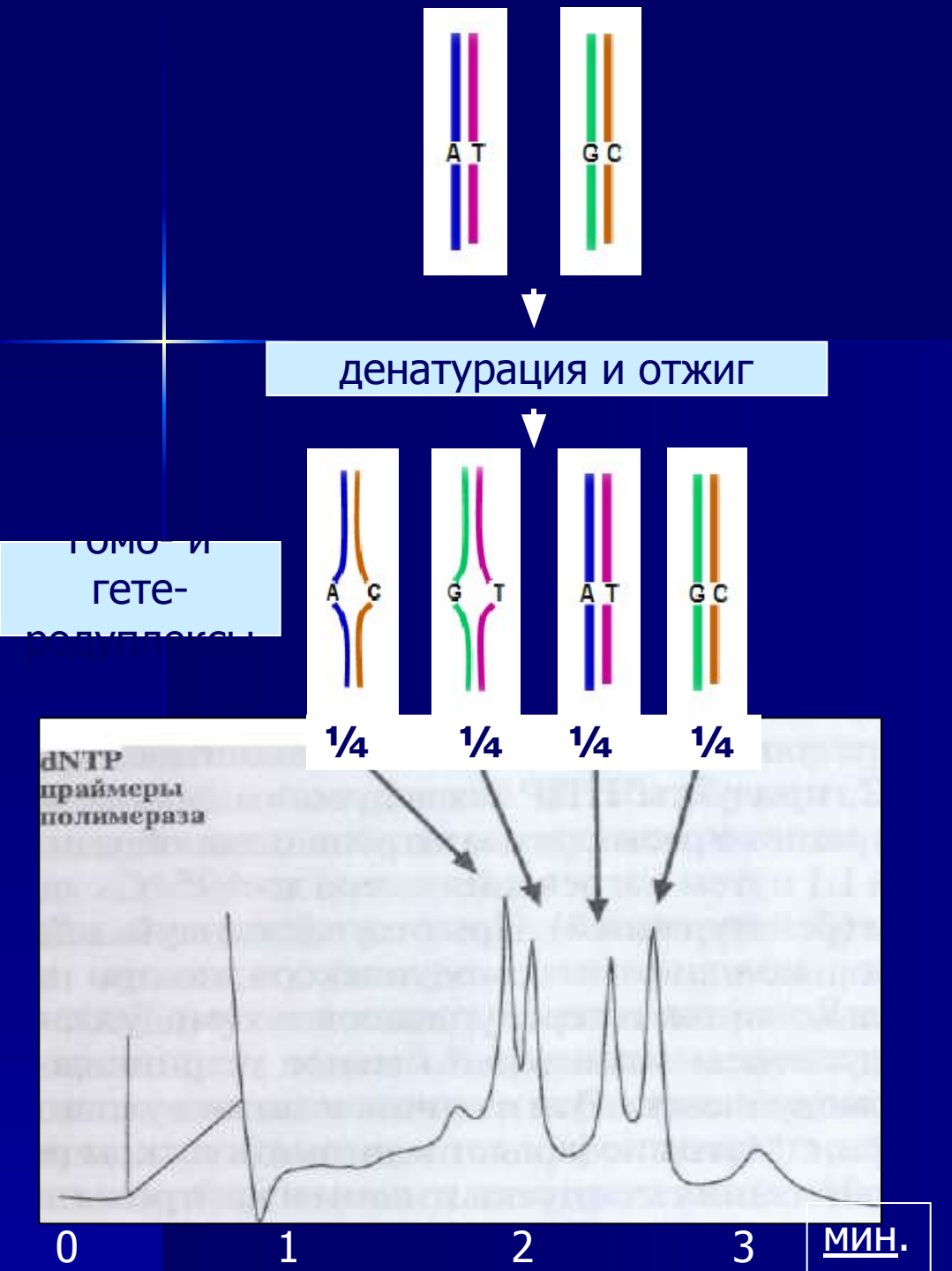


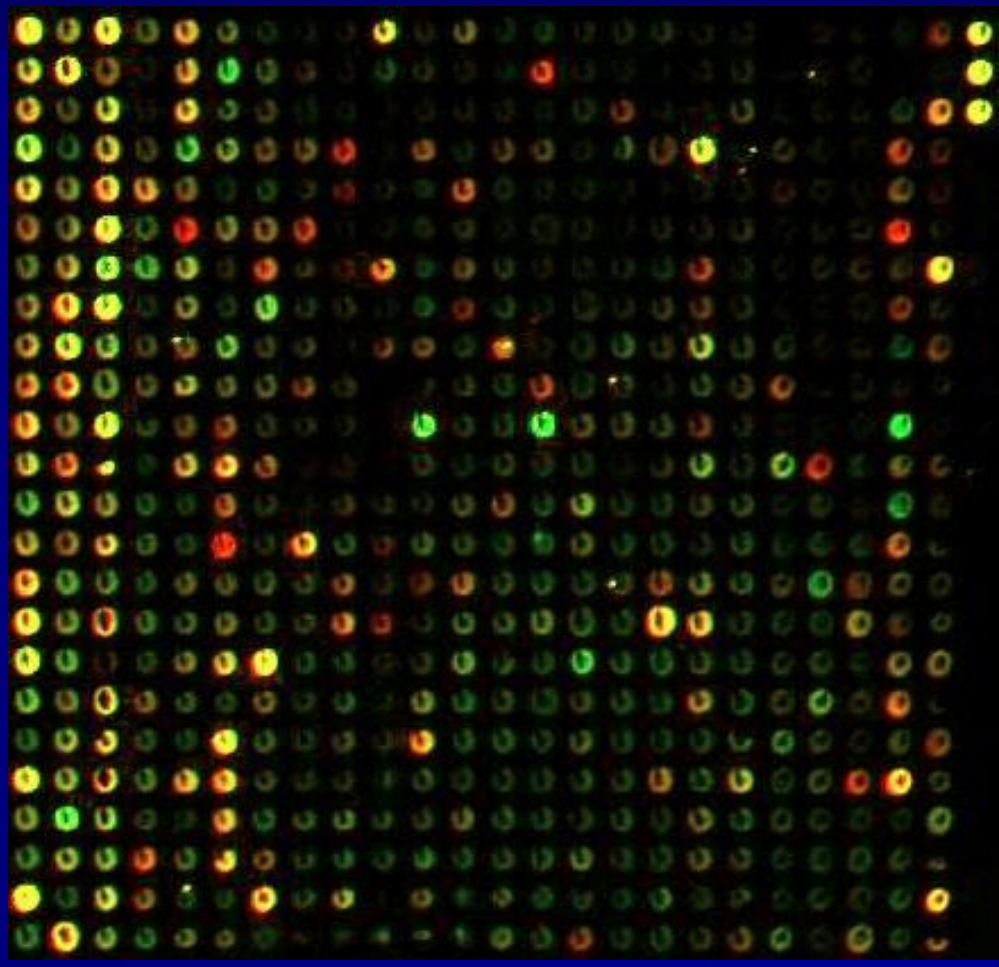
Схема проведения DHPLS-анализа (Xiao, Oefner, 2001)



Возникающие гетеродуплексы значительно менее устойчивы к температурным воздействиям, чем гомодуплексы. Эти отличия и улавливаются с помощью жидкостной хроматографии. Метод позволяет в автоматическом режиме улавливать наличие сайтов неспаривания между опытными и контрольными образцами ДНК.

ДНК-чипы (DNA microarrays)

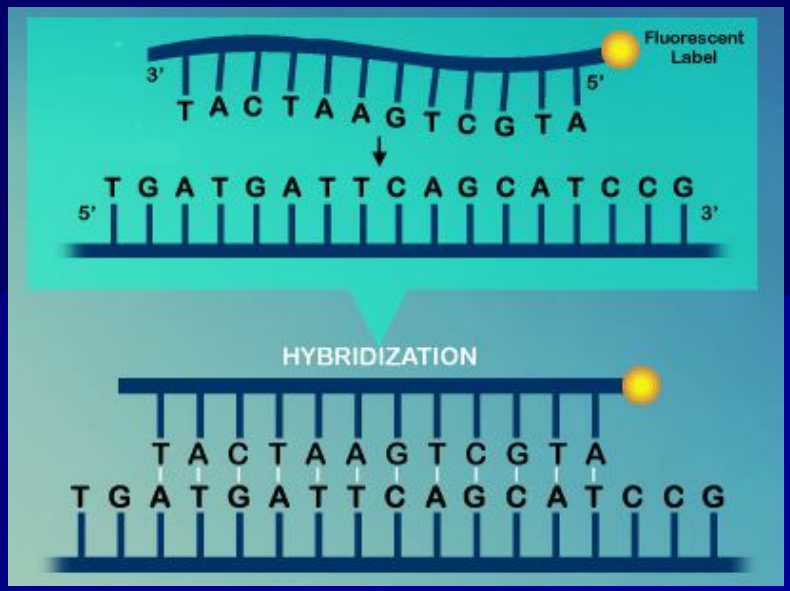
ДНК-чип представляет собой пластину площадью около 1 см2, на которой в строго определенном порядке размещены ячейки, каждая из которых содержит одноцепочечные полинуклеотиды определенной последовательности оснований. Количество таких полинуклеотидных ячеек, а, следовательно, и количество различных нуклеотидных последовательностей, может превышать 1 млн. на 1 см2, их длина варьирует от 9-10 до 1000 нуклеотидов.

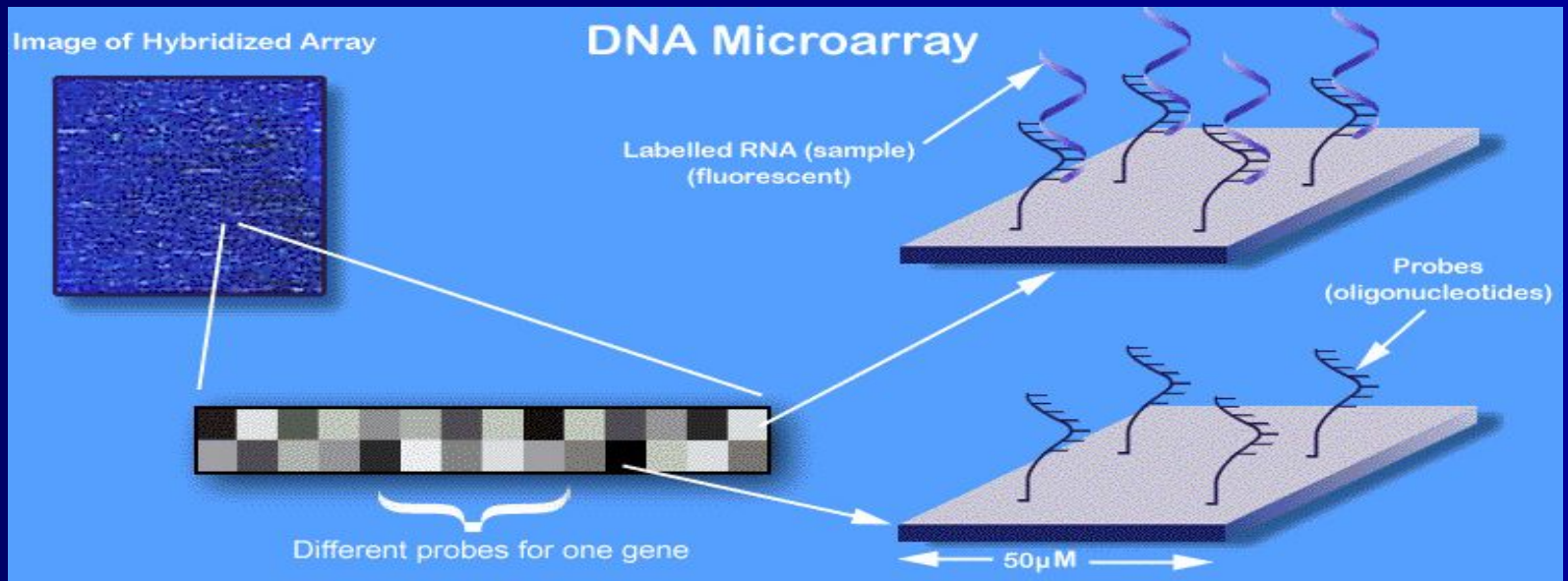


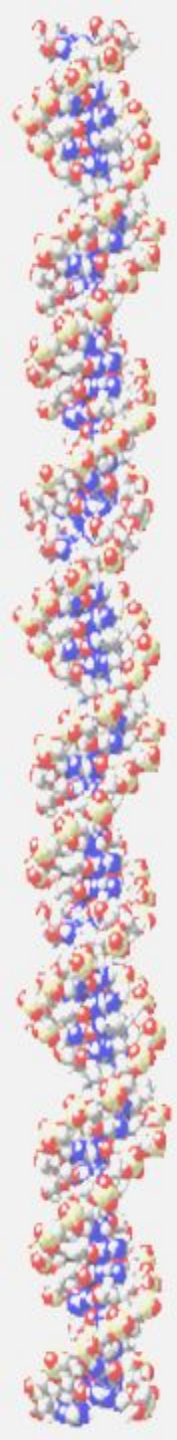
Цвет и его интенсивность несут информацию о специфическом гене исследуемого образца

- **В основе использования чипов лежит принцип аллель-специфической гибридизации.**

- **Гибридизация на чипе заключается во взаимодействии комплементарных цепей ДНК: одна из них (проба с известной последовательностью нуклеотидов) иммобилизована на подложке, а другая (анализируемая ДНК-проба, меченная флуоресцентной меткой), вносится в ДНК-чип. Флуоресцентно-меченный ПЦР-продукт с соответствующей последовательностью нуклеотидов гибридизуется на чипе.**





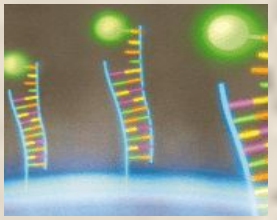


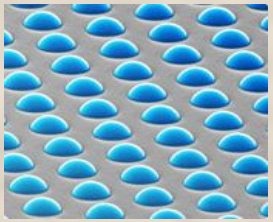
Современные технологии в молекулярной биологии:

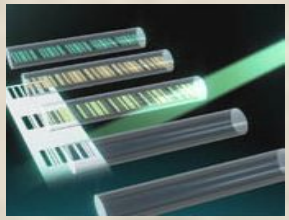
- Полногеномный анализ и современные методы биоинформатики
- Изучение на модельных организмах
- Современные молекулярно-генетические оборудование и методы
- Взаимодействие различных баз данных

Современные технологии исследования наследственных заболеваний

illumina

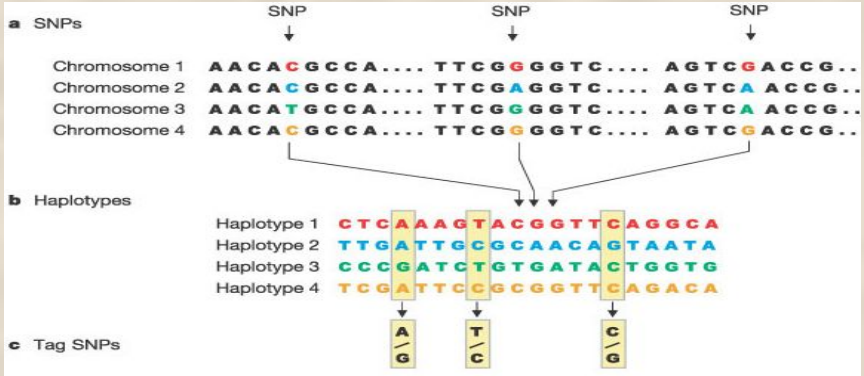






AFFYMETRIX

SEQUENOM



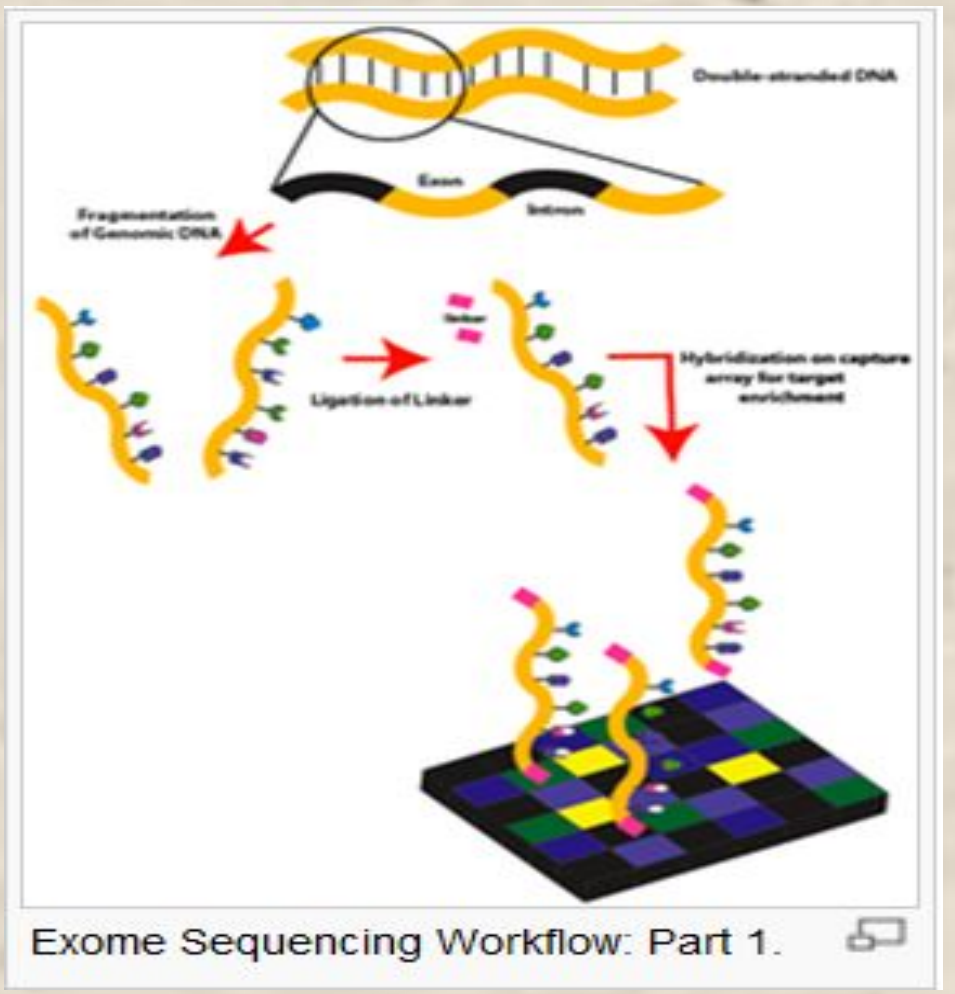
Секвенирование ДНК

1980-1990 **1990-2005** **> 2005**

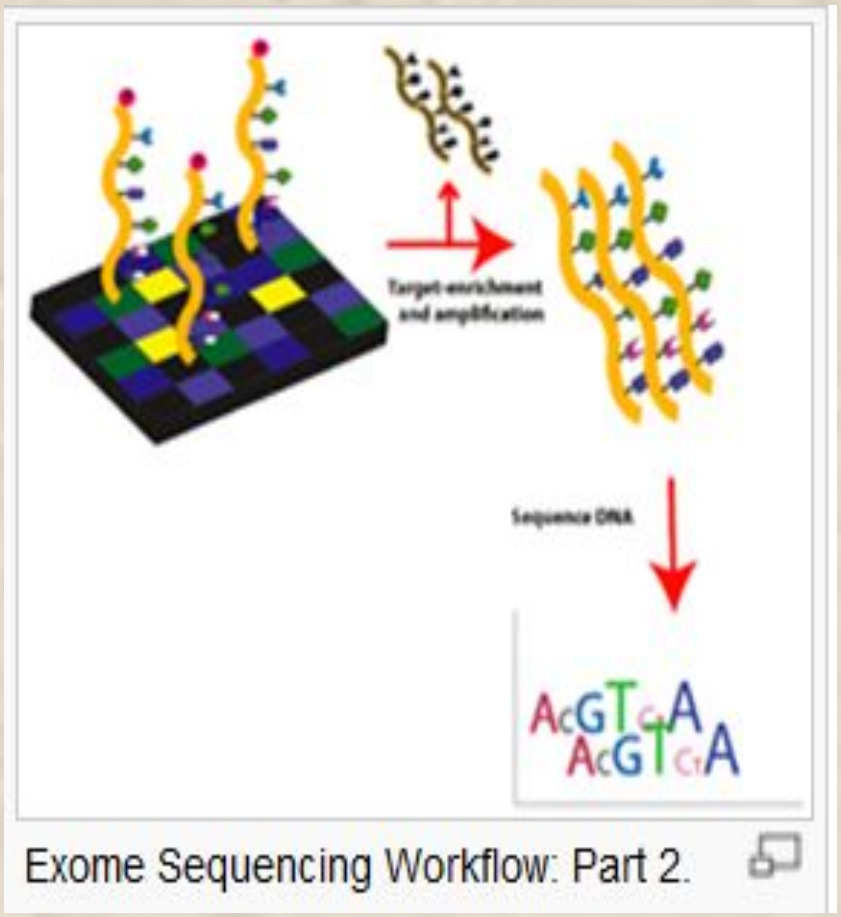
Radio - gel **Fluorescent - capillary** **Next generation**

Thousand bp / day **Million bp / day** **Billion bp / day**

Секвенирование экзома



Exome Sequencing Workflow: Part 1.



Exome Sequencing Workflow: Part 2.

Косвенные методы ДНК-диагностики

- **Генетический полиморфизм, т.е. одновременное существование в популяции нескольких аллельных вариантов какой-либо последовательности ДНК, и линейное расположение генов в хромосомах позволяют использовать сцепление гена заболевания с расположенным рядом полиморфным локусом, который может служить маркером для проверки присутствия нормального или мутантного гена в хромосоме.**

Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

является следствием точковых нуклеотидных замен, небольших вставок или делеций в сайтах узнавания рестрикционных эндонуклеаз

Количественный полиморфизм (вариабельные сателлитные повторы)

является результатом аллельных различий в числе повторов, возникающих, вероятно, при неравных обменах в митозе и мейозе, или при "скольжении" ДНК во время репликации

Длина фрагментов соответствующих локусов зависит от числа повторяющихся звеньев внутри мини- или микросателлита

Микросателлиты

CATGTCACACACACACACACACACACACACAGATA

- динуклеотидные повторы (CA-повторы)

CTATTGACGACGACGACGACGACGACGTTCGGAT

-тринуклеотидные повторы

TCACAACTGACTGACTGACTGACTGACTGATTGAC

-тетрануклеотидные повторы

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

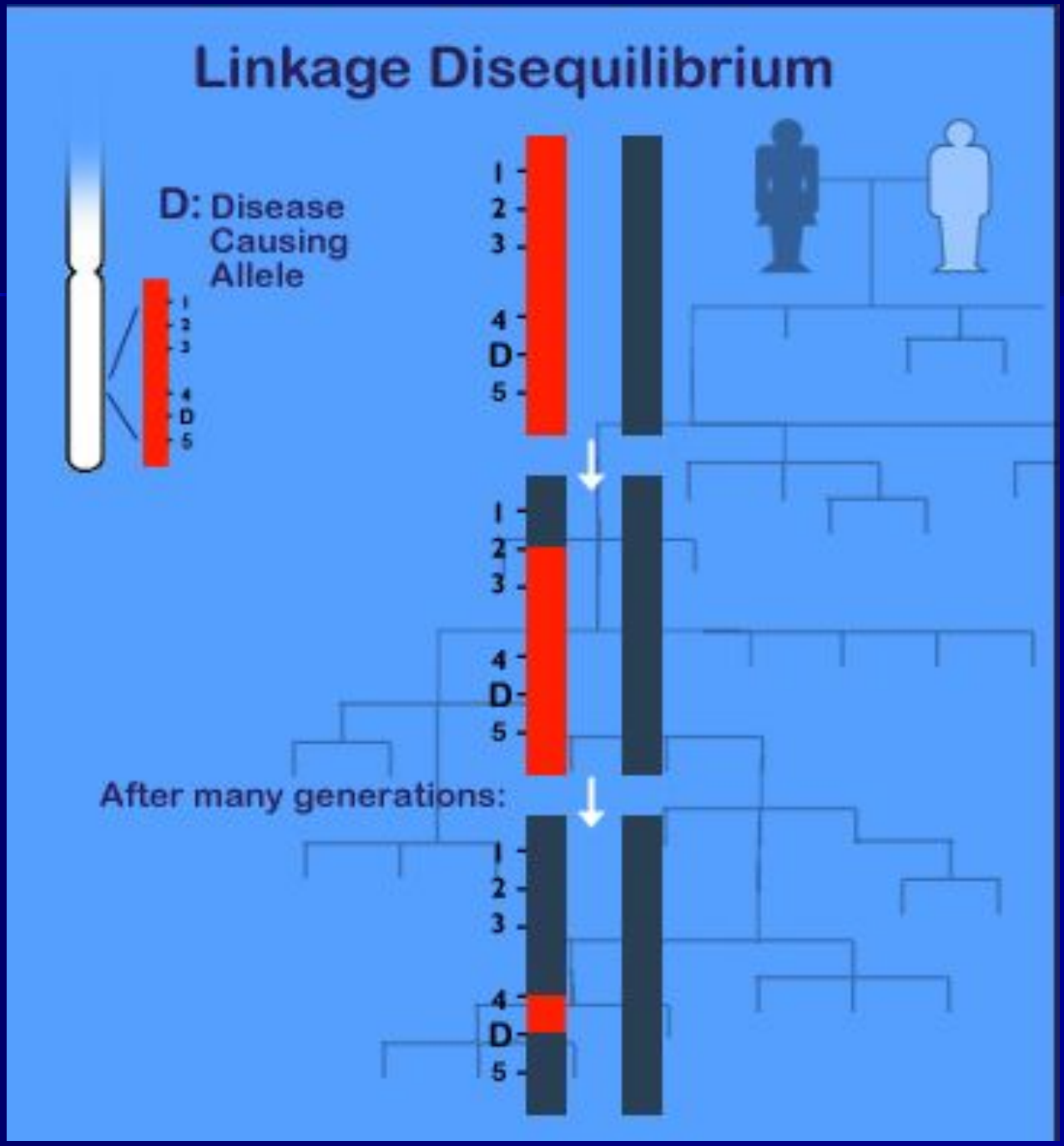
Polymorphism: variable number of repeats.

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

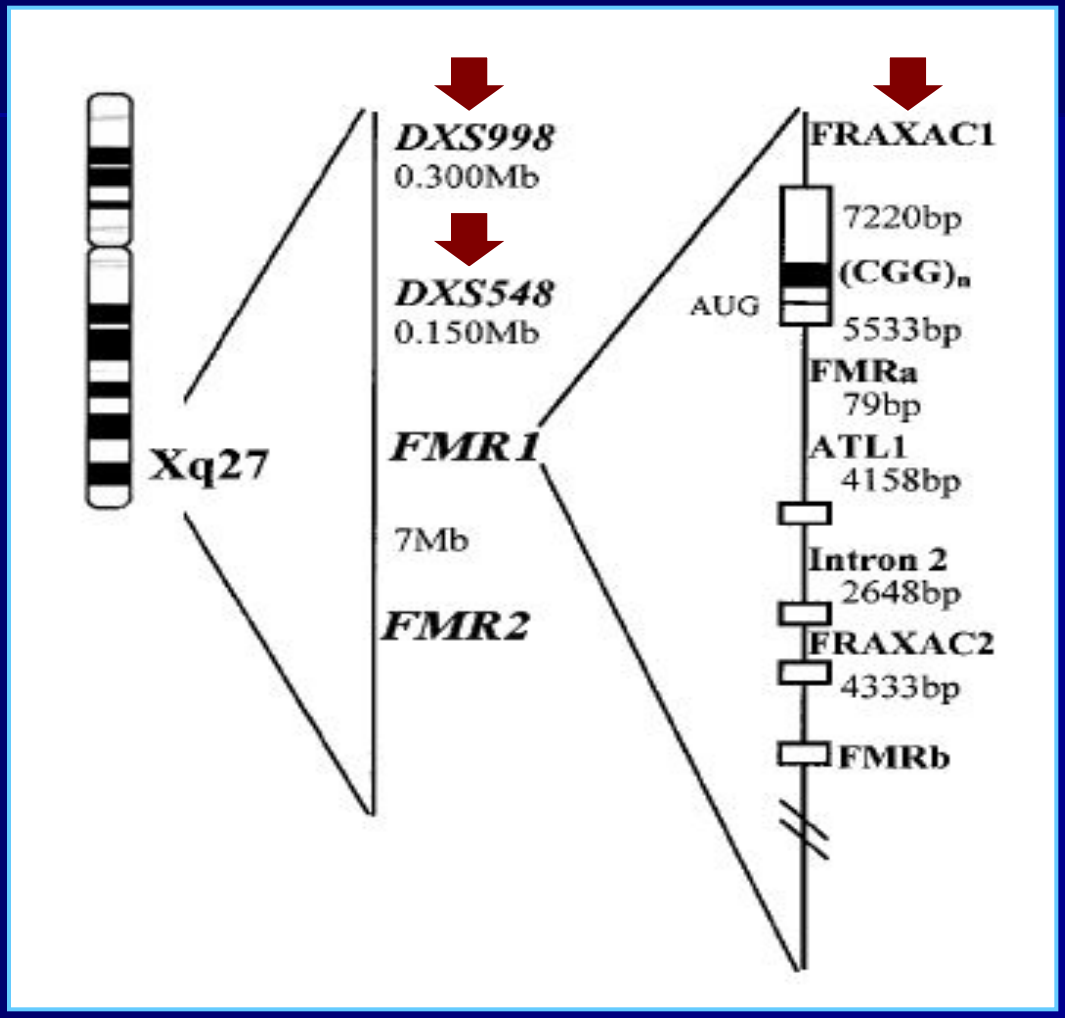
Polymorphism: variable number of CA repeats.

SNP: Single nucleotide polymorphism.

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

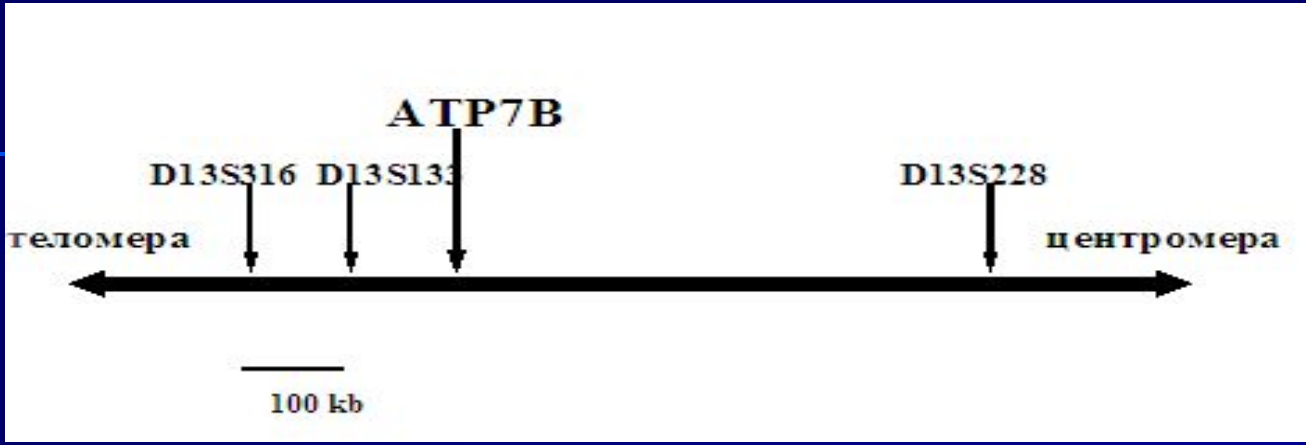

Linkage Disequilibrium
D: Disease Causing Allele
1
2
3
4
D
5
After many generations:

Локализация полиморфных маркёров, используемых для косвенной диагностики синдрома ломкой хромосомы Х



FMR 1 – ген синдрома ломкой хромосомы Х

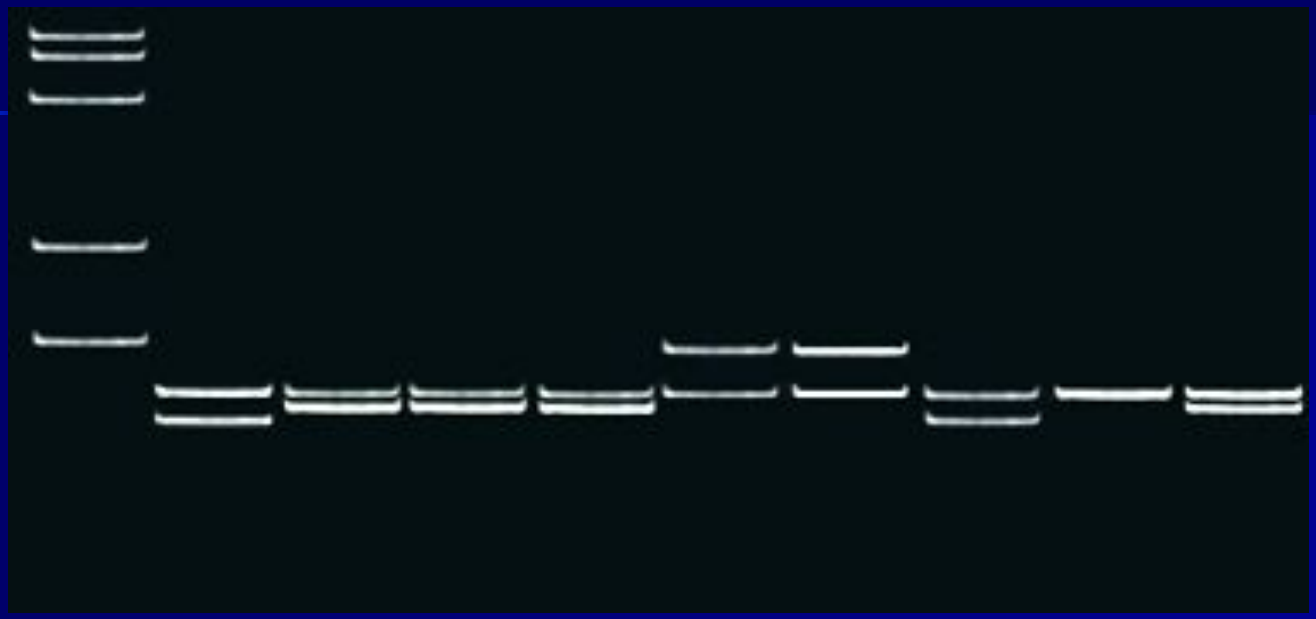
Полиморфные ДНК-локусы, сцепленные с геном болезни Вильсона-Коновалова (ATP7B)



Корреляция гаплотипов и мутаций в гене болезни Вильсона-Коновалова

Гаплотип D13S316-D13S133-D13S228	Мутация
4 - 7 - 4	3402delC
6 - 7 - 2	Glu1064Lys
6 - 18 - 3	His1069Gln
6 - 18 - 4	His1069Gln
6 - 18 - 5	His1069Gln
7 - 18 - 4	3559+1G→T

Электрофоретическое разделение продуктов амплификации по локусу D13S316



144/140 144/142 144/142 144/142 150/144 150/144 144/140 144/144 144/142

дорожка 1 - маркер молекулярного веса λ/PstI,

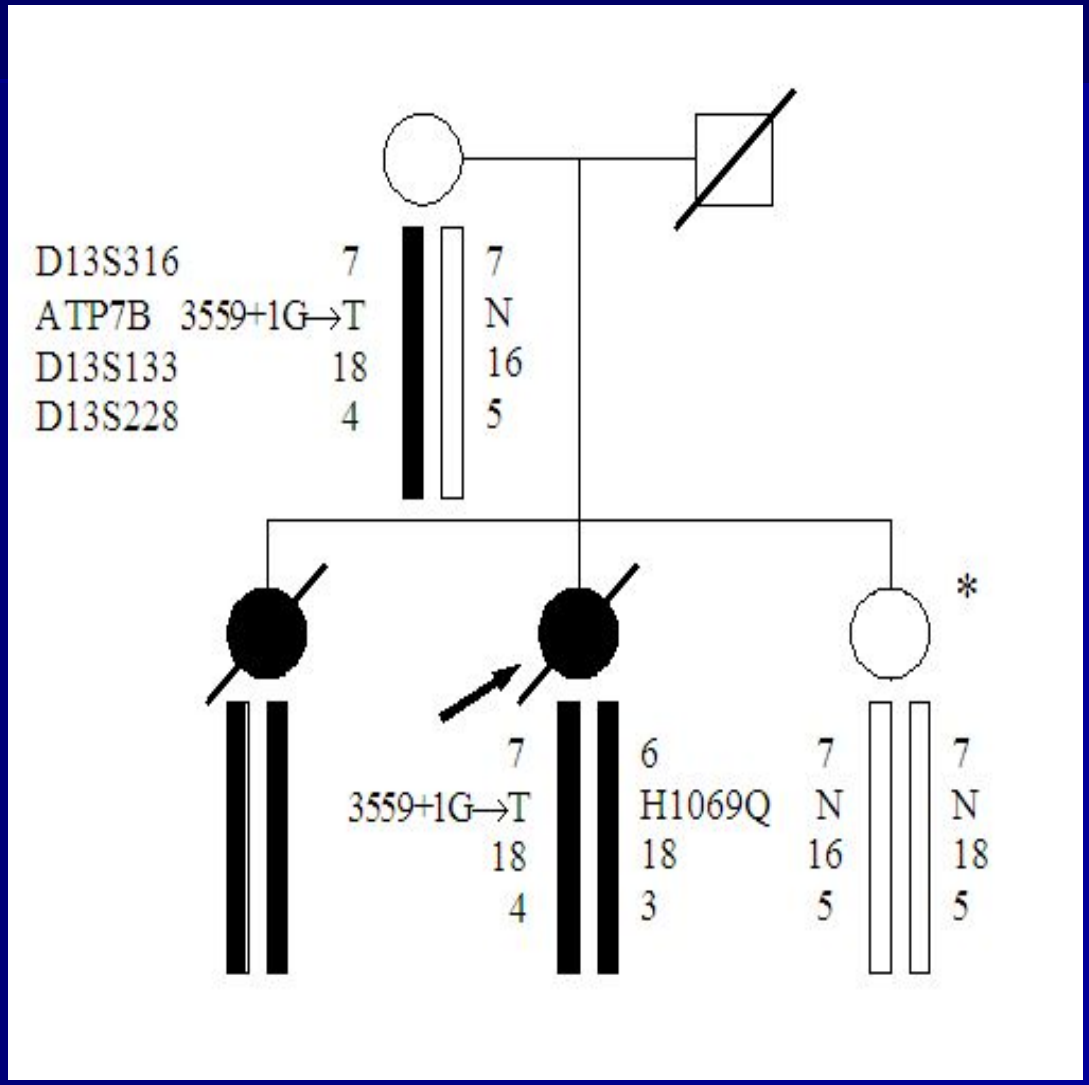
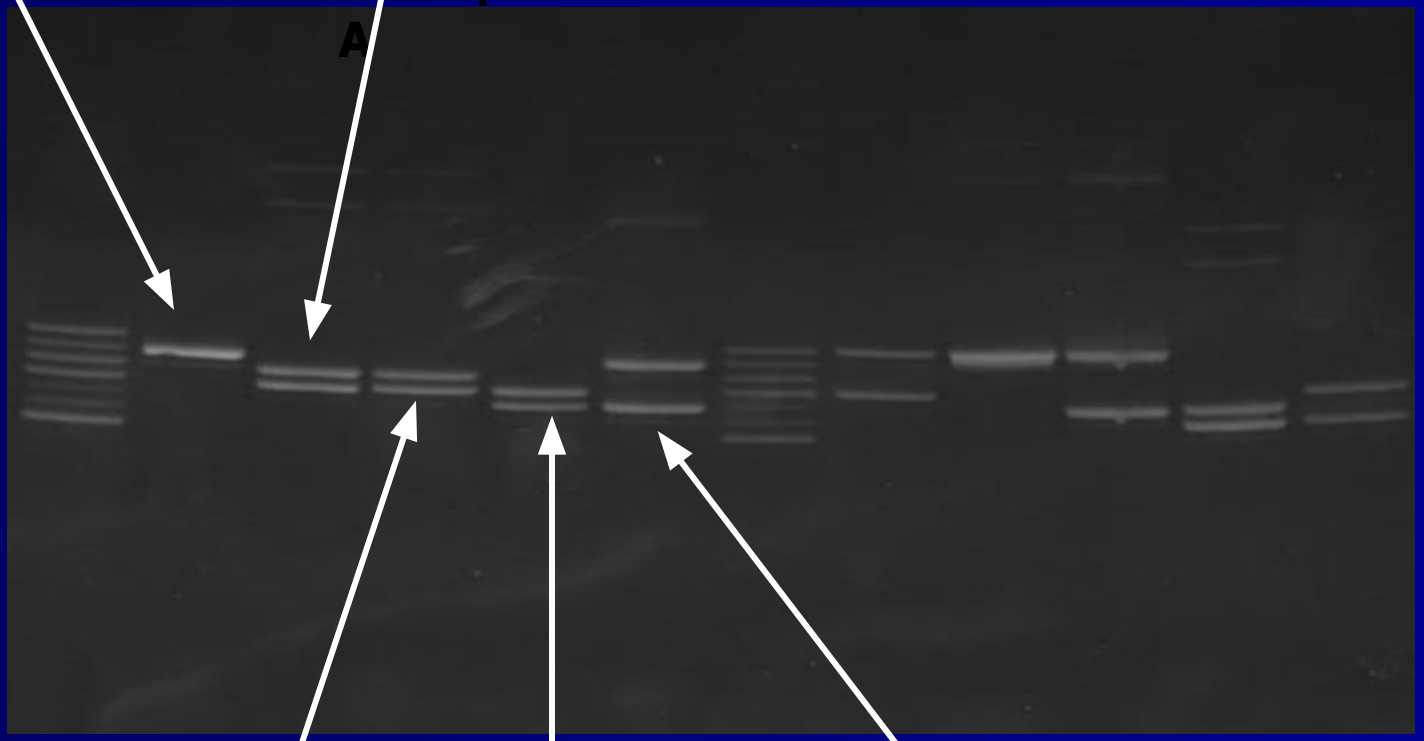
дорожка 2 - контрольный образец ДНК с известными размерами аллелей,

дорожки 3 -10 – исследуемые образцы ДНК

Прямая и косвенная диагностика болезни Вильсона-Коновалова

Родословная семьи Х.

- **пробанд указан стрелкой**
- **сестра пробанда, для которой проводилась пресимптоматическая ДНК-диагностика - ***
- **нормальные хромосомы обозначены белым цветом**
- **мутантные** хромосомы - **черным цветом**



Анализ STR-полиморфизма для установления биологического родства