Молекулярно-генетические исследования

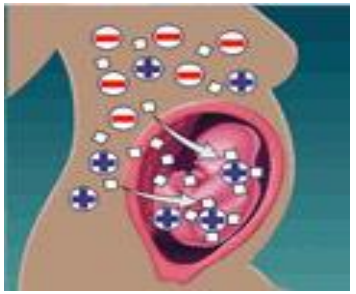
Выполнила: Галымжан Арна
7/103гр.
Проверила: Жумагали О.М.

Молекулярная основа экспрессии гена.

Вся наследственная информация передается от родителей к детям посредством наследования дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). **ДНК**—это линейный полимер, состоящий из пуриновых и пиримидиновых оснований, последовательность которых полностью предопределяет последовательность аминокислот любого белка, синтезируемого организмом. Четыре типа оснований ДНК организованы в группы по три; каждый триплет образует кодовое слово, или кодон, которое кодирует конкретную аминокислоту.

Классификация наследственных болезней

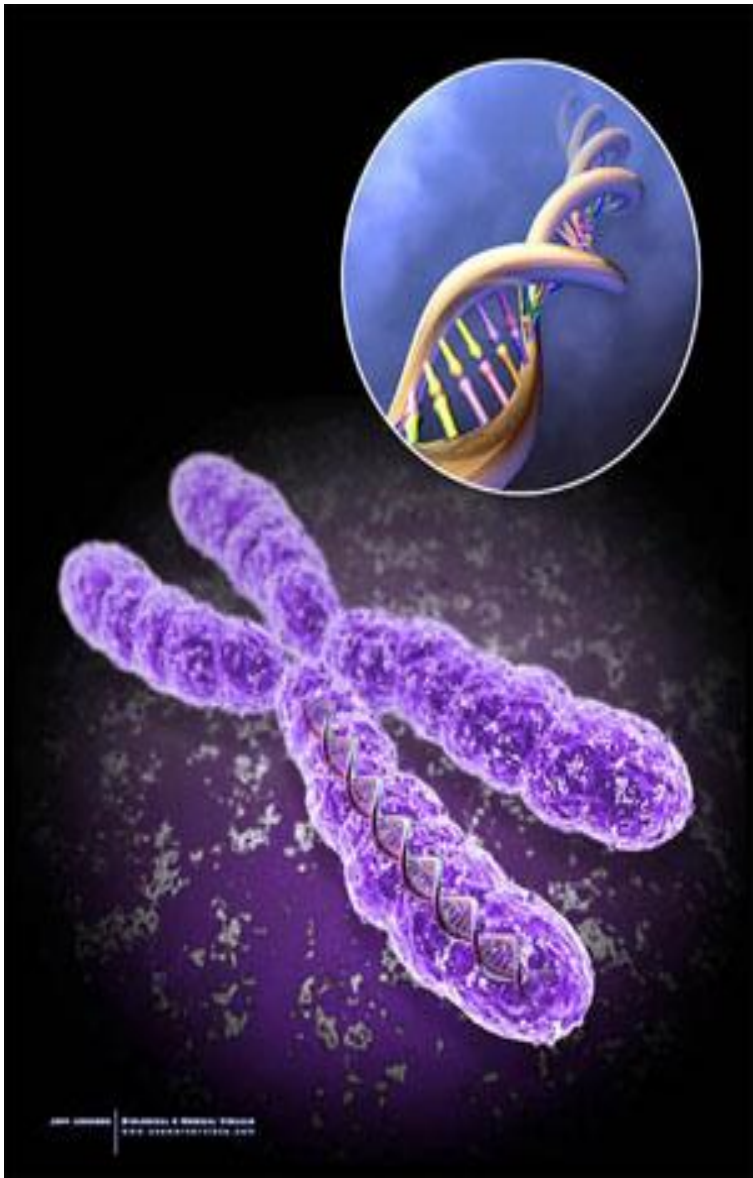
- 1. Генные болезни - обусловлены генными мутациями.
- 2. Хромосомные болезни - обусловленные хромосомными и геномными мутвциямы.
- 3. Мультифакториальные болезни (с наследственной предрасположенностью) обусловлены комбинацией генетических и негенетические факторов.
- 4. Болезни генетической несовместимости матери и плода (иммунологические реакции матери на антиген плода)
- Различают: моногенные - обусловлены действием одного гена;
- и полигенные болезни - действием нескольких генов.



Генные мутации

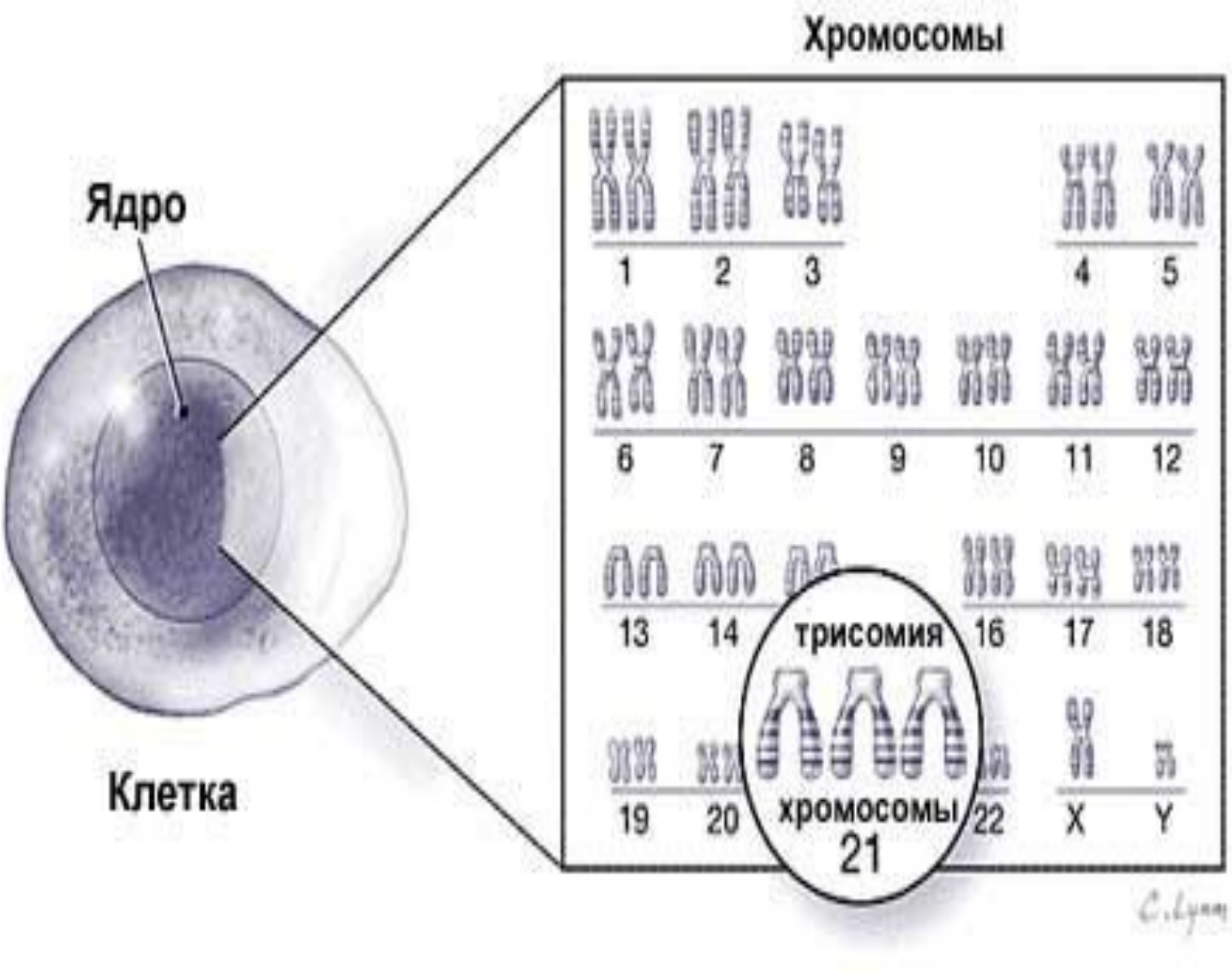
- **Генные мутации - изменение структуры ДНК гена**
- **Генные (молекулярные) болезни - это наследственные болезни, которые возникают вследствие генных мутаций.**

- **Виды генных мутаций: замены, вставки, выпадения, удвоение пар нуклеотидов.**
- **В результате нарушается строение белков**



СИНДРОМ ДАУНА (ТРИСОМИЯ 21)

- Описан в 1866 г.
- **Клинические признаки:** умственная отсталость, плоское лицо, монголоид - ный разрез глаз, открытый рот, брахицефалия, корот- кие конечности, попереч - ная ладонная складка, пороки сердца и катаракта. Частота рождения таких детей зависит от возраста матери.
- **Тип наследования:** трисомия 21
- **Популяционная частота** – 1 : 500 - 1000


Хромосомы
Ядро
Клетка
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
трисомия
16
17
18
19
20
хромосомы
21
22
X
Y

- “плоское лицо”;

- эпикантус;

- одна ладонная складка;

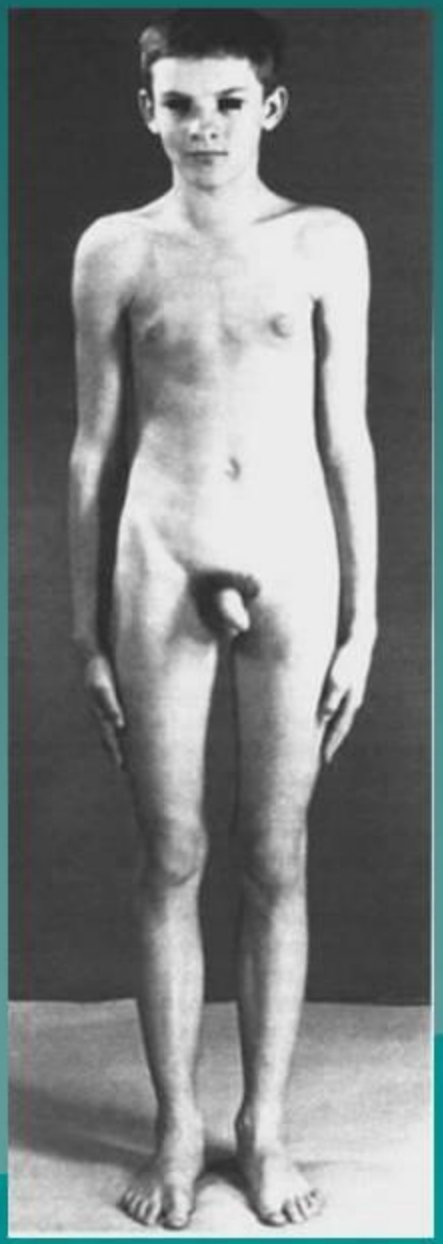
- искривление мизинца

аномальное расстояние между первым и вторым пальцами

Copyright the Lucina Foundation, all rights reserved.

СИНДРОМ КЛАЙНФЕЛЬТЕРА (47, ХХУ)

- Описан в 1942 г.
- **Клинические признаки:** высокий рост, хрупкое телосложение, гипоплазия яичек, импотенция и бесплодие, набухание молочных желез, широкий таз, поперечная ладонная складка, у взрослых наблюдается ожирение и склонность к алкоголизму, незначительное снижение умственного развития.
- **Тип наследования:** ХХУ синдром
- **Популяционная частота** – 1 : 1000 мальчиков



СИНДРОМ ШЕРЕШЕВСКОГО-ТЕРНЕРА (ХО –СИНДРОМ)

- **Клинические признаки:** низкий рост, первичная аменорея, бесплодие, стертые вторичные половые признаки, крыловидные кожные складки на шее, врожденные пороки сердца, гипоплазия ногтей, снижение остроты зрения и слуха, поперечная ладонная склад - ка, незначительное снижение умственного развития.
- **Тип наследования:** моносомия Х-хромосомы.
- **Популяционная частота** – 2 : 10 000

Лоуренса-Муна-Барде-Бидля синдром

- Впервые описан в 1866 г. J. Laurence и R. Moon.
- Клинические признаки: жирение, гипогонадизм, умственная отсталость, пигментная дегенерация сетчатки (приводит к ночной слепоте и потере зрения), полидактилия, судороги, патология почек и пороки сердца и мозга.
- Тип наследования –АР
- Популяционная частота неизвестна/

Синдром Эдвардса – трисомия 18

Гипогенитализм у мальчика (криптохизм, гипоспадия)

- Клинические признаки: задержка пренатального развития, множественные пороки развития черепа (маленькая нижняя челюсть, узкие глаза), сердца, половой и пищеварительной системы, спинномозговая грыжа, расщелина губы, сращение или кисты почек.
- Тип наследования – трисомия 18.
- Популяционная частота: 1 : 5000

Синдром Паскуалини или изолированный дефицит лютропина.

- Это врожденное заболевание, характеризующееся недостаточной выработкой лютеотропного гормона гипофиза, в результате чего недостаточно производится тестостерона в яичках и возникает недостаточность мужских половых желез (**гипогонадизм).** Это сопровождается снижением подвижности сперматозоидов, уменьшением объема спермы, нарушением биохимического состава спермы, нежизнеспособностью сперматозоидов.
- Рост пациентов высокий, пропорции тела евнухоидные, недоразвиты яички и половой член, оволосение на теле скудное. Бесплодие наблюдается в большинстве случаев.
- **Диагноз при синдроме Паскуалини** устанавливается по характерному внешнему виду больных, нарушениям половой функции, снижению в крови количества лютропина, тестостерона, при нормальном содержании фоллитропина. Генетическое исследование не выявляет отклонений от нормы.

ДНК - диагностика

Изучает непосредственную причину заболевания

Наиболее адекватная и точная диагностика

Возможна даже в тех случаях, когда неизвестен ген, ответственный за заболевание

Типы ДНК- диагностики

ПРЯМАЯ

Определение мутации, являющейся непосредственной причиной болезни

КОСВЕННАЯ

Определение хромосомы, несущей поврежденный ген при семейном анализе

Методы прямой ДНК-диагностики:

- Количественная флюоресцентная ПЦР.
- Real-time ПЦР.
- Анализ кривой плавления
- MLPA – анализ (количественная лигазная реакция)
- Ресеквенирование

ПЦР

- ПЦР лежит в основе ДНК-диагностики любых наследственных заболеваний. С помощью ПЦР можно непосредственно исследовать места локализации предполагаемых мутаций или полиморфных сайтов, а также изучать наличие любых других специфических особенностей ДНК.

Схема проведения исследования

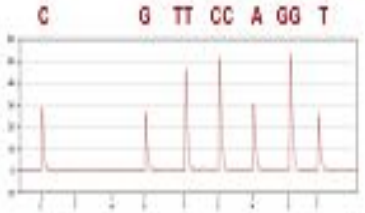
1 час	2 часа	15 минут	15 минут	10 минут
Выделение ДНК	Постановка ПЦР	Получение одноцепочечной ДНК	Проведение секвенирования	Анализ результатов исследования

Источник:
цельная кровь
или соскоб со щеки

MAXYGENE
Therm - 1000

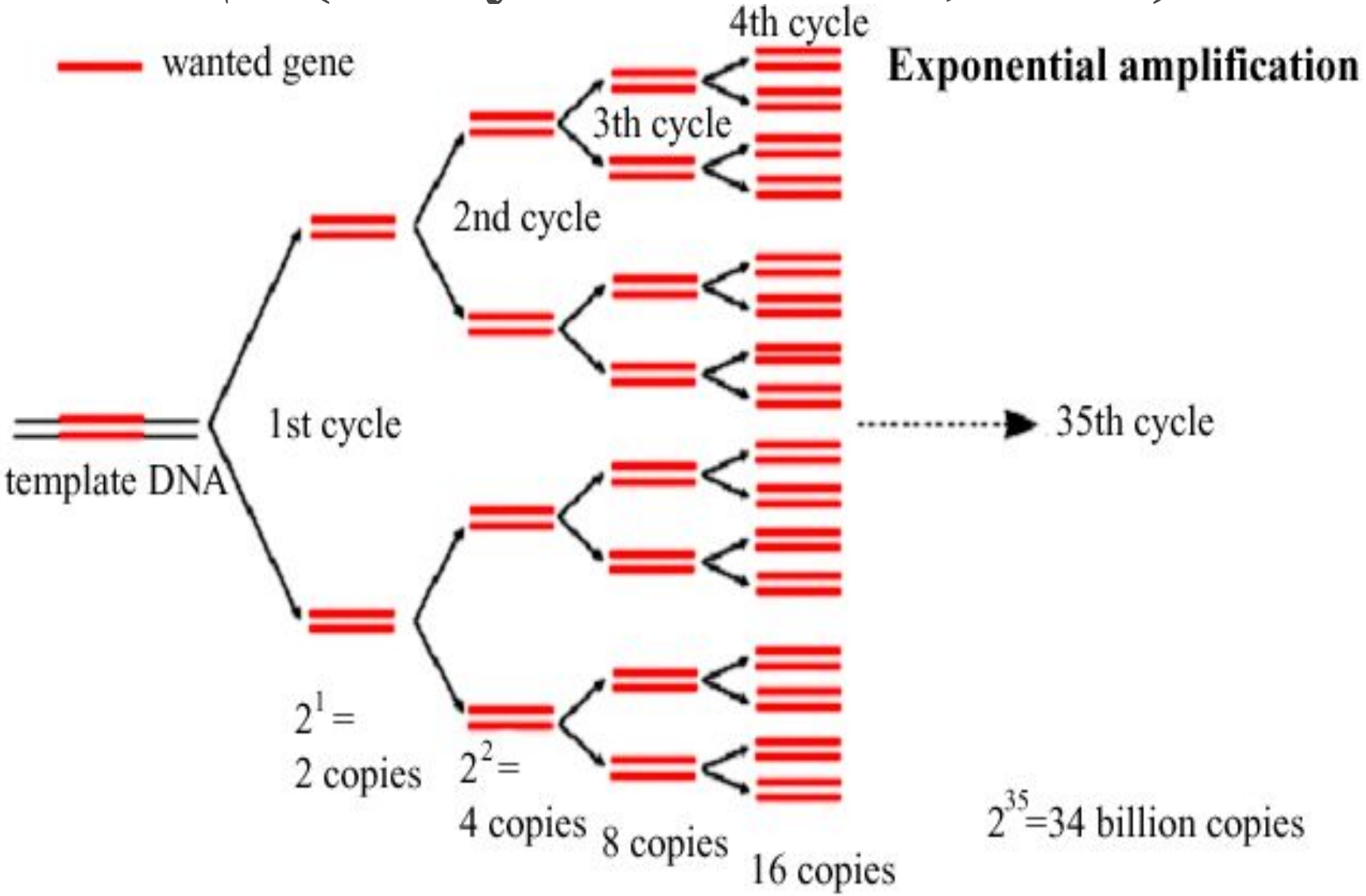
PyroMark Q24 Vacuum
Workstation

PyroMark Q24



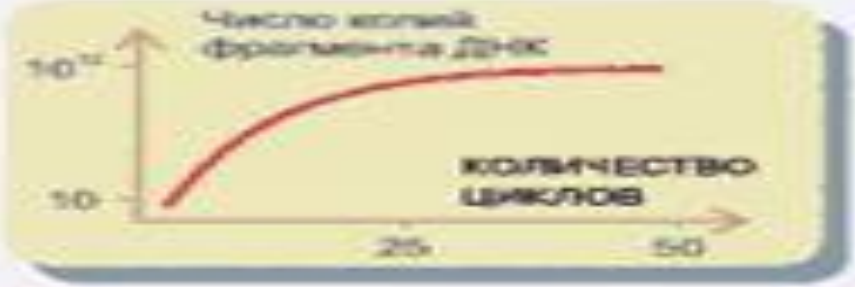
PyroMark Q24
Software

Схема удвоения фрагментов ДНК в ПЦР (Andy Vierstraete, 2001)



1. Выделение ДНК

2. Амплификация



3. Детекция в агарозном геле

ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ

ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ

ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ ОБРАЗЦЫ

ОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ ОБРАЗЦЫ

Количественная флуоресцентная ПЦР (QF PCR)

- Анализ дозы гена
- Анализ экспрессии генов

Метод флуоресцентной количественной полимеразной цепной реакции (quantitative Fluorescent PCR – QF-PCR) заключается в амплификации коротких тандемных повторов ДНК (STR), расположенных на исследуемой хромосоме или сцепленных с исследуемым геном. Использование в ПЦР специальной флуоресцентной метки позволяет идентифицировать количество аллелей STR-маркеров при разделении на капиллярном электрофорезе и точно определять дозу каждого фрагмента ДНК гена или хромосомы, для этого в реакционную смесь добавляют специфический флюоресцентный зонд и далее через 30-40 циклов определяют уровень флюоресценции. Интерпретация результатов проводится с учетом количества пиков на электрофореграмме и их относительной высоты.

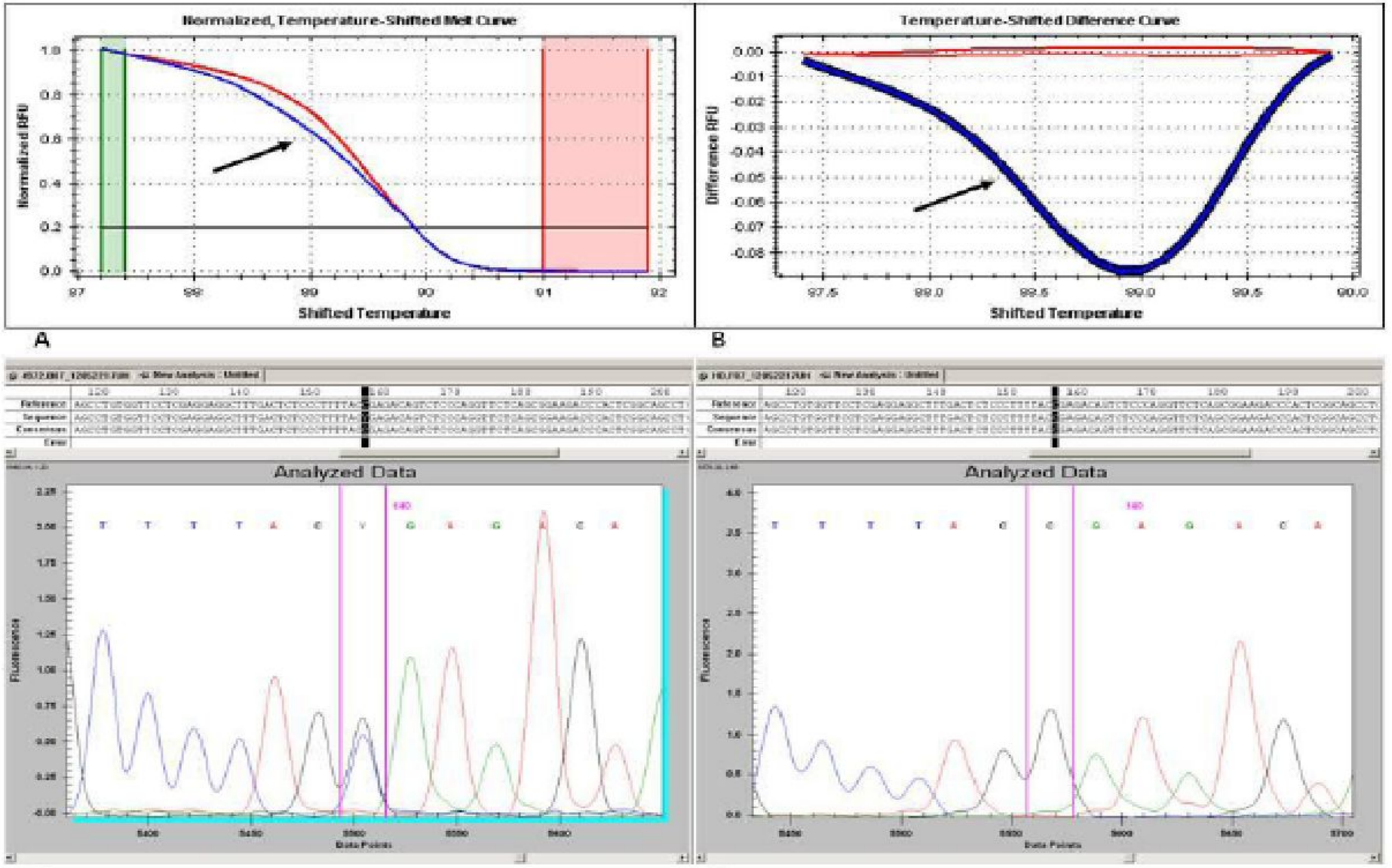
Real-time ПЦР

- Анализ дозы гена (делеции/дупликации)
- Определение точковых замен
- Анализ экспрессии генов

  - онкологические исследования
  - трисомии
  - анализ плодного материала по кровотоку матери
  - генотерапия

Анализ кривой плавления

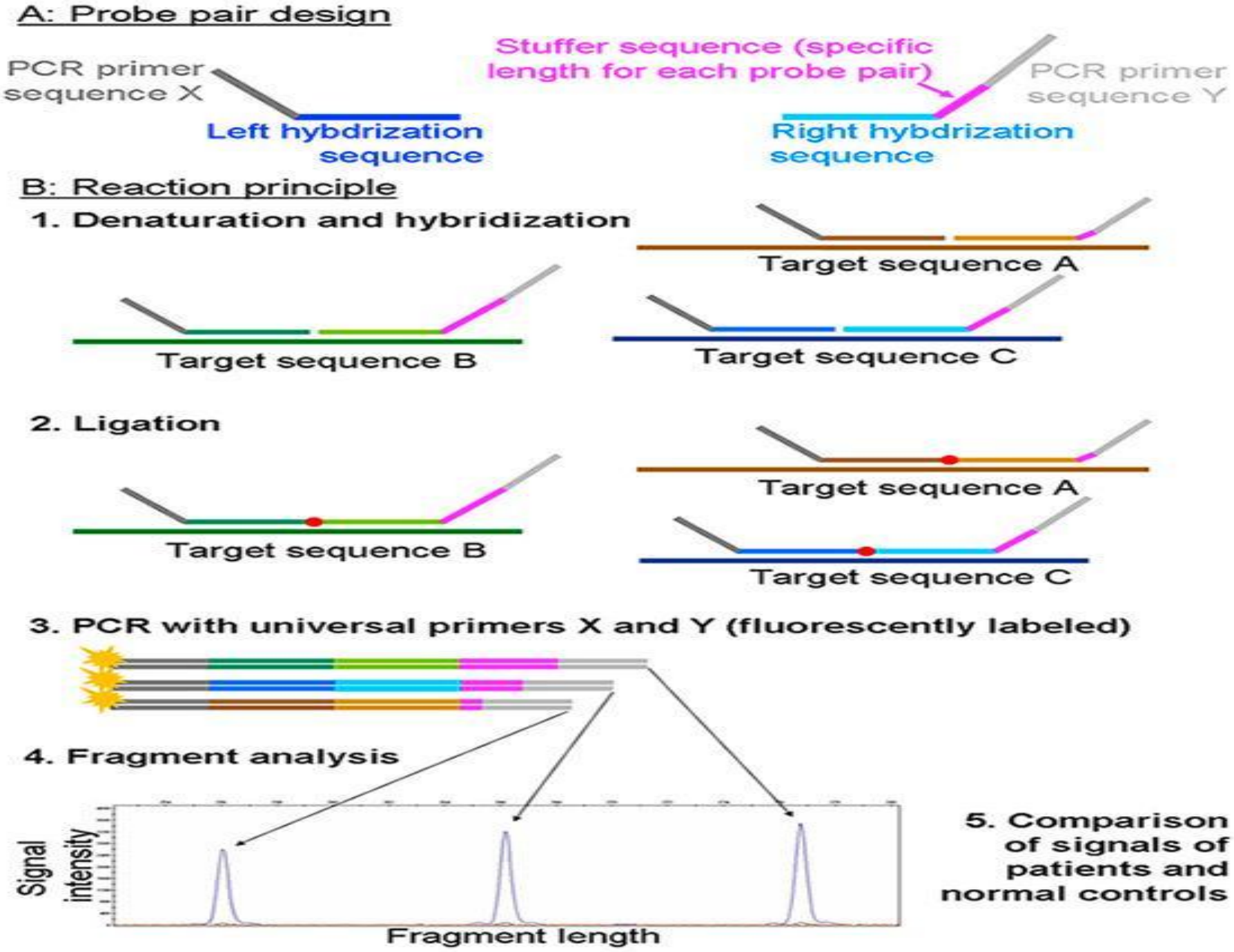
- Позволяет провести оценку качества реакции, поскольку увеличение флюорисценции может быть связано как с накоплением специфического продукта, так и неспецифического (праймеры-димеры, шмер).
- Для этого после окончания ПЦР реакционную смесь нагревают и непрерывно измеряют флюоресценцию. По достижении температуры плавления продукта амплификации флюоресценция резко снижается. Температура плавления зависит от нуклеотидного состава, поэтому путем сравнения кривых плавления изучаемых образцов с таковыми в образцах, имеющих известную последовательность, можно выявить кандидатов на дальнейшее секвенирование.



Стрелкой показана кривая плавления образца с мутацией; C – мутация TSC1c.1525C>T; D – нормальная нуклеотидная последовательность TSC1

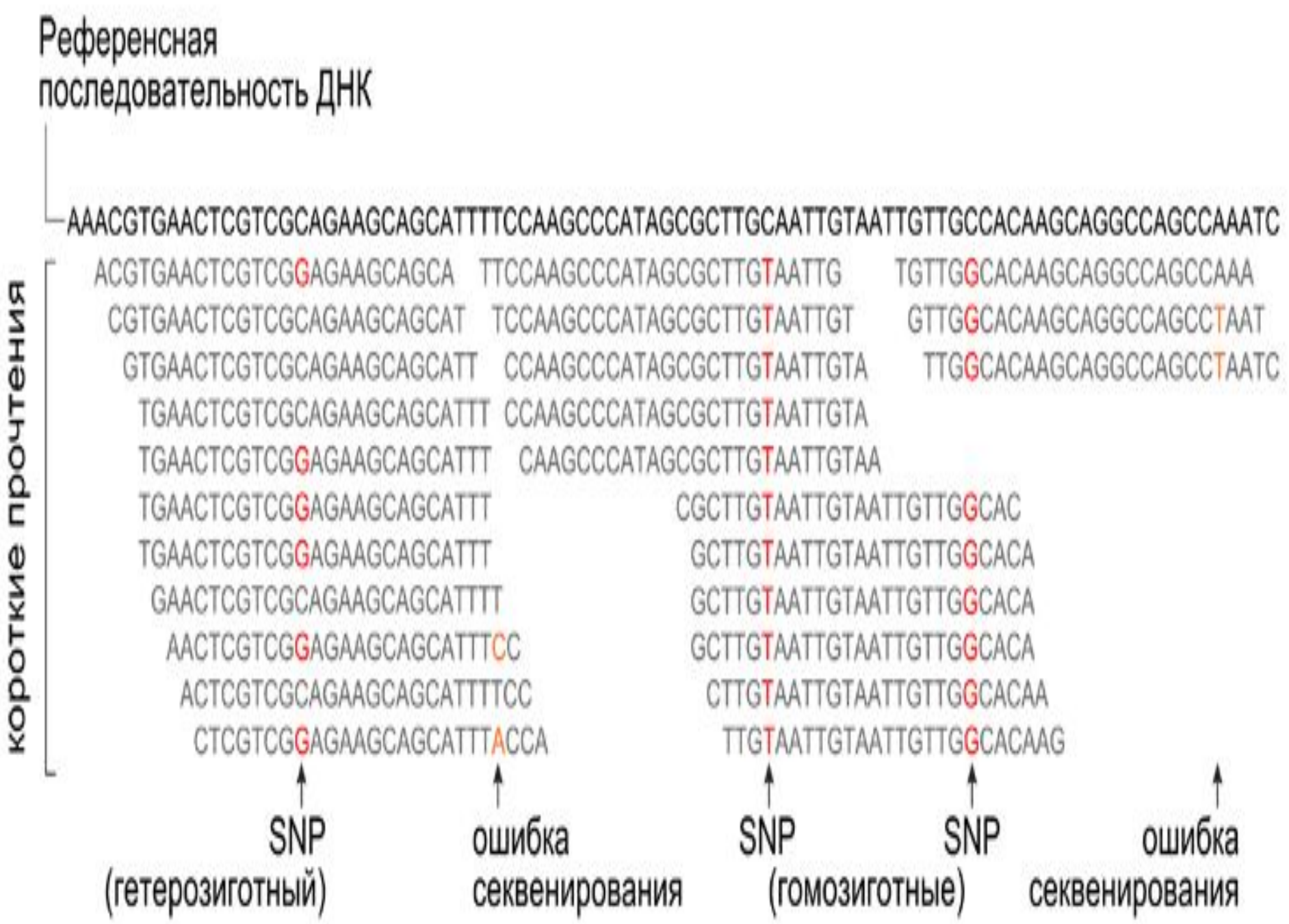
MLPA – анализ (мультиплексная амплификация лигазно-связаных проб)

- Определение числа копий фрагмента (дозы гена)
  - Носительство Х-сцепленных делеций для женщин
  - Аутосомные делеции/дупликации
  - Микроделеционные синдромы
  - Анеуплоидии
  - Определение числа копий гена/псевдогена
- Анализ однонуклеотидных замен (SNP)


A: Probe pair design
PCR primer sequence X
Left hybdrization sequence
Stuffer sequence (specific length for each probe pair)
PCR primer sequence Y
Right hybdrization sequence
B: Reaction principle
1. Denaturation and hybridization
Target sequence A
Target sequence B
Target sequence C
2. Ligation
Target sequence A
Target sequence B
Target sequence C
3. PCR with universal primers X and Y (fluorescently labeled)
4. Fragment analysis
Signal intensity
Fragment length
5. Comparison of signals of patients and normal controls

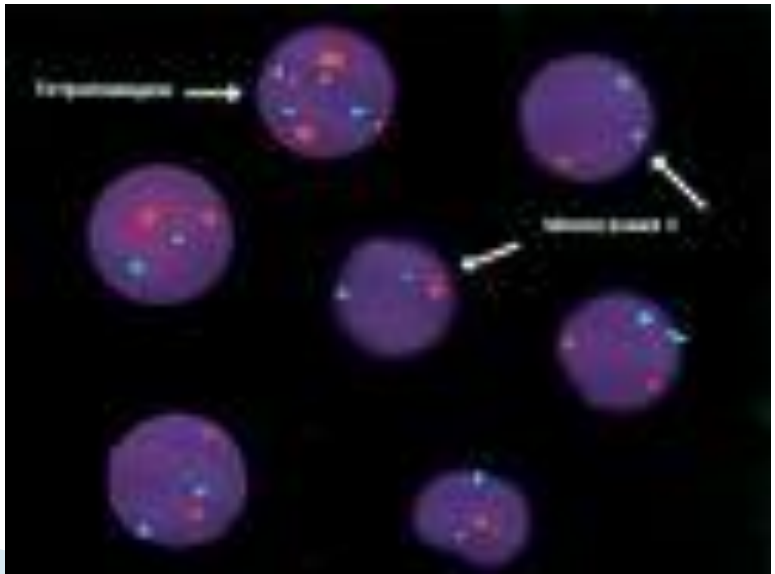
Ресеквенирование

- Повторное секвенирование генома с целью выявления разнообразных структурных вариаций (однонуклеотидных полиморфизмов, или «снипов», а также инсерций, делеций, повторов, инверсий, транслокаций). В отличие от секвенирования неизвестных последовательностей *de novo*, при котором прочтения соотносятся друг с другом и собираются в контиги, для ре-секвенирования достаточно просто «картировать» прочтения на референсную последовательность, уже имеющуюся под рукой. Снипы выглядят как однонуклеотидные замены в коротких прочтениях, при этом количество прочтений с заменой говорит о состоянии аллеля — гомозиготном (все прочтения с заменой) или гетерозиготном (половина прочтений с заменой).


Референсная
последовательность ДНК
AAACGTGAACTCGTCGCAGAAGCAGCATTTTCCAAGCCCATAGCGCTTGCAATTGTAATTGTTGCCACAAGCAGGCCAGCCAAATC
короткие прочтения
ACGTGAACTCGTCGGAGAAGCAGCA
CGTGAACTCGTCGCAGAAGCAGCAT
GTGAACTCGTCGCAGAAGCAGCATT
TGAACTCGTCGCAGAAGCAGCATTT
TGAACTCGTCGGAGAAGCAGCATTT
TGAACTCGTCGGAGAAGCAGCATTT
TGAACTCGTCGGAGAAGCAGCATTT
GAACTCGTCGCAGAAGCAGCATTTT
AACTCGTCGGAGAAGCAGCATTTCC
ACTCGTCGCAGAAGCAGCATTTTCC
CTCGTCGGAGAAGCAGCATTTACCA
TTCCAAGCCCATAGCGCTTGTAATTG
TCCAAGCCCATAGCGCTTGTAATTGT
CCAAGCCCATAGCGCTTGTAATTGTA
CCAAGCCCATAGCGCTTGTAATTGTA
CAAGCCCATAGCGCTTGTAATTGTAA
CGCTTGTAATTGTAATTGTTGGCAC
GCTTGTAATTGTAATTGTTGGCACA
GCTTGTAATTGTAATTGTTGGCACA
GCTTGTAATTGTAATTGTTGGCACA
CTTGTAATTGTAATTGTTGGCACAA
TTGTAATTGTAATTGTTGGCACAAG
TGTTGGCACAAGCAGGCCAGCCAAA
GTTGGCACAAGCAGGCCAGCCTAAT
TTGGCACAAGCAGGCCAGCCTAATC
SNP
(гетерозиготный)
ошибка
секвенирования
SNP
(гомозиготные)
SNP
ошибка
секвенирования

Цитогенетический метод

- Основным методом исследования хромосом человека после рождения является напивмикрометод, при котором анализируют лимфоциты периферической крови после предварительного культивирования. Культивирования происходит в специально предназначенном инкубаторе (37 ° С, 5% С02) в течение 50 или 69 часов (срок первого и второго митотических делений соответственно).



Генеалогический метод -

метод составления и анализа родословных.

Типи наследования генных заболеваний:

1) аутосомно-доминантный;
2) аутосомно-рецессивный;
3) Х-сцепленный доминантный;
4) Х-сцепленный рецессивный;
5) Y-сцепленный тип

Тест – системы для анализа генетического профиля позволяют определить предрасположенность пациента к:

- Сердечно - сосудистым заболеваниям
- Нарушению липидного обмена
- Невынашиванию беременности
- Предрасположенности к сахарному диабету 1,2 типов
- Риску рака молочной железы и яичников
- Патологии системы свертывания крови
- Предрасположенности к развитию ожирения, остеопороза
- Проведение фармакогенетических исследований

- Генетические тесты позволят предотвратить случаи невынашивания и осложнений протекания беременности, выявить случаи бесплодия

Заключение

- Заключение, полученное с помощью ДНК-диагностики, дает оценку вероятности возникновения заболеваний, ассоциированных с теми или иными мутациями/полиморфизмами и профилактические и лечебно-диагностические рекомендации для пациента и лечащего врача.

Литературы

- Харрисон – Внутренние болезни
- Н. П. Бочков “Клиническая генетика”-2011
- Сергеева Н.А. Базовый проект “Лаборатория ДНК – диагностики Школы биомедицины ДВФУ”
- Перевод с английского под редакцией проф. В.В. Фадеева “Диагностика и лечение в эндокринологии ”-2010

Спасибо за внимание!