

*Основные методы
исследования генетики
человека*

1. **Генеалогический метод** (*конец XIX века, Ф. Гальтон*)
2. **Близнецовый метод** (*Ф.Гальтон, 1876 г.*)
3. **Биохимические методы;**
4. **Дерматоглифический метод**
5. **Цитогенетический метод;**
6. **Популяционно-статистический метод;**
7. **Молекулярно-генетические методы**
(методы анализа ДНК).

Клинико-генеалогический метод

позволяет установить:

- 1) является ли данный признак наследственным;**
- 2) тип и характер наследования;**
- 3) зиготность лиц родословной;**
- 4) пенетрантность гена;**
- 5) вероятность рождения ребенка с данной наследственной патологией**

Норма реакции – границы варьирования признака, пределы модификационной изменчивости, которые определяются генотипом.

Экспрессивность – степень проявления признака.

Пенетрантность – частота проявления признака при наличии определенного генотипа.

$$П = ПВ \backslash ТВ * 100\%$$

П – пенетрантность

ПВ – практическая вероятность

ТВ – теоретическая вероятность

Этапы клинико-генеалогического метода:

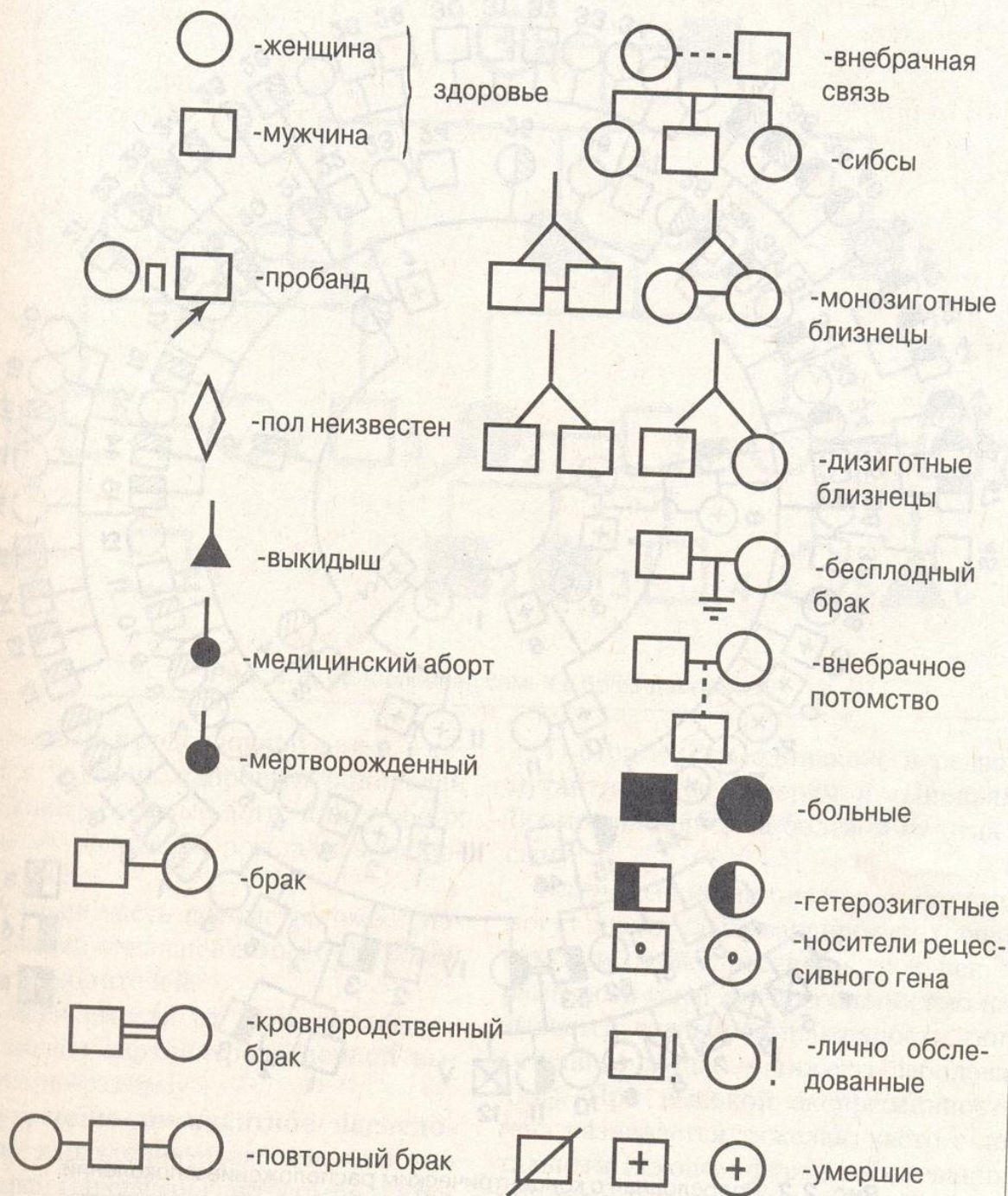
1. Сбор данных о всех родственниках обследуемого (анамнез);
2. Построение родословной;
3. Анализ родословной:
 - 3.1. *Определение, наследуемый ли данный признак;*
 - 3.2. *Определение типа наследования;*
 - 3.3. *Определение генотипов членов родословной;*
 - 3.4. *Определение вероятности проявления признаков у потомков .*

- **Родословная** – это схема, отражающая связи между членами семьи. Анализируя родословные, изучают какой-либо нормальный или (чаще) патологический признак в поколениях людей, находящихся в родственных связях.

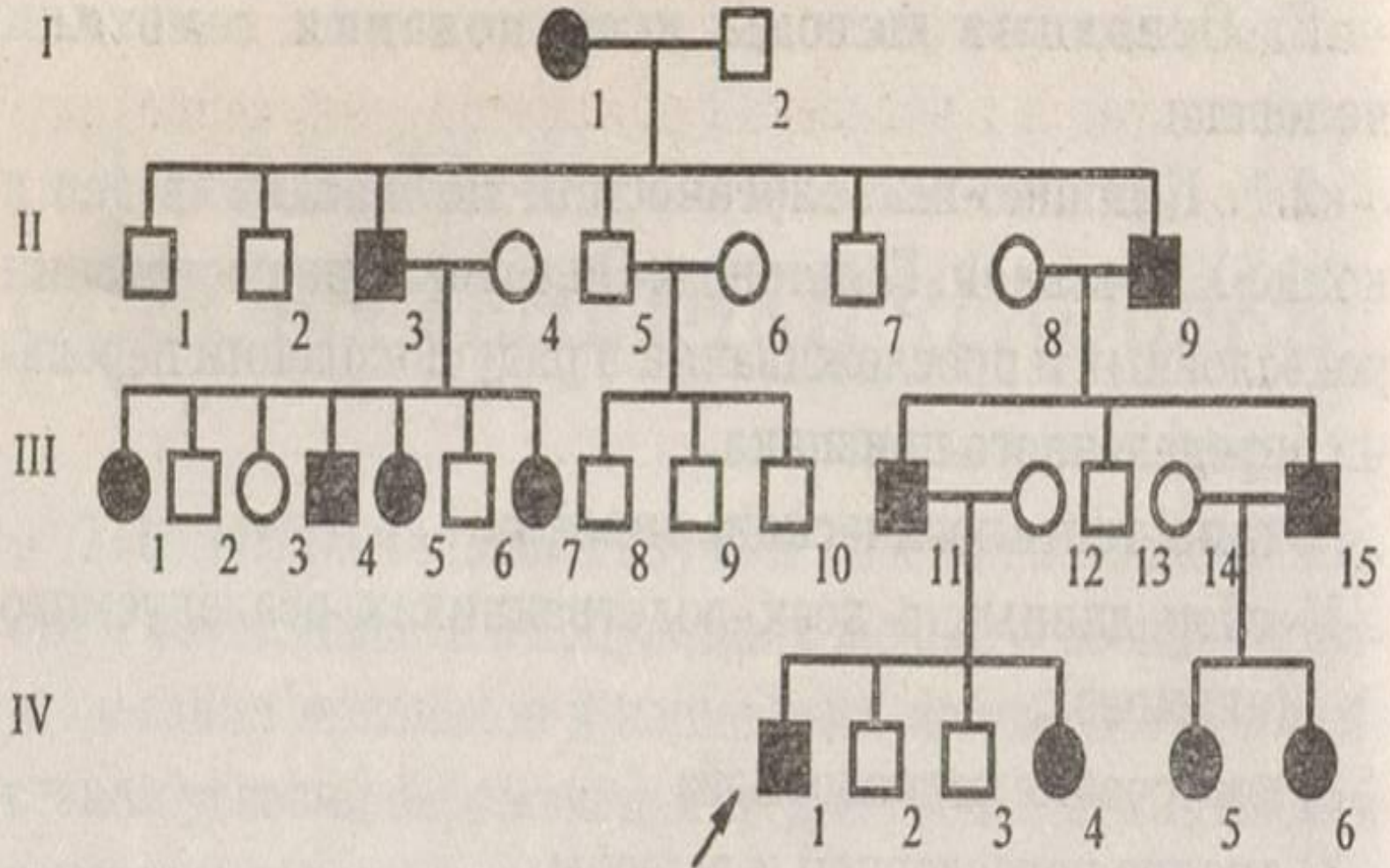
- При составлении родословных применяют стандартные обозначения.
- Персона (индивидуум), с которого начинается исследование, называется *пробандом* (если родословная составляется таким образом, что от пробанда спускаются к его потомству, то ее называют *генеалогическим древом*).
- Потомок брачной пары называется *сиблингом*, родные братья и сестры – *сибсами*, кузены – *двоюродными сибсами* и т.д.
- Потомки, у которых имеется общая мать (но разные отцы), называются *единоутробными*, а потомки, у которых имеется общий отец (но разные матери) – *единокровными*; если же в семье имеются дети от разных браков, причем, у них нет общих предков (например, ребенок от первого брака матери и ребенок от первого брака отца), то их называют *сводными*.

- **Каждый член родословной имеет свой шифр, состоящий из римской цифры и арабской, обозначающих соответственно номер поколения и номер индивидуума при нумерации поколений последовательно слева направо.**
- **При родословной должна быть легенда, т. е. пояснение к принятым обозначениям.**

Условные обозначения, принятые при составлении родословных:



ПРИМЕР РОДОСЛОВНОЙ С АУТОСОМНО-ДОМИНАНТНЫМ ЗАБОЛЕВАНИЕМ



(Полидактилия, веснушки, курчавые волосы, карие глаза..)

БЛИЗНЕЦОВЫЙ МЕТОД

- Близнецы – это два и более ребенка, зачатые и рожденные одной матерью почти одновременно.
- Термин «близнецы» используется по отношению к человеку и тем млекопитающим, у которых в норме рождается один ребенок (детеныш).
Различают однояйцевых и разнояйцевых близнецов.

Близнецовый метод

Монозиготные (однойяйцевые) близнецы – развиваются из одной оплодотворенной яйцеклетки и имеют совершенно одинаковый генотип.

Дизиготные (двухяйцевые) близнецы – развиваются из нескольких оплодотворенных яйцеклеток и имеют разный генотип.

- Частота рождения близнецов в относительных цифрах невелика и составляет около 1%, из них 1/3 приходится на монозиготных близнецов. Однако, в пересчете на общую численность населения Земли в мире проживает свыше 30 млн. разнояйцевых и 15 млн. однояйцевых близнецов.

При использовании близнецового метода проводится сравнение:

- 1) Монозиготных (однойяйцевых) близнецов (МБ) между собой;
- 2) Дизиготных (разнойяйцевых) близнецов (ДБ) между собой;
- 3) Монозиготных с дизиготными близнецами;
- 4) Данных анализа близнецовой выборки с общей популяцией

Конкордантность – процент сходства группы близнецов по изучаемому признаку.

Дискордантность – процент различия группы близнецов по изучаемому признаку

Для оценки роли наследственности и среды в развитии того или иного признака используют **формулу**

Хольцингера:

$$H = \frac{KMБ\% - KДБ\%}{100\% - KДБ\%}$$

где **H** – **доля наследственности;**

KMБ% - конкордантность монозиготных близнецов;

KДБ% - конкордантность дизиготных близнецов.

Влияние среды на развитие признака (**E**) вычисляется по формуле:

$$E = 100\% - H$$

Признаки	Конкордантность (%)	
	МБ	ДБ
Нормальные:		
Группа крови АВО	100	46
Цвет глаз	99,5	28
Цвет волос	97	23
Папиллярные узоры	92	40
Патологические		
Косолапость	32	3
«Заячья губа»	33	5
Полиомиелит	36	6
Бронхиальная астма	19	4,8
Корь	98	94
Туберкулез	37	15
Эпилепсия	67	3
Шизофрения	70	13
Гипертония	26,2	10

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

- Термин цитогенетика введен в 1903 г. В. Саттоном.
- **Цитогенетика** – область науки, изучающая структуру и функции хромосом
- Цитогенетические методы предназначены для изучения структуры хромосомного набора или отдельных хромосом
- Объектом цитогенетических исследований могут быть делящиеся соматические, мейотические и интерфазные клетки

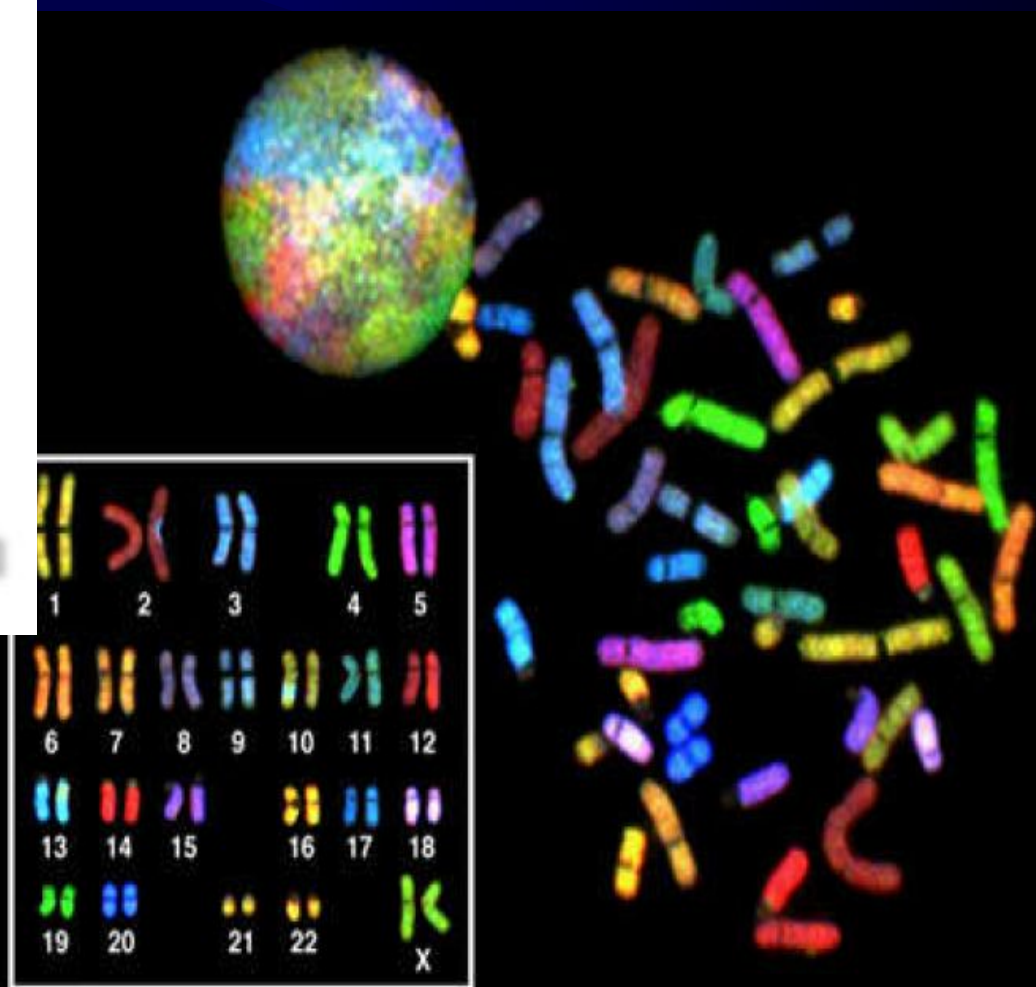
ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

- **Световая микроскопия**
- **Электронная микроскопия**
- **Конфокальная микроскопия**
- **Люминесцентная микроскопия**
- **Флуоресцентная микроскопия**

Цитогенетические исследования соматических клеток

- Получение препаратов митотических хромосом
- Окраска препаратов (простые, дифференциальные и флуоресцентные)
- Молекулярно-цитогенетические методы – метод цветной гибридизации *in situ* (FISH)

Спектральное кариотипирование



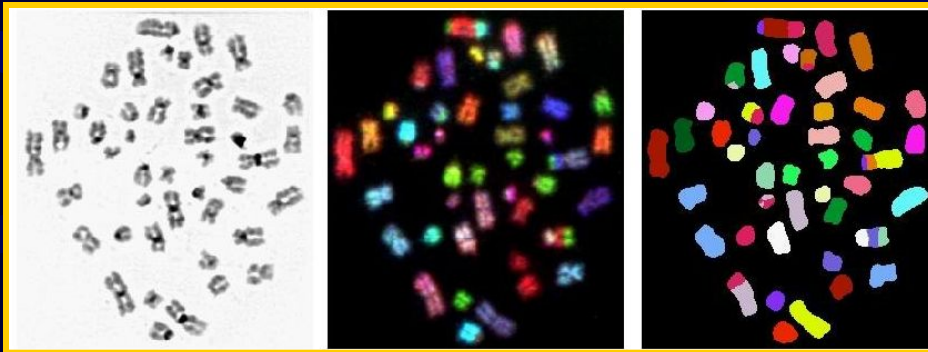
Многоцветная FISH

Основа многоцветной FISH:

Использование двух и более специфичных ДНК-проб

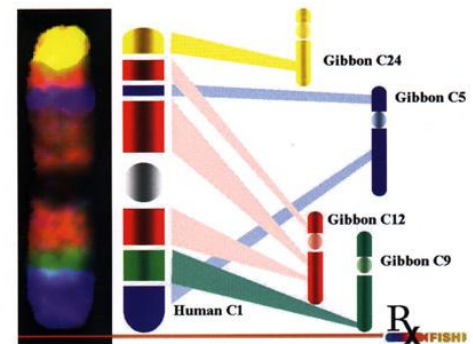
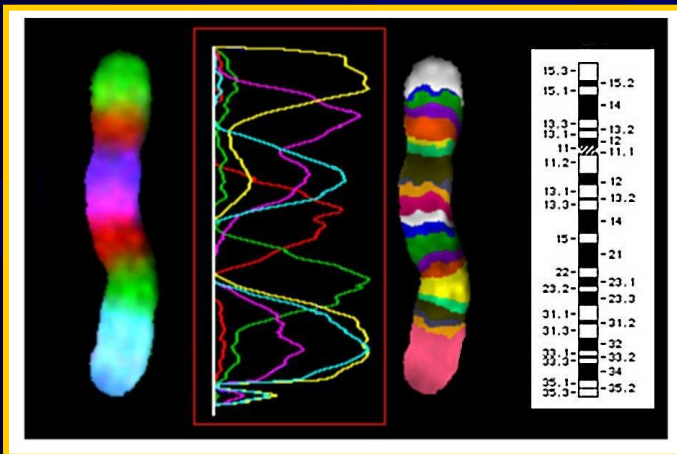
Анализ относительной пространственной локализации и интенсивностей сигналов

SKY

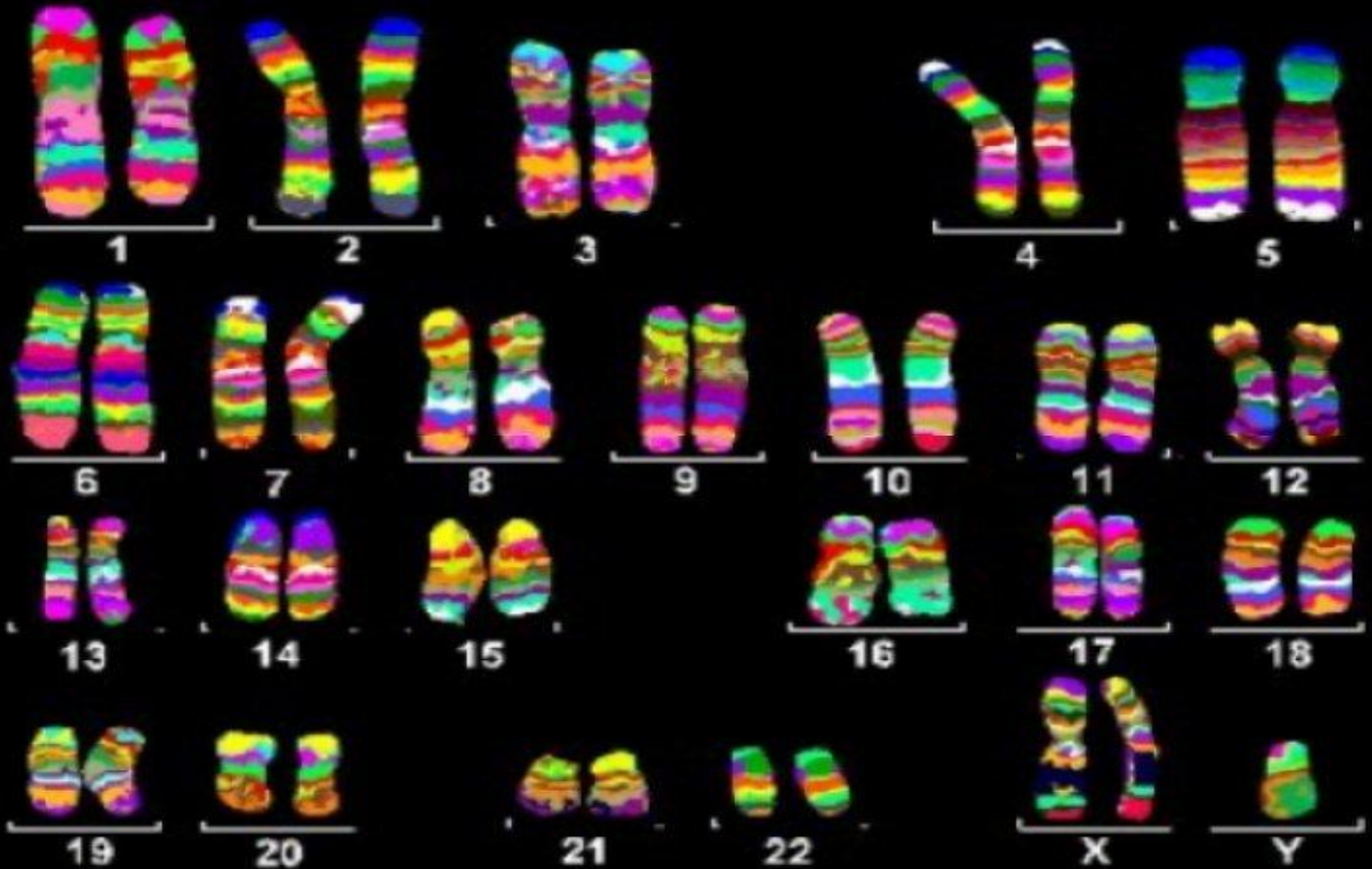


Rx (FISH)
color chromosome analysis

MCB



MultiColor Banding



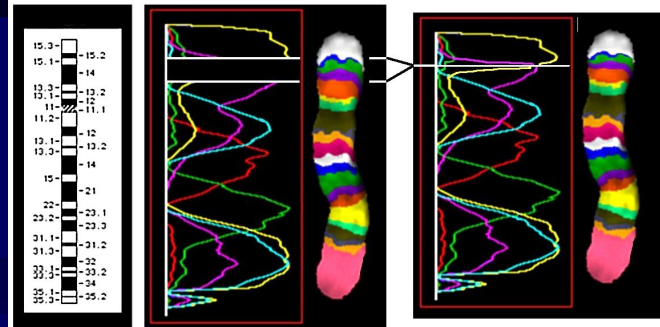
**Структурные хромосомные
перестройки
(МСВ, проблемы)**

**Делеция – ложноотрица-
тельный результат.**

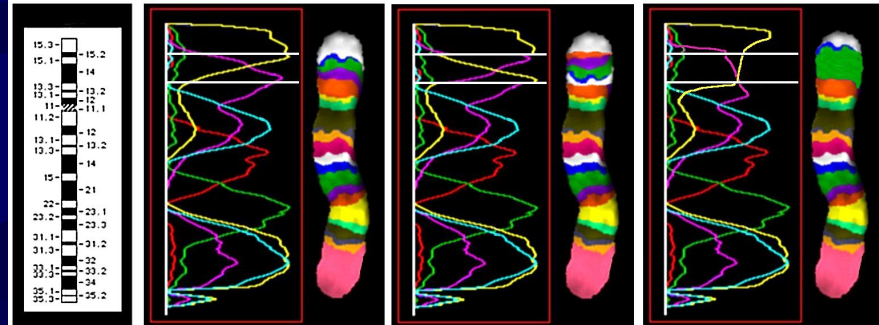
**Инверсия – имитация
комбинации делеции с
дупликацией.**

**Дупликация – имитация
комбинации делеции с
дупликацией.**

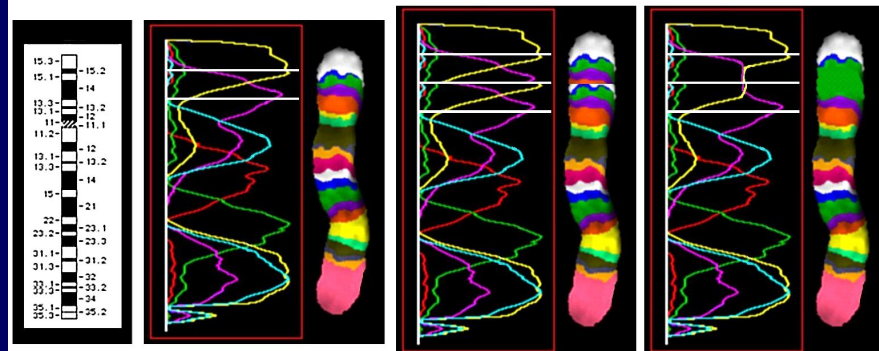
Делеция 5p15.1-p14



Инверсия 5p15.1-p14



Дупликация 5p15.1-p14



Показания для проведения цитогенетических исследований

- Подозрение на хромосомную болезнь по клинической симптоматике (для подтверждения диагноза)
- Наличие у ребенка множественных ВПР, не относящихся к генному синдрому
- Многократные спонтанные аборт, мертворождения или рождения детей с ВПР
- Нарушение репродуктивной функции неясного генеза у женщин и мужчин
- Существенная задержка умственного и физического развития у ребенка

- **Пренатальная диагностика (по возрасту, в связи с наличием транслокации у родителей, при рождении предыдущего ребенка с хромосомной болезнью)**
- **Подозрение на синдромы, характеризующиеся хромосомной нестабильностью**
- **Лейкозы (для дифференциальной диагностики, оценки эффективности лечения и прогноза лечения)**
- **Оценка мутагенных воздействий**

БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

- **Электрофорез белков**
- **Хроматография**
- **Спектроскопия**
- **Жидкостная хроматография**
- **Масс-спектрометрия**
- **Магнитная резонансная спектроскопия**

- **Объекты** биохимической диагностики – моча, пот, плазма и сыворотка крови, форменные элементы крови, культуры клеток
- **Программы** биохимической диагностики – массовые и селективные
- **Массовые** просеивающие программы используются для диагностики ФКУ, АГС, врожденного гипотиреоза, ВПР нервной трубки и болезни Дауна
 - **Селективные** - для диагностики ФКУ, гемоглобинопатий, нарушений обмена аминокислот и органических кислот

Показания для применения биохимических методов диагностики

- **У новорожденных** - судороги, кома, рвота, гипотония, желтуха, специфический запах пота и мочи, остановка роста
- **У детей** – задержка умственного и физического развития, потеря приобретенных функций, специфическая для какого-либо НЗ клиническая картина
- **У взрослых** – для диагностики НЗ и гетерозиготных состояний (недостаточность альфа 1-антитрипсина, Г-6-ФД)

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

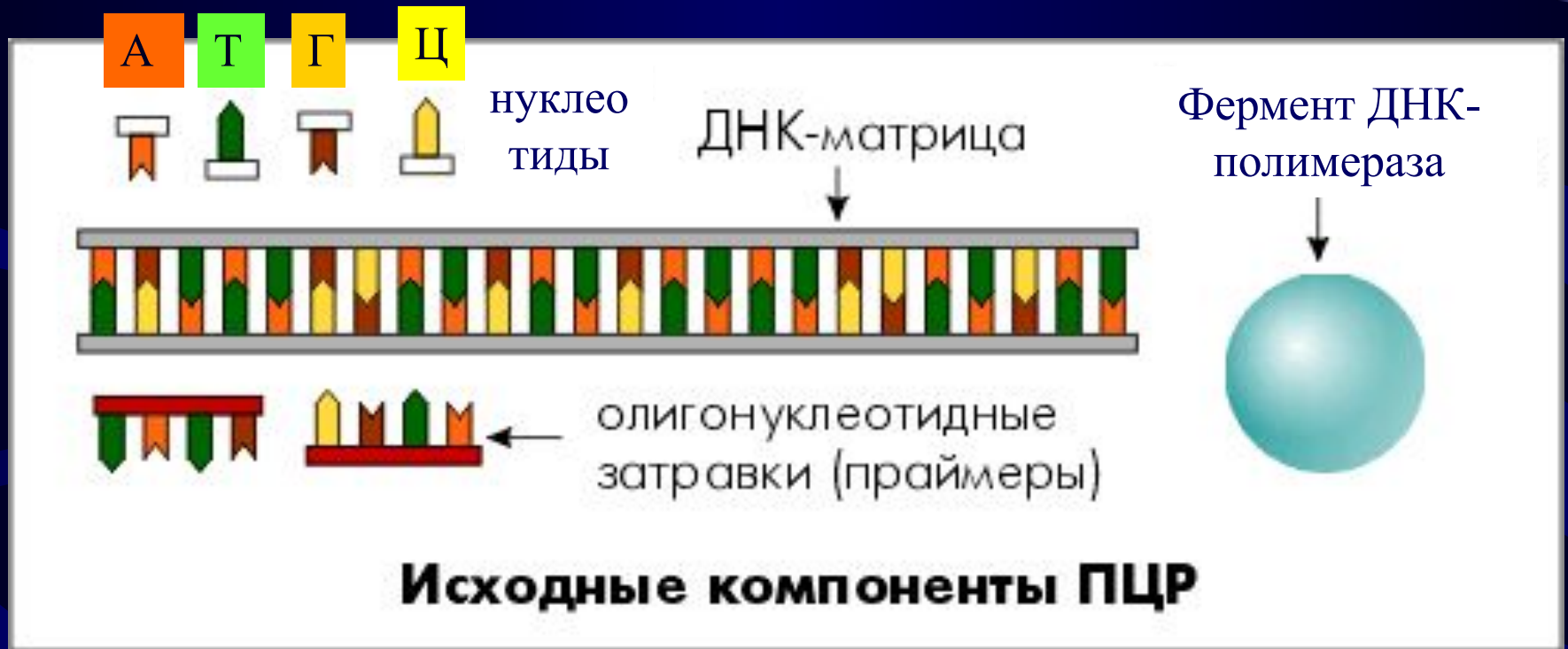
- ПЦР
- ПДРФ-анализ
- Секвенирование
- Блот-гибридизация по Саузерну
- Гибридизационные биочипы
- Полногеномный анализ

Метод ПЦР был разработан в 1983 г. Кэрри Мюллисом.

В России получил развитие с 1989 г.

Полимеразная цепная реакция синтеза ДНК – 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 ПЦР лежит репликация ДНК – комплементарное достраивание ДНК по матрице с помощью фермента ДНК-полимеразы.



*** Праймеры строго комплементарны правой и левой границам специфического фрагмента ДНК и синтез цепи протекает только между ними.**

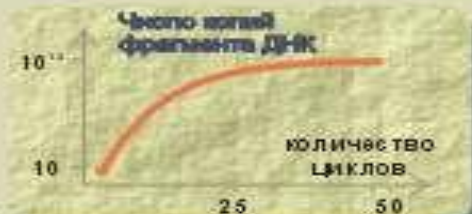
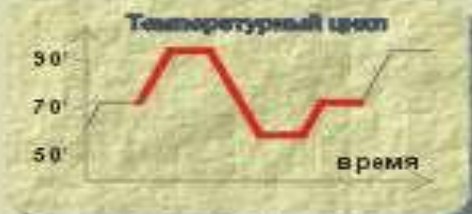
Основные этапы ПЦР:

Стадии метода ПЦР

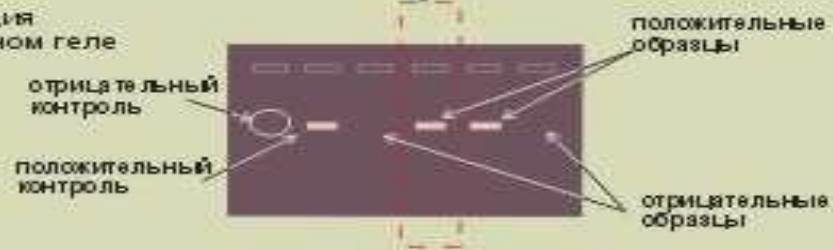
1. Выделение ДНК



2. Амплификация



3. Детекция в агарозном геле



Мультиплексная ПЦР

Анализ делеций у больных

мышечной дистрофией

Дюшенна:

44

51

43

45

50

53

47

42

60

52

19

49

3

8

13

6

46

амплификация отдельных

экзонов в 5' и 3' "горячих"

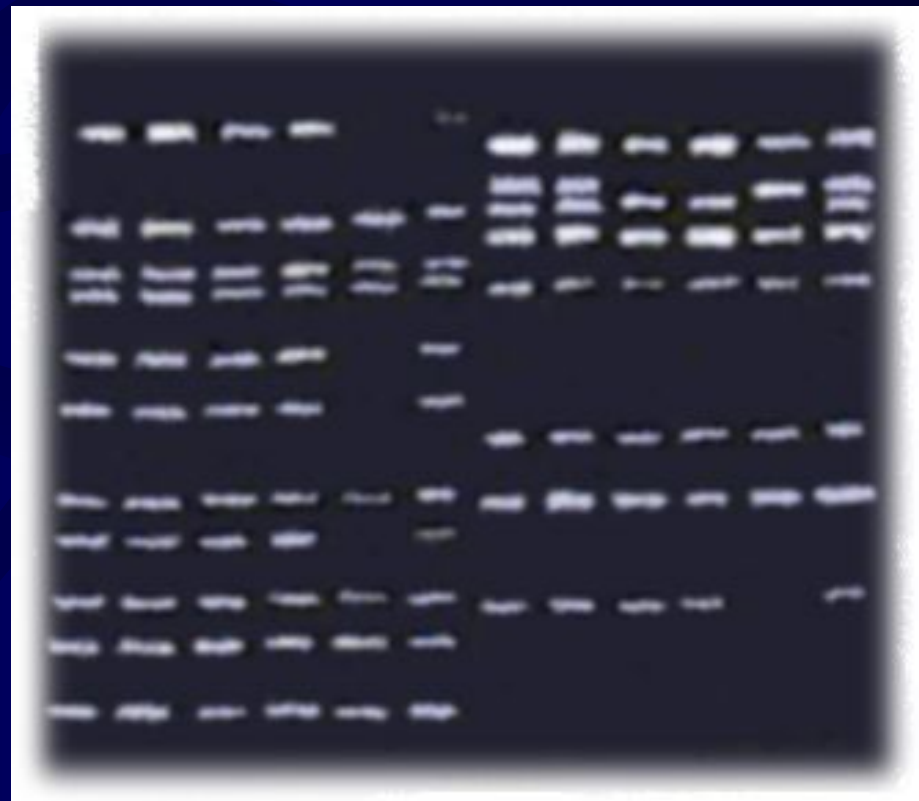
районах гена дистрофина

1-положительный контроль;

5-большой с делецией 44-50 экз.;

3,4-больные с делецией 19 экз.;

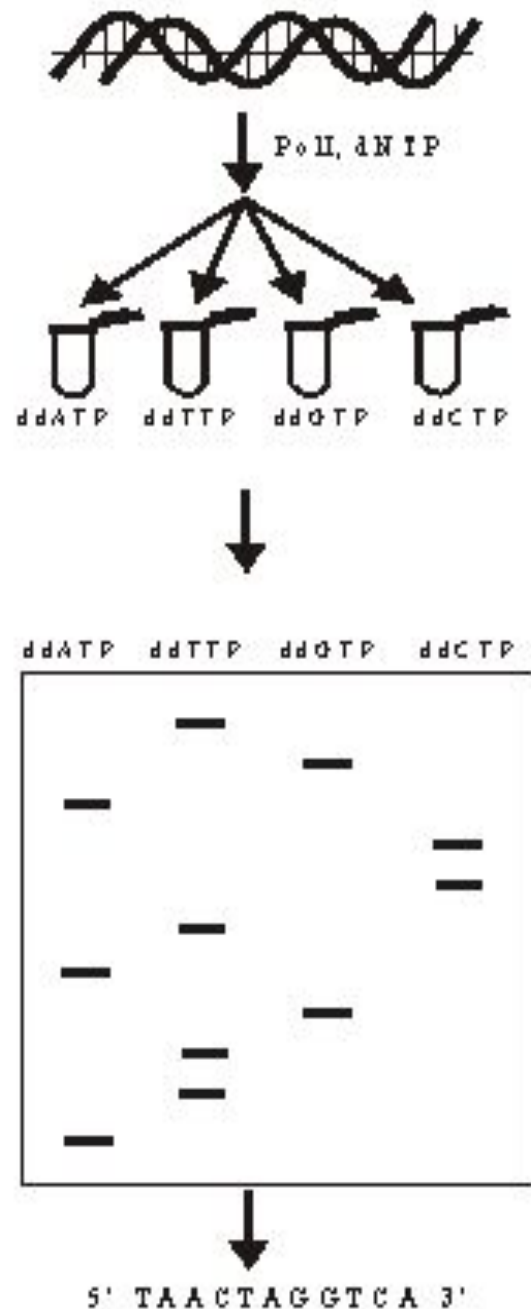
2, 6-больные, у которых делеций



1 2 3 4 5 6 1 2 3 4 5 6

Секвенирование ДНК по Сэнгеру

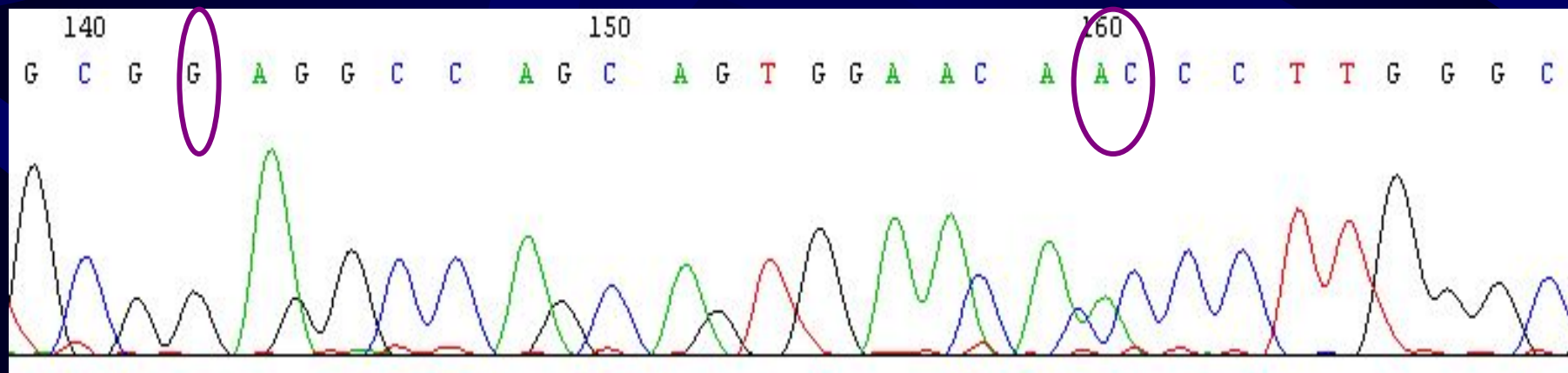
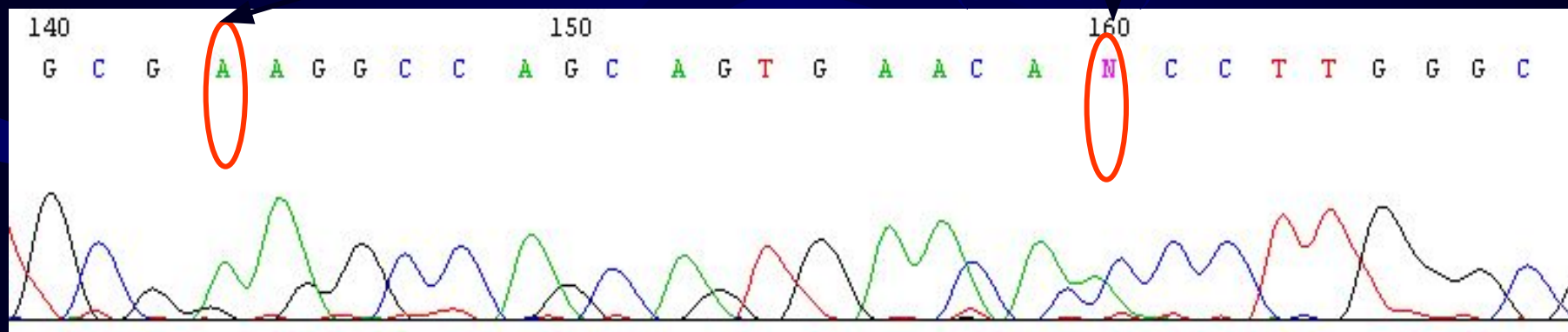
В 1977 г. Ф.Сэнгер предложил способ ферментативного секвенирования, получивший название метода терминирующих аналогов трифосфатов. В основе метода лежит ферментативное копирование с помощью ДНК полимеразы I из *E.coli*. Специфическая терминация синтеза обеспечивается добавлением в реакционную смесь помимо четырех типов dNTP (один из которых радиоактивно мечен по альфа положению фосфата) одного из 2',3'-дидезоксинуклеози-дтрифосфатов (ddATP, ddTTP, ddCTP или ddGTP), который способен включаться в растущую цепь ДНК, но не способен обеспечивать дальнейшее копирование из-за отсутствия 3'-ОН группы.



Секвенирование мутаций в 14 экзоне гена БВК

Glu1064 Lys (3190G/A)

His1069Gln
(3207C/A)

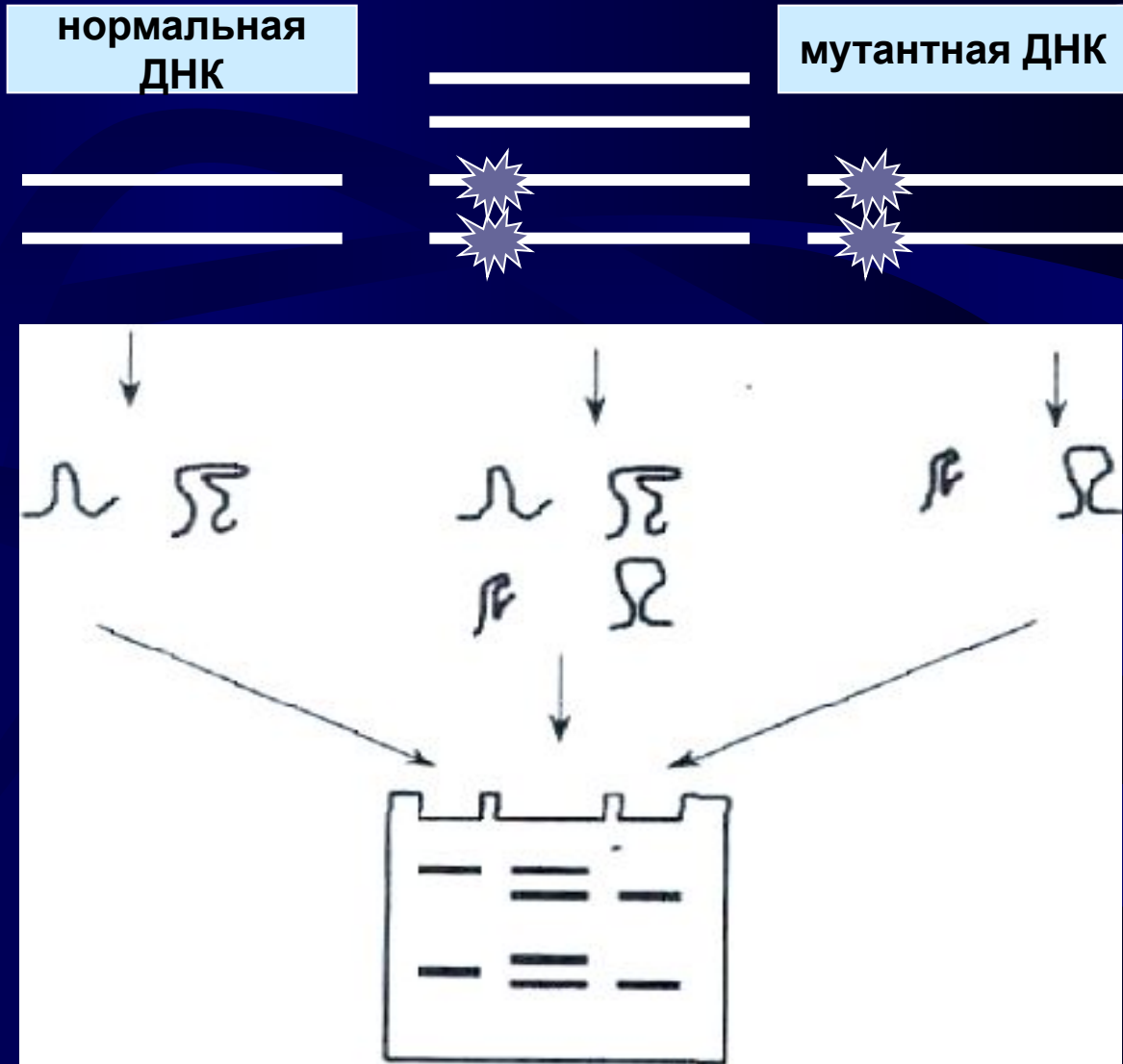


SSCP (single strand conformation polymorphism)

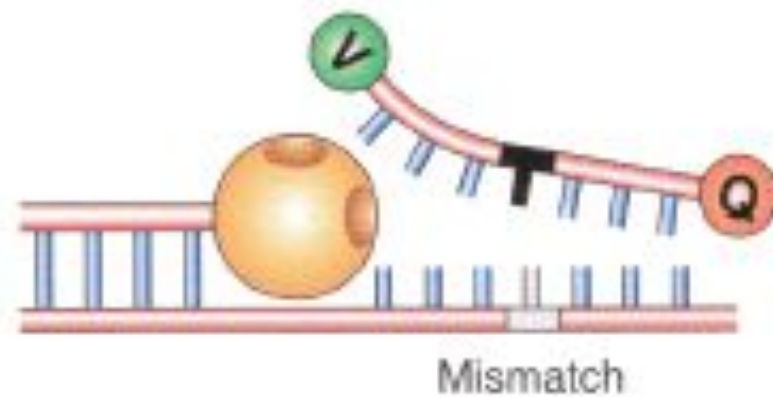
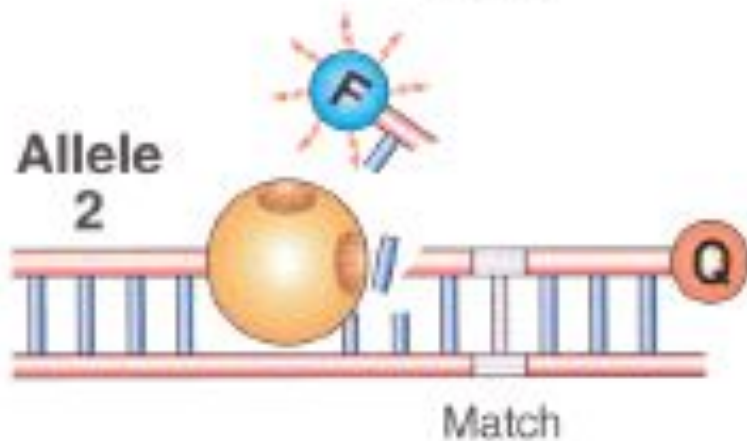
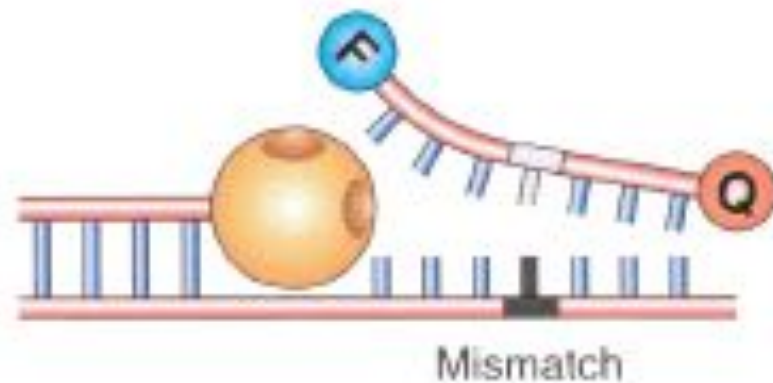
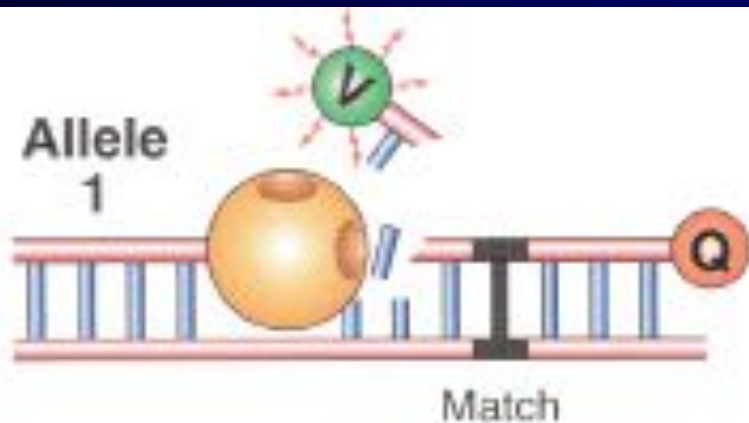
Метод анализа конформационного полиморфизма однонитевой ДНК, предложенный М. Orita с соавт. (1989), основан на регистрации различий в электрофоретической подвижности однонитевых фрагментов ДНК, одинаковых по величине, но различающихся вследствие нуклеотидных замен по пространственной организации молекул.

Метод включает в себя:

- амплификацию специфических фрагментов ДНК
- денатурацию
- электрофорез



SNP анализ в формате Real-Time PCR





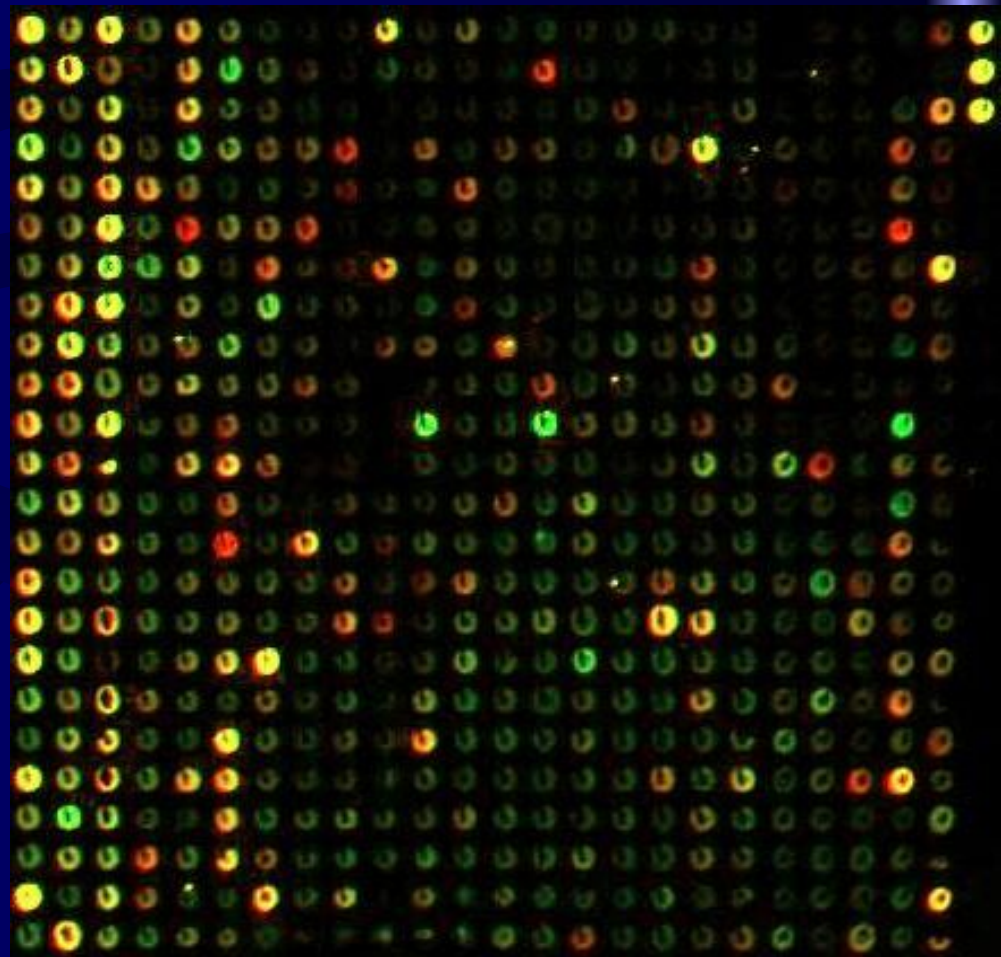
Первый в мире патент на микробиочипы для определения структуры ДНК принадлежит нашей стране

Биочип - это набор микроплощадок, каждая из которых содержит фрагмент ДНК из своего экзона генома человека

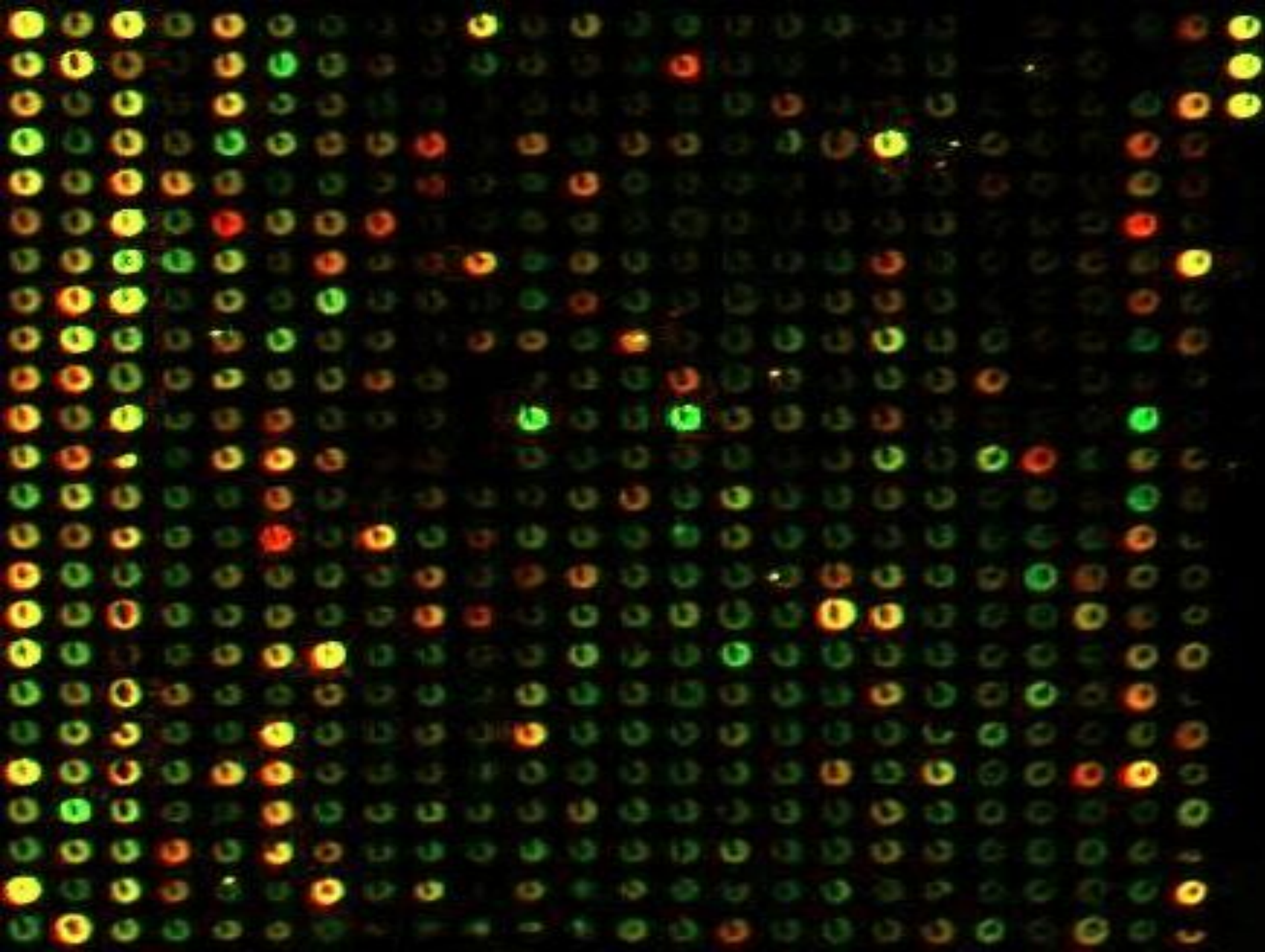
А. Мирзабеков - соавтор статьи за которую дана Нобелевская премия (В. Гилберт, секвенирование ДНК)

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.

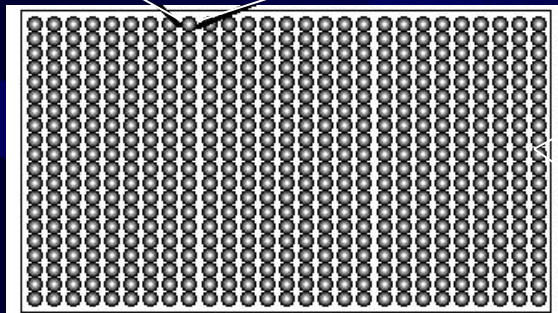
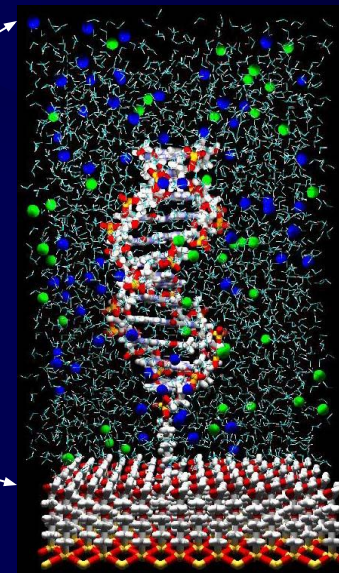
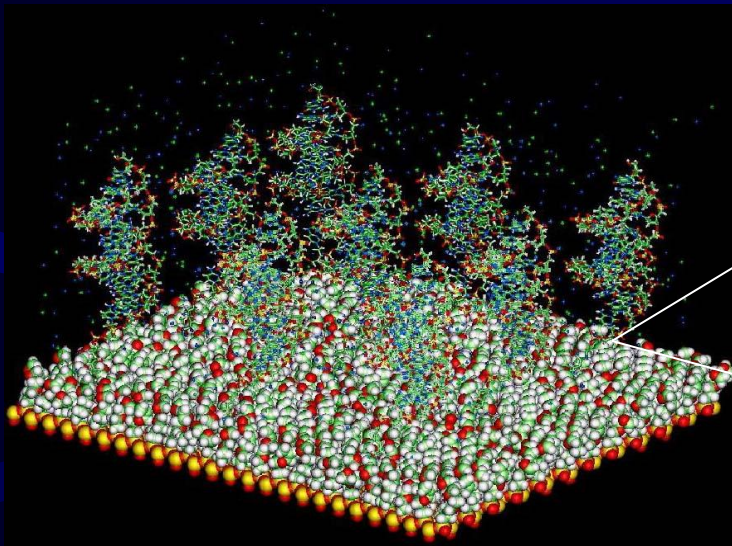


Цвет и его интенсивность несут информацию о специфическом гене исследуемого образца



ДНК (кДНК) – матрицы

Смесь молекул мРНК из исследуемого образца флуоресцентно метят и гибридизуют с чипом. "Свечение" площадки означает, что данный ген в исследуемом образце транскрибирован



TCCTTTCCGG	AACGGTTGGC	GTCTGCCAC	GGCGGTGTGG	GGCATGACAT
GCCGCCCCAG	GAACAACCCC	GACACGGCTT	TAAGCCTCTC	AAATCGCTGT
AGACATCATC	TTTACGTGCT	TGGCTTGCCC	TGCCACCATT	AGGGCTGTTC
CCGCGACGAC	TCGCCATTCA	ACCTCAGTCC	TTCCGGTTGA	GCGAGTGGGT
CGCGCGCAAG	GTGCGAATGG	GTCGCGCGCA	AAAGTGTTCG	CTGGCTGTAT
TATATGCTGC	CTATAGCGAG	ACTAACGACC	CACACTTTCA	CACAAGGATT
TCCCGCTAAT	GGGTACCTCG	CGTCAGGACC	TTGACGCAAG	CGCGCCTTCG
GTTGGCCCCA	AGCTTGCTAG	GACTACTTAT	CTTGAGCTCA	TTTAAACATCC
CGGCGCCTCT	CCGGGAGCGG	TCGTCGCGAA	GAAGTCAAAC	CCGGAACGGC
GTTGACAAAG	CGTGGAGACA	TCGATACCTC	TGTGTTCAGCG	GCCACAAATC