

Метод генетики соматических клеток

- Основу метода составляет культивирование отдельных соматических клеток человека и получение из них клонов, а так же их гибридизацию и селекцию.
- Тот факт, что соматические клетки несут в себе весь объем наследственной информации, дает возможность изучать на них генетические закономерности всего организма.

Соматические клетки обладают рядом особенностей:

- быстро размножаются на питательных средах;
- легко клонируются и дают генетически однородное потомство;
- клоны могут сливаться и давать гибридное потомство;
- легко подвергаются селекции на специальных питательных средах;
- клетки человека хорошо и долго сохраняются при замораживании.

Метод генетики соматических клеток

- Соматические клетки человека получают из разных органов — кожи, костного мозга, крови, ткани эмбрионов. Однако чаще всего используют клетки соединительной ткани (фибробласты), лимфоциты крови и эмбриональные стволовые клетки.
- С помощью этого метода можно изучать: метаболические процессы в клетке, картировать гены, генные мутации, мутагенную и канцерогенную активность химических веществ.

- В 1960 г. было показано, что совместно культивируемые клетки различных линий могут сливаться, образуя гибриды, содержащие геномы обеих родительских форм. Первые такие гибриды были получены при слиянии клеток разных линий мышей.

- Наряду с внутривидовыми получены и межвидовые гибриды, например, между клетками человека и мыши, мыши и хомячка, мыши и курицы и др.
- Образование гибридных клеток происходит чаще, если в культуру добавлены некоторые вещества (например, полиэтиленгликоль) или инактивированный вирус Сендай.

Метод генетики соматических клеток

- При гибридизации соматических клеток двух разных линий образуются гетерокарионы — клетки, которые содержат оба родительских ядра. Затем в результате митоза образуются две одноядерные клетки — синкарионы, имеющие хромосомы обоих родительских клеток.

- В течение первых делений гибридной клетки, не ясно почему, происходит потеря хромосом одного из видов. Так, у гибридов мышь-хомячок элиминируются хромосомы мыши. Если присутствие продукта изучаемого гена коррелирует с наличием определенной хромосомы в гибриде, то можно предположить, что этот ген локализован в данной хромосоме.

- Гибридные клетки человека и мыши имеют 43 пары хромосом: 23 от человека и 20 от мыши. В дальнейшем (при культивировании) происходит элиминация хромосом того вида, клетки которого медленнее размножаются. При этом хромосомы мыши сохраняются, а хромосомы человека утрачиваются.

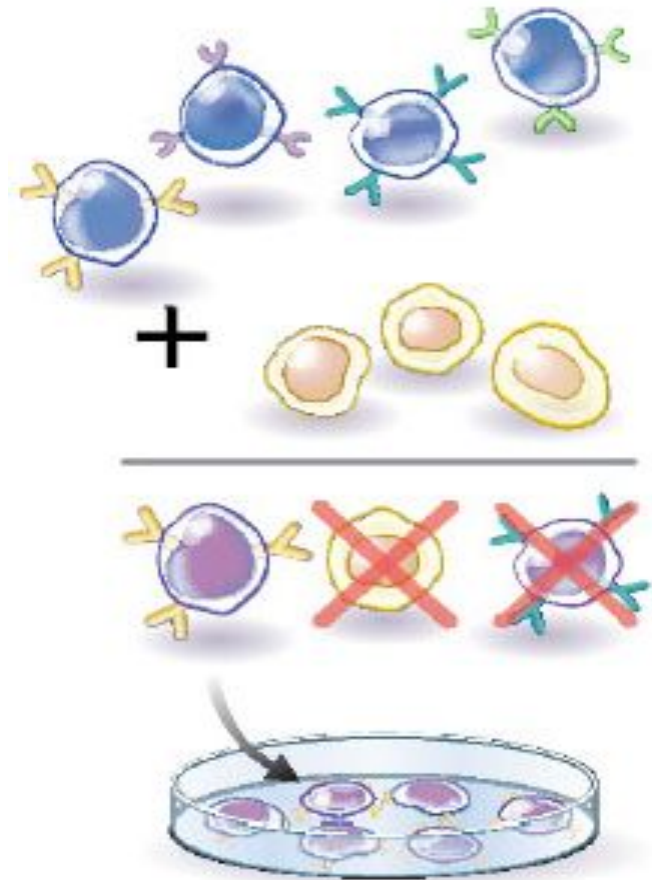
- Функционирующие в гибридных клетках хромосомы синтезируют определенные белки. Фенотипически хромосомы мыши и человека отличаются. Нетрудно определить, какие хромосомы присутствуют в гибриде и выяснить, синтез каких белков связан с данными хромосомами человека.

Гибридомы

- Гибридо́ма — гибридная клеточная линия, полученная в результате слияния клеток двух видов: способных к образованию антител В-лимфоцитов, полученных из селезёнки иммунизированного животного (чаще всего мыши), и раковых клеток миеломы.

Гибридомы

- Слиянием В-лимфоцитов (голубого цвета) с раковыми клетками миеломы (оранжевого цвета) получают гибридомы (фиолетового цвета), способные к бесконечному делению.
- Клетки гибридомы, производящие нужное антитело, идентифицируют и выращивают в культуре.



Биохимические методы

- **Наследственные заболевания, которые обусловлены генными мутациями, изменяющими структуру или скорость синтеза белков, обычно сопровождаются нарушением углеводного, белкового, липидного и других типов обмена веществ. Наследственные дефекты обмена можно диагностировать посредством определения структуры измененного белка или его количества, выявления дефектных ферментов или обнаружения промежуточных продуктов обмена веществ во внеклеточных жидкостях организма (крови, моче, поте и т.д.)**

Биохимические методы

- Использование современных биохимических методов (электрофореза, хроматографии, спектроскопии и др.) позволяют определять любые метаболиты, специфические для конкретной наследственной болезни.
- Объектами биохимического анализа могут служить моча, пот, плазма и сыворотка крови, форменные элементы крови, культуры клеток (фибробласты, лимфоциты).

Биохимические методы

- Кроме выявления гомозиготных носителей мутантных генов существуют методы выявления гетерозиготных носителей некоторых рецессивных генов, что особенно важно при медико-генетическом консультировании.
- Так, у фенотипически нормальных гетерозигот по фенилкетонурии после приема фенилаланина обнаруживается повышенное его содержание в крови.
- При гемофилии гетерозиготное носительство мутантного гена может быть установлено с помощью определения активности фермента, измененного в результате мутации.

Молекулярно-генетические методы

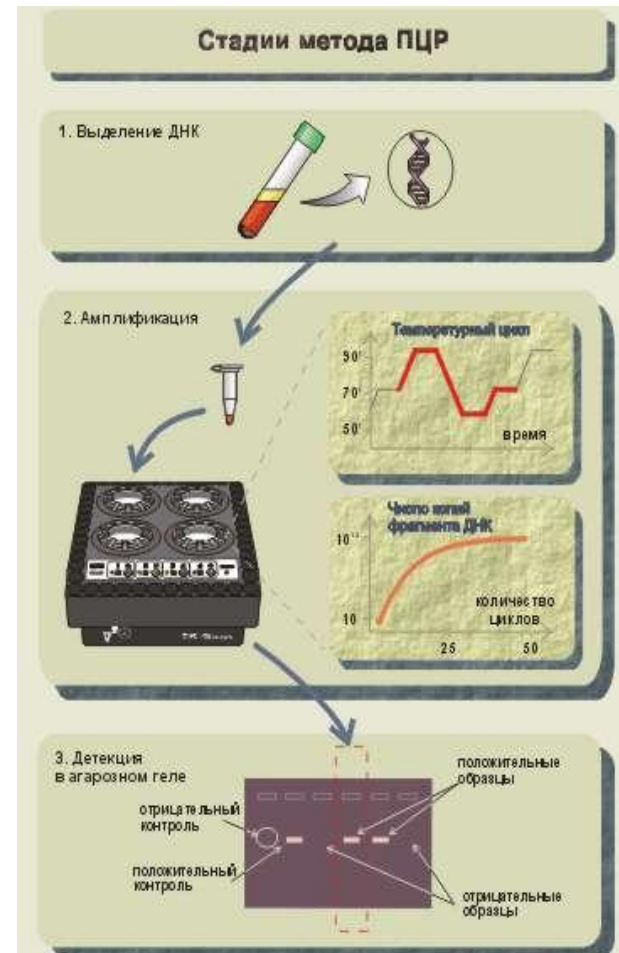
- В основе лежат современные методики работы с ДНК или РНК.
- - позволяют анализировать фрагменты ДНК, находить и изолировать отдельные гены и их сегменты и устанавливать в них последовательность нуклеотидов.

Молекулярно-генетические методы

- Начальным этапом любого молекулярно-генетического анализа является получение образцов ДНК или РНК. Для этого используют геномную ДНК (вся ДНК клетки) или отдельные ее фрагменты.
- чтобы получить достаточное количество таких фрагментов, необходимо, амплифицировать (размножить) их.

Полимеразная цепная реакция

- Для получения достаточного количества фрагментов ДНК используется полимеразная цепная реакция (ПЦР) - метод селективной амплификации отдельных регионов ДНК посредством имитации *in vitro* репликации ДНК.
- Открытие ПЦР (1983-1984 гг, Кэри Б. Мюллис (Нобелевский лауреат по химии 1993 г.) произвело революцию в молекулярной биологии, и трудно перечислить все разнообразие отраслей фундаментальной науки и практической медицины, в которых используется этот метод в настоящее время.



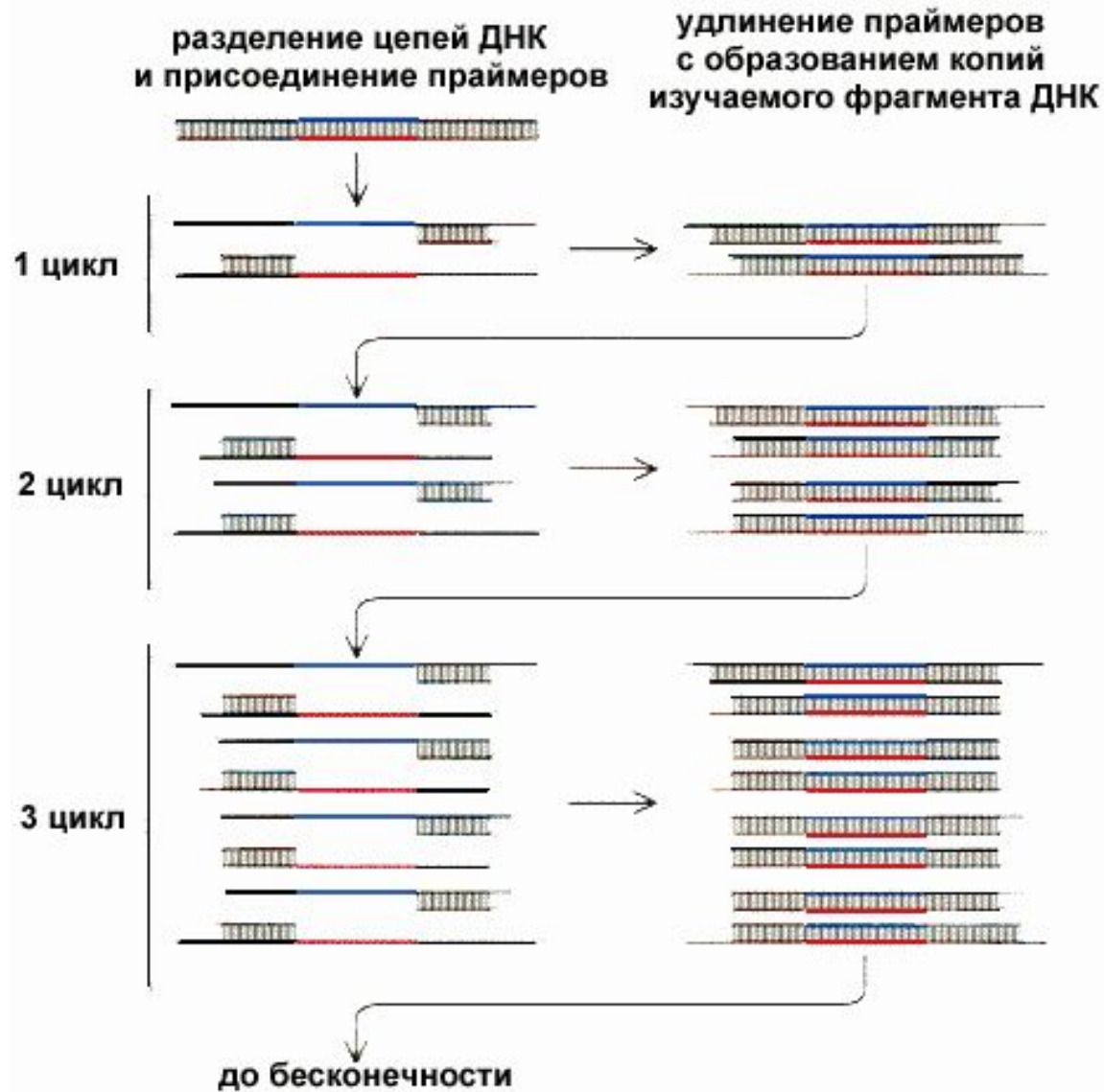
Кари Б. Мюллис (Kary B. Mullis) – изобретатель полимеразной цепной реакции (ПЦР)



- **Американский биохимик 1944 г.р.**
- **Патент - 1985 г., фирма Cetus Corp. California**
- **Нобелевская премия по химии – 1993 г.**

Метод ПЦР

- **Методом ПЦР можно синтезировать фрагмент ДНК *in vitro* и получить его как химически чистое вещество. Для синтеза используются короткие синтетические отрезки ДНК, называемые праймерами (затравка для синтеза). С 3'-конца праймера начинается синтез фрагмента ДНК по матричной нити, на которую он отжигается (прилипает при комплементарном взаимодействии между нуклеотидами праймера и матрицы). За один цикл достройки ДНК из двух нитей ДНК получают 4. В следующем цикле из 4 нитей получится уже 8 и т.д. Каждый цикл занимает несколько минут. За 30 циклов ПЦР нужный фрагмент размножится в 1 миллиард раз, что позволяет наблюдать фрагмент (после окраски).**



Принцип ПЦР. Синим и красным цветом обозначены две нити участка ДНК, который необходимо копировать.

Рестрикция ДНК

- Анализировать огромные молекулы ДНК в том виде, в котором они существуют в клетке, невозможно. Поэтому их необходимо разделить на части, обработать разными рестриктазами — бактериальными эндонуклеазами.
- Эти ферменты способны разрезать двойную спираль ДНК, причем места разрыва строго специфичны для данного образца.

Электрофорез ДНК

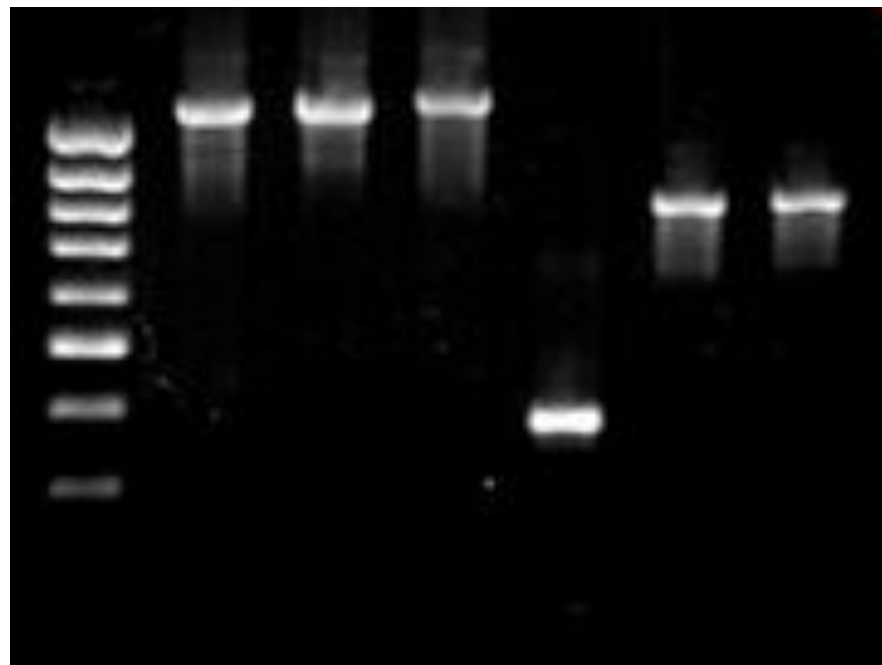
- Фракционирование (т.е. разделение) фрагментов ДНК по размеру и длине проводится с помощью электрофореза на поверхности агарозного или полиакриламидного геля.
- Силы электрического поля, прикладываемого к образцам, заставляют фрагменты ДНК мигрировать через гель. Сахарофосфатный остов молекул ДНК заряжен отрицательно и поэтому цепи ДНК двигаются от катода, заряженного отрицательно, к положительному аноду. Более длинные молекулы мигрируют медленнее, так как задерживаются в геле, более короткие молекулы двигаются быстрее.

Электрофорез ДНК

- После разделения (иногда краситель вносят в расплавленную агарозу) фрагменты ДНК разной длины визуализируют при помощи флюоресцентных красителей, специфично взаимодействующих с ДНК, например, агарозные гели обычно красят бромистым этидием, который интеркалирует между азотистыми основаниями дуплекса и флюоресцирует в УФ-лучах.

Визуализация гелей с результатами электрофореза ДНК

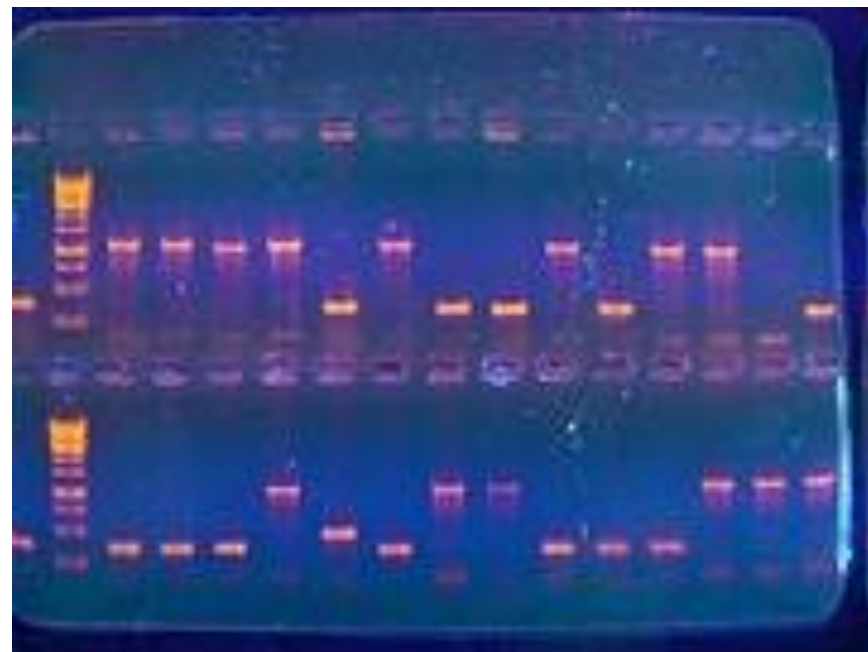
- Для ДНК электрофореза обычно используют агарозные (для относительно длинных молекул ДНК) и полиакриламидные (для высокого разрешения коротких молекул ДНК, например, в случае секвенирования) гели.
- Фотография агарозного геля после ДНК-электрофореза.



из <http://dic.academic.ru>

Визуализация гелей с результатами электрофореза ДНК

- Результат электрофоретического разделения продуктов ПЦР-реакции. Агарозный гель окрашен бромистым этидием. Визуализация посредством облучения ультрафиолетом с длиной волны 312нм



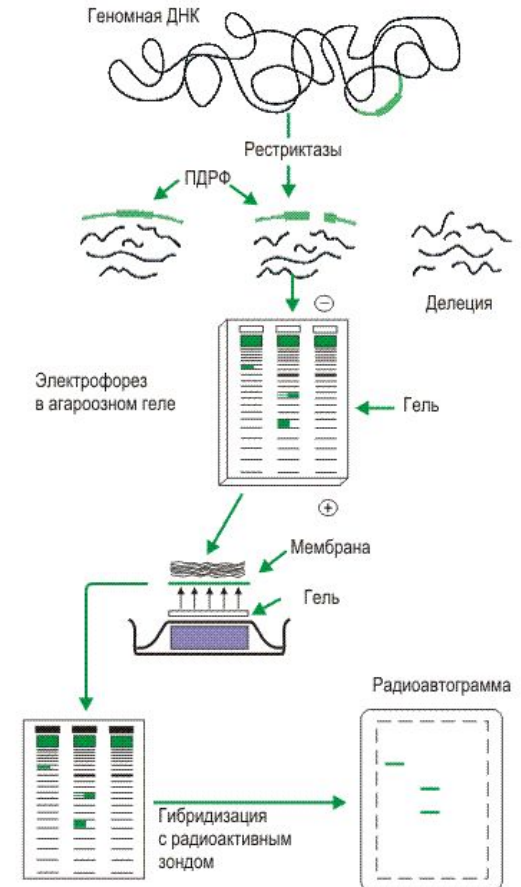
из <http://dic.academic.ru>

Блот-гибридизация

- Для выявления специфических фрагментов ДНК используется метод блот-гибридации по Саузерну. Эта методика состоит из следующих этапов:
- после окончания электрофореза гели помещают в щелочной раствор для денатурации фрагментов ДНК - получают одноцепочечные ДНК;
- одноцепочечные ДНК вымывают из геля на нитроцеллюлозный или нейлоновый фильтры перпендикулярным поверхности геля током буфера; одноцепочечные фрагменты ДНК фиксируют на фильтре;

Блот-гибридизация

- для визуального выявления нужных фрагментов проводят гибридизацию исследуемого образца со специфическим по нуклеотидной последовательности меченым радиоактивно или флуоресцентной меткой олигонуклеотидным синтетическим зондом;
- радиоактивно меченные участки выявляют путем экспонирования фильтра с рентгеновской пленкой (ауторадиография);
- флуоресцентные метки выявляют в люминесцентном микроскопе.
- Этот метод позволяет обнаружить единственный ген среди десятков тысяч.



Блот-гибридизация

- С помощью метода Саузерна можно составить рестрикционную карту генома в участке исследуемого гена и установить, несет ли данный ген какие-либо дефекты.

Секвенирование ДНК

- определение первичной нуклеотидной последовательности (от англ. sequence — последовательность).
- В результате секвенирования получается линейное символьное описание, которое сжато резюмирует атомную структуру молекулы ДНК.

Секвенирование ДНК

- Для секвенирования применяются методы Эдмана, Сэнжера и другие;
- в настоящее время для секвенирования нуклеиновых кислот обычно применяется метод Сэнжера с дидезоксинуклеозидтрифосфатами (ddNTP).
- Обычно до начала секвенирования при помощи ПЦР производят амплификацию участка ДНК, последовательность которого требуется определить.

Секвенирование ДНК по Сэнжеру

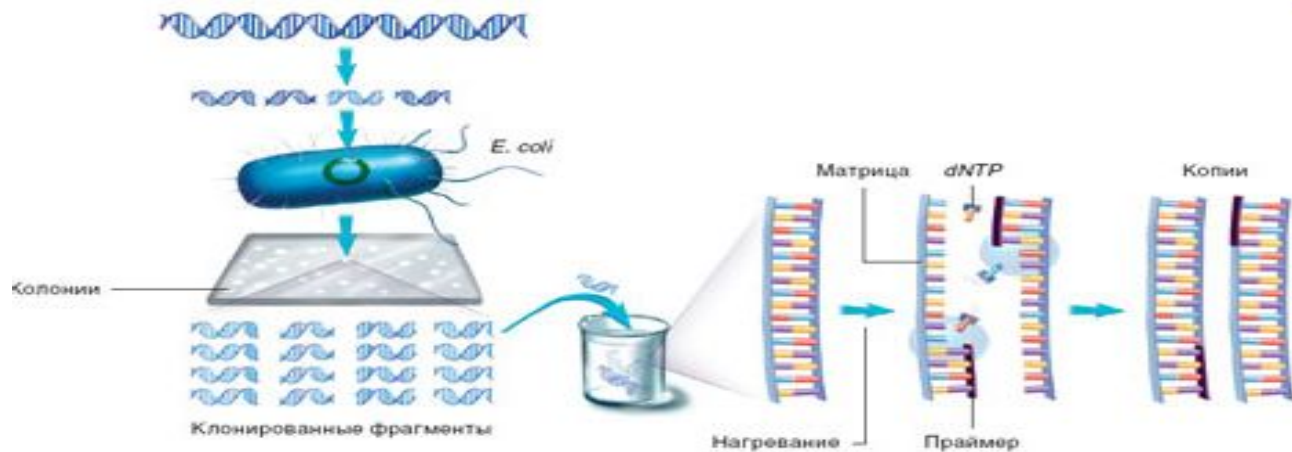
- Методология секвенирования была разработана в конце 1970-х гг. английским биохимиком Фредериком Сэнжером.



(из <http://www.internet-school.ru>)

Секвенирование ДНК по Сэнжеру

- Перед секвенированием молекулу ДНК разрезают на фрагменты и клонируют в *Escherichia coli*. Выделенные из бактериальных клеток фрагменты многократно амплифицируют с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР)



(из <http://wsyachina.narod.ru>)

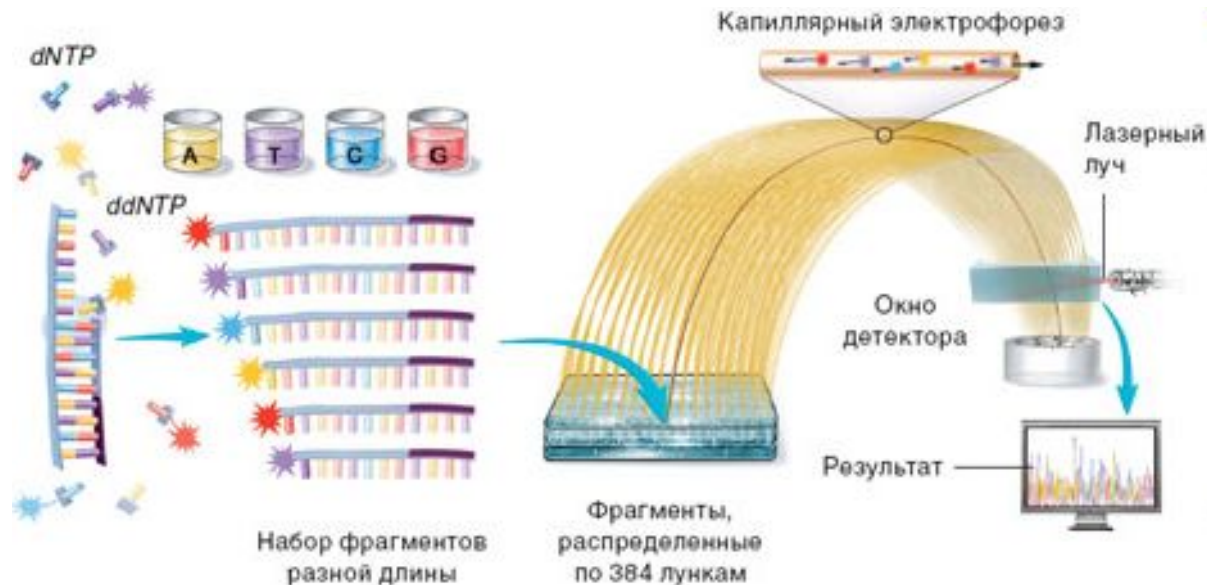
Секвенирование ДНК по Сэнжеру

- Раствор с одноцепочечными фрагментами и праймерами распределяют по четырём пробиркам, в каждую из которых добавлены четыре разные dNTP и один из флуоресцентно меченных дидезоксинуклеозидтрифосфатов (ddNTP). Удлинение гибридизовавшегося с ДНК-фрагментом праймера происходит до тех пор, пока в цепь не включится ddNTP. В этом месте синтез останавливается, и в результате в каждой из пробирок образуется уникальный набор отрицательно заряженных фрагментов разной длины, оканчивающихся одним из меченых ddNTP.

Секвенирование ДНК по Сэнжеру

- Фрагменты разделяют по размеру с помощью капиллярного электрофореза. Когда фрагменты определённой длины проходят через окно детектора, освещаемое лазерным лучом, ddNTP начинают флуоресцировать. Длина волны флуоресценции зависит от того, какой именно ddNTP находится у них на конце, так что на выходе получается цветная картинка, которую можно трансформировать в нуклеотидную последовательность.

(из
<http://wsyachina.narod.ru>)



Автоматическое секвенирование ДНК

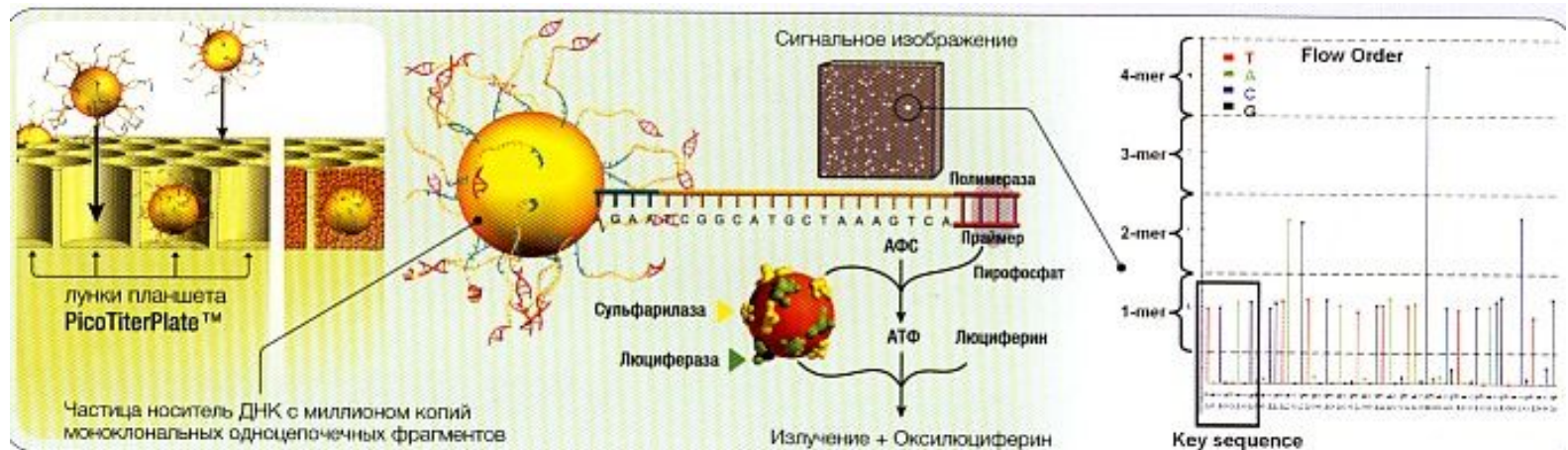
- Особенно перспективным для массового секвенирования в автоматическом режиме оказалось применение меченых различными флуорохромами дидезоксинуклеотидов. В этом варианте секвенирования каждому из нуклеотидов соответствует свой цвет полосы в геле, что хорошо распознается в автоматическом режиме.
- Этот метод нашел широкое применение в реализации программы «Геном человека».

Технология пиросеквенирования

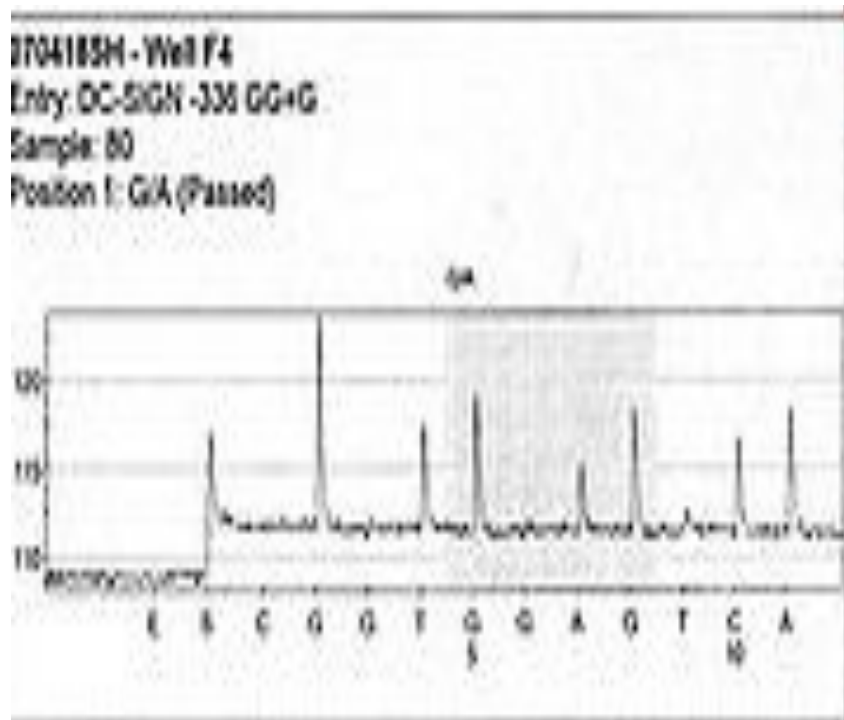
- Во время работы автоматического секвенатора нуклеотиды проходят последовательно, в определенном порядке, через миллион микроскопических лунок специального планшета, где находятся частицы с иммобилизованными на них копиями одноцепочечных фрагментов ДНК из библиотеки фрагментов образца ДНК.

Технология пиросеквенирования

- При прохождении нуклеотидов происходит одновременное секвенирование уникальных одноцепочечных ДНК на каждой частице, в каждой лунке планшета.
- Если через лунку проходит нуклеотид, комплементарный матрице, полимераза удлиняет цепь, встраивая этот нуклеотид.
- Добавление нуклеотида приводит к высвобождению пирофосфата и далее к реакции, генерирующей световой сигнал.
- Этот сигнал регистрируется CCD-камерой прибора.
- Интенсивность сигнала пропорциональна количеству нуклеотидов, встроенных в цепь ДНК за время одного прохода нуклеотидов.



Технология пиросеквенирования



Пример пиорограммы, которую отображает прибор по завершении сеанса пиросеквенирования



Автоматический геномный секвенатор