

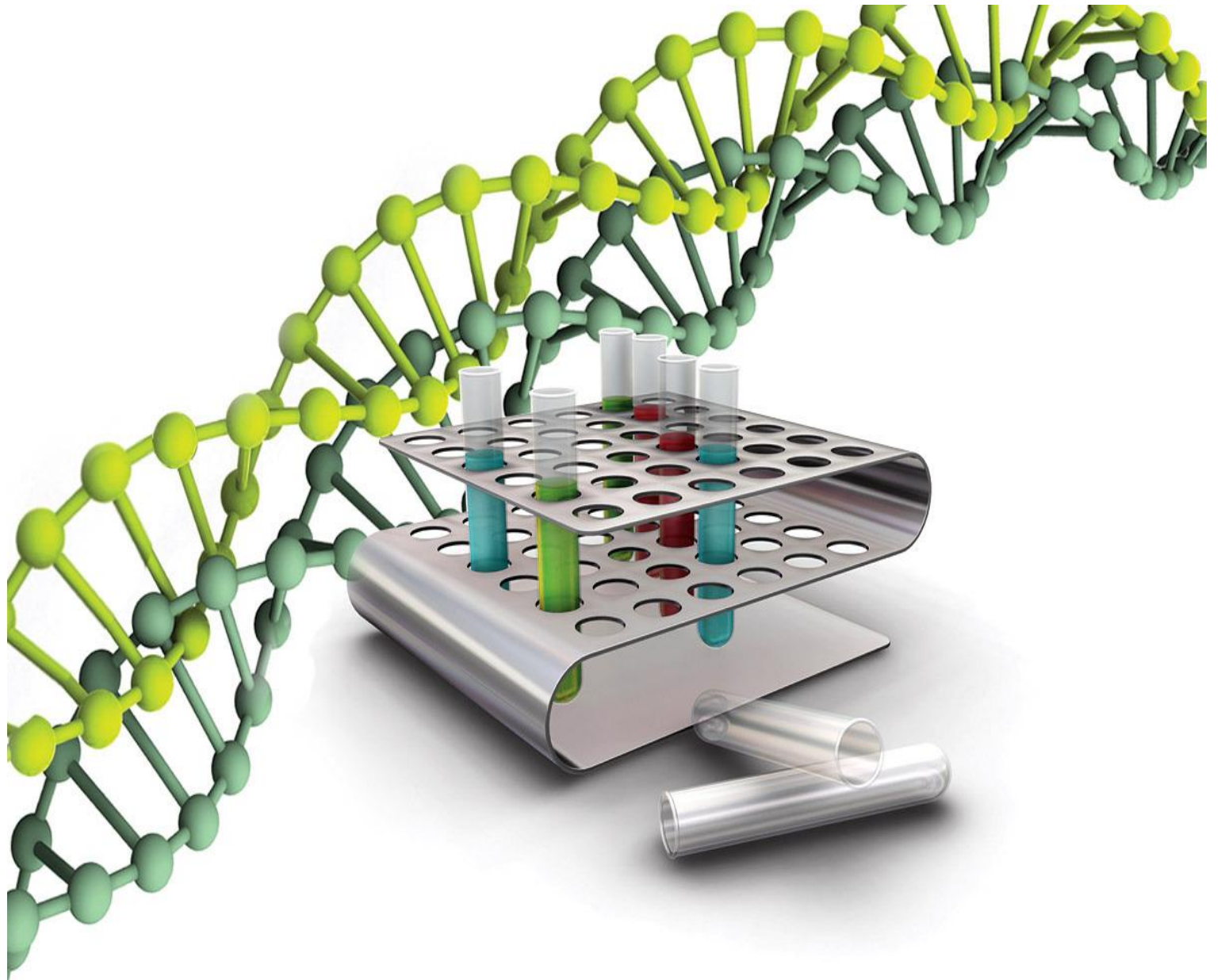
Методы анализа ДНК
ДНК-диагностика
наследственных заболеваний

Выполнила : Шкуратова Варвара

Группа № 180

Что такое ДНК - диагностика

- **ДНК-диагностика - это совокупность методов и технологий, которые позволяют выявлять повреждения в определенном гене человека, который либо является причиной различных заболеваний, либо может к ним привести**



ДНК-диагностику используют в следующих случаях:

- Медико-генетическая консультация при наследственных заболеваниях.
- Установление биологического родства.
- Диагностика к предрасположенности к некоторым заболеваниям, таким как атеросклероз, рак и т.д.
- Определение ДНК возбудителя при различных бактериальных и вирусных инфекциях.



- **Применение ДНК**

- Консультация при наследственных заболеваниях

- Установление биологического родства

- Установление предрасположенности к заболеваниям

- Выявление ДНК любого возбудителя болезней



Виды биологических материалов, используемых для ДНК-диагностики:

- Кровь
- Слюна
- Сперма
- Плодный материал

- **При ДНК-диагностике можно использовать пятна крови, нанесенные на пористую поверхность, а также трупный и эксгумированный материал. Однако чаще всего источником ДНК служат клетки крови и плодный материал.**

МЕТОДЫ ДНК- ДИАГНОСТИКИ

- Рестрикционный анализ
- Полимеризация цепной реакции
- ДНК - гибридизация

В настоящее время наиболее эффективным считается метод полимеризации цепной реакции. Он и применяется чаще всего.

РЕСТРИКЦИОННЫЙ АНАЛИЗ

- **Рестрикционный анализ**-метод анализа двухцепочечных молекул ДНК, образованных после обработки ферментами - рестриктазами.
- *Этапы:*
- **Выделение ДНК;**
- **Рестрикция ДНК;**
- **Электрофорез.**



Этапы рестрикционного анализа

Выделение ДНК:

- 3 мл венозной крови с помощью коагулянтов разделяют на плазму, лейкоциты и эритроциты.
- Затем при взаимодействии лейкоцитов с детергентами происходит лизис или разрушение клетки.
- Мягкое центрифугирование помогает осадить ядра клетки на дно пробирки.
- Надосадочную жидкость, оставшуюся после центрифугирования, сливают, добавляют протеолитические ферменты, из-за чего происходит разрушение ядерной оболочки и высвобождается ДНК.
- Затем происходит фенольная и хлороформная очистка ДНК, что помогает удалить молекулы белков, липидов и углеводов.
- В результате из одного грамма ткани получают 2 миллиграмма, необходимого для исследования

- **Рестрикция ДНК** – разрезание двухцепочечной молекулы ДНК с помощью ферментов - рестриктаз (их насчитывается около 150 видов).
- Рестриктаза разрезает молекулу ДНК в специальных районах – сайт рестрикции.
- *Сайт рестрикция-участок* ДНК, состоящий из 4-12 пар нуклеотидов, где конкретный вид рестриктазы разрушает фосфодиэфирные связи между нуклеотидами в каждой из цепи ДНК.
- У каждой рестриктазы есть свой сайт рестрикции. Для диагностики наследственных болезней используют симметричную рестрикцию—это, когда на концах разрезанных участков нет свободной валентности - по-другому называют тупые концы.

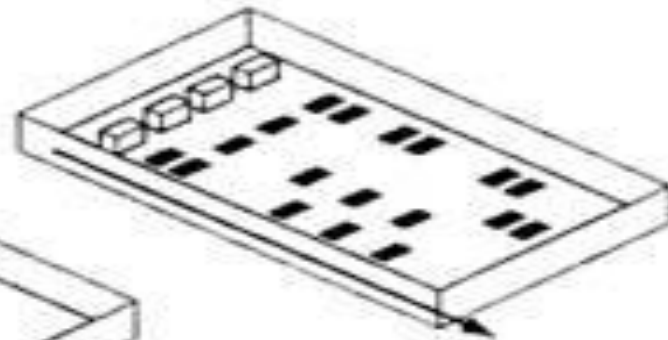
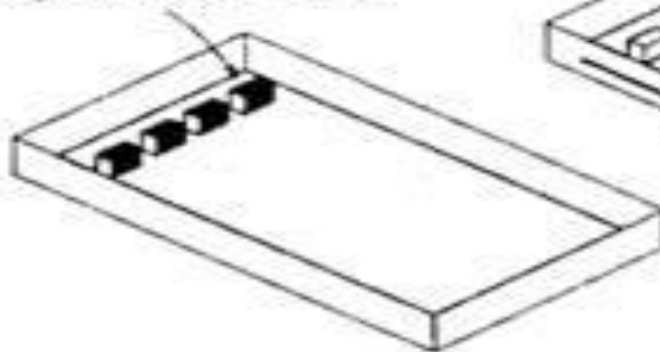
- Например, при частичном расщеплении ДНК ферментом А могут образовываться фрагменты 3100 п. н., 1400 п. н. и 500 п. н. Сопоставив их с данными полного расщепления (2100, 1400, 1000 и 500), можно сразу поставить рядом 2100 и 1000 (фрагмент 3100). А получив фрагмент 3500 – расположить рядом 2100 п. н. и 1400 п. н.



Секвенирование ДНК

ДНК можно поделить на фрагменты во время электрофореза (рис. 8.3). При этом используют вещество агарозу, похожее на агар, который используют в качестве питательной смеси. Смесь молекул ДНК помещают на гель агарозы. Когда через гель пропускают электрический ток, отрицательно заряженные молекулы ДНК устремляются к положительному полюсу и более мелкие молекулы движутся быстрее. Этот метод настолько чувствителен, что с его помощью можно определить длину молекулы

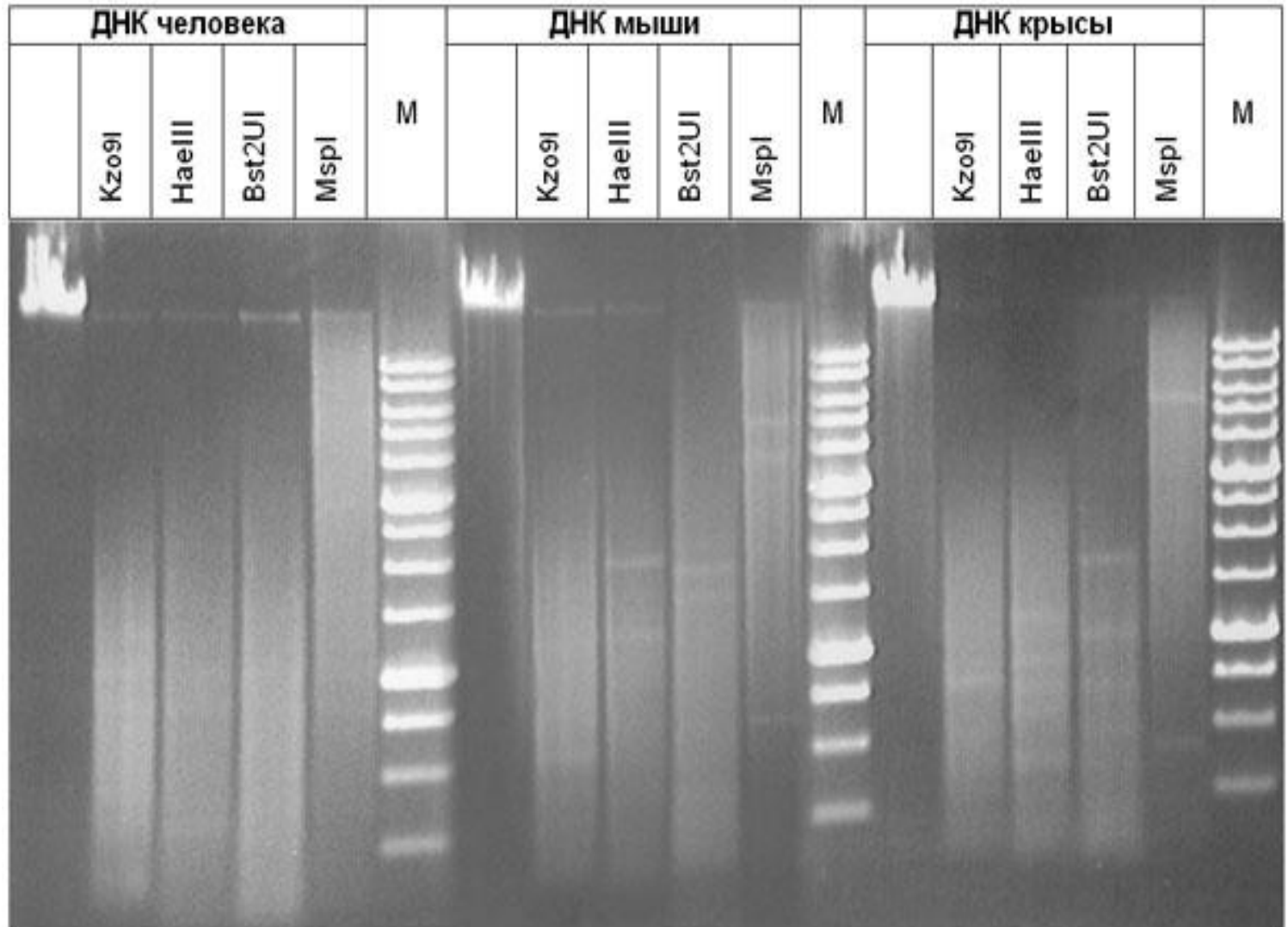
Образцы ДНК,
помещенные в гель



Под действием электрического тока фрагменты движутся

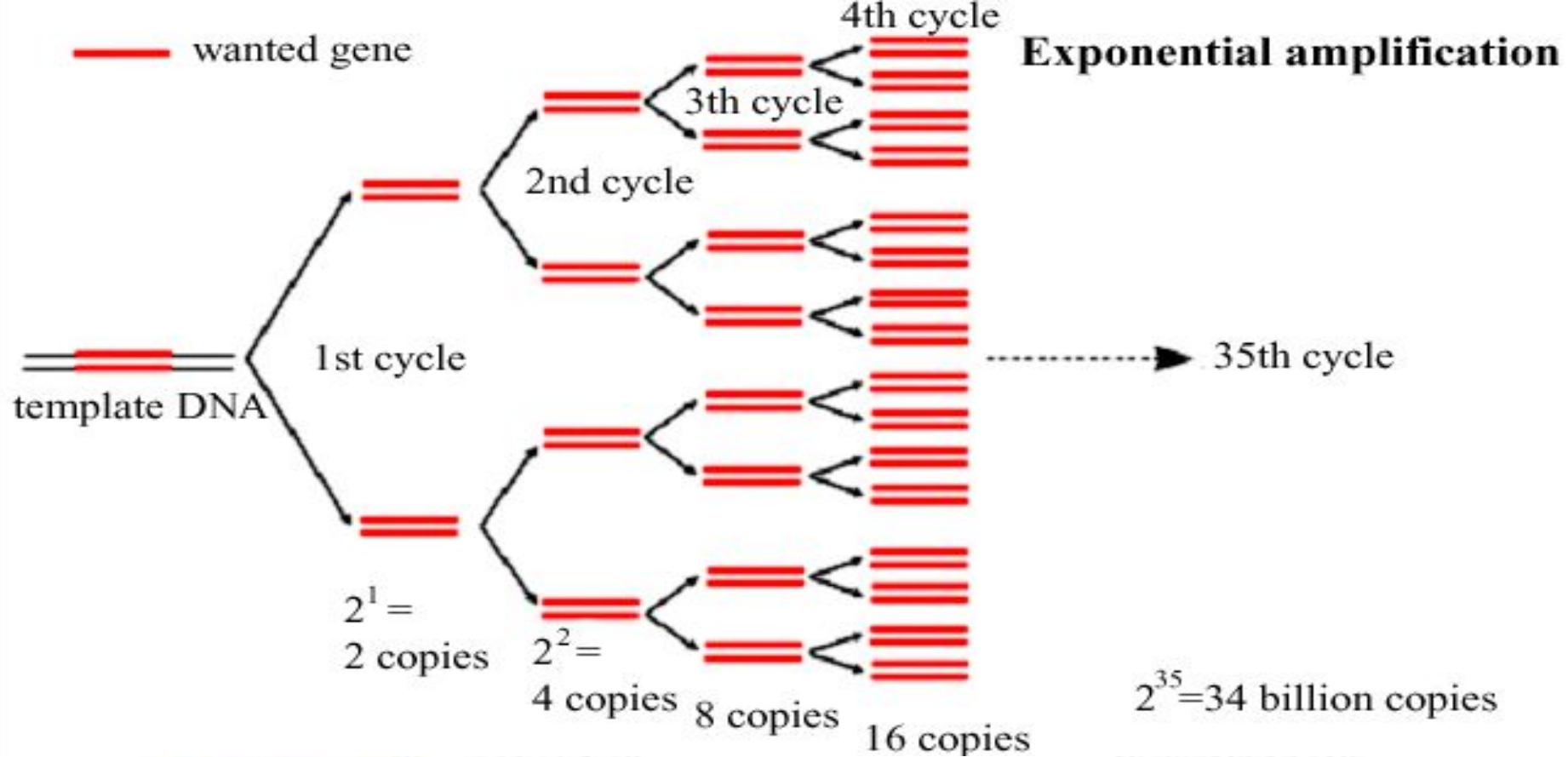
- **Рестрикционный анализ ДНК широко используется в молекулярно-биологических исследованиях и прикладных работах и является одним из наиболее важных инструментов при изучении ДНК.**
- **Большое разнообразие существующих эндонуклеаз рестрикции (ЭР) позволяет проводить расщепление ДНК по более чем 150 сайтам узнавания. Рестрикционный анализ проводится для самых различных ДНК, начиная от небольших фрагментов длиной несколько десятков нуклеотидных пар, и вплоть до целых геномов эукариот**

- Пример картины расщепления ДНК



ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ

- Полимеразную цепную реакцию (ПЦР, PCR) изобрел в 1983 году американский ученый *Кэри Мюллис*. Принцип метода заключается в удвоении (амплификации) участка ДНК, ограниченного праймерами, при помощи фермента ДНК-полимеразы. За каждый следующий цикл амплификации происходит удвоение, как исходного участка ДНК, так и вновь синтезированных фрагментов (амплификатов). В результате этого число фрагментов растет в геометрической прогрессии (цепная реакция). *После 30 - 40 циклов их число превышает несколько миллиардов, что делает возможным их обнаружение различными методами.*



Исходные компоненты ПЦР

Этапы ПЦР-исследования

- 1. Выделение нуклеиновых кислот. На первом этапе выделяется вся ДНК или РНК из исследуемого материала.
- 2. Собственно ПЦР или амплификация. В раствор, содержащий смесь нуклеотидов, ПЦР-буфер, полимеразу и праймеры добавляется ДНК, выделенная на первом этапе. ПЦР проводят следующим образом: сначала реакционную смесь нагревают до температуры 90-94° С, вызывая этим денатурацию ДНК, затем температуру снижают до 50-70° С в зависимости от нуклеотидной последовательности праймеров, чтобы отжиг происходил в строго комплементарных участках, и наконец, в смеси устанавливают температуру, оптимальную для работы ДНК-полимеразы. При повторении этих циклов количество копий участка ДНК, находящегося между местами посадки праймеров, возрастает

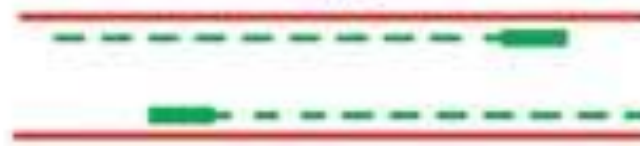
СИНТЕТИЧЕСКИЕ
«ЗАТРАВКИ»



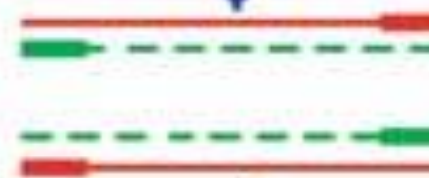
ДВУХЦЕПОЧЕЧНАЯ
МОЛЕКУЛА ДНК ИЗ
ИССЛЕДУЕМОГО
ОБРАЗЦА



Молекула ДНК
распалась на две
цепочки. «Затравки»
прикрепились
к соответствующим
участкам ДНК



Идет синтез новых
цепочек ДНК



Получены две копии
участка ДНК
из исследуемого образца,
соответствующие
вирусной ДНК



Процедура повторяется 20—60 раз.
Получены миллионы копий ДНК вируса

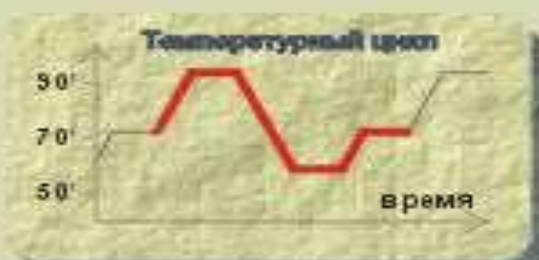
- **3. Учет результатов.** Накопленные продукты амплификации (большое число копий ДНК между местами посадки праймеров) можно выявить путем электрофореза в геле. Помимо этого, при использовании флуоресцентно меченых зондов, возможен учет результатов по изменению флуоресценции относительно отрицательного контроля.

Стадии метода ПЦР

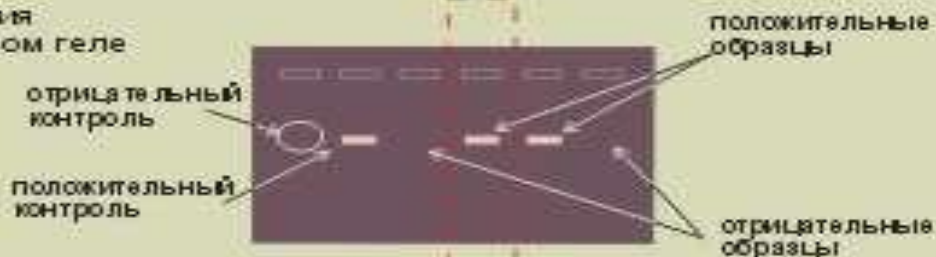
1. Выделение ДНК



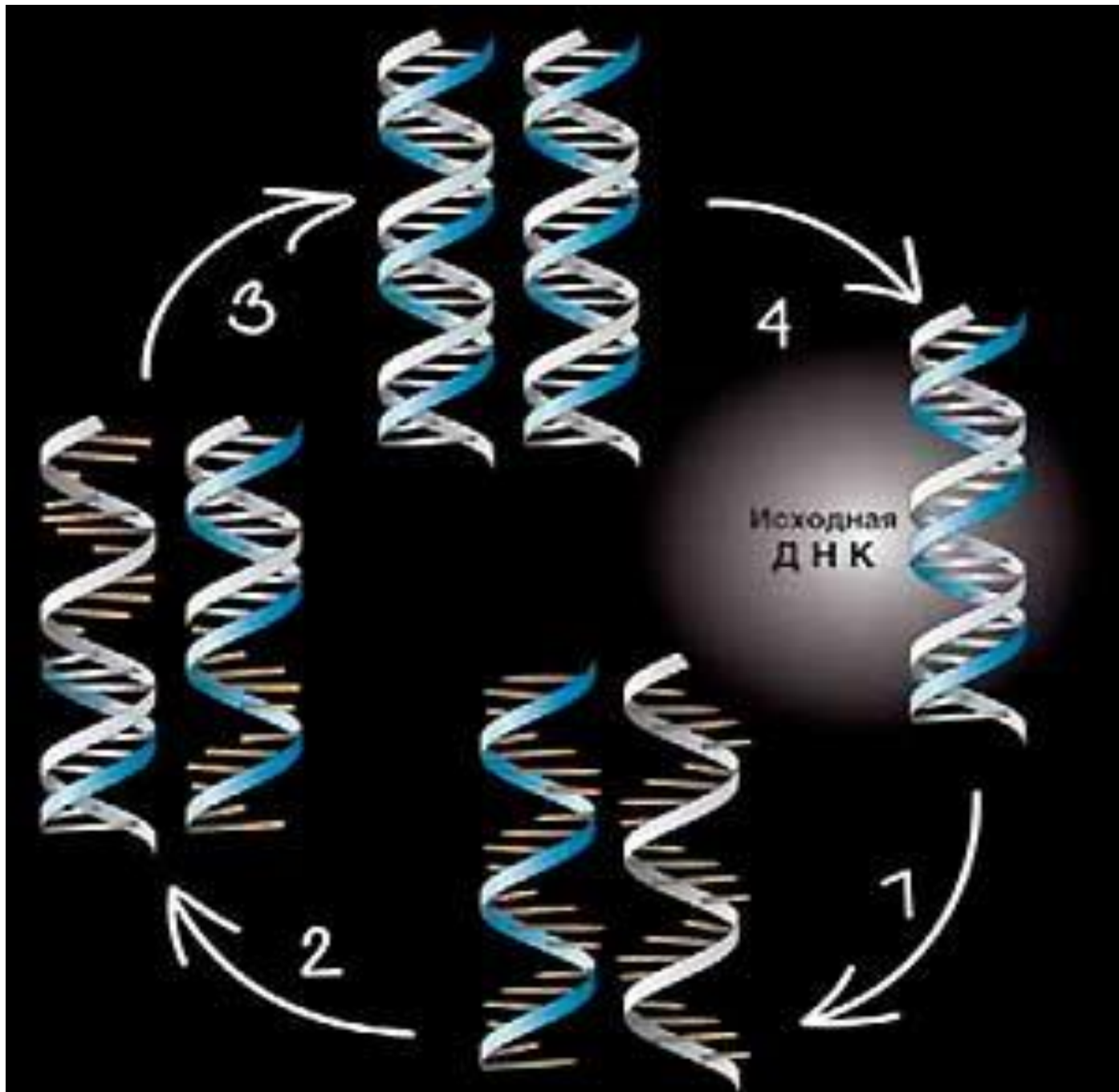
2. Амплификация



3. Детекция в агарозном геле

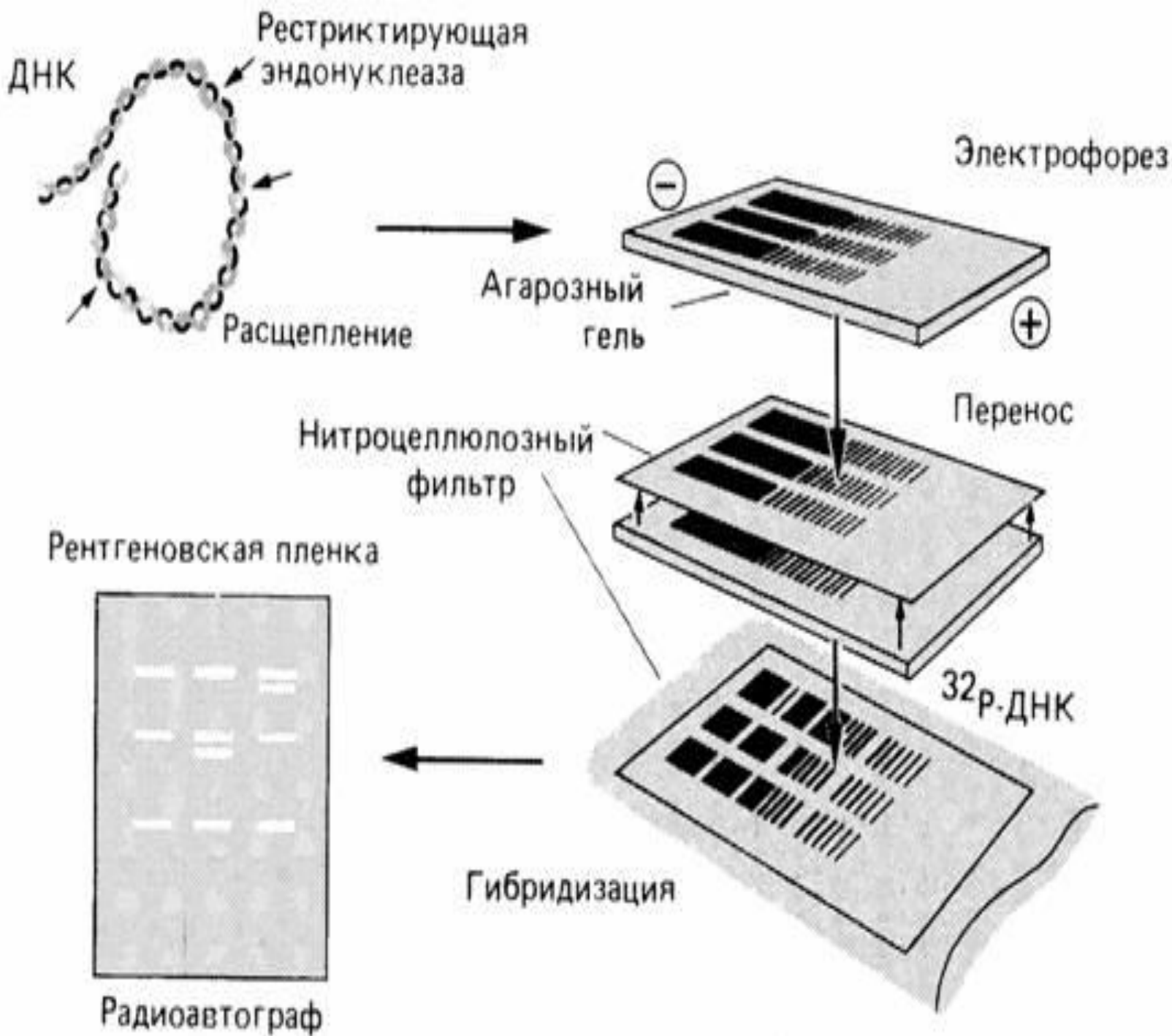


- **Преимуществами метода ПЦР являются:**
- **1. Универсальность.** При помощи ПЦР можно определять ДНК в любых биологических образцах.
- **2. Высокая специфичность.** Специфичность определяется тем, что в ПЦР определяется уникальный участок гена, характерный только для данного возбудителя. Для повышения специфичности, возможно, определять несколько разных генов одного микроба.
- **3. Высокая чувствительность.** Полимеразная цепная реакция способна выявлять единичные копии ДНК.
- **4. Малый объем биологического материала.** Проведение анализа возможно в минимальном объеме пробы (до нескольких микролитров), что крайне важно в педиатрии, неонатологии, неврологии, судебной медицине.
- **5. Возможность диагностики не только острых, но и латентных инфекций.** Особенно эффективен метод ПЦР для диагностики трудно культивируемых, некультивируемых и персистирующих (нереагирующих на антибиотик) форм микроорганизмов, с которыми часто приходится



ДНК – ГИБРИДИЗАЦИЯ

- Если водный раствор ДНК нагреть до 100°C и повысить рН до 13, то ДНК диссоциирует на 2 цепи (денатурирует), так как комплементарные связи между основаниями разрушаются. В 1961 году было обнаружено, что этот процесс обратим: выдерживание ДНК при температуре 65°C вело к восстановлению структуры двойной спирали. Этот процесс называется ренатурация или гибридизация.



- Процессы гибридизации происходят между любыми одинарными цепями, если они комплементарны: ДНК - ДНК, РНК - РНК, ДНК - РНК.

Для теста необходимо иметь чистый одноцепочечный фрагмент ДНК, комплементарный той последовательности, которую нужно обнаружить.

- **В большинстве случаев мутации, ведущие к наследственным болезням, рецессивны, то есть болезнь развивается, если человек получает дефектные гены от обоих родителей. Аномальные эмбрионы лучше выявлять до рождения. Например, для серповидноклеточной анемии в мутантном гене, кодирующем бета-цепь гемоглобина, последовательность ГАГ заменена на ГТГ. В этом случае синтезируют олигонуклеотид длиной около 20 оснований, метят радиоактивной меткой. Из эмбриональных клеток, содержащихся в амниотической жидкости, выделяют**

- *Исследуемую ДНК гидролизуют рестриктазами, фракционируют электрофорезом, переносят разделенные фрагменты на нитроцеллюлозный фильтр и проводят реакцию гибридизации с мечеными олигонуклеотидами*

- Этот метод можно применять для комплексной диагностики инфекционных заболеваний, наследственных дефектов, установления экспрессии тех или иных генов (в этом случае идет гибридизация с мРНК), то есть отслеживания нарушений обмена веществ. Они дешевы, очень надежны, просты в обращении и могут многократно использоваться. Недостаток – дорогая аппаратура для детекции.

Аппаратура используемая в ДНК - гибридизации



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

- В настоящее время ДНК-диагностика сильно продвинулась вперед. Сейчас её пройти может каждый человек, так как существует множество клиник и специалистов. Кроме того это направление продолжает развиваться, из-за необходимости в медицине и судебной медицине.

