

# 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 определяет 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 мутациями.
  - 3. Мультифакториальные болезни (с наследственной предрасположенностью) обусловлены комбинацией генетических и негенетических 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.

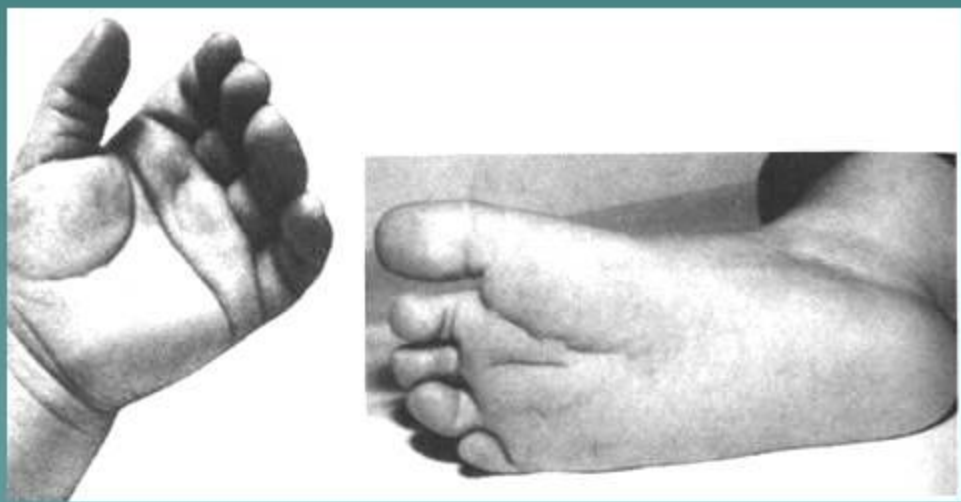


# *Генные мутации*

- **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**



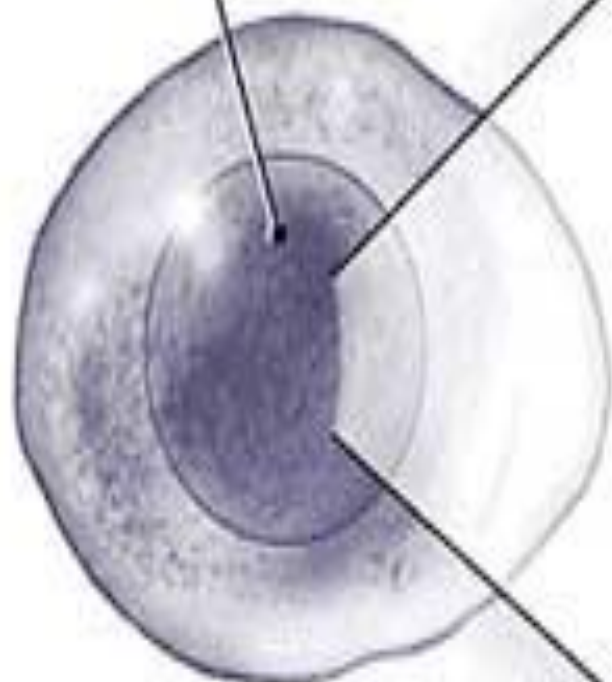
# СИНДРОМ ДАУНА (ТРИСОМИЯ 21)



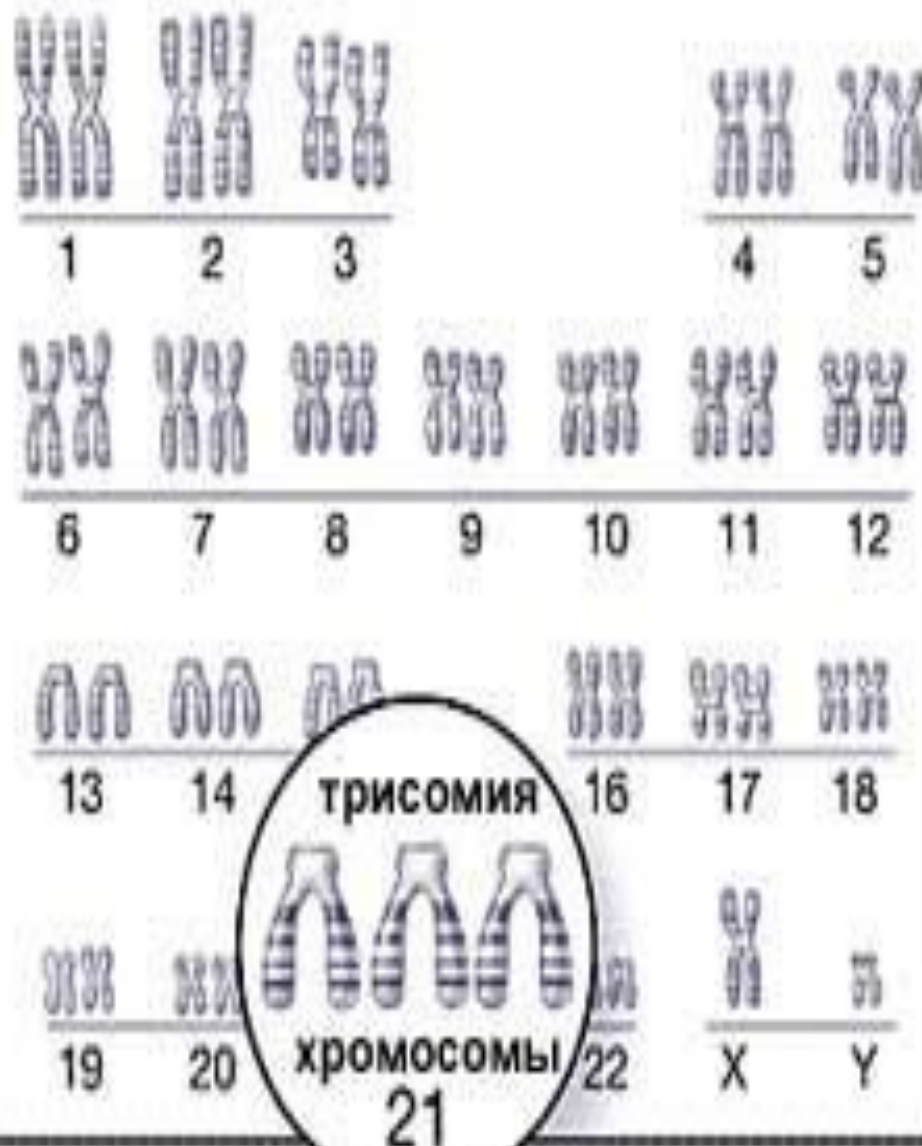
- ◆ Описан в 1866 г.
- ◆ **Клинические признаки:** умственная отсталость, плоское лицо, монголоидный разрез глаз, открытый рот, брахицефалия, короткие конечности, поперечная ладонная складка, пороки сердца и катаракта. Частота рождения таких детей зависит от возраста матери.
- ◆ **Тип наследования:**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

# Хромосомы

Ядро



Клетка



C. Lynn



- "плоское лицо";
- эпикантус;



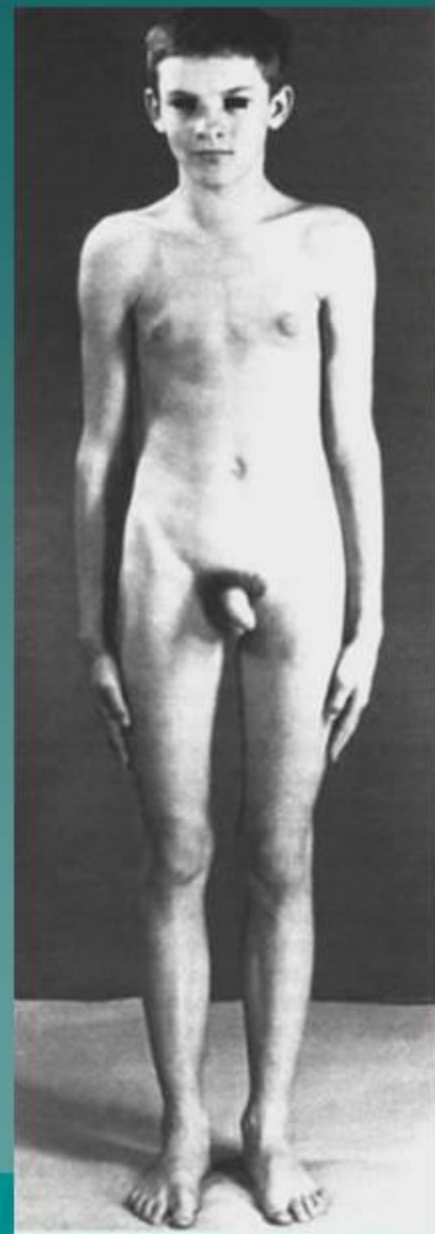
- одна ладонная складка;
- искривление мизинца

аномальное расстояние между первым и вторым пальцами



# СИНДРОМ КЛАЙНФЕЛЬТЕРА (47, XXУ)

- ◆ 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:** XXУ 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 складка, незначительное снижение умственного развития.
- ◆ **Тип наследования:** моносомия X-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  
(крипторхизм, 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.

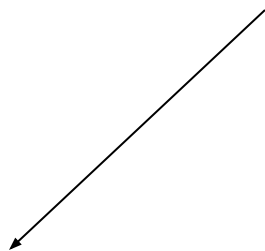
# ДНК - диагностика

Изучает непосредственную причину заболевания

Наиболее адекватная и точная диагностика

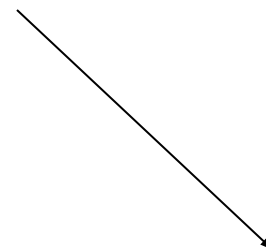
Возможна даже в тех случаях, когда  
неизвестен ген, ответственный за  
заболевание

# Типы ДНК- диагностики



## ПРЯМАЯ

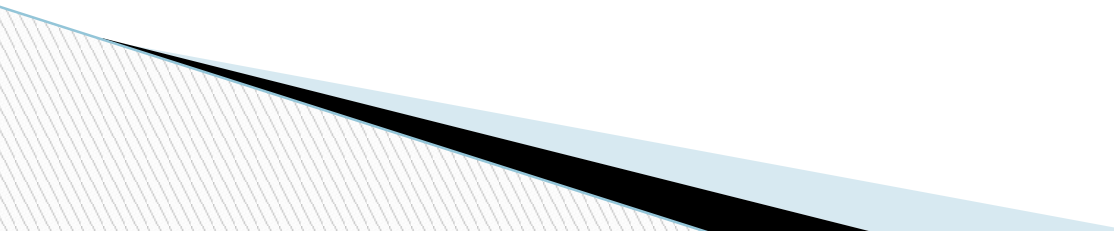
Определение  
мутации,  
являющейся  
непосредственной  
причиной болезни



## 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

Выделение  
ДНК

2 часа

Постановка  
ПЦР

15 минут

Получение  
одноцепочечной  
ДНК

15 минут

Проведение  
секвенирования

10 минут

Анализ  
результатов  
исследования

Источник:

цельная кровь

или соскоб со щеки



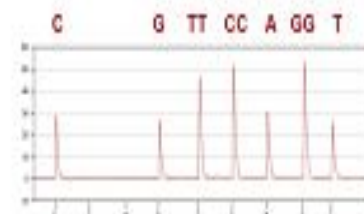
MAXYGENE  
Therm - 1000



PyroMark Q24 Vacuum  
Workstation

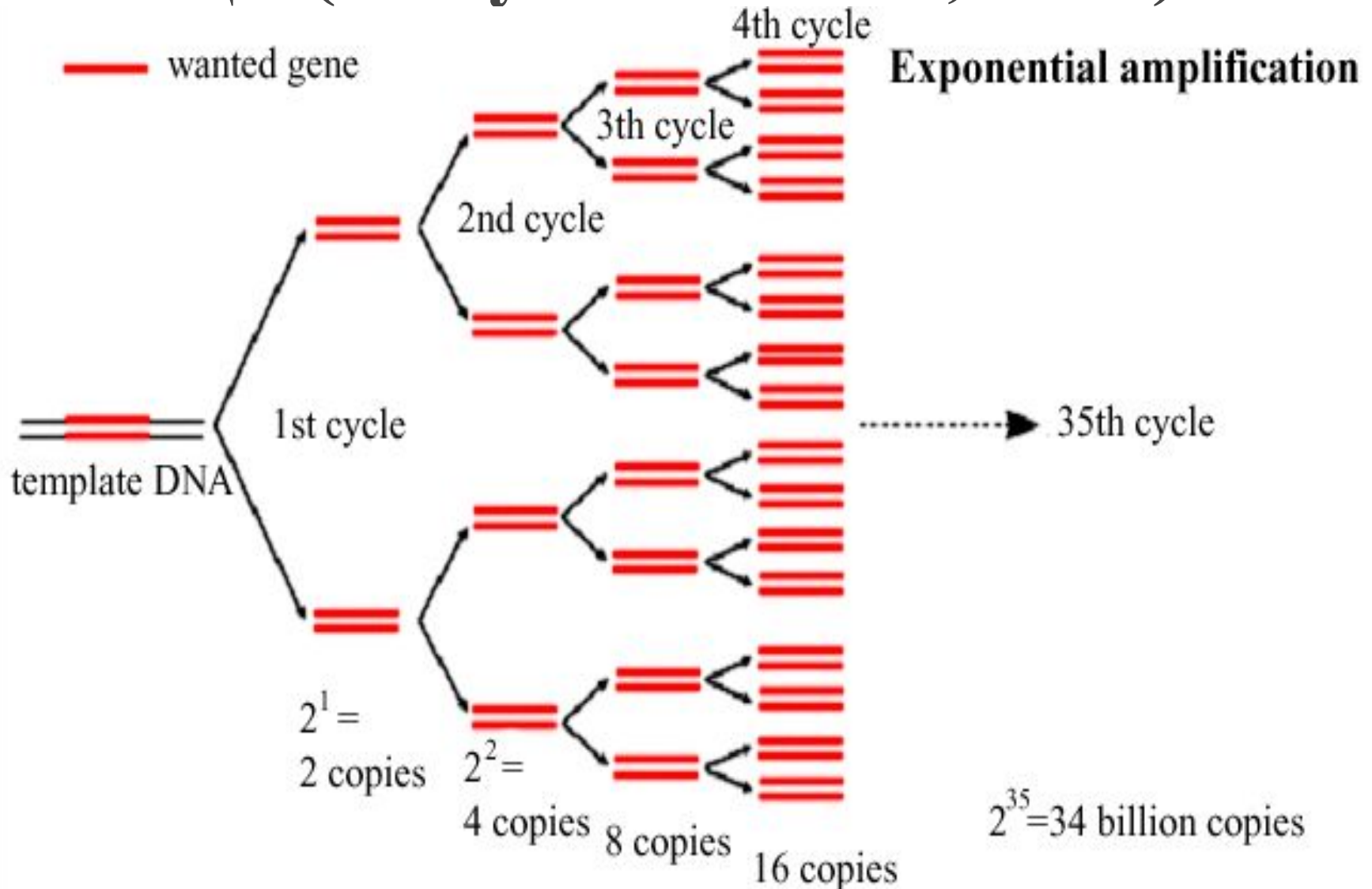


PyroMark Q24



PyroMark Q24  
Software

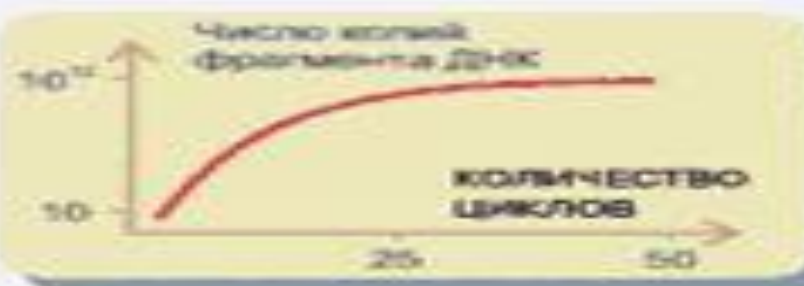
# Схема удвоения фрагментов ДНК в ПЦР (Andy Vierstraete, 2001)



### 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

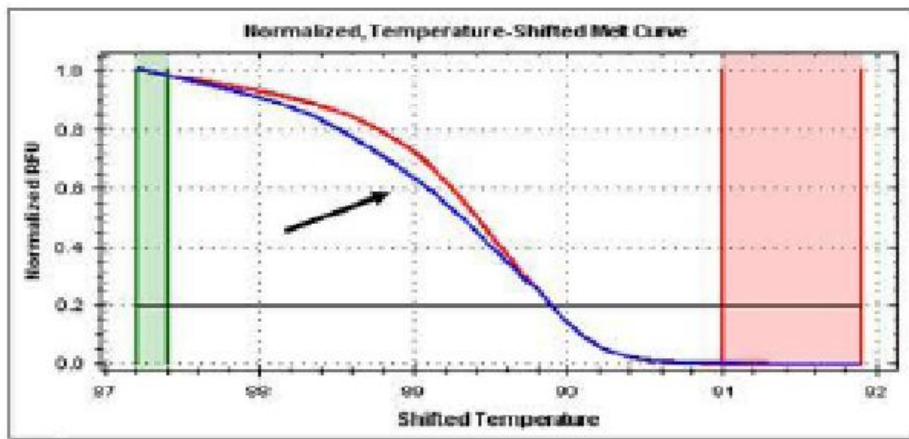
Метод флуоресцентной количественной полимеразной цепной реакции (quantitative Fluorescent PCR – QF-PCR) заключается в амплификации коротких tandemных повторов ДНК (STR), расположенных на исследуемой хромосоме или сцепленных с исследуемым геном. Использование в ПЦР специальной флуоресцентной метки позволяет 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 флуоресцентный зонд и далее через 30-40 циклов определяют уровень флуоресценции. Интерпретация результатов проводится с учетом количества пиков на электрофореграмме и их относительной высоты.

# Real-time ПЦР

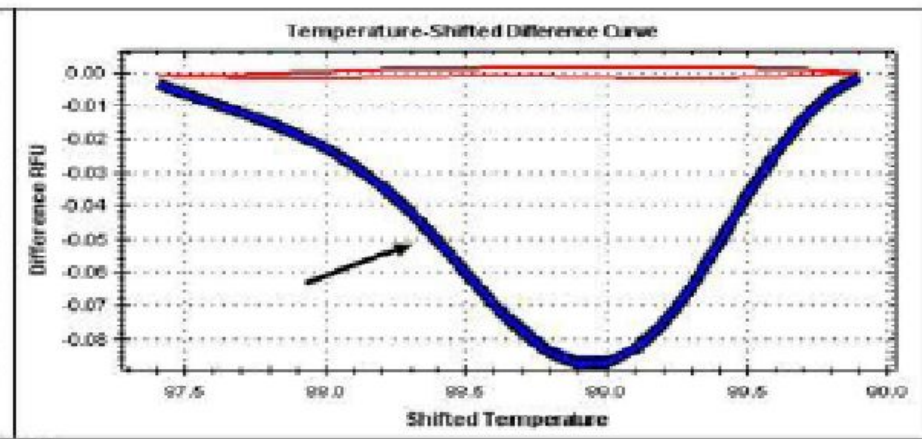
- Анализ дозы гена (делеции/дупликации)
- Определение точковых замен
- Анализ экспрессии генов
  - онкологические исследования
  - трисомии
  - анализ плодного материала по кровотоку матери
  - генотерапия

## Анализ кривой плавления

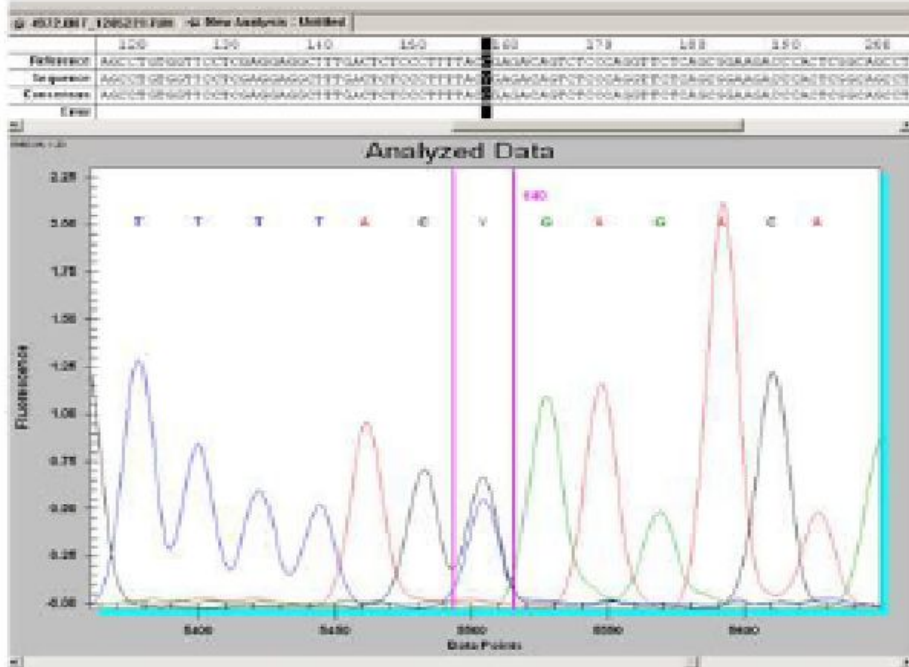
- Позволяет провести оценку качества реакции, поскольку увеличение флюорисценции может быть связано как с накоплением специфического продукта, так и неспецифического (праймеры-димеры, шмер).
- Для этого после окончания ПЦР реакционную смесь нагревают и непрерывно измеряют флюоресценцию. По достижении 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.



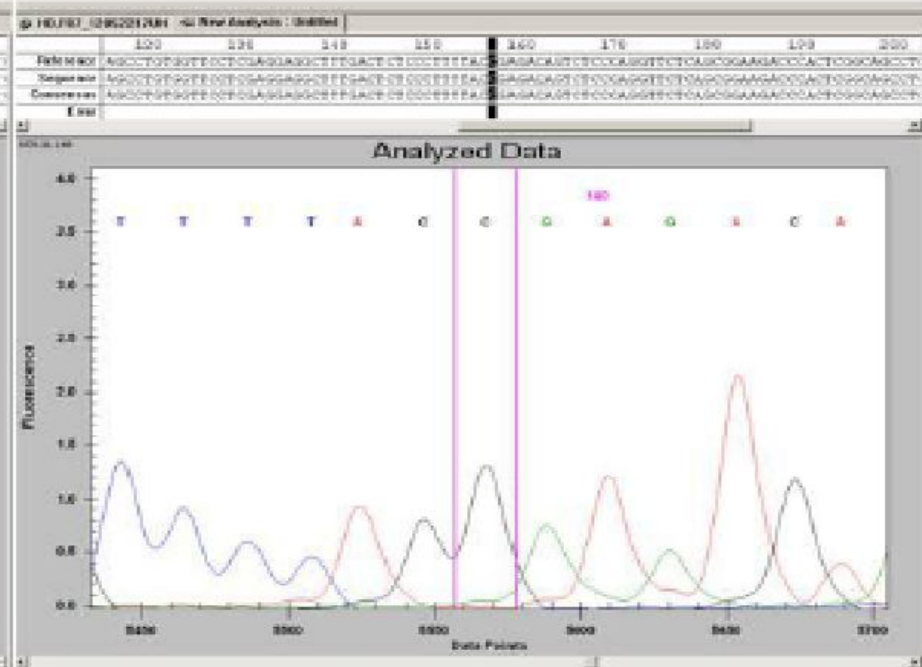
A



B



C



D

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

# MLPA – анализ (мультиплексная амплификация лигазно-связанных проб)

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

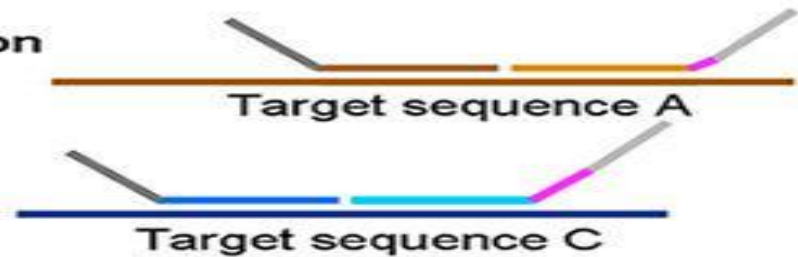


## A: Probe pair design

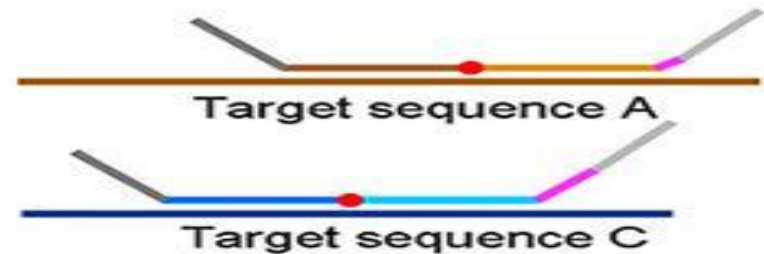


## B: Reaction principle

### 1. Denaturation and hybridization



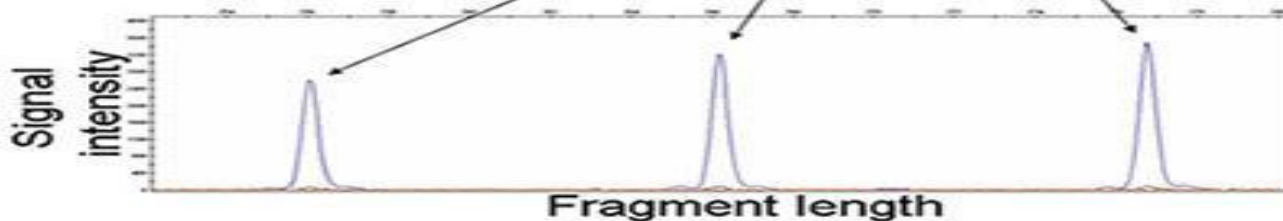
### 2. Ligation



### 3. PCR with universal primers X and Y (fluorescently labeled)



### 4. Fragment analysis



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

AAACGTGAACTCGTCGCAGAAGCAGCATTTCCTCAAGCCCATAGCGCTTGCAATTGTAATTGTTGCCACAAGCAGGCCAGCCAAATC

короткие прочтения

ACGTGAACTCGTCG**G**AGAAGCAGCA TTCCAAGCCCATAGCGCTTG**T**AATTG TGTT**G**CACAAGCAGGCCAGCCAAA  
CGTGAACTCGTCGCAGAAGCAGCAT TCCAAGCCCATAGCGCTTG**T**AATTGT GTT**G**CACAAGCAGGCCAGCC**T**AAT  
GTGAACTCGTCGCAGAAGCAGCATT CCAAGCCCATAGCGCTTG**T**AATTGTA TT**G**CACAAGCAGGCCAGCC**T**AATC  
TGAACTCGTCGCAGAAGCAGCATT CCAAGCCCATAGCGCTTG**T**AATTGTA  
TGAACTCGTCG**G**AGAAGCAGCATT CAAGCCCATAGCGCTTG**T**AATTGTA  
TGAACTCGTCG**G**AGAAGCAGCATT CGCTTG**T**AATTGTAATTGTT**G**CAC  
TGAACTCGTCG**G**AGAAGCAGCATT GCTTG**T**AATTGTAATTGTT**G**CACA  
GAACTCGTCGCAGAAGCAGCATT GCTTG**T**AATTGTAATTGTT**G**CACA  
AACTCGTCG**G**AGAAGCAGCATT**CC** GCTTG**T**AATTGTAATTGTT**G**CACA  
ACTCGTCGCAGAAGCAGCATT**TTCC** CTT**G**T AATTGTAATTGTT**G**CACAA  
CTCGTCG**G**AGAAGCAGCATT**ACCA** TT**G**T AATTGTAATTGTT**G**CACAAG

↑  
SNP

(гетерозиготный)

↑  
ошибка

секвенирования

↑  
SNP

(гомозиготные)

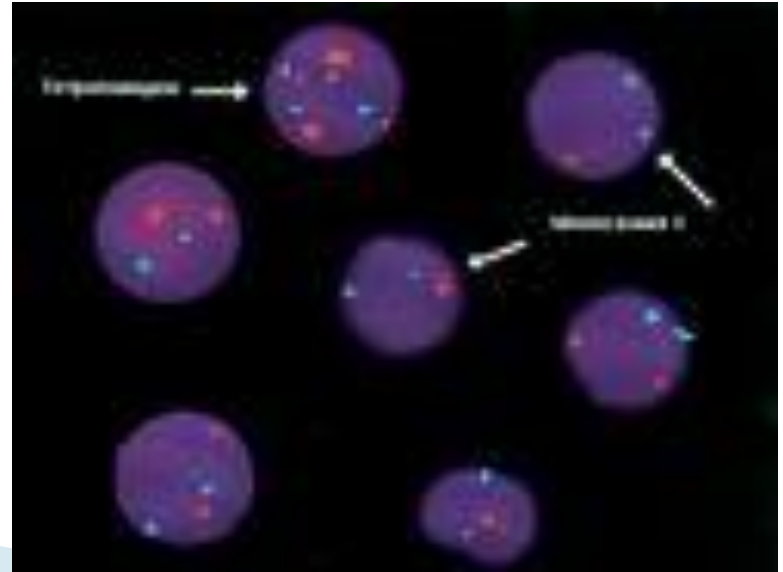
↑  
SNP

секвенирования

↑  
ошибка

# 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 ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) в течение 50 или 69 часов (срок первого и второго митотических делений соответственно).



# Генеалогический метод -

метод составления и анализа родословных.

## *Типы наследования генных заболеваний:*

- 1) аутосомно-доминантный;
- 2) аутосомно-рецессивный;
- 3) X-сцепленный доминантный;
- 4) X-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!**

