Молекулярно-генетические методы

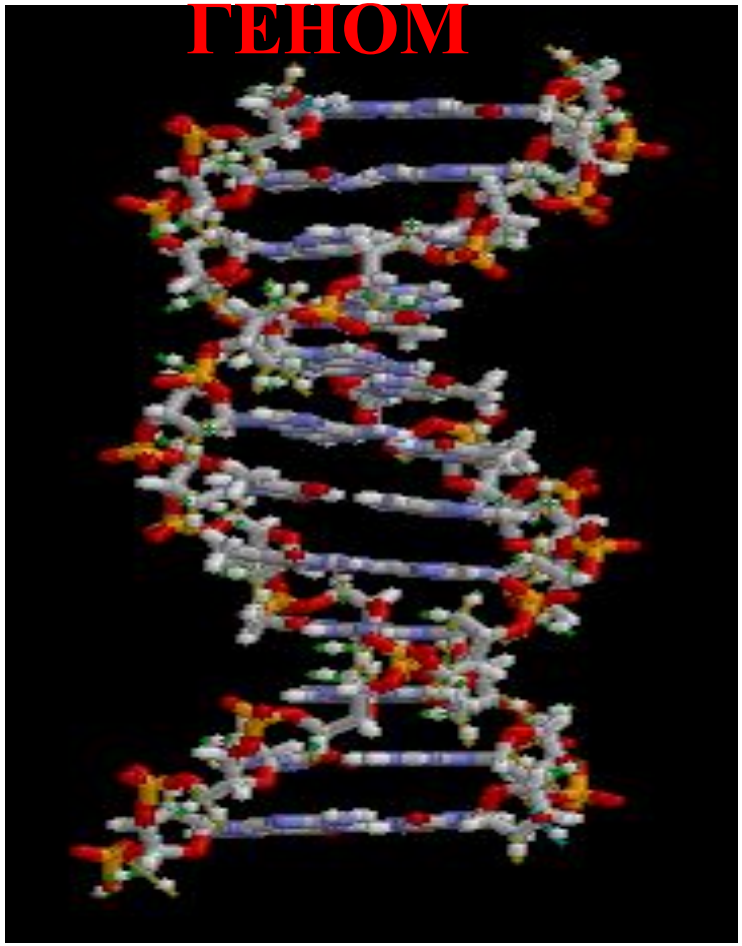
Ассистент кафедры лабораторной диагностики ИПО БГМУ

к.м.н. Билалов Ф.С.

Молекулярная медицина

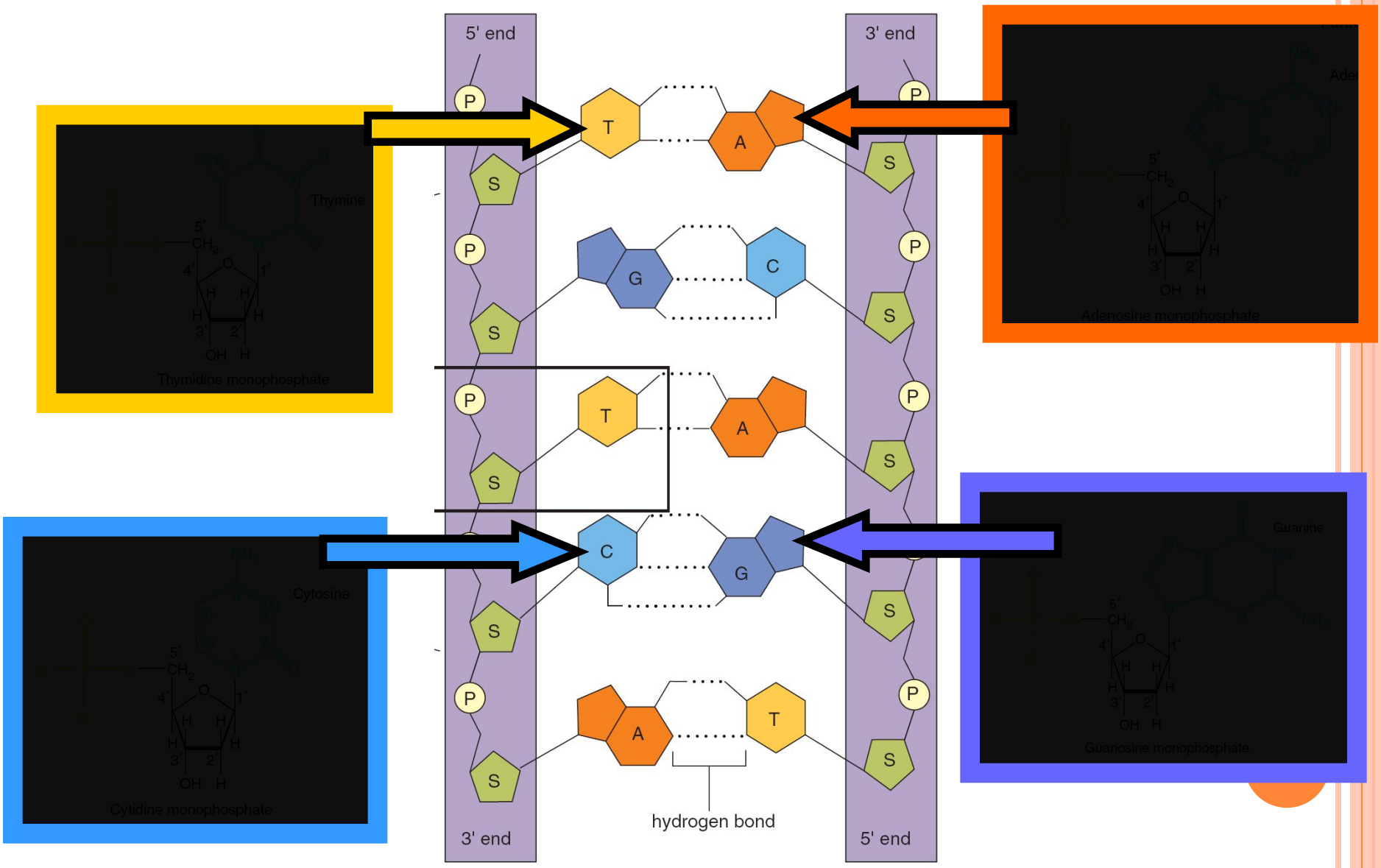
Своевременное выявление **предрасположенности** к возникновению патологии

ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ: ГЕНОМ

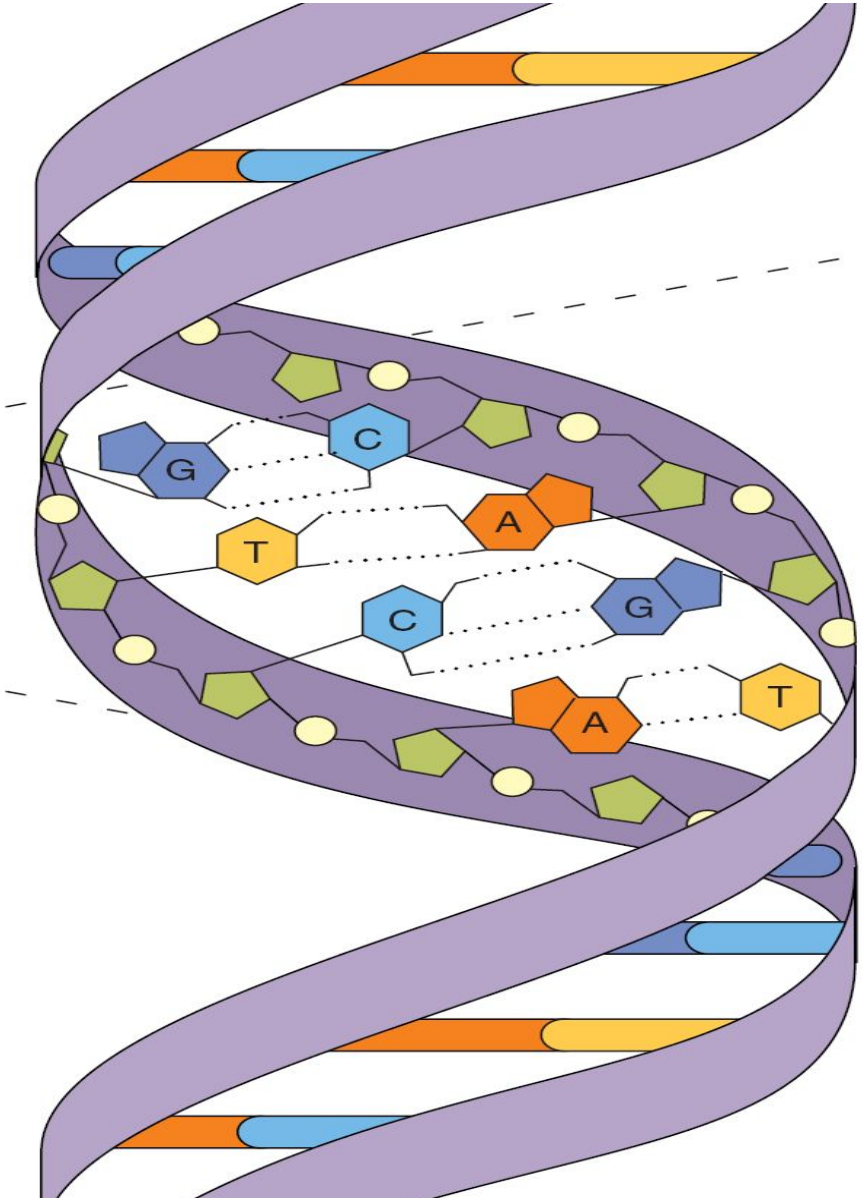


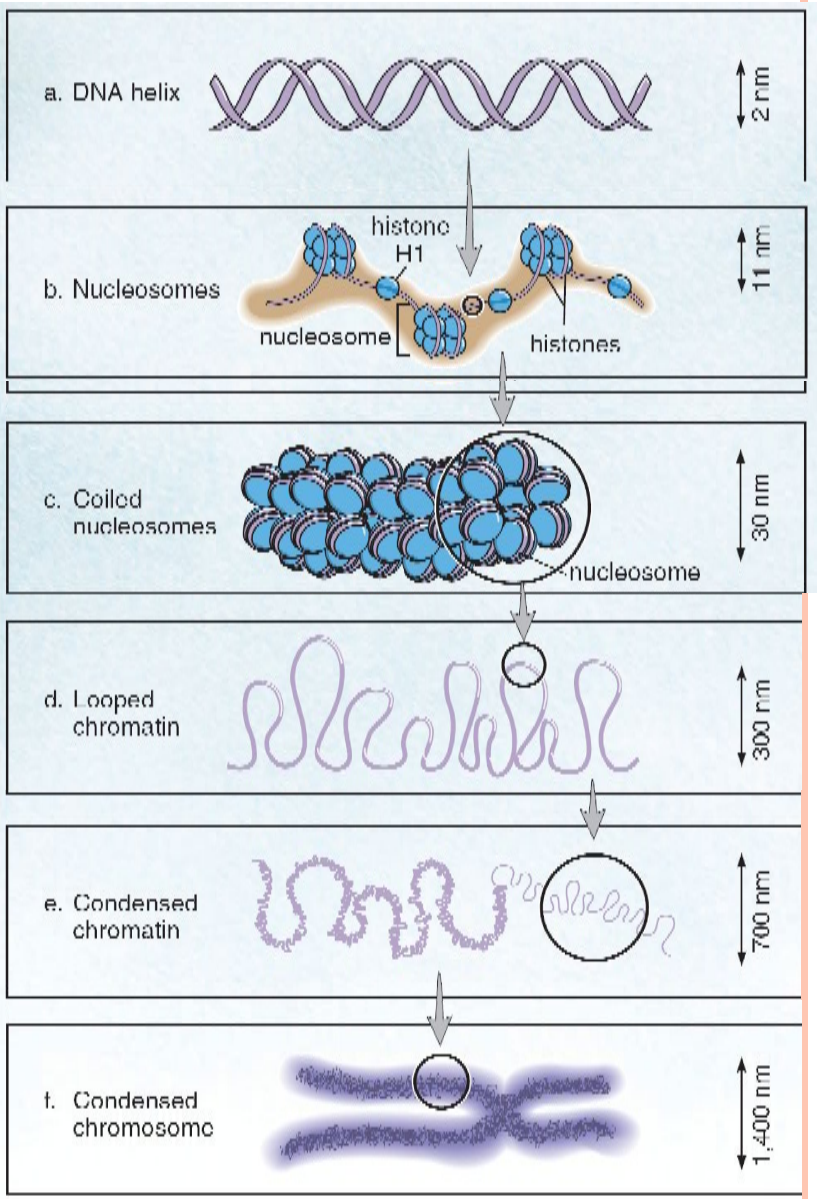
Геном – полный набор генов, содержащий весь объем информации, необходимой для развития организма, его существования в определенных условиях среды и передачи всех наследственных свойств в ряду поколений.

Организация генома: состав и структура ДНК

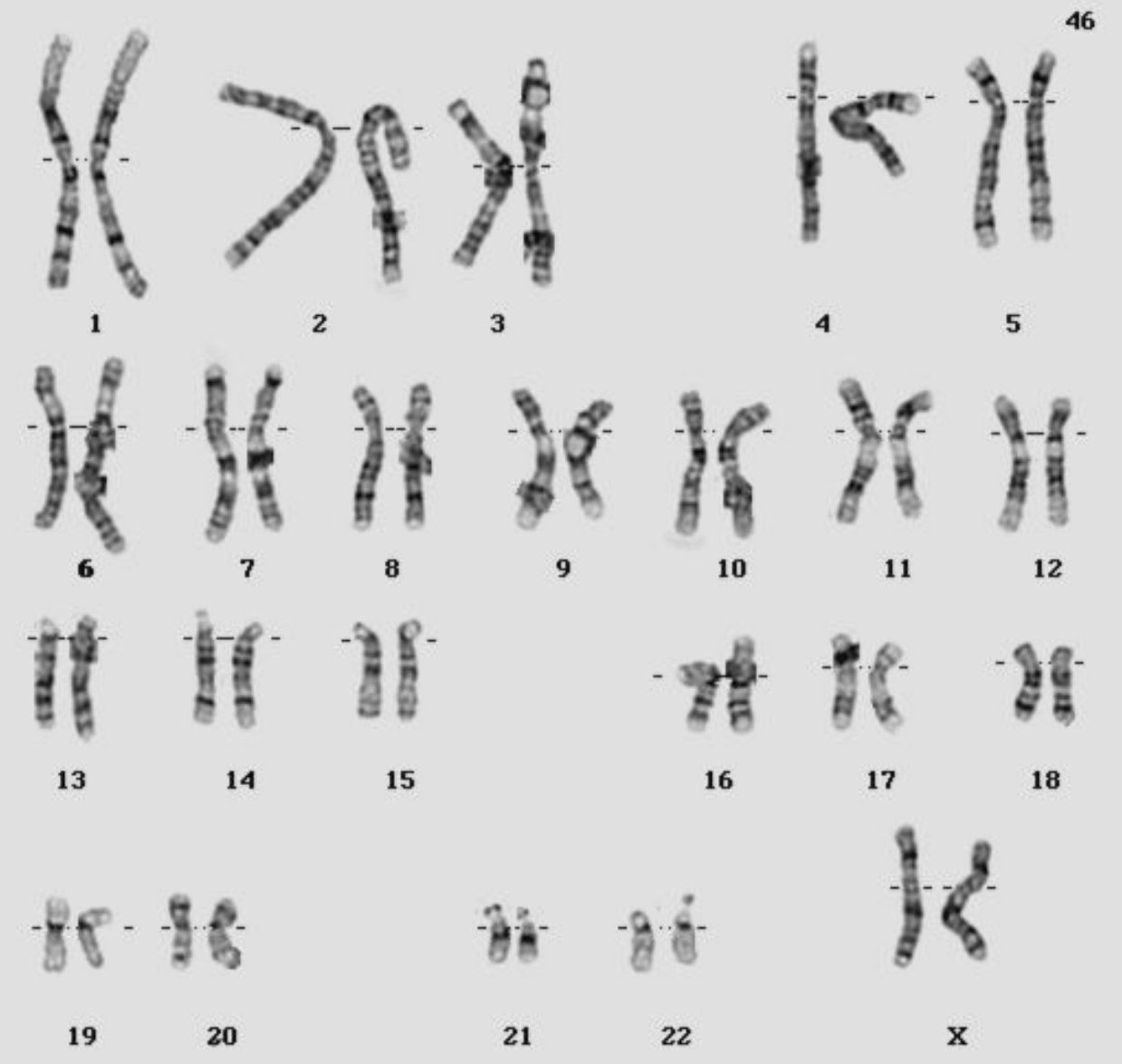


Организация генома: ДНК – хроматин - хромосома





Нормальный кариотип человека

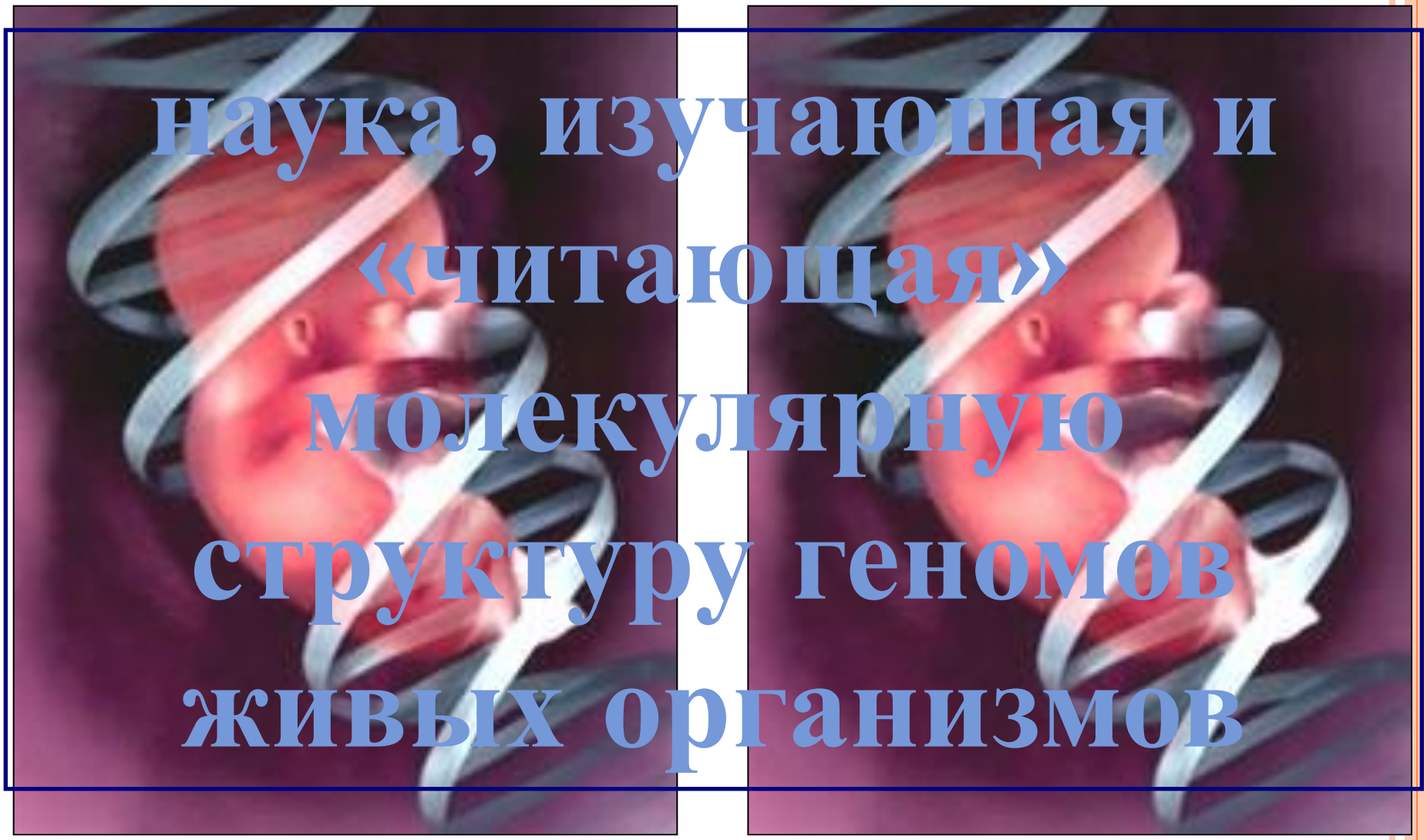


- 46, XX (жен.)
  или
  46, XY (муж.)

- 22 пары аутосом
  2 половые хромосомы
  Гаплоидный набор (n)
  Диплоидный набор (2n)

ГЕНОМИКА

инструмент молекулярной медицины



наука, изучающая и «читающая» молекулярную структуру геномов живых организмов

Основа геномики –

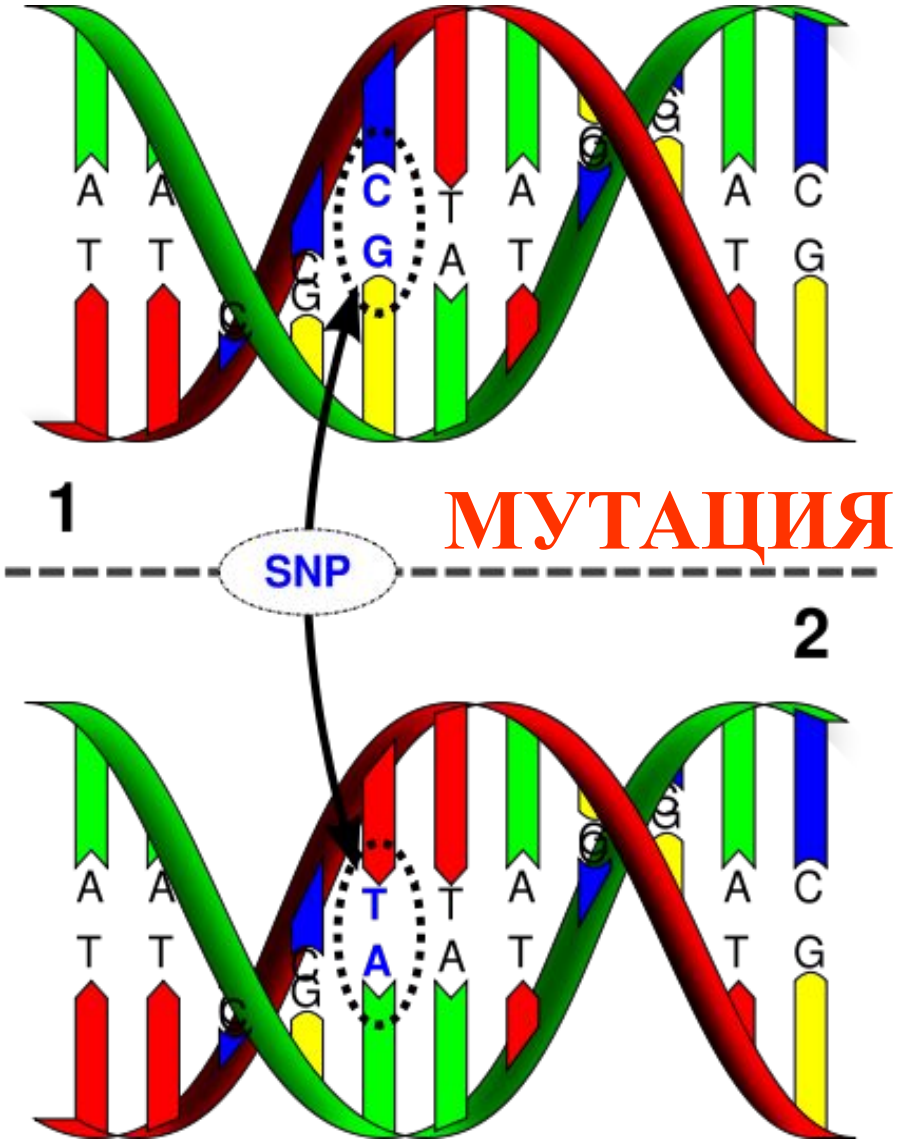
расшифровка генома человека

Проект «Геном человека» 1990-2003 г («двойная спираль» открыта в 1953 г.!)

Идентификация 3 миллиардов нуклеотидов!!!
Прочтены гены многих наследственных моногенных заболеваний

Обнаружены естественные вариации генома – однонуклеотидные замены –
полиморфизмы единичных нуклеотидов –
SNP
Создание карты SNP - до 600 000 вариаций

Естественные Вариации Генома???



МУТАЦИЯ?

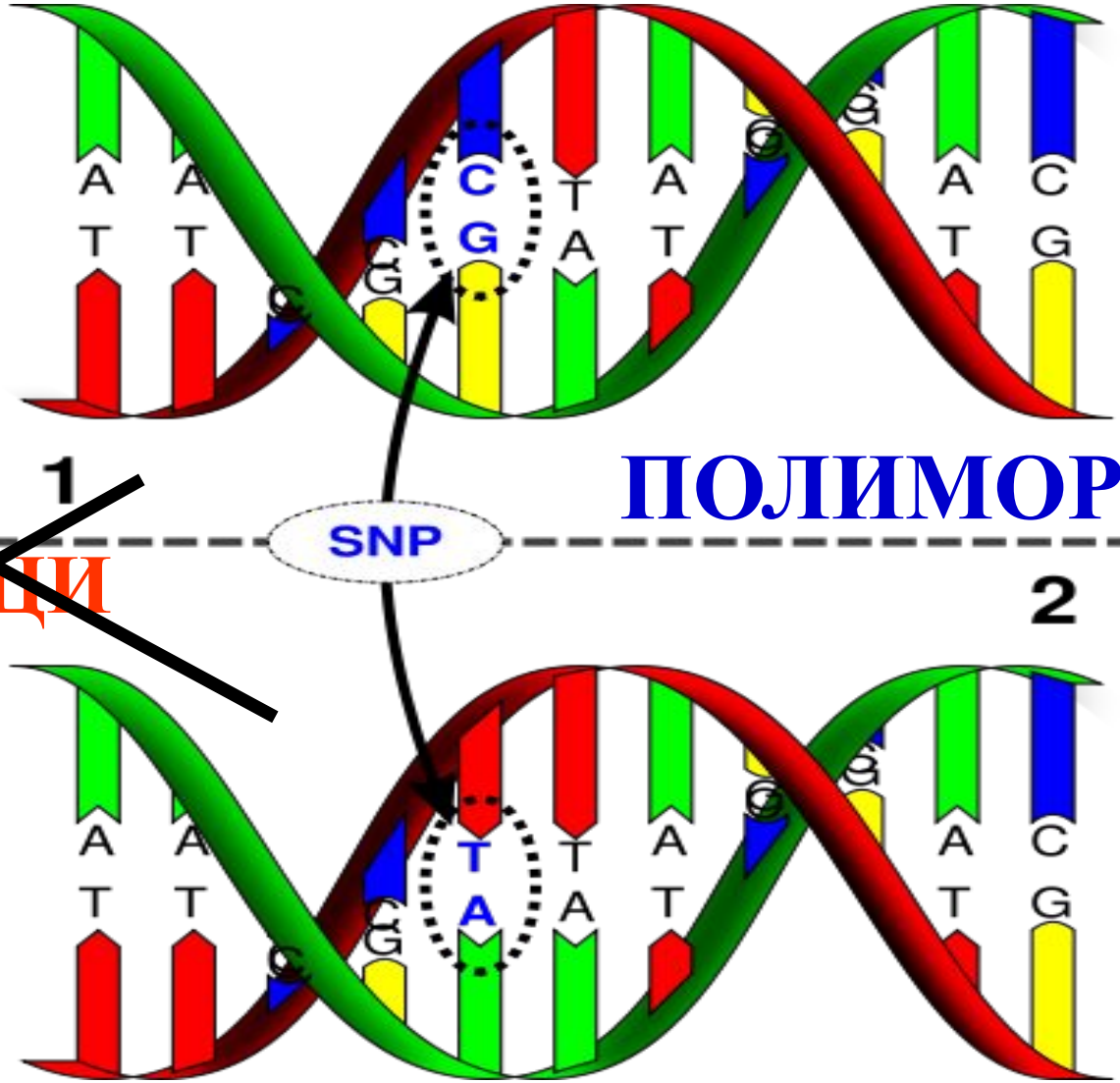
- **Моногенные болезни чаще всего вызваны мутацией одного гена – однонуклеотидными заменами.**
- **Для этих болезней характерно менделевское наследование - аутосомно-доминантное, аутосомно-рецессивное и Х-сцепленное.**
- **Муковисцидоз, Фенилкетонурия, Спинальные амиотрофии, Нейросиндромальная тугоухость**

Мутации и естественные вариации генома - полиморфизмы

Мутация – это изменение в последовательности нуклеотидов ДНК, встречающиеся в популяции с частотой менее 1% и приводящие к состоянию несовместимому с жизнью, либо ведущему к неэффективному функционированию генома (моногенные болезни).

Полиморфизм – это «мутации», встречающиеся в популяции с частотой 2% и выше и проявляющиеся в фенотипе не столь очевидно, и не приводящие к заметным нарушениям функции гена.

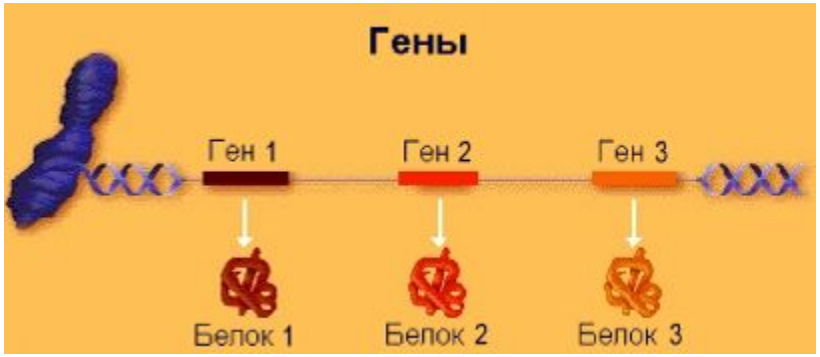
Естественные Вариации Генома



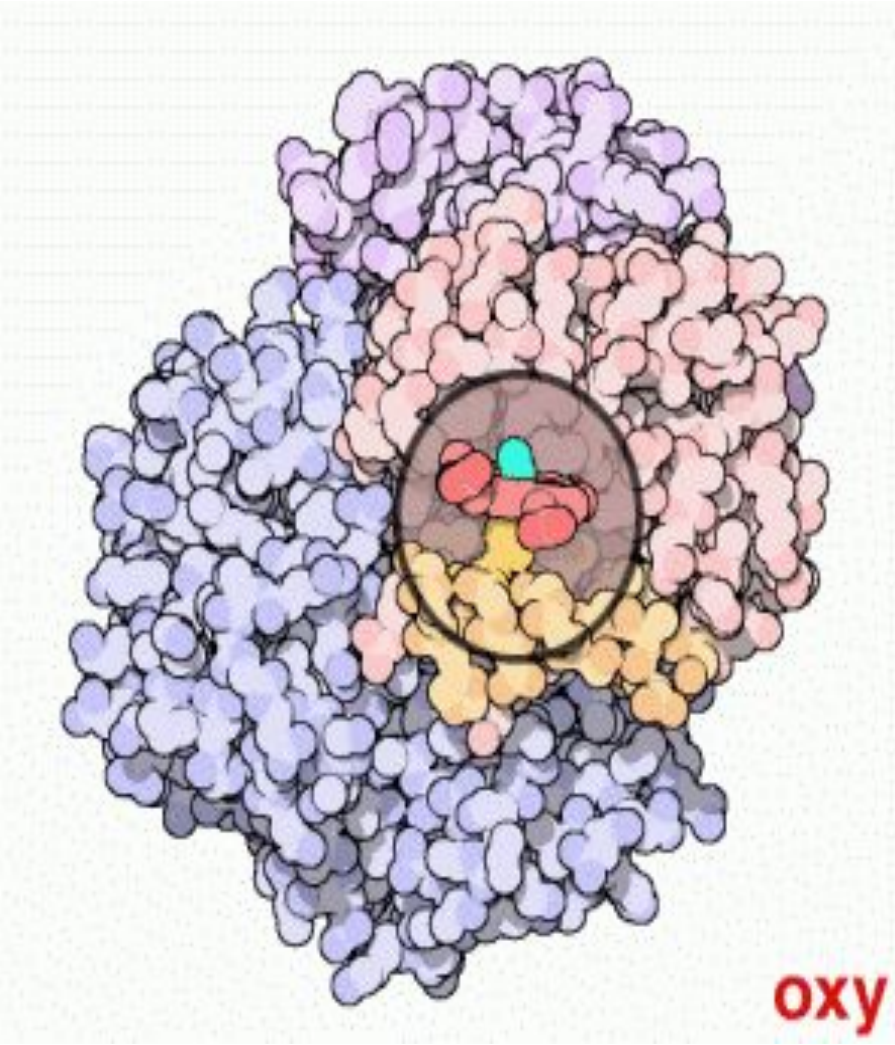
~~МУТАЦИЯ~~

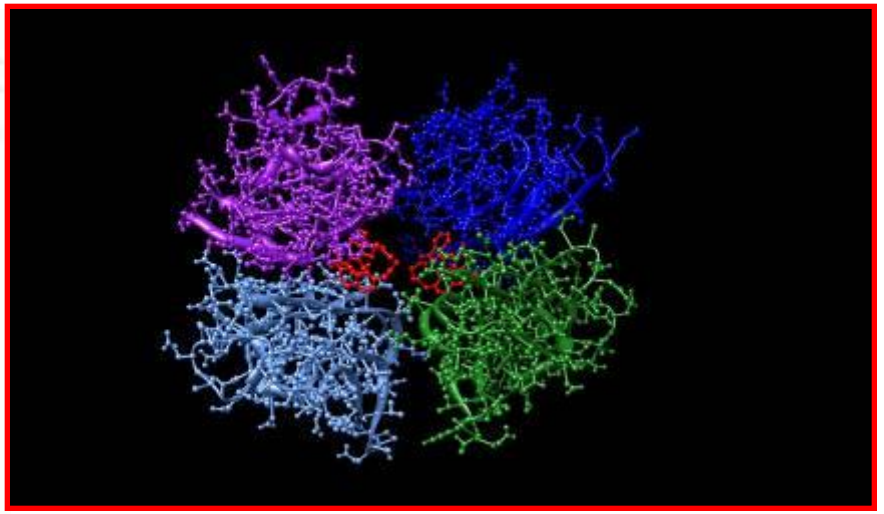
ПОЛИМОРФИЗМ

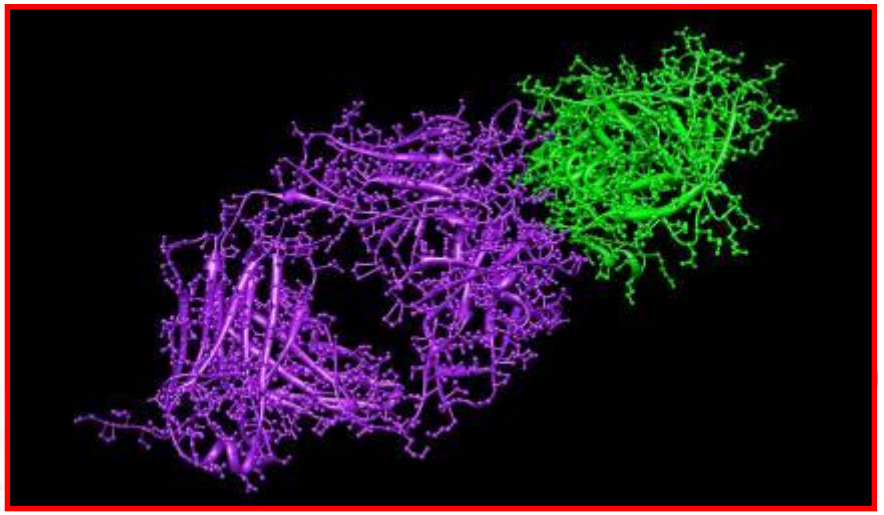
Гены кодируют последовательность аминокислот в белках



SNP – молекулярные свойства белка







SNP – молекулярные свойства белка

SNP – приводят к появлению белковых продуктов с незначительно измененными физико-химическими свойствами

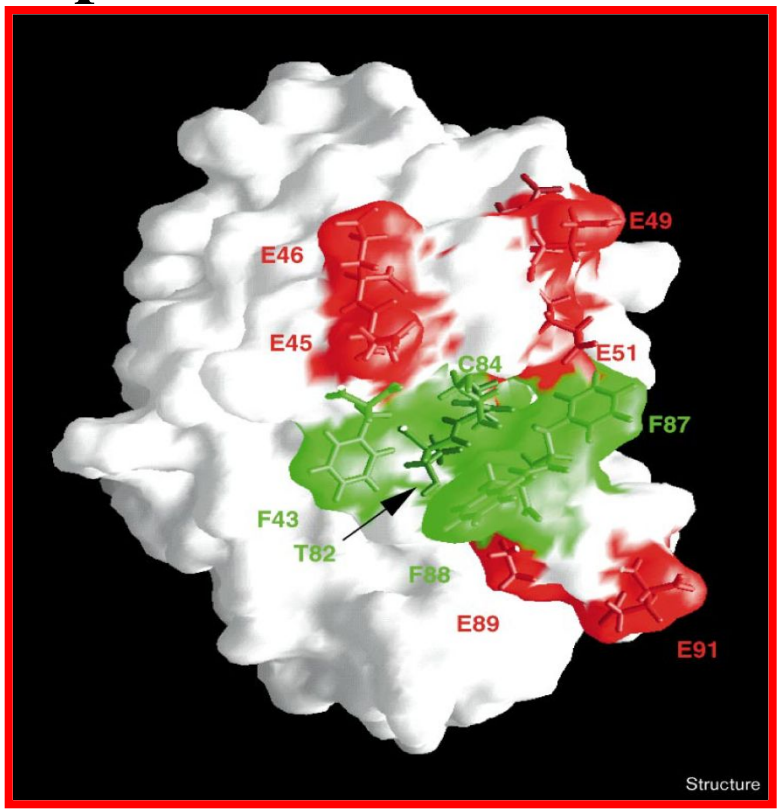
SNP – молекулярные свойства белка

- **Конформация -** 3D - формы молекул, которые могут динамически изменяться в пространстве.
- **Аффинность -** термодинамическая характеристика, количественно описывающая силу взаимодействия антигена и антитела или лиганда и рецептора.
- **Связь с субстратом -** величина, характеризующая прочность связи между ферментом и субстратом (насыщение химической реакции, обусловленная соотношением между концентрацией субстрата и скоростью реакции)
- **Температурный оптимум активности фермента**
- **Время «жизни» молекулы**
- **Посттрансляционная модификация –** достройка белковой молекулы углеводными, липидными и пр. молекулярными компонентами.
- **Избыточный синтез белка –** нарушение регуляции

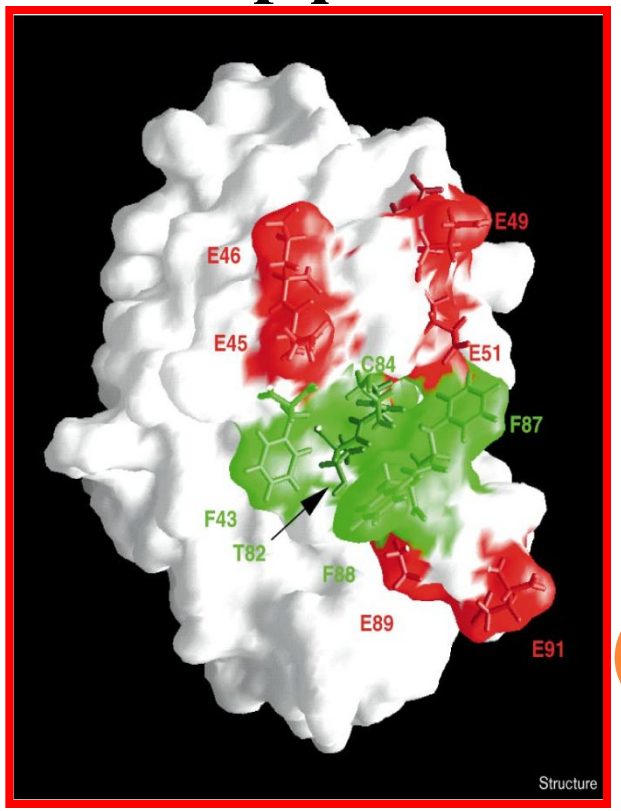
Как это представить?

МУТАЦИЯ!!!-моногенное заболевание!!!

Нормальный белок



Полиморфизм



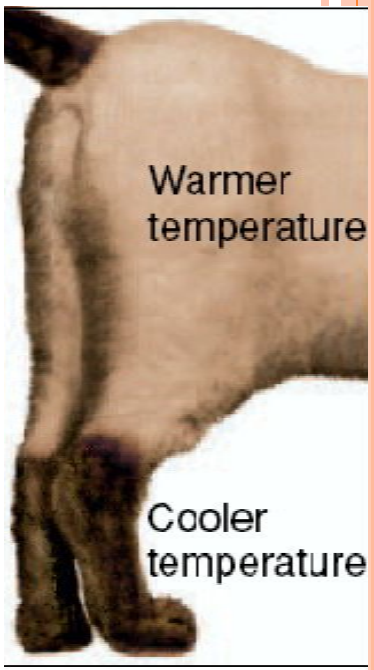
Как это представить (по другому)?

МУТАЦИЯ!!!-моногенное заболевание!!!

Норма

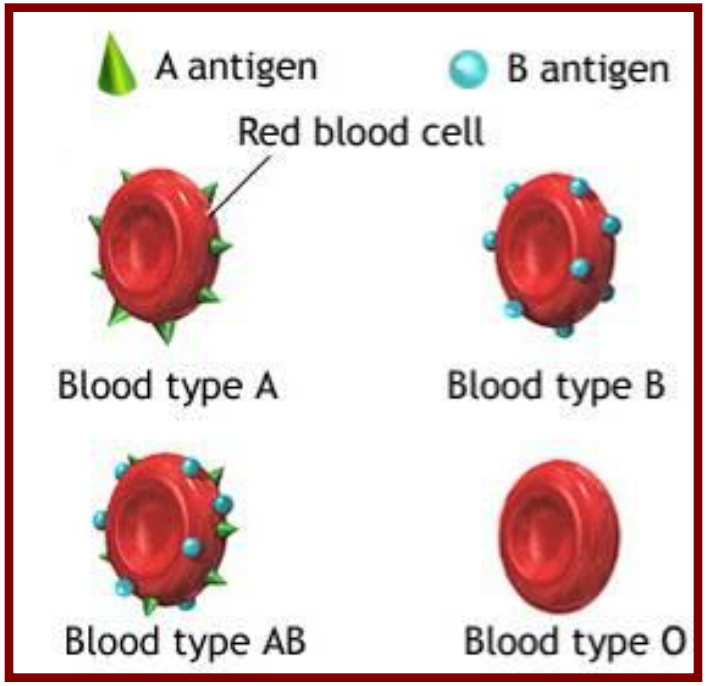
Полиморфизм

Как это увидеть?

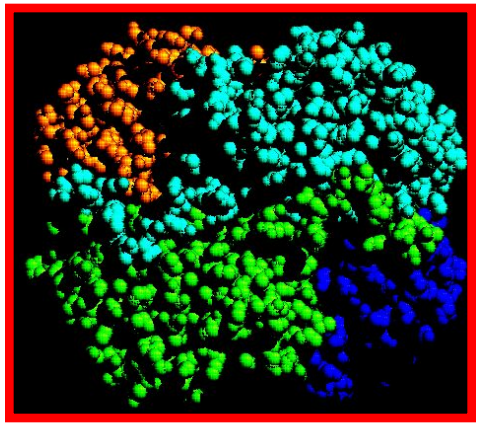


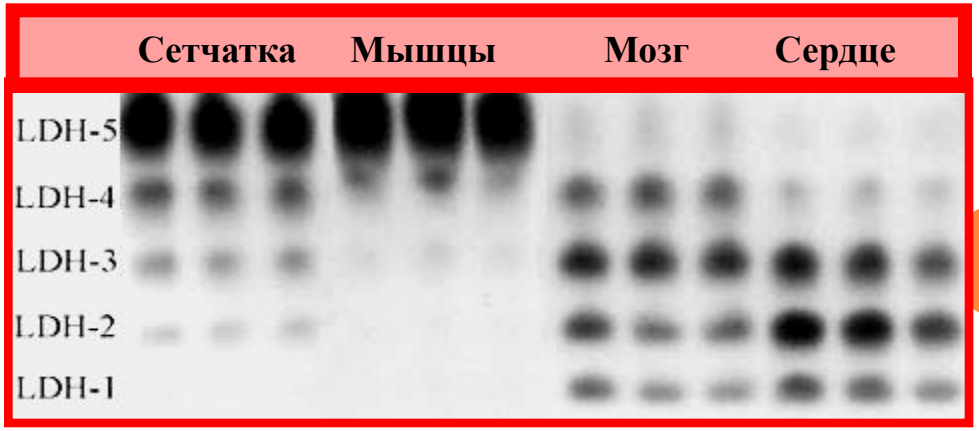
Цвет глаз

Группы крови



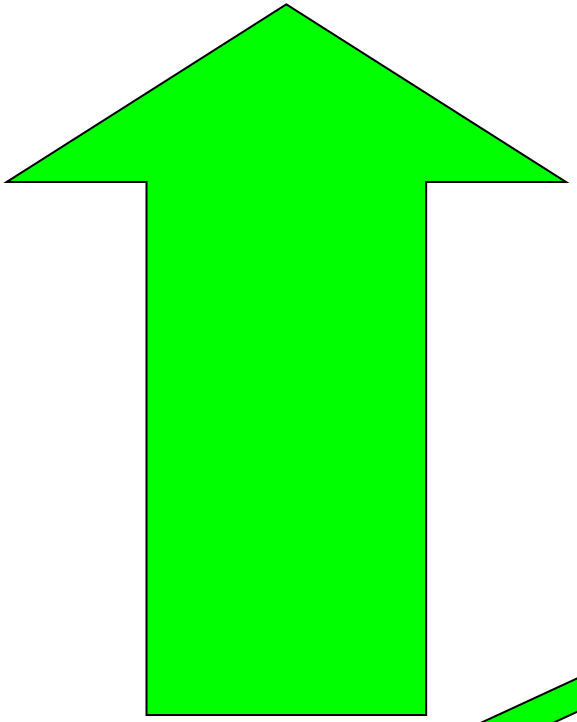
Изоферменты лактатдегидрогеназы



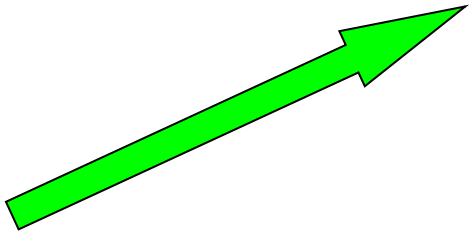


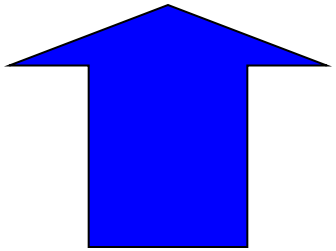
Геномика и болезни цивилизации

Моногенные болезни



Сахарный диабет , подагра , гипертоническая болезнь , ИБС, тромбофилии, язвенная болезнь, астма и онкопатология , нейродегенеративные заболевания, проблемы репродуктивного здоровья.





Наследственность

Окружающая среда

ГЕНОМИКА

Индивидуальный подход к человеку на основе его генетической уникальности позволяет предсказывать:

особенности строения и жизнедеятельности организма

развитие патологиии и проводить устранение опасных факторов окружающей среды до возникновения болезни

- **Болезнь – любое патофизиологическое состояние, увеличивающее вероятность смерти.**

Относительный риск (OR) и ГЕНОМИКА

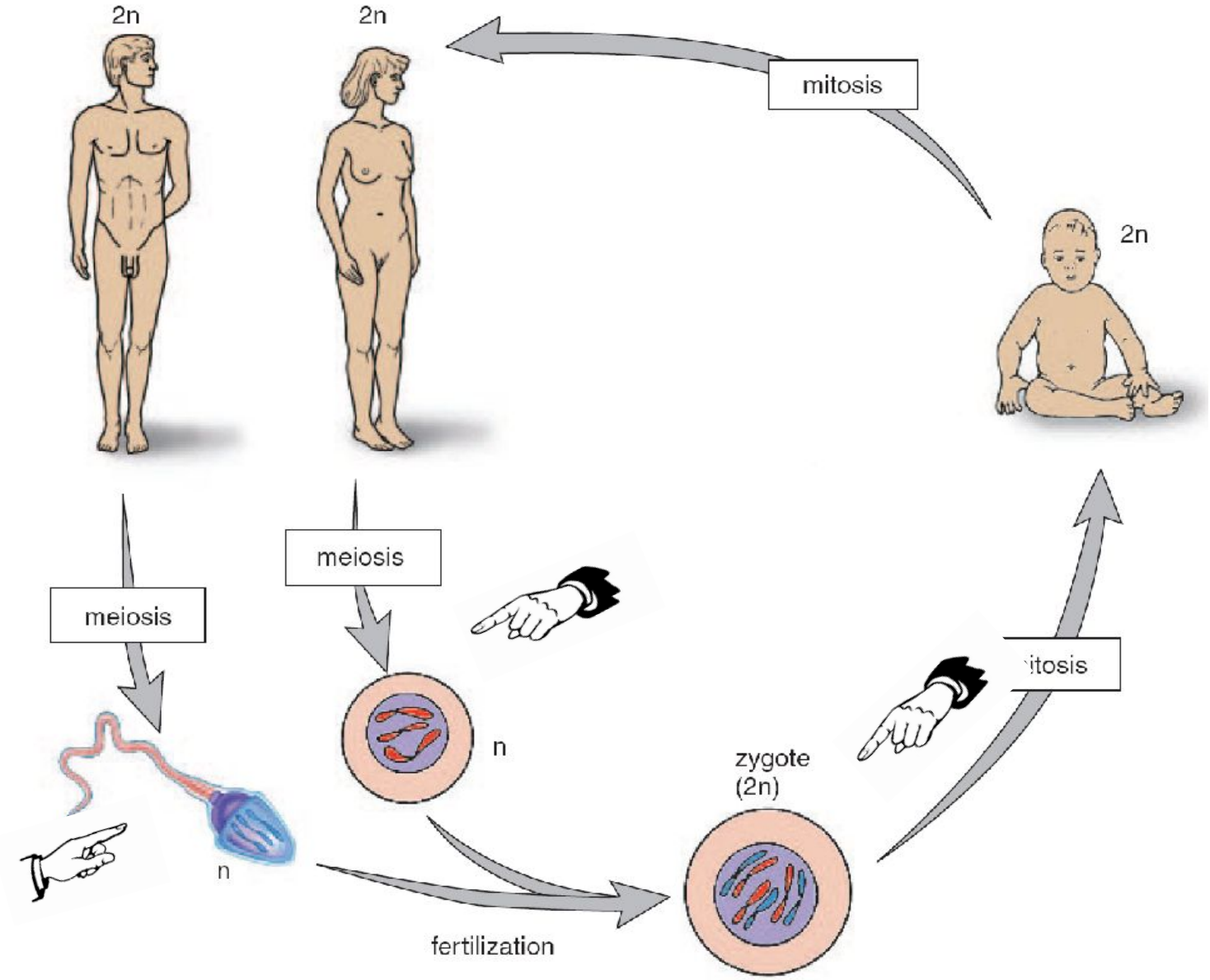
- Степень **взаимосвязи** между наличием **генетического фактора и риском развития заболевания.**

- Величина OR указывает, **во сколько раз риск данного заболевания выше у носителей данного генетического фактора, чем у лиц, не имеющих данного генетического фактора.**

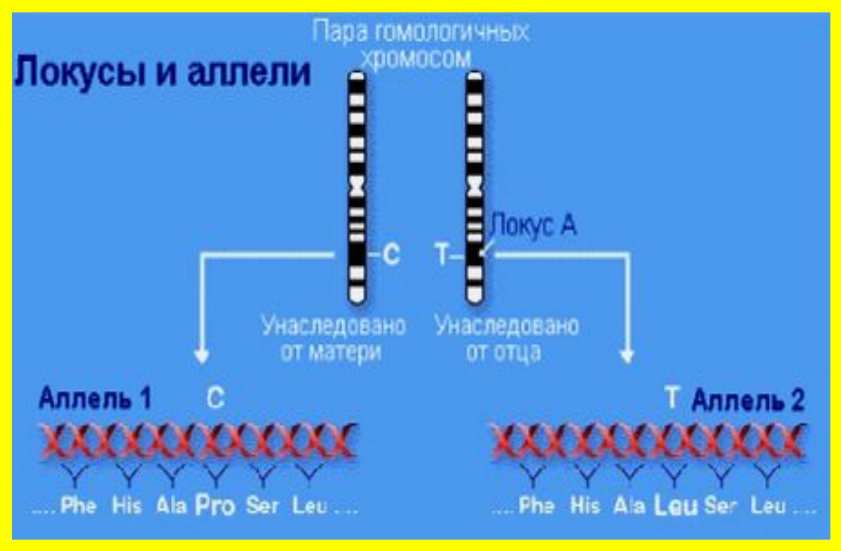
Критерии выбора клинически значимых полиморфизмов

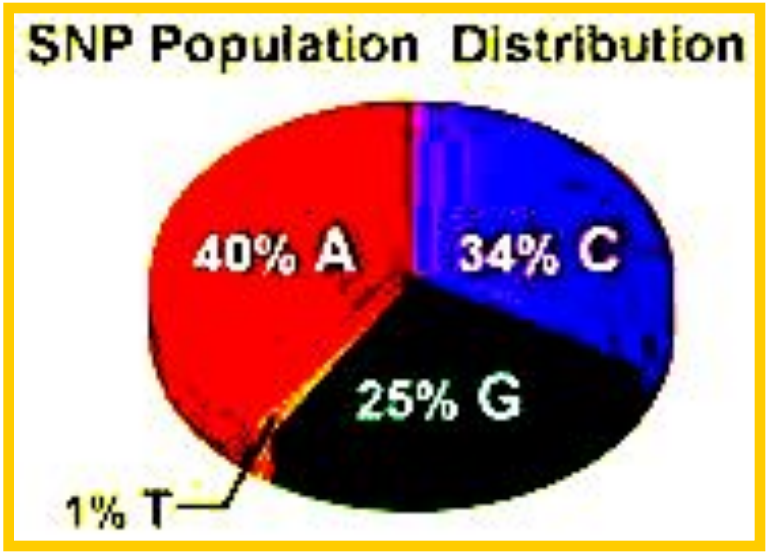
- Белок, кодируемый геном участвует в патогенетическом пути развития заболевания
- **Полиморфный аллель изменяет структуру и/или функциональную активность белка**
- Достоверные ассоциации заболевания с данным генетическим вариантом показаны несколькими независимыми группами исследователей (+ метаанализ)

У каждого двойной «комплект» генов



АЛЛЕЛЬ (от греч. allelon - друг друга, взаимно) - различные формы одного и того же гена, расположенные в одинаковых локусах (участках) гомологичных (парных) хромосом, контролирующие один и тот же белок. Все гены любых клеток, за исключением генов, расположенных в половых хромосомах, представлено двумя аллелями, один из которых унаследован от отца, а другой - от матери.





CCGAAATTTTTCGTCCAGCATACGTACCA
CCGAAATTTTTCGTACAGCATACGTACCA
CCGAAATTTTTCGTTCAGCATACGTACCA
CCGAAATTTTTCGTGCAGCATACGTACCA

Полиморфизм генов и предрасположенность к мультифакторным заболеваниям: принципы

- **Распространенность SNP зависит от географии и этнической принадлежности.**
- **SNP – либо предрасполагают, либо препятствуют проявлению и развитию заболевания.**
- **Гены аллельные варианты которых содержат SNP и при наличии определенных условий (диета, экология, вредные привычки, образ жизни, лекарства) предрасполагают к определенным мультифакторным заболеваниям – гены предрасположенности.**
- **Сочетание аллельных вариантов генов с SNP, вовлеченных в развитие конкретной патологии – «генные сети». У гомозигот риск развития заболевания выше, чем у гетерозигот.**

Профили обследования SNP

- Системы свёртывания крови и фибринолиза

Лейденская мутация (коагуляционный фактор V)	*F5*	Arg506Gln (LEIDEN)
Мутация протромбина (коагуляционный фактор II)	*F 2*	20210 G/A
Мутация 1 метилентетрагидрофолатредуктазы	*MTHFR*	Ala222Val (C677T)
Мутация 2 метилентетрагидрофолатредуктазы	*MTHFR*	Glu429Ala 1298 A>C
Мутация редуктазы метионинсинтазы	*MTRR*	Ile22Met (66 a-g)
Мутация метионинсинтазы	*MTR*	Asp919Gly
Мутация коагуляционного фактора F VII	*F7*	Arg353Gln
Мутация промотора гена коагуляционного фактора FVII	*F7*	-323 ins 10 bp (аллель A2)
Мутация интегрина, бета-3 (*тромбоцитарный рецептор фибриногена)*	*ITGB3*	Leu33Pro
Мутация-1 интегрина альфа-2 *(тромбоцитарный рецептор коллагена)*	*ITGA2*	C807T
Мутация тромбоцитарного гликопротеина 1b, α-субъединицы	*GP1BA*	Thr145Met
Мутация АДФ-рецептора тромбоцитов	*P2RY12*	H1/H2
Мутация фибриногена, бета	*FGB*	-455G-A
Мутация ингибитора активатора плазминогена SERPINE (PAI) 1	*SERPINE (PAI) 1*	-675 5G/4G

Профили обследования SNP

- **Сердечно-сосудистые заболевания - гипертензия**

Инсерция/делеция Alu-элемента в гене ангиотензин-превращающего фермента *Постановка по отдельной методике	*ACE*	Alu Ins/Del I>D
Мутация ангиотензиногена 1	*AGT*	Thr174Met
Мутация ангиотензиногена 2	*AGT*	Met235Thr
Мутация рецептора 1-го типа ангиотензиногена-2	*AGTR1*	A1166C
Мутация 1 синтазы окиси азота 3	*NOS3*	C786T
Мутация АМФ-дезаминазы 1	*AMPD1*	Gln12Ter

Профили обследования SNP

- **Сердечно-сосудистые заболевания – нарушения липидного обмена**

Мутация липопротеиновой липазы	*LPL*	S447X
Мутация аполипопротеина Е	*APOE*	Leu28Pro
Мутация параоксоназы 1	*PON1*	Gln192Arg
Мутация аполипопротеина С3	*APOC3*	C3238G (аллель SstI или S2)
Мутация - 1 печеночной липазы	*LIPC*	-250 G>A
Мутация - 2 печеночной липазы	*LIPC*	C-514T
Мутация рецептора к глюкагону	*GCCR*	A1220G Asn363Ser
Мутация 4 С-реактивного белка	*CRP*	A-717G

Профили обследования SNP

- **Индивидуальное лекарство – подбор дозы варфарина (антикоагулянтов ряда кумарина)**

Чувствительность к варфарину-1 Аллель CYP2C9*2	*CYP2C9*	Arg144Cys
Чувствительность к варфарину-2 Аллель CYP2C9*3	*CYP2C9*	Ile359Leu
Мутация – 1 эпоксидредуктазы витамина К (чувствительность к варфарину)	*VKORC1*	C1173T
Мутация – 2 эпоксидредуктазы витамина К (резистентность к варфарину)	*VKORC1*	G3730A
Мутация - 3 эпоксидредуктазы витамина К	*VKORC1*	G3673A

- ***Полимеразная цепная реакция (ПЦР)*** -метод молекулярной диагностики, применяемый в клинической практике для обнаружения специфической НК возбудителя в исследуемом материале.

Полимеразная цепная реакция

- **ПЦР сопряженная с обратной транскрипцией**
- **Гнездовая ПЦР**
- **ПЦР in situ**
- **Количественная ПЦР**
- **Мультипраймерная ПЦР**
- Ассиметричная ПЦР
- ПЦР с «горячим стартом»
- Амплификация больших фрагментов ДНК с высокой точностью
- Аллель-специфическая ПЦР
- ПЦР, чувствительная к метилированию матрицы
- Иммуно-ПЦР

Принцип метода

- Метод основан на многократном избирательном копировании определённого участка НК при помощи ферментов в искусственных условиях (in vitro).

Методика ПЦР

1. Выделение ДНК
2. Амплификация ДНК
3. Детекция ДНК

- ***Преаналитический этап***

  сбор, хранение, транспортировка

- ***Выделение НК***

  экспресс-методы, универсальные методы

- ***Сборка амплификационной смеси***

- ***Амплификация***

  денатурация, отжиг, элонгация

- ***Детекция***

  электрофорез, конечная точка, real-time

Преаналитический этап в ПЦР

Цели

- Правильное определение информативного для ПЦР вида биологического материала.
- Сохранение ДНК возбудителя в материале до момента доставки в лабораторию.
- Препятствие попаданию в материал ингибиторов ПЦР-реакции.
- Предварительная очистка материала для облегчения выделения из него ДНК возбудителя.

Материал

- ✔ соскоб эпителиальных клеток
- ✔ моча
- ✔ секрет простаты
- ✔ эякулят
- ✔ цельная венозная кровь
- ✔ мокрота
- ✔ спино-мозговая жидкость, выпоты, слюна и проч.

Все, что содержит ДНК!

подготовка пациента
прием системных препаратов
местная терапия
состояние пациента
взятие образца для исследования
протоколы взятия для разных видов биологических сред
условия транспортировки и хранения образцов
транспортные среды
температурный режим
сроки доставки

Ингибиторы ПЦР

1. Гепарин
2. Соли тяжелых металлов
3. Слизь
4. Кровь (гемоглобин)
5. Некоторые лекарственные формы
6. Мочевая кислота и ее соединения

Выделение ДНК

- Экспресс- методы (термический)

Сорбентный метод

Классический сорбентный метод

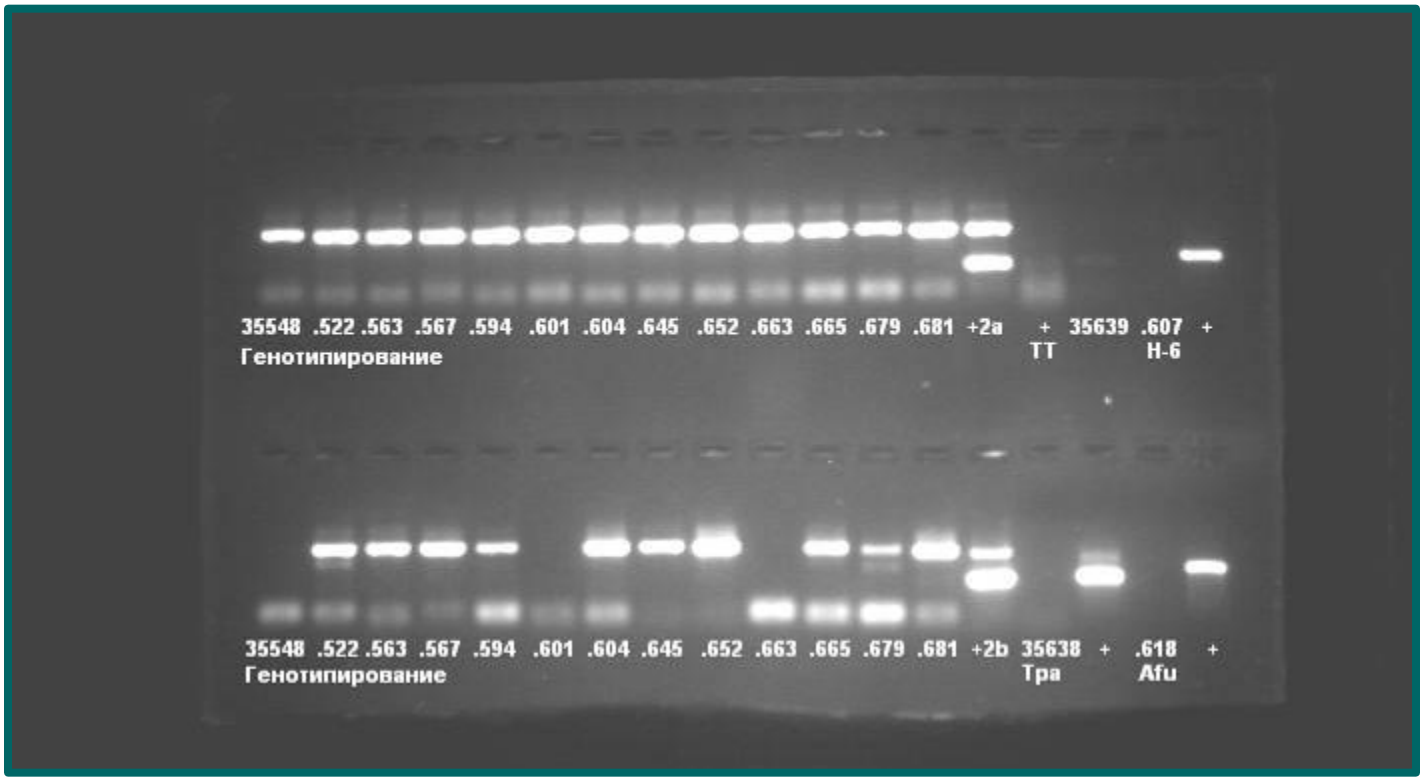
Преимущества: - чистота выделенной НК
- универсальность использования

Недостатки: - длительность
- трудоемкость

дНТФ
ДНК-матрица
фермент
Taq-полимераза
олигонуклеотидные
затравки (праймеры)
Исходные компоненты ПЦР

Амплификация

Детекция методом электрофореза



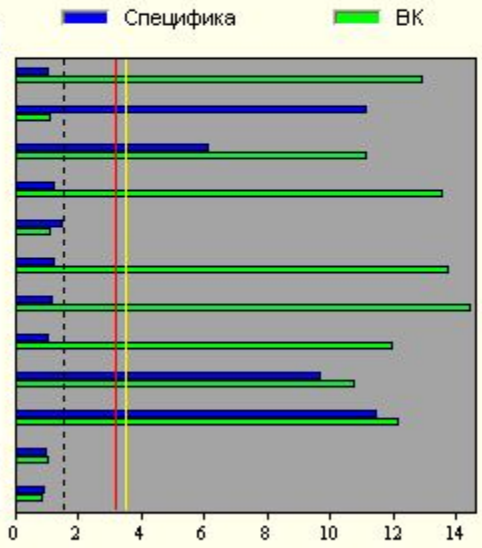
Детекция по конечной точке

Gene

Протокол Настройки Help

B Протокол: 0 Оператор: Геном

Пробирка	Образец	Результат	Специфика	ВК
2/0	-	-	1,08	13,00
3/0	+	+	11,20	1,13
4/0	2024	+	6,16	11,20
5/0	2027	-	1,28	13,60
6/0	2034	нд	1,50	1,16
7/0	2057	-	1,25	13,80
8/0	2058	-	1,24	14,50
9/0	2080	-	1,11	12,00
10/0	2116	+	9,71	10,80
11/0	2131	+	11,50	12,20
12/фон(B)	фон	фон	1,02	1,08
13/фон(B)	фон	фон	0,98	0,92



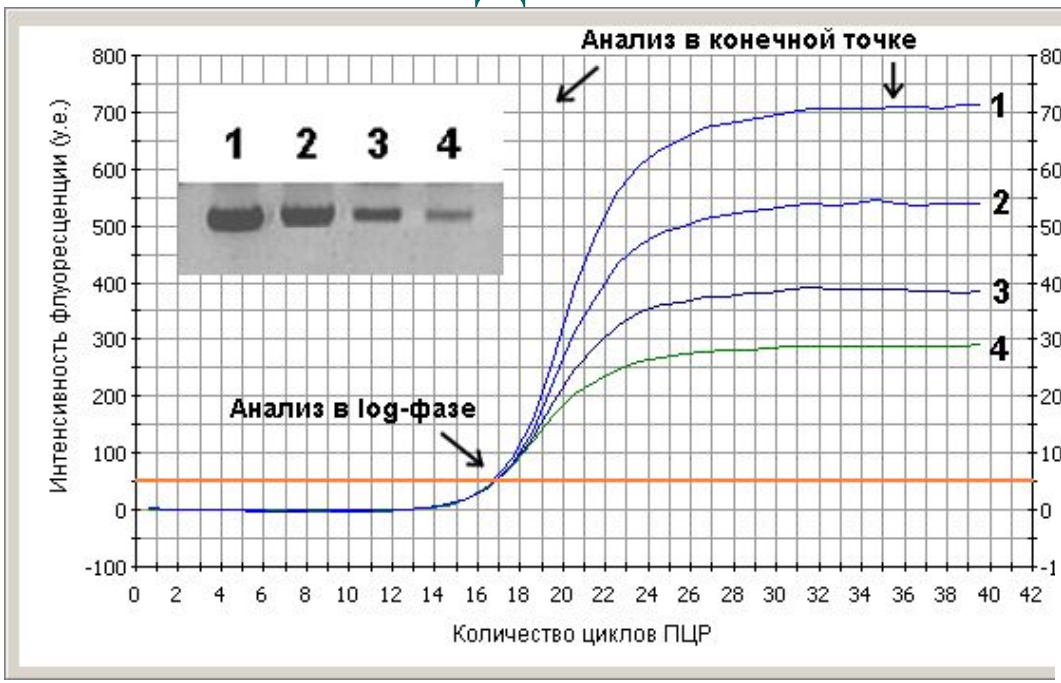
* Нормировочные значения 69,50* 38,00*

Примечание:

DNK - Технология

23 Март 2010, 15:23:40 030210 - HBV.gen__ 3 Февраль 2010, 14:56:43 Gene v3.3i (11.10.05)

Результаты ПЦР на образцах с одинаковым количеством ДНК



	Threshold Cycle Ct	Identifier
D2	17,2	
E7	17,0	
F3	17,1	
F5	17,1	

Анализ в log-фазе

Интерпретация результатов

Отрицательный ответ

1. НК возбудителя не обнаружено
2. Концентрация НК ниже 1000 ДНК-копий/мл
3. Неправильно выбран материал для исследования

Положительный ответ

- Присутствие НК возбудителя
- Присутствие фрагментов НК возбудителя

Преимущества ПЦР-метода

- *Прямое определение наличия возбудителей.*
- *Высокая специфичность.*
- *Высокая чувствительность.*
- *Универсальность процедуры выявления различных возбудителей.*
- *Высокая скорость получения результата анализа*

Спасибо за внимание!