

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В МЕДИЦИНСКОЙ ГЕНЕТИКЕ

Учебное пособие



	U	C	A	G	
U	<u>Phe</u> (F)	Ser(S)	Tyr(Y)	<u>Cys</u> (C)	U
	<u>Phe</u> (F)	Ser(S)	Tyr(Y)	<u>Cys</u> (C)	C
	<u>Leu</u> (L)	Ser(S)	Term	Term	A
	<u>Leu</u> (L)	Ser(S)	Term	Trp(W)	G
C	<u>Leu</u> (L)	Pro(P)	His(H)	Arg(R)	U
	<u>Leu</u> (L)	Pro(P)	His(H)	Arg(R)	C
	<u>Leu</u> (L)	Pro(P)	Gln(Q)	Arg(R)	A
	<u>Leu</u> (L)	Pro(P)	Gln(Q)	Arg(R)	G
A	<u>Ile</u> (I)	Thr(T)	Asn(N)	Ser(S)	U
	<u>Ile</u> (I)	Thr(T)	Asn(N)	Ser(S)	C
	<u>Ile</u> (I)	Thr(T)	Lys(K)	Arg(R)	A
	<u>Met</u> (M)	Thr(T)	Lys(K)	Arg(R)	G
G	<u>Val</u> (V)	Ala(A)	<u>Asp</u> (D)	Gly(G)	U
	<u>Val</u> (V)	Ala(A)	<u>Asp</u> (D)	Gly(G)	C
	<u>Val</u> (V)	Ala(A)	Glu(E)	Gly(G)	A
	<u>Val</u> (V)	Ala(A)	Glu(E)	Gly(G)	G

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России)

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ
В МЕДИЦИНСКОЙ ГЕНЕТИКЕ

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ

Уфа
2020

УДК 575 (075.8)
ББК 52.54я7
М 54

Рецензенты:

Д.м.н., профессор, заведующий кафедрой медико-биологических дисциплин НИУ «БелГУ» *М.И. Чурносков*

Д.б.н., заместитель директора по лабораторно-диагностической работе ГБУЗ РМГЦ. *Р.И. Хусаинова*

М 54 **Методы исследования в медицинской генетике:** учебное пособие / Р.Н. Мустафин, И.Р. Гилязова, Я.Р. Тимашева, Э.К. Хуснутдинова. — Уфа: ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, 2020. — 115 с.

Подготовлено в соответствии с требованиями ФГОС ВО по направлению подготовки (специальности) 31.05.01 «Лечебное дело» (уровень специалитета) и ООП высшего образования по специальности 31.05.01 «Лечебное дело», для изучения дисциплины «Медицинская генетика» на основании рабочей программы учебной дисциплины «Медицинская генетика» (2019 г.).

В нем излагаются современные данные о методах медицинской генетики. Подробно описана каждая группа методов с иллюстрациями, таблицами и формулами для лучшего восприятия материала. Издание включает тестовые задания и ситуационные задачи с эталонами ответов.

Пособие предназначено для обучающихся по специальности 31.05.01 «Лечебное дело» (уровень специалитета).

Рекомендовано в печать Координационным научно-методическим советом и утверждено решением Редакционно-издательского совета ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России.

УДК 575 (075.8)
ББК 52.54я7

© Мустафин Р.Н., Гилязова И.Р.,
Тимашева Я.Р., Хуснутдинова Э.К., 2020
© ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений	4
Введение	5
1. Популяционно-статистический метод	6
1.1. Статистическая обработка данных	7
1.2. Биоинформатический анализ	21
2. Близнецовый метод	23
3. Клинико-генеалогический метод	25
4. Цитогенетический метод	33
5. Молекулярно-цитогенетический метод	38
6. Молекулярно-генетические методы	40
6.1. Методы выделения ДНК и РНК	40
6.2. Полимеразная цепная реакция	53
6.3. Метод гель-электрофореза	60
6.4. SSCP-анализ и денатурирующий градиентный гель-электрофорез	70
6.5. ПДРФ-анализ и молекулярно-генетическое картирование	74
6.6. Секвенирование, правила обозначения мутаций	83
6.7. Микросателлитный и гетеродуплексный анализы	92
6.8. Метод биочипов	95
7. Биохимический метод	97
Тестовые задания	101
Ситуационные задачи	109
Эталоны ответов на тестовые задания и ситуационные задачи	111
Рекомендуемая литература	113

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ЛУК** — ледяная уксусная кислота
- МБА** — метиленбисакриламид
- НБ** — наследственная болезнь
- НП** — нуклеотидные последовательности
- ПДРФ** — полиморфизм длин рестрикционных фрагментов
- п.н.** — пар нуклеотидов
- ПСА** — персульфат аммония
- ПЦР** — полимеразная цепная реакция
- ТЕМЕД** — тетраметилэтилендиамин
- Трис** — трис-(оксиметил)-аминометан (2-амино-2-гидроксиметил-1,3-пропандиол)
- ЧВ** — частота встречаемости
- ЭДТА** — этилендиаминтетраацетат
- CAPS** — Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (Рестрикционный полиморфизм амплифицированных последовательностей)
- CCM** — Chemical Cleavage of Mismatch (Метод химического расщепления неспаренных оснований)
- DGGE** — Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (Денатурирующий градиентный гель-электрофорез)
- FISH** — метод флюоресцентной гибридизации in situ
- НА** — Heteroduplex Analysis (гетеродуплексный анализ)
- NB!** — Nota bene (обрати внимание)
- SDS** — додецилсульфат натрия
- SNP** — Single Nucleotide Polymorphism
- SSCP** — Single Strand Conformation Polymorphism
- ТАЕ** — Трис-ацетат-ЭДТА
- ТВЕ** — Трис-борат-ЭДТА

ВВЕДЕНИЕ

Учебное пособие предназначено для обучающихся по специальности 31.05.01 «Лечебное дело». Представлены новые данные о методах медицинской генетики в кратком и наглядном изложении. Необходимость создания учебного пособия обусловлена недостаточно полным описанием в имеющейся учебно-методической литературе современных методов медицинской генетики, отсутствием актуальных сведений о практическом применении методик статистического анализа, составления и анализа родословных, использования молекулярно-генетических методов, необходимых в работе врача любой специальности. В учебном пособии подробно изложена суть каждой методики, детекционные возможности, необходимые условия и реагенты. Материал представлен в доступной форме с использованием схем, таблиц и рисунков.

Учебное пособие соответствует ФГОС ВО, ООП специальности 31.05.01 «Лечебное дело», содержит современную, полезную информацию, дополняющую учебник, помогающую лучшему освоению учебного материала и формированию компетенций:

– **ПК-5** — готовностью к сбору и анализу жалоб пациента, данных его анамнеза, результатов осмотра, лабораторных, инструментальных, патолого-анатомических и иных исследований в целях распознавания состояния или установления факта наличия или отсутствия заболевания;

– **ПК-6** — способностью к определению у пациента основных патологических состояний, симптомов, синдромов заболеваний, нозологических форм в соответствии с Международной статистической классификацией болезней и проблем, связанных со здоровьем, X пересмотра.

1. ПОПУЛЯЦИОННО-СТАТИСТИЧЕСКИЙ МЕТОД

Популяционно-статистический метод — это метод исследования частоты встречаемости наследственных болезней и проявлений их полиморфизма в различных группах популяции.

Для идеальной популяции бесконечно большого размера, в которой не действует естественный отбор, нет обмена особями с другими популяциями и мутационного процесса, все скрещивания случайны и нет дрейфа генов, действует закон, установленный в 1908 году английским математиком Дж. Харди и немецким доктором В. Вайнбергом.

Данный закон оказался вполне пригодным для анализа генетических процессов в крупных (свыше 4500 человек) панмиксных (свободно вступающих в брак) популяциях.

Закон Харди-Вайнберга выражается формулами:

$$p+q=1, \text{ где}$$

p — частота доминантного аллеля;

q — частота рецессивного аллеля.

$$p^2+2pq+q^2=1, \text{ где}$$

p^2 — доля гомозигот по доминантному аллелю;

$2pq$ — доля гетерозигот;

q^2 — доля гомозигот по рецессивному аллелю.

Закон Харди-Вайнберга позволяет:

- оценить популяционный риск наследственной болезни, т.к. каждая популяция обладает определенными частотами неблагоприятных аллелей;
- определить степень межпопуляционного генетического разнообразия;
- рассчитать частоты аллелей определенных генов в популяции;
- рассчитать структуру аллелефонда и проанализировать закономерности мутационных процессов в популяции.

1.1. СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ДАННЫХ

Основные этапы статистического исследования

I этап. Планирование.

1. План:

- цель, задачи;
- методика;
- гипотеза;
- сроки;
- подбор, подготовка, обучение исполнителей;
- материальные и финансовые ресурсы;
- источники информации;
- тип работы (отчет, статья).

2. Программа — перечень вопросов, подлежащих изучению (признаки).

II этап. Сбор материала.

Регистрация запланированных признаков (на каждую единицу наблюдения — свой регистрационный документ: анкета, медицинские документы, специально разработанная карта исследования).

III этап. Обработка и сводка материала:

- проверка собранного материала;
- группировка, разбиение на однородные группы
- шифровка;
- составление таблиц, сопоставление признаков, определение взаимосвязей.

Представление данных

1. Таблица простая.

Стадия болезни	Число больных
I	
II	
III	
Итого	

2. Таблица сложная простая.

Стадия болезни	Возраст (лет)			Всего
	0-4	5-9	10-14	
I				
II				
III				
Итого				

3. Таблица сложная комбинационная.

Стадия болезни	Возраст						Всего		Итого
	0-10			11-20			М	Ж	
	м	Ж	всего	м	Ж	всего			
I									
II									
III									
Итого									

4. Графическое представление данных.

1. Диаграммы.

Правила построения диаграмм:

1) четкое, ясное, краткое название, отражающее ее содержание и порядковый номер (в отчете);

2) все элементы диаграммы пояснены на самой диаграмме или в приложенной таблице;

3) данные располагаются от большего к меньшему слева направо, снизу вверх или по часовой стрелке (элемент «прочее» всегда в конце).

2. Картодиаграммы.

3. Картограммы. Пример (Рис. 1):

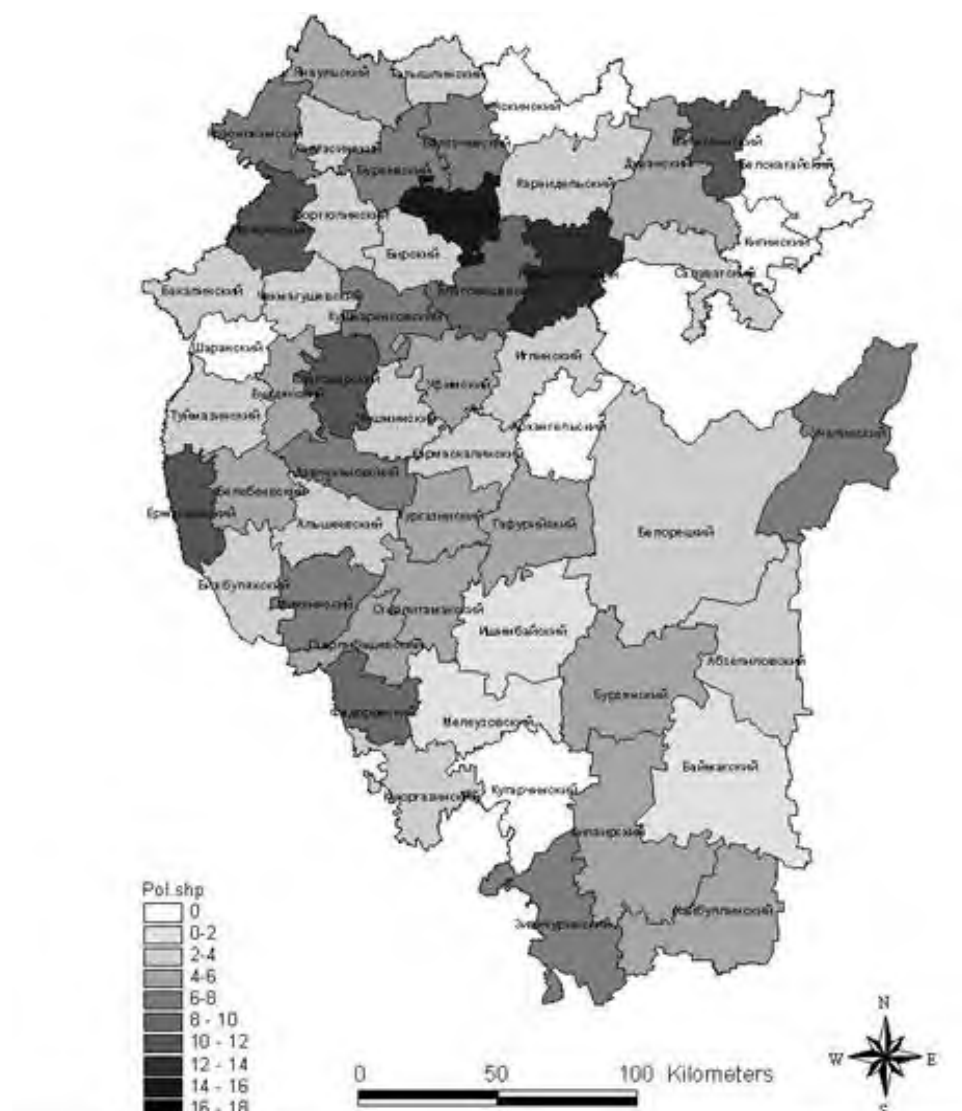


Рис. 1. Распространенность нейрофиброматоза 1-го типа в РБ.

IV этап. Статистический анализ — проводится в статистическом кабинете, медицинским информационно-аналитическим центром.

Интенсивный показатель демонстрирует интенсивность развития (уровень, распространенность, частоту) явления в среде, которая продуцирует это явление: коэффициенты рождаемости, смертности, заболеваемости, инвалидности и другие.

Интенсивный показатель = (явление/среда) × 10ⁿ (n зависит от распространенности явления в среде – чем она меньше, тем n больше)

Экстенсивный показатель характеризует распределение явления на его составные части, его внутреннюю структуру или отношение частей к целому (удельный вес).

Экстенсивный показатель = (часть совокупности/вся совокупность) $\times 10^n$

Биометрия — наука о статистическом анализе массовых явлений в биологии, то есть таких явлений, в массе которых обнаруживаются закономерности, не выявляемые на единичных случаях наблюдений. Единицы наблюдения — члены группы объектов научных наблюдений.

Статистическая совокупность — совокупность относительно однородных, но индивидуально различимых единиц, объединяемых по определенным общим признакам для их совместного изучения.

Генеральная совокупность — вся подлежащая изучению совокупность данных объектов. Объем генеральной совокупности обозначается буквой *N*.

Выборочная совокупность (выборка) — часть индивидуально различимых единиц, изучаемых по интересующему признаку.

Объем выборочной совокупности — число единиц выборочной совокупности, обозначается буквой *n*.

Если $n < 30$, выборочная совокупность малая.

Если $n > 30$, выборочная совокупность большая.

Признаки — характерные особенности строения или функционирования организма, разделяют на количественные и качественные, мерные (метрические) и счетные (меристические).

Варианта — значение (мера) признака для конкретного члена выборочной совокупности, обозначается буквой *V* (*x*).

Вариационный ряд — ряд ранжированных значений признака, в котором указана частота их встречаемости в данной совокупности. Графически вариационный ряд представляет собой двойной ряд чисел: I ряд обозначает классы; II ряд — частоты различных вариантов изучаемого признака.

Указанный ряд пар чисел составляет статистическое распределение — распределение частот f_i по значениям x_i .

Средняя арифметическая \bar{X} показывает, какое значение признака наиболее характерно для данной совокупности:

$$\bar{X} = \frac{\sum x_i}{n}, \text{ где}$$

x_i — значение вариант;

\sum — знак суммирования;

n — общее число вариант.

Средняя геометрическая G — такая средняя величина, которая выявляет средний прирост (уменьшение) какого-либо показателя за определенный период времени:

$$G = \sqrt[n]{x_1 \cdot x_2 \cdot x_3 \cdot \dots \cdot x_n}, \text{ где}$$

x_n — варианты;

n — число членов в выборке.

Средняя квадратичная S — параметр, который используется для расчета средних площадей, диаметров, радиусов и других параметров биологических объектов (диаметры клеток или их ядер и другие):

$$S = \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n}}, \text{ где}$$

x_i — варианты признака;

n — число членов в выборке.

Средняя гармоничная H — используется для определения средних величин процессов, скорость которых меняется во времени:

$$H = \frac{n}{\sum \frac{1}{x_i}}$$

Мода Mo — наиболее часто встречающееся значение варианты. Может быть выражена как у качественных, так и количественных признаков.

Медиана Me — варианта, расположенная в середине вариационного ряда и делящая его на две равные части. Используется при обработке качественных признаков.

Лимиты (lim) — максимальное и минимальное значения признака в совокупности.

Варiances (σ^2) — сумма квадратов отклонений отдельных вариантов от средней арифметической, деленная на число степеней свободы:

$$\sigma^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}, \text{ где}$$

x_i — i -тая варианта выборочной совокупности;

\bar{X} — средняя арифметическая выборочной совокупности;

n — объем выборочной совокупности.

Среднее квадратичное отклонение (σ — *сигма*) — наиболее точный параметр для характеристики изменчивости:

$$\sigma = \sqrt{\sigma^2} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Правило трех сигм — все значения признака лежат от средней арифметической в пределах 3σ . Чтобы определить возможные крайние значения варьирующего признака, нужно среднюю арифметическую увеличить и уменьшить на три сигмы.

Число степеней свободы вариации — величина $(n-1)$, использованная в знаменателях дробей в формулах вычисления σ^2 и σ .

Коэффициент вариации (C_v) — показывает, какой процент от \bar{X} составляет σ . Показывает изменчивость признака в относительных величинах (в процентах). Чем больше значение C_v , тем больше изменчивость признака у членов совокупности:

$$C_v = \frac{\sigma}{\bar{x}} \cdot 100\%$$

Нормированное отклонение (t) — отклонение конкретной варианты от средней арифметической, выраженной в сигмах:

$$t = \frac{x_j - \bar{x}}{\sigma}$$

Вычисление средней арифметической.

1. Для групп любой численности *непрямой метод* — используют построение вариационного ряда и условную среднюю по формуле:

$$\bar{x} = A + k \cdot \frac{\sum f \cdot a}{n}, \text{ где}$$

A — условная средняя;

k — величина классового промежутка;

f — число вариантов в классе;

n — число наблюдений;

a — условное отклонение средних значений классов от выбранной условной средней, вычисляется по формуле:

$$a = \frac{w_j - A}{k}$$

2. Для малых выборок ($n < 30$) среднюю арифметическую вычисляют прямым способом по формуле:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_j}{n}$$

Статистическое распределение — распределение частот f_i отдельных вариантов по значениям этих вариантов x_i или по классам вариационного ряда.

Вероятность — возможность осуществления определенного события в некотором количестве случаев из общего числа возможных. Вычисляется по формуле:

$$p = \frac{m}{n}, \text{ где}$$

m — число благоприятных случаев,

n — число всех возможных случаев.

Нормированное отклонение — отклонение той или иной варианты от средней арифметической, выраженное в сигмах:

$$t = \frac{x_i - \bar{X}}{\sigma}$$

Доверительная вероятность — уровень вероятности, который считается достаточным для суждения о достоверности статистических показателей, получаемых на основании выборочных данных. Вероятности, принятые как доверительные, определяют доверительные границы и доверительный интервал между ними.

Уровень значимости — вероятность получения случайного отклонения от установленных с определенной вероятностью результатов. При помощи уровня значимости можно установить, в каком проценте случаев (с какой вероятностью) все же возможна ошибка в тех выводах, которые делаются на основе опыта, в оценке достоверности показателей или различий между какими-то величинами, полученными в опытах или при наблюдениях.

Статистические утверждения, полученные в генетических исследованиях, справедливы только с определенной вероятностью. Сумма вероятностей наступления данного события всегда равна 1, а отношение a/n называется *относительной частотой* этого события. Признак x у изучаемой особи наблюдается с вероятностью p или не наблюдается с вероятностью q для дискретной переменной.

При проведении выборочных исследований полученный результат не обязательно совпадает с результатом, который мог бы быть получен при исследовании всей генеральной совокупности. Между этими величинами существует определенная разница, называемая *ошибкой репрезентативности*, то есть это погрешность, обусловленная переносом результатов выборочного исследования на всю генеральную совокупность.

Средняя ошибка средней арифметической величины определяется по формуле:

$$m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}, \text{ где}$$

σ — среднеквадратичное отклонение,

n — число наблюдений.

Ошибка относительного показателя определяется по формуле:

$$m = \sqrt{\frac{P \times q}{n}}, \text{ где}$$

p — показатель, выраженный в процентах, промилях, продецимилях и т.д.,
 $q = (100-p)$ при p выраженном в %; или $(1000-p)$ при p выраженном в промилях; или $(10000-p)$ при p выраженном в продецимилях и т.д.

При числе наблюдений меньше 30 ошибки репрезентативности определяются соответственно по формулам:

$$m = \frac{\sigma}{\sqrt{n-1}} \quad \text{и} \quad m = \sqrt{\frac{P \times q}{n-1}}$$

Формулы для *определения доверительных границ средних и относительных величин*:

– для средних величин (M): $M_{\text{ген}} = M_{\text{выб}} \pm t_m$;

– для относительных показателей (P): $P_{\text{ген}} = P_{\text{выб}} \pm t_m$, где

$M_{\text{ген}}$ и $P_{\text{ген}}$ — значения средней величины и относительного показателя генеральной совокупности;

$M_{\text{выб}}$ и $P_{\text{выб}}$ — значения средней величины и относительного показателя выборочной совокупности;

t — критерий достоверности (доверительный коэффициент);

m — ошибка репрезентативности.

Данный способ применяется в тех случаях, когда по результатам выборочной совокупности необходимо судить о размерах изучаемого явления в генеральной совокупности. Обязательное условие применения способа —

репрезентативность выборочной совокупности. Для переноса результатов, полученных при выборочных исследованиях, на генеральную совокупность необходима *степень вероятности безошибочного прогноза (P)*, показывающая, в каком проценте случаев результаты выборочных исследований по изучаемому признаку (явлению) будут иметь место в генеральной совокупности.

При определении *доверительных границ средней величины* или относительного показателя генеральной совокупности, исследователь сам задает определенную (необходимую) степень вероятности безошибочного прогноза (P). Для большинства медико-биологических исследований считается достаточной степень вероятности безошибочного прогноза, равная 95%, а число случаев генеральной совокупности, в котором могут наблюдаться отклонения от закономерностей, установленных при выборочном исследовании, не будут превышать 5%. При ряде исследований, связанных, например, с применением высокотоксичных веществ, вакцин, оперативного лечения и т.п., в результате чего возможны тяжелые заболевания, осложнения, летальные исходы, применяется степень вероятности $P=99,7\%$, то есть не более чем у 1% случаев генеральной совокупности возможны отклонения от закономерностей, установленных в выборочной совокупности.

Заданной степени вероятности (P) безошибочного прогноза соответствует определенное, представляемое в формулу, значение критерия t, зависящее также и от числа наблюдений.

При $n > 30$ степени вероятности безошибочного прогноза $P=99,7\%$ — соответствует значение $t=3$, а при $P=95,5\%$ — значение $t=2$.

При $n < 30$ величина t при соответствующей степени вероятности безошибочного прогноза определяется по специальной таблице по Н.А. Плехинскому (Табл. 1).

Значение критерия t для трех степеней вероятности

$n = n-1$ \ P	95%	99%	99,9%
1	12,7	63,7	37,0
2	4,3	9,9	31,6
3	3,2	5,8	12,9
4	2,8	4,6	8,6
5	2,6	4,0	6,9
6	2,4	3,7	6,0
7	2,4	3,5	5,3
8	2,3	3,4	5,0
9	2,3	3,3	4,8
10	2,2	3,2	4,6
11	2,2	3,1	4,4
12	2,2	3,1	4,3
13	2,3	3,0	4,1
14-15	2,1	3,0	4,1
16-17	2,1	2,9	4,0
18-20	2,1	2,9	3,9
21-24	2,1	2,8	3,8
25-29	2,0	2,8	3,7

Если необходимо определить, случайны или достоверны (обусловлены какой-либо причиной) различия между двумя средними величинами или относительными показателями, используется *оценка достоверности разности результатов исследования*. Обязательное условие для применения данного способа — *репрезентативность выборочных совокупностей*, а также наличие причинно-следственной связи между сравниваемыми величинами (показателями) и факторами, влияющими на них.

Формулы определения достоверности разности:

$$t = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}}$$

– для средних величин: для средних величин;

$$t = \frac{P_1 - P_2}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}}$$

– для относительных показателей: , где

t — критерий достоверности;

m_1 и m_2 — ошибки репрезентативности;

M_1 и M_2 — средние величины;

P_1 и P_2 — относительные показатели.

Если вычисленный критерий t более или равен 2 ($t \geq 2$), что соответствует вероятности безошибочного прогноза P равном или более 95% ($P \geq 95\%$), то разность следует считать достоверной (существенной), то есть обусловленной влиянием какого-то фактора, что будет иметь место и в генеральной совокупности. При $t < 2$, вероятность безошибочного прогноза $P < 95\%$, это означает, что разность недостоверна, случайна, то есть не обусловлена какой-то закономерностью (не обусловлена влиянием какого-то фактора).

Типичные ошибки, допускаемые исследователями при применении способа оценки достоверности разности результатов исследования:

– при оценке достоверности разности результатов исследования по критерию t часто делается вывод о достоверности (или недостоверности) самих результатов исследования. В действительности же этот способ позволяет судить только о достоверности (существенности) или случайности различий между результатами исследования;

– при полученном значении критерия $t < 2$ часто делается вывод о необходимости увеличения числа наблюдений. Если же выборочные совокупности репрезентативны, то нельзя делать вывод о необходимости увеличения числа наблюдений, так как в данном случае значение критерия $t < 2$ свидетельствует о случайности, недостоверности различия между двумя сравниваемыми результатами исследования.

Эпидемиология — наука, изучающая особенности распространения и причины возникновения заболеваний в обществе с целью применения полученных знаний для решения проблем в здравоохранении.

Эпидемиологические исследования направлены на:

- оценку собственно заболеваемости и распространенности;
- изучение естественного течения заболевания;
- оценку этиологических гипотез развития болезней;
- оценку эффективности диагностических тестов.

Типы эпидемиологических исследований.

1. **Обсервационное** (без преднамеренного вмешательства со стороны исследователя):

- описательное: одномоментное (обследования населения в определенный момент времени с целью изучения распространенности болезни) и когортное (определение частоты новых случаев в исследуемой популяции);
- аналитическое (одномоментное когортное и исследование типа «случай-контроль»).

2. **Экспериментальное** — сравнительное исследование при преднамеренном вмешательстве в одну из исследуемых групп (рандомизированный клинический эксперимент). Исследование со случайно отобранной контрольной группой и наличием воздействия со стороны исследователя называется рандомизированным контролируемым клиническим испытанием.

Если группа больных специально формируется для исследования и целенаправленно отслеживается, то такое исследование называют *проспективным (prospective)*. Наиболее сложными являются *популяционные проспективные когортные* исследования, для которых выбирают и затем отслеживают большую выборку из популяции. В ходе наблюдения фиксируют изменения, такие как возникновение новых болезней, их развитие и осложнения (исследования естественного развития заболеваний). Эти заболевания соотносятся с предшествовавшими им исходными особенностями изучаемых людей. То есть проводят *исследования причинных факто-*

ров, например, проводилось изучение зависимости заболеваемости ишемической болезнью сердца от концентрации холестерина в крови и артериального давления.

Продольное исследование может быть *ретроспективным*. Это означает, что изучаемая группа больных выделяется в конечный момент — в период выявления и лечения. Одновременно выделяется контрольная группа. Ретроспективно, в прошлом, можно выделить у больных какой-то общий фактор, например курение, использование ультрафиолетовых ламп для загара.

В продольных исследованиях *когорта* — группа лиц, изначально объединенных определенным общим признаком (наличие или отсутствие НБ).

Продольные исследования наиболее доказательны. Самые достоверные *двойные слепые рандомизированные многоцентровые плацебо-контролируемые исследования*.

Одиночное слепое означает, что больной не знает, в какую группу он попал при рандомизации и какой ему дают препарат, но это знает врач, который проводит исследование. *Двойное слепое* — и врач и пациент не знают. *Открытое исследование* — и врач и пациент знают.

Рандомизировать — располагать в случайном порядке, перемешивать. Рандомизация — случайное распределение больных по группам (опытная группа — принимает необходимый препарат, контрольная группа — принимает плацебо). *Многоцентровое* — выполняется в нескольких центрах (клиниках).

Поперечное исследование — однократный сбор данных, что облегчает привлечение участников и ускоряет обработку данных. Однако данный метод наименее достоверный, так как не позволяет определить динамику процесса.

1.2. БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Биоинформатика — это междисциплинарная область науки, которая рассматривает вопросы разработки методов и технологий для администрирования и анализа биологических данных (Табл. 2; 3).

Таблица 2

Биологические базы данных (Мухачева, 2012)

База данных	Интернет-сайт	Исследования
GenBank	www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank	нуклеотидные последовательности
GeneCards	http://www.genecards.org/	гены человека
Entrez Protein	www.ncbi.nlm.nih.gov/protein	белковые последовательности
SWISS-PROT	web.expasy.org/groups/swissprot	
InterPro	www.ebi.ac.uk	белковые домены
OMIM	www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/	наследственные болезни
Pfam	www.pfam.sanger.ac.uk	семейства белков
PDB	www.rcsb.org/pdb	структуры белков
KEGG	www.kegg.jp	метаболические пути

Таблица 3

Основные биоинформационные порталы

Название портала	Сокращение	Адрес сайта
National Center for Biotechnology Information	NCBI	www.ncbi.nlm.nih.gov
European Bioinformatics Institute	EBI	www.ebi.ac.uk
Swiss Institute for Bioinformatics	SIB	www.expasy.org
Kyoto University Bioinformatics Center	-	www.genome.jp

Данные для биоинформатического анализа:

- 1) последовательности ДНК/РНК;
- 2) последовательности белков;
- 3) 2D и 3D структуры;
- 4) данные по экспрессии генов;
- 5) данные о взаимодействии биомолекул;

б) научные данные.

Приложения биоинформатики:

- 1) функциональная аннотация биополимеров;
- 2) эволюция;
- 3) структурная аннотация биополимеров;
- 4) геномика и протеомика.

Задачи биоинформатики:

- 1) разработка алгоритмов;
- 2) разработка программного обеспечения;
- 3) анализ и интерпретация.

Вопросы для закрепления материала

1. Для каких болезней человека применим закон Харди-Вайнберга?
2. Какими формулами выражается закон Харди-Вайнберга и что они означают?
3. Какие основные этапы статистического исследования?
4. Чем отличается интенсивный показатель от экстенсивного?
5. Какие статистические показатели вы знаете?
6. Что такое эпидемиология и какие типы эпидемиологических исследований различают?
7. Какие исследования в области медицинской генетики наиболее достоверны?
8. Какое минимальное количество людей в исследовании необходимо для применения закона Харди-Вайнберга?

2. БЛИЗНЕЦОВЫЙ МЕТОД

Близнецовый метод — важнейший метод медицинской генетики, основанный на исследовании сходства признаков (например, НБ) у близнецов. Введен в 1875 году Ф. Гальтоном.

Частота встречаемости близнецов составляет около 1% от всех новорожденных (2/3 из них dizygotные, 1/3 — monozygotные). *Монозиготные близнецы* развиваются из одной оплодотворенной яйцеклетки, они имеют идентичный генотип, но могут отличаться по фенотипу вследствие воздействия средовых факторов. *Дизиготные близнецы* развиваются после оплодотворения разными сперматозоидами разных яйцеклеток. Они имеют различающийся генотип, и различия в их фенотипе обусловлены как средой, так и генотипом.

Конкордантность — процент сходства близнецов по изучаемому признаку или болезни. **Дискордантность** — процент различия.

Так как монозиготные близнецы имеют идентичный генотип, конкордантность у них выше, чем у dizygotных. При сопоставлении монозиготных и dizygotных близнецов **определяют коэффициент парной конкордантности ($K_{МБ}$ и $K_{ДБ}$)**, указывающий на долю близнецовых пар, в которых изучаемый признак проявляется у обоих лиц. Данный коэффициент выражается в процентах и вычисляется по формуле:

$$K_{МБ/ДБ} = C / (C + D), \text{ где}$$

C — число конкордантных пар;

D — число дискордантных пар.

Для количественной оценки роли наследственности и среды в развитии определенного признака или болезни используется формула Хольцингера для вычисления коэффициента наследуемости H (Heredity):

$$H = \frac{K_{МБ} - K_{ДБ}}{100 - K_{ДБ}},$$

Если H приближается к 1, то основная роль в развитии болезни или признака принадлежит наследственности. Если H приближается к 0, то основную роль играют средовые факторы.

Контрольные вопросы

1. Что означает конкордантность и дискордантность?
2. Кто впервые использовал близнецовый метод исследования?
3. Для исследования каких болезней применим близнецовый метод?
4. Как вычисляется коэффициент наследуемости по Хольцингеру?
5. В каком случае результаты близнецового метода говорят о большей роли генетических факторов в развитии болезни?

3. КЛИНИКО-ГЕНЕАЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

Клинико-генеалогический метод — это метод изучения наследственных болезней с помощью клинических данных, с составлением родословной для определения типа наследования. Метод был введен Ф. Гальтоном в 1883 году.

При составлении родословной обязательно указываются поколения римскими цифрами (I, II, III, IV) сверху вниз, начиная с самого старшего поколения. Все члены родословной располагаются в один ряд и нумеруются арабскими цифрами слева направо.

Этапы клинико-генеалогического метода:

- 1) сбор данных обо всех кровных родственниках пробанда;
- 2) графическое построение родословной, сопровождаемое поясняющими описаниями (легендой);
- 3) анализ родословной и формулировка выводов.

Благодаря клинико-генеалогическому методу можно установить, является ли болезнь наследственной, определить тип наследования, зиготность лиц в родословной, пенетрантность гена (частоту фенотипического проявления) и вероятность рождения ребенка с НБ (в %).

На рисунке 2 представлены символы, используемые при составлении родословных. Пробанд (консультирующийся) – больной или носитель изучаемой болезни, обратившийся на медико-генетическую консультацию. С пробанда начинается составление родословной. Другие члены семьи, лично обследованные генетиками, обозначаются знаком «!».

Митохондриальный тип наследования характеризуется признаками (Рис. 3):

- 1) больные отцы не передают болезнь сыновьям и дочерям;
- 2) болеют как мальчики, так и девочки;
- 3) заболевание передается от матери всем сыновьям и дочерям.
- 4) вероятность передачи НБ детям от матери составляет 100%.



Рис. 2. Символы, используемые при составлении родословной.

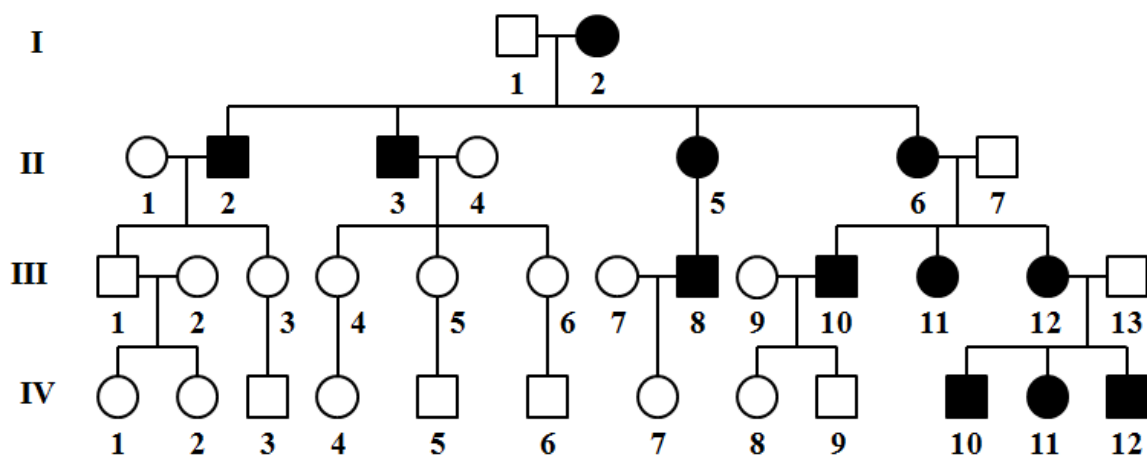


Рис. 3. Родословная митохондриального типа наследования НБ.

К митохондриальным болезням относятся синдромы Кернса-Сейра, MELAS (Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic acidosis, And Stroke-like episodes), MERRF (Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers), Лея (по-

дострая некротизирующая энцефаломиопатия), наследственная оптическая нейропатия Лебера.

Y-сцепленный тип наследования связан с наличием небольшого количества генов в Y-хромосоме и характеризуется передачей признака или болезни исключительно от отца всем сыновьям (вероятность наследования составляет 100%) (Рис. 4).

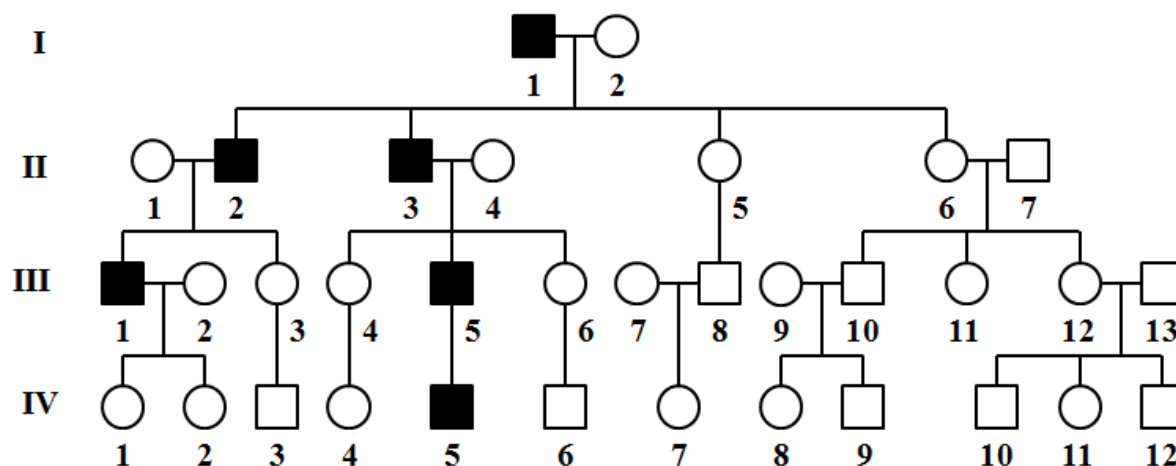


Рис. 4. Родословная Y-сцепленного типа наследования.

Наследуются определенные признаки, проявление которых обусловлено экспрессией генов, расположенных в Y-хромосоме. К этим признакам относятся интенсивность роста зубов, конечностей, тела, оволосение ушной раковины, сперматогенез. Мутации в генах, отвечающих за сперматогенез в Y-хромосоме выявляются у мужчин с тяжелой азооспермией.

X-сцепленный доминантный тип наследования (Рис. 5) характерен для заболеваний, для развития которых достаточно наличия мутации в одном аллеле гена, расположенного на X-хромосоме. Основные признаки:

- 1) отец, страдающий заболеванием с X-сцепленным доминантным типом наследования, передает его всем дочерям (вероятность 100%), но все его сыновья здоровы (вероятность 0%);
- 2) заболеванием страдают оба пола, но женщины в 2 раза чаще;
- 3) у мужчин заболевание протекает более тяжело вследствие гемизиготности по X-хромосоме;

4) вероятность передачи НБ от матери для сыновей и дочерей составляет 50%.

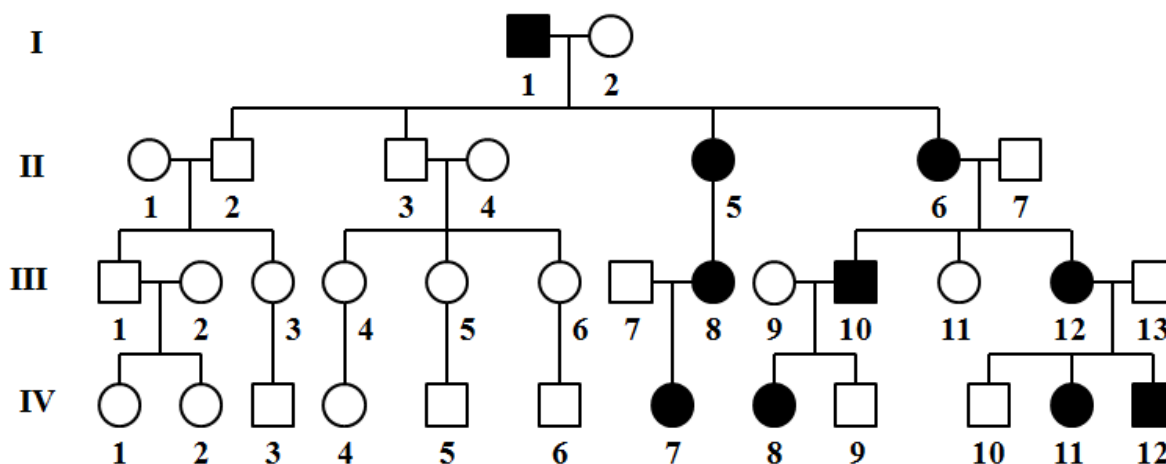


Рис. 5. Родословная X-сцепленного доминантного типа наследования.

Для большинства НБ с X-сцепленным доминантным типом наследования характерна летальность у гемизиготных мужчин (синдром Ретта, Гольтца-Горлина), то есть рождаются с НБ только девочки (возможно выживание мальчиков при синдроме Клайнфельтера). Есть примеры жизнеспособности гемизигот — гипофосфатемический витамин Д резистентный рахит.

X-сцепленный рецессивный тип наследования (Рис. 6) характерен для НБ, развивающихся при наличии мутации обоих аллелей гена у лиц женского пола или при наличии одного аллеля у лиц мужского пола. Признаки:

1) здоровые мужчины не передают НБ детям;

2) фенотипически здоровые женщины могут быть носительницами мутантного аллеля. Вероятность развития НБ у сыновей женщин-носительниц заболевания при условии, что отец ребенка здоров, составляет 50%, у дочерей — 0%. В то же время, вероятность того, что дочери станут носительницами заболевания, 50%;

3) среди детей от женщины носительницы и больного мужа вероятность развития НБ у сыновей составляет 50%, у дочерей — 50%;

4) НБ прослеживается в родословных по горизонтали с преимущественным поражением лиц мужского пола;

5) характерна высокая частота спорадических случаев (вновь возникшие мутации в X-хромосоме у лиц без семейного анамнеза).

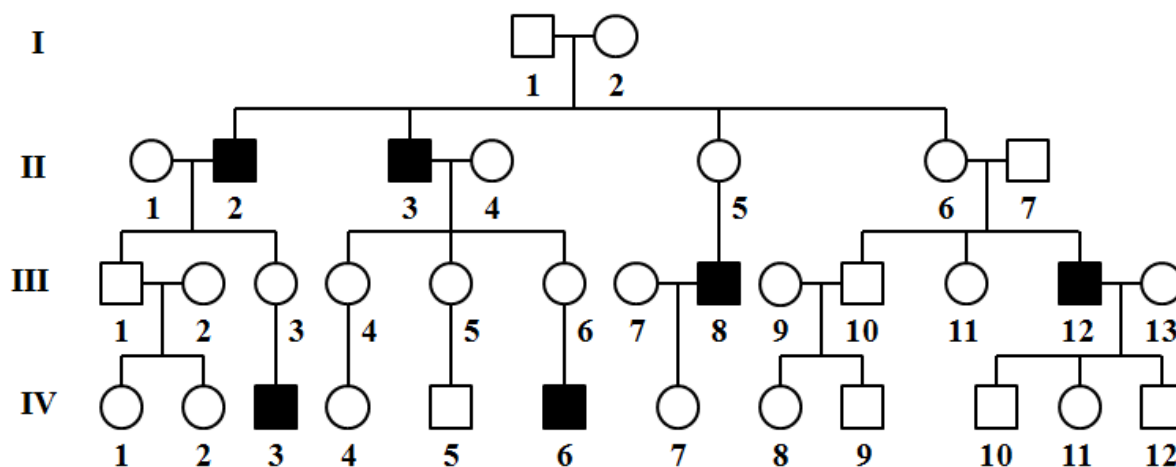


Рис. 6. Родословная X-сцепленного рецессивного типа наследования.

К X-сцепленному рецессивному типу наследования относятся синдром Леша-Нихена, гемофилии А и В, мукополисахаридоз II типа (синдром Хантера), болезнь Фабри, дальтонизм, миодистрофия Дюшенна-Беккера.

Аутосомно-рецессивный тип наследования характерен для болезней, проявляющихся при наличии двух аллелей генов, содержащих мутацию (Рис. 7). В гетерозиготном состоянии, при наличии одного нормального аллеля, болезнь не проявляется. Данные НБ чаще всего связаны с дефектами ферментов, реже — структурных белков. Особенности:

1) у родителей без фенотипических проявлений заболевания могут рождаться дети, страдающие этим заболеванием;

2) если заболеванием страдают оба родителя, то оно проявится у всех их детей;

3) мужчины и женщины поражаются с одинаковой частотой (исключение — болезни, ограниченные полом), характер передачи НБ не зависит от пола родителей, в одном поколении может встречаться несколько случаев НБ (в особенности это касается последних поколений);

4) если пораженный ребенок родился у фенотипически нормальных родителей, значит, оба родителя являются гетерозиготными носителями патологического аллеля. Если оба родителя являются гетерозиготными носителями патологического аллеля, то вероятность рождения у них детей с данной патологией (т.е. гомозигот по мутантному аллелю) составляет 25%, гетерозиготных носителей — 50%, гомозигот по нормальным аллелям — 25%.

5) если один из родителей болен, а другой является гетерозиготным носителем, то вероятность рождения у них детей, страдающих заболеванием, составляет 50%, как и вероятность рождения фенотипически здоровых детей, которые будут гетерозиготными носителями мутантного аллеля.

б) если один из родителей страдает заболеванием, а другой — гомозиготен по нормальным аллелям, то все их дети будут фенотипически здоровыми гетерозиготами.

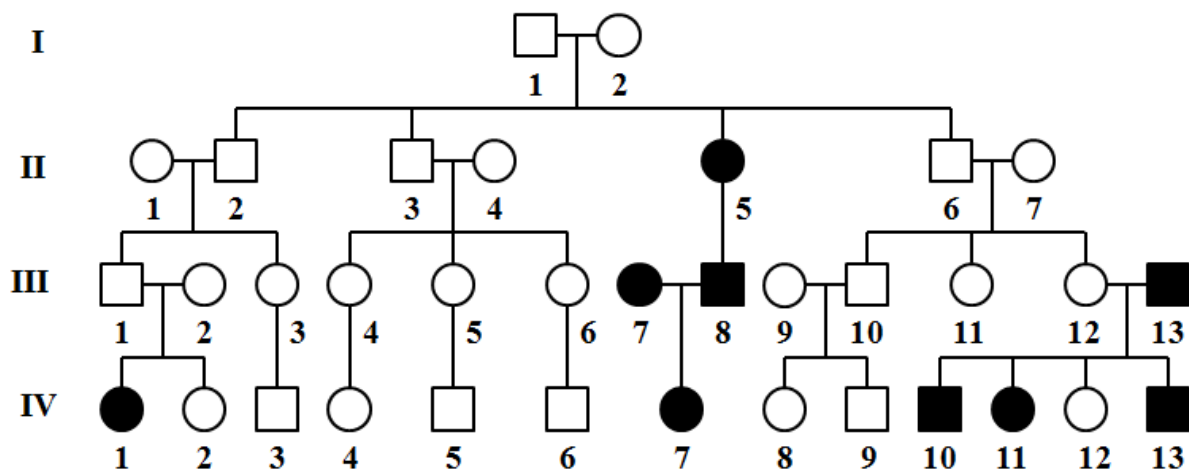


Рис. 7. Родословная аутосомно-рецессивного типа наследования.

К заболеваниям с аутосомно-рецессивным типом наследования относятся большинство НБ человека, в том числе 5 моногенных болезней, на которые проводится скрининг новорожденных в России: муковисцидоз, врожденный гипотиреоз, фенилкетонурия, адреногенитальный синдром и галактоземия.

Аутосомно-доминантный тип наследования характерен для НБ, для развития которых достаточно наличия одного мутантного аллеля в

гене, отвечающем за развитие болезни (Рис. 8). Для большинства НБ с данным типом наследования наличие обоих мутантных аллелей гена несовместимо с жизнью (внутриутробная гибель плода). Признаки:

1) у фенотипически здоровых родителей рождаются фенотипически здоровые дети. Тем не менее, для заболеваний с данным типом наследования характерна высокая частота спорадических случаев (заболевания, обусловленные вновь возникшими мутациями у лиц без семейного анамнеза);

2) если заболеванием страдают оба родителя, то вероятность развития НБ у их детей составляет 75% (с учетом жизнеспособности только гетерозигот — 50%) независимо от пола ребенка;

3) больная мать и больной отец передают НБ детям с равной степенью вероятности независимо от пола детей;

4) случаи НБ встречаются в каждом поколении;

5) частота встречаемости НБ в родословной около 50%;

6) если один из родителей здоров, а другой болен, то вероятность рождения больного ребенка составляет 50% независимо от пола.

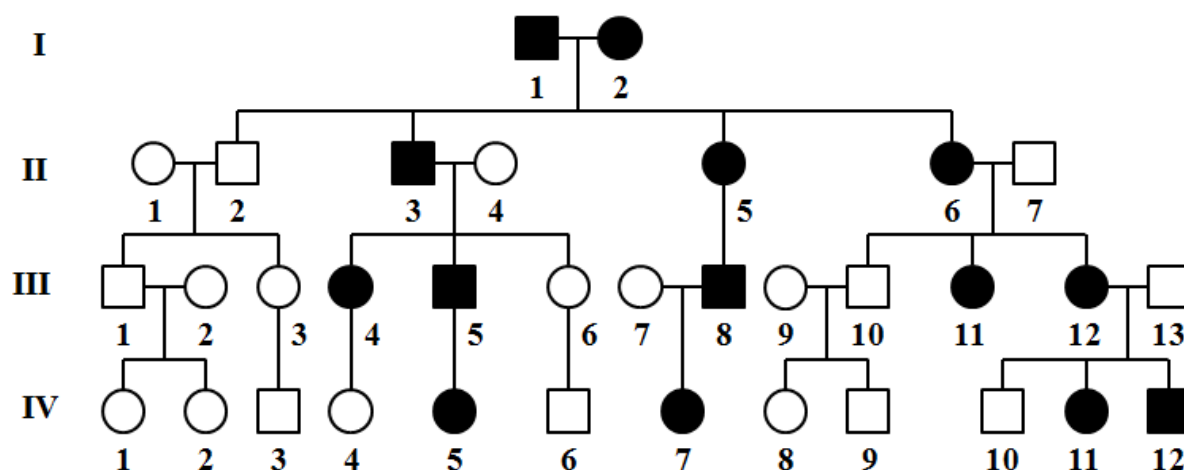


Рис. 8. Родословная аутосомно-доминантного типа наследования.

К НБ с аутосомно-доминантным типом наследования относятся семейная гиперхолестеринемия, поликистоз почек, нейрофиброматоз 1-го типа, синдром Марфана, миотоническая дистрофия, синдром Элерса-Данлоса, ахондродисплазия.

Следует отметить, что в клинико-генеалогическом методе важное значение имеет знание клинических проявлений НБ и правильная постановка диагноза по клиническим критериям независимо от данных, полученных при анализе родословной, поскольку у пациентов со спорадическим случаем НБ семейный анамнез будет неинформативным.

Контрольные вопросы

1. Какие этапы различают в клинико-генеалогическом методе?
2. Какие символы используются при составлении родословных?
3. Кто впервые ввел клинико-генеалогический метод и в каком году?
4. Какие типы наследования моногенных болезней вы знаете?
5. Охарактеризуйте X-сцепленный доминантный тип наследования.

4. ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД

Цитогенетический метод применяется для построения кариограммы с целью выявления количественного и качественного изменения хромосом человека, приводящих к развитию хромосомных болезней, к наиболее распространенным из которых относятся:

- синдром Дауна (трисомия 21), ЧВ=1 на 700 новорожденных;
- синдром Клайнфельтера (полисомия X у мальчиков), ЧВ=1:500–700 новорожденных мальчиков;
- полисомия X у девочек, ЧВ=1:1000 новорожденных девочек;
- полисомия Y, ЧВ=1:1000 новорожденных мальчиков;
- синдром Шерешевского-Тернера (Моносомия X), ЧВ=1:1500 новорожденных девочек;
- синдром Патау (трисомия 13), ЧВ=1:5000 новорожденных;
- синдром Эдвардса (трисомия 18), ЧВ=1:5000–1:7000 новорожденных;
- синдром Прадера-Вилли (делеция 15q11.2 отцовской хромосомы) 1:10000;
- синдром Ангельмана (делеция 15q11.2 хромосомы матери) 1:10000;
- синдром Беквита-Видемана (импринтинг/делеция 11p15) 1:12000;
- синдром Лежена или кошачьего крика (5p-) 1:45000;
- синдром Вольфа-Хиршхорна (4p-) 1:50000;
- синдром де Груши (18p-) 1:60000;
- синдром Орбели (13q-) 1:100000.

Хромосомный набор человека ($2n=46$, $n=23$) $2n=46$, $n=23$) содержит 22 пары аутосом и 1 пару половых хромосом. Аутосомы распределены по группам и пронумерованы. Половые хромосомы не относятся ни к одной

из групп и не имеют номера. В зависимости от расположения центромеры различают три типа строения хромосом:

- 1) метацентрические — плечи равной или почти равной длины, центромера располагается посередине или почти посередине;
- 2) субметацентрические — плечи неравной длины;
- 3) аacroцентрические — одно из плеч хромосомы имеет очень малые размеры и почти не видно на кариограмме.

Спутничные хромосомы содержат вторичную перетяжку в коротком плече. Y-хромосома — мелкая аacroцентрическая, X-хромосома — средняя субметацентрическая. В таблице 4 представлено распределение аутосом человека по группам в зависимости от размеров и расположения центромеры.

Таблица 4

Распределение аутосом человека на группы

Группа	Номер хромосомы	Размер	Форма хромосомы
A	1, 2, 3	крупные	1, 3 — метацентрические, 2 — субметацентрическая
B	4, 5	крупные	субметацентрические
C	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12	средние	субметацентрические
D	13, 14, 15	средние	аacroцентрические, спутничные
E	16, 17, 18	мелкие	субметацентрические
F	19, 20	мелкие	метацентрические
G	21, 22	мелкие	аacroцентрические, спутничные

В качестве материала для цитогенетического метода чаще всего используют кровь пациента. Могут исследовать также биоптаты — для получения клеток используют инвазивные методы исследования плода:

- 1) амниоцентез — пункция амниотической полости для получения околоплодных вод (10–20 мл). Срок проведения — с 12 по 19 неделю;
- 2) биопсия хориона — аспирация ворсин хориона (зародышевая часть плаценты) — с 10 по 14 недель;
- 3) плацентоцентез — аспирация ворсин хориона в более поздние сроки — после 15 недель;

4) кордоцентез — пункция сосудов пуповины для получения крови плода — в сроки с 20 недели (оптимально с 20 по 22);

5) биопсия тканей плода — во II триместре беременности;

6) кардиоцентез — пункция внутривенной пуповины плода.

Цитогенетический метод проводится в несколько этапов (Рис. 9):

- 1 этап — помещение лейкоцитов в среду с фитогемагглютинином;
- 2 этап — культивирование клеток (митотическое деление);
- 3 этап — остановка митоза на стадии метафазы с помощью колхицина;
- 4 этап — обработка гипотоническим раствором KCl;
- 5 этап — изготовление микропрепаратов;
- 5 этап — составление кариограммы.

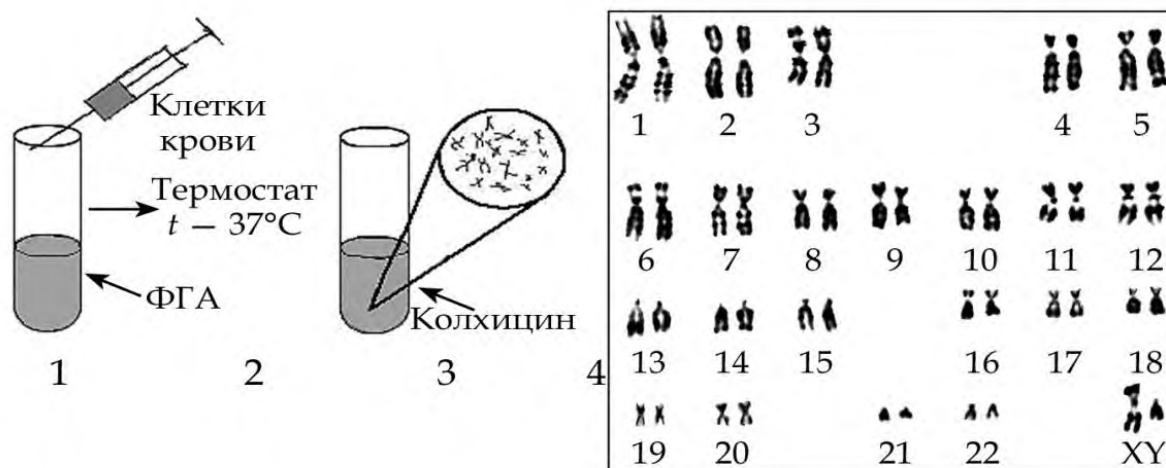


Рис. 9. Схема получения кариотипа.

При кариотипировании чаще всего используют окраску по Гимзе — простая или рутинная окраска (Рис. 10), при которой все хромосомы равномерно окрашиваются по всей длине. Состав красителя Гимза: Метанол — 750 мл, Глицерин — 256 мл, Азур-1 — 3,772 г, Эозин — 2,165 г, Метиленовый синий — 1,563 г. Готовый жидкий краситель перед окрашиванием разводят из расчета 2 капли на 1 мл дистиллированной воды.

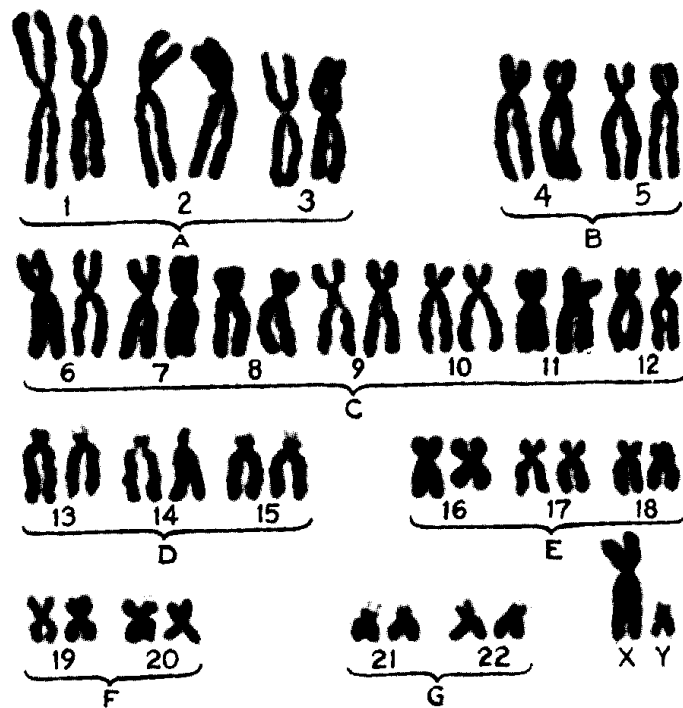


Рис. 10. Кариограмма соматической клетки человека при простой окраске по Гимзе.

Для обнаруженных структурных аномалий хромосом (инверсии, транслокации, делеции) проводится дифференциальная окраска, при помощи которой выявляют структурную организацию хромосом по длине (Рис. 11), выражающуюся в чередовании гетерохроматиновых (темные полосы) и эухроматиновых (светлые полосы) участков. Используется G-окраска (по Гимзе), с предварительной инкубацией в солевом растворе или путем добавления протеазы (например, трипсин — GTG окраска).

Подробное описание цитогенетического метода:

- 1) взятие образца венозной крови (достаточно 0,5 мл).
- 2) добавление крови во флакон с культуральной средой (содержит глутамин, сыворотку крупного рогатого скота, антибиотик (гентамицин). Для стимуляции митоза добавляют фитогемагглютинины, белки растительного происхождения (бобовых), стимулирующие митоз. Перемешивают смесь и помещают в термостат на 72 часа (3 суток) при 37°C;
- 3) после инкубации в термостате, за 2 часа до фиксации добавляют колхицин (алкалоид, связывающийся с белком тубулином микротрубочек и останавливающий митоз в метафазу);

4) непосредственно перед фиксацией клетки обрабатывают 0,56% раствором КСl при 37°C;

5) фиксацию производят смесью уксусной кислоты и метанола (1:3) в течение 60 минут. Далее на предметное стекло наносят 2 капли осадка, высушивают и окрашивают.

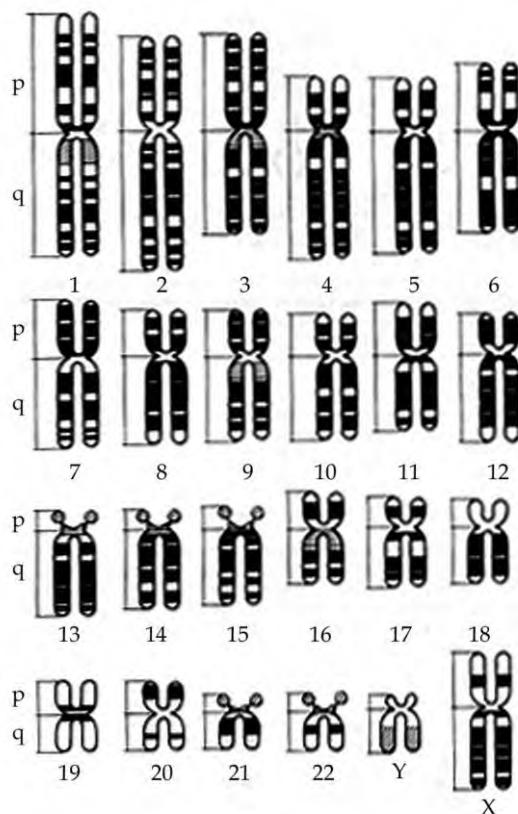


Рис. 11. Схема дифференциального окрашивания хромосом человека.

Контрольные вопросы

1. Для исследования каких болезней применим цитогенетический метод?
2. Какие типы строения хромосом вы знаете?
3. Что могут использовать в качестве материала для цитогенетического метода?
4. Какие основные этапы цитогенетического метода вы знаете?
5. Для чего добавляют колхицин и каков механизм его действия?
6. Как проводится дифференциальная окраска хромосом?

5. МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД

Молекулярно-цитогенетический метод основан на технологии флуоресцентной гибридизации *in situ* — FISH (fluorescence in situ hybridization) с использованием ДНК-зондов, которые связываются с комплементарными мишенями (анализируемые гены или участки хромосом) в образце.

Так как последовательность нуклеотидов зонда и анализируемого участка хромосомы комплементарны, зонд присоединяется к хромосоме при помощи водородных связей между азотистыми основаниями нуклеотидов — в данном участке происходит ренатурация ДНК. Для визуализации зонды метят:

- 1) прямое мечение — в состав ДНК-зондов входят нуклеозиды, меченные флуорофорами (флуоресцеин — зеленый, родамин — красный);
- 2) непрямое мечение — нуклеозиды мечены дигоксигенином (выявляют при помощи флуоресцентно-меченных антител) или биотином (при помощи авдина или стрептавидина).

Этапы метода.

1. Конструирование зондов (размер не более 1000 п.н.).
2. Приготовление препарата метафазных хромосом (глава 4) или интерфазных ядер, фиксация на предметном стекле.
3. Денатурация ДНК (воздействие формамда при 70°C).
4. Добавление ДНК-зонда и гибридизация в течение 12 часов.
5. Отмывка, удаление негибридизовавших зондов.
6. Визуализация при помощи люминесцентного микроскопа.

Преимуществом FISH является возможность исследования как метафазных хромосом, так и интерфазных ядер *in situ*. Кроме того, можно идентифицировать хромосомные перестройки, не выявляемые при помощи цитогенетического метода, определить локализацию гена, а также выявить определенные мРНК в образце биоптата. FISH метод позволяет провести

анализ всего за 1–3 дня и позволяет одновременно использовать несколько ДНК-зондов, меченых разными флюорофорами.

Контрольные вопросы

1. Что такое гибридизация?
2. Что представляет собой зонд в молекулярно-цитогенетическом методе?
3. Чем отличается прямое мечение от непрямого при FISH-методе?
4. Какие основные этапы молекулярно-цитогенетического метода?
5. Охарактеризуйте преимущество FISH-метода перед цитогенетическим?

6. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Молекулярно-генетические методы (в табл. 5 представлены данные об открытии наиболее известных из методов) направлены на выявление изменений или особенностей структуры исследуемого участка ДНК вплоть до расшифровки первичной последовательности оснований. Все методы начинаются с выделения из биологического материала (чаще всего крови) ДНК или РНК, которые в дальнейшем используют для анализа.

Таблица 5

Историческая сводка открытия методов

Метод	Исследователь	Год
Выделение нуклеиновых кислот	Фридрих Мишер	1869
Электрофорез белков крови	Арне Тизелиус	1930
Выделение рестриктазы	Смит Хамилтон	1970
Блот-гибридазация	Эдвин Мэллор Саузерн	1975
Дидезоксисеквенирование	Фредерик Сэнгер	1977
Полимеразная цепная реакция	Кэрри Бэнкс Муллис	1983
Выделение ДНК из крови	Кристофер Мэтью	1984
SSCP (анализ конформационного полиморфизма однонитевых локусов)	Масато Орита	1989
DGGE (денатурирующий градиентный гель-электрофорез)	Ричард Майерс	1990
DHPL (высокоэффективная жидкостная хроматография)	Петер Офнер, Петер Андерхилл	1995
Гетеродуплексный анализ	Вэйтао Сяо, Петер Офнер	2001

6.1. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК И РНК

При получении пробирок, содержащих биоматериал, в лаборатории исследователь должен руководствоваться следующими правилами:

1) проверка пробирок с кровью:

- все полученные пробирки должны содержать кровь;

- количество и надписи на пробирках должны соответствовать данным сопроводительных документов;
 - кровь в пробирках не должна содержать сгустков, плесени, инородных взвесей;
 - все пробирки должны быть герметично закрыты, не должно быть сколов и трещин;
- 2) дублирование информации с бумаги на электронные носители;
 - 3) создание архива *всех* данных на электронных носителях с распределением по датам и нозологиям.

NB! Все работы, начиная с выделения ДНК, должны проводиться строго в стерильных перчатках, в маске и очках при работающей вытяжке. Причины:

- 1) *исключить контаминацию образцов ДНК (контаминация может привести к ложным результатам исследований);*
- 2) *исключить заражение персонала, работающего с кровью и образцами ДНК возможными инфекциями (вирусные гепатиты, ВИЧ-инфекция и другие).*

Фенол-хлороформная экстракция ДНК из крови

Суть метода состоит в выделении ДНК из клеток путем лизиса их оболочек с последующим осаждением ДНК центрифугированием и очисткой фенол-хлороформной смесью. Применение фенола и хлороформа при выделении ДНК способствует созданию двухфазной системы. Фенол отделяет белки от ДНК. Хлороформ денатурирует белок и липиды и помогает поддерживать разделение органической и водной фазы, а также делает ДНК менее растворимой в феноле. Принцип метода основан на том, что нуклеиновые кислоты имеют высокую растворимость в водной фазе, в то время как большая часть белков, углеводов и других компонентов клетки растворяются в органических растворителях. Забор крови для выделения ДНК осуществляется в пробирки, в качестве консерванта содержащие 3.8% раствор цитрата натрия в соотношении 1:5, либо ЭДТА.

Первый этап.

1. К 5 мл крови добавляют 30 мл ледяного лизирующего буфера (Табл. 6). Полученную смесь центрифугируют при +4°C со скоростью 4000 оборотов/минуту в течение 20 минут (Рис. 12). Если центрифуга без охлаждения, то пробирки перед центрифугированием помещают в морозильник на 10 минут.

Таблица 6

Приготовление лизирующего буфера

Этап	Реактив	Количество
I	Сахароза	109,44 грамм
II	MgCl ₂ 0,2 М	25 мл
III	Трис-HCl (pH 7,6) 2 М	5 мл
IV	дистиллированная вода	до 1 литра
V	перемешать на магнитной мешалке	
VI	Тритон X-100 1%	10 мл



Рис. 12. Центрифуга для I этапа выделения ДНК.

2. Супернатант сливают, к осадку добавляют 20 мл холодного лизирующего буфера, перемешивают и центрифугируют при 4000 об/мин при +4°C, 10 минут.

При приготовлении лизирующего буфера Тритон X-100 добавляют в последнюю очередь, осторожно наслаивая по стенке, чтобы не образовать пузырей, после чего раствор осторожно перемешивается. Свежеприготовленный лизирующий буфер хранится в холодильнике от +4 до +10°C не более 3 суток. Если планируется использовать лизирующий буфер более чем через 3 суток, буфер замораживают.

Техника приготовления Трис-НСl представлена в таблице 7. Трис-НСl хранить в холодильнике от +4 до +10°C.

Таблица 7

Приготовление Трис-НСl 2 М (рН 7,6)

Этап	Реактив	Количество
I	Трис	60,55 г.
II	H ₂ O	150 мл
III перемешать на магнитной мешалке		
IV	НСl	30 мл (до получения рН 7,6)
V	H ₂ O	до 250 мл

Техника приготовления 0,2М раствора MgCl₂ представлена в таблице 8. Готовый раствор хранить в холодильнике от +4 до +10°C.

Таблица 8

Приготовление 0,2 М MgCl₂

Реактив	Количество
MgCl ₂	1,9 г.
H ₂ O	до 100 мл
удельный вес раствора должен быть 1,015	

3. Надосадочную жидкость сливают, ресуспензируют осадок в 800 мкл буфера для протеиназы К (Saline ЭДТА).

Для приготовления буфера Saline ЭДТА необходимо сделать матричный раствор 0,5М ЭДТА (Табл. 9), который хранят в холодильнике при +4 °С.

Таблица 9

Приготовление 0,5 М ЭДТА (рН 8,0)

Этап	Реагент	Количество
I	соль ЭДТА	186,1 г.
II	H ₂ O	800 мл
III перемешать на магнитной мешалке		
IV	NaOH	20 г. (до рН 8,0)
V стерилизовать автоклавированием		

Техника приготовления буфера Saline ЭДТА представлена в таблице 10. Готовый раствор хранится в холодильнике при +4 – +10°С.

Таблица 10

Приготовление Saline (ЭДТА)

Реагент	Количество
ЭДТА 0,5 М (рН 8,0)	25 мл
NaCl 5 М	7,12 мл
H ₂ O	до 500 мл

Для Saline ЭДТА используется 5М раствор хлорида натрия NaCl, техника приготовления которого представлена в таблице 11. рН раствора Saline EDTA определить при помощи лакмусовой бумаги (светло-зеленый цвет).

Таблица 11

Приготовление 5 М NaCl

Этап	Реагент	Количество
I	сухой NaCl	29,22 г.
II	H ₂ O	80 мл
III перемешать на магнитной мешалке		
IV	H ₂ O	до 1000 мл

4. Осадок с Saline EDTA переносят в пробирку на 2 мл, добавляют 80 мкл 10% SDS (Табл. 12) и 20 мкл протеиназы К (10мг/мл), слегка перемешивают и добавляют Saline EDTA до 1 мл. При приготовлении 10% SDS (Табл. 12) используется водяная баня или магнитная мешалка с подогревом ($t=68^{\circ}\text{C}$).

Протеиназа К выпускается в лиофилизированном виде и переносит транспортировку при комнатной температуре без заморозки. Перед использованием фермент необходимо растворить в бидистиллированной или деионизированной воде (1 мл на 1 пробирку). В дальнейшем протеиназа К хранится только при -20°C .

Таблица 12

Приготовление 10% SDS (додecil сульфат натрия)

Этап	Реагент	Количество
I	SDS (сухой)	25 г.
II	H ₂ O	200 мл
III перемешать на магнитной мешалке		
III нагреть в бане до 68°C		
IV	HCl	несколько капель — до получение pH 7,2
V	H ₂ O	до 250 мл

5. Готовую смесь необходимо хорошо перемешать на ротаторе (Рис. 13), добавить Saline EDTA до 1 мл и инкубировать в термостате при $t=37^{\circ}\text{C}$ 12 часов.



Рис. 13. Ротатор и центрифуга для пробирок на 1,5 и 2 мл.

Второй этап (Рис. 14).

1. В пробирку с инкубированной смесью добавляют 800 мкл забуференного фенола (на 50 мл фенола-Трис-НСI 200 мкл меркаптоэтанола). Перемешивают на ротаторе в течение 10 минут до однородной массы.

2. Центрифугируют при 5000 об/мин в течение 10 минут.

3. Супернатант переносят в новую пробирку, добавляют 500 мкл забуференного фенола и 500 мкл хлороформ-изоамилового спирта (24 мл хлороформа + 1 мл изоамилового спирта). Перемешивают на шейкере в течение 10 минут до однородной массы.

Готовый забуференный фенол должен четко разделяться на два слоя. Для очистки ДНК пипеткой осторожно набирать нижний слой. Техника приготовления фенола представлена в таблице 13.

Приготовление фенола

Этап	Реагент	Количество
I Расплавить твердый фенол при 68 ⁰ в водяной бане		
II	8-оксихинолин	до конечной концентрации 0,1% (антиоксидант)
III	Буфер (Трис-HCl pH 8,0 в смеси 0,2% 6-меркаптоэтанола)	насыщают равным объемом до pH 7,6
IV Хранить не более 1 месяца при t = +4 ⁰ C		

После центрифугирования раствор разделится на 2 слоя — для следующего этапа осторожно отбирают верхний слой, стараясь не захватить нижнего, иначе очистку придется повторять.

4. Центрифугируют при 5000 об/мин в течение 10 минут.

5. Супернатант переносят в новую пробирку, добавляют 800 мкл хлороформ-изоамилового спирта. Перемешивают в течение 5 минут на шейкере до однородной массы.

6. Центрифугируют при 3000 об/мин в течение 3 минут.

7. Супернатант переносят в новую пробирку, добавляют 1000 мкл охлажденного (при -20⁰C) 96% этанола (2 объема). Как можно быстрее перемешивают, наблюдая преципитацию ДНК. Если супернатанта, содержащего ДНК, больше 500 мкл, то лучше разлить его по двум пробиркам и добавить охлажденный 96% этанол в каждую из них.

8. Центрифугируют при 10000 об/мин в течение 5 минут для осаждения полученную ДНК.

9. Осторожно сливают спирт, промывают осадок ДНК 2 мл 70% этанола до удаления солей, тщательно встряхивая пробирку.

10. Полностью сливают спирт и высушивают осадок при комнатной температуре до полного испарения спирта.

11. Высушивают ДНК при комнатной температуре и растворяют в сверхчистой воде (Milli-Q) или воде для инъекций.

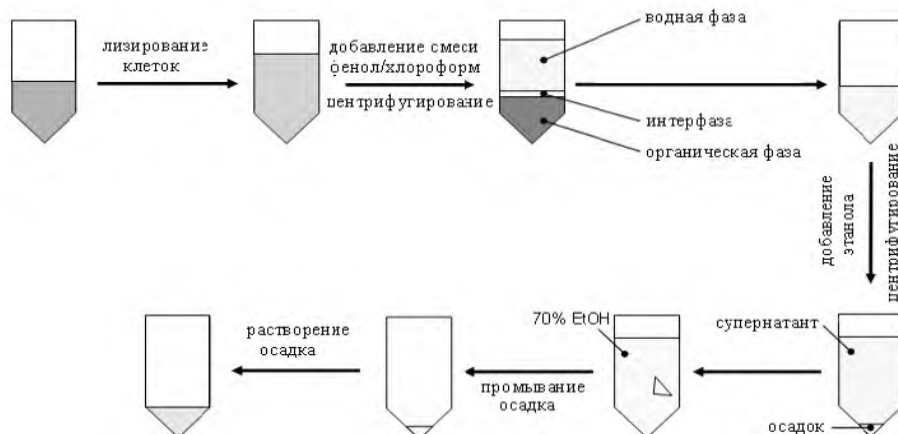


Рис. 14. Схема выделения ДНК [Епринцев и др., 2008].

Для определения концентрации и чистоты (наличие примеси белка) раствора ДНК применяют спектрофотометр (Рис. 15). Необходимо обязательно проводить оценку качества экстрагированной ДНК путем измерения оптической плотности раствора ДНК в области белкового и нуклеинового спектров поглощения. В чистых образцах ДНК соотношение $A(260)/A(280) > 1,8$; где $A(260)$ и $A(280)$ — оптическая плотность раствора при длине волны 260 и 280 нм. В противном случае процедуру очистки необходимо повторять.



Рис. 15. Анализ качества образца ДНК при помощи спектрофотометра.

Метод выделения ДНК из тканей

Метод выделения геномной ДНК из биологического материала (эпителий, несколько корней волос, ногтевая пластинка, биоптат), основанный на использовании лизиса клеток с последующим расщеплением белков протеиназой и адсорбции ДНК при помощи сорбента. Метод применяется в случаях, когда невозможно взять образец венозной крови не менее 2 мл.

Этапы:

- 1) к 5–10 мг ткани добавляют 100 мкл лизирующего буфера;
- 2) тщательно растирают ткань с лизирующим буфером;
- 3) добавляют 10 мкл протеиназы К, перемешивают на вортексе;
- 4) инкубируют 30 минут при 56°C , перемешивая;
- 5) инкубируют 5 минут при 90°C ;
- 6) к смеси добавляют 100 мкл сорбента, перемешивают на вортексе.

Сорбент используется для отделения молекул ДНК от смеси.

- 7) центрифугируют 2 минуты при 10 000 оборотов в минуту;
- 8) надосадочную жидкость переносят в новую пробирку и используют для постановки ПЦР в объеме 2–5 мкл или убирают на хранение в холодильник (при $+4^{\circ}\text{C}$ — хранить несколько недель, при -20°C — несколько лет).

Для работы с малыми объемами жидкости в молекулярно-генетических методах используются микропипетки, позволяющие измерять и отбирать необходимые объемы от 1 до 1000 мкл (Рис. 16).



Рис. 16. Микропипетка (дозатор).

Метод выделения РНК из цельной крови

Для выделения РНК 2 мл венозной крови отбирают в одноразовую пробирку с 200 мкл раствора антикоагулянта (0,05М раствор ЭДТА или 4% раствор цитрата натрия). В качестве антикоагулянта не используется гепарин, так он ингибирует активность ДНК-полимеразы. Пробы также нельзя замораживать, чтобы предотвратить разрушение РНК. Неохлажденные пробы можно хранить при температуре +4-+8⁰С не более суток.

Первый этап фенольно-хлороформной экстракции РНК из крови идентичен выделению ДНК (см. выше). Метод выделения РНК на этапе непосредственного применения фенола с хлороформом отличается тем, что при рН=7-8 происходит растворение ДНК и РНК в водной фазе, в то время как белки образуют непрозрачный слой между фазами. В кислых условиях (рН<5), суммарная РНК остается в верхней водной фазе, в то время как большая часть ДНК и белков остается или в интерфазе, или в органической фазе.

Суммарная РНК впоследствии выделяется осаждением с изопропиловым спиртом. Регулируя содержание фенола и его рН, можно добиться разделения ДНК и РНК между собой, при этом ДНК будет находиться в органической фазе, в то время как РНК будет в водной фазе. На данной стадии возможно добавление изоамилового спирта, чтобы предотвратить вспенивание. Для денатурации РНК используется LiCl, при этом эффективно удаляются ДНК.

Методика выделения РНК из крови

1. В пробирку вносят 1 мл цельной крови и центрифугируют со скоростью 3000 оборотов в минуту в течение 5 минут при комнатной температуре. В результате кровь разделится на плазму и форменные элементы. На поверхности осадка форменных элементов расположен тонкий слой лейкоцитов.

2. Аккуратно, не захватив лейкоциты, переносят плазму в чистую пробирку. Отделить плазму необходимо не позднее, чем через 2–6 часов

после взятия крови. В случае необходимости сохранения образцов для исследования плазму хранят при температуре $+2$ - $+4^{\circ}\text{C}$ не более 72 часов, для более длительного хранения замораживают при -20°C . Замороженную плазму хранят до 1 месяца.

3. Образец тщательно перемешивают на вортексе 10 секунд.

4. В пробирки объемом 1,5 мл вносят по 450 мкл денатурирующего раствора и по 3 мкл носителя (т-РНК). Денатурирующий раствор содержит фенол (необходимо избегать попадания на кожу и слизистые оболочки).

5. По 50 мкл исследуемой плазмы крови вносят в пробирки, перемешивают на вортексе по 10 секунд, сбрасывают капли, инкубируют при комнатной температуре 10 минут.

6. Добавляют 100 мкл хлороформа, тщательно закрывают пробирки и перемешивают на вортексе по 10 секунд.

7. Центрифугируют 5 минут при 14000 оборотов в минуту.

8. Не задевая интерфазу, переносят до 300 мкл верхней водной фазы в чистый эппендорф, содержащий 300 мкл изопропилового спирта. Пробирки закрывают и перемешивают на вортексе по 10 секунд.

9. Центрифугируют 15 минут при 14000 оборотов в минуту.

На данном этапе должен образоваться полупрозрачный рыхлый осадок.

10. Удаляют супернатант при помощи вакуумного аспиратора в колбу-ловушку, оставив на дне пробирки около 20 мкл жидкости. Нельзя допускать захвата рыхлого осадка!

11. Добавляют к осадку 1 мл промывочного раствора, перемешивают на вортексе 10 секунд.

12. Центрифугируют 10 минут при 14000 оборотов в минуту.

13. Удаляют супернатант как можно полнее, не захватив при этом осадок. Подсушивают 30 минут при комнатной температуре, оставляя пробирки открытыми (можно в термостате при 40°C). Спирт должен испариться полностью.

14. Добавляют 50 мкл деионизированной воды, пробирки закрывают и инкубируют 10 минут при комнатной температуре, затем перемешивают на вортексе или пипетированем.

Для определения РНК раствор необходимо сразу использовать для постановки реакции ПЦР. РНК в этом растворе не хранится!

Метод выделения РНК из тканей с тризолом

Выделение РНК с тризолом — быстрый и удобный метод, требующий замораживания тканей жидким азотом.

1. Гомогенизируют образец ткани в 1 мл тризола. Объем образца ткани не должен превышать 10% от объема фенола (50–100 мг на 1 мл тризола). Чем меньше ткани по отношению к тризолу, тем меньше будет примесь геномной ДНК. Если объем образца большой, то удобно залить образец тризолом, в керамической ступке заморозить жидким азотом и растереть пестиком. Если объем образца маленький, то можно гомогенизировать пластиковым пестиком в эппендорфе. Если нужно одновременно выделить РНК из нескольких образцов, то удобно гомогенизировать по одному, замораживать в азоте и хранить при -20°C , пока не будут гомогенизированы все образцы. Далее выделение РНК можно проводить параллельно.

2. Инкубируют на термошейкере при 65°C в течении 5 минут.

3. Центрифугируют при 10000 оборотов в минуту 10 минут.

4. Инкубируют на термошейкере при 65°C 10 минут.

5. Добавляют к смеси 200 мкл хлороформа. Должно произойти разделение фаз.

6. Плавнo перемешивают в течение 5 минут.

7. Центрифугируют при 10000 оборотов в минуту 10 минут.

8. Переносят водную фазу в новую пробирку.

9. Добавляют 1/10 объема 3М раствора ацетата натрия ($\text{pH}=5,2$), перемешивают.

10. Добавляют равный объем изопропанола, перемешивают.

11. Выдерживают пробирки в морозильнике при -20°C в течение 10 минут.

12. Центрифугируют при 6000 оборотов в минуту в течение 5 минут.

13. Осадок промывают 70% раствором этанола, подсушивают и растворяют в воде.

6.2. ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ

ПЦР — метод амплификации ДНК *in vitro*, позволяющий увеличить количество копий нужной последовательности ДНК длиной от нескольких десятков до нескольких сотен п.н. в количестве, превышающем исходное, в 10^6 и более раз. В основе реакции лежит механизм репликации молекул ДНК ферментом ДНК-полимеразой. ПЦР изобретена в 1983 году Кэри Муллисом.

Для проведения ПЦР необходимо знать нуклеотидную последовательность амплифицируемого фрагмента. Схематическое изображение ПЦР представлено на рисунке 17.

Процесс амплификации состоит из повторяющихся циклов. Каждый цикл включает 3 стадии:

I. Денатурация ДНК при температуре от 93° до 96°C .

II. Гибридизация (отжиг) праймеров — присоединение праймеров к комплементарным последовательностям одноцепочечных молекул ДНК (40° – 75°C).

III. Элонгация — синтез комплементарных цепей ДНК Таq-полимеразой на одноцепочечных молекулах в границах присоединенных праймеров (60 – 75°C).

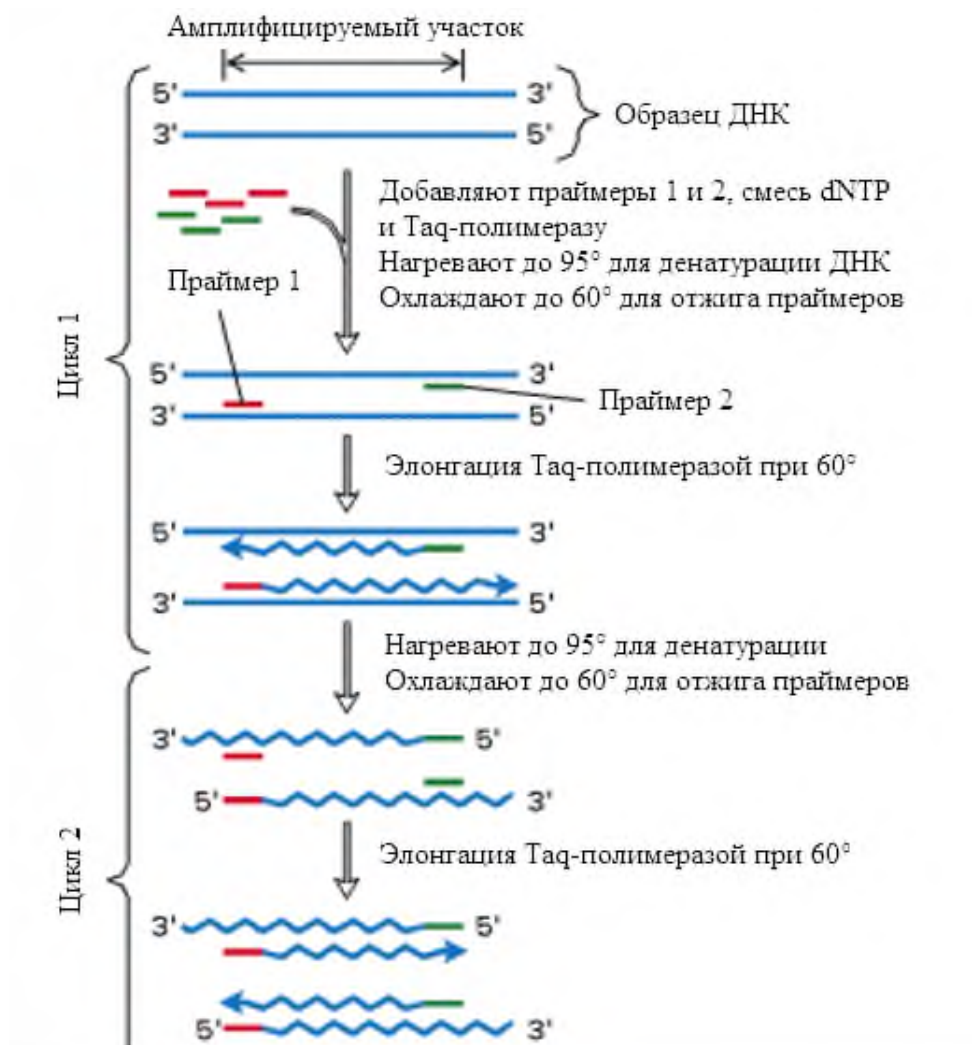


Рис. 17. Схема полимеразной цепной реакции (Телков М., 2006).

После помещения пробирок (стрипов) в термоблок амплификатора, задаются температурные параметры реакции и количество циклов и запускается ПЦР.

Реагенты для ПЦР (Табл. 14):

- 1) исследуемая ДНК;
- 2) праймеры — олигонуклеотидные последовательности ДНК длиной от 15 до 30 п.н., комплементарные 3'-концам амплифицируемого участка на *смысловой* и *антисмысловой* нитях ДНК (так как ДНК-полимераза способна образовывать новую цепочку ДНК только в направлении от 5'-конца к 3'-концу, добавляя свободные нуклеотиды к 3'-концу собираемой цепочки);

- 3) термофильная ДНК-полимераза (Taq-полимераза);
- 4) dNTP – набор дезоксинуклеотидтрифосафтов (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), из которых Taq-полимераза выстраивает новые цепи ДНК;
- 5) буферный раствор, насыщенный ионами Mg^{2+} ;
- 6) деионизированная вода.

Расчет оптимальной температуры отжига (T_m) праймера.

1. Если длина праймера не более 20 п.н.:

$$T_m = [(A+T) \times 2^{\circ}C] + [(G+C) \times 4^{\circ}C].$$

2. Если длина праймера = 20–30 п.н.:

$$T_m = 22 + 1,46 ([2 \times (G+C) + (A + T)],$$

где (A+T) — суммарное количество аденина и тимина, (G+C) — суммарное количество гуанина и цитозина в праймере.

Все работы по смешиванию реагентов для ПЦР ведутся в специальном стерильном ламинарном боксе в одноразовых стерильных перчатках, халате и маске для исключения контаминации образцов ДНК (Рис. 18).

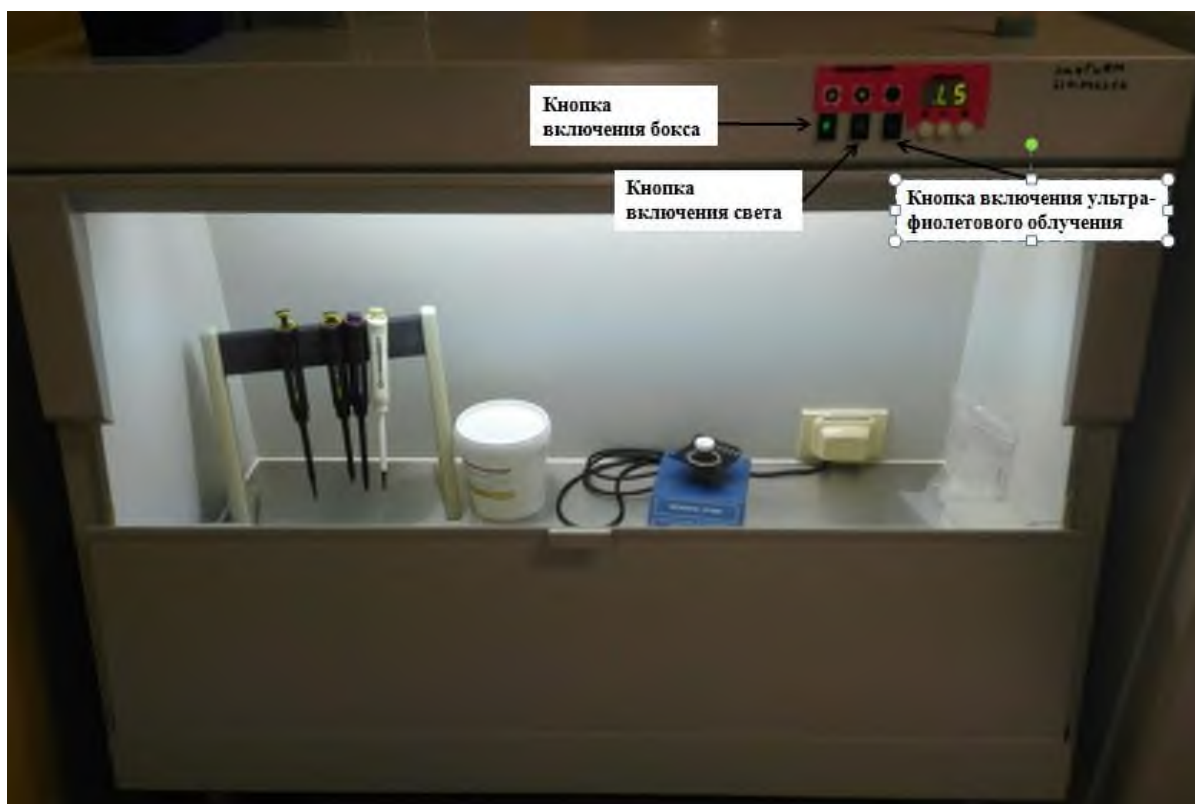


Рис. 18. Ламинарный бокс для приготовления смесей для ПЦР.

Общие рекомендации при выборе праймеров:

- минимум вторичных структур;
- содержание гуанина и цитозина 50–60%;
- повторы гуанина и цитозина не более 3 оснований подряд;
- не помещать гуанин на 5'-конце;
- не более двух гуанина и цитозина в пределах 5 крайних оснований на 3'-конце.

Чтобы исключить амплификацию других участков геномной ДНК, необходимо провести геномный поиск нуклеотидных последовательностей, которые гомологичны заданной ДНК.

Компьютерная программа для подбора праймеров — **DNAS_Tar**.

Таблица 14

Расчет реагентов для ПЦР

Реагенты	Стандарт	Количество на 1 образец
<i>Taq</i> .Буфер (Tris-HCl, pH 8.4; KCl; MgCl ₂)	25 мМ 50 мМ 1,5 мМ	1,25 мкл
dNTP	0.2 мМ	0,4 мкл
Праймеры	по 5пМ	по 0,2 мкл
<i>Taq</i> -полимераза	5 ЕД	0,1 мкл
H ₂ O	Стерильная	10 мкл
Тотальная ДНК	10-20 нг	1 мкл

Все работы для ПЦР ведутся с использованием только стерильных наконечников, пробирок (стрипов) и отдельных пипеток. Работа ведется в стерильных перчатках и в маске. Использовать реагенты можно только после их полного размораживания.

При смешивании компонентов смеси для ПЦР следует придерживаться определенной последовательности их добавления: первоначально в пробирки или стрипы (Рис. 19) добавляется дистиллированная вода, самым последним реагентом — Taq-полимераза. Несмотря на термоустойчивость, Taq-полимеразу вынимают из морозильной камеры только к моменту добавления её в смесь и немедленно снова помещают в морозильник, в противном случае фермент теряет свою активность в последующих реакциях.

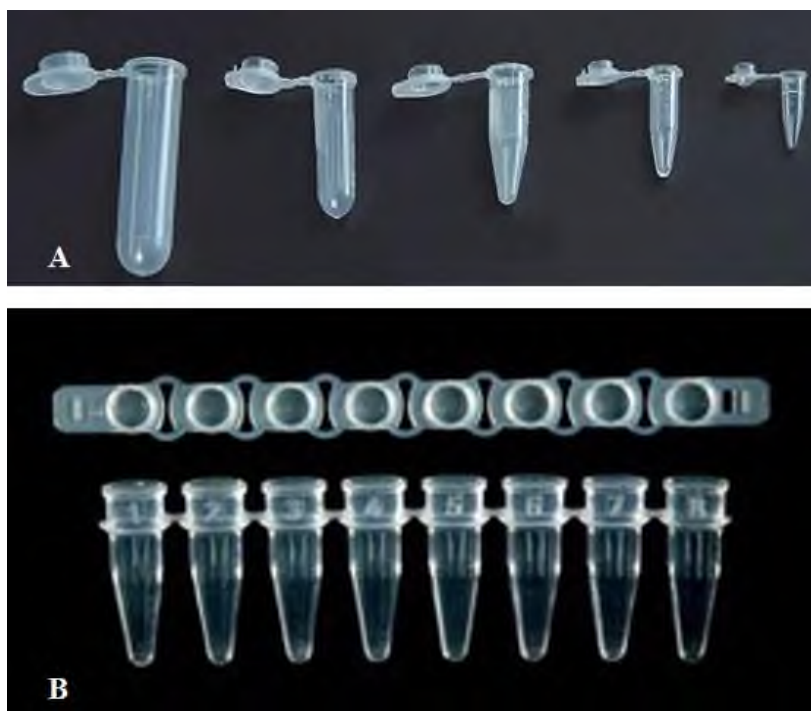


Рис. 19. Пробирки (А) и стрипы (В) для ПЦР.

При использовании термоциклеров без нагрева крышки, в каждую из пробирок объемом 600 мкл с реакционной смесью после смешивания всех реагентов и осаждения на микроцентрифуге в течение нескольких секунд добавляют по одной капле неорганического масла. Пробирки плотно закрывают и помещают в ячейки термоциклера (Рис. 20), закрывают крышку прибора и задают условия для проведения реакции (Табл. 15).

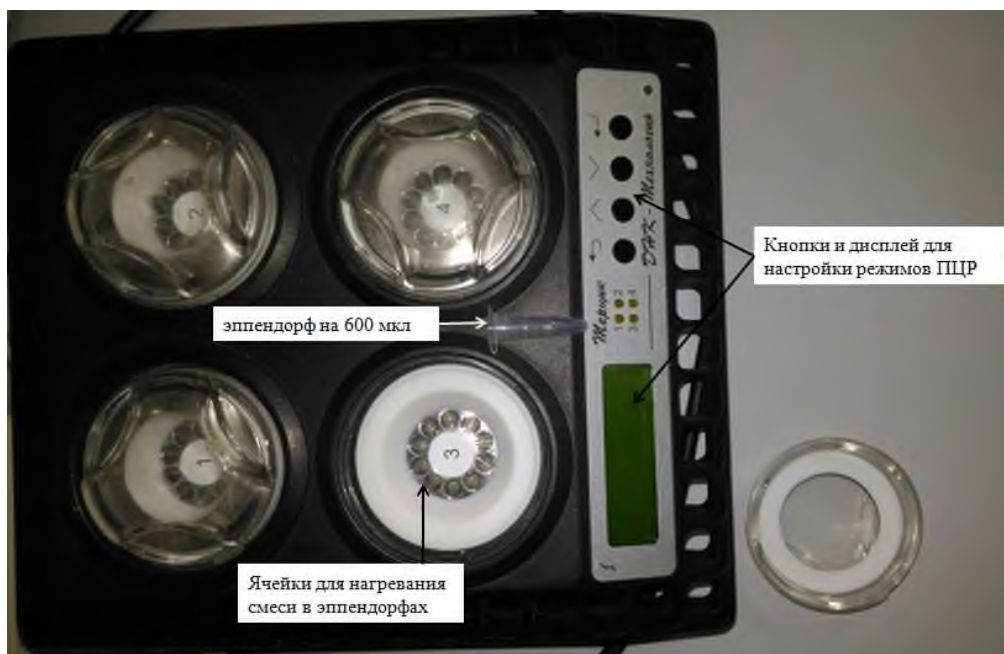


Рис. 20. Термоциклер для пробирок объемом 600 мкл.

Таблица 15

Параметры температурных циклов ПЦР (пример)

Стадия	Температура цикла	Длительность цикла	Количество циклов
«Горячий старт»	95°C	5 мин	1 цикл
I (Денатурация)	94°C	50 секунд	28 циклов
II (Отжиг праймера)	60°C	50 секунд	
III (Элонгация)	72°C	50 секунд	
«Достраивание»	72°C	7 мин	1 цикл
	4°C	Хранение	

При использовании стрипов или пробирок на 200 мкл с использованием современных ДНК-амплификаторов (Рис. 21), масло не используют, так как плотно закрывающиеся крышки пробирок и нагреваемая крышка прибора не позволяют воде испаряться при высокой температуре; при этом параметры температурных циклов пересматриваются (сокращается время цикла приблизительно на 20%).



Рис. 21. Современный ДНК-амплификатор.

ПЦР в реальном времени (Real-Time PCR)

Метод основан на одновременной амплификации и количественном определении специфической ДНК-последовательности.

Один из вариантов метода заключается в добавлении в смесь интеркалирующих красителей, при помощи которых затем определяют количество ДНК в смеси. Флюорофор приобретает способность к свечению только после того, как встраивается в ДНК-дуплекс. Чем больше синтезировано ПЦР-продукта, тем более интенсивна флюоресценция, благодаря чему можно определить количество продукта амплификации и исходную концентрацию ДНК. Метод отличается относительной простотой дизайна праймеров и дешевизной, но характеризуется низкой специфичностью.

Второй вариант метода (TaqMan) заключается в том, что флюорофор начинает светиться при вытеснении его полимеразой в процессе амплификации. Метод отличается высокой специфичностью и дает возможность проводить мультиплексный анализ до пяти целевых генов в одной пробирке. Для Real-Time PCR используются те же реагенты, что и для ПЦР, но дополнительно добавляется (Рис. 22) интеркалирующий краситель SYBR Green (I вариант) или флуоресцентно меченые ДНК-зонды (II вариант).

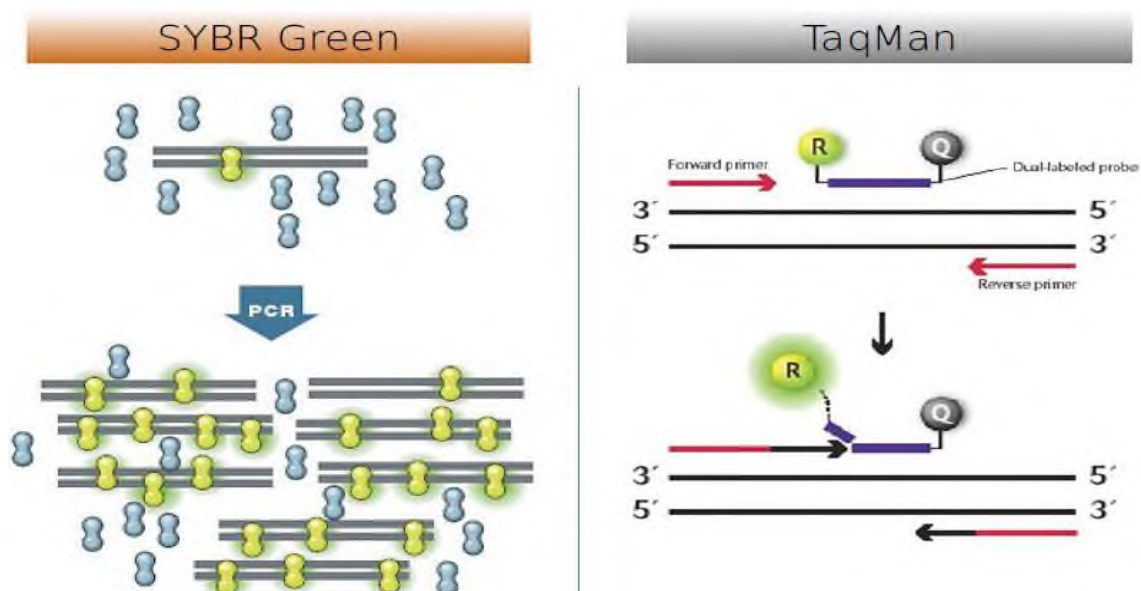


Рис. 22. ПЦР «в реальном времени», два варианта реакции. (<http://www3.biorad.com> и <http://www.genequantification.de/html>).

6.3. МЕТОД ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА

Метод электрофореза в полиакриламидном (ПААГ) и агарозном геле применяется для разделения фрагментов ДНК в зависимости от длины или особенностей конформационной структуры. Используется для визуализации продуктов реакции (ПЦР, ПДРФ) и выявления изменения нуклеотидной последовательности на основе разности электрофоретической подвижности молекул в геле.

Отрицательно заряженные фрагменты ДНК (анионы) движутся к положительно заряженному электроду (аноду). Чем меньше размер фрагмента, тем быстрее он движется (при окрашивании геля интеркалирующими красителями, например, бромистым этидием, полоса детектируется ближе к аноду). Скорость движения фрагмента ДНК зависит также от особенностей пространственной конфигурации молекулы.

Гель представляет собой трехмерную сетку, образованную длинными полимерными молекулами (Рис. 23).

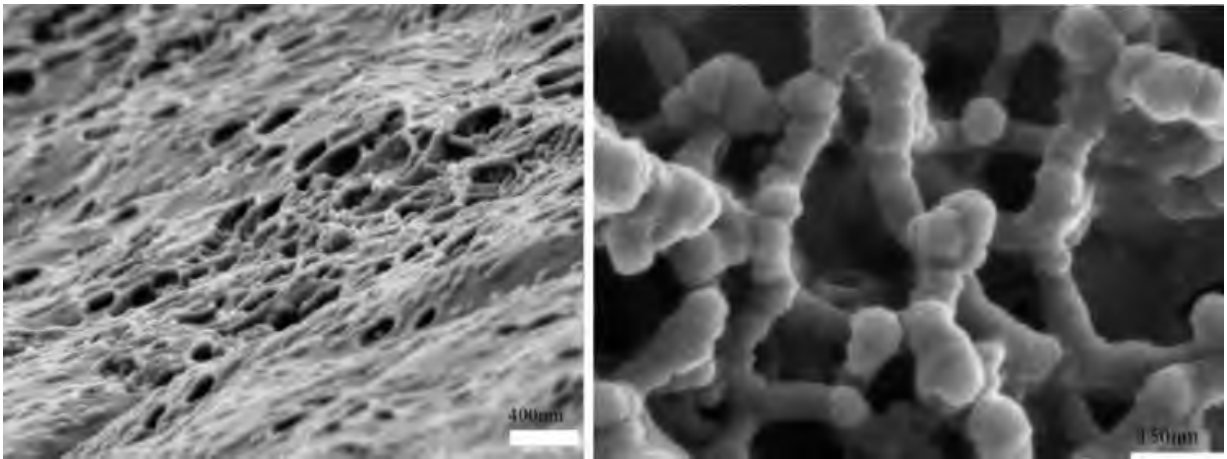


Рис. 23. Сканирующая электронная микроскопия 7,5% ПААГ на поверхности (слева) и изнутри (справа) (Поляничко, 2007).

ПААГ образуются при сополимеризации акриламида (АА) и N,N'-метиленабисакриламида. Реакция полимеризации происходит по свободно-радикальному механизму за счет объединения винильных групп и носит цепной характер. Полимеризация инициируется персульфатом аммония (ПСА): $\text{NH}_4\text{-SO}_4\text{-SO}_4\text{-NH}_4$. При растворении ПСА в воде образуются свободные радикалы $\text{NH}_4\text{-SO}_4^*$ (скорость их образования увеличивается при добавлении в раствор N,N,N,N-тетраметилэтилендиамина (ТЕМЕД)), которые взаимодействуют с мономерами акриламида, приводя к разрыву двойной связи и превращая их в свободные радикалы. Последние, в свою очередь взаимодействуют с неактивированными мономерами с образованием нового радикала, давая, таким образом, начало цепной реакции полимеризации. Цепная реакция идет до тех пор, пока не встретятся два радикала, которые после взаимодействия образуют обычную ковалентную связь. В растущую полимерную цепь встраиваются молекулы метиленабисакриламида, которые образуют между ними сшивку (Рис. 24).

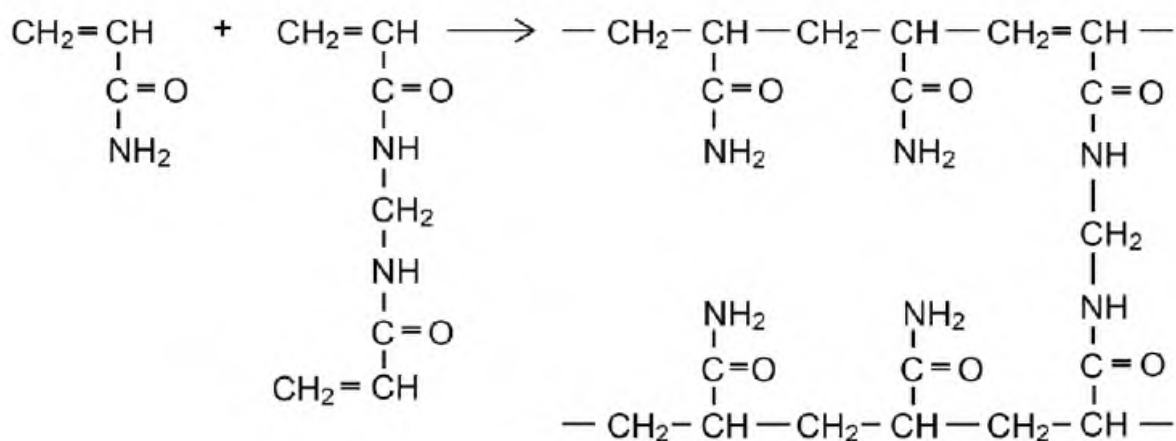
АКРИЛАМИД бис-АКРИЛАМИД**ПОЛИАКРИЛАМИД**

Рис. 24. Полимеризация акриламида с бис-акриламидом под действием иницирующего агента (Поляничко, 2007).

Для приготовления ПААГ предварительно готовится 30% раствор акриламида с метиленбисакриламидом в соотношении 29:1 (Табл. 16; 17), который затем можно хранить в холодильнике от +4 до +10⁰С.

Таблица 16

Приготовление 30% акриламида

Компоненты	На 100 мл	На 200 мл
Акриламид	29 г	58 г
Метиленбисакриламид	1 г	2 г

Количество реагентов при приготовлении ПААГ

Компоненты	На 15 мл	На 30 мл	На 40 мл	На 45 мл	На 50 мл
7% ПААГ					
30% акриламид	3,5 мл	7 мл	9,3 мл	10,5 мл	11,7 мл
10xTBE	1,5 мл	3 мл	4 мл	4,5 мл	5 мл
ТЕМЕД	15 мкл	30 мкл	40 мкл	45 мкл	50 мкл
10% ПСА	133 мкл	266 мкл	355 мкл	400 мкл	443 мкл
H ₂ O	до 15 мл	до 30 мл	до 40 мл	до 45 мл	до 50 мл
8% ПААГ					
30% акриламид	4 мл	8 мл	10,7 мл	12 мл	13,3 мл
10xTBE	1,5 мл	3 мл	4 мл	4,5 мл	5 мл
ТЕМЕД	15 мкл	30 мкл	40 мкл	45 мкл	50 мкл
10% ПСА	133 мкл	266 мкл	355 мкл	400 мкл	443 мкл
H ₂ O	до 15 мл	до 30 мл	до 40 мл	до 45 мл	до 50 мл
10% ПААГ					
30% акриламид	5 мл	10 мл	13,3 мл	15 мл	16,7 мл
10xTBE	1,5 мл	3 мл	4 мл	4,5 мл	5 мл
ТЕМЕД	15 мкл	30 мкл	40 мкл	45 мкл	50 мкл
10% ПСА	133 мкл	266 мкл	355 мкл	400 мкл	443 мкл
H ₂ O	до 15 мл	до 30 мл	до 40 мл	до 45 мл	до 50 мл

Гель заливают в форму, образованную двумя стеклами, расстояние между которыми задается пластиковыми прокладками («спейсерами») (Рис. 25). При заливке геля необходимо избегать образования пузырей воздуха между стеклами. Для формирования лунок между стеклами в верхней части вставляется гребенка. Время застывания геля — 15–30 минут. В дальнейшем гель вместе со стеклами помещают в специальную камеру для электрофореза, в которую заливают буфер 1xTBE. В ячейки, образованные на месте зубцов гребенки, наносят амплификат, полученный в результате проведения ПЦР.



Рис. 25. Приготовление ПААГ геля.

Для оценки скорости миграции образцов в геле перед нанесением пробы смешивают в соотношении 5:1 с краской, содержащей 0,25% бромфенолового синего, 0,25% ксиленцианола и 15% фикола. Бромфеноловый синий (Рис. 26) мигрирует в геле в том же направлении, что и пробы, обладает известной электрофоретической подвижностью и не взаимодействует с исследуемыми веществами.

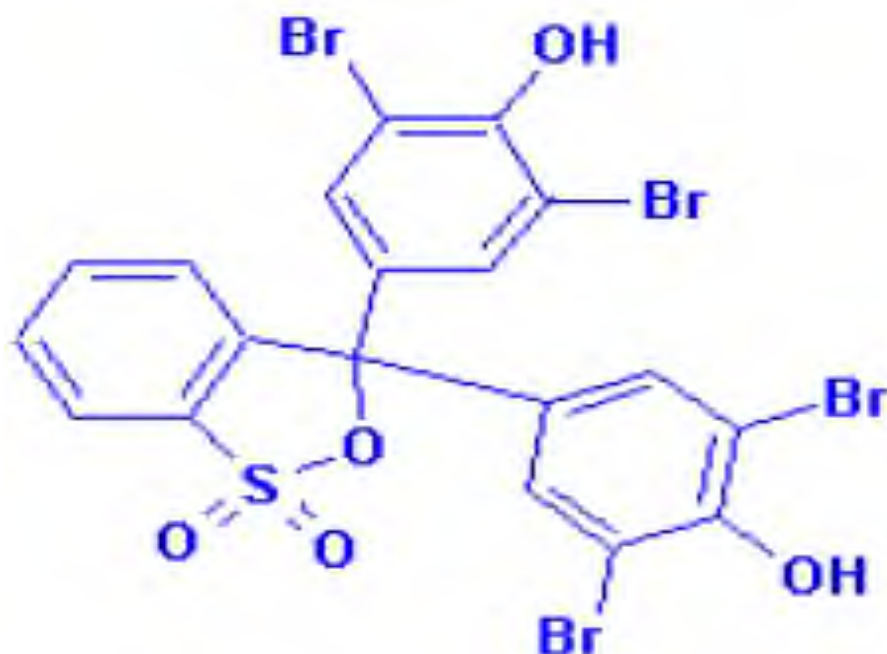


Рис. 26. Структурная формула бромфенолового синего (Поляничко, 2007).

Электрофорез проводят в 1 x TBE буфере (полученным путем разведения 10xTBE (Табл. 18) дистиллированной водой (100 мл 10xTBE + 900 мл H₂O)) при напряжении 300 В (Рис. 27).

Таблица 18

Приготовление буфера 10xTBE

Компоненты	На 1 л	На 0,5 л
Трис	108 г	54 г
Борная кислота	55 г	27,5 г
0,5 М ЭДТА pH=8 (или сухой)	40 мл (9,3 г)	20 мл (4,65 г)

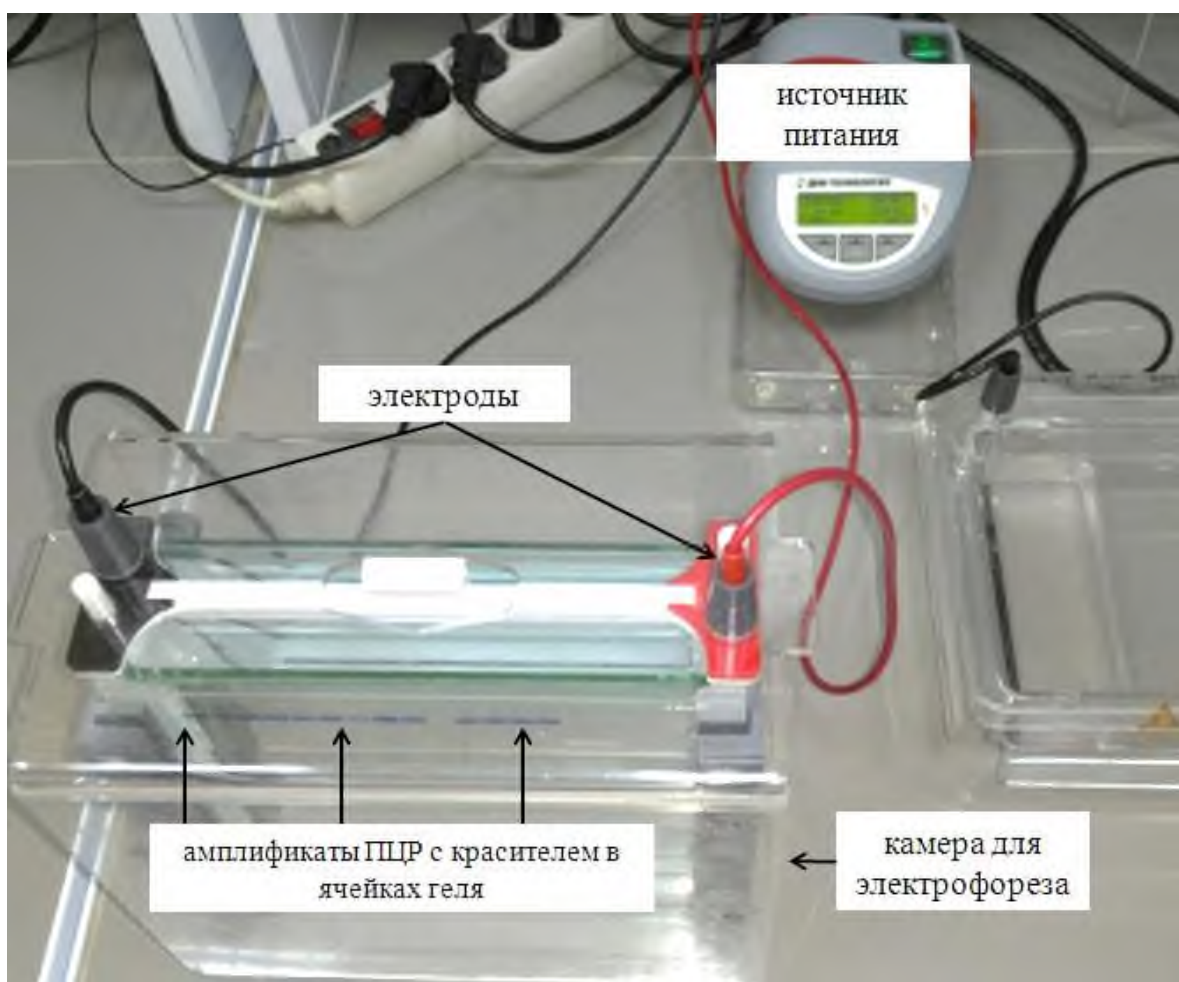


Рис. 27. Электрофорез продуктов ПЦР в ПААГ-геле.

Возможно использование TAE буфера (Табл. 19). Готовые растворы 10xTBE и 10xTAE хранятся при комнатной температуре в защищенном от света и влаги месте. Длительно хранить растворы нельзя, выпадает нерастворимый осадок.

Таблица 19

Приготовление буфера TAE_{x10}

Компоненты	На 1 л	На 0,5 л
Трис	48,4 г	24,2 г
Ледяная уксусная кислота	11,2 мл	5,6 г
0,5 М ЭДТА рН=8	20 мл	10 мл
рН доводим до 7,8 ледяной уксусной кислотой		

После окончания электрофореза гель окрашивают слабым раствором бромистого этидия в течение 10–15 минут и визуализируют в проходящем ультрафиолетовом свете с использованием видеогельдокументирующей системы. В одну из ячеек наносят маркер молекулярного веса (Рис. 28).

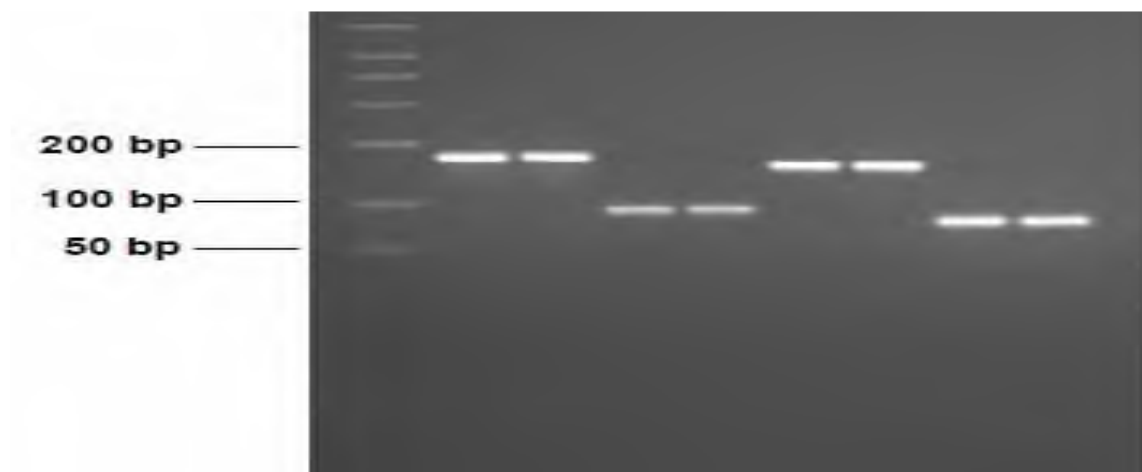


Рис. 28. Окраска ПААГ бромистым этидием.

В отдельных случаях проводят окрашивание раствором нитрата серебра. Гель помещают в раствор 0,09% AgNO_3 на 25 минут (Табл. 20). Готовый раствор AgNO_3 хранится в холодильнике при $+4$ – $+10^\circ\text{C}$. Возможно многократное использование раствора при условии тщательного промывания геля дистиллированной водой перед окрашиванием. При сильном потемнении раствора необходимо приготовить новый.

Таблица 20

Приготовление 0,09% раствора AgNO_3

Реагент	Количество
AgNO_3	1,8 г
H_2O	до 2000 мл

Далее гель двукратно промывают дистиллированной водой и помещают в раствор, содержащий 40%-ный формалин и NaOH (5M) (Табл. 21). После проявления гель промывают дистиллированной водой.

Формалин-щелочной раствор готовится непосредственно перед окрашиванием строго в маске и резиновых перчатках под вытяжкой.

Таблица 21

Приготовление формалин-щелочного раствора

Реагент	Количество
40% раствор формалина	15 мл
NaOH сухой	15 г
H ₂ O	до 500 мл

Недостатки метода: дороговизна и трудоемкость.

Преимущества метода: четкость полос ампликонов при низкой концентрации ПЦР-продукта, возможность идентификации образцов, значительно отличающихся по электрофоретической подвижности, за счет тонких полос (Рис. 29), для визуализации полос не требуется специальных приборов с источником ультрафиолетового излучения и видеогельдокументирующей системы



Рис. 29. Окраска ПААГ раствором нитрата серебра.

После окраски геля раствором нитрата серебра, его помещают в прозрачный файл и анализируют визуально. Учитывая недолговечность геля, помещаемого для остановки окраски в 40%-ный формалин и щелочь, рекомендуется отсканировать гель для дальнейшего хранения картинки в электронном виде.

Агарозные гели готовят с использованием очищенной фракции агара (агарозы), который получают из морских водорослей. Агароза состоит из чередующихся остатков 3-О-замещенной- β -D-галактопиранозы и 4-О-замещенной 3-б-ангидро- α -L-галактопиранозы.

Гелеобразование происходит вследствие связывания в пространственную сетку пучков нитей за счет формирования между ними водородных связей.

Для приготовления 0,8% геля 1,6 г порошка агарозы смешивают с 10 мл 10хТБЕ и доводят объем раствора до 200 мл, тщательно перемешивая. Полученную смесь нагревают в микроволновой печи в течение 2 минут до полного растворения агарозы. Перемешивают смесь и снова нагревают в микроволновой печи 1 минуту. Вынимают полученный раствор, добавляют в него 200 мкл раствора бромистого этидия, охлаждают полученный гель до 60°C и заливают в камеру.

С целью формирования лунок для нанесения на гель продуктов ПЦР используют гребенки, при этом между концом зубцов и стеклянной пластинкой должен оставаться зазор 0,3–0,5 см.

После полного затвердевания агарозы (20 минут) вынимают гребенку, помещают пластинку с гелем в электрофоретическую камеру. Заливают в камеру 1хТБЕ буфер, чтобы он полностью покрывал гель.

Результаты электрофореза визуализируют в проходящем ультрафиолетовом свете с использованием видеогельдокументирующей системы.

Бромистый этидий обладает высокой токсичностью, поэтому работать с ним необходимо в резиновых перчатках и маске и плотно закрывать все емкости для предотвращения испарения.

6.4. АНАЛИЗ ОДНОЦЕПОЧЕЧНОГО КОНФОРМАЦИОННОГО ПОЛИМОРФИЗМА

SSCP (single-strand conformation polymorphism), анализ **конформационного полиморфизма однонитевой ДНК** — это метод регистрации изменений электрофоретической подвижности однонитевых ДНК. Подвижность однонитевых ДНК может различаться вследствие мутаций, изменяющих пространственную организацию (конформацию) вторичных и третичных структур ДНК. Конформация небольших однонитевых ДНК зависит от нуклеотидной последовательности, поэтому замена даже одного нуклеотида приводит к изменению пространственной структуры молекулы ДНК (Рис. 30).



Рис. 30. SSCP-анализ, обнаружение гетерозиготной мутации.

Этапы SSCP-анализа:

- 1) выделение ДНК;
- 2) ПЦР необходимого фрагмента ДНК;
- 3) проверочный гель-электрофорез в 7% ПААГ;
- 4) денатурация продуктов ПЦР;
- 5) электрофорез в 8 (10)% ПААГ с глицерином.

Для проверки амплификации в лунки наносят 4–5 мкл ПЦР-продукта, смешанного с 2 мкл краски. Электрофорез проводят в течение 30 минут при напряжении 300 В. Гель окрашивают бромистым этидием. Если в ультрафиолетовом свете визуализируются яркие и толстые полосы (высокая концентрация), то для SSCP используют 4 мкл амплификата; при средней концентрации для SSCP используют 7 мкл амплификата.

Для денатурации продукт ПЦР смешивают с щелочной денатурирующей смесью (5М NaOH и 0,5М ЭДТА) в соотношении 7 мкл амплификата : 3 мкл смеси (Табл. 22). Полученную смесь нагревают в течение 15 минут при 42°C на амплификаторе (Табл. 23).

Таблица 22

Приготовление денатурирующей смеси для SSCP-анализа

Компонент	Количество
NaOH 5М	10 мкл
ЭДТА 0,5М	10 мкл
H ₂ O	90 мкл

Таблица 23

Программа для щелочной денатурации ДНК на термоциклере

Температура °С	Продолжительность	Количество циклов
42	15 минут	1
4	Хранение	

Денатурирующую смесь готовят непосредственно перед внесением в пробирки для смешивания с ПЦР-продуктом. Необходимо как можно быстрее использовать смесь, так как через 30 минут после приготовления ее активность резко снижается. Как только произошло охлаждение смеси до 4°C, пробирки вынимают из амплификатора, к пробам добавляют 3 мкл формамидной краски без ЭДТА (смешанной с 0,5% бромфеноловым синим и 0,5% ксиленцианолом) и наносят на 8(10)% ПААГ с 50%-ным глицерином (Табл. 24). Пробирки помещают в термоциклер сразу после добавле-

ния денатурирующей смеси. Непосредственно после того, как пробирки с пробами извлекают из термоциклера, к смеси добавляется краска, и полученные смеси без промедления наносят в ячейки геля для SSCP, иначе происходит ренатурация двойной цепочки ДНК и определить конформационный полиморфизм будет невозможно.

Таблица 24

Приготовление ПААГ для SSCP (на 50 мл)

10% гель		8% гель	
Компонент	Объем	Компонент	Объем
30% акриламид 29:1	16,7 мл	30% акриламид 29:1,3	13,3 мл
10xTBE	2,5 мл	10xTBE	2,5 мл
50% глицерин	5 мл	50% глицерин	5 мл
ТЕМЕД	50 мкл	ТЕМЕД	50 мкл
10% ПСА	443 мкл	10% ПСА	443 мкл
H ₂ O	до 50 мл	H ₂ O	до 50 мл

Для проведения электрофореза SSCP используют 0,5xTBE буфер (50 мл TBEx10 + 950 мл H₂O). Электрофорез геля длиной 20 см и толщиной 1 мм проводят при температуре 4–20°C, при напряжении 100 В, в течение 24–48 часов. Окрашивание геля проводят в течение 25 минут 0,09% раствором азотнокислого серебра (AgNO₃). Образцы ДНК с обнаруженным изменением подвижности в дальнейшем секвенируют для идентификации мутации.

Ограничением метода является размер исследуемого фрагмента ДНК. Высокая эффективность детекции мутаций (до 90%) наблюдается при длине фрагментов менее 200 п.н. Для фрагментов более 400 п.н. вероятность обнаружения мутаций уменьшается до 50%.

Денатурирующий градиентный гель-электрофорез

DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) — метод обнаружения мутаций, основанный на изменении электрофоретической подвижности ДНК-дуплексов. Последовательность нуклеотидов в двухцепочечных

фрагментах ДНК определяет особенности плавления этих фрагментов в денатурирующих условиях. Мутации изменяют температуру плавления доменов ДНК, содержащих эти мутации. Совокупность доменов плавления определенного участка ДНК образует профиль плавления.

ДНК-дуплексы подвергают миграции в геле с градиентом денатурирующих условий (химический или температурный градиент). Миграция продолжается до достижения ДНК-дуплексами в геле точки плавления и их разделения.

После расхождения цепей фрагмент одноцепочечной ДНК существенно замедляет движение в геле. Фрагменты двухцепочечной ДНК с более высокой температурой плавления продолжают движение в геле (Рис. 31).

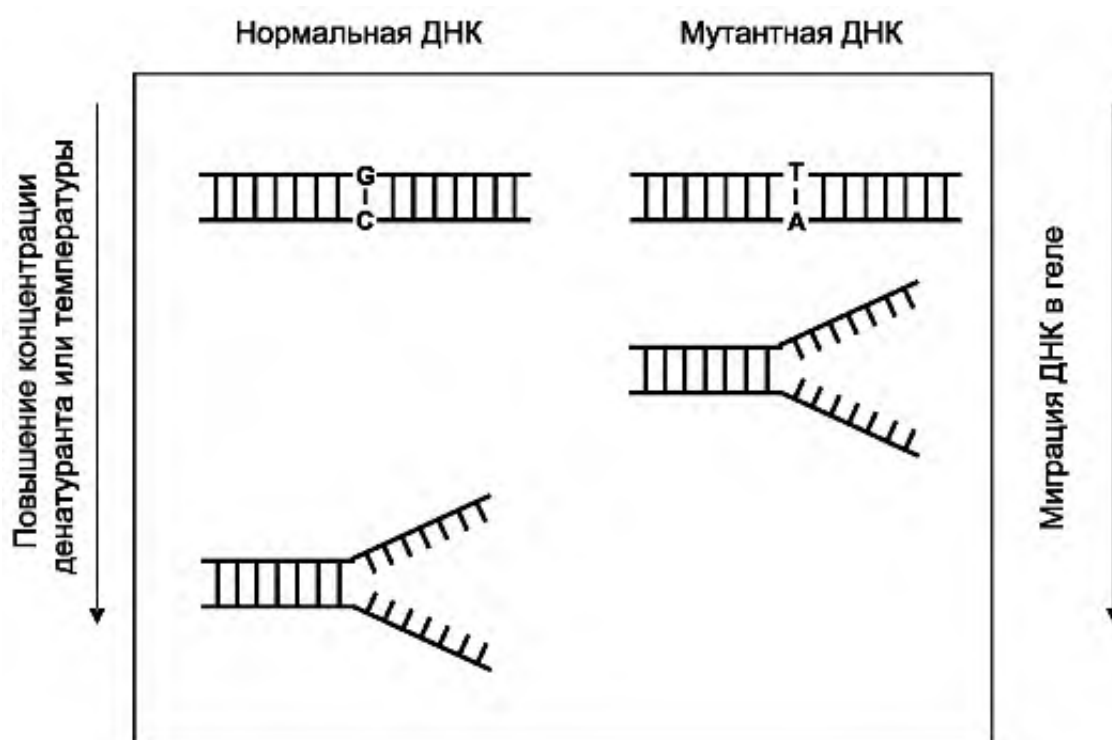


Рис. 31. Схема образования ДНК-дуплексов (Бочков, 2011).

Однонуклеотидные различия в нормальной и тестируемой ДНК выявляются по различной электрофоретической подвижности в геле. Чем раньше цепи ДНК разойдутся, тем раньше фрагмент остановится в геле (Рис. 32). Таким способом удастся идентифицировать лишь около 50% од-

нонуклеотидных замен в фрагментах ДНК длиной от 50 до нескольких сотен нуклеотидов. Связано это с тем, что при прохождении ДНК через гель может начаться частичная денатурация концов молекул еще до достижения оптимальной области плавления, поэтому мутации, локализованные вблизи концов амплифицированных участков ДНК, оказывают меньшее влияние на процесс плавления и могут не выявляться.

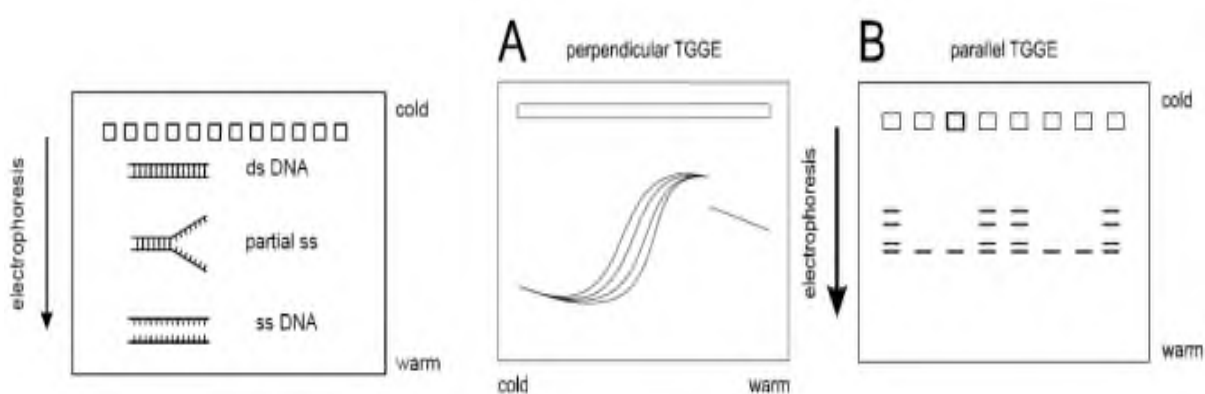


Рис. 32. Схема денатурирующего градиентного гель-электрофореза.

Чувствительность метода повышается до 95% за счет применения праймеров с GC-зажимом, представленным чередованием гуанина и цитозина в пределах до 20 п.н. Это предотвращает преждевременную полную денатурацию и расхождение цепей продуктов ПЦР во время электрофореза, так как противоположные цепи денатурирующих фрагментов. ДНК будут более продолжительное время связаны друг с другом GC-богатыми последовательностями праймеров. В результате температура плавления продукта амплификации значительно увеличивается, что повышает эффективность обнаружения мутации.

6.5. АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА

ДЛИН РЕСТРИКЦИОННЫХ ФРАГМЕНТОВ

Анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов — метод обнаружения мутаций, основанный на сопоставлении профилей полос после разрезания геномной ДНК рестриктазами.

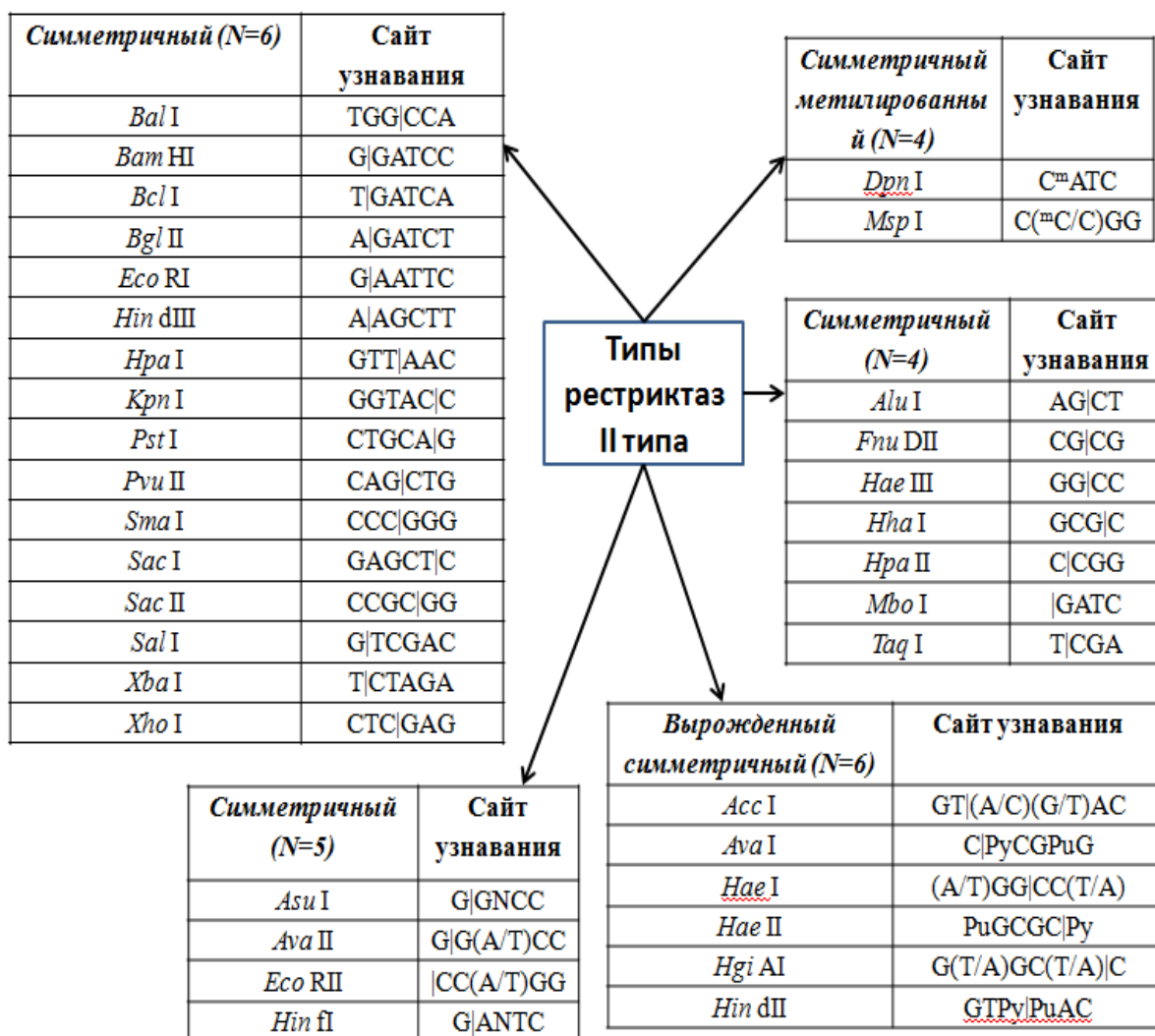
Рестриктазы — это ферменты бактерий, способные распознавать и разрезать определенные участки (сайты рестрикции) ДНК бактериофагов. У самих бактерий ДНК в сайтах рестрикции защищена метилированием. Для обозначения рестриктаз используют первую букву из названия рода бактерии, из которого выделена рестриктаза, две буквы названия вида, буквенный символ, обозначающий штамм, и римская цифра (например, **AluBI** — из *Arthrobacter luteus*, **EcoRI** — из *Escherichia coli*).

Известно три основных типа рестриктаз: I тип — распознают нуклеотидную последовательность и разрезают ДНК неподалеку от нее, но само место разреза не строго специфично; II тип — распознают нуклеотидную последовательность и разрезают ДНК в определенной фиксированной точке внутри этой последовательности; III тип — распознают нуклеотидную последовательность и разрезают ДНК на определенном расстоянии от её конца.

Для научных исследований используют рестриктазы II типа, которые узнают палиндромные последовательности (нуклеотидные последовательности, обладающие центральной симметрией и считывающиеся одинаково в обе стороны от оси симметрии).

Рестриктазы расщепляют ДНК в определенных сайтах рестрикции (Схема 1). Полученные таким образом фрагменты ДНК разделяются при помощи электрофореза в агарозном геле. Так как фрагменты определяются на геле в виде непрерывных полос при окрашивании бромистым этидием, полиморфизм невозможно обнаружить только окрашиванием. Поэтому для детекции определенной последовательности ДНК необходимо использовать гибридизацию. Для каждой рестриктазы существуют оптимальные условия реакции (температура, состав буфера), которые приводятся в описании, прилагаемой фирмой-изготовителем. Для подбора условий гидролиза ДНК рестриктазами можно воспользоваться программой DoubleDigest™.

Классификация рестриктаз



Этапы ПДРФ-анализа:

- 1) выделение ДНК.
- 2) рестрикция.
- 3) гель-электрофорез.
- 4) блот-гибридизация по Саузерну.

Рестриктазы хранятся при -20⁰С в буфере с 50% глицерина. Ферменты, вынутые из морозильной камеры, следует держать только во льду и не дольше, чем это необходимо. Объем добавляемых рестриктаз не должен превышать 1/10 от объема реакционной смеси, иначе избыток глицерина ингибирует реакцию.

Единица активности рестриктазы — это количество фермента, необходимое для гидролиза 1 мкг ДНК в реакционной смеси 50 мкл при оптимальных условиях (обычно при 37°C) за 1 час.

Через 1 час после обработки геномной ДНК рестриктазами проводится аналитический электрофорез, для чего в пробирках смешивают 3 мкл реакционной смеси с 6 мкл воды и с 3 мкл 4-кратного раствора, содержащего бромфеноловый синий и 40% глицерина.

Электрофорез в агарозном геле проводится при напряжении электрического тока 120 В, силе тока 40 мА в течение 30 минут. Аналитический гель просматривают в ультрафиолетовом спектре. Убедившись, что за 1 час гидролиз прошел достаточно хорошо, проводят электрофорез на препаративном геле. После 2 часов инкубации добавляют в каждую рестрикционную смесь 4 мкл раствора красителя и наносят на препаративный гель. Электрофорез проводят при напряжении 60–120 В и силе тока 30–40 мА в течении 40–60 минут.

Этапы блот-гибридизация по Саузерну.

1. Агарозный гель помещают в раствор NaOH, где ДНК денатурирует.
2. Перенос ДНК с геля на нитроцеллюлозный или нейлоновый фильтр в буферном растворе. На поверхность геля кладут фильтр и стопку фильтровальной бумаги. В результате капиллярного эффекта создается ток буфера, перпендикулярный плоскости геля. ДНК задерживается фильтром и оказывается на его поверхности.

3. Фиксация одноцепочечных нитей ДНК на фильтре. Расположение фрагментов на фильтре точно соответствует их расположению в геле.

4. Гибридизация ДНК с меченым радионуклидом (флюорохромом) синтетическим *зондом* из 16–30 п.н. или клонированным фрагментом ДНК, комплементарным изучаемому участку ДНК.

5. Происходит отмывание еспецифически связанных молекул зонда.

6. Визуализация меченных зондом участков на рентгеновской пленке (радиоактивно меченные) или с помощью флюоресценции (Рис. 33).



Рис. 33. Техника ПДРФ-анализа (IPGRI и Корнельский Университет, 2003 г).

Интерпретация полос ПДРФ.

А. Мутация образует новый сайт рестрикции в целевой области. На пленке две полосы меньшего размера (Рис. 34).

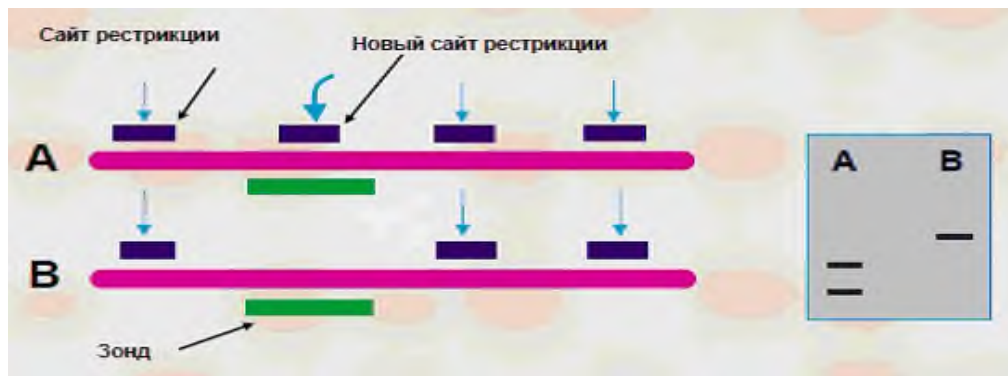


Рис. 34. ПДРФ-анализ — образование нового сайта рестрикции.

Б. Мутация образует новый сайт рестрикции между фланкирующими сайтами рестрикции, образуя рестрикт меньшего размера (Рис. 35).

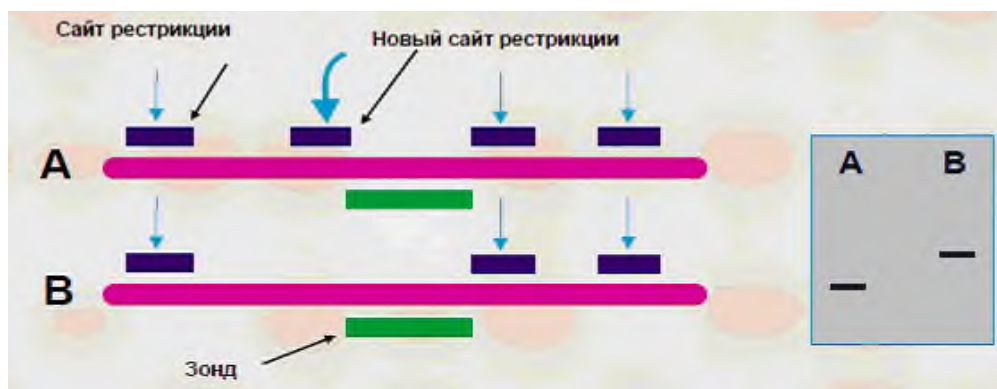


Рис. 35. ПДРФ-анализ — образования нового сайта рестрикции.

В. Инсерция между фланкирующими сайтами рестрикции создает более крупный рестрикт (Рис. 36).

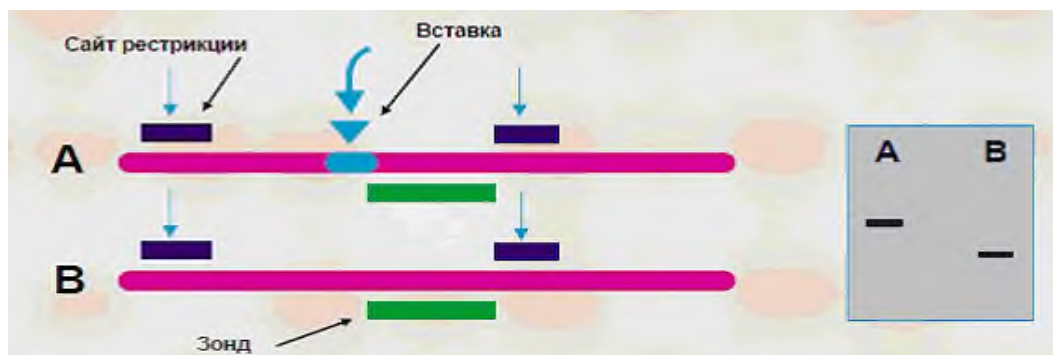


Рис. 36. ПДРФ-анализ — инсерция между сайтами рестрикции.

Г. Делеция последовательности ДНК между сайтами рестрикции создает рестриктонный фрагмент меньшего размера (Рис. 37).

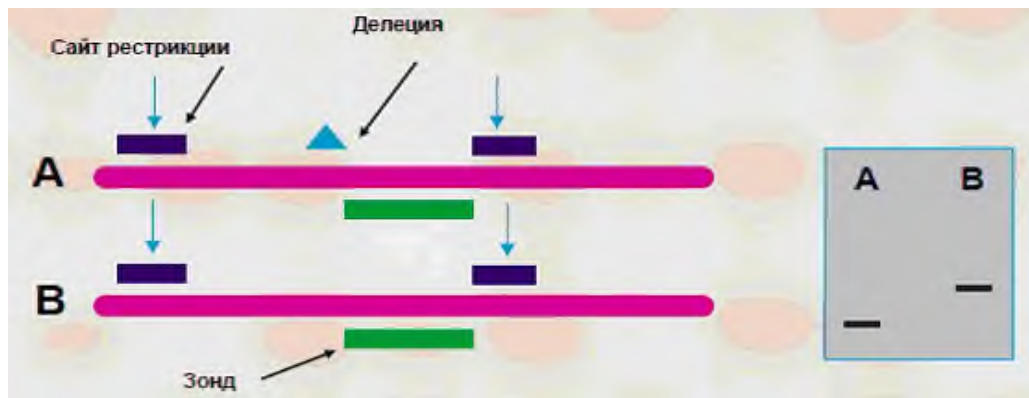


Рис. 37. ПДРФ-анализ — делеция между сайтами рестрикции.

Д. Один из фланкирующих зонд сайтов рестрикции изменяется или теряется вследствие мутации. Рестрикт меняется (Рис. 38).

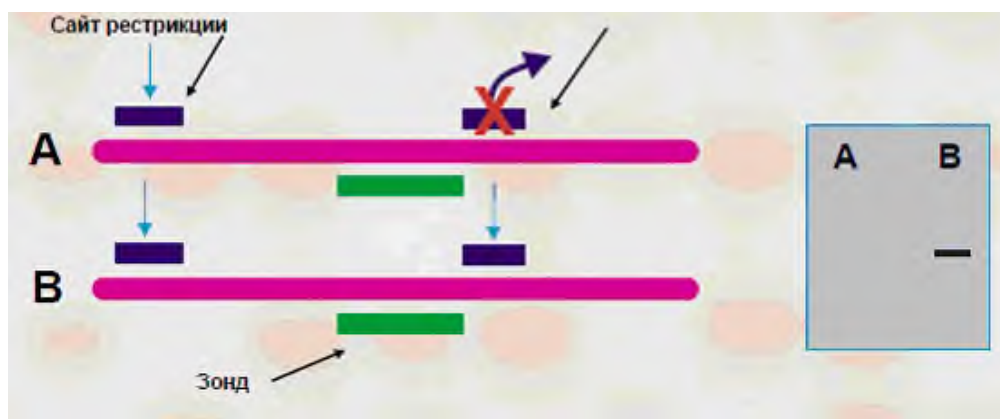


Рис. 38. ПДРФ-анализ — мутация сайта рестрикции.

Для выделения фрагментов ДНК из геля используются специальные наборы (например, компании Хеликон). Метод основан на способности ДНК взаимодействовать с боросиликатной мембраной в присутствии хаотропных солей (соединений, нарушающих нековалентные взаимодействия, к которым относятся водородные связи, и, соответственно, изменяющих третичную структуру клеточных макромолекул). Вначале кусочек агарозного геля, содержащий фрагмент ДНК, растворяют в растворе, содержащем хаотропную соль. Далее полученный раствор ДНК наносится на мембрану, что позволяет отделить фрагмент ДНК от примеси агарозы. Затем, после промывок, фрагмент ДНК элюируется с мембраны буфером с низкой ионной силой.

Разновидностью ПДРФ-анализа является **ПЦР-ПДРФ** — ферментативный метод анализа однонуклеотидных полиморфизмов, в основе которого лежит использование ПЦР. Однонуклеотидные полиморфизмы (SNP — single nucleotide polymorphism) — это вариации последовательности ДНК у разных людей размером в один нуклеотид, которые распространены в общей популяции с частотой не менее 1%. Данные вариации встречаются на протяжении всей ДНК, как в экзонах и интронах, так и в межгенных промежутках. SNP в геноме человека встречаются с частотой в среднем 1 замена на 600–1200 п.н., являясь важным источником различий между людьми. Метод анализа известных SNP используется для изучения многих многофакторных заболеваний.

Рестрикции в реакции ПЦР-ПДРФ подвергаются продукты амплификации, а не геномная ДНК.

Благодаря простоте и надежности метод получил широкое распространение и до сих пор используется для анализа аллельного полиморфизма генов у самых разных объектов.

Ограничением метода является то, что с его помощью можно тестировать только известные мутации, затрагивающие сайты рестрикции. В зарубежной литературе используется термин CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) — рестрикционный полиморфизм амплифицированных последовательностей. CAPS-маркеры считаются вторичными маркерами, так как праймеры для них создаются после выявления SNP на основе анализа нуклеотидной последовательности.

Молекулярно-генетическое картирование

Сайты рестрикции могут быть использованы в качестве генетических маркеров ДНК. Образующиеся в результате рестрикции фрагменты ДНК могут быть упорядочены по длине путем электрофореза в ПААГ и агарозном геле, и тем самым может быть определена их молекулярная масса и физическое расстояние между сайтами. При использовании для рестрикции нескольких эндонуклеаз можно добиться полного упорядочива-

ния сайтов узнавания для каждого из ферментов относительно друг друга. Этот процесс называется физическим картированием (Рис. 39).

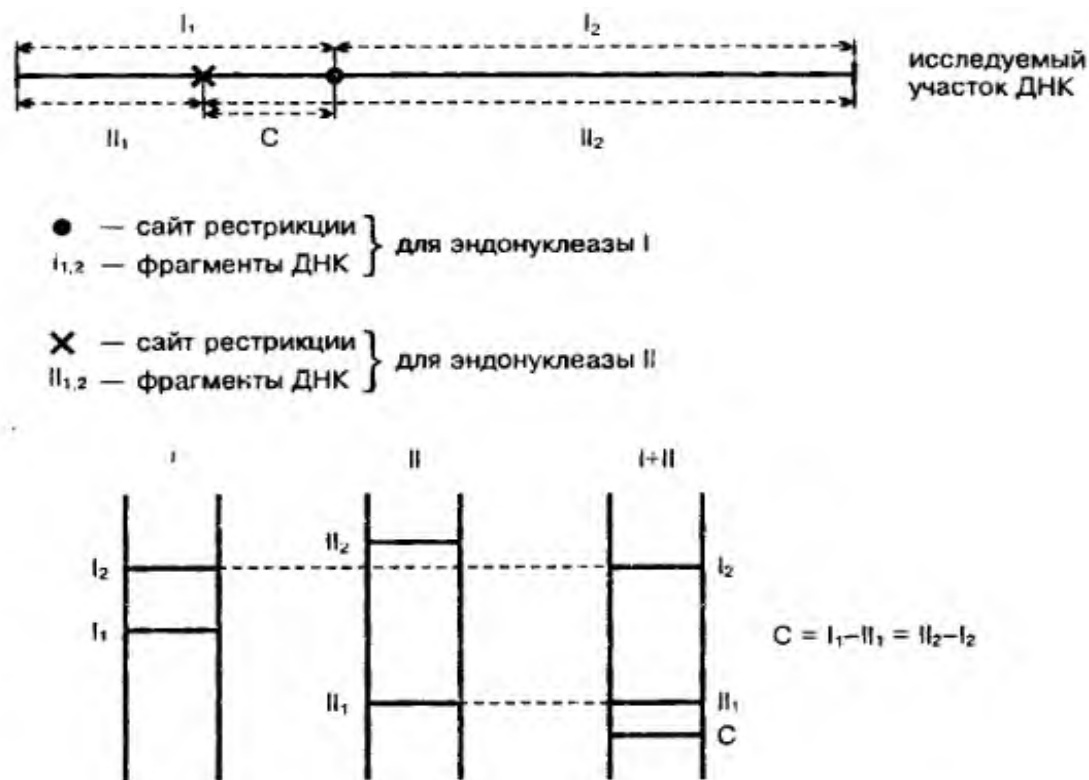


Рис. 39. Схема физического картирования (Горбунова и др., 1997).

Физическое картирование используют для исследования небольших фрагментов ДНК человека. Достаточно знать расположение хотя бы одного маркера для того, чтобы произвести точное физическое картирование исходной молекулы ДНК независимо от количества локализованных в ней сайтов рестрикции.

При обработке тотальной геномной ДНК человека часто- или среднещепящими эндонуклеазами образуется так много фрагментов различной длины, что на электрофореграмме образуется равномерное окрашивание по всей длине геля — так называемый шмер. Идентификация нужных фрагментов ДНК в таком геле возможна путем гибридизации с мечеными ДНК-зондами. Это достигается при помощи метода блот-гибридизации по Саузерну.

6.6. СЕКВЕНИРОВАНИЕ

Секвенирование (англ. *sequence* — последовательность) — метод определения последовательности нуклеотидов исследуемой ДНК.

К первому поколению методов секвенирования относятся:

1) химическое расщепление ДНК по одному основанию Максама-Гильберта (открыт в 1977 году). В связи со сложностью и дороговизной химический метод Максама-Гильберта в настоящее время практически не используется;

2) дидезоксисеквенирование по Сэнгеру (открыт в 1975 году). Данный метод определения последовательностей нуклеотидов ДНК путем получения комплементарных молекул ДНК, различающихся по длине на одно основание с использованием дидезоксинуклеотидов и радиоизотопов или флюорохромных красителей.

Исторически Сэнгер проводил секвенирование с использованием радиоизотопов. Суть метода заключалась в следующем: вначале ДНК денатурировали. Затем добавляли секвенирующий праймер, проводили отжиг праймера и инициирование синтеза ДНК, добавляя в реакционную смесь ДНК-полимеразу и дезоксинуклеотидтрифосфаты — dATP, dCTP, dGTP, dTTP, один из которых радиоактивен. Синтез вели в четырех параллельных пробирках, в каждую из которых добавляли один из специфических дидезоксинуклеотидтрифосфатов, или терминаторов — ddNTP. При встраивании ddNTP на место соответствующего нуклеотида синтез ДНК прекращался.

Таким образом, в каждой из пробирок получали набор различающихся по длине радиоактивно меченых фрагментов ДНК с одним и тем же специфическим для данной пробирки дидезокситерминатором на конце молекулы.

После одновременного электрофоретического разделения этих фрагментов на четырех соседних дорожках и радиоавтографии размер синтезированных фрагментов может быть определен, а значит, определена и лока-

лизация ddNTP, и порядок соответствующих им нуклеотидов в исходной молекуле ДНК (Рис. 40).

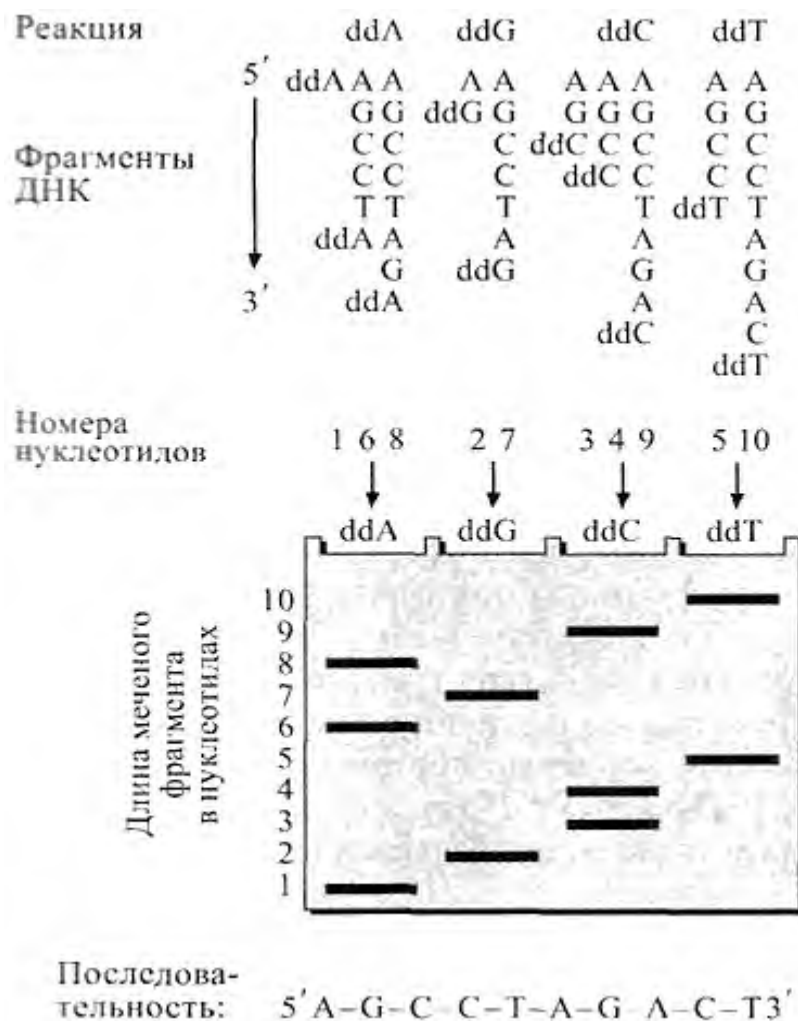


Рис. 40. Схема секвенирования по Сэнгеру (Жимулев, 2003).

В настоящее время метод секвенирования с использованием радионуклидов не применяется. Используется метод автоматического секвенирования при помощи присоединенных к каждому из ddNTP четырех разных флуоресцентных маркеров (Рис. 41). Синтез ДНК проводят в одном сосуде, после чего продукты флуоресцентной реакции подвергают электрофорезу в тонком стеклянном капилляре (капиллярный электрофорез). Проходя через отверстие в капилляре, флуоресцентные метки возбуждаются лазерным лучом и начинают испускать свечение, которое регистрируется цифровой камерой, превращается в электрический сигнал и выводится в виде графика.

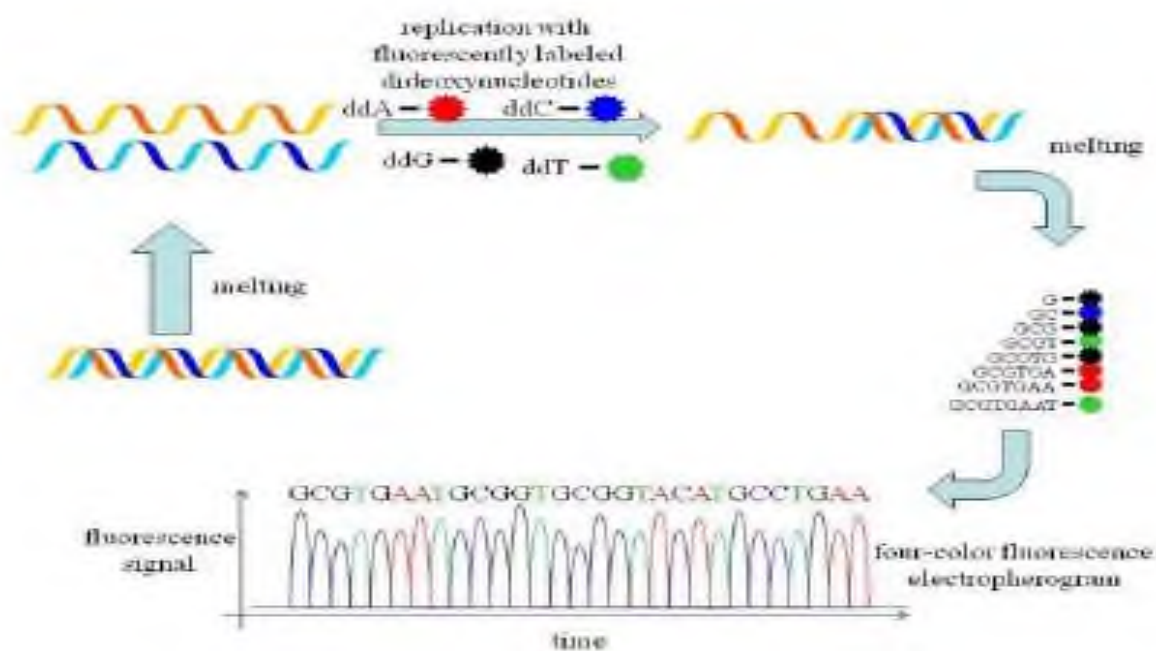


Рис. 41. Схема автоматического секвенирования (Мухачева, 2012).

Для считывания последовательности нуклеотидов по результатам автоматического секвенирования используют программу Chromas.

На рисунке 42 представлена идентификация нонсенс-мутации при помощи секвенирования (исследование гена *NF1*) — в области замены нуклеотида определяется дополнительный пик иного цвета, характерного для нуклеотида, на который происходит замена.

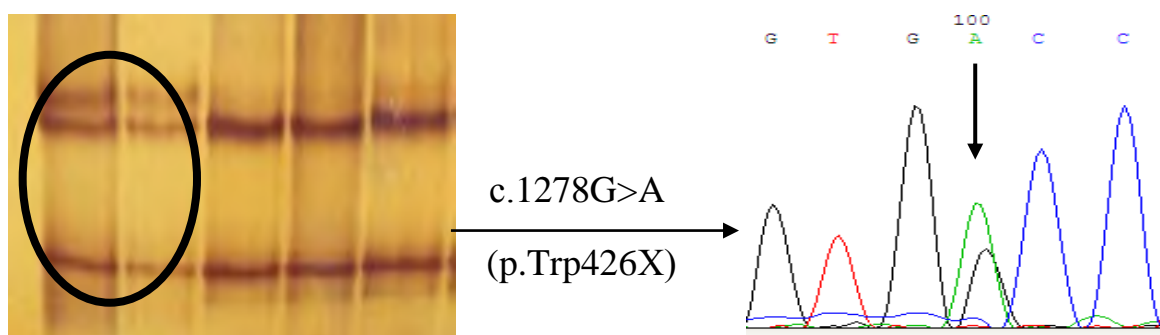


Рис. 42. Выявление мутации методами SSCP и секвенирования.

При обнаружении делеции происходит резкое изменение графика считывания нуклеотидных последовательностей с того нуклеотида, где начинается данная мутация. Анализ наслаивающихся друг на друга графиков позволяет определить сколько и какие нуклеотиды делетированы (Рис. 43).

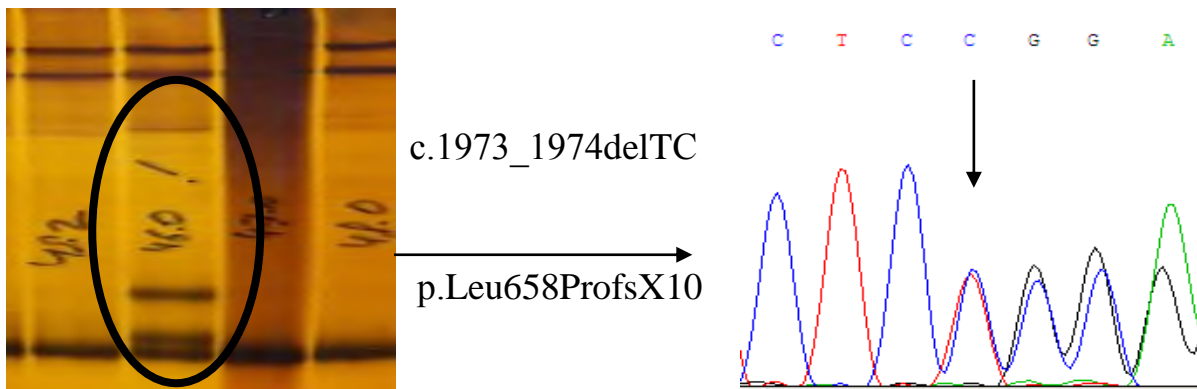


Рис. 43. Выявление frame shift мутации.

В процессе секвенирования матричная ДНК должна все время оставаться строго однонитевой, без возможных «шпилек». При комплементарном синтезе по методу Сэнгера (он повторяется многократно — в несколько циклов) такая опасность не возникает, так как в каждом цикле имеется стадия предварительной полной денатурации при температуре 96°C , а само копирование осуществляется при температуре 60°C . Но электрофорез приходится проводить в сильно денатурирующей среде: 80% растворе формамида, содержащим 5 М раствор ЭДТА.

Реакцию ограниченного матричного синтеза повторяют многократно. Это делается точно так же, как в ПЦР. Но с тем отличием, что используется только один праймер («асимметричная ПЦР»). Этап элонгации заканчивается по достижении конца матрицы.

Готовят 20 мкл инкубационной смеси:

- 1) ДНК секвенируемого фрагмента;
- 2) избыточное количество 4 нормальных dNTP;
- 3) ограниченное количество 4 флюоресцентных ddNTP;
- 4) Taq-pol.;
- 5) буфер с MgCl_2 ;
- 6) праймер;
- 7) H_2O .

Инкубационная смесь прогревается предварительно в пробирке емкостью 200 мкл при 96°C для полной денатурации ДНК. Затем ее помеща-

ют во встроенный в прибор термоблок, где автоматически осуществляется 25 последовательных циклов, каждый из которых состоит из:

- 10 секунд при 96⁰С;
- 5 секунд при 50⁰С;
- 4 минуты при 60⁰С.

Во избежание флюоресцентного фона смесь очищают от неиспользованных меченых ddNTP. С этой целью вновь синтезированные отрезки ДНК осаждают добавлением 1 мл 70% этанола и центрифугированием в эппендорфах на 1,5 мл. Осадок растворяют в 4 мкл 80% формамида с ЭДТА, прогревают при 96⁰С 2 минуты и 2 мкл вносят на старт трека ПААГ.

Порядок подготовки образцов ДНК к секвенированию.

1. Праймер разбавить водой в соотношении 1:10 мкл.
2. Готовят реакционную смесь (на 1 образец: 0,65мкл H₂O, 0,2 мкл*10-кратного буфера для эндонуклеазы рестрикции, 1мкл Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP), 0,25мкл эндонуклеазы).
3. ПЦР-продукт переносят в чистые пробирки по 5мкл.
4. Добавляют смесь по 2 мкл в каждый образец.
5. Перемешивают и осаждают на микроцентрифуге.
6. Инкубируют 30минут при 37⁰С, затем 10минут при 80⁰С.
7. Переносят по 2 мкл в новые пробирки.
8. Добавить по 2 мкл воды в каждый образец.
9. Перемешивают и осаждают на микроцентрифуге.
10. Измеряют концентрацию на спектрофотометре (аппарат для определения концентрации ДНК) — концентрация должна быть примерно 50.
11. Готовят смесь для амплификации:
 - на 1 образец по 6,5 мкл: 4,5мкл H₂O; 1мкл буфер BigDye; 1мкл BigDye;
 - добавляют в каждую соответствующий праймер по 1 мкл;
 - в каждую пробирку с амплификатом вносят по 1,5мкл.

Температурный режим реакции для образца объемом 10 мкл:

1. 96.0-1мин - 1цикл.

↓

2. 96.0-10сек - 25циклов

↓

52.0-10сек - 25цикл

↓

60.0-4мин - 25цикл

↓

3. 60.0-1мин - 1цикл

↓

4. 4.0 - хранение

12. После амплификации переносят весь объем в пробирки на 1,5 мкл (по 9 мкл).

13. Добавляют по 2 мкл декстрана и 30 мкл 96% спирта.

14. Помещают в морозильник при температуре -20⁰С на 15 минут.

15. Центрифугируют при 13000 об/сек в течение 15 минут.

16. При помощи пипетки удаляют из пробирки спирт.

17. Добавляют 200 мкл 70% спирта.

18. Центрифугировать 5 минут при 13000 об/сек.

19. Удаляют супернатант.

20. Сушат на термостате при 37⁰С 5 минут.

21. Добавляют 10мкл формамида (растворение происходит в течение 5–15 минут).

22. Образцы готовы для секвенирования.

При выявлении мутаций при помощи секвенирования, необходимо их обозначить согласно следующим правилам:

1. Если мутация произошла на уровне кодирующей последовательности ДНК, вначале ставится буква «с» (сDNA — кДНК). Пример: с.546А>Т. Если приводится номер нуклеотида на геномном уровне, то ставится буква «g.». Пример: g.54786А>G.

Затем идет цифровое обозначение местоположения нуклеотида, в котором произошла мутация, в последовательности кДНК.

После этого в случае миссенс-мутации вначале указывается нуклеотид нормальной последовательности заглавной буквой латинского алфавита, далее знак «>», обозначающий замену, и нуклеотид мутантного аллеля. Пример: с.123А>G.

Делеции обозначаются сокращением «del», после которого указывается deletированный нуклеотид. Пример: с.123delА.

В случае делеции нескольких нуклеотидов варианты обозначения возможны следующие: с.586_591del или с.586_591delTGGTCA или с.586_591del6.

Обозначение дупликации сходно с таковым делеций: с.546dupТ или с.546dup; с.586_591dup или с.586_591dupTGGTCA или с.586_591dup6.

Инсерции обозначаются аббревиатурой «ins», после чего, в зависимости от размеров инсерции, указывается либо буквенное обозначение нуклеотида (при однонуклеотидной инсерции, пример: с.546_547insТ), либо нуклеотидная последовательность (например, с.1086_1087insGCGTGA), либо, в случае крупных инсерций, указывается код инсерции в базе данных (например, с.1086_1087insAB567429.:g.34_12,567).

2. Мутации на белковом уровне обозначаются вначале буквой «р.» (protein), далее указывается заменяемая аминокислота (трёх- или однобуквенное обозначение, см. табл. 25), далее номер аминокислоты в белковой последовательности и затем аминокислота мутантного белка либо X (стоп-кодон). Пример миссенс-мутации: р.Glu78Gln. Пример нонсенс-мутации: р.Glu78X. В случае, когда изменение нуклеотидной последовательности приводит к сдвигу рамки считывания кода и изменению аминокислотного состава белка, вначале указывают первую аминокислоту, замена которой происходит, затем следует «fs» (frame shift), знак X (образование стоп-кодона) и количество аминокислот, через которое образуется стоп-кодон. Пример: р.Arg1276GlufsX8 или р.Arg1276fsX8.

3. Мутации сайтов сплайсинга на уровне интронов обозначаются следующим образом: вначале указывается знак «с.», затем номер нуклео-

тида, от которого идет отсчет, далее, в том случае, если мутация от начала экзона в сторону 5'-конца, ставится знак минуса; если мутация от последнего нуклеотида экзона в сторону 3'-конца, ставится знак плюса. Пример: с.362-2; с.457+5.

4. Однонуклеотидные варианты (SNP) обозначаются буквенно-цифровым шифром (rsID), в котором две первые буквы — сокращение «reference SNP», а цифры представляют собой номер, под которым данный вариант был внесен в базу данных dbSNP.

Для предположения о влиянии замены аминокислот в структуре белка необходимо знать основные химические группы аминокислот и особенности их строения (Рис. 44).

Таблица 25

Кодировка и молекулярный вес аминокислот

Аминокислоты	Трехбуквенный код	Однбуквенный код	Mr
Alanine	Ala	A	89
Arginine	Arg	R	174
Asparagine	Asn	N	132
Aspartic acid	Asp	D	133
Cysteine	Cys	C	121
Glutamine	Gln	Q	146
Glutamine acid	Glu	E	147
Glycine	Gly	G	75
Histidine	His	H	155
Isoleucine	Ile	I	131
Leucine	Leu	L	131
Lysine	Lys	K	146
Methionine	Met	M	149
Phenylalanine	Phe	F	165
Proline	Pro	P	115
Serine	Ser	S	105
Threonine	Thr	T	119
Tryptophan	Trp	W	204
Tyrosine	Tyr	Y	181
Valine	Val	V	117

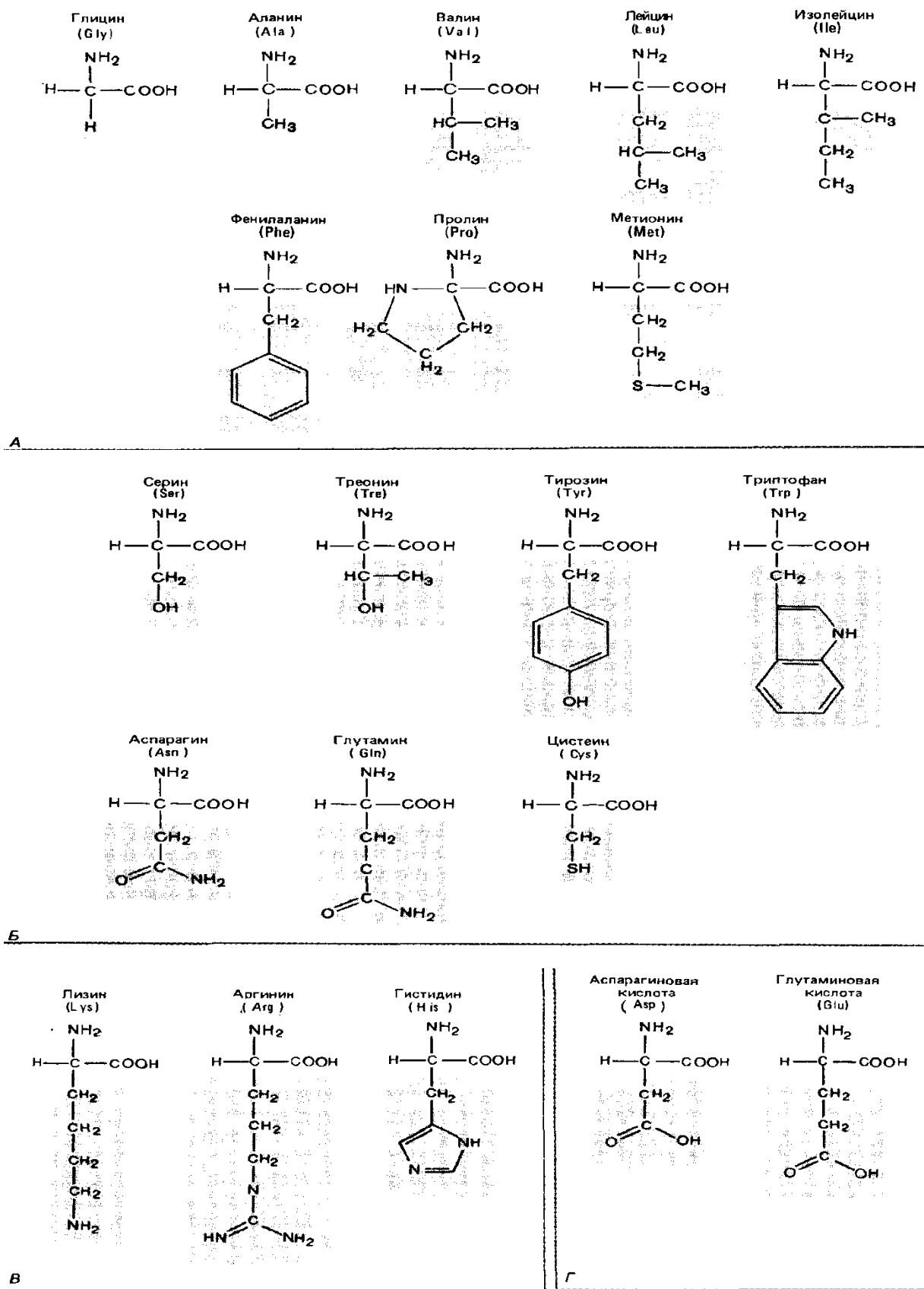


Рис. 44. Химические формулы аминокислот: А (нейтральные гидрофобные), Б (нейтральные полярные), В (основные), Г (кислые).

Для перевода нуклеотидной последовательности в аминокислотную используется таблица генетического кода (Табл. 26).

Таблица 26

Триплетный генетический код

	U	C	A	G	
U	Phe(F)	Ser(S)	Tyr(Y)	Cys(C)	U
	Phe(F)	Ser(S)	Tyr(Y)	Cys(C)	C
	Leu(L)	Ser(S)	Stop	Stop	A
	Leu(L)	Ser(S)	Stop	Trp(W)	G
C	Leu(L)	Pro(P)	His(H)	Arg(R)	U
	Leu(L)	Pro(P)	His(H)	Arg(R)	C
	Leu(L)	Pro(P)	Gln(Q)	Arg(R)	A
	Leu(L)	Pro(P)	Gln(Q)	Arg(R)	G
A	Ile(I)	Thr(T)	Asn(N)	Ser(S)	U
	Ile(I)	Thr(T)	Asn(N)	Ser(S)	C
	Ile(I)	Thr(T)	Lys(K)	Arg(R)	A
	Met(M)	Thr(T)	Lys(K)	Arg(R)	G
G	Val(V)	Ala(A)	Asp(D)	Gly(G)	U
	Val(V)	Ala(A)	Asp(D)	Gly(G)	C
	Val(V)	Ala(A)	Glu(E)	Gly(G)	A
	Val(V)	Ala(A)	Glu(E)	Gly(G)	G

6.7. МИКРОСАТЕЛЛИТНЫЙ АНАЛИЗ

Микросателлиты — повторяющиеся от 5 до 50 раз последовательности, состоящие из 2–6 п.н., общей протяженностью несколько сотен п.н. Микросателлиты разбросаны по всему геному, и их комбинация по числу tandemных повторов в разных локусах и по числу таких локусов является уникальной для каждого человека. Их выявление характеризует генетический полиморфизм человека.

Микросателлиты являются наиболее удобным объектом для косвенной ДНК-диагностики. Через каждые 30000 п.н. встречается 1 кластер ди-

нуклеотидных СА-повторов. При этом во многих кластерах присутствуют от 10 до 30 динуклеотидных пар, типичное количество аллелей составляет 4–8, что обеспечивает высокую информативность метода анализа полиморфизма микросателлитных повторов. Этот метод позволяет определить хромосомные мутации исследуемой области. Определяется частота рекомбинаций между сайтом повреждения и полиморфным генным локусом.

Этапы метода:

- 1) выделение ДНК;
- 2) ПЦР со специфическими праймерами для микросателлитов;
- 3) гель-электрофорез с окраской нитратом серебра или бромистым этидием.

Поскольку при АПМП анализируется от 4 до 8 аллелей, то наиболее подходящим методом окраски геля является окраска нитратом серебра, позволяющая дифференцировать аллели, отличающиеся даже по одному повтору.

Гетеродуплексный анализ

Гетеродуплексный анализ — метод выявления мутаций, основанный на образовании гетеродуплексов в процессе амплификации. Метод позволяет выявить мутации, находящиеся в гетерозиготном состоянии, а также инсерции и делеции. При амплификации участков ДНК гетерозигот, последующей денатурации и медленной ренатурации полученных продуктов ПЦР в амплификационной смеси наряду с двумя типами гомодуплексов образуются гетеродуплексы между нормальной и мутантной цепями ДНК (Рис. 45). Такие гетеродуплексные молекулы отличаются значительно более низкой по сравнению с гомодуплексами электрофоретической подвижностью вследствие конформационных особенностей в местах несовпадения нуклеотидов.

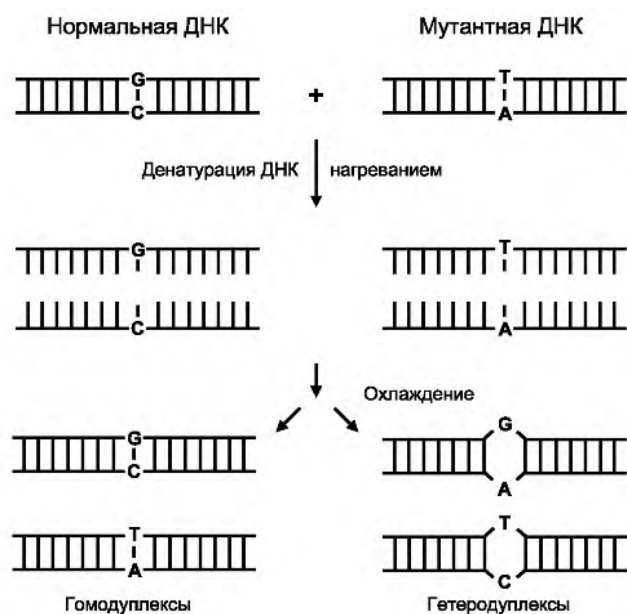


Рис. 45. Схема образования гетеродуплексов (Бочков, 2011).

Различия обнаруживаются при гель-электрофорезе (Рис. 46). Гетеродуплексный анализ проводится в неденатурирующем ПААГ. Образование дуплексов проводится путем прогревания продуктов ПЦР в течение 5 минут при $+95^{\circ}\text{C}$ с последующим быстрым охлаждением в течение 1 ч до $+4^{\circ}\text{C}$. Последующую визуализацию дуплексов проводят путем электрофореза в 10% ПААГ в 0,5xTBE буфере. Условия проведения электрофореза: 300–350 В, 12мА, 2 ч. Длина пробега – 20 см под контролем ПЦР-маркера (50–2000 п.н.). Окраску геля проводят бромистым этидием.



Рис. 46. Разделение гетеродуплексов в геле (Бочков, 2011).

6.8. МЕТОД БИОЧИПОВ

Прообразом современных биочипов послужил Саузерн-блот. Эдвин Саузерн использовал меченую нуклеиновую кислоту для выявления определенных последовательностей ДНК, зафиксированных на мембране. Биочипы (Рис. 47) — это молекулы биополимеров, помещенные в многочисленные правильно расположенные микроячейки на стекле, в микрокапли геля, в микрокапилляры, или своеобразные «микролаборатории».

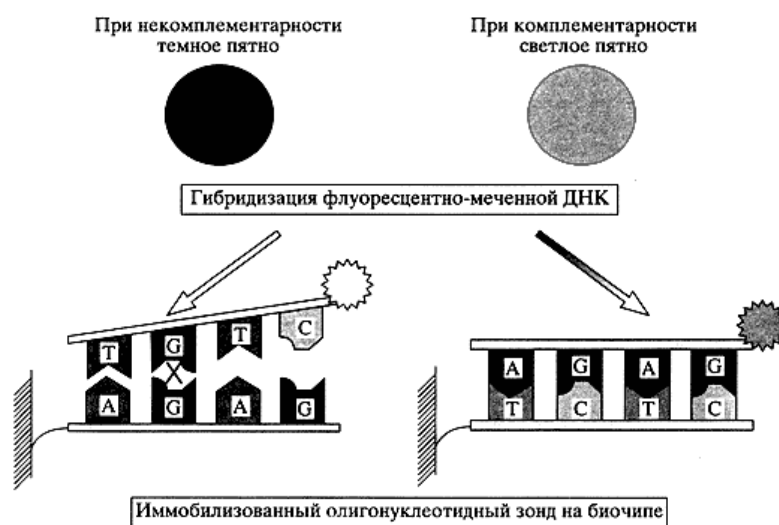


Рис. 47. Принцип действия биочипов (Мирзабеков, 2003).

Иммобилизованные зонды в ячейках избирательно связывают вещества, содержащиеся в анализируемом растворе. В зависимости от этих зондов различают: ДНК-чипы, РНК-чипы, белковые микрочипы, клеточные микрочипы. При взаимодействии биочипа с исследуемым образцом, предварительно обработанным флуоресцентным красителем, в ячейках происходит химическая реакция, и тогда эти ячейки начинают светиться — тем сильнее, чем интенсивнее процесс. Эффективность биочипов связана с возможностью параллельного проведения огромного количества специфических реакций и взаимодействий молекул биополимеров (ДНК, РНК, белки или клетки) друг с другом и низкомолекулярными лигандами.

Технологически ДНК-биочип представляет собой матрицу, состоящую из сотен и тысяч ячеек (Рис. 48), в каждой из них закреплен олигонуклеотид. Олигонуклеотиды имеют одинаковую длину, но отличаются по нуклеотидной последовательности.

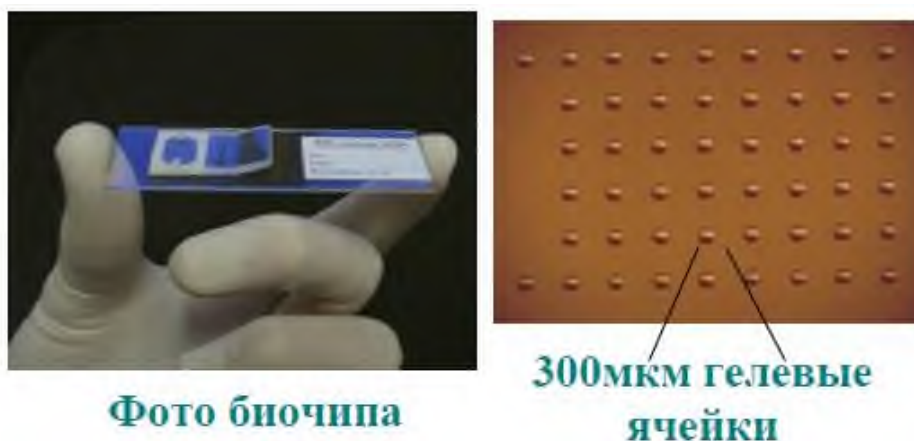


Рис. 48. Биочип «микроработатория» (А), в микрокаплях геля (Б).

Исследуемая ДНК подвергается рестрикции и проходит предварительную обработку — прикрепление флуоресцентной метки к фрагментам ДНК. Далее исследуемый образец наносится на все ячейки чипа и спустя некоторое время смывается. Если в наборе есть олигонуклеотид, комплементарный закрепленному в ячейке, то между ними образуется связь. После промывки чип помещается под флуоресцентный микроскоп, где по световому сигналу определяется состав проб: носителем этой информации являются интенсивность и цвет излучения. Зная последовательность олигонуклеотидов, изначально помещенных в флуоресцирующую ячейку, можно сделать вывод о составе фрагмента исследуемой ДНК.

Контрольные вопросы

1. Какие молекулярно-генетические методы исследования вы знаете?
2. Охарактеризуйте известные способы выделения ДНК и РНК.
3. Для чего проводится ПЦР, какие реагенты и основные этапы данного метода?
4. В чем отличие и преимущество ПЦР в реальном времени от обычной ПЦР?
5. Какая методика наиболее оптимальна для идентификации мажорных мутаций?
6. Для чего проводится секвенирование и какие реагенты при этом используют?

7. БИОХИМИЧЕСКИЙ МЕТОД

Биохимический метод используется для анализа различных ионов, углеводов, липидов, аминокислот и их метаболитов при диагностике наследственных заболеваний. Биохимический метод применяется для скрининга новорожденных на наличие моногенных болезней обмена веществ. Проводится также биохимический скрининг беременных для выявления наследственных болезней у плода:

В I триместре беременности проводится скрининг по показателям.

Белок PAPP-A (pregnancy-associated plasma protein-A) — фермент, вырабатываемый фибробластами плаценты, который отщепляет фрагменты от инсулиноподобного фактора роста, повышая его активность и обеспечивая тем самым стимуляцию роста и развития плаценты. В норме содержание PAPP-A повышается с 8 по 14 неделю от 1 до 8 ММЕ/мл. Низкий уровень PAPP-A отмечен при синдромах Дауна, Патау, Эдвардса.

Хорионический гонадотропин человека — гликопротеин, относящийся к гонадотропным гормонам. Состоит из α - и β -субъединиц, α -субъединица идентична α -субъединице фолликулостимулирующего, лютеинизирующего и тиреотропного гормона, а β -субъединица определяет его специфичность. Свободная β -субъединица ХГЧ синтезируется в трофобласте, составляя в норме 0,5–3% от общего ХГЧ. Высокий уровень β -субъединицы ХГЧ определяется при синдроме Дауна, преэклампсии (тяжелой форме позднего токсикоза с отеками, нарушением функции почек, артериальной гипертензией и поражением ЦНС).

Биохимический скрининг во II триместре беременности.

ХГЧ в норме выявляется с 8 дня оплодотворения (5 день после имплантации) — уровень возрастает от 25 до 300000 мЕд/мл, с максимумом на 11 неделе беременности. С 11 по 39 неделю снижается до 80000 мЕд/л. Концентрация ХГЧ понижена при синдроме Патау, Эдвардса, повышена — при синдроме Дауна.

Альфа-фетопротеин — гликопротеин, синтезируемый желточным мешком и печенью плода. В норме выявляется с 5 недели и в течение беременности уровень АФП в крови женщины повышается от 5 до 200 нг/мл. Низкий уровень наблюдается при синдроме Дауна, Патау, Эдвардса, повышенный — при открытых дефектах зародка нервной трубки (спинномозговая грыжа, анэнцефалия).

Неконтюгированный эстриол — стероидный гормон, экспрессируемый фетоплацентарным комплексом, надпочечниками и печенью плода. С 15 по 38 неделю беременности уровень этого гормона возрастает от 4 до 40 нмоль/л. Низкий уровень отмечается при врожденной гиперплазии коры надпочечников, аутосомных трисомиях.

Ингибин-А — половой гормон белковой природы, синтезируемый плацентой, плодом и плодными оболочками. Нормальное содержание ингибина-А при беременности составляет до 500 пг/мл, повышенный уровень обнаруживается при аутосомных трисомиях.

Биохимический метод играет важную роль для диагностики моногенных болезней обмена веществ, при которых определяют изменения уровня специфических показателей в крови:

- галактоземия — определяют концентрацию галактозы;
- тирозинемия — тирозина и фенилаланина;
- гомоцистинурия — гомоцистина и метионина;
- алкаптонурия — гомогентезиновой кислоты;
- болезнь Леша-Нихена — мочевой кислоты;
- адреногенитальный синдром — 17-альфа-оксипрогестерона;
- митохондриальные болезни — молочной и пировиноградной кислот;
- синдром Рефсума — фитановой кислоты;
- болезнь Вильсона-Коновалова — меди, церулоплазмина.

Нормальные показатели биохимического состава крови взрослого человека представлены в таблице 27.

Таблица 27

Нормальные биохимические показатели у взрослого человека

Показатель	Единицы СИ
Общий белок:	65–85 г/л
альбумины,	40–50 г/л
глобулины,	20–30 г/л
фибриноген	2–4 г/л
Остаточный азот	7–14 ммоль/л
Мочевина	2,5–6,6 ммоль/л
Мочевая кислота	120–380 мкмоль/л
Креатинин: мужчины,	88–177 мкмоль/л,
женщины	44–141 мкмоль/л
Общие липиды	4,6–10,4 ммоль/л
Общий холестерин	3–6,5 ммоль/л
Глюкоза	3–5,5 ммоль/л
Серомукоид	0,22–0,28 г/л
Билирубин: общий	8–20 мкмоль/л
прямой (связанный)	до 5,1 мкмоль/л
непрямой (несвободный)	до 16,1 мкмоль/л
Кальций сыворотки общий	2,0–2,5 ммоль/л
ионизированный	1,16–1,32 ммоль/л
Неорганический фосфор	0,65–1,3 ммоль/л
Железо	12,5–30,5 мкмоль/л
Медь	11–22 мкмоль/л
Калий плазмы	3,5–5,3 ммоль/л
Натрий плазмы	130–157 ммоль/л
Альфа-амилаза	20–100 Ед/л
Щелочная фосфатаза	34–114 Ед/л

Контрольные вопросы

1. Для анализа каких веществ используют биохимический метод?
2. Какие показатели исследуют при скрининге в I триместре беременности?
3. Какие показатели исследуют при скрининге во II триместре беременности?
4. Какие болезни можно заподозрить при повышенном уровне ХГЧ?
5. Какие специфические биохимические показатели исследуют при моногенных болезнях обмена веществ?

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Решение данных тестовых заданий направлено на оценку сформированных ПК-5, ПК-6

Выберите один правильный ответ

1. ЗАКОН ХАРДИ-ВАЙНБЕРГА ВЫРАЖАЕТСЯ ФОРМУЛАМИ

- 1) $p+q=1$, $q=1-p$, $p^2+2pq+q^2=1$
- 2) $H=(K_{мб}+K_{дб})/100-K_{дб}$
- 3) $C=1-H$
- 4) $p^2+2pq+q^2=1$, $p+t^2=1$
- 5) $p^2+2pq+q^2= p+q$

2. БЛИЗНЕЦОВЫЙ МЕТОД ПРЕДЛОЖИЛ

- 1) Грегор Мендель в 1866 году
- 2) Джеймс Уотсон и Фрэнсис Крик в 1953 году
- 3) Френсис Гальтон в 1883 году
- 4) Френсис Гальтон в 1875 году
- 5) Джеймс Уотсон и Фрэнсис Крик в 1958 году

3. ПРОЦЕНТ ОБЩИХ ГЕНОВ ДЛЯ IV СТЕПЕНИ РОДСТВА

- 1) 3,125%
- 2) 6,25%
- 3) 12,5%
- 4) 8%
- 5) 50%

4. КО II СТЕПЕНИ РОДСТВА ОТНОСЯТСЯ

- 1) двоюродные братья/сестры, двоюродная тетя/дядя
- 2) бабушка/дедушка – внуки, тетя/дядя – племянники
- 3) сибсы, дизиготные близнецы, правнуки
- 4) троюродные братья/сестры
- 5) монозиготные близнецы

5. КЛИНИКО-ГЕНЕАЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД НАЧИНАЕТСЯ С

- 1) закона Харди-Вайнберга
- 2) пробанда

- 3) формулы Хольцингера
- 4) закона Менделя
- 5) закона Гальтона

6. КЛИНИКО-ГЕНЕАЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ПРЕДЛОЖИЛ

- 1) Грегор Мендель в 1866 году
- 2) Джеймс Уотсон и Фрэнсис Крик в 1953 году
- 3) Френсис Гальтон в 1883 году
- 4) Френсис Гальтон в 1875 году
- 5) Джеймс Уотсон и Фрэнсис Крик в 1958 году

7. В ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОМ МЕТОДЕ ИСПОЛЬЗУЮТ

- 1) колхицин, колцемин, гипотонический раствор KCl
- 2) гипертонический раствор KCl, меркаптопурин
- 3) метилурацил, сыворотка крупного рогатого скота
- 4) фитогемагглютинин, агглютиноген, метиленовый синий
- 5) все вышеперечисленные

8. ГЕНТАМИЦИН ИСПОЛЬЗУЕТСЯ

- 1) в биохимическом скрининге
- 2) в молекулярно-генетическом методе
- 3) в цитогенетическом методе
- 4) в популяционно-статистическом методе
- 5) во всех вышеперечисленных методах

9. В МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОМ МЕТОДЕ

- 1) формамид, биотин, стрептавидин
- 2) родамин, кармин, дигоксин
- 3) биотин, строфантин, дигоксигенин
- 4) дигоксин, дигитоксин, варфарин
- 5) радиоизотоп

10. ПРИ ВЫДЕЛЕНИИ ДНК ИЗ КРОВИ ИСПОЛЬЗУЮТ

- 1) полимеразу
- 2) рестриктазу
- 3) протеиназу
- 4) топоизомеразу
- 5) геликазу

11. ПОСЛЕ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ХАРНЯТ

- 1) в растворе спирта при 100С
- 2) в деионизированной воде при -40С
- 3) в растворе формамида
- 4) в 0,9% растворе NaCl
- 5) в уксусной кислоте

12. ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ХРОМОСОМНОЙ БОЛЕЗНИ

- 1) секвенирование и электрофорез
- 2) рестрикционный анализ и SSCP
- 3) цитогенетический и биохимический методы
- 4) биохимический метод и ПДРФ
- 5) близнецовый метод

13. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД ВКЛЮЧАЕТ

- 1) ПЦР, кариотипирование
- 2) ПДРФ-анализ, гель-электрофорез
- 3) секвенирование, составление родословных
- 4) биочипы и закон Харди-Вайнберга
- 5) формулу Хольцингера.

14. КОЭФФИЦИЕНТ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДЕТЕРМИНАЦИИ ЭТО

- 1) $H^2 = VG/VT$
- 2) $H=1-C$
- 3) $A=Aa+AA$
- 4) $m=k+r$
- 5) $m=V-A$

15. В НЕПРЯМОМ FISH-МЕТОДЕ ИСПОЛЬЗУЮТ

- 1) родамин, стрептавидин
- 2) стрептавидин, катехоламин
- 3) авидин, дигоксин
- 4) флюоресцеин, дигитоксин
- 5) гентамицин, фторурацил

16. В ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ИСПОЛЬЗУЮТ

- 1) праймеры, dNTP, ДНК-полимеразу, буфер, ионы магния
- 2) ddNTP, праймер, ДНК-полимеразу, буфер, ионы магния
- 3) dNTP, протеиназу, ДНК-полимеразу, буфер, ионы магния
- 4) протеиназу, рестриктазу, H₂O, буфер, ионы магния
- 5) геликазу, топоизомеразу, рестриктазу

17. ПРИ СЕКВЕНИРОВАНИИ ПО СЭНГЕРУ ИСПОЛЬЗУЮТ

- 1) праймеры, dNTP, рестриктазу, буфер, ионы магния
- 2) ddNTP, dNTP, праймер, ДНК-полимеразу, буфер, ионы магния
- 3) dNTP, протеиназу, ДНК-полимеразу, буфер, ионы магния
- 4) протеиназу, рестриктазу, H₂O, буфер, ионы магния
- 5) раствор электролита, бромистый этидий

18. ДЛЯ ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ИСПОЛЬЗУЮТ ЭЛЕКТРОЛИТ

- 1) раствор Рингера, раствор KCl
- 2) Трис-ацетат-ЭДТА, TBE
- 3) раствор KCl 0,56%, TКNE
- 4) Трис-борат-ЭДТА, TFA
- 5) тритон, лизирующий буфер

19. РЕСТРИКТАЗА ИСПОЛЬЗУЕТСЯ ДЛЯ

- 1) разъединения двуцепочечной ДНК на одноцепочечную
- 2) разрезания двуцепочечной ДНК
- 3) специфической амплификации ДНК
- 4) удаления излишков воды из раствора
- 5) выделения ДНК

20. ДЛЯ ЧИСТОГО ОБРАЗЦА ДНК ХАРАКТЕРНО

- 1) $A(280)/A(260) < 1,8$
- 2) $A(270)/A(255) < 1,8$
- 3) $A(280)/A(260) > 1,8$
- 4) $A(240)/A(220) > 1,8$
- 5) $A(270)/A(250) < 1,8$

21. ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР ТРЕБУЕТСЯ

- 1) термостат
- 2) амплификатор
- 3) коагулятор
- 4) центрифуга и лизирующий буфер
- 5) рестриктаза и топоизомераза

22. ПОЛИМЕРАЗНУЮ ЦЕПНУЮ РЕАКЦИЮ ИЗОБРЕЛ

- 1) Сэнгер в 1977 году
- 2) Джеймс Уотсон и Фрэнсис Крик в 1953 году
- 3) Барбара Мак-Клинтон в 1983 году
- 4) Кэрри Муллис в 1983 году
- 5) Харди и Вайнберг

23. ОКРАСКУ ГЕЛЕЙ С ПЦР-ПРОДУКТАМИ ПРОВОДЯТ

- 1) нитратом серебра и бромистым этидием
- 2) хлоридом натрия и нитратом калия
- 3) бористым этидием и цитратом серебра
- 4) цитратом натрия и нитратом брома
- 5) бромистым этидием и нитратом брома

24. ПРООБРАЗОМ СОВРЕМЕННЫХ БИОЧИПОВ ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) амплификатор
- 2) термоциклер
- 3) саузерн-блот
- 4) секвенатор
- 5) термостат

25. В ПДРФ АНАЛИЗЕ ИСПОЛЬЗУЮТ

- 1) полимеразу
- 2) рестриктазу
- 3) ревертазу
- 4) протеиназу
- 5) топоизомеразу

26. SNP — ЭТО

- 1) сложные нуклеотидные последовательности
- 2) нонсенс-мутации
- 3) однонуклеотидные полиморфизмы
- 4) сенгеровские нуклео-протеины
- 5) сайт-негативные последовательности

27. РЕСТРИКТАЗЫ — ЭТО ФЕРМЕНТЫ

- 1) вирусов
- 2) эукариот
- 3) бактерий
- 4) человека
- 5) гусеницы

28. ПЦР ВКЛЮЧАЕТ ЦИКЛЫ

- 1) денатурация ДНК, отжиг праймеров, элонгация
- 2) температурная ренатурация ДНК, отжиг протеиназы, элонгация
- 3) элонгация, отжиг рестриктазы, элонгация
- 4) рестрикция, блот-гибридизация, элонгация
- 5) растворение, разведение, слияние

29. dNTP СОСТОИТ ИЗ

- 1) dATP, dUTP, dTTP, dGTP
- 2) dUTP, dATP, dTTP, dGTP
- 3) dTTP, dATP, dGTP, dCTP
- 4) dGTP, dPTP, dRTP, dNTP
- 5) dFTP, dPTP, dRTP, dNTP

30. СКРИНИНГ ВО II ТРИМЕСТРЕ БЕРЕМЕННОСТИ

- 1) белок РАРР-А, свободную β -субъединицу ХГЧ
- 2) АФП, ингибин-А, ХГЧ, неконъюгированный эстриол
- 3) белок РАРР-А, ингибин-А, ХГЧ, неконъюгированный эстриол
- 4) свободная β -субъединицу ХГЧ, АФП, ингибин-А
- 5) уровень холестерина, серомукоиды, фибриногена

31. СКРИНИНГ В I ТРИМЕСТРЕ БЕРЕМЕННОСТИ

- 1) белок РАРР-А, свободная β -субъединица ХГЧ
- 2) АФП, ингибин-А, ХГЧ, неконъюгированный эстриол
- 3) белок РАРР-А, ингибин-А, ХГЧ, неконъюгированный эстриол
- 4) свободная β -субъединица ХГЧ, АФП, ингибин-А
- 5) галактоза, фенилаланин, метионин

32. В НОРМЕ СВОБОДНАЯ β -СУБЪЕДИНИЦА В I ТРИМЕСТРЕ

- 1) 5–10% от ХГЧ
- 2) 3–5% от ХГЧ
- 3) 0,5–3% от ХГЧ
- 4) 21–33% от ХГЧ
- 5) 0,008 мкмоль/л

33. НИЗКИЙ УРОВЕНЬ БЕЛКА РАРР-А ХАРАКТЕРЕН ДЛЯ

- 1) аутосомных моносомий
- 2) гоносомных трисомий
- 3) гоносомных моносомий
- 4) аутосомных трисомий
- 5) фенилкетонурии

34. НИЗКИЕ УРОВНИ АФП И ХГЧ ВО II ТРИМЕСТРЕ ПРИ

- 1) синдроме Патау и Эдвардса
- 2) синдроме Дауна
- 3) синдроме Хантера
- 4) синдроме Моркио
- 5) галактоземии

35. НИЗКИЙ УРОВЕНЬ АФП И ВЫСОКИЙ — ХГЧ ПРИ

- 1) синдроме Патау и Эдвардса
- 2) синдроме Дауна
- 3) синдроме Хантера
- 4) синдроме Моркио
- 5) синдроме Леша-Нихена

36. ПРОБА ФЕЛИНГА ПРОВОДИТСЯ ПРИ

- 1) алкаптонурии
- 2) галактоземии
- 3) фенилкетонурии
- 4) муковисцидозе
- 5) тиреотоксикозе

37. ДЛЯ ПРОБЫ ФЕЛИНГА ИСПОЛЬЗУЮТ

- 1) раствор FeCl_3 10%, уксусную кислоту
- 2) раствор FeBr_3 5%, уксусную кислоту
- 3) уксусную кислоту, раствор AgNO_3
- 4) формалин, дигитоксин, NaNO_3
- 5) воду, мочевины, гидроксид натрия

38. ПОТЕМНЕНИЕ МОЧИ НА ВОЗДУХЕ НАБЛЮДАЕТСЯ ПРИ

- 1) алкаптонурии
- 2) галактоземии
- 3) фенилкетонурии
- 4) муковисцидозе
- 5) сфинголипидозах

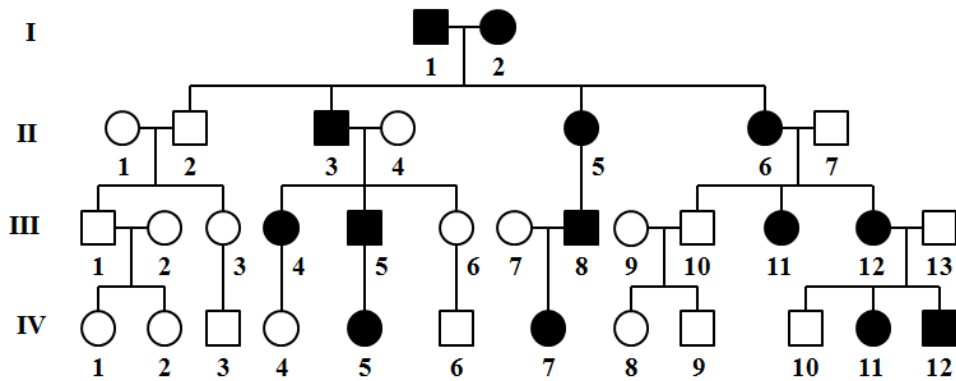
СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

Решение данных ситуационных задач направлено на оценку сформированных компетенций: ПК-5, ПК-6.

Задача № 1. Вычислите долю гетерозиготных носителей муковисцидоза в популяции, если частота встречаемости больных рецессивных гомозигот составляет 1 на 5000 населения.

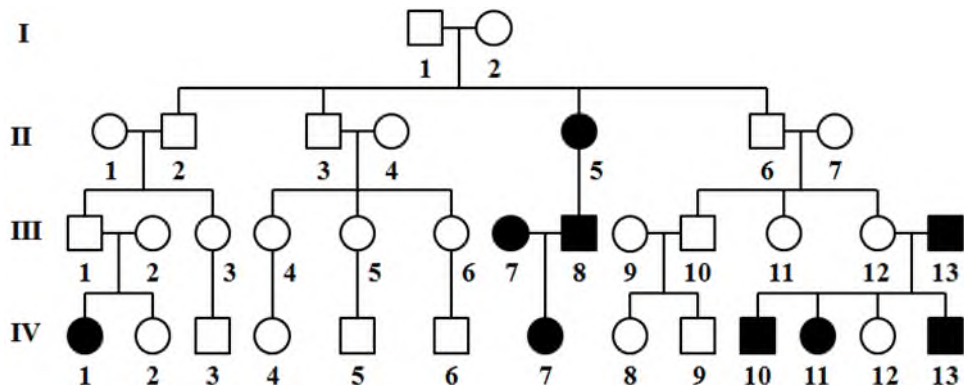
Задача № 2. Вычислите долю наследственности и средовых факторов в развитии гипертонической болезни. Конкордантность монозиготных близнецов = 26,2%, дизиготных близнецов = 10,0%.

Задача № 3.



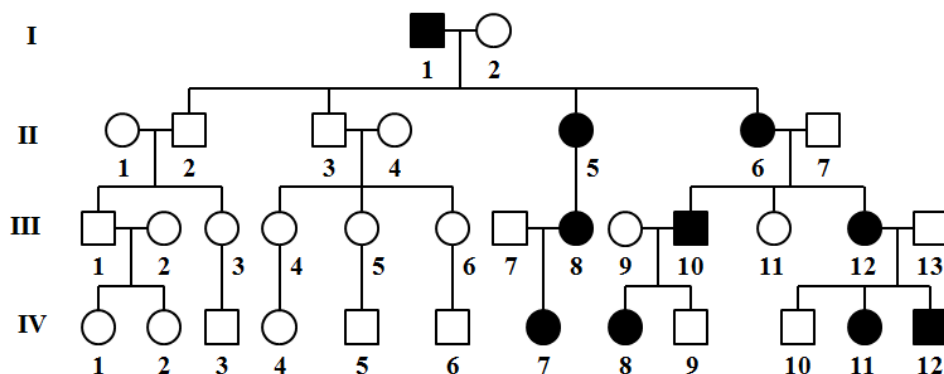
Проведите анализ родословной и определите тип наследования болезни, дайте обоснование заключению.

Задача № 4.



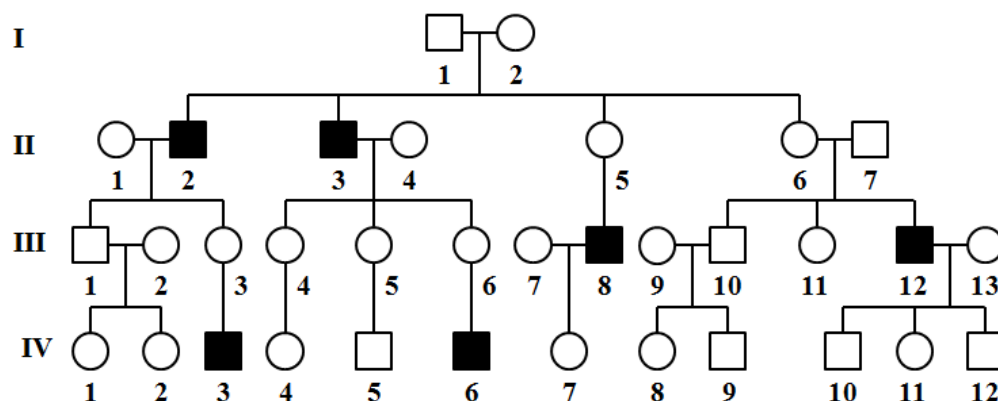
Проведите анализ родословной и определите тип наследования болезни, дайте обоснование заключению.

Задача № 5.



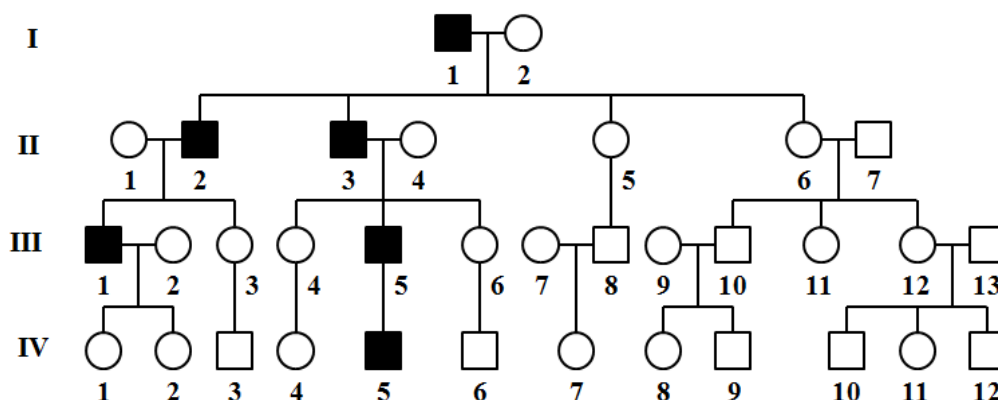
Проведите анализ родословной и определите тип наследования болезни, дайте обоснование заключению.

Задача № 6.



Проведите анализ родословной и определите тип наследования болезни, дайте обоснование заключению.

Задача № 7.



Проведите анализ родословной и определите тип наследования болезни, дайте обоснование заключению.

ЭТАЛОНЫ ОТВЕТОВ НА ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ И СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

Эталоны ответов на тестовые задания

№															
вопроса	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Ответ	1	4	1	2	2	3	1	3	1	3	2	3	2	1	1
№															
вопроса	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Ответ	1	2	2	2	3	2	4	1	3	2	3	3	1	3	2
№															
вопроса	31	32	33	34	35	36	37	38							
Ответ	1	3	4	1	2	3	1	1							

Ответы на ситуационные задачи

Задача № 1.

Решение: Долю генотипов людей в популяции определяем по формуле Харди-Вайнберга:

$p^2 + 2pq + q^2 = 1$, где p^2 — это доля гомозигот по доминантному аллелю, $2pq$ — доля гетерозигот, q^2 — доля гомозигот по рецессивному аллелю.

Из условия задачи мы знаем, что доля гомозигот по рецессивному аллелю составляет $q^2 = 1/5000 = 0,0002$.

Вычисляем $q = \sqrt{0,0002} = 0,014$.

Вычисляем $p = 1 - q = 0,986$.

Вычисляем долю гетерозиготных носителей муковисцидоза:

$2pq = 2 \times 0,986 \times 0,014 = 0,0276$, то есть носители муковисцидоза составляют 2,76% от всей популяции.

Выполняем проверку правильности решения:

$$p^2 + 2pq + q^2 = (0,986)^2 + 0,0276 + 0,0002 = 1.$$

Ответ: Доля гетерозиготных носителей муковисцидоза в популяции составляет 0,0276 или 2,76%.

Задача № 2.

Решение: Используя формулу Хольцингера, можно определить долю наследственности в развитии гипертонической болезни. Коэффициент наследуемости $H = (K_{МБ} - K_{ДБ}) / (100\% - K_{ДБ}) = (26,2 - 10,0) / (100 - 10,0) = 16,2 / 90 = 0,18$.

Доля среды $C = 1 - H = 1 - 0,18 = 0,82$.

Ответ: В развитии гипертонической болезни большую роль играют средовые факторы, так как доля среды $C = 0,82$, а коэффициент наследуемости $H = 0,18$.

Задача № 3. Аутомно-доминантный тип наследования, так как заболевание прослеживается в каждом из 4 поколений у лиц обоего пола. У больных детей один из родителей болен. Как мать, так и отец в равной степени вероятности передают болезнь и дочерям и сыновьям.

Задача № 4. Аутомно-рецессивный тип наследования, так как у здоровых родителей рождаются больные дети, болезнь проявляется не в каждом поколении. Болеют с равной степенью вероятности лица обоего пола.

Задача № 5. Х-сцепленный доминантный тип наследования, так как больные отцы передают болезнь всем своим дочерям и не передают сыновьям. Болезнь прослеживается в каждом поколении. Больные матери передают болезнь в равной степени как дочерям, так и сыновьям.

Задача № 6. Х-сцепленный рецессивный тип наследования, так как болезнь прослеживается только у лиц мужского пола. У здоровых женщин (носительниц) могут рождаться как здоровые, так и больные сыновья. У фенотипически здоровых женщин, родившихся от больных отцов, рождаются больные сыновья.

Задача № 7. Y-сцепленный тип наследования, так как болезнь прослеживается в каждом поколении только у лиц мужского пола, больные мужчины передают болезнь всем своим сыновьям и не передают дочерям.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Основная:

1. Медицинская генетика: учебное пособие / Л.В. Акуленко [и др.]; под ред. О.О. Янушевича. — Москва: ГЭОТАР- Медиа, 2015. — 192 с.
2. Бочков, Н.П. Клиническая генетика: учебник / Н.П. Бочков, В.П. Пузырев, С.А. Смирнихина; под ред. Н.П. Бочкова. — 4-е изд., доп. и перераб. — Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2018. — 592 с.
3. Клиническая генетика / В.Н. Горбунова, Д.Л. Стрекалов, Е.Н. Суспицын, Е.Н. Имянитов; под ред. В.Н. Горбуновой. — Санкт-Петербург: Фолиант, 2015. — 398 с. — Режим доступа: <http://library.bashgmu.ru>
4. Жимулёв, И.Ф. Общая и молекулярная генетика: учебное пособие / И.Ф. Жимулёв. — Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2017. — 480 с.
5. Анализ генома человека: учебное пособие / Р.Н. Мустафин, А.Х. Нургалиева, Д.С. Прокофьева, Э.К. Хуснутдинова. — Уфа: БашГУ, 2016. — 80 с.
6. Мустафин, Р.Н. Методы анализа генома человека: монография / Р.Н. Мустафин. — Уфа, 2016. — 96 с.
7. Рубан, Э.Д. Генетика человека с основами медицинской генетики / Э.Д. Рубан. — Ростов-на-Дону: Феникс, 2017. — 319 с. — Режим доступа: <http://library.bashgmu.ru>
8. Хмелевская, С.А. Новые биомедицинские технологии: философско-правовые проблемы / С.А. Хмелевская, Т.Ю. Павельева // Социально-политические науки. — 2019. — № 4. — С. 135–139. — Режим доступа: <http://library.bashgmu.ru>

Дополнительная:

1. Mustafin, R.N., Epigenetic Hypothesis of the Role of Peptides in Aging. / R.N. Mustafin, E.K. Khusnutdinova // Adv. Gerontol. — 2018. — V.8. — P. 200–209.
2. Mustafin, R.N. The Role of Transposons in Epigenetic Regulation of Ontogenesis / R.N. Mustafin, E.K. Khusnutdinova // Russian Journal of Developmental Biology. — 2018. — V. 49. — P. 61–78.

3. Mustafin, R.N. The Role of Transposable Elements in Emergence of Metazoa / R.N. Mustafin, E.K. Khusnutdinova // Biochemistry. — Moscow, 2018. — V. 83. — P. 185–199.
4. Mustafin R.N. Interrelation of prions with non-coding RNAs / R.N. Mustafin, E.K. Khusnutdinova. // Vavilov Journal of Genetics and Breeding. — 2018. — V. 22. — P. 415–424.
5. Mustafin, R.N. The hypothesis of the origin of viruses from transposons. Molecular Genetics / R.N. Mustafin // Microbiology and Virology. — 2018. — V. 36. — P. 182–190.
6. Mustafin, R.N. The role of transposable elements in the ecological morphogenesis under influence of stress / R.N. Mustafin, E.K. Khusnutdinova // Vavilov Journal of Genetics and Breeding. — 2019. — V. 23. — P. 380–389.
7. Mustafin, R.N. The Role of Reverse Transcriptase in the Origin of Life / R.N. Mustafin, E.K. Khusnutdinova // Biochemistry. — Moscow, 2019. — V. 84. — P. 870–883.

Интернет ресурсы:

1. GeneReviews: www.ncbi.nlm.nih.gov/books
2. OMIM: <https://www.omim.org>
3. www.pubmed.gov
4. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc
5. www.sciencedirect.com
6. www.scopus.com: Author Evaluator
7. www.scimagojr.com
8. www.elibrary.ru
9. www.Mol.Biol.ru

Мустафин Рустам Наилевич
Гилязова Ирина Ришатовна
Тимашева Янина Римовна
Хуснутдинова Эльза Камилевна

Методы исследования в медицинской генетике

Учебное пособие

Лицензия № 0177 от 10.06.96 г.
Подписано к печати 17.04.2020 г.
Отпечатано на цифровом оборудовании
с готового оригинал-макета, представленного авторами.
Формат 60x84 ¹/₁₆. Усл.-печ. л. 6,68.
Тираж 310 экз. Заказ № 18.

450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3,
Тел.: (347) 272-86-31, e-mail: izdat@bashgmu.ru
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России