

Молекулярно- биологические методы диагностики

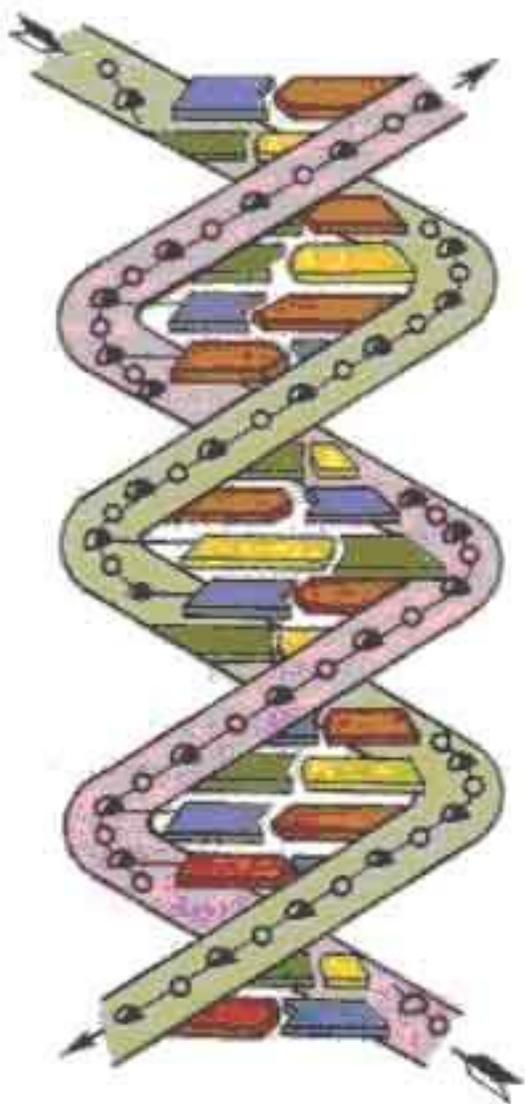




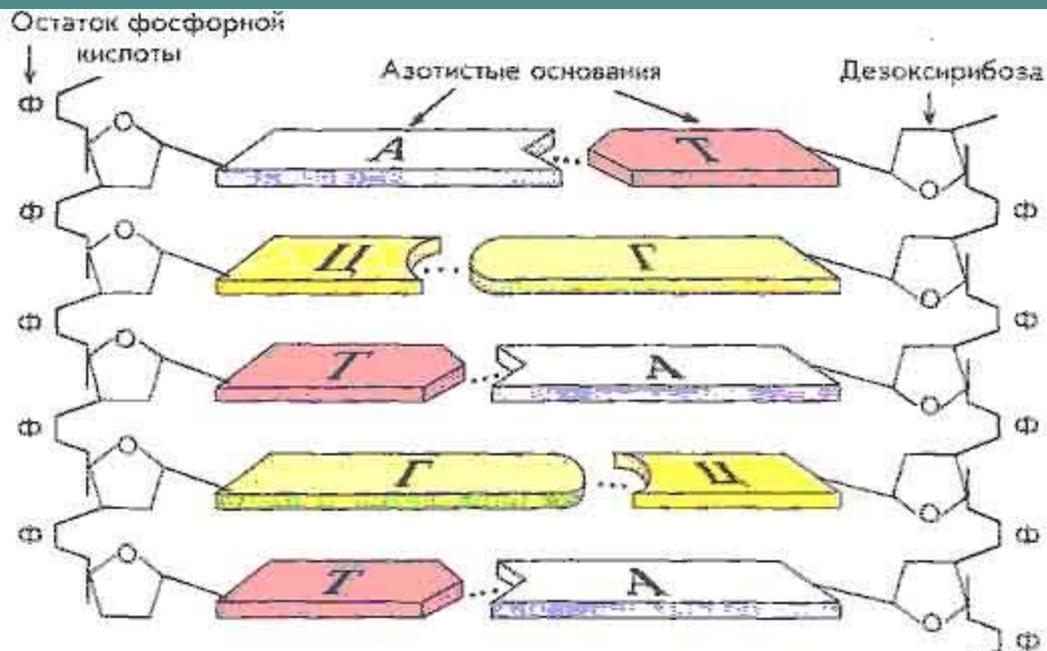
**Участок
двойной
спирали
молекулы
ДНК.**

Схематическое строение ДНК

Многообразие обозначены водородные связи

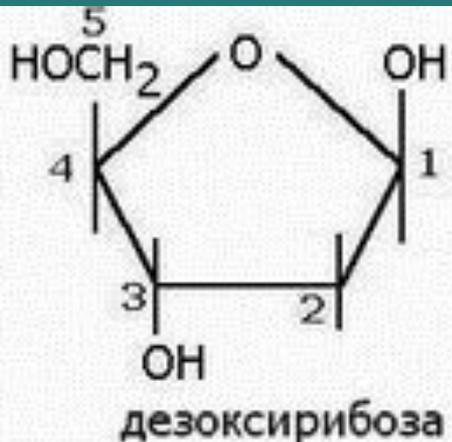
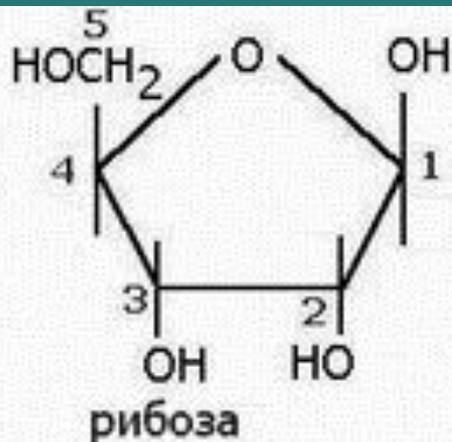


- Остаток дезоксирибозы
- Остаток фосфорной кислоты

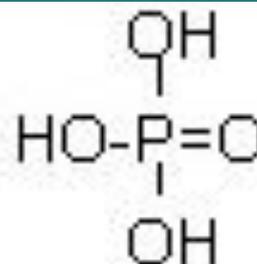


Строение нуклеотида:

1. Строение моносахаридов:



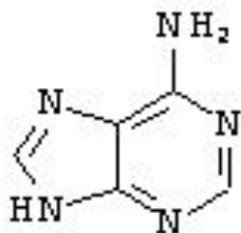
2. Фосфорная кислота



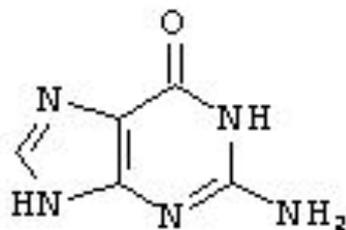
Фосфорная кислота

3. Азотистые основания:

Строение пуриновых оснований:

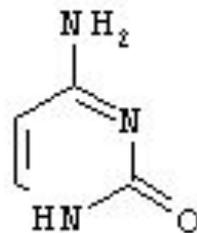


аденин

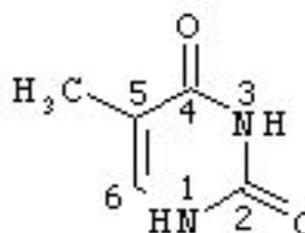


гуанин

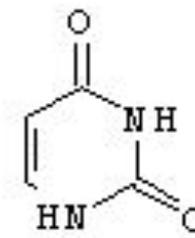
Строение пиримидиновых оснований:



ЦИТОЗИН



ТИМИН



урацил

Одинаковые компоненты	Отличающиеся компоненты	
АДЕНИН ГУАНИН ЦИТОЗИН	ДНК	РНК
	ДЕЗОКСИРИБОЗА ТИМИН	РИБОЗА УРАЦИЛ

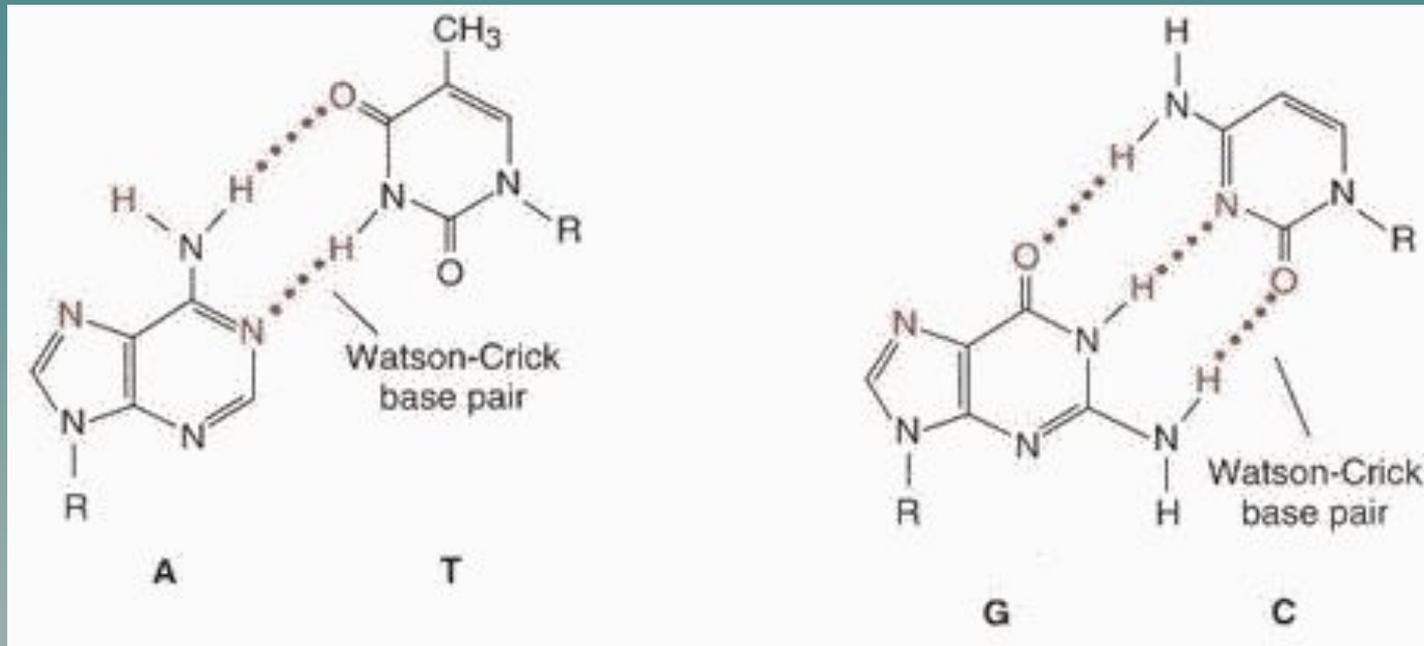
КОМПЛЕМЕНТАРНОСТЬ –

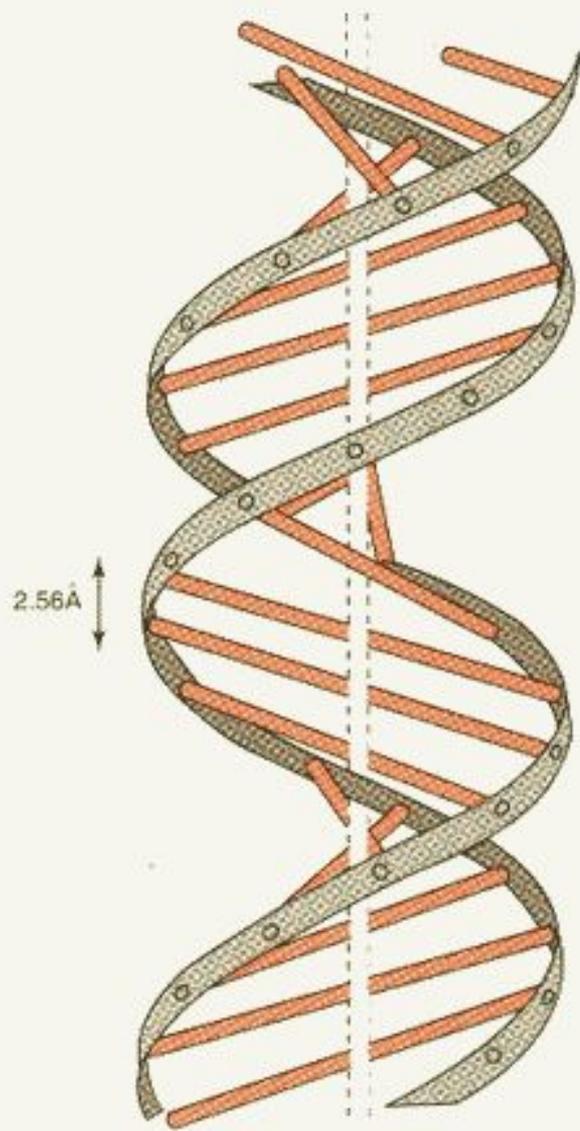
последовательность нуклеотидов в одной цепи автоматически определяет строго соответствующую ей последовательность нуклеотидов в КОМПЛЕМЕНТАРНОЙ ей цепи.

Так, азотистое основание Аденин (А) всегда взаимодействует только с комплементарным ему азотистым основанием Тимин (Т) в молекулах ДНК.

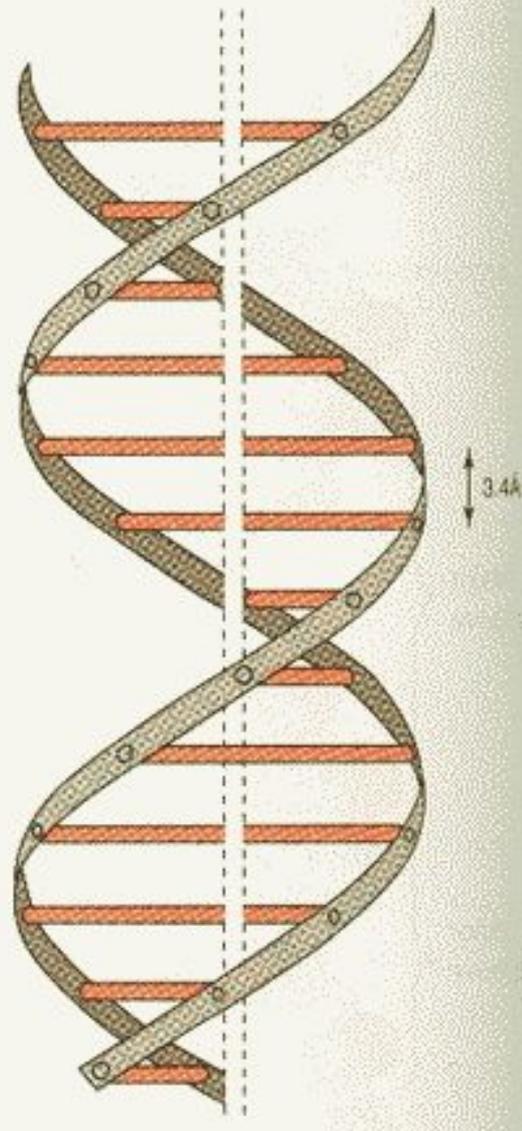
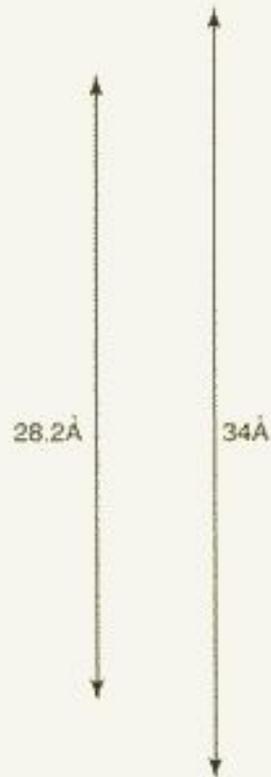
Одновременно азотистые основания Гуанин (Г) одной цепи взаимодействует только с комплементарными им азотистыми основаниями Цитозин (Ц) другой цепи ДНК (или Урацил (У) в РНК). Комплементарность

оснований обеспечивается системой водородных связей.





A-form

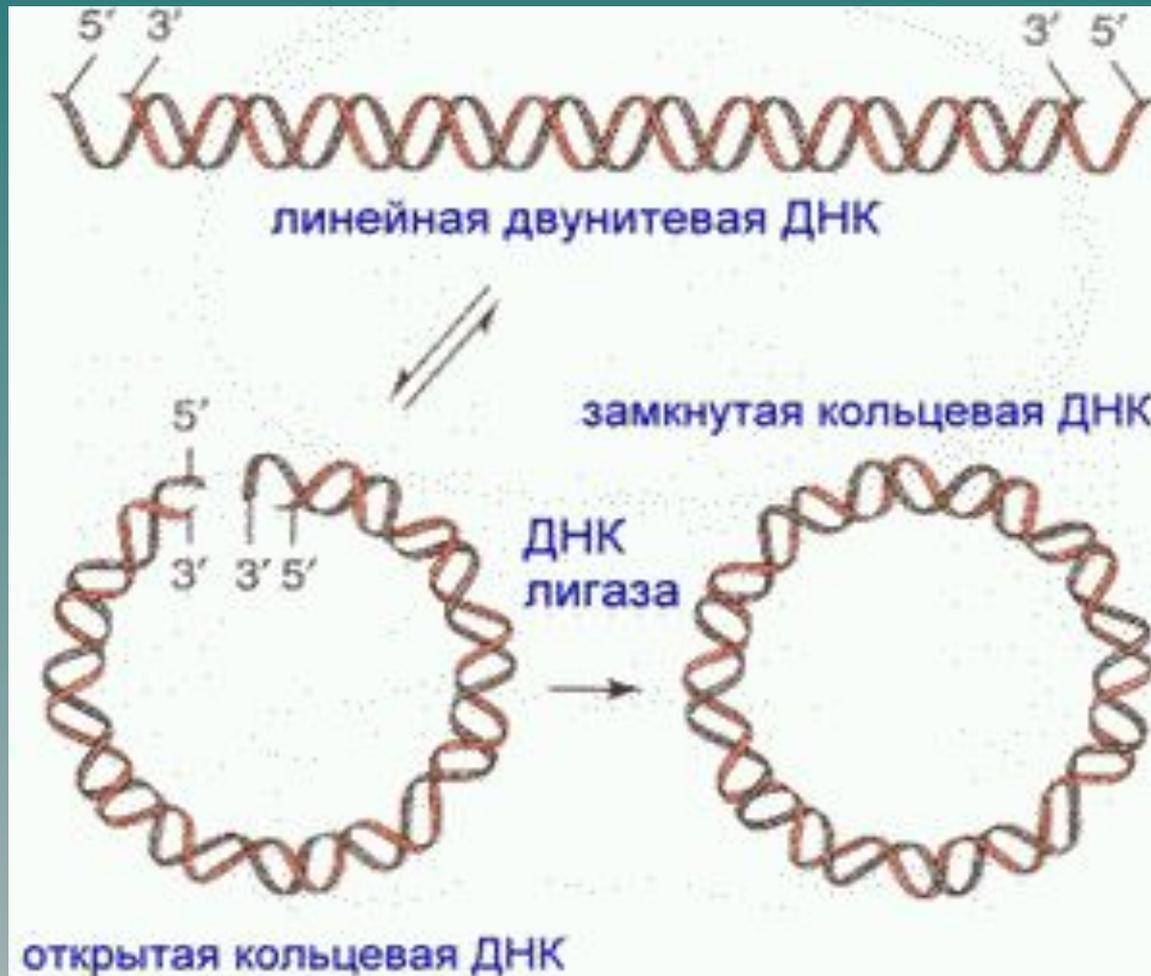


B-form

вторичная структура ДНК

ТРЕТИЧНАЯ СТРУКТУРА ДНК

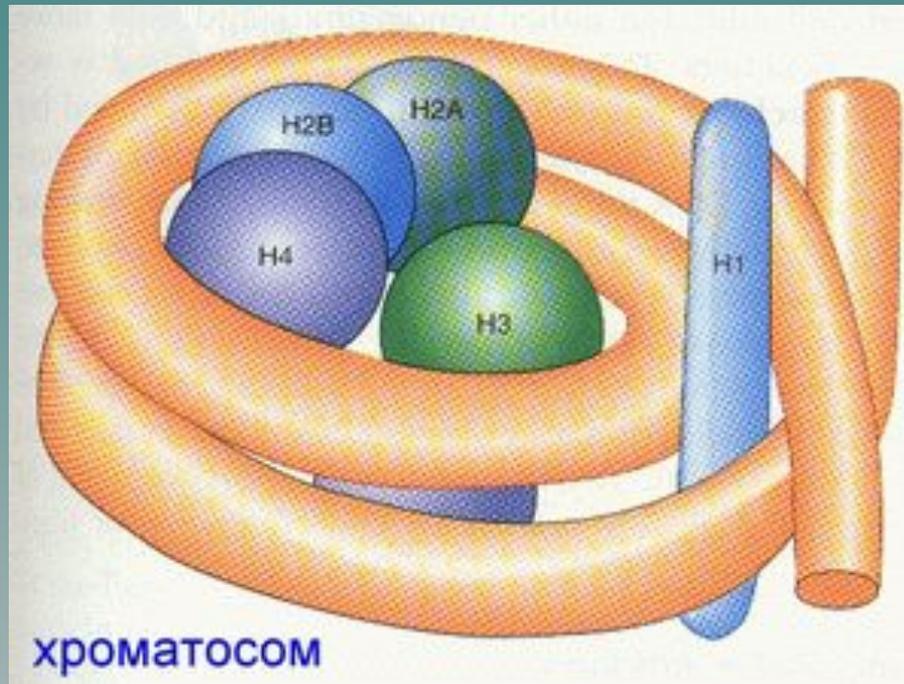
варианты форм : линейная,
кольцевая, 2-х и 1- цепочечная.



ХРОМАТОСОМ:

Нуклеосомный кор содержит октамер гистонов (2 х (H2a+H2b+H3+H4)).

Нуклеосомный кор образуется при оборачивании октамера гистонов двунитевой спирализованной ДНК на 1,5 оборота, отдельно включается дополнительный белок- гистон H1.



Хроматосомы напоминают нанизанные на нитку бусины. Следующий этап- сворачивание в спираль очень длинной последовательности “бус”. Эта спираль, в свою очередь, претерпевает сворачивание в двужильные канаты, из которых образуются гроздья, являющиеся небольшой частью хромосомы:

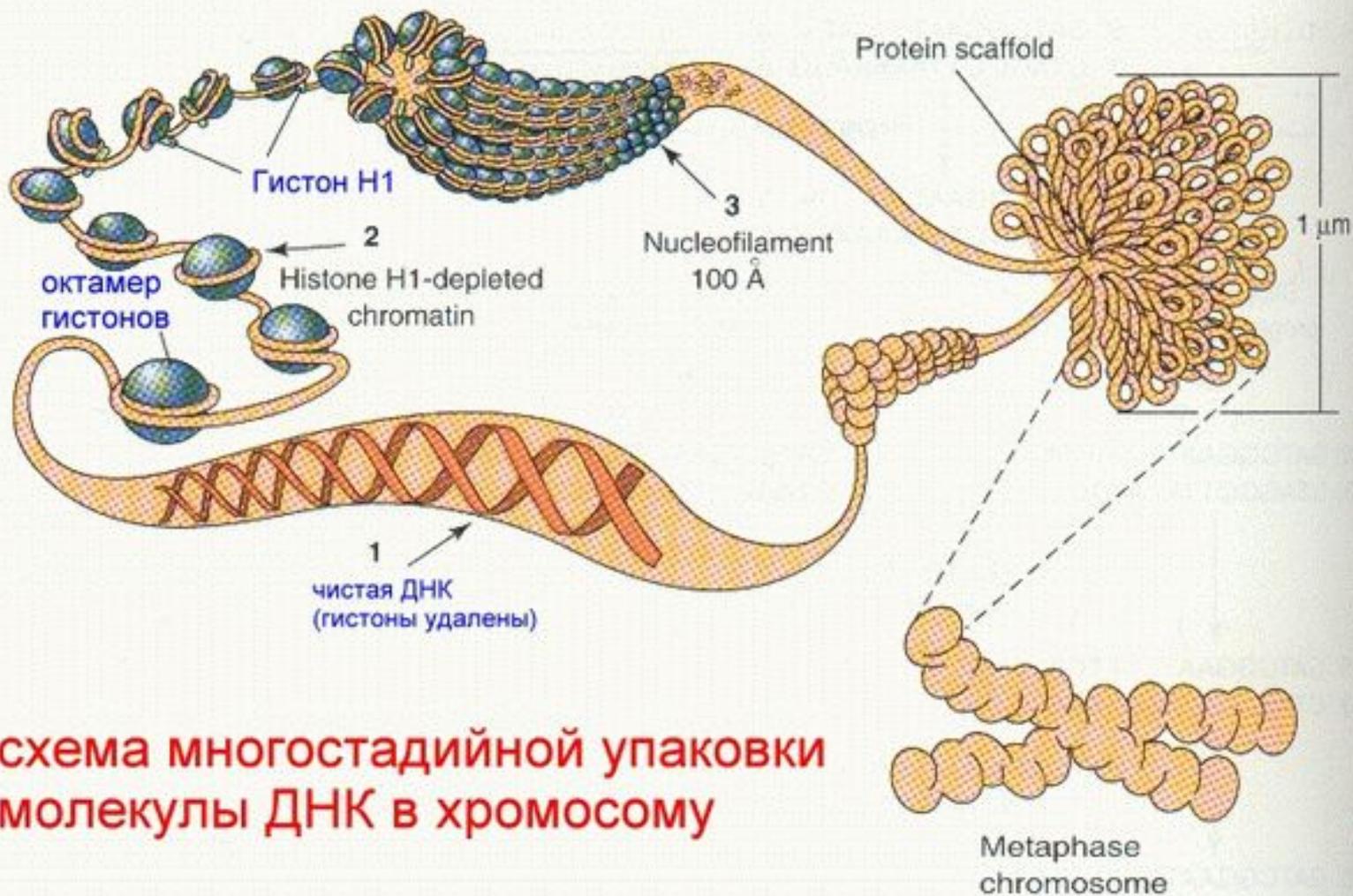


схема многостадийной упаковки молекулы ДНК в хромосому

Молекулярно-биологические методы диагностики

- ◆ Гибридизация ДНК
- ◆ Секвенирование ДНК
- ◆ Лигазная цепная реакция
- ◆ Полимеразная цепная реакция

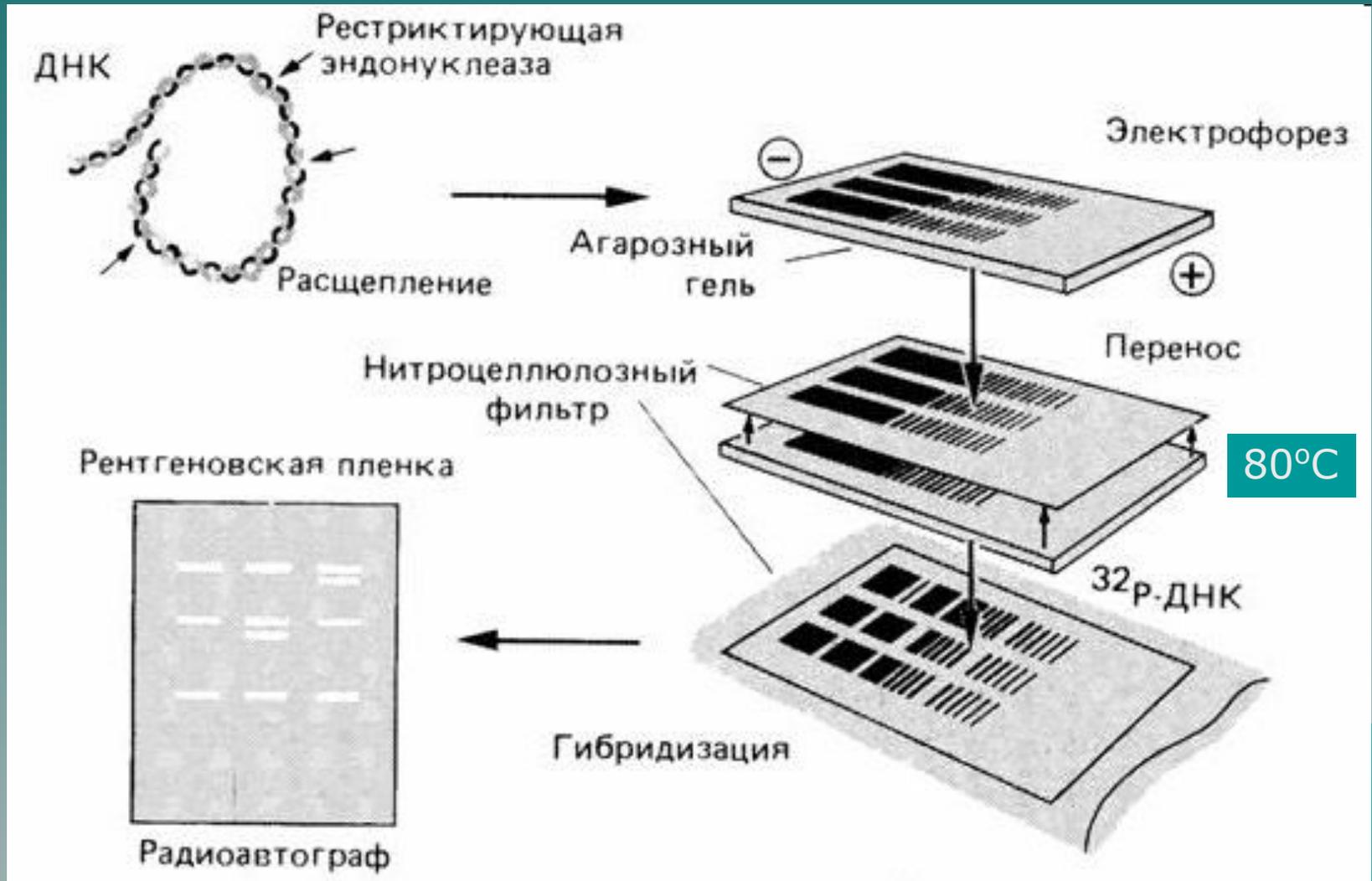
Гибридизация ДНК

Метод Эдварда М. Саузерна и Р. Дэйвиса 1975г.

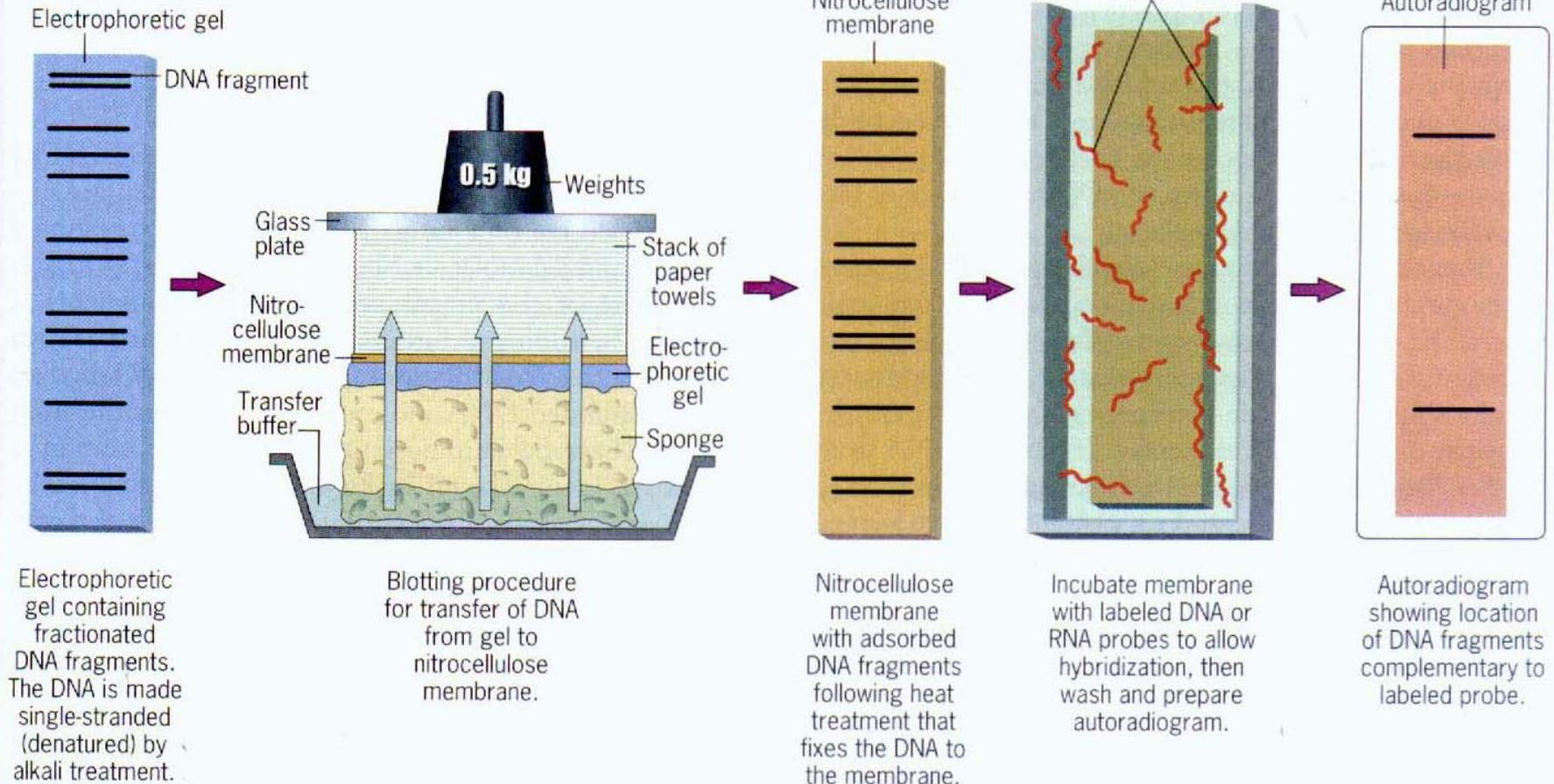
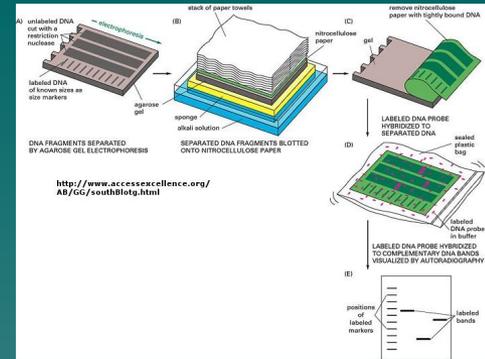
- ◆ Southern – южный блоттинг (ДНК)
- ◆ Northern – северный блоттинг (РНК)
- ◆ Western – западный блоттинг (белок)
- ◆ Eastern – вакантно (углеводы и липиды)

blotting – букв. "промокание"

Блоттинг ДНК по Саузерну (1975г)



Блоттинг ДНК по Саузерну



Использование метода гибридизации

- ◆ комплексная диагностика инфекционных заболеваний,
- ◆ наследственные дефекты,
- ◆ установления экспрессии тех или иных генов (в этом случае идет гибридизация с мРНК), то есть отслеживания нарушений обмена веществ.

- ◆ Недостаток – дорогостоящее оборудование.

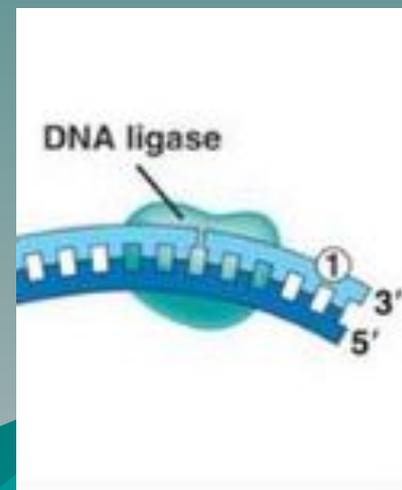
Секвенирование

- ◆ Метод расшифровки нуклеотидной последовательности нуклеиновых кислот (Секвенирование ДНК по Сэнгеру)
 - ◆ Метод расшифровки аминокислотной последовательности в белках
 - ◆ Для диагностики не используется
- 

Лигазная цепная реакция (ЛЦР, LCR - ligase chain reaction)

- ◆ В основе метода лежит способность специфического фермента ДНК-зависимой ДНК-лигазы сшивать (лигировать) цепь ДНК в присутствии АТФ и ионов Mg^{2+} при наличии разрыва фосфодиэфирной связи.
- ◆ Wu и Wallace в 1989г.

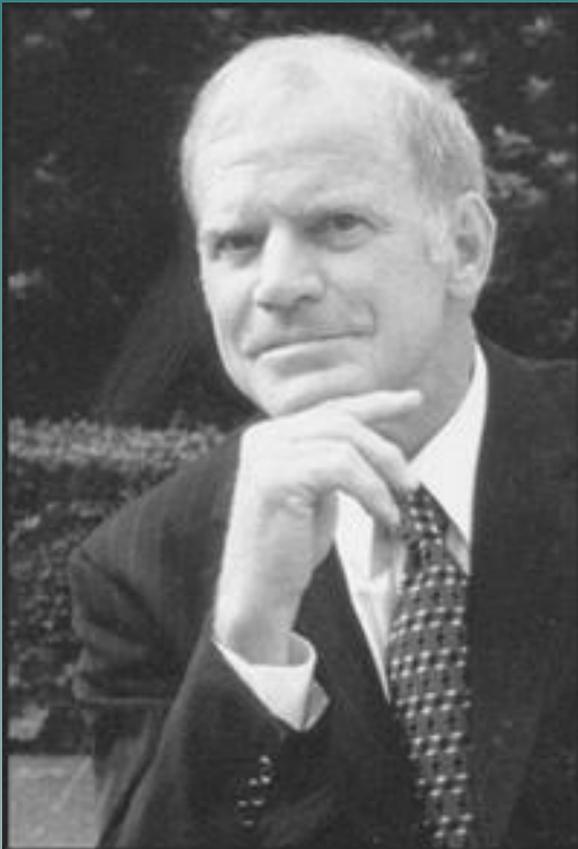
Метод позволяет выявить искомую ДНК в 85-90% случаев.



Использование

- ◆ Инфекции урогенитального тракта
 - ◆ *Chlamydia trachomatis*,
 - ◆ *Mycobacterium tuberculosis*
 - ◆ Различные вирусные инфекции
- 

Kary Mullis 1983г. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)



Kjell Kleppe в 1973г предложил амплификацию, как способ увеличения числа копий ДНК

1993г. – Нобелевская премия

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) в биологическом материале (пробе).

A stylized graphic of a mountain range in shades of teal and blue, located at the bottom right of the slide.

Направления генодиагностики (ПЦР):

- ◆ Медицинская диагностика (инфекционные заболевания, санитарно-показательные микроорганизмы в пищевых продуктах)
- ◆ Диагностика генетических и онкозаболеваний
- ◆ Судебная медицина и криминология (идентификация личности, установление отцовства)

ПЦР: компоненты реакции.

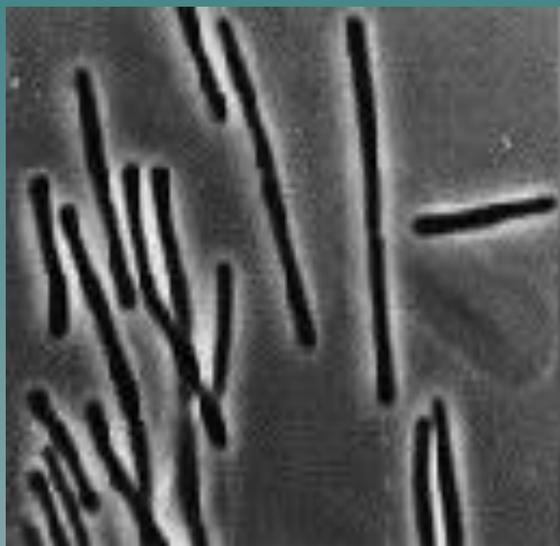
- ◆ **ДНК-матрица**, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать.
- ◆ **Два праймера**, комплементарные концам требуемого фрагмента.
- ◆ **Термостабильная ДНК-полимераза** — фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК. Полимераза для использования в ПЦР должна сохранять активность при высокой температуре длительное время, поэтому используют ферменты, выделенные из термофилов — *Thermus aquaticus* (Taq-полимераза), *Pyrococcus furiosus* (Pfu-полимераза), *Pyrococcus woesei* (Pwo-полимераза) и другие.
- ◆ **Дезоксинуклеотидтрифосфаты** (смесь четырех дНТФ, являющихся материалом для синтеза новых комплементарных цепей ДНК: dATP, dGTP, dCTP, dTTP).
- ◆ **Ионы Mg²⁺**, необходимые для работы полимеразы.
- ◆ **Буферный раствор**, обеспечивающий необходимые условия реакции — pH, ионную силу раствора. Содержит соли, бычий сывороточный альбумин.
- ◆ **Минеральное масло** – предохраняет от испарения и разбрызгивания.

ПЦР: компоненты реакции.



Размер праймеров – 18-30 оснований

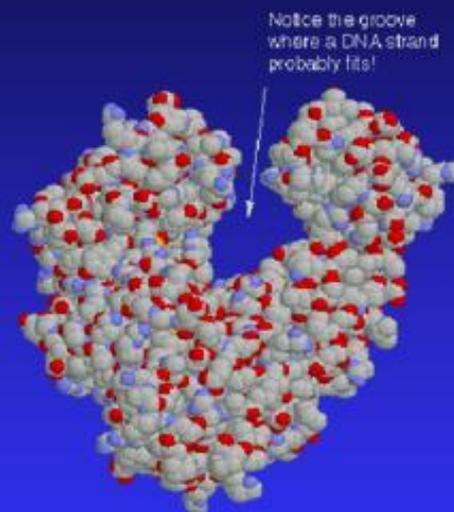
Открытие термостабильной ДНК-зависимой ДНК-полимеразы (Taq-полимеразы) из термофильных бактерий *Thermus aquaticus* 1989г.
Оптимальная температура 72-80°C



Скорость работы – 150 оснований в секунду

Ферменты

Taq-полимераза

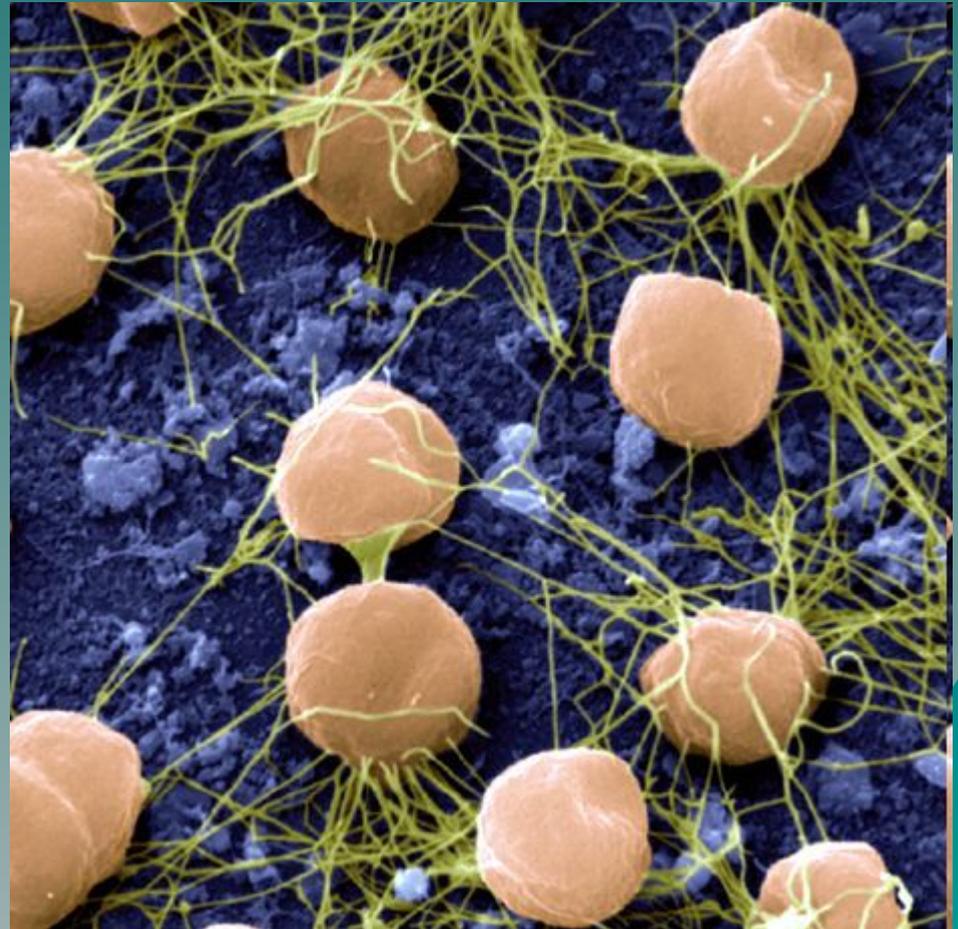
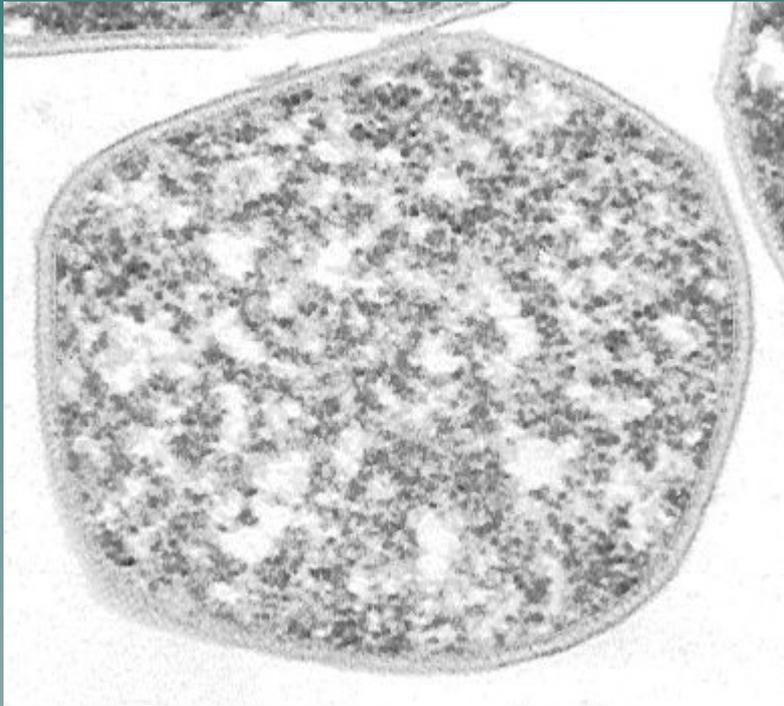


3-D модель *Taq*-полимеразы

“+” термостабильна

“-” не обладает 3'-5' экзонуклеазной активностью

Представитель домена архей - *Pyrococcus furiosus*. Анаэроб, обитает в термальных источниках с температурой воды 70°C. Источник Pfu-полимеразы.

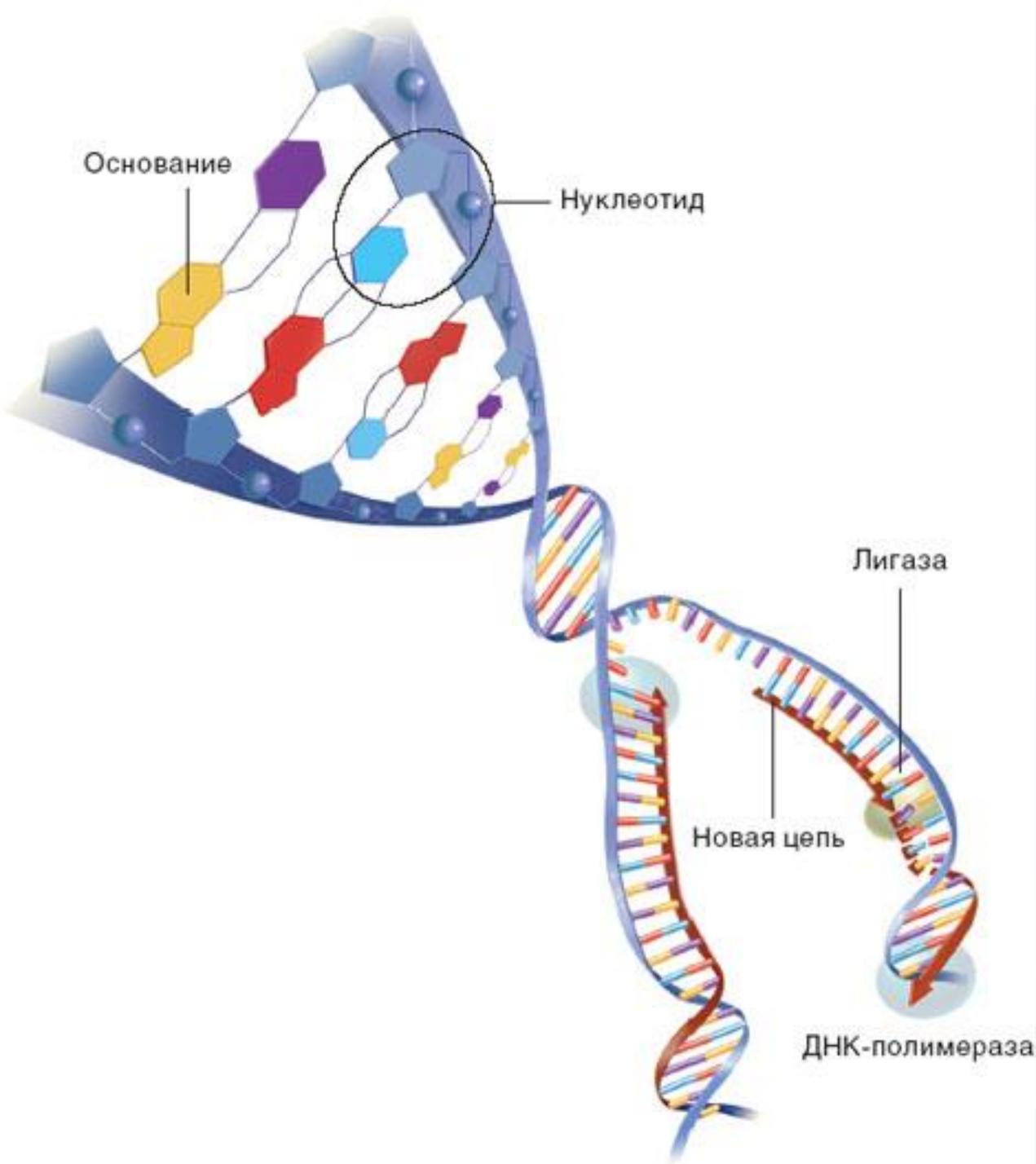


Представитель домена архей -
Pyrococcus woesei (Zillig 1988). Анаэроб,
обитает в термальных источниках с
температурой воды 90°C. Источник Рwo-
полимераза.

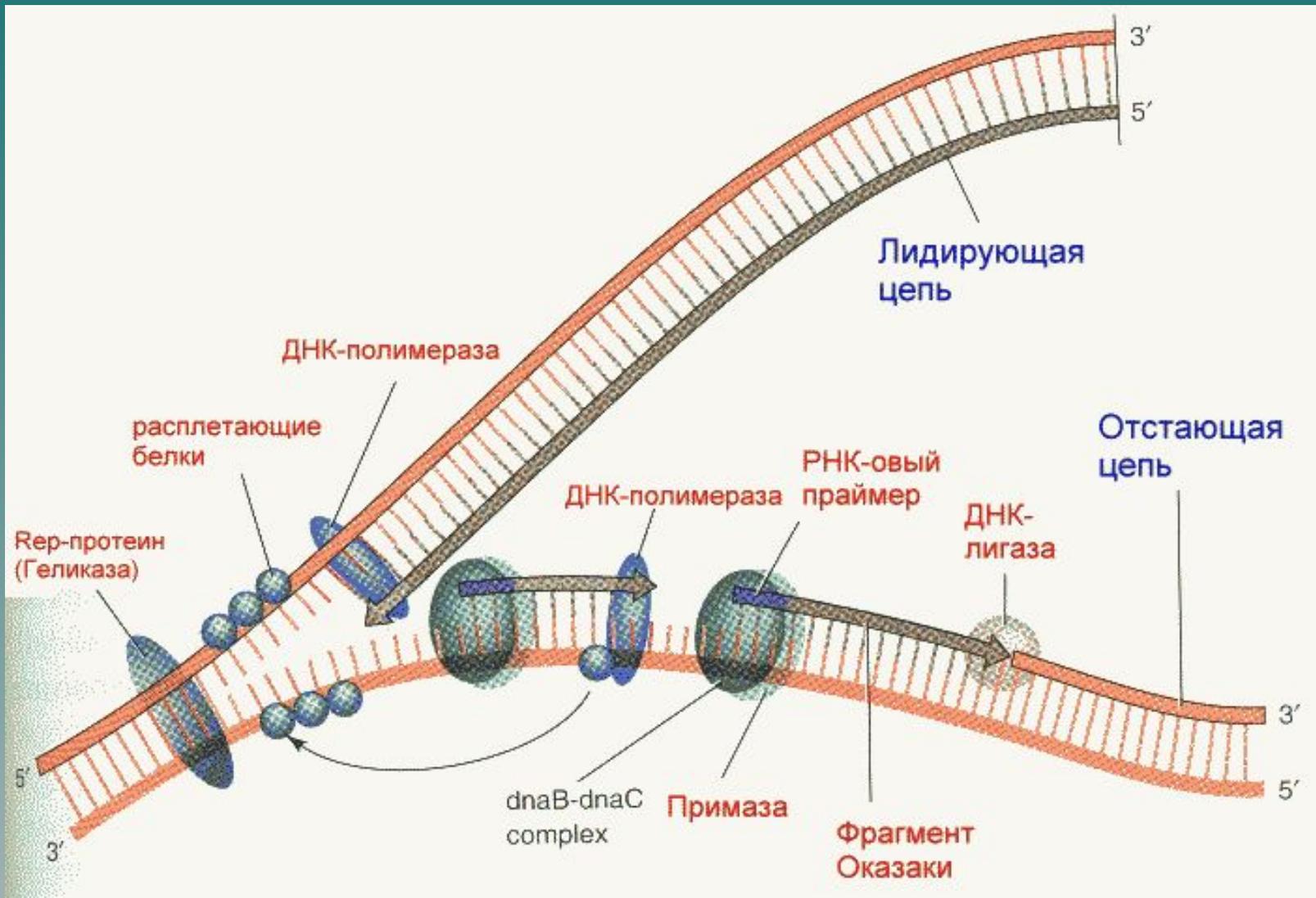


Некоторые характеристики ДНК-полимераз

Полимеразы	Время полужизни при 95°C (min)	Экзонуклеазная активность 5'-3' (+/-)	Экзонуклеазная активность 3'-5' (+/-)
Taq	40	+	-
Tth	20	+	-
Pfu	120	-	+
Pwo	120' при 100°C	-	+
Deep Vent	1300	-	+
Ultma	50	-	+
Vent	400	-	+



Транскрипция ДНК

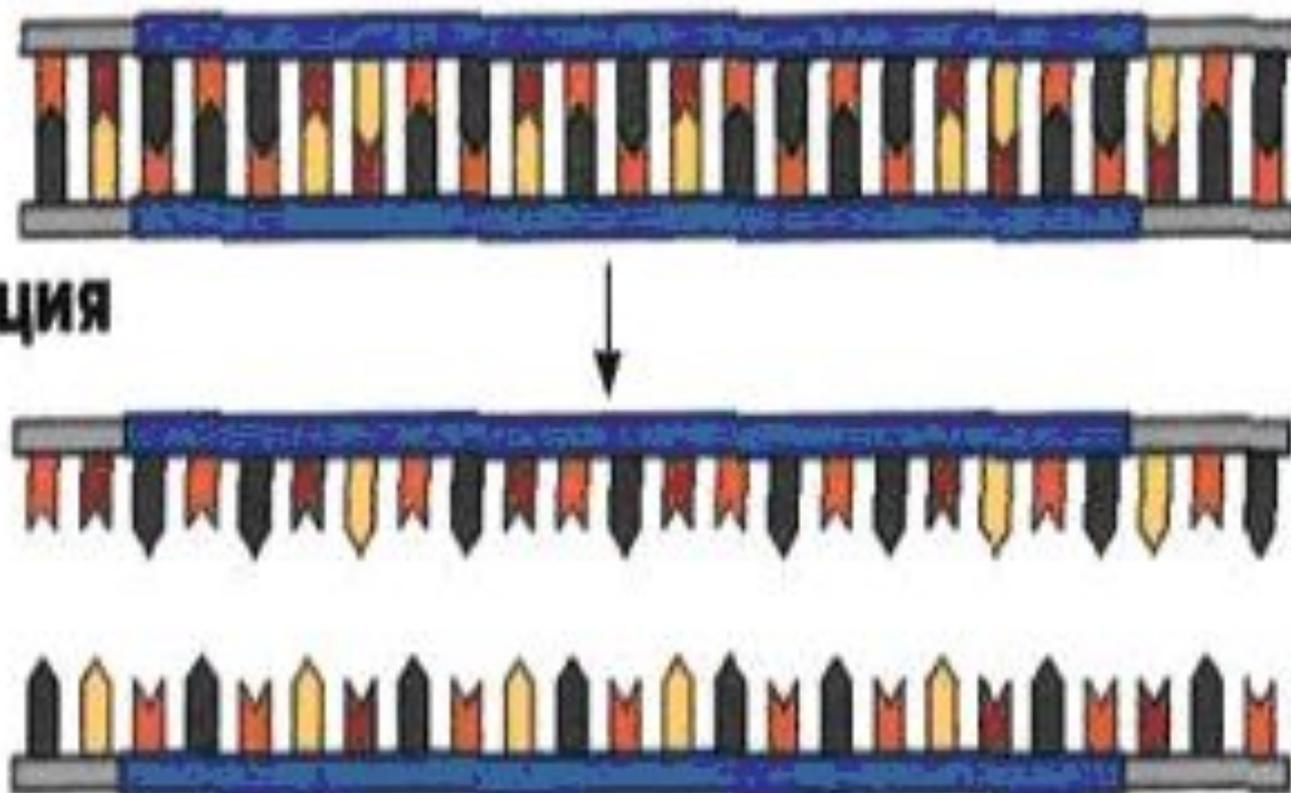


1-й этап реакции ПЦР (цикл амплификации)

1-ый цикл амплификации

1-ый этап
Денатурация
93-95°C

0,5 – 2 мин



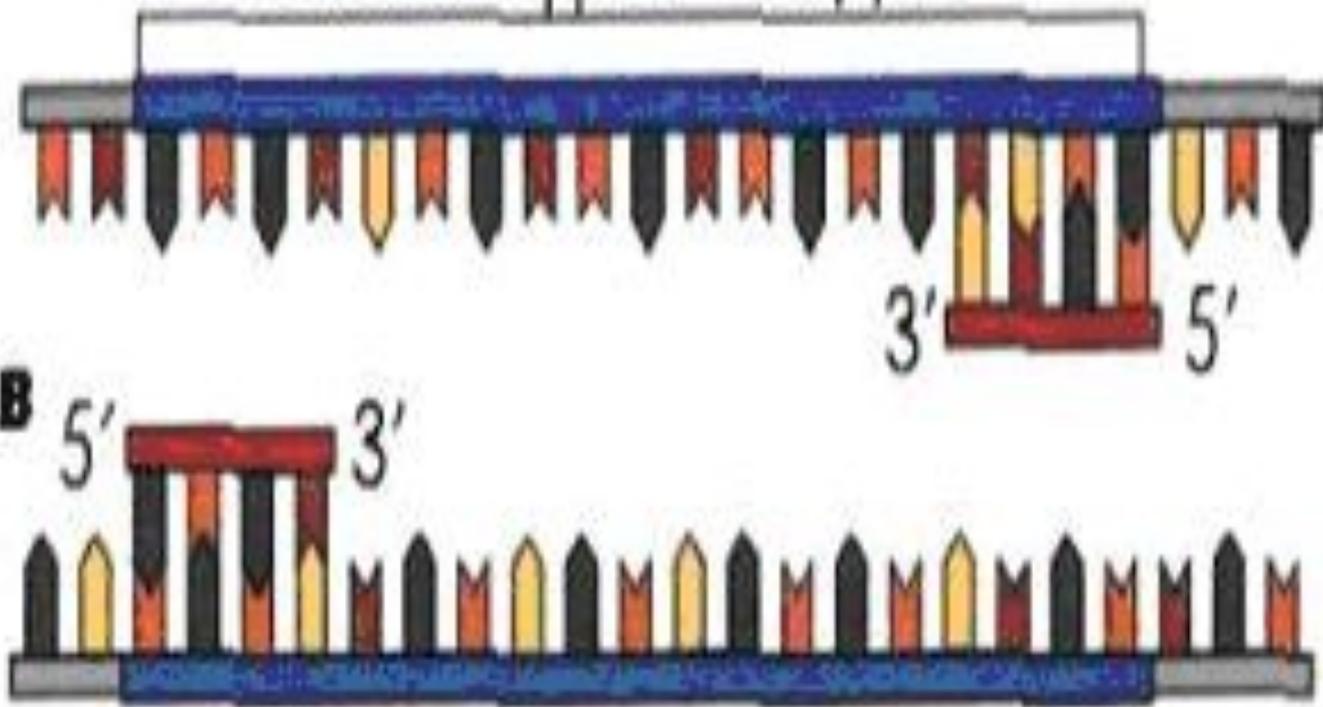
Искомый фрагмент ДНК

2-ый этап

Отжиг

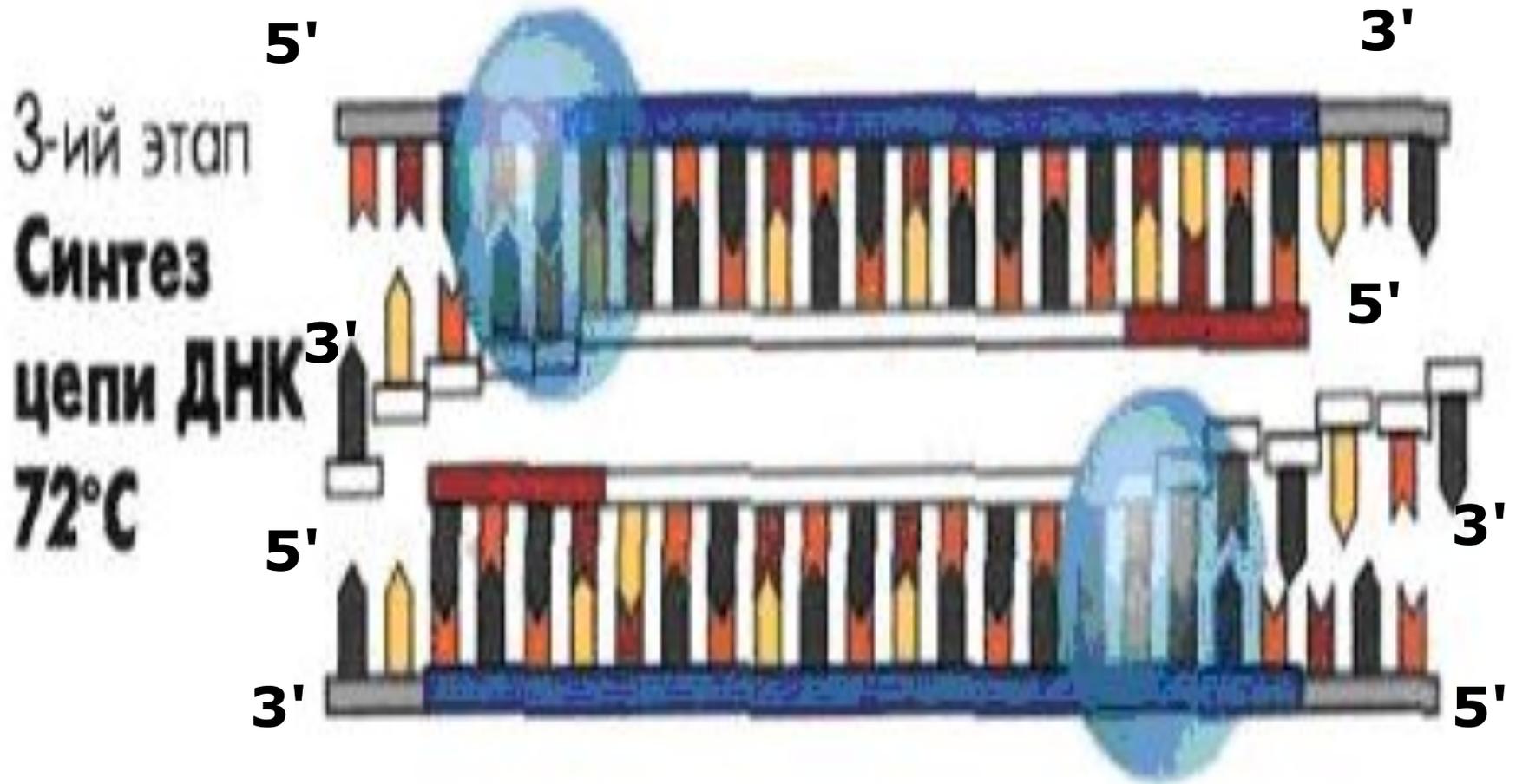
праймеров

50-65°C



0,5 – 2 мин

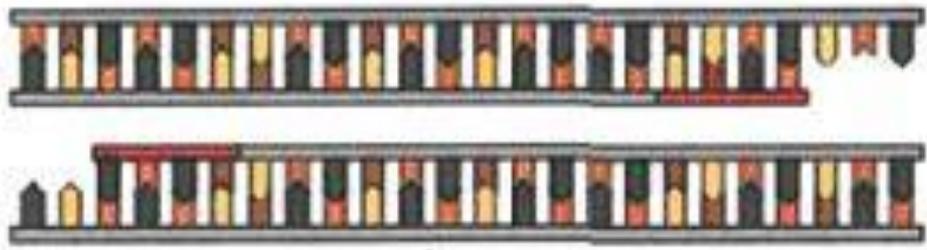
Размер цепи - 3000 пар оснований



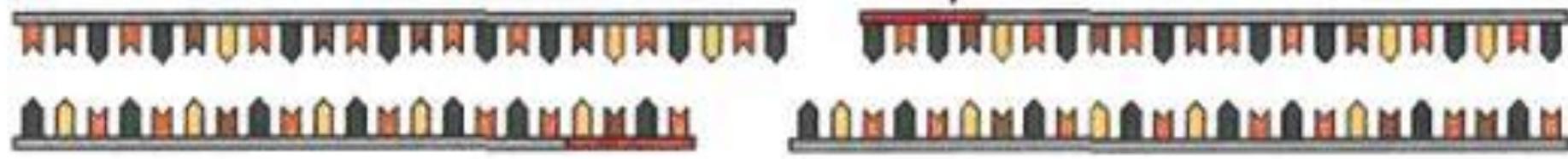
1 минута - 1000 пар оснований

2-ой цикл амплификации

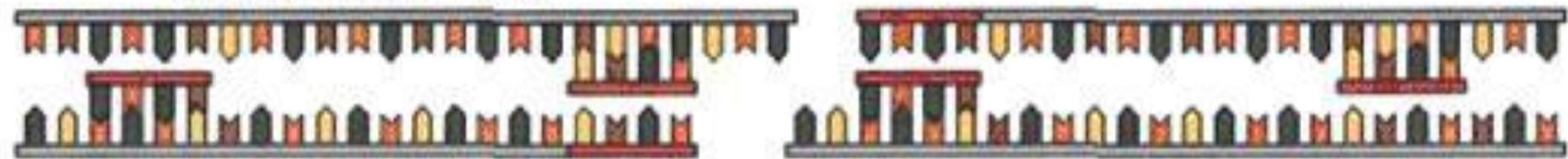
1-ый этап
Денатурация



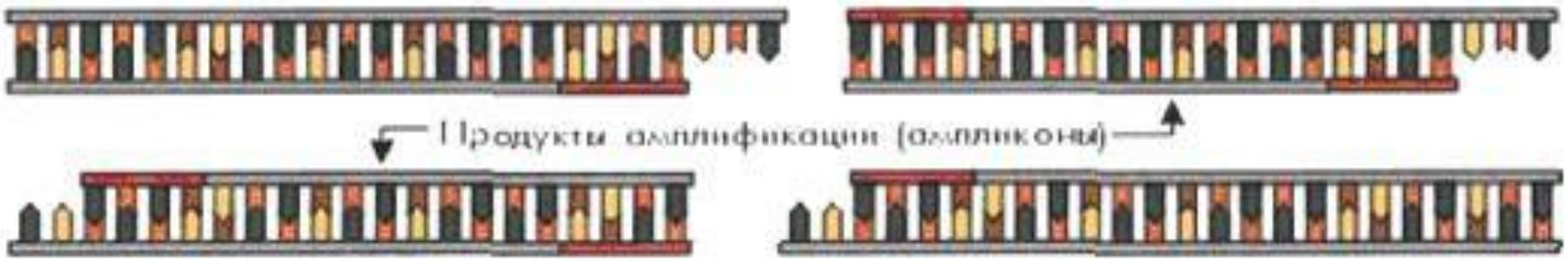
2-ый этап
Отжиг праймеров



3-ий этап
Синтез цепи ДНК

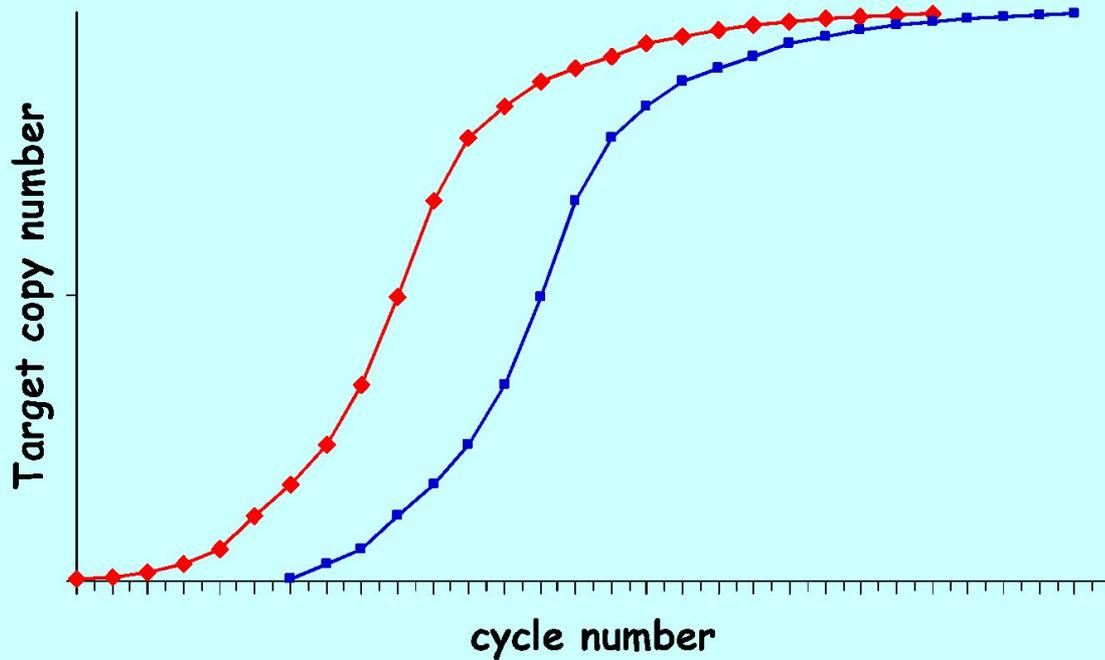


← Продукты амплификации (ампликоны) →



Геометрическая прогрессия нарастания числа амплификатов

PCR Amplification Curve



1 - 4
2 - 8
3 - 16
35 - $1,4 \times 10^{11}$



Приборы для проведения ПЦР Амплификатор



Настольная центрифуга (скорость 14 500 об/мин)



Термостат - предназначен для термостатирования микропробирок



Настольный ПЦР - бокс



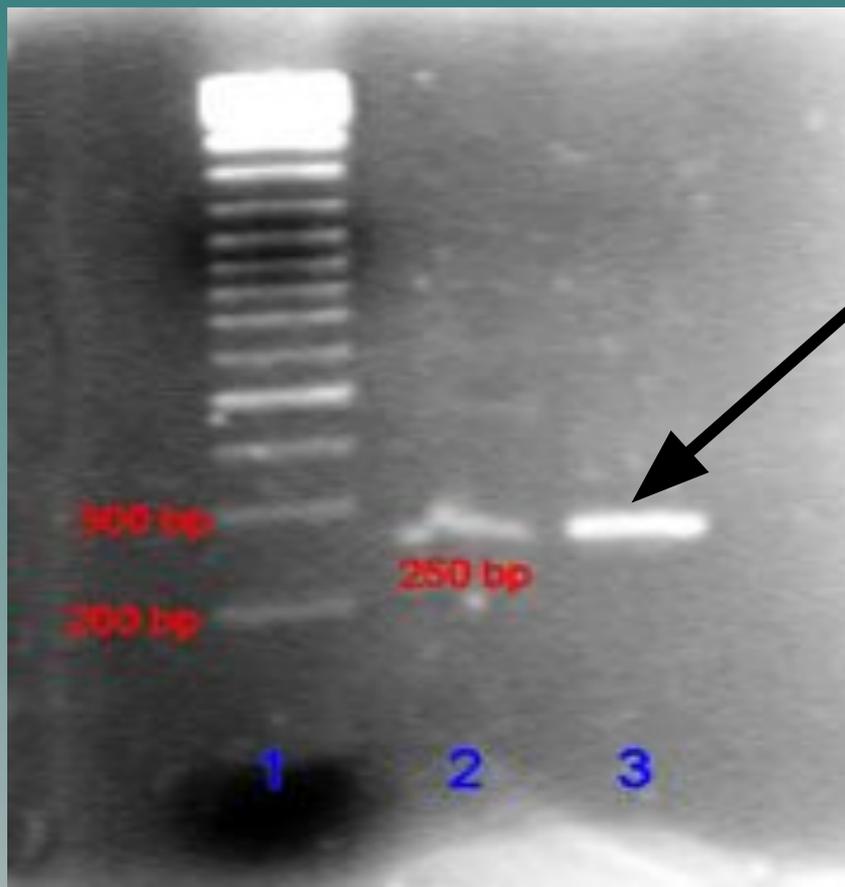
Камера для горизонтального электрофореза S-2N



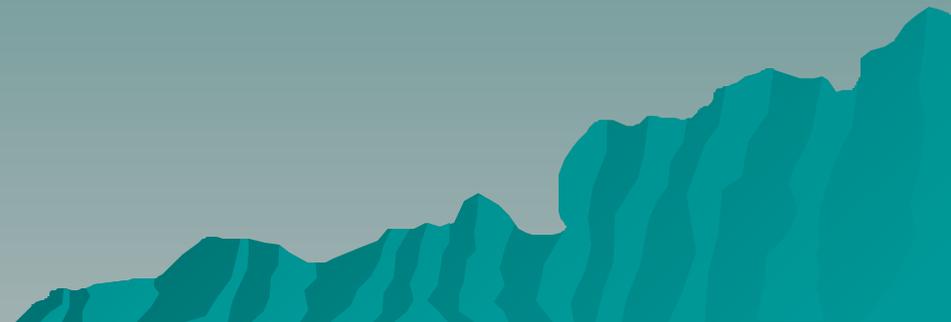
Флуориметр для детекции результатов ПЦР, позволяющий получить результат, не открывая пробирки, что значительно снижает риск контаминации



Фотография геля, содержащего маркерную ДНК (1) и продукты ПЦР-реакции (2,3). Цифрами показана длина фрагментов ДНК в парах нуклеотидов



Светящийся в УФ
лучах (290-330 нм)
бромистый
этидий



Ошибки, встречающиеся при проведении ПЦР-диагностики

- ◆ Контаминация пробы на стадии отбора материала
- ◆ Загрязнение пробы примесями, ингибирующими ПЦР
- ◆ Отбор материала выполнен неадекватно, в пробе отсутствуют клеточные структуры.
- ◆ Разрушение ДНК при транспортировке и хранении пробы
- ◆ Потери ДНК во время пробоподготовки
- ◆ Контаминация в отдельных пробах
- ◆ Тотальная контаминация

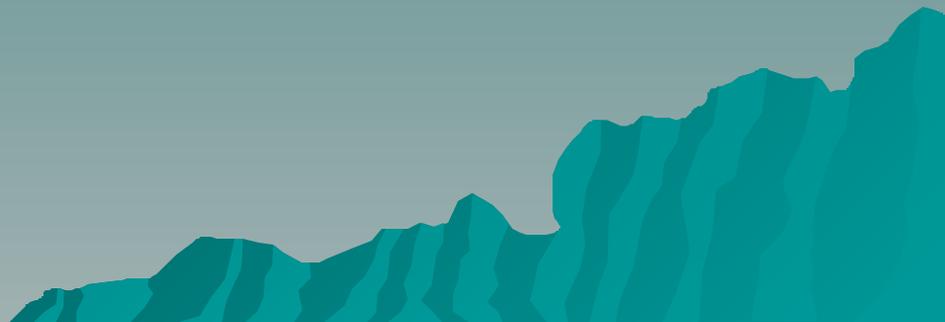
Достоинства ПЦР – анализа:

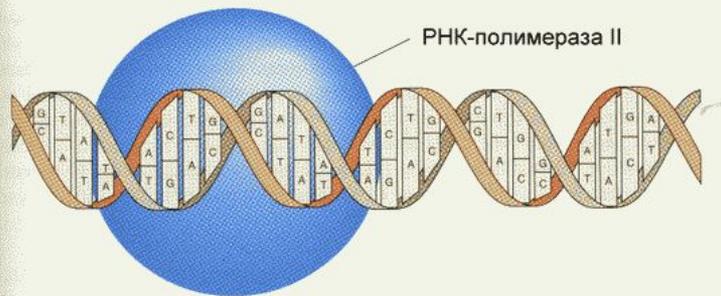
- ◆ Высокая скорость
- ◆ Высокая производительность
- ◆ Высокая чувствительность и специфичность
- ◆ Эффективность в отношении диагностики медленно растущих и некультивируемых микроорганизмов

Недостатки ПЦР – анализа:

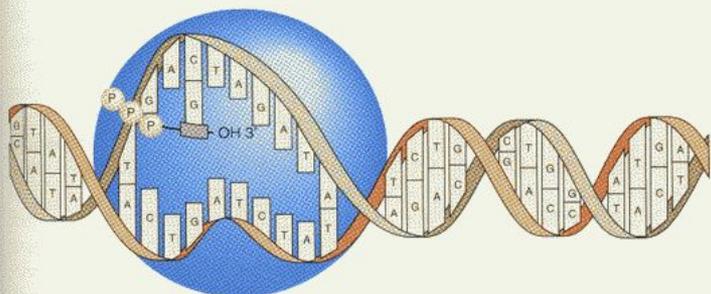
- ◆ Узкая направленность (нужно предполагать возбудителя).
- ◆ Проблема контаминации – строгий режим постановки.
- ◆ Наличие ингибиторов (гепарин при анализе крови).
- ◆ Не всегда подходит для контроля после лечения (Обнаруживают как живых, так и умерших м/о), не раньше, чем через 1 месяц.

Спасибо за внимание

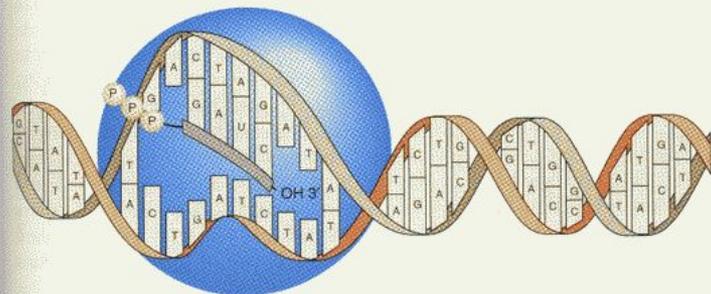




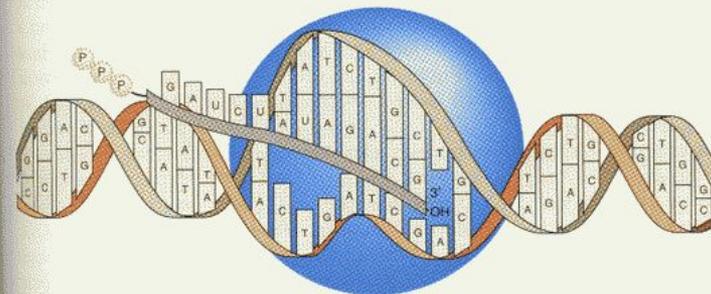
(a)



(b)



(c)



(d)

транскрипция

Молекула ДНК. Строение нуклеотида.

