

**МЗ РФ ВГМУ**

**2 высшее образование**

**«Молекулярно –**

**генетические методы**

**изучения генетики человека**

**Проф Каредина В.С.**

# Методы изучения генетики человека

- Клинико – генеалогический
- Близнецовый
- Популяционно – статистический
- Цитогенетический
- Метод генетики соматических клеток
- Биохимический метод
- Молекулярно – генетические
- Метод приемных детей
- Антропометрический
- Дерматоглифика

- Молекулярно – генетические методы.
- **Конечный итог молекулярно-генетических методов** — выявление изменений в определенных участках ДНК, гена или хромосомы. В их основе лежат современные методики работы с ДНК или РНК. В 70-80 гг. в связи с прогрессом в молекулярной генетике и успехами в изучении генома человека молекулярно-генетический подход нашел широкое применение.



.

**Начальным этапом** молекулярно-генетического анализа является получение образцов ДНК или РНК. Для этого используют геномную ДНК (вся ДНК клетки) или отдельные ее фрагменты. В последнем случае, чтобы получить достаточное количество таких фрагментов, необходимо, амплифицировать (размножить) их.

Для этого пользуются полимеразной цепной реакцией — быстрым методом ферментативной репликации определенного фрагмента ДНК. С его помощью можно амплифицировать любой участок ДНК, расположенный между двумя известными последовательностями.

- Анализировать огромные молекулы ДНК в том виде, в котором они существуют в клетке, невозможно. Поэтому прежде их необходимо разделить на части, обработать разнообразными рестриктазами — бактериальными эндонуклеазами. Эти ферменты способны разрезать двойную спираль ДНК, причем места разрыва строго специфичны для данного образца. Расщепление ДНК рестриктазами дает характерный набор фрагментов (4-6 пар оснований), отличающихся по длине.

- Фракционирование (т.е. разделение) фрагментов ДНК по размеру и длине проводится с помощью электрофореза на поверхности агарозного или полиакриламидного геля. Под действием электрического поля фрагменты ДНК начинают перемещаться вниз по гелю со скоростью, зависящей от их длины. (Чем короче фрагменты, тем быстрее они движутся). В результате каждый фрагмент ДНК занимает определенное положение в виде дискретной полосы в конкретном месте геля.

- Длину каждого фрагмента можно определить путем сравнения расстояния, пройденного им и стандартным (с известными размерами) отрезком ДНК.
- Молекулярно - генетическую диагностику наследственных болезней используют и для изучения генома человека. Чтобы выявить необходимые для этого специфические фрагменты ДНК, используют блот-гибридизацию по Саузерну. Сущность этой методики кратко состоит в следующем: сначала осуществляют денатурацию ДНК с образованием одноцепочечных фрагментов, которые переносят на нитроцеллюлезный или нейлоновый фильтр в буферном растворе.

- Молекулярно - генетическую диагностику наследственных болезней используют и для изучения генома человека. Чтобы выявить необходимые для этого специфические фрагменты ДНК, используют **блот-гибридизацию по Саузерну**.
- Сущность этой методики кратко состоит в следующем: сначала осуществляют денатурацию ДНК с образованием одноцепочечных фрагментов, которые переносят на нитроцеллюлезный или нейлоновый фильтр в буферном растворе.



- Агарозный гель с фрагментами ДНК помещают на фильтровальную бумагу, смоченную концентрированным солевым раствором. На гель накладывают нитроцеллюлезный фильтр, а сверху помещают сухую фильтровальную бумагу, в которую впитывается солевой раствор. ДНК переносится вместе с раствором, но задерживается фильтром и практически полностью оказывается на его поверхности. Затем одноцепочечные ДНК фиксируют на фильтре. Расположение фрагментов на фильтре точно соответствует их расположению в геле.

- Чтобы выявить нужные фрагменты, проводят гибридизацию ДНК с радиоактивным ДНК-зондом или клонированным фрагментом ДНК. Нуклеотидная последовательность зонда должна быть полностью или частично комплементарна изучаемому участку геномной ДНК.
- Результат гибридизации комплементарных цепей радиоактивного ДНК-зонда и фрагмента ДНК обнаруживают с помощью радиоавтографии: каждая комплементарная зонду последовательность ДНК проявляется в виде радиоактивной полосы.

- С помощью метода Саузерна можно составить рестрикционную карту генома в участке исследуемого гена и установить, несет ли данный ген какие-либо дефекты. Так, разработаны эффективные методы синтеза искусственных ДНК-зондов, которые используются в пренатальной диагностике наследственных заболеваний. Для этого из эмбриональных клеток, содержащихся в амниотической жидкости плода, выделяют ДНК и гибридизируют ее с помощью Саузерн-блоттинга с радиоактивным ДНК-зондом.

- Аномальный эмбрион легко распознается, т. к. его ДНК будет гибридизоваться только с ДНК-зондом, комплементарным мутантной последовательности.
- В настоящее время имеются различные методы выявления мутаций. Их делят на прямые и косвенные.
- **Прямая диагностика мутаций включает ряд методов:**
  - 1. Определение нуклеотидной последовательности (секвенирование), дающее возможность выявить замены оснований, делеции и вставки в изучаемом фрагменте

- 2. Выявление нарушения места рестрикции, с помощью блот-гибридизации по Саузерну. Около 50% нуклеотидных замен ведет к изменению сайта (места) рестрикции. Это делает возможным выявить мутацию путем рестриктного анализа.
- Проведение аллелоспецифической гибридации с синтетическими зондами, что позволяет обнаружить мутации в геномной ДНК. Последовательность оснований в зонде может быть задана по дефектному или нормальному варианту гена. В обоих случаях зонд используется для гибридации с фрагментами ДНК обследуемого индивида.

- Химическое и ферментативное расщепление ДНК в местах неправильной сшивки оснований выявляет большую группу мутаций, ведущих к нестабильности ДНК. Метод заключается в электрофорезе двух цепочечной ДНК в нейтральном или равномерно денатурирующем геле.
- Регистрация изменения электрофоретической подвижности мутантных молекул ДНК.

- Трансляция белкового продукта осуществляется в системе *in vitro* на основе получения специфической мРНК с добавлением лизата ретикулоцитов. Синтезируемый белок анализируют с помощью электрофореза. Изменение подвижности белка указывает на наличие мутации.

- **К косвенному выявлению мутаций прибегают** в тех случаях, когда нуклеотидная последовательность гена еще не расшифрована, но известно его положение на генетической карте. Технические приемы такие же, как и в прямой диагностике, но добавляется математический анализ.
- Диагностике мутаций способствует нахождение в геноме полиморфных по длине рестрикционных фрагментов. Их можно выявить с помощью блот-гибридизации по Саузерну.



- Другим типам полиморфизма ДНК являются микросателлиты. Это короткие моно-, ди-, три- и тетрануклеотидные тандемно повторяющиеся последовательности ДНК. Они используются в качестве маркерных локусов аллельных вариантов гена или маркеров дефектных мутаций..

- В 1993 г. был идентифицирован ген, ответственный за возникновение тяжелого заболевания нервной системы у человека — хореи Гентингтона (ХГ). Болезнь, проявляющаяся после 40 лет, выражается в расстройстве движений, снижении интеллекта, в нарушении эмоционально-волевой сферы и др. Этот недуг наследуется по аутосомно-доминантному типу со 100 % пенетрантностью. Ген локализован в коротком плече 4-й хромосомы.

- Оказалось, что ген ХГ содержит область, в которой нуклеотидная последовательность представлена многократным повторением трех нуклеотидов — ЦАГ (цитозин-аденин-гуанин) геномной ДНК. В норме количество таких повторов колеблется от 11 до 34, а у больных ХГ их 37-86 (в среднем 45). И, следовательно, хорейя Гентингтона относится к наследственным заболеваниям, при котором мутация гена состоит в экспансии (многократном увеличении числа копий) тринуклеотидных ЦАГ-повторов.

- Установлено, что форма болезни более тяжелая, если ХГ проявляется в молодом возрасте, наследуется по отцовской линии и нарастает в последующих поколениях. Ученые пришли к выводу, что число ЦАГ-повторов тесно связано и со сроком появления первых симптомов, и с тяжестью заболевания. В 1992 г. экспансия тринуклеотидных ЦТГ-повторов была обнаружена в гене, который вызывает миотоническую дистрофию. Этот ген, названный ДМ-1, был картирован на 19-й хромосоме.

- Длина последовательности ЦТГ- повторов весьма различна. Если в нормальной популяции она колеблется от 5 до 30, то у больных миотонической дистрофией, количество повторов может достигать многих сотен.
- Болезнь наследуется по аутосомно-доминантному типу, обычно начинается в зрелом возрасте и проявляется прогрессирующей мышечной слабостью, а в некоторых случаях задержкой умственного развития, поражением скелета, сердечнососудистой системы и глаз.

- Для миотонической дистрофии характерно возрастание тяжести болезни на протяжении трех или четырех поколений. Если в первом поколении болезнь возникает в зрелом возрасте и проявляется лишь развитием катаракты или легким нарушением сократимости мышц, то в последующих поколениях болезнь начинается сразу после рождения ребенка, у которого развивается выраженная мышечная слабость, задержка умственного развития.

- В последние годы было показано, что подобный механизм мутаций характерен и для ряда других наследственных заболеваний нервной системы человека: болезни Кеннеди, синдрома фрагильной (ломкой) X-хромосомы и др.