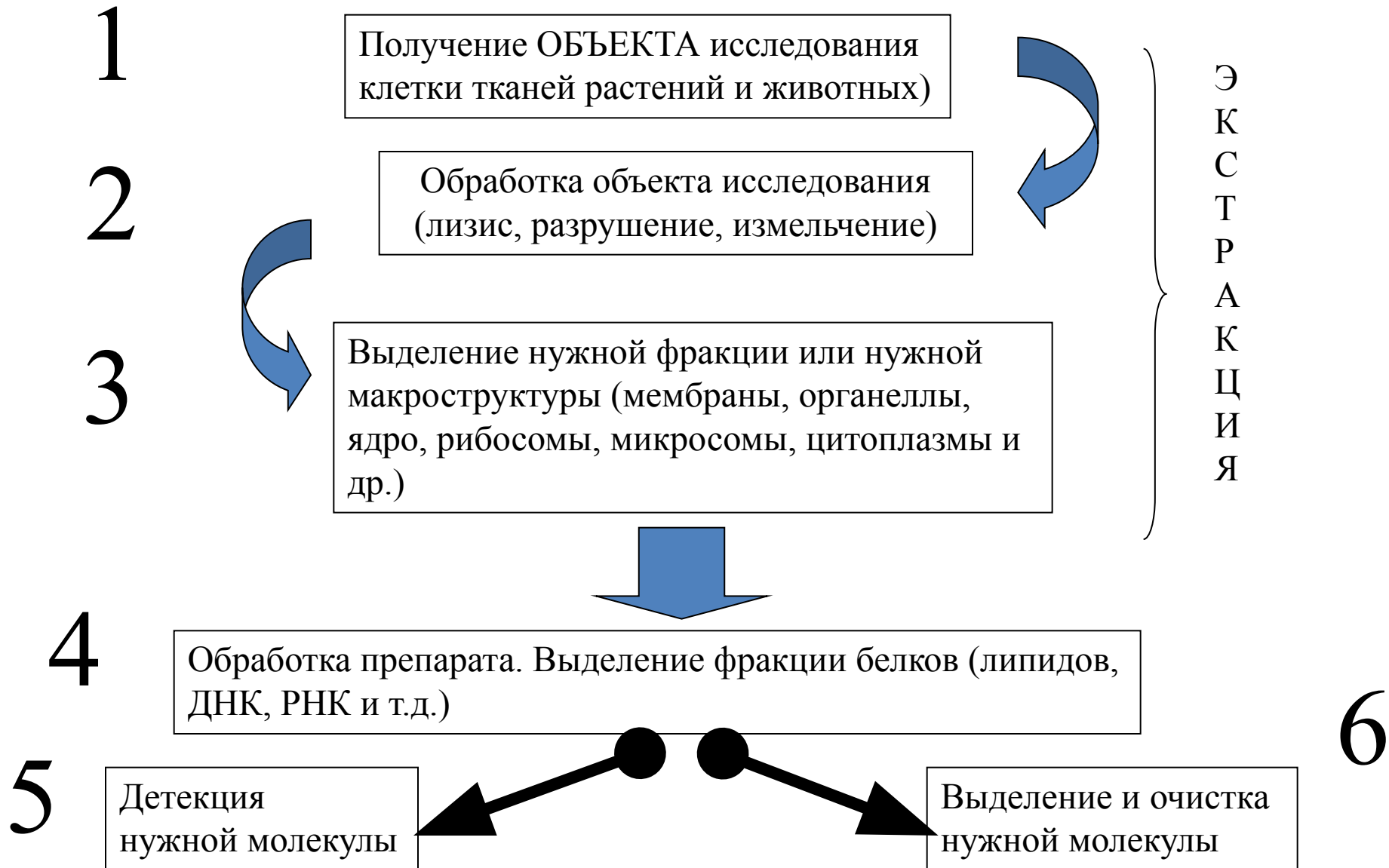


# ГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ

Выделение ДНК  
Секвенирование ДНК  
Изучение генома  
Геномный анализ

# ОБЩАЯ СТРАТЕГИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МАКРОМОЛЕКУЛ



# Геномный анализ

- Геномный анализ — это один из цитогенетических методов исследования, изучающий число геномов в данном генотипе и количество хромосом в каждом геноме; используется в медицинской генетике при диагностике наследственных болезней.



# Методы выделения и очистки геномной ДНК

## Методы выделения

Для выделения нуклеиновых кислот из биологических материалов необходимо провести лизис клеток, инактивацию клеточных нуклеаз и отделение искомым нуклеиновых кислот от клеточной массы. Часто идеальная процедура лизиса является компромиссом нескольких методик; она должна быть достаточно жесткой, чтобы разрушить структуры сложного исходного материала (например, тканей), и при этом достаточно деликатной, чтобы оставить в неприкосновенности целевые нуклеиновые кислоты. Обычная процедура лизиса включает:

- Механическое разрушение (например, измельчение, гипотонический лизис)
- Химическую обработку (например, лизис с помощью детергентов, хаотропных агентов, или тиоловое восстановление)
- Ферментативное расщепление белков (например, с помощью протеиназы К)

Процессы разрушения клеточных мембран и инактивации внутриклеточных нуклеаз могут быть совмещены. Например, один раствор может содержать детергенты для растворения клеточной мембраны и хаотропные соли для инактивации внутриклеточных ферментов. После лизиса клеток и инактивации нуклеаз, клеточная масса может быть легко удалена с помощью фильтрации или осаждения.

# Выделение и очистка ДНК

Основная цель этапов выделения ДНК - последовательная очистка ДНК от контаминирующего материала т.к. РНК и белков.

- Этапы:**
1. Гомогенизация ткани и изолирование ядерной ДНК. Экстрагирование ДНК из ядра проводят с помощью буферного солевого раствора, содержащего детергент SDS, который способствует лизированию ядра. Детергент также ингибирует активность нуклеаз во время экстрагирования.
  2. Депротеинизация фенолом или смесью Фенол:хлороформ. Фенол активизирует денатурацию белков вследствие утраты солюбиливной способности (растворимости) и выпадения в осадок (преципитат) из раствора, содержащего фенол+буферный солевой раствор. (Смесь перемешивают и центрифугируют для отделения осажденных белков от фракции НК. Надосадочную жидкость отбирают и повторяют цикл перемешивания с фенолом и центрифугированием до полного осаждения белков)
  3. Преципитация НК охлажденным этанолом. Холодный этанол приводит к расслоению жидкого раствора (ДНК будет содержаться в верхней части раствора НК-т). Фракцию ДНК отбирают на границе раздела фаз между этанолом и физраствором. РНК остается на дне микропробирки.
  4. Редиссолюция (растворение) ДНК и обработка рибонуклеазой для удаления контаминирующей РНК. (для полной очистки от остатков белков также можно использовать протеазу).

При выделении РНК на финальном этапе вместо рибонуклеазы используют ДНазу (дезоксирибонуклеазу). В более упрощенной схеме выделения РНК – ткань гомогенизируют в растворе, содержащем 4М гуанидин тиоционат. РНК экстракт смешивают с фенолом и хлороформом (или бром-хлор-пропаном) при встряхивании, затем смесь центрифугируют. РНК отбирают из надосадочной жидкости (ДНК и белки находятся на границе раздела двух фаз)



## **Выделение с использованием СТАВ и методы очистки**

Методика с использованием СТАВ - бромистого цетилтриметиламмония (cetyltrimethylammonium bromide), впервые разработанная Мюррээем и Томпсоном в 1980 г. (Murray and Thompson, 1980), была впоследствии опубликована Вагнером и сотрудниками (Wagner et al., 1987). Этот метод хорошо подходит для выделения и очистки ДНК из растений и пищевых продуктов растительного происхождения; и особенно удобен для удаления полисахаридов и полифенольных соединений, которые отрицательно влияют на чистоту ДНК и, следовательно, на ее качество. Эта процедура широко применяется в молекулярной генетике растений; и уже была испытана в специальных опытах, для проверки возможности ее утверждения в качестве методики для выявления ГМО (Lipp et al., 1999, 2001). Разработано несколько вариантов с целью адаптации данной методики к широкому спектру исходного материала пищевых продуктов, как не переработанных, так и подвергшихся переработке (Hupfer et al., 1998; Hotzel et al., 1999; Meyer et al., 1997; Poms et al., 2001).

## **Принципы метода с использованием СТАВ: лизис, выделение и осаждение**

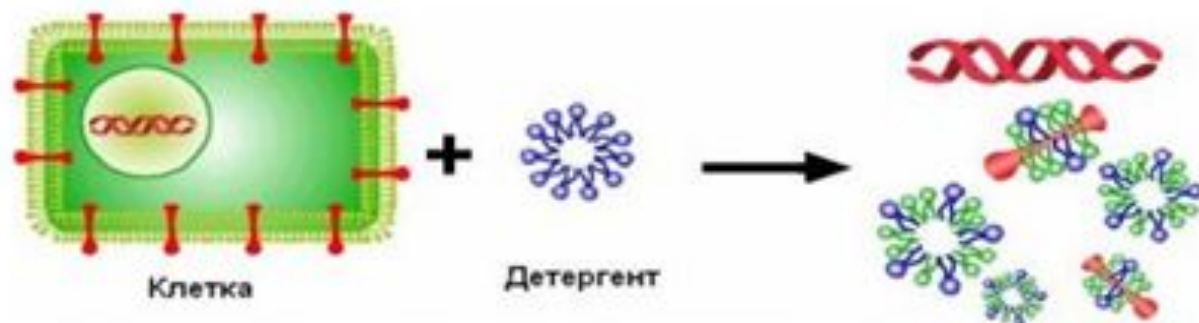
Растительные клетки могут быть лизированы с помощью ионного детергента СТАВ - бромистого цетилтриметиламмония (cetyltrimethylammonium bromide), который образует нерастворимый комплекс с нуклеиновыми кислотами в слабо-солевой среде. При этих условиях полисахариды, фенольные соединения и другие примеси остаются в супернатанте и могут быть слиты. ДНК комплекс растворяют путем повышения концентрации солей, и осаждают этанолом или изопропанолом. В данном разделе будут описаны принципы трех основных этапов – лизиса клеточной мембраны, выделения геномной ДНК и ее осаждения.

**Лизис клеточной мембраны.** Как уже упоминалось, первым этапом выделения ДНК является разрушение клеточных и ядерных стенок. Для этих целей, гомогенизированный образец обрабатывают сначала буфером для экстракции, содержащим EDTA, Tris/HCl и СТАВ. Все биологические мембраны имеют в целом одинаковую структуру, включающую липидные и белковые молекулы, которые удерживаются вместе под действием нековалентных связей.



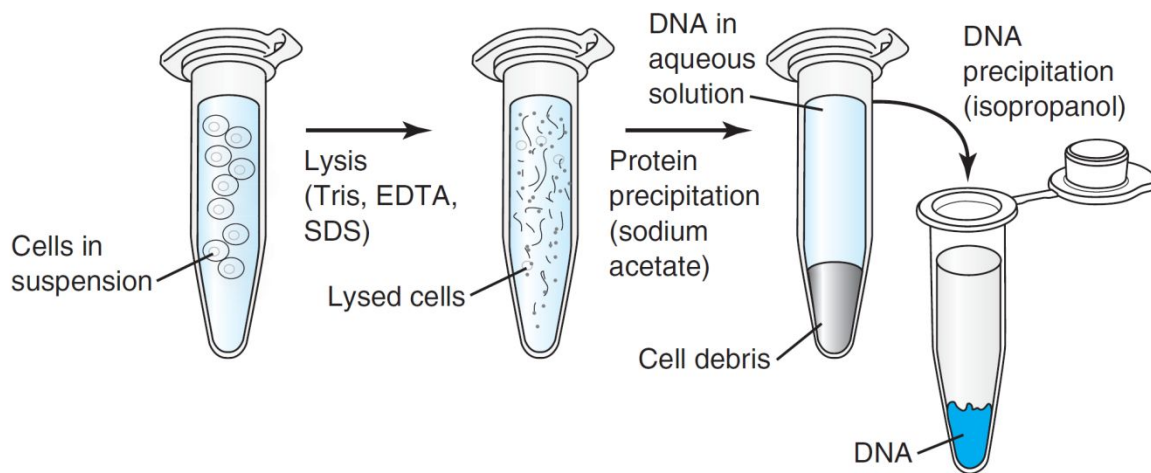
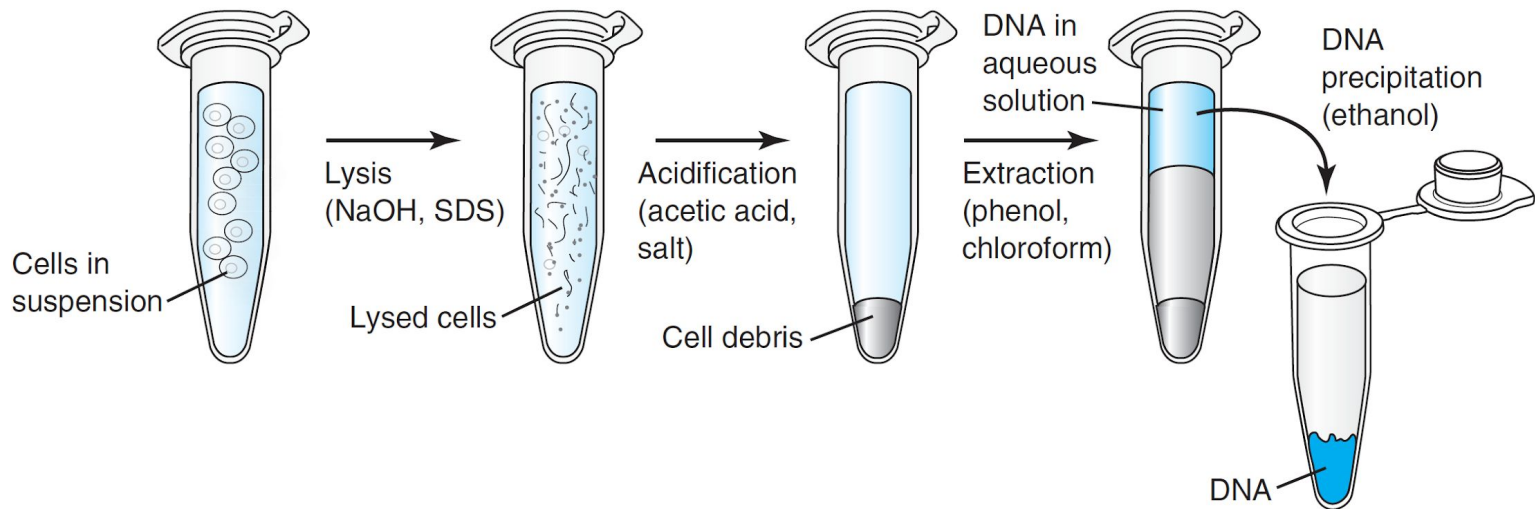
Рисунок 3 иллюстрирует, каким образом при взаимодействии клеточных мембран с буфером для экстракции, содержащим СТАВ, детергент захватывает липиды и белки, освобождая геномную ДНК. При определенной концентрации соли (NaCl) детергент

образует нерастворимый комплекс с нуклеиновыми кислотами. EDTA является хелатным агентом, который, наряду с другими металлами, способен связывать магний. Магний является кофактором фермента ДНКазы. При связывании магния с EDTA снижается активность имеющихся ДНКаз. Tris/HCl придает раствору способность поддерживать pH (в связи с тем, что и низкие, и высокие значения pH повреждают ДНК). Важно отметить, что вследствие того, что нуклеиновые кислоты могут легко разрушаться на стадии очистки, время между гомогенизацией пробы растительного материала и добавлением СТАВ-содержащего буферного раствора должно быть минимизировано. После того, как мембраны клеток и органелл (таких как митохондрии и хлоропласты) будут разрушены, можно осуществлять очистку ДНК.





**Выделение.** На этом этапе полисахариды, фенольные соединения, белки и другие компоненты клеточного лизата, находящиеся в водном растворе, отделяются от СТАВ-комплекса нуклеиновых кислот. Удаление полисахаридов, а также фенольных соединений особенно важно из-за их способности ингибировать значительное количество ферментативных реакций. При низкой концентрации соли ( $< 0.5 \text{ M NaCl}$ ) примеси из комплекса нуклеиновых кислот не осаждаются и могут быть удалены из водного раствора экстракцией хлороформом. Хлороформ денатурирует белки и облегчает разделение водной и органической фаз. Обычно водная фаза формирует верхнюю фазу. Однако, если водная фаза обладает значительной плотностью вследствие высокой концентрации солей ( $> 0.5 \text{ M}$ ), она может образовывать нижнюю фазу. В дополнение, нуклеиновые кислоты могут иметь тенденцию к перераспределению в органическую фазу, если pH водного раствора не был надежно доведен до значений pH 7.8 – 8.0. Если необходимо, экстракция хлороформом повторяется два или три раза для того, чтобы полностью удалить загрязнения водного слоя. Чтобы добиться наилучшего выхода нуклеиновых кислот, органическую фазу можно повторно экстрагировать водным раствором, который затем можно добавить к первому экстракту. Когда комплекс нуклеиновых кислот очищен, можно проводить заключительную стадию всей процедуры – осаждение.





**Осаждение.** На заключительном этапе нуклеиновые кислоты освобождают от детергента. Для этой цели водный раствор сначала обрабатывают раствором для осаждения, представляющим собой смесь СТАВ с NaCl в высокой концентрации ( $> 0.8$  M NaCl). Соль необходима для образования осадка нуклеиновых кислот. Ацетат натрия может быть предпочтительнее, чем NaCl, из-за его буферных свойств. При этих условиях детергент, который лучше растворяется в спирте, чем в воде, может быть отмыт, в то время как нуклеиновые кислоты осядут. Последовательная обработка 70% этанолом позволяет провести дополнительную очистку, или отмывку нуклеиновых кислот от остатка соли.

## **Методы очистки**

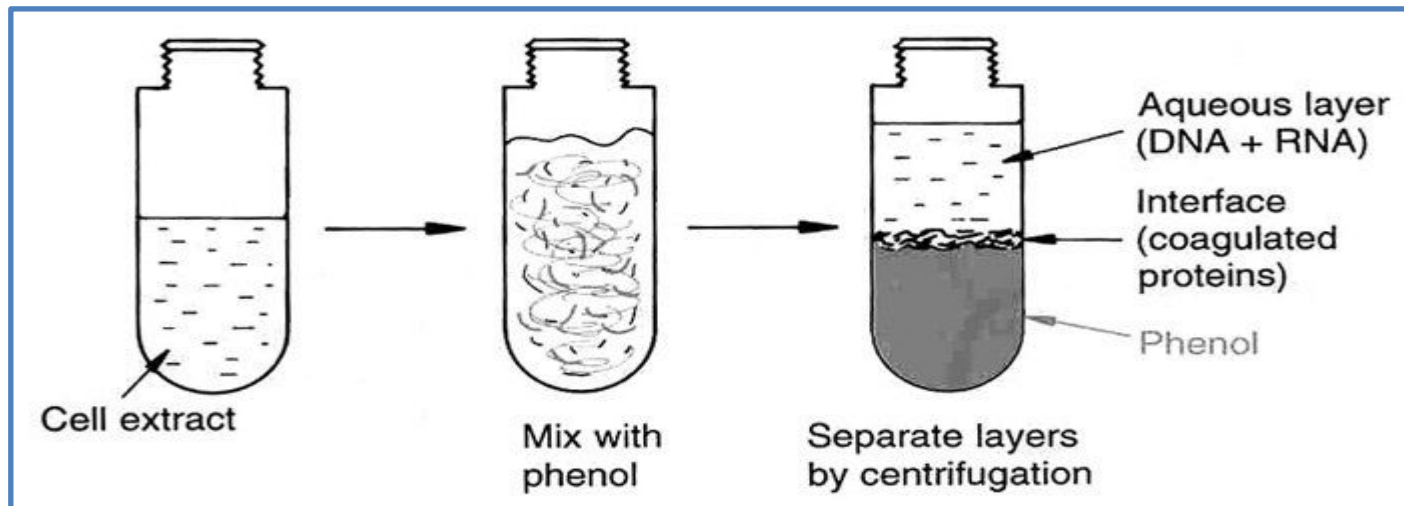
Методики очистки нуклеиновых кислот из клеточных экстрактов обычно являются комбинацией двух или более из следующих методов:

- выделение/осаждение
- хроматография
- центрифугирование
- аффинное разделение



## Выделение/осаждение

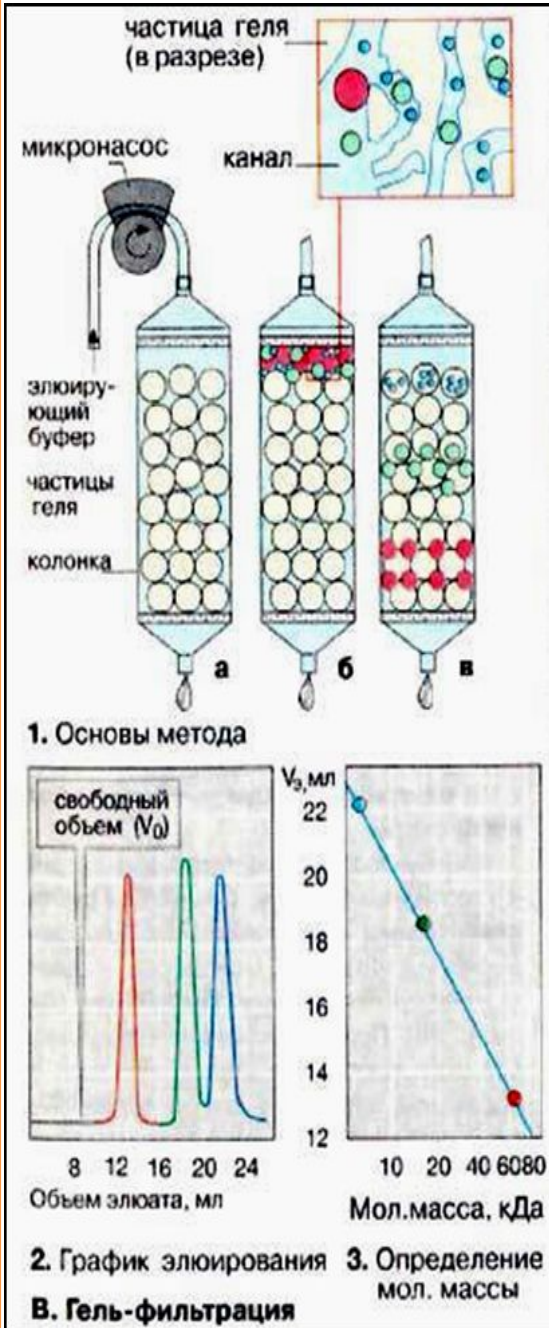
Экстракция растворителями часто используется для удаления примесей из нуклеиновых кислот. Например, комбинация растворителей: фенол - хлороформ часто используется для удаления белков. Осаждение изопропанолом, или этанолом обычно применяется для концентрирования нуклеиновых кислот. Если содержание целевых нуклеиновых кислот небольшое, к смеси может быть добавлен инертный носитель (такой как гликоген) для того, чтобы увеличить эффективность преципитации. Другие методы осаждения нуклеиновых кислот включают селективную преципитацию с использованием высоких концентраций солей («высаливание»), либо осаждение белков с использованием переменного pH.





# Хроматография

Хроматографические методики могут использовать различные технологии разделения, такие как гель-фильтрация, ионообменная хроматография, селективная адсорбция, либо аффинное связывание. Гель-фильтрация использует свойство молекулярного сита, которым обладают пористые частицы геля. Матрикс с определенным размером пор позволяет молекулам меньшего размера проникать в поры под действием диффузии, в то время как молекулы большего размера минуют поры и элюируются в свободном объеме. Таким образом, молекулы элюируются в порядке уменьшения их размера. Ионообменная хроматография, - еще один метод, который использует электростатическое взаимодействие между целевыми молекулами и функциональными группами носителя в хроматографической колонке. Нуклеиновые кислоты (имеющие высокий отрицательный заряд, линейные полианионы) могут быть элюированы с ионообменной колонки с помощью простого солевого буфера. В адсорбционной хроматографии нуклеиновые кислоты селективно адсорбируются на кремниевом или стеклянном носителе в присутствии определенных солей (например, хаотропных солей), в то время как другие биологические молекулы не способны к такой адсорбции. В этом случае слабые солевые растворы или вода способны элюировать нуклеиновые кислоты, в результате чего образцы, которые могут быть непосредственно использованы в дальнейших процедурах.





## Аффинное разделение

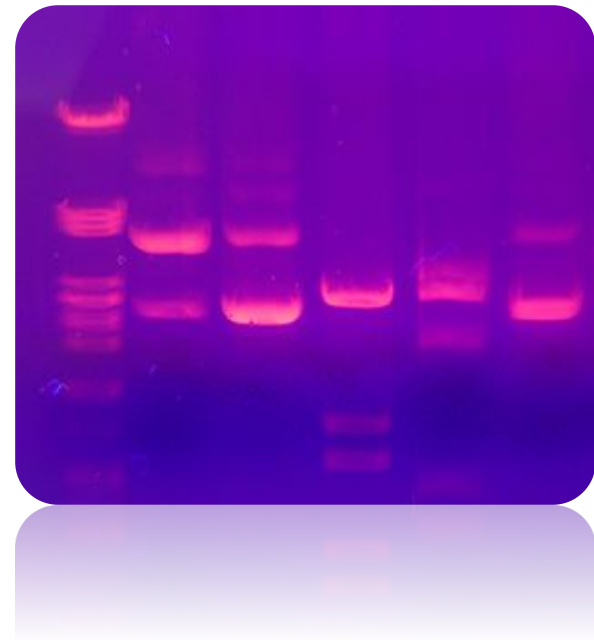
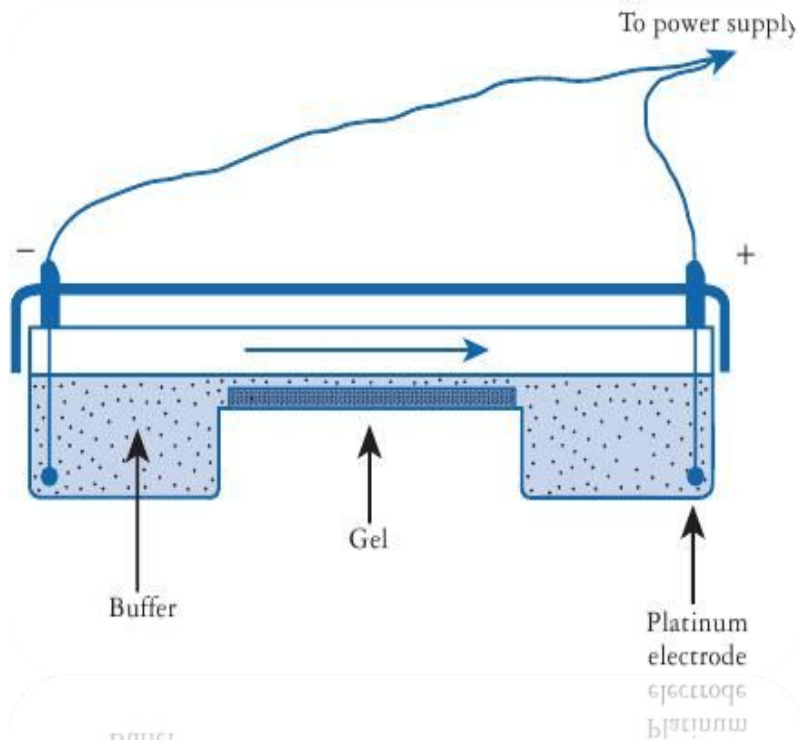
В последние годы все больше методик очистки объединяют аффинную иммобилизацию нуклеиновых кислот с магнитным разделением. Например, poly (A) + мРНК может быть привязана к магнитным частицам, покрытым стрептавидином, с помощью меченных биотином олигонуклеотидов (oligo (dT)), после чего комплекс частиц может быть удален из раствора (как и несвязанные примеси) с помощью магнита. Твердофазная техника упрощает очистку нуклеиновых кислот, так как способна заменить несколько этапов: центрифугирования, экстракции органическими растворителями и фазового разделения, одним быстрым этапом магнитного разделения.



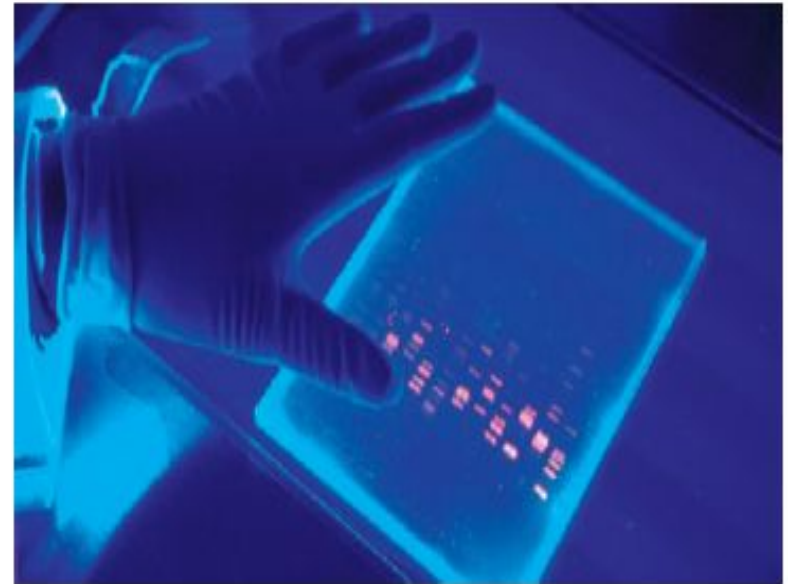
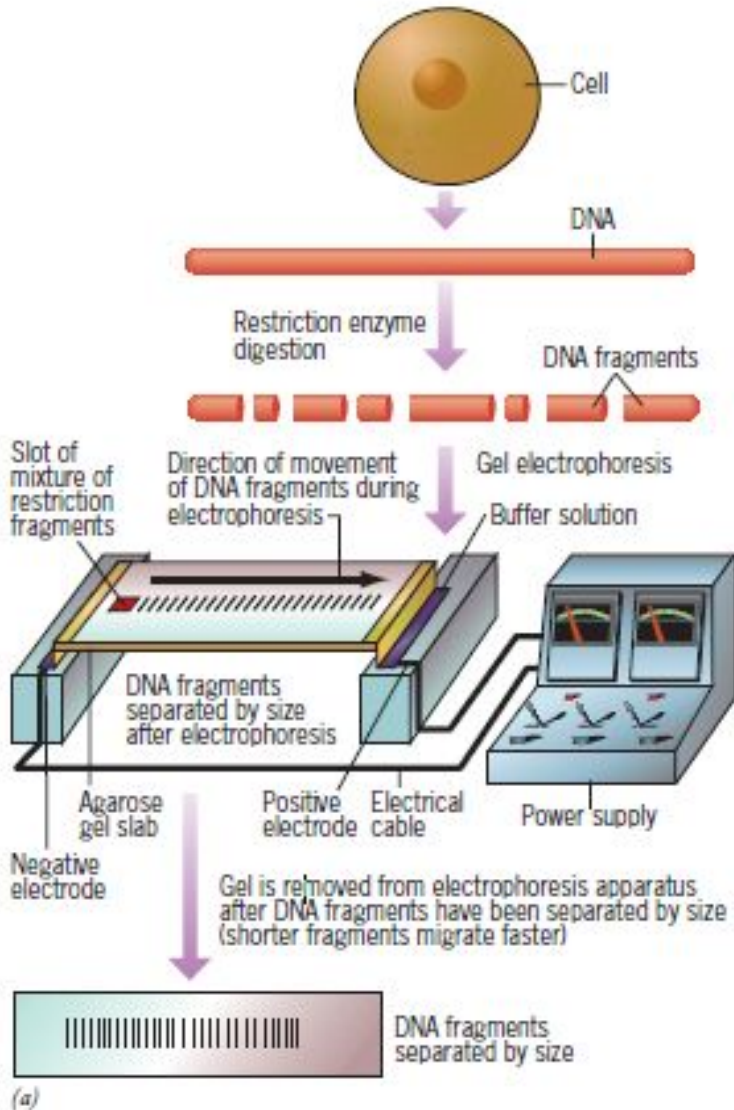
# Существует несколько методов ДНК–тестирования (анализа)

- Электрофорез ДНК в агарозном геле, в полиакриламидном геле
- Анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов — ПДРФ
- Метод полимеразной цепной реакции — ПЦР
- Секвенирование ДНК
- Детекция ДНК на чипах

- **Электрофорез** – метод разделения макромолекул, различающихся по таким параметрам, как размеры (или молекулярная масса), пространственная конфигурация, вторичная структура и электрический заряд.



# Фракционирование НК. Гель-электрофорез ДНК



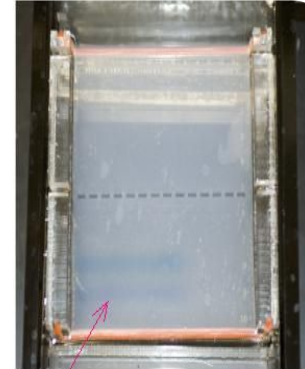
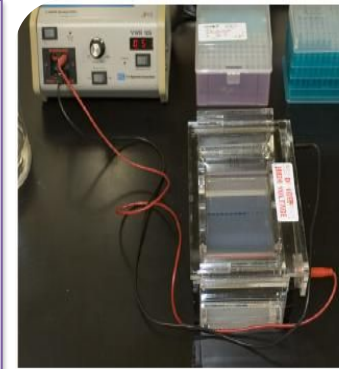
(b)

**FIGURE 18.34** Separation of DNA restriction fragments by gel electrophoresis. (a) DNA is incubated with a restriction enzyme, which cuts it into fragments (page 746). The mixture of fragments is introduced into a slot, or well, in a slab of agarose and an electric current is applied. The negatively charged DNA molecules migrate toward the positive electrode and separate by size. (b) All of the DNA fragments that are present in a gel can be revealed by immersing the gel in a solution of ethidium bromide and then viewing the gel under an ultraviolet light.



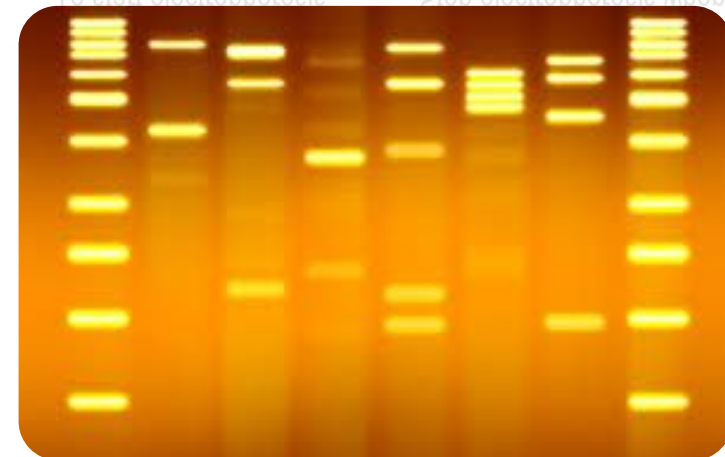
# Преимущества агарозного геля

- прочность агарозного геля;
- крупнопористость (позволяющая разделять особенно крупные молекулы, в частности нуклеиновые кислоты);
- агарозный гель является очень мягким носителем (т.е. в отличие от электрофореза на бумаге, например, при нем не происходит инактивации белков, что позволяет определять активность отдельных фракций белков после проведения электрофореза);
- приготовление агарозного геля значительно проще, чем крахмального и полиакриламидного;
- относительно небольшая продолжительность электрофореза (сильно варьирует в зависимости от варианта метода);
- относительная дешевизна метода.



To start electrophoresis attach gel box leads to power supply

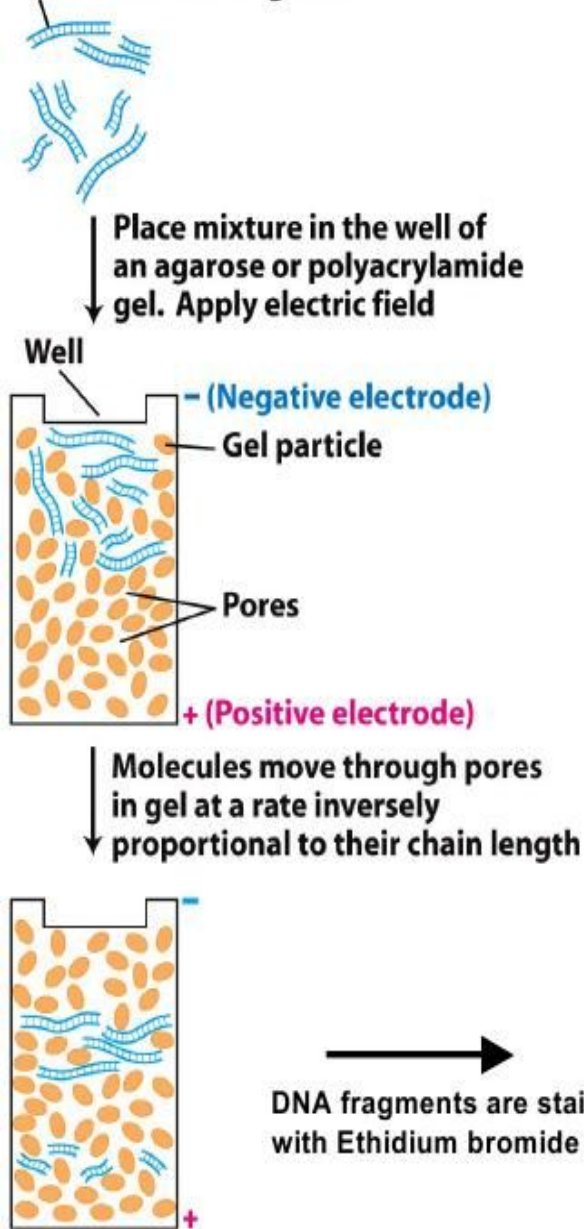
Stop electrophoresis when tracking dyes have migrated sufficiently



- Агароза очень хрупка, легко разрушается при манипулировании. Агарозные гели имеют «поры» большого размера и используются преимущественно для разделения больших молекул с молекулярной массой больше чем 200 кДа.
- Разделение в агарозных гелях происходит быстро, но с ограниченным разрешением, так как полосы, образующиеся в агарозных гелях, имеют тенденцию размываться и распространяться в стороны. Это является результатом большого размера пор и не может быть предотвращено. Агарозные гели получают суспендированием сухого порошка агарозы в водном буфере, и кипячением смеси до того момента, когда агароза расплавится и образует прозрачный раствор. Затем раствор наливают на подложку и дают остыть до комнатной температуры, чтобы сформировался прочный гель. При застывании агароза формирует матрикс, плотность которого определяется концентрацией.



## DNA restriction fragments



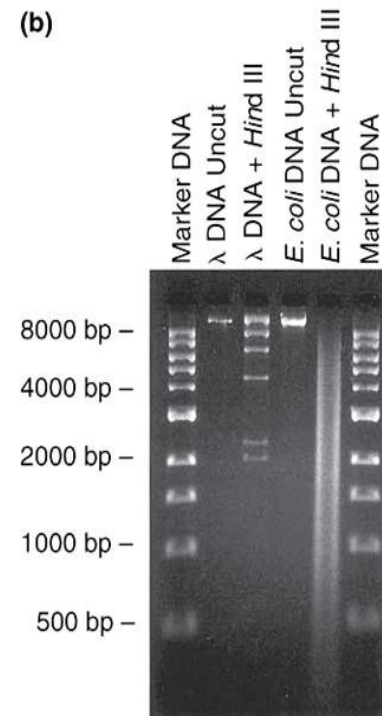
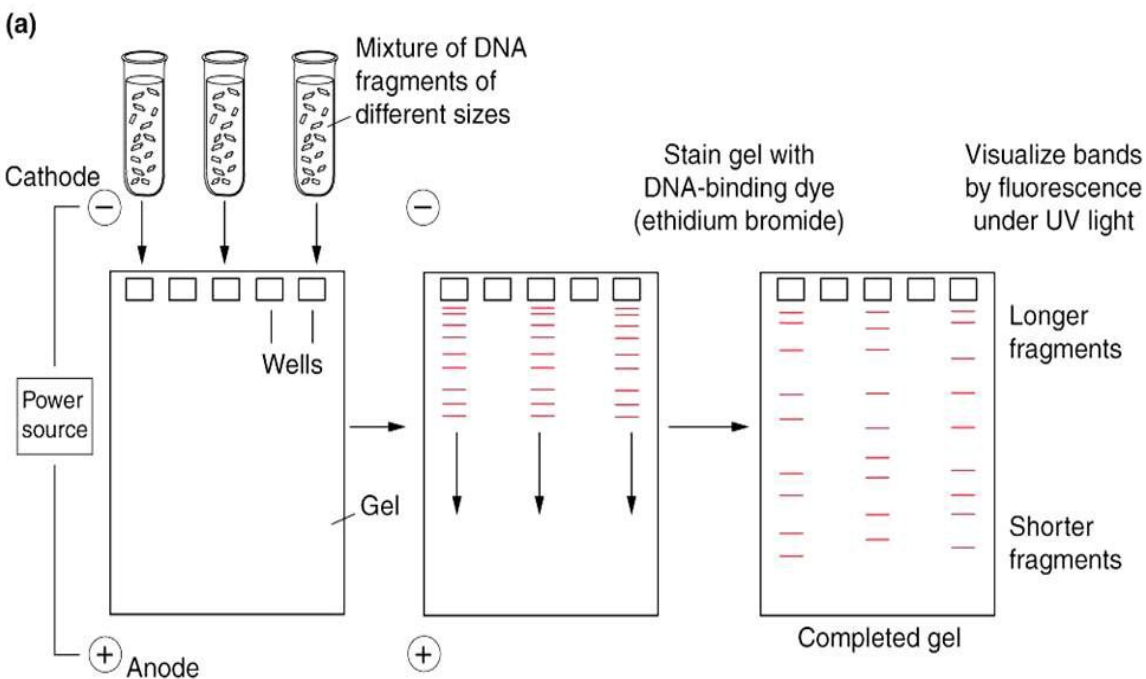
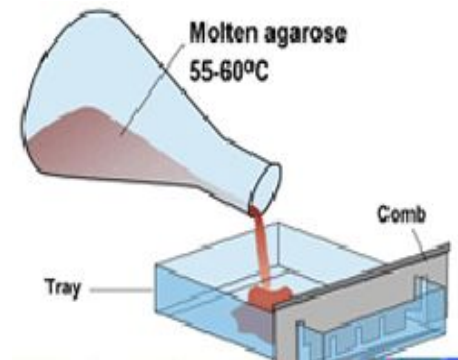
При проведении электрофореза фрагменты ДНК мигрируют в геле под воздействием сил электрического поля. Дело в том, что сахарофосфатный остов молекул ДНК заряжен отрицательно и поэтому цепи ДНК двигаются от катода, заряженного отрицательно, к положительному аноду. Более длинные молекулы мигрируют медленнее, так как задерживаются в геле, более короткие молекулы двигаются быстрее.



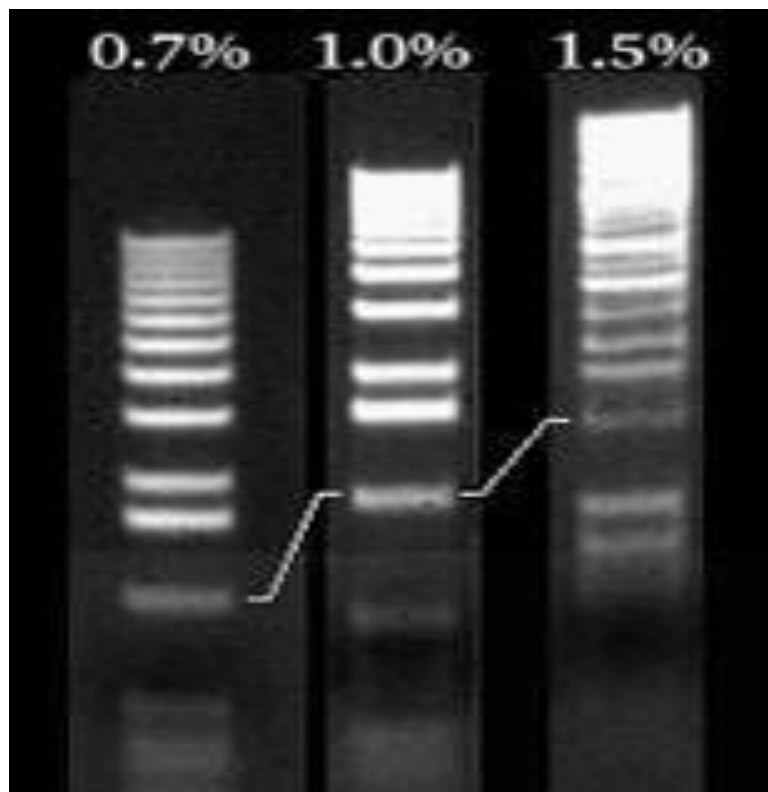
- Разделение фрагментов ДНК происходит из-за наличия у них заряда. Фосфатные остатки у нуклеотидов придают всей ДНК негативный заряд. Это делает ее растворимой в воде и привлекает ее к положительному(+) электроду. Поэтому, если поместить ДНК в электрическое поле, то она будет двигаться от минуса к плюсу. Чтобы ДНК не сильно бежала к плюсам, ее можно перемещать в какой-нибудь вязкой среде. Для этого и нужен агарозный гель.
- Фрагменты ДНК, имеющие наименьшую длину, приближаются быстрее всего к + электроду, в то время как длинные фрагменты остаются максимально близко к минусу. Те же базовые принципы электрофореза могут использоваться для разделения РНК и протеинов. Увеличение концентрации агарозы в геле уменьшает скорость миграции ДНК и позволяет разделять малые фрагменты ДНК. Чем больше напряжение тем быстрее проходит фореуз - но слишком сильное напряжение нагреет буфер а это недопустимо. Конформация ДНК тоже играет важную роль. Кольцевые плазмиды(неразрезанные рестриктазами) двигаются с другой скоростью чем линейные или суперскрученные.

# Компоненты электрофореза в агарозном геле

- Агароза
- Буфер для электрофореза
- Маркерная ДНК

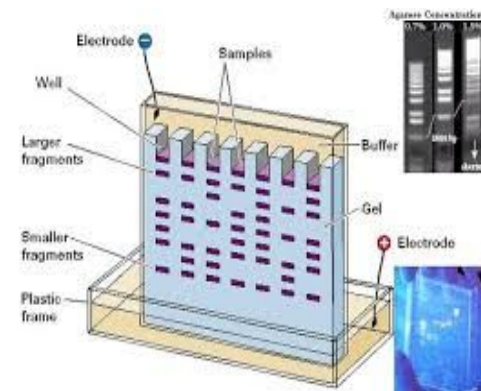
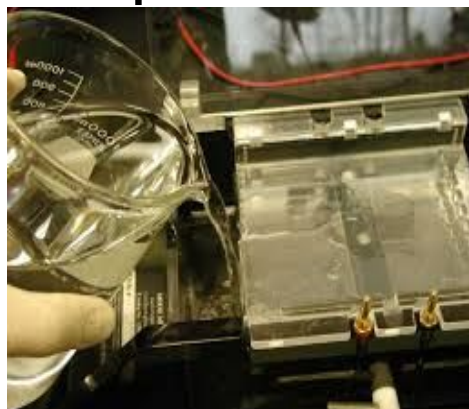
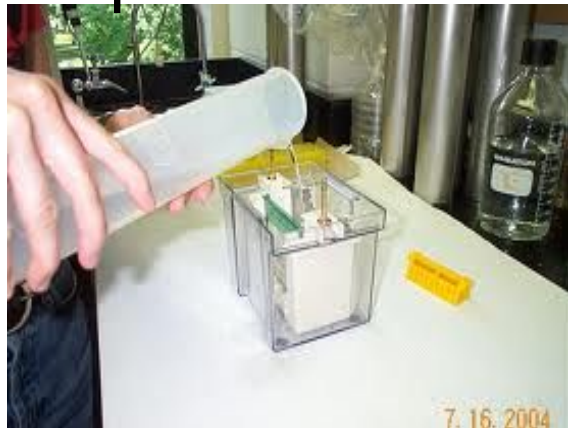


- В зависимости от выбранной процентности агарозы статистический размер ячеек геля будет различным, отличаться будет и картина разделения одной и той же смеси ДНК в гелях разной процентности. Процентность агарозы подбирают, исходя из задач конкретного эксперимента.



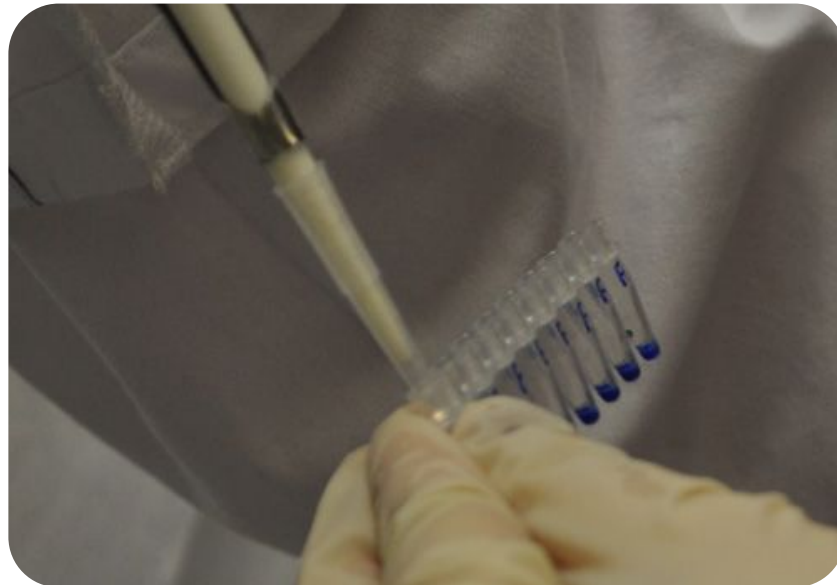
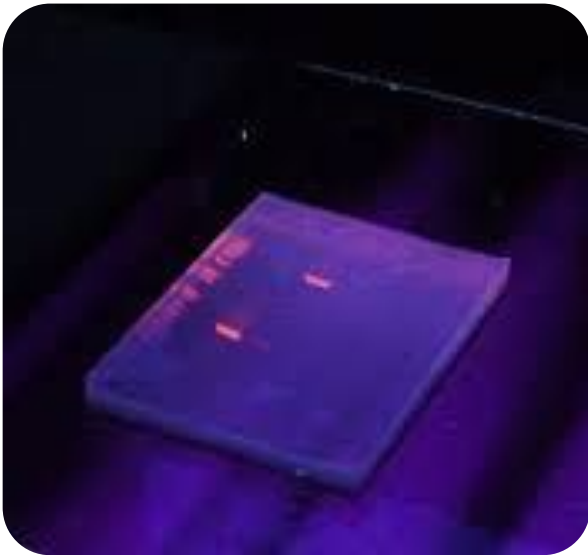
# Буфер для электрофореза

- Электрофорез проводится в камере, заполненной буферным раствором. Чаще всего используются буферы, содержащие ЭДТА, трис, а также борную или уксусную кислоты. Соответственно, буфер, содержащий борную кислоту называется TBE (tris-borate-EDTA), а буфер, содержащий уксусную кислоту TAE (tris-acetate-EDTA). Буфер необходим для повышения ионной силы раствора, в котором будет происходить разделение молекул ДНК под действием приложенного электрического поля.





- Перед началом электрофореза к образцам добавляют два разных красителя с кислым значением pH (часто для этих целей используют, ксиленовый голубой и бромфеноловый синий), чтобы визуализировать ход электрофореза и утяжелять образцы глицерином (до 20 % глицерина в образце). Краситель также необходим для того, чтобы определить, когда стоит остановить процесс.



- В образец добавляется глицерин(Loading buffer) + краситель(loading dye) концентрация молекул ДНК в образце желательно > 50 нг/мл, чем меньше ДНК тем труднее увидеть ее на трансиллюминаторе чтобы получить четкий сигнал при окрашивании бромистым этидием, в лунку шириной 5 мм достаточно внести 200нг маркерной ДНК



- EtBr (бромистый этидий) является наиболее распространенным реагентом, который используется для окрашивания ДНК в агарозном геле. Под воздействием ультрафиолетового излучения, электроны в ароматическом кольце молекулы этидия возбуждаются (активизируются), что приводит к освобождению энергии (света). EtBr интеркалирует в молекуле ДНК в зависимости от концентрации. Это позволяет дать оценку количества ДНК в той или иной пробе на основе интенсивности излучения. EtBr является мутагенным и канцерогенным реагентом, поэтому нужно проявлять осторожность при обращении с агарозным гелем, содержащим его и утилизировать надлежащим образом.



# Картирование и секвенирование - наиболее важные и трудоемкие части всех геномных исследований

Картирование - определение положения фрагментов ДНК в хромосоме с использованием генетических методов, то есть анализ сцепления и рекомбинации генов на основе родословных. Карты, полученные при использовании данного метода, часто называют картами генетического сцепления.

Маркеры, используемые в картировании, должны быть полиморфными, то есть должны существовать альтернативные формы признака, которые можно было бы легко отличить и описать у членов семьи.

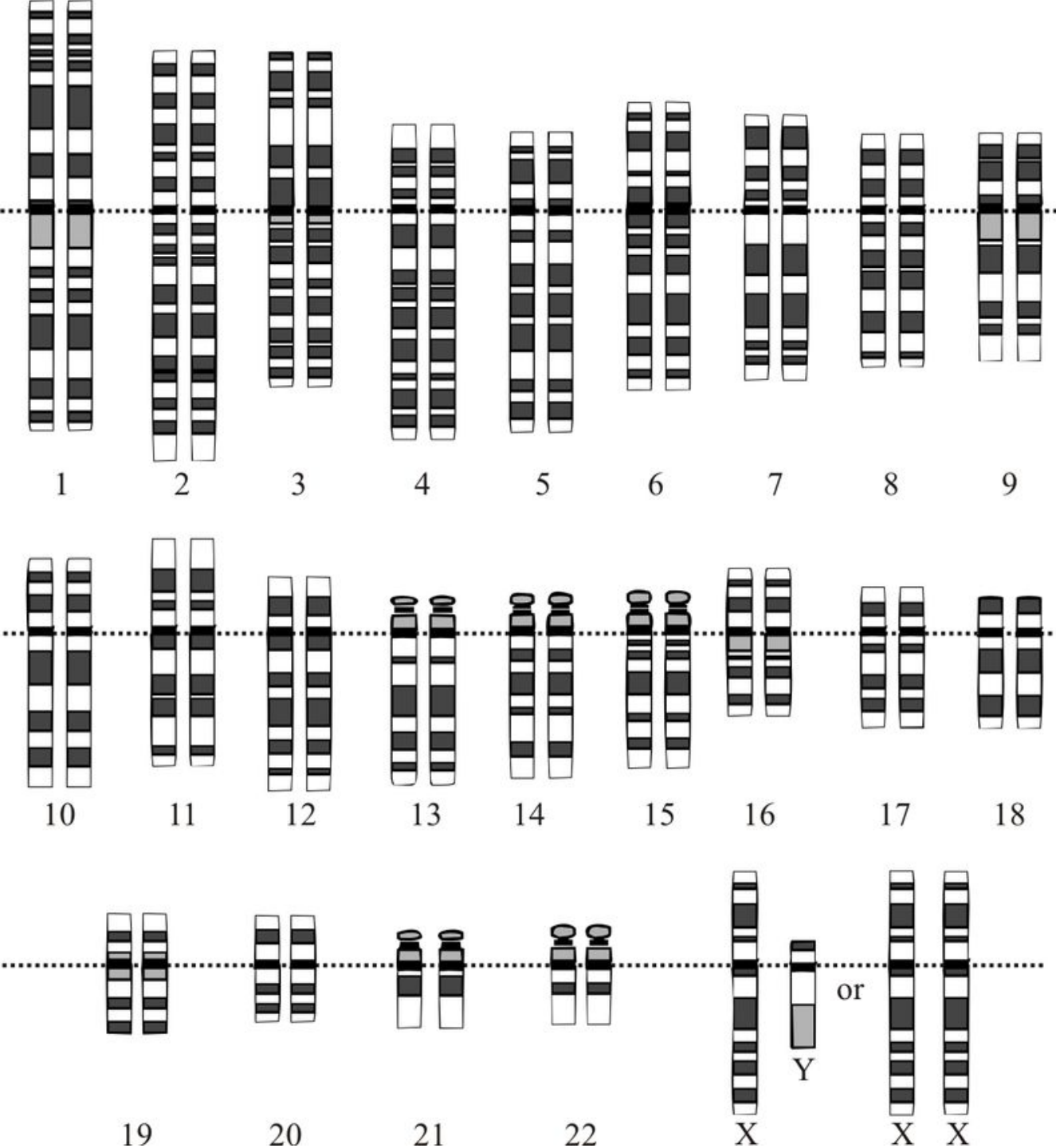
- **Карты генетического сцепления строят, наблюдая за тем, как часто два маркера наследуются вместе.**
- Два маркера, расположенные на одной хромосоме вблизи друг друга, имеют тенденцию передаваться от родителей ребенку совместно. Во время нормальных процессов формирования сперматозоидов и яйцеклеток цепочка ДНК случайным образом разрывается и воссоединяется в тех или иных местах хромосомы или ее копии (то есть гомологичной хромосомы).
- Этот процесс, называемый мейотической рекомбинацией, может приводить к разделению двух маркеров, первоначально расположенных на одной хромосоме. Чем ближе расположены маркеры друг к другу, тем "теснее" они сцеплены, тем менее вероятно, что процесс рекомбинации разделит их.

- Хромосомные карты показывают расположение генов или отдельных участков ДНК на соответствующих хромосомах, а расстояние между генами или фрагментами ДНК указывают в парах оснований.
- Эти маркеры могут быть физически связаны с определенным сегментом хромосомы при гибридизации *in situ* - методе, который позволяет пометить ДНК специальной "видимой" (флуоресцентной или радиоактивной) меткой. Локализация меченого зонда устанавливается после того, как он свяжется с комплементарной цепочкой ДНК на интактной хромосоме.



# Карта X-хромосомы





Графическое  
представление  
нормального  
человеческого  
[кариотипа](#) в  
виде [идеограмм](#)  
всех  
его [хромосом](#)

- Последняя стадия физического картирования генома человека - определение всех пар оснований на **каждой хромосоме**, то есть полной нуклеотидной последовательности ДНК. Эта задача решается современной **технологией секвенирования**,

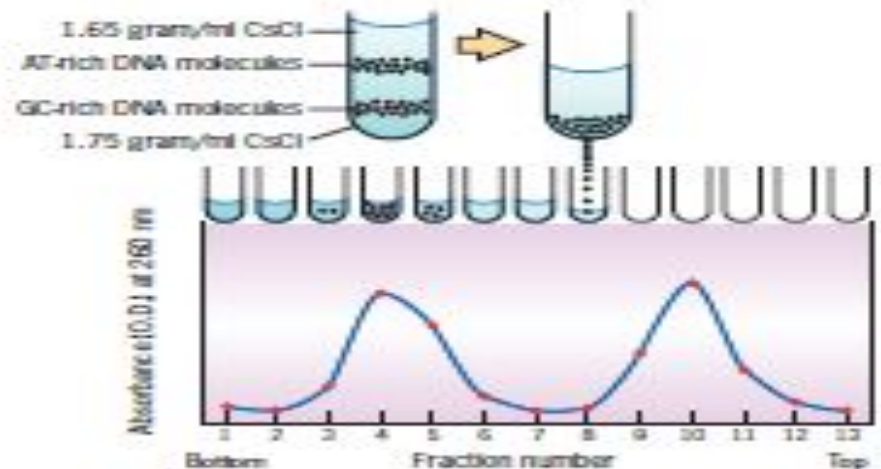
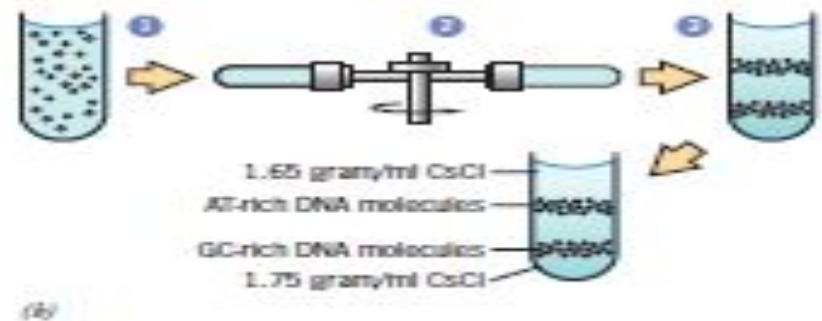
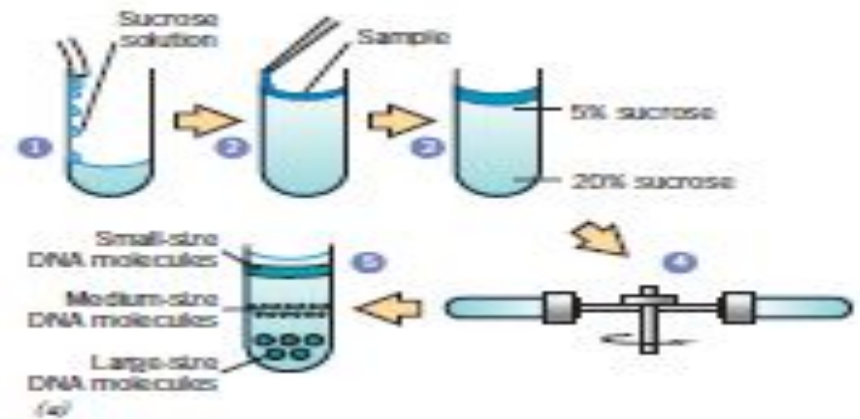


**Методы секвенирования**, то есть прочтения последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК, дают наиболее полную информацию о геноме. Секвенирование выявляет все возможные вариации и мутации генов, а также многочисленные длинные и короткие повторы. Основной проблемой секвенирования остается крайне сложная интерпретация полученных данных. Геном человека состоит из 3-х миллиардов пар нуклеотидов и большая их часть не несет какой-либо важной информации о здоровье. Поэтому в практику медицинского ДНК–тестирования секвенирование не включают.

## Techniques of nucleic acid sedimentation.

(a) Separation of different-sized DNA molecules by velocity sedimentation. The sucrose density gradient is formed within the tube (step 1) by allowing a sucrose solution of increasing concentration to drain along the wall of the tube. Once the gradient is formed, the sample is carefully layered over the top of the gradient (steps 2-3), and the tube is subjected to centrifugation (e.g., 50,000 rpm for 5 hours) as illustrated in step 4. The DNA molecules are separated on the basis of their size (step 5).

(b) Separation of DNA molecules by equilibrium sedimentation on the basis of differences in base composition. The DNA sample is mixed with the CsCl solution (step 1) and subjected to extended centrifugation (e.g., 50,000 rpm for 72 hours). The CsCl gradient forms during the centrifugation (step 2), and the DNA molecules band in regions of equivalent density (step 3). (c) The tube from the experiment of b is punctured and the contents are allowed to drip into successive tubes, thereby fractionating the tube's contents. The absorbance of the solution in each fraction is measured and plotted as shown.



# Секвенирование ДНК по Сэнгеру:

«ПЛЮС-МИНУС» МЕТОД

МЕТОД «ТЕРМИНАТОРОВ»

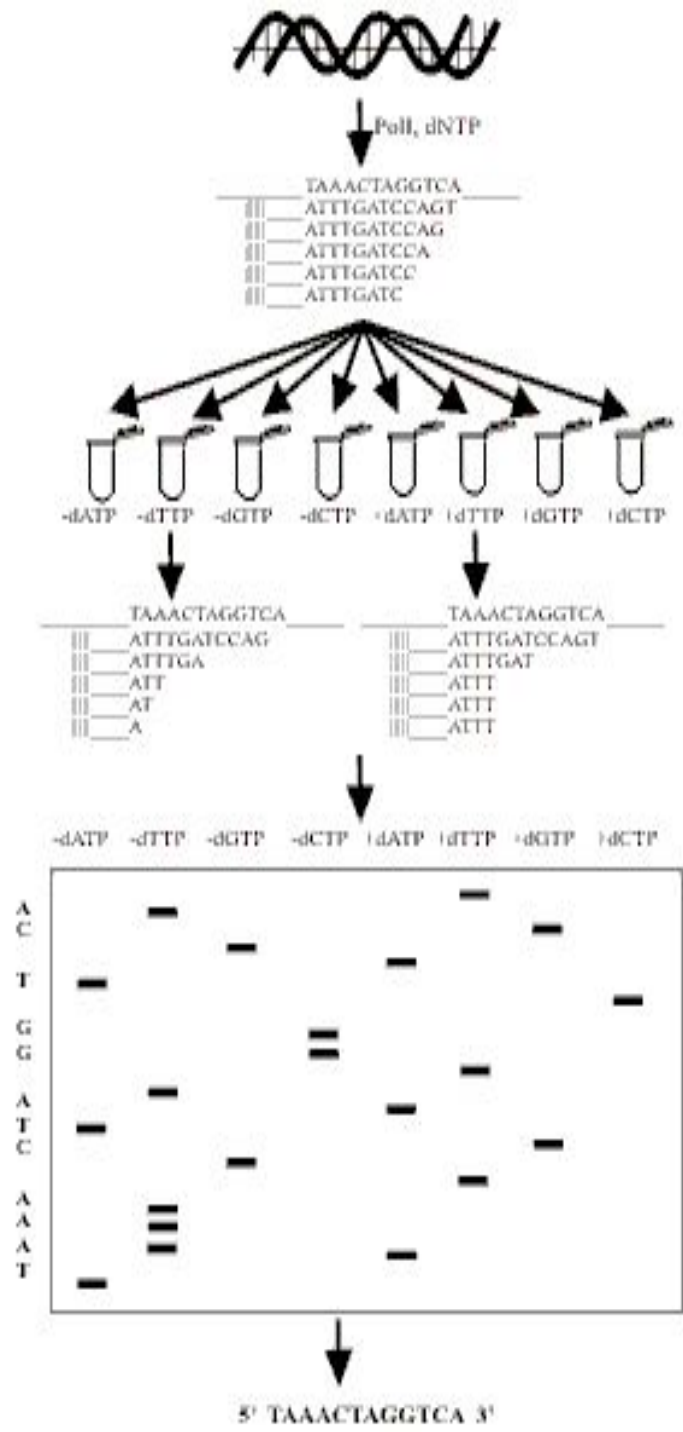
- Метод Сэнгера (плюс-минус метод) — метод секвенирования (определения последовательности нуклеотидов) ДНК, также известен как метод обрыва цепи или методом прямого ферментативного секвенирования ДНК.
- Впервые этот метод секвенирования был предложен Фредериком Сэнгером в 1977 году, за что он был удостоен Нобелевской премии по химии в 1980 году.
- Принцип метода
- В классическом варианте метода Сэнгера одна из цепочек анализируемой ДНК выступает в качестве матрицы для синтеза комплементарной цепочки ферментом ДНК-полимеразой, в качестве праймеров - синтетические олигонуклеотиды или природные субфрагменты, получаемые при гидролизе рестрицирующими эндонуклеазами.



Метод включал два этапа. Сначала в ограниченных условиях проводили полимеразную реакцию в присутствии всех 4-х типов dNTP (один из них был мечен по альфа-положению фосфата), получая на выходе набор продуктов неполного копирования матричного фрагмента. Смесь очищали от несвязавшихся дезоксинуклеозидтрифосфатов и делили на восемь частей. После чего в **"плюс"** системе проводили четыре реакции в присутствии каждого из четырех типов нуклеотидов, а в **"минус"** системе - в отсутствие каждого из них.

В результате, в **"минус"** системе терминация происходила перед dNTP данного типа, а в **"плюс"** системе - после него.

Полученные таким образом восемь образцов разделяли с помощью электрофореза, "считывали" сигнал и определяли последовательность исходной ДНК. Этим



## **Секвенирование ДНК по Максаму-Гилберту (метод терминаторов) -**

Этот метод также называется секвенированием ДНК методом химической дегградации по Максаму-Гилберту.

Центральный элемент метода секвенирования ДНК по Максаму-Гилберту - химическая дегградация меченой цепи ДНК изменился за эти годы не так сильно. Хотя многими исследователями и предлагались различные варианты модификаций тех или иных азотистых оснований, все же в основном арсенале этого метода находятся 4-6 химических реакций, показывающих наиболее стабильные результаты. К некоторому преимуществу метода секвенирования ДНК химической дегградацией можно отнести то, что здесь определяется последовательность фрагмента ДНК, или геномного, или клонированного, в каком-либо подходящем векторе (т.е. реплицировавшегося *in vivo*), а не новосинтезированная *in vitro* копия, как в ферментативном методе с дидезокситерминаторами. Еще одно отличие метода секвенирования ДНК по Максаму-Гилберту от метода Сэнгера заключается в том, что его осуществление может начаться практически с любого сайта узнавания какой-нибудь рестрикционной эндонуклеазы, присутствующего во вставке и поэтому не требуется предварительного знания даже небольшого участка нуклеотидной последовательности, окружающего данное место.

## Сравнение методов секвенирования по Сэнгеру и Максому-Гилберту

Метод Максама-Гилберта и метод Сэнгера основаны на одном принципе. В первом используется специфическое расщепление ДНК, обусловленное природой оснований, во втором - статистический синтез ДНК, заканчивающийся на каком-либо одном из 4 нуклеотидов. Таким образом, основой обоих методов является получение полного (статистического) набора фрагментов ДНК, оканчивающихся на каждом из четырех нуклеотидов.

Химический метод (метод Максама-Гилберта) проще использовать в том случае, когда исследуемая ДНК не слишком велика (200-500 звеньев). В том случае, если речь идет о секвенировании высокомолекулярной ДНК, лучше применять метод полимеразного копирования (метод Сэнгера), чтобы не вводить процедуру рестриктазного расщепления с выделением индивидуальных фрагментов. При энзиматическом секвенировании протяженных одноцепочечных ДНК (например, бактериофагов) можно применять набор олигонуклеотидов-затравок, синтез которых не требует больших затрат времени и труда. Для двуцепочечных высокополимерных ДНК наиболее удобен метод слепого энзиматического секвенирования с применением универсальных праймеров и обработки данных с помощью ЭВМ либо с использованием методов поэтапного секвенирования либо «прогулки по хромосоме». Химический метод также может быть применен, но в этом случае необходимо вырезать из вектора исследуемые фрагменты ДНК, и это усложняет всю процедуру.



1 A single-stranded DNA fragment whose base sequence is to be determined (the template) is isolated.

2 Each of the four ddNTPs is tagged with a fluorescent dye, and the Sanger sequencing reaction is carried out.

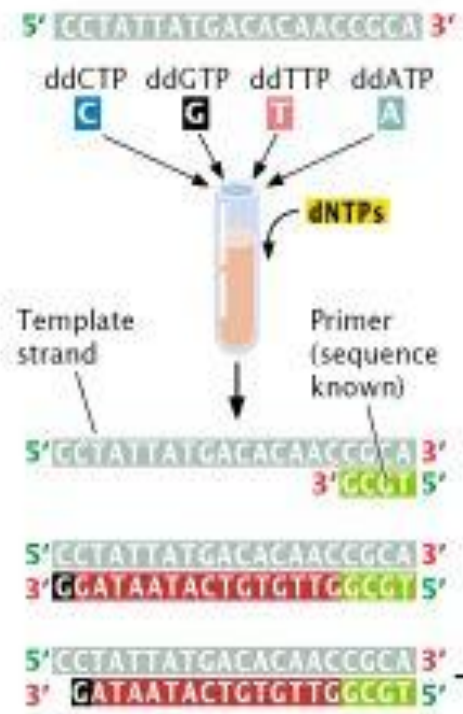
3 The fragments that end in the same base have the same colored dye attached.

4 The products are denatured, and the DNA fragments produced by the four reactions are mixed and loaded into a single well on an electrophoresis gel. The fragments migrate through the gel according to size...

5 ...and the fluorescent dye on the DNA is detected by using a laser beam and detector.

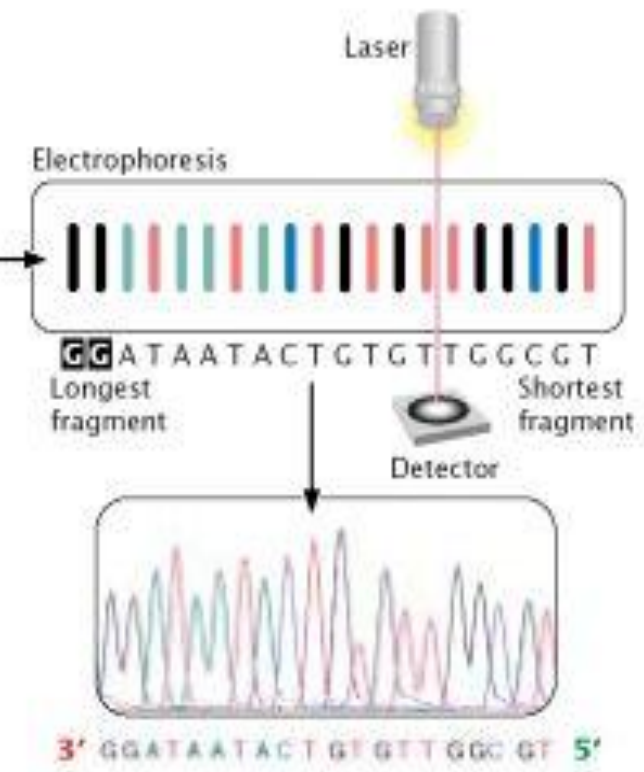
6 Each fragment appears as a peak on the computer printout; the color of the peak indicates which base the peak represents.

7 The sequence information is read directly into the computer, which converts it into the complementary—target—sequence.



**Терминированные  
фрагменты ДНК  
фракционируются  
электрофоретически**

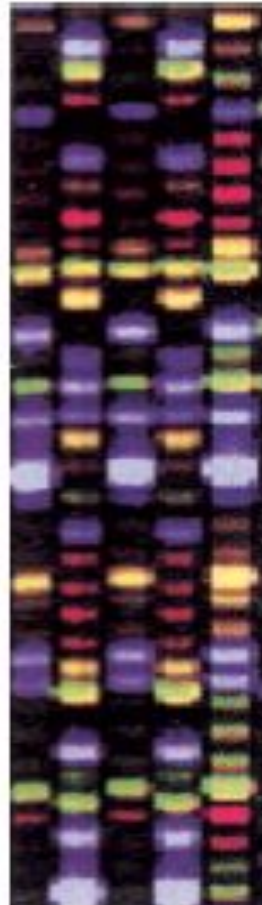
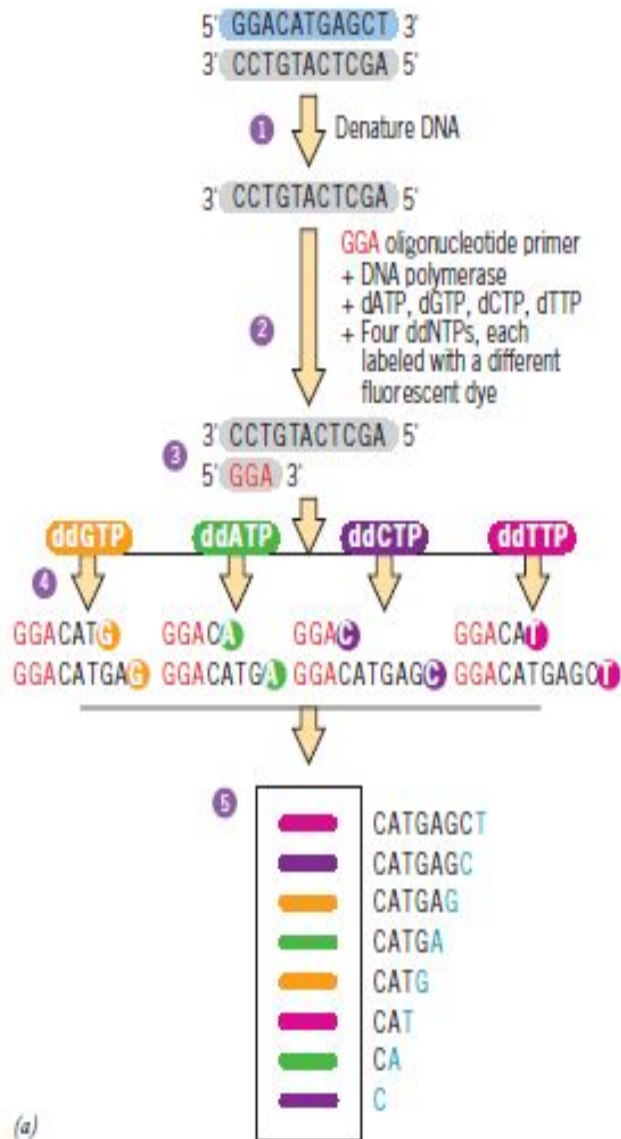
**Автоматизация  
секвенирования: каждый  
из четырех ddNTP имеет  
флюоресцентную метку  
своего цвета**



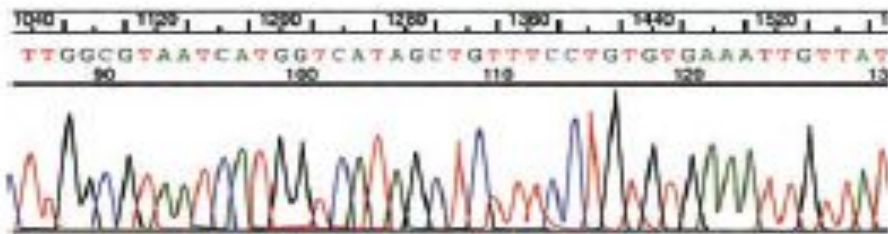
**Фрагмент каждого размера имеет цвет,  
соответствующий одному из четырех  
ddNTP**



# ДНК-секвенирование



(b)



(c)

**FIGURE 18.44** DNA sequencing. (a) The basic steps in sequencing a small hypothetical fragment by the Sanger-Coulson (dideoxy) technique, as described in the text. (b) Gel lanes in which fluorescently labeled daughter molecules have been separated. The color of the band is determined by the identity of the dideoxynucleotide at the 3' end of the DNA strand. (c) The sequence of nucleotides in the template strand is interpreted by a computer that "reads" from the bottom to the top of the gel, using the intensity and wavelength of the fluorescent light as input. The computer generates an "electropherogram" showing the intensity and color of the detected fluorescence, along with the DNA sequence interpretation. (B,C: REPRINTED WITH PERMISSION FROM LEROY HOOD AND DAVID GALAS, NATURE 421:445, 2003; © COPYRIGHT 2003, MACMILLAN MAGAZINES LTD.)

- **Геномные анализы помогают выявить**
- **Хромосомные болезни** — наследственные заболевания, обусловленные изменением числа или структуры хромосом.
- К хромосомным относятся болезни, обусловленные геномными мутациями или структурными изменениями отдельных хромосом. Хромосомные болезни возникают в результате мутаций в половых клетках одного из родителей.

- **Болезни, обусловленные нарушением числа хромосом**

синдром Дауна — трисомия по 21-й хромосоме,

синдром Патау — трисомия по 13-й хромосоме,

синдром Эдвардса — трисомия по 18-й хромосоме

- **Болезни, связанные с нарушением числа половых хромосом**

**Синдром Шерешевского — Тёрнера** — отсутствие одной X-хромосомы у женщин (45 XO) вследствие нарушения расхождения половых хромосом

**полисомия по X-хромосоме** — включает трисомию (кариотипы 47, XXX), тетрасомию (48, XXXX), пентасомию (49, XXXXX), отмечается незначительное снижение интеллекта, повышенная вероятность развития психозов и шизофрении с неблагоприятным типом течения;

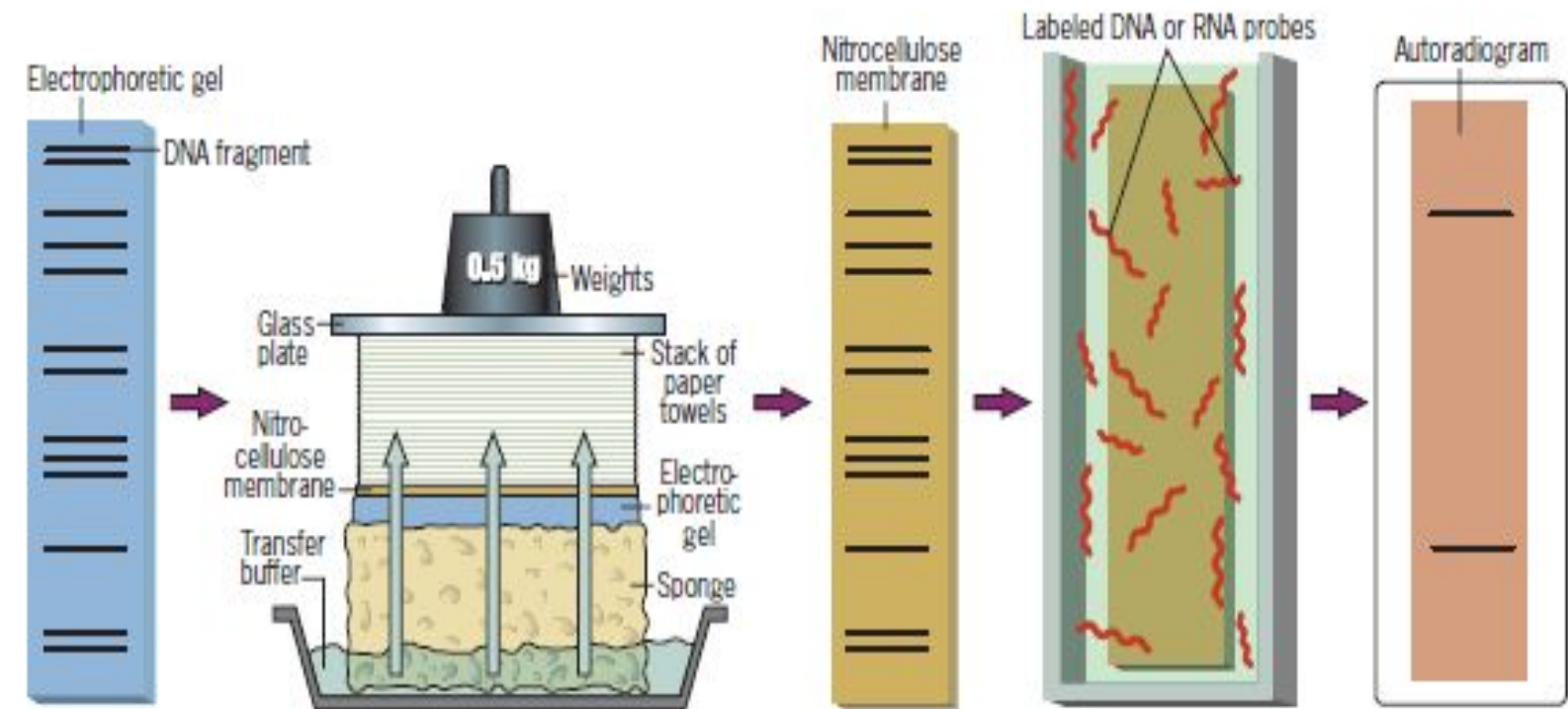
**полисомия по Y-хромосоме** — как и полисомия по X-хромосоме, включает трисомию (кариотипы 47, XYY), тетрасомию (48, XYYY), пентасомию (49, XYYYY), клинические проявления также схожи с полисомией X-хромосомы;

- Благодаря геномным исследованиям, а также совершенствованию инструментальной диагностической медицинской техники появилась возможность обнаружения "патологического" гена в пресимптоматическом периоде, то есть когда проявления болезни еще не наблюдается ("болезненный" ген проявит себя в более позднем возрасте) или пренатальном (дородовом) периоде (ДНК плода выделяют из ткани хорионической оболочки плода, амниотической жидкости, крови плода, полученных на разных стадиях беременности).
- Более того, возможна преимплантационная диагностика, когда ряд яйцеклеток матери оплодотворяются *in vitro* (в пробирке), затем несколько зародышей развиваются до стадии 8 клеток, и 1 - 2 клетки зародыша анализируют на наличие поврежденного гена. Зародыш, не содержащий поврежденного гена, имплантируется в клетку.



- Геномные исследования и идентификация генов, повреждение которых приводит к заболеваниям, позволяет глубже понять биохимические процессы, определяющие интимные механизмы формирования клинических проявлений болезни. Эти новые знания служат основой для разработки адекватных методов лечения заболеваний, в том числе генотерапии - этиологической (причинной) коррекции наследственных болезней.

- Результаты геномных исследований все шире используются в судебной медицине.
- Появление технологии геномной диагностики (DNA fingerprinting) позволило решать важные проблемы определения генетического разнообразия, индивидуальности и родства людей (и других организмов) на уровне анализа variability структуры ДНК



Electrophoretic gel containing fractionated DNA fragments. The DNA is made single-stranded (denatured) by alkali treatment.

Blotting procedure for transfer of DNA from gel to nitrocellulose membrane.

Nitrocellulose membrane with adsorbed DNA fragments following heat treatment that fixes the DNA to the membrane.

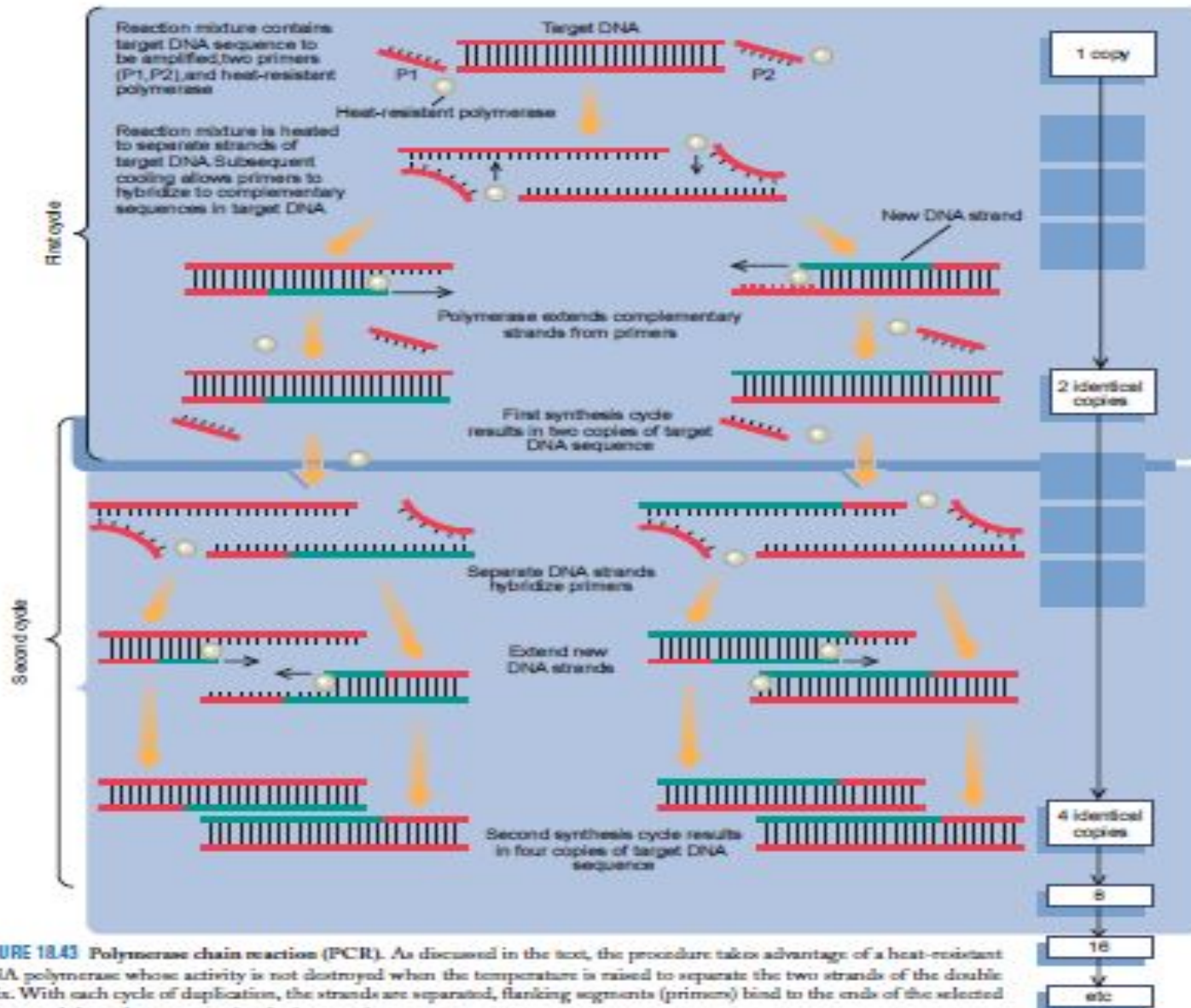
Incubate membrane with labeled DNA or RNA probes to allow hybridization, then wash and prepare autoradiogram.

Autoradiogram showing location of DNA fragments complementary to labeled probe.

**FIGURE 18.36** Determining the location of specific DNA fragments in a gel by a Southern blot. As described in the figure, the fractionated DNA fragments are washed out of the gel and trapped onto a nitrocellulose membrane, which is incubated with radioactively labeled DNA (or RNA) probes. The location of the hybridized fragments is deter-

mined autoradiographically. During the blotting procedure, capillary action draws the buffer upward into the paper towels. As the buffer moves through the electrophoretic gel, it dissolves the DNA fragments and transfers them to the surface of the adjacent membrane.

# ПЦР



**FIGURE 18.43** Polymerase chain reaction (PCR). As discussed in the text, the procedure takes advantage of a heat-resistant DNA polymerase whose activity is not destroyed when the temperature is raised to separate the two strands of the double helix. With each cycle of duplication, the strands are separated, flanking segments (primers) bind to the ends of the selected region, and the polymerase copies the intervening segment.



# Анализ полиморфизма длины рестриционных фрагментов - ПДРФ

- Один из ранних методов, основанный на использовании особых ферментов — **рестриказ**. Рестриктазы разрезают нить молекулы ДНК в определенных местах, распознавая последовательности нуклеотидов. Если у человека в какой-то молекуле ДНК в результате мутаций меняется состав нуклеотидов, то рестриктазы не могут разрезать эту часть молекулы. После обработки образца ДНК ферментами определяют длину получившихся фрагментов ДНК. В зависимости от наличия тех или иных мутаций фрагменты будут иметь разную длину.

