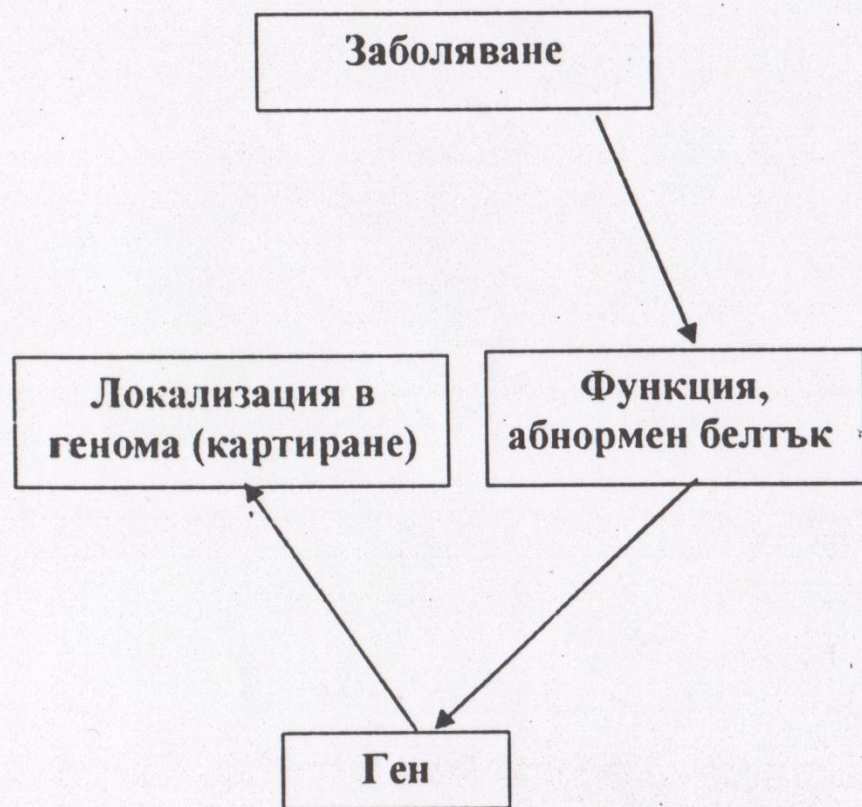


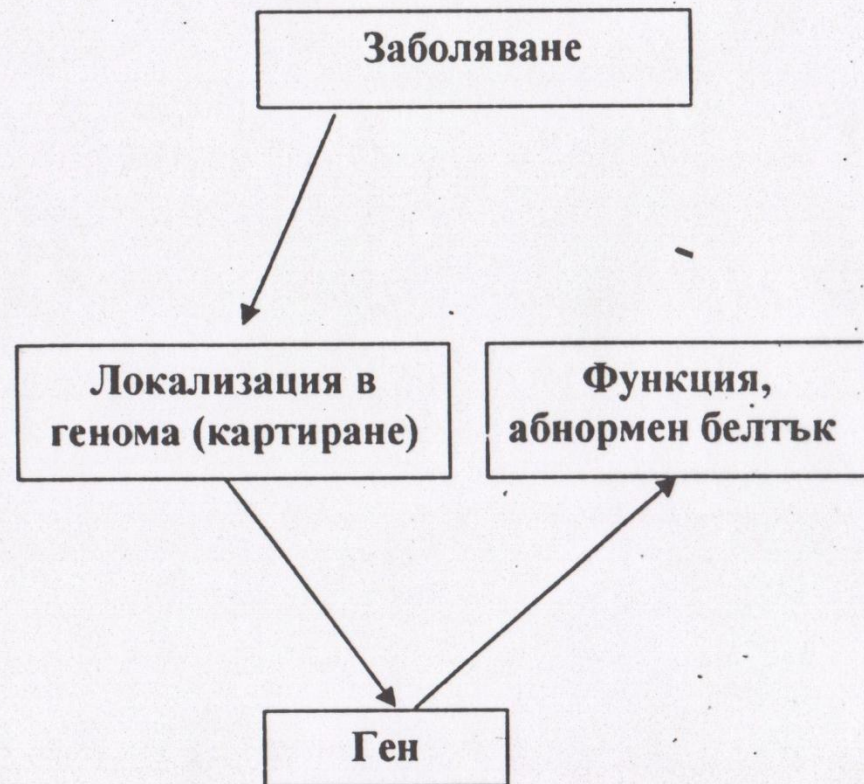
**Молекулярно-генетични
методи (ДНК анализ) за
изследване на моногенни
болести и
предразположения**

Разкриване на мутации

- **Клинично ниво** - заболяване (в отделен индивид или неговото семейство)
 - **Субклетъчно ниво** - промени в белтъчната структура, количество или активност
- 
- **Молекулно ниво** - промени в **ДНК** структурата



Функционално клониране



Позиционно клониране

Подходи за изучаване молекулярните основи на наследствените болести

Функционално клониране

(от фенотипа към генотипа)

Подход за клониране и идентифициране на ген, базиращ се на **известен протеин**.

Етапи:

- изолиране на абнормен протеин и определяне на АК последователност
- определяне на ДНК кода
- локализиране на ДНК кода в генома
- изолиране, клониране и характеризиране на гена

Примери: таласемии, сърповидно-клетъчна анемия, хемофилия

Позиционно клониране

(от генотипа към фенотипа)

Подходът се базира на **известна позиция** (хромозомна локализация) на гена.

Етапи:

- Хромозомна локализация – чрез ДНК анализ на лица с моногенно и хромозомно нарушение, чрез изучаване на картиран кандидат-ген или анализ за скаченост на картиран маркер)
- ДНК проучване и секвениране
- Търсене на протеин и протеинов модел

Примери: болшинството: муковисцидоза, ДМД/БМД, миотонична дистрофия, синдром на Марфан, синдром на чуплива X хромозома, хорея на Хънтингтон

Разкриване на мутацинна ДНК ниво - ДНК анализ

I. Общи етапи на ДНК анализа

Изолиране на ДНК – всички ядрени клетки

♠ Амплификация на ДНК – in vivo, in vitro (PCR)

Тестуване на ДНК - електрофореза в агарозен гел

II. Подходи за ДНК анализ

1. Директен ДНК анализ

1.1. Техника за мутационно скриниране

♠ Едноверижан конформационно полиморфен анализ (SSCP)

Хетеродуплексен анализ (НА)

Множествена полимеразно-верижна реакция (Multiplex PCR)

1.2. Техника за **диагностика** на специфични мутации

♠ Southern Blotting анализ

Алел-специфичен олигонуклеотиден анализ (ASO Analysis)

Амплификация рефракторна мутационна система (ARMS)

♠ Рестрикционен анализ

ДНК секвениране

2. Индиректен ДНК анализ

Полиморфизми по дължината на рестрикционните фрагменти (RFLP)

3. Доказване на генна експресия

Реално време (Real time PCR) RT- PCR анализ

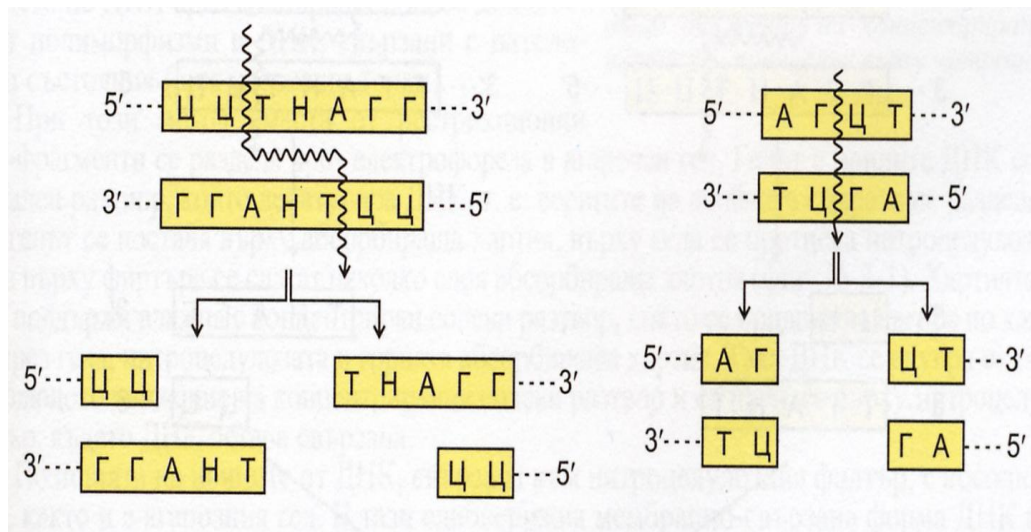
**Геномната ДНК се получава от:
цялостна кръв с антикоагулант
ЕДТА, свежа или замразена проба
тъкан, хорион биопсия,
култивирани амниоцити,
лимфобластoidни клетъчни линии.
Малко количество ДНК може да се
получи от смив на букална
лигавица и фиксирани тъкани.
Геномната ДНК остава стабилна
много години.**



**ДНК екстрахирана от парафинови
блокчета може да се използва за
семеини случаи на рак на
млечната жлеза.**

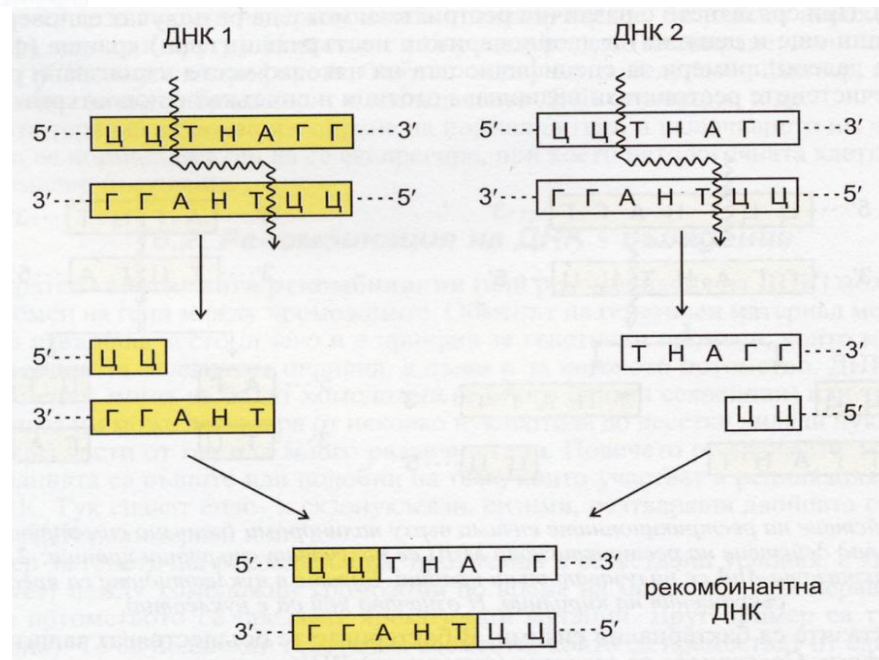
**Автоматизирана система за
екстракция на ДНК от цялостна
кръв 5-10 мл**

Рестриктази



В търговската мрежа са налични стотици рестрикциозни ензими.

Рестриктазните ендонулеазни ензими са естествен продукт на бактериални видове като защитен механизъм срещу “чужда” ДНК. Всеки ензим разпознава специфична ДНК последователност и срязва двойно-верижната ДНК в това място.



ДНК сонди

Едноверижна ДНК, белязана радиоактивно с P^{32} или нерадиоактивно с етидиев бромид, използвана за откриване на ДНК фрагмент с комплементарна нуклеотидна последователност.

Геномни ДНК сонди – стотици бд до няколко килобази. Специфични гени или случайни ДНК последователности. Съдържат екзони, интрони фланкиращи гена и/или междугенни последователности

к ДНК сонди - стотици бд до няколко килобази. Получават се от мРНК с използване на ензима обратна транскриптаза. Съдържат само екзони.

Олигнуклеотидни сонди - 20-80 бд. Синтезират се по химичен път от известна АК последователност на белтък (част от него) и ДНК кода му. Най-ефективни за хибридизиране.

Хибридизация на ДНК и РНК

Два основни метода - Southern blotting и Northern blotting

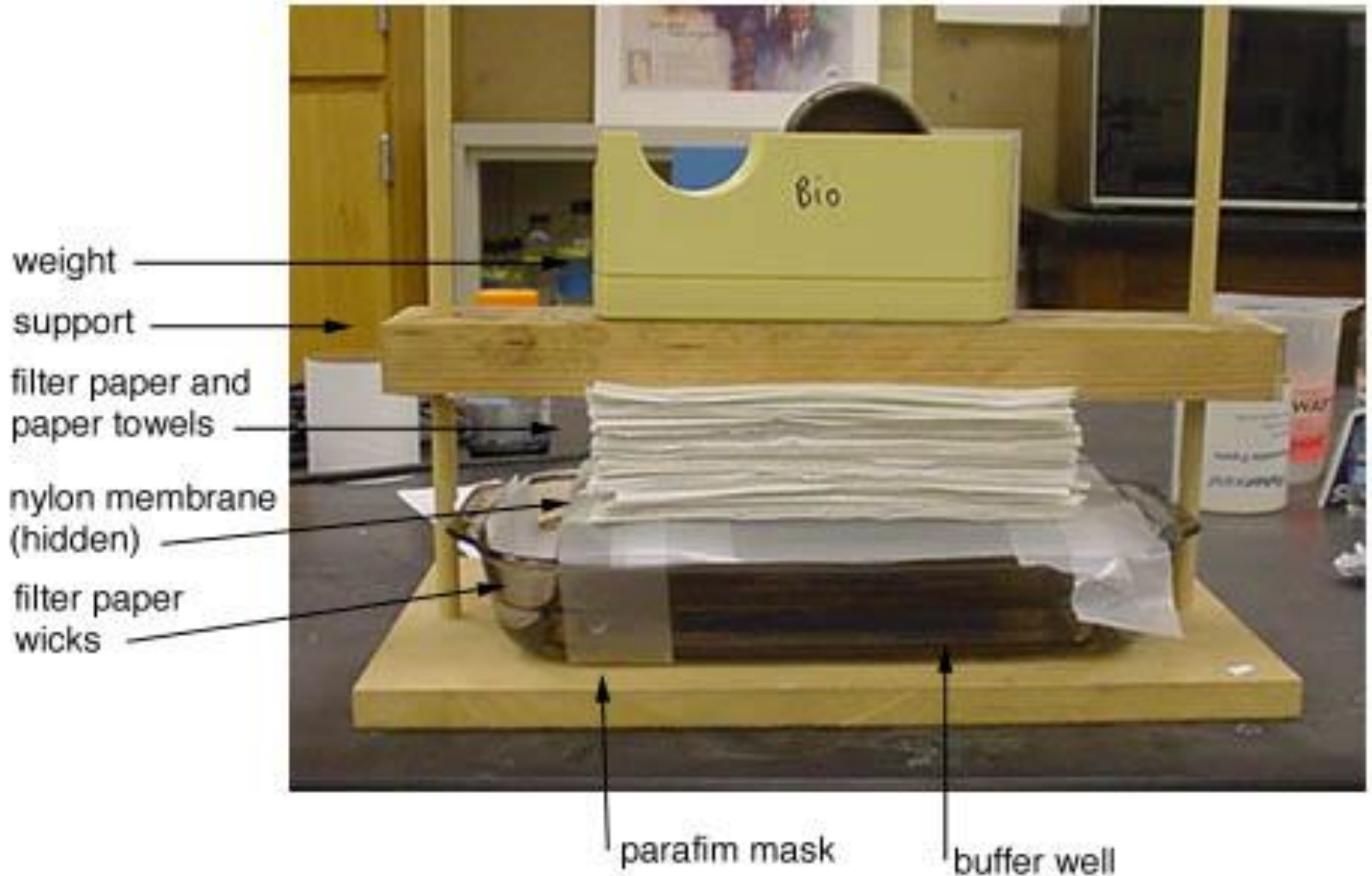
Southern blotting-класически метод за откриване на **специфични ДНК фрагменти (гени или части от гени)** в смеси от хиляди ДНК фрагменти, **независимо от броя на копията им в ДНК.**

Етапи:

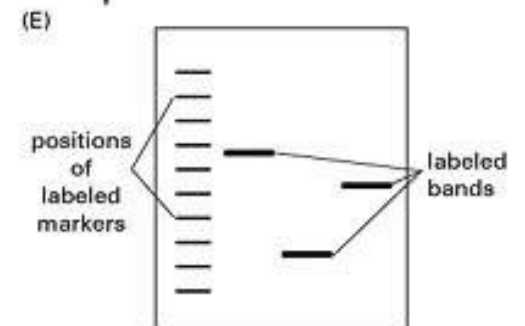
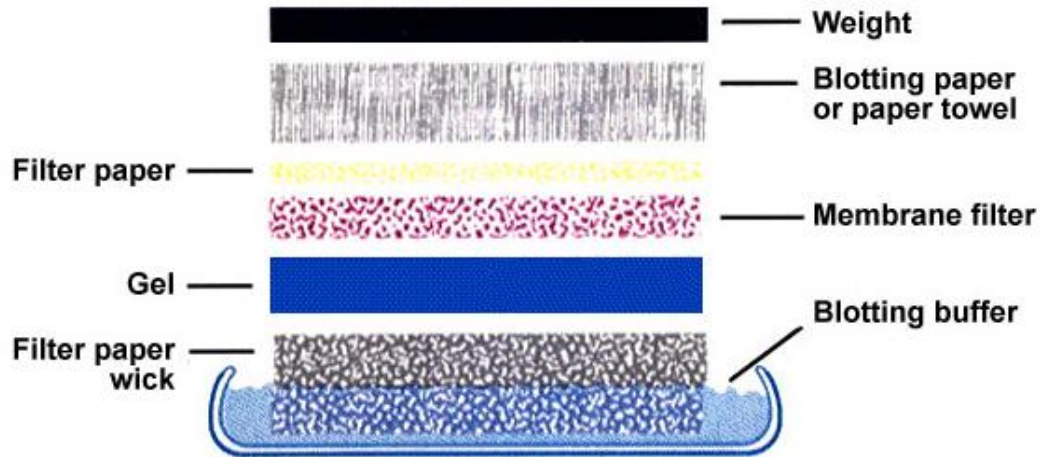
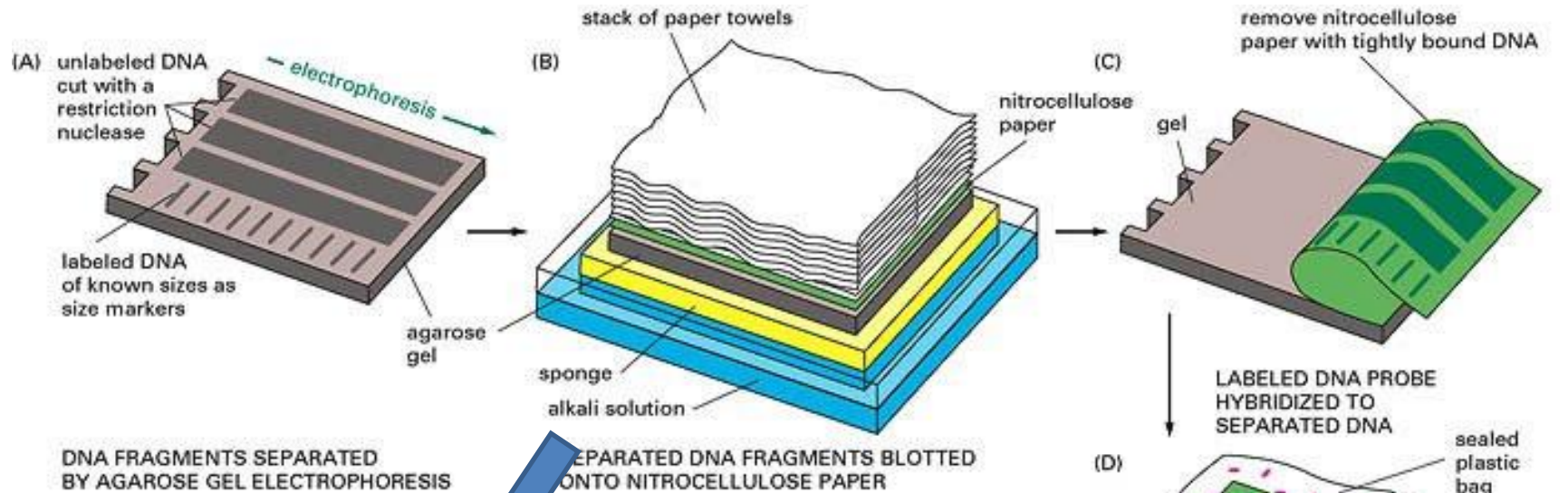
1. **Изолиране** на ДНК
2. **Нарязване** с подходяща рестриктаза на *двуверижни* фрагменти
3. **Електрофоретично разделяне** на фрагментите в зависимост от дължината им.
4. **Денатуриране** на двуверижните фрагменти в едноверижни
5. **Пренасяне (blotting)** на едноверижните фрагменти върху целулозни/найлонови филтри.
6. **Хибридизиране** върху филтрите с белязана ДНК сонда, комплементарна на търсения ДНК фрагмент.
7. **Визуализиране** на получените двойноверижни хибриди (*авторадиография, флуорисценция, луминисценция*).

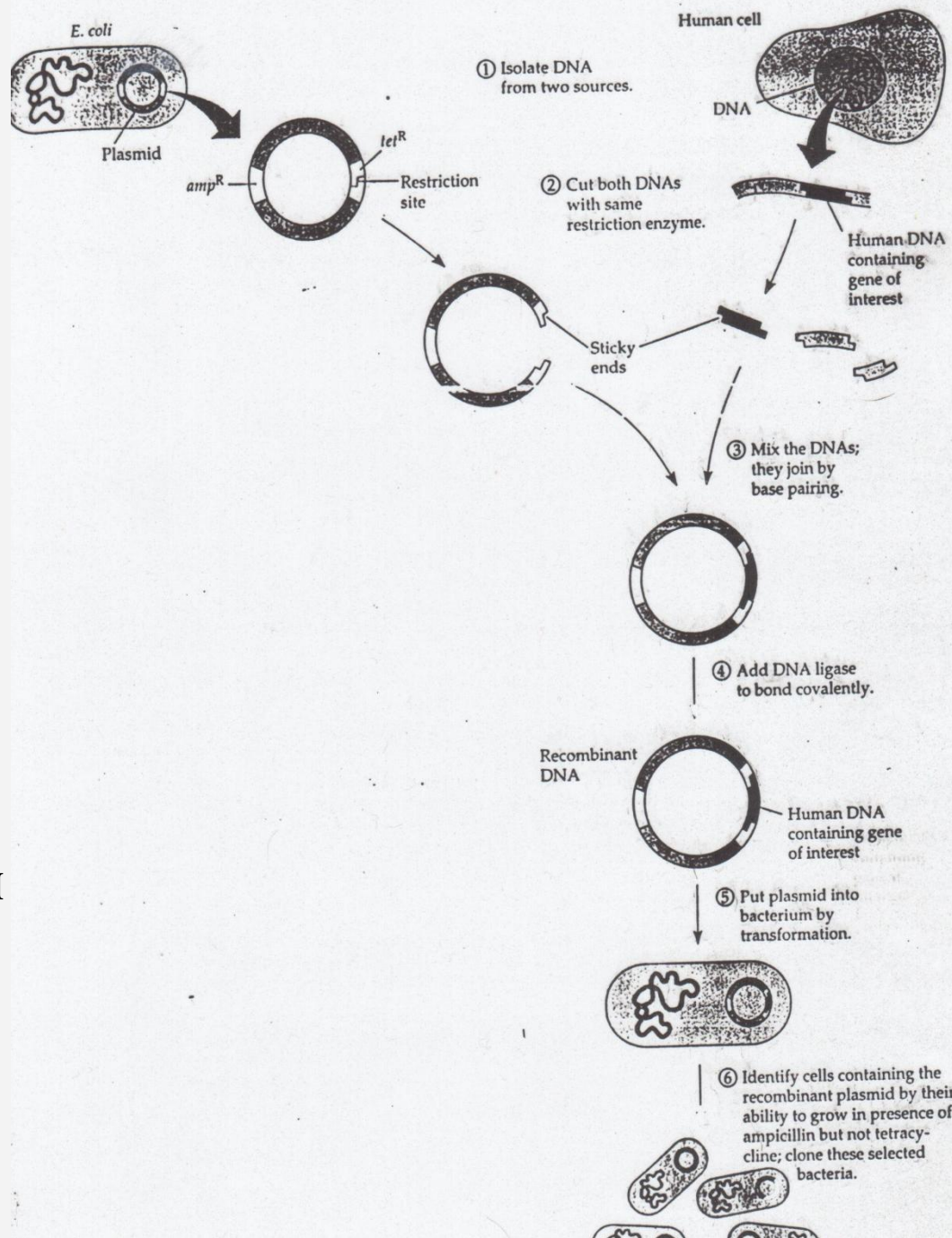
Southern blot анализ

– препечатка върху мембранен носител



Southern blot анализ

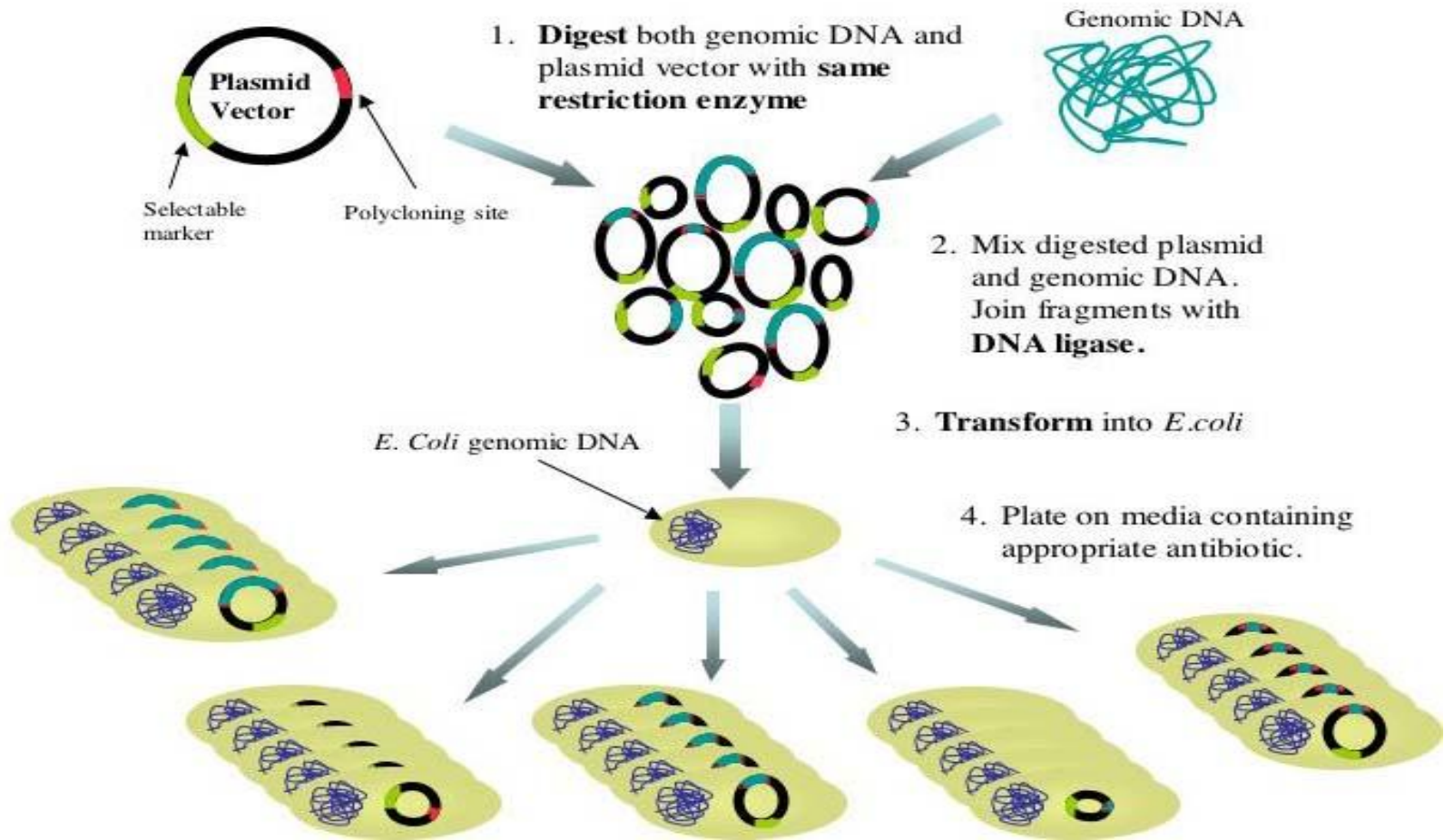




In vivo Клониране на ген в бактериален палзмид

Бактериален
клон, носещ
много копия на
човешкия ген

In vivo Клониране на ген в бактериален палзмид



Отбор на клетките, които съдържат химерния плазмид



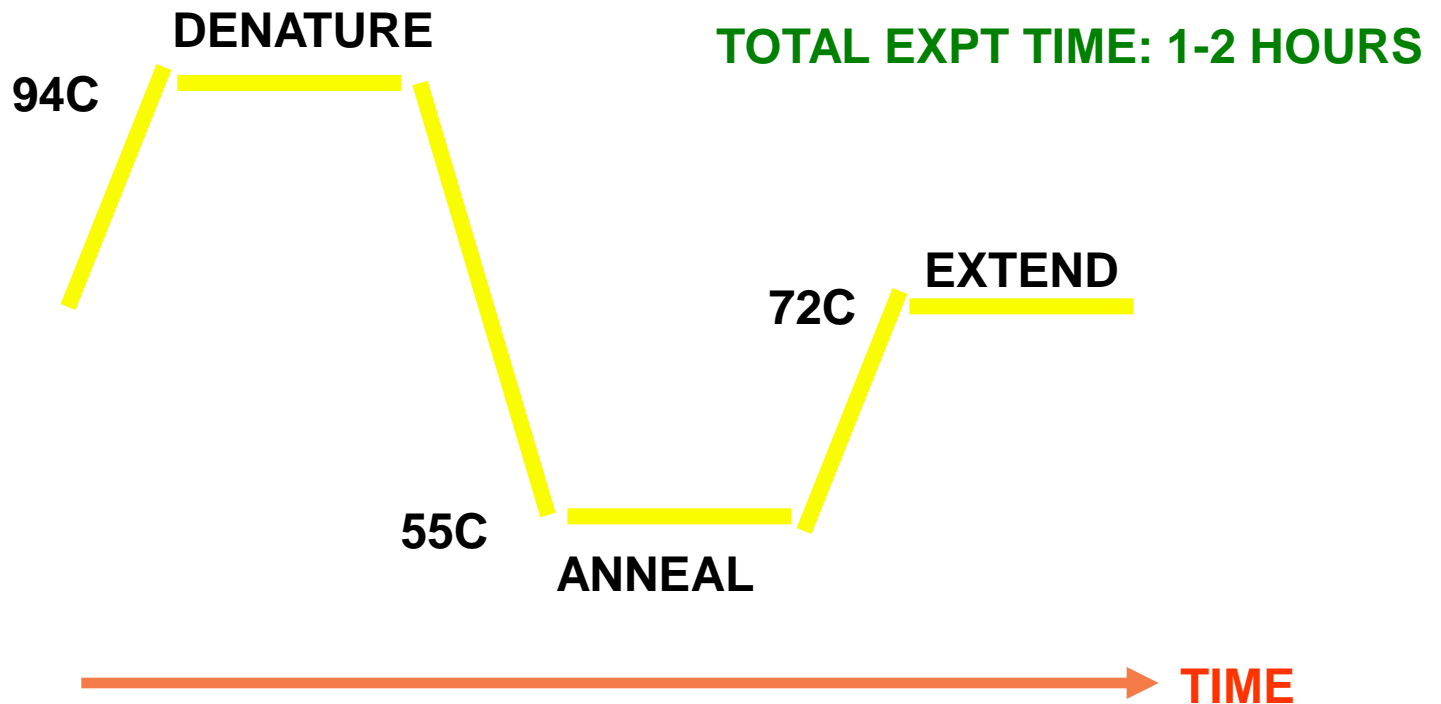
In vitro (неклетъчно) ДНК клониране - PCR

Метод за получаване на голямо количество специфичен сегмент ДНК (амплифицирани копия)

Етапи :

- 1. Топлинна денатурация** на изходната двуверижна ДНК
- 2. Свързване (анийлинг)** на 2 олигонуклеотидни праймера комплементарни на 3`краищата на единичните ДНК вериги
- 3. Удължаване на праймерите** върху матриците от едноверижна ДНК с помощта на термоустойчив ензим *ДНК полимераза* до получаване на двойноверижни копия на изходния ДНК фрагмент
- 4. ДНК копията се визуализират** след **електрофореза** и оцветяване с етидиев бромид, флуорисциращ на UV

PCR протокол
3 стъпки, повтарящи се ~25-40 пъти





PCR амплифицирана ДНК се поставя в агарозен гел за електрофореза

**Визуализиране на амплифицирана ДНК чрез УВ транслюминация.
ДНК се вижда като розово/оранжеви
бендове върху илюминиращия гел.**

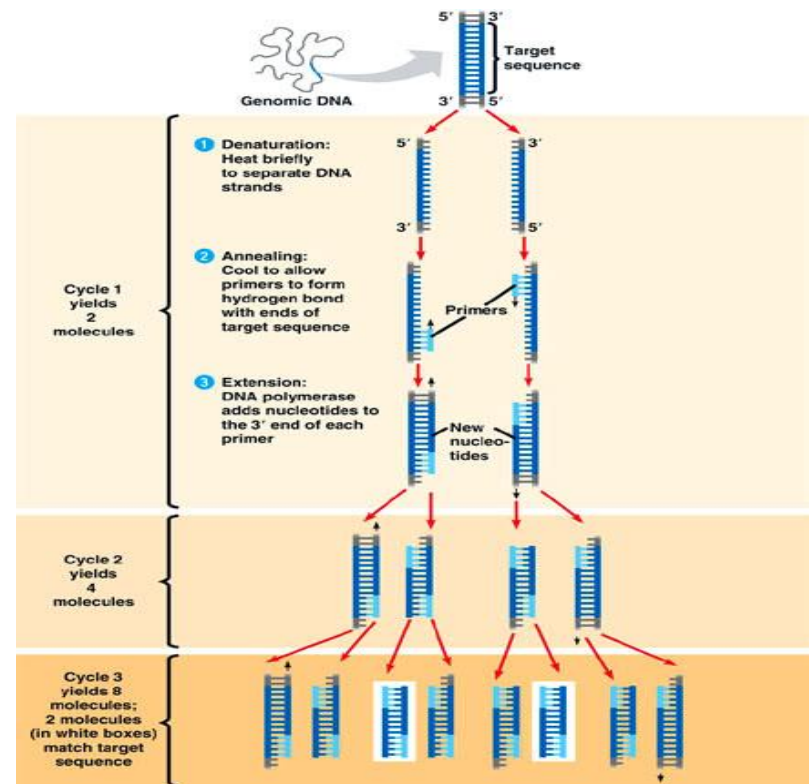
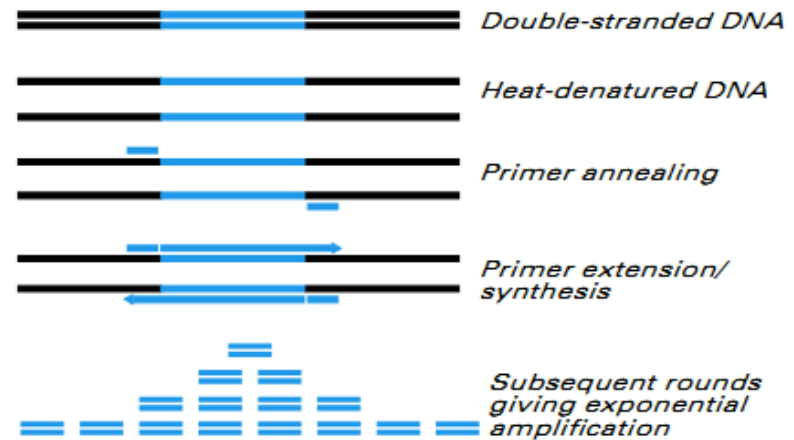
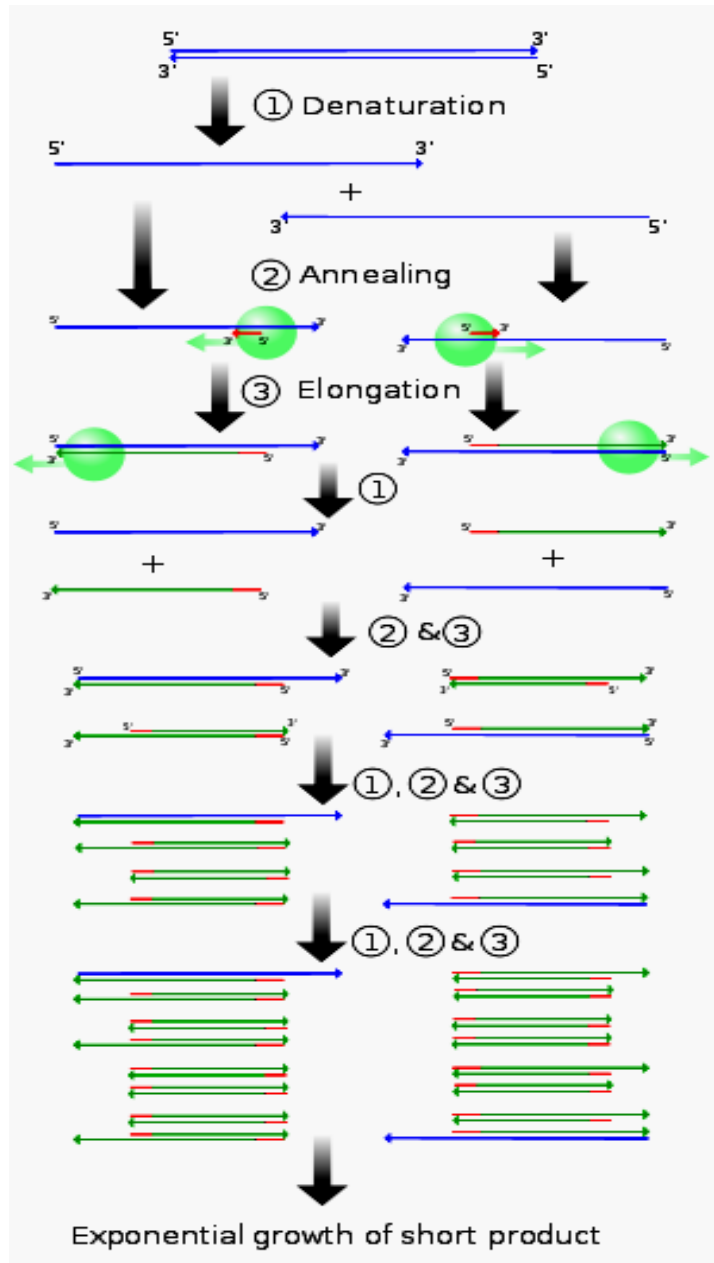


PCR - апарати

Цикълът се програмира и повтаря
20-40 пъти за 1,5-2 часа



In vitro - Полимеразна верижна реакция-PCR



In vitro (неклетъчно) ДНК клониране - PCR

Предимства:

- ☐ Голяма скорост на размножаване
- ☐ Висока чувствителност (1 клетка)
- ☐ Технически простот за изпълнение (пълна автоматизация)

Недостатъци:

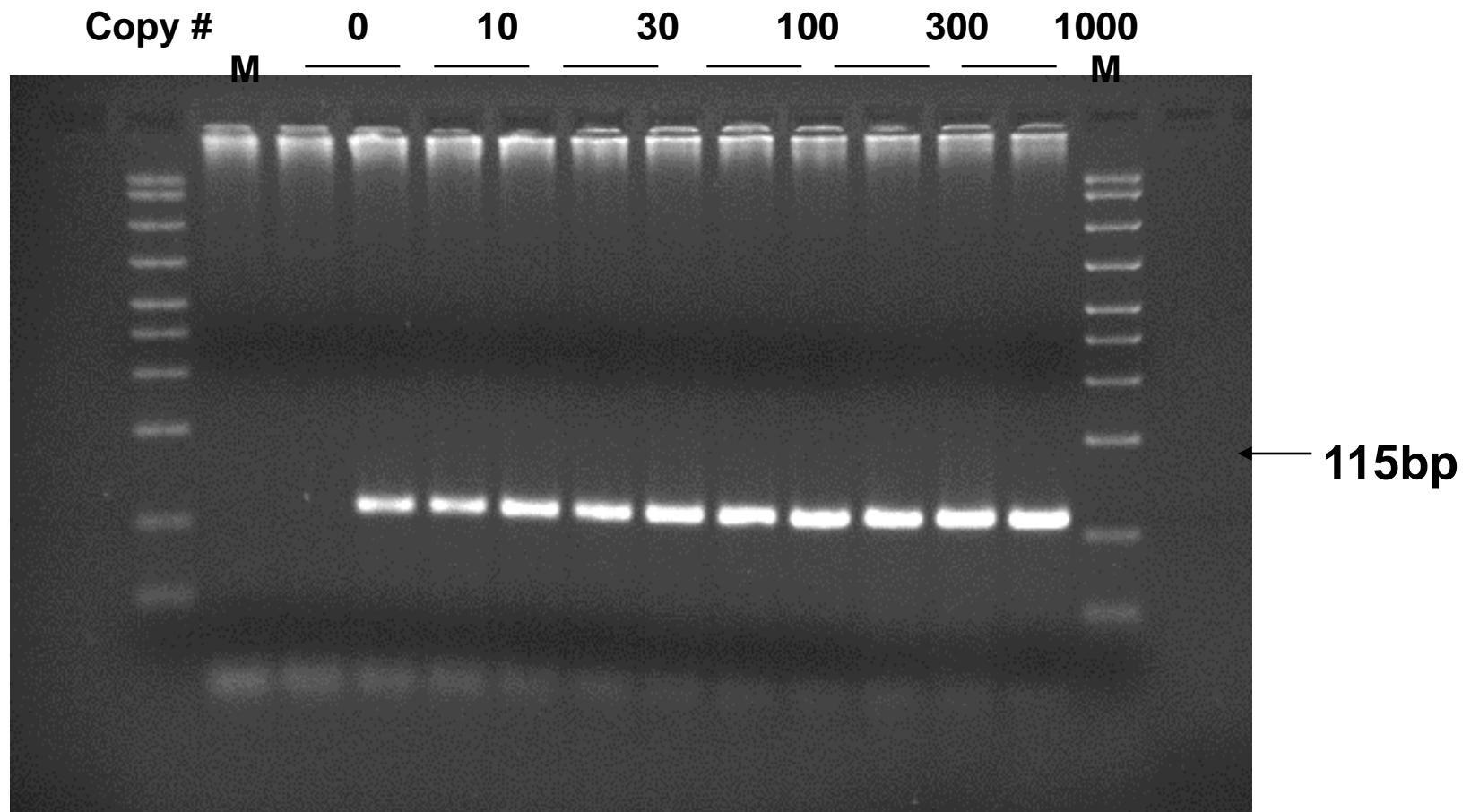
- ☐ Да е известна нуклеотидната последователност на ДНК фрагмента и на праймерите.
- ☐ Невъзможност да се размножават големи фрагменти

Приложение:

- ☐ Добив на доста материал за изследване с друг ДНК метод
- ☐ Диагностичен молекулярногенетичен метод за бързо и ефективно:
 - ✓ Идентифициране на мутации
 - ✓ Изследване на ДНК полиморфизми
 - ✓ Маркиране на мутантни хромозоми

Класически PCR

1 двойка праймери



Как PCR може да стане количествен метод? (Real-time PCR)

TaqMan техника

- 5'-3' екзонуклеазната активност на *Taq* полимеразата;
- Флуоресцентно-белязана специфична сонда;
- Небелязани праймери

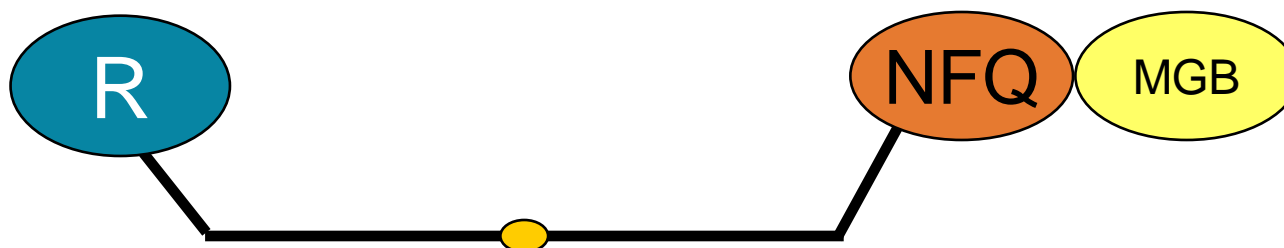
Основен принцип при количествен анализ

- данните се снемат в експоненциалната фаза на процеса /PCR/, когато факторите на средата не са лимитиращи

Основни стъпки на TaqMan анализа

1. **Изолиране на ДНК / РНКот пробата**
 - цяла кръв /ЕДТА/, серум, плазма, бокална лигавица, тъкан, хранит. продукти
 - кит за изолиране / органични разтворители
2. **Подготовка на пробите за RT-PCR / PCR:**
 - ГОТОВ КИТ * TaqMan Reverse Transcriptase * TaqMan Universal MM
 - готов набор праймери и сонда /оптимизиран кит/
 - стандарти с известно съдържание на ДНК – за колич. анализ
3. **Проба за PCR** = изолираната ДНК/РНК + TaqMan Univ. MM + специфичен набор праймери и сонда
4. **Зареждане на пробите в ABI 7500 + отриц. и положит. контрола**
5. **Стартиране на PCR протокола** - 2 до 3ч.
6. **Обработка на резултатите** със специализиран софтуер

TaqMan[®] MGB сонда



Флуоресцентен маркер в 5' края (VIC или FAM)

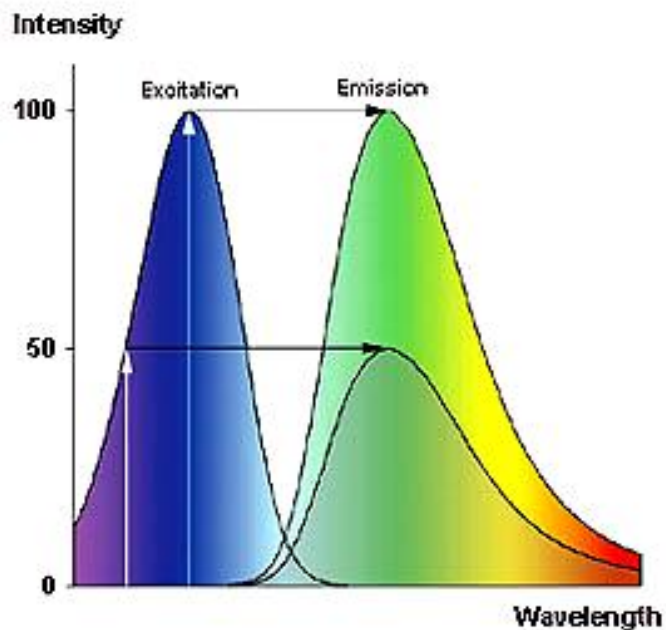
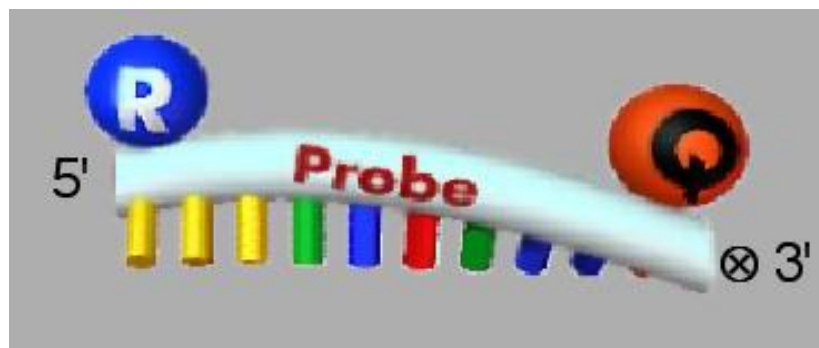


Нефлуоресцентен гасител на сигнала



Minor Groove Binder ($\uparrow T_m$ сондата чрез стабилизиране на двойноверижни структури - по-къси сонди - по-голяма разделителна способност)

Флуоресцентни маркери за real-time PCR



Маркер

SYBR[®] 528 nm

FAM[™] 530 nm

VIC[®] 554 nm

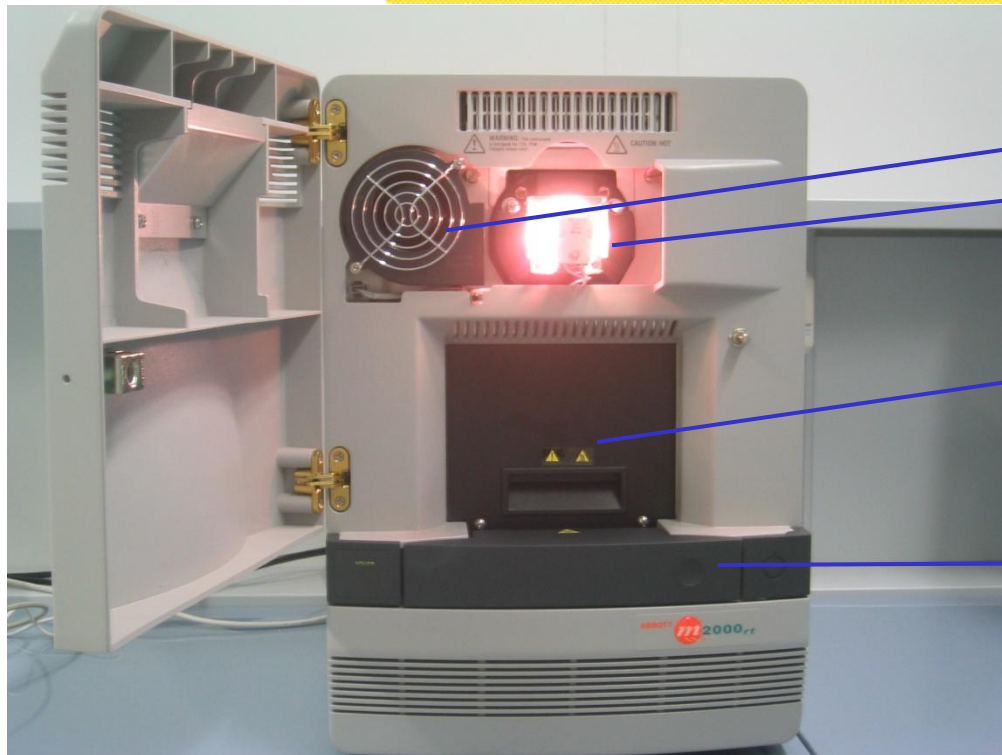
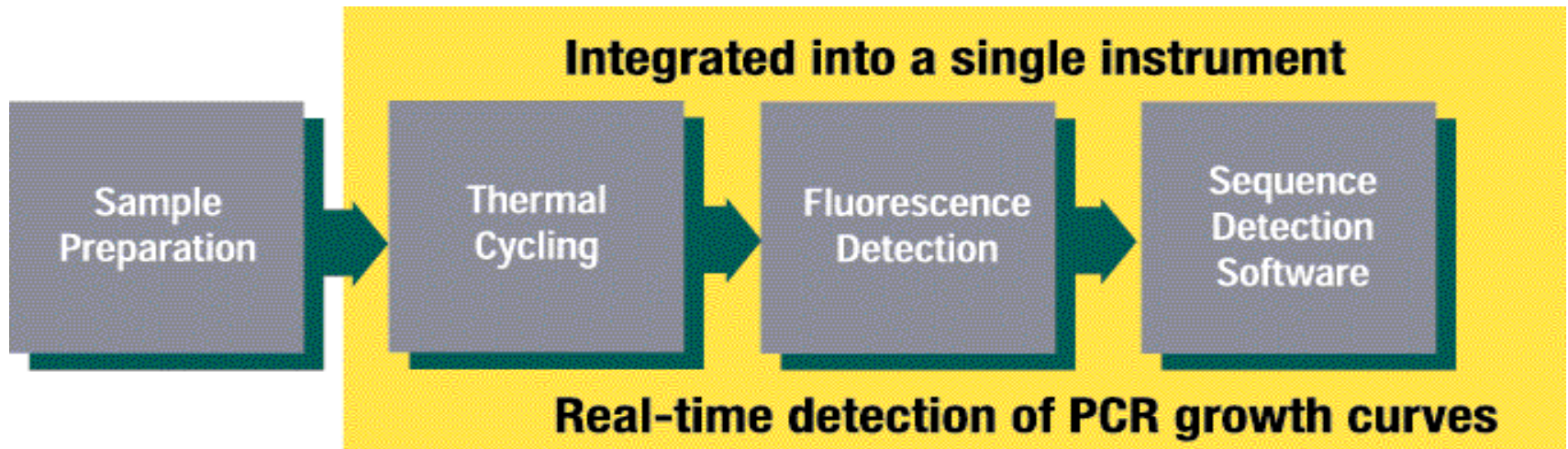
JOE[™] 554 nm

NED[™] 576 nm

TAMRA[™] 582 nm

ROX[™] 610 nm

Real-Time PCR Systems

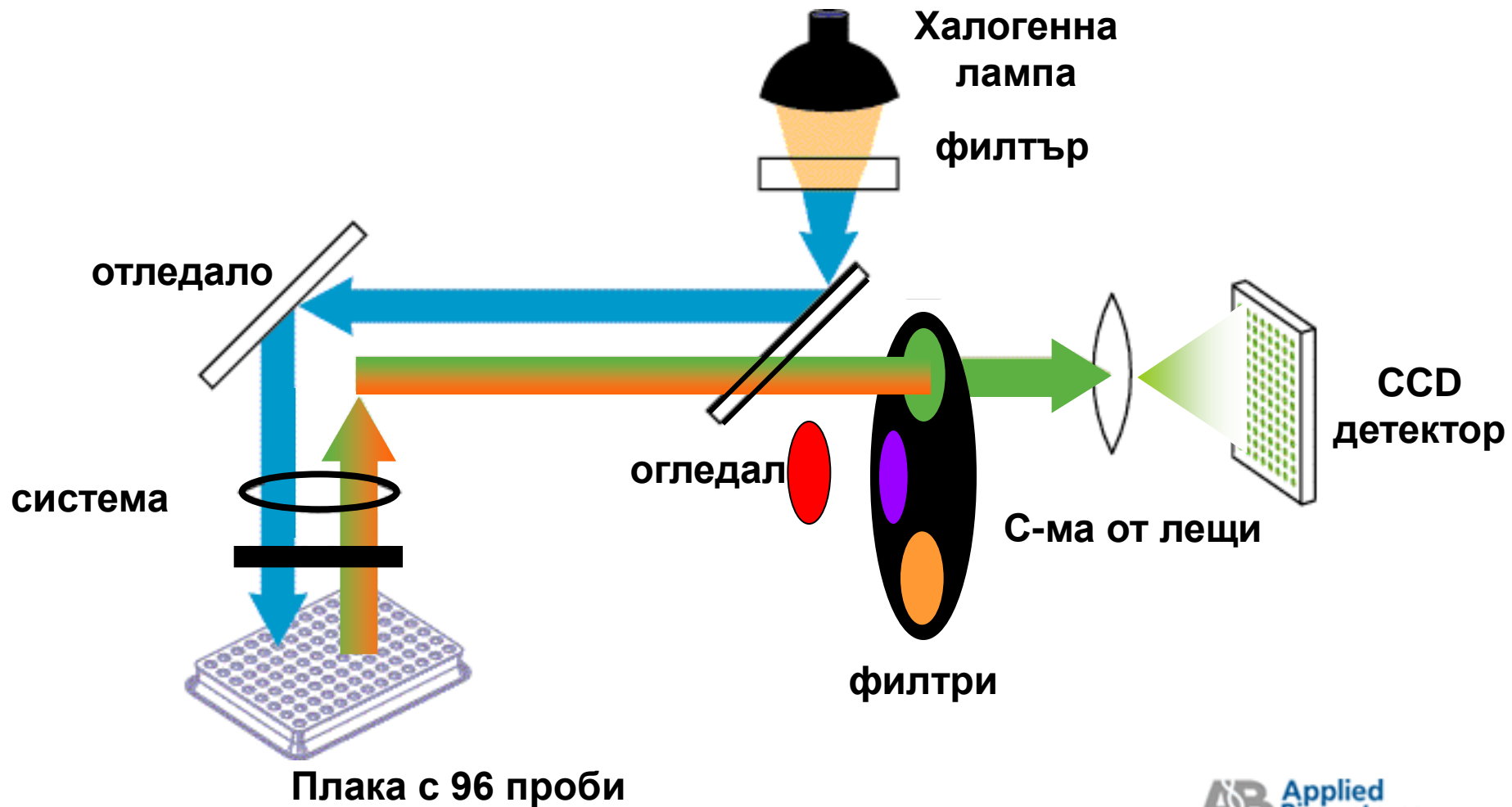


вентилатор
халогенна лампа

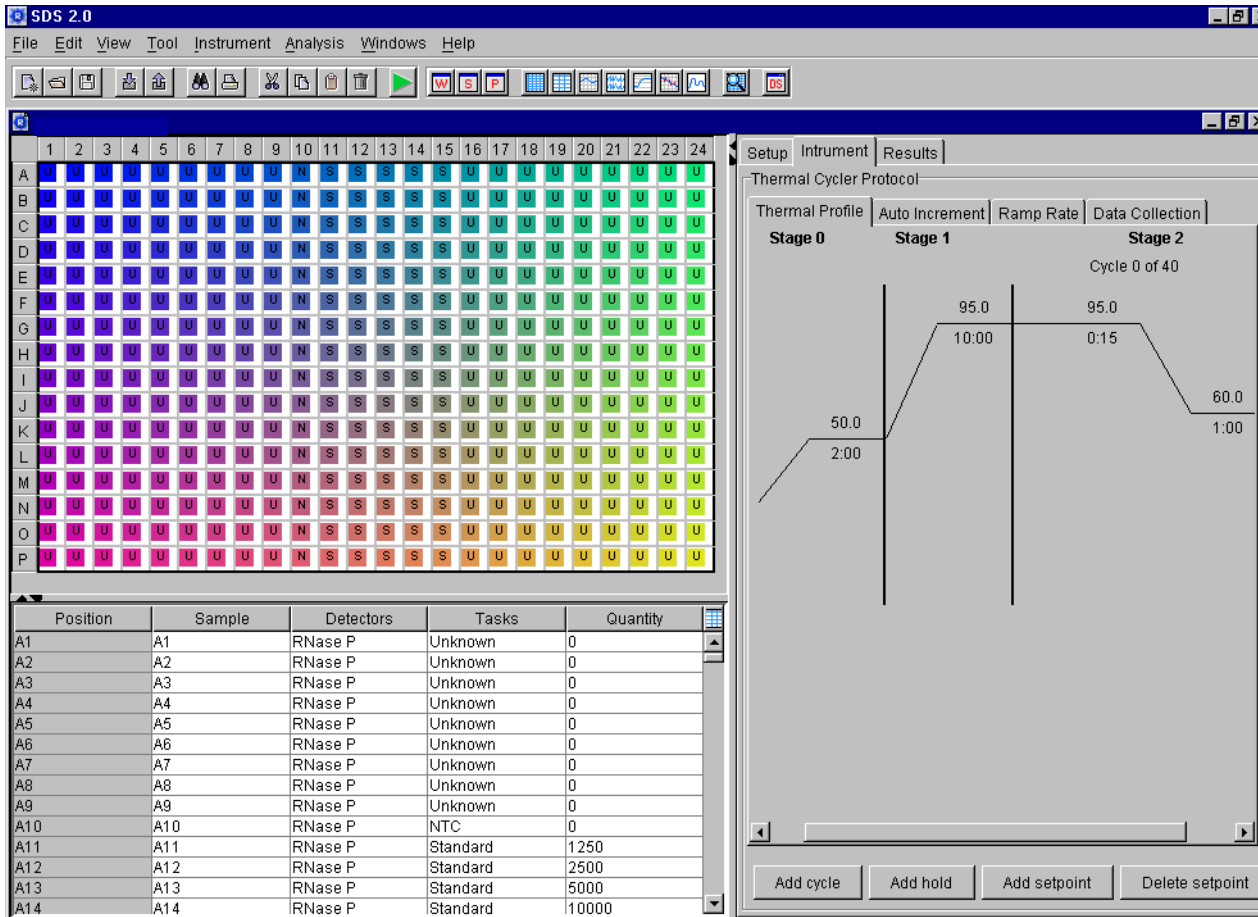
нагрыващ модул

модул за проби

Схема Real-time PCR 7000 / 7300 / 7500



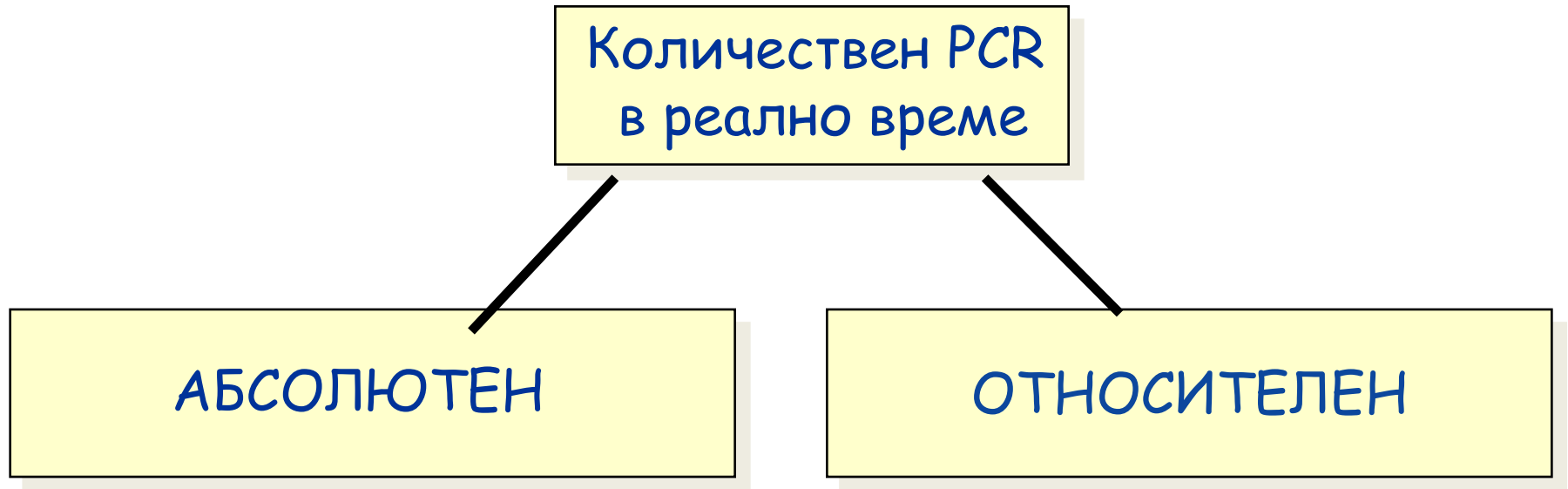
Системи за real-time PCR



Софтуер

- Управление
- Отчитане
- Обработка

TaqMan количествен PCR анализ



- Определя се точният брой генни копия
- По стандартна крива
- Отчита се нивото на генна експресия
- патология спрямо норма

Недостатъци

Скъпи сонди

5 контроли на пациент

3 пъти повторение

Основно за инфекции и карцином

при различни пациенти с едно и също заболяване

мониторинг на лечение с различни средства

- не е нужна стандартна крива

Молекулярно-биологични методи

● Основни типове анализ

■ Детекция

■ *Метод - PCR, качествен анализ*

■ *Апаратура – апарат за PCR + агарозна електрофореза*

■ Количествен анализ

■ *Метод – анализ на генна експресия, PCR и RT-PCR*

■ *Апаратура – апарат за количествен PCR в реално време*

■ Генотипиране и доказване на мутации

■ *Метод – микросателити, секвениране*

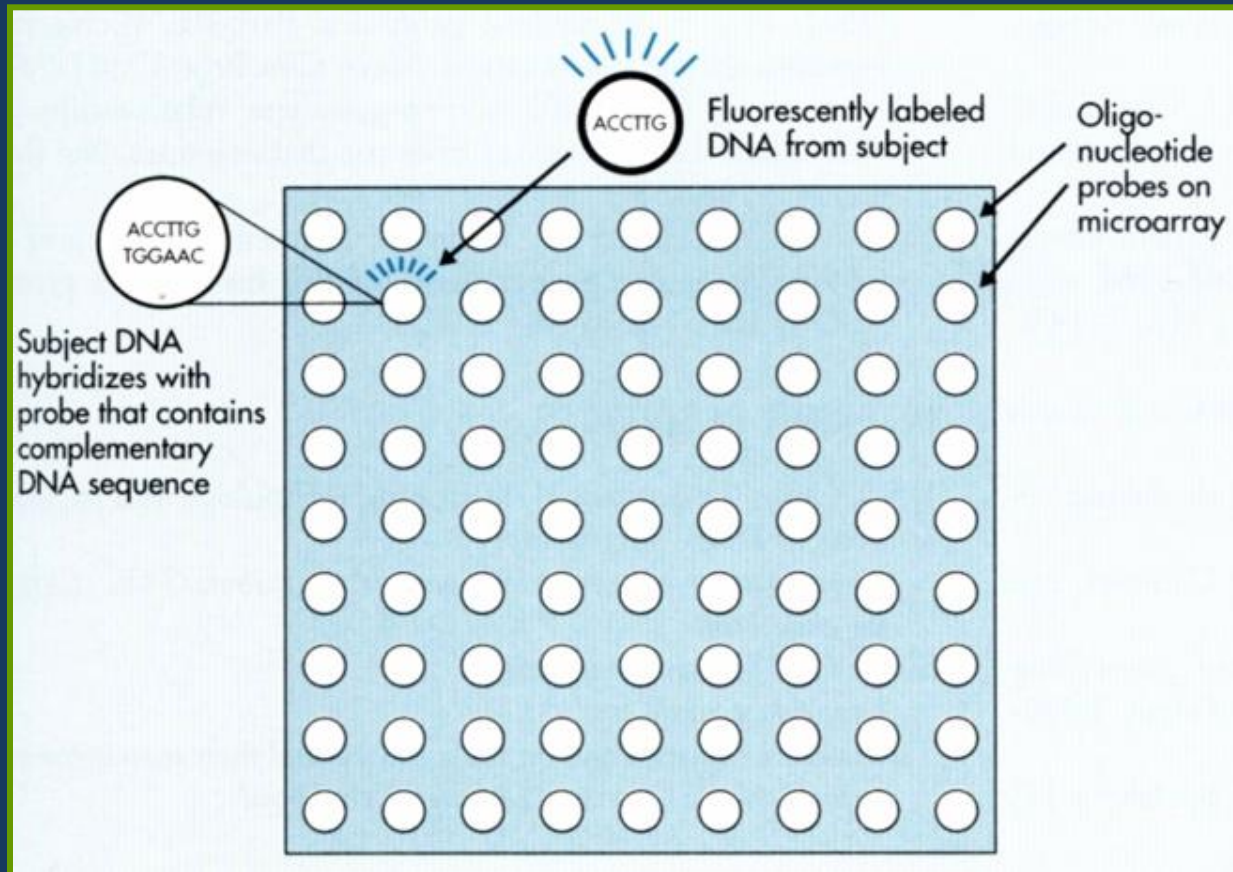
■ *Апаратура - апарат за PCR + автоматичен ДНК секвенатор*

■ Скрининг

■ *Метод – генна експресия*

■ *Апаратура - апарат за PCR + **MicroArray***

ДНК чипове (DNA microarrays)



1) Разкриване на мутации

2) Анализ на генна експресия в тъканна проба (тумор)

Няколко стотин до няколко хиляди олигонуклеотиди от нормални ДНК секвенции и ДНК с болест – предизвикващи мутации автоматично се нанасят върху малък стъклен слайд (1cm²). Флуоресцентно маркирана ДНК от човек хибридизира с нормалните и болест – свързаните олигонуклеотиди; сигналите се анализират от компютър.

Диагностичен ДНК анализ

(откриване на мутации и полиморфизми)

Директен (мутционен) анализ
откриване на мутаця в
известен увреден ген

- **Предимства**

Доказване в конкретен
индивид, без необходимост
от други родственици

Почти 100% точност

- **Недостатъци**

Само при известни, клонрани
гени с краен брой мутации

Индиректен (полиморфен) анализ
проследява в конкретно семейство
унаследяването на ДНК
полиморфизми (RFLP, VNTR, STR) и
косвено “говори” за болестния ген

- **Предимства**

Диагноза при неизвестна мутация
и ген

Висока ефективност при ползване
на няколко информативни маркера

- **Недостатъци**

Жив болен пациент и достатъчен
брой членове на семейството

Информативност на ДНК маркерите

Основни **принципи** на методите за директен и индиректен ДНК анализ

1. **Невъзможно е с единствен ДНК метод да се открият всички мутации на всички болни от едно заболяване**
2. Почти всички методи ползват **предварително амплифицирана (PCR) интересуваща ни ДНК**
3. Разработени са **десетки методи в стотици модификации**; почти всички са качествени и (почти) напълно автоматизирани
4. **Общи етапи:**
 - a) **изолиране на ДНК/РНК**
 - b) **намножаване с PCR**
 - c) **хибридизиране на 2 комплементарни ДНК-и, от които едната е известна (сонда)**
 - d) **електрофоретично разделяне на хибридите ДНК**
 - e) **визуализиране и отчитане**

**Условно, методите за анализ на мутации се делят на
“скриниращи” (пресяващи) и
“потвърждаващи”(диагностични)**

Скриниращите методи – откриват някаква промяна (полиморфизъм или болестна мутация) без да я уточняват. Имат диагностична стойност само при наличие на съответни контроли и при съчетание с потвърждаващ ДНК метод.

Видове:

- **SSCA** – (анализ на конформацията на едноверижни ДНК/РНК фрагменти) – лесен, висок информативен, универсално приложим за откриване на малки мутации
- **DGGE** – (денатурираща градиентна гел електрофореза) скъп капризен, с ограничено приложение
- **Хетеродуплексен анализ**

Приложение

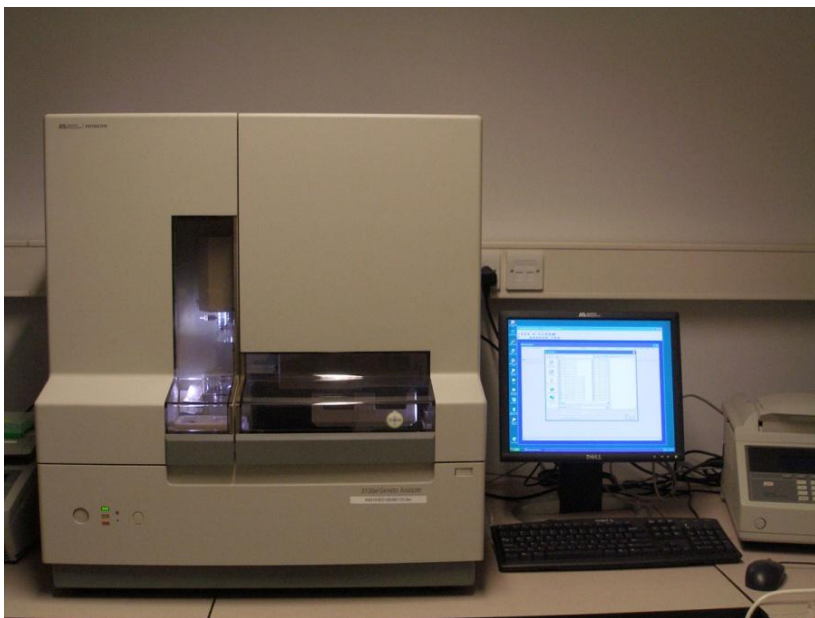
Муковисцидоза, Бета таласемия, Спинална мускулна атрофия

Потвърждаващи (диагностични) ДНК методи за откриване на мутации – откриват директно конкретна мутация и могат да се прилагат и самостоятелно.

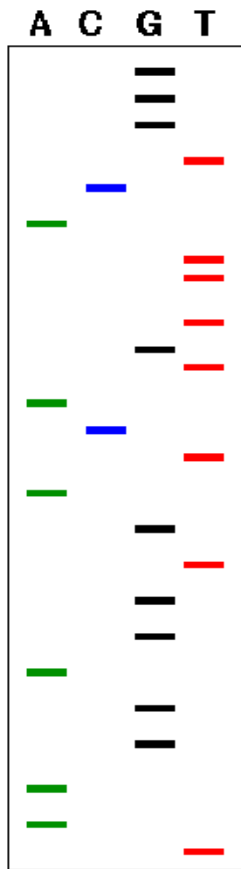
Видове:

- **АСО хибридизация** (Алел специфична олигонуклеотидна) използват се едновременно нормална и мутантна белязани ДНК сонди за търсене на изветни точкови мутации и полиморфизми
- **Southern blot анализ** – за откриване на големи делеции /инсерции и пренареждания (хемофилия, мускулна дистрофия, синдром на чуплива X)
- **Мултиплексен PCR** – с много двойки праймери в 1 реакция, удбен бърз при големи гени (ДМД)
- **ДНК секвениране** -определяне на базовата последователност, скъп трудоемък, полезен за уникални, редки,неизвестни мутации
- **Директен мутационно специфичен RFLP** – мутацията заличава/създава рестрикционно място (сърпов.клетъчна анемия)

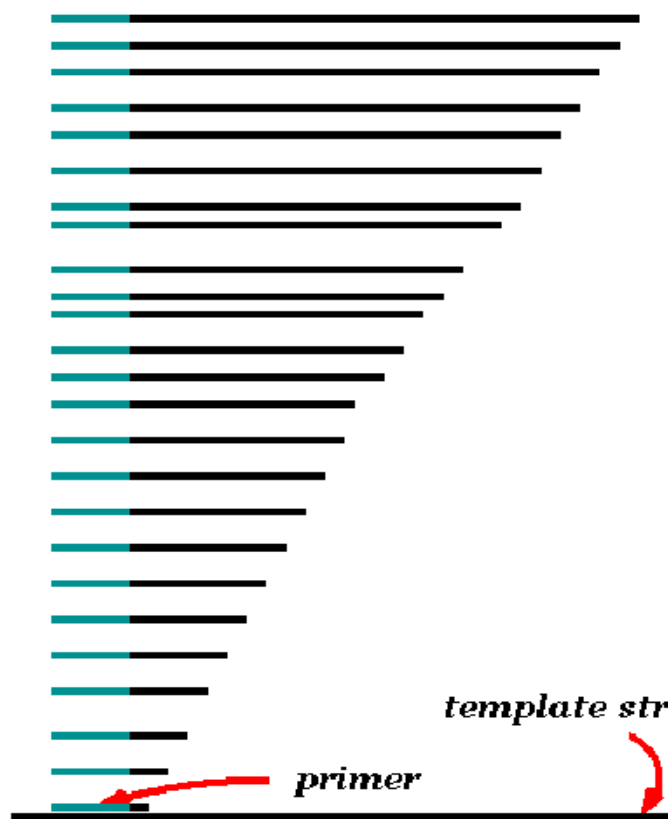
Секвениране - апарати



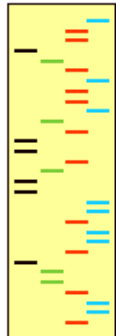
Секвениране



DNA Length



G A T C

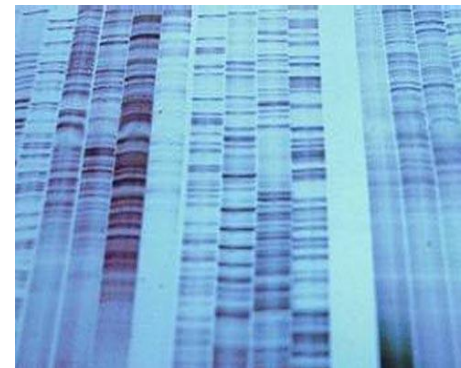


Here's what the products would look like in separate gel lanes.

G A T C



Here's what the products would look like in a single gel lanes.



Single-stranded DNA template — 5' ACACAGTCTATCTCGTA 3'

Primer — 5' GCAT 3'

Radiolabelled dNTPs — dATP, dCTP, dTTP, dGTP

DNA Polymerase

Dideoxy NTPs — ddCTP, ddTTP, ddATP, ddGTP

TACGAGATAGAC

TACGAGAT
TACGAGATAGACT

TACGAG
TACGAGAT
TACGAGATAG
TACGAGATAGACTGT
TACGAGATAGACTGTG

TACGAG
TACGAGATAG
TACGAGATAGACTGT
TACGAGATAGACTGTG

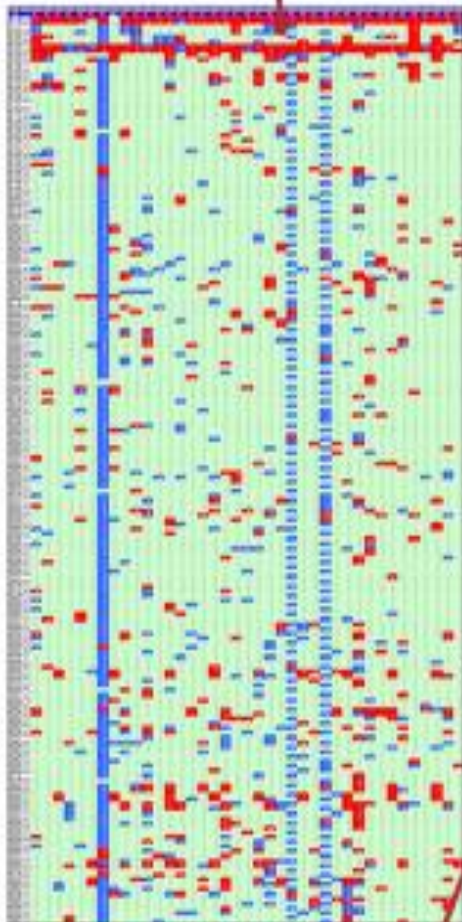
C T A G



Секвениране

~7500 reads

192 reads

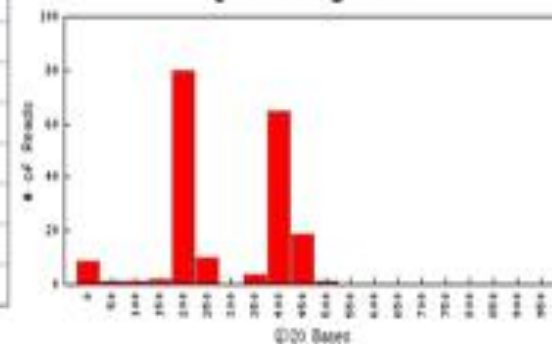


Folder Report

[PDF]

Folder			
Project	DEFAULT		
Group	PUBLIC		
Last data added	2007-06-06 11:22:53		
Accepting new data	Y	Zero trimmed length reads	4.69 % (9 / 192)
Chromats in folder	192	Chromats with reads	100.00 % (192 / 192)
Chromats with traces	192	Avg. # of bases > Q20	319
Comment			

Q20 Histogram



Quality Stats

Quality Plots

Find:

Label

LKE

%24_12%

Go

Reset

?

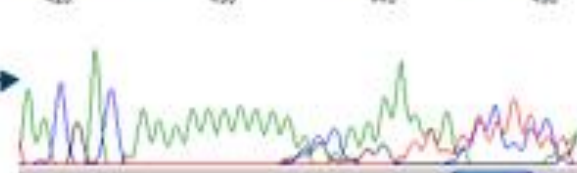
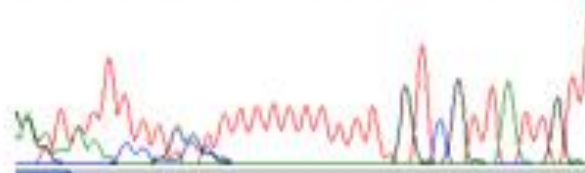
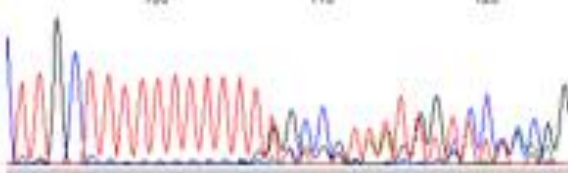
Items 1-2 of 2

One Page

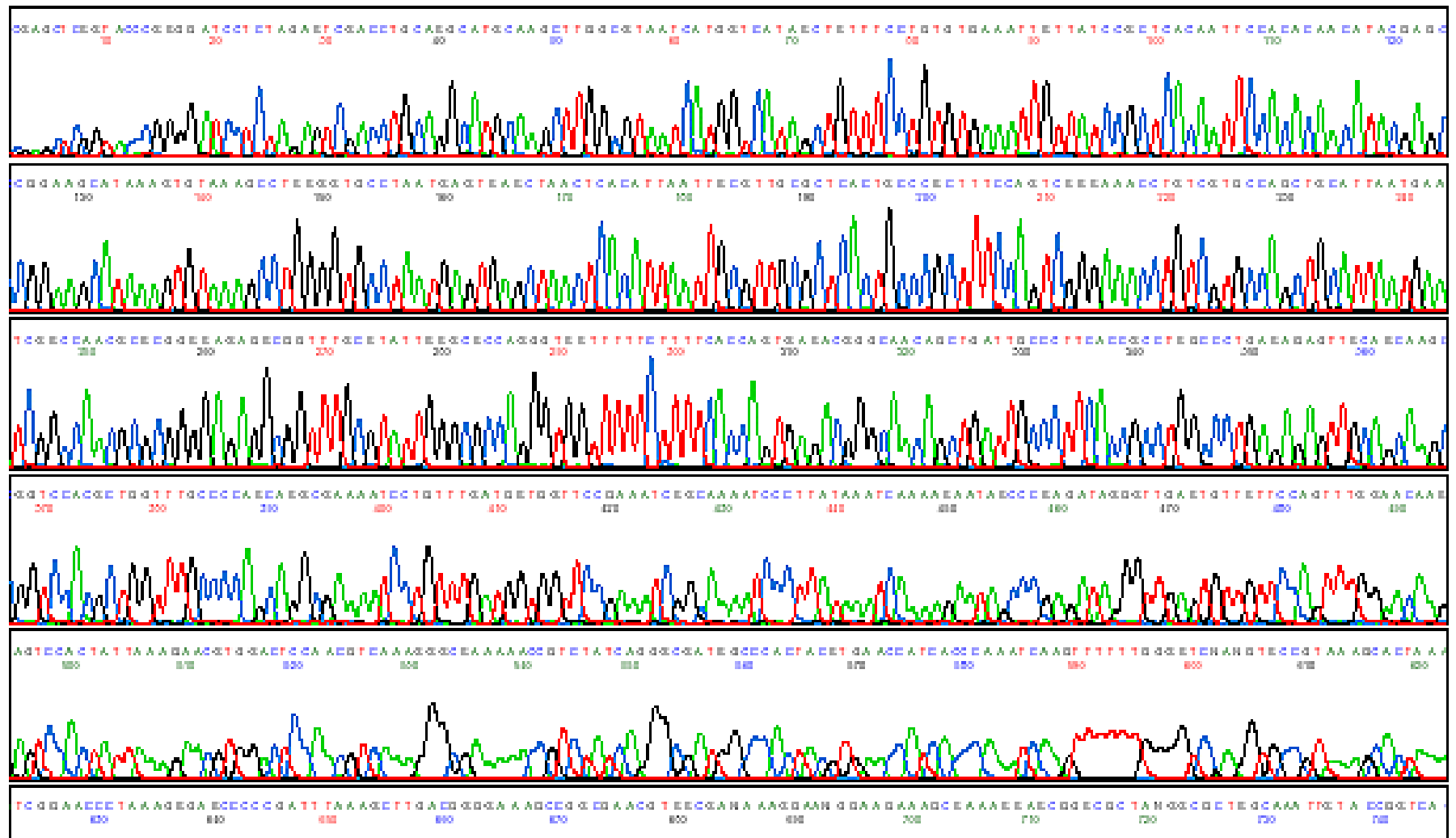
#	Label	Rev	Len	Q20	Q20/len	
1	24F_12.ab1	1	574	240	0.42	
2	24X_12.ab1	1	576	457	0.79	

Choose Action

OK

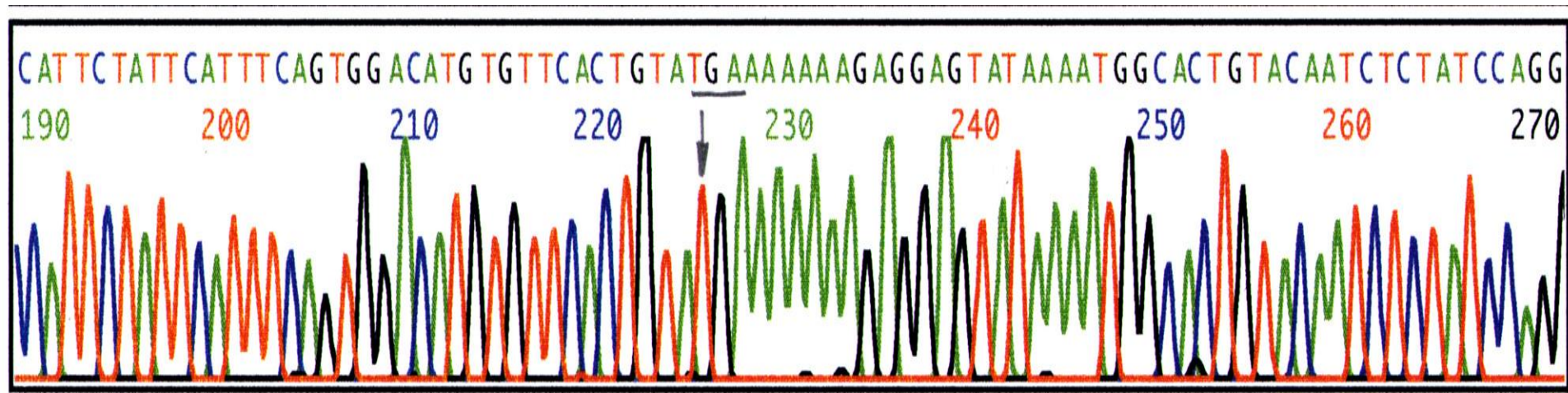


Секвенция



Умерена до лека Haemophilia A (фактор VIII от 2 до 5% ; фактор VIII >5%)

Точкови мутации - Секвениране на F8 (F9) гените



Мутации: c.5953C>T (CGA>TGA), p.Arg1966Stop

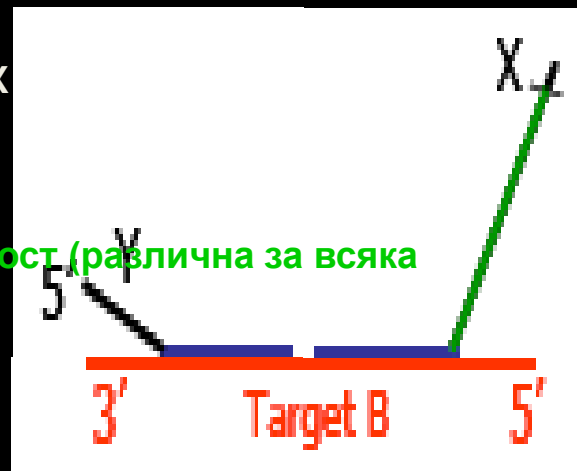
Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) Метод

Нов метод за детекция на мутации в човешкия геном на базата на мултиплексна хибридизация, лигиране и амплификация на голям брой фрагменти в една реакция



Праймерна последователност X

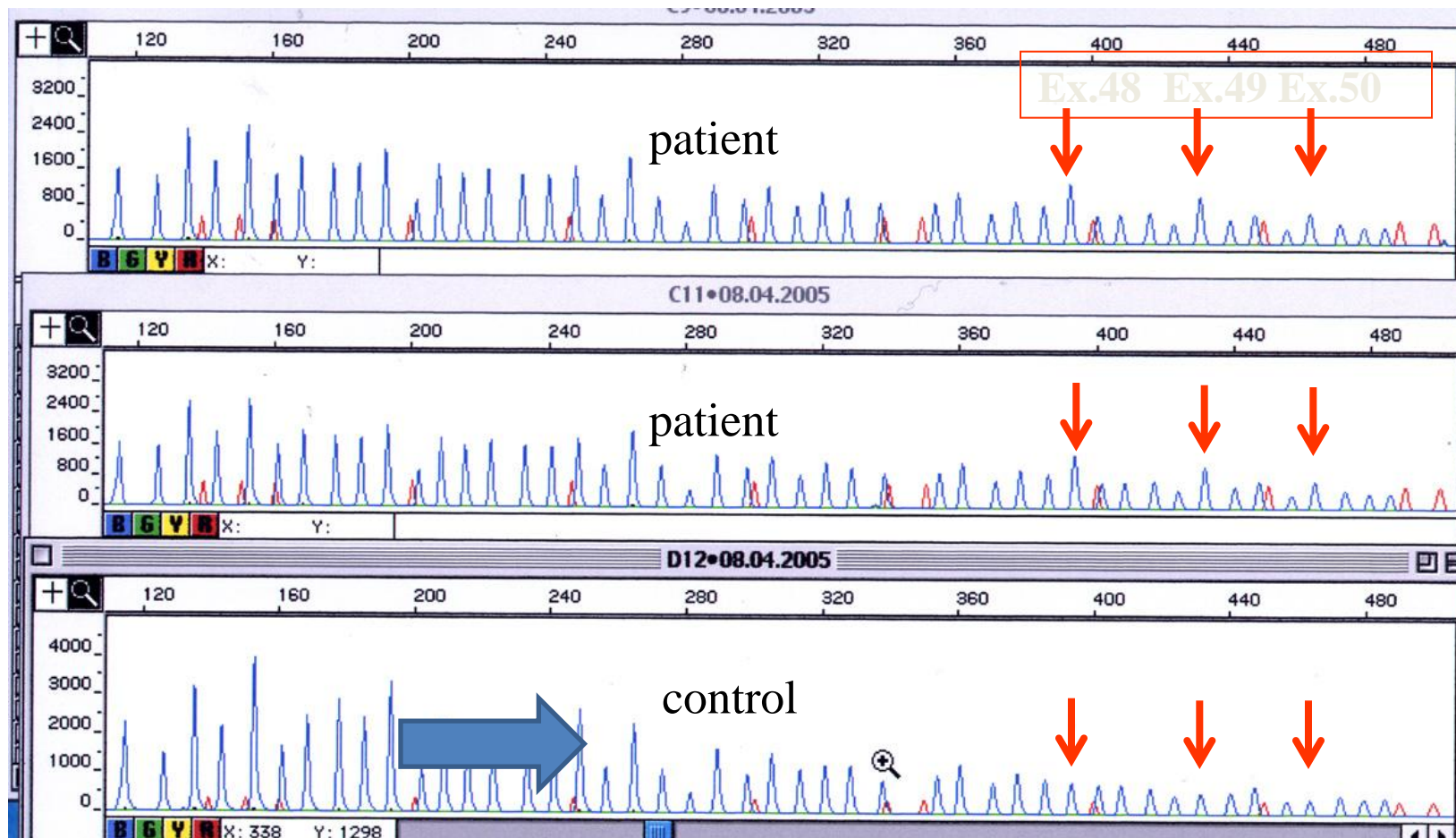
Вмъкната последователност (различна за всяка сонда)



Предимства:

- ❖ Прецизно откриване на около 90% от мутациите в DMD гена.
- ❖ Директно изясняване на носителския статус в жени от рискови фамилии
- ❖ Генетичен анализ в семейства с починал индексен пациент

Пациент с дупликация на екзони 48-50



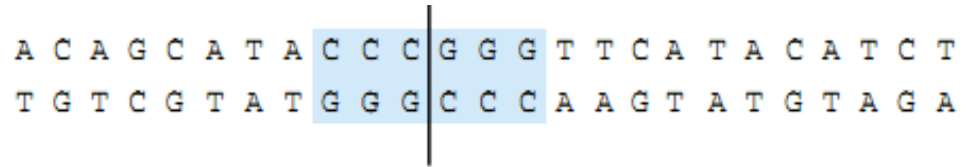
Методът изисква а) доказване на мутацията чрез повторение от 2 независими кита или б) потвърждаване чрез FISH

Методи за изследване на **полиморфизми (RFLPs, VNTR, STR) за **индиректен** ДНК анализ**

- 1. Могат да се използват всички досега описани методи за откриване на мутации.**
- 2. Разликата е, че се търсят не “болестни” промени в ДНК, т.е. не кодиращи последователности (интрони, фланкиращи области до интересувания ни ген), които се унаследяват скачено с него.**
- 3. Много по-рядко е възможно приложение за боластни мутации – RFLP анализ.**

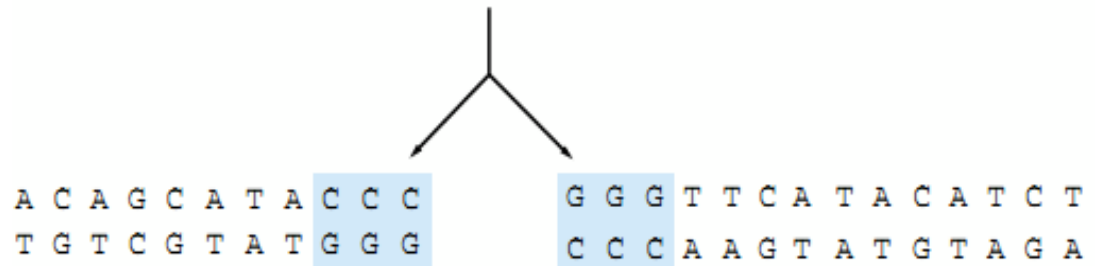
RFLP - Полиморфизъм по дължината на рестрикционните фрагменти

Определение – различие в големината на ДНК фрагментите, дължащ се на присъствието или отсъствието а конкретно рестрикционно място в нуклеотидната последователност на дадена ДНК.



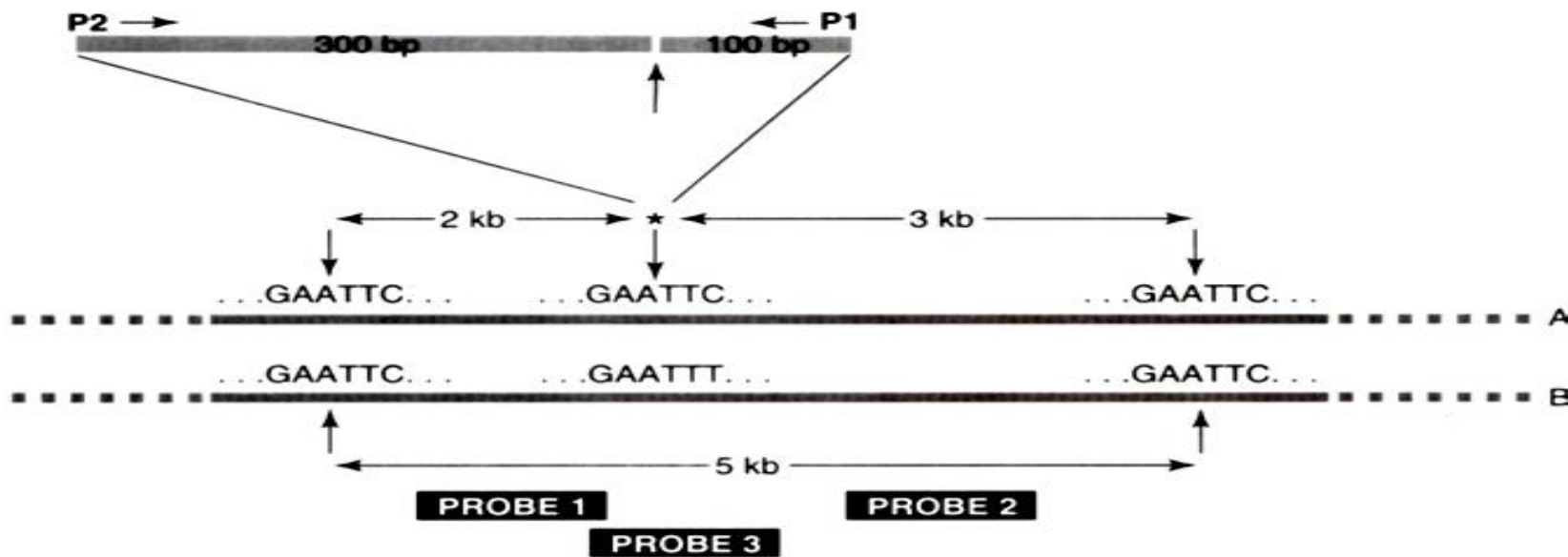
Рестрикционно място

Рестриктази



Размерът на получените фрагменти е постоянен за всеки индивид, но обикновено е различен за различните индивиди поради различия в не кодиращите им ДНК последователности. Различията се дължат на неутрални точкови мутации и се унаследяват по Мендел.

Точкова мутация, която *създава* или *елиминира* място *разпознаваемо от дадена рестриктаза* води до поява на различни от очакваните по дължина фрагменти, които се откриват по различната си електрофоретична подвижност.

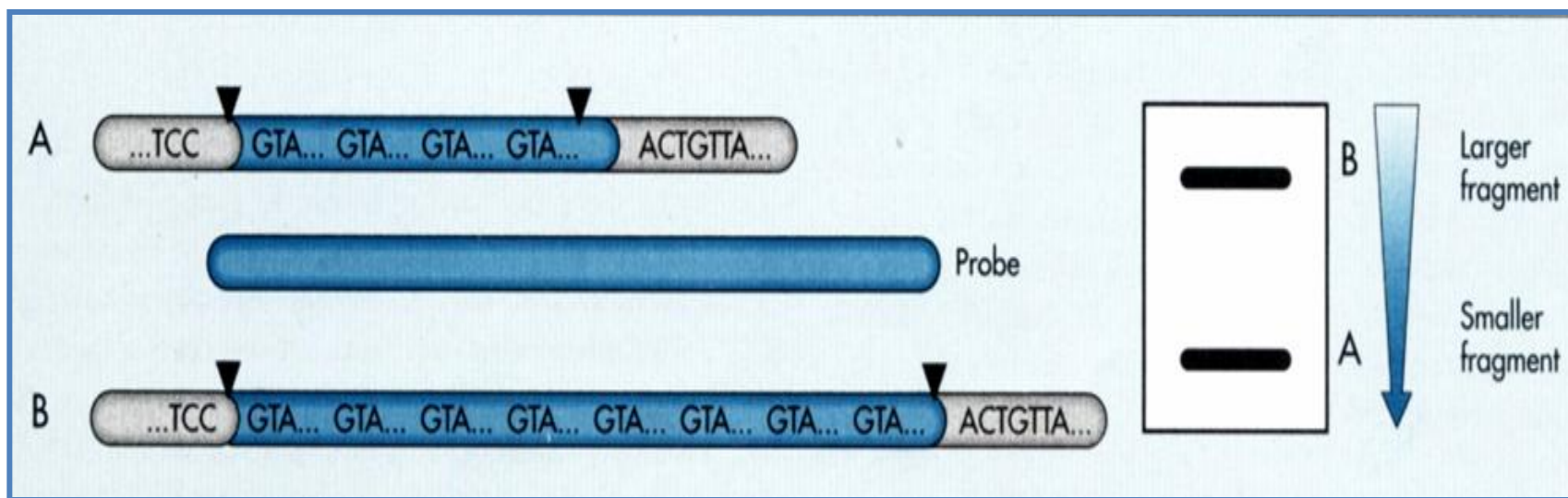


Точкова мутация (неутрална/болестна) е довела до създаване на ново рестрикционно място, т.е. до формиране на 2 алела – А и В

RFLP's са двуалелни – по 1 алел на хомоложна хромозома. Тяхното състояние на хетерозигатност т.е. информативност (различимост) достига само 50% - ниско информативни при индиректен ДНК анализ

VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) полиморфизми

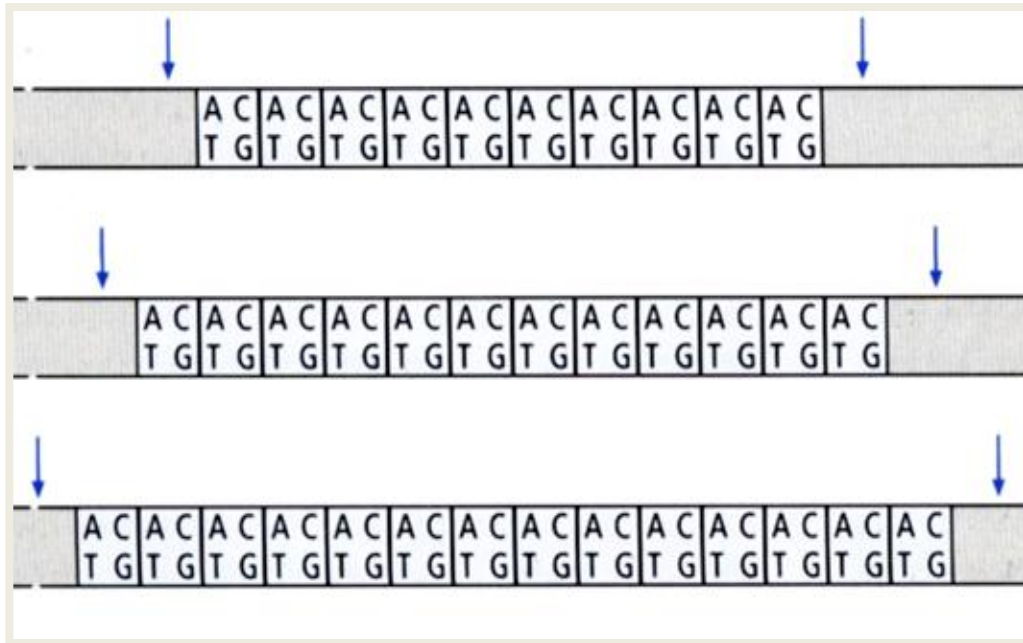
Различие в броя на тандемните повтори в локуси, ограничени от **2 постоянни рестрикционни места**. Различният брой повтори не засяга рестрикционните места.



Тандемни повтори от **минисателитна** ДНК

Тандемните повтори могат да имат различен брой копия – т.е. множество алели с огромен брой вариации в популацията. Затова **VNTR** маркерите са по-информативни (различими) от **RFLP**, тъй като състоянието на хетерозиготност достига 98%.

STR полиморфизми



Авторадиографията представя **микросателитен** ДНК полиморфизъм с множество алели, различни с по 4 базови двойки.

Диаграма на **микросателитни** ДНК полиморфизми с 10, 12 и 14 повтора м/у две разпознаваеми от рестриктаза места. Анализира се чрез **PCR**.

