

Молекулярно-генетични методи за диагностика на моногенни заболявания

д-р Трифон Червенков



Въведение

Кой е молекулният носител на наследствеността?



Въведение

~1860 Грегор Мендел

- Дискретност на генетичните детерминанти: признаците не се смесват, следователно се носят от отделни наследствени единици

Въведение

~1900 Хромозомите са носители на наследствеността

- 1905 Nettie Stevens и Edmund Wilson - Полът: първия признак приписан на хромозома
- 1910-1915 Thomas Morgan Белег за цвят на очите се носи от X-хромозома

Въведение

- ~1900 Хипотеза един ген – един белтък
- 1902 Sir Archibald Garrod: вродени грешки на обмяната, хипотеза: липса на ензим, кодиран от ген
- 1905 Linus Pauling сърповидно-клетъчна анемия се дължи на химически изменен (“мутантен”) хемоглобин

Въведение

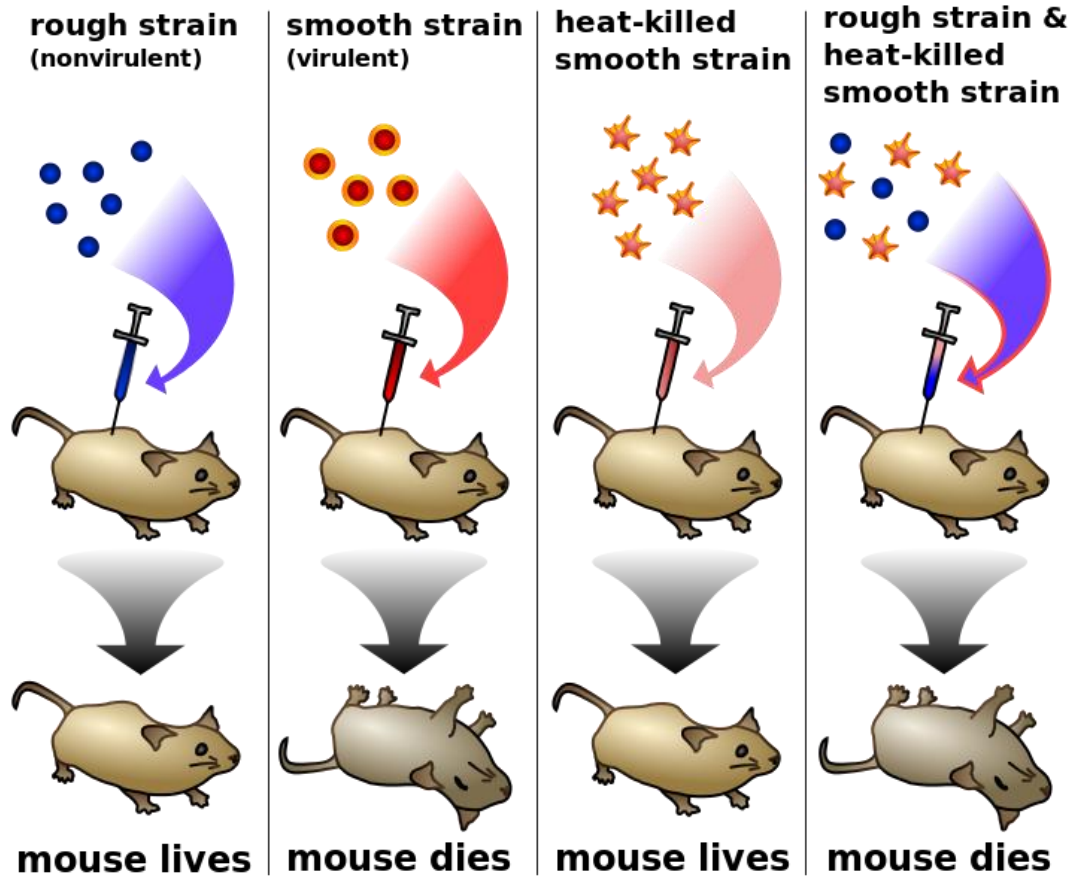
- ~1920 Хипотеза: ДНК е носител на наследствеността
- 1914 Robert Feulgen: оцветяване на ДНК: ДНК е разположена изключително в хромозомите
- Хистоните отсъстват в редица сперматозоиди



Въведение

- ~1930 Биологичен тест за определяне на молекулната природа на генетичния материал
- 1928 Frederick Griffith:
“трансформиращ принцип”

Въведение



“Трансформиращ принцип”



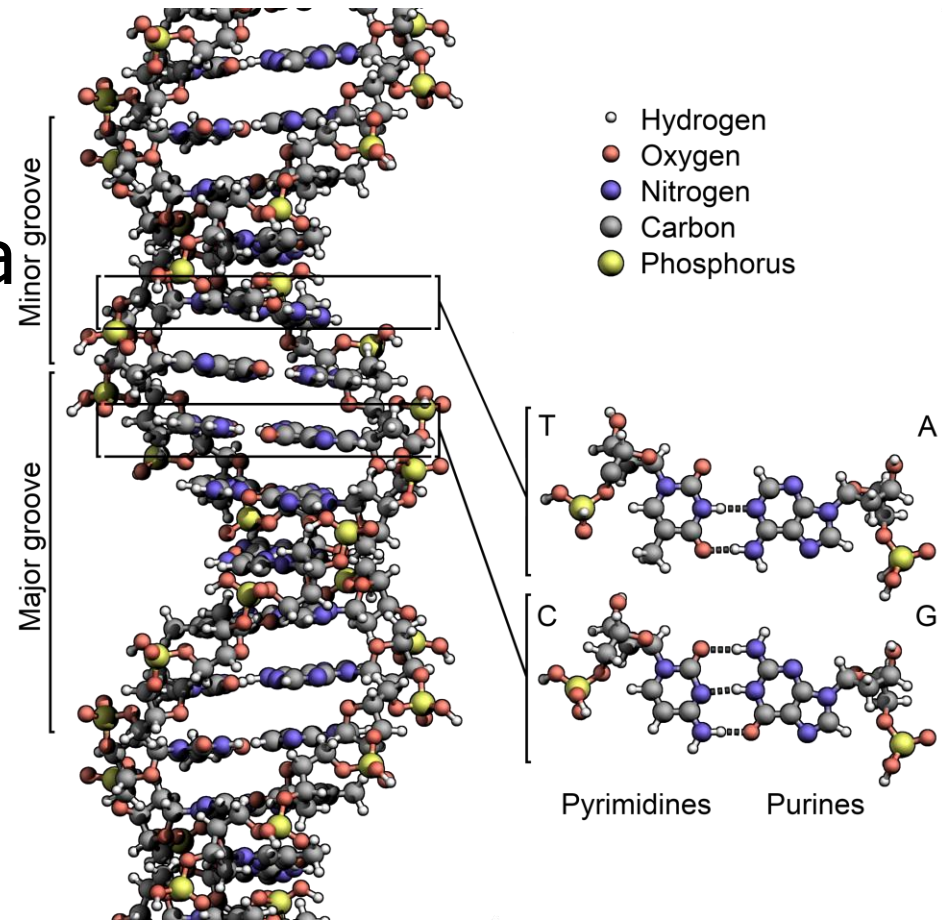
Въведение

- ~1930 Биологичен тест за определяне на молекулната природа на генетичния материал
- 1944 Oswald Avery: ДНК е основна съставка на "трансформиращия" фактор
- Трансформиращата активност изчезва при третиране с ДНКаза, но не с протеаза или РНКаза

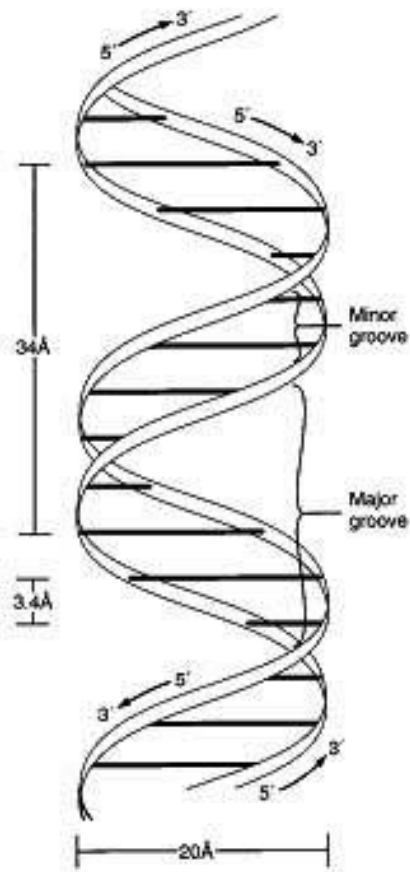
Въведение

1953:
Молекулна
структура на
ДНК:

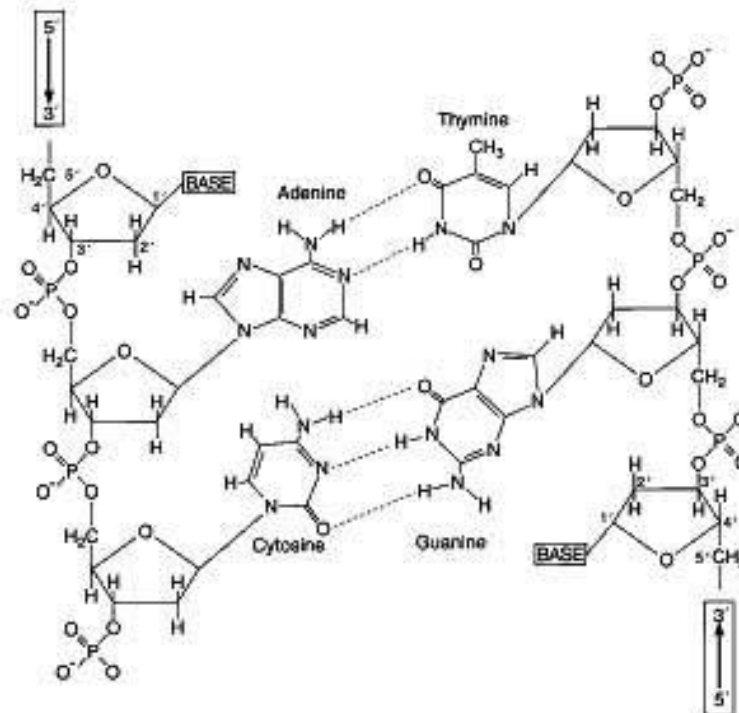
James Watson
и Francis
Crick,
Rosalind
Franklin



Въведение



A



B



Методи за ДНК анализ

Основни видове ДНК анализ:

- Директен ДНК анализ
- Индиректен ДНК анализ



Методи за ДНК анализ

Директен ДНК анализ: директно доказване на болестната мутация

- Точност на диагнозата
- Не е необходимо изследване на други родственици
- Необходима е предварителна информация за мутацията
- Неефективност при голям брой мутации в един ген



Методи за ДНК анализ

Индиректен ДНК анализ:
проследяване на начина на
унаследяване на полиморфен
маркер, скачен с патологичния
ген

- Не е необходима предварителна информация за мутацията
- Изследване на минимум родители и пробанд
- Възможност за рекомбинация



Методи за ДНК анализ

Основни етапи:

- Изолиране на ДНК
- Амплификация на ДНК
- Анализ на амплифицираната ДНК



Методи: Изолиране на ДНК

Условие: за амплификация и последващ анализ е необходима пречистена ДНК

Основни етапи:

- Лизиране на клетъчните мембрани
- Разделяне на (Д)НК от клетъчните отломки
- Премахване на солите

Методи: Изолиране на ДНК

QIAamp Spin Procedure

Sample



Lyse

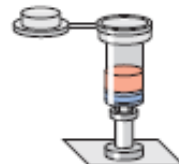


Bind

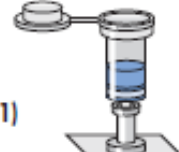
Wash
(Buffer AW1)

QIAamp Vacuum Procedure

Sample



Vacuum

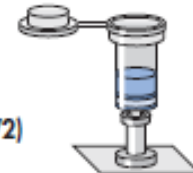


Vacuum



Pure genomic or viral DNA

Wash
(Buffer AW2)



Vacuum



Elute



Полимеразна верижна реакция

Амплификация на специфичен участък от молекулата на ДНК (матрица) чрез:

- Ензим ДНК полимераза
- Олигонуклеотидни праймери
- Субстрати: нуклеозидтрифосфати
- Промяна на температурата



Полимеразна верижна реакция

Предпоставки:

- ДНК полимераза не може самостоятелно да “разплете” веригите на ДНК
- ДНК полимераза не може да започне синтез *de novo*, може само да удължава вериги

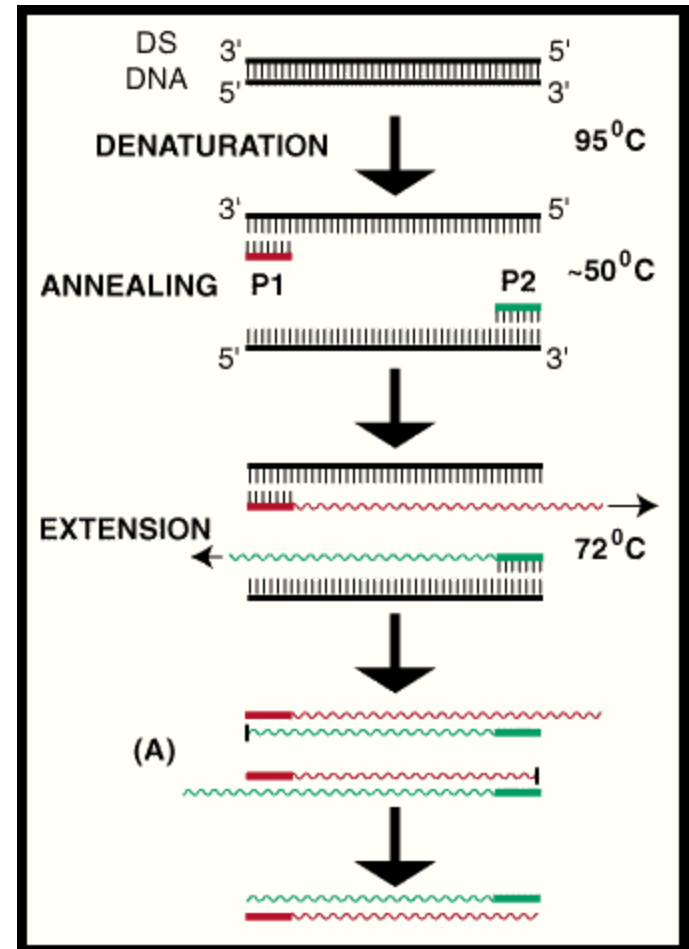


Полимеразна верижна реакция

Циклический процесс, при различной температуре выполняется:

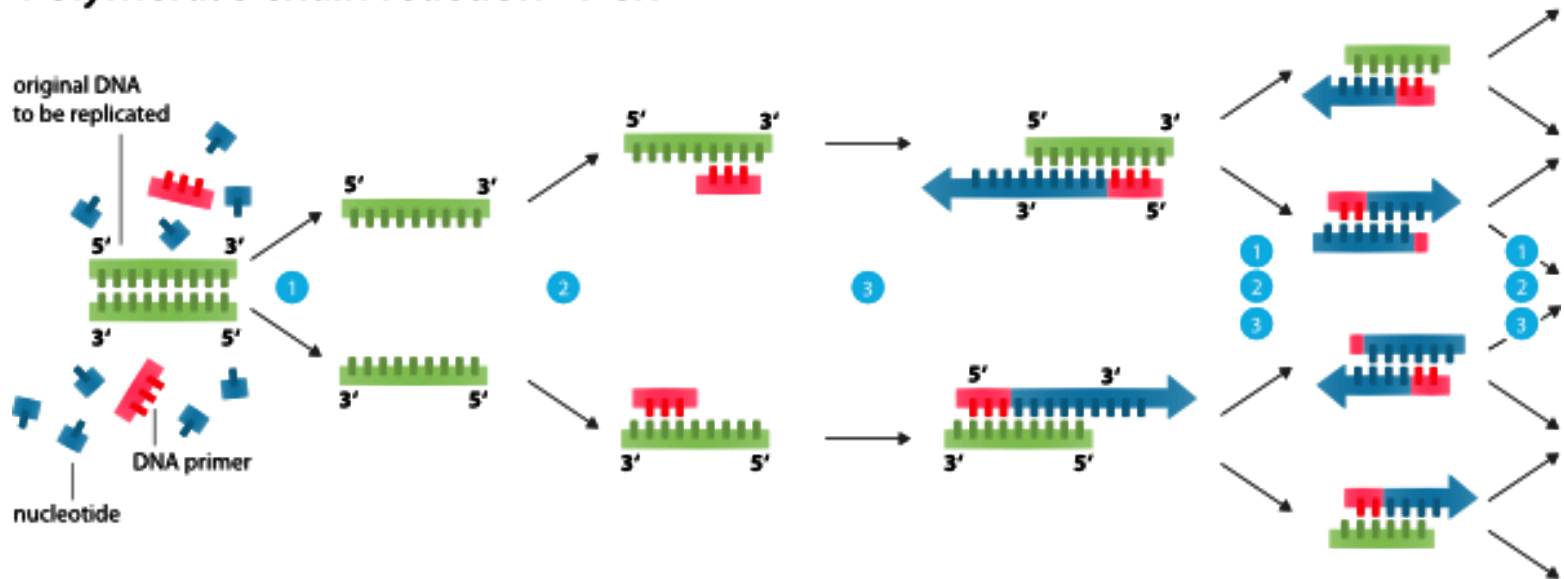
- Тепловая денатурация на ДНК ($\sim 95^{\circ}\text{C}$)
- Специфическая гибридизация на олигонуклеотидные праймеры ($\sim 60^{\circ}\text{C}$)
- Удлинение на праймерите ($\sim 72^{\circ}\text{C}$)

Полимеразна верижна реакция



Полимеразна верижна реакция

Polymerase chain reaction - PCR



- 1 **Denaturation** at 94-96°C
- 2 **Annealing** at ~68°C
- 3 **Elongation** at ca. 72 °C

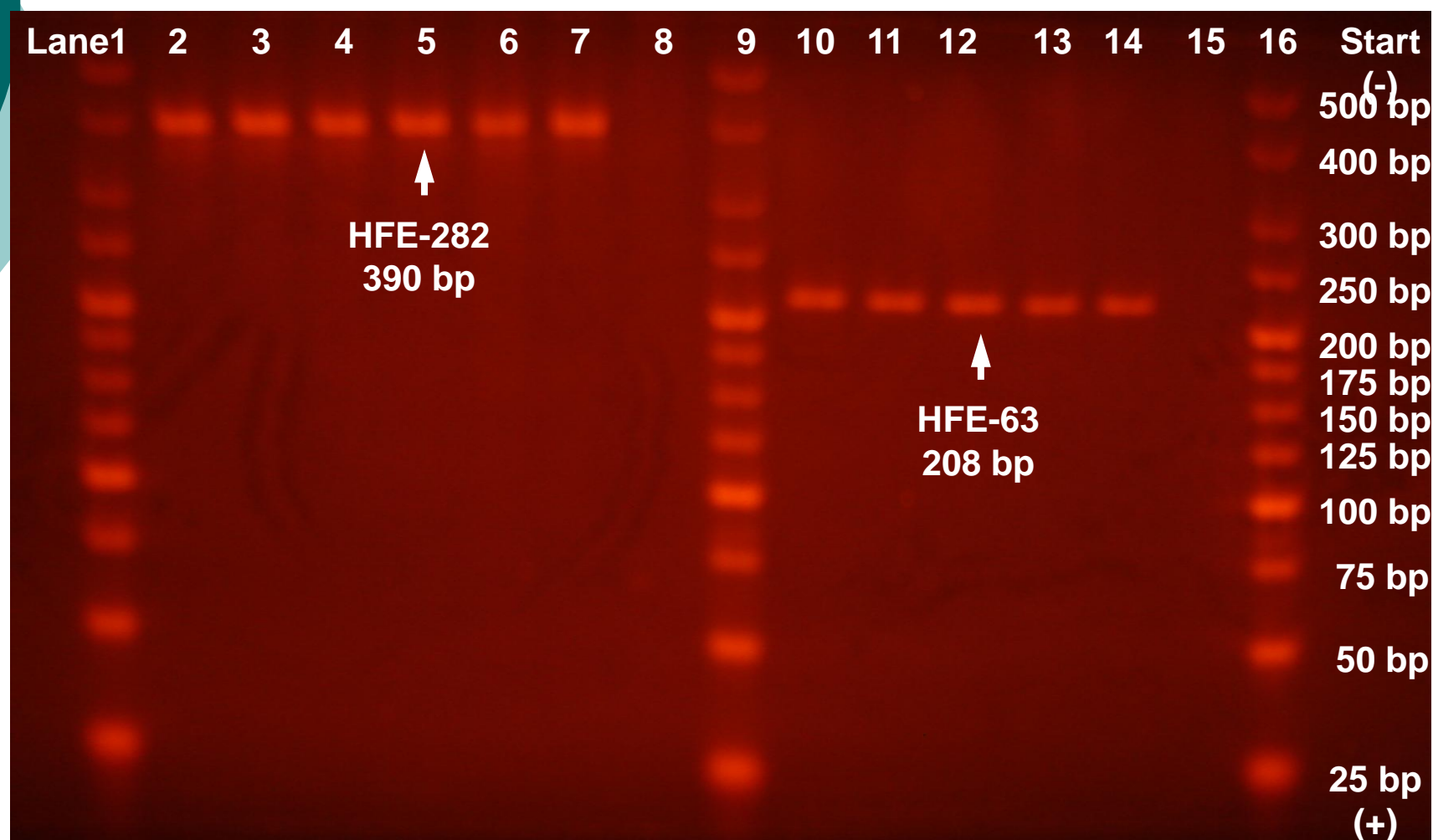
Количеството на продуктите нараства в геометрична прогресия



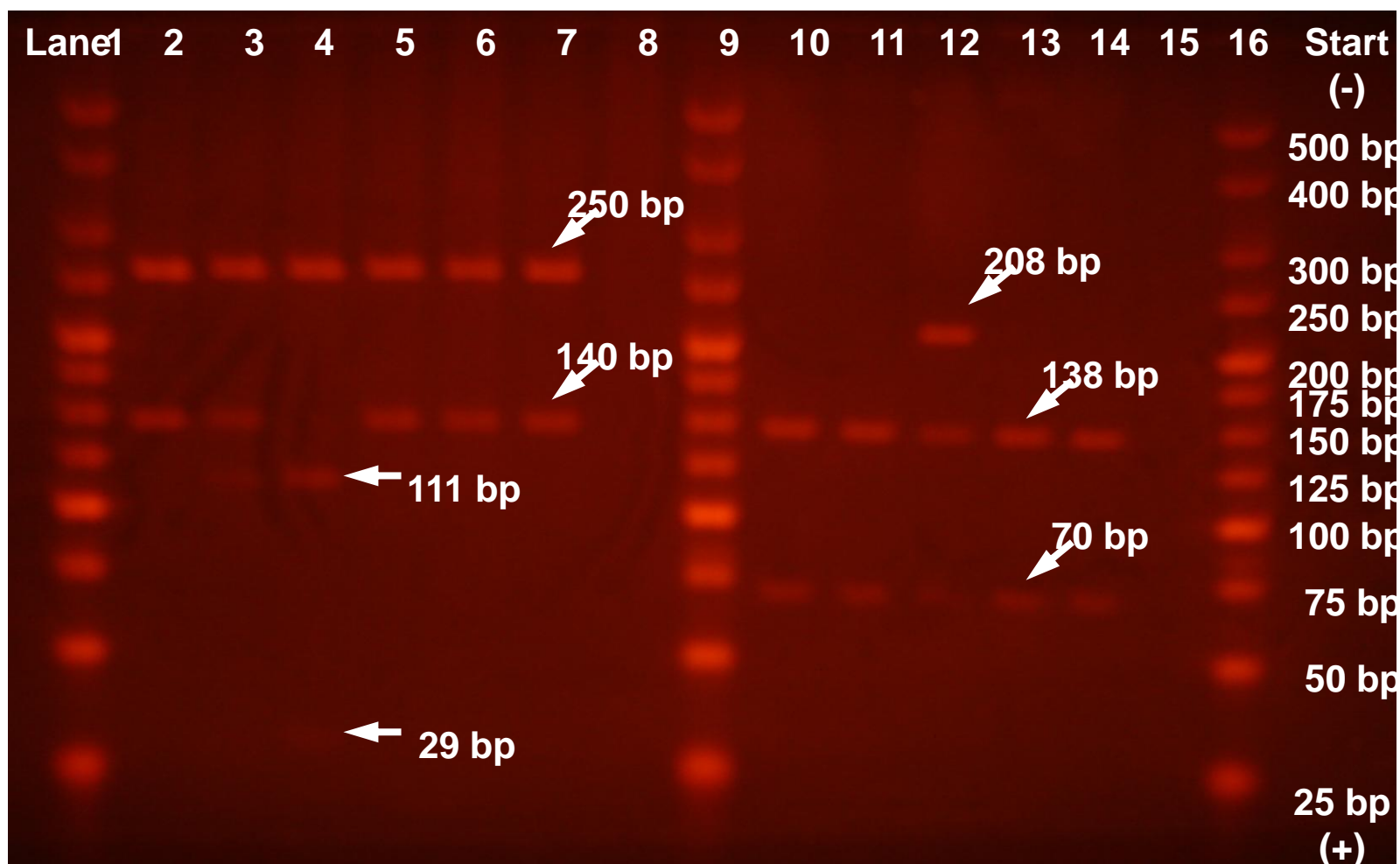
Анализ на амплифицираната ДНК: електрофореза

Електрофореза: поставени в електрично поле, отрицателно заредените молекули на ДНК се движат към положителния полюс със скорост в обратна зависимост от размера

Анализ на амплифицираната ДНК: електрофореза



Анализ на амплифицираната ДНК: електрофореза

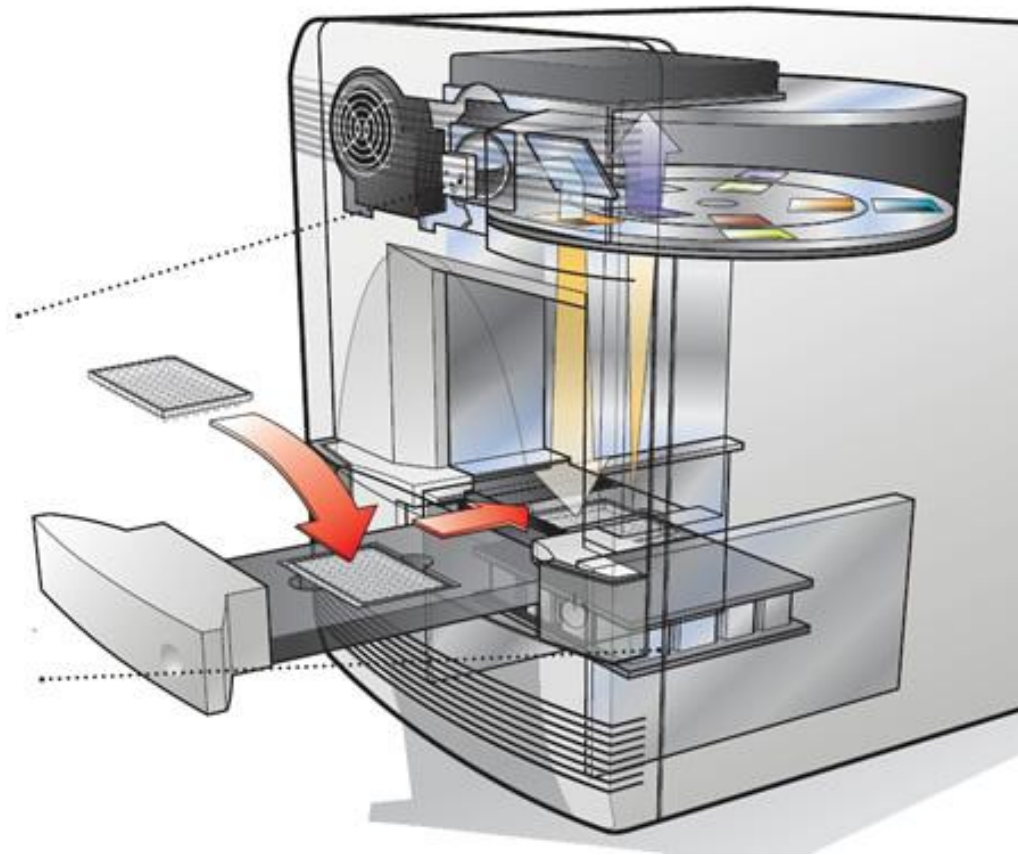




RealTime PCR

- Количествен метод (за разлика от класически PCR – качествен метод)
- Комбиниран инструмент:
програмируем термостат и
флуоресцентен детектор, отчитащ
в “реално време” количеството на
продуктите на PCR

RealTime PCR

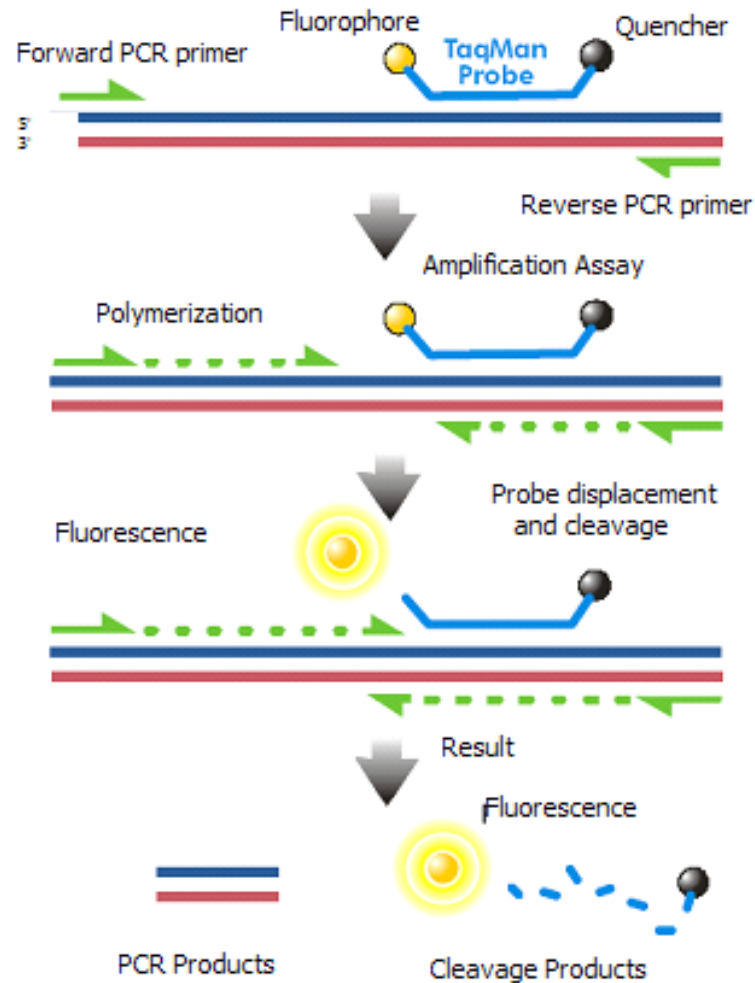




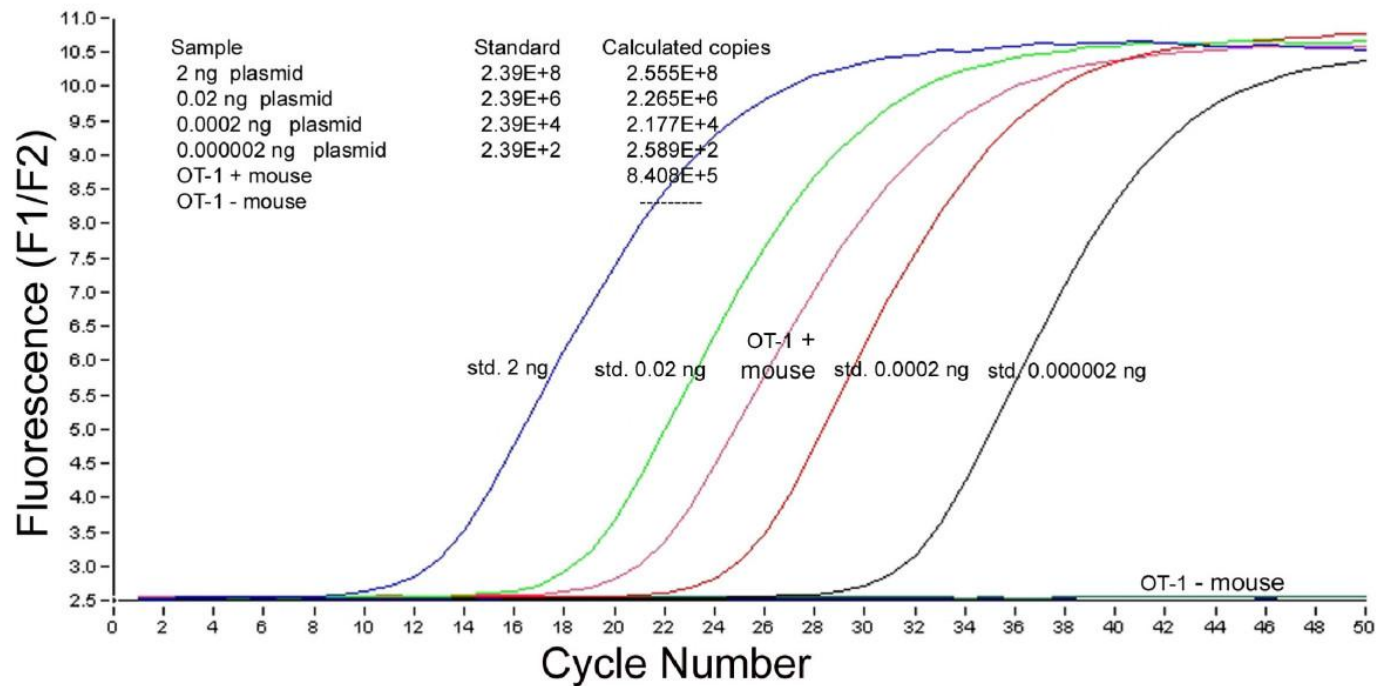
RealTime PCR

- Освен праймерите в реакционната смес има и хидролизна олигонуклеотидна сонда, маркирана с флуоресцентно багрило и гасител
- В хода на амплификацията ДНК полимеразата разгражда сондата (5' екзонуклеазна активност) и освобождава багрилото

RealTime PCR



RealTime PCR

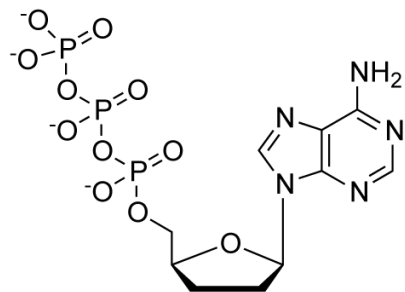




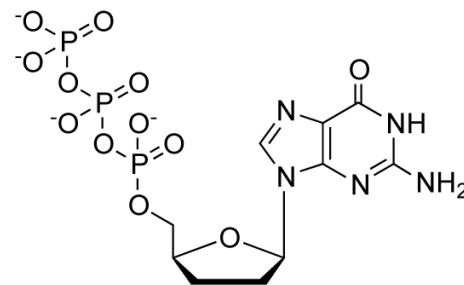
Секвениране на ДНК: Метод на Sanger

- Линейна амплификация на ДНК в присъствие на малко количество дидезоксинуклеозидтрифосфати (“терминатори”)
- Образуват се фрагменти с дължина, отговаряща на позициите на съответните бази

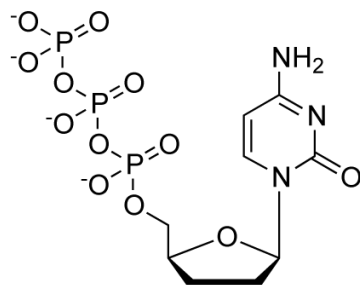
Секвениране на ДНК: Метод на Sanger



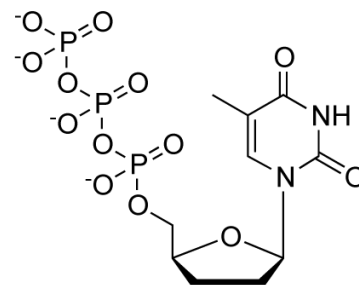
ddATP



ddGTP



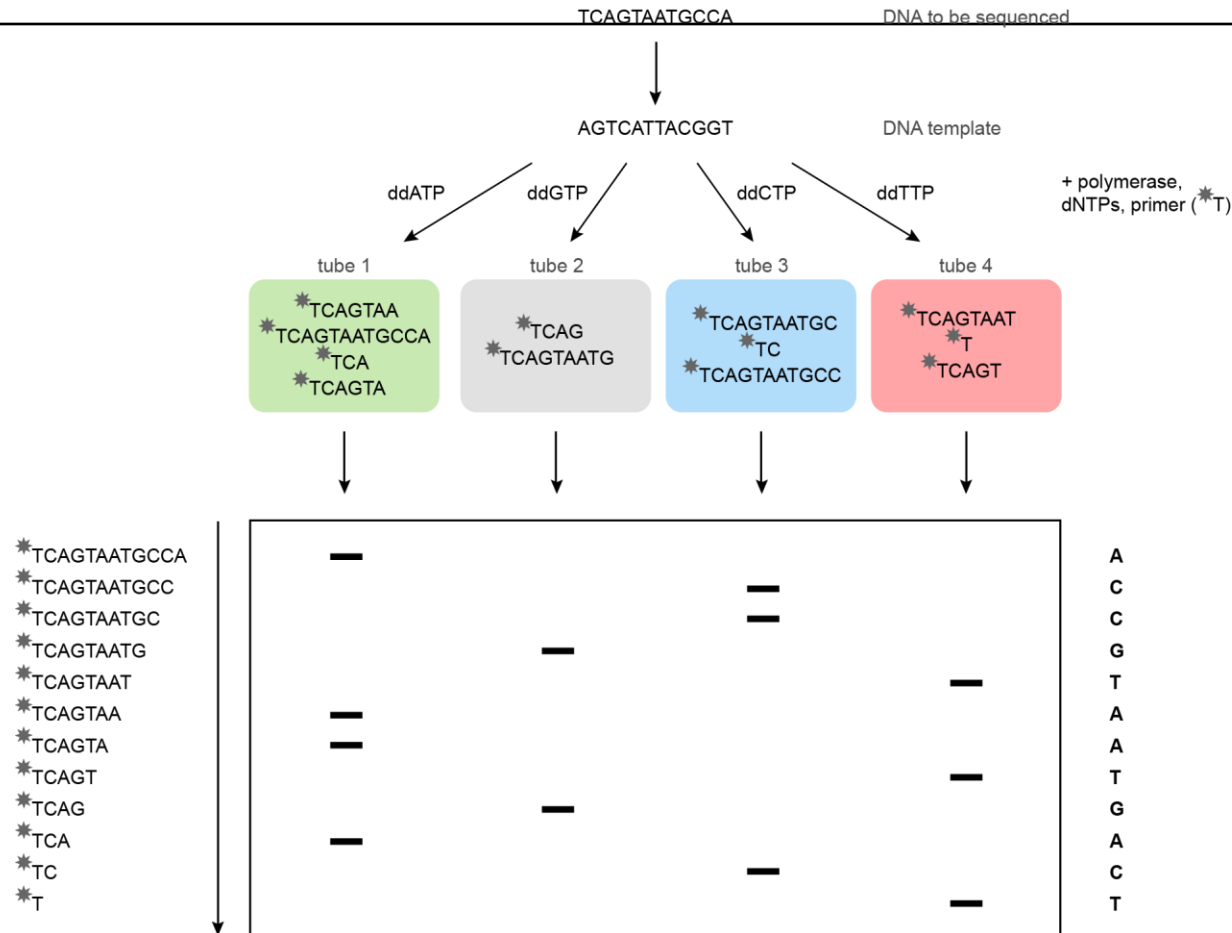
ddCTP



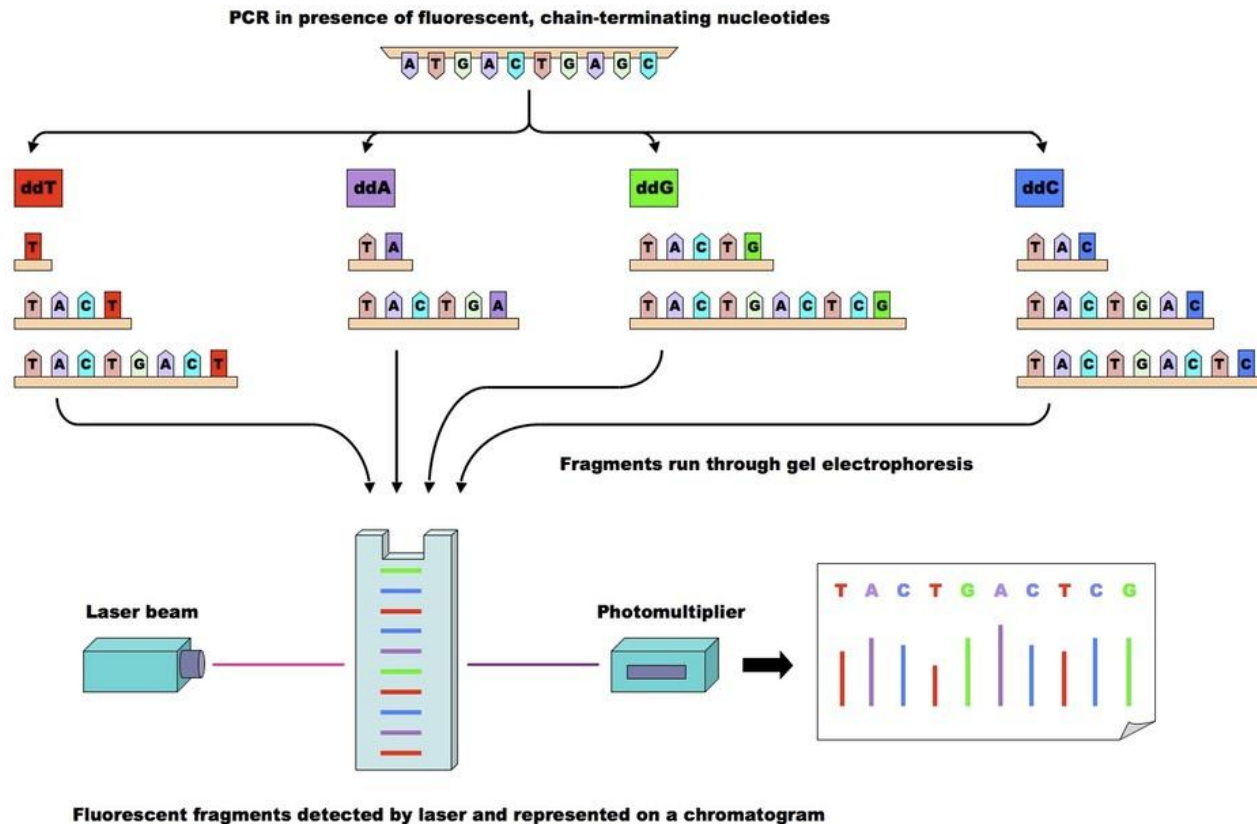
ddTTP

Дидезоксинуклеозид трифосфатни “терминатори”

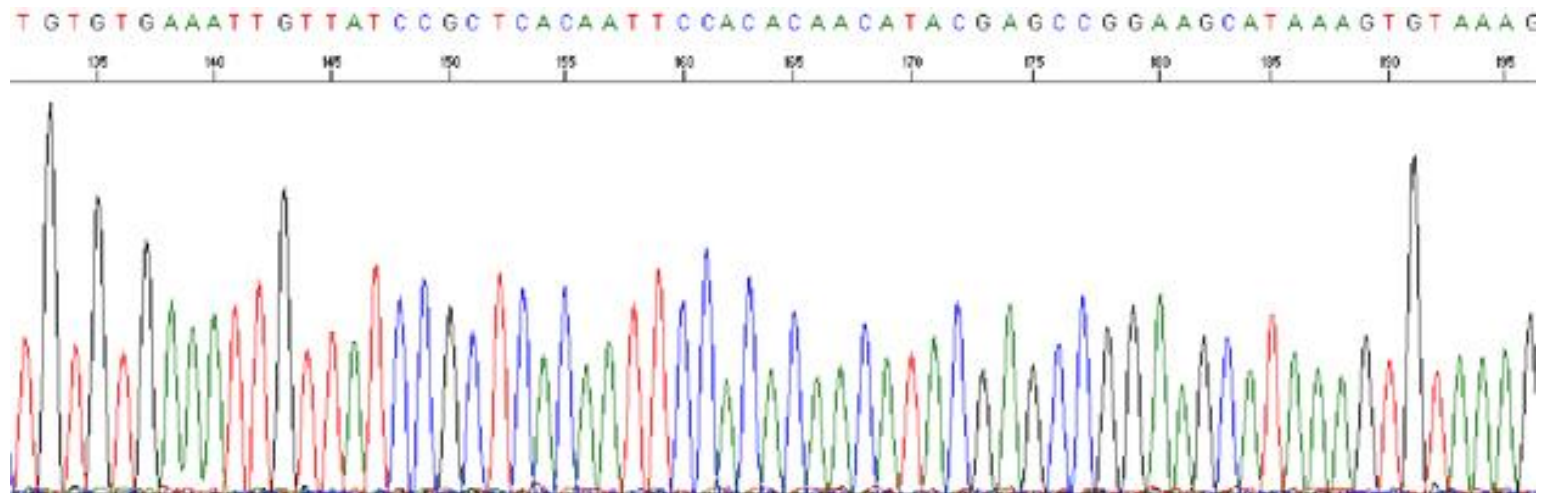
Секвениране на ДНК: Метод на Sanger



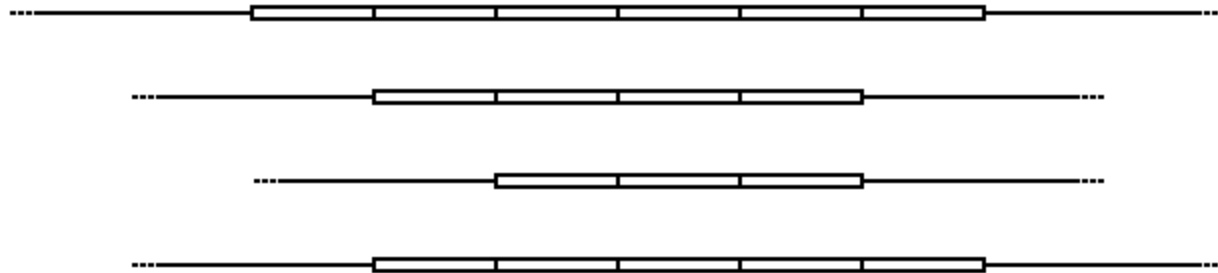
Секвениране на ДНК: Метод на Sanger



Секвениране на ДНК: Метод на Sanger

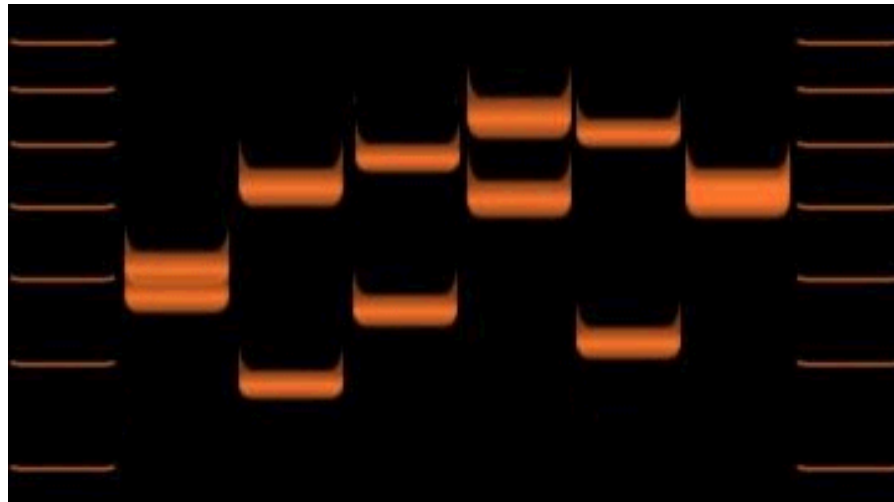


Индиректен ДНК анализ: VNTR



VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) полиморфизми: тандемни повтори с еднаква ориентация и различен брой

Индиректен ДНК анализ: VNTR



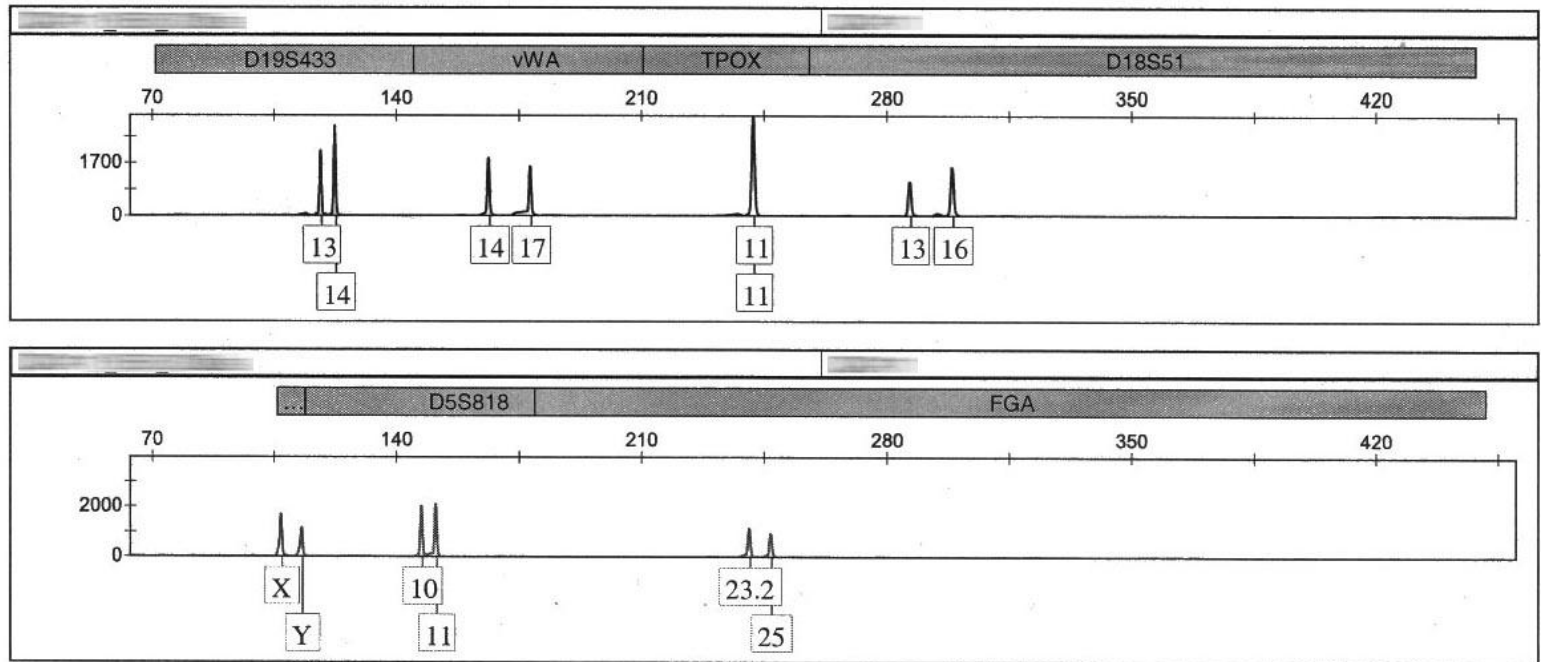
VNTR алели (локус D1S80) в
6 различни индивида




Индиректен ДНК анализ: STR

- VNTR: дължина на блока 8 – 50 нуклеотида
- STR (Short Tandem Repeats): дължина на блока <8 нуклеотида, оникновено 3 – 4 нуклеотида
- SNP (Single Nucleotide Polymorphism): единичен нуклеотиден полиморфизъм

Индиректен ДНК анализ: STR и VNTR



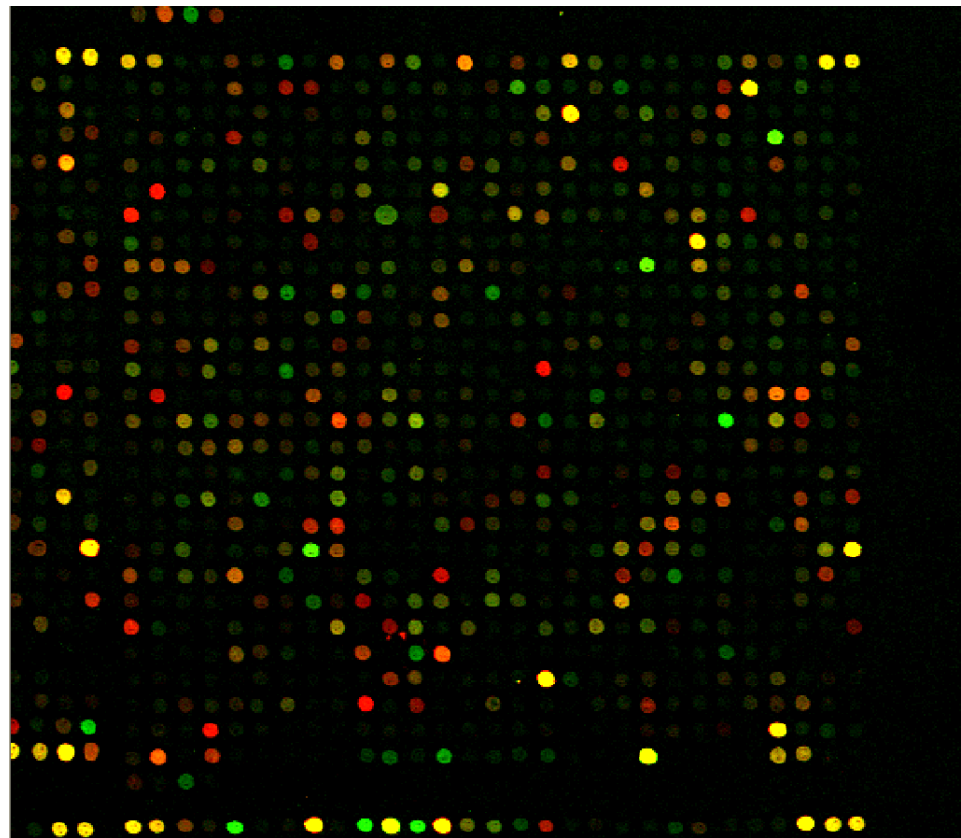
Точно определяне на дължината на
фрагментите: капилярна електрофореза



Микроплощен ДНК анализ (Microarray)

- Хибризиция на нуклеинови киселини към множество олигонуклеотидни сонди, имобилизирани върху малка площ ($d < 200 \mu m$)
- Флуоресцентно маркиране и отчитане

Микроплощен ДНК анализ (Microarray)



Микроплощен ДНК анализ (Microarray)

Приложения:

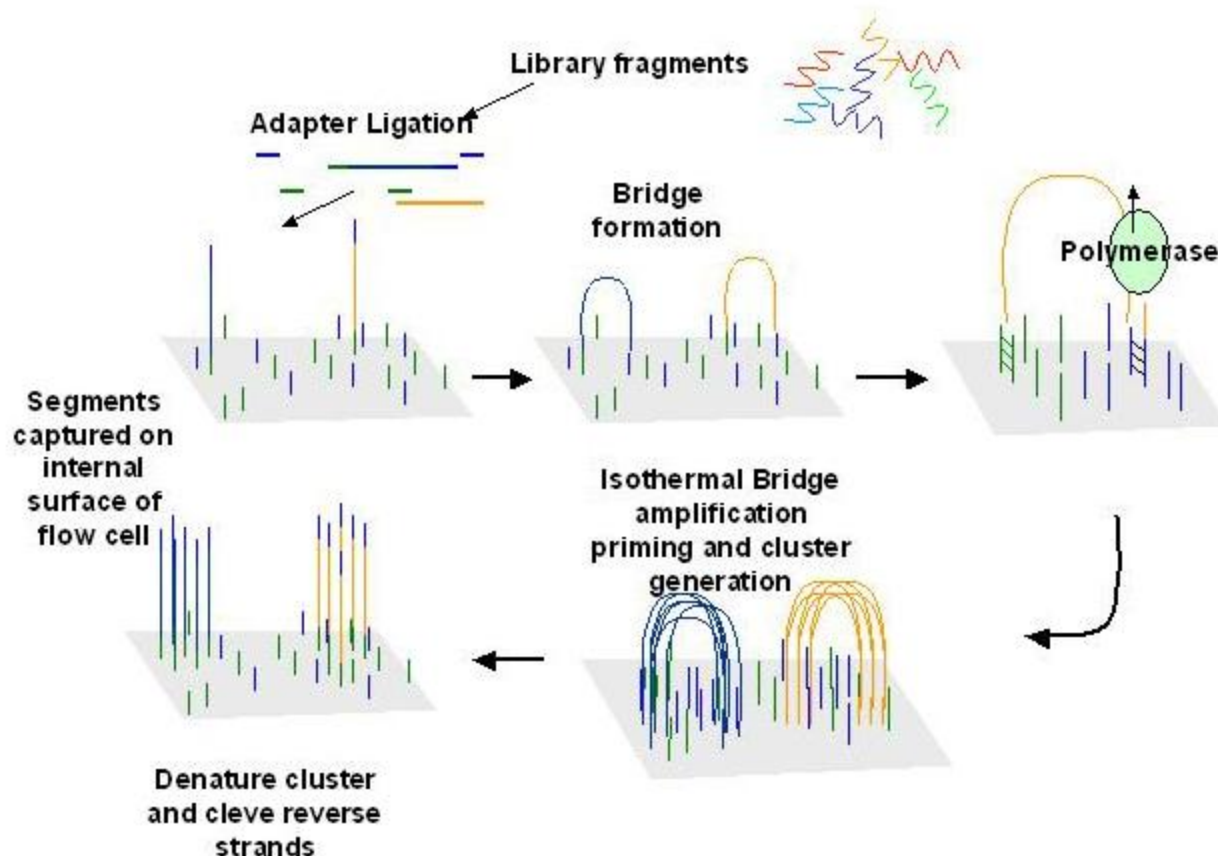
- aCGH (array Comparative Genome Hybridization): цялостно сканиране на генома за допълнителен или липсващ генетичен материал
- SNP array (Single Nucleotide Polymorphism): индиректен генетичен анализ на базата на единични нуклеотидни полиморфизми
- mRNA expression array: изследване на генна експресия: относително количество на mRNA



Секвениране от следващо поколение (Next Generation Sequencing)

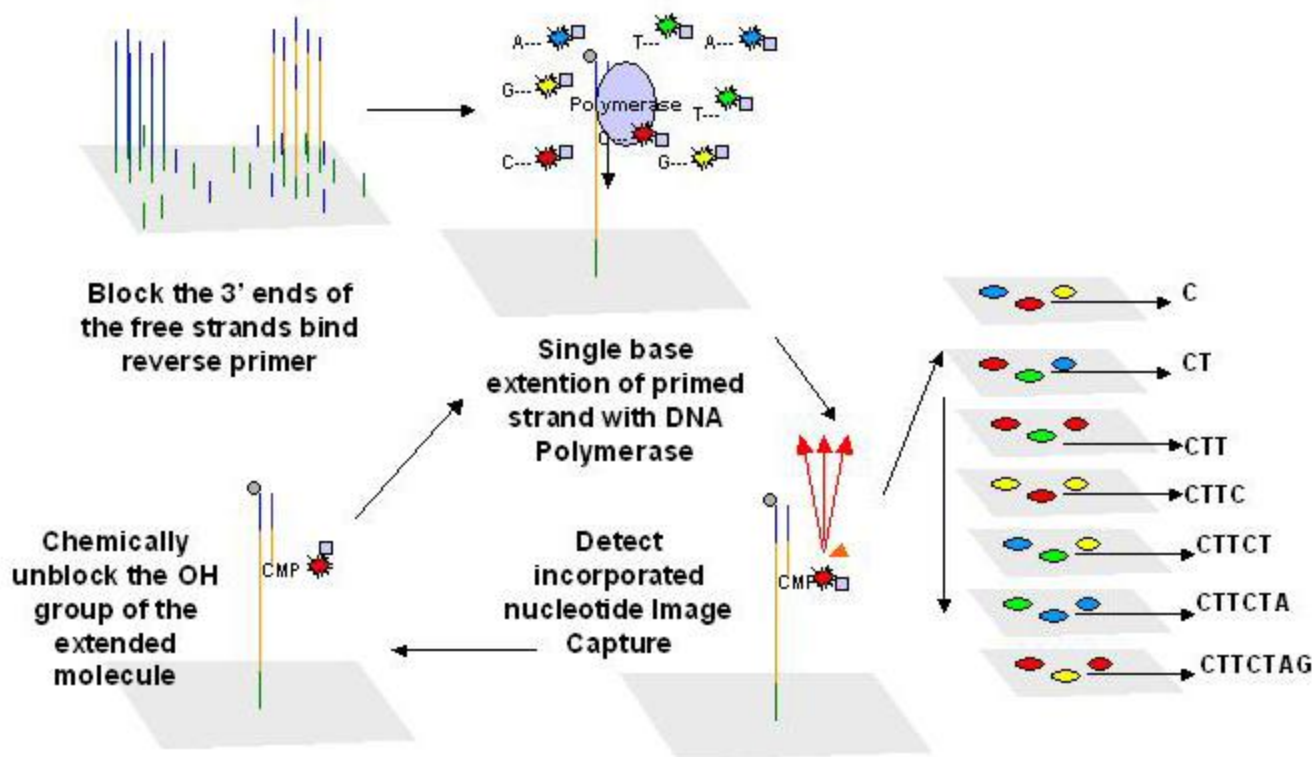
Най-разпространен метод: подобно на метода на Sanger се използват флуоресцентно маркирани терминатори, но са обратими – след всяко отчитане блокиращата част се премахва и започва следващ цикъл

Секвениране от следващо поколение (Next Generation Sequencing)



Предварителна
амплификация

Секвениране от следващо поколение (Next Generation Sequencing)



Циклично
отчитане



Секвениране в бъдеще време

Секвениране чрез нанопори:

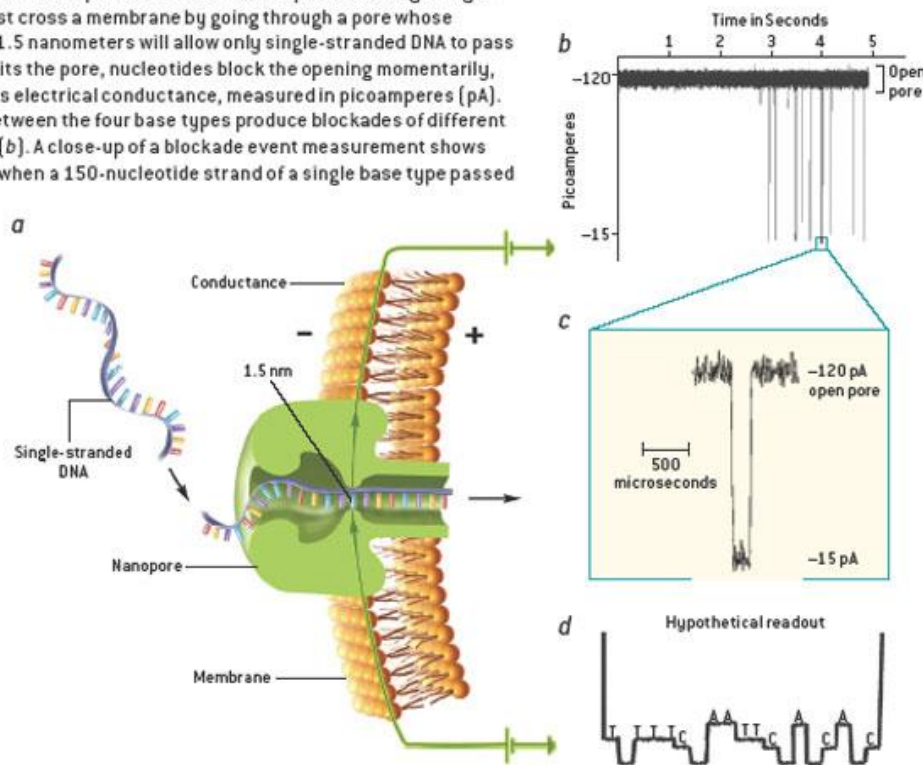
- Няма предварителна амплификация
- Няма скъпоструващи флуоресцентни багрила
- Извличане и на епигенетична информация (метиране на ДНК)

Секвениране в бъдеще време

NANOPORE SEQUENCING

Like electrophoresis, this technique draws DNA toward a positive charge. To get there, the molecule must cross a membrane by going through a pore whose narrowest diameter of 1.5 nanometers will allow only single-stranded DNA to pass [a]. As the strand transits the pore, nucleotides block the opening momentarily, altering the membrane's electrical conductance, measured in picoamperes (pA). Physical differences between the four base types produce blockades of different degrees and durations [b]. A close-up of a blockade event measurement shows a conductance change when a 150-nucleotide strand of a single base type passed through the pore [c].

Refining this method to improve its resolution to single bases could produce a sequence readout such as the hypothetical example at bottom (d) and yield a sequencing technique capable of reading a whole human genome in just 20 hours without expensive DNA copying steps and chemical reactions.



Секвениране в бъдеще време

