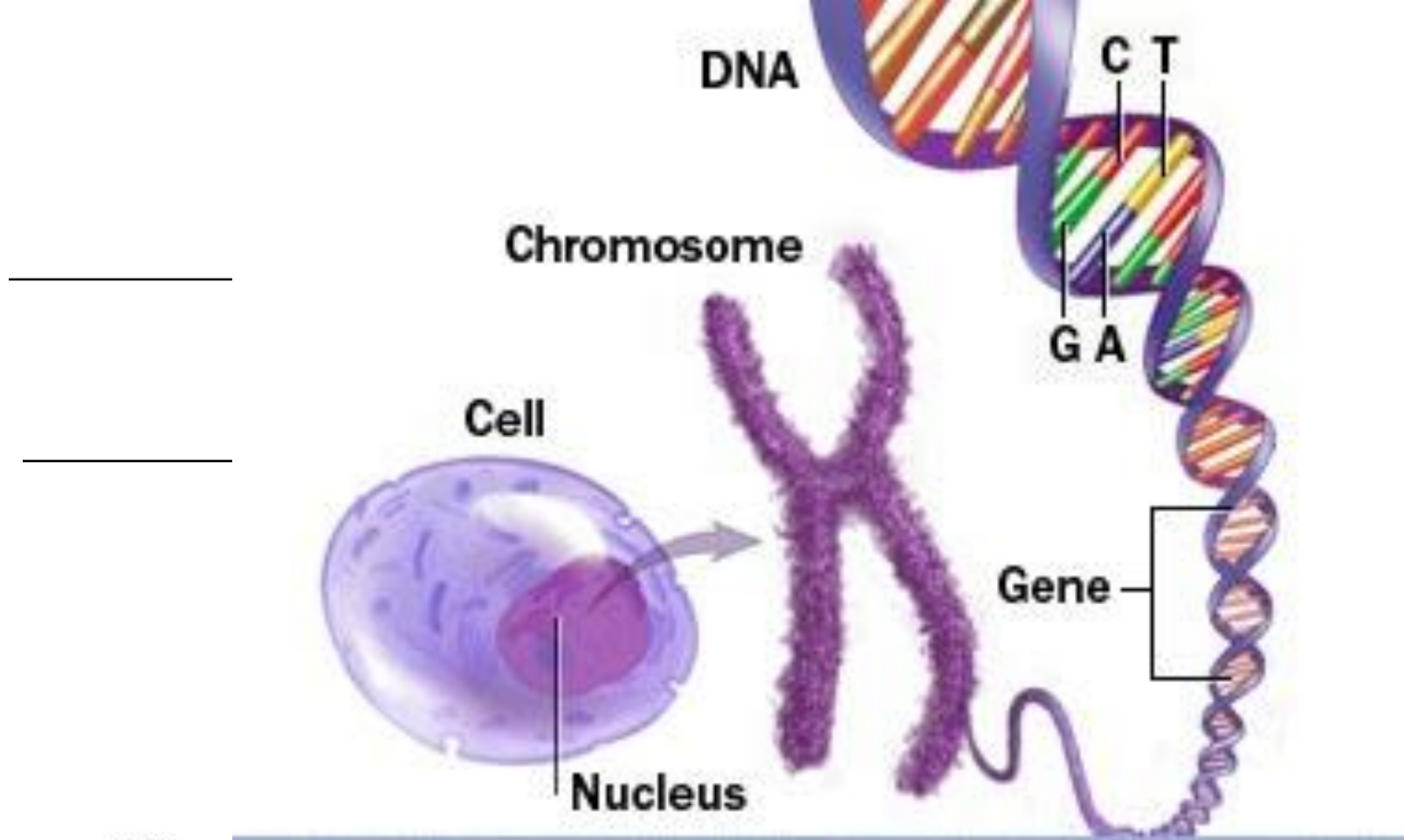


Основни методи на генетично изследване при човека

Катедра по Медицинска генетика



ОСНОВНИ МЕТОДИ НА ГЕНЕТИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ ПРИ ЧОВЕКА

I. Генеалогичен метод на изследване

1. Определение - първи етап на генетичната консултация, имащ за цел:

- да установи типа на унаследяване на патологичния признак (заболяване);
- да определи вероятните генотипове на родствениците;
- да подпомогне поставянето на генетичната диагноза;
- да определи риска за повторение в поколенията.

Генеалогичен метод - родословни схеми

- ❖ *Генеалогичният метод* на изследване завършва с начертаването на родословна схема, която представлява графичен израз на семейната история на консултиращите се. Индивидите са характеризирани съобразно своя пол, възраст, поколение и биологични връзки помежду си.
- ❖ Родословията дават възможност да се проследи унаследяването на гените, тъй като предоставят информация за много индивиди с определено заболяване.

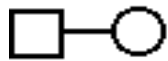
Символи, използвани при построяване на родословие



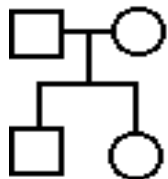
Мъжки пол



Женски пол



Брак



Родители и деца
1 момче и 1
момиче
(по реда на
раждане)



Дизиготни
близнаци



Монозиготни
близнаци



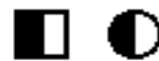
Неизвестен пол



Брой сибси



Засегнати
индивиди



Хетерозиготи по автозомно –
рецесивен ген
Носител на X – рецесивен ген



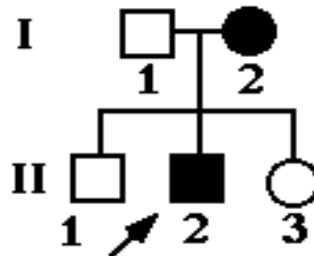
Починал



Спонтанен аборт или
мъртва раждане



Пробанд



Обозначаване на индивидите в
родословието



Кръвно – родствен брак

ОСНОВНИ ПОНЯТИЯ

- **Пробанд** (index case) – индивид с диагностицирано генетично заболяване, заради когото семейството е насочено за генетично консултиране; от него започва анализът на родословието
- **Консултиращ се** – пациент/семејство, посетил генетична консултация по повод генетично заболяване в семейството
- **Сибси** (siblings) – братя и сестри
- **Кръвно родство** – генетична връзка чрез общ предшественик

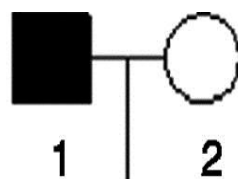
Основни принципи за изграждане на родословна схема

- Използват се символи, принадлежащи към определена номенклатурна система
- Започва се от пробанда, който се означава със стрелка и изграждането на родословието е в посока отдолу нагоре
- Лицата от едно поколение се разполагат на една хоризонтала и се отбелязват с арабски цифри
- Поколенията се отбелязват с римски цифри отляво, като се започва от най-старото поколение
- Винаги се отбелязва наличието на кръвнородствен брак, спонтанни аборти, мъртвораждаване

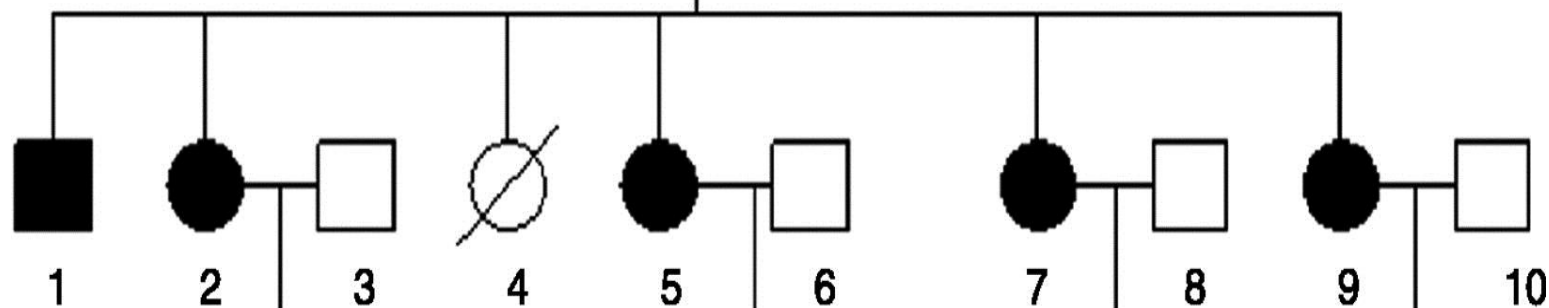
Генеалогичен метод - анализ на генеалогичната схема

1. Генеалогични *критерии* за тип на унаследяване
2. *Генетична диагноза* – определяне на типа на унаследяване
3. *Генетична прогноза* – определяне величината на генетичния риск

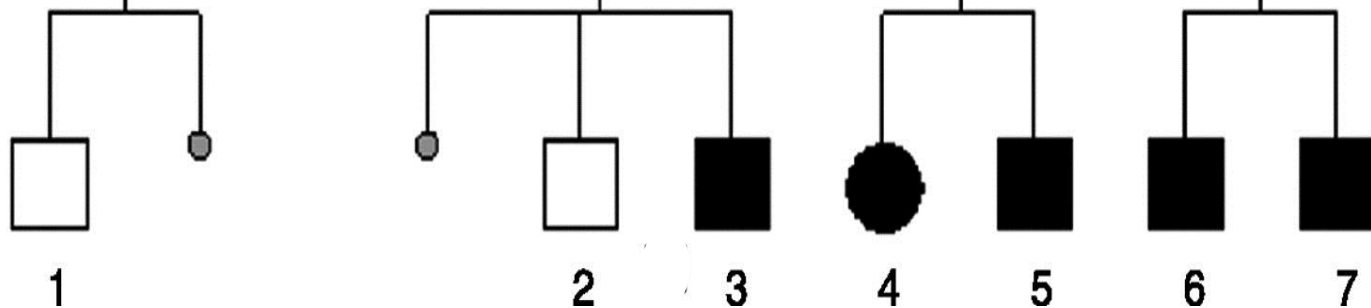
I



II



III



Степени на родство

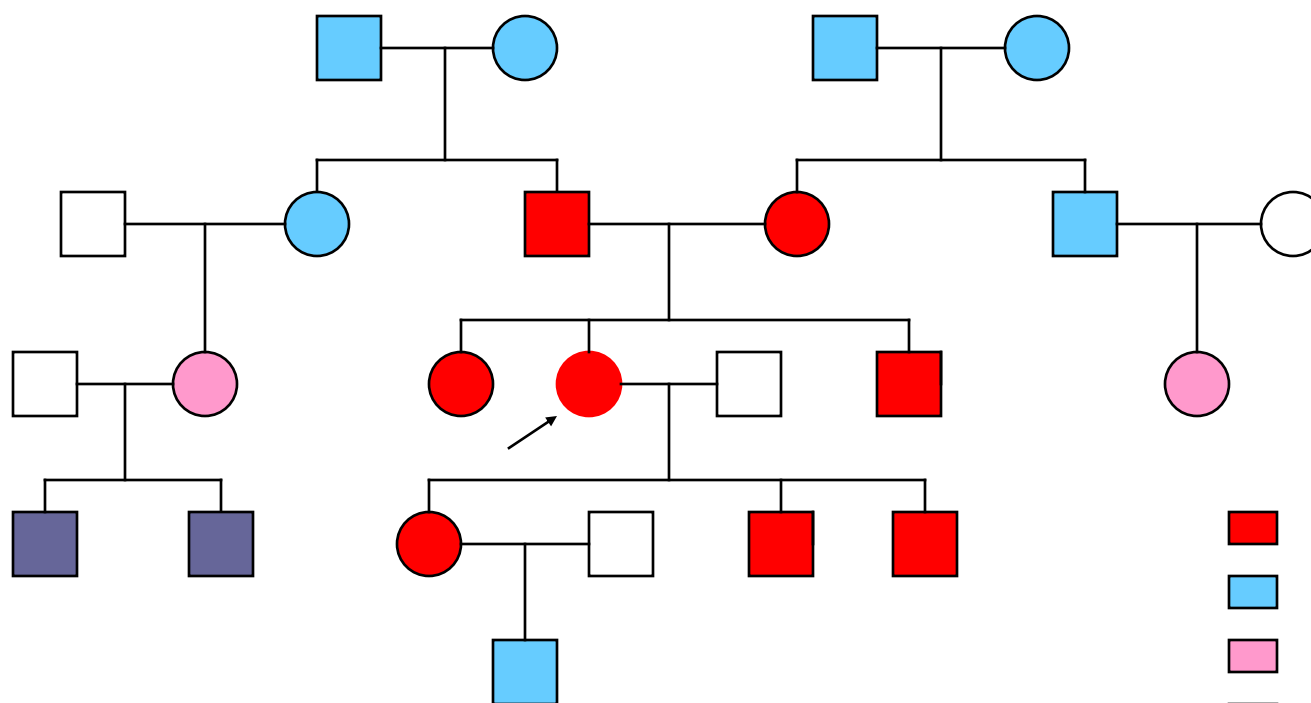
I

II

III

IV

V



I степен



II степен



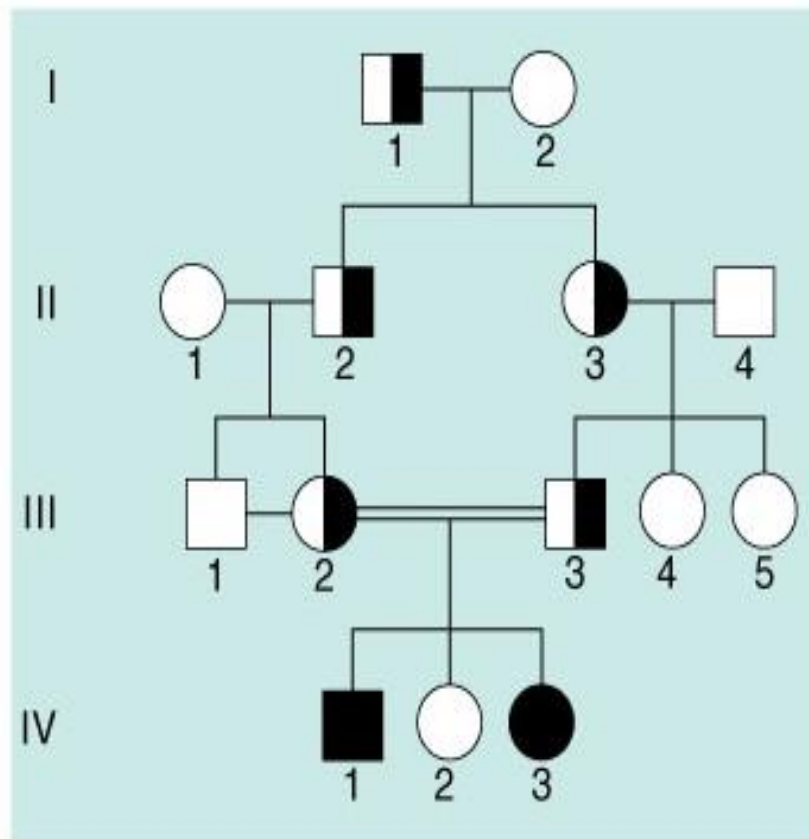
III степен



IV степен

Генеалогичен метод - построяване на родословие

b.



Кръвнородствените взаимоотношения или принадлежността към определени малки етнически групи насочват към търсенето на **рецесивна патология**.

Numbers

Roman numerals = generations

Arabic numerals = individuals in a generation

c.

Начертайте родословна схема , като използвате следните данни:

- Пробандът е момиче на 1 година, има брат (8г.) и сестра(5г.).
- Първата бременност в семейството е завършила със спонтанен аборт.
- Родителите са първи братовчеди.
- Майката има сестра, която има еднояйчни близнаци (момчета).
- Бащата има брат, който има момче (3г.) и момиче (1г.).
- Бабата по майчина линия и дядото по бащина линия са брат и сестра и са починали.



Начертайте родословна схема , като използвате следните данни:

- Пробандът е мъж на 20г.
- Има сестра на 24г. и брат на 16г.
- Баща им е починал.
- Сестрата на пробанда има дъщеря.
- Майка им има брат, който има двама сина.
- Бабата и дядото по майчина линия са починали, а по бащина линия са живи.

II. Популяционно-генетични методи

Закон на Hardy-Weinberg

- Законът свързва честотата на генотиповете в даден локус с фенотипните честоти в популацията
- Законът гласи: Ако популацията е в равновесие, то за даден локус с два алела (**D** и **d**) с честоти съответно **p** и **q**, честотата на генотипите е както следва:
 $DD=p^2$, $Dd=2pq$, $dd=q^2$

Популационно-генетични методи

Закон на Hardy-Weinberg

$$p + q = 1$$

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Алелните честоти не се променят от поколение в поколение, както и честотата на генотипите, определени от съответните алелни честоти в локуса.

Условия, при които е в сила законът на Hardy-Weinberg

- Достатъчно голяма популация
- Свободен избор на партньор
- Без поява на нови мутации
- Без селекция на определен фенотип
- Без миграция
- Ген в автозомен локус

Популяционно-генетични методи

p – честота на алел D

q – честота на алел d

генотипна

DD

Dd

dd

честота

p^2

$2pq$

q^2

Автозомно рецесивно унаследяване и закон на Hardy-Weinberg

Автозомно рецесивно заболяване с популационна честота **1/10 000**. Ако популацията е в равновесие съгласно закона на Hardy-Weinberg, то
популационната честота = $q^2 = 1/10\ 000$

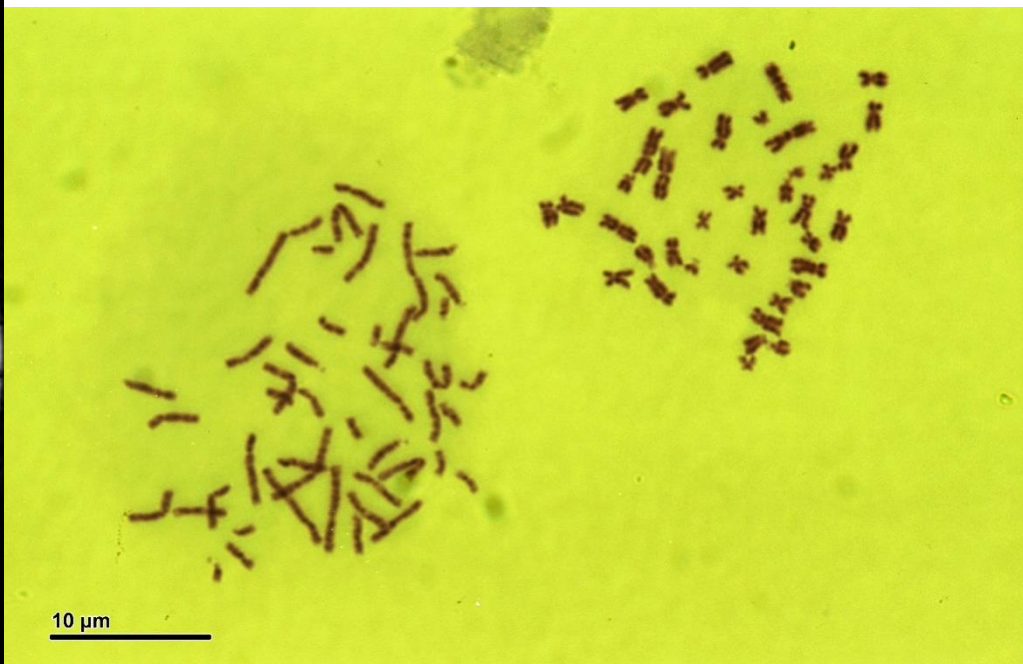
➡ **$q = \sqrt{1/10000} = 1/100$**

➡ **$2pq = 2 \times 99/100 \times 1/100 = 1/50$**

Или хетерозиготното носителство в популацията се среща **1/50**. В случай на рядко рецесивно заболяване почти всички мутантни гени в популацията се крият в хетерозиготите.

III. Цитогенетични методи

Позволяват рутинно хромозомно изследване за клинични цели с цел откриване на бройни и структурни хромозомни аберации. Извършват се на клетки, които позволяват отглеждане, растеж и деление в клетъчна култура.



Цитогенетичен метод (Изследване на кариотип)

Материал за изследване – от тъкани и клетъчни суспензии, съдържащи спонтанно или стимулирано

ДЕЛЯЩИ СЕ КЛЕТКИ:

МИТОТИЧНО ДЕЛЯЩИ СЕ :

МЕЙОТИЧНО ДЕЛЯЩИ СЕ :
тестиси, ембрионален яйчник

СТИМУЛИРАНО ДЕЛЯЩИ СЕ:
(клетъчно култивиране)

постнатално: пренатално:

- лимфоцити - епителни и
- фибробласти фетални кл.

СПОНТАННО ДЕЛЯЩИ СЕ:
(пряко изследване)

постнатално: пренатално:

- костен мозък - хорионни въси
- тумори

Краткосрочна лимфоцитна култура – основни етапи

I. Култивиране – в стерилни условия в присъствие на хранителна среда, серум, ФХА (фитохемаглутинин като стимулатор на митотичното деление), антибиотик, кръв/плазма

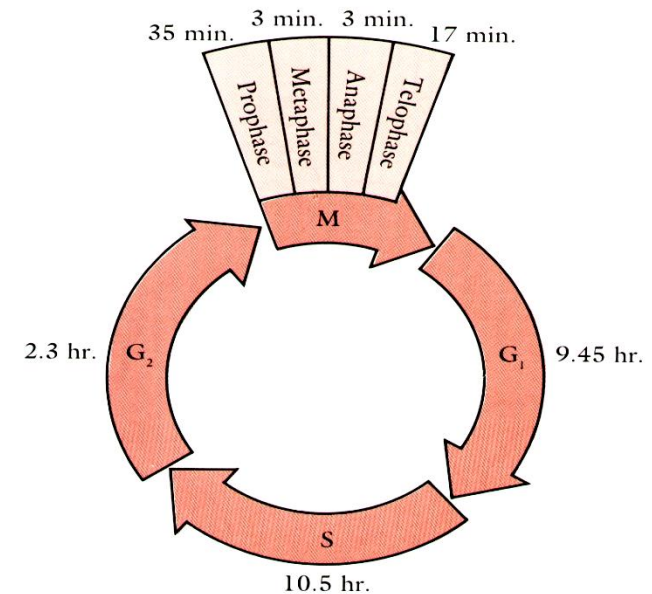
II. Обработка

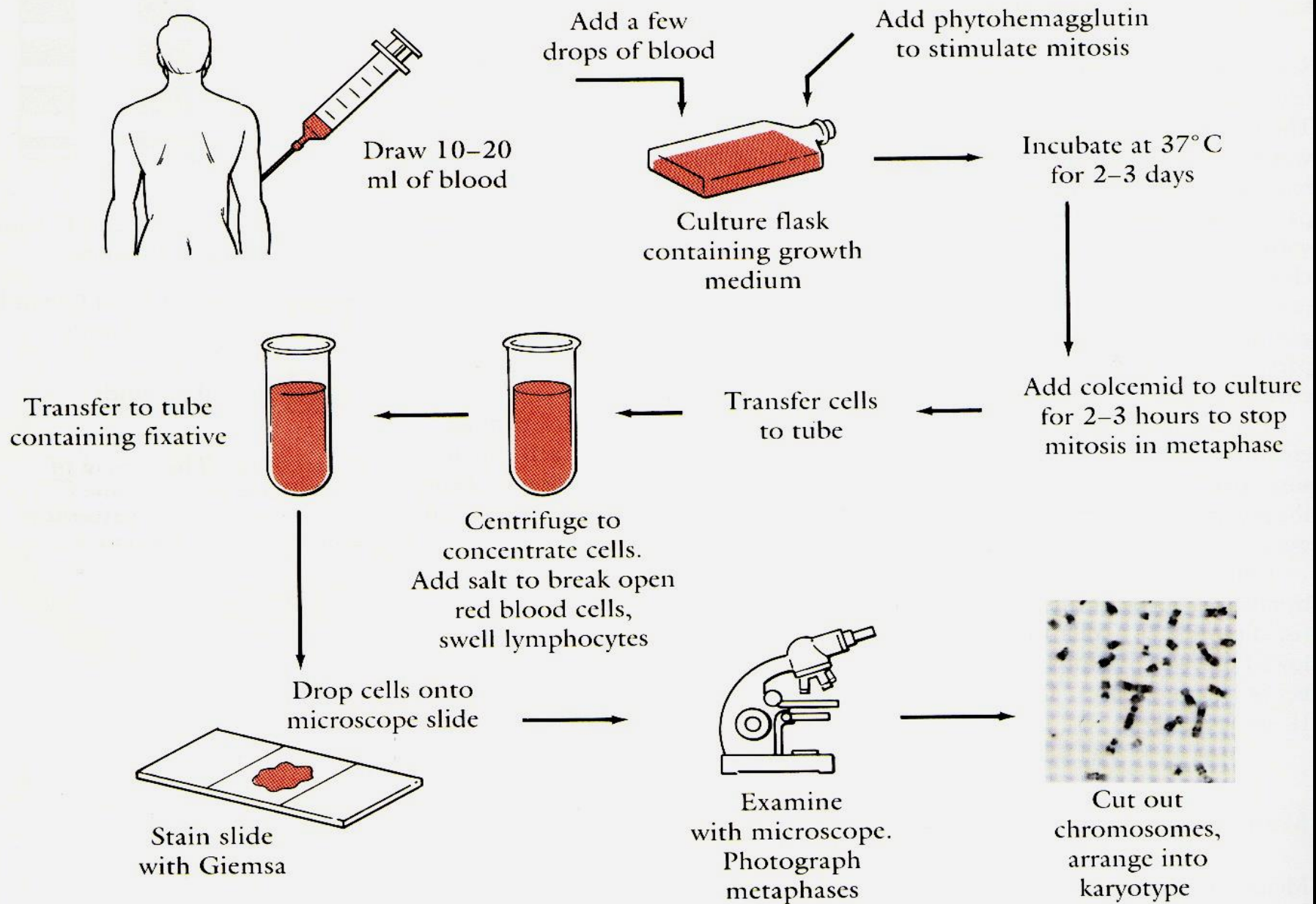
- ♦ а) третиране с колхицин
- ♦ б) хипотонична обработка
- ♦ в) фиксиране

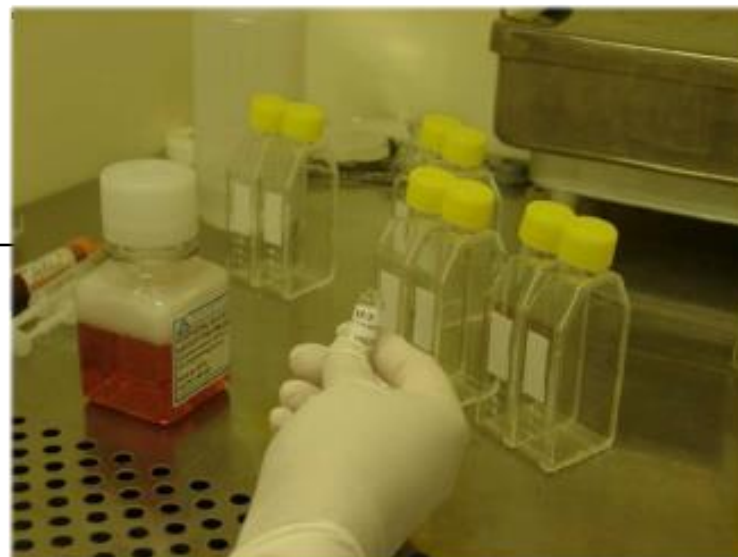
III. Изготвяне на препарати и “зреене”

IV. Оцветяване

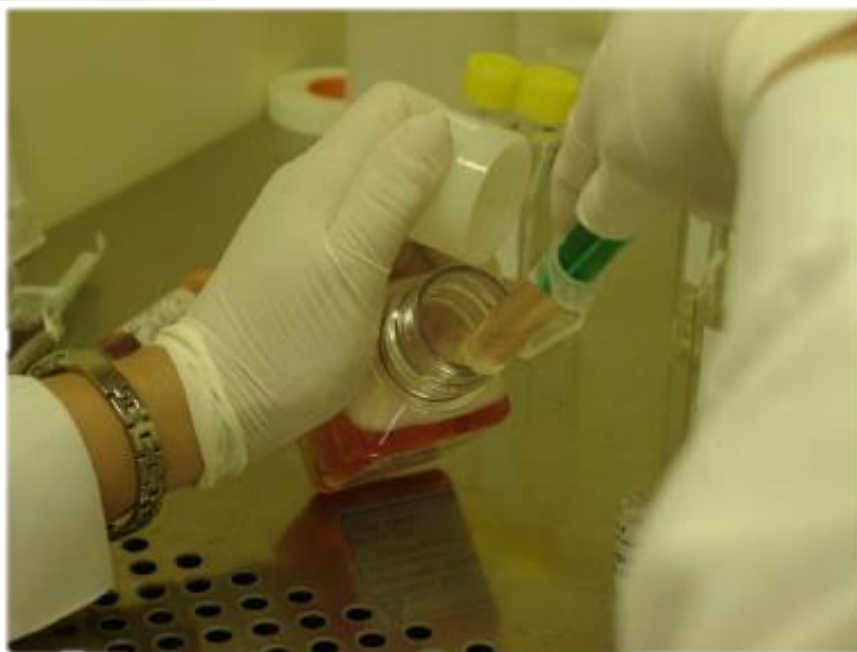
V. Анализирание





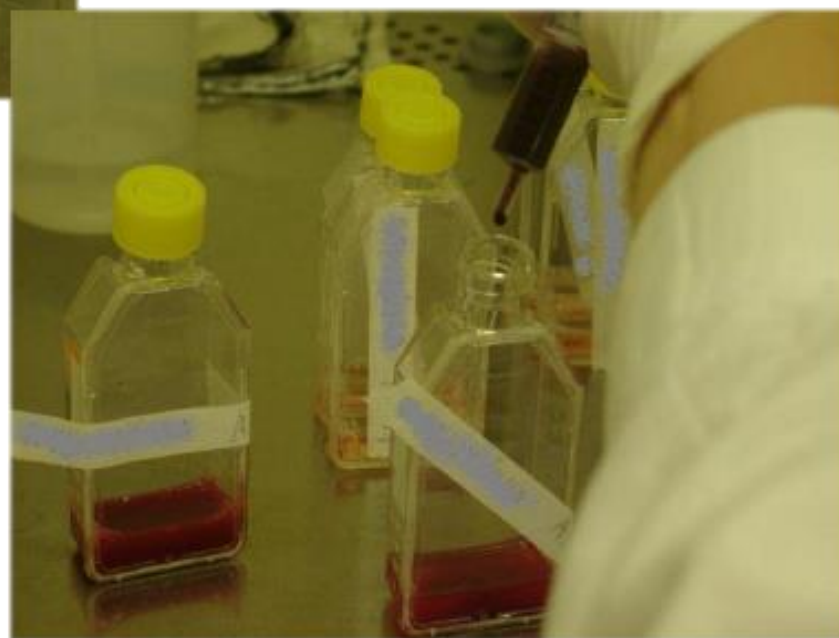


Работи се с малки
количества кръв, взета при
стерилни условия в
хепаринизирана епруветка.





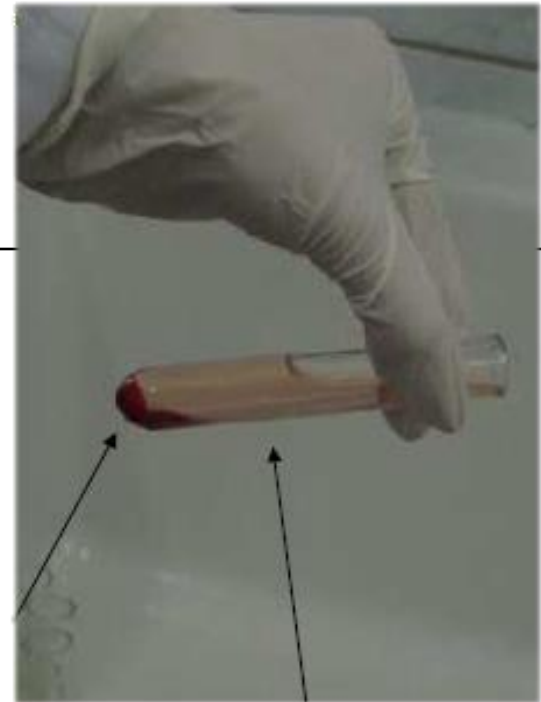
Около 0,5 – 1мл кръв се поставя в стерилни флакони със среда за култивиране, съдържаща митоген.





Флаконите се поставят в термостат за 72 часа, като температурата е постоянна – около 37°





Около 2 часа преди края на култивирането се добавя агент, който блокира образуването на делителното вретено и спира митозата, обикновено се добавя колцемид. След престояване с колцемида около 2 часа, клетките се отделят от средата чрез центрофугиране.




Следва хипотонична обработка на клетките с KCl. После има фиксация на клетките с метанол и ледена оцетна киселина. Прилага се трикратна фиксация с центрофугиране и от последния седимент се приготвят микроскопските препарати. Следва оцветяване на хромозомите.

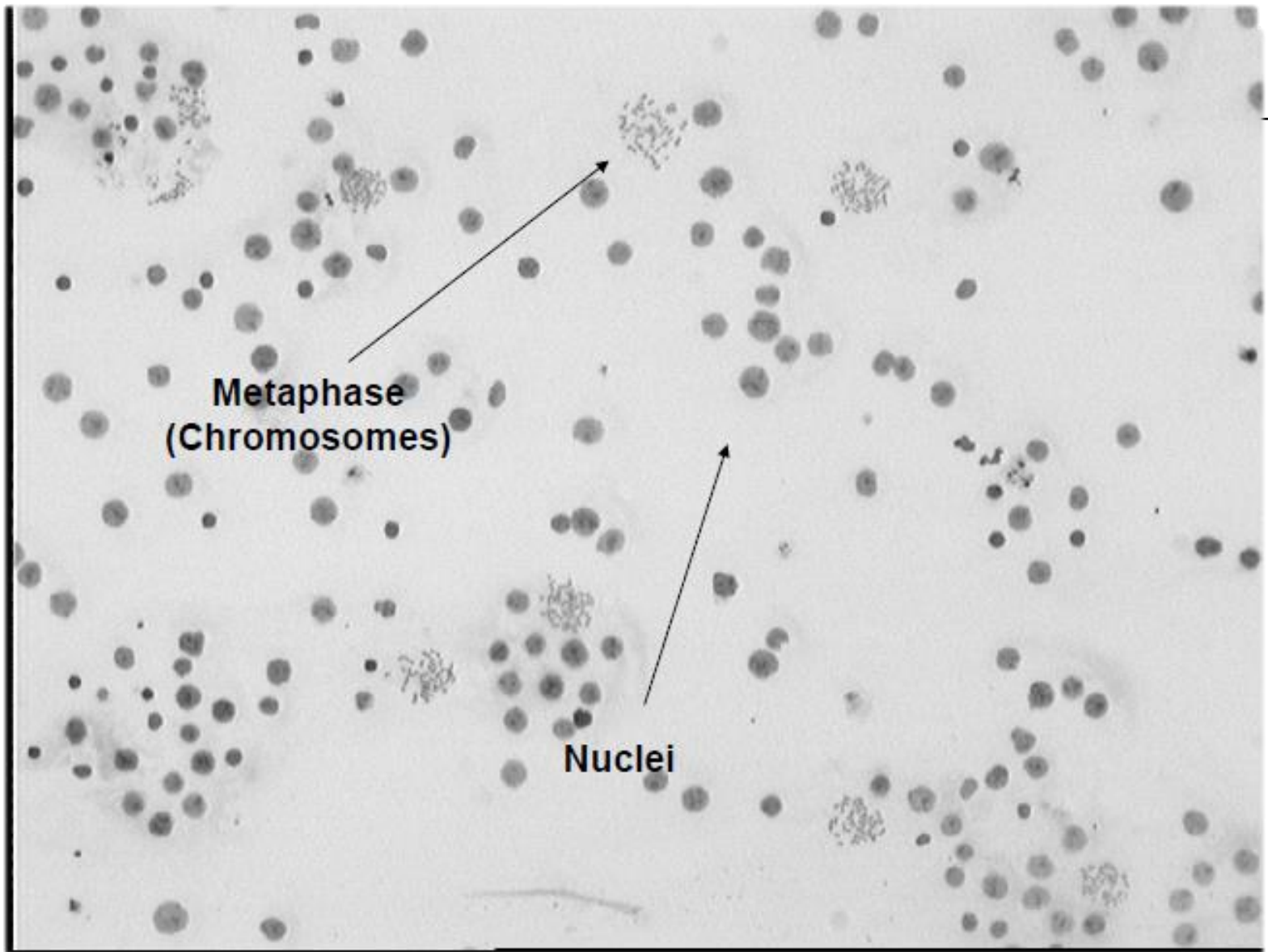
Лентови (бендинг) техники за диференциално оцветяване на хромозомите

детайлна картина на структурата на хромозомите и идентификация на всяка от тях или неин сегмент

Q - бендинг (квинакрин - флуорохром) – получават се специфични за всяка хромозома флуоресциращи напречни ивици, съответстващи на А-Т богати участъци на ДНК, с ниска транскрипционна активност (хетерохроматин)

G - бендинг (Gimsa) – почти идентичен на Q лентовия образ. Не е нужен флуоресцентен микроскоп. Получава се при третиране най-често с трипсин и последващо оцветяване с Gimsa. Днес се получават хромозоми с 3 - 4 пъти повече бендове (ленти) от стандартните метафази. При прометафазния анализ се достига високорезолютивен бендинг от около 800-900 бенда.

 *Прилага се за идентифициране на фини структурни хромозомни аберации*





2005.07.06

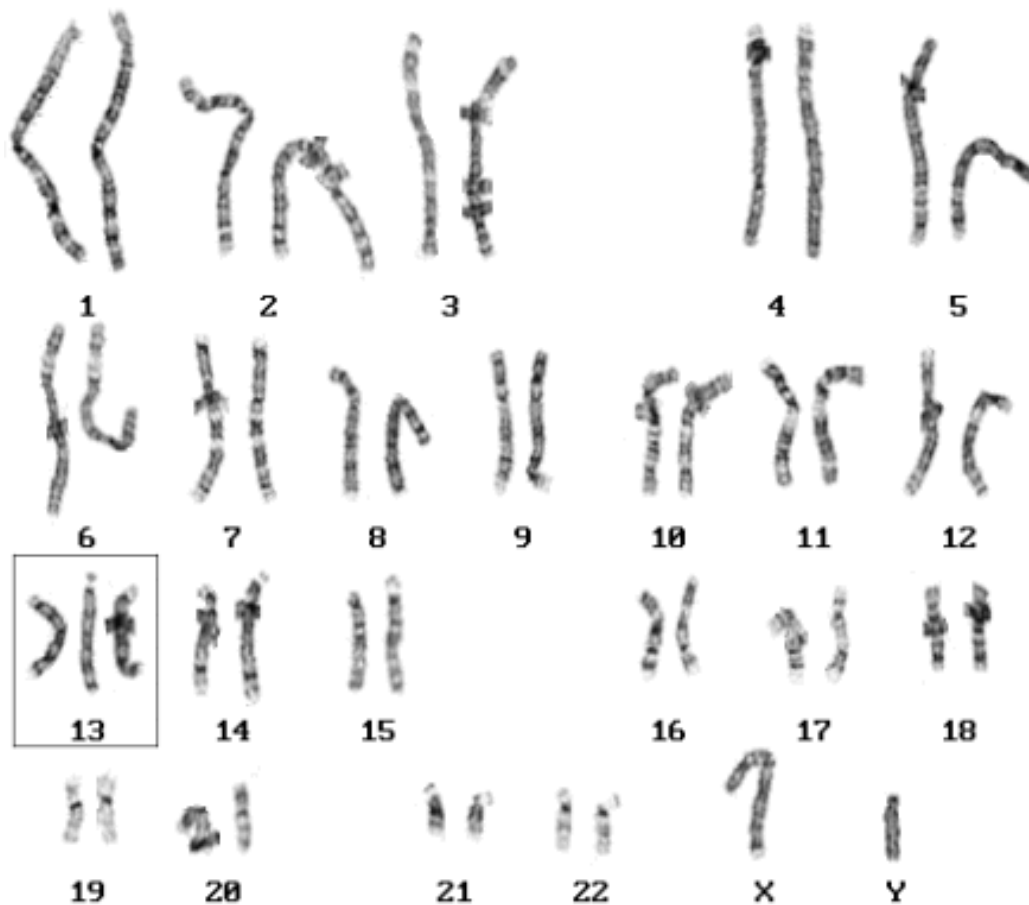
Наблюдаване на вече оцветените хромозоми под микроскоп





Цитогенетични методи

Тризомия 13 (Patau S.)



Karyotype: 47,XY,+13

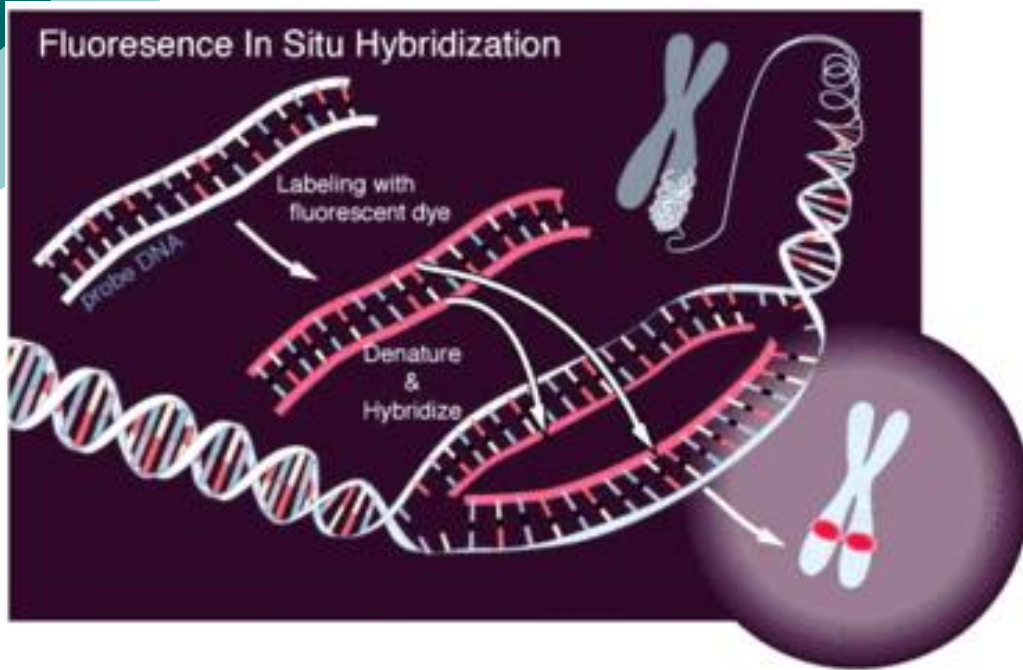
Wolf – Hirschhorn syndrome

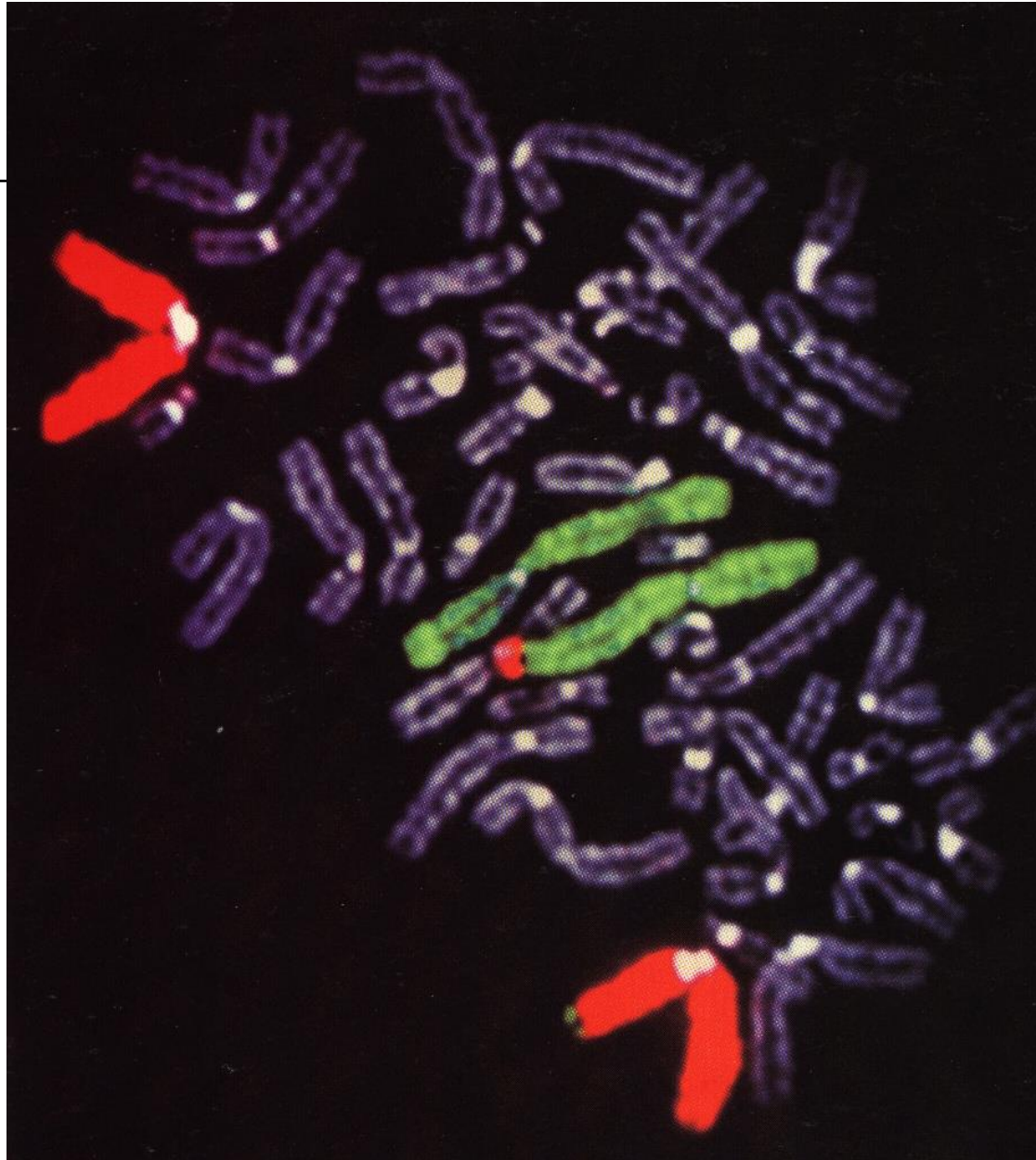


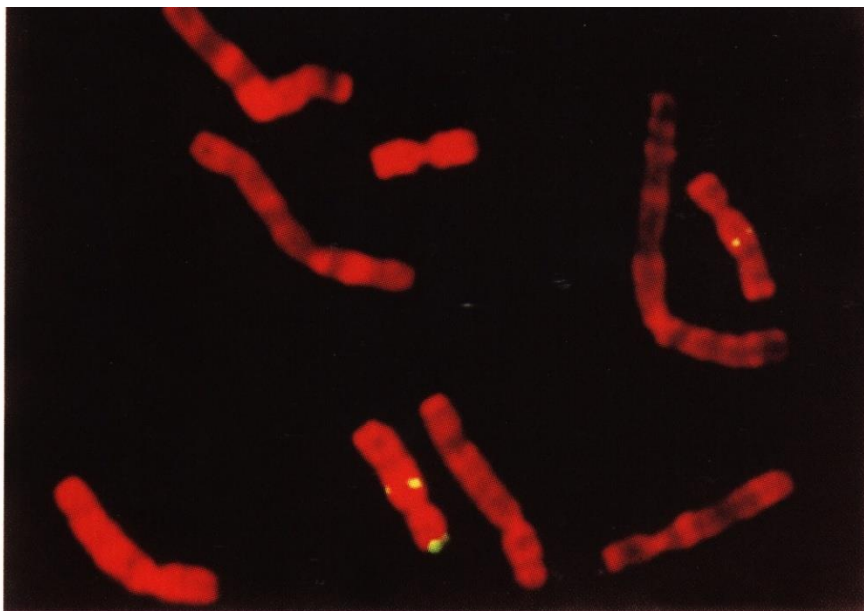
IV. Молекулярно – цитогенетични методи

1. FISH - Флуорисцентна ин ситу хибридизация.

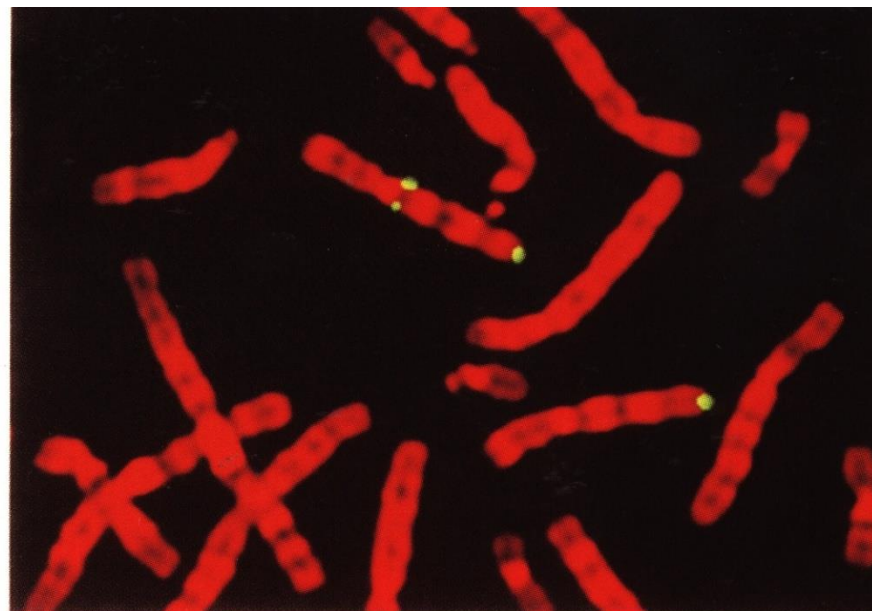
Базира се на уникалната възможност на част от **едноверижна ДНК** (сонда) да хибридизира със своята комплементарна прицелна последователност където и да е локализирана тя върху метафазна пластинка или имобилизирани интерфазни ядра на неделящи се клетки.



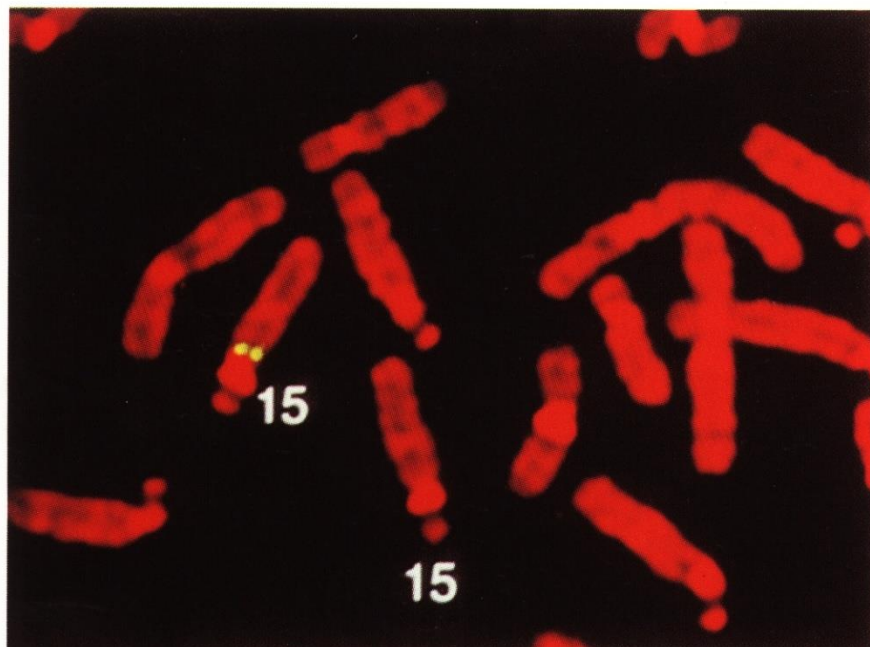




(a)

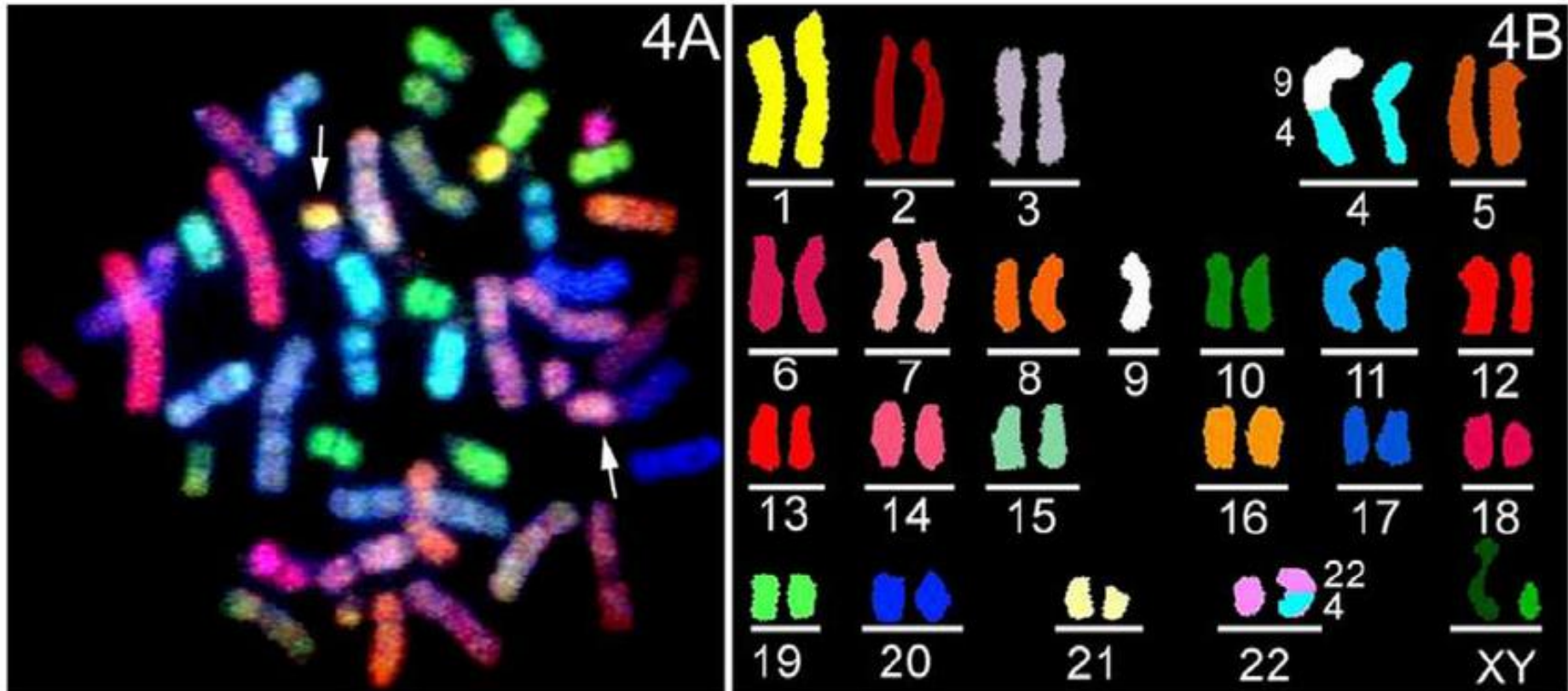


(b)

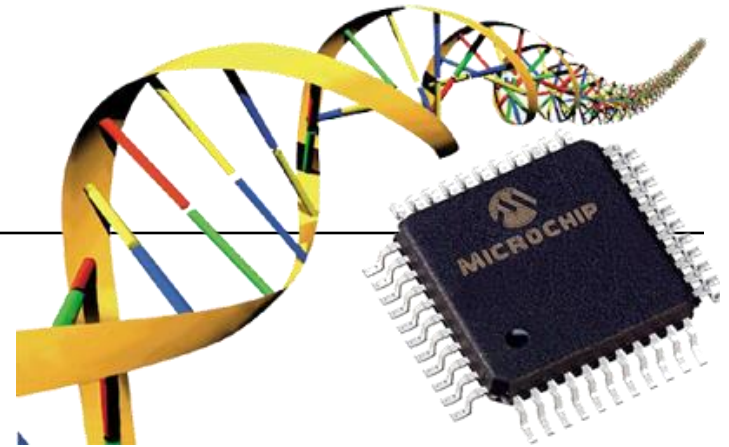


Miller-Dieker синдром - del 17p13; Williams синдром - del 7q11; Prader-Willi синдром - del 15q12; diGeorge синдром - del 22q11

Multicolor FISH, Spectral karyotyping



DNA микрочипове



Данните от Човешкия геномен проект дават възможност хромозомният анализ да бъде сведен на геномно ниво

- Голям брой ДНК фрагменти
- Всеки от тях съдържа нуклеотидна секвенция, представителна за последователността на специфичен ген или хромозомен участък
 - Олигонуклеотиди
 - Големи ДНК фрагменти (ВАС клонове)

How Do DNA Chips work?

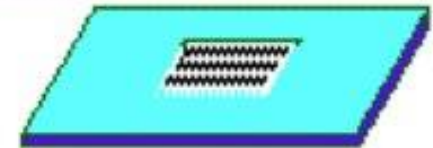
Sample DNA



PCR-Amplification of DNA



DNA Chips with
different probes

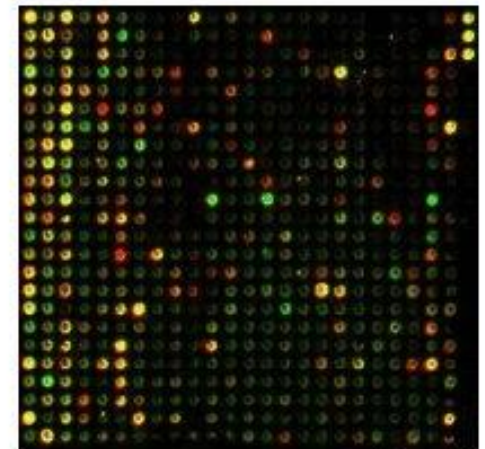


DNA Hybridization



A	●					●		●	
G			●		●	●			
C		●							
T				●			●		●

Scanning



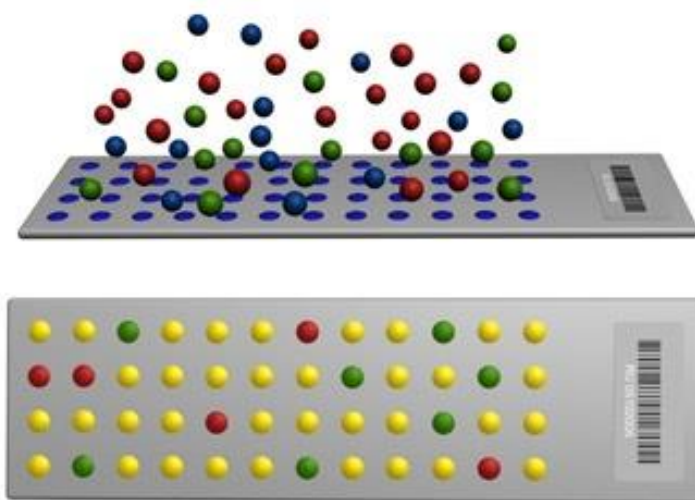
Result

2. CGH array (компаративна геномна хибридизация)

- Метод, позволяващ цялостно сканиране на генома за наличие на **допълнителен** или **липсващ** генетичен материал в единичен експеримент (не е възможно да бъдат отчитани транслокации или други размествания в генома)
- Основава се на конкурентната *in situ* хибридизация на референтна (нормална) и изследвана (тест) ДНК върху микрочип

CGH array (компаративна геномна хибридизация)

- Тестваната и референтната ДНК са различно боязани (напр. в зелено и червено) и хибрилизират върху микрочип (ВАС микрочип).
- При делеция на тест ДНК, по-малко тест ДНК ще се свърже със съответното “петно” и червената референтна ДНК ще доминира;
- Гейн в тест генома може да се идентифицира чрез доминиране на зеления белег на тест ДНК.
- “Петна” с еднакъв брой копия в тест генома спрямо референтния геном изглеждат жълти.



The Process of Array CGH

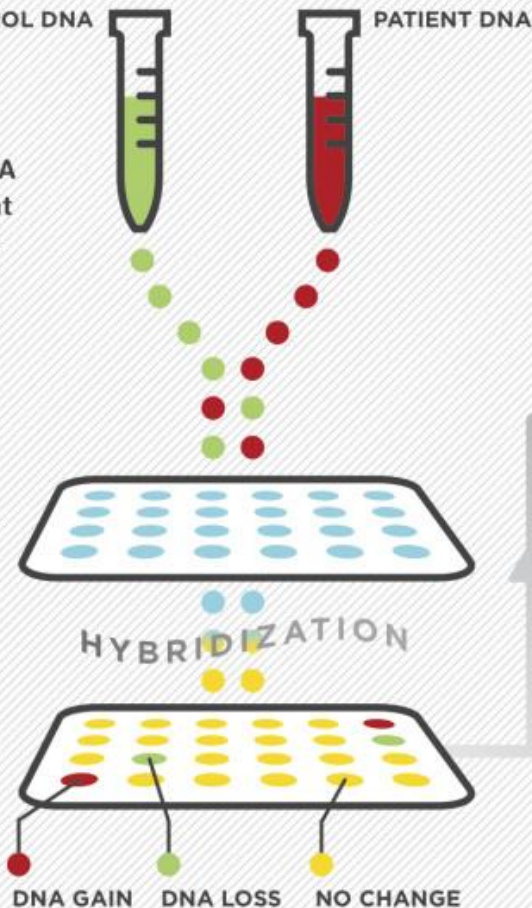
1

Patient and control DNA labeled with fluorescent dyes are applied to the microarray.

CONTROL DNA PATIENT DNA

2

Patient and control DNA are hybridized to the microarray.



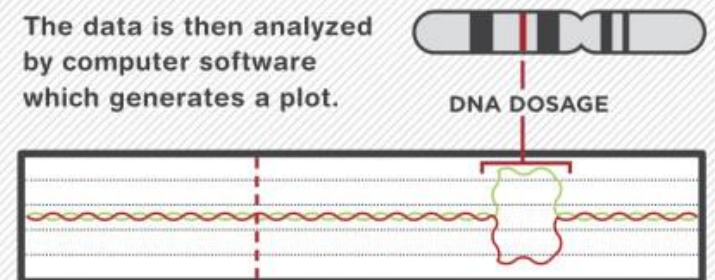
3

The fluorescent signals are measured by the microarray scanner.



4

The data is then analyzed by computer software which generates a plot.



Тест ДНК

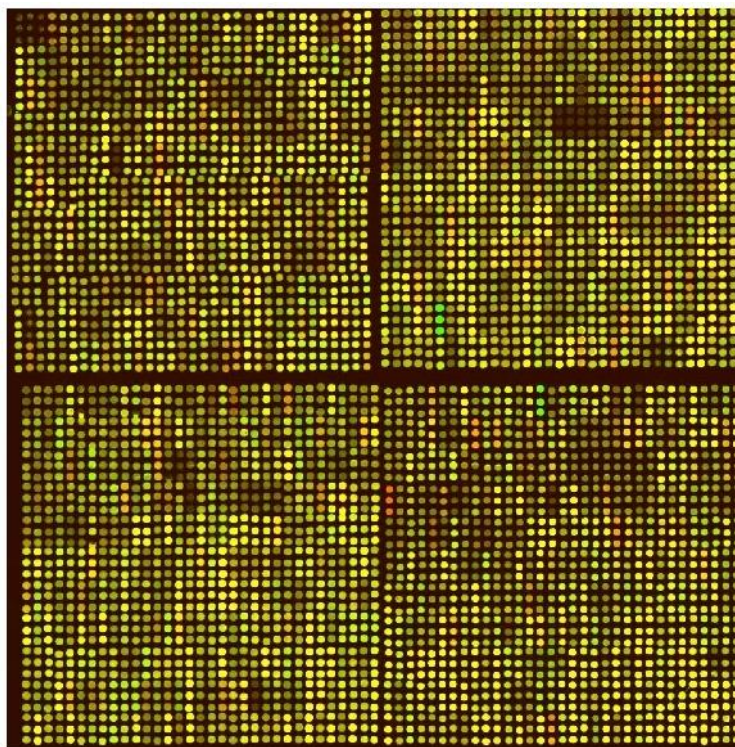
ДНК изолирана от нормална
контрола

Белязане със $Sy3$

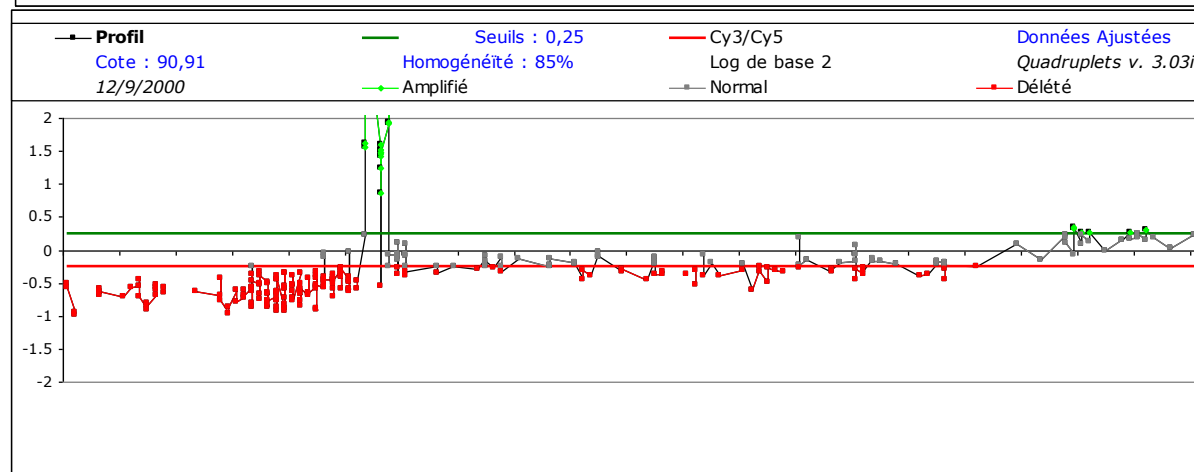
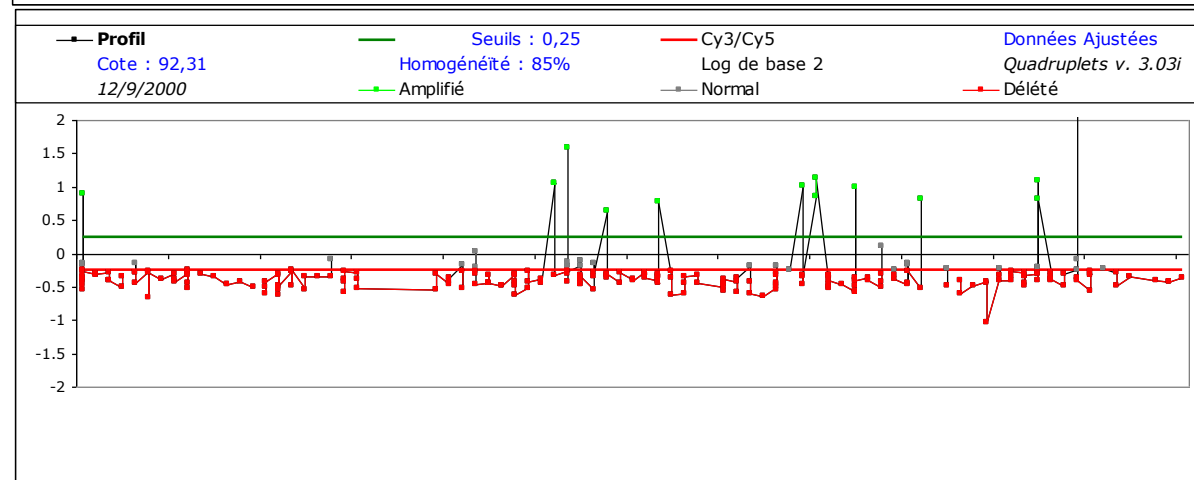
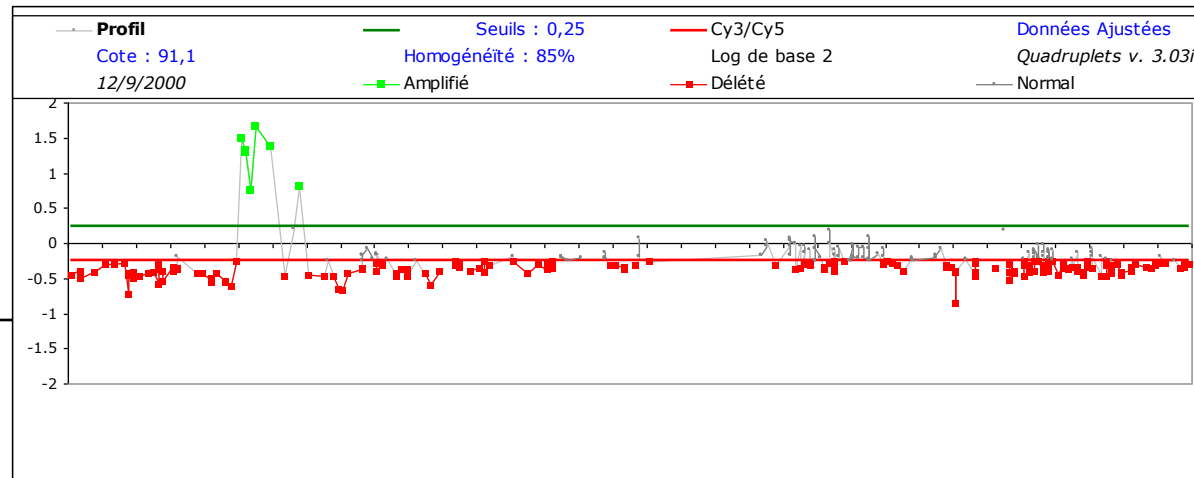
Белязане със $Sy5$

Смесване и хибридизиране върху
ВАС клонове

Определяне на съотношението
между флуорохромите за всеки клон



**Хибридизирано стъкло (сканиран образ)
Флуорохроми (Cu3 и Cu5)**



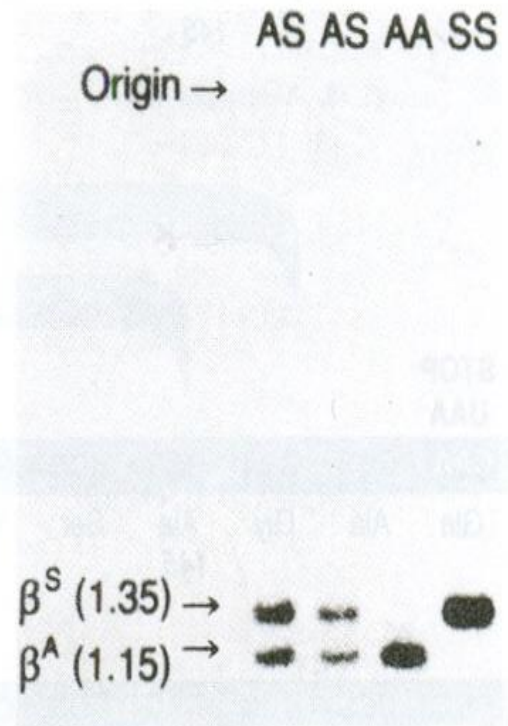
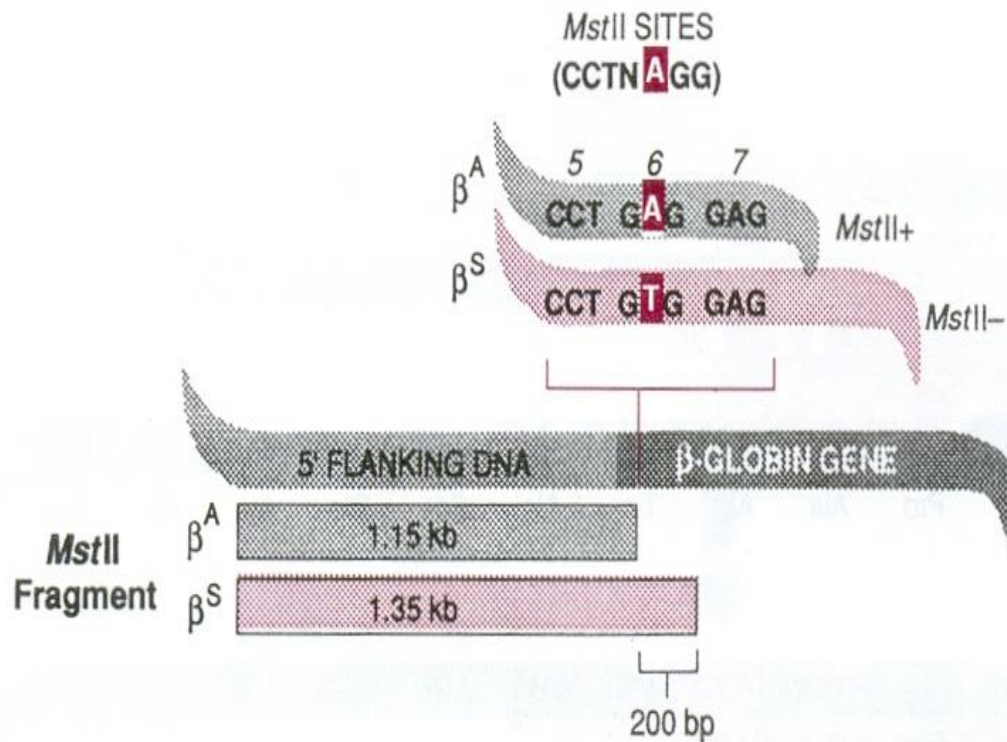
V. Молекулярно-генетични методи

- ДНК анализът може да се извърши директно, чрез доказване на специфична болестна мутация в съответния ген, или индиректно, чрез проследяване унаследяването в конкретна фамилия на ДНК полиморфни маркери, разположени в или близо до интересувания ни ген
- Подходи за ДНК диагностика:
 - Директен (мутационен) анализ
 - Индиректен (полиморфен) анализ

Директен ДНК анализ

- Предимства – точност на диагнозата и възможност да се докаже мутацията в конкретен индивид без да е необходимо изследване да други родственици
- Ограничения – приложение при изследване на известни гени; необходима е предварителна информация за локализацията, вида и честотата на най-честите мутации в гена за конкретната популация; неефективност при голям брой мутации в един ген
- Приложение – за откриване на мутации при някои от най-разпространените наследствени заболявания (кистична фиброза; мускулна дистрофия Дюшен/Бекер; таласемии)

Директен ДНК анализ



Индиректен ДНК анализ

- Основава се на проследяване в определена фамилия начина на унаследяване на специфичен полиморфен маркер, който е скачен с патологичен мутантен ген.
- Индиректният анализ не дава отговор за природата на молекулния дефект, лежащ в основата на заболяването, но дава информация за генетичния статус на индивида
- Условия :
 - сигурна клинична диагноза при индексния пациент
 - изследване на достатъчно голям брой родственици (минимум родители и болно дете)
 - възможност за рекомбинация (особено при отдалеченост на маркера от гена или при големи гени)